

大贵寺国家森林公园野生青檀居群的遗传多样性

李建华¹, 李雪松^{1,2}, 田春元¹, 邹礼平¹, 汪殿蓓^{1*}

1. 孝感学院农业资源保护与利用重点实验室, 湖北 孝感 432000; 2. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 200090

摘要: 利用 ISSR 分子标记技术对湖北省大贵寺国家森林公园野生青檀(*Pteroceltis tatarinowii* Maxim.)居群进行遗传多样性分析。用 11 条 ISSR 引物对 6 个青檀居群 64 个样品进行扩增, 扩增片段长度在 200 bp 至 3 000 bp 之间, 检测到 179 个位点, 其中多态位点 165 个, 多态位点百分率(P)为 92.14%。青檀在物种水平上的 Nei 基因多样性指数(H_e)和 Shannon 信息指数(I)分别为 0.273 和 0.423, 在居群水平上分别为 0.225 和 0.343, 显示出青檀有着较高的遗传多样性。居群间的遗传分化系数(G_{ST})为 0.192, 表明青檀居群间存在着较大的遗传分化; UPGMA 聚类分析表明遗传距离与海拔差距有一定的相关性, 相邻海拔的青檀居群间遗传距离较近。不同海拔导致的异质生境可能是影响青檀居群遗传分化的主要原因。

关键词: 青檀; ISSR 标记; 遗传多样性; 大贵寺国家森林公园

中图分类号: S718.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2011) 12-1799-06

ISSR (inter-simple sequence repeats, 简单重复序列区间扩增)是一种显性分子遗传标记, 具有操作简单、成本低、快速灵敏、多态性高、所需 DNA 量少以及无需预知研究对象的基因组序列等优点, 同时由于 ISSR 扩增引物较长, 退火温度较高, 因此 ISSR 的稳定性比 RAPD 强, 具有 SSR 的稳定性, 在进行植物遗传多样性和系统发育的研究时, 常被优先考虑使用^[1,2]。

青檀 (*Pteroceltis tatarinowii* Maxim.) 为榆科青檀属落叶乔木, 是中国特有的单种属植物及特有的纤维树种, 树皮纤维是制造宣纸的主要原料, 木材坚硬致密, 是制作农具、车轴、家具、建筑用的上等木料^[3]。近年来, 对青檀的研究报道集中于培育措施及其机理: 探讨了青檀种子的休眠机理、种子活力及发芽率^[4-6]、盐胁迫对青檀种子萌发及幼苗生长的影响^[7]、一年生播种苗生长发育规律^[8]、叶的解剖结构及其生态适应性特征^[9]、立地条件^[10,11]、经营措施^[12]、成土母岩和条龄^[13,14]对青檀人工林生产力(生物量)、檀皮产量及檀皮中矿质元素含量的影响等。

青檀分布于我国安徽、浙江、福建、湖北等 19 省, 常生于山谷溪边石灰岩山地疏林中^[3]。不过, 由于自然植被破坏及大量砍伐, 青檀分布区在逐渐缩小。目前对青檀天然群落结构、特征及土壤成分有研究报道^[15-17]。从分子水平对野生青檀居群的研究较少, 目前仅有 Chai^[18]从分子水平对山东、河南、安徽、江苏四省 5 个地点的青檀野生居群多样性水平作了研究。研究植物居群遗传结构和遗传多样性

水平, 对制订合理的保护和利用策略具有重要的意义^[19]。

湖北大贵寺国家森林公园的野生青檀是目前分布面积较大、保存较好的野生居群, 本文采用 ISSR 技术对其进行分析, 旨在揭示该野生青檀居群的遗传结构和遗传多样性的水平, 阐明不同生境条件对种群遗传多样性的影响, 为大贵寺国家森林公园青檀遗传资源的保护和利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 样地概况及材料采集

大贵寺国家森林公园位于湖北省广水市北 35 km (113°31'~114°07' E, 31°23'~32°05' N), 北面距河南信阳市 37 km, 处于桐柏山脉南麓、大别山西端, 为低山丘陵地带, 森林公园内山体连绵起伏, 最高点为大贵寺金顶, 海拔 908 m。属北亚热带大陆性季风气候, 年均气温 13~14 °C, 年均降水量 990 mm; 平均无霜期 221 d, 全年日照数 2 083 h。地带性植被为常绿落叶阔叶混交林。青檀野生居群主要分布于沟谷, 生长地为山谷溪流两侧或裸露岩石周围, 土壤为排水良好、无明显粘化现象的轻砂壤或疏松的腐殖质土。青檀群落外貌青绿色, 青檀多向坡下倾斜生长, 呈单生或丛状状态^[20,21]。

在全面勘查青檀分布的基础上, 于 2009 年 4 月进行采样, 按照居群取样原则, 对于个体数较密集的区域随机选取个体, 并保持个体间一定的间隔; 采样覆盖整个分布区, 共采取 6 个居群 64 个样本(表 1)。采样时尽量取同一年龄层次、同一高度的叶片置于塑封袋中, 放置在低温冷藏箱中冷冻

基金项目: 湖北省教育厅自然科学重大项目(Z20092601)

作者简介: 李建华(1969年生), 教授, 博士, 主要研究方向为分子遗传与生化工程。Email: zmkmcn2001@yahoo.com.cn

*通讯作者 E-mail: wangdp@xgu.cn

收稿日期: 2011-08-09

表1 青檀居群的地理位置及采样数目
Tab. 1 Locations of *P. tatarinowii* populations
and the numbers of individuals sampled

居群 Population	取样个体数 No. of individuals	海拔高度 Altitude(m)	经度(东经) Longitude(E)	纬度(北纬) Latitude(N)
Q1	8	470~540	113°56' 112'' ~113°56' 370''	31°49' 860'' ~31°50' 075''
Q2	12	430~470	113°56' 203'' ~113°56' 302''	31°50' 088'' ~31°50' 178''
Q3	13	390~430	113°56' 295'' ~113°56' 398''	31°50' 184'' ~31°50' 334''
Q4	15	310~390	113°56' 392'' ~113°56' 518''	31°50' 357'' ~31°50' 539''
Q5	8	230~270	113°56' 409'' ~113°56' 626''	31°50' 554'' ~31°51' 042''
Q6	8	220~280	113°55' 960'' ~113°56' 137''	31°50' 988'' ~31°51' 117''

保藏, 带回实验室后放置于-70℃冰箱保藏备用。

1.2 ISSR 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

以采集的青檀嫩叶为材料, 采用改良的 CTAB 法^[19,22]提取 DNA, 在 0.8% 琼脂糖凝胶(含有 0.1% EB)中电泳检测所提取模板 DNA 的完整性, 并用紫外分光光度计测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 的值, 计算其纯度及浓度。

1.2.2 ISSR 反应条件建立及引物筛选

为获得清晰、重复性的 ISSR 扩增结果, 对影响 ISSR-PCR 的多个因素进行了比较、优化, 确定 ISSR-PCR 扩增最适宜的 10 μL PCR 反应体系: 10×Buffer 1.0 μL, MgCl₂ 0.6 μL, dNTP(10 mM) 0.2 μL, 引物(10 μM) 0.3 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.6 μL, 模板 DNA 1.0 μL, 去离子水 6.7 μL。

本研究从加拿大 British Columbia 大学公布的一套(共 100 条) ISSR 引物中 (http://www.michaelsmith.ubc.ca/services/NAPS/Primer_Sets/Primers_Oct2006.pdf), 应用上述优化的反应体系, 筛选出 11 对稳定性好、多态性较高的引物用于青檀 PCR 扩增(引物由上海英骏生物技术有限公司合成), 所选引物见表 2。

1.2.3 ISSR 扩增及产物检测

扩增反应在 PTC-100 型 PCR 仪上进行, 程序如下: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 45 sec, 51℃~53℃ 退火 45 sec(退火温度依据引物变化), 72℃ 延伸 1.5 min, 进行 44 个循环, 最后 72℃ 延伸 5 min。扩增产物 4℃ 下保存。

扩增产物检测: 以 SDM38 DNA Marker L 为分子量标记, 用 1.2% 琼脂糖(含有 0.1% EB)凝胶电泳, 电泳缓冲液为 0.5×TBE, 在 100 V 稳定电压的条件下, 电泳 2.0 h。电泳结束后, 用凝胶成像

表2 ISSR 引物序列及退火温度

Tab. 2 ISSR primers sequences and annealing temperature

引物编号 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence	退火温度(℃) Temp.
UBC 807	(AG) ₈ T	51
UBC 808	(AG) ₈ C	53
UBC 810	(GA) ₈ T	52
UBC 811	(GA) ₈ C	52
UBC 834	(AG) ₈ YT	52
UBC 835	(AG) ₈ YC	51
UBC 836	(AG) ₈ YA	51
UBC 840	(GA) ₈ YT	51
UBC 841	(GA) ₈ YC	52
UBC 842	(GA) ₈ YG	53
UBC 844	(CT) ₈ RC	52

Note: Y=(A,C); R=(A,G)。

系统照相保存。

1.2.4 数据处理

ISSR 是显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性, 按相同位置上扩增产物条带的有无进行统计, 有带的标记为“1”, 无带的标记为“0”, 缺失的标记为“.”, 建立数据矩阵。用 POPGENE 1.32^[23]进行遗传参数分析, 分析的遗传参数包括多态位点百分率(P)、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_e)、Shannon's 信息指数(I)、居群总基因多样性(H_t)、居群内的基因多样性(H_s)及遗传分化系数(G_{ST})。用 POPGENE 1.32^[23]计算居群间 Nei 遗传距离和遗传一致度。用 NTSYS-pc^[24]软件根据居群间的遗传距离, 采用算术平均数的非加权成组配对法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 不同 ISSR 引物的扩增多态性

用 11 条 ISSR 引物对 6 个青檀居群 64 个个体基因组 DNA 进行 PCR 扩增, 共扩增出 179 条清晰可重复的条带(位点), 其中多态条带(位点)为 165 条(表 3)。扩增片段长度约在 200 bp 至 3 000 bp 之间, 每个引物扩增的位点数在 12 至 21 之间, 其中多态位点数目在 9 至 19 个之间, 引物 UBC808 扩增的位点数最多(19 个), UBC811 扩增的位点数最少(9 个), 平均每对引物能扩增出 16.27 个位点, 平均多态位点数为 15.00。图 1 为引物 UBC 834 对部分青檀样本基因组 DNA 进行 ISSR 扩增的琼脂糖电泳图谱。

2.2 青檀居群的遗传多样性

用 POPGENE1.32 软件对青檀 6 个居群的遗传多样性进行统计分析(表 4), 结果表明, 在物种水平上, 多态位点百分率(P)是 92.14%, 高于 Hamrick 等^[25]对 220 个属 662 种林木的统计平均值($P = 64$ 。

表 3 青檀 ISSR 引物扩增结果

Tab. 3 Amplification information of ISSR primers for *P. tatarinowii*

引物 Primer	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率(%) Percentage of polymorphic loci
UBC 807	21	18	85.71
UBC 808	19	19	100.00
UBC 810	12	11	91.67
UBC 811	10	9	90.00
UBC 834	16	13	81.25
UBC 835	20	18	90.00
UBC 836	16	16	100.00
UBC 840	14	13	92.86
UBC 841	19	18	94.74
UBC 842	14	13	92.86
UBC 844	18	17	94.44
平均 Average	16.27	15.00	92.14
总数 Total	179	165	

7%),说明物种水平上青檀具有较高的遗传多样性;在居群水平上,多态位点百分率(*P*)从 64.44%到 79.44%不等,平均多态带百分率为 72.13%,显示青檀 6 个居群具有较高的遗传变异水平。等位基因

数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Nei's 基因多样性指数 (*He*)、Shannon's 信息指数 (*I*) 在物种水平上分别为 1.944、1.448、0.273、0.423;在居群水平上各参数平均值分别为 1.721、1.376、0.225、0.343,进一步表明青檀在物种和居群水平上具有较高的遗传多样性,而且物种水平的遗传多样性高于居群水平。

2.3 青檀居群间的遗传分化、遗传距离及遗传一致度

计算Nei 基因多样性指数(*He*),分析青檀居群间的遗传分化,研究表明,6个居群总遗传多样性(总基因多样性, *Ht*)为0.278,居群内遗传多样性(基因多样性, *Hs*)为0.225,居群间的遗传分化系数(*G_{ST}*)为0.192,表明总的遗传变异有19.2%来自于居群间的分化,80.8%来自于居群内。

青檀6个居群间的Nei遗传距离和遗传一致度的计算结果(表5)表明,居群Q1和Q6之间的遗传距离最大,为0.1420;居群Q3和Q4之间的遗传距离最小,为0.0337。遗传一致度与遗传距离正好相反,居群Q1和Q6之间的遗传一致度最小,为0.8676;居

表 4 青檀居群的遗传多样性

Tab. 4 Genetic diversity of *P. tatarinowii* populations

居群 Population	等位基因数 <i>Na</i> Number of alleles	有效等位基因数 <i>Ne</i> Effective number of alleles	Nei's 基因多样性 <i>He</i> Nei's gene diversity	Shannon's 信息指数 <i>I</i> Shannon's information index	多态位点百分率 <i>P</i> (%) Percentage of polymorphic loci
物种水平 Species Level	1.944	1.448	0.273	0.423	92.14
Q1	1.644	1.345	0.207	0.315	64.44
Q2	1.722	1.360	0.218	0.335	72.22
Q3	1.794	1.400	0.239	0.366	79.44
Q4	1.794	1.357	0.221	0.344	79.44
Q5	1.711	1.419	0.246	0.370	71.11
Q6	1.661	1.373	0.219	0.330	66.11
平均 Average	1.721	1.376	0.225	0.343	72.13

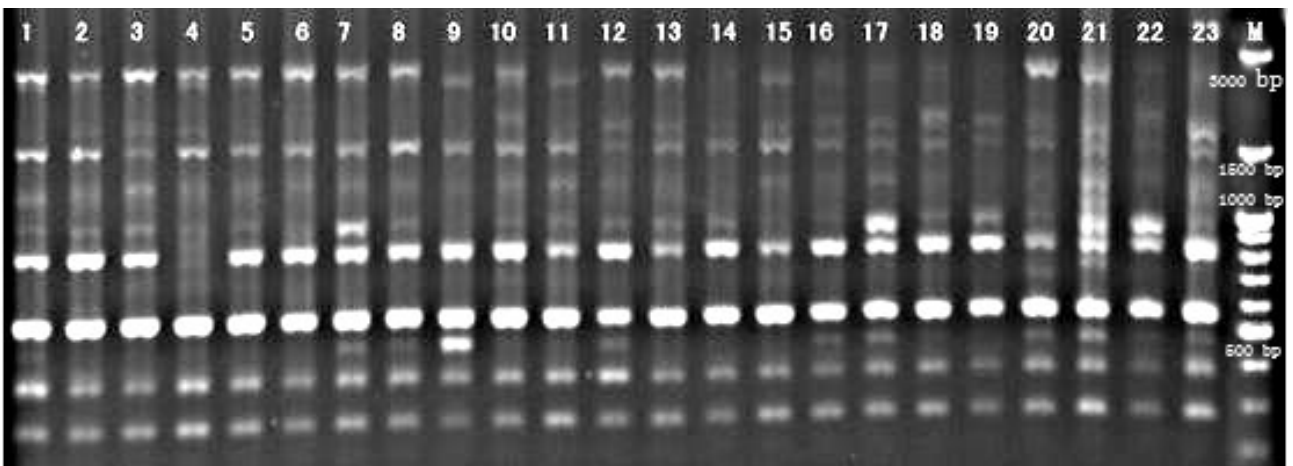


图 1 引物 UBC 834 对青檀 1-23 号样本的扩增结果 (M 为 DNA Marker)

Fig. 1 ISSR-PCR amplification results of *P. tatarinowii* from sample 1 to 23 with primer UBC834 (M, DNA Marker)

表5 青檀6个居群间的遗传一致度(对角线上面)
及遗传距离(对角线下面)

Tab. 5 Genetic identity (above diagonal) and genetic distance
(below diagonal) among six populations of *P. tatarinowii*

居群 Population	Q1	Q2	Q3	Q4	Q5	Q6
Q1	—	0.9437	0.9248	0.9086	0.8992	0.8676
Q2	0.0580	—	0.9459	0.9285	0.9040	0.8856
Q3	0.0781	0.0556	—	0.9669	0.9196	0.9136
Q4	0.0958	0.0742	0.0337	—	0.9137	0.9041
Q5	0.1063	0.1009	0.0839	0.0902	—	0.9348
Q6	0.1420	0.1215	0.0904	0.1008	0.0674	—

群Q3和Q4之间的遗传一致度最大,为0.9669。结合各居群的海拔高度分析,海拔高度相差越小,遗传距离越小,遗传一致性越大。

2.4 聚类分析

基于青檀各居群间的Nei遗传距离,采用UPGMA聚类法得到聚类图(图2)。从图2可知,相邻分布的居群Q1和Q2, Q3和Q4, Q5和Q6各聚为一支,进而Q1-Q2、Q3-Q4聚为一支,再与Q5-Q6聚为一支。聚类结果与青檀居群的实际分布状态相吻合, Q3和Q4居群处于青檀集中分布的中海拔区域,海拔高度相近,生境条件也极为相似,因而首先聚为一类; Q1居群分布于沟谷最上端,与Q2海拔高度相差不大,生境条件较为相似,因而Q1和Q2聚为一类; Q5和Q6均处于较低海拔,先聚为一类,由于山体起伏, Q1、Q2、Q3、Q4与Q5、Q6处于不同坡向的沟谷,加之Q1、Q2、Q3、Q4与Q5、Q6的海拔高度相差大,它们最后聚为一类。

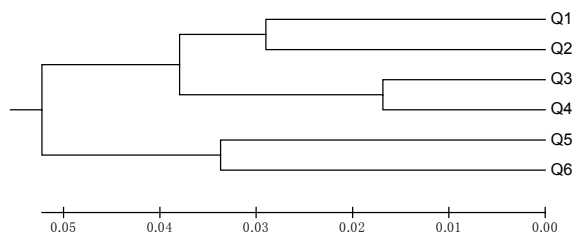


图2 基于Nei遗传距离的青檀居群UPGMA聚类图

Fig. 2 UPGMA Dendrogram of six *P. tatarinowii* populations based on Nei's genetic distance

3 讨论与结论

3.1 青檀居群的遗传多样性

遗传多样性即基因多样性,是生物所携带遗传信息的总和,是居群生存、发展和进化的基础^[2]。研究表明青檀在物种水平上具有较高的遗传多样性,这与青檀的生物学特性有一定关系,青檀为古老树种,风媒传粉,花单性、雌雄同株,小坚果两侧具翅,可扩散较远距离,湿藏后种子发芽率达到76.66%^[6],理论上应具有较高的遗传多样

性。此外,较高的遗传多样性可能还与该物种的进化历史有关,青檀是第三纪残遗植物,其祖先具有比较丰富的遗传基础^[26],虽然受第四纪冰川的影响,造成了大量个体的灭绝,但幸存的个体在一些“避难所”中保留下来,参照其它类似物种的进化历史^[27],青檀祖先广泛的遗传基础在某些“避难所”中得以保留是可能的。从居群水平看,6个青檀居群Nei基因多样性指数(H_e)和Shannon信息指数(I)分别为0.207~0.246、0.315~0.370,反映各居群的遗传多样性水平较高。野外调查发现,大贵寺国家森林公园青檀居群目前仍为野生自然居群,所处的植物群落结构比较完整,人为破坏较少,各龄级树都保存了一定的株数,因而避免了对遗传多样性的不利影响。

3.2 青檀居群的遗传分化

Buso等^[28]认为,遗传分化系数(G_{ST})值介于0~0.05之间表示居群间遗传分化程度很弱;0.05~0.15为分化程度中等;0.15~0.25为分化程度较大;大于0.25为分化程度很大。本研究中青檀居群间遗传分化系数(G_{ST})为0.192,表明大贵寺国家森林公园的青檀居群间存在着较大程度的遗传分化。异质生境导致的地理隔离是导致遗传分化的重要原因之一^[29],由于大贵寺森林公园由连绵起伏的山体构成,青檀居群分布于曲折走向的沟谷中,海拔高度、坡向、坡度不断变化,温度、水分、光照、土壤等生态因子也相应发生一定的变化,生境条件的改变最终可能导致居群内发生遗传分化。大量证据表明在一个连续的居群内遗传分化将很少发生,但在较小地理范围内异质生境确实可以造成某些植物居群的遗传分化^[30]。

遗传相似性系数或遗传距离是衡量居群间遗传分化程度的重要指标。本研究中青檀各居群的遗传距离变化幅度较大,表明各居群遗传分化的程度不同。海拔相近的居群遗传距离小,海拔相差大的遗传距离大,由此可知遗传距离与海拔高度有一定相关性。大的海拔跨度扩大了不同海拔居群的地理距离,影响着彼此居群间的遗传交流,因而表现出较大的遗传距离,这初步说明海拔对基因交流和基因选择有一定的影响,同时,海拔差距越大,生境差别也越大;而海拔相近的居群遗传距离较小,可能是小地区内生境类型基本一致,自然选择压力也趋于一致的缘故。

如果将居群生活的海拔高度分为低、中、高的话,不同海拔居群遗传多样性的关系有4种:一是中海拔居群的遗传多样性高于低、高海拔居群,二是高海拔居群的遗传多样性低于低海拔居群的遗传多样性,三是高海拔居群的遗传多样性高于低海

拔居群的遗传多样性,四是居群的遗传多样性与海拔没有关系^[31]。在青檀 6 个居群中,中海拔居群 Q3、Q4 表现出较高的遗传变异水平,居群 Q2、Q5 次之,而分别处于青檀海拔分布的上、下限的居群 Q1 和 Q6 的遗传变异水平最低,这一结果支持“中海拔居群的遗传多样性高于低、高海拔居群”的观点,造成这种现象的原因可能是低海拔居群受人类活动的影响较大,遗传多样性降低,而高海拔居群由于处于分布的极限位置,生境条件相对恶劣,环境选择压力大,因而居群的遗传多样性也相对较低。

3.3 野生青檀种质资源的保护

青檀为我国特有植物,具有造林、用材、观赏等多种用途,为了对这一珍稀优质资源进行长期有效的保护利用,就必须进行种群分化和遗传结构方面的研究,以摸清遗传背景。从本研究结果可以看出,目前大贵寺国家森林公园野生青檀种群仍然保持着较高的遗传多样性,是一个具有重大遗传和生态价值的青檀基因库,应加以保护和利用。从全国范围来看,由于自然植被被破坏及大量砍伐,青檀分布区在逐渐缩小,青檀野生种群的分布面积越来越小,资源数量锐减,因此,应当对野生青檀种群实施遗传多样性保护和种质资源保存的策略,通过建立种质库和基因库来实现对青檀种质资源的长期有效保存。

3.4 结论

通过研究,可以得出如下结论:湖北大贵寺国家森林公园野生青檀在物种水平上的 Nei 基因多样性指数(He)和 Shannon 信息指数(I)分别为 0.273 和 0.423,在居群水平上分别为 0.225 和 0.343,具有较高的遗传多样性;居群间的遗传分化系数(GST)为 0.192,青檀居群间存在着较大的遗传分化;该居群的遗传距离与海拔差距有一定的相关性,相邻海拔的青檀居群间遗传距离较近,不同海拔导致的异质生境可能是影响青檀居群遗传分化的主要原因。

参考文献:

[1] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants [J]. *Molecular Ecology*, 2004, 13: 1143-1155.

[2] 陈灵芝. 中国的生物多样性现状及其保护对策[M]. 北京: 科学出版社. 1993: 93-113.
CHEN Lingzhi. Present status and conservation strategies of Biodiversity in China [M]. Beijing: Science Press. 1993: 93-113.

[3] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第 22 卷[M]. 北京: 科学出版社. 1998: 380-382
Chinese Flora Editorial Committee, Chinese Academy of Sciences. *Flora of China* (Volume 22) [M]. Beijing: Science Press. 1998: 380

[4] 洪香香, 方升佐, 杜艳. 青檀种子休眠机理及发芽条件的探讨[J]. *植物资源与环境学报*, 2002, 11(1): 9-13.

FU Xiangxiang, FANG Shengzuo, DU Yan. A study on mechanism of dormancy and germination condition of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim. Seeds [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2002, 11(1): 9-13

[5] 方升佐, 朱梅, 唐罗忠, 等. 不同种源青檀种子的营养成分及种子活力的差异[J]. *植物资源与环境学报*, 1998, 7(2): 16-22
FANG Shengzuo, ZHU Mei, TANG Luozhong, et al. A preliminary study on seed nutrient ingredient contents and seed vigour for various provinces of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim[J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 1998, 7(2): 16-21

[6] 汪殿蓓, 李建华, 艾娜, 等. 野生青檀种子的形态特征及其发芽率[J]. *种子*, 2011, 30(1): 35-38
WANG Dianpei, LI Jianhua, Ai Na, et al. The morphological characteristics and the germination rate of wild *Pteroceltis tatarinowii* seeds [J]. *Seed*, 2011, 30(1): 35-38.

[7] Fang S Z, Song L Y, Fu X X. Effects of NaCl stress on seed germination, leaf gas exchange and seedling growth of *Pteroceltis tatarinowii* [J]. *Journal of Forestry Research*, 2006, 17(3):185-188

[8] 洪香香, 方升佐, 汪红卫, 等. 青檀一年生播种苗的年生长期规律[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2001, 25(6): 11-14
FU Xiangxiang, FANG Shengzuo, WANG Hongwei, et al. Studies on Annual Growth Dynamics of One-year Seedlings of *Pteroceltis tatarinowii* [J]. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science*, 2001, 25(6): 11-14

[9] 张兴旺, 张小平, 杨开军, 等. 珍稀植物青檀叶解剖结构及其生态适应性特征[J]. *植物研究*, 2007,27(1): 38-42.
ZHANG Xingwang, ZHANG Xiaoping, YANG Kaijun, et al. Study on Anatomical Structure of Leaf and Ecological Adaptability of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2007, 27(1): 38-42

[10] 李光友, 方升佐, 吕家驹, 等. 立地条件对青檀人工林生物生产力及檀皮产量的影响[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2001, 25(4): 49-53
LI Guangyou, FANG Shengzuo, LV Jiayu, et al. The Effects of Site Conditions on Above-ground Biomass Production and Bark Yield of *Pteroceltis tatarinowii* Plantations [J]. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Science*, 2001, 25(4): 49-53

[11] 方升佐, 李光友, 洪香香. 立地条件对青檀檀皮中矿质元素含量的影响[J]. *林业科学*, 2002, 38(1): 8-14
FANG Shengzuo, LI Guangyou, FU Xiangxiang. Effects of site conditions on mineral element contents in the bark of wingceltis (*Pteroceltis tatarinowii*) [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2002, 38(1): 8-14

[12] 方升佐, 李光友, 李同顺, 等. 经营措施对青檀人工林生物量及檀皮产量的影响[J]. *植物资源与环境学报*, 2001,10(1): 21-24
FANG Shengzuo, LI Guangyou, LI Tongshun, et al. The effects of management practice on above-ground biomass production and phloem production of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim. Plantations [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2001, 25(1): 21-25

[13] 方升佐, 崔同林, 虞木奎. 成土母岩和条龄对青檀檀皮质量的影响[J]. *北京林业大学学报*, 2007, 29(2): 122-127
FANG Shengzuo, CUI Tonglin, YU Mukui. Effects of soil-forming rocks and sprout ages on the bark quality of *Pteroceltis tatarinowii* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2007, 29(2): 122-127

[14] Fang S Z, Li G Y, Fu X X. Biomass production and bark yield in the plantations of *Pteroceltis tatarinowii* [J]. *Biomass & Bioenergy*, 2004, 26(4): 319-328

[15] 王文静, 何雅菁. 宝天曼自然保护区青檀林结构特征与物种多样性研究[J]. *河南农业大学学报*, 2001, 35(1):364-367
WANG Wenjing, HE Yaqiang. Studies on the structural feature and species diversity of *Pteroceltis tatarinowii* forest in Baotianman national nature reserve [J]. *Journal of Henan Agricultural University*, 2001, 35(1): 364-367

[16] 覃文更, 韦国富, 谭卫宁. 广西木论自然保护区青檀群落特征及其多样性研究[J]. *广西林业科学*, 2004, 33(3): 126-129.

- QIN Wengeng, WEI Guofu, TAN Weining. Research on *Pteroceltis tatarinowii* Community Features and Its Diversity in Mulun Nature Reserve [J]. Guangxi Forestry Science, 2004, 33(3):126
- [17] 汪殿蓓, 李建华, 陈玉兰, 等. 青檀天然群落土壤成分及其对青檀生长的影响[J]. 生态环境学报, 2010, 19(10): 2318-2324
WANG Dianpei, LI Jianhua, CHEN Yulan, et al. The soil composition of *Pteroceltis tatarinowii* natural community and its effect on the growth of plant [J]. Ecology and Environmental Science, 2010, 19(10): 2318-2324
- [18] Chai X Y, Chen S L, Xu W. Using inter-simple sequence repeat markers to analyze the genetic structure of natural *Pteroceltis tatarinowii* populations and implications for species conservation [J]. Plant System Evolution, 2010, 285: 65-73.
- [19] Ribeiro R A, Lovato M B. Comparative analysis of different DNA extraction protocols in fresh and herbarium specimens of the genus *Dalbergia*[J]. Genetics and Molecular Research, 2007, 6 (1): 173-187.
- [20] 时宝茹, 张辉勇. 大贵寺国家森林公园青檀资源保护与对策[J].湖北林业科技, 2006, (4): 54-56.
SHI Baoru, ZHANG Huiyong. Resource Protection and Countermeasure for *Pteroceltis Tatarinowii* in Daguisi State Forest Park [J]. Hubei Forestry Science and Technology, 2006, (4): 54-56
- [21] 余超波. 鄂北高高山珍稀树木及其保护对策[J]. 江汉大学学报, 2001, 18 (3): 18-20, 30.
YU Chaobo. The Rare and Endangered Trees of Gaogui Mountain and Their Conservation [J]. Journal of Jianghan University, 2001, 18 (3): 18-20, 30.
- [22] Dehestani A, Kazemi Tabar S K. A rapid efficient method for DNA isolation from plants with high levels of secondary metabolites[J]. Asian Journal of Plant Sciences, 2007, 6 (6): 977-981.
- [23] Yeh F C, Boyle T J B. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits[J]. Belgian Journal of Botany, 1997, 129 (2): 157.
- [24] Rohlf F J. NTSYS-pc, numerical taxonomy and multivariate analysis system v.2.02 [Z]. New York: Exeter Software, 1998.
- [25] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman - Broyles S L. Factors Influencing Levels of Genetic Diversity in Wood Plant Species[J]. New Forest, 1992, 6: 95-124.
- [26] 王荷生. 植物区系地理[M]. 北京: 科学出版社. 1992: 6, 56.
WANG Hesheng. Flora geography of Plant [M]. Beijing: Science Press.1992: 6, 56
- [27] 李艳, 朱柏芳, 江玉梅, 等. 江西穗花杉自然居群遗传多样性的ISSR 分析[J]. 南昌大学学报: 理科版, 2008, 32 (4): 405-408.
LI Yan, ZHU Baifang, JIANG Yumei, et al. ISSR Analysis on Genetic Diversity of the Relict Plant *Amentotaxus argotaenia* Natural Populations in Jiangxi Province [J]. Journal of Nanchang University: Natural Science, 2008, 32 (4): 405-408.
- [28] Buso G S C, Rangel P H, Ferreira M E. Analysis of genetic variability in South American wild rice populations(*Oryza glumaepatula*) with isozymes and RAPD markers[J]. Molecular Ecology, 1998, 7 (1): 107-117.
- [29] 黄玮, 孙平, 张文生, 等. 北京东灵山地区不同海拔柴胡居群的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9 (4): 453-457.
HUANG Wei, SUN Ping, ZHANG Wensheng, et al. Genetic Diversity of *Bupleurum chinense* DC. Populations from Different Altitudes in Dongling Mountain District in Beijing [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9 (4): 453-457.
- [30] 李钧敏, 金则新, 钟章成. 不同海拔高度大血藤群体遗传多样性的RAPD 分析及其与生境因子的相关性[J]. 生态学报, 2004, 24 (3) : 567-573.
LI Junmin, JIN Zexin, ZHONG Zhangcheng. RAPD analysis of genetic diversity of *Sargentodoxa cuneata* at different altitude and the influence of environmental factors [J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24 (3): 567-573.
- [31] Ohsawa T, Ide Y. Global patterns of genetic variation in plant species along vertical and horizontal gradients on mountains [J]. Global Ecology and Biogeography, 2007, 17(2):152-163.

Genetic Diversity of Wild Populations in DaGuiSi National Forest Park

LI Jianhua¹, LI Xuesong^{1,2}, TIAN Chunyuan¹, ZOU Liping¹, WANG Dianpei¹

1. Protection and Utilization of Agriculture Resources Key Laboratory, Xiaogan University, Xiaogan 432000, China;

2. School of Fisheries and Aqua Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 200090, China

Abstract: Genetic diversity of *Pteroceltis tatarinowii* populations in DaGuiSi National Forest Park of Hubei Province was analyzed by using the molecular marker technique of inter simple sequence repeat (ISSR). ISSR amplification was conducted with 11 primers, and fragments from 200 to 3000 bp for 64 individuals were amplified from 6 populations. 165 polymorphic loci were detected from total 179 loci, and the percentage of polymorphic loci (P) was 92.14%. The Nei's genetic diversity and Shannon's information index of *P. tatarinowii* were 0.273 and 0.423 at species level, 0.225 and 0.343 at population level, respectively, which showed relatively high genetic diversity of *P. tatarinowii*. The genetic differentiation coefficient (GST) among six populations was 0.192, which indicated comparatively large genetic differentiation among *P. tatarinowii* populations. UPGMA cluster demonstrated that hereditary distances among different populations were certainly correlated with altitudes. The nearer the altitudes between two populations were, the smaller the value of hereditary distance between them was. Divergent habitats at different altitudes may be the main reason of genetic differentiation among *P. tatarinowii* populations.

Key words: *Pteroceltis tatarinowii*, ISSR marker, Genetic diversity, Daguisi National Forest Park