

舒钰. 黑龙江省茶条槭种质资源遗传多样性分析[J]. 黑龙江农业科学, 2025(6):60-70.

黑龙江省茶条槭种质资源遗传多样性分析

舒钰^{1,2,3}

(1. 黑龙江开放大学 继续教育学院, 黑龙江 哈尔滨 150080; 2. 东北林业大学 园林学院, 黑龙江 哈尔滨 150040; 3. 黑龙江省林业科学研究所, 黑龙江 哈尔滨 150081)

摘要:为进一步研究黑龙江省茶条槭种质资源遗传多样性,从促进茶条槭的选育、种质创新、遗传改良以及种质资源的保护。根据转录组数据,开发了13对SSR分子标记引物,在20个茶条槭居群、400个样本中共检测到33个等位基因。不同SSR位点的等位基因数量存在差异,最少为2个,最多为5个,平均每个位点的等位基因数量为2.5385个。茶条槭种群的遗传结构特征显示,居群间的变异较高,居群内的杂合度较高,并存在一定程度的遗传分化。基因流动水平适中($Nm < 1$),物种的迁移方向为从高纬度地区向低纬度地区扩散。根据遗传多样性分析结果,建议孙吴、嫩江和沾河的居群作为重点保护种源。

关键词:茶条槭;遗传多样性;SSR分子标记;遗传结构特征

茶条槭(*Acer tataricum* subsp. *ginnala*)槭属植物,是优良的秋季景观树种;其果实富含油脂,可用于生产食用油^[1];叶片富含没食子酸^[2-3],可用于抗菌、降血糖、抗炎、抗肿瘤等多种药物的开发^[4-6];是一种综合利用价值很高的植物。作为一种重要的生态、经济及观赏植物,茶条槭正遭受过度开发和栖息地破碎化的威胁,其生存环境日益严峻。茶条槭的天然居群仍处于野生状态,分布零散,尚未形成独立稳定的森林群落^[7]。黑龙江省处于茶条槭自然分布的北界,在人类活动和气候环境变化的双重影响下,亟需深入调查与评估黑龙江省茶条槭的种质资源现状。通过揭示茶条槭野生居群的遗传结构和多样性水平,可以识别遗传资源的丰富性和潜在的保护价值^[8],为制

定有效的保护策略提供科学依据,特别是对于遗传多样性较高的居群^[9],其包含重要的适应性特征以及为育种提供优异基因资源。并为科学利用和可持续管理茶条槭资源提供指导^[10]。SSR标记因其共显性、带型的简单性和一致性、客观性以及较低的开发和检测成本,在许多植物遗传多样性研究中得到了广泛应用^[11]。在本研究中,选用SSR标记用于评估茶条槭天然居群的遗传多样性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 黑龙江省茶条槭种质资源材料 根据黑龙江省茶条槭分布情况,在20个地点(表1)采集样本。

表1 茶条槭调查地自然概况

序号	调查地点	东经/°	北纬/°	海拔/m	年均温/°C	年降水量/mm
1	嫩江县(NJ)	126.4247768	49.49627946	470.30	1.2	493.3
2	孙吴县(SW)	127.5622605	49.44359545	200.86	0.8	558.0
3	通北林业局(TB)	127.4190463	48.18397819	368.28	1.5	554.0
4	沾河林业局(ZH)	128.2181624	48.63226821	418.67	1.2	532.2
5	五营镇(WY)	129.1877139	48.11063219	319.11	0.9	638.3
6	嘉荫县(JY)	130.2899672	48.78351389	182.71	0.9	607.8
7	双丰林业局(SF)	128.0919896	46.81564476	276.48	1.8	665.4
8	铁力市(TL)	128.8192314	46.97212255	432.49	2.5	662.4
9	鹤北林业局(HB)	130.3110471	47.55039874	184.51	3.6	672.8
10	桦南林业局(HN)	131.2349379	46.33794907	438.20	4.1	542.1
11	东方红林业局(DFH)	133.7382576	46.67155927	202.69	3.1	618.4
12	八五三农场(BWS)	134.0767661	47.33994517	68.08	4.6	529.1
13	密山市(MS)	131.7825733	45.51813173	173.14	4.4	562.4

收稿日期:2025-03-07

基金项目:黑龙江省省属科研院所科研业务费项目(QN2024-02)。

作者简介:舒钰(1982-),女,博士,副研究员,从事园林植物研究工作。E-mail:370194057@qq.com。

表 1 (续)

序号	调查地点	东经/°	北纬/°	海拔/m	年均温/℃	年降水量/mm
14	迎春林业局(YC)	132.5664849	46.07308948	246.79	4.0	618.4
15	山河屯林业局(SHT)	127.7477122	44.79543843	218.25	4.9	606.4
16	方正林业局(FZ)	128.8920177	45.78422534	137.60	4.1	617.5
17	林口林业局(LK)	130.3137931	45.12931289	445.96	3.9	555.3
18	东京城林业局(DJC)	129.0585240	43.98886190	460.52	4.5	533.1
19	大海林林业局(DHL)	128.8252669	44.46438601	616.99	5.0	559.1
20	绥阳林业局(SY)	130.7056763	44.22695817	382.54	6.0	553.6

注:相关气象数据于国家气象科学中心下载。

2024年,6月—7月,每个地区随机选取20株健康植株(做好标记),植株间距大于50m,以降低植株间的亲缘关系。每棵树分别在东、南、西、北4个方向摘取当年生枝条成熟叶片第6片、第7片、第8片、第9片叶放入装有硅胶的密封袋,作为一个样本,干燥后放入-80℃冰箱内保存。

1.1.2 三代全长转录组材料 选自哈尔滨市巴彦县茶条槭良种繁育基地。选择生长健壮的3株茶条槭采集样本,分别于2022年7月1日、9月20日、10月5日,均在10:00,在茶条槭的中部取健康无虫害的成熟叶片。去掉叶柄,叶片在液氮中速冻后保存至-80℃超低温冰箱中。

1.2 方法

1.2.1 三代全长转录组测序 采用Suberads软件来鉴定各个插入片段,并将这些片段整合成consensus序列。在获得consensus sequence (CCS)后,首先通过blast比对primer序列,以定位CCS序列的两端,并对其进行检测及序列定向,从而获得统一分子标识符(UMI)序列。测序完成后经过过滤得到高质量的测序数据,进行后续的生物信息分析,使用Iso-Seq3分析软件,对原始数据进行处理,聚类后得到全长的一致性序列,然后利用全长的一致性序列进行后续分析。流程如图1。

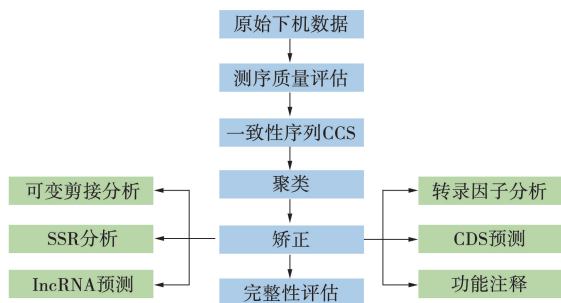


图 1 全长转录组生信分析流程

1.2.2 茶条槭DNA提取 参照Zhou^[12]的方法进行茶条槭DNA的提取。

1.2.3 茶条槭转录组中SSR位点的标记开发 SSR引物序列在基因组中广泛分布且相对保守,

这使其在近缘植物中表现出较高的通用性。SSR位点具有较高的遗传稳定性,因此被广泛应用于居群结构分析和亲缘关系鉴定等领域^[13]。根据全长转录组数据,使用软件MISA (<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)对转录组的所有isoform进行搜索,寻找isoform中的SSR。使用Primer3软件设计引物后,随机选取100对引物,并在20个种源中选择地理位置较远的双丰和绥阳两个居群进行初步筛选。每个居群随机抽取3个样本用于引物筛选。筛选标准包括峰型良好、稳定性高以及多态性信息含量高的引物。最终筛选出的引物应用于对来自20个居群、共计400个个体的茶条槭样本进行多态性扩增分析。

1.2.4 SSR扩增 根据筛选结果,加入荧光标记探针扩增SSR引物,进行毛细管电泳。

PCR反应体系:总反应体系为20μL,4μL 5×buffer;0.8μL上游引物F(10μmol·L⁻¹);1μL下游引物R(10μmol·L⁻¹);0.2μL Probe;1μL模板;1μL PCREnhancer;12μL dd H₂O。

PCR反应程序:首先进行预变性95℃,15min。循环数为35(95℃,30s;55℃,30s;72℃,30s),72℃延伸3min。扩增结束后,使用ABI3130xl基因测序仪进行电泳检测。

1.2.5 数据分析 分别使用Popgen32和GenAlEx version 6.501软件计算SSR位点和群体的各项遗传多样性指标,包括观测等位基因(Na)、有效等位基因(Ne)、香农指数(I)、多态性信息指数(PIC)、观测杂合度(Ho)、期望杂合度(He)、哈迪温伯格平衡(PHWE)、主要等位基因频率(MP)和个体近交系数(Fis)、群体近交系数(Fit)、遗传分化系数(Fst)和基因流(Nm)。Nm=0.25×(1-Fst)/Fst。使用SSRSTRUCTURE version 2.3.3软件进行群体遗传结构分析。遗传距离采用非加权组平均法,在populations-1_2_30软件中构建UPGMA树,数值设置为1000。使用FigTree version 1.4.2软件进行聚类树的美化和编辑。使用GenAlEx version 6.501软件计算各群体间和群体内的变异、分化并进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 转录组中 SSR 位点的标记开发

2.1.1 转录组中 SSR 位点的基元类型分析 根据转录组数据,共获得了 53 902 条 unigenes(非冗余基因),通过 MISA 在线软件发现有 21 283 条 unigenes 含有 42 119 个 SSR 位点。EST-SSR 位点的出现频率为 78.14%,发生频率为 39.48%,平均约每 2.35 kb 含有 1 个 SSR 位点。其中一核苷酸重复有 24 999 个,占比 59.35%,是 SSR 位点的主要重复类型,占主导地位;其次是二核苷酸重复类型有 10 008 个,占比 23.76%;再次为三核苷酸重复有 6 403 个,占比 15.20%;其余四、五、六核苷酸重复序列类型占比约为 1.69%(表 2)。

表 2 茶条槭叶片转录组 SSR 重复类型的分布特点

重复类型	数量	比例/%	分布率/%	平均距离/kb
一核苷酸重复	24999	59.35	46.38	3.96
二核苷酸重复	10008	23.76	18.57	9.90
三核苷酸重复	6403	15.20	11.88	15.48
四核苷酸重复	469	1.11	0.87	211.33
五核苷酸重复	99	0.25	0.18	1001.13
六核苷酸重复	141	0.33	0.26	702.92
合计	42119	100.00	78.14	2.35

2.1.2 转录组中 SSR 重复基元核苷酸组成分析

42 219 个 SSR 位点共存在着 95 种的重复基元,二核苷酸至六核苷酸重复分别有 4,10,19,17 和 43 种。由表 3 可知,二核苷酸重复主要基元有 2 种,占总 SSR 重复基元的 21.73%,分别为 AG/CT (4 364 个,11.00%) 和 AT/AT (4 519 个,10.73%)。三核苷酸的主要重复基元有 4 种,占 SSR 重复总量的 10.10%,其中 AAC/GTT(850 个,2.01%)、AAG/CTT(1 536 个,3.64%)、AAT/ATT(1 016 个,2.41%) 和 ATC/ATG(852 个,2.02%)。四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复类型中没有主要的重复基元。

表 3 二、三核苷酸主要重复基元重复类型以及分布频率

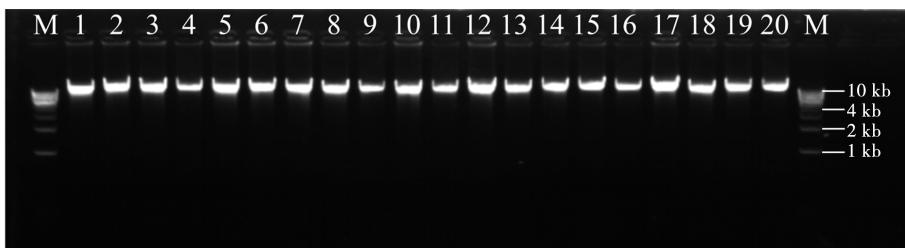
重复类型	重复单元数量	主要重复单元	数量	占总 SSR 重复的百分比/%
二核苷酸重复	4	AG/CT	4364	11.00
		AT/AT	4519	10.73
三核苷酸重复	10	AAC/GTT	850	2.01
		AAG/CTT	1536	3.64
		AAT/ATT	1016	2.41
		ATC/ATG	852	2.02

42 119 个 SSR 位点片段长度分布范围为 10~1 111 bp,主要分布于 10~42 bp 之间,占全部 SSR 位点的 99.10%,其中长度为 10 bp 的 SSR 序列占据主导地位,占全部 SSR 位点的 16.08%。其中二核苷酸重复基元长度范围为 12~76 bp,三核苷酸重复基元长度范围为 15~48 bp,四核苷酸重复基元长度范围为 20~40 bp,五核苷酸重复基元长度范围为 25~35 bp,六核苷酸重复基元长度范围为 30~48 bp。

2.1.3 转录组中 SSR 可用性分析 转录组数据中具较高多态性的 SSR 有 8 423 条(20.00%);具中等多态性的 SSR 有 22 467 条(53.34%);多态性较低的 SSR 位点有 11 229 条(26.66%);具有 2 种低级重复基元,二核苷酸 3 461 条(41.10%),三核苷酸 1 556 条(18.47%),共 5 017 占高多态性 SSR 总数的 59.56%。

2.2 分子标记组 DNA 提取结果与检测

使用改进的 CTAB 方法提取茶条槭分子标记组 DNA,其 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 的比值约为 1.7,表明蛋白质和其他可能的污染物已被有效清除,从而确保了 DNA 的较高纯度。通过浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,确认提取的 DNA 样本中不含有 RNA,无破坏迹象,电泳孔点清晰,纯度满足 SSR 分析的标准需求(图 2)。



M. Marker;泳道 1. 嫩江;泳道 2. 孙吴;泳道 3. 通北;泳道 4. 沾河;泳道 5. 五营;泳道 6. 嘉荫;泳道 7. 双丰;泳道 8. 铁力;泳道 9. 鹤北;泳道 10. 桦南;泳道 11. 东方红;泳道 12. 八五三;泳道 13. 密山;泳道 14. 迎春;泳道 15. 山河屯;泳道 16. 方正;泳道 17. 林口;泳道 18. 东京城;泳道 19. 大海林;泳道 20. 绥阳。

图 2 DNA 提取电泳结果

2.3 SSR 分子标记引物筛选

使用 Primer 3 软件设计了 30 741 个 SSR 位点的引物,其中 11 478 个位点无法成功设计引物。每个 SSR 位点设计了 3 对引物,总共设计了 92 223 对引物。从中随机选取了 100 对引物,在双丰和绥阳的 6 个茶条槭样本中进行筛选,最终

选出了 13 对引物,这些引物在样本中显示出良好且稳定的扩增效果,同时具有高多态性信息含量。具体的引物信息见表 4。将这 13 对引物应用于对来自 20 个居群、共计 400 个个体的茶条槭样本进行多态性扩增分析。例如,引物 AgSSR-02 在 6 份茶条槭样品中的扩增结果详见图 3。

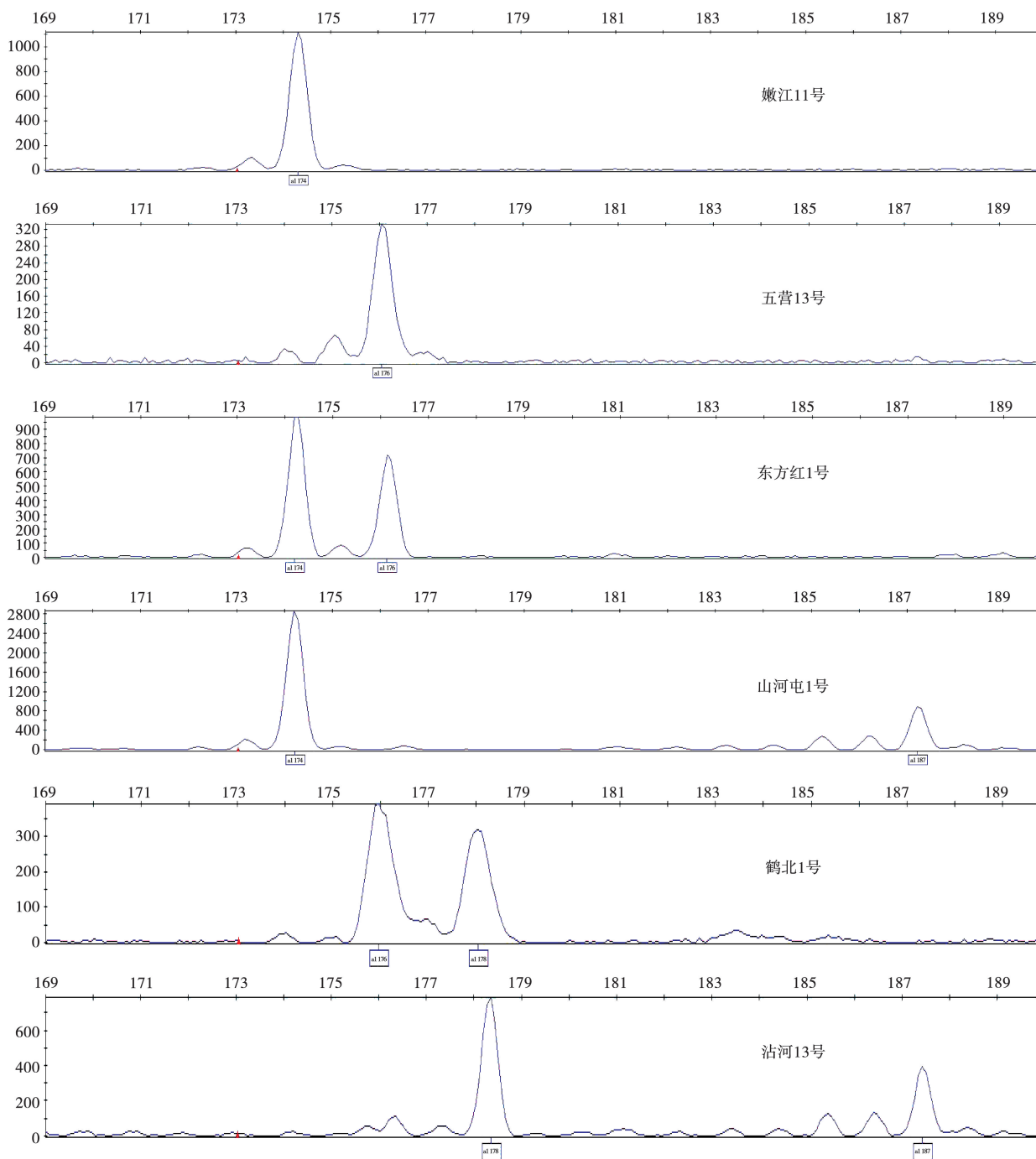


图 3 引物 AgSSR-02 扩增产物的不同基因型示意图

表4 可用引物信息

引物名称	引物序列(5'~3')	重复基序	片段大小/bp	退火温度/℃
AgSSR-02	F:AGGCCAGATCTTGGTCGTCT R:GATGATAATGATCGGTCCGGC	(CT)17	234	58
AgSSR-09	F:CAGGTGATGGTGATTGGT R:CAAAGTGGTGAAATTGAG	(AG)5(AC)6	202	57
AgSSR-12	F:CACTCAACTCTCCTCTCGTAGTA R:CATGAAAAACGCAACCCTAC	(AG)6	280	55
AgSSR-16	F:GTATAGCGATAGTATGGCCAAC R:GTGATAATTTGATTCTTCGCCGC	(TC)5	249	55
AgSSR-26	F:TCGTCTTCTCTTCCCTCCACGT R:GCTCTCTCCCTCTCTCTAT	(GA)6	248	55
AgSSR-37	F:ACTTTTTATGGTTCTGGTTTG R:CAGGGATAGCCCCACGAAGT	(AGC)5	219	50
AgSSR-39	F:ATCCAAGTCAGCTGAGTCGA R:ACAAAACGCTGACTTTGAAGAGC	(TCT)5	389	51
AgSSR-48	F:CACTTTTGTGAAGCTCGTGTAGCC R:GCCACAAGTCTTTTACATGCAGT	(GCA)5	339	57
AgSSR-57	F:TGGGGAAGGTGAGAAAGGTC R:TCATCGGACTCGCACCTTC	(GA)7	206	51
AgSSR-59	F:TCAGGTCTGTGGAGGGAAG R:ATTGAAGCTCGTGTAGCCA	(AG)6	307	57
AgSSR-63	F:CAATTCATCATTCTGTGTGG R:ATCTTCTCCATCTCAGGAT	(GA)7	363	55
AgSSR-75	F:ACGTACACCACGTCTCTTA R:TCAACTCTCCTCTCGTAGTA	(TTG)5	225	50
AgSSR-94	F:GTTGGAGGTGATTGGGGT R:CAACTTTCGTCCAGAGACT	(CCA)7	269	51

2.4 引物多态性分析

由表5可知,多态信息含量(PIC)的数值范围为0.045 4(AgSSR-94)~0.739 3(AgSSR-02),平均值0.311 9,其中8对引物具有较高的多态信息(PIC>0.25),且AgSSR-02的PIC值最大为0.739 3,表明其具有较高的多态性信息含量且分区能力最强。

观测杂合度(H_o)的数值范围为0.047 5(AgSSR-94)~0.857 5(AgSSR-02),均值为0.445 2;期望杂合度(H_e)的数值范围为0.046 4(AgSSR-94)~0.777 5(AgSSR-02),均值为0.367 3。观

测杂合度整体高于期望杂合度,说明居群间的基因流动可能导致较高的杂合度,可能是由于不同居群之间存在基因交流或者在选择压力下某些等位基因频繁出现使得杂合现象增加。

此外,还检测了13对多态性微卫星位点在茶条槭居群中是否遵循哈迪温伯格平衡(PHWE)。数据分析结果表明,位点AgSSR-16、AgSSR-26、AgSSR-37、AgSSR-75和AgSSR-94的遗传结构较为稳定,未受到外部因素的显著影响。然而,其余8个位点可能受到自然选择、迁移或其他因素的影响,导致遗传平衡被破坏。

表5 茶条槭居群13对微卫星位点的遗传多样性信息

位点	观测等位基因(Na)	有效等位基因(Ne)	香农指数(I)	多态性信息指数(PIC)	观测杂合度(H _o)	期望杂合度(H _e)	哈迪温伯格平衡(PHWE)
AgSSR-02	5	4.4758	1.5396	0.7393	0.8575	0.7775	0.000000***
AgSSR-09	3	2.2704	0.9480	0.4976	0.5875	0.5603	0.000000***
AgSSR-12	5	3.6425	1.4388	0.6849	0.7700	0.7264	0.000000***
AgSSR-16	2	1.1697	0.2757	0.1346	0.1575	0.1453	0.090068
AgSSR-26	2	1.0512	0.1169	0.0476	0.0500	0.0488	0.617406
AgSSR-37	2	1.0512	0.1169	0.0476	0.0500	0.0488	0.617406
AgSSR-39	2	1.8889	0.6634	0.3599	0.6175	0.4712	0.000000***

表 5 (续)

位点	观测等位基因 (Na)	有效等位基因 (Ne)	香农指数 (I)	多态性信息指数 (PIC)	观测杂合度 (Ho)	期望杂合度 (He)	哈迪温伯格平衡 (PHWE)
AgSSR-48	2	1.9531	0.6811	0.3689	0.8150	0.4886	0.000000***
AgSSR-57	2	1.8846	0.6622	0.3592	0.6225	0.4700	0.000000***
AgSSR-59	2	1.8779	0.6603	0.3582	0.6250	0.4681	0.000000***
AgSSR-63	2	1.8846	0.6622	0.3592	0.5325	0.4700	0.007692**
AgSSR-75	2	1.0571	0.1269	0.0526	0.0556	0.0541	0.597485
AgSSR-94	2	1.0486	0.1123	0.0454	0.0475	0.0464	0.636007
平均	2.5385	1.9427	0.6157	0.3119	0.4452	0.3673	0.197390
St. Dev	1.1266	1.0487	0.4796		0.3213	0.2653	

注: * 表示 $P < 0.05$; ** 表示 $P < 0.01$; *** 表示 $P < 0.001$ 。

由表 6 可知,通过分析 13 对引物的近交系数和基因流,个体近交系数(F_{is})平均值为 -0.8825 ,居群内杂合程度较高。群体近交系数(F_{it})平均值为 -0.2044 表明整个群体的近亲交配程度相对较低。基因流(N_m)均值为 0.4440 ,居群内有中等水平的基因流动,群体间遗传分化系数(F_{st})均值为 0.3603 表示居群之间有一定的遗传分化。

表 6 13 对引物的近交系数和基因流

位点	个体近交 系数(F_{is})	群体近交 系数(F_{it})	遗传分化 系数(F_{st})	基因流 (N_m)
AgSSR-02	-0.7405	-0.1042	0.3656	0.4339
AgSSR-09	-0.8834	-0.0499	0.4425	0.3149
AgSSR-12	-0.8616	-0.0614	0.4298	0.3316
AgSSR-16	-0.9222	-0.0855	0.4353	0.3243
AgSSR-26	-1.0000	-0.0256	0.4872	0.2632
AgSSR-37	-1.0000	-0.0256	0.4872	0.2632
AgSSR-39	-0.9070	-0.3122	0.3119	0.5515
AgSSR-48	-0.9244	-0.6701	0.1321	1.6418
AgSSR-57	-0.9202	-0.3262	0.3093	0.5582
AgSSR-59	-0.9275	-0.3369	0.3064	0.5659
AgSSR-63	-0.9394	-0.1345	0.4150	0.3523
AgSSR-75	-1.0000	0.7861	0.8930	0.0299
AgSSR-94	-0.9048	-0.0243	0.4622	0.2909
平均	-0.8825	-0.2044	0.3603	0.4440

表 7 茶条槭群体间的遗传多样性

居群	观测等位基因(Na)	有效等位基因(Ne)	香农指数(I)	观测杂合度(Ho)	期望杂合度(He)	固定指数(F)
HN	1.231	1.228	0.213	0.273	0.153	-0.782
LK	1.615	1.614	0.426	0.585	0.307	-0.902
DJC	1.538	1.481	0.335	0.446	0.235	-0.904
HB	1.385	1.382	0.266	0.354	0.192	-0.847
TL	1.615	1.511	0.355	0.446	0.241	-0.854
JY	1.615	1.582	0.397	0.527	0.277	-0.909
BWS	1.231	1.231	0.213	0.277	0.154	-0.800
DHL	1.308	1.303	0.212	0.288	0.153	-0.889
YC	1.538	1.484	0.336	0.454	0.236	-0.929
SHT	1.462	1.457	0.319	0.438	0.230	-0.909
DFH	1.538	1.500	0.342	0.450	0.238	-0.895

2.5 居群 SSR 遗传多样性分析

对 20 个居群的茶条槭群体进行遗传多样性分析发现(表 7),观测等位基因的变化范围在 $1.231 \sim 1.769$ 之间,均值为 1.508 个。有效等位基因的数值在 $1.228 \sim 1.721$ 之间,均值为 1.471 个,最高值在沾河(ZH)居群,最低值在桦南(HN)和八五三(BWS)居群。香农信息指数的变化范围在 $0.212 \sim 0.499$ 之间,均值为 0.334 ,最高为沾河居群(0.499),其次为嫩江(NJ)(0.492),第三为孙吴(SW)(0.446),最低在大海林(DHL)居群(0.212)这表明沾河、嫩江(NJ)、孙吴居群多样性程度较高,是值得重点保护的种源。

观测杂合度在 $0.273 \sim 0.677$ 之间,最大值为沾河居群,最小值在桦南(HN)和密山(MS)居群,均值为 0.445 。期望杂合度在 $0.153 \sim 0.352$ 之间,最大值为沾河,最小值为桦南和大海林,均值为 0.236 ,在居群中观测杂合度均大于期望杂合度,表明杂合子数量增加。所有居群的固定指数(F)的变化范围为 $-0.929 \sim -0.761$,均值为 -0.876 ,均为负值,表明居群内杂合子较多,可能是居群在进化的过程中由于环境变化、选择性优势或者基因突变的频率变高导致的,对群体进化有一定影响。

表 7 (续)

居群	观测等位基因(Na)	有效等位基因(Ne)	香农指数(I)	观测杂合度(Ho)	期望杂合度(He)	固定指数(F)
NJ	1.769	1.708	0.492	0.673	0.350	-0.928
SF	1.692	1.569	0.398	0.519	0.276	-0.885
SY	1.385	1.318	0.233	0.308	0.164	-0.761
MS	1.308	1.307	0.213	0.273	0.154	-0.776
WY	1.462	1.460	0.320	0.431	0.230	-0.870
TB	1.385	1.329	0.229	0.285	0.158	-0.804
FZ	1.615	1.611	0.425	0.577	0.307	-0.882
SW	1.692	1.624	0.446	0.615	0.318	-0.869
ZH	1.769	1.721	0.499	0.677	0.352	-0.927
平均	1.508	1.471	0.334	0.445	0.236	-0.876

2.6 不同居群间的遗传关系和聚类分析

为探讨群体间的遗传关系,在 Popgen 32 软件中计算了各群体间的遗传距离(Nei,1972)和遗传同一性。从表 8 中可以看出,茶条槭各个居群

之间的遗传同一性存在一定差异,其中嘉荫(JY)和沾河(ZH)之间的遗传距离最小,为 0.030 0;而孙吴(SW)和绥阳(SY)之间的遗传距离最大,为 0.634 0。

表 8 群体间的遗传同一性(右上角)和遗传距离(左下角)

居群	NJ	WY	DJC	HB	TL	JY	SW	DHL	YC	SHT
NJ	****	0.7195	0.6199	0.7480	0.6611	0.7285	0.8221	0.7503	0.7501	0.6876
WY	0.3292	****	0.7848	0.8623	0.8088	0.8269	0.7151	0.8643	0.8517	0.7951
DJC	0.4781	0.2423	****	0.8846	0.8844	0.8331	0.6680	0.7708	0.7491	0.8101
HB	0.2903	0.1481	0.1226	****	0.9247	0.8702	0.7512	0.8160	0.8810	0.8597
TL	0.4138	0.2122	0.1228	0.0782	****	0.8611	0.7416	0.8015	0.8276	0.8465
JY	0.3168	0.1901	0.1826	0.1390	0.1495	****	0.8157	0.8567	0.8671	0.8208
SW	0.1958	0.3354	0.4034	0.2861	0.2989	0.2038	****	0.6847	0.7577	0.6389
DHL	0.2873	0.1459	0.2603	0.2034	0.2213	0.1546	0.3788	****	0.8270	0.9036
YC	0.2876	0.1605	0.2888	0.1267	0.1892	0.1427	0.2775	0.1899	****	0.8471
SHT	0.3745	0.2292	0.2105	0.1512	0.1667	0.1975	0.4480	0.1013	0.1659	****
DFH	0.2326	0.2141	0.3350	0.1572	0.1722	0.1741	0.2893	0.1876	0.0890	0.1463
HN	0.1729	0.1219	0.2559	0.0980	0.1875	0.1667	0.2141	0.2073	0.0726	0.2013
ZH	0.2809	0.1525	0.2818	0.1616	0.1750	0.0300	0.1839	0.1126	0.1676	0.1937
SY	0.4593	0.1811	0.3261	0.1647	0.2591	0.3398	0.6340	0.2384	0.2455	0.1495
MS	0.3679	0.2273	0.3879	0.1808	0.2294	0.1415	0.3293	0.2078	0.1020	0.1194
BWS	0.2920	0.1858	0.3066	0.1383	0.1726	0.1457	0.2813	0.1941	0.0534	0.2175
TB	0.2761	0.1682	0.2667	0.1650	0.1757	0.0562	0.2097	0.1270	0.1966	0.2248
FZ	0.3774	0.1588	0.1989	0.0963	0.1035	0.1444	0.2620	0.2394	0.1714	0.1138
LK	0.5036	0.3287	0.2923	0.2718	0.2837	0.2129	0.5184	0.3163	0.3199	0.1629
SF	0.2128	0.1651	0.2513	0.1079	0.1823	0.1889	0.2325	0.2230	0.1559	0.1941
居群	DFH	HN	ZH	SY	MS	BWS	TB	FZ	LK	SF
NJ	0.7925	0.8412	0.7551	0.6317	0.6922	0.7467	0.7587	0.6856	0.6044	0.8083
WY	0.8073	0.8853	0.8585	0.8343	0.7967	0.8304	0.8452	0.8532	0.7199	0.8478
DJC	0.7153	0.7742	0.7544	0.7217	0.6785	0.7360	0.7659	0.8197	0.7466	0.7778
HB	0.8545	0.9066	0.8507	0.8482	0.8346	0.8708	0.8479	0.9082	0.7620	0.8977
TL	0.8418	0.8290	0.8395	0.7717	0.7950	0.8415	0.8389	0.9017	0.7530	0.8334
JY	0.8403	0.8465	0.9704	0.7119	0.8680	0.8644	0.9453	0.8655	0.8082	0.8279
SW	0.7488	0.8073	0.8320	0.5304	0.7195	0.7548	0.8108	0.7695	0.5955	0.7926
DHL	0.8289	0.8128	0.8935	0.7879	0.8124	0.8236	0.8807	0.7871	0.7289	0.8001
YC	0.9148	0.9300	0.8457	0.7823	0.9030	0.9480	0.8216	0.8425	0.7262	0.8556
SHT	0.8639	0.8177	0.8239	0.8611	0.8875	0.8045	0.7987	0.8924	0.8497	0.8236
DFH	****	0.9180	0.8438	0.8140	0.8775	0.9470	0.8685	0.8751	0.7660	0.8999
HN	0.0855	****	0.8475	0.8027	0.8466	0.9025	0.8482	0.8584	0.7372	0.9118

表 8 (续)

居群	DFH	HN	ZH	SY	MS	BWS	TB	FZ	LK	SF
ZH	0.1699	0.1654	****	0.7251	0.8683	0.845	0.9682	0.8629	0.7777	0.831
SY	0.2058	0.2198	0.3215	****	0.7919	0.7723	0.7149	0.8582	0.7324	0.7856
MS	0.1307	0.1665	0.1413	0.2333	****	0.8736	0.8182	0.8829	0.8842	0.8432
BWS	0.0544	0.1026	0.1684	0.2584	0.1351	****	0.8756	0.8194	0.6858	0.8714
TB	0.1410	0.1646	0.0324	0.3356	0.2007	0.1328	****	0.8362	0.7333	0.8573
FZ	0.1334	0.1526	0.1475	0.1529	0.1245	0.1991	0.1789	****	0.8478	0.8661
LK	0.2665	0.3049	0.2514	0.3114	0.1231	0.3771	0.3102	0.1651	****	0.8000
SF	0.1055	0.0923	0.1851	0.2414	0.1706	0.1377	0.1539	0.1438	0.2231	****

注:****为同一居群间的遗传比较。

基于 Nei 的遗传距离,采用非加权组平均法(UPGMA)分别构建了群体和个体的系统发育树,并进行了聚类分析。群体聚类分析结果如图 4 所示,20 个居群主要被分为两组,同组内居群之间的遗传距离较近。第一个类群由嫩江、嘉荫、沾河、通北(TB)和孙吴组成,这些居群分布在高纬度地区。剩下的 15 个居群聚类成一个类群,包括

五营(WY)、鹤北(HB)、铁力(TL)、方正(FZ)、双丰(SF)、迎春(YC)、东方红、八五三、桦南、密山、绥阳、东京城、大海林、山河屯(SHT)和林口(LK)。其中,距离较近的鹤北和铁力,东方红和八五三,大海林和山河屯,均形成最小的聚类。黑龙江省茶条槭的分布居群随着地理距离的减小,亲缘关系逐渐接近,遗传距离也逐渐缩小。

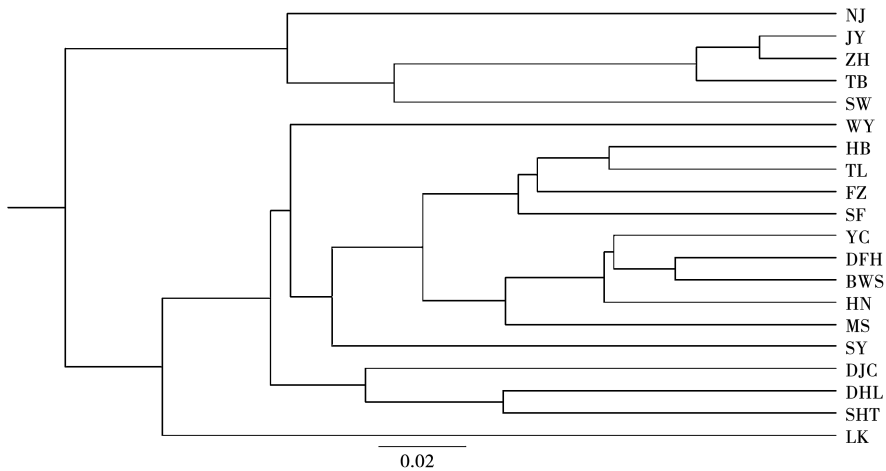


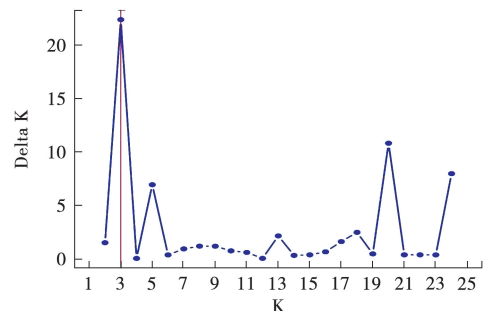
图 4 20 个居群的 UPGMA 聚类结果

2.7 居群结构分析

为了更加深入的了解 20 个居群 400 份茶条槭样品之间的居群的遗传背景,探究其居群间的遗传分化和居群结构,基于贝叶斯模型的群体聚类方法,使用 StructureSelector 中根据 Evanno^[14]的方法计算得到,当 $K=3$ 时, ΔK 为最大值(图 5),表明 20 个群体中 3 个基因库的存在,分别为 Q1、Q2、Q3(图 6)。由表 9 可知,当 $K=3$ 时,嫩江、密山、沾河、铁力、东方红、嘉荫、八五三、双丰的基因组成主要来源于基因库 2;通北、五营、桦南、孙吴、绥阳、方正、林口的基因组成主要源于基因库 1;通北、迎春、山河屯、东京城、大海林的基因组成主要源于基因库 3。

说明这些居群非均质、具有明显的遗传结构。

通过 400 个样品的 STRUCTURE 结果图表(图 6、表 9)可知居群内和群居间存在基因的相互渗透,居群之间存在明显的遗传分化。

图 5 STRUCTURE 分析的 ΔK 方法绘制的 K 值变动图

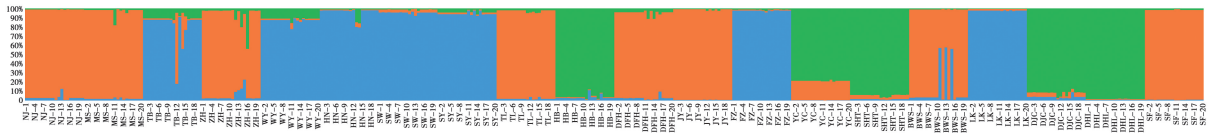


图6 K=3时400个样品的STRUCTURE结果

表9 STRUCTURE中K=3时各群体的样本比例

K=3	1	2	3
NJ	0.0323	0.9555	0.0122
WY	0.8688	0.0171	0.1141
DJC	0.0411	0.0443	0.9146
HB	0.0348	0.0112	0.9540
TL	0.0218	0.9506	0.0276
JY	0.0090	0.9779	0.0131
SW	0.9525	0.0346	0.0129
DHL	0.0108	0.0088	0.9804
YC	0.0060	0.2102	0.7839
SHT	0.0166	0.0416	0.9418
DFH	0.0282	0.9219	0.0499
HN	0.9585	0.0141	0.0273
ZH	0.0492	0.8886	0.0623
SY	0.9400	0.0181	0.0419
MS	0.0225	0.9494	0.0280
BWS	0.1123	0.8761	0.0115
TB	0.8199	0.0776	0.1026
FZ	0.9735	0.0114	0.0151
LK	0.9743	0.0180	0.0077
SF	0.0104	0.9722	0.0174

2.8 不同居群遗传分化 AMOVA 分析

从分子方差分析(AMOVA)结果(表10)可知,居群内遗传变异较小,占变异总量的22.43%,主要变异来自居群间,其占遗传变异总量的77.57%,因此可以看出遗传变异主要来自居群间。

表10 居群 AMOVA 分析

变异来源	自由度 df	平方和 SS	均方 MS	方差分量 Est. Var.	变异百分比/%
居群内	19	1494.953	78.682	3.915	77.57
居群间	380	430.050	1.132	1.132	22.43
总量	399	1925.003		5.047	100

3 讨论

3.1 茶条槭 SSR 标记引物的筛选

在槭属其他树种的相关研究中,刘春苹^[14]对色木槭的遗传结构进行分析时,从现有的色木槭及其他相关树种中筛选了引物。刘林^[15]在五角枫的遗传多样性研究中,采用了从烟草中开发的23对叶绿体微卫星 cpSSR 通用引物。张翠琴等^[16-17]在研究五角枫的遗传多样性时,也参考了其他同属树种的引物。杨娟^[18]在研究金钱槭遗传多样性时,

使用了从通用引物中筛选出的叶绿体微卫星 cpSSR 引物。郝云庆等^[19]在研究五小叶槭时,则使用了加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的第9套 ISSR 引物序列进行初步筛选。

与使用同属其他树种的引物和通用引物相比,利用转录组数据开发的 SSR 标记具有显著优势。全长转录组测序技术是一种分子实时测序方法,相较于二代测序技术,它能够从头测序完整的 mRNA,从而获取转录本的全长信息^[20]。转录组数据不仅包含丰富的基因表达信息,还涵盖大量 SSR(简单序列重复)位点,这些位点广泛分布于基因组中,使得转录组数据成为开发 SSR 分子标记的理想资源^[21]。但目前通过利用转录组数据开发 SSR 标记的新方法正在被广泛采纳,例如在牧草种质资源如苜蓿(*Medicago sativa*)^[22]、木豆(*Cajanus cajan*)^[23]和鸭茅(*Dactylis glomerata*)^[24]等方面。这些标记更具物种特异性,能够更准确地反映目标物种的特征,并且降低了与相关物种的交叉扩增可能性。此外,这些标记通常展示出更高的内部多态性,它们基于直接来自研究物种的序列,能更好地捕捉种群内的变异。相比于传统方法,这种基于转录组的 SSR 标记开发省去了大量的交叉扩增验证过程,从而减少了因非特异扩增而产生的误解风险^[25]。

本研究中,通过分析茶条槭的三代全长转录组数据,总计设计了92223对引物。在随机筛选的100对引物中,确定了13对优质引物,这些新开发的 SSR 分子标记引物不仅为茶条槭物种的遗传分析提供了强有力的工具,还为近缘物种的分子标记研究提供了重要参考,拓宽了茶条槭及其相关物种在遗传多样性和进化研究中的应用前景。

3.2 茶条槭遗传多样性分析

本研究对黑龙江省20个居群的茶条槭群体进行遗传多样性分析,Shannon 信息指数为33.4%,高于庙台槭^[26](*A. miaotaiense*)31.45%,低于金钱槭^[27]55.63%。其中,沾河居群的遗传多样性最高(0.499),其次为嫩江居群(0.492),孙吴居群排名第三(0.446),均分布在高纬度地区。原因可能是高纬度地区的环境通常更加复杂多变,包括气候、土壤、水分等因素。这种环境的异质性可能促使植物适应多样化的生态条件,进而产生丰富

的表型多样性和遗传多样性。其次,高纬度地区气候寒冷且生长季较短,植物面临较强的生存压力。适应不同环境条件的个体可能更容易被自然选择保留,进而导致遗传多样性增加。高强度的自然选择也可能加速基因突变或重组,从而形成多样化的基因库。由于地理隔离和居群间的距离较远,基因流动受限,导致茶条槭在不同高纬度居群间发生较高的遗传分化。个体居群可能会由于遗传漂变积累不同的等位基因频率,进一步推动遗传多样性的提升。茶条槭显示出较高的遗传多样性,这可能与其自然适应性和漫长的进化历程有关。茶条槭分布于我国东北、华北和西北等地,这些区域具有不同的地理和气候条件,促使茶条槭群体积累了丰富的遗传变异。此外,茶条槭有着漫长的进化历史,现存群体保留了许多祖先的遗传特征。茶条槭既能适应温暖湿润的环境,又能够抵抗恶劣气候,通常生长在森林、河流边及半阳坡等地。这些特性显示了茶条槭的强大环境适应力,有利于保持其高度的遗传多样性。因此,漫长的进化历史、广泛的地理分布和强大的环境适应能力是茶条槭高遗传多样性的重要原因。

3.3 茶条槭不同居群遗传分化与基因流

对茶条槭的遗传结构特征的研究,发现其居群间变异(77.57%)显著高于居群内变异(22.43%)。这一结果与兴安杜鹃(*Rhododendron dauricum*)的研究发现相似^[28]。这种遗传变异模式可能反映了茶条槭对不同生态环境的适应过程,也可能是其进化历史的结果。植物的繁育系统与遗传分化之间的关系复杂,受到多个因素的影响。这些因素包括但不限于花粉和种子的传播方式、基因流动、基因漂变以及栖息地分化^[29]。这些因素的相互作用塑造了茶条槭居群独特的遗传结构。

基因流分析结果显示,个体近交系数(F_{is})为 -0.8825 ,表明茶条槭居群内杂合程度较高。这一结果暗示茶条槭种群正经历积极的进化过程,通过增加杂合性来提高遗传多样性,从而增强种群的生存能力和环境适应性。高度的杂合性可能有助于茶条槭应对环境变化和抵抗病虫害,提高其长期生存的潜力。群体近交系数(F_{it})为 -0.2044 ,进一步证实整个群体的近亲交配程度相对较低,这有利于维持种群的遗传健康。

茶条槭作为两性花植物,可以表现出雌雄同株或异株的特性^[30]。这种繁育系统的灵活性增强了居群间花粉的传递,从而促进了居群间的遗传多样性交流^[31]。这种机制可能是茶条槭维持高度遗传多样性的关键因素之一。根据Wright^[32]的研究,当基因流 $N_m > 1$ 时,居群间的遗传分化

将受到抑制;而当基因流 $N_m < 1$ 时,遗传分化则会在居群之间形成。本研究中基因流(N_m)均值为 0.4440 ,表明茶条槭居群间存在中等水平的基因交流,维持了居群间一定程度的遗传分化。

聚类分析将20个居群分为两个主要类群且,第一个类群由嫩江、嘉荫、沾河、通北和孙吴组成,这些居群分布在高纬度地区。另一个类群由剩下的15个居群组成,包括五营、鹤北、铁力、方正、双丰、迎春、东方红、八五三、桦南、密山、绥阳、东京城、大海林、山河屯和林口。表明这两个类群在遗传背景和适应性方面存在显著差异。

4 结论

通过对黑龙江省20个茶条槭居群的分析,发现遗传多样性最高的居群为高纬度地区的沾河居群、嫩江居群和孙吴居群遗传多样性分别为 0.499 、 0.492 和 0.446 。建议作为重点保护种源。茶条槭种群的遗传结构呈现出以下特征:居群间变异较高,居群内杂合度较高,居群之间存在一定程度的遗传分化,同时基因流动水平适中($N_m < 1$),表型多样性和遗传多样性在高纬度地区更为显著,物种迁移方向为高纬度扩散到低纬度。

参考文献:

- [1] 李雷鹏,马晓倩,孙亮,等.茶条槭在东北地区的研究现状及展望[J].东北林业大学学报,2007,35(10):81-82.
- [2] DONG J, ZHAN Y G. Effects of several physiochemical factors on cell growth and Gallic acid accumulation of *Acer ginnala* Maxim cell suspension culture[J]. African Journal of Biotechnology, 2011, 10(40): 7831-7839.
- [3] QI F H, JING T Z, WANG Z X, et al. Fungal endophytes from *Acer ginnala* maxim: isolation, identification and their yield of Gallic acid [J]. Letters in Applied Microbiology, 2009, 49(1): 98-104.
- [4] LIAO C Y, WU T C, YANG S F, et al. Effects of NAC and Gallic acid on the proliferation inhibition and induced death of lung cancer cells with different antioxidant capacities[J]. Molecules, 2021, 27(1): 75.
- [5] YANG J X, JI Y T, SUI J J, et al. Hypoglycemic action of polyphenols from *Toona sinensis* [J]. Current Topics in Nutraceutical Research, 2020, 18(2): 183-190.
- [6] JIANG Y, PEI J, ZHENG Y, et al. Gallic acid: a potential anti-cancer agent [J]. Chinese Journal of Integrative Medicine, 2022, 28(7): 661-671.
- [7] 马忠华,张茂松,马传恩,等.茶条槭专用经济林培育技术要点[J].特种经济动植物,2005,8(5):22.
- [8] YE H, WU J H, WANG Z, et al. Population genetic variation characterization of the boreal tree *Acer ginnala* in Northern China [J]. Scientific Reports, 2020, 10(1): 13515.
- [9] LIU C P, TSUDA Y, SHEN H L, et al. Genetic structure and hierarchical population divergence history of *Acer mono* var. *mono* in South and NorthEast China[J]. PLoS One, 2014, 9(1): e87187.
- [10] AKKAK A, SCARIOT V, TORELLO MARINONI D, et al.

- Development and evaluation of microsatellite markers in *Phoenix dactylifera* L. and their transferability to other Phoenix species[J]. *Biologia Plantarum*, 2009, 53(1): 164-166.
- [11] KIKUCHI S, SHIBATA M. PERMANENT GENETIC RESOURCES; Development of polymorphic microsatellite markers in *Acer mono* Maxim [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(2): 339-341.
- [12] ZHOU Q, WANG G J, LI Y G. Analysis of the conservation status, genetic diversity and population structure of endangered *Ostrya rehderiana* resources using SSR markers[J]. *Forests*, 2023, 14(8): 1519.
- [13] TERUI H, LIAN C L, SAITO Y, et al. Development of microsatellite markers in *Acer capillipes* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6(1): 77-79.
- [14] 刘春苹. 色木槭天然种群遗传结构及系统地理学分析[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2013.
- [15] 刘林. 五角枫群体遗传差异研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2017.
- [16] 张翠琴. 五角枫种群遗传多样性研究[D]. 临汾: 山西师范大学, 2015.
- [17] 张翠琴, 林丽丽, 王祎玲. 山西霍山五角枫不同海拔种群遗传多样性研究[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(5): 66-70.
- [18] 杨娟. 金钱槭属植物居群遗传结构及谱系地理研究(续) [D]. 西安: 西北大学, 2008.
- [19] 郝云庆, 罗晓波, 王晓玲. 珍稀濒危植物五小叶槭 ISSR-PCR 反应体系的建立和优化[J]. *四川林业科技*, 2018, 39(5): 17-21.
- [20] LIU D, YAN F L, LIU C M, et al. Developing EST-SSR markers for identifying and evaluating *Asparagus* germplasm resources based on transcriptome sequences [J]. *Horticulturae*, 2024, 10(2): 121.
- [21] SINGH H C, TIWARI V, TIWARI A, et al. Development of EST-SSR markers in *Bergenian ciliata* using *de novo* transcriptome sequencing [J]. *Genome*, 2024, 67(4): 119-124.
- [22] LIU Z P, CHEN T L, MA L C, et al. Global transcriptome sequencing using the Illumina platform and the development of EST-SSR markers in autotetraploid alfalfa [J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e83549.
- [23] DUTTA S, KUMAWAT G, SINGH B P, et al. Development of genic-SSR markers by deep transcriptome sequencing in pigeonpea *Cajanus cajan* (L.) Millspaugh [J]. *BMC Plant Biology*, 2011, 11: 17.
- [24] HUANG L K, YAN H D, ZHAO X X, et al. Identifying differentially expressed genes under heat stress and developing molecular markers in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) through transcriptome analysis [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2015, 15(6): 1497-1509.
- [25] ZHAO Z N, ZHANG H W, WANG P X, et al. Development of SSR molecular markers and genetic diversity analysis of *Clematis acerifolia* from Taihang Mountains[J]. *PLoS One*, 2023, 18(5): e0285754.
- [26] 李珊. 用 RAPD 标记检测庙台槭自然居群的遗传结构和遗传分化[D]. 西安: 西北大学, 2001.
- [27] 李珊. 金钱槭属植物保护遗传学与分子亲缘地理学研究[D]. 西安: 西北大学, 2004.
- [28] 姜楠. 基于叶绿体 DNA 的兴安杜鹃遗传结构与亲缘地理学研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2016.
- [29] Putenikhin V P. Phenotype analysis of picea obovata in the southern Urals population structure [J]. *lesovedenie*. 1997, 6: 37-49.
- [30] 梁鸣, 张悦, 杨轶华, 等. 槭属植物种子解剖生物学的研究 [J]. *林业科技*, 2007, 32(3): 9-12.
- [31] HOGGIN P M, PEAKALL R. Evaluation of the contribution of genetic research to the management of the endangered Plant *Zieria prostrata* [J]. *Conservation Biology*, 1999, 13(3): 514-522.
- [32] WRIGHT S. The genetical structure of populations[J]. *Annals of Eugenics*, 1951, 15(4): 323-354.

Genetic Diversity Analysis of *Acer tataricum* subsp. *ginnala* Germplasm Resources in Heilongjiang Province

SHU Yu^{1,2,3}

(1. College of Continuing Education, Heilongjiang Open University, Harbin 150080, China; 2. College of Landscape Architecture, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China; 3. Heilongjiang Forestry Sciences Research Institute, Harbin 150081, China)

Abstract: In order to further study the genetic diversity of *Acer tataricum* subsp. *ginnala* germplasm resources in Heilongjiang Province, and provide reference for breeding, germplasm innovation, genetic improvement, and conservation of these resources, 13 pairs of SSR molecular markers were developed based on transcriptome data. A total of 33 alleles were detected across 20 populations and 400 samples of *A. tataricum* subsp. *ginnala*. The number of alleles at different SSR loci varied, ranging from 2 to 5, with an average of 2.538 5 alleles per locus. The genetic structure of the populations showed high variation among populations, high heterozygosity within populations, and a certain degree of genetic differentiation. Gene flow was moderate ($N_m < 1$), and the migration direction of the species was from higher to lower latitude regions. Based on the results of genetic diversity analysis, the populations from Sunwu, Nenjiang, and Zhanhe are recommended as key conservation sources.

Keywords: *Acer tataricum* subsp. *ginnala*; genetic diversity; SSR molecular markers; genetic structural characteristics