

doi:10.11707/j.1001-7488.20220408

RAD-seq 技术研究鹅掌楸属种源遗传多样性和遗传结构*

潘文婷 孙建军 原勤勤 张利利 邓康桥 厉月桥

(中国林业科学研究院亚热带林业实验中心 分宜 336600)

摘要: 【目的】揭示鹅掌楸属遗传结构和地理变异特点,为鹅掌楸属遗传资源的保存、利用及改良提供依据。【方法】以 9 个鹅掌楸种源 97 份样本和 4 个北美鹅掌楸种源 46 份样本为材料,采用 RAD-seq 测序鉴定各样本 SNP 标记,计算观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、核苷酸多样性(π)和基因分化系数(G_{st})等遗传统计量指标,分析鹅掌楸属种源遗传多样性和遗传结构。【结果】在 143 份鹅掌楸属样本中共鉴定出 4 454 个高质量的 SNP 标记;鹅掌楸种源之间存在较大的遗传分化以及中水平的基因流($G_{st} = 0.2419$, $N_m = 0.8051$),北美鹅掌楸种源之间存在很大的遗传分化以及低水平的基因流($G_{st} = 0.3886 > 0.25$, $N_m = 0.3970$);通过结构分析将 13 个鹅掌楸属种源分为 3 个类群,其中 9 个中国的鹅掌楸种源被分为东部种源群(即类群 2)和西部种源群(即类群 1),类群 3 均为北美鹅掌楸,遗传多样性顺序为:类群 3 > 类群 1 > 类群 2。【结论】鹅掌楸属遗传结构的形成与其地理隔离和片段化分布有关,且存在由于小群体效应和片段化影响导致的濒危现象,本研究开发的 SNP 标记可为鹅掌楸属分子鉴定、种质创新及种质资源收集与保存提供参考。

关键词: 鹅掌楸属; RAD 测序; 遗传多样性; 遗传结构

中图分类号: S722.3+4; S718.46 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-7488(2022)04-0074-08

Analysis of Genetic Diversity and Structure in Different Provenances of *Liriodendron* by RAD-seq Technique

Pan Wenting Sun Jianjun Yuan Qinqin Zhang Lili Deng Kangqiao Li Yueqiao

(Subtropical Experimental Center, CAF Fenyi 336600)

Abstract: 【Objective】 This study aims to reveal the genetic structure and geographic variation characteristics of *Liriodendron* populations, in order to provide a basis for the conservation, utilization and improvement of genetic resources of *Liriodendron*. 【Method】 A total of 97 samples derived from 9 provenances of *Liriodendron chinensis* and 46 samples derived from 4 provenances of *L. tulipifera* were collected. The SNP markers of the samples were identified by RAD-Seq sequencing. The observed heterozygosity (H_o), expected heterozygosity (H_e), nucleotide diversity (π), gene differential coefficient (G_{st}) and other genetic statistics were calculated to analyze the genetic diversity and genetic structure of *Liriodendron* provenances. 【Result】 A total of 4 454 high quality SNP markers were identified in the 143 samples of *Liriodendron*. There were *Liriodendron* maintained moderate genetic differentiation and medium level gene flow among provenances of *L. chinensis* ($G_{st} = 0.2419$, $N_m = 0.8051$). There were large genetic differentiation and low level gene flow among *L. tulipifera* provenances ($G_{st} = 0.3886 > 0.25$, $N_m = 0.3970$). The 13 *Liriodendron* provenances were divided into 3 subgroups by population structure analysis. Among them, 9 provenances of *L. chinensis* were divided into eastern provenances (group 2) and western provenances (group 1), and the other provenances belonged to group 3 and they are all *L. tulipifera*. The order of genetic diversity was: group 3 > group 1 > group 2. 【Conclusion】 The formation of genetic structure of *Liriodendron* is related to its geographical isolation and fragmented distribution, and there are endangered phenomena caused by small population effect and fragmentation. The SNP markers developed in this study can provide a reference basis for molecular identification, germplasm innovation and collection and preservation of germplasm resources of *Liriodendron*.

Key words: *Liriodendron*; RAD-seq; genetic diversity; genetic structure

收稿日期: 2021-04-16; 修回日期: 2021-11-14。

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2016QA015)。

* 厉月桥为通讯作者。

木兰科 (Magnoliaceae) 鹅掌楸属 (*Liriodendron*) 为落叶大乔木, 叶大形似马褂, 故又称之为“马褂木”, 欧洲人称其为“郁金香树”, 是珍贵用材和优良观赏树种。现仅存两个种, 即北美鹅掌楸 (*Liriodendron tulipifera*) 和鹅掌楸 (*Liriodendron chinense*), 为孑遗树种, 前者生长于美国东部及加拿大南部的阔叶林中, 从平原到山区呈连续分布, 遗传资源十分丰富; 后者大多零星分布于我国长江流域以南的亚热带中、低山区, 常混生于常绿或落叶阔叶林中 (郝日明等, 1995), 虽分布范围较大且遗传多样性良好, 但因种群数量稀少, 种群片段化严重, 天然更新不良, 处于濒危状态, 已被列入我国二级珍稀濒危保护植物 (王章荣, 2005)。鹅掌楸属中的这两个种是典型的东亚-北美间断分布“种对” (Vicariad Species Pairs) (Parks *et al.*, 1990), 是植物群体遗传学和分子系统发育地理学的理想材料 (李康琴, 2013)。

随分子标记研究方法的增多, 对鹅掌楸分子育种研究也逐渐完善, 王晓阳等 (2011) 利用 SSR 技术研究鹅掌楸苗期生长杂种优势; 李康琴 (2013) 基于 SSR 技术对鹅掌楸属进行群体遗传结构及分子系统地理学研究; 罗群凤等 (2015) 采用同源克隆和 RACE 技术克隆北美鹅掌楸的查尔酮合成酶基因 (LiCHS), 并对其进行生物信息学及组织表达进行了分析; 祁荔 (2017) 利用 AFLP 及 SSR 分子标记构建鹅掌楸遗传图谱及重要性状 QTL 初步定位。近年来基于全基因组酶切位点相关的简化基因组测序基础上发展出来了二代测序技术 RAD-seq (Restriction-site associated DNA sequencing), 该技术由 Miller 等 (2007) 提出, 主要利用酶切、序列捕获降低基因组复杂度从而获得部分基因组序列信息 (Wang *et al.*, 2017; Jérémy *et al.*, 2020), 作为一种快速有效的手段, 实现大规模的分子标记开发, 既节约成本又节省时间, 已成功应用于 SNP 标记的开发、动植物重要经济性状的 QTL 定位、生物进化等研究领域 (Feng *et al.*, 2020; Li *et al.*, 2020)。陆叶等 (2019) 利用 RRAD-seq 技术开展了鹅掌楸基因组 SNP 标记开发, 最终获得 3 501 个候选 SNP 标记; Sheng 等 (2021) 利用 RAD-seq 技术分析了鹅掌楸 Myb 基因家族的表征及其在非生物胁迫应答中的作用, 可见 RAD-seq 技术能提供更多 SNP 标记, 有效补充了鹅掌楸遗传信息较少这一问题, 但有关鹅掌楸属群体遗传结构和遗传分化的研究较少。

开展群体结构和遗传分化的研究能精准评估遗

传多样性和制定科学有效的种质资源保护策略, 李云飞等 (2019) 采用 RAD-seq 技术开发了 85 种杜鹃花属植物的高质量 SNP 位点, 通过高通量测序探讨分类, 在亚属水平的分类取得很好的效果。黄承玲等 (2021) 采用 RAD-seq 技术对 34 种杜鹃花属 (*Rhododendron*) 植物进行分类, 证实了 RAD-seq 技术在复杂植物类群的物种分类方面比传统分子标记具有明显优势。本研究利用 RAD-seq 测序技术, 以 9 个中国鹅掌楸和 4 个北美鹅掌楸种源为研究材料, 通过高通量测序, 对 13 个鹅掌楸属种源 143 份样本进行了遗传多样性、遗传变异、遗传分化以及群体基因交流等分析, 揭示鹅掌楸属各种源亲缘关系, 以为鹅掌楸属分子鉴定、种质创新及种质资源收集与保存提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料共有 13 个鹅掌楸属种源, 其中 9 个来自中国 7 个省, 另外 4 个来自美国, 相关种源地理信息详见表 1。所有种源种植在中国林业科学研究院亚热带林业实验中心年珠实验林场鹅掌楸种源试验林中。分别于 2016 年 10 月和 2017 年 5 月进行采样, 每个种源随机采取 10~14 株树, 每株树取 5~6 片叶, 共采集了 143 份鹅掌楸属样本, 其中有 97 个样本采自 9 个中国鹅掌楸种源, 还有 46 个样本采自 4 个北美鹅掌楸种源。样本用自封袋装好并倒入硅胶干燥、保存。

1.2 基因组 DNA 的制备

全部 143 份鹅掌楸属样本的基因组 DNA 采用改良的 CTAB 法 (Liu *et al.*, 2008) 提取, 用 1.0% 琼脂糖凝胶检测 DNA 质量。

1.3 酶切建库

利用 RAD-seq 技术对 143 份鹅掌楸属样本的基因组 DNA 进行简化测序。采用限制性内切酶 *Ava*II 与 *Msp*I 酶切组合对全基因组 DNA 完全酶切 (Peterson *et al.*, 2012), (插入片段范围: 500~600 bp, 将酶切产物进行 5' 末端修复, 同时对 5' 末端进行磷酸化修饰, 3' 末端加 A, 使之与接头 5' 端 T 互补, 提高接头连接效率, 阻止接头自连。然后连接测序接头, 将连接产物锚定在 flowcell 上, 进行桥式扩增。用琼脂糖凝胶电泳进行片段大小选择, 通过 PCR 扩增, 增大文库量, 建好的文库用 Illumina HiSeq X10 进行测序。

表 1 各参试种源地理信息及参试数量

Tab. 1 Geographic information and sample number of 13 provenances in the experiment

种源 Provenance	种源地 Provenance region	北纬 Latitude	东经 Longitude	海拔 Elevation/m	样品数 Number of samples
XY	四川叙永 Sichuang Xuyong	28. 20°N	105. 5°E	700~900	10
EX	湖北鄂西 Hubei Exi	30. 30°N	109. 0°E	1 100~1 300	11
MN	贵州陌南 Guizhou Monan	26. 80°N	109. 5°E	950~1 150	11
LY	湖南浏阳 Hunan Liuyang	28. 05°N	113. 9°E	1 000~1 200	11
SZ	湖南桑植 Hunan Sangzhi	29. 15°N	110. 2°E	1 100~1 300	11
LS	江西庐山 Jiangxi Lushan	29. 53°N	116. 0°E	1 000~1 200	10
WYS	江西武夷山 Jiangxi Wuyishan	27. 92°N	117. 8°E	900~1 100	10
MSL	密苏里州 Missouri	37. 60°N	91. 5°W	600~800	11
LYS	路易斯安纳州 Louisiana	31. 00°N	93. 6°W	0~100	10
BK	北卡罗来纳州 North Carolina	35. 13°N	80. 1°W	1 000~1 200	12
NK	南卡罗来纳州 South Carolina	34. 50°N	81. 8°W	100~300	14
YN	云南勐腊 Yunnan Mengla	21. 40°N	101. 6°E	600~800	11
DBS	大别山舒城 Dabieshan Shucheng	31. 13°N	118. 2°E	1 350~1 550	11

1.4 统计分析

对原始数据进行识别、过滤、质量评估,再进行单样本测序数据的 RAD 标记开发、样本群体的 RAD 标记开发、多态性标记 SNPs 开发等,最后开展群体多样性分析,包括进化树构建及群体结构分析等。

主要通过 Stacks 软件 (<http://creskolab.uoregon.edu/stacks/>) (Catchen *et al.*, 2013) 进行 RAD 标记开发。基因组经酶切处理打断为多个小片段,每个片段相当于一个标记位点,同一位点的序列通过相似性聚类,形成一个 Stack。每个 Stack 中存在数条高深度片段,其余全为低深度片段。高深度片段即为潜在基因型,低深度片段可能由于测序错误导致。

采用 Mega5.1 软件 (<http://www.atgc-montpellier.fr/phyml/>) (Tamura *et al.*, 2011) 中的 Upgma 算法和 Neighbour-joining 分别构建 13 个种源的关系树和 143 份样本的进化树。通过 Admixture 软件 (Alexander *et al.*, 2009) 对 143 份样本的群体结构进行聚类分析,该软件运算速度快,创建 Plink (<http://pngu.mgh.harvard.edu/~purcell/plink/>) 的

输入文件,用 Plink 进行 SNP 过滤,将样品的分群数 (K 值) 设定为 1-6 进行聚类,根据 CV error 最小值确定分群数。

使用 POPGENE 1.32 软件 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>) (Yeh *et al.*, 2000) 计算观察杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、核苷酸多样性 (π) 和基因分化系数 (G_{st}) 等主要遗传结构的度量参数。

2 结果与分析

2.1 RAD-seq 测序及质量评估

本研究通过 RAD-seq 测序技术,完成 13 个鹅掌楸属种源的 143 份样本的测序,总碱基数为 396.95 Gb,样本平均获取的碱基数为 2.76 Gb;测得有效数据为 1 323.17 Mb,样本平均获取的有效数据为 9.21 Mb;共开发 RAD 标签 2 611 618 个,样本的平均标签数为 141 222 个,平均测序深度为 25.02 x (表 2)。所测序列 GC 含量较低 (平均值为 26.51%),Q30 数据较高 (平均值为 95.07%),表明错误率低,测序结果可靠。通过对样本间进行多态性分析,共得到高质量的 SNP 位点 4 454 个。

表 2 RAD-seq 测序数据统计

Tab. 2 Statistics of RAD-seq sequencing data of 13 provenances

种源 Provenance	总碱基数 Total nucleotides (Gb)	有效数据 Clean reads (Mb)	RAD 标记数 RAD tag	测序深度 Sequencing depth (x)
XY	1.77	5.90	129 420	16.29
EX	2.46	8.19	140 080	20.19
MN	4.20	14.01	155 030	34.20
LY	1.94	6.46	147 270	17.77
SZ	1.41	4.70	157 950	13.70
LS	4.37	14.57	156 650	35.74
WYS	2.71	9.02	128 700	25.34
MSL	3.89	12.97	136 120	39.76
LYS	3.75	12.50	139 340	34.95
BK	1.99	6.62	140 020	19.14
NK	3.14	10.48	128 720	29.78
YN	2.15	7.16	127 330	19.47
DBS	2.16	7.20	149 230	18.97
均值 Mean	2.76	9.20	142 130	24.76

2.2 种源遗传多样性统计

对 13 个鹅掌楸属种源的遗传多样性相关参数进行统计(表 3),结果表明, H_o 为 0.013 2~0.049 6,均值为 0.037 9; H_e 为 0.022 2~0.059 7,均值为 0.047 7; π 为 0.023 6~0.064 0,均值为 0.050 6。

采用隶属函数法(彭松等, 2014)对 H_o 、 H_e 和 π 进行综合评价(表 4),其中遗传多样性排前三位的种源依次为 EX, NK 和 BK, DBS 种源的遗传多样性最低。

表 3 各种源遗传结构参数统计

Tab. 3 Statistics of genetic structure in different provenances

种源 Provenance	等位基因数 Allele number	H_o Observed heterozygosity	H_e Expected heterozygosity	π Nucleotide diversity	G_{st} Gene differential coefficient	N_m Gene flow
XY	4 334	0.035 2	0.059 7	0.064 0	0.211 2	0.933 8
EX	5 573	0.049 6	0.058 1	0.061 7	0.196 8	1.020 3
MN	3 834	0.039 5	0.047 2	0.049 9	0.243 0	0.778 8
LY	2 934	0.036 4	0.049 9	0.053 0	0.237 8	0.801 3
SZ	4 212	0.036 9	0.052 0	0.055 5	0.213 1	0.923 4
LS	855	0.044 8	0.045 9	0.048 9	0.235 4	0.812 2
WYS	758	0.038 9	0.044 8	0.047 3	0.234 9	0.814 4
MSL	1 113	0.038 6	0.038 4	0.040 6	0.439 8	0.318 4
LYS	2 726	0.043 8	0.055 1	0.058 8	0.385 5	0.398 5
BK	2 017	0.044 2	0.058 1	0.061 6	0.367 9	0.429 5
NK	3 309	0.047 1	0.058 8	0.061 6	0.361 5	0.441 6
YN	2 604	0.013 2	0.029 9	0.031 6	0.280 2	0.642 2
DBS	1 245	0.024 4	0.022 2	0.023 6	0.324 8	0.519 8
均值 Mean	2 732	0.037 9	0.047 7	0.050 6	0.287 1	0.679 6

表 4 13 个鹅掌楸属种源遗传多样性各指标的隶属函数值

Tab. 4 Subordinative function values of genetic diversity parameters among 13 provenances in *Liriodendron*

参数 parameters	XY	EX	MN	LY	SZ	LS	WYS	MSL	LYS	BK	NK	YN	DBS
H_o 得分 H_o score	0.60	1.00	0.72	0.64	0.65	0.87	0.71	0.70	0.84	0.85	0.93	0.00	0.31
H_e 得分 H_e score	1.00	0.96	0.67	0.74	0.79	0.63	0.60	0.43	0.88	0.96	0.98	0.21	0.00
π 得分 π score	1.00	0.94	0.65	0.73	0.79	0.63	0.59	0.42	0.87	0.94	0.94	0.20	0.00
综合得分 Comprehensive score	2.60	2.90	2.04	2.10	2.24	2.13	1.90	1.55	2.59	2.75	2.85	0.40	0.31

2.3 遗传结构分析

对 13 个鹅掌楸属种源的 G_{st} 和 N_m 数据(表 3) 进行分析,结果表明 G_{st} 从 0.196 8 到 0.439 8,鹅掌楸种源之间存在较大的遗传分化($G_{st} = 0.241 9$) 以及中等的基因流($N_m = 0.805 1$,其中种源 EX 的 $N_m > 1$),北美鹅掌楸种源之间存在很大的的遗传分化 ($G_{st} = 0.388 6 > 0.25$) 以及低水平的基因流 ($N_m = 0.397 0$),表明北美鹅掌楸遗传变异主要存在于种源间。

基于筛选的有效 SNP,通过 Mega5.1 软件中的 Upgma 算法和 Neighbour-joining 分别构建 13 个种源的关系树(图 1)和 143 份样本的进化树(图 2),结果显示,13 个鹅掌楸属种源被分为 3 个类群,其中 XY、YN、EX、SZ 和 MN 5 个种源为一个类群; LY、DBS、LS 和 WYS 4 个种源为一个类群; NK、LYS、MSL 和 BK 4 个种源为一个类群。

通过 Admixture 软件对 143 份样本的群体结构

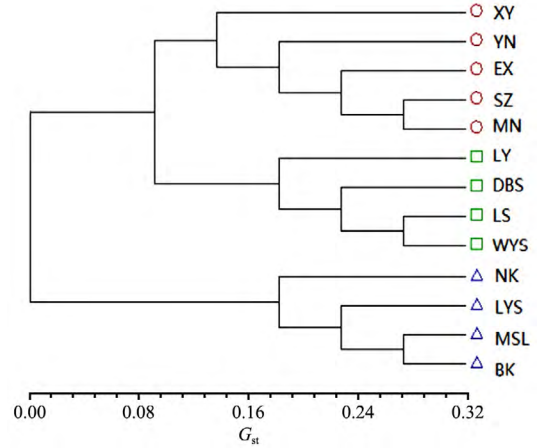


图 1 13 个种源的关系树

Fig. 1 Relation tree of 13 provenances in *Liriodendron*

进行聚类分析,假设样品的分群数(K 值)为 1~6,对应的 CV error 值分别为: 0.465 4,0.178 6,0.142 1,0.153 1,0.163 2,0.168 9(图 3)。其群体结构最

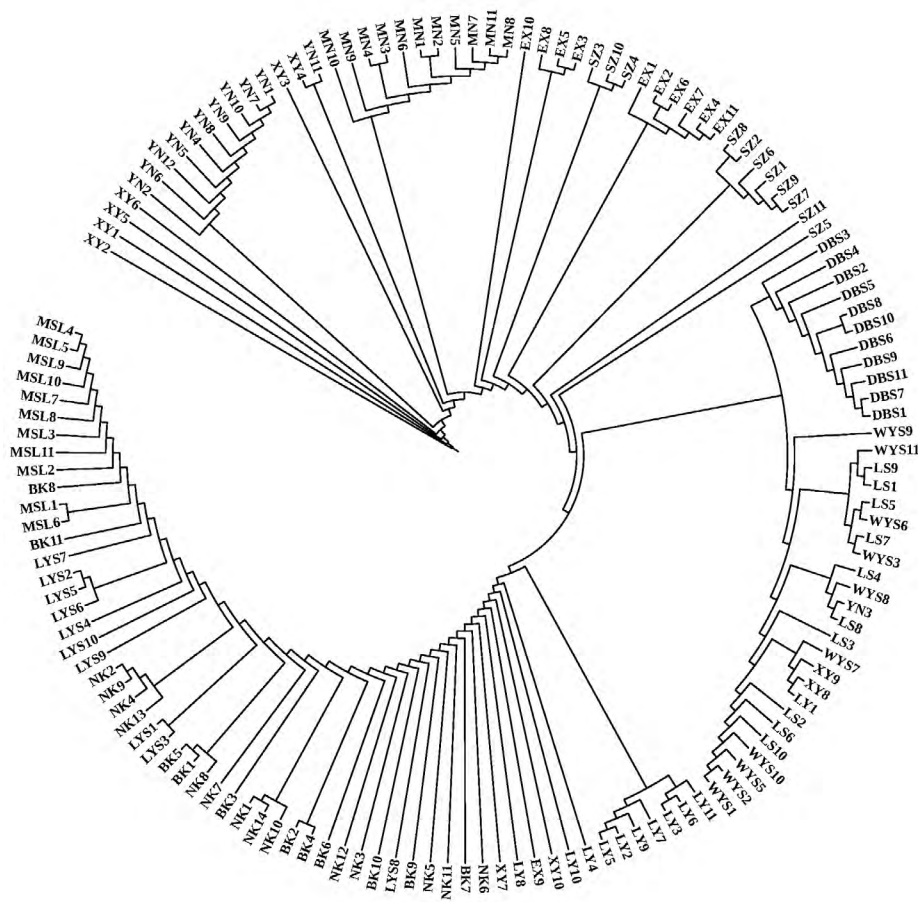


图 2 143 份样本的进化树

Fig. 2 Neighbour-joining phylogram illustrating genetic relationships among 143 individuals

每一个分枝代表一份种质材料,树枝长度代表两个物种间的进化距离,树分支上的数字代表该分支的支持的百分数。Each branch represents one piece of germplasm, and the length of the branch represents the evolutionary distance between two species, the number on a branch of the tree represents the percentage of support for that branch.

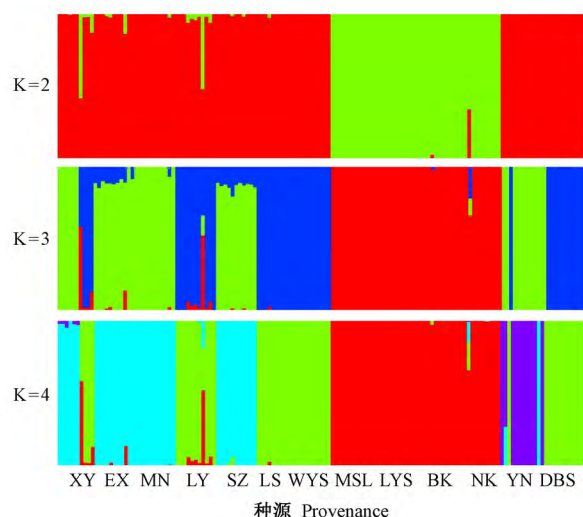


图3 分群数为2~4的聚类图

Fig. 3 Bar plot of 2-4 clusters identified with adegenet R package. 左图图中每种颜色代表一个群体,每列代表一个样品的情况;图中展示了143个样品分群值从2~4的聚类情况。右图中为每个K值对应的CV error值,K为3的时候最小。The picture left shows the clustering of 143 samples with cluster values from 2 to 4 (each color represents a subgroup, Each column represents a sample). The figure on the right shows the CV error value corresponding to each K value (When K is 3, the CV error value is minimal).

优分群数为3,分群的结果与关系树和进化树分析所得结果基本一致。

3 讨论

本研究通过RAD-seq测序技术,完成13个鹅掌楸属种源的143份样品的测序,平均测序深度为 $25.02 \times$,共获得总碱基数396.95 Gb,平均每个样品的碱基数为2.76 Gb,获得高质量SNPs标记4454个。比李云飞等(2019年)获得的3501个SNP标记多,这与本研究有13个种源的研究材料,而李云飞等(2019年)为2个种源有关,但均比以往鹅掌楸的分子标记开发技术获得的候选SNPs数量有显著提高。这些标记进一步增加了鹅掌楸属的基因组资源量,可更准确地界定群体分类,为鹅掌楸属资源的遗传保存、育种及改良应用提供依据(李云飞等,2019;黄承玲等,2021)。

以获得的高质量SNP位点为基础,进一步分析13个鹅掌楸属遗传多样性和遗传结构。遗传多样性排前三位的种源依次为EX, NK和BK, DBS种源的遗传多样性最低。但总体与报道的鹅掌楸遗传多样性数值(李康琴,2013;赵亚琦等,2014)相比较低,可能是由于遗传多样性的估算受样本数量、采样策略及基因分型数据等因素的影响,本研究样本数

量较少,且为种源试验林内采样,因此遗传多样性较低。

对13个鹅掌楸属种源的 G_{st} 和 N_m 数据进行分析,结果表明 G_{st} 从0.1968到0.4398,鹅掌楸种源之间存在较大的遗传分化以及中等的基因流($G_{st} = 0.2419$ 、 $N_m = 0.8051$,其中种源EX的 $N_m > 1$),北美鹅掌楸种源之间存在很大的遗传分化以及低水平的基因流($G_{st} = 0.3886 > 0.25$ 、 $N_m = 0.3970$),表明鹅掌楸属遗传分化变异主要存在于种源间;EX种源的 N_m 值大于1,表明基因流可以防止由遗传漂变引起的群体间的遗传分化,但各种源间 N_m 均值只有0.6796;且多数种源 H_o 小于期望杂合度 H_e 。群体间的高度分化的根源在于由生境片段化而引起的遗传漂变和群体间低水平的基因流(Zaouali *et al.*, 2012),可见鹅掌楸属存在由小群体效应和片段化影响导致的濒危现象,该结论与李康琴(2013)的研究的结果一致。

通过对13个鹅掌楸属种源的143份样本进行聚类分析和群体结构分析,可将13个鹅掌楸属种源分为3个类群,其中XY、YN、EX、SZ和MN5个种源为类群1;LY、DBS、LS和WYS4个种源为类群2;NK、LYS、MSL和BK4个种源为类群3。经过分析可见类群1和类群2分别处在中国西部和东部,该结论进一步验证了朱晓琴等(1995)和李康琴(2013)的研究结果,可见鹅掌楸属遗传结构的形成与其地理隔离和片段化分布有关。中国东部种源群(类群2)较中国西部种源群(类群1)遗传多样性高($H_o: 0.0361 > 0.0349$),但均低于北美鹅掌楸(类群3)遗传多样性,该结论与李康琴(2013)的结论一致。进化树和聚类图均显示3个类群间出现了少数的个体混杂现象,表明群体间有基因交流的现象,因此,利用这些材料进行杂交育种时,既要考虑其亲缘关系也要注意他们的遗传结构。

4 结论

采用RAD-seq技术对鹅掌楸属13个种源143份样本进行测序,获得了高质量SNP位点,进而分析鹅掌楸属遗传多样性、群体结构分析及进化树的构建,鹅掌楸属13个种源被分为3个类群,其中北美鹅掌楸和鹅掌楸可显著区分、中国东部鹅掌楸和西部鹅掌楸的差异也很显著。本研究结果表明高效的RAD-seq技术获得的大量SNP位点可应用于鹅掌楸属物种的区分,进一步证实了鹅掌楸属遗传结构的形成与其地理隔离和片段化分布有关,且存在由于小群体效应和片段化影响导致的濒危现象;同

时这些 SNP 标记可进一步用于鹅掌楸属 QTL 定位、遗传连锁图谱、分子辅助育种等研究,进而为鹅掌楸属的遗传演化研究提供理论基础,为今后鹅掌楸属种质创新及种质资源收集与保存提供参考依据。

参 考 文 献

- 郝日明,贺善安,汤诗杰,等. 1995. 鹅掌楸在中国的自然分布及其特点. 植物资源与环境, 4(1): 1-6.
- (Hao R M, He S A, Tang S J, *et al.* 1995. Geographical distribution of *Liriodendron chinense* in China and its significance. *Plant Resources and Environment*, 4(1): 1-6. [in Chinese])
- 黄承玲,姚刚,田晓玲,等. 2021. 基于 RAD 高通量测序的贵州百里杜鹃保护区杜鹃花属分类. 林业科学, 57(2): 72-81.
- (Huang C L, Yao G, Tian X L, *et al.* 2021. Phylogenomic analysis of rhododendron species in Guizhou Baili rhododendron reserve based on RAD sequencing. *Scientia Silvae Sinicae*, 57(2): 72-81. [in Chinese])
- 李康琴. 2013. 鹅掌楸属群体遗传结构及分子系统地理学研究. 南京: 南京林业大学.
- (Li K Q. 2013. Studies on population genetics and molecular phylogeography of *Liriodendron*. Nanjing: Nanjing Forestry University. [in Chinese])
- 李云飞,李世明,金鑫,等. 2019. 基于 RAD 高通量测序探讨中国 85 种杜鹃花属植物的分类. 林业科学研究, 32(3): 1-8.
- (Li Y F, Li S M, Jin X, *et al.* 2019. Phylogenomic analysis of 85 rhododendron species in China based on RAD sequencing. *Forest Research*, 32(3): 1-8. [in Chinese])
- 陆叶,龙晓飞,王鹏凯,等. 2019. 基于 RAD-seq 技术的鹅掌楸基因组 SNP 标记开发. 南京林业大学学报(自然科学版), 43(4): 1-7.
- (Lu Y, Long X F, Wang P K, *et al.* 2019. Development of genomic SNP markers based on RAD-seq and genome data in *Liriodendron*. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 43(4): 1-7. [in Chinese])
- 罗群凤,胥猛,冯源恒,等. 2015. 北美鹅掌楸 *LtCHS* 基因的克隆及生物信息学与组织表达特征分析. 林业科学, 51(5): 37-45.
- (Luo Q F, Xu M, Feng Y H, *et al.* 2015. Cloning and bioinformatics of chalcone synthase gene (*CHS*) in *Liriodendron tulipifera* and characterization of its tissue expression. *Scientia Silvae Sinicae*, 51(5): 37-45. [in Chinese])
- 彭松,马森,郑勇奇,等. 2014. 不同种源花楸树幼苗越冬能力的比较. 生态学杂志, 33(2): 321-327.
- (Peng S, Ma M, Zheng Y Q, *et al.* 2014. Comparison in thermotolerance over summer of seedlings among different provenances of *Sorbus pohuashanensis* (Hance) Hedl. *Chinese Journal of Ecology*, 33(2): 321-327. [in Chinese])
- 祁荔. 2017. 鹅掌楸遗传图谱构建及重要性状 QTL 初步定位. 南京: 南京林业大学.
- (Qi L. 2017. Genetic linkage map construction and QTL mapping of *Liriodendron*. Nanjing: Nanjing Forestry University. [in Chinese])
- 王晓阳,李火根. 2011. 鹅掌楸苗期生长杂种优势的 SSR 分析. 林业科学, 47(4): 57-62.
- (Wang X Y, Li H G. 2011. Possible mechanism analysis for heterosis of hybrid *Liriodendron* based on seedling growth and SSR markers. *Scientia Silvae Sinicae*, 47(4): 57-62. [in Chinese])
- 王章荣. 2005. 鹅掌楸属树种杂交育种与利用. 北京: 中国林业出版社.
- (Wang Z R. 2005. With the use of *Liriodendron* hybrids breeding. Beijing: China Forestry Publishing House. [in Chinese])
- 赵亚琦,成铁龙,施季森,等. 2014. 鹅掌楸属 SRAP 分子标记体系优化及遗传多样性分析. 林业科学, 50(7): 37-43.
- (Zhao Y Q, Cheng T L, Shi J S, *et al.* 2014. Optimization of a SRAP-PCR system for analysis of genetic diversity of *Liriodendron*. *Scientia Silvae Sinicae*, 50(7): 37-43. [in Chinese])
- 朱晓琴,马建霞,姚青菊,等. 1995. 鹅掌楸遗传多样性的等位酶论证. 植物资源与环境, 4(3): 9-14.
- (Zhu X Q, Ma J X, Yao Q J, *et al.* 1995. Allozyme verification on the population of *Liriodendron chinense*. *Plant Resources and Environment*, 4(3): 9-14. [in Chinese])
- Catchen J, Hohenlohe P, Bassham S, *et al.* 2013. Stacks: an analysis tool set for population genomics. *Molecular Ecology*, 22(11): 3124-3140.
- Feng J Y, Zhao S, Li M, *et al.* 2020. Genome-wide genetic diversity detection and population structure analysis in sweet potato (*Ipomoea batatas*) using RAD-seq. *Genomics*, 112(2): 1978-1987.
- Jérémy G, Charlotte M, Tomasz S, *et al.* 2020. Disco Snp-RAD: de novo detection of small variants for RAD-Seq population genomics. *PeerJ*, 8(2): e9291.
- Lexander D H, Novembre J, Lange K. 2009. Fast model-based estimation of ancestry in unrelated individual. *Genome Research*, 19(9): 1655-1664.
- Li Z B, Hua Z T, Dong L, *et al.* 2020. Quantitative trait locus mapping for yield-associated agronomic traits in a BC2F6 population of Japonica hybrid rice Liaoyou 5218. *Journal of Plant Growth Regulation*, 39(1): 60-71.
- Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, *et al.* 2008. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers. *Scientia Horticulturae*, 116(3): 240-247.
- Miller M R, Dunham J P, Amores A, *et al.* 2007. Rapid and cost-effective polymorphism identification and genotyping using restriction site associated DNA (RAD) markers. *Genome Research*, 17(2): 240-248.
- Parks C R, Wendel J F. 1990. Molecular divergence between Asian and North American species of *Liriodendron* (Magnoliaceae) with implications for interpretation of fossil floras. *American Journal of Botany*, 77(10): 1243-1256.
- Peterson B K, Weber J N, Kay E H, *et al.* 2012. Double digest RADseq: an inexpensive method for de novo SNP discovery and genotyping in model and non-model species. *PLoS One*, 7(5): e37135.
- Sheng Y, Hao Z D, Peng Y, *et al.* 2021. Morphological, phenological, and transcriptional analyses provide insight into the diverse flowering traits of a mutant of the relic woody plant *Liriodendron chinense*.

- Horticulture Research, 8(1): 174.
- Tamura K, Peterson D, Peterson N, *et al.* 2011. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10): 2731–2739.
- Wang Y, Shahid M Q, Lin S, *et al.* 2017. Footprints of domestication revealed by RAD-tag resequencing in loquat: SNP data reveals a non-significant domestication bottle neck and a single domestication event. *BMC Genomics*, 18(1): 354.
- Yeh F C, Yang R C. 2000. Popgene version 1. 32. <http://www.ualberta.ca/~fyeh/download.htm>.
- Zaouali Y, Chograni H, Trimech R, *et al.* 2012. Genetic diversity and population structure among *Rosmarinus officinalis* L. (Lamiaceae) varieties: var. *typicus* Batt. and var. *troglodytorum* Maire. based on multiple traits. *Industrial Crops and Products*, 38: 166–176.

(责任编辑 万贤崇)