

研究报告

A Letter

应用 RAPD 分析新疆六个核桃品种的遗传多样性

叶春秀[✉], 牛建新[✉], 吕建强[✉], 王林[✉], 李荣[✉], 张虎平[✉]

石河子大学农学院园艺系, 石河子, 832003

✉ 通讯作者: njx105@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第43篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0043

收稿日期: 2011年02月22日

接受日期: 2011年04月02日

发表日期: 2011年04月14日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

叶春秀等, 2011, 应用 RAPD 分析新疆六个核桃品种的遗传多样性, 分子植物育种 Vol.9 No.43 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0043)

摘要 本实验对新疆早实核桃资源进行遗传多样性研究。以新疆六个核桃品种母本及 F₁ 代叶片为材料, 提取总 DNA, 从已筛选出来的 55 个随机引物中筛选出 7 个扩增效果较好的引物, 采用 RAPD 分子标记技术进行遗传多样性的分析, 最终得到 81 条扩增条带, 其中多态性条带为 63 条, 占 77.8%, 平均每条引物扩增出 9 条。采用 SPSS 16.0 软件计算遗传距离, 并采用类平均法(Unweighted Pair-Group Method with Arithmetic Mean, UPGMA)进行聚类分析, 可将 6 个核桃品种的母本分为 3 类, F₁ 代材料可以明显地划分为距离较远的两类。分析结果显示在母本及 F₁ 代之间都存在着交叉聚类, 说明基因间存在着基因交流, 将为新疆早实核桃遗传多样性研究提供一定的研究基础。

关键词 核桃; 遗传多样性; RAPD; 分子标记

Analysis of the genetic diversity of six Walnut Seeding-Species in XinJiang by RAPD

Ye Chunxiu[✉], Niu Jianxin[✉], Lv Jianqiang[✉], Wang Lin[✉], Li Rong[✉], Zhang Huping[✉]

Department of Horticulture, Agricultural College of Shihezi University, Shihezi, 832003, P.R. China

✉ Corresponding author, yulijie1961@126.com; ✉ Authors

Abstract In order to research the diversity of six walnut seeding species which belonged to XinJiang, the leaves of 6 female and F₁ generations of proceious mature walnut were used to extract genomic DNA. 7 single primers were selected from 55 random primers which have been selected for RAPD. RAPD amplification was used for studies on genetic diversity and SPSS was used to calculate heredity distance, and the dendrogram was constructed by UPGMA base on heredity distance. There were 81 products were used to RAPD analysis and 63(77.8%) bands were polymorphic loci, every primer amplified 9 bands in average. The results showed that the female parents of six species were classified into three groups, and the generation of six groups could be classified into two groups, but the heredity distance was large. There were gene flow among different females and F₁ generations, the result will gave us some information for research diversity of walnut in future.

Keywords Walnut; Genetic diversity; RAPD; Molecular marks

研究背景

核桃(*Juglans regia* L.)是重要的坚果和木本油料树种, 原产于我国, 是古老的栽培植物之一, 研究和评价核桃资源的遗传多样性, 对进一步探讨核桃的起源和进化, 开展种质资源的考察搜集, 指导制定核桃资源遗传多样性保护措施、确定核桃资源遗传多样性保护范围和保护地点, 合理开发利用核桃种质资源, 以及指导核桃优异种质的创新和新品种选育均具有重要意义(李国和, 2007)。新疆作为世界核桃的原产地之一, 蕴藏着无数优良特异性状和遗传多样性, 是天然的基因库, 在北疆存在着天然的野生核桃林, 南疆

存在早实、薄皮核桃, 而且在各地州分布着许多树龄较大的古老核桃树种, 这将为新疆核桃资源的研究与应用提供良好的基础。林培钧和崔乃然(2000)对分布在伊犁野果林中的新疆野核桃生境、形态特征、生物学特性以及种下类型进行了详细的调查研究, 认为新疆野核桃可能是栽培核桃的直接祖先, 但有待于从分子水平上进一步研究确认(刘晓丽和陈学森, 2008)。吴燕民等(2000)应用RAPD对新疆、华北和秦巴山地, 西藏高地核桃进行聚类分析发现新疆核桃属于单独的一个地理生态型。金强等(2009)采用AFLP对温宿核桃林场、库车县、库尔勒若羌县、喀什叶城县, 和田

地区、伊犁巩留野生核桃林的核桃种质资源进行分析发现新疆核桃各居群种质之间存在差异, 具有一定的地域特征, 同一产地的核桃种质资源基本聚在同一个类群中, 各居群之间核桃种质资源存在着一定程度上的交流现象。目前, 对新疆核桃群体内的遗传多样性研究还比较少, 对群体内的遗传和变异现象进行研究将有助于进行筛选, 组合, 选育优良品种。本实验的目的在于利用RAPD分子标记技术研究新疆六个核桃品种实生群体的遗传多样性, 揭示新疆核桃品种的多样性, 并进行分类, 分析相互遗传关系, 为进一步从分子水平上研究新疆核桃遗传多样性提供研究基础。

1 结果与分析

1.1 RAPD 扩增

通过对55个随机引物进行再次筛选, 筛选出了7个重复性较好的引物。部分扩增结果(图1和图2)。

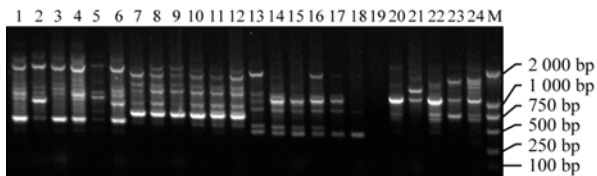


图1 S26, S95, S121 和 S126 在六个品种上的扩增结果
注: M: Marker (100 bp~2 000 bp); S26: 1~6; S95: 7~12; S121: 13~18; S126: 19~24
Figure 1 The result of amplified in six walnut-species by S26, S95, S121 and S126
Note: M: Marker (GM335); S26: 1~6; S95: 7~12; S121: 13~18; S126: 19~24

表1 六个核桃品种F₁代多态性位点比率

Table 1 The diversity loci rate of six walnut-groups

品种	位点数	多态位点数	比率(%)
Species	Number of loci	Number of polymorphic loci	Percentage of polymorphic loci (%)
品种1	81	55	67.9
Species 1			
品种2	81	43	53.1
Species 2			
品种3	81	37	46.8
Species 3			
品种4	81	65	80.2
Species 4			
品种5	81	59	72.8
Species 5			
品种6	81	57	70.4
Species 6			

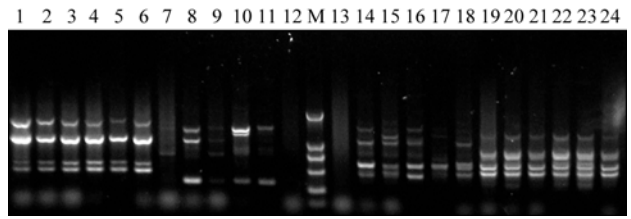


图2 S21, S135, S151 和 S245 在六个品种上的扩增结果
注: M: Marker(GM335); S21: 1~6; S135: 7~12; S151: 13~18; S245: 19~24
Figure 2 The result of amplified in six walnut-species by S21, S135, S151 and S245
Note: M: Marker(GM335); S21: 1~6; S135: 7~12; S151: 13~18; S245: 19~24

经过筛选获得的7个引物在母本上共扩增出了81条扩增带, 其中多态性条带为63条, 占77.8%, 平均每条引物扩增出9条。在六个核桃品种F₁代单株群体上扩增的多态性片段数和比率如表1, 扩增片段的大小为200 bp~2 500 bp。

1.2 遗传多样性分析

1.2.1 品种间母本遗传多样性分析

以筛选出的7个随机引物在新疆六个核桃品种母本和F₁代单株上检测出的条带为遗传信息基础, 用SPSS16.0软件进行聚类分析, 采用欧式平方计算遗传距离(如图2), 根据遗传距离, 采用非加权类平均法作遗传聚类分析图(如图3)。

从聚类分析图中可以看出, 可将六个核桃品种母本主要分为三类: 其中轮5和轮6聚成了一类; 首先轮2、轮3、轮4聚成一类, 轮2和轮4的遗传距离较近; 而轮1则单独聚成了一类, 与其他母本的遗传距离较远。根据本实验室前期的研究结果, 其中轮1、轮2、轮3、轮4、轮5为早实核桃互交, 轮6为晚实核桃为母本, 早实核桃为父本杂交推测, 轮5和轮6可能来自于亲缘关系较近的早实核桃父本, 也可能拥有同一早实核桃父本, 轮2、轮3、轮4可能来自于亲缘关系较近的早实父本或母本, 而轮1的早实父本可能距其它品种的母本亲缘关系稍远。然而, 要更加清楚地说明这六个新疆核桃品种之间的亲缘关系和遗传多样性, 需要进一步的研究。

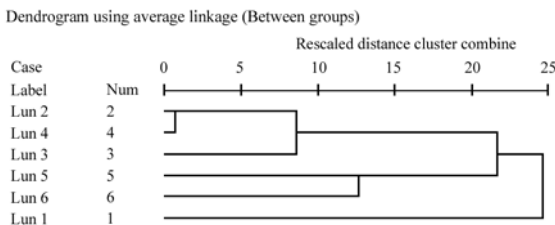


图3 六个核桃品种母本的 UPGMA 聚类分析图
注: 1:母本 1; 2: 母本 2; 3: 母本 3; 4: 母本 4; 5: 母本 5; 6: 母本 6

Figure 3 The UPGMA dendrogram of the six walnut-species based on genetic distances
Note: 1: Lun 1; 2: Lun 2; 3: Lun 3; 4: Lun 4; 5: Lun 5; 6: Lun 6

表 2 六个品种母本间遗传距离(下三角)
Table 2 The distance of female parents of six walnut-groups

品种 Species	母本 1 Female 1	母本 2 Female 12	母本 3 Female 3	母本 4 Female 4	母本 5 Female 5	母本 6 Female 6
母本 1 Female 1	0.000					
母本 2 Female 2	0.765	0.000				
母本 3 Female 3	0.529	0.235	0.000			
母本 4 Female 4	0.882	0.000	0.235	0.000		
母本 5 Female 5	0.471	0.529	0.412	0.529	0.000	
母本 6 Female 6	0.824	0.412	0.647	1.000	0.353	0.000

1.2.2 F₁实生后代遗传多样性分析

对筛选出来的引物在六个核桃品种F₁代单株上的扩增结果进行统计和分析, 结果表明: 6个品种F₁代可以明显地划分为距离较远的两类: 第一类为轮6的四个F₁代单株; 第二类为其余的所有样品。第二类又可以分为三亚类, 第一亚类为轮3的F₁代单株3-8, 第二亚类为轮5的17个F₁代单株和轮2的1个F₁代单株; 第三亚类为其余的样品。计算各群体母本和个体之间的遗传距离, 可以看出, 各群体母本之间的遗传距离为0-1(表2), 平均遗传距离为0.5215; 轮1 F₁代群体遗传距离为0.000-0.124; 轮2 F₁代群体的遗传距离为0.000-0.209; 轮3 F₁代群体遗传距离为0.000-0.333; 轮4 F₁代群体遗传距离为0.000-0.338; 轮5 F₁代群体遗传距离为0.000-0.547; 轮6 F₁代群体遗传距离为0.000-0.428, 可以看出, 轮1 F₁代之间的遗传距离相对较小, 个体之间的差异较小; 而轮5 F₁代群体之间的遗传距离相对较大, 个体之间的差异相对较大, 说明具有较好的遗传与变异资源。从六个品种的母本和F₁代单株聚类分析结果中可以看出, 轮1F₁代单株与母本聚在一起, 而轮5和轮6; 轮2, 轮3和轮4 F₁代单株之间存在着相互的交叉聚类, 这与其母本的聚类结果相似。原因可能是如前期试验得到的实验结果所说的轮5和轮6可能来自于亲缘关系较近的早实核桃父本, 也可能拥有同一早实核桃父本。轮2、轮3、轮4则可能

来自于亲缘关系较近的早实父本或母本, 这有待于进一步研究, 而且, 通过对引物在母本和F₁代上扩增条带的统计可以看出, 在母本上出现的条带在子代上并不是都出现, 子代上有新的条带出现, 这说明核桃基因组是相对较保守的, 但也存在着一定程度上的差异, 这可能是由于自然授粉产生了新的变异, 这将有利于得到较丰富的种质资源, 对核桃育种将是珍贵的资源。

2 讨论

对于核桃种质资源的分类国际上并没有比较系统的方法和标准。目前认为核桃种群演化发展的主要动力是种内个体间及种间的天然杂交和各种生境下的自然与人为选择(吴燕民等, 2000)。一些学者把我国的核桃栽培种分为新疆核桃、华北山地核桃、秦巴核桃和西藏高地核桃。由此可以看出, 新疆核桃是其中较重要的资源之一。近年来, 核桃产业在新疆得到了较好的发展, 成为创收的一部分产业, 但良种和无性系生产的不断扩大使资源遭受了破坏, 使得一些适应性较强的地方品种和野生种逐渐被淘汰, 呈现出单一化。为了改善这种单一化的局面, 对新疆核桃资源进行较全面的研究是比较重要的, 将有助于种质资源的保存于应用, 对其进行种质资源遗传多样性的研究将是核桃新品种选育的理论基础。

遗传多样性是决定物种发生、进化、选择、重组和创新的物质基础(解新明和云锦凤, 2000)(夏铭, 1999)。从分子遗传角度来看, 表型的差异归根到底是基因型和基因组的差异, 对这些基因组序列差异的比较研究为植物系统与进化研究提供了最直接的依据(王红霞, 2006)。目前, 在遗传多样性研究的几种标记方法中, 分子标记已经成为一种简便、可靠的鉴定方法, 广泛用于核桃遗传多样性的研究。王宝庆采用 SSR 分子标记技术对四川西部的川毫和知母群体进行遗传多样性的比较分析发现川毫铁核桃群体的遗传丰富度高于知母核桃群体, 与表型多样性观察结果一致(王宝庆, 2007)。郭传友等(2008)采用 RAPD 分子标记技术对山核桃天然群体进行遗传结构分析发现大部分的变异存在居群内, 居群间基因交流相对较少, 并且地理隔离、居群内近交及居群间有限的基因交流可能是形成山核桃天然结构遗传结构的主要因素, 研究结果符合山核

桃风媒、异交的繁育系统特点和实际分布情况。邹雪梅采用 RAPD 对川西南高山峡谷区的核桃资源(109 个样品)进行遗传多样性进行研究显示该分子标记产物能够显示核桃丰富的遗传多样性, 聚类分析结果与地理区划基本符合(邹雪梅, 2006)。本实验通过采用 RAPD 分子标记技术对新疆的 6 个地方品种进行多样性的分析, 最终可以将这六个核桃品种的母本分为 3 类, 品种 F₁ 代可以明显地划分为距离较远的两类, 并且在 F₁ 代之间存在着一定程度上的基因交流, 与母本也存在着差异, 这将为保存和育种提供一定的资源与信息。

3 材料和方法

3.1 材料

实验材料为采自新疆轮台资源圃的母本材料(材料为当地农民自己嫁接, 品种名为: 轮1, 轮2, 轮3, 轮4, 轮5, 轮6)和种植在石河子大学农学院实验站15号网室的F₁代单株(约190株), 以叶片为试材, 春季待叶片展开后, 对每个品种单株采新鲜嫩叶, 提取总DNA。研究所用的 CTAB、PVP₄₀、EDTA、Tris碱、Taq DNA聚合酶、dNTPs、琼脂糖等购自于上海生物工程有限公司, 随机引物由北京三博远志生物有限责任公司合成, 其它氯仿、乙醇、异戊醇、异丙醇等试剂皆为国产分析纯试剂。

3.2 方法

3.2.1 DNA的提取与测定

DNA 提取采用改良 CTAB 法, 参照张虎平等(2003) (Cheng et al., 2003) (Proberki et al., 1997)的方法并稍加改动, 提取的 DNA 经 TE 稀释 100 倍, 用紫外分光光度计测定波长 260 nm 及 280 nm 处的光吸收值(OD 值), 确定 DNA 的纯度和浓度, 最后用 TE 稀释为 20 ng/μL 保存在-20℃备用。

3.2.2 引物筛选及PCR反应体系的确定

通过对张虎平(2003)、邹雪梅(2006)、杨恩(2006)已筛选出的55个随机引物进行再次筛选, 选取扩增稳定, 重复性好的引物用于试验。

PCR反应体系参照张虎平(2003)、邹雪梅(2006)的扩增体系, 在试验了各种不同的扩增条件后, 获得了适合于实验的扩增反应体系和循环条件, 反应总体积为25μL, 各成分如下: 10×Buffer (含Mg²⁺) 2.5

μL , dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL , 引物1.87 μL , Taq 酶(5 U/ μL) 0.2 μL , DNA模板(20 ng/ μL)1.5 μL , ddH₂O 18.43 μL 。扩增反应程序为:94 °C 预变性5 min, 94 °C 变性1 min, 36°C 退火1 min, 72 °C 延伸90s, 共42个循环; 72 °C 延伸7 min。在冰盒上加完反应物后在微型离心机上微甩放入PCR仪中进行反应, 反应完成后取扩增产物10 μL 点入含EB的1.2%的凝胶中电泳, 然后在凝胶成像分析仪下观察并记录结果。

3.2.3 数据处理

RAPD扩增实验重复2次, 统计所有能产生多态性位点的引物在六个核桃品种母本和F₁代单株上扩增的总带数和多态性条带数。在电泳图谱同一RAPD位点上有电泳带的记为“1”, 无带的记为“0”, 做[0、1]矩阵输入计算机, 统计总带数, 共有带, 计算多态性: 多态性=(总带数-共有带)/总带数, 采用SPSS 16.0软件进行分析, 用欧式距离平方法计算遗传距离(D), 根据遗传距离采用非加权类平均法(UPGMA法)构建聚类分析图, 对结果进行统计与分析。

作者贡献

叶春秀、牛建新是本研究的实验设计和实验研究执行人; 叶春秀完成实验操作及数据分析, 论文初稿的写作; 吕建强、王林、李荣、张虎平参与实验设计, 结果分析; 牛建新是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金(30560090)资助。作者感谢实验室同学在实验中给予的帮助和建议, 感谢石河子大学果树生物技术实验室给予的技术支持。感谢同行评审人给予的评审建议和修改意见。

参考文献

Guo C.Y., Huang J.Q., Wang Z.J., and Fang Y.M., 2006, RAPD analysis for natural population genetic structure of *Carya cathayensis*, *Nanjing Nongye Daxue Xuebao* (*Nanjing Agricultural Sciences*), 29(3): 12-17 (郭传友, 黄坚钦, 王正加, 方炎明, 山核桃天然群体遗传结构的 RAPD 分析, *南京农业大学学报*, 29(3): 12-17)

Jin Q., Yang Y., Wang X.J., Wu C.Y., and Guo L., 2009, Analysis of *Juglans* varieties of Xinjiang Province by AFLP, *Jiangsu Nongye Kexue* (*Jiangsu Agricultural*

Sciences), 2: 28-31 (金强, 杨宇, 王新建, 吴翠云, 郭玲, 2009, 新疆核桃种质资源遗传多样性 AFLP 分析, *江苏农业科学*, 2: 28-31)

Li G.H., 2007, Studies on germ plasm resources of walnuts, Thesis for D.C., Agricultural University of Sichuan, Supervisor: Yang D.S., and Hu T.X., pp.1 (李国和, 2007, 核桃种质资源研究, 博士学位论文, 四川农业大学, 导师: 杨冬升, 胡庭兴, pp.1)

Lin P.J., and Cui N.R., 2000, Researching wild fruit resources of TianShan and YiLi, Beijing: Publishing Forest Press, pp.178-192(林培均, 崔乃然, 2000, 天山野果林资源-伊犁野果林综合研究, 北京: 中国林业出版社, pp.178-192)

Liu X.L., and Chen X.S., 2008, Analysis of three walnut group's heredity by SSR, *Guoshu Xuebao* (*Journal of Fruit Science*), 25(4): 526-530 (刘晓丽, 陈学森, 2008, 普通核桃(*Juglans regia*)3 个群体遗传结构的 SSR 分析, *果树学报*, 25(4): 526-530)

Proberki S.L., Bailey G., and Baum R.B., 1997, Modification of a CTAB extraction protocol for plant containing high polysaccharide and polyphone components, *Plant Mol. Rep.*, 12: 8-15

Wang B.Q., 2007, Study on genetic diversity of *Juglans* in the western of Sichuan province, Thesis For M.S., Agriculture University of Nei Meng-gu, Supersor: Zhang M.T., pp.25 (王宝庆, 2007, 四川西部核桃属植物遗传多样性研究, 硕士学位论文, 内蒙古农业大学, 导师: 张明铁, pp.25)

Wang H.X., 2006, Analysis of Genetic Diversity and Establishment of Core Collection of Walnut Varieties with AFLP Markers, Thesis For D.C., Agriculture University of Hebei, Supervisor: Zhang Z.H., pp.56 (王红霞, 2006, 核桃遗传多样性分析及核心种质的构建, 博士学位论文, 河北农业大学, 导师: 张志华, pp.56)

Wu Y.M., Liu Y., and Dong F.X., and Xi S.K., 2000, Study on different ecological types of Chinese walnut using RAPD markers, *Beijing Linye Daxue Xuebao* (*Journal of Forestry University of Beijing*), 22(5): 23-27 (吴燕民, 刘英, 董凤祥, 奚声珂, 2000, 应用RAPD对我国栽培核桃不同地理生态型的研究, *北京林业大学学报*, 22(5): 23-27)

- Xia M., 1999, The advance in diversity, *Shengwuxue Zazhi (Journal of Biological)*, 18(3): 59-65 (夏铭, 1999, 遗传多样性研究进展, *生物学杂志*, 18(3): 59-65)
- Xie X.M., and Yun J.F., 2000, Studying the diversity of plants and the diagnose method, *Grassland of China*, 6: 51-59 (解新明, 云锦凤, 2000, 植物遗传多样性及其检测方法, *中国草地*, 6: 51-59)
- Yang E., 2006, Molecular Identification and genetic analysis of *Juglans* varieties planted in Yunnan province, Thesis for M.S., Forest College of Southwest, Supervisor: Chen S.Y., pp.32 (杨恩, 2006, 云南省主要推广核桃品种的分子标记鉴定及遗传分析, 硕士学位论文, 西南林学院, 导师: 陈少喻, pp.32)
- Yun J.C., Wen W.G., Hua L.Y., Xiao M.P., and Xiu X.D., 2003, An efficient protocol for genomic DNA extraction from Citrus Species, *Plant Molecular Biology Reporter*, 21: 177a-177g
- Zhang H.P., Hu H.F., Niu J.X., Wang G.A., and Ma B.G., 2005, Early fruiting and its RAPD analysis of Walnut in Xinjiang Uygur autonomous, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 25(11): 2157-2162 (张虎平, 虎海防, 牛建新, 王国安, 马兵钢, 2005, 新疆核桃早实特性及RAPD分析, *西北植物学报*, 25(11): 2157-2162)
- Zhang H.P., Niu J.X., and Wang G.A., 2003, Optimal DNA extraction method for gene mark in walnuts, *Shengwu Jishu (Biological Technology)*, 13(5): 18-19 (张虎平, 牛建新, 王国安, 2003, 适于核桃基因标记的DNA提取方法, *生物技术*, 13(5): 18-19)
- Zou X.M., 2006, Random amplifies polymorphic DNA studies on walnut resource which belong to mountain and ravine region of southwest Sichuan, Thesis for M.S., Agriculture university of Sichuan. Supervisor: Xiao Q.W., and Zhou L.Y., pp.33 (邹雪梅, 2006, 川西南高山峡谷区核桃资源的 RAPD 研究, 硕士学位论文, 四川农业大学, 导师: 肖千文, 周兰英, pp.33)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>