

基于 SRAP 标记的墨西哥落羽杉 优良单株的遗传多样性分析

周冬琴, 莫海波, 芦治国, 於朝广, 徐和宝, 殷云龙^①

[江苏省·中国科学院植物研究所(南京中山植物园), 江苏 南京 210014]

摘要: 采用 SRAP 标记方法, 分析了原产地及种植地不同的 18 个墨西哥落羽杉(*Taxodium mucronatum* Tenore) 优良单株的遗传多样性, 并根据遗传相似系数, 采用 UPGMA 法对它们的遗传关系进行了聚类分析。结果显示: 用 7 对引物组合从 18 个单株的总 DNA 中共扩增出 87 条带, 其中多态性条带 71 条, 多态性条带百分率为 81.6%。按照原产地和种植地可将 18 个单株分为 4 组, 它们的总体 Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数和基因分化系数分别为 0.229、0.355 和 0.479 9, 而基因流仅为 0.542, 说明各组间的基因交流较少。18 个单株间的遗传相似系数为 0.632 2~0.919 5, 平均值为 0.753 9。聚类分析结果显示: 18 个单株可分为 3 组, 其中 18 号和 14 号单株分别单独成组, 其余 16 个单株聚为 1 组。后者可进一步分为 8 个亚组: 1 号、7 号、12 号和 15 号单株各自单独成亚组; 2 号、3 号、5 号、9 号、11 号和 13 号单株聚为 1 个亚组; 4 号和 6 号单株、8 号和 17 号单株、10 号和 16 号单株分别聚为 3 个亚组。研究结果表明: 18 个优良单株间存在丰富的遗传变异, 但它们的遗传关系与原产地及种植地明显不相关。

关键词: 墨西哥落羽杉; 优良单株; SRAP 标记; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q946-33; S791.34 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2012)01-0036-06

Genetic diversity analysis of superior individuals of *Taxodium mucronatum* based on SRAP marker
ZHOU Dong-qin, MO Hai-bo, LU Zhi-guo, YU Chao-guang, XU He-bao, YIN Yun-long^① (Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2012, 21(1): 36-41

Abstract: Genetic diversity of eighteen superior individuals of *Taxodium mucronatum* Tenore from different origins and cultivating places was analyzed by SRAP marker method, and the genetic relationship among eighteen individuals was also analyzed by using UPGMA method based on genetic similarity coefficient. The results show that 87 bands are amplified from total DNA of eighteen superior individuals by seven pairs of primer combinations, in which, there are 71 polymorphic bands with the polymorphic band percentage of 81.6%. Eighteen individuals are divided into four groups according to origin and cultivating place, their total Nei's gene diversity index, Shannon information index and genetic differentiation coefficient are 0.229, 0.355 and 0.479 9, respectively, but their gene flow is only 0.542, which shows that there is a little gene intercommunion among different groups. Genetic similarity coefficient among eighteen individuals is 0.632 2-0.919 5 with an average value of 0.753 9. The result of cluster analysis shows that eighteen superior individuals are divided into three groups, in which, individuals of No. 18 and No. 14 are independent respectively, and other sixteen individuals form a group. The latter is further divided into eight sub-groups, in which, individuals of No. 1, No. 7, No. 12 and No. 15 are respectively independent, individuals of No. 2, No. 3, No. 5, No. 9, No. 11 and No. 13 form a sub-group, and every two individuals of No. 4 and No. 6, No. 8 and No. 17, No. 10 and No. 16 form three sub-groups, respectively. It is suggested that there is rich genetic diversity among eighteen superior individuals, while their genetic relationship is not obviously related to origin and cultivating place.

收稿日期: 2011-02-28

基金项目: 江苏省林业三项工程项目[lysx(2007)02]

作者简介: 周冬琴(1979—), 女, 浙江临海人, 博士, 助理研究员, 主要从事林木生态和遗传育种方面的研究。

^①通信作者 E-mail: yiny1066@sina.com

Key words: *Taxodium mucronatum* Tenore; superior individual; SRAP marker; genetic diversity; cluster analysis

墨西哥落羽杉(*Taxodium mucronatum* Tenore)为杉科(Taxodiaceae)落羽杉属(*Taxodium* Rich.)植物。20世纪70年代,同属植物落羽杉[*T. distichum* (L.) Rich.]和池杉(*T. ascendens* Brongn.)大量应用于中国水网地区的绿化,随即墨西哥落羽杉的应用也逐渐引起人们的重视。20世纪60年代叶培忠教授开展了墨西哥落羽杉(♀)与柳杉(♂)的杂交育种研究^[1-2];20世纪70年代开始,江苏省·中国科学院植物研究所针对中国东部沿海滩涂面积广和树种资源缺乏的实际情况,开展了落羽杉属树种速生、耐湿、耐盐碱品种的选育以及落羽杉(♀)与墨西哥落羽杉(♂)种间杂交等工作,并培育出‘中山杉302’和‘中山杉118’等新品种^[3],几十年的品比试验、中间示范试验和江浙皖多点区域试验均表明这些杂种无性系具有观赏价值高、速生、耐湿、耐盐碱、抗风力强、病虫害少、材质优良和适应性广等特点^[4-7]。为了进一步丰富墨西哥落羽杉种质资源,从2003年开始作者所在的研究小组先后从美国引进墨西哥落羽杉种源3批,并筛选出17个墨西哥落羽杉优良单株。

杂交育种是通过不同个体间杂交创造变异和选育新品种的方法。杂交育种的物质基础是种质差异,只有杂交亲本间具有较多、较大的个体差异,才能创造出更多的变异。因此,育种材料遗传多样性的分析对于杂交育种亲本选择有着重要的理论指导意义。分子标记技术的发展为植物遗传多样性分析提供了可靠的技术手段,目前杉木遗传育种研究工作中常用的分子标记有RAPD^[8-10]、RFLP^[11]和ISSR^[12-13]等,但都存在一些不足,如:RAPD标记的重复性和稳定性较差,检测位点不多;RFLP方法费时、费力,需要进行DNA多种酶切、转膜以及探针的制备等多个步骤,且仅能够对基因组单拷贝序列进行鉴定;ISSR分析方法在PCR扩增时需要一定时间摸索最适反应条件并且呈显性遗传标记,不能区分显性纯合基因型和杂合基因型。

SRAP(sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性)标记是21世纪初诞生的新型DNA分子标记,由美国加州大学Li和Quiros开发^[14]。该方法利用独特的引物设计方法对编码基因的开放阅读框(ORF)区域进行设计,其多态性因个

体内内含子有无、大小及启动子与间隔长度不等而异,较AFLP和RAPD等标记更能反映表型的多样性及进化史。Ferriol等^[15]利用11对SRAP引物组合分析了47份南瓜[*Cucurbita moschata* (Duch. ex Lam.) Duch. ex Poiret]种质,多态性达66.2%;Budak等^[16]利用SRAP分析了53种野牛草[*Buchloe dactyloides* (Nutt.) Engelm.]的遗传多样性,多态性高达95%。於朝广等^[17]利用48对SRAP引物对亲本落羽杉与墨西哥落羽杉进行多态性分析,筛选出29对多态性引物,其中的1对引物可对落羽杉与墨西哥落羽杉的4个杂交后代进行杂种真实性鉴定。因而,利用SRAP标记可有效检测种质资源的遗传多样性。

本研究旨在利用SRAP标记对墨西哥落羽杉优良单株的遗传多样性进行评价,为落羽杉属杂交育种工作中优良亲本的选择提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试18个单株均为墨西哥落羽杉的优良单株。1~8号单株选自2003年引自美国加州的种源(原产墨西哥),于2004年分别种植于南京中山植物园实验苗圃和浙江宁波永丰园林绿化建设有限公司苗圃,其中1~6号单株选自浙江群体,7~8号单株选自南京中山植物园群体;9~17号单株选自2005年由美国奥斯汀州立大学提供的种源(原产美国新墨西哥州),于2006年播种于南京中山植物园实验苗圃;18号单株来源于南京中山植物园繁殖圃内的墨西哥落羽杉大树,为南京本地产墨西哥落羽杉(来源于南京东南大学校园内)的扦插后代。

参照文献^[18]的方法确定优良单株。通过简单的目测比较确定10棵候选树,以候选树为中心,划定面积15 m×15 m的样方10个,随机测量样方十字线上30棵树的株高、胸径和冠幅并计算平均值和标准差,当候选树的指标位于该基本群体相应指标平均值加0.5个标准差以上时则为优良单株。

1.2 方法

1.2.1 总DNA提取及检测 取新鲜嫩叶3~5 g置于液氮中快速研磨,采用CTAB法^[19]提取总DNA并

检测其质量和浓度,然后溶解于 TE 缓冲液中,贮藏于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中备用。

1.2.2 SRAP 引物筛选、扩增条件及扩增产物检测
参考 Li 等^[14]发表的引物序列筛选 SRAP 引物,引物合成由上海英骏生物技术有限公司完成。选取 15 条正向引物和 5 条反向引物(表 1)组合成 45 对引物,从中筛选出 7 对扩增条带清晰、多态性丰富的引物组合对 18 个优良单株总 DNA 进行 PCR 扩增。

表 1 用于墨西哥落羽杉优良单株总 DNA SRAP 标记分析的引物序列

Table 1 Primer sequences used for SRAP marker analysis of total DNA from superior individuals of *Taxodium mucronatum* Tenore

引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence	引物 Primer	5'→3'序列 5'→3' sequence
Me06	TGAGTCCAAACCGGAGA	Me16	TGAGTCCAAACCGGGAC
Me07	TGAGTCCAAACCGGACG	Me17	TGAGTCCAAACCGGGTA
Me08	TGAGTCCAAACCGGAAA	Me18	TGAGTCCAAACCGGGGT
Me09	TGAGTCCAAACCGGAAC	Me19	TGAGTCCAAACCGGCAG
Me10	TGAGTCCAAACCGGAAT	Me20	TGAGTCCAAACCGGCAT
Me11	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em07	GACTGCGTACGAATTGAG
Me12	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em08	GACTGCGTACGAATTGCC
Me13	TGAGTCCAAACCGGTTG	Em09	GACTGCGTACGAATTTCAT
Me14	TGAGTCCAAACCGGTGT	Em10	GACTGCGTACGAATTTCAT
Me15	TGAGTCCAAACCGGTCA	Em11	GACTGCGTACGAATTAAT

采用 Mastercycler ep PCR 仪(德国 Eppendorf 公司)进行扩增反应。反应体系总体积 $10\text{ }\mu\text{L}$,包括 20 ng 模板 DNA、 $1\times\text{PCR}$ 缓冲液、 $2.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{Mg}^{2+}$ 、 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{dNTPs}$ 、 $0.2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物和 0.5 U Taq DNA 聚合酶。反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , $35\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min , 5 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min , $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 补齐 5 min 。扩增产物于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

扩增产物在 DYY-8B 型电泳仪(江苏南达生物技术开发公司)上采用质量体积分数 10% 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测,电压 240 V ,电泳时间 2 h 。电泳结束后参照文献[20]采用快速银染法显色:先用含体积分数 10% 乙醇和体积分数 0.5% 冰乙酸的混合溶液固定 12 min ,用质量体积分数 0.2% AgNO_3 溶液银染 12 min ,水洗后用含质量体积分数 1.5% NaOH 、体积分数 0.4% 甲醛和质量体积分数 0.02% $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 的混合溶液显色 $5\sim 10\text{ min}$ 至谱带清晰,自来水冲洗后在 Tanon-2500 全自动数码凝胶图像分析系统(上海天能科技有限公司)中观察并拍照。

1.3 数据处理

根据相同迁移率条带的有无进行统计,有条带的记为“1”、无条带的记为“0”,形成条带的二元数据矩阵。在假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,采用 POPGENE v1.32 软件计算多态性条带数、Nei's 基因多样性指数、Shannon 信息指数和遗传相似系数等;采用 UPGMA 分子系统聚类法由 MEGA 3.1 软件生成聚类图。

2 结果和分析

2.1 SRAP 扩增结果分析

选用 18 号优良单株对所有引物组合进行初筛,有 30 对引物组合有清晰的扩增条带;再用 1 号、3 号、9 号、12 号和 15 号单株对初筛的 30 对引物组合进行复筛,筛选出 19 对具有清晰条带的引物组合;然后采用这 19 对引物组合对 18 个优良单株进行扩增,筛选出 7 对反应稳定、重复性好的引物组合(表 2)用于 18 个优良单株的 SRAP 分析。

表 2 用于墨西哥落羽杉优良单株 SRAP 分析的引物组合及扩增结果

Table 2 Primer combinations used for SRAP analysis of superior individuals of *Taxodium mucronatum* Tenore and amplification result

引物组合 Primer combination	条带总数 Total number of band	多态性条带数 Number of polymorphic band	多态性条带百分率/% Percentage of polymorphic band
Me09+Em10	21	17	81.0
Me18+Em07	11	8	72.7
Me12+Em07	17	13	76.5
Me08+Em07	9	9	100.0
Me17+Em08	11	9	81.8
Me19+Em08	9	9	100.0
Me18+Em08	9	6	66.7
总计 Total	87	71	81.6

墨西哥落羽杉 18 个优良单株的 SRAP 扩增结果见表 2。由表 2 可见:7 对引物组合共扩增出 87 条带,多态性条带 71 条,多态性条带百分率为 81.6%。其中用引物组合 Me09+Em10 扩增出的条带数和多态性条带数均最多,分别达 21 和 17 条;用引物组合 Me08+Em07、Me19+Em08 和 Me18+Em08 扩增出的条带数最少,均只有 9 条;用引物组合 Me18+Em08 扩增出的多态性条带数最少,仅 6 条。引物组合 Me08+Em07 和 Me19+Em08 扩增出的多态性条带百分率则达 100.0%;引物组合 Me18+Em08 扩增出的多态性

条带百分率最低, 仅 66.7%。

2.2 墨西哥落羽杉优良单株的遗传差异分析

根据引种地和种植地将 18 个墨西哥落羽杉优良单株分为 4 组并采用 SRAP 标记进行遗传多样性分析, 结果见表 3。9~17 号优良单株的多态性条带百分率 (PPB)、观察有效等位基因数 (na)、有效等位基

表 3 基于 SRAP 标记的 18 个墨西哥落羽杉优良单株的遗传多样性分析结果¹⁾
Table 3 Analysis result of genetic diversity of eighteen superior individuals of *Taxodium mucronatum* Tenore based on SRAP marker¹⁾

单株编号 ²⁾ No. of individual ²⁾	NPB	PPB/%	na	ne	H	I
1-6	46	52.9	1.529	1.287	0.171	0.260
7,8	22	25.3	1.253	1.179	0.105	0.153
9-17	56	64.4	1.644	1.369	0.214	0.322
18	-	-	-	-	-	-
总计 Total	71	81.6	1.816	1.376	0.229	0.355

¹⁾ NPB: 多态性条带数 Number of polymorphic band; PPB: 多态性条带百分率 Percentage of polymorphic band; na: 观察有效等位基因数 Observed effective number of allele; ne: 有效等位基因数 Effective number of allele; H: Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index; I: Shannon 信息指数 Shannon information index.

²⁾ 1-6: 原产墨西哥, 种植于中国江苏南京 Originated in Mexico and cultivated at Nanjing in Jiangsu of China; 7,8: 原产墨西哥, 种植于中国浙江宁波 Originated in Mexico and cultivated at Ningbo in Zhejiang of China; 9-17: 原产美国, 种植于中国江苏南京 Originated in U. S. A. and cultivated at Nanjing in Jiangsu of China; 18: 种植于中国江苏南京 Cultivated at Nanjing in Jiangsu of China.

因数 (ne)、Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon 信息指数 (I) 最高, 分别为 64.4%、1.644、1.369、0.214 和 0.322; 1~6 号优良单株的 PPB、na、ne、H 和 I 值居中, 分别为 52.9%、1.529、1.287、0.171 和 0.260; 7 号和 8 号 2 个优良单株的 PPB、na、ne、H 和 I 值均最低, 分别为 25.3%、1.253、1.179、0.105 和 0.153; 18 号单株单独成组, 无法计算其 PPB、na、ne、H 和 I 值。18 个优良单株总体的 PPB、na、ne、H 和 I 值分别为 81.6%、1.816、1.376、0.229 和 0.355。

对 4 组 18 个优良单株的遗传分化分析结果显示: 基因分化系数为 0.479 9, 即有 47.99% 的遗传变异存在于群体间; 种水平的基因多样性为 0.235; 组内的基因多样性为 0.122; 基因流为 0.542, 表明各组间的基因交流比较少。

2.3 墨西哥落羽杉优良单株的聚类分析

墨西哥落羽杉 18 个优良单株间的遗传相似系数和遗传距离见表 4。18 个优良单株间的遗传相似系数为 0.632 2~0.919 5, 平均值为 0.753 9。其中, 3 号和 9 号单株的遗传相似度最大, 遗传相似系数为 0.919 5; 5 号和 18 号以及 7 号和 10 号单株间的遗传相似系数均最小, 为 0.632 2, 而 18 号单株与另外 17 个单株的遗传相似系数均较低, 遗传差异较大。

根据 18 个优良单株的遗传相似系数, 采用

表 4 墨西哥落羽杉 18 个优良单株间的遗传相似系数和遗传距离¹⁾

Table 4 Genetic similarity coefficient and genetic distance among eighteen superior individuals of *Taxodium mucronatum* Tenore¹⁾

单株编号 ²⁾ No. of individual ²⁾	各单株间的遗传相似系数和遗传距离 Genetic similarity coefficient and genetic distance among different individuals								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1	-	0.816 1	0.793 1	0.747 1	0.758 6	0.781 6	0.747 1	0.747 1	0.804 6
2	0.203 2	-	0.862 1	0.747 1	0.804 6	0.758 6	0.770 1	0.839 1	0.827 6
3	0.231 8	0.148 4	-	0.724 1	0.873 6	0.781 6	0.724 1	0.862 1	0.919 5
4	0.291 5	0.291 5	0.322 8	-	0.689 7	0.804 6	0.770 1	0.701 1	0.689 7
5	0.276 3	0.217 4	0.135 2	0.371 6	-	0.724 1	0.712 6	0.781 6	0.862 1
6	0.246 4	0.276 3	0.246 4	0.217 4	0.322 8	-	0.735 6	0.735 6	0.724 1
7	0.291 5	0.261 2	0.322 8	0.261 2	0.338 8	0.307 0	-	0.747 1	0.712 6
8	0.291 5	0.175 4	0.148 4	0.355 0	0.246 4	0.307 0	0.291 5	-	0.804 6
9	0.217 4	0.189 2	0.083 9	0.371 6	0.148 4	0.322 8	0.338 8	0.217 4	-
10	0.291 5	0.291 5	0.175 4	0.291 5	0.246 4	0.276 3	0.458 6	0.291 5	0.217 4
11	0.231 8	0.148 4	0.175 4	0.261 2	0.161 8	0.276 3	0.231 8	0.175 4	0.189 2
12	0.276 3	0.189 2	0.246 4	0.246 4	0.355 0	0.231 8	0.276 3	0.246 4	0.291 5
13	0.261 2	0.175 4	0.175 4	0.322 8	0.217 4	0.338 8	0.322 8	0.231 8	0.189 2
14	0.338 8	0.246 4	0.307 0	0.338 8	0.422 9	0.291 5	0.371 6	0.338 8	0.291 5
15	0.322 8	0.261 2	0.291 5	0.322 8	0.405 5	0.338 8	0.231 8	0.322 8	0.276 3
16	0.261 2	0.261 2	0.203 2	0.322 8	0.246 4	0.338 8	0.322 8	0.322 8	0.246 4
17	0.291 5	0.231 8	0.231 8	0.355 0	0.307 0	0.307 0	0.322 8	0.175 4	0.276 3
18	0.405 5	0.371 6	0.371 6	0.338 8	0.458 6	0.291 5	0.405 5	0.371 6	0.388 4

续表 4 Table 4 (Continued)

单株编号 ²⁾ No. of individual ²⁾	各单株间的遗传相似系数和遗传距离 Genetic similarity coefficient and genetic distance among different individuals								
	10	11	12	13	14	15	16	17	18
1	0.747 1	0.793 1	0.758 6	0.770 1	0.712 6	0.724 1	0.770 1	0.747 1	0.666 7
2	0.747 1	0.862 1	0.827 6	0.839 1	0.781 6	0.770 1	0.770 1	0.793 1	0.689 7
3	0.839 1	0.839 1	0.781 6	0.839 1	0.735 6	0.747 1	0.816 1	0.793 1	0.689 7
4	0.747 1	0.770 1	0.781 6	0.724 1	0.712 6	0.724 1	0.724 1	0.701 1	0.712 6
5	0.781 6	0.850 6	0.701 1	0.804 6	0.655 2	0.666 7	0.781 6	0.735 6	0.632 2
6	0.758 6	0.758 6	0.793 1	0.712 6	0.747 1	0.712 6	0.712 6	0.735 6	0.747 1
7	0.632 2	0.793 1	0.758 6	0.724 1	0.689 7	0.793 1	0.724 1	0.724 1	0.666 7
8	0.747 1	0.839 1	0.781 6	0.793 1	0.712 6	0.724 1	0.724 1	0.839 1	0.689 7
9	0.804 6	0.827 6	0.747 1	0.827 6	0.747 1	0.758 6	0.781 6	0.758 6	0.678 2
10	-	0.770 1	0.689 7	0.747 1	0.666 7	0.701 1	0.816 1	0.747 1	0.735 6
11	0.261 2	-	0.781 6	0.862 1	0.712 6	0.793 1	0.793 1	0.816 1	0.666 7
12	0.371 6	0.246 4	-	0.735 6	0.770 1	0.758 6	0.712 6	0.758 6	0.724 1
13	0.291 5	0.148 4	0.307 0	-	0.735 6	0.747 1	0.747 1	0.770 1	0.643 7
14	0.405 5	0.338 8	0.261 2	0.307 0	-	0.758 6	0.666 7	0.758 6	0.701 1
15	0.355 0	0.231 8	0.276 3	0.291 5	0.276 3	-	0.724 1	0.747 1	0.643 7
16	0.203 2	0.231 8	0.338 8	0.291 5	0.405 5	0.322 8	-	0.678 2	0.666 7
17	0.291 5	0.203 2	0.276 3	0.261 2	0.276 3	0.291 5	0.388 4	-	0.689 7
18	0.307 0	0.405 5	0.322 8	0.440 6	0.355 0	0.440 6	0.405 5	0.371 6	-

¹⁾ 横线上方的数据为遗传相似系数, 横线下方的数据为遗传距离 Datums above horizontal lines are genetic similarity coefficient, and those below horizontal lines are genetic distance.

²⁾ 1-6: 原产墨西哥, 种植于中国江苏南京 Originated in Mexico and cultivated at Nanjing in Jiangsu of China; 7, 8: 原产墨西哥, 种植于中国浙江宁波 Originated in Mexico and cultivated at Ningbo in Zhejiang of China; 9-17: 原产美国, 种植于中国江苏南京 Originated in U. S. A. and cultivated at Nanjing in Jiangsu of China; 18: 种植于中国江苏南京 Cultivated at Nanjing in Jiangsu of China.

UPGMA 法进行聚类分析, 结果见图 1。由图 1 可见: 在遗传相似系数 0.70 处可以把 18 个单株分为 3 组: 18 号和 14 号单株分别单独成组; 其余的 16 个单株共同聚为 1 组。在遗传相似系数 0.80 处又可把 16 个单株进一步分为 8 个亚组: 1 号、7 号、12 号和 15 号单株各自单独成亚组, 2 号、3 号、5 号、9 号、11 号和 13 号单株聚为 1 个亚组, 4 号和 6 号单株、8 号和 17 号单株、10 号和 16 号单株各自聚为 1 个亚组。

3 讨论和结论

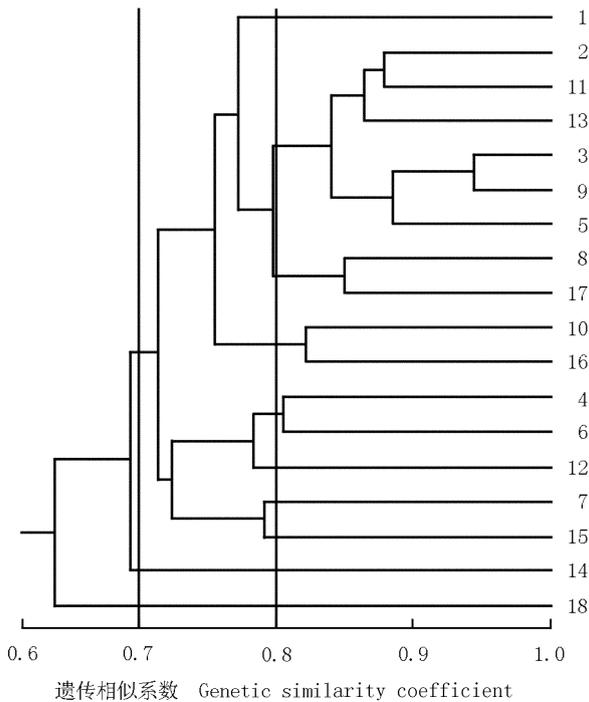
由于落羽杉属树种具有干型直、材质好、耐盐碱和耐水湿等优良特点, 自引入中国以来一直倍受林学界的关注。为培育满足国内生态环境建设需求的树种, 江苏省·中国科学院植物研究所持续进行了落羽杉属种间杂交的研究工作^[21-23], 培育出‘中山杉 302’、‘中山杉 401’、‘中山杉 405’、‘中山杉 406’和‘中山杉 407’等新品种^[3, 24]。随着落羽杉属杂交育种工作的进一步深入, 需要不断丰富杂交亲本的遗传多样性, 为此作者所在研究中心先后从美国引进墨西哥落羽杉种源 3 批。为了明确现有墨西哥落羽杉的

遗传多样性状况, 作者通过基因组总 DNA 的 SRAP 标记对 18 个墨西哥落羽杉优良单株进行了遗传分析, 结果显示: 18 个墨西哥落羽杉优良单株的 Nei's 基因多样性指数为 0.229, Shannon 信息指数为 0.355, 遗传相似系数为 0.632 2~0.919 5, 与周玉珍等^[10]利用 RAPD 标记对 53 个墨西哥落羽杉优良无性系进行的遗传分析结果类似。说明引种可以有效丰富国内现有墨西哥落羽杉种质资源的遗传多样性。

在供试的 18 个优良单株中, 18 号单株为目前国内树龄最大的 1 株墨西哥落羽杉的无性系后代, 存在生理年龄老化的问题。聚类分析结果表明: 目前新筛选出的优良单株(1~17 号优良单株)与 18 号优良单株间的遗传差异较大, 这为选配新的杂交组合、培育优良品种及创造优良变异类型奠定了遗传基础。

根据聚类分析结果可将 18 个单株分为 3 组 8 亚组, 每个亚组中的单株遗传关系均较近, 因此在选配杂交组合时可以选择遗传关系较远的单株, 以避免杂交亲本单一等问题, 从而在有限的土地资源 and 人力资源条件下创造更多的优良杂交组合。

18 个优良单株的聚类分析结果与其引种地和种植地的相关性不明显, 这可能与本研究中优良单株的



1-6: 原产墨西哥, 种植于中国江苏南京 Originated in Mexico and cultivated at Nanjing in Jiangsu of China; 7,8: 原产墨西哥, 种植于中国浙江宁波 Originated in Mexico and cultivated at Ningbo in Zhejiang of China; 9-17: 原产美国, 种植于中国江苏南京 Originated in U. S. A. and cultivated at Nanjing in Jiangsu of China; 18: 种植于中国江苏南京 Cultivated at Nanjing in Jiangsu of China.

图1 18个墨西哥落羽杉优良单株的UPGMA聚类图
Fig. 1 UPGMA cluster dendrogram of eighteen superior individuals of *Taxodium mucronatum* Tenore

选择和引物的选择有关。本实验筛选出的引物组合数较少,对研究结果有一定的影响,因此,应进一步扩大引物筛选的范围,对墨西哥落羽杉亲本和杂交墨西哥落羽杉进行更为精确的遗传分析。

参考文献:

[1] 中国树木志编委会. 中国主要树种造林技术:上册[M]. 北京: 农业出版社, 1978.

[2] 陈永辉, 王名金, 伍寿彭. 落羽杉属的引种和选育[J]. 江苏林业科技, 1988, 15(2): 43-47.

[3] 陈永辉, 伍寿彭, 王名金, 等. 中山杉302和401无性系在碱地上的生长和适应性的初步研究[J]. 江苏林业科技, 1989, 16(3): 14-18.

[4] 陈永辉, 伍寿彭, 殷云龙, 等. 江苏滨海盐碱地中山杉造林推广试验[J]. 江苏林业科技, 1996, 23(4): 18-22.

[5] 殷云龙, 陈永辉. 中山杉与池杉、落羽杉和水杉对比造林的调查和评价[J]. 植物资源与环境, 1997, 6(3): 23-28.

[6] 虞华强, 费本华, 赵荣军, 等. 中山杉和落羽杉木材解剖性质研究[J]. 林业科学研究, 2007, 20(2): 213-217.

[7] 於朝广, 殷云龙. 落羽杉属树木间杂交育种研究进展[J]. 江

苏林业科技, 2008, 35(2): 39-46.

[8] 陈云鹏, 潘士华, 张建军, 等. 利用RAPD检测技术推测杂交落羽杉群落间的亲缘关系[J]. 复旦学报:自然科学版, 2002, 41(6): 641-646.

[9] 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.

[10] 周玉珍, 李火根, 张燕梅, 等. 墨西哥落羽杉无性系RAPD指纹图谱的构建[J]. 南京林业大学学报:自然科学版, 2006, 30(5): 29-33.

[11] LING Y, LU W F, LU F, et al. PCR-RFLP and AP-PCR of *rbcL* and ITS of rDNA show that *Taxodiomeria peizhongii* (*Taxodium* × *Cryptomeria*) is not an intergeneric hybrid [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2006, 48(4): 468-472.

[12] 袁建国, 邱英雄, 余久华, 等. 百山祖冷杉的ISSR分析优化和遗传多样性初步研究[J]. 浙江大学学报:农业与生命科学版, 2005, 31(3): 277-282.

[13] 张蕊, 周志春, 金国庆, 等. 南方红豆杉种源遗传多样性和遗传分化[J]. 林业科学, 2009, 45(1): 50-56.

[14] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2001, 103(2/3): 455-461.

[15] FERRIOL M, PICÓ B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(2): 271-282.

[16] BUDAK H, SHEARMAN R C, GAUSSOIN R E, et al. Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of turfgrass species [J]. HortScience, 2004, 39: 955-958.

[17] 於朝广, 殷云龙, 徐建华. 用SRAP标记鉴定落羽杉属植物杂种[J]. 林业科学, 2009, 45(2): 142-146.

[18] 国家林业局编委会. 全国森林培育技术标准汇编:种子苗木卷[S]. 北京: 中国标准出版社, 2003: 347-350.

[19] PATERSON A H, BRUBAKER C L, WENDEL J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 122-127.

[20] 袁菊红, 权俊萍, 胡绵好, 等. 石蒜SRAP-PCR扩增体系的建立与优化[J]. 植物资源与环境学报, 2007, 16(4): 1-6.

[21] CREECH D, YIN Y L. *Taxodium* × 'Nanjing Beauty': a new landscape plant for the south [J]. HortScience, 2003, 38: 1292-1293.

[22] 殷云龙, 尹晓明, 於朝广, 等. 中山杉302回交一代的早期选育[J]. 植物资源与环境学报, 2003, 12(2): 22-27.

[23] 尹晓明, 殷云龙, 陈永辉. 中山杉302和墨西哥落羽杉及其回交一代的同工酶分析[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(3): 59-61.

[24] 於朝广, 殷云龙, 徐建华. 落羽杉属4个新品种[J]. 林业科学, 2011, 47(5): 181-182.