

基于 CE-SRAP 标记的榉树优良单株指纹图谱构建

李婷婷^{1,2}, 朱锦茹¹, 邱 帅^{2,3}, 沈爱华¹, 吴初平¹, 袁位高¹

(¹浙江省林业科学研究院森林培育所, 杭州 310023; ²南京林业大学林木遗传与基因工程重点实验室, 南京 210037;

³杭州市园林绿化股份有限公司, 杭州 310020)

摘要:建立了榉树 SRAP 分子标记技术体系, 并在此基础上结合毛细管电泳技术 (CE, capillary electrophoresis) 对来自贵州、江西、浙江和日本京都的 70 个榉树优良单株进行指纹图谱构建和遗传聚类分析。筛选出 13 对 SRAP 引物, 共扩增出 2276 个位点, 均为多态性条带, 多态性百分率达到 100%, 筛选出的任意一条引物在采用毛细管电泳技术的情况下均可将所有样本区分开。70 个优良单株间的遗传距离变化范围为 0.0078 ~ 0.3772, 平均值为 0.0629; 遗传相似系数在 0.9218 ~ 0.9565 之间, 平均值为 0.9339, 说明种源间遗传距离近, 遗传相似性较高。SRAP 遗传聚类分析结果显示, 榉树的分类依次与其所生长的时间、地理位置以及秋季叶色和叶面光滑程度等性状相关。本研究可以为榉树优良单株无性系的分子鉴定、遗传资源管理及品种保护提供参考依据。

关键词:榉树; 指纹图谱; SRAP 标记; 毛细管电泳技术

Fingerprinting Construction for Superior Individuals of *Zelkova schneideriana* Based on CE-SRAP

LI Ting-ting^{1,2}, ZHU Jin-ru¹, QIU Shuai^{2,3}, SHEN Ai-hua¹, WU Chu-ping¹, YUAN Wei-gao¹

(¹Institute of Forest Cultivation, Zhejiang Forestry Academy, Hangzhou 310023;

²The Key Lab of Forest Genetics and Gene Engineering/ Nanjing Forestry University, Nanjing 210037;

³Hangzhou Landscaping Incorporated Company, Hangzhou 310020)

Abstract: In this study, the SRAP reaction system of *Zelkova schneideriana* was established. Combining capillary electrophoresis technology, fingerprinting and genetic cluster analysis were studied for seventy superior individuals of *Zelkova schneideriana* collected from Guizhou, Jiangxi, Zhejiang province and Kyoto of Japan. Totally 2276 bands were generated with 13 pairs of SRAP primers, of which all were polymorphic and each pair could separate all samples. Genetic distance among 70 superior individuals was 0.0078 – 0.3772 with an average value of 0.0629, while genetic similarity coefficient was 0.9218 – 0.9565 with an average value of 0.9339. This suggested that the genetic distance of zelkovas was close and the genetic similarity was high. The cluster analysis based on SRAP markers revealed that the classification of zelcovas related with their origin time, geographic location and the phenotypes such as autumn color and glossy degree of leaves. This study could be useful in identification, genetic resource management and protection of plant breeders' rights in *Z. schneideriana*.

Key words: *Zelkova schneideriana*; fingerprint; SRAP marker; capillary electrophoresis

收稿日期: 2015-03-03 修回日期: 2015-05-04 网络出版日期: 2015-12-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151209.0903.004.html>

基金项目: 竹木农业新品种选育重大科技专项 (2012C12908-9); 中央财政林业科技推广示范资金项目 (2014TS04); 浙江省科技厅项目 (2011R50027)

第一作者研究方向为林木遗传育种。E-mail: tingtingli71@163.com

通信作者: 袁位高, 主要研究方向为森林培育。E-mail: zfywg@126.com

榉树(*Zelkova schneideriana*)属于榆科(Ulmaceae)榉属(*Zelkova Spach*),落叶大乔木,主要分布于我国淮河、秦岭和长江中下游及其以南地区,中国台湾、日本也有分布,多散生在平原丘陵河谷沟涧等地^[1]。榉树木材坚致,纹理美观,树形优美,叶色季相变化丰富,具有很强的抗病和滞尘能力,在用材、庭院绿化和生态环境改善中有广泛的用途。由于榉树优质苗木需求量大,大量天然林被过度采伐,导致资源急剧减少濒临枯竭,已被列入国家重点保护珍稀濒危树种^[2]。浙江省林业科学研究院于2012-2015年对浙江全省及贵州、江西、安徽、江苏和云南等历史上榉树分布丰富的地区进行的调查显示,目前生存的个体多为村庄附近的风水树和国家挂牌保护对象,分布疏散;天然的榉树林已不多见,小面积的天然次生林由于自身生物学特性和生境的人为破坏演替缓慢,因此,对榉树遗传资源的保护刻不容缓。

分布于我国的榉属植物在生物学特性上的相似性很大^[3]。刘勋成等^[4]对5个榉树种群的ISSR分析显示:榉树种群遗传多样性的变异主要存在于种群内部,且受地理环境的影响较大。单纯依靠表型进行种源鉴定和良种选育不够稳定,易受环境影响,并且存在选择周期长的问题。DNA指纹图谱技术能有效克服形态和生化指标上易受环境影响的局限性,是种属间亲缘关系及遗传多样性分析的有效工具^[5],在苗木的早期鉴定、品种选育、品种权益保护与区分命名方面有广泛的应用^[6]。其中,相关扩增多态性(SRAP)是G. Li等^[7]开发的一种基于PCR的分子标记技术,具有无需序列信息、简单、高效、高共显性等特点。SRAP标记多态性丰富,由于其扩增的是内含子和外显子区域,有研究表明比AFLP和RAPD更能反映表型的多样性及生物进化特性,因而更具应用价值^[8-9]。已经应用于玫瑰^[10]、葡萄^[11]、墨西哥落羽杉^[12]、杨树^[13]、白花树^[14]、油茶^[15]和松属树种^[16-18]等很多木本植物的遗传多样性分析和指纹图谱构建中。

笔者团队于2012年开始在全国范围内搜集天然榉树优良单株,并对单株进行了无性繁殖,建立了榉树无性系种质资源保存库,为榉树优良种质资源的保存、品种繁育和无性系种子园的建立奠定了基础。本研究采用SRAP分子标记技术和毛细管电泳识别系统对从中国贵州、江西、浙江和日本京都天然榉树分布区中筛选出的70个优良单株进行指纹图谱构建和聚类分析,为种质资源库中每一份榉树优

良无性系建立分子档案,并对其亲缘关系、聚类与表型相关性进行了初步分析,以期对榉树种质资源库的管理、杂种优势预测、优良品种选育及品种保护提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据榉树的树姿、枝叶的可观赏性等表型特征,在榉树天然林中选取优良单株并采集枝条,以嫁接方式保存于榉树种质资源库中,于6月取新鲜嫩叶用以提取DNA,部分样本于次年扩繁后再次采集叶片并提取DNA,用于遗传稳定性和生物重复试验。本试验选用的70个榉树优良单株,包括中国浙江省(42株)、贵州省(21株)、江西省(6株)和日本京都(1株)。样本的具体种源编码、来源、秋季叶色和叶片光滑程度见表1。叶色变化类型参照赵旺兔^[19]、刘雪梅等^[20]的划分标准。

1.2 基因组DNA提取及检测

采用自动磨样机和BioTeke新型快速植物基因组DNA提取试剂盒提取榉树叶片DNA。用Thermo NanoDrop 2000/2000C分光光度计测定DNA的浓度和纯度,用1.5%琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,然后将检测合格的DNA样品稀释到50 ng/ μ L,保存到-20℃冰箱备用。

1.3 SRAP引物筛选

根据G. Li等^[7]发表的引物设计原则,设计正向引物9条,反向引物10条,共90个引物组合,引物序列详见表2,由上海Invitrogen公司合成。选用4个DNA样品对SRAP引物组合进行初筛,获取可稳定扩增出条带的引物;再随机选取6个DNA样品对初筛引物进行复筛,选择扩增稳定,条带清晰,多态性好的引物对70个榉树样本进行扩增并进行毛细管电泳检测。

1.4 SRAP反应体系和扩增程序

PCR反应扩增体系为20 μ L,反应混合液包括:2 \times Power Taq PCR MasterMix (BioTeke) 10 μ L, 10 μ mol/L上下游引物各2 μ L, 10~100 ng/ μ L DNA模板1 μ L,由无菌水补足至20 μ L。参考标准SRAP反应程序^[7]选择2种程序:(1)94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 35℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 5个循环;然后94℃变性1 min, 50℃退火1 min, 72℃延伸1.5 min, 35个循环; 72℃延伸10 min; 4℃保存。(2)94℃预变性5 min; 94℃变性1 min, 35℃退火1 min, 72℃延伸1 min, 5个循环;然后94℃变

表 1 供试榉树编码、来源和秋季叶色

Table 1 Code, origin and leaf color of *Zelkova schneideriana* in autumn

编号 Code	来源 Origin	东经 East	北纬 North	海拔 Elevation	叶色 Color	编号 Code	来源 Origin	东经 East	北纬 North	海拔 Elevation	叶色 Color
G111	贵阳开阳	106°54'	26°55'	958	绿*	Z133	嘉兴海盐	120°50'	30°22'	137	黄
G112	贵阳开阳	106°54''	26°55'	958	棕红	Z134	嘉兴海盐	120°50'	30°22'	137	棕红
G113	贵阳开阳	106°57'	26°55'	1041	绿*	Z142	嘉兴海宁	120°43'	30°23'	5	黄
G114	贵阳开阳	106°57'	26°55'	1041	棕红	Z143	嘉兴海宁	120°43'	30°23'	7	棕红
G121	贵阳乌当	106°56'	26°38'	1215	棕红	Z144	嘉兴海宁	120°43'	30°23'	11	紫红
G122	贵阳乌当	106°56'	26°39'	1215	棕红	Z151	嘉兴桐乡	120°30'	30°43'	3	黄
G211	黔西南望谟	106°06'	25°14'	789	紫红	Z152	嘉兴桐乡	120°31'	30°44'	13	黄
G212	黔西南望谟	106°06'	25°14'	781	紫红	Z153	嘉兴桐乡	120°30'	30°43'	2	紫红
G213	黔西南望谟	106°06'	25°14'	790	棕红	Z161	嘉兴秀洲	120°43'	30°35'	14	棕红
G214	黔西南望谟	106°06'	25°14'	751	绿	Z211	金华永康	120°14'	28°54'	547	黄
G215	黔西南望谟	106°06'	25°14'	751	棕红	Z212	金华永康	120°14'	28°54'	532	黄
G216	黔西南望谟	106°05'	25°14'	756	棕红	Z213	金华永康	120°14'	28°54'	535	黄
G221	黔西南册亨	105°47'	24°53'	1005	绿	Z221	金华义乌	119°57'	29°06'	161	棕红
G222	黔西南册亨	105°47'	24°54'	981	绿	Z222	金华义乌	119°57'	29°06'	155	棕红
G223	黔西南册亨	105°47'	24°54'	981	绿	Z231	金华武义	119°32'	28°42'	358	棕红
G224	黔西南册亨	105°47'	24°53'	966	绿	Z232	金华武义	119°45'	28°36'	514	棕红
G225	黔西南册亨	105°50'	24°82'	991	棕红	Z233	金华武义	119°45'	28°36'	520	黄
G226	黔西南册亨	105°50'	24°49'	991	棕红	Z225	金华武义	119°41'	28°35'	529	棕红
G227	黔西南册亨	105°50'	24°49'	967	棕红	Z236	金华武义	119°41'	28°35'	537	棕红
G311	铜仁石阡	108°23'	27°52'	881	绿*	Z242	金华磐安	120°40'	29°34'	510	棕红
G312	铜仁石阡	108°23'	27°52'	882	绿*	Z243	金华磐安	120°40'	29°34'	510	黄
J111	赣州石城	116°22'	26°03'	463	绿*	Z244	金华磐安	120°37'	29°10'	459	黄
J112	赣州石城	116°23'	26°03'	573	绿*	Z245	金华磐安	120°37'	29°10'	462	黄
J211	南昌	115°49'	28°45'	42	棕红	Z246	金华磐安	120°34'	29°09'	350	黄
J212	南昌	115°49'	28°45'	42	黄	Z247	金华磐安	120°24'	28°58'	728	黄
J213	南昌	115°49'	28°45'	41	棕红	Z248	金华磐安	120°27'	29°11'	373	黄
J214	南昌	115°49'	28°45'	41	棕红	Z249	金华磐安	120°15'	29°03'	272	黄
Z111	嘉兴嘉善	120°57'	30°54'	2	棕红	Z411	杭州桐庐	119°30'	29°43'	379	棕红
Z112	嘉兴嘉善	120°57'	30°55'	2	棕红	Z412	杭州桐庐	119°15'	29°43'	379	棕红
Z113	嘉兴嘉善	120°58'	30°55'	2	棕红	Z511	宁波宁海	121°15'	29°17'	416	棕红
Z121	嘉兴平湖	121°07'	30°42'	11	棕红	Z522	宁波奉化	121°18'	29°34'	466	棕红
Z122	嘉兴平湖	121°08'	30°42'	19	棕红	Z523	宁波奉化	121°12'	29°41'	547	棕红
Z123	嘉兴平湖	121°09'	30°42'	1	棕红	Z531	宁波鄞州	121°39'	29°38'	97	棕红
Z131	嘉兴海盐	120°49'	30°30'	0	棕红	Z551	宁波江北	121°31'	29°58'	114	黄
Z132	嘉兴海盐	120°49'	30°30'	10	棕红	Japan1	日本京都	135°43'	35°10'	0	棕红*

* 代表叶面光滑;未标注*代表叶面粗糙

* represent the leaves are glossy, Unlabeled * represent the leaves are rough

表2 SRAP引物序列

Table 2 The sequence of SRAP primers

编号 Code	正向引物序列 Forward primer sequence	编号 Code	反向引物序列 Reverse primer sequence
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTG
Me9	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em9	GACTGCGTACGAATTCGA
		Em10	GACTGCGTACGAATTCAG

性 1 min, 50 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 40 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 保存。PCR 反应均在 ABI Veriti™ 基因扩增仪上进行。扩增产物先用 2% 琼脂糖凝胶进行检测, 然后使用 Qsep100™ (BioOptic Inc.) 毛细管电泳分析仪对扩增产物进行分析。为验证榉树 SRAP 分子标记 PCR 体系的稳定性和重复性, 试验对 4 个 DNA 样本, 13 对引物进行了重复性试验(本研究列出 2 对引物结果)。生物学重复采用不同年份采集同一无性系叶片提取 DNA 作为模板进行试验, 技术重复采用同一批次 DNA 作为模板重复 2 次 PCR 反应进行试验。

1.5 数据处理与分析

使用 BiOptic 公司的 Q-Editor 1.4.8 分析软件对毛细管电泳图像结果进行处理; 去除杂峰, 设定统一 Marker, 设置峰强度阈值; 每对引物生成一份图像模拟文件和显示包括片段长短、荧光强度和峰度面积

在内的数字文件; 在 EXCEL 里将所有读数排列匹配, 将 100 ~ 800 bp 区间的片段根据条带的有无转化成“0, 1”矩阵文件。用软件 NTSYS 2.1.0e 计算单株间遗传距离和遗传相似性系数, 采用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 检测结果和 PCR 反应体系的确定

本试验采用 BioTeke 试剂盒提取榉树叶片的基因组 DNA, 经 NanoDrop 分光光度计和 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和浓度。结果显示: 70 个榉树样本 DNA 的 OD260/280 值介于 1.63 ~ 1.89, OD260/230 值介于 1.8 ~ 2.06, 样品浓度在 91 ~ 243 ng/μL 之间, 琼脂糖凝胶电泳点样清晰, 样品条带完整、明亮、无拖尾(图 1), 满足 SRAP 分子标记后续试验对 DNA 纯度和浓度的要求。

本试验的 PCR 反应体系采用了 BioTake 的 MasterMix 反应液, 该试剂是较为稳定的反应溶液, 只需加入 DNA 模板和上下游引物即可。为了验证该体系在试验中的稳定性, 本试验设定不同模板、不同引物进行了多次重复, 并对模板浓度进行了梯度检测, 以确立最佳反应体系。试验结果显示: 20 μL 反应体系中, 模板浓度在 50 ~ 100 ng 之间扩增出的条带较为稳定、清晰(图 2), 50 ng 可以满足试验要求。用 6 个模板, 2 对引物对 2 个反应程序的测试结果显示: 程序(1)扩增出的条带多且清晰, 效果较好(图 3)。说明延长 72 °C 延伸时间不仅有利于增加扩增条带数, 而且更稳定; 而在延伸时间较短的情况下, 即使增加循环次数也不能得到更多的 PCR 产物。在确定反应体系和程序的情况下, 生物重复和技术重复的结果也验证了该反应体系的稳定性(图 4)。

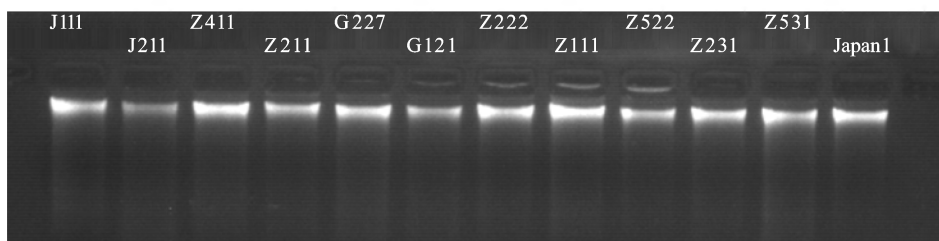
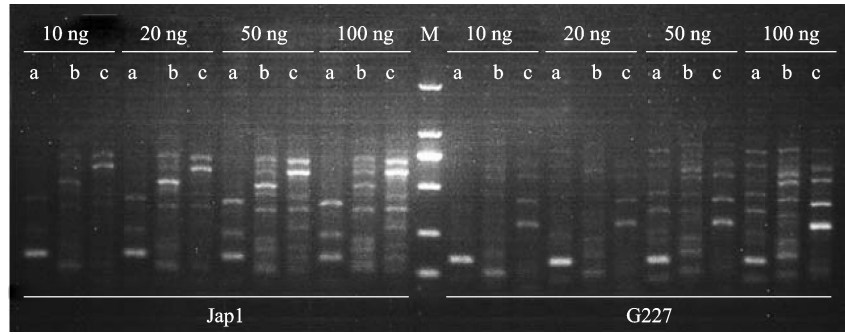


图1 榉树 DNA 琼脂糖凝胶电泳图

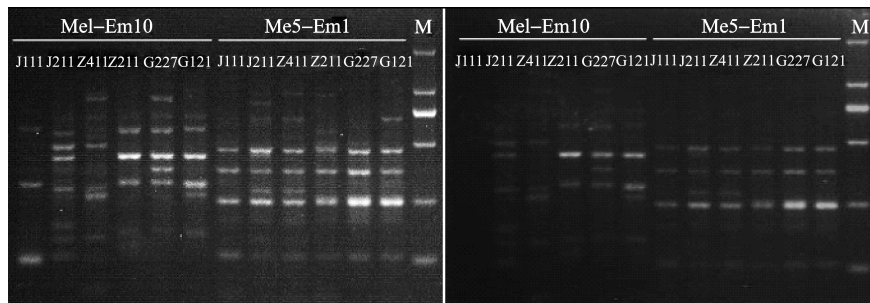
Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of DNA samples of *Zelkova schneideriana*



a: Me9-Em8, b: Me9-Em9, c: Me1-Em2, M: Marker

图 2 不同浓度 DNA 模板对 PCR 扩增影响

Fig. 2 Effect of different concentration of DNA template on PCR



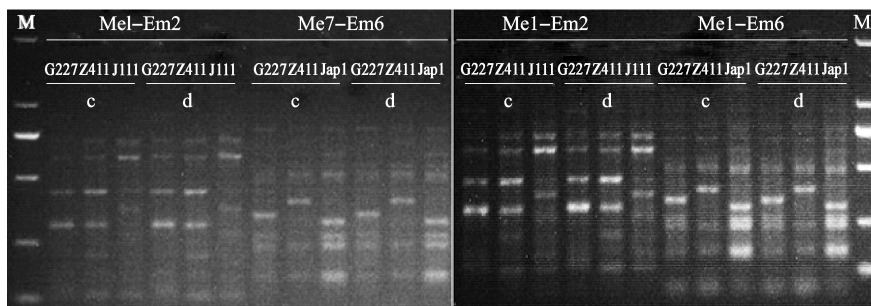
(1)

(2)

(1)、(2):程序编号 (1)、(2):Procedure No.

图 3 SRAP-PCR 反应程序的影响

Fig. 3 Effect of the procedure on SRAP-PCR system



a

b

a, b:生物重复编号; c, d:技术重复编号

a, b:Biological repetition No. , c, d:Technical repetition No.

图 4 PCR 体系技术重复和生物重复结果

Fig. 4 Result of technological and biological repetition of PCR system

2.2 SRAP 引物筛选

选用多个榉树样本,对 90 对 SRAP 引物进行初筛和复筛,最终筛选出 13 对多态性好、扩增稳定的 SRAP 引物组合。扩增条带多分布在 100 ~ 500 bp 之间,13 对引物组合 70 个榉树样本获得总条带 2276 条,平均每对引物产生 175 个条带。本试验中,由于试验样本均为间隔地区较远的散生单株,测试样本较多,且毛细管电泳具有超高的分辨率和灵敏度(分辨率达到 1 bp),因此,每对引物的多态性比率均达到 100%。筛选出的 13 对 SRAP 引物组合在采

用毛细管电泳技术的情况下,任何一对均能够将试验中所有样本区分开来。

2.3 榉树优良单株指纹图谱构建

根据各对引物的多态性比率、稳定性、有效等位点数和毛细管电泳胶图分离程度,筛选出 Me9-Em8 和 Me7-Em6 两对引物对 70 个榉树种源构建标准指纹图谱。对生成的电子图进行图像处理:第 1 步,根据每对引物扩增条带数字文件中的浓度、峰图面积、峰起始和结束间隔大小,结合峰图显示,设定峰光滑度为 2 ~ 5,峰阈值为 20% ~ 30%,峰清晰度为

5~10,达到去掉弱表达带、提高分辨率的目的;第2步,将样品 marker 标准化,根据样品中的荧光标记将样品条带与参照 marker 两端拉齐,确保不同批次样品迁移率的一致性,对每个样品进行计算赋值;第3

步,调整图像对比度,使显示图像与处理后的可读带一一对应,最终形成榉树优良单株的 DNA 指纹图谱(图 5)。

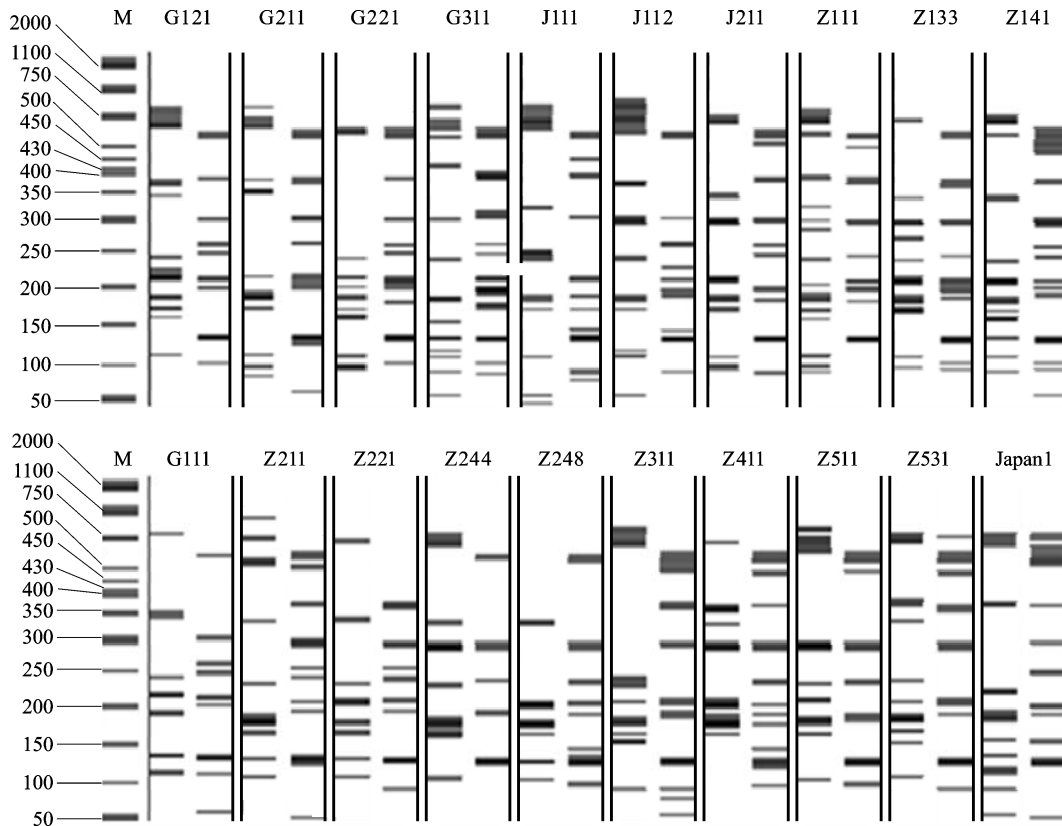


图 5 部分榉树优良单株标准 DNA 指纹图谱

Fig. 5 The standard DNA fingerprint of some superior individuals of *Z. schneideriana*

2.4 榉树优良单株聚类分析

采用 UPGMA 方法进行聚类,对 70 个榉树优良单株进行遗传聚类分析(图 6)。遗传距离的变化范围为 0.0078~0.3772,平均值为 0.0629;遗传相似系数在 0.9218~0.9565 之间,平均值为 0.9339。在遗传相似系数 0.932 处(L1),采集到的种源可分为 3 类:第 I 类包括贵、赣的全部种源和浙江的大部分种源共 65 个;第 II 类包括浙江宁波奉化、鄞州的 3 个种源;第 III 类有 2 个种源,分别为宁波江北和日本的两个种源。与采集到的常规性状数据相对应,第 II 类中的 3 个种源和第 III 类中江北的母树均为胸径达到 1 m 以上的古树,推测树龄在 150 年以上,可能这是分支较早的原因;而日本种源则由于地理分隔的原因分支较早。第 I 类在相似系数 0.935 处(L2)可以分为 3 个亚类,具有明显的地域分布,第 I-1 亚类包括除铜仁外贵州的全部 19 个种源,第 I-2 亚类包括贵州铜仁、江西全部和浙江嘉兴的部

分种源共 18 个;第 I-3 亚类的 33 份均为浙江的种源。在相似系数 0.938 处(L3),这 3 个亚类又可划分为 7 个组,各组间种源的聚类除了具有地域性,还表现出与同一分布地海拔、秋季叶色以及叶片粗糙程度的相关性。如黔西南望漠地区的 6 个单株分属 2 个组(第 1 组 G211~G213、第 2 组 G214~G216),其种源地在经纬度相似的情况下,海拔高度差异显著;第 3 组中的 4 个单株虽然分属贵州(G311 和 G312)和江西(J111 和 J112),但与同一地区的其他单株相比,叶片较为光滑,变色期更晚;第 6 组 Z242 的秋色叶为棕红色,而同属金华磐安的第 7 组(Z243~Z249)秋色叶均为黄色。

3 讨论

榉树在材用、药用、防护、园林和文化等多方面都具有利用价值^[21],由于资源开发利用过度,资源量急剧减少处于濒危状态。对榉树资源的保护,一

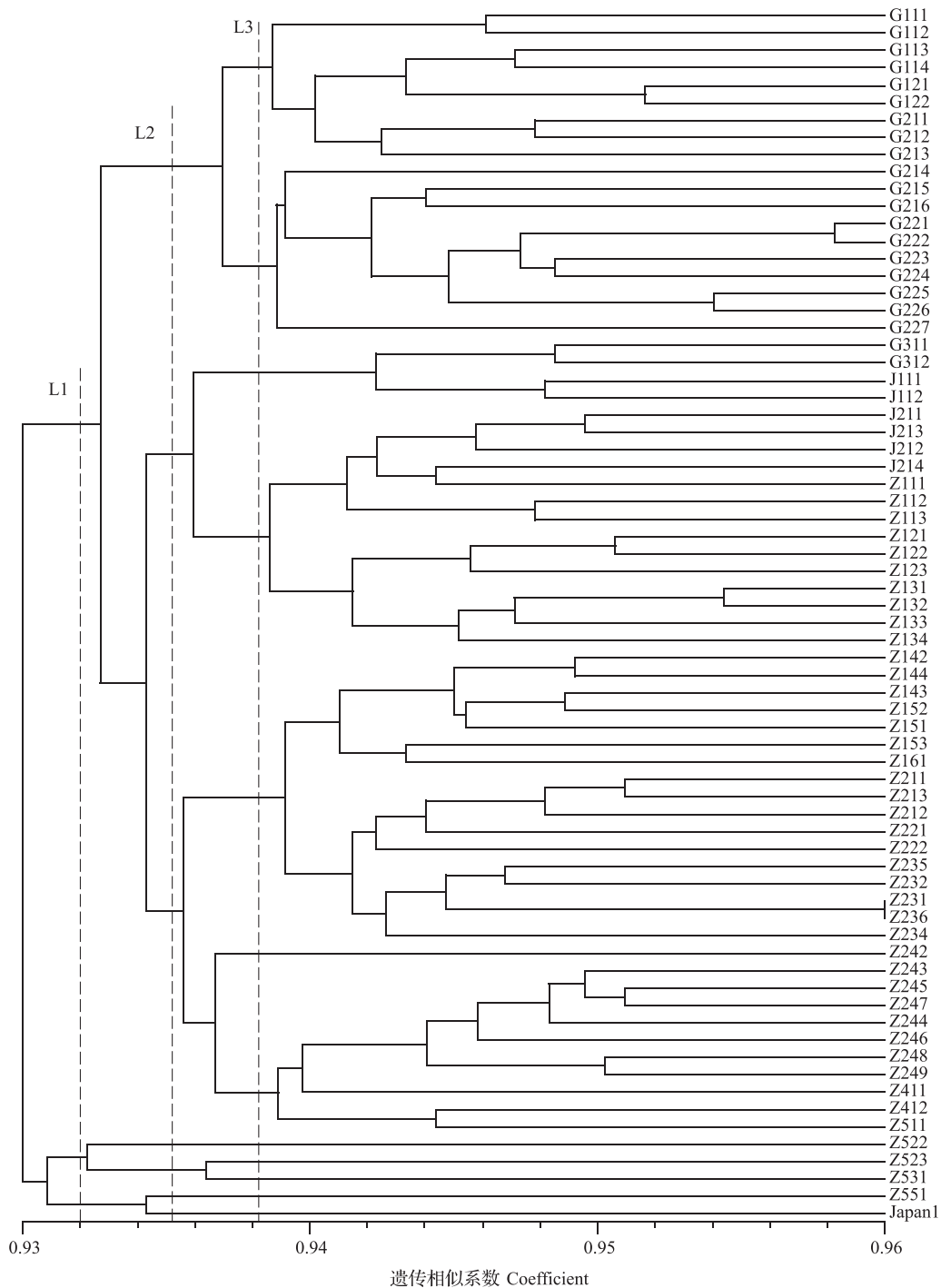


图 6 基于 Nei's 遗传相似系数的 SRAP 聚类图

Fig. 6 SRAP dendrogram for cluster based on Nei's genetic similarity coefficient

方面采取就地保护措施保护榉树的栖息地环境;另一方面,要开展榉树遗传学、育种学和栽培学研究^[22]。榉树种质资源库可以为榉树基因资源的保存,良种繁育,丰富杂交亲本的遗传多样性,培育新品种提供研究平台。为了更好地利用这一种质资源平台,本研究构建了榉树 SRAP 分子标记体系,在营建种质资源库的同时为引入的每一份优良单株无性系建立 DNA 指纹图谱档案,并且对引入种源的遗传

多样性进行了评估和聚类分析。该工作在今后开展榉树遗传多样性分析、亲缘关系鉴定、分子标记辅助育种以及品种鉴定和保护等方面具有重要的作用。

3.1 榉树 SRAP-PCR 反应体系建立和指纹图谱构建

通过试验,本研究确定了榉树 SRAP-PCR 反应体系: DNA 模板浓度 50 ng, 10 μmol/L 上下游引物各 2 μL, MasterMix 10 μL, 总体积为 20 μL。反应程

序为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,35℃退火1 min,72℃延伸1.5 min,5个循环;然后94℃变性1 min,50℃退火1 min,72℃延伸1.5 min,35个循环;72℃延伸10 min;4℃保存。使用SRAP分子标记构建的指纹图谱,在进行种源鉴定时,可以使用Me9-Em8和Me7-Em6这2对引物扩增DNA,经毛细管电泳检测产物,将产生的图与标准指纹图谱比对,可鉴定出检测样品来自哪一种源;或者将生成的碱基长度文件在EXCEL里根据公式转化成0,1文件与所有品种聚类,从而迅速找出相同类群。本试验采用SRAP分子标记,结合使用MasterMix试剂和毛细管电泳技术,大大提高了榉树指纹图谱的准确性和稳定性。经验证,采用本体系构建的指纹图谱,鉴定准确率达到95%以上。

3.2 榉树优良单株遗传多样性和聚类分析

本研究中,采用毛细管电泳技术,13对SRAP引物扩增出2276个条带,多态性百分率达到100%。70个榉树优良单株的遗传相似系数在0.9218~0.9565之间,遗传距离平均值为0.0629,说明这些榉树优良单株的遗传相似程度比较高,遗传距离小,亲缘关系近,说明各单株种间杂交成功的可能性较大,为种质资源库中榉树杂交育种工作提供了理论支持。

利用SRAP分子标记的扩增结果,通过NTSYS软件获得的70个单株聚类分析图显示,L1层次和L2层次聚类结果与榉树生长的时间和地理位置有较大相关性。如宁波奉化、鄞州和江北的榉树单株均为树龄百年以上的古树无性系,聚类分析显示这几个单株与其他单株间的遗传差异较大;而浙江宁波地区的榉树单株与日本的榉树单株聚在了一起,与其他地区相比,在地理位置上这二者的距离最近,仅隔东海。此外,L3层的分析结果显示,榉树种源聚类还依次与其分布的经纬度、海拔,叶面光滑程度,秋季叶色等数据相关,这与曹娴^[23]使用ISSR分子标记分析得出的榉树叶片表型与聚类结果相似的结论一致。赵旺兔等^[24]的研究发现秋季叶色不同的榉树叶解剖结构存在一定差异,表现在叶绿体降解速度显著不同,推测这一性状可能与叶片衰老基因启动时间不同有关,表明榉树在长期的进化过程中已经形成了性状稳定的不同品系。在今后的研究中,进一步扩大繁殖榉树优良单株数量,搜集榉树重要表型性状数据,采用SRAP分子标记进行关联分析,有望检测到一批与榉树重要经济、观赏性状相关

的分子标记,对于开展榉树新品种选育、分子标记辅助育种和克隆控制优异性状的相关基因具有重要意义。

参考文献

- [1] 郑万钧. 中国树木志[M]. 北京:中国林业出版社,1997
- [2] 方元平,葛继稳,项俊,等. 国家二级重点保护植物榉树的开发利用[J]. 中国野生植物资源,2002,21(5):20-21
- [3] 金晓玲. 榉树的生物学特性和微繁技术研究[D]. 长沙:中南林学院,2003
- [4] 刘勋成,李玉媛,陈少瑜. 不同榉树种源遗传多样性的ISSR分析[J]. 西部林业科学,2005,34(2):43-47
- [5] 杨婧. 中国林木种质资源DNA指纹图谱构建现状[J]. 北京农业,2012(15):157-158
- [6] 梅洪娟,马瑞君,庄东红. 指纹图谱技术及其在植物种质资源中的应用[J]. 广东农业科学,2014(3):159-164
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theor Appl Genet,2001,103:455-461
- [8] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. Theor Appl Genet,2003,107(2):271-282
- [9] Li G, McVetty P B E, Quiros C F. SRAP molecular marker technology in plant science[J]. Plant Breeding from Laboratories to Fields,2013,2:23-43
- [10] 徐宗大,赵兰勇,张玲,等. 玫瑰SRAP遗传多样性分析与品种指纹图谱构建[J]. 中国农业科学,2011,44(8):1662-1669
- [11] Guo D, Zhang J, Liu C, et al. Genetic variability and relationships between and within grape cultivated varieties and wild species based on SRAP markers[J]. Tree Genet Genomes,2012,8:789-800
- [12] 周冬琴,莫海波,芦治国,等. 基于SRAP标记的墨西哥落羽杉优良单株的遗传多样性分析[J]. 植物资源与环境学报,2012,21(1):36-41
- [13] 员涛,颜璐茜,李佳蔓,等. 西南地区乡土杨树遗传变异的SRAP分析[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(4):836-841
- [14] 李楠,柳新红,李因刚,等. 白花树天然群体的遗传多样性[J]. 林业科学,2012,48(11):49-56
- [15] 黄勇. 基于SRAP分子标记的小果油茶遗传多样性分析[J]. 林业科学,2013,49(3):43-50
- [16] 王春春,冯健,陈罡,等. 31个种源东部白松SRAP指纹图谱分析[J]. 辽宁林业科技,2011(6):5-7
- [17] 杨会肖,刘天颐,罗锐,等. 用SRAP标记构建松树良种指纹图谱方法的研究[J]. 广东林业科技,2012,28(5):1-8
- [18] Feng F, Chen M, Zhang D, et al. Application of SRAP in the genetic diversity of *Pinus koraiensis* of different provenances[J]. Afr J Biotechnol,2009,8(6):1000-1008
- [19] 赵旺兔. 榉树生物学特性及园林应用研究[D]. 南京:南京林业大学,2003
- [20] 刘雪梅,胡希军,罗雪梅,等. 榉树秋季叶色变化类型和生长特性[J]. 经济林研究,2014,32(1):121-125
- [21] 胡红泉,崔同林. 珍贵树种榉树的生物学利用价值及繁育技术[J]. 安徽农学通报,2011,17(15):79-80
- [22] 曹娴,罗玉兰,崔心红,等. 榉树遗传变异分析及优良单株选择[J]. 上海交通大学学报:农业科学版,2010,28(6):499-503
- [23] 曹娴. 草莓抗灰霉病基因定位及榉树种质资源多样性的ISSR分析[D]. 上海:上海交通大学,2011
- [24] 赵旺兔,彭冶,丁雨龙. 榉树叶解剖构造和叶肉细胞超微结构的观察[J]. 植物资源与环境学报,2003,12(2):52-57