

论文编号:

中国农业科学院 学位论文

桑种质资源的遗传多样性及分子系统学研究

Studies on Genetic Diversity and Molecular Phylogeny of
Germplasm Resources of genus *Morus*

博 士 研 究 生: 赵卫国

指 导 教 师: 潘一乐 黄勇平

申 请 学 位 类 别: 农学博士

专 业: 特种经济动物饲养

研 究 方 向: 桑树遗传育种

培 养 单 位: 蚕业所

提交日期 2005 年 6 月

密级

论文编号：

中国农业科学院 学位论文

桑种质资源的遗传多样性及分子系统学研究

**Studies on Genetic Diversity and Molecular Phylogeny of
Germplasm Resources of genus *Morus***

博 士 研 究 生：赵卫国

指 导 教 师：潘一乐 黄勇平

申 请 学 位 类 别：农学博士

专 业：特种经济动物饲养

研 究 方 向：桑树遗传育种

培 养 单 位：蚕业所

提交日期 2005 年 6 月

Dissertation for Ph.D. Degree of Chinese Academy of Agricultural Sciences

Studies on Genetic Diversity and Molecular Phylogeny of
Germplasm Resources of genus *Morus*

Author: Zhao Wei-guo

Directors: Pan Yi-le, Huang Yong-ping

Major: The Rearing of Special-type Economic Animals

Direction: Mulberry Genetics and Breeding

The Sericultural Research Institute,
Chinese Academy of Agricultural Sciences
Jun, 2005

论文答辩委员会成员名单

答辩委员会主席：楼程富 研究员 浙江大学

答辩委员会成员：蔡伟明 研究员 中国科学院上海植物生理生态研究所

黄自然 教 授 华南农业大学

吴大洋 教 授 西南农业大学

秦 利 教 授 沈阳农业大学

郭锡杰 研究员 中国农科院蚕业研究所

黄君霆 研究员 中国农科院蚕业研究所

论文答辩日期：2005 年 6 月

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名： 赵卫国

时间： 2005 年 6 月 20 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名： 赵卫国

时间： 2005 年 6 月 20 日

导师签名： 潘一乐

时间： 2005 年 6 月 21 日

摘 要

桑树是多年生的重要经济作物，是家蚕的唯一饲料。桑树在我国地理分布广，易适应不同的生态环境，容易通过自然和人工杂交，这些特性形成了丰富的桑树种质资源。利用 DNA 分子标记，本文开展了桑种质资源的遗传多样性和分子系统发育研究，对桑种质的鉴定、保护、利用、核心种质的构建和遗传育种具有重要的实用价值和理论意义。本论文的主要研究内容如下：

一、桑树栽培种和野生种间遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析

构建了一个桑树 (CA)₁₅ 微卫星富集文库，筛选出了 10 对具有多态性的 SSR 引物。首次利用新的 SSR 引物和已报道的 5 对 SSR 引物以及筛选出的 ISSR 引物，研究了 27 个桑树品系（包括 19 个栽培种和 8 个野生种品系）的遗传多样性。15 个 ISSR 引物共扩增条带为 138 条，多态性条带为 126 条，多态性比例为 91.3%，平均多态性信息含量 (PIC 值) 为 0.2006。15 对 SSR 引物每个位点平均等位基因数为 5.13，平均 PIC 值为 0.5210。桑树品系间 ISSR 和 SSR 揭示的平均遗传相似系数分别为 0.7677 和 0.6131。2 种标记揭示野生种内所有遗传多样性指数高于栽培种内，说明栽培、驯化引起了桑树遗传多样性的丢失。利用 UPGMA 法构建的 ISSR 和 SSR 聚类图，野生种和栽培种有较远的亲缘关系。基于 ISSR 和 SSR 数据的主成分分析 (PCA) 支持 UPGMA 聚类。比较 ISSR 和 SSR 标记，发现 SSR 标记多态性较高，有较强的信息量，并进行了 ISSR 和 SSR 标记的相关性测验。根据研究结果，进一步提出了桑树种质资源的保护策略。

二、我国桑树选育品种 ISSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析

利用 ISSR 标记构建了 24 个选育桑品种的指纹图谱，用 3 种独立的方法（特殊的标记；特异的谱带类型；不同引物提供的谱带类型组合）可以有效地鉴别桑树选育品种，证明 ISSR 标记在桑树品种的鉴别方面是一个有效的工具和方法。17 个 ISSR 引物共扩增出 80 条带，40 条带具有多态性，占 50.0%。24 份选育桑树品种间平均遗传相似系数、Nei's 基因多样性 (gene diversity) 和 Shannon's 信息指数分别为 0.8731, 0.1210 和 0.1942。桑树选育品种间的遗传多样性较低，说明我国选育桑品种间遗传距离较小，亲缘关系较近，遗传基础较狭窄。UPGMA 法聚类和 PCA 分析都清楚地显示了 24 个桑树选育品种的亲缘关系，聚类结果与桑树品种的系谱基本一致。

三、我国不同生态型桑树品种遗传多样性的 ISSR 分析

利用 ISSR 标记评价了我国 8 个不同生态类型桑树群体结构和遗传变异。来源 8 个生态类型的 66 个桑树地方品种间，12 个 ISSR 引物总扩增条带数为 83，50 条为多态性条带，多态性比例为 60.24%，平均 PIC 值为 0.1469。总杂合度 (H_T) 为 0.1600，群体内杂合度 (H_s) 为 0.0851，群体间多样性为 (D_{st}) 0.0749，群体间的遗传分化系数 (G_{st}) 为 0.5678，表明群体间的变异大于群体内的变异。基因流 (N_m) 为 0.4683，说明群体间遗传漂移引起了当地遗传差异及群体分化。平均遗传相似系数为 0.8456，8 个群体间的遗传相似系数变异范围为 0.8441~0.9640，说明不同群体间的遗传多样性存在差异。根据 ISSR 标记遗传相似系数按 UPGMA 法对 66 个地方桑树品种进行了聚类分析。从聚类结果来看，每个生态型的大部分桑树品种聚为一类。

四、桑树二倍体及人工诱导同源四倍体遗传变异的 ISSR 分析

利用 ISSR 分子标记技术,对 6 份二倍体桑树品种和经秋水仙素化学诱变得到的同源四倍体间的 DNA 遗传差异进行了研究。农桑 8 号、湖桑 197 号、育 2 号的二倍体及其同源四倍体间扩增条带完全一致,无差异,湖桑 32 号二倍体及其同源四倍体 ISSR 多态性最高,达到了 23.53%,说明不同桑树材料经秋水仙素诱变后在 DNA 分子遗传结构上差异较大。

五、桑树无性系遗传变异的 ISSR 初步分析

利用 ISSR 初步分析了桑树无性繁殖系的遗传变异,在田间和组织培养无性系中仅检测到 1 个变异,此结果说明桑树通过无性繁殖方法繁殖个体仅存在少量遗传变异,遗传性状稳定。

六、凤尾桑及其芽变品系间遗传变异的 ISSR 分析

利用 ISSR 引物,从分子水平分析了凤尾桑及其芽变株系的遗传变异。从 8 个 ISSR 引物扩增结果来看,3 个引物的扩增产物在株系间无差异,从变异株系扩增条带来看,凤尾芽变变异最大。本结果从分子水平证明了芽变株系的遗传结构差异。

七、基于 nrDNA 的 ITS 序列研究桑属(荨麻目:桑科)系统发育

用 PCR 产物直接测序法对 9 个种 3 个变种共 13 份桑种质和构属构树的 ITS 序列进行了测定。结果表明:桑属植物 ITS1 长度平均约为 189 bp;桑属 5.8S rDNA 为 152 bp; ITS2 长度平均为 212 bp;桑属 ITS 序列 G+C 含量大约为 60%左右。构建了桑属 ITS 序列的系统发育树,桑属所有材料聚为一类,并探讨了参试桑种质的亲缘关系。

八、基于 cpDNA 的 trnL-trnF 间隔区序列研究桑属(荨麻目:桑科)系统发育

用 PCR 产物直接测序法对 12 个种 4 个变种共 25 份桑种质和构属构树的 trnL-trnF 基因间隔区序列进行了测定,桑属内该序列长度变异范围为 360bp~367bp,平均核苷酸组成为 0.29935(A) 0.37448(T) 0.18379(C) 0.14238(G),平均 A+T 含量为 0.6738,说明该序列富含 A/T。由 trnL-trnF 基因间隔区序列构建了其分子系统发育树,聚类结果表明蔷薇科所有材料聚为一类;菊科的所有材料聚为一类;桑科中的桑属和木菠萝属,无花果属和构属亲缘关系较近,总的形成了桑科的姐妹群,表明它们亲缘关系较近。桑属所有材料聚为一类,证明桑属为单系,并探讨了桑属的亲缘关系。

关键词: 桑树, 遗传多样性, SSR, ISSR

Abstract

Mulberry (*Morus*, L.) is a perennially and economically important plant, as it is the sole food for the domesticated silkworm, *Bombyx mori*. Mulberry is widely distributed geographically in China, easily adapted to different ecological conditions, and easily hybridized both naturally and artificially, which formed abundant mulberry germplasm resources. Evaluating the genetic diversity and molecular phylogeny in mulberry (genus *Morus*) by DNA molecular markers in this paper, it would be valuable for germplasm identification, conservation, using the mulberry germplasms, construction of core collection, and mulberry genetic breeding. The main results were summarized as the following:

1. Comparative analysis of genetic diversity among mulberry wild and cultivated species as revealed by ISSR and SSR markers

A (CA)₁₅ enriched microsatellite library was constructed for mulberry and screened ten SSR primers with polymorphism. SSR, including 10 novel primers and five primers previously reported, and ISSR markers were used firstly to investigate genetic diversity of 27 mulberry accessions including 19 cultivated accessions and 8 wild accessions. Using 15 ISSR primers, 138 discernible DNA fragments were generated with 126 (91.3%) being polymorphic, the mean PIC (polymorphism information content) values of each ISSR primer was 0.2006. The 15 SSR primers produced an average of 5.13 alleles/locus, and an average PIC value of 0.5210. The mean genetic similarity coefficients among all mulberry accessions ascribed by ISSR and SSR matrices were 0.7677 and 0.6131, respectively. All index values of genetic diversity revealed by both markers indicated that within wild species had higher genetic diversity than within cultivated species. It suggests that cultivation may cause the loss of genetic diversity of mulberry. Cluster analysis of ISSR and SSR using UPGMA method revealed that the wild species are genetically distant from the domesticated species studied here. Principal coordinates analysis (PCA) for ISSR and SSR data also supports their UPGMA clustering. ISSRs and SSRs were compared in terms of their informativeness and efficiency in a study of genetic diversity and relationships among 27 mulberry accessions, the result showed that SSRs presented a higher level of polymorphism and greater information content, and the correlation coefficients of similarity were performed for both marker systems used. According to the results, the conservation strategy was put forward.

2. Construction of fingerprinting and genetic diversity of mulberry cultivars in China by ISSR markers

The ISSR fingerprintings of 24 mulberry cultivars were constructed, and proved that ISSRs were a very effective tool and robust method in the mulberry varieties discrimination. There were 3 independent ways to identify the mulberry varieties, a) unique ISSR markers, b) unique band patterns and c) a combination of the band patterns provided by different primers. 17 ISSR primers amplified 80

bands, 40 of them (50.00%) were polymorphic. The mean genetic similarity coefficient, the mean Nei's gene diversity (h) and the mean Shannon's Information index (I) of mulberry cultivars were 0.8731, 0.1210 and 0.1942, respectively, suggesting that genetic diversity of mulberry cultivars was lower and the genetic base was rather narrow. Both UPGMA cluster and PCA analysis showed clear genetic relationships between the 24 mulberry cultivars. The major clusters were related to known pedigree relationships.

3. Genetic diversity of mulberry varieties from different ecotypes as revealed by ISSR analysis in China

Population structure and genetic diversity of 8 mulberry populations from different ecotypes in China were analyzed by ISSR markers. 12 SSR primers generated a total of 83 amplification products, of which 50 were polymorphic, revealing 60.24% polymorphism among 66 mulberry local varieties, the mean PIC value was 0.1469. The total heterozygosity (H_T), heterozygosity within population (H_S), diversity between populations (D_{ST}) were 0.1600, 0.0851 and 0.0749, respectively. The coefficient of population differentiation (G_{ST}) was 0.5678, indicating that the genetic variation between populations was higher than that of within populations. The gene flow (Nm) was 0.4683, suggesting that genetic drift between populations caused local genetic differentiation and therefore, population divergence. The mean genetic similarity coefficient was 0.8456, genetic similarity coefficient among 8 mulberry populations ranged from 0.8441 to 0.9640, indicating that genetic diversity of different populations existed variation. A dendrogram of all 66 local varieties of mulberry based on the genetic similarity using ISSR markers was generated by UPGMA cluster method. In the dendrogram, most varieties from the same ecotype clustered together.

4. The ISSR analysis of genetic variation between diploid and artificially induced homologous tetraploid of mulberry

ISSR markers were used to analyze the genetic variation between 6 diploid mulberry varieties and homologous tetraploid chemically induced by colchicines. There were no different bands between Nongsang 8, Husang 197 and Yu 2 and their homologous tetraploid while the polymorphic rate between Husang 32 and its homologous tetraploid was the highest (23.53%). The results showed that genetic variation between diploid and homologous tetraploid of mulberry induced by colchicines varied with different mulberry varieties.

5. A preliminary analysis of genetic variation in mulberry clones as revealed by ISSR markers

Genetic variations of mulberry clones were analyzed by ISSR markers. The results showed that only one variation was tested in the clones within field and tissue culture, suggesting that this result highlighted the genetic stability in the clonally propagated.

6. Genetic variation between Fengweisang and its spourts as revealed by ISSR markers

The genetic variation between Fengweisang and its spourts was analyzed at the molecular level by ISSR primers. From the results of amplification, 3 from 8 ISSR primers showed no different bands between Fengweisang and its spourts while Fengweiyabian showed the highest variation among spourts. The study provided molecular evidence for the genetic variation of the spourts.

7. Molecular phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) based on nuclear ribosomal ITS sequences

ITS (internal transcribed spacer) sequences of 13 mulberry accessions representing 9 species and 3 varieties of the genus *Morus*, and one individual of *Broussonetia papyrifera* were determined using direct sequencing of PCR products. The length of ITS-1 and ITS-2 of genus *Morus* is about 189 bp and 211 bp, respectively, while that of 5.8S rDNA is 152 bp. Its G+C contents is about 60%. Phylogenetic analysis of ITS sequences indicated that all accessions of genus *Morus* grouped together and their affinity relationship was discussed.

8. Phylogenetic relationships of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) based on chloroplast *trnL-trnF* intergenic spacer sequences

The *trnL-trnF* intergenic spacer region sequences of 25 mulberry accessions representing 12 species and 4 varieties of the genus *Morus* and one individual of *Broussonetia papyrifera* were sequenced by direct sequencing of PCR products and their length varied from 360 to 367bp. The average nucleotide composition was 0.29935(A) 0.37448(T) 0.18379(C) 0.14238(G), the mean A+T content is 0.6738, indicating that the spacer region sequences were characterized by AT-rich fragment. Molecular phylogenetic analysis was done. Clustering showed that the family Rosebush clustered together while the family Compositae formed a clade. Genus *Morus* was closely related to *Artocarpus heterophyllus*, and *B. papyrifera* to *Ficus pretoriae*, all of which formed the sister group of the family Moraceae, indicating they had a closer affinity to genus *Morus*. We also analyzed the cluster of all materials which belong to the genus *Morus*. The resulted showed that all accessions of genus *Morus* grouped together, indicating that the genus *Morus* was a monophyletic and phylogenetic relationship among genus *Morus* was further discussed.

Key words: Mulberry, Genetic diversity, SSR, ISSR

目 录

第一章 绪 论	1
1.1 研究目的和意义	1
1.2 国内外研究现状	3
1.2.1 桑树的分类简史	3
1.2.2 分子系统学的研究方法及其在桑树分子系统学研究上的应用	6
1.2.3 SSR和ISSR分子标记及其在桑树遗传育种研究中的应用	12
1.2.4 分子系统学研究的主要基因种类及其在桑属系统学研究中的应用	17
1.3 研究内容和方法	20
1.3.1 利用微卫星富集程序,开展桑树微卫星的分离与鉴定研究	20
1.3.2 利用 SSR 和 ISSR 标记,研究桑树栽培种和野生种遗传多样性	21
1.3.3 利用 ISSR 标记,构建我国育成桑树品种的指纹图谱及其遗传多样性分析	21
1.3.4 利用 ISSR 标记,研究不同生态型桑树品种的遗传多样性	21
1.3.5 利用 ISSR 标记,研究桑树二倍体及人工诱导同源四倍体的遗传变异	21
1.3.6 利用 ISSR 标记,研究桑树无性系的遗传变异	21
1.3.7 利用 ISSR 标记,研究凤尾桑及其芽变品系间遗传变异	21
1.3.8 利用 PCR 产物直接测序法,测定桑属 nrDNA 的 ITS 序列,研究其系统发育	21
1.3.9 利用 PCR 产物直接测序法,测定桑属 cpDNA 的 trnL-trnF 间隔区序列,研究其系统发育	21
第二章 桑树微卫星位点的分离与鉴定	22
2.1 材料与方法	22
2.1.1 试验材料	22

2.1.2	桑树基因组 DNA 的提取·····	22
2.1.3	桑树基因组 DNA 的酶切反应及提纯·····	24
2.1.4	酶切产物的纯化·····	24
2.1.5	准备接头(Adaptor) ·····	25
2.1.6	接头连接反应·····	25
2.1.7	PCR检测·····	25
2.1.8	生物素化·····	26
2.1.9	磁珠捕获·····	26
2.1.10	PCR扩增·····	26
2.1.11	T 载体连接·····	26
2.1.12	电转感受态细胞的制备·····	27
2.1.13	感受态电转·····	27
2.1.14	涂板·····	28
2.1.15	克隆的筛选·····	28
2.1.16	测序和设计引物·····	28
2.1.17	SSR 扩增体系·····	28
2.1.18	SSR 电泳·····	28
2.1.19	数据分析·····	28
2.2	结果·····	29
2.2.1	桑树基因组 SSR 分离·····	29
2.2.2	微卫星基因组文库构建与碱基序列分析·····	30
2.2.3	桑树微卫星的多态性检测·····	30

2.3 讨论	33
第三章 桑树栽培种和野生种间遗传多样性的 SSR 和 ISSR 比较分析	34
3.1 材料与方法	35
3.1.1 试验材料	35
3.1.2 桑树基因组DNA的提取	35
3.1.3 ISSR分析	35
3.1.4 SSR分析	36
3.1.5 数据分析	36
3.2 结果	37
3.2.1 ISSR和SSR多态性分析	37
3.2.2 遗传相似系数和聚类分析	40
3.2.3 ISSR和SSR标记的相关分析	41
3.3 讨论	41
3.3.1 ISSR和SSR标记信息量比较	41
3.3.2 ISSR和SSR的多态性和遗传变异	42
3.3.3 桑种质资源资源保护策略的思考	42
第四章 我国桑树选育品种 ISSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析	50
4.1 材料和方法	51
4.1.1 试验材料	51
4.1.2 桑树基因组 DNA 的提取	51

4.1.3	ISSR 分析	51
4.1.4	PCR 的扩增、电泳、数据分析	51
4.2	结果	51
4.2.1	桑树选育品种间的ISSR多态性	51
4.2.2	桑树选育品种的ISSR分子鉴定	55
4.2.3	桑树选育品种的遗传变异及聚类分析	56
4.3	讨论	60
第五章	我国不同生态型桑树品种遗传多样性的 ISSR 分析	61
5.1	材料与方法	61
5.1.1	试验材料	61
5.1.2	桑树基因组 DNA 的提取、ISSR 扩增、电泳	61
5.1.3	数据分析	61
5.2	结果	64
5.2.1	群体间 ISSR 多态性	64
5.2.2	遗传多样性及聚类分析	65
5.3	讨论	69
5.3.1	群体间遗传多样性及聚类分析	69
5.3.2	群体样本大小	69
5.3.3	生物保护的涵义	69
第六章	桑树二倍体及人工诱导同源四倍体遗传差异的 ISSR 分析	71
6.1	材料与方法	71
6.1.1	试验材料	71

6.1.2	桑树基因组 DNA 的提取、SSR 的扩增、电泳及数据分析·····	71
6.2	结果·····	71
6.2.1	桑树品种间的多态性·····	72
6.2.2	桑树二倍体及人工诱导同源四倍体的ISSR多态性·····	73
6.2.3	供试材料间的遗传相似系数及聚类结果·····	74
6.3	讨论·····	75
6.3.1	同源材料间的多态性·····	75
6.3.2	二倍体及人工诱导同源四倍体桑树品种性状差异的原因分析·····	75
第七章	桑树无性系遗传变异的 ISSR 分析·····	77
7.1	材料和方法·····	77
7.2	结果·····	77
7.2.1	桑树田间和试管苗无性繁殖个体 ISSR 遗传变异·····	77
7.2.1	桑树品种间 ISSR 遗传变异·····	79
7.3	讨论·····	80
第八章	凤尾桑及其芽变品系间遗传变异的 ISSR 分析·····	81
8.1	材料与方法·····	81
8.2	结果·····	81
8.3	讨论·····	83
第九章	基于 nrDNA 的 ITS 序列研究桑属（荨麻目：桑科）系统发育·····	84
9.1	材料与方法·····	84
9.1	试验材料·····	84

9.2 桑树基因组 DNA 的提取·····	84
9.3 ITS 序列的扩增·····	84
9.4 ITS 扩增产物的纯化和测序·····	84
9.5 ITS 序列分析·····	85
9.2 实验结果·····	85
9.2.1 桑属 ITS 序列的长度、G+C 含量·····	85
9.2.2 桑属 ITS 序列的聚类分析·····	87
9.3 讨论·····	87
第十章 基于 cpDNA 的 trnL-trnF 间隔区序列研究桑属(荨麻目: 桑科)	
系统发育·····	89
10.1 材料与方法·····	89
10.1 试验材料·····	89
10.2 桑树基因组 DNA 的提取·····	89
10.3 trnL-trnF 序列的扩增·····	89
10.4 trnL-trnF 扩增产物的纯化和测序·····	89
10.5 trnL-trnF 序列分析·····	90
10.2 结果·····	91
10.2.1 桑属 trnL-trnF 的特点·····	91
10.2.2 桑属 trnL-trnF 基因间隔区序列同源性的比较和进化分析·····	91
10.3 讨论·····	92
10.3.1 桑属 trnL-trnF 基因间隔区序列和 ITS 序列的比较·····	92
10.3.2 桑属 trnL-trnF 基因间隔区序列的聚类结果分析·····	92

第十一章 结论与讨论·····	94
参考文献·····	98
附录·····	108
致谢·····	114
作者简介·····	116

英文缩写说明

CTAB: cetyltrimethylammonium bromide 十六烷基三甲基溴化胺

PVP: polyvinyl-polypyrrolidone 聚乙烯吡咯烷酮

RNase: ribonuclease RNA 酶

Amp: Ampicillin 氨苄青霉素

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-indolyl- β -galactoside 5-溴-4-氯-3-吲哚- β -硫代半乳糖苷

IPTG: isopropyl-1-thio- β -D-galactoside 异丙基-硫代- β -D-半乳糖苷

Oligo: oligonucleotide 寡核苷酸

ISSR: inter-simple sequence repeat

SSR: simple sequence repeat 简单序列重复

PCR: polymerase chain reaction 聚合酶链式反应

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶

ITS: internal transcribed spacer 内转录间隔区

cpDNA: chloroplast DNA 叶绿体 DNA

bp: base pair 碱基对

DNA: deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸

EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid 乙二胺四乙酸

mtDNA: Mitochondrial DNA 线粒体 DNA

nrDNA: nuclear ribosomal DNA 核核糖体 DNA

SDS: sodium dodecyl sulfate 十二烷基硫酸钠

UPGMA Unweighted pair group with mathematic average 类平均法聚类

DNA: deoxyribonucleic acid 脱氧核糖核酸

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate 十二烷基硫酸钠

dNTP: deoxynucleoside triphosphate 脱氧核苷三磷酸

TEMED: *N,N,N',N'*-tetramethylethylenediamine *N,N,N',N'*-四甲基乙二胺

PIC: polymorphism information content 多态性信息含量

PCA: principal coordinates analysis 主成分分析

H_E : expected heterozygosity 期望杂合度

H_O : observed heterozygosity 观察杂合度

W/B buffer: wash buffer 洗涤缓冲液

第一章 绪 论

1.1 研究目的与意义

我国是蚕桑生产起源地,栽桑、养蚕历史悠久,蚕茧产量居世界首位。蚕业对中华民族的繁荣昌盛,对世界物质文明与文化交流作出了杰出的贡献。我国地域辽阔,生态环境各异,经长期的自然选择和人工选育,形成了丰富的桑树种质资源,不少种为我国特有。开展桑树种质资源遗传多样性和分子系统学研究,这对桑种质的亲缘关系鉴定、保存、利用、核心种质的构建、评价及桑树育种都具有重要的实用价值和理论意义。

桑树是多年生的重要经济作物,是家蚕的唯一饲料,目前我国有桑种质资源 3000 余份。由于桑是异花授粉植物,自然界分布极广,很易杂交,又能通过无性繁殖,所以易于形成过渡类型,且易于保留,因此通过长期的自然杂交和人工杂交繁殖,使桑树遗传背景十分复杂,使桑属(*Morus*)有许多种(species)及变种(variety)。自从 1753 年林奈将桑属分为五个桑种以来,许多有关植物学家对桑树进行过分类。但到目前为止,该分类方法仍存在不足。继传统的形态学分析后,不少学者开展了染色体核型分析、同工酶分析以及其它方法,但仍难以解决系统进化及分类上的许多分歧。它们是基因表达型的标记,可利用的多态位点少,易受环境影响,不能满足种质资源鉴定和育种工作需求。桑树分类百家齐鸣,各有不同的观点,因此,采用不同的手段和技术来完善和补充现行的分类系统,实属必要。

1980 年 Botstein 提出 DNA 限制性酶切片段长度多态性(RFLP)可以作为遗传标记,开创了分子标记的新阶段。当前飞速发展的分子标记已在基础理论、遗传育种和物种进化等方面显示出了重要应用价值。向仲怀等(1995)首次利用 RAPD 技术构建了桑属 9 个种的共 9 种材料基因 DNA 指纹图谱,对桑属植物分类进行了探索性研究。此后有许多学者相继利用 RAPD (菅贵史, 1995; 冯丽春, 1996; 1997; 楼程富, 1996, 2003; 赵卫国, 2000; Esha, 2001; 焦锋, 2001; 杨光伟, 2003)对桑属植物进行了研究。但随着 RAPD 技术的广泛应用,其局限性也相继被提出。认为不同种或属的扩增产物难以作其同源性分析,只能作表征分析而且 PCR 产物存在重复性问题。桑树利用 AFLP 分子标记技术方面, Sharma (2000)、王卓伟 (2000)、杨光伟 (2003)和丁农 (2005) 等对桑品种 DNA 多态性进行了研究,并探讨了桑种间的亲缘关系。

简单序列重复(Simple Sequence Repeat, SSR),又称微卫星(Microsatellite),是指由 1~5 个核苷酸组成的短序列(又称核心序列或主题序列),现已证明存在于绝大多数真核生物基因组中。和其它 DNA 分子遗传标记相比,SSR 数量比较丰富,覆盖整个基因组;呈现多基因特点,信息含量高;表现为共显性;孟德尔式遗传 (Love,1990);可利用 PCR 进行分析,重复性好。而且,SSR 分析对 DNA 数量及纯度要求不高,可以引物序列的形式进行实验室间交流等优点。因此,SSR 是一种较为理想的分子遗传标记,一经问世就引起了广泛兴趣,促进了对其在植物基因组中分离、分布及数量研究。对植物 SSR 的分离及克隆始于对几个热带树种的研究 (Condit, 1991),其后,

扩展到大豆、水稻、小麦等农作物及其它植物中。目前已有大量文章对传统分离 SSR 方法进行了改进,建立了一套有效的富集 SSR 方法,为开展桑树 SSR 分子标记研究成为可能。ISSR (Inter-simple sequence repeat) 是由 Zietkiewicz 等 1994 年创建的一种简单序列重复区间扩增多态性的新型的分子标记。ISSR 标记根据植物广泛存在 SSR 的特点,利用在植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物,PCR 扩增的引物通常为 16-18 个碱基序列,由 1-4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,无需预先克隆和测序。ISSR 分子标记具有简单和重复性好的优点。SSR 和 ISSR 并已应用于品种鉴定、基因组作图、遗传距离分析、群体遗传等研究中。目前利用 ISSR 和 SSR 研究桑树遗传多样性报道甚少 (Vijayan, 2003, 2004; Awasthi, 2004; Aggarwal, 2004)。

近几年来,由于分子系统学蓬勃发展,核 rDNA、叶绿体 DNA 以及线粒体 DNA 序列分析纷纷被应用到系统发育研究中,从 DNA 核苷酸水平来研究生物多样性与生物进化,揭示了 DNA 分子中核苷酸的变异来研究植物的系统发育、种内进化及遗传多样性等,这比一般方法更直观、准确、可靠,并已被广大分类学家接受。目前用于分子系统学研究的主要基因种类有叶绿体基因组的 *rbcL*(Ribulose-bisphosphate carboxylase large subunit)、*matK* (tRNA 成熟酶编码基因)、*ndh* (脱氢酶编码基因)、*trn*(tRNA 编码基因间隔区)、*rps4*、*atp* 和核基因组的 18s rRNA 以及 ITS (内转录间隔区) 等。赵卫国等 (2001) 对白桑和鲁桑 *trnL-trnF* 基因间隔区序列进行了测定。史全良 (2001) 等对蒙桑的 ITS 进行了测序,并探讨了其 DNA 序列在桑属植物分子系统发育研究中的潜在作用。

任何一个物种都有其独特的基因库和遗传结构,同时在不同的个体间往往也存在着丰富的遗传变异,这些统统构成了生物的遗传多样性。因此,遗传多样性是生物界所有遗传变异的总和。遗传多样性与物种多样性及生态系统多样性的不同之处在于有些遗传多样性是我们用肉眼难以直观感觉到的,而必须要借助某些现代生物学的技术与手段加以检测。遗传多样性的研究可以揭示物种或居群的进化历史(起源的时间,地点,方式),也能为进一步分析其进化潜能和未来的命运提供重要的信息(葛颂, 1994)。不仅如此,它还可以帮助我们正确地理解不同分类群间的亲缘演化关系,为生物的分类和进化研究提供有益的资料,为系统发育分类系统的建立提供佐证。

从总体上讲,桑树的遗传多样性和系统进化研究,在国内外都处于相对滞后的阶段。我国是世界上桑种质资源最丰富的国家,桑树系统学研究的现状与桑树在我国经济发展中所发挥的地位和作用十分不相称。因此本研究拟利用《国家种质—镇江桑树圃》保存丰富的桑种质资源 (其数量和类型居世界首位),开展桑树微卫星的富集,利用 ISSR、SSR 标记,研究桑属植物和不同生态类型遗传资源的遗传多样性;利用 ITS 和 *trnL-trnF* 基因间隔区序列研究桑属植物的系统发育、亲缘关系与分子进化,构建桑属系统发育树;分析我国育成桑品种遗传多样性和亲缘关系,解决桑品种同种异名和异名同种的混淆状况,建立桑品种的有效分子标记鉴定;研究桑树变异株系和无性系的遗传变异,以期了解桑树的遗传结构变异机理、无性繁殖的遗传稳定性以及为桑树遗传改良提供理论依据。以上研究对桑遗传资源的鉴定、核心种质的构建、重要农艺性状基因的发掘与利用和桑树遗传育种都具有重要意义,为有效保护和合理利用桑遗传资源提供了科学依据和技术方法,为蚕业可持续发展提供种质基础。

1.2 国内外研究现状

1.2.1 桑树的分类简史

植物分类学是区分植物种类,探索植物间亲缘关系、阐明植物界自然系统的科学。它与植物形态学、植物解剖学、植物胚胎学、植物生理学、植物地理学、植物生态学、细胞学、遗传学、古生物学、生物化学等都有密切关系。凭借这些学科知识,对植物形态描述,对植物体的结构和机能特性,作出综合的、深入的研究,才能反映出客观的植物界进化的情况,才能完成植物分类学的任务。对一个特定的种的系统学的发展和理解经常表明该种基因型利用的进步。对桑属而言更是千真万确。在蚕业重要国家,例如中国、日本和法国等国家,非常重视桑种的系统学和桑种的相互关系研究。植物分类学在开发和利用植物遗传资源等方面起重要作用。

1.2.1.1 桑树在植物分类学上的位置

桑树是落叶性多年生木本植物,乔木多,灌木少。植物体中有白色乳汁,叶互生,叶裂或不裂、叶缘有锯齿,叶柄基部侧生早落性托叶。穗状花序,花雌雄异株或同株,果实肉质肥厚,相集而成为聚花果或称桑椹。桑树在植物分类学上的位置是:

界 植物界 (Regnum Vegetabile)
 门 种子植物门 (Spermatophyta)
 亚门 被子植物亚门 (Angiospermae)
 纲 双子叶植物纲 (Dicotyledoneae)
 目 荨麻目 (Urticales)
 科 桑科 (Moraceae)
 属 桑属 (*Morus* L.)
 种 桑种 (*Morus alba* Linn.)

桑科植物中,同桑属近缘的植物有构属 (*Broussonetia*)、柘属 (*Cudrania*)及榕属 (*Ficus*)等。

1.2.1.2 桑属系统分类研究简史

桑属现主要生长在纬度 50°N 和 10°N 的温暖潮湿地区 (Yokoyama, 1962)。Hooker (1885)把桑属放在荨麻目下,同时Takhtajan (1980)根据它们的相对进化程度,正确地把桑属分在荨麻目桑科下。荨麻目有4个科组成,包括榆科 (*Ulmaceae*),桑科 (*Moraceae*)、大麻科 (*Cannabaceae*)和荨麻科 (*Urticaceae*); Takhtajan (1980)分成5个科增加了Cecropiaceae科。荨麻目内部,榆科认为是最原始,桑科和榆科有相当近的同源性。

关于以上桑属的目和科的系统有了广泛的认识,但对于桑属的分类系统学研究却存在不同意见和相当大的混乱。Das 认为种群间的杂交授粉产生了大量变异,使桑属分类和鉴定产生了困难 (Das, 1983)。

桑属的分类法,植物学鼻祖林奈 (Linnaeus) (1753)其所著的 *Species plantarum* 第一版,记载五个桑种,这是世界上桑属分类的开始。

白桑 *Morus alba* Linn.

黑桑 *Morus nigra* Linn.

红桑 *Morus rubra* linn.

鞑靼桑 *Morus tatarica* linn.

印度桑 *Morus indica* linn.

1842 年意大利的毛利奇 (G. Moretti) 将桑属分为 10 个种。Ledebour (1846~51) 根据柱头上毛的有无将桑属分为白桑和黑桑两个桑种。1855 年施林寄 (Seringe) 将桑属分为 8 个种。1873 年法国布油劳 (Bureau) 根据花序形状和长度类型将桑属分为 6 个种 19 个变种 12 个亚种。Brandis (1906) 根据花序长度、聚花果形状和叶片特性对桑属进行力量分类。1916 年德国舒奈德 (Schnecker) 将桑属分为 3 个种, 7 个变种。1916 年美国的贝莱 (Bailey) 将桑属分为 6 个种 6 个变种。

1917 年日本的小泉源一 (Koidzum) 利用前人桑属分类工作成就和日本蚕丝试验场收集的桑树材料, 把桑属分为 24 个种 1 个变种, 1921 年又改为 30 个种 10 个变种。小泉源一对桑属的分类, 比前人进了一步, 虽然它还存在缺点, 但还是令人满意的。他所建议的分类按雌花柱有无分二大类, 再就柱头上具毛和突起再分两类, 共四类, 再就叶子、花序、花萼、枝条的形态性状进行描述, 还应用了叶、叶柄、花序、聚花果数量上的指标表示。日本的堀田祯吉 (Hotta) (1930) 又按小泉源一的分类法把桑属分为 35 个种。他从日本、中国、朝鲜等国家的桑属植物中所作的分类共列有 14 个种。Airyshaw (1973) 报道桑属至少有 10 个种。

最近有许多作者根据解剖学和其他方法对桑属系统学进行了研究和探讨。

Katsumata (1971) 根据在叶片上发现的异细胞类型提出了桑属的分类。用异细胞形状和大小可把桑种分为 4 类, 这种分类和根据花柱特性的分类系统有相关性。

Shah (1979) 根据叶片解剖特性, 例如表皮厚度、表皮细胞大小和形状、厚角组织类型、叶肉细胞中栅栏组织和海绵组织相对厚度等指标, 将桑种分为白桑、广叶桑、山桑和黑桑。同年又根据木质结构将桑属分为 2 个组。

白胜 (1998) 开展了桑属植物形态系统数值分类研究。Tikader (2001) 根据 26 个桑树形态特征特性指标用 6 种不同的聚类方法对 13 个桑种的遗传分化进行了研究, 发现印度桑和黑桑、白桑和鲁桑、鸡桑和红桑、华桑和山桑聚为一类, 说明它们亲缘关系较近。杨光伟 (2003) 根据桑树形态分类中 16 个重要形状开展了桑属植物的分支分析, 发现川桑分化最早。

1.2.1.3 我国桑属分类近况

根 1937 年我国植物学家陈嵘在《中国树木分类学》中将我国桑属分为 5 个种 7 个变种。继陈嵘后我国植物学家胡先骕又将我国桑属分为 8 个种。据国内外植物分类学家对桑属分种的文献记载, 近年来各省区开展桑树种质资源考察、收集到的大量实物, 经过整理和鉴定, 我国有 15 个种 4 个变种。是目前世界上桑种分布最多的国家。我国的桑属分种分为二部分, 其中栽培种有: 白桑、鲁桑、广东桑、瑞穗桑; 野生桑有长穗桑、长果桑、黑桑、华桑、细齿桑、蒙桑、山桑、川桑、唐鬼桑、滇桑、鸡桑等, 变种有蒙桑的变种鬼桑、白桑的变种大叶桑、垂枝桑、白脉桑等, 分布于全国不同地区 (潘一乐, 2000; 2003)。

桑树分类沿用形态特征进行分类, 一般都以树型、枝条、冬芽、叶片、托叶、花萼等。目前按植物分类学家对桑属植物分类主要根据雌花花柱有无分为二类 (即有明显花柱、无明显花柱), 再就柱头上具毛或突起再分二类, 共四类。再以枝、叶、花、萼形态性状描述。中国桑属分种检索表如下:

1. 雌花无明显花柱

2. 柱头内侧具突起

3. 叶面、叶背无毛，聚花果圆筒形，长4~16厘米

4. 叶长椭圆形或椭圆形，边缘有浅锯齿或近全缘，雌花极短花柱，聚花果成熟紫红色……………1. 长穗桑 (*Morus wittiorum* Hand-Mazz.)

4. 叶卵圆形或广卵圆形，边缘有细锯齿，雌花无花柱，聚花果成熟紫红色或黄白色……………2. 长果桑 (*Morus laevigata* Wall.)

3. 叶背叶脉被生柔毛，聚花果椭圆形或圆筒形，长1.6~3厘米

5. 叶大，心脏形，常不分裂，叶面有缩皱，边缘圆形锯齿，雌花无花柱，聚花果成熟紫黑色……………3. 鲁桑 (*Morus multicaulis* Perr.)

5. 叶小，卵圆形，常分裂，叶平无缩皱，边缘钝、锐锯齿，雌花短花柱，聚花果成熟白色，胎红色或黑色……………4. 白桑 (*Morus alba* Linn.)

6. 枝条直，叶通常不分裂

7. 叶大，多为心脏形，叶基浅心形，边缘锯齿状，叶脉深绿色…5. 大叶桑 (*Morus alba* var. *macrophylla* Loud.)

7. 叶小，菱状卵圆，叶基楔形，边缘有不整齐的锯齿，有白色粗叶脉……………6. 白脉桑 (*Morus venose* Del.)

6. 枝条细长下垂，叶小，通常分裂……………7. 垂枝桑 (*Morus alba* var. *pendula* Dipp.)

2. 柱头内侧具毛

8. 叶背被柔毛，叶柄粗短，聚花果成熟紫红色或黑色

9. 叶广心形，叶上面粗糙，雌花无花柱，聚花果椭圆形或球形，长2~3厘米，成熟呈黑色……………8. 黑桑 (*Morus nigra* linn.)

9. 叶心脏形或近圆形，叶上面被毛，雌花极短花柱，聚花果圆筒形，长约3厘米，成熟紫红色或白色……………9. 华桑 (*Morus cathayana* Hensl.)

8. 叶上面无毛，叶背面被毛或脉腋被簇毛，聚花果成熟紫黑色或紫色

10. 叶卵圆形，边缘钝锯齿，齿尖无短刺芒，叶基浅心形或截形，聚花果圆锥状，椭圆形，先端钝圆，成熟紫黑色……………10. 广东桑 (*Morus atropurpurea* Box.)

10. 叶广卵形或近心形，背面被白色柔毛，边沿锯齿三角形，齿尖有短刺芒，叶基心形，聚花果短圆筒形，成熟紫色……………11. 细齿桑 (*Morus serrata* Roxb.)

1. 雌花有明显花柱

11. 柱头内侧具突起

12. 叶缘齿尖具长刺芒

13. 叶卵圆形或卵状椭圆形，叶面光滑无毛，叶背光滑无毛，仅叶脉散生毛，叶常不分裂……………12. 蒙桑 (*Morus mongolica* Schneid.)

13. 叶卵圆形或心脏形，叶面粗糙有刚毛，叶背生白色柔毛，叶脉密生毛，叶常分裂……………13. 鬼桑 (*Morus mongolica* var. *diabolica* Koidz.)

12. 叶缘齿尖无长刺芒

14. 叶上面粗糙

15. 叶心脏形或卵圆形, 叶背面稍生微毛或较粗毛, 叶缘钝锯齿而不整齐, 聚花果球状椭圆形, 长 2~3 厘米, 成熟紫黑色……………14 山桑 (*Morus bombycis* Koidz.)

15. 叶亚圆形, 叶背无毛, 边缘具窄三角形锯齿, 聚花果圆筒形, 长 3~5 厘米, 成熟时黄白色 ……15 川桑 (*Morus notabilis* Schne.)

14. 叶上面光滑

16. 叶缘钝锯齿, 聚花果球形或椭圆形

17 广心脏形, 叶上面无缩皱, 叶缘钝锯齿, 齿尖具短突起, 花柱同柱头等长, 聚花果小球形……………16 唐鬼桑 (*Morus nigriiformis* Koidz.)

17. 叶长心脏形, 叶上面有微缩皱, 叶缘齿尖无短突起, 花柱比柱头短, 聚花果椭圆形……………17 瑞穗桑(*Morus mizuho* Hotta.)

16. 叶心脏形, 叶上面无缩皱, 边缘三角形锯齿, 齿尖具短尖头, 聚花果长圆筒形, 长 4~6 厘米……………18 滇桑 (*Morus yunnanensis* Koidz.)

11. 柱头内侧具毛, 叶卵圆形或斜卵圆形, 常分裂, 边缘有不整齐的钝锐锯齿, 齿尖具短突起, 聚花果短椭圆形, 长 1~2 厘米, 成熟紫黑色…………… 19 鸡桑 (*Morus australis* Poir.)

1.2.2 分子系统学的研究方法及其在桑树分子系统学研究上的应用

分子系统学 (molecular systematics) 是近 30 年发展起来的一门综合性前沿学科, 它在分子水平上对生物进行遗传多样性、分类、系统发育和进化等方面的研究, 其研究结果对于保护生物多样性 (尤其是遗传多样性), 揭示生物进化历程及机理具有十分重要的意义。

1.2.2.1 分子系统学的定义及发展简史

分子系统学是通过检测生物大分子包含的遗传信息, 定量描述、分析这些信息在分类、系统发育和进化上的意义, 从而在分子水平上解释生物的多样性、系统发育及进化规律的一门学科。它以分子生物学、系统学、遗传学、分类学和进化论为理论基础, 以分子生物学、生物化学和仪器分析技术的最新发展为研究手段, 是一门交叉性很强的学科。分子系统学使得系统发育和进化的研究进入到在分子水平上对演化机制的本质进行探讨的阶段, 其发展历史根据研究方法的发展大致可分为三个阶段。20 世纪 50~60 年代, 分子系统学的研究主要在蛋白质的水平上进行。70 年代, 分子系统学研究进入了核酸水平时期。Botstein (1980) 美国提出 DNA 限制性酶切片段长度多态性(RFLP)可以作为遗传标记, 开创了直接应用 DNA 多态性发展遗传标记, 即分子标记的新阶段。80 年代以来, 以多聚酶链式反应(PCR)和 Southern 杂交为基础发展了一系列衍生技术, 如随机扩增多态性 DNA 技术、DNA 指纹图谱技术和扩增片段长度多态性技术等, 近几年来又发展了微卫星 DNA 指纹图谱技术及核酸序列测定技术, 分子系统学在 DNA 水平的研究飞速发展并取得了大量的显著性成果。

1.2.2.2 遗传标记及分子标记概念

遗传标记(genetic markers)是基因型的特殊的易于识别的表现形式。广义的分子标记

(molecular marker)是指可遗传的并可检测的 DNA 序列或蛋白质。蛋白质标记包括种子贮藏蛋白和同工酶(指由一个以上基因位点编码的酶的不同分子形式)及等位酶(指由同一基因位点的不同等位基因编码的酶的不同分子形式)。狭义的分子标记概念只是指 DNA 标记,而这个界定现在被广泛采纳。理想的分子标记必须达到以下几个要求:(1)具有高的多态性;(2)共显性遗传,即利用分子标记可鉴别二倍体中杂合和纯合基因型;(3)能明确辨别等位基因;(4)遍布整个基因组;(5)除特殊位点的标记外,要求分子标记均匀分布于整个基因组;(6)选择中性(即无基因多效性);(7)检测手段简单、快速(如实验程序易自动化);(8)开发成本和使用成本尽量低廉;(9)在实验室内和实验空间重复性好(便于数据交换)(Weising, 1995)。

1.2.2.3 遗传多样性及分子系统学的研究方法

1.2.2.3.1 蛋白质水平的标记与检测手段

在植物系统与进化研究中,单纯以植物的形态特征为依据,有时会产生很多困难。因为植物的外部形态有很大的伸缩性,杂交、多倍体和无融合生殖的存在又常常使原来清楚的形态界线变得模糊。70 年代,酶电泳开始应用于植物系统和进化研究。酶是基因的产物,是基因表达的结果。酶蛋白多肽链结构中的氨基酸排列顺序,是由 DNA 上结构基因所携带的遗传信息所决定的。因此根据酶电泳谱带的分析,就能识别控制这些谱带表达的基因,在 DNA 分子水平上研究生物。由于这种技术的应用依赖于酶多分子形式(同工酶)的存在,所以又被称之为同工酶分析技术。同工酶分析应用范围较宽,还包括对研究种的遗传学结构、遗传多样性、繁育系统、探查无性系和地理变异等,种上的种间界线、标本鉴定、推断,对杂种或多倍体的亲本、类群间的亲缘关系、近期系统发育重建等都有巨大潜力(Market, 1959; Soltis, 1989; 葛颂, 1994)。

桑树同工酶研究起步较晚,70 年代才开始(勒永年, 1995)。在桑树品种的分类和亲源关系的鉴别方面,平野久(Hirano, 1976)采用凝胶等电电泳法对 250 个桑品种的叶片进行了过氧化物酶同工酶分析,根据电泳图谱中各桑品种的酶带表型特征及其迁移分布的不同,来判别品种间的亲源关系,并按其亲源关系分成 Go 型、Ya 型、Ka 型、Ko 型、Da 型等 5 个不同类型。我国陈道明等(1980)采用聚丙烯酰胺盘状凝胶电泳法分析了 60 个不同品系的桑品种侧芽的过氧化物酶同工酶酶谱的差异,从中找到了 8 个不同类型。武玉壁等(1986)对 40 个桑品种的幼叶和成叶,分别进行过氧化物酶同工酶比较分析,按亲源关系的远近分为 5 类。何大彦(1988)等对桑属的几个种以及品种的幼叶和冬芽的细胞色素氧化酶同工酶和过氧化物酶同工酶酶谱进行分析。何大彦(1990a, 1990b)等又利用桑树冬芽的过氧化物酶同工酶酶谱进行了分析,来鉴别同种异名的桑品种。又有作者进行了类似研究(郭洪荣, 1994 年;朱祥瑞, 1995)。同工酶标记这一生化表现型反映基因型异同的方法与依据形态学、农艺性状来对桑属植物分类更正确可靠,但同工酶标记的实验结果随桑树不同发育时期、器官及环境而变化,有限种类的酶分析会带来一定偏差,常选用的酶只有 20~30 种,很难代表整个基因组的随机取样。可以利用的遗传位点数量比较少;对电泳分析的样品要求较高,所选酶的所有基因未必都表达在酶谱上,酶电泳分析可能会低估居群中遗传变异的量,电泳条件(凝胶孔径、pH 值等)的改变都可能产生额外的酶谱差异(王中仁, 1996)。

1.2.2.3.2 DNA 水平的标记与检测

目前遗传标记主要有 4 种类型:(1)形态标记(morphological markers);(2)细胞标记(cytological markers);(3)生化标记(biochemical markers);(4)DNA 分子标记(molecular markers)。但前 3 种标记都是基因表达型的标记,可利用的多态位点少,易受环境影响,不能满足种质资源鉴定和育种工

作需求。DNA 分子标记即是指以 DNA 多态性为基础的遗传标记。分子标记与前 3 种遗传标记相比,具有以下优点:(1)直接以 DNA 形式出现,没有上位效应,不受环境及其它因素的影响;(2)数量极多,遍及整个基因组;(3)多态性高;(4)表现“中性”,即不影响目标性状的表达,与不良性状无必然的连锁;(5)许多表现为“共显性”,能鉴别纯合和杂合基因(Tanksley,1989)。当前 DNA 分子标记已用于作物遗传资源及育种研究,分别被称为分子种质资源鉴定和分子标记育种(贾继增,1996)。

1) 限制性片段长度多态性

限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphism, 缩写 RFLP) 是发展最早的分子标记技术。其基本原理是检测 DNA 在限制性内切酶酶切后形成的特定 DNA 片段的大小。因此凡是可以引起酶切位点变异的突变如点突变(新产生和去除酶切位点)和一段 DNA 的重新组织(如插入和缺失造成酶切位点间的长度发生变化)等均可导致 RFLP 的产生。此技术及其从中发展起来的一些变型均包括以下基本步骤: DNA 的提取、用限制性内切酶酶切 DNA、用凝胶电泳分开 DNA 片段、把 DNA 片段转移到滤膜上、利用放射性标记的探针显示特定的 DNA 片段(通过 Southern 杂交)和分析结果。与传统的遗传标记比较, RFLP 标记对构建遗传图谱最突出的优点是:无表型效应, RFLP 标记的检测不受环境条件和发育阶段的影响;非等位基因不存在上位效应,因而互不干扰; RFLP 标记源于基因 DNA 的自身变异,几乎不受数量上的限制; RFLP 标记在等位基因之间一般表现为共显性,因而在配置组合时不受杂交方式的影响。但其也存在不足之处:需要 DNA 的量较大,检测方法繁琐且周期长,需放射性的标记探针,探针的种属特异性强,检测的位点少,提供信息有限(Angela, 1996)。

2) 随机扩增多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)

该技术用一个(有时用两个)随机引物(一般 8~10 个碱基)非定点地扩增 DNA 片段,然后用凝胶电泳分开扩增片段(Williams, 1990; Welsh, 1990)。其特点包括:(1)不需 DNA 探针,设计引物也不需要知道序列信息;(2)用一个引物就可扩增出许多片段(一般一个引物可扩增 6~12 条片段,但对某些材料可能不能产生扩增产物),总的来说 RAPD 在检测多态性时是一种相当快速的方法;(3)技术简单,RAPD 分析不涉及 Southern 杂交、放射自显影或其它技术;(4)不象 RFLP 分析,RAPD 分析只需少量 DNA 样品;(5)成本较低;(6)RAPD 标记一般是显性遗传(极少数是共显性遗传的),这样对扩增产物的记录就可记为“有/无”,但这也意味着不能鉴别杂合子和纯合子;(8) RAPD 分析中存在的最大问题是重复性不太高,因为在 PCR 反应中条件的变化会引起一些扩增产物的改变,但是,如果把条件标准化,还是可以获得重复结果的(Lowe, 1996);(9)由于存在共迁移问题,在不同个体中出现相同分子量的带后,并不能保证这些个体拥有同一条(同源)的片段;同时,在胶上看见的一条带也有可能包含了不同的扩增产物,因为所用的凝胶电泳类型(一般是琼脂糖凝胶电泳)只能分开不同大小的片段,而不能分开有不同碱基序列但有相同大小的片段。

RAPD 技术的发展和相近的分子标记种类

下面提到的所有技术都是利用一个或两个短的富含 GC 碱基的随机引物:

DAF(DNA amplification fingerprinting):与 RAPD 技术不同的是,在 DAF 分析中,引物浓度更高,引物长度更短(一般 5~8 个碱基),只有两个温度循环(在 RAPD 中是三个温度循环),并且往往用聚丙烯酰胺凝胶电泳,DAF 通常会产生非常复杂的带型(Caetano, 1991)。在 DAF 技术的

基础上,又发展出了 ASAP 技术(arbitrary signatures from amplification files) (Caetano, 1996)。

AP-PCR(arbitrarily primed polymerase chain reaction): 在 AP-PCR 分析中,扩增分为三个部分,每个部分要求的条件和组分的浓度存在差异;在第一个 PCR 循环中,引物浓度较高;引物长度不定,并且常常来自为其它目的而设计的引物(如 M13 通用测序引物) (Welsh, 1990)。

3) 特定序列位点特定序列位点(sequence-tagged site,缩写 STS)是对由其特定引物序列所界定的一类标记的统称。利用特异 PCR 技术的最大优点是它产生的信息非常可靠,而不象 RAPD、AFLP 和利用随机探针产生的 RFLP 存在某种模糊性(如难以鉴别片段的来源)。这类分子标记主要包括以下几种分子标记。

STMS(Sequence-tagged microsatellites)通常又称为 SSR,也可称为 SSR (Simple sequence repeat polymorphisms): 基本原理和特点是引物根据与微卫星重复序列两翼的特定短序列设计,用来扩增重复序列本身。由于重复的长度变化极大,所以这是检测多态性的一种有效方法。其特点包括:一般检测到的是一个单一的多等位基因位点;共显性遗传,故可鉴别杂合子和纯合子;得到的结果复性很高。为了提高分辨力,通常使用聚丙烯酰胺凝胶电泳,它可检测出单拷贝差异。也可以在同一个反应试管中把 PCR 反应与不同的 STMS 引物结合起来(称为 multiplexing),这可节省时间,但是,这只能在不同引物的产物在大小上下不重叠的情况下才能使用 (Chaix, 2002)。

STMS 的发展和相近的分子标记种类: (1) 把与 SSR 互补的寡核苷酸作为多位点 RFLP 技术中的探针; (2) 把与 SSR 互补的寡核苷酸作为 PCR 引物 (可单独作引物或与随机引物配合使用), 扩增的是基因组 DNA 的特定片段, 即 MP-PCR (Gupta, 1994) 和 RAMP s (Wu, 1994); (3) 用标记的 SSR 探针与 RAPD 扩增片段杂交, 即 RAMPO (Richardson, 1995) 或称为 RAHM 或 RAMS。

4) 加锚微卫星寡核苷酸(Anchored microsatellite oligonucleotides)

对 STMS 技术进行了发展,用加锚微卫星寡核苷酸作引物,对基因组节段而不是重复序列本身进行扩增。在 SSR 的 5' 端或 3' 端加上 2~4 个随机选择的核苷酸,这可引起特点位点退火。这样就能导致位于反向排列的间隔不太大的重复序列间的基因组节段进行 PCR 扩增。这类标记又被称为 ISSR (Inter-simple sequence repeat) (Zietkiewicz, 1994)。

5) SCAR (Sequence-characterized amplified regions) SCAR 标记是在 RAPD 技术的基础上发展起来的 (Paran, 1993)。其基本步骤是:先作 RAPD 分析,然后把目标 RAPD 片段 (如与某目的基因连锁的 RAPD 片段) 进行克隆和测序,根据原 RAPD 片段两末端的序列设计特定引物 (一般比 RAPD 引物长,通常 24 个碱基),再进行 PCR 特异扩增,这样就可把与原 RAPD 片段相对应的单一位点鉴定出来,这样的位点就称为 SCAR。SCAR 比 RAPD 和其它利用随机引物的方法在基因定位和作图中的应用更好,因为它有更高的可重复性(原因是使用的引物长),标记是共显性遗传的。

6) CAPS (Cleaved amplified polymorphic sequence) CAPS 技术又可称为 PCR-RFLP。所用的 PCR 引物是针对特定的位点而设计的。其基本步骤是:先进行 PCR 扩增,然后将 PCR 扩增产物用限制性内切酶酶切,再用琼脂糖凝胶电泳将 DNA 片段分开,用 EB 染色,观察 (Konieczny, 1993; Gharzeyazie, 1995)。与 RFLP 技术一样, CAPS 技术检测的多态性其实是酶切片段大小的差异。在酶切前进行 PCR 产物检测,其多态性称为 ALP (Akopyanz, 1992)。在此基础上又发展出 dCARS 技术(derived CAPS),这是检测单核苷酸多态性的一种良好方法 (Neff, 1998)。

7) SPAR (Single primer amplification reaction) SPAR技术与RAPD技术相似的是也只用一个引物,但SPAR分析中所用的引物不是随机的,而是在SSR的基础上设计的,例如可能的序列是(TA)₁₀ 或 (CGA)₆。扩增的是SSR之间的DNA序列 (Gupta, 1996)。又称为MP-PCR(microsatellite-primed PCR) (Weising, 1995)。

8) DAMD (Directed amplification of minisatellite region DNA) 直接用小卫星的核心序列作引物进行扩增。

9) 扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, 缩写 AFLP): 其特点是把 RFLP 和 PCR 结合了起来。其基本步骤是: 把 DNA 进行限制性内切酶酶切, 然后选择特定的片段进行 PCR 扩增 (在所有的限制性片段两端加上带有特定序列的“接头”, 用与接头互补的 3' 端有几个随机选择的核苷酸的引物进行特异 PCR 扩增, 只有那些与 3' 端严格配对的片段才能得到扩增), 再在有高分辨力的测序胶上分开这些扩增产物, 用放射性法、荧光法或银染染色法均可检测之。这种技术又称为“选择性限制性片段扩增”(Zabeau, 1994; Vos, 1995)。

10) 单核苷酸多态性 (Single nucleotide polymorphism, 缩写 SNP) 技术同一位点的不同等位基因之间常常只有一个或几个核苷酸的差异, 因此在分子水平上对单个核苷酸的差异进行检测是很有意义的。目前 SNP 作为一种新的分子标记, 已有 2000 多个标记定位于人类染色体上, 在植物上也在进行开发研究。可在胶上也可不在胶上就能检测出 SNP, 但检测 SNP 的最佳方法是新近发展起来的 DNA 芯片技术。

表 1.1 对上面的主要标记的特性进行了总结。

表 1.1 常用的分子标记特性比较

Table 1.1 Comparison of characters of commonly used molecular markers

特性 Character	RFLP	RAPD	AFLP	SSR
分布	普遍	普遍	普遍	普遍
可靠性	高	中等	高	高
重复性	高	中等	高	高
遗传性	共显性	显性	显性	共显性
多态性	中等	高	非常高	高
DNA 需求	2~30ng	1~100ng	100ng	50~100ng
放射性	一般有	无	有或无	无
技术难度	中等	简单	中等	简单
样品生产率	中低	高	非常高	高
时间因素	长	快	中等	快
探针类型	低拷贝DNA或cDNA克隆	随机序列	特异 DNA 序列	特异 DNA 重复序列
探测部分	低拷贝编码区域	整个基因组	整个基因组	整个基因组
检测位点	1~3	1~10	20~100	1~5

1.2.2.3.3 核酸序列测定(直接方法)

通过测定核酸一级结构中核苷酸序列组成来比较同源分子之间相关性的方法即为核酸序列分析方法。序列分析可提供高度重复的、信息丰富的数据, 适合中等和高层次分类群的系统学研究, 近年来用于种群水平的研究也逐步增加。具体在后面的章节进行详细叙述。

1.2.2.3.4 DNA 的构象变化与 SSCP 分析该

技术是 PCR 技术和 SSCP 技术的结合。PCR 产物经热或化学变性后形成单链, 其在中性聚丙烯酰胺凝胶中泳动时, 由于序列变化而引起单链 DNA 折叠的变化, 从而影响电泳迁移率变化, 产生单股 DNA 构象的多态性 (Hayashi, 1992; White, 1992)。

1.2.2.4 分子系统发生树 (phylogenetic trees) 构建的方法

系统发生 (phylogeny) 是指一群有机体发生或进化的历史。系统发生树就是描述这一群有机体发生或进化的拓扑结构。系统树分有根 (rooted) 和无根 (unrooted) 树。有根树反映了树上物种或基因的时间顺序, 而无根树只反映分类单元之间的距离而不涉及谁是谁的祖先问题。构建系统树的方法也有多种, 主要有非加权组平均法 (UPGMA, unweighted pair-group method using an arithmetic average)、邻结法 (NJ, Neighbor-joining Method) (Saitou, 1987)、最大简约法 (MP, maximum parsimony) 和最大似然法 (ML, maximum likelihood) 等4种 (Nei, 1983; Spencer, 2000; Doyle, 2000)。

用于系统发育分析的相关软件主要有 PHYLIP、PAUP, 另外还有其它一些系统发育程序, 这些程序包括 FastDNAm1, MACCLADE, MEGA plus METREE, MOLPHY 和 PAML 等。

1.2.2.5 DNA 分子标记技术在桑树遗传多样性上的研究进展

桑树是重要的经济作物, 但分子标记技术在桑树上的应用较晚。向仲怀等(1995)首次利用 RAPD 技术研究了 PCR 反应条件, 构建了桑属 9 个种的共 9 种材料基因 DNA 指纹图谱, 对桑属植物分类进行了探索性研究。日本的菅贵史 (1995) 等报导了利用 RAPD 技术评价桑树品种的研究, 他们利用 SDS 法提取桑树 DNA, 用 7 对引物对 100 个桑品种的 DNA 多态性进行了检测, 根据不同桑品种 DNA 多态性及遗传距离, 初步绘制出了供试桑品种的系统树状图。楼程富等 (1995; 1996; 1998) 用 24 个引物进行 PCR 扩增后, 供试 12 个品种显示较丰富的 DNA 多态性, 并利用 RAPD 技术对桑树有性杂交后代与双亲基因组 DNA 进行研究, 分析亲子代的变异情况。冯丽春 (1996, 1997) 等对桑树 4 个栽培种多态性进行了研究, 并探讨了桑树栽培种及各品种间的亲缘关系, 指出栽培种间亲缘关系由近及远依次为鲁桑-山桑-广东桑-白桑, 并探讨了桑属 12 个种和 2 个变种的进化分类。赵卫国等 (2000) 用 RAPD 技术对桑属 12 个种 3 个变种的 44 份材料和构属的 1 份材料基因组 DNA 进行了多态性分析, 用筛选出的 24 个随机引物扩增, 共得到 113 条清晰稳定的多态性片段, 多态性达 72.0%, 表明材料间有较丰富的遗传多样性。根据 Nei 遗传相似系数和遗传距离, 然后用 UPGMA 法 (类平均聚类法) 进行分析, 构建了 45 份材料间的系统树, 并进一步探讨了材料间的亲缘关系。焦锋等 (2001) 对桑树变异株系基因组 DNA 扩增多态性 (RAPD) 进行了研究, 为桑树的性状变异提供了分子水平的证据。Esha 等 (2001) 利用 23 RAPD 引物和 3 DAMD 引物对 9 个桑树材料进行了多态性研究。楼程富等 (2003) 利用 2 个混合引物的不同浓度梯度配比进行了 RAPD 扩增, 得到明显不同的扩增图谱, 表明 RAPD 反应中引物混合具有可行性, 并探明了双引物混合应用的合适配比和范围。杨光伟等 (2003) 利用 RAPD 技术开展了桑树种群遗传结构变异分析。以上研究为进一步利用 RAPD 分子标记技术构建桑树遗传图谱、分子辅助育种、重要农艺性状基因定位和系统分类提供了理论依据。

桑树利用 AFLP 分子标记技术方面, Sharma 等 (2000) 利用荧光 AFLP 标记对桑种质资源遗传多样性进行了评价。王卓伟等 (2001) 利用 AFLP 分子标记技术, 对 19 份桑育种材料, 其中 14 份四倍体, 5 份 2 倍体的遗传背景进行了研究分析, 构建了这些人工多倍体桑育种材料的 UPGMA 聚类图。杨光伟 (2003) 利用该技术探讨了桑属植物系统发育。以上研究不仅为从基因组 DNA 分子水平上为人工三倍体桑品种选育以及杂交亲本的选择和组配提供了遗传背景依据, 也为以后利用该技术对桑树分子遗传图谱构建、桑品种 (品系) 的鉴定以及亲缘关系遗传

分析提供了技术基础。

1.2.2.6 DNA 分子标记技术在桑树遗传和育种上的应用前景

利用分子标记技术进行研究虽然只有近 20 年的历史,但在农作物种质资源鉴定和分类、目标性状基因的定位、遗传图谱的构建等方面,已取得了突破性进展。随着分子标记新方法的不段出现,检测过程的自动化,数据分析的计算机化,在桑树上利用分子标记技术将有广阔的应用前景。

1) 利用分子标记技术,构建桑树分子遗传图谱

遗传图谱既是遗传研究的重要内容,又是作物资源、育种及分子克隆等许多应用研究的理论依据和基础。几乎所有重要农作物,包括水稻、玉米、小麦等 RFLP 图谱均已构成,并趋于饱和(Tanksley, 1989),而桑树仍是空白,所以应利用分子标记技术,构建桑树的分子遗传图谱。

2) 利用分子标记技术,分析桑树亲缘关系

应用多种分子标记技术,研究桑种质资源遗传多样性,这对种质资源的鉴定、创新及保存、探究桑树起源与发展进化,杂交亲本的选择都具有重要意义。

3) 利用分子标记技术,辅助选择育种

为改善某一品种的某一性状,常规育种是以此品种为轮回亲本,多次回交,将目的基因从供体转入轮回亲本,但回交育种中,与有利基因连锁的不利基因,也会随之导入。利用与目的基因紧密连锁的 DNA 标记,直接筛选,提高效率,培育出高产、优质、多抗的新品种。另外,几乎所有的育种过程都贯穿着选择这样一个基本环节。长期以来,选择都是基于植株的表型性状进行的。当性状的遗传基础较为简单或即使较为复杂但表现加性基因效应遗传时,表型选择是非常有效的。但植物的许多性状为数量性状,其表型受许多微效基因的控制,且易受环境的影响,此时根据表型提供的对性状遗传潜力的度量多是不确切的,因而选择往往是低效的。遗传育种家们很早就曾提出利用标记和遗传图谱进行辅助选择以加速植物遗传改良进程的理论(Sax, 1923)。标记辅助选择,就是通过标记对目标性状实施间接选择,其前提是标记与目标性状紧密连锁。

4) 利用分子标记技术,对桑树农艺性状定位

基因定位一直是遗传学研究的重要范畴之一,它对育种家的意义之大是不言而喻的,同时它对绘制生物体的基因图和由此研究生物的进化关系也有重要的意义。利用分子标记技术已对农作物中许多与经济性状及重要农艺性状有关的基因,如抗白粉病基因、耐盐基因及数量性状基因等进行了定位(贾继增, 1996; 邱芳, 1998; 冯宗云, 1998; 钱惠荣, 1998)。桑树方面应加强这一领域研究,这对品种的改良及新品种的选育具有重要意义。

5) 比较基因组

比较基因组(Comparative Mapping)研究主要是利用相同的 DNA 分子标记(主要是 cDNA 标记和基因克隆)在相关物种之间进行遗传或物理作图,比较这些标记在不同物种基因组中的分布特点,揭示染色体或染色体片段上的基因及其排列顺序的相同(共线性)或相似性(同线性),并由此对相关物种的基因组结构和起源进化进行分析。许多植物比较基因组作图研究发现,存在生殖隔离的不同植物物种之间在标记探针的同源性、拷贝数及连锁顺序上都具有很大程度的保守性,如番茄、马铃薯和辣椒(Tanksley, 1988)和大麦和水稻(Maroof, 1996)等。可见,比较基因组研究已使得传统的植物遗传学突破了物种的框架限定,发展成了新的系统遗传学。

1.2.3 SSR和ISSR分子标记及其在桑树遗传育种研究中的应用

近年来,分子标记的研究与利用得到了迅速的发展。对不同分子标记技术的选用,主要取决于应用目的和研究对象,理想的分子标记应既简单又可靠。目前应用于植物中的DNA分子标记主要有限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性DNA(RAPD)、扩增酶切片段长度多态性(AFLP)、序列特异扩增区域(SCAR)、数量可变串联重复(VNTR)、简单序列重复长度多态性(SSR)和简单序列重复区间扩增多态性(ISSR)等。由于SSR分子标记其高度可变性,一经问世就引起了广泛兴趣,成为了一种强有力的理想的分子遗传标记(Litt, 1989; Tautz, 1989; Weber, 1989)促进了对其在植物基因组中分离、分布及数量研究。对植物SSR的分离及克隆始于对几个热带树种的研究(Condit, 1991),其后,扩展到大豆(Gupla, 1992)、水稻(Akkaya, 1992; Rongwen, 1995)、小麦(Wu, 1993; Panoado, 1995)、油菜(Szewe, 1996)、西红柿(Brown, 1996)、甜菜(Morchen, 1996)等农作物及其它植物中(Brunel, 1994; Depeiges, 1995; Weising, 1996)。并已应用于品种鉴定、基因组作图、遗传距离分析、群体遗传等研究中(Senior, 1993; Hoz, 1996; Taramino, 1996; McDonald, 1997; Giovanni, 2003)。

1.2.3.1 微卫星DNA的特征

1) 微卫星DNA的定义

在真核生物整个基因组的不同座位上广泛分布着一类非常特殊的DNA: 重复DNA (repetitive DNA), 在结构上它包括重复不同次数的核心模体(core motif)。根据核心模体的长度, 重复DNA分别称作微卫星(microsatellite)、小卫星(minisatellite)和卫星(satellite) DNA。微卫星, 也叫简单序列(simple sequence)、简单序列重复(simple sequence repeat, SSR)、简单串联重复(simple tandem repeat, STR), 核心重复单元可达6碱基。而小卫星, 也叫可变数量串联重复(variable number tandem repeat, VNTR)有更长的核心重复单元, 常在十几个碱基到几百个碱基之间。微卫星和小卫星经常用作分子标记(Tautz, 1993)。有关小卫星的报导不多(Morgante, 1997), 相反微卫星在DNA序列数据库中却很丰富(Morgante, 1993)。

有关微卫星的报导始见于1974年, Skinner等在研究寄生蟹的卫星DNA时发现了一种简单的串联重复序列, 但在当时并未引起重视(Chambers, 1978)。直到Ali等(1986)首次将合成的微卫星寡聚核苷酸用于人的指纹分析, 才有所重视。微卫星利用的序幕就此拉开。Jeffreys等(1988)和Gao等人进一步将微卫星发展成一种新的遗传标记系统(Jeffreys, 1988)。1989年, Tautz等实验室同时报道微卫星丰富的多态性(Tautz, 1989)。Litt等(1989)正式命名微卫星并将其作为基因标记。

2) 微卫星DNA的类型

微卫星DNA的核心结构是由1~6个核苷酸为重复单位串联组成的长达几十个核苷酸的序列(Litt, 1989)。按照重复结构的不同微卫星DNA分为三种类型(Tautz, 1989; Weber, 1990; Wintero, 1992; Estoup, 1995):

完全重复型(perfect repeats), 重复单元重复没有打断, 如[CAG] n ;

不完全重复型(imperfect repeats), 重复单元重复被打断, 如[CAG] n -CTG-[CAG] m ;

复合型(compound repeats), 邻近的串联重复序列不同, 如[CAG] n [TG] m 。

微卫星DNA的两侧是相对保守和专一的单拷贝序列。利用侧翼序列设计引物可以特异性的扩

增微卫星位点,使微卫星DNA以PCR的形式从基因组中选择扩增出来(Schlötterer, 1991)。这就是微卫星标记(Microsatellite marker)。

3) 微卫星标记的主要特征

① 微卫星标记具有高度的多态性

微卫星DNA本身重复单位数的变异是形成微卫星多态性的基础。一般认为微卫星多态性产生的机制是DNA复制和修复过程中的碱基的滑动、错配或减数分裂过程中姊妹染色单体的不均等交换(Schlötterer, 1992; Tautz, 1994)。这种多态性常常表现为复等位性,在不同的基因型间广泛存在。重复次数的多少与该位点等位基因数呈强的正相关。微卫星核心结构的突变频率约 10^{-2} – 10^{-6} 每代每位点(Li, 1996)。这样的突变率使微卫星呈现高多态性,又有一定的稳定性,成为一个优良的遗传标记。

② 卫星标记在真核生物基因组中数量多且分布均匀

据估计,在基因组中平均约30~50kb就存在一个微卫星DNA(Tan, 2001; Reddy, 1999),它的这一特点为在整个基因组中定位更多的基因提供了极大的方便。

③ 微卫星标记遵循孟德尔式遗传规律、共显性遗传

多位点的指纹图谱和RAPD通常仅可被解释为显性标记,杂合子看起来就象一种纯合子,不能看到父源染色体与母源染色体上等位基因的差异。用显性标记来估计表现型参数更困难。而微卫星标记是共显性标记,并且遵循孟德尔式遗传法则(Weber, 1989; Groenen, 1995)。

④ 微卫星DNA检测容易、重复性较好、省时,适合于进行自动化分析

目前,微卫星位点的检测一般采用以互补于两个侧翼序列的寡核苷酸(约20 N t)作为引物,通过PCR扩增,然后再用测序凝胶分离检测其结果(Schlötterer, 1998)。一个位点的检测一般可在24h内完成,且可同时进行多位点的检测。而RFLP除了上述的缺点外,在操作上亦很费时;RAPD还存在重复性差的缺点,对不同的仪器、不同厂家的试剂可能导致不同的分析结果。微卫星标记引物是特异性引物,重复性强,稳定性好,所得的数据可以在不同实验室之间交流和比较。

⑤ 微卫星标记在相关物种中具有保守性和通用性

由于用于设计微卫星标记特异性引物的序列是微卫星位点两侧的侧翼序列,该序列在相关物种中是高度保守的,这使微卫星标记也具有相同的保守性(Schlötterer, 1991; Ellegren, 1997; Scribner, 2000; 周涵韬, 2002)。目前许多物种的微卫星的来源之一就是相关种的微卫星标记的直接应用。

⑥ 微卫星标记可作为序列示踪位点(Sequence Tagged Site, STS)

微卫星标记与其它的分子标记如RAPD、VNTR、RFLP、AFLP、ISSR不同,它得到的引物可以直接用于基因组的特异性扩增,PCR每个样品应该只产生一条带或两条同样深度的带(在实际应用中要稍比这复杂些),可直接作为STS,这一特点拓宽了它的应用前景。

4) 植物 SSR 的分离及多态性检测

获得 SSR 的途径有两条,一是对现有基因数据库,如 EMBL、GeneBank 等进行搜索,二是来自于对植物基因组的分离。由于现有基因数据库中 DNA 序列数量有限以及 SSR 在基因组中分布特点,现已得到的绝大多数 SSR 来自于对植物基因组的分离(Zane, 2002)。

SSR 的分离方法涉及以下几个步骤:1) 构建小片段基因文库 [如基因组文库、富集文库(Enriched library)、BAC/YAC 库, cDNA 文库], 利用限制性内切酶或超声波将基因组 DNA 切

割成小片段,选择其中的 200~500 碱基部分,构建基因文库,以便于其后的 DNA 测序。2) 杂交筛选: 利用经标记的由数个核心序列构成的寡聚核苷酸作探针在基因文库中筛选相应的 SSR。3) DNA 测序: 对呈现阳性的克隆进行 DNA 测序。4) 引物设计及位点特异性 PCR 分析: 根据包含 SSR 的克隆 DNA 的两侧序列设计引物,两引物的 T_m 值应相近,扩增后的 DNA 片段大小最好在 100~300 碱基之间,以便于分析。5) 多态性分析: 引物设计完成后,应在相应植物不同基因型上进行扩增以检测该位点是否呈现多态性。基因组 DNA 经引物进行 PCR 扩增反应后,不同大小的 SSR 通常需在高分辨力凝胶上电泳后其差异才能显示出来,故经常使用测序凝胶或特殊琼脂糖凝胶。为显示不同大小的 DNA 片段,通常的做法是将引物或扩增产物用放射性同位素标记,电泳后的凝胶进行放射自显影;也可将电泳后的凝胶进行银染色,而无需标记引物或扩增产物。最近的发展之一是用荧光素标记引物进行 PCR 扩增,利用 DNA 测序仪(如 ABI373,ABI377 等)确定扩增片段大小。在不同位点引物的 T_m 值相近及扩增片段大小有一定差异的情况下,还可同时利用多对引物对多个位点进行扩增,与 DNA 测序仪配合使用,从而大大提高了分析效率(Rassmann, 1991; Chaix, 2002)。

微卫星分离传统方法(Rassmann, 1991)从基因组文库中筛选微卫星,特别是低频率的微卫星时,要花费大量人力和物力,效率低(Cooper, 1999),目前已有大量文章对传统方法进行了改进,建立了一套富集的有效的方法(Ostrander, 1992; Karagyzov, 1993; Wu, 1994; Richardson, 1995; Edwards, 1996; Fisher, 1996; Cooper, 1997; Refseth, 1997; Lunt, 1999; Paetkau, 1999; Hayden, 2001, 2002; Erdogan, 2002)。

1.2.3.2 植物中 SSR 的种类、数量、分布及多态性

不同作者对植物中 SSR 的种类、数量及其分布进行了研究。和哺乳动物相比,植物中 SSR 数量约为前者的六分之一;在人类中,AC/GT 重复数量最大,而在植物中,AT/TA 重复数量最大,AC/TG 数量极小(Moore, 1991; Lagercrantz, 1993)。在植物核基因组中,各种 SSR 数量从大到小依次为(AT) n , (A) n , (T) n , (AG) n , (CT) n , (AAT) n , (ATT) n , (AAC) n , (GTT) n , (AGC) n , (GCT) n , (AAG) n , (CTT) n , (AATT) n , (TTAA) n , (AAAT) n , (ATTT) n , (AC) n , (GT) n 。就分布频率而言,平均每 23.3 千碱基中有一 SSR,而每 62 千碱基中有一 AT/TA 类型 SSR;单子叶及双子叶植物中的 SSR 数量也有差异,分别为每 64.6 千碱基及 21.2 千碱基中有一 SSR。所有的单核苷酸及双核苷酸重复类型 SSR 均位于非编码区,而 57% 左右的含 GC 碱基对的三核苷酸重复位于编码区。SSR 不仅存在于核 DNA 中,在细胞质 DNA 中也有分布,但数量极少,其中 A/T 重复占绝对优势,AT/TA 重复仅发现于少数几种植物的叶绿体 DNA 中(Power, 1995; Powell, 1996)。研究表明,不同作物中均存在 SSR 多态性。绝大多数作物,如大豆、水稻、小麦(Ma, 1996)、玉米(Panoado, 1995)、大麦等中, SSR 位点上的等位基因数目可多达十几个乃至几十个,个别作物如西红柿中,多态性水平较低。鉴于(AT) n 是植物中数量最大的一类 SSR,这一趋势如在其它作物中得到证实,可大大提高整个作物的 SSR 的多态性水平。但因(AT) n 类型寡聚核苷酸探针容易形成二级结构,降低了筛选效率,影响了这一类型 SSR 的分离。然而现有研究表明,(AT) n 类型 SSR 仍是可以分离的(Akkaya, 1992; Rongwen, 1995; Roder, 1995)。

1.2.3.3 ISSR (Inter-simple sequence repeat) 标记

它是一种新型的分子标记,是由 Zietkiewicz 等(1994)创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。它的生物学基础仍然是基因组中存在的 SSR。ISSR 标记根据植物广泛存在

SSR 的特点,利用在植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物,无需预先克隆和测序。用于 ISSR-PCR 扩增的引物通常为 16~18 个碱基序列,由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成,从而保证了引物与基因组 DNA 中 SSR 的 5' 或 3' 末端结合,导致位于反向排列,间隔不太大的重复序列间的基因组节段进行 PCR 扩增。SSR 在真核生物中的分布是非常普遍的,并且进化变异速度非常快,因而锚定引物的 ISSR-PCR 可以检测基因组许多位点的差异 (Tsumura, 1996; Nagaoka, 1997)。

ISSR、SSR 分子标记在植物遗传育种研究中的应用主要包括以下几个方面:

1) 品种登记及杂交种纯度鉴定 作物的形态性状大多属数量性状,由微效多基因控制,容易受环境影响。随着同一作物品种的不断增多以及亲本的遗传基础日渐狭窄,利用传统的形态学性状鉴定方法区分新品种日益困难。同时传统的品种鉴定采用田间调查品种性状的方法,时间长,费用高。和其它分析方法相比,利用 SSR 可检测出更多的等位基因差异 (Panoado, 1995),甚至能够区分基因型极相近的不同品种。在品种登记和品种鉴定方面,SSR 技术可望成为传统形态学鉴定方法的重要补充甚至替代技术。SSR 的遗传共显性特点使其在杂交种纯度鉴定方面极为有用。

2) 亲缘关系和遗传多样性的研究 基因型不同的品种,或不同亲缘关系的物种,基因组内核苷酸序列存在差异,当使用同一 SSR 引物对不同基因组体外扩增时,基因组上与引物互补的 DNA 片段(模板)的数目、位点是不同的,因而其扩增产物(DNA 片段)的大小、数目也不同,亦即扩增产物表现出多态性。当使用一系列不同的 SSR 引物扩增时,这种多态性更加丰富。这种扩增产物的多态性反映了被测材料的遗传多样性。种质亲缘关系和种质资源多样性评价是作物育种研究的重要内容,它决定了这些种质在今后育种实践中的有效利用。例如 Awasthi (2004) 用 19 个 RAPD 引物和 4 个 ISSR 标记对 15 个桑种进行了亲缘关系鉴定。

3) DNA 指纹库的建立 SSR、ISSR 分子标记可以用来建立 DNA 指纹库。在同一物种的各个品种间存在大量的多态性标记,某一品种具有区别于其它品种的独特标记即一些特异性 DNA 片段的组合就称为该品种的“指纹”,各品种的独特指纹片段构成该物种的 DNA 指纹库,它具有类似于人的指纹那般的高度个体特异性和稳定性。DNA 指纹库在作物育种中有广泛应用。第一,每个品种 DNA 指纹差异可直接提供与目标性状有关的 DNA 水平的信息,避免了环境的干扰,从而能大大提高杂交育种中对亲本及后代理想单株的选择效率;第二,通过检测品种是否只具有该品种特有的标记指纹片段,可以很有效地鉴定品种纯度与真伪,以及用于新品种登记和品种知识产权保护等。

4) 分子标记遗传图谱的建立和基因定位 遗传图谱既是遗传研究的重要内容,又是作物资源、育种及分子克隆等许多应用研究的理论依据和基础。SSR 应用于植物基因组作图最广泛的是拟南芥与大豆。在连锁图的绘制上,SSR、ISSR 可以填补连锁图上较大间隙,是更易为育种家们接受的经济、实用的分子标记。二是利用已有的连锁图进行标记,一旦发现某一目标基因被定位在某一染色体上,就可以选择分散在染色体不同位点的标记,逐渐逼近,找到该基因的分子标记。Kojim 等 (1998) 首次以 ISSR 与 RAPD 标记建立了一个包含 7 个小麦品种的遗传连锁图,其中有 9 个 ISSR 位点被定位在 5 条小麦染色体上。

5) 分子标记辅助育种 植物育种中分子标记辅助选择是通过分析与目标基因紧密连锁的分子标记来判断目标基因是否存在。通过 SSR、ISSR 分析可筛选出与目标基因(性状)紧密连锁的

DNA 片段, 作为辅助育种的分子标记。利用分子标记不仅可以定位目标基因,也可利用与目标基因紧密连锁的分子标记追踪目标基因。应用这些分子标记进行间接选择, 将得到事半功倍的作用。特别是抗病育种,直接选择需要创造特殊环境进行筛选鉴定,不仅育种时间长,而且受许多条件限制,而分子标记辅助选择不受环境条件的影响, 分析手段既快速又简便。

1.2.3.4 结束语

桑树是重要的经济植物, 而桑树 SSR 分子标记的研究报道极少 (Aggarwal, 2004), 现仅仅利用 ISSR 初步对桑树的遗传多样性进行研究 (Vijayan, 2003, 2004; Awasthi, 2004; Aggarwal, 2004), 以后桑树分子标记标记的发展将着眼于以下几个方面: 开发桑树微卫星标记, 构建遗传连锁图谱; 寻找与性状紧密连锁的微卫星标记, 用于遗传辅助育种、基因定位和 QTL 分析; 开发后的 SSR 和 ISSR 标记可用于桑树的个体、品系、品种的鉴定, 种质资源保存与利用, 演变追踪, 系谱确证, 杂种优势判定, 亲缘关系及起源研究等等。

1.2.4 分子系统学研究的主要基因种类及其在桑属系统学研究中的应用

以前生物学家在研究物种的演化方面采用的方法是在群体的整体水平上, 以物种的形态特征特别是生殖系统的形态特征及繁育方式、代谢物等为基础, 同时结合古生物学、植物地理学、统计学和系统学的方法, 对植物系统学进行研究, 并取得了辉煌的成绩。然而这些基于表型变异的分析由于受环境影响较大, 其结果稳定性低、一致性差。有必要寻求一种更为可靠的手段来探讨、描述和解释生物多样性及其分类和演化关系。在相当长的一段时间内, 人们苦于找不到度量遗传变异有效而又准确的方法, 更无法深入到分子水平上去揭示生物进化的本质和规律。

随着生物技术的迅猛发展, 使植物系统学和进化的研究深入到分子水平。八十年代开始利用 DNA 分子对生物系统进化的研究, 已成为现代植物分子系统学研究的热点。桑树是重要的经济植物, 本文就以桑树为主要材料的分子系统学和进化研究作一概述。

1.2.4.1 分子系统学实验方法的改进

1) DNA 的制备

DNA 的提取是一项十分繁重的工作, 但却是分子系统学研究的前提。以前, 从桑树中提取出高质量以及高含量 DNA 往往受到很多因素的限制, 如材料不易保存, DNA 提取过程中样品易氧化及受次生化化合物的影响, 严重影响 DNA 的质量。为此, 在八十年代就进行了桑树基因组 DNA 分离和纯化研究, 如赵学峰等 (1984) 探讨了桑树 DNA 的抽提方法 (CTAB 法); 町井 (1989) 分离纯化总 DNA, 可完全被 EcoR 和 Hind 限制性内切酶酶切, 说明此 DNA 可用于构建桑树基因组图谱。赵卫国等 (2001) 改进 CTAB 和 SDS 提取方法, 开展了桑树总基因组 DNA 和叶绿体基因组 DNA 提取研究, 获得了得率高、纯度好的桑树基因组 DNA。因此通过对桑树 DNA 提取程序的改进, 基本上能够提取高质量桑树基因组 DNA, 并简化了实验步骤, 降低了成本, 提高了实验效率, 为进一步开展桑树分子系统学研究打下了基础。

2) PCR 在序列分析研究中的应用

1980 年美国 Botstein 提出 DNA 限制性酶切片段长度多态性 (RFLP) 可以作为遗传标记, 开创了直接应用 DNA 多态性发展遗传标记, 即分子标记的新阶段。但经典的 RFLP 研究含 Southern 转移、探针标记、杂交及检测等繁琐的实验步骤, 花费高、耗时多, 有时还要受到探针来源的

限制,因此极大地限制了该技术的推广应用。直到 80 年代, DNA 多聚酶链式反应(PCR)技术的出现,推动产生了许多新型的分子标记如 RAPD, SSR 标记等,才使植物分子系统学研究得到迅速发展。

向仲怀等(1995)首先利用 RAPD 分子标记技术开展了桑属植物分子系统学研究,并相继有许多学者利用该方法进行了桑属植物 DNA 多态性研究,构建了其系统发育树,并探讨了桑属植物的亲缘关系。

随 RAPD 技术的广泛应用,其局限性也相继被提出 (Smith, 1994; 汪小全, 1996)。认为不同种或属的扩增产物难以作其同源性分析,只能作表征分析,从而只能从相似性和遗传距离去分析亲缘关系。最近发展起来的 DNA 序列测定从 DNA 水平来研究生物多样性与生物进化的分子生物学技术,它通过揭示 DNA 分子中核苷酸的变异来研究植物的系统发育、种内进化及遗传多样性等,比一般方法更直观、准确。

经典的序列分析基本上均要以分子克隆为基础,制备测序模板往往需要几周时间,工作量大、成本高,很难应用于大量基因或分类群的研究中。此外,由于克隆为单个分子。不适用于杂合位点的基因研究。PCR 技术与序列分析技术的结合,产生了 PCR 直接测序法,该方法直接以双链或单链 PCR 产物为模板,以 PCR 扩增引物作为测序引物,极大地提高了序列分析的效率,从 DNA 提取到序列结果往往只需几天时间。相对于克隆方法,PCR 直接测序法读出的序列偏短,但代表性好,无论是杂合的等位基因,或是重复序列的重复单位存在序列上的差异,序列图谱上均能得到反映,故该方法特别适用于核基因组 DNA (rDNA)、叶绿体基因组 DNA (cpDNA) 等基因的研究 (Nickrent, 1995)。

1.2.4.2 用于桑属植物分子系统学研究的主要基因种类及其进化规律

植物拥有3个不同基因组,因此成为了以PCR为目标的3个具有潜力的序列来源。叶绿体在植物中是单向遗传(通常为母系遗传)。叶绿体在叶片中丰富存在,因此可以大量提取和分离。植物叶绿体相对比较保守,大多数利用叶绿体序列研究系统学一般都在较高系统单元,但目前 cpDNA 以用于群体研究 (Zurawski, 1984; Taberlet, 1981; Olmstead, 1994; Johnson, 1994; Fujii, 1997)。相反,植物线粒体基因组 (mtDNA) 在植物叶片中丰度低,提取困难且重排事件频繁,很难用于分子系统学研究。但目前也有少量利用 mtDNA 序列研究系统学 (Demesure, 1995; Cipriani, 2003)。对核基因组分析,核糖体 RNA (rDNA) 基因家族广泛用于遗传多样性研究 (Hillis, 1991)。

1) 叶绿体基因组

高等植物中,细胞器基因包括叶绿体基因组 (cpDNA) 和线粒体基因组 (mtDNA)。而植物的叶绿体基因组相对比较保守,很多叶绿体基因已被用于分子系统学研究。

已知的叶绿体基因组大小为 71~217kb,但绝大部分叶绿体基因组的大小为 120~160kb。适用于系统学研究的叶绿体基因有 *rbcL* (Ribulose-bisphosphate carboxylase large subunit)、*matK* (tRNA 成熟酶编码基因)、*ndh* (脱氢酶编码基因)、*trn*(tRNA 编码基因间隔区)等 20 种以上。本文仅选择几个使用频率较高的基因加以说明。

① *rbcL* 基因

目前用于远缘间及科级以上分类群的研究绝大多数利用叶绿体基因中的 *rbcL* 基因。Morgan 等(1994)利用 *rbcL* 序列中的变异位点对赤桑和菊科植物进行了系统学和分子进化研究。Nickrent

等（1995）分别测定了白桑的 *rbcL* 序列和 18s rRNA 序列，并构建了被子植物的系统树，同时比较了这两个基因的变异速率及其在系统学研究中分辨率，结果发现 *rbcL* 基因不仅分辨率高，而且变异均一地分布于整个基因上。由于 *rbcL* 基因的上述优点，它有时用于分子钟的构建。Savolainen 等（2000）对开花植物（包括黑桑）的 *rbcL* 和 *atpB* 基因进行了研究，并构建了其系统树。

运用 *rbcL* 基因序列构建系统树应注意一些问题，*rbcL* 基因的变异虽然较为均匀地分布于整个基因上，但其密码子的 3 个位置的变异速率有极大的差异，密码子的第一和第二位的变异速率远低于第三位的变异速率。对上述情况必须进行以下处理：（1）对密码子 3 个位置的变异进行加权；（2）用对应的氨基酸序列构建系统树；（3）用距离法构建系统树。

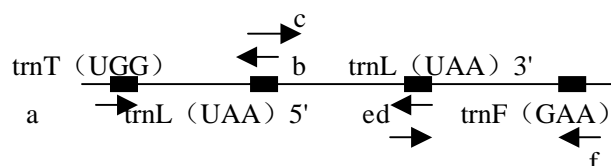
② *matK* 基因

matK 基因编码一种成熟酶，位于 *trnK* 基因的内含子中，长约 1500 个碱基，参与 RNA 转录中 II 型内含子的剪切。

到目前为止，该基因被认为在叶绿体基因组中的所有编码蛋白基因中进化速率最快基因之一。在被子植物科内、属间、甚至种间水平的近缘关系研究中已被使用。由于 *matK* 序列的变异较为均一，在构建系统树时不必对不同类型的变异进行加权，极大地增强了分子系统树的可靠性（Johnson, 1995）。宋葆华等（2002）对白桑的该序列进行了测定，并构建了榆科的系统发育树。预计该基因在桑属分子系统演化研究中将会被重视和广泛地应用。

③ *trn* 基因

trnT-L-F 基因内三段非编码区，由于不受功能的限制，其进化速率大于功能编码区，目前已被广泛用于植物系统学研究（Pierre, 1991）。其三段非编码区所在位置及通用扩增引物设计见图 1.1。



a=5'-CATTACAAATGCGATGCTCT-3' b=5'-TCTACCGATTTCGCCATATC-3'

c=5'-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3' d=5'-GGGGATAGAGGGACTTGAAC-3'

e=5'-GGTTCAAGTCCCTCTATCCC-3' f=5'-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3'

图 1.1 *trn* 基因三段非编码区及引物

Fig.1.1 Three non-coding of *trn* gene and primers

注：a, b 引物扩增 *trnT* 和 *trnL* 5'端外含子的基因间隔区，c, d 引物扩增 *trnL* 的内含子，e, f 引物 *trnL* 3'端外含子和 *trnF* 之间的基因间隔区。

Note: Gene intergenetic spacer of *trnT* and *trnL* 5'end exon amplified by primer a and b, *trnL* intron by primer c and d, *trnL* 5'end exon and *trnF* by e and f primers

目前 *trn* 基因在桑属分子系统演化中的研究报道甚少。赵卫国等（2001）设计桑树 *trnL-trnF* 间隔区序列的特异引物，成功地扩增出了桑属育 71-1 和桑莲的该序列，并进行了同源性分析。

④ *ndh* 基因

ndh 基因在植物叶绿体内编码脱氢酶，常用于系统学研究的是 *ndhF* 基因。由于 *ndhF* 基因进化速率也比较快，所以常用于属间以上的系统学研究。Randall 等（1997）用该基因研究了风

梨科植物的系统学位置。

诚然 cpDNA 的研究为探讨科及科以上分类阶元的系统发育提供了重要依据,并将在这方面的研究中继续发挥重要作用,但由于 cpDNA 的进化速率远低于核基因组,这就限制了其在低级分类阶元(如属、亚属)的应用,尤其是对于关系非常密切及近期才发生分化的分类群, cpDNA 就无能为力了。此外, cpDNA 是细胞质 DNA,属于单亲遗传,而种间杂交常常是双向的(Grant, 1981),这样基于 cpDNA 的系统发育关系研究就往往不能反映物种间的进化方向,在实际应用中有一定的局限性。

2) 核基因组

① 内转录间隔区(ITS)

核 rDNA 的内转录间隔区(Internal Transcribed Spacer, ITS)包含被 5.8s rDNA 所分隔的 ITS1 和 ITS2 两个片段。在被子植物中 ITS1 的长度为 187~298bp, ITS2 为 187~252bp(王建波, 1999)。ITS 序列变异较快,可以提供较丰富的遗传信息,已证实它是研究许多被子植物类群系统进化的重要分子标记,不仅可以解决科、亚科、族、属、组内的系统发育和分类问题,而且可用于重建多倍体复合体的网状进化关系,探讨异源多倍体的起源过程。ITS 之所以成为被子植物系统与进化研究中的重要分子标记,主要基于以下两个方面原因:第一,作为 18s-26s rDNA 的一个组成部分, ITS 在核基因组中是高度重复的,而且通过不等交换和基因转换,这些重复单位间已发生了位点内或位点间的同步进化,即不同 ITS 拷贝间的序列趋于相近或完全一致,这就为对 PCR 扩增产物直接测序奠定了基础;第二,被子植物的 ITS 区长度较裸子植物相比比较稳定,为测序带来了方便,同时 18s、5.8s、26s rDNA 的序列非常保守,有利于通用引物的设计,目前研究中所用的引物是 White 等(1990)在真菌系统学研究中设计的引物,也有作者采用调整后的引物。关系密切的物种间 ITS 长度接近,而序列有一定程度的变异因此该片段特别适合于属、组级的系统发育和分类研究。

ITS 序列分析已在被子植物的系统学研究中广泛使用,但在桑树上的应用较少。史全良等(2001)采用 PCR 产物直接测序法测定了蒙桑的 ITS 全序列,指出了该序列在桑树分子系统学及分子进化研究中的潜在作用。

② 18S rDNA 序列分析

18S rDNA 序列分析是另一种重要的研究手段。18SrDNA 序列中的插入和缺失并不频繁,在高度保守区发生的几个插入和缺失事件均有系统学意义,说明 18S rDNA 序列分析对揭示被子植物中高等级分类群间的系统发育关系具有重要意义(汪小全, 1997)。

综上所述,桑树分子系统学的研究还处于初始阶段。主要原因是由于桑树是异化授粉植物,自然界分布极广,很易杂交,又能通过无性繁殖,所以易于形成过渡类型,且易于保留,因此通过长期的自然杂交和人工杂交繁殖,遗传物质高度杂合,基因组较大,遗传背景材料知之甚少。这些特性大大增加了桑属分子生物学基础研究的难度。与其它植物相比,桑树也有其优势特性,如材料的相对永久性、性状可反复测定,为确立分类地位和起源及进化速率提供了可靠的证据。我们相信随着现代生物技术的发展及桑树基因工程的深入进行,用于桑属分子系统学研究的手段和方法会更多、更合理,这必将为探讨桑属的发生、发展及演变,从而进一步为桑属种质资源的保存、新品种的培育和改良提供理论依据,并为研究整个生物界的系统演化过程作出贡献。

1.3 研究内容与方法

- 1.3.1 利用微卫星富集程序, 开展桑树微卫星位点的分离与鉴定研究
- 1.3.2 利用 SSR 和 ISSR 标记, 桑树栽培种和野生种间遗传多样性比较分析
- 1.3.3 利用 ISSR 标记, 构建我国选育桑树品种的指纹图谱及其遗传多样性分析
- 1.3.4 利用 ISSR 标记, 研究不同生态型桑树品种的遗传多样性
- 1.3.5 利用 ISSR 标记, 研究桑树二倍体及人工诱导同源四倍体间的遗传变异
- 1.3.6 利用 ISSR 标记, 研究桑树无性系的遗传变异
- 1.3.7 利用 ISSR 标记, 研究凤尾桑及其芽变株系间遗传变异
- 1.3.8 利用 PCR 产物直接测序法, 测定桑属 nrDNA 的 ITS 序列, 研究其系统发育
- 1.3.9 利用 PCR 产物直接测序法, 测定桑属 cpDNA 的 trnL-trnF 基因间隔区序列, 研究其系统发育

第二章 桑树微卫星位点的分离与鉴定

微卫星(Microsatellite), 又称简单序列重复(Simple Sequence Repeat, SSR), 是指由1~5个核苷酸组成的短序列(又称核心序列或主题序列)首尾相连重复多次构成的一段DNA, 现已证明普遍存在于动植物基因组中。相对于其它分子标记, 微卫星标记具有多态性高, 共显性, 能用PCR检测等诸多优点(Litt, 1989; Tautz, 1989; Weber, 1989), 因此, 它被认为是较理想的遗传标记之一而广泛用于植物遗传图谱的构建、QTL分析、基因型鉴别、遗传多样性和遗传结构分析、亲缘关系研究和分子辅助育种(Brown, 1996; Morgante, 1993; Rongwen, 1995; Raffaele, 2000; He, 2003; Perera, 2004;)等方面。

尽管微卫星的优点显而易见, 但对桑树微卫星的开发研究极少(Aggarwal, 2004)。本研究旨利用微卫星富集程序, 构建富含桑树微卫星的基因组文库, 对桑树基因组的微卫星进行分离, 设计PCR扩增引物, 为开发桑树的微卫星分子标记打下基础。

2.1 材料与方法

2.1.1 试验材料

桑树品种育711基因组DNA用于桑树微卫星基因组文库构建。27个桑树品系用于微卫星多态性扫描(表2.1)。所有试验材料均采于中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃。

2.1.2 桑树基因组DNA的提取

桑树基因组DNA提取采用CTAB法(Doyle, 1987), 程序为:

5mL离心管中加入2mL CTAB提取液[50 mM Tris-HCl, pH 8.0, 1.4 M NaCl, 20 mM EDTA, 2% (w/v) CTAB, 2% PVP(w/v) and 1% (v/v) β -mercaptoethanol], 在水浴锅中(65℃)预热;
取2~3片嫩叶剪碎置于研钵中, 加液氮速冻, 充分研磨后移到上述离心管中;
在65℃下保温30 min, 并不时摇动;
取出离心管置于冰浴中冷却至室温;
向离心管中加2mL 氯仿/异戊醇(24:1), 摇匀;
离心10 min (10000 $r.m^{-1}$), 取上清液至另一已编号的5 mL离心管中;
加入2V无水乙醇沉淀DNA, 在-20℃下冷却2 h以上;
高速离心10 min (10000 $r.m^{-1}$), 弃上清液, 倒置干燥后加500 μ l纯净水溶解;

表 2.1 用于 SSR 多态性鉴定的桑树品系

Table 2.1 Mulberry accessions used for polymorphism screening.			
编号 N0.	品系 Accession	桑种 Species	来源 Origin
1	育 2 号 Yu 2	鲁桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	江苏省镇江市 Zhenjiang city, Jiangsu province, China
2	桐乡青 Tongxiangqing	鲁桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	浙江桐乡市 Tongxiang city, Zhejiang province, China
3	育 711 Yu 711	鲁桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	江苏省镇江市 Zhenjiang city, Jiangsu province, China
4	牛耳桑 Niuersang	白桑 <i>M. alba</i> Linn.	山西省阳城县 Yangcheng city, Shanxi province, China
5	新一之濂 Xinyizhilai	白桑 <i>M. alba</i> Linn.	日本 Japan
6	桑莲 Sanglian	白桑 <i>M. alba</i> Linn.	福建 Fujian province, China
7	珙县黑油桑 Gongxianheiyousang	大叶桑 <i>M. alba</i> var. <i>macrophylla</i> Loud.	四川省珙县 Gongxian city, Sichuan province, China
8	纹契桑 Wenqisang	白脉桑 <i>M. alba</i> var. <i>venose</i> Delile.	陕西省周至 Zhouzhi city, Shanxi province, China
9	垂枝桑 Chuzhisang	垂枝桑 <i>M. alba</i> var. <i>pendula</i> Dipp.	Korea
10	伦敦 40 号 Lunjiao 40	广东桑 <i>M. atropurpurea</i> Roxb.	广东省顺德 Shunde city, Guangdong province, China
11	沙二 Shaer	广东桑 <i>M. atropurpurea</i> Roxb.	广东省顺德 Shunde city, Guangdong province, China
12	昌农山桑 Changnongshansang	山桑 <i>M. bombycis</i> Koidz	山东省 Shandong province, China
13	T12	暹罗桑 <i>M. rotundiloba</i> Koidz.	泰国 Thailand
14	毕节 5 号 Bijie 5	长穗桑 <i>M. wittiorum</i> Hand-Mazz.	贵州省毕节 Biejie city, Guizhou province, China
15	吉蒙桑 Jimengsang	蒙桑 <i>M. mongolica</i> Schneid.	吉林 Jilin province, China
16	德江 10 号 Dejiang 10	长果桑 <i>M. laevigata</i> Wall.	贵州省德江 Dejiang city, Guizhou province, China
17	雅安 3 号 Yaan 3	华桑 <i>M. cathayana</i> Hemsl.	四川雅安 Yaan city, Sichuan province, China
18	药桑 Yaosang	黑桑 <i>M. nigra</i> Linn.	新疆 Xingjiang autonomous region, China
19	云南水桑 Yunnanshuisang	长果桑 <i>M. laevigata</i> Wall.	云南 Yunnan province, China
20	黔鄂桑 1 号 Qianesang 1	长穗桑 <i>M. wittiorum</i> Hand-Mazz.	贵州省德江 Dejiang city, Guizhou province, China
21	育 54 号 Yu 2	鲁桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	江苏省镇江市 Zhenjiang city, Jiangsu province, China
22	育 82 号 Yu 2	鲁桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	江苏省镇江市 Zhenjiang city, Jiangsu province, China
23	T11	暹罗桑 <i>M. rotundiloba</i> Koidz.	泰国 Thailand
24	保靖 5 号 Baojing 5	华桑 <i>M. cathayana</i> Hemsl.	云南保靖 Baoqing city, Hunan province, China
25	剑持 Jianchi	山桑 <i>M. bombycis</i> Koidz	日本 Japan
26	丽江山桑 Lijiangshansang	山桑 <i>M. bombycis</i> Koidz	云南丽江 Lijiang city, Yunnan province, China
27	湖桑 39 号 Husang 39	鲁桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	江苏省镇江市 Zhenjiang city, Jiangsu province, China

加入 7 μL 100 mg/mL RNase 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1.5 h;
加等体积酚抽提 1 次, 酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 抽提 1 次, 氯仿: 异戊醇 (24: 1) 抽提 1 次;
加 2V 无水乙醇沉淀 DNA, 过夜;
离心 10 min 后用 70% 无水乙醇漂洗; 倒置干燥后加入 200 μL TE (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) 溶解, -20 $^{\circ}\text{C}$ 下保存备用。DNA 浓度用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 (图 2.1)。

2.1.3 桑树基因组 DNA 的酶切反应及提纯

桑树基因组 DNA 和 *Mbo*I 粘端限制性内切酶 (TaKaRa Biotechnology Co. Ltd.) 酶切反应体系的组成体系如下:

基因组DNA	20 μL
<i>Mbo</i> I	1.5 μL
10 \times Buffer	8 μL
ddH ₂ O	20.5 μL
<hr/>	
总体积	50 μL

将酶切体系混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 酶切 6 h。

2.1.4 酶切产物的纯化

酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶中以 1 \times TAE 缓冲液 (40 mM Tris-Acetic acid, pH 8.0, 1 mM EDTA) 为介质电泳分离, 紫外灯切下 400~1000bp 的片段, 放入 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 用 3S spin DNA gel Purification Kit 试剂盒纯化 (上海申能博彩生物技术有限公司), 具体操作步骤如下:

加入 4 倍体积的 Solution SN 混匀。无论样品量多少, 最少需要使用 400 μL Solution SN;
置于 55~65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 5 min, 至胶完全溶化, 加入 100 μL Solution B, 混匀;
将 3S 柱放入收集管中, 把混合液转移到柱内, 不要盖上离心管管盖, 室温放置 5min;
盖上离心管, 用台式离心机高速离心 (10000rpm) 1 min;
倒掉收集管中的废液, 将 3S 柱放入同一个收集管中, 加入 600 μL Wash Solution, 高速离心 (10000rpm) 1 min;
重复步骤 3 一次;
倒掉收集管中的废液, 将 3S 柱放入同一个收集管中, 高速离心 (10000rpm) 2 min;
将 3S 柱放入一新的 1.5 mL 离心管中, 在 3S 柱膜中央加 30 μL 水, 不要盖上离心管盖, 室温或 37 $^{\circ}\text{C}$ 放置 2 min;
盖上离心管盖, 10000rpm 高速离心 1 min, 离心管中的液体即为回收的 DNA 片段, 可立即使用或保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

2.1.5 准备接头(Adaptor)

用ddH₂O将合成的粘端接头干粉Oligo A (GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG) 和 Oligo B (PO₄ - GAT CCG AAG CTT GGG GTC TCT GGCC) 稀释成终浓度 100 pmol/μL, 4 °C溶解 2 h以上, -20°C保存备用。

在 1.5mL离心管中加入 10 μL Oligo A (100 pmol/μL) 和 10 μL Oligo B (100 pmol/μL) 轻微振荡, 混匀, 在PCR仪上 80 °C加热 2~5 min变性, 室温下复性 1h, 加入 80μL ddH₂O, 使终浓度为 10 pmol/μL, -20°C保存备用。

复性后接头为: GGC CAG AGA CCC CAA GCT TCG
 CCG GTC TCT GGG GTT CGA AGC CTA G - PO4

2.1.6 接头连接反应

接头连接反应体系为:

经纯化后的酶切基因组DNA	12 μL
T4 DNA ligation Buffer	10 μL
T4 DNA ligase	0.5 μL
ddH ₂ O	75.5 μL
Adaptor	2 μL
总体积	100 μL

混匀, 16 °C连接过夜。连接产物用3S PCR Product Purification Kit V2.0试剂盒纯化(上海申能博彩生物技术有限公司)。具体步骤为:

将连接产物移至干净的 1.5 mL Eppendorf 离心管中, 加入 4 倍体积的 Solution BS 混匀。无论样品量多少, 最少需要使用 300 μL Solution BS;

将 3S 柱放入收集管中, 把混合液转移到柱内, 不要盖上离心管管盖, 室温放置 5 min;

盖上离心管, 用台式离心机高速离心 (10000rpm) 1 min;

倒掉收集管中的废液, 将 3S 柱放入同一个收集管中, 加入 600 μL Wash Solution, 高速离心 (10000rpm) 1 min;

重复步骤 3 一次;

倒掉收集管中的废液, 将 3S 柱放入同一个收集管中, 高速离心 (10000rpm) 2 min;

将 3S 柱放入一新的 1.5 mL 离心管中, 在 3S 柱膜中央加 30 μL 水, 不要盖上离心管盖, 室温或 37 °C放置 2 min;

盖上离心管盖, 10000rpm 高速离心 1 min, 离心管中的液体即为回收的 DNA 片段, 可立即使用或保存于-20°C备用。

2.1.7 PCR检测

纯化后的连接产物进行PCR检测。反应总体积50 μL, 包含: 模板DNA 10 μL; 粘端接头Oligo

A (浓度10 pmol/μL) 作为引物, 2 μL; 1.5 单位Taq 聚合酶; 10×Buffer 5 μL; dNTP 4 μL; 用纯水补充至50 μL。反应程序为: 95 °C预变性15 min; 95 °C变性50s, 56°C退火1 min, 72°C延伸2 min, 30个循环后, 72 °C延伸10 min; 最后在4 °C保存。取4μL产物电泳检测。电泳结果见图2.2, 说明接头和酶切产物连接成功。PCR产物用3S PCR Product Purification Kit V2.0试剂盒纯化。

2.1.8 生物素化

将纯化的接头和酶切产物连接DNA作为模板, 以生物素标记寡核苷酸的(CA)₁₅作为引物(上海博亚生物技术有限公司合成), 进行生物素化, 具体反应体系: 反应总体积100 μL, 包含模板DNA 20 μL, 生物素标记寡核苷酸的(CA)₁₅ (浓度10 pmol/μL) 4 μL; 2 单位Taq聚合酶; 10×Buffer 20 μL; dNTP 16 μL; 用纯水补充至100 μL。反应程序为: 95 °C预变性15 min; 95 °C变性50s, 56 °C退火1 min, 72 °C延伸2 min, 30个循环后, 72 °C延伸10 min; 最后在4 °C保存。PCR产物用3S PCR Product Purification Kit V2.0试剂盒纯化。

2.1.9 磁珠捕获

根据生物素化的寡核苷酸和链霉素有强烈亲和性特点, 纯化后产物用包含链霉素磁珠吸附, 按照M-280 Dynabeads Streptavidin (10 mg/mL)试剂盒(M-280 Dynabeads, Dynal)说明进行操作:

约25μL 磁珠加入1.5 mL管中, 在磁座上清除磁珠悬液;

用 2×W/B buffer (2M NaCl, 10mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA) 洗 2 次, 弃清液;

用 2×W/B buffer重悬磁珠到5 μg/μL (一般为原吸出体积的2倍, 50 μL);

加入等体积生物素化的DNA;

在室温轻微振荡30 min以上;

放在磁座上1~2 min, 弃除上清, 此时磁珠已固定了包含SSR的DNA片段;

用1×W/B buffer (1 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH7.5, 1 mM EDTA) 洗2~3次, 弃清液;

加入100 μL ddH₂O, 95°C保温5 min, 进行洗脱。

2.1.10 PCR扩增

包含富集SSR的单链DNA片段洗脱液为模板, 以10 pmol Oligo A and 10 pmol 生物素化 biotin-(CA)₁₅ 为引物进行PCR扩增。扩增程序: 95°C 3 min; 95°C 30s, 60°C 30s, 72°C 45 s, 5个循环; 92°C 30 s, 60°C 30 s, 72°C 55 s, 30 个循环; 72°C 延伸30 min。PCR产物电泳, 割胶回收400~1000 bp片段, 用3S spin DNA gel Purification Kit 试剂盒纯化。电泳结果见图2.3。

2.1.11 T 载体连接

将纯化的回收 DNA 片段和 T-载体 pMD18-T Vector (TaKaRa Biotechnology Co. Ltd.) 在 16 °C连接过夜, 连接反应体系为:

纯化后包含SSR回收DNA	13 μ L
T4 DNA ligase Buffer	5 μ L
T4 DNA ligase	1 μ L
T-Vector	1 μ L
总体积	20 μ L

2.1.12 电转感受态细胞的制备

仪器和试剂的准备：三角瓶用洗洁精洗三次，用自来水冲洗干净。然后用NaOH洗，用自来水冲洗干净（一般要冲10次左右）。然后用蒸馏水冲洗三次，再用蒸馏水（多量的）来泡三角瓶。其中配制SOB培养基的三角瓶要求更加严格。离心管只要用洗洁精洗三次即可，冲洗干净，然后用双蒸水冲洗三次。

SOB培养基的配制：配制 1 L培养基，在 950 mL去离子水中加入胰化蛋白胨(Tryptone)(Oxoid LTD,England)20 g,酵母提取物 (Oxoid LTD, England) 5 g, NaCl 0.5 g.摇动容器使溶质完全溶解。加 10 mL 250 mmol/L KCl溶液（将 1.86 g KCl用 100 mL去离子水溶解即配成）。用 5 mol/L NaOH调pH值至 7.0（Cyberscan 510）。用去离子水定容至 1 L。在 15 psi（1.05 Kg/cm²）高压下蒸气灭菌 20 min。该溶液在使用前加入 5 mL灭菌的 2 mol/L MgCl₂。

SOC 培养基配制：SOB 培养基经高压灭菌后冷至 60℃或 60℃以下，加 20 mL 除菌的 1 mol/L 葡萄糖溶液。

10%甘油的配制：称 126g 的甘油溶于 900 mL 的双蒸水中，混匀。

灭菌：所有的试剂都要经过灭菌。离心管灭菌时要加双蒸水，内盖要反过来盖以免变形。

冰箱中保存的菌种划单菌落：

早晨，接种单克隆感受态细胞，XL1-Blue，到 1 mL SOB液体培养基中；37℃，300rpm，6 h，然后倒入 400 mL SOB液体培养基中（按 1:500 的量转接），300rpm，4 h，然后每隔 2 min测一次OD₆₀₀，至OD₆₀₀=0.76，立刻置冰水浴中骤冷，随后在 250 mL预冷的离心杯中离心，4℃，2000 g（若为 50 mL的离心管，转速为 2970），10 min；弃上清后，用预冷的灭菌的重蒸水洗：先加少量水悬浮菌体，再把水加满，2200g，10 min（若为 50 mL的离心管，转速为 3170），弃上清；再用 10%的甘油同样方法洗两次，2400 g（若为 50 mL的离心管，转速为 3200），10 min；最后一次倒尽甘油后，用残存在管底的甘油悬浮细胞，每 100 μ L分装一Eppendorf管，用-70℃的乙醇迅速冰冻。保存在-80℃冰箱中备用。

2.1.13 感受态电转

取连接产物取10 μ L透析（水和1×TE 1:100）0.5 h 以上；

先将SOC放在50℃预热，电转杯放在冰上预冷；

感受态细胞 40 μ L 从-70℃冰箱中拿出来在冰上化冻后马上加入透析好的连接产物，加入电转杯中；

1.5 KV（200 欧姆，25 μ F）电转，时间常数应在 4.5~5.0 ms 之间，其值越大，表明感受

态细胞中离子洗去的越彻底;

电转后马上加入 1 mL SOC, 转入一个新的摇菌管中, 37 °C, 200 转/min 摇 30 min, 即构建了一个桑树基因组(CA)₁₅微卫星富集文库。

2.1.14 涂板

要求在含 Amp 的 LB 固体培养基上涂菌液 40 μ L, X-Gal (100mg/1000mg) 100 μ L 以及 IPTG (50 mg/1000 mg) 20 μ L, 37 °C 培养过夜。

2.1.15 克隆的筛选

对克隆进行蓝白斑筛选, 挑取白斑, 在 LB 液体培养基上培养过夜。

2.1.16 测序和设计引物

将菌株大量培养后, 送上海南方基因组测序。

包含 SSR 序列用 Primer 5.0 (E. Lander, Cambridge, MA) 软件设计引物, 具体参数: 引物长度 16~25 nt, oligomer Tm 55-63 °C, G+C 含量 30~70%, 引物得分 \geq 70%。设计引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

2.1.17 SSR 扩增体系

反应体系: PCR 扩增反应用扩增板在 Flexigene thermal cycler 扩增仪上进行。采用总体积 15 μ L: 10 ng 模板 DNA; 引物 0.6 μ L (浓度为 10 ng/ μ L); 1 单位 Taq 聚合酶; 10 倍反应缓冲液 1.5 μ L; dNTP 0.25 μ L (200 μ mol/L); 用纯水补充至 15 μ L。SSR PCR 扩增采用 Touchdown 程序 (Rahman, 2000): 95 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 16 个循环, 每个循环降低 0.5 °C; 94 °C 变性 30s, 56 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1 min, 24 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 最后在 4 °C 保存。

2.1.18 SSR 电泳

扩增产物用含 0.2% 溴化乙锭 (EB) 的 1% 琼脂糖凝胶电泳。电泳结果在紫外灯用 Tanon (Gis-2008) 摄像系统照像记录。根据琼脂糖凝胶电泳结果确定聚丙烯酰胺凝胶电泳上样量。

采用 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (30% 丙烯酰胺 26.6 mL, ddH₂O 52.7 mL, 5 \times TBE 20.0 mL, 10% 过硫酸铵 0.7 mL, TEMED 35 μ l) 预电泳 20 min 后上样, 反应混合物在 1 \times TBE 缓冲液 (100 mM Tris-borate, pH 8.0, 2 mM EDTA) 中 120 V 电泳 8 h。电泳结束后, 在 0.2% 溴化乙锭中浸泡 15 min, 并不时晃动。电泳结果在紫外灯用 Tanon (Gis-2008) 摄像系统照像记录。扩增片段分子量大小用 501bp ladder (501bp, 404bp, 321bp, 242bp, 190bp, 147bp, 111/110bp, 67bp) (TaKaRa Biotechnology Co. Ltd.)。

2.1.19 数据分析

微卫星(SSR)标记按共显性标记进行数据统计。等位基因数, 期望杂合度 (H_E), 观察杂合度(H_O)用 Popgene32(PHYLIP3.5 版本)分析 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/popgene.pdf>)。多态性信息含量 (PIC) 值按下列公式计算:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=i+1}^n 2p_i p_j$$

, 其中 n 是等位基因数目, p_i 和 p_j 分别是表示第 i 和第 j 个等位片段的频率 (Botstein, 1980)。

2.2 结果

2.2.1 桑树基因组微卫星分离

用 *Mbo*I 粘端限制性内切酶酶切桑树基因组DNA, 1%琼脂糖凝胶电泳检测, 发现酶切完全, 酶切片段主要集中在 1000 bp 左右, 符合构建基因组文库的要求 (图 2.1)。通过接头连接、生物素化、磁珠捕获等一些列步骤, 得到含有微卫星序列的单链目的片段, 然后用以 Oligo A 和生物素化 biotin-(CA)₁₅ 为引物扩增获得双链目的片段 (图 2.3)。

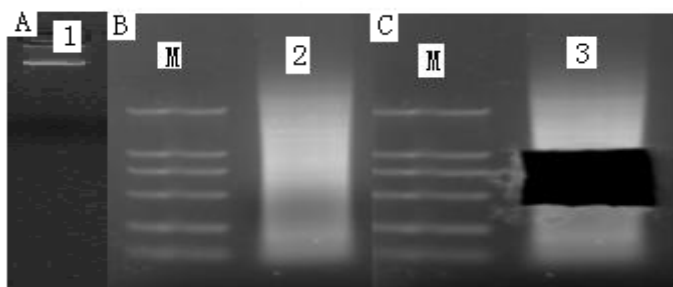


图2.1 桑树基因组DNA(A)经*Mbo*I酶切后(B)和1,000~400 bp的移走后(C)的DNA片段

Fig. 2.1 DNA fragment after *Mbo*I digestion (B) of mulberry genomic DNA (A) and removal of 1000~400 bp (C)

1:桑树基因组DNA 2: 经*Mbo*I酶切后片段 3: 1,000~400 bp的移走 M:Marker (DL2000: 2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp)

1:Mulberry genomic DNA 2: DNA fragment after *Mbo*I digestion 3:Removal of 1000~400 bp M:Marker

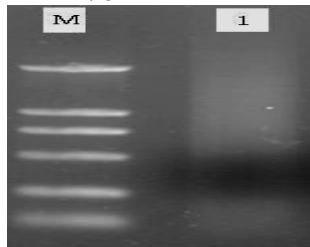


图2.2 酶切产物和接头连接产物PCR扩增结果

Fig. 2.2 The result of PCR amplification of ligated fragments of enzyme-digested fragments and adaptor

1: 酶切片段和接头连接产物的PCR扩增产物 M:Marker (DL2000)

1: PCR amplification product of ligated fragments of enzyme-digested fragments and adaptor M:Marker

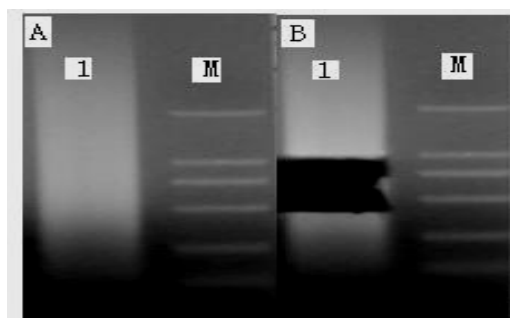


图2.3 包含SSR(A)和1,000~400 bp的移走后(B)的DNA片段

Figure2.3 DNA fragment containing SSR and removal of 1,000~400 bp

2.2.2 微卫星基因组文库构建与碱基序列分析

构建的微卫星基因组文库中,有大量阳性克隆,随机选取 96 个克隆进行测序,24 个序列中包含 SSR 序列,所占比例为 25% (表 2.2),同源性检索,未发现重复序列。统计得出 24 个克隆中共含有 30 个微卫星位点,平均每个克隆含 1.3 个,最多的为 3 个。30 个微卫星位点中不完全型 16 个,占 53.33%;完全型 13 个,占 43.33%;复合型 1 个,占 3.33%。桑树微卫星序列完全型较低,而不完全型较高,这可能是由于我们抽样测序的克隆较少,不能完全反映其微卫星的分布情况,另一方面可能和桑树的生态环境和易杂交等有关,受到的选择压力较大,基因组中发生更多的碱基替换、错配和不等交换等,从而增加其遗传杂合度,以适应复杂的自然环境有关。以 (CA)₁₅ 为探针建立的微卫星基因组文库,测序结果发现 24 个包含微卫星的克隆中以 (CA/GT)_n 微卫星为主,同时还发现 2 个 (CT)_n 微卫星,伴随 (CA/GT)_n 微卫星出现在同一克隆中。

表 2.2 桑树基因组部分微卫星克隆的碱基序列

Table 2.2 Base sequences of two clones with SSR from mulberry

克隆	Clone	碱基序列	Base sequences
M11		TTAAGCTATGAACCTGNNTACGNANTNCGNNGCTCGGTACCCGGGGNTCCTCTANNGTT GCCAGNNGGACCTCAAGCTTCGATCAATCTAGCTTCCCCAGGGACCTCTTCAATATATACA <u>CACACACACACCACACACAACACACAACACACACACACACACACACACACACACACAC</u> <u>AC</u> <u>ACACACACACACACACACACACACACACGCACGCACACACACAACACAACACACACACAC</u> <u>ACACAACACCACACACACACACACA</u> AGTCGGTTCGACGTGCCGGGTGGCGTAGTTTGCC CAGAGGGGGCTGGCCAGAGACCCCAAGCTTCGGATCTCCTTAGCGTCTCGCAGCCTCGCA ATGTGGAAGGTCCGATGTTGCCCCAAGGCGAGGCGTCGACCAAAGGCCAACAAAGGGGAT TGCCCTCTCGAAAAGCAACAAGCCCACCAAGCATGCAAC <u>CACACACACACACACACACACA</u> <u>CACACACACACACACACACACA</u> TCTCTAAGGNTGCAAAACGTTTAATTCCTTATACTTGA GTGCACCAACTAACCCAACTTTANTGTNACGTNT GNACAAAACTCAAAATGAAGGAAAAGGAATTATACAAATTTTTATGGCGAACTTCATA TACGAATACGCATATATAGCAAGAGTATATGTGTATACATGCGAGTGTTT <u>TGTGTGTGTGT</u> M55 <u>TGGCTGGGATTTA</u> AGTAAATTTATTTACTTGTAGAATAAACTTTTANNTGGACNNCGATGTANGCTCNGANC GGGNTNGGCGTG	

注:下划线为微卫星。 Note: lines on the bottom stand for microsatellites.

2.2.3 桑树微卫星的多态性检测

考虑引物长度、退火温度、A+T/G+C、碱基配对等限制条件，利用Primer5.0 软件对含微卫星位点进行引物设计，共设计出20对引物，其余微卫星位点未能设计出理想的引物。对20对微卫星引物进行多态性检测，8对无特异性扩增，2对无多态性，10对引物在27个桑树品系间表现多态（图2.4,2.5）。10对多态性微卫星引物序列、27个桑树品系间的等位基因数、等位基因变异大小、杂合度和PIC值分析结果见表2.3。从表2.3可以看到，所有桑树品系间每个位点等位基因数变异范围为3~8，平均4.9。

观察杂合度在0.00和1.00间变异，平均为0.4296，表明分离的微卫星位点变异程度高。 PIC 值变异范围为0.1979~0.6798，平均0.4483。另外，在许多植物中报道微卫星重复数和等位基因数为正相关，而我们发现桑树中无相关性。



图2.4 引物SS01在27个品系间的1%琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig.2.4 The 1% agarose gel electrophoresis pattern of PCR products amplified using primer SS01 in 27 mulberry accessions.

1~27代表桑树品系,如表1.1所示。M为Marker (DL2000)

Lane 1~27 represent mulberry accessions, as shown in Table 1.1. Lane M is a DNA molecular weight marker.

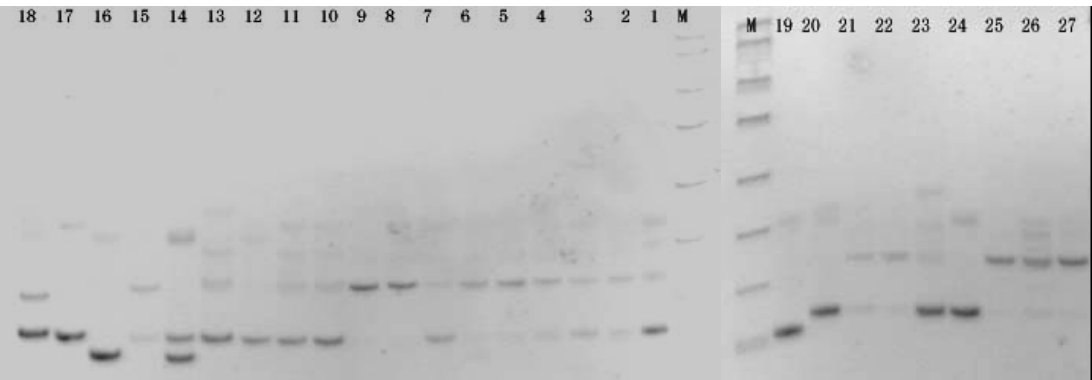


图2.5 引物SS01在27个品系间的PAGE图谱

Fig.2.5 PAGE pattern of PCR products amplified using primer SS01 in 27 mulberry accessions.

1~27代表桑树品系,如表1.1所示。M为Marker(DL501)

Lane 1~27 represent mulberry accessions, as shown in Table 1.1. Lane M is a DNA molecular weight marker.

表 2.3 桑树微卫星的鉴定

Table 1.3 Characteristics of mulberry microsatellites

位点 Locus	重复单位 Repeat motif	引物 Primer (5'-3')	等位基因数 Number of alleles	等位基 因大小 Allele size(bp)	H_o	H_E	PIC values	GenBank 登 录号 GenBank accession No.
SS01	(CA) ₃₀	F: CGGTCACGCCTTCTTCTCC R: TGACCGAGAAATGAGGAAGGAG	8	115-190	0.8889	0.7184	0.6798	AY714401
SS02	(CA) ₄₉	F: GCTTCGATCAATCTAGCTTCCC R: GCAAACCTACGCCACCCCG	3	325-420	0.1111	0.1768	0.2506	AY714392
SS04	(TG) ₂₇	F: CGAGGGAGGGATGAGGAGC R: CACATTCATGCACCCTCCTATA	3	188-240	0.0000	0.4752	0.4501	AY714393
SS05	(CA) ₅ CC(CA) ₂₇	F: TCCAGCAAAGATGTGACAAAAGTT R: TTGCCTTCCCATTATGCTG	3	342-478	0.2963	0.5339	0.4370	AY714400
SS06	(TG) ₁₈	F: ACTCAAAATGAAGGAAAAGGAATTATAC R: TTTACTTAAATCCCAGCCACA	7	239-245	0.0000	0.3242	0.5016	AY714394
SS09	(CA) ₅₆	F: AGAACCCTTCCGCCCTATG R: CCTTGGCGTAGGCAAAGTTG	3	358-364	0.0000	0.4920	0.4266	AY714395
SS17	(CA) ₂₆	F: TACAGGGCTCGGGCAAATG R: TGATCCGAAGCTTGGGGTCT	6	249-243	1.0000	0.6534	0.4595	AY714396
SS18	(CA) ₂₇	F: TCTTCGCCCCGTTGTTTCGC R: AGCAATTTTCTTCAACTCACCTTCT	4	181-210	1.0000	0.6366	0.1976	AY714397
SS19	(TG) ₁₈	F: TTCTGTCTGTCCTCCGTCAA R: TGAGAACATACACTAATAGGTGAAAAC	7	352-357	0.0000	0.4444	0.6332	AY714398
SS20	CA) ₁₄ ACAA (CA) ₁₂	F: CCCTTTCATCGCCTCCTCC R: CTCTGCCCATTAGTAGCGG	5	260-330	1.0000	0.6303	0.4472	AY714399
平 均 Mean			4.90		0.4296	0.5085	0.4483	
St.Dev			1.9692		0.4766	0.1655		

2.3 讨论

在遗传学研究中微卫星标记已经成为广泛使用的分子标记之一,目前微卫星筛选方法很多,主要可分为两类:一类是根据其他物种已知微卫星的侧翼序列设计引物,以基因组 DNA 为模板进行扩增筛选,优点是可利用已知序列、实验技术和仪器设备要求不高,缺点是工作量大,不能筛选出该物种特有的微卫星;另一类是构建基因组文库进行筛选。构建基因组文库这类方法大致又可分 3 种:(1)大插入片段基因组文库法,优点相对简单,但该技术费时、效率低(0.059~5.8%) (Zane, 2002),需多次进行杂交和亚克隆;(2)常规小片段基因组文库法,优点是灵敏度高,但该技术操作复杂、周期长、成本高、效率低;(3)微卫星富集文库法,就是利用链亲和素磁珠亲和捕获生物素标记的微卫星探针上结合的基因组 DNA 片段,获得高度富集微卫星的基因组文库,对文库进行大规模测序即可获得大量的微卫星序列,优点是周期短,操作简单,目的性强,效率高。

本文采用富集文库法构建了桑树(CA)₁₅微卫星富集文库,富集效率为25%,发育了10对桑树微卫星创新引物。Aggarwal等(2004)以生物素化的(GA)₁₅, (CA)₁₅, (AGA)₁₀ 和 (CAA)₁₀ 为探针仅发育6对桑树微卫星标记,结果表明本文富集效率较高。但和其它植物富集效率50~90% (Butcher, 2000) 相比,桑树微卫星富集效率(25%)仍相对偏低。为此为了富集更多的桑树微卫星,更多微卫星探针,例如, (CT)_n 和 (AT)_n 生物素探针,扫描桑树微卫星。另外为了提高富集效率,必须对生物素化的微卫星探针和接头连接DNA片段反应条件,微卫星洗脱温度以及克隆的检测等方面进行优化。

第三章 桑树栽培种和野生种间遗传多样性的 SSR 和 ISSR 比较分析

桑树属桑科桑属,是多年生的重要经济作物,是家蚕的唯一饲料。桑树分布范围广,从热带到亚北极圈,说明遗传资源丰富的多样性,分类学和地理证据显示桑树遗传多样性主要存在亚洲,特别是中国、日本和印度(Sharma, 2000)。目前我国有桑种质资源 3000 余份,包括 15 个种 4 变种(潘一乐, 2000, 2003)。由于桑是异花授粉植物,自然界分布极广,很易杂交,又能通过无性繁殖,所以易于形成过渡类型,且易于保留,因此通过长期的自然杂交和人工杂交繁殖,使桑树遗传背景十分复杂(Dandin, 1998),使桑属(*Morus*)有许多种(species)及变种(variety),传统的形态学、染色体核型以及同工酶等分析方法,难以解决系统进化及分类上的许多分歧。Williams (1990)开创了利用人工合成的短核苷酸引物经 PCR 扩增进行基因组 DNA 多态性分析的新方法,使人们从 DNA 分子水平检测植物遗传变异成为可能。国内外应用 DNA 分子标记技术对主要农作物,如水稻和小麦等在作物遗传和育种等方面均取得了突出进展(贾继增, 1996)。分子标记技术在桑树上的应用较晚,国内向仲怀等(1995)首次利用 RAPD 技术构建了桑属 9 个种的共 9 种材料基因 DNA 指纹图谱,对桑属植物分类进行了探索性研究,此后有许多学者相继利用 RAPD(菅贵史, 1995; 冯丽春, 1996; 1997; 楼程富, 1996, 2003; 赵卫国, 2000; Esha, 2001; 焦锋, 2001; 杨光伟, 2003)、AFLP(Sharma, 2000, 王卓伟, 2000; 杨光伟, 2003; 丁农, 2005)等分子标记技术对桑品种 DNA 多态性进行了研究,并探讨了桑种间的亲缘关系。

ISSR(Inter-simple sequence repeat)是一种新型的分子标记,是由 Zietkiewicz 等(1994)创建的一种简单序列重复区间扩增多态性分子标记。它的生物学基础仍然是基因组中存在的 SSR。ISSR 标记根据植物广泛存在 SSR 的特点,利用在植物基因组中常出现的 SSR 本身设计引物,无需预先克隆和测序。ISSR-PCR 扩增的引物通常为 16~18 个碱基序列,由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成。SSR 在真核生物中的分布是非常普遍的,并且进化变异速度非常快,因而锚定引物的 ISSR-PCR 可以检测基因组许多位点的差异(Tsumura, 1996; Nagaoka, 1997; Wolfe, 1998)。与 RAPD 相比,由于 ISSR 高的退火温度和较长的引物长度,其稳定性高。SSR 为共显性标记,据报道变异比 RFLP 和 RAPD 高(Morgante, 1993; Rongwen, 1995; He, 2003)。目前利用 ISSR 和 SSR 研究桑树遗传多样性报道甚少(Vijayan, 2003, 2004; Awasthi, 2004; Aggarwal, 2004),而且这些研究主要集中在桑种水平,桑树栽培种和野生种间的遗传变异知之不多。为了满足桑树育种和保护桑树遗传资源,本文首次检测了 ISSR 和 SSR 两种不同标记的多态性水平,对两种标记的信息量进行了比较,并调查了两种标记在多种来源桑树栽培种和野生种间的遗传多样性。

3.1 材料与方法

3.1.1 试验材料

27 个桑树品系, 其中包括 19 个栽培种品系和 8 个野生种品系, 用于 ISSR 和 SSR 遗传多样性分析 (见表 2.1)。

3.1.2 桑树基因组 DNA 的提取

桑树全基因组 DNA 采用 CTAB 法提取 (Doyle, 1987)。具体操作见 2.1.2。DNA 浓度和纯度由 DNA 浓度测定仪 (Biophotometer) 测得, 260/280 比值在 1.68~1.88 间, 说明提取桑树基因组较纯, 完全能用于 PCR 分析。提取桑树基因组 DNA 1% 琼脂糖凝胶电泳结果见图 3.1。

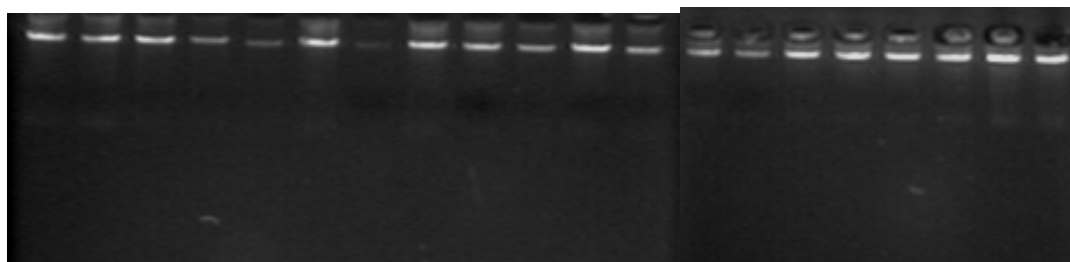


图 3.1 部分桑树基因组 DNA 的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 3.1 Mulberry genomic DNA agarose gel electrophoresis pattern

3.1.3 ISSR 分析

首先用一个 DNA 样品对 20 个 ISSR 引物进行第一次筛选, 选出有扩增条带且清晰的引物, 然后用 5 个 DNA 样品 (育 2 号, 桑莲, 伦敦 40, 雅安 3 号, 药桑) 对其进行第二次筛选, 选出具有多态性的引物, 并用统一程序进行 2~3 次重复性试验, 验证其稳定性和重复性。从 22 个 ISSR 引物中筛选出了 15 个具有多态性、扩增产物清晰、重复性好的 ISSR 引物用于桑种质资源遗传多样性检测。其结果见表 3.1。

PCR 反应体系总体积 15 μ L: 10ng 模板 DNA; 引物 0.6 μ L (浓度为 10ng/ μ L); 1 单位 Taq 聚合酶; 10 倍反应缓冲液 1.5 μ L; dNTP 0.25 μ L (200 μ mol/L); 用纯水补充至 15 μ L。ISSR PCR 扩增程序如下: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40s, 退火 45s (温度根据每个引物的 T_m 值而定), 72 $^{\circ}$ C 延伸 90s [除引物 (CA)₆GG, 延伸时间为 4 min], 36 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min; 最后在 4 $^{\circ}$ C 保存。

DNA 扩增产物以 1 \times TBE 缓冲液为介质, 制备含 0.2% 溴化乙锭 EB 的 2.2% 琼脂糖凝胶, 90 W 电泳 2~4 h。电泳结果在紫外灯用 Tanon (Gis-2008) 摄像系统照像记录。扩增片段分子量大小用 DL 2000bp ladder (2000bp, 1000bp, 750bp, 500bp, 250bp, 100bp) (TaKaRa Biotechnology Co. Ltd.) 估算。

表3.1 ISSR引物、扩增条件及多态性

Table 3.1 Primers, amplification conditions and polymorphism of ISSR markers

引物编号 Primer No.	序列 Sequence (3'-5')	T_m (°C)	退火温度 Annealing Temperature (°C)	扩增条带数 Number of Amplified bands	多态性条带数 Number of Polymorphic bands	多态性比例 Percent of polymorphic bands (%)	PIC值 PIC Value
IS01	(GACA) ₄	51.6	54	7	7	100	0.1807
IS02	(CA) ₆ AC	47.1	50	*	*	*	*
IS03	(AAT) ₆	34.5	37	*	*	*	*
IS04	(GTGC) ₄	61.8	64	8	6	75	0.1769
IS05	(GT) ₆ CC	50	60	5	5	100	0.2022
IS06	(CA) ₆ gt	47.1	50	*	*	*	*
IS07	(CAC) ₄ gc	55.9	60	*	*	*	*
IS08	(CA) ₆ AG	47.1	50	*	*	*	*
IS09	(GAG) ₄ GC	55.9	60	12	10	83.3	0.2055
IS10	(CA) ₆ GG	50	52	13	13	100	0.2830
IS11	(CTC) ₄ GC	55.9	60	*	*	*	*
IS12	(CAA) ₆	48.2	50	*	*	*	*
IS13	(CT) ₈ TG	55	54	6	6	100	0.2561
IS14	(AG) ₈ TA	52.7	54	21	21	100	0.2274
IS15	(GTG) ₆	61.9	64	2	1	50	0.1980
IS16	(GA) ₆ GG	50	54	9	8	88.9	0.1801
IS17	(TG) ₈ GT	50	54	5	5	100	0.1368
IS18	(CT) ₈ GC	57.3	60	7	6	85.7	0.1594
IS19	(AG) ₈ TC	55	54	22	22	100	0.1989
IS20	(CT) ₈ AC	55	54	7	7	100	0.3049
IS21	(GTC) ₆	60	64	12	7	58.3	0.0966
IS22	(ATT) ₆	34	37	2	2	100	0.2025
平均 Mean				138	126	91.3	0.2006

*无清晰扩增条带。 * No clear amplification.

3.1.4 SSR 分析

10个桑树富集SSR和5个Aggarwal等(2004)报道的SSR引物 (MulSTR1, MulSTR2, MulSTR4, MulSTR5 and MulSTR6) 用于桑种质资源遗传多样性检测 (表3.2)。 SSR的扩增、电泳方法见2.1.17、2.1.18。

3.1.5 数据分析

将ISSR扩增产物每个条带视为一个位点, 清晰、重复性好、分辨率高的条带用于分析, 按条带有或无分别赋值, 有带记为 1, 无带记为 0; SSR标记按共显性分析格式统计。按Nei等(1979)的方法计算样品间的遗传相似系数 (I): $I = 2 \times m_{xy} / (m_x + m_y)$, 其中: m_x 、 m_y 为两个样品间各自的总扩增带数; m_{xy} 为两个样品间共有扩增条带数。根据I, 求出样品间的遗传距离(D): $D = -\ln I$ 。利用系统分析软件Popgene32 (PHYLP3.5 版本) 计算桑树品系间遗传相似系数、Nei's (1973) gene diversity、Shannon's 信息指数(1949)、期望杂合度 (H_E), 观察杂合度 (H_O) 等, 按类平均数聚类方法 (UPGMA) 进行聚类, 得到UPGMA系统树。PIC值按下列公式计算,

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2 - \sum_{i=1}^n \sum_{j=1, j \neq i}^n 2p_i^2 p_j^2$$
，其中 n 是等位基因数目， p_i 和 p_j 分别是表示第 i 和第 j 个等位片段的频率 (Botstein, 1980)。根据统计的 ISSR 和 SSR 数据，用 Statistica 6.0 (by StatSoft, Inc.) 软件分析其第一、第二主成分分析 (principal coordinates analysis, PCA) (Gower, 1966)。ISSR and SSR 标记相关性用 SPSS 10.0 for Windows 软件分析。

3.2 结果

3.2.1 ISSR和SSR多态性分析

1) ISSR的多态性分析

22个ISSR引物进行PCR扩增，6个引物未产生扩增条带，1个产生弱的模糊的扩增条带，15个引物(占68.2%)扩增出了谱带清晰、重复性好并呈现多态的条带，被用于遗传多样性分析。这15个ISSR引物包含9个2碱基，4个3碱基和2个4碱基微卫星重复单位（表3.1）。15个引物共扩增出138条带，不同引物的扩增带数变幅从2~22条不等，平均每个引物可扩增出9.2条带。138条DNA扩增带中，126条带具有多态性，占91.3%，每个引物可扩增出1~22条多态性带，平均为8.4条。ISSR的PIC值平均为0.2006。PCR扩增产物电泳结果见图3.2。这表明桑树材料间ISSR变异大，多态性高。平均每个位点观察等位基因数为1.93。栽培种内，15个ISSR引物共扩增出104条带，84条(80.7%)为多态性条带，而在野生种内同样扩增出104条带，但87条(83.7%)表现出多态性，表明在野生种内有较高多态性。扩增结果也表明扩增条带数和多态性程度以及碱基重复单位数和扩增条带数间无相关性。例如引物(AG)₈TC扩增条带数最高，为22条，全部具有多态性(100%)，(GTG)₆扩增条带数最低，为2条，多态性仅1条(50%)，而引物(TG)₈GT and (GTC)₆分别产生了5条和12条带，多态性分别为100%和58.3%。

126条多态性条带中有些条带为本试验桑树品系和桑种所特有的。统计结果找到29条带，占多态性条带23.01%，为27个桑树品系中品系特有的；18条为27个桑树品系中桑种特有的，占多态性条带14.3%（表3.3）。这些特有标记通过克隆、测序和引物设计可转换成SCARs (sequence characterized amplification regions)。另外，由引物(GTG)₄-500bp, (GT)₆CC-1750bp, (GAG)₄GC-2500bp和990bp产生的特异条带可明显将栽培种和野生种区分开。

表 3.3 27 桑树品系中桑种特异的 ISSR 标记
Table 3.3 Putative mulberry species specific ISSR markers among 27 mulberry accessions

桑种 Species	引物 primer	特异条带大小 Band size(bp)
广东桑 <i>M. atropurpurea</i>	IS10	2250
暹罗桑 <i>M. rotundilob</i>	IS18; IS13	900; 1500
华桑 <i>M. cathayana</i>	IS19	170
长穗桑 <i>M. wittiorum</i>	IS14	1500
长果桑 <i>M. laevigata</i>	IS10	480
蒙桑 <i>M. mongolica</i>	IS01; IS04; IS05; IS14; IS19;	2000; 300; 2000; 2020; 150;
黑桑 <i>M. nigra</i>	IS04; IS04; IS09; IS09; IS19;	890; 300; 850; -, 250;

注: “-”为条带缺失。Note: “-”means band missing.

表 3.2 SSR位点、引物序列、期望杂合度 (H_E)，观察杂合度 (H_O)、PIC值和GenBank登录号

Table 3.2 SSR loci, primer sequences, number of alleles, heterozygosity, PIC value and GenBank accession No.

位点 Locus	重复单位 Repeat motif	引物 Primer (5'-3')	等位基因数 Number of alleles	等位基因大小 Allele size(bp)	H_O	H_E	PIC 值 PIC	GenBank 登录号 GenBank accession No.
SS01	(CA) ₃₀	F: CGGTCACGCCTTCTTCTCC R: TGACCGAGAAATGAGGAAGGAG	8	115-190	0.8889	0.7184	0.6798	AY714401
SS02	(CA) ₄₉	F: GCTTCGATCAATCTAGCTTCCC R: GCAAACACGCCACCCCG	3	325-420	0.1111	0.1768	0.2506	AY714392
SS04	(TG) ₂₇	F: CGAGGGAGGGATGAGGAGC R: CACATTCATGCACCTCCTATA	3	188-240	0.0000	0.4752	0.4501	AY714393
SS05	(CA) ₅ CC(CA) ₂₇	F: TCCAGCAAAGATGTGACAAAAGTT R: TTGCCTTCCCGATTATGCTG	3	342-478	0.2963	0.5702	0.437	AY714400
SS06	(TG) ₁₈	F: ACTCAAATGAAGGAAAAGGAATTATAC R: TTTACTTAAATCCCAGCCACA	6	239-245	0.0000	0.3242	0.5016	AY714394
SS09	(CA) ₅₆	F: AGAACCCCTCCGCCCTATG R: CCTTGGCGTAGGCAAAGTTG	3	358-364	0.0000	0.4920	0.4266	AY714395
SS17	(CA) ₂₆	F: TACAGGGCTCGGGCAAATG R: TGATCCGAAGCTTGGGGTCT	6	249-243	1.0000	0.6534	0.4595	AY714396
SS18	(CA) ₂₇	F: TCTTCGCCCCTGTGTTTCGC R: AGCAATTTTCTTCAACTCACCTTCT	4	181-210	1.0000	0.6366	0.1976	AY714397
SS19	(TG) ₁₈	F: TTCTGTCTGTCCTCCGTCAC R: TGAGAACATACATAATAGGTGAAAAC	7	352-357	0.0000	0.4444	0.6332	AY714398
SS20	CA) ₁₄ ACAA (CA) ₁₂	F: CCCTTTCATCGCTCCTCC R: CTCTGCCCATTCAGTAGCGG	5	260-330	1.0000	0.6303	0.4472	AY714399
MulSTR1	(GTT) ₆ + (GTT) ₄	F: GCCGTGTACCAAGTGGAGTTTGCA R: TGACCGTTTCTTCCACTTTACCTAATG	8	180-220	1.0000	0.6667	0.6058	AY326440
MulSTR2	(GTT) ₁₁	F: CGTGGGGCTTAGGCTGAGTAGAGG R: CACCACCACTACTTCTCTTCTCCAG	7	158-200	1.0000	0.6737	0.6295	AY326441
MulSTR4	(GAA) ₆	F: GGTCAAGCGCTCCAGAGAAAAAG R: GGTGCAGAGGATGAAAGATGAGGT	4	110-148	0.2963	0.2704	0.4511	AY326443
MulSTR5	(CCA) ₈	F: CCCCCTGCAATGCCCTCTTTC R: TGGGCGAGGCAGGGAAGATTC	6	130-160	1.0000	0.6373	0.4781	AY326444
MulSTR6	(GT) ₁₅	F: TCCTTAGGTTTTTGGGGTCTGTTTACAT R: CCTCATTCTCCTTTCACCTATTGTTG	4	115-130	0.2222	0.3725	0.4938	AY326445
平均 Mean			5.1333		0.5210	0.5129	0.4811	
St.Dev			1.8465		0.4595	0.1708		

桑树遗传多样性指数分析结果为27个桑树品系间的平均Nei's gene diversity 和 Shannon's 信息指数分别为0.1929, 0.3137。栽培种内, 平均Nei's gene diversity、Shannon's 信息指数分别为0.1660, 0.2617, 而野生种内, 分别为0.1993, 0.3027,表明在野生种内有较高遗传多样性。

2) SSR的多态性分析

共15个SSR引物用于桑树多态性分析(表3.2; Fig.3.3).从表3.2可以看到, 在所有桑树品系中每个位点等位基因数变异范围为3~8, 平均5.13。观察杂合度在0.00和1.00间变异, 平均为0.5210, 表明分离的微卫星位点变异程度高。PIC值变异范围为0.1979~0.6798, 平均0.4811。栽培种内, 每个位点观察等位基因数变异范围为3~5, 平均观察杂合度、Shannon's 信息指数和 PIC 值分别为0.4912、0.7399 和 0.3300, 而野生种内, 观察等位基因数变异范围为3~7, 平均观察杂合度、Shannon's 信息指数和 PIC 值分别为0.5917、1.0518 和 0.5178。SSRs 结果同样表明在野生种内有较高多态性。

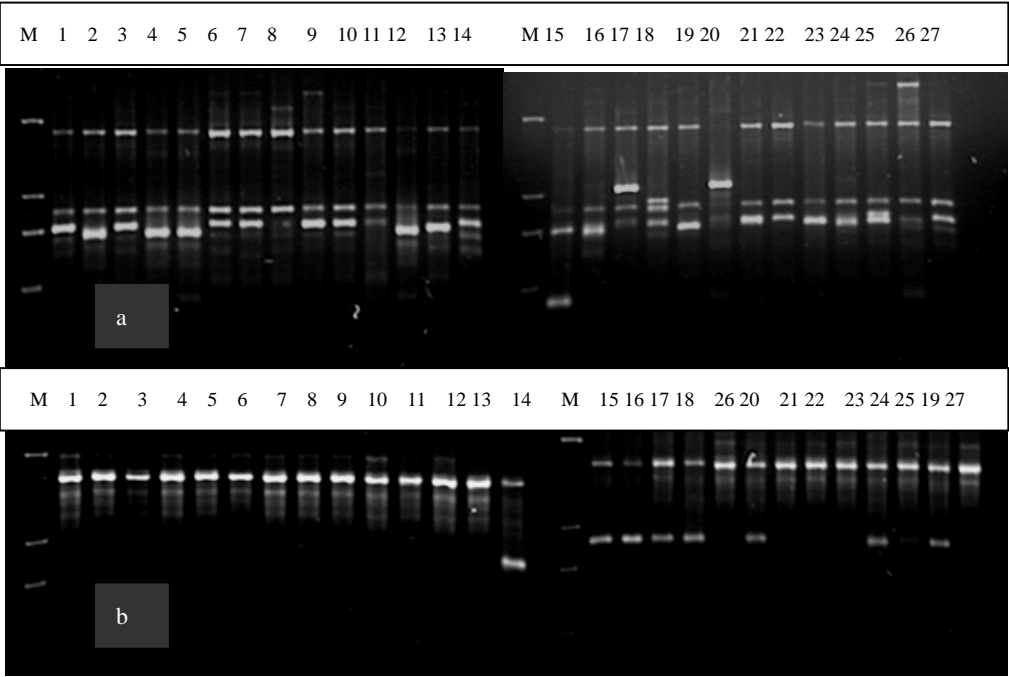


图 3.2 ISSR引物(GTGC)₄ (a) and (GTG)₆(b)在 27 个桑树品系间扩增的电泳图谱
Fig. 1 Electrophoretic pattern amplified using primer (GTGC)₄ (a) and (GTG)₆ (b) in 27 mulberry accessions.

1~27 代表桑树品系,如表 2.1 所示。M 为 Marker (DL2000)

Lane 1 ~ 27 represent mulberry accessions, as shown in Table 1. M is a DNA marker DL 2,000

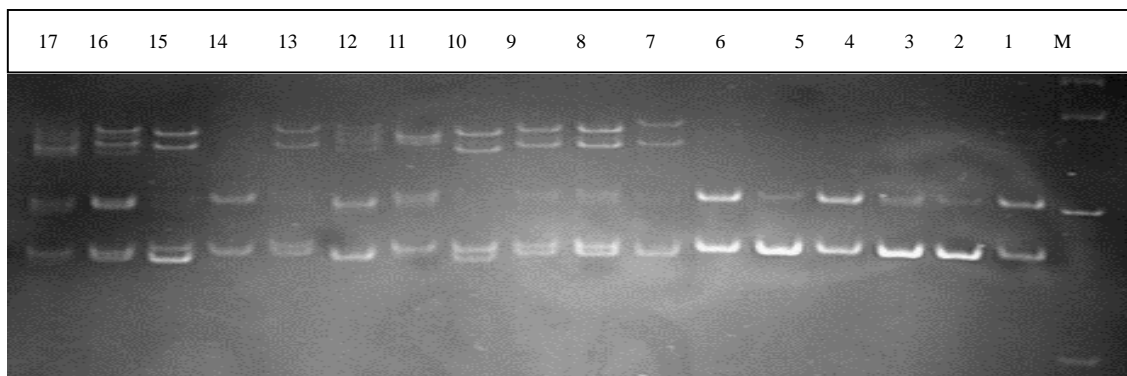


图3.3 桑树品系间SSR引物MulSTR2扩增的PAGE图谱

Fig.3.3 SSR PAGE pattern of PCR products amplified using SSR primer MulSTR2 in mulberry accessions.

1~17分别代表伦敦40号、湖桑39号、新一之濂、牛耳桑、垂枝桑、纹契桑、珙县黑油桑、T11、T12、保靖5号、雅安3号、德江10号、丽江山桑、吉蒙桑、毕节5号和药桑。M为Marker (DL501bp)

Lane 1~17 represent mulberry accessions: Lunjiao 40, Husang 39, Xinyizhilai, Niuersang, Chuizhisang, Wenqisang, Gongxianheiyousang, T11, T12, Baojing 5, Yaan 3, Dejiang 10, Lijiangshansang, Jimengsang, Yunnanshuisang, Bijie 5 and Yaosang. Lane M is a DNA molecular weight marker.

3.2.2 遗传相似系数和聚类分析

1) 基于ISSR标记的遗传相似系数和聚类分析

用15个ISSR引物扩增出的138条DNA扩增带,根据Nei等的公式,计算出了27个桑树品系间的遗传相似系数和遗传距离,见表3.4。供试材料间遗传相似系数值变化范围为0.6014 ~ 0.9493,平均值为0.7677,说明供试桑树品系间存在较高遗传变异。其中育2号与育711间遗传相似系数最大(0.9493),亲缘关系最近,这是由于育711是育2号与育54号杂交选育而来;垂枝桑和得江10号间遗传相似系数最小,亲缘关系最远。为进一步揭示不同桑树种间和种内的遗传进化关系,表3.5列出了种(类型)间的平均遗传相似系数。鲁桑、白桑及白桑变种间平均遗传相似系数多在0.87 以上,说明它们间有相近的遗传背景,亲缘关系较近。这与利用RAPD(赵卫国, 2000)、AFLP(杨光伟, 2003)等研究结果一致。在传统桑树分类史中,曾将鲁桑和白桑作为同一桑种(Perrottet, 1825)以及鲁桑为白桑的变种(Loudon, 1838; 张秀实, 1998),说明它们从形态学上也较相近,本试验从分子上验证了它们间的亲缘关系。另外从表3.5,我们也发现一些种内水平遗传相似系数比种间高,例如白桑种内遗传相似系数为0.8358,而鲁桑和白桑种间为0.9579。野生种与栽培种相比,平均遗传相似系数在0.8300以下,说明它们间存在遗传差异,亲缘关系远。野生种中以蒙桑亲缘关系最远,黑桑次之。以上研究结果与赵卫国等(2000)利用RAPD分析结果基本一致。

根据这些遗传相似系数按UPGMA法进行聚类分析(图3.4)。从聚类图可以看出,所有桑树栽培种(大多数为2倍体)聚为一类,形成I类,包括鲁桑、白桑、白桑变种、广东桑、山桑、暹罗桑等,所有桑树野生种(大多数为多倍体)聚为一类,形成II类,包括药桑、吉蒙桑、华桑、长果桑等。ISSR数据主成分分析(PCA)也支持UPGMA 聚类结果(图3.5)。第一和第二主成分分别占总变异的52.5% 和10.0%。

从聚类图还可以看出, ISSR 标记能将 27 份桑树品系完全分开。栽培种中鲁桑、白桑及白桑变种(桑莲除外),在桑属形态学分类中属于无花柱(Koidzumi,1917),聚为一类,亲缘关系较近,这与遗传相似系数是一致的。桑莲属于白桑,但从聚类图中看到它较特殊,亲缘关系较远,这可能与桑莲为千年古桑,较原始有关。广东桑的两个品种伦敦 40 和沙二聚为一类。属于山桑的昌农山桑和剑持聚为一类,在桑属形态学分类中属于长花柱。暹罗桑的 2 个材料, T11 和 T12, 都来源于泰国,桑属形态学分类中属于长花柱,和其它栽培种分开,单独聚一类。野生种中 2 个华桑品系保靖 5 号和雅安 3 号聚为一类。2 个长果桑材料,德江 10 号与云南水桑聚为一类,但 2 个长穗桑并没有聚成一类。本研究与传统的形态分类有较好的一致性。

2) 基于 SSR 标记的遗传相似系数和聚类分析

根据共显性标记 SSR 统计数据计算出了 27 个桑树品系间的遗传相似系数和遗传距离,见表 3.6。供试材料间遗传相似系数值变化范围为 0.3730~1.00,平均值为 0.6131,说明供试桑树材料间存在较高遗传变异。其中品系间最大和最小遗传相似系数和 ISSR 结果一致,育 2 号与育 711 间 (1.00) 最大,垂枝桑和得江 10 号间遗传相似系数最小 (0.3730)。

根据 SSR 标记形成的聚类图虽然和 ISSR 聚类结果有差异(图 3.6),这种差异可能是由于标记的特点造成的,但总的聚类相似,例如所有的栽培种聚为一类,并和野生种区分开。在亚类水平上,育 2 和育 711,得江 10 号和云南水桑两种标记聚类结果一致。SSR 数据主成分分析 (PCA) 也支持 UPGMA 聚类结果(图 3.7)。第一和第二主成分分别占总变异的 30.3% 和 25.5%。

3.2.2 ISSR 和 SSR 标记的相关性分析

为进一步强有力比较两类标记的聚类结果,检验 ISSR 和 SSR 对桑种质分析的相关程度,对这两种标记的遗传相似系数矩阵相关性进行了显著性测验,结果为极显著正相关 ($r=0.87$, $P < 0.01$),说明两者聚类图吻合性好。

3.3 讨论

3.3.1 ISSR 和 SSR 标记信息量比较

SSR 标记对区分桑树材料提供了强有力的手段。SSR 为共显性标记,引物每次仅从 1 个位点扩增 PCR 产物,本试验每个位点检测的平均观察等位基因数为 5.13。而 ISSR 作为显性标记,每个位点扩增 2 个等位基因,可每个位点平均观察等位基因仅为 1.93。ISSR 的 PIC 值平均为 0.2006,而 SSR 的 PIC 值平均达到了 0.4811。因此 SSR 标记比 ISSR 标记有较高的分析效率。SSR 位点有高度变异这与其独特的机制有关,SSR 变异主要是复制滑动产生的,比 ISSR 的单核苷酸的突变、插入/缺失产生频率高 (Powell, 1996; Milbourne, 1997)。SSR 标记共显性这个特性允许检测每个位点数量多的等位基因,这归功于 SSR 比 ISSR 标记可能达到高的期望杂合度。根据共有等位基因分析构建的相似矩阵揭示用 SSR 标记计算的桑树材料间平均遗传相似系数 (0.6131) 比 ISSR 标记 (0.7677) 低。这些结果表明 SSR 标记比 ISSR 标记有较强的区分能力。这与

在其它植物中取得的研究结果一致 (Powell, 1996; Milbourne, 1997)。

3.3.2 ISSR和SSR的多态性和遗传变异

证明2种标记辨别27个桑树供试材料(包括10桑种3个变种)高度有效。发育的SSRs本文检测每个位点等位基因数为3~8个,而Aggarwal (2004)等报道检测到每个位点等位基因数为 14~20,可能由所用材料和检测方法有关。15个ISSR标记获得138条可靠的带,126条表现多态性,多态性比例为91.3%,高于RAPD标记(85%)(Esha, 2001)。

2种标记都揭示27个多个来源的桑树供试材料间具有相当高的遗传多样性,基于ISSR和SSR的遗传相似系数变异范围分别为0.6014 ~ 0.9493和0.3730 ~ 1.0000。Hirano (1982)检查了几个同工酶和树液蛋白质,在桑种水平未发现差异。不管怎么样,本研究2种标记都观察到了高水平的遗传多样性,这和以前利用不同的分子标记技术研究结果一致(向仲怀, 1995; 冯丽春, 1996; 赵卫国, 2000; Sharma, 2000; Esha, 2001; Awasthi, 2004)。

桑树栽培种和野生种内遗传多样性也进行了比较分析。所有的遗传多样性指数2种标记都揭示野生种内遗传多样性高于栽培种内。ISSR和SSR标记的UPGMA聚类分析,野生种和栽培种亲缘关系较远。主成分分析(PCA)也支持UPGMA 聚类结果。蚕业在中国人类文明中起了重要作用,在这个漫长的历史进程中,栽培种通过了长期人工、自然杂交和选育,而野生桑种几乎未开发利用,野生桑种具有高的遗传多样性可能与它们的地理隔离有关。与此相反,栽培桑品种通过长期的栽培、驯化、杂交、培育,造成了遗传多样性的丢失。

3.3.3 桑种质资源资源保护策略的思考

桑种质资源保护的主要目标之一就是遗传多样性的保护。虽然本研究揭示27个桑树材料间都存在比较高的遗传多样性,但是2种标记都显示野生种内遗传多样性高于栽培种内的遗传多样性。这可能使由于长期的栽培、驯化,使栽培种内遗传多样性狭窄。从保护遗传多样性角度来看,野生桑种应优先保护。但目前许多部门从育种目标考虑,仅收集、保存、评价桑树栽培桑,所以现在的保护策略是不够的,阻碍了桑属基因池遗传多样性和遗传亲缘关系的信息,必须对现有保护策略进行思考,建立一套长期、有效桑种质资源保护机制。

表3.4 基于ISSR标记的27个桑树品系间遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Table 3.4 Genetic similarity coefficient(above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between 27 mulberry accessions based on ISSR markers

品系 Accession	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	****	0.8623	0.9493	0.8551	0.8551	0.7971	0.8841	0.8623	0.8696	0.8406	0.8261	0.7681	0.7899	0.6884	0.6957	0.6594	0.6957	0.7246	0.7391	0.6884	0.8478	0.8478	0.7681	0.6812	0.8261	0.7899	0.8696
2	0.1481	****	0.8841	0.8768	0.9058	0.7899	0.8478	0.8551	0.8623	0.8333	0.7754	0.8043	0.7536	0.6667	0.7319	0.6377	0.6739	0.6884	0.7319	0.6377	0.8986	0.8986	0.7319	0.6739	0.8333	0.7971	0.9058
3	0.0521	0.1232	****	0.8623	0.8623	0.7899	0.8478	0.8261	0.8478	0.8623	0.8333	0.7609	0.7971	0.6957	0.7319	0.6812	0.7174	0.7609	0.7609	0.6957	0.8841	0.8551	0.7754	0.6884	0.8478	0.7971	0.8478
4	0.1566	0.1315	0.1481	****	0.8986	0.7826	0.8406	0.8623	0.8406	0.8406	0.8406	0.8116	0.8188	0.7174	0.7536	0.7029	0.7101	0.7536	0.7971	0.7029	0.8913	0.8913	0.7826	0.7246	0.8841	0.8623	0.9275
5	0.1566	0.0989	0.1481	0.107	****	0.8261	0.8696	0.8623	0.8696	0.8406	0.7971	0.8406	0.8043	0.6884	0.7246	0.6739	0.6957	0.7101	0.7536	0.6739	0.8913	0.8913	0.7681	0.7101	0.8406	0.8043	0.8986
6	0.2268	0.2359	0.2359	0.2451	0.1911	****	0.8551	0.8188	0.8406	0.8116	0.8116	0.7391	0.7174	0.6739	0.6377	0.6159	0.6812	0.6812	0.7246	0.6739	0.8188	0.7899	0.7101	0.6812	0.7971	0.7464	0.7971
7	0.1232	0.1651	0.1651	0.1737	0.1398	0.1566	****	0.8913	0.8841	0.8406	0.8406	0.7826	0.7319	0.7319	0.6667	0.6449	0.7101	0.6957	0.7536	0.6739	0.8478	0.8333	0.7101	0.6957	0.8116	0.7609	0.8551
8	0.1481	0.1566	0.1911	0.1481	0.1481	0.1999	0.1151	****	0.8768	0.8188	0.8188	0.8188	0.7681	0.7101	0.6884	0.6667	0.7174	0.7174	0.7609	0.6957	0.8696	0.8551	0.7464	0.7174	0.8333	0.8116	0.8768
9	0.1398	0.1481	0.1651	0.1737	0.1398	0.1737	0.1232	0.1315	****	0.8696	0.8406	0.8116	0.7754	0.6739	0.6522	0.6014	0.6812	0.7101	0.7391	0.6739	0.8478	0.8478	0.7536	0.6667	0.8261	0.7754	0.8696
10	0.1737	0.1823	0.1481	0.1737	0.1737	0.2088	0.1737	0.1999	0.1398	****	0.8841	0.7826	0.8043	0.6884	0.7101	0.6594	0.7101	0.7681	0.7536	0.7029	0.8623	0.8333	0.7971	0.6957	0.8261	0.7609	0.8406
11	0.1911	0.2544	0.1823	0.1737	0.2268	0.2088	0.1737	0.1999	0.1737	0.1232	****	0.7391	0.8043	0.7174	0.7101	0.6594	0.7246	0.7536	0.7536	0.7174	0.8043	0.7899	0.7826	0.7101	0.8261	0.7609	0.8116
12	0.2638	0.2177	0.2733	0.2088	0.1737	0.3023	0.2451	0.1999	0.2088	0.2451	0.3023	****	0.8043	0.6739	0.7246	0.6884	0.6957	0.6812	0.7826	0.6739	0.8043	0.8188	0.7681	0.7246	0.8116	0.7899	0.8261
13	0.2359	0.2829	0.2268	0.1999	0.2177	0.3321	0.3121	0.2638	0.2544	0.2177	0.2177	0.2177	****	0.6812	0.7174	0.6667	0.6739	0.6884	0.7174	0.6667	0.7536	0.7681	0.9348	0.6739	0.8043	0.7681	0.7899
14	0.3734	0.4055	0.3629	0.3321	0.3734	0.3947	0.3121	0.3423	0.3947	0.3734	0.3321	0.3947	0.384	****	0.7319	0.7826	0.7899	0.7319	0.7609	0.7681	0.7246	0.6957	0.6449	0.7609	0.7319	0.6667	0.6884
15	0.3629	0.3121	0.3121	0.2829	0.3221	0.4499	0.4055	0.3734	0.4274	0.3423	0.3423	0.3221	0.3321	0.3121	****	0.7464	0.7536	0.7391	0.7391	0.6739	0.7174	0.7174	0.6812	0.7681	0.7681	0.8043	0.7101
16	0.4164	0.4499	0.384	0.3525	0.3947	0.4846	0.4386	0.4055	0.5084	0.4164	0.4164	0.3734	0.4055	0.2451	0.2925	****	0.7609	0.7319	0.8188	0.7391	0.6957	0.6667	0.6449	0.7754	0.7029	0.6957	0.6594
17	0.3629	0.3947	0.3321	0.3423	0.3629	0.384	0.3423	0.3321	0.384	0.3423	0.3221	0.3629	0.3947	0.2359	0.2829	0.2733	****	0.7826	0.8116	0.7899	0.7174	0.6739	0.6522	0.7971	0.7536	0.6739	0.6812
18	0.3221	0.3734	0.2733	0.2829	0.3423	0.384	0.3629	0.3321	0.3423	0.2638	0.2829	0.384	0.3734	0.3121	0.3023	0.3121	0.2451	****	0.7681	0.8043	0.7319	0.7029	0.6667	0.7971	0.7826	0.7174	0.7101
19	0.3023	0.3121	0.2733	0.2268	0.2829	0.3221	0.2829	0.2733	0.3023	0.2829	0.2829	0.2451	0.3321	0.2733	0.3023	0.1999	0.2088	0.2638	****	0.7899	0.7609	0.7174	0.6667	0.7536	0.7826	0.7464	0.7391
20	0.3734	0.4499	0.3629	0.3525	0.3947	0.3947	0.3947	0.3629	0.3947	0.3525	0.3321	0.3947	0.4055	0.2638	0.3947	0.3023	0.2359	0.2177	0.2359	****	0.6812	0.6667	0.6594	0.7754	0.7319	0.6812	0.6594
21	0.1651	0.107	0.1232	0.1151	0.1151	0.1999	0.1651	0.1398	0.1651	0.1481	0.2177	0.2177	0.2829	0.3221	0.3321	0.3629	0.3321	0.3121	0.2733	0.384	****	0.942	0.7319	0.7029	0.8768	0.8116	0.9058
22	0.1651	0.107	0.1566	0.1151	0.1151	0.2359	0.1823	0.1566	0.1651	0.1823	0.2359	0.1999	0.2638	0.3629	0.3321	0.4055	0.3947	0.3525	0.3321	0.4055	0.0597	****	0.7464	0.6884	0.8478	0.8116	0.9348
23	0.2638	0.3121	0.2544	0.2451	0.2638	0.3423	0.3423	0.2925	0.2829	0.2268	0.2451	0.2638	0.0674	0.4386	0.384	0.4386	0.4274	0.4055	0.4055	0.4164	0.3121	0.2925	****	0.6522	0.7826	0.7609	0.7681
24	0.384	0.3947	0.3734	0.3221	0.3423	0.384	0.3629	0.3321	0.4055	0.3629	0.3423	0.3221	0.3947	0.2733	0.2638	0.2544	0.2268	0.2268	0.2829	0.2544	0.3525	0.3734	0.4274	****	0.7681	0.7319	0.6957
25	0.1911	0.1823	0.1651	0.1232	0.1737	0.2268	0.2088	0.1823	0.1911	0.1911	0.1911	0.2088	0.2177	0.3121	0.2638	0.3525	0.2829	0.2451	0.2451	0.3121	0.1315	0.1651	0.2451	0.2638	****	0.8623	0.8551
26	0.2359	0.2268	0.2268	0.1481	0.2177	0.2925	0.2733	0.2088	0.2544	0.2733	0.2733	0.2359	0.2638	0.4055	0.2177	0.3629	0.3947	0.3321	0.2925	0.384	0.2088	0.2088	0.2733	0.3121	0.1481	****	0.8333
27	0.1398	0.0989	0.1651	0.0752	0.107	0.2268	0.1566	0.1315	0.1398	0.1737	0.2088	0.1911	0.2359	0.3734	0.3423	0.4164	0.384	0.3423	0.3023	0.4164	0.0989	0.0674	0.2638	0.3629	0.1566	0.1823	****

1~27代表桑树品系,如表2.1所示。

Lane 1~27 represent mulberry accessions, as shown in Table 2.1.

表3.5 桑种间、种内的平均遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Table3.5 Mean genetic similarity coefficients (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among inter- , intra- species of mulberry													
桑种 Species	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1	0.8870	0.9579	0.8863	0.8928	0.8903	0.9017	0.9153	0.8161	0.783	0.7527	0.7811	0.7764	0.7622
2	0.043	0.8358	0.895	0.8934	0.8990	0.9194	0.9387	0.8328	0.8117	0.7632	0.8204	0.8118	0.7808
3	0.1207	0.1109	****	0.8913	0.8841	0.8708	0.8310	0.7386	0.7551	0.6667	0.7411	0.7501	0.6957
4	0.1134	0.1128	0.1151	****	0.8768	0.8546	0.8743	0.7753	0.7646	0.6884	0.7531	0.7621	0.7174
5	0.1162	0.1064	0.1232	0.1315	****	0.8856	0.8594	0.7826	0.7309	0.6522	0.7172	0.7198	0.7101
6	0.1035	0.084	0.1384	0.1571	0.1215	0.8841	0.8831	0.8348	0.7895	0.7371	0.7801	0.783	0.7921
7	0.0886	0.0632	0.1851	0.1343	0.1515	0.1244	0.8213	0.8651	0.8091	0.8173	0.837	0.8275	0.794
8	0.2033	0.183	0.303	0.2545	0.2451	0.1805	0.1449	0.9348	0.7387	0.7196	0.7338	0.7212	0.6945
9	0.2447	0.2086	0.2809	0.2685	0.3135	0.2363	0.2118	0.3028	0.7681	0.7614	0.8787	0.8999	0.8205
10	0.2841	0.2702	0.4055	0.3734	0.4274	0.3051	0.2018	0.3291	0.2726	****	0.7863	0.8107	0.7391
11	0.247	0.1979	0.2996	0.2836	0.3324	0.2483	0.1779	0.3095	0.1293	0.2404	0.8188	0.8794	0.797
12	0.2531	0.2085	0.2875	0.2716	0.3287	0.2446	0.1893	0.3269	0.1055	0.2099	0.1285	0.7971	0.8347
13	0.2716	0.2474	0.3629	0.3321	0.3423	0.233	0.2306	0.3646	0.1978	0.3023	0.2269	0.1807	****

注:1~13分别代表桑种:鲁桑,白桑,大叶桑,白脉桑,垂枝桑, 广东桑,山桑, 暹罗桑,长穗桑,蒙桑,长果桑,华桑和药桑.

Note: Numbers indicate the following mulberry species: *M. multicaulis* Perr., *M. alba* Linn., *M. alba* var. *macrophylla* Loud., *M. alba* var. *venose* Delile., *M. alba* var. *pendula* Dipp., *M. atropurpurea* Roxb., *M. bombycis* Koidz., *M. rotundiloba* koidz., *M. wittiorum* Hand-Mazz., *M. mongolica* Schneid., *M. laevigata* Wall., *M. cathayana* Hemsl., *M. nigra* Linn.

表3.6 基于SSR标记的27个桑树品系间遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Table 3.6 Genetic similarity coefficient(above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between 27 mulberry accessions based on SSR markers

品系 Accession	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
1	****	0.6875	0.875	0.8391	0.7188	0.875	0.8391	0.6973	0.6875	0.6875	0.7812	0.5457	0.7188	0.6778	0.5487	0.4343	0.7423	0.5164	0.4841	0.5809	0.75	0.875	0.7188	0.5487	0.875	0.7188	0.75
2	0.3747	****	0.8125	0.7746	0.7188	0.8125	0.6455	0.7579	0.625	0.6875	0.8125	0.5457	0.6562	0.71	0.71	0.5011	0.4841	0.4841	0.5164	0.6455	0.6875	0.5625	0.4062	0.8714	0.8125	0.9688	0.9375
3	0.1335	0.2076	****	0.9682	0.8438	1	0.71	0.8186	0.5625	0.8125	0.9062	0.667	0.8438	0.5487	0.5487	0.5679	0.6132	0.6455	0.6132	0.71	0.875	0.75	0.5938	0.6778	1	0.8438	0.875
4	0.1754	0.2554	0.0323	****	0.8069	0.9682	0.6667	0.7828	0.5487	0.7746	0.8714	0.6262	0.8069	0.5	0.5667	0.5866	0.5667	0.6	0.5667	0.6667	0.8391	0.71	0.5487	0.6333	0.9682	0.8069	0.8391
5	0.3302	0.3302	0.1699	0.2146	****	0.8438	0.5487	0.667	0.5312	0.7188	0.8125	0.576	0.6875	0.4518	0.4518	0.4677	0.5164	0.4841	0.7746	0.8714	0.7188	0.5938	0.5625	0.5809	0.8438	0.75	0.7188
6	0.1335	0.2076	0	0.0323	0.1699	****	0.71	0.8186	0.5625	0.8125	0.9062	0.667	0.8438	0.5487	0.5487	0.5679	0.6132	0.6455	0.6132	0.71	0.875	0.75	0.5938	0.6778	1	0.8438	0.875
7	0.1754	0.4377	0.3424	0.4055	0.6003	0.3424	****	0.7828	0.6455	0.6455	0.6132	0.501	0.6778	0.7	0.5	0.276	0.6	0.4	0.3667	0.4667	0.5809	0.71	0.5487	0.5667	0.71	0.6778	0.71
8	0.3606	0.2772	0.2002	0.2449	0.405	0.2002	0.2449	****	0.576	0.6063	0.6973	0.4706	0.6367	0.4697	0.5323	0.4213	0.4384	0.501	0.4697	0.5323	0.6973	0.576	0.3941	0.5949	0.8186	0.7882	0.8186
9	0.3747	0.47	0.5754	0.6003	0.6325	0.5754	0.4377	0.5516	****	0.3438	0.4375	0.1819	0.375	0.5809	0.5487	0.167	0.3873	0.1936	0.2905	0.355	0.4375	0.5625	0.625	0.4518	0.5625	0.6562	0.6875
10	0.3747	0.3747	0.2076	0.2554	0.3302	0.2076	0.4377	0.5003	1.0678	****	0.8438	0.8186	0.9375	0.5809	0.4196	0.5345	0.5809	0.6132	0.6455	0.7423	0.6875	0.5625	0.4375	0.71	0.8125	0.7188	0.6875
11	0.2469	0.2076	0.0984	0.1376	0.2076	0.0984	0.489	0.3606	0.8267	0.1699	****	0.667	0.7812	0.5809	0.5487	0.6013	0.6132	0.6132	0.6455	0.7423	0.7812	0.6562	0.5312	0.71	0.9062	0.8125	0.7812
12	0.6057	0.6057	0.405	0.468	0.5516	0.405	0.6912	0.7538	1.7043	0.2002	0.405	****	0.7882	0.4384	0.3131	0.5186	0.5949	0.6262	0.501	0.6262	0.667	0.5457	0.4244	0.5636	0.667	0.576	0.5457
13	0.3302	0.4212	0.1699	0.2146	0.3747	0.1699	0.3889	0.4515	0.9808	0.0645	0.2469	0.238	****	0.5487	0.3873	0.5011	0.5809	0.6455	0.6132	0.7423	0.7188	0.5938	0.4688	0.71	0.8438	0.6875	0.7188
14	0.3889	0.3424	0.6003	0.6931	0.7944	0.6003	0.3567	0.7557	0.5431	0.5431	0.5431	0.8247	0.6003	****	0.5667	0.3105	0.5667	0.4	0.4667	0.4333	0.4196	0.5487	0.4518	0.7667	0.5487	0.71	0.6778
15	0.6003	0.3424	0.6003	0.568	0.7944	0.6003	0.6931	0.6306	0.6003	0.8685	0.6003	1.1612	0.9486	0.568	****	0.414	0.3667	0.2333	0.2667	0.3667	0.4196	0.4196	0.2582	0.5667	0.5487	0.71	0.6778
16	0.834	0.6909	0.5658	0.5335	0.7599	0.5658	1.2873	0.8643	1.7895	0.6264	0.5086	0.6567	0.6909	1.1695	0.8818	****	0.6211	0.5175	0.5175	0.5175	0.7016	0.5679	0.3341	0.4485	0.5679	0.4677	0.4343
17	0.298	0.7254	0.489	0.568	0.6609	0.489	0.5108	0.8247	0.9486	0.5431	0.489	0.5193	0.5431	0.568	1.0033	0.4763	****	0.5	0.4333	0.5333	0.7423	0.8714	0.6132	0.4667	0.6132	0.5164	0.4841
18	0.6609	0.7254	0.4377	0.5108	0.7254	0.4377	0.9163	0.6912	1.6417	0.489	0.489	0.468	0.4377	0.9163	1.4553	0.6587	0.6931	****	0.6	0.5	0.6455	0.5164	0.3873	0.5667	0.6455	0.4841	0.5164
19	0.7254	0.6609	0.489	0.568	0.2554	0.489	1.0033	0.7557	1.2362	0.4377	0.4377	0.6912	0.489	0.7621	1.3218	0.6587	0.8362	0.5108	****	0.8333	0.4841	0.355	0.3873	0.6	0.6132	0.5164	0.4841
20	0.5431	0.4377	0.3424	0.4055	0.1376	0.3424	0.7621	0.6306	1.0356	0.298	0.298	0.468	0.298	0.8362	1.0033	0.6587	0.6286	0.6931	0.1823	****	0.5809	0.4518	0.4518	0.6333	0.71	0.6132	0.5809
21	0.2877	0.3747	0.1335	0.1754	0.3302	0.1335	0.5431	0.3606	0.8267	0.3747	0.2469	0.405	0.3302	0.8685	0.8685	0.3544	0.298	0.4377	0.7254	0.5431	****	0.875	0.5938	0.5487	0.875	0.7188	0.75
22	0.1335	0.5754	0.2877	0.3424	0.5213	0.2877	0.3424	0.5516	0.5754	0.5754	0.4212	0.6057	0.5213	0.6003	0.8685	0.5658	0.1376	0.6609	1.0356	0.7944	0.1335	****	0.7188	0.4196	0.75	0.5938	0.625
23	0.3302	0.9008	0.5213	0.6003	0.5754	0.5213	0.6003	0.9311	0.47	0.8267	0.6325	0.857	0.7577	0.7944	1.354	1.0964	0.489	0.9486	0.9486	0.7944	0.5213	0.3302	****	0.2905	0.5938	0.4375	0.4688
24	0.6003	0.1376	0.3889	0.4568	0.5431	0.3889	0.568	0.5193	0.7944	0.3424	0.3424	0.5734	0.3424	0.2657	0.568	0.8018	0.7621	0.568	0.5108	0.4568	0.6003	0.8685	1.2362	****	0.6778	0.8391	0.8069
25	0.1335	0.2076	0	0.0323	0.1699	0	0.3424	0.2002	0.5754	0.2076	0.0984	0.405	0.1699	0.6003	0.6003	0.5658	0.489	0.4377	0.489	0.3424	0.1335	0.2877	0.5213	0.3889	****	0.8438	0.875
26	0.3302	0.0317	0.1699	0.2146	0.2877	0.1699	0.3889	0.238	0.4212	0.3302	0.2076	0.5516	0.3747	0.3424	0.3424	0.7599	0.6609	0.7254	0.6609	0.489	0.3302	0.5213	0.8267	0.1754	0.1699	****	0.9688
27	0.2877	0.0645	0.1335	0.1754	0.3302	0.1335	0.3424	0.2002	0.3747	0.3747	0.2469	0.6057	0.3302	0.3889	0.3889	0.834	0.7254	0.6609	0.7254	0.5431	0.2877	0.47	0.7577	0.2146	0.1335	0.0317	****

1~27代表桑树品系,如表2.1所示。

Lane 1~27 represent mulberry accessions, as shown in Table 2.1.

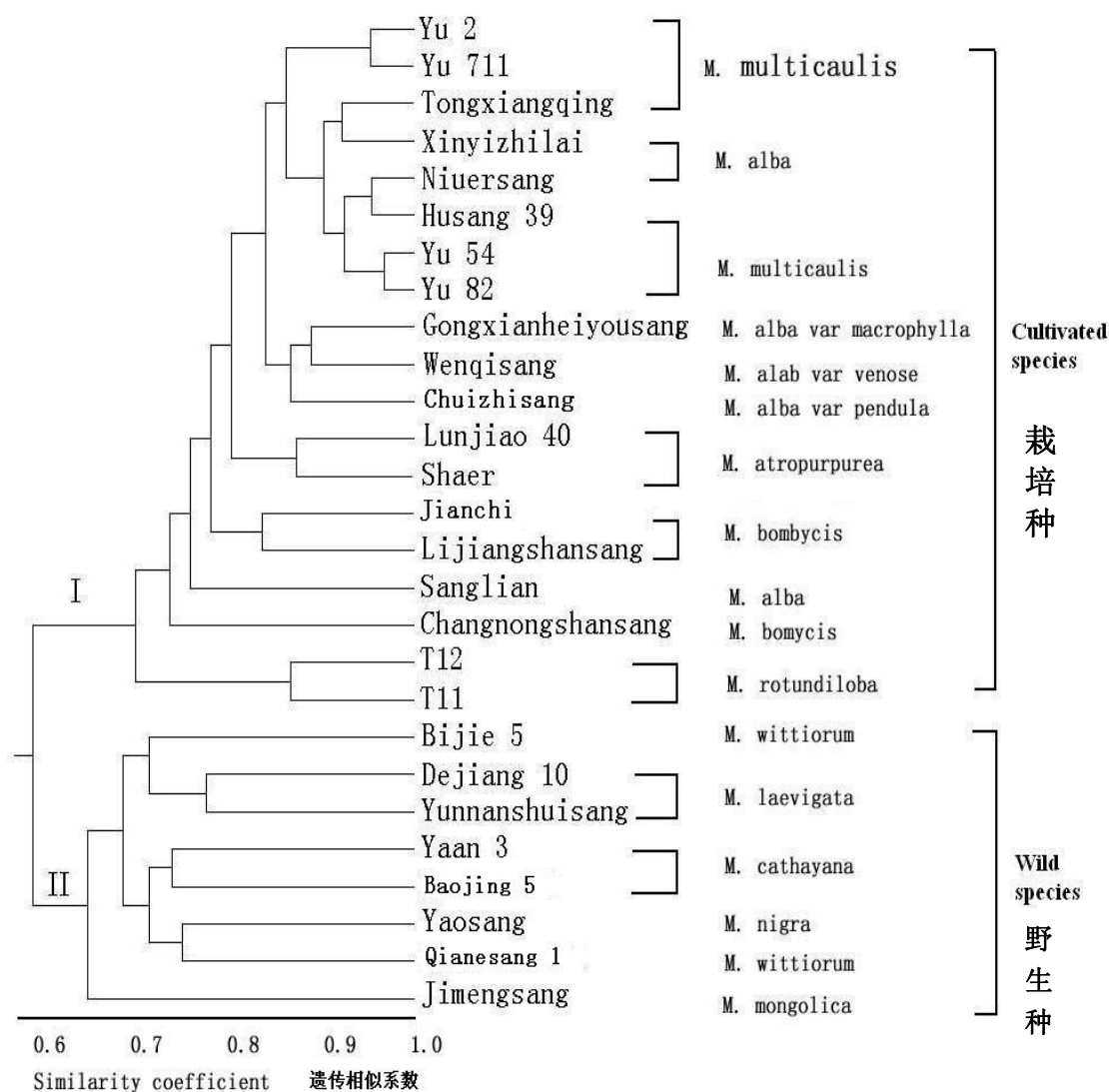


图 3.4 基于 ISSR 标记的 27 个桑树品系 UPGMA 聚类图

Fig.3.4 A dendrogram obtained by UPGMA for 27 mulberry accessions based on ISSR markers

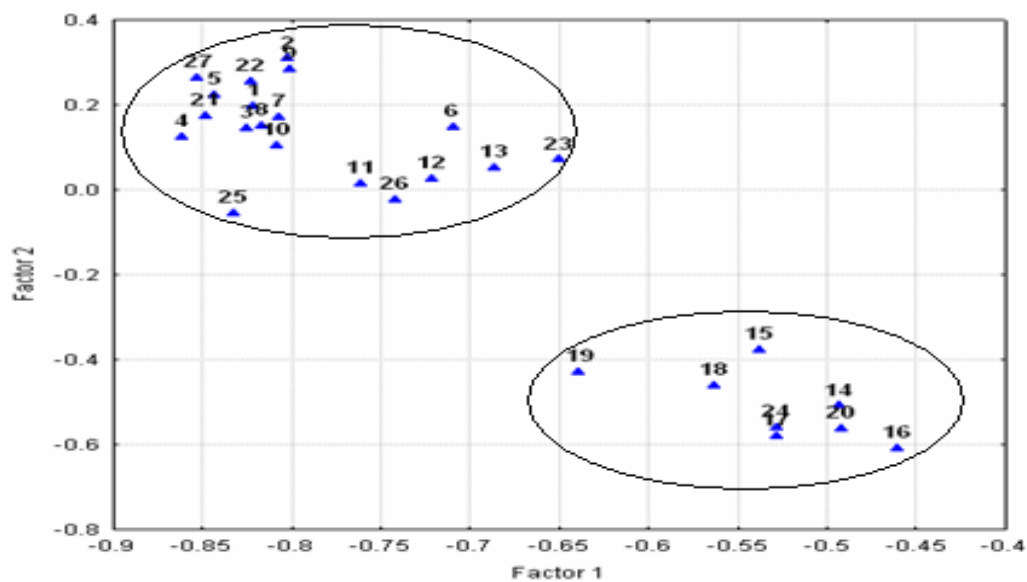


图3.5 利用ISSR数据作的27个品系第一和第二主成分散点图

Fig.3.5 Scatter plots of 27 mulberry accessions based on first and second components of principal coordinate analysis using ISSR data.

注:1~27相对应表2.1

Note:The numbers correspond to those listed on Table 2.1.

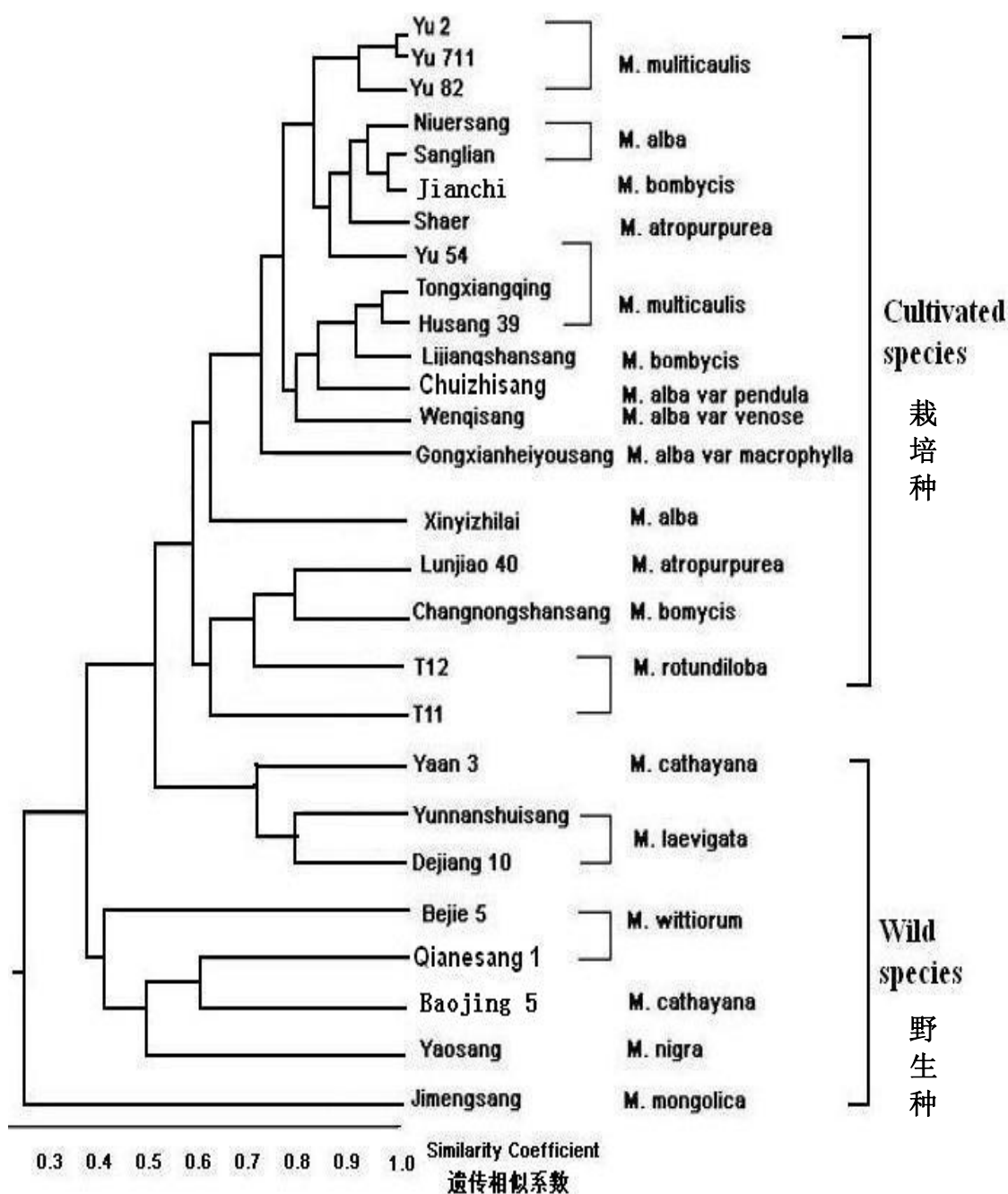


图 3.6 基于 SSR 标记的 27 个桑树品系 UPGMA 聚类图

Fig.3.6 A dendrogram obtained by UPGMA for 27 mulberry accessions based on SSR markers

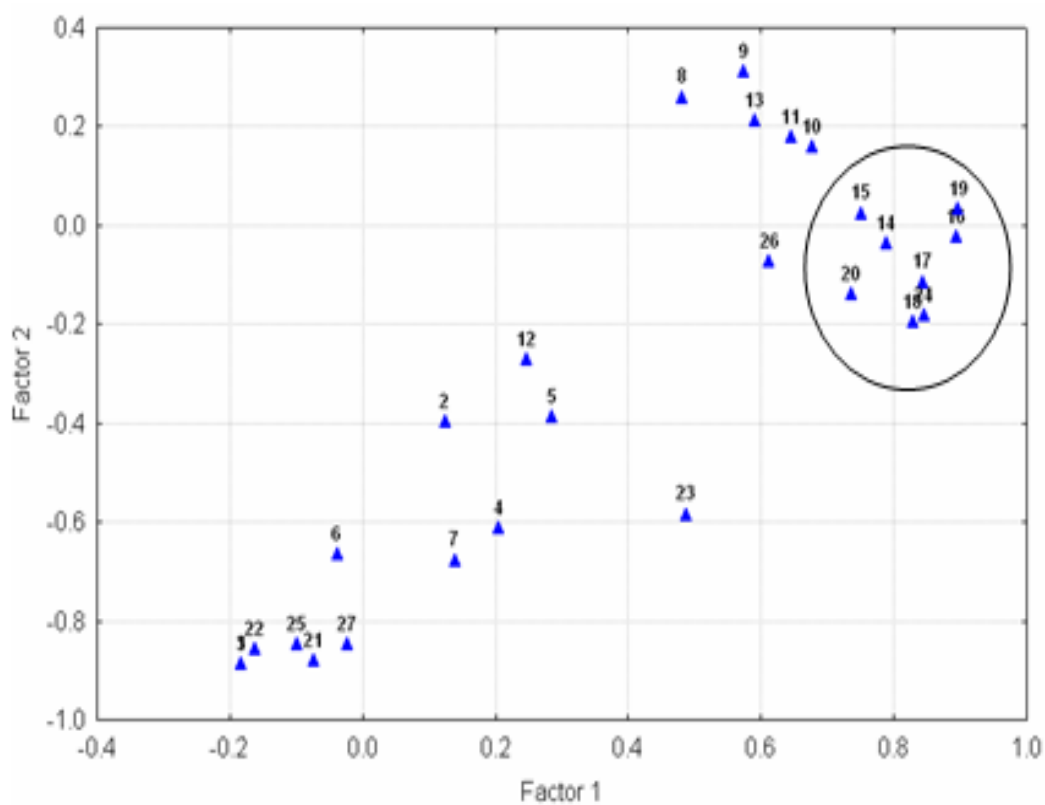


图3.7 利用SSR数据作的27个品系第一和第二主成分散点图

Fig.3.7 Scatter plots of 27 mulberry accessions based on first and second components of principal coordinate analysis using SSR data.

注:1~27相对应表2.1

Note:The numbers correspond to those listed on Table 2.1.

第四章 我国桑树选育品种 ISSR 指纹图谱的构建 及遗传多样性分析

我国是蚕桑生产起源地,栽桑、养蚕历史悠久,蚕茧产量居世界首位。目前我国蚕桑生产已遍及 28 个省、市、自治区的 1300 多个县,桑园面积达到了 100 多万公顷,蚕茧产量、生丝产量、生丝出口量和丝绸出口量分别占世界总量 80%、75%、80%和 45%左右,年创汇 30 多亿美元,在国际茧丝绸生产和贸易中占有重要地位。我国地域辽阔,生态环境各异,经长期的自然选择和人工选育,形成了丰富的桑树遗传资源。利用 DNA 分子标记的手段开展我国选育桑树品种基因资源的分子鉴定和遗传多样性分析,这对我国桑树选育品种的分子鉴定、遗传改良、种质保护、核心种质的构建、重要农艺性状基因定位以及分子辅助育种都具有重要的实用价值和理论意义。

桑树是多年生的重要经济作物,是家蚕的唯一饲料。优良的桑树新品种是获得优质高产蚕茧的基础。随着蚕桑生产的发展和科技进步,人们对桑树新品种的需求也愈来愈迫切。自然生态环境复杂,经过长期的自然和人工选择,形成了极其丰富的桑树基因资源。桑树新品种选育通过全国各蚕区广泛开展桑树种质资源的收集、整理、鉴定、利用和育种研究,选育了一大批适应不同环境条件、栽培技术、养蚕技术和其它用途的优良品种供生产应用。桑树新品种的选育开始主要以地方品种的选拔为主,这些地方品种的选拔与推广,极大地促进了全国各地蚕桑生产的发展。80 年代随着桑树育种技术的进步,全国各蚕业科研单位、大专院校先后开展了桑树的有性杂交育种、诱变育种、多倍体育种等研究,并取得了重要进展。至今,经全国桑、蚕品种审定委员会审定(认定)的品种有 29 个,由各省、区农作物品种审定委员会审定通过的品种有 10 多个(潘一乐, 2000; 2003)。

传统的品种鉴定多采用形态学鉴定方法,当作物在田间生长到一定阶段,各性状充分表达后,通过对大量形态学性状进行调查统计,鉴别鉴定不同品种。该方法存在下列不足。首先,鉴定周期长,费用高。其次,形态学方法所调查性状大多属数量性状,由微效多基因控制,容易受环境影响。第三现代育种技术中,新品种多由数量有限的一些优良品种作亲本杂交育成,新品种间的遗传变异日趋狭窄,品种之间的形态学差异越来越小,可供品种鉴定利用的形态性状不足,增加了品种鉴定的困难。现有的其它品种鉴定方法中,同工酶和蛋白质电泳应用较广,但因检测到的位点少,蛋白质类型不多,多态性水平低,不能有效区分同一作物不同品种(陈道明, 1980; Hirano, 1982; 何大彦, 1988),与其他方法相比, DNA 分子标记技术分布于整个基因组中,多态性丰富、准确性高、重复性好、无器官发育时期的特异性,不受环境影响,易于分析。因此在品种鉴定和遗传基础分析应用中显示出较大潜力。

DNA 分子标记技术在桑树鉴定和系统学研究上起步较晚。向仲怀(1995)、菅贵史(1995)、楼程富(1995)、冯丽春(1997)、赵卫国(2000; 2004)等相继利用 RAPD 技术对桑属植物分类和遗传多样性进行了研究。桑树利用 AFLP 分子标记技术方面, 2000 年 Sharma 等利用荧光 AFLP 标记对桑种质资源遗传多样性进行了评价;王卓伟(2001)等对多倍体育种材料遗传背

景进行了研究分析；2003 年杨光伟等利用该技术探讨了桑属植物系统发育。2004 年 Awasthi 用 19 个 RAPD 引物和 4 个 ISSR (inter-simple sequence repeats) 标记对 15 个桑种进行了亲缘关系鉴定。但这些研究主要在桑种水平，对桑选育品种指纹图谱的构建、遗传基础分析及多样性研究仍为空白。就生产应用来说，选育品种指纹图谱的构建、遗传资源多样性和亲缘关系研究对作物改良更有意义。

因此本研究利用 ISSR 分子标记技术对我国生产推广的桑树选育品种进行指纹图谱的构建和遗传多样性研究，旨在解决选育品种同种异名、异名同种、品种名混淆和品种产权不清状况，明确我国育成品种的遗传基础，为我国桑树品种遗传改良提供依据。

4.1 材料和方法

4.1.1 试验材料

24 个桑树选育桑品种用于 ISSR 指纹图谱的构建和遗传多样性分析，具体见表 4.1。所有试验材料均采于中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃。

4.1.2 桑树基因组 DNA 的提取

桑树全基因组 DNA 采用 CTAB 法提取 (Doyle and Doyle, 1987)。具体见 2.1.2,3.1.2。

4.1.3 ISSR 分析

除已有合成 ISSR 引物外 (表 3.1)，我们又合成了 15 对 ISSR 引物，包括一些兼并引物(表 4.2)，并进行筛选。其结果见表 4.3。其余同 3.1.3。

4.1.4 PCR 的扩增、电泳、数据分析

ISSR 引物 PCR 的扩增、电泳、数据分析见 3.1.3、3.1.5。

4.2 结果

4.2.1 桑树选育品种间的ISSR多态性

通过筛选，17 个 ISSR 引物被用于桑树选育品种指纹图谱的构建和遗传多样性分析。17 个 ISSR 引物共扩增出 80 条带，不同引物的扩增带数变幅从 1~8 条不等，平均每个引物可扩增出 4.7 条带。80 条 DNA 扩增带中，40 条带具有多态性，占 50.0%，平均每个引物可扩增出多态性条带 2.35 条 (表 4.3)。从统计数据来看，桑树选育品种间的 ISSR 多态性水平较低 (图 4.1)。

表 4.1 供试选育桑品种

Table 4.1 Mulberry varieties analyzed

序号 No.	品 种 Variety	选 育 单 位 Selection and breeding unit	通过年份 Year	适 宜 地 区 Suitable zone	备注 Note
1	陕桑 305 Xiansang 305	陕西省蚕桑所 Sericultural Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences	2001	黄河流域 The Huanghe River valley	审定 Examination and approval
2	北桑一号 Beisangyihao	四川北碚蚕种场 Beibei silkworm eggs production farm ,Sichun province	1995	长江流域、黄河中下游 The Changjiang River valley, The middle and lower reaches of the Huanghe River	审定 Examination and approval
3	农桑 8 号 Nongsang 8	浙江蚕研所 Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences	2000	长江流域 The Changjiang River valley	浙江省审定
4	黄鲁选 Huangluxuan	河北蚕研所 Sericultural Research Institute, Hebei Academy of Agricultural Sciences	1998	黄河流域 The Huanghe River valley	审定 Examination and approval
5	吉湖 4 号 Jihu 4	吉林蚕研所 Sericultural Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences	1989	东北地区 Northeast zone	审定 Examination and approval
6	大中华	浙江蚕研所 Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences	1996	长江流域 The Changjiang River valley	浙江省审定
7	薪一圆 Xinyiyuan	浙江蚕研所 Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences	1995	长江流域、黄河中下游 The Changjiang River valley, The middle and lower reaches of the Huanghe River	审定 Examination and approval
8	农桑 14 号 Nongsang 14	浙江蚕研所 Sericultural Research Institute, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences	2000	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval
9	育 237 号 Yu 237	中国农科院蚕业所 Sericultural research institute ,CAAS	1989	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval
10	选秋 1 号 Xuanqiu 1	黑龙江蚕研所 Heilongjiang Sericultural Research Institute	1989	东北地区 Northeast zone	审定 Examination and approval
11	7307	中国农科院蚕业所 Sericultural research institute ,CAAS	1989	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval
12	湖桑 32 号	来源江苏省无锡		长江流域、黄河中下游 The Changjiang River valley, The middle and lower reaches of the Huanghe River	地方品种 Local variety
13	湘 7920 Xiang 7920	湖南蚕研所 Sericultural Research Institute, Hunan Academy of Agricultural Sciences	1995	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval

序号	品 种 Variety	选 育 单 位 Selection and breeding unit	通过年份 Year	适 宜 地 区 Suitable zone	备注 Note
14	蚕专 4 号 Canzhuan 4	苏州大学蚕桑学院 Sericultural Department, Soochow University	2001	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval
15	华明桑 Huamingsang	安徽蚕研所 Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences	1994	安徽池州、宣州、安庆和山东临沂地区 chizhou, Xuanzhou, Anqing in Anhui province and Linyi in Shandong province	认定 Recognition
16	7946	山东蚕研所 Sericultural Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	1998	黄河流域 The Huanghe River valley	审定 Examination and approval
17	育 2 号 Yu 2	中国农科院蚕业所 Sericultural research institute,CAAS	1989	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval
18	实钻 11-6 Shigu 11-6	四川三台蚕种场 Shantai silkworm eggs production farm, Sichun province	1995	长江流域、黄河中下游 The Changjiang River valley, The middle and lower reaches of the Huanghe River	审定 Examination and approval
19	选 792 Xuan 792	山东蚕研所 Sericultural Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences	1989	黄河流域 The Huanghe River valley	审定 Examination and approval
20	育 711 Yu 711	中国农科院蚕业所 Sericultural research institute,CAAS	1995	长江流域、黄河中下游 The Changjiang River valley, The middle and lower reaches of the Huanghe River	审定 Examination and approval
21	育 151 号 Yu 151	中国农科院蚕业所 Sericultural research institute ,CAAS	1989	长江流域 The Changjiang River valley	审定 Examination and approval
22	红星五号 Hongxin 5	安徽蚕研所 Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences	1995	长江流域、黄河中下游 The Changjiang River valley, The middle and lower reaches of the Huanghe River	审定 Examination and approval
23	伦敦 40 号 Lunjiao 40	广东蚕研所 Sericultural Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences	1989	珠江流域 The Zhujiang River valley	审定 Examination and approval
24	皖 7707	安徽蚕研所 Sericultural Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences	1994	安徽池州、宣州、安庆和山东临沂地区 chizhou, Xuanzhou, Anqing in Anhui province and Linyi in Shandong province	认定 Recognition

表 4.2 ISSR 引物
Table 4.2 ISSR primers

引物号 Primer No.	引物序列 Primer sequence (5'-3')	碱基数 Base No.
BI-1	(AG) ₈ S	17
BI-2	(GA) ₈ T	17
BI-3	(AC) ₈ T	17
BI-4	(AG) ₈ YT	18
BI-5	(AG) ₈ YC	18
BI-6	(AC) ₈ YC	18
BI-7	(AC) ₈ YT	18
BI-8	(TG) ₈ RC	18
BI-9	(CT) ₈ RT	18
BI-10	(AT) ₈ ST	18
BI-11	(GTA) ₆	18
BI-12	(AGG) ₆	18
BI-13	(GATA) ₄	16
BI-14	(GAGT) ₄	16
BI-15	(GCGT) ₄	16
备注 Note	Y= (C, T), R= (A, G), S=(C, G)	

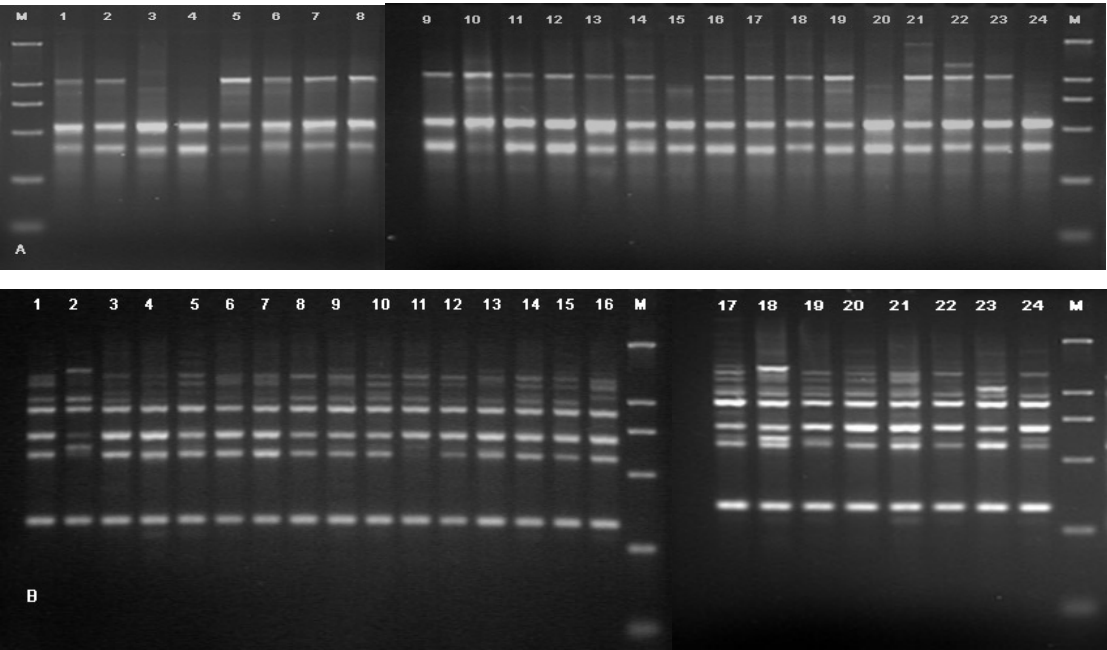


图4.1 ISSR引物(CT)₈RT (A)和(GAG)₄GC (B)扩增的24个选育桑树品种指纹图谱

Fig. 4.1 ISSR fingerprinting of 24 mulberry varieties with primers (CT)₈RT (A) and (GAG)₄GC (B)

1~24代表桑树品种,如表4.1所示。M为Marker (DL2000)

Lane 1~24 represent mulberry varieties, as shown in Table 4.1. M is DNA Marker (DL2000)

表4.3 用于24个桑树品种鉴定的引物、扩增条件和多态性

引物编号 Primer No.	序列 Sequence (3'-5')	T_m (°C)	退火温度 Annealing Temperature (°C)	扩增条带数 Number of Amplified bands	多态性条带数 Number of Polymorphic bands	多态性比例 Percent of polymorphic bands (%)
IS01	(GACA) ₄	51.6	54	4	1	25.0
IS04	(GTGC) ₄	61.8	64	5	3	60.0
IS09	(GAG) ₄ GC	55.9	60	8	5	62.5
IS14	(AG) ₈ TA	52.7	54	7	4	57.1
BI-15	(GCGT) ₄	61.8	64	1	0	0
IS18	(CT) ₈ GC	57.3	60	6	4	66.7
IS19	(AG) ₈ TC	55	54	6	2	33.3
IS20	(CT) ₈ AC	55	54	7	1	14.3
IS21	(GTC) ₆	60	64	5	3	60.0
BI-1	(AG) ₈ S	49.8	50	3	1	33.3
BI-4	(AG) ₈ YT	50.3	54	3	2	66.7
BI-7	(AC) ₈ YT	50.3	54	3	0	0
BI-3	(AC) ₆ T	50.00	55	6	4	66.7
BI-14	(GAGT) ₄	47.1	50	3	1	33.3
BI-9	(CT) ₈ RT	50.3	54	4	3	75.0
BI-5	(AG) ₈ YC	52.6	55	3	2	66.7
BI-6	(AC) ₈ YC	52.6	54	6	4	66.7
平均 Mean				80	40	50.0

4.2.1 桑树选育品种的ISSR分子鉴定

应用ISSR技术评估、鉴别资源无论在遗传育种中还是在资源理论研究中都有重要的意义。研究表明, ISSR标记鉴别品种非常有效, 有3种独立的方法可以用于鉴别桑树选育品种: 特殊的标记; 特异的谱带类型; 不同引物提供的谱带类型组合。

通过特异的ISSR标记可以鉴别的资源。(GTC)₆等7个引物产生的7个特异标记的存在和4个特异标记的缺失使鉴别区分黄鲁选、农桑14号、选秋1号、红星5号、7946、实钻11-6、伦敦40号等7份资源成为可能(表4.4)。

不同桑树品种经过ISSR扩增后, 产生了不同的谱带类型, 可以用来区分不同的桑品种。例如ISSR引物(GTC)₆和(GTGC)₄经扩增后分别产生了5种和4种不同带型, 可以用来鉴别黄鲁选、选秋1号等不同的桑树选育品种(图4.2)。另外, 通过不同引物谱带类型的组合可以有效地区分所有桑树品种。

表4.4 可用鉴别桑树品种的特异标记

Table4.4 Specific markers can be used for discrimination of mulberry varieties	
能鉴别的品种 Discrimnable varieties	特殊标记及鉴别标准 Specific markers and criteria
黄鲁选 Huangluxuan	(GTC) ₆ -1500bp (缺失 Absence)
农桑14号 Nongsang 8	(CT) ₈ GC-1900bp (存在 Presence)
选秋1号 Xuanqiu 1	(CT) ₈ GC-1500bp (存在 Presence) ; (CT) ₈ RT-1200bp (缺失 Absence) ; (AG) ₈ YC-400bp (存在 Presence) ;
红星5号 Hongxing 5	(CT) ₈ RT-1200bp (存在 Presence) ; (AG) ₈ TC-1050bp (存在 Presence) ; (AG) ₈ TC-1000bp (缺失 Absence)
7946	(GAG) ₄ GC-1000bp (缺失 Absence)
实钻11-6 Shigu11-6	(GAG) ₄ GC-540bp (存在 Presence)
伦敦40号 Lunjiao 40	(CT) ₆ AC-540bp (存在 Presence)

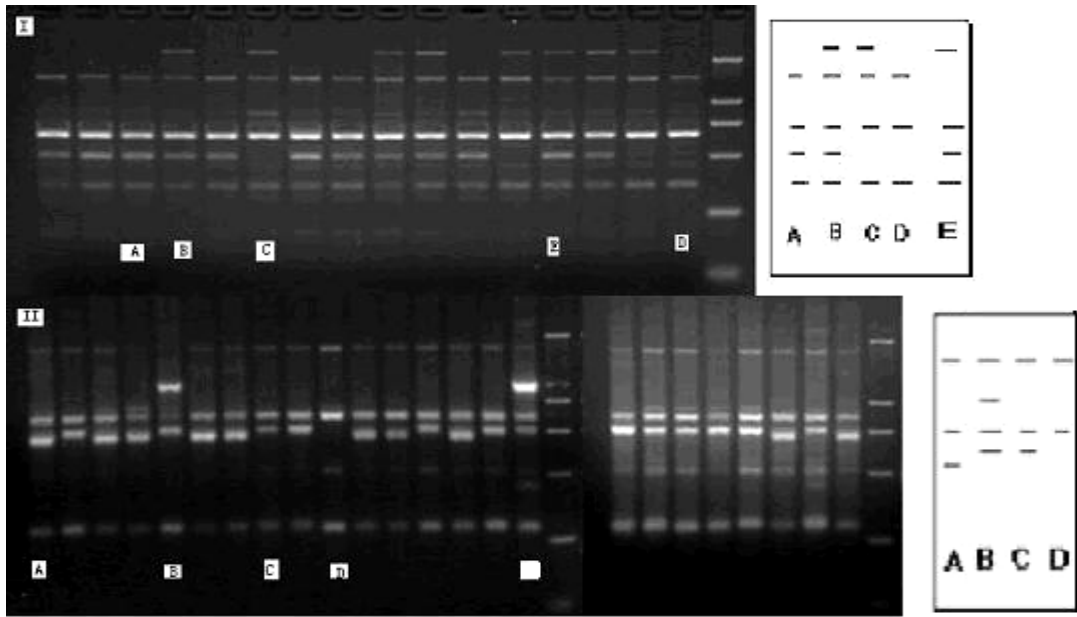


图4.2 ISSR引物(GTC)₆(I)和(GTGC)₄(II)扩增产物和带型

Fig. 4.2 ISSR amplification products and schematic of the bands pattern with the primer (GTC)₆(I) and (GTGC)₄(II)

4.2.1 桑树选育品种的遗传变异及聚类分析

利用17个ISSR引物产生的80条扩增条带计算了桑树品种间的Nei'遗传相似系数（表4.5）。结果表明，24份选育桑树品种间遗传相似系数值变异范围为0.7778~0.9877，平均0.8731。其中，含有新一之瀨亲本的三倍体桑品种大中华和陕桑305间的遗传相似系数最大（0.9877），遗传距

离最小, 亲缘关系很近; 来源河北的黄鲁选与四川的北桑1号的遗传相似系数最小(0.7778), 亲缘关系最远。桑树育成品种间的Nei's (1973) 基因多样性 (gene diversity) 和 Shannon's 信息指数 (Lewontin, 1972) 分别为0.1210和0.1942, 说明我国育成桑品种间遗传距离较小, 遗传基础较狭窄。

根据这些遗传相似系数按UPGMA法进行了聚类分析(图4.3)。从聚类图中可以看出, 桑品种被分为差异明显的两大类。总的聚类是含有共同亲本或互为亲缘关系的, 具有相同血缘的桑品种聚为一类。来源于四川的白桑品种北桑1号和实钻11-6与其它桑品种间的遗传分化最显著, 聚为I类; 其它的桑品种聚为II类。之所以出现这种聚类关系, 其实质可能是北桑1号是从四川当地实生桑中选出的优良品种, 而实钻11-6同样是通过当地实生桑诱变而来, 具有共同的四川血缘, 未和外部桑品种进行基因交换, 也就是地理的隔离, 造成和其它桑品种亲缘关系较远。而其它桑品种并没有按地域即育成品种来源地聚类, 这也是因为不同地区育成的桑品种和其它地区育成桑品种具有共同血缘的关系, 并使桑品种的种植打破了区域界限。在II类中, 又可分成A、B、C、D四个亚类。红星5号[红皮湖桑×(一之濑、梨叶大桑等)和农桑14号(北区1号×实生桑1号)]分别单独聚为A、B亚类, 这可能与其它杂交亲本有关, 它们为多父本, 遗传背景较复杂。在C亚类中, 具有一之濑血缘的薪一圆(新一之濑辐射诱变而来)、陕桑305(三倍体, 新一之濑秋水仙素诱变后无性分离而来)和大中华(三倍体, 大种桑×新一之濑_{4x})首先聚合, 农桑8号(一之濑×伦109)也有一之濑血统, 但聚类相比较较远, 这可能与各品种育种方法以及各自亲本差异, 所包含的一之濑的血缘比例各不相同有关。选秋1号和华明桑都是从本地桑园自然杂交桑中选育出来的, 虽来源地差异很远, 但亲缘关系较近, 7307和皖7707也一样。在D亚类中, 除伦敦40(广东桑)外, 其余多为鲁桑, 大部分具有湖桑和广东桑血统, 各品种所包含的血统的比例各不相同, 因而聚类又有差异。育2号(湖桑39号×广东荆桑)首先和育237(早青桑×育2号)聚合, 接着和育151(早青桑×育2号)、育711(育54×育2号)、伦敦40聚为一类, 亲缘关系较近, 具有相近的特征特性。湘7920和吉湖4号聚在一起, 接着和选792聚为一类, 这也不难理解, 湘7920的杂交亲本为中桑5801和澧桑24号, 而中桑5801又是湖桑38号和广东荆桑的杂交组合中选育出来的, 吉湖4号的亲本为吉九和湖桑2号, 都具有湖桑血统, 而选792是从梨叶大桑中选拔出来的, 都属鲁桑种。蚕专4号是苏州大学从当地自然杂交实生桑中选拔出来的, 和湖桑32号、黄鲁选, 聚为一类, 它们全为鲁桑种。从聚类结果来看, 蚕专4号含有湖桑血统不难理解, 而黄鲁选是从河北地方资源考察中筛选出的优异桑品种, 和前两者间亲缘关系较近, 黄鲁选是否是栽培历史上从江浙地区引进的桑种质经过杂交或变异而形成的优异桑种, 所以含有湖桑血统, 这值得进一步探讨分析。PCA和UPGMA聚类结果一致, 其第一、第二、第三主成分分别占总变异的70.7%, 5.5% 和 4.2% (图4.4)。

表4.5 基于ISSR标记的24个桑树品种间的遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Table 4.5 Genetic similarity coefficient(above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between 24 mulberry varieties based on ISSR markers

品种 Variety	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1	****	0.7901	0.8889	0.8889	0.9136	0.9877	0.9383	0.8272	0.8642	0.9012	0.9012	0.9136	0.9012	0.8765	0.9259	0.8272	0.8272	0.8272	0.8642	0.8272	0.8765	0.8642	0.8642	0.9012
2	0.2356	****	0.8272	0.7778	0.8519	0.8025	0.8519	0.8148	0.8519	0.7901	0.8395	0.8272	0.8642	0.8148	0.8148	0.8395	0.8395	0.9383	0.8272	0.8395	0.8395	0.8025	0.8519	0.8148
3	0.1178	0.1898	****	0.8519	0.8765	0.9012	0.8765	0.8642	0.8519	0.8395	0.8642	0.8765	0.9136	0.8889	0.8642	0.7901	0.8148	0.7901	0.8272	0.8395	0.8395	0.8519	0.8272	0.8889
4	0.1178	0.2513	0.1603	****	0.8765	0.9012	0.9012	0.8148	0.8519	0.8148	0.8642	0.9259	0.8642	0.8889	0.8642	0.8395	0.8889	0.8148	0.8765	0.8889	0.9136	0.8519	0.8765	0.8642
5	0.0904	0.1603	0.1318	0.1318	****	0.9259	0.9259	0.8889	0.9259	0.8889	0.8889	0.8765	0.963	0.8642	0.9136	0.9136	0.8889	0.8889	0.9259	0.8889	0.9136	0.8272	0.9259	0.8889
6	0.0124	0.2201	0.104	0.104	0.077	****	0.9506	0.8395	0.8765	0.9136	0.9136	0.9259	0.9136	0.8889	0.9383	0.8395	0.8395	0.8395	0.8765	0.8395	0.8889	0.8765	0.8765	0.9136
7	0.0637	0.1603	0.1318	0.104	0.077	0.0506	****	0.8395	0.8765	0.8642	0.8889	0.9012	0.9136	0.8642	0.8889	0.8889	0.8395	0.8889	0.8765	0.8395	0.8642	0.8519	0.8765	0.8889
8	0.1898	0.2048	0.146	0.2048	0.1178	0.1749	0.1749	****	0.8642	0.8025	0.8025	0.8395	0.9259	0.8765	0.8272	0.8272	0.8519	0.8272	0.8889	0.8765	0.8519	0.8148	0.8889	0.8272
9	0.146	0.1603	0.1603	0.1603	0.077	0.1318	0.1318	0.146	****	0.8889	0.8642	0.8765	0.9383	0.8642	0.9136	0.8642	0.963	0.8642	0.8765	0.9136	0.9136	0.8272	0.9259	0.8642
10	0.104	0.2356	0.1749	0.2048	0.1178	0.0904	0.146	0.2201	0.1178	****	0.8765	0.8642	0.8765	0.8519	0.9259	0.8272	0.8519	0.8272	0.8395	0.8272	0.8765	0.8148	0.8642	0.8765
11	0.104	0.1749	0.146	0.146	0.1178	0.0904	0.1178	0.2201	0.146	0.1318	****	0.9136	0.8765	0.9012	0.8765	0.8519	0.8519	0.8519	0.8889	0.8519	0.9012	0.8395	0.8642	0.9506
12	0.0904	0.1898	0.1318	0.077	0.1318	0.077	0.104	0.1749	0.1318	0.146	0.0904	****	0.8889	0.963	0.8889	0.8642	0.9136	0.8395	0.8765	0.9136	0.9383	0.9259	0.9012	0.8889
13	0.104	0.146	0.0904	0.146	0.0377	0.0904	0.0904	0.077	0.0637	0.1318	0.1318	0.1178	****	0.9012	0.9012	0.8765	0.9012	0.8765	0.9136	0.9012	0.9012	0.8395	0.9136	0.8765
14	0.1318	0.2048	0.1178	0.1178	0.146	0.1178	0.146	0.1318	0.146	0.1603	0.104	0.0377	0.104	****	0.8519	0.8519	0.9012	0.8272	0.8642	0.9259	0.9259	0.8889	0.9136	0.9012
15	0.077	0.2048	0.146	0.146	0.0904	0.0637	0.1178	0.1898	0.0904	0.077	0.1318	0.1178	0.104	0.1603	****	0.8519	0.8765	0.8519	0.8642	0.8765	0.9012	0.8395	0.8889	0.9012
16	0.1898	0.1749	0.2356	0.1749	0.0904	0.1749	0.1178	0.1898	0.146	0.1898	0.1603	0.146	0.1318	0.1603	0.1603	****	0.8765	0.8765	0.9136	0.8765	0.9012	0.7901	0.8889	0.8272
17	0.1898	0.1749	0.2048	0.1178	0.1178	0.1749	0.1749	0.1603	0.0377	0.1603	0.1603	0.0904	0.104	0.104	0.1318	0.1318	****	0.8519	0.8889	0.9506	0.9506	0.8395	0.9383	0.8272
18	0.1898	0.0637	0.2356	0.2048	0.1178	0.1749	0.1178	0.1898	0.146	0.1898	0.1603	0.1749	0.1318	0.1898	0.1603	0.1318	0.1603	****	0.8395	0.8519	0.8765	0.7901	0.8889	0.8272
19	0.146	0.1898	0.1898	0.1318	0.077	0.1318	0.1318	0.1178	0.1318	0.1749	0.1178	0.1318	0.0904	0.146	0.146	0.0904	0.1178	0.1749	****	0.8889	0.9136	0.8272	0.9012	0.8642
20	0.1898	0.1749	0.1749	0.1178	0.1178	0.1749	0.1749	0.1318	0.0904	0.1898	0.1603	0.0904	0.104	0.077	0.1318	0.1318	0.0506	0.1603	0.1178	****	0.9259	0.8395	0.963	0.8765
21	0.1318	0.1749	0.1749	0.0904	0.0904	0.1178	0.146	0.1603	0.0904	0.1318	0.104	0.0637	0.104	0.077	0.104	0.104	0.0506	0.1318	0.0904	0.077	****	0.8642	0.9383	0.8765
22	0.146	0.2201	0.1603	0.1603	0.1898	0.1318	0.1603	0.2048	0.1898	0.2048	0.1749	0.077	0.1749	0.1178	0.1749	0.2356	0.1749	0.2356	0.1898	0.1749	0.146	****	0.8519	0.8395
23	0.146	0.1603	0.1898	0.1318	0.077	0.1318	0.1318	0.1178	0.077	0.146	0.146	0.104	0.0904	0.0904	0.1178	0.1178	0.0637	0.1178	0.104	0.0377	0.0637	0.1603	****	0.8889
24	0.104	0.2048	0.1178	0.146	0.1178	0.0904	0.1178	0.1898	0.146	0.1318	0.0506	0.1178	0.1318	0.104	0.104	0.1898	0.1898	0.1898	0.146	0.1318	0.1318	0.1749	0.1178	****

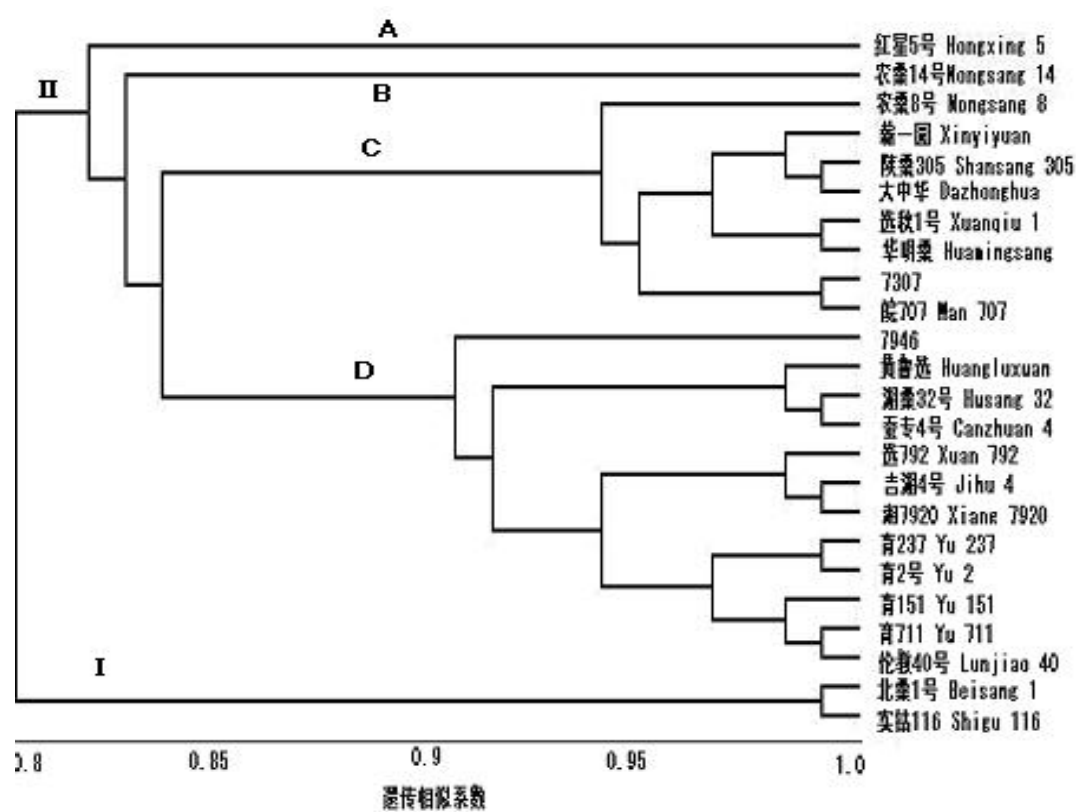


图 4.3 基于 ISSR 标记的 24 个桑树品种 UPGMA 聚类图
Fig.4.4 A dendrogram obtained by UPGMA for 24 mulberry varieties based on ISSR markers

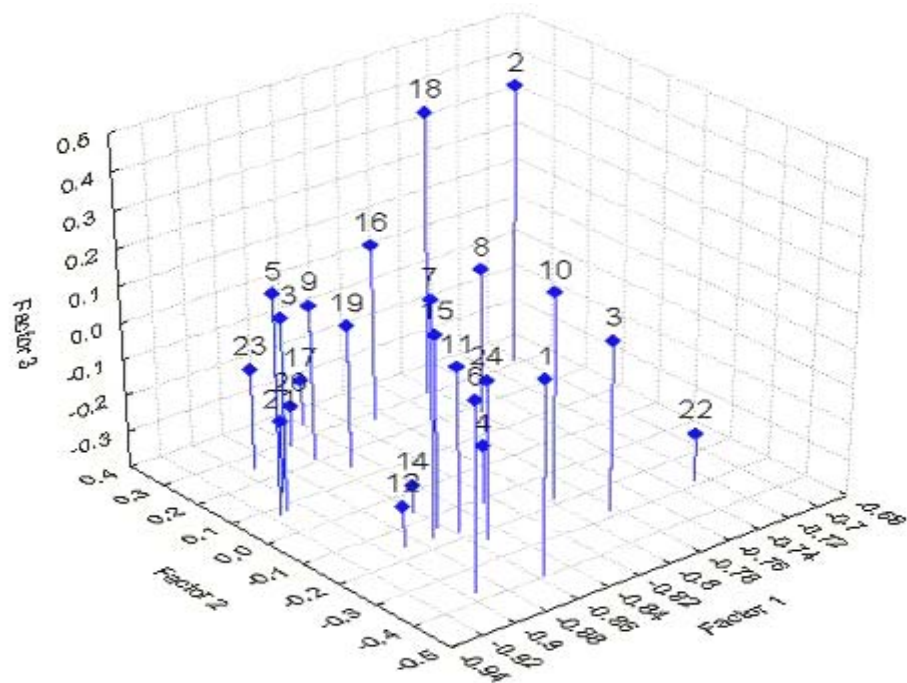


图3.7 利用ISSR数据作的24个桑树品种第一、第二和第三主成分散点图
Fig.3.7 Scatter plots of 24 mulberry varieties based on first,second and third components of principal coordinate analysis using ISSR data. 注:1~24相对应表4.1 Note:The numbers correspond to those listed on Table 4.1.

4.3 讨论

依靠形态特征鉴别桑树品种，需要对成龄植株进行仔细的观察，木本植物可能需要花费好几年时间。形态性状容易受生长发育阶段、自然环境、栽培条件，甚至取样误差等的影响。等位酶也有一些缺陷，如位点有限，只能检测功能基因的部分变异。而ISSR分子标记能灵敏地揭示两个亲缘关系十分相近个体间的差异（Wolfe, 1998）。本文17个ISSR引物被用于桑树选育品种指纹图谱的构建和遗传多样性分析。17个ISSR引物共扩增出80条带，40条带具有多态性，占50.0%。40条多态性条带中11个特异标记可以鉴别、区分黄鲁选、农桑14号、选秋1号、红星5号、7946、实钻11-6、伦敦40号等7份资源，有望通过克隆、测序、设计引物，将特异标记转换成SCAR标记，品种鉴定将更快速、准确。另外本研究也表明，通过特殊的标记、特异的谱带类型和不同引物提供的谱带类型组合等3种独立的方法可以有效地鉴别桑树育成品种。

从统计数据来看，桑树选育品种间的ISSR多态性水平较低（50.0%），24份育成桑树品种间平均遗传相似系数为0.8731，说明我国育成桑品种间遗传多样性较低，遗传距离较小，亲缘关系较近，遗传基础较狭窄，这主要是桑树育成品种不少具有共同的祖先亲本，例如湖桑和广东桑血缘所致。因此为了拓宽我国桑树品种遗传基础，必须采用聚合育种技术（Jones, 1965），利用亲缘关系较远的国内外及异类型种质的育种策略。

以上研究结果对我国桑树选育品种的分子鉴定、系谱分析、遗传改良、种质保护、核心种质的构建、重要农艺性状基因定位以及分子辅助育种都具有重要的实用价值和理论意义。

第五章 我国不同生态型桑树品种遗传多样性的 ISSR 分析

桑树栽培历史悠久, 适应性广, 遗传资源丰富, 桑树长期在不同的生态环境中生长, 每个地区的典型品种成为相应的生态型。根据我国桑资源的分布, 共分为 8 个不同的生态类型, 每个生态型桑种质形成了不同的特征特性, 其枝条形态、叶形大小、发芽期、抗逆性等方面都有所差异。这些地方品种包含许多优异性状和特异基因, 栽培品种有许多是从这些类型中选拔出来的。目前利用 DNA 分子标记技术研究桑树遗传多样性和亲缘关系研究方面, 主要是在桑属桑种水平, 对不同生态类型桑资源研究极少, 而种质保护的一个重要方面就是评估不同生态环境中群体的遗传多样性 (Ellstrand, 1992), 因为它是长期生存和不断进化的种 (Young, 2000; Sosa, 2001; Frankham, 2002)。本文利用 ISSR 分子标记技术对我国不同生态型桑种质的遗传多样性进行了研究, 这对桑遗传资源的保护、地方品种核心种质的构建、重要农艺性状基因的发掘与利用和桑树遗传育种都具有重要意义。

5.1 材料与方法

5.1.1 试验材料

8 个我国不同生态型的桑树群体被取样, 每个群体取样桑树品种为地方品种, 其取样数量及每个生态型桑树品种的主要特征特性见表 5.1。所有试验材料均采于中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃。

5.1.2 桑树基因组 DNA 的提取、ISSR 扩增、电泳

桑树基因组 DNA 提取、ISSR 引物、PCR 的扩增、电泳见 2.1.2、3.1.3、4.1.3。

5.1.3 数据分析

种群间的遗传变异以几种方式进行计算。有效等位基因数 (N_e) 是基因致度的倒数, 反映了等位基因间的相互影响, 群体遗传变异的一个测度, $N_e = L / \sum_{i=1}^L p_i^2$, 其中, p_{ij} 为第 i 位点上第 j 号等位基因的基因频率, L 是位点数。总杂合度 (total heterozygosity, H_T) 根据条带剖面计算, 公式为 $H_T = 1 - \sum p_i^2$, p_i 为群体中第 i 等位基因某一位点的基因频率, \sum 代表所有等位基因总和 (Nei's, 1973, 1977), 种群内平均杂合度 (mean heterozygosity, H_S), 种群间的多样性 (diversity among populations, $D_{ST} = H_T - H_S$) 一同用 PopGene 32 分析软件进行计算。基因流 (gene flow, Nm) 用公式 $Nm = 0.5(1 - G_{ST}) / G_{ST}$, G_{ST} 为遗传分化系数 (Nei, 1977)。其余同 3.1.5。

表 5.1 我国 8 个不同生态类型群体取样本数及各个群体的主要特征特性

Table 5.1 Sample sizes and main characters of of 8 mulberry populations collected in different ecological locations in China

群体编号 Population No.	生态类型 Ecotype	桑树品种及编号 Mulberry variety and No.	主要特征特性 Main characters
I	太湖流域湖桑类型 Hu mulberry in Taihu region	1) 龙门荷叶; 2) 红头桑; 3) 海宁荷叶桑; 4) 周镇荷叶白; 5) 长安荷叶; 6) 湖桑 7 号; 7) 锡湖 2 号; 8) 锡湖 26 号; 9) 洞庭 2 号; 10) 湖桑 32 号	湿润气候带, 温湿度适宜, 积温高, 桑树生长期较长。发芽期在 3 月下旬至 4 月上旬, 发芽率为 60~70%, 成熟期 5 月中旬, 多属中、晚生桑。发条数中等, 枝条粗长, 侧枝少, 节距 4~5cm, 节间微曲, 皮孔多, 每平方米 9~17 个。叶形大, 叶长 17~25cm, 叶幅 15~23cm, 全叶, 心脏形居多, 叶面皱缩, 叶肉较厚, 叶质柔软, 硬化迟。花和椹较少。
II	珠江流域广东桑类型 Guangdong mulberry in the Pearl River valley	11) 紫城桑; 12) 草桑; 13) 润竹桑; 14) 红茎牛; 15) 枫梢桑; 16) 潘水; 17) 广东桑 2 号; 18) 邕新 4 号	热带、亚热带季风湿润气候。桑树发芽早, 发芽率高, 一般达 80% 左右, 成熟快, 多属早生早熟桑。发条数多, 枝条较细而长, 一般达 200cm 以上。枝态直, 皮孔多, 节距 4~5cm。叶形小, 叶长 15~22cm, 叶幅 13~19cm, 叶肉薄, 叶色淡绿。花、椹多。再生机能旺, 耐剪伐。抗寒性弱, 耐湿性强, 易受旱害。
III	黄河下游鲁桑类型 Lu mulberry in lower reaches of the Yellow River	19) 昌潍大白条; 20) 沂水黄鲁头; 21) 昌潍黑鲁; 22) 大鸡冠; 23) 杨善黑鲁; 24) 小黄桑; 25) 益都大白条	桑树在这种生态环境中生长期较长, 桑树发芽期在 4 月中旬, 但开叶后, 叶片开放、成熟均较快, 发芽率 75% 左右, 多属中生中熟或晚生中熟桑。发条数中等, 枝条粗短, 一般条长 100~150cm, 节间较直, 节距 3.5~4cm, 皮孔较小。叶形中等, 叶长 16~23cm, 叶幅 13~20cm, 叶片厚, 叶色深绿, 硬化较早。叶用品种花、椹小而较少, 又有椹多的果用品种。抗寒耐旱性较强, 易发生赤锈病。
IV	四川盆地嘉定桑类型 Jiading mulberry in Sichuan Basin	26) 瓢儿桑; 27) 瓜瓢桑; 28) 二红皮; 29) 三台药桑; 30) 大花桑; 31) 大红皮; 32) 汉源 6 号; 33) 花桑; 34) 油桑; 35) 西充黑油桑; 36) 石棉 25 号; 37) 藤藤桑	暖温带和亚热带气候。发芽期多在 3 月上、中旬, 发芽率 75% 左右, 成熟期 5 月中旬, 多属中生中熟桑。发条数较少, 枝条粗长, 一般达 200cm 左右 (夏伐中干桑), 皮孔多, 每平方米 12 个以上, 节间直, 节距约 5cm。叶形大, 叶长 18~24cm, 叶幅 15~22cm, 全叶、心脏形、叶面平滑、硬化迟、叶质优。花穗较多, 椹少。对真菌病抵抗力强, 不耐寒。本类型以川南栽培最多, 其次川西平原, 多栽植于“四边”, 养成中、高干桑。

群体编号 Pop. No.	生态类型 Ecotype	桑树品种及编号 Mulberry variety and No.	主要特征特性 Main characters
V	新疆白桑类型 White mulberry in Xinjiang	38) 阿克苏白桑 3 号; 39) 新疆白桑; 40) 阿克苏白桑 4 号; 41) 阿克苏白桑 1 号; 42) 流水 1 号	大陆性沙漠气候。本类型与湖桑类型同地栽培, 其发芽期比湖桑类型迟 2~4 天, 但开叶后, 生长快, 成熟期比湖桑类型快 2~3 天, 多属晚生中熟桑。发芽率约 70% 左右, 发条数多, 枝条细长而直, 条长 150~200cm (夏伐中干桑), 木质硬, 节间直, 节距 4cm 左右, 皮孔少, 每平方厘米约 5~10 个, 叶形小, 叶长 13~18cm, 叶幅 10~16cm, 叶色深绿, 叶背气孔比其它类型少。叶质优良, 养蚕成绩较好。花、椹较多, 椹多白色、味甜。根系发达, 侧根扩展面大, 适应风力大、沙暴多和天气干燥的不良环境。
VI	长江中游摘桑类型 Zhe mulberry in middle reaches of the Yantze River	43) 摘桑 18 号; 44) 大叶瓣; 45) 摘桑 12 号; 46) 摘桑 13 号; 47) 摘桑	本区域主要指安徽南部和湖北、湖南的部分地区, 属暖温带季风湿润气候, 春秋季节较长, 冬寒夏热, 四季分明。本类型桑树发芽期比湖桑类型早 1~3 天, 成熟期 5 月中旬, 发芽率 70% 左右, 多属中生中熟桑。发条数少, 枝条粗壮, 长度 150~200cm (夏伐中干桑), 枝态直, 侧枝少, 节距 3.5~4.5cm, 皮孔多, 每平方厘米 12~16 个。叶形很大, 叶长 19~30cm, 叶幅 17~28cm, 叶面有泡状缩皱, 叶片着生下垂, 硬化迟。花穗小, 椹少。抗寒性较弱。
VII	黄土高原格鲁桑类型 Gelu mulberry in loess plateau	48) 红格鲁; 49) 端氏格鲁; 50) 格鲁桑; 51) 晋城白格鲁; 52) 黑格鲁 3 号; 53) 晋城白格鲁 1 号; 54) 黄克桑; 55) 黑格鲁 4 号; 56) 阳城黄格鲁; 57) 横河红格鲁; 58) 花条格鲁; 59) 町店白格鲁; 60) 黑格鲁	本区域位于内陆, 包括山西、陕西省的东北部和甘肃省的东南部, 属温带季风干燥气候。本类型与湖桑类型同地栽培, 发芽期和成熟期早 2~3 天。发芽率 65~80%, 多属中生中熟桑。发条多, 枝条细直, 条长 150~180cm (夏伐中干桑), 节间直, 节距约 4cm, 皮孔少, 每平方厘米约 6~10 个, 叶形较小, 叶长 14~21cm, 叶幅 11~17cm, 全叶多, 裂叶少, 卵圆或心脏形, 叶色深绿, 硬化较早。耐旱性较强, 易感黑枯型细菌病。
VIII	东北辽桑类型 Liao mulberry in the Northeast	61) 接桑; 62) 辽家桑; 63) 毛杖桑; 64) 依兰桑; 65) 东南沟 62 号; 66) 辽 44	本区域在我国东北部, 是寒温带的半湿润或半干燥气候。本类型与湖桑类型同地栽培, 其发芽期和成熟期均早 2~3 天, 多属中生中熟桑。发芽率高, 一般达 70~80%, 发条数多, 枝条细长, 达 150~200cm (春伐中干桑), 富有弹性, 不易受积雪压断, 侧枝多, 节间直, 节距约 4cm, 皮孔少, 每平方厘米约 5~12 个。叶形小, 叶长 14~21cm, 叶幅 10~19cm, 叶色深绿, 硬化早。根系发达, 入土层深, 抗寒性强, 易发生褐斑病。

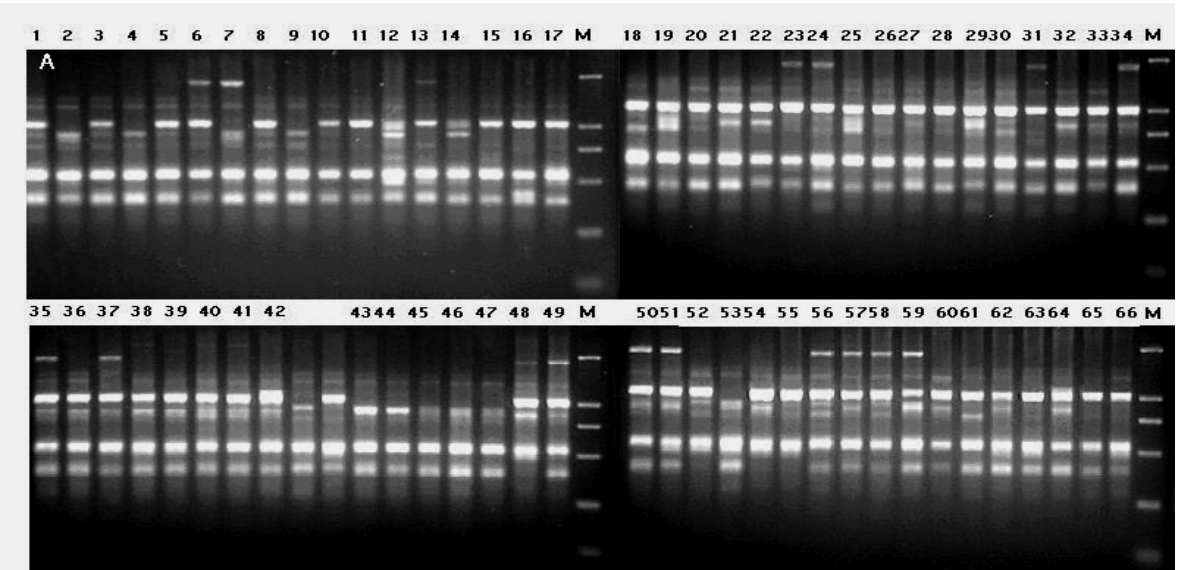
5.2 结果

5.2.1 群体间 ISSR 多态性

在 8 个群体的 66 个桑树品种间，12 个 ISSR 引物扩增条带数为 83，平均每个引物为 6.9 条，50 条为多态性条带，多态性比例为 60.24%（表 5.2）。平均每个位点观察等位基因数(n_a)为 1.6145，有效等位基因数(N_e)为 1.2638，ISSR 的 PIC 值平均为 0.1469。群体内，不同群体内扩增条带数和多态性也有差异，总扩增条带变异范围在 57~72 之间，多态性格鲁桑类型最高，比例为 54.17%，摘桑类型最低多态性比例仅为 7.01%，平均 PIC 值和每个位点观察等位基因数也反映了相同的结果(表 5.3)。PCR 扩增结果见图 5.1。

表5.2 用于66个桑树品种遗传多样性研究的引物、扩增条件和多态性

Table 5.2 Primers, amplification conditions and polymorphism of ISSR markers used among 66 mulberry varieties						
引物编号 Primer No.	序列 Sequence (3'-5')	退火温度 Annealing Temperature (°C)	扩增条带数 Number of Amplified bands	多态性条带数 Number of Polymorphic bands	多态性比例 Percent of polymorphic bands (%)	PIC 值 PIC Value
1	(CT) ₈ RT	54	5	4	80.00	0.1605
2	(GTC) ₆	64	6	4	66.67	0.1374
3	(GTGC) ₄	64	7	3	42.86	0.1601
4	(AC) ₈ T	55	9	7	77.78	0.1252
5	(AG) ₈ YC	55	9	4	44.44	0.1500
6	(GT) ₆ CC	60	4	1	25.00	0.0689
7	(CT) ₈ AC	54	5	3	60.00	0.1157
8	(AG) ₈ TA	54	7	4	57.14	0.1392
9	(AG) ₈ TC	54	13	11	84.62	0.2124
10	(CT) ₈ GC	60	5	5	100.00	0.3071
11	(GAG) ₄ GC	60	8	3	37.50	0.0951
12	(CT) ₈ TG	54	5	1	20.00	0.0170
总数 Total			83	50		
平均 Mean					60.24	0.1469



B:

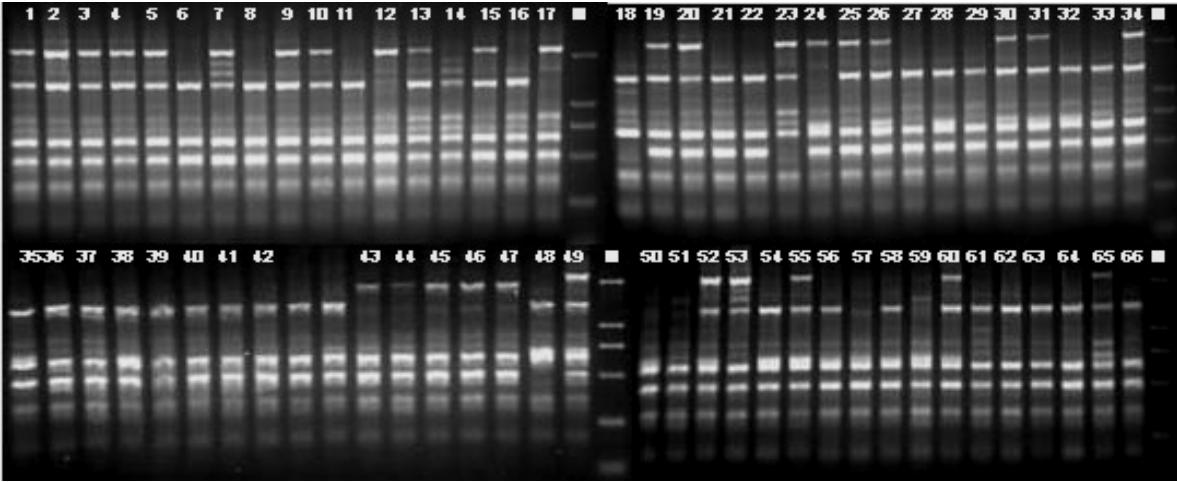


图5.1 ISSR引物 (CT)₈RT (A)和(GTC)₆(B)扩增图谱
Fig. 5.1 ISSR patterns amplified with ISSR primer (CT)₈RT (A)和(GTC)₆(B)
注:编号相对应表5.1 Note:The numbers correspond to those listed on Table 5.1.

5.2.2 遗传多样性及聚类分析

8 个桑树群体间，总杂合度（ H_T ）为 0.1600，群体内杂合度（ H_s ）为 0.0851，群体间多样性为（ D_{st} ）0.0749，群体间的遗传分化系数（ G_{st} ）0.5678，表明在总杂合度中群体间和群体内的变异贡献率分别为 56.78%和 43.28%，群体间的变异大于群体内的变异。整个群体平均Nei's gene diversity (h) 是 0.1616, Shannon's 信息指数为 (I) 是 0.2520。群体内，格鲁桑类型Nei's gene diversity (h)最高为 0.1432, Shannon's 信息指数为 (I) 同样表现为最大，达 0.2106，但都小于整个群体的指数。遗传相似系数变异范围为 1~0.6867，平均Nei's遗传相似系数是 0.8456，基因流（gene flow, N_m ）为 0.4683。湖桑类型的龙门荷叶和红海宁荷叶桑、长安荷叶和湖桑 32 号以及摘桑类型的摘桑 12 号和摘桑 13 号间遗传相似系数最大，为 1，遗传亲缘关系近，未

表 5.3 8 个不同生态型桑树群体遗传多样性评估

Table 5.3 Genetic diversity estimates for 8 mulberry populations in different ecological locations in China

群体 Population	总带数 Total bands	多态性带数 Polymorphic bands	多态性比例 Percent of polymorphic bands (%)	PIC 值 PIC value	等位基因数 na (St.Dev)	有效等位基因数 Ne (St.Dev)	gene diversity <i>h</i> (St.Dev)	Shannon's 信息指数 <i>I</i> (St.Dev)
群体间 Overall populations	83	50	60.24	0.1469	1.6145 (0.4897)	1.2638 (0.3349)	0.1616 (0.1824)	0.2520 (0.2610)
群体内 Within groups								
I	67	17	25.37	0.0817	1.2048 (0.4060)	1.1463 (0.3210)	0.0808 (0.1703)	0.1177 (0.2430)
II	72	26	36.11	0.0739	1.3133 (0.4666)	1.1935 (0.3413)	0.1105 (0.1840)	0.1643 (0.2640)
III	68	22	32.35	0.1100	1.2651 (0.4440)	1.1801 (0.3338)	0.1024 (0.1813)	0.1505 (0.2612)
IV	71	25	35.21	0.1155	1.3012 (0.4616)	1.1682 (0.3020)	0.1009 (0.1703)	0.1527 (0.2495)
V	65	11	16.92	0.0636	1.1325 (0.3411)	1.0864 (0.2424)	0.0501 (0.1347)	0.0742 (0.1961)
VI	57	4	7.01	0.0274	1.0482 (0.2155)	1.0262 (0.1273)	0.0163 (0.0760)	0.0248 (0.1139)
VII	72	39	54.17	0.1357	1.3855 (0.4897)	1.2538 (0.3767)	0.1432 (0.2014)	0.2106 (0.2877)
VIII	67	18	26.87	0.0941	1.2169 (0.4146)	1.1324 (0.2935)	0.0764 (0.1594)	0.1142 (0.2308)

注:群体编号相对应表5.1 Note:The population numbers correspond to those listed on Table 5.1.

检测到遗传变异。广东桑类型的润竹桑和鲁桑类型的益都大白条，嘉定桑的二红皮和广东桑类型的红茎牛间的遗传相似系数最小，为 0.6867，遗传亲缘关系较远。8 个群体间的遗传相似系数变异范围为 0.8441（格鲁桑类型群体和辽桑类型群体间）~0.9640（嘉定桑类型群体和白桑类型群体间）（表 5.4）。

表5.4 基于ISSR标记的8个桑树群体间的遗传相似系数(对角线上)和遗传距离(对角线下)

Table 5.4 Genetic similarity coefficient(above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 8 mulberry populations based on ISSR markers

群体 Populations	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII
I	****	0.9262	0.9323	0.8969	0.9224	0.8781	0.9415	0.942
II	0.0767	****	0.9246	0.8550	0.9002	0.8471	0.8996	0.9055
III	0.0701	0.0784	****	0.9070	0.9471	0.8542	0.9411	0.9416
IV	0.1088	0.1567	0.0976	****	0.9180	0.8441	0.9254	0.9140
V	0.0808	0.1052	0.0543	0.0855	****	0.8350	0.9247	0.9453
VI	0.1299	0.1659	0.1576	0.1694	0.1803	****	0.8953	0.8766
VII	0.0603	0.1058	0.0607	0.0776	0.0782	0.1106	****	0.9640
VIII	0.0597	0.0993	0.0602	0.0900	0.0562	0.1317	0.0367	****

注:编号相对应表5.1 Note:The numbers correspond to those listed on Table 5.1.

根据 ISSR 标记遗传相似系数按 UPGMA 法对 66 个桑树品种进行了聚类分析（图 5.2）。从聚类结果来看，每个生态型的大部分桑树品种聚为一类，例如摘桑类型、广东桑类型（11 号、18 号个体除外）、嘉定桑类型（37 号除外）。湖桑类型聚为一类，但在该聚类中也包含广东桑的 11 号、18 号个体，以及格鲁桑类型的 53 号个体。格鲁桑类型、白桑类型、鲁桑类型、辽桑类型个体虽然没有完全聚在一起，但它们中的个体还是每每聚在一起，中间被其它类型所分隔。另外在聚类图中我们还可看出一些例外，例如格鲁桑中的 48 号个体和其它桑树品种存在显著差异。

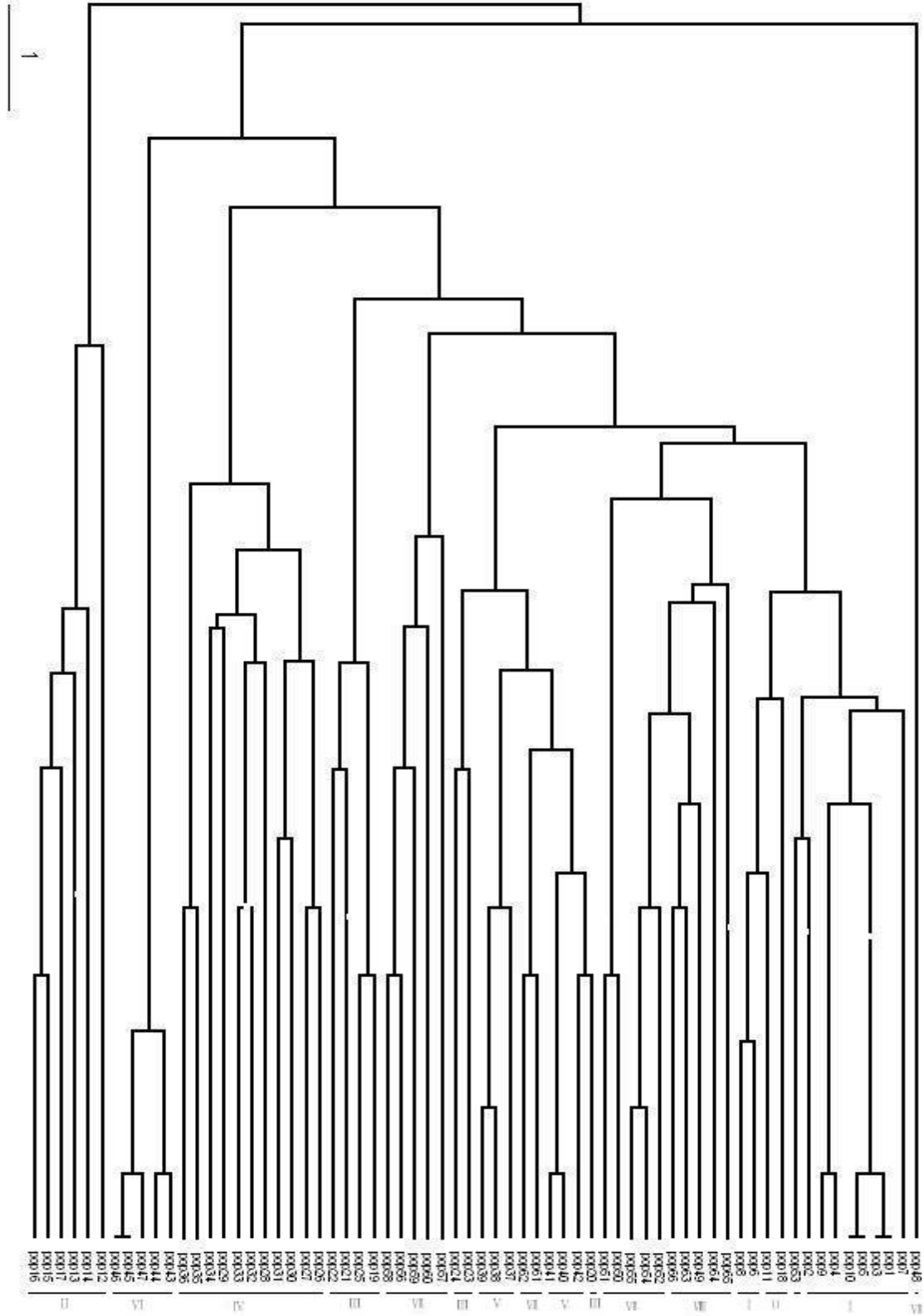


图 5.2 基于 ISSR 标记的来源中国不同生态类型的 66 个桑树品种 UPGMA 聚类图

Fig.5.2 A dendrogram obtained by UPGMA for 66 mulberry varieties from different ecological locations in China based on ISSR markers 注:编号相对应表5.1 Note:The numbers correspond to those listed on Table 5.1.

5.3 讨论

5.3.1 群体间遗传多样性及聚类分析

桑树栽培历史悠久, 适应性广, 长期在不同的生态环境中生长, 形成了各具特色的不同生态类型桑遗传资源。本文利用 ISSR 分子标记技术分析了我 8 个不同生态类型的群体结构和遗传多样性。研究结果显示, 12 个 ISSR 引物共扩增出了 83 条条带, 多态性比例为 60.24%, 总扩增条带数和多态性比例无相关性。群体内扩增条带数也存在差异, 多态性格鲁桑类型群体最高 (54.17%), 但遗传多样性所有指数 (PIC 值、观察等位基因数、有效等位基因数、Nei's gene diversity、Shannon's 信息指数) 群体间均大于群体内。

8 个桑树群体间的遗传分化系数为 (G_{st}) 0.5678, 表明总遗传多样性有 56.78% 来自群体间, 43.28% 来自群体内, 群体间的变异大于群体内的变异, 而杨光伟等 (2003) 利用 AFLP 研究了桑种间的群体结构正好相反, 桑种种群内的变异大于种群间变异。 G_{st} 值大小与基因流 (N_m) 成反比, G_{st} 值越大, N_m 值越小。群体间基因流 (N_m) 较低 (0.4683), 说明群体间遗传漂移, 引起当地遗传差异及群体分化 (Slatkin, 1987; Deshpande, 2001)。

根据 ISSR 标记遗传相似系数按 UPGMA 法对 66 个桑树品种进行了聚类分析 (图 5.2)。从聚类结果来看, 每个生态型的大部分桑树品种聚为一类, 虽然存在一些例外。同时为了进一步揭示群体间的亲缘关系, 利用群体间的遗传相似系数按 UPGMA 法进行了聚类分析 (图 5.3)。结果显示湖桑类型群体、格鲁桑类型群体和辽桑类型的群体, 鲁桑类型群体和白桑类型群体间亲缘关系较近。

5.3.2 群体样本大小

群体遗传多样性结果和群体取样大小密不可分, 样本越大, 检测的等位基因数越多。Hiroshi 等 (2003) 认为群体大小和遗传多样性间的关系是实际存在的, 并不是人为的由样本大小变化产生的。为此我们随机从每个群体选择了 3 个样本进行遗传多样性分析, 结果显示遗传多样性比原有指数降低, 但群体间及群体内遗传多样性大小和原趋势是一致的, 这结果和 Peng 等 (2002) 研究结果一致。本研究取样主要是考虑利用国家种质镇江桑树圃保存现有的、具有典型生态类型特征特性的地方桑品种, 因此桑树群体遗传结构和遗传多样性取样策略有待进一步研究、探讨。

5.3.3 生物保护的涵义

Freville 等 (1998) 建议由地理分化产生的群体, 由于地理隔离和对当地的适应性, 包含一些特有的基因, 可能产生一些新的、稀有的品种, 从这方面来看, 对不同生态类型桑树遗传资源进行保护是非常重要的, 例如我国桑树育成品种中许多来源于广东桑和湖桑血统。

研究不同生态桑树群体的遗传变异对遗传资源的保护也是必需的。Hamric 等 (1993) 建议 80% 遗传多样性在群体内, 5 个取样地点即可包含该群体总遗传多样性的 99%。不管怎么样,

本研究显示平均遗传多样性 56.78%来自群体间，群体间的变异大于群体内的变异，为了保护遗传多样性，我们必须保护更多的生态群体，而不是少数的群体。而随着我国经济的发展，农村出现城镇化的趋势以及桑树良种化，大量的不同生态型地方品种正面临丧失的可能，因此急需对这些不同生态类型的桑资源进行抢救性收集，制定有效、长期的保护策略。

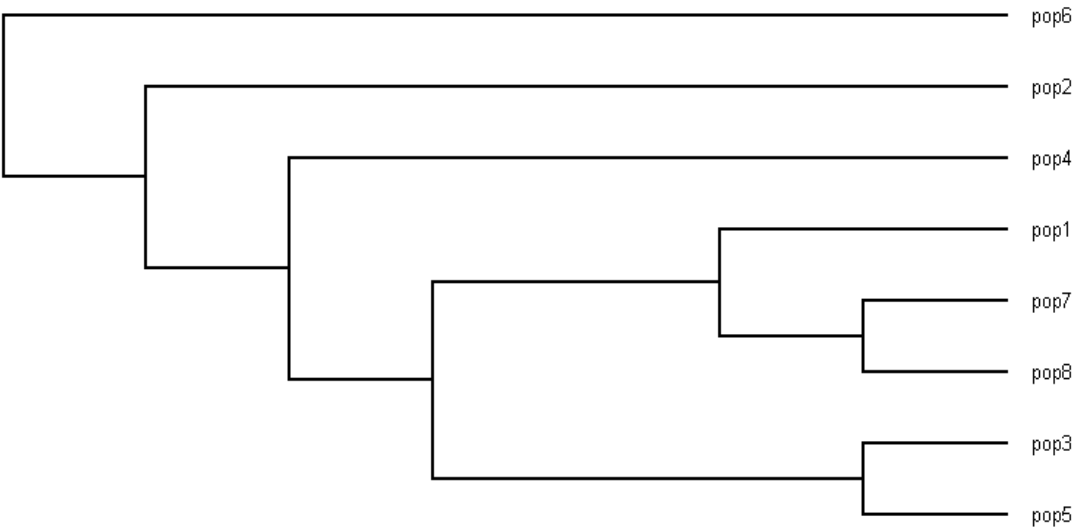


图 5.3 基于 ISSR 标记的中国 8 个不同生态类型桑树群体 UPGMA 聚类图

Fig.5.3 A dendrogram obtained by UPGMA among 8 mulberry populations from different ecotypes in China based on ISSR markers

注:群体编号相对应表5.1 Note:The population numbers correspond to those listed on Table 5.1.

第六章 桑树二倍体及人工诱导同源四倍体 遗传差异的 ISSR 分析

自然界鲜见有四倍体桑,国内外桑树育种工作者通过人工诱导技术获得了一大批桑树四倍体资源,并已育成四倍体品种在生产上应用。在桑树四倍体人工诱导方法上,普遍采用化学诱变剂秋水仙碱处理法,因采用的诱变材料不同而分为无性系诱导(以枝条、芽为诱变材料)和有性系诱导(以杂交实生桑幼苗为诱变材料)。近年来,多倍体育种有了突破性进展,杨今后等(1992)阐述了多倍体桑的性状,总结了人工诱导四倍体的方法,展望了今后桑多倍体育种前景,对开展桑多倍体育种研究具有积极作用。多倍体种质资源研究、四倍体桑诱导技术、人工三倍体品种选育与三倍体杂优组合选配方面已达较高水平。八十年代,日本人工育成了三倍体桑品种新剑持和青叶鼠,使产量提高 20% 以上。我国各地通过人工诱导的四倍体材料达数百份,人工三倍体桑品种嘉陵 16 号、大中华、粤桑 2 号(杂优组合)的问世,填补了我国栽培品种中无人工三倍体品种的空白。这些多倍体品种(杂优组合)普遍具有优质、高产、抗逆性强等特性。多倍体桑品种与杂优组合的育成,大大加快了多倍体育种的进程。人工培育三倍体新桑品种,已成为人工多倍体育种的主要方向。人工三倍体新桑品种是用二倍体与四倍体杂交后选育而成,因此了解亲本以及其同源四倍体材料的遗传背景及其遗传差异极为重要。Sujathamma 等(2002)比较研究了桑树不同倍数体间形态学与组织学差异。焦锋等(2001)利用 RAPD 技术探讨了桑树变异株系的遗传差异。王卓伟等(2001)利用 AFLP 技术研究了桑树多倍体育种材料和同源四倍体材料间的遗传差异。本文我们采用多态性较强的 ISSR 分子标记技术,从 DNA 分子水平分析桑树二倍体及其同源四倍体遗传结构差异,为开展桑树诱变规律、基因表达调控以及桑树遗传改良提供理论依据。

6.1 材料与方法

6.1.1 试验材料

选用 6 份桑树二倍体品种(农桑 8 号、湖桑 199 号、湖桑 197 号、育 711、育 2 号、湖桑 32 号)和它们的同源四倍体作为试验材料。同源四倍体主要来源于浙江,为经秋水仙素化学诱变

获得。所有试验材料均采自中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃。

6.1.2 桑树基因组 DNA 的提取、SSR 的扩增、电泳及数据分析

DNA 的提取、SSR 的扩增、电泳及数据分析方法见 3.1.3、3.1.5。

6.2 结果

6.2.1 桑树品种间的多态性

本实验采用筛选出的 10 个 ISSR 引物进行了 PCR 扩增（表 6.1），10 个引物共扩增出 65 条带，不同引物的扩增带数变幅从 1~12 条不等，平均每个引物可扩增出 6.5 条带。65 条 DNA 扩增带中，37 条条带在品种间具有多态性，占 56.92%，每个引物可扩增出 0~9 条多态性带，平均为 3.7 条。虽然 ISSR 技术在不同材料间检测出多态性，但每个引物在不同的材料间也出现共同的带，最多的达 7 条，这一方面表明供试材料遗传背景的复杂性，另一方面也表现出桑属的共同性。供试材料所表现出的 ISSR 多态性如图 6.1 所示。

ISSR 扩增引物、条件及桑树品种间的多态性

Primers, amplification conditions and polymorphism of ISSR markers among mulberry varieties						
引物编号 Primer No.	序列 Sequence (3'-5')	<i>T_m</i> (℃)	退火温度 Annealing Temperature (℃)	扩增条带数 Number of Amplified bands	多态性条带数 Number of Polymorphic bands	多态性比例 Polymorphic amplified bands (%)
IS01	(GTGC) ₄	61.8	64	5	4	80.00
IS02	(GAG) ₄ GC	55.9	60	11	4	36.36
IS03	(CT) ₈ TG	55	54	8	7	87.50
IS04	(AG) ₈ TA	52.7	54	12	9	75.00
IS05	(GTG) ₆	61.9	64	1	0	0.00
IS06	(GA) ₆ GG	50	54	8	2	25.00
IS07	(CT) ₈ GC	57.3	60	7	6	85.71
IS08	(AG) ₈ TC	55	54	5	3	60.00
IS09	(CT) ₈ AC	55	54	5	1	20.00
IS10	(GTC) ₆	60	64	3	1	33.33
平均 Mean				65	37	56.92

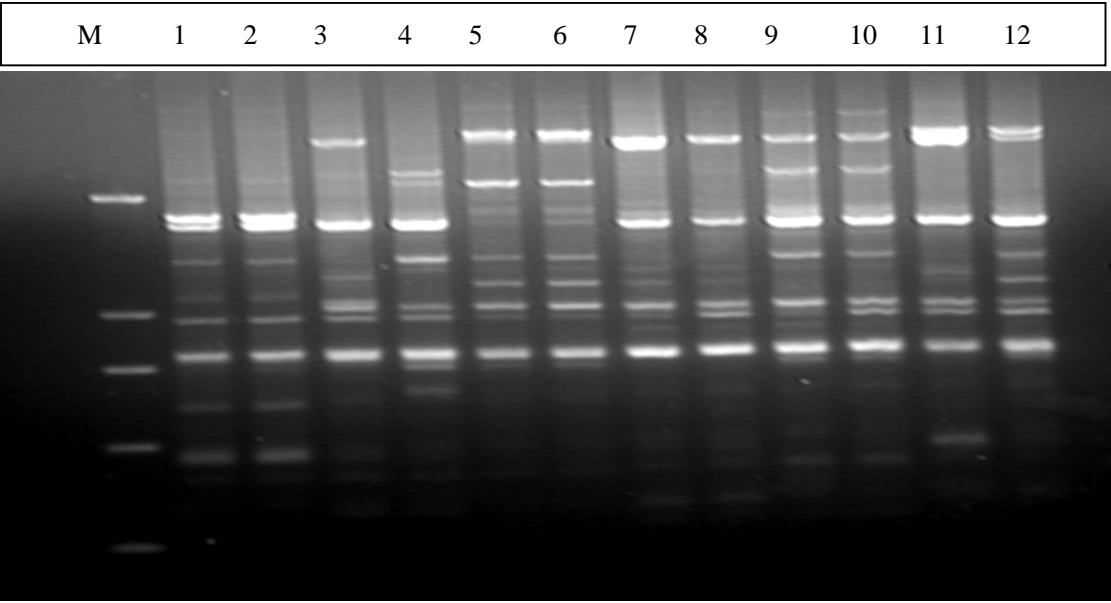


图6.1 ISSR引物 (AG)₈TA 在12桑树材料间PCR扩增电泳图谱。

Fig.6.1 Electrophoretic pattern amplified using primer (AG)₈TA in 12 mulberry materials.

1~12泳道分别代表桑树品种：农桑8号、农桑8号（4×）、湖桑199号、湖桑199号（4×）、湖桑197号、湖桑197号（4×）、育711、育711（4×）、育2号、育2号（4×）、湖桑32号、湖桑32号（4×）。

Lane 1~12 represent mulberry varieties: Nongsang 8、Nongsang 8（4×）、Husang 199、Husang 199（4×）、Husang 197、Husang 197（4×）、Yu 711、Yu 711（4×）、Yu 2、Yu 2（4×）、Husang 32、Husang 32（4×）. M is a DNA marker DL 2,000

6.2.2 桑树二倍体及人工诱导同源四倍体的ISSR多态性

桑树不同材料二倍体及其同源四倍体间的ISSR多态性有明显差异（表6.2）。农桑8号、湖桑197、育2号的二倍体及其同源四倍体间扩增条带完全一致，无差异，2001年焦锋等利用RAPD技术也发现了相同的现象。湖桑32号二倍体及其同源四倍体ISSR多态性最高，达到了23.53%，湖桑199和育711的二倍体及其同源四倍体ISSR多态性居中，分别为13.04%和6.98%，说明不同桑树材料经秋水仙素诱变后产生的DNA遗传结构差异较大。

表6.2 桑树二倍体及人工诱导同源四倍体间的ISSR多态性

Table 6.2 ISSR polymorphism between diploid and artificially induced homologous tetraploid of mulberry												
品种 Variety	农桑8号 Nongsang 8		湖桑199 Husang 199		湖桑197 Husang 197		育711 Yu 711		育2号 Yu 2		湖桑32号 Husang 32	
倍数性 Ploid	2 x	4 x	2 x	4 x	2 x	4 x	2 x	4 x	2 x	4 x	2 x	4 x
ISSR总带数 Total bands	43		46		49		43		46		51	
共有带 Common bands	43		40		49		40		46		39	
多态性带数 Polymorphism	0		6		0		3		0		12	
多态性(%) Polymorphisic rate	0		13.04		0		6.98		0		23.53	

6.2.3 供试材料间的遗传相似系数及聚类结果

12份桑树材料间的遗传距离及相似系数见表6.3。农桑8号、湖桑197、育2号的二倍体及其人工诱导同源四倍体间的遗传相似系数全部为1，湖桑32号、湖桑199和育711二倍体及其同源四倍体的遗传相似系数分别为0.8154、0.9077、0.9538。而从表6.3中我们也发现一个有趣的现象，湖桑32号与湖桑197号、湖桑199号间的遗传相似系数分别为0.8769、0.8923，大于与其同源四倍体间的遗传相似系数（0.8154），可见并非所有的二倍体及其同源四倍体间的遗传相似系数最大，王卓伟等（2001）利用AFLP技术分析桑树多倍体育种材料的遗传背景也获得了相似的研究结果。

表6.3 桑树品种间的遗传相似系数(上)和遗传距离(下)

Table 3 Genetic similarity coefficient(above diagonal) and genetic distance (below diagonal) between mulberry varieties

品种名称 Variety	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	****	1.0000	0.7385	0.8	0.7231	0.7231	0.6769	0.6923	0.6769	0.6769	0.7846	0.7538
2	0	****	0.7385	0.8	0.7231	0.7231	0.6769	0.6923	0.6769	0.6769	0.7846	0.7538
3	0.3032	0.3032	****	0.9077	0.8615	0.8615	0.6923	0.7385	0.7231	0.7231	0.8	0.8923
4	0.2231	0.2231	0.0968	****	0.8000	0.8000	0.6923	0.7077	0.6923	0.6923	0.8	0.8308
5	0.3242	0.3242	0.149	0.2231	****	1.0000	0.7077	0.7231	0.6769	0.6769	0.7846	0.8769
6	0.3242	0.3242	0.149	0.2231	0.0000	****	0.7077	0.7231	0.6769	0.6769	0.7846	0.8769
7	0.3902	0.3902	0.3677	0.3677	0.3457	0.3457	****	0.9538	0.7846	0.7846	0.7385	0.7385
8	0.3677	0.3677	0.3032	0.3457	0.3242	0.3242	0.0473	****	0.8308	0.8308	0.7231	0.7846
9	0.3902	0.3902	0.3242	0.3677	0.3902	0.3902	0.2426	0.1854	****	1.0000	0.7692	0.7077
10	0.3902	0.3902	0.3242	0.3677	0.3902	0.3902	0.2426	0.1854	0.0000	****	0.7692	0.7077
11	0.2426	0.2426	0.2231	0.2231	0.2426	0.2426	0.3032	0.3242	0.2624	0.2624	****	0.8154
12	0.2826	0.2826	0.1139	0.1854	0.1313	0.1313	0.3032	0.2426	0.3457	0.3457	0.2041	****

注：1-12分别代表桑树材料：农桑8号、农桑8号（4×）、湖桑199号、湖桑199号（4×）、湖桑197号、湖桑197号（4×）、育711、育711（4×）、育2号、育2号（4×）、湖桑32号、湖桑32号（4×）。

Note: 1-12 represent mulberry materials: Nongsang 8、Nongsang 8（4×）、Husang 199、Husang 199（4×）、Husang 197、Husang 197（4×）、Yu 711、Yu 711（4×）、Yu 2、Yu 2（4×）、Husang 32、Husang 32（4×），respectively.

据遗传相似系数按UPGMA法进行聚类分析（图6.2）。除湖桑32号外，其余所有的二倍体及其同源四倍体材料聚在一起。桑树品种间，育711和育2号聚为一类，这和它们的系谱是一致的。湖桑32号与湖桑199号、湖桑197号聚为一个亚类，再和农桑8号总的聚为一类，亲缘关系较近。

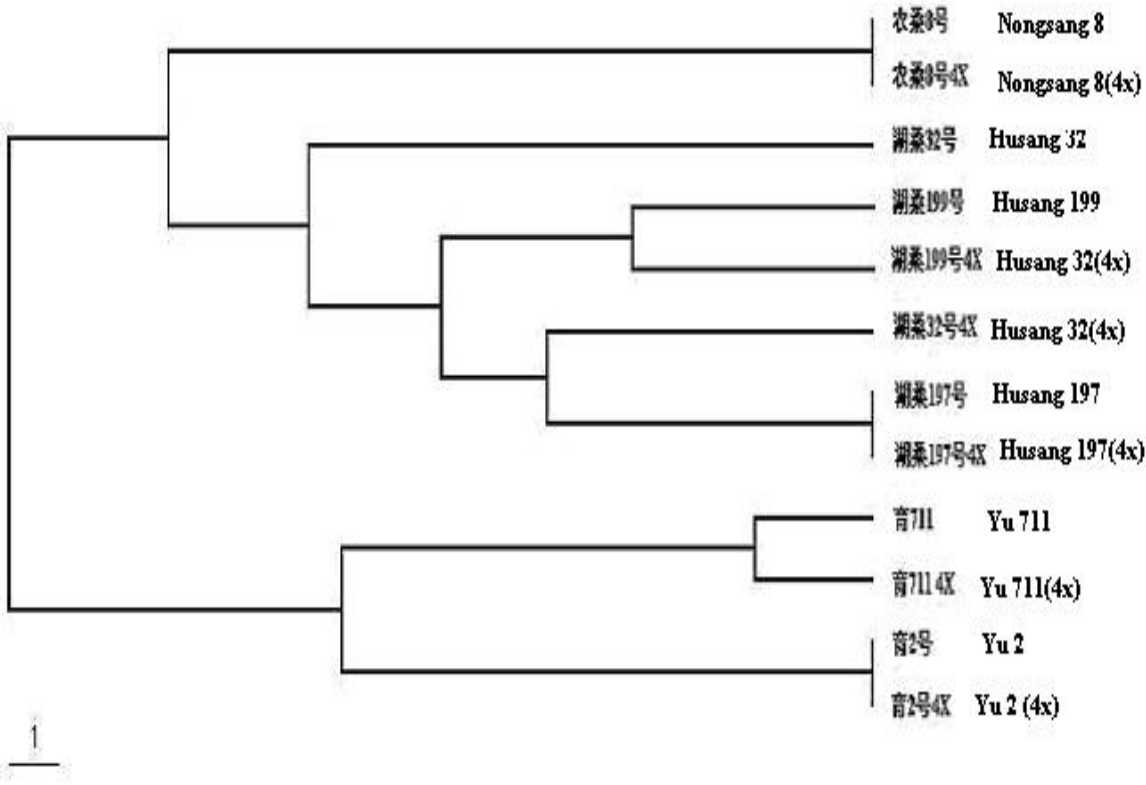


图6.2 基于ISSR标记的12份桑树品种的UPGMA聚类图

Fig.6.2 A dendrogram obtained by UPGMA for 12 mulberry varieties based on ISSR markers

6.3 讨论

6.3.1 二倍体和四倍体同源材料间的多态性

通过 6 组二倍体及其人工诱导同源四倍体桑树品种间的 ISSR 多态性分析，不同材料间有明显差异。农桑 8 号等 3 组二倍体及其同源四倍体间未检测到差异，其余 3 组虽检测到差异，但 ISSR 多态性也不相同，湖桑 32 号二倍体及其同源四倍体 ISSR 多态性最高，达到了 23.53%。一方面可能是由于桑树品种本身的遗传特性所决定的，另一方面可能是染色体诱变加倍时，秋水仙素作用浓度、时间、部位以及外部环境条件差异，造成与其同源四倍体在 DNA 多态性上发生变异的程度有所差异。

6.3.2 桑树二倍体及其人工诱导同源四倍体间性状差异的原因分析

诱导或培育四倍体最常用方法为用化学方法诱导多倍体，一般是用具有麻醉作用的植物碱或植物生长素等化学药剂对植物进行处理，目前最常用的化学药剂是秋水仙碱(colchicine)。秋水仙碱与正在分裂的细胞接触后，使纺锤丝的形成受到阻碍，染色体分裂加倍后停留在赤道板上，而不向两极移动，也不形成新的隔膜，因此，使分

裂后的染色体结合在一个细胞核内，从而形成细胞核内染色体的加倍。四倍体与其亲本二倍体比较，都表现为叶片增大，叶肉增厚，叶色加深，叶质优等特点。二倍体和同源四倍体之间的性状差异，是由 DNA 序列引起的还是其它因素引起的？本研究认为，桑树二倍体与经秋水仙素诱变获得的同源四倍体，在染色体加倍时，二倍体及其同源四倍体间虽然有某些品种在 DNA 遗传结构发生了变化，但仍然有 3 个品种的二倍体与其诱导四倍体间未检测到变异，初步说明性状差异主要是由基因的累加效应造成的，这与植物多倍体化过程中的表观遗传现象是一致的（Wendel, 2000）。该试验结果仅是 DNA 多态性反映的结果，没有具体联系到形态、生理生化及基因表达的差异，关于这一点，还需进一步研究，加以验证。

第七章 桑树无性系遗传变异的 ISSR 初步分析

桑树繁殖主要是通过嫁接、扦插等无性繁殖方式来繁殖的,无性繁殖可以继承和保持亲本优良经济性状,而不产生分离,可防止品种的退化。组织培养是通过无菌操作取植株的一部分(器官、组织等)接种至人工培养基上,在适宜的条件下进行培养,使其产生完全植株的技术过程。通过组织培养的方法进行植物的繁殖也是一种无性继代和无性扩增的过程,目前组织培养主要用于种质的离体培养和扩大种质资源。因此研究无性繁殖系遗传稳定性对桑种质的保护与利用十分重要。无性繁殖的后代叫做无性系(clone),由于不涉及到有性过程,因而其基因型在世代间保持不变,只有通过突变才能引起遗传变异,随着时间的推移,在无性系内可以积累一定数量的遗传变异,但遗传变异微小,从形态学有时可能难以区分,随着 DNA 分子标记技术的发展,检测无性系群体内的遗传变异成为可能(Avise, 1994; Schaal, 1996; Smith, 1996; Wolfe, 1998)。ESSELMAN (1999) 等对物种 *Calamagrostis porteri* ssp. 无性系利用 ISSR 检测到 24% 的变异。González 等 (2003) 利用 AFLP 技术研究龙舌兰属植物 (*Agave fourcroydes*) 组织培养无性系遗传变异为 25.2%, 田间无性系遗传变异为 19.9%。崔德才 (2003) 等经 RAPD 鉴定, 离体保存的大蒜种质未发现遗传变异。本文利用 ISSR 初步分析桑树田间和试管苗无性繁殖系遗传变异。

7.1 材料和方法

试验桑树品种为凤尾一之濑,从其无性繁殖群体中每棵树随机取 1 根枝条,其芽用于 DNA 提取。样本数量为 7 个, 采自浙江大学华家池校区。

组织培养试管苗由浙江大学动物科学学院陆小平博士和潘刚博士提供。试管苗为实生苗,继代培养了 15 代,所有试管苗由同一桑芽愈伤组织培养而来,即来源于相同的原始基因型,在继代培养过程中进行了分瓶,本试验共取试管苗数量为 27 个,取自 4 个瓶中,每瓶数量分别为 5, 4, 6 和 12。

桑树基因组 DNA 的提取、ISSR 的扩增、电泳及数据分析方法见 2.1.2、3.1.3、3.1.5。

7.2 结果

7.2.1 桑树田间和试管苗无性繁殖个体 ISSR 遗传变异

本试验用于无性繁殖个体 ISSR 遗传变异的引物为 8 个 [(GAG)₄GC, (GTC)₆, (AG)₆TA, (CT)₆RC, (AC)₈T, (AC)₈YC, (GACA)₄, (GT)₆CC]。8 个 ISSR 引物在 7 个田间无性繁殖个体间共扩增出稳定、清晰的条带数为 33 条,检测到 1 个变异,变异率为 3.03%; 27 个试管苗间扩增条带数为 35 条,检测到 1 个变异,变异率为 2.89%(图 7.1,7.2,7.3),此结果说明桑

树通过无性繁殖方法繁殖个体存在遗传变异，但大部分遗传性状稳定，遗传变异率低，遗传物质基本是稳定的。

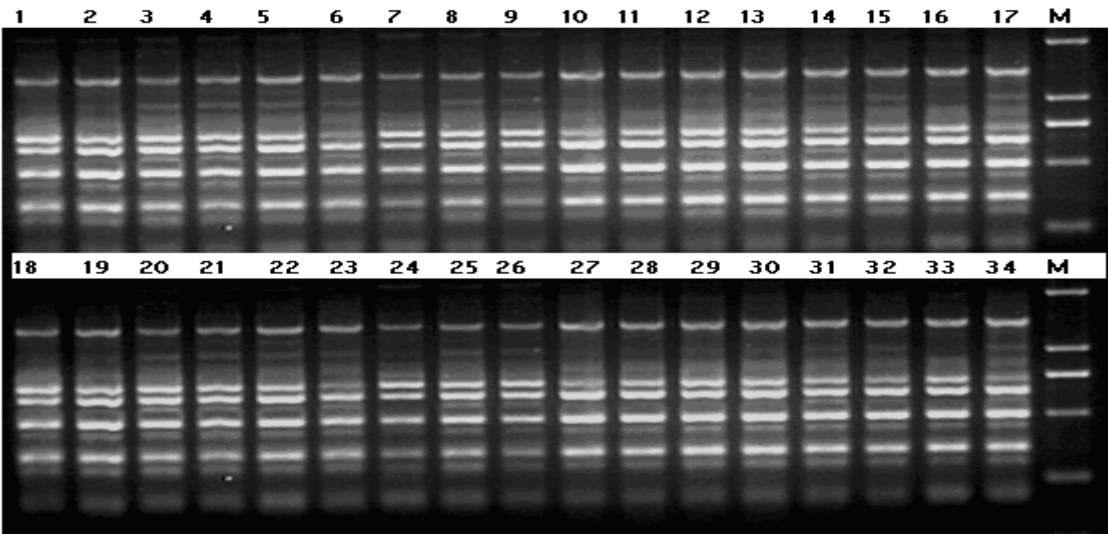


图 7.1 引物(GTC)₆扩增条带各供试材料相同

Fig. 7.1 All materials analyzed showed the same bands with primer (GTC)₆

注:1~27 为桑树组织培养无性系;28~34 为桑树田间无性系. M : DNA marker DL 2,000

Note: 1 ~ 27 represent tissue cultural clones; 28 ~ 34 represent mulberry clones from field. M is a DNA marker DL 2,000

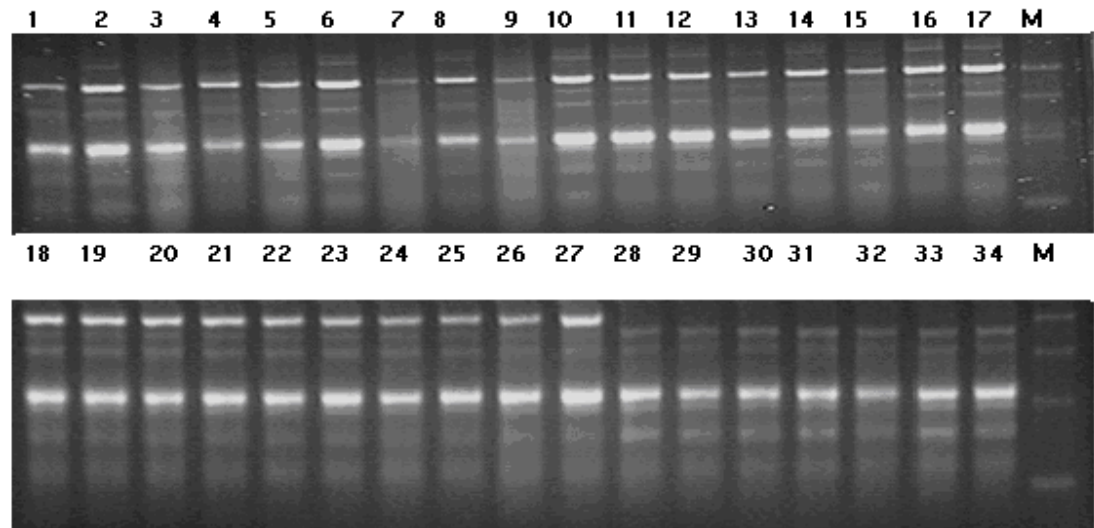


图 7.2 引物(CT)₆RT扩增产物在田间无性系和组培试管苗无性系间有条带差异

Fig. 7.2 Clones between field and tissue culture showed different bands with primer (CT)₆RT

注:1~27 为桑树组织培养无性系;28~34 为桑树田间无性系. M :DNA marker DL 2,000

Note: 1 ~ 27 represent tissue cultural clones; 28 ~ 34 represent mulberry clones from field. M is a DNA marker DL 2,000

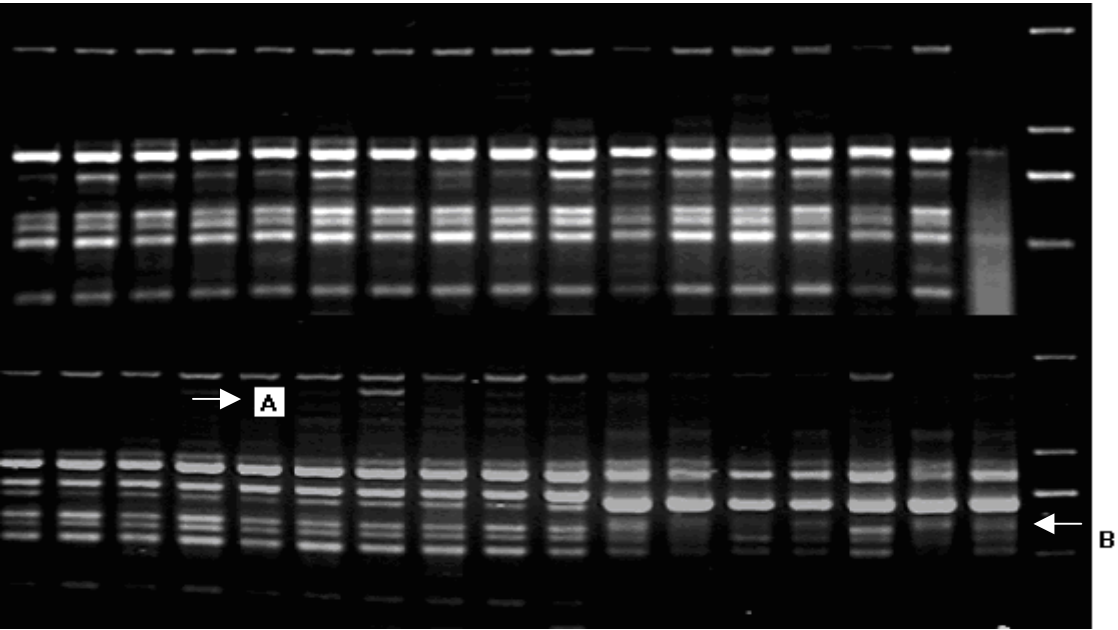


图 7.3 田间无性系和组培试管苗无性系用引物(GAG)₄GC检测的变异条带

Fig. 7.3 The special bands of clones of field and tissue culture were tested with primer (GAG)₄GC

注:1~27 为桑树组织培养无性系;28~34 为桑树田间无性系.A: 组织培养试管苗无性系中的变异条带. B: 田间无性系中的变异条带
M :DNA marker DL 2,000

Note: 1 ~ 27 represent tissue cultural clones; 28 ~ 34 represent mulberry clones from field. A: The special band of tissue culture clones. B: The special band of field clones. M is a DNA marker DL 2,000

7.2.1 桑树品种间 ISSR 遗传变异

桑树品种凤尾一之濑和实生桑间共扩增出 40 条带，多态性条带为 13，多态性条带占总条带的 30.5%，说明品种间的多态性大大大于无性繁殖个体间的多态性，从 UPGMA 聚类结果也可以看出，两个品种间的个体分别聚为一类（图 7.4）。

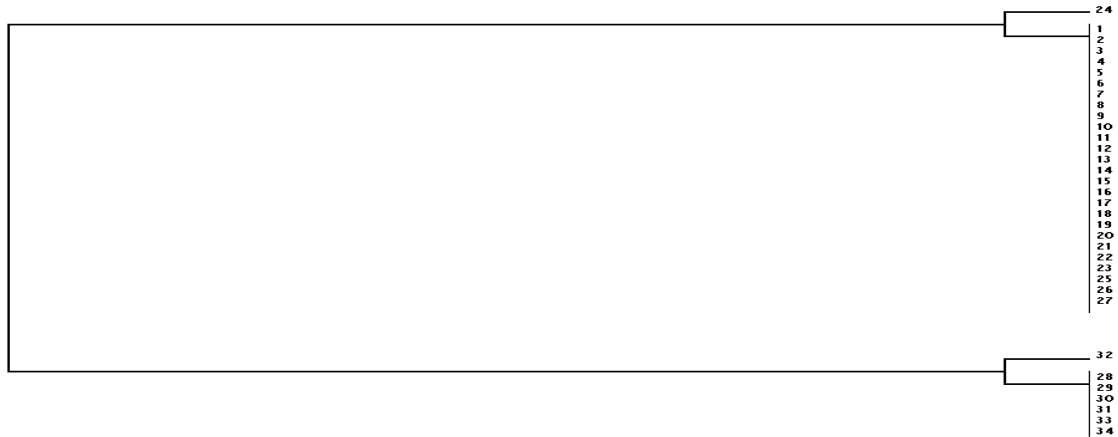


图 7.4 基于 ISSR 标记的桑树 34 个无性系材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 7.4 A dendrogram obtained by UPGMA for 34 mulberry clones based on ISSR markers

注:1~27 为桑树组织培养无性系;28~34 为桑树田间无性系. Note: 1 ~ 27 represent tissue cultural clones; 28 ~ 34 represent mulberry clones from field.

7.3 讨论

本文利用 ISSR 初步分析了桑树无性繁殖系遗传变异，在田间和组织培养无性系中都检测到 1 个变异，变异率分别为 3.03% 和 2.89%，此结果说明桑树通过无性繁殖方法繁殖个体大部分遗传性状稳定，能用于桑种质保存和扩大繁殖。此结果也说明桑树通过无性繁殖方法繁殖个体存在少量遗传变异，田间无性系变异估计主要是受环境影响所造成的，而组织培养试管苗的变异可能是由于培养剂中组成成分引起的（崔德才，2003）。桑树芽变的存在，也证明了田间无性系遗传变异的存在，无性系遗传变异也为桑树育种提供了一个新的途径。

本文经对桑树无性系遗传变异的初步分析，不同桑品种无性系、无性系在田间的环境生态条件以及种质年限是否有关，无性系和母株之间是否也存在遗传变异需进一步研究分析，这对桑种质的保存、利用和育种具有重要的理论意义和实用价值。

第八章 凤尾桑及其芽变品系间遗传变异的 ISSR 分析

体细胞突变影响了植物的结构和繁殖力，形成所谓芽变（sports），又称芽条变异，最初主要发生在芽的部位，而后发芽长成枝条。芽变是植物在生长发育过程中受到某些环境因素的影响，如温度的剧变，采伐或化学物质的刺激等，使生长点细胞在分裂过程中发生遗传学上的变化，从而表现芽条的形态特征和生物学特性方面有所改变，通过无性繁殖可将变异性状固定下来。有些芽变构成了原始基因的改良型，从中可选出新的品种，例如陕 707，凤尾芽变等。然而大多数芽变与原始种在特征上区别细微，从形态学上很难区分，特别是桑树休眠期间。Nybom（1990）和 Mulcahy 等（1993）利用 RAPD 方法在苹果的芽变和原始种未检测到变异。本文利用 ISSR 分子标记技术，对凤尾桑及其芽变品系间的遗传变异进行了初步分析，以期了解芽变的遗传结构变异机理。

8.1 材料与方法

选用凤尾桑及其 4 个芽变株系为试验材料，采其桑芽提取其基因组 DNA。所有试验材料均来自中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃。凤尾芽变和凤尾 1 号、2 号、3 号是南京地方桑树品种凤尾桑的芽条变异，芽变生长的枝叶与母株显著不同，叶长、叶幅显著增大，枝条粗壮而长。经对变异芽条的多次繁育，长期观察调查，芽变品系群体性状稳定一致，生长势旺，无病害发生。对母株凤尾桑和芽变株系凤尾芽变和凤变 1 号的产叶量、叶质、抗病性等进行系统鉴定，结果其各项成绩均优于母株凤尾桑（表 8.1），其它芽变株系正在鉴定之中。

表 8.1 凤尾桑与部分芽变株系农艺性状对比

Table 8.1 A comparasion of characters between Fengweisang and its sports

品 种 Variety	叶长 Leaf Length	叶幅 Leaf Breadth	叶形 Leaf Shape	花 性 Sex	黄化型 萎缩病 Mulberry Yellow Dwarf Disease	黑枯型 细菌病 Bacterium Mori Snith	春公斤 叶片数 The Number of Leaf Blades Per Kilo in Spring	秋公斤 叶片数 The Number of Leaf Blades Per Kilo in Autumn	单株 产叶 量(kg) Leaf Yield Per Tree
凤尾桑 Fengweisang	19.0	15.5	卵圆 形	雌	感病	中抗	615	240	4.97
凤尾芽变 Fengweiyabian	21.9	19.3	心脏 形	雌雄	中抗	抗	383	182	6.28
凤变1号 Fengbian1	22	19	心脏 形	雌	中抗	-	382	170	7.44

桑树基因组 DNA 提取、ISSR 的扩增、电泳及数据分析方法见 2.1.2、3.1.3、3.1.5。

8.2 结果

选用 8 个ISSR引物进行了凤尾桑及其芽变株系的分子生物学鉴定（图 8.1）。从 8 个ISSR引

物扩增结果来看，3 个引物的扩增产物[(GTC)₆ (扩增条带数 5 条)，(GAG)₄GC (扩增条带数 7 条)，(TG)₆GT (扩增条带数 5 条)]在株系间无差异。8 个 ISSR 引物扩增总条带为 47 条，多态性条带为 11 条，占总条带的 23.40%。从株系扩增条带来看，凤尾芽变变异最大，和母株凤尾桑相比，有 10 条差异带，凤变 1 号、2 号、3 号差异条带分别为 6 条，5 条和 5 条。从变异株系间来看，凤尾芽变和其它株系间仍为最大，为 6 条，凤变 1 号、2 号、3 号间仅有 1 条差异带，凤变 2 号、3 号间未检测到差异，通过单独引物和引物组合可以有效地鉴定母株及其变异株系（凤变 2 号、3 号除外）（见表 8.2）。

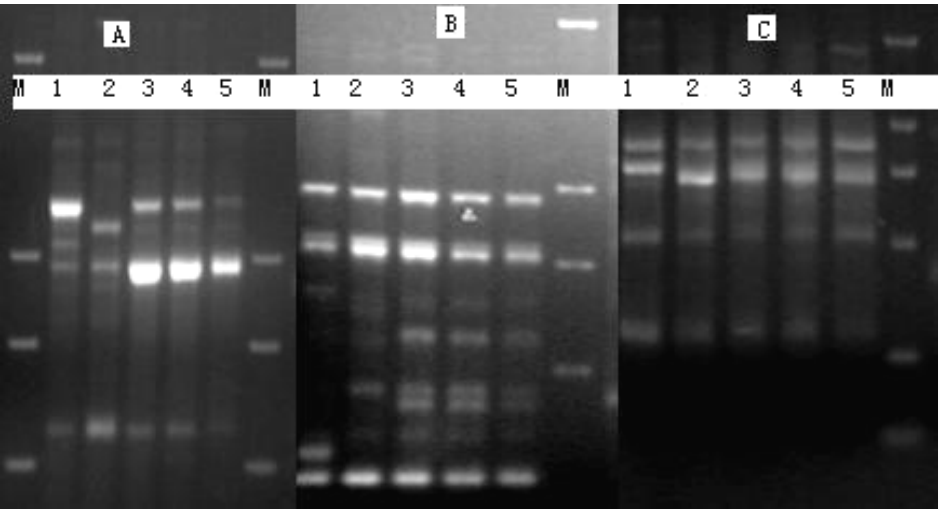


图 8.1 不同 ISSR 引物电泳扩增图谱

Fig. 8.1 Patterns of ISSR

注：A: (CT)₈GC B: (AG)₈TA C: (GTGC)₄。泳道 1~5 分别为凤尾桑、凤尾芽变和凤尾 1 号、2 号、3 号。M: DNA marker DL 2,000

Note: Lane 1~5 represent Fengweisang, Fengweiyabian, Fengbian 1, Fengbian 2 and Fengbian 3. M is a DNA Marker.

表 8.2 凤尾桑、凤尾芽变和凤变 1 号、2 号、3 号多态性条带统计

Table 8.2 A summary of polymorphic bands among Fengweisang,Fengweiyabian and Fengbian 1、2、3

引物 (条带大小 bp)		凤尾桑	凤尾芽变	凤变 1 号	凤变 2 号	凤变 3 号
Primer (band size)		Fengweisang	Fengweiyabian	Fengbian 1	Fengbian 2	Fengbian 3
(CT) ₈ GC	820	1	0	1	1	1
	780	0	1	1	1	1
	760	1	0	0	0	0
(AG) ₈ TA	450	0	1	1	1	1
	430	0	0	1	1	1
	360	1	0	0	0	0
(GTGC) ₄	730	1	0	1	1	1
	700	0	1	0	0	0
(AG) ₆ TC	850	0	1	1	0	0
	900	0	1	0	0	0
	880	1	0	1	1	1

8.3 讨论

本研究从分子水平验证了母株及其芽变株系间的差异，也为芽变品系的鉴定提供了一种有效的鉴定手段。芽变株系间的变异程度不一样，这和形态上的差异大小是一致的，通过变异株系间的形态学观察，凤尾芽变同样差异最明显，凤变 1 号、2 号、3 号从形态学上相近。此外，通过母株、及其变异株系间的差异条带的回收、纯化、克隆、测序和序列同源性比较，可望能找到一些与桑树性状有关的基因标记，这对更好地认识桑树的芽变规律和桑树品种改良具有重要的理论和实践意义。

第九章 基于 nrDNA 的 ITS 序列研究桑属 (荨麻目：桑科) 系统发育

我国桑树遗传资源丰富，大约有 3 000 份种质资源，包括 15 个种 4 个变种，不少桑种为我国特有，且分布范围广泛。开展桑属系统发育和分子进化研究，对丰富的桑树遗传资源收集、整理、保存和创新利用有着重大意义。

内转录间隔区(internal transcribed spacer, ITS)位于 18s 和 26s rRNA 基因之间,被 5.8S rRNA 基因分为两段,即 ITS-1 和 ITS-2。ITS 序列在被子植物中的长度变异很小,ITS-1 和 ITS-2 的长度均不足 300 bp,PCR 扩增及测序简单易行,特别是 PCR 产物直接测序法的诞生,极大地推动了 ITS 在被子植物科内,尤其是近缘属间及种间关系研究中的应用。本文以桑树为材料,用 PCR 产物直接测序法测定桑属各材料 ITS 序列,并探讨了参试桑树材料间的系统发育关系,为桑树遗传改良提供理论依据。

9.1 材料与方法

9.1 试验材料

所有试验材料均采于中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃,具体见表 9.1。

9.2 桑树基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取桑树基因组 DNA,具体见 2.1.2。

9.3 ITS 序列的扩增

PCR 扩增 反应在PE公司的 9600 型PCR扩增仪上进行,反应体系为 50 μ L,内含:双链 DNA模板(约 25 ng), $MgCl_2$ (2.5 mmol/L), dNTP (200 μ mol/L), 正反引物 (2 μ mol/L 5' -CGTAACAAGGTTTCCGTAGG-3', 5' -TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'), Taq DNA聚合酶 (1.5 U), 10 \times PCR Buffer (100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 0.01% gelatin)。扩增反应程序: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s。循环 38 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR产物经 1%琼脂糖凝胶电泳鉴定(图 9.1)。

9.4 ITS 扩增产物的纯化和测序

ITS 扩增产物的纯化用 GLASSMILK 法。具体为:扩增产物通过 1%琼脂糖凝胶电泳分离

目的片段。电泳至总长度的 2/3 处，停止电泳。在紫外灯下，割下扩增片段，加入 3 倍体积 6M NaI，摇匀；加入 20 μ L GlassMilk，轻轻混匀，放置 10 min，每隔 2~3 min 轻轻摇匀一次；5000rpm 离心 5 s，去掉上清；加 700 μ l NewWash（10 mM Tris-HCl, 0.5mM EDTA, 50mM NaCl, 50% ethanol），混匀，5000rpm 离心 5 s，去上清，重复 3 次；用滤纸吸干残液，37℃放 10 min；加 50 μ L 0.1×TE，在 37℃条件下，释放 2~5 min；10000rpm 离心 2 min，取上清置一新管。纯化 DNA 浓度通过 1%琼脂糖凝胶电泳测定。

纯化 PCR 产物由上海生工生物工程技术服务有限公司和大连宝生物工程有限公司直接测序。

9.5 ITS 序列分析

ITS-1 和 ITS-2 序列范围根据所用引物以及水稻等相关序列确定（Takaiwa, 1996）。采用 Clustal X (版本 1.81) (Thomson, 1997) 和 DNASTAR 软件进行序列同源性和聚类分析。

表 9.1 桑树材料的来源

Table 9.1 The source of materials

编号 N0.	桑 种 Species	品系 Accession	来源 Origin
1	鲁 桑 <i>M. multicaulis</i> Perr.	纳溪桑 Naxisang	四川省纳溪县 Naxi city, Sichuan province, China
2	白桑 <i>M. alba</i> Linn.	牛耳桑 Niuersang	山西省阳城县 Yangcheng city, shanxi province, China
3	大叶桑 <i>M. alba</i> var. <i>macrophylla</i> Loud.	珙县黑油桑 Gongxianheiyousang	四川省珙县 Gongxian city, Sichuan province, China
4	白脉桑 <i>M. alba</i> var. <i>venose</i> Delile.	纹契桑 Wenqisang	陕西省周至 Zhouzhi city, shanxi province, China
5	广东桑 <i>M. atropurpurea</i> Roxb.	伦敦 40 号 Lunjiao 40	广东省顺德 Sunde city, Guangdong province, China
6	山桑 <i>M. bombycis</i> Koidz	剑持 Jianchi	日 本 Japan
7	长果桑 <i>M. laevigata</i> Wall.	德江 10 号 Dejiang 10	贵州省德江 Dejiang city, guizhou province, China
8	蒙桑 <i>M. mongolica</i> Schneid.	吉蒙桑 Jimengsang	吉林省 Jilin province, China
9	鬼 桑 <i>M. mongolica</i> var. <i>diabolica</i> Koidz.	有毛岩桑 Youmaoyansang	贵 州 Guizhou province, China
10	暹罗桑 <i>M. rotundiloba</i> Koidz.	T11	泰 国 Thailand
11	长穗桑 <i>M. wittiorum</i> Hand-Mazz.	黔鄂桑 1 号 Qianesang 1	贵州省德江 Dejiang city, guizhou province, China
12		贵 14 号 Gui 14	贵州省毕节 Biejie city, guizhou province, China
13	鸡桑 <i>M. australis</i> Poir.	插桑 Chasang	Sichuan province, China
14	外源种 outgroup	构树 <i>B. papyrifera</i>	南京林业大学 Nanjing Forestry University, China

9.2 实验结果

9.2.1 桑属 ITS 序列的长度、G+C 含量

本试验采用 PCR 产物直接测序法对 9 个种 3 个变种共 13 份桑种质的 ITS 序列进行了测定，其长度、G+C 含量见表 9.2。

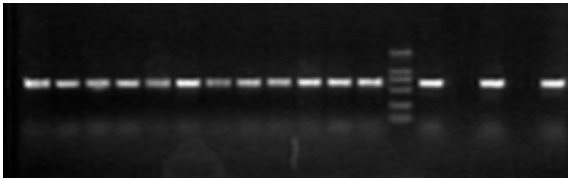


图 9.1 部分桑树 ITS 序列 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig.9.1 Identification of mulberry ITS sequences by agarose gel electrophoresis

表 9.2 桑属的 ITS 序列长度、G+C 含量以及在 GenBank 的登录号

Table 9.2 Length (bp) and G+C contents of ITS1,5.8s rDNA and ITS2 of genus Morus and GenBank accession No.

品系 Accession	ITS-1		5.8S rDNA		ITS-2		GenBank 登录号 Accession No.
	长度 (bp) Length	G+C %	长度 (bp) Length	G+C %	长度 (bp) Length	G+C %	
纳溪桑 Naxisang	189	59.3	152	55.3	217	60.8	AY345153
牛耳桑 Niuersang	181	59.1	152	54.6	217	62.2	AY345157
珙县黑油桑 Gongxianheiyousang	189	59.3	152	55.3	209	62.7	AY345148
纹契桑 Wenqisang	190	60.0	152	55.3	219	62.1	AY345149
伦敦 40 号 Lunjiao 40	189	59.3	152	55.3	208	62.5	AY345145
剑持 Jianchi	188	58.5	152	42.1	210	57.8	AY345151
德江 10 号 Dejiang 10	189	59.8	152	55.3	208	63.0	AY345147
吉蒙桑 Jimengsang	197	58.9	154	55.2	210	62.9	AY345158
有毛岩桑 Youmaoyansang	189	59.3	152	55.3	210	62.9	AY345146
T11	189	59.3	152	55.3	211	62.6	AY345150
黔鄂桑 1 号 Qianesang 1	189	59.8	152	55.3	213	61.5	AY345154
贵 14 号 Gui 14	189	59.8	152	55.3	209	62.9	AY345155
插桑 Chasang	189	59.3	152	55.3	210	62.9	AY345152
平均 Average	189				212		
构树 <i>B. papyrifera</i>	192	68.8	148	57.4	-	-	AY345156

从表 9.2 可见，桑属 ITS1 长度在 181~197 bp 之间，最大相差 16 bp，平均约为 189 bp，与构属构树 192 bp 相差不大。桑属 5.8S rDNA 除吉蒙桑为 154bp 外，其余完全一致，为 152 bp，说明该区比较保守。桑属 ITS2 长度在 208~219 bp 间，最大相差 11 bp，平均为 212 bp。桑

属 ITS 序列长度和已报道的被子植物长度基本一致 (ITS-1 在 187~298 bp 间, ITS-2 在 187~252 bp 间) (葛颂, 1997; 汪小全, 1997; 王建波, 1999)。桑属 ITS 序列 G+C 含量大约为 60% 左右, 而且 ITS1 和 ITS2 基本一致, 反映出协同进化现象。

9.2.2 桑属 ITS 序列的聚类分析

用 Clustal X 分析软件对测定 ITS 序列进行了同源性分析, 结果显示桑属和桑科构属间同源性在 60%~75% 间, 而桑属内材料间遗传变异范围为 90%~100%, 平均为 96.2%, 说明桑属材料间亲源关系较近, 其中插桑 (属于鸡桑) 和有毛岩桑 (属于鬼桑) ITS 完全相同。通过序列配对 (3'端 18 S 基因和 5'端 26 S 基因的部分序列用于系统分析), 序列总长度为 623bp, 变异位点为 260 个, 说明该序列完全可用于聚类分析。于是, 用 Clustal X 软件对 14 个样本 ITS 序列进行了聚类分析, 建立了其系统进化发育树 (图 9.2)。从聚类结果来看, 桑科的构属和桑属单独聚为一类, 说明桑属属于单系类结果。单独从桑属聚来看: 在供试桑种质中, 蒙桑单独聚为一类, 亲源关系最远; 插桑 (属于鸡桑) 和有毛岩桑 (属于鬼桑) 聚为一类, 插桑和有毛岩桑从形态上看, 都具有长花柱, 这和形态分类基本一致; 其它桑种质聚为一类, 在这个聚类中有可分成 2 个亚类, 黔鄂 1 号、剑持、纳溪桑和纹契桑聚为一类, 说明它们有相近的亲源关系, 桑属其余材料聚为一类。

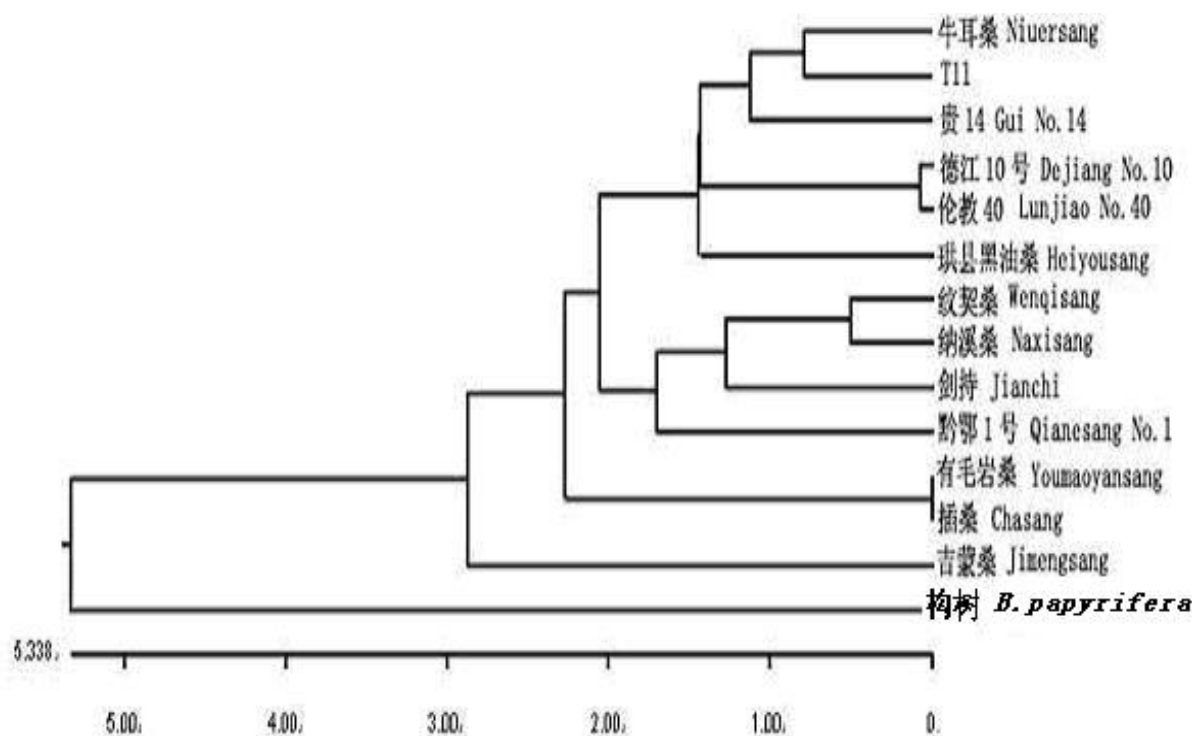


图 9.2 桑属 ITS 序列系统发育树

Fig. 9.2 Phylogenetic tree of genus *Morus* generated from ITS sequences (The number represents nucleotide substitutions)

9.3 讨论

桑树是多年生的重要经济作物。由于桑是异花授粉，自然界分布极广，易杂交，又能通过无性繁殖，因此通过长期的自然杂交和人工杂交，使桑树的遗传背景相当复杂。传统的形态学、染色体核型分析和同工酶分析等方法，难以解决桑树系统进化和分类上的许多分歧，不能充分满足种质资源鉴定和育种工作的需求。另外，在桑树方面目前虽进行了分子标记技术研究，但主要集中在 RAPD 技术对桑属系统学研究，其局限性也被相继提出。为此，本文利用 PCR 产物测序法，对桑属 ITS 序列进行了分析，通过揭示 DNA 分子核苷酸的变异来研究桑属的系统发育，比一般方法更直观、准确。

测定的 13 份桑属 ITS-1 长度在 181~197 bp 之间，ITS-2 长度在 208~219 bp 间，和已报道的被子植物长度基本一致（ITS-1 在 187~298 bp 间，ITS-2 在 187~252 bp 间），G+C 含量大约为 60% 左右，而且 ITS-1 和 ITS-2 基本一致，反映出协同进化现象。用 Clustal X 分析软件对测定 ITS 序列进行了同源性分析，结果显示桑属和桑科构属间同源性在 60%~75% 间，而桑属内材料间遗传变异范围为 90%~100%，平均为 96.2%，说明桑属材料间亲源关系较近。通过序列配对，序列总长度为 623 bp，变异位点为 260 个，其中 ITS-1 有 66 个变异位点(33.0%)，ITS-2 有 81 个变异位点(36.5%)，说明在桑属内 ITS-2 比 ITS-1 具有较高的序列多样性。聚类结果显示所有桑属材料聚在一起。

第十章 基于 cpDNA 的 trnL-trnF 间隔区序列研究

桑属（荨麻目：桑科）系统发育

我国桑属种质资源种类及类型居世界之最，遗传资源丰富。由于桑树分布范围广，适应性强，极易杂交和繁殖，使桑树形成了广泛的生态适应性。开展桑属系统发育和分子进化研究，不仅对丰富的桑树遗传资源保存和利用有着重大作用，而且具有重要的生物学意义。叶绿体 DNA（cpDNA）由于进化速率低，人们一直认为仅适合于科以上的种群系统学研究，但最近随着叶绿体 DNA 非编码区几个通用引物的成功设计(Taberlet,1991)，使叶绿体 DNA 在种内和种间系统学研究中得到了广泛应用，例如 trnL-trnF 基因。叶绿体基因组 DNA 中 trnL-trnF 基因内非编码区，由于不受功能的限制，其进化速率大于功能编码区，受外界环境选择压力小，片段长度适中，目前已被广泛应用于植物系统学研究 (Johnson,1994;Gielly,1994; Fujii,1997)。本文的目的是通过测定桑属 trnL-trnF 间隔区序列来初步确定桑属的系统发育以及进化关系。

10.1 材料与方法

10.1 试验材料

所有试验材料均采自中国农业科学院蚕业研究所国家种质镇江桑树圃，具体见表 10.1。

10.2 桑树基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取桑树基因组 DNA，具体见 2.1.2。

10.3 trnL-trnF 序列的扩增

PCR 扩增 反应在PE公司的 9600 型PCR扩增仪上进行，反应体系为 50 μ L，内含：双链 DNA模板（约 25 ng），MgCl₂（2.5 mmol/L），dNTP（200 μ mol/L），正反引物（2 μ mol/L），Taq DNA聚合酶（1.5 U），10 \times PCR Buffer（100 mmol/L Tris-HCl pH 8.3, 500 mmol/L KCl, 0.01% gelatin）。扩增引物为“e”（5’ -AAAATCGTGAGGGTTCAAGTC-3’）和“f”（5’ -GATTGAACTGGTGACACGAG-3’）(Taberlet,1991)。扩增反应程序为：95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min；95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s。循环 38 次；72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳鉴定（图 10.1）。

10.4 trnL-trnF 扩增产物的纯化和测序

trnL-trnF 扩增产物的纯化同 9.4。

纯化 PCR 产物由上海基康生物技术有限公司和上海生工生物工程技术有限公司测序。

10.5 trnL-trnF 序列分析

trnL-trnF 序列采用 Clustal X (版本 1.81)软件进行序列同源性分析 (Thomson, 1997)。用 Blast 对测定序列和 GenBank 数据进行比对分析。按 UPGMA 法用 GENETYX 分析软件进行聚类分析。

表 10.1 25 桑树材料和其它材料的来源

Table 10.1 The source of all materials

编号 No.	品系 Accession	分类 Taxa	原 产 地 Origin	GenBank 登录 号 Accession No.
1	伦敦 40 Lunjiao 40	广东桑 <i>M.atropurea</i> Roxb.	广东省顺德	AY271270
2	保靖 5 号 Baojing 5	华 桑 <i>M.cathayana</i> Hemsl.	湖南省保靖	AY271271
3	垂枝桑 Chuizhisang	垂枝桑 <i>M.alba</i> var. <i>pendula</i> Dipp.	朝 鲜	AY271272
4	雅安 3 号 Yaan 3	华 桑 <i>M.cathayana</i> Hemsl.	四川省雅安	AY271273
5	丽江山桑 Lijiangshansang	山 桑 <i>M.bombycis</i> Koidz	云南省丽江	AY271274
6	纹契桑 Wenqisang	白脉桑 <i>M.alba</i> var. <i>venose</i> Delile.	陕西省周至	AY271275
7	阿富汗 1 号 Ahuhan 1	白 桑 <i>M.alba</i> Linn.	阿 富 汗	AY271276
8	龙川秋雨 Longchuanqiuyu	白 桑 <i>M.alba</i> Linn.	朝 鲜	AY271277
9	火 桑 Housang	瑞穗桑 <i>M.mizuho</i> Hotta.	浙江省余杭	AY271278
10	牛耳桑 Niuersang	白 桑 <i>M.alba</i> Linn.	山西省阳城	AY271279
11	钦 二 Qiner	广东桑 <i>M.atropurpurea</i> Roxb.	广东省钦州	AY271280
12	构 树 Goushu	构 属 <i>B.papyrifera</i>		AY271281
13	毕节 5 号 Bijie 5	长穗桑 <i>M.wittiorum</i> Hand-Mazz.	贵州省毕节	AY271282
14	黔鄂 1 号 Qianesang 1	长穗桑 <i>M.wittiorum</i> Hand-Mazz.	贵州省德江	AY271283
15	药 桑 Yaosang	黑 桑 <i>M.nigra</i> Linn.	新 疆	AY267539
16	贵 14 Gui 14	长穗桑 <i>M.wittiorum</i> Hand-Mazz.	贵州省毕节	AY271284
17	吉蒙桑 Jimengsang	蒙 桑 <i>M.mongolica</i> Schneid.	吉 林 省	AY271285
18	T11	暹罗桑 <i>M. rotundiloba</i> Koidz.	泰 国	AY271286
19	有毛岩桑 Youmaoyansang	鬼桑 <i>M. mongolica</i> var. <i>diabolica</i> Koidz.	贵州省	AY271287
20	德江 10 号 Dejiang 10	长果桑 <i>M.Laevigata</i> Wall.	贵州省	AY271288
21	珙县黑油桑 Gongxianheiyousang	大叶桑 <i>M.alba</i> var. <i>macrophylla</i> Loud.	四川省珙县	AY271289
22	剑 持 Jianchi	山 桑 <i>M.bombycis</i> Koidz	日本新潟	AY271290
23	云南水桑 Yunnanshuisang	长果桑 <i>M.Laevigata</i> Wall.	云 南	AY271291
24	鸡 桑 Chasang	鸡 桑 <i>M.Australis</i> Poir.	四 川	AY271292
25	纳溪桑 Naxisang	鲁 桑 <i>M.multicaulis</i> Perr.	四川省纳溪	AY271293
26	桑莲 Sanglian	白 桑 <i>M.alba</i> Linn.	福建 Fujian	AY406984
27	木菠萝 Muboluo	<i>Artocarpus heterophyllus</i>	来自 GenBank	AHE390376
28	无花果 Wuhuaguo	<i>Ficus pretoriae</i>	来自 GenBank	AJ390366
29	野樱桃 Yeyingtao	<i>Prunus virginiana</i>	来自 GenBank	AF318695
30	绣线菊 Xiuxianju	<i>Spiraea cantoniensis</i>	来自 GenBank	AF318675
31	风箱果 Fengxiangguo	<i>Physocarpus capitatus</i>	来自 GenBank	AF318711
32	香飞廉 Xiangfeilian	<i>Carduus nutans</i>	来自 GenBank	AF129825
33	球花蓝刺头 Qihualancitou	<i>Echinops sphaerocephalus</i>	来自 GenBank	AF129830
34	窄叶还阳参 Zhayehuan yangshen	<i>Crepis tectorum</i>	来自 GenBank	U820271
35	刺菜蓟 Cicaiji	<i>Cynara cardunculus</i>	来自 GenBank	AF129828
36	刺头 Citou	<i>Echinops humilis</i>	来自 GenBank	U820311
37	蜡菊 Laju	<i>Helichrysum argrophyllum</i>	来自 GenBank	AF100500
38	大蜡菊 Daqiji	<i>Onopordum acanthium</i>	来自 GenBank	AF129833
39	杯子菊 Beiziju	<i>Pentzia flabelliformis</i>	来自 GenBank	AF100519
40	阔苞菊 Kuobaoju	<i>Pluchea dentex</i>	来自 GenBank	AF100521.1
41	蕨叶千里光 Jueyeqianliguang	<i>Senecio pterophorus</i>	来自 GenBank	AF100516
42	千里光 Qianliguang	<i>Senecio lineatus</i>	来自 GenBank	AF100515.1

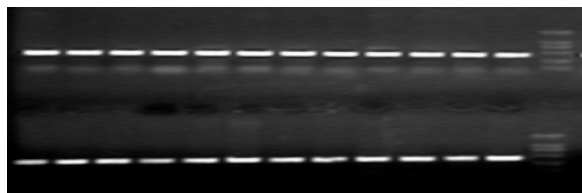


图 10.1 桑树 *trnL-trnF* 基因间隔区序列 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳鉴定

Fig.10.1 Identification of mulberry *trnL-trnF* intergenic spacer sequences by agarose gel electrophoresis

10.2 结果

10.2.1 桑属 *trnL-trnF* 的特点

长度：在所有的被子植物中，迄今为止报道的 *trnL-trnF* 为 360~470 bp 间。我们测定的桑属的 *trnL-trnF* 间隔区序列为 360bp~367bp，符合上述规律 (Fernandez,2001; Zimmer,2002)。

A+T 含量：桑属平均 *trnL-trnF* 间隔区序列核苷酸组成为 0.29935(A) 0.37448(T) 0.18379(C) 0.14238(G)，平均 A+T 含量为 0.6738，说明该序列富含 A/T，这是 *trnL-trnF* 基因间隔区的特征。

10.2.2 桑属 *trnL-trnF* 基因间隔区序列同源性的比较和进化分析

桑属 *trnL-trnF* 间隔区比较分析：从序列配情况来看，26 个材料的 *trnL-trnF* 间隔区序列间有 41 个变异位点 (11.02%)，桑属内有 12 变异位点(3.2%)存在，这是系统分析的信息点，在这些变异中以碱基的插入和缺失（主要是插入/缺失 dA/T）为进化形式，其余的发生了少数置换，除了这些变异位点，其余核苷酸序列完全相同。序列同源性变异范围在 89.9%~100%之间，平均为 98.1%，桑属内该序列同源性 98.0%~100%之间，平均为 99.3%，桑属内所有材料与构属构树间的同源性都低于 90.2%，结果说明与构属相比，桑属内所有材料间有较高相似性。

通过 Genbank 查询，发现测定序列与桑科、菊科和蔷薇科的 100 多个植物的 *TrnL-trnF* 间隔区序列有同源性，我们挑选了 16 个有代表性的材料，它们是桑科的无花果和木菠萝，蔷薇科的风箱果、野樱桃和绣线菊，其余的为菊科的香飞廉、球花蓝刺头、窄叶还阳参、刺菜蓟、刺头、蜡菊、大蜡菊、杯子菊、阔苞菊、千里光、蕨叶千里光等（表 10.1）。利用测定的该序列和部分 *trnL* 内含子序列，用 GENETYX 分析软件对这些材料进行了同源性分析，用 UPGMA 法建立了系统进化发育树。聚类结果见图 10.2。从聚类结果来看，桑科单独聚为一类，蔷薇科的风箱果、野樱桃和绣线菊聚为一类，菊科的材料聚为一类。桑科中的无花果属、木菠萝属、构属和所有桑属材料分别聚为一类，可见桑属与其它材料相比，桑属种间的同源性为最高，其次桑属与桑科的无花果属（无花果）、构属（构树）和木菠萝属（木菠萝）有较高的同源性，而桑属与蔷薇科和菊科的材料间同源性较低，以上从 DNA 序列水平上说明同为桑科植物的桑属、构属、无花果属和木菠萝属有相近的遗传背景，亲缘关系较近，其次为蔷薇科植物，与菊科亲缘关系最远。桑属 25 份品系聚为一类，说明桑属为单系(monophyletic)，从桑属聚类结果来看，蒙桑、鬼桑（蒙桑的变种）、剑持、丽江山桑和插桑聚为一类，它们在形态上都具有长花柱，广东桑的伦敦 40 和钦二聚为一类，而桑莲为白桑，但它单独聚为一类，其亲缘关系较远，可能

是其为千年古桑，起源分化较远的缘故，其它桑种质总的有聚为一类，其中药桑单独聚为一类，其他华桑（雅安 3 号、保靖 5 号）、长穗桑（毕节 5 号、贵 14 和黔鄂桑 1 号）、长果桑（德江 10 号、云南水桑）、白桑、鲁桑、白脉桑、瑞穗桑和暹罗桑聚为一类，说明它们亲缘关系较近。

10.3 讨论

10.3.1 桑属 trnL-trnF 基因间隔区序列和 ITS 序列的比较

通过桑属内两者序列同源性比较分析发现 ITS 序列变异大于 trnL-trnF 基因间隔区序列，说明 ITS 序列进化速率大。

10.3.2 桑属 trnL-trnF 基因间隔区序列的聚类结果分析

由 trnL-trnF 基因间隔区序列构建的系统发育树，和 ITS 的聚类结果一样，桑属单独聚为一类，从分子水平证明桑属为单系。蒙桑、鬼桑（蒙桑的变种）、剑持、丽江山桑和插桑聚为一类，它们在形态上都具有长花柱，这与利用 ISSR 标记和 ITS 序列研究结果有一定相同的趋势。广东桑的伦敦 40 和钦二聚为一类，这与本文利用 ISSR 的研究一致。桑莲为白桑，但它单独聚为一类，其亲缘关系较远，本文利用 ISSR 标记也出现了相同情况，这可能是其为千年古桑，起源分化较远的缘故。其它桑种质总的又聚为一类，其中药桑单独聚为一类，华桑（雅安 3 号、保靖 5 号）、长穗桑（毕节 5 号、贵 14 和黔鄂桑 1 号）、长果桑（德江 10 号、云南水桑）、白桑、鲁桑、白脉桑、瑞穗桑和暹罗桑聚为一类，说明它们亲缘关系较近。

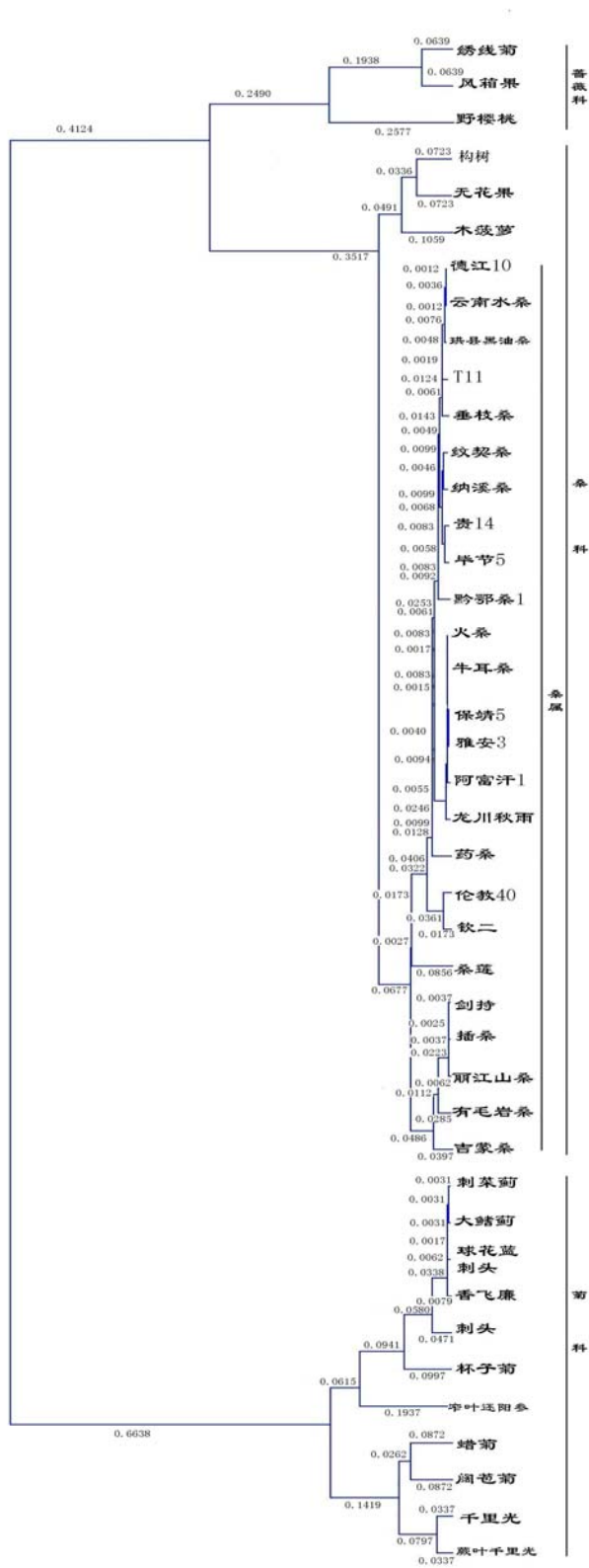


图 10.2 利用 trnL-trnF 序列用 GENETYX 软件构建的桑属系统进化树

Fig. 10.2 Evolutionary trees obtained from the analysis of trnL-trnF data of genus *Morus* using GENETYX software

注：分支上的数字代表遗传距离。Note: The numbers on the branch represented genetic distance.

第十一章 结论与讨论

我国具有丰富的桑树遗传资源,利用 ISSR 和 SSR 分子标记,开展了桑树种质资源、育成桑树品种以及不同生态类型桑树群体的遗传多样性研究,分析了桑树无性系以及变异株系的遗传变异,同时利用 ITS 和 trnL-trnF 间隔区序列探讨了桑属植物的分子系统学,获得以下结果。

11.1 桑树栽培种和野生种间遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析

11.1.1 桑树微卫星位点的分离与鉴定

建立了桑树微卫星富集程序,成功构建了一个桑树(CA)₁₅微卫星富集文库。随机选取 96 个阳性克隆进行测序,24 个克隆含有微卫星序列,阳性克隆率为 25%。共设计出 20 对引物,经微卫星多态性检测,筛选出了 10 对具有多态的 SSR 引物,每个位点等位基因数变异范围为 3~8,平均 4.9。平均观察杂合度为 0.4296,平均多态性信息含量(PIC 值)为 0.4483,表明分离的微卫星位点变异程度高。

11.1.2 桑树栽培种和野生种 SSR 和 ISSR 多态性分析

从 22 个 ISSR 引物中筛选出了 15 个具有多态性、扩增产物清晰、重复性好的 ISSR 引物用于桑树种质资源遗传多样性检测。15 个引物共扩增出 138 条带,126 条带具有多态性,占 91.3%,平均每个位点观察等位基因数为 1.93。ISSR 的 PIC 值平均为 0.2006,这表明桑树品系间 ISSR 变异大,多态性高。栽培种内,15 个 ISSR 引物共扩增出 104 条带,84 条(80.7%)为多态性条带,而在野生种内同样扩增出 104 条带,但 87 条(83.7%)表现出多态性。平均 Nei's gene diversity 和 Shannon's 信息指数分别为 0.1929, 0.3137。栽培种内,平均 Nei's gene diversity、Shannon's 信息指数分别为 0.1660, 0.2617, 而野生种内,分别为 0.1993, 0.3027。结果表明在野生种内有较高遗传多样性。

共 15 个 SSR 引物用于桑树多态性分析,平均每个位点等位基因数为 5.13,表明微卫星位点变异程度高。平均 PIC 值为 0.4811。栽培种内,每个位点观察等位基因数变异范围为 3~5,平均观察杂合度、Shannon's 信息指数(*I*)和 PIC 值分别为 0.4912、0.7399 和 0.3300,而野生种内,观察等位基因数变异范围为 3~7,平均观察杂合度、Shannon's 信息指数和 PIC 值分别为 0.5917、1.0518 和 0.5178。SSRs 结果同样表明在野生种内有较高多态性。

11.1.3 桑树栽培种和野生种遗传相似系数和聚类分析

供试材料间平均遗传相似系数 ISSR 为 0.7677, SSR 为 0.6131,说明供试桑树材料间存在较高遗传变异。鲁桑、白桑及白桑变种间平均遗传相似系数高,有相近的遗传背景,亲缘关系较近。在传统桑树分类史中,曾将鲁桑和白桑作为同一桑种以及鲁桑为白桑的变种,说明它们从形态学上也较相近,本试验从分子上验证了它们间的亲缘关系。野生种与栽培种相比,平均遗传相似系数在 0.8300 (ISSR) 以下,说明它们间存在遗传差异,亲缘关系远。

ISSR 和 SSR 标记的 UPGMA 聚类图虽有差异,但两种标记的遗传相似系数矩阵相关性为极显著正相关($r=0.87$ and $P < 0.01$),说明两者聚类图吻合性好。结果显示野生种和栽培种亲缘关系较远。主成分分析(PCA)也支持 UPGMA 聚类结果。蚕业在中国人类文明中起了重要作用,

在这个漫长的历史进程中,栽培种通过了长期人工、自然杂交和选育,使栽培种内遗传多样性狭窄,而野生桑种几乎未开发利用,因此野生桑种具有高的遗传多样性可能与它们的地理隔离有关。根据研究结果对现有桑种质保护策略进行了思考,必须建立一套长期、有效桑种质资源保护机制。

11.2 我国桑树选育品种 ISSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析

利用ISSR标记构建了24个选育桑品种的指纹图谱,建立了3种独立的方法(特殊的标记;特异的谱带类型;不同引物提供的谱带类型组合)来有效地鉴别桑树选育品种。17个ISSR引物共扩增出80条带,40条条带具有多态性,占50.0%。桑树品种间平均遗传相似系数、Nei's gene diversity 和 Shannon's 信息指数分别为0.8731, 0.1210和0.1942,说明我国桑树育成品种的遗传多样性较低,亲缘关系较近,遗传基础较狭窄,这主要是桑树育成品种不少具有共同的祖先亲本所致,今后育种策略必须拓宽我国桑树品种遗传基础。根据遗传相似系数按UPGMA法进行了聚类分析,结果显示来源于四川的白桑品种北桑1号和实钻116与其它桑品种间的遗传分化最显著,聚为I类;其它的桑品种聚为II类。从总的聚类结果来看,基本上含有共同亲本或互为亲子关系的,具有相同血缘的桑品种聚为一类。

11.3 我国不同生态型桑树品种遗传多样性的 ISSR 分析

利用 ISSR 标记分析了我国 8 个不同生态类型共 66 个桑树地方品种的遗传多样性。12 个 ISSR 引物扩增条带数为 83, 50 条为多态性条带,多态性比例为 60.24%, 平均每个位点观察等位基因数为 1.6145, ISSR 的 PIC 值平均为 0.1469。群体内,不同群体扩增条带数和多态性也有差异,总扩增条带变异范围在 57~72 之间,多态性格鲁桑类型最高,比例为 54.17%,摘桑类型最低多态性比例仅为 7.01%,平均 PIC 值和每个位点观察等位基因数也反映了相同的结果。

8 个桑树生态群体中,总杂合度(H_T)为 0.1600,群体内杂合度(H_s)为 0.0851,群体间多样性为(D_{st}) 0.0749,群体间的遗传分化系数(G_{st}) 0.5678,表明在总杂合度中群体间和群体内的变异贡献率分别为 56.78%和 43.28%,群体间的变异大于群体内的变异。整个群体平均 Nei's gene diversity (h) 是 0.1616, Shannon's 信息指数为 (I) 是 0.2520。群体内,格鲁桑类型 Nei's gene diversity (h) 最高,为 0.1432, Shannon's 信息指数为 (I) 同样表现为最大,达 0.2106,但都小于整个群体的多样性指数。平均 Nei's 遗传相似系数是 0.8456,基因流(gene flow, Nm) 为 0.4683。8 个生态型群体间的遗传相似系数变异范围为 0.8441~0.9640,格鲁桑类型群体和辽桑类型群体间最高,嘉定桑类型群体和白桑类型群体间最低。

UPGMA法聚类分析表明,每个生态型的大部分地方桑树品种聚为一类,例如摘桑类型、广东桑类型(11号、18号个体除外)、嘉定桑类型(37号除外)。湖桑类型聚为一类,但在该聚类中也包含广东桑的11号、18号个体,以及格鲁桑类型的53号个体。格鲁桑类型、白桑类型、鲁桑类型、辽桑类型个体虽然没有完全聚在一起,但它们中的个体还是每每聚在一起。聚类结果表明桑树地方品种与生态类型有一定相关性。根据研究结果提出必须对不同的地方品种进行抢救性收集,制定有效、长期的保护策略。

11.4 桑树无性系及变异株系遗传变异的 ISSR 分析

11.4.1 桑树二倍体及人工诱导同源四倍体遗传变异的 ISSR 分析

利用 ISSR 分子标记技术, 研究 6 份二倍体桑树品种和经秋水仙素化学诱变得到的同源四倍体间的 DNA 遗传差异。农桑 8 号、湖桑 197、育 2 号的二倍体及其人工诱导同源四倍体间扩增条带完全一致, 无差异, 湖桑 32 号二倍体及其四倍体间 ISSR 多态性最高, 达到了 23.53%, 说明不同桑树材料经秋水仙素诱变后产生的遗传差异较大, 二倍体和人工诱导同源四倍体间的性状差异可能主要是由基因的累加效应造成的。

11.4.2 桑树无性系遗传变异的 ISSR 初步分析

利用 ISSR 初步分析了桑树无性繁殖系遗传变异, 在田间和组织培养无性系中都检测到 1 个变异, 变异率分别为 3.03% 和 2.89%, 材料间的多态性大大大于无性繁殖个体间的多态性。此结果说明桑树通过无性繁殖方法繁殖个体仅存在少量遗传变异, 大部分遗传性状稳定, 遗传变异率低, 能用于桑种质保存和扩大繁殖。

11.4.3 凤尾桑及其芽变品系间遗传变异的 ISSR 分析

从 8 个 ISSR 引物扩增结果来看, 3 个引物扩增产物在株系间无差异, 从变异株系扩增条带来看, 凤尾芽变变异最大, 和母株凤尾桑相比, 有 10 条差异带, 凤变 1 号、2 号、3 号差异条带分别为 6 条, 5 条和 5 条。从变异株系间来看, 凤尾芽变和其它株系间仍为最显著, 为 6 条, 凤变 1 号、2 号、3 号间仅有 1 条差异带, 凤变 2 号、3 号间未检测到差异, 通过单独引物和引物组合可以鉴定母株及其变异株系。本结果从分子水平证明了芽变株系的遗传结构差异。

11.5 基于 nrDNA 的 ITS 和 cpDNA 的 trnL-trnF 间隔区序列研究桑属(荨麻目: 桑科) 系统发育

11.5.1 基于 nrDNA 的 ITS 序列研究桑属(荨麻目: 桑科) 系统发育

用 PCR 产物直接测序法对 9 个种 3 个变种共 13 份桑种质和构属构树的 ITS 序列进行了测定。结果表明: 桑属 ITS1 长度平均约为 189 bp; 桑属 5.8S rDNA 为 152 bp; ITS2 长度平均为 212 bp; 桑属 ITS 序列 G+C 含量大约为 60% 左右, 而且 ITS1 和 ITS2 基本一致, 反映出协同进化现象。用 Clustal X 分析软件对测定 ITS 序列进行了桑属的同源性分析, 结果显示桑属和桑科构属间同源性在 60%~75% 间, 而桑属内材料间遗传变异范围为 90%~100%, 平均为 96.2%, 说明桑属材料间亲源关系较近。桑属内 ITS-2 比 ITS-1 具有较高的序列多样性。构建了桑属 ITS 序列的系统发育树, 桑属所有材料聚为一类, 并探讨了参试桑种质的亲源关系。

11.5.2 基于 cpDNA 的 trnL-trnF 间隔区序列研究桑属(荨麻目: 桑科) 系统发育

用 PCR 产物直接测序法对 12 个种 4 个变种共 25 份桑种质和构属构树的 trnL-trnF 基因间隔区序列进行了测定, 桑属内该序列长度变异范围为 360bp~367bp, 平均核苷酸组成为 0.29935(A) 0.37448(T) 0.18379(C) 0.14238(G), 平均 A+T 含量为 0.6738, 说明该序列富含 A/T。通过桑属内 ITS 和 trnL-trnF 基因间隔区序列两者序列比较分析发现 ITS 序列变异大于 trnL-trnF 基因间隔区序列, 说明 ITS 序列进化速率大。由 trnL-trnF 基因间隔区序列构建的系统发育树, 桑科中的无花果属、构属、木菠萝属和桑属单独聚为一类, 蔷薇科的风箱果、野樱桃和绣线菊聚为一类, 菊科的所有材料聚为一类。桑属所有材料聚为一类, 证明桑属为单系, 并探讨了桑属的亲缘关系。

参考文献

1. 白胜等.桑属植物形态系统数值分类研究.蚕业科学, 1998,24 (2): 1~2
2. 陈道明等.桑树主要品种的同工酶研究初报.蚕业科学, 1980, 6 (2): 4~9
3. 丁农,钟佰雄,张金卫等.利用 AFLP 指纹技术鉴定桑树品种.农业生物技术学报,2005,13(1):119~120
4. 冯丽春, 杨光伟, 余茂德等.利用 RAPD 对桑属植物种间亲缘关系的研究.中国农业科学, 1997, 30 (1): 52~56
5. 冯丽春等.桑树栽培种的随机扩增 DNA 多态性 (RAPD) 研究.蚕业科学, 1996, 22 (3): 135~140
6. 冯宗云等.DNA 分子标记与作物数量性状改良.西南农学报, 1998, 11 (3): 67~71
7. 葛颂,Baschaal,洪德元. 用核糖体DNA的ITS序列探讨裂叶沙参的系统位置—兼论ITS片段在沙参属系统学研究中的价值. 植物分类学报,1997,35(5):385~395
8. 葛颂. 植物进化生物学.武汉: 武汉大学出版社, 1994,153~194
9. 郭洪荣.新疆桑品种资源过氧化物酶同工酶研究.新疆蚕业, 1994 (合刊): 25~28
10. 何大彦.过氧化物酶识别桑品种同种异名的研究.北京: 国家自然科学基金资助科研项目论文集, 1990
11. 何大彦.桑属几个种及品种过氧化物酶同工酶的研究.蚕业科学, 1990, 16 (3): 129~134
13. 何大彦.桑属几个种及品种细胞色素氧化酶同工酶的研究.蚕业科学, 1988, 14 (1): 1~5
14. 贾继增.分子标记种质资源鉴定和分子标记育种.中国农业科学, 1996, 24 (4): 1~10
15. 菅贵史.利用 RAPD 分析桑品种的评价.日蚕 65 次讲要, 1995 (1): 6~8
16. 焦锋等.桑树变异株系基因组 DNA 扩增多态性 (RAPD) 研究. 蚕业科学, 2001, 27 (3): 165~169
17. 勒永年.桑树同工酶研究进展.蚕桑通报, 1995, 3: 5~8
18. 林寿康主编.实用桑树育种学.成都: 四川科技出版社, 1989
19. 柳松译. 国外畜牧科技,1996,23(5):24
20. 楼程富等.RAPD 技术及其在桑树上的应用.蚕桑通报, 1995, 3: 9~10
21. 楼程富等.桑树随机扩增 DNA 多态性研究.浙江农业大学学报, 1996, 22 (2): 179~151
22. 楼程富等.引物混用对桑树 RAPD 扩增条带的影响. 蚕业科学, 2003, 29 (1): 14~17
23. 南泽吉三郎著.栽桑学.沉增学等译.南京: 东南大学出版社, 1998
24. 聂龙,施立明,和向东.独龙牛遗传多样性及其种群遗传结构的等位酶分析.遗传学报,1995,22(3):185~191
25. 潘一乐. 桑种质资源和桑树育种的研究现状与展望. 蚕业科学, 2000, 26(增刊): 1~8
26. 潘一乐.桑树良种化与蚕业发展.蚕业科学, 2003, 1: 1~6
27. 钱惠荣等.DNA 标记与分子育种.生物工程进展, 1998, 18 (3): 12~18
28. 邱芳等.遗传多样性的分子检测.生物多样性, 1998, 6 (2): 143~150
29. 史全良, 赵卫国.桑树 ITS 序列测定及特点的初步分析.蚕业科学, 2001 (2): 140~141
30. 宋葆华, 李法曾.TmK基因 5' 端内含子序列在榆科 (广义) 系统发育研究中的应用.植物分类学报, 40(2):125~132
31. 町井.桑叶全 DNA 的分离.日蚕杂, 1989, 58 (4): 349~183
32. 汪小全, 洪德元. 植物分子系统学近五年的研究进展概况.植物分类学报, 1997, 35(5):465~480
33. 汪小全, 邹喻苹等.RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题. 植物学报, 1996, 38 (12): 954~962
34. 王建波, 张文驹, 陈家宽. 核 rDNA 的 ITS 序列在被子植物系统与进化研究中的应用.植物分类学报, 1999, 37(4):407~416
35. 王中仁.植物等位酶分析.北京: 科学出版社,1996

36. 王卓伟.桑树多倍体育种材料遗传背景的 AFLP 分析.[硕士论文], 四川重庆: 西南农业大学, 2001
37. 王卓伟等.桑树多倍体育种材料遗传背景的 AFLP 分析.蚕业科学, 2001, 27(3):170~176
38. 向仲怀等.采用随机扩增多态性DNA 技术 (RAPD) 在桑属植物系统学研究的应用初报.蚕业科学, 1995, 21 (4): 203~208
39. 杨光伟. 中国桑属植物遗传结构及系统发育分析. [博士论文].四川重庆: 西南农业大学, 2003
40. 杨光伟.桑树种群遗传结构变异分析. 蚕业科学, 2003, 29 (4): 323~329
41. 杨今后,杨新华. 桑树多倍体及其育种研究进展. 蚕业科学, 1992, 18(3):195~201
42. 俞志华.分子标记及其在植物遗传育种中的应用.生物学通信, 1999, 34 (10): 10~13
43. 张秀实等. 中国植物志-23 卷第一分册.北京:科学出版社,1998.
44. 赵卫国, 潘一乐. 从桑树营养组织中提取高纯度 DNA 的方法.江苏蚕业, 2001, (1): 19~20
45. 赵卫国, 潘一乐等.桑属种质资源的 RAPD 研究.蚕业科学, 2000 (4): 1~8
46. 赵卫国, 张志芳, 潘一乐等.桑属 TmL-tmF 基因间隔区序列的特点及分析. 蚕业科学, 2002, 28 (2): 1~4
47. 赵卫国, 赵巧林, 张志芳等.桑树叶绿体基因组 DNA 的提取及部分序列分析.蚕业科学, 2001, 27 (4): 303~306
48. 赵学峰, 蒋建平, 张裕清等.桑叶中 DNA 的含量及桑品种间的差异.蚕业科学, 1984, 10 (3): 182~183
49. 中国农业科学院蚕业研究所主编. 中国桑树品种志. 北京: 农业出版社, 1993
50. 周涵韬,郑文竹,周以仁,夏涛.不同作物间共用SSR引物的初步研究. 厦门大学学报,2002,41(1): 1~5
51. 朱祥瑞.桑叶超氧化歧化酶的研究.蚕业科学, 1995, 21 (4): 214~217
52. 邹喻萍, 葛颂编者.系统与进化植物学中的分子标记.北京:科学出版社,2001
53. Aggarwal, Ramesh K., Udaykumar, D., Hender, P. S., Sarkar, A. & Singh, Lalj. Isolation and characterization of six novel microsatellite markers for mulberry (*Morus indica*). *Molecular Ecology Notes*,2004
54. Airyshaw, H.K..Willis-Dictionary of the flowering plants and ferns.1973,761
55. Akkaya MS,et al.. Length polymorphism of simple sequence repeat DNA in soybean. *Genetics*, 1992,132:1131~1139
56. Akopyanz N, Bukanov N, Westblom TU, Berg DE.. PCR-based RFLP analysis of DNA sequence diversity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Nucleic Acids Research*,1992, 20: 6221~6225
57. Ali, S., C. R. Muller, and J. T. Epplen. DNA fingerprinting by oligonucleotide probes specific for simple repeats. *Hum. Genet.*, 1986,74: 239~243
58. ANGELA KARP, OLE SEBERG and MARCELLO BUIATTI. Molecular Techniques in the Assessment of Botanical Diversity .*Annals of Botany*, 1996.78: 143~149
59. Awasthi A K, Nagaraja G M, Naik G V ,Sriramana , Thangavelu K, Nagaraju J. Genetic diversity and relationships in mulberry (genus *Morus*) as revealed by RAPD and ISSR marker assays. *BMC Genetics* 2004, 5:1~18
60. Brandis, D..India trees,1906,612~613
61. Brown Pand Tanksley S D. Characterization and genetic mapping of simple repeat sequences in the tomato genome.*Mol.Gen.Genet.*,1996,250:39~49
62. Brown, JF, and AL Archibald. A porcine polymorphic microsatellite locus (S0031). *Anim. Genet.*,1993, 24:70
63. Brunel P A. Microsatellite marker in *Helianthus annuus* L. *Plant Biology*, 1994, 24: 397~400
64. Bureau, E.D.. Moraceae in A.P de Candolle.*Prodromus*.1873,17:211~279
65. Butcher, PA, Decroocq, S, Gray, Y, & Moran, GF. Development, inheritance and cross-species amplification of microsatellite markers from *Acacia mangium*. *Theor Appl Genet*, 2000, 101:1282~1290
66. Caetano-Anolles G.Biotechniques,1996,20:1044~1056

67. Caetano-Anolles G, Bassam BJ, Gresshoå PM.. DNA ampliÆcation finngerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *BioTechnology*, 1991, 9: 553~557
68. Chaix, G. and Chantal I.. Microsatellite primer amplification by multiplexing:a first application to Eucalyptus grands. *Plant molecular biology reporter* ,2002,20:67~71
69. Chambers CA, Schell MP, Skinner DM..Cell J., 1978, 13(1):97~110
70. Cipriani, G., Fiori, A., Moroldo, M., De Pauli, P., Messina, R. and Testolin, R. SCREENING CHLOROPLAST, MITOCHONDRIAL, AND NUCLEAR DNA SEQUENCES SUITABLE FOR TAXONOMIC STUDIES IN ACTINIDIACEAE. *Acta Hort. (ISHS)*, 2003,610:337~342
71. Condit, R. and Hubbell, S. P.. Abundance and DNA sequence of two-base repeat regions in tropical tree genomes. *Genome*,1991,34,66~71
72. Cooper G, Amos W, Bellamy R *et al.* An empirical exploration of the genetic distance for 213 human microsatellite markers. *American Journal of Human Genetics*, 1999,65, 1125~1133
73. Cooper S, Bull C M, Gardner M G. Characterization of microsatellite loci from the socially monogamous lizard *Tiliqua rugosa* using a PCR-based isolation technique. *Molecular Ecology*, 1997, 6:793~795
74. Das ,B.C..Mulberry taxonomy,cytogenetics and breeding.Presented in National Seminar on Silk Res. and Development. Bangalore, 1983:1~9
75. Demesure B, Sodzi N, Petit RJ. A set of universal primers for amplification of polymorphic non-coding regions of mitochondrial and chloroplast DNA in plants. *Molecular Ecology*,1995, 4: 129~131
76. Depeiges A, et al. Identification of the most repeated motifs in Arabidopsisthaliana Microsatelliteloci. *Theor.Appl.Genet.*, 1995,91:160~168
77. Doyle J J and Doyle J L A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytoch Bull.*,1987,19:11~15
78. Doyle J.J and Gaut B.S..Evolution of genes and taxa:a primer. *Plant Molecular Biology*,2000,42: 1~23
79. Edwards KJ, Barker JHA, Daly A, Jones C, Karp A. Microsatellite libraries enriched for several microsatellite sequences in plants. *Biotechniques*, 1996,20: 758
80. Ellstrand N.C.. Gene flow by pollen—implications for plant conservation genetics. *Oikos*,1992, 63: 77~86
81. ELLEGREN, H., S. MOORE, N. ROBINSON, K. BYRNE, and W. WARD.. Microsatellite evolution-a reciprocal study of repeat lengths at homologous loci in cattle and sheep. *Mol. Biol. Evol. et al.*, 1997,14:854~860
82. Erdogan Hakkı1, Christo Peev2, Luchezar Karagyzov. ISOLATION OF WHEAT MICROSATELLITE DNA FRAGMENTS BY HYBRIDIZATION SELECTION, *BULG. J. PLANT PHYSIOL.*, 2002, 28:3~10
83. Esha B. and Shirish A. R. Molecular distinction amongst varieties of Mulberry using RAPD and DAMD profiles. *BMC Plant Biology* ,2001,1:3
84. ESSELMAN, E. J., JIANQIANG, L., CRAWFORD, D. J., WINDUS, J. L. and WOLFE, A. D. Clonal diversity in the rare *Calamagrostis porteri* ssp. *insperata* (Poaceae): comparative results for allozymes and random amplified polymorphic DNA (RAPD) and intersimple sequence repeat (ISSR) markers. *Molecular Ecolog*,1999, 8(3),443~451
85. Estoup A., Garnery L., Solignac M.. Microsatellite Variation in Honey Bee (*Apis Mellifera* L.) Populations: Hierarchical Genetic Structure and Test of the Infinite Allele and Stepwise Mutation Models. *Genetics*, 1995,140:679~695
86. Fernandez I A, Aguilar J F, Panero J L. and Feliner G N. A Phylogenetic Analysis of *Doronicum* (Asteraceae,

- Senecioneae) based on morphological, nuclear ribosomal (ITS) and Chloroplast (*trnL-F*) Evidence. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 2001, 20(1): 41~64
87. Fisher P J, Gardner R C, and Richardson T E. Single locus microsatellites isolated using 5' anchored PCR. *Nucleic Acids Res.* 1996, 24 (21): 4369~4371
88. Fréville H, Colas B, Ronfort J, Riba M, Olivieri I. Predicting endemism from population structure of a widespread species: case study in *Centaurea maculosa* Lam. (Asteraceae). *Conservation Biology*, 1998, 12, 1269~1278
89. Fujii, N., K. Ueda, Y. Watano, and Shimizu T.. Intraspecific sequence variation of chloroplast DNA in *Pedicularis chamissonis* Steven (Scrophulariaceae) and geographic structuring of Japanese "alpine" plants. *Journal of Plant Research*, 1997, 110: 195~207
90. Frankham R., Ballou J.D., Briscoe D.A.. *Introduction to Conservation genetics*, Cambridge University Press, Cambridge, 2002
91. Gharzeyazie B.. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 218~227
92. GIELLY L., and TABERLET P.. The use of chloroplast DNA to resolve plant phylogenies: noncoding versus rbcL sequences. *Molecular Biological Evolution*, 1994, 11: 769~777
93. Giovanni M.. Sugarcane microsatellites for the assessment of genetic diversity in sugarcane germplasm. *Plant Science*, 2003, 165(1): 181~189
94. Goldstein, D. B., Linares, A. R., Cavalli-Sforza, L. L., & Feldman, M. W.. *Genetics*, 1995, 139, 463~471
95. González Gerardo, Silvia Alemán and Diógenes Infante. Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science*, 2003, 165(3): 595~601
96. Goodman, M. Man place in the phylogeny of the primates as reflected in serum protein[A]. In: Washburn, S.L. (ed). *Classification and Human Evolution*[C]. Chicago: Aldine Press, 1963. 204~233
97. Gower, J.C. Some distance properties of latent root and vector methods used in multivariate analysis. *Biometrika*, 1966, 53: 325~338
98. Groenen MA, Ruyter D, Verstege EJ, de Vries M, van der Poel JJ. *Anim Genet.*, 1995, 26(2): 115~118
99. Gupta PK, et al. Microsatellite in plants: a new class of molecular marker. *Current Science*, 1996, 70: 45~54
100. Gupta M. *Theor. Appl. Genet*, 1994, 99: 8~1006
101. Hamrick JL. Genetic diversity and conservation in tropical forest. In: *Proceeding of the ASEAN-Canada Symposium on Genetic Conservation and Production of Tropical Tree Seed* (eds Drysdale RM, John SET, Yapa AC), 1993: 1~9
102. ASEAN-Canada Forest Tree Center, Saraburi, Thailand.
103. Hayashi K.. PCR-SSCP: a method for detection of mutations *Genetic Analysis: Techniques and Applications*, 1992, 9: 73~79
104. Hayden, M.J. and Sharp, P.J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): a rapid technique for developing SSR markers. *Nucleic Acids Res.*, 2001, 29: 43
105. Hayden, M.J. and Sharp, P.J. Sequence tagged microsatellite profiling (STMP): improved isolation of DNA sequence flanking target SSRs. *Nucleic Acids Res.*, 2002, 30: 129
106. He GH, Meng RH, Newman M, Gao GQ, Pittman R.N. and Prakash C.S.. Microsatellites as DNA markers in cultivated peanut. *BMC Plant Biol.*, 2003, 3(1): 3~11
107. Hillis, DM, Dixon MT. Ribosomal DNA: molecular evolution and phylogenetic inference. *Quarterly Reviews in Biology*, 1991, 66: 411~453
108. Hirano H.. Thremmatological studies of protein variation in mulberry (in Japanese). *Bull. I mp. Sericult. Exp. Sta.* 1976, 28: 67~186

109. Hiroshi Tomimatsu and Masashi Ohara. Genetic diversity and local population structure of fragmented populations of *Trillium camschatcense* (Trilliaceae). *Biological Conservation*, 2003, 109(2): 249~258
110. Hooker, J.D.. *f1. Brit. India*. 1985, V: 491~493
111. Hotta, T.. *Kinugasa Sanpo*. 1930, 34: 13~21
112. Hoz, et al. Simple sequence repeat primers used in polymerase chain reaction amplifications to study genetic diversity in barley. *Genome*, 1996, 39: 112~117
113. Jarne, P. and Lagoda, P. J.. *Trends Ecol. Evol.*, 1996, 11, 424~429
114. Jeffreys, A.J., Royle, N.J., Wilson, V. and Wong, Z.. Spontaneous mutation rates to new length alleles at tandem-repetitive hypervariable loci in human DNA. *Nature*, 1988, 332, 278~281
115. Johnson L A, Soltis D E. Phylogenetic inference in saxifragaceae sensu stricto and Gilia using matK sequences. *Ann Missouri Bot Gard.*, 1995, 82: 149~175
116. JOHNSON L. A., and SOLTIS D. E.. matK DNA sequences and phylogenetic reconstruction in saxifragaceae s.s. *Systematic Botany*, 1994, 19: 143~156
117. Jones. A proposed breeding procedure for sweet potato. *Crop. Sci.*, 1965, 5: 191~192
118. Karagyozov L, Kalcheva ID, Chapman VM. Construction of random small-insert genomic libraries highly enriched for simple sequence repeats. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21, 3911~3912
119. Katsumata, G. Mulberry species in west java and their peculiarities. *J. Sericult. Sci. Japan*. 1971, 42(3): 213~223
120. Koidzumi, G. *Id.* 1921, 2: 1~45
121. Koidzumi, G. Taxonomical discussion on *Morus* plants. (in Japanese). *Bull. Imp. Sericult. Exp. Sta.* 1917, 3: 1~63
122. Kojima T, Nagaoka T. Genetic linkage map of ISSR and RAPD markers in Einkorn wheat in relation to that of RFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1998, 96(1): 37~45
123. Konieczny A, F M Ausubel. *Plant J.*, 1993, 4: 403~410
124. Lagercrantz U, H Ellegren and Andersson L. The abundance of various polymorphic microsatellite motifs differs between plants and vertebrates. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(5): 1111~1115
125. Ledebour, C.F. 1846~1951. *F1. Rossica sive enumeratio plantarum in Totius. Imperii Rossici* 3: 643~644. *Symptilus Libraria E. Schuscizer part, Stuttgartiae*. 1951
126. Levinson G and Gutman G A . High frequencies of short frameshifts in poly-CA/TG tandem repeats borne by bacteriophage M13 in *Escherichia coli* K-12. *Nucleic Acids Research*, 15(13): 5323~5338
127. Li Jin, Claudia Macaubas, Joachim Hallmayer. Mutation rate varies among alleles at a microsatellite locus: Phylogenetic evidence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1996, 24; 93 (26): 15285~15288
128. Linnaeus, C.. *Species plantarum*, 1753, 986
129. Litt M, Luty J A. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44, 397~401
130. Lou CF, Zhang YZ, Zhou JM: Polymorphisms of genomic DNA in parents and their resulting hybrids in mulberry *Morus*. *Sericologia*, 1998, 38: 437~445
131. Loudon. *Arboretum et Fruticetum Britannicum*. 1838, 3: 1348, f. 1223
132. Lowe A J. *Plant genetic resources News*, 1996, 107: 50~54
133. Lunt D H, Hutchinson W F, Carvalho G R. An efficient method for PCR-based identification of microsatellite

- arrays (PIMA). *Molecular Ecology*, 1999, 8: 893~894
134. Ma ZQ, Roder M, Sorrells ME. Frequencies and sequence characteristics of di-, tri-, and tetra-nucleotide microsatellites in wheat. *Genome*, 1996, 39: 123~130
135. Market CL, Moller F.. Multiple forms of enzymes: tissue, ontogenetic and species specific patterns. *PNAS, USA*, 1959, 45: 753~763
136. Maroof, M. A., G. P. Yang, R. M. Biyashev. Analysis of the barley and rice genomes by comparative RFLP linkage mapping. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 92: 541~551
137. McDonald, D.B., and Potts W.K.. 1997. Microsatellite DNA as a genetic marker at several scales. pp. 29~49 *In* Avian Molecular Evolution and Systematics (D. Mindell, ed.). Academic Press, New York
138. Moore SS, Sargeant LL, King TJ, Mattick JS, Georges M. and Hetzel DJS. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 1991, 10: 654~660
139. Morchen M, et al. Abundance and length polymorphism of Microsatellite repeats in Beta Vulgaris L. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 92: 326~333
140. Moretti, G. Presented in National Seminar on Silk Res. And Development. Bangalore, 1942, 10
141. Morgan, D.R., Soltis, D.E. and Robertson, K.R. Systematic and Evolutionary Implications of rbcL Sequence Variation in Rosaceae. *American Journal of Botany*, 1994, 81
142. Morgante M and Olivieri A. M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant J.*, 1993, 3: 175~182
143. Morgante M, Jurman I, Shi L, Zhu T, Keim P, Rafalski JA. *Chromosome Res.* 1997, 5(6): 363~73
144. Mulcahy D.L., Gresti M, Vignani R and Pancaldi M.. The use of RAPD to fingerprint apple genotypes. *Sci Hort.*, 1993, 54: 89~96
145. Nagaoka T and Ogihara Y. Applicability of inter-simple sequence repeat polymorphisms in wheat for use as DNA markers in comparison to RFLP and RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 597~602
146. Neff M M.. *Plant J.*, 1998, 14: 387~392
147. Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70: 3321~3323
148. Nei M. and Li W.H.. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonuclease. *Proc. Natl. Acad Sci. USA*, 1979, 76: 5269~5273
149. Nei M. F-Statistics and analysis of gene diversity in subdivided populations. *Annals of Human Genetics*, 1977, 41, 225~233
150. Nei M. Genetic distance between populations. *American Naturalist*, 1972, 106, 283~292
151. Nei, M., Tajima F. and Tateno Y.. *J. Mol. Evol.*, 1983, 19: 153~170
152. Nickrent D L and Soltis D E. A comparison of angiosperm phylogenies from nuclear 18S rRNA and rbcL sequences. *Ann. Mo. Bot. Gard.*, 1995, 82(2): 208~234
153. Nickrent D L. From field to film: rapid sequencing methods for field-collected plant species. *Biotechniques*, 1995, 16(3): 470~475
154. Nybom H.. DNA fingerprinting in sports of Red Delicious apples. *HortScience*, 1990, 25: 1641~1642
155. Olmstead, R G. and Sweere J. A.. Combining data in phylogenetic systematics: an empirical approach using three molecular data sets in the Solanaceae. *Syst. Biol.*, 1994, 43: 467~481
156. Ostrander E A, Jong P M, Rine J, Duyk G. Construction of small~insert genomic DNA libraries highly enriched for microsatellite repeat sequences. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1992, 89: 3419~3423

157. Paetkau D. Microsatellites obtained using strand extension: An enrichment protocol. *Biotechniques*, 1999,26, 690~697
158. Panoad O.,etal. Frequency of Microsatellite sequences in rice (*OryzaSativa*). *Genome*,1995,38:1170~1176
159. Paran I,R W Michelmore. *Theor Appl Genet*, 1993,85:985~993
160. PENG NAN, SUHUA SHI, SHAOLIN PENG, CHUNJIE TIAN and YANG ZHONG. Genetic Diversity in *Primula obconica* (Primulaceae) from Central and South-west China as Revealed by ISSR Markers.*Annals of Botany*,2003,91: 329~333
161. Perera L, Russell J R, Provan J, et al. Use of microsatellite DNA markers to investigate the level of genetic diversity and population genetic structure of coconut (*Cocos nucifera L.*). *Genome*, 2004, 3: 15~21
162. Perrottet. *Memoires de la Societe Linneenne de Paris*. 1825,3:129
163. Pierre Taberlet, Ludovic Gielly, Guy Pautou *et al.* Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Bio.*,1991, 17:1105~1109
164. Powell W, Morgante M, Andre C, Hanafey M, Vogel J, Tingey S, Rafalski A. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breed* ,1996, 2:225~238
165. Powell W,etal.Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends in Plant Science*,1996,1:215~222
166. Power W,et al. Hypervariable Microsatellite provide a general source of polymorphi cDNA markers for chloroplast genome. *Current Biology*, 1995, 15: 1023~1029
167. Queller D.C, Strassman. Microsatellites and kinship. *Trends.Ecol.Evolut.*,8:285~288
168. Raffaele Testolin, Teresa Marrazzo, Guido Cipriani, et al. Microsatellite DNA in peach (*Prunus persica L. Batsch*) and its use in fingerprinting and testing the genetic origin of cultivars. *Genome*, 2000, 43: 512~520
169. Rahman MH, Dayanandan S, Rajora OP. Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*. *Genome*,2000, 43:293~297
170. Randall G Terry, Gregory K. Brown, Richard G. Olmstead.Examination of subfamilial phylogeny in Bromeliaceae using comparative sequencing of the plastid locus *ndhF*. *Amer. J. Bot.*, 1997, 84(5):664~670
171. Rassmann K, Schlötterer C, Tautz D. Isolation of simple-sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*,1991,12, 113~118
172. Reddy, K.D., Nagaraju, J., and Abraham, E.G. *Heredity*, 1999,83: In press.
173. Refseth UH, Fangan BM, Jakobsen KS. Hybridization capture of microsatellites directly from genomic DNA. *Electrophoresis*, 1997,18, 1519~1523
174. Richardson T, Cato S, Ramser J, Kahl G, Weising K. Hybridization of microsatellites to RAPD: a new source of polymorphic markers. *Nucleic Acids Research*,1995,23: 3798~3799
175. Roder MS, Plaschke J, Konig SU, Borner A, Sorrells ME, Tanksley SD, Ganai MW. Abundance, variability and chromosomal location of microsatellites in wheat. *Mol Gen Genet.*, 1995,246(3):327~33
176. Rongwen, J, Akkaya, MS, Bhagwat, AA, Lavi, U, & Cregan, PB. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. *Theor Appl Genet*, 1995,90:43~48.
177. Saitou, N. and Nei M.. *Mol. Biol. Evol.* ,1987, 4:406~425
178. Savolainen,V., Chase,M.W., Morton,C.M.. Phylogenetics of flowering plants based upon a combined analysis of plastid *atpB* and *rbcL* gene sequences (J) . *Syst. Biol.*, 2000, 49, 306~362
179. Sax, K.. The association of size difference with seed~coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris.*. *Genetics*,1923, 8:552~560

180. Schaal BA & Leverich WJ. Molecular variation in isolated plant populations. *Plant Species Biology*, 1996,11, 33~40
181. Avise JA..*Molecular Markers, Natural History and Evolution*. Sinauer, Sunderland, MA. 1994
182. Smith TB and Wayne RK..*Molecular Genetic Approaches in Conservation*. Oxford University Press, New York. 1996
183. Schlötterer C and Pemberton J. The use of microsatellites for genetic analysis of natural populations a critical review. R. Desalle (eds). *Molecular approaches to ecology of evolution*. 1998
184. Schlötterer C, Amos B, Tautz D. Conservation of polymorphic simple sequence loci in cetacean species. *Nature*, 1991,354: 63~65
185. Schlötterer C, Tautz D. Slippage synthesis of simple sequence DNA. *Nucleic Acids Research*, 1992, 20, 211~215
186. Schneecder,C.C.K. Mulberry taxonomy, cytogenetics and breeding. Presented in National Seminar on Silk Res. and Development.Bangalore,1916
187. Scribner KT, Pearce JM.. Microsatellites: evolutionary and methodological background and empirical applications at individual, population, and phylogenetic levels. In: *Molecular Methods in Ecology* (ed. Baker A, Blackwell Science Limited, London,2000, 235~271
188. Semerikov,V.L.and Lascoux,M. Genetic relationship among Eurasian and American Larix species based on allozymes.Heredity,1999,83:62~70
189. Senior ML,et al. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using CTprimer.Genome,1993,36:884~889
190. Seringe, N.C. Description culture et taille lours esceces et Leurs varieties.Paris,1985
191. Shah, A.M.. Anatomy of the in some species of Morus.In S.S.(Bir ed.)Recent research in plant science. New Delhi,1979,159~173
192. Shannon CE, Weaver W. The mathematical theory of communication. *Univ. of Illinois Press*, Urbana ,1949
193. Sharma A., Sharma R., Machii H. Assessment of genetic diversity in a Morus germplasm collection using fluorescence-based AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2000, 101:1049~1055
194. Slatkin M. Gene flow and the geographic structure of natural populations. *Science*,1987,236, 787~792
195. Smith J J,Scottcraig J S. Characterization of random amplified polymorphisms DNA products from xanthomonas capmestris and some comments on the use of RAPD products in phylogenetic analysis(J). *Mol phylogen Evol* ,1994,3:135~145
196. Soltis D E,Soltis P S eds. Isozyme in Plant Biology,Portland OR:Dioscorides Press,1989
197. Spencer V.M.. Examining rates and patterns of nucleotide substitution in plants. *Plant Molecular Biology*, 2000,42: 25~43
198. Sujathamma P,杨今后, 楼程富. 桑树不同倍数性形态学与组织学差异的比较研究. *蚕业科学*, 2002, 28 (1): 8~13
199. Szewe-Mc Fadelen Ak,et al. Identification of polymorphic, conserved simples equence repeats (SSRs) in cultivated Brassicaspecies. *Theor. Appl. Genet.*,1996,93:534~538
200. Sosa P.A..Genes, poblaciones y especies, in: J. Martín-Esquivel, J.M. Fernández-Palacios (Eds.), *Naturaleza de las Islas Canarias*, Santa Cruz de Tenerife, Canary Islands, Editorial, Turquesa:151~155,2001
201. TABERLET P,GIELLY L.,PAUTON G,BOUVET J.. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. *Plant Mol. Biol.*,1991,17:1105~1109
202. Takaiwa F, Oono K, Sugiura M. Nucleotide sequence of the 17s-25s spacer region from rice rDNA. *Pl Mole Bio*, 1985, 4: 355~364
203. Takhtajan,A.L. Outline of the classification of flowering plants.*Botanical Review*, 1980,46(3):225~359
204. Tan YD, Wan C, Zhu Y, Lu C, Xiang Z, Deng HW. *Genetics*, 2001, 157(3):1277~84
205. Tanksley S.D.. RFLP mapping in plant breeding. *BioTechnology*, 1989, 7:257~264

206. Tanksley, S. D., J. Miller, A. Paterson and R. Bernatzky. Molecular mapping of plant chromosomes. In J.P. Gustafson and R. Appels, eds., *Chromosome Structure and Function - Impact of New Concepts*, Proceedings of the 18th Stadler Genetics Symposium, Plenum Press, New York, 1988,157~173
207. Taramino G and Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome*, 1996, 39: 277~287
208. Tautz D, Schlötterer C. Simple sequences. *Current Opinion in Genetics and Development*, 1994, 4, 832~837
209. Tautz D. EXS. 1993; 67: 2~8. Review
211. Tautz, D., and Renz, M.. Simple sequences are ubiquitous repetitive components of eukaryotic genomes. *Nucleic Acid Res.*, 1984, 12: 4127~4138
212. Tautz, D.. Hypervariability of simple sequences as a general source of polymorphic DNA markers. *Nucleic Acids Research*, 1989, 17: 6463~6471
213. Thompson J. D., Gibson T. J., Plewniak F., Jeanmougin F., and Higgins D. G. The Clustal-X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25: 4876~4882
214. Tikader, A.. Analysis of divergence in mulberry species through different clustering techniques. *Sericologia*, 2001, 41(1): 109~116
215. Tsumura Y, Ohba K and Strauss SH. Diversity and inheritance of inter-simple sequence repeat polymorphisms in Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugi (*Cryptomeria japonica*). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 40~45
216. Vijayan K and Chatterjee SN. ISSR profiling of Indian cultivars of mulberry (*Morus* spp.) and its relevance to breeding programs. *Euphytica*, 2003, 131: 53~63
217. Vijayan K., Srivastava P.P., Awasthi A.K.. Analysis of phylogenetic relationship among five mulberry (*Morus*) species using molecular markers. *Genome*, 2004, 47(3): 439~448
218. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Rijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M.. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4407~4414
219. Weber J L, May P E. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 1989, 44, 388~396
220. Weber, J L: Informativeness of human (dC-dA)n (dG-dT)n polymorphism. *Genomics*, 1990, 7: 524~530
221. Weising J, Nybom H, Wolff K.. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press, Inc., Boca Raton, 1995
222. Weising K, et al. Characterization of Microsatellite from *Actinidia chinensis*. *Molecular Breeding*, 1996, 2: 117~131
223. Weising K.. *PCR Methods Appl.*, 1995, 4: 249~225
224. Welsh, J. and McClell, M.. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acid. Res.*, 1990, 18: 7213~7218
225. Wendel J F, Schnabel A S, Seelanan T. Bidirectional interlocus concerted evolution following allopolyploid speciation in cotton (*Gossypium*). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 280~284
226. Wendel J F. Genome evolution in polyploids. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(1): 225~249
227. White MB, Carvalho M, Derse D, O'Brien SJ, Dean M.. Detecting single base substitutions as heteroduplex polymorphisms. *Genomics*, 1992, 12: 301~306
228. Williams J G K, Kubelik A R, DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531~6535
229. Wintero, AK, Fredholm, M., and Thomsen. Variable (dG-dT) n -(dC-dA) n sequences in the porcine genome. *Genomics*, 1992, 12: 281~288

230. Wolfe AD and Liston A..Contributions of the polymerase chain reaction to plant systematics. In: *Molecular Systematics of Plants II: DNA Sequencing* (eds Soltis DE, Soltis PS, Doyle JJ), Kluwer, New York,1998: 43~86
231. Wu K, Jones R, Danneberger L, Scolnik PA. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning. *Nucleic Acids Research*,1994, 22:3257~3258
232. Wu KS,Tanksley SD. Abundance,Polymorphism and genetic mapping of Microsatellite in rice. *Mol.Gen.Genet.* , 1993, 241:225~235
233. Yokoyama,T..Synthesised Science of Sericulture. Japan ,1962, 39~46
234. Young A.G., Clarke G.M.. *Genetics, Demography and Viability of Fragmented Populations*, Cambridge, Cambridge University Press, 2000
235. Zabeau M.L...Abstract of Molecular Biology Symposium. The Netherlands,1994, 1844
236. Zane L., Bargelloni L. and Patarnello T.. Strategies for microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology*, 2002,11(1): 1~10
237. Zietkiewicz E, Rafalski A and Labuda D .. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*,1994,20:176~183
238. ZIMMER, E. A., E. H. ROALSON, L. E. SKOG, J. K. BOGGAN, AND A. IDNURM. Phylogenetic relationships in the Gesnerioideae (Gesneriaceae) based on nrDNA ITS and cpDNA *trnL-F* and *trnE-T* spacer region sequences. *American Journal of Botany*, 2002,89(2):296~311.
239. ZURAWSKI G., CIEGG, M. T., and BROWN, H. D.. The barley chloroplast DNA *atpBE*, *trnM2*, and *trnV1* loci. *Nucleic Acids Research*,1984,12: 2549~2559

附表 1 ISSR 引物在 27 个桑树品系中扩增条带统计结果

Table 1 The statistical result of amplified bands with ISSR primers among 27 mulberry accessions

品系 Accession	扩增条带统计结果 The statistical result of amplified band
育 2 号	10010000101001100101010100000010100110100101011110100100101010001001001001000110000000100101010110010000010001010001001100000101001100100001
桐乡青	1001110101001100101000100010001001101001010111100001001000110000100000100011000001000100010010010000010000010001001010000101001000101001
育 711	10010000101001100101010100000010100110100101001010000100101010001001001000001000110000010100101010110010000010000010001001100000101001000100001
牛耳桑	1000000100001100101010100001101001100001010110100001001001110000100100100011000000100010001000001000001000010001001010000100001000100001
新之濂	10011101010011101010101010001010011000010101101010010010001100001001001000100010010010000010000010001001010000100001000100010001
桑莲	100110010100111010101010100010100110001101011001101100101001010000000001000110010100000110010001010010010000010011001100000101001101101001
斑叶黑油桑	10011101000011101010101100001010011000010101111010110010100100001000001000110010001000100010110010000010001010011001100000101001100100001
纹裂桑	10001101000011001010101000001010011000101101111000110010001100001001001000100010000000110010010010000010001010001001100000101001100100001
垂枝桑	10011101010011011010101000001110011010001101111010010010100100000001001000110010000000100010000010000010000010011001100000101001000100001
伦敦 40 号	101101010100110010101010000010100110000111011010111100101101010000000001010110000010000100010000010100010000010001001100000111001000100001
沙 二	101000010000110010101011000010101110000001011010111100101101011000000001000110011000100100010000011000010000010001001100000101001000100001
昌农 1 号	10011101000011001010101000001010011010001101100010010110010100001001001000010010010000000010000010101001010000110001101100001
T12	101100010000110010101010000010010110000011011011100100100111001000001011000100010010100101000100011000010000010001001010000110010001100001
毕节 5 号	000010111010110010111001010110000100010101010000001110100101010000000010000010010000101000000110000000010000010001001100000111100100100000
吉蒙桑	000000011000110010101101000010100100000101010010000110100111001110000001000000100010100100001010000000010100010001001011100011001001101010
德江 0 号	0000000110111100101011000001101001000101010100000011110111110100001000100000101001010101010011000000011000001000100101000110001100100000
雅安 3 号	10001011100011001110100100011010010001010101000000110000000110100010000100000101001010010100100000000011000010001101100001011001100100000
药 桑	100000011000110010101000000010100100010101100000001100101101101000001001000000000010110000010000000001010000011001011100000011001010110101
云南水桑	110000010000110110101000000110100100010101010000001110011001000001010001000100010010010010100000000010000010001001110000110001100100001
黔东 1 号	11000011100111001010100000011010010001010101000000110110100100100000010100000000110101100000000110000010010100001101100000111001110100001
育 54 号	10011101010011001010101000011010011000010101100000010010011100001000001000110000010000110010010010000100000010001001100000101001000100001
育 82 号	10011101000011001010101000011010011010010101101010010010011100001001000000110000010000110010010010000100000010001001000000101001000101001
T11	101100010000110010101010000010010110000011011011100101100111001000001011100101011010100101010100010110010000010001001010000111010001100001
保靖 5 号	0000001110011100101010010000101001010101010000001000101101100000001001001000010010100110010010000000011000101001001010000011001101100000
剑 持	1000010110001100101010100001101001100001010110000001001001010100000010010001000000101001010010010000010000010011001110000101001001100001
丽江桑	1000000110001100101010100000111001100001010110100001111001110001101000100100010100110010000010000010000010011001010000101001101100011
湖桑 39 号	10011101000011001010101000111010011010010101101010010010011100001001001000110000000000110010000010000010001010001001010000101001000100001

附表 2 ISSR 引物在 24 个桑树品种中扩增条带统计结果

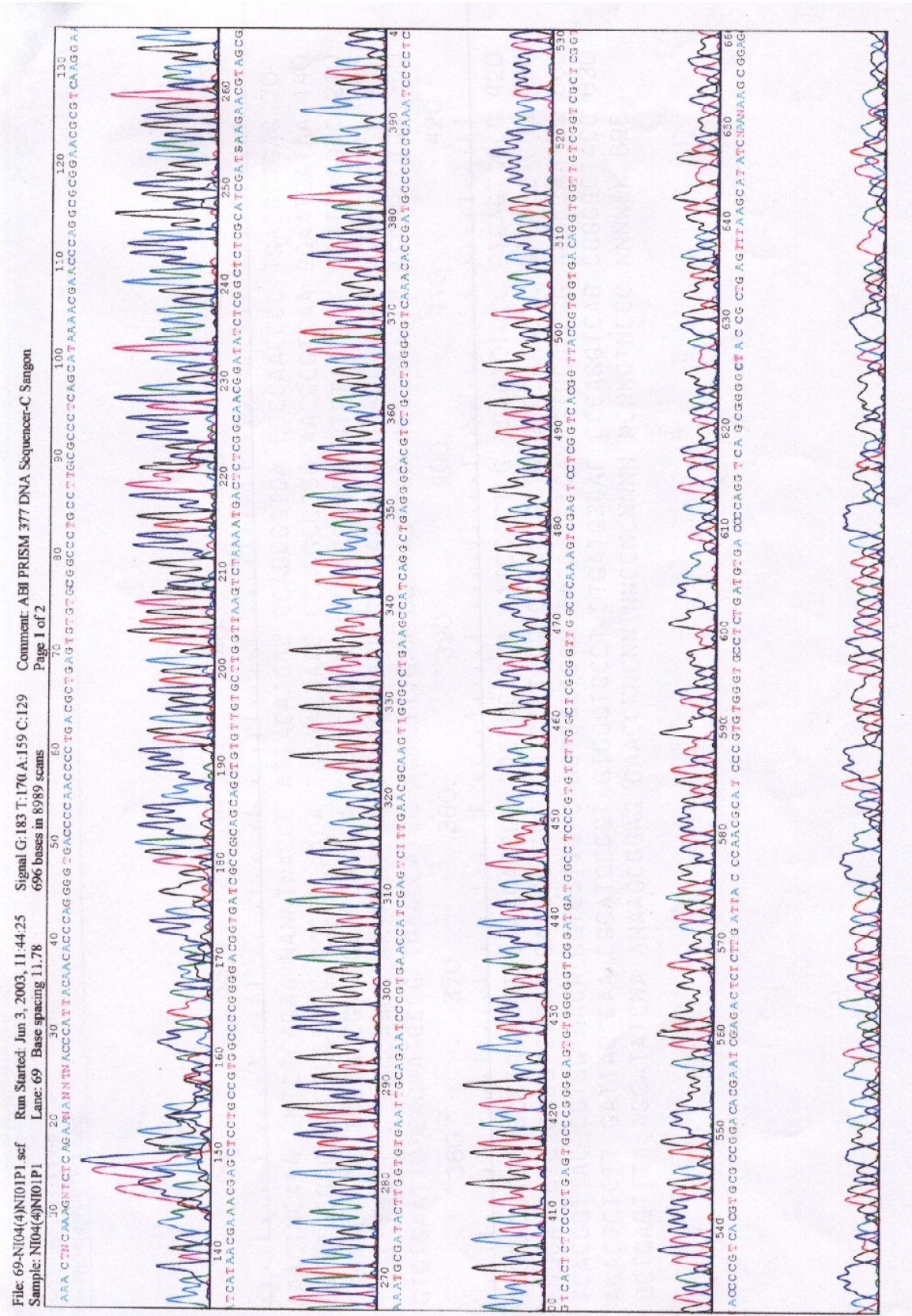
Table 2 The statistical result of amplified bands with ISSR primers among 24 mulberry varieties

品种 Variety	扩增条带统计结果 The statistical result of amplified band
陕桑 305	01111101011001011111110101110101101011110101110101001101011111110111111111101010
北桑一号	11111111011000111111110100110110101011110111111001011110011111111111110111110010
农桑 8 号	011111010110000111111101011101011010011101011101010111100111111111111101111101111
黄鲁选	101111010110010111111100101101011010011101011101011011010111111111111101111101010
吉湖 4 号	011111010110000111111101001111101010111101011101010011010111111111111101111101010
大中华	011111010110010111111101011101011010111101011101010011010111111111111101111101010
薪一圆	011111010110010111111101001101011010111101011101010011010111111111111101111110010
农桑 14 号	111011010011000111111111001101101010111101011101010111010111111111111101111101111
育 237 号	01111111111100001111111010011011011101111010111101011111010111111111111101111101010
选秋 1 号	011111111111010011111110101110100101011011101110101001101011111111111101111101010
7307	011111110110001111111100011101011010111100011100010011010111111111111101111101010
湖桑 32 号	111111110110010111111100111101011010111101011101010111010111111111111101111101010
湘 7920	011111010110000111111101001101101010111101011101010111010111111111111101111101011
蚕专 4 号	111011110110000111111100111101011010111101011101010111010111111111111101111101011
华明桑	011111111111001011111110101110110101001110101110101001101011111111111101111101010
7946	011111110010000111111100101111101010111101001101010011010111111111111101111110010
育 2 号	11111111111100001111111001011011011101111010111010111110101111111111111101111101010
实钻 11-6	111111110110000111111101001101101010111101111110110011010111111111111101111110010
选 792	011111010010001111111110101101101010111101011101010011010111111111111101111101010
育 711	111011110110000111111100101101101110011101011101010111010111111111111101111101010
育 151 号	111111110110000111111100111101101010111101011101011011010111111111111101111101010
红星五号	111111110110010111111111111101011011111101011101010111111011111111111101111101010
伦敦 40 号	111011110110000111111101101101101110111101011101010011010111111111111101111101010
7707	011011110110001111111101011101011010011100011101010011010111111111111101111101010

Table 2 The statistical result of amplified bands with ISSR primers among 66 mulberry varieties from different ecotypes

110

注:编号相对应表 5.1 Note:The numbers correspond to those listed on Table 5.1



附图 1 测定的桑树品种德江 10 号 ITS 核苷酸序列

Fig. 1 ITS nucleotide sequence of mulberry variety, Dejiang 10

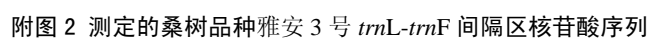


Fig.2 *trnL-trnF* intergenic spacer nucleotide sequence of mulberry variety, Yaan 3

致 谢

本研究内容由“十五”国家科技攻关项目 2001BA511B09-05、科技部基础性工作专项资金项目和国家科技基础条件平台工作项目 2003DKA3N013-09、江苏科技大学青年基金项目 Q2001X01 的部分资助，特此致谢。

本论文是在导师潘一乐研究员和黄勇平研究员的严格教诲和悉心指导下完成的。从论文的选题、设计、试验到论文写作，无不凝聚着导师大量的心血。两位导师严谨的治学态度、广博的学识、开创性的思维、忘我的工作作风以及对学科前沿敏锐的洞察力和孜孜以求的精神时刻激励着我，并将使我终生受益。在此，谨向我的两位恩师表示最诚挚的谢意。

感谢中国农业科学院蚕业研究所领导给予我继续深造学习的机会和帮助，感谢室主任程嘉翎副研究员、张林副研究员、刘利博士和方荣俊先生等各位老师和同仁们在论文工作中给予的帮助和支持。感谢师母杨奇霞女士在生活中给予的关心和照顾。

感谢中国农业科学院培养处、学位办、工作处的诸位老师在我学习期间给予的帮助和支持。

本论文的大部分工作是在中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所昆虫功能基因组学研究组完成的。该研究所的苗雪霞博士、周志华研究员、郭秋红女士和章秀英女士等在我实验研究工作和生活中给予了极大帮助和支持，在此深表谢意。我还要感谢给予我真诚帮助的、富有朝气和热情的学友们：李明辉博士、戴凌燕硕士、李木旺博士、黄健华博士、彭金英博士、贾世海博士、王四宝博士、张勇博士、相辉博士、刘文彬博士、周博硕士、何琳硕士等。这是一个团结互助、奋发向上、亲密无间的集体。无论身居何处，我都会想念这个温暖的集体。

感谢中国农业科学院蚕业研究所农业部家蚕生物技术重点实验室张志芳博士和易永竹副研究员等在论文完成中给予的无私帮助。感谢浙江大学动物科学院陆小平博士和潘刚博士提供的无私帮助。

感谢中国农业科学院蚕业研究所黄君霆研究员在百忙中审阅了初稿，并提出许多建设性的、有益的意见和建议。

本论文的完成离不开家庭的支撑，在三年的学习过程中，我的妻子王玉华女士承担了抚育孩子的所有重任，她的理解和支持是我精神上的慰藉，在此深表谢意，并将此文献给我的女儿赵梦迪，祝她学习进步。

最后再次感谢所有关心、帮助和指导过我的老师、同学、朋友和亲人们。

作者简历

赵卫国, 男, 汉族, 副研究员, 1966 年 10 月出生, 江苏省丹阳市人。1989 年 7 月毕业于南京农业大学土化系, 获农学学士学位, 同年分配至中国农业科学院蚕业研究所工作。1998 年 9 月考入中国农业科学院研究生院, 在职攻读特种经济动物饲养专业硕士学位, 2001 年 7 月毕业并获得农学硕士学位。2002 年 9 月考入中国农业科学院研究生院, 在职攻读特种经济动物饲养专业博士学位。自参加工作以来, 先后从事桑园土壤肥料, 桑树育种及种质资源和分子生物学等工作。在读期间参加了“十五”国家科技攻关项目(其中 1 项为副主持)、国家高技术研究发展计划(863 计划)项目、科技部基础性工作项目、国家科技基础条件平台工作项目、国家茧丝绸风险基金项目、江苏科技大学青年基金项目(2 项, 主持)等资助的科研项目十余项, 通过江苏省科技厅组织的科技成果鉴定 3 项, 获得中国农科院科技进步一等奖 1 项(排名第 10), 累计在学术期刊上发表论文 16 篇, 其中以第一作者在国外杂志发表 5 篇(SCI 收录 2 篇)、核心期刊 4 篇。

攻读博士期间发表论文及获得成果统计如下:

1. **Zhao Weiguo**, Miao Xuxia;Pan Yile,Huang Yongping. Isolation and characterization of microsatellite loci from the mulberry, *Morus* L. **Plant Science**, 2005, 168(2): 519~525 (SCI 收录)
2. **Zhao Weiguo**, Miao Xuxia;Pan Yile,Huang Yongping. A comparison of genetic variation among wild and cultivated *Morus* Species (Moraceae: *Morus*) as revealed by ISSR and SSR markers. **Biodiversity and Conversation**. (in press, SCI 收录)
3. **Zhao Weiguo**; Pan Yile; Zhang Zhifang;Jia Shihai; Miao Xuexia;Huang Yongping. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and *trnL*-F sequences. **African Journal of Biotechnology**, 2005, 4 (6): 563~569
4. **Zhao Weiguo**, Pan Yile. Genetic diversity of genus *Morus* revealed by RAPD markers in China. **International Journal of Agriculture and Biology**, 2004, 6: 950~954
5. **Zhao Weiguo**, Zhang Zhi-fang and Pan Yile. Molecular phylogeny of genus *Morus* based on cpDNA *trnL*-*trnF* sequence data. **Sericologia**, 2003, 43(3):359~364
6. **Zhao Weiguo**, Zhou Zhihua, Wang Sibao, Miao Xuexia, Pan Yile, Huang Yongping. Genetic diversity of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) analysis in China. **Canadian Journal of Plant Science**. 2005 (已修改寄回, SCI 收录)
7. 赵卫国, 苗雪霞, 黄勇平, 潘一乐. 桑树二倍体及其同源四倍体遗传差异的 ISSR 分析. 蚕业科学.2005 (接受)

8. 赵卫国, 潘一乐, 张志芳. 桑属植物 ITS 序列研究与系统发育分析. 蚕业科学, 2004, 30(1):11~14
9. 赵卫国, 彭金英, 苗雪霞, 黄勇平, 潘一乐. 一种桑树 RNA 的提取方法. 蚕业科学, 2004, 30(2):224
10. Zhao Weiguo, Miao Xuxia; Pan Yile, Huang Yongping. Genetic diversity between mulberry cultivated and wild species by ISSR and SSR markers analysis. 中国蚕学会第四届青年学术研讨会, 广州, 2004, 234~244
11. 赵卫国, 潘一乐, 黄勇平, 潘一乐. SSR 和 ISSR 分子标记及其在桑树遗传育种研究中的应用前景. 中国蚕学会第四届青年学术研讨会, 广州, 2004, 293~301
12. Zhao Weiguo, Y.L. Pan and Z.F. Zhang. Phylogeny of the genus *Morus* (Urticales: Moraceae) inferred from ITS and *trnL*-F sequences. International symposium on sericulture and biological resource sciences, Hangzhou, China, on November 17-20, 2004, 4~12
13. 赵卫国, 张志芳, 潘一乐. 桑属植物 ITS 序列研究与系统发育分析. 全国桑树种质资源研讨会, 江苏镇江, 2003, 26~30
14. 赵卫国, 潘一乐, 张林, 刘利等. “天达-2116”叶面肥在桑树上的应用初报. 蚕桑通报, 2002, 4:17~20
15. 赵卫国, 潘一乐, 史全良, 潘刚. DNA 分子系统学方法及其在桑属系统学中的应用. 蚕业科学, 2002, 1~4
16. 刘利, 张林, 赵卫国, 潘一乐. 桑树种质资源的国内外现状比较. 植物遗传资源科学, 2003, 5(3):285~289
17. 黄健华, 苗雪霞, 李木旺, 张勇, 赵卫国, 黄勇平. 家蚕基因特异性 CAPS 标记获得及其分子系统学应用. 遗传, 2004 (接受)
18. 优质高产桑品种育 71-1 的育成与推广, 2005 年获中国农业科学院科技进步一等奖, 排名第 10。
19. 高产桑品种金 10 的选育, 于 2003 年 6 月 16 日通过江苏省科学技术厅组织的科学技术成果鉴定, 鉴定证书编号为苏科字[2003]第 291 号, 排名第 6。
20. 高产优质桑品种凤尾芽变的选育, 于 2003 年 6 月通过了江苏省科学技术厅组织的科学技术成果鉴定, 鉴定证书编号为苏科字[2003]第 292 号, 排名第 7。
21. 优质丰产桑品种苏湖 16 号的选育, 于 2003 年 6 月 16 日通过江苏省科学技术厅组织的科学技术成果鉴定, 鉴定证书编号为苏科字[2003]第 293 号, 排名第 6。