

# 利用 SRAP 和 EST-SSR 分析香椿资源的遗传多样性

陈倩倩<sup>1,2</sup>, 荣丽媛<sup>2</sup>, 邵紫君<sup>2</sup>, 刘甜<sup>2</sup>, 魏蕾<sup>3,\*</sup>, 宋振巧<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>作物生物学国家重点实验室, 山东泰安 271018; <sup>2</sup>山东农业大学农学院, 山东泰安 271018; <sup>3</sup>泰安中心医院, 山东泰安 271000)

**摘要:** 利用 SRAP 和 EST-SSR 标记技术对中国 9 省 10 个香椿居群的遗传多样性和亲缘关系进行了分析, 试图为香椿种质资源的保护和开发利用奠定基础。结果表明, 33 对 SRAP 标记共扩增出 167 个多态性位点, 平均每对引物产生 5.06 个多态性位点; 45 对 EST-SSR 引物共检测到 221 个多态性位点, 平均每对引物检测到 4.9 个多态位点; 所选香椿居群的等位基因数和期望杂合度 (EST-SSR,  $N_a = 2.3506$ ,  $H_e = 0.4632$ ) 及 Shannon's 信息指数 (SRAP,  $I = 0.6140$ ; EST-SSR,  $I = 0.6752$ ) 较高, 表明中国香椿资源具有较高的遗传多样性; 居群间的遗传分化系数 (SRAP,  $G_{st} = 0.3124$ ; EST-SSR,  $F_{st} = 0.2462$ ) 表明所研究的香椿资源分化程度较高; 聚类结果显示, 10 个香椿居群可分成 3 类, 其中衡水、泰安和太和居群为一类, 成都、昆明、武汉和汝阳居群为一类, 德州和泉州居群聚为一类, 南京居群的结果因两类引物略有不同; 香椿居群间的遗传距离与实际的地理距离相关性不显著。

**关键词:** 香椿; 遗传多样性; SRAP; EST-SSR

**中图分类号:** S 567; S 644.4

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2018) 05-0967-10

## Genetic Diversity Analysis of *Toona sinensis* Germplasms Based on SRAP and EST-SSR Markers

CHEN Qianqian<sup>1,2</sup>, RONG Liyuan<sup>2</sup>, SHAO Zijun<sup>2</sup>, LIU Tian<sup>2</sup>, WEI Lei<sup>3,\*</sup>, and SONG Zhenqiao<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>State Key laboratory of Crop Biology, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>3</sup>Tai'an Central Hospital, Tai'an, Shandong 271000, China)

**Abstract:** Expressed sequence tags (EST) - simple sequence repeats (SSR) and sequence related amplified polymorphism (SRAP) markers were applied to assess the genetic diversity and genetic relationship of 10 *Toona sinensis* populations collected from nine provinces in China. A total of 167 polymorphic loci were detected by 33 SRAP primers with 5.06 polymorphic loci per primer, and 221 polymorphic loci were observed by 45 EST-SSR primers with 4.9 alleles per primer. The results of observed number of alleles (EST-SSR,  $N_a = 2.3506$ ), expected heterozygosity (EST-SSR,  $H_e = 0.4632$ ) and the Shannon's information index (SRAP,  $I = 0.6140$ ; EST-SSR,  $I = 0.6752$ ) demonstrated that relatively higher level of genetic diversity possessed in these populations of *T. sinensis*. The genetic

**收稿日期:** 2018-02-11; **修回日期:** 2018-04-10

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (81001603); 泰安市大学生科技创新行动计划项目 (2017-4)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: wei77lei@163.com; szq@sda.edu.cn)

differentiation coefficients data (SRAP,  $G_{st} = 0.3124$ ; EST-SSR,  $F_{st} = 0.2462$ ) also revealed relatively higher level of genetic polymorphisms among these *T. sinensis* resources. Cluster analysis divided 10 populations into 3 groups, one group consisted of Hengshui, Tai'an and Taihe populations, another group consisted of Chengdu, Kunming, Wuhan and Ruyang populations, Dezhou and Quanzhou populations were belonging to the third group. The results of Nanjing population were different in two kind of markers. Genetic relationship among these *T. sinensis* populations have no significant correlation with their geographical distribution.

**Keywords:** *Toona sinensis*; genetic diversity; SRAP; EST-SSR

香椿 (*Toona sinensis*) 作为开发前景良好的药食同源植物, 对其进行资源的收集、遗传多样性评价具有重要意义。目前对香椿遗传多样性方面的研究报道较少, 且多数研究往往局限于某个地区或某几个品种 (Wang et al., 2008; Xing et al., 2016), 其样品数量不足、代表性差, 缺少对香椿资源的广泛收集和评价。

基于表达序列标签开发的微卫星标记 EST-SSR (expressed sequence tag SSR), 因其开发过程简单、共显性、有较高的可转移性和通用性等优点 (陈树林 等, 2006; 忻雅 等, 2006; 郑丽珊 等, 2008; Song et al., 2016; 鲁敏 等, 2017), 被广泛应用于植物遗传多样性评价、种质鉴定、标记通用性等研究 (杨成君 等, 2008; 邓科君 等, 2009; Zeng et al., 2010)。SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 分子标记利用 ORFs 保守区域进行引物设计, 因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔长度不等而产生多态性, 其简便稳定, 被广泛应用于植物种质资源鉴定评价、遗传图谱构建、重要性状标记以及比较基因组学等研究 (Li & Quiros, 2001; 井赵斌 等, 2016; Yang et al., 2016)。

本研究中收集了来自山东、安徽、河北、四川、湖北、云南等 9 省 10 个居群的 93 份香椿资源, 利用 33 对 SRAP 和 45 对 EST-SSR 标记对其进行了遗传多样性分析, 以明确各产地香椿资源的遗传基础和亲缘关系, 为香椿资源的收集保存、分类鉴定、合理开发利用及品种选育奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验所用 10 个香椿居群共 93 份香椿材料 (表 1) 种植于山东农业大学药用植物圃。2016 年 5

表 1 香椿居群的编号及来源地信息  
Table 1 Geographical locations and codes of the ten *Toona sinensis* populations

居群来源地 Sampling locality	样本数量 Sample size	纬度 Latitude	经度 Longitude
河北衡水 Hengshui, Hebei	9	37°44'17.84"	115°39'51.49"
四川成都 Chengdu, Sichuan	5	30°34'30.93"	104°03'51.45"
湖北武汉 Wuhan, Hubei	8	30°35'42.92"	114°18'0.36"
山东泰安 Tai'an, Shandong	33	36°12'0.02"	117°04'53.59"
山东德州 Dezhou, Shandong	4	37°25'59.63"	116°21'5.67"
云南昆明 Kunming, Yunnan	9	24°52'59.33"	102°49'53.27"
福建泉州 Quanzhou, Fujian	2	24°52'37.34"	118°40'16.09"
安徽太和 Taihe, Anhui	15	33°09'44.08"	115°36'59.81"
江苏南京 Nanjing, Jiangsu	4	32°03'44.36"	118°47'30.10"
河南汝阳 Ruyang, Henan	4	34°09'18.88"	112°28'1.07"

月, 每份材料取适量幼嫩叶片 (1 ~ 2 片), 低温下带回实验室, 冷冻于 - 20 °C 冰箱, 用于 DNA 的提取。

1.2 DNA 的提取与 PCR 扩增

基因组 DNA 的提取与纯化参照 Rogers 和 Bendich (1989) 的 CTAB 方法, 并稍加改进。

分别从 100 个 SRAP 和 120 个 EST-SSR 引物组合中筛选出重复性好、带形清晰的 33 个 SRAP (Li & Quiros, 2001) 和 45 个 EST-SSR (表 2) 用于分析。

表 2 EST-SSR 引物序列  
Table 2 List of primers used in EST-SSR

引物代号 Primer code	基序 Motif	T <sub>m</sub> /°C	正向引物序列 (5' - 3') Forward primer sequence	反向引物序列 (5' - 3') Reverse primer sequence
2	AG	59	CCATCCGGGTAAGAAATAGTTTCC	TGAGGCCATCAGTTTCACGG
5	TC	60	CGCTGTGTGTTTGTGTGTGT	TCGCTGATTTTGAGGCAGGA
9	ATT	59	ACCAAAGGCACCACAAATGAG	ACCCATTGCAAATTTTCATCAAGA
11	AC	60	GACGAATAGCAGGGTCAGCA	AGTTCAACATTGTTACTACCTTGCA
12	TC	60	CCAACTTCGCTTCAGGTCCT	GATGAGAGGAGAGTCGTGCG
14	CAG	60	TGCAGAGGCGATGGAAGTTT	AGCCATACCCGGTCCCTAAA
16	AG	60	CCATCTTCGGCTTCGATCCA	ACCGTGTACACATTCCATGT
18	ATT	60	TCACACTCGTACTCATCAAGCA	ATGGGTAGCTTGTGGGTGG
19	AG	60	GTAGACCTAGCTCGACGCAC	TCCCAAATAGAAAACTGTCGCAC
21	AT	60	AATGCATTCGTGGAGGAGCA	ACATGCTTGGGTAGGCATGT
22	CAG	59	GAGGCAGCAGACCATCTTCT	TGCAGGTGCTTTGTATCCACA
24	ACC	60	CAGCAGCGGTGGTAGTACTC	GCTCAATTGTCTCACCCCCA
29	AC	60	TGAAACCTGAGGTGCCATTCT	TCCTTGGTTCCTCCGAGTCTCT
32	TC	60	TCTGTCCAAGGCCAAAACCA	AGGCTTGCTTGACCGATCAA
35	GTT	59	TCTGGGTGGTGTCCAAATCT	TCGGAAGTTGGTTTGGTCTGA
38	AGA	60	AACACCAATGGAATGCCGC	AACCCACCTCGTTTACACCG
39	ATG	60	ATTGCAACTGGTGAGGGGAG	TGGGTGGTGGAATGGTCAT
40	CT	60	GTGCAGGCAGTTGGTTTTC	CCAGGTGTTTGTGAAATGAAATGA
42	TC	60	CCTTCCAAAGAGCATGGGGT	CGAAAGAGCGTGCCAAACAA
44	TC	60	AGTGCCTAAAGTAGGCTTGCT	TCAGCTGATTGACCGAGTAGT
45	TG	60	TGAATTGTTTCATGCATGAAGCCT	TGGGCAGAACTTAGTGTGCA
47	GTG	60	GCAATACTGGAGCTGCTGGA	TCGGTGATTACAGCTTGGA
50	ACC	60	AGCGATTTCACCATGCTGA	TATGAAGATCCGGCTGCTGC
51	TA	60	TGTACAAAACCGCCGTACGT	TCGCAACACAATCCGTCTCT
52	GCT	60	TGTCTCGAAGAAGAGGAGGGT	GCCAAATCCCCGGAGCTTAT
53	AAAG	59	AAGGTAAAGAAGGAGGGCG	TCGAAGGCGAGTTTGTGGGA
56	TGT	60	TTCGTGGCTGTACATCCTC	ATTACGAGGAGCAGCAGCAG
58	TA	60	CGGGTACTTTGACTGCAGGT	ATTTCGCGCAGACAGACAGA
60	TGT	60	AACAGCTCCAGAACTCCGG	TCAAGCTCATCAGTCACTCCT
64	TA	60	CTTCCTTCGCATCCTGTGGT	AGTCATCAGCAGCCATACAAGA
66	TGA	59	GCTGTCTTATCGCTTGCCA	TTTGAAACCTGCACTGCTGC
70	GA	57	ATGAAGTTTTTGGGCGGAAC	AGGTAGCCAATCCTCCTCGT
71	AG	60	GCCACATTTGCAAGGCTTCA	ATACAAAGCCCAGTCCCTGC
72	AG	60	GAGACGAAGGCGATGGAGAG	TGTGAATAACCACAAAAGCCAACT
73	TGG	60	GGATGGTCAGAACACTGGCA	AGCAGACACAACACACCA
74	GCT	59	TGCTTCTTCCTTCACTTTTGCT	AGCAGTTCTCTGAAGTGGGA
78	TCT	59	CTCCAGCAAGGGTTACATCTCT	GCGAGGGAGGAAGCCAAATA
82	GA	59	ACCAAGTGCCTAACAGCGTA	CACCGCTACACTTGCAAGTT
83	GA	59	CCAACGCGTCTCCTCTAGAA	AGGTTTCAATCTCCTTGGCT
84	TA	59	TCGTAGCTGTCTCATGTCAACT	CTCACAAGCCTCAGGTCGAT
86	TCG	60	TGGCAGAGCAGCATTAGAGG	TGGAAGGATTGTGGCTCACC
87	AAG	59	AGCCAACGCAATCTAGAAATCA	CGTCTGCCTCGTCTTCTTCT
97	CAC	60	GCTAGCTGCAACATGGCATC	AGCCTCCTCAGATGCTCTCA
99	GA	60	AAGAAGAGCACGACGTCTCG	CTCAGTTCCACTGTGCGTCG
100	AG	60	CAGCCAATGGTGAGCCTACA	ACCTCCACTCTCTGACCTGT

PCR 扩增反应在 BIO-RAD 型基因扩增仪上进行。15  $\mu\text{L}$  的 PCR 反应体系中, *Taq* PCR Master Mix 为 7.5  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 为 4.5  $\mu\text{L}$ , 上、下游引物各 1  $\mu\text{L}$ , DNA ( $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 1  $\mu\text{L}$ 。SRAP 的 PCR 扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min, 然后 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, 50  $^{\circ}\text{C}$  退火 50 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 50 s, 35 个循环, 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。EST-SSR 的 PCR 扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 55 ~ 58  $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min, 35 次循环; 最后 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。

扩增产物经 6.0% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳 (1 $\times$  TBE 缓冲液, 120 V, 2.5 h) 检测后银染, 最后拍照保存。

### 1.3 数据分析

对于 SRAP 标记, 采用人工读带的方法, 将电泳图谱中可重复的清晰的条带 (包括弱带) 记为 “1”, 同一位置无带或不易分辨的弱带记为 “0”。统计扩增产物总位点数和多态性位点数, 计算多态性位点百分比。利用 POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1997) 软件分析计算各居群的多态性位点数 ( $A$ )、多态性位点百分比 ( $P$ )、Nei 基因多样性 ( $H$ )、Shannon's 信息指数 ( $I$ ), 以及居群间的 Nei 基因遗传距离 ( $GD$ ) 和遗传一致度 ( $GI$ )。居群间的遗传分化采用遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 和基因流 ( $N_m$ ) 来估算。根据 Nei 基因遗传一致度, 利用 NTSYSpc-2.10 (Exeter Software, Setauket, N.Y.) 软件中的 UPGMA 方法对各居群进行聚类分析。

对于 EST-SSR 标记, 选择电泳图谱中清晰稳定出现的条带, 根据分子量大小从大到小依次记为 A、B、C、D…… (李伟丰 等, 2007)。利用 POPGENE 1.32 (Yeh et al., 1997) 软件分析计算各扩增位点和居群的等位基因数 ( $N_a$ )、有效等位基因数 ( $N_e$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、Shannon's 信息指数 ( $I$ ), 并统计各居群的多态性位点数 ( $A$ )、多态性位点百分比 ( $P$ )、居群间的 Nei 基因遗传距离 ( $GD$ ) 和遗传一致度 ( $GI$ )。居群间的遗传分化采用遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) 和基因流 ( $N_m$ ) 来估算。根据 Nei 基因遗传一致度, 利用 NTSYSpc-2.10 (Exeter Software, Setauket, N.Y.) 软件中的 UPGMA 方法对居群进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 标记的多态性分析

本研究中所用的 33 对 SRAP 引物共扩增出 168 条带, 多态性条带 167 条, 占 99.41%。不同引物扩增条带数在 4 ~ 8 条之间, 平均扩增带数为 5.09 条。

45 对 EST-SSR 引物全部能扩增出多态性位点, 共计多态性位点 73 个, 产生 221 个等位基因, 平均每对引物检测到 4.9 个等位基因。各位点的多样性指数列于表 4, 平均每个位点的等位基因数为 3.03, 有效等位基因 ( $N_e$ ) 为 2.4633, 观测杂合度 ( $H_o$ ) 为 0.4149, 期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.5820, 平均观测杂合度低于期望杂合度, 表明香椿种群内存在一定程度的近交。

### 2.2 香椿不同居群的遗传多样性

SRAP 标记结果显示 (表 3), 10 个香椿居群总的 Nei 基因多样性  $H$  为 0.4275, Shannon's 信息指数  $I$  为 0.6140, 反映了香椿资源遗传多样性水平较高。10 个香椿居群内的多态性位点数在 27 ~ 160 之间, 均值 106.3; 多态性位点百分比在 16.07% ~ 95.24% 范围内, 均值 63.27%;  $H$  在 0.0666 ~ 0.4105 之间, 均值 0.2625;  $I$  在 0.0972 ~ 0.5864 之间, 均值 0.3802。10 个香椿居群比较, 安徽太和居群、

泰安居群以及武汉居群的遗传多样性高于其他 7 个居群，显示出较大的遗传变异，而泉州居群遗传多样性水平最低。

表 3 基于 SRAP 标记香椿居群的遗传多样性指数  
Table 3 Genetic diversity index of 10 *Toona sinensis* populations analyzed by SRAP markers

居群 Population	<i>A</i> 多态性位点数 Number of polymorphic loci	<i>P</i> 多态性位点百分比/% The percentage of polymorphic loci	<i>H</i> Nei 基因多样性 Nei's gene diversity	<i>I</i> 香农信息指数 Shannon's information index
衡水 Hengshui	121	72.02	0.3216	0.4588
成都 Chengdu	120	71.43	0.2871	0.4182
武汉 Wuhan	160	95.24	0.3679	0.5394
泰安 Tai'an	160	95.24	0.4065	0.5864
德州 Dezhou	64	38.10	0.1501	0.2203
昆明 Kunming	127	75.60	0.3005	0.4395
泉州 Quanzhou	27	16.07	0.0666	0.0972
太和 Taihe	153	91.07	0.4105	0.5834
南京 Nanjing	31	18.45	0.0727	0.1064
汝阳 Ruyang	100	59.52	0.2415	0.3525
总数 Total	167	99.40	0.4275	0.6140
平均 Mean	106.3	63.27	0.2625	0.3802

EST-SSR 标记结果（表 4）表明，各居群的平均多态性位点数（*A*）为 63.3，多态性位点百分比（*P*）为 86.71%，香椿居群整体多态性水平高。各居群的等位基因数（*N<sub>a</sub>*）范围为 1.6027 ~ 2.9452，均值为 2.3506；有效等位基因数（*N<sub>e</sub>*）平均 1.9305。观测杂合度（*H<sub>o</sub>*）范围为 0.2500 ~ 0.5513，平均为 0.3385，期望杂合度（*H<sub>e</sub>*）变化范围为 0.3293 ~ 0.5595，平均为 0.4632，整体杂合度高；Shannon's 信息指数（*I*）范围为 0.3755 ~ 0.9033，平均 0.6752，反映出香椿资源的遗传多样性丰富。综合各项指标，泰安居群在 10 个居群中遗传多样性最高，太和、昆明和武汉居群次之，泉州居群的遗传多样性最低。

表 4 基于 EST-SSR 标记香椿居群的遗传多样性指数  
Table 4 Genetic diversity index of 10 *Toona sinensis* populations on EST-SSR markers

居群 Population	<i>A</i> 多态性位点数 The number of polymorphic loci	<i>P</i> 多态性位点百分比/% Percentage of Polymorphic loci	<i>N<sub>a</sub></i> 等位基因数 Observed number of alleles	<i>N<sub>e</sub></i> 有效等位基因数 Effective number of alleles	<i>I</i> 香农信息指数 Shannon's information index	<i>H<sub>o</sub></i> 观测杂合度 Observed heterozygosity	<i>H<sub>e</sub></i> 期望杂合度 Expected heterozygosity
衡水 Hengshui	70	95.89	2.4932	1.9885	0.7273	0.3957	0.4815
成都 Chengdu	68	93.15	2.4110	1.9378	0.6996	0.2849	0.4822
泰安 Tai'an	73	100.00	2.9452	2.3229	0.9033	0.5513	0.5595
德州 Dezhou	61	83.56	2.0959	1.7273	0.5629	0.3041	0.3985
昆明 Kunming	70	95.89	2.5753	1.9808	0.7492	0.2542	0.4888
武汉 Wuhan	70	95.89	2.5753	1.9608	0.7348	0.2500	0.4822
泉州 Quanzhou	40	54.79	1.6027	1.5132	0.3755	0.3219	0.3447
太和 Taihe	72	98.63	2.7808	2.2845	0.8690	0.4447	0.5517
南京 Nanjing	46	63.01	1.7397	1.5680	0.4282	0.3116	0.3293
汝阳 Ruyang	63	86.30	2.2877	2.0218	0.7028	0.2671	0.5137
平均 Mean	63.3	86.71	2.3506	1.9305	0.6752	0.3385	0.4632

2.3 基于 SRAP 标记的香椿居群聚类分析

利用 SRAP 标记计算 10 个居群的 Nei 遗传一致度（*GI*）和遗传距离（*GD*）。结果显示（表 5），

居群间的遗传一致度在 0.6479 ~ 0.9621 之间，遗传距离在 0.0386 ~ 0.4339 之间。10 个香椿居群间的相似程度较高，遗传距离较小。

聚类图（图 1）显示，在遗传一致度为 0.85744 处可将 10 个香椿居群分为 3 类。第 1 类包括衡水、泰安和太和居群；第 2 类包括成都、武汉、昆明、汝阳和南京居群；第 3 类包括德州和泉州居群。地理距离较近同属山东省的德州和泰安居群被划分到不同的组类中，德州和相距较远的泉州同属一类，香椿居群间的遗传距离与实际的地理距离没有显著相关性。

表 5 香椿居群的 Nei 遗传一致度和遗传距离的无偏估计 (SRAP)  
Table 5 Nei's unbiased measures of genetic identity and genetic distance of *Toona sinensis* populations (SRAP)

居群 Population	衡水 Hengshui	成都 Chengdu	武汉 Wuhan	泰安 Tai'an	德州 Dezhou	昆明 Kunming	泉州 Quanzhou	太和 Taihe	南京 Nanjing	汝阳 Ruyang
衡水 Hengshui	****	0.8096	0.8049	0.9590	0.7360	0.8242	0.7083	0.9311	0.6479	0.7603
成都 Chengdu	0.2113	****	0.9610	0.8469	0.8475	0.9460	0.8413	0.8819	0.8914	0.9294
武汉 Wuhan	0.2170	0.0397	****	0.8689	0.8220	0.9284	0.7923	0.8836	0.8482	0.9136
泰安 Tai'an	0.0419	0.1662	0.1405	****	0.7387	0.8577	0.7348	0.9621	0.6846	0.7998
德州 Dezhou	0.3066	0.1654	0.1960	0.3029	****	0.8827	0.9167	0.8201	0.8973	0.8621
昆明 Kunming	0.1933	0.0555	0.0743	0.1535	0.1248	****	0.8719	0.8968	0.9065	0.9453
泉州 Quanzhou	0.3449	0.1728	0.2328	0.3081	0.0869	0.1371	****	0.8128	0.8742	0.8644
太和 Taihe	0.0714	0.1257	0.1238	0.0386	0.1984	0.1089	0.2073	****	0.7788	0.8724
南京 Nanjing	0.4339	0.1150	0.1647	0.3790	0.1083	0.0981	0.1345	0.2501	****	0.9410
汝阳 Ruyang	0.2741	0.0733	0.0904	0.2233	0.1484	0.0563	0.1457	0.1365	0.0609	****

注：表中\*\*\*\*上方为 Nei 遗传一致度，\*\*\*\*下方为 Nei 遗传距离。  
Note: Nei's genetic identity is above \*\*\*\* and genetic distance is below \*\*\*\*.

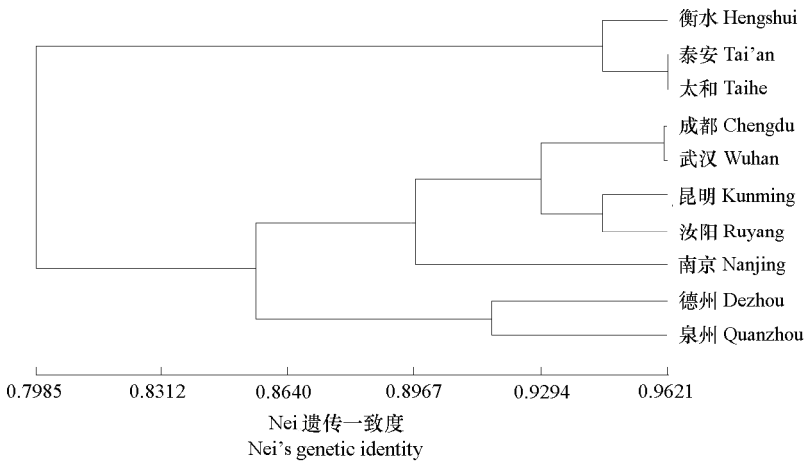


图 1 基于 Nei's 遗传一致度的 10 个香椿居群聚类图 (SRAP)  
Fig. 1 Dendrogram obtained by UPGMA analysis based on Nei's genetic identity on ten *Toona sinensis* populations (SRAP)

2.4 基于 EST-SSR 标记的香椿居群聚类分析

利用 EST-SSR 标记对 10 个居群的遗传距离 (GD) 和遗传一致度 (GI) 分析显示 (表 6)，居群间的遗传一致度在 0.5471 ~ 0.9116 之间，遗传距离在 0.0925 ~ 0.6031。整体来看，10 个香椿居群的遗传相似度较高，遗传差异较小。

聚类图显示（图 2），在遗传一致度 0.7792 处，可将 10 个居群分为 3 类。第 1 类包括衡水、泰安和太和居群；第 2 类分别是成都、昆明、武汉和汝阳居群；第 3 类是德州、泉州和南京居群。与利用 SRAP 标记分析的聚类结果基本一致。

表 6 香椿居群的 Nei 遗传一致度和遗传距离的无偏估计 (EST-SSR)  
Table 6 Nei's unbiased measures of genetic identity and genetic distance of *Toona sinensis* populations (EST-SSR)

居群 Population	衡水 Hengshui	成都 Chengdu	泰安 Tai'an	德州 Dezhou	昆明 Kunming	武汉 Wuhan	泉州 Quanzhou	太和 Taihe	南京 Nanjing	汝阳 Ruyang
衡水 Hengshui	****	0.7635	0.8745	0.6722	0.7624	0.7793	0.5810	0.8831	0.5471	0.6857
成都 Chengdu	0.2699	****	0.8075	0.8368	0.8740	0.8484	0.8005	0.8061	0.7654	0.7548
泰安 Tai'an	0.1341	0.2138	****	0.7904	0.7933	0.7672	0.6960	0.8992	0.6564	0.7374
德州 Dezhou	0.3972	0.1782	0.2352	****	0.8313	0.7825	0.8295	0.7390	0.8037	0.7460
昆明 Kunming	0.2713	0.1347	0.2316	0.1847	****	0.9116	0.7181	0.8101	0.7123	0.8198
武汉 Wuhan	0.2493	0.1643	0.2650	0.2453	0.0925	****	0.7018	0.8323	0.6800	0.8165
泉州 Quanzhou	0.5430	0.2225	0.3624	0.1869	0.3311	0.3540	****	0.6687	0.8052	0.7295
太和 Taihe	0.1243	0.2155	0.1062	0.3025	0.2106	0.1836	0.4025	****	0.6516	0.7515
南京 Nanjing	0.6031	0.2673	0.4210	0.2186	0.3393	0.3857	0.2166	0.4283	****	0.7507
汝阳 Ruyang	0.3773	0.2813	0.3047	0.2930	0.1987	0.2027	0.3154	0.2857	0.2868	****

注：表中\*\*\*\*上方为 Nei 遗传一致度，\*\*\*\*下方为 Nei 遗传距离。  
Note: Nei's genetic identity is above \*\*\*\* and genetic distance is below \*\*\*\*.

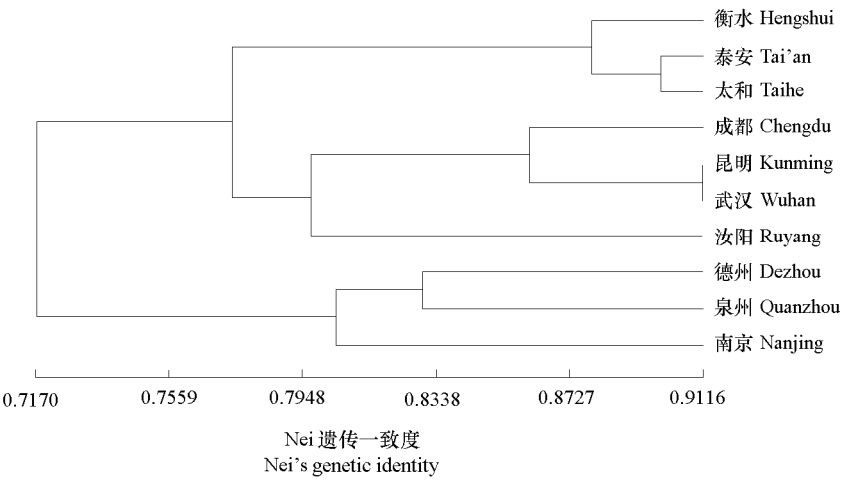


图 2 基于 Nei 遗传一致度的 10 个香椿居群聚类图 (EST-SSR)  
Fig. 2 Dendrogram obtained by UPGMA analysis based on Nei's genetic identity on ten *Toona sinensis* populations (EST-SSR)

2.5 香椿居群的遗传分化系数和基因流

对 10 个香椿居群的遗传分化系数和基因流的统计结果显示，利用 SRAP 标记得到的遗传分化系数 ( $G_{st}$ ) 为 0.3124，表明 31.24% 的遗传变异发生在居群间，68.76% 的遗传变异发生在居群内部。利用 EST-SSR 标记分析得到的遗传分化系数 ( $F_{st}$ ) 为 0.2462，75.38% 的遗传变异发生在居群内部。两种标记分析得到的基因流值在 1 左右，分别为 1.1004 和 0.7656，居群间存在一定的基因流，但并不频繁。

### 3 讨论

#### 3.1 中国香椿资源的遗传多样性

等位基因数 ( $N_a$ ) 和期望杂合度 ( $H_e$ ) 是衡量一个物种遗传多样性水平高低的重要指标。本研究中, 香椿居群平均等位基因数 ( $N_a = 2.3506$ ) 和期望杂合度 ( $H_e = 0.4632$ ) 较高, 高于 Hamrick 等 (1992) 报道的其他多年生木本植物的平均值 ( $N_a = 1.76$ ,  $H_e = 0.148$ ), Shannon's 信息指数 (SRAP,  $I = 0.6140$ ; EST-SSR,  $I = 0.6752$ ) 大于前人 (Xing et al., 2016) 的研究结果 (ISSR,  $I = 0.1466$ ; SRAP,  $I = 0.1717$ )。相比于其他重要的栽培树种和植物资源, 如花椒树 (EST-SSR,  $I = 0.5933$ ) (郑健 等, 2008)、菊苣 (SRAP,  $I = 0.572$ ; EST-SSR,  $I = 0.493$ ) (梁小玉 等, 2017)、荔枝 (EST-SSR,  $I = 0.425$ ) (向旭 等, 2010)、黄金茶 (EST-SSR,  $I = 0.55$ ) (杨阳 等, 2009)、核桃 ( $H_e = 0.44$ ) (Ma et al., 2011)、凤梨 ( $I = 0.418$ ) (Souzasobreira et al., 2015)、云南茶树 ( $H_e = 0.4977$ ) (王丽鸳 等, 2010) 和山葡萄 ( $H_e = 0.5762$ ) (Wu et al., 2008) 等, 中国香椿也有着较高的遗传多样性。与 Wang 等 (2008)、Xing 等 (2016) 的研究相比, 本研究所用香椿资源遗传多样性较为丰富。这可能与本研究中所收集的资源分布广泛、样本量较大有关。在居群水平上, 两种标记检测结果相似, 均显示出泰安、武汉和太和居群遗传多样性较高, 泉州居群遗传多样性最低。居群间的多样性差异可能与居群内所取样本量有关 (王丽鸳 等, 2010), 泰安、武汉和太和居群样本量均大于 20 个, 而泉州仅仅 2 个, 说明取样样本量是影响多样性分析结果的重要因素。

#### 3.2 中国香椿资源的遗传分化

香椿资源的交配系统、基因流、分布范围以及生态习性也可能是其高遗传多样性的重要原因。研究者普遍认为异交、多年生广布种具有较高的遗传多样性 (Hamrick & Godt, 1989; Hamrick, 1990)。香椿是雌雄异株多年生木本植物, 交配系统为异交, 遍布于中国河南、山东、安徽、湖北、四川、云南等地区, 地理分布范围广。这些可能是造成其遗传多样性高、居群杂合度高的结果。本研究中居群间的遗传分化系数较高, 说明本研究香椿资源大部分的遗传变异存在于居群内, 可能因为香椿属于虫媒异花传粉, 在同一居群内的个体可充分杂交, 后代遗传分化较大; 不同居群间由于地理隔离, 降低了杂交的可能性, 也会导致居群间存在一定的遗传分化, 但与居群内分化相比较小 (邓科君 等, 2009)。此结果高于其他多年生木本植物的平均值 (0.076) (Hamrick & Godt, 1989), 也高于 Hamrick (1990) 对 1968—1988 年里以异交为主的物种遗传变异量 ( $G_{st} = 0.10$ ) 的统计结果。同时, 依据 Nei (1978) 对遗传分化程度的  $G_{st}$  分类标准 (低:  $G_{st} < 0.05$ , 中等:  $G_{st} = 0.05 \sim 0.15$ , 高:  $G_{st} > 0.15$ ), 本研究所用香椿资源也属高度分化群体。以上说明本研究中香椿居群存在高度遗传分化。

基因流是影响群体遗传结构的主要因素 (Hamrick, 1990)。本研究中根据 EST-SSR 标记得到的基因流  $N_m$  为 0.7656, 根据 SRAP 分析结果为  $N_m$  为 1.1004, 说明居群间存在一定的基因交流, 如通过移植、种子交流或种群间杂交的方式, 但并不频繁, 从而导致种群间遗传分化更加明显。

#### 3.3 香椿资源的聚类分析与资源保护策略

根据 SRAP 和 EST-SSR 两种标记得到的聚类结果基本一致, 10 个居群划分为 3 类, 第 1 类包括衡水、泰安和太和居群; 第 2 类包括成都、武汉、昆明和汝阳居群; 第 3 类主要是德州和泉州居群。对此从资源保护的角度考虑, 结合泰安、武汉和太和居群遗传多样性较高, 资源最丰富的事实, 建议可以在第 1 类群中建立以泰安和太和居群为中心的主要资源保护中心, 在第 2 类群中建立以武



汉居群为中心的主要资源保护中心, 并在泉州和德州建立次级资源保护中心, 这样可一定程度上保护现有中国香椿资源。安徽太和与山东泰安在地理位置上相聚较远, 但遗传距离最近, 遗传一致度最大, 反映出遗传距离与地理距离之间相关性不大, 这种现象可能与两居群多为栽培树种, 与人工选择培育并广泛引种有一定关系。

本研究中利用 33 对 SRAP 和 45 对 EST-SSR 分子标记对来自 10 个居群的香椿资源进行多样性评价和群体遗传结构分析, 结果表明中国香椿资源具有较高的遗传多样性, 居群间遗传差异大, 遗传分化较为明显, 同时为香椿种质资源提出了初步的保护策略。研究结果可为中国香椿资源种质评价、进一步的开发与利用、新品种选育等方面研究奠定基础。

## References

- Chen Shu-lin, Wang Pei-zheng, Hu Bao-min. 2006. Transferability of upland cotton EST-SSRs to sunflower. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 26 (3): 502 - 506. (in Chinese)
- 陈树林, 王沛政, 胡保民. 2006. 陆地棉 EST-SSRs 在向日葵中的通用性研究. *西北植物学报*, 26 (3): 502 - 506.
- Deng Ke-jun, Zhang Yong, Xiong Bing-quan, Peng Jin-hua, Zhang Tao, Zhao Xiao-nan, Ren Zheng-long. 2009. Identification, characterization and utilization of simple sequence repeat markers derived from *Salvia miltiorrhiza* expressed sequence tags. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 44 (10): 1165 - 1172. (in Chinese)
- 邓科君, 张 勇, 熊丙全, 彭金华, 张 韬, 赵晓楠, 任正隆. 2009. 药用植物丹参 EST-SSR 标记的鉴定. *药学报*, 44 (10): 1165 - 1172.
- Hamrick J L. 1990. Isozymes and the analysis of genetic structure in plant populations // Soltis D E, Soltis P S. *Isozymes in plant biology* ( II ). London: Chapman and Hall: 87 - 105.
- Hamrick J L, Godt M J W. 1989. Allozyme diversity in plant species // Brown A H D, Clegg M T, Kahler A I, Weir B S. *Plant population genetics, breeding and genetic resources* ( II ). Sunderland: Sinauer: 43 - 63.
- Hamrick J K, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. 1992. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species. *New Forests*, 6 (1 - 4): 95 - 124.
- Jing Zhao-bin, Xu Ming, Lei Yu-shan. 2016. Construction and application of SRAP-PCR system to analyze genetic relationship of *Actinidia*. *Acta Horticulturae Sinica*, 43 (2): 337 - 346. (in Chinese)
- 井赵斌, 徐 明, 雷玉山. 2016. 猕猴桃 SRAP-PCR 体系的建立及品种资源亲缘关系研究. *园艺学报*, 43 (2): 337 - 346
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theoretical & Applied Genetics*, 103 (2 - 3): 455 - 461.
- Li Wei-feng, Yang Lang, Tang Kan, Zeng Ling, Liang Guang-wen. 2007. Microsatellite polymorphism of *Bactrocera dorsalis* (Hendel) populations in China. *Acta Entomologica Sinica*, 50 (12): 1255 - 1262. (in Chinese)
- 李伟丰, 杨 朗, 唐 侃, 曾 玲, 梁广文. 2007. 中国桔小实蝇种群的微卫星多态性分析. *昆虫学报*, 50 (12): 1255 - 1262.
- Liang Xiao-yu, Bai Shi-qie, Ji Yang, Hu Yuan-bin, Yi Jun, Zhang Xin-quan. 2017. Comparative analysis of genetic diversity of *Cichorium intybus* L. with SRAP and EST-SSR markers. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, (7): 17 - 23. (in Chinese)
- 梁小玉, 白史且, 季 杨, 胡远彬, 易 军, 张新全. 2017. SRAP 和 EST-SSR 标记对菊苣遗传多样性的比较分析. *黑龙江畜牧兽医*, (7): 17 - 23.
- Lu Min, Yan Xiu-qin, Bai Jing, Zhuang Huai-shan, Wang Dao-ping, An Hua-ming. 2017. Construction of core collection in wild *Rosa roxburghii* from Guizhou province using EST-SSR markers and fruits quality traits. *Acta Horticulturae Sinica*, 44 (8): 1486 - 1495. (in Chinese)
- 鲁 敏, 鄢秀芹, 白 静, 张怀山, 王道平, 安华明. 2017. 基于 EST-SSR 标记与果实品质性状的贵州野生刺梨核心种质构建. *园艺学报*, 44 (8): 1486 - 1495.
- Ma Q Q, Zhang J P, Pei D. 2011. Genetic analysis of walnut cultivars in china using fluorescent amplified fragment length polymorphism. *Journal of the American Society for Horticultural Science American Society for Horticultural Science*, 136 (6): 422 - 428.

- Nei M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89 (3): 583 – 590.
- Rogers S O, Bendich A J. 1989. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant molecular biology manual*. Berlin: Springer Netherlands: 73 – 83.
- Song X Y, Zhang C Z, Li Y, Feng S S, Yang Q, Huang S W. 2016. SSR analysis of genetic diversity among 192 diploid potato cultivars. *Horticultural Plant Journal*, 2 (3): 163 – 171.
- Souzasobreira F B, Souza G B, Rosado C C, Miranda F D, Soares T C, Gontijo A B. 2015. Genetic diversity in three natural populations of *Pitcairnia flammea* (L.) John (Bromeliaceae) estimated by ISSR markers. *Genetics & Molecular Research*, 14 (4): 15892 – 15901.
- Wang C L, Cao J W, Tian S R, Wang Y R, Chen Z Q. 2008. Germplasm resources research of *Toona sinensis*, with RAPD and isoenzyme analysis. *Biologia*, 63 (3): 320 – 326.
- Wang Li-yuan, Jiang Yan-hua, Duan Yun-shang, Cheng Hao, Zhou Jian, Zeng Jian-ming, Wei Kang. 2010. Genetic diversity of tea landraces using SSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 36 (12): 2191 – 2195. (in Chinese)
- 王丽鸳, 姜燕华, 段云裳, 成浩, 周健, 曾建明, 韦康. 2010. 利用 SSR 分子标记分析茶树地方品种的遗传多样性. *作物学报*, 36 (12): 2191 – 2195.
- Wu Z L, Wang J, Shen Y J, Lu W P. 2008. Analysis of genetic diversity of *Vitis amurensis* by using SSR markers. *Journal of Fruit Science*, 25 (6): 821 – 827.
- Xiang Xu, Ou Liang-xi, Chen Hou-bin, Sun Qing-ming, Chen Jie-zhen, Cai Chang-he, Bai Li-jun, Zhao Jun-sheng. 2010. EST-SSR analysis of genetic diversity in 96 litch (*Litchi chinensis* Sonn.) germplasm resources in China. *Genomics and Applied Biology*, 29 (6): 1082 – 1092. (in Chinese)
- 向旭, 欧良喜, 陈厚彬, 孙清明, 陈洁珍, 蔡长河, 白丽军, 赵俊生. 2010. 中国 96 个荔枝种质资源的 EST-SSR 遗传多样性分析. *基因组学与应用生物学*, 29 (6): 1082 – 1092.
- Xin Ya, Cui Hai-rui, Zhang Ming-long, Yao Yan-ling, Lu Mei-zhen, Jin Ji-qiang, Lim Yong-pyo, Choi Su-ryun. 2006. The transferability of chinese cabbage EST-SSR markers. *Chinese Journal of Cell Biology*, 28 (2): 248 – 252. (in Chinese)
- 忻雅, 崔海瑞, 张明龙, 姚艳玲, 卢美贞, 金基强, 林容构, 崔水莲. 2006. 白菜 EST-SSR 标记的通用性. *细胞生物学杂志*, 28 (2): 248 – 252.
- Xing P Y, Liu T, Song Z Q, Li X F. 2016. Genetic diversity of *Toona sinensis* roem in China revealed by ISSR and SRAP markers. *Genetics & Molecular Research*, 15 (3): doi: 10.4238/gmr.15038387.
- Yang Cheng-jun, Wang Jun, Mu Li-qiang, Li Shao-chen, Liu Guan-jun, Hu Chang-qun. 2008. Development of EST-SSR marker in *Panax ginseng*. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 16 (1): 114 – 120. (in Chinese)
- 杨成君, 王军, 穆立蔷, 李绍臣, 刘关君, 胡长群. 2008. 人参 EST-SSR 标记的建立. *农业生物技术学报*, 16 (1): 114 – 120.
- Yang S H, Guo N, Ge H. 2016. Morphological and AFLP-Based genetic diversity in *Rosa platyacantha* population in eastern Tianshan mountains of northwestern China. *Horticultural Plant Journal*, 2 (1): 55 – 60.
- Yang Yang, Liu Zhen, Zhao Yang, Liang Guo-qiang, Zhao Xi. 2009. Genetic diversity and relationship of Huangjinchai cultivar based on EST-SSR markers. *Journal of Tea Science*, 29 (3): 236 – 242. (in Chinese)
- 杨阳, 刘振, 赵洋, 梁国强, 赵熙. 2009. 利用 EST-SSR 标记研究黄金茶群体遗传多样性及遗传分化. *茶叶科学*, 29 (3): 236 – 242.
- Yeh F C, Yang R C, Boyle T. 1997. Popgene, the user friendly shareware for population genetic analysis. Edomonton, Canada: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta.
- Zeng S H, Xiao G, Guo J, Fei Z J, Xu Y Q, Roe B A, Wang Y. 2010. Development of a EST dataset and characterization of EST-SSRs in a traditional Chinese medicinal plant, *Epimedium sagittatum* (Sieb. Et Zucc.) Maxim. *BMC Genomics*, 11 (1): 1 – 11.
- Zheng Jian, Zheng Yong-qi, Zhang Shuan-hong, Zong Yi-chen, Li Bo-jing, Wu Chao. 2008. Genetic diversity in natural populations of *Sorbus pohuashanensis*. *Biodiversity Science*, 16 (6): 562 – 569. (in Chinese)
- 郑健, 郑勇奇, 张川红, 宗亦臣, 李伯菁, 吴超. 2008. 花椒树天然群体的遗传多样性研究. *生物多样性*, 16 (6): 562 – 569.
- Zheng Li-shan, Shi Yu-zhen, Wang Jing-yi, Huang Bing-zhi, Ji Xiao-rui, Zhang Bao-cai, Yuan You-lu, Wu Yao-ting. 2008. Transferability of cotton EST-SSRs markers to *Musa*. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 24 (1): 33 – 37. (in Chinese)
- 郑丽珊, 石玉真, 王静毅, 黄秉智, 冀小蕊, 张保才, 袁有禄, 武耀廷. 2008. 棉花 EST-SSRs 在香蕉中通用性. *中国农学通报*, 24 (1): 33 – 37.