

抗松材线虫病马尾松种质资源遗传多样性分析及核心种质构建

邓莉丽^{1,2}, 刘青华¹, 周志春¹, 高凯¹, 骆定会³

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所浙江省林木育种技术研究重点实验室, 浙江杭州 311400; 2. 南京林业大学林学院, 江苏南京 210037; 3. 浙江省临海市自然资源和规划局, 浙江临海 317000)

摘要: 【目的】对来自安徽省林业科学研究院和异地保存在浙江省临海市林业技术推广和场圃旅游服务总站的 114 份抗松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 病马尾松 *Pinus massoniana* 种质进行遗传多样性与群体结构分析, 构建抗性马尾松核心种质库。【方法】对 114 份抗性马尾松种质进行检测, 使用分子生物学软件计算遗传多样性参数, 并进行主坐标 (PCoA) 和群体结构分析。利用 M 策略和随机取样策略分别构建核心种质, 分析不同核心种质的遗传多样性参数, 确定最适合的构建方法。【结果】114 份抗性马尾松种质共检测到 115 个等位基因, 平均有效等位基因数 (N_e) 为 5.54, 平均 Shannon's 多样性指数 (I) 为 1.51, 平均多态信息含量 (P_{IC}) 为 0.90, 结果表明其具有较高的遗传多样性水平。群体结构分析将 114 份抗性马尾松种质分为 4 个亚群, 主坐标分析结果与上述基本一致。根据遗传多样性参数和抽样数量综合考虑, M 策略构建的核心种质能以最小的种质数保留原有种质最大的遗传多样性, 为最佳的取样策略。利用该策略得到了 72 份核心种质, 其保留了原有种质 100% 的等位基因数, N_e 、 I 、期望杂合度 (H_e)、 P_{IC} 等遗传参数的保留率分别为 95.67%、94.96%、98.12% 和 100.00%, 将构建的核心种质与原有种质进行 t 检验、PCoA 分析和 UPGMA 聚类分析, 结果表明两者间的遗传多样性无显著差异。【结论】114 份抗性马尾松种质遗传多样性水平较高, 构建的 72 份抗性马尾松核心种质, 去除了遗传冗余, 有利于抗性马尾松种质资源的有效保护和科学利用, 可为优异基因发掘和新品种选育提供参考。图 7 表 8 参 37

关键词: 马尾松; 抗松材线虫病; SSR; 遗传多样性; 核心种质

中图分类号: S722.3

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2024)01-0067-12

Genetic diversity analysis and core collection of pinewood nematodiasis-resistant *Pinus massoniana* germplasm resources

DENG Lili^{1,2}, LIU Qinghua¹, ZHOU Zhichun¹, GAO Kai¹, LUO Dinghui³

(1. Zhejiang Provincial Key Laboratory of Tree Breeding, Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Hangzhou 311400, Zhejiang, China; 2. College of Forestry, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, Jiangsu, China; 3. Linhai Natural Resources and Planning Bureau of Zhejiang Province, Linhai 317000, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] This study, with analyses conducted of the genetic diversity and population structure of 114 germplasm resources of pinewood nematodiasis-resistant *Pinus massoniana* from Anhui Academy of Forestry and Forestry Technology Extension and Farm tourism Service Center of Linhai in Zhejiang Province, and the construction of a core collection of the germplasm resources, is aimed to provide a theoretical basis for

收稿日期: 2023-05-29; 修回日期: 2023-10-09

基金项目: 浙江省“十四五”育种专项林木协作组课题 (2020C02007); 江西省林业局林业科技创新专项 (创新专项〔2021〕13号)

作者简介: 邓莉丽 (ORCID: 0009-0002-3535-9972), 从事林木遗传育种研究。E-mail: Lili_Deng1706@163.com。通信作者: 刘青华 (ORCID: 0000-0002-7960-6739), 研究员, 博士, 从事抗性马尾松遗传改良研究。E-mail: liuqinghua642@163.com

the scientific management and efficient utilization of germplasm resources of *P. massoniana*. [Method] First, a total of 114 resistant *P. massoniana* germplasms were detected before their principal co-ordinates analysis (PCoA), population structure and genetic diversity parameters were calculated by bioinformatics software. Then, the core collection was constructed by using M strategy and random sampling strategy so that a comparative analysis was conducted of the genetic diversity indicators of different core collection in order to determine the most suitable construction method. [Result] 115 alleles were detected in 114 resistant *P. massoniana* germplasms, with an average effective allele number (N_e) of 5.54, an average Shannon's diversity index (I) of 1.51, and an average P_{IC} value of 0.90 for polymorphic information content, which had a high genetic diversity. The population structure analysis based on Structure software showed that the 114 resistant *P. massoniana* germplasm resources were divided into four subgroups, and the result of principal coordinate analysis was basically consistent with the above. Based on the genetic diversity parameters and the sampling quantity, the core collection constructed by the M strategy could retain the maximum genetic diversity of the original germplasm with the minimum sampling quantity, which was the optimal sampling strategy. 72 core collections were obtained using this strategy, which retained 100% alleles of the original germplasm, with the ration rates of N_e , I , expected heterozygosity (H_e), P_{IC} being 95.67%, 94.96%, 98.12%, 100.00%. No significant difference in genetic diversity was shown between the constructed core germplasm and the original germplasm according to the PCoA and UPGMA cluster analysis. [Conclusion] The level of genetic diversity of 114 resistant *P. massoniana* germplasm was high. The 72 core germplasm of resistant *P. massoniana* were constructed to remove genetic redundancy, which is conducive to the effective conservation and scientific utilization of resistant *P. massoniana* germplasm resources, and lays the foundation for excellent gene discovery and new cultivar selection. [Ch, 7 fig. 8 tab. 37 ref.]

Key words: *Pinus massoniana*; pine wood nematodiasis-resistance; SSR; genetic diversity; core collection

松材线虫 *Bursaphelenchus xylophilus* 病是 20 世纪 80 年代初传入中国的一种毁灭性森林病害, 其传播速度快, 防治难度大, 危害中国松林面积超 180 万 hm^2 , 其中, 马尾松 *Pinus massoniana* 最易受感染, 松材线虫病对中国马尾松林业经济发展造成了极大破坏^[1]。马尾松具有速生、耐旱等优良特点, 松林面积达 804 万 hm^2 , 是中国南方荒山造林的先锋树种^[2]。近 40 a 的林业生产实践和研究发现, 松树种间和种内不同个体对松材线虫病的抗性存在较大差异, 且马尾松群体中存在抗病基因型, 因此选育抗性品种是当前治理松材线虫病最经济有效的途径之一^[3]。自 2001 年开始, 中国开展了马尾松松材线虫病抗性育种研究, 现已收集保存一批抗松材线虫病马尾松种质资源^[4-6]。种质资源是遗传改良的物质基础, 种质资源收集保存的越多, 其群体遗传多样性越高, 但收集保存的成本也越高。FRANKEL 等^[7]提出核心种质的概念, 即用最小的遗传资源数量和最小的遗传冗余最大限度地代表整个遗传资源的多样性。通过构建核心种质, 能最大限度地去除重复和遗传关系较近的种质材料, 加强现有抗性马尾松种质资源的有效保护利用, 降低管理成本^[8]。分子标记法是林木遗传多样性分析、种质资源评价和核心种质库构建常用的方法^[9-13]。其中简单序列重复 (SSR) 分子标记具有多等位基因、共显性和高度多态性等优点, 能够直观反映不同种质间遗传信息差异, 在遗传育种中得到广泛应用^[14]。LÜ 等^[15]利用 SSR 分子标记数据研究了桉树 *Eucalyptus cloeziana* 的遗传多样性并构建了核心种质; 唐玉娟等^[16]利用 12 对 SSR 引物对杧果 *Mangifera indica* 种质资源的遗传多样性进行分析并构建了分子身份证; HU 等^[17]利用 SSR 分子标记技术对猕猴桃 *Actinidia chinensis* 的遗传多样性进行研究, 构建了猕猴桃核心种质。

本研究利用 SSR 分子标记技术对前期筛选获得的 103 份抗松材线虫病马尾松种质和安徽省林业科学研究院审定的高抗良种进行遗传多样性及亲缘关系分析, 并基于 M 策略和随机取样策略构建核心种质, 通过分析不同构建策略的核心种质确定抗性马尾松核心种质的最适取样比例, 为抗性马尾松种质资源的合理开发和利用以及挖掘优异基因提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

2018 年, 在国家马尾松种质资源库中依据松脂和抗性的关系, 从 1 207 株树中选择 120 份候选抗性马尾松无性系, 同年在松材线虫病重灾区严重感染林分中收集健康树 242 份, 并将所有无性系嫁接保存于浙江省临海市林业技术推广和场圃旅游服务总站 (28°88'N, 121°01'E)。2018—2020 年连续 3 a 高强度对收集区内的候选抗性马尾松无性系进行人工接种松材线虫测定, 筛选存活健康株系, 共获得 103 份抗性马尾松无性系, 另取安徽省林业科学研究院审定的抗松材线虫病良种 (为目前中国所有的抗松材线虫病良种) 作为对照。合计 114 份, 其中浙江 37 份、江西 26 份、安徽 42 份、福建 6 份、贵州 1 份、广西 2 份。采集抗性样株幼嫩针叶, 在 -80 °C 冰箱中保存, 各试验材料编号及来源见表 1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 SSR 引物信息 马尾松针叶基因组 DNA 采用北京艾德莱生物科技有限公司生产的改良 CTAB 植物基因组 DNA 快速提取试剂盒提取。利用超微量分光光度计, 根据在 260 nm 的吸光度

表 1 材料编号及来源

Table 1 Test materials' number and source

编号	来源	编号	来源	编号	来源	编号	来源
1	广西贵港	35	安徽黄山	DAC12	浙江临海	HGS5	浙江临海
2	广西桂平	36	安徽黄山	DAC13	浙江临海	HGS6	浙江临海
3	贵州黎平	37	安徽全椒	DAC15	浙江临海	HGS8	浙江临海
4	福建南平	38	安徽泾县	DAC17	浙江临海	HGS9	浙江临海
6	福建南平	39	安徽休宁	DAC18	浙江临海	HGY1	浙江临海
7	安徽休宁	40	安徽休宁	DAC19	浙江临海	LS001	浙江临海
9	安徽休宁	41	安徽休宁	DAC20	浙江临海	LS003	浙江临海
10	安徽祁县	42	安徽休宁	DAC21	浙江临海	LS005	浙江临海
11	福建南平	43	安徽休宁	DAC22	浙江临海	LS007	浙江临海
12	浙江淳安	44	安徽休宁	DAC23	浙江临海	LS008	浙江临海
13	浙江淳安	45	安徽休宁	DAC24	浙江临海	LS009	浙江临海
14	福建南平	46	安徽休宁	DAC26	浙江临海	LS010	浙江临海
15	浙江松阳	47	安徽休宁	DAC34	浙江临海	XJ003	江西峡江
17	福建南平	48	安徽休宁	DLS27	浙江临海	XJ004	江西峡江
19	江西婺源	49	安徽休宁	DLS28	浙江临海	XJ005	江西峡江
20	福建南平	71	江西分宜	DLS29	浙江临海	XJ014	江西峡江
21	安徽广德	114	江西分宜	DLS30	浙江临海	AH1	安徽广德
22	安徽广德	161	江西分宜	DLS31	浙江临海	AH2	安徽滁州
23	安徽广德	231	江西分宜	DLS32	浙江临海	AH3	安徽黄山
24	安徽广德	242	江西分宜	DLS33	浙江临海	AH4	安徽休宁
25	安徽广德	305	江西分宜	DLS35	浙江临海	AH5	安徽广德
26	安徽广德	355	江西分宜	DLS36	浙江临海	AH6	安徽广德
27	安徽广德	398	江西分宜	DLS37	浙江临海	AH7	安徽广德
28	安徽广德	413	江西分宜	DLS38	浙江临海	AH8	安徽泾县
29	安徽广德	461	江西分宜	DLS40	浙江临海	AH9	安徽广德
30	安徽和县	473	江西分宜	HGS11	浙江临海	AH10	安徽休宁
31	安徽和县	485	江西分宜	HGS2	浙江临海	AH11	安徽广德
32	安徽和县	486	江西分宜	HGS3	浙江临海		
34	安徽和县	490	江西分宜	HGS4	浙江临海		

说明: AH1~AH11为安徽省林业科学研究院审定的马尾松抗松材线虫病良种皖马抗1~11号。

$D(260)$ 和 $D(260)/D(280)$ 确定 DNA 样品的纯度和质量浓度, 经检验合格后的 DNA 用 TE 溶液或去离子水 (灭菌后) 稀释至 $20\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 置于 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的冰箱保存备用。

参考董虹好等^[18] 和 YANG 等^[19] 使用的马尾松 SSR 引物, 用质量浓度为 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 筛选条带清晰且多态性较高的 SSR 引物 (图 1), 最终筛选出具有高多态性引物 14 对 (表 2), 引物序列由浙江尚亚生物技术有限公司合成。

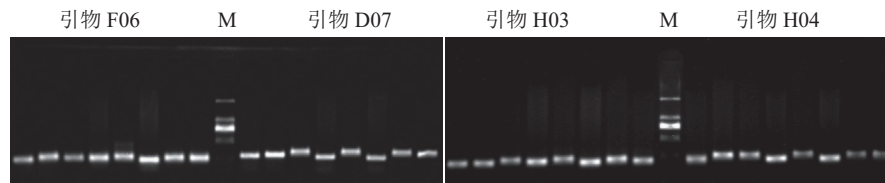


图 1 引物多态性检测图
Figure 1 Primer polymorphism detection diagram

表 2 14 对 SSR 引物信息

Table 2 14 pairs of SSR primer information

编号	引物名称	正向引物(5'→3')	反向引物(5'→3')
1	H03	CTCCAAAGGCGAGACTGC	ACGAAAGCCAAGCTGAAC
2	D04	AGGATGGTATGGTCGTGG	CCCTTCTCGCTCTGTGA
3	H04	AAGAAGCGATCTGAGATGACTAA	CTGTCATTGATTGTTTCCTTTTG
4	B05	CCGTGCCTTCAGCATCTTCT	CAGTGGATCTGTCACCTCCTCAT
5	F05	AGAAGAAGAGCAGCAGTTTC	GGTTTTCCATTGTTCTCACT
6	H05	GTGCCTTCAGCATCTTCTAC	ATCTGTCACCTCCTCATCTT
7	B06	TATTAGCACCCCTCCAAAG	TGGGGTAGAAGAATCGTAAGT
8	D06	GATTCGGCTTCGTGACCTT	CCCCATAACCCCTGTC
9	F06	AAGGACTTACAGAGGTTGGGTT	GCTGCGACGAGCGTTTCT
10	H06	TTCCTACCGCTGGGTTCTTG	GACCTGACCTCGGGCATTAC
11	D07	TCGCCTGGGCTTTGTCTG	GCGGGTTGCATATTTGGTG
12	F07	CAGCATCTTCTACATCTGAGTC	CAATCAAAAAGACTACATCACT
13	H07	CACCATCGGTTTCTCCATC	CTCAATCAAAAAGACTACATCACT
14	D08	TGCTTTCAGAAGGATAAGGGGT	AAATACAATACTGGGTTTCGCC

1.2.2 SSR-PCR 扩增和毛细管电泳 利用选取的 14 对 SSR 引物对 114 份马尾松 DNA 样本进行 PCR 扩增, 设定本研究的反应体系为 $25.0\text{ }\mu\text{L}$: $2\times\text{ Taq Plus Master Mix}$ (Nazyme Code: P211-03) $12.5\text{ }\mu\text{L}$, 引物 F 和 R ($10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 各 $1.0\text{ }\mu\text{L}$, DNA 模板 $2.0\text{ }\mu\text{L}$, ddH_2O $8.5\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR 扩增反应在 Takara PCR Thermal cyclers 上进行, 其程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 15 s, $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 15 s, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。所得 PCR 产物采用 Qsep100 全自动毛细管电泳核酸分析仪进行检测和基因分型。

1.2.3 遗传参数及群体结构分析 利用 GenAlex 6.5^[20] 计算各位点的遗传多样性参数, 包括等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、Shannon's 多样性指数 (I)、近交系数 (F_{is})、固定指数 (F) 和基因流 (N_m), 并对收集的抗松材线虫病马尾松种质进行主坐标分析 (PCoA)。采用 Cervus 2.0^[21] 获得微卫星位点的多态信息含量 (P_{IC})。利用 Structure 2.3.4^[22] 对抗性马尾松种质资源进行分类, 推测最佳聚类组群数目, 确定群体结构, 并对各亚群的遗传多样性参数进行分子方差分析 (AMOVA)。

1.2.4 核心种质构建 对抗松材线虫病马尾松种质进行群体结构分析后, 利用 Power Core^[23] 和 Core Finder^[24] 对各亚群基于不同算法构建核心种质。其中, Power Core 是利用随机取样策略和启发式算法, 寻找从初始阶段到最终阶段的最优路径进行核心集合选择; Core Finder 基于 NP-完全覆盖问题, 采用拉斯维加斯式 (Las Vegas-style) 随机算法的 M 策略进行样本选择。在构建核心种质过程中, Power Core 和

Core Finder 会自动生成合理的取样比例。最后利用 SPSS 26.0 和 Excel 中 t 检验对原有种质与核心种质各遗传多样性指标进行差异显著性分析，同时运用 PCoA 和 Powermarker^[25] 对所构建的核心种质构建 UPGMA 进化树，确认构建的核心种质的代表性。

2 结果与分析

2.1 抗松材线虫病马尾松种质资源遗传多样性分析

由表 3 可知：14 对 SSR 引物在 114 份抗松材线虫病马尾松样本中共检测出 115 个等位位点， N_a 为 5~11，平均为 8.17。所有材料的 N_e 为 3.45~8.05，平均为 5.54。 H_o 和 H_e 的分别为 0~0.57 和 0.51~0.73， H_e 均值 (0.64) 高于 H_o 均值 (0.06)， F_{is} 平均为 0.92，综合表明该抗性马尾松种质中存在杂合子缺失现象。 P_{IC} 为 0.82~0.95，平均为 0.9， I 为 1.15~1.90，平均为 1.51，表明所选引物多态性高。

表 3 不同 SSR 位点的遗传多样性统计

Table 3 Genetic diversity of different SSR microsatellite loci

位点	N_a	N_e	H_o	H_e	P_{IC}	I	F_{is}	F	N_m
H03	5	3.54	0.00	0.59	0.83	1.18	1.00	1.00	0.68
D04	7	4.62	0.01	0.62	0.89	1.38	0.98	0.98	0.60
H04	9	5.51	0.04	0.65	0.93	1.55	0.94	0.95	0.70
B05	8	5.93	0.00	0.66	0.92	1.57	0.99	0.99	0.78
F05	6	3.57	0.00	0.51	0.82	1.15	0.99	0.99	0.43
H05	9	6.46	0.00	0.66	0.95	1.59	1.00	1.00	0.63
B06	9	5.87	0.01	0.65	0.92	1.54	0.99	0.99	0.67
D06	7	4.72	0.00	0.62	0.90	1.39	1.00	1.00	0.55
F06	7	5.09	0.02	0.64	0.93	1.47	0.98	0.98	0.62
H06	11	8.05	0.57	0.73	0.93	1.90	0.21	0.19	0.92
D07	10	6.35	0.01	0.66	0.93	1.62	0.98	0.98	0.64
F07	10	6.99	0.02	0.68	0.93	1.70	0.97	0.98	0.69
H07	11	7.45	0.14	0.70	0.93	1.79	0.79	0.76	0.76
D08	6	3.45	0.00	0.60	0.82	1.25	0.99	0.99	0.50
平均	8.17	5.54	0.06	0.64	0.90	1.51	0.92	0.91	0.66

说明： N_a 等位基因数； N_e 有效等位基因数； H_o 观测杂合度； H_e 期望杂合度； P_{IC} 多态信息含量； I Shannon's 多样性指数； F_{is} 居群近交系数； F 固定指数； N_m 基因流。

2.2 抗松材线虫病马尾松种质群体结构和主坐标分析

Structure 分析得出的结果经 Structure Haevester 处理后发现 (图 2A)： $\ln P(D)$ (马尔科夫链不作数迭代后所得的对数似然值) 持续增大，没有拐点，可用 ΔK [$L(K)$ 在连续 K 之间变化率的增量] 来确定最优分组数 (K)。由图 2B 可知：当 $K=4$ 时， ΔK 取得最大值，表明参试的 114 份马尾松样本被划分为 4 个亚群。亚群 I (绿色) 包含了 12 份种质资源，其中 2 份来自广西，1 份来自贵州，3 份来自福建，2 份来自安徽，4 份来自浙江；亚群 II (黄色) 包含 24 份种质资源，其中 8 份来自安徽，7 份来自江西，9 份来自浙江，该亚群有 12 份抗性马尾松种质掺杂有来自红色部分的基因；亚群 III (红色) 包含了 29 份种质资源，其中 10 份来自安徽 (均为皖马抗良种)，8 份来自江西，11 份来自浙江，共有 12 份抗性马尾松种质掺杂有来自黄色部分的基因；亚群 IV (蓝色) 包含 49 份种质资源，其中 2 份来自福建，21 份来自安徽 (其中 1 份为皖马抗良种)，11 份来自江西，15 份来自浙江 (图 3)。由 Structure 输出的分组结果可知 (表 4)：筛选获得的抗性马尾松种质中有 75.4% 的个体样本隶属不同亚群的比例 (Q) > 0.8，仅有 12.3% 的个体 $Q < 0.6$ ，表明抗性马尾松种质群体结构较强，不同来源的个体被聚在相同的遗传结构中表明不同省间的马尾松存在基因渗入现象。

基于遗传距离矩阵对抗性马尾松材料进行主坐标分析 (PCoA)。由图 4 可知：全部马尾松种质资源可大致分为 3 组，主坐标 1 和 2 分别解释了位点信息数据中 10.45% 和 6.74% 的变异。基于抗性马尾松

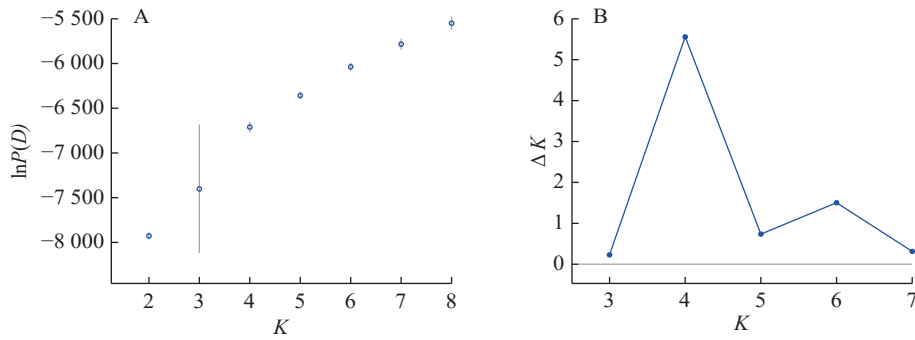


图2 $\ln P(D)$ 和 ΔK 随 K 变化的折线图

Figure 2 Line plots of $\ln P(D)$ and ΔK as a function of K

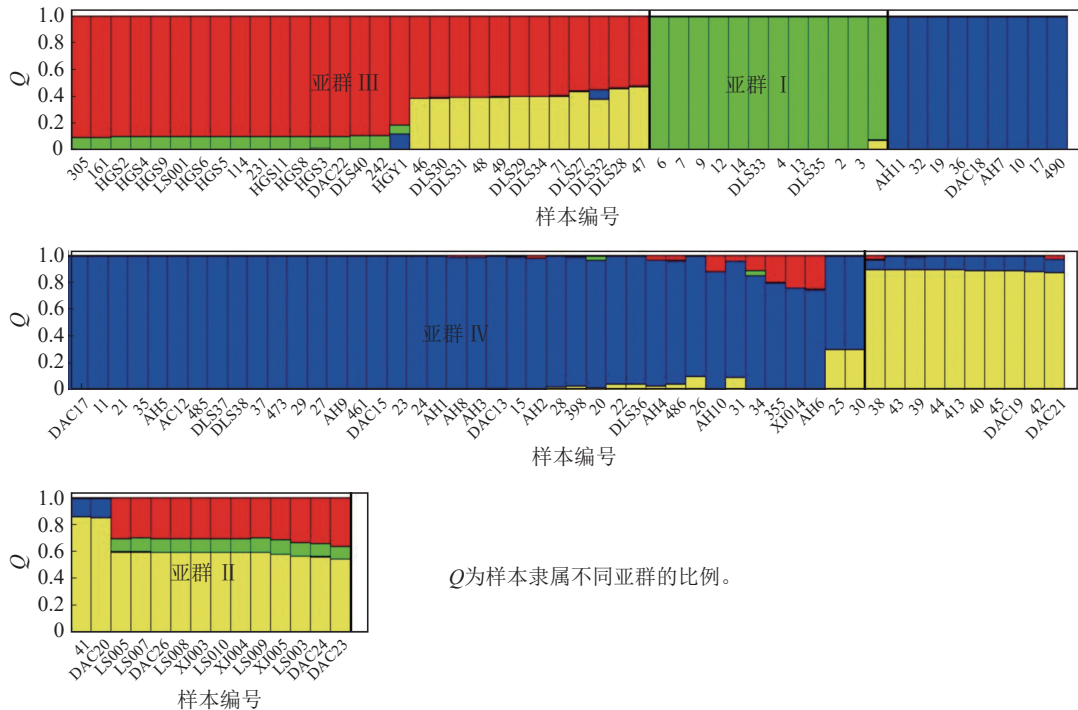


图3 114份抗性马尾松样本的 Structure 聚类图

Figure 3 Structure cluster diagram of 114 samples of resistant *P. massoniana*

114份样本主坐标分析图可知：大部分地理来源一致的抗性马尾松种质分布比较集中，但来自安徽、江西、浙江的部分抗性马尾松种质在3个组中均有分布。结合群体结构分析结果可知：114份抗性马尾松种质资源的分布情况基本符合群体结构分析。

2.3 抗松材线虫病马尾松各亚群间遗传多样性及分子方差分析

由表5可见：抗性马尾松种质各亚群的遗传多样性整体水平较高。亚群IV的等位基因数在4个亚群

表4 各亚群基因型情况

Table 4 Number of genotypes in each cluster

亚群	各亚群种质数量	各亚群基因型数	
		$Q < 0.6$	$Q > 0.8$
I	12	0	12
II	24	9	12
III	29	5	17
IV	49	0	45

说明： Q 为样本隶属不同亚群的比例。

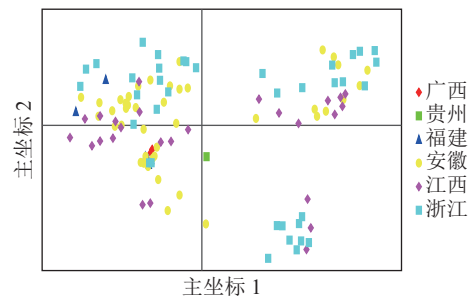


图4 抗性马尾松 114份样本主坐标分析

Figure 4 Principal coordinate analysis of 114 samples

中最大 (13.43)，亚群 I 具有最低的等位基因数 (6.07)。抗性马尾松 4 个亚群所包含的马尾松个体数不同，但亚群间遗传多样性水平差异不明显。亚群 IV 的 N_e 最高，为 7.14，而最低的是亚群 I，为 4.87。亚群 IV 的 H_o 和 H_e 均最高，但与具有最小值的亚群 III 差异不显著，分别高 0.03 和 0.15。

AMOVA 方差分析表明 (表 6)：抗性马尾松遗传变异 14% 存在于亚群间，而亚群内变异为 80%，表明亚群内的遗传变异是抗性马尾松变异的主要来源。4 个亚群间 F_{ST} 为 0.143，表明亚群间存在中等程度遗传分化。

表 5 马尾松各亚群遗传多样性水平

Table 5 Genetic diversity parameters for all populations of resistant *P. massoniana*

亚群	样本量/份	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F
I	12	6.07	4.87	1.64	0.06	0.78	0.93
II	24	9.57	6.48	1.88	0.08	0.78	0.91
III	29	7.50	4.88	1.59	0.03	0.70	0.96
IV	49	13.43	7.14	2.16	0.06	0.85	0.93

说明： N_a 等位基因数； N_e 有效等位基因数； I Shannon's 多样性指数； H_o 观测杂合度； H_e 期望杂合度； F 固定指数。

表 6 基于微卫星数据的遗传变异分析

Table 6 Analysis of molecular variance from microsatellite data using GenALEX

变异来源	自由度	方差总和	平均方差	方差分量	变异百分比/%	P
亚群间	3	184.865	61.622	0.957	14	<0.01
亚群内	110	1216.328	11.058	5.323	80	<0.01
F_{ST}			0.143			

说明： F_{ST} 为遗传分化系数。

2.4 抗松材线虫病马尾松核心种质库构建与评价

利用 M 策略和随机取样策略构建核心种质的遗传多样性指标见表 7。结果显示：基于随机取样策略的 Power Core 和基于 M 策略的 Core Finder 分别筛选得到的核心种质均保留了原有种质 100% 的等位基因数。但 Core Finder 核心种质包含的种质 (72 份) 少于 Power Core (79 份)，且两者间各遗传多样性参数差异不显著 ($P > 0.05$)。综合以上分析表明：选择 M 策略抽取 72 份抗性马尾松种质能够以最小的种质份数最大程度地代表收集区内抗性马尾松种质资源的遗传多样性。利用 M 策略构建的核心种质中包含广西 2 份 (100.0%)、贵州 1 份 (100.0%)、福建 4 份 (66.7%)、安徽 33 份 (其中 4 份为皖马抗良种) (78.6%)、江西 8 份 (30.8%) 和浙江 24 份 (64.8%) 种质材料。

由表 8 可见：构建的 72 份抗性马尾松核心种质占 114 份原有种质的 63.16%，其 N_a 均值、 N_e 均值、 I 均值分别占原有种质相应遗传参数的 100.00%、95.67% 和 94.96%。 t 检验结果表明：列入研究的抗性马尾松种质与入选的核心种质的遗传多样性无显著差异 ($P > 0.05$)，说明本研究基于 M 策略构建的抗性马尾松核心种质能充分代表列入研究的原抗性马尾松种质资源的遗传多样性，剔除了与 114 份原有

表 7 不同策略构建的核心种质遗传多样性指标比较

Table 7 Comparisons of genetic diversity index of core collections constructed by different tactics

构建方法	种质数/份	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F	N_m	P_{IC}
原有种质	114	115	5.54	1.51	0.06	0.64	0.91	0.66	0.90
M策略	72	115	5.30	1.43	0.06	0.63	0.91	0.61	0.92
随机取样策略	79	115	5.53	1.48	0.06	0.64	0.91	0.65	0.92

说明： N_a 等位基因数； N_e 有效等位基因数； H_o 观测杂合度； H_e 期望杂合度； P_{IC} 多态性信息含量； I Shannon's 多样性指数； F_{is} 居群近交系数； F 固定指数； N_m 基因流。* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

表 8 72 份抗性马尾松核心种质与 114 份原有种质遗传多样性对比

Table 8 Comparison of genetic diversity between 72 core germplasm and 114 original germplasm of resistant *P. massoniana*

种质	种质数/份	N_a	N_e	I	H_o	H_e	F	N_m	P_{IC}
原有种质	114	25.29	5.54	1.51	0.06	0.64	0.91	0.66	0.90
核心种质	72	25.29	5.30	1.43	0.06	0.63	0.91	0.61	0.92
保留比例/%	63.16	100.00	95.67	94.96	100.00	98.12	99.57	92.54	100.00
t		0.000	-0.652	-1.428	0.059	-0.826	-0.052	0.014	-0.152
P		1.000	0.525	0.177	0.953	0.424	0.960	0.989	0.882

说明： N_a 等位基因数； N_e 有效等位基因数； H_o 观测杂合度； H_e 期望杂合度； P_{IC} 多态信息含量； I Shannon's 多样性指数； F_{is} 居群近交系数； F 固定指数； N_m 基因流。

种质重复或亲缘关系较近的材料。

PCoA 分析(图 5)显示:抗性马尾松核心种质均匀分布在整体马尾松种质资源中,表明本研究构建的抗性马尾松核心种质具有很好的代表性。UPGMA 进化树(图 6)显示:72 份抗性马尾松可分为 3 个类群,其中类群 I 的 11 份抗性马尾松种质全部位于亚群 I (91.7%),类群 II 的 30 份抗性马尾松种质全部位于亚群 IV (61.2%),类群 III 的抗性马尾松种质 18 份位于亚群 II (75.0%),其余 13 份位于亚群 III (44.8%)。结合结构分析可知:位于亚群 II 中混杂有黄色和红色的核心种质与亚群 III 中的核心种质聚为一个亚类,亚群 II 中以黄色为主的核心种质聚为另一个亚类,但抗性马尾松核心种质的 UPGMA 聚类结果与列入研究的原有种质结构分析和 PCoA 分析结果基本一致,进一步对核心种质进行了确认。

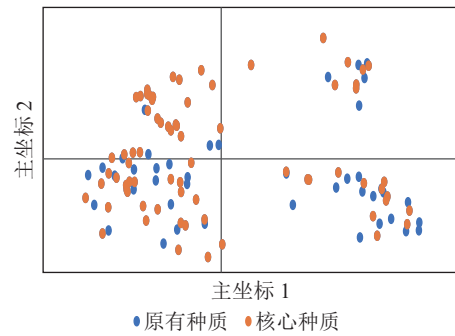


图 5 72 份核心种质与 114 份原有种质主坐标分析

Figure 5 Principal coordinate analysis of 72 core germplasm and 114 original germplasm

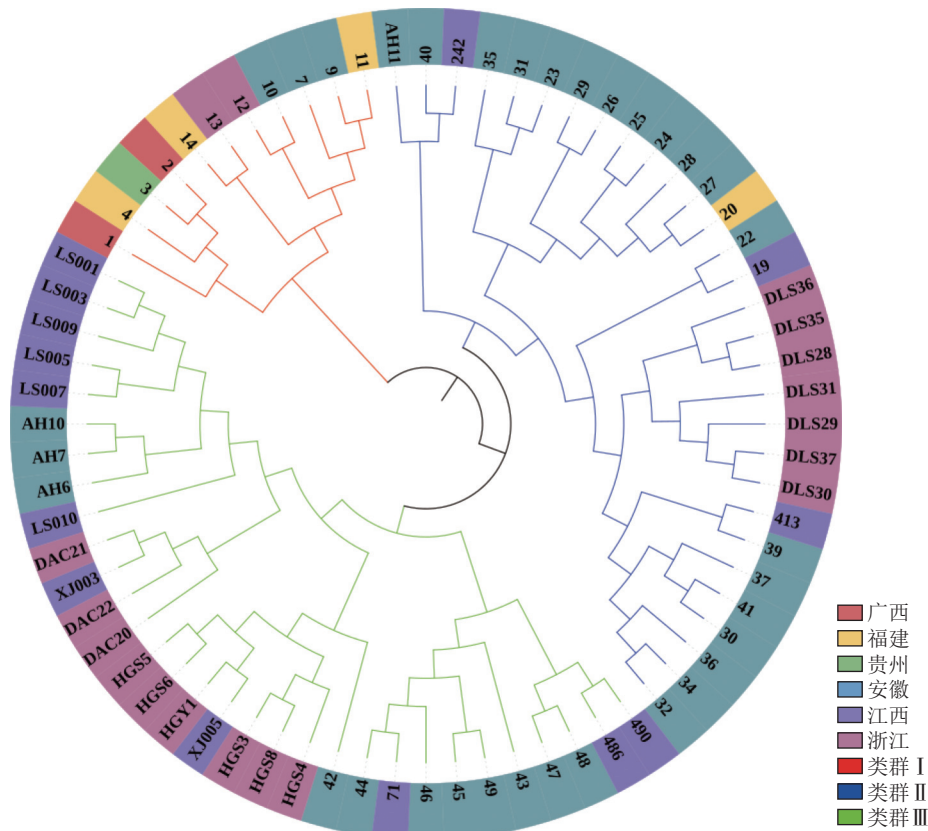


图 6 72 份抗性马尾松核心种质的 UPGMA 聚类图

Figure 6 UPGMA clustering map of 72 samples of resistant *P. massoniana*

3 讨论

3.1 抗松材线虫病马尾松种质资源遗传多样性及群体结构

遗传多样性在生物育种工作中至关重要,是评价生物多样性的重要组成部分,物种的遗传多样性越高或遗传变异越丰富,其对环境变化的适应能力也就越强^[26]。本研究利用 14 对 SSR 引物对经高强度人工接种松材线虫后存活下来的 103 份马尾松种质和安徽省林业科学研究院审定的 11 份高抗良种进行遗传多样性和群体结构分析。 N_a 是衡量 SSR 位点多态性高低的重要指标,其中所有种质的平均 N_a 为 8.17,高于沈敬理等^[27]利用 SSR 分子标记技术对 131 个马尾松无性系的研究 ($N_a=3.67$),可能是本研究

选择的 SSR 引物具有较高多态性和基因分型检测手段不一样造成的。 N_e 、 H_e 、 I 等是评价遗传多样性的重要指标。高景斌等^[28]利用 SCAR 分子标记对抗性马尾松材料进行遗传多样性研究,其 N_e 和 I 分别为 1.51 和 0.46; YANG 等^[19]运用 20 对 SSR 引物分析马尾松二代亲本种质的遗传多样性,其 N_e 为 3.01, I 为 1.26, P_{IC} 为 0.89; 董虹好等^[18]对选自马尾松第 2 代育种群体的 12 份马尾松材料运用 13 对 SSR 引物进行研究,其中 N_a 和 I 分别为 3.17 和 0.47。与上述研究结果相比,本研究所选择的 14 对 SSR 引物能有效用于检测马尾松的遗传多样性 ($N_e=5.54$ 、 $H_e=0.64$ 、 $I=1.51$ 、 $P_{IC}=0.90$),同时表明筛选获得的 103 份抗性马尾松种质和安徽省林业科学研究院审定的 11 份良种具有丰富的遗传多样性,在未来的抗性育种进程中具有很大的遗传增益潜力。

Structure 结构分析、UPGMA 聚类分析和 PCoA 分析被广泛应用于推断植物的群体结构,但三者的统计原理不同。PCoA 分析是一种非约束性的数据降维方法,通过对特征值和特征向量进行排序来寻找主坐标,从而有效地绘制所分析的样本; Structure 结构分析基于贝叶斯模型的计算方法,根据基因型信息对多组样本进行分类; UPGMA 聚类分析利用非加权组平均法对参试样本进行层次聚类。PCoA 和 UPGMA 聚类分析可直观看到材料间的分类关系,但 Structure 结构分析能清晰地反映材料间的遗传背景和基因交流情况^[29-30]。总体而言, Structure 结构分析、UPGMA 聚类分析和 PCoA 分析相辅相成,两两使用有助于全面了解不同样本间的遗传差异。本研究 Structure 结构分析结果表明: 114 份抗性马尾松种质资源被分成 4 个亚群,而 PCoA 分析将所有抗性马尾松种质划分为 3 组,将结构分析所得 4 个亚群中的亚群 II 和亚群 III 合并为一组,可能是因为这 2 个亚群中的部分抗性马尾松种质 $Q < 0.6$, 存在一定频率的基因交流和渗透。在结构分析中,每个亚群内都包含来自不同地区的个体,地理来源一致的抗性马尾松种质并没有完全聚在一起,这可能是由于不同地区育种者之间亲本交换或频繁的人工引种,导致新环境中种质的遗传信息发生了改变。安徽省林业科学研究院审定的 11 份抗松材线虫病良种是中国所有的抗松材线虫病马尾松优良种质,已在安徽省松材线虫病疫区进行了大面积的林相改造和造林,在松材线虫病防控中发挥了重要作用。这 11 份抗松材线虫病良种主要分布在亚群 III 中,仅与 19 份抗性马尾松种质聚为一个亚群,这表明本研究筛选获得的大部分抗性马尾松优良品系与审定的良种遗传关系较远,具有较低的遗传相似性。因此,本研究筛选获得的 103 份抗性马尾松种质与审定的 11 份良种遗传信息同质性程度较低,且具有较高的遗传多样性,可保障今后营造的抗性林在生态系统中具有较强的稳定性。

3.2 抗松材线虫病马尾松核心种质库构建

传统的核心种质构建方法是对比不同种质资源在植物学、形态学等性状上的差异来剔除亲缘关系相近的样本并且抽取核心种质,但表型性状容易受到外界因素影响而表现不稳定^[31]。基于分子标记数据构建核心种质可减少温度、气候、环境等外界因素的影响,能够很好地作为植物形态和生理特性的有效补充。本研究根据 SSR 分子标记基因分型数据,利用 Core Finder 和 Power Core,基于 M 策略和随机取样策略构建抗松材线虫病马尾松核心种质。综合对比分析不同构建策略,得到 72 份抗性马尾松核心种质,其保留了列入研究的原有种质全部的等位基因数,且各遗传多样性参数如 N_e 、 I 、 H_e 、 P_{IC} 分别为 5.30、1.43、0.63、0.92,均与 114 份原有种质的遗传多样性参数无显著差异 ($P > 0.05$)。本研究构建的 72 份抗性马尾松核心种质在广西、贵州、福建、安徽、江西和浙江 6 省中均有分布,但江西抗性马尾松核心种质抽取比例为 30.8%,低于其他省份抗性马尾松种质的入选比例,表明该省抗性马尾松样本存在较高的遗传相似性。结合结构分析可知: 72 份抗性马尾松核心种质全面涵盖了列入研究的抗性马尾松种质的 4 个亚群,亚群 III 抗性马尾松核心种质入选比例最低 (44.8%),表明该亚群抗性马尾松种质遗传信息比较一致;亚群 I 的抗性马尾松核心种质入选比例最高 (91.7%),表明该亚群可能存在最丰富的遗传多样性。

取样比例的大小是核心种质库能否构建成功的重要因素。WANG 等^[32]和 ESCEIBANO 等^[33]认为核心种质取样比例为 5%~40%,大多数为 5%~15%。李魁鹏等^[34]利用 SSR 分子标记从 864 份杉木 *Cunninghamia lanceolata* 中筛选获得了 80 份核心种质,占原有种质的 9.3%;黄小凤等^[35]利用 SNP 分子标记从 221 份荔枝 *Litchi chinensis* 品种 (品系) 中获得了 44 份核心种质,占原有种质的 20%;张馨芳等^[36]基于 SSR 分子标记数据,从 161 份板栗 *Yanshan chestnut* 中构建了含 46 份种质的核心种质,取样

比例为 28.6%。但本研究核心种质取样比例为 63.13%，高于其他木本植物的取样比例。李自超等^[37]认为核心种质取样比例通常由原有种质的数量、群体结构和遗传多样性水平等决定，对于遗传多样性丰富、原有种质数量较小的群体，可适当增大取样比例。

4 结论

利用 14 对 SSR 引物对 114 份抗松材线虫病马尾松种质的遗传多样性分析表明：所选抗性马尾松种质具有丰富的遗传多样性 ($N_a=8.17$, $N_e=5.54$, $H_e=0.64$, $I=1.51$, $P_{IC}=0.90$)，且本研究筛选的 103 份抗性马尾松材料遗传结构简单、遗传变异丰富，可用于开展马尾松重要性状的关联分析研究。根据 SSR 分子标记数据基于 M 策略构建了含有 72 份材料的抗性马尾松核心种质，保留了列入研究的原有种质 100% 的等位基因。经过 t 检验、PCoA 分析和 UPGMA 聚类分析，构建的抗性马尾松核心种质与列入研究的原有种质之间无显著差异，剔除了遗传相近的材料，具有良好的代表性。

5 参考文献

- [1] 叶建仁, 吴小芹. 松材线虫病研究进展[J]. 中国森林病虫, 2022, 41(3): 1-10.
YE Jianren, WU Xiaoqin. Research progress of pine wilt disease [J]. *Forest Pest and Disease*, 2022, 41(3): 1-10.
- [2] 刘彬, 刘青华, 周志春, 等. 马尾松 β -蒎烯合酶基因克隆以及对松材线虫侵染的响应[J]. 林业科学研究, 2020, 33(6): 1-12.
LIU Bin, LIU Qinghua, ZHOU Zhichun, et al. Cloning of β -pinene synthase gene of *Pinus massoniana* and response to infection of pine wood nematode [J]. *Forest Research*, 2020, 33(6): 1-12.
- [3] 刘彬, 刘青华, 周志春, 等. 基于高通量转录组测序筛选马尾松抗松材线虫病相关基因[J]. 林业科学研究, 2019, 32(5): 1-10.
LIU Bing, LIU Qinghua, ZHOU Zhichun, et al. Identification of candidate constitutive expressed resistant genes of pine wilt disease in *Pinus massoniana* based on high-throughput transcriptome sequencing [J]. *Forest Research*, 2019, 32(5): 1-10.
- [4] 徐六一, 章健, 高景斌, 等. 安徽省松材线虫病抗性育种研究进展[J]. 安徽林业科技, 2013, 39(2): 8-10, 14.
XU Liuyi, ZHANG Jian, GAO Jingbin, et al. Research progress on breeding to pinewood nematodiasis in Anhui Province [J]. *Anhui Forestry Science and Technology*, 2013, 39(2): 8-10, 14.
- [5] 高景斌, 席启俊, 孙主义, 等. 松材线虫病抗性马尾松苗木的选育[J]. 林业科技开发, 2009, 23(1): 91-95.
GAO Jingbin, XI Qijun, SUN Zhuyi, et al. Screening and breeding of *Pinus massoniana* seedlings for resistant to pine wood nematode [J]. *Journal of Forestry Engineering*, 2009, 23(1): 91-95.
- [6] 郝焰平, 徐六一, 姜春武, 等. 安徽省适生马尾松优良种源子代抗松材线虫病评价及生长性状研究[J]. 江西农业学报, 2019, 31(3): 41-45.
HAO Yanping, XU Liuyi, JIANG Chunwu, et al. Nematode-resistance evaluation and growth trait study of fine offspring of suitable *Pinus massoniana* provenance in Anhui Province [J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2019, 31(3): 41-45.
- [7] FRANKEL O H, BROWN A H D. Plant genetic resources today: a critical appraisal [M]// HOLDON J H W. *Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation*. London: George Allen and Unwin Press, 1984: 249-257.
- [8] 徐晓美, 李颖, 孙启迪, 等. 辣椒种质材料疫病抗性鉴评及遗传多样性分析[J]. 广东农业科学, 2022, 49(10): 19-28.
XU Xiaomei, LI Ying, SUN Qidi, et al. Resistance evaluation and genetic diversity analysis of *Phytophthora* disease in pepper germplasm materials [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2022, 49(10): 19-28.
- [9] 周延清. 遗传标记的发展[J]. 生物学通报, 2000, 35(5): 17-18.
ZHOU Yanqing. Development of genetic markers [J]. *Bulletin of Biology*, 2000, 35(5): 17-18.
- [10] 杨海平, 李继生, 于国强, 等. 分子标记技术在林木育种中的应用[J]. 山东林业科技, 2017, 47(3): 111-114.
YANG Haiping, LI Jisheng, YU Guoqiang, et al. Application of molecular marker technology in forest tree breeding [J]. *Shandong Forestry Science and Technology*, 2017, 47(3): 111-114.
- [11] 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 Hanbo, ZHANG Rui, WANG Bangshun, et al. Construction of core collection of *Schima superba* based on SSR molecular markers [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2017, 53(6): 37-46.

- [12] 陈存, 丁昌俊, 张静, 等. 美洲黑杨群体结构分析及核心种质库构建[J]. 林业科学, 2020, **56**(9): 67 – 76.
CHEN Cun, DING Changjun, ZHANG Jing, *et al.* Population structure analysis and core collection construction of *Populus deltoides* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2020, **56**(9): 67 – 76.
- [13] 陈明堃, 陈璐, 孙维红, 等. 建兰种质资源遗传多样性分析及核心种质构建[J]. 园艺学报, 2022, **49**(1): 175 – 186.
CHEN Mingkun, CHEN Lu, SUN Weihong, *et al.* Genetic diversity analysis and core collection of *Cymbidium ensifolium* germplasm resources [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2022, **49**(1): 175 – 186.
- [14] RAJPUT S G, SANTRA D K. Evaluation of genetic diversity of Proso millet germplasm available in the United States using simple sequence repeat markers [J]. *Crop Science*, 2016, **56**(5): 2401 – 2409.
- [15] LÜ Jiabin, LI Changrong, ZHOU Changpin, *et al.* Genetic diversity analysis of a breeding population of *Eucalyptus cloeziana* F. Muell. (Myrtaceae) and extraction of a core germplasm collection using microsatellite markers [J/OL]. *Industrial Crops and Products*, 2020, **145**: 112157[2023-05-26]. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112157.
- [16] 唐玉娟, 罗世杏, 黄国弟, 等. 基于SSR荧光标记的杧果种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建[J/OL]. 热带作物学报, 2023-01-17[2023-05-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.s.20221122.1956.004.html>.
TANG Yujuan, LUO Shixing, HUANG Guodi, *et al.* Genetic diversity analysis and molecular ID construction of mango germplasm based on SSR fluorescence marker [J/OL]. *Chinese Journal of Tropical Crops*: 2023-01-17[2023-05-26]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1019.s.20221122.1956.004.html>.
- [17] HU Guangming, JIANG Quan, WANG Zhi, *et al.* Genetic diversity analysis and core collection construction of the *Actinidia chinensis* complex (Kiwi fruit) based on SSR Markers [J/OL]. *Agronomy*, 2022, **12**(12): 3078[2023-05-26]. doi: 10.3390/agronomy12123078.
- [18] 董虹妤, 刘青华, 周志春, 等. 马尾松子代生长杂种优势与亲本配合力、遗传距离的相关性[J]. 林业科学, 2017, **53**(2): 65 – 75.
DONG Hongyu, LIU Qinghua, ZHOU Zhichun, *et al.* Correlation between heterosis in the growth of progeny and combining ability and genetic distance of the parents for *Pinus massoniana* [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2017, **53**(2): 65 – 75.
- [19] YANG Hanbo, LIU Qinghua, ZHANG Rui, *et al.* Genetic diversity of second generation-parental germplasm of masson pine revealed by SSR markers and establishment of a core germplasm collection [J]. *Scandinavian Journal of Forest Research*, 2021, **36**(7/8): 524 – 531.
- [20] ROD P, PETER E S. GenAIEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research an update [J]. *Bioinformatics*, 2012, **28**(19): 2537 – 2539.
- [21] KIALINOWSK S, TAPER M L, MARSHALL T C. Revising how the computer program cervus accommodates genotyping error increases success in paternity assignment: CERVUS LIKELIHOOD MODEL [J]. *Molecular Ecology*, 2007, **16**(5): 1099 – 1106.
- [22] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, **155**(2): 945 – 959.
- [23] KIM K W, CHUNG H K, CHO G T, *et al.* PowerCore: a program applying the advanced M strategy with a heuristic search for establishing core sets [J]. *Bioinformatics*, 2007, **23**(16): 2155 – 2162.
- [24] CIPRIANI G, SPADOTTO A, JURMAN L, *et al.* The SSR-based molecular profile of 1005 grapevine (*Vitis vinifera* L.) accessions uncovers new synonymy and parentages, and reveals a large admixture amongst varieties of different geographic origin [J]. *TAG Theoretical and Applied Genetics*, 2010, **121**(8): 1569 – 1585.
- [25] LIU K, MUSE S V. PowerMarker: integrated analysis environment for genetic marker data [J]. *Bioinformatics*, 2005, **21**(9): 2128 – 2129.
- [26] 杨梅, 张敏, 师守国, 等. 武当木兰种群遗传结构的ISSR分析[J]. 林业科学, 2014, **50**(1): 76 – 81.
YANG Mei, ZHANG Min, SHI Shouguo, *et al.* Analysis of genetic structure of *Magonlia sprengeri* populations based on ISSR marker [J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, **50**(1): 76 – 81.
- [27] 沈敬理, 白天道, 陈亚斌, 等. 马尾松无性系种子园亲本指纹图谱构建[J]. 分子植物育种, 2015, **13**(3): 646 – 652.
SHEN Jingli, BAI Tiandao, CHEN Yabin, *et al.* The fingerprints construction of clonal in *Pinus massoniana* seed orchard [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2015, **13**(3): 646 – 652.
- [28] 高景斌, 徐六一, 叶建仁. 马尾松松材线虫病抗性无性系的筛选和遗传多样性分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学

- 版), 2021, **45**(5): 109 – 118.
- GAO Jingbin, XU Liuyi, YE Jianren. Growth and genetic diversity analysis of clones screened by phenotypical resistance to pine wilt disease in *Pinus massoniana* [J]. *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 2021, **45**(5): 109 – 118.
- [29] 谢立峰, 李宁, 李焯, 等. 茄子种质遗传多样性及群体结构的SRAP分析[J]. 植物学报, 2019, **54**(1): 58 – 63.
- XIE Lifeng, LI Ning, LI Ye, *et al.* Genetic diversity and population structure of eggplant (*Solanum melongena*) germplasm resources based on SRAP method [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2019, **54**(1): 58 – 63.
- [30] 魏利斌, 苗红梅, 李春, 等. 芝麻SNP和InDel标记遗传多样性、群体结构及连锁不平衡分析[J]. 分子植物育种, 2017, **15**(8): 3070 – 3079.
- WEI Libin, MIAO Hongmei, LI Chun, *et al.* Genetic diversity, population structure and linkage disequilibrium analysis of Sesame using SNP and InDel markers [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, **15**(8): 3070 – 3079.
- [31] 方乐成, 夏慧敏, 麻文俊, 等. 基于SSR标记的楸树遗传多样性及核心种质构建[J]. 东北林业大学学报, 2017, **45**(8): 1 – 5.
- FANG Lecheng, XIA Huimin, MA Wenjun, *et al.* Genetic diversity analysis and primary core collection of *Catalpa bungei* germplasm with SSR markers [J]. *Journal of Northeast Forestry University*, 2017, **45**(8): 1 – 5.
- [32] WANG J C, HU J, XU H M, *et al.* A strategy on constructing core collections by least distance stepwise sampling [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, **115**(1): 1 – 8.
- [33] ESCRIBANO P, VIRUEL M A, HORMAZA J I. Comparison of different methods to construct a core germplasm collection in woody perennial species with simple sequence repeat markers. a case study in cherimoya (*Annona cherimola*, Annonaceae), an underutilised subtropical fruit tree species [J]. *Annals of Applied Biology*, 2008, **153**(1): 25 – 32.
- [34] 李魁鹏, 陈仕昌, 程琳, 等. 基于SSR标记构建广西杉木核心种质[J]. 广西科学, 2021, **28**(5): 511 – 519.
- LI Kuipeng, CHEN Shichang, CHENG Lin, *et al.* Construction of core germplasm of *Cunninghamia lanceolata* in Guangxi based on SSR marker [J]. *Guangxi Sciences*, 2021, **28**(5): 511 – 519.
- [35] 黄小凤, 韦阳连, 袁叶, 等. 基于SNP分子标记的221份荔枝品种(品系)的遗传多样性分析及核心种质库构建[J]. 植物资源与环境学报, 2022, **31**(4): 74 – 84.
- HUANG Xiaofeng, WEI Yanglian, YUAN Ye, *et al.* Genetic diversity analysis and core collection construction of 221 cultivars (strains) of *Litchi chinensis* based on SNP molecular markers [J]. *Journal of Plant Resources and Environment*, 2022, **31**(4): 74 – 84.
- [36] 张馨方, 张树航, 李颖, 等. 基于SSR标记构建燕山板栗核心种质[J]. 华北农学报, 2021, **36**(增刊1): 31 – 38.
- ZHANG Xinfang, ZHANG Shuhang, LI Ying, *et al.* Construction of core collection of Yanshan chestnut germplasm based on SSR marker [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2021, **36**(suppl 1): 31 – 38.
- [37] 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 等. 云南地方稻种资源核心种质取样方案研究[J]. 中国农业科学, 2000, **33**(5): 1 – 7.
- LI Zichao, ZHANG Hongliang, ZENG Yawen, *et al.* Study on sampling schemes of core collection of local varieties of rice in Yunnan, China [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, **33**(5): 1 – 7.