

基于 ISSR 分子标记的新疆西天山枸杞属种质资源遗传多样性分析

阿克居力得孜·努尔改里得¹, 李茹雪², 杨禧雨¹, 陆彪³, 周龙¹

(¹新疆农业大学园艺学院, 乌鲁木齐 830052; ²新疆维吾尔自治区林草种质资源中心, 乌鲁木齐 830000; ³特克斯县林业与草原局, 新疆特克斯 835500)

摘要: 为探究新疆西天山枸杞属各居群之间的遗传多样性水平及亲缘关系, 本研究利用 ISSR 分子标记的方法对新疆西天山 15 个野生居群 112 份枸杞属植物进行遗传多样性分析。研究发现 15 条 ISSR 引物共扩增出 166 个条带, 其中多态性条带 143 个, 平均多态性条带比例为 86.29%, 新疆西天山 15 个野生居群 112 份枸杞属植物的 Nei's 基因多样性指数 (H) 和香农信息指数 (I) 分别为 0.2124 和 0.3254, 各居群间遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.4259, 基因流 (Nm) 为 0.6740, 认为枸杞属野生居群水平的遗传分化程度极大且各居群间存在一定的基因交流。新疆西天山枸杞属植物在整体水平上的遗传差异明显, 遗传多样性较高。在居群水平上, 特克斯县北山毛溜沟居群的遗传多样性最为丰富。聚类结果显示, 绝大部分居群能够按照地理位置相近而聚为一类, 但也有部分地理位置相近的居群并没有聚在一起。本研究结果可为新疆西天山枸杞属种质资源的有效保护及开发利用提供重要参考依据。

关键词: 新疆西天山; 枸杞属; 遗传多样性; ISSR 分子标记

Genetic diversity analysis of *Cotoneaster* germplasm resources in western Tianshan Mountains of Xinjiang based on ISSR molecular markers

Akejulidezi·Nuergailide¹, LI Ruxue², YANG Xiyu¹, LU Biao³, ZHOU Long¹

(¹College of Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052; ²Xinjiang Uygur Autonomous Region Forest and Grass Germplasm Resources Center, Urumqi 830000; ³Tekes County Forestry and Grassland Bureau, Tekesi 835500, Xinjiang)

Abstract: In order to explore the genetic diversity and genetic relationship among the populations of *Cotoneaster* in the Western Tianshan Mountains of Xinjiang, the genetic diversity of 112 *Cotoneaster* plants from

收稿日期: 2024-09-09 网络出版日期:

URL:

第一作者: 阿克居力得孜·努尔改里得, 研究方向为野生果树种质资源, E-mail: 3173895842@qq.com

通信作者: 周龙, 研究方向为果树种质资源与栽培生理研究, E-mail: zhoulong2004@126.com

资助项目: 2022 新疆维吾尔自治区高校基本科研业务费项目 (XJEDU2022Z004); 第三次新疆综合科学考察课题 (2021xjkk0501)

Foundation projects: 2022 Basic scientific research business fee project of colleges and universities in Xinjiang Uygur Autonomous Region (XJEDU2022Z004); The third comprehensive scientific expedition in Xinjiang (2021xjkk0501)

15 wild populations in the Western Tianshan Mountains of Xinjiang was analyzed by ISSR molecular markers. A total of 166 bands were amplified by 15 ISSR primers, of which 143 were polymorphic bands, with an average polymorphic band ratio of 86.29 %. The Nei 's gene diversity index(H) and Shannon's information index(I) of 112 *Cotoneaster* species from 15 wild populations in Western Tianshan Mountains were 0.2124 and 0.3254, respectively. The genetic differentiation coefficient(F_{st}) among populations was 0.4259, and the gene flow(Nm) was 0.6740. It is believed that the degree of genetic differentiation at the level of wild populations of *Cotoneaster* is great and there is a certain degree of gene exchange among populations. The genetic differences of *Cotoneaster* in the western Tianshan Mountains of Xinjiang are obvious at the overall level, and the genetic diversity is high. At the population level, the genetic diversity of Beishan Maoliugou population in Tekes County was the most abundant. The clustering results showed that most of the populations could be clustered according to the geographical location, but some of the geographically close populations were not clustered together. The results of this study can provide an important reference for the effective protection and development and utilization of *Cotoneaster* germplasm resources in the Western Tianshan Mountains of Xinjiang.

Key words: West Tianshan of Xinjiang; *Cotoneaster*; genetic diversity; ISSR molecular markers

栒子属 (*Cotoneaster*) 植物隶属于蔷薇科 (*Rosaceae*) 苹果亚科 (*Maloideae*) , 全世界 90 余种, 主要分布于亚洲、欧洲和北非的温带地区^[1]。我国栒子属种质资源非常丰富, 全属三分之二以上的种均产于我国, 是世界栒子属的重要分布中心^[2]。栒子属植物作为一种具有较高经济利用潜力的果树, 其野生群体广泛分布于新疆西天山野果林前山带的河谷灌丛中, 是新疆西天山野果林的重要组成部分。新疆栒子属植物主要有黑果栒子(*Cotoneaster melanocarpus* Lodd.)、少花栒子(*Cotoneaster oliganthus* Pojark.)、单花栒子(*Cotoneaster uniflorus* Bunge.)、多花栒子(*Cotoneaster polyanthemus* E.L.Wolf.)、异花栒子(*Cotoneaster allochrous* Pojark.)、大果栒子(*Cotoneaster conspicuus* Comber ex Marquand.)、甜栒子(*Cotoneaster suavis*.)、梨果栒子(*Cotoneaster roborowskii*.)、毛叶水栒子(*Cotoneaster submultiflorus* Popov.)等 10 余种^[3]。通过前期对新疆西天山野果林栒子属植物分布区进行实地踏查时发现, 该分布区内存在因过度放牧大量植株被牲畜啃食、病虫害大面积蔓延、人类无节制的乱砍乱伐以及山体滑坡、泥石流、大风、暴雨造成植株淹没、倒伏等现象, 从而致使栒子属植物的生存环境及遗传多样性遭到严重破坏, 自然繁衍受阻, 各居群内栒子属植物的个体数量和分布面积日趋明显减少, 其现状岌岌可危。因此, 保护新疆西天山栒子属种质资源迫在眉睫。

遗传多样性研究是种质资源评价保护及开发利用工作的基础,对种质资源的遗传多样性进行研究不仅可以分析其当下的生存状况与发展潜力,还可以发掘优良种质资源,为保护种质资源奠定基础^[4-5]。ISSR 分子标记技术以高效、简便、精确度高等特点已广泛应用到植物种质资源遗传多样性分析、遗传变异评价和品种鉴定等诸多领域中^[6]。尽管已有大量学者通过 ISSR 分子标记技术对我国野生山楂^[7]、野杏^[8]、天山樱桃^[9]、野生欧洲李^[10]、野扁桃^[11]等野生果树种质资源开展了遗传多样性研究,并取得了一定研究成果,也为其遗传资源评价、保护及可持续利用提供了重要参考。但国内关于栒子属植物遗传多样性方面的研究报道较少,仅见朱燕蕾等^[12-13]对云南省 5 个州市的 9 个县的野生厚叶栒子 (*Cotoneaster coriaceus* Franch.) 和云南省 7 个州市的 15 个县的野生黄杨叶栒子 (*Cotoneaster buxifolius* Lindl.) 的遗传多样性进行了研究,目前尚未见到关于新疆西天山栒子属植物遗传多样性方面的研究报道,有关新疆西天山栒子属植物的遗传信息匮乏,不利于开展对其种质资源进行保护工作。鉴于此,本研究利用 ISSR 分子标记技术对新疆西天山 15 个野生居群 112 份栒子属植物进行遗传多样性研究,评价新疆西天山栒子属种质资源遗传多样性水平和遗传结构,以期能够为更好的保护及合理利用新疆西天山栒子属种质资源提供参考和理论依据。

1 材料与方法

1.1 栒子属植物分布区概况

特克斯县北山毛溜沟居群位于蒙古乡北山较为封闭狭长的山谷中,高山气候,年平均降水量 383 mm,人为干扰较少;特克斯县科桑森林公园居群位于南乔拉克铁热克乡科桑溢口,北温带大陆性气候,年平均降水量 402.6 mm,由于实行禁牧措施,人为干扰较少;特克斯县阔克苏温泉居群位于县城的南边,温带大陆性气候,年平均降水量 375-402.6 mm 之间,受景点的影响,人为干扰频繁;特克斯县太极岛居群位于县城以南 1.2 公里的特克斯河中心的公园,北温带大陆性气候,年平均降水量 382.8 mm,受太极岛风景区及太极岛酒店的影响,人为干扰频繁;巩留县乌图布拉克居群位于东买里乡乌图布拉克村较为封闭狭长的山谷中,高山气候,年平均降水量 250-300 mm 之间,人为干扰较少;巩留县大莫合居群位于巩留县东部山区,山地湿润气候,年平均降水量 378 mm,受大莫合景区影响,人为干扰频繁;巩留县库尔德宁居群位于巩留县东南部山区,温带大陆性气候,年平均降水量 700 mm,受库尔德宁风景区的影响,人为干扰频繁;巩留县野核桃沟居群位于伊什格力克山北坡巩留核桃林场南侧的山谷中,温带大陆性气候,年平均降水量 250~300 mm 之间,受野核桃沟景区的影响,人为干扰频繁;巩留县伊勒格代居群位于塔斯托别乡伊勒格代村,北温带大陆性半

干旱气候，年平均降水量 200~400 mm 之间，人为干扰较少；新源县野果林居群位于阿勒玛勒乡的野果林改良场，北温带大陆性半干旱气候，年平均降水量 400~600 mm 之间，受野果林风景区的影响，人为干扰频繁；新源县植物园居群位于阿勒玛勒镇野果林社区的伊犁植物园中，北温带大陆性半干旱气候，年平均降水量 476 mm 之间，受植物园的影响，人为干扰频繁；新源县吐尔根杏花沟居群位于新源县吐尔根乡的山谷中，温带大陆性气候，年平均降水量 550~700 mm 之间，人为干扰频繁；伊宁县阿吾赞森林公园居群位于卡拉亚杂奇乡北部山区，山区小气候，年平均降水量 340 mm，人为干扰较少；伊宁县皮里青沟居群位于潘津镇北山山沟里，大陆性温带气候，年平均降水量 150 mm 左右，人为干扰较少；霍城县大西沟居群位于霍城县的西北部，山地逆温带气候，年平均降水量 671 mm，受中华福寿山景区影响，人为干扰频繁。新疆西天山栒子属 15 个野生居群的地理位置如表 1 所示。

表 1 新疆西天山栒子属 15 个野生居群

Table 1 15 wild populations of *Cotoneaster* in West Tianshan Mountains of Xinjiang

编号 No.	居群 Population	采集地点 Collecting location	采样 个体数/个 Sample size	纬度 Latitude	经度 Longitude	海拔/m Altitude	坡度/° slope
P1	TKS-BSMLG	特克斯县北山毛溜沟	18	43°14'47"~N43°15'54"	81°57'10"~81°57'42"	1140~1420	17~39
P2	TKS-KSSLG	特克斯县科桑森林公园	2	42°54'14"~42°57'24"	81°45'59"~81°46'47"	1750~1940	42~45
P3	TKS-KKSWQ	特克斯县阔克苏温泉	1	42°55'20"	81°55'08"	1450	12
P4	TKS-TJD	特克斯县太极岛	8	43°11'45"~43°11'49"	81°51'05"~81°51'20"	1176~1215	0
P5	GL-WTBLK	巩留县乌图布拉克	8	43°20'25"~43°21'03"	82°17'48"~82°18'10"	1170~1360	15~35
P6	GL-DMH	巩留县大莫合	2	43°11'57"~43°13'05"	82°44'51"~82°47'25"	1310~1400	19~27
P7	GL-KEDN	巩留县库尔德宁	5	43°18'07"~43°18'59"	82°33'23"~82°36'30"	930~970	12~20
P8	GL-YHTG	巩留县野核桃沟	11	43°20'41"~43°21'01"	82°16'21"~82°16'40"	1211~1500	20~33
P9	GL-YLGD	巩留县伊勒格代	6	43°20'35"~43°21'15"	82°06'10"~82°06'34"	1285~1406	18~36
P10	XY-YGL	新源县野果林	2	43°14'21"~43°14'52"	82°50'46"~82°51'14"	1300~1550	39~46
P11	XY-ZWY	新源县植物园	1	43°26'55"	83°30'10"	1410	22
P12	XY-TEGXHG	新源县吐尔根杏花沟	4	43°22'40"~43°34'33"	83°28'44"~83°36'25"	1160~1360	16~46
P13	YN-AWZSLGY	伊宁县阿吾赞森林公园	24	44°07'43"~44°25'58"	80°47'03"~81°43'50"	1184~2300	12~35
P14	YN-PLQG	伊宁县皮里青沟	8	44°08'42"~44°09'25"	81°31'07"~81°31'33"	1122~1300	18~32
P15	HC-DXG	霍城县大西沟	12	44°25'42"~44°25'57"	80°47'10"~80°47'48"	1107~1350	17~36

1.2 试验材料

于 2022 年 6 月起对新疆西天山野果林栒子分布区栒子属植物进行样品采集，收集 15 个野生居群共 112 份材料用于 ISSR 分析。各野生居群内每个样株依据不同海拔、不同坡向和不同坡度选择，各样株相距不少于 50 m。采集各定点样株 50 - 80 片健康幼嫩叶片，立即放入装有变色硅胶的自封袋中干燥脱水，带回实验室后置于 -80 °C 超低温冰箱保存备用。其

中，供试的 112 份柃子属植物材料在野生状态下叶部形态、枝部形态、花部形态和果实形态均存在明显的差异，其各表型的最大值，最小值、变异系数及表型分化系数等参数如表 2 所示。

表 2 15 个野生居群 112 份柃子属植物表型多样性参数

Table 2 Phenotypic diversity parameters of 112 *Cotoneaster* species from 15 wild populations

表型性状	最小值	最大值	变异系数	表型分化系数
Phenotypic character	Minimum	Maximum	CV (%)	Fst%
叶长(mm)	9.14	83.27	27.57	71.88
Leaf length (mm)				
叶宽(mm)	3.48	82.96	34.47	82.67
Leaf width (mm)				
叶形指数	0.35	7.27	24.67	82.76
Leaf index				
叶柄长(mm)	0.97	16.77	47.00	86.40
Petiole length (mm)				
新梢长(cm)	1.96	97.00	53.27	97.78
Branch length (cm)				
新梢粗(mm)	0.32	6.67	33.49	83.82
Thick branch (mm)				
果实纵径(mm)	2.93	16.33	19.15	71.36
Fruit length (mm)				
果实横径(mm)	1.83	11.29	22.50	66.69
Fruit diameter (mm)				
果形指数	0.46	6.74	26.02	47.62
Fruit index				
果柄长(mm)	0.96	25.40	40.38	60.56
Stalk length (mm)				
单果重(g)	0.10	0.40	25.00	66.67
Fruit weight (g)				
花瓣长(mm)	2.01	9.50	18.75	47.14
Petal length (mm)				
花瓣宽(mm)	1.26	7.52	21.73	76.94
Petal width (mm)				
花梗长(mm)	2.08	18.32	38.56	83.60
Pedicel length (mm)				
花数目(个)	2.00	24.00	39.93	50.56
Number of flowers (个)				
花柱高(mm)	1.02	4.04	23.74	85.58
Style height (mm)				
萼片长(mm)	1.08	5.69	25.00	63.67
Sepal length (mm)				
萼片宽(mm)	1.06	4.60	22.80	81.98

Sepal width (mm)				
花序轴长(mm)	1.02	4.14	33.22	53.40
Inflorescence axis length (mm)				
花丝长(mm)	1.03	4.46	24.51	84.02
length of silk (mm)				

1.3 研究方法

1.3.1 叶片基因组 DNA 提取与检测 采用天根生化科技（北京）有限公司的 DNAsecure 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取叶片基因组 DNA, 用 1.0 % 琼脂糖凝胶电泳法检验浓度, 在凝胶成像系统下观察、拍照, 条带越清晰说明浓度越高。提取的 DNA 样品稀释至 20 ng·μL⁻¹, 放于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.3.2 引物筛选及最佳退火温度筛选 试验所用引物为加拿大哥伦比亚大学（UBC, The University of British Columbia）发布的 ISSR 通用引物, 参照前人^[12-13]基于 ISSR 分子标记在栲子属植物上的相关研究, 挑选出适用于栲子属植物扩增的 20 条 ISSR 引物, 交由生工生物工程（上海）股份有限公司合成。并对筛选出的 20 条引物进行再次筛选, 使用梯度 PCR 仪, 根据各引物理论退火温度设置不同退火温度梯度进行最佳退火温度的确定, 最后选用 15 条引物进行 ISSR-PCR 扩增（见表 3）。

表 3 15 条 ISSR 引物及其序列信息

Table 3 15 ISSR primers and their sequence information

编号 Numbering	引物 Primer	引物序列 Primer sequence (5'-3')	碱基数 Base pairs	理论退火温度 T _m /°C
1	UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	18	48.4
2	UBC873	GAC AGA CAG ACA GACA	16	46.9
3	UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	17	45.1
4	UBC852	TCT CTC TCT CTC TCT CRA	18	48.6
5	UBC815	CTC TCT CTC TCT CTC TG	17	46.7
6	UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	17	44.9
7	UBC848	CAC ACA CAC ACA CAC ARG	18	52.7
8	UBC854	TCT CTC TCT CTC TCT CRG	18	50.0
9	UBC846	CAC ACA CAC ACA CAC ART	18	51.4
10	UBC825	ACA CAC ACA CAC ACA CT	17	50.8
11	UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	18	52.3
12	UBC850	GTG TGT GTG TGT GTG TYC	18	52.7
13	UBC818	CAC ACA CAC ACA CAC AG	17	51.0
14	UBC827	ACA CAC ACA CAC ACA CG	17	52.9
15	UBC853	TCT CTC TCT CTC TCT CRT	18	48.6

1.3.3 ISSR-PCR 扩增及产物检测 运用已筛选出的 15 条条带清晰、多态性好、反应较稳定、重复性好的引物, 对参试样品进行 ISSR-PCR 扩增。其中, PCR 反应体系 (25μL) 为: 10

×Taq PCR Mix、2 μ L DNA 模板、1 μ L ISSR 引物（10 μ mol/L），ddH₂O 补足 25 μ L。反应条件为：94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min，94 $^{\circ}$ C 变性 30 s，不同 T_m 值下退火 45 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min，34 个循环，最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min，4 $^{\circ}$ C 结束反应保存。扩增后的产物于 2% 的琼脂糖凝胶、1×TAE 缓冲液中进行电泳分离，将 DL2000 Plus Marker 作为分子量标准，在 160 V 电压下电泳 1 h，泡染法进行显色。结束后在紫外凝胶成像系统中观察并拍照保存。

1.4 数据分析

根据 ISSR-PCR 电泳结果进行人工读带，采取“0”“1”赋值记录条带结果，有条带记为“1”，无条带记为“0”，将数据录入 Excel 建立 0、1 数据矩阵。用 Popgene 32 软件完成对 ISSR 扩增引物的多态性条带数，多态性位点比例（PPL）、等位基因数（ N_a ）、有效等位基因数（ N_e ）、香农信息指数（ I ）、Nei's 基因多样性指数（ H ）、基因流（ Nm ）、遗传分化系数（ F_{st} ）、总遗传多样性指数（ H_t ）、居群内遗传多样性指数（ H_s ）、居群间遗传多样性指数（ D_{st} ）、遗传一致度和遗传距离等。同时，使用 NTsys.10e 软件分析原始数据，以非加权配对算术平均法（UPGMA）进行柃子属植物不同个体间遗传相似系数的计算、与 15 个柃子属植物野生居群的聚类分析并构建聚类图。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取与检测

1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测结果显示，112 个样本 DNA 的电泳带为一条清晰明亮的条带，无明显拖尾现象，可以用于后续试验。

2.2 ISSR 引物筛选及扩增结果

本研究使用 15 对有扩增条带的 ISSR 引物对 112 份柃子属种质进行扩增。结果表明：15 对 ISSR 引物共扩增出 166 个清晰条带，平均每条引物扩增 11 个条带，扩增产物主要介于 100~2800 bp。其中，UBC846 和 UBC818 引物扩增出数量最多的多态性条带，为 14 条（见图 1）。引物 UBC827 扩增出数量最少的多态性条带，为 8 条。多态性条带为 143 个，平均每条引物扩增具有多态性条带 10 个，平均多态性条带比例为 86.29%，引物扩增结果（见表 4）。



白色数字 1~112 为 112 份枸杞子属种质资源 ; M stands for DL2000 Plus Marker

White numbers 1-112 were 112 *Cotoneaster* germplasm resources

图 1 引物 UBC846 的 PCR 扩增电泳

Fig.1 Electrophoretogram of PCR amplification of primer UBC846

表 4 15 条 ISSR 引物的扩增结果

Table 4 The amplification results of 15 ISSR primers

引物 Primers	序列 Sequence (5'-3')	最佳退火温度 Optimum T _m /°C	扩增条带数 (个) Number of amplified bands	多态性条带数 (个) Number of polymorphic bands	多态性条带比例 (%) Polymorphic bands	位点条带长度范围 Band range of loci(bp)
UBC836	(AG) ₈ YA	54.0	10	10	100.00	200-1800
UBC873	(GACA) ₄	52.0	11	9	81.82	250-2000
UBC812	(GA) ₈ A	55.0	11	10	90.91	200-2000
UBC852	(TC) ₈ RA	50.0	9	9	100.00	500-2500
UBC815	(CT) ₈ G	46.0	12	11	91.67	100-1900
UBC810	(GA) ₈ T	54.0	13	12	92.31	200-1200
UBC848	(CA) ₈ RG	52.0	9	7	77.78	350-1800
UBC854	(TC) ₈ RG	50.0	12	10	83.33	350-2800
UBC846	(CA) ₈ RT	51.4	14	12	85.71	300-2000
UBC825	(AC) ₈ T	52.0	11	7	63.64	350-1600
UBC856	(AC) ₈ YA	55.5	11	11	100.00	350-1400
UBC850	(GT) ₈ YC	52.0	12	10	83.33	350-1800
UBC818	(CA) ₈ G	50.5	14	11	78.57	200-1600
UBC827	(AC) ₈ G	52.0	8	7	87.50	500-1200
UBC853	(TC) ₈ RT	51.0	9	7	77.78	350-2500
平均 Mean	-	-	11	10	86.29	-
小计 Subtotal	-	-	166	143	-	-

2.3 不同居群遗传多样性分析

基于 Popgene 32 软件计算各居群的等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei's 基因多样性指数 (H)、香农信息指数 (I) 等遗传多样性参数 (见表 5)。15 个居群的等位基因数 (N_a) 在 1.000-1.6207 之间; 有效等位基因数 (N_e) 在 1.0000-1.4312 之间; Nei's 基因多样性指数 (H) 在 0.000-0.2480 之间; 香农信息指数 (I) 在 0.000-0.3638 之间, 且表中各遗传多样性参数与多态性位点比例成正比关系, 多态性位点比例高的居群其各项遗传多样性参数都偏高。枸杞属植物的 N_a 为 1.7241、 N_e 为 1.3601、 H 为 0.2124、 I 为 0.3254, 说明新疆西天山枸杞属植物在整体水平上的遗传差异明显, 遗传多样性较高。在居群水平上, 特克斯县北山毛溜沟、巩留县乌图布拉克、巩留县野核桃沟、伊宁县阿吾赞森林公园、霍城县大西沟等居群的多态性位点比例 (PPL>40%) 较高, 从高到低依次为: 62.07%、48.28%、48.28%、48.28%、44.83%, 与其相应的 N_a 、 N_e 、 H 、 I 都较高 (图 2、图 3、图 4); 而特克斯阔克苏温泉、巩留县大莫合、新源植物园等居群在各项遗传多样性参数上则相对较低, 这结果可能与该居群样本数量较少、其物种多样性较低有关。总体来说, 15 个野生居群中特克斯县北山毛溜沟居群的遗传多样性最为丰富, 其 N_a 、 N_e 、 H 、 I 值分别为 1.6207、1.4312、0.2480、0.3638。

表 5 不同居群枸杞属植物遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of different populations of *Cotoneaster*

居群 Populations	样本 数量 Sample size (个)	多态性位点比例 Proportion of polymorphism loci (%)	等位基因数 Number of alleles (N_a)	有效等位基因数 Effective number of alleles (N_e)	Nei's 基因 多样性指数 Nei's genetic Diversity (H)	香农信息指数 Shannon's information index (I)
特克斯县北山毛溜沟 TKS-BSMLG	18	62.07	1.6207	1.4312	0.2480	0.3638
特克斯县科桑森林公园 TKS-KSSLY	2	17.24	1.1724	1.1219	0.0714	0.1043
特克斯县阔克苏温泉 TKS-KKSWQ	1	0.00	1.000	1.0000	0.000	0.000
特克斯县太极岛 TKS-TJD	8	37.93	1.3793	1.3013	0.1642	0.2358
巩留县乌图布拉克 GL-WTBLK	8	48.28	1.4828	1.3539	0.1989	0.2891
巩留县大莫合 GL-DMH	2	0.00	1.000	1.000	0.000	0.0000
巩留县库尔德宁 GL-KEDN	5	34.48	1.3448	1.2546	0.1419	0.2060
巩留县野核桃沟	11	44.83	1.4483	1.3037	0.1764	0.2594

GL-YHTG						
巩留县伊勒格代	6	31.03	1.3103	1.2162	0.1231	0.1802
GL-YLGD						
新源县野果林	2	13.79	1.1379	1.0975	0.0571	0.0834
XY-YGL						
新源县植物园	1	0.00	1.000	1.000	0.000	0.000
XY-ZWY						
新源县吐尔根杏花沟	4	24.14	1.2414	1.0970	0.0653	0.1054
XY-TEGXHG						
伊宁县阿吾赞森林公园	24	48.28	1.4828	1.2799	0.1576	0.2342
YN-AWZSLGY						
伊宁县皮里青沟	8	31.03	1.3103	1.1863	0.1091	0.1630
YN-PLQG						
霍城县大西沟	12	48.28	1.4828	1.2934	0.1746	0.2604
HC-DXG						
平均	7	29.43	1.2049	1.1958	0.1956	0.1657
Mean						
物种	112	72.41	1.7241	1.3601	0.2124	0.3254
Species						



图 2 特克斯县北山毛溜沟居群

Fig.2 Populations of Maoliugou in Beishan Mountain, Tekes County



图 3 特克斯县科桑森林公园居群

Fig.3 Populations of Kesang Forest Park, Tekes County



图 4 巩留县野核桃沟居群

Fig.4 Populations of Wild Walnut Gully, Gongliu County

2.4 不同居群遗传分化

利用 Popgene 32 软件进行 Nei's 居群遗传多样性的分析结果显示,新疆西天山柃子属植物野生居群的遗传分化系数 (F_{st}) 为 $0.4259 > 0.25$, 基因流 (N_m) 为 $0.6740 < 1$, 总遗传多样性指数 (H_t)、居群内遗传多样性指数 (H_s) 和居群间遗传多样性指数 (D_{st}) 分别为 0.1960、0.1125 和 0.0835 (见表 6)。根据 Wright^[14]的遗传分化系数指标: 当 $F_{st} > 0.25$ 时, 说明群体的遗传分化极大; 当 $0.15 < F_{st} > 0.25$ 时, 说明群体遗传分化较大, 当 $0.05 < F_{st} < 0.15$ 时, 说明群体遗传分化中等, 而当 $F_{st} < 0.05$ 时说明群体分化较弱; $N_m > 1$ 表示居群间的基因交流较为频繁, $N_m < 1$ 则表示居群间的基因交流较小。由此可知, 新疆西天山柃子属植物野生居群的遗传分化程度极大且各居群间存在一定的基因交流。

表 6 柃子属不同居群 ISSR 遗传分化结果

Table 6 ISSR genetic differentiation results of different populations of *Cotoneaster*

物种 Species	总遗传多样性指数 (H_t)	居群内遗传多样性指数 (H_s)	居群间遗传多样性指数 (D_{st})	遗传分化系数 (F_{st})	基因流 (N_m)
柃子 <i>Cotoneaster</i>	0.1960	0.1125	0.0835	0.4259	0.6740

2.5 不同居群 ISSR 聚类分析

根据 15 对引物对新疆西天山 15 个柃子属野生居群的 ISSR 分析结果, 利用 NTsys.10e 软件进行聚类分析并绘制聚类图 (见图 5)。结果显示, 遗传相似系数为 0.954 时, 可将新疆西天山 15 个居群分为四大类群 (I、II、III、IV): 第 I 类群为新源县野果林居群和新源植物园居群; 巩留县大莫合居群为单独的第 II 类群; 第 III 类群为特克斯县阔克苏温泉居群和霍城县大西沟居群; 第 IV 类群分为两个亚群, 第一类亚群包括特克斯县的北山毛溜沟、科桑森林公园、太极岛等居群, 巩留县的伊勒格代、乌图布拉克等居群, 伊宁县的阿吾赞森林公园、皮里青沟等居群和新源县吐尔根杏花沟居群。第二类亚群为巩留县的野核桃沟居群和

库尔德宁居群。由聚类结果可知，绝大部分居群能够按照地理位置相近而聚为一类，但也有部分地理位置相近的居群并没有聚在一起。

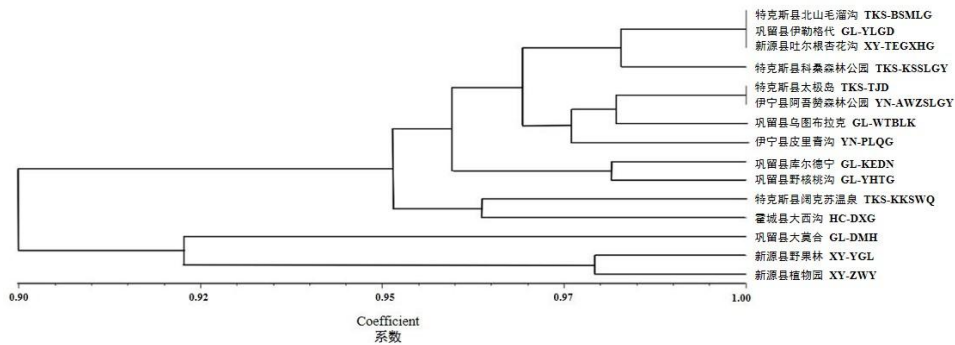


图 5 新疆西天山柃子属 15 个居群 ISSR 聚类图

Fig.5 ISSR clustering map of 15 populations of *Cotoneaster* in Western Tianshan Mountains of Xinjiang

2.6 不同居群的遗传结构与遗传关系

本研究通过利用 Popgene 32 软件对不同居群之间的遗传距离和遗传一致度进行计算发现，不同居群之间的遗传距离变化范围在 0.0183-0.2609 之间，遗传一致度变化范围在 0.7703-0.9818 之间，表明居群间亲缘关系较近，居群间遗传分化较低（见表 7）。其中遗传一致度最大值表现在新源野果林居群和伊宁皮里青沟居群之间（0.9818），两居群间的遗传距离最小（0.0183），遗传一致度最小表现在特克斯阔克苏温泉居群和霍城大西沟居群之间（0.7703），两个居群间的遗传距离最大（0.2609）。

表 7 柃子属居群间遗传一致度（对角线上）与遗传距离（对角线下）

Table 7 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) of *Cotoneaster* populations

编号 No.	P1	P2	P3	P4	P5	P6	P7	P8	P9	P10	P11	P12	P13	P14	P15
P1	****	0.8895	0.8074	0.9276	0.9444	0.9126	0.9687	0.9434	0.9189	0.9359	0.8548	0.8974	0.9444	0.9512	0.9514
P2	0.1171	****	0.9051	0.8998	0.8469	0.8632	0.8823	0.8627	0.8649	0.9016	0.8335	0.8909	0.8507	0.8994	0.8772
P3	0.2139	0.0997	****	0.8468	0.7733	0.7931	0.7851	0.7884	0.8119	0.8021	0.7931	0.7955	0.7762	0.8264	0.7703
P4	0.0752	0.1056	0.1663	****	0.9439	0.8790	0.8897	0.9353	0.9168	0.9119	0.9167	0.9525	0.9079	0.8999	0.8991
P5	0.0572	0.1661	0.2570	0.0577	****	0.8984	0.9006	0.9464	0.9229	0.8953	0.9147	0.9272	0.9361	0.8995	0.9047
P6	0.0915	0.1472	0.2318	0.1290	0.1072	****	0.9153	0.9002	0.9266	0.9233	0.8621	0.8904	0.9010	0.9250	0.8984
P7	0.0318	0.1252	0.2419	0.1169	0.1047	0.0885	****	0.9242	0.9131	0.9395	0.8184	0.8759	0.9401	0.9608	0.9598
P8	0.0582	0.1477	0.2377	0.0669	0.0551	0.1051	0.0789	****	0.9568	0.9426	0.9258	0.9434	0.9669	0.9460	0.9633
P9	0.0846	0.1452	0.2084	0.0868	0.0803	0.0762	0.0909	0.0442	****	0.9134	0.9386	0.9530	0.9375	0.9286	0.9430
P10	0.0663	0.1036	0.2206	0.0923	0.1106	0.0798	0.0624	0.0592	0.0906	****	0.8939	0.9306	0.9562	0.9819	0.9656
P11	0.1569	0.1821	0.2318	0.0870	0.0892	0.1484	0.2004	0.0771	0.0633	0.1122	****	0.9617	0.9078	0.8886	0.8944
P12	0.1082	0.1155	0.2288	0.0487	0.0756	0.1161	0.1325	0.0583	0.0481	0.0719	0.0391	****	0.9113	0.9022	0.9281

P13	0.0572	0.1617	0.2533	0.0966	0.0660	0.1043	0.0618	0.0336	0.0645	0.0448	0.0967	0.0928	****	0.9753	0.9662
P14	0.0501	0.1060	0.1907	0.1055	0.1059	0.0780	0.0399	0.0555	0.0740	0.0183	0.1181	0.1029	0.0250	****	0.9687
P15	0.0498	0.1310	0.2609	0.1064	0.1001	0.1071	0.0411	0.0374	0.0587	0.0350	0.1116	0.0746	0.0344	0.0318	****

注：P1：特克斯县北山毛溜沟；P2：特克斯县科桑森林公园；P3：特克斯县阔克苏温泉；P4：特克斯县太极岛；P5：巩留县乌图布拉克；P6：巩留县大莫合；P7：巩留县库尔德宁；P8：巩留县野核桃沟；P9：巩留县伊勒格代；P10：新源县野果林；P11：新源县植物园；P12：新源县吐尔根杏花沟；P13：伊宁县阿吾赞森林公园；P14：伊宁县皮里青沟；P15：霍城县大西沟；

Note:P1: Beishan Maoliu Gully, Tekes County; P2: Kesang Forest Park, Tekes County; P3: Kuokesu Hot Springs, Tekes County; P4: Taichi Island, Tekes County; P5: Wutubulake, Gongliu County; P6: Damohe, Gongliu County ; P7: Kuerduning, Gongliu County; P8: Wild Walnut Gully, Gongliu County ; P9: Ilegde, Gongliu County; P10: Wild fruit forest, Xinyuan County ; P11: Botanical Garden, Xinyuan County; P12: Turgen Apricot Orchard, Xinyuan County; P13: Awuzan Forest Park, Yining County; P14: Piliqing Gully, Yining County; P15: Daxigou, Huocheng County;

3 讨论

3.1 新疆西天山不同居群枸杞属植物遗传多样性分析

本研究中，新疆西天山 15 个野生居群 112 份枸杞属植物的 Nei's 基因多样性指数 (H) 和香农信息指数 (I) 分别为 0.2124、0.3254，与同科同属的厚叶枸杞 (0.4141、0.5979)^[12] 和黄杨叶枸杞 (0.3520、0.5059)^[13] 的多样性指标相对较低，认为新疆西天山枸杞属植物遗传多样性并不丰富，这可能与枸杞属植物的繁殖方式有关。前期对新疆西天山枸杞属植物分布区进行实地踏查时发现，在其分布区内枸杞属植物绝大多数均以根蘖繁殖的方式进行繁殖，很难发现通过传粉结实形成的实生幼苗。并且，发现在新疆西天山枸杞属植物分布区存在大量成龄株有被乱砍乱伐、牲畜啃食的现象，这样将会导致居群内大量基因流失，进而影响新疆西天山枸杞属种质资源的遗传多样性丰富程度。另外，在对新疆西天山枸杞属植物 15 个野生居群的遗传多样性比较中发现，特克斯县北山毛溜沟居群的遗传多样性最为丰富。因此，今后在新疆西天山枸杞属种质资源的保护与开发利用可以优先选择特克斯北山毛溜沟居群。

3.2 新疆西天山不同居群枸杞属植物遗传结构分析

遗传结构是指遗传变异在居群内部及居群间的分布，其受基因流、种子及花粉传播方式、繁育系统、地理或生态障碍以及自然选择等因子的共同作用^[15,16]。遗传分化系数 (F_{st}) 和基因流 (Nm) 是评价居群遗传结构的重要指标^[17]。本研究中，新疆西天山枸杞属植物 15 个野生居群的遗传分化系数 (F_{st}) 为 0.4259 > 0.25，说明枸杞属植物野生居群水平的遗传分化程度极大。黄玮等^[18]、王效宁等^[19]在分别研究北京东灵山地区不同海拔柴胡居群

(*Bupleurum chinense* DC.) 和海南普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 天然居群的遗传多

样性时也发现,柴胡(0.349)和野生稻(0.4640)的遗传分化系数(F_{st})均大于0.25,说明居群遗传分化极大。这与本研究结果一致。西天山柃木属植物各野生居群间的基因流(Nm)为(0.6740)小于1,说明新疆西天山柃木属各野生居群之间缺乏适当的基因交流,其原因是因为新疆西天山柃木属15个野生居群处于不同的地理位置,在基因流传授时受各野生居群之间地形、山川及河流等的影响,阻断了各野生居群之间的基因交流。

4 结论

本研究通过ISSR分子标记技术对新疆西天山15个野生居群112份柃木属植物的遗传多样性进行研究,发现新疆西天山柃木属植物遗传多样性并不丰富,其中特克斯县北山毛溜沟居群遗传多样性最高,建议今后在新疆西天山柃木属种质资源的保护与开发利用可以优先选择特克斯北山毛溜沟居群。新疆西天山柃木属植物野生居群的遗传分化系数(F_{st})为0.4259>0.25,基因流(Nm)为0.6740<1,说明柃木属野生居群的遗传分化程度极大且各居群间存在一定的基因交流。聚类结果显示,绝大部分居群能够按照地理位置相近而聚为一类,但也有部分地理位置相近的居群并没有聚在一起。该研究结果可为新疆西天山柃木属种质资源合理开发及保护利用提供科学参考依据。

参考文献

- [1] 吴征镒. 云南植物志. 北京: 科学出版社, 2006
Wu Z Y. Flora Yunnanica. Beijing: Science press, 2006
- [2] 周丽华, 吴征镒. 大果柃木的分类修订. 云南植物研究, 1999, 21 (02): 32-38
Zhou L H, Wu Z Y. Taxonomic Revision on *Cotoneaster conspicuus* (Rosaceae). Acta Botanica Yunnanica, 1999, 21 (02): 32-38
- [3] 杨昌友. 新疆树木志. 北京: 中国林业出版社, 2012
Yang C Y. Sylva Xinjiangensis. Beijing: China Forestry Publishing House, 2012
- [4] 杨姝琦, 杨彦伶, 彭婵, 张新叶, 李振芳. 基于SSR标记的紫薇分子鉴定及遗传分析. 安徽农业大学学报, 2024, 51(03): 397-403
Yang S Q, Yang Y L, Peng C, Zhang X Y, Li Z F. Molecular identification and genetic analysis of *Lagerstroemia indica* based on SSR markers. Journal of Anhui Agricultural University, 2024, 51(03): 397-403
- [5] Ayala F.J, Valentine J W. Evolving:the theory and progress of organic evolution. MenloPark: Benjamin-Cummings, 1991
- [6] 赵霖熙, 崔林开, 韩赞平. 玉米大斑病菌遗传多样性的分子标记研究进展. 河北农业科学, 2023, 27(03): 75-79
Zhan L X, Cui L K, Han Z P. Research Progress on Molecular Markers for Genetic Diversity of *Exserohilum turcica*. Journal of Hebei Agricultural Sciences, 2023, 27(03): 75-79
- [7] 刘欢, 廖康, 刘娟, 赵世荣, 孙琪, 曹倩. 新疆野生山植资源遗传多样性及亲缘关系的ISSR分析. 经济林研究, 2016, 34(02): 19-23

- Liu H, Liao K, Liu J, Zhao S R, Sun Q, Cao Q. Analysis of genetic diversity and genetic relationship of wild *hawthorn* resources in Xinjiang by ISSR markers. *Non-wood Forest Research*, 2016, 34(02):19-23
- [8] 马丽娟, 郭太君, 何丹丹, 李锋, 张艳波. 中国东北部野生杏资源 ISSR 遗传多样性. *东北林业大学学报*, 2013, 41(12): 13-16+20
- Ma L J, Guo T J, He D D, Li F, Zhang Y B. ISSR Genetic Diversity Analysis of *Armeniaca* spp. Resources in Northeastern China. *Journal of Northeast Forestry University*, 2013, 41(12): 13-16+20
- [9] 李春侨, 周龙, 陆彪, 刘春燕, 董凯向. 天山樱桃野生居群遗传多样性 ISSR 分析. *分子植物育种*, 2017, 15(06): 2420-2426
- Li C Q, Zhou L, Lu B, Liu C Y, Dong K X. Analysis of Genetic Diversity of Wild Populations of *Cerasus Tianschanica* Pojark Revealed by ISSR Molecular Markers. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(06): 2420-2426
- [10] 在建永. 新疆野生欧洲李遗传多样性研究. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2020
- Jing J Y. Study on Genetic Diversity of Wild *European Plum* in Xinjiang. Urumq: Xinjiang Agricultural University, 2020
- [11] 吕志江, 李疆, 吾买尔夏提·塔汉, 曾斌, 罗淑萍. 新疆野扁桃种质资源遗传多样性的 ISSR 分析. *果树学报*, 2010, 27(06): 918-923
- Lu Z J, Li J, Wumaierxiati · Tahan, Zeng B, Luo S P. ISSR analysis for genetic diversity of *Amygdalus ledebouriana* germplasm from Xinjiang, China. *Journal of Fruit Science*, 2010, 27(06): 918-923
- [12] 朱燕蕾, 郭凤根. 基于表型性状和 ISSR 标记的厚叶栒子遗传多样性分析. *云南农业大学学报: 自然科学版*, 2020, 35 (04): 693-699
- Zhu Y L, Guo F G. Genetic Diversity Analysis of *Cotoneaster coriaceous* Based on Phenotypic Traits and ISSR Marker. *Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Sciences Edition*, 2020, 35 (04): 693-699
- [13] 朱燕蕾, 郭凤根. 基于表型和 ISSR 标记滇产黄杨叶栒遗传多样性分析. *林业科学研究*, 2020, 33(02): 19-26
- Zhu Y L, Guo F G. Genetic Diversity Analysis of *Cotoneaster buxifolius* Based on Phenotypic Traits and ISSR Marker. *Forest Research*, 2020, 33(02): 19-26
- [14] Wright S. The genetic structure of populations. *Annals of Eugenics*, 1951, 15: 323-354
- [15] 段义忠, 白春梅, 段春燕, 申烨华. 基于叶绿体 DNA 非编码序列的蒙古扁桃谱系地理学研究. *西北植物学报*, 2018, 38(09): 1625-1633
- Duan Y Z, Bai C M, Duan C Y, Shen Y H. Molecular Phylogeography of *Amygdalus mongolica* (Rosaceae) Based on Chloroplast DNA Non-coding Sequences. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2018, 38(09): 1625-1633
- [16] 边境, 王晓楠, 曹焜, 赵越, 王云云, 张晓艳, 孙宇峰. 大麻 EST-SSR 遗传结构分析及指纹图谱构建. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(06): 1794-1808
- Bian J, Wang X N, Can K, Zhan Y, Wang Y Y, Zhang X Y, Sun Y F. Genetic Structure Analysis and Fingerprint Construction of *Hemp* by EST-SSR Analysis. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(06): 1794-1808
- [17] 李春侨, 周龙, 陆彪, 董凯向, 刘春燕. 天山樱桃野生居群遗传多样性 SSR 分析. *经济林研究*, 2017, 35(03): 44-49
- Li C Q, Zhou L, Lu B, Dong K X, Liu C Y. Analysis of genetic diversity of wild *Cerasus tianschanica* populations bu SSR molecular markers. *Non-wood Forest Research*, 2017, 35(03): 44-49
- [18] 黄玮, 孙平, 张文生, 孟繁蕴, 王永炎, 冯成强. 北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(04): 453-457
- Huang W, Sun P, Zhang W S, Meng F Y, Wang Y Y, Feng C Q. Genetic Diversity of *Bupleurum chinense* DC. Populations from Different Altitudes in Dongling Mountain District in Beijing. *Journal of Plant Genetic Resources.*, 2008, 9(04): 453-457
- [19] 王效宁, 韩东飞, 云勇, 孟卫东, 严小微, 杨庆文. 利用 SSR 标记分析海南普通野生稻的遗传多样性. *植物遗传资源学报*,

2007, (02): 184-188

Wang X N, Han D F, Yun Y, Meng W D, Yan X W, Yang Q W. Genetic Diversity of *Oryza rufipogon* Griff. in Hainan Province with SSR Markers. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, (02): 184-188