

短枝木麻黄无性系鉴定及其指纹图谱构建

余 微, 仲崇禄, 张 勇*, 魏永成, 孟景祥

(中国林业科学研究院热带林业研究所, 广东 广州 510520)

摘要: [目的] 构建木麻黄无性系的 DNA 指纹图谱鉴定体系, 为今后短枝木麻黄的品种鉴定、品种权保护、新品种的选育提供依据。 [方法] 从 71 对 EST-SSR 引物中筛选出扩增条带清晰、多态性好、扩增稳定的 12 对引物, 采用降落 PCR 和毛细管电泳的基因分型方法, 以采集的 9 个短枝木麻黄标准无性系的基因分型结果为参照, 对华南沿海地区采集的 109 个短枝木麻黄无性系单株进行鉴定, 并结合引物组合法构建基于 EST-SSR 分子标记的短枝木麻黄无性系鉴定体系。 [结果] 12 对 EST-SSR 引物对 109 个短枝木麻黄无性系单株进行 PCR 扩增, 共检测到 50 个等位基因, 每个位点的等位基因数为 3~6 个, 平均为 4.2 个, 每对引物可区分 2~5 个短枝木麻黄无性系。根据鉴定结果, 最终所有样品被划分为 22 个无性系, 除已知的 9 个标准无性系外, 另有 13 个无性系为不知名无性系, 说明不同地区的无性系存在重复命名现象; 利用引物组合法进一步优化后, 发现只需 7 对引物就可将 22 个短枝木麻黄无性系完全区分, 并依此建立了基于 7 对 EST-SSR 引物的 22 个短枝木麻黄无性系的指纹图谱, 每个无性系都获得了一个 7 位数的指纹图谱编码。 [结论] 利用 7 对 EST-SSR 引物构建的 22 个短枝木麻黄无性系的 DNA 指纹图谱可用于短枝木麻黄无性系的鉴别, 研究表明, 华南沿海地区部分短枝木麻黄无性系存在命名混乱、同物异名、无性系数量少少的现象, 新品种选育工作亟待开展和加强。

关键词: 短枝木麻黄; EST-SSR 分子标记; 基因分型; 指纹图谱

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

文章编号: 1001-1498(2019)05-0157-08

木麻黄 (*Casuarina*) 作为我国最成功的外引树种之一, 对台风危害、沿海沙丘固定和贫瘠干旱的沿海沙地生态系统的恢复有不可替代的作用^[1]。目前, 华南沿海木麻黄防护林的种植材料主要是无性系, 其中短枝木麻黄 (*Casuarina equisetifolia* L. Johnson) 无性系的栽种面积最大。近年营造的木麻黄防护林绝大部分使用主要几个木麻黄无性系, 如福建省的“惠-1”、“平潭 2 号”等, 广东省的“A-13”、“A-8”、“501”等, 海南省的“宝-9”、“真-4”等^[2], 还有一些当地林场或私人苗圃场自己选育但未经遗传测定的无性系, 因此, 华南沿海木麻黄无性系可能存在数量不明、同物异名、命名混乱等现象。

传统的植物品种鉴定多采用形态学鉴定方法, 但是植物的一些外观形态不稳定, 易受到环境因素的影响, 加上一些品种间的形态差异较小, 采用形态学的鉴定方法具有时间长和可靠性低的缺点^[3]。植

物的 DNA 分子标记技术具有不受环境影响, 且变异丰富等优点, 被迅速应用到品种鉴定的实践中^[4]。相较于其他分子标记, SSR 标记是共显性标记, 具有数量丰富、稳定性好、多态性高、基因组覆盖性好等优点, EST-SSR 分子标记在保持了其优点的前提下, 具有较强的种属间通用性, 且因为它们来自于转录区域, 因此更具保守性^[5]。目前, 在林业上, 利用 SSR 分子标记进行品种鉴定的研究方法和技术已经比较成熟。如马尾松 (*Pinus massoniana*)^[6]、柑橘 (*Citrus*)^[7]、刺槐 (*Robinia pseudoacacia*)^[8]、山杏 (*Armeniaca sibirica*)^[9] 等利用 SSR 分子标记进行指纹图谱的构建, 用于开展品种鉴定。在木麻黄树种上, Kullán 等^[10] 研究开发了 50 对 EST-SSR 标记用于木麻黄遗传图谱的构建; 许秀玉等^[11] 开发了 235 个 EST-SSR 标记, 并利用其分析了木麻黄核心种质的遗传多样性与群体结构; 胡盼^[12] 通过借助 EST-SSR

收稿日期: 2018-12-24 修回日期: 2019-06-19

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项目 (CAFYBB2018ZB003); 国家自然科学基金面上项目 (31470634); 广东省林业科技创新项目 (2014KJCX017) 和福建省林木种苗科技攻关五期项目

* 通讯作者: 张 勇, 博士, 主要从事木麻黄遗传改良研究. E-mail: zhangyongrif@caf.ac.cn

分子标记研究短枝木麻黄不同种源的遗传差异。目前,利用分子标记进行木麻黄无性系鉴定研究还比较少,基于 EST-SSR 分子标记进行无性系鉴定和构建木麻黄无性系指纹图谱的研究还未见报道。

本研究利用 EST-SSR 分子标记技术,对华南沿海主栽的短枝木麻黄无性系进行鉴定,摸清华南沿海正在使用的短枝木麻黄无性系及其数量,并构建基于 EST-SSR 分子标记技术的短枝木麻黄无性系指纹图谱,以期解决我国木麻黄无性系命名混乱等问题,为育成品种的精确鉴定提供技术支持,并对林业管理部门的科学决策、科研部门的种质资源引进与收集、木麻黄的遗传改良和新品种选育提供参考,对保护木麻黄的品种权和育种者的合法权益也具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究所用材料为华南三省(福建、广东、海南)沿海地区防护林主栽的短枝木麻黄无性系。沿着 3 个省海岸线的县、县级市或区,选择种植面积大的无性系人工林采样(图 1、表 1)。采集时间为 2017 年 12 月至 2018 年 4 月。选取生长健壮、无病虫害的嫩枝叶(木麻黄的叶片已退化成齿状,光合作用器官主要是针叶状的小枝条),放入硅胶干燥剂,带回实验室后保存于 -80°C 超低温冰箱,以备后续提取 DNA。

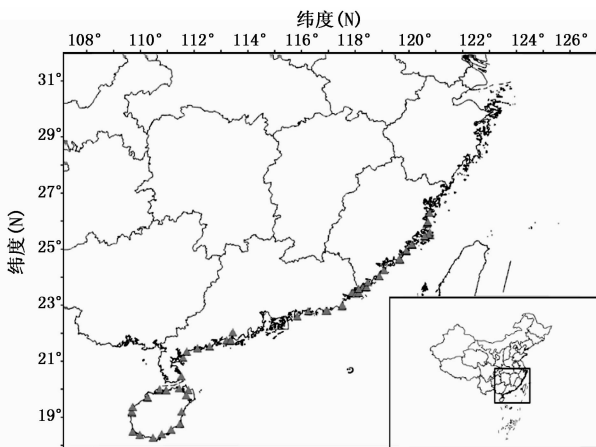


图 1 采样地点图

Fig. 1 Map of sampling locations

采集样品前,先向当地林业部门咨询当地所种植的木麻黄无性系的名称,咨询不到或者情况模糊

表 1 短枝木麻黄无性系采样地点

Table 1 Sampling locations of *C. equisetifolia* clone

采样地点 Provinces	包含市、县或区 City, county, or district	采集单株数 Sample quantity	采样序号 Sampling number
福建省 (12 个市、县或区)	连江县、长乐市、福清市、平潭县、莆田秀屿区、惠安县、漳浦县、云霄县、东山县、诏安县、龙海市和晋江市	31	1 ~ 31
广东省 (16 个市、县或区)	饶平县、南澳县、澄海区、惠来县、陆丰市、海丰县、惠东县、台山市、恩平市、阳东县、阳西县、电白县、吴川市、湛江坡头区和徐闻县	50	32 ~ 81
海南省 (14 个市、县或区)	海口美兰区、文昌市、琼海市、陵水县、三亚崖州区、三亚海棠区、三亚天涯区、东方市、儋州市、临高县、乐东县、澄迈县、万宁市和昌江市	28	82 ~ 109

的则只记录采样顺序号。采样过程中,注意采集各省份已育成并大规模推广应用的无性系作为鉴定的标准无性系。在福建省惠安赤湖林场采集到标准无性系“惠-1”和“平潭 2 号”,在福建省东山县赤山林场采集到“501”和“601”,在广东省吴川市采集了“宝-9”和“A-13”,在海南省岛东林场采集到“A-8”、“东-2”和“真-4”。最后共采集到 109 个木麻黄无性系单株和 9 个木麻黄标准无性系。

1.2 研究方法

1.2.1 样品的 DNA 提取和引物筛选 叶片材料的 DNA 提取采用改良后的 CTAB 法^[13-14],提取的 DNA 稀释后 -80°C 保存备用。所用引物来源于课题组前期研发的 21 对引物以及 Kullán 等^[10]开发的 50 对引物,共 71 对引物。选取 8 个短枝木麻黄无性系的 DNA 作为模板进行引物筛选,最终筛选出 12 对多态性高的引物(表 2)。

1.2.2 毛细管电泳和遗传分型 参考 Li 等^[15]降落 PCR(Touchdown PCR)反应体系,采用在 PCR 反应体系中加入荧光 dUTP 的方法,利用 12 对 EST-SSR 引物对 109 个木麻黄无性系单株的 DNA 进行 PCR 扩增和毛细管电泳检测。降落 PCR 反应体系为 10 μL ,即:10 ng 模板 DNA、1 U TaqDNA 聚合酶、1.2 ~ 1.6 \times buffer(Mg^{2+} plus)、4 ~ 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP、引物 0.5 ~ 0.85 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、荧光 dUTP 0.01 $\text{nmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 、ddH₂O 补平至 10 μL 。PCR 反应程序如下:105 $^{\circ}\text{C}$ 热盖,94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,50 ~ 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s(每个循环降低 0.5 $^{\circ}\text{C}$),72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 20 次,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,60 ~ 70 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,循环 26 次,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物在 ABI 3130x1 遗传分析仪上进行分型。

表2 12对SSR引物信息
Table 2 Information of primers for 12 SSR loci

引物 Primer	SSR 类型 SSR Type	引物序列 Primer Sequence (5' - 3')	预期片段大小 Expected product size/bp	退火温度 T _m /°C
C13	(CATCTT) ₃	F: ATGGGACATTTTGGTGAT R: CTTTGCCTTAGGCGTTTT	282	50
M03	(AG) ₁₁	F: GATCGTCAGGGGAAGAGTGA R: CATCGGTTTCAGCGAGTACC	290	60
M26	(AGA) ₁₅	F: CCCGTCTCTGAGAGTTTTGG R: TAGAGACTGATCCTCGGCGT	263	54
M27	(GAA) ₁₃	F: TTTTATAGATGGGTTTCCCCC R: GAAATGAGCACTTCTTGCC	269	54
M32	(TC) ₁₂	F: AGCATGAAAGCAGGACCACT R: AAGCCTGGCTGGCTCTGA	179	60
M46	(TA) ₉	F: TGTTTCCATTCTTATTTGCTTCA R: TCAAATCTCCCAAACCCATC	196	60
M36	(GAG) ₁₀	F: CGGAGGAGCTGTTGGTACTC R: TACTTGCAGGTCCGTTTCTCT	248	60
M37	(GAA) ₁₆	F: TGCTTCAGCCTCACTCTTGA R: CACCAACCCAATCAACTCAAC	175	58
M38	(AG) ₂₀	F: TAACGGTCGACATGATTGGA R: AAAATCATCGTCCAATCTCAGAA	161	60
M39	(AG) ₁₈	F: CGTAAACGTGCGTGTGTTTT R: TTGATTTTCGATTTCTCCGC	160	60
M40	(AT) ₁₁	F: CAACATAATTGAATGCCCGA R: GTCTGGCCCTGGATGTAAGA	163	60
M41	(CT) ₁₇	F: CCTCCCCTGTGGTTTTTAT R: GAGATCTGAGGGTCCGAGAG	170	58

1.2.3 数据统计分析与图谱构建 原始数据采用 Data Collection 软件收集扩增片段信息。利用软件 Data Former 将数据转换成软件可识别格式,再利用 POPGENE 1.31 软件进行等位基因数(N_a)、有效等位基因平均数(N_e)等的计算。利用 EXCEL 和遗传分析软件 GenALEX6.5 的 Mutilocus 功能对 109 个木麻黄无性系单株与 9 个标准无性系的基因分型结果进行比对,分析 109 个无性系单株中包含的无性系数数量。

指纹图谱构建采用引物组合分析法^[16]和指纹图谱代码方法^[17],采用 1~9 字符进行赋值,删除鉴定性差(即多态性低)的等位基因,对 12 对引物扩增的所有等位基因进行筛选后,选择其中具代表性的基因位点进行赋值,保证每对引物下的编码只有一位数字,编码木麻黄指纹图谱代码。借助 GenALEX6.5 软件,通过不同引物的组合,达到以最少数量的引物完全区分所有待鉴定木麻黄无性系的目的,提高鉴定效率。通过软件 NTSys2.10,根据 Nei 遗传距离对短枝木麻黄无性系进行 UPGMA 亲缘聚类。

2 结果与分析

2.1 华南沿海短枝木麻黄无性系的基因分型

利用 12 对 EST-SSR 引物对 109 个木麻黄无性系单株进行扩增,共检测到 50 个等位基因,等位变异扩增片段长度范围为 129~292 bp,每对引物可检测到的等位基因数为 3~6 个,平均等位基因数为 4.2 个;平均每对引物可检测到的有效等位基因数为 2.96;每对引物可区分的无性系数量为 2(M36)~5(M26)个,平均为 3.4 个,4 个无性系在 4 个位点上具有特异等位基因(表 3)。

2.2 我国沿海主栽短枝木麻黄无性系的鉴别及其分布特点

根据毛细管电泳的基因分型结果可知:12 对引物可以将 9 个标准无性系(宝-9、A-8、501、东-2、短杂 1 号、A-13、601、平潭 2 号、惠-1)完全区分开来。以 9 个标准无性系的毛细管电泳结果(图 2)为参照,鉴定 109 个短枝木麻黄无性系单株。

在 12 个 EST-SSR 位点获得的基因型完全一致时,可以确定为同一个无性系(累积排除概率 $PE = 0.998$)。基因分型结果显示:109 个木麻黄无性系

表3 12对EST-SSR引物对109个木麻黄无性系单株的基因分型

Table 3 Genotyping of 109 *C. equisetifolia* clones using 12 pairs of EST-SSR primers

引物 Primer	等位基因 数 N_a	有效等位 基因数 N_e	多态性信 息量 PIC	区分材料 数 DV	扩增片段长 度范围/bp
C13	3	1.63	0.35	4	265~277
M03	3	2.25	0.49	3	278~292
M26	5	3.80	0.69	5	249~267
M27	6	3.41	0.66	3	246~270
M32	3	2.95	0.59	4	169~179
M46	5	3.46	0.67	3	194~210
M36	3	2.43	0.50	2	240~258
M37	6	4.10	0.72	4	134~167
M38	4	2.22	0.49	4	132~154
M39	3	2.51	0.53	3	129~139
M40	5	3.91	0.70	3	157~169
M41	4	2.89	0.60	3	151~179
平均值 Mean	4.2	2.96	0.58	3.4	

DV:区分材料数。DV: Distinguished varieties.

单株最终归类为22个无性系(表4)。根据分型结果,有13个不同地点采集的无性系单株跟“宝-9”标准无性系在12个位点的基因分型结果完全一致,可以被确定为“宝-9”无性系;另有16个单株被鉴定为“A-8”无性系,5个被鉴定为“501”无性系,4个被鉴定为“东-2”无性系,3个被鉴定为“短杂1号”无性系,3个被鉴定为“A-13”无性系,7个被鉴定为“601”无性系,11个被鉴定为“平潭2号”无性系,8个被鉴定为“惠-1”无性系。其中,被鉴定为“A-8”

表4 109个木麻黄无性系的鉴定结果

Table 4 Identification of 109 *C. equisetifolia* clones

无性系名 Clone name	基因分型相同的单株序号 Sample serial number with the same genotype	单株数量 Sample number	无性系名 Clone name	基因分型相同的单株序号 Sample serial number with the same genotype	单株数量 Sample number
宝-9	13,39,82,85,87,91,94,95,97,98,100,104,108	13	UC-3	33,88	2
A-8	3,7,8,10,11,22,27,61,70,81,89,96,99,101,103,107	16	UC-4	34,37,67	3
501	4,38,68,69,71	5	UC-5	35,65,105	3
东-2	24,46,47,83	4	UC-6	32,54,56,74	4
短杂1号	18,42,43	3	UC-7	49,75,109	3
A-13	45,50,52	3	UC-8	51,76,77	3
601	30,36,40,41,44,48,84	7	UC-9	55,57,58,73	4
平潭2号	2,17,19,20,23,25,28,29,31,72,106	11	UC-10	63,66	2
惠-1	5,6,9,12,14,15,16,102	8	UC-11	1,59,60,64,78,80	6
UC-1	21,62,86	3	UC-12	90,92	2
UC-2	26,93	2	UC-13	53,79	2

结合采样情况,福建省采样31个,检测有11个无性系;广东省采样50个,检测有19个无性系;海南省采样28个,检测有12个无性系,结果显示:

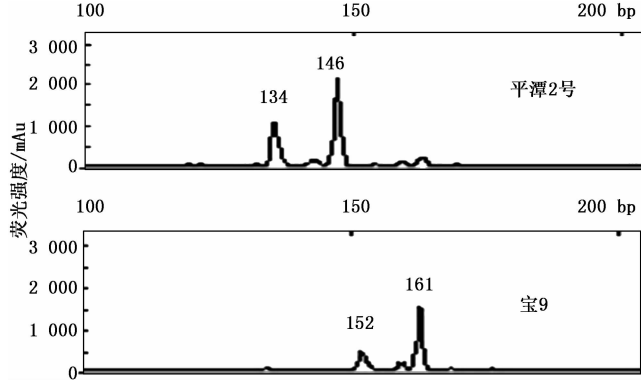


图2 部分短枝木麻黄无性系在M37位点的等位基因变异
Fig. 2 Allelic phenotype of *C. equisetifolia* clones at M37 locus

无性系的单株数量最多,在3个省的16个采样点都有大面积种植;还有39个无性系单株的基因型与9个标准无性系均不相同,被划分为13个不同的不知名无性系,暂且命名为UC-1(Unknown clone)~UC-13(表4)。在采样过程中,未能从当地林业部门获得这13个无性系的来源地、育种者和命名等信息,可能是当地林业生产单位或私人苗圃自己选择优株进行无性繁殖获得的无性系。这些无性系通常未经过系统和严格的遗传测定便进行大面积造林应用,会对木麻黄沿海防护林造成巨大的潜在风险。林业管理部门应该采取措施对这种行为进行适当的指导和规范。

A-8、平潭2号、宝-9、东-2、601、UC-1等6个无性系在3个省间都互有苗木调用或引种种植;A-13、UC-4、UC-6、UC-8、UC-9等5个无性系只在广东省有

种植,UC-12 只在海南省有种植。可见,各无性系的分布范围各异、分布数量不均,其中,广东省使用的无性系较丰富,海南省和福建省所使用的无性系数目相对较少。参试木麻黄无性系的样品采集点覆盖了华南三省的42 个市、县(区)中有大规模沿海防护林种植的区域,基本包括了所有大面积种植的木麻黄无性系。结果显示:局部地区存在无性系相对单一、多样性低等严重问题,说明应加强木麻黄新品种的选育工作。

2.3 木麻黄的 EST-SSR 特征指纹图谱的构建

采用引物组合分析法通过 GenALEX6.5 软件排序发现:只需7 对引物就可达到将22 个短枝木麻黄无性系完全区分的目的。依据这7 对引物的毛细管电泳结果,构建了22 个短枝木麻黄无性系的指纹图谱(表5)。以平潭2 号为例,代表的是平潭2 号分别在引物 M26 的258 bp、M27 的267 和270 bp、M46 的196 和198 bp、M37 的134 和146 bp、M38 的142 bp、M40 的163 和169 bp、M41 的151 和163 bp 处检测到等位基因片段。对7 对引物扩增的等位基因进行筛选后,选择了其中25 个具代表性的等位基因进行赋值(表6),编码了木麻黄无性系的指纹图谱代码(表7),便于应用识别。编码后,每个无性系的DNA 指纹图谱代码具有7 位数字,分别代表该无性系在7 对引物上扩增出的电泳峰值。如平潭2 号,图谱代码为3321231,表示平潭2 号在引物 M26 的258 bp(3)、M27 的267 bp(3)、M46 的196 bp(2)、M37 的134 bp(1)、M38 的142 bp(2)、M40 的169 bp(3)、M41 的151 bp(1)处的特异基因分型。

2.4 22 个短枝木麻黄无性系亲缘关系分析

根据 Nei 遗传距离对22 个短枝木麻黄无性系进行UPGAM 聚类。由图3 可看出:22 个无性系根据 Nei 遗传距离被分成了2 个主要的组,大多数无性系两两之间的遗传距离小于0.3,说明这22 个短枝木麻黄无性系相互间的亲缘关系较近,整体的遗传多样性较低,其中,部分的无性系间遗传距离极小,如A-8 和UC-1、东-2 和UC-12、UC-6 和UC-9 之间的 Nei 遗传距离不足0.10。

3 讨论

3.1 EST-SSR 标记的优点和效果

根据建立 SSR 标记的序列性质不同,SSR 标记可分为基因组 SSR (gSSR) 和表达序列标签 SSR (EST-SSR)^[18]。EST-SSR 标记具有 gSSR 标记的共

表5 基于7 对引物的22 个短枝木麻黄无性系的指纹图谱
Table 5 Fingerprints of 22 *C. equisetifolia* clones based on 7 primers bp

无性系 Clone	引物 Primer						
	M26	M27	M46	M37	M38	M40	M41
平潭2 号	258/258	267/270	196/198	134/146	142/142	163/169	151/163
宝-9	249/267	267/270	194/196	152/161	132/142	157/161	163/179
A-8	252/267	267/270	196/198	134/146	142/154	163/169	151/163
东-2	258/258	261/264	196/198	152/161	142/142	163/167	151/163
短杂1 号	267/267	267/270	194/196	152/161	132/142	163/169	159/163
601	258/258	267/270	196/198	134/146	132/142	163/169	151/163
惠-1	252/267	267/270	194/196	134/146	132/142	163/169	159/163
A-13	249/267	261/264	208/210	134/146	132/142	163/169	163/179
501	252/267	246/249	194/196	134/146	132/142	163/167	159/163
UC-1	249/267	267/270	196/198	134/146	142/154	163/169	151/163
UC-2	261/261	267/270	194/196	143/152	142/154	157/161	159/163
UC-3	261/261	267/270	194/196	152/161	132/142	163/167	159/163
UC-4	258/258	267/270	196/198	134/146	142/154	163/167	151/163
UC-5	249/267	267/270	194/196	143/167	142/154	157/161	163/179
UC-6	249/267	267/270	194/196	143/152	142/154	157/161	151/163
UC-7	252/267	246/249	208/210	134/146	132/142	163/169	163/179
UC-8	252/267	261/264	208/210	134/146	132/142	163/167	163/179
UC-9	249/267	267/270	194/196	143/152	142/154	157/161	159/163
UC-10	252/267	246/249	194/196	152/161	142/142	163/167	159/163
UC-11	252/267	261/264	208/210	134/146	142/142	163/169	151/163
UC-12	249/267	267/270	194/196	152/161	142/142	157/161	163/179
UC-13	252/267	246/249	194/196	143/152	142/146	163/167	151/163

表6 等位基因选择和赋值标准

Table 6 Alleles selection and encoded standard bp

引物 Primer	编码 Code				
	1	2	3	4	5
M26	249	252	258	261	267
M27	246	261	267	—	—
M46	194	196	208	—	—
M37	134	143	152	143	—
M38	132	142	146	154	—
M40	157	163	169	—	—
M41	151	159	163	—	—

表7 22 个短枝木麻黄无性系的指纹图谱代码

Table 7 Fingerprint codes of 22 clones of *C. equisetifolia* bp

无性系名 Clonal name	指纹图谱代码 Fingerprint codes	无性系名 Clonal name	指纹图谱代码 Fingerprint codes
平潭2 号	3321231	UC-3	4313122
宝-9	1313113	UC-4	3321421
A-8	2321431	UC-5	1314413
东-2	3223221	UC-6	1312411
短杂1 号	5313132	UC-7	2131133
601	3321131	UC-8	2231123
惠-1	2311132	UC-9	1312412
A-13	1231133	UC-10	2113222
501	2111122	UC-11	2231231
UC-1	1321431	UC-12	1313213
UC-2	4312412	UC-13	2112321

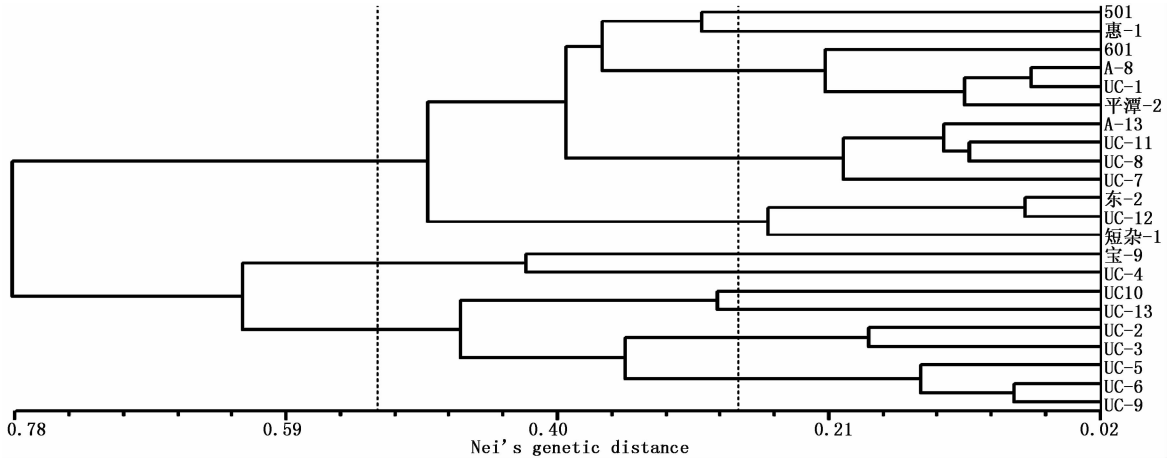


图 3 基于 Nei's 遗传距离的 22 个短枝木麻黄无性系的亲缘聚类

Fig. 3 UPGMAdendrogram of 22 clones of *C. equisetifolia* based on Nei's genetic distance

显性、重复性高、多态性高等优点^[19-20],且较之 gSSR 标记 EST-SSR 具有较强的种属间的通用性^[5]。近年来,许多物种的大规模 cDNA 测序并在网上公开释放,大大增加了 EST-SSR 标记的开发能力^[21]。在 GenBank 等数据库可以获得大量相关植物的表达序列标签且数据库仍在不断更新中,为其 EST-SSR 引物的开发提供了极大便利。因此,EST-SSR 逐渐成为植物遗传多样性分析、系谱分析、品种鉴定及 DNA 指纹图谱构建中广泛应用的分子标记。

稳定性高、多态性好的引物可以得到更好的鉴定效果^[22]。本文的 12 对 EST-SSR 引物在木麻黄的 109 个木麻黄无性系单株中总共扩增出 50 个等位基因,平均每对为 4.2 个,这与许秀玉等^[11]利用 226 对 EST-SSR 标记在短枝木麻黄中扩增得到的 5.4 个平均等位基因数相近,低于胡盼^[12]利用 13 个 EST-SSR 标记在 29 个短枝木麻黄种源中扩增得到的 23.69 个平均等位基因数和 Kullán 等^[10]在短枝木麻黄与山地木麻黄扩增得到的 17 个平均等位基因。在 12 个位点中, PIC 值(多态性信息量)变幅为 0.35~0.72,根据引物多态性信息量的评价标准(高: $PIC > 0.5$;中: $0.5 > PIC > 0.25$;低: $PIC < 0.25$)^[23],这 12 对引物中有 9 对(75%)的 PIC 高于 0.5,剩余 3 对的 PIC 也高于 0.25,表明其均有较高的多态性, PIC 值越大,引物鉴定能力越强^[24],说明所选 EST-SSR 引物能够较好地用于短枝木麻黄无性系指纹图谱的构建。本研究 12 对 EST-SSR 引物扩增出的平均等位基因数稍低可能是由于参试无性系较少(实际是 22 个无性系)引起的,对此有待进一步研究。

3.2 品种鉴定

毛秀红等^[8]对刺槐的研究,前后 2 次各利用 9 对不同的引物均无法区分“鲁刺 62”、“鲁刺 90”、“鲁刺 57”、“鲁刺 103”这 4 份无性系,由此推断它们可能是同物异名。本文研究发现,很多具有不同名字的短枝木麻黄无性系其实是属于同一个无性系(其 12 个扩增位点的等位基因完全相同),如广东选育的“601”(采样序号 36)无性系和海南的“真-4”(采样序号 84)无性系是同一个无性系(注:20 世纪 80 年代初 601 无性系选育时,海南岛属于广东省),海南选育的“东-2”(采样序号 83)和广东的“BF-3”(采样序号 47)为同一个无性系,还有一些具有当地名字的无性系实际是从其他省份或地区引进后被重新命名,存在重复命名的现象。曾乐^[25]对大麦进行品种鉴定时发现,不同的大麦品种由于遗传背景接近导致其在外观形态特征上很相似,相比 DUS 测试鉴定法,SSR 分子标记鉴定法具有快速、方便、不受环境条件影响等优点。短枝木麻黄无性系多种植在海边,生长环境较恶劣,形态性状极易受环境影响。本文实践证明,利用 EST-SSR 标记技术开展木麻黄无性系的鉴别,可以精确鉴定外观形态上近似的无性系,解决命名混乱的现象,鉴定效率更高,鉴定结果更可靠,有利于木麻黄无性系选育和鉴定工作的开展。

3.3 基于 EST-SSR 分子标记的 DNA 指纹图谱构建

DNA 指纹图谱是快速鉴别植物品种时的有效工具,效率较 DUS 鉴定法更加准确快速,错误率更低^[26-27],能在各类植物中普遍应用。DNA 指纹分

析方法一般有特征谱带法、引物组合法和核心引物组合法^[16],其中,特征谱带法仅需用1对引物就可以鉴别品种,简单方便,实用价值大;但是,并不是所有的品种都有特征谱带,本研究只有4个无性系在4个位点上具有特异等位基因,而金玲等^[9]通过155对引物的扩增,于97个山杏无性系中发现89个无性系的特异等位基因。若想获取其他无性系的特征谱带,还需要进行大量的引物筛选工作;而引物组合法通过不同引物的组合,利用相对少量的引物就可以区分全部材料,避免了大量引物筛选的繁重工作量。本研究中,利用7对引物可将22个木麻黄无性系完全区分开,引物组合的鉴定效率高于刘欢等^[28]利用6对EST-SSR引物组合完全区分10个多花黑麦草材料,而低于金玲等^[9]利用5对SSR引物可全部区分97个山杏无性系和赵阿凤^[6]利用8对SSR引物组合可全部区分120个马尾松无性系的鉴定效率,这可能与鉴定材料之间的亲缘关系远近程度有关。本文所鉴定的无性系之间亲缘关系较近,鉴定难度大,所需引物数量也较多。如毛秀红等^[8]与袁存权等^[29]同样利用8对多态性高的引物分别对来自不同地市的49份刺槐材料和来自同一林场的48份刺槐材料进行鉴定,前者所得等位基因数是后者的2.04倍,分析原因可能与后者所用材料之间的亲缘关系相近有关,对此应该做进一步研究。

4 结论

本文开展了基于EST-SSR标记的我国华南沿海地区短枝木麻黄无性系的鉴定及指纹图谱构建的研究,筛选出12对多态性较高的EST-SSR引物;109个短枝木麻黄无性系单株被鉴定为分别属于22个无性系;各无性系在3个省间互有引种,引种过程中存在重复命名的情况,各无性系的分布范围各异、分布数量不均,海南和福建两省存在栽培无性系数量较少的情况;采用7对引物扩增谱带的组合构建了22个短枝木麻黄无性系的DNA指纹图谱,建立了基于EST-SSR标记的短枝木麻黄无性系指纹鉴定体系;目前所种植的短枝木麻黄无性系之间整体亲缘关系较近,遗传多样性不高,对此应加强新品种的选育。

参考文献:

[1] 仲崇禄,张 勇.我国木麻黄的引种培育和经营[J].林业科技开发,2003,17(2):3-5.
[2] 张 勇.三种木麻黄的遗传改良研究[D].北京:中国林业科学

研究院,2013.
[3] 兰海燕,李立会.蛋白质凝胶电泳技术在作物品种鉴定中的应用[J].中国农业科学,2002,35(8):916-920.
[4] 宋 婉,续九如.果树种质资源鉴定及DNA指纹图谱应用研究进展[J].北京林业大学学报,2000,22(1):76-80.
[5] 李 响,杨 楠,赵凯歌,等.蜡梅转录组EST-SSR标记开发与引物筛选[J].北京林业大学学报,2013,35(S1):25-32.
[6] 赵阿凤.马尾松无性系指纹图谱构建[D].南京:南京林业大学,2005.
[7] 雷天刚,何永睿,吴 鑫,等.柑橘栽培品种(系)DNA指纹图谱库的构建[J].中国农业科学,2009,42(8):2852-2861.
[8] 毛秀红,郑勇奇,孙百友,等.基于SSR的刺槐无性系遗传多样性和指纹图谱构建[J].林业科学,2017,53(10):80-89.
[9] 金 玲,刘明国,董胜君,等.97个山杏无性系的遗传多样性及SSR指纹图谱[J].林业科学,2018,54(7):51-61.
[10] Kullán A R K, Kulkarni A V, Kumar R S, et al. Development of microsatellite markers and their use in genetic diversity and population structure analysis in *Casuarina* [J]. Tree Genetics & Genomes, 2016,12(3):49.
[11] 许秀玉.木麻黄青枯病的抗性鉴定及EST-SSR关联分析[D].北京:中国林业科学研究院,2017.
[12] 胡 盼.短枝木麻黄种质资源遗传多样性研究[D].北京:中国林业科学研究院,2015.
[13] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem. Bull, 1987:11-15, 19.
[14] 汪 洁.鹅掌楸EST-SSR引物大规模开发及应用[D].南京:南京林业大学,2013.
[15] Li F, Gan S. An optimised protocol for fluorescent-dUTP based SSR genotyping and its application to genetic mapping in *Eucalyptus* [J]. Silvae Genetica, 2011,60(1-6):18-25.
[16] 王风格,赵久然,郭景伦,等.比较三种DNA指纹分析方法在玉米品种纯度及真伪鉴定中的应用[J].分子植物育种,2003,1(5):655-661.
[17] 陈昌文,曹 珂,王力荣,等.中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建[J].中国农业科学,2011,44(10):2081-2093.
[18] 孙清明,马文朝,马帅鹏,等.荔枝EST资源的SSR信息分析及EST-SSR标记开发[J].中国农业科学,2011,44(19):4037-4049.
[19] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics [J]. The Plant Journal, 1993,3(1):175-182.
[20] Rojas G, Méndez M A, Muñoz C, et al. Identification of a minimal microsatellite marker panel for the fingerprinting of peach and nectarine cultivars [J]. Electronic Journal of Biotechnology, 2008,11(5):4-5.
[21] 潘海涛,汪俊君,王盈盈,等.小麦EST-SSR标记的开发和遗传作图[J].中国农业科学,2010,43(3):452-461.
[22] 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.
[23] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genet-

- ic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314–331.
- [24] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, *et al.* An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.); comparisons with data from RFLPs and pedigree[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95(1–2): 163–173.
- [25] 曾 乐. 大麦 DUS 测试和 SSR 分子标记鉴定法的比较研究[D]. 扬州:扬州大学, 2016.
- [26] Heckenberger M, Bohn M, Ziegler J S, *et al.* Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties[J]. *Molecular Breeding*, 2002, 10(4): 181–191.
- [27] 葛亚英, 张 飞, 沈晓岚, 等. 丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J]. *中国农业科学*, 2012, 45(4): 726–733.
- [28] 刘 欢, 张新全, 马 啸, 等. 基于荧光检测技术的多花黑麦草 EST-SSR 指纹图谱的构建[J]. *中国农业科学*, 2017, 50(3): 437–450.
- [29] 袁存权, 李 云, 路 超, 等. 刺槐种子航天诱变生物学效应研究[J]. *核农学报*, 2010, 24(6): 1141–1147.

Identification and Fingerprinting Construction of *Casuarina equisetifolia* Clones

YU Wei, ZHONG Chong-lu, ZHANG Yong, WEI Yong-cheng, MENG Jing-xiang

(Research Institute of Tropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Guangzhou 510520, Guangdong, China)

Abstract: [Objective] To construct DNA fingerprints of *Casuarina equisetifolia* clones and to provide the references for cultivar identification, cultivar variety right protection, and genetic breeding. [Method] Twelve EST-SSR primers with clear and stable amplified products were selected from 71 primers. The 12 primer pairs were used to identify the cultivars of 109 clonal samples collected from coastal shelterbelts of South China using touchdown PCR and capillary electrophoresis genotyping method through matching genotyping results of 9 standard reference cultivars. A DNA fingerprint identification system of *C. equisetifolia* clones based on EST-SSR molecular markers and multi-primer combination method was established. [Result] In this study, totally 50 alleles were detected from 12 primers, where the allele number of each locus ranged from 3–6 and the average value was 4.2, and 2–5 clones can be identified by single locus. According to identification results, 109 clone samples were identified as 22 clones, including 9 reference cultivars and 13 unknown clones, suggesting that repetitive naming of clones was common in different regions. After further optimization by multi-primer combination method the valid molecular marker decreased to 7 primers, that a 7-digit numbers fingerprinting was established to identify the clones of *C. equisetifolia*, in which each clone can obtain a 7-digit numbers fingerprinting code. [Conclusion] The DNA fingerprints of 22 clones can be used for the identification of *C. equisetifolia* clones. This study demonstrates that some clones are repetitive named and the reality of insufficient clone for afforestation. South China will enforce to strengthen breeding and selection work of new clone cultivars of *C. equisetifolia*.

Keywords: *Casuarina equisetifolia*; EST-SSR molecular markers; genotyping; fingerprinting

(责任编辑:张 研)