

# 锥栗自然居群遗传多样性的 ISSR 分析

龚榜初, 刘国彬

(中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400)

**摘要:** 采用 20 条 ISSR 分子标记对栗属中国特有种 - 锥栗 (*Castanea henryi*) 的 16 个自然居群进行了遗传多样性与遗传关系分析。在 449 份试材上共扩增得到 379 个位点, 其中多态性位点 378 个, 多态性位点百分率 (*PPL*) 达 99.74%, 平均期望杂合度 ( $H_e$ ) 为 0.2950, Shannon 信息指数 ( $I$ ) 为 0.4522; 居群水平遗传多样性为 46.09%, 且不同居群遗传多样性水平有较大差异, 16 个自然居群中以湘西居群的遗传多样性水平最高 ( $PPL = 53.30\%$ ,  $H_e = 0.1861$ ,  $I = 0.2781$ ), 其次为靖州、庆元、昭通及都江堰居群, 南平居群最低 ( $PPL = 36.94\%$ ,  $H_e = 0.1202$ ,  $I = 0.1817$ )。Nei's 遗传多样性和 AMOVA 分析表明, 居群间产生了较大的遗传分化 ( $G_{st} = 0.4466$ ), 锥栗自然居群内的遗传变异稍占优势 (52.51%)。UPGMA 聚类分析将 16 个锥栗居群分为 2 大类 5 亚类。湘西地区可能是锥栗的次生分布中心和现代遗传多样性分布中心, 是锥栗研究的资源中心, 也是最有价值的基因库, 需要重点保护。

**关键词:** 锥栗; 自然居群; 遗传多样性; 遗传关系; ISSR

## ISSR Analysis of Genetic Diversity in Natural Populations of *Castanea henryi*

GONG Bang-chu, LIU Guo-bin

(Research Institute of Subtropical Forestry, CAF, Fuyang Zhejiang 311400)

**Abstract:** Genetic diversity and genetic relationships of 16 natural populations of *Castanea henryi* were assessed by ISSR. 379 loci were identified in 449 individuals, of which 378 loci were polymorphic, the polymorphic loci percent (*PPL*) was 99.74%. The mean expected heterozygosity ( $H_e$ ) and the Shannon information index ( $I$ ) was 0.2950 and 0.4522, respectively. In population level, the *PPL* was 46.09%. The genetic diversity in different population was not consistent. Compared with those from other 15 regions, Xiangxi region had the higher level of diversity ( $PPL = 53.30\%$ ,  $H_e = 0.1861$ ,  $I = 0.2781$ ). A high level of genetic differentiation was detected among populations based on analysis of Nei's genetic diversity and molecular variance (AMOVA), which showed that a large genetic differentiation existed among populations ( $G_{st} = 0.4466$ ), and distribution of genetic variation within and among populations was 52.51% and 47.49%, respectively. 16 populations were clustered into 2 groups and 5 subgroups by the UPGMA analysis. Xiangxi region might be the secondary distribution center and modern center of genetic diversity of *C. henryi*, also was the resource center. It was the most valuable gene pool, therefore, natural populations of *C. henryi* in this region need deserve prior conservation.

**Key words:** *Castanea henryi*; natural populations; genetic diversity; genetic relationship; ISSR

锥栗 (*Castanea henryi* Rehd. et Wils.) 为壳斗科 (Fagaceae) 栗属 (*C. Mill.*) 植物, 与中国板栗 (*C. mollissima* Bl.)、茅栗 (*C. seguinii* Dode.) 同为我国特有 3 大栗属物种。现今世界上经济栽培的食用栗主

要有中国的板栗、欧洲栗 (*C. sativa* Mill.) 和日本栗 (*C. crenata* Sieb. & Zucc.)<sup>[1-2]</sup>, 锥栗因坚果品质好, 营养丰富, 树干通直, 材质坚实等优点, 逐渐成为我国乃至世界重要的食用栗之一, 具果材两用双重经

济价值,是世界食用栗栽培品种改良的重要基因来源<sup>[1]</sup>;锥栗直立生长特性也成为栗属植物材用林品种改良的可利用资源。锥栗自然资源对世界栗属植物资源的保护、利用和可持续发展具有积极意义。

锥栗主要分布于我国长江流域及其以南的大部分分地区,除福建和浙江部分地区有少量优良品种用于栽培外,大部处于野生状态。由于目前社会对锥栗资源开发利用不合理,锥栗资源保护意识不强,造成锥栗野生资源破坏严重,所以,开展锥栗自然居群遗传多样性和遗传关系研究,对我国锥栗资源的保护、利用及可持续发展具有重要意义。

栗属植物系统学研究、遗传多样性、遗传分化、品种鉴定以及遗传连锁图谱构建研究自 20 世纪末开始已有不少报道<sup>[3-14]</sup>。栗属植物自然居群的遗传多样性在欧洲栗<sup>[15]</sup>、日本栗<sup>[16]</sup>、茅栗<sup>[17]</sup>、中国板栗<sup>[18]</sup>中均有研究,但迄今为止,关于锥栗自然居群遗传多样性的研究未见报道,锥栗自然居群间遗传分化程度及遗传关系尚未可知。

表 1 锥栗居群的采样地点信息

Table 1 The location information of *C. henryi* populations sampled

居群 Population	纬度(N) Latitude	经度(E) Longitude	海拔(m) Altitude	人为干预 Interference	林分类型 Forests type	立地 Sites	取样株数 Individual
江西宜春	27°39'	114°32'	532 ~ 590	中	落叶与常绿阔叶林	山腰	27
福建南平	26°32'	117°19'	690 ~ 873	很少	落叶与常绿阔叶林、竹阔混交	山腰	30
广西资源	25°53'	110°32'	681 ~ 715	很少	竹阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	20
云南昭通	28°05'	104°07'	1020 ~ 1123	中	落叶与常绿阔叶林	山脚	28
湖南郴州	25°33'	113°52'	606 ~ 706	近原始林	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山顶	30
湖南靖州	26°26'	109°35'	453 ~ 509	较多	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	24
湖南湘西	28°23'	110°32'	305 ~ 494	中	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	30
贵州凯里	26°36'	108°18'	777 ~ 897	中	落叶与常绿阔叶林	山脚	30
四川乐山	29°35'	103°17'	1271 ~ 1364	中	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	30
四川都江堰	30°57'	103°33'	1029 ~ 1150	中	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山脚	30
湖北房县	31°52'	110°28'	880 ~ 1445	中	落叶与常绿阔叶林	山顶	28
湖北宜昌	31°05'	110°57'	1271 ~ 1590	中	落叶阔叶林	山腰	30
浙江庆元	28°50'	120°31'	579 ~ 709	较多	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	27
浙江仙居	27°37'	118°59'	369 ~ 582	中	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	30
浙江安吉	30°32'	119°20'	580 ~ 810	中	针阔混交、落叶与常绿阔叶林	山腰	30
安徽黄山	30°10'	118°10'	440 ~ 625	很少	落叶阔叶林	山腰	30

## 1.2 ISSR 分析

本研究所用引物参考加拿大哥伦比亚大学 UBC 公司公布的引物序列,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。通过前期试验,初步构建了锥栗 ISSR 分析技术体系,进而从 60 条 ISSR 引物中筛选出

ISSR(inter-simple sequence repeat)分子标记技术在植物品种鉴定<sup>[19]</sup>、亲缘关系分析和遗传多样性研究<sup>[20-23]</sup>、指纹图谱<sup>[24]</sup>和遗传连锁图谱构建<sup>[9]</sup>等方面得到了成功应用,适用于锥栗研究的 ISSR 引物和相应的分析技术体系已经建立<sup>[25]</sup>。本文运用 ISSR 技术对我国锥栗自然居群的遗传多样性和居群间的遗传关系进行分析,探讨锥栗遗传多样性分布中心和自然居群间(内)的遗传变异,为锥栗资源的遗传学研究奠定基础,为锥栗资源保护及可持续发展提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 样本采集

通过对锥栗野生资源的实地调查,于 2006 - 2008 年春季在锥栗主要自然分布区的 10 个省份取样,取样策略参考金燕等<sup>[26]</sup>。共采集到 16 个天然居群 449 个个体(表 1)。采集到的锥栗叶片装入硅胶盒中,经干燥处理后带回实验室提取基因组 DNA。

20 条多态性高的引物用于本研究(表 2)。PCR 扩增反应在 ABI-2720 型热循环 PCR 仪上进行,最终优化反应体系 25  $\mu\text{L}$ :模板 DNA 1.0  $\mu\text{L}$ (50 ng/ $\mu\text{L}$ )、 $\text{Mg}^{2+}$  1.5  $\mu\text{L}$ (25 mmol/ $\mu\text{L}$ )、dNTPs 2.0  $\mu\text{L}$ (2.5 mmol/ $\mu\text{L}$ )、*Taq* DNA 聚合酶 0.2  $\mu\text{L}$ (5U/ $\mu\text{L}$ )、引物 0.75  $\mu\text{L}$

(10  $\mu\text{mol}/\mu\text{L}$ )、10  $\times$  PCR buffer 2.5  $\mu\text{L}$ 、ddH<sub>2</sub>O 17.05  $\mu\text{L}$ ;反应程序:94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;94  $^{\circ}\text{C}$  变性 45 s, $T_m$ (不同引物退火温度有所不同)退火 45 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min,32 个循环;最后 72  $^{\circ}\text{C}$  充分延伸 5 min。

表 2 引物信息

Table 2 The information of primers

引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) $T_m$	多态性位点数/引物 No. of PL	引物 Primer	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	扩增温度 ( $^{\circ}\text{C}$ ) $T_m$	多态性位点数/引物 No. of PL
808	(AG) <sub>8</sub> C	57	18	836	(AG) <sub>8</sub> YA	57	22
810	(GA) <sub>8</sub> T	58	23	840	(GA) <sub>8</sub> YT	58	22
811	(GA) <sub>8</sub> C	57	21	841	(GA) <sub>8</sub> YC	52	14
815	(CT) <sub>8</sub> G	55	18	842	(GA) <sub>8</sub> YG	56	15
818	(CA) <sub>8</sub> G	55	15	845	(CT) <sub>8</sub> RG	58	18
820	(GT) <sub>8</sub> C	57	18	857	(AC) <sub>8</sub> YG	52	22
821	(GT) <sub>8</sub> T	57	19	868	(GAA) <sub>5</sub>	44	19
824	(TC) <sub>8</sub> G	53	18	873	(GACA) <sub>4</sub>	58	23
825	(AC) <sub>8</sub> T	58	19	880	(GGAGA) <sub>3</sub>	53	18
830	(TG) <sub>8</sub> G	59	17	881	(GGGT) <sub>3</sub>	59	19

### 1.3 数据分析

采用人工读带方式进行数据统计,以标准分子量 200 bp ladder 为标准,根据各位点电泳谱带的有无统计所有的二元数据:同一位点(分子量相同的条带)扩增条带有带的记为 1,无带的记为 0。

假设居群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,运用 POPGENE 1.32 分析软件计算物种水平和居群水平的多态性位点百分率、观测等位基因数( $A_o$ )、有效等位基因数( $A_e$ )、Shannon 信息指数( $I$ )、 $Nei's$  基因多样性(即平均期望杂合度  $H_e$ )( $Nei, 1973$ )、居群总基因多样性( $H_t$ )、居群内基因多样性( $H_s$ )、居群间基因分化系数( $G_{st}$ )和  $Nei's$  遗传距离( $D$ )及遗传相似性系数。

基于遗传相似性系数,使用软件 NTSYS-pc 2.1

扩增产物在 0.5  $\times$  TBE 缓冲液中,1.5% 琼脂糖凝胶上电泳,SYBR Gold 核酸凝胶染料染色,然后通过计算机凝胶成像系统(FR-200A 全自动紫外与可见分析装置)观察和摄影记录。

对个体及各居群进行非加权配对算术平均法(UPGMA, unweighted pair group method using arithmetic average)聚类分析;采用 ARLEQUIN 2.1 软件进行分子方差分析(AMOVA, analysis of molecular variance),估测遗传变异在居群内和居群间的配比情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 锥栗自然居群的遗传多样性

20 条引物对锥栗 16 个自然居群 449 个个体进行 ISSR 分析,共检测到位点 379 个,其中多态性位点 378 个(部分扩增结果见图 1、2)。每条引物产生 14~23 个多态性位点,平均每个引物产生多态性位点 18.9 个。

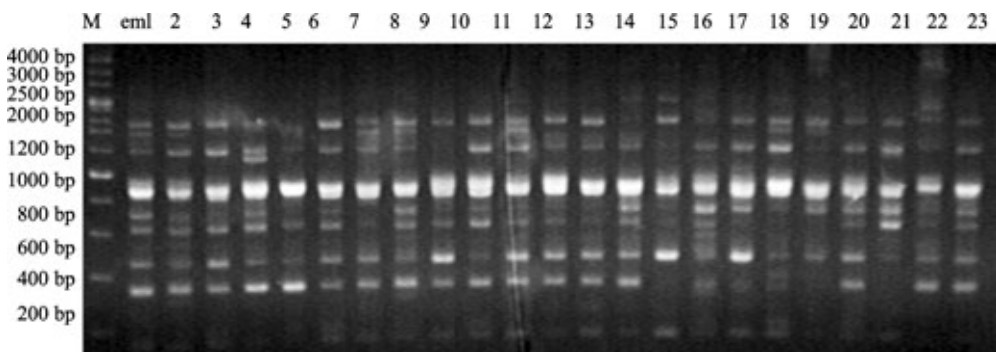


图 1 引物 836 对乐山居群的扩增谱带

Fig. 1 ISSR bands amplified with primer 836 from Leshan population

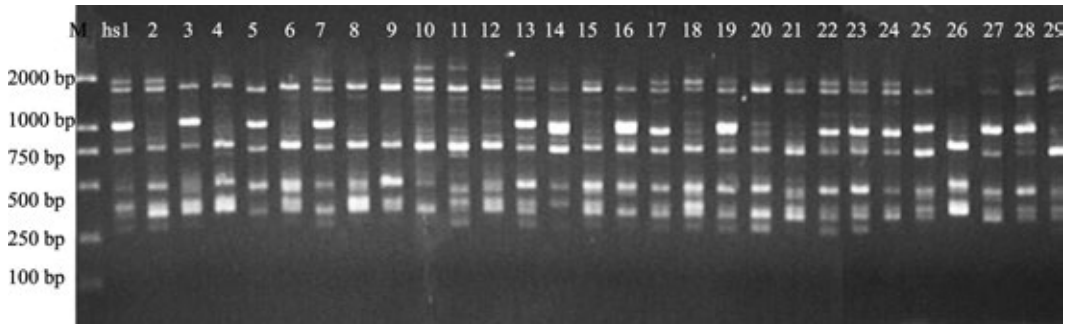


图2 引物 824 对黄山居群的扩增谱带

Fig. 2 ISSR bands amplified with primer 824 from Huangshan population

锥栗遗传多样性水平在物种和居群 2 个层面表现不同(表 3),在物种水平上,多态性位点百分率为 99.74%,显示了极高的遗传多样性水平,其 *Nei's* 基因多样性( $H_e$ )为 0.2950,Shannon 信息指数( $I$ )为 0.4522。在居群水平上,多态性位点百分率在 36.94%~53.30%之间,平均为 46.09%,遗传多样性水平偏低。其中多态性位点百分率最高的是湘西居群为 53.30%,较低的有南平居群 36.94%、黄山居群 37.20%和资源居群 37.99%。居群的 *Nei's* 基因多样性( $H_e$ )在 0.1202~0.1861 之间,平均为 0.1573;Shannon 信息指数在 0.1817~0.2781 之间,平均为 0.2357,*Nei's* 基因多样性和 Shannon 信息指数 2 者大小与居群多态性位点百分率的大小趋势基

本一致。

## 2.2 锥栗自然居群的遗传结构和遗传分化

POPGENE 分析结果表明,居群水平 Shannon 信息指数为 0.2357,占总遗传变异的 52.12%;*Nei's* 基因多样性为 0.1573,占总遗传变异的 53.32%。居群间的遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.4460,基因流  $N_m$  为 0.5730。基因流小于 1,说明居群间基因流动程度较低;居群间遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.4460,揭示了居群间存在明显的遗传分化。AMOVA 分析结果进一步表明(表 4),总变异中,47.49% ( $P < 0.0010$ )出现在居群间,52.51% ( $P < 0.0010$ )出现在居群内,进而说明锥栗居群间发生了较大幅度的遗传分化。

表 3 锥栗 16 个居群的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of 16 *C. henryi* populations

居群 Population	观测等位 基因数 $A_o$	有效等位 基因数 $A_e$	<i>Nei's</i> 基因 多样性 $H_e$	Shannon 信息指数 $I$	多态性位点数 No. of PL	多态性百分率 (%) PPL
南平 Nanping	1.3694	1.2033	0.1202	0.1817	140	36.94
黄山 Huangshan	1.3720	1.2365	0.1354	0.2001	141	37.20
资源 Ziyuan	1.3799	1.2345	0.1348	0.2004	144	37.99
安吉 Anji	1.4142	1.2572	0.1486	0.2210	157	41.42
仙居 Xianju	1.4222	1.2598	0.1506	0.2240	160	42.22
宜春 Yichun	1.4274	1.2506	0.1483	0.2224	162	42.74
房县 Fangxian	1.4380	1.2464	0.1459	0.2201	166	43.80
宜昌 Yichang	1.4591	1.2374	0.1434	0.2190	174	45.91
郴州 Chenzhou	1.4908	1.2966	0.1717	0.2560	186	49.08
凯里 Kaili	1.4960	1.2777	0.1644	0.2481	188	49.60
乐山 Leshan	1.5092	1.3060	0.1769	0.2640	193	50.92
都江堰 Dujiangyan	1.5119	1.2819	0.1654	0.2496	194	51.19
昭通 Zhaotong	1.5145	1.3084	0.1785	0.2662	195	51.45
庆元 Qingyuan	1.5172	1.2927	0.1709	0.2568	196	51.72
靖州 Jingzhou	1.5198	1.3022	0.1762	0.2644	197	51.98
湘西 Xiangxi	1.5330	1.3191	0.1861	0.2781	202	53.30
居群水平 Population level	1.4609	1.2694	0.1573	0.2357	175	46.09
物种水平 Species level	1.9974	1.4869	0.2950	0.4522	378	99.74

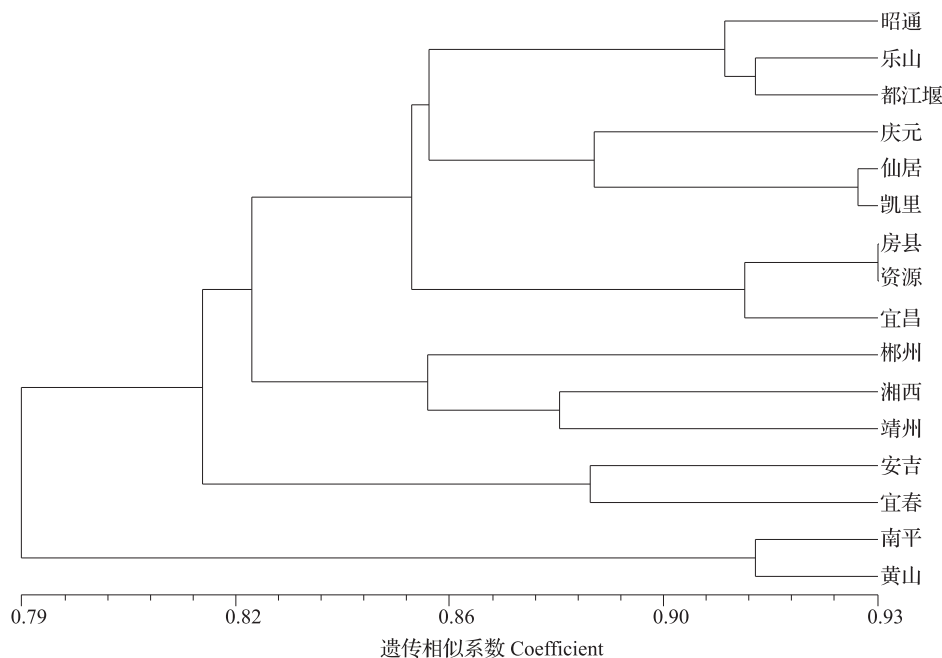
表 4 锥栗 16 个野生居群 449 个个体的分子变异分析

Table 4 Analysis of molecular variance (AMOVA) for 449 individuals in sixteen populations of *C. henryi*

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	方差 SS	变异组成 Variation of components	百分率 (%) Percentage	<i>P</i> 值 <i>P</i> value
居群间 Among populations	15	13454.030	31.07166	47.49	<0.0010
居群内 Within populations	433	14916.407	34.35200	52.51	<0.0010
总和 Total	448	28370.37	65.42366	—	—

## 2.3 聚类分析

根据 *Nei's* 遗传相似性系数,用 NTSYS-pc 2.1 软件对 16 个自然居群进行 UPGMA 聚类分析,16 个居群按照遗传一致度高和遗传距离远近分为 2 大类 5 个亚类(图 3)。房县和资源居群遗传一致度最高,遗传距离最近,首先聚在一起,而后与宜昌居群聚为一类;仙居和凯里、庆元居群在与其他居群聚类前优先聚在一支,位于西南地区的乐山和都江堰居群间遗传一致度也较其他居群高,也较先聚类,进而才与昭通聚在一支,然后与庆元等 3 个居群聚为一类;湖南的 3 个居群与其他居群间的遗传一致度和遗传距离处于中间地位;安吉居群和宜春居群与其他居群遗传一致度较低,遗传距离较远,在 0.81 阈值处与其他居群聚类;遗传一致度最低值存在于黄山和南平居群与其他 14 个居群间,二者最后与其他 14 个居群聚在一起。

图 3 锥栗自然居群间基于 *Nei's* 遗传一致度的 UPGMA 聚类Fig. 3 UPGMA dendrogram for 16 *C. henryi* natural populations based on *Nei's* genetic identity

## 3 讨论

J. L. Hamrick 等<sup>[28]</sup>曾对 655 种植物的遗传多样性进行研究,并得出结论:种群水平的遗传多样性( $H_e$ )为 0.1500,多态性位点百分率(*PPL*)为 51.30%;居群水平的遗传多样性( $H_e$ )为 0.1130,多态性位点百分率(*PPL*)为 34.60%。中国栗属植物具有较高的遗传多样性水平,黄宏文<sup>[1]</sup>通过对中国板栗 4 个品种群的人工栽培群体和茅栗、美洲栗自然居群的

遗传多样性进行分析,并与欧洲栗的研究结果进行了比较,发现中国板栗具有的遗传多样性水平显著高于美洲栗和欧洲栗,认为中国大陆为栗属植物的遗传多样性中心;郎萍等<sup>[29]</sup>利用同工酶技术对栗属 3 个中国特有种板栗、茅栗、锥栗的 30 个居群(其中锥栗 3 个居群,分别来自宜昌、房县、资源),12 个酶系统的 20 个位点进行遗传多样性和遗传结构分析,认为 3 个中国特有种均具有较高的遗传多样性水平,且板栗在种群和居群水平都具有较茅栗、锥栗高

的遗传多样性;在种群的水平上,板栗的多态性位点百分率达 90.00%,茅栗为 82.40%,而锥栗仅为 76.50%。在居群水平锥栗的多态性位点百分率为 66.67%。

本研究中锥栗在物种水平上的多态性位点百分率达 99.7%,远高于植物的自然水平(51.30%);居群水平在 36.94%~53.30%之间,也高于植物的自然水平(34.60%),反映出锥栗具有丰富的遗传多样性。但与郎萍等<sup>[29]</sup>研究结果有所不同,究其原因,一方面可能与取样方法有关,本研究从锥栗自然分布区的大格局取样,锥栗居群数达到 16 个,取样数量多,基本覆盖整个锥栗自然分布区;另一方面,分析方法不同,本文应用 ISSR 分子标记技术进行系统分析。锥栗自然居群高水平的遗传多样性可能是由于:(1)锥栗为多年生落叶大乔木,属于典型的异花授粉植物,具有高度的杂合性,实生后代变异复杂;(2)地理分布范围也是决定植物物种遗传多样性的主要因素,宽分布区的种趋向于具有更高的遗传多样性水平,反之,遗传多样性水平较低。锥栗分布于秦岭以南广大亚热带丘陵山区,涵盖江浙、两湖、两广等 10 多个省市(自治区)等,属于宽分布区物种。这可能是锥栗遗传多样性丰富的主要原因。

锥栗居群间的生境差异较大,海拔及分布范围均较大(表 1)造成 16 个居群间的遗传多样性水平也存在较大差异。研究发现湘西居群遗传多样性水平较其他 15 个居群高( $PPL = 53.3\%$ ,  $H_e = 0.1861$ ,  $I = 0.2781$ ),初步推测湘西地区为锥栗遗传多样性的现代分布中心。关于锥栗遗传多样性的原分布中心,根据郎萍等<sup>[29]</sup>、田华等<sup>[18]</sup>的研究结果,长江流域的神农架及其周边地区是中国板栗的遗传多样性中心和遗传多样性的现代分布中心,茅栗和锥栗起源于中国板栗,且长江流域锥栗居群(神农架附近)的遗传多样性水平(70.6%)较本研究高,但究竟是否也为锥栗的原分布中心,尚待深入研究、探讨。本研究中湘西地区锥栗资源丰富,野生资源分布集中,遗传多样性水平较其他地区高,从而推测湘西地区为锥栗遗传多样性的现代分布中心。

已有研究表明,中国板栗自然居群的遗传分化中,居群内的遗传变异较大于居群间的<sup>[18,29-30]</sup>,与之相比,锥栗自然居群具有较高度度的遗传分化( $G_{st} = 0.4460$ ;  $N_m = 0.5730$ ),Wright 曾指出,如果  $N_m < 1$ ,则遗传漂变可以导致居群间明显的遗传分化,这意味着遗传漂变很大程度上影响着锥栗自然居群遗传变异的分配比例。分子方差分析(AMO-

VA)研究显示,锥栗自然居群间的遗传变异为 47.49%,居群内的遗传变异仅占 52.51%,进一步表明锥栗居群间发生了较大程度的遗传分化,但仍以居群内为主。锥栗属于广分布树种,分布范围广,各居群间地理距离远,可能影响着居群间的基因交流,造成基因流受限,进而导致居群间遗传分化加大;此外,不同地区小气候的形成,也造成锥栗居群生存环境的差异,引起生境的异质性,长期的自然选择,使锥栗居群产生对局部环境的适应性;环境恶化,人为活动对锥栗的干扰、破坏,都在一定程度上影响着遗传分化在锥栗居群内和居群间的分配。

居群的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性<sup>[28]</sup>。在本研究中,根据各居群间的遗传距离和遗传相似性系数建立的聚类图将 16 个居群聚为 2 大类 5 个亚类,比较锥栗各居群间的地理分布及聚类结果,可以看出,较之资源居群,同位于湖北的房县和宜昌的地理距离最近,然而聚类时宜昌居群却后于资源居群而与房县居群聚在一起,同样,浙江的仙居、庆元、安吉 3 个居群也没有聚在一起,安吉居群与地理分布较远的分布于江西的宜春居群单独聚为一支,而庆元与仙居也没有优先聚为一支,而是仙居与贵州的凯里居群先于庆元居群聚类,反映出地理分布和遗传距离没有相关性;而分布于湖南的郴州、湘西、靖州 3 个居群和位于西南地区的乐山、都江堰、昭通 3 个居群却又分别聚在了一起,又表现了地理分布与遗传多样性间的相关性。从本研究结果来看,如何准确判断锥栗居群间地理分布或地理距离与遗传距离间是否具有相关性,还有待于利用相关分析软件对锥栗遗传距离和地理距离之间的相关性进行地理隔离模式分析。

锥栗是我国第 2 大栗种,生长分布范围仅次于板栗,是我国重要的粮食树种、生态树种和材用树种。但由于对其重视不够,加上长期不合理利用,砍栗种竹,伐栗用材等等,只伐不栽,野生锥栗资源遭到严重破坏,导致各地野生锥栗分布密度不断变小。本研究首次利用 ISSR 分子标记技术对锥栗自然资源进行取样并进行系统的遗传多样性分析研究,对于了解我国锥栗资源分布现状,进行行之有效的保护,促进锥栗可持续发展具有重要意义。湘西地区资源丰富,可能是锥栗的次生分布中心或现代遗传多样性分布中心,是锥栗研究的资源中心,也是最有价值的基因库,需要重点保护;本研究每一居群代表一定的生态区域,可以进行有代表性的资源收集,为构建锥栗核心种质库提供了重要的科学依据。

## 参考文献

- [1] 黄宏文. 从世界栗属植物研究现状看中国栗属资源保护的重要性[J]. 武汉植物学研究, 1998, 16(2): 171-176
- [2] 张宇和, 柳鑫, 梁维坚. 中国果树志: 板栗, 榛子卷[M]. 北京: 中国林业出版社, 2005: 21-27
- [3] Pigliucci M, Villani F, Benedettelli S. Spatial patterns of genetic variability in Italian chestnut (*Castanea sativa* Mill.) [J]. Can J Bot, 1990, 68: 1962-1967
- [4] Villani F, Pigliucci M, Benedettelli S, et al. Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations [J]. Heredity, 1991, 66: 131-136
- [5] Huang H W, Dane F, Norton J D. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp) [J]. Theor Appl Genet, 1994a, 88: 981-985
- [6] Huang H W, Dane F, Norton J D. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes [J]. J Am Soc Hortic Sci, 1994b, 119: 840-849
- [7] Huang H W, Dane F, Kubisiak T L. Allozyme and RAPD analysis of the genetic and geographic variation in wild population of the American chestnut *Castanea dentate* (Fagaceae) [J]. Am J Bot, 1998, 85: 1013-1021
- [8] Huang H W, Dane F, Jiang Z W. Inheritance and diversity of PGI in chestnut (*Castanea*) [J]. J Wuhan Bot Res, 1999, 17: 31-41
- [9] Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 1190-1199
- [10] Marinoni D, Akkak A, Bounous G, et al. Development and characterization of microsatellite markers in *Castanea sativa* (Mill.) [J]. Mol Breeding, 2003, 11: 127-136
- [11] Yamamoto T, Tahaka T, Kotobuki K, et al. Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnut [J]. J Hort Sci Biotech, 2003, 78: 197-203
- [12] 杨剑, 唐旭蔚, 涂炳坤, 等. 栗属中国特有种-板栗、茅栗、锥栗 RAPD 分析 [J]. 果树学报, 2004, 21(3): 275-277
- [13] Lang P, Dane F, Kubisiak T L, et al. Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America [J]. Mol Phylogenet Evol, 2007, 43: 49-59
- [14] Martin M A, Mattioni C, Cherubini M, et al. Genetic diversity in European chestnut populations by means of genomic and genetic microsatellite markers [J]. Tree Genet Genomes, 2010, 6: 735-744
- [15] Dane F, Lang P, Huang H, et al. Intercontinental genetic divergence of *Castanea* species in eastern Asia and eastern North America [J]. Heredity, 2003, 91: 314-321
- [16] Tanaka T, Yamamoto T, Suzuki M. Genetic diversity of *Castanea crenata* in northern Japan assessed by SSR markers [J]. Breeding Sci, 2005, 55: 271-277
- [17] 王英, 康明, 黄宏文. 用分子标记揭示植物随机大居群中亚居群的遗传结构—茅栗自然居群空间遗传结构的 SSR 分析 [J]. 植物生态学报, 2006, 30(1): 147-156
- [18] 田华, 康明, 李丽, 等. 中国板栗自然居群微卫星 (SSR) 遗传多样性 [J]. 生物多样性, 2009, 17(3): 296-302
- [19] 王晓飞, 陈建华, 梁明宝, 等. 苎麻种质资源分子身份证构建的初步研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 802-805
- [20] 李国田, 艾呈祥, 张力思, 等. 核桃实生居群遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 640-645
- [21] 彭沙沙, 黄华宏, 童再康, 等. 濒危植物伯乐树遗传多样性的初步研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 362-367
- [22] 孙芳, 杨敏生, 张军, 等. 刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 91-96
- [23] 黄文霞, 何仪, 何觉民, 等. 高效能源植物绿玉树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 487-490
- [24] 刘本英, 王丽鸳, 周健, 等. 云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 458-464
- [25] 刘国彬, 龚榜初, 罗正荣. 锥栗自然居群 ISSR-PCR 分析技术的建立 [J]. 果树学报, 2009, 26(1): 103-107
- [26] 金燕, 卢宝荣. 遗传多样性的取样策略 [J]. 生物多样性, 2003, 11(2): 155-161
- [27] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bul, 1987, 19: 11-15
- [28] Hamick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [M] // Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant population genetics, breeding, and genetic resources. Sunderland: Sinauer Associates, 1989: 43-63
- [29] 郎萍, 黄宏文. 栗属中国特有种居群的遗传多样性及地域差异 [J]. 植物学报, 1999, 41(6): 651-657
- [30] Ai C X, Zhang L S, Wei H R, et al. Study on the genetic diversity of natural chestnut of Shandong by ISSR [J]. Chin J Biotech, 2007, 23(4): 628-633