

# 秦黑杨 1 号等美洲黑杨指纹图谱构建及遗传关系分析

巫明会,樊军锋\*,高建设,周永学

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘要:**以西北农林科技大学渭河试验站的 12 个美洲黑杨无性系为材料,从国际杨树基因组委员会官方网站中提供的引物中选取 25 对引物对美洲黑杨进行指纹图谱构建,最终筛选出 5 对多态性丰富、扩增效率高、条带清晰的引物。5 对引物共扩增条带 24 条,其中多态性条带 23 条,占 95.8%,SSR 引物多态性条带数 4~8 条,平均 4.8 条。对 12 份种质进行 UPGMA 聚类分析,品种遗传相似性系数在 0.458 3~0.958 3,平均相似系数为 0.666 0。研究利用 5 对引物(PMGC\_2217、PMGC\_2675、PMGC\_2866、WPMS\_14、WPMS\_17)可将 12 份美洲黑杨种质完全区分开。研究结果可为美洲黑杨品种鉴定和知识产权保护提供理论依据。

**关键词:**秦黑杨;SSR;指纹图谱;遗传关系

**中图分类号:**S792.11      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2019)04-0091-05

## Construction of Fingerprints and Analysis of Genetic Relationship among *Populus deltoides* Hybrids Qinheiyang No. 1

WU Ming-hui, FAN Jun-feng\*, GAO Jian-she, ZHOU Yong-xue

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling 712100, Shaanxi, China)

**Abstract:** Twelve *Populus deltoides* clones from Weihe Experimental Station of Northwest A&F University were used as materials, and 25 pairs of primers were selected from the official website of the International Poplar Genomics Commission to construct fingerprints of *P. deltoides* and eventually to screen out 5 pairs of rich polymorphism, highly amplified, and clear band primers. Five pairs of primers co-amplified 24 bands, including 23 polymorphic bands, accounting for 95.8%, and 4—8 polymorphic bands of SSR primers, with an average of 4.8. A UPGMA cluster analysis was performed on 12 germplasms. The genetic similarity coefficients of the varieties were between 0.458 3—0.958 3, and the average similarity coefficient was 0.666 0. In this study, using 5 pairs of primers (PMGC\_2217, PMGC\_2675, PMGC\_2866, WPMS\_14, WPMS\_17) could completely distinguish 12 *P. deltoides* germplasms. The results of this study could provide a theoretical basis for the identification and protection of intellectual property of *P. deltoides*.

**Key words:** *Populus deltoides*; SSR; fingerprinting; genetic relationship

美洲黑杨(*Populus deltoides*)为杨柳科(Salicaceae)杨属(*Populus*)黑杨派树种,为落叶乔木<sup>[1]</sup>,天然分布于美国东部和西北部,加拿大南部等地<sup>[2]</sup>,由于其适应性强、速生、木材用途广泛,已成为我国长江流域重要的造林树种和绿化树种。我国从 20 世纪 80 年代,陆续开始从国外引进黑杨派种质资

源,并经过杂交育种等手段,培育出了很多如陕林 3 号、创新杨等新品种<sup>[3-4]</sup>,但由于外部形态容易受环境及人为因素影响,某些品种很难通过形态上被区分开<sup>[5]</sup>,且形态学鉴定周期长,具有很大的局限性。因此,为保护种质资源和维护育种者权益,寻找一种简便又准确的方法来鉴别这些品种显得尤为重要。

收稿日期:2018-04-16    修回日期:2018-12-28

基金项目:杨树工业资源材高效培育技术研究(SQ2016YFNC030041)。

作者简介:巫明会,女,硕士,研究方向:林木遗传改良。E-mail:wuminghui94@163.com

\* 通信作者:樊军锋,男,博士,研究员,研究方向:杨树新品种选育及油松遗传改良。E-mail:fanjf28@163.com

分子标记技术自发展以来,已广泛应用到动植物遗传多样性分析、亲缘关系分析和指纹图谱构建等方面,最常用的分子标记技术有 AFLP、RADP、ISSR 和 SSR 等<sup>[6-7]</sup>,相对于其他几种标记技术而言,SSR 具有共显性、多态性高和经济实惠等特点,已在如杜仲<sup>[8]</sup>、核桃<sup>[9]</sup>等多种植物中被开发,并且被国际植物新品种保护联盟组织(UPOV)同 SNP 标记技术一同确认为构建 DNA 指纹图谱的标准标记方法。大量研究表明,SSR 标记在杨树不同派别中均可扩增出具有多态性、清晰的条带,具有研究亲缘关系的可行性、品种鉴定的可靠性等<sup>[10-13]</sup>。

由于近年来美洲黑杨无性系的逐渐增多,某些无

性系之间形态特征较为相近,不容易区分,本研究以西北农林科技大学渭河实验站保存的 12 个美洲黑杨无性系为研究对象,利用 SSR 分子标记技术,选择 25 对多态性高的引物,筛选并构建 DNA 指纹图谱,为杨树新品种保护和品种鉴定等提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 12 个美洲黑杨无性系(表 1)于 2017 年 11 月采自西北农林科技大学渭河试验站,采集 1 年生扦插苗的苗干,室内水培催芽(温度 26±2℃),光照 12 h,光照强度 50 lx。

表 1 试验材料

Table 1 Experimental materials

编号	无性系	遗传来源
1	St-123(印度)	印度引种美洲黑杨 ( <i>P. deltoides</i> )
2	14-苏 3	林科院引种美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
3	田纳西美 2	美国田纳西州引种引种美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
4	14-苏 8	林科院引种美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
5	田纳西美 3	美国田纳西州引种美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
6	14-苏 1	林科院引种美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
7	14-苏 5	林科院引种美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
8	秦黑杨 1 号	I-69 杨( <i>Populus deltoides</i> ‘I-69’)×美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
9	秦黑杨 2 号	I-69 杨( <i>Populus deltoides</i> ‘I-69’)×美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )
10	田纳西美 1	美国田纳西州引种美洲黑杨( <i>P. Deltoides</i> )
11	I-69 杨	I-69 杨( <i>Populus deltoides</i> ‘I-69’)
12	陕林 3 号	I-69 杨( <i>P. deltoides</i> , cv. ‘Lux’ (I-69/55))×美洲黑杨( <i>P. deltoides</i> )

1.2 叶片基因组 DNA 提取

用改良 CTAB 法<sup>[14]</sup>提取水培催芽的新鲜叶片 DNA。并用 NanoDrop 2000 (基因有限公司,中国)进行 DNA 纯度和浓度检测,并稀释到 50 ng/μL,在-20℃备用。

1.3 SSR 分析

1.3.1 SSR 引物筛选 从国际杨树基因组委员会官方网站的杨树 SSR 数据库中选取 25 对 SSR 引物<sup>[14-16]</sup>,所有引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3.2 PCR 反应与电泳 PCR 反应体系为 10 μL,其中 2×Taq Master Mix(诺唯赞生物)5 μL,模板 DNA 1 μL,去离子水 3.2 μL,正反引物各 0.4 μL。PCR 扩增程序为:94℃预变性 5 min 94℃变性 30 s,适宜温度(根据 Tm 值确定)退火 30 s,72℃延伸 1 min 共 35 个循环,72℃最终延伸 1 min。其中 PMGC\_2217、PMGC\_2675、OMGC\_2866 的 Tm 温度为 52℃,WPMS\_14、WPMS\_17 的 Tm 温度为 60℃。扩增后的产物放置 4℃保存,备用。

扩增产物在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上电

泳 1 h,采用王竹林<sup>[17]</sup>等的银染法染色。待条带显色清晰后,拍照记录。

1.4 数据统计分析

统计扩增得到的多态性条带数目,采用人工读带的方式,在相同迁移位置上,有带记为 1,无带记为 0,每条带相当 1 个等位基因,使用 Excel 建立供试材料与等位基因之间的 0/1 矩阵图。遗传相似性利用 NTSYS 2.0.1 软件通过 UPGMA(unweighted paor group method analysis)聚类分析实现。根据分子量 Marker 的片段大小的对数值与电泳迁移距离绘制出 DNA 分子量标准曲线,然后用直尺量出每个等位基因在胶板上的迁移距离,根据 DNA 分子量标准曲线计算每个等位基因的分子量大小。并以此构建 12 个美洲黑杨无性系的指纹图谱。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的多态性

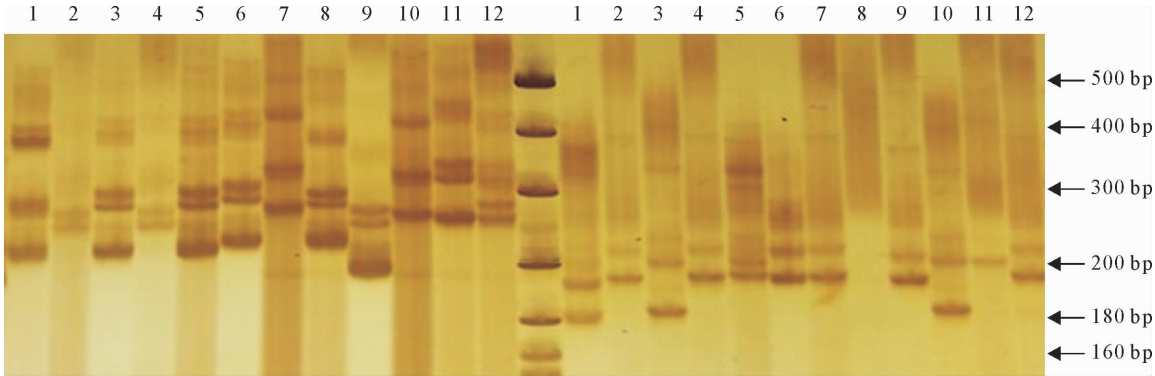
利用筛选出的 25 对引物,对 12 份样品的基因组 DNA 进行扩增,最终筛选出 5 对扩增效率高、稳定性好、多态性丰富的 SSR 引物进行供试材料的指

纹图谱构建,5 对引物在 12 份美洲黑杨中共扩增出条带 24 条,其中多态性条带 23 条,占 95.8%,SSR 引物多态性条带数 4~8 条,平均每对引物为 4.8 条,其中引物 PMGC\_2866 最多,具有 8 个多态位点。5 对引物详细信息见表 2。引物 PMGC\_2866

和引物 PMGC\_2217 的扩增结果如图 1,图中可以看出,同一引物下,条带各有不同,说明 DNA 分子水平上具有一定的遗传差异,通过这些谱带可以将它们区分开。

表 2 5 对引物的扩增结果  
Table 2 Amplification results of 5 primers

引物名称	引物序列	退火温度/℃	条带数/条	多态性条带数/条	多态性比率/%
PMGC_2217	F:ATTAGCTTCTTCTAAAGCAGC R:TGACTGACTGTCTGTCTTCG	52	4	4	100
PMGC_2675	F:CACACCGACAAATTATGAGTG R:TTT TAGAGTGAATTTTCCTGCG	52	4	4	100
PMGC_2866	F:ATTGTTCAAAATCCTCAGGTTC R:TAGCATAGTAGCTAGCTAGTG	52	8	8	100
WPMS_14	F:CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC R:GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	60	4	4	100
WPMS_17	F:ACATCCGCCAATGCTTCGGTGTTT R:GTGACGGTGGTGGCGGATTTTCTT	60	4	3	75



注:编号 1~12 同表 1。下同。

图 1 SSR 引物 PMGC2217(左)和 PMGC124(右)扩增产物的电泳结果

Fig. 1 Amplification products generated from SSR primers PMGC2217(left)and PMGC124(right)

2.2 12 个美洲黑杨的遗传差异分析

由表 3 可知,12 个美洲黑杨之间的遗传相似系数在 0.458 3~0.958 3,平均相似系数为 0.666 0,表明品系间相似度较高。遗传相似系数越大,遗传差异性越小。14-苏-3 和 14-苏 8 的遗传相似系数最大,为 0.958 3,遗传差异性较小。田纳西美 1 和 14-苏 1 的遗传相似系数最小,为 0.458 3,遗传差异性较大。秦黑杨 1 号和秦黑杨 2 号的遗传相似系数为 0.750 0。将 12 个美洲黑杨品种进行聚类分析,并绘制它们的树状聚类图(图 2)。

2.3 SSR 引物的指纹图谱构建

根据美洲黑杨品种 PCR 扩增结果图谱中 SSR 标记位点的 0/1 矩阵统计结果,绘制各品种的指纹图谱,结果见表 4。根据相同位置下条带的有无,引物 PMGC\_2217、PMGC\_2675、PMGC\_2866、WPMS\_14、WPMS\_17 完全能够将 12 个美洲黑杨品种区分开。

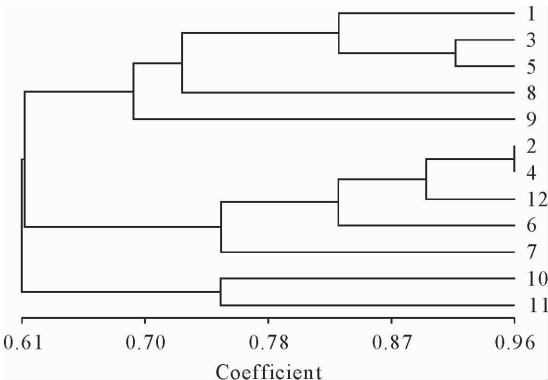


图 2 12 个美洲黑杨品种的聚类分析结果

Fig. 2 The result of cluster analysis of 12 materials of *P. deltoides*

3 结论与讨论

研究表明,通过 SSR 技术利用 PMGC\_2217、PMGC\_2675、PMGC\_2866、WPMS\_14、WPMS\_17 等 5 对引物可将 12 个美洲黑杨无性系完全区分开。

表 3 12 个美洲黑杨种质的遗传相似系数

Table 3 Genetic similarity coefficient of 12 materials of *P. deltoides*

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	1.000 0											
2	0.708 3	1.000 0										
3	0.833 3	0.541 7	1.000 0									
4	0.666 7	0.958 3	0.583 3	1.000 0								
5	0.833 3	0.625 0	0.916 7	0.666 7	1.000 0							
6	0.625 0	0.833 3	0.625 0	0.875 0	0.708 3	1.000 0						
7	0.541 7	0.750 0	0.458 3	0.791 7	0.541 7	0.750 0	1.000 0					
8	0.666 7	0.541 7	0.750 0	0.583 3	0.750 0	0.708 3	0.458 3	1.000 0				
9	0.708 3	0.666 7	0.666 7	0.708 3	0.708 3	0.583 3	0.500 0	0.708 3	1.000 0			
10	0.750 0	0.625 0	0.750 0	0.583 3	0.666 7	0.458 3	0.458 3	0.583 3	0.625 0	1.000 0		
11	0.500 0	0.708 3	0.583 3	0.750 0	0.583 3	0.625 0	0.625 0	0.500 0	0.541 7	0.750 0	1.000 0	
12	0.666 7	0.875 0	0.583 3	0.916 7	0.666 7	0.791 7	0.708 3	0.583 3	0.708 3	0.583 3	0.666 7	1.000 0

表 4 12 个美洲黑杨种质的指纹图谱

Table 4 Fingerprints of 12 materials of *P. deltoids*

引物	条带大小/bp	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
PMGC_2217	244	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1
	228	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0
	216	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1
	187	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
PMGC_2675	302	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
	277	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0
	251	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0
	233	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
PMGC_2866	348	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0
	323	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0
	310	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0
	299	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1
	277	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1
	251	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0
	244	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	226	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
WPMS_14	306	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	298	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
	259	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
	246	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
WPMS_17	266	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0
	256	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
	134	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	126	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0

采用 UPGMA 法对美洲黑杨不同无性系进行了遗传多样性分析,聚类结果表明,12 个美洲黑杨无性系间遗传差异较小,其中 14-苏-3 和 14-苏 8 的遗传相似系数高达 0.9583,这可能是因为杨树选育常为人工选择天然优良无性系,使得出现共同的母本或父本导致遗传距离窄;另外陕林 3 号与 I-69 杨的遗传相似系数为 0.666 7,与郭娟<sup>[18]</sup>得到的数据一致;秦黑杨 1 号、2 号的遗传相似系数为 0.750 0,它们

之间的差异也较小,因为两者父本母本一致,均是西北农林科技大学林学院杨树选育课题组从美洲黑杨 I-69 杨(*Populus deltoides* ‘I-69’)×美洲黑杨(*P. deltoides*)天然杂种中选育出来的 2 个美洲黑杨杂交新品种。

SSR 分子标记技术作为一种有效的 DNA 水平上的鉴定技术,已经在林木指纹图谱和遗传关系等方面广泛运用。本试验首次将 SSR 分子标记在秦

黑杨 1 号、秦黑杨 2 号及 8 个美洲黑杨国外引种的鉴别上,利用筛选出的多态性丰富、扩增效率高的 5 对 SSR 引物对 12 个美洲黑杨无性系进行指纹图谱构建和遗传多样性分析。秦黑杨 1 号、秦黑杨 2 号、陕林 3 号均为 I-69 杨和美洲黑杨优良无性系杂交的子代,其与 I-69 杨的遗传相似系数在 0.541 7~0.666 7,显示出其与 I-69 杨的遗传差异性均较小的情况。在本试验中,田纳西美 2、田纳西美 3、14-苏 1、14 苏 5、秦黑杨 1 号、秦黑杨 2 号、I-69 杨出现 3 个不同等位基因的情形,可能是三倍体,这与贾会霞<sup>[19]</sup>等的研究结果一致,还需进行其他相关试验进行验证。试验结果显示,利用 SSR 分子标记可以准确可靠地鉴定区分试验材料,以此构建的指纹图谱可以作为 12 个美洲黑杨无性系鉴定的依据,具有一定的实践意义。研究结果进一步揭示了 SSR 分子标记在美洲黑杨新品种鉴定中的可靠性,同时也揭示了 SSR 分子标记在杂种无性系鉴别方面的广泛性,为这些优良无性系的分子鉴定和推广提供理论依据,在种质资源保护和生产实践上具有重要意义。

参考文献:

[1] GROUP T A P. An ordinal classification for the families of flowering plants[J]. Annals of the Missouri Botanical Garden, 1998,85(4):531-553.

[2] 吕士行,徐锡增. 美洲黑杨及其引种展望[J]. 南京林产工业学院学报,1980(3):13-21.

LU S X,XU X Z. Populus deltoids and their prospect of being introduced from abroad[J]. Journal of Nanjing Forestry University; Natural Sciences Edition,1980(3):13-21. (in Chinese)

[3] 符毓秦,刘玉媛,李均安,等. 美洲黑杨杂种无性系——陕林 3、4 号杨的选育[J]. 陕西林业科技,1990,3(13):1-9,13.

[4] 王洁华,籍燕,杨少辉,等. 速生优质北创杨新品系的选育[J]. 天津大学学报: 自然科学与工程技术版,2014,47(10):914-918.

WANG J H,JI Y,YANG S H,*et al.* Breeding of a fast-growing and high quality Beichuang variety[J]. Journal of Tianjin University; Science and Technology, 2014,47(10):914-918. (in Chinese)

[5] 苏晓华,丁昌俊,马常耕,等. 我国杨树育种的研究进展及对策[J]. 林业科学研究,2010,23(1):31-37.

[6] 黄秦军,苏晓华,张香华. SSR 分子标记与林木遗传育种[J]. 世界林业研究,2002,15(3):14-21.

HUANG Q J,SU X H,ZHANG X H. Microsatellite marker and its application in tree genetics and breeding[J]. World Forestry Research,2002,15(3):14-21.

[7] 余花娣,陈景堂,黄亚群,等. 利用 DNA 指纹图谱进行农作物品种鉴定的研究进展[J]. 河北农业大学学报,2003,26(增刊 1):28-30,33.

SHE H D,CHEN J T,HUANG Y Q,*et al.* Progress on variety identification of crop using DNA fingerprinting[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2003,26(Supp. 1):28-30,

33. (in Chinese)

[8] 吴敏,杜红岩,乌云塔娜,等. 杜仲基因组微卫星特征及 SSR 标记开发[J]. 林业科学研究,2015,28(3):387-393.

[9] 齐建勋,郝艳宾,朱艳,等. 核桃属种质资源的 EST-SSR 标记研究[J]. 园艺学报,2011,38(3):441-448.

QI J X,HAO Y B,ZHU Y,*et al.* Studies on germplasm of *Juglans* by EST-SSR markers[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2011,38(3):441-448. (in Chinese)

[10] DAYANANDAN S,RAJORA O P,BAWA K S. Isolation and characterization of microsatellites in trembling aspen (*Populus tremuloides*) [J]. Theoretical & Applied Genetics, 1998,96(6-7):950-956.

[11] 藕丹,樊军锋,周永学,等. 美洲黑杨×青杨派杂种无性系 SSR 指纹图谱的构建与遗传差异性分析[J]. 西北林学院学报, 2017,32(2):112-116.

OU D,FAN J F,ZHOU Y X,*et al.* Construction of fingerprint and analysis of genetic difference for hybrid clones of *Populus deltoides* × *Section tacamahaca* using SSR marker [J]. Journal of Northwest Forestry University,2017,32(2):112-116. (in Chinese)

[12] 韩志校,张军,左力辉,等. 基于 SSR 和 ITS 标记的杨树多态性及聚类分析[J]. 中国农业科技导报,2017,19(7):36-43.

[13] 李薇,刘春英,郭娟,等. 3 个美洲黑杨新无性系的 SSR 分析及鉴定[J]. 西北林学院学报,2014,29(1):73-77.

LI W,LIU C Y,GUO J,*et al.* Analysis and identification of three new clones of *Populus deltoides* based on SSR molecular markers[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2014,29(1):73-77. (in Chinese)

[14] 李金璐,王硕,于婧,等. 一种改良的植物 DNA 提取方法[J]. 植物学报,2013,48(1):72-78.

LI J L,WANG S,YU J,*et al.* A modified CTAB protocol for plant DNA extraction[J]. Chinese Bulletin of Botany,2013,48(1):72-78. (in Chinese)

[15] 樊蓉,樊军锋,李周岐. 9 个白杨品种 SSR 指纹图谱构建及遗传关系的研究[J]. 西北林学院学报,2015,30(3):76-80.

FAN R,FAN J F,LI Z Q, Fingerprinting and genetic relatedness of 9 varieties in *Populus* L. sect. *Populus* using SSR markers[J]. Journal of Northwest Forestry University,2015,30(3):76-80. (in Chinese)

[16] 韩志校,张军,左力辉,等. 3 个不同派别杨树资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 河南农业科学,2017,46(4):99-103.

[17] 王竹林,杨睿,刘联正,等. 聚丙烯酰胺凝胶电泳银染的影响因素[J]. 实验室研究与探索,2011,30(9):15-17,113.

WANG Z L,YANG R,LIU L Z,*et al.* Factors of silver staining of polyacrylamide gel electrophoresis[J]. Research and Exploration in Laboratory,2011,30(9):15-17,113. (in Chinese)

[18] 郭娟. 美洲黑杨 5 个优良品种 EST-SSR 和 SRAP 指纹图谱构建[D]. 杨陵:西北农林科技大学,2014.

[19] 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. (in Chinese)