

## 应用 SRAP 标记分析新疆地区主要杨属树种的遗传多样性

刘艳萍<sup>1</sup>, 郭志富<sup>2</sup>, 刘玉东<sup>2</sup>, 姜树坤<sup>2</sup>, 张丽<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>塔里木大学植物科学技术学院, 新疆阿拉尔市 843300; <sup>2</sup>沈阳农业大学辽宁省农业生物技术重点实验室, 沈阳 110161

**摘要:** 用30对SRAP引物对15个采集于新疆不同地区的杨属树种进行了遗传多样性分析, 共扩增出881条具多态性的条带, 平均多态性信息量为0.958, 平均多态性比率为96.8%。通过聚类分析将15个杨树材料分为4个群。这一聚类结果与传统的分类基本上一致。这表明SRAP标记适用于研究杨属树种遗传多样性。

**关键词:** 杨属; SRAP; 遗传多样性; 分子标记

## Genetic Diversities of *Populus* in Xinjiang Based on SRAPs Markers

LIU Yan-Ping<sup>1</sup>, GUO Zhi-Fu<sup>2</sup>, LIU Yu-Dong<sup>2</sup>, JIANG Shu-Kun<sup>2</sup>, ZHANG Li<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup>College of Plant Science and Technology, Talimu University, Alaer, Xinjiang 843300, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

**Abstract:** The objective of this paper was to evaluate the utility of SRAP markers for assessing genetic diversity of *Populus* germplasm. In total, 30 SRAP primers were used to evaluate the genetic diversities of 15 *Populus* material, and 853 polymorphic bands were produced. On average, polymorphism information content (PIC) was 0.958, and the percentage of polymorphic bands was 96.8%. The results of cluster analysis showed that the accessions assessed could be clustered into 4 groups. This result was partly in accordance with the previous classification based on conventional methods with a little difference. So, we considered that SRAP was a potentially useful marker technique for genetic diversity study in *Populus* germplasm.

**Key words:** *Populus*; SRAP; genetic diversity; molecular marker

杨树具有适应性强、生长速度快和丰产等特性, 是广泛作为短期轮伐的造林树种, 在生态环境治理和解决木材短缺方面占有重要位置。研究杨属植物的遗传多样性可以了解其起源和资源分布, 以合理利用和保存杨属基因资源, 充实杨树育种工作中的亲本筛选和利用的理论基础(尹春英等 2004)。多年来, 染色体多态性(康向阳 1996)、同工酶(Legionnet 和 Lefevre 1996; Muller-Starck 1992)以及 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等分子标记技术都广泛地应用于杨树遗传多样性的研究(尹春英等 2004)。但各种研究手段均存在局限性, 很难将亲缘关系较近的变种区分得很清楚, 因此杨属植物起源进化的深入研究和遗传改良完整理论基础的建立也受到限制。

基于 PCR 的相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记技术的特点是简单、高效、高共显性、易测序、可检测基因的可读框(ORFs)区域等。这些特点都表明SRAP标记是一种能够表现表型遗传差异的标记, 适用于植物的遗传多样性分析。

本文用30对SRAP引物对15个采集于新疆不同地区的杨属植物材料进行了遗传多样性分析, 以探讨用SRAP标记研究杨属植物遗传多样性中的可行性。

### 材料与方法

实验材料于2006年采集自新疆地区6个不同地点的15个材料的杨树(*Populus*)。选取较嫩的杨树叶片立刻用硅胶风干后备用。所选用的15个材料的杨树名称和采集地见表1。

基因组DNA的提取采用CTAB法稍加改动(姜树坤等 2006), SRAP分析的引物采用Li和 Quiros (2001)已发表的引物: ME1, ME3~ME6/EM1~EM6(表2), 由北京赛百胜生物公司合成。PCR扩增总体积为15 μL, 包括20 ng DNA模板、

收稿 2007-10-22 修定 2008-01-21

资助 辽宁省农业生物技术重点实验室基金和塔里木大学校长硕士基金(TDZKSS06001)。

\* 通讯作者(E-mail: ququlili2000@yahoo.com.cn; Tel: 024-88487164)。

表1 杨树的种类及采集地点

Table 1 Type of *Populus* and their sampling locations

种名	采集地
胡杨( <i>Populus euphratica</i> )	阿克苏
胡杨	疏勒
灰叶胡杨( <i>Populus pruinosa</i> )	阿克苏
灰叶胡杨	巴楚
银白杨( <i>Populus alba</i> )	柯坪县
银白杨	阿克苏
银白杨	石河子
新疆杨( <i>Populus alba</i> var. <i>pyramidalis</i> )	石河子
新疆杨	阿克苏
新疆杨	疏勒
密叶杨( <i>Populus talassica</i> )	石河子
托木尔峰密叶杨( <i>Populus talassica</i> var. <i>tomortensis</i> )	阿克苏
加拿大杨( <i>Populus canadensis</i> )	阿克苏
阿富汗杨( <i>Populus afghanica</i> )	阿克陶
钻天杨( <i>Populus italica</i> )	石河子

引物各 0.3  $\mu\text{mol}$ 、200  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP, 1 U Taq DNA 聚合酶, 2.5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{Mg}^{2+}$ , 不足部分用超纯水补足。扩增程序参照 Li 和 Quiros (2001) 的方法: 94 3 min; 94 1 min, 37 1 min, 72 2 min, 5 个循环; 94 1 min, 50 1 min, 72 2 min, 35 个循环; 72 5 min。扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶分离, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TBE。电泳时, 恒定功率为 85 W, 预电泳约 30 min 后, 电泳 2 h。电泳后采用银染法进行染色(Panaud 等 1996)。

SRAP 扩增条带在 100~1 000 bp 之间的以相同迁移位置上有带记为 1, 无带记为 0, 缺失记为 9, 建立数据库。用简单配对参数(simple matching coefficient)估计基因频率, 依据  $GS=m/(m+n)$  计算遗传相似系数, 其中  $m$  为基因型间共有带的数目,  $n$  为差异带的数目。然后采用 UPGMA (unweighed pair group method arithmetic average) 进

行聚类分析, 构建树状图(dendrogram)。标记位点的多态性信息量(polymorphism information content, PIC)用公式  $PIC=1-\sum f_i^2$  ( $f_i$  表示  $i$  位点的基因频率) 来计算(Smith 等 1997)。所有数据均用 NTSYS-pc 2.1 和 Excel 软件处理。

## 结果与讨论

### 1 SRAP 标记的多态性

本实验用 30 对 SRAP 引物对采集自新疆不同地区的 15 个杨属材料进行了遗传多样性分析, 其中 27 对引物的扩增产物具有多态性, 带型稳定, 重复性好(图 1), 3 对引物在有些杨树中无扩增产物或扩增质量较差, 不能进行正常统计。27 对 SRAP 在 15 个杨树个体间扩增出 881 条可辨认条带, 片段长度集中在 100~1 000 bp 之间, 15 个杨属植物材料的相似系数在 0.54~0.95 之间。在 881 条带中表现出多态性的带有 853 条, 多态性比率为 96.8%。平均每个引物扩增出 32.6 条带, 多态性带 31.6 条。在实验的杨树材料中, 27 对 SRAP 引物检测到的平均 PIC 为 0.958。

### 2 杨属种内和种间的遗传多样性

杨树是严格的异交植物, 种间和属间极易产生天然杂种, 加之其在新疆分布的地域广大, 生长地南、北疆的气候地理环境差异极大, 因此, 其种内存在一定程度的遗传变异是很正常的现象。本文中采集自不同地区的 4 种杨树种内遗传多样性分析表明, 在 27 条引物扩增的 881 条带中, 2 个胡杨间扩增出 72 条多态性条带, 遗传相似系数为 92.5%; 2 个灰叶胡杨间有 110 条多态性条带, 遗传相似系数为 87.5%; 3 个银白杨间有 129 条多态性条带, 遗传相似系数为 85.4%; 而 3 个新疆杨间有 152 条多态性条带, 遗传相似系数为 82.7%。这些杨树等位基因变异频率的广泛分布暗示不同杨

表2 实验所用的 SRAP 引物

Table 2 The SRAP primers used in the experiment

引物编号	上游引物序列	引物编号	下游引物序列
ME1	TGAGTCAAACCGGATA	EM1	GACTGCGTACGAATTAAT
ME3	TGAGTCAAACCGGAAT	EM2	GACTGCGTACGAATTTGC
ME4	TGAGTCAAACCGGACC	EM3	GACTGCGTACGAATTGAC
ME5	TGAGTCAAACCGGAAG	EM4	GACTGCGTACGAATTTGA
ME6	TGAGTCAAACCGGTAA	EM5	GACTGCGTACGAATTAAC
		EM6	GACTGCGTACGAATTGCA

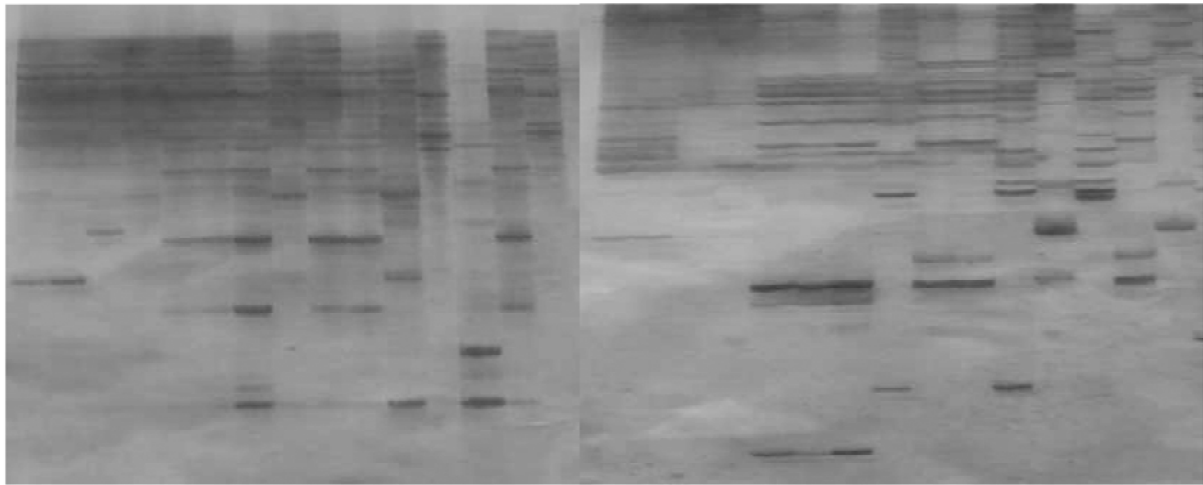


图1 引物组合ME5/EM2和ME3/EM2在15个杨树材料中扩增出的SRAP条带

Fig.1 SRAP fragments amplified by primer combination ME5/EM2 and ME3/EM2 from 15 material of *Populus*

树群体内存在高水平的遗传多样性, 评价各种之间的遗传多样性十分困难。

在评价杨树种间遗传多样性中, 我们将采集自不同地区同种杨树的DNA混合后进行电泳的结果表明: 多态性条带明显减少, 这样评价种间遗传多样性变得很方便。我们用计算得到的各种杨树间的遗传相似系数评价种间DNA水平上的遗传多样性的结果表明, 在27对引物组合扩增出的881条电泳谱带建立的0, 1数据库, 根据所建的数据库计算各种材料间的遗传相似系数中, 各种杨树间的遗传相似系数在41.9%~79.7%之间, 其

中遗传相似性最大的是密叶杨和其变种托木尔峰密叶杨, 其相似系数为79.7%, 遗传相似性最小的是加拿大杨和灰叶胡杨, 其相似系数为41.9%。平均遗传相似系数为0.697。

### 3 聚类分析

根据各杨树种间的遗传相似系数, 采用NTSYS-pc 2.1软件进行聚类分析(图2)。由聚类图可知9个杨树材料可以划分为4个群, 每一群包含2~3个材料。第1群包括胡杨和灰叶胡杨; 第2群包括托木尔峰密叶杨和密叶杨; 第3群包括银白杨和新疆杨; 第4群包括阿富汗杨、钻天

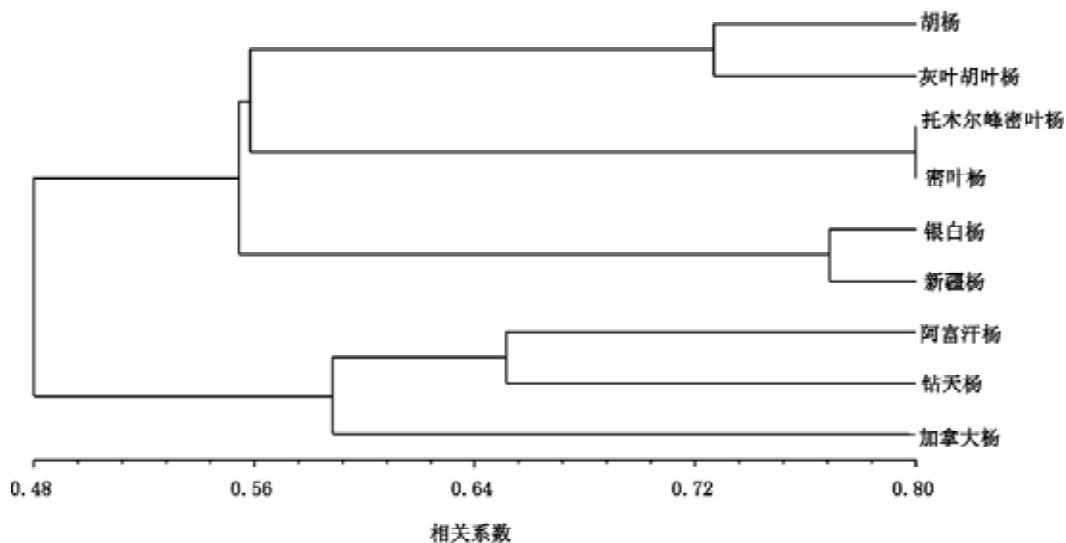


图2 九个杨属树种的聚类图

Fig.2 Dendrograms of 9 *Populus* material

杨和加拿大杨。从这些杨树的分类关系可知,第1群的2个材料同属于胡杨亚属;第2群的材料是青杨亚属中密叶杨及其变种托木尔峰密叶杨;第3群中的材料是白杨亚属中银白杨及其变种新疆杨;第4群中的材料则同属于黑杨亚属,其中钻天杨和阿富汗杨属于欧亚黑杨组,加拿大杨属于美洲杨组。这说明,用SRAP遗传相似系数进行聚类分析与传统的分类有较好的一致性,能够真实的反应各杨树种间亲缘关系。

另外,从以上的聚类图还可看出,在杨属的4个亚属之中,黑杨亚属与其他3个亚属之间的亲缘关系较远,从进化的角度讲,是独立于其他3个亚属的,而其他3个亚属间的亲缘关系相对于黑杨亚属来说虽然较近,但也表现出明显的独立性。在这3个亚属中,属于青杨亚属的密叶杨及其变种间的遗传差异最小,其次是白杨亚属的银白杨及其变种新疆杨,而胡杨和灰叶胡杨这同属于胡杨亚属的2个组间植物的遗传差异最大。相对而言,黑杨亚属中的3个材料间的遗传差异都较大,这暗示它们在进化过程中的起源可能有所不同。

## 参考文献

- 姜树坤, 钟鸣, 徐正进, 张丽, 马慧, 刘少霞(2006). RAPD 标记进行水稻籼粳分类的研究. 沈阳农业大学学报, 37 (4): 639~641
- 康向阳(1996). 杨树染色体数目和形态观察. 甘肃农业大学学报, 31 (1): 67~70
- 尹春英, 彭幼红, 罗建勋, 李春阳(2004). 杨属遗传多样性研究进展. 植物生态学报, 28 (5): 711~722
- Legionnet A, Lefevre F (1996). Genetic variation of the riparian pioneer tree species *Populus nigra* L. I. Study of population structure based on isozymes. *Heredity*, 77: 629~637
- Li G, Quiros CF (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 103: 455~461
- Muller-Starck G (1992). Genetic control and inheritance of isoenzymes in poplars of the Tacamahaca section and hybrids. *Silvae Genet*, 41: 87~95
- Panaud O, Chen X, McCouch SR (1996). Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice. *Mol Gen Genet*, 252: 597~607
- Smith JSC, Chin ECL, Shu H, Smith OS, Wall SJ, Senior ML, Mitchell SE, Kresovich S, Ziegler J (1997). An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor Appl Genet*, 95: 163~173