

DOI:10.12171/j.1000-1522.20190413

基于荧光 SSR 标记的毛白杨核心种质构建

毛秀红¹ 朱士利² 李善文¹ 华辉³ 田书勇⁴ 仲伟国¹ 董玉峰¹ 安新民⁵

(1. 山东省林木遗传改良重点实验室, 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014; 2. 临沂市森林湿地保护中心林场站, 山东 临沂 276000;
3. 郯城县国有何庄林场, 山东 郯城 274700; 4. 冠县国有毛白杨林场, 山东 冠县 252000;
5. 北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083)

摘要:【目的】研究毛白杨核心种质的取样策略, 在进行相应的遗传分析基础上, 构建核心种质, 分析其遗传多样性, 为毛白杨种质资源库建设、引种和新品选育提供科学依据, 亦为其他树种核心种质构建提供参考。【方法】基于 16 对荧光 SSR 引物, 利用毛细管电泳技术分析 272 份毛白杨和白杨杂种种质不同取样比例的遗传多样性参数。根据期望杂合度, 计算每个样品对总体遗传多样性的贡献值, 然后对所有样品根据贡献值从大到小进行排序。通过比较贡献率最高的前 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20% 和 15% 取样比例获得的平均有效等位基因数(N_e)、平均 Shannon 信息指数(I)、平均期望杂合度(H_e)等, 分析核心种质的代表性, 确定其合适的取样比例。【结果】随着取样比例的降低, N_e 、 I 和 H_e 值均在升高, 均大于原始种质相应数值, 而且 H_e 值均大于 0.5, 表明具有丰富的遗传多样性, 而原始种质的 H_e 值小于 0.5。按照 25% 取样比例, 得到前 68 名种质, 其中包含 18 份杂种种质以及所有省份选出的部分优异种质。所得到的 N_e 、 I 和 H_e 分别是 2.761、1.094 和 0.539, 均大于原始种质的相应值 2.075、0.825 和 0.432。 t 检测结果表明, 核心种质与原始种质的遗传多样性无显著差异, 表明这 68 份种质在遗传多样性方面具有可靠的代表性, 可以作为核心种质。北京的种质与河北的种质遗传一致性最高, 为 0.997; 与山西次之, 为 0.990。【结论】毛白杨核心种质的最佳取样比例是 25%, 最佳取样范围为 20%~40%, 如果种质资源数目较大, 可以适当降低至 15%, 如果基数较小, 可以升高至 45%。 H_e 、 N_e 、 I 等均表明这些核心种质具有丰富的遗传多样性。杂种种质遗传变异丰富, 聚合了亲本的优良等位基因, 首次从分子水平证明了杂种种质是毛白杨遗传改良的重要育种资源。建议相关部门或者育种者要高度重视白杨杂种种质的收集、保存和再利用。

关键词: 毛白杨; SSR; 分子标记; 遗传多样性; 核心种质

中图分类号: S718.46; S718.49 **文献标志码:** A **文章编号:** 1000-1522(2020)07-0040-08

引文格式: 毛秀红, 朱士利, 李善文, 等. 基于荧光 SSR 标记的毛白杨核心种质构建 [J]. 北京林业大学学报, 2020, 42(7): 40-47. Mao Xiuhong, Zhu Shili, Li Shanwen, et al. Core germplasm construction of *Populus tomentosa* based on the fluorescent SSR markers [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2020, 42(7): 40-47.

Core germplasm construction of *Populus tomentosa* based on the fluorescent SSR markers

Mao Xiuhong¹ Zhu Shili² Li Shanwen¹ Hua Hui³ Tian Shuyong⁴

Zhong Weiguo¹ Dong Yufeng¹ An Xinmin⁵

(1. Key Laboratory for Forestry Tree Genetic Improvement of Shandong Province, Shandong Academy of Forestry, Jinan 250014, Shandong, China;

2. Forest Farm Station of Forest Wetland Protection Center in Linyi City, Linyi 276000, Shandong, China;

3. State-Owned Hezhuang Forest Farm in Yuncheng County, Yuncheng 274700, Shandong, China;

4. State-Owned Chinese White Poplar Forest Farm in Guanxian County, Guanxian 252000, Shandong, China;

5. School of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

收稿日期: 2019-10-29 **修回日期:** 2020-02-27

基金项目: 林木遗传育种国家重点实验室开放基金项目(K2020203), 林业科技发展项目(KJZXZZ2019015、KJZXSA202003), 山东省林业科技创新项目。

第一作者: 毛秀红, 博士, 高级工程师。主要研究方向: 林木遗传育种。Email: xiuhongmao@163.com 地址: 250014 山东省济南市历下区文化东路 42 号山东省林业科学研究院。

责任作者: 李善文, 博士, 研究员。主要研究方向: 林木遗传育种。Email: lishanwen66@163.com 地址: 同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

Abstract: [Objective] To study the sampling proportion and to determine the sampling strategy on the basis of corresponding genetic analysis, analyzing the genetic diversity and constructing the core germplasm of *P. tomentosa* can provide molecular foundation for the introduction, genetic breeding, collection and preservation of *Leuce* germplasm resources. It also can provide reference for the core germplasm construction of other tree species. [Method] Based on 16 pairs of fluorescent SSR primers, the genetic diversity of 272 accessions of *P. tomentosa* and poplar hybrid was analyzed by capillary electrophoresis. Based on expected heterozygosity data, all samples were ranked according to their contribution to the overall genetic diversity. The sampling ratios from top to low were 50%, 45%, 40%, 35%, 30%, 25%, 20% and 15%. The representativeness of core germplasm was analyzed by comparing the average effective allele number N_e , the average Shannon information index I and the average expected heterozygosity H_e , et al. Then the appropriate sampling proportion was determined. [Result] With the decrease of sampling proportion, the values of N_e , I and H_e were all increasing, which were all greater than the corresponding values of the original germplasm. The values of H_e were all greater than 0.5, indicating abundant genetic diversity, while the values of the original germplasms were less than 0.5. According to 25% sampling ratio, the first 68 germplasms were obtained, including 18 hybrid germplasms and some excellent germplasms selected by all provinces. The N_e , I and H_e values were 2.761, 1.094 and 0.539, respectively, which were all higher than the corresponding values of the original germplasm 2.075, 0.825 and 0.432. It was showed by the t -test that there was no significant difference between the genetic diversity of the core germplasm and the original germplasm resources, indicating that these 68 germplasms have a very reliable representation in terms of genetic diversity and can be used as the core germplasm. The genetic consistency between Beijing germplasm and Hebei germplasm was 0.997, followed by Shanxi of 0.990. [Conclusion] The best sampling proportion of core germplasm of *P. tomentosa* is 25%, and the best sampling range is 20%–40%. If the number of germplasm resources is large, it can be reduced to 15%; if the base is small, it can be increased to 45%. H_e , N_e , I , etc. all indicate that the above core germplasm has abundant genetic diversity. The genetic variation of hybrid germplasm is rich, which aggregates the good alleles of parents. It is proved at the molecular level that hybrid germplasm is an important breeding resource for genetic improvement of *P. tomentosa*. We suggest that relevant departments or breeders should attach great importance to the collection, preservation and reuse of poplar hybrid germplasm.

Key words: *Populus tomentosa*; SSR; molecular marker; genetic diversity; core germplasm

毛白杨(*Populus tomentosa*)是我国重要的乡土树种,具有树干通直圆满、抗干旱、抗病虫、材质优良、树形美观等优良特点,被广泛应用于我国城乡绿化、生态防护林及工业用材林建设中^[1-2]。中国具有丰富的毛白杨种质资源,育种研究者如何从中选择出合适的育种材料,既减少工作量,又不至于缩减遗传基础,是目前亟待解决的科学问题。林木种质资源包括森林植物的栽培种、野生种的繁殖材料以及利用上述繁殖材料人工创造的遗传材料,是选育新品种的基础材料,是国家重要的基础战略资源。因此全国各个省、市、自治区越来越重视林木种质资源的收集、保护和保存。由于土地数量有限,租地成本日益攀升,劳务费上涨,所以利用一些技术手段筛选并构建核心种质,具有重要的现实意义。

核心种质是一个作物种质资源库中的具有最小遗传重复的子集,且能代表该种质库的遗传多样性^[3]。

构建核心种质的标准是筛选出最少的遗传资源来代表整个原始种群的遗传多样性,能够最大限度地保存原始种群的遗传多样性^[4]。核心种质构建的依据是在收集表型数据或(和)分子数据的基础上,利用表型或(和)遗传多样性参数,确定取样策略,然后进行统计学检验,如果与原始种质差异不显著,则表明具有代表性。目前 Razieh 等^[5]基于 18 个形态学标记从所收集的 104 份伊朗核桃种质中筛选出 27 份核心种质。钟永达等^[6]基于 4 个形态学标记从所收集的 872 份中国樟树种质中筛选出 217 份核心种质。形态学标记简单、直观、易于区分种质资源,然而易受到环境影响而产生一些非遗传变异^[7],另外观测记录表型数据需要耗费大量的时间和人力,而且受人为的主观性影响较大。而分子标记是 DNA 水平遗传多态性的直接反映,不受环境、季节、人为等因素影响,被广泛应用于揭示林木种内的遗传多样

性^[8-11]。前人在林木分子标记方面取得了一些研究结果,但是所用标记,大部分是显性标记。简单重复序列(SSR)标记是共显性标记,具有多态性高、杂合度大和遗传多样性检测效果高等优点。Liang等^[12]基于SSR标记构建了55份苹果(*Malus domestica*)核心种质。Wang等^[13]基于EST-SSR标记成功构建了荔枝(*Litchi chinensis*)的核心种质。Liu等^[14]利用19对SSR标记从251份降香黄檀(*Dalbergia hupeana*)种质中成功筛选出31份核心种质。传统SSR标记是使用聚丙烯酰胺凝胶电泳,但是不如荧光SSR标记分辨率高。本研究利用荧光SSR标记探讨毛白杨核心种质构建,进而分析其遗传多样性,以期为毛白杨种质资源保存保护、遗传改良提供科技支撑,为其他树种核心种质构建提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料共有272个毛白杨和白杨杂种无性系,有252份是北京、河北、山东、河南、山西、陕西、甘肃、安徽、江苏省9个省(市)选出的毛白杨优树。其中1~25号来自北京市,共25份;26~81号来自河北省,共56份;82、83、221、222、232、234、235、237、242~249、251、254、255号来自山东省,共19份;84~114、223、225~230、257、258、259来自河南省,共41份;115~157号和260号来自山西省,共44份;158~203号、238、239、261号来自陕西省,共49份;204~208号来自甘肃省,共5份;209~217来自安徽省,共9份;218~220、263来自江苏省,共4份。265是新疆杨(*P. bolleana*)。19份白杨杂种分别是224(毛新杨×鲁毛50杨)((*P. tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa* ‘Lumao 50’)、231(84K)(*P. alba* × *P. glandulosa* ‘84K’)、233(银腺杨3号)(*P. alba* × *P. glandulosa* 3)、236(毛新杨×截叶毛白杨)((*P. tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa* ‘Truncata’)、240(毛新杨×银灰杨)((*P. tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. canescens*)、241(毛新杨×银灰杨)、250(银腺杨1号×新疆杨)((*P. alba* × *P. glandulosa* 1) × *P. bolleana*)、252(银腺杨6号)(*P. alba* × *P. glandulosa* 6)、253(银腺杨1号×新疆杨)((*P. alba* × *P. glandulosa* 1) × *P. bolleana*)、256(毛新杨×截叶毛白杨)((*P. tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa* ‘Truncata’)、262(银腺杨2号×新疆杨)((*P. alba* × *P. glandulosa* 2) × *P. bolleana*)、264(毛新杨×截叶毛白杨)((*P. tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa* ‘Truncata’)、266(毛新杨1号)(*P. tomentosa* × *P. bolleana* 1)、267(毛新杨2号)(*P. tomentosa* × *P.*

bolleana 2)、268(银腺杨1号)(*P. alba* × *P. glandulosa* 1)、269(银腺杨2号)(*P. alba* × *P. glandulosa* 2)、270(银腺杨5号)(*P. alba* × *P. glandulosa* 5)、271(毛新杨×截叶毛白杨)((*P. tomentosa* × *P. bolleana*) × *P. tomentosa* ‘Truncata’)和272(响叶杨×毛新杨)(*P. adenopoda* × (*P. tomentosa* × *P. bolleana*))。

试验所用叶片全部采集于山东省冠县国有毛白杨林场。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取

将硅胶干燥过的叶片按照植物组织基因组DNA提取试剂盒(磁珠法)说明书(英芮诚生化科技(上海)有限公司,货号PTED-6 030)操作步骤,提取所有试验材料的DNA。

1.2.2 引物来源

16对引物是由北京林业大学林木育种国家工程实验室基于基因组数据,利用Primer 3软件,在SSR位点侧翼序列设计,并经过多态性和通用性筛选后得到的。详情见表1。

1.2.3 荧光引物PCR扩增与PCR产物毛细管电泳检测

试验所用荧光引物和2×Taq PCR MasterMix是由北京市睿博兴科生物技术有限公司生产,引物的纯化方式为PAGE。PCR 10 μL体系包括2×Taq PCR MasterMix 5 μL, DNA(20 ng/μL)0.5 μL, 正反引物各0.1 μL, 灭菌双蒸水4.3 μL。使用Touchdown模式进行PCR扩增:95℃预变性5 min;95℃变性30 s, 57℃退火30 s(每个循环降低0.5℃), 72℃延伸40 s, 14个循环;95℃变性30 s, 50℃退火30 s, 72℃延伸40 s, 20个循环;72℃延伸10 min。使用毛细管电泳仪(ABI公司的3730XL)检测PCR产物。

1.3 统计分析

使用软件Genemarker 2.2.0分析毛细管电泳数据;使用GeneALEX软件^[15]计算平均等位基因数(Na)、实际观察杂合度(Ho)、Nei’s遗传一致度、Ne、He和I;使用软件DPS对所构建的不同比例核心种质资源的遗传多样性参数进行t检验。

1.4 核心种质取样策略

首先基于期望杂合度数值,通过R语言包Genetic Subsetter计算每个样品对总体遗传多样性的贡献值,然后对所有样品根据贡献值从大到小顺序排序^[16]。然后通过比较贡献率最高的前50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%和15%取样比例获得的核心种质的代表性,确定其合适的取样比例。

表 1 16 对引物序列信息

Tab. 1 Sequence information of 16 pairs of SSR primers

引物编号 Primer No.	重复基元 Repeat motif	5'—3'引物序列 5'-3' primer sequence	3'—5'引物序列 3'-5' primer sequence	荧光 Fluorochrome
Ptr_1_SSR1	(CCT) ₅	AAAGCTTGTGTCCACTTGT	CAGATCTACCTCCTCCATCA	TAMRA
Ptr_1_SSR2	(AAGA) ₆	TCTCAATTACATCCCAATCC	GGTTGATTACCAGCAGTAT	FAM
Ptr_3_SSR13	(TA) ₁₀	AGTTGTTTGGGCTGTGTATC	GTGCAATTCCTGATTAAAG	FAM
Ptr_7_SSR14	(ATT) ₆	TCCCACAAGCACTCTTAACT	CCTTTGCAGCACAGTAGTAA	HEX
Ptr_7_SSR15	(TG) ₁₂	CACTTGCTCTTACTCCTGCT	CCAGGACAAATGCAATACTT	FAM
Ptr_9_SSR3	(CGA) ₇	TCGAATTCTCCGATAGTGTT	AATGCTTCTTATGCTGCTC	FAM
Ptr_10_SSR1	(GAC) ₉	CCAACAACAAGTACCCTCAT	AGCTAGAGTCTGTCTGCTG	TAMRA
Ptr_11_SSR1	(TA) ₂₉	TGAATGAAATACATTGCTGC	GCTATTATTGGATTTCCTG	HEX
Ptr_11_SSR8	(AT) ₃₀	AAATGGAGACTTGTGTGGAC	GTGCAATAAAGCAGTGTGAA	FAM
Ptr_13_SSR6	(GAA) ₈	TGGTACTCTCTCTTGCTA	CCTTCAGTTTCTGCTTCATC	FAM
Ptr_14_SSR7	(GCG) ₆	TGATTCTACTGGATCCAACC	TATCCGATTCTCTAAGGCAA	FAM
Ptr_14_SSR11	(TCC) ₈	CTCTCAGTCTCTTGGATCG	GAGGTCTCATTGTGTAAGC	HEX
Ptr_14_SSR12	(AT) ₁₃	TACTGGTGGTGCTCAATACA	AAAGCAAACGCAGTAATAGC	HEX
Ptr_16_SSR3	(AT) ₁₀	GGGATTCACCACTTATTGA	TTATATTGTCTGGGAGCGT	FAM
Ptr_18_SSR17	(AT) ₁₃	TTTCTGATGCTGTAGCTGTG	ATCAGTATGCTTTGCCTGTT	TAMRA
Ptr_19_SSR1	(TCA) ₈	ATTTCTTTGCGCTCATAACA	CCCTCTTGTGTGGAATTTA	TAMRA

2 结果与分析

2.1 毛白杨核心种质排序

基于 16 对荧光 SSR 引物, 根据 272 个样品对总体遗传多样性的贡献程度, 按照 50% 的取样比例, 得到前 136 名排序结果。由表 2 可以看出, 此 136 份种质包含北京的种质 1 份(共 25 份), 河北 17 份(共 56 份), 山东 9 份(共 19 份), 河南 25 份(共 41 份), 山西 19 份(共 44 份), 陕西 32 份(共 49 份), 甘肃 2 份(共 5 份), 安徽 7 份(共 9 份), 江苏 4 份(共 4 份), 新疆杨 1 份, 杂种种质 19 份(共 19 份)。部分种质在 Ptr-1-SSR2 位点的等位基因变异见图 1。其他不同取样比例所得核心种质数量以及不同种源所占数量见表 3, 可以看出当取样比例为 40% 时, 不再包括北京的任何种质; 当取样比例由 50% 逐渐降至 15% 时, 始终包含江苏种质 4 份, 表明这 4 份种质具有很好的遗传代表性。另外当取样比例降至 15% 时, 陕西、河南和山东的种质分别有 7 份、3 份和 3 份入选, 具有较好的代表性。

2.2 毛白杨核心种质遗传多样性分析

由 16 个 SSR 位点不同取样规模的遗传多样性指标平均值可以看出, 当取样比例为 20% 及以上时, 所有取样比例的 Na 值均大于 6(表 4)。但是当取样比例为 15% 时, Na 值则小于 6, 而且观测杂合度也由 50% 时的 0.608 逐渐降低至 0.601。随着取

样比例的降低, Ne、I 和 He 值均在升高, 均大于原始种质相应数值。而且 He 值均大于 0.5, 表明这些不同取样比例的种质均具有丰富的遗传多样性, 具有可靠的代表性, 可以作为核心种质资源。但是 272 份种质的 Ne、I 和 He 值分别是 2.075、0.825 和 0.432, 表明原始群体具有中度丰富的遗传多样性。利用 DPS 软件对遗传多样性参数进行 *t* 检验, 由表 5、表 6 和表 7 可知, 不同取样比例的核心种质遗传多样性参数与原始种质差异均不显著 ($P > 0.05$), 能够充分代表原始种质。由表 7 可知, 当取样比例为 25% 时, Na 值大于 6, Ne、I 和 He 值分别是 2.761、1.094 和 0.539, 表明这个群体的遗传多样性丰富。而且此时数量较少, 共 68 份, 保存这些核心种质, 占地相对较少。

2.3 毛白杨不同种源及杂种种质的遗传一致度分析

由表 8 可知, 北京的种质与河北的种质遗传一致度最高, 为 0.997; 与山西次之, 为 0.990; 与杂种种质的遗传一致度为 0.756。江苏的种质与河北的种质遗传一致度最高, 为 0.936; 与北京次之, 为 0.934; 与杂种种质的遗传一致度为 0.834。

3 讨 论

种质资源收集和保存对于保存物种遗传多样性和育种具有重要意义。但是对于一个物种来说, 种质资源基因库中的全部种质, 是基础群体, 数目巨大, 不方便开展具体遗传改良研究。所以基于合适

表2 核心种质排序

Tab. 2 Order of core germplasm

顺序 Order	品种编号 Variety No.	顺序 Order	品种编号 Variety No.	顺序 Order	品种编号 Variety No.	顺序 Order	品种编号 Variety No.
1	156	35	227	69	146	103	85
2	258	36	264	70	224	104	162
3	236	37	211	71	194	105	153
4	253	38	196	72	144	106	84
5	266	39	208	73	216	107	150
6	262	40	176	74	182	108	83
7	261	41	195	75	137	109	99
8	231	42	138	76	106	110	128
9	34	43	193	77	132	111	79
10	241	44	152	78	175	112	53
11	271	45	184	79	130	113	78
12	242	46	180	80	214	114	97
13	252	47	181	81	127	115	77
14	186	48	89	82	100	116	221
15	240	49	26	83	174	117	76
16	237	50	178	84	119	118	91
17	268	51	126	85	212	119	70
18	265	52	161	86	118	120	88
19	263	53	113	87	172	121	67
20	233	54	160	88	112	122	200
21	225	55	259	89	210	123	10
22	267	56	203	90	171	124	66
23	218	57	158	91	107	125	63
24	222	58	110	92	170	126	254
25	270	59	155	93	101	127	61
26	197	60	272	94	209	128	168
27	256	61	202	95	169	129	59
28	269	62	154	96	96	130	248
29	220	63	255	97	166	131	226
30	250	64	151	98	93	132	58
31	191	65	201	99	204	133	165
32	219	66	47	100	86	134	243
33	72	67	147	101	164	135	52
34	215	68	109	102	92	136	105

注:表中所有无性系的来源见1.1试验材料。Note: the source of all clones in the table is shown in chapter 1.1: materials.

的技术手段构建核心种质,对于深入挖掘优异种质资源,提高种质资源的利用价值和效率具有重要的实践意义^[4]。有关核心种质的取样比例,前人已经做了一些研究。Balakrishnan等^[17]、张洪亮等^[18]均认为应根据种质资源总数来确定核心种质取样比例。如果总数很大,则核心种质取样比例可小一些;如果资

源较少,则取样比例可相对大一些。当核心种质所占比例超过总数的50%时,则样本量会很大,这不符合核心种质的特征要求^[19]。Li等^[20]认为农作物的核心种质取样比例为5%~40%,10%左右最佳。本研究从50%取样比例开始,依次降低5%,直至15%,共设计了8个取样比例,依次计算各遗传多样

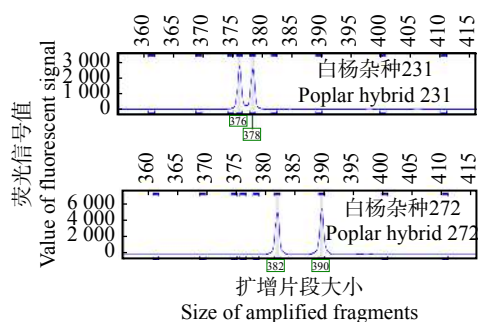


图 1 2 个杂种种质在 Ptr-1-SSR2 位点的等位基因变异

Fig. 1 Allelic phenotype of two hybrid germplasm at Ptr-1-SSR2 locus

性参数。所有取样比例的全部参数均表明这些取样种质比初始种质(仅是中度丰富)具有更丰富的遗传多样性。通过比较参数 Na、Ne、平均 *I* 和 He, 认为毛白杨核心种质的最佳取样比例为 25%, 最佳取样范围为 20% ~ 40%。如果种质资源数目较大, 可以适当降低至 15%, 如果基数较小, 可以升高至 45%。

遗传多样性分析结果表明, 随着取样比例的逐渐降低, 其 Ne、*I* 和 He 值均在逐渐的升高, 没有重复的数值, 可以作为遗传多样性的重要参考指标。然而 Na 和 Ho 在取样比例不同时, 数值有时却是相同

表 3 不同取样比例不同种源所占数量

Tab. 3 Number of different provenances at varied sampling proportions

比例 Ratio/%	北京 Beijing	河北 Hebei	山东 Shandong	河南 Henan	山西 Shanxi	陕西 Shaanxi	甘肃 Gansu	安徽 Anhui	江苏 Jiangsu	新疆 Xinjiang	杂交种 Hybrid	总计 Total
100	25	56	19	41	44	49	5	9	4	1	19	272
50	1	17	9	25	19	32	2	7	4	1	19	136
45	1	11	6	23	19	30	2	7	4	1	19	123
40	0	4	5	20	18	29	2	7	4	1	19	109
35	0	4	4	14	16	29	1	7	4	1	19	96
30	0	4	4	10	14	24	1	4	4	1	19	82
25	0	4	4	8	8	18	1	2	4	1	18	68
20	0	3	3	6	4	14	1	2	4	1	17	55
15	0	2	3	3	1	7	1	2	4	1	17	41

表 4 不同取样比例的遗传多样性分析

Tab. 4 Analysis of genetic diversity with different sampling proportions

样本量 Sample number (<i>N</i>)	取样比例 Sampling ratio/%	等位基因数 Allele number (<i>Na</i>)	有效等位基因数 Effective number of allele (<i>Ne</i>)	Shannon 信息指数 Shannon information index (<i>I</i>)	观测杂合度 Observed heterozygosity (<i>Ho</i>)	期望杂合度 Expected heterozygosity (<i>He</i>)
272	100	6.625	2.075	0.825	0.561	0.432
136	50	6.375	2.456	0.982	0.608	0.502
123	45	6.375	2.479	0.998	0.606	0.507
109	40	6.375	2.537	1.023	0.607	0.516
96	35	6.313	2.597	1.047	0.607	0.525
82	30	6.313	2.690	1.083	0.607	0.537
68	25	6.063	2.761	1.094	0.605	0.539
55	20	6.063	2.916	1.141	0.605	0.557
41	15	5.875	3.145	1.205	0.601	0.584

表 5 初始样品及核心种质 (20%) 的遗传多样性比较

Tab. 5 Comparison of genetic diversity of the primary samples and core germplasm (20%)

群体 Population	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
初始种质 Primary germplasm	272	6.625	2.075	0.825	0.561	0.432
核心种质 Core germplasm	55	6.063	2.916	1.141	0.605	0.557
保留率 Retention rate/%	20	91.52	140.53	138.30	107.84	128.94

表 6 初始样品及核心种质 (40%) 的遗传多样性比较

Tab. 6 Comparison of genetic diversity of the primary samples and core germplasm (40%)

群体 Population	<i>N</i>	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>I</i>	<i>Ho</i>	<i>He</i>
初始种质 Primary germplasm	272	6.625	2.075	0.825	0.561	0.432
核心种质 Core germplasm	109	6.375	2.537	1.023	0.607	0.516
保留率 Retention rate/%	40	96.23	122.27	124.00	108.20	119.44

表7 初始样品及核心种质(25%)的遗传多样性比较

Tab. 7 Comparison of genetic diversity of the primary samples and core germplasm (25%)

群体 Population	<i>N</i>	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>I</i>	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>
初始种质 Primary germplasm	272	6.625	2.075	0.825	0.561	0.432
核心种质 Core germplasm	68	6.063	2.761	1.094	0.605	0.539
保留率 Retention rate/%	25	91.52	133.06	132.61	107.84	124.77

表8 Nei's 遗传一致度

Tab. 8 Nei's genetic identity

种源 Provenance	北京 Beijing	河北 Hebei	山东 Shandong	河南 Henan	山西 Shanxi	陕西 Shaanxi	甘肃 Gansu	安徽 Anhui	江苏 Jiangsu	新疆 Xinjiang	杂交种 Hybrid
北京 Beijing	1.000										
河北 Hebei	0.997	1.000									
山东 Shandong	0.978	0.987	1.000								
河南 Henan	0.969	0.979	0.982	1.000							
山西 Shanxi	0.990	0.996	0.993	0.987	1.000						
陕西 Shaanxi	0.938	0.954	0.962	0.984	0.966	1.000					
甘肃 Gansu	0.974	0.985	0.988	0.983	0.986	0.957	1.000				
安徽 Anhui	0.940	0.950	0.971	0.979	0.958	0.957	0.974	1.000			
江苏 Jiangsu	0.934	0.936	0.927	0.934	0.932	0.926	0.921	0.913	1.000		
新疆 Xinjiang	0.694	0.707	0.728	0.733	0.720	0.719	0.722	0.728	0.722	1.000	
杂交种 Hybrid	0.756	0.774	0.787	0.796	0.790	0.806	0.784	0.783	0.834	0.745	1.000

的。例如 H_o 在取样比例为 25% 和 20% 时, 数值却是相同的, 均为 0.605。表明这两个参数只能作为评价遗传多样性的辅助参考。

基于 16 对荧光 SSR 引物, 根据 272 个样品对总体遗传多样性的贡献大小, 按照 50% 和 45% 的取样比例, 分别得到 136 份和 123 份核心种质。然而仅包含 1 份北京的种质(总共 25 份)。所以我们推测北京的毛白杨种质与河北或者其他省份的遗传相似度很高。当取样比例小于等于 40% 时, 不再包含北京的种质, 而来自江苏的 4 份种质(总共 4 份), 从 50% 比例一直降到 15% 时, 总是包含此 4 份种质。所以我们推测江苏的种质与其他种源的种质遗传相似度较低, 遗传变异较丰富。Nei's 遗传一致度计算结果证明了我们以上的推测是完全正确的。

一般而言, 构建核心种质的步骤主要有: 收集数据、选择遗传多样性参数、确定取样策略、构建准核心种质和进行代表性检验。本研究的创新之处是首先利用每份种质对总体遗传多样性的贡献大小进行排序, 然后通过比较贡献率最高的前 50%、45%、40%、35%、30%、25%、20% 和 15% 取样比例获得的核心种质的代表性, 初步确定准核心种质, 接着利用遗传多样性参数进行验证, 最后利用 t 检验进行统计学上的验证。所以构建的核心种质更具有代表性。

林惠斌等^[21]研究表明用毛白杨做母本进行杂

交, 存在严重败育问题, 而用白杨杂种作母本, 选用双杂交和回交是有效的育种的方式, 因此本研究也收集了部分白杨杂种作为试验材料。从 50% 取样比例逐渐降到 30% 时, 一直包含 19 份杂种种质(总共 19 份); 当取样比例为 20% 和 15% 时, 核心种质数量分别是 55 份和 41 份, 依然有 17 份杂种种质入选, 表明这些杂种种质遗传变异丰富, 聚合了来自父本和母本的优良等位基因。本文首次从分子水平证明了林惠斌和朱之梯先生关于杂种种质是毛白杨遗传改良的重要育种资源的观点。建议相关部门或者育种者要高度重视白杨杂种种质的收集、保存和再利用。

参 考 文 献

- [1] 徐纬英. 杨树 [M]. 哈尔滨: 黑龙江人民出版社, 1988.
Xu W Y. *Populus* spp. [M]. Harbin: Heilongjiang People's Publishing House, 1988.
- [2] 李善文, 张志毅, 何承忠, 等. 中国杨树杂交育种研究进展 [J]. *世界林业研究*, 2004, 17(2): 37-41.
Li S W, Zhang Z Y, He C Z, et al. Advances in hybrid breeding of poplar in China [J]. *World Forestry Research*, 2004, 17(2): 37-41.
- [3] Frankel O H. Genetic perspectives of germplasm conservation [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1984: 161-170.
- [4] Frankel O H, Brown A H D. Plant genetic resources today: a critical appraisal [C] // Holden J H W, Williams J T. Crop genetic resources: conservation and evaluation. London: George Allan

- and Unwin, 1984: 249–257.
- [5] Razieh M, Mohammad R D, Darab H, et al. Development of a core collection in Iranian walnut (*Juglans regia* L.) germplasm using the phenotypic diversity[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 249(4): 439–448.
- [6] 钟永达, 赵善文, 程泽龙, 等. 基于种苗表型初步构建中国樟树核心种质[J]. *江西农业大学学报*, 2019, 41(1): 81–89.
- Zhong Y D, Zhao S W, Cheng Z L, et al. Preliminary construction of core collection of *Cinnamomum camphora* based on seedling phenotypic data[J]. *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2019, 41(1): 81–89.
- [7] 毛秀红. 刺槐不同来源无性系种质的表型变异与遗传多样性分析 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2017.
- Mao X H. Analysis of phenotypic variation and genetic diversity for *Robinia pseudoacacia* clonal germplasms from different sources[D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2017.
- [8] 邵辰光, 丁西朋, 白昌军, 等. 利用 EST-SSR 技术分析银合欢种质资源遗传多样性 [J]. *云南农业大学学报(自然科学)*, 2016, 31(6): 1031–1037.
- Shao C G, Ding X P, Bai C J, et al. Analysis of genetic diversity in *Leucaena* germplasm using stylosanthes EST-SSRs[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University (Natural Science)*, 2016, 31(6): 1031–1037.
- [9] Sun R X, Lin F R, Huang P, et al. Moderate genetic diversity and genetic differentiation in the relict tree *Liquidambar formosana* Hance revealed by genic simple sequence repeat markers[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2016, 7: 1411–1421.
- [10] 刘宝尧, 刘小利, 魏海斌, 等. 青海地方核桃种质资源遗传多样性研究[J]. *西北林学院学报*, 2017, 32(2): 130–135.
- Liu B Y, Liu X L, Wei H B, et al. Genetic diversity of germplasm resources of walnut in Qinghai[J]. *Journal of Northwest University of Forestry*, 2017, 32(2): 130–135.
- [11] 骆鹏, 曹玉婷, 莫家兴, 等. 柳杉无性系指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J]. *南京林业大学学报*, 2017, 32(2): 130–135.
- Luo P, Cao Y T, Mo J X, et al. Analysis of genetic diversity and construction of DNA fingerprinting of clones in *Cryptomeria fortune*[J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2017, 32(2): 130–135.
- [12] Liang W, Dondini L, Franceschi P D, et al. Genetic diversity, population structure and construction of a core collection of apple cultivars from Italian germplasm[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2014, 33(3): 1–16.
- [13] Wang Y, Fu J X, Pan L J, et al. Construction of core collection of lychee by SSR marker[J]. *Acta Horticulturae*, 2014, 1029: 87–92.
- [14] Liu F M, Zhang N N, Liu X J, et al. Genetic diversity and population structure analysis of *Dalbergia odorifera* germplasm and development of a core collection using microsatellite markers[J]. *Genes*, 2019, 10(4): 281–295.
- [15] Peakall R, Smouse P E. GenAlEx6.5[J]. *Bioinformatics*, 2012, 28: 2537–2539.
- [16] Maria M A, Alfonso C M, Jefferey B E, et al. The USDA Barley core collection genetic diversity, population structure, and potential for genome-wide association studies[J/OL]. *PLoS ONE*, 2014, 9(4): 1–13[2019–09–25]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24732668/>.
- [17] Balakrishnan R, Nair N V, Sreenivasan T V. A method for establishing a core collection of *Saccharum officinarum* L. germplasm based on quantitative-morphological data[J]. *Genetic Resource and Crop Evolution*, 2000, 47(1): 1–9.
- [18] 张洪亮, 李自超, 曹永生, 等. 表型水平上检验水稻核心种质的参数比较[J]. *作物学报*, 2003, 29(2): 252–257.
- Zhang H L, Li Z C, Cao Y S, et al. Comparison of parameters for testing the rice core collection in phenotype[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(2): 252–257.
- [19] 李慧峰, 陈天渊, 黄咏梅, 等. 基于形态性状的甘薯核心种质取样策略研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(1): 91–96.
- Li H F, Chen T Y, Huang Y M, et al. Sampling strategies of sweet potato core collection based on morphological traits[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013, 14(1): 91–96.
- [20] Li Z C, Zhang H L, Zeng Y W, et al. Studies on sampling schemes for the establishment of core collection of rice landraces in Yunnan, China[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2002, 49(1): 67–74.
- [21] 林惠斌, 朱之梯. 毛白杨杂交育种战略的研究[J]. *北京林业大学学报*, 1988, 10(3): 97–101.
- Lin H B, Zhu Z T. Studies on breeding strategies of *Populus tomentosa*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1988, 10(3): 97–101.

(责任编辑 范娟 崔艳红
责任编辑 卢孟柱)