

130 份优良无性系毛白杨遗传多样性的 AFLP 分析

王彦珍, 张继华, 马荣才, 谢华, 魏建华*

(1. 北京市农林科学院生物技术研究中心, 北京 100097; 2. 北京市农林科学院林业果树研究所, 北京 100093)

摘要 [目的] 为毛白杨种质资源的利用提供依据。[方法] 以 130 个毛白杨无性系为材料, 取新鲜叶片, 提取 DNA, 筛选多态性引物, 进行 AFLP 扩增, 分析所选材料的遗传多样性。[结果] 利用筛选出的 9 对多态性引物对 130 个毛白杨样品进行分析, 扩增片段的长度在 50 ~ 400 bp 之间, 检测到 612 条标记带, 每对引物可扩增出 55 ~ 80 条标记带, 其中多态性标记 210 个, 平均多态性条带 23.33 条, 多态性条带百分率为 34.31%。聚类分析结果表明, 毛白杨的同源性与地理来源无明显关系, 来源相同的毛白杨无性系并没有完全聚在一起。聚类分析结果与材料的系谱关系一致。[结论] AFLP 标记技术能很好地揭示毛白杨的遗传背景和亲缘关系, 为毛白杨种质资源的利用提供依据。

关键词 毛白杨; AFLP 分析; 种质资源

中图分类号 S792.117 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2009)05-01939-03

Analysis on Genetic Diversity of 130 Superior Clones of Chinese White Poplar by AFLP

WANG Yan-zhen et al (Beijing Botechnology Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097)

Abstract [Objective] The aim was to provide the basis for the utilization of the germplasm resources of Chinese white poplar. [Method] With 130 clones of Chinese white poplar as the materials, the DNA was extracted from their fresh leaves. The polymorphic primers were screened out for AFLP amplification and the genetic diversity of the selected materials was analyzed. [Result] 9 pairs screened polymorphic primers were taken to analyze 130 samples of Chinese white poplar, the length of the amplified fragment was 50-400 bp, 612 marked strip were detected and each pairs of primer could amplify 55-80 marked strip, among which the polymorphic marker was 210 and the average polymorphic marker of each pairs of primer amplified was 23.33, the percentage of the polymorphic marker was 34.31%. The result of cluster analysis showed that the homology of Chinese white poplar had no obvious relationship with its geographic origin and the clones of Chinese white poplar from the same area was not all clustered together. The result of cluster analysis was consistent with the genealogical relationships of the material. [Conclusion] The technique of AFLP marker could well reveal the genetic background and genetic relationship of Chinese white poplar, and provide the basis for the utilization of the germplasm resources of Chinese white poplar.

Key words Chinese white poplar; AFLP analysis; Germplasm resources

毛白杨(*Populus tomentosa*)是我国特有的乡土树种,具有材质优良、树干高大通直、树形美观等优点,有重要的经济和生态应用价值,毛白杨不但可用于造纸、建筑及木材工业,而且可用来防风固沙。20世纪80年代初期,我国曾组织科技攻关,开展了全国毛白杨资源的调查与搜集,共收集了包括北京、河北、河南、陕西、山西、安徽等省市的优良无性系毛白杨1000多株,这些毛白杨无性系类型繁多,表型差异丰富,形成了宝贵的毛白杨种质资源库。为了更有效地保存和利用这些品种资源,为选、育种应用提供技术支持和理论依据,笔者利用AFLP方法对其中130份优良毛白杨无性系进行了分析,以期了解这些毛白杨的遗传多样性,为其深入开发利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料 供试毛白杨种植于北京顺义双青农场,共130个毛白杨无性系,其中有21株为雌株,109株为雄株,(北京地区56株,河北省43株,河南省5株,陕西省1株,山西省4株)。

EcoRI、MeI购自TaKaRa公司,AFLP分析所用的EcoRI、MeI接头及引物均由北京奥科生物技术有限责任公司合成。

1.2 方法

1.2.1 样品DNA的提取纯化。取新鲜叶片3g,在液氮中研磨成粉末,用CTAB提取液65℃提取后,用Tris饱和酚氯仿异戊醇(24:24:1)混合液抽提2次,用无水乙醇加醋酸钠

沉淀,70%酒精洗涤沉淀,风干后溶于100 μl TE缓冲液(含RNA酶)。用琼脂糖电泳检查DNA的完整性,用分光光度计检测其浓度。将所有样品稀释至200 ng/μl, -20℃保存备用。

1.2.2 酶切。采用内切酶EcoRI和MeI对DNA样品进行双酶切。反应体系为:模板DNA 2 μl (200 ng/μl),EcoRI酶(2 U/μl) 0.2 μl,MeI酶(2 U/μl) 0.4 μl,5×RL buffer 4 μl,37℃温浴4h,酶切结束后65℃处理样品10 min。

1.2.3 连接。在上述酶切反应体系中分别加入4 μl的如下反应液:EcoRI接头(5 μmol)和MeI接头(50 μmol)各0.4 μl,10 mM ATP 0.4 μl,T₄ DNA连接酶(10 U/μl) 0.08 μl,5×RL buffer 0.8 μl,ddH₂O 1.92 μl,4℃过夜,连接完成后65℃处理样品10 min。

1.2.4 预扩增。采用EcoRI/MOI引物组合,反应体系为20 μl,其中,酶切连接产物2 μl,EcoRI(10 μmol)和MOI(10 μmol)各1 μl,dNTP(10 mmol) 0.4 μl,10×PCR缓冲液2 μl,Taq DNA聚合酶(5 U/μl) 0.1 μl,无菌水13.5 μl。反应在ABI 9700 PCR仪上进行,反应程序为94℃变性30 s,56℃复性60 s,72℃延伸60 s,共29个循环。取预扩增产物3 μl于0.8%琼脂糖凝胶上电泳,根据预扩增产物的浓度将其稀释20倍。

1.2.5 选择性扩增。采用(M+2)/(E+2)为引物组合,反应体系为20 μl,其中,稀释后的模板5 μl,MeI和EcoRI引物各0.3 μl(30 ng),10×PCR buffer 2 μl,Taq DNA聚合酶(5 U/μl) 0.1 μl,灭菌水11.9 μl,dNTP(10 mmol/L) 0.4 μl。扩增反应第一步程序为(9700 PCR仪):94℃ 30 s,65℃ 30 s,72℃ 60 s,每个循环中复性温度逐级降低0.7℃,共12个循环;第二步程序为94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,24个循环。扩增后的产物每管加入5 μl上样缓冲液,95℃变性7~10 min,立即放入冰

基金项目 北京市农林科学院青年基金;北京市优秀人才培养自主个人项目(20061D0200500040)。

作者简介 王彦珍(1972-),女,山西柳林人,硕士,助理研究员,从事植物基因工程研究。*通讯作者。

收稿日期 2008-11-25

浴中冷却,待用。

1.2.6 电泳及银染。用6%的聚丙烯酰胺凝胶进行预电泳约20~30 min,使凝胶温度达到最适温度45~50℃,取5.5 μl变性后的样品上样,电泳1.5 h。银染按文献[1]的方法进行。

1.2.7 聚类分析。统计AFLP扩增条带,清晰易辨认的条带记为“1”,无条带出现时记为“0”。用NISYS2.10软件进行分析,遗传相似系数通过公式 $G(i,j) = 2N(i,j) / [N(i) + N(j)]$ 来计算,式中 $N(i,j)$ 为所有材料共有的条带数, $N(i)$ 、 $N(j)$ 分别为每个材料的总条带数,用UPGMA法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选结果 随机选用6个供试材料对16对AFLP引物进行筛选,结果表明,所有引物都能得到AFLP扩增产物。但是,不同引物扩增谱带的多少、分布均匀程度及清晰度均有差异。经过对比分析,选取扩增条带多,分布均匀、清晰可辨且多态性高的9对引物对毛白杨130个无性系进行AFLP分析(见表1)。

表1 9对引物扩增的多态性条带数

Table 1 The number of polymorphic bands amplified by nine primer pairs

| 引物组合 Primer combination | 平均条带数 Average band number | 多态性条带数 Number of polymorphic bands | 多态比例 % Polymorphism proportion |
|----------------------------|------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| M(TG)/E(TG) | 72 | 28 | 38.88 |
| M(CT)/E(GA) | 61 | 20 | 32.79 |
| M(CG)/E(TA) | 63 | 17 | 26.98 |
| M(AA)/E(GI) | 75 | 27 | 36.00 |
| M(AT)/E(CG) | 69 | 25 | 36.23 |
| M(GI)/E(AC) | 58 | 18 | 31.03 |
| M(GI)/E(AQ) | 55 | 16 | 29.09 |
| M(CT)/E(TT) | 80 | 31 | 38.75 |
| M(CT)/E(TG) | 79 | 28 | 35.44 |
| 总计 Total | 612 | 210 | 34.31 |

2.2 多态性分析结果 用9对AFLP引物对130个毛白杨供试样品进行了分析(图1),结果表明,在50~400 bp之间,共检测到612个标记,每对引物可扩增出55~80条标记带,平均扩增出68条样品带,其中多态性标记210个,平均每对引物扩增的多态性条带为23.33条,多态性带百分率为34.31%(表1)。

2.3 聚类分析结果 对612条AFLP多态性条带产生的标记,用NISYS2.10软件进行遗传相似系数计算,用UPGMA法进行聚类分析,构建了130份毛白杨材料的亲缘关系树状图(见图2)。由图2可知,相似系数为0.85时,130个毛白杨无性系可以分为2大类;相似系数为0.88时,每个大类又可分为2个小组,其中bj-27为窄冠优选品种,在第1大类里独立成为1组,与其他毛白杨的亲缘关系相对较远。第2大类中,毛白杨雌株W至W11差异极小,说明所选毛白杨雌株的亲缘关系很近,该试验使用的引物组合揭示的多态性有限,还不足以将它们区分开,或者它们是同一个母株的后代,具有相同的遗传基础。从整体聚类图上可以看出,同一小组中相似系数高于0.9的样品最少为1个,最多有十几个。同一组中的毛白杨株系在形态上差别很小,仅依据形态指标很

难区分。相似系数达到0.95以上的株系形态差别更小,仅在叶形、叶基、叶脉和侧枝上有细微差别,难以区分,聚类分析的结果与供试材料的系谱关系一致(数据略)。

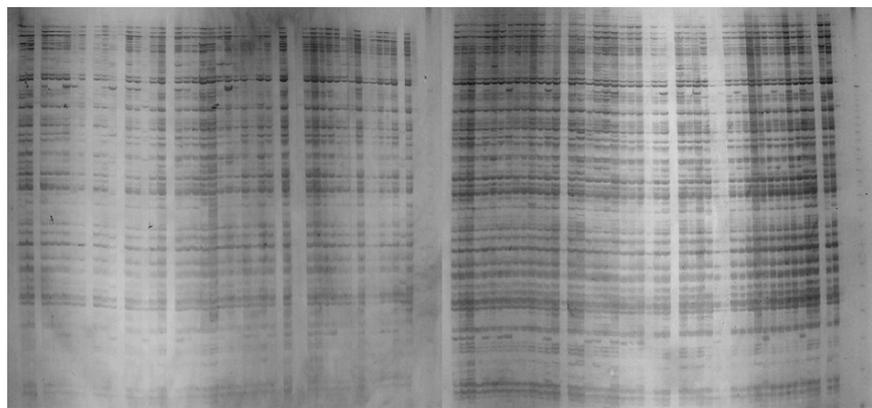


图1 AFLP选择性扩增图谱引物组合(MCT)/(ETT)

Fig.1 AFLP selective amplification mapping with primer combination of (MCT)/(ETT)

3 结论与讨论

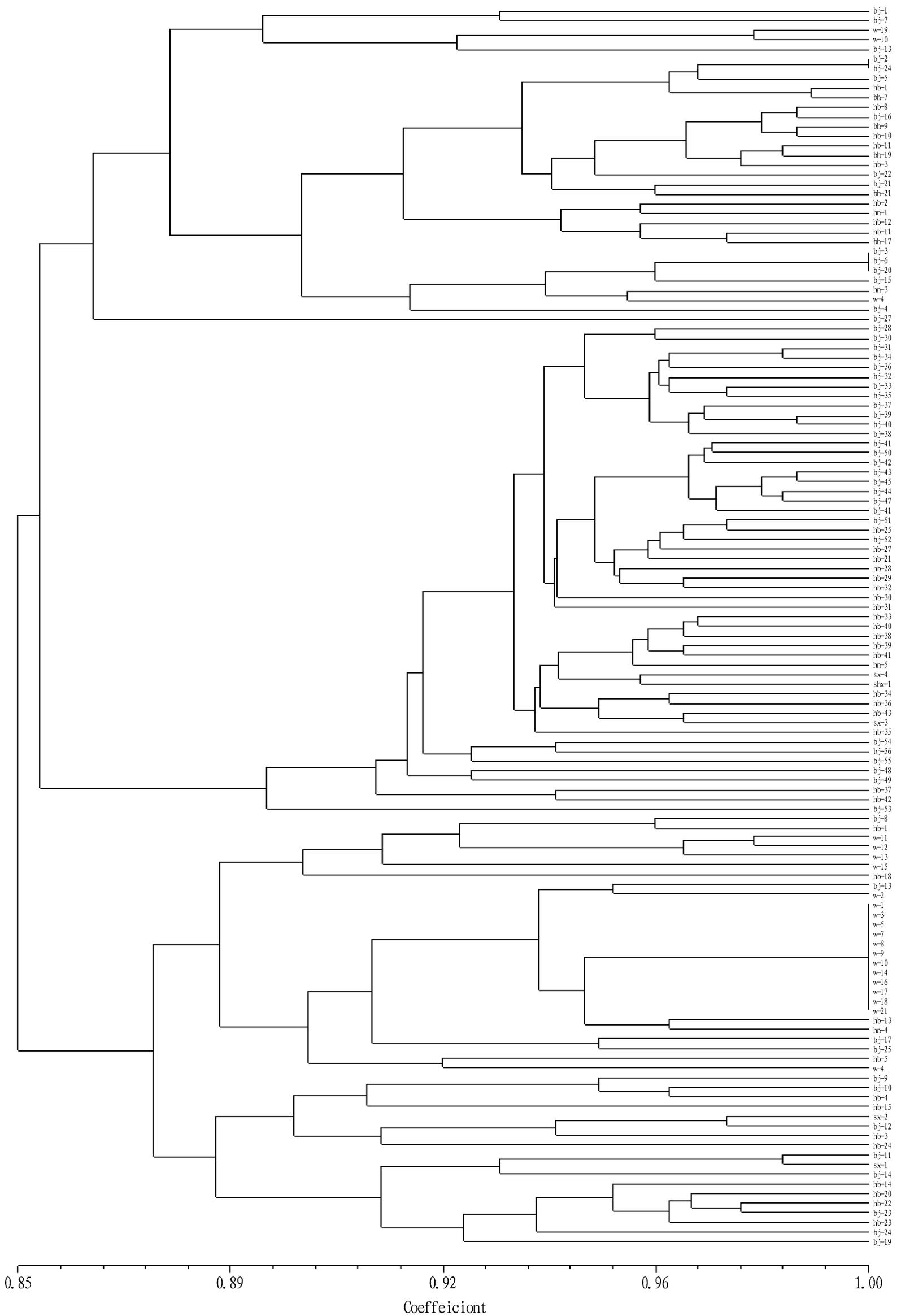
(1) 多种DNA分子标记被应用于杨树遗传多样性研究^[2-3]。早期的RFLP和RAPD被用于鉴别杨树的个体遗传变异^[4-8],但种间多态性较容易被发现,而揭示种内多样性的研究较少。随着DNA分子标记技术的发展和不断完善,一些新型的标记,如稳定性好、可重复性强的AFLP标记被用于研究植物的遗传多样性。特别随着杨树全基因组序列的公布,林木模式植物杨树的研究进入新的高峰期,我国特有的乡土树种毛白杨,具有材质优良、树干高大通直、树型美观等优点,20世纪80年代全国毛白杨种质资源集中种植后,形成了珍贵的毛白杨种质库,其中蕴含多种基因资源,仅2007年就筛选出7个表现优良的雄株系,通过国家林业局林木品种委员会的审定。分子标记的应用,为开发利用毛白杨种质资源提供了新的途径。

(2) 利用AFLP技术分析这些毛白杨的遗传多态性,为合理利用和开发该优良资源提供依据。试验材料取自北京及河北、陕西、山西、河南5个地区的毛白杨优良无性系品种,利用AFLP技术,通过聚类分析表明,供试材料中毛白杨雌株之间的亲缘关系较近,多态性较小;在雄性毛白杨中,来自5个地区的毛白杨没有明显的按地区独立成组的现象。北京地区和河北地区的毛白杨有相对集中的部分,出现该现象,一方面可能与取材数量的多少有关,另一方面,这些来源不同的毛白杨生活的同种环境是否对其遗传多样性发生变化产生影响也是不能确定的。在研究的130株毛白杨中有1株来自北京东城区的60a树龄的古树在第一大类里独立成一个小类,在遗传距离上与其他毛白杨相距较远,该品种为窄冠雄株,树冠幅仅为3.5×2.3 m,分支角度小于35°,树型美观,高大通直,非常适合城市街道两旁绿化和农田林网建设,通过遗传多态性分析,发现该古树在遗传距离上与其他北京地区毛白杨相距较远,因此该研究为挖掘窄冠毛白杨的优良基因提供了理论依据。

在这些优良的毛白杨种质中,还有更多的没有被发现的优良基因资源,通过对毛白杨遗传多样性的研究,可为科学合理地开发利用这些基因资源提供理论依据。

参考文献

- [1] 许绍斌,陶玉芬,杨昭庆,等.简单快速的DNA银染和胶保存方法[J].遗传,2002,24(3):335-336.



注:bj 为北京材料,hb 为河北材料,sx 为山西材料,hn 为河南材料,shx 为陕西材料,w 为雌株。

Note :bj stands for Beijing materials ,hb stands for Hebei materials ,sx stands for Shanxi materials ,hn stands for Henan materials ,shx stands for Shanxi materials ,w stands for female plants .

图2 130 个毛白杨样品聚类分析图

Fig.2 The clustering analysis of 130 samples of Chinese white poplar

[2] 向碧霞,黄敏仁,王明麻.分子标记在杨树遗传改良中的应用[J].南京林业大学学报,1998,22:83-87.

[3] 张德强,张志毅,杨凯.分子标记技术在杨树遗传变异R系统分类中的应用[J].北京林业大学学报,2001(1):76-80.

[4] IIUZ, FURNER G.R. Comparison of allozyme, RFLP, and RAPD markers for revealing genetic variation within and between trembling aspen and ligoth aspen[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 87: 97-105.

种方法的不足。将一些有利基因转入水稻中,可改善水稻的生产性能。将FGHJ20KAFL基因导入水稻,借助报导基因,聚合酶链式反应(PCR)检测和分子杂交鉴定出转基因植株,考查后代光合性能和农艺性状,选育出叶片衰老慢、光合性能好、单株产量高的转基因株系,可以有效培育出抗旱衰种质和品种。目前,已有人通过农杆菌介导将玉米PEPC导入水稻中选育出了耐光氧化、高光效的转PEPC基因水稻种质^[23]。利用这一优良种质可将耐光氧化、高光效特性整合到不育系和恢复系中^[24]。培育出更多、高光效、抗旱衰品种高东迎等^[25]利用转玉米PEPC基因水稻HFFER(高感水稻白叶枯病)和抗白叶枯病水稻HX3(具有抗白叶枯病基因X25)杂交,获得杂种F1,对F1进行花药培养,获得42株二倍体植株。通过对这些植株后代进行抗白叶枯病鉴定,PEPC酶活性和光合速率测定及PCR检测,最后获得同时具有玉米PEPC基因和抗白叶枯病基因X25的水稻聚合株系7个。这一常规育种和基因工程相结合的生理育种手段将为高光效水稻育种开创一条新的研究途径。同时,有试验证明,低浓度蔗糖也可延缓水稻叶片衰老。近年来,有人尝试用控制CTK生物合成的IPT基因工程延缓植物叶片衰老也是一项具有启迪性的工作。随着分子生物学研究地深入发展,利用生物技术延缓植物早衰将是一个重要的研究方向。

4 展望

(1) 杂交水稻早衰是一个极其复杂的遗传生理过程,除受遗传因素影响外,外部环境因素的诱导也可使其发生早衰。因此,对水稻早衰的机理和遗传调控需从多方面进行综合研究,如从代谢、激素、基因等不同方面加以探讨。此外,水肥条件、温度、光照强度、矿质元素等也是影响水稻衰老的重要因素。目前,关于水稻早衰机理的研究仍停留在假说或推测的基础上。分子标记辅助育种(MAS)的出现,为研究水稻早衰机理提供了更宽阔的平台。在生产上,用根系发达、功能强大的特异性材料进行育种改良,将可能成为解决籼粳亚种间杂交结实率低、品种易早衰的一条出路。

(2) 近几年对水稻早衰机理的研究取得了很大进展,并由以前的生理学层面向分子生物学方向延伸。利用SSR、RAPD、AFLP等各种分子方法标记定位控制水稻早衰的基因,以及数量性状基因座(QTL)的定位研究发展迅速。通过基因工程改装早衰基因,使之朝有利的方向转化,不仅能提高水稻产量,也可改善稻米品质。因此,着眼于杂交水稻分子生物学和基因工程研究,有可能从根本上解决杂交水稻早衰的问题,成为优质抗旱衰杂交水稻品种选育的新途径。

(上接第1941页)

- [5] YE H F, CHONG D K X, YANG R C. RAPD variation within and among natural population of trembling aspen from Alberta[J]. *Journal of Heredity*, 1995, 86: 454 - 460.
- [6] SANCHEZ N, GRAUJ M, MANZANERA J A. RAPD markers for the identifica-

参考文献

- [1] 梁建生,曹显祖.杂交水稻叶片的若干生理指标与根系伤流强度关系[J].*江苏农学院学报*,1993,14(4):25-30.
- [2] TH MANN K R. Senescence in plants. CRC Press Inc[M]. Boca Raton, 1980:359-380.
- [3] TANG Y L, WEN X G, LU C M. Differential changes in degradation of chlorophyll-protein complexes of photosystem I and photosystem II during flag leaf senescence of rice[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2005, 43:193-201.
- [4] 张其德,卢从明,张启峰,等.几种杂交组合杂交稻及其亲本光合特性的比较研究[J].*植物生理学报*,1996,12(3):511-516.
- [5] LESHEMY Y. Oxygen free radical and plant senescence[J]. *Wheat Newin Plant Physiol*, 1981, 12:1-4.
- [6] 郭兆武,萧浪涛.超级杂交稻两优培九剑叶叶鞘叶绿体光化学活性的初步研究[J].*中国水稻科学*,2007,21(4):379-385.
- [7] 孙静文,陈温福,臧春明,等.水稻根系研究进展[J].*沈阳农业大学学报*,2002,33(6):466-470.
- [8] 川田信一郎.水稻的根系[M].北京:北京农业出版社,1984.
- [9] 黄发松.水稻根系生长生理与根系遗传育种研究[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [10] 许凤英,马均,王贺正,等.强化栽培条件下水稻的根系特征及其与产量形成的关系[J].*杂交水稻*,2003,18(4):61-65.
- [11] 吴伟明,王一平,赵航,等.水稻不定根的穿鞘现象及其与叶片衰老的关系[J].*中国农业科学*,2005,38(3):474-479.
- [12] MARIEN TH MANN. KM Threddef protein synthesis in the senescence of leaves[J]. *Plant Physiol*, 1972, 49:64-71.
- [13] 聂先舟,刘道宏,徐竹生.水稻旗叶脂质过氧化作用与叶龄及 Ni^{2+} , Ag^{+} 的关系[J].*植物生理学通讯*,1989(2):32-34.
- [14] 马绪亮,李合松.杂交水稻早衰机理研究进展[J].*湖南农业科学*,2007(3):59-61.
- [15] 李卫,邓四洪,刘道宏.自由基对水稻叶片衰老的影响[J].*湖北大学学报*,1998,20(1):86-89.
- [16] 胡一鸿,刘刚毅.SOD活性和VtC含量的变化与杂交水稻叶片抗旱衰的关系[J].*常德师范学院学报:自然科学版*,2001,13(2):70-71.
- [17] KUO TUNG HUNG, CHING HUI KAO. Nitric oxide counteracts the senescence of rice leaves induced by abscisic acid[J]. *J Plant Physiol*, 2003, 160:871-879.
- [18] MOK D W, MOK M C. Cytokinin retardation action[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, 52:89-118.
- [19] MERCEDES LUCAS M, DI MITRIGOS BALOMENOS B, JOSE J. Puyo A cytokine receptor homologue is induced during root nodule organogenesis and senescence in *Lupinus albus* L.[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2007, 11:1-7.
- [20] 王旭军,徐庆国,杨建知.水稻叶片衰老生理研究进展[J].*中国农学通报*,2005,21(3):187-190.
- [21] KUO TUNG HUNG, CHING HUI KAO. Nitric oxide acts as an antioxidant and delays methyl jasmonate-induced senescence of rice leaves[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2004, 161(1):43-52.
- [22] KUO TUNG HUNG, CHING HUI KAO. Ammonium, calcium, and leaf senescence in rice[J]. *Plant Growth Regulation*, 1998, 26:63-66.
- [23] JIAO D M, LI X, LI B H. The characteristics of CO_2 assimilation of photosynthesis and chlorophyll fluorescence in transgenic PEPC rice[J]. *Chin Sci Bulletin*, 2001, 46:414-418.
- [24] LI X, JIAO D M, DAI C C, et al. Photosynthetic characteristics for rice hybrids with transgenic PEPC parent Hter 201[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27:137-143.
- [25] 高东迎,郭士伟,何冰,等.玉米PEPC基因和抗白叶枯病基因X25的水稻聚合育种[J].*江苏农业学报*,2006,22(1):5-9.
- [6] 苏晓华,张绮纹,郑先武,等.利用RAPD分析大青杨天然群体的遗传结构[J].*林业科学*,1997(6):504-512.
- [8] SATO Y, SHRAISH S, TANIMOTO T. Genetic diversity of *Populus euphratica* populations in northwestern China determined by RAPD DNA analysis[J]. *New Forests*, 2002, 23:97-103.