

落羽杉属种类及其杂交子代‘中山杉’系列品种的 SSR 指纹图谱构建及遗传关系分析

段 豪, 徐建华, 王紫阳, 郭金博, 於朝广, 杨 颖^①

[江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省落羽杉属树木种质创新与繁育工程研究中心, 江苏 南京 210014]

摘要: 运用荧光标记毛细管电泳技术,对池杉[*Taxodium distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom]、墨西哥落羽杉(*T. mucronatum* Tenore)和落羽杉[*T. distichum* (Linn.) Rich.]的单株以及‘中山杉’(*T. ‘Zhongshanshan’*)系列品种共 96 个样本进行 SSR 分子标记检测,分析供试样本的遗传多样性并分别构建指纹图谱;在此基础上,依据供试样本的 Nei's 遗传距离进行聚类分析。结果显示:6 对 SSR 引物共扩增条带 91 条,其中多态性条带 68 条;每对引物扩增条带 9~31 条,其中多态性条带 6~27 条,多态性条带百分率平均值为 70.9%;各引物的多态性信息含量指数为 0.476~0.793,平均值为 0.658;供试样本的 Nei's 基因多样性指数、Shannon's 多态性信息指数、观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 0.755、1.599、0.381 和 0.245。用 4 对 SSR 引物的多态性条带可构建 40 个‘中山杉’系列品种的指纹图谱,指纹编码数量为 33,鉴别率达 85.0%;用 6 对 SSR 引物的多态性条带可构建 15 个池杉、23 个墨西哥落羽杉和 18 个落羽杉共 56 个单株的指纹图谱,指纹编码数量为 49,鉴别率达 91.1%,表明采用荧光标记毛细管电泳技术并运用 SSR 分子标记构建的指纹图谱可明显提高鉴别率。聚类分析结果显示:池杉与墨西哥落羽杉和落羽杉的 Nei's 遗传距离分别为 0.420 和 0.169,‘中山杉’系列品种与池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉的 Nei's 遗传距离分别为 0.358、0.114 和 0.137。在 Nei's 遗传距离 0.405 处,12 个池杉单株聚为 I 大类,其余 84 个样本聚为 II 大类;II 大类可进一步分为 5 组,其中,‘中山杉 1302’(‘Zhongshanshan 1302’)、落羽杉单株 L15 和‘中山杉 1305’(‘Zhongshanshan 1305’)分别单独成组,‘中山杉 1304’(‘Zhongshanshan 1304’)、‘中山杉 112’(‘Zhongshanshan 112’)、‘中山杉 149’(‘Zhongshanshan 149’)、9 个落羽杉单株和 1 个池杉单株聚为 II₄组,供试的所有墨西哥落羽杉单株与其余样本聚为 II₅组。综合分析结果表明:供试的‘中山杉’系列品种与池杉的遗传关系较远,与墨西哥落羽杉的遗传关系较近;而池杉与落羽杉的遗传关系较近,与墨西哥落羽杉的遗传关系较远。

关键词: 落羽杉属; ‘中山杉’系列品种; SSR 分子标记; 指纹图谱; 遗传关系

中图分类号: Q943.2; Q949.66⁺6 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2020)04-0011-08

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2020.04.02

Construction of SSR fingerprint and analysis on genetic relationship of *Taxodium* species and their hybrid progenies *T. ‘Zhongshanshan’* series cultivars DUAN Hao, XU Jianhua, WANG Ziyang, GUO Jinbo, YU Chaoguang, YANG Ying^① (Jiangsu Engineering Research Center for *Taxodium* Rich. Germplasm Innovation and Propagation, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2020, 29(4): 11-18, 44

Abstract: SSR molecular marker detection was conducted for 96 samples including individuals of *Taxodium distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom, *T. mucronatum* Tenore and *T. distichum* (Linn.) Rich., and *T. ‘Zhongshanshan’* series cultivars by using fluorescence labeled capillary electrophoresis, and their genetic diversity was analyzed and fingerprints were separately constructed; on the basis, cluster analysis was performed based on Nei's genetic distance of test samples. The results show that 91 bands are

收稿日期: 2019-08-07

基金项目: 江苏省现代农业重点研发计划(BE2018390); 中国科学院战略生物资源服务网络项目(kfj-brsn-2018-6-003); 江苏省植物资源研究与利用重点实验室项目(JSPKLB201842); 国家自然科学基金资助项目(31700588)

作者简介: 段 豪(1995—),男,湖北浠水人,硕士研究生,主要从事植物资源与生态环境方面的研究工作。

^①通信作者 E-mail: yo.ri@163.com

amplified with 6 pairs of primers, in which, 68 bands are polymorphic bands; 9–31 bands are amplified with each pair of primer, in which, 6–27 bands are polymorphic bands, and the average percentage of polymorphic bands is 70.9%; polymorphic information content index of each primer is 0.476–0.793, with the average of 0.658; the averages of Nei's gene diversity index, Shannon's polymorphic information index, observed heterozygosity and expected heterozygosity of test samples are 0.755, 1.599, 0.381 and 0.245, respectively. Fingerprints of 40 *T.* 'Zhongshanshan' series cultivars can be constructed with polymorphic bands amplified by using 4 pairs of SSR primers, and the number of fingerprint code is 33, with the identification rate of 85.0%; fingerprints of 56 individuals including 15 *T. distichum* var. *imbricatum*, 23 *T. mucronatum* and 18 *T. distichum* can be constructed with polymorphic bands amplified by using 6 pairs of SSR primers, and the number of fingerprint code is 49, with the identification rate of 91.1%, indicating that fingerprints constructed with SSR molecular marker *via* fluorescence labeled capillary electrophoresis can evidently increase identification rate. The cluster analysis result shows that Nei's genetic distances of *T. distichum* var. *imbricatum* with *T. mucronatum* and *T. distichum* are 0.420 and 0.169, respectively, and those of *T.* 'Zhongshanshan' series cultivars with *T. distichum* var. *imbricatum*, *T. mucronatum* and *T. distichum* are 0.358, 0.114 and 0.137, respectively. At Nei's genetic distance of 0.405, 12 individuals of *T. distichum* var. *imbricatum* cluster into class I, other 84 samples cluster into class II; class II can be further divided into 5 groups, in which, 'Zhongshanshan 1302', individual L15 of *T. distichum* and 'Zhongshanshan 1305' cluster into separate group, 'Zhongshanshan 1304', 'Zhongshanshan 112', 'Zhongshanshan 149', 9 individuals of *T. distichum* and 1 individual of *T. distichum* var. *imbricatum* cluster into group II₄, and all test individuals of *T. mucronatum* and other samples cluster into group II₅. The comprehensive analysis result shows that the genetic relationship of test *T.* 'Zhongshanshan' series cultivars with *T. distichum* var. *imbricatum* is relatively distant, but that with *T. mucronatum* is relatively close; while the genetic relationship of *T. distichum* var. *imbricatum* with *T. distichum* is relatively close, but that with *T. mucronatum* is relatively distant.

Key words: *Taxodium* Rich.; *T.* 'Zhongshanshan' series cultivars; SSR molecular marker; fingerprint; genetic relationship

落羽杉属 (*Taxodium* Rich.) 包含落羽杉 [*T. distichum* (Linn.) Rich.]、池杉 [*T. distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom] 和墨西哥落羽杉 (*T. mucronatum* Tenore) 3 个类群^{[1]58–60}。江苏省中国科学院植物研究所经过数十年的杂交选育,从落羽杉属种间杂交后代中选育出‘中山杉’ (*T.* 'Zhongshanshan') 系列优良无性系品种,该品种具有耐水湿、耐盐碱和观赏价值高等优点,是长江中下游地区主要的生态和园林树种之一^[2–5]。

由于在育种过程中高频率使用少数骨干亲本,部分‘中山杉’品种的亲缘关系较近,形态特征差异较小,难以鉴别,为此研究者们利用形态和分子特征对‘中山杉’系列品种的亲缘关系进行了研究。杨美凌等^[6]利用外部形态性状的差异,通过聚类分析仅能理清落羽杉属部分种类、栽培品种及杂种间的亲缘关系,且表型特征易受环境因子的影响。李涵等^[7]利用 RAPD 分子标记对落羽杉属种类及其杂交后代共 13 个样本进行亲缘关系鉴定,但 RAPD 分子标记提供的是显性标记,无法区分纯合型和杂合型,获得的遗传信息不全面。随着‘中山杉’新优品种的推广,

在生产过程中难以避免出现品种混杂的现象,亟需应用鉴别率更高的技术进行种质鉴定。

与其他分子标记相比,SSR 分子标记具有多态性高、共显性、种属间通用性良好等优点,且实验过程中所需样本量少、操作简便、分辨率高、可重复性强、结果稳定,SSR 分子标记已广泛用于遗传图谱构建、基因定位、指纹图谱分析以及多样性评价等领域^[8]。而基于 SSR 分子标记的指纹图谱也被应用于茶树 [*Camellia sinensis* (Linn.) Kuntze]^[9] 和马尾松 (*Pinus massoniana* Lambert)^[10] 等林木种质资源和品种的鉴定。王紫阳等^[3]利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,通过 81 对 SSR 引物和 6 对 SRAP 引物组合对 23 个‘中山杉’品种及其亲本的基因型进行分析,构建了落羽杉属种质的指纹图谱,并从中筛选出 7 对 SSR 多态性引物,对供试样本的鉴别率达 84.6%。相比于常规的聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,荧光标记毛细管电泳技术是一项高通量、自动化的电泳技术,其分辨率约 1 bp^[11],检测结果更为精确、灵敏、高效,适用于大批量样本的检测分析。

为探索荧光标记毛细管电泳技术在落羽杉属种

质鉴定中的应用,作者基于前期筛选的 SSR 分子标记,采用荧光标记毛细管电泳技术对 96 个样本(40 个‘中山杉’系列品种以及 15 个池杉、23 个墨西哥落羽杉和 18 个落羽杉的单株)进行检测,并比较了引物的多态性以及供试样本间的遗传参数。考虑实际应用时的简便性和鉴别率,尽可能选择数量少的引物构建指纹图谱;并根据供试样本的遗传距离进行聚类分析,探讨供试样本间的亲缘关系。以期为‘中山杉’品种创新和推广以及落羽杉属种质资源的引种和鉴定奠定基础,并为‘中山杉’新品种的知识产权保护、优良亲本的选育和育种策略的制定提供基础数据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试 96 个样本具有不同的基因型,均来源于江苏省中国科学院植物研究所落羽杉属林木种质资源库,具体包括 40 个‘中山杉’系列品种(无性系,下同)以及 15 个池杉、23 个墨西哥落羽杉和 18 个落羽杉的单株。

40 个‘中山杉’系列品种包括:‘中山杉 401’(‘Zhongshanshan 401’)由池杉与墨西哥落羽杉(前为父本、后为母本,下同)杂交获得;‘中山杉 1’(‘Zhongshanshan 1’),‘中山杉 27’(‘Zhongshanshan 27’),‘中山杉 86’(‘Zhongshanshan 86’),‘中山杉 91’(‘Zhongshanshan 91’),‘中山杉 102’(‘Zhongshanshan 102’),‘中山杉 118’(‘Zhongshanshan 118’),‘中山杉 123’(‘Zhongshanshan 123’),‘中山杉 140’(‘Zhongshanshan 140’),‘中山杉 146’(‘Zhongshanshan 146’)和‘中山杉 149’(‘Zhongshanshan 149’)由‘中山杉 302’(‘Zhongshanshan 302’)与墨西哥落羽杉杂交获得;‘中山杉 111’(‘Zhongshanshan 111’),‘中山杉 112’(‘Zhongshanshan 112’),‘中山杉 113’(‘Zhongshanshan 113’),‘中山杉 120’(‘Zhongshanshan 120’),‘中山杉 125’(‘Zhongshanshan 125’)和‘中山杉 127’(‘Zhongshanshan 127’)由墨西哥落羽杉与池杉杂交获得;‘中山杉 301’(‘Zhongshanshan 301’),‘中山杉 302’(‘Zhongshanshan 302’),‘中山杉 1002’(‘Zhongshanshan 1002’),‘中山杉 1013’(‘Zhongshanshan 1013’),‘中山杉

1073’(‘Zhongshanshan 1073’),‘中山杉 1074’(‘Zhongshanshan 1074’),‘中山杉 1075’(‘Zhongshanshan 1075’),‘中山杉 1076’(‘Zhongshanshan 1076’),‘中山杉 1201’(‘Zhongshanshan 1201’)和‘中山杉 1213’(‘Zhongshanshan 1213’)由落羽杉与墨西哥落羽杉杂交获得;‘中山杉 405’(‘Zhongshanshan 405’),‘中山杉 406’(‘Zhongshanshan 406’),‘中山杉 407’(‘Zhongshanshan 407’),‘中山杉 502’(‘Zhongshanshan 502’),‘中山杉 503’(‘Zhongshanshan 503’),‘中山杉 601’(‘Zhongshanshan 601’)和‘中山杉 703’(‘Zhongshanshan 703’)由墨西哥落羽杉与落羽杉杂交获得;‘中山杉 1301’(‘Zhongshanshan 1301’),‘中山杉 1302’(‘Zhongshanshan 1302’)和‘中山杉 1303’(‘Zhongshanshan 1303’)由‘中山杉 102’与墨西哥落羽杉杂交获得;‘中山杉 1304’(‘Zhongshanshan 1304’)由‘中山杉 302’与落羽杉杂交获得;‘中山杉 1305’(‘Zhongshanshan 1305’)和‘中山杉 1306’(‘Zhongshanshan 1306’)由‘中山杉 102’与落羽杉杂交获得。

15 个池杉单株中,C1、C2、C3、C4、C5、C6、C7、C8、C9 和 CT 引自南京中山植物园盲人植物园,ZM6、ZM8、ZM10 和 ZM12 引自南京中山植物园树木园,CC 引自美国。23 个墨西哥落羽杉单株中,YJM 引自南京挹江门,DD 引自南京东南大学校园,A1、A2、A3、A4、A5、XM1、XM2、XM3、XM4、XM5、XM6、XM7、XM8、JM1、JM2、JM3、JM4 和 JM5 引自美国,B4、B6 和 B7 引自墨西哥。18 个落羽杉单株中,L1、L2、L4 和 L5 引自河南,L7、L8、L9、LP1 和 LP2 引自南京中山植物园,L11、L13、L14、L15、L16、L17、CL、LH1 和 LH2 引自美国。

于 2019 年 4 月,分别在各单株的东、南、西、北 4 个方向采集侧枝嫩芽 10~15 枚,放入自封袋中,用冰盒带回实验室,于-80 °C 冰箱中保存、备用。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 取 200 mg 嫩芽,用新型快速植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取 DNA,用 Berthold Colibri 超微量分光光度计(德国 Berthold Technology 公司)检测 DNA 的浓度和纯度,用双蒸水将 DNA 质量浓度稀释至 5~10 ng· μL^{-1} ,置于-20 °C 冰箱中保存、备用。

1.2.2 PCR 扩增 参照文献[3]合成6对SSR引物TA0158、TA0231、TA0236、TA0438、TA0440和TA0443,在每对引物的正向引物5'端加FAM荧光标记,由上海捷瑞生物工程有限公司合成荧光引物。

用EDC-810 PCR仪(北京东胜创新生物科技有限公司)进行PCR扩增反应。扩增体系包括10×buffer 1.50 μL、2.5 mmol·L⁻¹dNTPs 0.30 μL、25 mmol·L⁻¹MgCl₂ 1.50 μL、5 ng·L⁻¹DNA样品 1.00 μL、Taq DNA聚合酶 0.30 μL以及10 μmol·L⁻¹正向和反向引物各0.15 μL,用双蒸水补足至15.00 μL。扩增程序为:94℃预变性3 min;94℃变性15 s、55℃退火15 s、72℃延伸30 s,共35个循环;72℃延伸3 min。扩增产物置于4℃保存。

1.2.3 毛细管电泳检测 扩增产物先经质量体积分数1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,然后将扩增产物稀释10倍,并与ROX 500内标(上海捷瑞生物工程有限公司)混匀;混合物经95℃变性5 min后迅速冰浴3 min,用3730XL基因测序仪(美国ABI公司)进行毛细管电泳检测^[12]。

1.3 数据处理和分析

对SSR荧光标记条带进行分析,统计每对引物的所有多态性位点;某一位点上有条带记为“1”,无条带记为“0”,形成6对引物的“0”、“1”矩阵,据此构建供试96个样本的SSR分子标记指纹图谱。

采用PIC-CALC 2.0软件计算各引物的多态性信息含量指数(PIC);基于各引物扩增的多态性条带,采用PopGene32软件计算供试96个样本的Nei's基因多样性指数(H)、Shannon's多态性信息指数(I)、观测杂合度(Ho)和期望杂合度(He)。

参照文献[13]计算供试的‘中山杉’系列品种间以及池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉单株间的Nei's遗传一致度和Nei's遗传距离;并将供试96个样本的Nei's遗传距离矩阵导入MEGA 5.0软件,构建NJ聚类图。

2 结果和分析

2.1 SSR分子标记的多态性分析和指纹图谱构建

2.1.1 多态性分析 基于6对SSR引物的多态性条带数量计算供试样本间的遗传多样性参数,结果见表1。由表1可见:6对SSR引物共检测到48个等位基因,平均每对引物扩增出8个等位基因;共检测到条带91条,每对引物的扩增条带数为9~31,平均值为15.2,其中,引物TA0158扩增的条带数最多(31),引物TA0231和TA0438扩增的条带数较少(9)。6对引物的多态性条带数为6~27,多态性条带数总数为68;每对引物扩增的多态性条带数平均值为11.3;多态性条带百分率平均值为70.9%。各引物的多态性信息含量指数为0.476~0.793,平均值为0.658。

由表1还可见:供试96个样本的Nei's基因多样性指数为0.690~0.843,平均值为0.755;Shannon's多态性信息指数为1.391~2.088,平均值为1.599;观测杂合度为0.071~0.714,平均值为0.381;期望杂合度为0.157~0.310,平均值为0.245。

2.1.2 指纹图谱 依据SSR分子标记分析结果,40个‘中山杉’系列品种的SSR指纹图谱见表2;15个池杉、23个墨西哥落羽杉和18个落羽杉单株的SSR指纹图谱见表3。

表1 6对SSR引物扩增条带的多态性及供试落羽杉属样本间的遗传多样性参数

Table 1 Polymorphism of amplified bands of 6 pairs of SSR primers and genetic diversity parameter among test samples of *Taxodium Rich.*

引物 Primer	Na	N _{PB}	PPB/%	PIC	样本间的遗传多样性参数 Genetic diversity parameter among samples			
					H	I	Ho	He
TA0158	13	27	87.1	0.793	0.843	2.088	0.196	0.157
TA0231	6	6	66.7	0.666	0.690	1.221	0.446	0.310
TA0236	9	13	86.7	0.626	0.814	1.855	0.071	0.186
TA0438	6	6	66.7	0.476	0.697	1.391	0.393	0.303
TA0440	8	9	60.0	0.764	0.734	1.565	0.714	0.266
TA0443	6	7	58.3	0.625	0.754	1.477	0.464	0.246
平均值 Average	8	11.3	70.9	0.658	0.755	1.599	0.381	0.245

¹⁾ Na: 等位基因数 Number of alleles; N_{PB}: 多态性条带数 Number of polymorphic bands; PPB: 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic bands; PIC: 多态性信息含量指数 Polymorphic information content index; H: Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index; I: Shannon's 多态性信息指数 Shannon's polymorphic information index; Ho: 观测杂合度 Observed heterozygosity; He: 期望杂合度 Expected heterozygosity.

表 2 基于 SSR 引物 TA0158、TA0236、TA0440 和 TA0443 扩增条带构建的‘中山杉’系列品种的指纹图谱

Table 2 Fingerprints of *Taxodium* ‘Zhongshanshan’ series cultivars constructed based on amplified bands of SSR primer TA0158, TA0236, TA0440 and TA0443

品种 Cultivar	指纹编码 Fingerprint code	品种 Cultivar	指纹编码 Fingerprint code
中山杉 1 Zhongshanshan 1	001000100000010000100100000000001	中山杉 406 Zhongshanshan 406	001000000000010100100010000010001
中山杉 27 Zhongshanshan 27	001000100000010010100100000000001	中山杉 407 Zhongshanshan 407	001000000000010100100100000010001
中山杉 86 Zhongshanshan 86	001000100000010010100100000010001	中山杉 502 Zhongshanshan 502	001000100000010100100010000010001
中山杉 91 Zhongshanshan 91	001000000001011000100010000000101	中山杉 503 Zhongshanshan 503	001000000000010100100100000010001
中山杉 102 Zhongshanshan 102	001010000000010010100010000000101	中山杉 601 Zhongshanshan 601	010000100000010100100010000010001
中山杉 111 Zhongshanshan 111	001010000000011000100010000010001	中山杉 703 Zhongshanshan 703	010000000000010100100010000010001
中山杉 112 Zhongshanshan 112	00000000011000011000010000000110	中山杉 1002 Zhongshanshan 1002	001000000000010100010010000000101
中山杉 113 Zhongshanshan 113	010000000000011000010010000010001	中山杉 1013 Zhongshanshan 1013	000000100000011000001010000010001
中山杉 118 Zhongshanshan 118	011000000000010010100100000000101	中山杉 1073 Zhongshanshan 1073	000000100000010100001010000000001
中山杉 120 Zhongshanshan 120	000010100000010100100100000000001	中山杉 1074 Zhongshanshan 1074	001000100000010100100100000010001
中山杉 123 Zhongshanshan 123	001010000000011000100010000010001	中山杉 1075 Zhongshanshan 1075	001000000000010100100010000010001
中山杉 125 Zhongshanshan 125	000010100000011000001100000010001	中山杉 1076 Zhongshanshan 1076	000000100000010100010010000010001
中山杉 127 Zhongshanshan 127	000010100000011000001010000010001	中山杉 1201 Zhongshanshan 1201	001000100000010100100100000010001
中山杉 140 Zhongshanshan 140	001000100000010010010010000000001	中山杉 1213 Zhongshanshan 1213	010000000000010100010100000000001
中山杉 146 Zhongshanshan 146	0010001000000100000100100000010001	中山杉 1301 Zhongshanshan 1301	001000001000010000010010000000101
中山杉 149 Zhongshanshan 149	001000000000000110100100000010001	中山杉 1302 Zhongshanshan 1302	001000001000001000100010000010100
中山杉 301 Zhongshanshan 301	010000000000010000010010000000001	中山杉 1303 Zhongshanshan 1303	0010000010000011000010010000000101
中山杉 302 Zhongshanshan 302	001010000000010010100010000010001	中山杉 1304 Zhongshanshan 1304	001000000000000110100100000010100
中山杉 401 Zhongshanshan 401	001000100000010100010100000010001	中山杉 1305 Zhongshanshan 1305	0010000010000010100100010000010001
中山杉 405 Zhongshanshan 405	010000000000011000001100000000001	中山杉 1306 Zhongshanshan 1306	001000001000001100100010000010001

表 3 基于 SSR 引物 TA0158、TA0231、TA0236、TA0438、TA0440 和 TA0443 扩增条带构建的池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉单株的指纹图谱

Table 3 Fingerprints of individuals of *Taxodium distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom, *T. mucronatum* Tenore and *T. distichum* (Linn.) Rich. constructed based on amplified bands of SSR primer TA0158, TA0231, TA0236, TA0438, TA0440 and TA0443

编号 ¹⁾ No. ¹⁾	单株 Individual	指纹编码 Fingerprint code	编号 ¹⁾ No. ¹⁾	单株 Individual	指纹编码 Fingerprint code
1	C1	000010100000001100000000110000100000000001011000	29	XM4	0010001000000010100000010100110000000000001110000
2	C2	0000000001001001000001000010001100000010001011000	30	XM5	00100010000000101000000100100100000000000001110000
3	C3	0001000000001001000000100100000110100000100001000	31	XM6	0010001000000010100000010100110000000000001010000
4	C4	00001000000001001000000100010001010000010000011000	32	XM7	0000001000000010100000010010100000000000001100000
5	C5	00000010000001001001000100010001100000010001011000	33	XM8	0010001000000010000000000011100000000000001010000
6	C6	0000010001000010100000100010100100000000100010100	34	JM1	000000100000000100000010100100000000100001100000
7	C7	00100000000001011000000100010100000110000000001000	35	JM2	00100010000000101000000000111100000000000001010000
8	C8	00001000010000011000001001001010000010000000010000	36	JM3	00100010000000101000000000111100000000000001010000
9	C9	0000101000000001100000100100101000000010000010000	37	JM4	0010010000000010100000100100100000000010000010000
10	ZM6	0010010000000011000000000110101000000100000010100	38	JM5	001000100000001000000001010011000000000001110000
11	ZM8	00001000000000001010000101000100100000010001011000	39	L1	0010000100000011000000010100100000000001000101000
12	ZM10	0100100000000001000110000000001000000000001000001	40	L2	00100001000000010000000100010100010000001000101000
13	ZM12	0000001000000001000110000000001100000000101000101	41	L4	0010001000000011000000010010100100000010001011000
14	CC	0001010000000101000100000000100100000010000000101	42	L5	0010000000000011000000100100001000000010000001000
15	CT	00001000000001001000010100000101000000001000000110	43	L7	00100000100000110000000100010100000000010000011000
16	YJM	0000001000000010000000000110101000000110000100000	44	L8	001000000000001010000000010100100000010000110000
17	DD	001000100000001010000001001010000000000001100000	45	L9	0100001000000010000000000101001000000001000001100
18	A1	01000000100000010100000000110100000000100001100000	46	L11	0010000000010001100000100010110000000000001010100
19	A2	0100000010000000100000010010100000000100001100000	47	L13	0010100000000010100000100010110000000010000100100
20	A3	0100000100000000100000010010100000000100001100000	48	L14	000010001000001000000001000101100000000000001001100
21	A4	0100000010000000100000010010100000000100001100000	49	L15	0010100000000001100000100010101000000010000100100
22	A5	0000000110000000100000010010100000000100001100000	50	L16	0100010000000001000000000101101000000001000101000
23	B4	0100000010000000100000010010100000000100001100000	51	L17	0000000001100001000000000010110000001000000001100
24	B6	00100000000000000100000010100110000000000001110000	52	LP1	0000001000000010100000001010101000000010000001000
25	B7	010000000100000010001010000001000000000110000100000	53	LP2	1000001000000001000001000010101000000010000001000
26	XM1	0010001000000010100000010100010000000000001100000	54	CL	00000010010000011000000000101000100000001000010100
27	XM2	0000001000000000100000000011100001000000001110000	55	LH1	0010000000000011000000000010001100000010000011000
28	XM3	0010001000000010000000010100110000000000001010000	56	LH2	00100000100000110000001001000001000000100000010000

¹⁾ 1-15: 池杉单株 Individuals of *Taxodium distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom; 16-38: 墨西哥落羽杉单株 Individuals of *T. mucronatum* Tenore; 39-56: 落羽杉单株 Individuals of *T. distichum* (Linn.) Rich.

由表2可见:运用4对SSR引物TA0158、TA0236、TA0440和TA0443的扩增条带就可以构建40个‘中山杉’系列品种的指纹图谱,指纹编码数量为33,鉴别率达85.0%,这4对SSR引物可作为鉴定‘中山杉’系列品种的核心引物。除‘中山杉111’与‘中山杉123’、‘中山杉407’与‘中山杉503’、‘中山杉1074’与‘中山杉1021’的指纹图谱分别相同外,通过该SSR指纹图谱可鉴别其他34个‘中山杉’系列品种。

由表3可见:运用6对SSR引物TA0158、TA0231、TA0236、TA0438、TA0440和TA0443的扩增条带可以构建15个池杉、23个墨西哥落羽杉和18个落羽杉共56个单株的指纹图谱,指纹编码数量为49,鉴别率达91.1%。除墨西哥落羽杉单株A2、A4与B4以及墨西哥落羽杉单株JM2与JM3的指纹图谱分别相同外,通过该SSR指纹图谱可鉴别其他51个单株。

2.2 遗传关系和聚类分析

2.2.1 遗传关系分析 对供试的‘中山杉’系列品种以及池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉单株的Nei's遗传一致度和Nei's遗传距离进行计算,结果显示:‘中山杉’系列品种与池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉的Nei's遗传一致度分别为0.699、0.893和0.871,Nei's遗传距离分别为0.358、0.114和0.137,表明‘中山杉’系列品种与墨西哥落羽杉和落羽杉的遗传关系较近,而与池杉的遗传关系较远。在池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉间,池杉与墨西哥落羽杉和落羽杉的Nei's遗传一致度分别为0.657和0.845,Nei's遗传距离分别为0.420和0.169;落羽杉与墨西哥落羽杉的Nei's遗传一致度为0.857,Nei's遗传距离为0.154,表明池杉与落羽杉的遗传关系较近,而与墨西哥落羽杉的遗传关系较远。

2.2.2 聚类分析 根据Nei's遗传距离对供试的96个样本进行聚类分析,结果见图1。结果显示:在Nei's遗传距离0.405处,96个样本首先被分为2大类,其中,除C6、C7和ZM6外的其他12个池杉单株聚为I大类,其余84个样本聚为II大类。在Nei's遗传距离0.310处,II大类可进一步分为5组,其中,‘中山杉1302’、落羽杉单株L15和‘中山杉1305’分别单独成组,即II₁、II₂和II₃组;‘中山杉1304’、‘中山杉112’、‘中山杉149’、9个落羽杉单株和1个池杉单株聚为II₄组;其余68个样本聚为II₅组,其中供

试的23个墨西哥落羽杉单株均被聚在此组中。

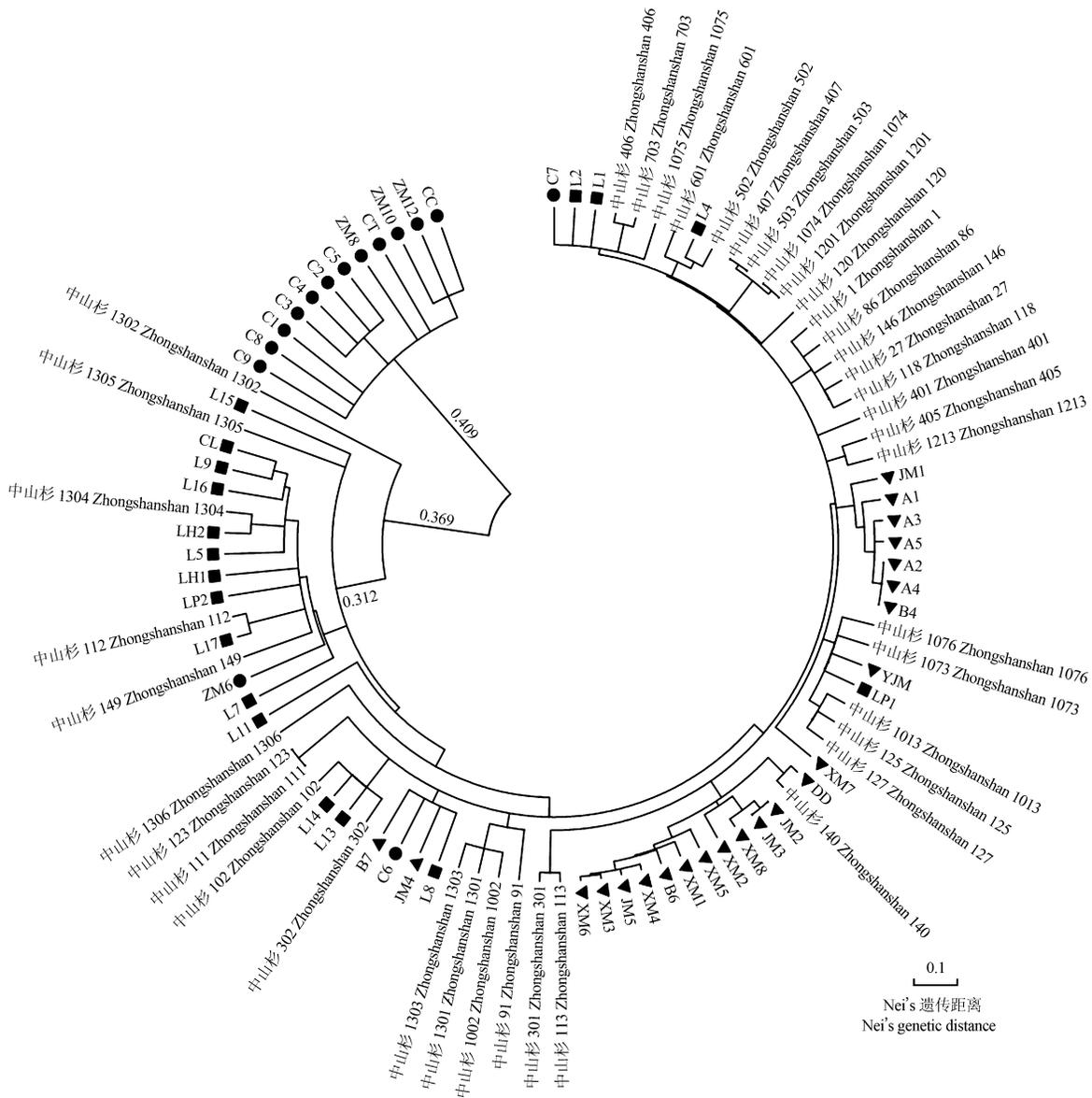
大多数池杉单株聚为一大类,而落羽杉和墨西哥落羽杉的所有单株与‘中山杉’系列品种聚为另一大类,说明池杉与供试‘中山杉’系列品种的遗传关系较远,而落羽杉和墨西哥落羽杉则与供试‘中山杉’系列品种的遗传关系较近,特别是墨西哥落羽杉,与大多数‘中山杉’系列品种的遗传关系更近。

3 讨论和结论

基于聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,王紫阳等^[3]利用7对SSR引物构建26个落羽杉属样本的指纹图谱,鉴别率为84.6%。本研究采用荧光标记毛细管电泳技术,利用其中4对SSR引物建立的40个‘中山杉’系列品种的指纹图谱,鉴别率达85.0%;而利用6对SSR引物建立的池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉的56个单株的指纹图谱,鉴别率可达91.1%,说明相较于PAGE技术,荧光标记毛细管电泳技术具有较高的分辨率。

王紫阳等^[3]的研究结果显示:6对SSR引物TA0158、TA0231、TA0236、TA0438、TA0440和TA0443扩增条带的多态性信息含量指数(PIC)分别为0.514、0.362、0.677、0.488、0.393和0.420,平均值为0.476。而本研究中,同样6对SSR引物的PIC值分别为0.793、0.666、0.626、0.476、0.764和0.625,平均值为0.658,各引物的PIC值明显提高。PIC值越高,表明SSR分子标记的多态性越丰富^[14]。若 $PIC < 0.25$,表示引物具有低度多态性;若 $0.25 < PIC < 0.50$,表示引物具有中度多态性;若 $PIC > 0.50$,则表示引物具有高度多态性^[15]。可见,利用荧光标记毛细管电泳检测技术可以显著提高同一SSR引物扩增条带的多态性。

SSR分子标记通常是共显性标记,呈共显性的引物有3种带型,即只有父本带、只有母本带和亲本杂合带^[16-17]。本研究中,针对‘中山杉’系列品种进行SSR分子标记扩增,在排除信息错误后,其中有些品种的扩增条带出现了亲本中没有的新条带,例如:经四碱基(CCTT)₅重复SSR引物TA0443扩增后,‘中山杉1002’出现2条长度分别为182和190bp的条带,而其父本落羽杉单株L4仅有1条长度为182bp的条带,母本墨西哥落羽杉单株DD出现2条长度分别为182和186bp的条带,从中可以看出‘中山杉



●: 池杉单株 Individuals of *Taxodium distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom; ▼: 墨西哥落羽杉单株 Individuals of *T. mucronatum* Tenore; ■: 落羽杉单株 Individuals of *T. distichum* (Linn.) Rich.

图 1 40 个‘中山杉’系列品种以及 56 个池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉单株的 NJ 聚类图
 Fig. 1 NJ dendrogram of 40 cultivars of *Taxodium* ‘Zhongshanshan’ series and 56 individuals of *T. distichum* var. *imbricatum* (Nuttall) Croom, *T. mucronatum* Tenore and *T. distichum* (Linn.) Rich.

1002’出现的长度为 190 bp 的条带是其双亲本均没有的新条带。在鸭茅 (*Dactylis glomerata* Linn.)^[18] 和茄 (*Solanum melongena* Linn.)^[19] 的 SSR 分子标记扩增条带中也存在这一现象, 这种情况可能是由于在配子体形成过程中, 染色体减数分裂时同源染色体发生配对与交换, 染色体复制过程中存在碱基突变等现象, 从而表现出 DNA 条带的消失或新条带的出现^[18-19]。

在供试的 40 个‘中山杉’系列品种中, 仅少数品种以池杉为亲本杂交获得, 所有品种均是以墨西哥落羽杉或墨西哥落羽杉的杂交后代为亲本杂交或回交后获得的品种, 因而在 NJ 聚类图上, 大多数池杉单株聚为一大类, 所有墨西哥落羽杉单株与所有‘中山杉’系列品种被聚在另一大类中, 说明墨西哥落羽杉单株与‘中山杉’系列品种有较近的遗传关系。由此可见, SSR 分子标记可在一定程度上追溯‘中山杉’

系列品种与其亲本间的亲缘关系。

从 19 世纪至今,对落羽杉属下类群的分类处理一直存在争议^[20]。本研究中,从供试的池杉、墨西哥落羽杉和落羽杉单株的 Nei's 遗传距离看,池杉与落羽杉的遗传关系更近,与 Lickey 等^[21]基于形态学证据对这 2 个类群遗传关系的研究结果一致,印证了将池杉作为落羽杉变种^{[1]59}的分类处理。从上述的聚类图可见:部分‘中山杉’系列品种与其父本关系更近(如‘中山杉 302’与其父本落羽杉),部分‘中山杉’系列品种与其母本关系更近(如‘中山杉 401’与其母本墨西哥落羽杉),还有部分‘中山杉’系列品种难以判断与亲本的关系(如‘中山杉 1002’);虽然大多数池杉单株聚为一类,落羽杉和墨西哥落羽杉单株以及全部的‘中山杉’系列品种聚为另一大类,但还有少数池杉单株与落羽杉和墨西哥落羽杉单株有较近的 Nei's 遗传距离,导致这一现象的原因可能是这 3 个类群的原分布区域互相重叠,可产生自然杂交的后代。

植物不同种间杂交或基因渗透在自然界非常普遍,如松属(*Pinus* Linn.) 种类间存在的基因渗透现象^[22]。落羽杉属的种类可能也存在类似现象,如: McMillan^[23]在美国德克萨斯州墨西哥落羽杉与落羽杉的重叠分布区域,观察到大量的具有二者中间特征和结实种子的后代; Lickey 等^[24]在研究中也发现了大量池杉和落羽杉的中间类型个体。落羽杉属种类通过这种自然杂交过程产生的基因交换,使各种类的遗传多样性水平提高,且‘中山杉’系列品种在育种过程中反复杂交和回交也使不同品种的遗传多样性水平存在较大差异,如供试 96 个样本的 Nei's 基因多样性指数和 Shannon's 多态性信息指数分别为 0.690~0.843 和 1.391~2.088,平均值分别达到 0.755 和 1.599,为‘中山杉’系列品种的改良奠定了丰富的遗传基础。

综合分析结果表明:供试 96 个样本的遗传多样性较高,依据 SSR 分子标记构建的 40 个‘中山杉’系列品种以及落羽杉属 3 个类群 56 个单株的指纹图谱,对供试样本的鉴别率分别达到 85.0% 和 91.1%,因而,可以采用毛细管电泳技术并运用 SSR 分子标记构建落羽杉种质资源的指纹图谱。此外,通过聚类分析,发现供试的部分‘中山杉’系列品种及其亲本间的遗传关系较为混乱,因而,在后续还应进一步

借助多学科手段对落羽杉属的种质资源进行鉴定。

参考文献:

- [1] WU Z Y, RAVEN P H. Flora of China: Vol. 4 [M]. Beijing: Science Press, 1999.
- [2] 赵洋, 饶良懿, 徐子棋, 等. 水淹对三峡库区消落带中山杉生长的影响[J]. 环境科学与技术, 2017, 40(2): 19-25.
- [3] 王紫阳, 於朝广, 华建峰, 等. 23 个中山杉品种及其父母本的指纹图谱构建[J]. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1222-1228.
- [4] 王紫阳, 成彦丽, 殷云龙, 等. 中山杉 EST-SSR 引物通用性及基因分型检测[J]. 分子植物育种, 2015, 13(7): 1632-1638.
- [5] 朱越骅, 潘彪, 於朝广, 等. ‘中山杉 118’与落羽杉胸径生长及木材密度的比较研究[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2019, 43(6): 201-206.
- [6] 杨美凌, 殷云龙, 方炎明, 等. 落羽杉属种类、栽培变种及杂种外部形态变异及亲缘关系研究[J]. 植物资源与环境学报, 2010, 19(2): 40-47.
- [7] 李涵, 殷云龙, 徐朗莱, 等. 落羽杉属树种及其杂交后代亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 林业科学, 2007, 43(2): 48-51.
- [8] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. SSR 分子标记的研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2019, 18(4): 429-436.
- [9] 蔡一鸣, 吕未, 吴淑平, 等. SSR 分子标记及其在茶树 DNA 指纹图谱上的应用[J]. 天津农业科学, 2019, 25(3): 8-10.
- [10] 梅利那, 范付华, 崔博文, 等. 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, 2017, 25(6): 991-1002.
- [11] 匡猛, 王延琴, 周大云, 等. 棉花 DUS 测试标准品种的 SSR 指纹数据库构建[J]. 棉花学报, 2015, 27(1): 46-52.
- [12] 曾斌, 马鑫鑫, 余镇藩, 等. 新疆野扁桃的 TP-M13-SSR 荧光标记引物的筛选[J]. 中国农学通报, 2019, 35(1): 45-49.
- [13] 曹祥. 罗非鱼不同群体遗传变异的微卫星标记分析[D]. 无锡: 南京农业大学无锡渔业学院, 2010: 47-50.
- [14] 张晓娟, 张羽, 李英, 等. 利用 SSR 分子标记分析油菜菌核病抗性资源遗传多样性[J]. 分子植物育种, 2015, 13(12): 2767-2772.
- [15] 吴艳艳, 黄伟华, 黄永才, 等. 栽培种西番莲完全型 SSR 的高通量鉴定及标记开发[J]. 分子植物育种, 2018, 16(20): 6738-6743.
- [16] 杨留启, 杨文鹏, 王伟, 等. 13 份 o2 玉米自交系的 SSR 分子标记遗传多样性分析[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(3): 5-8, 13.
- [17] 付小琼, 叶武威. 亲本未知的棉花 F₁ 杂种及其 F₂ 单株的 SSR 分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2012, 10(5): 600-606.
- [18] 谢文刚, 张新全, 陈永霞. 鸭茅杂交种的 SSR 分子标记鉴定及其遗传变异分析[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 212-217.
- [19] 王艳娜, 王益奎, 李文嘉, 等. 利用 SSR 分子标记技术鉴定和分析茄子杂种 F₁ 的纯度[J]. 南方农业学报, 2015, 46(9): 1551-1556.

参考文献:

- [1] 杨丹怡, 吉文丽, 杨静萱, 等. 平茬措施对凤丹生长、光合生理和结实的影响[J]. 植物资源与环境学报, 2019, 28(1): 43-51.
- [2] 史国安, 焦封喜, 焦元鹏, 等. 中国油用牡丹的发展前景及对策[J]. 中国粮油学报, 2014, 29(9): 124-128.
- [3] 杨玉珍, 张志浩, 李娟. 不同间作模式下油用牡丹‘凤丹’光合特性及其与环境因子的关系[J]. 生态学杂志, 2018, 37(10): 2905-2912.
- [4] 蔡艳飞, 李世峰, 王继华, 等. 遮荫对油用牡丹植株生长和光合特性的影响[J]. 西北植物学报, 2016, 36(8): 1623-1631.
- [5] 周曙光, 孔祥生, 张妙霞, 等. 遮光对牡丹光合及其他生理生化特性的影响[J]. 林业科学, 2010, 46(2): 56-60.
- [6] 张衷华, 唐中华, 杨逢建, 等. 两种主要油用牡丹光合特性及其微环境影响因子分析[J]. 植物研究, 2014, 34(6): 770-775.
- [7] 笕丽霞, 陈君红, 霍科科, 等. 牡丹籽油脂肪酸成分分析及微胶囊化工艺优化[J]. 粮食与油脂, 2018, 31(11): 32-35.
- [8] 董秀婷, 杨国恩, 王秋敏. 凤丹牡丹籽油的提取工艺优化及脂肪酸组成分析[J]. 中国油脂, 2018, 43(7): 6-9.
- [9] 冯贞, 方晓璞, 任春明. 不同提取方法对牡丹籽油品质和微量活性成分的影响[J]. 中国油脂, 2018, 43(10): 17-19.
- [10] DA SILVA J A T, SHEN M, YU X. Tissue culture and micropropagation of tree peony (*Paeonia suffruticosa* Andr.) [J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2012, 15(3): 159-168.
- [11] 王新, 成仿云, 钟原, 等. 凤丹牡丹鳞芽离体培养与快繁技术[J]. 林业科学, 2016, 52(5): 101-110.
- [12] 杨静萱, 吉文丽, 刘玲, 等. 株行距配置对油用牡丹‘凤丹’生长发育及产量的影响[J]. 干旱区资源与环境, 2017, 37(6): 202-208.
- [13] 王晓静, 马慧丽, 郭丽丽, 等. 种植密度对油用牡丹‘凤丹’形态性状和产量的影响[J]. 北方园艺, 2018(3): 101-108.
- [14] 张忠华, 唐中华, 杨逢建, 等. 两种主要油用牡丹光合特性及其微环境影响因子分析[J]. 植物研究, 2014, 34(6): 770-775.
- [15] ARNON D I. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* [J]. Plant Physiology, 1949, 24(1): 1-15.
- [16] 宋宏伟, 刘少华, 沈植国, 等. 不同栽培条件下油用牡丹种子产量及含油率[J]. 经济林研究, 2018, 36(1): 105-109.
- [17] KITAO M, UTSUGI H, KURAMOTO S, et al. Light-dependent photosynthetic characteristics indicated by chlorophyll fluorescence in five mangrove species native to Pohnpei Island, Micronesia [J]. Physiologia Plantarum, 2003, 117(3): 376-382.
- [18] 王信宏, 王月福, 赵长星, 等. 不同生育时期断根对花生光合特性及产量的影响[J]. 生态学报, 2015, 35(5): 1521-1526.
- [19] 张立宇, 董玉芝, 陈虹, 等. 核(桃)农间作系统小气候水平分布特征研究[J]. 新疆农业大学学报, 2009, 32(3): 5-10.
- [20] 高冠龙, 冯起, 张小由, 等. 植物叶片光合作用的气孔与非气孔限制研究综述[J]. 干旱区研究, 2018, 35(4): 929-937.
- [21] 彭晓邦, 张硕新. 商洛低山丘陵区农林复合生态系统光能竞争与生产力[J]. 生态学报, 2012, 32(9): 2692-2698.
- [22] 王灿, 杨建峰, 祖超, 等. 胡椒园间作槟榔对胡椒产量及养分利用的影响[J]. 热带作物学报, 2015, 36(7): 1191-1196.
- [23] 师帅. 间作及施肥对油用牡丹籽产量和品质的影响[D]. 合肥: 安徽农业大学林学与园林学院, 2016: 38.

(责任编辑: 郭严冬)

(上接第18页 Continued from page 18)

- [20] DENNY G C, ARNOLD M A. Taxonomy and nomenclature of baldcypress, pondcypress, and montezuma cypress: one, two, or three species? [J]. Horttechnology, 2007, 17(1): 125-127.
- [21] LICKY E B, WALKER G L. Population genetic structure of baldcypress (*Taxodium distichum* [L.] Rich. var. *distichum*) and pondcypress (*T. distichum* var. *imbricarium* [Nuttall] Croom): biogeographic and taxonomic implications [J]. Southeastern Naturalist, 2002, 1(2): 131-148.
- [22] 翟大才, 宣磊, 周琦, 等. 黄山地区马尾松和黄山松基于SSR分子标记的基因渐渗研究[J]. 分子植物育种, 2018, 16(14): 4614-4622.
- [23] MCMILLAN C. Differentiation in habitat response in *Taxodium distichum*, *Taxodium mucronatum*, *Platanus occidentalis*, and *Liquidambar styraciflua* from the United States and Mexico [J]. Vegetation, 1974, 29: 1-10.
- [24] LICKY E B, WATSON F D, WALKER G L. Differences in bark thickness among populations of baldcypress [*Taxodium distichum* (L.) Rich. var. *distichum*] and pondcypress [*T. distichum* var. *imbricarium* (Nuttall) Croom] [J]. Castanea, 2002, 67(1): 33-41.

(责任编辑: 郭严冬)