

# 基于 *rpl16* 序列分析大百合的遗传多样性及遗传结构

张晓芸<sup>1,2</sup>, 杨妙琴<sup>1,3</sup>, 徐英<sup>1</sup>, 张永洪<sup>1</sup>, 李洪飞<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> 云南师范大学生命科学学院, 昆明 650500; <sup>2</sup> 贵州省兴义市第三中学, 兴义 562400;

<sup>3</sup> 中国科学院植物研究所, 北京 100093; <sup>4</sup> 重庆市北碚区林木种苗站, 重庆 400717)

**摘要:** 大百合是百合科大百合属一种重要的野生植物资源, 本研究采用基因测序法, 利用叶绿体 DNA *rpl16* 序列对 10 个大百合居群进行了遗传多样性和遗传结构分析, 旨在为其资源保护和开发利用提供理论基础。结果显示: *rpl16* 序列矩阵长度为 699 bp, 共检测到 14 个变异位点和 12 个单倍型, 单倍型多态性 ( $H_d$ ) 为 0.604; 总的遗传多样性 ( $H_T$ ) 为 0.660。该居群间遗传变异 (71.53%) 大于居群内遗传变异 (28.47%), 说明居群间变异是其居群的主要变异来源; 居群间遗传分化很高 ( $G_{st}=0.677$ ,  $N_{st}=0.614$ ,  $F_{st}=0.71531$ ), 基因流较低 ( $N_m=0.0995$ )。失配分析结果表明种群在进化过程中曾经历过快扩张, 中性检验支持上述结果: Tajima's  $D=-1.74368$  ( $P>0.05$ ); Fu and Li's  $D=-2.69366$  ( $P<0.05$ ); Fu and Li's  $F=-2.79896$  ( $P<0.05$ )。研究结果表明: 大百合居群遗传多样性较高, 居群间存在较高的遗传分化, 主要与其生活史特征相关。基于得到的居群遗传信息, 建议采取就地保护为主的保护策略。

**关键词:** 大百合; *rpl16*; 遗传多样性; 遗传结构

## Study on the Genetic Diversity and Genetic Structure of *Cardiocrinum giganteum* Based on *rpl16* Sequences Analysis

ZHANG Xiao-yun<sup>1,2</sup>, YANG Miao-qin<sup>1,3</sup>, XU Ying<sup>1</sup>, ZHANG Yong-hong<sup>1</sup>, LI Hong-fei<sup>4</sup>

(<sup>1</sup> Life Science Department, Yunnan Normal University, Kunming 650500; <sup>2</sup> Xingyi Third Middle School, Guizhou province, Xingyi 562400;

<sup>3</sup> Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; <sup>4</sup> Forest tree seedling station in Beibei district, Chongqing 400717)

**Abstract:** *Cardiocrinum giganteum* belongs to the genus *Cardiocrinum* (Endl.) Lindl. (Liliaceae), which is an important wild plant resource. In this study, the genetic diversity and genetic structure of 10 *C.giganteum* populations were analyzed by using the *rpl16* sequence of the chloroplast DNA in order to provide theoretical basis for its resource protection and utilization. By alignment of 699 bp sequence, 14 mutation sites and 12 haplotypes were identified, with the haplotype polymorphism ( $H_d$ ) and the total genetic diversity ( $H_T$ ) of 0.604 and 0.660, respectively. The genetic variation among the population (71.53%) was higher than the intra-population genetic variation (28.47%), indicating the population variation largely contributed by different populations. The genetic differentiation among the population was high ( $G_{st}=0.677$ ,  $N_{st}=0.614$ ,  $F_{st}=0.71531$ ) and the gene flow was low ( $N_m=0.0995$ ). Mismatch analysis revealed that the population had experienced rapid expansion during the evolution process, which was supported by the neutrality tests (Tajima's  $D=-1.74368$  ( $P>0.05$ ); Fu and Li's  $D=-2.69366$  ( $P<0.05$ ); Fu and Li's  $F=-2.79896$  ( $P<0.05$ )). The study revealed the abundant genetic diversity and differentiation of *C.giganteum* particularly among populations, which was mainly related to the characteristics of life history. Thus, this work suggested an *in-situ* conservation strategy being employed in *C.giganteum*.

**Key words:** *Cardiocrinum giganteum*; *rpl16*; genetic diversity; genetic structure

收稿日期: 2018-04-27 修回日期: 2018-07-23 网络出版日期: 2018-10-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181012.1553.002.html>

第一作者研究方向为植物遗传多样性及谱系地理学, E-mail: yn\_xzy@sina.com

通信作者: 张永洪, 研究方向为植物分类与系统学, E-mail: yhzhang@mail.kib.ac.cn

李洪飞, 研究方向为经济林培育, E-mail: 474080483@qq.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31460050); 国家级大学生创新创业项目 (201710681013)

**Foundation project:** The National Natural Science Foundation of China (31460050), National Undergraduate Entrepreneurship and Innovation Project (201710681013)

大百合 (*Cardiocrinum giganteum* (Wall.) Makino), 东亚地区特有, 为百合科大百合属的多年生草本植物, 是一个由中国秦岭山脉至西南各省和东喜马拉雅分布式样的物种<sup>[1-2]</sup>。大百合植株挺拔优美, 花硕大雅致, 是重要的园林观赏植物; 同时因其花茎粗壮且硬度大, 也是鲜切花的好材料<sup>[3-4]</sup>。大百合鳞茎富含淀粉和多种营养成分, 属高纤维的可食蔬菜资源, 民间常将鳞茎加工成大百合粉并作为滋补营养品或八宝饭<sup>[5]</sup>。民间用大百合果实入药, 俗称“兜铃子”, 具有清肺、平喘、止咳的功效<sup>[6]</sup>。该种还可以作为百合属鲜切花卉杂交种选育的母本<sup>[7-8]</sup>。

目前, 关于大百合的研究主要集中在核型及形态分析<sup>[9]</sup>、引种栽培<sup>[10]</sup>以及 RAPD 标记<sup>[11]</sup>等方面, 未见基于叶绿体 DNA 序列的遗传多样性和居群遗传结构研究。野外调查发现有很多大百合被动物啃食; 随着人类活动范围扩大以及大百合的采集利用, 大百合野生资源及生境遭到了破坏<sup>[12]</sup>。种内遗传多样性, 即种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和, 关系到物种的长期生存与稳定, 物种遗传多样性越高, 对环境变化的适应性越强, 也就越容易扩展其分布范围和开拓新的生存空间, 遗传多样性是生物多样性的基础和核心<sup>[13]</sup>; 居群遗传

结构指居群间和居群内的遗传变异在时间和空间上的分布格局及特征, 是遗传多样性的另一重要体现, 也是探讨植物适应性、物种形成过程及进化机制的基础, 还是保护生物学的核心<sup>[14]</sup>。

叶绿体 DNA 具有单拷贝、重组少、母系遗传、测序以及序列分析相对方便、编码区与非编码区的进化速率相差较大等优点, 可用于起源进化、种质鉴定、遗传多样性分析等研究<sup>[15]</sup>。叶绿体 DNA 非编码区 *rpl16* 拥有较快的进化速率<sup>[16-17]</sup>, 常用在属以下的研究中<sup>[18-21]</sup>。本研究在大百合野外资源调查的基础上, 基于叶绿体 DNA *rpl16* 序列, 分析大百合种群遗传多样性水平和遗传结构, 为该物种的资源保护及引种栽培提供理论基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本研究共采集到 10 个大百合野生居群 (表 1) 的材料。根据居群大小, 每个居群随机选取 4~20 株生长状况良好的植株, 每株之间的水平距离或垂直距离不小于 30 m。取其健康幼嫩叶片, 用硅胶干燥处理, 置于 -20 °C 冰箱保存。凭证标本存于云南师范大学标本馆 (YNUB)。

表 1 大百合居群样本信息

Table 1 Detailed information of the *C.giganteum* populations

居群编号 Population code	采集地 Location	纬度 (N) Longitude	经度 (E) Latitude	采样个体数 Sample size
YN_XP	云南省新平县哀牢山	24° 56' 46.80"	100° 54' 20.64"	15
YN_SF	云南省水富县铜锣坝	28° 25' 9.40"	104° 7' 21.70"	18
GZ_JZP	贵州省江口县金盏坪	27° 56' 46.80"	108° 38' 30.60"	12
CQ_JFS	重庆市南川区金佛山	29° 2' 21.26"	107° 12' 30.65"	4
HN_BDGS	湖南省桑植县斗篷山	29° 44' 4.53"	109° 47' 28.10"	20
SX_NTDZ	陕西省镇平县红星村	32° 2' 53.62"	109° 26' 22.46"	14
SC_AB	四川省汶川县三江生态风景区	30° 56' 7.92"	103° 18' 6.60"	17
SC_MX	四川省茂县宝顶山神溪沟	31° 46' 2.52"	103° 59' 13.52"	20
HB_HF	湖北省鹤峰县木林子自然保护区	30° 3' 49.52"	110° 12' 30.13"	19
HB_WFTJZ	湖北省五峰土家族自治县后河自然保护区	30° 4' 53.25"	110° 37' 13.84"	19

### 1.2 试验方法

采用改良 CTAB 法<sup>[22]</sup>提取所有大百合样品基因组总 DNA, 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后置 -20 °C 冰箱保存备用。用叶绿体 DNA *rpl16* 序列进行大百合基因组 DNA 的扩增。根据引物的退火温度、基因组 DNA 浓度和扩增产物长度进行单因素梯度 PCR 实验, 以确定最佳反应体系和程序。优化后的 PCR 反应总体系为 20 μL, 包括模板 1 μL DNA (浓度为 10~20 ng/μL); 正反向引物各

1 μL (浓度为  $10 \times 10^{-12}$  mol/L);  $2 \times$  Mix 混合物 12.5 μL; 剩余体积用无菌双蒸水补齐。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。

### 1.3 数据分析

利用 BioEdit<sup>[23]</sup>进行序列的核对, 用 Dnastar 软件包中的 SeqMan (DNASTAR, Madison, WI) 进行序列的拼接及简单的对比。ClustalX version 1.81<sup>[24]</sup>进

行多序列的比对排列。利用 DNAsp5.0 软件计算遗传多样性( $H_T$ )、核苷酸多样性指数( $\pi$ )、单倍型多态性( $H_d$ )、居群间的遗传分化系数( $F_{st}$ )、基因分化系数( $G_{st}$ )和遗传距离下的基因分化系数( $N_{st}$ )值<sup>[25]</sup>等,并根据  $F_{st}$  值计算基因流  $N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$ <sup>[26]</sup>;通过 Tajima's D 和 Fu and Li's D 检测<sup>[27-28]</sup>其是否符合中性进化模型;利用失配分析对居群是否经历扩张或者瓶颈效应进行判断。通过 ARLEQUIN<sup>[29]</sup>软件的 AMOVA 程序进行居群间和居群内的遗传变异组成分析。采用 MEGA 6.0 软件进行居群间遗传距离分析,并进行非加权组平均法(UPGMA)聚类分析,绘制树状聚类图<sup>[30]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 序列变异及单倍型分布分析

*rpl16* 序列测序长度为 683~697 bp,经排序比对后序列矩阵长度为 699 bp,检测到 14 个变异位点和 12 个单倍型(表 2、3)。10 个居群总的单倍型多态性( $H_d$ )为 0.604,核苷酸多样性( $\pi$ )为 0.00120。各个居群的单倍型多态性和核苷酸多样性见表 3。其中贵州江口金盏坪(GZ\_JZP)居群具有较高的单倍型多态性( $H_d=0.727$ )和核苷酸多样性( $\pi=0.00174$ );其次是四川阿坝(SC\_AB),单

倍型多态性( $H_d$ )为 0.492,核苷酸多样性( $\pi$ )为 0.00084。单倍型 H8 为广布单倍型,分布于除云南的新平哀牢山、水富县以及陕西镇平的居群外的所有居群;云南新平(YN\_XP)、水富(YN\_SF)共有单倍型 H11,陕西的居群仅有单倍型 H9;贵州江口金盏坪单倍型多态性最高,有 5 个单倍型(H2、H4、H6、H7、H8);其次是四川阿坝三江居群(H3、H5、H8)和湖北鹤峰县(H1、H8、H11),各有 3 个单倍型;而云南水富(H11)、重庆金佛山(H8)、陕西镇平(H9)仅有一个单倍型。

### 2.2 遗传多样性及遗传结构分析

10 个大百合居群基于叶绿体片段 *rpl16* 的分析在居群水平上总的遗传多样性较高( $H_T=0.660$ ),居群内的遗传多样性相对较低( $H_S=0.214$ )。采用 Nei 算法对 12 个单倍型分析得出遗传分化系数  $G_{st}=0.677$ ,  $N_{st}=0.614$ ,  $N_m=0.0995$ 。U  $N_{st}/G_{st}$  test =  $-0.33 < 1.96$ , 差异不显著,说明各居群没有明显的地理亲缘结构,居群间遗传变异占 67.7%,居群内变异占总变异的 32.3%。分子方差分析(AMOVA)结果显示(表 4)大百合居群间遗传分化系数  $F_{st}$  为 0.7153,即遗传变异主要来源于居群间,占 71.53%,而在居群内仅为 28.47%。这也进一步揭示了大百合较高的居群间遗传分化。

表 2 大百合 *rpl16* 序列的 12 个单倍型中的变异位点

Table 2 Polymorphic sites of the aligned sequences of *rpl16* DNA fragment in the 12 haplotypes

单倍型 Haplotype	变异位点 Variable nucleotide position													
	7	62	64	74	95	130	203	211	433	534	598	605	635	667
H1	A	T	A	G	G	C	G	G	G	A	G	G	T	T
H2	A	T	G	G	G	C	G	G	A	A	G	G	T	T
H3	A	T	G	G	G	C	G	G	G	A	G	G	T	G
H4	A	T	G	G	G	C	G	G	G	A	G	G	G	T
H5	A	T	G	G	G	C	G	G	G	A	G	G	G	G
H6	A	T	G	G	G	C	G	G	G	A	A	G	T	G
H7	A	T	G	G	G	C	G	G	G	A	A	A	T	T
H8	A	T	G	G	G	C	G	G	G	A	G	G	T	T
H9	A	T	G	G	G	G	G	G	G	A	G	G	T	T
H10	G	T	G	G	G	C	G	G	G	A	G	G	T	T
H11	A	T	G	G	G	C	G	G	G	G	G	G	T	T
H12	A	C	A	A	A	C	A	A	G	G	G	G	T	T

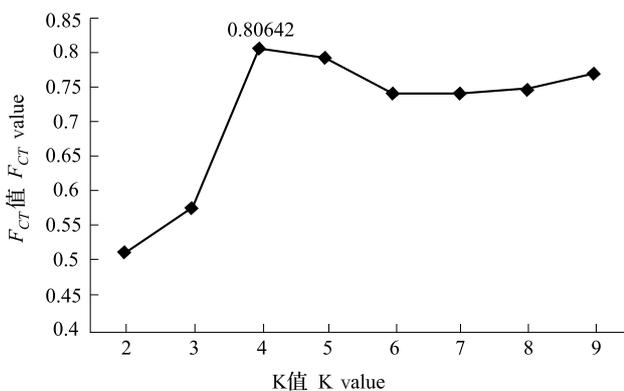
表 3 基于叶绿体 DNA *rpl16* 序列分析大百合遗传多样性指数Table 3 Genetic diversity index of different *C.giganteum* populations based on chloroplast DNA *rpl16* sequence analysis

居群编号 Population code	单倍型多态性 <i>Hd</i>	核苷酸多样性 $\pi$	单倍型数量 Haplotypes	单倍型分布 Haplotype distribution
YN_XP	0.182	0.00156	2	H11 ( 10 ), H12 ( 1 )
YN_SF	0	0	1	H11 ( 16 )
GZ_JZP	0.727	0.00174	5	H2 ( 3 ), H4 ( 1 ), H6 ( 1 ), H7 ( 1 ), H8 ( 6 )
CQ_JFS	0	0	1	H8 ( 3 )
HN_BDGS	0.100	0.00014	2	H4 ( 1 ), H8 ( 19 )
SX_NTDZ	0	0	1	H9 ( 13 )
SC_AB	0.492	0.00084	3	H3 ( 4 ), H5 ( 1 ), H8 ( 11 )
SC_MX	0.105	0.00015	2	H3 ( 1 ), H8 ( 18 )
HB_HF	0.404	0.00061	3	H1 ( 3 ), H8 ( 13 ), H11 ( 1 )
HB_WFTJZ	0.125	0.00018	2	H8 ( 15 ), H10 ( 1 )
总计 Total	0.604	0.00120	12	

表 4 不同居群大百合基于 *rpl16* 序列的 AMOVA 分析Table 4 Results of AMOVA analysis based on *rpl16* sequences from populations of *C.giganteum*

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	方差和 <i>SS</i>	方差组分 Variance of components	变异系数 (%) Percentage of variation
居群间 Among populations	9	58.512	0.44744	71.53
居群内 Within populations	133	23.684	0.17808	28.47
总计 Total	142	82.196	0.62551	

通过 SAMOVA 软件对大百合居群 12 个单倍型进行空间遗传结构分析,设置 K 值从 2~9,得到不同的  $F_{CT}$  值(图 1)。结果显示,当 K=4 时,  $F_{CT}$  值达到最大值,即大百合居群分为 4 个组:云南的水富(YN\_SF)、新平(YN\_XP)、陕西镇平(SX\_NTDZ)分别各为一个组,其余贵州(GZ\_JZP)、重庆(CQ\_JFS)、四川(SC\_AB、SC\_MX)、湖南(HN\_BDGS)、湖北(HB\_HF、HB\_WFTJZ)的居群为一个组。

图 1 大百合居群基于叶绿体 DNA *rpl16* 数据的 SAMOVA 分组模拟的  $F_{CT}$  值分布Fig. 2  $F_{CT}$  value of *C.giganteum* based on cpDNA *rpl16* data

### 2.3 聚类分析

利用 MEGA 软件计算居群间的遗传距离为 0.0001~0.0036。其中,新平(YN\_XP)与陕西镇平(SX\_NTDZ)遗传距离最远(0.0036),重庆(CQ\_JFS)与湖南(HN\_BDGS)、湖北(HB\_WFTJZ),四川茂县(SC\_MX)与湖南(HN\_BDGS)遗传距离最小为 0.0001(表 5)。UPGMA 聚类(图 2)显示,在遗传距离为 0.0004 时,10 个居群分为 4 个类群,其中类群 I 为云南的两个居群(YN\_SF、YN\_XP);类群 II 为陕西的居群(SX\_NTDZ);类群 III 为贵州居群(GZ\_JZP);类群 IV 包括湖北(HB\_HF、HB\_WFTJZ)、湖南(HN\_BDGS)、四川(SC\_AB、SC\_MX)、重庆(CQ\_JFS)4 个省份的居群。

### 2.4 居群中性检测及失配分析

运用 DNAsp 软件在物种的水平上对大百合居群进行失配分析,得到的曲线为单峰曲线(图 3),符合快速扩张模型的假设,表明种群在进化过程中曾经历过快速扩张。该结果也得到了中性检验的支持: Tajima's  $D = -1.74368$  ( $P > 0.05$ ), Fu and Li's  $D = -2.69366$  ( $P < 0.05$ ), Fu and Li's  $F = -2.79896$  ( $P < 0.05$ )。

表 5 各居群间的遗传距离

Table 5 Genetic distance among populations

居群 Populations	CQ_JFS	SC_AB	SC_MX	GZ_JZP	HB_HF	HB_ WFTTJZ	HN_ BDGS	SX_ NTDZ	YN_SF	YN_XP
CQ_JFS	0									
SC_AB	0.0005	0								
SC_MX	0.0001	0.0006	0							
GZ_JZP	0.0010	0.0014	0.0010	0						
HB_HF	0.0003	0.0009	0.0004	0.0013	0					
HB_WFTJZ	0.0001	0.0006	0.0002	0.0010	0.0004	0				
HN_BDGS	0.0001	0.0006	0.0001	0.0010	0.0004	0.0002	0			
SX_NTDZ	0.0014	0.0020	0.0015	0.0024	0.0018	0.0015	0.0015	0		
YN_SF	0.0014	0.0020	0.0015	0.0024	0.0016	0.0015	0.0015	0.0029	0	
YN_XP	0.0022	0.0028	0.0023	0.0032	0.0023	0.0023	0.0023	0.0036	0.0008	0

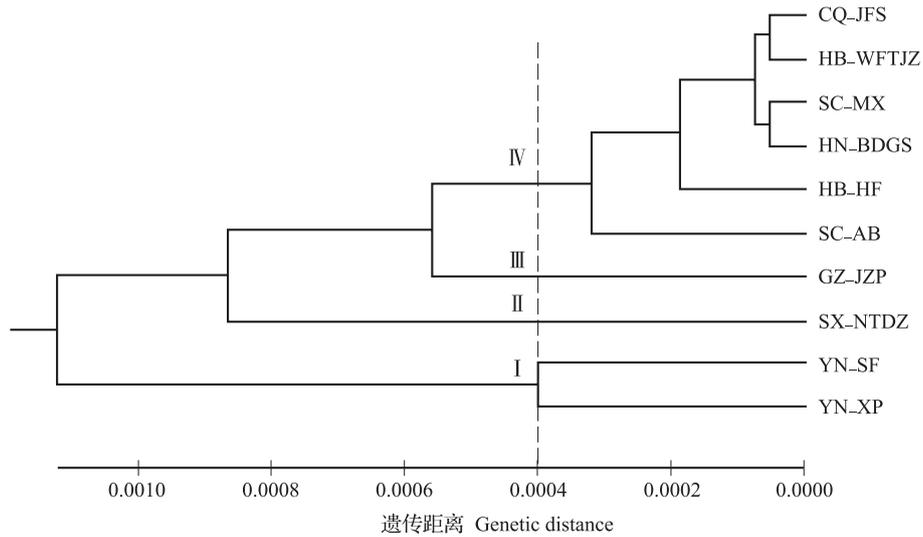


图 2 基于大百合 Nei's 遗传距离的聚类图

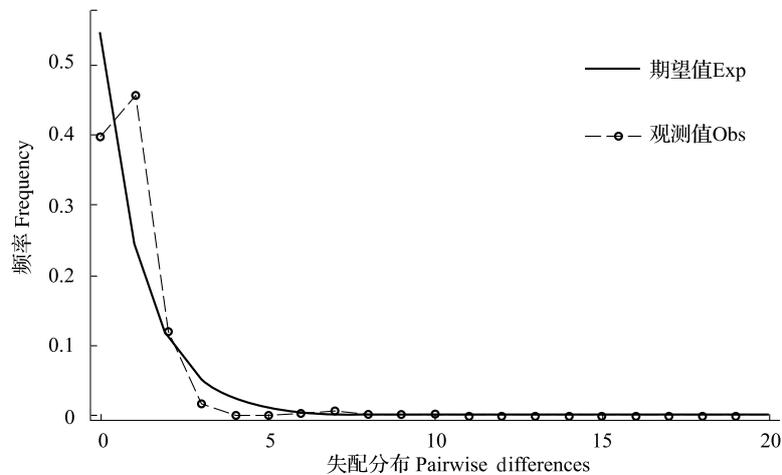
Fig. 2 The dendrogram of 10 populations of *C. giganteum* based on Nei's genetic distance

图 3 大百合的叶绿体 DNA 核苷酸差异分布图

Fig. 3 Distribution of the number of pairwise nucleotide difference for cpDNA haplotypes in *C. giganteum*

### 3 讨论

#### 3.1 大百合居群遗传多样性

Brown 等<sup>[31]</sup>和 Loveless 等<sup>[32]</sup>研究发现植物的遗传多样性与其生活史特性极其相关。生活型:木本植物在种群分化中具有较低的遗传多样性,而非木本植物具有更高的遗传多样;繁育系统:具有无性和有性生殖的物种比仅有有性生殖的物种有更多的变异,且异交为主的物种比自交占优势的种具有更多的遗传变异;分布范围:广布种具有较高的遗传变异性,特有种变异性相对较低;传粉方式:通过普通虫媒的物种居群间遗传变异较高。本研究中,10个大百合居群共检测到12个单倍型,高于 Petit 等<sup>[33]</sup>于2005年收集的基于测序结果的单倍型比例平均值(平均108个个体,有9.5个单倍型);遗传多样性( $H_T=0.660$ )接近平均值(0.67)<sup>[33]</sup>,高于其伴生草本植物蛇莓(0.468)<sup>[34]</sup>、木本植物木姜子(0.1595)<sup>[35]</sup>,属较高水平。大百合为东亚地区特有的多年生草本植物,喜湿润、冷凉、有一定遮荫的环境,干燥空气或阳光直射都会影响其生长,导致其叶片干枯卷曲<sup>[12]</sup>。由于大百合对生境有着较高的要求,以及近年来人为的开发利用,大百合的分布范围逐渐缩小并碎片化,增加了近亲交配机会,限制了基因流,居群间遗传变异增加。研究发现<sup>[36]</sup>大百合兼具性和无性两种繁育系统,无性生殖占优势,这一特点使其居群间具有较高的遗传多样性。套袋试验结果表明<sup>[35]</sup>大百合传粉方式以虫媒异花传粉为主,结实率为100%,主要传粉昆虫有蜜蜂、食蚜蝇、蚂蚁等,虫媒限制了大百合花粉的长距离传播,减少居群间基因流,增加了居群间的遗传分化,使其具有较高的遗传多样性。Buso 等<sup>[37]</sup>认为,当 $G_{st}>0.25$ 时居群间存在极强的遗传变异。本研究中,大百合居群 $G_{st}$ 为0.677,大于单子叶植物( $G_{st}=0.231$ )与多年生草本( $G_{st}=0.233$ )<sup>[31]</sup>,表明大百合居群间存在强烈的遗传分化,与 AMOVA 分析结果一致,其中,71.53%的遗传分化来源于居群间,28.47%的遗传分化来自居群内。Bussell<sup>[38]</sup>对35个物种进行分析,发现29个远交物种的居群间变异在总遗传变异中平均占19.3%( $G_{st}=0.193$ ),而6个近交物种的平均 $G_{st}$ 为0.625。大百合居群间的遗传分化系数明显高于近交物种,这种遗传结构进一步证明大百合居群间遗传变异高于居群内。研究结果显示大百合居群遗传分化系数高于同族植物泸定百合(0.3367)<sup>[39]</sup>、南川百合(0.1031)<sup>[26]</sup>、岷江百合(0.1619)<sup>[40]</sup>,低于

百合的遗传分化系数(0.775)<sup>[41]</sup>。

Vigilant 等<sup>[42]</sup>认为影响居群结构最重要的因素是繁育系统方式、基因交流的程度以及居群的隔离机制,居群间的基因流 $N_m<1.0$ ,各居群会发生强烈分化,遗传漂变就成为导致居群遗传变异的主导因素。大百合物种水平上基因流极低( $N_m=0.0995$ ),很可能经历了奠基者或者瓶颈效应,因此研究认为漂变作用是其变异的主要来源。同时,本研究的中性检测和失配分析结果同样显示大百合在进化过程中经历过快速扩张,支持了上述观点。

#### 3.2 大百合居群遗传结构

本研究对10个大百合居群进行了 SAMOVA 分组分析和 UPGMA 聚类分析,二者结果基本一致。两种分析结果均显示贵州(GZ\_JZP)、重庆(CQ\_JFS)、四川(SC\_AB、SC\_MX)、湖南(HN\_BDGS)、湖北(HB\_HF、HB\_WFTJZ)的居群亲缘关系较近;而云南水富、新平居群与其他居群亲缘关系最远,形成独立的类群;陕西居群也是独立的一支,与其他居群亲缘关系相对较远。此结果与单倍型分析结果一致:云南的水富(YN\_SF)、新平(YN\_XP)、陕西镇平(SX\_NTDZ)均有特有单倍型,而其余居群共有单倍型H8。本研究对分布范围内的10个大百合居群进行遗传多样性和遗传结构分析,但居群数量相对较少,可能低估了大百合野生居群的遗传多样性,对遗传结构的分析也可能存在偏差,后续会继续进行野外采集工作以补充相关数据。

#### 3.3 大百合野生资源保护策略

中国具有丰富的大百合野生资源,但是由于其具有观赏、食用、药用等方面的经济价值,野生居群受人类活动影响较大,在一定程度上破坏了该种的遗传多样性<sup>[43]</sup>。本研究发现大百合居群存在较高的居群间遗传分化。因此,采取合理的就地保护策略,有利于其野生居群的自然更新和维持物种遗传多样性。贵州金盏坪(GZ\_JZP)、四川阿坝(SC\_AB)、湖北鹤峰(HB\_HF)等居群具有较高的单倍型多样性,应优先进行保护。同时,在大百合资源利用的过程中,应通过合理的人工栽培繁殖,减少野生资源的破坏。

#### 参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第十四卷. 北京: 科学出版社, 1980: 157  
Chinese flora editorial board of the Chinese Academy of Sciences. Flora reipublicae popularis sinicae: Volume 14. Beijing: Science Press, 1980: 157

- [ 2 ] Matthews V A. The genus *Cardiocrinum* in cultivation. *The plantsman*, 2002, 1 ( 4 ): 192-205
- [ 3 ] 冯正波, 张超. 花中新贵大百合. *植物杂志*, 2001 ( 3 ): 22  
Feng Z B, Zhang C. *Cardiocrinum giganteum*, new nobility of flowers. *Plant Journal*, 2001 ( 3 ): 22
- [ 4 ] 孙国峰. 百合王子——“大百合”. *中国花卉盆景*, 2002, ( 11 ): 10-11  
Sun G F. Lily prince- *Cardiocrinum giganteum*. *China Flower & Penjing*, 2002 ( 11 ): 10-11
- [ 5 ] 裴盛基, 龙春林. *应用民族植物学*. 昆明: 云南民族出版社, 1998: 156-158  
Pei S J, Long C L. *Applied ethnobotany*. Kunming: The Nationalities Publishing House of Yunnan, 1998: 156-158
- [ 6 ] Hayashik K, Kawano S. Bulbous monocots native to Japan and adjacent areas—their habitats, life histories and phylogeny. *Acta Horticulture*. 2005, 673: 43-58
- [ 7 ] 李守丽. 大百合属间杂交亲和性、离体培养及耐热生理研究. 北京: 中国科学院研究生院, 2006  
Li S L. Research on hybridization compatibility, tissue culture and heat tolerance *Cardiocrinum giganteum*. Beijing: The Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, 2006
- [ 8 ] 林凤琼, 朱昌叁, 黎素平. 大百合与百合属优良品种杂交试验. *南方农业学报*, 2012, 43 ( 11 ): 1733-1736  
Lin F Q, Zhu C S, Li S P. Hybridization research on *Cardiocrinum giganteum* and elite varieties of *Lilium*. *Journal of Southern Agriculture*, 2012, 43 ( 11 ): 1733-1736
- [ 9 ] 张金政, 龙雅宜, 孙国峰. 大百合的生物多样性及其引种观察. *园艺学报*, 2002, 29 ( 5 ): 462-466  
Zhang J Z, Long Y Y, Sun G F. Biodiversity of *Cardiocrinum giganteum* and observation during its introduction. *Acta Horticulturae Sinica*, 2002, 29 ( 5 ): 462-466
- [ 10 ] 关文灵, 李枝林, 黄建新. 野生花卉大百合的引种栽培. *北方园艺*, 2003 ( 4 ): 33  
Guan W L, Li Z L, Huang J X. Introduction and cultivation of wild *Cardiocrinum giganteum*. *Northern Horticulture*, 2003 ( 4 ): 33
- [ 11 ] 喻晓, 文涛, 曾杨. 大百合 RAPD 体系的建立与优化. *西南农业学报*, 2007, 20 ( 6 ): 1304-1306  
Yu X, Wen T, Zeng Y. Establishment and optimization of *Cardiocrinum giganteum*'s RAPD system. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2007, 20 ( 6 ): 1304-1306
- [ 12 ] 李彦坤, 高亦珂. 大百合属植物开发价值研究. *现代园艺*, 2015 ( 10 ): 106-107  
Li Y K, Gao Y K. Study on the development value of *Cardiocrinum giganteum*. *Xiandai Horticulture*, 2015 ( 10 ): 106-107
- [ 13 ] 王云生, 黄宏文, 王瑛. 植物分子群体遗传学研究动态. *遗传*, 2007, 29 ( 10 ): 1191-1198  
Wang Y S, Huang H W, Wang Y. Recent progress in plant molecular population genetics. *Hereditas*, 2007, 29 ( 10 ): 1191-1198
- [ 14 ] 葛颂, 洪德元. 濒危物种裂叶沙参及其近缘广布种泡沙参的遗传多样性研究. *遗传学报*, 1999, 26 ( 4 ): 410-417  
Ge S, Hong D Y. Studies of morphological and allozyme variation of the endangered *Adenophora lobophylla* and its widespread congener *A. potaninii*. *Acta Genetica Sinica*, 1999, 26 ( 4 ): 410-417
- [ 15 ] Soltis D E, Soltis P S. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. Soltis D E, Soltis P S, Doyle J J. *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequence*. Boston: Kluwer Academic Publishers, 1998
- [ 16 ] 王容升, 魏鑫, 曹立荣. 基于叶绿体基因多样性的中国水稻起源进化研究. *植物遗传资源学报*, 2011, 12 ( 5 ): 686-693  
Wang R S, Wei X, Cao L R. Origin and evolution of cultivated rice (*O. sativa* L) in China based on gene diversity of chloroplast genome. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12 ( 5 ): 686-693
- [ 17 ] Downie S R, Katz-Downie D S. A molecular phylogeny of Apiaceae subfamily Apioideae: evidence from ribosomal DNA internal transcribed spacer sequence. *American Journal of Botany*, 1996, 83 ( 2 ): 234-251
- [ 18 ] 何薇. 基于叶绿体序列 *rpl16* 的中国樱桃居群遗传多样性及居群遗传结构研究. 成都: 四川农业大学, 2014  
He W. Studies on genetic diversity and population genetic structure of Chinese cherry resource (*Cerasus pseudocerasus* Lindl.) based on cpDNA *rpl16*. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2014
- [ 19 ] 彭铁成, 徐芳, 罗静瑶, 陈云云, 汤华. 基于叶绿体基因的香蕉遗传多样性研究. *热带生物学报*, 2012, 3 ( 4 ): 293-294  
Peng T C, Xu F, Luo J Y, Chen Y Y, Tang H. Genetic diversity of banana varieties based on genes from chloroplast. *Journal of Tropical Organisms*, 2012, 3 ( 4 ): 293-294
- [ 20 ] 郭会芳, 阙显照, 张韧, 陈鸿姍. nrDNA ITS 和 cpDNA *rpl16* 基因测序法对六种鼠尾草的检测. *植物分类与资源学报*, 2008, 30 ( 3 ): 345-350  
Guo H F, Kan X Z, Zhang R, Chen H S. Identification of *Salvia* species by nrDNA ITS and cpDNA *rpl16* sequence analyses. *Plant Diversity and Resources*, 2008, 30 ( 3 ): 345-350
- [ 21 ] Jordan W C, Courtney M W, Neigel J E. Low levels of intraspecific genetic variation at a rapidly evolving chloroplast DNA locus in north American duckweeds (Lemnaceae). *American Journal of Botany*, 1996, 83: 430-439
- [ 22 ] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochemical Bulletin*, 1987, 19 ( 1 ): 11-15
- [ 23 ] Hall T A. BioEdit: a user friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 1999, 41: 95-98
- [ 24 ] Thompson J D, Gibson T J, Plewniak F, Higgins D G. The ClustalX windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25 ( 24 ): 4876-4882
- [ 25 ] Raymond M, Pousset F. An exact test for population differentiation. *Evolution*, 1995, 49 ( 6 ): 1280-1283
- [ 26 ] 赵玉倩, 丁瑞华, 李玉帆, 刘正权, 贾桂霞. 中国特有植物南川百合群体遗传多样性研究. *分子植物育种*, 2016, 14 ( 3 ): 749-755  
Zhao Y Q, Ding R H, Li Y F, Liu Z Q, Jia G X. Studies on genetic diversity of *Lilium rosthornii* Diels populations, the endemic plants of China. *Molecular Plant Breeding*, 2016, 14 ( 3 ): 749-755
- [ 27 ] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 1989, 123 ( 3 ): 585-595
- [ 28 ] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations.

- Genetics, 1993, 133 ( 3 ): 693-709
- [ 29 ] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ( version 3 ) : an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, 2005, 1 ( 4A ): 47-50
- [ 30 ] 张成林, 郭智慧, 张新全, 白且史, 张昌平, 李平, 马啸. 利用 SSR 标记对垂穗披碱草和老芒麦进行物种鉴定和遗传变异分析. *植物遗传资源学报*, 2016, 17 ( 3 ): 416-422  
Zhang C L, Guo Z H, Zhang X Q, Bai Q S, Zhang C P, Li P, Ma X. An analysis of species identification and genetic divergence of drooping wildrye (*Elymus nutans*) and Siberian wildrye (*E. sibiricus*) by SSR markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2016, 17 ( 3 ): 416-422
- [ 31 ] Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L. Plant population genetics, breeding and genetics resources. *Bioscience*, 1990, 41 ( 1 ): 613-614
- [ 32 ] Loveless M D, Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 1984, 15: 65-95
- [ 33 ] Petit R J, Duminil J, Fineschi S. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations. *Molecular Ecology*, 2005, 14 ( 3 ): 689-701
- [ 34 ] 刘春香, 李钧敏, 李红丽, 罗芳丽. 匍匐茎克隆植物蛇莓的遗传多样性和遗传结构. *江苏农业科学*, 2016, 44 ( 2 ): 215-220  
Liu C X, Li J M, Li H L, Luo F L. Genetic diversity and genetic structure of creeping stem clone plant mock-strawberry. *Jiangsu Agricultural Sciences*, 2016, 44 ( 2 ): 215-220
- [ 35 ] 陈俊秋, 慈秀芹, 李巧明, 李捷. 樟科濒危植物思茅木姜子遗传多样性的 ISSR 分析. *生物多样性*, 2006, 14 ( 5 ): 410-420  
Chen J Q, Ci X Q, Li Q M, Li J. Genetic diversity of *Litsea szemaois*, an endangered species endemic to China, detected by inter-simple sequence repeat ( ISSR ). *Biodiversity Science*, 2006, 14 ( 5 ): 410-420
- [ 36 ] 关文灵, 李叶芳, 陈贤. 大百合自然繁殖特性研究. *园艺学报*, 2009, 36 ( S ): 2056  
Guan W L, Li Y F, Chen X. Study on the natural propagation characteristics of *Cardiocrinum giganteum*. *Acta Horticulturae Sinica*, 2009, 36 ( S ): 2056
- [ 37 ] Buso G S C, Rangel P H, Ferreira M E. Analysis of genetic variability of South American wild flee populations (*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers. *Molecular Ecology*, 1998, 7 ( 1 ): 107-117
- [ 38 ] Bussell J D. The distribution of random amplified polymorphic DNA ( RAPD ) diversity amongst populations of *Isotoma perraea* ( Lobeliaceae ). *Molecular Ecology*, 1999, 8 ( 5 ): 775-789
- [ 39 ] 段青, 崔光芬, 王祥宁, 王继华, 贾文杰, 马璐琳, 吴丽芳. 云南泸定百合遗传多样性的表型与 ISSR 分析. *西北植物学报*, 2013, 33 ( 6 ): 1106 - 1113  
Duan Q, Cui G F, Wang X N, Wang J H, Jia W J, Ma L L, Wu L F. Genetic diversity of *Lilium sargentiae* based on phenotypic traits and SSR markers. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2013, 33 ( 6 ): 1106-1113
- [ 40 ] 吴祝华. 百合属部分种亲缘关系与岷江百合群体遗传结构研究. 南京: 南京农业大学, 2008  
Wu Z H. Research on genetic relationship conservation genetics of *Lilium* species and of *L. regale*. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2008
- [ 41 ] 熊勇, 陈名红, 熊华斌. 百合 *psbA-trnH* 基因序列变异及遗传多样性分析. *生物技术*, 2013, 23 ( 2 ): 53-56  
Xiong Y, Chen M H, Xiong H B. Genetic diversity analysis of *Lilium* based on *psbA-trnH* gene sequence variation. *Biotechnology*, 2013, 23 ( 2 ): 53-56
- [ 42 ] Vigilant L, Stoneking M, Harpending H, Hawkes K, Wilson A C. African populations and the evolution of human mitochondrial DNA. *Science*, 1991, 253 ( 5027 ): 1503-1507
- [ 43 ] 伍丹. 四川大百合繁殖及遗传多样性研究. 成都: 四川农业大学, 2006  
Wu D. Study on reproduction and genetic diversity of *Cardiocrinum giganteum* in Sichuan. Chengdu: Sichuan Agricultural University, 2006