

滇龙胆居群遗传多样性和遗传结构分析

沈 涛^{1,2}, 虞 泓^{2*}, 王元忠³

1. 玉溪师范学院化学生物与环境学院, 云南 玉溪 653100

2. 云南大学生态学与环境学院云百草实验室, 云南 昆明 650091

3. 云南省农业科学院药用植物研究所, 云南 昆明 650200

摘要:目的 揭示不同分布区滇龙胆 *Gentiana rigescens* 的遗传多样性与遗传结构。方法 基于 GBS (genotyping-by-sequencing) 简化基因组 (reduced-representation genome sequencing, RRGs) 技术对采自云南、四川和贵州的 19 个居群 147 株滇龙胆进行测序; 利用样本 SNPs 数据集结合聚类树分析、主成分分析、遗传结构分析、Mantel 检验等方法, 从基因组水平研究滇龙胆居群的遗传多样性与遗传结构; 结果 聚类树分析、主成分分析及遗传结构分析显示, 不同分布区采集的样品有明显的基因型差异; 依据样品地理来源, 19 个居群大致可分为横断山区 (分布于滇西北和川西南的居群) 及云贵高原 (分布于滇西、滇中、滇东南及贵州的居群) 2 个亚群。通过观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度 (expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量 (polymorphic information, PIC)、Shannon 多样性指数 (shannon's diversity index, I')、Nei's 多样性指数 (Nei's gene diversity, $Nei's$)、核苷酸多样性 (nucleotide diversity, π) 比较, 发现云贵高原的居群遗传多样性高于横断山区的居群 (云贵高原居群遗传多样性参数均值: $H_o=0.052$, $H_e=0.110$, $PIC=0.088$, $I'=0.164$, $Nei's=0.127$, $\pi=1.677\times 10^{-3}$; 横断山区居群遗传多样性参数均值: $H_o=0.051$, $H_e=0.098$, $PIC=0.077$, $I'=0.144$, $Nei's=0.114$, $\pi=1.175\times 10^{-3}$); 居群遗传分化系数 (genetic differentiation index, F_{ST}) 和基因流 (gene flow, N_m) 分析显示, 滇龙胆居群间存在一定的遗传分化和基因流; 遗传变异分析 (AMOVA) 显示滇龙胆种内变异主要来自居群内; 基于 23 个环境变量的环境差异分析显示, 横断山亚群与云贵高原亚群生境的热量与 UV-B 辐射存在差异; Mantel 检验显示, 居群间的遗传分化主要由环境差异导致, 其中 UV-B 辐射与居群 F_{ST} 呈极显著正相关 ($P<0.01$)。结论 横断山区与云贵高原滇龙胆居群遗传结构和遗传多样性具有差异, 分布区 UV-B 辐射变化可能是驱动滇龙胆居群遗传分化的重要因素。

关键词: 滇龙胆; 遗传多样性; 遗传结构; 简化基因组测序; 资源评价

中图分类号: R286 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)03-0926-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.03.027

Population genetic diversity and genetic structure of *Gentiana rigescens*

SHEN Tao^{1,2}, YU Hong², WANG Yuan-zhong³

1. College of Chemistry, Biology and Environment, Yuxi Normal University, Yuxi 653100, China

2. Yunnan Herbal Laboratory, School of Ecology and Environmental Science, Yunnan University, Kunming 650091, China

3. Institute of Medicinal Plants, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650200, China

Abstract: Objective To uncover the genetic diversity and genetic structure of wild Dianlongdan (*Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl.) population in different distribution areas. **Methods** In the study, genomic sequencing of 147 individuals from 19 populations of Yunnan, Sichuan and Guizhou was performed by Genotyping-by-sequencing (GBS) simplified genomic technology (reduced-representation genome sequencing, RRGs). SNPs data set combined with cluster analysis, principal component analysis, genetic structure analysis, and mantel test were used to reveal the genetic diversity and genetic structure of wild *G. rigescens* populations at the whole genome level. **Results** System clustering, principal component analysis and population genetic structure analysis showed that the samples collected from different distribution areas had obvious genotypic differences. According to the geographical origin of those samples, 19 populations could be roughly divided into two sub-populations. One was the Hengduan

收稿日期: 2022-11-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (32060086); 云南省中青年学术和技术带头人后备人才项目 (202205AC160088)

作者简介: 沈 涛, 男, 博士研究生, 主要从事药用植物资源评价研究。E-mail: st_yxnu@126.com

*通信作者: 虞 泓, 男, 博士, 教授, 主要从事生物资源开发与可持续利用研究。E-mail: hongyu@ynu.edu.cn

Mountains sub-populations (populations distributed in northwest Yunnan and southwest Sichuan), and the other was the Yunnan-Guizhou Plateau sub-populations (populations distributed in western Yunnan, central Yunnan, southeastern Yunnan and Guizhou). It was found that the population genetic diversity in the Yunnan-Guizhou Plateau was higher than that in the Hengduan Mountain area based on the comparison of observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), polymorphic information (PIC), Shannon's diversity index (I), Nei's gene diversity (Nei's), and nucleotide diversity (π) at the population level (the Genetic diversity parameters mean value of the Yunnan-Guizhou Plateau populations: $H_o = 0.052$, $H_e = 0.110$, $PIC = 0.088$, $I = 0.164$, Nei's = 0.127, $\pi = 1.677 \times 10^{-3}$; the Genetic diversity parameters mean value of the Hengduan Mountain area populations: $H_o = 0.051$, $H_e = 0.098$, $PIC = 0.077$, $I = 0.144$, Nei's = 0.114, $\pi = 1.175 \times 10^{-3}$). The genetic differentiation index (F_{ST}) and gene flow (N_m) analysis showed that there were genetic differentiation and gene flows among the populations of *G. rigescens*. Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that intraspecific variation of *G. rigescens* mainly from within populations. Environmental difference analysis using 23 environmental variables showed various difference between habitats of the Hengduan Mountains sub-populations and the Yunnan-Guizhou Plateau sub-populations with significant difference of thermal indicators and UV-B radiation indicators. Mantel test showed the genetic differentiation of *G. rigescens* was mainly caused by environmental difference. There was a very significant positive correlation between UV-B radiation and F_{ST} of populations ($P < 0.01$). **Conclusion** Various differences of population genetic diversity and genetic structure could be found between the Hengduan Mountains and Yunnan-Guizhou Plateau sub-populations. And one of the important driving factors for populations genetic differentiation of *G. rigescens* might be the variation of UV-B radiation in the distribution area.

Key words: *Gentiana rigescens*; genetic diversity; genetic structure; simplified genome sequencing technology; resource evaluation

遗传多样性是药用植物种质资源多样性的基石,也是药材质量变异的内因^[1-3]。多数药用植物人工种植时间短,野生资源仍是药材的主要来源^[4-5];在环境适应与地理隔离的共同影响下,生长于不同生境或环境梯度下的植物可能产生遗传变异,为药用植物资源多样性形成奠定基础^[3]。系统研究植物居群遗传多样性与遗传结构^[6-7];科学认识分布区自然景观、环境因子对药用植物遗传多样性的影响^[8-9];有助于揭示复杂环境条件药材质量变异的驱动机制,并对药用资源的可持续利用、药材人工驯化、濒危药用植物保护等提供重要理论指导^[3, 10-11]。

分子标记可直接检测 DNA 分子上的遗传变异,是探索药用植物遗传多样性与居群遗传结构的重要工具^[2]。近年单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 因其在基因组中位点多、分布广,具有较好的多态性和较高的遗传稳定性,被国内外研究者所关注^[11-13];全基因组测序有助于获取高质量 SNP 数据,但与农作物相比多数药用植物研究面临基因组测序基础薄弱、分析缺乏模式物种及有效参考基因、后续 SNP 标记开发难度大等问题^[14-16]。近年 GBS (genotyping-by-sequencing) 简化基因组 (reduced-representation genome sequencing, RRGs) 技术的发展成为解决上述问题的重要途径^[17-18]。Otto 等^[19]通过 GBS 技术确定了药用植物母菊 *Matricaria chamomilla* L. 的遗传结构,并通过全基因组关联作图鉴定了与植株花期、

药效成分积累相关的 SNP 位点。Qiao 等^[7]基于 GBS 技术与 SNP 标记,分析了四川、青海等地川西獐牙菜 *Swertia mussotii* Franch. 的遗传结构,同时结合分布区环境数据,探讨了物种遗传多样性形成的可能机制。此外,张笑^[20]则利用 GBS 技术结合物种生态位模拟,开展绞股蓝 *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino 居群遗传学与进化历史研究。以上报道表明 GBS 与 SNP 技术相结合的分析策略,可为传统药用植物资源多样性评价提供新的方法和研究思路。

滇龙胆 *Gentiana rigescens* Franch. ex Hemsl. 为传统保肝中药龙胆的主要植物来源,云南及周边地区是其药材主产地^[21-22]。作为云南边疆少数民族山区脱贫攻坚和乡村振兴的特色药用植物,开展滇龙胆种质资源多样性评价对其药用资源的永续利用及科学保护具有重要意义。当前滇龙胆资源学研究主要集中于化学评价^[23-25],种质资源遗传多样性与调查评估鲜有报道^[26-27]。国内学者利用核糖体 DNA (rDNA) ITS 序列和多个叶绿体 DNA (cpDNA) 序列片段,初步探讨了云南滇龙胆野生居群的遗传变异与分化,发现滇龙胆对环境适应性较强,不同居群间遗传关系较复杂^[26-27]。滇龙胆分布区跨越横断山区与云贵高原,区域内从南至北伴随海拔逐渐升高,生境气候条件也呈现出较大差异^[28];不同环境条件滇龙胆居群的遗传多样性及其变化有待探明。

本研究以生长于横断山区和云贵高原的野生滇龙胆为材料,基于 GBS 简化基因组测序和 SNP 分

子标记, 研究滇龙胆居群遗传多样性与遗传结构; 探讨异质环境对该物种遗传分化的影响作用。研究结果为滇龙胆种质资源多样性评价, 野生资源保护及遗传资源的发掘利用提供理论依据。

1 材料与仪器

1.1 材料

2019—2020 年对云南、贵州和四川的 19 滇龙胆居群 147 株健康野生植株进行采样; 所有样品经云南大学虞泓教授鉴定为滇龙胆 *G. rigescens*

Franch. ex Hemsl.。采样居群 10 个分布于横断山区, 9 个分布于云贵高原; 采样信息详见表 1。居群内采样个体间距离不小于 10 m; 个体数较少的居群采样 4~5 株, 其余居群采样数>9 株; 每株个体采摘带叶柄新鲜无病害叶 10~15 片, 去除叶面灰尘后迅速放入独立的分子材料袋内, 包埋于洁净的变色硅胶中干燥保存。凭证标本保存于云南省农业科学院药用植物研究所标本馆, 居群信息详见表 1。

表 1 滇龙胆居群采样信息
Table 1 Sampling information of *G. rigescens* populations

居群代号	居群	地点	经度 (E)	纬度 (N)	个体数
HQ	鹤庆居群	云南省大理州鹤庆县金墩乡	100.181°	26.521°	10
XH	新华居群	云南省鹤庆县草海镇	100.037°	26.537°	5
YL	玉龙居群	云南省丽江市玉龙县黄山镇	100.276°	26.791°	5
YS	永胜居群	云南省丽江市永胜县永北镇	100.744°	26.686°	9
WX	维西居群	云南省迪庆州维西县维登乡	99.172°	27.089°	5
FG	福贡居群	云南省怒江州福贡县石月亮乡	98.920°	27.286°	5
PZH	攀枝花居群	四川省攀枝花市盐边县新九乡	101.953°	26.640°	5
NN	宁南居群	四川省凉山彝族自治州宁南县六铁乡	102.684°	27.266°	10
XC	西昌居群	四川省凉山州西昌市开元乡	102.098°	27.872°	5
LS	乐山居群	四川省乐山市金口河区永胜乡	103.305°	29.454°	5
CN	昌宁居群	云南省保山市昌宁县潞水镇	99.681°	24.887°	10
GM	耿马居群	云南省临沧市耿马县芒洪乡	99.719°	23.645°	10
YX	云县居群	云南省临沧市云县茂兰镇	100.357°	24.539°	15
CX	中山居群	云南省楚雄州楚雄市中山镇	101.097°	24.863°	9
SB	双柏居群	云南省楚雄州双柏县妥甸镇	101.599°	24.754°	4
HT	红塔居群	云南省玉溪市红塔区北城镇	102.520°	24.482°	10
HN	华宁居群	云南省玉溪市华宁县青龙镇	103.058°	24.497°	5
WS	文山居群	云南省文山州砚山县阿舍乡	103.717°	23.633°	10
NY	纳雍居群	贵州省毕节市纳雍县中岭镇	105.256°	26.739°	10

1.2 仪器

Agilent 2100 Bioanalyzer 型生物分析仪 (美国安捷伦公司)、NanoPhotometer N60 型微量分光光度计 (德国因普恩公司)、Invitrogen Qubit Flex 型 Qubit 荧光光度计 (美国赛默飞公司)、VeritiPro 型 PCR 仪 (美国赛默飞公司)。

2 方法

2.1 样品 DNA 提取

采用 CTAB 法, 从低温保存的干燥叶片中提取滇龙胆测序所需基因组 DNA^[11,29]。测序前, 提取的 DNA 均使用 1.00% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 结合微

量分光光度计和 Qubit 荧光光度计检测 DNA 的浓度 (OD) 和纯度^[30]。

2.2 文库构建与测序

滇龙胆基因组信息较缺乏, 因此研究采用无参考基因的 GBS 技术进行测序。文库构建与测序主要参考 Sonah 等^[31]的方法。建库流程主要包括 DNA 酶切、接头链接、片段筛选、PCR 文库富集及纯化等流程^[32]。测序工作由 Illumina NovaSeq 6000 测序平台完成, 测序策略为双端测序 (paired-end, PE), 每端 150 bp; 以上 GBS 测序工作在广州基迪奥生物科技有限公司内完成。

2.3 数据过滤与 SNP 挖掘

SNP 分析前为保证数据质量需对测序后原始数据进行数据过滤并减少噪音；数据过滤过程中，含有接头（adapter）、无法识别碱基（N 碱基）或含有较大比例低质量碱基的片段（reads）均需要处理和剔除^[20]。以上分析由数据质控软件 fastp（Version: 0.18.0）完成。利用 BWA（Version: 0.7.12）软件进行对比；使用变异检测软件 GATK（Version: 3.4.46）进行群体 SNP 检测，并对原始数据的质量进行过滤；在此基础上用 ANNOVAR（Version: 2.0）分析基因组数据中的遗传变异，并对检测出的变异进行功能注释；使用 VCFtools（Version: 0.1.13）依据文献设定参数对数据再次进行数据质量过滤^[7]；最终获得高质量的 SNP 数据集，用于滇龙胆的居群遗传学分析。

2.4 遗传多样性与遗传结构分析

选取近年文献报道较多的指标^[7,9]，利用 perl 脚本与样品 SNP 信息计算居群的观测杂合度（observed heterozygosity, H_o ）、期望杂合度（expected heterozygosity, H_e ）、多态信息含量（polymorphic information, PIC）、Shannon 多样性指数（shannon's diversity index, I ）、Nei's 多样性指数（Nei's gene diversity, Nei's）、核苷酸多样性（nucleotide diversity, π ）、遗传分化系数（genetic differentiation index, F_{ST} ）和基因流（gene flow, N_m ）。

采用 Stack（Version 1.43）软件与邻接法

（neighbor-joining methods, NJ）构建进化树；GCTA（genome-wide complex trait analysis）软件用于主成分分析（principal component analysis, PCA）；利用 ADMIXTURE 软件（Version 1.3.0）结合 SNPs 数据集和最大似然法（maximum-likelihood methods, ML）对滇龙胆居群的遗传结构进行推算；预先设定 K 值为 1~10，选取最低交叉验证错误率对应的 K 作为最优分群方法，用于推测居群个体可能的分组。

2.5 环境因子分析与 Mantel 检验

利用 ArcGIS 提取 19 个居群对应的水分、热量、UV-B 辐射等环境因子（表 2）数值分析横断山区与云贵高原滇龙胆分布区的环境差异。环境变量中生物气候变量（Bio01~Bio19）和活动积温（10AAT）分别由 WorldClim（<https://worldclim.org>）与中国科学院资源环境与数据中心（<https://www.resdc.cn/>）提供，UV-B 辐射相关数据源自 glUV 网站（<https://www.ufz.de/gluv/>）。Mann-Whitney U 检验用于不同分布区环境因子的差异比较；基于差异显著的环境因子计算不同居群间的环境距离（Environmental distance, ED），利用居群经纬度信息计算居群间地理距离（Geographical distance, GD）^[33-34]；本研究中 ED 和 GD 均为欧式距离。Mantel 检验用于分析居群间 F_{ST} 与地理距离、环境距离间的相关性^[34]。Mann-Whitney U 检验由 IBM SPSS Station 25.0 计算；Mantel 检验在 XLSTAT（Version 2019.2.2）中完成；其余统计分析由 SIMCA（Version 14.1）完成。

表 2 研究涉及环境因子

Table 2 Environment factors used in the study

代码	环境因子	单位	代码	环境因子	单位
Bio01	年平均温度	℃	Bio13	最湿月降水量	mm
Bio02	平均气温日较差	℃	Bio14	最干月降水量	mm
Bio03	等温性	—	Bio15	降水量季节性变化	—
Bio04	温度季节性变化	—	Bio16	最湿季降水量	mm
Bio05	最热月最高温度	℃	Bio17	最干季降水量	mm
Bio06	最冷月最低温度	℃	Bio18	最暖季降水量	mm
Bio07	温度年较差	℃	Bio19	最冷季降水量	mm
Bio08	最湿季平均气温	℃	10AAT	活动积温	℃
Bio09	最干季平均气温	℃	UV-B A2	UV-B 辐射季节性变化	$J \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$
Bio10	最热季平均气温	℃	UV-B A3	UV-B 辐射最强月平均值	$J \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$
Bio11	最冷季平均气温	℃	UV-B A5	UV-B 辐射最强季度月均值总和	$J \cdot m^{-2} \cdot d^{-1}$
Bio12	年均降水量	mm			

3 结果与分析

3.1 测序数据统计结果

滇龙胆 GBS 简化基因组测序结果统计显示, 数据经过滤后, 数据集测序质量值 Q20 (碱基错误率 < 1.00%) 平均值为 97.81%, 测序质量值 Q30 (碱基错误率 < 0.10%) 平均值为 93.55%, 平均 CG 含量为 41.07%, N 碱基含量为 0.00%, 表明测序结果出错率低, 数据总体质量较高。测序样品高质量序列 (HQ clean reads) 条数均值为 10 923 810, 中位数为 9 527 980, 每份样品平均测序序列数据量约 1.55 Gb。

3.2 滇龙胆居群遗传结构

基于筛选后的 SNPs 数据集, 运用邻接法构建 19 个居群 147 株滇龙胆的系统树。系统树分析结果显示 (图 1), 不同地理来源的样品可大致分为 2 个分支。第 1 分支主要是生长在云贵高原的滇龙胆,

包括滇中的中山 (CX)、双柏 (SB)、红塔 (HT) 居群, 滇西昌宁 (CN)、耿马 (GM)、云县 (YX) 居群以及贵州西北部的纳雍 (NY) 居群部分个体; 此外四川乐山 (LS) 居群的滇龙胆也被聚到第 1 个分支中。第 2 分支主要为云贵高原以北地区分布的滇龙胆; 包括滇西北福贡 (FG)、维西 (WX)、鹤庆 (HQ)、新华 (XH)、玉龙 (YL)、永胜 (YS) 居群, 川西南的攀枝花 (PZH)、宁南 (NN) 和西昌 (XC) 居群; 除上述地区的滇龙胆, 滇中华宁 (HN) 聚居及滇东南文山 (WS) 居群的样品也被聚到第 2 分支中。系统树显示, 同一居群的样品基本聚在一起, 相近地理区域的样品多聚为一类, 分布于云贵高原和滇西北横断山区的植株聚为不同分支, 表明上述地区的滇龙胆在遗传上呈现出较明显的地域分异。

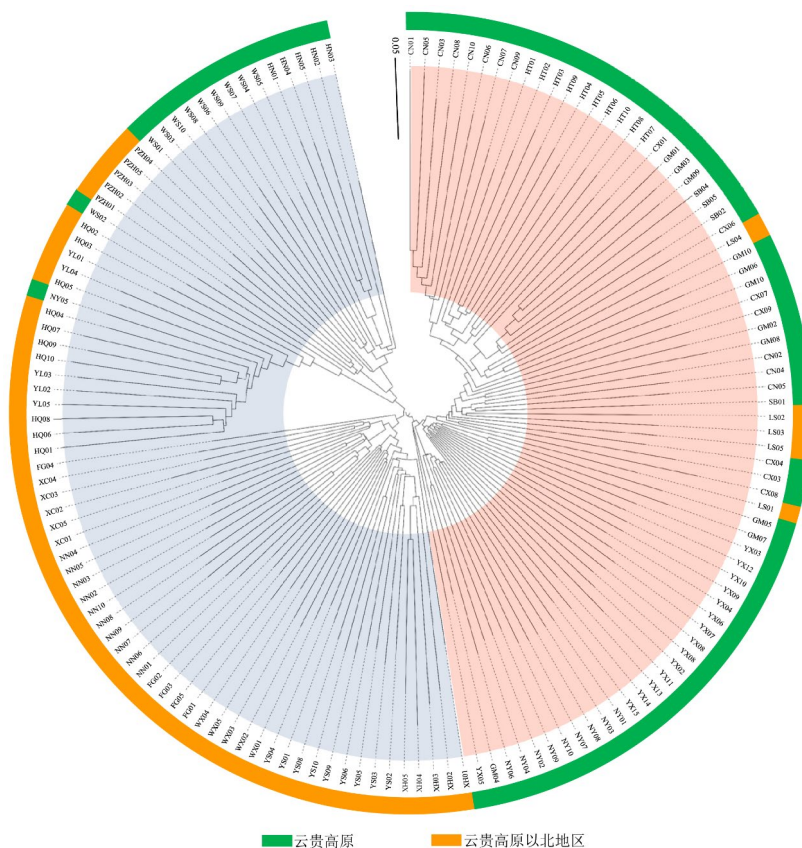


图 1 滇龙胆 19 个居群 147 株个体基于 SNPs 数据集聚类分析

Fig. 1 Cluster analysis of 147 individuals in 19 populations of *G. rigescens* based on the SNPs data set

PCA 三维得分图显示 (图 2), 所有样品依据得分大致聚为 4 组。第 I 组样品主要由云南鹤庆 (HQ)、玉龙 (YL) 2 个居群的滇龙胆构成; 第 II 组样品主要由云南新华 (XH)、永胜 (YS)、福贡 (FG)、维西 (WX) 及四川西昌 (XC)、宁南 (NN) 居群

的植株构成; 第 III 组样品主要为四川攀枝花 (PZH)、云南玉溪 (HN) 和文山 (WS) 居群的植株; 第 IV 组样品为云南南昌宁 (CN)、临沧 (YX、GM)、楚雄 (CX、SB)、玉溪 (HT) 及四川乐山 (LS)、贵州纳雍 (NY) 的居群的滇龙胆构成。

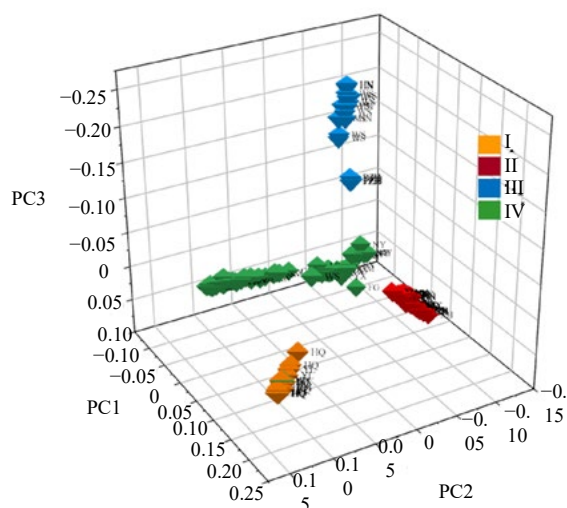


图2 滇龙胆 19 个居群 147 株个体 SNPs 数据集主成分分析
Fig. 2 PCA of 147 individuals in 19 populations of *G. rigescens* based on SNPs data set

19 个滇龙胆居群的遗传结构分组研究发现, 随 K 值增加模型交叉验证误差逐步降低; 当 K 为 4 时误差值达到谷值, 因此 $K=4$ 是最优分群方法 (图 3)。

基于最优分组结果发现, 19 个居群的基因型从

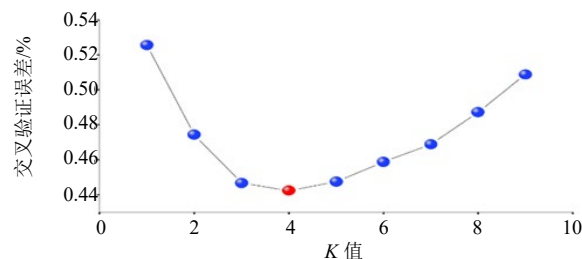
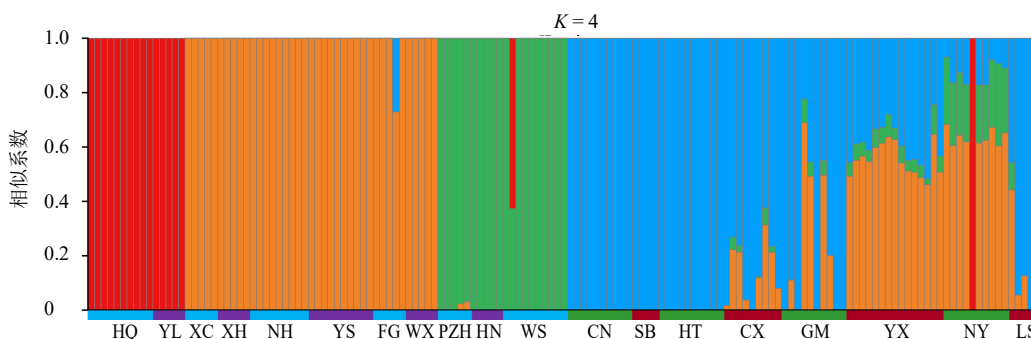


图3 滇龙胆 19 个居群 147 株个体 SNPs 数据集遗传结构最佳 K 值筛选

Fig. 3 Optimum K value selection for genetic structure of 147 individuals in 19 populations of *G. rigescens* based on SNPs data set

地理上呈现出明显的地域特征 (图 4)。4 个亚群中, 红色基因型个体主要存在于鹤庆 (HQ) 和玉龙 (YL) 2 个居群中; 橙色基因型个体主要生长在滇西北和川西南地区 (攀枝花居群除外)。保山昌宁、楚雄双柏、玉溪红塔及四川乐山居群中蓝色基因型占主导地位; 四川攀枝花、云南华宁和云南文山 3 个居群植株均以绿色基因型为主。云南耿马、云县及贵州纳雍居群具有明显的种质混杂, 其组成可能来源于多个理论祖先亚群。



每 1 条柱状图代表 1 株滇龙胆个体, 不同颜色对应不同祖先基因组成分
Each bar represents a sample of *G. rigescens* and one color correspond to one Ancestral genotype.

图4 滇龙胆 19 个居群的遗传结构分组 ($K=4$)

Fig. 4 Genetic structure analysis of 19 *Gentiana rigescens* population ($K=4$)

综合以上分析结果认为以滇西昌宁 (CN) — 黔纳雍 (NY) 一线为界, 滇龙胆居群遗传结构在云贵高原和横断山区间呈现出明显的南北差异。依据研究样品地理来源和简化基因组分析结果, 19 个居群的滇龙胆有 4 种基因型, 并可划分为北部 (共计 10 个居群) 和南部 (共计 9 个居群) 2 个组。北部组主要分布在横断山区 (滇西北和川西南), 组内基因型 I 和基因型 II 占比较高; 南部组主要分布于云

贵高原, 组内基因型 III 和基因型 IV 占比较高。

3.3 居群遗传多样性

3.3.1 横断山区居群遗传多样性 对分布于横断山区的 10 个滇龙胆居群遗传多样性参数进行计算, 结果显示 (表 3), 10 个居群 6 个遗传参数均值分别为 $H_o=0.051$ (数值 0.040~0.070), $H_e=0.098$ (数值 0.085~0.111), $PIC=0.077$ (数值 0.067~0.088), $I=0.144$ (数值 0.125~0.163),

表 3 横断山及周边地区滇龙胆 10 个居群的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of 10 population of *G. rigescens* in Hengduan Mountains and its surrounding areas

居群	居群编号	Ho	He	PIC	I	Nei's	π
鹤庆居群	HQ	0.058	0.095	0.076	0.141	0.106	1.272×10^{-3}
新华居群	XH	0.070	0.111	0.088	0.163	0.130	1.625×10^{-3}
玉龙居群	YL	0.070	0.093	0.074	0.137	0.108	1.134×10^{-3}
永胜居群	YS	0.040	0.105	0.083	0.156	0.120	1.407×10^{-3}
维西居群	WX	0.046	0.092	0.072	0.134	0.110	0.951×10^{-3}
福贡居群	FG	0.043	0.090	0.071	0.132	0.108	0.823×10^{-3}
攀枝花居群	PZH	0.048	0.085	0.067	0.125	0.100	0.941×10^{-3}
宁南居群	NN	0.043	0.106	0.084	0.157	0.120	1.460×10^{-3}
西昌居群	XC	0.044	0.087	0.069	0.128	0.105	0.886×10^{-3}
乐山居群	LS	0.048	0.111	0.088	0.163	0.133	1.251×10^{-3}

Nei's=0.114(数值 0.100~0.133), $\pi=1.175 \times 10^{-3}$ (数值 $0.823 \times 10^{-3} \sim 1.625 \times 10^{-3}$)。

3.3.2 云南贵高原居群遗传多样性 分布于云贵高原的滇龙胆居群遗传多样性参数统计结果显示(表 4), 9 个居群遗传参数均值分别为: Ho=0.052(数值 0.042~0.072), He=0.110(数值 0.088~0.141), PIC=0.088(数值 0.071~0.113), I=0.164(数值 0.132~0.211), Nei's=0.127(数值 0.098~0.161), $\pi=1.677 \times 10^{-3}$ (数值 $1.209 \times 10^{-3} \sim 2.261 \times 10^{-3}$)。

19 个居群遗传多样性参数总体计算显示, Ho=0.037, He=0.268, PIC=0.223, I=0.426, Nei's=0.279, $\pi=1.399 \times 10^{-3}$ 。综合比较横断山区居群和云贵高原居群 He、No、I、Nei's、PIC 和 π 6 个遗传多样性参数的数值变化, 并对 2 组数据进行 Mann-Whitney U 检验(图 5)。均值和中位数比较发现, 横断山区滇龙胆居群的遗传多样性较云贵高原居群低, 其中 π 值组间差异显著(Mann-Whitney U 检验 $P<0.05$)。

3.4 遗传分化与基因流

3.4.1 横断山区居群 横断山及周边地区 10 个滇龙胆居群 F_{ST} 的均值为 0.471, F_{ST} 数值变化范围

0.163~0.580, 鹤庆(HQ)居群与玉龙(YL)居群间 F_{ST} 值最小, 攀枝花(PZH)居群与玉龙(YL)居群间 F_{ST} 值最大(表 5)。除鹤庆、玉龙 2 个居群, 横断山区滇龙胆群间总体呈现出中等或较高水平的遗传分化。

N_m 计算显示(表 6), 横断山区 10 个居群间 N_m 数值介于 0.181~1.279; 仅鹤庆(HQ)居群与玉龙(YL)居群间 N_m 值大于 1.000, 其余 44 对居群的 N_m 值均小于 1.000。 N_m 数据分析显示, 除滇西北少数居群外, 横断山区大部分居群间的基因交流均受到不同程度的阻隔。

3.4.2 云南贵高原居群 云贵高原 9 个滇龙胆居群 F_{ST} 均值为 0.422, F_{ST} 数值 0.227~0.576, 中山(CX)居群与双柏(SB)居群间 F_{ST} 值最小, 南华(NH)居群与昌宁(CN)居群间 F_{ST} 值最大。贵州纳雍的居群(NN)与云贵高原其它地区的居群呈现出不同程度的遗传分化, 居群间 F_{ST} 值在 0.373~0.495(表 7)。

N_m 分析显示(表 8), 云贵高原 9 个居群间 N_m 值变化范围: 0.184~0.853; 3 对居群 N_m 值小于 0.200, 13 对居群 N_m 值小于 0.300, 6 对居群 N_m

表 4 云贵高原滇龙胆 9 个居群的遗传多样性参数

Table 4 Genetic diversity parameters of nine population of *G. rigescens* in Yunnan-Guizhou Plateau

居群	编号	Ho	He	PIC	I	Nei's	π
昌宁	CN	0.050	0.088	0.071	0.132	0.098	1.403×10^{-3}
耿马	GM	0.052	0.115	0.092	0.172	0.129	2.034×10^{-3}
云县混	YX	0.048	0.128	0.101	0.188	0.150	1.864×10^{-3}
中山	CX	0.049	0.121	0.097	0.180	0.138	1.940×10^{-3}
双柏	SB	0.072	0.096	0.076	0.140	0.116	1.297×10^{-3}
红塔	HT	0.044	0.089	0.071	0.134	0.100	1.330×10^{-3}
华宁	HN	0.063	0.093	0.074	0.138	0.110	1.209×10^{-3}
文山	WS	0.042	0.122	0.097	0.182	0.141	1.752×10^{-3}
纳雍	NY	0.048	0.141	0.113	0.211	0.161	2.261×10^{-3}

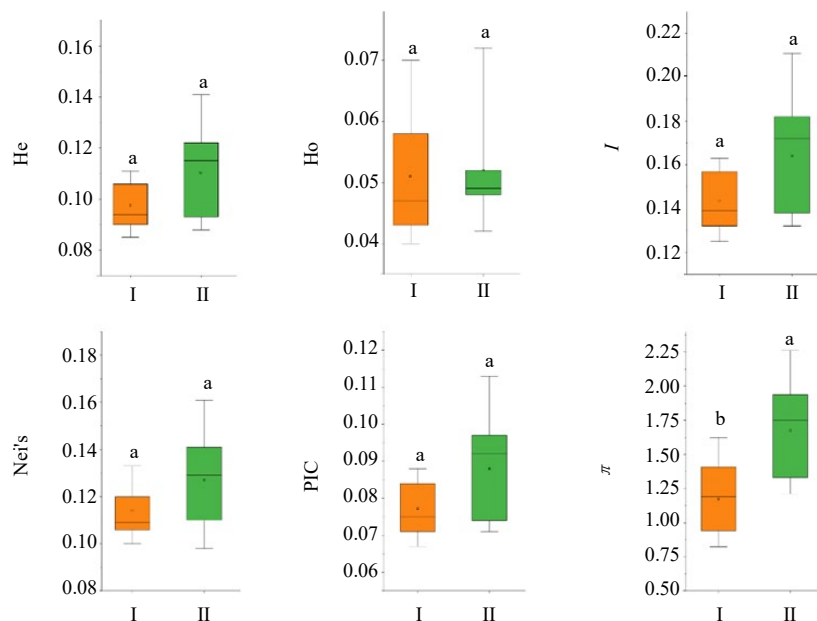


图5 横断山区与云贵高原滇龙胆居群遗传多样性比较

Fig. 5 Genetic diversity comparison between the Hengduan Mountains population and the Yunnan-Guizhou Plateau population of *G. rigescens*

表 5 横断山及周边地区滇龙胆 10 个居群的 F_{ST} 数值

Table 5 F_{ST} value between 10 population of *G. rigescens* in Hengduan Mountains and its surrounding areas

[illegible]

表 6 横断山及周边地区滇龙胆 10 个居群的 N_m 数值

Table 6 N_m value between 10 population of *G. rigescens* in Hengduan Mountains and its surrounding areas

[illegible]

值小于 0.400, 10 对居群 N_m 值小 0.600, 仅有 4 对居群 N_m 值在 0.603~0.853。贵州境内滇龙胆居群与云南境内滇龙胆居群间 N_m 值多小于 0.400; 滇中华宁居群与滇东南文山群间 N_m 值较高为 0.754; 综合比较发现, 滇龙胆居群间基因流在滇中与滇西地区

较强。

3.4.3 遗传变异分析 滇龙胆 19 个居群的遗传变异分析显示 (表 9), 遗传变异主要来源于居群内, 占总变异的 86.99%; 剩余 13.01% 的变异来源于居群间。

表 7 云贵高原滇龙胆 9 个居群的 F_{ST} 数值

Table 7 F_{ST} value between nine population of *G. rigescens* in Yunnan-Guizhou Plateau

种群	F_{ST} 值								
	CN	GM	YX	CX	SB	HT	HN	WS	NY
CN	0.000	0.342	0.421	0.344	0.317	0.354	0.576	0.546	0.495
GM		0.000	0.330	0.301	0.263	0.335	0.525	0.514	0.465
YX			0.000	0.341	0.408	0.425	0.517	0.460	0.373
CX				0.000	0.227	0.329	0.508	0.502	0.442
SB					0.000	0.293	0.566	0.497	0.436
HT						0.000	0.568	0.534	0.483
HN							0.000	0.249	0.445
WS								0.000	0.459
NY									0.000

表 8 云贵高原滇龙胆 9 个居群的 N_m 数值

Table 8 N_m value between nine population of *G. rigescens* in Yunnan-Guizhou Plateau

种群	N_m								
	CN	GM	YX	CX	SB	HT	HN	WS	NY
CN	0.000	0.481	0.343	0.477	0.539	0.456	0.184	0.208	0.255
GM		0.000	0.507	0.580	0.701	0.496	0.226	0.237	0.288
YX			0.000	0.482	0.363	0.339	0.233	0.294	0.421
CX				0.000	0.853	0.511	0.242	0.248	0.315
SB					0.000	0.603	0.191	0.253	0.323
HT						0.000	0.190	0.218	0.267
HN							0.000	0.754	0.312
WS								0.000	0.294
NY									0.000

表 9 滇龙胆 19 个居群的分子变异分析

Table 9 AMOVA results of 19 population of *G. rigescens*

变异来源	自由度	方差	变异成分百分比/%
居群间	19	0.861 5	13.01
居群内	127	0.692 3	86.99
合计	146	1.553 8	

3.5 地理距离、环境距离对居群遗传分化的影响

3.5.1 横断山区与云贵高原环境差异分析 Mann-Whitney U 检验结合分布区 23 个环境因子数据 (表 2) 的统计分析显示, 横断山区与云贵高原滇龙胆生境在热量指标和 UV-B 辐射两方面存在显著差异 (表 10), 温度季节性变化 (Bio 04)、最冷月最低温度 (Bio 06)、温度年较差 (Bio 07)、

活动积温 (10AAT)、UV-B 辐射季节性变化 (UV-B A2)、UV-B 辐射最强月份平均值 (UV-B A3) 以及 UV-B 辐射最强季度月均值总和 (UV-B A5) 在居群间差异显著 ($P < 0.05$)。

对上述差异显著的 7 个环境变量进行 PCA, 结合双标图显示 (图 6), 7 个环境变量均远离圆心, 表明上述环境变量可作为区分不同居群生境的特征变量; 7 个变量进一步划分为 3 组, Bio 04 与 Bio 07 为第 1 组 (均在第 1 象限), Bio 06 与 10AAT 为第 2 组 (均在第 2 象限), 所有 UV-B 辐射变量为第 3 组 (均在第 3 象限)。综合上述, Bio 04、Bio 07、Bio 06 等 7 个变量能较好反映 19 个居群的生境差异与环境特征, 适用于计算居群间环境距离。

表 10 横断山区与云贵高原差异显著的环境变量

Table 10 Environmental variables with significant differences between Hengduan Mountains and Yunnan-Guizhou Plateau

环境变量	中位数		平均秩		P 值
	横断山区	云贵高原	横断山区	云贵高原	
温度季节性变化	484.00	433.00	13.60	6.00	0.002
最冷月最低温度/℃	-0.50	1.00	7.25	13.06	0.022
温度年较差/℃	24.00	22.00	13.30	6.33	0.006
活动积温/℃	3 301.35	4 401.90	6.90	13.44	0.010
UV-B 辐射季节性变化/(J·m ⁻² ·d ⁻¹)	215 744.77	125 737.53	14.20	5.33	0.000
UV-B 辐射最强月份平均值/(J·m ⁻² ·d ⁻¹)	8 565.02	5 766.32	13.30	6.33	0.006
UV-B 辐射最强季度月均值总和/(J·m ⁻² ·d ⁻¹)	24 448.37	16 728.96	12.60	7.11	0.035

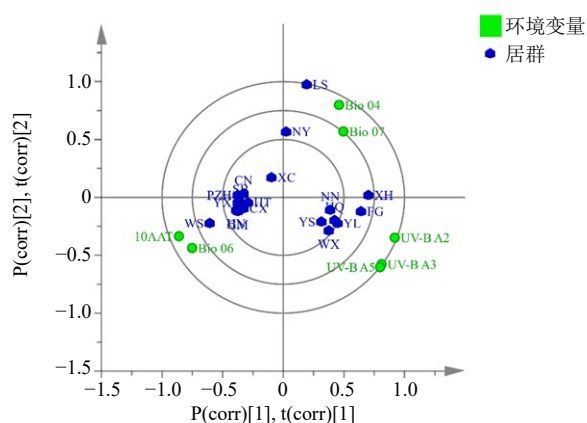


图 6 基于 7 个环境变量的 PCA 双标图

Fig. 6 Biplot based on PCA of seven environment variables

3.5.2 Mantel 检验 Mantel 检验显示 (表 11), 地理距离 (GD) 与居群 F_{ST} 相关性不显著 ($P>0.05$); 环境距离与 F_{ST} 显著相关 ($P<0.05$)。为进一步分析影响居群遗传分化的主要环境因子, 分别用表 10 中的 4 个热量指标和 3 个 UV-B 辐射指标计算环境距离, 并与居群 F_{ST} 进行 Mantel 检验。结果显示 (表 11), 居群间 UV-B 辐射指标与 F_{ST} 呈极显著正相关 ($P<0.01$), 热量指标与 F_{ST} 相关性不显著 ($P>0.05$)。以上结果表明, 横断山区和云贵高原滇龙胆居群间的遗传分化可能与生境 UV-B 辐射变化有关。

4 讨论

4.1 滇龙胆遗传结构与遗传多样性

基于 GBS 简化基因组测序, 对分布于云南、四川、贵州的 19 个居群 147 株个体居群遗传结构和遗传多样性进行分析。发现滇龙胆野生居群基因型丰富, 其中四川乐山 (LS)、贵州纳雍 (NY)、云南楚雄 (CX)、临沧 (YX、GM) 等地居群存在种质

表 11 遗传距离与地理距离、环境距离的 Mantel 检验 (基于斯皮尔曼相关系数)

Table 11 Mantel tests for the correlation between genetic distance and geographic distance, environmental distance (Spearman's coefficient)

参数	遗传距离 F_{ST}	
	r	P
地理距离 GD	-0.039	0.613
环境距离 ED	0.262	0.001
基于热量指标计算的环境距离	0.126	0.110
基于 UV-B 辐射指标计算的环境距离	0.260	>0.01

混杂。19 个居群依据遗传结构从地理上大致可划分为北部、南部 2 个组。北部组居群主要分布于滇西北横断山区及川西南山区, 南部组居群主要分布于云贵高原。

北部组与南部组各居群 F_{ST} 平均值分别为 0.471、0.422; 物种 F_{ST} 值与线叶龙胆 *G. lawrencei* var. *farreri* (I. B. Balfour) T. N. Ho 较接近, 高于多花龙胆 *G. striolata* T. N. Ho、阿墩子龙胆 *G. atuntsiensis* W. W. Smith, 低于钻叶龙胆 *G. haynaldii* Kanitz^[35-36]。遗传变异分析显示滇龙胆个体间遗传多样性较高, 种内变异有 13.01%源自居群间, 其余 86.99%均来自居群内。该结果与龙胆科药用植物线叶龙胆和川西獐牙菜较相似^[7, 37]。居群间 N_m 数值变化分析显示, 横断山区各居群 N_m 值在 0.181~1.279, 云贵高原各居群 N_m 值在 0.184~0.853。结合赵宗莘等^[27]的研究结果认为, 滇龙胆居群间存在一定的遗传分化和基因流, 但不同分布区居群间遗传分化程度及基因流强度存在差异。

基于 I 、 N_e 's、 π 等参数的分析结果, 与龙胆属其他物种对比发现, 滇龙胆遗传多样性较分布于青

藏高原和横断山区的线叶龙胆、六叶龙胆 *G. hexaphylla* Maxim. ex Kusnez.、三叶龙胆 *G. ternifolia* Franch. 低^[37-38]，与麻花艽 *G. straminea* Maxim. 和粗茎秦艽 *G. crassicaulis* Duthie ex Burk. 较接近^[11,39]。将 19 个居群依据其地理分布进行划分发现，横断山居群与云贵高原居群的遗传多样性具有差异；分布于横断山区的滇龙胆遗传多样性总体低于分布于云贵高原的滇龙胆。

4.2 生境差异对居群遗传分化的影响

物种多样性及特异种质的形成通常与地理隔离或特殊生境适应有关^[40-41]。利用 Mantel 检验分析了滇龙胆居群间遗传距离与地理距离、环境距离的相关性；结果显示居群 F_{ST} 数值的变化与地理距离相关性不显著 ($P > 0.05$)，而与环境距离紧密相关 ($P < 0.05$)。该结果暗示环境隔离 (isolation by environment, IBE) 可能在驱动滇龙胆群遗传分化方面发挥了重要作用。

较复杂的地形可能对居群间种子流和花粉流造成影响，使物种的遗传分化与地理距离不相关^[42]。滇龙胆为虫媒花，繁育系统为兼性异交型^[43]；种子有蜂窝状网纹，仅适合短距离风媒传播^[28]。横断山区内部及横断山与云贵高原间的居群可能因高大山脉或河流、峡谷阻隔，影响植株授粉及种子传播；导致居群间遗传分化与地理距离不相关。此外，槭树 *Acer ginnala* Maxim.、青杨 *Populus cathayana* Rehd.、无患子 *Sapindus mukorossi* Gaertn. 等物种研究表明对于分布较广，分布区地貌复杂、生境条件差异大的物种，居群水平的遗传分化更多与分布区环境差异形成的选择压有关^[42,44-45]。滇龙胆分布区北部属云贵高原与青藏高原的过渡区，海拔总体较高；分布区南部多为向西下降的盆地，海拔相对较低^[46]。分布区地势变化总体呈现高纬度与高海拔相结合，低纬度与低海拔相一致的特点，进一步加剧了南北分布区的 UV-B 辐射强度差异^[46-47]。分布于青藏高原的麻花艽研究显示，改变生境 UV-B 辐射强度可对植株叶片厚度、呼吸强度、光合作用等造成影响^[48-50]；同时麻花艽在长期进化过程中也形成对 UV-B 辐射强度变化的适应机制^[48]。通过 Mantel 检验结合简化基因组数据初步分析推测 UV-B 辐射变化可能是驱动滇龙胆南部、北部居群遗传分化的重要环境因素。目前 UV-B 辐射对滇龙胆生理、生态的影响尚未见报道。对于生长于高海拔山区的龙胆属植物，生境 UV-B 辐射渐变如何驱动滇龙胆种

内遗传分化，上述遗传变异对环境的适应意义及对药材质量的影响仍有待后续深入研究。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Niazian M. Application of genetics and biotechnology for improving medicinal plants [J]. *Planta*, 2019, 249(4): 953-973.
- [2] Wang W L, Xu J F, Fang H Y, et al. Advances and challenges in medicinal plant breeding [J]. *Plant Sci*, 2020, 298: 110573.
- [3] 袁媛, 黄璐琦. 道地药材分子生药学研究进展和发展趋势 [J]. 科学通报, 2020, 65(12): 1093-1102.
- [4] 段金彪, 周荣汉, 宿树兰, 等. 我国中药资源科学发展现状及展望 [J]. 自然资源学报, 2009, 24(3): 378-386.
- [5] Cheng J, Dang P P, Zhao Z, et al. An assessment of the Chinese medicinal *Dendrobium* industry: Supply, demand and sustainability [J]. *J Ethnopharmacol*, 2019, 229: 81-88.
- [6] Yao X H, Deng J Y, Huang H W. Genetic diversity in *Eucommia ulmoides* (Eucommiaceae), an endangered traditional Chinese medicinal plant [J]. *Conserv Genet*, 2012, 13(6): 1499-1507.
- [7] Qiao Y, Guo F X, Huo N X, et al. Genotyping-by-sequencing to determine the genetic structure of a Tibetan medicinal plant *Swertia mussotii* Franch [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2021, 68(2): 469-484.
- [8] Yang X, Yang Z L, Li H G. Genetic diversity, population genetic structure and protection strategies for *houpoëa officinalis* (Magnoliaceae), an endangered Chinese medical plant [J]. *J Plant Biol*, 2018, 61(3): 159-168.
- [9] Liu X F, Ma Y P, Wan Y M, et al. Genetic diversity of *Phyllanthus emblica* from two different climate type areas [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 580812.
- [10] 孟祥才, 李晓颖, 姚杰, 等. 生态胁迫促进道地药材质量形成机制与质量评价思路 [J]. 中草药, 2022, 53(5): 1587-1594.
- [11] 宗粉粉, 赵志礼, 倪梁红, 等. 藏药解吉那保基原植物粗茎秦艽品种鉴定及种内遗传多样性分析 [J]. 药学报, 2020, 55(8): 1941-1950.
- [12] Xia W, Luo T T, Zhang W, et al. Development of high-density SNP markers and their application in evaluating genetic diversity and population structure in *Elaeis guineensis* [J]. *Front Plant Sci*, 2019, 10: 130.
- [13] Nguyen V B, Linh G V N, Waminal N E, et al. Comprehensive comparative analysis of chloroplast genomes from seven *Panax* species and development of an authentication system based on species-unique single

- nucleotide polymorphism markers [J]. *J Ginseng Res*, 2020, 44(1): 135-144.
- [14] 徐江, 孙超, 徐志超, 等. 药用模式生物研究策略 [J]. 科学通报, 2014, 59(9): 733-742.
- [15] 邱树青, 陆青, 喻辉辉, 等. 水稻全基因组选择育种技术平台构建与应用 [J]. 生命科学, 2018, 30(10): 1120-1128.
- [16] 谢玲娟, 叶楚玉, 沈恩惠. 植物基因组测序研究进展 [J]. 植物科学学报, 2021, 39(6): 681-691.
- [17] 王伟, 刘阳. 植物生命之树重建的现状、问题和对策建议 [J]. 生物多样性, 2020, 28(2): 176-188.
- [18] 熊燕, 张金柱, 董婕, 等. 简化基因组测序技术在观赏植物中的应用研究进展 [J]. 园艺学报, 2020, 47(6): 1194-1202.
- [19] Otto L G, Mondal P, Brassac J, *et al.* Use of genotyping-by-sequencing to determine the genetic structure in the medicinal plant chamomile, and to identify flowering time and alpha-bisabolol associated SNP-loci by genome-wide association mapping [J]. *BMC Genomics*, 2017, 18(1): 599.
- [20] 张笑. 绞股蓝属植物系统发育和群体遗传学研究 [D]. 西安: 西北大学, 2019.
- [21] 李智敏, 刘莉, 李晚谊, 等. 滇龙胆的药用资源研究与开发进展 [J]. 云南大学学报: 自然科学版, 2009, 31(S1): 485-487, 491.
- [22] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 263.
- [23] 吕伟奇, 张霁, 左智天, 等. 滇西北野生滇龙胆根部 HPLC 指纹图谱研究 [J]. 时珍国医国药, 2017, 28(1): 119-123.
- [24] Wu Z, Zhao Y L, Zhang J, *et al.* Quality assessment of *Gentiana rigescens* from different geographical origins using FT-IR spectroscopy combined with HPLC [J]. *Molecules*, 2017, 22(7): 1238.
- [25] Zhang G L, Li Y, Wei W L, *et al.* Metabolomics combined with multivariate statistical analysis for screening of chemical markers between *Gentiana scabra* and *Gentiana rigescens* [J]. *Molecules*, 2020, 25(5): 1228.
- [26] 刘小莉, 李国栋, 王杏婷, 等. 滇龙胆不同居群 rDNA-ITS 序列分析 [J]. 时珍国医国药, 2016, 27(1): 104-106.
- [27] 赵宗苹, 严媛, 郑梅梅, 等. 滇龙胆基于叶绿体 psbA-trnH、trnL-trnF 序列多态性遗传评价 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(5): 1203-1206.
- [28] 沈涛, 虞泓, 王元忠. 滇龙胆草野生资源的地理分布与生物气候特征 [J]. 应用生态学报, 2019, 30(7): 2291-2300.
- [29] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19(1): 11-15.
- [30] 王雪, 高暎, 吴立文, 等. 峨眉山地区杨叶木姜子群体遗传多样性研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2019, 20(2): 359-369.
- [31] Sonah H, Bastien M, Iquira E, *et al.* An improved genotyping by sequencing (GBS) approach offering increased versatility and efficiency of SNP discovery and genotyping [J]. *PLoS One*, 2013, 8(1): e54603.
- [32] Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q, *et al.* A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species [J]. *PLoS One*, 2011, 6(5): e19379.
- [33] Nie H T, Yan X W, Huo Z M, *et al.* Construction of a high-density genetic map and quantitative trait locus mapping in the Manila clam *Ruditapes philippinarum* [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 229.
- [34] 叶俊伟, 田斌. 中国西南地区重要木本油料植物扁核木的遗传结构及成因 [J]. 生物多样性, 2021, 29(12): 1629-1637.
- [35] Zhang X L, Yuan Y M, Ge X J. Genetic structure and differentiation of *Gentiana atunsiensis* W. W. Smith and *G. striolata* T. N. Ho (Gentianaceae) as revealed by ISSR markers [J]. *Bot J Linn Soc*, 2007, 154(2): 225-232.
- [36] 付鹏程, 刘玉玉, 史明艳. 青藏高原钻叶龙胆的遗传分化与种群动态历史研究 [J]. 西北植物学报, 2021, 41(8): 1294-1301.
- [37] 付鹏程, 林清银, 孙姗姗. 线叶龙胆 (*Gentiana lawrencei* var. *farreri*) ITS 序列杂合性与遗传分化分析 [J]. 生物学杂志, 2020, 37(5): 44-47.
- [38] 付鹏程, 谭金舟, 王宏宇, 等. 横断山地区六叶龙胆复合群的遗传分化与种群动态历史 [J]. 植物科学学报, 2020, 38(3): 390-399.
- [39] 朱田田, 晋玲, 马晓辉, 等. 甘肃祁连山地区麻花秦艽 UPLC 指纹图谱与遗传多样性研究 [J]. 中国药学杂志, 2018, 53(14): 1170-1176.
- [40] Liu J Q, Duan Y W, Hao G, *et al.* Evolutionary history and underlying adaptation of alpine plants on the Qinghai-Tibet Plateau [J]. *Jnl Sytem Evol*, 2014, 52(3): 241-249.
- [41] Mosbrugger V, Favre A, Muellner-Riehl A N, *et al.* Cenozoic evolution of geo-biodiversity in the Tibeto-Himalayan region [J]. *Mountains, Climate, Biodiversity*, 2018, 429: 448.
- [42] 彭幼红. 青藏高原东缘青杨 (*Populus cathayana* Rehd.) 遗传多样性研究 [D]. 成都: 中国科学院研究生院(成都生物研究所), 2006.
- [43] 余成华, 朱春艳, 段绍凤, 等. 滇龙胆开花物候与交配系统研究 [J]. 热带作物学报, 2021, 42(6): 1639-1645.
- [44] Ye H, Wu J H, Wang Z, *et al.* Population genetic variation

- characterization of the boreal tree *Acer ginnala* in Northern China [J]. *Sci Rep*, 2020, 10(1): 13515.
- [45] 刁松峰, 邵文豪, 陈涛, 等. 无患子天然居群遗传多样性研究 [J]. 林业科学研究, 2016, 29(2): 176-182.
- [46] 王声跃. 云南地理 [M]. 昆明: 云南民族出版社, 2002: 256.
- [47] 郑度. 中国自然地理总论 [M]. 北京: 科学出版社, 2015: 263.
- [48] 岳向国, 韩发, 师生波, 等. 不同强度的 UV-B 辐射对高山植物麻花艽光合作用及暗呼吸的影响 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(2): 231-235.
- [49] 师生波, 贲桂英, 赵新全, 等. 增强 UV-B 辐射对高山植物麻花艽净光合速率的影响 [J]. 植物生态学报, 2001, 25(5): 520-524.
- [50] 吴建国. UV-B 辐射增强和温度变化对麻花艽光响应的影响 [J]. 草地学报, 2010, 18(5): 622-628.

[责任编辑 时圣明]