



# 中国引种桉树种质资源的遗传多样性分析

刘 果, 谢耀坚, 陈鸿鹏, 吴志华

(国家林业局桉树研究开发中心, 广东湛江 524022)

**摘 要:** 该研究从 110 对 SSR 引物中, 选用 47 个扩增稳定、条带特异的 SSR 多态位点, 对 42 种 159 份桉树种质材料进行 PCR 扩增, 通过统计条带构建二维数据库的方法, 进行遗传多样性分析和聚类分析。结果显示: (1) 共检测到 137 个等位基因, 平均每个位点等位基因数为 2.915 个, 各位点等位基因变异范围为 2~7 个。(2) 遗传多样性分析结果表明, 平均 Shannon's 信息指数为 0.181, 平均观察杂合度  $H_o$  为 0.068, 平均多态信息含量  $PIC$  为 0.182。综合各指标分析发现, 位点 eSSR-GR018、eSSR-GR083 和 eSSR-GR109 的多态性程度最高, 反映的遗传信息量更大, 能够在桉树种质资源的遗传多样性分析和种质鉴定等方面发挥更大的作用。(3) 非加权类平均法 (UPGMA 法) 和主坐标分析法 (PCoA 法) 聚类分析均表明, 159 份桉树种质材料分为两大类群, 且昆士兰桉和少花桉间具有较高的遗传相似度, 很可能产生杂交种; 聚类结果与基于形态学的 Hill & Johnson 分类系统基本一致。研究表明, 中国引种的桉树种质资源具有较高水平的遗传多样性, 该研究所选用的 47 对 SSR 引物可有效地应用于桉树种质资源的鉴定分析。

**关键词:** 桉树; SSR 标记; 遗传多样性; 杂交育种; 种质鉴定

**中图分类号:** Q346<sup>+</sup>.5; Q789 **文献标志码:** A

## Genetic Diversity among the Introduced Germplasms of *Eucalyptus* in China

LIU Guo, XIE Yaojian, CHEN Hongpeng, WU Zhihua

(China Eucalypt Research Centre, Zhanjiang, Guangdong 524022, China)

**Abstract:** In the study, 47 SSR polymorphic sites which have steady and specificity amplification were selected. PCR using 159 *Eucalyptus* germplasms accessions including 42 species of eucalyptus were applied to the genetic diversity analysis and clustering analysis, through the method of constructing a two dimensional database composed of the numbers of bands. (1) A total of 137 alleles obtained from the analysis of PCR results among all 159 accessions by 47 pairs of SSR primers with an average of 2.915 alleles per pairs of primers ranging from 2 to 7. (2) The results of genetic diversity showed that the average Shannon's information index ( $I$ ) was 0.181. The average observed heterozygosity ( $H_o$ ) was 0.068, and the average value of polymorphism information content ( $PIC$ ) was 0.182. The highest genetic diversity level was found in the three loci eSSR-GR018, eSSR-GR083 and eSSR-GR109 by comprehensive comparison. These three SSR loci would play an important role in genetic diversity and germplasm identification among *Eucalyptus* germplasm resources. (3) The results of UPGMA analysis and principal coordinate analysis (PCoA method) were consistently indicated that 159 accessions were divided into two groups, and this classification agreed with the taxonomy of Hill & Johnson (1995) that based on morphology. Two cluster results showed

收稿日期: 2017-05-26; 修改稿收到日期: 2017-11-07

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(CAFYBB2016QA018)

作者简介: 刘 果(1987—), 女, 博士, 从事林木遗传育种研究。E-mail: liuguopz@163.com

that the relationship between *Eucalyptus cloeziana* and *E. pauciflora* was relatively higher genetic similarity and they were more likely to produce hybrids. The results in present research revealed high level of genetic diversity among the 159 *Eucalyptus* germplasms accessions including 42 species of *Eucalyptus* introduction in China. The 110 pairs of SSR primers could be applied to analyze *Eucalyptus* germplasm identification, effectively.

**Key words:** *Eucalyptus*; SSR marker; genetic diversity; cross breeding; germplasm identification

桉树是桃金娘科(Myrtaceae)桉属(*Eucalyptus* L' Herit.)、杯果木属(*Angophora* Cav.)和伞房桉属(*Corymbia* K. D. Hill & L. A. S. Johnson)树种的统称<sup>[1]</sup>。桉树遗传资源非常丰富,种类繁多,截至1998年底,得到承认的共有808种和137个亚种或变种,共945个分类群<sup>[2-3]</sup>。桉树具有优良的遗传特性和生物学性状,并且桉树基因组较小,约为650 Mb,这为桉树的基因组学研究和分子操作提供了很大的便利<sup>[4]</sup>。桉树具有丰富的遗传多样性,对桉树遗传多样性水平的研究有助于及时保存桉树的基因资源,确定桉树种间杂交率和种内远交率,确保杂种优势的获得<sup>[5]</sup>。

SSR(Simple Sequence Repeat)简单重复序列,又称微卫星,广泛分布于植物基因组中,由于其数量多、多态性高、稳定性好等特点,在植物遗传多样性中的研究中应用非常广泛<sup>[6-10]</sup>。桉属植物中SSR表现出高度的保守性和多态性,非常有利于桉树遗传结构和遗传多样性的研究<sup>[11-13]</sup>。

中国自1890年从意大利引种桉树以来,南方14个省(市、区)通过各种渠道共引进桉树300多种,保存下来的有211种,仅有20~30种桉树进行了大面积人工造林<sup>[14-17]</sup>。虽然国内外学者对桉树遗传资源进行了遗传多样性的研究,但其试验材料主要针对某一种桉树进行种源/家系<sup>[18-19]</sup>或群体<sup>[20]</sup>水平上的分析研究,而基于树种水平上的桉树遗传多样性鲜有报道。田华<sup>[21]</sup>和张党权等<sup>[22]</sup>对赤桉(*Eucalyptus camaldulensis*)、巨桉(*E. grandis*)、细叶桉(*E. tereticornis*)和粗皮桉(*E. pellita*)4种桉树18个种源材料进行遗传多样性分析发现,4种桉树种间遗传相似性差异较大,种内遗传相似性极高。

为了更清楚地掌握桉树不同属间、亚属间以及不同种间的遗传多样性和遗传基础,促进桉树种质资源的合理开发和有效利用,本研究所选159份桉树种质材料包括42种桉树,利用110对扩增结果稳定、多态性丰富、条带特异的SSR引物进行PCR扩增,分析42种桉树种质资源的遗传多样性和亲缘关

系,以期为中国桉树种质资源的合理保存、准确鉴定及杂交育种等工作提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本研究所用的42种桉树159份桉树材料,其中29种桉树来自于20世纪80年代中澳合作项目引种并成功保存下来的桉树树种,13种为桉树人工林中广泛栽培的桉树树种,具体来源于云南省昆明海口林场,云南省楚雄州一平浪林场,广西区柳州市黄冕林场和广东省湛江市南方国家级林木种苗示范基地,42种桉树材料的基本信息及采集的数量详见表1。

1.2 方 法

1.2.1 总DNA的提取 桉树叶片总DNA的提取采用CTAB法<sup>[23]</sup>,并参照Gan等<sup>[24]</sup>和李发根<sup>[25]</sup>进行适当改良。提取DNA浓度利用Throme核酸蛋白测定仪测定。并根据测得浓度结果对提取样品稀释至约100 ng/uL,保存于-20℃,备用。

1.2.2 SSR扩增反应 SSR-PCR扩增反应体系总体积为10 μL,其中含模板DNA约20 ng,100 μmol/L引物各0.5 μL,2× TopTaq MasterMix (1.25U Taq DNA聚合酶,0.2 mmol/L dNTPs,1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>) 5 μL。

PCR扩增反应程序采用Touch-Down PCR:首先94℃预变性4 min,94℃变性30 s, T<sub>m</sub>退火30 s, 50℃~60℃复性30 s,72℃延伸1 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。

1.3 数据统计与分析

采用Quantity One统计软件对PCR扩增谱带进行统计,根据检测结果,对电泳图谱中清晰明亮的条带,按照英文字母的顺序记录等位基因。即同一位点片段出现频率最高的等位基因记为A,其余等位基因则依次记为B、C、D等。如果扩增产物仅有一个条带,则按照纯合基因型处理,记为AA、BB、CC或DD;没有扩增条带的则记为0,构建数据库。利用GenAlEx 6.5.01软件计算等位基因数(num-

表 1 159 份桉树 DNA 材料信息表

Table 1 159 *Eucalyptus* samples used in the study

| 编号<br>Code | 树种名称<br>Species                    | 数量<br>Number | 采集地点<br>Locality | 编号<br>Code | 树种名称<br>Species            | 数量<br>Number | 采集地点<br>Locality |
|------------|------------------------------------|--------------|------------------|------------|----------------------------|--------------|------------------|
| HK001      | 多枝桉 <i>E. viminalis</i>            | 4            | HKFF             | YPL022     | 滨河白桉 <i>E. elata</i>       | 1            | YPLFF            |
| HK002      | 直干桉 <i>E. maidenii</i>             | 3            | HKFF             | YPL023     | 大叶桉 <i>E. robusta</i>      | 2            | YPLFF            |
| HK003      | 蓝桉 <i>E. globulus</i>              | 4            | HKFF             | HM024      | 柳桉 <i>E. saligna</i>       | 2            | HMFF             |
| HK004      | 广叶桉 <i>E. ampli folia</i>          | 1            | HKFF             | HM025      | 昆士兰桉 <i>E. cloeziana</i>   | 1            | HMFF             |
| HK005      | 迪恩桉 <i>E. deanei</i>               | 4            | HKFF             | HK026      | 本沁桉 <i>E. benthamii</i>    | 6            | HKFF             |
| HK006      | 铁皮桉 <i>E. fibrosa</i>              | 1            | HKFF             | SX027      | 窿缘桉 <i>E. exserta</i>      | 2            | NFZM             |
| HK007      | 奥米奥圆叶桉 <i>E. neglecta</i>          | 2            | HKFF             | SX028      | 韦塔桉 <i>E. wetarensis</i>   | 6            | NFZM             |
| HK008      | 巴吉桉 <i>E. badjensis</i>            | 4            | HKFF             | SX029      | 粗皮桉 <i>E. pellita</i>      | 6            | NFZM             |
| HK009      | 小叶桉 <i>E. parvula</i>              | 6            | HKFF             | SX030      | 托里桉 <i>C. torelliana</i>   | 6            | NFZM             |
| HK010      | 白蜡树桉 <i>E. fraxinoides</i>         | 1            | HKFF             | SX031      | 皱果桉 <i>C. ptychocarpa</i>  | 6            | NFZM             |
| HK011      | 毛皮桉 <i>E. macarthurii</i>          | 5            | HKFF             | SX032      | 细叶桉 <i>E. tereticornis</i> | 6            | NFZM             |
| HK012      | 三花桉 <i>E. triflora</i>             | 1            | HKFF             | SX033      | 尾叶桉 <i>E. urophylla</i>    | 6            | NFZM             |
| HK013      | 山桉 <i>E. dalrympleana</i>          | 5            | HKFF             | SX034      | 柠檬桉 <i>C. citriodora</i>   | 4            | NFZM             |
| HK014      | 银顶纤皮桉 <i>E. laeovpinea</i>         | 4            | HKFF             | SX035      | 赤桉 <i>E. camaldulensis</i> | 6            | NFZM             |
| HK015      | 亮果桉 <i>E. nitens</i>               | 2            | HKFF             | SX036      | 巨桉 <i>E. grandis</i>       | 6            | NFZM             |
| HK016      | 邓恩桉 <i>E. dumii</i>                | 4            | HKFF             | HK037      | 多利桉 <i>E. dorrigoensis</i> | 6            | HKFF             |
| HK017      | 樟脑桉 <i>E. camphora</i>             | 4            | HKFF             | SX038      | 威瑞桉 <i>C. variegata</i>    | 6            | NFZM             |
| HK018      | 假美叶桉 <i>E. mannifera</i>           | 3            | HKFF             | HK039      | 少花桉 <i>E. pauciflora</i>   | 1            | HKFF             |
| HK019      | 新英格兰桉 <i>E. nova-angli-<br/>ca</i> | 4            | HKFF             | HK040      | 头果桉 <i>E. cephslocsrps</i> | 5            | HKFF             |
| HK020      | 灰桉 <i>E. cinerea</i>               | 5            | HKFF             | YPL041     | 斜叶桉 <i>E. obliqua</i>      | 1            | YPLFF            |
| HK021      | 史密斯桉 <i>E. smithii</i>             | 6            | HKFF             | YPL042     | 约翰斯顿桉 <i>E. johnstonii</i> | 1            | YPLFF            |

注: HKFF 代表云南省昆明市海口林场, HMFF 代表广西自治州柳州市黄冕林场, NFZM 代表广东省湛江市南方国家级林木种苗示范基地, YPLFF 代表云南省楚雄州一平浪林场

Note: HKFF represents Haikou Forest Farm, Kunming, Yunnan, HMFF represents Huangmian Forest Farm, Liuzhou, Guangxi; NFZM represents South China Experiment Nursery, Zhanjiang, Guangdong; YPL represents Yipinglang Forest Farm, Chuxiong, Yunnan

ber of alleles,  $N_a$ ), 有效等位基因数 (effective number of alleles,  $N_e$ ), Shannon 多态性信息指数  $I$ , 观察杂合度 (observed heterozygosity,  $H_o$ ) 和多态信息量 (polymorphic information content,  $PIC$ ) 等遗传参数。通过 NTsys 2. 10e 软件计算各供试材料间的遗传相似性系数, 以非加权类平均法 (un-weighted pair group with mathematic average, UPGMA) 进行聚类分析, 获得 SHAN 型树状图; 并对相关系数矩阵中心化进行主坐标分析, 通过主坐标分析 (principal coordinate analysis, PCoA) 方法, 判断种质资源的分类群; 利用 UPGMA 聚类分析不同类群间不同桉树种间的亲缘关系。

根据 Botsteins 等<sup>[26]</sup> 的方法, 利用每个等位基因频率和以下公式计算 SSR 标记的多态信息含量 (polymorphism information content,  $PIC$ ):

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n P_i^2 - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2P_i^2 P_j^2$$

式中,  $n$  表示每个位点检测到的等位基因数目,  $P_i$ 、 $P_j$  表示第  $i$ 、 $j$  个等位基因在供试材料中出现的频率<sup>[27]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 位点的多态性分析

110 对 SSR 引物在 159 份桉树种质材料中均有扩增, 共检测到 200 个等位基因, 平均每个位点等位基因数  $N_a$  为 1. 818 个, 等位基因数变异范围为 1~7 个。其中, 47 个 SSR 位点在 159 份桉树种质材料中有多个等位基因 (2~7 个), 即多态位点, 共检测到 137 个等位基因, 平均每个位点的等位基因数为 2. 915 个 (表 2)。等位基因型数量最多的为引物 gSSR-UR001, 有 7 种基因型 (4 种纯合基因型和 3

种杂合基因型),其次为引物 gSSR-GL011,有 5 种等位基因型。47 个多态位点具有更丰富的遗传多样性,用于本研究 159 份桉树种质材料的 SSR 分析。

遗传多样性分析中,有效等位基因数( $N_e$ )、Shannon's 信息指数( $I$ )、观察杂合度( $H_o$ )和多态信息含量( $PIC$ )衡量群体遗传多样性大小。159 份桉树种质材料在 47 个多态位点中的遗传多样性分析得到,平均有效等位基因数  $N_e$  为 1.172 个,变异范围为 1.005 ~ 2.049 个,变异系数为 0.218。其中引物 gSSR-GR096 的平均有效等位基因数最少,为 1.004 个,而引物 eSSR-GR083 的平均有效等位基因数最多,为 2.049 个。每个多态位点的平均

Shannon 信息指数  $I$  为 0.181,变化幅度为 0.012 (位点 gSSR-GR096)~ 0.628(位点 eSSR-GR083),变异系数为 0.218。每个位点的平均观察杂合度  $H_o$  为 0.068,变幅为 0.000 ~ 0.749(位点 eSSR-GR039),变异系数为 2.082。各引物多态信息含量  $PIC$  值的变化范围为 0.018(引物 gSSR-GL005)~ 0.618(引物 eSSR-GR083),平均值为 0.182,变异系数为 0.882。

### 2.2 主坐标分析

利用软件 NTsys 2.10e 进行主坐标分析显示(图 1),47 个多态 SSR 位点的扩增结果中,159 份桉树种质材料可分为 3 个类群,类群 A、类群 B 和类群

表 2 47 对 SSR 引物在 159 份桉树种质材料中的多态性分析  
Table 2 Polymorphic analysis of 47 SSR primers pairs in 159 *Eucalyptus* germplasms

| 引物编号<br>Primer Code | 等位<br>基因<br>数 $N_a$ | 有效等<br>位基因<br>数 $N_e$ | Shannon's<br>信息指数 $I$ | 观察杂<br>合度 $H_o$ | 多态<br>信息<br>量 $PIC$ | 引物编号<br>Primer Code | 等位<br>基因<br>数 $N_a$ | 有效等<br>位基因<br>数 $N_e$ | Shannon's<br>信息指数 $I$ | 观察杂<br>合度 $H_o$ | 多态<br>信息<br>量 $PIC$ |
|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|---------------------|---------------------|-----------------------|-----------------------|-----------------|---------------------|
| eSSR-GL006          | 2                   | 1.090                 | 0.109                 | 0.000           | 0.198               | gSSR-GR014          | 5                   | 1.021                 | 0.052                 | 0.008           | 0.086               |
| eSSR-GL008          | 2                   | 1.005                 | 0.013                 | 0.005           | 0.029               | gSSR-GR020          | 2                   | 1.008                 | 0.021                 | 0.008           | 0.049               |
| eSSR-GR018          | 5                   | 1.841                 | 0.534                 | 0.339           | 0.550               | gSSR-GR025          | 4                   | 1.051                 | 0.085                 | 0.017           | 0.185               |
| eSSR-GR026          | 2                   | 1.462                 | 0.340                 | 0.000           | 0.364               | gSSR-GR028          | 5                   | 1.306                 | 0.351                 | 0.135           | 0.333               |
| eSSR-GR027          | 2                   | 1.328                 | 0.282                 | 0.000           | 0.275               | gSSR-GR038          | 3                   | 1.201                 | 0.222                 | 0.008           | 0.214               |
| eSSR-GR029          | 2                   | 1.032                 | 0.020                 | 0.000           | 0.036               | gSSR-GR041          | 4                   | 1.081                 | 0.296                 | 0.300           | 0.260               |
| eSSR-GR033          | 3                   | 1.037                 | 0.214                 | 0.250           | 0.073               | gSSR-GR054          | 2                   | 1.117                 | 0.165                 | 0.000           | 0.189               |
| eSSR-GR035          | 2                   | 1.033                 | 0.068                 | 0.000           | 0.040               | gSSR-GR075          | 3                   | 1.126                 | 0.252                 | 0.075           | 0.417               |
| eSSR-GR039          | 2                   | 1.317                 | 0.625                 | 0.746           | 0.375               | gSSR-GR086          | 3                   | 1.047                 | 0.088                 | 0.040           | 0.164               |
| eSSR-GR042          | 2                   | 1.081                 | 0.131                 | 0.000           | 0.101               | gSSR-GR091          | 2                   | 1.058                 | 0.102                 | 0.000           | 0.074               |
| eSSR-GR044          | 2                   | 1.055                 | 0.101                 | 0.000           | 0.094               | gSSR-GR096          | 2                   | 1.004                 | 0.012                 | 0.004           | 0.027               |
| eSSR-GR077          | 2                   | 1.007                 | 0.018                 | 0.000           | 0.020               | gSSR-GR104          | 2                   | 1.010                 | 0.023                 | 0.000           | 0.030               |
| eSSR-GR083          | 5                   | 2.049                 | 0.628                 | 0.126           | 0.618               | gSSR-GR106          | 4                   | 1.048                 | 0.095                 | 0.036           | 0.073               |
| eSSR-GR108          | 2                   | 1.004                 | 0.013                 | 0.004           | 0.027               | gSSR-GR120          | 5                   | 1.318                 | 0.354                 | 0.058           | 0.341               |
| eSSR-GR109          | 3                   | 1.974                 | 0.512                 | 0.409           | 0.569               | gSSR-GR125          | 3                   | 1.038                 | 0.064                 | 0.003           | 0.110               |
| eSSR-GR116          | 2                   | 1.011                 | 0.025                 | 0.010           | 0.059               | gSSR-GR126          | 2                   | 1.016                 | 0.034                 | 0.000           | 0.048               |
| eSSR-GR128          | 2                   | 1.008                 | 0.020                 | 0.000           | 0.025               | gSSR-GR127          | 2                   | 1.005                 | 0.013                 | 0.000           | 0.015               |
| eSSR-GR132          | 2                   | 1.684                 | 0.504                 | 0.000           | 0.374               | gSSR-GR133          | 3                   | 1.056                 | 0.082                 | 0.006           | 0.161               |
| eSSR-GR133          | 3                   | 1.443                 | 0.424                 | 0.002           | 0.274               | gSSR-GR164          | 4                   | 1.038                 | 0.084                 | 0.022           | 0.110               |
| gSSR-GL005          | 2                   | 1.006                 | 0.016                 | 0.000           | 0.018               | gSSR-GU010          | 2                   | 1.054                 | 0.095                 | 0.000           | 0.062               |
| gSSR-GL007          | 2                   | 1.020                 | 0.048                 | 0.020           | 0.054               | gSSR-GU019          | 3                   | 1.060                 | 0.107                 | 0.007           | 0.119               |
| gSSR-GL011          | 5                   | 1.118                 | 0.306                 | 0.331           | 0.364               | gSSR-UR001          | 7                   | 1.408                 | 0.429                 | 0.130           | 0.438               |
| gSSR-GL013          | 2                   | 1.028                 | 0.052                 | 0.027           | 0.146               | 均值 Mean             | 2.915               | 1.172                 | 0.181                 | 0.068           | 0.182               |
| gSSR-GR006          | 3                   | 1.042                 | 0.091                 | 0.040           | 0.171               | 变异系数 CV.            | 0.418               | 0.218                 | 1.088                 | 2.082           | 0.882               |
| gSSR-GR009          | 4                   | 1.325                 | 0.152                 | 0.044           | 0.185               |                     |                     |                       |                       |                 |                     |

注:均值和变异系数为 47 个 SSR 位点各项遗传指标的平均值和变异系数  
Note: Mean and CV. represent the value of mean and the coefficient of value in 47 SSR polymorphic loci.

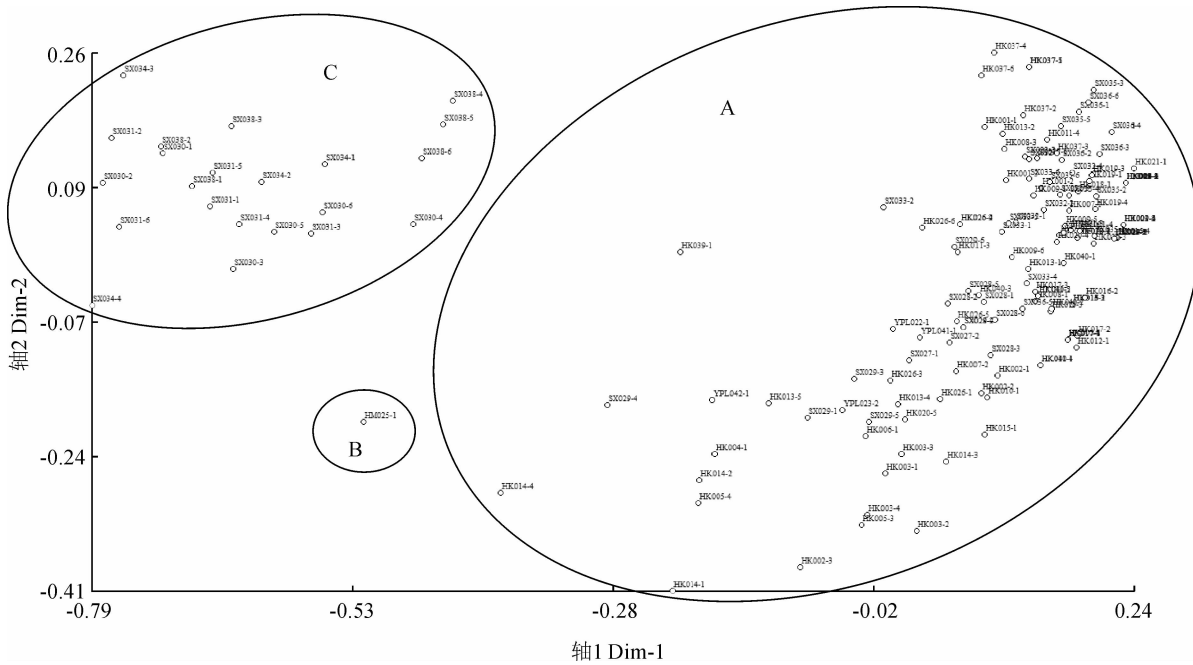


图 1 159 份桉树种质材料的主坐标分析

Fig. 1 Principal coordinates analysis of 159 *Eucalyptus* germplasm

C. 依据 Pryor & Johnson 分类系统<sup>[28]</sup>、Hill & Johnson 分类系统<sup>[1]</sup>和 Brooker 分类系统<sup>[29]</sup>中 159 份桉树种质材料 42 种桉树的分类状态可知,类群 A 中 136 份桉树 DNA 种质材料均为桉属树种,其中 31 种 127 份 DNA 种质材料为桉属双蒴盖亚属(*Eucalyptus* subgenus *Symphyomyrtus*)树种材料,6 种 9 份 DNA 种质材料为桉属单蒴盖亚属(*E.* subgenus *Monocalyptus*)树种材料;类群 B 中仅包括 1 份桉树 DNA 种质材料 HM025-1 昆士兰桉(*E. cloeziana*),形态学分类中昆士兰桉为桉属昆士兰桉亚属(*E.* subgenus *Idiogenes*)单种树种;类群 C 中 22 份 DNA 种质材料 4 种桉树, SX030 托里桉(*Corymbia torelliana*)-1~6, SX031 皱果桉(*C. ptychocarpa*)-1~6, SX034 柠檬桉(*C. citriodora*)-1~4 和 SX038 威瑞桉(*C. variegata*)-1~6,均为伞房属树种。3 个类群间的遗传距离表明,类群 B(昆士兰桉)与类群 A 中 HK014-4 银顶纤皮桉(*E. laevopinea*)间的距离更近,这可能与类群 A 和 B 中同为桉属树种有关。类群 C 与 A 和 B 的遗传距离明显较远,说明伞房属树种与桉属树种间存在明显的遗传差异。由此可得,159 份桉树种质材料的主坐标分析结果与传统形态学分类状态基本一致。

2.3 种质资源亲缘关系分析

利用软件 NTsys 2. 10e,以非加权类平均法(UPGMA)进行聚类分析,得到 159 份桉树 DNA 材料的在 47 个 SSR 多态位点的聚类图(图 2)。根据

聚类分析图可将 159 份桉树 DNA 种质材料分为两大类群 I 和 II,其中类群 I 包括 137 份桉树种质材料,遗传相似度范围为 0. 436~1. 000,平均遗传相似系数为 0. 866;类群 II 包括 22 份桉树种质材料,遗传相似度范围为 0. 355~0. 745,平均遗传相似系数为 0. 525。

依据形态学分类系统中 42 种 159 份桉树种质材料的分类状态可知,类群 I 中 38 种 137 份桉树种质材料均属于桉属树种,类群 II 中 4 种 22 份桉树种质材料均属于伞房属树种,由此说明,159 份桉树种质材料在 47 个 SSR 位点中的聚类结果与形态学分类状态一致。

类群 I 中,在遗传相似系数为 0. 614 处,分为亚群 a 和亚群 b。其中类群 a 包括 133 份桉树种质材料, HK001-4 多枝桉(*E. viminalis*)、HK009-2 小叶桉(*E. parvula*)和 HK021-5 史密斯桉(*E. smithii*)间的遗传距离非常接近,三者间的遗传相似系数分别为 0. 991、0. 982 和 0. 973。形态学分类中多枝桉、小叶桉和史密斯桉均属于桉属双蒴盖亚属蓝桉组(section *Maidenaria*),三者的聚类结果与形态学分类状态一致。同样,属于蓝桉组的 HK018 假美叶桉(*E. mannifera*)、HK019 新英格兰桉(*E. nova-anglica*)和 HK020 灰桉(*E. cinerea*), HK011 毛皮桉(*E. macarthurii*)和 HK040 头果桉(*E. ceph-slocsrps*), HK013 山桉(*E. dalrympleana*)、HK015 亮果桉(*E. nitens*)和 HK016 邓恩桉(*E. dunnii*)之

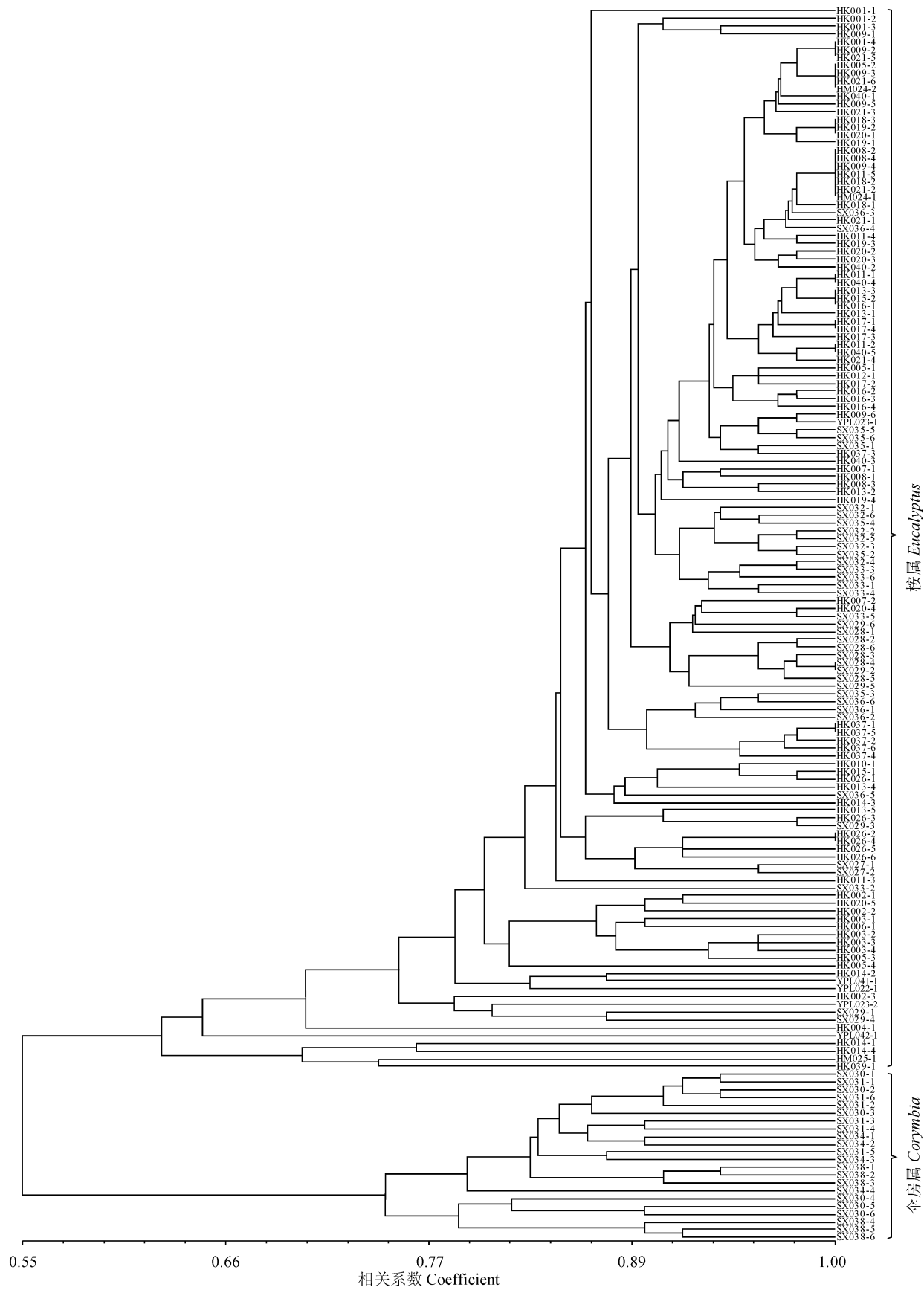


图 2 159 份桉树种质材料的 UPGMA 聚类分析  
Fig. 2 Cluster analysis of 159 eucalyptus germplasms by UPGMA

间的遗传相似度更高。HM024 柳桉(*E. saligna*) 在形态学分类中属于桉属双蒴盖亚属横脉组(section *Transversaria*),图 2 中 HM024-1, HM024-2 均表现出与蓝桉组部分树种的遗传相似性更高。从遗传相似性系数分析发现,柳桉与蓝桉组树种 HK001 多枝桉、HK005 迪恩桉(*E. deanei*)、HK008 巴吉桉(*E. badjensis*)、HK009 小叶桉、HK011 毛皮桉、HK018 假美叶桉、HK019 新英格兰桉、HK020 灰桉和 HK021 史密斯桉间的遗传相似性系数均高于 0.980,与同属于横脉组的 YPL023 大叶桉(*E. robusta*)、SX028 韦塔桉(*E. wetarensis*)、SX029 粗皮桉(*E. pellita*)、SX033 尾叶桉(*E. urophylla*)和 SX036 巨桉(*E. grandis*)间的遗传相似性系数分别为 0.981、0.936、0.882、0.964 和 0.982。Pryor 和 Johnson<sup>[30]</sup>曾明确指出,同一亚属内不同桉树树种间的杂种是频繁发生的,而且是可育的。由此说明,同一亚属内不同组分的树种间遗传相似性比较高,对遗传相似性更高的不同组间的树种进行杂交组合,能够为桉树杂交育种提供理论基础。

亚群 b 包括 4 份种质材料, HK014-1, HK014-4, HM025-1, HK-39-1。HK014 银顶纤皮桉的 2 份 DNA 材料间的遗传距离更近,二者间的遗传相似系数为 0.836;而 HM025 昆士兰桉与 HK039 少花桉具有更近的遗传关系,遗传相似系数为 0.745。

类群 II 中包括伞房属 4 种 22 份桉树 DNA 种质材料(托里桉-1~6, 皱果桉-1~6, 柠檬桉-1~4, 威瑞桉-1~6),其遗传相似度范围为 0.655~0.936,平均遗传相似系数为 0.801。22 份伞房属 DNA 种质材料与其余 137 份桉树 DNA 种质材料间的遗传相似度范围为 0.355~0.745,平均遗传相似系数为 0.525。图 2 显示出, SX030 托里桉和 SX031 皱果桉间的遗传距离更近, SX034 柠檬桉和 SX038 威瑞桉间具有更近的遗传距离。

## 3 讨 论

### 3.1 桉树种质资源的遗传多样性分析

遗传多样性作为生物多样性的重要组成部分,对维持生态系统和物种多样性具有重要的作用<sup>[31]</sup>。准确评价种质资源的遗传变异程度对于品种改良和种质资源的保存、利用有重要意义。本研究从 110 对 SSR 特异性引物中选出 47 个具有与 DNA 模板结合稳定、重复性好、扩增条带清晰等特性的多态位点对 42 种 159 份桉树种质材料进行遗传多样性分

析和聚类分析。47 对 SSR 引物中包括 19 对基于基因表达序列的 SSR 引物(EST-SSR, eSSR)和 28 对基于基因组序列的 SSR 引物(Genomic-SSR, gSSR)。在对桉树进行遗传多样性的研究中,利用不同来源的分子标记,能够获得更加客观、准确的遗传多样性评价<sup>[32]</sup>。

159 份桉树种质材料的遗传多样性分析的结果表明,47 个多态 SSR 位点的各项遗传多样性评价指标值均较高,能够有效地进行 42 种 159 份桉树种质材料的遗传多样性评价。分析各个多态性指标的变异系数发现,47 个 SSR 多态位点的 Shannon's 信息指数 *I* 值和观察杂合度 *Ho* 的离散程度比较大,变异系数值均大于 1,说明 47 个多态位点间的多态性程度变化较大。综合分析各多态性指标,位点 eSSR-GR018、位点 eSSR-GR083 和位点 eSSR-GR109 的各项评价指标值更高,多态性程度更丰富,反映的信息量更大,可能会在桉树种质资源的精确鉴定及指纹图谱等研究中发挥更大的作用。

### 3.2 桉树种质资源的亲缘关系分析

主坐标分析法是一种研究数据相似性或差异性的方法,通过 PCoA 法分析可以观察个体或群体间的差异,通过个体或群体间的差异,对研究材料进行个体间或群体间的分类分析。类平均法是使用算术平均的不加权的组对法,能够反映类群的表征相似程度<sup>[33]</sup>。

20 世纪 80 年代以来,中国桉树引种发展迅速。由于桉树在外观上具有一定的相似性,常把不同桉树树种笼统地作为“桉树”对待;而且可以作为参考的有关桉树分类的植物学文献和资料比较有限,以致于在很多情况下造成鉴定错误,甚至鉴定错误的结果广泛传播,影响甚大<sup>[34]</sup>。因此,对中国引种的桉树进行种间亲缘关系分析和种质资源的鉴定研究迫在眉睫。

本研究利用 PCoA 法分析 159 份桉树种质材料的分类结果表明,47 个 SSR 标记将 159 份桉树种质材料分成的三大类群结果与形态学分类结果基本一致。PCoA 法能够将 159 份桉树种质材料中 22 份伞房属材料和 137 份桉属材料明显区分,并且桉属昆士兰桉亚属的单种桉树昆士兰桉也表现出与桉属其他亚属有较远的遗传距离。由此证明了 47 个 SSR 标记在 PCoA 法中对 159 份桉树种质材料分类的有效性。UPGMA 法对 159 份桉树种质材料的聚类结果与 PCoA 法的分类结果基本一致,159 份种质材料分为桉属和伞房属两大类。桉属类群内不

同种间的遗传相似度值表明,同一亚属内不同组间的桉树树种遗传相似度较高,不同亚属间(昆士兰桉亚属和单蒴盖亚属)的树种间也存在遗传相似度较高的情况,这些可能能够为桉树杂交育种工作提供选种依据和理论基础。

长期以来,研究者都认为昆士兰桉与其它桉树均无近缘关系<sup>[1,28-29]</sup>。直至 Stokeo 等<sup>[35]</sup>利用分子标记研究证实了与昆士兰桉存在天然杂种的白桃花心桉(*E. acmenoides*)属于单蒴盖亚属。Ladiges 等<sup>[36]</sup>和 Steane 等<sup>[37]</sup>的研究中发现,桉属中昆士兰桉亚属与单蒴盖亚属遗传距离比较接近,这也说明昆士兰桉与单蒴盖亚属间具有很紧密的亲缘关系,很可能能够进行自然或人工杂交。本研究中,UP-GMA 聚类结果发现,昆士兰桉与桉属单蒴盖亚属

的少花桉具有更高的遗传相似度。这一结论为昆士兰桉和单蒴盖亚属间的杂交育种工作的开展提供了一个重要信息和理论基础,也为桉树种质资源的有效利用提供了重要参考。

桉树的遗传结构复杂且遗传多样性非常丰富,研究桉树群体的遗传结构和多样性对桉树遗传基础、分化规律、进化过程的研究和群体遗传改良、利用以及桉树基因资源的保存等方面均有重要意义。在桉树不同亚属间存在遗传隔离的理论下,昆士兰桉亚属表现出与单蒴盖亚属部分树种间更高的遗传相似度,这一结论不仅证实了昆士兰桉亚属与单蒴盖亚属间遗传关系较近,同时也为阐释桉树遗传结构和桉树生物系统学上具有重要意义。

参考文献:

[1] HILL KENNETH D,JOHNSON LAWRENCE A S. Systematic studies in the *Eucalyptus*-7. A revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae) [J]. *Telopea*, 1995, **6** (2-3): 185-504.

[2] WILCOX M D. A catalogue of the *Eucalyptus*[M]. New Zealand; Groome Poyry Ltd,Auckland. 1997;114-116.

[3] WILCOX M D. Supplement to a Catalogue of the *Eucalyptus* [M]. New Zealand; Groome Poyry Ltd, Auckland. 1998; 9-11.

[4] 沈君辉,宋东亮,赵运军,等. 桉树基因组和功能基因组[J]. 植物生理学通报,2010,**46**(1):94-100.  
SHEN J H,SONG D L,ZHAO Y J,*et al.* *Eucalyptus* genomic and functional genomics[J]. *Plant Physiology and Molecular Biology*,2010,**46**(1):94-100.

[5] 杨模华,李志辉,刘友权,等. 生物技术在桉树遗传育种中的应用[J]. 桉树科技,2001,2:15-27.  
YANG M H,LI Z H,LIU Y Q,*et al.* The application of biotechnology in *Eucalyptus* genetic and breeding[J]. *Eucalyptus Science & Technology*,2001,2:15-27.

[6] 周炎花,乔小燕,马春雷,等. 广西茶树地方品种遗传多样性和遗传结构的 EST-SSR 分析[J]. 林业科学,2011,**47**(3):59-67.  
ZHOU Y H,QIAO X Y,MA C L,*et al.* Genetic diversity and structure of tea landraces from Guangxi based on EST-SSR analysis[J]. *Scientia Silvae Sincae*,2011,**47**(3):59-67.

[7] 黄平,崔鹏娇,郑勇奇,等. 基于 SSR 标记月季品种鉴定及遗传关系分析[J]. 林业科学,2012,**48**(10)10:55-62.  
HUANG P,CUI P J,ZHENG Y Q,*et al.* SSR-based molecular identification and analysis of genetic relationship among rose varieties[J]. *Scientia Silvae Sincae*,2012,**48**(10):55-62.

[8] 梁玉琴,张嘉嘉,梁晋军,等. 河南省柿种质资源的遗传多样性[J]. 林业科学,2015,**51**(6):71-80.

[9] 王金玲,王瑞俭,杜凤国,等. 天女木兰遗传多样性微卫星标记的研究[J]. 西北植物学报,2017,**37**(2):266-272.

[10] 刘洪博,范源洪,陆鑫,等. 29 份云南甘蔗创新种质的 SSR 遗传多样性分析和指纹图谱构建[J]. 西北植物学报,2015,**35** (12):2 414-2 421.

[11] 刘果,谢耀坚. 分子标记技术在桉树育种中的应用研究[J]. 世界林业研究,2012,**25**(3):19-25.

[12] 刘果,张党权,谢耀坚,等. 桉树 Genomic-SSR 和 EST-SSR 引物的快速筛选与通用性研究[J]. 林业科学,2013,**49**(2): 127-133.

[13] DENIS M,BOUVET J-M. Efficiency of genomic selection with models including dominance effect in the context of *Eucalyptus* breeding[J]. *Tree Genetics & Genomes*,2012,**9**(1): 37-51.

[14] 宋永芳. 我国桉树资源的利用与展望[J]. 林产化工通讯,

[15] LIANG Y Q,ZHANG J J,LIANG J J,*et al.* Genetic diversity among persimmon germplasms in henan province[J]. *Scientia Silvae Sincae*,2015,**51**(6):71-80.

[16] WANG J L,WANG R J,DU F G,*et al.* Genetic diversity of *Magnolia sieboldii* assessed with SSR markers[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*,2017, **37**(2):266-272.

[17] LIU H B, FAN Y H, LU X, *et al.* Genetic diversity and construction of fingerprint of 29 Yunnan germplasms of Sugarcane innovation by SSR[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*,2015,**35**(12):2 414-2 421.

[18] LIU G,ZHANG D Q,XIE Y J,*et al.* Rapid screening and transferability analysis of Genomic-SSR and EST-SSR primers in *Eucalypt* [J]. *Scientia Silvae Sincae*, 2013, **49** (2): 127-133.

- 1998, **32**(4):3-7.
- SONG Y F. The analysis of utilization and prospection among *Eucalyptus* resources in China[J]. *Journal of Chemical Industry of Forest Products*, 1998, **32**(4):3-7.
- [15] BOLAND D J, BROOKER M I H, CHIPPENDALE G M, *et al.* Forest Trees of Australia[M]. 5th ed. Melbourne: Nelson/CSIRO, 2006:736.
- [16] 谢耀坚. 中国桉树育种研究进展及宏观策略[J]. 世界林业研究, 2011, **24**(4):50-54.
- XIE Y J. Research progress on *Eucalyptus* breeding and its strategy in China[J]. *World Forestry Research*, 2011, **24**(4):50-54.
- [17] 谢耀坚. 我国桉树种质资源现状与育种目标探讨[J]. 桉树科技, 2012, **29**(2):33-39.
- XIE Y J. Study on *Eucalyptus* selection objectives and current situation of genetic resources in China[J]. *Eucalyptus Science & Technology*, 2012, **29**(2):33-39.
- [18] GAULI A. Genetic diversity and adaptation in *Eucalyptus pauciflora*[D]. Tasmania: University of Tasmania, 2014.
- [19] 陈升侃. 基于 SSR 粗皮桉种源遗传多样性研究[D]. 南宁: 广西大学, 2015.
- [20] 宋志娇, 杨合宇, 翁启杰, 等. 细叶桉群体的遗传多样性和受选择位点[J]. 林业科学, 2016, **52**(9):39-47.
- SONG Z J, YANG H Y, WENG Q J, *et al.* Genetic diversity and selective loci in *Eucalyptus tereticornis* populations[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, **52**(9):39-47.
- [21] 田 华. 桉树 4 个种遗传多样性的 ISSR 分析及 STS 标记开发初探[D]. 长沙: 中南林业科技大学, 2009.
- [22] 张党权, 田 华, 谢耀坚, 等. 桉树 4 个种遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, **30**(1):12-17.
- ZHANG D Q, TIAN H, XIE Y J, *et al.* Genetic diversity of four *Eucalyptus* species by ISSR[J]. *Journal of Central South University of Forestry & Technology*, 2010, **30**(1):12-17.
- [23] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. *Focus*, 1990, **12**:13-15.
- [24] GAN S M, SHI J S, LI M, *et al.* Moderate-density molecular maps of *Eucalyptus urophylla* S. T. Blake and *E. tereticornis* Smith genomes based on RAPD markers[J]. *Genetica*, 2003, **118**:59-67.
- [25] 李发根. 尾叶桉和细叶桉 STS 标记连锁图谱构建及生长状况 QTL 定位研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010.
- [26] DAVID B, RAYMOND L W, MARK S, RONALD W D. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphism[J]. *Am. J. Hum. Genet.*, 1980, **32**(3):314-331.
- [27] 丁西朋, 罗小燕, 张 龙, 等. 新引进桂花草资源的 SSR 遗传多样性分析[J]. 广东农业科学, 2015, **22**:32-38.
- DING X P, LUO X Y, ZHANG L, *et al.* Genetic diversity analysis of newly introduced *Stylosanthes* varieties by SSR markers[J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2015, **22**:32-38.
- [28] PRYOR L D, JOHNSON L A S. A Classification of the *Eucalyptus*[M]. Canberra: The Australian National University, 1971:102.
- [29] BROOKER M I H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae) [J]. *Australian Systematic Botany*, 2000, **13**(1):79-148.
- [30] PRYOR L D, JOHNSON L A S. *Eucalyptus*, the universal Australian. In: Keast A [J]. *Ecological Biogeography of Australia*, 1981:499-536.
- [31] 刘振盼. 分子生物学技术在林木遗传育种研究中的应用[J]. 农业科技与装备, 2009, **185**(5):23-25.
- LIU Z P. Applications of molecular biotechnology in heredity breeding of forest trees[J]. *Agricultural Science & Technology and Equipment*, 2009, **185**(5):23-25.
- [32] 宋跃朋, 江锡兵, 张 曼, 等. 杨树 Genomic-SSR 与 EST-SSR 分子标记遗传差异性分析[J]. 北京林业大学学报, 2010, **32**(5):1-7.
- SONG Y P, JIANG X B, ZHANG M, *et al.* Genetic differences revealed by genomic-SSR and EST-SSR in *Poplar*[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, **32**(5):1-7.
- [33] NEI M, KUMAR S. Molecular Evolution and Phylogenetic [M]. Oxfordshire: Oxford University Press, 2000:76.
- [34] 祁述雄. 中国桉树[M]. 北京: 中国林业出版社, 2002:33-55.
- [35] RHONDA L S, MERVYN S, DAVID J L, *et al.* Natural inter-subgeneric hybridization between *Eucalyptus acmenoides* Schauer and *Eucalyptus cloeziana* F. Muell (Myrtaceae) in southeast Queensland[J]. *Annals of Botany*, 2001, **88**(4):564-570.
- [36] LADIGES P Y, UDOVICIC F. Comment on a new classification of the *Eucalyptus*[J]. *Australian Systematic Botany*, 2000, **13**(1):149-152.
- [37] STEANE A D, NICOLLE D, MCKINNON G, *et al.* Higher-level relationships among the *Eucalyptus* is resolved by ITS-sequence data[J]. *Australian Systematic Botany*, 2002, **15**(1):49-62.

(编辑: 宋亚珍)