

## 9 种引进栎属植物遗传多样性及亲缘关系的 ISSR 分析

余敏芬<sup>1,2,3</sup>, 梅家琪<sup>1,2</sup>, 何立平<sup>3</sup>, 李东宾<sup>3</sup>, 徐栋斌<sup>1,2</sup>, 杨影<sup>1,2</sup>, 袁虎威<sup>1,2</sup>,  
闫道良<sup>1,2</sup>, 郑炳松<sup>1,2</sup>

(1. 浙江农林大学 省部共建亚热带森林培育国家重点实验室, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 浙江省森林芳香植物康养功能  
研究重点实验室, 浙江 杭州 311300; 3. 宁波市林场, 浙江 宁波 315440)

**摘要:** 为有效利用栎属 *Quercus* 植物, 以 ‘针栎’ *Q. palustris* ‘Pin Oak’、‘猩红橡木’ *Q. coocinea* ‘Scarlet Oak’、‘太平洋光辉’ *Q. palustris* ‘Pacific Brilliance’、‘沼泽白橡木’ *Q. icolor* ‘Swamp White Oak’、‘北方红橡’ *Q. rubra* ‘Red Oak’、‘绿柱’ *Q. palustris* ‘Green pillar’、柳叶栎 *Q. phellos* 和 2 种娜塔栎 *Q. nuttallii* 种质 (红叶娜塔栎和绿叶娜塔栎) 9 种国外引进的栎属植物为研究对象, 利用 ISSR 分子标记对其遗传多样性和亲缘关系进行分析和 UPGMA 聚类。结果表明, 在所选 26 条引物中筛选出 23 条多态性 ISSR 引物; 利用多态性 ISSR 引物对 9 种栎属植物进行 PCR 扩增, 共获得 298 条多态性条带, 其多态性条带比例达 93.42%, 表明这 9 种栎属植物的遗传多样性较为丰富; 9 种栎属植物之间的遗传相似系数为 0.485 9 ~ 0.764 9。UPGMA 聚类结果表明, 9 种栎属植物之间具有不同程度的相对亲缘关系, 在遗传相似系数 0.650 处, 9 种栎属植物可聚为 3 类, 其中 3 个沼生栎品种 (‘绿柱’ ‘太平洋光辉’ 和 ‘针栎’) 和 2 种娜塔栎种质 (红叶娜塔栎和绿叶娜塔栎) 被归为第一类, 柳叶栎、‘猩红橡木’ 以及 ‘北方红橡’ 被归为第二类, 而 ‘沼泽白橡木’ 单独归为第三类, 在第一类中, ‘绿柱’ 和 ‘太平洋光辉’ 的亲缘关系最近, 与其属于同一个种的分类特征一致, ‘沼泽白橡木’ 与其他 8 个种 (品种) 间的相对亲缘关系最远。以上研究结果可为栎属植物的培育和开发利用提供参考。

**关键词:** 栎属; ISSR 分子标记; 遗传多样性; 亲缘关系分析

**中图分类号:** S792.18      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1001-3776 (2022) 05-0009-07

## Genetic Diversities and Relationships of 9 Introduced Species/Cultivars of *Quercus* by ISSR Molecular Markers

YU Min-fen<sup>1,2,3</sup>, MEI Jia-qi<sup>1,2</sup>, HE Li-ping<sup>3</sup>, LI Dong-bin<sup>3</sup>, XU Dong-bin<sup>1,2</sup>, YANG Ying<sup>1,2</sup>, YUAN Hu-wei<sup>1,2</sup>, YAN Dao-liang<sup>1,2</sup>, ZHENG Bing-song<sup>1,2</sup>

(1. State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Hangzhou 311300, China; 2. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Forest Aromatic Plants-based Healthcare Functions, Hangzhou 311300, China; 3. Ningbo Forest Farm of Zhejiang, Ningbo 315440, China)

**Abstract:** In October 2017, *Quercus palustris* ‘Pin Oak’, *Q. coocinea* ‘Scarlet Oak’, *Q. palustris* ‘Pacific Brilliance’, *Q. icolor* ‘Swamp White Oak’, *Q. rubra* ‘Red Oak’, *Q. palustris* ‘Green Pillar’ were introduced from Haining, Zhejiang province, and in November 2017, 5-year seedlings of *Q. phellos* and two *Q. nuttallii* germplasms (red leaves and green leaves) were introduced from Changsha, Hunan province, Ningbo, Zhejiang province. In May 2018, leaves of above introduced plants were collected for genomic DNA extract. Genetic diversities, genetic relationships were analyzed by UPGMA dendrogram and ISSR molecular markers. The results showed that 23 polymorphic primers were selected from 26 ones for ISSR, and 298 polymorphic bands accounting for 93.42% of the total bands were obtained by PCR amplification. The genetic similarity coefficients of species and

**收稿日期:** 2022-06-04; **修回日期:** 2022-08-12

**基金项目:** 宁波市科学技术局市级科技计划项目 (CX-D01-科技富民项目 2017C10014)

**作者简介:** 余敏芬, 工程师, 从事林木良种培育及森林资源保护工作; E-mail: 491856944@qq.com。通信作者: 郑炳松, 教授, 从事林木培育与利用研究; E-mail: bszheng@zafu.edu.cn。

cultivars of *Quercus* varied from 0.485 9 to 0.764 9. UPGMA dendrogram showed that there were different genetic relations among tested species and cultivars. They could be divided into 3 groups at the genetic similarity coefficient of 0.650, among which *Q. palustris* 'Green pillar', *Q. palustris* 'Pacific Brilliance' and *Q. palustris* 'Pin Oak' and two *Q. nuttallii* germplasm were in Group I, *Q. phellos*, *Q. coocinea* 'Scarlet Oak' and *Q. rubra* 'Red Oak' were in group II, while *Q. icolor* 'Swamp White Oak' in group III. The relationship between *Q. palustris* 'Green pillar' and *Q. palustris* 'Pacific Brilliance' was the closest, because of the same species, while the relationships between *Q. icolor* 'Swamp White Oak' and the other 8 species/cultivars were the farthest.

**Key words:** *Quercus*; ISSR molecular markers; genetic diversity; phylogenetic analysis

栎属 *Quercus* 是壳斗科 Fagaceae 中分布最广、种类最多的属, 主要分布在亚洲、非洲、欧洲以及美洲地区<sup>[1]</sup>。如我国的栓皮栎 *Q. variabilis*, 从辽宁省南部到云南省中部皆有分布, 并且分布的海拔上限从北到南不断增加<sup>[2]</sup>, 横跨亚热带、热带<sup>[3]</sup>。与其它树种相比, 栎属植物应用颇多。栎属植物的木材坚硬。赵泾峰等<sup>[4]</sup>发现陕西 4 种栎属植物的木材皆可用作实木地板和建筑材料。栎属 *Quercus* 树种又称橡树, 其种子被称作橡子。橡子可以食用, 营养丰富。魏练平等<sup>[5]</sup>测定了安徽黄山出产的橡子粉, 其淀粉含量高达 83.24%。橡子亦可用于酿酒。据报道, 将橡子粉和糯米以一定的比例混合发酵, 可以产生大量酒精, 成品酒中富含糖分、有机酸, 还含有氨基酸、矿物质和维生素等<sup>[6]</sup>。由此可见, 栎属植物具有巨大的开发利用价值。

鉴定不同栎属植物的遗传多样性和亲缘关系是对其进行有效利用的基础和前提。分子标记是分析物种遗传多样性和亲缘关系的有力工具。在众多分子标记中, 简单序列重复间扩增 (inter-simple sequence repeat, ISSR) 标记是目前最有效的分子标记之一<sup>[7]</sup>, 具有操作简单、多态性高、经济方便等优点。ISSR 标记是以在简单重复序列的末端加 2 ~ 4 个随机核苷酸序列为引物, 通过 PCR 反应在简单重复序列间进行扩增的标记技术<sup>[8]</sup>。ISSR 分子标记可用于分子辅助育种、亲缘关系分析和遗传多样性分析等多个方面。目前, 已有大量研究利用 ISSR 分子标记对植物进行亲缘关系分析和遗传多样性分析。廖菊阳等<sup>[9]</sup>利用 ISSR 标记对 28 种杜鹃属 *Rhododendron* 植物进行了分析, 扩增出 127 个多态性位点, 多态性比例高达 96.21%, 并以平均相似系数 0.588 为阈值, 将 28 种杜鹃属植物分为三个类群。曾惠敏等<sup>[10]</sup>利用 ISSR 标记对 14 个八仙花 (绣球 *Hydrangea macrophylla*) 品种进行分析, 计算出的 14 个八仙花品种的遗传相似系数皆大于 0.9, 表明了其相近的亲缘关系, 并在遗传相似性系数约 0.38 处将 14 个八仙花品种分为两类。李彬彬<sup>[11]</sup>等利用 ISSR 标记对 20 个种质的紫花苜蓿 *Medicago sativa* 进行遗传多样性分析, 其多态性条带比率达 82.67%。禹靓倩等<sup>[12]</sup>采用 ISSR 分子标记分析了 27 个栎属树种的亲缘关系, 利用 12 条引物扩增出 140 个位点, 其中多态性位点比率为 82.14%, 将 27 个栎属树种分为 5 类。Coutinho 等<sup>[13]</sup>利用 ISSR 分子标记分析了国外部分栎属资源的遗传多样性和亲缘关系, 为其开发利用奠定了基础。

近年来, 我国从国外引进了一些栎属植物, 但对这些栎属植物的遗传多样性和相对亲缘关系还不清楚, 限制了其在我国的开发利用。本文拟用 ISSR 分子标记技术对 9 种从国外引进的栎属植物 (种或品种) 进行遗传多样性分析和亲缘关系分析, 以期从国外引种的栎属植物的有效利用提供科学依据并奠定坚实的基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

2017 年 10 月, 宁波市林场从海宁俄勒岗苗木繁育技术有限公司引进 '针栎' *Q. palustris* 'Pin Oak'、'猩红橡木' *Q. coocinea* 'Scarlet Oak'、'太平洋光辉' *Q. palustris* 'Pacific Brilliance'、'沼泽白橡木' *Q. icolor* 'Swamp White Oak'、'北方红橡' *Q. rubra* 'Red Oak'、'绿柱' *Q. palustris* 'Green pillar' 6 个栎属品种 (均为海宁俄勒岗苗木繁育技术有限公司 2014 年从美国引入) 地径为 2 ~ 5 cm 的实生苗, 按 4 m × 4 m 株行距在露地无保护状态下栽培。种植试验地的海拔为 730 m, 面积为 0.67 hm<sup>2</sup>。2017 年 11 月, 宁波市林场从湖南长沙引进柳叶栎 *Q. phellos* 和 2 种娜塔栎 *Q. nuttallii* 种质 (红叶娜塔栎和绿叶娜塔栎) 苗木, 均为早期从北美引进种子进行播种培育的 5 年生实生苗。这些栎属品种引进后均生长良好, 能在宁波市林场基地正常萌芽、生长、变色和落叶,

但部分栎属品种冬天易受雪压折断, 部分出现病虫害, 还在进一步观察和研究中。

本文以这 9 种国外引进的栎属植物的叶片为实验材料, 叶片于 2018 年 5 月 9 日采自宁波市林场种植基地, 多株混合采样, 样品采集后立即放入液氮中暂存, 随后带到浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室, 在 - 80℃超低温冰箱中保存以用于后续测定。9 种栎属植物的基本信息如表 1。

表 1 9 种国外引进栎属植物的基本信息  
Table 1 Morphological traits of introduced nine species/cultivars of *Quercus*

植物编号	名称	表型特征		
		叶	花/果	树形
Q1	‘针栎’	叶片椭圆至长椭圆形, 裂片顶端长渐尖、基部截形, 5~7 裂; 叶片春季深绿有光泽, 秋季变红色	花黄色, 果棕色	树圆锥形, 树高 20~25 m, 冠径 10~15 m
Q2	柳叶栎	叶片形似柳叶, 单叶互生, 狭椭圆形或披针形, 叶缘全缘; 叶片春季鲜绿色, 秋季变红黄色	花黄绿色, 果实单生或对生, 近球形	树高 20~30 m
Q3	‘猩红橡木’	叶片长方形或椭圆形, 基部短楔形、稀宽楔形, 7~9 裂, 单叶互生; 叶片春季亮深绿色, 秋天变棕红色	花黄色, 果棕色	树卵圆形, 树高 25~35 m, 冠径 10~15 m
Q4	‘太平洋光辉’	叶片卵形或椭圆形, 顶端渐尖、基部楔形, 7~9 裂; 叶片春季鲜绿有光泽、秋季变黄色或棕色	花黄色, 果棕色	树圆锥形, 树高 15~22 m, 冠径 8~14 m
Q5	娜塔栎(绿叶种质)	叶片椭圆形, 具 5~7 个锯齿状裂片; 叶片春季亮深绿色, 秋季变亮红色或红棕色	坚果, 长 2~3 cm, 卵形	塔状树冠, 树高约 30 m
Q6	‘沼泽白橡木’	叶片倒卵形至狭椭圆形, 基部楔形至急尖, 顶部圆形, 叶面深绿有光泽, 革质, 秋天变棕色或黄棕	花黄色, 果棕色	树卵圆形, 树高 18~24 m, 冠径 10~15 m
Q7	‘北方红橡’	叶片椭圆或倒椭圆形, 7~12 裂, 基部宽楔形, 顶端急尖, 叶面深绿色具有光泽, 叶背灰白或白色, 秋天变橙色或红色	花黄色, 果棕色	树圆形, 树高 18~22 m, 冠径 15~20 m
Q8	娜塔栎(红叶种质)	叶片椭圆形, 具 5~7 个锯齿状裂片; 叶片早春红褐色, 后渐变成绿色, 秋季变亮红色或红棕色	坚果, 长 2~3 cm, 卵形	塔状树冠, 树高约 30 m
Q9	‘绿柱’	叶片卵形或椭圆形, 基部楔形、顶端急尖; 春季叶面油亮具光泽, 深绿, 秋季变棕黄色	花黄色, 果棕色	树长圆柱形, 树高 18~22 m, 冠径 4~6 m

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取及质量检测 参考王玲玲等<sup>[14]</sup>的方法, 利用改良 CTAB 法提取栎属植物叶片基因组 DNA。每个样品至少进行 3 次重复提取。提取后用 NanoDrop-1000 分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度(OD260/280); 用质量分数为 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。

1.2.2 ISSR 引物的筛选及 PCR 扩增 基于前人的研究<sup>[15-17]</sup>, 结合加拿大哥伦比亚大学报道的 100 条栎属植物 ISSR 引物, 从中筛选出 26 条引物送往生工生物工程(上海)股份有限公司进行合成。根据公司提供的引物的 T<sub>m</sub> 值, 设定合适的退火温度, 具体信息如表 2。

表 2 ISSR 引物信息  
Table 2 The ISSR primers used in this study

序号	引物编号	引物序列	引物退火温度/℃	序号	引物编号	引物序列	引物退火温度/℃
1	UBC-807	AGAGAGAGAGAGAGA	45.5	14	UBC-841	GAGAGAGAGAGAGAG	48.5
2	UBC-808	AGAGAGAGAGAGAGA	48.5	15	UBC-845	CTCTCTCTCTCTCTCTR	48.5
3	UBC-809	AGAGAGAGAGAGAGA	48.5	16	UBC-853	TCTCTCTCTCTCTCTCR	48.5
4	UBC-810	GAGAGAGAGAGAGAG	45.5	17	UBC-857	ACACACACACACACAC	55.0
5	UBC-811	GAGAGAGAGAGAGAG	45.5	18	UBC-862	AGCAGCAGCAGCAGC	61.0
6	UBC-812	GAGAGAGAGAGAGAG	45.5	19	UBC-864	ATGATGATGATGATGA	42.0
7	UBC-814	CTCTCTCTCTCTCTCT	45.5	20	UBC-868	GAAGAAGAAGAAGAA	42.0
8	UBC-815	CTCTCTCTCTCTCTCT	45.5	21	UBC-873	GACAGACAGACAGAC	45.5
9	UBC-817	CACACACACACACAC	48.5	22	UBC-876	GATAGATAGACAGAC	42.0
10	UBC-826	ACACACACACACACA	42.0	23	UBC-879	CTTCACTTCACTTCA	42.0
11	UBC-834	AGAGAGAGAGAGAGA	48.5	24	UBC-880	GGAGAGGAGAGGAGA	48.5
12	UBC-836	AGAGAGAGAGAGAGA	48.5	25	UBC-881	GGGTGGGGTGGGGTG	61.0
13	UBC-840	GAGAGAGAGAGAGAG	48.5	26	UBC-900	ACTTCCCCACAGGTTA	55.0

以提取的 9 份栎属植物的 DNA 为 PCR 反应的模板, 分别用 26 条引物进行产物扩增。PCR 反应体系共 25.0  $\mu\text{L}$ , 包括栎属植物 DNA 0.5  $\mu\text{L}$ 、ISSR 引物 2.0  $\mu\text{L}$ 、rTaq 酶 12.5  $\mu\text{L}$ 。反应体系中的 rTaq Mix 为预混型 rTaq 酶 (日本, Takara), 其中包含了 DNA 聚合酶、 $\text{Mg}^{2+}$ 、反应缓冲液、dNTP 等成分。ISSR-PCR 扩增程序: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 依据表 5 中的  $T_{\text{m}}$  值退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 共 30 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  保存。PCR 扩增产物用质量分数为 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳分离, 恒压 135 V 电泳 35 min, 在紫外凝胶成像系统中观察电泳条带并拍照。每个样品的 PCR 扩增至少进行 3 次重复, 以减少误差。

1.3 数据统计分析

电泳条带记录时, 用数字“1”表示电泳图中某孔道在该行中存在条带, 用数字“0”表示电泳图中某孔道在该行中不存在条带。根据条带统计结果, 用分析软件 NTsys-pc 2.10e 计算 9 种栎属植物之间的遗传相似系数, 并基于遗传相似系数进行聚类分析, 聚类方法选用 UPGMA。

2 结果与分析

2.1 9 种栎属植物的 ISSR 扩增结果

用 26 条 ISSR 引物 (见表 2) 对 9 种栎属植物的基因组 DNA 进行 PCR 扩增。经过琼脂糖凝胶电泳检测后, 共筛选出 23 条扩增条带清晰、多态性高的 ISSR 引物。以 4 号引物 UBC-810 所扩增结果为例, 9 种栎属植物在该引物扩增位点的多态性较高, 共扩增出 18 条电泳条带, 其中多态性条带有 17 条, 多态性条带百分率达 94.44% (图 1), 初步显示了 9 种栎属植物间的遗传差异。

2.2 9 种栎属植物的 ISSR 遗传多样性

以扩增条带清晰、多态性高的 23 条 ISSR 引物进行 9 种栎属植物间的遗传多样性分析, 发现 23 条引物共扩增出 319 条条带, 除 UBC-879 仅扩增出 3 条条带以外, 其它每条引物至少扩增出了 9 条条带, 其中引物 UBC-845 扩增出的条带数最多 (为 20 条), 平均每个引物扩增出 13.87 条条带。在 319 条扩增条带中, 298 条为多态性条带, 平均多态性条带百分率为 93.42%。在 23 条引物中, 多态性条带百分率最低的为 66.67% (3 号引物), 最高的为 100% (共有 11 条引物) (表 3), 表明这 9 种栎属植物的遗传多样性较为丰富。

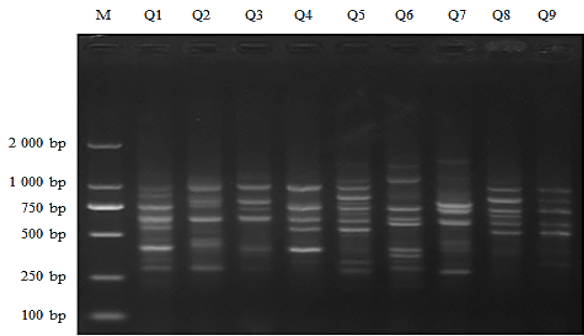


图 1 9 种栎属植物的 ISSR 扩增结果 (以 4 号引物 UBC-810 为例)

Figure 1 ISSR amplification bands of the introduced nine species of *Quercus* (primer: UBC-810)

表 3 9 种栎属植物在 23 条 ISSR 引物位点上的扩增条带统计  
Table 3 Bands amplified by the 23 ISSR polymorphic primers of nine introduced species of *Quercus*

序号	编号	总条带数/条	多态性条带数/条	多态性条带百分比/%	序号	编号	总条带数/条	多态性条带数/条	多态性条带百分比/%
1	UBC-807	17	16	94.12	13	UBC-840	15	15	100.00
2	UBC-808	10	9	90.00	14	UBC-841	18	15	83.33
3	UBC-809	9	6	66.67	15	UBC-845	20	17	85.00
4	UBC-810	18	17	94.44	16	UBC-853	9	9	100.00
5	UBC-811	16	15	93.75	17	UBC-862	17	17	100.00
6	UBC-812	18	16	88.89	18	UBC-864	9	9	100.00
7	UBC-814	17	17	100.00	19	UBC-868	14	13	92.86
8	UBC-815	13	12	92.31	20	UBC-873	11	10	90.91
9	UBC-817	11	11	100.00	21	UBC-876	16	16	100.00
10	UBC-826	12	12	100.00	22	UBC-879	3	3	100.00
11	UBC-834	18	18	100.00	23	UBC-880	16	16	100.00
12	UBC-836	12	9	75.00		合计	319	298	93.42

2.3 9 种栎属植物的亲缘关系分析

从 9 种栎属植物的遗传相似系数分析结果可以看出，除了 Q6 (‘沼泽白橡木’)与其它栎属植物的遗传相似系数在 0.485 9~0.558 0 外，其它 8 种栎属植物互相之间的遗传相似系数都在 0.605 0~0.764 9 (表 4)。由此可以说明‘沼泽白橡木’与其它 8 种栎属植物的亲缘关系最远。在 9 种栎属植物中，遗传相似系数最大，即两个品种间亲缘关系最近的是 Q9 (‘绿柱’)和 Q4 (‘太平洋光辉’)，两者间的遗传相似系数为 0.764 9，与其同属于沼生栎品种的客观事实相符。

表 4 9 种栎属植物的遗传相似系数  
Table 4 Genetic similarity coefficients of the nine introduced species of *Quercus*

植物编号	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6	Q7	Q8	Q9
Q1	1.000 0								
Q2	0.717 9	1.000 0							
Q3	0.705 3	0.699 1	1.000 0						
Q4	0.717 9	0.648 9	0.655 2	1.000 0					
Q5	0.702 2	0.652 0	0.652 0	0.727 3	1.000 0				
Q6	0.526 6	0.507 8	0.558 0	0.526 6	0.536 1	1.000 0			
Q7	0.605 0	0.623 8	0.699 1	0.617 6	0.639 5	0.532 9	1.000 0		
Q8	0.658 3	0.627 0	0.658 3	0.664 6	0.667 7	0.485 9	0.627 0	1.000 0	
Q9	0.733 5	0.664 6	0.633 2	0.764 9	0.724 1	0.485 9	0.645 8	0.705 3	1.000 0

根据遗传相似系数对 9 种栎属植物进行聚类分析，结果见图 2。由图 2 可知，在遗传相似系数 0.650 处，9 种栎属植物可分为 3 类，其中 3 个沼生栎品种 (‘绿柱’ ‘太平洋光辉’ 和 ‘针栎’) 和 2 种娜塔栎种质 (红叶娜塔栎和绿叶娜塔栎) 被归为第一类，柳叶栎、‘猩红橡木’ 以及 ‘北方红橡’ 被归为第二类，而 ‘沼泽白橡木’ 单独归为第三类。在第一类中，‘绿柱’ 和 ‘太平洋光辉’ 沼生栎两者之间的亲缘关系最近。‘沼泽白橡木’ 和其它 8 种栎属植物的亲缘关系最远。

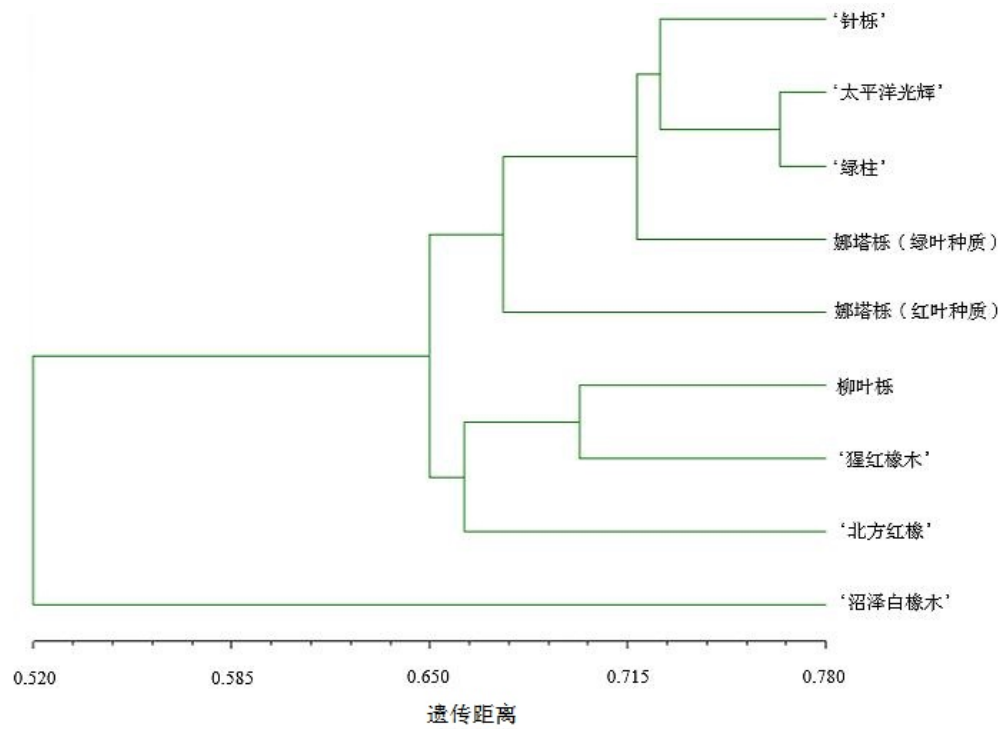


图 2 基于遗传相似系数的 9 种栎属植物 UPGMA 聚类

Figure 2 UPGMA dendrogram of the nine introduced species of *Quercus* based on genetic similarity coefficients

### 3 结论与讨论

栎属植物具有重要的开发利用价值<sup>[18-19]</sup>。世界上的栎属植物约有 300 种,我国仅有 51 种,因此,引进并合理开发利用国外优良栎属种质资源对于丰富我国栎属种质资源并促进其开发利用具有重要意义。近年来,我国从国外引进了一些栎属植物资源,但对其开发利用水平有限。充分利用国外优良栎属种质资源的优势提升我国栎属植物的遗传改良水平对于促进我国栎属植物的开发利用具有积极影响。了解国外引进栎属植物的相对亲缘关系和遗传多样性,是将其应用到我国栎属植物遗传改良进程中的基础性工作。

分子标记技术是对植物种质资源进行亲缘关系分析和遗传多样性评价的有效技术手段。在多种分子标记中,ISSR 分子标记是最简便有效的分子标记之一,被广泛应用于辅助选育<sup>[20]</sup>、品种鉴定<sup>[21]</sup>、种质资源评价、遗传多样性研究<sup>[22]</sup>、遗传图谱构建<sup>[23]</sup>以及亲缘关系分析<sup>[24]</sup>等多个方面。ISSR 分子标记在多个物种的亲缘关系分析和遗传多样性分析上具有广泛应用。王志清<sup>[25]</sup>等采用 ISSR 标记分析了 61 份细辛 *Asarum sieboldii* 种质的遗传多样性,其多态性条带的比例为 86.3%。原勤勤等<sup>[26]</sup>对 38 个优良枣 *Ziziphus jujuba* 品种进行了亲缘关系分析,发现品种间的亲缘关系与地理位置密切相关。宁静等<sup>[27]</sup>对 110 个株系的黄金茶 *Camellia sinensis* ‘Huangjincha’ 进行了亲缘关系分析和遗传多样性分析,共获得 187 个多态性条带,多态率高达 91.22%,并在遗传相似系数平均值 0.55 处,将黄金茶分为 7 个类群。严华<sup>[28]</sup>等利用 ISSR 分子标记对 38 个品种的国兰(兰科 Orchidaceae 兰属 *Cymbidium* 植物)进行了亲缘关系分析,得出的亲缘关系聚类图与传统分类的结果基本一致,并选用其中两个品种进行杂交实验,获得其成形的干果。由此也说明了 ISSR 分子标记在亲缘关系分析、遗传多样性评价、指导植物辅助育种等方面具有一定的可行性。

本研究选用 23 条 ISSR 引物,利用 PCR 技术对 9 种国外引种的栎属植物进行遗传多样性分析和亲缘关系分析,共扩增出 298 条多态性条带,其多态性条带比例达 93.42%,其中扩增出多态性条带的比率为 100%的引物有 11 条,表明这 9 种栎属植物的遗传多样性较高。禹靓倩等对 27 种栎属树种亲缘关系的分析发现,利用 12 条 ISSR 引物扩增出 140 个位点,其中多态性位点比率为 82.14%<sup>[12]</sup>。本文研究结果发现基于 ISSR 分子标记的栎属植物的多态性条带比率均超过 80%,显示了所研究的栎属植物具有较高的遗传多样性;同时,本文研究的 9 种国外引进栎属植物的多态性条带比例为 93.42%,显著高于前人对 27 种栎属树种的研究,显示了国外引进的 9 种栎属植物的较高遗传多样性,这也为其在国内栎属植物遗传改良中的应用奠定了坚实的材料基础。

本研究利用 ISSR 分子标记,从分子水平上揭示 9 种国外引进的栎属植物的亲缘关系。从遗传相似系数来看,在遗传相似系数为 0.650 处,可将 9 种栎属植物分为 3 类,其中‘沼泽白橡木’和其它 8 种栎属植物的亲缘关系最远,而 3 种沼生栎(‘绿柱’‘太平洋光辉’和‘针栎’)之间的亲缘关系最近,ISSR 亲缘分析聚类结果与传统分类结果相似。从表型特征上看,‘绿柱’‘太平洋光辉’和‘针栎’三者的树形、秋色、树高等表型特征较为接近,但仍能在分子水平上检测出它们之间的差别,说明根据形态学特征,个体之间没有较大差异的品种,利用 ISSR 标记仍能鉴别出其在分子水平上的差别。但值得注意的是,2 个娜塔栎种质的表型特征相近,最显著的区别仅为叶色,但从分子水平上看,绿叶娜塔栎种质与 3 个沼生栎品种的亲缘关系更近。因此,不能仅仅依据物种的表型特征来判断物种之间的亲缘关系。建议对于亲缘关系的分析,应该结合分子标记、形态学标记等多种遗传标记综合考虑,进而分析确定物种以及品种之间的亲缘关系。当然,当前的分类结果是基于少数 ISSR 位点的多态性,通量较低,可能对亲缘分析结果有一定的影响,未来可应用更多的标记进行进一步分析。在未来育种过程中,参考本文的分析结果,利用亲缘关系较远的品种进行杂交可创造更为优良的种质资源,从而保证育种群体的遗传多样性,促进栎属植物应用的可持续发展。

#### 参考文献:

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会编. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1998(22): 215.
- [2] 雷静品, 肖文发, 刘建锋. 我国栓皮栎分布及其生态学研究[J]. 世界林业研究, 2013, 26(4): 57-62.
- [3] 王婧, 王少波, 康宏樟, 等. 东亚地区栓皮栎的地理分布格局及其气候特征[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2009, 27(3): 235-241.

- [4] 赵泾峰, 冯德君, 雷亚芳. 陕西壳斗科栎属与青冈属主要木材研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2007(10): 196–202.
- [5] 魏练平, 毛非鸿, 蒋立科, 等. 橡子营养成分及其加工利用的初步研究[J]. 安徽农学通报, 2007(9): 137–138.
- [6] 杨萍, 张传军, 邓开野. 橡子米酒的生产工艺研究[J]. 食品工业科技, 2005, 26(11): 93–96.
- [7] ALIKHANI L, RAHMANI M.S, SHABANIAN N, et al. Genetic variability and structure of *Quercus brantii* assessed by ISSR, IRAP and SCoT markers[J]. Gene, 2014, 552(1): 176–183.
- [8] PRADEEP REDDY M, SARLA N, SIDDIQ E. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding[J]. Euphytica, 2002, 128(1): 9–17.
- [9] 廖菊阳, 吴林世, 刘艳, 等. 28 种杜鹃亲缘关系 ISSR 分析[J]. 经济林研究, 2018, 36(2): 133–138.
- [10] 曾惠敏, 陈爽, 赵冰. 14 个八仙花品种亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 种子, 2018, 37(12): 19–22.
- [11] 李杉杉, 毛培春, 郭静雅, 等. 20 个紫花苜蓿品种的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 草原与草坪, 2016, 36(4): 1–5, 15.
- [12] 禹靓倩, 吴毅, 彭继庆, 等. 基于 ISSR 分子标记的 27 种栎属树种亲缘关系研究[J]. 湖南林业科技, 2020, 47(5): 7–13.
- [13] JOÃO PAULO COUTINHO, ANA CARVALHO, JOSÉ LIMA-BRITO. Genetic diversity assessment and estimation of phylogenetic relationships among 26 Fagaceae species using ISSRs[J]. Biochem Syst Ecol, 2014, 54: 247–256.
- [14] 王玲玲, 叶青雷, 王学英. 采用改良 CTAB 法提取柞树(*Quercus L.*)基因组 DNA[J]. 蚕业科学, 2008(3): 494–496.
- [15] 李娜, 张存旭, 崔晓燕, 等. 栓皮栎 ISSR 反应体系的建立[J]. 北方园艺, 2014(13): 93–97.
- [16] LIU H, CHEN X, QIN Z, et al. Molecular identification of *Castanopsis hystrix*, *Castanopsis carlesii* and *Quercus griffithii* using ISSR-PCR method[J]. Agr Sci Tech, 2011, 12(12): 1781–1783.
- [17] 彭礼琼, 金则新, 祁彩虹, 等. 麻栎 ISSR-PCR 扩增条件的优化[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(4): 30–32.
- [18] 郭立新, 周勇, 冯旭, 等. 黑龙江省柞树资源及其副产品利用[J]. 国土与自然资源研究, 1995(1): 49.
- [19] 闻天声. 栓皮栎的培育与用途[J]. 中国林副特产, 1991(02): 29.
- [20] 周亚星. 超低氢氰酸高丹草新品系分子标记辅助选育研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2010.
- [21] 甘霖. 马铃薯杂交种 ISSR 鉴定与高产优质株系选育研究[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2013.
- [22] 孙红艳. 小麦化感种质资源评价及其遗传多样性研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2008.
- [23] 战晴晴, 隋春, 魏建和, 等. 利用 ISSR 和 SSR 分子标记构建北柴胡遗传图谱[J]. 药学学报, 2010, 45(4): 517–523.
- [24] 王永清, 付燕, 杨琴, 等. 枇杷属植物遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 林业科学, 2010, 46(4): 49–57.
- [25] 王志清, 刘继永, 李昌禹, 等. 利用 ISSR 和 SRAP 标记分析细辛资源遗传多样性与亲缘关系[J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1035–1044.
- [26] 原勤勤, 文亚峰, 刘儒, 等. 枣优良品种亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 经济林研究, 2012, 30(1): 56–61.
- [27] 宁静, 李健权, 董丽娟, 等. “黄金茶”特异种质资源遗传多样性和亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 茶叶科学, 2010, 30(2): 149–156.
- [28] 严华, 张冬梅, 罗玉兰, 等. 38 种国兰亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 736.