

十二份芒果种质亲缘关系的 SRAP 分析

赵 英, 黄国弟, 付海天, 莫永龙, 李日旺, 周俊岸

(广西亚热带作物研究所, 广西 南宁 530001)

摘 要:以 12 份芒果种质为试材, 利用 SRAP 分子标记技术对其进行遗传多样性研究。结果表明:从 36 对引物中筛选出 22 对多态性好的引物, 共扩增出 251 条 DNA 条带, 其中多态性谱带 181 条, 平均每对引物扩增得到 15.08 条多态性谱带, 多态性比率为 72.11%。UPGMA 聚类表明, 所有供试品种(系)之间的亲缘关系都比较近, 相似系数在 0.77~0.89; 如果以相似系数 0.78 为标准, 可将供试的 12 个品种(系)分为 3 类。表明利用 SRAP 技术能较好的区分芒果的亲缘关系; SRAP 分子标记适合芒果的 DNA 遗传多样性分析, 可作为芒果种质鉴定依据之一。

关键词:芒果; SRAP; 亲缘关系

中图分类号:S 667.703.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0099-04

近年来, 由于我国芒果种质资源的深入挖掘利用以及芒果育种的进步, 特别是国外引进品种的增多, 种质资源日益丰富, 为芒果的品种创新奠定了坚实的基础, 但是同时也对其遗传多样性鉴定和新品种测试与保护工作提出了新的挑战。人们对分子标记应用于芒果种质资源方面的研究开始了有益的探索。国内外有关研究者陆续报道了应用和标记进行芒果品种鉴别及种质资源的遗传分析^[1-2]。相关序列扩增多态性 SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) 标记集 RAPD 和 AFLP 2 种技术的优点于一体, 具有简便、稳定、重复性好、多态性强、在基因组中分布均匀等优点。目前已应用于水果、大蒜、棉花、水稻、花生^[3-5]等的研究, 但在芒果应用研究的报道较少见。

该研究以不同种质芒果为试验材料, 对 12 份种质资源进行了遗传多样性分析, 一方面探讨 SRAP 分子标记技术在芒果遗传多样性研究中的有效性, 另一方面鉴定供试芒果材料的遗传多样性及亲缘关系, 以期为芒果品种 SRAP 指纹图谱的构建及品种登记、分类和保护奠定基础。

第一作者简介:赵英(1980-), 女, 硕士, 助理研究员, 现主要从事芒果育种等研究工作。E-mail:zhaoying-222@163.com.

责任作者:黄国弟(1965-), 男, 硕士, 研究员, 现主要从事芒果种质资源及育种与栽培等研究工作。E-mail:gxhgd@126.com.

基金项目:广西壮族自治区亚热带作物研究所专项资金资助项目(桂热研 201305); 广西壮族自治区亚热带作物研究所专项资金资助项目(桂热研 201504); 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(2015GXNSFBA139046)。

收稿日期:2015-05-25

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料来自中国广西亚热带作物研究所芒果种质资源圃。选取田间生长健壮、无病虫害、同龄的叶片, 洗净于一70℃保存备用。供试材料及其来源、亲本、胚性详见表 1。

表 1 用于 SRAP 分析的芒果材料

Table 1 Materials of Mango analyzed by SRAP

编号 No.	品种或种系 Variety or species	来源地 Origin	亲本或母本 Parents or female parent	种子胚性 Seed embryonic type
1	“黄象牙芒”“Yellow Aroemwnis”	泰国	?	单胚
2	“白象牙芒”“Nang Klang Wan”	泰国	?	单胚
3	“印度 901 号”“Neelum”	印度	“椰香芒”“Deshehari”	多胚
4	“桂热芒 10 号”“Gui Re Mango10”	广西	“印度芒 901 号”“Neelum”	单胚
5	“桂热芒 14 号”“Gui Re Mango14”	广西	“印度芒 901 号”“Neelum”	单胚
6	“金煌芒”“Jin Huang Mango”	台湾	“白象牙芒×凯特芒” “Nang Klang Wan×Keitt”	多胚
7	“桂热芒 23 号”“Gui Re Mango23”	广西	?	多胚
8	“桂热芒 82 号”“Gui Re Mango82”	广西	“印度芒 901 号”“Neelum”	多胚
9	“桂热芒 264 号”“Gui Re Mango264”	广西	“印度芒 901 号”“Neelum”	多胚
10	“桂热芒 265 号”“Gui Re Mango71”	广西	“白象牙芒”“Nang Klang Wan”	多胚
11	“秋实 1 号芒”“Qiu Shi1”	广西	“印度芒 901 号”“Neelum”	多胚
12	“秋实 2 号芒”“Qiu Shi2”	广西	“印度芒 901 号”“Neelum”	多胚

注: ? 表示还未确定。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 DNA 的提取采用改良 CTAB 法^[6], 用核酸蛋白仪检测 DNA 的浓度与纯度, 同时采用 1.6% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量。最后将样品稀释至浓度 50 ng/μL, -20℃保存备用。

1.2.2 SRAP 分析 试验所用引物组合 36 对^[7], 从中筛

选出 22 对重复性好、多态性高的引物组合(表 2)。SRAP 扩增反应体系总体积为 25 μ L, 含有 30 ng DNA, 0.3 μ mol/L 引物, 12.5 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix。扩增反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 预变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物吸取 10 μ L 用 2.0% 琼脂糖凝胶在 0.5 \times TBE 中电泳, 85 V 条件下电泳 1.5 h。结束后, 于凝胶成像系统上检测并拍照。

1.3 项目测定

每个引物组合的多态性比率(%)=引物组合扩增的多态性条带数/总条带数 \times 100。每个引物的鉴别能力(%)=此引物组合可鉴别的品种类别数/总品种数 \times 100^[8]。

1.4 数据分析

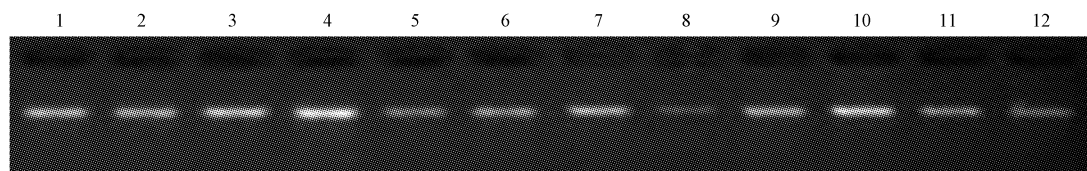
12 份芒果材料的聚类分析利用 UPGMA(unweight-

ed pair-group using arithmetic average)方法和 NTSYS 软件进行, 并建立树状聚类图。以建立的最佳反应体系对 12 份芒果种质进行多样性分析, 将电泳图谱上清晰出现的条带记为“1”, 同一位置没有条带的记为“0”, 带型不清或者数据缺失的记为“-”, 生成“0”和“1”组成的原始矩阵。

2 结果与分析

2.1 芒果基因组 DNA 的检测结果

12 份芒果材料的基因组 DNA 经电泳后条带清晰, 无拖尾现象(图 1)。经分光光度计测定, DNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 值为 2.0~2.5, OD₂₆₀/OD₂₈₀ 值为 1.7~1.9, 表明所提取的 DNA 纯度较好。可见, 参试材料的基因组 DNA 质量和浓度都较好, 满足试验要求。



注: 1~12 样品名称与表 1 相对应。

Note: The name of samples is same as that of Table 1.

图 1 芒果 DNA 的电泳检测图

Fig. 1 Electrophoresis of mango DNA

2.2 引物的多态性分析

筛选出的 22 对引物组合(表 2)共扩增出 251 条谱带, 其中多态性谱带 181 条。每个组合的多态性条带数为 5~15 条, 平均每对引物扩增得到 15.08 条多态性条带, 单个引物组合的多态性比率在 56%~100% 之间。这说明 SRAP 多态性较高, 适于鉴别芒果种质, 其中 Me7+Em10 引物扩增结果见图 2。

2.3 芒果种质多态性鉴定

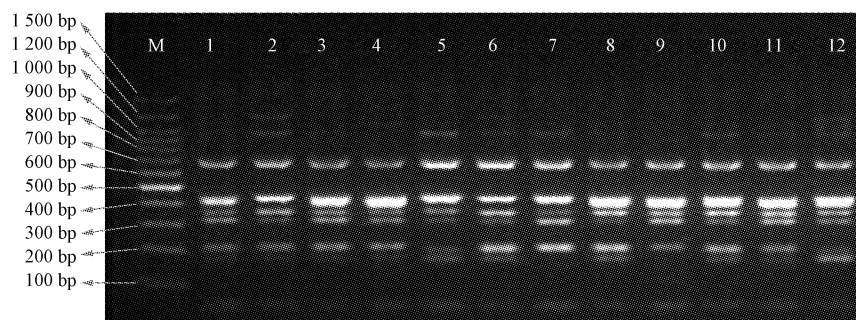
由表 2 可知, 22 对引物组合的鉴别能力在 33.33%~91.67% 之间, 其中 Me1+Em5、Me1+Em7、Me2+Em10、Me3+Em7、Me5+Em6、Me5+Em8、Me5+Em9、Me6+Em9、Me7+Em5、Me10+Em3、Me10+Em10 11 个引物组合的鉴别能力达 80% 以上, 可以用来区分大部分品种。没有得到完全区分所有品种的单个引物组合。这说明部分品种之间的亲缘关系比较相近, 有共用亲本的现象。由图 3 可知, 12 份芒果种质的同源性很高, 遗传相似系数为 0.77~0.89, 平均为 0.83, 其中以“印度 901 号”与“秋实 1 号”最高, 达 96%。这 22 对引物组合除“印度 901 号”与“秋实 1 号”外, 其余品种都能区分。如果以相似系数 0.776 为界, 可以将 12 份芒果种质分为 3 类: 第 1 类有“桂热 10 号”、“桂热 82 号”、“桂热 14 号”、“白象牙”、“黄象牙”、“金煌”; 第 2 类有“桂热 23 号”、“桂热 265 号”; 第 3 类有“桂热 264 号”、“秋实 2 号”、“印度 901 号”、“秋实 1 号”。

表 2

22 对引物组合对
12 份芒果种质的扩增结果

Table 2 The amplification result of
12 mango germplasms by 22 primer pairs

组合名称 Name of primer pair	总条带数 Total number	多态性条带数 Number of polymorphic bands/条	多态性比率 Polymorphic rate /%	可鉴别的品种数 Number of distinguishable kinds	鉴别能力 Distinguished ability /%
Me1+Em5	10	9	90	10	83.33
Me1+Em6	8	5	63	5	41.67
Me1+Em7	11	7	64	10	83.88
Me1+Em8	12	9	75	6	50.00
Me2+Em1	9	5	56	6	50.00
Me2+Em5	11	8	73	4	33.33
Me2+Em10	11	9	82	10	83.88
Me3+Em2	10	6	60	5	50.00
Me3+Em7	13	10	77	10	83.88
Me4+Em1	11	7	64	9	75.00
Me4+Em7	8	5	63	8	66.67
Me5+Em1	11	8	73	9	75.00
Me5+Em6	13	9	69	11	91.67
Me5+Em8	17	15	88	10	83.88
Me5+Em9	15	9	60	11	91.67
Me5+Em10	12	8	67	9	75.00
Me6+Em9	6	6	100	11	91.67
Me7+Em5	10	6	60	11	91.67
Me7+Em10	11	9	82	7	58.33
Me10+Em2	10	7	70	8	66.67
Me10+Em3	12	10	83	11	91.67
Me10+Em10	14	11	79	11	91.67



注:M,DL 1 500 Marker;1~12 见表 1。

Note:M,DL 1 500 Marker;1-12 are the same as table 1.

图 2 Me7+Em10 对 12 份芒果种质的 PCR 扩增图谱

Fig. 2 PCR amplified pattern of 12 mango germplasms with primers Me7+Em10

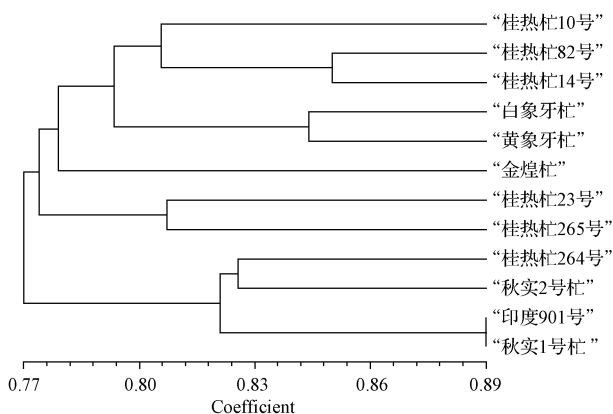


图 3 12 个芒果品种(系)的 UPGMA 聚类图

Fig. 3 UPGMA dendrogram among 12 mango cultivars or lines

3 讨论与结论

SRAP 标记最早是在芸苔属植物上开发出来的,是一种比较理想的分子标记系统。它结合了 RAPD 与 AFLP 等通用型 DNA 标记的优点,弥补了 RAPD 与 AFLP 标记在遗传多样性分析中的缺陷,对 DNA 需要量少且纯度要求不高,正向与反向引物可自由配对,降低了成本。该标记已经在植物遗传多样性检测、遗传图谱构建、重要基因定位、品种鉴定和种子纯度检测上得到了广泛的应用^[9]。该研究通过 SRAP 标记可以较好地反映芒果种质的遗传差异和亲缘关系,该试验用 36 个引物组合进行扩增,从中筛选出 22 对多态性强、重复性好的引物组合,共扩增出 251 条谱带,其中多态性谱带 181 条,平均每对引物扩增得到 15.08 条多态性谱带,多态性比率为 72.11%。将为芒果种质资源遗传多样性的 SRAP 分析奠定了基础。

从图 2 可以看出,12 份芒果种质的相似系数在 0.77~0.89 之间,说明这些芒果材料有着丰富的遗传多样性,但部分材料相似系数接近 1,表明它们的亲缘关系很近,说明这些材料可能有着相同的起源,或者出现同

物异名、同名异物的现象,故对芒果资源进行鉴定是十分有必要的。

从聚类图上可以看出,“桂热杧 82 号”、“桂热杧 10 号”、“桂热杧 14 号”、“白象牙杧”、“黄象牙杧”、“金煌杧”聚类在一起;黄国弟等^[10]把“桂热杧 23 号”、“桂热杧 265”聚类在一起,与该试验的结果一致;王家保等^[11]把白象牙、黄象牙、金煌杧聚类到一起,与该试验的结果一致。

根据种子胚性将芒果分为单胚和多胚类型,有研究根据 RAPD 结果从分子水平上可以将芒果单胚和多胚类型分开;也有研究认为 RAPD 技术、ISSR 技术不能区分单胚与多胚类型芒果品种^[10],这与该研究一致,根据上述,课题组认为芒果种质的胚性遗传规律尚无定论,在分子水平上不能按种子胚性来明确分类。

(该文作者还有张宇、唐玉娟,单位同第一作者。)

参考文献

- [1] 赵英. 分子标记在芒果上的应用研究[J]. 农业研究与应用, 2013(5): 19-23.
- [2] 王静毅,王家保,武耀廷,等. 广西主要芒果品种(系)遗传关系的 SSR 分析[J]. 热带作物学报, 2009, 30(9): 1301-1307.
- [3] 郭凌飞,邹明宏,杜丽清,等. 均匀设计优化澳洲坚果 SRAP 反应体系[J]. 果树学报, 2008, 25(2): 250-253.
- [4] 邱文武,孙伟生,窦美安. 菠萝 SRAP 反应体系的建立及优化[J]. 生物技术, 2008, 18(1): 40-42.
- [5] 韦金菊,何凡,范鸿雁,等. 番木瓜 DNA 提取与 SRAP 反应体系优化[J]. 中国南方果树, 2010, 39(1): 33-36.
- [6] 何新华,李阳瑞,郭永泽,等. 23 个广西本地芒果品种的 ISSR 分析[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 829-834.
- [7] 付海天,赵英,周俊岸,等. 正交设计优化芒果 SRAP-PCR 反应体系及引物筛选[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(12): 41-43.
- [8] 张西西,徐进,王涛,等. 万寿菊杂交一代遗传多态性的 SRAP 标记分析[J]. 园艺学报, 2008, 35(8): 1221-1226.
- [9] 杨柳燕,徐永阳,徐志红,等. 甜瓜霜霉病抗性遗传及 SRAP 分子标记[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(5): 1200-1202.
- [10] 黄国弟,罗聪,何新华,等. 热杧系列品种(系)的亲缘关系分析[J]. 热的亚热带植物学报, 2008, 16(6): 521-525.
- [11] 王家保,王令霞,杜中俊,等. 部分芒果品种亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 园艺学报, 2007, 34(1): 87-92.

DOI:10.11937/bfyy.201521027

四种野生梨离体培养体系的建立及耐盐性比较

王德芬, 谭俊超, 李鼎立, 杨英杰, 宋健坤, 王 然

(青岛农业大学 园艺学院, 青岛市园艺植物遗传改良与育种重点实验室, 山东 青岛 266109)

摘 要:以杜梨、豆梨、川梨和山梨为试材,进行了无菌体系的建立和增殖培养基的优化,在此基础上进行了Na盐胁迫下耐盐相关生理指标的测定,以期进行不同材料耐盐性的比较,探讨利用离体培养体系进行耐盐性鉴定的可行性。结果表明:不同种类梨芽的增殖对培养基中附加的各类生长调节剂的配比要求不同,筛选得到最佳芽增殖培养基为杜梨MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;豆梨MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L+GA₃ 0.1 mg/L;川梨MS+6-BA 2.0 mg/L+IBA 0.1 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L;山梨MS+6-BA 1.0 mg/L+IBA 0.3 mg/L+GA₃ 0.5 mg/L。对4种梨试管苗进行不同浓度NaCl胁迫处理的结果表明,不同梨盐害指数从高到低分别为川梨、豆梨、山梨、杜梨;对保护性酶类的活性及脯氨酸含量测定分析显示,4种梨中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)和脯氨酸(Pro)在NaCl处理浓度较低时均呈现上升趋势,杜梨的活性变化相对平缓,而MDA变化以川梨的活性最高。

关键词:梨;离体培养;盐胁迫

中图分类号:S 661.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)21-0102-05

梨(*Pyrus spp.*)是我国第三大水果,在我国农业经济发展中起重要的作用,但盐碱化的危害使产业发展变

第一作者简介:王德芬(1990-),女,山东潍坊人,硕士研究生,研究方向为果树育种与基因工程。E-mail:wangdefen503@163.com.

责任作者:王然(1960-),女,山东烟台人,博士,教授,现主要从事果树遗传育种与生物技术等研究工作。E-mail:qauwr@126.com.

基金项目:国家现代农业(梨)产业技术体系建设专项资助项目(CARS-29-07);“十二五”农村领域国家科技计划课题资助项目(2013BAD02B01-2);山东省农业良种工程资助项目(2014—2016年)。

收稿日期:2015-07-29

缓且质量受到影响^[1-2],梨的抗盐碱胁迫能力因品种、砧木、树龄和生长时期的不同而有差异^[2],其中砧木的抗盐性是决定砧木栽培应用价值和应用范围的最重要的性状之一^[3]。通过选育耐/抗盐碱砧木也是提高品种耐性的有效途径之一。我国是梨属植物原产地之一,具有丰富的野生资源类型,有12个种原产于我国,如杜梨(*Pyrus betulaeifolia*)、豆梨(*Pyrus calleryana*)、山梨(*Pyrus ussuriensis*)、川梨(*Pyrus pashia*)等,常被生产上广泛用作梨的砧木,抗逆性较好^[3]。由于这些野生梨主要是实生繁殖,种内变异大、类型多,对其耐盐性缺乏系统的评价。植物在遇到盐胁迫时,体内常发生一系列生

SRAP Analysis of 12 Mango Germplasm Genetic Relationships

ZHAO Ying, HUANG Guodi, FU Haitian, MO Yonglong, LI Riwan, ZHOU Jun'an, ZHANG Yu, TANG Yujuan
(Guangxi Institute of Subtropical Crops, Nanning, Guangxi 530001)

Abstract: Taking 12 mango germplasms as materials, SRAP marker was used to analyze genetic diversities. The results showed that 22 primers selected from 36 SRAP-primer were used for amplification and 251 DNA bands were obtained, including 181 polymorphic bands. Each primer amplified 15.08 polymorphic bands. The percent of polymorphic was 72.11%. Based on UPGMA analysis, all samples showed higher similarities and their coefficients from 0.77 to 0.89. If the coefficient 0.78 was regarded as divided line of their genetic relationship, 12 materials could be clustered into 3 groups by SRAP. The study indicated that the genetic relationship of mango cultivars or lines could be better assessed by SRAP which could be used in mango germplasms identification.

Keywords: mango; SRAP; genetic relationship