

## 麻疯树遗传多样性的相关序列扩增多态性(SRAP)分析

沈俊岭<sup>1</sup>, 倪慧群<sup>2</sup>, 陈晓阳<sup>1,2</sup>, 黄少伟<sup>2</sup>

(1. 北京林业大学 林木花卉遗传育种教育部重点实验室, 北京 100083; 2. 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 采用相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记对中国6省(区)及印度尼西亚共8个麻疯树 *Jatropha curcas* 种源样本进行研究, 旨在阐明麻疯树种源间的遗传关系和遗传多样性。结果表明: 麻疯树相关序列扩增多态性-聚合酶链式反应(SRAP-PCR)最佳反应体系为:  $10 \times$  PCR buffer 2  $\mu$ L, DNA模板 20 ng, *Taq* 酶 16.67 nkat,  $Mg^{2+}$  2.50 mmol·L<sup>-1</sup>, 三磷酸脱氧核苷酸(dNTP)120.00  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, 引物 0.15  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>, 总体积为 20  $\mu$ L; 并从 274 对引物中选出具有多态性的 45 对引物, 共检测出 500 条清晰的条带, 其中多态性条带 141 条, 占总条带数的 28.20%。非加权成对算术平均法(UPGMA)聚类分析及主成分分析表明, 各个种源间的亲缘关系均很近, 其相似系数为 0.791~0.940, 8 个种源被聚为 3 类, 其中印度尼西亚种源单独聚为 1 类, 来自不同地域的 7 个中国种源被混聚为另外 2 类。图 6 表 3 参 16

**关键词:** 林木育种学; 麻疯树; 相关序列扩增多态性-聚合酶链式反应; 亲缘关系; 聚类分析; 主成分分析

中图分类号: S722 文献标志码: A 文章编号: 1000-5692(2010)03-0347-07

## Genetic diversity of *Jatropha curcas* with SRAP molecular markers

SHEN Jun-ling<sup>1</sup>, NI Hui-qun<sup>2</sup>, CHEN Xiao-yang<sup>1,2</sup>, HUANG Shao-wei<sup>2</sup>

(1. The Key Laboratory for Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China; 2. Forestry College, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

**Abstract:** To investigate genetic relationships and genetic diversity of *Jatropha curcas*, seven populations from six provinces of China and one from Indonesia were analyzed using polymerase chain reaction (PCR) with sequence related amplified polymorphic (SRAP) DNA molecular markers. The  $L_{16}(4^5)$  orthogonal experimental design was utilized to optimize the SRAP amplification system with Jaccard's similarity coefficient as well as cluster and principle component analyses being employed. The optimum reaction concentrations in a 20  $\mu$ L reaction mixture were: 2  $\mu$ L  $10 \times$  PCR buffer, 20 ng DNA template, 16.67 nkat *Taq* enzyme, 2.50 mmol·L<sup>-1</sup>  $Mg^{2+}$ , 120.00  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> deoxyribonucleotide triphosphate (dNTP) and 0.15  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup> primers. For the eight populations, using the 45 most informative primer pairs, 141 (28.20%) of which were polymorphic, SRAP screening produced 500 bands. Jaccard's similarity coefficient showed a high similarity (0.791-0.940). Also, the cluster and principle component analyses showed three groupings: the Indonesian population, and seven Chinese populations were divided into two groups. [Ch, 6 fig. 3 tab. 16 ref.]

**Key words:** forest tree breeding; *Jatropha curcas*; SRAP-PCR; genetic relation; cluster analysis; principle component analysis

麻疯树 *Jatropha curcas* 为大戟科 Euphorbiaceae 麻疯树属 *Jatropha* 小乔木或大灌木, 广泛分布于热带和亚热带地区。在中国主要分布在四川、云南、贵州、广西、海南及西南地区的干热河谷地区。

收稿日期: 2009-06-27; 修回日期: 2009-11-06

基金项目: “十一五”国家科技支撑计划项目(2006BAD07A04); 广东省科技攻关重点项目(2007B020703003)

作者简介: 沈俊岭, 博士研究生, 从事林木遗传育种研究。E-mail: junling5541@163.com。通信作者: 陈晓阳, 教授, 博士生导师, 从事林木遗传育种研究。E-mail: xychen@scau.edu.cn

麻疯树用途广泛,种子可以入药,有清热解毒,消肿散瘀等作用,同时又是干热河谷地区荒山造林的优良树种,具有广阔的开发利用前景。近年来,人们发现麻疯树的种子还可以用来提炼生物柴油,从而使麻疯树成为一种新的能源植物。在当前能源短缺的情况下,如何尽快筛选、培育出栽植范围广,适应性强,产油量高的优良种源成为育种工作者的首要任务。分子标记辅助育种因可以加快优良品种的选育速度而已被广泛应用。麻疯树分子标记研究已有报道<sup>[1-8]</sup>,国外研究发现非洲和印度种源的遗传多样性较低,而拉丁美洲种源遗传多样性较高;Sun<sup>[3]</sup>发现中国境内麻疯树遗传多样性较低,而何玮等<sup>[6]</sup>的结果确与之相反。相关序列扩增多态性(SRAP, sequence related amplified polymorphism)标记是Li等<sup>[9]</sup>新发展的一种分子标记技术,已被应用于图谱构建、比较基因组学、基因定位和遗传多样性分析中,但利用SRAP技术进行麻疯树分子标记的研究国内外尚未见报道。本研究拟以中国6个省(区)及印度尼西亚的麻疯树8个种源为材料,建立并优化麻疯树的SRAP-PCR反应体系,并对其结果进行聚类分析及主成分分析,以期进一步确定麻疯树种源亲缘关系及遗传多样性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

8份麻疯树种源的幼叶均于5月中旬采自华南农业大学增城基地,各个种源采8份材料。其种子来源分别为:1印度尼西亚,2中国广东湛江,3中国海南保亭,4中国广西田林,5中国广西凌云,6中国云南怒江,7中国四川德昌,8中国贵州望谟昂武。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组DNA的提取** DNA提取采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法,取麻疯树的幼龄叶片经液氮研磨后转至1.5 mL离心管中,加入700  $\mu$ L 1  $\times$  STE置于冰上,1 h后离心弃上清;加入700  $\mu$ L 2  $\times$  CTAB混匀,65  $^{\circ}$ C水浴中温育1 h,其间20 min混匀1次;加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)抽提2次,充分摇匀后离心;取其上清液至新的离心管中,加入2/3体积预冷的异丙醇沉淀DNA,离心弃上清;用体积分数为70%乙醇洗涤沉淀2次,风干后用1  $\times$  TE溶解。然后用8.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量并定量为20  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.2.2 相关序列扩增多态性-聚合酶链式反应(SRAP-PCR)扩增程序选择** SRAP-PCR反应程序参照文献<sup>[9]</sup>。94  $^{\circ}$ C, 5 min  $\rightarrow$  5个循环

94 $^{\circ}$ C, 1 min 35 $^{\circ}$ C, 1 min $\rightarrow$ 30个循环 72 $^{\circ}$ C, 2 min	}	94 $^{\circ}$ C, 1 min
		50 $^{\circ}$ C, 1 min $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C, 72 $^{\circ}$ C, 10 min。
		72 $^{\circ}$ C, 2 min

**1.2.3 SRAP反应体系的建立** 采用正交试验设计 $L_{16}(4^5)$ <sup>[9]</sup>对麻疯树反应体系的5因素(*Taq*酶,  $\text{Mg}^{2+}$ , 模板DNA, 三磷酸脱氧核苷酸dNTP, 引物)在4个水平上进行优化试验。引物由上海生工公司合成,其他试剂均购自天根试剂公司,PCR扩增在PTC-100上完成,PCR产物用2.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  琼脂糖凝胶和溴化乙锭(EB)染色检测。各影响因素水平见表1。

**1.2.4 引物的筛选** 运用优化的SRAP-PCR反应体系进行引物筛选,从中挑选条带清晰并有多态性的引物组合,然后对8个麻疯树种源进行遗传多样性分析。PCR产物用60.0  $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,电泳上样量为3  $\mu$ L,220 V恒压预电泳2 h,用银染方法显色<sup>[10]</sup>。所用DYY-6C型电泳仪和DYCZ-30型双板夹芯式垂直电泳槽由北京六一仪器厂生产,Marker D2000作标准。

**1.2.5 数据统计和聚类分析** 使用凝胶成像系统及相机照相,根据同一引物的电泳图谱中同一位点上DNA扩增条带的有无进行统计,有带(强带、弱带)的记为“1”,无带的记为“0”,用NTSYS 2.1统计分析软件<sup>[11]</sup>,计算相似系数,并用SAHN Clustering进行非加权成对算术平均法(UPGMA, un-

表1 各影响因素的水平

Table 1 Levels of each factor

水平	影响因素				
	DNA/ng	dNTP/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	引物/ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$\text{Mg}^{2+}/$ ( $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )	<i>Taq</i> 酶/nkat
1	20	50.0	0.1	1.0	0.3 $\times$ 16.67
2	30	80.0	0.2	1.5	0.5 $\times$ 16.67
3	40	100.0	0.3	2.0	0.8 $\times$ 16.67
4	60	120.0	0.5	2.5	1.0 $\times$ 16.67

weighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析及主成分分析, 构建聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 麻疯树基因组 DNA 的质量

采用改良的 CTAB 法提取麻疯树基因组 DNA, 加入适量的 RNase 酶, 去除 RNA 后, 用  $8.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量(图 1)。从图 1 中看出, DNA 带型清晰, 无降解, 可用于 SRAP 分析。

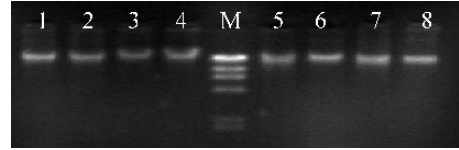


图 1 麻疯树基因组 DNA 电泳检测结果

Figure 1 Result of genomic DNA electrophoresis

### 2.2 SRAP 反应体系的建立

在 16 个处理中, 因各处理 *Taq* 酶、模板 DNA、dNTPs、引物和  $\text{Mg}^{2+}$  的浓度不同, 扩增结果表现出明显差异(图 2)。除 1, 6, 9, 15 组合基本上扩增不出谱带外, 其他组合均有扩增结果, 但 4, 11, 12, 14, 16 号处理的扩增结果相对较好, 其中 4 号处理得到的谱带最清晰, 亮度好并且带型最为丰富; 虽然 16 号组合扩增结果也较为清晰, 但其在 1 000 bp 处的条带不如 4 号处理清晰, 因此, 选择 4 号处理的各个浓度作为 SRAP-PCR 扩增的最佳浓度。即:  $10 \times \text{PCR buffer } 2 \mu\text{L}$ , DNA 模板  $20 \text{ ng}$ , *Taq* 酶  $1.0 \times 16.67 \text{ nkat}$ ,  $\text{Mg}^{2+} 2.50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP  $120.00 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 引物  $0.15 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 总体积为  $20 \mu\text{L}$ 。

为了检测该体系的可靠性, 随机抽取种源及引物组合进行验证, 产物用  $6.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$  的聚丙烯酰胺进行了检测, 图 3 引物为 E1/M1 和 E1/M2 的扩增结果。由图 3 可以看出, 2 对引物组合在该体系下均扩出了清晰的条带, 进一步说明该 SRAP-PCR 反应体系的可靠性。

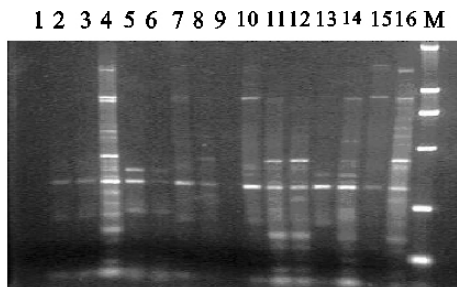


图 2 正交试验设计  $L_{16}(4^5)$  得到的各处理扩增结果

Figure 2 Result of amplification of every treatment according to orthogonal design  $L_{16}(4^5)$

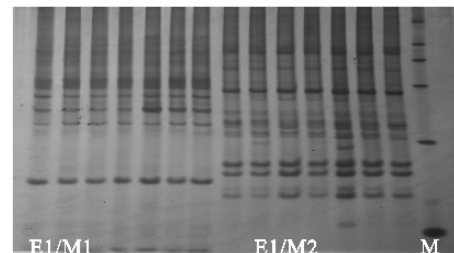


图 3 最佳反应体系的检测

Figure 3 Evaluation of best reaction combination for SRAP-PCR

### 2.3 SRAP 引物的选择及标记多态性

本研究从 274 对引物中选出了由 18 个正向引物与 21 个反向引物组成的 45 对多态性引物组合(表 2), 多态性引物组合占 16.42%, 运用这些多态性引物组合对 8 个麻疯树种源进行了遗传多样性分析, 45 对引物共扩增出 500 条带, 其中多态性条带为 141 条, 平均多态性比率为 28.20%; 每对引物组合扩出的条带数从 8 条到 16 条不等, 平均每对引物组合扩增出 11 条; 每个引物扩出的多态性条带从 1 条(E21/M12)条到 9 条(E15/M16)不等, 平均每对引物扩增出多态性条带 3.13 条, 多态性频率从 8.33%(E21/M13)到 64.29%(E15/M16)不等。图 4 是部分引物对 8 份样本 SRAP-PCR 扩增的结果。

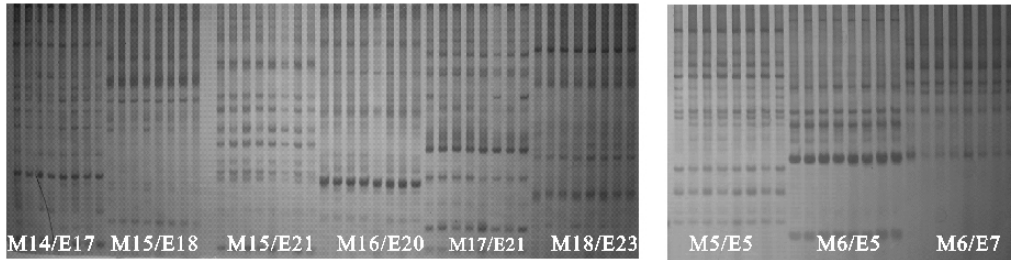
### 2.4 聚类分析及亲缘关系

利用遗传统计学软件(NTSYS, numerical taxonomy system)对 SRAP 扩增所得多态性位点进行分析, 得出 8 个种源的相似系数为 0.791 ~ 0.940, 其中中国海南保亭和中国广东湛江的相似系数最大, 为 0.940, 即两者之间的亲缘关系最近; 印度尼西亚种源与中国国内种源的相似系数介于 0.858(中国贵州望谟昂武)与 0.791(中国海南保亭)之间(表 3), 可见, 中国麻疯树种源之间的亲缘关系很近, 同时, 中国种源与印度尼西亚种源间的亲缘关系也比较近。

表2 多态性引物序列及45对引物组合产生的多态性条带数

Table 2 Polymorphism primer sequences and number of polymorphic bands generated by 45 primer pairs

引物名称及序列	引物名称及序列	引物组合	多态性条带数/总条带数	多态性百分率/%
E5 5'gac tgc gta cga att aac 3'	M5 5'tga gtc caa acc gga ag 3'	E5/M5	6/14	42.86
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M15 5'tga gtc caa acc gg aga 3'	E21/ M15	5/11	45.45
E20 5'gac tgc gta cga att tag 3'	M16 5'tga gtc caa acc gg ata 3'	E20/M16	8/15	53.33
E25 5'gac tgc gta cga att ctg 3'	M18 5'tga gtc caa acc gg cat 3'	E25/ M18	6/14	42.86
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M14 5'tga gtc caa acc gg aac 3'	E21/ M14	5/15	33.33
E25 5'gac tgc gta cga att ctg 3'	M17 5'tga gtc caa acc gg tag 3'	E25/ M17	7/14	50.00
E19 5'gac tgc gta cga att acg 3'	M19 5'tga gtc caa acc gg ttg 3'	E19/ M19	5/10	50.00
E20 5'gac tgc gta cga att tag 3'	M19 5'tga gtc caa acc gg ttg 3'	E20/ M19	7/15	46.67
E15 5'gac tgc gta cga att ctt 3'	M16 5'tga gtc caa acc gg ata 3'	E15/ M16	9/14	64.29
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M19 5'tga gtc caa acc gg ttg 3'	E21/M19	2/9	22.22
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M12 5'tga gtc caa acc gg agg 3'	E21/M12	1/11	9.09
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M13 5'tga gtc caa acc gg aaa 3'	E21/M13	1/12	8.33
E19 5'gac tgc gta cga att acg 3'	M14 5'tga gtc caa acc gg aac 3'	E19/M14	3/9	33.33
E14 5'gac tgc gta cga att ctc 3'	M16 5'tga gtc caa acc gg ata 3'	E14/M16	3/11	27.27
E16 5'gac tgc gta cga att gat 3'	M16 5'tga gtc caa acc gg ata 3'	E16/M16	4/16	25.00
E17 5'gac tgc gta cga att atg 3'	M16 5'tga gtc caa acc gg ata 3'	E17/M16	1/11	9.09
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M21 5'tga gtc caa acc gg tca 3'	E21/M21	1/8	12.50
E20 5'gac tgc gta cga att tag 3'	M22 5'tga gtc caa acc gg gca 3'	E20/M22	1/10	10.00
E1 5'gac tgc gta cga att aat 3'	M2 5'tga gtc caa acc gga gc 3'	E1/M2	3/8	37.50
E7 5'gac tgc gta cga att gag 3'	M8 5'tga gtc caa acc ggt gc 3'	E7/M8	2/11	18.18
E7 5'gac tgc gta cga att gag 3'	M4 5'tga gtc caa acc gga cc 3'	E7/M4	3/10	33.33
E25 5'gac tgc gta cga att ctg 3'	M18 5'tga gtc caa acc gg cat 3'	E25/M18	5/14	35.71
E22 5'gac tgc gta cga att gtc 3'	M20 5'tga gtc caa acc gg tgt 3'	E22/M20	1/9	11.11
E22 5'gac tgc gta cga att gtc 3'	M17 5'tga gtc caa acc gg tag 3'	E22/M17	1/9	11.11
E10 5'gac tgc gta cga att caa 3'	M22 5'tga gtc caa acc gg gca 3'	E10/M22	1/10	10.00
E11 5'gac tgc gta cga att gca 3'	M22 5'tga gtc caa acc gg gca 3'	E11/M22	2/14	14.29
E14 5'gac tgc gta cga att ctc 3'	M9 5'tga gtc caa acc gg aca 3'	E14/M9	5/16	31.25
E15 5'gac tgc gta cga att ctt 3'	M9 5'tga gtc caa acc gg aca 3'	E15/M9	5/16	31.25
E15 5'gac tgc gta cga att ctt 3'	M21 5'tga gtc caa acc gg tca 3'	E15/M21	1/11	9.09
E3 5'gac tgc gta cga att gac 3'	M21 5'tga gtc caa acc gg tca 3'	E16/M21	3/14	21.43
E17 5'gac tgc gta cga att atg 3'	M14 5'tga gtc caa acc gg aac 3'	E17/M14	2/10	20.00
E21 5'gac tgc gta cga att teg 3'	M17 5'tga gtc caa acc gg tag 3'	E21/M17	3/13	23.08
E23 5'gac tgc gta cga att ggt 3'	M18 5'tga gtc caa acc gg cat 3'	E23/M18	1/15	6.67
E20 5'gac tgc gta cga att tag 3'	M20 5'tga gtc caa acc gg tgt 3'	E20/M20	3/16	18.75
E19 5'gac tgc gta cga att acg 3'	M20 5'tga gtc caa acc gg tgt 3'	E19/M20	2/9	22.22
E15 5'gac tgc gta cga att ctt 3'	M18 5'tga gtc caa acc gg cat 3'	E15/M18	2/13	15.38
E14 5'gac tgc gta cga att ctc 3'	M18 5'tga gtc caa acc gg cat 3'	E14/M18	6/15	40.00
E25 5'gac tgc gta cga att ctg 3'	M17 5'tga gtc caa acc gg tag 3'	E25/M17	5/9	55.56
E3 5'gac tgc gta cga att gac 3'	M3 5'tga gtc caa acc gga at 3'	E3/M3	6/15	40.00
E5 5'gac tgc gta cga att aac 3'	M6 5'tga gtc caa acc ggt aa 3'	E5/M6	1/12	8.33
E7 5'gac tgc gta cga att gag 3'		E7/M2	3/12	25.00
		总计	141/500	28.20



各个引物组合中从左到右样品的顺序为种源 1 到种源 8。

图 4 部分引物的电泳结果

Figure 4 Electrophoresis results from some primer pairs

采用 UPGMA 法构建了 8 个种源的遗传关系聚类图(图 5)。结果表明,在相似系数为 0.880 时,可将该 8 个种源分为 3 类:其中印度尼西亚种源自成一类;中国广东湛江、中国海南保亭、中国广西凌云和中国四川德昌为第 2 类;中国广西田林、中国云南怒江和中国贵州望谟昂武为第 3 类。

2.5 主成分分析及亲缘关系

为了更好地反映材料间的亲缘关系,进行了主成分分析(图 6),第一主成分的贡献率为 31.6%,第二主成分的贡献率为 18.06%。主成分聚类结果:中国广东湛江、中国海南保亭、中国广西凌云和中国四川德昌为一类;中国广西田林、中国云南怒江和中国贵州望谟昂武为一类;印度尼西亚种源自成一类。主成分分析的结果和 UPGMA 聚类图相似,进一步说明了本试验结果的可靠性。

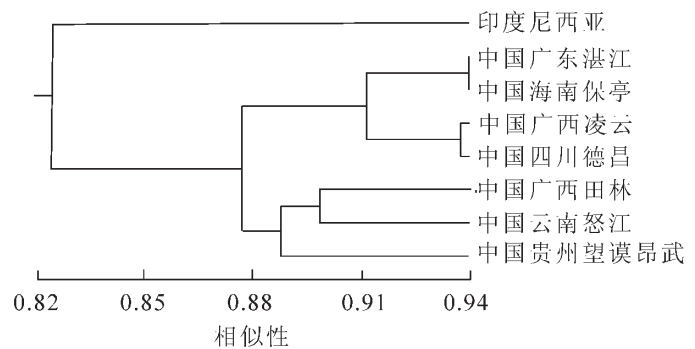


图 5 8 份试验材料的 SRAP 分析的 UPGMA 聚类图

Figure 5 Dendrogram of 8 populations from the UPGMA cluster analysis based on SRAP analysis

3 结论与讨论

3.1 SRAP 反应体系的建立

作为一个聚合酶链式反应(PCR)扩增反应体系,必须有良好的重复性和可靠的稳定性,相关序列扩增多态性(SRAP)是基于 PCR 反应的一种分子标记,因此,影响 PCR 反应的各种因素,如 DNA 模板量、Taq 酶量、Mg<sup>2+</sup>浓度、dNTP、引物浓度及循环次数都会影响 SRAP 的扩增结果。本研究在探讨麻疯树种源的亲缘关系时,首先建立并优化了适合麻疯树的 SRAP-PCR 扩增反应体系:10 × PCR

表 3 相似系数表

Table 3 Coefficient between populations

	印度尼西亚	中国广东湛江	中国海南保亭	中国广西田林	中国广西凌云	中国云南怒江	中国四川德昌	中国贵州望谟昂武
印度尼西亚	1							
中国广东湛江	0.835	1						
中国海南保亭	0.791	0.940	1					
中国广西田林	0.837	0.889	0.883	1				
中国广西凌云	0.801	0.908	0.898	0.864	1			
中国云南怒江	0.837	0.885	0.875	0.900	0.868	1		
中国四川德昌	0.818	0.925	0.918	0.889	0.937	0.910	1	
中国贵州望谟昂武	0.858	0.864	0.854	0.879	0.868	0.900	0.897	1

buffer 2  $\mu\text{L}$ , DNA 模板 20 ng, *Taq* 酶  $1.0 \times 16.67$  nkat,  $\text{Mg}^{2+}$  2.50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , dNTP 120.00  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 引物 0.15  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 总体积为 20  $\mu\text{L}$ 。

在 SRAP 扩增中有 2 种常用的 PCR 程序, 第 1 种是 Li 等<sup>[9]</sup>提出程序(见方法 1.2.2); 第 2 种是 Budka 等<sup>[12]</sup>所使用的程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 47  $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72  $^{\circ}\text{C}$  1 min (35 个循环), 72  $^{\circ}\text{C}$  5 min; 前者因为后 30 个循环所用的退火温度较第 2 种高, 扩增结果更稳定。因此, 本研究采用第 1 种程序。

### 3.2 麻疯树种源的遗传多样性及亲缘关系

研究结果表明, 这 8 个麻疯树种源间的遗传多样性较低, 多态性条带比例为 28.2%, 各个种源间的相似系数介于 0.791 ~ 0.940, 聚类分析及主成分分析表明各个种源间的亲缘关系较近, DVN Sudheer 等<sup>[13]</sup>也发现麻疯树种内的亲缘很近, 而且种间的亲缘关系也很近; 部分种源聚类结果与地域之间的距离有的有一定的相关性, 如中国广东湛江与中国海南保亭地理距离最近, 相似系数也最大, 为 0.940; 印度尼西亚种源为国外种源, 则被单独据为一类; 但有的聚类结果却与种源地分布距离相反, 如中国广西田林和中国广西凌云在地理位置是很近, 但它们之间的相似系数却为 0.864; 由此可以推断, 中国境内的麻疯树种源间亲缘关系较近, 并且没有明显的与种源来源有关的聚类模式; Rao 等<sup>[14]</sup>研究了介于  $77^{\circ} \sim 84^{\circ}40' \text{N}$  和  $12^{\circ}41' \sim 22^{\circ}0' \text{E}$  之间的 32 个高产植株, 通过对种子形态及生长指标的研究, 聚类结果也没有发现明显的与地理相关的聚类模式, 来自同一地区的植株并未聚为一类。

Sun 等<sup>[3]</sup>运用扩增片段长度多态性(AFLP, amplified fragment length polymorphism)和简单重复序列(SSR, simple sequence repeat)对中国境内的 58 个麻疯树居群进行了遗传多样性分析, 发现用 SSR 分子标记扩增结果没有多态性, AFLP 分子标记方法得到的遗传多样性指数只有 14.3%; 何玮等<sup>[6]</sup>采用简单重复序列区间扩增多态性(ISSR, inter simple sequence repeat)分子标记技术对麻疯树 9 个自然居群的遗传多样性水平和遗传结构进行了研究, 用 10 个引物对 9 个居群共 135 个样品进行了扩增, 共获得 169 条清晰的扩增位点, 其中多态性位点 164 个, 多态百分率为 97.04%, 与本研究及 Sun 等的结果不同, 究其原因可能是与试验材料差异有关, 至于确切的原因还有待于进一步研究。Basha 等<sup>[5]</sup>利用 ISSR 和随机扩增多态性 DNA(RAPD, random amplified polymorphic DNA)研究印度尼西亚和墨西哥 42 个麻疯树种源的遗传多样性, 结果发现 400 个 RAPD 引物扩增的多态性为 42.0%, 100 个 ISSR 引物扩增的多态性为 64%, 说明印度尼西亚和墨西哥麻疯树种源的遗传多样性较高; 同时他们也发现来自非洲及亚洲的种源遗传多样性普遍都很低。因此, 中国应引进国外特别是遗传多样性较高的拉丁美洲种源<sup>[14]</sup>, 扩大麻疯树的遗传基础。

较宽的遗传背景是育种的基础, 从本研究结果看目前的育种材料遗传背景窄, 但并不代表没有选择的空间。Tatikonda 等<sup>[15]</sup>发现基于种仁含油量和种子质量的聚类结果与分子标记聚类结果不完全相同, 因此, 在以后的育种中应该参考其他指标例如树高、地径、种子千粒质量、种子产量及种仁含油量等来方面来选择。

### 3.3 SRAP 标记及多态性

Budka 等<sup>[12]</sup>以野牛草 *Buchloe dactyloides* 为材料比较了 RAPD, SSR, ISSR 和 SRAP 等 4 种分子标记技术, 发现 SRAP 有最高的多态性和最强的区分能力; Ahmad 等<sup>[16]</sup>发现 SRAP 标记在桃 *Prunus persica* 和油桃 *P. persica* var. *nucipersica* 的品种鉴定中比 SSR 标记更有效, 显示的多态性更高, 操作简便快速。SRAP 技术具有操作方便快速, 多态性高, 并且预先不需要知道物种的序列信息, 可以产生共显性标记等优点, 在植物遗传育种的各个领域有着广泛的应用前景。

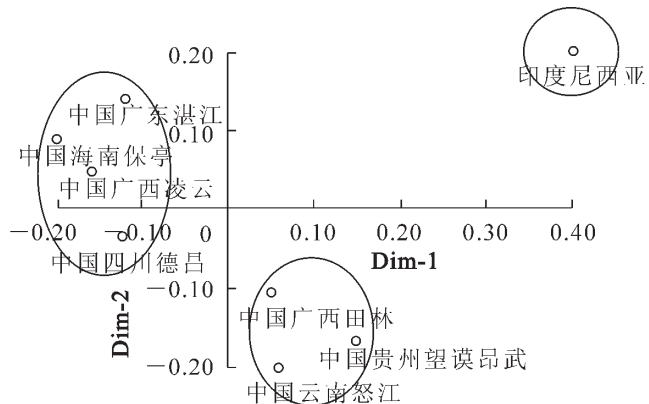


图 6 主成分分析散点图

Figure 6 Diagram showing the relationships among 8 populations based on principal component analysis using SRAP

本研究中绝大部分 SRAP 引物均可扩增出清晰的条带, 但多态性引物的比例不高, 从 274 对引物中仅选出 45 对具有多态性的引物, 多态性引物的比例为 16.4%。这与试验材料本身有很大的相关性, 同时也可能与种源的数量有限有关, 因此, 需要进一步扩大种源数量, 同时与其他分子标记进行对比分析, 更为准确地研究麻疯树的遗传多样。

#### 参考文献:

- [1] DVN SUDHEER P, NIRALI P, MUPPALA P, *et al.* Comparative study of interspecific genetic divergence and phylogenetic analysis of genus *Jatropha* by RAPD and AFLP [J]. *Mol Biol Rep*, 2008, **4**: 901 – 907.
- [2] DVN SUDHEER P, SWETA S, SHAIK G, *et al.* Molecular characterization and identification of markers for toxic and non-toxic varieties of *Jatropha curcas* L. using RAPD, AFLP and SSR markers [J]. *Mol Biol Rep*, 2008, **4**: 1357 – 1364.
- [3] SUN Qibao, LI Linfeng, LI Yong, *et al.* SSR and AFLP markers reveal low genetic diversity in the biofuel plant *Jatropha curcas* in China [J]. *Plant Genet Resour Crop Sci*, 2008, **48**: 1865 – 1871.
- [4] RANADE S A, SRIVASTAVA A P, RANA T S, *et al.* Easy assessment of diversity in *Jatropha curcas* L. plants using two single-primer amplification reaction (SPAR) [J]. *Biomass Bioenergy*, 2008, **6**: 533 – 540.
- [5] BASHA S D, SUJATHA M. Inter and intra-population variability of *Jatropha curcas* (L.) characterized by RAPD and ISSR markers and development of population-specific SCAR markers [J]. *Euphytica*, 2007, **156** (3): 375 – 386.
- [6] 何玮, 郭亮, 王岚, 等. 麻疯树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *应用与环境生物学报*, 2007, **13** (4): 466 – 470.  
HE Wei, GUO Liang, WANG Lan, *et al.* ISSR analysis of genetic diversity of *Jatropha curcas* L. [J]. *Chin J Appl & Environ Biol*, 2007, **13** (4): 466 – 470.
- [7] RAM S G, PARTHIBAN K T, KUMAR R S, *et al.* Genetic diversity among *Jatropha* species as revealed by RAPD markers [J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2008, **55** (6): 803 – 809.
- [8] 向振勇, 宋松泉, 王桂娟, 等. 云南南部不同种源地小桐子遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *云南植物研究*, 2007 (6): 21 – 26.  
XIANG Zhenyong, SONG Songquan, WANG Guijuan, *et al.* Genetic diversity of *Jatropha curcas* (Euphorbiaceae) collected from Southern Yunnan, detected by inter-simple sequence repeat (ISSR) [J]. *Acta Bot Yunnan*, 2007 (6): 21 – 26.
- [9] 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.
- [10] 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.  
XU Shaobin, TAO Yufen, YANG Zhaoqing, *et al.* A simple and rapid method used for silver staining and gel preservation [J]. *Hereditas*, 2002, **24** (3): 335 – 336.
- [11] ROHLF F J. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System User Guide, Version 2.1*[M]. New York: Exeter Software, 2000.
- [12] BUDKA H, SHEARMAN R C, PANRMAKSIZ I, *et al.* Comparative analysis of seeded and vegetative biotype bufflo grasses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, **109**: 280 – 288.
- [13] DVN SUDHEER P, RAMINI S, PRAGYA K, *et al.* Isolation of novel microsatellites from *Jatropha curcas* L. and their cross-species amplification [J]. *Mol Ecol Resour*, 2009, **9** (1): 431 – 433.
- [14] RAO G R, KORWAR G R, SHANKER A K. Genetic associations, variability and diversity in seed character, growth, reproductive phenology and yield in *Jatropha curcas* accessions [J]. *Trees*, 2008, **22** (5): 697 – 709.
- [15] TATIKONDA L, WANI S P, KANNAN S, *et al.* AFLP-based molecular characterization of an elite germplasm collection of *Jatropha curcas* L., a biofuel plant [J]. *Plant Sci*, 2009, **176** (4): 505 – 513.
- [16] AHMAD R, POTTER D, SOUTHWICK S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2004, **129** (2): 204 – 211.