

基于 ISSR 分析湖北省枫香资源的遗传多样性

裴云霞¹, 曹健², 管兰华², 蒋祥娥², 许红霞², 倪天虹¹, 胡兴宜³, 杜克兵^{1*}

(1. 华中农业大学园艺林学学院/湖北省林业信息技术研究中心, 武汉 430070; 2. 湖北省林业局林木种苗管理总站, 武汉 430079; 3. 湖北省林业科学研究院, 武汉 430075)

摘要: 为了给湖北省枫香资源的保护与利用提供科学依据, 选取湖北省远安 (YA)、红安 (HA)、赤壁 (CB)、竹溪 (ZX)、南漳 (NZ)、利川 (LC) 和武汉 (WH) 的枫香资源为研究对象, 并以安徽黄山 (HS)、重庆丰都 (FD)、江西铜鼓 (TG) 和海南霸王岭 (BWL) 的枫香资源为对照, 采用 ISSR 分子标记对这 11 个枫香群体的 335 份个体样品进行了遗传多样性分析。结果表明: (1) 湖北省 7 个枫香群体的 215 份样本共扩增得到 334 个条带, 其中多态性条带 306 条。群体内的遗传变异为 84.19%, 群体间遗传变异为 15.81%, 基因流 (N_m) 为 2.663 3。在群体内部, HA 和 WH 的遗传多样性最丰富, ZX 的遗传多样性最低。ZX 和 LC 的亲缘关系最近, YA 和 LC 的亲缘关系最远。当遗传相似系数为 0.94 时, 可将 7 个群体分为 4 个大类, NZ、LC 和 ZX 群体聚为一类, YA 和 WH 群体聚为一类, HA 群体、CB 群体分别单独聚为一类。(2) 11 个枫香群体共扩增出 349 个条带, 其中多态性条带 320 个, 平均多态性百分比为 91.69%。不同群体的多态位点百分率范围为 54.29%~77.14%, 平均值为 67.01%。WH 和 HA 的遗传多样性最丰富, BWL 的遗传多样性最低。11 个群体中, 18.01% 的遗传变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 81.99%, 基因流 (N_m) 为 2.276 5。在群体内部, HA 和 WH 的遗传多样性最丰富, BWL 的遗传多样性最低。遗传相似度和遗传距离均显示, ZX 和 TG 的亲缘关系最近, TG 和 BWL 的亲缘关系最远。当遗传相似系数为 0.93 时, 可将 11 个群体分为四大类: 第 1 类包括 NZ、ZX、TG 和 LC; 第 2 类包括 FD、HA 和 CB; 第 3 类包括 YA、WH 和 HS; 第 4 类是 BWL 单独一类。可见湖北省 7 个枫香群体的聚类结果与其自然地理分布大致吻合, 可分为东部、中部和西部三大类; 4 个省外枫香群体中, 除 BWL 单独聚成一类外, 其余 3 个群体 (TG、FD 和 HS) 并未与湖北省内地理位置临近的群体聚为一类。

关键词: 枫香; ISSR; 遗传多样性

中图分类号: S722.33; S792.990.4

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2022)06-0876-09

Genetic diversity of *Liquidambar formosana* resources in Hubei Province based on ISSR analysis

PEI Yunxia¹, CAO Jian², GUAN Lanhua², JIANG Xiang'e², XU Hongxia², NI Tianhong¹, HU Xingyi³, DU Kebing¹

(1. College of Horticulture and Forestry Sciences/ Hubei Engineering Technology Research Center for Forestry Information, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070; 2. Forest Seed and Seedling Management Station of Hubei Forestry Bureau, Wuhan 430079; 3. Hubei Academy of Forestry, Wuhan 430075)

Abstract: To provide a reference for the protection and utilization of *Liquidambar formosana* resources in Hubei Province, *L. formosana* populations of Yuan'an (YA), Hong'an (HA), Chibi (CB), Zhuxi (ZX), Nanzhang (NZ), Lichuan (LC) and Wuhan (WH) in Hubei Province were adopted as the materials, coupled with the control populations from Huangshan (HS) in Anhui, Fengdu (FD) in Chongqing, Tonggu (TG) in Jiangxi and Bawangling (BWL) in Hainan. The genetic diversity of 335 samples from the 11 populations were analyzed by ISSR (inter-simple sequence repeat). The results were as follows. (1) A total of 334 bands were amplified from the 215 samples of the seven populations in Hubei Province, including 306 polymorphic bands. The genetic variations of intra- and inter-populations were 84.19% and 15.81%, respectively, and the gene flow (N_m) was 2.663 3. Within the population, HA and WH had the most abundant genetic diversity, and ZX had the lowest genetic diversity. The relationship between ZX and LC was the closest, while which between YA and LC was the farthest. The seven populations could be divided into four groups at the genetic similarity coefficient of 0.94. The populations of NZ, LC and ZX were clustered into the first group, YA and WH

收稿日期: 2022-02-17

基金项目: 国家林业和草原种质资源库 (2005DKA21003) 和湖北省林业科技支撑重点项目 ([2017] LYKJ04) 共同资助。

共同第一作者: 裴云霞, 硕士。E-mail: 674093700@qq.com 曹健, 正高级工程师。E-mail: souu810@163.com

* 通信作者: 杜克兵, 博士, 副教授。E-mail: kebingdu@mail.hzau.edu.cn

were clustered into the second group, and HA and CB were clustered into one group alone, separately. (2) A total of 349 bands were amplified from the 11 populations, of which, 320 were polymorphic bands, and the average percentage of polymorphism was 91.69%. The percentage of polymorphic loci in different populations ranged from 54.29% to 77.14%, with an average of 67.01%. WH and HA had the most abundant genetic diversity, and BWL had the lowest genetic diversity. Among the 11 populations, 18.01% of the genetic variation was observed among the populations, and 81.99% was observed within the population, coupled with the gene flow (N_m) of 2.276 5. Within the population, HA and WH had the most abundant genetic diversity, and BWL had the lowest genetic diversity. Both genetic similarity and genetic distance showed that ZX and TG were closely related, and TG and BWL were the farthest. When the genetic similarity coefficient was 0.93, the 11 populations could be divided into four groups: the first group included NZ, ZX, TG and LC; the second group consisted FD, HA and CB; the third group included YA, WH and HS; the fourth group was BWL. In conclusion, the clustering results of the seven populations in Hubei Province were roughly consistent with their physical geographical distribution and could be divided into three categories: western, central and eastern. Among the four populations outside the Hubei province, except for BWL was clustered into one group alone, the other three populations (TG, FD and HS) were not clustered together with their neighboring populations in Hubei Province.

Key words: *Liquidambar formosana*; ISSR; genetic diversity

枫香 (*Liquidambar formosana* Hance) 是金缕梅科 (Hamamelidaceae) 枫香属的高大落叶乔木, 原产于我国秦岭淮河以南各省份, 在我国分布跨越南温带、亚热带和热带 3 个气候带, 主产区主要有湖北、湖南、江西、贵州、安徽、浙江、江苏、海南等省份。枫香是营建用材林和园林观赏的重要乡土树种, 其树形美观, 秋天叶片变为红色, 鲜艳动人。同时, 枫香对 Cl_2 和 SO_2 等有害气体具有较强的吸附能力。除此之外, 枫香还具有较高的经济价值和医用价值, 如树脂是不可或缺的制香剂; 木材纹理细密是制作家具、乐器的主要材料; 树叶可治疗湿疹等皮肤外伤; 果实对小便不利等症状具有较好的疗效。

遗传多样性 (genetic diversity) 是指种内各群体间或同一群体内不同个体间发生遗传变异的总和, 能够反映物种起源、进化和对环境的适应力, 在植物的保护与利用中应用广泛^[1-2]。目前, 关于我国不同省份以及部分省份内部不同地区枫香资源的遗传多样性研究已有一些报道, 但涉及湖北省内不同枫香群体的遗传多样性研究尚较少^[3-4]。湖北省枫香资源十分丰富, 各个地区均有分布, 但这些资源的遗传多样性尚不清楚。对湖北省的枫香资源进行遗传多样性分析, 将有助于了解种质资源的状况、遗传背景、遗传结构以及不同地区种质资源间的亲缘关系, 为湖北省枫香资源的保护以及不同生态环境间的引种提供理论依据。ISSR (inter-simple sequence repeat)、SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 和 SSR (simple sequence repeat) 等 DNA 分子标记技术在植物良种选育和遗传多样性分析等领域应用广泛。ISSR 分子标记技术与其他 DNA 分子标记技术相比, 具有操作简便、重复性好、

多态性高、成本低等优点^[5]。基于此, 本研究以湖北省 7 个枫香群体与外省 4 个枫香群体为材料, 采用 ISSR 分子标记技术研究其遗传变异规律和遗传结构, 以期对湖北省枫香资源的科学保护与利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年 7 月—2019 年 9 月, 在湖北省远安 (YA)、红安 (HA)、赤壁 (CB)、竹溪 (ZX)、南漳 (NZ)、利川 (LC) 和武汉 (WH) 共 7 个枫香集中分布区分别选取野生母株进行取样, 获得 7 个群体的叶片样品 215 份。取样时, 每个群体选取 30 株左右母树进行采样, 两棵母树之间的距离保证在 50 m 以上。每个单株采集新鲜叶片 10 g 以上, 放入硅胶中干燥, 随后带回实验室于 $-70^\circ C$ 超低温冰箱中保存。为了解湖北省与其他省份枫香资源间遗传多样性的差异, 还选取了湖北省周边地区的 4 个枫香野生群体作为对照材料 (保存于湖北省京山县虎爪山林场), 包括安徽黄山 (HS)、重庆丰都 (FD)、江西铜鼓 (TG) 和海南霸王岭 (BWL)。所有试验材料共计 11 个群体的 335 份样品 (表 1)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取 0.3 g 枫香叶片, 采用 CTAB 法提取叶片样品 DNA^[5]。利用 Nanodrop ND-2000 微量核酸蛋白检测仪检测 DNA 质量及浓度。利用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 链的完整性, 电泳缓冲液为 $1 \times TAE$ 。将 DNA 浓度调节至 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 于 $-20^\circ C$ 贮存备用。

1.2.2 ISSR 引物筛选与 PCR 扩增 从哥伦比亚大学 (University of British Columbia) 公布的 100 条

ISSR 引物 (UBC801-UBC900) 中随机抽取 30 条, 由北京擎科新业生物技术有限公司合成。PCR 反应体系为 20 μL , 包括模板 DNA 2 μL , ISSR 引物 2 μL (终浓度为 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), PCR 反应混合 (Master Mix) 10 μL , 加入 ddH₂O 使体系达到 20 μL 。

PCR 反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 50.3~52.6 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1

min, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 最后 8 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 1.5% 琼脂糖凝胶加入 8 μL PCR 扩增产物, 在 180 $\text{V}\cdot\text{cm}^{-1}$ 电压下电泳 20 min。试验共筛选出 14 条扩增条带清晰稳定、多态性高的引物 (表 2)。采用这 14 条 ISSR 引物对 335 份样品分别进行 PCR 扩增和电泳检测。

表 1 枫香采样群体分布

Table 1 List of sampling population distribution of *L. formosana*

群体编号	采样地点	样品数/个	经度 E	纬度 N	海拔/m
YA	远安	31	111°14'~111°52'	30°53'~31°22'	111~1 245
HA	红安	32	114°23'~114°49'	30°56'~31°35'	29~443
CB	赤壁	30	113°32'~114°13'	29°28'~29°59'	20~196
ZX	竹溪	30	109°29'~110°80'	31°32'~32°31'	390~1795
NZ	南漳	30	111°26'~112°90'	31°13'~32°10'	66~1 138
LC	利川	30	108°21'~109°18'	29°42'~30°39'	630~1 656
WH	武汉	32	113°41'~115°05'	29°58'~31°22'	16~49
FD	丰都	30	107°28'~108°12'	29°33'~30°16'	175~2 000
TG	铜鼓	30	114°05'~114°44'	28°22'~28°50'	246~1 078
HS	黄山	30	117°02'~118°55'	29°24'~30°24'	161~1 589
BWL	霸王岭	30	109°03'~109°17'	18°57'~19°11'	300~400

表 2 ISSR 标记的引物序列

Table 2 Sequences of ISSR markers

引物编号	引物序列 (5'-3')	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAGAC	52.2
UBC-815	CTCTCTCTCTCTCTG	52.2
UBC-818	CACACACACACACAAG	52.6
UBC-820	GTGTGTGTGTGTGTGTC	52.2
UBC-835	AGAGAGAGAGAGAGAGYC	52.6
UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAGAYT	50.3
UBC-842	GAGAGAGAGAGAGAGAYG	52.6
UBC-844	CTCTCTCTCTCTCTRC	52.6
UBC-845	CTCTCTCTCTCTCTRG	52.6
UBC-849	GTGTGTGTGTGTGTGYA	50.3
UBC-850	GTGTGTGTGTGTGTGYC	52.6
UBC-852	TCTCTCTCTCTCTCRA	50.3
UBC-855	ACACACACACACACACYT	50.3
UBC-857	ACACACACACACACACYG	52.6

注: R= (A, G); Y= (C, T)。

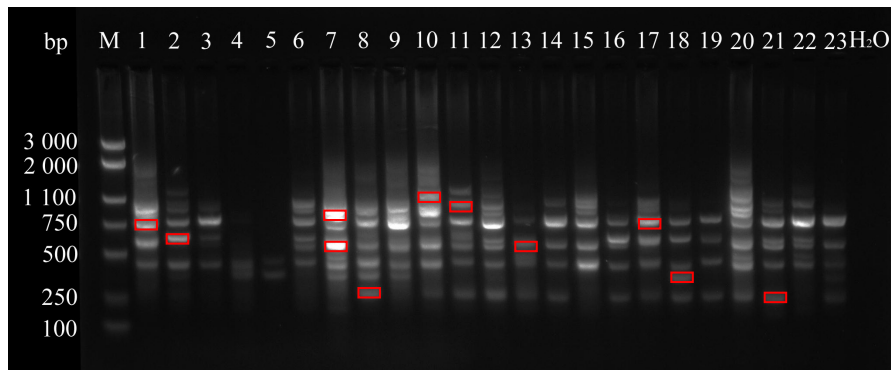
1.3 数据分析

对扩增条带进行统计, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 得到 ISSR 分析的原始数据矩阵, 使用 POPgen32 软件分析获取各引物多态位点个数、多态位点百分率 (percentage of polymorphic bands, PPB)、观测等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、Nei's 基因多样性指数、Nei's 遗传距离等信息。同时, 使用 NTsys2.10e 软件分析原始数据, 得到不同个体间遗传相似系数、UPGMA 聚类树等结果。

2 结果与分析

2.1 湖北省 7 个天然群体的遗传多样性分析

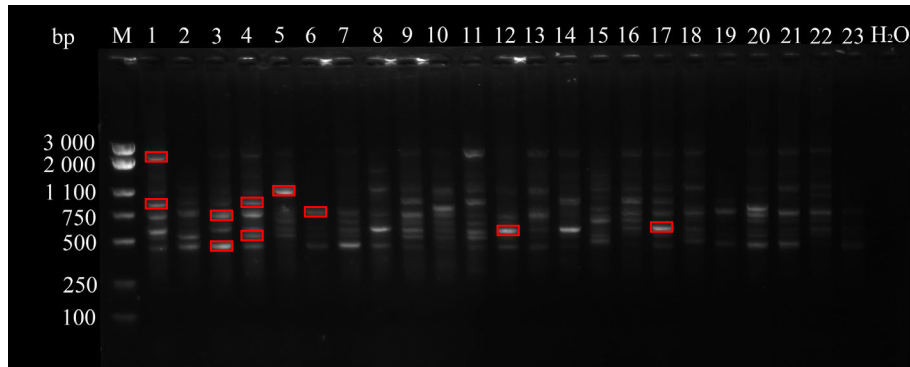
2.1.1 ISSR 引物扩增条带的多态性 14 条 ISSR 引物对湖北省 215 份样本共扩增得到 334 个条带, 其中多态性条带 306 个 (图 1、图 2 和表 3)。引物扩增条带数介于 11~33, 平均每个引物扩增条带 23.86 个, 平均多态性百分比为 91.62%。多态性百分比最高的引物为 UBC820, 达到 96.88%。UBC852 扩增条带数最少, 仅有 11 条, 多态性百分比为 81.82%。



M: 3 000 bp DNA Marker; 1—23: 赤壁群体中的 23 个样本。

图 1 引物 UBC815 对赤壁 (CB) 群体中 23 个样品的扩增结果

Figure 1 Amplification results of 23 samples from CB population by primer UBC815



M: 3 000 bp DNA Marker; 1—23: 竹溪群体中的 23 个样本。

图 2 引物 UBC849 对竹溪 (ZX) 群体中 23 个样品的扩增结果

Figure 2 Amplification results of 23 samples from ZX population by primer UBC849

表 3 14 条 ISSR 引物对湖北省 7 个枫香群体的 PCR 扩增结果

Table 3 Amplification results of the 14 ISSR primers in the seven *L. formosana* populations from Hubei Province

引物编号	PCR 产物大小/bp	扩增条带数/条	多态性条带/条	多态性百分比/%
UBC-811	250 ~ 2 000	25	23	92.00
UBC-815	250 ~ 2 200	20	19	95.00
UBC-818	250 ~ 2 500	21	18	85.71
UBC-820	400 ~ 3 000	32	31	96.88
UBC-835	200 ~ 2 000	27	25	92.59
UBC-840	150 ~ 2 000	28	25	89.29
UBC-842	200 ~ 1 500	18	14	77.78
UBC-844	250 ~ 2 000	21	20	95.24
UBC-845	150 ~ 2 500	31	29	93.55
UBC-849	200 ~ 3 000	33	31	93.94
UBC-850	400 ~ 2 500	23	21	91.30
UBC-852	500 ~ 1 600	11	9	81.82
UBC-855	200 ~ 1 700	22	20	90.91
UBC-857	350 ~ 1 900	22	21	95.45
总计		334	306	
平均数		23.86	21.86	91.62

2.1.2 遗传多样性分析 衡量遗传多样性的指标主要有观察等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 指数 (I)。

供试的 7 个枫香群体的遗传多样性信息见表 4。不同群体的多态位点百分率介于 54.29%~77.14%，平均值为 68.98%。Nei's 基因多样性指数介于 0.200 0(ZX)

~0.275 3 (WH), 平均值为 0.240 0。Nei's 基因多样性排序为 WH(0.275 3)>HA(0.272 6)>YA (0.245 9) > CB (0.245 0) >NZ (0.228 4) >LC (0.212 8) >ZX (0.200 0)。Shannon's 指数介于 0.297 9(ZX)~ 0.408 6 (HA), 平均值为 0.359 2。按 Shannon's 指数排序为 HA (0.408 6) >WH (0.404 3) >YA (0.370 5) >

CB (0.364 5) >NZ(0.347 3) >LC(0.321 6) >ZX (0.297 9)。可见, 7 个枫香群体中, WH 群体和 HA 群体的 Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 指数 (I) 最大, 说明二者的遗传多样性最丰富, 而 ZX 群体 H 和 I 值最小, 遗传多样性最低。

表 4 枫香群体的遗传多样性分析
Table 4 Genetic diversity analysis of the *L. formosana* populations

群体	多态位 点数	多态位点 百分率/%	观察等位基 因数 (N_a)	有效等位基 因数 (N_e)	Nei's 基因多样性 指数 (H)	Shannon's 指数 (I)
NZ	25	71.43	1.714 3	1.377 2	0.228 4	0.347 3
ZX	19	54.29	1.542 9	1.340 9	0.200 0	0.297 9
LC	23	65.71	1.657 1	1.358 2	0.212 8	0.321 6
HA	27	77.14	1.771 4	1.460 5	0.272 6	0.408 6
YA	25	71.43	1.714 3	1.414 2	0.245 9	0.370 5
WH	26	74.29	1.742 9	1.487 0	0.275 3	0.404 3
CB	24	68.57	1.685 7	1.425 0	0.245 0	0.364 5
HS	20	57.14	1.571 4	1.349 5	0.204 2	0.305 1
BWL	20	57.14	1.571 4	1.284 4	0.174 2	0.267 2
FD	24	68.57	1.685 7	1.471 5	0.266 8	0.390 5
TG	25	71.43	1.714 3	1.416 3	0.243 7	0.365 3
7 个湖北枫香群体平均值	24	68.98	1.689 8	1.409 0	0.240 0	0.359 2
7 个湖北枫香群体总体	33	94.29	1.942 9	1.474 0	0.285 7	0.439 2
11 个枫香群体平均值	23	67.01	1.670 1	1.398 6	0.233 5	0.349 3
11 个枫香群体总体	33	94.29	1.942 9	1.470 0	0.285 3	0.438 5

表 5 枫香群体间和群体内的分子变异分析
Table 5 Analysis of molecular variations of inter- and intra- the *L. formosana* populations

群体	样品数	群体总基因多样性 H_t	群体内遗传多样性 H_s	群体间遗传分化系数 G_{st}	基因流 N_m
湖北 7 个枫香群体	215	0.285 1	0.240 0	0.158 1	2.663 3
11 个枫香群体	335	0.284 8	0.233 5	0.180 1	2.276 5

表 6 ISSR 标记的湖北省 7 个枫香群体间的遗传相似性和遗传距离

Table 6 Genetic similarity and genetic distance among the seven *L. formosana* populations in Hubei Province by ISSR markers

pop ID	NZ	LC	HA	YA	WH	CB	ZX
NZ	****	0.933 9	0.915 4	0.934 4	0.927 1	0.918 4	0.953 3
LC	0.068 3	****	0.939 3	0.905 1	0.922 6	0.943 1	0.958 9
HA	0.088 4	0.062 6	****	0.930 0	0.944 3	0.937 6	0.917 2
YA	0.067 8	0.099 7	0.072 6	****	0.956 7	0.921 8	0.920 8
WH	0.075 7	0.080 5	0.057 3	0.044 3	****	0.921 6	0.909 7
CB	0.085 1	0.058 6	0.064 4	0.081 4	0.081 7	****	0.942 1
ZX	0.047 8	0.042 0	0.086 4	0.082 5	0.094 7	0.059 7	****

注: 遗传一致度 (对角线以上), 遗传距离 (对角线以下)。

ISSR-PCR 扩增的总基因多样性(H_t)为 0.285 1, 群体内的遗传多样性 (H_s) 为 0.240 0 (表 5)。不同群体间遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.158 1, 说明 7 个枫香群体间存在着遗传分化现象, 15.81%的遗传变异

存在于群体间, 群体内的遗传变异为 84.19%, 群体内的遗传变异高于群体间。7 个群体的基因流 (N_m) 为 2.663 3, 表明 7 个枫香群体间存在一定程度的基因交流。

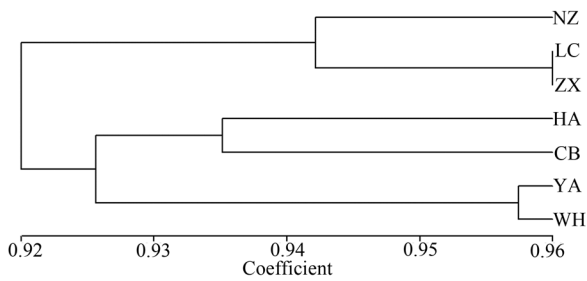


图 3 基于湖北省 7 个枫香群体遗传距离的聚类图

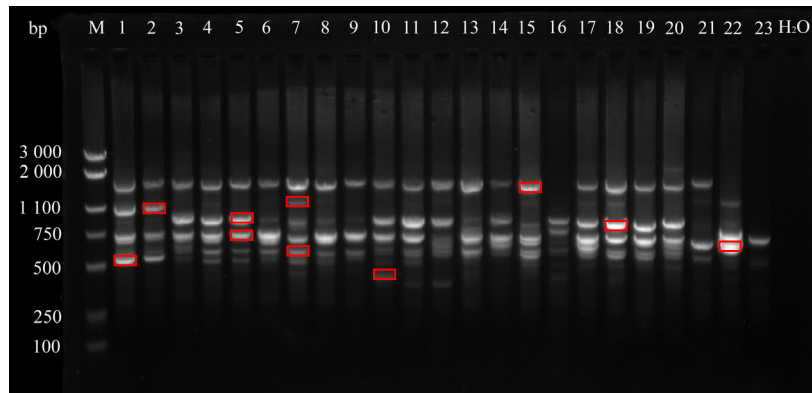
Figure 3 Cluster graph based on genetic distance of the seven *L. formosana* populations in Hubei Province

2.1.3 不同群体遗传距离分析 通过 Nei's 指数计算湖北省 7 个枫香群体的遗传相似度和遗传距离可知, 群体间的遗传相似性介于 0.905 1~0.958 9 (表 6)。其中, ZX 和 LC 的遗传相似性最大, 为 0.958 9; YA 和 LC 的遗传相似性最小, 为 0.905 1。7 个供试群体的遗传距离介于 0.042 0~0.099 7。其中, ZX 和

LC 的遗传距离最小, 为 0.042 0; YA 和 LC 的遗传距离最大, 为 0.099 7。当遗传相似系数为 0.94 时, 可将 7 个枫香群体分为 4 个大类, 第 1 类包括 NZ、LC 和 ZX; 第 2 类包括 YA 和 WH; HA 和 CB 分别单独成为一类 (图 3)。种质聚类与其自然地理分布呈一定的相关性, 但略有差异。如种质 YA 和 WH, 分别来自湖北的西部和东部, 但也聚在同一类群。

2.2 11 个枫香群体的遗传多样性分析

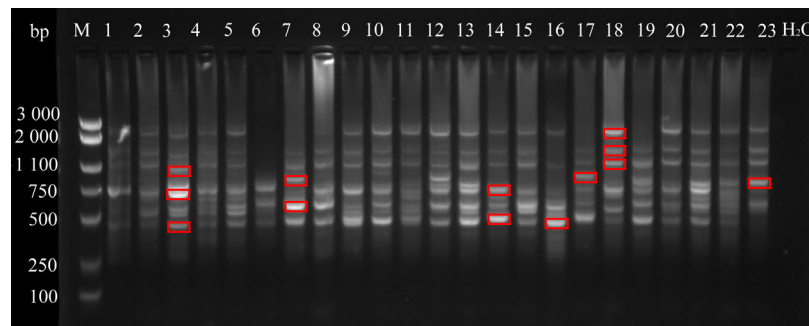
2.2.1 ISSR 扩增条带的多态性 用 14 条 ISSR 引物对 335 份样本的 PCR 扩增共得到 349 个条带, 其中多态性条带为 320 条 (图 4、图 5 和表 7)。引物扩增条带数范围为 11~34, 平均每个引物扩增条带 24.93 个, 平均多态性百分比为 91.69%。多态性条带丰富, 且多态性百分比最高的引物为 UBC820, 多态性百分比达到 97.06%。UBC852 扩增条带数最少, 仅有 11 条, 多态性百分比为 81.82%。



M: 3 000 bp DNA Marker; 1—23: 铜鼓群体中的 23 个样品。

图 4 引物 UBC857 对铜鼓 (TG) 群体中 23 个样品的扩增结果

Figure 4 Amplification results of 23 samples from TG population by primer UBC857



M: 3 000 bp DNA Marker; 1—23: 霸王岭群体的 23 个样品。

图 5 引物 UBC849 对霸王岭 (BWL) 群体中 23 个样品的扩增结果

Figure 5 Amplification results of 23 samples from BWL population by primer UBC849

2.2.2 遗传多样性分析 11 个枫香群体的多态位点百分率介于 54.29%~77.14%, 平均值为 67.01% (表 4)。Nei's 基因多样性指数 (H) 介于 0.174 2 (BWL)~0.275 3 (WH), 平均值为 0.233 5, Nei's

基因多样性排序为 WH (0.275 3) > HA (0.272 6) > FD (0.266 8) > YA (0.245 9) > CB (0.245 0) > TG (0.243 7) > NZ (0.228 4) > LC (0.212 8) > HS (0.204 2) > ZX (0.200 0) > BWL (0.174 2)。

表 7 14 条 ISSR 引物对 11 个枫香群体的 PCR 扩增结果

Table 7 Amplification results of the 14 ISSR primers in the 11 *L. formosana* populations

引物编号	PCR 产物大小/bp	扩增条带数/条	多态性条带/条	多态性百分比/%
UBC-811	150 ~ 2 500	27	24	88.89
UBC-815	250 ~ 2 200	22	21	95.45
UBC-818	250 ~ 2 500	21	18	85.71
UBC-820	300 ~ 3 000	34	33	97.06
UBC-835	200 ~ 2 300	29	27	93.10
UBC-840	150 ~ 2 000	28	25	89.29
UBC-842	200 ~ 1 500	18	14	77.78
UBC-844	250 ~ 2 000	21	20	95.24
UBC-845	150 ~ 2 500	31	29	93.55
UBC-849	200 ~ 3 000	34	32	94.12
UBC-850	350 ~ 2 500	26	24	92.31
UBC-852	500 ~ 1 600	11	9	81.82
UBC-855	200 ~ 1 800	23	21	91.30
UBC-857	350 ~ 2 000	24	23	95.83
总计		349	320	
平均数		24.93	22.86	91.69

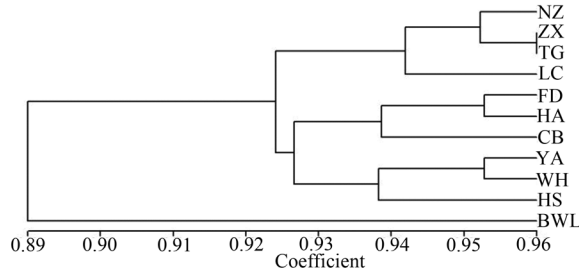


图 6 基于 11 个枫香群体遗传距离的聚类图

Figure 6 Cluster graph based on genetic distance of the 11 *L. formosana* populations

Shannon's 指数 (I) 介于 0.267 2 (BWL) ~ 0.408 6 (HA), 平均值为 0.349 3。按 Shannon's 指数排序为 HA (0.408 6) > WH (0.404 3) > FD (0.390 5) > YA (0.370 5) > TG (0.365 3) > CB (0.364 5) >

NZ (0.347 3) > LC (0.321 6) > HS (0.305 1) > ZX (0.297 9) > BWL (0.267 2)。可见, 11 个枫香群体中, WH 和 HA 的 Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon's 指数 (I) 最大, 说明二者的遗传多样性最丰富, 而 BWL 的 H 和 I 值最小, 遗传多样性最低。

ISSR-PCR 扩增的总基因多样性 (H_t) 为 0.284 8, 群体内的遗传多样性 (H_s) 为 0.233 5 (表 5)。不同群体间遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.180 1, 说明 11 个枫香群体间存在着遗传分化现象, 18.01% 的遗传变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 81.99%, 群体内的遗传变异高于群体间。11 个群体的基因流 (N_m) 为 2.276 5, 表明 11 个枫香群体间存在一定程度的基因交流。

表 8 ISSR 标记的 11 个枫香群体间的遗传相似性和遗传距离

Table 8 Genetic similarity and genetic distance among the 11 populations of *L. formosana* by ISSR markers

pop ID	NZ	FD	LC	HA	YA	WH	BWL	HS	CB	ZX	TG
NZ	***	0.926 7	0.933 9	0.915 4	0.934 4	0.927 1	0.916 2	0.951 7	0.918 4	0.953 3	0.959 0
FD	0.076 1	***	0.942 4	0.956 7	0.937 4	0.947 5	0.895 3	0.927 7	0.947 6	0.918 6	0.928 9
LC	0.068 3	0.059 3	***	0.939 3	0.905 1	0.922 6	0.888 1	0.917 5	0.943 1	0.958 9	0.944 9
HA	0.088 4	0.044 2	0.062 6	***	0.930 0	0.944 3	0.900 2	0.917 8	0.937 6	0.917 2	0.924 3
YA	0.067 8	0.064 7	0.099 7	0.072 6	***	0.956 7	0.894 9	0.936 6	0.921 8	0.920 8	0.944 1
WH	0.075 7	0.054 0	0.080 5	0.057 3	0.044 3	***	0.907 6	0.947 8	0.921 6	0.909 7	0.942 0
BWL	0.087 5	0.110 6	0.118 7	0.105 1	0.111 1	0.096 9	***	0.892 6	0.878 0	0.898 3	0.870 3
HS	0.049 5	0.075 0	0.086 1	0.085 7	0.065 5	0.053 7	0.003 6	***	0.928 0	0.924 6	0.931 2
CB	0.085 1	0.053 8	0.058 6	0.064 4	0.081 4	0.081 7	0.130 2	0.074 7	***	0.942 1	0.927 2
ZX	0.047 8	0.084 9	0.042 0	0.086 4	0.082 5	0.094 7	0.107 3	0.078 4	0.059 7	***	0.963 9
TG	0.041 8	0.073 8	0.056 7	0.078 7	0.057 5	0.059 7	0.138 9	0.071 3	0.075 6	0.036 8	***

注: 遗传一致度 (对角线以上), 遗传距离 (对角线以下)。

2.2.3 不同群体遗传距离分析 通过 Nei's 指数计算 11 个枫香群体的遗传相似度和遗传距离可知, 枫香群体间的遗传相似性介于 0.870 3 ~ 0.963 9 (表 8)。其中, ZX 和 TG 的遗传相似性最大, 为 0.963 9; TG 和 BWL 的遗传相似性最小, 为 0.870 3。11 个供试群体的遗传距离介于 0.036 8 ~ 0.138 9。其中, ZX 和 TG 的遗传距离最小, 为 0.036 8; TG 和 BWL 的遗传距离最大, 为 0.138 9。当遗传相似系数为 0.93 时, 可将 11 个枫香群体分为 4 个大类, 第 1 类包括 NZ、ZX、TG 和 LC; 第 2 类包括 FD、HA 和 CB; 第 3 类包括 YA、WH 和 HS; 第 4 类是 BWL 单独一类 (图 6)。种质聚类与自然地理分布呈一定的相关性, 但并不完全一致。如群体 ZX 和 TG, 分别来自湖北和江西两个省份, 但也聚在同一类群。

3 讨论与结论

湖北省 7 个枫香群体的群体内 (84.19%) 遗传变异高于群体间 (15.81%), 群体间存在一定程度的基因交流 ($N_m = 2.663 3$)。在群体内部, HA 和 WH 的遗传多样性最丰富, ZX 的遗传多样性最低。遗传相似度和遗传距离均显示, ZX 和 LC 的亲缘关系最近, YA 和 LC 的亲缘关系最远。当遗传相似系数为 0.94 时, 可将湖北省的 7 个群体分为四大类, 第 1 类包括 NZ、LC 和 ZX; 第 2 类包括 YA 和 WH; HA 和 CB 则分别单独成为一类。这一聚类结果与其自然地理分布大致吻合, 可分为东部、中部和西部三大类。引入 4 个省外枫香群体后, 群体内和群体间的遗传变异分别变为 81.99% 和 18.01%, HA 和 WH 群体内部的遗传多样性仍然最丰富, BWL 群体的遗传多样性最低。在 11 个群体中, ZX 和 TG 的亲缘关系最近, TG 和 BWL 的亲缘关系最远。当遗传相似系数为 0.93 时, 可将 11 个群体分为四大类, 第 1 类包括 NZ、ZX、TG 和 LC; 第 2 类包括 FD、HA 和 CB; 第 3 类包括 YA、WH 和 HS; 第 4 类是 BWL 群体单独一类。可见, 3 个省外群体 (TG、FD、HS) 并未与湖北省内地理位置临近的群体聚为一类, 例如 TG 位于湖北省东南部, 却与湖北省西部的 NZ、LC 和 ZX 聚为一类; FD 位于湖北省西南部, 却与湖北省东部的 HA 和 CB 聚为一类; HS 位于湖北省东部, 却与湖北省中西部的 YA 和 WH 聚为一类。

遗传多样性能够反映植物在不同环境条件下为了生存而进行的变异, 极大地反映目标树种的地理分布和未来的生存发展^[2, 6]。本研究使用 14 条 ISSR 引物对 7 个湖北天然群体和 4 个省外群体的 335 份

枫香种质资源进行分析, 共扩增出 349 个条带, 其中多态性条带 320 个, 平均每个引物扩增 24.93 个条带, 其中多态性条带 22.86 个, 多态性百分比为 91.69%。335 个个体共检测多态性位点数为 33, 多态位点百分率为 94.29%, 略高于毕泉鑫等^[3]枫香的多态位点百分率 87.41%, 产生差异的原因可能是采样群体的分布和生境不同, 但与其他木本植物如板栗 (多态位点百分率 100%) 和棕榈 (多态位点百分率 97.31%) 相接近^[7-8]。这表明枫香在基因水平上的遗传多样性丰富, 适应性强, 与其作为重要的先锋树种, 在逆境中仍能不断繁衍等特性相一致^[9-11]。遗传指数分析表明, WH 和 HA 群体的遗传多样性最丰富, 而 BWL 群体的遗传多样性最低。这说明 WH 和 HA 地区种质的环境适应能力较强, 更利于枫香的生长繁衍, 而 BWL 属热带雨林区, 特殊的地理位置和气候特征, 致使该群体在长期进化中形成了区别于其他地区的基因性状。ISSR 扩增的总基因多样性 (H_t) 为 0.284 8, 群体内的遗传多样性 (H_s) 为 0.233 5, 群体间遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.180 1, 说明枫香群体间存在着遗传分化现象, 11 个群体中 18.01% 的遗传变异存在于群体间, 群体内的遗传变异为 81.99%, 群体内的遗传变异高于群体间, 这一结果与前人的研究结果相一致^[3, 12-13]。遗传多样性分析能够得到群体内或群体间遗传变异的大小以及群体间亲缘关系的远近等信息。遗传变异大小显示了种质资源基因型的丰富度, 对于资源的科学保护具有指导意义, 而群体间亲缘关系的远近则能够对植物杂交的亲性和性提供依据。本研究中, 7 个湖北群体和 11 个总群体中 ZX 分别与 LC 和 TG 的遗传距离较近, 说明 ZX 与 LC 或 TG 种源之间的杂交成功率较大, 这与刘中华等^[14]的研究结果相符。对于湖北省的枫香资源而言, HA 和 WH 群体的遗传多样性最丰富, 应在未来予以重点保护。

基因流 (N_m) 是基因之间的交流, 常见的基因交流方式有花粉和种子等。基因流能够防止群体的分化^[15-16]。当物种的 $N_m > 1$ 时, 群体间基因流水平较高; 当 $N_m > 5$ 时, 表明物种拥有高的异交率^[17]。本研究中 7 个湖北群体和 11 个总群体的 N_m 分别为 2.663 3 和 2.276 5, 说明群体之间存在较高水平的基因交流, 能够防止遗传漂变引起的遗传分化, 这与瞿印权等^[18]的研究结果相一致。有趣的是, 4 个省外枫香群体 TG、FD 和 HS 均未与在湖北省内相临近的群体聚为一类, 而是与地理位置较远的群体聚为一类, 产生这一现象的原因还值得进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 李芳芳. 浙江省枫香天然群体的遗传多样性研究[D]. 郑州: 河南农业大学, 2015.
- [2] 刘学锋, 刘果, 李小梅, 等. 基于 ISSR 分子标记技术的蓝花楹遗传多样性和亲缘关系分析[J]. 分子植物育种, 2021, 19(21): 7146-7153.
- [3] 毕泉鑫, 金则新, 李钧敏, 等. 枫香自然种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 植物研究, 2010, 30(1): 120-125.
- [4] 林昌礼, 张大伟, 吴丽萍, 等. 优良观赏枫香种质的遗传多样性分析[J]. 湖北林业科技, 2013, 42(2): 7-10.
- [5] 贾元, 胡利娟, 冯群, 等. 基于 ISSR 标记的西南地区石斛资源亲缘关系分析[J]. 贵州农业科学, 2019, 47(12): 8-12.
- [6] 巨秀婷, 潘阿青, 蒋福娟, 等. 郁金香种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2019, 38(8): 3667-3674.
- [7] 毛跃雄, 陆跃堂, 胡志姣, 等. 基于 SRAP 分子标记的贵州省棕榈种质资源遗传多样性分析[J]. 南方农业学报, 2020, 51(1): 27-35.
- [8] 张馨方, 张树航, 李颖, 等. 基于 SSR 标记的燕山板栗种质资源遗传多样性分析[J]. 中国农业大学学报, 2020, 25(4): 61-71.
- [9] 庞宏东, 胡兴宜, 胡文杰, 等. 淹水胁迫对枫杨等 3 个树种生理生化特性的影响[J]. 中南林业科技大学学报, 2018, 38(10): 15-20, 26.
- [10] 施翔, 王冬雪, 王树凤, 等. 枫香幼苗对铅胁迫的生理生化响应与元素分布[J]. 林业科学研究, 2019, 32(4): 88-95.
- [11] 洪震, 刘术新, 洪琮浩, 等. 5 种造林树种对干旱胁迫的抗性应答[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2021, 45(2): 111-119.
- [12] 李江伟, 杨琴军, 刘秀群, 等. 台湾杉遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 林业科学, 2014, 50(6): 61-66.
- [13] 杨梅, 张敏, 师守国, 等. 武当木兰种群遗传结构的 ISSR 分析[J]. 林业科学, 2014, 50(1): 76-81.
- [14] 刘中华, 林志坚, 李华伟, 等. 甘薯种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 南方农业学报, 2019, 50(11): 2392-2400.
- [15] 李娟, 董利军, 林建勇, 等. 闽楠不同地理种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 分子植物育种, 2019, 17(23): 7822-7828.
- [16] WRIGHT S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating[J]. *Evolution*, 1965, 19(3): 395-420.
- [17] 段义忠, 王海涛, 张格格, 等. 基于 ISSR 分子标记的孑遗濒危植物四合木遗传结构分析[J]. 植物研究, 2021, 41(3): 466-473.
- [18] 瞿印权, 杨德明, 徐雯, 等. 花吊丝竹居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 林业科学研究, 2018, 31(6): 33-38.