

## 基于 SSR 标记羊角槭子一代和子二代的遗传多样性分析

罗芊芊<sup>1,2</sup>, 赵明水<sup>3</sup>, 肖德卿<sup>2</sup>, 金国庆<sup>2</sup>, 庞春梅<sup>3</sup>, 祁祥斌<sup>3</sup>, 周志春<sup>2,①</sup>

(1. 抚州市林业科学研究所, 江西 抚州 344000;

2. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所 浙江省林木育种技术研究重点实验室, 浙江 杭州 311400;

3. 浙江天目山国家级自然保护区管理局, 浙江 杭州 311300)

**摘要:** 基于 13 对 SSR 引物, 对分布于浙江省杭州市西天目山的羊角槭 (*Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu) 子一代及子二代群体共 66 个样株进行遗传参数和遗传聚类分析。结果显示: 13 对 SSR 引物对应位点的观测等位基因数 ( $N_a$ ) 和有效等位基因数 ( $N_e$ ) 分别为 6~17 和 2.4~8.5, 均值分别为 9.8 和 4.4; 羊角槭子一代群体的  $N_a$  和  $N_e$  值分别为 5.7 和 3.9, 分别较子二代群体减少了 3.5 和 1.1。羊角槭子一代群体的观测杂合度略高于子二代群体, 子一代群体的等位基因丰富度 (3.461) 和私有等位基因丰富度 (1.648) 低于子二代群体。羊角槭 66 个样株间的遗传相似系数为 0.540~0.908。基于遗传相似系数的 UPGMA 聚类分析结果显示: 以遗传相似系数 0.709 为阈值, 羊角槭 66 个样株分为 A、B 和 C 3 组, A 组包括 51 个样株, 以遗传相似系数 0.723 为阈值可进一步分为  $A_1$  和  $A_2$  2 个亚组; B 组包括 14 个样株, 以遗传相似系数 0.718 为阈值可进一步分为  $B_1$  和  $B_2$  2 个亚组, 即 Y5、Y22 和 Y23 样株聚为  $B_2$  亚组, 其他 11 个样株聚为  $B_1$  亚组; C 组仅有 Y66 样株。综合分析认为, 羊角槭群体的遗传多样性水平整体较高, 且子二代群体的遗传多样性略高于子一代群体, 羊角槭群体具有一定的进化潜力, 可采集亲缘关系较远植株的种子进行人工培养, 并开展人工杂交授粉, 扩大羊角槭的遗传变异, 丰富其遗传信息。

**关键词:** 羊角槭; 子一代; 子二代; SSR 标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q946-33; S718.46 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2022)05-0066-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2022.05.08

**Analysis on genetic diversity of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* based on SSR markers** LUO Qianqian<sup>1,2</sup>, ZHAO Mingshui<sup>3</sup>, XIAO Deqing<sup>2</sup>, JIN Guoqing<sup>2</sup>, PANG Chunmei<sup>3</sup>, QI Xiangbin<sup>3</sup>, ZHOU Zhichun<sup>2,①</sup> (1. Forestry Research Institute of Fuzhou, Fuzhou 344000, China; 2. Key Laboratory of Tree Breeding of Zhejiang Province, Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, China; 3. Administration Bureau of Tianmushan National Nature Reserve, Hangzhou 311300, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2022, 31(5): 66-73

**Abstract:** Genetic parameter and genetic clustering analyses were conducted for 66 sampling individuals of populations of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu distributed in West Tianmu Mountain of Hangzhou in Zhejiang Province based on 13 pairs of SSR primers. The results show that the number of observed alleles ( $N_a$ ) and number of effective alleles ( $N_e$ ) of 13 pairs of SSR primers are 6-17 and 2.4-8.5 respectively, and their averages are 9.8 and 4.4 respectively; the  $N_a$  and  $N_e$  values of population of first filial generation of *A. yangjuechi* are 5.7 and 3.9 respectively,

收稿日期: 2022-01-02

基金项目: 浙江省珍稀濒危野生动植物物种抢救保护工程天目铁木、羊角槭保护项目(2018-2020)

作者简介: 罗芊芊(1995—), 女, 湖南衡阳人, 硕士, 助理工程师, 主要从事林木遗传育种与培育方面的研究。

①通信作者 E-mail: zczhou\_ris@163.com

引用格式: 罗芊芊, 赵明水, 肖德卿, 等. 基于 SSR 标记羊角槭子一代和子二代的遗传多样性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2022, 31(5): 66-73.

which are 3.5 and 1.1 lower than those of population of second filial generation. The observed heterozygosity of population of first filial generation of *A. yangjuechi* is slightly higher than that of population of second filial generation, and the allelic richness (3.461) and private allelic richness (1.648) of population of first filial generation are lower than those of population of second filial generation. The genetic similarity coefficient among 66 sampling individuals of *A. yangjuechi* are 0.540–0.908. The UPGMA clustering analysis result based on genetic similarity coefficient shows that 66 sampling individuals of *A. yangjuechi* can be divided into three groups namely A, B, and C using the genetic similarity coefficient of 0.709 as the threshold value. Group A contains 51 sampling individuals, and can be further divided into two subgroups namely A<sub>1</sub> and A<sub>2</sub> using the genetic similarity coefficient of 0.723 as the threshold value; group B contains 14 sampling individuals, and can be further divided into two subgroups namely B<sub>1</sub> and B<sub>2</sub> using the genetic similarity coefficient of 0.718 as the threshold value, among them Y5, Y22, and Y23 sampling individuals are clustered into subgroup B<sub>2</sub>, and the other 11 sampling individuals are clustered into subgroup B<sub>1</sub>; group C only has Y66 sampling individual. Taken together, the overall genetic diversity level of *A. yangjuechi* population is relatively high, the genetic diversity of population of second filial generation is slightly higher than that of population of first filial generation, and the *A. yangjuechi* population has some evolutionary potential. It is recommended to collect the seeds of plants with relative far genetic relationships, conduct artificial cultivation, and carry out artificial cross pollination to expand the genetic variation of *A. yangjuechi* and enrich its genetic information.

**Key words:** *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu; first filial generation; second filial generation; SSR marker; genetic diversity; clustering analysis

近年来的研究表明:即使是狭域种、濒危种或特有种,也保持着较高的遗传多样性,例如漾濞槭(*Acer yangbiense* Y. S. Chen et Q. E. Yang)<sup>[1]</sup>。Spielman 等<sup>[2]</sup>比较了 170 个濒危物种及相关非濒危物种的平均杂合度,77%濒危物种的杂合度较低,且濒危物种的杂合度比相关非濒危物种低 35%,表明濒危物种的进化潜力降低,生殖健康受损,灭绝风险升高。近亲繁殖引起的遗传多样性降低意味着该物种繁殖适合度降低,这会增加濒危物种在自然栖息地灭绝的风险<sup>[3]</sup>。此外,濒危植物渐少的主要外部原因是天然植被屡遭破坏和生境恶化<sup>[4,5]</sup>。了解珍稀濒危植物的濒危机制,掌握珍稀濒危植物的遗传多样性变化规律和亲缘关系有利于对其开展科学保育工作。

羊角槭(*Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu)为槭树科(Aceraceae)槭属(*Acer* Linn.)落叶乔木,被列入《国家重点保护野生植物名录(第一批)》,具有重要的科研及园林应用价值<sup>[6,7]</sup>。由于人为(折损)和自然(台风和冰雪)的双重影响,分布于浙江省杭州市西天目山的羊角槭 4 株原生大树(亲代)已死亡,仅有小苗留存下来。近年来,虽然相关部门对羊角槭采取了有效的保护和引种措施,但由于羊角槭存在繁育严重、生存能力较差和种子深休眠等特性<sup>[8]9,35</sup>,其仍然面临生境破坏、人为干扰和自身更新困难等问题。

因此,亟需对羊角槭遗传多样性进行研究,这对其遗传保育和扩繁工作具有重要意义。本研究通过 13 对 SSR 引物系统分析了来自浙江省杭州市西天目山的羊角槭子一代和子二代的遗传多样性和亲缘关系,以期最大化利用其基因资源的多样性生产优质种子,并为其科学遗传保育提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供试材料为分布于浙江省杭州市西天目山的羊角槭子一代和子二代群体。该地区气候多雾、潮湿,年平均温度在 12 ℃左右,空气相对湿度为 76%~81%,年降水量约为 1 600 mm,土壤酸碱度为 pH 4.0 至 pH 5.0,土壤为山地红壤或黄壤<sup>[9]</sup>。羊角槭天然分布区内的主要伴生树种为毛竹[*Phyllostachys edulis* (Carrière) J. Houz.]、构树[*Broussonetia papyrifera* (Linn.) L' Hér. ex Vent.]和枫香树(*Liquidambar formosana* Hance)等,植被类型为亚热带常绿阔叶林。近年来,有关部门对仅存的 12 株实生子代苗(以下简称为子一代,树龄 20~40 a,编号 Y1 至 Y12)采取了就地保护和引种驯化措施,并营建了 0.33 hm<sup>2</sup>羊角槭母树林。本文中子二代植株共 54 株,其中,编号 Y13 为子一代 Y6 的旁生小树,其余 53 株[树龄较大且较

为接近(8~10 a),编号 Y14 至 Y66]皆来自羊角槭母树林<sup>[10]</sup>。

于2020年6月,在每株冠层中部的靠阳面,随机采集无病虫害当年生叶片50 g,单株混合,用锡箔纸包裹后置于液氮中,带回实验室后于-80℃保存、备用。采样时,使用胸径尺(精度1 mm)测量样株胸

径,使用测距望远镜(精度0.1 m)测量树高,使用GPS记录样株所处的经度、纬度和海拔,使用指南针判断坡向,使用坡度测量仪(精度1°)测量坡度,肉眼判断坡位和郁闭度。羊角槭子一代和子二代样株的基本信息见表1。

表1 羊角槭子一代和子二代样株的基本信息

Table 1 Basic information of sampling individuals of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu

样株编号 <sup>1)</sup> No. of sampling individual <sup>1)</sup>	胸径/cm <sup>2)</sup> Diameter at breast height <sup>2)</sup>	树高/m Tree height	经度 Longitude	纬度 Latitude	海拔/m Altitude	坡向 <sup>3)</sup> Aspect <sup>3)</sup>	坡度/(°) Slope	坡位 <sup>4)</sup> Slope position <sup>4)</sup>	郁闭度 Canopy density	地点 Site
Y1	28.3	12.0	E119°26'33"	N30°18'59"	354	I	20	L	0.1-0.2	画眉山庄 Huamei Villa
Y2	21.2	10.0	E119°26'33"	N30°19'00"	354	I	20	L	0.1-0.2	画眉山庄 Huamei Villa
Y3	27.0	12.5	E119°26'33"	N30°19'00"	354	I	20	L	0.1-0.2	画眉山庄 Huamei Villa
Y4	18.3	9.8	E119°26'31"	N30°19'34"	470	II	6	M	0.3-0.7	天目山庄 Tianmu Villa
Y5	16.3	12.7	E119°26'32"	N30°19'35"	473	II	5	M	0.3-0.7	天目山庄 Tianmu Villa
Y6	25.1	13.0	E119°26'32"	N30°19'34"	472	II	6	M	0.3-0.7	天目山庄 Tianmu Villa
Y7	14.6	10.0	E119°26'22"	N30°19'28"	428	I	10	M	0.3-0.7	天目书院 Tianmu Academy
Y8	28.8	12.0	E119°26'23"	N30°19'29"	428	II	20	M	0.3-0.7	太子庵 Prince Temple
Y9	14.7	7.0	E119°26'31"	N30°19'26"	350	III	10	L	0.1-0.2	禅源寺 Chanyuan Temple
Y10	12.7	6.0	E119°27'15"	N30°18'09"	352	I	15	L	0.3-0.7	仙桃颐养院 Xiantao Hospital Care
Y11	14.0	9.0	E119°27'15"	N30°18'09"	352	I	15	L	0.3-0.7	仙桃颐养院 Xiantao Hospital Care
Y12	11.2	6.0	E119°27'15"	N30°18'09"	352	I	15	L	0.3-0.7	仙桃颐养院 Xiantao Hospital Care
Y13	—	1.0	E119°26'31"	N30°19'34"	472	II	6	M	0.3-0.7	天目山庄 Tianmu Villa
Y14-Y43	—	1.6-4.0	E119°27'15"	N30°18'09"	257	I	6-15	L	0.3-0.7	仙桃颐养院 Xiantao Hospital Care
Y44-Y66	—	0.8-3.0	E119°26'32"	N30°19'32"	344	I	6-15	L	≥0.7	苗圃 Nursery

<sup>1)</sup> Y1-Y12: 子一代 First filial generation; Y13-Y66: 子二代 Second filial generation.

<sup>2)</sup> —: 样株主干较细,未测量 The main stem of sampling individual is too thin, and is not measured.

<sup>3)</sup> I: 半阴坡 Semi-shady slope; II: 半阳坡 Semi-sunny slope; III: 阳坡 Sunny slope.

<sup>4)</sup> L: 山体下部 Lower part of the mountain; M: 山体中部 Middle part of the mountain.

## 1.2 方法

参照文献[11-17]收集多个引物片段,初筛后选出13对条带清晰且多态性较高的SSR引物(表2)进行PCR扩增。采用DN14 CTAB植物基因组DNA快速提取试剂盒(北京艾德莱生物科技有限公司)提取羊角槭叶样的基因组DNA,使用NanoDrop 2000超微量分光光度计(美国Thermo Fisher Scientific公司)和质量体积分数1.0%琼脂糖凝胶电泳检测基因组DNA浓度及质量。

PCR扩增反应体系总体积25.0 μL,包括2×*Taq* Plus Master Mix PCR预混液(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)12.5 μL、ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL、20 ng·μL<sup>-1</sup> DNA模板2.0 μL以及10 μmol·L<sup>-1</sup>正向和反向引物各1.0 μL。使用TP600梯度PCR仪(日本Takara Bio公司)进行PCR扩增反应,扩增程序为:94℃预变性

5 min;94℃变性30 s、相应温度退火60 s(退火温度见表2)、72℃延伸60 s,共33个循环;72℃延伸7 min。采用Qsep100™全自动核酸蛋白分析系统(光鼎生物科技股份有限公司)对所有PCR扩增产物进行电泳分离检测<sup>[18,19]</sup>。

## 1.3 数据处理和统计分析

采用Q-analyze 3.0软件对SSR检测结果进行峰图分析、等位基因读取和胶图比对,然后采用GenALEx 6.5软件<sup>[20]</sup>对子一代和子二代群体的遗传多样性进行分析,遗传参数包括观测等位基因数( $N_a$ )、有效等位基因数( $N_e$ )、观测杂合度( $H_o$ )、期望杂合度( $H_e$ )、固定指数( $F_i$ )、Shannon's多样性指数( $I$ )和子二代特有等位基因数( $N_u$ ),其中, $F_i$ 值的计算公式为 $F_i = 1 - H_o/H_e$ 。采用HP-RARE 1.1软件<sup>[21]</sup>计算等位基因丰富度( $A_R$ )及私有等位基因丰富度

表 2 用于羊角槭子一代和子二代群体 SSR 标记分析的 13 对 SSR 引物信息

Table 2 Information of 13 pairs of primers used for SSR marker analysis on populations of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence (5'→3')		重复基序 Repeated motif	片段长度/bp Fragment length	退火温度/°C Annealing temperature	GenBank 登录号 <sup>1)</sup> Accession number in GenBank <sup>1)</sup>	参考文献 Reference
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer					
A4	AAACCTTGAATGGGAAAAAAC	ACACGGCATAAAGCTAGGAGAA	(CT) <sub>10</sub>	190-206	52	—	[11]26
A14	CACTGCTTCTCAACCTTTGG	TTGCTGATTGTTTTGCCTCT	(CT) <sub>13</sub>	164-174	53	—	[11]26
A21	GCATCAGAGTTAGTCATAC	CTTGCTACTTCATCTTGTC	(CT) <sub>16</sub>	208-260	49	KF801629	[11]26
A27	GCAGAAAACAAGCCCTAAA	GCACAAACAGTTGAAAACATA	(CT) <sub>16</sub>	256-338	49	KF801633	[11]26
A44	GAACCAAAGTATGTAATCTG	CCATCAAAGGGAGTCAAC	(CT) <sub>18</sub>	158-198	50	KF801640	[11]26
A52	GCCATCAACGACCTCAGCCT	GTCAAAAAGATCAGACCCCGC	(TC) <sub>21</sub>	210-238	59	—	[11]27
A61	CGCAGTTGACTGGTGTCTC	GTTTCTTCGACGTTGTTGGAGTTAAACC	(AG) <sub>16</sub>	136-162	57	KP825169	[12]
A67	CCACAAATCTCCTCTGCCAT	GTTTCTGTAGAAACAAATTGGAACCCA	(TCT) <sub>11</sub>	100-114	55	KP825175	[12]
A82	GAAGAAAGTCTCCACCAC	TGAGTAAACCATGAAAGG	(CA) <sub>6</sub>	160-310	50	MG554395	[13]
A88	TCCCTCGTTAGATTTACGGTGGTTT	TTCTTGATGACGATGATGACGATG	(CT) <sub>11</sub>	174-210	55	EF531293	[14]
A102	CACACATGGGCTTCTCTATGAGT	CATCCGCCAGTTGGTGAAT	(AG) <sub>15</sub>	130-156	55	AB303355	[15]
A118	TTTAAACACCATTCTCGCCCC	TATCGTTCCGCAGGGAGCTATGATTCG	(AC) <sub>23</sub>	180-217	58	—	[16]
A120	ACAATAAAAAGCCACATAGATAG	TCTCTCAATTGCAAGGCTTC	(GA) <sub>8</sub>	106-138	53	AJ620723	[17]

<sup>1)</sup>—: 无 GenBank 登录号 Without accession number in GenBank.

( $P_A$ )。采用 CERVUS 2.0 软件<sup>[22]</sup>对子一代和子二代群体进行哈迪-温伯格(Hardy-Weinberg)平衡检验,最小期望频率为 5,使用叶氏连续性修正,使用 Bonferroni 校正,获得微卫星位点的多态性信息含量(PIC)。采用 Micro-checker 2.2.3 软件<sup>[23]</sup>对 13 个位点进行无效等位基因检测,按照 Brookfield 估算方法得出无效等位基因频率并对观测等位基因频率进行调整。采用 FSTAT 2.9.3 软件<sup>[24]</sup>对上述遗传多样性参数在子一代和子二代群体间的区别进行检测(1 000 次模拟),计算子一代和子二代群体的近交系数( $F_{is}$ )<sup>[25]</sup>。

根据 Q-analyze 3.0 软件显示的分型结果,在相同位置,有条带赋值为“1”,无条带赋值为“0”。计算供试材料的遗传相似系数(GS),采用非加权组平均法(UPGMA)进行聚类分析,绘制树状图。以上操作均在 EXCEL 2016 和 NTSYS pc 2.10e 统计分析软件中完成<sup>[26-28]</sup>。

## 2 结果和分析

### 2.1 羊角槭子一代和子二代群体的遗传多样性

采用 13 对 SSR 引物对供试羊角槭 12 个子一代样株和 54 个子二代样株进行遗传多样性分析,结果见表 3 和表 4。

由表 3 可知:13 对 SSR 引物共扩增出 128 个观测等位基因( $N_a$ ),各引物对应位点的  $N_a$  值为 6~17,均值为 9.8;有效等位基因数( $N_e$ )为 2.4~8.5,均值为 4.4;观测杂合度( $H_o$ )为 0.421~1.000,均值为 0.738;期望杂合度( $H_e$ )为 0.524~0.873,均值为 0.727;Shannon's 多样性指数( $I$ )为 1.058~2.319,均值为 1.559;多态性信息含量(PIC)为 0.425~0.906,均值为 0.723,表明各引物的多态性较高。13 对 SSR 引物中,A14、A21、A61、A67 和 A82 引物对应位点的固定指数( $F_i$ )小于 0,且 13 对 SSR 引物对应位点的  $F_i$  值的均值也小于 0,表明羊角槭群体内存在杂合子过剩的现象。哈迪-温伯格平衡检验结果表明:13 对 SSR 引物对应位点中,有 4 对 SSR 引物对应位点显著偏离遗传平衡。此外,13 对 SSR 引物对应位点的子二代特有等位基因数( $N_u$ )为 1~8,均值为 4.2;无效等位基因频率为 0.000~0.279。

由表 4 可知:羊角槭子一代和子二代群体的遗传多样性水平总体较高,与子一代群体相比,子二代群体的遗传多样性水平更高( $N_a = 9.2, N_e = 5.0, H_e = 0.740, I = 1.671$ )。羊角槭子一代群体的  $H_o$  值大于  $H_e$  值,而子二代群体的  $H_o$  值小于  $H_e$  值,且子一代群体的近交系数( $F_{is}$ )小于 0,子二代群体的  $F_{is}$  值大于 0,表明子一代群体中杂合子过剩,而子二代群体中杂合子缺失。此外,子二代群体的  $H_o$  值略小于子一代群体,

表3 用于羊角槭子一代和子二代群体 SSR 标记分析的 13 对引物对应位点的遗传参数<sup>1)</sup>Table 3 Genetic parameters of loci corresponding to 13 pairs of primers used for SSR marker analysis on populations of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu<sup>1)</sup>

引物 Primer	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$I$	$PIC$	$F_i$	$N_u$	$F_n$
A4	7	3.4	0.671	0.703	1.352	0.671	0.048 *	2	0.000
A14	6	4.2	0.771	0.755	1.516	0.701	-0.025 *	1	0.046
A21	17	8.5	1.000	0.873	2.319	0.906	-0.147	5	0.000
A27	13	4.9	0.657	0.777	1.714	0.823	0.129	8	0.161
A44	9	2.9	0.611	0.651	1.303	0.659	0.070	5	0.015
A52	13	6.8	0.787	0.829	2.051	0.898	0.056	5	0.022
A61	12	5.5	1.000	0.810	1.825	0.874	-0.238	6	0.000
A67	7	2.4	0.845	0.583	1.066	0.522	-0.452 *	3	0.028
A82	9	3.7	0.886	0.719	1.411	0.740	-0.241	5	0.279
A88	9	3.0	0.468	0.667	1.315	0.685	0.301 *	5	0.133
A102	9	3.9	0.664	0.744	1.459	0.706	0.106	5	0.173
A118	11	5.6	0.807	0.819	1.877	0.793	0.011	3	0.065
A120	6	2.4	0.421	0.524	1.058	0.425	0.329	1	0.160
均值 Mean	9.8	4.4	0.738	0.727	1.559	0.723	-0.004	4.2	

<sup>1)</sup>  $N_a$ : 观测等位基因数 Number of observed alleles;  $N_e$ : 有效等位基因数 Number of effective alleles;  $H_o$ : 观测杂合度 Observed heterozygosity;  $H_e$ : 期望杂合度 Expected heterozygosity;  $I$ : Shannon's 多样性指数 Shannon's diversity index;  $PIC$ : 多态性信息含量 Polymorphism information content;  $F_i$ : 固定指数 Fixation index;  $N_u$ : 子二代特有等位基因数 Number of alleles unique to second filial generation;  $F_n$ : 无效等位基因频率 Null allele frequency. \*:  $P < 0.05$ .

表4 羊角槭子一代 ( $F_1$ ) 与子二代 ( $F_2$ ) 群体的遗传多样性比较<sup>1)</sup>Table 4 Comparison on genetic diversity of populations of first filial generation ( $F_1$ ) and second filial generation ( $F_2$ ) of *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu<sup>1)</sup>

世代 Generation	样株数 Sampling individual number	$N_a$	$N_e$	$H_o$	$H_e$	$I$	$F_i$	$A_R$	$P_A$	$F_{is}$
$F_1$	12	5.7	3.9	0.758	0.715	1.447	-0.064	3.461	1.648	-0.015
$F_2$	54	9.2	5.0	0.717	0.740	1.671	0.056	3.593	1.780	0.040

<sup>1)</sup>  $N_a$ : 观测等位基因数 Number of observed alleles;  $N_e$ : 有效等位基因数 Number of effective alleles;  $H_o$ : 观测杂合度 Observed heterozygosity;  $H_e$ : 期望杂合度 Expected heterozygosity;  $I$ : Shannon's 多样性指数 Shannon's diversity index;  $F_i$ : 固定指数 Fixation index;  $A_R$ : 等位基因丰富度 Allelic richness;  $P_A$ : 私有等位基因丰富度 Private allelic richness;  $F_{is}$ : 近交系数 Inbreeding coefficient.

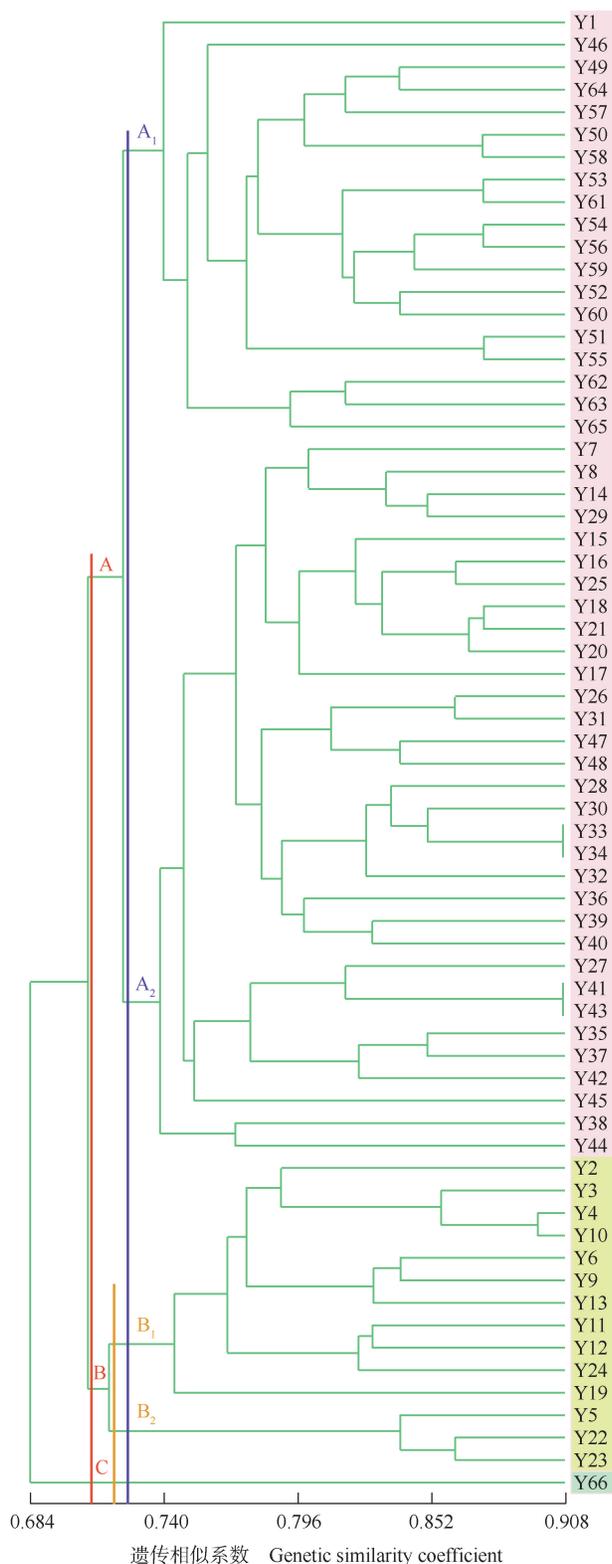
说明子二代群体中实际杂合单株比率较子一代群体有所下降。

## 2.2 羊角槭子一代和子二代群体的亲缘关系分析

羊角槭 66 个样株间的遗传相似系数为 0.540 ~ 0.908。羊角槭子一代样株中, Y4 与 Y10 的亲缘关系最近(遗传相似系数为 0.897), Y5 与 Y12 的亲缘关系最远(遗传相似系数为 0.644); 羊角槭子二代样株中, Y33 与 Y34 以及 Y41 与 Y43 的亲缘关系最近(遗传相似系数均为 0.908), Y17 与 Y65 的亲缘关系最远(遗传相似系数为 0.540)。羊角槭子一代样株与子二代样株间, 子一代 Y5 与子二代 Y24 的亲缘关系最近(遗传相似系数为 0.851), 子一代 Y12 与子二代 Y36、Y37 和 Y65 的亲缘关系最远(遗传相似系数均为 0.575)。

基于遗传相似系数的羊角槭子一代和子二代群

体的 UPGMA 聚类图见图 1。由图 1 可知: 以遗传相似系数 0.709 为阈值, 羊角槭 66 个样株分为 A、B 和 C 3 组。A 组包括 51 个样株, 以遗传相似系数 0.723 为阈值进一步分为  $A_1$  和  $A_2$  2 个亚组。 $A_1$  亚组中, 子一代 Y1 单独聚为一支, 与子二代 Y46、Y49、Y50、Y51、Y52、Y53、Y54、Y55、Y56、Y57、Y58、Y59、Y60、Y61、Y62、Y63、Y64 和 Y65 的亲缘关系较近;  $A_2$  亚组中, 子一代 Y7 和 Y8 与子二代 Y14 和 Y29 的亲缘关系较近。B 组包括 14 个样株, 以遗传相似系数 0.718 为阈值进一步分为  $B_1$  和  $B_2$  2 个亚组,  $B_1$  亚组包括子一代 Y2、Y3、Y4、Y6、Y9、Y10、Y11 和 Y12 以及子二代 Y13、Y19 和 Y24, 其中, Y4 与 Y10 先聚为一支, 亲缘关系较近;  $B_2$  亚组包括子一代 Y5 以及子二代 Y22 和 Y23。大多数的子一代样株聚集在 B 组。C 组仅包括子二代 Y66。



Y1-Y12: 子一代样株编号 No. of sampling individual of first filial generation; Y13-Y66: 子二代 No. of sampling individual of second filial generation.

图 1 羊角槭子一代和子二代群体的 UPGMA 聚类图  
 Fig. 1 UPGMA dendrogram of populations of first filial generation and second filial generation of *Acer yangjuechi* Fang et P. L. Chiu

### 3 讨论和结论

羊角槭群体数量少,种子不孕率高,交配方式以异交为主,部分自交亲和<sup>[29]</sup>,其主要传粉方式为虫媒传粉,具有传粉效率低、胚珠败育和落花落果现象明显等特点,这些因子均导致羊角槭的自然结实率和繁殖成功率较低<sup>[8]18-19,29</sup>。本研究中,羊角槭子一代和子二代群体的遗传多样性水平总体较高,且子二代群体的遗传多样性水平略高于子一代群体。刘晓宏<sup>[30]</sup>的研究结果表明:在槭属树种中的遗传聚类结果中羊角槭单独聚为一类,在槭属中较特殊。与血皮槭 [*Acer griseum* (Franch.) Pax]<sup>[11]53</sup>、葛萝槭 [*Acer davidii* subsp. *grosseri* (Pax) P. C. de Jong]<sup>[31]</sup>、金钱槭 (*Dipteronia sinensis* Oliv.)<sup>[32]</sup> 和云南金钱槭 (*Dipteronia dyeriana* Henry)<sup>[32]</sup> 相比,羊角槭的遗传多样性水平较高,且明显高于亲缘关系较近的庙台槭 (*Acer miaotaiense* P. C. Tsoong) (Shannon's 多样性指数为 0.291 8)<sup>[33]</sup>,说明羊角槭群体具有一定的进化潜力。本研究中,羊角槭子二代的亲本并不完全包括在供试的子一代群体内,由于羊角槭子一代群体中部分植株已死亡,推测子二代中检测到的特有等位基因可能来源于已死亡子一代植株。

本研究中,13 对 SSR 引物对应位点的多样性水平存在一定差异,A21、A27、A52、A61 和 A118 引物对应位点的观测等位基因数较多,为 11~17 个,且这 5 对 SSR 引物对应位点的期望杂合度、Shannon's 多样性指数和多态性信息含量也高于其他引物,说明这 5 对 SSR 引物能揭示羊角槭群体更为丰富的遗传多样性信息。其余 8 对 SSR 引物对应位点的观测等位基因数较少(6~9),其相应的遗传多样性参数也相应较低。羊角槭子一代群体的观测杂合度大于期望杂合度,子二代群体的观测杂合度却小于期望杂合度,表明子一代群体中杂合子过剩,子二代群体中杂合子缺失;并且,子二代群体的观测杂合度略小于子一代,说明子二代群体中实际杂合单株比率较子一代群体有所下降,但差异不大,子二代样株中存在近亲交配的后代。杂合子过剩一般出现在研究对象为小群体或者封闭群体<sup>[34]</sup>,如羊角槭野生群体中的子一代群体往往由于亲本数量所限,出现的奠基者效应 (founder effect) 会导致连锁不平衡现象,继而造成杂合子过剩。而羊角槭子二代群体呈现的杂合子缺失

除与无效基因和研究样本范围大小有关外,还可能与人为干扰、单株交配型式样改变、群体退化和亲缘近交所造成的稀有碱基丢失等有关<sup>[35]</sup>。此外,人类砍伐和自然灾害等也会影响其群体遗传多样性和单株交配型式样。

聚类分析结果显示:A<sub>1</sub>亚组中,羊角槭子一代 Y1 与 18 个子二代样株的亲缘关系较近,遗传相似系数为 0.644~0.805,推测这 18 个子二代样株为 Y1 的后代。羊角槭花期传粉昆虫以蝇类、蛾类和蜜蜂为主<sup>[8]19</sup>,这类昆虫的传粉飞行距离较短<sup>[36]</sup>,所以距离相近的子一代 Y1 和 Y2 易促成异交结实,有利于繁殖成功,这与其异交为主、部分自交可育的繁殖特性相关联<sup>[29]</sup>。A<sub>2</sub>亚组中,仅有的子一代 Y7 和 Y8 的地理分布位置较近,且二者的亲缘关系也较近,有可能来源于同一个母本。此外,子一代 Y7 和 Y8 与 30 个子二代样株的亲缘关系较近,推测 A<sub>2</sub>亚组中的这些子二代样株应为 Y7 和 Y8 的后代。B<sub>1</sub>亚组中,子一代 Y2、Y3、Y4 和 Y10 聚为一个小分支,这 4 个单株均位于浙江省杭州市西天目山的同一山坳,加上其主要依赖昆虫传粉,导致这 4 个单株很可能来源于同一祖先。子一代 Y6 和 Y9 与子二代 Y13 以及子一代 Y11 和 Y12 与子二代 Y24 的亲缘关系较近。在实地调查过程中发现,Y13 是 Y6 树下旁生的小树,Y11 和 Y12 与 Y24 的地理位置也较近,推测 Y13 为 Y6 与 Y9 的异交子代,Y24 为 Y11 和 Y12 的异交子代。B<sub>2</sub>亚组中,子二代 Y22 和 Y23 与子一代 Y5 聚为一个小分支,三者间亲缘关系较近,推测 Y5 很可能是 Y22 和 Y23 的父本或母本。66 个样株中,子二代 Y66 与其他样株的遗传相似系数为 0.632~0.759,但却单独聚为 C 组,说明 Y66 的亲本可能是子一代中已死亡的植株。

羊角槭与庙台槭亲缘关系非常近,《Flora of China》将二者归并为 1 个种<sup>[37]</sup>,但林立等<sup>[38]</sup>通过 nrDNA ITS 和 cpDNA 序列比对发现二者差异较大,采集于武汉和杭州的羊角槭样品在 5 条 DNA 序列上都表现出 100%相似度,而与庙台槭则在 5 条 DNA 序列上存在 13 个位点差异,分子证据不支持将羊角槭归并为庙台槭;此外,二者在形态和地理分布上也差异较大,庙台槭分布于甘、陕 2 省,小枝、果序和叶柄无毛,而羊角槭分布于浙西北地区,小枝、果序和叶柄被宿存的灰色或淡黄色短柔毛,因此,不支持将羊角槭归并为庙台槭。

本研究中供试的羊角槭子二代群体已被浙江天目山国家级自然保护区管理局划分为羊角槭母树林。在对羊角槭母树林实施就地保护的过程中,可在其分布较为集中的地方,有规模地扩大幼树和幼苗的林窗面积,这样既能增加群落下层光照,提高林下幼苗和幼树的光合作用速率,又不至于因光照太强对幼苗和幼树的叶片造成伤害<sup>[39]</sup>。羊角槭自然受精率、结实率低<sup>[8]35-37</sup>,人为地将遗传相似系数较小的植株间的种子、幼苗植株进行交叉种植,有利于促进自然异交。此外,还可对其实施人工采种,选取亲缘关系较远植株的种子进行人工培养,如 Y17 和 Y65,开展人工杂交授粉,扩大羊角槭的遗传变异,丰富其遗传信息。

#### 参考文献:

- [1] 赵琳琳. 极度濒危植物漾濞槭的遗传多样性研究[D]. 北京: 中国科学院昆明植物研究所, 2011: 53.
- [2] SPIELMAN D, BROOK B W, FRANKHAM R. Most species are not driven to extinction before genetic factors impact them [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2004, 101(42): 15261-15264.
- [3] 罗芊芊. 南方红豆杉天然居群及家系遗传变异研究[D]. 长沙: 中南林业科技大学林学院, 2020: 2.
- [4] 免燕栋, 王立, 周晓雷. 大熊猫国家公园白水江片区珍稀濒危植物资源调查: 以白水江国家级自然保护区为例[J]. 中国野生植物资源, 2020, 39(6): 68-75.
- [5] 姚志, 郭军, 金晨钟, 等. 中国纳入一级保护的极小种群野生植物濒危机制[J]. 生物多样性, 2021, 29(3): 394-408.
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第四十六卷[M]. 北京: 科学出版社, 1981: 87-89.
- [7] 浙江植物志编辑委员会. 浙江植物志: 第四卷 冬青科—山茱萸科[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 56.
- [8] 许小连. 濒危植物羊角槭生殖生物学的初步研究[D]. 杭州: 浙江农林大学风景园林与建筑学院, 2012.
- [9] 叶仲节, 蒋秋怡, 何黎明, 等. 西天目山自然保护区的森林土壤类型及其性质[J]. 浙江林学院学报, 1991, 8(1): 40-47.
- [10] 陈香波, 刘杨, 赵明水, 等. 光照和土壤环境因子对羊角槭开花结实的影响[J]. 浙江林业科技, 2021, 41(5): 90-94.
- [11] 孙圣. 基于 SSR 标记的血皮槭天然群体遗传变异研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院林业研究所, 2014.
- [12] SAEKI I, HIRAO A S, KENTA T. Development and evaluation of microsatellite markers for *Acer miyabei* (Sapindaceae), a threatened maple species in East Asia [J]. Applications in Plant Sciences, 2015, 3(6): 1500020.
- [13] WANG H Y, WEI B Y, XIAO H X. Development of 15 microsatellite markers in *Acer triflorum* (Aceraceae) and cross-amplification in congeneric species [J]. Applications in Plant Sciences, 2018, 6(7): e1166.
- [14] SEGARRA-MORAGUES J G, GLEISER G, GONZÁLEZ-

- CANDELAS F. Isolation and characterization of microsatellite loci in *Acer opalus* (Aceraceae), a sexually-polymorphic tree, through an enriched genomic library[J]. *Conservation Genetics*, 2008, 9(4): 1059-1062.
- [15] KIKUCHI S, SHIBATA M. Development of polymorphic microsatellite markers in *Acer mono* Maxim[J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(2): 339-341.
- [16] TERUI H, LIAN C L, SAITO Y, et al. Development of microsatellite markers in *Acer capillipes* [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2006, 6: 77-79.
- [17] PANDEY M, GAILING O, FISCHER D, et al. Characterization of microsatellite markers in sycamore (*Acer pseudoplatanus* L.) [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(2): 253-255.
- [18] 李峰卿. 红豆树天然居群遗传多样性和交配系统分析[D]. 杭州: 中国林业科学研究院速生树木研究所, 2017: 21-22.
- [19] 杨汉波. 木荷繁殖生物学特性及种子园交配系统研究[D]. 杭州: 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 2017: 91-92.
- [20] PEAKALL R, SMOUSE P E. GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research: an update[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28(19): 2537-2539.
- [21] KALINOWSKI S T. HP-RARE 1.0: a computer program for performing rarefaction on measures of allelic richness [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 5(1): 187-189.
- [22] KALINOWSKI S T, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program CERVUS accommodates genotyping error increases success in paternity assignment[J]. *Molecular Ecology*, 2007, 16(5): 1099-1106.
- [23] VAN OOSTERHOUT C, HUTCHINSON W F, WILLS D P M, et al. Micro-checker: software for identifying and correcting genotyping errors in microsatellite data [J]. *Molecular Ecology Notes*, 2004, 4(3): 535-538.
- [24] GOUDET J. FSTAT (Version 1.2): a computer program to calculate F-statistics [J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86(6): 485-486.
- [25] 王霞, 王静, 蒋敬虎, 等. 观光木片断化居群的遗传多样性和交配系统[J]. *生物多样性*, 2012, 20(6): 676-684.
- [26] 麦静, 杨志玲, 杨旭, 等. 基于SSR标记的厚朴亲本及其子代群体的遗传多样性分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2015, 24(3): 10-17.
- [27] 张浩, 胡德昌, 解孝满, 等. 山东鹊山省级自然保护区胡桃楸的居群结构及遗传多样性分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2020, 29(3): 34-42.
- [28] 穆莹, 张梦璐, 白云海, 等. 基于EST-SSR标记的青榨槭天然种群遗传多样性分析[J]. *植物资源与环境学报*, 2022, 31(2): 57-63.
- [29] 陈香波, 吕秀立, 刘杨, 等. 极度濒危树种羊角槭花部形态特征及开花动态[J]. *植物研究*, 2019, 39(3): 329-337.
- [30] 刘晓宏. 槭树种质资源遗传多样性及亲缘关系的SRAP分析[D]. 扬州: 扬州大学园艺与植物保护学院, 2009: 34.
- [31] 孟超. 葛萝槭天然种群遗传多样性研究[D]. 临汾: 山西师范大学生命科学学院, 2014: 51.
- [32] 柏国清, 杨娟, 李忠虎, 等. 金钱槭属植物的遗传多样性与保护策略[J]. *西北植物学报*, 2014, 34(10): 1975-1980.
- [33] 李珊, 阎桂琴, 赵桂仿. 庙台槭的居群遗传结构和遗传多样性[J]. *西北大学学报(自然科学版)*, 2005, 35(1): 71-75.
- [34] 王蕾, 张立冬, 万玉美, 等. 牙鲆微卫星标记的筛选及群体遗传结构分析[J]. *遗传*, 2010, 32(10): 1057-1064.
- [35] ANTORO S, NA-NAKORN U, KOEDPRANG W. Study of genetic diversity of orange spotted grouper, *Epinephelus coioides* from Thailand and Indonesia using microsatellite markers [J]. *Marine Biotechnology*, 2006, 8: 17-26.
- [36] PARTAP U. The pollination role of honeybees[M]//HEPBURN H R, RADLOFF S E. Honeybees of Asia. Heidelberg: Springer-Verlag, 2011: 227-255.
- [37] WU Z Y, RAVEN P H. Flora of China: Vol. 11[M]. Beijing: Science Press, 2008: 515-553.
- [38] 林立, 林乐静, 祝志勇, 等. 中国槭属植物的分类和系统发育研究[J]. *园艺学报*, 2017, 44(8): 1535-1547.
- [39] 丁圣彦, 卢训令. 不同干扰背景下栲树(*Castanopsis fargesii*)幼苗幼树的生理生态特性比较: 以浙江天童常绿阔叶林为例[J]. *生态学报*, 2007, 27(9): 3892-3900.

(责任编辑: 张明霞)