

基于 SSR 分子标记构建南方型 美洲黑杨初级核心种质

彭 婵¹, 樊孝萍², 苏晓华³, 龙开莲², 张新叶^{1*}

(1 湖北省林业科学研究院 湖北省速生丰产林工程技术研究中心, 武汉 430075; 2 湖北省林业科学研究院石首杨树研究所, 湖北石首 434400; 3 中国林业科学研究院 林业研究所, 北京 100091)

摘 要:以所收集的 363 份美洲黑杨无性系为实验材料, 利用 20 对 SSR 引物扩增数据, 设置 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40% 共 7 个取样梯度构建南方型美洲黑杨初级核心种质, 并采用平均观察等位基因数(N_a)等遗传参数的 t 检验对核心种质有效性进行确认, 以初级核心种质、保留种质以及原始种质三者之间平均观察等位基因数(N_a)等遗传参数的保留比例作为评价指标, 结合主坐标轴分析法对初级核心种质做进一步代表性确认。结果显示: (1) 20 对 SSR 引物共检测到 278 个多态位点, 遗传多样性参数 I 、 H 分别为 1.667 和 0.688 2, 表明南方型美洲黑杨种质资源具有丰富的遗传变异。 (2) 比较平均 N_a 、 I 、 H 变化确定 15% 为最佳取样比例, 得到 54 份核心种质和 309 份保留种质, 构建的初级核心种质与原始种质的平均 N_a 、 I 、 H 经 t 检验不显著, 除平均 N_a 外其他平均遗传多样性参数, 如 N_e 、 H_o 、 I 、 H 的保留率分别为 111%、105%、104% 和 104%。 (3) PCoA 分析显示, 所构建的初级核心种质不仅与原始种质分布相似, 而且分散均匀覆盖较全面, 可以代表原始种质在图中的几何分布。研究认为, 所构建的 45 份初级核心种质保存了原始种质大部分的等位基因和基因型, 剔除了原始种质的遗传冗余度和遗传重复度, 具有更高的遗传多样性参数保留率, 能全面代表原始种质的遗传多样性。

关键词: 南方型美洲黑杨; 初级核心种质; SSR

中图分类号: Q346⁺.5; Q789 **文献标志码:** A

Construction of Core Collection in Southern Type of *Populus deltoides* Using SSR Markers

PENG Chan¹, FAN Xiaoping², SU Xiaohua³, LONG Kailian², ZHANG Xinye^{1*}

(1 Hubei Academy of Forestry, Hubei Fast-growing and High-yield Forest Engineering Technology Research Center, Wuhan 430075, China; 2 Shishou Research Institute of Poplar, Hubei Academy of Forestry, Shishou, Hubei 434400, China; 3 Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: 363 clones of *Populus deltoides* were used as test materials. Based on 20 pairs of SSR molecular marker amplification data, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35% and 40% sampling ratios were set to construct the primary core collection of *P. deltoides*. The validity of the core collection was supported by t -test using genetic parameters such as the average number of observed alleles (N_a). Retention ratio of genetic diversity such as average observed allele number (N_a) between core collection, reserve collection and original collection, and the core collection was further confirmed by the PCoA analysis. The results were

收稿日期: 2018-12-06; 修改稿收到日期: 2019-01-25

基金项目: “十三五”国家重点研发计划(2016YFD0600402); 湖北省技术创新重大专项(2016ABA111)

作者简介: 彭 婵(1983—), 女, 助理研究员, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: 837718728@qq.com

* 通信作者: 张新叶, 研究员, 主要从事林木遗传育种研究。E-mail: 1641135733@qq.com

described as follows: (1) A total of 278 polymorphic loci was detected by 20 pairs of SSR primers. The genetic diversity parameters I and H were 1.667 and 0.688 2, respectively, indicating that the southern type of *P. deltoides* germplasm resources were rich in genetic variation. (2) Comparing the average N_a , I and H changes to determine the optimal sampling ratio of 15%, obtaining 54 core collections and 309 reserve collection, t -test analysis suggested that there was not a significant correlation between average N_a , I and H of primary core collection and the original collection ($P > 0.05$), except for the average N_a , the retaining ratios of N_e , H_o , I and H was 111%, 105%, 104% and 104%, respectively. (3) Principal coordinate analysis (PCoA) showed that the primary core collection was not only similar to the original germplasm distribution, but also distributed uniformly and comprehensively, which could represent the geometric distribution of the original germplasm in the figure. These results demonstrated that the 45 accessions as primary core collection could preserved most of the alleles and genotypes of the original germplasm, Some genetic diversity indexes increase while the genetic redundancy and genetic repetition was removed, which mean that the primary core collection could stand for original collection excellently.

Key words: southern type of *Populus deltoides*; primary core collection; SSR

美洲黑杨(*Populus deltoides* Bartr. ex Marsh.)也叫三角叶杨,南方型美洲黑杨主要起源于美国南方密西西比河沿岸,中国没有自然分布,20 世纪 70 年代被引入中国,因其优良无性系具有早期速生、材质好、抗逆性强、适生范围广、易扩繁^[1-2]等特点,已成为中国重要的速生工业用材林树种^[3],又是最适合中国中部江汉平原滩地造林的生态防护林树种之一^[2]。近几十年,中国在资源引进基础上通过人工杂交已培育出包括 NL95、NL895 等 NL 系列^[4],‘中林 46’^[5],‘丹红杨’^[6]等众多综合表型优良的黑杨新品种,满足了中国日益增长的木材需要,在推动地方经济增长、林农增收和生态保护中发挥了重要作用。

优良新品种培育需要丰富的种质资源作为其遗传基础,而资源收集和保存是关键。湖北省林业科学研究院及其杨树研究所,通过南京林业大学及中国林业科学研究院林业研究所引进收集了大量南方型美洲黑杨资源,于 2011 年在位于江汉平原的石首市东升镇建立了种质资源库,目前保存有 448 份南方型美洲黑杨资源,随着持续发展的资源收集工作,其数量还会不断攀升。这些丰富的南方型美洲黑杨资源为高抗优质新品种选育提供了保障,项目组前期已经开展了生长特征^[7]、物候^[8]相关研究,还有大量的种质特征尚未实现进一步的研究利用。南方型美洲黑杨为多年生高大乔木,常规资源保存占地面积大,长期保存管理成本高,因此提高种质资源的管理质量和效率,构建核心种质并厘清其复杂的遗传背景十分必要和迫切。

1984 年澳大利亚学者 Frankel^[9]首次提出核心种质学说,目前国内外已经在杜仲^[10]、桂花^[11]、苹

果^[12]、木荷^[13]、西瓜^[14]、萝卜^[15]、欧洲黑杨^[16]等很多植物中开展了核心种质构建研究,其结果均显示构建有效的核心种质能极大提高种质资源的保存管理效率,而且为种质资源参与后续的品种改良与新品种创制提供了物质基础。本研究旨在利用 SSR 分子标记技术对南方型美洲黑杨种质库中的资源遗传多样性与亲缘关系进行分析,同时基于分子数据构建南方型美洲黑杨初级核心种质,促进现有资源的深入研究,为优异基因挖掘提供核心材料,为华中地区乃至全国美洲黑杨优良新品种选育搭建实用性平台。

1 材料和方法

1.1 实验材料

研究材料来源于湖北石首市东升镇湖北省林业科学研究院石首杨树研究所营建的南方型美洲黑杨种质资源库(112°45'E, 29°40'N),资源库面积 16.67 hm²,海拔 31~36 m,年均降雨量 1 099~1 230 mm。实验材料包括中国林业科学研究院林业所杨树课题组从美国路易斯安纳州及田纳西州引种的 139 个无性系,以及从南京林业大学美洲黑杨基因库的 83 个半同胞家系中初筛出的 224 个无性系,共 363 份无性系种质。2017 年 6 月采集全部 363 份南方型美洲黑杨优树无性系种质的新鲜嫩叶,冰盒保存带回实验室后置于-80 ℃冰箱中备用。

1.2 实验方法

采用 CTAB 法提取 DNA。SSR-PCR 反应体系 25 μL:1U *Taq* 酶,2 μL MgCl₂ (25 mmol/L),0.5 μL dNTP(10 mmol/L),10 μmol/L 上下游引物 0.5 μL,25 ng 基因组 DNA,无菌去离子水(ddH₂O)补

齐。PCR 扩增程序为：95 ℃预变性 3 min;95 ℃变性 30 s,60 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s(10 个循环),95 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 30 s(20 个循环);72 ℃延伸 6 min,SSR 扩增产物经由 ABI3730 全自动测序仪毛细管电泳检测鉴别。

根据已有报道的杨树基因组 SSR 引物,初步合成 30 对荧光引物,由上海生工公司合成。以 6 个不同家系或种源的南方型美洲黑杨种质为 DNA 模板,在优化好的 SSR 反应体系中筛选引物。最后选出 20 对目的片段清晰、多态性高的引物(表 1)用于 363 份南方型美洲黑杨种质的分子生物学分析。使用 Genemapper 软件分析 SSR 数据结果,记录每个位点的分子量大小。

1.3 取样方法

1.3.1 取样比例 借鉴前人的研究经验将参试种质分别按 40%(145)、35%(127)、30%(108)、25%(91)、20%(73)、15%(54)和 10%(36)的比例从总体中取样,并对 7 个不同取样规模的初级核心种质进行评价。

1.3.2 取样方法 南方型美洲黑杨初级核心种质

构建采用逐步聚类随机取样法(stepwise clusters with random sampling strategy,SCR):首先根据所有种质类间距离的远近,将样品进行聚类分析组成树状图,从差异最低分类水平上的类(组)内随机抽取一个样品保留进入下一轮聚类分析,若组内只有一个样品则该样品直接保留进入下一轮聚类分析;将所有保留的样品再次聚类,按之前同样的方法取样,再进入下一轮聚类、取样,循环直至所取样品量达到设定的 7 个取样比例^[17]。

1.3.3 遗传距离计算与聚类方法 本研究将所有种质资源视为一组,采用 NTSYS 软件估算各无性系样品间遗传距离。遗传相似系数采用简单匹配(Simple matching,SM)系数,选用 SAHN 程序,基于遗传距离上运用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means,UPG-MA)对原始群体进行聚类取样。

1.4 核心种质代表性检验和评价

借助 SSR 标记的多样性评价方法,利用 POP-GENE1.32 对样品进行平均等位基因数(number of alleles,Na)、平均有效等位基因数(effective number

表 1 实验用 SSR 引物
Table 1 SSR primers used in this study

引物编号 Primer number	正向引物序列(5'→3') Forward primer sequence	反向引物序列(5'→3') Reverse primer sequence	重复单元 Repeat motif
P1	CTGGTCCATCCAAGAGACAC	TCCTATCCCACATCCAAAAA	TCC
P2	CAAAGCAGCTCCAACTCATT	AATCCCAACACAACAGAGGA	CCTC
P3	TGTTCTTGTCGCCTATCCAT	ATTGATTTGAGGCTTGCATT	AT
P4	CCCTCCCAGAAATCAAACCTT	TGACTCGTTTCCATTGGATT	GA
P5	TCAATCTTCTCCAGCCATTC	GGGTAGACACGCCCTTTTAT	TTG
P6	GGAGGAGGAAGAGGAAGACA	ATATCCTTCTCCCGGAACAC	AG
P7	AGGGCTTTTGTCTTTGTTT	GGTTTGTGTGTGTTGGGTTT	ATG
P9	CCCTTTTAATTACCTTTCCC	GAGGGACGTGAGAATCATT	CT
P10	TCAATGATTGGTCTTGTTGA	CAGAATTCAGAATAGAACCCA	GT
P12	ATAATGTTCAAAAAGGGCAA	ATTTCAATCATGACCTCTGC	AAG
P13	TTCAGAATGTGCATGATGG	GTGATGATCTCACCGTTTG	CTT
P15	GCTGTCAGAATCAAACACTTC	AAGCAGATAACTAAGACATGCC	GA
P16	AAGAGAGATAGCATCACCAAG	TATGTCGAGGAAATCCTTAGC	GA
P17	TCTGTTAATTTCTCAGCTGTTG	TGCTTTACTAAACTTTTTACTGC	GA
P19	ATTGTAATTATTGAACACATGCC	GTGCAGTTCAGAGTATTGTTG	GA
P21	ATCATGCGTTCGGCTACAGC	CTCAAACCTCAACTGTTATAAC	CTT
P24	AACCTCGAATTAAGAATAACCC	GTCTCGGTTAAGGTATTGTCGC	GA
P25	GCAGCATTGTAGAATAATAAAAG	AAGGGGTCTATTATCCACG	GA
P27	ACTAAGGAGAATTGTTGACTAC	TATCTGGTTTCCTCTTATGTG	GT
P30	GCATTTCTCTCTCCACTGTC	AGCTGCCAACATTCACTACT	AT

of alleles, N_e)、平均观测杂合度 (observed heterozygosity, H_o)、平均 Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity index, H)、平均 Shannon's 信息指数 (Shannon's information index, I) 等遗传参数计算,筛选最佳取样比例构成初级核心种质。通过 SPASS19 软件对原始种质与初级核心种质间遗传参数均值进行方差齐性 F 检验和差异显著性 t 检验^[10]。以各项群体遗传参数的保留率来评价初级核心种质是否保留原始种质的遗传结构,运用主坐标分析法利用 GenAlEx6.5 构建 PCoA (Principal coordinate analysis) 图以确认评价初级核心种质的代表性和异质性。

2 结果与分析

2.1 南方型美洲黑杨遗传多样性

利用筛选出的 20 对 SSR 引物对 363 个南方型美洲黑杨无性系的遗传多样性进行分析(表 2),共扩增多态性位点 278 个,Shannon's 信息指数(I)和 Nei's 基因多样性指数(H)分别为 1.667 和 0.688 2,说明所收集的南方型美洲黑杨无性系种质具有较丰富的遗传多样性。

2.2 不同取样比例的比较

基于 363 份南方型美洲黑杨种质的聚类结果,采用逐步聚类随机取样法,分别构建了 40%(145)、35%(127)、30%(108)、25%(91)、20%(73)、15%(54)和 10%(36)的 7 个候选初级核心种质,采用 N_a 、 I 和 H 这 3 个遗传多样性主要衡量指标,对 7 个候选初级核心种质的 SSR 数据进行检验,并对结果进行对比分析(表 3)。

从表 3 可以看出,随着核心种质取样比例的下降,观测等位基因数(N_a)也随之降低,趋势平缓。而 Nei's 基因多样性指数(H)则随着核心种质取样比例的下降而增大,15%取样比例时上升速率最快,15%之后又趋于平缓,即 15%取样比例后期增幅小于前期增幅。Shannon's 信息指数(I)起初是降低,到取样比例为 30%之后开始升高,到 15%达所有取样比例中最高值(1.733 8)。总体说来遗传多样性随取样比例减少而增加,15%取样比例后又下降,这种趋势在 Shannon's 信息指数(I)中表现为数值明显降低,在 Nei's 基因多样性指数(H)中则表现为增幅明显下降,说明取样比例在 15%时候选核心种质群体遗传冗余度最低。在 15%取样比例之前由于取样量过大增加了群体的遗传冗长度和遗传重复度,反而拉低了核心种质的遗传多样性。15%之后

随着取样比例的降低取样量过少,导致丢失了过多的遗传变异,致使遗传多样性又呈降低趋势。因此本研究最终确定取样比例为 15%,即从 363 份原始种质中获得了 54 份南方型美洲黑杨初级核心种质。

2.3 南方型美洲黑杨初级核心种质的评价与鉴定

2.3.1 核心种质与原始种质遗传参数的 t 检验

利用 SPSS19.0 统计软件对初级核心种质和原始种质 2 个群体的观测等位基因数(N_a)、Shannon's 信息指数(I)和 Nei's 基因多样性指数(H)分别进行 F 检验和 t 检验, F 检验结果(表 4)显示,2 个群体样本的方差是齐性的, t 检验结果在概率 0.05 水平上

表 2 SSR 位点在总群体中的遗传参数

Table 2 Genetic parameters of total populations at SSR loci

位点 Locus	N_a	N_e	H_o	I	H
P1	16	3.749	0.265 7	1.801 2	0.733 3
P2	14	5.888 2	0.168 7	1.941 2	0.830 2
P3	23	4.447 1	0.223 8	2.124 8	0.775 1
P4	3	1.256 4	0.795 6	0.400 4	0.204 1
P5	7	3.252 4	0.306 5	1.333	0.692 5
P6	26	12.832	0.076 6	2.791 4	0.922 1
P7	9	1.951 8	0.511 7	0.959 4	0.487 6
P9	14	5.034	0.197 5	1.954 3	0.801 3
P10	16	3.989	0.249 7	1.722 9	0.749 3
P12	6	1.396 6	0.715 6	0.549 7	0.284
P13	2	1.678 1	0.595 4	0.593 9	0.404 1
P15	10	3.978 3	0.250 3	1.609 4	0.748 6
P16	21	8.380 7	0.118 1	2.346 2	0.880 7
P17	5	2.727 1	0.365 8	1.174 5	0.633 3
P19	22	8.274 8	0.119 6	2.476 9	0.879 2
P21	6	3.532 8	0.282 1	1.514 3	0.716 9
P24	18	7.106 7	0.139 5	2.304 9	0.859 3
P25	22	12.265	0.080 3	2.686 3	0.918 5
P27	24	3.528 7	0.282 4	1.890 7	0.716 6
P30	14	2.114 8	0.472 1	1.165 4	0.527 2
平均 Mean	13.9	4.869 2	0.310 9	1.667	0.688 2

注: N_a . 平均等位基因数; N_e . 平均有效等位基因数; H_o . 平均观测杂合度; I . 平均 Shannon's 指数; H . 平均 Nei's 基因多样性指数。下同

Notes: N_a . Average number of allele; N_e . Average effective number of allele; H_o . Average observed Heterozygosity; I . Average Shannon's information index; H . Average Nei's diversity index. The same as below

表明初级核心种质以上 3 组遗传参数与初始种质差异不显著,说明构建的南方型美洲黑杨初级核心种质能很好地代表原始种质资源。

2.3.2 原始种质、初级核心种质和保留种质的遗传多样性比较 363 份南方型美洲黑杨原始种质通过多次聚类取样得到 54 份初级核心种质和 309 份保留种质,保留种质为去除核心种质后剩余的种质,这部分种质作为遗传资源储备有重要意义。20 对基因组 SSR 引物扩增的原始种质、初级核心种质、保留

种质的遗传多样性保留率结果见表 5,占原始种质 15%的核心种质样品对平均观测等位基因数(N_a)、平均有效等位基因数(N_e)、平均观测杂合度(H_o)、平均 Shannon's 信息指数(I)和平均 Nei's 基因多样性指数(H)的保留比例分别为:81%、111%、105%、104%和 104%,其中核心种质中仅平均观测等位基因数较少于原始种质和保留种质,其他 5 个遗传多样性参数均高于原始种质。说明核心种质在少量的样品情况下,保留了更多的遗传变异,有效剔除了原始 363 份种质中的遗传冗余。本研究构建的初级核心种质各个遗传参数保留率较优,符合以 10%的核心样品代表原始 70%以上的遗传多样性的标准^[18]。

309 份保留种质的 6 个遗传多样性参数的保留率分别为 96%、97.4%、99.1%、98.4%和 99.1%,均低于原始种质,说明因去除了遗传多样性更高的样品而导致群体的遗传重复率升高。

2.3.3 核心种质的确认 为进一步确认所选南方型美洲黑杨初级核心种质的代表性,最后对原始种质和初级核心种质利用 GenAlEx6.5 进行主坐标 PCoA 分析,前三主成分贡献率依次为 17.71%、12.69%和 6.87%,累积贡献率为 37.27%,可以代表原数据的主要信息。选取最大贡献率的 2 个主坐标

表 3 各取样比例下的遗传多样性比较					
Table 3 Ration of genetic diversity between each selection scale					
取样比例 Sampling ratios/%	候选核心 种质数目 Collection number	N_a	I	H	
100	363	13.9	1.667	0.688 2	
40	145	13.0	1.710 9	0.699 5	
35	127	12.6	1.710 3	0.700 4	
30	108	12.35	1.708 2	0.702 1	
25	91	12.15	1.719 8	0.705	
20	73	11.7	1.724 1	0.708 1	
15	54	11.25	1.733 8	0.714 1	
10	36	10.4	1.714 4	0.715 9	

表 4 初级核心种质与原始种质的遗传多样性指标 t 检验							
Table 4 T -test of the genetic diversity index between primary core collection and original collection							
评价参数 Evaluation parameter	种质群 Germplasm group	平均值 Average value	标准差 Standard deviation	差值均数 Difference mean	差值标准差 Standard error difference	t	P
N_a	原始种质 Original collection	13.90	7.573	-2.650	2.153	-1.231	0.226
	初级核心种质 Primary core collection	11.25	5.946				
I	原始种质 Original collection	1.667	0.703 5	0.066 8	0.223 3	0.029 9	0.766
	初级核心种质 Primary core collection	1.733 9	0.708 8				
H	原始种质 Original collection	0.688 2	0.206 4				
	初级核心种质 Primary core collection	0.714 1	0.203 7	0.025 9	0.064 8	0.399	0.692

注:a=0.05 显著水平下, $P>0.05$ 时,差异不显著; $P<0.05$ 时,差异显著
Note:at a=0.05 significant level, $P>0.05$,the difference is not significant; $P<0.05$,the difference is significant

表 5 原种质、保留种质与初级核心种质的遗传多样性保留率对比					
Table 5 Contradistinction of the genetic diversity between original collection, primary core collection and reserve collection					
群体 Population	N_a	N_e	H_o	I	H
原始种质 Original collection	13.9	4.869 2	0.626 7	1.667	0.688 2
初级核心种质 Primary core collection	11.25	5.395 2	0.657 6	1.733 8	0.714 1
保留率 Retention rate/%	81	111	105	104	104
保留种质 Reserve collection	13.35	4.742	0.621 3	1.639 8	0.681 8
保留率 Retention rate/%	96	97.4	99.1	98.4	99.1

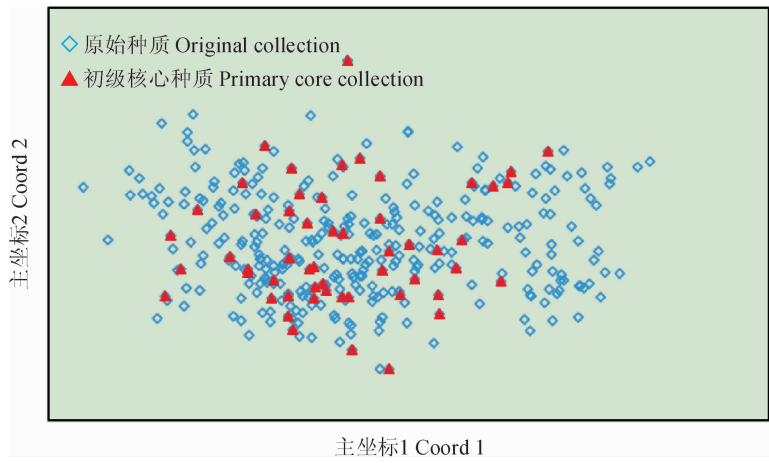


图 1 初级核心种质和原始种质的主坐标分布图

Fig. 1 Principal coordinates plots of primary core collection and original collection

构建了南方型美洲黑杨种质分布二维图(图 2),图 2 中可以看出原始种质中部分材料比较集中,分布近乎重叠,而初级核心种质不仅与原始种质分布相似,而且分散均匀覆盖较全面,可以代表原始种质在图中的几何分布,说明对原始种质的遗传结构能很好保持。

3 讨 论

形态数据和分子标记数据是用于构建核心种质最常用且有效的数据。形态数据容易获得,然而在构建核心种质存有局限性,因为它们在很大程度上受植物发育时期的影响,受环境的影响也很大^[19]。而分子标记数据采集自植物基因组,不受组织部位、生长期或环境的影响,且具信息量大、稳定等优点^[20],许多研究证明根据基因型数据构建的核心种质优于基于表型数据构建的核心种质^[19-20]。在分子标记中微卫星 SSR 标记应用尤为广泛,并且在美洲黑杨中具有共显性分离和高度的多态性^[21],此前利用微卫星标记对美洲黑杨已经进行了遗传多样性和品种鉴定工作^[22-23],另一方面,微卫星标记也成为了美洲黑杨指纹图谱构建的重要标记^[24]。因此本研究从 30 对 SSR 引物中筛选出 20 对带型清晰重复性好的引物构建南方型美洲黑杨初级核心种质。

核心种质构建不单单是筛选原始样品汇集成核心群体,Spagnoletti 等^[25]认为若不对构建的核心种质进行评价,构建的核心种质就毫无价值。对核心种质的检验取决于构建时所使用的数据类型,一般来说,分子标记类间断性数据常采用遗传参数来进行评价。对核心种质、原始种质的遗传参数进行 t

检验,结果差异显著性与否可以评价核心种质的有效性,前人通过 t 检验确定了所构建的古巴可可树^[26]、金针菇^[27] 等核心种质,并比较样品分布图 PCoA 相似性来确认核心种质的代表性^[27-28]。此外,等位基因保留率也是检验核心种质实用性的重要参数^[28],用于检测是否有足够多的变异保留于核心种质中,也有综合比较平均观察等位基因数(N_a)、平均有效等位基因数(N_e),平均 Shannon's 指数(I) 等^[29] 参数来评价各位点上的多样性差异。本研究首先采用平均观察等位基因数(N_a)、平均 Shannon's 指数(I) 和平均 Nei's 基因多样性指数(H)这 3 个重要参数的 t 检验对核心种质的有效性进行了确认($P>0.05$)。同时,比较核心种质、保留种质以及原始种质之间平均观察等位基因数(N_a)等 6 个遗传参数的保留率,发现除 N_a 在保留种质中的保留率高于核心种质外,其他参数在核心种质中保留率为 104%~110%,均明显高于保留种质和原始种质,符合核心种质构建的标准,进一步 PCoA 图也直观印证所构成初级核心种质的有效性。

确定抽样比例是构建核心种质的一个重要方面,目前的报道中取样比例 5%~40%不等,10%~30%是大部分核心种质构建效果比较好的取样比例^[12-14],一般认为群体数较多或遗传多样性小的样本,其核心种质所取的比例可相对小一些,反之可适当提高^[29],参考前人结果本研究分别设计了 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40% 共 7 个取样比例,结果显示代表等位基因丰富程度的观测等位基因数(N_a)随着取样比例下降有所降低,但总体降幅不大,说明因取样比例的减少有少量等位基因也跟随被剔除。代表遗传多样性的 Nei's 基因多样性指

数(H)一直持上升趋势,在取样比例 15%时出现最大增速。Shannon's 信息指数(I)变化不规律,先降后升取样比例 15%时出现最大值,取样比例为 10%时 Shannon's 信息指数陡降而 Nei's 基因多样性指数略有升高。不同的变化可能是因为这两个指数估算方法的原理不同,Nei's 基因多样性指数侧重反映群体遗传变异均匀度,而 Shannon's 信息指数侧重于反映丰富度,也更容易受样本数量变化影响^[30]。综合以上分析,本研究确定 15%取样比例为最佳取样比例,这也与倪茂磊^[31]对江苏省泗洪县陈圩林场美洲黑杨种质资源库 124 个美洲黑杨无性构建初级

核心种质的结果一致,但低于曾宪君^[16]利用表型性状所构建的欧洲黑杨比例 30.2%,主要可能是欧洲黑杨来自于不同国家,更大地理跨度致使其具有更高的遗传多样性,故核心种质所占的比例更大一些。

综上所述,本研究以 363 份南方型美洲黑杨为材料,利用 SSR 标记数据通过构建 7 个取样比例梯度和逐步聚类随机取样法获得了 45 份初级核心种质占原始种质的 15%,经 t 检验和主坐标分析法进行确认,表明本研究中构建的初级核心种质能全面代表原始种质的遗传多样性。

参考文献:

[1] 藕 丹. 美洲黑杨×青杨派杂种无性系 SSR 和 SCoT 指纹图谱的构建与遗传关系分析[D]. 陕西杨陵:西北农林科技大学,2017.

[2] 董中源. 美洲黑杨自然多倍体筛选与鉴定及群体遗传多样性分析[D]. 南京:南京林业大学,2017.

[3] 陶申童. 基于重测序的杨树基因组重组事件的研究[D]. 南京:南京林业大学,2017.

[4] 曾亚男. 欧美杨新一代杂种无性系评比试验[D]. 长沙:中南林业科技大学,2012.

[5] 康向阳. 关于杨树多倍体育种的几点认识[J]. 北京林业大学学报,2010,**32**(5): 149-153.
KANG X Y. Some understandings on polyploid breeding of poplars[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2010, **32**(5): 149-153.

[6] 冯锦霞,张川红,郑勇奇,等. 利用荧光 SSR 标记鉴别杨树品种[J]. 林业科学,2011,**47**(6): 167-174.
FENG J X,ZHAG C H,ZHENG Y Q,*et al.* Identification of poplar varieties by SSR markers using capillary electrophoresis with fluorecence detection[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2011, **47**(6): 167-174.

[7] 黄国伟,樊孝萍,譙四红,等. 南方型美洲黑杨基因库物候期及生长比较[J]. 湖北林业科技,2017,**46**(1): 26-29.
HUANG G W, FAN X P, QIAO S H, *et al.* The comparison of phenophase and growth in gene bank of *Populus deltoides* [J]. *Hubei Forestry Science and Technology*, 2017, **46**(1): 26-29.

[8] 杨 杉,樊孝萍,苏晓华,等. 南方型美洲黑杨种质资源物候期特征[J]. 东北林业大学学报,2017,**45**(7): 7-11.
YANG S, FAN X P, SU X H, *et al.* Phenological character of southern type of *Populus deltoides* germplasm[J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2017, **45**(7): 7-11.

[9] FRANKEL O H, BROWN A H D. Crop genetic resources: Conservation & Evaluation[M]// HOLDEN J H W, WIL-LIAMS J T, *et al.* Curent plant genetic resources today-A critical appraisal. London: George Allan & Unwin L t d, 1984: 249-257.

[10] 李洪果,许基煌,杜红岩,等. 基于等位基因最大化法初步构建杜仲核心种质[J]. 林业科学,2018,**54**(2): 42-51.
LI H G, XU J H, DU H Y, *et al.* Preliminary construction of core collection of *Eucommia ulmoides* based on allele number maximization strategy[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2018, **54**(2): 42-51

[11] 张维瑞,袁王俊,尚富德. 基于 AFLP 分子标记的桂花品种核心种质的构建[J]. 西北植物学报,2012,**32**(7): 1 349-1 354.
ZHANG W R, YUAN W J, SHANG F D. Development of core collection of *Osmanthus fragrans* Lour. cultivars based on AFLP molecular markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalalia Sinica*, 2012, **32**(7): 1 349-1 354.

[12] PEREIRA-LORENZO S, RAMOS-CABRER A M, FERREIRA V, *et al.* Genetic diversity and core collection of *Malus × domestica* in northwestern Spain, Portugal and the Canary Islands by SSRs [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 240: 49-56.

[13] 杨汉波,张 蕊,王帮顺,等. 基于 SSR 标记的木荷核心种质构建[J]. 林业科学,2017,**53**(6): 37-46.
YANG H B, ZHANG R, WANG B S, *et al.* Construction of core collection of *Schima superba* based on SSR molecular markers[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2017, **53**(6): 37-46.

[14] 石 磊,王 萍,杨 静,等. 籽用西瓜种质资源 SSR 分析及初级核心种质库构建[J]. 西北植物学报,2016, **36**(6): 1 125-1 134.
SHI L, WANG P, YANG J, *et al.* Genetic diversity analysis and construction of seed watermelon core germplasm resources by SSR[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalalia Sinica*, 2016, **36**(6): 1 125-1 134.

[15] LEE Y J, MUN J H, JEONG Y M, *et al.* Assembly of a radish core collection for evaluation and preservation of genetic diversity[J]. *Horticulture, Environment, and Biotechnology*, 2018, **59**(5): 711-721.

[16] 曾宪君, 李 丹, 胡彦鹏, 等. 欧洲黑杨优质核心种质库的初步构建[J]. 林业科学, 2014, **50**(9): 51-58.

ZENG X J, LI D, HU Y P, *et al.* A preliminary study on construction of high-quality core collection of *Populus nigra* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, **50**(9): 51-58.

[17] HU J, ZHU J, XU H M. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, **101**(1/2): 264-268.

[18] BROWN A H D. Core collections: a practical approach to genetic resources management [J]. *Genome*, 1989, **31**(2): 818-824.

[19] 杨 静. 基于植物学性状和 SCoT 标记的籽用西瓜遗传多样性分析及核心种质构建[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2017.

[20] 邓学斌, 刘 磊, 闫 喆, 等. 加工番茄核心种质构建及其遗传背景分析[J]. 园艺学报, 2015, **42**(7): 1 299-1 312.

DENG X B, LIU L, YAN Z, *et al.* Development of a core collection of processing tomato germplasms and analysis of genetic background [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2015, **42**(7): 1 299-1 312.

[21] LIU H L, YANG W X, HOU J, *et al.* Genetic identification of 43 elite clonal accessions of *Populus deltoides* by SSR fingerprinting[J]. *Canadian Journal of Plant Science*, 2016, **96**(3): 494-502.

[22] 周文才, 侯 静, 郭 炜, 等. 基于 SSR 标记的美洲黑杨杂交子代的鉴定[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2015, **39**(3): 45-49.

ZHOU W C, HOU J, GUO W, *et al.* Identification of the true hybrids for *Populus deltoides* by using SSR markers[J]. *Journal of Nanjing Forestry University*(Natural Sciences Edition), 2015, **39**(3): 45-49.

[23] 李 薇. 美洲黑杨新无性系的 SSR 和 ISSR 指纹鉴别及应用[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2014.

[24] 贾会霞, 姬慧娟, 胡建军, 等. 杨树新品种的 SSR 指纹图谱构建和倍性检测[J]. 林业科学, 2015, **51**(2): 69-79.

JIA H X, JI H J, HU J J, *et al.* Fingerprints of SSR markers and ploidy detection for new *Populus* varieties[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2015, **51**(2): 69-79.

[25] ZEULI P L, QUALSET C O. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resource collection of durum wheat[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1993, **87**(3): 295-304.

[26] LIU X B, LI J, YANG Z L. Genetic diversity and structure of core collection of winter mushroom (*Flammulina velutipes*) developed by genomic SSR markers[J]. *Hereditas*, 2018, 155: 3.

[27] BIDOT MARTÍNEZ I, VALDÉS DE LA CRUZ M, RIERA NELSON M, *et al.* Establishment of a core collection of traditional cuban *theobroma cacao* plants for conservation and utilization purposes[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2016, **35**(1): 47-60.

[28] CHEN R K, HARA T, OHSAWA R, *et al.* Analysis of genetic diversity of rapeseed genetic resources in Japan and core collection construction[J]. *Breeding Science*, 2017, **67**(3): 239-247.

[29] 潘英华, 徐志健, 梁云涛. 广西普通野生稻群体结构解析与核心种质构建[J]. 植物遗传资源学报, 2018, **19**(3): 498-509.

PAN Y H, XU Z J, LIANG Y T. Genetic structure and core collection of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Guangxi [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, **19**(3): 498-509.

[30] 齐建建. 黄瓜遗传多样性和人工驯化的分子基础[D]. 北京: 中国农业科学院, 2014.

[31] 倪茂磊. 美洲黑杨遗传多样性分析与核心种质库构建[D]. 南京: 南京林业大学, 2011.

(编辑: 宋亚珍)