

网络出版时间:2020-06-01 10:45
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.s.20200529.0830.006.html>

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2020.12.006

18 份杨树资源的遗传多样性分析

张海燕,樊军锋,郑 涛

(西北农林科技大学 林学院 陕西,杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】正确评价杨树资源的遗传多样性,为其新品种选育和资源利用提供理论依据。【方法】以来自黑杨派和白杨派的 18 个杨树无性系为试验材料,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳从 84 对 SSR 引物中初步筛选出多态性较好的 12 对,再利用 12 对 SSR 荧光引物构建 18 个杨树无性系的指纹图谱并进行遗传多样性分析,同时依据遗传相似系数构建聚类图并进行亲缘关系分析。【结果】筛选出的 12 对引物共检测到 91 个多态性位点,每对引物检测到的多态性位点为 4~12 个,平均为 7.6 个,观测杂合度平均为 0.482 8,Shannon 信息指数平均为 1.801 5,Nei's 基因多样性指数平均为 0.794 8;通过引物 PMGC-2385 和 PMGC-2500 构建了 18 个无性系的指纹图谱,该指纹图谱可将全部无性系区分开。UPGMA 聚类分析表明,18 个无性系的遗传相似系数在 0.549~0.978,平均遗传相似系数为 0.764,黑杨派与白杨派无性系遗传相似系数变幅分别在 0.681~0.978 和 0.549~0.912,均具有较高的遗传变异性;18 个无性系被分为黑杨与白杨 2 大类及 6 个亚群,与传统形态分类学结果基本一致。【结论】18 份杨树资源的遗传多样性较为丰富,SSR 分子标记技术结合 STR 分型检测技术在杨树资源的鉴定与分类中具有一定的可靠性。

【关键词】 杨树;简单重复序列;遗传多样性;指纹图谱

【中图分类号】 S792.11 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-9387(2020)12-0047-08

Genetic diversity analysis of 18 poplar resources

ZHANG Haiyan,FAN Junfeng,ZHENG Tao

(College of Forestry,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

Abstract: 【Objective】 This study evaluated the diversity of poplar genetic resources to provide basis for breeding and resource utilization of new varieties. 【Method】 A total of 12 pairs of SSR primers were preliminarily screened from 84 SSR primers using polyacrylamide gel electrophoresis on 18 poplar germ-plasm resources. A total of 12 short tandem repeat (STR) markers were used to construct clone fingerprints and analyze genetic diversity,and the tree clustering graph were constructed to conduct genetic analysis based on genetic similarity coefficients. 【Result】 A total of 91 polymorphic loci were detected in 12 pairs of primers. The number of polymorphic loci detected by each pair of primers ranged from 4 to 12 with an average of 7.6,and the observed heterozygosity averaged 0.482 8. The average Shannon index was 1.801 5,and the average Nei's gene diversity index was 0.794 8. Fingerprints of 18 clones were constructed by primers PMGC-2385 and PMGC-2500,and all clones could be distinguished. UPGMA cluster analysis was performed on 18 clones. The genetic similarity coefficient ranged from 0.549 to 0.978 with an average of 0.764. The coefficients of genetic similarity of Sect. Aigeiros Duby and Sect. Leuce Duby ranged from 0.681 to 0.978 and 0.549 to 0.912,respectively,and both had high genetic variability. The 18 clones

【收稿日期】 2019-11-22

【基金项目】 “十三五”国家重点研发计划项目(SQ2016YFNC030041)

【作者简介】 张海燕(1994—),女,新疆库尔勒人,在读硕士,主要从事林木遗传育种与林业生物技术研究。
E-mail:1692150900@qq.com

【通信作者】 樊军锋(1963—),男,陕西扶风人,教授,博士,主要从事杨树新品种选育及油松遗传改良研究。
E-mail:fanjf28@163.com

were mainly divided into 2 categories of Sect. Aigeiros Duby and Sect. Leuce Duby, and 6 subgroups, which was basically consistent with the traditional morphology taxonomy. 【Conclusion】 The genetic diversity of 18 poplar resources was abundant. SSR molecular marker technology combined with STR typing detection technology had certain reliability in the identification and classification of poplar resources.

Key words: poplar; SSR; genetic diversity; fingerprint

杨树(*Populus* spp.)是杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus* L.)树种的统称,具有生长快、适应性广、抗逆性强等特性,作为我国重要的纸浆、胶合板等工业用材及西北地区“三北”防护林体系的主栽树种,为地区经济发展和生态建设带来了可观的投资效益及防护效益^[1-2]。近几十年来,我国杨树育种工作发展迅速,培育出了大量的优良无性系,但存在杂交组合亲本间遗传差异较小^[3]、繁殖及发育阶段易受外界环境干扰^[4]、仅利用表型难以区分品种及其亲缘关系等诸多问题^[5-6]。因此,借助现代生物学技术手段进行杨树无性系鉴别及遗传多样性分析,在杨树的品种改良、生产推广、丰富育种资源等方面具有重要的理论与实践意义。

DNA 指纹图谱是分子标记技术应用在杨树品种鉴定、亲缘关系分析上的开创性方法,为杨树育种的辅助选择提供了理论依据^[7]。利用分子标记技术构建杨树指纹图谱,可以对不同地区、不同来源的相似品种进行鉴定和遗传差异分析^[8]。SSR(simple sequence repeat)分子标记又称为微卫星序列或简单重复序列,属于短串联重复序列,广泛分布于基因组的不同位置。SSR 分子标记技术已在多种植物的 DNA 指纹鉴定上表现出特有的优越性,并且被国际植物新品种保护联盟(UPOV)确定为构建 DNA 指纹图谱数据库的标准标记方法^[9]。STR(short tandem repeat)分型检测技术是基于自动荧光测序技术的 SSR 检测体系,可以进行高通量分析。相对传统凝胶电泳检测技术,STR 分型检测技术无需手动测量,所需的样本量少,稳定性好,其分辨率可达 1 bp,扩增位点更加清晰准确^[10-11],已在樱桃^[12](*Prunus avium* L.)、梨^[13](*Pyrus* spp.)、山楂^[14](*Crataegus pinnatifida*)等多种植物的遗传多样性分析中得到了广泛应用。

亲缘关系的鉴定对林木新品种的系谱定位至关重要。国内中国林业科学研究院林业研究所苏晓华等^[15]最早采用 RAPD 标记对东北地区的 4 种杨树进行了遗传关系鉴定,认为亲缘关系最近的树种为马氏杨(*Populus maximowiczii*)与香杨(*Populus koreana*),与传统的宏观形态鉴定观点完全不同;刘

春英等^[16]采用 SSR 分子标记,对 2 种白杨新杂交品种及其亲本的遗传关系进行了鉴定;李薇等^[17]采用 SSR 分子标记,对 6 种美洲黑杨的遗传差异进行了分析。我国的黑杨育种资源有限,其派内杂交遗传基础较窄,目前对黑杨派树种遗传多样性的研究报道相对较少。本试验采用 SSR 分子标记技术,并结合高自动化、高精度的 STR 分型检测技术,对新引自意大利的黑杨派欧美杨和白杨派银白杨杂交无性系(La、Pa、Ti、Qg、Ta、A50、A39、A46)及其近缘无性系进行指纹图谱构建与遗传多样性分析,以期为杨树新无性系的杂交选育、系谱鉴定、知识产权保护及品种推广利用提供一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

杨树试验样品采自西北农林科技大学渭河试验站种质资源库(表 1)。其中欧美杨无性系 La、Pa、Ti、Qg、Ta、I-107 及银白杨无性系 A50、A39、A46、I-101,均为中国林业科学研究院林业研究所由意大利引进;84K 由韩国引进;中林 46 为中国林业科学研究院选育的优良杂交子代;秦白杨系列及西北杨 2 号为西北农林科技大学选育的白杨无性系。11 月下旬从试验苗圃采集各无性系健康的 1 年生枝条,每个无性系随机采集 4~5 株,做好标记,带回实验室水培,等到萌生新芽时采摘幼嫩叶片,于液氮中研磨成匀浆后,分装后于-80℃冰箱中保存备用。

1.2 杨树 DNA 的提取

称取各供试杨树无性系新生嫩叶 0.1 g,采用改良的 CTAB 法提取新生叶片 DNA^[18]。利用超微量分光光度计(NanoDrop 2000,美国)检测 DNA 纯度与浓度,DNA 样品于-20℃冰箱中保存待用。

1.3 SSR 引物的筛选合成与 PCR 扩增

从国际杨树基因组委员会官方网站(http://web.ornl.gov/sci/ipgc/ssr_resources.htm)的杨树 SSR 数据库以及 Yin 等^[19]报道的 SSR 引物中,选取 84 对引物进行 PCR 扩增反应。在预试验中通过 8%聚丙烯酰胺凝胶电泳初步筛选出多态性较好、条带清晰的引物 12 对(表 2),将 12 对 SSR 引物

对供试杨树无性系的荧光 PCR 产物送至上海生工生物工程有限公司进行 STR 分型检测。PCR 反应体系为:模板 DNA(20 ng/ μL)1 μL ,正、反引物(10 $\mu\text{mol/L}$)各 1 μL ,dNTP(mix)(10 $\mu\text{mol/L}$)1 μL ,10 $\times$ *Taq* Buffer(MgCl₂)2.5 μL ,*Taq* 酶(5 U/ μL)

0.5 μL ,再用 ddH₂O 补充至 25 μL 。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,48~63 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,35 次循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

表 1 18 份杨树无性系及其遗传背景
Table 1 18 poplar clones and their genetic background

编号 Code	无性系 Clone	遗传背景 Genetic background
1	La	欧美杨无性系(意大利) <i>P. nigra</i> $\times$ <i>P. deltoides</i> (Italy)
2	Pa	欧美杨无性系(意大利) <i>P. nigra</i> $\times$ <i>P. deltoides</i> (Italy)
3	Ti	欧美杨无性系(意大利) <i>P. nigra</i> $\times$ <i>P. deltoides</i> (Italy)
4	Qg	欧美杨无性系(意大利) <i>P. nigra</i> $\times$ <i>P. deltoides</i> (Italy)
5	中林 46 Zhonglin 46	欧亚黑杨 $\times$ I-69 <i>P. nigra</i> $\times$ <i>P. deltoides</i>
6	I-107	欧美杨无性系(意大利) <i>P. euramiercana</i> (Italy)
7	Ta	欧美杨无性系(意大利) <i>P. nigra</i> $\times$ <i>P. deltoides</i> (Italy)
8	秦白杨 1 号 Qinbaiyang 1	I-101 $\times$ 84K <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. glandulosa</i>
9	秦白杨 2 号 Qinbaiyang 2	I-101 $\times$ 84K <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. glandulosa</i>
10	秦白杨 3 号 Qinbaiyang 3	I-101 $\times$ 84K <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. glandulosa</i>
11	秦白杨 4 号 Qinbaiyang 4	I-101 $\times$ 84K <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. glandulosa</i>
12	秦白杨 5 号 Qinbaiyang 5	I-101 $\times$ 84K <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. glandulosa</i>
13	西北杨 2 号 Xibei yang 2	I-101 $\times$ 毛白杨 <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. tomentosa</i>
14	A50	银白杨(意大利) <i>P. alba</i> (Italy)
15	84K	银白杨 $\times$ 腺毛杨(韩国) <i>P. alba</i> $\times$ <i>P. glandoulsa</i> (Korea)
16	A39	银白杨(意大利) <i>P. alba</i> (Italy)
17	A46	银白杨(意大利) <i>P. alba</i> (Italy)
18	I-101	银白杨(意大利) <i>P. alba</i> (Italy)

表 2 筛选出的 12 对 SSR 引物序列及其退火温度
Table 2 Selected 12 pairs of SSR primer sequences and their annealing temperature

引物名称 Name of primers	正向序列(5′-3′) Forward primers (5′-3′)	反向序列(3′-5′) Reverse primers (3′-5′)	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ <i>T</i> _m
GCPM-1048	CTTCTCTTCAGCGTTCTCAT	GTATGATACCCCTCTCTCCC	52.70
GCPM-1454	ATTGCGCTGGTTGTAGTTAT	CATTTGAAAGAAGGGTTTTG	48.90
ORPM-16	GCAGAAACCACTGCTAGATGC	GCTTTGAGGAGGTGTGAGGA	56.85
ORPM23	ATTCCATTTGGCAATCAAGG	CCCTGAAAGTCACGTCTTCG	53.25
ORPM-206	CCGTGGCCATTGACTCTTTA	GAACCCATTTGGTGCAAGAT	54.05
PCGM2217	ATTAGCTTCTTCTAAAGCAGC	TGACTGACTGTCTGTCTTCG	51.75
PMGC2385	ATTCTTCACCTGGGCAATATG	CTTGGCTGTAAATGACGAGTC	52.85
PMGC2500	AATGTCGACCACTCCACGC	AGAGGGTTTTCAATAACATACC	53.80
PMGC2885	CATGATCAAAATTGGATTTGAATG	AAAGATGAACATGGCTAGCTC	49.80
WPMS14	CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC	GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	62.40
WPMS15	CAACAAACCATCAATGAAGAAGAC	AGAGGGTGTGGGGGTGACTA	56.20
LG1937	GTCGTTGTTAGGGTTAAACG	ATATGCCACATATACGCACA	53.55

1.4 数据处理与分析

采用 DataFormatter 软件将电泳检测结果转换为“1,0”矩阵,运用 POPGENE32 软件计算出观测等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、Shannon 信息指数和 Nei’s 基因多样性指数等遗传多样性指标^[20]。在 Excel 2007 中统计能够鉴别所有杨树无性系的高效率引物组合。运用 Nt-sys 2.1 软件将“1,0”矩阵转换为 ntsys 格式,采用软件中的 SM 相似系数程序,计算杨树无性系的遗

传相似系数(genetic similarity,GS)^[21],采用软件中的 clustering 程序基于 UPGMA(unweighted pair group method using arithmetic averages)方法进行聚类分析并绘制聚类图。

2 结果与分析

2.1 12 对引物在供试杨树无性系中的多态性

根据电泳检测结果统计目标峰所在位置目标片段的大小,部分结果见图 1。

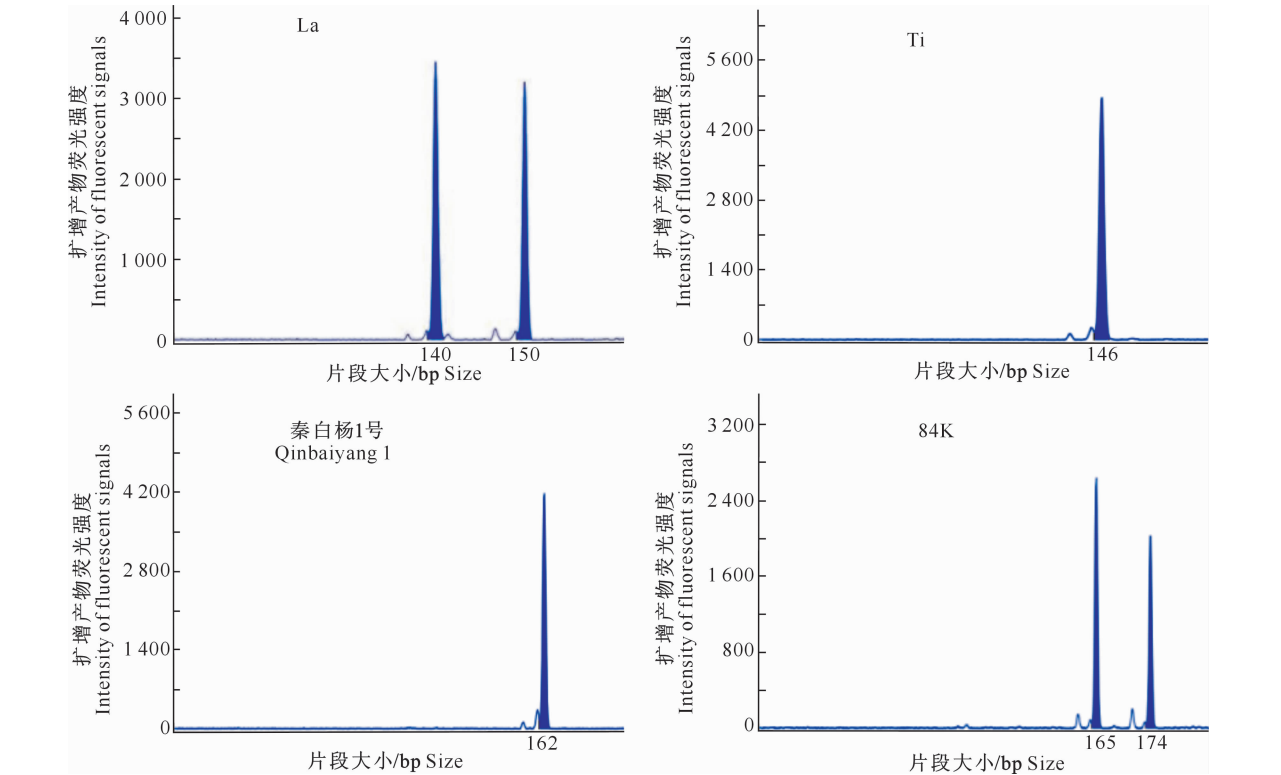


图 1 引物 GCPM-1454 对部分杨树无性系的基因分型

Fig. 1 Genotyping between parts of poplar clones using primer GCPM-1454

由图 1 可以看出,引物 GCPM-1454 对欧美杨 La 的 DNA 扩增产物中,检测到片段长度为 140 和 150 bp 的位点荧光强度达到峰值;在欧美杨 Ti、秦白杨 1 号中均检测到 1 个荧光强度峰值位点;在银腺杨 84K 中检测到 165 和 174 bp 两个位点达到荧光强度峰值。

18 个杨树无性系的遗传多样性分析参数见表 3。

表 3 18 个杨树无性系的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity analysis parameters of 18 poplar clones

引物 Code	观测等位 基因数 Alleles	有效等位基因数 Effective number of allele	观测杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity	Shannon 信息指数 Shannon's index	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index
GCPM-1048	8	6.4	0.277 8	0.868 3	1.974 2	0.844 1
GCPM-1454	5	4.2	0.529 4	0.786 1	1.503 7	0.763 0
ORPM-16	6	4.8	0.888 9	0.815 9	1.673 2	0.793 2
ORPM-23	12	7.1	0.555 6	0.884 1	2.258 7	0.859 6
ORPM-206	4	2.6	0.166 7	0.627 0	1.124 3	0.609 6
PCGM-2217	9	7.5	0.444 4	0.890 5	2.100 6	0.865 7
PMGC-2385	12	7.7	0.222 2	0.895 2	2.289 3	0.870 4
PMGC-2500	6	4.0	0.444 4	0.773 0	1.586 4	0.751 5
PMGC-2885	5	3.8	0.375 0	0.760 1	1.457 0	0.736 3
WPMS-14	8	4.8	0.611 1	0.814 3	1.835 0	0.791 7
WPMS-15	6	4.8	0.444 4	0.814 3	1.678 6	0.791 7
LG-1937	10	7.2	0.833 3	0.885 7	2.136 4	0.861 1
总计 Total	91	64.9				
平均值 Mean	7.6	5.4	0.482 8	0.817 9	1.801 5	0.794 8

表 3 结果显示,12 对引物对 18 个供试杨树无性系共检测到 91 个多态性位点,每对引物检测到的多态性位点在 4~12 个,平均 7.6 个,有效等位基因数平均为 5.4 个,其中引物 ORPM-23 及 PMGC-2385 扩增出的多态性位点最多,为 12 个;引物 OR-PM-206 扩增出的多态性位点最少,为 4 个。期望杂合度为 0.627 0~0.895 2,平均为 0.817 9;观测杂合度为 0.166 7~0.888 9,平均为 0.482 8;Shannon 信息指数和 Nei's 基因多样性指数平均值分别为 1.801 5 和 0.794 8,表明供试无性系遗传多样性

较为丰富。

2.2 18 个杨树无性系指纹图谱的构建

综合 12 对引物对 18 个供试杨树无性系的扩增结果和遗传多样性指标,选取多态性和鉴定效率较高的引物组合 PMGC-2385 和 PMGC-2500,构建出 18 个杨树无性系的 SSR 指纹图谱,其扩增结果见表 4。由表 4 可知,引物 PMGC-2385 可以区分出欧美

杨 La、Pa、Ti、Qg、Ta、秦白杨 1 号、秦白杨 5 号、A50、A39 和 84K 共 10 个无性系,PMGC-2500 可以区分中林 46、I-107、秦白杨 2 号、秦白杨 3 号、秦白杨 4 号、西北杨 2 号、A46 和 I-101,通过 2 对高效引物 PMGC-2385 和 PMGC-2500 即可将 18 个杨树无性系区分开。

表 4 18 个杨树无性系的指纹图谱

Table 4 Fingerprint map of 18 materials of poplar clones

编号 No.	无性系 Clone	引物 PMGC-2385 扩增 的条带大小/bp Band size of primer PMGC-2385	引物 PMGC-2500 扩增 的条带大小/bp Band size of primer PMGC-2500	编号 No.	无性系 Clone	引物 PMGC-2385 扩增 的条带大小/bp Band size of primer PMGC-2385	引物 PMGC-2500 扩增 的条带大小/bp Band size of primer PMGC-2500
1	La	128	163/173	10	秦白杨 3 号 Qinbaiyang 3	122	123/138
2	Pa	156	163	11	秦白杨 4 号 Qinbaiyang 4	122	123
3	Ti	122	163	12	秦白杨 5 号 Qinbaiyang 5	120/134	123/138
4	Qg	108	157/163	13	西北杨 2 号 Xibeiayang 2	122	117/119
5	中林 46 Zhonglin 46	128/156	112/163	14	A50	160	125/132
6	I-107	128/156	163	15	84K	164	125/129
7	Ta	130	163/167	16	A39	126	112/163
8	秦白杨 1 号 Qinbaiyang 1	120	119/138	17	A46	120/122	119/123
9	秦白杨 2 号 Qinbaiyang 2	122	119/138	18	I-101	120/122	123/163

2.3 18 个杨树无性系的遗传相似性及聚类分析

系数如表 5 所示。

基于 SSR 分析的 18 个杨树无性系的遗传相似

表 5 基于 SSR 分析的 18 个杨树无性系的遗传相似系数

Table 5 Genetic similarity coefficient of 18 poplar clones by SSR

无性系 Clones	La	Pa	Ti	Qg	中林 46 Zhonglin 46	I-107	Ta	秦白杨 1 号 Qinbaiyang 1	秦白杨 2 号 Qinbaiyang 2
La	1.000								
Pa	0.780	1.000							
Ti	0.703	0.769	1.000						
Qg	0.791	0.791	0.725	1.000					
中林 46 Zhonglin 46	0.769	0.747	0.703	0.780	1.000				
I-107	0.769	0.747	0.725	0.780	0.978	1.000			
Ta	0.769	0.747	0.780	0.769	0.681	0.681	1.000		
秦白杨 1 号 Qinbaiyang 1	0.604	0.670	0.593	0.637	0.571	0.571	0.571	1.000	
秦白杨 2 号 Qinbaiyang 2	0.582	0.670	0.582	0.637	0.571	0.571	0.582	0.824	1.000
秦白杨 3 号 Qinbaiyang 3	0.593	0.659	0.582	0.648	0.560	0.560	0.582	0.857	0.857
秦白杨 4 号 Qinbaiyang 4	0.593	0.659	0.582	0.626	0.560	0.560	0.560	0.791	0.879
秦白杨 5 号 Qinbaiyang 5	0.582	0.648	0.571	0.615	0.549	0.549	0.549	0.824	0.868
西北杨 2 号 Xibeiayang 2	0.615	0.659	0.615	0.681	0.615	0.615	0.604	0.813	0.791
A50	0.670	0.670	0.626	0.703	0.637	0.637	0.626	0.714	0.714
84K	0.604	0.648	0.604	0.681	0.593	0.593	0.604	0.670	0.670
A39	0.626	0.670	0.626	0.703	0.637	0.615	0.626	0.648	0.648
A46	0.604	0.648	0.604	0.659	0.593	0.593	0.604	0.824	0.758
I-101	0.648	0.692	0.648	0.725	0.637	0.637	0.648	0.736	0.692

表 5(续) Continued table 5

无性系 Clones	秦白杨 3 号 Qinbai- yang 3	秦白杨 4 号 Qinbai- yang 4	秦白杨 5 号 Qinbai- yang 5	西北杨 2 号 Xibei- yang 2	A50	84K	A39	A46	I-101
秦白杨 3 号 Qinbaiyang 3	1.000								
秦白杨 4 号 Qinbaiyang 4	0.890	1.000							
秦白杨 5 号 Qinbaiyang 5	0.857	0.879	1.000						
西北杨 2 号 Xibei- yang 2	0.769	0.813	0.736	1.000					
A50	0.769	0.769	0.736	0.791	1.000				
84K	0.703	0.703	0.670	0.736	0.824	1.000			
A39	0.681	0.681	0.670	0.736	0.802	0.912	1.000		
A46	0.791	0.813	0.758	0.879	0.802	0.736	0.736	1.000	
I-101	0.769	0.769	0.692	0.769	0.758	0.736	0.714	0.890	1.000

由表 5 可知,18 份杨树无性系的遗传相似系数在 0.549~0.978,平均遗传相似系数为 0.764。由黑杨派各品种间的遗传相似系数可知,5 个意大利引进的欧美杨无性系 La、Pa、Ti、Qg、Ta 之间的遗传相似系数为 0.703~0.791,与中林 46、I-107 间的遗传相似系数在 0.681~0.780;中林 46 与 I-107 的遗传相似系数最大,为 0.978,表明二者遗传组成最近,以上黑杨派无性系均是从欧洲黑杨与美洲黑杨为亲本的杂交子代中选育出来的。白杨派树种中,

从意大利引进的银白杨 A39 与 84K 的遗传相似系数为 0.912,A46 与 I-101 的遗传相似系数在 0.890,A50 与西北杨 2 号的遗传相似系数为 0.791,表明三者分别与 84K、I-101、西北杨 2 号的遗传关系较近。

以 18 个杨树无性系的遗传相似系数为依据,采用 UPGMA 法进行聚类分析,得到供试无性系的遗传关系聚类图(图 2)。

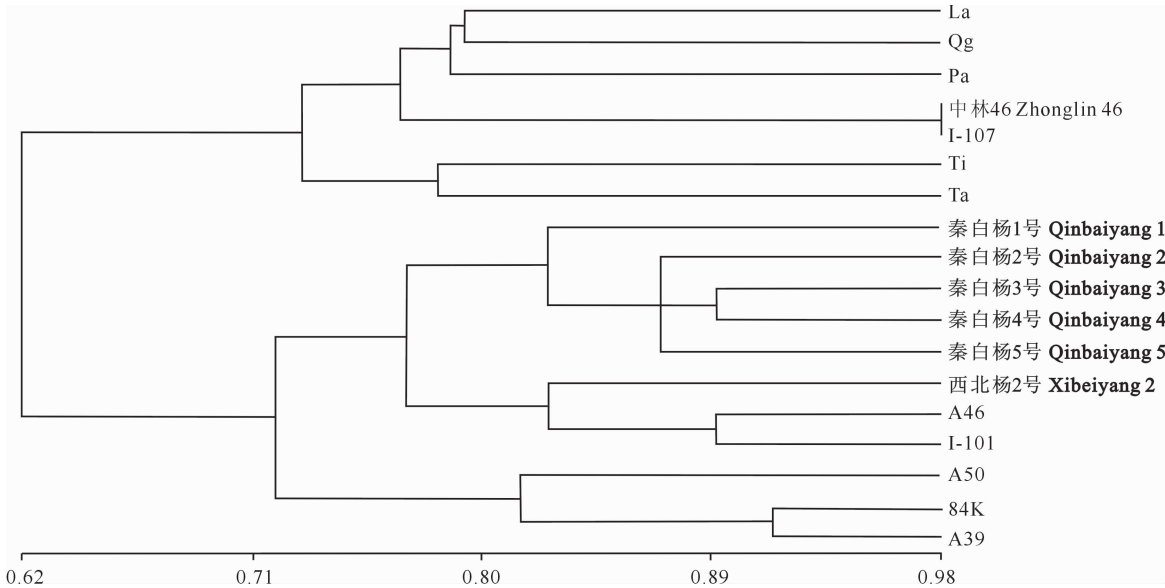


图 2 18 个杨树无性系遗传相似系数的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Clustering of 18 poplar clones by UPGMA based on genetic similarity coefficients

由图 2 可知,18 个杨树无性系被分成 2 个类群。第Ⅰ类为黑杨派 7 个树种,包括 La、Qg、Pa、中林 46 号、I-107、Ti 和 Ta,其中中林 46 号和 I-107 的遗传相似系数最小,聚为一类,其余 5 个欧美杨无性系之间与中林 46 号、I-107 的亲缘关系较远,各自单独聚成一类;第Ⅱ类为白杨派的 11 个杨树无性系,

分为 3 个亚群:第 1 个亚群包括秦白杨 1 号、秦白杨 2 号、秦白杨 3 号、秦白杨 4 号和秦白杨 5 号 5 个无性系,其遗传相似系数在 0.791~0.890,这 5 个无性系的遗传来源相同,因此聚为一类;第 2 个亚群包含 I-101、A46、西北杨 2 号 3 个无性系,西北杨 2 号的母本为 I-101,I-101 和 A46 均为来自意大利的银白

杨,遗传相似系数均较大,故聚为一类;第 3 个亚群包含 A39、A50 和 84K 3 个无性系,其中 84K 的亲本中包含银白杨,其与 A39 的亲缘关系最近,之后再与 A50 聚为一类。

3 小 结

基于高效、灵敏、全自动基因分析的测序检测技术,能够克服传统银染法检测技术中人工读带易产生较大误差、条带数据难以整合等不足,在现代分子育种研究中已被广泛采用^[22]。黎钊等^[21]基于 STR 分型检测技术,利用 10 对 SSR 引物对茶树(*Genus Camellia* L.)种质资源进行遗传分析,平均每对引物检测出 12.4 个多态性位点,期望杂合度和观测杂合度平均值分别为 0.771 1 和 0.816 5,Shannon 信息指数平均为 1.978 0,表明 89 份茶树资源遗传变异性较高;寇淑君等^[23]在中国糜子(*Panicum miliaceum* L.)遗传多样性的研究中,利用 22 对荧光引物检测出多态性位点平均为 5.82 个,基因多样性指数平均为 0.628 4,Shannon 信息指数为 1.206 2,表明其遗传多样性较为丰富;贾会霞等^[24]采用 GeXP 毛细电泳检测到 19 对 SSR 引物对 24 份杨树种质资源的平均多态性位点为 5.37 个,多态性比率为 95.01%,并为 24 份杨树种质资源构建了指纹图谱。本试验利用 12 对 SSR 引物检测到 18 份杨树无性系的多态性位点平均为 7.60,期望杂合度和观测杂合度平均为 0.817 9 和 0.482 8,Shannon 信息指数平均为 1.801 5,Nei's 基因多样性指数平均值为 0.794 8,相较于前人的研究^[25-27]具有较高的引物多态性和遗传变异性。

遗传相似系数的变幅越大,表明物种遗传多样性越丰富,作为后期育种亲本选择的潜力也越大^[14,28]。欧美杨与白杨派无性系的亲缘关系相对较远,这与采用其他不同标记手段得出的分类结论一致^[29-30]。本试验黑杨派 7 个无性系中,遗传相似系数变幅在 0.681~0.978,白杨派的遗传相似系数变幅在 0.549~0.912,说明其均有较为丰富的遗传变异基础和遗传多样性。根据前人研究结果^[31-32],无性系杂交子代可能更多地获得了亲缘关系较近亲本的优良性状。本试验中,秦白杨 1 号、秦白杨 2 号、秦白杨 3 号、秦白杨 4 号、秦白杨 5 号、西北杨 2 号优先与母本 I-101 聚类,其亲本遗传一致性较高,由此可以推测,相对于父本,母本对秦白杨系列及西北杨的基因影响可能更大。

本研究聚类结果显示,黑杨派 7 个欧美杨无性

系聚为一类,其中亲缘关系较近的中林 46 杨与 I-107 优先聚为一类;白杨派 11 个无性系聚为一类,其中秦白杨系列 5 个无性系聚为一类,试验结果符合植物学经典传统分类。但白杨派中也出现了不同结果,如 A39 与 84K、A46 与 I-101 分别优先聚为一类。A39、A46、A50 与 I-101 同为意大利银白杨,84K 为由韩国引进的银白杨×腺毛杨杂交子代,按照地理起源和生理遗传,A39、A46、A50 应与 I-101 具有较高的遗传相似性,但 A39、A50 却优先与 84K 聚在一起,试验结果存在一定差异。因此,有关银白杨和银腺杨的遗传差异还需要进一步研究。

在杨树无性系育种中,选择遗传差异丰富的亲本进行杂交可以扩大遗传基础,培育出具有复合性状的优良杂种。SSR 分子标记可以从分子水平上区分不同品种间的遗传距离,不受外在环境条件对植物表型的影响,是一种理想且可靠的遗传多样性分析技术。本试验采用 12 对 SSR 引物构建了 18 个杨树优良无性系的指纹图谱,这与可追溯的系谱信息基本一致,可为杨树优良无性系种间杂交试验和新品种选育提供一定的理论依据。

[参考文献]

- [1] 贾黎明,刘诗琦,祝令辉,等.我国杨树林的碳储量和碳密度[J].南京林业大学学报(自然科学版),2013,37(2):1-7.
Jia L M, Liu S Q, Zhu L H, et al. Carbon storage and density of poplars in China [J]. Journal of Nanjing Forestry University (Nat Sci Ed), 2013, 37(2): 1-7.
- [2] 丁莉萍,王宏芝,魏建华.杨树转基因研究进展及展望[J].林业科学研究,2016,29(1):124-132.
Din L P, Wang H Z, Wei J H. Progress and prospect of research in transgenic poplar [J]. Forest Research, 2016, 29(1): 124-132.
- [3] 张 妍,冯连荣,矫丽曼,等.杨树指纹图谱建立研究进展[J].安徽农业科学,2015,43(19):32-33.
Zhang Y, Feng L R, Jiao L M, et al. The research progress of poplar fingerprint establishment [J]. Journal of Anhui Agri Sci, 2015, 43(19): 32-33.
- [4] Ray A, Jena S, Haldar T, et al. Population genetic structure and diversity analysis in *Hedychium coronarium* populations using morphological, phytochemical and molecular markers [J]. Industrial Crops & Products, 2019, 132(2): 118-133.
- [5] 刘春英,樊军锋,高建社,等.杨树新杂种(无性系)ISSR 指纹图谱的构建[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(6):56-60.
Liu C Y, Fan J F, Gao J S, et al. Construction of ISSR fingerprint of poplar new hybrid (clonal) [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2013, 41(6): 56-60.
- [6] 栾鹏慧,苏晓华,张冰玉.杨属(*Populus* L.)种质资源遗传学评

- 价研究进展 [J]. 植物学报, 2011, 46(5): 586-595.
- Luan H H, Su X H, Zhang B Y. Research progress in genetic evaluation of *Populus* L. germplasm resources [J]. Chinese Bulletin of Botany, 2011, 46(5): 586-595.
- [7] 周玉敏, 王 遂, 刘 轶, 等. 小黑杨基因组的初步组装及 SSR 信息分析 [J]. 植物研究, 2019, 39(1): 156-160.
- Zhou Y M, Wang S, Liu Y, et al. Sequencing and assembly of *Populus simonii* × *P. nigra* genome and SSR analysis [J]. Bulletin of Botanical Research, 2019, 39(1): 156-160.
- [8] Andiego K P, Dngasuk O G, Odee D W, et al. Genetic diversity of endangered sandalwood (*Osyris lanceolata*) populations in Kenya using ISSR molecular markers [J]. East African Agricultural and Forestry Journal, 2019, 83(2): 80-93.
- [9] Union for the Protection of New Varieties of Plants (UPOV). Guidelines for DNA-profiling; molecular marker selection and database construction [R]. Geneva, Switzerland: UPOV, 2007: 3-4.
- [10] Rang J X, Jian Z, Guo Y W, et al. Cultivar identification and genetic diversity of Chinese bayberry (*Myrica rubra*) accessions based on Fluorescent SSR markers [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2011, 29(3): 554-562.
- [11] 武星彤, 文亚峰, 韩文军, 等. 杉木荧光标记通用引物多重 PCR 微卫星基因分型技术的建立与应用 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(7): 1795-1803.
- Wu X T, Wen Y F, Han W J, et al. Establishment of microsatellite marker genotyping technology by multiplex PCR with fluorescently labelled universal primers and application on Chinese Fir (*Cunninghamia lanceolata*) [J]. Molecular Plant Breeding, 2016, 14(7): 1795-1803.
- [12] Lian C L, Wan T, Xu S Y, et al. Molecular identification and genetic analysis of cherry cultivars using capillary electrophoresis with fluorescence-labeled SSR markers [J]. Biotech, 2018, 8(1): 1-10.
- [13] 高 源, 田路明, 刘凤之, 等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱 [J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446.
- Gao Y, Tian L M, Liu F Z, et al. Using the SSR fluorescent labeling to establish SSR fingerprints for 92 cultivars in *Pyrus* [J]. Acta Horticulture Sinica, 2012, 39(8): 1437-1446.
- [14] Ma S L, Dong W X, Liu T, et al. An RNA sequencing transcriptome analysis and development of EST-SSR markers in Chinese hawthorn through illumina sequencing [J]. Forests, 2019, 10(2): 1-15.
- [15] 苏晓华, 张绮纹, 张望东, 等. 大青杨及其近缘种的遗传变异和系统关系研究 [J]. 林业科学, 1996(2): 118-124.
- Su X H, Zhang Q W, Zhang W D, et al. The genetic variability and phylogenetic relationship in *Populus ussuriensis* Kom. and its relatives [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1996(2): 118-124.
- [16] 刘春英, 樊军锋, 高建社, 等. 杨树新杂种的 SSR 分析及鉴定 [J]. 西北林学院学报, 2013, 28(2): 70-73.
- Liu C Y, Fan J F, Gao J S, et al. Simple sequence repeat analysis and identification of new *Populus* hybrid [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013, 28(2): 70-73.
- [17] 李 薇, 刘春英, 郭 娟, 等. 3 个美洲黑杨新无性系的 SSR 分析及鉴定 [J]. 西北林学院学报, 2014, 29(1): 73-77.
- Li W, Liu C Y, Guo J, et al. Analysis and identification of three new clones of *Populus deltoides* based on SSR molecular markers [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014, 29(1): 73-77.
- [18] Hamad A. Modified CTAB method for high quality genomic DNA extraction from medicinal plants [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, PJBS, 2011, 14(21): 998-999.
- [19] Yin T M, Zhang X Y, Gunter L E, et al. Microsatellite primer resource for *Populus* developed from the mapped sequence scaffolds of the Nisqually-1 genome [J]. New Phytologist, 2009, 181(2): 489-503.
- [20] Yang R C, Yeh F C. Multilocus structure in *Pinus contorta* Dougl [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 87: 568-576.
- [21] 黎 钊, 肖 斌, 余有本, 等. 基于 STR 分型检测技术的 89 份茶树种质资源遗传多样性分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2017, 45(1): 140-146.
- Li Z, Xiao B, Yu Y B, et al. Genetic diversity of 89 tea germplasm based on STR markers [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2017, 45(1): 140-146.
- [22] 张全芳, 梁水美, 李 燕, 等. 基于荧光 SSR 标记的玉米自交系遗传结构解析 [J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 19-31.
- Zhang Q F, Liang S M, Li Y, et al. Analysis of genetic diversity and genetic structure of maize germplasms using fluorescent SSR markers [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(1): 19-31.
- [23] 寇淑君, 霍阿红, 付国庆, 等. 利用荧光 SSR 分析中国糜子的遗传多样性和群体遗传结构 [J]. 中国农业科学, 2019, 52(9): 1475-1487.
- Kou S J, Huo A H, Fu G Q. Genetic diversity and population structure of broomcorn millet in China based on fluorescently labeled SSR [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2019, 52(9): 1475-1487.
- [24] 贾会霞, 姬慧娟, 胡建军, 等. 杨树新品种的 SSR 指纹图谱构建和倍性检测 [J]. 林业科学, 2015, 51(2): 69-79.
- Jia H X, Ji H J, Hu J J, et al. Fingerprints of SSR markers and ploidy detection for new *Populus varieties* [J]. Scientia Silvae Sinicae, 2015, 51(2): 69-79.
- [25] 樊 蓉, 樊军锋, 李周岐. 9 个白杨品种 SSR 指纹图谱构建及遗传关系的研究 [J]. 西北林学院学报, 2015, 30(3): 76-80.
- Fan R, Fan J F, Li Z Q. Fingerprinting and genetic relatedness of 9 varieties in *Populus* L. Sect. *Populus* using SSR markers [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2015, 30(3): 76-80.
- [26] 纵 丹, 周安佩, 张 垚, 等. 西南地区古杨树遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 西北植物学报, 2018, 38(5): 839-849.
- Zong D, Zhou A P, Zhang Y, et al. SSR revealed genetic diversity in large old poplars from southwest China [J]. Acta Bot Boreal, 2018, 38(5): 839-849.

matic hydrolysis of rice straw via a high-performance two-stage deep eutectic solvents synergistic pretreatment [J]. *Bioresource Technology*,2017,8(238):139-146.

[20] Chen Z,Reznicek W D,Wan C. Deep eutectic solvent pretreatment enabling full utilization of switchgrass [J]. *Bioresource Technology*,2018,9(263):40-48.

[21] Hongzhang C,Liying L. Unpolluted fractionation of wheat straw by steam explosion and ethanol extraction [J]. *Bioresource Technology*,2007,98(3):666-676.

[22] Hou X D,Li A L,Lin K P,et al. Insight into the structure-function relationships of deep eutectic solvents during rice straw pretreatment [J]. *Bioresource Technology*, 2018, 2(249):261-267.

[23] Tang X,Zuo M,Li Z. Green processing of lignocellulosic biomass and its derivatives in deep eutectic solvents [J]. *ChemSuschem*,2017,10:2696-2706.

[24] Chen Z,Wan C. Ultrafast fractionation of lignocellulosic biomass by microwave-assisted deep eutectic solvent pretreatment [J]. *Bioresource Technology*,2018,2(250):535-537.

[25] 耿星月,刘 苇,侯庆喜,等. 自水解预处理对杨木聚木糖分布的影响 [J]. *中国造纸*,2016,35(7):1-6.

Geng X Y,Liu W,Hou Q X,et al. Effect of auto-hydrolysis pretreatment on xylan distribution in the cell walls of poplar chips [J]. *China Pulp & Paper*,2016,35(7):1-6.

[26] Wang Z K,Shen X J,Chen J J,et al. Lignocellulose fractionation into furfural and glucose by $AlCl_3$ -catalyzed DES/MIBK biphasic pretreatment [J]. *International Journal of Biological Macromolecules*,2018,117:721-726.

[27] Zhao Z,Chen X,Ali M F,et al. Pretreatment of wheat straw using basic ethanolamine-based deep eutectic solvents for improving enzymatic hydrolysis [J]. *Bioresource Technology*, 2018,263:325-333.

(上接第 54 页)

[27] 张金旺,李代丽,尚峰男,等. 15 个北方杨树栽培品种倍性检测与 SSR 遗传分析 [J]. *西南林业大学学报(自然科学)*, 2018,38(5):27-33.

Zhang J W,Li D L,Shang F N,et al. Ploidy detection and genetic analysis of SSR markers of 15 *Populus* cultivars in north China [J]. *Journal of Southwest Forestry University ((Nat Sci))*,2018,38(5):27-33.

[28] Karam M,Aouad M,Roig A,et al. Characterizing the genetic diversity of *Atlas cedar* and phylogeny of *Mediterranean Cedrus* species with a new multiplex of 16 SSR markers [J]. *Tree Genetics & Genomes*,2019,15(4):1-12.

[29] 郭 娟,樊军锋,梁 军,等. 利用 SRAP 标记鉴别美洲黑杨及指纹图谱构建 [J]. *西北林学院学报*,2014,29(2):98-102.

Guo J,Fan J F,Liang J,et al. Identification and fingerprinting of *Populus deltodes* using SRAP markers [J]. *Journal of Northwest Forestry University*,2014,29(2):98-102.

[30] 李树春,夏 辉,严 冬,等. 不同派别杨树无性系 SSR 遗传距离及聚类分析 [J]. *植物研究*,2015,35(1):68-76.

Li S C,Xia H,Yan D,et al. SSR of genetic distance and clustering analysis on different *Populus* section clones [J]. *Bulletin of Botanical Research*,2015,35(1):68-76.

[31] 藕 丹,樊军锋,周永学,等. 美洲黑杨×青杨派杂种无性系 SSR 指纹图谱的构建与遗传差异性分析 [J]. *西北林学院学报*,2017,32(2):112-116,160.

Ou D,Fan J F,Zhou Y X,et al. Construction of fingerprint and analysis of genetic difference for hybrid clones of *Populus deltoids*×*Section tacamahaca* using SSR marker [J]. *Journal of Northwest Forestry University*,2017,32(2):112-116,160.

[32] 郑书星,张建国,段爱国,等. 新疆阿尔泰地区白杨派 3 个树种半同胞家系子代遗传多样性分析 [J]. *林业科学研究*,2013, 26(3):366-372.

Zheng S X,Zhang J G,Duan A G,et al. The genetic diversity of half-sib family progenies of *Populus (Section Leuce)* in Altai of Xinjiang [J]. *Forest Research*,2013,26(3):366-372.