

广西极小种群野生喙核桃遗传多样性分析

邓丽丽, 邹蓉, 杨一山, 蒋运生, 韦霄, 史艳财*

(广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西 桂林 541006)

摘要: 喙核桃(*Annamocarya sinensis*)为国家二级重点保护野生植物和极小种群野生植物。阐明广西喙核桃野生种群遗传多样性和遗传变异, 可为广西喙核桃遗传多样性保护及管理策略制定提供指导。该研究筛选出 6 对稳定性和多态性良好的 SSR 引物, 对广西 4 个喙核桃野生种群(共 47 个个体)的遗传多样性和遗传变异进行了分析。结果表明, 4 个喙核桃野生种群的观测等位基因数平均为 2.125, 有效等位基因数平均为 1.581, Shannon 信息指数平均为 0.477, 观测杂合度平均为 0.310, 期望杂合度平均为 0.286, 等位基因丰富度平均为 1.677, 广西喙核桃的遗传多样性水平较低。群体间遗传呈中度分化(0.120), 种群间遗传变异占 20%, 种群内遗传变异占 80%。Structure 和 UPGMA 分析表明, 47 份样品大致分为 3 类, 样品间彼此相互混杂, 遗传背景丰富。桂林市永福县种群的群体遗传多样性最高($He=0.339$, $I=0.598$), 应把该种群作为重点保护单元。

关键词: 喙核桃; 濒危植物; SSR 标记; 遗传多样性; 遗传变异

doi: 10.11926/jtsb.4857

CSTR:32235.14.jtsb.4857

Genetic Diversity Analysis of *Annamocarya sinensis*, a Wild Plant with Extremely Small Populations in Guangxi

DENG Lili, ZOU Rong, YANG Yishan, JIANG Yunsheng, WEI Xiao, SHI Yancai*

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin 541006, Guangxi, China)

Abstract: *Annamocarya sinensis* is a national Class II key protected wild plant with extremely small populations. To elucidate the genetic diversity and variation of wild *A. sinensis* population in Guangxi can provide guidance for the development of genetic diversity conservation and management strategies. The genetic diversity and genetic variation of 4 wild populations (47 individuals) in Guangxi were analyzed by using 6 pairs of SSR primers with good stability and polymorphism. The results showed that the average number of observed alleles was 2.125, the average number of effective alleles was 1.581, the average Shannon information index was 0.477, the average observed heterozygosity was 0.310, the average expected heterozygosity was 0.286, and the average allele richness was 1.677. The level of genetic diversity of *A. sinensis* in Guangxi was low. There was a moderate genetic differentiation among populations (0.120), accounting for 20% among populations and 80% within population. Structure and UPGMA analysis showed that the 47 samples could be divided into three categories, which were mixed with each other and had rich genetic background. The genetic diversity of Yongfu County population in Guilin City was the highest ($He=0.339$, $I=0.598$), which should be regarded as the key conservation unit.

收稿日期: 2023-10-18

接受日期: 2024-03-21

基金项目: 国家重点研发计划(2022YFF1300703); 广西科学院“广西特色植物资源保育及利用”创新团队启动经费项目(CQZ-C-1902); 中国科学院“西部之光”计划(2022); 广西林业科技推广示范项目([2022]GT23)资助

This work was supported by the National Key Research and Development Plan (Grant No. 2022YFF1300703), Guangxi Academy of Sciences “Conservation and Utilization of Characteristic Plant Resources in Guangxi” Innovation Team Launched a Funding Project (Grant No. CQZ-C-1902), Chinese Academy of Sciences “Light of the West” Program (Grant No. 2022), and Guangxi Forestry Science and Technology Promotion Demonstration Project (Grant No. [2022] GT23).

作者简介: 邓丽丽(1992 年生), 女, 助理研究员, 主要从事濒危植物保护及开发利用研究。E-mail: denglilimini@163.com

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: shiyancaianan@163.com

Key words: *Annamocarya sinensis*; Endangered species; SSR marker; Genetic diversity; Genetic variation

喙核桃(*Annamocarya sinensis*)是胡桃科(Juglandaceae)喙核桃属的单属植物,其因果实的顶端具鸟喙状尖头而得名,是第三纪古热带孑遗植物^[1-3]。喙核桃是《国家重点保护野生植物(2021 版)》中的国家二级保护物种,也是《中国植物红皮书》中的濒危等级物种^[4-5]。喙核桃从植株到果实均具有较高的利用价值,其树皮和外果皮均可提取单宁;果壳能制作活性炭;种仁含油率较高,可应用在食用和工业方面;其木材纹理清晰,光泽亮丽,常用于制作家具或乐器^[6-7]。喙核桃在全世界仅在中国西南部(广西、贵州、云南三省极为狭窄的几个区域)和越南北部有分布,野外分布范围极其狭窄且植株数量稀少,是一种高价值的濒危树种^[8-9],对其进行研究和保护是目前亟待进行的重要任务。

目前国内外学者对喙核桃的形态^[1,10]、分类^[11-12]、群落结构^[13]、繁育方法^[14]、营养成分^[7]、光合特性^[15]等方面已进行了部分研究,在分子遗传学方面,Manos 等^[16]通过分子和形态数据进行了分子系统发育分析;Ji 等^[17]利用云南省西畴县的喙核桃样品组装了喙核桃完整的叶绿体基因组,并利用新一代测序技术得出了喙核桃叶绿体基因组完整序列;史艳财等^[18]对喙核桃 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化,这些研究均为喙核桃的遗传多样性研究奠定了坚实基础。Zhang 等^[8]对喙核桃进行了遗传多样性和种群结构分析,但研究对象仅限于分布于贵州省三都县、云南省富宁县和麻栗坡县的喙核桃群体,而广西作为喙核桃的主要分布地之一,该区域内喙核桃的种群遗传多样性还未见报道,由于喙核桃本身繁育困难,自我更新能力弱,且植株和栖息地均遭到严重的人为破坏,致使广西喙核桃极度濒临灭绝^[8-9]。Spielman 等^[19]认为,大多数稀有物种的种群在随机事件导致种群灭绝之前往往已经受到遗传因素的影响,对于濒危物种来说,丰富的遗传变异是其长期生存的重要因素。因此,开展广西喙核桃遗传多样性研究对其资源保护具有重要意义。本文采用 SSR (simple sequence repeat) 标记对喙核桃进行遗传多样性研究,分析致濒原因,为广西喙核桃遗传资源保护和迁地保护提供建议,同时为后续喙核桃资源评价、良种选育、种苗繁育和回归引种等工作奠定坚实基础。

1 材料和方法

1.1 材料

2022 年对广西地区内 4 个喙核桃野生种群进行采样,采样信息见表 1,4 个种群共采集样品 47 份。采集样品时选择完整无病虫害的叶片放入密封袋中,立即向密封袋中加入足量的变色硅胶,对叶片进行干燥保存,每份样品做好标签,并对采样点进行 GPS 定位。植物样品由广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所韦霄研究员鉴定为喙核桃(*Annamocarya sinensis*)。

表 1 喙核桃种群的采样信息

Table 1 Sampling information of *Annamocarya sinensis* populations

种群 Population	采样点 Sampling site	经度 (E) Longitude	纬度 (N) Latitude	数量 Number
JX	来宾市金秀县 Jinxiu County, Laibin City	110°05'	24°04'	12
DL	河池市东兰县 Donglan County, Hechi City	107°21'	24°22'	9
LC	河池市罗城县 Luocheng County, Hechi City	108°34'	24°54'	16
YF	桂林市永福县 Yongfu County, Guilin City	110°01'	24°49'	10

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取和检测

使用改良的 CTAB 法^[20]对喙核桃叶片进行 DNA 提取,提取的 DNA 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度,使用 Nanodrop 2000 微量分光光度计检测所提取的 DNA 浓度和质量,检测合格的 DNA 样品于 -20 °C 冰箱中保存,用于后续实验。

1.2.2 引物筛选

随机挑选 1 份喙核桃样品进行简化基因组测序,由于简化基因组测序分析得到的 SSR 位点较少,所以去除了上游和下游引物长度不是 20 bp 的位点、引物扩增片段长度小于 110 bp 的位点,并在余下的位点中每隔一段距离,随机选择 1 个位点作为引物筛选的备选引物,共选择了 96 对进行引物多态性筛选。引物筛选阶段采用的扩增方法是接头引物法,所有引物都共用 1 条荧光接头引物,荧光标记为 FAM。选取 8 个样本对 96 对引物进行多态性验证,经筛选得到 9 对引物,再选取 8 个样本对 9 对引物进行复筛获得 6 对扩增稳定、多态性良好的 SSR 引物(表 2)用于 47 份样品的遗传多样性检测。

引物由生工生物工程(上海)股份有限公司北京合成部合成。

1.2.3 PCR 扩增及测序

在 Veriti 384 PCR 仪上进行 PCR 扩增反应, 反应体系为(10 μ L): DNA (20 ng/ μ L) 1.0 μ L, 2 $\times$ Taq PCR Master Mix 5.0 μ L, ddH₂O 3.0 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L)各 0.5 μ L。PCR 扩增反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 然后 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 62 $^{\circ}$ C~52 $^{\circ}$ C 梯度退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 运行 10 个循环, 每

个循环下降 1 $^{\circ}$ C; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 运行 25 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 末端延伸 20 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。荧光 PCR 扩增完成后, 取 2 μ L PCR 产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 合格后按照样本上机检测浓度要求, 对各荧光 PCR 产物进行稀释, 得到浓度均一的荧光 PCR 产物。取荧光 PCR 产物 1.0 μ L, GeneScan™ 500 LIZ 0.5 μ L, Hi-Di™ Formamide 8.5 μ L 将样品和试剂加至上机板中, 参照 ABI 3730xl 上机操作流程进行荧光毛细管电泳检测。

表 2 SSR 引物

Table 2 SSR primer information

位点 Locus	重复单元 Repeat unit	上游引物 (5'-3') Upstream primer	下游引物 (5'-3') Downstream primer	目的片段 (bp) Destination fragment
HHT010	(TA) ₆	CATGTTTCAATTCTGGCTGC	CGTTTCCAATCCCGGTTAAT	112
HHT033	(AT) ₆	GAGGATCGGCACTGAGATTC	TTGCTTTTCTTGCATTTTGG	133
HHT039	(CCA) ₆	TATTACCCACCACCACCACC	AGTGGCCAAGCAGAACATTT	125
HHT054	(CT) ₉	GCCCACTGTTCAACCAGAAT	GGCAGGCAGAAACCATACTC	119
HHT058	(TC) ₇	GCCAATCTCCTCTCGTTCAG	AGTGAGTGCGTAGTGTGCGT	181
HHT078	(TC) ₇	GGCGCTACCTTCCTTCTCAT	CAAATACGTTCTGAATGCG	121

1.3 数据分析

使用 GeneMarker 分析软件进行基因型数据的读取, 并导出 Excel 基因型原始数据和 PDF 分型峰图文件。使用 GenAlEx version 6.501 软件计算 SSR 位点和种群的遗传多样性指标, 包括观测等位基因数(number of observed alleles, N_a)、有效等位基因数(number of effective alleles, N_e)、观测杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、Shannon 信息指数(Shannon's information index, I)、固定指数(fixation index, F)、基因流(gene flow, N_m)和遗传分化系数(genetic differentiation coefficient, F_{st})等。使用 Convert 1.3.1 进行数据转换, 使用 ADZE 1.0 计算种群的等位基因丰富度(allelic richness, A_R)和私有等位基因丰富度(private allelic richness, P_A)。使用 Powermarker v3.25 计算所有位点多态性信息指数(polymorphism information content, PIC)。使用 STRUCTURE 2.3.4 对 47 份样品进行群体结构分析, 设置 $K=1\sim4$, Burn-in 周期为 10 000, MCMC (MarkovChain Monte Carlo)设为 100 000, 每个 K 值运行 20 次, 运行的结果使用 STRUCTURE HARVESTER 算出最佳 ΔK 值(即为最佳群体分组情况)。根据最佳 K 值作图, 使用 CLUMMP 和 DIST-RUCT 软件制图。使用 GenAlEx version 6.501 进行分子方差分析(AMOVA)。使用 Powermarker 软件计算

各群体间的遗传距离, 使用 UPGMA 方法进行聚类分析, 绘制环状聚类图和树状聚类图。

2 结果和分析

2.1 SSR 引物多态性分析

对筛选出的 6 对引物进行多态性分析(表 3), 其中, N_a 共 19 个, 最小的 2 个, 最大的 6 个, 平均每个位点为 3.167 个。 N_e 最大为 2.612, 平均每个位点为 1.656。 I 平均为 0.616。 H_o 为 0.106 (HHT033)~0.574 (HHT054), 平均为 0.303。 H_e 最小为 0.137 (HHT033), 最大为 0.617 (HHT039), 平均 0.345。 PIC 最大为 0.536 (HHT039), 最小为 0.128 (HHT033), 平均为 0.306。6 对引物的 F 为-0.153 (HHT054)~0.333 (HHT058), 平均为 0.112。6 对引物中 HHT054 和 HHT078 存在显著差异($P<0.001$)。位点 HHT039 的多态性较高($H_e=0.617$, $I=1.014$)。

2.2 喙核桃群体遗传多样性分析

2.2.1 群体间的遗传多样性分析

对 4 个喙核桃野生种群进行遗传多样性分析(表 4), 4 个野生种群的 N_a 为 1.667~2.667, 种群 JX 最低, YF 最高, 平均为 2.125。 N_e 最高的是种群 DL, 最低的是 LC, 平均 1.581。 I 平均为 0.477, 最高的是种群 YF, 最低的是 JX。 H_o 最高为种群 YF, 最低为 LC, 平

均 0.310。种群 JX 的 H_e 最低, YF 最高, 平均为 0.286。 A_R 最高的是种群 YF, JX 最低, 平均 1.677。 P_A 最高的是种群 DL, 最低的是 JX, 平均为 0.194。4 个种群的 F 均小于 0, 说明 4 个种群的杂合体过剩。综合来看, 4 个喙核桃野生种群中, YF 的遗传多样性水平最高($H_e=0.339$, $I=0.598$), JX 最低($H_e=0.247$, $I=0.379$)。

表 3 SSR 引物的多态性

Table 3 Polymorphisms of SSR primers							
位点 Locus	N_a	N_e	I	H_o	H_e	PIC	F
HHT010	2	1.184	0.291	0.170	0.156	0.143	-0.094
HHT033	2	1.159	0.264	0.106	0.137	0.128	0.224
HHT039	3	2.612	1.014	0.457	0.617	0.536	0.260
HHT054	6	1.993	0.982	0.574	0.498	0.450	-0.153***
HHT058	3	1.540	0.575	0.234	0.351	0.296	0.333
HHT078	3	1.446	0.572	0.277	0.308	0.280	-0.103***
平均 Mean	3.167	1.656	0.616	0.303	0.345	0.306	0.112
标准差 St Dev	1.472	0.558	0.324	0.178	0.189	0.149	

N_a : 观测等位基因数; N_e : 有效等位基因数; I : Shannon 信息指数; H_o : 观测杂合度; H_e : 期望杂合度; PIC : 多态性信息指数; F : 固定指数; ***: $P<0.001$ 。下同

N_a : Number of observed alleles; N_e : Number of effective alleles; I : Shannon's information index; H_o : Observed heterozygosity; H_e : Expected heterozygosity; PIC : Polymorphism information content; F : Fixation index; ***: $P<0.001$. The same below

表 4 喙核桃群体间的遗传多样性

Table 4 Genetic diversity among <i>Annamocarya sinensis</i> populations								
种群 Population	N_a	N_e	I	H_o	H_e	A_R	P_A	F
DL	2.167	1.777	0.514	0.315	0.305	1.747	0.294	-0.016
JX	1.667	1.531	0.379	0.278	0.247	1.524	0.093	-0.120
LC	2.000	1.424	0.416	0.263	0.253	1.576	0.155	-0.054
YF	2.667	1.593	0.598	0.383	0.339	1.863	0.232	-0.136
Mean	2.125	1.581	0.477	0.310	0.286	1.677	0.194	-0.084

A_R : 等位基因丰富度; P_A : 私有等位基因丰富度。

A_R : Allelic richness; P_A : Private allelic richness.

2.2.2 群体的遗传分化分析

4 个种群的分子方差分析结果表明, 种群间的遗传变异占 20%, 种群内的遗传变异占 80%。对种群间的遗传分化系数和基因流进行分析(表 5), 结果表明, LC 和 DL 种群间的遗传分化系数为 0.202, 2 个群体间达到了高度分化水平, 其他种群间的遗传分化系数为 0.058~0.137, 达到中度分化水平。4 个种群间的基因流为 0.986~4.084, 其中 LC 和 DL 种群间的基因流最小, 为 0.986, 为中度基因交流水平, 而其他种群间的基因流为 1.580~4.084, 均达高度基因交流水平, 其中 YF 和 DL 种群间的基因流最大(2.489)。

2.2.3 喙核桃群体遗传结构分析

对 47 份样品进行 *Structure* 遗传结构分析, 根据似然值最大原则, 当 $K=3$ 时, ΔK 最大(图 1)。从

表 5 喙核桃群体间的基因流(上三角)和遗传分化系数(下三角)

Table 5 Gene flow between populations (upper triangle) and coefficient of genetic differentiation (lower triangle) of *Annamocarya sinensis*

种群 Population	DL	JX	LC	YF
DL		1.584	0.986	2.489
JX	0.136		1.580	2.314
LC	0.202	0.137		4.084
YF	0.091	0.097	0.058	

图 2 可知, 4 个种群的 47 份样品均混合了 3 个亚群, 且每个亚群所占比例相接近, 样本植株间存在不同程度的基因交流, 遗传背景丰富。

2.2.4 UPGMA 聚类分析

对 4 个种群进行 UPGMA 聚类分析, 由图 3 可见, YF 和 LC 最先聚在一起, 这 2 个种群的遗传距离最近, 其次与 JX 相聚, 最后相聚的是 DL, 但综

合来看, 4 个种群的遗传距离均较近。

对 47 份样品进行 UPGMA 聚类分析, 由图 4 可见, 47 份样品无法按种群精确划分, 但大致可分为 3 类, 第 1 类包含了 7 份 JX 样品、5 份 DL 样品和 2 份 YF 样品; 第 2 类包含了 9 份 LC 样品; 第 3 类包含了 8 份 YF 样品、7 份 LC 样品、5 份 JX 样品和 4 份 DL 样品。可见 4 个种群的 47 份样品分类时相互混杂, 这也说明了 4 个种群遗传距离近, 基因交流较为频繁。

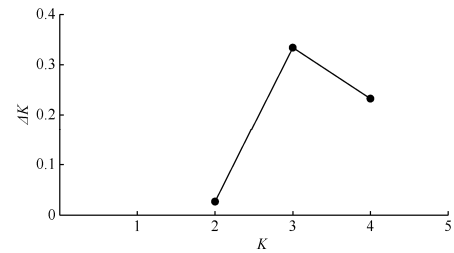


图 1 最佳类群数(K)与推断值(ΔK)的变化趋势
Fig. 1 Trend of the rational groups number (K) and estimated value (ΔK)

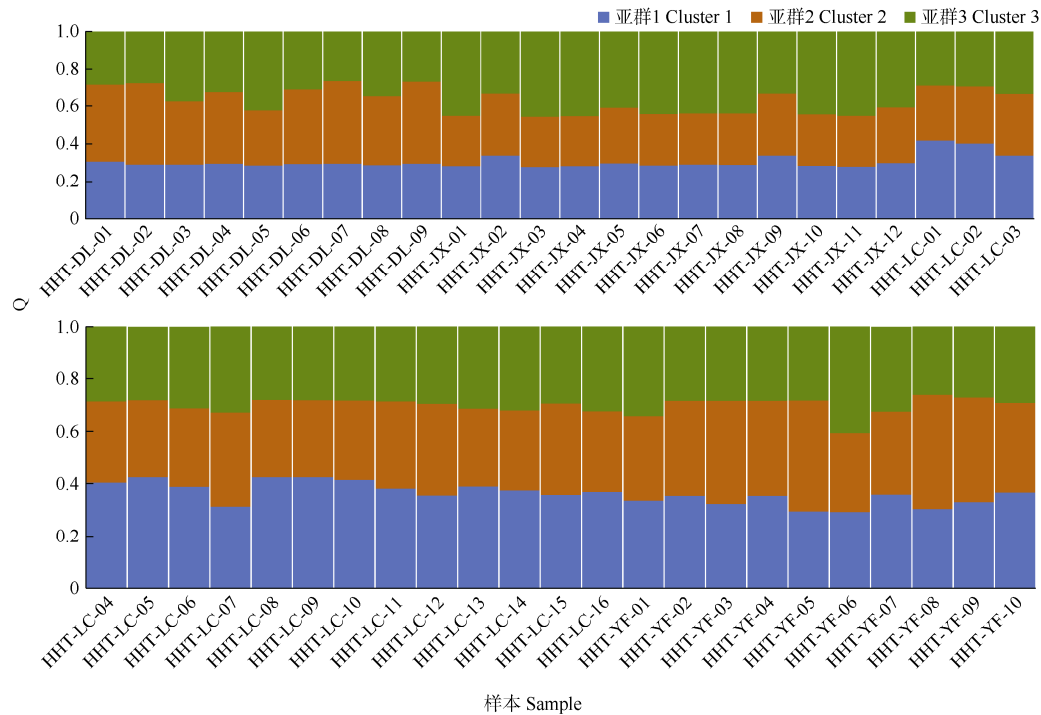


图 2 喙核桃的 Structure 分析结果($K=3$)
Fig. 2 Structure analysis results of *Annamocarya sinensis* ($K=3$)

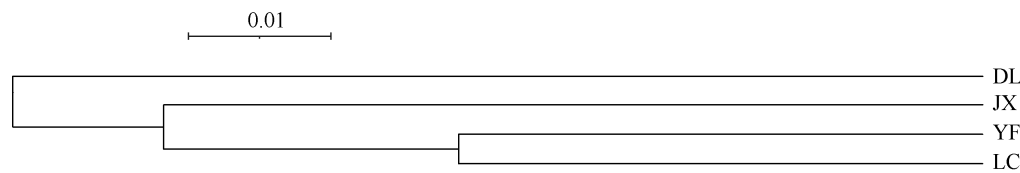


图 3 喙核桃 4 个种群的 UPGMA 聚类
Fig. 3 UPGMA cluster of 4 populations of *Annamocarya sinensis*

3 讨论和结论

3.1 喙核桃遗传多样性

SSR 标记在植物遗传多样性分析方面应用较为广泛, 使用 SSR 分子标记方法对喙核桃遗传多样性进行分析, 能揭示喙核桃的多样性和遗传变异, 为喙核桃的资源保护和选育提供参考^[21-23]。本研究使

用 SSR 分子标记对喙核桃种群遗传多样性进行分析, 结果表明, Shannon 信息指数为 0.477, 期望杂合度为 0.286, 低于其他濒危物种($He=0.42$)^[24]; 比同科的珍稀濒危植物胡桃楸(*J. mandshurica*)的 Shannon 信息指数(0.748 8)和期望杂合度(0.363 3)^[25]低。也低于 Zhang 等^[8]对分布于贵州省三都县、云南省富宁县和麻栗坡县的 70 个喙核桃样品($He=0.582$)。可见

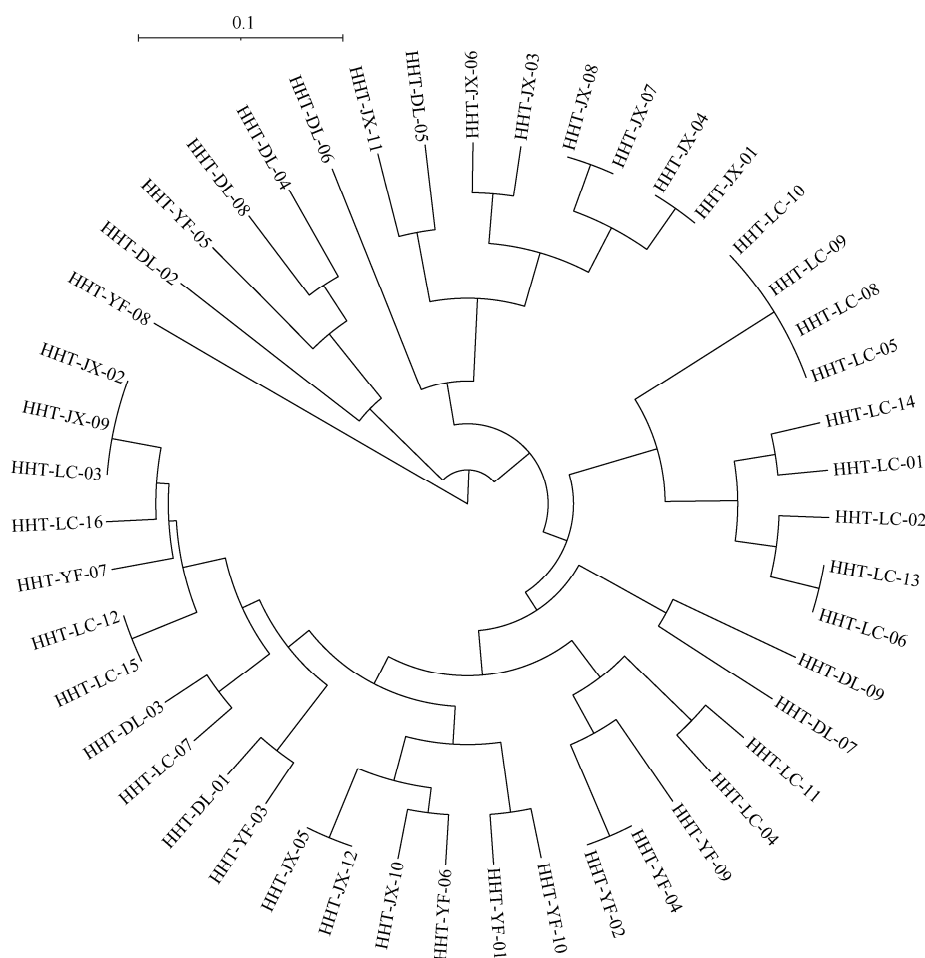


图 4 喙核桃 47 份样品的 UPGMA 聚类结果

Fig. 4 UPGMA cluster of 47 samples of *Annamocarya sinensis*

本研究中喙核桃种群的遗传多样性水平较低,这或许是因为广西喙核桃种群较小,且现存的喙核桃植株遭受到严重的人为破坏,人为砍伐和破坏可能会导致喙核桃生境片段化,进而导致种群内个体数量减少,使种群内本就不高的遗传多样性越来越低^[26]。

3.2 喙核桃遗传结构和遗传分化

喙核桃种群间的遗传分化系数为 0.120,达到中高度分化,基因流为 2.173,种群间的遗传分化程度较高,且存在一定程度基因交流。罗城种群(LC)与东兰种群(DL)的遗传分化达高度分化水平($F_{st}=0.202$),这 2 个种群间的基因交流为中度水平($N_m=0.986$)。张智勇^[26]认为喙核桃与核桃(*J. regia*)在形态上表现出相似性,如风媒花、雌雄同株异花、雌雄异熟等,推测其与核桃类似具有自交不亲和现象,但尚未有其繁育系统的研究报道。喙核桃一般以单株形式存在或稍多几棵成群分布,地理距离可能会

影响其种群间基因交流而引起种群遗传分化,特别是地理距离较远的种群间,如罗城种群(LC)与东兰种群(DL)(距离约 136.56 km)、靖西种群(JX)与东兰种群(DL)(距离约 279.18 km)。

另外,本调查在永福、东兰等地发现喙核桃单株下有相当数量的不同年份果实,但在周围却没有发现任何植株和幼苗,说明其种子的萌发率很低,与张智勇^[26]的调查结果一致,预示喙核桃存在着自交衰退现象,并导致种子萌发率低。因此,喙核桃可能是由于种群小,且自身繁育困难,种子萌发率低,因而促进了群体内的遗传漂变的发生,也可能会影响种群间的遗传分化水平。

分子方差分析表明种群间的遗传变异占 20%,个体内的遗传变异占 80%,遗传变异主要来源于种群内。张智勇^[26]的研究表明 87%的遗传变异来自于种群内,13%的差异来自于种群间。对不同地区喙核桃的研究结果一致,说明喙核桃群体的主要遗传

变异存在于种群内,所以在进行整体遗传多样性保护的基础上还应加大力度筛选优良植株进行保护,并进行传粉生物学和种苗繁育研究,挖掘更多的群体内的遗传变异。

UPGMA 和 Structure 的分析结果均表明 4 个喙核桃种群的样品无法按地理位置精确划分,但大致可分为 3 类,各类中各种群的喙核桃样品相互混杂,遗传背景丰富,种群间均质化明显,推测可能是广西现存的各种群的起源祖先种群相同,但由于历史进化过程中发生了生境片段化,从而造成了现存的多个分散种群,这可能会导致喙核桃的长期适应性进化能力降低,增加在变迁环境中因随机事件而灭绝的风险^[27],因此在进行喙核桃种群保护时建议建立保护小区,对喙核桃植株进行保护的同时对栖息地环境进行保护,以避免喙核桃无法适应变化的环境而灭绝。

3.3 喙核桃的保护策略

遗传多样性能体现物种进化潜力以及适应环境变化的能力,物种的遗传多样性水平越高,适应环境变化的能力越强,反之越弱^[28]。由于广西喙核桃的遗传多样性非常低,对环境的适应能力较低,环境的改变极易引起喙核桃遗传多样性的丢失,甚至是灭绝。因此,对喙核桃和原生境进行就地保护是遗传多样性保护的首要任务,所以应将广西所有喙核桃种群建立保护小区以达到保护种群植株及生境的目的。在 4 个种群中,永福种群的遗传多样性水平最高,在进行保护时应作为重点保护种群。另外,喙核桃的主要遗传变异存在于群体内,应加强对喙核桃优良种质资源的筛选并进行迁地保护,加强喙核桃的种苗繁育、传粉生物学等相关基础研究,攻克繁育瓶颈问题,繁育更多的优质种苗。由于野生喙核桃野生更新能力低,建议加强回归引种工作,通过增加种群的植株数量来缓解自交衰退问题,从而保护和提高广西喙核桃种群的遗传多样性。

参考文献

[1] Delectis Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Agendae Academiae Sinicae Editta. Florae Reipublicae Popularis Sinicae, Tomus 21 [M]. Beijing: Science Press, 1979. [中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志, 第 21 卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1979.]

[2] QIN H N, LIU Y. A Checklist of Vascular Plants of Guangxi [M]. Beijing: Science Press, 2010. [覃海宁, 刘演. 广西植物名录 [M]. 北京: 科学出版社, 2010.]

[3] SHI Y C, DUAN N, LIU B B. Complete chloroplast genome sequence of *Annamocarya sinensis* (Juglandaceae), an endangered perennial plant [J]. Mitochond DNA Part B, 2019, 4(2): 3800–3801. doi: 10.1080/23802359.2019.1681919.

[4] National Forestry and Grassland Administration, Ministry of Agriculture and Rural Affairs of the People's Republic of China. Perspectives from the list of national key protected wild plant [EB/OL]. (2021-09-08) [2024-01-06]. [国家林业和草原局, 农业农村部. 国家林业和草原局农业农村部公告(2021 年第 15 号)(国家重点保护野生植物名录) [EB/OL]. (2021-09-08) [2024-01-06]. <http://www.forestry.gov.cn/main/5461/20210908/162515850572900.html>.]

[5] FU L G. Chinese Plant Red Book, Vol. 1 [M]. Beijing: Science Press, 1991: 1–736. [傅立国. 中国植物红皮书, 第 1 册 [M]. 北京: 科学出版社, 1991: 1–736.]

[6] DUAN W, HUANG Y J. Research progress on *Annamocarya sinensis* [J]. Guangxi For Sci, 2021, 50(3): 362–366. [段伟, 黄有军. 喙核桃研究现状 [J]. 广西林业科学, 2021, 50(3): 362–366. doi: 10.3969/j.issn.1006-1126.2021.03.022.]

[7] QIN F, SHI Y C, ZOU R, et al. Comparative analysis of nutritional components of *Annamocarya sinensis* and *Juglans regia* [J]. Food Sci Technol, 2020, 45(7): 93–97. [覃芳, 史艳财, 邹蓉, 等. 喙核桃与核桃营养成分的比较分析 [J]. 食品科技, 2020, 45(7): 93–97. doi: 10.13684/j.cnki.spkj.2020.07.017.]

[8] ZHANG Z Y, PANG X M, HAN J W, et al. Conservation genetics of *Annamocarya sinensis* (Dode) Leroy, an endangered endemic species [J]. Genet Mol Res, 2013, 12(3): 3965–3974. doi: 10.4238/2013.march.11.9.

[9] Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. Rare and Endangered Plants in China [M]. Shanghai: Shanghai Education Publishing House, 1989. [中国科学院植物研究所. 中国珍稀濒危植物 [M]. 上海: 上海教育出版社, 1989.]

[10] LIU K W. Rare Tree Species in Tongdao Autonomous County [M]. Changsha: Hunan Science and Technology Press, 1988. [刘克旺. 通道侗族自治县珍贵树种 [M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1988.]

[11] ZHANG J B, LI R Q, XIANG X G, et al. Integrated fossil and molecular data reveal the biogeographic diversification of the eastern Asian-eastern North American disjunct hickory genus (*Carya* Nutt.) [J]. PLoS One, 2013, 8(7): e70449. doi: 10.1371/journal.pone.0070449.

[12] HU Y H, CHEN X, FENG X J, et al. Characterization of the complete chloroplast genome of the endangered species *Carya sinensis* (Juglandaceae) [J]. Conserv Genet Resour, 2016, 8(4): 467–470. doi: 10.1007/s12686-016-0601-4.

[13] YANG J H, SONG Z Q, SU Y H, et al. Investigation on *Annamocarya*

- sinensis* community in southern Tongdao County [J]. J Green Sci Technol, 2016(24): 89–93. [杨金华, 宋宗强, 栗远和, 等. 通道县南部喙核桃群落调查 [J]. 绿色科技, 2016(24): 89–93. doi: 10.16663/j.cnki.lskj.2016.24.035.]
- [14] ZHANG G H, LI D, HE C Z. Identification of contaminating endophytes in tissue culture of *Annamocarya sinensis* [J]. J Green Sci Technol, 2022, 24(15): 169–172. [张桂华, 李旦, 何承忠. 喙核桃组织培养污染内生真菌的鉴定 [J]. 绿色科技, 2022, 24(15): 169–172. doi: 10.16663/j.cnki.lskj.2022.15.047.]
- [15] SHI Y C, JIANG Y S, QIN F, et al. Study on photosynthetic characteristics of rare and endangered plant *Annamocarya sinensis* [J]. J Guangxi Acad Sci, 2020, 36(1): 73–77. [史艳财, 蒋运生, 覃芳, 等. 珍稀濒危植物喙核桃的光合特性研究 [J]. 广西科学院学报, 2020, 36(1): 73–77. doi: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20200317.015.]
- [16] MANOS P S, SOLTIS P S, SOLTIS D E, et al. Phylogeny of extant and fossil Juglandaceae inferred from the integration of molecular and morphological data sets [J]. Syst Biol, 2007, 56(3): 412–430. doi: 10.1080/10635150701408523.
- [17] JI Y M, ZHANG W J, LI D, et al. The complete chloroplast genome sequence of *Annamocarya sinensis* (Juglandaceae), an endangered species endemic to Yunnan Province, China [J]. Mitochond DNA Part B, 2020, 5(3): 2021–2023. doi: 10.1080/23802359.2020.1756477.
- [18] SHI Y C, ZOU R, ZHU C H, et al. Establishment and optimization of the ISSR-PCR Reaction system for *Annamocarya sinensis* [J]. J Guangxi Acad Sci, 2020, 36(1): 78–82. [史艳财, 邹蓉, 朱成豪, 等. 极小种群喙核桃 ISSR-PCR 反应条件的建立与优化 [J]. 广西科学院学报, 2020, 36(1): 78–82. doi: 10.13657/j.cnki.gxkxyxb.20200317.011.]
- [19] SPIELMAN D, BROOK B W, FRANKHAM R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101(42): 15261–15264. doi: 10.1073/pnas.0403809101.
- [20] TAN X Y, MA Y H, HAO Z X. Comparison of four improved CTAB methods for extraction of DNA from mature leaves of pomegranate [J]. S China Fruits, 2021, 50(3): 122–125. [谭小艳, 马耀华, 郝兆祥. 4 种改良 CTAB 法提取石榴成熟叶片 DNA 的比较研究 [J]. 中国南方果树, 2021, 50(3): 122–125. doi: 10.13938/j.issn.1007-1431.20200370.]
- [21] HUANG Z Q, WU L Y, GAO X Y, et al. Genetic diversity analysis of *Handroanthus impetiginosus* populations by SSR markers [J]. J Trop Subtrop Bot, 2024, 32(1): 125–133. [黄稚清, 吴林源, 高筱钰, 等. 基于 SSR 标记的紫花风铃木群体遗传多样性分析 [J]. 热带亚热带植物学报, 2024, 32(1): 125–133. doi: 10.11926/jtsb.4697.]
- [22] WU B D, GAO X M, HU L S, et al. Genetic diversity analysis of breadfruit complex based on SSR molecular markers [J]. Chin J Trop Crops, 2023, 44(7): 1383–1391. [伍宝朵, 高效梅, 胡丽松, 等. 基于 SSR 分子标记的面包果资源遗传多样性分析 [J]. 热带作物学报, 2023, 44(7): 1383–1391. doi: 10.3969/j.issn.1000-2561.2023.07.008.]
- [23] ZHANG H R, LI X, CHEN Z X, et al. Genetic diversity analysis and DNA fingerprints construction of *Callicarpa nudiflora* germplasm resources based on SSR markers [J]. Chin Trad Herb Drugs, 2023, 54(12): 3971–3982. [张红瑞, 李鑫, 陈振夏, 等. 基于 SSR 分子标记的裸花紫珠种质资源遗传多样性分析及 DNA 指纹图谱构建 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3971–3982. doi: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.12.023.]
- [24] YANG L, CAO Q M, FENG Y, et al. Genetic diversity and genetic structure of the rare and endangered plant *Ferula fukanensis* [J]. Bull Bot Res, 2023, 43(1): 51–58. [杨磊, 曹秋梅, 冯纛, 等. 珍稀濒危植物阜康阿魏的遗传多样性及遗传结构 [J]. 植物研究, 2023, 43(1): 51–58. doi: 10.7525/j.issn.1673-5102.2023.01.006.]
- [25] ZHANG H. Population structure and genetic analysis of the endangered plant *Juglans mandshurica* Maxim. in Shandong Province [D]. Yantai: Ludong University, 2021. [张浩. 濒危植物胡桃楸山东地区种群结构及遗传分析 [D]. 烟台: 鲁东大学, 2021. doi: 10.27216/d.cnki.gysfc.2021.000501.]
- [26] ZHANG Z Y. Development and characterization of EST-SSRs for walnut (*Juglans regia*) and their utilization in conservation genetics of *Annamocarya sinensis* (Dode) Leroy [D]. Beijing: Beijing Forestry University, 2013. [张智勇. 核桃 EST-SSR 引物开发及其在喙核桃保育遗传学中的应用 [D]. 北京: 北京林业大学, 2013.]
- [27] XU Y, CHEN Z G, XU Y F, et al. Genetic diversity of wild *Paphiopedilum hirsutissimum* populations in southwest China with SSR markers [J]. Chin J Trop Crops, 2023, 44(11): 2208–2218. [徐言, 陈之光, 徐玉凤, 等. 基于 SSR 标记的西南地区野生带叶兜兰资源遗传多样性分析 [J]. 热带作物学报, 2023, 44(11): 2208–2218.]
- [28] TIAN X, LI Z J, LIU X L, et al. Genetic diversity analysis of *Erigeron breviscapus* based on SSR markers [J]. Chin J Exp Trad Med Formul, 2021, 27(18): 136–143. [田星, 李中霁, 刘小莉, 等. 基于 SSR 分子标记的灯盏花遗传多样性分析 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(18): 136–143. doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20211119.]