

DOI:10.12171/j.1000-1522.20240399

基于 SSR 分子标记的紫椴遗传多样性分析和 指纹图谱构建

高磊¹ 刘丹²

(1. 聊城大学农业与生物学院, 山东 聊城 252000; 2. 山东省林草种质资源中心, 山东 济南 250100)

摘要:【目的】紫椴是重要的经济树种和国家重点保护的濒危树种, 基于 SSR 分子标记, 分析不同种源紫椴遗传多样性, 构建指纹图谱, 旨在为紫椴居群的保护、全国紫椴种质资源的收集保存以及资源库建设提供参照。【方法】从国内 5 个省 11 个市采集 16 个种源的 173 份紫椴样品, 采用 SSR 分子标记进行 PCR 扩增, 分析紫椴的遗传多样性; 利用分子方差分析和种群聚类分析探究居群间的遗传分化; 根据筛选的引物构建紫椴的指纹图谱。【结果】(1)从 12 组引物中筛选出了 8 组表现出高度多态性和良好重复性的引物, 这些引物总共识别出 101 个等位基因, 平均每个多态性位点上分布有 12.6 个等位基因。多态信息含量在不同位点间的变动区间为 0.506 ~ 0.897, 平均值达到 0.739。(2)仅需 4 对引物(C110、C840、D150、TC5)即可有效区分所有紫椴个体, 并构建紫椴指纹图谱。(3)紫椴种源的遗传多样性较为丰富, 有效等位基因数为 4.937, Shannon's 信息指数达到 1.777, Nei's 基因多样性则为 0.771。(4)分子方差分析结果表明, 91% 的遗传变异来源于紫椴群体内。(5)根据遗传距离构建进化树, 将 16 个种源划分为 5 个亚类, 多数地理距离较近的种源聚到一起, 表现出较相近的遗传关系。【结论】紫椴群体总体遗传多样性水平较高, 遗传分化处于中等水平, 群体内遗传变异占主导地位。16 个居群中, 吉林省汪清种源(JWQ3)、黑龙江种源(HDN7、HDN8、HDN9)和河北承德市种源(HCD15)遗传多样性水平低, 应进行原地保护, 重点持续关注; 种群 JWQ2、JWQ4、JHL5、HNA10、LDD12 和 LFX13 等的遗传多样性水平较高, 可重点收集资源和保存培育。研究结果为深入研究中国紫椴的居群分布、进化和保护提供科学依据。

关键词: 紫椴; SSR 标记; 遗传多样性; 遗传分化; DNA 指纹图谱; 聚类分析

中图分类号: S792.36 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2025)03-0028-10

引文格式: 高磊, 刘丹. 基于 SSR 分子标记的紫椴遗传多样性分析和指纹图谱构建 [J]. 北京林业大学学报, 2025, 47(3): 28-37. Gao Lei, Liu Dan. Genetic diversity analysis and fingerprint mapping construction of *Tilia amurensis* based on SSR molecular markers [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2025, 47(3): 28-37.

Genetic diversity analysis and fingerprint mapping construction of *Tilia amurensis* based on SSR molecular markers

Gao Lei¹ Liu Dan²

(1. College of Agriculture and Biology, Liaocheng University, Liaocheng 252000, Shandong, China;
2. Shandong Provincial Center of Forest and Grass Germplasm Resources, Jinan 250100, Shandong, China)

Abstract: [Objective] *Tilia amurensis* is an important economic tree species and a nationally protected endangered tree species. Based on SSR molecular markers, this study analyzed the genetic diversity of *Tilia amurensis* from different provenances and constructed DNA fingerprinting profiles, aiming to provide

收稿日期: 2024-11-26 修回日期: 2024-12-17

基金项目: 山东省重点研发计划 (重大科技创新工程) 项目 (2021LZGC023), 国家林木种质资源共享服务平台建设与运行项目 (2005DKA21003)。

第一作者: 高磊。主要研究方向: 园林植物。Email: 17658258675@163.com 地址: 252000 山东省聊城市东昌府区湖南路 1 号聊城大学农业与生物学院。

责任作者: 刘丹, 博士, 正高级工程师。主要研究方向: 林草种质资源与古树名木保护研究。Email: 1821618@163.com 地址: 250100 山东省济南市历城区港九路 2011 号山东省林草种质资源中心。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

references for the conservation of *Tilia amurensis* populations, the nationwide collection and preservation of germplasm resources, and the establishment of germplasm resource banks. [Method] A total of 173 *Tilia amurensis* samples from 16 provenances across 11 cities in 5 provinces in China were collected. SSR molecular markers were used for PCR amplification to analyze the genetic diversity of *Tilia amurensis*. Molecular variance analysis (AMOVA) and population clustering analysis were employed to investigate genetic differentiation among populations. Specific primers were selected to construct DNA fingerprinting profiles for *Tilia amurensis*. [Result] (1) From 12 primer pairs, 8 highly polymorphic and reproducible primer pairs were selected, collectively identifying 101 alleles, with an average of 12.6 alleles per polymorphic locus. The polymorphism information content (PIC) across loci ranged from 0.506 to 0.897, with a mean value of 0.739. (2) Only 4 primer pairs (C110, C840, D150, TC5) were required to effectively distinguish all *Tilia amurensis* individuals and construct their DNA fingerprinting profiles. (3) The genetic diversity of *Tilia amurensis* provenances was relatively high, with an effective number of alleles (N_e) of 4.937, Shannon's information index (I) of 1.777, and Nei's gene diversity (H) of 0.771. (4) Molecular variance analysis (AMOVA) revealed that 91% of genetic variation originated from within-population differences. (5) A phylogenetic tree constructed based on genetic distances classified the 16 provenances into 5 subclusters, with geographically proximate provenances clustering together, indicating closer genetic relationship. [Conclusion] The *Tilia amurensis* populations exhibit a relatively high overall level of genetic diversity, with moderate genetic differentiation observed. Intra-population genetic variation is predominant. Among the 16 populations, the seed sources from Wangqing, Jilin Province (JWQ3), Heilongjiang Province of northeastern China (HDN7, HDN8, HDN9), and Chengde City, Hebei Province of northern China (HCD15) show low genetic diversity levels and should be prioritized for in situ conservation and continuous monitoring. Populations JWQ2, JWQ4, JHL5, HNA10, LDD12, and LFX13 demonstrate higher genetic diversity and could serve as key targets for resource collection and conservation cultivation. This study provides a scientific basis for further research on population distribution, evolutionary patterns, and conservation strategies of *Tilia amurensis* in China.

Key words: *Tilia amurensis*; SSR marker; genetic diversity; genetic differentiation; DNA fingerprint mapping; cluster analysis

紫椴(*Tilia amurensis*)是锦葵科(Malvaceae)、椴属(*Tilia*)的落叶乔木,主产于中国东北三省,北京、河北和山东等地亦有少量分布,属于国家二级重点保护的濒危植物^[1-2]。作为重要的蜜源树种,紫椴树形优美且木材细腻,是优良的城市园林绿化树种和建筑木材原料^[3]。野生紫椴存在种子休眠现象,影响其种群更新,因此目前处于衰退状态^[4]。此外,紫椴喜光稍耐阴,对土壤要求严格,面临环境退化与生存面积减少的危险^[5]。

种质资源是植物育种的基础,开展紫椴资源遗传多样性与群体遗传结构分析对其育种、种质资源收集及保存鉴定具有重要的指导意义^[6]。随着分子生物学技术的发展,扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)等分子标记技术已经成为研究植物遗传多样性、群体遗传结构、构建植

物指纹图谱等的重要手段^[7-9]。相较于其他几种分子标记,简单重复序列标记(simple sequence repeat, SSR)因其良好稳定性和高多态性而广泛应用于植物遗传多样性和遗传结构分析中^[10]。程玮哲等^[11]采用 SSR 荧光标记对 10 个白杨派资源进行遗传多样性分析,发现 Shannon 指数和基因多样性指数分别为 1.433 4 和 0.694 3,表明该材料具有较高遗传多样性,并利用 2 对 SSR 引物构建了 DNA 指纹图谱。吕晓娜等^[12]通过 SSR 引物分析了 13 个北京枣树(*Ziziphus* spp.)品种的遗传多样性,筛选出 4 对引物即可将所有品种全部区分开。任重等^[13]筛选出 7 对 SSR 引物,对中国黄连木(*Pistacia chinensis*)种质资源进行亲缘关系与遗传分化特征分析,并成功构建了 DNA 分子身份证,实现了在分子层面鉴定与保护种质资源。

目前椴属植物在分子水平上有一定的研究,王欢利等^[14]采用 15 对 SSR 引物对 5 个南京椴(*Tilia miqueliana*)天然群体进行遗传结构分析,发现其

96%的变异来自群体内,遗传多样性丰富,遗传分化小。穆立嵩等^[15]采用简单重复间序列标记(inter-simple sequence repeat, ISSR)技术,对不同纬度、不同海拔的紫椴种群进行遗传多样性研究,发现其遗传多样性随海拔升高而逐渐降低。王东升运用 AFLP 荧光标记对紫椴进行遗传多样性分析,发现观测等位基因数、观测有效等位基因数、Nei's 基因多样性、Shannon's 信息指数分别介于 1.992 2~2.000、1.273 8~1.395 7、0.180 2~0.244 6、0.298 6~0.383 6, 具有较大的遗传多样性^[16]。然而,关于采用 SSR 标记对来自于中国多个省份的紫椴种质资源进行遗传多样性分析的研究还未见报道。因而,本研究选取能反映中国紫椴资源遗传多样性水平的我国 5 个紫椴分布省(吉林省、黑龙江省、辽宁省、河北省和山东省),从中采集 16 个紫椴种质资源,拟通过 SSR 分子标记技术分析紫椴种源的遗传多样性水平,旨在揭示紫椴的遗传结构、居群内和居群间的遗传分化程度以及基因流水平,从分子水平探讨紫椴的濒危原因,发掘高遗传多样性水平的种群,建立核心种质资源,为低遗传多样性水平的种源实施保护策略提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

在文献查阅和调查的基础上,在全国紫椴分布的主要区域收集资源,其中包括吉林省、黑龙江省、

辽宁省、河北省和山东省 5 个省, 11 个市,共采集到 16 个种源 173 份样品(表 1)。调查时随机选取各种源内紫椴健康个体,相邻植株的间距在 20 m 以上,取若干幼嫩、无病害叶片,经变色硅胶干燥处理后保存至-80 ℃超低温冰箱备用^[17]。

1.2 研究方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

运用改良版 CTAB 法进行紫椴基因组 DNA 的提取^[18],采用 Nanodrop2000 检测 DNA 的浓度和纯度,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,将合格的 DNA 样品保存于-20 ℃冰箱用于后续试验^[13]。

1.2.2 PCR 扩增与毛细管电泳上机检测

基于针对椴树属植物遗传多样性的相关研究所采用的引物^[14,19-20],从 12 对引物中筛选出 8 对扩增效果好的 SSR 引物(表 2)。PCR 扩增体系为 20 μL: 2 × Phanta Max Master Mix 10 μL; 上、下游引物各 0.15 μL; 模板 DNA 1 μL; ddH₂O 补足至 20 μL^[11]。PCR 反应程序为 95 ℃ 5 min 预变性; 95 ℃ 30 s 变性, 55 ℃ 30 s 退火, 72 ℃ 30 s 延伸, 35 个循环; 72 ℃ 10 min 延伸; 4 ℃, 保存^[13]。

完成 PCR 扩增反应后 24 h 内,取 PCR 产物 0.3 μL、分子量内标 0.5 μL 和去离子甲酰胺 9.5 μL 混合加入 PCR 板, 95 ℃ 变性 5 min, 4 ℃ 冷却后离心, 1 × Buffer 缓冲液上机检测^[21]。上机检测的具体参数设置为模块文件 GeneMapper50_POP7_1, 运行电压 15.0 kV, 进样电压 1.6 kV, 进样时间 15 s, 温

表 1 紫椴种源地理分布

Tab. 1 Geographical distribution of provenance of *Tilia amurensis*

种群	来源地	纬度	经度	海拔/m
JWQ1	吉林省汪清县	43°23'41"N	130°11'49"E	718.00
JWQ2	吉林省汪清县	43°20'08"N	130°00'15"E	398.36
JWQ3	吉林省汪清县	43°22'56"N	130°04'09"E	560.61
JHC4	吉林省珲春市	42°49'26"N	130°29'29"E	219.70
JHL5	吉林省和龙市	43°18'27"N	128°53'42"E	1 004.63
JHL6	吉林省和龙市	42°20'55"N	129°06'23"E	586.43
HDN7	黑龙江省东宁市	43°47'10"N	131°08'37"E	368.45
HDN8	黑龙江省东宁市	43°28'48"N	131°03'46"E	820.90
HDN9	黑龙江省东宁市	44°43'10"N	131°04'43"E	719.01
HNA10	黑龙江省宁安市	44°04'39"N	128°48'41"E	390.12
HML11	黑龙江穆棱市	44°15'59"N	130°02'26"E	567.70
LDD12	辽宁省丹东市	40°56'21"N	124°48'18"E	591.27
LFX13	辽宁省阜新市	41°49'22"N	121°45'23"E	556.50
LLY14	辽宁省凌源市	40°47'19"N	118°55'15"E	977.36
HCD15	河北省承德市	40°37'14"N	117°28'40"E	1 176.30
SZB16	山东省淄博市	36°17'37"N	118°05'45"E	946.15

表2 8对紫椴SSR分子标记引物信息

Tab. 2 8 pairs of SSR molecular marker primer information of *Tilia amurensis*

引物名称	引物序列(5'-3')	重复单元	产物/bp
B2410	F: TATAGATGCCCGTTCCAAGC R: CATCAAGACAAGGGCAATGA		195
B2550	F: ATTGTGCTGTGGTGGCATT R: TACCCCTGCATGTTTTCCAT		226
B2915	F: CGACCTGGTTCTCTGGTTTC R: CGACCAGGTGCATATAGCCT		268
B485	F: TGGATGGTGATGGTAGGGTT R: GTGTGTCAACTGGCAGCAAT		278
C840	F: TATTGGTGGTGGTAGTGCGA R: CCCATACGAATTCGCTTCAT		190
C110	F: AGAGCTGCCTTCAAGCTACG R: ATACCCCGGGCGTTATACTT		150
D150	F: GCTTGTTTTCAAGAGTCGGC R: ATGGGGAAAATTGTATGGCA		170
Tc5	F: TTTTCATACATTTAGAGACTTTTAGCA R: TGCATGATTTGTATGTTAGGG	(AG) ¹²	150

度 63 °C, 电流稳定性 30.0 uA, 每个试验重复 3 次。

1.2.3 数据分析

使用 Excel 2010 软件统计并整理 SSR 荧光毛细管电泳数据, 利用 Genalex 6.501^[22]、PopGene 1.32^[23]、和 Powermarker V3.25 软件^[10]计算等位基因数、有效等位基因数、Shannon 信息指数、观测杂合度、期望杂合度、Nei's 遗传多样性指数和多态信息含量等相关指标, 通过分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 探究群体遗传变异来源。根据居群间的遗传距离, 利用 MEGA 11^[24]软件的邻接法 (neighbor joining, NJ) 法进行聚类分析, 构建进化树。最后地理距离和遗传距离之间的相关性采用 Genalex 6.501 进行 Mantel 检验。

1.2.4 紫椴种群指纹图谱构建

采用核心引物技术构建紫椴的指纹图谱, 遵循以最精简的引物鉴别最多品种的原则, 具有高效性、可重复性和标准化。综合考虑 Nei's 遗传多样性、等位基因数、多态性信息含量等关键参数, 在

Powermarker V3.25 软件进行统计, 最终精选出核心引物。紫椴属于二倍体, 等位基因片段为成对存在, 按照等位基因片段大小命名 (如 C110 249 bp/249 bp); 同时利用公式 $P = 1/2n$ 评估指纹图谱的唯一性, 其中 n 为核心引物的多态性位点总数, P 为任意两个品种间出现相同指纹图谱的概率^[25]。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的多态性

利用 8 对 SSR 引物对 173 份来自 16 个种源的紫椴样品进行了遗传多样性分析, 共检测到 101 个等位基因, 其中每对引物的等位基因数目介于 6 ~ 23 个之间, 平均数为 12.6 个 (表 3)。具体而言, TC5 引物检测到的等位基因数量最多, 达到了 23 个, 其次是 D150、C110 和 B2410, 而 B2550 引物检测到的等位基因数量最少, 仅为 6 个。有效等位基因数的范围在 2.212 ~ 11.970 之间, 平均值为 4.937。此外, 8 对引物的多态性信息含量范围为

表3 8对SSR引物扩增产物及其多态性分析

Tab. 3 Amplification products and polymorphism analysis of 8 pairs of SSR primers

引物名称	区间/bp	等位基因数(N_a)	有效等位基因数(N_e)	Shannon's信息指数(I)	观测杂合度(H_o)	期望杂合度(H_e)	Nei's遗传多样性(H)	多态性信息含量(PIC)
B2550	216 ~ 229	6	2.732	1.177	0.053	0.636	0.695	0.640
B485	230 ~ 249	7	2.212	1.187	0.412	0.552	0.904	0.897
B2915	256 ~ 263	7	3.179	1.370	0.010	0.689	0.739	0.694
C840	171 ~ 229	10	4.923	1.794	0.646	0.799	0.885	0.875
B2410	180 ~ 200	11	3.007	1.434	0.052	0.670	0.827	0.807
D150	135 ~ 174	18	5.820	2.205	0.405	0.832	0.721	0.677
C110	245 ~ 271	19	5.656	2.266	0.369	0.826	0.560	0.506
TC5	125 ~ 172	23	11.970	2.785	0.196	0.920	0.836	0.818
平均		12.6	4.937	1.777	0.268	0.741	0.771	0.739

理距离之间的相关性不显著。

2.4 紫椴种群指纹图谱构建

综合考虑 Nei's 遗传多样性、等位基因数、多态性信息含量等关键参数, 最终精选出 4 对核心引物 (C110、C840、D150、TC5)。4 对引物组合共产生多态性位点 69 个, 意味着任意两个品种间出现相同指纹图谱的概率低至 1/138, 显示了指纹图谱的高度独特性, 为紫椴及其近缘物种的快速准确鉴定提供了有效手段。将 4 对核心引物按照顺序排列并赋值为 C110(A)、C840(B)、D150(C)、TC5(D), 使用位点带码和各位点扩增的等位基因形成各个种质的指纹带码。如 JWQ1-1 的代码为 A249/249-B0/0-C0/0-D0/0, 代表由引物 C110 对样本 JWQ1-1 扩增产生的二倍体等位基因数为 249 个和 249 个, 中间用“/”分隔, 由引物 C840 对样本 JWQ1-1 扩增产生的二倍体等位基因数为 0 个, 因此为“0/0”; 由此类推, 再用“-”连结每个引物产生的等位基因数。173 个紫椴个体的 DNA 指纹图谱见表 6。

3 讨 论

3.1 紫椴遗传多样性分析

利用 SSR 分子标记技术, 对 16 个种源的紫椴种质资源进行扩增, 并深入分析遗传多样性, 结果显示, 选取的 8 对引物均呈现较高多态性, 其多态性信息含量均超过 0.5。173 个紫椴样本共检测到 101 个等位基因, 其中引物 TC5、D150 和 C110 检测到的等位基因数量较多, 引物 B2250、B485 和 N2915 检测到的等位基因较少; 遗传多样性指数平均值为 0.771, 大于 0.5, 平均 Shannon's 信息指数为 1.777, 高于其他椴属研究结果^[15-16]。椴属植物具有昆虫传粉的生物学特性, 居群内部基因流动扩大, 导致紫椴种质的遗传多样性水平较高, 适应环境和抗逆的能力增强^[26]。

依据 Wright^[27]的界定标准: 当遗传分化系数位于 0~0.05 区间时, 表明群体间的遗传分化程度较低; 当遗传分化系数在 0.05~0.15 范围内, 则群体间的分化程度中等; 当遗传分化系数处于 0.15~0.25 之间时, 意味着群体间的分化程度较高; 而当遗传分化系数超过 0.25 时, 表明群体间的遗传分化程度极高。本研究中紫椴群体遗传分化系数为 0.093, 遗传分化程度中等, 并且群体内的变异(91%)在遗传变异中占主导地位, 说明群体内个体具有应对生境变化的广泛适应性与灵活性^[16]。本研究结果与王欢利等^[14]对南京椴的研究结果相似, 南京椴群体遗传分化系数为 0.03, 遗传分化程度较低, 并且群体内变异(96%)远大于群体间变异(4%)。紫椴在进化史上未

表 6 紫椴个体 DNA 指纹图谱

Tab. 6 Individual DNA fingerprint mapping of *Tilia amurensis*

样本号	指纹图谱
JWQ1-1	A249/249-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ1-2	A256/256-B182/182-C158/164-D137/137
JWQ1-3	A254/254-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ1-4	A253/253-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ1-5	A0/0-B182/182-C158/160-D148/148
JWQ1-6	A0/0-B277/277-C0/0-D0/0
JWQ1-7	A0/0-B182/227-C158/164-D137/137
JWQ1-8	A255/255-B182/227-C160/160-D141/150
JWQ1-9	A245/251-B182/182-C158/158-D141/150
JWQ1-10	A249/249-B182/182-C158/158-D150/150
JWQ2-1	A257/276-B183/227-C160/162-D135/135
JWQ2-2	A258/264B182/182C158/160D141/141
JWQ2-3	A258/264B182/227C156/158D136/142
JWQ2-4	A0/0B182/182C160/162D135/135
JWQ2-5	A0/0B170/227C158/164D135/141
JWQ2-6	A262/262-B227/227-C0/0-D141/141
JWQ2-7	A258/263-B171/171-C161/165-D141/141
JWQ2-8	A258/264B182/227C162/165D141/141
JWQ2-9	A261/261B182/227C156/158D139/142
JWQ2-10	A258/258B227/227C156/156D140/140
JWQ2-11	A257/263B180/180C160/163D152/152
JWQ2-12	A252/257B171/227C161/164D143/143
JWQ2-13	A258/258B182/226C158/164D142/142
JWQ3-1	A0/0-B227/227-C0/0-D0/0
JWQ3-2	A268/268-B227/227-C0/0-D0/0
JWQ3-3	A271/271-B227/227-C0/0-D0/0
JWQ3-4	A262/262-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ3-5	A260/266-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ3-6	A257/263-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ3-7	A265/271-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ3-9	A266/273-B0/0-C0/0-D0/0
JWQ3-10	A260/260-B229/229-C0/0-D0/0
JWQ3-11	A261/261-B227/227-C0/0-D0/0
JHC4-1	A258/264-B182/182-C161/161-D141/146
JHC4-2	A0/0-B170/226-C158/160-D146/146
JHC4-3	A257/264-B182/227-C160/163-D151/151
JHC4-4	A265/265-B227/227-C0/0-D0/0
JHC4-5	A0/0-B182/218-C158/160-D141/152
JHC4-6	A0/0-B170/227-C158/160-D141/141
JHC4-7	A0/0-B0/0-C0/0-D0/0
JHC4-8	A263/276-B182/226-C159/159-D160/166

表 6(续)
Tab.6 (continued)

样本号	指纹图谱
JHC4-9	A0/0-B182/182-C158/160-D143/143
JHC4-10	A258/276-B183/183-C160/160-D147/147
JHC4-11	A259/259-B182/182-C161/161-D141/141
JHC4-12	A258/258-B171/171-C158/161-D141/141
JHC4-13	A264/264-B171/171-C156/158-D139/139
JHC4-14	A258/264-B182/182-C161/161-D154/154
JHC4-15	A260/260-B182/227-C158/158-D147/147
JHC4-16	A258/264-B171/227-C160/160-D142/142
JHC4-17	A0/0-B182/227-C158/158-D140/142
JHC4-18	A259/259-B182/226-C158/164-D146/150
JHC4-19	A258/258-B171/227-C160/163-D144/144
JHC4-20	A0/0-B170/226-C158/164-D146/146
JHC4-21	A258/264-B179/227-C165/168-D141/141
JHC4-22	A255/258-B180/227-C157/159-D141/141
JHC4-23	A263/263-B227/227-C0/0-D0/0
JHC4-24	A263/275-B171/227-C161/164-D152/156
JHL5-1	A263/263-B182/182-C158/164-D160/160
JHL5-2	A258/258-B182/227-C158/164-D149/149
JHL5-3	A258/264-B182/218-C156/156-D141/141
JHL5-4	A258/264-B171/226-C148/148-D141/148
JHL5-5	A259/264-B0/0-C0/0-D0/0
JHL5-6	A0/0-B182/227-C158/160-D140/140
JHL5-7	A0/0-B182/227-C158/164-D148/148
JHL5-8	A258/276-B182/227-C158/164-D137/140
JHL5-9	A257/257-B182/182-C158/164-D141/144
JHL 5-10	A0/0-B182/227-C158/164-D139/150
JHL 5-11	A0/0-B182/226-C0/0-D0/0
JHL 5-12	A256/260-B182/182-C158/164-D140/148
JHL 5-14	A0/0-B182/227-C158/164-D137/160
JHL 5-15	A0/0-B182/226-C158/164-D140/140
JHL 5-16	A259/259-B182/226-C158/164-D140/140
JHL 5-17	A258/258-B183/183-C158/164-D140/140
JHL 5-18	A0/0-B170/227-C0/0-D148/148
JHL 5-19	A0/0-B182/182-C0/0-D0/0
JHL 5-20	A0/0-B182/226-C158/164-D135/135
JHL 5-21	A258/269-B182/226-C159/165-D150/154
JHL 6-1	A256/260-B171/227-C163/163-D139/141
JHL 6-2	A252/252-B171/171-C156/156-D146/146
JHL 6-3	A259/264-B183/227-C156/158-D139/148
JHL 6-4	A249/249-B183/227-C156/156-D141/141
JHL 6-5	A257/264-B170/226-C156/158-D140/140
JHL 6-6	A252/257-B171/226-C156/156-D135/135

表 6(续)
Tab.6 (continued)

样本号	指纹图谱
JHL 6-7	A258/258-B170/227-C158/164-D148/154
HDN 7-1	A258/258-B170/225-C160/164-D141/141
HDN 7-2	A258/264-B182/226-C160/160-D141/141
HDN 8-1	A258/258-B180/227-C161/161-D130/135
HDN 8-2	A258/264-B183/218-C160/160-D150/150
HDN 8-3	A257/257-B182/227-C158/164-D140/140
HDN 8-4	A258/264-B170/218-C0/0-D0/0
HDN 9-1	A256/261-B226/226-C0/0-D0/0
HDN 9-2	A258/258-B227/227-C0/0-D0/0
HDN 9-4	A262/262-B227/227-C0/0-D139/139
HDN 9-5	A260/260-B227/227-C156/160-D148/148
HNA 10-1	A253/258-B182/226-C0/0-D0/0
HNA 10-2	A256/256-B183/183-C156/156-D144/144
HNA 10-3	A256/256-B182/182-C156/156-D141/141
HNA 10-4	A0/0-B183/216-C152/152-D141/141
HNA 10-5	A258/258-B182/227-C135/135-D135/135
HNA 10-6	A262/269-B182/227-C174/174-D145/145
HNA 10-7	A252/264-B183/183-C164/164-D141/141
HNA 10-8	A258/264-B182/227-C157/157-D135/135
HNA 10-9	A264/282-B182/226-C0/0-D148/148
HNA 10-10	A257/263-B182/182-C156/156-D145/145
HNA 10-11	A258/263-B183/183-C0/0-D146/146
HNA 10-12	A258/258-B182/182-C160/160-D152/152
HML 11-1	A258/258-B183/226-C158/158-D135/135
HML 11-2	A0/0-B182/227-C156/156-D135/135
HML 11-3	A254/254-B182/226-C156/156-D141/141
LDD 12-1	A258/263-B182/218-C164/164-D138/150
LDD 12-2	A256/276-B182/226-C164/164-D139/139
LDD 12-3	A256/263-B182/227-C156/156-D141/141
LDD 12-4	A262/270-B182/226-C0/0-D154/154
LDD 12-5	A257/263-B183/218-C164/164-D160/160
LDD 12-6	A257/263-B182/218-C0/0-D0/0
LDD 12-7	A257/269-B182/226-C164/164-D149/149
LDD 12-8	A0/0-B183/218-C0/0-D0/0
LDD 12-9	A258/258-B183/227-C0/0-D141/141
LDD 12-10	A256/259-B182/218-C0/0-D0/0
LDD 12-11	A257/276-B182/218-C156/156-D148/148
LDD 12-12	A260/260-B180/227-C156/156-D130/130
LFX 13-1	A256/256-B182/226-C156/156-D142/142
LFX 13-2	A252/257-B177/225-C163/163-D143/143
LFX 13-3	A258/258-B183/183-C160/164-D150/150
LFX 13-4	A258/264-B182/227-C148/148-D125/125

表6(续)
Tab.6 (continued)

样本号	指纹图谱
LFX 13-5	A258/263-B177/218-C0/0-D152/152
LFX 13-6	A258/264-B182/226-C165/165-D141/141
LFX 13-7	A257/263-B226/226-C164/164-D141/141
LFX 13-8	A258/264-B183/226-C161/161-D152/152
LFX 13-9	A252/257-B183/218-C164/164-D141/141
LFX 13-10	A258/258-B174/174-C162/162-D135/135
LFX 13-11	A257/264-B183/226-C140/140-D135/135
LFX 13-12	A257/257-B183/227-C156/156-D136/136
LFX 13-13	A258/258-B182/226-C0/0-D0/0
LLY 14-1	A252/257-B183/218-C156/156-D135/135
LLY 14-2	A258/263-B180/218-C0/0-D143/148
LLY 14-3	A258/263-B182/227-C0/0-D148/148
LLY 14-4	A258/264-B227/227-C166/166-D147/147
LLY 14-5	A258/264-B183/183-C156/156-D0/0
LLY 14-6	A252/262-B227/227-C0/0-D135/141
LLY 14-7	A249/258-B182/226-C161/161-D135/135
LLY 14-8	A264/267-B183/227-C158/158-D146/146
LLY 14-9	A258/264-B227/227-C156/156-D144/144
LLY 14-10	A257/257-B183/226-C0/0-D172/172
LLY 14-11	A258/258-B182/218-C0/0-D146/152
LLY 14-12	A0/0-B226/226-C156/156-D146/146
LLY 14-13	A263/270-B183/227-C158/158-D150/150
LLY 14-14	A258/258-B182/182-C0/0-D141/141
HCD 15-1	A258/294-B0/0-C0/0-D150/150
HCD 15-2	A258/294-B182/226-C160/160-D143/143
HCD 15-3	A257/294-B183/218-C160/160-D138/143
HCD 15-4	A257/294-B180/218-C150/150-D139/143
SZB 16-1	A258/264-B183/226-C156/156-D141/147
SZB 16-2	A0/0-B182/182-C158/158-D152/152
SZB 16-3	A257/263-B182/226-C144/144-D140/140
SZB 16-4	A0/0-B179/226-C160/160-D140/140
SZB 16-5	A258/263-B176/176-C156/156-D135/135
SZB 16-6	A257/261-B183/227-C156/156-D140/140
SZB 16-7	A257/257-B182/226-C0/0-D146/146
SZB 16-8	A257/261-B182/182-C0/0-D140/154
SZB 16-9	A264/264-B182/226-C0/0-D146/154
SZB 16-10	A0/0-B182/218-C161/161-D140/145
SZB 16-11	A258/258-B182/227-C156/156-D0/0
SZB 16-12	A258/264-B183/227-C156/156-D146/146
SZB 16-13	A0/0-B226/226-C156/156-D148/148
SZB 16-14	A256/263-B182/226-C0/0-D0/0
SZB 16-15	A258/261-B182/218-C160/160-D147/147

遇到严峻的瓶颈,有性繁殖和无性繁殖确保了遗传稳定性,使其在长期的进化进程中保留了较高水平的遗传多样性,因而紫椴受到遗传变异的威胁较小;其濒危原因可能主要在于生境破坏、生境退化和人为干扰的影响^[15]。

3.2 紫椴种群聚类分析

通过对16个紫椴群体进行聚类分析,将紫椴16个群体分为5个亚群,从聚类结果来看,河北省承德种群(HCD15)在遗传距离为0.16时单独划为一个亚类,与其相似的吉林汪清JWQ3种群、黑龙江东宁(HDN7、HDN8、HDN9)种群和黑龙江穆棱HML11种群。在实际采样过程中发现,这些种群在地理上处于山脉阻隔或河流分割的孤立生境,使其在生态上处于特殊的微气候,并形成了适应性分化^[28-29],结合遗传多样性检测指标,这些种群的遗传多样性水平低于平均水平,濒危的风险更大。因此这种高度隔离分化的种群在物种多样性保护方面具有警示意义^[30],需对这些地区的种源进行重点生态抚育保护,禁止人为扰动,采取野外放置蜂箱,促进群体内昆虫传粉,提高结实率。收集种子并繁育,在合适生境移栽,实现种质资源收集与回归更新^[14]。

通过Mantel检验分析,结果显示紫椴种群遗传距离与地理距离间存在一定的关联性,然而这种相关性不显著^[15]。简曙光等^[31]的研究发现,种群间遗传距离与地理距离在同一国家的相关性不显著,这可能与基因流和生境适应有关。另外木本植物寿命长,异交授粉,其群体遗传分化在一定程度上也会受到人类活动的影响^[32]。

3.3 指纹图谱构建

SSR标记具有位点多、信息含量高、重复性好、共线性高等特点,能够有效鉴定亲缘关系,可以构建DNA指纹图谱,为众多植物品种鉴定和良种选育提供鉴定依据^[33]。李思琪等^[34]利用SSR分子标记为29份文冠果(*Xanthoceras sorbifolium*)种质资源构建了分子身份证;刘加能等^[35]为10份油棕(*Elaeis guineensis*)核心种质构建了DNA指纹图谱;李慧等^[36]采用SSR分子标记为168份皱皮木瓜(*Chaenomeles speciosa*)种质构建了指纹图谱,为其遗传资源管理和种质数据库构建提供了参考。在实际调查中,小叶紫椴(*Tilia amurensis* var. *taquetii*)、裂叶紫椴等因形态特征发生变化形成了紫椴的变种,这些变种容易被忽视,甚至可能出现鉴别错误的情况。本研究首次构建了16个种源173个紫椴个体的指纹图谱,以便提供品种来源、种质类型等信息,这为构建紫椴种质资源核心库提供依据,补充了紫椴遗传多样性评价体系。

4 结 论

通过 SSR 分子标记发现, 16 个种源紫椴总体遗传多样性水平较高, 遗传分化程度中等, 群体内遗传变异(91%)远大于群体间(9%)。种群 JWQ2、JWQ4、JHL5、HNA10、LDD12 和 LFX13 等的遗传多样性水平较高, 可以重点收集这些地点的紫椴资源进行保存培育。吉林省汪清种源(JWQ3)、黑龙江种源(HDN7、HDN8、HDN9)和河北承德市种源(HCD15)遗传多样性水平低于其他种群, 应进行原地保护, 维持原有生境, 降低其消亡的风险。16 个群体进行聚类, 划分为 5 个亚群, 基本按照地理距离进行聚类。研究结果有助于直观了解国内紫椴资源的遗传多样性和差异, 对探究紫椴濒危机制具有重要意义, 同时为种质资源的可持续发展实施有效的保护措施、建立完善的遗传资源管理系统和遗传育种优种亲本选择提供理论支撑。

参 考 文 献

- [1] 王敏凤. 紫椴繁育技术研究进展[J]. 辽宁林业科技, 2023(5): 47-50.
Wang M F. Research progress on *Tilia amurensis* breeding technology[J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 2023(5): 47-50.
- [2] 国家林业和草原局野生动植物保护司. 调整后的《国家重点保护野生植物名录》正式公布[EB/OL]. (2021)[2024-07-16]. <https://www.forestry.gov.cn/c/www/lczc/10746.jhtml>.
Department of Wildlife Conservation. The revised list of wild plants under state key protection was officially released[EB/OL]. (2021)[2024-07-16]. <https://www.forestry.gov.cn/c/www/lczc/10746.jhtml>.
- [3] Lin S J, Wang Z M, Zhou H B, et al. A new micropropagation technology of *Tilia amurensis*: in vitro micropropagation of mature zygotic embryos and the establishment of a plant regeneration system[J]. Phytion-international Journal of Experimental Botany, 2024, 93(2): 277-289.
- [4] Chun S W, Lee J W, Ahn J Y. Development and characterization of novel microsatellite markers in *Tilia amurensis* Rupr. using next-generation sequencing[J]. Molecular Biology Reports, 2022, 49: 1-5.
- [5] Zhang F G, Zhang S, Wu K, et al. Potential habitat areas and priority protected areas of *Tilia amurensis* Rupr. in China under the context of climate change[J]. Frontiers in Plant Science, 2024, 15: 1365264.
- [6] 陈志祥, 罗小燕, 李拴林, 等. 基于 SSR 标记的木豆种质资源遗传多样性与群体结构分析[J]. 草地学报, 2021, 29(5): 904-911.
Chen Z X, Luo X Y, Li S L, et al. Genetic diversity and population structure analysis of the pigeonpea (*Cajanus cajan* L.) germplasm resources based on SSR markers[J]. Acta Agrestia Sinica, 2021, 29(5): 904-911.
- [7] 毛秀红, 郑勇奇, 孙百友, 等. 基于 SSR 的刺槐无性系遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 林业科学, 2017, 53(10): 80-89.
Mao X H, Zheng Y Q, Sun B Y, et al. Genetic diversity and fingerprints of *Robinia pseudoacacia* clones based on SSR markers[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2017, 53(10): 80-89.
- [8] 金玲, 刘明国, 董胜君, 等. 97 个山杏无性系的遗传多样性及 SSR 指纹图谱[J]. 林业科学, 2018, 54(7): 51-61.
Jin L, Liu M G, Dong S J, et al. Genetic diversity and fingerprints of 97 *Prunus sibirica* clones based on SSR markers[J]. Scientia Silvae Sinicae, 2018, 54(7): 51-61.
- [9] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. SSR 分子标记的研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2019, 18(4): 429-436.
Yang M T, Huang Z, Gan J P, et al. Research progress of SSR molecular markers[J]. Journal of Hangzhou Normal University (Natural Science Edition), 2019, 18(4): 429-436.
- [10] 叶冬梅, 吴晓萌, 段国珍, 等. 基于 SSR 分子标记分析白杆的群体遗传多样性[J/OL]. 分子植物育种, 2024. [2024-07-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230329.1043.008.html>.
Ye D M, Wu X M, Duan G Z, et al. The population genetic diversity of *Picea meyeri* based on SSR molecular markers[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2024. [2024-07-16]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230329.1043.008.html>.
- [11] 程玮哲, 樊军锋, 周永学, 等. 基于荧光 SSR 标记的 10 个白杨派种质资源遗传多样性分析[J]. 西北林学院学报, 2021, 36(3): 88-93.
Cheng W Z, Fan J F, Zhou Y X, et al. Genetic diversity analysis of the 10 poplar accessions based on SSR molecular makers[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2021, 36(3): 88-93.
- [12] 吕晓娜, 范小青, 闫伯前, 等. 基于 SSR 标记的北京地方枣新品系的鉴定和亲缘关系分析[J/OL]. 分子植物育种, 2024. [2024-08-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231229.1055.004.html>.
Lü X N, Fan X Q, Yan B Q, et al. Identification and phylogenetic analysis of new jujube strains from Beijing region based on SSR markers[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2024. [2024-08-29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20231229.1055.004.html>.
- [13] 任重, 白倩, 苏淑钗. 基于 SSR 分子标记的中国黄连木遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2022, 42(9): 1530-1539.
Ren Z, Bai Q, Su S C. Genetic diversity analysis of *Pistacia chinensis* Bunge based on SSR markers[J]. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2022, 42(9): 1530-1539.
- [14] 王欢利, 严灵君, 黄犀, 等. 南京椴群体遗传多样性和遗传结构分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2023, 47(1): 145-153.
Wang H L, Yan L J, Huang X, et al. Genetic diversity and genetic structure of *Tilia miqueliana* population[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2023, 47(1): 145-153.
- [15] 穆立蕾, 刘赢男. 不同地理分布区紫椴种群的遗传多样性变化[J]. 植物生态学报, 2007, 31(6): 1190-1198.
Mu L Q, Liu Y N. Genetic diversity of *Tillia amurensis* populations in different geographical distribution regions[J]. Chinese Journal of Plant Ecology, 2007, 31(6): 1190-1198.

- [16] 王东升. 山东省紫椴和野核桃 AFLP 遗传多样性研究 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2014.
Wang D S. Genetic diversity study of *Tilia amurensis* Rupr. and *Juglans cathayensis* Dode from Shandong Province by AFLP markers [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2014.
- [17] 林立, 林乐静, 祝志勇, 等. 93 份槭树种质资源的 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2022, 20(4): 1250–1263.
Lin L, Lin L J, Zhu Z Y, et al. Construction of SSR fingerprint and genetic diversity analysis of 93 maple germplasm resources[J]. Molecular Plant Breeding, 2022, 20(4): 1250–1263.
- [18] Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA[J]. BioTechniques, 2000, 28(3): 432, 434.
- [19] 岳远灏, 严灵君, 黄犀, 等. 基于全长转录组测序的南京椴 EST-SSR 标记开发 [J/OL]. 分子植物育种, 2024. [2024–08–29]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220715.1525.008.html>.
Yue Y H, Yan L J, Huang X, et al. Development of EST-SSR markers based on transcriptome sequences of *Tilia miqueliana* maxim[J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2024. [2024–08–29]. <https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220715.1525.008.html>.
- [20] Phuekvilai P, Wolff K. Characterization of microsatellite loci in *Tilia platyphyllos* (Malvaceae) and cross-amplification in related species[J]. Applications in Plant Sciences, 2013, 1(4): 1200386.
- [21] 燕丽萍, 吴德军, 毛秀红, 等. 基于 SSR 荧光标记的白蜡核心种质构建 [J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(7): 1–9.
Yan L P, Wu D J, Mao X H, et al. Construction of core collection of *Fraxinus* based on SSR molecular markers[J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology, 2019, 39(7): 1–9.
- [22] Peakall R O D, Smouse P E. GENALEX 6: genetic analysis in Excel: population genetic software for teaching and research[J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6(1): 288–295.
- [23] Krawczak M, Nikolaus S, Von E H, et al. PopGen: population-based recruitment of patients and controls for the analysis of complex genotype-phenotype relationships[J]. Community Genetics, 2006, 9(1): 55–61.
- [24] Balloux F, Lehmann L, de Meeûs T. The population genetics of clonal and partially clonal diploids[J]. Genetics, 2003, 164(4): 1635–1644.
- [25] 侯立娜, 李慧, 王天琪, 等. 金银花及近缘种遗传多样性分析及 SSR 指纹图谱构建 [J]. 分子植物育种, 2024, 22(19): 6382–6389.
Hou L N, Li H, Wang T Q, et al. Genetic diversity analysis and SSR fingerprint construction of *Lonicera japonica* and its related species[J]. Molecular Plant Breeding, 2024, 22(19): 6382–6389.
- [26] Wu Q C, Zhang Y, Xie X M, et al. Analysis of the genetic diversity and population structure of *Tilia amurensis* from China using SSR markers: implications for conservation[J]. Global Ecology and Conservation, 2024, e03173.
- [27] Wright S. Evolution and the genetics of populations: experimental results and evolutionary deductions[M]. Vol. 3. Chicago: University of Chicago Press, 1984: 515–520.
- [28] Wright S. Evolution in Mendelian populations[J]. Genetics, 1931, 16(2): 97–159.
- [29] Chen B R, Zou H, Zhang X Y, et al. Distribution change and protected area planning of *Tilia amurensis* in China: a study of integrating the climate change and present habitat landscape pattern[J]. Global Ecology and Conservation, 2023(43): e02438.
- [30] Lobo A, Hansen O K, Hansen J K, et al. Local adaptation through genetic differentiation in highly fragmented *Tilia cordata* populations[J]. Ecology and Evolution, 2018, 8(12): 5968–5976.
- [31] 简曙光, 唐恬, 张志红, 等. 中国银叶树种群及其受威胁原因 [J]. 中山大学学报 (自然科学版), 2004, 43(增刊 1): 91–96.
Jian S G, Tang T, Zhang Z H, et al. The population characteristics and endangered causes of *Heritiera littoralis* dryand in China[J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni, 2004, 43(Suppl. 1): 91–96.
- [32] Hamrick J L, Godt M J W, Sherman-Broyles S L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species[J]. Forestry Sciences, 1992(6): 95–124.
- [33] 田忠琼. 濒危植物水青树 SSR 分子标记的开发与群体遗传结构的研究 [D]. 南充: 西华师范大学, 2020.
Tian Z Q. The development of SSR markers and genetic structure analysis of an endangered plant *Tetracentron sinense* Oliv. [D]. Nanchong: China West Normal University, 2020.
- [34] 李思琪, 张文臣, 杨柳, 等. 基于 SSR 标记的文冠果遗传多样性分析及指纹图谱构建 [J]. 生物技术通报, 2024, 40(5): 74–83.
Li S Q, Zhang W C, Yang L, et al. Genetic diversity analysis and DNA fingerprint construction based on SSR markers for *Xanthoceras sorbifolia*[J]. Biotechnology Bulletin, 2024, 40(5): 74–83.
- [35] 刘加能, 潘登浪, 程秋如, 等. 基于 SSR 标记的油棕核心种质筛选及 DNA 指纹图谱构建 [J/OL]. 分子植物育种, 2024, [2025–02–28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20240318.1734.016.html>.
Liu J N, Pan D L, Cheng Q R, et al. Selection of oil palm core germplasm and DNA fingerprinting construction based on SSR markers [J/OL]. Molecular Plant Breeding, 2024, [2025–02–28]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.s.20240318.1734.016.html>.
- [36] 李慧, 侯立娜, 王天琪, 等. 基于 SSR 标记的皱皮木瓜遗传多样性分析及品种分子身份证构建 [J]. 南京林业大学学报 (自然科学版), 2025, 49(1): 59–70.
Li H, Hou L N, Wang T Q, et al. The genetic diversity analysis and molecular ID establishment of *Chaenomeles speciosa* based on SSR markers[J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2025, 49(1): 59–70.

(责任编辑 赵田芸
责任编辑委 康向阳)