

SSR 标记在桉树树种精准鉴定中的应用分析

刘果, 谢耀坚, 吴志华, 陈鸿鹏

(国家林业局桉树研究开发中心, 广东 湛江 524022)

摘要: 为精准鉴定桉树种质, 利用 4 个在种内完全保守的 SSR 位点对 28 种桉树(*Eucalyptus*)进行鉴定。根据这 4 个 SSR 位点的微卫星重复次数和侧翼序列特异核苷酸组合, 构建了 28 种桉树种间种质资源的鉴定条码, 能够精准鉴定 9 种桉树。这为桉树杂交育种工作提供了生物学依据。

关键词: 桉树; SSR 标记; 微卫星序列; 种质鉴定

doi: 10.11926/jtsb.3784

Application of SSR Markers in Precise Identification of *Eucalyptus* Germplasms

LIU Guo, XIE Yao-jian, WU Zhi-hua, CHEN Hong-peng

(*Eucalypt Research Centre, State Forest Administration, Zhanjiang 524022, Guangdong, China*)

Abstract: In order to precise identification *Eucalyptus* germplasms, twenty-eight germplasms of *Eucalyptus* were classified by using 4 SSR loci with complete conservation sequence. According to the multiplicity of microsatellite and the specific bases in associated flanking region (FR) sequences, the identification barcodes among the 28 species of *Eucalyptus* were constructed, and 9 species of *Eucalyptus* were precisely identified. Therefore, these would provide the biological basis for hybrid breeding of *Eucalyptus*.

Key words: *Eucalyptus*; SSR marker; Microsatellite sequence; Germplasm identification

桉树自然分布于澳大利亚及华莱士线以东的澳洲大陆附近的太平洋岛屿。桉树生长快速, 抗逆性较强, 用途非常广泛, 是热带和亚热带地区的重要造林树种。我国引种桉树已有 127 年的历史, 现在我国华南、西南和华东南地区进行了广泛的引种和栽培。据 2016 年底最新数据统计, 我国桉树人工林面积已达 $4.50 \times 10^6 \text{ hm}^{2[1]}$ 。

桉树遗传资源丰富, 1998 年底确认的桉树有 945 个分类群^[2-3]。我国早期的桉树引种具有很大的随机性, 最早的种子可能来源已经发生变异的地理种群, 或非正常的变异个体, 在此基础上发展起来的新栽培群体, 其特征与自然分布区内的正常种群很可能存在较大的不同^[4]。而且, 桉树同一亚属内

的种间容易产生自然杂交种, Griffin 等^[5]列出了 494 个自然发生的种间杂交组合, 其中 141 个涉及 20 种主要人工桉树林栽培种。桉树各属和亚属的种群分离趋异的间断分布特点, 使得属内一些亲缘关系较远或没有亲缘关系的种在表型上表现出相似性, 这些都增加鉴定引种地的不同桉树种的困难。因此, 建立一套桉树种间种质资源的精准鉴定体系势在必行。

植物种质资源是植物利用和改良的物质基础, 更是实施各个育种途径的原材料。20 世纪 80 年代以来, 我国引种桉树的种类迅速增加。由于桉树在外观上具有一定的相似性, 不同树种常笼统地称为“桉树”; 而且有关桉树分类的文献和资料比较有限,

收稿日期: 2017-06-30

接受日期: 2017-09-13

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)资助

This work was supported by the Special Project for Basic Scientific Research of Central Public Welfare Institution (Grant No. CAFYBB2016QA018).

作者简介: 刘果(1987~), 女, 博士, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: liuguopz@163.com

以致于经常造成鉴定错误,且错误结果广泛传播,影响甚大^[6]。因此,对我国引种的桉树进行种间种质资源的精准鉴定体系的研究迫在眉睫。

SSR (simple sequence repeat)分子标记,又称为微卫星标记(microsatellite),由于其多态性高,重复性和稳定性好等优点,已广泛应用于各物种的 DNA 指纹图谱绘制、亲缘关系分析、品种鉴定、遗传多样性分析等研究^[7-10]。本研究基于 SSR 标记技术和 DNA 测序技术,对 28 种桉树 115 份种质材料进行 PCR 扩增产物直接测序,根据 4 个在同种不同个体 DNA 扩增序列完全一致的 SSR 位点的微卫星信息特征和两端侧翼序列的核苷酸特征对 28 种桉树构建特异鉴定条码,以期达到精准鉴定的目的,为桉树品种(无性系)种质鉴定体系的构建奠定基础,为

桉树遗传育种的研究和生产实践提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 28 种桉树 115 份种质材料(表 1),分别取自云南省昆明市海口林场、广西壮族自治区柳州市黄冕林场、广东省湛江市南方国家级林木种苗示范基地和云南省楚雄州一平浪林场。每种桉树采集若干个体的新鲜幼嫩叶片,保存于 -80°C 低温冰箱。参照桉树分类系统^[11-14],28 种桉树均属于桉属(*Eucalyptus*),其中 24 种为双蒴盖亚属(subgenus *Symphyomyrtus*),4 种为单蒴盖亚属(subgenus *Monocalyptus*)。

表 1 28 种桉树基本信息

Table 1 Information of 28 *Eucalypts* species

编号 No.	植物 Species	数量 Number	亚属 Subgenus	组 Section	采集地 Location
HK01	多枝桉 <i>Eucalyptus viminalis</i>	4	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK02	迪恩桉 <i>E. deanei</i>	4	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Transversaria</i>	昆明 Kunming
HK03	奥米奥圆叶桉 <i>E. neglecta</i>	2	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK04	巴吉桉 <i>E. badjensis</i>	4	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK05	小叶桉 <i>E. parula</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK06	白腊桉 <i>E. fraxinoides</i>	1	<i>Monocalyptus</i>	<i>Renantheria</i>	昆明 Kunming
HK07	毛皮桉 <i>E. macarthurii</i>	5	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK08	三花桉 <i>E. triflora</i>	1	<i>Monocalyptus</i>	<i>Renantheria</i>	昆明 Kunming
HK09	山桉 <i>E. dalrympleana</i>	5	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK10	邓恩桉 <i>E. dunnii</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK11	樟脑桉 <i>E. camphora</i>	4	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK12	假美叶桉 <i>E. mannifera</i>	3	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK13	新英格兰桉 <i>E. nova-anglica</i>	4	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK14	灰桉 <i>E. cinerea</i>	5	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK15	史密斯桉 <i>E. smithii</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK16	本沁桉 <i>E. benthamii</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK17	多利桉 <i>E. dorrigoensis</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HK18	头果桉 <i>E. cephalocarpa</i>	5	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Maidenaria</i>	昆明 Kunming
HM19	柳桉 <i>E. saligna</i>	2	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Transversaria</i>	柳州 Liuzhou
SX20	窿缘桉 <i>E. exserta</i>	2	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Exsertaria</i>	湛江 Zhanjiang
SX21	维塔桉 <i>E. wetarensis</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Transversaria</i>	湛江 Zhanjiang
SX22	细叶桉 <i>E. tereticornis</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Exsertaria</i>	湛江 Zhanjiang
SX23	尾叶桉 <i>E. urophylla</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Transversaria</i>	湛江 Zhanjiang
SX24	赤桉 <i>E. camaldulensis</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Exsertaria</i>	湛江 Zhanjiang
SX25	巨桉 <i>E. grandis</i>	6	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Transversaria</i>	湛江 Zhanjiang
YPL26	滨河白桉 <i>E. elata</i>	1	<i>Monocalyptus</i>	<i>Renantheria</i>	楚雄 Chuxiong
YPL27	大叶桉 <i>E. robusta</i>	2	<i>Symphyomyrtus</i>	<i>Transversaria</i>	楚雄 Chuxiong
YPL28	斜叶桉 <i>E. obliqua</i>	1	<i>Monocalyptus</i>	<i>Renantheria</i>	楚雄 Chuxiong

1.2 SSR-PCR 扩增反应

桉树叶片总 DNA 的提取采用 CTAB 法^[15],并参照 Gan 等^[16]和李发根^[17]的方法进行适当改良。提

取结果利用 Thermo 核酸蛋白测定仪和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行浓度和质量测定,并将提取样品稀释至约 $100\text{ ng }\mu\text{L}^{-1}$,保存于 -20°C 冰箱备用。

1.3 SSR-PCR 扩增反应

本研究从 110 对 SSR 引物中筛选出种内 PCR 扩增片段大小基本一致的引物 20 对, 利用特异 SSR

引物进行 SSR-PCR 扩增, 其产物直接测序, 最终选出 4 对种内扩增序列完全保守的特异 SSR 引物 (表 2), 对 28 种桉树 115 份种质材料进行分析。

表 2 SSR 引物序列

Table 2 Sequences of SSR primers

引物 Primer	序列 Sequence	目标序列 Target sequence	长度 Length (bp)	退火温度 (°C) Annealing temperature
eSSR-GR001	F: GGAAGTGCCTCTGAAGT R: TCTTAGTTGTCCCATCCTG	(AGAAA) ₃ (AAG) ₆	245	56
eSSR-GR029	F: CAAGCAGACTATTCCGTGAG R: CATAAGCAACCAGCGATC	(CT) ₁₀	275	56
gSSR-GR139	F: AGAGCGACCAAGAGTGTTC R: GCGGCTTCTTCAGGCTTAGTG	(TCC) ₆ (CCG) ₇	304	56
gSSR-GU031	F: CTTTGCCGTACCTTGTC R: TTCCTGCTTGCCTTCAT	(GCC) ₇	293	56

SSR-PCR 扩增反应体系总体积为 50 μ L, 其中模板 DNA 约 100 ng, 100 μ mol L⁻¹ 引物各 5.0 μ L, 2 \times TopTaq Master Mix (1.25 U *Taq* DNA 聚合酶, 0.2 mmol L⁻¹ dNTPs, 1.5 mmol L⁻¹ MgCl₂) 25 μ L。采用 Touch-Down PCR 扩增反应程序: 首先 94°C 预变性 4 min, 94°C 变性 30 s, 50°C ~ 60°C 复性 30 s, 72°C 延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后 72°C 延伸 10 min。PCR 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 送至英潍捷基(上海)贸易有限公司(广州实验室)进行序列测定。

1.4 数据统计和分析

使用软件 Genious 7.1 对所得序列进行核对, 并进行相应的正反序列拼接和手工调整, 以保证序列的准确性。软件 SSRHunter 对 4 个 SSR 位点的所有扩增序列进行 SSR 位点的检索, 分析桉树种间和同种桉树不同个体间的微卫星重复单元和重复次数的差异性; 通过软件 BioEdit 7.09 对 4 个位点在不同种间的扩增序列进行 Clustal W 比对分析, 统计各位点在不同种间的扩增序列中碱基变化情况, 找出侧翼保守序列中的特异性碱基, 即扩增序列中某处碱基在多数种间均存在变异(替换、插入或缺失)。通过综合 4 个 SSR 位点的微卫星重复次数和特异碱基组合建立 28 种桉树种间种质资源的鉴定条码。最后, 通过软件 Modeltest 2.1.5 选择最佳建树模型^[18]的基础上, 分别利用软件 PhyML-3.1 和 WinPaup-4.10 以最大似然法(maximum likelihood, ML)与最大简约法(maximum parsimony, MP)重建系统发生树, 分析桉树种间亲缘关系的远近。

2 结果和分析

2.1 SSR-PCR 扩增结果

根据 4 对 SSR 引物对 28 种桉树 115 份种质材料的扩增结果, 桉树种内不同个体间的 PCR 扩增序列完全一致, 表明 4 个 SSR 位点在桉树种内没有长度多态性。从图 1 可见, 4 个 SSR 位点在不同桉树种的扩增片段虽然存在较小的差异性(引物 eSSR-GR029 扩增的白腊树桉 DNA, 泳道 6-1), 但各桉树样品的扩增片段大小基本一致, 特别是同一桉树种不同个体间的扩增片段大小几乎一致, 且均为单态位点, 说明 4 个 SSR 位点的多态性丰富程度较低。

2.2 微卫星序列的特征分析

位点 eSSR-GR001、eSSR-GR029、gSSR-GR139 和 gSSR-GU031 的扩增序列中, 对种内各种质材料的扩增序列完全一致, 即 4 个 SSR 位点在 28 种桉树中的扩增序列完全保守(侧翼序列和微卫星序列完全保守), 种内不同个体间在 4 个 SSR 位点处的扩增序列完全无差异。

对 4 个 SSR 位点的扩增序列进行 SSR 位点检索表明, 当桉树种内个体间的序列无差异时, 桉树种间的微卫星序列的差异也不明显。在位点 eSSR-GR001 和位点 eSSR-GR029 的扩增序列中(表 3), 不同桉树种的微卫星重复单元和重复次数完全一致。位点 gSSR-GR139 的 115 条扩增序列中, 单萆盖亚属的 HK06、HK08、YPL26、YPL28 的微卫星重复单元为 CTC, 重复次数 7~9。双萆盖亚属的 25 种

桉树微卫星重复单元均为 CTT, 重复次数为 4~10。位点 gSSR-UR009 的 115 条扩增序列中, 微卫星重复单元均为 GCC, 而单蒴盖亚属的微卫星重复次数均为 3, 双蒴盖亚属的 24 种桉树的微卫星重复次数为 5~8。因此, 微卫星重复单元和重复次数的变化, 与桉树种间亲缘关系的远近存在着相关性。

4 个位点在种间的微卫星序列变化主要是由于微卫星重复次数的变化引起。有研究表明, SSR 重复次数在很大程度上与序列长度多态性 (simple sequence length polymorphism, SSLP) 相关^[19]。简单序列长度多态性在不同动植物品系中的重复次数不同, 可以用来快速检测出等位基因间的差异。

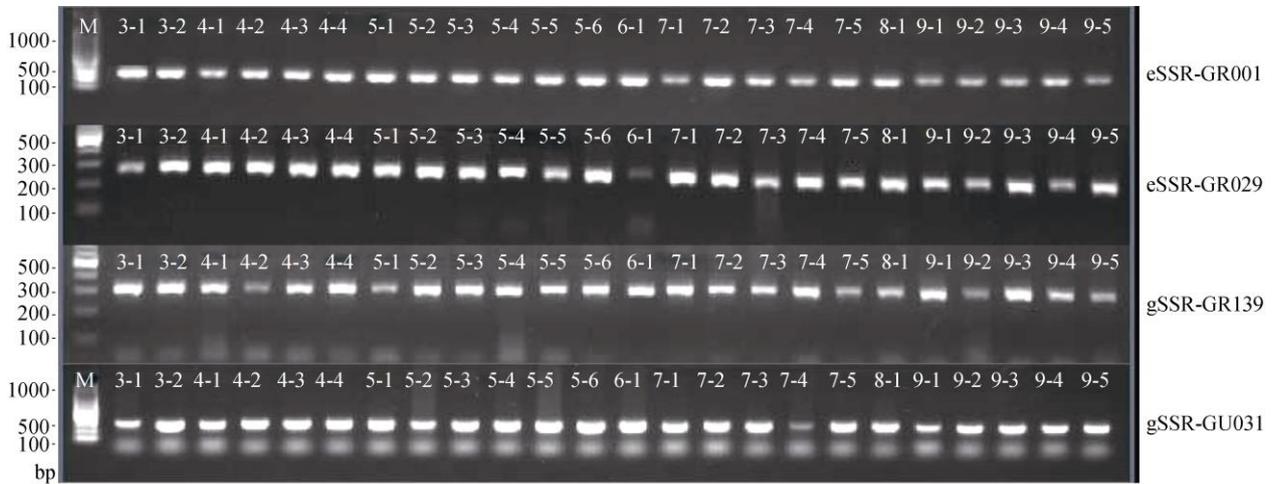


图 1 4 对 SSR 引物的部分种质的扩增结果。M: Marker; 3-1,3-2: 奥米奥圆叶桉; 4-1~4-4: 巴吉桉; 5-1~5-6: 小叶桉; 6-1: 白腊树桉; 7-1~7-5: 毛皮桉; 8-1: 三花桉; 9-1~9-5: 山桉。

Fig. 1 Amplification of part germplasms by four pairs of SSR primer. M: Marker; 3-1,3-2: *Eucalyptus neglecta*; 4-1~4-4: *E. badjensis*; 5-1~5-6: *E. parula*; 6-1: *E. fraxinoides*; 7-1~7-5: *E. macarthurii*; 8-1: *E. triflora*; 9-1~9-5: *E. dalrympleana*.

表 3 4 对 SSR 引物对 28 种桉树 SSR 位点的扩增

Table 3 Amplification sequences of 28 *Eucalyptus* species by 4 SSRs

编号 No.	eSSR-GR001	eSSR-GR029	gSSR-GR139	gSSR-GU031
HK01, HK02, HK03, HK05, HK07, HK09, HK10, HK12, HK13, HK14, HK15, HK16, HK17, SX20, SX21, SX24	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(TCC) ₇	(GCC) ₅
HK04	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(TCC) ₇	(GCC) ₈
HK06	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(CTC) ₉	(GCC) ₃
HK08, YPL28	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(CTC) ₇	(GCC) ₃
HK11	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(TCC) ₄	(GCC) ₅
HK18	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(TCC) ₇	(GCC) ₆
HM19, SX23, SX25, YPL27	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(TCC) ₆	(GCC) ₅
SX22	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(TCC) ₁₀	(GCC) ₅
YPL26	(AGAAAA) ₃	(CT) ₄	(CTC) ₇	(GCC) ₅

根据 4 个 SSR 位点微卫星序列的重复次数变化情况, 微卫星序列的重复单元的碱基组成在 28 种桉树间的差异较小。若组合 4 个位点的重复次数进行条码编辑, 不仅简单明了, 而且根据数字的组合, 能够区分其中部分桉树种类。从表 3 可以看到, 28 种桉树根据 4 个 SSR 位点微卫星重复次数组成的鉴定条码有 9 种数字条码, 其中 HK04 巴吉桉, HK06 白蜡树桉, HK11 樟脑桉, HK18 头果桉, SX22 细

叶桉和 YPL26 滨河白桉的数字条码特异, 即通过 4 个 SSR 位点微卫星重复次数组成的数字条码能够将此 6 种桉树进行区分。HK08 三花桉和 YPL28 斜叶桉的 4 个 SSR 位点中微卫星重复单元和重复次数完全一致, 均属于桉属单蒴盖亚属; HM19 柳桉, SX23 尾叶桉, SX25 巨桉和 YPL27 大叶桉的 4 个 SSR 位点中微卫星重复单元和重复次数完全一致, 均属于桉属双蒴盖亚属横脉组。

因此, 基于 4 个 SSR 位点微卫星序列的长度差异性, 能够将巴吉桉、白蜡树桉、樟脑桉、头果桉、细叶桉和滨河白桉区分开来, 但仍有 22 种桉树不能区分。

2.3 侧翼保守序列的特征分析

SSR 位点侧翼序列一般是相对保守的单拷贝序列, 本研究对 4 个 SSR 位点的侧翼序列进行分析表明, 位点 eSSR-GR001、eSSR-GR029、gSSR-GR139

和 gSSR-GU031 对桉树种内的扩增序列完全一致, 而不同种桉树在同一 SSR 位点的扩增序列存在着一定的差异。

利用 DNAMAN 软件对 4 个 SSR 位点扩增序列进行比对分析, 桉树种间的扩增序列相似度 Identity 较高。4 个位点扩增序列的相似度值由高到低依次为位点 eSSR-GR001 (99.34%)>位点 eSSR-GR029 (99.24%)>位点 gSSR-GU031 (95.58%)>位点 gSSR-GR139 (95.05%)(图 2)。

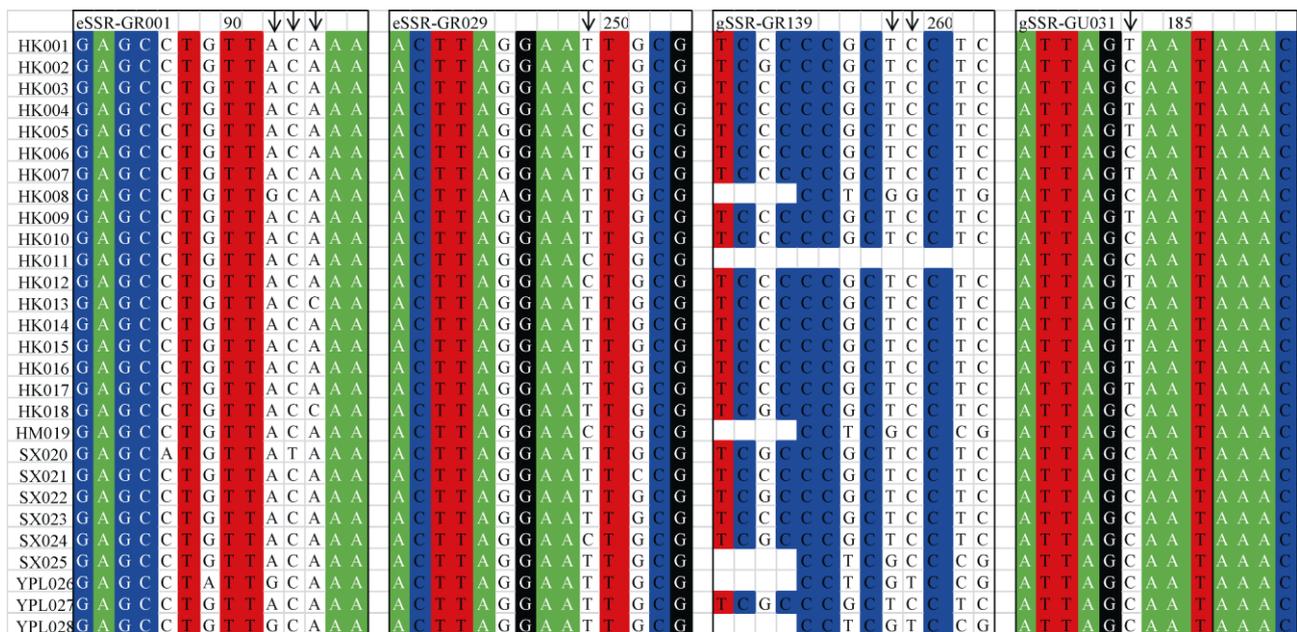


图 2 28 种桉树基于位点 gSSR-GR139 的扩增序列比对

Fig. 2 Alignment of 28 *Eucalyptus* species based on gSSR-GR139 loci

在 28 种桉树中各位点扩增序列的比对分析表明, 侧翼保守序列中存在较多的单核苷酸的变异(替换、缺失、插入), 多个连续核苷酸变异的较少。4 个 SSR 位点共有 76 处单核苷酸(single nucleotide)变异, 占总变异的 79.2%, 二核苷酸(di-nucleotide)变异共 6 处, 三核苷酸(tri-nucleotide)及三核苷酸以上的变异共 14 处。

每个 SSR 位点的侧翼序列中选择 1~2 处特异性核苷酸组合成碱基条码。通过序列比对进行特异性核苷酸的定位, 4 个 SSR 位点的 96 处碱基变异中找出 4 处特异核苷酸, 分别位于位点 eSSR-GR001 扩增序列的 92~94 bp 处、eSSR-GR029 扩增序列的 249 bp 处、gSSR-GR139 扩增序列的 255~256 bp 处、gSSR-GU031 扩增序列的 183 bp 处(图 2)。将 4 处特异核苷酸进行组合, 4 个 SSR 位点在碱基条码中

的顺序依次为位点 eSSR-GR001、eSSR-GR029、gSSR-GR139 和 gSSR-GU031, 构建侧翼序列特异碱基字母条码(表 4)。

表 4 4 个 SSR 位点侧翼序列特异碱基条码表

Table 4 Barcodes of special combination of bases on 4 SSRs' flanking sequences

编号 No.	碱基条码 Barcode of base
HK01, HK07, HK09, HK14, HK15, HK17	ACATTCT
HK05, HK04, HK12, HK16	ACACTCT
HK02, HK03, SX24	ACACTCC
HK06, HK10, SX21, SX22, SX23, YPL27	ACATTCC
HK08	GCATGGC
HK11	ACACC
HK13, HK18	ACCTTCC
HM19, SX25	ACATGCC
SX20	ATCTTCC
YPL26, YPL28	GCATGTC

从表4可见,侧翼序列中特异核苷酸组成的条码共10个,能够将HK08三花桉, HK11樟脑桉, SX20窿缘桉精准鉴定出来。HK01多枝桉、HK07毛皮桉、HK09山桉、HK14灰桉、HK15史密斯桉和HK17多利桉在4处特异碱基处的碱基完全相同,同属于桉属双蒴盖亚属蓝桉组;同样, YPL26滨河白桉和YPL28斜叶桉在4处特异碱基处的碱基完全相同,均属于桉属单蒴盖亚属。

2.4 桉树种间种质资源鉴定分析

结合表3的数字条码和表4的碱基条码,基于4个SSR微卫星序列能够从28种桉树中精准鉴定的种有9种,共计得到16种鉴定条码,部分桉树种间共享同一种鉴定条码(表5)。构建4个SSR位点的微卫星序列和侧翼保守序列中的特异核苷酸组合的鉴定条码,能够进行精准鉴定的种有:HK04巴吉桉、HK05小叶桉、HK06白蜡树桉、HK08三花桉、HK11樟脑桉、HK13新英格兰桉、HK18头果桉、SX20窿缘桉和SX22细叶桉。

表5 基于SSR标记的28种桉树种质鉴定条码表

Table 5 Identification barcodes of 28 *Eucalyptus* species based on SSR marker

编号 No.	鉴定条码 Identification barcode
HK01, HK07, HK09, HK14, HK15, HK17	3475ACATTCT
HK02, HK03, SX24	3475ACACTCC
HK04	3476ACACTCT
HK05	3475ACACTCTT
HK06	3493ACATTCC
HK08	3473GCATGGC
HK10, SX21	3475ACATTCC
HK11	3445ACACC
HK12, HK16	3475ACACTCT
HK13	3475ACCTTCC
HK18	3476ACCTTCC
HM19, SX25	3465ACATGCC
SX20	3475ATCTTCC
SX22	3485ACATTCC
SX23, YPL27	3465ACATTCC
YPL26, YPL28	3473GCATGTC

共享同一鉴定条码的不同桉树种中, HK01多枝桉、HK07毛皮桉、HK09山桉、HK14灰桉、HK15史密斯桉和HK17多利桉在分类中同属于桉属双蒴盖亚属蓝桉组; HK12假美叶桉和HK16本沁桉属于桉属双蒴盖亚属蓝桉组; HM19柳桉和SX25巨桉属于桉属双蒴盖亚属横脉组; SX23尾叶桉和

YPL27大叶桉属于桉属双蒴盖亚属横脉组; YPL26滨河白桉和YPL28斜叶桉属于桉属单蒴盖亚属; HK02迪恩桉、HK03奥米奥圆叶桉和SX24赤桉属于桉属双蒴盖亚属; HK10邓恩桉和SX21维塔桉属于桉属双蒴盖亚属。

2.5 桉树种间亲缘关系分析

综合分析4个SSR位点在28种桉树中的扩增序列,利用最大简约法和最大似然法构建系统发育树(图3)。根据软件DnaSP 5.10.01对4个SSR位点的综合序列进行多态性评估,核苷酸多态性 $P_i=0.012$,单倍型多样性 $H_d=0.989$,变异位点比率为0.082。最大似然法构建系统发育树的最佳建树模型为TIM1+I。最大简约法分析得到一致性指数 $CI=0.679$,维持性指数 $RI=0.804$ 。

依据前人的分类系统^[11-14],28种桉树均属于桉属,包括4种单蒴盖亚属和24种双蒴盖亚属。由图3可见,28种桉树基于4个SSR位点中扩增序列的聚类状态与传统分类学完全一致,可分为两大类群,属于单蒴盖亚属的4种桉树聚为一大类群,属于双蒴盖亚属的24种桉树聚为另一大类群。24种双蒴盖亚属桉树的分组情况与传统分类学基本一致,可分为横脉组、蓝桉组和窿缘组3个亚群。但蓝桉组亚群中HK02迪恩桉在传统分类学中属于横脉组,与HM19和YPL27等是近缘种关系^[20],而图3表明HK02迪恩桉与HK11樟脑桉的遗传距离更近, HK11樟脑桉属于桉属双蒴盖亚属蓝桉组。在形态特征上,横脉组的成龄叶上下两面同色,脉序或多或少横向排列;而蓝桉组的实生苗幼态叶无柄^[21]。HK02迪恩桉的形态特征与横脉组和蓝桉组的均不一致:幼态叶具柄,对生,叶卵形或椭圆形,幼茎呈红色,成熟叶片两面不同色,脉序排列没有明显的横向排列,树枝、树干及树皮均呈红色^[22-23]。因此, HK02迪恩桉的分类地位还有待深入研究。

3 讨论和结论

SSR标记中微卫星DNA序列的主要特征是重复单元的重复次数不同和重复程度的不完全。微卫星DNA序列在生物进化过程中存在着大量的变异,位于非编码区的突变多为“中性突变”,对生物生长和发育都不会产生太大的影响,一般不受选择的影响,大部分变异都能够得到保存。而基因组SSR的



图 3 基于 4 个 SSR 位点的综合 MP 法系统发育树。枝点处数字表示 ML/MP 法 1 000 次启发式搜索值。

Fig. 3 MP phylogenetic based on four SSRs sites. The numbers on branch points represent heuristic searching of 1 000 times by ML/MP methods.

丰富度和对应的各种功能与效应都与他们的突变率相关,与表达序列标签 SSR 上的点突变率相比,要高很多^[24]。

本研究中 4 个 SSR 位点具有在种内个体间的扩增序列完全保守的特征。4 个 SSR 位点在同种桉树不同个体间的 SSR-PCR 扩增序列完全一致,排除了因个体间 SSR 位点中重复单元和重复次数的变异而导致的种间差异,确保了 4 个 SSR 位点在同种桉树内微卫星序列和侧翼序列的完全保守。

分析 4 个 SSR 位点的遗传多样性表明,微卫星 DNA 序列中位点 gSSR-GR139 和 gSSR-GU031 的遗传多样性明显高于位点 eSSR-GR001 和 eSSR-GR029,即来源于基因组 SSR 位点比 EST-SSR 位点具有更高的变异性,这与刘果等^[25]报道桉树 EST-SSR 引物的多态性要低于 Genomic-SSR 引物的结论一致。

在位点 gSSR-GR139 的扩增序列中,形态分类中属于单萼盖亚属的 4 种桉树的微卫星重复单元一

致,属于双萼盖亚属的 24 种桉树的微卫星重复单元分布一致;在位点 gSSR-UR009 的扩增序列中,形态分类中属于单萼盖亚属的 4 种桉树的微卫星重复次数完全相同。这与 Stephanie 等^[19]认为不同种间(种群间)微卫星重复次数(重复单元的长度)不一致与种间亲缘关系存在一定关系的结论相一致。

本研究对 4 个 SSR 位点进行微卫星序列及两端侧翼保守序列进行分析,表明微卫星的变异主要是由于重复序列和侧翼序列的改变引起的。这与 Matsuoka 等^[26]和 Sonnante 等^[27]分别报道玉米(*Zea mays*)和朝鲜蓟菜(*Cynara cardunculus* var. *scolymus*)的 SSR 位点变异主要来源于侧翼序列的插入/缺失和点突变的结论相同。

对 4 个 SSR 位点扩增序列中的侧翼序列进行比对分析,桉树种间的侧翼序列中单碱基的变异比较普遍,占总变异的 79.2%。这与王静毅^[24]报道 4 个位点的侧翼序列均存在插入/缺失突变,等位基因的长度变异主要是由 SSR 重复次数及侧翼序列的

插入/缺失和点突变造成的结论一致。

Stebbins^[28]曾指出桉树能够在相对均匀的种群间产生杂种,双蒴盖亚属是桉属内最大的亚属,为方便划分为数众多的组系,亚属内组的划分在某种程度上存在主观性,某些组内的树种之间完全是可交可孕的^[6]。根据 Griffin^[5]对蜡叶标本的检查和统计,横脉组、蓝桉组以及窿缘组的树种彼此之间产生自然杂种的频率很高。本研究中构建桉树树种精准鉴定条码出现共享同一鉴定条码的桉树组合,也证实横脉组、蓝桉组和窿缘组树种间存在较近的遗传关系,各组间部分树种的遗传关系比较亲密。同一亚属共享同一鉴定条码的桉树种间有可能进行自然或人工杂交,产生杂交种。这为桉树杂交育种工作提供了新思路和生物学依据。从表5可知, HK02 迪恩桉和 HK03 奥米奥圆叶桉、SX24 赤桉的鉴定条码完全一致,而迪恩桉在形态分类中属于横脉组,奥米奥圆叶桉属于蓝桉组,赤桉属于窿缘组种,由此证实了蓝桉组、横脉组和窿缘组具有比较近的遗传关系,也为3个组间树种出现频繁杂交提供了证据。

利用4个SSR位点的扩增序列构建系统发育树,结果表明,28种桉树基于4个SSR位点扩增序列的聚类结果与传统分类系统^[11-14]的分类地位基本一致。但属于横脉组的HK02迪恩桉明显表现出与蓝桉组的亲缘关系更近,且迪恩桉的形态特征与横脉组和蓝桉组的均不一致,由此可以推断,在形态分类中将双蒴盖亚属内的迪恩桉划分为横脉组具有一定的主观性。

本研究通过构建基于4个SSR位点的微卫星重复次数和侧翼序列特异碱基组合的鉴定条码,对28种桉树进行了种质资源的精准鉴定。15个鉴定条码,能够精确鉴定的桉树有9种(32.1%),即9种桉树有特异性的鉴定条码。共享同一鉴定条码的桉树种间存在较近的亲缘关系,这为桉树杂交育种工作提供了新的选种方法,也为全面系统地构建桉树种间种质资源精准鉴定体系得出了初步的研究成果,为桉树品种(无性系)种质资源的精准鉴定体系的建立奠定了基础。

参考文献

[1] XIE Y J. *Eucalyptus* [M]. Beijing: China Forestry Publishing House, 2015: 35-37.

谢耀坚. 真实的桉树 [M]. 北京: 中国林业出版社, 2015: 35-37.

[2] WILCOX M D. A Catalogue of the *Eucalypts* [M]. Auckland: Groome Poyry Ltd, 1997: 114-116.

[3] WILCOX M D. Supplement to a Catalogue of the *Eucalypts* [M]. Auckland: Groome Poyry Ltd, 1998: 9-11.

[4] QI S X. Eucalypt introduction and development status in China [J]. Guangxi For Sci, 2006, 35(4): 250-252. doi: 10.3969/j.issn.1006-1126.2006.04.016.

祁述雄. 中国引种桉树与发展现状 [J]. 广西林业科学, 2006, 35(4): 250-252. doi: 10.3969/j.issn.1006-1126.2006.04.016.

[5] GRIFFIN A R, BURGESS I P, WOLF L. Patterns of natural and manipulated hybridisation in the genus *Eucalyptus* L'hérit: A review [J]. Aust J Bot, 1988, 36(1): 41-66. doi: 10.1071/BT9880041.

[6] QI S X. *Eucalyptus* in China [M]. 2nd ed. Beijing: China Forestry Publishing House, 2002: 33-55.

祁述雄. 中国桉树 [M]. 第2版. 北京: 中国林业出版社, 2002: 33-55.

[7] HONG Y B, LIANG X Q, CHEN X P, et al. Construction of genetic linkage map in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars [J]. Acta Agron Sin, 2009, 35(3): 395-402. doi: 10.3724/SP.J.1006.2009.00395.

洪彦彬, 梁炫强, 陈小平, 等. 花生栽培种SSR遗传图谱的构建 [J]. 作物学报, 2009, 35(3): 395-402. doi: 10.3724/SP.J.1006.2009.00395.

[8] LIANG Y Q, ZHANG J J, LIANG J J, et al. Genetic diversity among persimmon germplasm in Henan Province [J]. Sci Silv Sin, 2015, 51(6): 71-80. doi: 10.11707/j.1001-7488.20150609.

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. doi: 10.11707/j.1001-7488.20150609.

[9] GUO Z D, XIA X Y, AN L J, et al. Genetic relationship analysis and cultivar identification of blueberry based on SSR markers [J]. J Plant Genet Resour, 2015, 16(5): 1020-1026. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2015.05.013.

郭照东, 夏秀英, 安利佳, 等. 基于SSR标记的越橘亲缘关系分析及品种鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2015, 16(5): 1020-1026. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2015.05.013.

[10] ZHANG C L, GUO Z H, ZHANG X Q, et al. An analysis of species identification and genetic divergence of drooping wildrye (*Elymus nutans*) and siberian wildrye (*E. sibiricus*) by SSR markers [J]. J Plant Genet Resour, 2016, 17(3): 416-422. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2016.03.003.

张成林, 郭志慧, 张新全, 等. 利用SSR标记对垂穗披碱草和老芒麦进行物种鉴定和遗传变异分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(3): 416-422. doi: 10.13430/j.cnki.jpgr.2016.03.003.

[11] PRYOR L D, JOHNSON L A S. A Classification of the *Eucalypts* [M]. Canberra: The Australian National University, 1971: 102.

[12] HILL K D, JOHNSON L A S. Systematic studies in the *Eucalypts*: 7. A

- revision of the bloodwoods, genus *Corymbia* (Myrtaceae) [J]. *Telopea*, 1995, 6(2/3): 185–504. doi: 10.7751/telopea19953017.
- [13] BROOKER M I H. A new classification of the genus *Eucalyptus* L'Hér. (Myrtaceae) [J]. *Aust Syst Bot*, 2000, 13(1): 79–148. doi: 10.1071/SB98008.
- [14] NICOLLE D. Classification of the *Eucalypts* (*Angophora*, *Corymbia* and *Eucalyptus*), Version 2 [EB/OL]. (2015–04). <http://www.dn.com.au/Classification-Of-The-Eucalypts.pdf>.
- [15] DOYLE J J, DOYLE J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. *Focus*, 1990, 12(1): 13–15.
- [16] 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(1): 59–67. doi: 10.1023/A:1022966018079.
- [17] LI F G. Linkage map construction and growth QTL detection in *Eucalyptus urophylla* and *E. tereticornis* based on STS markers [D]. Beijing: Chinese Academy of Forestry, 2010: 50–62.
李发根. 尾叶桉和细叶桉 STS 标记连锁图谱构建及生长性状 QTL 定位研究 [D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2010: 50–62.
- [18] POSADA D, CRANDALL K A. MODELTEST: Testing the model of DNA substitution [J]. *Bioinformatics*, 1998, 14(9): 817–818. doi: 10.1093/bioinformatics/14.9.817.
- [19] BARTHE S, GUGERLI F, BARKLEY N A, et al. Always look on both sides: Phylogenetic information conveyed by simple sequence repeat allele sequences [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40699. doi: 10.1371/journal.pone.0040699.
- [20] HU T Y, LI X Q. Research on introduction of *Encalyptus grandis* and its normal region [J]. *J Sichuan For Sci Technol*, 1999, 20(4): 8–13. doi: 10.16779/j.cnki.1003-5508.1999.04.002.
胡天宇, 李晓清. 巨桉引种栽培及适生区域的研究 [J]. *四川林业科技*, 1999, 20(4): 8–13. doi: 10.16779/j.cnki.1003-5508.1999.04.002.
- [21] WANG H R. A Chinese Appreciation of *Eucalypts* [M]. Beijing: Science Press, 2010: 1–16,93.
王豁然. 桉树生物学概论 [M]. 北京: 科学出版社, 2010: 1–16,93.
- [22] DONG J X, WU C W. Towards horticultural and ornamental value of 27 introduced *Eucalyptus* species [J]. *Yunnan For Sci Technol*, 2003(4): 39–41. doi: 10.16473/j.cnki.xblykx1972.2003.04.007
董静曦, 吴赤卫. 27 种引种桉树的园艺观赏价值 [J]. *云南林业科技*, 2003(4): 39–41. doi: 10.16473/j.cnki.xblykx1972.2003.04.007
- [23] HAN Z, LIN J Y, HUANG Y F. The introduced resource and application on gardening virescence of *Eucalypt* in China [J]. *Guangdong For Sci Technol*, 2007, 23(1): 109–111.
韩宙, 林家怡, 黄永芳. 我国桉树引种资源及其在园林绿化上的应用 [J]. *广东林业科技*, 2007, 23(1): 109–111.
- [24] WANG J Y. Development and characterization of microsatellite markers for phylogenetic analysis of *Musa* [D]. Haikou: Hainan University, 2010: 43–71.
王静毅. SSR 分子标记开发和在香蕉种质资源遗传分析中的应用 [D]. 海口: 海南大学, 2010: 43–71.
- [25] 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]. *Sci Silv Sin*, 2013, 49(2): 127–133. doi: 10.11707/j.1001-7488.20130219.
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. doi: 10.11707/j.1001-7488.20130219.
- [26] MATSUOKA Y, MITCHELL S E, KRESOVICH S, et al. Microsatellites in *Zea*: Variability, patterns of mutations, and use for evolutionary studies [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 104(2/3): 436–450. doi: 10.1007/s001220100694.
- [27] SONNANTE G, CARLUCCIO A V, de PAOLIS A, et al. Identification of artichoke SSR markers: Molecular variation and patterns of diversity in genetically cohesive taxa and wild allies [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2008, 55(7): 1029–1046. doi: 10.1007/s10722-008-9310-5.
- [28] STEBBINS Jr G L. Variation and Evolution in Plants [M]. New York: Columbia University Press, 1950: 174–184.