

DOI:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.003

基于表型和 ISSR 标记滇产黄杨叶栒子遗传多样性分析

朱燕蕾¹, 郭凤根^{2*}

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: [目的] 从表型和分子 2 个角度揭示黄杨叶栒子 (*Cotoneaster buxifolius* Lindl.) 野生种群的遗传多样性。[方法] 利用 33 个表型性状和 ISSR 分子标记对滇产野生黄杨叶栒子进行了遗传多样性分析。用 PopGen 32 软件计算多样性指数, 用 SPSS 16.0 软件构建系统发育树系图。[结果] 黄杨叶栒子种内表型性状在居群间存在着丰富的变异, 居群间表型性状叶片大小变异系数达 25.99%, 萼裂片相关 3 个性状变异达 40.66%, 差异较大; 24 条 ISSR 引物扩增出 228 条带, 其中, 153 条具有多态性, 平均多态率为 81.56%, Nei's 基因多样性指数和 Shannon 多样性指数分别为 0.352 0 和 0.505 9, 具有较高的遗传多样性; 采用 UPGMA 法构建遗传关系聚类图, 形态和分子标记的 2 种聚类结果基本一致: 分布在同一地区的各个居群多数能聚在一起, 地理位置的隔离促进了黄杨叶栒子居群间的遗传分化; 个别居群未能与同一产区的其他居群聚在一起, 而聚进了其他产区的居群之中, 其原因可能是同一产区内各居群的小生境不完全相同, 在不同产区内也有相似的小生境, 导致黄杨叶栒子居群间发生了趋同进化。[结论] 黄杨叶栒子遗传多样性丰富, 居群间的亲缘关系及分布与地理位置、海拔位置有密切关系。

关键词: 黄杨叶栒子; 遗传多样性; 表型性状; ISSR

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 1001-1498(2020)02-0019-08

黄杨叶栒子 (*Cotoneaster buxifolius* Lindl.) 是蔷薇科栒子属 (*Cotoneaster*) 的常绿至半常绿灌木, 产四川、贵州、云南等省, 生于海拔 1 000~3 300 m 的多石砾坡地、灌林丛中^[1]。黄杨叶栒子在 4—6 月开花, 花 3~5 朵, 在 8 月至次年 2 月红色的果实挂满植株, 是优良的观花、观果植物, 根系发达, 是优良的护坡植物, 具有很高的开发价值^[2]。野外调查发现, 不同产地的黄杨叶栒子间在表型性状上存在较大差异, 但根据前期查阅的文献, 有关滇产黄杨叶栒子的遗传多样性研究尚未见报道^[3-5]。

用表型性状来检测遗传变异是直接、简便、易行的方法, 但表型性状受环境因素的影响, 在某些情况下并不能反映遗传变异的真实状况。分子生物学技术的快速发展为遗传多样性检测提供了更直接和精确的方法, 其中, ISSR (inter-simple sequence

repeat) 分子标记技术由于具有引物通用性强、利用率高、操作简便和重复性好等优点, 在植物的遗传多样性、系统进化、DNA 指纹图谱及核心种质构建等方面已得到广泛的应用^[6-10]。本文以云南不同产地的黄杨叶栒子为材料, 从表型性状和 ISSR 分子标记 2 个角度分析其遗传多样性, 为其种质资源的合理利用和保护奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

对云南省内 7 个州市 15 个县区市的 51 个野生黄杨叶栒子居群进行了调查和表型性状的观测, 采集各居群叶片并用硅胶干燥于自封口袋中, 编号后保存于 -80 °C 冰箱, 用于 ISSR 分子标记试验。各居群的产地、代码、纬度、经度和海拔等信息见表 1。

表1 51份黄杨叶栒子材料的来源及重要地理特征

Table 1 Sources and important geographic characters of 51 *C. buxifolius* samples

居群产地 Population site	代码 Code	北纬 North latitude	东经 East longitude	海拔/m Altitude /m
丽江市文笔山 Wenbi Mountain, Lijiang City	LJ1	26°48'14.10"	100°11'11.40"	2 787
丽江市文笔山 Wenbi Mountain, Lijiang City	LJ2	26°48'15.90"	100°11'12.80"	2 784
丽江市玉龙县腊普村 Lapu Village, Yulong County, Lijiang City	LJ3	27°36'23.70"	99°23'37.50"	2 025
丽江市玉龙县石鼓镇红岩村 Hongyan Village, Shigu Town, Yulong County, Lijiang City	LJ4	26°59'51.18"	99°56'26.12"	1 845
丽江市玉龙县塔城乡金沙江边 Jinsha River, Tacheng Township, Yulong County, Lijiang City	LJ5	27°29'10.01"	99°33'59.92"	1 902
丽江市玉龙县雄古观景台 Xionggu Views Platform, Yulong County, Lijiang City	LJ6	26°51'48.40"	100°02'19.7"	2 568
昆明市晋宁县普照寺 Puzhao Temple, Jinning County, Kunming City	KM1	24°39'56.43"	102°33'49.11"	2 002
昆明市盘龙区松华乡大哨村 Dashao Village, Songhua Township, Panlong District, Kunming	KM2	25°14'00.14"	102°44'22.69"	2 323
昆明市盘龙区松华街道野鸭湖 Yeya Lake, Songhua Street, Panlong District, Kunming	KM3	25°07'10.71"	102°52'11.31"	2 095
昆明市盘龙区茨坝街道黑龙潭后山 Heilongtan, Ciba Street, Panlong District, Kunming City	KM5	25°09'12.31"	102°45'25.01"	1 964
昆明市盘龙区茨坝街道农大后山 Ynau, Ciba Street, Panlong District, Kunming	KM6	25°09'06.50"	102°45'38.60"	1 997
昆明市盘龙区茨坝街道红军墓 Red Army Tomb, Ciba Street, Panlong District, Kunming	KM7	25°11'28.14"	102°44'31.89"	2 235
昆明市盘龙区双龙街道黄龙箐 Huanglongqing, Shuanglong Street, Panlong District, Kunming	KM8	25°05'28.93"	102°47'53.40"	2 047
昆明市五华区红云街道长虫山 Changcong Mountain, Hongyun Street, Wuhua District, Kunming	KM9	25°07'21.98"	102°42'23.97"	1 997
昆明市五华区红云街道长虫山 Changcong Mountain, Hongyun Street, Wuhua District, Kunming	KM10	25°07'18.97"	102°42'41.97"	2 004
昆明市五华区红云街道长虫山 Changcong Mountain, Hongyun Street, Wuhua District, Kunming	KM11	25°07'31.98"	102°42'46.30"	2 038
昆明市西山区团结乡棋盘山 Qipan Mountain, Tuanjie Township, Xishan District, Kunming City	KM12	25°04'10.88"	102°36'52.57"	2 223
昆明市西山区团结乡棋盘山 Qipan Mountain, Tuanjie Township, Xishan District, Kunming City	KM13	25°03'30.28"	102°31'42.72"	2 459
昆明昆明市石林县圭山镇 Guishan Town, Shilin County, Kunming	SL1	24°37'01.00"	103°34'01.00"	2 102
昆明市石林县圭山镇圭山水库 Guishan Reservoir, Guishan Town, Shilin County, Kunming	SL2	24°42'07.01"	103°36'7.58"	2 057
昆明市石林县圭山镇小糯黑 Xiaonuohei, Guishan Town, Shilin County, Kunming	SL3	24°39'54.55"	103°31'22.48"	1 954
昆明市石林县圭山镇矣美堵村 Yimeiduo Village, Guishan Town, Shilin County, Kunming	SL4	24°38'56.48"	103°34'39.22"	2 083
昆明市石林县圭山镇矣美堵村 Yimeiduo Village, Guishan Town, Shilin County, Kunming	SL5	24°38'48.90"	103°34'43.54"	2 081
昆明市石林县圭山镇矣美堵村 Yimeiduo Village, Guishan Town, Shilin County, Kunming City	SL6	24°38'50.72"	103°34'36.43"	2 089
昆明市石林县长湖镇园湖村 Yuanhu Village, Changhu Town, Shilin County, Kunming City	SL7	24°37'37.80"	103°34'10.61"	1 930
昆明市嵩明县嵩阳镇大石头水库 Dashitou Reservoir, Songyang Town, Songming County, Kunming City	SM1	25°22'14.54"	103°00'57.20"	2 024
昆明市嵩明县嵩阳镇法界寺 Fajie Temple, Songyang Town, Songming County, Kunming City	SM2	25°21'11.85"	103°00'50.48"	2 021
昆明市嵩明县嵩阳镇法界寺 Fajie Temple, Songyang Town, Songming County, Kunming City	SM3	25°21'14.19"	103°00'45.14"	2 034
昆明市嵩明县嵩阳镇法界寺 Fajie Temple, Songyang Town, Songming County, Kunming City	SM4	25°21'13.07"	103°00'30.62"	2 100
昆明市嵩明县嵩阳镇法界寺 Fajie Temple, Songyang Town, Songming County, Kunming City	SM5	25°21'18.52"	103°00'22.58"	2 110
迪庆州维西县攀天阁乡嘎嘎坝 Gagaba, Pantiangge Township, Weixi County, Diqing Prefecture	WX1	27°17'15.75"	99°10'51.32"	2 656
迪庆州维西县康普乡康普村 Kangpu Village, Kangpu Township, Weixi County, Diqing Prefecture	WX2	27°36'05.06"	99°01'24.25"	1 812
迪庆州维西县攀天阁乡贝格吉 Baigeji, Pantiangge Township, Weixi County, Diqing Prefecture	WX3	27°20'29.09"	99°13'19.83"	2 530
迪庆州维西县叶枝镇同乐村 Tongle Village, Yezhi Town, Weixi County, Diqing Prefecture	WX4	27°39'53.99"	99°03'00.01"	2 005
迪庆州香格里拉市虎跳峡镇 Tiger Leaping Gorge Town, Shangri-la City, Diqing Prefecture	XGLL1	27°03'45.98"	100°04'10.88"	1 866
迪庆州香格里拉市迪庆州经开区 Economic Development Zone of Diqing Prefecture, Shangri-la City, Diqing Prefecture	XGLL2	27°04'41.50"	100°03'47.51"	1 953
迪庆州香格里拉市纳帕海边 Napahai, Shangri-la City, Diqing Prefecture	XGLL3	27°52'54.38"	99°40'15.43"	3 268
迪庆州香格里拉市纳帕海边 Napahai, Shangri-la City, Diqing Prefecture	XGLL4	27°52'49.19"	99°40'14.50"	3 272
迪庆州香格里拉市尼西乡 Nixi Township, Shangri-La City, Diqing Prefecture	XGLL5	27°57'40.91"	99°24'47.63"	3 135

续表 1

居群产地 Population site	代码 Code	北纬 North latitude	东经 East longitude	海拔/m Altitude /m
迪庆州香格里拉市桑那水库 Sanna Reservoir, Shangri-La City, Diqing Prefecture	XGLL6	27°49'48.46"	99°44'25.53"	3 282
迪庆州香格里拉市中甸水库 Zhongdian Reservoir, Shangri-La City, Diqing Prefecture	XGLL7	26°31'47.86"	103°49'58.26"	1 957
迪庆州德钦县东竹林寺 Dongzhulin Temple, Deqin County, Diqing Prefecture	XGLL8	28°15'45.73"	99°13'57.44"	2 633
曲靖市宣威市龙潭乡新河村 Xinhe Village, Longtan Township, Xuanwei City, Qujing City	XW1	26°27'10.80"	104°01'15.30"	1 948
曲靖市宣威市宗范村 Zongfan Village, Xuanwei City, Qujing City	XW3	26°17'59.09"	104°05'41.75"	2 012
曲靖市宣威市宗范村 Zongfan Village, Xuanwei City, Qujing City	XW4	26°17'58.19"	104°05'35.57"	2 023
曲靖市会泽县大井镇芦坪村桃树湾 Taoshuwan, Luping Village, Dajing Town, Huize County, Qujing City	HZ1	26°31'47.86"	103°49'58.26"	1 957
曲靖市会泽县者海镇七五卡村金家门 Jinjiamen, Qiwuka Village, Zehai Town, Huize County, Qujing City	HZ2	26°27'19.59"	103°40'02.55"	2 166
昭通市巧家县巧家营乡 Qiaojiaying Township, Qiaojia County, Zhaotong City	QJ1	27°01'56.55"	102°57'05.55"	2 495
昭通市巧家县巧家营乡 Qiaojiaying Township, Qiaojia County, Zhaotong City	QJ2	27°02'51.32"	102°58'52.25"	2 489

1.2 表型性状的观测

观测了 51 个野生黄杨叶栒子居群的枝条颜色和夹角及毛被情况、叶片的形态及毛被情况、花朵的数量、花瓣的形状和颜色, 将采集的果实带回实验室后观测果实的颜色、形状及大小、萼筒毛被情况、萼裂片形状及毛被情况、每果小核数, 共计观测了 33 个表型性状。

1.3 ISSR 分析

采用改良 CTAB 法提取黄杨叶栒子各样品的叶片总 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 用紫外分光光度法测定 DNA 浓度, 达到 ISSR 分子标记要求的 DNA 保存于 -20 °C 冰箱备用^[11-13]。对 DNA 质量检测, 有 27 个居群达到后续分析的要求。从 100 条 ISSR 引物中筛选出 24 条适于黄杨叶栒子扩增的引物, 用优化后的反应体系 (25 μ L 反应体系中含 2.5 mmol·L⁻¹ Mg²⁺、2U Taq DNA 聚合酶、0.15 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.48 mol·L⁻¹ 引物和 100 ng 模板 DNA) 对黄杨叶栒子的 DNA 模板进行扩增, 程序如下: 95 °C 预变性 5 min, 1 个循环; 94 °C 变性 1 min, 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 进行 38 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min。用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物并拍摄照片, 根据有带为 1、无带为 0 的原则对重复性好且清晰易辨的条带进行统计, 获得 27 个居群的 24 条引物的“0, 1”ISSR 数据矩阵。

1.4 数据的统计与分析

对表型性状中的质量性状进行赋值后参与聚类运算; 对数量性状则直接用 SPSS 16.0 软件进行平均值、标准差、标准误的计算和方差分析, 进而计

算出各性状的变异系数和相对极差。依据 33 个表型性状的欧氏平方距离系数, 用 UPGMA 法构建基于表型性状的树系图。

依据获得的 27 个居群的 24 条引物的 ISSR 数据计算各引物的总条带数、多态性条带数和多态性百分率; 应用 SPSS 16.0 软件, 根据欧氏平方距离系数, 用 UPGMA 法构建基于 ISSR 标记的 27 个黄杨叶栒子居群的树系图。采用 POPGEN 32 软件计算滇西北群体 (DXB)、宣威群体 (XW)、嵩明群体 (SM)、石林群体 (SL)、昆明群体 (KM) 和会泽群体 (HZ) 等 6 个产区的黄杨叶栒子居群的多态性位点百分比 (PPB)、观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、Shannon 信息指数 (I) 和遗传多样性指数 (H_t)。

2 结果与分析

2.1 基于表型性状的遗传多样性分析

2.1.1 表型性状分析 各黄杨叶栒子居群的枝条颜色全部为棕褐色; 所有小枝都被糙伏毛; 二级枝条与主枝之间的夹角为 80.07°~37.67°, 平均为 42.4°, 平均变异系数为 16.53%; 叶片长度为 0.6~1.83 cm, 叶片宽度为 0.37~1.26 cm, 二者变异系数分别为 23.19% 和 28.78%; 叶片质地纸质占 100%; 叶片形状为卵形; 叶基形状 98.04% 为近圆形, 还有 1.96% 为宽楔形; 叶尖形状有 98.04% 为锐尖, 有 1.96% 为钝尖; 叶片正面 98.04% 有毛, 有 1.96% 为幼时有毛; 叶片正面都疏被白色绒毛; 叶片背面都疏被灰白色绒毛; 100% 花序具有 1 朵以上的

花；花朵颜色全部为白色；果实均为红色钟状果；萼筒全部密疏绒毛；果实纵径为 5.48~8.29 mm，果实的横径为 5.37~7.76 mm，变异系数分别为 18.00% 和 17.34%；果实萼裂片形状变异相对较大，变异系数为 69.02%，其中，尖三角形占 54.90%，宽三角形间隔缝大占 33.33%，宽三角形占 9.8%，几乎不开裂占 1.96%；果实萼裂片中 94.12% 被毛，其中，66.67% 是被密绒毛，而 33.33% 被疏绒毛，其变异系数达 35.17%；26.56% 的果实包含 1 个小核，39.06% 的果实包含 2 个小核，28.91% 的果实包含 3 小核，4.69% 的果实包含 4 小核，只有 0.78% 的果实含 5 小核。

2.1.2 各表型性状的聚类分析 依据 33 个表型性状的 51 个野生黄杨叶栒子居群的 UPGMA 树系图见图 1。各居群之间的距离在 25 阈值内，51 个样本在遗传距离系数 25 处可以划分为 2 个类群，其中，类群 II 包括了 3 个居群，二级枝条与主枝之间的夹角为 78°~80°，叶片长度为 0.9~1.0 cm，叶

片宽度为 0.5~0.55 cm，属于所有居群中夹角最大的一组；类群 I 中，在遗传距离系数为 10 处可以划分为 I-1 和 I-2 两个分支，其中，I-2 分支中包括了 21 个居群，二级枝条与主枝之间的夹角多数为 62°~68°，居群分布海拔在 1 900~2 500 m；I-1 类群中，在遗传距离系数 8 处分为 I-1-1 和 I-1-2 两个分支，分别包括了 26 个和 1 个居群。I-1-1 分支中，一个小分支夹角基本为 53°~57°，另一小分支则保持在 42°~49°；I-1-2 分支中仅有 1 个来自昆明居群的栒子，其夹角最小（37°）。从图 1 可看出：51 个黄杨叶栒子居群间的亲缘关系，多数地理位置或者海拔相近的居群能够聚在同一分支，但有些同一产地的不同居群却分布在不同的分支中。

2.2 基于 ISSR 分子标记的遗传多样性分析

2.2.1 黄杨叶栒子 ISSR 多样性分析 24 条 ISSR 引物对 27 个黄杨叶栒子居群共扩增出 228 条带，其中，多态性条带有 153 条，每条引物扩增得到的总条带数为 5~14，平均 9.50 条；多态性条带数为 3~13，平均 6.38 条；多态百分率为 58.33%~100.00%，多态百分率达 81.56%（表 2）。

将来自滇西北、宣威、嵩明、石林、昆明、会泽地区的 27 个居群按产区进行归类后用 PopGene 32 软件分析，得表 3。6 个产区平均扩增出 151.67 多态性位点，多态性位点比率达到 66.52%，其中，嵩明产区多态性位点最多，达 170，多态性位点比率达 74.56%；会泽产区的多态性位点最少，只有 122，比率 53.51%。群体间平均 Nei's 遗传多样性指数为 0.413 2，Shannon 多样性指数为 0.595 9，群体内多态性位点比率为 53.51~74.56%。Nei's 遗传多样性指数 (H) 为 0.156 2~0.432 5，平均为 0.352 0；Shannon 多样性指数 (I) 为 0.216 6~0.621 2，平均 0.505 9。6 个产地中，HZ 群体 ($H=0.156 2$, $I=0.216 6$) 的遗传多样性水平最低，KM 群体 ($H=0.432 5$, $I=0.621 2$) 的遗传多样性水平最高。Nei's 遗传多样性指数、Shannon 多样性指数和多态性位点比率 3 个指标所表现的多样性趋势基本一致，6 个群体遗传多样性由高到低依次为:KM 群体 > XW 群体 > SL 群体 > SM 群体 > DXB 群体 > HZ 群体。经计算可知，遗传多样性指数 (H_i) 为 $0.413 2 \pm 0.011 0$ 。XW 群体与 KM 群体的遗传距离最大 (0.980 8)，XW 群体与 DXB 群体遗传距离相对较近 (0.330 2)；XW 群体与

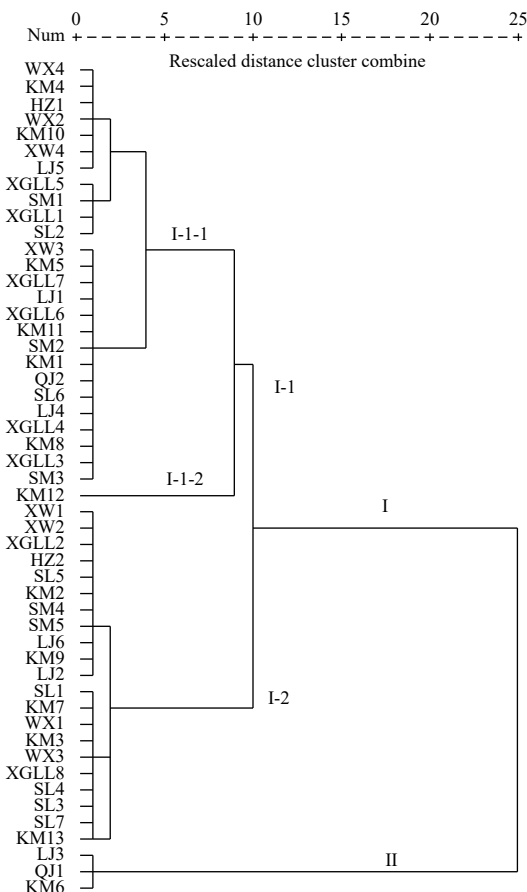


图 1 基于表型性状 51 份黄杨叶栒子资源 UPGMA 聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of 51 *C. buxifolius* resources based on the phenotypic traits

表 2 24 条引物的扩增结果

Table 2 Amplification results of 24 primers

引物编号 Primer	正向引物 Forward primer (5'-3')	扩增条带数 Number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorphi- c band	多态比 率/% Polymo- rphic ratio	引物编号 Primer	正向引物 Forward primer (5'-3')	扩增条带数 Number of amplified band	多态性条带数 Number of polymorph-ic band	多态比 率/% Polymorp- hic ratio
P10	GAGAGAGAGAGAGAT	12	5.67	58.33	P41	GAGAGAGAGAGAGATC	7	5.00	71.43
P13	CTCTCTCTCTCTCTT	11	4.83	72.73	P43	CTCTCTCTCTCTCTAA	11	8.33	90.91
P14	CTCTCTCTCTCTCTA	11	7.83	90.91	P48	CACACACACACACAGG	7	5.00	71.43
P15	CTCTCTCTCTCTCTG	12	8.17	83.33	p50	GTGTGTGTGTGTGTCC	7	3.67	85.71
P18	CACACACACACACAG	7	3.67	85.71	P52	TCTCTCTCTCTCTCAA	10	7.33	80.00
p19	GTGTGTGTGTGTGTGA	7	5.17	85.71	P53	TCTCTCTCTCTCTCAT	10	6.67	80.00
P20	GTGTGTGTGTGTGTGC	8	5.00	87.50	P56	ACACACACACACACTA	12	8.83	83.33
P21	GTGTGTGTGTGTGTGT	6	3.33	66.67	P64	ATGATGATGATGATGATG	11	6.33	63.64
P22	TCTCTCTCTCTCTCA	5	2.83	80.00	P72	GATAGATAGATAGATA	14	13.33	100.00
P25	ACACACACACACACT	8	4.17	87.50	p73	GACAGACAGACAGACA	14	11.33	100.00
P26	ACACACACACACACC	6	4.00	66.67	P78	GGATGGATGGATGGAT	13	9.33	76.92
P27	ACACACACACACACG	9	5.50	88.89	P79	CTTCACTTCACTTCA	10	7.67	100.00

表 3 栒子群体的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of populations of *C. buxifolius*

居群 Population	多态性位点 Polymorphism locus number	多态性位点比率 Percentage of polymorphism loci/%	观测等基因 N_a	有效等位基因 N_e	Nei's 基因多样性指数 H	Shannon 多样性指数 I
DXB	143	62.72	1.812 5±0.396 6	1.612 5±0.348 0	0.343 8±0.176 8	0.497 8±0.249 8
XW	169	74.12	1.937 5±0.245 9	1.762 5±0.280 3	0.414 1±0.124 7	0.592 6±0.168 2
SM	170	74.56	1.875 0±0.336 0	1.680 4±0.329 6	0.375 0±0.160 6	0.540 3±0.221 2
SL	138	60.53	1.937 5±0.245 9	1.696 6±0.277 4	0.390 6±0.128 9	0.566 7±0.171 9
KM	168	73.68	2.000 0±0.000 0	1.792 0±0.219 8	0.432 5±0.080 3	0.621 2±0.088 8
HZ	122	53.51	1.312 5±0.470 9	1.312 5±0.470 9	0.156 2±0.235 5	0.216 6±0.326 4
平均 Mean	151.67	66.52	1.812 5±0.282 6	1.642 8±0.321 0	0.352 0±0.151 1	0.505 9±0.204 4

KM 群体遗传一致度最低 (0.375 0), XW 群体与 DXB 群体遗传一致度最高 (0.718 8)。其余遗传一致度基本在 0.48 左右, 4 个群体间的遗传一致度变幅为 0.375 0~0.718 8。

2.2.2 基于 ISSR 分子标记的黄杨叶栒子居群间亲缘关系 用 SPSS 16.0 软件计算 27 个黄杨叶栒子居群间的欧氏平方距离系数, 采用 UPGMA 聚类方法, 得到 27 个黄杨叶栒子居群的聚类树系图 (图 2)。从图 2 可以看出: 以距离系数 23 为界, 可以将 27 个居群划分为 3 大分支: 分支 I 包含 13 个居群, 又可进一步细分为昆明、嵩明组 (I-1), 5 个居群基本分布在海拔 2 050 m 左右, 石林等组 (I-2) 6 个居群分布在海拔 1 950~2 100 m; 分支 II 包含 3 个居群, 包括了全部来自

滇西北的居群; 分支 III 包含 11 个居群, 可进一步细分为昆明、宣威等组 (III-1), 包括了 9 个居群, 昆明与会泽 (III-2、III-3) 2 个分支, 各自包括 1 个居群, 其均分布在海拔 2 400 m 的地区。

3 讨论

3.1 黄杨叶栒子的遗传多样性丰富

表型性状是种质资源遗传多样性的一种表现方式, 与分子标记有着同等重要的作用, 同时也是育种和种质保护研究的基础工作^[14-15]。本研究选取 33 个表型性状, 对 51 个野生黄杨叶栒子居群的遗传多样性进行了分析, 发现有 22 个性状均表现出不同程度的变异, 且变异主要存在于居群之间, 变异系数较大的性状有萼裂片形状 (69.02%)、萼裂

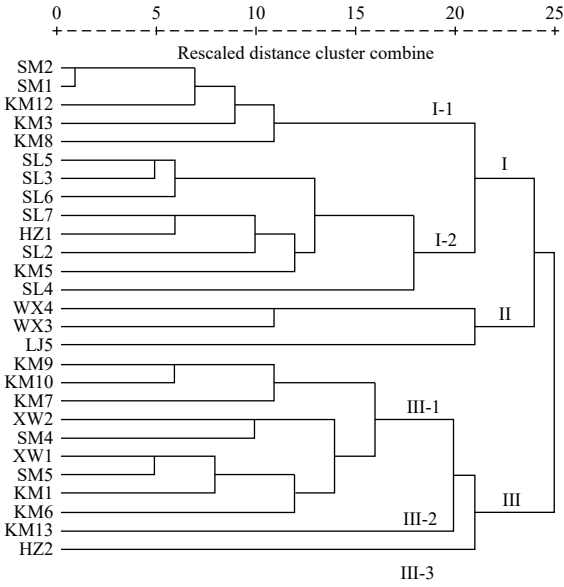


图2 基于ISSR标记分析27份黄杨叶栒子资源UPGMA聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram of 27 *C. buxifolius* resources based on the ISSR marker

片毛被情况 (35.71%)、叶片宽度 (28.78%)、叶片长度 (23.19%) 等, 说明黄杨叶栒子居群间在果实萼裂片和叶片形态上存在较大的差异, 大于野生玫瑰 (18.48%)^[16]、假俭草 (25.59%)^[17]、垂珠花 (22.64%)^[18], 但这些差异均没有准噶尔山楂 (86.10%)^[19] 的大。

ISSR 分子标记可以产生丰富的多态位点, 从而揭示种间、种内遗传变异情况^[4]。本文利用 ISSR 分子标记对 27 个野生黄杨叶栒子居群进行遗传多样性分析, 发现多态百分率达 81.56%, 说明云南的黄杨叶栒子资源存在较丰富的遗传多样性, 其丰富程度与枣庄石榴 (82.86%)^[7] 相近, 但不如大别山区的白檀 (92.62%)^[20] 和杜鹃花 (98.94%)^[21] 高。

3.2 黄杨叶栒子居群间的亲缘关系

本文用 33 个表型性状构建了 51 个黄杨叶栒子居群的树系图 (图 1), 用 24 个 ISSR 引物的 228 条条带构建了 27 个黄杨叶栒子居群的树系图 (图 2)。2 张图对比分析可知: 在 ISSR 聚类图中 I-1 分支中的 5 个居群, 有 3 个居群 (SM1、SM2、KM8) 在表型性状聚类图中都属于 I-1-1 这个分支, 表型性状和 ISSR 分子标记所得结果都表明这 3 个居群的亲缘关系近; 而其中的 KM3 居群在表型性状图中属于 I-2 分支, 2 种聚类方法结果

不一致。分析此现象出现的原因: 一是黄杨叶栒子居群间的亲缘关系与地理位置密切相关, 分布在同一地区的各个居群多数能聚在一起, 如昆明群体、滇西北群体、石林群体和会泽群体的部分材料可分别聚为一类, 说明分布位置的隔离促进了黄杨叶栒子居群间的遗传分化^[22-23]; 二是个别居群未能与同一产区的其他居群聚在一起, 而聚进了其他产区的居群之中, 其原因可能是同一产区内各居群的小生境不完全相同, 在不同产区内也有相似的小生境, 生境的不同导致不同居群间发生遗传分化和趋同进化。在材料采集时发现, 虽然有些居群采集自同一产地, 但它们的生境 (土壤、水分、坡度、坡向、光照、海拔高度、伴生植物等) 各不相同; 但有些居群虽然采自不同的产地, 但却拥有极为相似的生境, 导致黄杨叶栒子呈现地域性趋同进化^[24]。

3.3 地理隔离促进栒子居群间的遗传分化

正如沙棘, 由于其分布区广泛, 分布区内气候、土壤和海拔等生态因子的差异, 地理隔离促进其高度种群遗传分化, 形成 11 亚种^[1, 25]。地理隔离是物种间基因交流的天然屏障, 也是影响居群间遗传分化的重要因素^[26]。在聚类分析中, 昆明群体 (I-1 分支中 3 个居群和 III-1 亚分支中 3 个居群)、石林群体 (I-2 亚分支中 6 个居群)、滇西北群体 (II 分支中 3 个居群) 可分别聚为一类。昆明群体和石林群体的栒子分布于滇中盆地, 但 2 个地区相距 70 km, 受虫媒和鸟媒飞行距离的影响, 依靠其在居群间传播花粉的能力必定受到地理距离的限制^[27], 空间隔离是居群间遗传分化的因素; 而滇西北群体则分布在三江并流区域, 群体间在地理分布上有横断山脉阻隔, 使得物种区域分布的山脉阻隔特点突出, 对黄杨叶栒子不同的居群具有天然的隔离作用, 山脉阻隔严重影响了居群间花粉及种子散布, 也使居群之间的基因交流受到了一定程度的阻碍^[28], 是引起居群间遗传分化的重要因素。

表型性状是植物的外部特征, 标记数量少, 且受到生境、生长状况和时期等方面因素的影响, 利用受限。表型性状与 ISSR 分子标记所提供的 DNA 片段信息相结合, 可以揭示黄杨叶栒子遗传的本质特征。同时通过遗传聚类了解栒子遗传变异在地理上的分布格局, 对于制定科学的保护策略起着极为重要的作用。上述黄杨叶栒子遗传多样性分

析将为今后黄杨叶栒子种质资源分类、起源、保存和利用奠定基础。

4 结论

研究表明:滇产黄杨叶栒子表型性状和分子遗传多样性丰富。根据分子标记聚类结果可以将27个居群分为3个分支。黄杨叶栒子居群间的亲缘关系及分布与地理位置、海拔位置有密切关系。

参考文献:

- [1] 吴征镒,陈心启. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 107-120.
- [2] 吴征镒. 云南植物志[M]. 北京: 科学出版社, 2006: 303-332
- [3] Hilde N, Igor V B. DNA Markers and Morphometry Reveal Multiclinal and Poorly Defined Taxa in an Apomictic *Cotoneaster* Species Complex[J]. *Taxon*, 2007, 56(1): 119-128.
- [4] Bartish V I, Hylmö B, Nybom H. RAPD analysis of interspecific relationships in presumably apomictic *Cotoneaster* species[J]. *Euphytica*, 2001, 120(2): 273-280.
- [5] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants.[J]. *Molecular Ecology*, 2014, 13(5): 1143-1155.
- [6] 黎 裕, 贾继增, 王天宇. 分子标记的种类及其发展[J]. *生物技术通报*, 1999, 15(4): 19-22.
- [7] 王建波. ISSR分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J]. *遗传*, 2002, 24(5): 102-105.
- [8] 张文龙, 陈志伟, 杨文鹏, 等. 分子标记辅助选择技术及其在作物育种上的应用研究[J]. *种子*, 2008, 27(4): 39-43.
- [9] 夏 铭. 遗传多样性研究进展[J]. *生态学杂志*, 1999, 8(03): 60-66, 82.
- [10] 葛永奇, 邱英雄, 丁炳扬, 等. 孑遗植物银杏群体遗传多样性的ISSR分析[J]. *生物多样性*, 2003, 11(4): 276-287.
- [11] 梁雪莲, 郑奕雄, 陈晓玲, 等. 花生DNA提取方法比较[J]. *生物技术*, 2007, 17(1): 41-44.
- [12] 马 明, 杨克强, 郭起荣. 改良CTAB法提取林木树种基因组DNA的研究[J]. *生物技术*, 2007, 17(3): 36-38.
- [13] 文晓鹏, 邓秀新. 五种蔷薇属植物基因组DNA的提取及鉴定[J]. *种子*, 2002, 21(6): 18-21.
- [14] 李自超, 张洪亮, 孙传清, 等. 植物遗传资源核心种质研究现状与展望[J]. *中国农业大学学报*, 1999, 4(5): 51-62.
- [15] 赵 耀, 李耕耘, 杨 继. 栽培植物野生近缘种的保护与利用[J]. *生物多样性*, 2018, 26(4): 91-103.
- [16] 童 冉, 吴小龙, 姜丽娜, 等. 野生玫瑰种群表型变异[J]. *生态学报*, 2017, 37(11): 3706-3715.
- [17] 白史且, 荀文龙, 张新全, 等. 假俭草种群变异与生态特性的研究[J]. *北京林业大学学报*, 2002, 24(4): 97-101.
- [18] 许晓岗, 吴秀萍, 丁芳芳. 垂珠花自然居群表型性状及遗传多样性分析[J]. *西北植物学报*, 2017, 37(8): 1517-1524.
- [19] 盛 芳, 陈淑英, 田 嘉, 等. 新疆准噶尔山楂不同居群的遗传多样性[J]. *生物多样性*, 2017, 25(5): 518-530.
- [20] 马 丽, 王庆军, 罗 华, 等. 枣庄石榴种质资源遗传多样性的ISSR分析[J]. *北方园艺*, 2018(24): 35-40.
- [21] 张蓓林, 任 瑾, 田时雨, 等. 大别山地区杜鹃花资源遗传多样性的ISSR分析[J]. *北方园艺*, 2018(24): 79-84.
- [22] 张安世, 韩臣鹏, 齐秀娟, 等. 基于ISSR标记的猕猴桃品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J]. *植物资源与环境学报*, 2017, 26(3): 19-26.
- [23] 包文泉, 乌云塔娜, 王 淋, 等. 野生杏和栽培杏的遗传多样性和遗传结构分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2017, 18(2): 201-209.
- [24] 范 彦, 曾 兵, 张新全, 等. 中国野生鸭茅遗传多样性的ISSR研究[J]. *草业学报*, 2006, 15(5): 103-108.
- [25] 马玉花, 冶贵生, 向前胜, 等. 基于ITS序列探讨沙棘属植物的系统发育关系[J]. *应用生态学报*, 2014, 25(10): 2985-2990.
- [26] 刘永良, 毛建丰, 王晓茹, 等. 同倍杂交种高山松与亲本种云南松的地理隔离研究[J]. *植物分类与资源学报*, 2011, 33(3): 269-274.
- [27] 林 立, 李纪元, 倪 穗, 等. 岛屿地理隔离对山茶种群遗传结构的影响[J]. *林业科学研究*, 2012, 25(3): 378-384.
- [28] 何承忠, 李佳蔓, 员 涛, 等. 地理隔离对西南藏区山杨居群遗传结构影响的SRAP分析[J]. *林业科学研究*, 2015, 28(2): 12-17.

Genetic Diversity Analysis of *Cotoneaster buxifolius* in Yunnan Province Based on Phenotype Characters and ISSR Marker

ZHU Yan-lei¹, GUO Feng-gen²

(1. College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, Yunnan, China)

Abstract: [Objective] To reveal the level of genetic diversity of wild populations of *Cotoneaster buxifolius* Lindl. from the viewpoints of phenotypic traits and molecular marker. [Method] 33 phenotypic traits and ISSR primers were used to investigate the genetic diversity of wild populations of *C. buxifolius* in Yunnan. The diversity indices were calculated by PopGen software and the phylogenetic trees were constructed by SPSS 16.0 software. [Result] The analysis of numeric traits indicated that the average coefficient of variation of leaf length and leaf width was 25.99%. The variation of three related traits of calyx lobes was 40.66%, and the difference was significant. In total 228 bands were detected by 24 ISSR primers, 153 of them were polymorphic and the percentage of polymorphic bands was 81.56%. The Nei's gene diversity index was 0.352 0 while the Shannon diversity index was 0.505 9. These data indicated that there was abundant genetic diversity in *C. buxifolius*. The 2 phylogenetic trees based on phenotypic traits and ISSR markers by UPGMA were similar. Most populations in the same distribution areas were classified into the same group, while a few populations did not combine with other populations in the same distribution areas. This phenomenon indicated that the geographical isolation promoted genetic differentiation and there were convergent evolutions due to the similar micro-habitat. [Conclusion] The *C. buxifolius* in Yunnan shows the higher level of genetic diversity. The inter-specific relationship and distribution of *C. buxifolius* populations are closely related to geographical location and altitude.

Keywords: *Cotoneaster buxifolius* Lindl.; genetic diversity; phenotype character; ISSR

(责任编辑: 张 研)