

湿地松 SSR 分子标记开发及脂用无性系遗传多样性分析

胡 珊¹, 张文娟², 龚 斌¹, 张志红³, 周 光¹, 李火根², 杨春霞^{1*}

(1. 江西省林业科学院 江西乡土树种良种选育与高效利用江西省重点实验室/南昌市特色香料树种生物育种重点实验室, 南昌 330013; 2. 南京林业大学 林木遗传与生物技术教育部重点实验室/南方现代林业协同创新中心, 南京 210037; 3. 峡江县林木良种场, 吉安 331409)

摘 要: 湿地松是重要的产脂树种。为探究不同来源脂用无性系的遗传多样性差异及群体分化规律, 解析其群体遗传结构与育种材料来源地的关联机制, 该研究利用转录组数据开发 SSR 标记, 对 172 份湿地松脂用无性系进行遗传多样性评估和群体结构分析。采用 MISA 软件从湿地松转录组 Unigene 序列中挖掘 SSR 位点, 利用 Primer 3.0 软件设计特异性引物; 经聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选多态性引物后, 选取 12 对扩增稳定、多态性丰富的 SSR 引物, 对 172 份湿地松脂用无性系进行 PCR 扩增, 开展遗传多样性参数估算、群体遗传结构分析及主成分分析。结果表明: (1) 从 68 211 条 unigenes 序列中共鉴定出 2 077 个 SSR 位点, 以三核苷酸和二核苷酸重复类型为主, 重复单元重复次数主要集中在 5~6 次, 重复单元类型以六碱基基元最为丰富, 且以 AGATGG/ATCTCC 重复基元出现频率最高, 占六碱基重复基元总数的 22.39%; 筛选出 12 对多态性优良的 SSR 引物, 其多态性信息含量 (PIC) 平均值为 0.291, 属于中度多态性水平, 可用于湿地松遗传评价。(2) 群体遗传结构分析将供试群体划分为两个亚群 ($K=2$, $\Delta K=346$), 其中亚群 A 包含 25 个无性系, 主要源自峡江林木良种场的高产脂育种材料; 亚群 B 包含其余 147 个无性系, 广泛分布于江西省其他地区; 主成分分析结果与 Structure 划分高度吻合, 第一、二主成分分别解释总遗传变异的 25.06% 和 12.68%; 遗传多样性比较显示, 亚群 B 的遗传多样性水平 ($N_a=3.617$, $I=0.549$, $h=0.320$) 显著高于亚群 A ($N_a=1.917$, $I=0.258$, $h=0.143$)。综上, 江西省湿地松脂用无性系遗传多样性较丰富, 且存在明显的群体遗传结构, 其中峡江林木良种场育种材料遗传基础相对狭窄, 而其他地区来源的无性系遗传多样性更为丰富。该研究为江西省及周边相似气候区域的湿地松良种选育及核心种质构建提供了重要的理论依据。

关键词: 湿地松, 脂用无性系, SSR 分子标记, 遗传多样性, 遗传结构

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A

Development of SSR molecular markers in *Pinus elliottii* and genetic diversity analysis of resin-producing clones

HU Shan¹, ZHANG Wenjuan², GONG Bin¹, ZHANG Zhihong³, ZHOU Guang¹, LI Huogen², YANG Chunxia^{1*}

基金项目: 国家重点研发计划子课题 (2022YFD2200204-4); 江西省林业科学院青年科技人才培养项目 (2023522901); 江西省林业科学院基础研究科研项目-领军人才项目 (2025522903)。

第一作者: 胡珊(1997—), 硕士, 助理研究员, 从事林木遗传育种研究, (E-mail) lkyhushan@163.com。

***通信作者:** 杨春霞, 博士, 研究员, 研究方向为林木遗传育种与培育, (E-mail) yangcx0812@126.com。

(1. Jiangxi Provincial Key Laboratory of Improved Variety Breeding and Efficient Utilization of Native Tree Species, Nanchang Key Laboratory of Biological Breeding of Special Spice Trees Species, Jiangxi Academy of Forestry, Nanchang 330013, China; 2. Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology of Ministry of Education, Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China; 3. Xiajiang County Forest Seed Farm, Ji'an 331409, China)

Abstract: *Pinus elliottii* is an important resin-producing tree species. This study focused on resin-use clones from different origins. It aimed to explore their genetic diversity differences and population differentiation patterns. It also sought to clarify how population genetic structure relates to the geographic sources of breeding materials. To achieve this, researchers developed SSR markers using transcriptome data. They then evaluated the genetic diversity and analyzed the population structure of 172 slash pine resin-use clones. The goal is to support selection, protection, and utilization of high-resin germplasm. SSR loci were mined from unigene sequences using MISA software. Specific primers were designed with Primer3.0. Polymorphic primers were screened by polyacrylamide gel electrophoresis. Twelve SSR primers with stable amplification and high polymorphism were selected. These primers were used to amplify 172 resin-used clones of *P. elliottii*. Genetic diversity parameters, population structure, and principal component analysis (PCA) were calculated. The results were as follows: (1) A total of 2,077 SSR loci were identified from 68,211 unigene sequences. Trinucleotide and dinucleotide repeats were the main types. Repeat numbers were mostly 5-6 times. Hexanucleotide motifs were the most abundant type. The AGATGG/ATCTCC motif had the highest frequency, accounting for 22.39% of all hexanucleotide repeats. Twelve SSR primers with good polymorphism were selected. Their average polymorphism information content (PIC) was 0.291, indicating moderate polymorphism. These 12 primers are suitable for genetic evaluation of *P. elliottii*. (2) Population structure analysis divided the tested population into two subpopulations ($K=2$, $\Delta K=346$). Subpopulation A contained 25 clones, mainly from high-resin breeding materials of Xiajiang Forest Tree Improvement Station. Subpopulation B contained the remaining 147 clones, widely distributed in other regions of Jiangxi Province. PCA results were highly consistent with Structure analysis. The first two principal components explained 25.06% and 12.68% of total genetic variation, respectively. Genetic diversity comparison showed subpopulation B had significantly higher diversity ($N_a=3.617$, $I=0.549$, $h=0.320$) than subpopulation A ($N_a=1.917$, $I=0.258$, $h=0.143$). In conclusion, resin-used clones of *P. elliottii* in Jiangxi Province have rich genetic diversity and obvious population structure. Breeding materials from Xiajiang Forest Tree Improvement Station have a relatively narrow genetic basis. Clones from other regions show richer genetic diversity. This study provides an important theoretical basis for the selective breeding of improved slash pine varieties and the construction of core germplasm collections in Jiangxi Province and adjacent regions with similar climatic conditions.

Key words: *Pinus elliottii*, resin-producing clones, SSR molecular markers, genetic diversity, genetic structure

湿地松 (*Pinus elliottii*) 原产于美国东南部, 因其生长迅速、树脂产量高、适应性强等特点, 自 20 世纪 80 年代末被大量引入我国, 现已成为南方重要的材用和脂用树种。经过数十年的育种改良, 我国已在多地建立起不同世代的湿地松种子园, 育种工作逐步深入。然而, 国外引种不可避免地存在遗传基础狭窄的先天缺陷, 且随着育种世代的逐步推进, 这一问题日益凸显, 严重制约了湿地松高产脂、优质材等优良性状的持续改良, 也对种质资源的长期稳定利用构成潜在威胁 (覃先玉等, 2025)。遗传多样性是物种生存适应能力的重要体现, 也是种质资源评价与遗传改良策略制定的核心依据 (Wei et al., 2022)。因此, 系统评价现有湿地松种质资源的遗传多样性, 明确其群体遗传结构, 对于种质资源的保护、核心种质构建及后续高效育种策略的制定具有重要的现实意义。

分子标记技术的迭代发展为林木种质资源的精准评价与保护利用提供了高效的技术支撑。在各类分子标记中, 简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 凭借其基因组分布广泛、共显性遗传、实验操作简便、多态性信息含量高显著优势, 已成为植物遗传学研究的重要工具。目前, SSR 标记已被广泛应用于遗传连锁图谱构建 (卢瑶等, 2025)、种质资源遗传多样性评估 (马晓雨等, 2026; 宋超然等, 2026) 以及品种鉴定与种质纯度检测 (孟令聪等, 2025; 高雯雯等, 2026) 等多个研究领域。随着二代测序技术的快速发展与成本的持续降低, RNA-Seq 技术已成为大规模开发功能性 SSR 标记的高效途径。相较于传统基于基因组文库开发的 SSR 标记, 基于转录组数据开发的 EST-SSR (expressed sequence tag-SSR) 标记来源于基因的编码区或非翻译区, 其序列在物种间具有更高的保守性, 且更易于与目标性状的候选基因建立直接关联, 从而为分子标记辅助育种提供更具生物学意义的工具 (Parchman et al., 2010)。

在松属 (*Pinus*) 树种中, SSR 标记的开发与应用已取得了长足进展。国外学者率先在火炬松 (*P. taeda*) (Bérubé et al., 2007) 和欧洲赤松 (*P. sylvestris*) (Soranzo et al., 1998; Sebastiani et al., 2012) 中开发了大规模 EST-SSR 标记, 并应用于遗传多样性及群体结构分析。国内方面同样基于转录组数据开发了马尾松 (*P. massoniana*)、云南松 (*P. yunnanensis*)、红松 (*P. koraiensis*)、大明松 (*P. taiwanensis*) 及白皮松 (*P. bungeana*) 等 SSR 标记, 应用与遗传多样性和群体遗传结构分析等方面研究 (杨章旗等, 2014; 蔡年辉等, 2015; 张振等, 2015; 梅利那等, 2017; 杨雄等, 2021; 罗群凤等, 2022)。近年来, 湿地松 SSR 标记开发取得了重要突破。易敏等 (2020) 基于湿地松转录组测序数据, 从 79 574 条 unigenes 中鉴定出 3 818 个 SSR 位点, 开发了 120 对 EST-SSR 引物, 其中 24 对引物在 113 份家系中表现出良好多态性, 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.349, 证实了基于湿地松转录组序列开发 SSR 标记的可行性。此外, 利用松属公共 EST 数据库开发的 EST-SSR 引物也已在湿地松中成功应用, 贾婕等 (2014) 从松属 EST 序列中筛选出 39 对在湿地松中具有扩增产物的引物, 其中 9 对呈现多态性。上述研究所开发的 SSR 标记主要针对湿地松家系材料或基于通用数据库设计, 而针对以产脂为目标专门筛选的湿地松脂用无性系群体, 其遗传多样性评估及群体结构解析仍未见系统报道。

江西省作为我国湿地松主要种植区, 种植面积居全国首位, 且项目组前期收集了丰富的脂用无性系种质资源, 为开展遗传多样性研究提供了良好的材料基础。基于此, 本研究以江西省内 172 个湿地松脂用无性系为研究材料, 依托转录组测序数据开发 EST-SSR 分子标记,

采用 MISA 位点挖掘与聚丙烯酰胺凝胶电泳筛选相结合的方法，通过遗传多样性参数估算、群体遗传结构分析和主成分分析，拟探讨以下科学问题：（1）基于转录组 SSR 标记，江西省 172 份湿地松脂用无性系的遗传多样性水平如何；（2）供试群体的遗传分化是怎样的。本研究以期对江西省乃至周边相似气候区湿地松脂用种质资源的精准评价、育种群体的遗传拓宽及核心种质库的理性构建提供分子依据。

1.材料与方法

1.1 材料

从江西省各地筛选的 172 份湿地松脂用无性系（表 1），采集新鲜的针叶或者树皮放在 -80 ℃ 保存，从中挑选 4 个不同来源的脂用无性系作为 SSR 引物筛选的样品。

表 1 供试的湿地松材料

Table 1 Materials of *Pinus elliottii*

编号 Number	无性系名称 Clone name	采集地 Sampling site	编号 Number	无性系名称 Clone name	采集地 Sampling site
A1	6-44	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B43	TH-4	吉安市泰和县 Taihe County, Ji'an City
A2	6-42	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B44	TH-17	吉安市泰和县 Taihe County, Ji'an City
A3	5-21	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B45	TH-11	吉安市泰和县 Taihe County, Ji'an City
A4	4-15	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B46	TH-10	吉安市泰和县 Taihe County, Ji'an City
A5	4-11-5	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B47	TH-1	吉安市泰和县 Taihe County, Ji'an City
A6	3-64	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B48~B9 7	BYS01~BYS 84	吉安市白云山林场 Jian'an City Baiyun Mountain Forest Farm
A7	3-55	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B98	QY-72	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A8	3-468	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B99	QY-70	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A9	3-3-1	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B100	QY-68	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A10	3-142	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B101	QY-67	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A11	2-9	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B102	QY-64	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A12	2-31	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B103	QY-59	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A13	2-28	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B104	QY-56	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A14	2-24	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B105	QY-55	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A15	2-198	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B106	QY-51	吉安市青原区 Qingyuan District, Ji'an City
A16	2-191	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed	B107	JS-46	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City

编号 Number	无性系名称 Clone name	采集地 Sampling site	编号 Number	无性系名称 Clone name	采集地 Sampling site
		Farm			
A17	2-173	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B108	JS-45	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A18	2-164	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B109	JS-42	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A19	2-150	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B110	JS-41	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A20	2-142	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B111	JS-38	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A21	2-0420	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B112	JS-31	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A22	1-38	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B113	JS-28	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A23	1-31	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B114	JS-24	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A24	0-867	峡江县林木良种场 Xiajiang County Forest Seed Farm	B115	JS-22	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
A25	AF-81	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City	B116	JS-21	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
B1~B7	PY04~PY10	上饶市鄱阳县 Poyang County, Shangrao City	B117	JS-30	吉安市吉水县 Jishui County, Ji'an City
B8~B11	PY17~PY20	上饶市鄱阳县 Poyang County, Shangrao City	B118	JA-122	吉安市吉安县 Ji'an County, Ji'an City
B12~B14	FL01~FL03	景德镇市浮梁县 Furai County, Jingdezhen City	B119	JA-116	吉安市吉安县 Ji'an County, Ji'an City
B15~B20	AY01~AY06	南昌市安义县 Anyi County, Nanchang City	B120	JA-111	吉安市吉安县 Ji'an County, Ji'an City
B21~B23	AY09~AY13	南昌市安义县 Anyi County, Nanchang City	B121	JA-106	吉安市吉安县 Ji'an County, Ji'an City
B24~B26	ZS01、ZS02、ZS04	樟树市吴城乡 Wucheng Town, Zhangshu City	B122	AF-191	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City
B27	XG-183	吉安市新干县 Xingan County, Ji'an City	B123	AF-97	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City
B28	XG-185	吉安市新干县 Xingan County, Ji'an City	B124	AF-94	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City
B29	XJ-174	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B125	AF-90	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City
B30	XJ-170	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B126	AF-76	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City
B31	XJ-169	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B127	AF-75	吉安市安福县 Anfu County, Ji'an City
B32	XJ-165	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B128~B133	XF01~XF06	赣州市信丰县 Xinfeng County, Ganzhou City
B33	XJ-155	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B134~B136	HC02~HC04	赣州市会昌县 Huichang County, Ganzhou City
B34	XJ-150	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B137~B140	DX02~DX05	抚州市东乡区 Dongxiang District, Fuzhou City
B35	XJ-149	吉安市峡江县 Xiajiang County, Ji'an City	B141	CR01	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City
B36	WA-142	吉安市万安县 Wan'an County, Ji'an City	B142	CR02	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City

编号 Number	无性系名称 Clone name	采集地 Sampling site	编号 Number	无性系名称 Clone name	采集地 Sampling site
B37	WA-141	吉安市万安县 Wan'an County, Ji'an City	B143	CR04	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City
B38	WA-138	吉安市万安县 Wan'an County, Ji'an City	B144	CR05	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City
B39	WA-132	吉安市万安县 Wan'an County, Ji'an City	B145	CR06	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City
B40	WA-129	吉安市万安县 Wan'an County, Ji'an City	B146	CR07	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City
B41	WA-126	吉安市万安县 Wan'an County, Ji'an City	B147	CR08	抚州市崇仁县 Chongren County, Fuzhou City
B42	TH-8	吉安市泰和县 Taihe County, Ji'an City			

1.2 方法

1.2.1 SSR 位点来源及选择标准

基于课题组现有的高产脂湿地松转录组数据（未发表）：以江西省峡江县林木良种场湿地松第一代种子园(115°24'E, 27°33'N)中的高产脂无性系 2-142 为试验材料，分别在 4 月(采脂前期)、8 月(采脂高峰期)、10 月(采脂结束期)采集无性系 1.3 m 胸径处树干的木质部组织及针叶，4、8、10 月的木质部样本编号为 SAPB、SAUB、SOCB，针叶为混样，编号为 SPN，每组样本设置 3 个重复。利用 CTAB 法提取样本总 RNA，构建 cDNA 文库，采用 IlluminaHiSeq4000 进行转录组测序，共获得 68 211 条 unigenes。

在湿地松转录组的所有 68 211 条 unigenes 范围内，通过 MISA 软件寻找 SSR 位点。寻找标准为单核苷酸的重复次数大于 20，二核苷酸的重复次数大于 6，三、四、五、六核苷酸重复次数大于 5。

1.2.2 DNA 提取与 SSR 引物设计

湿地松针叶基因组 DNA 使用来自北京庄盟公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒（离心柱型）提取，DNA 的纯度和浓度分别用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检验。

利用 Primer 3.0 软件对含有 SSR 位点的 unigenes 序列设计引物，引物设计标准为：退火温度 (TM) 55~65 °C，GC 含量 40%~60%，扩增产物大小 100~300 bp，引物长度 18~22 bp。设计的引物序列不应具有 SSR 位点，并且上游和下游引物的 GC 含量不应有太大差异，TM 差小于或等于 5 °C。引物的 3'端最好不要出现错配，5'端错配不超过 4 个。

1.2.3 SSR-PCR 扩增和引物筛选

选择产脂量差异的 4 个脂用无性系样品为模板，用 170 对引物对模版进行 SSR-PCR 扩增，PCR 扩增体系为 10 × Hieff® PCR Buffer (Mg²⁺ Free) 1 μL, 25 mmol⁻¹ MgCl₂ 0.6 μL, dNTP Mix (10 mmol⁻¹ each) 0.2 μL, 正反引物各 0.4 μL, Hieff® Taq DNA Polymerase (100 U · μL⁻¹) 0.08 μL, DNA 模版 0.4 μL, ddH₂O 补足 10 μL。PCR 反应体系为：94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 15 s, 退火温度从 62 °C 开始，每个循环降低 0.8 °C，退火时间 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 20 个循环; 94 °C 变性 15 s, 46 °C 退火 15 s, 72 °C 延伸 15 s, 10 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对引物进行筛选，利用毛细管电泳检测引物多态性。

1.2.4 数据分析

用 Genemarker 2.2.0 软件读取毛细管电泳的原始数据，将相关的峰图、位点信息导出，然后利用 GenAlEx、PowerMarker V3.25 软件计算等位基因数量、观测等位基因、有效等位基因、基因多样性、观测杂合度、期望杂合度、多态性信息含量。群体遗传结构通过 Structure2.3.4 软件分析，然后 GenAlEx 进行主成分分析，UPGMA 聚类树由 Mega 7.0.26 软件绘制。

2.结果与分析

2.1 SSR 位点的特征与分布

湿地松转录组过滤后共获得 81.94 G 数据，从中鉴定出 68 211 条 unigenes，通过检测共发现 2077 个 SSR 位点，位于 1518 条 unigenes 上，其中有 262 条 unigenes 含有 1 个以上位点。SSR 出现频率(SSR 总数/总 unigenes)为 3.04%，发生频率(含 SSR 的 unigenes/总 unigenes)为 2.23%，SSR 位点之间的平均距离是 36.62 kb。

湿地松转录组中共发现 6 种不同的 SSR 位点重复类型，以三核苷酸(1 145 个，55.13%)和二核苷酸(824 个，39.67%)为主，二者合计占总数的 94.80%。单核苷酸、四核苷酸、五核苷酸和六核苷酸重复类型分别占 1.30%、0.53%、0.14%和 3.23%(表 2)。重复次数多集中于 5~6 次，其中重复 5 次的序列占各类型总数的 50%以上。共鉴定出 57 种重复单元类型(表 2, 图 1)。六核苷酸重复基元类型最为丰富(30 种, 占 52.63%), 其中 AGATGG/ATCTCC 类型占六核苷酸总数的 22.39%，ATATCC/ATATGG 占 11.94%。三核苷酸重复基元中，AGG/CCT (22.18%)、AAG/CTT (20.79%) 和 AGC/CTG (19.48%) 为主要类型。二核苷酸中 AG/CT 类型数量最多(656 个)，呈现显著的优势分布。

表 2 SSR 重复单元的分布特征

Table 2 Distribution of the SSR motifs

重复单元 Repetitive unit	重复单元的类型数 Number of types for repeating units	数量 Number	比例 Percentage
单核苷酸 Mononucleotide	2	27	1.30%
二核苷酸 Dinucleotide	4	824	39.67%
三核苷酸 Trinucleotide	10	1 145	55.13%
四核苷酸 Tetranucleotide	9	11	0.53%
五核苷酸 Pentanucleotide	2	3	0.14%
六核苷酸 Hexanucleotide	30	67	3.23%
合计 Summation	57	2 077	100.00%

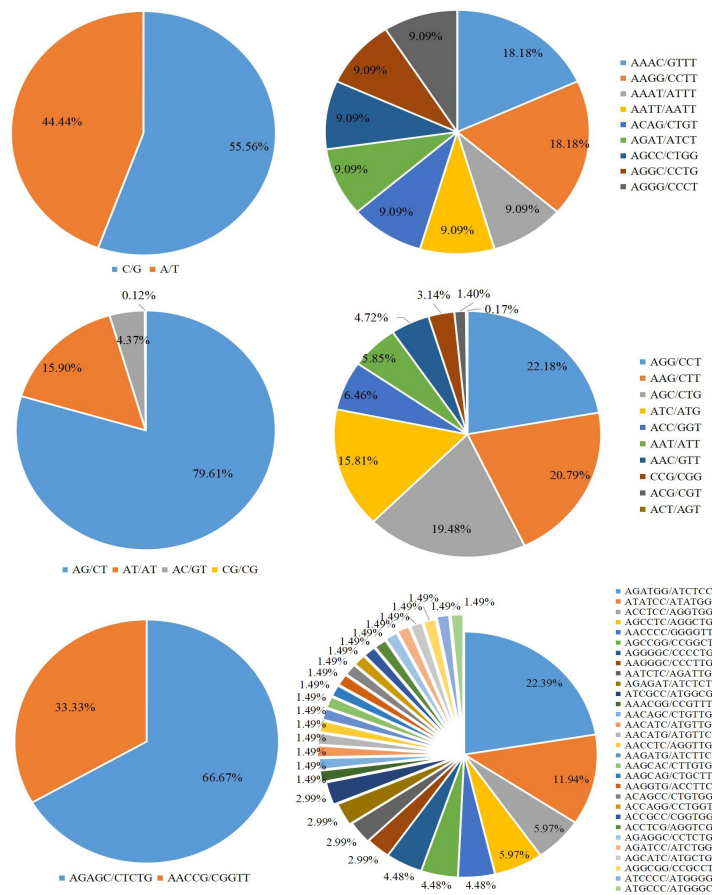


图 1 湿地松转录组 SSR 不同重复类型各基元的比例

Fig.1 Motif proportions of each type of repeat in *Pinus elliottii* transcriptome

2.2 SSR 引物筛选和多态性评价

基于 SSR 位点特征，选择 170 对引物进行合成与筛选。选择 4 个不同来源的脂用无性系对 SSR 引物进行扩增，154 对引物能扩增条带，扩增效率 90.6%，有 36 对引物有多态性位点，多态性引物的占比为 23.4%（多态性引物数/可扩增引物数），且多属于二核苷酸和三核苷酸重复单元类型。其中有 12 对引物多态性较好（表 3），扩增稳定、条带清晰，可用于后续群体遗传多样性分析。

12 对引物共检测到 40 个等位基因，每对引物检测到的等位基因数量为 2-7 个，平均每对引物等位基因数量为 3.33 个，其中，引物 TH18 检测到的等位基因数量最多（7 个），引物 TH7 次之（6 个）。有效等位基因数（ N_e ）平均为 1.363，以引物 TH18、TH7 和 TH22 的有效等位基因数相对较高。观测杂合度（ H_o ）和期望杂合度（ H_e ）的均值分别为 0.241 和 0.231。Shannon's 信息指数（ H' ）的变化范围为 0.152~0.854，平均值为 0.403；Nei's 基因多样性（ h ）介于 0.241~0.497 之间，平均值为 0.331。多态性信息含量（PIC）的平均值为 0.291，变化范围为 0.152~0.454，其中引物 TW43 的 PIC 值最高（0.454），其次为 TH18（0.375）、TH7（0.361）和 TW31（0.346），表明上述 4 对引物的多态性水平相对较高，可作为后续群体遗传多样性分析的核心引物（表 4）。

表 3 多态性引物序列

Table 3 Polymorphic primer sequences

引物名称 Primer name		序列 Sequence	退火温度 Temperature of annealing (°C)
O12	R	TAAACAAGGATGCGGGCCAT	56.9
	F	TGACCCGGAGAAGGATAGCA	
S20	R	CACCTGCTCCCAGAAAGAGG	57.1
	F	AACGAAAACAGCACGACAGC	
TH7	R	AGTCATGGGCTCTTCCTCCT	57.0
	F	ACCCAAAACGAATGCCAAGC	
TH18	R	GGTGGTGGCTGTGATGATGA	57.4
	F	CCAAGTCCAGCACCATCAGT	
TH22	R	TGCAGTGCATGTTGTTGACG	58.0
	F	TGGATCATTTGGTGGGGGTG	
TH28	R	AGAAGGGAGAGAGAGGCCTG	57.0
	F	TGGAGAAGAAAGCCGTCGTC	
TW38	R	CCGGCCGTATGGGTTTTAGT	57.5
	F	CATCGGTTTTGCGGCATAGG	
TW52	R	CATAGCCGGAAAGTTCCCCA	57.5
	F	AAGGTGGAGGGTTGCTTAGC	
TW67	R	CTGGTAGAAGCGTTCACCGT	57.4
	F	CAGCAGCTCCCCTCATCAAA	
TW71	R	GCACTTCACCACTCGGTACA	57.6
	F	GGCTGGGTTGCAATTTCGTT	
TW43	R	GCGGTCTGAGAGTTGTGAA	57.0
	F	GCGGCCTGGAACATACATCAA	
TW31	R	GAAAGAGGGCCAGCTCAAGT	58.6
	F	GGTGCTTCTGACAGGTACCC	

表 4 12 对引物的遗传多样性参数

Table 4 Genetic characteristic of 12 SSR primers

引物名称 Primer name	观测等位基 因 N_a	有效等位基 因 N_e	Shannon's 信息 指数 I	基因多样 度 h	多态性信息含 量 PIC
O12	2.00	1.247	0.256	0.297	0.253
S20	3.00	1.222	0.342	0.241	0.220
TH7	6.00	1.677	0.745	0.404	0.361
TH18	7.00	1.662	0.854	0.393	0.375
TH22	2.00	1.317	0.288	0.349	0.288
TH28	2.00	1.073	0.152	0.276	0.238
TW38	3.00	1.192	0.246	0.243	0.219
TW52	3.00	1.299	0.324	0.331	0.293
TW67	2.00	1.205	0.233	0.258	0.225
TW71	2.00	1.197	0.228	0.248	0.218
TW43	4.00	1.482	0.523	0.497	0.454
TW31	4.00	1.789	0.650	0.436	0.346
平均值 Mean	3.33	1.363	0.403	0.331	0.291

2.3 群体结构与遗传多样性分析

2.5.1 群体结构分析

利用 structure 软件对 172 份湿地松无性系进行群体结构分析，当 K 等于 2 时， ΔK 达到峰值 ($\Delta K=346$) (图 2)，表明供试无性系最适宜划分为两个群体。参考个体归属概率阈值 ($Q>0.6$)，172 份无性系被明确划分至 A、B 两个独立群体 (图 3)，A 群体包含 25 个无性系，其中 24 个来自峡江林木良种场 1 代种子园中选出的高产脂无性系，另外 1 个来自吉安市安福县。B 群体包含剩下的 147 个无性系，分别来自江西省不同地区的高产脂优树资源。按照 Structure 分析的群体结构，将 A 群体的各无性系编为 A1-A25，将 B 群体的各无性系编为 B1-B147。

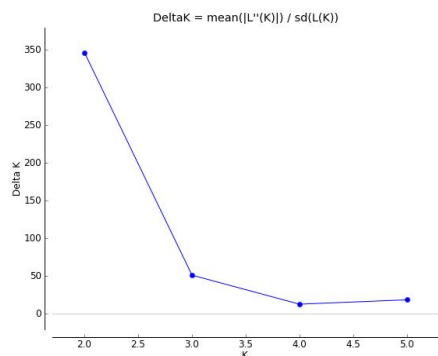


图 2 基于 ΔK 准则选择最佳 K 值
Fig. 2 Model choice criterion ΔK of the Structure analysis of the most suitable K value

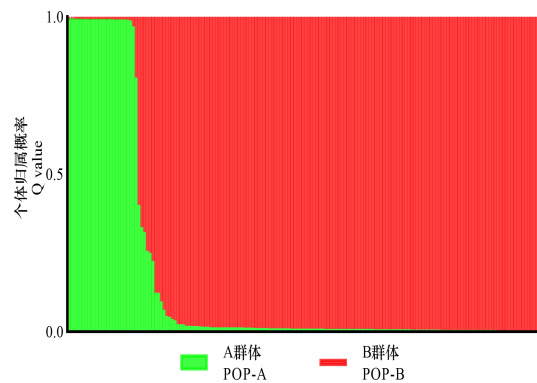


图 3 172 个湿地松无性系的群体结构
Fig. 3 Population structure of 172 *Pinus elliottii* clones

2.5.2 聚类分析与主成分分析

UPGMA 聚类分析 (图 4) 将 172 个无性系分为两大类：第一类包含 23 个 A 群体无性系；第二类包含 149 个无性系 (全部 B 群体个体及 2 个 A 群体无性系)，与 Structure 分析结果基本一致。

主成分分析结果 (图 5) 显示，第一主成分 (PC1) 和第二主成分 (PC2) 分别解释了总遗传变异的 25.06% 和 12.68%。在二维主成分散点图中，无性系间的遗传距离反映了其亲缘关系的远近 (图 5)。沿 PC1 轴方向，供试无性系可清晰区分为 A、B 两个群体，这与 Structure 分析的群体划分结果高度吻合。沿 PC2 轴方向，B 群体内部呈现出进一步分化的趋势，可大致识别出两个潜在的亚群结构。



图 4 172 份湿地松无性系的 UPGMA 聚类树
Fig. 4 UPGMA tree of 172 clones of *Pinus elliottii*

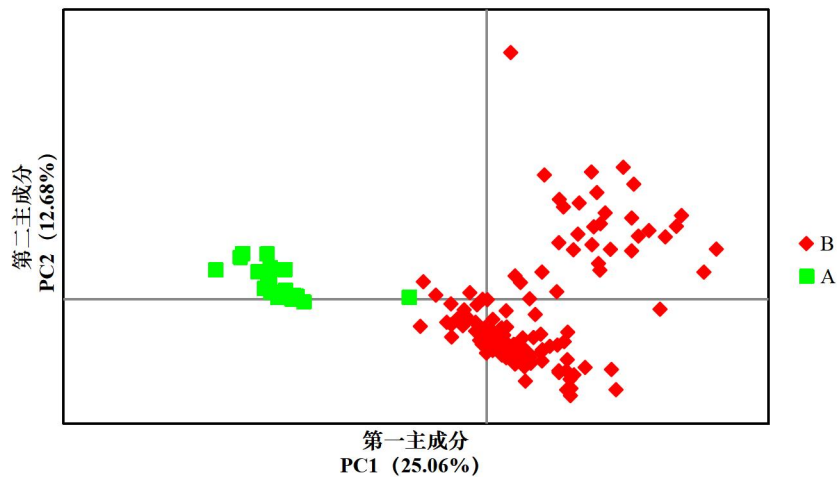


图 5 湿地松群体的主成分分析

Fig. 5 Principal component analysis (PCA) in population of *Pinus elliottii*

2.5.3 湿地松群体遗传多样性分析

为深入揭示不同群体的遗传分化程度,对 A、B 两个群体的遗传多样性参数进行了比较分析(表 5)。结果表明,B 群体的遗传多样性水平整体高于 A 群体。具体而言,B 群体的观测等位基因数(N_a)和有效等位基因数(N_e)分别为 3.617 和 1.496,均高于 A 群体($N_a=1.917$, $N_e=1.231$)。在杂合度方面,A 群体的观测杂合度($H_o=0.172$)高于期望杂合度($H_e=0.143$),而 B 群体的观测杂合度($H_o=0.309$)则低于期望杂合度($H_e=0.320$)。此外,B 群体的 Shannon's 信息指数(I)和 Nei's 基因多样性指数(h)亦均高于 A 群体,进一步证实 B 群体具有更为丰富的遗传多样性。

表 5 湿地松群体的遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of populations of *P. elliottii*

群体 Population	观测等位基因 <i>N_a</i>	有效等位基因 <i>N_e</i>	Shannon's 信息指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>H_o</i>	期望杂合度 <i>H_e</i>	基因多样性 <i>h</i>
A	1.917	1.231	0.258	0.172	0.143	0.1428
B	3.167	1.496	0.549	0.309	0.320	0.3201

3 讨论

3.1 湿地松转录组 SSR 特征及标记开发效率

基于湿地松转录组 unigenes 序列共鉴定出 2 077 个 SSR 变异位点, SSR 发现频率为 3.04%, 低于易敏等 (2020) 的研究结果。造成这一差异的主要原因是本研究中单核苷酸重复的检索参数设置为重复次数 ≥ 20 , 而多数同类研究 (包括易敏等, 2020) 通常将单核苷酸重复次数阈值设为 ≥ 10 。本研究中单核苷酸的检出频率仅为 0.04%, 远低于易敏等 (2020) 的 3.05%, 而二核苷酸、三核苷酸的检出频率相对较高, 这直接印证了检索阈值的差异是导致 SSR 总检出率偏低的主要原因。值得注意的是, 在排除单核苷酸重复单元后, 本研究的二核苷酸和三核苷酸检出频率与其他松属树种处于相近水平, 说明参数设置对 SSR 挖掘结果具有显著影响, 不同研究间的直接比较需充分考虑检索标准的差异。

在重复类型组成上, 三核苷酸占比最高 (55.13%), 二核苷酸次之 (39.67%), 二者合计占 SSR 总数的 94.80%。三核苷酸在编码区 SSR 中占主导地位的现象已在白皮松 (杨雄等, 2021)、云南松 (蔡年辉等, 2015) 等松属物种中广泛观察到。同样的, 转录组 SSR 中三核苷酸重复类型往往占主导地位 (Varshney et al., 2007), 这是由于三核苷酸在编码区中的插入或缺失不会引起阅读框移码突变, 因而受到更强的纯化选择压力得以保留 (Metzgar et al., 2000)。本研究中三核苷酸重复单元占比最高, 符合转录组 SSR 的一般分布规律。二核苷酸虽在基因组 SSR 中通常最为丰富, 但在转录组中因易引起移码突变而多被负选择清除, 这解释了本研究中二核苷酸占比低于三核苷酸的原因。此外, 在六碱基重复基元中, AGATGG/ATCTCC 出现频率最高, 占六碱基重复基元总数的 22.39%, 这一偏向性在其他松属树种中亦有报道, 可能与松属物种特异的重复序列扩张机制有关。

在 170 对合成的引物中, 有 154 对扩增成功, 扩增效率为 90.6%, 高于白皮松 (54.17%, 杨雄等, 2021) 和马尾松 (78.5%, 梅利那等, 2017)。这一较高的扩增效率可能与引物设计策略有关: 本研究优先选择位于编码区保守性较高的序列区域设计引物, 提高了跨物种或同物种内的扩增通用性。在成功扩增的引物中, 36 对具有多态性, 其中大部分属于二核苷酸和三核苷酸重复类型, 这与 Dreisigacker 等 (2004) 的推论一致——碱基数少的重复单元因具有更高的突变速率, 其多态性通常高于碱基数多的重复单元。最终筛选的 12 对核心引物 PIC 均值为 0.291, 属中度多态性水平, 其中 TW43 (PIC=0.454)、TH18 (0.375)、TH7 (0.361) 和 TW31 (0.346) 表现出较高的标记信息量, 可作为后续湿地松遗传评价的核心标记组合。

3.2 湿地松脂用无性系遗传多样性特征及成因

在本研究中, 湿地松脂用无性系的 Shannon's 信息指数 (*I*) 变化范围在 0.152~0.854, 平均值为 0.403, Nei's 基因多样性 (*h*) 介于 0.241~0.497 之间, 平均值为 0.331。与其他松

类研究相比,本研究检测到的遗传多样性水平存在一定差异。易能君等(2000)利用 RAPD 分子标记对湿地松抗病种子园的研究结果显示,Shannon's 信息指数平均值为 0.433,基因多样性平均值为 0.278,基因多样性指数略低于本研究,而 Shannon's 信息指数略高于本研究。然而,与我国本土松属树种相比,如樟子松(*P. sylvestris*)的 Shannon's 信息指数为 1.124(王辉丽等,2022),华山松(*P. armandii*)的则为 1.187,而其多样性指数为 0.638(辛静等,2021),湿地松遗传多样性水平整体偏低。但需注意,不同研究间标记类型、样本量及取样范围的差异可能影响多样性绝对值的直接可比性,本研究的多样性参数应视为江西省区域种质库的特征值,更大尺度的研究应进一步校正。这一多样性差距的成因可以从以下几个方面加以理解。

首先,湿地松为外来引进树种,其引种群体本身存在遗传基础较窄的问题。我国自 20 世纪 80 年代末大规模引种湿地松以来,种源来源相对有限,加之长期的人工选择与改良,可能导致部分等位基因的丢失,进一步加剧了遗传多样性的收窄。亚群 A 的遗传多样性($I=0.258$, $h=0.143$)显著低于亚群 B($I=0.549$, $h=0.320$),正是高强度育种选择对遗传多样性收窄效应的直接体现。

其次,分子标记类型及其多态性水平也会对多样性评估结果产生影响。相较于 RAPD 等显性标记,SSR 标记具有共显性、多态性高、重复性好等优势,能够更准确地反映群体的遗传结构。但在不同研究中,所用 SSR 引物的多态性信息含量(PIC)可能不同。PIC 是衡量标记区分能力强弱的指标,数值越高,说明标记越能灵敏地揭示群体内的遗传变异。本研究使用的 12 对 SSR 引物,平均 PIC 为 0.291,虽然只处于中等水平,但已足够有效揭示群体的遗传结构,并从中筛选出高多态性的核心引物(如 TW43 等)。

此外,取样范围、样本数量及群体结构等因素亦可能对多样性参数产生一定影响。本研究群体包含来自峡江种子园的高世代育种材料(亚群 A)和江西省不同地区的优树资源(亚群 B),这种“育种核心种质+区域种质资源”的组合结构,本身就包含了遗传多样性水平的天然梯度。亚群 A 代表高强度人工选择下的育种群体,亚群 B 代表相对自然状态下的区域种质资源,二者的多样性差异真实地反映了不同育种阶段和选育强度对群体遗传组成的塑造作用。值得注意的是,亚群 A 中观测杂合度($H_o=0.172$)高于期望杂合度($H_e=0.143$),暗示该群体可能存在一定的负选型交配或杂合子优势选择,而亚群 B 则呈现相反的 $H_o < H_e$ 模式,符合人工选择群体中常见的杂合子缺失特征。

综上所述,江西省湿地松脂用无性系的遗传多样性受其引种历史、育种强度、标记选择及群体结构等多重因素的综合影响,后续研究还需进一步扩大种质资源收集范围,结合高多态性标记与全基因组关联分析,为湿地松高效遗传改良提供更全面的理论支撑。

3.3 湿地松脂用无性系群体结构

群体遗传结构是理解种质资源遗传背景、亲缘关系及分化特征的关键,对于育种策略的制定和核心种质构建具有重要指导意义。本研究基于 Structure 软件的贝叶斯聚类分析,将 172 份湿地松脂用无性系明确划分为 A、B 两个群体($K=2$, $\Delta K=346$),主成分分析(PCA)和 UPGMA 聚类分析结果进一步验证了这一划分的合理性。从群体构成来看,亚群 A 包含 25 个无性系,其中 24 个系自吉安市峡江林木良种场第 1 代种子园的高产脂育种材料,表现出高度的遗传同质性;亚群 B 包含其余 147 个无性系,广泛分布于江西省不同地区,遗传

背景相对多样。这一分化格局并非简单的地理隔离所致，而是育种历史与人工选择共同作用的结果：峡江种子园作为江西省湿地松高产脂育种的核心基地，经过多轮定向选育，其群体遗传基础已显著收窄。遗传多样性参数的对比进一步量化了这一差异——亚群 A 的等位基因数 ($N_a=1.917$) 和 Shannon's 指数 ($H=0.258$) 均不足亚群 B ($N_a=3.617$, $H=0.549$) 的 60%，提示高强度的育种选择虽然实现了产脂性状的定向改良，但也伴随了遗传多样性的显著流失。类似现象在湿地松种子园遗传多样性研究中亦有报道，增补无性系虽可引入部分低频等位基因，但对整体遗传多样性的提升幅度有限（覃先玉等，2025）。

PCA 结果中 B 群体沿 PC2 轴的进一步分化，提示 B 群体可能具有更为复杂的遗传组成，可能反映了地理来源差异或局部适应性分化。这一现象暗示，未来在 B 群体内部可能存在进一步划分次级育种群体的空间，为针对不同生态区的专用品种选育提供线索。江西省湿地松种植面积达 900 万亩，占全国湿地松林分总面积的 40.90%，不同地区的气候条件、土壤类型及经营管理模式可能存在差异，长期的自然选择和人工干预可能塑造了局部的遗传分化格局。此外，引种过程中多次引入不同种源、不同育种材料的混合也可能增加群体遗传结构的复杂性。群体 A 中高产脂育种材料的遗传基础相对狭窄，这一方面反映了前期定向选育的成效，但另一方面也提示育种群体可能存在遗传脆弱性风险。遗传多样性的降低可能限制群体对病虫害、气候变化等环境胁迫的响应能力，也可能制约长期遗传增益的可持续性。因此，在后续育种工作中，应有意识地引入外部种质资源，拓宽育种群体的遗传基础。而群体 B 丰富的遗传多样性为种质资源挖掘和核心种质构建提供了良好材料基础，实现不同遗传背景间的优势互补。

需要指出的是，本研究的材料来源虽然局限于江西省现有种植的湿地松引种材料，所获得的遗传参数绝对值（如等位基因数、多样性指数）反映的是江西省湿地松脂用无性系的区域种质特征，但湿地松是外来引种树种，在南方地区的湖南、浙江等地可能存在相同来源的湿地松种质材料。因此，本研究结果也可能反映了我国南方地区湿地松脂用种质的遗传特征，具体情况还需后期进一步拓展脂用湿地松遗传资源，全面深入评价其遗传结构和遗传多样性。并且，本研究揭示了高强度定向选育导致遗传多样性流失育种瓶颈效应的核心规律，以及人工选择对群体结构的重塑作用强于地理隔离，在针叶树引种育种中具有普遍的理论参照价值。

4. 结论

本研究基于湿地松转录组分析和引物筛选，开发了 12 对多态性较好的引物，并成功筛选出高多态性的核心引物（如 TW43），以此对江西省 172 份来源不同的湿地松脂用无性系进行遗传多样性及群体结构分析。研究发现江西省湿地松脂用无性系遗传多样性较丰富，且存在明显的群体遗传结构，揭示了育种选择对遗传多样性的流失效应和选择强度对群体结构的主导作用，为江西乃至相似气候区湿地松高产脂优良无性系的筛选与核心种质构建提供了重要的理论依据。

参考文献:

- Berube Y, Zhuang J, Rungia D, et al., 2007. Characterization of EST-SSRs in loblolly pine and spruce [J]. *Tree Genetics & Genomes*, 3: 251-259.
- Cai N H, Xu Y L, Xu Y, et al., 2015. The distribution and characteristics of SSR in transcriptome of *Pinus yunnanensis* [J]. *Journal of Yunnan University*, 37(5): 770-778. [蔡年辉, 许玉兰, 徐杨, 等, 2015. 云南松转录组 SSR 的分布及其序列特征 [J]. 云南大学学报(自然科学版), 37(5): 770-778.]
- Dreisigacker S, Zhang P, Warburton M L, et al., 2004. SSR and pedigree analyses of genetic diversity among CIMMYT wheat lines targeted to different mega environments [J]. *Crop science*, 44(2): 381-388.
- Gao W W, Zhong H X, Ji J H, et al., 2026. Analysis of molecular genetic characteristics and QR code construction of grape 'M10' based on SSR molecular markers [J]. *Molecular Plant Breeding*, 24(1): 95-101. [高雯雯, 钟海霞, 纪佳慧, 等, 2026. 基于 SSR 分子标记分析葡萄‘M10’分子遗传特性及 QR 码构建 [J]. 分子植物育种, 24(1): 95-101.]
- Jia J, Feng Y H, Yang Z Q, et al., 2014. EST-SSR primer development for *Pinus* and primers selection for interspecies-specific identification between *P. massoniana* and *P. elliottii* [J]. *Molecular Plant Breeding*, 12(5): 963-968. [贾婕, 冯源恒, 杨章旗, 等, 2014. 松属 EST-SSR 引物开发及马尾松-湿地松种间特异性鉴别引物筛选 [J]. 分子植物育种, 12(5): 963-968.]
- Lu Y, Yuan P P, Jin X, et al., 2025. Genetic Diversity Analysis and Fingerprinting of Wild Potato and Landraces Based on SSR Markers [J]. *Biotechnology Bulletin*, 41(9): 94-104. [卢瑶, 袁平平, 金鑫, 等, 2025. 基于 SSR 标记的马铃薯野生种和地方种遗传多样性分析和指纹图谱构建 [J]. 生物技术通报, 41(9): 94-104.]
- Luo Q F, Feng Y H, Wu D S, et al., 2022. Genetic diversity of *Pinus taiwanensis* var. *damingshanensis* natural populations by SSR markers [J]. *Guihaia*, 42(8): 1367-1373. [罗群凤, 冯源恒, 吴东山, 等, 2022. 基于 SSR 标记的大明松天然群体遗传多样性分析 [J]. 广西植物, 42(8): 1367-1373.]
- Ma X Y, Gao Y, Shang F Q, 2026. Genetic Diversity Analysis of *Pinus koraiensis* Seed Orchards Based on Phenotypic Traits and Molecular Mrkers [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 54(4): 16-24. [马晓雨, 高源, 尚福强, 2026. 依据表型指标和分子标记的红松种子园遗传多样性分析 [J]. 东北林业大学学报, 54(4): 16-24.]
- Mei L N, Fan F H, Cui B W, et al., 2017. Development of SSR Molecular Markers Based on Transcriptome Sequences and Germplasm Identification in Masson Pine (*Pinus massoniana*) [J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(6): 991-1002. [梅利那, 范付华, 崔博文, 等, 2017. 基于马尾松转录组的 SSR 分子标记开发及种质鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 25(6): 991-1002.]
- Meng L C, Mao H Q, Sun Z C, et al., 2025. Rapid Identification of Gray Leaf Spot Resistance in Tropical Maize Germplasms Using SSR Markers [J]. *Journal of Maize Sciences*, 33(12): 36-44.

- [孟令聪, 毛泓权, 孙志超, 等, 2025. 利用 SSR 标记快速鉴定热带玉米种质灰斑病抗性 [J]. 玉米科学, 33(12): 36-44.]
- Metzgar D, Bytof J, Wills C, 2000. Selection against frameshift mutations limits microsatellite expansion in coding DNA [J]. *Genome Research*, 10(1): 72-80.
- Parchman T L, Geist K S, Grahnen J A, et al., 2010. Transcriptome sequencing in an ecologically important tree species: assembly, annotation, and marker discovery [J]. *BMC Genomics*, 11: 180.
- Qin X Y, Feng Y H, Xie J K, et al., 2025. Effect of supplementary clones on genetic diversity of *Pinus elliottii* seed orchard [J]. *Guihaia*, 45(4): 689-701. [覃先玉, 冯源恒, 谢俊康, 等, 2025. 增补无性系对湿地松种子园遗传多样性的影响[J]. 广西植物, 45(4): 689-701.]
- Sebastiani F, Pinzanti F, Kujala S T, et al., 2012. Novel polymorphic nuclear microsatellite markers for *Pinus sylvestris* L. [J]. *Conservation Genetics Resources*, 4(2): 231-234.
- Song C R, Cao Z, Li J P, et al., 2026. SSR Analysis on Genetic Diversity of 48 Table Grape Germplasm [J]. *Guizhou Agricultural Sciences*, 54(2): 1-12. [宋超然, 曹朝, 李俊鹏, 等, 2026. 48 份鲜食葡萄种质遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 贵州农业科学, 54(2): 1-12.]
- Soranzo N, Provan J, Powell W, 1998. Characterization of microsatellite loci in *Pinus sylvestris* L. [J]. *Molecular Ecology*, 7(9): 1260-1261.
- Varshney R K, Marcel T C, Ramsay L, et al., 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(6): 1091-1103.
- Wang H L, Yu S X, Guo L, et al., 2022. Genetic diversity assessment and fingerprint construction of superior tree populations of *Pinus sylvestris* var. *Mongolica* [J]. *Journal of Gansu Agricultural University*, 57(3): 103-110. [王辉丽, 于树学, 郭立, 等, 2022. 樟子松优树群体遗传多样性评价及指纹图谱构建 [J]. 甘肃农业大学学报, 57(3): 103-110.]
- Wei J, Li X, Xu H, et al., 2022 Evaluation of the genetic diversity of *Pinus koraiensis* by EST-SSR and its management, utilization and protection [J]. *Forest Ecology and Management*, 505: 119882.
- Xin J, Gao L Y, Xu J, et al., 2021. SSR Markers Analysis of Genetic Diversity in *Pinus armandii* Clones from Seed Orchard in Zixi Mountain [J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 36(5): 898-904. [辛静, 高丽云, 徐剑, 等, 2021. 基于 SSR 标记的紫溪山华山松种子园无性系遗传多样性分析 [J]. 云南农业大学学报(自然科学版), 36(5): 898-904.]
- Yang X, Yang N, Yuan Q H, et al., 2021. Development and application of EST-SSR molecular markers in *Pinus bungeana* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 43(7): 1-11. [杨雄, 杨宁, 袁启华, 等, 2021. 白皮松 EST-SSR 分子标记的开发及应用 [J]. 北京林业大学学报, 43(7): 1-11.]
- Yang Z Q, Feng Y H, Wu D S, 2014. Analysis of genetic diversity of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* nature populations by SSR marker [J]. *Guihaia*, 34(1): 10-14. [杨章旗, 冯源恒, 吴东山, 2014. 细叶云南松天然种源林遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 广西植物, 34(1): 10-14.]

- Yi M, Zhang L, Lei L, et al., 2020. Analysis of SSR information in transcriptome and development of EST-SSR molecular markers in *Pinus elliottii* Engelm. [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition), 2020, 44(2): 75-83. [易敏, 张露, 雷蕾, 等, 2020. 湿地松转录组 SSR 分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 44(2): 75-83.]
- Yi N J, Han Z M, Yin T M, et al., 2000. Genetic Variation of Rapd Markers in a Disease Resistant Seed Orchard of *Pinus elliottii* Engelm [J]. Scientia Silvae Sinicae, 36(S1): 51-55. [易能君, 韩正敏, 尹佟明, 等, 2000. 湿地松抗病种子园的遗传多样性分析 [J]. 林业科学, 36(增刊 1): 51-55.]
- Zhang Z, Zhang H G, Mo C, et al., 2015. Transcriptome sequencing analysis and development of EST-SSR markers for *Pinus koraiensis* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 51(8): 114-120. [张振, 张含国, 莫迟, 等, 2015. 红松转录组 SSR 分析及 EST-SSR 标记开发 [J]. 林业科学, 51(8): 114-120.]