



祝园青,白天道,王晓波,等.马褂木母树林与不同来源无性系的遗传多样性比较分析[J].江西农业大学学报,2021,43(3):630-639.

ZHU Y Q,BAI T D,WANG X B,et al.A comparative analysis of genetic diversity between seed-tree stand and clones of *Liriodendron* spp.[J].Acta agriculturae universitatis Jiangxiensis,2021,43(3):630-639.

马褂木母树林与不同来源无性系的遗传多样性比较分析

祝园青¹,白天道¹,王晓波²,胥 猛³,蒋维昕^{1*},黄寿先¹

(1.广西大学 林学院/国家林业与草原局中南速生材繁育重点实验室,广西 南宁 530004;2.全州县咸水林场,广西 全州 541500;3.南京林业大学 南方现代林业协同创新中心,江苏 南京 210037)

摘要:【目的】马褂木(*Liriodendron chinense*(Hemsl.)Sarg.)为国家二级保护珍稀树种,因其叶形独特,干形通直,木材纹理清晰,为我国优良的用材及园林绿化树种。它与该属仅存的另一种北美鹅掌楸(*L. tulipifera* L.)均属古老的孑遗植物,具有重要的科学研究价值。开展马褂木天然实生苗群体和嫁接优树群体遗传结构研究对马褂木树种的保护以及开发利用具有十分重要的意义。课题利用EST-SSR分子标记技术分析中国马褂木嫁接无性系(LC)、北美鹅掌楸嫁接无性系(LT)和中国马褂木母树林(LCS)的遗传多样性,为马褂木优良无性系评价及良种繁育工作提供参考。【方法】以广西全州咸水林场的中国及北美嫁接无性系(共35株)和全州种源的马褂木采种母树林(53株)的新鲜叶片为实验材料,利用25对EST-SSR引物进行扩增,PCR产物经8%聚丙烯酰胺胶电泳及银染分析,计算其遗传多样性参数,遗传距离,开展遗传分化和遗传聚类分析,以比较不同材料的遗传多样性及亲缘关系。【结果】遗传多样性分析表明,LT的遗传多样性参数:等位基因数(n_a)为4.840 0,有效等位基因数(n_e)为3.3386,Shannon多样性指数(I)为1.271 0,观测杂合度(H_o)为0.399 3,期望杂合度(H_e)为0.662 7,基因多样性(N_{ei})为0.642 6,普遍高于LC($n_a=4.040$ 0, $n_e=2.828$ 9, $I=1.108$ 0, $H_o=0.359$ 6, $H_e=0.611$ 5, $N_{ei}=0.591$ 0)及LCS($n_a=4.160$ 0, $n_e=2.450$ 2, $I=0.963$ 4, $H_o=0.313$ 5, $H_e=0.514$ 1, $N_{ei}=0.508$ 8),Kruskal-Wallis检验显示组间在 n_e ($P=0.029$)、 I ($P=0.036$)、 H_e ($P=0.012$)、 N_{ei} ($P=0.029$)上达到显著水平;分子方差分析(AMOVA)结果显示,群体间、群体内的遗传变异分别占总变异量的14.3%和85.7%;基于个体共祖系数的遗传结构分析表明参试材料共祖群体数(K)为3,且基于Ward最小方差法对个体间遗传距离以分组数为3进行聚类分析,可将LCS、LC及LT较好地区分。【结论】参试材料总体上具有较高的遗传多样性,其中LT遗传多样性最高,其次为LC,而LCS最低;遗传变异以群体内为主,群体间分化处于中等水平,有一定基因流($F_{st}=0.143$, $N_m=1.496$);LC和LT间的亲缘关系小于LC和LCS间的亲缘关系,表明中国马褂木群体间的分化更为明显;这为马褂木优良种质资源的收集和良种繁育提供了参考。

关键词:马褂木;北美鹅掌楸;嫁接无性系;SSR;遗传多样性;比较分析

中图分类号:S792.21.04 **文献标志码:**A **文章编号:**1000-2286(2021)03-0630-10

收稿日期:2020-10-22 **修回日期:**2020-12-15

基金项目:国家林业和草原局中央预算内林业基本建设投资计划项目(林规发[2019]18号)、广西财政林木良种专项基金(桂林计发[2018]23号)和广西科技攻关项目(桂科攻10100012-2)

Project supported by the Forestry Infrastructure Investment Project of State Forestry and Grassland Administration (Linguifa No.201918), the Special Fund for Improved Tree Species of Guangxi (Guilinjifa No.201823) and Key Scientific and Technological Projects of Guangxi (Guikong No.10100012-2)

作者简介:祝园青,orcid.org/0000-0002-0675-9689,781026678@qq.com;*通信作者:蒋维昕,讲师,博士,主要从事林木群体遗传研究,orcid.org/0000-0001-6447-8087,jwx_1985@163.com。

A Comparative Analysis of Genetic Diversity Between Seed-Tree Stand and Clones of *Liriodendron* spp.

ZHU Yuanqing¹, BAI Tiandao¹, WANG Xiaobo², XU Meng³,
JIANG Weixin^{1*}, HUANG Shouxian¹

(1.College of Forestry, Guangxi University, Nanning 530004, China; 2.Xianshui Forest Farm, Quanzhou, Guangxi 541500, China; 3.Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China)

Abstract: [Objective] *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. is a national second-class protected rare tree species, which is an excellent wood and landscaping tree in China due to its unique leaf shape, straight dry shape and clear wood texture. Both *L. chinense* (LC) and *L. tulipifera* (LT), the only two remaining plants in *Liriodendron*, are ancient relict plants of great scientific value. It is very important to study the genetic structure of natural seedling population and grafted tree populations of *L. chinense*. Given this, LC clones, LT clones and the seed-trees stand of *L. chinense* (LCS) from the provenance of Quanzhou were sampled and studied on their genetic diversity based on EST-SSR (expressed sequence tag-simple sequences repeats) markers technology, aiming to provide reference for superior clone selection and breeding of *Liriodendron*. [Method] In this study, fresh healthy leaves of a total of 35 grafted clones of *L. chinense* and *L. tulipifera* and 53 seed-trees of *L. chinense* stand were collected from Xianshui Forest Farm, Quanzhou, Guangxi Zhuang Autonomous Region. The total genomic DNAs of all the individuals were isolated and amplified across 25 pairs of EST-SSR primers. The PCR products were electrophoresed by 8% polyacrylamide gel and stained with silver. The genetic diversity, genetic differentiation and genetic clustering were analyzed to reveal the genetic variation of and relationship among different tulip trees. [Result] The results showed that the genetic variation parameters of *L. tulipifera* (LT) clones were as follows: the number of alleles (na) was 4.840 0, the number of effective alleles (ne) was 3.338 6, Shannon diversity index (I) was 1.271 0, observed heterozygosity (Ho) was 0.399 3, expected heterozygosity (He) was 0.662 7, gene diversity (Nei) was 0.642 6, which were generally higher than those of *L. chinense* (LC) clones ($na=4.040$ 0, $ne=2.828$ 9, $I=1.108$ 0, $Ho=0.359$ 6, $He=0.611$ 5, $Nei=0.591$ 0) and LCS population ($na=4.160$ 0, $ne=2.450$ 2, $I=0.963$ 4, $Ho=0.313$ 5, $He=0.514$ 1, $Nei=0.508$ 8). Kruskal-wallis test showed significant levels in ne ($P=0.029$), I ($P=0.036$), He ($P=0.012$) and Nei ($P=0.029$) between the groups; AMOVA (analysis of molecular variance) showed that the genetic variation among and within populations accounted for 14.3% and 85.7% of the total variation; the genetic structure analysis based on the coefficient of individual common ancestor showed that the number of common progeny population (K) of the tested materials was 3, and the cluster analysis of genetic distance among the individuals with the number of groups of 3 based on Ward's minimum variance method could better distinguish LCS population, LC clones and LT clones. [Conclusion] The above results implied that the genetic diversity of the materials tested was high, among which LT clones possessed the highest genetic diversity, the second was LC, and the LCS population was the opposite. In addition, the genetic variation within population was predominant and moderate differentiation was detected among the populations, with a certain gene flow ($F_{st}=0.143$, $N_m=1.496$). The genetic similarity between the grafting clones LC and LT was smaller than that detected between LC clone and LCS population, implying that the differentiation between the populations of *L. chinense* was more obvious. This provides reference for the collection and breeding of superior germplasm resources of *Liriodendron*.

Keywords: *Liriodendron chinense*; *L. tulipifera*; grafting clone; SSR; genetic diversity; comparative analysis

【研究意义】鹅掌楸属(*Liriodendron*)树种隶属木兰科(Magnoliaceae),大部分已经灭绝,现存2个种,中国马褂木(*Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg.)和北美鹅掌楸(*L. tulipifera* L.),因其叶形似马褂又似鹅掌而得名^[1-2]。其树干挺拔,树姿优美,是优良的用材及园林绿化树种。中国马褂木星散间断分布于浙

江、江西、福建、湖北、湖南、广西、陕西、四川、贵州、云南等地,越南北部也有分布,资源相对较为稀少,属渐危种,已被列为国家二级濒危保护树种^[3]。与中国马褂木濒危状态不同,北美鹅掌楸连续成片分布于美国东部各州及加拿大东南部地区,其群体规模普遍较大,资源保存较为丰富^[3-6]。【前人研究进展】由于鹅掌楸属 2 个树种的用途及其分布特性,国内学者先后对其开展较多的研究,主要涉及系统地理进化、群体遗传多样性、资源收集保存与评价、杂交育种、栽培技术等。在系统进化与遗传多样性方面,刘玉壶^[7]于 1984 年在木兰科分类系统的初步研究中利用形态标记对马褂木进行了形态学水平上的比较,表明中国马褂木较原始,而北美鹅掌楸是次生的。Parks 和 Wendel^[8]利用等位酶标记和 RFLP 技术比较中国马褂木和北美鹅掌楸遗传多样性,研究得出中国马褂木的遗传多样性低于北美鹅掌楸的遗传多样性。基于分子标记群体遗传研究表明,中国马褂木在天然群体中具有较高的遗传多样性^[9-12],且种群间的遗传分化程度较高^[13]。在马褂木杂交育种方面,Xu 等^[14]表明马褂木在自由授粉过程中,存在着自交、种内交配和种间交配等多种交配方式,研究发现杂交马褂木的遗传多样性较高,且马褂木亲本遗传距离及子代杂合度可能并非马褂木杂种优势形成的主要原因^[15-17],优良杂种后代可能有较多的遗传信息来自北美鹅掌楸^[18]。因此,开展中国马褂木及北美鹅掌楸优良遗传资源收集和保存,有助于该属树种的杂交改良和扩繁利用。【本研究切入点】遗传多样性评价是良种选育的前提和基础,开展马褂木优良种质资源遗传多样性评价,以为其科学管理和有效利用提供指导。【拟解决的关键问题】基于此,本研究利用 SSR 分子标记,对广西全州县咸水林场收集保存的中国马褂木及北美鹅掌楸嫁接优树以及实生采种母树林进行遗传多样性分析,以为其育种利用及良种生产提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验地概况及试验材料

试验地位于广西桂林市全州县咸水林场,地理位置为 E110°42'12",N25°47'27",地貌主要为低山、丘陵,土壤以红壤土为主。全年光照充足,雨量充沛,年平均气温 17.9 ℃,年平均降雨量 1 454 mm,年均相对湿度 78%,属中亚热带季风气候^[19]。

表 1 嫁接优树基本信息
Tab.1 Basic information of grafting plus trees

序号 Number	群体 Population	无性系号 Clone number	样本量 Sample size	个体编号 Individual number	接穗来源 Scion source	嫁接成活率/% Grafting survival rate
1	LC	LC-FJ	2	LC-FJ-1/ LC-FJ-2	中国(福建柘荣)	50.0
2	LC	LC-GX	2	LC-GX-1/ LC-GX-2	中国(广西全州)	53.4
3	LC	LC-GZ1	2	LC-GZ1-1/ LC-GZ1-2	中国(贵州黎平)	53.7
4	LC	LC-GZ2	2	LC-GZ2-1/ LC-GZ2-2	中国(贵州黎平)	53.0
5	LC	LC-JX	2	LC-JX-1/ LC-JX-2	中国(江西庐山)	48.3
6	LC	LC-YN1	1	LC-YN1	中国(云南金平)	23.3
7	LC	LC-YN2	2	LC-YN2-1/ LC-YN2-2	中国(云南金平)	37.0
8	LC	LC-ZJ1	2	LC-ZJ1-1/ LC-ZJ1-2	中国(浙江安吉)	75.0
9	LC	LC-ZJ2	2	LC-ZJ2-1/ LC-ZJ2-2	中国(浙江丽水)	62.0
10	LT	LT-MSL1	2	LT-MSL1-1/ LT-MSL1-2	北美(密苏里州)	66.6
11	LT	LT-MSL2	2	LT-MSL2-1/ LT-MSL2-2	北美(密苏里州)	58.8
12	LT	LT-MSL3	2	LT-MSL3-1/ LT-MSL3-2	北美(密苏里州)	78.1
13	LT	LT-LYS1	2	LT-LYS1-1/ LT-LYS1-2	北美(路易斯安那州)	38.6
14	LT	LT-LYS2	1	LT-LYS2	北美(路易斯安那州)	20.5
15	LT	LT-BK1	2	LT-BK1-1/ LT-BK1-2	北美(北卡罗来纳州)	35.8
16	LT	LT-BK2	2	LT-BK2-1/ LT-BK2-2	北美(北卡罗来纳州)	25.7
17	LT	LT-BK3	2	LT-BK3-1/ LT-BK3-2	北美(北卡罗来纳州)	44.6
18	LT	LT-NK1	2	LT-NK1-1/ LT-NK1-2	北美(南卡罗来纳州)	25.8
19	LT	LT-NK2	1	LT-NK2	北美(南卡罗来纳州)	20.5
20	LCS	—	53	LCS-1~LCS-53	中国(广西全州)	—

试验材料分为两部分,第一部分是中国马褂木(LC)及北美鹅掌楸嫁接优树(LT)(2019年3月嫁接)。其中LC共9个无性系,接穗材料来源于咸水林场种源试验林选育的优良单株。LT共10个无性系,接穗材料来源于南京林业大学北美鹅掌楸种源试验林。砧木为广西全州种源1年生实生苗。第二部分为中国马褂木全州种源人工林(LCS),面积共10 hm²,造林时间2011年3月,因其生长表现较好且已进入开花结实期,于2018年初步通过样方调查、去劣疏伐、抚育施肥等措施,将其改建为采种母树林。在全林范围内随机选择了53株母树作为样本,株间间隔30 m以上。此外,为了验证SSR扩增的稳定性及嫁接管理过程中是否出现错漏,针对部分优树无性系采集了2个样本(嫁接分株),共计获得35个样本(表1)。

1.2 DNA的提取及PCR扩增

采用改良CTAB法提取马褂木叶片的DNA^[20],用微量核酸蛋白检测仪(ScanDrop200,耶拿,德国)进行DNA浓度和纯度测定,并用10 g/L琼脂糖凝胶电泳检测DNA完整性。基于文献检索^[20],引物初筛,最终获得扩增稳定,多态性较高的25个SSR位点(表2),SSR引物由生工生物科技有限公司(上海)合成。PCR扩增体系参见文献^[20]。

表 2 SSR 引物基本信息
Tab.2 Information table of of SSR primers

位点 Locus	引物序列 Primer sequences	重复序列 Repeat sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
LT002	F:CCTACCACCAGCAATACCTA R:TCTCGTCGCTGAAGATATG	(GCA)9	56.6
LT015	F:TCCGTTATCTCTCTCCAAAA R:CTAGACAGGTGCTCGGATAC	(CCGAAC)5	56.7
LT037	F:CCCTAAATTCTCATCACACC R:CCAGATCGTCTTGTCTCAT	(GCA)12	55.5
LT046	F:CCTTCCACACACTCAGCTA R:CTCAAAACATTCTCCAACA	(CT)42	55.7
LT056	F:CTTGGGTTCTTTATGCAGTC R:TCTGTAGCATCTCCTTGACC	(CT)26	56.8
LT057	F:CATGGTGGACATCACATAAA R:CTTACAGGCAAATCTTACAGG	(CA)11	54.7
LT058	F:TTAAAAATGGAGGAACGAGAG R:GTAGAGGCTTCGAGTTTGTG	(GA)9	55.8
LT060	F:CTACAGAGCCGTTGATTCTC R:GGGAAGAACAGCATAAATGA	(CT)23	56.8
LT061	F:CTTCGATCCTGAAATCGTAT R:GAGCGAGAGAGAGAGAAGAA	(TCTG)5	55.8
LT068	F:CACAGGTATTGGCTTTTCTC R:GGTGGGTTATTTACAACAT	(TC)19	54.7
LT071	F:GCGCTTCCTCTAAAATCTCT R:CCAAATCCATGCAACATC	(TC)17	54.2
LT072	F:TGGAATAAATCAGCTCCTACTC R:CTGTTGAAAAGAGGGAAAATG	(CT)18	55.0
LT078	F:ACTGGGCCGTTTATACTTTT R:TGACCTTTCCCTTATTCTCA	(AACA)5	53.7
LT081	F:GCAAGGCTAGTGAAAGACTG R:GAGTCACCGAAGACAAAAGAG	(TCA)6	57.8
LT096	F:TGCAACCTAACAAGATGTGT R:TGAAAAGCAACCAAGTTACC	(CT)20	54.8

续表 Continued tab.

位点 Locus	引物序列 Primer sequences	重复序列 Repeat sequence	退火温度/℃ Annealing temperature
LT113	F:CCAAGTGAAAATCAACTCCT R:ATCTCGACGGTGTCTTGAT	(CT)18	54.5
LT121	F:GCATGAATCCAAAGAAGAG R:CTGCGAAGAAGAGAAGAAG	(TC)23	54.8
LT123	F:TCAGACTTTCGGATTAGACC R:AAGGAATGGAGGGAATTTAG	(CAG)6	54.8
LT125	F:GTCCAAGATCAAGGGTAGTG R:TAGATGGATTGACCCACTTG	(TC)15	56.8
LT127	F:GTTGGGTTTCATGTTTATGGT R:GGAGGAAAATCACAGTATCG	(TC)11	54.8
LT140	F:TACAAGGTCTCCCTCCTTCT R:GAAGCCGGTTAGAAACATC	(CTT)8	56.7
LT163	F:TACCAATTCGAGAGCATCTT R:AAGGAGAAGGAGAAGGAGAA	(CTT)7	54.8
LT172	F:GATAAACACTGGCGTCTGAT R:AAGACCATTGAAGAAGACCA	(CTTT)6	54.8
LT3	F:AGAAATCCACTCGCAGGAGA R:CGGGTCGGATTACTACTGGA	(GAA)10	58.8
LT21	F:GGGCTTTAACCGAGGGATAG R:CATTTCCTGCCTCACATAGC	(CT)16	58.8

1.3 数据处理

将 PCR 产物经 8% 聚丙烯酰胺胶电泳并银染,拍照保存。利用凝胶 DNA 片段识别软件 GelAnalyzer 19.1(<http://www.gelalyzer.com/index.html>)对每张胶图上的目的条带数量及片段大小进行判读,将判读结果导出为 Excel 文件。利用 POPGENE32^[21]计算各群体的等位基因数(na)、有效等位基因数(ne)、Shannon 多样性指数(I),各位点的观测杂合度(Ho)、期望杂合度(He),基因多样性(Nei)。利用群体遗传分析软件 GenAlEx6.5^[22]AMOVA 计算 F -统计量和基因流(Nm)。利用 R3.6.1^[23]及其相关 R 数据包^[24-25]分析参试马褂木材料的遗传多样性、遗传结构、计算个体遗传距离并进行聚类。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

遗传多样性分析结果显示(图 1),北美鹅掌楸嫁接无性系(LT)的等位基因数(na)为 4.840 0,有效等位基因数(ne)为 3.338 6,香农信息指数(I)为 1.271 0,观测杂合度(Ho)为 0.399 3,期望杂合度(He)为 0.662 7,基因多样性(Nei)为 0.642 6,高于中国马褂木嫁接无性系(LC)的遗传多样性($na=4.040\ 0, ne=2.828\ 9, I=1.108\ 0, Ho=0.359\ 6, He=0.611\ 5, Nei=0.591\ 0$)。相较于嫁接无性系 LT 和 LC,中国马褂木母树林(LCS)遗传多样性较低($na=4.160\ 0, ne=2.450\ 2, I=0.963\ 4, Ho=0.313\ 5, He=0.514\ 1, Nei=0.508\ 8$)。

对遗传多样性指标进行 Kruskal-Wallis 检验(图 1),发现除 na, Ho 外,其他指标在群体间均有显著差异。

2.2 遗传分化

AMOVA 分析表明,3 组材料(LCS、LC 及 LT)间的 F_{st} 值为 0.143,即有 14.3% 的遗传变异存在于群体间,大部分变异(85.7 %)存在于群体内,说明群体间存在中等程度的遗传分化^[26]。马褂木群体间的存在一定程度的基因流($Nm=1.496$)可能是其维持中等程度分化原因之一。参试 3 组材料间的成对遗传分化系数显示(表 4),LC 和 LT 之间的遗传分化系数最低,其次是 LT 和 LCS 之间,而 LC 和 LCS 之间的遗传分化系数最高。

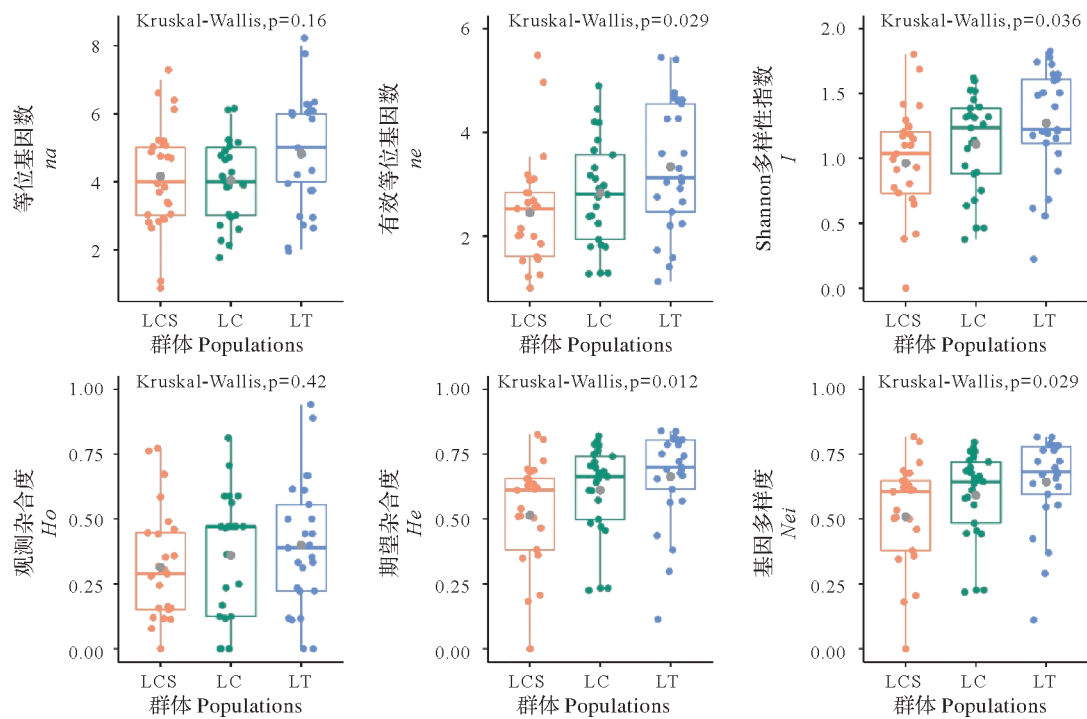


图1 马褂木优树无性系与母树林遗传变异参数比较

Fig.1 Comparison of genetic variation parameters between superior clones and seed stands of *L. chinense*

表3 马褂木材料的遗传分化程度分析

Tab.3 Genetic differentiation of *L. chinense*

变异来源 Source	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	方差估计值 Est.Var.	F统计 F-Statistics	基因流 Nm
群体间 Among populations	2	146.635	73.317	1.265(14%)	$F_{st}=0.143(0.001)$	1.496
个体间 Among individuals	85	949.672	11.173	3.603(41%)	$F_{is}=0.476(0.001)$	
个体内 Within individual	88	349.000	3.966	3.966(45%)	$F_{it}=0.551(0.001)$	

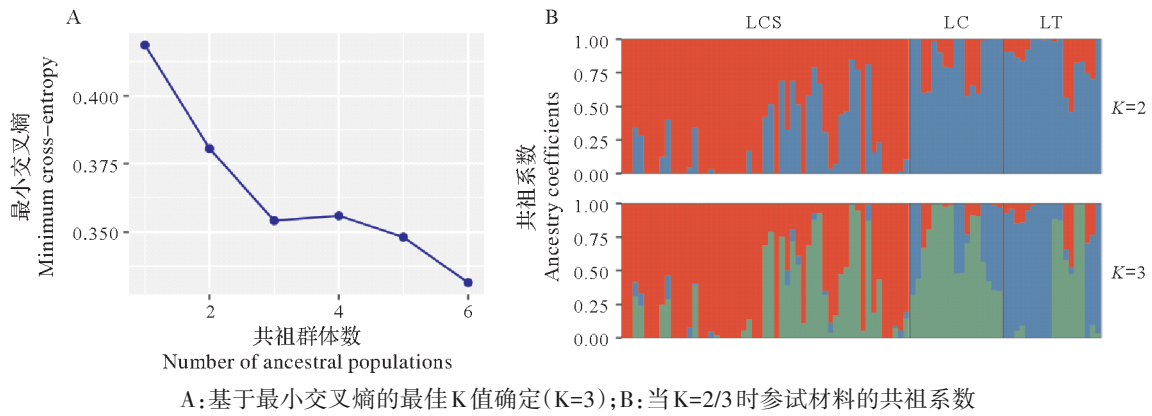
表4 参试3组材料间的成对遗传分化系数(Pairwise F_{st})

Tab.4 The coefficient of genetic differentiation between populations

群体 Population	中国马褂木母树林 LCS	中国马褂木嫁接无性系 LC
中国马褂木嫁接无性系 LC	0.109	
北美鹅掌楸嫁接无性系 LT	0.097	0.072

基于个体共祖系数的遗传结构分析表明,参试材料的共祖群体数(K)为3时,其最小交叉熵值出现拐点(图2A),由此认为供试材料可分为3个组。共祖系数图显示(图2B),第一类群主要由LCS构成(红色),第二类群主要由LC构成(绿色),第三类则主要为LT(蓝色)。需要指出的是,在 $K=2$ 时,发现LC和LT中个体的共祖比例更高(蓝色)。这可能意味着用于分析的SSR位点可能与生长性状相关基因有着密切关联,在人为表型趋同选择(均为种源试验林中表型优良的个体)下,使得LC和LT个体的等位基因及其频率具有较高的相似性,一定程度上掩盖自然状态下两者的真实遗传差异。

基于 Ward 最小方差法对个体间遗传距离^[27]进行聚类,发现聚类数等于 3 时,可将参试的 3 组材料 (LCS、LC、LT)较好的区分(图 3)。除 LT-MSL 2 与母树林聚在一起,LT-MSL 1,LT-MSL 3 与中国嫁接优树聚在一起外,同来源的基因型大多聚为一类。同时,从遗传距离上看,LC 和 LT 距离更近,聚在一起,这与上述推测一致。



A: 基于最小交叉熵的最佳 K 值确定 (K=3); B: 当 K=2/3 时参试材料的共祖系数
A: The best K value is determined by the minimum cross entropy (k=3); B: The ancestor coefficient of the individuals when k=2/3

图 2 参试马褂木材料群体结构分析

Fig.2 Population structure analysis of *L. chinense*

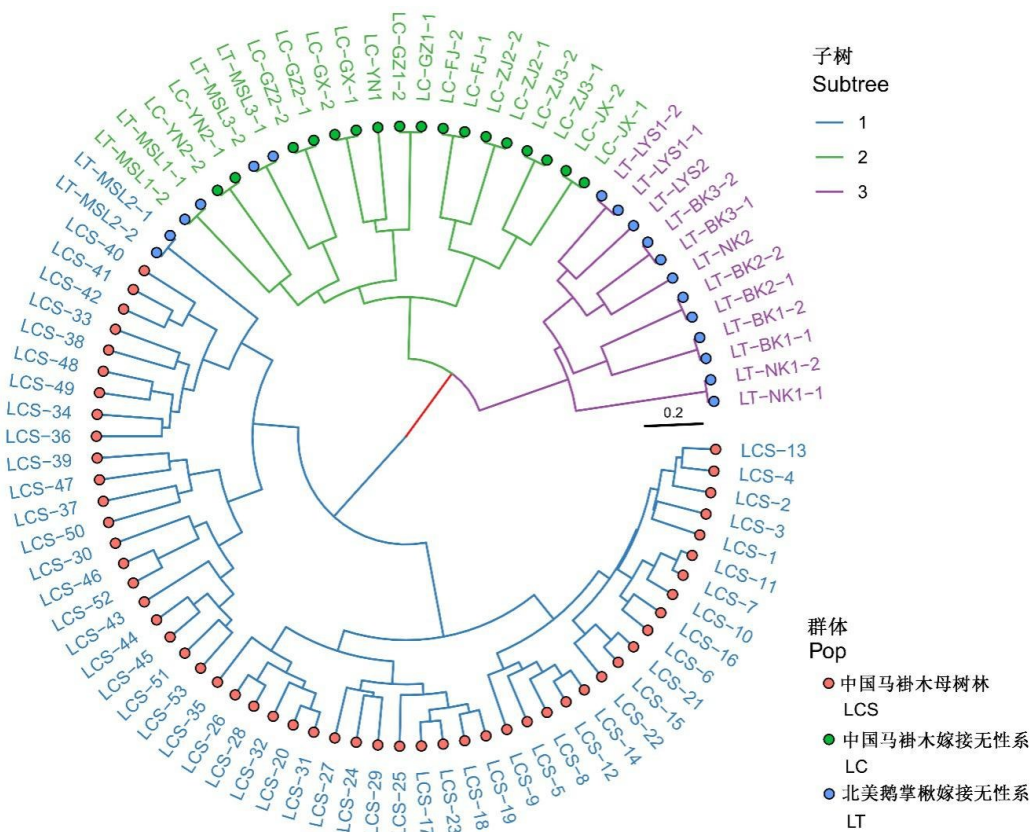


图 3 参试中国马褂木及北美鹅掌楸个体的聚类 (Ward.D2)

Fig.3 Hierarchical cluster of individuals of *L. chinense* and *L. tulipifera* (Ward.D2)

3 结论与讨论

3.1 遗传多样性

丰富的遗传多样性是林木群体遗传改良的前提和基础。本研究利用 25 对 SSR 引物对中国马褂木和北美鹅掌楸嫁接无性系,以及中国马褂木种源人工母树林进行遗传多样性比较分析,结果发现母树林的

遗传多样性($I=0.963\ 4$, $He=0.514\ 1$)低于优树无性系;而优树无性系中北美鹅掌楸的遗传多样性($I=1.271\ 0$, $He=0.662\ 7$)高于中国马褂木($I=1.108\ 0$, $He=0.611\ 5$)。与罗光佐^[28]等利用RAPD技术和李康琴^[29]利用SSR分子标记发现北美鹅掌楸的遗传多样性在天然、种源群体均高于中国马褂木的结果一致。表明中国马褂木异交水平普遍低于北美鹅掌楸。推测主要由于中国马褂木呈星散分布,居群间隔离较大,基因流动相对较少,同时居群内个体数量普遍较少,加剧了居群内个体的近交及自交程度,使得纯合位点增加,遗传多样性下降。相反,北美鹅掌楸呈大面积连续分布,居群间基因流动频繁,异交更为充分。而从中国马褂木嫁接无性系与母树林比较来看,尽管无性系样本数较少,在观测等位基因数上低于母树林,但其观测及期望杂合度、香农指数等指标等均高于母树林,这表明表型优良马褂木个体可能更多来自异交个体,即马褂木具有明显的近交或自交衰退^[30]。

马褂木作为国家Ⅱ级濒危保护树种,尽管其遗传多样性不如北美鹅掌楸,但与同为木兰科的珍稀树种红花玉兰(*Magnolia wufengensis*)相比,其遗传多样性整体高于红花玉兰($I=0.304\ 2$, $He=0.248\ 8$)^[31],且也明显高于同科的武当木兰(*Magnolia sprengeri*)的种群遗传多样性($I=0.198$, $He=0.128$)^[32]。中国马褂木具有较高遗传多样性的原因可能是马褂木属于孑遗植物,历史悠久,个体生命周期长,在进化过程中积存了较高水平的遗传变异,且存在着高水平的地理分化。中国东、西部的马褂木也可能起源于不同的避难所,在冰期后再向不同方向扩散,形成了丰富的多样性^[33]。此外,其维持相对较高杂合度的重要原因可能与其强烈的近交、自交衰退效应有关,由于环境对近/自交子代强烈的选择淘汰作用,使得最终成林植株多数来自异交个体,使得林分(通过样本检测)维持着一定水平的杂合度。而近交、自交子代的大量淘汰,也进一步解释了当前中国马褂木天然群体普遍规模较小的原因。

3.2 遗传分化

AMOVA分析结果发现,参试材料的 F_{st} 值为0.143,说明组内的遗传变异程度较高,组间的遗传分化程度相对较低。马褂木组间存在较高基因流($Nm=1.496$),高于前人对马褂木天然群体研究的结果($Nm=1.044$)^[11]。这与中国马褂木和北美鹅掌楸存在较大的地理隔离矛盾,推测造成这种组间基因流偏高和分化较小的原因可能并非完全来自居群间的花粉流动,而与人为基于表型的趋同选择有关,LC和LT无性系均选自种源试验林生长表现优良(树高及胸径较大,树干较通直圆满)的个体,LCS则来自单一种源天然林(广西全州)优树子代,在基因构成上与前两组差异较大,同时参试SSR位点可能与控制这些人为偏好的性状的基因紧密关联(连锁),使得LC和LT的SSR基因及基因型频率相对于LCS群体更为相似,进而造成两者遗传分化较小的现象。

基于个体遗传距离的聚类结果与组间分化水平基本一致,LCS独立一组,优树无性系LT、LC各一组,但距离更近。有研究表明,北美鹅掌楸与中国马褂木东部种源的遗传分化小于中国马褂木东西部种源间的差异,从进化上北美鹅掌楸介于中国马褂木东西部种群分化之间^[34]。这与组间成对分化系数变化趋势一致。因此,LC中部分无性系来自东部种源可能是造成其与LT遗传上更近的原因之一。Shen^[35]的研究表明,马褂木在中国东部和西部是分离的2个类群,在历史上虽然有一定的基因交流,但随着第四纪气候的波动,生境和扩散廊道被暖温带常绿林所占据,这可能使得马褂木的生境变得支离破碎,加剧了东西部种群的分化,最终形成了如今星散分布于部分山区的局面。并且随着近年来人们的乱砍滥伐,对马褂木天然群体造成了一定的破坏,人为的选择也加剧了马褂木种群的分化。需要指出的是,其中LT中的LT-MSL 2与LCS聚为一组,LT-MSL 1,LT-MSL 3与LC聚为一组,可能原因除了其自生遗传特性与中国马褂木较接近外,不排除错把紧靠砧木接口的萌条当作了接穗的可能性。

参考文献 References:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会.中国植物志[M].北京:科学出版社,1996:194-198.
Chinese Flora Editorial Board, Chinese Academy of Sciences. Flora of China[M]. Beijing: Science Press, 1996: 194-198.
- [2] 王章荣. 鹅掌楸属(*Liriodendron*)杂交育种回顾与展望[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2003, 27(3): 76-78.
WANG Z R. The review and outlook on Hybridization in tulip tree breeding in China[J]. Journal of Nanjing forestry university(natural sciences edition), 2003, 27(3): 76-78.
- [3] 郝日明, 贺善安, 汤诗杰, 等. 鹅掌楸在中国的自然分布及其特点[J]. 植物资源与环境, 1995, 4(1): 1-6.

- HAO R M, HE S A, TANG S J, et al. Geographical distribution of *Liriodendron chinense* in China and its significance[J]. Journal of plant resources and environment, 1995, 4(1): 1-6.
- [4] 李火根, 陈龙, 梁呈元, 等. 鹅掌楸属树种种源试验研究[J]. 林业科技开发, 2005, 19(5): 13-16.
- LI H G, CHEN L, LIANG C Y, et al. A case study on provenance testing of Tulip Tree (*Liriodendron* spp.)[J]. Journal of forestry engineering, 2005, 19(5): 13-16.
- [5] 李周歧, 王章荣. 中国马褂木的研究现状[J]. 林业科技开发, 2000, 14(6): 3-6.
- LI Z Q, WANG Z R. Research status of *Liriodendron chinense*[J]. Journal of forestry engineering, 2000, 14(6): 3-6.
- [6] 杨海青, 高喜荣, 王齐瑞, 等. 杂种马褂木研究综述[J]. 河南林业科技, 2007, 27(4): 37-39.
- YANG H Q, GAO X R, WANG Q R, et al. A review of studies on hybrid *Liriodendron chinense*[J]. Journal of Henan forestry science and technology, 2007, 27(4): 37-39.
- [7] 刘玉壶, 夏念和, 杨惠秋. 木兰科(Magnoliaceae)的起源、进化和地理分布[J]. 热带亚热带植物学报, 1995, 3(4): 1-12.
- LIU Y H, XIA N H, YANG H Q. The origin, evolution and phytogeography of Magnoliaceae[J]. Journal of tropical and sub-tropical botany, 1995, 3(4): 1-12.
- [8] PARKS C R, WENDEL J F. Molecular divergence between Asian and North American species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with implications for interpretation of fossil floras[J]. American journal of botany, 1990, 77(10): 1243-56.
- [9] 李康琴, 李火根. 利用 SSR 分子标记研究鹅掌楸种源及家系间遗传多样性[C]//国家林业局、广西壮族自治区人民政府、中国林学会. 第二届中国林业学术大会: S2 功能基因组时代的林木遗传与改良论文集. 国家林业局、广西壮族自治区人民政府、中国林学会: 中国林学会, 2009: 1.
- LI K Q, LI H G. Study on genetic diversity of *Liriodendron chinense* provenances and families by SSR molecular markers [C]//State Forestry Administration, people's Government of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China forestry society. The second China forestry academic conference: Forest Genetics and improvement in S2 functional genomic era. State Forestry Administration, people's government of Guangxi Zhuang Autonomous Region, China Forestry Society: China forestry society, 2009: 1.
- [10] LI K, CHEN L, FENG Y, et al. High genetic diversity but limited gene flow among remnant and fragmented natural populations of *Liriodendron chinense* Sarg[J]. Biochemical systematics and ecology, 2014, 54(2014): 230-236.
- [11] 陈龙. 利用 SSR 分子标记研究鹅掌楸天然群体遗传结构[D]. 南京: 南京林业大学, 2008.
- CHEN L. Genetic structure of natural populations of *Liriodendron chinense* revealed by SSR markers [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2008.
- [12] 李龙梅, 石晓蒙, 蒋维昕, 等. 广西境内马褂木天然群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 广西植物, 2017, 37(1): 22-28.
- LI L M, SHI X M, JIANG W X, et al. ISSR analysis on genetic diversity of *Liriodendron chinense* natural populations in Guangxi[J]. Guihaia, 2017, 37(1): 22-28.
- [13] AI-HONG Y, NA W, W F P, et al. AFLP genome scanning reveals divergent selection in natural populations of *Liriodendron chinense* (Magnoliaceae) along a latitudinal transect[J]. Frontiers in plant science, 2016, 7(697): 1-10.
- [14] XU M, SUN Y, LI H. EST-SSRs development and paternity analysis for *Liriodendron* spp. [J]. New forests, 2010, 40(3): 361-82.
- [15] 姚俊修. 鹅掌楸杂种优势分子机理研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- YAO J X. Studies on the molecular mechanism of heterosis in *Liriodendron* based on SSR markers [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013.
- [16] 朱其卫, 李火根. 鹅掌楸不同交配组合子代遗传多样性分析[J]. 遗传, 2010, 32(2): 183-8.
- ZHU Q W, LI H G. Comparison of genetic diversity among five mating types of *Liriodendron* revealed by SSR markers[J]. Hereditas (Beijing), 2010, 32(2): 183-8.
- [17] 王晓阳, 李火根. 鹅掌楸苗期生长杂种优势的 SSR 分析[J]. 林业科学, 2011, 47(4): 57-62.
- WANG X Y, LI H G. Possible mechanism analysis for heterosis of Hybrid *Liriodendron* based on seedling growth and SSR Markers[J]. Scientia silvae sinicae, 2011, 47(4): 57-62.
- [18] 黄淑婧. 杂种马褂木采穗母株性状观察及亲缘关系分析[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- HUANG S J. Analysis on the yield of branch and genetic relationship of scion-seed trees of the *Liriodendron Chinense* x *tulipifera* [D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.
- [19] 张春回, 蒋维昕, 黄鹏艳, 等. 广西北部亚美马褂木的早期生长表现[J]. 甘肃农业大学学报, 2019, 54(6): 142-148.

- ZHANG C H, JIANG W X, HUANG P Y, et al. Growth performance in early stage of *Liriodendron sino-americanum* in north Guangxi[J]. Journal of Gansu agricultural university, 2019, 54(6): 142-148.
- [20] 李龙梅. 结合表型生长及分子指纹图谱构建亚美马褂木无性系档案[D]. 南宁: 广西大学, 2016.
- LI L M. Combined with phenotypic growth and molecular fingerprint construction of *Liriodendron sino-americanum* clones archives[D]. Nanning: Guangxi University, 2016.
- [21] YEH F C, BOYLE T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgibot, 1996, 129(157).
- [22] PEAKALL R, SMOUSE P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research[J]. Mol ecol notes, 2006, 6(1): 288-295.
- [23] R CORE TEAM. R: a language and environment for statistical computing[M]. R foundation for statistical computing, vienna, austria. <https://www.R-project.org/>. 2018.
- [24] FRICHOT E, FRANCOIS O. LEA: an R package for landscape and ecological association studies[J]. Methods in ecology and evolution, 2015, 6(8): 925-929.
- [25] WICKHAM H. ggplot2: elegant graphics for data analysis[M]. Springer-Verlag New York, 2016.
- [26] WRIGHT S. The interpretation of population structure by f-statistics with special regard to systems of mating[J]. Evolution, 1965, 19(3): 395-420.
- [27] KAMVAR Z N, TABIMA J, GRUNWALD N J. Poppr: an R package for genetic analysis of populations with clonal, partially clonal, and/or sexual reproduction[J]. PeerJ, 2014, 2: e281.
- [28] 罗光佐, 施季森, 尹佟明, 等. 利用 RAPD 标记分析北美鹅掌楸与鹅掌楸种间遗传多样性[J]. 植物资源与环境学报, 2000, 9(2): 9-13.
- LUO G Z, SHI J S, YIN D M, et al. Comparison of genetic diversity between *Liriodendron tulipifera* Linn. and *Liriodendron chinense* (Hemsl.) Sarg. by means of RAPD markers[J]. Journal of plant resources and environment, 2000, 9(2): 9-13.
- [29] 李康琴. 鹅掌楸属群体遗传结构及分子系统地理学研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2013.
- LI K Q. Studies on population genetics and molecular phylogeography of *Liriodendron*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013.
- [30] 姚俊修, 李火根, 边黎明, 等. 鹅掌楸属树种近交衰退分析[J]. 东北林业大学学报, 2012, 40(7): 1-5.
- YAO J X, LI H G, BIAN L M, et al. Inbreeding depression in *Liriodendron* revealed by both phenotypic and genotypic Characteristics[J]. Journal of northeast forestry university, 2012, 40(7): 1-5.
- [31] 张妹, 何正权, 马江, 等. 基于 SSR 和 SRAP 标记的红花玉兰品种遗传关系分析及分子鉴定[J]. 北京林业大学学报, 2019, 41(9): 69-80.
- ZHANG M, HE Z Q, MA J, et al. Genetic relationship analysis and molecular identification of *Magnolia wufengensis* cultivars based on SSR and SRAP markers[J]. Journal of Beijing forestry university, 2019, 41(9): 69-80.
- [32] 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.
- YANG M, ZHANG M, SHI S G, et al. Analysis of genetic structure of *Magnolia sprengeri* populations based on ISSR markers[J]. Scientia silvae sinicae, 2014, 50(1): 76-81.
- [33] 惠利省. 马褂木遗传多样性及系统地理学研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2010.
- HUI L X. Genetic diversity and phylogeography of *Liriodendron chinense*[D]. Nanjing: Nanjing Forestry University, 2010.
- [34] CHEN J, HAO Z, GUANG X, et al. *Liriodendron* genome sheds light on angiosperm phylogeny and species-pair differentiation[J]. Nature plants, 2019, 5(1).
- [35] SHEN Y, CHENG Y, LI K, et al. Integrating phylogeographic analysis and geospatial methods to infer historical dispersal routes and glacial refugia of *Liriodendron chinense*[J]. Forests, 2019, 10(7): 1-26.