

基于SNP分子标记的乌饭树种质遗传多样性研究

黄婧, 张敏

(江苏省林业科学研究院工程中心, 南京 211153)

摘要: 为更好地保护、开发和利用乌饭树资源, 采用基因分型测序(GBS, genotyping by sequencing)技术对采集于5个地区的70份乌饭树野生种质进行了SNP分子标记开发, 利用开发的标记研究了乌饭树种质的遗传多样性和群体遗传结构。结果显示, 通过测序数据分析共筛选得到9752个高质量SNP标记用于后续研究; 乌饭树5个群体均具有丰富的遗传多样性, 平均有效等位基因数为1.523, 平均期望杂合度为0.219, 平均观测杂合度为0.231, 其中江苏溧阳群体的遗传多样性最高。分子方差分析显示整个群体的遗传变异主要来自个体间(65.45%)。群体间遗传分化系数显示5个群体间遗传分化程度高, 其中江苏溧阳与江西上犹群体间的遗传分化系数最高, 为0.406。系统进化树(邻接法)显示乌饭树种质聚类为3个进化分支, 种质的聚集与其地理来源无确定性关系; 群体结构分析将乌饭树种质分为3个亚群, 主成分分析结果与群体结构的结果类似, 不同地区的乌饭树种质在3个亚群中均有分布, 显示了乌饭树资源存在着广泛的基因交流。本研究可为今后乌饭树良种选育和资源保护提供参考。

关键词: 乌饭树; 遗传多样性; 群体结构; SNP标记

Genetic Diversity Analysis of *Vaccinium bracteatum* Germplasm Based on SNP Markers

HUANG Jing, ZHANG Min

(Engineering Center, Jiangsu Academy of Forestry, Nanjing 211153)

Abstract: In order to provide reference for the protect, development and utilization of *Vaccinium bracteatum* resources, a total of 70 germplasm resources from 5 geographical populations were genotyped by GBS (Genotyping-by-Sequencing) technique to develop SNP markers. Using the developed markers, we investigated the genetic diversity and population genetic structure of *V. bracteatum*. The result shows a total of 9752 highly consistent and effective SNP markers were obtained through sequencing data analysis. 5 geographical populations of *V. bracteatum* all have high levels of genetic diversity, with an average effective number of alleles (N_e) of 1.523, expected heterozygosity (H_e) of 0.219, and observed heterozygosity (H_o) of 0.231. Among the 5 populations, the Liyang population had the highest genetic diversity. Analysis of variance for molecular variation (AMOVA) revealed that 64.45% of the total genetic variation resided among individuals. The fixation index (F_{st}) showed a high degree of genetic differentiation among the 5 geographical populations, with the highest F_{st} values (0.406) observed between the Liyang and Shangyou populations. Based on the results of NJ Phylogenetic tree, *V. bracteatum* resources clustered into three branches, which did not show obvious correspondence between geographical location and genetic relationships. The STRUCTURE analysis clustered

收稿日期: 2024-06-19 网络出版日期: 2024-11-28

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20240619002>

第一作者主要从事林木花卉繁育技术研究, Email: xiaojingzi1229@163.com

通信作者: 张敏, 主要从事生物技术与林木花卉良种繁育工作, Email: 29157510@qq.com

基金项目: 中央财政林业科技推广示范资金项目(苏[2024]TG08); 江苏省林业科学研究院自主科研项目(ZZKY202303); 江苏省林业科学研究院青年科技基金项目(JAF-2016-07)

Foundation projects: Central Finance Forestry Science and Technology Promotion Demonstration Fund Project (Su [2024] TG08); Independent Research Projects of Jiangsu Academy of Forestry (ZZKY202303); Jiangsu Academy of Forestry Youth Foundation (JAF-2016-07)

the *V. bracteatum* resources into three subgroups, the results of principal component analysis was consistent with it, and different geographical populations are distributed in each subgroup, indicating the existence of high gene exchange in *V. bracteatum* resources. This study provides reference for selection and breeding of *V. bracteatum* and germplasm conservation.

Key words: *Vaccinium bracteatum*; genetic diversity; population structure; SNP marker

乌饭树 (*Vaccinium bracteatum* Thunb.) 又名南烛, 古称染菽, 属于杜鹃花科 (Ericaceae) 越橘属 (*Vaccinium*) 植物, 是一种极具发展前景的食用、药用和观赏型植物。乌饭树有良好的食用价值, 江浙地区自古就有以乌饭树枝叶入药及制作“乌饭”的传统, 其黄酮类物质含量极其丰富, 具有很高的营养价值和保健功能^[1]。同时, 乌饭树的药用历史悠久, 其果实、枝叶入药, 有益身体, 功效甚多^[2]。

乌饭树在我国分布很广^[3], 主要分布在长江以南各省区的丘陵地带或海拔 400~1400 m 的山坡林内或灌木丛中, 是越橘属在我国分布最广、蕴藏量最大的一个种, 然而, 国内丰富的野生乌饭树种质资源却没有得到足够的重视, 基本处于野生状态, 人为破坏极为严重, 同时优良种质的选择和品种的选育还尚未起步。前人对乌饭树资源的调查过程中, 发现它在表型特征和遗传性状方面有很大差异和多样性, 单株果实大小受纬度的影响呈现显著差异^[4], 不同地区乌饭树叶片的类黄酮化合物含量存在显著差异^[5], 许多野生植株的优良性状具有很高的应用价值。

目前越橘属植物如欧洲越橘、蓝莓、蔓越莓等已经广泛开展了分子标记开发和遗传多样性分析。Aruna 等^[6]使用 RAPD 标记对 15 份栽培兔眼越橘以及 4 份野生兔眼越橘进行亲缘关系分析, 发现栽培品种遗传背景狭窄。Boches 等^[7]应用 SSR 标记研究了 69 份高丛蓝莓资源, 经遗传相似性检测, 可以将野生资源和栽培资源相分离, 将南高丛蓝莓和北高丛蓝莓单独聚类。Rowland 等^[8]设计了 44 对 EST-PCR 引物对 28 个兔眼越橘品种和 1 个高丛越橘品种进行亲缘关系分析, 结果显示聚类结果与杂交系谱以及品种类型存在一定的相关性。Bian 等^[9]设计 36 对 EST-SSR 引物, 对 150 个蓝莓品种进行遗传多样性、种群结构及亲缘多样性进行分析, 发现兔眼蓝莓在遗传上明显区别于其他种群; 同时将高丛蓝莓分为 3 个亚群, 分别是南高丛蓝莓、北高丛蓝莓和由 Weymouth 品种衍生的后代。Debnath^[10]用 12 对 EST-SSR 引物分析 36 份野生蓝莓和栽培种的遗传多样性及遗传关系, 将矮丛蓝莓分为 3 个亚群, 而半

高丛蓝莓和高丛蓝莓被分为同一组。

相比之下, 我国在这方面的研究起步较晚, 植物资源开发利用的力度尚不够。我国蕴藏着极其丰富的野生乌饭树植物资源, 特别是长江流域及以南地区, 但是目前乌饭树的分子标记开发和应用尚未见报道, 生产上使用的乌饭树多是由野生品种通过组培技术繁育, 遗传背景不详、遗传特性不清楚, 严重影响了乌饭树资源的利用和育种工作的进展。本研究通过开发乌饭树分子标记, 利用分子标记进行遗传多样性分析, 了解乌饭树群体的遗传多样性特征; 同时, 利用分子标记进行聚类分析和群体结构分析, 将聚类结果和亚群划分结果与植株的地理分布相对应, 阐明种质之间的亲缘关系和群体结构, 该研究可以为乌饭树的资源开发和品种培育提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据本课题组前期调查分析^[3], 乌饭树的最适生区为湖南、江西南部、福建武夷山地等。课题组所在地为江苏省, 江苏溧阳市的地方特产“三黑三白”中“一黑”即为乌饭树叶片制成的乌米饭^[11], 溧阳市的乌饭树资源丰富。安徽宣城地区为课题组前期进行乌饭树野生资源调查时发现的一处野生资源分布区。因此本研究收集了江苏溧阳、安徽宣城和其他 3 个最适生区域的乌饭树资源, 包括江苏溧阳 (LY)、安徽宣城 (XC)、湖南白云山 (BYS)、江西上犹 (SY)、福建南平 (NP) 共 5 个地区的乌饭树野生种质资源, 采用野生移植的方式^[12]保存于江苏省林业科学研究所内, 通过流式细胞术^[13]筛选出 70 份二倍体野生单株 (表 1), 进行后续研究。

1.2 基于 GBS 测序技术的 SNP 分子标记开发

1.2.1 GBS-seq 测序 于 2020 年春季 5 月份新叶生长期收集植物叶片, 采用天根植物基因组 DNA 提取试剂盒法和 CTAB 法提取基因组 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测检验提取 DNA 的完整性和浓度。GBS-seq 文库构建及高通量测序: 参照 Elshire 等^[14]建库技术进行文库构建, 采用限制性内切酶 *MseI* 对

表1 乌饭树种质分布及数量

Table 1 Distribution and quantity of *V. bracteatum* germplasm

来源 Origin	数量 Size of population
江苏溧阳 LY	15
安徽宣城 XC	13
湖南白云山 BYS	14
江西上犹 SY	14
福建南平 NP	14

LY: Liyang, Jiangsu; XC: Xuancheng, Anhui; BYS: Baiyunshan, Hunan; SY: Shangyou, Jiangxi; NP: Nanping, Fuping; The same as below

DNA进行酶切,加上带有barcode的接头后,对每个样品进行扩增,然后对样品进行混合,电泳回收375~400 bp的DNA条带,纯化后进行文库构建。采用IlluminaHiSeq测序平台进行双末端(Paired-End)150测序,测序工作委托北京诺禾致源生物有限公司完成。测序数据质控:采用Fastp软件(<https://github.com/OpenGene/fastp>)将测序得到的原始数据(raw data)按照如下标准过滤,①去除每条reads两端的测序接头(Adapter);②当单端测序read中测序情况不明碱基(N)的含量超过该条read长度比例的10%时,去除此对paired reads;③当单端测序read中含有的低质量(Q≤5)碱基数超过该条read长度比例的50%时,去除此对paired reads,每个测序文件经Fastp质控后,得到高质量的有效数据(clean data)用于后续SNP标记开发。

1.2.2 SNP位点开发 以蓝莓(*Vaccinium corymbosum*) W8520基因组^[15](<http://www.igbquickload.org/blueberry/>)为参考基因组,通过短序列比对软件BWA(<http://bio-bwa.sourceforge.net>)将每个样本的clean data比对到参考基因组,采用mem算法,比对参数为MEM-t=4, -k=32, -M。根据比对结果,应用变异检测软件GATK(<https://gatk.broadinstitute.org/hc/en-us>)进行群体SNP位点检测,利用VCFtools软件(<https://vcftools.github.io/>)对SNP标记按照以下标准进行筛选:①测序深度>2;②缺失率≤40;③最小等位基因频率(MAF, minor allele frequency)≥0.05;最后获得高质量的SNP位点。采用PowerMarker(<https://brcwebportal.cos.ncsu.edu/powermarker/>)软件分析这些SNP标记的特征信息,包括最小等位基因频率、多态性信息量(PIC, polymorphic information content)、平均杂合度(H,

heterozygosity)和基因多样性(Gene diversity)。

1.3 遗传多样性与遗传分化分析

利用Popgene^[16]软件计算各群体的有效等位基因数(N_e , number of effective alleles)、观测杂合度(H_o , observed heterozygosity),期望杂合度(H_e , expected heterozygosity)和近交系数(F_{is} , inbreeding coefficient in population),获得各群体的遗传多样性指数。

通过Popgene软件计算群体间遗传分化系数(F_{st} , genetic differentiation coefficient)来评价两两群体之间的分化程度。

利用Arlequin 3.5^[17]软件计算群体间的分子变异,分析群体间、群体内和个体间的遗传变异贡献率。

1.4 遗传进化与群体结构分析

运用Tassel^[18]软件计算SNPs的Nei's标准遗传距离,采用MEGAX^[19]软件通过邻接法(Neighbor-joining method)构建系统进化树,引导值(Bootstrap values)经过达1000次计算获得。用iTOL(<https://itol.embl.de/>)软件标注分枝和标签颜色。

运用STRUCTURE^[20]软件基于贝叶斯数学模型对群体材料进行群体结构分析,将每份材料归类到特定的类群中,从而确定出总群体的群体结构。假定类群数目k从2到10,进行5次重复运算,根据似然值最大原则判断合适的k值,最终确定群体中存在的最优的类群数目。

运用Tassel软件,利用SNP标记对群体材料进行主成分分析,按照不同性状特征将个体按主成分聚类成不同的亚群,同时用于和其他方法做相互验证。

2 结果与分析

2.1 GBS-seq测序及SNP标记筛选

70个乌饭树样本测序共获得了43.18 Gb数据,平均每个样本0.61 Gb, Q20≥92.8%、Q30≥82.85%;共获得223768个SNP位点,过滤后获得9752个SNP,用于后续分析。SNP标记的遗传多样性信息结果表明(表2,图1),SNP的最小等位基因频率范围为0.05~0.50,群体SNP最小等位基因频率较低,多为最小等位基因频率<0.1的稀有等位基因,占54.02%。基因多样性均值为0.21,其中0.10~0.15所占组份最大,占36.40%。基因多态性信息量均值为0.18,66.33%的位点小于0.20。基因平均杂合度表示群体中SNP为杂合子的比例,乌饭树野生群体平

均杂合度范围为 0.09~0.96, 其中杂合度 >0.4 的标记位点占 10.54%, 相比自交作物而言, 杂合基因比例较高, 说明乌饭树可能通过杂交方式繁殖。

表 2 SNP 特性分析

Table 2 Characterization analysis of SNP markers

SNP 特征	最小值	最大值	平均值
SNP characteristics	Min.	Max.	Mean
最小等位基因频率 MAF	0.05	0.50	0.14
基因多样性 GD	0.10	0.50	0.21
多态性信息量 PIC	0.09	0.38	0.18
平均杂合度 H	0.09	0.96	0.21

MAF: Minor allele frequency; GD: Gene diversity; PIC: Polymorphic information content; H: Heterozygosity; The same as below

2.2 不同群体的遗传多样性

根据变异位点对群体遗传学参数进行统计分析(表 3)。5 个群体的有效等位基因数范围为 1.483~1.593, 平均值为 1.523; 观测杂合度范围为 0.195~0.255, 平均值为 0.231; 期望杂合度范围为 0.200~0.228, 平均值为 0.219; 近交系数范围为 -0.172~0.337, 平均值为 0.131。福建南平群体的有效等位基因数最多, 说明该群体中可能存在更丰富的稀有基因。江苏溧阳群体的观测杂合度和期望杂合度均最高, 说明江苏溧阳群体具有更多的遗传变异。只有溧阳群体的近交系数 <0, 其他 4 个群体的近交系数 >0, 说明溧阳群体的遗传结构更平衡。总体而言, 5 个群体中江苏溧阳群体的遗传多样性最高。

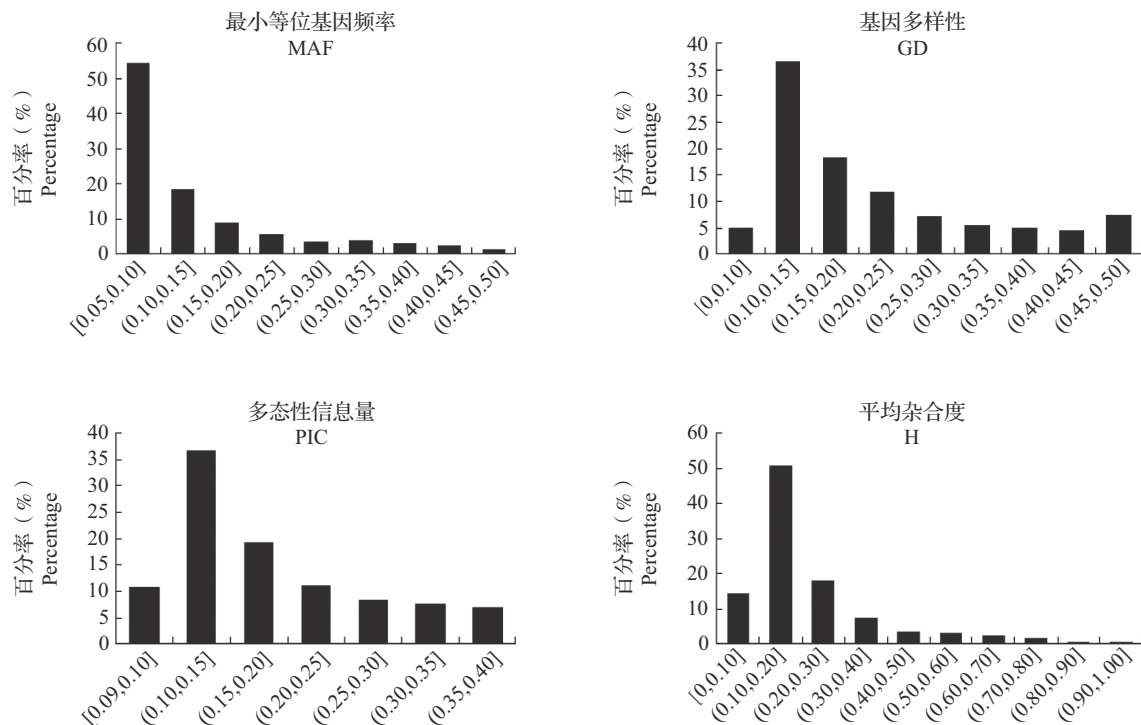


图 1 SNP 的遗传多样性

Fig. 1 Genetic diversity parameters of SNP markers

表 3 乌饭树群体的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity parameters of *V. Bracteatum* populations

群体	有效等位基因数	观测杂合度	期望杂合度	近交系数
Population	N_e	H_o	H_e	F_{is}
江苏溧阳 LY	1.483	0.255	0.228	-0.172
安徽宣城 XC	1.492	0.243	0.218	0.132
湖南白云山 BYS	1.499	0.246	0.222	0.095
福建南平 NP	1.593	0.195	0.200	0.337
江西上犹 SY	1.548	0.214	0.227	0.264
均值 Mean	1.523	0.231	0.219	0.131

2.3 群体遗传变异分析

分子遗传方差分析的结果如表4所示,群体间的遗传变异为21.27%,群体内个体间的遗传变异为14.28%,所有个体间的遗传变异为65.45%,所有个

体间的遗传变异远大于群体间和群体内个体间的遗传变异程度,说明尽管群体间存在一定程度的遗传分化,但是自然群体的遗传变异主要来源于所有个体间。

表4 乌饭树群体的分子方差分析

Table 4 Analysis of molecular variance of *V. Bracteatum* populations

变异来源 Source of variation	自由度 df	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance component	变异百分率(%) Percentage of variance
群体间 Among populations	4	96.42	0.75c	21.27
群体内个体间 Among individuals within population	65	211.72	0.50b	14.28
所有个体间 Among individuals within individuals	70	158.00	2.26a	64.45
总体 Total	139	466.14	3.50	100

小写字母表示方差在 $P < 0.05$ 水平上差异显著

Different lowercase letters indicate significant differences at the $P < 0.05$ level

2.4 群体间的遗传分化情况

群体间遗传分化系数可评价两两群体之间的分化程度,结果(表5)表明,5个群体间的遗传分化系数平均值为0.178。根据 Wright^[21]对遗传分化系数的划分,江西上犹与江苏溧阳、安徽宣城和湖南白云山3个群体之间的分化程度极大,其中江苏溧阳与江西上犹群体的遗传分化系数最高,为0.406,

说明两个群体间的遗传分化程度最高。江西上犹与福建南平之间遗传分化系数为0.168,这两组群体间遗传分化程度属于高度分化。湖南白云山与江苏溧阳、安徽宣城之间为中等分化;福建南平与江苏溧阳、安徽宣城、湖南白云山之间也为中等分化。江苏溧阳与安徽宣城群体的遗传分化系数最低,为0.021,群体间遗传分化很弱。

表5 乌饭树群体的遗传分化情况

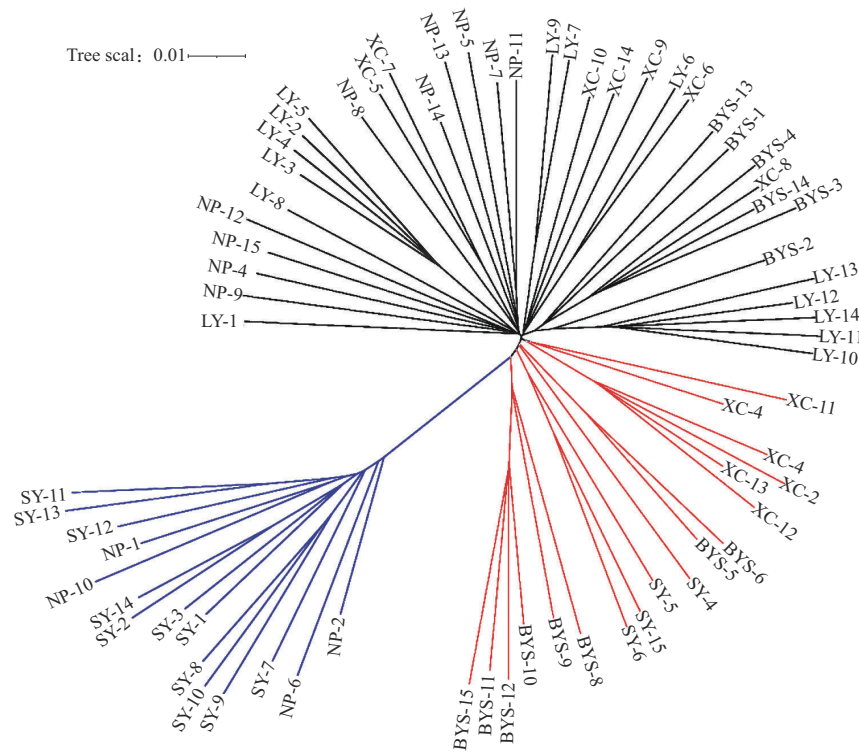
Table 5 Fixation index between *V. Bracteatum* populations

群体 Population	江苏溧阳 LY	安徽宣城 XC	湖南白云山 BYS	福建南平 NP	江西上犹 SY
江苏溧阳LY	0				
安徽宣城XC	0.021	0			
湖南白云山BYS	0.117	0.074	0		
福建南平NP	0.087	0.087	0.097	0	
江西上犹SY	0.406	0.384	0.338	0.168	0

2.5 遗传进化与群体结构分析

2.5.1 系统进化树分析 采用邻接法构建系统发育树,进化树(图2)显示了70份乌饭树单株的进化关系和亲缘关系远近。从树形结构来看,大致分为3个分支,分支I(蓝色)包含11个江西上犹和4个福建南平的种质,该分支与其他材料遗传距离较远;分支II(红色)由湖南白云山的8份材料、江西上犹的4份材料和安徽宣城的6份材料组成,分支间距离较为松散;分支III(黑色)包含51份种质材料,分支内种质间遗传距离较为紧密。进化树的每一个分支代表一个种质材料,分支分离程度代表遗传关系远近,结果显示遗传进化距离远近与地理分布无确定性关系,说明乌饭树种质的遗传背景复杂。

2.5.2 群体遗传结构分析 经STRUCTURE软件计算发现LnP(D)值随着K值持续上升,当K=3时,Delta K值最大(图3A),由此推断群体结构K值为3较为合理。根据K=3时的每个种质材料划分到各亚群的概率值 q 值,将各个种质划分为3个不同的亚群(图3B)。各亚群种质的地理分布显示(表6),亚群1包含大部分江西上犹种质(11个)和福建南平种质(4个),没有其他地区的种质。亚群2包含江苏溧阳(5个)、江西上犹(4个)和湖南白云山(8个)种质,没有安徽宣城和福建南平的种质。亚群3包括部分江苏溧阳(9个)、湖南白云山(6个)、福建南平(10个)种质,以及全部的安徽宣城种质,没有江西上犹的种质。群体结构划分与种质地理分布不一致。

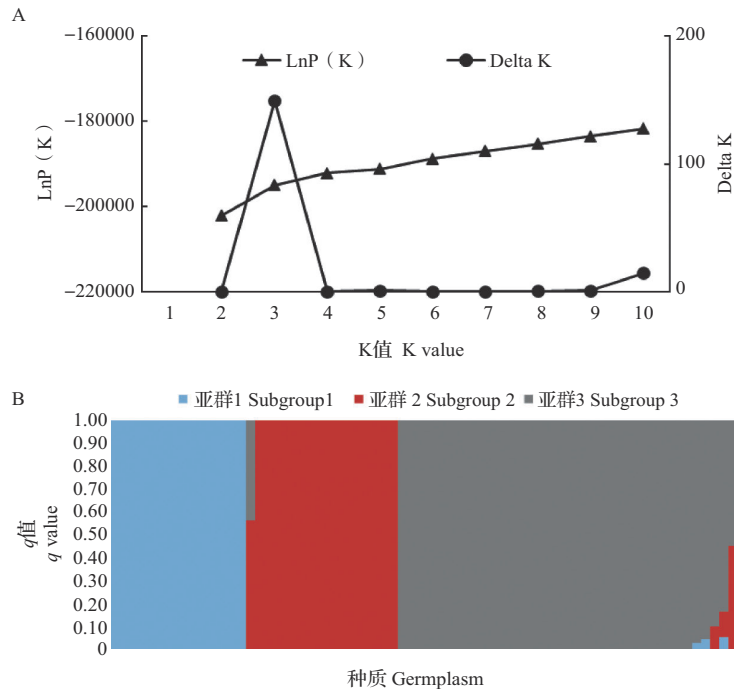


蓝色、红色和黑色线条代表不同的分支;SY代表江西上犹种质,NP代表福建南平种质,BYS代表湖南白云山种质, XC代表安徽宣城种质,LY代表江苏溧阳种质

Blue, red and black lines represent different branches;SY represents germplasm from Shangyou in Jiangxi province, NP represents germplasm from Nanping in Fujian province, BYS represents germplasm from Baiyunshan in Hunan province, XC represents germplasm from Xuancheng in Anhui province, LY represents germplasm from Liyang in Jiangsu province

图2 乌饭树种质聚类分析

Fig. 2 Cluster analysis of *V. Bracteatum* germplasm



A为K=2~10时, LnP(K)和Delta K值的变化;B为当K=3时, 70份种质材料属于3个亚群的概率值

A shows the changes in LnP (K) and Delta K values when K=2-10;B shows the q values of 70 germplasm resources belonging to three subgroups when K=3

图3 乌饭树种质的群体结构

Fig. 3 The population structure of *V. Bracteatum* germplasm

表6 亚群种质的地理分布情况

Table 6 Origin distribution of *V. Bracteatum* germplasm samples in each subgroup

亚群 Subgroup	各地区种质数目 Number of germplasm resources in each origin				
	江苏溧阳 LY	安徽宣城 XC	湖南白云山 BYS	福建南平 NP	江西上犹 SY
	亚群1 Subgroup 1	0	0	0	4
亚群2 Subgroup 2	5	0	8	0	4
亚群3 Subgroup 3	9	13	6	10	0

2.5.3 主成分分析 基于个体基因组 SNP 差异程度,利用主成分分析对 70 份种质资源进行聚类。其中,第 1 主成分和第 2 主成分分别解释 44.87% 和 6.62% 的群体结构变异,超过了 50% 的群体结构变异。图 4 表明,根据群体结构划分的 3 个亚群能够互相区分开,验证了前文中不同亚群的划分是可靠的。亚群 1 和亚群 3 散点密集,说明其包含种质的遗传关系较近,亚群 2 散点较为分散,聚集效果不好,说明其内部可能存在遗传分化;亚群 1 与其他亚群距离较远,说明通过群体结构的划分可以将亚群 1 明显地区分开;亚群 2 与亚群 3 存在部分种质重叠,可能遗传背景上较为相似,难以区分。

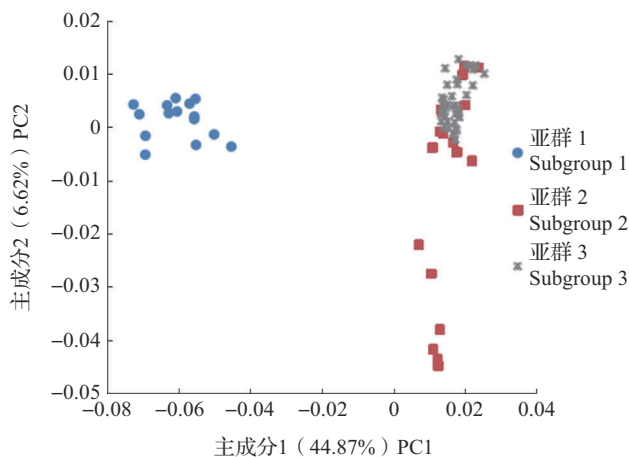


图4 乌饭树种质的主成分分析

Fig. 4 The principal component analysis of *V. Bracteatum* germplasms

3 讨论

基因分型测序技术(GBS, genotyping-by-sequencing)广泛应用于植物遗传多样性研究中^[22]。本研究通过 GBS 测序获得 SNP 分子标记,经过筛选后获得了 9752 个高质量 SNP 位点,通过分析 SNP 标记的最小等位基因频率、多态性信息量、基因多样性和平均杂合度,显示这些分子标记具有一定的遗传多样性,可以用于后续分析。从本研究的测序质量以及

获得的 SNP 数量方面来看,使用 GBS 技术开发乌饭树的 SNP 分子标记是可行且高效的。

3.1 乌饭树群体的遗传多样性比较

遗传多样性是植物进化和适应性的基础^[23],遗传多样性分析是保护和利用植物资源的重要基础^[24]。一个物种或种群的遗传多样性越高,说明该物种或种群对外部环境变化的应对能力越高;相反,一个物种或种群的遗传多样性较低,则表明该物种或种群近期可能经历过或正在经历种群数量的减少^[25]。有效等位基因数、期望杂合度和观测杂合度数值越大表明群体中有更丰富的等位基因和更多的遗传变异^[26],本研究中福建南平群体的有效等位基因数数值最大,江苏溧阳群体的观测杂合度和期望杂合度数值最高。期望杂合度受样本取样的影响较小,其值越高说明群体的遗传多样性就越丰富,观测杂合度更易受样本大小等因素的影响^[27],本研究中江苏溧阳和江西上犹群体的期望杂合度值较高,湖南白云山和安徽宣城的期望杂合度值中等,福建南平群体的期望杂合度值最低。观测杂合度和期望杂合度两者的差值分析有助于理解群体的遗传结构,本研究中江苏溧阳、安徽宣城、湖南白云山群体的期望杂合度小于观测杂合度,且差值较大,表明群体中杂合子的实际数量多于预期,这意味着群体内存在较高的遗传多样性,需要采取措施以维持其遗传资源的可持续利用;而福建南平和江西上犹群体的期望杂合度大于观测杂合度,且差值较小,表明群体中杂合子的实际数量少于预期,需要采取特别的保护措施以避免遗传资源的丧失。本研究使用近交系数来了解群体内的遗传多样性情况,近交系数是衡量种群内近交程度的指标,其值范围在-1 到 1 之间^[28]。江苏溧阳群体的近交系数值为负值,这说明该群体个体间近交程度较低,杂合子数量相对较多,群体内的遗传多样性较高。综合以上指标,江苏溧阳群体的遗传多样性最高,可以进行开发利用。

3.2 乌饭树群体的遗传变异分布和遗传分化

为了解乌饭树群体的遗传变异在群体间以及群体内的分布情况,分析了乌饭树自然群体的遗传变异来源,发现主要的遗传变异来自于乌饭树所有个体间(65.45%),其他的遗传差异来自于群体间(21.27%),而来自于群体内个体间的遗传差异占比最少(14.28%),表明本研究的乌饭树群体的遗传分化主要表现为所有样本个体之间的分化,即由个体间不同基因型间的遗传分化引起。乌饭树各群体间的遗传分化系数平均值达到0.178,根据 Wright^[21]提出的遗传分化指数标准:0.05以下群体间遗传分化很弱、0.05~0.15为中等分化、0.15~0.25为高度分化、0.25以上群体间遗传分化程度极大,乌饭树各群体之间遗传分化程度高。其中,江西上犹群体与其他群体间的分化程度均较高,其他各群体间分化程度为中等分化,江苏溧阳和安徽宣城群体分化程度很弱。结果显示乌饭树各群体间的分化程度与地理位置远近不完全相关,可能还受群体间遗传差异、基因流以及群体大小等多种因素影响^[29]。

3.3 乌饭树群体的亲缘关系和群体结构

群体进化结果表明,乌饭树群体可分为3个分支,种质遗传距离远近和进化关系与地理位置不一致,说明乌饭树野生资源在长期的进化过程中形成了复杂的遗传背景。群体结构分析将70份种质资源分为3个亚群,推测可能具有3个祖先,不同地理来源的种质在各亚群中均有分布,显示了乌饭树资源存在着广泛的基因交流。乌饭树种质资源的群体结构划分与地理来源没有明显的相关性,在其他植物资源的遗传分析也发现了类似的结果^[30]。主成分分析结果与群体结构划分结果类似,3个亚群能够互相区分开,亚群1与其他亚群距离较远,亚群2和亚群3有部分重叠,表明了亚群内不同个体的遗传关系远近存在差异。

了解掌握乌饭树野生群体遗传多样性、亲缘关系和遗传结构,能为其资源利用提供更加清晰的思路和更可靠的证据,育种目标更容易实现。前期的研究发现江苏溧阳乌饭树群体与江西上犹、福建南平的群体相比具有丰富的黄酮含量^[4],本研究结果显示这3个群体间遗传分化程度高,且江苏溧阳群体的种质与部分上犹群体、南平群体的种质在群体结构上分属不同的亚群,因此江苏溧阳的种质创新可以利用江西上犹、福建南平群体的资源,进而丰富江苏溧阳地区乌饭树的遗传多样性。

综上,本研究基于SNP分子标记对70份来自5

个地区的乌饭树种质资源遗传多样性进行分析,结果表明江苏溧阳群体的遗传多样性高于其他群体。群体进化分析显示70份乌饭树种质资源的聚类结果与地理来源没有明显的相关性,遗传结构分析和主成分分析将70份种质材料分为3个亚群,说明乌饭树野生资源在长期的进化过程中形成了复杂的遗传背景。本研究结果为更好地利用乌饭树种质资源提供有利参考和依据,为今后进一步收集保护乌饭树种质资源和乌饭树种质创新、育种实践提供指导。

参考文献

- [1] 南京中医药大学. 中药大辞典. 第二版, 下册. 上海: 上海科学技术出版社, 2006: 2203-2205
Nanjing University of Traditional Chinese Medicine. Dictionary of traditional Chinese medicine. 2nd edn, volume 2. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2006: 2203-2205
- [2] 谢远程, 周晓琴. 乌饭树浆果营养成分分析及其开发. 中国野生植物资源, 2004, 23(3): 28-35
Xie Y C, Zhou X Q. Analysis and development of nutritional components in *Vaccinium bracteatum* berries. Chinese Wild Plant Resources, 2004, 23(3): 28-35
- [3] 张敏, 陈庆生, 黄婧, 周鹏. 乌饭树的地理分布及潜在分布区分析. 江苏林业科技, 2019, 46(4): 1-8
Zhang M, Chen Q S, Huang J, Zhou P. Geographic distribution and potential distribution of *Vaccinium bracteatum*. Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology, 2019, 46(4): 1-8
- [4] 黄婧, 赵青, 周鹏, 张敏. 不同产地乌饭树叶中黄酮成分含量差异研究. 江苏林业科技, 2020, 47(4): 8-12, 21
Huang J, Zhao Q, Zhou P, Zhang M. Analysis of flavonoids in the leaves of *Vaccinium bracteatum* Thunb. from different regions. Journal of Jiangsu Forestry Science and Technology, 2020, 47(4): 8-12, 21
- [5] 刘仁林, 胡明娇, 李江, 刘江华. 乌饭树果实大小的地理变异研究. 经济林研究, 2016, 34(3): 114-120
Liu R L, Hu M J, Li J, Liu J H. Study on geographic variation of fruit sizes in *Vaccinium bracteatum*. Nonwood Forest Research, 2016, 34(3): 114-120
- [6] Aruna M, Ozias-Akins P, Austin M E, Kochert G. Genetic relatedness among rabbiteye blueberry (*Vaccinium ashei*) cultivars determined by DNA amplification using single primers of arbitrary sequence. Genome, 1993, 36(5): 971-977
- [7] Boches P S, Bassil N V, Rowland L. Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2006, 131(5): 674-686
- [8] Rowland L J, Ogden E L, Ehlenfeldt M K. EST-PCR markers developed for highbush blueberry are also useful for genetic fingerprinting and relationship studies in rabbiteye blueberry. Scientia Horticulturae, 2010, 125(4): 779-784

- [9] Bian Y, Ballington J, Raja A, Brouwer C, Reid R, Burke M, Wang X G, Rowland L J, Bassil N, Brown A. Patterns of simple sequence repeats in cultivated blueberries (*Vaccinium* section *Cyanococcus* spp.) and their use in revealing genetic diversity and population structure. *Molecular Breeding*, 2014, 34:675-689
- [10] Debnath S C. Structured diversity using EST-PCR and EST-SSR markers in a set of wild blueberry clones and cultivars. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2014, 54:337-347
- [11] 王惠. 旅游餐饮特色化对旅游目的地影响——以溧阳市天目湖旅游度假区餐饮为例. *中国商论*, 2016(36):47-49
Wang H. The impact of tourism catering characteristics on tourist destinations—a case study on the catering of Tianmu Lake Tourist Resort in Liyang city. *China Journal of Commerce*, 2016 (36):47-49
- [12] 陈庆生, 黄利斌, 张敏, 窦全琴. CN103814731B一种提高野生乌饭树移植成活率的方法. 2015-09-23
Chen Q S, Huang L B, Zhang M, Dou Q Q. CN103814731B A method to improve the survival rate of *Vaccinium bracteatum* transplantation. 2015-09-23
- [13] 黄婧, 张敏, 林峰, 周鹏, 周洁. 基于流式细胞术的乌饭树核DNA含量(2C-值)测定. *广西植物*, 2020, 40(5):680-686
Huang J, Zhang M, Lin F, Zhou P, Zhou J. Determination of nuclear DNA content (2C-value) of *Vaccinium bracteatum* by flow cytometry. *Guihaia*, 2020, 40(5):680-686
- [14] Elshire R J, Glaubitz J C, Sun Q, Poland J A, Kawamoto K, Buckler E S, Mitchell S E. A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 2011, 6(5):e19379
- [15] Gupta V, Estrada A D, Blakley I, Reid R, Patel K, Meyer M D, Andersen S U, Brown A F, Lila M A, Loraine A E. RNA-Seq analysis and annotation of a draft blueberry genome assembly identifies candidate genes involved in fruit ripening, biosynthesis of bioactive compounds, and stage-specific alternative splicing. *GigaScience*, 2015, 4:5
- [16] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3):583-590
- [17] Excoffier L, Lischer H E. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. *Molecular Ecology Resources*, 2010, 10(3):564-567
- [18] Bradbury P J, Zhang Z W, Kroon D E, Casstevens T M, Ramdoss Y, Buckler E S. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 2007, 23(19):2633-2635
- [19] Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S. MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28(10):2731-2739
- [20] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Dominant markers and null alleles. *Molecular Ecology Notes*, 2007, 7(4):574-578
- [21] Wright S. *Evolution and the genetics of populations vol. 4: Variability within and among natural populations*. Chicago: University of Chicago Press, 1978
- [22] Balloux F, Lugon-Moulin N. The estimation of population differentiation with microsatellite markers. *Molecular Ecology*, 2002, 11(2):155-165
- [23] 蒋志刚, 马克平. 保护生物学的现状、挑战和对策. *生物多样性*, 2009, 17(2):107-116
Jiang Z G, Ma K P. Status quo, challenges and strategy in Conservation Biology. *Biodiversity Science*, 2009, 17(2):107-116
- [24] 刘旭, 黎裕, 李立会. 作物种质资源学理论框架与发展战略. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(1):1-10
Liu X, Li Y, Li L H. Theoretical framework and development strategy for the science of crop germplasm resources. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(1):1-10
- [25] 李福贵, 孙艺文, 陈凯, 余进祥, 阮记明, 隗黎丽, 梁惜梅, 王义华, 戴银根. 鄱阳湖流域长江江豚种群遗传差异分析. *江西农业大学学报*, 2024, 46(5):1298-1307
Li F G, Sun Y W, Chen K, Yu J X, Ruan J M, Wei L L, Liang X M, Wang Y H, Dai Y G. Genetic diversity of Yangtze finless porpoises population in Poyang Lake Basin. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2024, 46(5):1298-1307
- [26] Gutiérrez-Espeleta G A, Kalinowski S T, Boyce W M, Hedrick P W. Genetic variation and population structure in desert Bighorn sheep: Implications for conservation. *Conservation Genetics*, 2000, 1(1):3-15
- [27] Gustavo A G, Kalinowski S T, Boyce W M, Hedrick P W. Genetic variation and population structure in desert Bighorn sheep: Implications for conservation. *Conservation Genetics*, 2000, 1(1):3-15
- [28] Alaskar H, Alhajeri B H, Almathen F, Alhaddad H. Genetic diversity and population structure of dromedary camel-types. *Journal of Heredity*, 2020, 111(4):405-413
- [29] Kelley S T, Farrell B D, Mitton J B. Effects of specialization on genetic differentiation in sister species of bark beetles. *Heredity*, 2000, 84(2):218-227
- [30] 谢和霞, 范兢升, 谢小东, 周海宇, 程伟东, 覃兰秋, 马全姿, 程芳丽, 石志斯, 江禹奉. 基于SNP标记分析广西玉米地方品种遗传多样性. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(6):1580-1590
Xie H X, Fan J S, Xie X D, Zhou H Y, Cheng W D, Qin L Q, Ma Q Z, Cheng F L, Shi Z S, Jiang Y F. SNP-based genetic diversity dissection of maize landraces from Guangxi. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2023, 24(6):1580-1590