

雌性榧树种实性状和 SSR 标记的遗传变异

李柯豫¹, 陈荣¹, 刘琏¹, 蔡晓郡², 姜郑楚¹, 谢前丹¹, 俞晨良¹, 喻卫武¹

(1. 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; 2. 浙江省杭州市富阳区农业农村局, 浙江 杭州 311499)

摘要: 【目的】探究不同种群雌性榧树 *Torreya grandis* 种实性状, 基于简单重复序列标记 (SSR) 引物对榧树的种群遗传变异进行分析, 比较榧树种群间、种群内种实表型、品质及遗传多样性的差异。【方法】以浙江富阳、嵊州、临安、建德及安徽黄山种群雌性榧树为材料, 通过方差分析、主成分分析对榧树叶片及种实表型进行比较; 以浙江富阳、嵊州、临安、淳安及安徽黄山种群雌性榧树为材料, 通过 SSR 分子标记对榧树遗传多样性进行比较。【结果】榧树种实分析发现: 叶质量、叶形指数、种实质量、种形指数、种核质量、核形指数、假种皮厚、种壳厚等 8 个指标在种群间和种群内个体差异极显著 ($P < 0.01$); 脂肪相对含量及可溶性糖质量分数在种群间差异极显著 ($P < 0.01$), 脂肪相对含量为 29.36%~42.35%, 榧树种实外观和种仁品质变异丰富。SSR 引物分析发现: 榧树种群的 Nei's 遗传多样性指数 (H) 均值为 0.400, Shannon's 信息指数 (I) 均值为 0.650, 多态性信息含量 (P_{IC}) 均值为 0.400。淳安种群的遗传多样性 ($H=0.410$, $I=0.658$) 最高, 嵊州种群 ($H=0.369$, $I=0.565$) 最低。92% 总遗传变异存在于种群内。【结论】榧树种实的表型、品质在种群间和种群内存在遗传变异, 淳安种群遗传多样性最高, 且种群内遗传变异大于种群间。图 2 表 11 参 26

关键词: 榧树; 不饱和脂肪酸; 可溶性糖; SSR 标记; 遗传变异

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2024)00-0001-09

Genetic variation of seed traits and SSR markers in femal *Torreya grandis*

LI Keyu¹, CHEN Rong¹, LIU Lian¹, CAI Xiaojun², JIANG Zhengchu¹, XIE Qiandan¹, YU Chenliang¹, YU Weiwu¹

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

2. Fuyang Agriculture and Rural Bureau of Hangzhou City, Hangzhou 311499, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study is to investigate the seed traits of female *Torreya grandis*, analyze the genetic variation of the population based on SSR primers, and compare the differences in seed phenotype, quality, and genetic diversity between and within populations of *T. grandis*. [Method] Female *T. grandis* from Fuyang, Shengzhou, Lin'an, Jiande in Zhejiang Province and Mount Huangshan in Anhui Province were used as materials to compare the phenotypic traits of *T. grandis* leaves and seeds through variance analysis and principal component analysis. The genetic diversity of *T. grandis* was compared by SSR molecular markers using female *T. grandis* from Fuyang, Shengzhou, Lin'an, Chun'an and Mount Huangshan as raw materials. [Result] Analysis of seed traits revealed that there were significant individual differences ($P < 0.01$) in 8 indicators: leaf quality, leaf shape index, seed mass, seed shape index, seed weight, kernel shape index, seed coat thickness, and shell thickness between and within populations. The relative fat content and soluble sugar content also showed extremely significant differences among populations ($P < 0.01$), with fat content ranging from 29.36% to 42.35%, indicating rich variation in *T. grandis* seed appearance and kernel quality. SSR primer

收稿日期: 2024-03-22; 修回日期: 2024-05-14

基金项目: 浙江省果品育种重大专项 (2021C02066-11)

作者简介: 李柯豫 (ORCID: 0009-0000-2764-0007), 从事经济林培育研究。E-mail: 1554106281@qq.com。通信作者: 喻卫武 (ORCID: 0000-0003-4246-4287), 高级实验师, 从事经济林栽培与产品分析研究。E-mail: yww888@zafu.edu.cn

analysis showed that the mean Nei's genetic diversity index (H) was 0.400, the mean Shannon's information index (I) was 0.650, and the mean polymorphic information content (P_{IC}) was 0.400. Chun'an population exhibited the highest genetic diversity ($H=0.410$, $I=0.658$), while Shengzhou population showed the lowest ($H=0.369$, $I=0.565$). 92% of the total genetic variation existed within the population. [Conclusion] There are genetic variations in the phenotype and quality of *T. grandis* between and within populations. The genetic diversity of Chun'an population is the highest, and the genetic variation within the population is greater than that between populations. [Ch, 2 fig. 11 tab. 26 ref.]

Key words: *Torreya grandis*; unsaturated fatty acids; soluble sugar; SSR markers; genetic variation

榿树 *Torreya grandis* 四季常绿, 是红豆杉科 Taxaceae 植物中少有的集果用、油用、药用、材用、观赏于一体的植物, 雌雄异株, 生命周期可达上千年。榿树种子含油量高, 主要含油酸和亚油酸, 不饱和脂肪酸含量远超饱和脂肪酸^[1]。饱和脂肪酸中主要是山俞酸和棕榈酸^[2]。榿树自然分布于浙江、安徽南部、福建北部、江西东北部, 零星分布于贵州松桃、江苏南部、湖南西南部等地, 其中以浙江最多, 近年来人类活动的干扰加剧了榿树资源的破坏, 威胁到部分种群的生存^[3-4]。

遗传多样性是生物多样性的重要组成部分。一个物种的稳定性和进化潜力依赖其遗传多样性, 物种的经济和生态价值依赖其特有的基因组成。因此, 保护生物多样性的最终目标就是保护遗传多样性^[5-7]。DNA 分子标记的数量极多, 多态性高, 受限制少, 检测方法简单易掌握, 结果稳定可靠, 已被广泛应用于植物多样性研究^[8-9]。简单重复序列标记 (SSR) 技术是以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术, 其特点是标记在整个基因组 DNA 中随机分布, 多态性较高, 操作简单, 可通过 PCR 直接扩增来检测, 重复性好, 成本低^[10]。

香榿 *T. grandis* 'Merrillii' 是榿树优良的变异类型, 具有较高的经济价值^[11]。自然环境中榿树结种迟, 一般作为香榿嫁接的砧木, 因其雄株不结种而被大量砍伐, 遗传多样性受到影响, 但其生物学特性又使得榿树产生丰富的变异类型, 形成了物种生存与进化的基础, 也为资源的开发利用提供了可供选择的物质基础^[12]。因此, 本研究利用多重比较、方差分析等对不同种群雌性榿树叶片、种实表型、种实营养成分及遗传多样性指标的变异进行分析, 以为榿树的利用提供理论依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

基于天然榿树的分布情况以及前人的研究成果^[13], 于 2019 年 10—11 月榿树种实成熟期, 从浙江省杭州市富阳区洞桥村 (富阳)、杭州市临安区洪岭村 (临安)、杭州市建德市大库村 (建德)、绍兴市嵊州市榆树村 (嵊州) 及安徽省黄山市呈坎村 (黄山) 5 个海拔在 250~600 m 的雌性榿树种群中, 分别采集叶片和种实用于表型及种实营养成分的探究。基于詹利云等^[14]的研究, 选择富阳、临安、嵊州、黄山以及杭州市淳安县半夏村 (淳安) 的雌性榿树种群, 分别采集叶片对榿树种群遗传多样性进行研究。样株间距大于 50 m, 生长状况良好。每株采集相同位置的新鲜叶片, 采集至少 100 颗自然脱落的成熟种实, 样品装入带有硅胶的塑封袋中, 并利用全球卫星定位系统 (GPS) 定位采样点。叶片测量表型后置于 -40 °C 冰箱保存, 种实测完表型后置于阴凉通风处, 等待假种皮自然开裂, 用于后续研究。

1.2 表型测定

从各单株选取 2 个小枝相同部位的叶片共 20 片, 用卡尺测量叶长、叶宽, 并计算叶形指数 (叶宽/叶长), 用天平称取单片叶的质量。从各单株随机选取 30 颗种实, 用卡尺测量单颗种实和种核的横径、纵径、假种皮厚、种壳厚, 并计算种形指数 (种实横径/种实纵径)、核形指数 (种核横径/种核纵径), 用天平称取单颗种实质量和种核质量。

1.3 营养成分测定

脂肪相对含量参照 GB/T 14772—2008《食品中粗脂肪的测定》索氏抽提法测定。脂肪酸组成参照 GB/T 17376—2008《食品脂肪酸含量的测定》测定。可溶性糖质量分数参照蒽酮比色法^[15]测定。

1.4 DNA 提取及 SSR 标记分析

采用改良的 CTAB 法^[16]提取雌性榧树叶片的 DNA。参照郑刘辉等^[17]的 SSR 反应体系，合成引物序列，进行 PCR 扩增。

1.5 数据分析

采用 SPSS 23.0 进行数据统计、方差分析、多重比较、主成分分析；用 Genemarker 软件准确读取 SSR 位点信息。用 Popgene 1.32 计算平均等位基因数、观察杂合度、多态信息含量等遗传多样性指标。使用 Structure 2.3.4 分析种群的遗传结构，并绘制遗传结构图，用 Q 值表示一种遗传组成的比率，即同一颜色所占比率最大的种群聚类为同一亚群。通过 NTSYS2.10e 计算 Nei's 遗传相似矩阵，使用非加权组平均聚类分析法 (UPGMA) 分析样品的亲缘关系，并进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 叶与种实性状的变异研究

从表 1 可见：在叶质量和叶形指数上，临安种群的变异系数最大。在种实质量上，嵊州种群的变异系数最大。种形指数和种核质量富阳种群的变异系数最大。核形指数的变异系数在富阳种群中最大，但仅为 10.2%。种壳厚和假种皮厚的变异系数在嵊州种群中最大。方差分析 (表 2) 表明：叶质量、叶形指数、种实质量、种形指数、种核质量、核形指数、假种皮厚、种壳厚 8 个指标在种群间和种群内个体间差异极显著 ($P < 0.01$)。

表 1 雌性榧树种群叶片与种实表型

Table 1 Leaf and seed phenotypes of female quince populations in *T. grandis*

种群	叶质量		叶形指数		种实质量		种形指数		假种皮厚		种核质量		核形指数		种壳厚	
	数值/g	CV/%	数值	CV/%	数值/g	CV/%	数值	CV/%	数值/mm	CV/%	数值/g	CV/%	数值	CV/%	数值/mm	CV/%
富阳	0.02±0.01	31.1	0.15±0.02	10.8	10.70±2.42	22.6	0.78±0.07	9.0	3.53±0.36	10.2	4.77±1.27	26.5	0.66±0.07	10.2	0.54±0.11	19.7
嵊州	0.02±0.01	29.9	0.16±0.02	11.2	11.85±3.36	28.3	0.79±0.05	6.5	3.67±0.78	21.3	4.92±1.18	23.9	0.68±0.06	8.9	0.72±0.25	34.6
黄山	0.02±0.01	19.2	0.16±0.02	11.6	9.50±2.27	22.9	0.81±0.07	5.5	2.94±0.53	17.8	4.51±0.93	19.0	0.71±0.07	5.8	0.91±0.17	21.1
临安	0.02±0.01	33.9	0.16±0.02	15.3	9.50±2.27	23.9	0.81±0.07	8.2	2.94±0.53	18.1	4.51±0.93	20.6	0.71±0.07	9.5	0.91±0.17	19.1
建德	0.02±0.01	33.8	0.17±0.02	9.5	11.19±2.41	21.5	0.83±0.05	6.1	3.63±0.46	12.8	4.58±0.97	21.1	0.70±0.05	7.8	0.85±0.13	14.7

说明：数值为均值±标准差；CV为变异系数。

表 2 榧树叶片与种实表型的方差分析

Table 2 Variance analysis of phenotypic parameters of the leaf and seeds in *T. grandis*

指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F	指标	变异来源	平方和	自由度	均方	F
叶质量	种群间	0.220	4	0.005	121.000	种核质量	种群间	358.014	4	89.503	112.981
	个体间	0.028	29	0.001	21.158		个体间	355.326	29	12.253	15.467
叶形指数	种群间	0.181	4	0.045	50.937	核形指数	种群间	0.600	4	0.150	64.909
	个体间	0.252	29	0.009	9.779		个体间	1.256	29	0.043	18.755
种实质量	种群间	2 530.950	4	632.737	191.245	假种皮厚	种群间	796.646	4	199.162	91.175
	个体间	1 612.471	29	55.602	16.806		个体间	484.026	29	16.691	7.641
种形指数	种群间	0.408	4	0.102	46.454	种壳厚	种群间	16.018	4	4.005	116.324
	个体间	1.194	29	0.041	18.764		个体间	10.813	29	0.373	10.831

说明：所有指标 $P=0.000$ 。

2.2 种仁营养成分分析

2.2.1 脂肪相对含量和组成 由表 3 可见：5 个种群的脂肪相对含量从大到小依次为嵊州、黄山、临安、建德、富阳，变异系数为 7.70%~21.60%。多重分析发现：各种群间脂肪相对含量差异显著 ($P < 0.05$)。

榧树种子脂肪酸组成(表4)分析发现: 不饱和脂肪酸的相对含量远远高于饱和脂肪酸, 且前者是后者的2倍多; 脂肪酸中亚油酸的相对含量最高, 其次是油酸、金松酸、棕榈酸, 亚麻酸相对含量最低。可见, 榧树种子中主要的不饱和脂肪酸是亚油酸和油酸。5个种群间的脂肪酸组成存在不同程度的变异, 其中多不饱和脂肪酸相对含量最高的是临安种群, 随后依次是嵊州、建德、黄山、富阳种群; 单不饱和脂肪酸相对平均含量富阳种群最高, 为 $29.20\% \pm 6.30\%$, 建德种群最低, 为 $24.10\% \pm 2.59\%$; 变异系数不饱和脂肪酸远小于饱和脂肪酸。从脂肪酸种类上看, 变异系数最大的为花生一烯酸($13.00\% \sim 40.00\%$), 其次是硬脂酸($18.00\% \sim 38.00\%$)、花生二烯酸($15.00\% \sim 27.00\%$)。

表4 5个榧树种群脂肪酸组成的变异

Table 4 Variation in fatty acid composition among 5 *T. grandis* populations

种群	棕榈酸/%		硬脂酸/%		油酸/%		亚油酸/%		亚麻酸/%		花生一烯酸/%	
	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV
富阳	10.70±2.59	24	2.97±1.14	38	28.29±6.06	21	41.82±8.01	19	0.52±0.17	32	0.91±0.37	40
嵊州	8.52±1.22	14	2.18±0.47	21	23.78±4.26	18	47.85±2.88	6	0.50±0.06	12	0.67±0.09	14
黄山	8.06±0.98	12	2.97±0.54	18	26.21±2.87	11	46.81±2.35	5	0.47±0.05	11	0.65±0.08	13
临安	8.47±0.88	10	2.15±0.46	22	23.63±2.4	11	49.00±2.45	5	0.57±0.0	14	0.59±0.09	16
建德	9.58±1.83	19	2.80±0.92	33	23.47±2.63	11	46.49±3.67	8	0.48±0.07	14	0.67±0.1	15

种群	花生二烯酸/%		金松酸/%		饱和脂肪酸/%		不饱和脂肪酸/%		单不饱和脂肪酸/%		多不饱和脂肪酸/%	
	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV	相对含量	CV
富阳	2.42±0.63	26	10.76±2.14	20	13.68±3.45	25	84.71±4.39	5	29.20±6.34	22	55.52±10.16	18
嵊州	2.80±0.75	27	12.61±2.02	16	10.70±1.32	12	88.22±2.04	2	24.45±4.30	18	63.77±4.36	7
黄山	2.64±0.41	15	11.11±1.25	11	11.03±0.88	8	87.89±0.97	1	26.86±2.89	11	61.03±2.97	5
临安	2.60±0.53	20	12.00±0.98	8	10.63±1.06	10	88.39±1.14	1	24.22±2.52	10	64.18±2.92	5
建德	2.49±0.40	16	11.98±1.56	13	12.38±2.16	17	85.58±2.95	3	24.14±2.59	11	61.44±4.63	8

说明: 数值为均值±标准差。CV为变异系数。

2.2.2 可溶性糖 从表5可见: 平均可溶性糖质量分数建德种群最高, 为 $(50.49 \pm 9.26) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 随后依次是黄山、嵊州、临安种群, 富阳种群最低, 为 $(40.23 \pm 4.80) \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。不同种群的变异系数为 $8.80\% \sim 19.30\%$ 。多重比较发现: 嵊州、黄山种群间无显著差异, 但与其他种群间差异显著($P < 0.05$)。

2.2.3 主成分分析 20个指标通过主成分分析提取出6个指标, 发现特征值均大于1.000的前6个主成分累计贡献率为75.38%, 可以全面反映各个指标的信息(表6)。第1主成分贡献率为30.76%, 特征值较高的为亚油酸、饱和脂肪酸、不饱和脂肪酸;

第2主成分贡献率为13.09%, 特征值较高的为种实质量、种核质量; 第3主成分贡献率为10.92%, 其大小主要由核形指数、种形指数决定; 第4主成分贡献率为7.98%, 特征值较高的为叶形指数、叶片质量、种皮厚度; 第5主成分贡献率为6.93%, 特征值较高的为叶片质量、种形指数、叶形指数; 第6主

表3 5个榧树种群种仁的脂肪相对含量

Table 3 Lipid content of the kernel among 5 *T. grandis* populations

种群	脂肪相对含量/%			CV/%
	最大值	最小值	平均值±标准差	
富阳	47.79	18.25	29.36±6.34 d	21.6
嵊州	48.14	30.62	42.35±3.77 a	8.9
黄山	46.81	33.61	40.93±3.19 ab	7.8
临安	44.90	32.19	39.82±3.07 b	7.7
建德	40.52	16.19	33.96±4.66 c	13.7

说明: 不同字母表示不同种群间差异显著($P < 0.05$); CV为变异系数。

其次为硬脂酸($18.00\% \sim 38.00\%$)、花生二烯酸($15.00\% \sim 27.00\%$)。

表5 5个榧树种群种仁的可溶性糖质量分数

Table 5 Soluble sugar content of the kernel among 5 *T. grandis* populations

种群	可溶性糖质量分数/($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)			
	最大值	最小值	平均值±标准差	CV/%
富阳	47.91	32.10	40.23±4.80 c	11.90
嵊州	65.56	29.35	45.35±8.77 b	19.30
黄山	60.02	31.80	44.38±7.56 b	17.00
临安	54.34	37.24	47.75±4.18 ab	8.80
建德	68.68	34.36	50.49±9.26 a	18.30

说明: 不同字母表示不同种群间差异显示($P < 0.05$); CV为变异系数。

表 6 5 个榿树种群叶片和种实表型、品质的主成分分析

Table 6 Principal components of leaf and plant phenotypes among 5 *T. grandis* populations

指标	主成分						指标	主成分					
	1	2	3	4	5	6		1	2	3	4	5	6
种实质量	0.074	0.856	-0.082	0.387	-0.007	0.263	硬脂酸	0.724	-0.236	-0.217	0.248	0.062	-0.061
种核质量	0.116	0.819	0.091	0.132	-0.187	0.305	油酸	0.731	-0.431	-0.251	0.157	0.132	0.269
种形指数	0.010	-0.131	0.741	0.370	0.466	-0.085	亚油酸	-0.946	0.142	0.046	-0.106	-0.011	0.009
核形指数	-0.099	-0.097	0.834	0.194	0.370	0.003	亚麻酸	0.239	-0.047	0.295	-0.204	-0.314	0.120
种皮厚度	0.105	0.498	-0.321	0.529	0.259	0.054	花生一烯酸	0.804	-0.046	0.027	-0.047	0.076	-0.017
种壳厚度	-0.367	-0.243	0.340	0.082	-0.333	0.327	花生二烯酸	-0.372	0.114	-0.178	0.152	0.369	-0.310
叶片质量	0.202	0.289	0.049	-0.533	0.496	0.190	金松酸	-0.649	0.424	0.186	-0.152	-0.176	-0.397
叶形指数	-0.116	-0.179	0.056	0.614	-0.416	-0.391	饱和脂肪酸	0.943	0.093	0.160	0.000	-0.124	-0.106
含油率	-0.459	-0.485	-0.195	0.319	0.018	0.426	不饱和脂肪酸	-0.927	-0.113	-0.194	-0.025	0.131	0.114
可溶性糖	-0.199	0.010	0.497	0.044	-0.207	0.330	特征值	6.153	2.618	2.184	1.595	1.387	1.138
棕榈酸	0.843	0.221	0.296	-0.111	-0.181	-0.105	累计贡献率/%	30.76	43.85	54.77	62.75	69.68	75.38

成分贡献率为 5.70%，其大小主要由含油率、金松酸、叶形指数决定。

2.3 雌性榿树 SSR 标记分析

2.3.1 SSR 位点分析 13 对引物在 146 个雌性榿树中共获得 37 个等位基因，每对引物可扩增 2~5 个等位基因，平均每对引物扩增出 2.85 个等位基因，TG55 平均等位基因数最多，ZAFU-3 和 TG19 最少；每对引物的平均有效等位基因数为 1.899 个；平均观测杂合度 (0.429) 略高于平均期望杂合度 (0.404)；Nei's 遗传多样性指数平均为 0.400，其中 GR98 (0.688) 最高，TG19 (0.015) 最低；Shannon's 指数为 0.039~1.252，有 11 对引物的 Shannon's 信息指数高于 0.500，其中 GR98 (1.252) 最高，TG19 (0.039) 最低，平均为 0.650，说明榿树遗传多样性丰富 (表 7)。

表 7 榿树 13 个 SSR 位点的遗传参数

Table 7 Genetic parameters of 13 SSR loci in *T. grandis*

引物 编号	平均等位 基因数/个	有效等位 基因数/个	观测 杂合度	期望 杂合度	Nei's遗传 多样性指数	Shannon's 指数	引物 编号	平均等位 基因数/个	有效等位 基因数/个	观测 杂合度	期望 杂合度	Nei's遗传 多样性指数	Shannon's 指数
ZAFU-1	3.750	1.604	0.225	0.366	0.362	0.661	GR98	4.375	3.230	0.697	0.695	0.688	1.252
ZAFU-3	1.625	1.120	0.030	0.091	0.090	0.164	TG19	1.625	1.016	0.000	0.015	0.015	0.039
ZAFU-5	2.500	2.004	0.550	0.506	0.501	0.709	TG55	5.375	2.706	0.584	0.622	0.616	1.112
ZAFU-6	2.000	1.495	0.289	0.329	0.325	0.504	TG70	2.500	1.986	0.912	0.502	0.496	0.698
ZAFU-8	2.000	2.000	0.997	0.505	0.500	0.693	TG81	2.000	1.014	0.000	0.014	0.014	0.041
ZAFU-11	2.625	1.961	0.462	0.491	0.486	0.713	TG88	3.750	2.453	0.492	0.593	0.587	1.022
GR12	3.000	2.095	0.341	0.525	0.519	0.839	平均	2.856	1.899	0.429	0.404	0.400	0.650

2.3.2 种群遗传多样性分析 在种群水平上，Nei's 遗传多样性指数 (H) 与 Shannon's 指数 (I) 在 5 个雌性种群间的变化趋势相似。Nei's 遗传多样性指数平均为 0.390，从大到小依次为淳安、临安、黄山、富阳、嵊州；Shannon's 指数平均为 0.621，从大到小依次为淳安、临安、富阳、黄山、嵊州；多态位点百分比平均为 81.54%，其中富阳、黄山、嵊州 3 个种群的多态位点百分比相等，临安和淳安种群相等。淳安 ($H=0.410$, $I=0.658$) 的遗传多样性最高，嵊州 ($H=0.369$, $I=0.565$) 的遗传多样性最低 (表 8)。

在物种水平上，5 个种群榿树的平均等位基因数为 3.231 个，平均有效等位基因数为 1.925 个，期望杂合度 (0.406) 略小于观测杂合度 (0.429)，Nei's 遗传多样性指数为 0.405，Shannon's 指数为 0.671，多态位点百分比为 92.31% (表 8)。各种群在种群水平上的多态位点百分比及 Shannon's 指数均低于物种水平，仅淳安种群在种群水平上的 Nei's 遗传多样性指数高于物种水平。

表8 5个榧树亲本种群的遗传多样性

Table 8 Genetic diversity among 5 *T. grandis* populations

种群	平均等位基因数/个	有效等位基因数/个	观测杂合度	期望杂合度	Nei's遗传多样性指数	Shannon's指数	多态位点百分比/%
富阳	2.692	1.848	0.431	0.387	0.381	0.625	84.62
嵊州	2.154	1.791	0.377	0.376	0.369	0.565	84.62
黄山	2.231	1.811	0.451	0.399	0.392	0.611	84.62
临安	2.462	1.917	0.464	0.406	0.399	0.648	76.92
淳安	2.462	1.954	0.423	0.418	0.410	0.658	76.92
种群水平	2.400	1.864	0.429	0.397	0.390	0.621	81.54
物种水平	3.231	1.925	0.429	0.406	0.405	0.671	92.31

说明：种群水平指5个种群平均值；物种水平指5个种群中所有物种平均值。

2.3.3 遗传分化与遗传结构 5个雌性榧树种群间的总遗传多样性平均为0.497；群体内近交系数均为负值，说明群体内杂合子过剩，纯合子缺失^[18]，这与榧树雌雄异株的特性相吻合，且这些供试雌株都是杂交后代；种群的近交系数变幅为0.054~0.207，平均为0.129；遗传分化指数变幅为0.153~0.218，平均为0.199，表明5个雌性榧树种群间存在的遗传分化程度不大，这与榧树风媒、花粉流动性大的特性相吻合；基因流的变幅为0.898~1.381，平均为1.029，表明种群间存在基因交流，每代交流约1个基因，基因流动相对来说不是很频繁(表9)。

方差分析结果(表10)表明：榧树的遗传变异集中在种群内，种群内(92%)的遗传变异远大于种群间(8%)。

对亚群归属分析发现：每个种群的样本基本上都有3个亚群的痕迹，只是比例不同而已(图1)。这说明榧树天然杂交导致高度杂合的特性。

2.3.4 种群间的遗传距离和遗传相似度 5个榧树

种群的遗传相似系数平均为0.969，说明各种群间的遗传相似度很高，亲缘关系较近，存在一定程度的遗传变异(表11)。遗传距离平均为0.032，黄山与淳安种群的遗传距离最大(0.055)，遗传相似度最小(0.946)，富阳与黄山、临安种群的遗传距离最小(0.022)，遗传相似度最大(0.977)。表明雌性榧树群体遗传相似度高，但因雌雄异株天然杂交的特性，使物种内又存在一定的变异。

UPGMA聚类分析发现：富阳与黄山种群相聚之后再与嵊州种群聚在一起，随后上述3个种群与临安种群聚在一起，富阳、黄山、嵊州、临安4个种群与淳安种群之间存在差异(图2)。

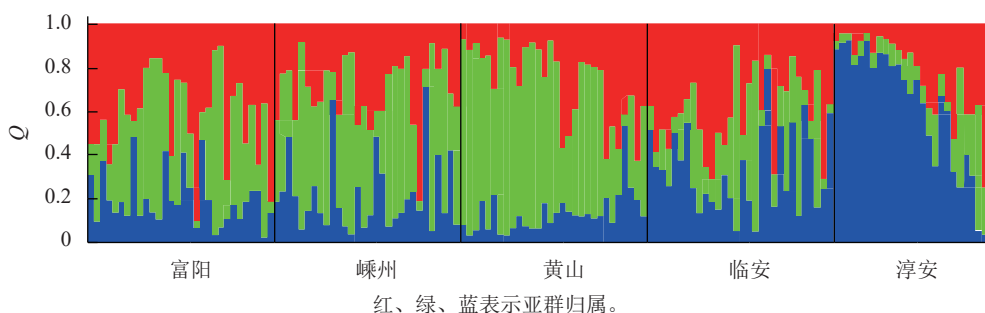


图1 基于Structure分析的5个榧树种群的遗传结构图

Figure 1 Genetic structure of 5 *T. grandis* populations based on structure analysis

表9 5个榧树种群的遗传分化

Table 9 Genetic differentiation among 5 *T. grandis* populations

种群	总遗传多样性	种群内近交系数	种群间近交系数	遗传分化指数	基因流
富阳	0.457	-0.113	0.058	0.153	1.381
嵊州	0.475	-0.003	0.206	0.209	0.946
黄山	0.491	-0.132	0.054	0.188	1.082
临安	0.527	-0.143	0.120	0.230	0.838
淳安	0.534	-0.013	0.207	0.218	0.898
平均值	0.497	-0.081	0.129	0.199	1.029

表10 5个榧树种群的分子方差分析

Table 10 Analysis of molecular variance among 5 *T. grandis* populations

来源	自由度	平方和	均方	方差分量	变异百分比/%	P
种群间	4	67.427	16.857	0.416	8	0.081
种群内	141	664.251	4.711	4.711	92	
总数	145	731.678		5.127	100	

表 11 5 个榧树种群的遗传距离和遗传相似度

Table 11 Genetic distance and genetic identity among 5 *T. grandis* populations

种群	富阳	嵊州	黄山	临安	淳安
富阳		0.976	0.977	0.977	0.962
嵊州	0.024		0.970	0.971	0.957
黄山	0.023	0.031		0.973	0.946
临安	0.023	0.030	0.027		0.977
淳安	0.038	0.045	0.055	0.024	

说明：对角线下方为遗传距离，对角线上方为遗传相似度。

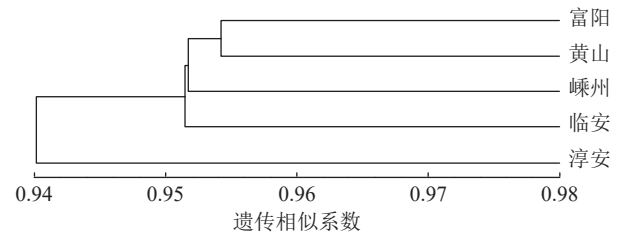


图 2 5 个榧树种群的 UPGMA 聚类图

Figure 2 UPGMA dendrogram of 5 *T. grandis* populations

3 讨论

本研究表明：5 个雌性榧树种群叶与种实指标在种群间及个体间均存在显著差异，这与其本身雌雄异株风媒花天然杂交的特性相符。詹利云等^[14]对富阳、嵊州、黄山、临安种群雄性榧树的叶片、种实表型指标进行了研究，而本研究则对上述相同种群雌株的叶片、种实表型指标进行探究。比较发现：在种群间，雄株仅叶长这一指标存在显著差异，雌株则各指标均有差异，但种群内雌雄榧树间各指标都有显著差异；黄山种群雌株叶质量的均值要小于雄株，且变异系数雌株种群比雄株种群大；叶形指数雌雄榧树均值接近，变异系数仅嵊州 (13.97%) 和临安 (18.27%) 种群的雄株比雌株 (分别为 11.20%、15.30%) 大。

与沈登锋等^[19]的研究结果相比，本研究的种实和种核质量与其接近，但变异系数较低，而种实相对脂肪含量两者相近。究其原因，沈登锋等^[19]的研究是从种子可食性的角度收集种质，而本研究在各种群的取样则是随机的，数据更能反映自然条件下榧树种群的状况。董雷鸣等^[20]对榧树黄山种群的种实进行了分析，发现与本研究在种实质量、种核质量、种形指数、核形指数上接近，而脂肪相对含量本研究的结果要高近 7%。尽管研究材料取自同一种群，但榧树雌雄异株天然风媒杂交的特性决定了雄株花粉在其中所起的作用，加之研究的年份不同，气候气象条件也不同，因此研究结果有出入。本研究表明：榧树种实与种核的表型指标中，变异系数大于 10% 的包括种实质量、假种皮厚、种核质量及种壳厚，这些指标与种实产量有关，而各种群间相差 10% 以上的指标包括假种皮厚、种壳厚。

本研究的榧树种实可食性较差，其脂肪相对含量不及香榧。金松酸作为一种特殊的不饱和脂肪酸，目前已知来源较少，得率低^[21]。本研究各种群金松酸的平均相对含量为 10.76%~12.61%，接近或高于香榧及日本榧 *Torreya nucifera* 的平均值，且有的单株相对含量更高，进一步说明榧树种子的利用价值。本研究发现：榧树种实脂肪相对含量的变异系数为 7.70%~21.80%，而不饱和脂肪酸的变异系数较小，低于 5%，脂肪中各脂肪酸组分种群间差异显著，金松酸的变异系数为 8.00%~20.00%，因此不仅具有优株选择的潜力，且基于脂肪、金松酸相对含量的高低来进行优株选择理论上是可行的。

本研究表明：天然雌性榧树的遗传变异集中在种群内，种群内 (92%) 的遗传变异远大于种群间 (8%)，这与异交风媒植物 90% 以上的遗传变异存在于种群内的结果相符^[22]，且说明榧树单株间的遗传变异更丰富，选育要基于单株性状表现来进行。以遗传多样性指标来看，仅淳安种群 ($H=0.410$, $I=0.658$) 的遗传多样性大于雌性榧树物种水平 ($H=0.405$, $I=0.671$)，而雌性物种水平的多态位点百分比 (92.31%) 均大于 5 个天然雌性榧树种群。这与刘浩凯^[12]用相关系列扩增多态性 (SRAP) 分析天然雌性榧树种群的结果相似。

天然榧树种群内近交系数均为负值，杂合子过剩而纯合子缺失，这也与该物种风媒传粉天然杂交的特性相吻合，说明天然雌性榧树种群没有近交衰退的现象^[10]。WRIGHT^[23]研究表明：遗传分化指数 (F_{st}) 可反映群体间遗传分化程度，当 $0 < F_{st} \leq 0.05$ 、 $0.05 < F_{st} \leq 0.15$ 、 $0.15 < F_{st} \leq 0.25$ 、 $F_{st} > 0.25$ 时，遗传分化程度分别为很弱、中等、较大分化、极大。基因流越大，遗传分化越小^[24]。当基因流大于 1 时，说明种群间存在一定的基因交流，种群间的遗传分化不会太大^[25]。在本研究中，5 个雌性榧树种群的遗传分化指数为 0.199，但基因流为 1.029，说明种群间的遗传分化较大。

从榧树染色体水平参考基因组，可获得更加详细和精确的基因组信息^[26]。这些信息不仅包括基因的序列，还包括基因的结构、功能和调控网络等。通过深入分析这些信息，可以更准确地识别和定位

SSR 标记, 从而提高其全面性和多态性。

4 结论

不同雌性榧树种群叶与种实表型指标在种群间及个体间存在显著差异。脂肪相对含量、脂肪酸相对含量及可溶性糖质量分数在种群间差异极显著, 榧树种实表型和种仁品质变异丰富。基于遗传多样性指标, 发现雌性榧树种群表现出一定程度的变异, 淳安种群的遗传多样性最大, 且雌性榧树的遗传变异种群内远大于种群间。

5 参考文献

- [1] SUO Jinwei, MA Zhenmin, ZHAO Bing, *et al.* Metabolomics reveal changes in flavor quality and bioactive components inpost-ripening *Torreya grandis* nuts and the underlying mechanism [J/OL]. *Food Chemistry*, 2024-01-11 [2024-03-10]. doi:10.1016/j.foodchem.2022.134987.
- [2] 蒋起宏, 卢红铃, 姚诗炜, 等. 不同香榧品种果实特性比较及脂肪酸组成分析[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(4): 945 – 948. JIANG Qihong, LU Hongling, YAO Shiwei. Comparison of fruit characteristics and fatty acid composition of different *Torreya grandis* varieties [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2023, 64(4): 945 – 948.
- [3] 钟早荣, 王镜琰, 温远丽, 等. 中国香榧的资源开发研究及产业化对策[J]. 浙江农业科学, 2023, 64(12): 3020 – 3025. ZHONG Zaorong, WANG Jingyan, WEN Yuanli, *et al.* Study on resource exploitation and industrialization countermeasures of *Torreya grandis* in China [J]. *Journal of Zhejiang Agricultural Sciences*, 2023, 64(12): 3020 – 3025.
- [4] 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 survey of *Torreya tree* [J]. *Anhui Agricultural Science*, 2013, 41(19): 8200 – 8202.
- [5] 张会芳, 齐红志, 孙岩, 等. 黄淮冬麦区不同来源地新育成小麦品种性状多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2023, 24(3): 719 – 731. ZHANG Huifang, QI Hongzhi, SUN Yan, *et al.* Analysis on variety character diversity of newly grown wheat from different sources in Huanghuai winter wheat region [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(3): 719 – 731.
- [6] 冯薇, 吴哲, 孟然, 等. 基于酚酸类分析和SSR标记的蒲公英资源遗传多样性评价[J/OL]. 分子植物育种, 2023-03-10 [2024-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230309.1716.008.html>. FENG Wei, WU Zhe, MENG Ran, *et al.* Genetic diversity evaluation of dandelion resources based on phenolic acid analysis and SSR markers[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2023-03-10 [2024-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230309.1716.008.html>.
- [7] XU Manhou, DU Rong, LI Xiaoli, *et al.* The mid-domain effect of mountainous plants is determined by community life form and family flora on the Loess Plateau of China [J]. *Scientific Reports*, 2021, 11(1): 10974 – 10974.
- [8] 王刚, 曹佩, 韦学敏, 等. 分子标记技术在药用植物种质资源研究中的应用[J]. 中国现代中药, 2019, 21(11): 1435 – 1444. WANG Gang, CAO Pei, WEI Xuemin, *et al.* Applications of molecular markers in study of germplasm resources of medicinal plants [J]. *Modern Chinese Medicine*, 2019, 21(11): 1435 – 1444.
- [9] 漆艳香, 赵洪, 谢艺贤, 等. DNA分子标记在香蕉种质资源中的应用[J]. 分子植物育种, 2024, 22(6): 1944 – 1950. QI Yanxiang, ZHAO Hong, XIE Yixian, *et al.* Application of DNA molecular markers in banana (*Musa L.*) germplasm resources [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, 22(6): 1944 – 1950.
- [10] GUPTA P K, VARSHNEY R K. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat [J]. *Euphytica*, 2000, 113(3): 163 – 185.
- [11] 马爽, 索金伟, 成豪, 等. 树形调整对香榧树冠光照强度和种实品质的影响[J/OL]. 浙江农林大学学报, 2024, 41(3): 467 – 477. MA Shuang, SUO Jinwei, CHENG Hao, *et al.* Effects of tree shape adjustment on canopy light intensity and seed quality of *Torreya grandis* ‘Merrillii’ [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2024, 41(3): 467 – 477.
- [12] 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 Analysis of Genetic Diversity in Torreya Tree* [D]. Hangzhou: Zhejiang A&F University, 2014.

- [13] CHEN LI, LIU Ning, WANG Zhibing, *et al.* The growth equation and element distribution of *Torreya grandis* in the Huangshan region of China [J/OL]. *Forests*, 2024, **15**(1): 68[2024-03-12]. doi: 10.3390/f15010068.
- [14] 詹利云, 刘琏, 曾燕如, 等. 雌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 and primary selection of male adults [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2020, **37**(6): 1120 – 1127.
- [15] 张强, 马全会, 彭小龙, 等. 南疆地区17个鲜食枣品种引种效果评价[J]. *西北农林科技大学学报(自然科学版)*, 2024, **52**(11): 1 – 12. ZHANG Qiang, MA Quanhui, PENG Xiaolong, *et al.* Evaluation on introduction effect of 17 fresh jujube varieties in southern Xinjiang [J]. *Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)*, 2024, **52**(11): 1 – 12.
- [16] 胡芳名, 谭晓风. 香榧种子胚乳DNA抽提[J]. *经济林研究*, 1999, **17**(4): 5 – 7. HU Fangming, TAN Xiaofeng. *Torreya* seed endosperm DNA extraction [J]. *Economic Forest Research*, 1999, **17**(4): 5 – 7.
- [17] 郑刘辉, 詹利云, 侯宇, 等. 雌性榧树遗传多样性的SSR荧光标记分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2022, **39**(2): 329 – 337. ZHENG Liuhui, ZHAN Liyun, HOU Yu, *et al.* SSR analysis of genetic diversity of male *Torreya grandis* [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(2): 329 – 337.
- [18] 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 the genetic structure of *S. striae* population in eight provinces (autonomous regions) of southern China [J]. *Chinese Agricultural Science*, 2015, **48**(13): 2538 – 2548.
- [19] 沈登锋, 曾燕如, 喻卫武, 等. 榧树种质资源的收集与种子理化性质的初步分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2011, **28**(5): 747 – 752. SHEN Dengfeng, ZENG Yanru, YU Weiwu, *et al.* Collection of *Torreya* tree quality resources and preliminary analysis of seed physicochemical properties [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2011, **28**(5): 747 – 752.
- [20] 董雷鸣, 曾燕如, 鄢玉芬, 等. 榧树天然群体中种子表型特征与化学成分的变异分析[J]. *浙江农林大学学报*, 2014, **31**(2): 224 – 230. DONG Leiming, ZENG Yanru, WU Yufen, *et al.* Analysis of variation in seed phenotypic characteristics and chemical composition in native *Torreya* populations [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2014, **31**(2): 224 – 230.
- [21] 孟祥河, 杨奇波, 肖丹, 等. 香榧籽油金松酸的分离及其1, 3-甘油二酯的制备研究[J]. *中国粮油学报*, 2020, **35**(7): 72 – 78. MENG Xianghe, YANG Qibo, XIAO Dan, *et al.* Isolation of *Torreya* seed solpene acid and its preparation of 1, 3-glycerol [J]. *Chinese Journal of Grain and Oil News*, 2020, **35**(7): 72 – 78.
- [22] DANUSEVIČIUS D, RAJORA O P, KAVALIAUSKAS D, *et al.* Stronger genetic differentiation among within-population genetic groups than among populations in Scots pine provides new insights into within-population genetic structuring[J/OL]. *Scientific Reports*, 2024, **14**(1): 2713[2024-03-12]. doi: 10.1038/s41598-024-52769-y.
- [23] WRIGHT S E. Evolution and the genetics of populations Vol-2 [J]. *Review of Progress in Coloration & Related Topics*, 2011, **127**(6): 365 – 371.
- [24] ELLSTRAND N C, ELAM D R. Population genetic consequences of small population size: implications for plant conservation [J]. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 1993, **24**(1): 217 – 242.
- [25] 陈泰国, 唐健民, 邹蓉, 等. 基于SSR标记的广西德保苏铁与叉孢苏铁遗传多样性分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2024-02-19[2024-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240219.1219.004.html>. CHENG Taiguo, TANG Jianmin, ZOU Rong, *et al.* Genetic diversity analysis of Guangxi *Cycas debaoensis* and *C. segmentifida* based on SSR markers[J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 2024-02-19[2024-03-12]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240219.1219.004.html>.
- [26] LOU Heqiang, SONG Lili, LI Xiaolong, *et al.* The *Torreya grandis* genome illuminates the origin and evolution of gymnosperm-specific sciadonic acid biosynthesis [J/OL]. *Nature Communications*, 2023, **14**(1): 1315[2024-03-12]. doi:10.1038/S41467-023-37038-2.