

利用SSR分析白蜡样本之间的亲缘关系

刘金凤¹ 韩晓雨¹ 陈志刚² 李守科¹ 张行杰³

1. 山东沃奇农业开发有限公司 山东潍坊 261000
2. 东营市湿地保护中心 山东东营 257029
3. 胜利油田胜大生态林场 山东东营 257083

摘要: 根据国家白蜡良种基地发展的需要, 为了加强白蜡资源的管理, 进一步理清资源之间的亲缘关系, 提升其利用效率, 基地利用SSR分子标记, 对汇集的全国不同地区的200份样本进行检测, 研究其遗传多样性, 为选育优良树种提供基础理论依据。

关键词: 白蜡; 亲缘关系; SSR

Analysis of genetic relationship among white wax samples by SSR

Jinfeng Liu¹, Xiaoyu Han¹, Chen Zhigang², Li Shouke¹, Zhang Hangjie³

1. Shandong Woqi Agricultural Development Co., Ltd., Shandong Weifang 261000
2. Dongying Wetland Protection Center, Dongying, Shandong 257029
3. Shengli Oilfield Shengda Ecological Forest Farm, Dongying, Shandong 257083

Abstract: This paper, in response to the development needs of the national excellent Chinese lacquer tree germplasm base, aims to strengthen the management of Chinese lacquer tree resources. It further elucidates the genetic relationships among these resources, and enhances their utilization efficiency. By employing SSR molecular markers, this study conducted genetic diversity analysis on 200 samples collected from different regions across the country. The research serves as a foundational theoretical basis for the breeding of superior tree varieties.

Keywords: White Wax; Kinship; SSR

木犀科(Oleaceae)白蜡属(Fraxinus)在全球约有60余种,我国目前已见约有29种,其中有10余种来自于国外引进。白蜡属树种,在我国各省区都有分布^[1],适应性比较广,除东北的水曲柳,较早开发利用,具有一定规模外,其他树种开发利用较少,该树种无论是生长量、木材品种、生态适应性等,都有较大的提升空间,市场应用前景广阔,但同时也对树种的观赏性、抗虫性、抗病性等方面提出了更高的要求^[2]。本课题利用SSR标记对我基地汇集的全国不同地区的200份资源进行遗传

性研究,目的为通过检测结果对白蜡进行系统分类,确认其他特用、特殊价值白蜡资源的目标,围绕用材、生态建设、城镇绿化等的需求特点,细分下一步白蜡良种选育目标,改良方向等,速生型、优质型、抗逆型、观干型、观叶型、观花型等,以及在日常管理、观察、市场调研中,发现、了解到的对白蜡种性表现或需求的其他性状,进行归纳、分析,作为育种目标的修订依据,保证育种目标与时俱进,科学有效^[3]。

一、试验目的

利用SSR分子标记检测不同样本之间的区别。

二、试验材料

采集本白蜡良种基地健壮无病虫害植株的当年生叶片200个样本,每个样本1g左右^[4],干燥后样品约0.5g,用硅胶干燥剂室温保存,样本自然风干,样本编号依次

作者简介: 刘金凤,女,汉,出生于1982年2月,山东省临沂市人,硕士研究生,高级工程师,毕业院校于北京林业大学,研究方向:森林培育,林业树种的遗传育种、栽培管理及种苗繁育。

为R21001、R21002……R21199、R21200。

三、主要仪器设备

(1) PCR扩增仪: K960 杭州晶格科学仪器有限公司

(2) 测序仪: 3730XL ABI 美国应用生物系统公司

(3) 水平电泳槽: JY-SPFT 北京君意东方电泳设备有限公司

(4) 水平电泳仪: JY300C 北京君意东方电泳设备有限公司

(5) 凝胶成像分析系统: K 8160 北京科创锐新生物科技有限公司

四、主要试剂

(1) Taq 酶、dNTP: TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司

(2) DL2000: TaKaRa, 宝生物工程(大连)有限公司

(3) 引物在通用生物系统(安徽)有限公司合成

五、试验方法

1. 基因组DNA的提取

采取改良的磁珠法进行DNA提取^[5], 每个样本采取约0.5g样品进行DNA提取。

2. PCR扩增

(1) PCR反应体系:

SSR 引物体系(共20 μ l): ddH₂O 14.8 μ l, dNTP 0.4 μ l, Buffer 2 μ l, F 0.3 μ l (20 μ M), R0.3 μ l (μ M),

1. 各引物的基因型频率和PIC值

表1 各引物的基因型频率和PIC(部分)

Allele \ Locus	AlleleA	AlleleB	AlleleC	AlleleD	AlleleE	AlleleF	AlleleG	AlleleH
BL-P144	5	0.0025	0.0707	0.0025	0.1717	0.7526		
BL-P147	4	0.0732	0.0051	0.1692	0.7525			
BL-P167	3	0.1162	0.5934	0.2904				
BL-P186	5	0.1591	0.2652	0.2753	0.1842	0.1162		
BL-P208	5	0.1111	0.7172	0.1111	0.0429	0.0177		
BL-P213	6	0.1717	0.0581	0.6439	0.0152	0.0884	0.0227	
BL-P217	4	0.0025	0.6591	0.2273	0.1111			
BL-P92	3	0.5227	0.2298	0.2475				
BL-Y077	4	0.0278	0.0833	0.3409	0.548			
BL-Y093	8	0.0202	0.0101	0.0783	0.0101	0.4874	0.3081	0.0833

2. 遗传多样性及统计量

表2 各引物在198个样本中的遗传多样性

Locus	Sample Size	na*	ne*	I*	Obs_Hom	Exp_Het*	Nej**
BL-P144	396	5	1.6645	0.734	0.7323	0.4002	0.3992
BL-P147	396	4	1.6658	0.7327	0.7424	0.4007	0.3997
BL-P167	396	3	2.2223	0.9188	0.601	0.5514	0.55

DNA模板2 μ l, Taq 0.2 μ l。

(2) PCR反应采用如下循环参数:

SSR PCR扩增程序: 94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30S, 54 $^{\circ}$ C(退火温度在54 $^{\circ}$ C上下波动)复性35 s, 72 $^{\circ}$ C延伸40S, 共35个循环; 最终72 $^{\circ}$ C延伸3min。

3. 引物筛选

首先, 用6个样本R21005、R21011、R21104、R21024、R21131、R21199进行23对引物的筛选。最终确定用10对引物进行批量实验。

然后, 筛选方法是PCR产物先1.5%琼脂糖电泳检测, 有产物的进行6%PAGE胶分析。

4. 毛细管电泳方法

将甲酰胺与分子量内标按100:1的体积比混匀后, 取15 μ L加入上样板中, 再加入1 μ L稀释10倍的PCR产物。然后使用3730XL测序仪进行毛细管电泳, 利用Genemarker中的Fragment(Plant)片段分析软件对测序仪得到的原始数据进行分析, 将各泳道内分子量内标的位置与各样品峰值的位置做比较分析, 得到片段大小^[6]。

六、统计分析结果

先进行的200个样本的聚类分析, 发现样本R21002和R21006与其他好些样本遗传相似系数为0, 即没有所研究的10个位点共同的基因片段。亲缘关系太远, 所以正式分析的时候将其去掉^[7]。

Locus	Sample Size	na*	ne*	I*	Obs_Hom	Exp_Het*	Nej**
BL-P186	396	5	4.5692	1.5613	0.2424	0.7831	0.7811
BL-P208	396	5	1.8478	0.9332	0.8081	0.46	0.4588
BL-P213	396	6	2.1926	1.1152	0.5253	0.5453	0.5439
BL-P217	396	4	2.0064	0.8707	0.5707	0.5029	0.5016
BL-P92	396	3	2.582	1.0226	0.0455	0.6143	0.6127
BL-Y077	396	4	2.3573	1.0031	0.803	0.5772	0.5758
BL-Y093	396	8	2.889	1.3063	0.4242	0.6555	0.6539
Mean	396	4.7	2.3997	1.0198	0.5495	0.5491	0.5477
St. Dev		1.4944	0.856	0.2558	0.2516	0.118	0.1177

注: Na: 观察等位基因数; Ne: 有效等位基因数; I: Shannon信息指数; 实际杂合度; He: 预期杂合度

Note: Na=Observed number of alleles; Ne=Effective number of alleles; I=Shannon's Information P=The percentage of polymorphic loci; Ho:Observed heterozygosity;He:Expected heterozygosity

3. 亲缘关系分析

利用 popgene 软件计算 198 个样本之间的遗传距离和遗传相似系数, 详见表 3。

表 3 遗传距离和遗传相似系数 (部分)

	R21001	R21003	R21004	R21006	R21007	R21008	R21009
R21001	****	0.5312	0.5312	0.5312	0.5345	0.5938	0.6367
R21003	0.6325	****	1	1	0.5011	0.375	0.7276
R21004	0.6325	0	****	1	0.5011	0.375	0.7276
R21006	0.6325	0	0	****	0.5011	0.375	0.7276
R21007	0.6264	0.6909	0.6909	0.6909	****	0.3675	0.6806
R21008	0.5213	0.9808	0.9808	0.9808	1.0011	****	0.4548
R21009	0.4515	0.318	0.318	0.318	0.3848	0.788	****
R21010	0.3747	0.5213	0.5213	0.5213	0.6264	0.8267	0.4515
R21011	0.3747	0.5213	0.5213	0.5213	0.6909	0.6325	0.3606
R21012	2.1383	2.426	2.426	2.426	1.6661	1.7329	2.1686
R21013	2.1383	2.426	2.426	2.426	1.6661	1.7329	2.1686

七、结论与讨论

1. 结束语

本课题从 23 对 SSR 引物中筛选出 10 对扩增稳定的荧光标记引物, 采用毛细管法研究了来自全国不同地区的 200 份白蜡种质资源的遗传多样性, 发现样本 R21002 和 R21006 与其他好些样本遗传相似系数为 0, 即没有所研究的 10 个位点共同的基因片段, 亲缘关系太远, 正式检测时淘汰不计。结果显示共检测出 47 个等位变异, 平均每对引物等位基因 (Na) 数为 4.7 个; 平均有效等位基因数 (Ne) 为 2.3997; 平均多态性信息含量 (PIC) 为 0.497, 由此可见白蜡属植物个体变异很大, 遗传性丰富多样, 对我们研究其内在性状意义重大, 此次检测建立了以 SSR 分子标记方式的白蜡种质鉴定体系, 并构建了白蜡属植物的 20 份核心种质, 对白蜡属植物种质资源的

遗传多样性研究提供理论基础, 对开展好林木种质资源调查和选优, 提高良种选育及抚育管理的科学性、先进性, 提高新品种选育进度, 将特有的、优良的树种收集并选优, 提高基地的良种选育、审定效率等工作都有很好的指导意义^[8]。

2. 讨论

目前, 随着白蜡良种的推广, 基于白蜡耐盐碱、耐旱、耐涝、抗逆性强, 材质好、树形美观等优势, 社会各界对其的认可度越来越高, 栽植范围东自黄渤海之滨, 南至淮河流域, 北至辽河流域、蒙古高原, 西至山西、新疆等地逐年扩大, 在目前绿化市场不景气的情况下, 基地白蜡等耐盐碱苗木, 仍然保持年销售 10 万株以上的业绩, 市场对良种的需求更为迫切, 良种穗条的需求量逐步增长, 因此白蜡良种具有较大的发展空间, 很

好的发展前景。加强白蜡的种质资源的收集、测定、评价, 迅速推出良种, 可填补盐碱地绿化种苗短缺的空白, 丰富盐碱地造林的林木种质资源, 促进盐碱地森林生态的物种多样化和系统稳定化^[9]。

参考文献:

[1] 宫慧慧, 谢华, 马荣才, 等. 利用SSR分析小豆种质遗传多样性[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(5): 872-880.

[2] 燕丽萍, 吴德军, 毛秀红, 等. 基于SSR荧光标记的白蜡核心种质构建[J]. 中南林业科技大学学报, 2019, 39(7): 1-9.

[3] 李法曾, 李文清, 樊守金. 山东木本植物志(下卷)[M]. 北京: 科学出版社, 2016: 251-252.

[4] 冯夏莲, 何承忠, 张志毅, 等. 植物遗传多样研究方法概述[J]. 2006, 1(26): 69-74.

[5] 崔铁成. 陕西白蜡树属植物资源[J]. 陕西林业科技, 1987(2): 9-12

[6] 胡守荣, 夏铭. 林木遗传多样性研究方法概况[J]. 东北林业大学学报, 2001, 3(29): 72-75

[7] 李莉. 基于SSR标记的山东省小麦DNA指纹图谱的构建[D]. 山东师范大学, 2013

[8] 刘剑辉. 分子标记技术在黄瓜育种上的应用[J]. 北方园艺, 2006(3): 38-39

[9] 王健兵. 白蜡核心种质及绒毛白蜡无性系SSR评价体系建立[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.