

doi:10.16779/j.cnki.1003-5508.2019.01.018

桤木属植物遗传变异研究进展

王泽亮, 李佳蔓, 黄 振, 杨汉波, 陈 炙, 刑文曦, 郭洪英*

(四川省林业科学研究院, 四川 成都 610081)

摘要:桤木属为非豆科固氮树种,能改良土壤,适应性强,具有重要的生态价值。本文概述了桤木属植物在系统发育、染色体、同工酶与 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 分子标记水平上的、包括亚属分类、倍性问题、不同桤木种的群体遗传多样性、遗传结构以及系统地理学等方面的研究进展,并探讨了现有研究中的存在问题,以期为桤木属植物进一步的遗传改良提供参考。

关键词:桤木属;遗传变异;遗传改良;分子标记;简单序列重复

中图分类号:S792.14 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5508(2019)01-0081-06

Research Progress on Genetic Variation of *Alnus*

WANG Ze-liang LI Jia-man HUANG Zhen YANG Han-bo

CHEN Zhi XING Wen-xi GUO Hong-ying*

(Sichuan Academy of Forestry, Chengdu 610081, Sichuan, China)

Abstract: As nitrogen fixation trees of non-Leguminosae, *Alnus* was becoming an ecologically valuable genus of plants for its ability in soil improvement and adaptation. In this paper, the research progress was reviewed and discussed on phylogeny and genetic variation on the level of chromosome, isozymes, RFLP, RAPD, AFLP and SSR in *Alnus*, including subgenus taxon, cytology, population genetic diversity and structure, phylogeography, and so on, with the expectation to provide references to genetic improvement of *Alnus* in future.

Key words: *Alnus* Mill., Genetic variation, Genetic improvement, Molecular marker, SSR

桤木属(*Alnus* Mill.)为非豆科固氮树种,根系富含根瘤,能改良土壤,是重要的先锋造林与生态功能树种。桤木属是现存桦木科植物中最原始的属,也是北半球新生代植物区系的重要植物类群,主要分布在欧亚和北美,少见于拉丁美洲与非洲,中国有11种^[1~2]。四川省及邻近地区是桤木的一个重要分布区,原生分布有四川桤木、川滇桤木、毛桤木、蒙自桤木,被认为可能是桤木属植物起源与分化的中心^[1],此外,台湾桤木在本地区有一定范围的引种推广。在这一地区,四川桤木(*Alnus cremastogyne*

Burk.)是我国最重要的一个特有种,也是目前国内研究最广泛的一个种,其适应性强、童期短且结实量大、生长迅速,目前适生栽培区域已扩大至长江中下游地区,是我国长江流域退耕还林工程、生态建设工程和混交造林的重要树种。

目前,国内桤木属遗传改良研究主要集中于常规育种方面,对其群体遗传多样性与遗传结构研究较少,影响了其保护与进一步的推广利用。本文系统介绍了国内外桤木属植物在系统发育、染色体、同工酶与DNA分子标记水平上,特别是基于SSR分

收稿日期:2018-10-29

基金项目:四川省科技计划项目(2017JY0278);四川省公益性科研院所基本科研业务费项目(JB2016-04)

作者简介:王泽亮(1978-),男,副研究员,博士,从事桤木、榛子遗传改良,e-mail:wzl-020304@163.com。

*通讯作者:郭洪英(1973-),女,研究员,硕士,研究方向桤木、桉树遗传改良,e-mail:ghy0607@163.com。

子标记水平的遗传变异研究现状, 以期为桤木属特别是国内区域桤木遗传改良提供参考。

1 桤木属植物系统发育研究

从形态学、解剖学、植物地理学等方面的证据来看, 桤木属植物是桦木科中最为原始的类群^[3]。在桤木属内的分类上, 基于表型性状、古生物学数据等资料, 匡可任等将我国现有种分为桤木组和单序组两大类^[2]。Furlow 则把桤木属植物分为桦桤组、蒙自桤木组和桤木组 3 个分支类群^[4]。而陈之端根据桤木的生态表型性状将其分为四组即桦桤组、蒙自桤木组、桤木组和单序组, 并认为蒙自桤木组是最原始的, 桤木组是现存的最繁盛的组, 单序组是在多变气候下独立发展成的一个分支、仅在西南地区保存下来的一个残遗类群, 桦桤组是桤木属中最进化的^[1]。

随着分子生物学技术的发展, DNA 序列信息也逐渐用于桤木属内的分类上, 如 Savard 等利用 *rbcl*、18s rRNA 以及核糖体 DNA ITS (Internal transcribed spacer, 内转录间隔区) 序列, 研究了桤木属与桦木属属内的系统发育关系, 分析显示桤木属与桦木属都是单系(支)分布, 而且同化石数据一致, 桤木属与桦木属都显示了较近的分化历史^[5]。2004 年, Chen 与 Li 测序分析了 32 份桤木材料的 ITS 序列, 认为其可分为 3 个亚属 (*Alnobetula*, *Clethropsis* 与 *Alnus*)^[6]。在最新的研究中, Gryta 等通过 Genome skimming 策略装配质体基因组与核糖体 DNA 簇方法研究了桤木属植物系统发育, 结果同 Chen 与 Li 类似也分为 3 个亚属, 而且 *Alnobetula* 亚属最早分化形成单支, 但是 *Clethropsis* 亚属并没有形成一个单支, 而是整体位于 *Alnus* 亚属内^[7]。因此, 桤木属亚属或组的分类, 除了利用多种分子生物学数据, 还需要充分利用其生态表型性状数据。

桤木属除了分类, 其起源与进化历史也一直是相关研究的热点。Murai 曾提出桤木属植物起源于日本^[8], 任保清与刘军等根据核型数据与细胞学资料也认为桤木属植物起源于东亚日本^[9~10]。而 Furlow 认为桤木属植物起源于亚洲的温带地区^[4], 陈之端根据生态表型性状与现代地理分布的分析, 认为桤木属植物可能起源于东亚具有周期性干旱的亚热带地区, 以四川为中心的中国中部地区是其起源和早期分化的中心, 起源之后向东、向西散布, 并分别通过白令陆桥和大西洋北极陆桥到达北美^[1]。

目前, 关于桤木属起源中心与进化历史尚未有明确的研究结论, 具体起源于哪个地区需要根据分子生物学数据与进一步发掘的化石数据来确认。

2 桤木属遗传变异研究

桤木属植物群体遗传变异研究主要在染色体、同工酶与 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 分子水平开展得较多, 这些研究为桤木资源的保护与育种利用提供了参考。

2.1 染色体

在染色体水平上, 任保青与刘军首次对桤木属自然分布于中国西南地区的川滇桤木、四川桤木、蒙自桤木、毛桤木进行了细胞学研究, 结果显示染色体数目均为 $2n = 56$, 其中川滇桤木的核型属于 2A 型, 其余均为 2B 型^[10]。随后, 饶龙兵等与杨汉波等分别研究明确了灰桤木 (*A. incana*)、欧洲桤木 (*A. glutinosa*)、意大利桤木 (*A. cordata*)、绿桤木 (*A. viridis*) 等 12 个桤木种的染色体数与核型结构^[11~12]。

此外, 洪德元认为桤木属的染色体基数为 $x = 14$ ^[13], 而在 Murai 报道中 $x = 7$, 且唯一的二倍体是日本南部的 *A. inokumae*^[8]。但在 Mandák 等^[14]与 Lepais 等的研究中认为欧洲桤木在北非与欧洲存在四倍体群体, 其研究中染色体基数使用 $x = 14$ 。染色体计数基数会影响分子数据分析结果, 特别是对于通过共显性标记获得的数据, 因此桤木属染色体计数基数究竟是 $x = 14$ 还是 $x = 7$, 以及欧洲桤木、川滇桤木、四川桤木、蒙自桤木、毛桤木等 (染色体数目为 56) 是否是二倍化的四倍体还有需要进一步研究确认。

2.2 同工酶

同工酶研究在二十世纪八九十年代开展得较多, 最早是 Bousquet 等于 1987 年在 *A. crispa* 上开展的, 该研究采集了 22 个群体, 筛选了包括 16 个位点的 11 个同工酶, 分析结果显示群体平均期望杂合度为 0.14, 所有群体基本符合哈代-温伯格平衡状态, 异交率为 0.9^[15]。随着采样群体区域的扩大, *A. crispa* 群体仍表现出较低的自交率以及特异亚群体结构的缺失, 群体间与群体内存在高度的基因交流^[16]。在随后对 *A. rugosa* 的研究中, 也发现了类似的结果, 并发现其与 *A. crispa* 的遗传距离为 0.4, 占据不同的生态位^[17]。同工酶技术也被应用于对朝鲜半岛桤木资源、包括 *A. hirsuta* 与 *A. japonica* 的研究, 结果显示前者群体间有广泛的基因交流, 导致群

体分化很小,而后者群体内平均遗传多样性系数为 0.207,高于作为对照的 *A. rugosa* 与 *A. crispa*,同时 $Gst = 0.095$,作者认为群体间有基于种子或花粉的广泛的基因交流,导致群体分化很小^[18-19]。

A. maritima 为美国濒危树种,目前仅存在 3 个不连续分布的群体,同工酶分析结果也被用于为其濒危保护提供遗传背景。如 Gibson 等利用同工酶技术研究了其群体遗传多样性与群体结构,结果显示与广布种 *A. serrulata* 相比,*A. maritima* 的遗传多样性低,而近交系数、遗传变异分化均高于广布种,分析显示 *A. maritima* 高度片段化的分布是由于其自然栖息地的减少,认为对其区域保护来说,可以使用当地群体作为种子库^[20]。

2.3 RFLP、RAPD 与 AFLP

随着分子生物学技术的发展,DNA 分子标记技术也逐渐用于柃木资源的研究。利用 PCR-RFLP 技术,基于对 cpDNA 的分析,King 与 Ferris 研究了欧洲柃木在冰河期后发展历史,发现 13 个高度结构化的 cpDNA 单倍体型,显示喀尔巴阡山脉可能是欧洲柃木的一个避难地,冰河期后逐渐向北欧与中欧发展^[21]。结合 cpDNA PCR-RFLP 与基因组 ISSR 技术,King 与 Ferris 进一步研究了在意大利分布区重叠的意大利柃木与欧洲柃木遗传特征,分析结果显示两种柃木有明显的地理结构特征^[22]。Hantemirova 等利用 cpDNA 的 trnH-psbA、trnS-trnG、psaA-trnS 区域序列对俄罗斯远东地区 *A. alnobetula* 地理分布进行了研究,发现存在高度的群体分化,认为其在进化历史上片段化分布于冰期避难地^[23]。

Huh 与 Huh 利用 AFLP 技术研究了 *A. firma* 的遗传变异,结果发现 58.1% 的 AFLP 标记具有多态性,与 *A. firma* 风媒、远交、伐桩再生特性相一致,98% 的遗传变异存在于群体内^[24]。国内也逐渐有柃木 DNA 分子标记研究的报道,如李洁等对云南省来凤山、高黎贡山、鸡足山、苍山和无量山的蒙自柃木(*A. nepalensis*) 资源进行了 RAPD 分析,结果表明:蒙自柃木遗传多样性丰富,其中鸡足山居群多样性指数最高,作者认为蒙自柃木的分布及遗传结构与环境区域有密切的关系,区域特点是该种遗传多样性水平的重要因子之一^[25]。饶龙兵等构建了柃木属植物的 AFLP 体系,并通过分析柃木属不同倍性的 116 份材料,认为种群间及种群内部均具有较丰富的遗传多样性,且种群间的遗传差异大于种群内部的遗传差异^[26]。随后,利用 AFLP 分子标记结合形态学指标,采用 UPGMA 法进行聚类分析,对柃

木属 17 个种 57 份材料进行了亲缘关系研究及模糊种鉴定,结果显示形态学聚类与 AFLP 聚类结果基本一致,但存在一定的差异^[27],说明柃木属植物遗传背景丰富,种的分类应该综合考虑确认。

2.4 SSR 分子标记

SSR 分子标记具有分布广泛、多态性丰富、稳定、共显性等特点,自从被开发以来,获得了广泛的应用。在柃木属植物 SSR 研究方面,最早的报道见于 2008 年 Zhuk 的研究,其发现 15 个柃木 SSR 引物中的 8 个能从欧洲柃木与灰柃木中扩增到产物^[28]。随后,Lance 等通过 *A. maritima* 富集文库,筛选了 19 条柃木 SSR 引物,并可应用于 *A. maritima* 与 *A. serrulata* 相关研究^[29]。同时,研究发现桦木科植物不同属的部分 SSR 引物也可以用于其他属的 SSR 分析^[30],该特性也被 Mingeot 等的研究证实,后者从欧榛 SSR 引物成功筛选到 9 条引物,可用于欧洲柃木的遗传多样性分析^[31]。使用 Lance 开发的引物,Jones 等人系统研究了 *A. maritima* 的遗传多样性、群体结构、交配系统,为其保护生物学提供了理论基础^[32-33]。Schrader 与 Graves 利用 ISSR 技术,结合表型数据,研究了 *A. maritima* 3 个群体的系统遗传特性,认为已分化为 3 个亚种,而且 Oklahoma 群体分化最早,进一步分析认为其可能起源于亚洲,通过白令路桥迁移到北美地区,并曾广泛分布^[34]。2011 年,Lepais 通过鸟枪测序方法对富集 SSR 序列文库进行测序,获得 392 个 SSR 位点,该研究根据 48 个 2 碱基重复 SSR 序列设计引物,筛选确认了 12 条欧洲柃木 SSR 引物,其中有 10、8 条分别在灰柃木与意大利柃木中能够得到应用^[35]。随后,这 12 条引物被用于研究北非地区欧洲柃木后缘群体的种群动态与进化历史,结果发现摩洛哥群体为稀有四倍体群体,比其他的北非群体更古老,在地中海地区仍在进行的气候变化中更具有进化与生态价值^[36]。这些 SSR 引物的开发,丰富了柃木属植物遗传多样性分析工具。

近年来,SSR 技术也逐渐应用在研究不同柃木演化进程等方面。例如,在欧洲柃木冰期后的(重建)建群扩展历史,SSR 分析结果显示在整个欧洲地域水平上存在 3 个主要的扩展方向,与通常认为喀尔巴阡山脉是冰期避难所不同。同时分析认为重建世系群体相遇多次、且在中欧与斯堪的纳维亚半岛地区形成了高遗传多样性的次生接触群体,而在南欧避难地,欧洲柃木有限的遗传混合使其在气候变化中更易遭受灭绝的危险^[37]。在比利时、卢森堡、法

国交界地区欧洲桤木保护生物学研究中, Mingeot 等通过过 SSR 与 cpDNA 方法研究了自然群体与种质资源库的遗传结构, 结果发现自然群体无显著分化, 自然群体与种质资源库也无显著分化, 说明种质资源库代表了自然群体的遗传多样性, 可用于种质资源的保护与后续利用^[38]。欧洲桤木在非洲存在四倍体群体^[36], 在包括欧洲、北非与西亚的大规模欧洲桤木群体起源与地理分化研究中(包括 209 个群体、2200 个个体), Mandák 等结合 SSR 分型、流式细胞技术、气候模型分析, 首次发现了欧洲存在两个地理分隔鲜明的四倍体类群(Iberian Peninsula 与 Dinaric Alps 地区), 基于 SSR 分析, 作者认为这两个类群为同源多倍化起源、且灰桤木并未参与其进化历史, 同时分析认为这两个四倍体类群并未参与冰期后该物种中欧与北欧群体的物种建群(重建)^[14]。而 Vit 等通过进一步分析鉴定, 认为这两个四倍体群体是与欧洲桤木密切相关的新的四倍体物种, 并将其分别命名为 *A. lusitanica*、*A. rohlenae*^[39]。在欧洲极地树种灰桤木冰期后生物地理扩展模式研究中, Mandák 等利用 SSR 与 cpDNA 方法重建了其系统发育进程, 分析认为该树种并不遵从模式树种挪威云杉的建群历史, 而且 Fennoscandian 群体是来源于中欧而不是东欧^[40]。结合古植物学数据(化石), Dering 等研究了灰桤木群体的系统地理结构, 认为这一树种于末次冰期在欧洲北方避难地幸存, 在整个欧洲范围可能存在多个避难地, 如西阿尔卑斯山地区、喀尔巴阡山脉西部和东部地区, 克隆繁殖能力促进了这一树种在末次冰期的存活, 但是也导致了群体遗传多样性的降低^[41]。

目前, 同工酶、RFLP、RAPD、AFLP 与 SSR 等标记已逐渐应用于桤木属植物群体遗传变异研究, 特别是 RFLP、RAPD、AFLP 与 SSR 分子标记, 由于其利用的是植物 DNA, 较少受样本材料限制, 因此应用的更为广泛。通过这些研究, 桤木属植物群体遗传多样性、群体结构、系统发育进程、亲缘关系等已阐释得越来越清晰, 有力地促进了桤木属植物的保护与改良利用。但是, 桤木属植物属于固氮树种, 也是一个重要的生态树种, 在对其机理、效应等方面研究较少, 限制了其实际的推广。而且目前相关研究主要集中于欧洲桤木(*A. glutinosa*)与海岸桤木(*A. maritima*), 对其他桤木研究相对较少。

在国内, 目前桤木属遗传改良研究主要集中于其引种、选育、繁育、栽培、生理特性研究等常规育种方面, 尽管大部分研究尚处于种源/家系水平上, 但

是一定程度上促进了其遗传改良进程。如吴际友等论述了桤木优树选择应遵循的基本原则, 针对桤木短周期工业用材林(纸浆材)这一选择目标, 提出了选择方法与选择标准^[42]。杨春惠等通过对 6 a 生种源对比试验林的观测分析, 发现桤木各种源、家系高生长迅速, 远远优于江南桤木, 并选出 5 个适宜在湖北省推广发展的桤木种源^[43]。龚细娟等在洞庭湖区对 25 个桤木家系进行造林对比试验, 发现有两个家系胸径、树高、单株材积生长量具有明显优势, 可作为纸浆材在湖区推广^[44]。在形态水平上, 朱俊义与陆静梅扫描电镜下首次观察了东北桤木(*A. mandshurica*)和辽东桤木(*A. sibirica*)花序和花的形态发生过程, 为种的鉴定提供了微形态学依据^[45]。陈益泰等引进国外桤木属植物 11 种 54 个种源, 在浙江富阳进行了育苗和早期适应性观测, 结果显示欧洲桤木表现最佳, 在夏季高温干旱下未见受害^[46]。上述各研究促进了国内桤木属植物遗传改良研究, 也表明桤木大多数性状在种源/家系间具有显著差异, 因而通过种源/家系的选择, 可以获得一定的遗传增益。

群体遗传多样性与遗传结构, 是物种长期进化的产物, 是其生存适应、发展进化的前提, 不仅是保护生物学的核心之一, 也是进行种质资源遗传改良、培育和利用的基础。在桤木属群体遗传变异研究方面, 主要通过表型鉴定方法进行, 如陈益泰等通过群体生长与表型性状研究, 认为四川桤木种内存在着极其丰富的产地变异和(或)个体变异, 并基于果实与木材等 8 个性状的聚类分析, 将种源初步划分为川西南区、川中-西北区、川北区和鄂西-渝东区 4 个产区, 其中川西南产区林木生长和木材品质最佳^[47]。王军辉从果实性状、材性性状等方面系统研究了不同四川桤木种源的地理变异, 通过引入生态梯度值(EGA), 把桤木划分为盆西北周沿区、盆中区和盆南周沿区 3 个种源区, 并认为盆中区为优质种源区且可能是树种起源的中心地区^[48]。上述研究所得出的(优质)种源区划有差异^[47-48], 可能是基于不同的表型性状, 或者是取样范围有差异或样本数太少。

而采用分子标记手段的报道较少, 除了上述李洁等对云南蒙自桤木资源进行的 RAPD 分析, 以及饶龙兵等构建的桤木属植物 AFLP 体系外, 仅有卓仁英等建立了 RAPD 体系, 对 12 个四川桤木种源的群体遗传变异进行研究, 从产区划分上支持了上述陈益泰等的研究结果^[49]。在 SSR 分子标记方面, 也

仅有饶龙兵等基于四川桤木、欧洲桤木、硬桤木转录组数据开发了适用于桤木属树种的 SSR 标记,目前仅在该文中应用于四川桤木、欧洲桤木、硬桤木等 12 份材料的遗传多样性检测上^[50],笔者所在研究组也已经开发出四川桤木适用的 SSR 标记^[51]。总之国内桤木属植物群体遗传变异缺乏分子水平上的数据支撑。

3 展望

综上所述,桤木属植物遗传变异研究取得了长足的进步,为其遗传改良奠定了理论基础。但也存在一些问题,需要进一步研究。

(1) 桤木属植物染色体计数基数究竟是 $x = 14$ 还是 $x = 7$,需要通过核型分析、流式细胞技术等进一步分析确认。

(2) 除了欧洲桤木、海岸桤木、四川桤木等研究的热点桤木种,对其他桤木种群遗传变异研究也应加强,以保护桤木资源的多样性以及提升桤木属遗传改良水平。此外,在群体遗传多样性研究的基础上,桤木属植物核心种质构建研究也应加强,以促进桤木属植物保护效率与水平的提高。

(3) 当前桤木属改良的目的主要是作为短周期工业原料林或用材林,对其生态效益关注度不足,对其固氮机理以及不同种、不同群体的生态效应等方面需要进一步加强研究。

(4) 就笔者所在四川及邻近地区来说,本地区天然分布有四川桤木、川滇桤木、毛桤木、蒙自桤木,这一区域面积虽然不大,但自然条件复杂、地理及气候类型多样,桤木资源可能存在着广泛的遗传变异,但是尚未利用分子手段进行过系统的研究。同时不同种分布区域有差异,部分种有重叠,如四川桤木主要分布在丘陵区与盆周山地地区,而川滇桤木、蒙自桤木主要分布在川西南山地,其系统地理分布格局是怎样形成的? 是否是青藏高原隆起导致的地理分布差异? 这些也尚未进行研究。笔者所在研究组正在着手利用 SSR 标记对其群体遗传变异进行分析研究,以期在清晰了解遗传变异的基础上,推动区域桤木属植物遗传改良研究。

参考文献:

- [1] 陈之端. 桦木科植物的系统发育和地理分布(续)[J]. 植物分类学报,1994b,32(2):101~153.
- [2] 匡可任,李沛琼,郑斯绪,等. 中国植物志(21卷)[M]. 北京:科学出版社,1979:93~103.
- [3] 陈之端,路安民. 桦木科植物的系统发育和演化[J]. 中国科学院院刊,2001,16(3):188~191.
- [4] Furlow J. The systematics of the American species of *Alnus* (Betulaceae)[J]. Rhodora,1979,81(1):1~121.
- [5] Savard L, Michaud M, Bousquet J. Genetic diversity and phylogenetic relationships between birches and alders using ITS, 18S rRNA and rbcL gene sequences[J]. Molecular Phylogenetics Evolution,1993,2(2):112~118.
- [6] Chen ZD, Li J. Phylogenetics and biogeography of *Alnus* (Betulaceae) inferred from sequences of nuclear ribosomal DNA ITS region[J]. International Journal of Plant Sciences,2004,165(2):325~335.
- [7] Gryta H, Van DE PAER C, Manzi S, et al. Genome skimming and plastid microsatellite profiling of alder trees (*Alnus* spp., Betulaceae): phylogenetic and phylogeographical prospects[J]. Tree Genetics Genomes,2017,13(6):118.
- [8] Murai S. Phytotaxonomical and geobotanical studies on gen. *Alnus* in Japan (III). Taxonomy of whole world species and distribution of each section[J]. Bulletin of the Government Forest Experiment Station,1964,171:1~107.
- [9] Liu J, Ren BQ, Luo PG, et al. Karyotype analysis of *Alnus* Mill. (Betulaceae) species originating from Northeastern Asia[J]. Silvae Genetica,2010,59(5):219~223.
- [10] 任保青,刘军. 中国桤木属植物的细胞学研究(1)[J]. 广西植物,2006,26(4):356~359.
- [11] 饶龙兵,杨汉波,郭洪英,等. 桤木属 7 种植物的核型分析[J]. 西北植物学报,2013,33(7):1333~1338.
- [12] 杨汉波,饶龙兵,郭洪英,等. 5 种桤木属植物的核型分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(6):203~207.
- [13] 洪德元. 植物细胞分类学[M]. 北京:科学出版社,1990.
- [14] Mandák B, Vít P, Krak K, et al. Flow cytometry, microsatellites and niche models reveal the origins and geographical structure of *Alnus glutinosa* populations in Europe[J]. Annals of botany,2016,117(1):107~120.
- [15] Bousquet J, Cheliak W M, Lalonde M. Allozyme variability in natural populations of green alder (*Alnus crispa*) in Quebec[J]. Genome,1987,29(2):345~352.
- [16] Bousquet J, Cheliak W M, Lalonde M. Genetic diversity within and among 11 juvenile populations of green alder (*Alnus crispa*) in Canada[J]. Physiologia Plantarum,1987,70(2):311~318.
- [17] Bousquet J, Cheliak W M, Lalonde M. Allozyme variation within and among mature populations of speckled Alder (*Alnus rugosa*) and relationships with green Alder (*A. crispa*) [J]. American Journal of Botany,1988,75(11):1678~1686.
- [18] Huh M K, Huh H W. Genetic diversity and population structure of *Alnus hirsuta* (Betulaceae) in Korea[J]. Journal of Plant Research,1999,112(4):437~442.
- [19] Huh M K. Genetic diversity and population structure of Korean alder (*Alnus japonica*; Betulaceae)[J]. Canadian Journal of Forest Research,1999,29(9):1311~1316.
- [20] Gibson J P, Rice SA, Stucke CM. Comparison of population genet-

- ic diversity between a rare, narrowly distributed species and a common, widespread species of *Alnus* (Betulaceae) [J]. American journal of botany, 2008, 95(5): 588 ~ 596.
- [21] King R A, Ferris C. Chloroplast DNA and nuclear DNA variation in the sympatric alder species, *Alnus cordata* (Lois.) Duby and *A. glutinosa* (L.) Gaertn [J]. Biological journal of the Linnean society, 2000, 70(1): 147 ~ 160.
- [22] King RA, Ferris C. Chloroplast DNA phylogeography of *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn [J]. Molecular Ecology, 1998, 7(9): 1151 ~ 1161.
- [23] Hantemirova EV, Pimenova EA, Korchagina OS. Polymorphism of Chloroplast DNA and Phylogeography of Green Alder (*Alnus alnobetula* (Ehrh.) K. Koch sl) in Asiatic Russia [J]. Russian Journal of Genetics, 2018, 54(1): 64 ~ 74.
- [24] Huh MK, Huh HW. Genetic diversity and phylogenetic relationships in alder, *Alnus firma*, revealed by AFLP [J]. Journal of Plant Biology, 2001, 44(1): 33 ~ 40.
- [25] 李洁, 熊智, 张成刚. 云南尼泊尔桤木遗传多样性研究 [J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(1): 16 ~ 21.
- [26] 饶龙兵, 杨汉波, 郭洪英, 等. 不同倍性桤木属植物遗传差异的 AFLP 分析 [J]. 植物研究, 2014, 34(6): 803 ~ 809.
- [27] 饶龙兵, 杨汉波, 郭洪英, 等. 17 种桤木属植物的亲缘关系研究及模糊种鉴定 [J]. 植物研究, 2015, 35(4): 528 ~ 534.
- [28] Zhuk A, Veinberga I, Daugavietis M, et al. Cross-species amplification of *Betula pendula* Roth. simple sequence repeat markers in *Alnus* species [J]. Baltic Forestry, 2008, 14(2): 116 ~ 121.
- [29] Lance SL, Jones KL, Hagen C, et al. Development and characterization of nineteen polymorphic microsatellite loci from seaside alder, *Alnus maritima* [J]. Conservation Genetics, 2009, 10(6): 1907 ~ 1910.
- [30] Gürcan K, Mehlenbacher S A. Transferability of microsatellite markers in the Betulaceae [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2010, 135(2): 159 ~ 173.
- [31] Mingeot D, Baleux R, Watillon B. Characterization of microsatellite markers for black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn) [J]. Conservation Genetics Resources, 2010, 2: 269 ~ 271.
- [32] Jones JM, Gibson JP. Population genetic diversity and structure within and among disjunct populations of *Alnus maritima* (seaside alder) using microsatellites [J]. Conservation Genetics, 2011, 12(4): 1003 ~ 1013.
- [33] Jones JM, Gibson JP. Mating System Analysis of *Alnus maritima* (Seaside Alder), a Rare Riparian Tree [J]. Castanea, 2012, 77(1): 11 ~ 20.
- [34] Lepais O, Bacles CFE. De novo discovery and multiplexed amplification of microsatellite markers for black alder (*Alnus glutinosa*) and related species using SSR-enriched shotgun pyrosequencing [J]. Journal of Heredity, 2011, 102(5): 627 ~ 632.
- [35] Schrader JA, Graves WR. Systematics of *Alnus maritima* (seaside alder) resolved by ISSR polymorphisms and morphological characters [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2004, 129(2): 231 ~ 236.
- [36] Lepais O, Muller SD, Saad-limam SB, et al. High genetic diversity and distinctiveness of rear-edge climate relicts maintained by ancient tetraploidisation for *Alnus glutinosa* [J]. PLoS One, 2013, 8(9): e75029.
- [37] HA VRDOVÁ A, Douda J, Krak K, et al. Higher genetic diversity in recolonized areas than in refugia of *Alnus glutinosa* triggered by continent-wide lineage admixture [J]. Molecular Ecology, 2015, 24(18): 4759 ~ 4777.
- [38] Mingeot D, Husson C, Mertens P, et al. Genetic diversity and genetic structure of black alder (*Alnus glutinosa* [L.] Gaertn) in the Belgium-Luxembourg-France cross-border area [J]. Tree Genetics Genomes, 2016, 12(2): 1 ~ 12.
- [39] Vít P, Douda J, Krak K, et al. Two new polyploid species closely related to *Alnus glutinosa* in Europe and North Africa-An analysis based on morphometry, karyology, flow cytometry and microsatellites [J]. Taxon, 2017, 66(3): 567 ~ 583.
- [40] Mandák B, Havrdová A, Krak K, et al. Recent similarity in distribution ranges does not mean a similar postglacial history: a phylogeographical study of the boreal tree species *Alnus incana* based on microsatellite and chloroplast DNA variation [J]. New Phytologist, 2016, 210(4): 1395 ~ 1407.
- [41] Dering M, Lata? owa M, Boratyńska K, et al. Could clonality contribute to the northern survival of grey alder [*Alnus incana* (L.) Moench] during the Last Glacial Maximum [J]. Acta Societatis Botanicorum Poloniae, 2017, 86(1): 3523.
- [42] 吴际友, 龙应忠, 童方平, 等. 桤木优树选择研究 [J]. 湖南林业科技, 2004, 31(6): 10 ~ 12.
- [43] 杨春惠, 谭琼, 熊冬连, 等. 桤木地理种源/家系选择试验初报 [J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(1): 64 ~ 69.
- [44] 龚细娟, 张国君, 梁丽容, 等. 25 个桤木家系在湖区对比试验初报 [J]. 林业实用技术, 2013(8): 23 ~ 24.
- [45] 朱俊义, 陆静梅. 桤木属花序和花的形态发生 [J]. 植物分类学报, 2008, 46(4): 641 ~ 650.
- [46] 陈益泰, 卓仁英, 吴天林. 桤木属植物的引种和早期适应性 [J]. 林业科学研究, 2004, 17(2): 139 ~ 146.
- [47] 陈益泰, 李桂英, 王惠雄. 桤木自然分布区内表型变异的研究 [J]. 林业科学研究, 1999, 12(4): 379 ~ 385.
- [48] 王军辉. 桤木遗传变异与选择的研究 [D]. 北京: 北京林业大学, 2000.
- [49] 卓仁英, 陈益泰. 四川桤木不同群体间遗传分化研究 [J]. 浙江林业科技, 2005, 25(1): 13 ~ 16.
- [50] 饶龙兵, 杨汉波, 郭洪英, 等. 基于桤木属转录组测序的 SSR 分子标记的开发 [J]. 林业科学研究, 2016, 29(6): 875 ~ 882.
- [51] Yang A, Wu B, Shen C, et al. Microsatellite records for volume 9, issue 3 [J]. Conservation Genetics Resources, 2017, 9(3): 507 ~ 511.