

杨树新杂种的 SSR 分析及鉴定

刘春英, 樊军锋*, 高建社, 周永学, 魏 宁

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:以 2 个杨树杂交新品种(编号分别为:02-9-22,02-12-29)及其亲本和毛白杨无性系 30 号为材料,从 36 对 SSR 引物中筛选出在杂交新品种双亲之间多态性明显、重复性比较好的 12 对引物,用于杨树的遗传变异分析。共扩增出 125 个 DNA 片段,其中 111 个片段呈现多态性,占总扩增片段的 88.8%,片段大小介于 80~1 000 bp 之间。基因型间的平均遗传相似系数为 0.445 9。聚类分析结果表明,杂交种与亲本的亲缘关系较近,与毛白杨 30 号的亲缘关系较远。选用 3 对引物构建 5 个杨树品种的指纹图谱,在该图谱中,每个品种都有自身独特的片段。

关键词:杨树;杂交种;SSR;品种鉴定;指纹图谱

中图分类号:S792.110.4

文献标志码:A

文章编号:1001-7461(2013)02-0070-04

Simple Sequence Repeat Analysis and Identification of New *Populus* Hybrid

LIU Chun-ying, FAN Jun-feng*, GAO Jian-she, ZHOU Yong-xue, WEI Ning

(College of Forestry, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Analysis of genetic variations was carried out by using genomic DNA of two new *Populus* hybrid cultivars (Code:02-9-22 and 02-12-29) and their parents as materials, and simple sequence repeat (SSR) molecular technology was adopted. *Populus tomentosa* 30 was used as control. Among 36 pairs of SSR primers, 12 pairs of primers which presented apparent polymorphism between the parents were determined to analyze genetic diversity for *Populus* cultivars. Fragments of 125 DNA were amplified, of which 111 were polymorphic (accounting for 88.8% of the total). Fragment size ranged from 80 to 1 000 bp. The average genetic similarity between the genotypes of the cultivars was 0.445 9. Cluster analysis showed that high similarity coefficient existed between new *Populus* hybrid cultivars and their parents. However, low similarity coefficients were found between the two hybrids and *P. tomentosa* 30. Three pairs of primers were selected to construct DNA fingerprints of 5 *Populus* cultivars. In this fingerprint, every cultivar had special fragment.

Key words: poplars; hybrid; SSR; cultivar identification; fingerprint

杨树是防护林、水土保持林、四旁绿化、速生丰产林及短周期工业用材林的重要树种。我国杨属植物约有 50 多种^[1],近年来,随着杨树育种工作的蓬勃发展,杨树育种工作者先后引进、选育出杨树新品种就有 50 多个^[2],但在同一大类不同无性系间形态特征差异很小,因此很难通过形态特征进行区分,这样不仅影响到品种的进一步遗传改良,也影响到良

种的正确应用。因此,准确地鉴别杨树品种或无性系,正确保护和利用遗传资源,为避免混乱和保护育成品种的知识产权及育种家的权益,应用分子标记技术对杨树鉴定进行研究,建立可靠的杨树品种或无性系分类和鉴定体系具有重要的意义^[3-4]。

本研究中 2 个白杨新杂种(编号分别为:02-9-22,02-12-29)是西北农林科技大学林学院从白杨派

收稿日期:2012-05-20 修回日期:2012-09-12

基金项目:“十二五”农村领域国家科技计划专题:“超高产优质毛白杨新品种选育”(2012BAD01B0302)。

作者简介:刘春英,女,硕士研究生,主要研究方向:林木遗传育种林业生物技术。E-mail:liuchy87@163.com

* 通信作者:樊军锋,男,研究员,主要研究方向:林木遗传育种。E-mail:fanjf28@163.com

种间杂交育种材料中新近选育出来的优良白杨杂种。其母本银白杨 I-101 杨(*Populus alba*)从意大利引进,父本 84K 杨(*P. alba*×*P. glandulosa*)从南韩引进。毛白杨无性系 30 号^[5]与 2 个杂交新品种的形态特征相似而不易区分,因此作为对比进行鉴别。SSR 分子标记具有高度的重复性和可靠性,易于操作,被认为是目前最好的分子标记,已成功地应用于指纹分析和构建遗传连锁图谱、基因定位、种子纯度检测、植物进化及遗传多样性的研究中^[6]。本试验利用 SSR 分子标记对杨树新品种进行鉴定研究,为将来的林木品种鉴定和育种工作提供科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究材料来自西北农林科技大学林学院试验站,分别为 2 个杨树杂交新品种(编号分别为:02-9-22,02-12-29)及其亲本(母本:银白杨 I-101;父本:84K)和毛白杨无性系 30 号。

1.2 DNA 的提取

2012 年 3 月初,采集各杨树品种 1 年生苗干,进行室内水培。取其幼叶,置于液氮中冷冻,研磨,采用改良的 CTAB 法^[7-8]提取基因组 DNA,检测 DNA 浓度并稀释为 30 ng/μL,−20℃冰箱储存备用。

1.3 SSR 分析

1.3.1 引物来源 SSR 分析中所用的 36 对引物^[9-11]分布在杨树 19 条染色体上^[12],SSR 所有引物由北京英骏生物技术公司合成。

1.3.2 PCR 反应体系及扩增程序 PCR 反应总体系为 20 μL,其组成为 10 μL 2×Tap MasterMix(购自康为世纪),前段和末端引物 25 pmol/μL 各 1 μL,模板 DNA 1 μL,RNase-Free Water 7 μL。反应在 Bio-S1000 热循环仪上进行,PCR 扩增程序为:95℃预变性 8 min,94℃变性 30 s,52℃复性 30 s,

72℃延伸 50 s,40 个循环,最后一个循环结束后 72℃延伸 7 min,最后 4℃保存。在反应程序中,由于不同的引物其退火温度不同,因此不同的引物 PCR 时其退火温度有相应的变动。

1.3.3 PCR 产物检测 在扩增结束后,灌制 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶,取 5 μL 扩增产物上样,250 V 稳压电泳,电泳 120 min。电泳结束后,剥胶银染显色,染色过程在低速转动的水平摇床上进行,步骤为:1)10.0%乙醇+0.4%冰乙酸固定 25 min;2)蒸馏水冲洗 2 次,每次 3 min;3)0.1%硝酸银+0.1%甲醛轻摇染色 25 min;4)蒸馏水冲洗,但时间不要超过 5 s;5)1.5%氢氧化钠+0.2%甲醛显色,直至显现清晰条带,倒掉显色液;6)用蒸馏水冲洗 2 次,每次 3 min,终止显色,照相分析^[13]。

1.4 数据处理

1.4.1 条带统计 电泳结果采用 0,1 系统记录谱带位置。观察某一引物扩增条带的有无,有带记为 1,无带记为 0。选取引物扩增带型相对分布均匀、间距较大、清晰、肉眼可辨的主带为主要指纹参考带型。

1.4.2 数据分析 按 NEI 的方法计算品种间的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD),公式为:

$$GS=2a/(2a+b+c),GD=1-GS$$

式中:*a* 为 2 个品种共有的多态性条带数,*b* 为 *X* 品种特有条带数,*c* 为 *Y* 品种特有条带数。

利用 NTSYSpc2.10 软件进行各品种间的 UP-GMA 的聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性引物的筛选

用分布在杨树 19 条染色体上的 36 对 SSR 标记引物,对 2 个亲本 I-101 和 84K 的基因组 DNA 进行扩增,挑选出 12 对多态性高、清晰且稳定的引物对供试材料进行扩增(表 1),扩增结果经电泳得到指纹图谱。

表 1 SSR 引物名称及序列
Table 1 Sequence of SSR primer

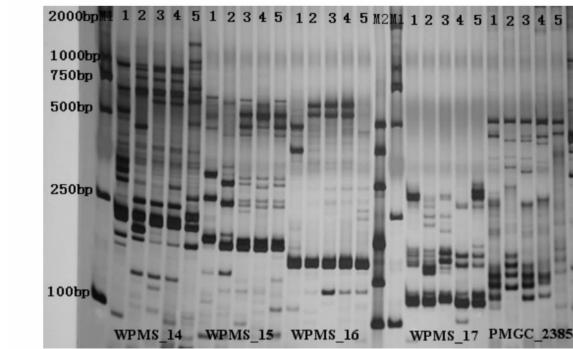
引物名称	引物序列(5'-3')	
PMGC_2385	ATTCTTCACCTGGGCAATATG	CTTGGCTGTAAATGACGAGTC
PMGC_2885	CATGATCAAATTGGATTTGAATG	AAAGATGAACATGGCTAGCTC
PMGC_2501	CACAGGACGTTTTGGAGCAG	AATTTCGACAGTCAGTCACC
PMGC_2839	AACCCATAGCAAGAAGCTAG	CAATTACCGAAGAGGATTACTG
ORPM_15	CGTGAGTTTTGAGGCCATTT	CATGGAAAGGATCACCCACT
ORPM_30	ATGTCACACCCAGATGACA	CCGGCTTCATTAAGAGTTGG
ORPM_210	TGACCATTTTGTGGGACAG	TAAGGGGCTCAGTTATGCAC
ORPM_276	GCAGGAGAAAAACACCAGGAA	TCGCGAAAGAGAAGAAAAGC
WPMS_14	CAGCCGCAGCCACTGAGAAATC	GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC
WPMS_15	CAACAAACCATCAATGAAGAAGAC	AGAGGGTGTTGGGGGTGACTA
WPMS_16	GCCTGCTGAGAAGACTGCCTTGAC	AGATTATTAGGTGGGCCAAGGACT
WPMS_17	ACATCCGCCAATGCTTCGGTGTTT	GTGACGGTGGTGCGGATTTTCTT

2.2 SSR 扩增结果分析

通过对扩增图谱的统计分析,所选的 12 对引物,共扩增出 125 条 DNA 条带。其中,多态性条带 111 条,占总条带的 88.8%;特异性条带 41 条,特异性条带率 32.8%(表 2),每对引物扩增的条带数在 6~15 条之间,平均 10.4 条。扩增出的条带大小在 80~1 000 bp 之间(图 1)。通过本试验所选出的 12 对引物中 PMGC_2385、PMGC_2501、WPMS_14、WPMS_15、WPMS_17、ORPM_15 共 6 对引物可将所有的品种区分开。其他引物虽然不能将所有品种区分开,但可利用不同引物在品种间的扩增多态性,采用不同的引物组合进行鉴别区分。

表 2 12 对 SSR 引物的扩增情况

Table 2 Amplifications of 12 pairs of SSR primers					
引物名称	扩增条带数	多态性条带数	特异性条带数	多态性条带率/%	特异性条带率/%
PMGC_2385	11	10	4	90.91	36.36
PMGC_2885	11	10	3	90.91	27.27
PMGC_2501	9	9	4	100.00	44.44
PMGC_2839	7	5	0	71.43	0.00
ORPM_15	6	6	3	100.00	50.00
ORPM_30	12	11	6	91.67	50.00
ORPM_210	11	7	3	63.64	27.27
ORPM_276	9	8	2	88.89	22.22
WPMS_14	15	13	8	86.67	53.33
WPMS_15	13	13	2	100.00	15.38
WPMS_16	7	6	2	85.71	28.57
WPMS_17	14	13	4	92.86	28.57
总计	125	111	41	88.80	32.80



注:1:银白杨 I-101;2:84K;3:02-9-22;4:02-12-29;
5:毛白杨 30 号,图 3 同。
M1:DNA 分子量标准(DM2000);M2:DNA 分子量标准(DM500)。

图 1 杨树品种的基因组 DNA 指纹图谱

Fig. 1 Genomic DNA fingerprints of *Populus* varieties

2.3 杨树品种(无性系)的聚类分析

将杨树 SSR 扩增结果统计的 0,1 矩阵,输入到 NTSYSpc2. 10,计算出各品种的遗传相似系数和遗传距离(表 3)。12 对引物标记获得相似系数中,各个品种之间的相似系数分布在 0.18~0.71 之间,平均遗

传相似系数为 0.4459。2 个杂交种的遗传相似系数最大为 0.71,说明 2 个杂交种之间遗传差异较小,亲缘关系近。2 个杂交种与父本 84K 的遗传相似性要比 I-101 大,说明 2 杂交种与父本 84K 的亲缘关系较近。作为对比的毛白杨 30 号,与其他 4 个品种的遗传关系都较远。利用 NTSYSpc2. 10 按 UPGMA 法作出 5 个品种的聚类树状图(图 2)。树状图中可以直观地看出各品种之间的遗传关系的远近。

表 3 杨树各品种之间遗传相似系数
(下三角)和遗传距离(上三角)

Table 3 Genetic similarity(lower triangular) and genetic distance upper triangular) of *Populus* varieties

杨树品种	I-101	84K	02-9-22	02-12-29	毛白杨 30 号
I-101	* * *	0.790 5	0.468 9	0.436 7	0.815 0
84K	0.209 5	* * *	0.420 5	0.347 0	0.692 0
02-9-22	0.531 1	0.579 5	* * *	0.285 2	0.631 4
02-12-29	0.563 3	0.653 0	0.714 8	* * *	0.653 8
毛白杨 30 号	0.185 0	0.308 0	0.368 6	0.346 2	* * *

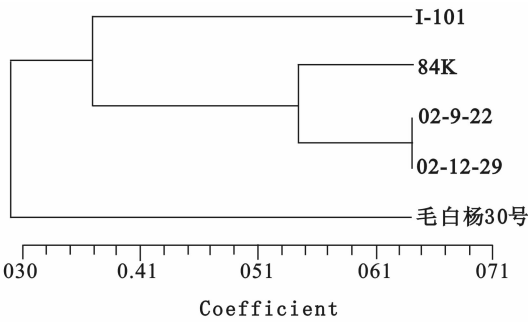


图 2 5 个杨树材料的树状聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 5 *Populus* genotypes from cluster analysis

2.4 杨树品种的 DNA 指纹图谱的构建

选用 WPMS_14、WPMS_15 和 ORPM_15 共 3 对引物,对 5 个杨树品种进行扩增反应,根据 SSR 的电泳结果,选取条带清晰、间距均匀、易于辨认的条带进行统计,以 DNA 标准分子量为对应,构建了 5 个品种的 SSR 指纹图谱(图 3)。在该指纹图谱中,每个品种都有特异的条带与其他品种进行区分。

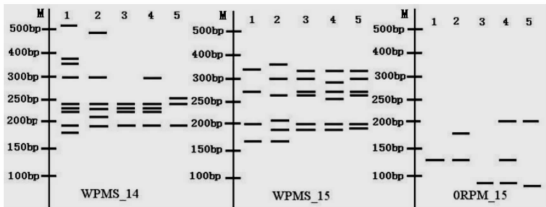


图 3 利用 3 对引物构建的 5 个
杨树材料的 DNA 指纹图谱

Fig. 3 DNA fingerprints of 5 *Populus* varieties obtained by 3 pairs of primers

3 结论与讨论

本研究从分布于杨树 19 条染色体上的 36 对 SSR 引物中选取了 12 对扩增条带清晰、分布均匀、易于辨认的引物。利用这 12 对引物对 5 个杨树品种进行遗传变异分析,共得到 125 个位点,其中多态性位点 111 个,多态性条带率为 88.8%,说明杨树各供试品种之间的遗传差异较小。聚类分析结果表明,2 个新杂交种的遗传相似性较大,与父本 84K 较之与母本的亲缘关系更近一些。本研究中利用 12 对引物对于分析杨树各品种间的遗传关系可能具有一定的局限性,采用越多的引物得到的结果可能越准确,但 12 对引物可足够用于构建杨树指纹图谱和品种鉴定。虽然毛白杨 30 号与两个新杂交种形态上不易区分,但通过分子标记扩增的指纹图谱可将其进行区分,其中,聚类分析结果也表明,毛白杨 30 号与 2 个杂交种的亲缘关系较远,即有明显的遗传差异。利用 WPMS_14 引物构建的 5 个杨树品种的指纹图谱中,2 个杂交种条带均远远少于其 2 个亲本,可能是该位点染色体结构发生了缺失、插入或易位突变,从而使得 WPMS_14 引物在杂交种中扩增的 DNA 片段数量减少。指纹图谱的构建可以为生产上杨树品种的真实性鉴定提供参考依据,避免品种混杂,更好地保护和利用遗传资源。

SSR 广泛地分布于基因组中,能代表一定的基因组特征,因此 SSR 标记作为一种有效的分子鉴定技术应用于品种的鉴别研究。谭君等构建了西南常用玉米自交系 SSR 指纹图谱,其中运用 6 对引物组合可将所有供试的自交系区分开^[14]。现在杨树品种繁多,有的品种仅凭形态特征不易区分,因此新品种权纠纷案件也时常发生,使品种权人的权益得不到及时的保护而失去植物新品种保护的意义。因此,利用本研究筛选的引物对杨树品种进行 SSR 指纹图谱的鉴别分析,从而确定杨树品种的归属权。

参考文献:

[1] 姜岳忠,李善文,秦光华,等. 黑杨派无性系区域化试验初报[J]. 林业科学,2006,42(12):143-147.

JIANG Y Z,LI S W,QIN G H,*et al.* Regional Test of *poplar* clones in section aigeiros[J]. Scientia Silvae Sinicae,2006,42(12):143-147. (in Chinese)

[2] 王印肖,徐秀琴,韩宏伟. 分子标记在品种鉴定中的应用及前景[J]. 河北林业科技,2006,9:46-49.

[3] 张德强,张志毅,杨凯. 杨树分子标记研究进展[J]. 北京林业大学学报,2000,22(6):79-84.

ZHANG D Q,ZAHNG Z Y,YANG K. Advances of molecular marker researches in poplar[J]. Journal of Beijing Forestry U-

niversity,2000,22(6):79-84. (in Chinese)

[4] 黎云昆. 植物新品种保护与种植业产业的发展[J]. 西北林学院学报,2003,18(1):104-108.

LI Y K. Protection of new varieties and development of growing industry[J]. Journal of Northwest Forestry University,2003,18(1):104-108. (in Chinese)

[5] 樊军锋,周永学,高建社,等. 陕西杨树育种历史及展望[J]. 西北林学院学报,2004,19(2):77-81.

FAN J F,ZHOU Y X,GAO J S,*et al.* Historical review of *Populus* breeding achievements of Shaanxi Province and its future breeding sStrategy[J]. Journal of Northwest Forestry University,2004,19(2):77-81. (in Chinese)

[6] 吕学辉,李根前. SSR 分子标记及在林木基因组中的应用[J]. 山东林业科技,2011(5):57-60.

LV X H,LI G Q. SSR molecular maker and its application in forest tree genomics[J]. Shandong Forestry Science and Technology,2011(5):57-60. (in Chinese)

[7] 高建明. 杨树植物的 ISSR 与 AFLP 的指纹分析及应用研究[D]. 天津:南开大学,2006.

[8] 陈艺,郭军战,李辉,等. 15 个果桑无性系指纹图谱的构建[J]. 西北林学院学报,2011,26(6):62-65.

CHEN Y,GUO J Z,LI H,*et al.* Fingerprints construction of 15 fruit mulberry (*Morus* spp.) clone[J]. Journal of Northwest Forestry University,2011,26(6):62-65. (in Chinese)

[9] TUSKAN G A,GUNTER L E. Characterization of microsatellites revealed by genomic sequencing of *Populus trichocarpa* [J]. Canadian Journal of Forest Research,2004,34(1):85-93.

[10] VAN DER SCHOOT J,POSPISKOVA M,VOSMAN B.,*et al.* Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.)[J]. Thoer. Appl. Genet,2000,101(1-2):317-322.

[11] SMULDERS M J M,VAN DER SCHOOT J,ARENS P,*et al.* Trinucleotide repeat microsatellite markers for black poplar (*Populus nigra* L.)[J]. Molec. Ecol. Notes,2001,1(3):188-190.

[12] ISABELLA P,MURIEL G,VeRONIQUE J,*et al.* Genetic linkage maps of *Populus alba* L. and comparative mapping analysis of sex determination across *Populus* species[J]. Tree Genetics & Genomes,2010(6):863-875.

[13] 王文洁,周联东,郭玉霞,等. 构建玉米新品种新科 19 指纹图谱的 SSR 引物筛选[J]. 湖北农业科学,2011,50(17):3635-3636.

WANG W J,ZHOU L D,GUO Y X,*et al.* Screening SSR primers for fingerprint establishment of maize hybrid Xinke 19[J]. Hubei Agricultural Sciences,2011,50(17):3635-3636. (in Chinese)

[14] 谭君,丁仲芳,孙仕贤,等. 西南常用玉米自交系 SSR 指纹图谱构建[J]. 西南农业学报,2003,16(2):1-6.

TAN J,DING Z F,SUN S X,*et al.* SSR fingerprints of maize inbred-lines widely used in southwest Chinese[J]. Southwest Chinese Journal of Agricultural Sciences,2003,16(2):1-6. (in Chinese)