

百山祖冷杉 SSR 体系的建立及人工辅助授粉子代的初步鉴定

林二培¹, 马海泉², 樊民亮³, 骆文坚³, 黄华宏¹, 童再康¹

(1. 浙江农林大学 亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省庆元县林业局, 浙江 庆元 323800; 3. 浙江省林业种苗管理总站, 浙江 杭州 310020)

摘要: 应用十六烷基三甲基溴化铵(CTAB)法提取百山祖冷杉 *Abies beshanzuensis* 叶片 DNA, 建立百山祖冷杉简单重复序列(SSR)反应体系。在体系建立过程中, 采用单因素法分别对影响聚合酶链反应(PCR)的因素进行分析。结果表明: 在 20.00 μL 反应体系中, 模板DNA用量、镁离子(Mg^{2+})浓度、三磷酸鸟嘌呤脱氧核苷酸(dNTPs)浓度、引物浓度、*Taq* DNA 聚合酶用量分别是 60 ng, 3.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, 0.40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 16.67 nkat(1.0 U)时结果最好。随机挑取其中 1 对引物扩增的多态性片段进行克隆测序, 序列经比对后得到的一致性值达到 94%, 表明其他杉科植物的 SSR 引物可以在百山祖冷杉中应用。通过引物筛选, 得到 15 对引物可在百山祖冷杉中扩增得到多态性条带, 其中 4 对引物扩增得到的部分片段在百山祖冷杉和日本冷杉 *Abies firma* 间有明显区别。这些结果表明, 利用 SSR 分子标记技术能够用于百山祖冷杉人工辅助授粉子代的初步鉴定。图 7 表 2 参 16

关键词: 林木育种学; SSR 标记; 反应体系; 百山祖冷杉

中图分类号: S722.3 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2011)02-0234-07

An SSR reaction system for *Abies beshanzuensis* progeny with artificial pollination and progeny identification

LIN Er-pei¹, MA Hai-quan², FAN Min-liang³, LUO Wen-jian³, HUANG Hua-hong¹, TONG Zai-kang¹

(1. The Nurturing Station for the State Key Laboratory of Subtropical Silviculture, Zhejiang A & F University, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Zhejiang Qingyuan Forestry Enterprise, Qingyuan 323800, Zhejiang, China; 3. Forest Tree Seed and Stock Master Station of Zhejiang Province, Hangzhou 310020, Zhejiang, China)

Abstract: To establish a Simple Sequence Repeat with Polymerase Chain Reaction (SSR-PCR) system for *Abies beshanzuensis* and to optimize the factors which affect the PCR reaction, the cetyl-trimethyl-ammonium bromide (CTAB) method was used to extract DNA from its leaves. Then, to evaluate the universality of the primers, the amplified product of one pair of primers were cloned and sequenced. Finally, primer pairs with good amplification and diversity were selected. Results showed that the optimal PCR reaction system was 60 ng template DNA, 3.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+} , 0.15 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs, 0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ primers, and 16.67 nkat (1.0 U) *Taq* polymerase in a volume of 20 μL . Blast results also showed that the identity value reached 94%. Then, 15 pairs of primers with good amplification and diversity were obtained with four that could produce differing DNA fragments between *Abies beshanzuensis* and *Abies firma*. Identity value results indicated that SSR primers from other Taxodiaceae species could be used with *Abies beshanzuensis*; additionally the SSR-PCR technique was applicable to preliminary identification of progeny from artificial pollination. [Ch, 7 fig. 2 tab. 16 ref.]

Key words: forest tree breeding; SSR marker; reaction system; *Abies beshanzuensis*

百山祖冷杉 *Abies beshanzuensis* 是中国特有的松科 Pinaceae 冷杉属 *Abies* 的珍稀植物, 国家 I 级重

收稿日期: 2010-06-28; 修回日期: 2010-11-07

基金项目: 浙江省重大科技专项重点项目(2006C12059-4); 浙江省重点农业科研项目(2006C22064)

作者简介: 林二培, 讲师, 博士, 从事植物分子遗传研究。E-mail: zjulep@hotmail.com。通信作者: 黄华宏, 副教授, 硕士, 从事林木分子育种研究。E-mail: huanghh1976@163.com

点保护野生植物，目前仅存 3 株野生植株，分布在浙江庆元百山祖海拔 1 700 m 左右的南坡^[1]。由于百山祖冷杉开花异常，造成天然群体更新能力极弱。为了保护百山祖冷杉的遗传资源，林业科技人员利用人工授粉技术成功地繁育了一批实生苗，利用日本冷杉 *Abies firma* 作为砧木嫁接繁育了一些个体^[2]。但有人怀疑这些人工获得的杂交后代为日本冷杉和百山祖冷杉的杂种，而不是百山祖冷杉自身的杂交后代。为了鉴定这些人工辅助授粉子代，有必要建立科学的检验方法，同时也为百山祖冷杉群体遗传资源的有效保护提供技术手段。简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 又名微卫星技术，是建立在聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 基础上的第二代分子标记^[3]，具有遗传上共显性、高度重复性、高度丰富的多态性和技术简单性等优点^[4]，目前已被广泛用于品种鉴定^[5]、遗传作图^[6-7]、基因定位^[8]、植物分类和进化及遗传多样性^[9]等方面的研究。本研究以百山祖冷杉的 DNA 为模板，分析了 SSR 反应体系中模板 DNA 浓度、镁离子 (Mg^{2+}) 浓度、三磷酸鸟嘌呤脱氧核苷酸 (dNTPs) 浓度、*Taq* DNA 聚合酶含量对 PCR 结果的影响，建立了适合于百山祖冷杉的 SSR 反应体系，筛选出用于百山祖冷杉多样性分析的引物，并初步将其应用于百山祖冷杉人工辅助授粉子代的鉴定，为百山祖冷杉的遗传资源的保护提供有效的技术手段。

1 材料与amp;方法

1.1 植物材料

在浙江省庆元县百山祖自然保护区采集百山祖冷杉 3 个群体植株 (野生植株 3 株，其中 2 株父本，1 株母本；嫁接植株 4 株；人工授粉实生苗 5 株) 及日本冷杉的嫩叶，置变色硅胶中干燥保存。

1.2 DNA 提取

取 0.1 g 干燥叶片，加入液氮研磨成均匀粉末，采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[10]提取总 DNA，10.0 g·kg⁻¹ 琼脂糖电泳检测 DNA 质量，紫外吸收法 (NanoDrop 微量分光光度计) 检测 DNA 的浓度和纯度。样品置 20 °C 保存。

1.3 PCR 反应及其产物检测

PCR 反应在 ABI 9700 PCR 仪上进行。反应程序为：94 °C 预变性 5 min，然后 94 °C 变性 30 s，45 ~ 55 °C 复性 30 s；72 °C 延伸 40 s，30 个循环；循环结束后 72 °C 延伸 5 min。反应总体积为 20.00 μL。PCR 产物在含有溴化乙啶的 15.0 g·kg⁻¹ 琼脂糖凝胶中电泳，以 DL 2000 TM DNA 标记 (Takara) 作为标准分子量对照，凝胶成像系统 (Gel Doc™, Bio-Rad) 上拍照和分析。

体系建立过程中，对可能影响扩增条带清晰度和多态性的因子：模板 DNA 浓度、镁离子 (Mg^{2+}) 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶 (Takara) 含量等进行实验。据此确定百山祖冷杉 SSR-PCR 反应的最佳体系。

1.4 SSR 引物

SSR 引物的序列来源于冷杉属其他物种的 40 对 SSR 引物^[11-14]，均由南京金思特公司合成。

1.5 电泳检测及多态性分析

PCR 扩增产物在 80.0 g·kg⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳，电压 75 V，电泳 1.0 ~ 1.5 h，采用银染法^[15]进行染色，Nikon D80 相机照相记录，对条带进行统计分析。

1.6 引物通用性研究

随机选取引物 Abfi 11，PCR 扩增产物在 80.0 g·kg⁻¹ 聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离，割取多态性片段，进行克隆、测序分析。

2 结果与分析

2.1 百山祖冷杉 DNA 的提取及检测

完整且纯度高的 DNA 是进行 SSR-PCR 的基本条件。本研究采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法从百山祖冷杉和日本冷杉的叶片中提取得到 DNA，进行电泳和紫外吸收法检测。电泳结果显示，所获得的 DNA 样品条带清晰，完整性良好，没有降解和 RNA 污染 (图 1)。同时，紫外吸收法检测结果表明，所获得的 DNA 样品吸光度比 $D(\lambda)_{260}/D(\lambda)_{280}$ 均大于 1.80，质量浓度均达到 80 mg·L⁻¹ 以上 (表 1)。

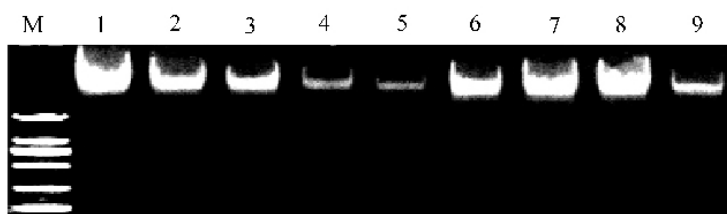


图1 部分样本的基因组DNA电泳结果

1~9代表不同样本基因组DNA; M为DL2000 DNA标记。

Figure 1 Electrophoresis of genomic DNA from some samples

1-9. genomic DNA of partial samples; M is DL2000 DNA marker.

2.2 DNA模板浓度的优化

DNA模板是PCR扩增的关键,要保证足够的扩增产物得率,模板含量不能过低,同时要保证PCR的特异性,模板含量又不能过高。本研究在20.00 μL 反应体系中DNA模板设置了8, 20, 40, 60, 80, 100 ng含量6个梯度,用1对引物(AfSI_20)进行扩增试验,结果见图2。

研究发现,百山祖冷杉SSR反应对DNA模板含量的接受范围较大,20.00 μL 反应体系中20~100 ng的模板含量均能扩增出基本相同的带型,扩增效率高。当模板含量低于20 ng时,扩增效率相对较低,信号不强。当模板含量高于60 ng时,扩增产物达到饱和不再增加。60 ng的DNA模板含量扩增出的条带清晰,信号强,且没有背景。因此60 ng的DNA模板是百山祖冷杉SSR反应最佳浓度。

2.3 镁离子(Mg^{2+})浓度

镁离子(Mg^{2+})对PCR扩增的特异性和产量有显著的影响,*Taq* DNA聚合酶是镁离子(Mg^{2+})依赖性酶,对镁离子(Mg^{2+})浓度非常敏感。在一般的PCR反应中,镁离子(Mg^{2+})浓度为1.5~2.0 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 为宜。镁离子(Mg^{2+})浓度过高,反应特异性降低,出现非特异扩增,浓度过低会降低*Taq* DNA聚合酶的活性,使反应产物减少。本试验设定了1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25, 7.50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 共6个梯度的镁离子(Mg^{2+})浓度。试验结果见图3。

本试验发现1.25~7.50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镁离子(Mg^{2+})浓度都扩增出了清晰的带,但1.25, 6.25和7.50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 条件下扩增的产率不及2.50, 3.75和5.00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$,而2.50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 清晰度不及3.75和5.00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。因此,3.75和5.00 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镁离子(Mg^{2+})浓度都适合于百山祖冷杉SSR反应体系。考虑到节约的目的,后续的试验我们将采用3.75 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的镁离子(Mg^{2+})浓度。

2.4 *Taq*酶用量

在PCR反应中,*Taq*酶的使用量也是影响实验的一个重要因素。用量过高可引起非特异性扩增,用量过低则合成产物量减少。催化典型的PCR反应约需酶量41.7 nkat(指总反应体积为100.00 μL 时)。本试验设置了8.3, 16.7, 25.0, 33.3, 41.7, 50.0 nkat共6个*Taq*酶用量梯度。结果表明在20.00 μL 反应体系中使用8.3~50.0 nkat *Taq*酶用量均有扩增产物出现,33.3 nkat时开始出现非特异性扩增,16.67 nkat反应效果最佳(图4)。

2.5 dNTPs浓度

dNTPs的质量与浓度和PCR扩增效率有密切关系,底物dNTPs浓度过高,会导致聚合酶错误的掺入,浓度过低,又会影响合成效率,甚至会因dNTPs过早消耗而使产物单链化,影响扩增效果。在PCR反应中,dNTPs一般应为0.05~0.200 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验设计了0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.225 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 8个梯度的dNTPs浓度,用2对引物(AfSI_20, AfSI_4)进行扩增实验。扩增的结

表1 部分样本DNA紫外吸收法检测结果

Table 1 Results of partial DNA samples by UV absorption

样本名称	D_{0260}/D_{0280}	质量浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
父本1	1.86	83.8
母本	1.90	174.0
实生苗1	1.82	155.7
实生苗3	1.88	80.6
嫁接植株1	1.87	226.6
嫁接植株2	1.89	104.3

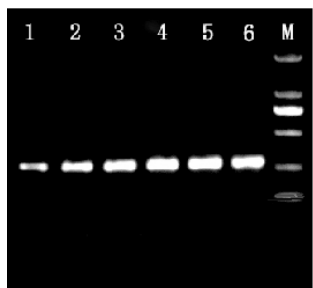


图 2 DNA 模板浓度对 SSR-PCR 的影响

1~6 代表不同浓度 DNA 模板的扩增结果，分别为 8, 20, 40, 60, 80, 100 ng; M 为 DL2000 DNA 标记。

Figure 2 Effects of different DNA dosages on SSR-PCR

1-6. products amplified with 8, 20, 40, 60, 80 and 100ng DNA template, respectively; M is DL2000 DNA marker.

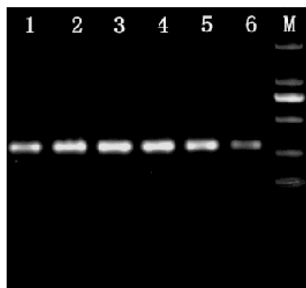


图 3 Mg^{2+} 浓度对 SSR-PCR 的影响

1~6 代表不同 Mg^{2+} 浓度扩增结果，分别为 1.25, 2.50, 3.75, 5.00, 6.25, 7.5 $mmol \cdot L^{-1}$; M 为 DL2000 DNA 标记。

Figure 3 Effects of Mg^{2+} concentration on SSR reaction

1-6. products amplified with 1.25, 2.5, 3.75, 5.0, 6.25 and 7.5 $mmol \cdot L^{-1}$ Mg^{2+} , respectively. M is DL2000 DNA marker.

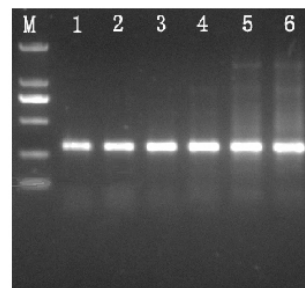


图 4 *Taq* 酶用量对 SSR-PCR 的影响

1~6 代表不同 *Taq* 酶用量扩增结果，分别为 8.3, 16.7, 25.0, 33.3, 41.7, 50.0 nkat. M 为 DL2000 DNA 标记。

Figure 4 Effects of *Taq* polymerase concentration on SSR reaction

1-6. products amplified with 8.3, 16.7, 25.0, 33.3, 41.7, 50.0 nkat *Taq*, respectively. M is DL2000 DNA marker.

果见图 5。引物对 AfSI_20 在 $0.025 \sim 0.225 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 dNTPs 浓度范围内均有扩增产物，不同浓度间没有太大的差异；引物对 AfSI_04 在 $0.025 \sim 0.225 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 dNTPs 浓度范围内均有扩增产物， 0.025 和 $0.050 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 扩增产率低，信号弱。 $0.150 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时，扩增产率最高，且稳定。

2.6 SSR 引物的筛选与扩增

通过以上优化实验，最终确定了百山祖冷杉 SSR-PCR 最佳优化反应体系。在 $20.00 \mu L$ 反应体系中：DNA 模板 60 ng ，*Taq* 酶 $16.67 \text{ nkat}(1.0 \text{ U})$ ，镁离子 (Mg^{2+}) $3.75 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ ，dNTPs 各 $0.15 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ ，引物 $0.4 \mu \text{mol} \cdot L^{-1}$ 。按此反应体系筛选由南京金思特公司合成的 40 对引物，经最佳退火温度的调试，可重复性试验，共筛选出 15 对扩增条带较多、信号强、背景清晰的引物(表 2)用于 SSR-PCR 正式扩增。

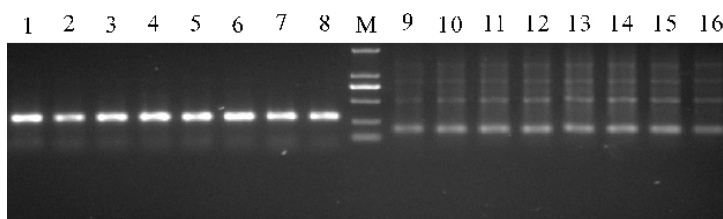


图 5 dNTPs 浓度对 SSR-PCR 的影响

1~8. AfSI_20 在不同 dNTPs 浓度下扩增结果；9~16. AfSI_04 在不同 dNTPs 浓度下扩增结果，dNTPs 浓度分别为 $0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.225 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$; M 为 DL2000 DNA 标记。

Figure 5 Effects of dNTPs concentration on SSR-PCR reaction

1-8 and 9-16. products amplified using primer AfSI_20 and AfSI_04 with $0.025, 0.050, 0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175$ and $0.225 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ dNTPs, respectively; M is DL2000 DNA marker.

2.7 引物通用性检测

随机选取引物 Abfi 11 在百山祖冷杉上进行 PCR 扩增，产物在 $80.00 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶上电泳，割取多态性片段，三羟甲基氨基甲烷(TE)溶液洗脱，再进行扩增，扩增后在琼脂糖上电泳检测，回收扩增产物，T 载体连接，转入大肠杆菌 *Escherichia coli*，后挑取克隆进行菌落 PCR 检测，测序。序列经 BLAST 比对后，与来自日本冷杉的序列相似度达到 94%，并含有 1 个 $(CA)_6$ 的 SSR 基序(图 6)，说明其他杉科植物的 SSR 引物可以应用于百山祖冷杉。

2.8 百山祖杂交后代的初步鉴定

SSR 反应体系建立后，根据筛选得到的 15 对 SSR 引物，以百山祖冷杉杂交实生苗、嫁接个体及日本冷杉的 DNA 为模板进行 PCR 扩增。扩增产物在 $80.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$ 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳，然后银染检测。通过实验发现：以上筛选得到的 15 对引物能在百山祖冷杉和日本冷杉样品中得到扩增的片段，其

表2 筛选获得的具有多态性的 SSR-PCR 引物序列及其退火温度

Table 2 Sequences of SSR primers and their T_m temperature

引物名称	引物序列	$T_m/^\circ\text{C}$
AfSI_02	CCTAGTGAGGCATTTGTATAGACCCTAGATATCTGCAGGTCCGCC	50
AfSI_03	GATCATGAAGCTCACCAACATCATATGGGGAGATTTTTGCAG	53
AfSI_04	ATTCAGAGGGGTCATTGCACAGTGTGTGCTGAAGTGC	48
AfSI_06	CAAACGAGGATGGGTATTGGATTGTGTGGTTCATCCCACC	55
AfSI_07	GTCACATTATGCCTCTCCCCCTTACCACCACCAATGTGGG	50
AfSI_08	GATGATGGTCTTGTGTCTGCTATCACTGGTAGTGGATTTC	51
AfSI_20	CATTATGTTGGCTAGTAAGGTCACCCTACTCATTGGATGGGCTC	45
SF b5	AAAAAGCATCATTTTCTCGAAGAGGAGGGGAGTTACAAG	50
SF 50	CATTTGGTGGGTTTCATTCAGTGGCATTTCACCTATTGG	50
SF g36	CACAAGAAAAAGCTGGTAAAAATAGGACTTTGGGACTTCAGA	53
Abfi01	GCTCCACGGATAGGTTAGAGTGGTGCATTCCACCGGTATGA	53
Abfi11	GCATCCTAGGCACTATATTAGTTATACCATCAACCAGGAATGCACCC	55
Abfi15	TAGTCAAATGTGTTTCATACCCTATATTCTCTGGTTAAGGTCG	54
Abfi17	TTGGTGTATGAGGCTCTGCAGGGGCCGGTTGCCACCAAATG	53
NFF2	GGGTTAGAGACTTGGCTGCTCATAAGGATGACTGGCTTCCA	49

1 (1) GCATCCTAGGCACTATATTAGCTTAGTTAGTTTACTTTAGTTCAGTTCAAATTAGAATAAAATGCCATTAA
 2 (1) GCATCCTAGGCACTATATTAGCTTAGTTAGTTTACTTTAGTTCAGTTCAAATTAGAATAAAAGGCCATTAA

1 (71) TGGTCTTGTGCATTTGAGCACACACACACTTGGTGGCAACCGAGGCCACATACCGGTGGAATGTACCACA
 2 (71) TGGTCTTGTGCATTTGAGCACACACACACTTGGTGGCAATCAGGCCACATACCGGTGGAATGTACCACA

1 (141) CCAAAACAAAAGAGAGTCTAATTAGGCCTCTTGAATGGGTGCATTCCCTGGTTGATGGTATAA
 2 (141) CCAAAAATAAATAGAGTCTAATTGGGCCTCTCGATCGGGTGCATTCCCTGGTTGATGGTATAA

图6 引物通用性检测

1. 引物 Abfi11 从百山祖冷杉中扩增得到的片段序列。2. 来自日本冷杉的同源序列，其中 SSR 基序用下划线标出。

Figure 6 Test of universality of primer

1. Sequence of fragment amplified by Abfi 11 from *Abies beshanzuensis*; 2. Homologous sequence from *Abies firma*, its SSR motif was underlined.

中 11 对引物扩增得到的片段在百山祖冷杉和日本冷杉间没有明显差异，但其余 4 对引物 AfSI_03, AfSI_06, AfSI_20, Abfi11 扩增得到的部分片段在百山祖冷杉和日本冷杉间有明显区别(图 7 中箭头所指)，但在杂交实生苗与父母本，嫁接个体与母株间没有检测到差异片段(图 7)。

3 结论与讨论

本研究通过单因素法确定了百山祖冷杉 SSR-PCR 反应体系中模板 DNA 用量、镁离子 (Mg^{2+}) 浓度、dNTPs 浓度、*Taq* DNA 聚合酶浓度，建立百山祖冷杉 SSR-PCR 反应体系。在体系建立过程中，当各个因素水平较低或较高时，条带都比较弱或者会出现扩增的背景，这与柳晓磊等^[16]研究的结果一致。除了上述这些影响 PCR 反应的因素，我们也对每一对引物进行梯度退火实验，得到各引物最佳退火温度(表 2)。

SSR 分子标记因具有诸多优点，但其传统的开发方法代价昂贵，且费时费力。由于微卫星序列具有保守性，其引物在近缘种间有较强的通用性。因此近年来，在序列信息和 SSR 引物较少的物种中，常常采用其近缘种的 SSR 引物，在杉科植物的研究中也报道^[13-14]。本实验结果也表明：随机选取的 SSR 引物 Abfi 11 在百山祖冷杉中的扩增序列，与原物种日本冷杉的序列比对，相似度值均达到 94%。这说

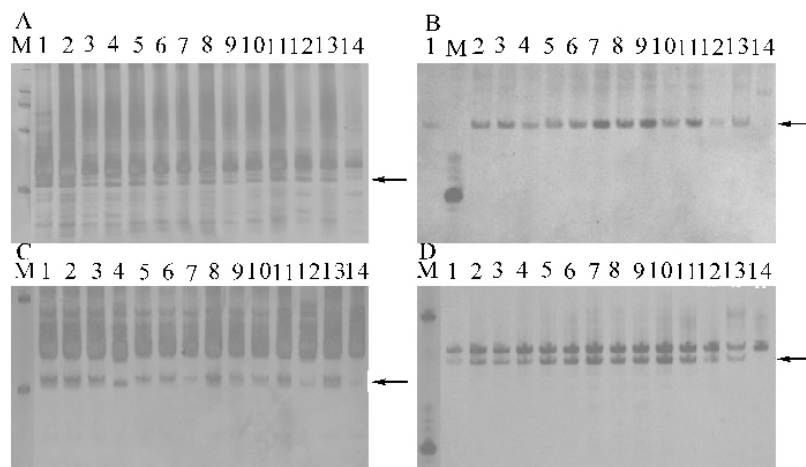


图 7 4 对 SSR 引物在百山祖冷杉和日本冷杉中扩增结果

M. DL2000 DNA 标记。1~13. 百山祖冷杉样品，分别为父本 1, 2；母本；母本重复；实生苗 1, 2, 3, 4, 5；嫁接植株 1, 2, 3, 4；14. 日本冷杉。箭头所指为差异片段。A. 引物对 AfSI_03；B. 引物对 AfSI_06；C. 引物对 AfSI_20；D. 引物对 Abfi 11。

Figure 6 Amplification results of four SSR primers in *Abies beshanzuensis* and *Abies firma*

M. DL2000 DNA marker; 1-13. samples of *Abies beshanzuensis*, including two pollen parent(1, 2); female parent(3, 4); five seedling plants (5-9); four grafting plants (10-13); 14. samples of *Abies firma*. Differential fragments were indicated by arrow. A. results of primer AfSI_03; B. results of primer AfSI_06; C. results of primer AfSI_20; D. results of primer Abfi 11.

明其他杉科植物的 SSR 引物在百山祖冷杉中具有通用性。

本实验通过 SSR-PCR 反应筛选得到 15 对引物能在百山祖冷杉和日本冷杉样品中扩增得到片段，其中 11 对引物在百山祖冷杉和日本冷杉间没有扩增得到差异明显的片段，但其余 4 对引物 AfSI_03, AfSI_06, AfSI_20, Abfi 11 扩增得到的部分片段在百山祖冷杉和日本冷杉间有明显区别(图 7)。这些结果表明：利用 SSR 分子标记技术能够在遗传水平上鉴别百山祖冷杉与日本冷杉，但由于引物数量较少尚不能对百山祖冷杉杂交实生苗和嫁接个体与亲本间的亲缘性作出鉴别。综上所述，SSR 分子标记技术初步证实了，人工授粉杂交和异砧嫁接获得的百山祖冷杉后代与其亲本间具有遗传上的较高一致性，能够有效保护百山祖冷杉的遗传资源。当然有必要在将来开发更多的 SSR 引物，为更深入地研究百山祖冷杉遗传多样性和遗传资源保护打下基础。

参考文献：

- [1] 吴鸣翔. 百山祖冷杉发现纪实[J]. 植物杂志, 1999 (1): 6 - 8.
WU Mingxiang. Discovery of *Abies beshanzuensis* [J]. *Plants*, 1999 (1): 6 - 8.
- [2] 吴鸣翔, 吴善兴, 马海泉, 等. 百山祖冷杉异砧嫁接试验初报[J]. 浙江林业科技, 1996, 16 (5): 28 - 29.
WU Mingxiang, WU Shanxing, MA Haiquan, *et al.* Preliminary experimental report on xenostock grafting of *Abies beshanzuensis* [J]. *J Zhejiang For Sci Technol*, 1996, 16 (5): 28 - 29.
- [3] SHARON D, ADATO A, MHAMEED S, *et al.* DNA fingerprint in plant using simple sequence repeat and minisatellite probes [J]. *Hort Sci*, 1995, 30 (1): 109 - 112.
- [4] GUPTA P K, BALYAN H S, SHARMA P C, *et al.* Microsatellite in plants: a new class of molecular markers [J]. *Curr Sci*, 1996, 70: 45 - 54.
- [5] 朱其卫, 李火根. 鹅掌楸不同交配组合子代遗传多样性分析[J]. 遗传, 2010 (2): 183 - 188.
ZHU Qiwei, LI Huogen. Comparison of genetic diversity among five mating types of *Liriodendron* revealed by SSR markers [J]. *Hereditas*, 2010 (2): 183 - 188.
- [6] 宋健, 韩明玉, 赵彩平, 等. 桃“秦光 2 号”×“曙光”F1 代 SSR 遗传连锁图谱的构建[J]. 西北植物学报, 2008, 28 (5): 895 - 900.
SONG Jian, HAN Mingyu, ZHAO Caiping, *et al.* Construction of a general genetic linkage map for peach using a ‘Qingguang 2’ × ‘Shuguang’ F1 progeny by SSR markers [J]. *Acta Bot Boreali-Occident Sin*, 2008, 28 (5): 895

- 900.

- [7] 徐小林, 徐立安, 黄敏仁, 等. 栓皮栎天然群体 SSR 遗传多样性研究[J]. 遗传, 2004, **26** (5): 683 - 688.
XU Xiaolin, XU Li'an, HUANG Minren, *et al.* Genetic diversity of microsatellites (SSRs) of natural populations of *Quercus variabilis* [J]. *Hereditas*, 2004, **26** (5): 683 - 688.
- [8] 黄烈健, 苏晓华, 张香华, 等. 与杨树木材密度、纤维性状相关的 SSR 分子标记[J]. 遗传学报, 2004, **31** (3): 299 - 304.
HUANG Liejian, SU Xiaohua, ZHANG Xianghua, *et al.* SSR molecular markers related to wood density and fibre traits in poplar [J]. *Acta Gen Sin*, 2004, **31** (3): 299 - 304.
- [9] 陆丹, 牛楠, 李玥莹. SSR 标记技术在植物基因组研究上的应用[J]. 沈阳师范大学学报: 自然科学版, 2010, **28** (1): 83 - 85.
LU Dan, NIU Nan, LI Yueying. Application of SSR marker in plant genome research [J]. *J Shenyang Nor Univ Nat Sci Ed*, 2010, **28** (1): 83 - 85.
- [10] CHENG F S, BROWN S K, WEEDEN N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species [J]. *HortScience*, 1997, **32** (5): 921 - 922.
- [11] JOSSERAND S A, POTTER K M, JOHNSON G, *et al.* Isolation and characterization of microsatellite markers in fraser fir (*Abies fraseri*) [J]. *Mol Ecol Note*, 2006, **6**: 65 - 68.
- [12] CREMER E, LIEPELT S, SEBASTIANI F, *et al.* Identification and characterization of nuclear microsatellite loci in *Abies alba* Mill [J]. *Mol Ecol Note*, 2006, **6**: 374 - 376.
- [13] HANSEN O K, VENDRAMIN G G, SEBASTIANI F, *et al.* Development of microsatellite markers in *Abies nordmanniana* (Stev.) Spach and cross-species amplification in the *Abies* genus [J]. *Mol Ecol Note*, 2005, **5**: 784 - 787.
- [14] SAITO Y, LIAN C L, HOGETSU T, *et al.* Development and characterization of microsatellite markers in *Abies firma* and interspecific amplification in other Japanese *Abies* species [J]. *Mol Ecol Note*, 2005, **5**: 234 - 235.
- [15] 胥猛, 李火根. 鹅掌楸 EST-SSR 引物开发及通用性分析[J]. 分子植物育种, 2008, **6** (3): 615 - 618.
XU Meng, LI Huogen. Development and characterization of microsatellite markers from expressed sequence tags for *Liriodendron* [J]. *Mol Plant Breed*, 2008, **6** (3): 615 - 618.
- [16] 柳晓磊, 汤华, 李东栋, 等. 椰子 SSR 反应体系的建立和优化[J]. 华中农业大学学报, 2007, **26** (5): 676 - 679.
LIU Xiaolei, TANG Hua, LI Dongdong, *et al.* Optimization and establishment of SSR analysis method in coconut [J]. *J Huazhong Agric Univ*, 2007, **26** (5): 676 - 679.