

雄性榧树遗传多样性的 SSR 荧光标记分析

郑刘辉, 詹利云, 侯 宇, 喻卫武, 曾燕如, 戴文圣

(浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】旨在利用 SSR 荧光标记对榧树雄株 5 个野生居群的 121 个单株进行遗传多样性及群体遗传结构分析, 为榧树雄株遗传背景、种质资源评价和优良种质筛选提供参考。【方法】采用 CTAB 法提取榧树基因组 DNA, 设计引物, 通过荧光引物 PCR 扩增方法, 利用毛细管电泳检测技术检测榧树雄株的多态位点。【结果】24 对引物共检测到 85 个等位基因, 变幅为 2~7 个, 平均每个标记有 3.542 个, 其中平均有效等位基因有 1.915 个。5 个居群的平均 Nei's 遗传多样性指数为 0.365, 平均 Shannon's 信息指数为 0.608。5 个居群中, 多态位点百分比为 75.00%~95.83%, 平均为 82.50%, 居群遗传多样性从大到小依次为嵊州居群、临安居群、富阳居群、黄山居群、淳安居群。居群间的基因流为 4.172, 遗传分化系数为 0.096, 遗传分化程度很低。聚类分析结果表明: 5 个居群的遗传相似度为 0.865~0.978, 平均为 0.932。【结论】雄性榧树居群的遗传多样性较丰富。榧树雄株的遗传变异主要存在于居群内, 但居群间也存在一定的基因交流。5 个居群可以分为 3 大类群, 这与表型的遗传多样性分析结果比较相似。图 4 表 6 参 32

关键词: SSR 荧光标记; 榧树; 雄性; 居群; 遗传多样性

中图分类号: S722

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2022)02-0329-09

SSR analysis of genetic diversity of male *Torreya grandis*

ZHENG Lihui, ZHAN Liyun, HOU Yu, YU Weiwu, ZENG Yanru, DAI Wensheng

(State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study aims to analyze the genetic diversity and population genetic structure of 121 individual plants from 5 wild populations of male *Torreya grandis* using SSR fluorescent markers, in order to provide reference for genetic background, germplasm resource evaluation and elite germplasm screening of male *T. grandis*. [Method] The genomic DNA of *T. grandis* was extracted by CTAB method, and the primers were designed. The polymorphic sites of the male *T. grandis* were detected by capillary electrophoresis using fluorescent primer PCR amplification. [Result] A total of 85 alleles were detected by 24 pairs of primers, ranging from 2–7, with an average of 3.542 per marker, among which the average effective alleles were 1.915. The average Nei's genetic diversity index and Shannon's information index in 5 populations were 0.365 and 0.608 respectively. Among the 5 populations, the percentage of polymorphic sites ranged from 75.00% to 95.83%, with an average of 82.50%. The order of genetic diversity of the 5 populations from large to small was Shengzhou, Lin'an, Fuyang, Huangshan and Chun'an. The gene flow among the populations was 4.172, the coefficient of gene differentiation was 0.096, and the degree of genetic differentiation was very low. The results of clustering analysis showed that the genetic similarity coefficient (GS) of the 5 populations varied from 0.865 to 0.978, with an average of 0.932. [Conclusion] The genetic diversity of male *T. grandis* populations is

收稿日期: 2021-04-07; 修回日期: 2021-07-12

基金项目: 浙江省科学技术重点研发计划项目 (2016C02052-12)

作者简介: 郑刘辉 (ORCID: 0000-0001-6815-5568), 从事经济林木发育与栽培生理研究。E-mail: 1184277046@qq.com。通信作者: 戴文圣 (ORCID: 0000-0002-1314-2759), 教授, 博士, 从事经济林木发育与栽培生理、生态研究。E-mail: dai_wensheng@163.com

relatively rich. The genetic variation of the male *T. grandis* mostly exists within the population, but the gene exchange is also present between the populations. The 5 populations can be divided into 3 groups, which is similar to the results of phenotypic genetic diversity analysis. [Ch, 4 fig. 6 tab. 32 ref.]

Key words: SSR fluorescence markers; *Torreya grandis*; male; population; genetic diversity

榿树 *Torreya grandis* 是红豆杉科 Taxaceae 榿属 *Torreya* 中国特有植物, 为第三纪孑遗植物, 零星片状分布于浙江、安徽、福建、江西、湖南等省的丘陵地带^[1]。榿树雌雄异株, 稀同株。雄性榿树是香榿 *T. grandis* ‘Merrillii’ 的父本, 为雌性香榿提供花粉, 并在在维持榿树多样性中具有重要地位。目前, 生产中大面积栽培的仅香榿一个栽培类型, 因而榿树天然杂交产生的多样性在优良种质选育及新品种培育方面潜力巨大, 其中雄性榿树起着重要的作用。以前由于雄株不结果, 榿农不了解它对香榿生产的重要性, 雄性榿树被严重破坏, 种群数量及范围越来越小, 雌雄比例严重失调^[2]。近年来, 随着香榿产业的发展, 人们逐渐认识到充分授粉对种实产量的影响, 日益重视香榿造林中授粉树的配置。研究发现: 雄性榿树单株间在花期、花粉得率与生活力等表型指标上存在丰富的变异^[3]。因为变异是选育的基础, 因此, 从 DNA 标记分析研究雄性榿树的多样性, 可从遗传物质 DNA 水平了解雄性榿树表型丰富变异的内在基础, 从根本上为榿树雄株选育提供理论基础。遗传多样性是生物多样性的重要组成部分。随着生物技术和研究层次的深入, DNA 分子标记成为检测遗传多样性的主要方法^[4]。简单序列重复 (SSR) 是基于聚合酶链式反应 (PCR) 的分子标记技术, 具有重复性好, 多态性高, 共显性遗传, 操作方便等优点, 已广泛应用于植物基因定位、遗传育种、遗传图谱构建和遗传多样性研究等方面^[5-8]。在榿树遗传多样性研究方面, 闵会等^[9]利用扩增片段长度多态 (AFLP) 分子标记对香榿天然群体进行分析, 发现香榿群体的遗传多样性丰富, 且居群内的遗传变异大于居群间; 吴昊等^[10]依据个体间的差异现象, 建立了基于序列相关扩增多态 (SRAP) 标记的榿树核心种质确定方法; 刘浩凯^[11]则用 SRAP 分子标记研究榿树雄性居群的遗传多样性, 结果表明: 榿树种内变异十分复杂。前人的研究揭示了榿树种质资源复杂的遗传背景和丰富的遗传多样性, 但他们均使用的是显性标记。显性标记不能区分纯合显性与杂合显性的基因型, 而 SSR 标记则反之, 它是共显性标记。有关雄性榿树遗传多样性的研究尚未见报道。本研究以 5 个雄性榿树居群为研究对象, 用荧光 SSR 分子标记分析榿树雄株的遗传多样性和遗传结构, 旨在为榿树雄株后续的培育、雄株种质资源的保护与可持续利用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

詹利云等^[3]对浙江省淳安县半夏村 (淳安居群)、杭州市临安区洪岭村 (临安居群)、杭州市富阳区洞桥村 (富阳居群)、浙江嵊州市榆树村 (嵊州居群) 及安徽省黄山市呈坎村 (黄山居群) 等 5 个野生雄性榿树居群叶片及雄球花相关性状进行了研究。本研究的叶片材料来自上述研究相同居群相同单株, 121 份叶片材料包括来源于淳安 17 份、临安 24 份、富阳 24 份、嵊州 24 份和黄山 32 份。每株采集的新鲜嫩叶放入装有硅胶的自封袋中为 1 份, 带回实验室后置于 -80 °C 冰箱保存备用。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[12], 用紫外分光核酸测定仪 (GENEQUANT, Eppendorf, 德国) 测定 DNA 浓度和光密度 $[D(260)]$ 值, 用质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 并在 AlphaImager 成像系统 (Alpha Innotech Corporation, 美国) 中拍照储存电泳结果。检测合格的 DNA 样品用无菌水稀释到 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 备用。

1.2.2 SSR 分析 从榿属物种 (长叶榿 *T. jackii* 和榿树) 研究中选取 55 对 SSR 引物^[13-16]。SSR 反应体系由北京睿博兴科生物技术有限公司提供, 即采用 2 步法, 其中第 2 步扩增时的正向引物加有 M13 序列 (5'-TGTAACGACGGCCAGT-3')(M13-F), 并在合成时分别加有蓝 (FAM)、绿 (HEX)、红 (ROX)、黑 (TAMRA) 荧光, 以方便 PCR 产物的毛细管电泳检测。引物均由北京睿博兴科生物技术有限公司合成。

PCR 第 1 步反应体系为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 DNA $1.0 \mu\text{L}$ 、 $2 \times \text{Taq PCR MasterMix}$ (诺唯赞生物科技有限公司) $5.0 \mu\text{L}$ 、 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 正反向引物各 $0.5 \mu\text{L}$ 、灭菌去离子水补足 $10.0 \mu\text{L}$; PCR 扩增程序为 $95 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性

5 min, 后 35 个循环, 每个循环 95 ℃ 变性 30 s, 60 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 30 s, 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。PCR 产物用质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测。第 2 步 PCR 反应体系为第 1 步的 PCR 产物 1.0 μL、2×*Taq* PCR MasterMix 10.0 μL, M13-F 及反向引物各 0.5 μL, 灭菌去离子水补足 20.0 μL; PCR 扩增程序同第 1 次 PCR, 仅退火温度降低了 5 ℃。PCR 产物用质量分数为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 条带清晰的样送北京睿博兴科生物技术有限公司毛细管电泳检测。

随机选取 5 株雄性榿树样品进行 PCR 扩增的引物筛选, 并用筛选得到的引物对样品进行 SSR 分析。

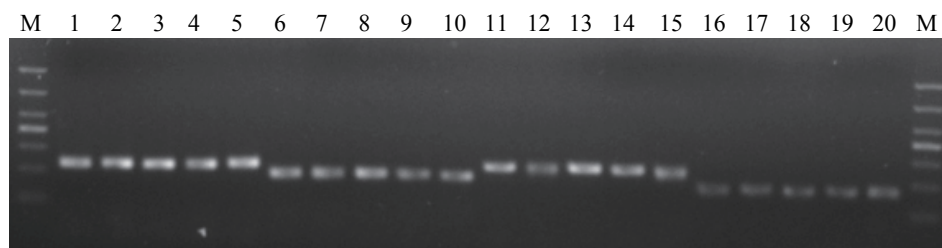
1.2.3 数据统计与分析 在 Excel 中统计扩增的等位基因位点信息, 并用 DataFormater 软件^[17] 进行格式转换。利用 GenALEx 6.5 软件^[18] 计算多态信息含量 (P_{IC})、多态位点百分比 (P_{PL})、近交系数 (F_{IS})、遗传相似度 (G_D) 和遗传距离 (G_I), 并进行分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 和主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA), 用 Popgene Ver.1.3.2 软件计算等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、Nei's 遗传多样性指数 (H)、Shannon's 信息指数 (I)、Nei's 总基因多样性 (H_T)、遗传分化系数 (F_{ST})、基因流 (N_m) 等遗传参数。

采用 NTSYS 2.10e 软件^[19] 计算 Nei's 遗传相似性。采用混合模型和 Structure 2.3.4 软件分析居群的遗传结构和 $\ln P(D)$ ^[20]。 $\ln P(D)$ 为 Delta K 和似然值的对数函数, 针对基因库数目建模, 以确定最佳群体数 K 值, 设置 K 为 1~5, 每个参数运行 10 次, 每次运行的丢弃迭代时间和重复次数都为 10000。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物筛选

从 55 对引物中筛选出了 24 对扩增稳定、条带清晰的引物对 (图 1), 并将其用于榿树雄株遗传多样性分析。引物信息见表 1。



M. markers; 泳道 1~5、6~10、11~15、16~20 的引物: TG70、TG81、TG82、TG90。引物编号见表 1

图 1 部分引物对 PCR 扩增产物电泳图

Figure 1 Electrophoresis of DNAs amplified with some pairs of primers

2.2 遗传多样性分析

24 对 SSR 引物在 121 株榿树雄株中共获得 85 个等位基因, 每对引物扩增的等位基因数为 2~7 个, 平均每对引物扩增出 3.54 个等位基因, 其中引物对 ZAFU-4 检测到 7 个等位基因; 有效等位基因数为 45.69 个, 平均每个位点有有效等位基因数为 1.92 个; 平均观测杂合度 (0.461) 略高于平均期望杂合度 (0.400); Shannon's 信息指数为 0.10~1.31, 平均为 0.70, 其中 GR98 位点的 Shannon's 信息指数最高 (1.310); 多态信息含量为 0.040~0.699, 平均为 0.400, 其中 GR98 位点的多态信息含量最高 (0.699), GR48 位点最低 (0.040) (表 2)。

平均等位基因数淳安居群最高, 为 2.292 个, 嵊州居群最少, 为 2.792 个, 平均为 2.508 个。平均有效等位基因数为 1.798 个; 平均观测杂合度为 0.459, 平均期望杂合度为 0.365。5 个居群的平均多态位点比率为 82.50%, 其中嵊州居群最高 (95.83%), 黄山居群和临安居群分别为 87.50% 和 79.17%, 富阳居群和淳安居群最低 (75.00%)。Nei's 遗传多样性指数, 嵊州居群最高, 为 0.431, 淳安居群最低, 为 0.332, 平均为 0.365; Shannon's 信息指数嵊州居群最高, 为 0.720, 淳安居群最低, 为 0.541, 平均为 0.608; 各居群的 Shannon's 信息指数高于 Nei's 遗传多样性指数, 且两者变化趋势一致。以多样性指数为评价指标, 则嵊州居群的遗传多样性最高 (Nei's 遗传多样性指数为 0.431, Shannon's 信息指数为 0.720), 淳安居群的遗传多样性较低 (Nei's 遗传多样性指数为 0.332, Shannon's 信息指数为 0.541) (表 3)。

表1 雄性榿树 SSR 分析引物

Table 1 SSR primers used in male *T. grandis*

引物编号	SSR基序及重复数	正、反向引物序列	退火温度/℃	PCR扩增片段长度/bp	来源	荧光标记
ZAFU-1	(TG) ₉	F: GGCTATGCTACACCCAAAGAA R: GGGGCACCACCTATTGTATG	59.0	160~200	张敏等 ^[16]	HEX
ZAFU-2	(TG) ₉	F: TCAAAGTGCAACCGGTACAA R: CAACAGGCCAACATGGAGTA	59.0	110~140	张敏等 ^[16]	FAM
ZAFU-3	(CAG) ₈	F: GGGTTACCCCTTGCTTTAT R: CCCTACTTTATTTCCGTGCG	59.0	250~280	张敏等 ^[16]	ROX
ZAFU-4	(TAA) ₈	F: GAATTCCCATTCCCATTGTG R: ACCCCCTTCTGCTCTGATTT	59.0	140~170	张敏等 ^[16]	TAMRA
ZAFU-5	(TTC) ₈	F: AATGAATGCGTGTTACGCTG R: TTGGAGCGGAAGGAATAATG	59.0	170~200	张敏等 ^[16]	HEX
ZAFU-6	(TTCT) ₅	F: CCAATTTGTGGAGCGTTTCT R: TGTGAAAAGGTGGTGAACAA	59.0	190~210	张敏等 ^[16]	FAM
ZAFU-7	(TATT) ₅	F: TTTTCCAACCTCAACCCCTTG R: ATGTTTGGGGTTGACGTGTT	59.0	170~190	张敏等 ^[16]	ROX
ZAFU-8	(TAGCA) ₅	F: AATTGGCCCTTCATTCAACA R: CTAGTGGGTGCATTTGAGCC	60.0	250~700	张敏等 ^[16]	TAMRA
ZAFU-11	(AT) ₈	F: ACATCTGCAAGGCAAGGTTTC R: TTGAATTTTACCAGGCTCC	59.0	170~180	张敏等 ^[16]	FAM
ZAFU-16	(TGAGCC) ₇	F: AAGGTTGCCACCTCAGTCAC R: ACAGAACGTCTCCAACCGAC	60.0	220~260	张敏等 ^[16]	TAMRA
GR12	(ATTT) ₆	F: GCTGTGGAAGCGTTGGAGAA R: TCTGAAACCTCGCTCGAACC	56.0	204~216	LI等 ^[15]	HEX
GR48	(CA) ₁₁	F: TTTTAGAACTGCTTGCCCGT R: CATGTACATGCACCATCATGC	58.0	197~205	LI等 ^[15]	ROX
GR67	(TCC) ₁₂	F: TCCAGTCAGCGCGAATAGTC R: AGTAGAGGAGTCCATGGCGT	58.0	141~162	LI等 ^[15]	TAMRA
GR81	(CCT) ₇	F: GGCTCAGTACTCCCAAACCC R: TCGGCTCCTTTATACGACGC	57.0	211~226	LI等 ^[15]	HEX
GR98	(ATCT) ₅	F: TATTCGAGACGCGCATTCGA R: CTCGCATTGAAGCTGTCTGC	58.0	161~173	LI等 ^[15]	FAM
TG19	(CAT) ₇	F: GGACGTCTCAGCAATGTCAA R: GCAAAGAAAAGGATTGCCAC	53.8	100~250	YI等 ^[14]	TAMRA
TG32	(GAA) ₆ GT(AGA) ₆	F: GGCCGTGAGAGTAGCATAGC R: AGGTCCCTCACCATGAGCTT	58.5	100~250	YI等 ^[14]	HEX
TG55	(AAC) ₇	F: AGTCAAGAGCAGAAGGAGCG R: TATTGGTGTGGTGGTGGTG	56.3	100~250	YI等 ^[14]	ROX
TG65	(TTG) ₈	F: GCTTCACTCGGGTTTGTCT R: AGCAGCAGCAGCAATAACAA	55.3	200~300	YI等 ^[14]	TAMRA
TG70	(AAG) ₇	F: AGCCTCCGATGAATCCTCTT R: AACATCTGCTTTTCCATGCC	54.5	200~300	YI等 ^[14]	HEX
TG81	(TGC) ₆ (TTC) ₅	F: AGTTGACGCAGCGCTTTAAT R: GGTTTTGTGGGAGTTTCAA	54.0	180~250	YI等 ^[14]	FAM
TG82	(CAG) ₅ (GAG) ₅	F: AACACCACACCACCTGATGA R: TACCGCTACAGCAACACCTG	57.0	200~300	YI等 ^[14]	ROX
TG88	(TG) ₉	F: GCACAAACATCCATGCAAAC R: AACAAAGGGTCCAGGGAGAGT	55.6	200~300	YI等 ^[14]	TAMRA
TG90	(CTG) ₇ (ATT) ₆	F: CACTAGGGCTTCCTGCACTC R: AGAACAAATATGCCCGTTG	55.7	150~250	YI等 ^[14]	HEX

2.3 遗传分化分析

5个雄性榿树居群各位点的近交系数为-0.923(ZAFU-8)~0.143(GR12), 平均近交系数为-0.227, 绝大多数位点(22个)近交系数为负值, 说明绝大多数位点表现杂合子过剩^[21]。各位点遗传分化系数为0.006(GR81)~0.286(ZAFU-7), 平均遗传分化系数为0.096。由Nei's遗传多样性指数估算的雄性榿树Nei's总基因多样性为0.427。基因流的变化范围较大, 平均基因流为4.172(表4)。AMOVA结果表明: 榿树雄株居群间差异极显著($P<0.01$), 居群内的遗传变异远大于居群间, 居群内占79%, 而居群间则只占

表 2 雄性榧树 SSR 位点遗传信息

Table 2 Genetic information of SSR loci amplified from male <i>T. grandis</i>						
引物编号	平均等位基因	有效等位基因	观测杂合度	期望杂合度	Shannon's 信息指数	多态信息含量
ZAFU-1	2	1.584	0.422	0.370	0.555	0.369
ZAFU-2	6	2.111	0.570	0.529	0.962	0.526
ZAFU-3	2	1.113	0.107	0.102	0.209	0.102
ZAFU-4	7	1.790	0.554	0.443	0.855	0.441
ZAFU-5	3	2.149	0.488	0.537	0.826	0.535
ZAFU-6	2	1.339	0.281	0.254	0.421	0.254
ZAFU-7	2	1.141	0.116	0.124	0.244	0.123
ZAFU-8	3	2.290	1.000	0.566	0.903	0.563
ZAFU-11	2	1.821	0.504	0.453	0.643	0.451
ZAFU-16	6	2.361	0.777	0.579	1.158	0.576
GR12	3	2.396	0.488	0.585	0.967	0.583
GR48	2	1.042	0.041	0.041	0.101	0.041
GR67	5	2.165	0.554	0.540	0.100	0.539
GR81	3	2.721	0.934	0.635	1.044	0.632
GR98	5	3.320	0.760	0.702	1.310	0.699
TG19	3	1.095	0.074	0.088	0.199	0.087
TG32	3	1.086	0.083	0.080	0.186	0.080
TG55	5	3.038	0.703	0.674	1.255	0.671
TG65	2	1.563	0.356	0.362	0.546	0.361
TG70	3	2.394	0.901	0.585	0.945	0.583
TG81	3	1.069	0.066	0.064	0.158	0.064
TG82	3	1.095	0.091	0.088	0.199	0.086
TG88	6	2.842	0.603	0.651	1.205	0.648
TG90	4	2.439	0.546	0.593	1.010	0.590
平均	3.542	1.915	0.459	0.402	0.704	0.400

表 3 雄性榧树居群的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of male populations in male <i>T. grandis</i>								
居群	样本数量/株	平均等位基因数	平均有效等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	Nei's 遗传多样性指数	Shannon's 信息指数	多态位点百分比/%
淳安居群	17	2.292	1.690	0.409	0.342	0.332	0.541	75.00
临安居群	24	2.667	1.857	0.464	0.379	0.371	0.627	79.17
富阳居群	24	2.375	1.822	0.453	0.360	0.352	0.587	75.00
嵊州居群	24	2.792	1.899	0.556	0.441	0.431	0.720	95.83
黄山居群	32	2.417	1.723	0.414	0.346	0.340	0.566	87.50
平均	24.2	2.508	1.798	0.459	0.374	0.365	0.608	82.50

21% (表 5)，表明遗传变异主要集中在居群内。

2.4 居群聚类分析

5 个榧树雄株居群的遗传相似度为 0.865~0.978，平均遗传相似度为 0.932，相似性很高，但也存在着一定的遗传变异。淳安居群与嵊州居群的遗传距离最大 (0.145)，而遗传相似度最小 (0.865)，说明它们的遗传变异最大。临安居群和黄山居群的遗传距离最小 (0.022)，遗传相似度最大 (0.978)，表明两者之间的遗传差异最小 (表 6)。

主坐标分析结果表明：5 个野生榧树居群主要分成 2 大类群，其中第 1 类群包括淳安居群、富阳居群、临安居群、黄山居群，且彼此间混合在一起，难以区分，而嵊州居群单独聚为一类 (图 2)。

表 4 SSR 位点的遗传分化

Table 4 Genetic differentiation of SSR loci in male *T. grandis*

引物编号	Nei's总基因多样性	近交系数	遗传分化系数	基因流	引物编号	Nei's总基因多样性	近交系数	遗传分化系数	基因流
ZAFU-1	0.355	-0.186	0.043	5.616	GR81	0.628	-0.525	0.026	9.520
ZAFU-2	0.526	-0.158	0.068	3.445	GR98	0.687	-0.174	0.058	4.065
ZAFU-3	0.101	-0.165	0.093	2.430	TG19	0.086	-0.011	0.160	1.316
ZAFU-4	0.465	-0.474	0.121	1.820	TG32	0.080	-0.234	0.158	1.336
ZAFU-5	0.635	-0.015	0.084	2.719	TG55	0.670	-0.197	0.114	1.947
ZAFU-6	0.255	-0.145	0.029	8.345	TG65	0.368	0.031	0.009	26.235
ZAFU-7	0.124	-0.313	0.286	0.625	TG70	0.579	-0.818	0.184	1.106
ZAFU-8	0.564	-0.928	0.080	2.882	TG81	0.650	-0.174	0.122	1.793
ZAFU-11	0.460	-0.218	0.083	2.769	TG82	0.089	-0.113	0.062	3.799
ZAFU-16	0.580	-0.425	0.046	5.242	TG88	0.650	-0.045	0.101	2.226
GR12	0.581	0.143	0.082	2.791	TG90	0.549	-0.108	0.155	1.360
GR48	0.031	-0.085	0.064	3.688	平均	0.427	-0.227	0.096	4.172
GR67	0.542	-0.101	0.076	3.048					

表 5 雄性榧树居群的分子方差分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of male populations in male *T. grandis*

变异来源	自由度	平方和	均方	方差分量	变异百分比/%	P
居群间	4	199.526	49.882	1.797	21	<0.01
居群内	116	791.118	6.820	6.820	79	
总计	120	990.645	56.702	8.617	100	

2.5 遗传结构分析

Structure 软件分析结果表明：*K* 为 2~4 (图 3)。供试的所有样品如果分成 2 个群体，则嵊州居群的雄株单独成 1 个群体，其余 4 个居群组合成 1 个群体。如果将所有样品归属于 3 个群体，则嵊州居群和黄山居群分别各自形成 1 个群体，另外 3 个居群形成 1 个群体。如果所有样品归属于 4 个群体，则结果会和聚类的结果一样，临安居群和黄山居群组合成 1 个群体，另 3 个居群则各自形成 1 个群体。结合主坐标分析 (图 2) 的结果，将供试材料分成 2~3 个群体比较合理。当 *K* 为 3 时，ln*P* (*D*) 最大，故将所有个体分成 3 个群体 (图 3)。由群体遗传结构图 (图 4) 可知：每个颜色表示一种遗传组成，同一聚类亚群中相同的遗传组成占据主要成分，即同一颜色所占比率最大的居群聚类为同一亚群。因此 5 个野生榧树居群可以划分为 3 大亚群，淳安居群和富阳居群聚为一类 (红色基因池)，临安居群和黄山居群聚为一类 (绿色基因池)，嵊州居群单独聚为一类 (蓝色基因池)。

3 结论与讨论

本研究表明：尽管 SSR 标记具有物种的特异性，但近缘种的 SSR 引物在同属物种中具有一定的通用性。这也从一个侧面反映了物种的亲缘关系。SSR 标记的开发基于 DNA 序列，利用近缘种的 SSR 引

表 6 5 个雄性榧树居群的遗传距离和遗传相似度

Table 6 Genetic distance and genetic identity among the 5 populations in male *T. grandis*

居群	淳安居群	临安居群	富阳居群	嵊州居群	黄山居群
淳安居群		0.957	0.964	0.865	0.952
临安居群	0.044		0.976	0.895	0.978
富阳居群	0.037	0.024		0.877	0.967
嵊州居群	0.145	0.111	0.132		0.873
黄山居群	0.049	0.022	0.034	0.136	

说明：对角线左下角为遗传距离，右上角为遗传相似度

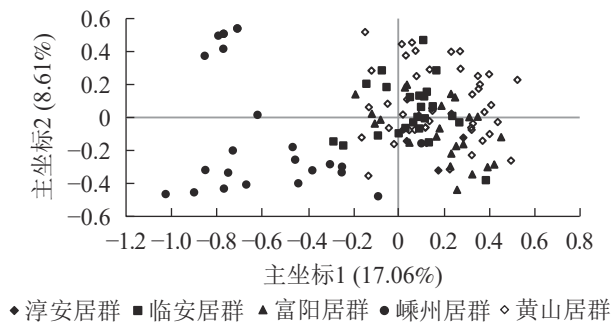


图 2 5 个雄性榧树居群的主坐标分析

Figure 2 PCoA of 5 populations in male *T. grandis*

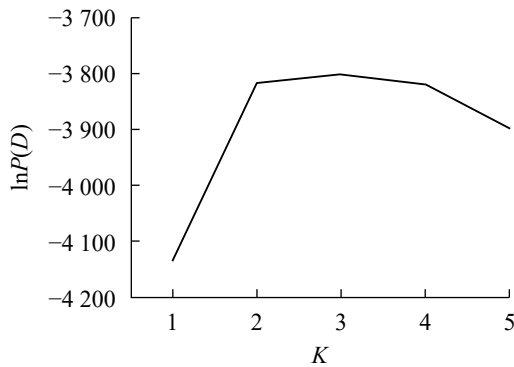


图 3 基于 $\ln P(D)$ 值供试材料的遗传群体划分

Figure 3 Reasonable group number of tested apricot germplasms inferred by $\ln P(D)$

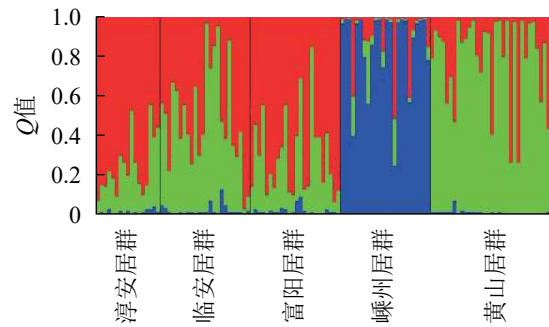


图 4 基于 Structure 分析的 5 个雄性榧树居群的遗传结构图

Figure 4 Genetic structure of 5 male *T. grandis* populations based on structure analysis

物进行目标物种 SSR 引物的筛选不失为一种经济的方法。理论上，同一物种的 SSR 引物在具体的研究中应该都是适用的，但各研究所使用的 PCR 仪在循环过程中升降温不同，会不同程度地影响引物与模板的结合，进而影响扩增结果，因而实验过程需进行引物筛选。本研究专门研究雄性榧树，这有别于雌性榧树。这也可能造成已有的榧树 SSR 引物不适用于雄株的现象。

本研究的 SSR 位点显示：雄性榧树存在多个等位基因的现象(表 1)。除多态信息含量以外，不管是观察杂合度还是期望杂合度，雄性榧树的杂合度都较高，这也体现在 Shannon's 信息指数上。BOSTSEIN 等^[22]认为：Shannon's 信息指数大于 0.5 时表明遗传多样性较高。这与榧树雌雄异株天然杂交产生杂种的特性有关。同样，居群水平观察杂合度、Shannon's 信息指数、多态位点百分比都不低，但观察杂合度要高于期望杂合度。与刘浩凯^[11]利用 SRAP 标记研究雄性榧树居群的结果相比，本研究结果(多态位点百分比、Nei's 遗传多样性指数、Shannon's 信息指数)要高于显性标记的研究结果，可见共显性 SSR 标记要优于显性标记，在茶树 *Camellia sinensis*^[23]、甜菜 *Beta vulgaris*^[24] 中也有类似的结果。

本研究所获得的平均 Shannon's 信息指数为 0.704，均高于同属植物巴山榧 *T. fargesii* 居群 (Shannon's 信息指数为 0.370)^[25] 和长叶榧居群 (Shannon's 信息指数为 0.309)^[26] 以及同科植物南方红豆杉 *Taxus wallichiana* (Shannon's 信息指数 0.376)^[27] 和白豆杉 *Pseudotaxus chienii* (Shannon's 信息指数 0.236)^[28] 研究所得的结果。WRIGHT^[25] 研究认为：遗传分化系数大于 0.25 时，表明群体间有很大的遗传分化。本研究雄性榧树居群的遗传分化程度很小(遗传分化系数为 $0.096 < 0.25$)，说明居群间基因交流较频繁。基因流是影响居群内部和居群间遗传变异程度的重要因素^[27]，其大小反映居群遗传结构的变异，它能防止基因分化。WRIGHT^[25] 认为：基因流 > 1 时说明居群间存在一定的基因流动。本研究 5 个雄性榧树居群间的基因流为 4.172，不仅居群间存在较大的基因流动，且大于 SRAP 标记的分析结果(基因流为 2.192)^[11]，但低于异交、风媒植物基因流的平均水平(5.380)^[29]。这与榧树雌雄异株风媒的特性相符。频繁基因交流导致居群间遗传的均质化，使各居群间遗传相似度较高。这在遗传分化系数上有所体现，与刘浩凯^[11]的研究结果一致，也与 HAMRICK^[29] 研究异交风媒植物的结论相符，即遗传变异主要集中在居群内。因此，选育可基于居群内个体的表现进行，且要注意对优良单株的保护。

从主坐标分析结果及遗传结构来看，嵊州居群均相对单独地聚为一类。嵊州是香榧的主产地，当地不乏上千年的古香榧^[30]，也是榧树古老的原生地，而另 4 个居群则非也。从主坐标分析结果来看：除嵊州居群外，其余居群的个体混杂在一起，这也说明居群间分化较小。

遗传多样性与生物自身的生存和竞争能力息息相关，其丰富程度决定物种对环境的适应能力和进化潜力^[31]。遗传多样性越高，该物种对环境变化的适应能力越强，有利于资源进一步的选择和保存^[32]。本研究表明：雄性榧树的遗传多样性丰富。雄性榧树的多样性为雌性榧树的多样性及榧树物种水平的多样性作出了重要贡献，为优良种质的选择及杂交育种提供了丰富的物质基础，但同时也是造成栽培类型香榧内部分化的原因^[30]，因此，雄性榧树资源值得大力保护与利用。

4 参考文献

- [1] 程晓建, 黎章矩, 喻卫武, 等. 榧树的资源分布与生态习性[J]. 浙江林学院学报, 2007, **24**(4): 383 – 388.
CHENG Xiaojian, LI Zhangju, YU Weiwu, *et al.* The resource distribution and ecological habits of *Torreya grandis* [J]. *J Zhejiang For Coll*, 2007, **24**(4): 383 – 388.
- [2] 易官美, 邱迎君, 李晓花, 等. 榧树的地理分布与资源调查[J]. 安徽农业科学, 2013, **41**(19): 8200 – 8202.
YI Guanmei, QIU Yingjun, LI Xiaohua, *et al.* Geographic distribution and resource status of *Torreya grandis* [J]. *J Anhui Agr Sci*, 2013, **41**(19): 8200 – 8202.
- [3] 詹利云, 刘琰, 曾燕如, 等. 雄性榧树天然居群表型多样性及优株初选[J]. 浙江农林大学学报, 2020, **37**(6): 1120 – 1127.
ZHAN Liyun, LIU Lian, ZENG Yanru, *et al.* Phenotypic diversity of male cones and the selection of superior plants among male populations in *Torreya grandis* [J]. *J Zhejiang A&F Univ*, 2020, **37**(6): 1120 – 1127.
- [4] 王国霞, 曹福亮, 方炎明. 古银杏雄株的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 北京林业大学学报, 2010, **32**(2): 39 – 45.
WANG Guoxia, CAO Fuliang, FANG Yanming. Genetic diversity of ancient male ginkgo trees by ISSR analysis [J]. *J Beijing For Univ*, 2010, **32**(2): 39 – 45.
- [5] ZHOU Yanqing, ZHOU Chune, YAO Huanlin, *et al.* Application of ISSR markers in detection of genetic variation among Chinese yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) cultivars [J]. *Life Sci J*, 2008, **5**(4): 6 – 12.
- [6] 刘列钊, 林呐. 油菜简单重复序列 SSR(simple sequence repeat) 研究进展[J]. 生命科学, 2004, **16**(3): 173 – 176.
LIU Liezhao, LIN Na. Research advance of SSR (simple sequence repeat) in canola [J]. *Chin Bull Life Sci*, 2004, **16**(3): 173 – 176.
- [7] 刘会, 彭春钰, 武忠亮, 等. 植物 SSR 标记开发及应用研究进展[J]. 科学技术创新, 2018(36): 18 – 20.
LIU Hui, PENG Chunyu, WU Zhongliang, *et al.* Development and application of plant SSR markers [J]. *Sci Technol Innovation*, 2018(36): 18 – 20.
- [8] 郭瑞星, 刘小红, 荣廷昭, 等. 植物 SSR 标记的发展及其在遗传育种中的应用[J]. 玉米科学, 2005, **13**(2): 8 – 11.
GUO Ruixing, LIU Xiaohong, RONG Tingzhao, *et al.* Development of SSR marker and its application in plant genetics and breeding [J]. *J Maize Sci*, 2005, **13**(2): 8 – 11.
- [9] 闵会, 程诗明, 康志雄, 等. 香榧天然群体遗传多样性的 AFLP 分析[J]. 林业科学研究, 2009, **22**(3): 367 – 372.
MIN Hui, CHENG Shiming, KANG Zhixiong, *et al.* Genetic diversity of different *Torreya grandis* populations by AFLP [J]. *For Res*, 2009, **22**(3): 367 – 372.
- [10] 吴昊, 喻卫武, 吴慧敏, 等. 基于种子性状及分子标记分析确定榧树核心种质[J]. 分子植物育种, 2019, **17**(16): 5513 – 5520.
WU Hao, YU Weiwu, WU Huimin, *et al.* Determination of core germplasm in *Torreya grandis* Fort. ex Lindl. based on seed traits and molecular markers [J]. *Mol Plant Breed*, 2019, **17**(16): 5513 – 5520.
- [11] 刘浩凯. 榧树遗传多样性的 SRAP 标记分析[D]. 杭州: 浙江农林大学, 2014.
LIU Haokai. *SRAP Marker-based Analysis of the Genetic Diversity in Torreya grandis* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2014.
- [12] NAGOKA T, OGIHARA Y. Application of inter-simple sequence repeat polymorphism in wheat for use of DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, **94**: 597 – 602.
- [13] ZENG Jun, CHEN Jie, KOU Yixuan, *et al.* Application of EST-SSR markers developed from the transcriptome of *Torreya grandis* (Taxaceae), a threatened nut-yielding conifer tree[J/OL]. *Peer J*, 2018, **6**(3): e5606[2021-02-18]. doi: [10.7717/peerj.5606](https://doi.org/10.7717/peerj.5606).
- [14] YI Guanmei, ZHAO Tingting, YIN Zhinang, *et al.* Mining and characterizing EST-SSR markers from ESTs of *Torreya grandis* [J]. *Biochem Syst Ecol*, 2016, **65**: 124 – 128.
- [15] LI Jianhui, JIAO Jing, JIANG Kai, *et al.* Development and characterize of microsatellites in *Torreya jackii* (Taxaceae), an endangered species in China [J]. *Am J Bot*, 2011, **98**(12): 349 – 351.
- [16] 张敏, 周彩红, 陈焘, 等. 榧树转录组 SSR 信息分析及其分子标记开发[J]. 果树学报, 2017, **34**(10): 1258 – 1265.
ZHANG Min, ZHOU Caihong, CHEN Tao, *et al.* Analysis of SSR information in transcriptome and development of molecular markers in *Torreya grandis* [J]. *J Fruit Sci*, 2017, **34**(10): 1258 – 1265.

- [17] 王大玮, 李煜, 周玮, 等. 杜仲 AFLP 反应体系的建立及优化[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2010, **38**(6): 88–94.
WANG Dawei, LI Yu, ZHOU Wei, *et al.* Establishment and optimization of AFLP reaction system in *Eucommia ulmoides* Oliv. [J]. *J Northwest A&F Univ Nat Sci Ed*, 2010, **38**(6): 88–94.
- [18] EXCOFFIER L, SMOUSE P E, QUATTRO J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: applications to human mitochondrial DNA restriction data [J]. *Genetics*, 1992, **131**(2): 479–491.
- [19] HUANG Hong, LU Jiang, REN Zhongbo. *et al.* Mining and validating grape(*Vitis* L.) ESTs to develop EST-SSR markers for genotyping and mapping [J]. *Mol Breed*, 2011, **28**(2): 241–254.
- [20] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, **14** (8): 2611–2620.
- [21] 王玲, 左示敏, 张亚芳, 等. 中国南方八省(自治区)水稻纹枯病菌群体遗传结构的 SSR 分析[J]. *中国农业科学*, 2015, **48**(13): 2538–2548.
WANG Ling, ZUO Shimin, ZHANG Yafang, *et al.* SSR analysis of population genetic structure of rice sheath blight causing agent *Rhizoctonia solani* AG1-IA collected from eight provinces (autonomous region) in southern China [J]. *Sci Agric Sin*, 2015, **48**(13): 2538–2548.
- [22] BOSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, *et al.* Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment polymorphisms [J]. *Am J Hum Genet*, 1980, **32**: 314–331.
- [23] 刘振, 赵洋, 杨培迪, 等. SSR、SRAP、ISSR 分子标记在茶树品种亲本鉴定上的比较分析[J]. *茶叶科学*, 2014, **34**(6): 617–624.
LIU Zhen, ZHAO Yang, YANG Peidi, *et al.* Comparison of parents identification for tea variety based on SSR, SRAP and ISSR markers [J]. *J Tea Sci*, 2014, **34**(6): 617–624.
- [24] 王华忠, 吴则东, 王晓武, 等. 利用 SRAP 与 SSR 标记分析不同类型甜菜的遗传多样性[J]. *作物学报*, 2008, **34**(1): 37–46.
WANG Huazhong, WU Zedong, WANG Xiaowu, *et al.* Analysis of the genetic diversity in different types of sugar beets by SRAP and SSR markers [J]. *Acta Agron Sin*, 2008, **34**(1): 37–46.
- [25] WRIGHT S. The genetical structure of populations [J]. *Ann Eugenics*, 1951, **15**(4): 323–354.
- [26] 易官美, 邱迎君. 榿树居群遗传多样性的 cpSSR 分析[J]. *果树学报*, 2014, **31**(4): 583–588.
YI Guanmei, QIU Yingjun. Genetic diversity of *Torreya grandis* populations as revealed by chloroplast microsatellite markers [J]. *J Fruit Sci*, 2014, **31**(4): 583–588.
- [27] SLATKIN M. Gene flow and the geographic structure of natural populations [J]. *Science*, 1987, **236**(4803): 787–792.
- [28] 高源, 王昆, 王大江, 等. 7 个来源地区山荆子的遗传多样性与群体结构分析[J]. *中国农业科学*, 2018, **51**(19): 3766–3777.
GAO Yuan, WANG Kun, WANG Dajiang, *et al.* The genetic diversity and population structure analysis on *Malus baccata* (L.) Borkh from 7 sources [J]. *Sci Agric Sin*, 2018, **51**(19): 3766–3777.
- [29] HAMRICK J L. Gene flow and distribution of genetic variation in plant populations[C]//URBANSKA K. *Differentiation Patterns in Higher Plants*. New York: Academic Press, 1987: 53–67.
- [30] 何明, 董雷鸣, 刘浩凯, 等. 香榿古树的遗传差异性[J]. *浙江林业科技*, 2014, **34**(6): 1–5.
HE Ming, DONG Leiming, LIU Haokai, *et al.* Genetic differences in ancient *Torreya grandis* cv. *Merrillii* trees [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 2014, **34**(6): 1–5.
- [31] 刘萍, 马宏伟, 王掌军. 我国药用植物种质资源遗传多样性及其研究进展[J]. *农业科学研究*, 2008, **29**(3): 66–70.
LIU Ping, MA Hongwei, WANG Zhangjun. Research progress on genetic diversity of germplasm resources of medicinal plants in China [J]. *J Agric Sci*, 2008, **29**(3): 66–70.
- [32] 葛淑俊, 孟义江, 李广敏, 等. 我国药用植物遗传多样性研究进展[J]. *中草药*, 2006(10): 1584–1589.
GE Shujun, MENG Yijiang, LI Guangmin, *et al.* Research progress on genetic diversity in Chinese medicinal plants [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2006(10): 1584–1589.