果 树 学 报 2026,43(8):2035-2051
Journal of Fruit Science

DOI:10.13925/j.cnki.gsxb.20250469

桑树InDel分子标记体系优化及遗传多样性分析

李佳奇[1],沈子靖[1],史建国[1*],王富刚[1],李泽坤[1],杨东升[2],常志颖[1],马尔萌[1]

([1]榆林学院现代农学院,陕西榆林 719000;[2]河套学院农学系,内蒙古巴彦淖尔 015000)

摘 要:【目的】开发桑树特异性分子标记,系统解析桑树种质资源的遗传多样性,为种质鉴定、亲缘关系分析和核心种质筛选提供依据,进而服务于桑树育种材料的高效利用与种质创新。**【方法】**以46份桑树种质为供试材料,基于桑树基因组重测序数据筛选设计Indel(insertion-deletion)引物,通过单因素和正交试验优化InDel-PCR反应体系,并进行遗传多样性分析。**【结果】**InDel-PCR最佳反应体系为:Buffer(含Mg^{2+})2.0 μL,2.5 mmol·L^{-1} dNTP 0.4 μL,上、下游引物(10 μmol·$μL^{-1}$)各0.8 μL,*Taq* DNA聚合酶(5 U·$μL^{-1}$)0.25 μL,DNA(50 ng·$μL^{-1}$)1 μL,ddH_2O 14.75 μL。扩增程序为95 ℃预变性3 min,94 ℃变性30 s、58 ℃退火60 s、72 ℃延伸60 s,30个循环,72 ℃延伸10 min,4 ℃保存。基于优化的InDel分子标记体系,对42份桑树种质开展遗传多样性检测及UPGMA(Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean)聚类分析。供试种质间遗传分化显著,群体呈中等偏上遗传多样性水平;平均遗传距离为0.372 9,期望杂合度(*H*)平均值达0.350 7,香农信息指数(*I*)均值为0.533 8。**【结论】**桑树材料分为六大类,揭示了桑树种质间复杂的关系。研究结果可为桑树分子标记数据库的完善、种质资源的鉴定和分子辅助选育提供了科学依据。

关键词:桑树;InDel标记;遗传多样性;种质资源

中图分类号:S663.2 **文献标志码:**A **文章编号:**1009-9980(2026)08-2035-17

Optimization of InDel molecular marker system and analysis of genetic diversity in mulberry

Li Jiaqi[1], Shen Zijing[1], Shi Jianguo[1*], Wang Fugang[1], Li Zekun[1], Yang Dongsheng[2], Chang Zhiying[1], Ma Ermeng[1]

([1]College of Advanced Agricultural Sciences, Yulin University, Yulin 719000, Shaanxi, China; [2]Department of Agricultural Science, Hetao University, Bayannur 015000, Inner Mongolia, China)

Abstract:【Objective**】** By developing species-specific molecular markers for mulberry, we systematically dissected the genetic diversity of mulberry germplasm resources. This approach would provide a solid foundation for accurate germplasm identification, analysis of genetic relationships, and selection of core germplasm collections. Ultimately, it facilitates the efficient utilization of breeding materials, supports germplasm innovation, and thus accelerates the development of elite mulberry varieties. **【**Methods**】** In this study, 46 mulberry germplasm resources were used as test materials, and Indel primers were designed and screened based on mulberry genome resequencing data. The InDel-PCR reaction system was optimized *via* single-factor and orthogonal experiments to ensure the accuracy of PCR results. Subsequently, genetic diversity analysis was conducted on the test materials using the optimized system and the selected primers. The experimental procedure involved collecting 46 representative mulberry germplasm resources, extracting genomic DNA, and performing genome resequencing. Indel primers were designed from resequencing data. Single-factor experiments were conducted to explore the optimal concentration ranges of PCR components: (Buffer with Mg^{2+}, dNTPs, primers, *Taq* DNA

收稿日期:2025-09-18 **接受日期:**2026-01-15

基金项目:陕西省教育厅重点科研计划项目(23JS069);陕西省重点研发计划一般项目(2024JC-YBQN0224);陕西省科技创新团队项目(2025RS-CXTD-038);陕西林业科技创新重点专项(SXLK2023-02-36);榆林市科技计划项目(2024-CXY-131);榆林学院博士科研启动基金项目(2023GK11)

作者简介:李佳奇,女,讲师,研究方向为中草药及饲用作物遗传育种。E-mail:1097243283@qq.com

***通信作者** Author for correspondence. E-mail:378279015@qq.com

polymerase, template, and ddH_2O. Orthogonal experiments were then performed to determine the optimal combination of these components. Finally, the optimized reaction system and polymorphic primers were used to amplify the genomic DNA of 46 mulberry germplasm resources, which enabled genetic diversity analysis based on the amplification results.【Results】The final optimal InDel-PCR reaction system was determined to consist of 2.0 μL of Buffer (containing Mg^{2+}), 0.4 μL of dNTPs, 0.8 μL each of upstream and downstream primers (10 μmol·$μL^{-1}$), 0.25 μL of *Taq* DNA polymerase, 1 μL of DNA (50 ng·$μL^{-1}$), and 14.75 μL of ddH_2O. The amplification program was set as follows: initial pre-denaturation at 95 ℃ for 3 min, followed by 30 cycles of denaturation at 94 ℃ for 30 s, annealing at 58 ℃ for 60 s, and extension at 72 ℃ for 60 s, with a final extension at 72 ℃ for 10 min, and the reaction product was stored at 4 ℃. This reaction system and amplification protocol demonstrated good stability and repeatability, ensuring the smooth conduct of subsequent experiments. From the 42 pairs of designed primers, 17 pairs with polymorphism and clear bands were screened out. These screened primers could effectively distinguish different mulberry germplasm resources and provide reliable tools for genetic diversity analysis. Using these 17 pairs of primers, a total of 37 polymorphic loci were detected. For each locus, the observed number of alleles (*Na*) was 2.0, the effective number of alleles (*Ne*) averaged 1.524, and Shannon's information index (*I*) ranged from 0.112 5 to 0.692 0, with an average of 0.470 1. Nei's genetic diversity (*h*) ranged between 0.023 7 and 0.499 7, with an average of 0.374 1, and the average observed heterozygosity (*Ho*) and expected heterozygosity (*He*) were 0 and 0.308 8, respectively. These data indicated that the tested mulberry germplasm resources exhibited rich genetic diversity, providing a solid genetic foundation for germplasm innovation and variety improvement.【Conclusion】Using the optimized InDel-PCR reaction system for *Morus* (mulberry trees) and the UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean) cluster analysis, the tested mulberry materials were classified into six major groups. The results revealed the complex geographic genetic relationships among different mulberry germplasm resources. These research findings can provide a scientific basis for improving the mulberry molecular marker database, identifying mulberry germplasm resources, and conducting molecular-assisted breeding for mulberry.

Key words: Mulberry; InDel marker; Genetic diversity; Germplasm resources

桑树(*Morus alba* L.)为桑科桑属多年生落叶乔木或灌木,在中国已有三千多年的栽培历史,其不仅是蚕桑产业的核心资源,也是兼具药食同源的特色经济果树,还是干旱地区植被恢复的先锋树种,具有极高的经济、生态和社会价值[1-2]。然而,桑树种质资源分类体系混乱,核心种质利用率较低,传统育种周期长且效率低下,致使桑树品种的选育工作进展缓慢,产业发展受到严重制约。因此,开发桑树高效分子标记、优化标记体系并进行种质资源遗传多样性分析,对加速桑树品种改良、促进产业可持续发展具有重要的理论和实践意义。

目前,国家桑树种质资源圃(镇江)保存3000多份种质,为遗传多样性研究提供了重要的物质基础。值得注意的是,早期研究受限于形态学、同工酶和核型分析等方法,难以解析桑属植物的系统发育关系。随着分子标记技术的发展,桑树种质分类研究已取得阶段性成果。赵卫国[3]首次采用RAPD(Random amplified polymorphic DNA)技术对44份桑材料进行分析,揭示了鲁桑(*Morus multicaulis* Perr.)、广东桑(*Morus atropurpurea* Roxb.)与白桑(*Morus alba* L.)变种的近缘关系及山桑(*Morus bombycis* Koidz.)的分化特征。林强等[4]利用SRAP标记(Sequence-related amplified polymorphism)技术进一步细化了桑种质的分类精度,将32份广东桑划分为三个具有显著表型差异的类群(遗传相似系数0.826 4~1.000 0)。陈仁芳等[5]利用ISSR标记(Inter-simple sequence repeat marker)技术实现了供试桑树材料地理种群的精准划分,将89份材料按地域聚集成四大类群,明确了多地区资源的聚类特征。陈加利[6]利用SSR标记(Simple sequence repeat)证实在海

南种质中桑树存在高多态性（多态位点87.18%）。孙秀秀等[7]利用SRAP标记揭示34份果桑种质具有明确的地域聚类特征，按遗传聚类将其划分为五个地理组群。尽管上述研究构建了桑树亲缘关系和遗传距离的基本框架，但所用标记多为基于电泳的分子标记（如RAPD、SSR）与基于PCR（Polymerase chain reaction）的显性标记（如ISSR、SRAP），存在显著的技术局限。与传统标记相比，基于全基因组重测序开发的InDel（Insertion-deletion）标记优势显著，具体体现在三个方面：一是多态性覆盖，RAPD、ISSR标记分布不均，SRAP标记缺失非编码区覆盖，SSR标记因依赖微卫星序列存在基因组分布盲区，而InDel标记在全基因组均匀分布，覆盖编码区与非编码区，可全面捕捉基因组水平遗传变异[7]；二是检测效率，RAPD、ISSR引物筛选量大且重复性差，SRAP、SSR单反应检测位点少、批量分析效率低，而InDel标记可基于重测序数据批量开发位点并实现高通量分型[8]；三是杂合子区分，RAPD、ISSR、SRAP均为显性标记，无法区分杂合子与纯合子，导致遗传参数量化不准确，SSR与InDel虽均为共显性标记，但InDel标记通过片段长度差异分型更直观精准[6]。上述技术优势使InDel标记弥补了传统标记的不足，成为突破桑树遗传多样性研究技术瓶颈的有效解决方案。

随着高通量测序技术的发展，第三代分子标记的大规模应用成为可能，特别是基于基因组结构变异检测的InDel标记展现出独特的研究价值[8-9]。InDel兼具多态性高、检测成本低和实验重复性好等优势[9]。目前，InDel标记已广泛用于植物的标记开发、遗传分析和品种选育等方面，如玉米（*Zea mays*）[10]、油菜（*Brassica napus*）[11]、苦荞（*Fagopyrum tataricum*）[12]等作物，以及杨梅（*Morella rubra*）[13]、千年桐（*Aleurites montana*）[14]、杨树（*Populus*）[15]等木本植物，但在桑树中尚未见相关研究报道。桑树遗传多样性研究对精准、高效分子标记的需求日益迫切，进一步凸显了构建桑树InDel标记开发体系的必要性与创新性。因此，亟须构建高效的标记开发体系以推动桑树的遗传学研究。

本研究以46份桑树种质资源为供试材料，利用Illumina HiSeq平台对29份适合陕北栽种的桑种质进行全基因组重测序，基于测序数据设计InDel引物，通过单因素和正交试验优化InDel-PCR反应体系，并对供试材料进行遗传多样性分析，旨在为桑树分子标记数据库的完善、种质资源的鉴定和分子辅助选育提供科学依据。

1　材料和方法

1.1　试验材料

供试材料为46份桑树种质（表1），包含36份栽培品种和10份野生资源，地理来源广泛，囊括中国南北各桑树主产区典型材料，如华南地区广西桂桑优62、桂桑优12等高产叶用桑[16]，东北地区黑龙江万宝红1号、万宝红10号等耐寒果桑，西北地区陕西红果3号、秦饲1号等果叶兼用型桑树特色种质，以及华东地区浙江强桑1号、浙杂1号等主推叶用桑。供试材料在全国及区域范围内具有良好代表性，为后续分子标记开发及性状关联分析提供了可靠的种质基础。所有供试桑树种质均种植于陕西省榆林市林科所桑树种质资源区，基于生长表现，从中筛选29份适合陕北地区栽种的优良桑种质，送北京百迈客公司进行全基因组重测序。基于重测序数据，选取遗传背景差异显著的4份代表性种质（寒杂3号、荆桑、黑珍珠、红果1号）进行InDel多态性引物开发与验证，并对其余42份种质开展InDel标记遗传多样性分析。所有试验材料均采用统一标准进行田间管理，确保生长环境的一致性。

1.2　DNA提取及电泳检测

取供试桑树材料幼嫩且无病虫害的叶片0.2 g，液氮冷冻后充分研磨成细粉状，利用植物基因组试剂盒（型号：DP305-02）（北京TIANGEN公司）提取DNA。通过3%琼脂糖凝胶电泳（110 V，25 min）及超微量分光光度计（NanoDrop ND-2000）对DNA的纯度与浓度进行检测，并计算OD_{260}/OD_{280}与OD_{260}/OD_{230}比值，筛选出合格DNA样品。将部分合格的基因组DNA用于文库构建及测序分析，剩余DNA样本稀释至50 ng·μL^{-1}，分装后于−80 ℃超低温保存，用于后续InDel多态性引物开发及遗传多样性分析。

1.3　InDel引物设计及合成

基于29份桑树种质的基因组重测序数据（PRJNA1304463），筛选符合以下条件的InDel位点：（1）插入或缺失长度大于30 bp；（2）位于CDS编码区（Coding sequence）的变异位点；（3）至少在两份测序种质间存在差异。从每条染色体（共14条染色体）的CDS区中随机挑选3个InDel位点，利用Samtools

表1　46份桑树种质资源

Table 1　46 mulberry germplasm resources

序号 No.	种/品种 Species/Variety	重测序 Resequencing	类型 Type	产地 Place of origin	序号 No.	种/品种 Species/Variety	重测序 Resequencing	类型 Type	产地 Place of origin
1	新一之瀨 Shin Ichinose	是 Yes	栽培品种 Cultivar	日本 Japan	24	万宝红1号 Wanbaohong No. 1	否 No	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China
2	白果桑 Baiguo mulberry	否 No	野生种 Wild	中国辽宁 Liaoning, China	25	策沙1号 Cesha No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国新疆 Xinjiang, China
3	米脂老桑树 Mizhi mulberry	否 No	野生种 Wild	中国陕西 Shaanxi, China	26	耐旱桑1号 Naihansang No. 1	否 No	野生种 Wild	中国陕西 Shaanxi, China
4	辽鲁1号 Liaolu No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国山东 Shandong, China	27	沙丘 Shaqiu	是 Yes	野生种 Wild	中国陕西 Shaanxi, China
5	桑甜1号 Sangtian No. 1	否 No	栽培品种 Cultivar	中国辽宁 Liaoning, China	28	秋雨桑 Autumn mulberry	是 Yes	栽培品种 Cultivar	朝鲜 Democratic People's Republic of Korea
6	丰驰1号 Fengchi No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国江苏 Jiangsu, China	29	万宝红12号 Wanbaohong No. 12	否 No	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China
7	育71-1 Yu71-1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国江苏 Jiangsu, China	30	万宝红10号 Wanbaohong No. 10	否 No	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China
8	白桑 White mulberry	否 No	栽培品种 Cultivar	中国吉林 Jilin, China	31	寒果2号 Hanguo No. 2	否 No	栽培品种 Cultivar	中国陕西 Shaanxi, China
9	桂桑优12 Guisangyou 12	否 No	栽培品种 Cultivar	中国广西 Guangxi, China	32	湖桑 Husang	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国浙江 Zhejiang, China
10	桂桑优62 Guisangyou 62	否 No	栽培品种 Cultivar	中国广西 Guangxi, China	33	台湾长果 Taiwan long mulberry	否 No	栽培品种 Cultivar	中国台湾 Taiwan, China
11	农桑14号 Nongsang No. 14	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国浙江 Zhejiang, China	34	丰驰2号 Fengchi No. 2	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国江苏 Jiangsu, China
12	依兰桑 Yilan mulberry	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China	35	蜜果1号 Miguo No. 1	否 No	野生种 Wild	中国陕西 Shaanxi, China
13	雄桑 Xiongsang	是 Yes	野生种 Wild	中国新疆 Xinjiang，China	36	红果3号 Hongguo No. 3	否 No	栽培品种 Cultivar	中国陕西 Shaanxi, China
14	选792 Xuan 792	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国山东 Shandong, China	37	浙杂1号 Zheza No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国浙江 Zhejiang, China
15	吴堡桑 Wubaosang	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国陕西 Shaanxi, China	38	鲁杂1号 Luza No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国山东 Shandong, China
16	雅津桑 Yajin mulberry	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国四川 Sichuan, China	39	秦饲1号 Qinsi No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国陕西 Shaanxi, China
17	柽椤桑 Poluosang	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国河北 Hebei, China	40	农户家 Nonghujia	是 Yes	野生种 Wild	中国陕西 Shaanxi, China
18	镜泊湖桑 Jingbohu mulberry	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China	41	白玉果桑 Baiyuguo mulberry	否 No	野生种 Wild	中国河北 Hebei, China
19	甜桑 Sweet mulberry	否 No	栽培品种 Cultivar	中国四川 Sichuan, China	42	冀桑3号 Jisang No. 3	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国河北 Hebei, China
20	强桑1号 Qiangsang No. 1	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国浙江 Zhejiang, China	43	寒杂3号 Hanza No. 3	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China
21	朱钰1号 Zhuyu No. 1	否 No	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China	44	荆桑 Jingsang	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国湖北 Hubei, China
22	太阳岛桑 Taiyangdao mulberry	是 Yes	栽培品种 Cultivar	中国黑龙江 Heilongjiang, China	45	黑珍珠 Heizhenzhu	否 No	栽培品种 Cultivar	中国河北 Hebei, China
23	三道河泽 Sandaoheze	是 Yes	野生种 Wild	中国陕西 Shaanxi, China	46	红果1号 Hongguo No. 1	否 No	栽培品种 Cultivar	中国陕西 Shaanxi, China

软件从白桑（*M alba* L.）参考基因中提取InDel位点上下游200 bp的DNA序列。使用Primer 5软件设计InDel引物，参数设置如下：（1）具有高特异性（通过Primer-BLAST工具比对桑树参考基因组序列，确保引物仅与目标位点特异性结合）、有功能注释（基于NCBI GenBank进行注释，明确引物对应基因的生物学功能），GC含量在40%~60%之间，退火温度在47~60 ℃之间；（2）InDel的PCR产物长度在100~400 bp之间；（3）上游和下游引物长度均为18~23 bp。引物命名规则为“所在染色体的编号+序号”（如chr1-1F/R）。委托生工生物工程（上海）股份有限公司合成引物，将引物管13 000 r·min^{-1}离心30 s，按照说明书加入ddH_2O溶解为10 μmol·L^{-1}的工作浓度，并置于−20 ℃备用。

1.4　InDel-PCR体系优化的试验设计

采用白果桑的基因组DNA作为模板，选用引物设计保守性较强且扩增稳定的Chr13-4引物进行InDel-PCR体系优化。

1.4.1　InDel反应体系单因素试验设计　采用单因素控制法对InDel-PCR扩增体系关键组分进行系统优化。试验选取dNTP（2.5 mmol·L^{-1}）、Buffer（含Mg^{2+}）、引物、模板DNA及*Taq* DNA聚合酶（5U）5个核心参数作为优化变量，每个因素设置8个梯度水平。当对某一单因素展开研究时，其余组分均维持基础体系浓度以保证单因素分析的准确性（表2）。本研究中InDel基础反应体系总体积为20 μL：2.5 mmol·L^{-1} dNTP 0.25 μL，Buffer 2.25 μL，上、下游引物（10 μmol·μL^{-1}）各0.8 μL，DNA（50 ng·μL^{-1}），*Taq* DNA聚合酶（5 U·μL^{-1}）0.25 μL，剩余部分用ddH_2O补齐。上述试剂均购自全式金生物技术（北京）有限公司。

表2　InDel反应体系单因素试验设计

Table 2　Single-factor experimental design for InDel reaction system

水平 Level	dNTP用量 Amount of dNTP/μL	正反向引物用量 Amount of primer/μL	DNA用量 Amount of DNA/μL	*Taq* DNA聚合酶用量 Amount of *Taq* DNA polymerase/μL	Buffer用量 Amount of buffer/μL
1	0.35	0.8	0.6	0.10	1.00
2	0.40	1.2	0.8	0.15	1.25
3	0.45	1.6	1.0	0.20	1.50
4	0.50	2.0	1.2	0.25	1.75
5	0.55	2.4	1.4	0.30	2.00
6	0.60	2.8	1.6	0.35	2.25
7	0.65	3.2	1.8	0.40	2.50
8	0.70	3.6	2.0	0.45	2.75

1.4.2　InDel反应体系正交试验设计　为确定InDel反应的最佳体系，本研究在单因素梯度试验确定引物、Buffer、dNTP、酶及模板DNA 5个核心因素有效扩增区间的基础上，设计开展$L_{16}(4_5)$正交试验；4个水平依据单因素试验结果，在各因素可稳定扩增出清晰条带的有效区间内选取，且呈均匀梯度分布（表3、表4）。每个组合设置3次重复。通过琼脂糖凝胶电泳条带的清晰度、数量以及杂带情况进行评分定级。具体评分标准为：条带亮度按3个等级计分（明亮清晰无背景干扰计4~6分、条带亮度中等或暗淡可辨识计1~3分、无可见条带计0分），特异性按3个等级计分（仅目标条带或目标条带为主、伴些许弱杂带计7~10分，目标条带模糊杂带明显或弥散拖尾计2~6分，无目标条带仅存杂带计1分），综合计算条带亮度得分与特异性得分。评分体系按分数划分为

表3　正交体系的因素及水平

Table 3　Factors and levels of orthogonal system

水平 Level	dNTP用量 Amount of dNTP/μL	正反向引物用量 Amount of primer/μL	DNA用量 Amount of DNA/μL	*Taq* DNA聚合酶用量 Amount of *Taq* DNA polymerase/μL	Buffer用量 Amount of buffer/μL
1	0.35	1.6	1.0	0.20	1.50
2	0.40	2.0	1.2	0.25	1.75
3	0.45	2.4	1.4	0.30	2.00
4	0.50	2.8	1.6	0.35	2.25

表4 InDel反应的正交试验设计

Table 4 Orthogonal experimental design of InDel reaction

水平 Level	dNTP用量 Amount of dNTP/μL	正反向引物用量 Amount of primer/μL	DNA用量 Amount of DNA/μL	*Taq* DNA聚合酶用量 Amount of *Taq* DNA polymerase/μL	Buffer用量 Amount of buffer/μL
1	0.35	1.6	1.0	0.20	1.50
2	0.40	1.6	1.2	0.25	1.75
3	0.45	1.6	1.4	0.30	2.00
4	0.50	1.6	1.6	0.35	2.25
5	0.40	2.0	1.6	0.30	1.50
6	0.35	2.0	1.8	0.35	1.75
7	0.50	2.0	1.2	0.20	2.00
8	0.45	2.0	1.0	0.25	2.25
9	0.45	2.4	1.2	0.35	1.50
10	0.50	2.4	1.0	0.30	1.75
11	0.35	2.4	1.6	0.25	2.00
12	0.40	2.4	1.4	0.20	2.25
13	0.50	2.8	1.4	0.25	1.50
14	0.45	2.8	1.6	0.20	1.75
15	0.40	2.8	1.0	0.35	2.00
16	0.35	2.8	1.2	0.30	2.25

16个等级，其中，条带明亮单一且无杂带的组合评为最高分（16分），而条带模糊或出现弥散拖尾的组合则评为最低分（1分）。选取最优结果作为InDel-PCR最佳反应体系。

1.5 InDel-PCR优化体系的验证

为验证优化后的InDel标记反应体系的稳定性，选取具有地域代表性和不同生态型的4份桑树种质资源（寒杂3号、荆桑、黑珍珠、红果1号）的基因组DNA为模板，采用前述优化的PCR反应体系，对42对InDel引物进行扩增验证。

1.6 InDel-PCR扩增及引物筛选

本试验采用InDel-PCR扩增程序：95 ℃预变性3 min；94 ℃变性30 s，58 ℃退火60 s，72 ℃延伸60 s，30个循环；72 ℃延伸10 min，4 ℃冰箱保存。PCR扩增产物用3%的琼脂糖凝胶进行电泳检测。

选用开发出的42对InDel引物（表5），以寒杂3号、荆桑、黑珍珠、红果1号的基因组DNA为扩增模板，基于优化后的反应体系进行InDel多态性引物筛选。通过系统评估扩增条带的清晰度、特异性、稳定性和多态性表现，筛选出符合要求的多态性引物，随后对剩余42份材料的DNA进行扩增，分析桑种质的遗传多样性。

1.7 InDel多态性位点统计及分析处理

胶板上InDel等位基因多态性位点的统计采用0/1赋值法，有条带计“1”，无条带计“0”，经Excel软件生成“0”“1”二元数据矩阵。利用PopGen32软件计算多态性引物的Nei's多样性（*H*）。利用GenAlEx 6.51软件计算观测等位基因数（*Na*）、有效等位基因数（*Ne*）、Shannon信息指数（*I*）、观测杂合度（*Ho*）和期望杂合度（*He*）。利用NTSYS-pc 2.10e软件通过UPGMA算法进行聚类分析、构建聚类图，并计算供试材料间的遗传相似性系数。

2 结果与分析

2.1 DNA纯度和浓度检测

46份桑树种质的基因组DNA的电泳检测结果显示，多数条带清晰明亮，无蛋白质、RNA污染，除41号外均未出现拖尾现象。DNA浓度（ρ，后同）范围为57.6~112.7 ng·μL^{-1}，平均值为82.3 ng·μL^{-1}，OD_{260}/OD_{280}变幅在1.58~1.98之间，表明DNA的质量和浓度均满足本试验要求（图1）。

2.2 桑树InDel反应体系单因素试验结果

2.2.1 dNTP对扩增体系的影响 本试验通过dNTP梯度浓度体系验证发现：当用量设置为0.35~0.4 μL时扩增条带清晰稳定，而超过0.4 μL则会导致电泳条带弥散或无扩增条带现象，综合因素考虑0.4 μL为最佳dNTP用量（图2-A）。

2.2.2 Buffer（Mg^{2+}）对扩增体系的影响 当Buffer用量处于1.5~2.75 μL范围内，可获得清晰的扩增条带；其中2.0 μL为Buffer（Mg^{2+}）的最佳用量，可避免

表 5　InDel 引物的碱基序列及多态性情况

Table 5　Base sequences and polymorphism of InDel primers

引物 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增条带数 Number of amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands
Chr1-4	F:TAATGAGGGTAAGGTTGCGG	4	4
	R:CTTAAGATCTGAGTGGCGGC		
Chr1-5	F:GGACTTCTTCTTCCTCCGCT	0	0
	R:TCCCTCGGTCAAGACCATAC		
Chr1-6	F:TCGAAATCCAATACGGGAAC	2	2
	R:GCATTGATGGAGTCGGTTTT		
Chr2-4	F:TTCTCCTCCAAAACAATCGG	2	2
	R:ATCCTTTCTTTGCTTCGCCT		
Chr2-5	F:ATCGAGCAGTTCATGTGTGG	1	1
	R:GAGCCGTTATAAGCGACGAG		
Chr2-7	F:CCCGTAAAATTCCTTTTGGA	0	0
	R:ATGTTGTTGGTGCTGCAGAG		
Chr3-5	F:CTTCTCATTGTCGGTGCTGA	2	2
	R:ATCAAATCCCACTTTCACCG		
Chr3-6	F:AGAAACGAATCCATCAACCG	1	1
	R:GGCGAGGAACATAGCAACAT		
Chr3-7	F:ATTCATCCGTTGCATGTGAA	1	1
	R:TTCTTGTCTTTGCATCTGCG		
Chr4-5	F:AATTGCTGTTGACGAAACCC	4	4
	R:ACTCTGGTGCAGATTCCCTG		
Chr4-6	F:ACGAGTAGGCCAAAGGGATT	2	2
	R:CGATGTCGCCACTAGTTTCA		
Chr4-7	F:CCTCTCCCAATCCAAACAAA	2	2
	R:GGCATAGCATGGTCCACTTT		
Chr5-4	F:TCGATGTTGGTGATCGTTGT	3	3
	R:GAGTTGAGATGTGGACGCAA		
Chr5-5	F:GAGATTTCCTTCCCTTCGCT	1	1
	R:TGCAGATCCTCTCAGTGGTG		
Chr5-6	F:TTCTTCTGCATCCAACATCG	2	2
	R:GATCACGGGGTTGAGGAATA		
Chr6-4	F:GGAATCTGAGAACGGGCATA	2	2
	R:AACGTCTTCCGTGAAACCAG		
Chr6-5	F:GGTGGATTCGAAGAAGTGGA	1	0
	R:CTTCGAAGCCGAAACTTGAG		
Chr6-6	F:CCTTGCTTTTTCTTGGCTTG	1	0
	R:TCATCACCAGTTCCATCGTC		
Chr7-5	F:TCCCTTTTTGGAAATGGATG	1	0
	R:ACGTTTCACAGGATCCGTTC		
Chr7-6	F:TTCACAATGGAGGACATGGA	1	0
	R:GGAAGTAGCGCAGAACTTGG		
Chr7-7	F:TCATGTTCAAACGGAATGGA	1	0
	R:CTGAGGATGAAGCACGTCAA		
Chr8-4	F:AGGAGCGATGAAGGACAAGA	1	0
	R:AAAGGTTGTTCCCGGAGATT		
Chr8-6	F:TGGGGATTCATTCATCTGGT	1	0
	R:TCCTCGTTCAACCAATGTGA		

表5 （续） Table 5 (Continued)

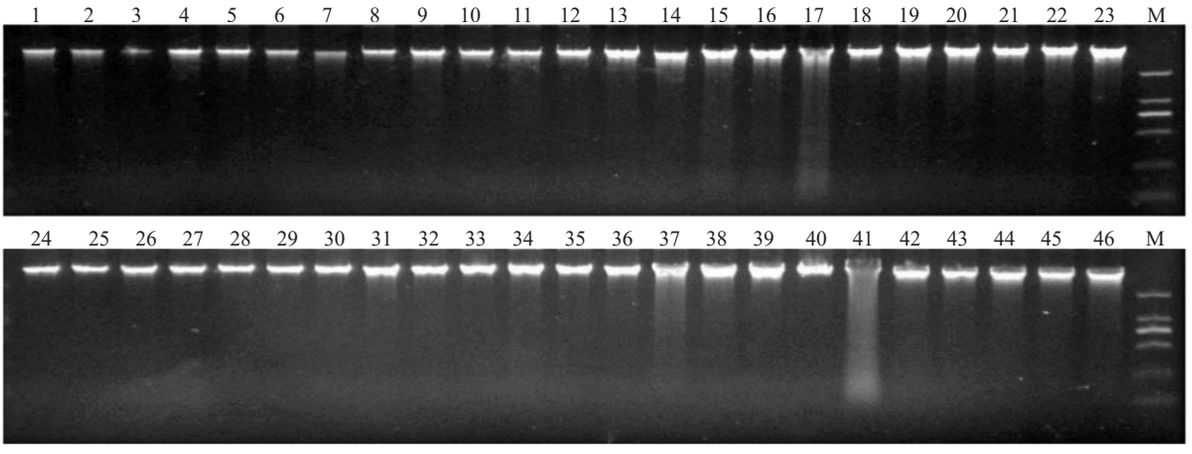
引物 Primer name	引物序列 Primer sequence	扩增条带数 Number of amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands
Chr8-7	F:GCAGTGAATTGGTAGGAGGC	1	0
	R:AACATTTCTACCCGCTGCAT		
Chr9-5	F:GGAGAATTTGAATACGGCGA	1	0
	R:TTTTGCCATATTCTCCGACC		
Chr9-6	F:ACTTGAAAGCAAGGAAGCCA	1	0
	R:GATAATCCGGCCAAGTGAGA		
Chr9-7	F:CTTTCTCCTTCAAATCGCGT	1	1
	R:TGAGGTTAGCATGCCAAAGA		
Chr10-4	F:GTTCTATGTGGCCAGGCATT	2	2
	R:CAAGGGGAGGTTCCACTGTA		
Chr10-6	F:TTGTCAGCCAGCCTCTTTTT	1	0
	R:CAGCGGCATTAGATGTGAGA		
Chr10-7	F:TTGTTGCGCTTTTTCTCAAA	1	0
	R:TTGCCAAGAGATGAGGAAAGA		
Chr11-4	F:CACAGCTCATGTTGGGATTG	1	0
	R:GTTGCGACTGAGATCAAGCA		
Chr11-6	F:GGTAGAGGTGGAGGAGGAGG	4	4
	R:CACCAGACCCATACCCAGAC		
Chr11-7	F:GTTTTGGCAATCGGAGAAGA	0	0
	R:AGAGCCAACCAAAAAGCAAA		
Chr12-4	F:CCAGTCCAGGTTCAGGTCAT	1	0
	R:CGTGGAACCGATGGAGTAGT		
Chr12-5	F:TTGTTCAAAAGCCCCACTTC	2	2
	R:CTCAAGATGCTACGGCGACT		
Chr12-7	F:ACTTTTGTGCTGGGATTTGG	1	0
	R:TCCGAGTTCCGATGAGAGTT		
Chr13-4	F:GAAAAGCCCTCCCCTCTCTA	1	0
	R:TTGGGACATTCTTTGGAACC		
Chr13-5	F:TTGTGGCTTAATGGGAGCTT	1	0
	R:CACAAACAACTCACCGCAAT		
Chr13-7	F:AGCGTACATAATTGGCCAGG	1	0
	R:TTCGCTTTCGCTTTTTCAAT		
Chr14-4	F:CCTCTACTCCAGCCTTCGG	1	0
	R:AATGGAGTGGAGAGCAAGGA		
Chr14-5	F:AGCAAGCGAAGCACTAGGAG	1	0
	R:TCTGATCACTGCAACAAGCC		
Chr14-7	F:GCCACGAACGGTCTTGTAAT	1	0
	R:CACAACCGTCAATCAACCTG		

高浓度Buffer导致的非特异性扩增和酶活性抑制等问题[17-18]（图2-B）。

2.2.3 引物对扩增体系的影响 如图2-C所示，当引物用量处于0.8~2.0 μL时，均有扩增条带，综合考虑以1.6 μL为最佳引物用量。

2.2.4 DNA对扩增体系的影响 在InDel-PCR扩增体系优化中，模板DNA用量对扩增效果具有显著影响。如图2-D所示，当DNA用量为1.0、1.4和1.6 μL时，扩增条带均明亮，而当DNA用量低于1.0 μL时，则出现条带不明显和拖尾弥散的现象。综合考虑确定1.0 μL为最佳模板DNA用量，该用量既有效节约样品，又能减少因DNA过量导致的非特异性扩增等问题。

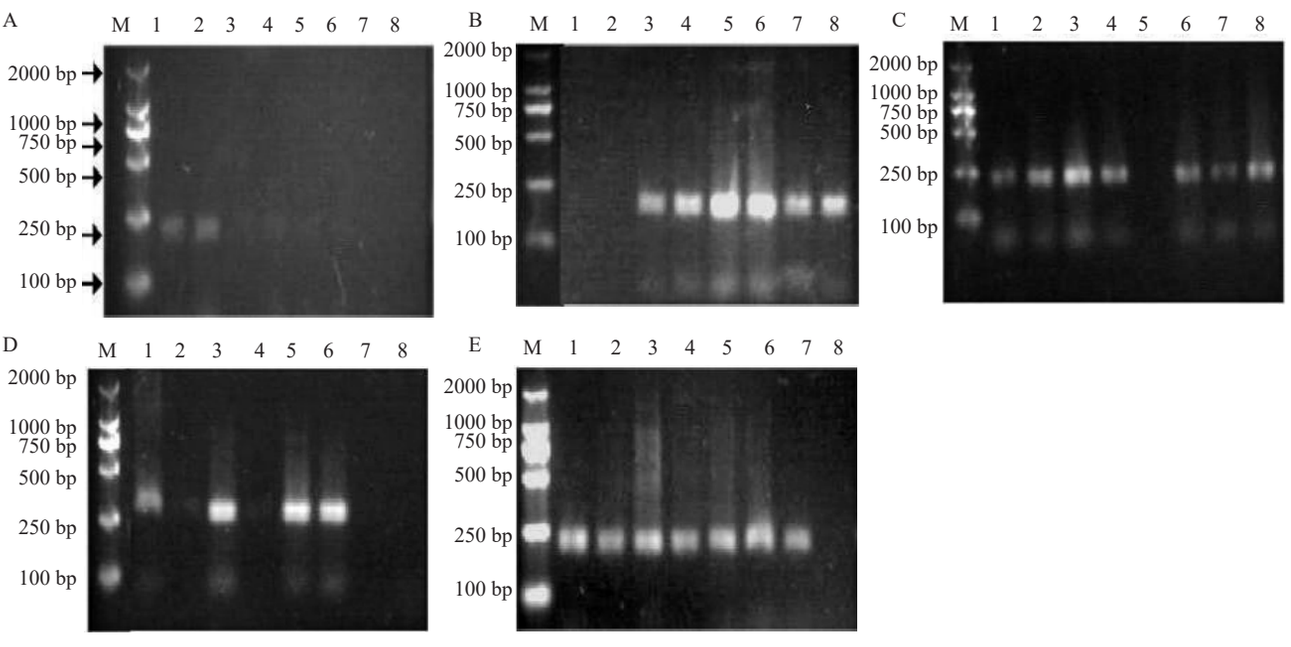
2.2.5 *Taq* DNA聚合酶对扩增体系的影响 在In-



M. 2000 bp DNA marker.

图 1　46 份桑树种质的基因组 DNA 电泳

Fig. 1　Electrophoretogram of genomic DNA from 46 mulberry germplasms



M. 2000 bp DNA marker；A. dNTP 用量（泳道 1~8 分别对应表 2 中水平 1~8：0.35、0.40、0.45、0.50、0.55、0.60、0.65、0.70 μL）；B. Buffer（Mg^{2+}）用量（泳道 1~8 分别对应表 2 中水平 1~8：1.00、1.25、1.50、1.75、2.00、2.25、2.50、2.75 μL）；C. 引物用量（泳道 1~8 分别对应表 2 中水平 1~8：0.8、1.2、1.6、2.0、2.4、2.8、3.2、3.6 μL）；D. DNA 用量（泳道 1~8 分别对应表 2 中水平 1~8：0.6、0.8、1.0、1.2、1.4、1.6、1.8、2.0 μL）；E. *Taq* DNA 聚合酶用量（泳道 1~8 分别对应表 2 中水平 1~8：0.10、0.15、0.20、0.25、0.30、0.35、0.40、0.45 μL）。

M. 2000 bp DNA marker; A. dNTP amount (Lanes 1-8 correspond to levels 1-8 in Table 2: 0.35, 0.40, 0.45, 0.50, 0.55, 0.60, 0.65, 0.70 μL respectively); B. Buffer (Mg^{2+}) amount (Lanes 1-8 correspond to levels 1-8 in Table 2: 1.00, 1.25, 1.50, 1.75, 2.00, 2.25, 2.50, 2.75 μL respectively); C. Primer amount (Lanes 1-8 correspond to levels 1-8 in Table 2: 0.8, 1.2, 1.6, 2.0, 2.4, 2.8, 3.2, 3.6 μL respectively); D. DNA amount (Lanes 1-8 correspond to levels 1-8 in Table 2: 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8, 2.0 μL respectively); E. *Taq* DNA polymerase amount (Lanes 1-8 correspond to levels 1-8 in Table 2: 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30, 0.35, 0.40, 0.45 μL respectively).

图 2　桑树单因素不同浓度处理下的 InDel-PCR 产物凝胶电泳结果

Fig. 2　Gel electrophoresis results of InDel-PCR products under different concentration treatments of single factors in mulberry

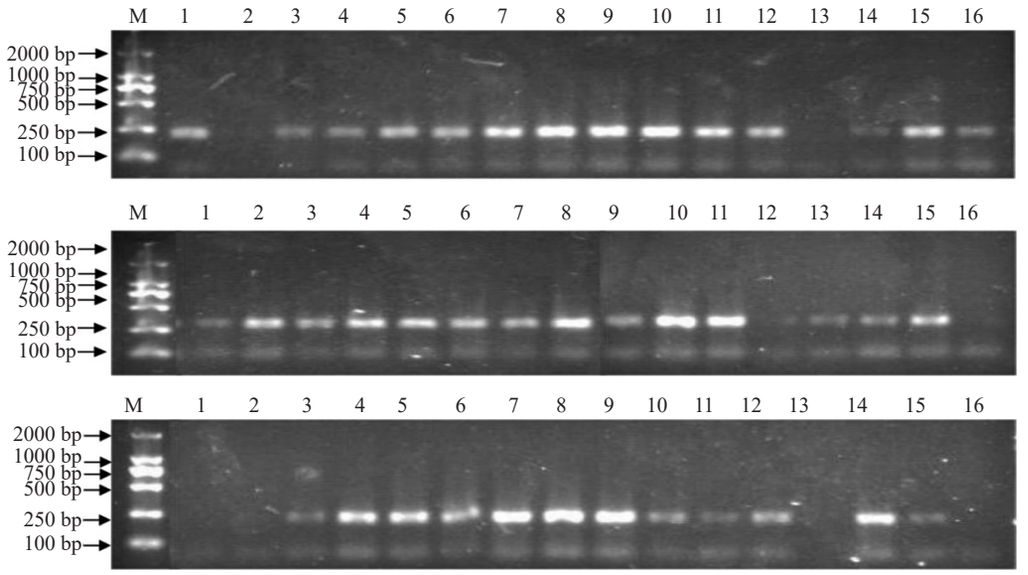
Del-PCR扩增体系优化中，*Taq* DNA聚合酶浓度是影响扩增特异性和效率的关键参数。在 *Taq* DNA聚合酶用量为0.2~0.35 μL时，电泳条带数目逐渐增多且相对清晰；当用量高于0.4 μL时，则出现背景混

杂、条带模糊等非特异性扩增现象。最终确定最佳*Taq* DNA聚合酶用量为0.25 μL（图2-E）。

综上，单因素试验获得的桑树InDel-PCR最优体系为：2.5 mmol·L^{-1} dNTP用量0.4 μL，Buffer用量2.0 μL，引物用量1.6 μL，模板DNA用量1.0 μL，*Taq* DNA聚合酶（5 U·μL^{-1}）用量0.25 μL。

2.3 桑树InDel反应体系正交试验设计的扩增结果

如图3所示，组合7、8、9的电泳条带清晰、丰富，扩增效果较好；组合1、3、4、5、6、10、11、14、15、16有部分条带缺失或有杂带产生，且背景较模糊；组合2、12、13的条带数目相对较少，扩增效果差。依据正交试验的3次重复扩增结果进行直观打分（表6），



M. 2000 bp DNA marker. A、B、C 为 InDel 正交试验设计的扩增结果（3 次重复）。

M. 2000 bp DNA marker. A, B and C are three repetitions of the amplification results of the InDel orthogonal experimental design.

图3 桑树InDel正交试验16个处理的扩增结果

Fig. 3 Amplification results of 16 treatments in mulberry InDel orthogonal experiment

表6 InDel反应的正交试验评分

Table 6 Scoring of orthogonal experiments for InDel reaction

水平 Level	评分1 Score 1	评分2 Score 2	评分3 Score 3	综合排名 Overall rankings
1	7	3	1	14
2	1	9	4	13
3	4	7	5	12
4	5	12	12	7
5	9	11	11	5
6	8	10	10	8
7	13	6	16	2
8	16	16	15	1
9	14	2	14	6
10	15	13	6	3
11	12	14	7	4
12	10	2	9	10
13	2	5	2	16
14	3	4	13	11
15	11	8	8	9
16	6	1	3	15

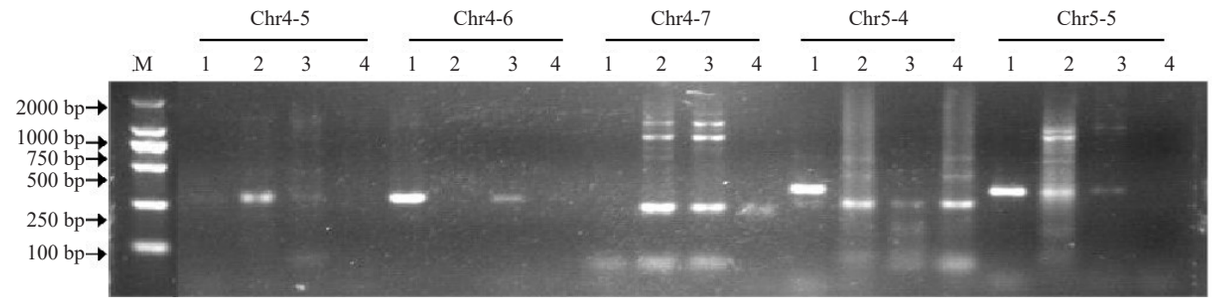
最终确定组合8为最佳反应体系，即5因素的用量分别为Buffer（含Mg^{2+}）2.0 μL，2.5 mmol·L^{-1} dNTP 0.4 μL，上、下游引物（10 μmol·μL^{-1}）各0.8 μL，Taq DNA聚合酶（5 U·μL^{-1}）0.25 μL，DNA（50 ng·μL^{-1}）1 μL，ddH_2O 14.75 μL。

2.4 桑树InDel优化体系的验证

基于前期优化的桑树InDel-PCR最佳扩增体系，利用4份桑树种质的基因组DNA进行体系验证。结果表明，42对InDel引物在该体系下均能稳定扩增，条带稳定清晰且多态性丰富（图4），证明该扩增体系具有高度的重复性和可靠性，可广泛应用于桑树基因组DNA的InDel标记分析。

2.5 桑树InDel多态性及居群遗传分化

以4份桑材料的DNA为模板，对42对引物进行PCR扩增，从中筛选出22对条带清晰的引物，有17对引物多态性高、条带清晰且重复性好。共扩增出



M. 2000 bp DNA Marker; 1. 寒杂 3 号，2. 荆桑，3. 黑珍珠，4. 红果 1 号；Chr4-5、Chr4-6、Chr4-7、Chr5-4 和 Chr5-5 代表不同 InDel 引物。

M. 2000 bp DNA Marker; 1. Hanza No. 3, 2. Jingsang, 3. Heizhenzhu, 4. Hongguo No. 1; Chr4-5, Chr4-6, Chr4-7, Chr5-4 and Chr5-5 represent different InDel primers.

图 4　部分引物对 InDel-PCR 最佳体系的验证

Fig. 4　Verification of the optimal InDel-PCR system by partial primer pairs

42 个位点，其中多态性位点为 37 个，平均每对引物产生 1.91 个多态性位点，多态性位点百分率为 88.10%，表明桑树遗传多样性丰富。17 对引物的观测等位基因数（*Na*）均为 2，有效等位基因数（*Ne*）范围为 1.048 8~2.000 0，平均为 1.524 1；Nei 多样性指数（*H*）在 0.023 7~0.499 7 之间，平均 0.374 1，其中 10 号条带的 *H* 值最高为 0.499 7；Shannon 信息指数（*I*）为 0.112 5~0.692 0，平均为 0.470 1。观察杂合度与期望杂合度也是群体遗传多样性的重要指标[19]。本研究观测杂合度（*Ho*）和期望杂合度（*He*）的平均值分别为 0 和 0.308 8，表明开发的 InDel 分子标记多态性良好，可以用于桑树遗传多样性分析（表 7）。

2.6　桑树种质的遗传距离和聚类分析

各供试材料的遗传距离变幅为 0.114 4~1.213 0，平均遗传距离为 0.372 9，表明材料间存在一定的遗传差异。新一之赖、丰驰 2 号、秦饲 1 号和辽鲁 1 号以及万宝红 12 号和万宝红 10 号间的 GD (Genetic Distance)值最小，为 0.114 4，表明遗传相似性较高。秋雨桑和依兰桑之间的遗传距离最大，其 GD 值为 1.213 0，表明存在显著分化。

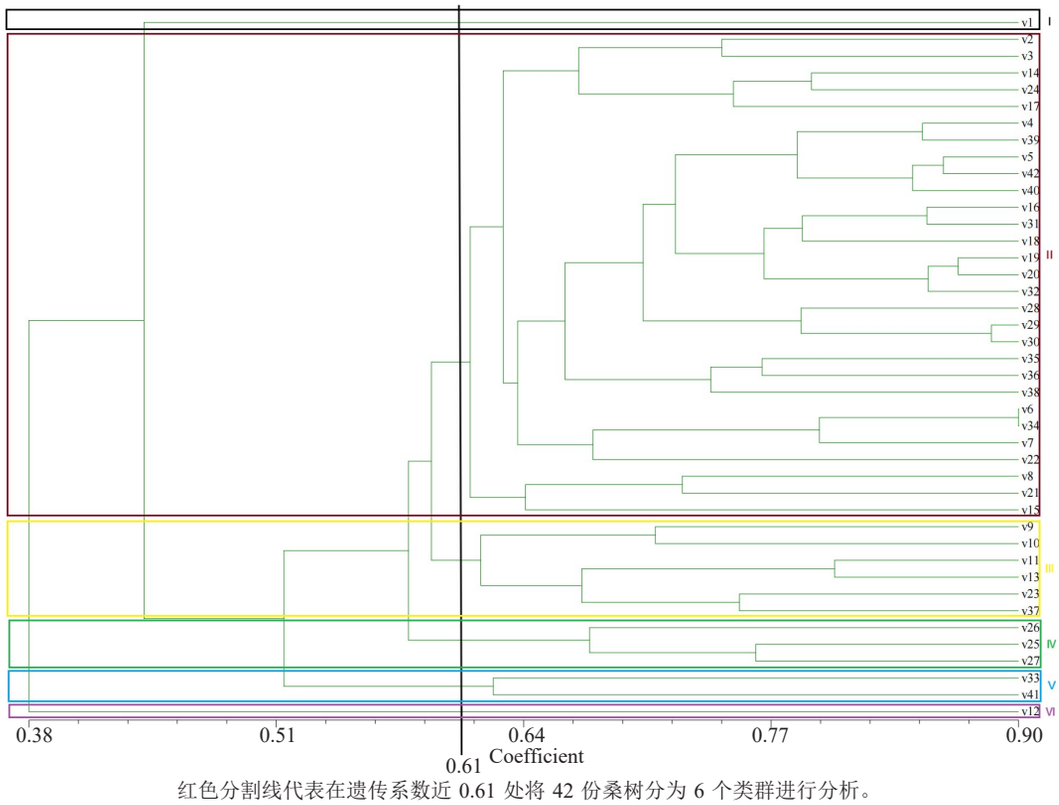
基于 17 对引物扩增的 37 条多态性条带构建 0/1 矩阵，通过 NTSYS 软件进行 UPGMA 聚类分析（图 5），42 份桑树种质遗传相关系数范围为 0.38~0.90，聚类分析的相关系数 $r = 0.696\ 40$，表明聚类结果可靠。42 份桑树种质整体 *H* 值变化范围为 0.271 1~0.473 5，平均值为 0.350 7；*I* 值变化范围为 0.415 3~0.666 4，平均值为 0.533 8；*Na* 均为 2；*Ne* 范围为 1.331 6~1.899 3，平均值为 1.551 0，证实供试种质整体具有中等偏上的遗传多样性水平（表 8）。在遗传系数近 0.61 处可将 42 份桑树分为六个类群。第一类群为从日本引进的种质新一之濑，独立聚类，其 *H* 值 0.271 1、*I* 值 0.442 5、*Ne* 值 1.372 0，为遗传丰富度最低的类群。因其单一引种来源，缺乏本地化自然杂交交流，导致遗传背景趋于纯合。第二类群包含 29 份桑种质（如白果、米脂老桑树、辽鲁 1 号等），地理来源覆盖东北、华东、华北、西部地区及朝鲜，是样品来源最广泛的类群，其遗传丰富度最高（平均 *H*=0.356 7、平均 *I*=0.540 6、平均 *Ne*=1.566 3），其中镜泊湖桑（*H*=0.473 5，*I*=0.666 4，*Ne*=1.899 3）和柽椤桑（*H*=0.450 3，*I*=0.642 6，*Ne*=1.819 3）的遗传多样性尤为突出，这一特征与地理跨度大、生态环境异质性高密切相关。因源于同一育种体系，丰驰 1 号与丰驰 2 号（相似系数 0.90）、万宝红 10 号与万宝红 12 号（相似系数 0.89）遗传关系最近。第三类群涵盖桂桑优 12、农桑 14 号等种质，地理来源涉及桂、黑、新、浙、陕等省份，均具高产、高蛋白、抗逆特性，平均 *H* 值 0.346 6、*I* 值 0.529 4、*Ne* 值 1.540 3，遗传丰富度居中。此特征与定向选育密切相关，其中桂桑优 12 的遗传多样性最优，与其融合华南、华东种质的复杂亲本背景直接相关。第四类群包含策沙 1 号（新疆）、沙丘（陕北）、耐旱桑 1 号（陕北），均具耐旱、防风固沙特性，其平均 *H* 值 0.318 7、*I* 值 0.498 0、*Ne* 值 1.473 3，遗传丰富度较低。推测可能是因为干旱环境的定向选择导致遗传背景相对单一，且该类群多为地方野生种，缺乏外源基因引入，进一步限制了遗传多样性提升。第五类群为白玉果桑、台湾长果两类专用果桑，平均 *H* 值 0.333 2、*I* 值 0.515 4、*Ne* 值 1.501 1，遗传丰富度中等偏低。推测可能是因为台湾与大陆果桑

表7 37个多态性条带的遗传多样性分析

Table 7 Genetic diversity analysis of 37 polymorphic bands

序号 No.	条带数 Stripe number/bp	观测等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	观测杂合度 Observed Heterozy-gosity	期望杂合度 Expected heterozy-gosity	香农信息指数 Shannon's information index	Nei's基因多样性指数 Nei's gene diversity index
1	1~4 250	2.000 0	1.995 5	0	0.498 9	0.692 0	0.427 8
2	1~4 350	2.000 0	1.152 9	0	0.132 7	0.257 3	0.070 1
3	1~4 470	2.000 0	1.152 9	0	0.132 7	0.257 3	0.070 1
4	1~41 000	2.000 0	1.208 2	0	0.172 3	0.314 5	0.092 9
5	1~6 255	2.000 0	1.800 0	0	0.444 4	0.636 5	0.488 0
6	2~450	2.000 0	1.099 8	0	0.090 7	0.191 4	0.047 0
7	2~4 260	2.000 0	1.099 8	0	0.090 7	0.191 4	0.047 0
8	2~5 265	2.000 0	1.930 0	0	0.481 9	0.674 9	0.462 9
9	3~7 270	2.000 0	1.265 4	0	0.209 8	0.365 0	0.452 0
10	6~4 255	2.000 0	1.569 4	0	0.362 8	0.548 9	0.499 7
11	6~4 260	2.000 0	1.630 3	0	0.386 6	0.575 0	0.242 1
12	12~5 265	2.000 0	1.152 9	0	0.132 7	0.257 3	0.391 7
13	12~51 000	2.000 0	1.048 8	0	0.046 5	0.112 5	0.023 7
14	10~4 240	2.000 0	1.849 1	0	0.459 2	0.651 8	0.317 9
15	10~4 255	2.000 0	1.630 3	0	0.386 6	0.575 0	0.242 1
16	4~695	2.000 0	1.099 8	0	0.090 7	0.191 4	0.047 0
17	4~6 250	2.000 0	1.384 6	0	0.277 8	0.450 6	0.483 2
18	4~790	2.000 0	1.445 9	0	0.308 4	0.486 9	0.180 4
19	4~7 240	2.000 0	1.800 0	0	0.444 4	0.636 5	0.299 7
20	5~4 105	2.000 0	1.507 7	0	0.336 7	0.519 6	0.201 4
21	5~4 250	2.000 0	1.800 0	0	0.444 4	0.6365	0.299 7
22	5~4 285	2.000 0	1.208 2	0	0.172 3	0.314 5	0.092 9
23	5~5 260	2.000 0	1.982 0	0	0.495 5	0.688 6	0.440 4
24	5~6 200	2.000 0	1.995 5	0	0.498 9	0.692 0	0.427 8
25	5~6 450	2.000 0	1.995 5	0	0.498 9	0.692 0	0.427 8
26	9~7 250	2.000 0	1.507 7	0	0.336 7	0.519 6	0.497 2
27	1~6 260	2.000 0	1.849 1	0	0.459 2	0.651 8	0.480 9
28	4~5 245	2.000 0	1.982 0	0	0.495 5	0.688 6	0.384 8
29	4~5 750	2.000 0	1.048 8	0	0.046 5	0.112 5	0.023 7
30	4~51 000	2.000 0	1.099 8	0	0.090 7	0.191 4	0.047 0
31	4~51 500	2.000 0	1.630 3	0	0.386 6	0.575 0	0.242 1
32	3~5 250	2.000 0	2.000 0	0	0.500 0	0.693 1	0.414 2
33	3~5 270	2.000 0	1.930 0	0	0.481 9	0.674 9	0.462 9
34	11~6 125	2.000 0	1.800 0	0	0.444 4	0.636 5	0.488 0
35	11~6 250	2.000 0	1.208 2	0	0.172 3	0.314 5	0.426 7
36	11~6 750	2.000 0	1.324 3	0	0.244 9	0.410 1	0.470 2
37	11~61 500	2.000 0	1.208 2	0	0.172 3	0.314 5	0.092 9
均值 Mean		2.000 0	1.524 1	0	0.308 8	0.470 1	0.292 1

种质交流有限，品种改良多依赖本地资源，缺乏跨地域杂交重组，遗传多样性低于兼用型桑树种质。第六类为黑龙江引进种质依兰桑（*H*=0.389 3，*I*=0.578 0，*Ne*=1.637 6），依兰桑与来自黑龙江的典型种质资源（雄桑、镜泊桑、太阳岛桑、秋雨桑）的遗传距离呈现梯度分化，范围在0.519 9~0.902 9之间。具体而言，其与雄桑、镜泊桑、太阳岛桑、万宝红1号、万宝红12号、万宝红10号的遗传距离分别为0.519 9、0.902 9、0.720 5、0.666 5、0.902 9、0.902 9，显著高于该地区其他引进品种的遗传距离（0.2~0.5），且依兰



红色分割线代表在遗传系数近 0.61 处将 42 份桑树分为 6 个类群进行分析。

The red dashed line indicates the division of 42 mulberry trees into 6 groups for analysis at a genetic coefficient close to 0.61.

图 5　42 份桑树种质资源的 UPGMA 聚类分析

Fig. 5　UPGMA clustering analysis diagram of 42 mulberry germplasm resources

表 8　42 份桑树种质资源的遗传多样性数据

Table 8　Genetic diversity data of 42 mulberry germplasm resources

序号 No.	观测等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	香农信息指数 Shannon's information index	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index	序号 No.	观测等位基因数 Number of alleles	有效等位基因数 Number of effective alleles	香农信息指数 Shannon's information index	Nei's 基因多样性指数 Nei's gene diversity index
1	2.000 0	1.372 0	0.271 1	0.442 5	22	2.000 0	1.591 4	0.371 6	0.558 6
2	2.000 0	1.456 6	0.313 5	0.492 8	23	2.000 0	1.456 6	0.313 5	0.492 8
3	2.000 0	1.500 6	0.333 6	0.516 0	24	2.000 0	1.637 6	0.389 3	0.578 0
4	2.000 0	1.456 6	0.313 5	0.492 8	25	2.000 0	1.456 6	0.313 5	0.492 8
5	2.000 0	1.591 4	0.371 6	0.558 6	26	2.000 0	1.372 0	0.271 1	0.442 5
6	2.000 0	1.500 6	0.333 6	0.516 0	27	2.000 0	1.591 4	0.371 6	0.558 6
7	2.000 0	1.413 7	0.292 6	0.468 4	28	2.000 0	1.545 6	0.353 0	0.537 9
8	2.000 0	1.456 6	0.313 5	0.492 8	29	2.000 0	1.730 1	0.422 0	0.613 0
9	2.000 0	1.775 4	0.436 7	0.628 5	30	2.000 0	1.545 6	0.353 0	0.537 9
10	2.000 0	1.545 6	0.353 0	0.537 9	31	2.000 0	1.684 0	0.406 2	0.596 1
11	2.000 0	1.591 4	0.371 6	0.558 6	32	2.000 0	1.684 0	0.406 2	0.596 1
12	2.000 0	1.637 6	0.389 3	0.578 0	33	2.000 0	1.545 6	0.353 0	0.537 9
13	2.000 0	1.500 6	0.333 6	0.516 0	34	2.000 0	1.545 6	0.353 0	0.537 9
14	2.000 0	1.591 4	0.371 6	0.558 6	35	2.000 0	1.372 0	0.271 1	0.442 5
15	2.000 0	1.372 0	0.271 1	0.442 5	36	2.000 0	1.331 6	0.249 0	0.415 3
16	2.000 0	1.545 6	0.353 0	0.537 9	37	2.000 0	1.372 0	0.271 1	0.442 5
17	2.000 0	1.819 3	0.450 3	0.642 6	38	2.000 0	1.500 6	0.333 6	0.516 0
18	2.000 0	1.899 3	0.473 5	0.666 4	39	2.000 0	1.456 6	0.313 5	0.492 8
19	2.000 0	1.684 0	0.406 2	0.596 1	40	2.000 0	1.637 6	0.389 3	0.578 0
20	2.000 0	1.730 1	0.422 0	0.613 0	41	2.000 0	1.500 6	0.333 6	0.516 0
21	2.000 0	1.413 7	0.292 6	0.468 4	42	2.000 0	1.730 1	0.422 0	0.613 0

桑的遗传多样性高于其他黑龙江引进品种的均值。推测可能是因为引种后生长环境（如气候条件、土壤特性、光照度等）的显著差异，导致品种基因频率发生改变。

本研究基于遗传距离（GD值）与UPGMA聚类分析的结果均表明，丰驰2号、秦饲1号和辽鲁1号间遗传距离较近，万宝红10号与万宝红12号遗传距离较近且在遗传系数0.89处聚为一支，这些种质间的高度遗传相似性（GD=0.118 7）暗示其可能具有共同的育种背景或亲本来源，为桑树品种改良中的亲本选配提供了重要依据。与之相反的是，秋雨桑与依兰桑间遗传距离最大（GD=1.213 0）且分属不同类群，这种显著的遗传分化可能源于其不同的地理起源和生态适应性选择。综合分析显示，桑树种质的多态性与其地域性和功能特性存在一定程度的关联，为后续深入解析桑树遗传多样性形成机制及种质创新利用奠定了重要基础。

3 讨 论

Indel-PCR反应体系的确立是确保扩增产物得率与纯度的关键技术环节[20]。本研究通过正交试验与单因素试验相结合的方法，系统优化了桑树In-Del-PCR反应体系中的关键参数，包括*Taq*酶浓度、dNTP含量、模板DNA用量、Buffer组分及引物浓度等核心因素。这种双设计方法不仅体现了试验各因素的整齐可比性，更利用正交设计的均衡分散特性，即各因素水平组合在试验空间中均匀分布，有效补充了单因素试验可能遗漏的参数组合。研究结果显示，引物浓度对Indel-PCR扩增效果具有决定性影响，这与李辉玲等[21]在色素辣椒中的研究结论高度一致。当引物浓度不足时，扩增反应不完全，导致电泳条带模糊且数量减少；而浓度过高则易引发错配现象，产生引物二聚体及非特异性扩增产物。该体系最终确定的2 μL引物用量，与李辉玲等[21]团队的研究数据形成相互验证；1 μL模板DNA最佳用量与宋谢天等[22]在山金柑体系中的研究结论相符，体现了不同作物间PCR核心参数优化规律的共性特征。桑树InDel标记能产生清晰稳定的条带，证实了该体系的可靠性和适用性。与已有分子标记体系相比，本研究优化的InDel体系在多态性位点检测方面展现出显著的技术优势，17对InDel引物多态性位点百分率达88.10%，不仅显著高于延娜[23]等利用EST-SSR标记对果桑品种的检测结果（多态性比率79.46%），而且远超林强[4]采用SRAP标记对桑树种质的检测结果（多态性比率仅30.56%）。较高的多态性检测能力意味着本体系可捕捉到更丰富的遗传变异信息，这对精准解析桑树种质间的亲缘关系、挖掘优异基因资源具有重要意义。

目前，用于种质资源鉴定及物种间遗传多样性分析的分子标记类型较为丰富，如传统的SSR、AFLP（Amplified fragment length polymorphism）、SRAP等分子标记[24-26]。随着测序技术和基因组学的不断发展，新一代Indel分子标记逐渐进入人们的视野。在桑树遗传多样性研究中，延娜[23]利用SRAP和EST-SSR分子标记方法对15份果桑进行分析，将供试桑材料分成三大类；吴项丹萍等[27]应用ISSR分子标记技术对141份湖桑的遗传多样性进行分析，分为两大类4亚类。但是ISSR、SRAP是显性标记，无法区分纯合基因型和杂合基因型。InDel标记具有共显性、遗传稳定性高、位点丰富且分布广泛等优势，能够更准确地揭示品种间的遗传差异与亲缘关系，因此本研究采用InDel标记技术对桑树种质材料进行分析。

本试验选用17对InDel引物，对42份桑材料的基因组DNA进行PCR扩增得到37个多态性条带，多态性比率为88.10%，该结果与陈加利[6]采用SSR标记分析的海南桑树种质数据（引种资源的多态百分比71.79%，野生资源的多态性百分比82.56%）具有可比性，表明了InDel与SSR标记在桑树遗传多样性检测中均具有高灵敏度（多态性＞70%），InDel标记显示出更高的分辨率（较SSR提高5.54%），也反映出桑属植物本身具有较为丰富的遗传变异。值得注意的是，本研究检测到观测杂合度（*Ho*）的平均值为0，这一异常结果可能源于试验误差（如DNA质量、PCR条件）或生物学原因（如自交亲和、无性繁殖）。在试验误差层面，本研究已通过严格控制试验流程排除核心干扰，如桑树DNA采用植物基因组试剂盒提取，经3%琼脂糖凝胶电泳（显示条带清晰、无明显降解）和超微量分光光度计检测（OD_{260}/OD_{280}变幅在1.58~1.98之间），符合InDel标记检测的质量要求，避免DNA降解、杂质污染导致的扩增异常。PCR反应则基于前期优化的最佳体系进行扩增，可稳定获得条带清晰、无假阳性或假阴性现象，因此可排除DNA质量、PCR条件等试验误差对杂合度检测

结果的影响；而在生物学层面，推测该结果与桑树的繁殖特性及种质来源特征密切相关。桑树虽为异花授粉植物，但在长期人工驯化过程中，为精准保持优良农艺性状（如高产、优质、抗逆等），生产上多采用扦插、嫁接等无性繁殖方式保存与繁殖种质，极大地减少自然杂交产生基因重组的机会，导致种群中杂合基因型逐渐流失并固定为纯合基因型。此外，本研究供试材料包含多个地理起源相对集中的地方品种（如陕西地方野生资源、湖桑系列），地理隔离效应限制了不同种群间的基因交流，加之人工选择对纯合优良基因型的定向保留，共同加剧了群体杂合度的降低。这一现象并非桑属植物特有，在其他长期采用无性繁殖的木本经济植物中已有类似报道，如樱桃[28]的部分栽培种群、杨树[29]的无性系品种中均检测到低杂合度甚至纯合化特征，与本研究结果一致。综上，本研究中观测杂合度（*Ho*）平均为0非试验误差导致，极大可能是桑树长期无性繁殖、地理隔离及人工定向选择共同作用的结果。

基于遗传相似系数0.61的聚类分析将42份材料划分为六个类群，其中红果3号与湖桑被聚为同一类群，这与延娜[23]基于SRAP和EST-SSR标记将红果系列归为鲁桑，以及夏明炯等[30]确认湖桑属于鲁桑系统的研究结论高度一致，进一步验证了利用InDel标记进行分类的准确性。陕西省地方野生资源（包括米脂老桑树、农户家桑）集中分布于同一类群，反映出地理隔离对遗传分化的显著影响；而农桑14号与三道河泽桑独立形成第三类群，这种遗传分化可能源于人工选择导致的遗传漂变和育种过程中基因型的定向筛选。该研究结果不仅为桑树种质资源的分类鉴定提供了分子依据，也为今后利用地方野生资源进行品种改良奠定了理论基础。

4　结　论

本研究建立了适用于桑属植物的高稳定性、高特异性InDel-PCR最优反应体系，该体系总体积为20 μL，具体组分为Buffer（含Mg^{2+}）2.0 μL、2.5 mmol·L^{-1} dNTPs 0.4 μL、上/下游引物（10 μmol·$μL^{-1}$）各0.8 μL、*Taq* DNA聚合酶（5 U·$μL^{-1}$）0.25 μL、模板DNA（50 ng·$μL^{-1}$）1 μL、ddH_2O 14.75 μL。基于该优化体系开展遗传多样性与UPGMA聚类分析发现，42份供试桑树种质存在显著遗传差异，整体处于中等偏上遗传多样性水平（平均遗传距离为0.372 9，平均*H*为0.350 7，平均*I*为0.533 8），在遗传系数0.61处可明确划分为六个类群。聚类结果可靠，类群划分与种质的地理起源、功能特性及育种背景密切相关。桑树种质的遗传多样性与遗传分化可能与地理跨度、生态环境异质性、定向育种、无性繁殖、地理隔离及引种后环境变化等多重因素有关。本研究建立的标准化体系及高多态性引物可实现快速精准的鉴定优异种质、指导育种亲本选配，丰富桑树分子标记数据库，明确种质的遗传潜力，为优异基因挖掘、种质创新及育种效率提升提供支撑，也为解析桑树遗传多样性形成的机制奠定基础。

参考文献 References：

[1] Li Y，Yu C，Mo R L，Zhu Z X，Dong Z X，Hu X M，Deng W，Zhuang C X. Screening and verification of photosynthesis and chloroplast-related genes in mulberry by comparative RNA-seq and virus-induced gene silencing[J]. International Journal of Molecular Sciences，2022，23(15)：8620.

[2] 李佳奇，张沁，贾富贵，沈子靖，史建国 . 不同盐碱胁迫对2个桑品种种子萌发的影响[J]. 饲料研究，2025，48(23)：102-108.
Li Jiaqi，Zhang Qin，Jia Fugui，Shen Zijing，Shi Jianguo. Effects of different saline-alkali stresses on seed germination of two mulberry varieties[J]. Feed Research，2025，48(23)：102-108.

[3] 赵卫国 . 桑种质资源的随机扩增多态性DNA（RAPDs）及叶绿体基因组DNA的研究[D]. 北京：中国农业科学院，2001.
Zhao Weiguo. Studies on RAPD and chloroplast genomic DNA for germplasm resources of genus mulberry，*Mori* L.[D]. Beijing：Chinese Academy of Agricultural Sciences，2001.

[4] 林强，邱长玉，赵卫国，朱方容，张英华，陈小青，方荣俊，黄旭华 . 32份广东桑类型桑树种质资源亲缘关系的SRAP标记分析[J]. 蚕业科学，2011，37(3)：373-379.
Lin Qiang，Qiu Changyu，Zhao Weiguo，Zhu Fangrong，Zhang Yinghua，Chen Xiaoqing，Fang Rongjun，Huang Xuhua. Phylogenetic relationship of 32 mulberry germplasm resources of *Morus atropurpurea* revealed by SRAP marker[J]. Science of Sericulture，2011，37(3)：373-379.

[5] 陈仁芳，刘玲，钱永华，苏超，陈祥平，范小敏，柯皓天 . 北方蚕区89份桑种质资源的ISSR标记遗传多样性分析[J]. 蚕业科学，2015，41(3)：410-416.
Chen Renfang，Liu Ling，Qian Yonghua，Su Chao，Chen Xiangping，Fan Xiaomin，Ke Haotian. Analysis of genetic diversity of 89 mulberry germplasm resources in the Northern sericultural regions using ISSR markers[J]. Science of Sericulture，2015，41(3)：410-416.

[6] 陈加利 . 海南岛桑树种质资源现状调查及保护利用建议[J]. 南方农业，2018，12(27)：164-165.
Chen Jiali. Investigation on the current situation of mulberry germplasm resources in Hainan island and suggestions for pro-

tection and utilization[J]. South China Agriculture，2018，12(27)：164-165.

[7] 孙秀秀，林夏，王景飞，翁春雨，张永豪，陈宣 . 基于 SRAP 分子标记的果桑种质资源遗传多样性分析[J]. 现代农业科技，2023(15)：73-78.
Sun Xiuxiu，Lin Xia，Wang Jingfei，Weng Chunyu，Zhang Yonghao，Chen Xuan. Genetic diversity analysis of fruit mulberry germplasm resources based on SRAP molecular markers[J]. Modern Agricultural Science and Technology，2023(15)：73-78.

[8] 余歆，郭意，刘小丰，万润楚，江东，曹立 . 利用 InDel 标记鉴定不同橘柚品种[J]. 果树学报，2024，41(8)：1477-1489.
Yu Xin，Guo Yi，Liu Xiaofeng，Wan Runchu，Jiang Dong，Cao Li. Identification of tangelo varieties with InDel markers[J]. Journal of Fruit Science，2024，41(8)：1477-1489.

[9] 解为玮，徐丹彤，陈方策，宋贞富，钟思玲，敖艳飞，安星，王红林，何业华，郑乾明，刘朝阳 . 蜂糖李种质鉴定中孢粉学与 InDel 标记的应用[J]. 果树学报，2024，41(7)：1297-1309.
Xie Weiwei，Xu Dantong，Chen Fangce，Song Zhenfu，Zhong Siling，Ao Yanfei，An Xing，Wang Honglin，He Yehua，Zheng Qianming，Liu Chaoyang. Application of palynology and InDel markers in germplasm identifica- tion in Fengtangli plum[J]. Journal of Fruit Science，2024，41(7)：1297-1309.

[10] 刘霁虹，包劲松，朱碧云，颜韶兵，应逸宁 . 基于二代测序技术的玉米 InDel 分子标记开发及品种鉴定[J]. 核农学报，2025，39(8)：1630-1639.
Liu Jihong，Bao Jinsong，Zhu Biyun，Yan Shaobing，Ying Yining. Development of InDel molecular markers for maize varieties based on next-generation sequencing technology and variety identification[J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences，2025，39(8)：1630-1639.

[11] 何鸟飞，赵绪涛，李开祥 . 基于 InDel 标记的春油菜品种指纹图谱构建和杂交种纯度鉴定[J]. 草业科学，2025，42(3)：687-697.
He Niaofei，Zhao Xutao，Li Kaixiang. Fingerprint construction and hybrid purity identification of spring rapeseed varieties using InDel markers[J]. Pratacultural Science，2025，42(3)：687-697.

[12] 令狐斌，侯思宇，孙朝霞，黄可盛，路阳，韩渊怀，许冬梅 . 苦荞 SRAP 分子标记体系优化与遗传多样性分析[J]. 中国农业大学学报，2015，20(1)：37-43.
Linghu Bin，Hou Siyu，Sun Zhaoxia，Huang Kesheng，Lu Yang，Han Yuanhuai，Xu Dongmei. Optimization of SRAP-PCR amplification system and its application in the analysis of genetic diversity in Tartary buckwheat[J]. Journal of China Agricultural University，2015，20(1)：37-43.

[13] 焦云，高中山，汪国云，陈方永，姚小映，周超超 . 杨梅种质资源 InDel 标记开发及与熟期的关联分析[J]. 植物遗传资源学报，2025，26(3)：575-588.
Jiao Yun，Gao Zhongshan，Wang Guoyun，Chen Fangyong，Yao Xiaoying，Zhou Chaochao. Development of insertion and deletion (InDel) markers in germplasm resources of Chinese bayberry and correlation analysis with mature stage[J]. Journal of Plant Genetic Resources，2025，26(3)：575-588.

[14] Li W Y，Dong X，Zhang X T，Cao J，Liu M L，Zhou X，Long H X，Cao H P，Lin H，Zhang L. Genome assembly and resequencing shed light on evolution，population selection，and sex identification in *Vernicia montana*[J]. Horticulture Research，2024，11(7)：uhae141.

[15] 戴晓港，陈晨，薛良交，吴怀通，尹佟明 . 基于物种特异性 InDel 标记鉴别美洲黑杨与小叶杨的杂交子代[J]. 林业科学，2021，57(11)：79-84.
Dai Xiaogang，Chen Chen，Xue Liangjiao，Wu Huaitong，Yin Tongming. Identification of interspecific hybrids between *Populus deltoides* and *P. simonii* by using species- specific InDel marker[J]. Scientia Silvae Sinicae，2021，57(11)：79-84.

[16] 谭福洋，彭业成，施祖珍，赖艳梅，兰艳妮，李枫烨，吴静颜，浦月霞 . 桂桑优 12 和桂桑优 62 不同夏伐时间对桑叶产量的影响试验[J]. 广西蚕业，2022，59(3)：7-11.
Tan Fuyang，Peng Yecheng，Shi Zuzhen，Lai Yanmei，Lan Yanni，Li Fengye，Wu Jingyan，Pu Yuexia. Test on the effects of different summer pruning times on mulberry leaf yield of Guisangyou 12 and Guisangyou 62[J]. Guangxi Sericulture，2022，59(3)：7-11.

[17] 胡鑫，游伟，姜富贵，成海建，孙志刚，宋恩亮 . 基于全基因组重测序分析西门塔尔牛遗传多样性与群体结构[J]. 畜牧兽医学报，2025，56(3)：1189-1202.
Hu Xin，You Wei，Jiang Fugui，Cheng Haijian，Sun Zhigang，Song Enliang. Analysis of genetic diversity and population structure of simmental cattle based on whole genome resequencing[J]. Acta Veterinaria et Zootechnica Sinica，2025，56(3)：1189-1202.

[18] 周亚星，周伟，徐寿军，提俊阳，郭然，于卓 . 马铃薯 ISSR 体系优化及品系间遗传差异分析[J]. 内蒙古民族大学学报(自然科学版)，2019，34(5)：407-412.
Zhou Yaxing，Zhou Wei，Xu Shoujun，Ti Junyang，Guo Ran，Yu Zhuo. Optimization of an ISSR system and analysis of genetic differences among potato strains[J]. Journal of Inner Mongolia University for Nationalities，2019，34(5)：407-412.

[19] 莫润秀，黄开健，翟瑞宁，黄爱花，邹成林，杨萌，韦新兴 . 利用 SNP 标记对 60 份糯玉米自交系的遗传多样性和杂种优势群研究[J]. 玉米科学，2025，33(7)：46-50.
Mo Runxiu，Huang Kaijian，Zhai Ruining，Huang Aihua，Zou Chenglin，Yang Meng，Wei Xinxing. Genetic diversity and heterosis groups of 60 waxy maize inbred lines using SNP markers[J]. Journal of Maize Sciences，2025，33(7)：46-50.

[20] Kumar R，Das S P，Choudhury B U，Kumar A，Prakash N R，Verma R，Chakraborti M，Devi A G，Bhattacharjee B，Das R，Das B，Devi H L，Das B，Rawat S，Mishra V K. Advances in genomic tools for plant breeding：harnessing DNA molecular markers，genomic selection，and genome editing[J]. Biological Research，2024，57：80.

[21] 李辉玲，董洁，张国儒，火顺利，叶远荣，杜珊珊，张建文 . 色素辣椒 InDel-PCR 反应体系优化及引物筛选[J]. 江苏农业科学，2021，49(18)：72-76.
Li Huiling，Dong Jie，Zhang Guoru，Huo Shunli，Ye Yuanrong，Du Shanshan，Zhang Jianwen. Optimization and primer screening of InDel-PCR reaction system for pigment pepper[J]. Jiangsu Agricultural Sciences，2021，49(18)：72-76.

[22] 宋谢天，田啸宇，王楠，周银，谢源源，谢宗周，柴利军，叶俊丽，邓秀新 . 利用 InDel 标记筛选多胚山金柑珠心苗后代[J]. 果树学报，2023，40(7)：1312-1317.
Song Xietian，Tian Xiaoyu，Wang Nan，Zhou Yin，Xie Yuanyuan，Xie Zongzhou，Chai Lijun，Ye Junli，Deng Xiuxin. InDel marker-assisted selection of nucellar seedlings in polyembryonic *Fortunella hindsii*[J]. Journal of Fruit Science，2023，40(7)：1312-1317.

[23] 延娜 . 15 个果桑品种的 EST-SSR 和 SRAP 遗传多样性分析[D]. 杨凌：西北农林科技大学，2016.
Yan Na. The analysis of genetic diversity in fifteen fruitmulberry resources by EST- SSR and SRAP markers[D]. Yangling：Northwest A & F University，2016.

[24] 刘燕，汪毅，马晶晶，史经昂，王志勇，刘建秀，郭海林 . 海雀稗 SRAP-PCR 分子标记体系优化及引物筛选[J]. 草地学报，2016，24(5)：1080-1086.
Liu Yan，Wang Yi，Ma Jingjing，Shi Jing’ang，Wang Zhiyong，Liu Jianxiu，Guo Hailin. Optimization of SRAP-PCR system in *Paspalum vaginatum* and primers screening[J]. Acta Agrestia Sinica，2016，24(5)：1080-1086.

[25] 田娅林，张林霞，刘国锋，江杰，张思思 . 悬铃木 *LFY* 基因第二内含子多态性分析[J]. 种子，2025，44(6)：68-74.
Tian Yalin，Zhang Linxia，Liu Guofeng，Jiang Jie，Zhang Sisi. Polymorphism analysis of the second intron of *LFY* gene in *Platanus acerifolia*[J]. Seed，2025，44(6)：68-74.

[26] 赵洋，张蓓，马俊峰，郭振营，张坤玺，黄金华，李梦姣，朱坤，王振军 . 草莓属(*Fragaria*)植物遗传多样性研究进展[J]. 江苏农业科学，2025，53(11)：23-30.
Zhao Yang，Zhang Bei，Ma Junfeng，Guo Zhenying，Zhang Kunxi，Huang Jinhua，Li Mengjiao，Zhu Kun，Wang Zhenjun. Research progress on genetic diversity of (*Fragaria*) plants[J]. Jiangsu Agricultural Sciences，2025，53(11)：23-30.

[27] 吴项丹萍，张林，潘一乐 . 中国湖桑地方品种遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学，2011，39(2)：745-747.
Wu Xiangdanping，Zhang Lin，Pan Yile. Genetic diversity of Chinese *Hu mulberry* (*Morus* L.) based on ISSR analysis[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences，2011，39(2)：745-747.

[28] 曹朝，宋超然，陈都，陈晓峰 . 基于 SSR 技术的山东烟台樱桃种质资源遗传多样性分析[J]. 广东农业科学，2025，52(1)：24-36.
Cao Zhao，Song Chaoran，Chen Du，Chen Xiaofeng. Analysis of genetic diversity of cherry germplasm resources in Shandong Yantai based on SSR technology[J]. Guangdong Agricultural Sciences，2025，52(1)：24-36.

[29] 张海燕，樊军锋，郑涛 . 18 份杨树资源的遗传多样性分析[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版)，2020，48(12)：47-54.
Zhang Haiyan，Fan Junfeng，Zheng Tao. Genetic diversity analysis of 18 poplar resources[J]. Journal of Northwest A&F University (Natural Science Edition)，2020，48(12)：47-54.

[30] 夏明炯 . 桑属植物的分类检索及中国桑种的特征性状与分布[J]. 中国蚕业，2015，36(4)：8-14.
Xia Mingjiong. Taxonomic key and characteristic traits with distribution of *Morus* species in China[J]. China Sericulture，2015，36(4)：8-14.