



陈丽君, 刘明骞, 廖柏勇, 等. 苦楝 SRAP 分子标记及遗传多样性分析[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(1): 70-74.

# 苦楝 SRAP 分子标记及遗传多样性分析

陈丽君<sup>1</sup>, 刘明骞<sup>2</sup>, 廖柏勇<sup>3</sup>, 李俊成<sup>3</sup>, 陈晓阳<sup>3</sup>

(1 华南农业大学 试验中心, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 华南农业博物馆筹建办公室, 广东 广州 510642;  
3 广东省森林植物种质创新与利用重点实验室/华南农业大学 林学与风景园林学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**【目的】为快速分析苦楝 *Melia azedarach* 不同种源提供方法, 揭示苦楝遗传多样性, 为苦楝的开发、利用及选育育种提供一定的理论依据。【方法】从 783 对 SRAP 引物组合中筛选出 20 对多态性较高的引物组合, 对苦楝国内全分布区的 37 个种源和肯尼亚 1 个种源样品进行 SRAP 遗传多样性分析。【结果】20 对引物组合共扩增出 242 条谱带, 其中多态性条带 101 条, 多态性百分率平均值为 40.89%, 每对引物组合扩增条带 5~17 条, 平均每对引物扩增条带 12.1 条; 其多态性信息量 (Polymorphism information content, PIC) 值介于 0.188~0.488, 平均值为 0.299。基于 UPGMA 法聚类以 0.350 为阈值可将 38 个苦楝种源划分为 7 类, 在此基础上, 去掉 2 个种源, 将其余 36 个种源划分 5 个地理类群。【结论】SRAP 分子标记可以很好地反映苦楝的遗传多样性, 聚类类群划分结果有明显的地理趋势和气候生态特征。

**关键词:**苦楝; 种源; 遗传多样性; SRAP  
**中图分类号:**S792.33      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-411X(2016)01-0070-05

## Analysis of genetic diversity of *Melia azedarach* with SRAP markers

CHEN Lijun<sup>1</sup>, LIU Mingqian<sup>2</sup>, LIAO Boyong<sup>3</sup>, LI Juncheng<sup>3</sup>, CHEN Xiaoyang<sup>3</sup>

(1 Center for Teaching & Research Base, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
2 Preparation Office of South China Agricultural Museum, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;  
3 Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm/College of Forestry and Landscape Architecture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:**【Objective】To set up a method for rapid detection of different provenances, to investigate the genetic diversity, and to provide a theoretical basis for development, utilization and selective breeding of *Melia azedarach*. 【Method】Twenty SRAP primer combinations (PCs) with relatively high polymorphisms from 783 PCs were selected to analyze the genetic diversity of 37 provenances from all distribution areas nationwide and 1 provenance from Kenya. 【Result】The results showed 242 clear bands were amplified by 20 PCs, among which 101 bands (40.89%) were polymorphic. The number of bands of each PC ranged from 5 to 17, with an average of 12.1. The polymorphism information content (PIC) values of these PCs ranged from 0.188 to 0.488, with an average of 0.299. Thirty-eight provenances could be divided into 7 categories based on UPGMA (with a threshold value of 0.350), and furthermore, by excluding 2 provenances, the rest 36 provenances could be divided into 5 geographic groups. 【Conclusion】SRAP markers can be used to effectively evaluate the genetic diversity of *Melia azedarach*, and the results of cluster analysis demonstrate clear geographical trends and climatic-ecological characteristics.

**Key words:***Melia azedarach*; provenance; genetic diversity; SRAP

苦楝 *Melia azedarach* 又名翠树、楝树、紫花树、森树等,为楝科楝属落叶乔木,分布于中国、韩国、日本、印度、斯里兰卡、印度尼西亚和澳大利亚等地,欧洲、美洲也有栽培<sup>[1]</sup>。苦楝生长速度快、木材材质优良、纹理美丽,易加工,可用于家具、建筑、农具、船舶、乐器等方面,木材抗白蚁、抗虫蛀、耐腐。苦楝耐烟尘、能大量吸收有毒有害气体,是优良的城市及工矿区绿化树种,也是我国南方四旁绿化常用树种<sup>[2-3]</sup>。苦楝的根、皮、花、果均可入药,也可作为植物源农药<sup>[4]</sup>。分子标记是继形态学标记、细胞学标记、生化标记之后最为可靠的遗传标记技术<sup>[5-6]</sup>。目前已有少量文献对部分苦楝种源的遗传多样性进行分析,程诗明<sup>[7]</sup>采用 7 对 AFLP 引物对分层随机抽样的 8 个群体 240 个个体基因组进行研究分析,共扩增得到 658 条清晰谱带,其中 650 条为多态性谱带,各群体多态位点百分率为 51.4% ~ 76.29%;陈羨德<sup>[8]</sup>利用筛选出的 20 个 RAPD 引物对 15 个不同来源的苦楝进行分析,20 个随机引物共扩增出 193 条重复性好、清晰的谱带,其中多态性谱带共计 189 条,占 97.9%。夏海涛<sup>[9]</sup>采用筛选出的 24 个简单重复序列间多态性(Inter-simple sequence repeat,ISSR)引物对 13 个种源苦楝优树 DNA 进行分析,共扩增出 382 个位点,多态位点百分率为 98.43%,其中南宁和仓山种源的多态位点百分率最高,为 54.97%,延平的多态位点百分率最低,为 43.98%,说明 13 个种源苦楝的遗传多样性丰富。但是,苦楝分布广泛,以前的研究采样点偏少,不足以准确地反映全分布区苦楝的遗传多样性。本项研究从国内 18 个省(区、市)37 个县(市)采集苦楝种子,并收集肯尼亚

内罗毕苦楝种子,采取相关序列扩增多态性(Sequence-related amplified polymorphism, SRAP)分子标记方法进行遗传多样性分析。此外,SRAP 分子标记结合了扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)及随机扩增的多态性 DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)各自的优点,方便快捷,只需要极少量 DNA 材料,且不需要预先知道 DNA 序列信息,即可快速获得大量的信息,试验结果稳定可靠,且再现性较高,重复性较好<sup>[10-11]</sup>。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以国内全分布区的 37 个种源和肯尼亚内罗毕 1 个种源为对象进行苦楝 SRAP 遗传多样性分析,采种点地理位置及编号见表 1。试验材料采于广州市华南农业大学苗圃 1 年生苦楝,采集幼嫩枝条上嫩叶 6~8 片,低温保存用于提取 DNA。

1.2 试验仪器与设备

试验仪器主要有超微量紫外分光光度计(Thermo nanodrop 2000),PCR 扩增仪(PTC-200),DYY-III 型恒压恒流电泳仪(北京六一仪器公司),凝胶成像系统(Bio-rad),高速离心机(Eppendorf)等。试验用 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Mg<sup>2+</sup> 及 100 bp DNA ladder 等购自 TaKaRa 公司,琼脂糖和 Gold View 核酸染料购自广州鼎国生物科技有限公司,酚、三氯甲烷、乙醇、异丙醇、硫代硫酸钠、硼酸、甲醛、冰醋酸、硝酸银等其他试剂为国产分析纯。SRAP 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成,本研究所用引物序列见表 2。

表 1 苦楝材料及来源  
Tab.1 Materials and sources of *Melia azedarach*

| 种源编号 | 来源   | 种源编号 | 来源     | 种源编号 | 来源   | 种源编号 | 来源     |
|------|------|------|--------|------|------|------|--------|
| A04  | 海南三亚 | D01  | 云南西双版纳 | H06  | 贵州平塘 | M02  | 重庆市    |
| A09  | 海南琼中 | D05  | 云南开远   | I01  | 浙江临安 | O01  | 河南内乡   |
| B01  | 广东从化 | E01  | 福建建瓯   | I02  | 浙江绍兴 | P03  | 陕西蒲城   |
| B03  | 广东兴宁 | E02  | 福建尤溪   | J01  | 江苏泰兴 | P04  | 陕西南郑   |
| B04  | 广东茂名 | E03  | 福建连城   | J02  | 江苏南京 | Q01  | 甘肃陇南   |
| B06  | 广东乐昌 | F01  | 江西南昌   | J03  | 江苏姜堰 | Q02  | 甘肃舟曲   |
| C02  | 广西钦州 | F04  | 江西于都   | K01  | 安徽利辛 | U01  | 河北邯郸   |
| C03  | 广西梧州 | G01  | 湖南龙山   | K02  | 安徽歙县 | Z01  | 肯尼亚内罗毕 |
| C04  | 广西永福 | G03  | 湖南浏阳   | L01  | 湖北郧县 |      |        |
| C10  | 广西上思 | H03  | 贵州石阡   | M01  | 四川广元 |      |        |

表 2 用于苦楝 SRAP 分析的引物序列

Tab. 2 Primer sequences used for SRAP analysis of *Melia azedarach*

| 引物名称 | 正向序列                  | 碱基数 | 引物名称 | 反向序列                   | 碱基数 |
|------|-----------------------|-----|------|------------------------|-----|
| Me1  | 5'TGAGTCCAAACCGGATA3' | 17  | Em4  | 5'GACTGCGTACGAATTTGA3' | 17  |
| Me2  | 5'TGAGTCCAAACCGGAGC3' | 17  | Em5  | 5'GACTGCGTACGAATTAAC3' | 17  |
| Me4  | 5'TGAGTCCAAACCGGACC3' | 17  | Em7  | 5'GACTGCGTACGAATTGAG3' | 17  |
| Me5  | 5'TGAGTCCAAACCGGAAG3' | 17  | Em9  | 5'GACTGCGTACGAATTTCA3' | 17  |
| Me6  | 5'TGAGTCCAAACCGGTAA3' | 17  | Em10 | 5'GACTGCGTACGAATTCAA3' | 17  |
| Me11 | 5'TGAGTCCAAACCGGACT3' | 17  | Em12 | 5'GACTGCGTACGAATTCAT3' | 17  |
| Me17 | 5'TGAGTCCAAACCGGTAG3' | 17  | Em13 | 5'GACTGCGTACGAATTCTA3' | 17  |
| Me19 | 5'TGAGTCCAAACCGGTTG3' | 17  | Em14 | 5'GACTGCGTACGAATTCTC3' | 17  |
| Me20 | 5'TGAGTCCAAACCGGTGT3' | 17  | Em15 | 5'GACTGCGTACGAATTCTT3' | 17  |
| Me24 | 5'TGAGTCCAAACCGGGAT3' | 17  | Em17 | 5'GACTGCGTACGAATTATG3' | 17  |
| Me27 | 5'TGGGGACAACCCGGCTT3' | 17  | Em18 | 5'GACTGCGTACGAATTAGC3' | 17  |
| Me28 | 5'TGAGTCCAAACCGGATC3' | 17  | Em19 | 5'GACTGCGTACGAATTACG3' | 17  |
|      |                       |     | Em29 | 5'GACTGCGTACGAATTTAG3' | 17  |

1.3 苦楝 DNA 提取和 SRAP-PCR 扩增

苦楝基因组 DNA 提取参照上海生工生物工程有限公司柱式基因组 DNA 提取试剂盒说明书。所提取的基因组 DNA 用  $8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳检测质量,超微量紫外分光光度计检测浓度后稀释至  $50\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ ,置于  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保存备用。通过单因子及正交试验建立并优化苦楝 SRAP-PCR 最佳反应体系为模板 DNA  $30\text{ ng}$ 、dNTPs 浓度  $0.125\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  浓度  $2.25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、引物浓度  $0.48\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、*Taq* DNA 聚合酶  $0.75\text{ U}$  ( $25\text{ }\mu\text{L}$ )。SRAP-PCR 反应程序为:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  预变性  $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ,  $35\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性  $1\text{ min}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ , 5 个循环;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  变性  $1\text{ min}$ ,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  复性  $1\text{ min}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $1\text{ min}$ , 30 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  延伸  $10\text{ min}$ 。

1.4 数据统计与分析方法

电泳结果统计时将具有相同迁移率的扩增片段,按 0/1 系统纪录,有带记为 1,无带记为 0,并参照标准 Marker 带估计扩增片段的大小,形成 0/1 矩阵。将图形资料转换成数据资料,并输入 Excel 2007 中建立 0/1 数据矩阵,使用 NTSYS-pc2. 10e 软件计算遗传距离和相似系数,使用非加权平均法 (UPGMA) 进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SRAP 扩增多态性条带统计

本研究采用 20 对 SRAP 引物对苦楝 38 个不同种源进行扩增,分析结果见表 3。由表 3 可知,引物扩增条带多数集中在  $100\sim1\,500\text{ bp}$  之间,20 对引物组合对全部样品进行分析,共扩增出 247 条带,其中

<http://xuebao.scau.edu.cn>

多态性条带 101 条,平均多态性百分率为  $40.89\%$ 。20 对引物扩增的条带数从 5 条 (Me11/Em29) 到 17 条 (Me20/Em7) 不等,平均为 12.1 条。多态性条带的数量从 1 条 (Me11/Em29、Me6/Em29) 到 12 条 (Me20/Em7) 不等,多态性比率最高的引物组合为 Me24/Em14 ( $88.89\%$ ),其次为 Me20/Em7 ( $70.59\%$ )、Me1/Em9 ( $60.00\%$ );多态性比率最低的引物组合为 Me6/Em29 ( $12.50\%$ ),总体而言,引物多态性比率较高。

多态性信息量 (Polymorphism information content, PIC) 是用来衡量不同引物对反应多态性高低的程度,20 对引物组合的 PIC 为  $0.188\sim0.488$ ,其中 Me1/Em9 扩增引物总条带数 (15 条)、多态性条带数 (9 条) 以及 PIC ( $0.387$ ) 均较高,该引物组合可以成为苦楝 SRAP 分子标记的骨干引物<sup>[12]</sup>,20 对引物的平均 PIC 为  $0.299$ ,介于  $0.25\sim0.50$  之间,说明所选的 SRAP 引物可以很好地反映苦楝的遗传多样性<sup>[13]</sup>。引物 Me1/Em9 的扩增图谱见图 1。

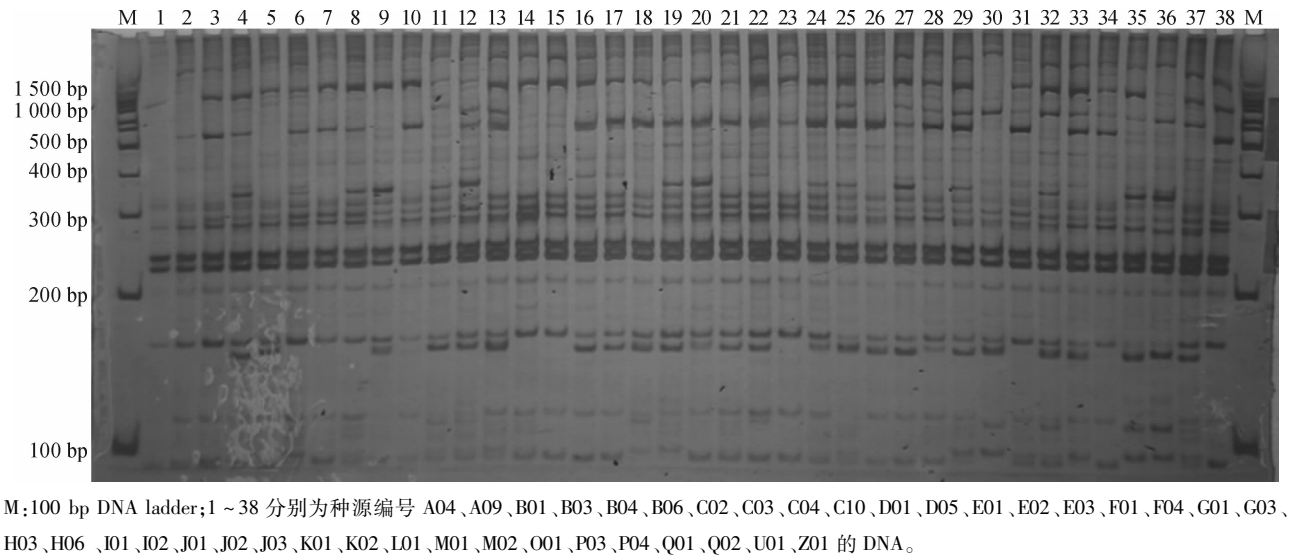
2.2 38 个不同苦楝种源的聚类分析

根据 SRAP 标记分析结果,对苦楝 38 个种源间基于 Nei's 的遗传距离进行 UPGMA 聚类分析,从聚类分析结果 (图 2) 可知,以  $0.350$  为阈值,38 个种源可以分为 7 类, A04、A09、B01、B04、B06、C02、C03、C10、H03、H06、Z01 为第 1 类,这一类主要分布在海南、广东、广西等地理位置偏南的地区,其中肯尼亚内罗毕的种源 Z01 也在这一类; B03、E02、E03、F01、F04、I01、J01、J02、K02 为第 2 类,这一类主要分布在广东、福建、浙江、江苏东部沿海省份; E01、G01、G03、I02、J03、K01、L01、M02、P03、P04、U01 为第 3

类,主要分布在湖南、湖北、陕西、河北等地;D01、5 类,来自甘肃。O01 和 C04 各为一类,分别来自河  
D05、M01 为第 4 类,主要为云南种源;Q01、Q02 为第 南内乡和广西永福。

表 3 SRAP 引物组合扩增信息分析  
Tab. 3 Analysis of amplification with SRAP primer combination

| 引物组合      | 统计带长范围/bp  | 扩增带数/条 | 多态性带数/条 | 多态性比率/ % | 多态性信息量(PIC) |
|-----------|------------|--------|---------|----------|-------------|
| Me1/Em9   | 100 ~ 1500 | 15     | 9       | 60. 00   | 0. 387      |
| Me1/Em17  | 100 ~ 1500 | 13     | 3       | 23. 08   | 0. 201      |
| Me2/Em12  | 100 ~ 1500 | 12     | 4       | 33. 33   | 0. 244      |
| Me2/Em13  | 100 ~ 1500 | 10     | 4       | 40. 00   | 0. 294      |
| Me4/Em5   | 100 ~ 1500 | 16     | 4       | 25. 00   | 0. 384      |
| Me5/Em10  | 100 ~ 1500 | 13     | 4       | 30. 77   | 0. 253      |
| Me6/Em4   | 100 ~ 1500 | 16     | 8       | 50. 00   | 0. 291      |
| Me6/Em5   | 100 ~ 1500 | 11     | 6       | 54. 55   | 0. 285      |
| Me6/Em10  | 100 ~ 1500 | 11     | 4       | 36. 36   | 0. 226      |
| Me6/Em29  | 100 ~ 1500 | 8      | 1       | 12. 50   | 0. 488      |
| Me11/Em29 | 100 ~ 1500 | 5      | 1       | 20. 00   | 0. 188      |
| Me17/Em29 | 100 ~ 1500 | 13     | 5       | 38. 46   | 0. 312      |
| Me19/Em5  | 100 ~ 1500 | 9      | 3       | 33. 33   | 0. 377      |
| Me19/Em7  | 100 ~ 1500 | 8      | 3       | 37. 50   | 0. 391      |
| Me20/Em7  | 100 ~ 1500 | 17     | 12      | 70. 59   | 0. 317      |
| Me24/Em14 | 100 ~ 1500 | 9      | 8       | 88. 89   | 0. 237      |
| Me27/Em4  | 100 ~ 1500 | 14     | 8       | 57. 14   | 0. 237      |
| Me27/Em18 | 100 ~ 1500 | 16     | 4       | 25. 00   | 0. 192      |
| Me28/Em15 | 100 ~ 1500 | 11     | 6       | 54. 55   | 0. 336      |
| Me28/Em19 | 100 ~ 1500 | 15     | 4       | 26. 67   | 0. 340      |
| 总计        |            | 242    | 101     |          |             |
| 平均值       |            | 12. 1  | 5. 05   | 40. 89   | 0. 299      |



M:100 bp DNA ladder;1 ~ 38 分别为种源编号 A04、A09、B01、B03、B04、B06、C02、C03、C04、C10、D01、D05、E01、E02、E03、F01、F04、G01、G03、H03、H06、J01、J02、J01、J02、J03、K01、K02、L01、M01、M02、O01、P03、P04、Q01、Q02、U01、Z01 的 DNA。

图 1 Me1/Em9 引物对苦楝群体材料的扩增聚丙烯电泳图

Fig. 1 Amplified products of samples from different provenances of *Melia azedarach* on polyacrylamide gels with the primer combination of Me1/Em9

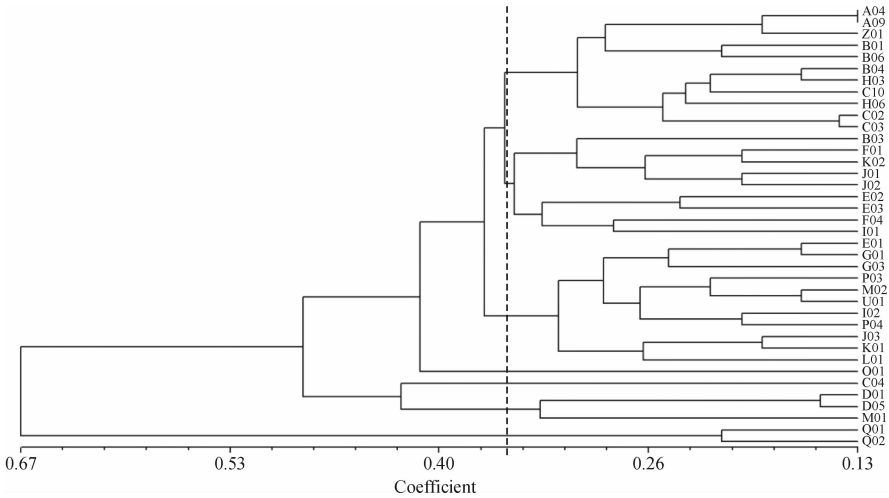


图 2 SRAP 标记的 38 个苦楝种源 UPGMA 聚类图  
Fig. 2 UPGMA clustering dendrogram of 38 *Melia azedarach* provenances with SRAP markers

3 讨论

本试验从 783 对引物组合中筛选获得多态性较好的引物组合 20 对,这些引物组合多态性百分率平均为 40. 89%,PIC 平均为 0. 299,说明 SRAP 分子标记可以较好地应用于苦楝的遗传多样性分析<sup>[13]</sup>,并为充分开发、利用苦楝资源及完善苦楝遗传背景分析奠定基础。通过本试验开发出了多态性比率和 PIC 均较高的可用于苦楝 SRAP 分析的骨干引物 (Me4/Em5、Me1/Em9),可将大部分种源划分为准确的类型,为快速分析苦楝不同种源提供了方法。

根据 SRAP 标记分析结果,以 0. 350 为阈值,可将 38 个苦楝种源划分为 7 类。其中,O01 和 C04 各为一类,分别来自河南内乡和广西永福。由于这 2 类仅各含 1 个种源,代表性不强,为稳妥起见,河南内乡和广西永福暂不独立成类,将其余的 36 个种源,划分 5 个类群。苦楝种源类群划分有明显的地理趋势和气候生态特征。例如第 1 类群的种源来自海南、广东、广西等偏南省份,属于纬度较低,沿海地区的苦楝,这些地方水热条件充足。肯尼亚内罗毕种源聚在此类,这可能因为当地气候条件与我国两广、海南岛的气候更相似;第 2 类群种源主要分布在广东、福建、浙江、江苏东部沿海省份,其气温和降水量普遍低于第 1 类种源地;第 3 类群种源主要分布在湖南、湖北、陕西、河北等地,其气温和降水量低于第 2 类种源地;第 4、5 类群分别为云南、甘肃种源,两地区的气候差异很大,与前 3 类也有较大差异。

将该聚类结果与苦楝果核及种子性状做对比<sup>[14]</sup>,果实主要表型特征为第 1 类的果实种子形态较小且质量较轻、棱粒较小;第 2 类的果实果核棱纹明显、果核单果棱数及粒数较少;第 3 类的果实种子较宽,果核形态近球形且棱纹不明显;第 4 类的果实种子形状较大且质量较重,果核皮较厚,果核单果棱数较多,但种粒数较少;第 5 类的果实果核和种子的

质量及形态较大,核果皮较厚且棱纹较明显,果核单果棱数及粒数较多。

参考文献:

[1] 杨湘. 不同果核群苦楝中苦楝素含量变化规律研究 [D]. 南京:南京林业大学,2011.

[2] 刘丽云. 苦楝栽培技术及应用价值 [J]. 北方园艺,2009 (9):144-145.

[3] 曾东东. 家具用苦楝集成材的研究 [D]. 南京:南京林业大学,2011.

[4] 程诗明,顾万春. 苦楝遗传资源学研究进展及其展望 [J]. 浙江林业科技,2007,27(2):64-69.

[5] 单雪,王秀丽,仇雪梅. 分子标记及其在海洋动物遗传研究中的应用 [J]. 生物技术通讯,2005,16(4):46.

[6] 姚红伟,张立冬,孙金阳,等. DNA 分子标记技术概述 [J]. 河北渔业,2010(7):42-46.

[7] 程诗明. 苦楝聚合群体遗传多样性研究与核心种质构建 [D]. 北京:中国林业科学研究院,2005.

[8] 陈美德. 植物源农药原料林树种苦楝良种选育及其遗传多样性分析 [D]. 福州:福建农林大学,2008.

[9] 夏海涛. 药用苦楝遗传多样性 ISSR 分析和遗传变异规律研究 [D]. 福州:福建农林大学,2009.

[10] 董星光,樊丽,王志刚,等. 梨 SRAP 体系的正交优化研究 [J]. 江苏农业科学,2009(2):51-53.

[11] 张晓蕾,张凯旋,杨传平,等. 白桦 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 东北林业大学学报,2010,38(9):1-3.

[12] 令狐斌,侯思宇,孙朝霞,等. 苦荞 SRAP 分子标记体系优化与遗传多样性分析 [J]. 中国农业大学学报,2015,20(1):37-43.

[13] XIE W G, ZHANG X Q. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) [J]. Biochem Syst Ecol, 2010, 38(4):740-749.

[14] 陈丽君,邓小梅,丁美美,等. 苦楝种源果核及种子性状地理变异的研究 [J]. 北京林业大学学报,2014,36(1):15-20.

【责任编辑 柴 焰】