

doi:10.11937/bfyy.20184462

# SRAP 标记在五十份新疆人工栽培 核桃种质资源的鉴定与应用

李亚兰, 潘存德, 陈虹

(新疆农业大学 林学与园艺学院, 新疆教育厅干旱区林业生态与产业技术重点实验室, 新疆 乌鲁木齐 830052)

**摘要:**以新疆核桃主栽区收集的 50 份核桃种质资源为试材, 采用序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)标记技术分析其遗传多样性, 以期为分布于新疆地区的核桃种质资源的保存、鉴定及综合开发利用提供参考依据。结果表明:从 100 对引物中筛选出 16 对扩增条带清晰、稳定性好的多态性 SRAP 引物组合, 16 对引物组合在 50 份供试种质中共扩增出 178 条带, 多态性条带 135 条, 多态位点百分率为 75.84%。聚类分析及聚类锐度测试显示供试种质可分为 10 类, 热图显示出不同引物对种质的区分情况, 多元回归树显示不同引物中的 26 个扩增条带能够区分 50 份供试种质, 其中 M4/E4、M7/E5、M14/E4、M2/E11、M3/E4、M2/E4、M12/E13、M7/E1、M14/E13 和 M1/E3 共 10 对引物组合是供试种质鉴定中重要的引物组合。同时 R 语言在统计分析中的应用, 为今后核桃植物形态与遗传变异研究提供了新的数据分析方法。

**关键词:**核桃; SRAP-PCR; 热图; 多元回归树; R 语言

**中图分类号:**S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2019)16-0044-09

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科(Juglandaceae)胡桃属(*Juglans*)多年生落叶乔木, 又名胡桃, 是世界重要的坚果树种之一<sup>[1-2]</sup>。其坚果不仅风味独特, 而且具有极高的营养、保健和药用价值<sup>[3-4]</sup>。新疆作为我国核桃的重要产区之一<sup>[5]</sup>, 其种质资源丰富, 不仅包括当地的野生种质资源与优质栽培种质, 还包括许多外来栽培种质。核桃是多年生木本植物, 且核桃种质资源经过长期的自然选择和人工选育使得其基因型高度杂合, 遗传背景十分复杂。从分子生物学角度对其种质资

源遗传变异的研究往往滞后于育种实践, 给核桃种质资源的有效利用及鉴定带来很大麻烦, 影响了遗传育种效率的提高。快速准确的鉴别种质资源, 有效确定其种质身份, 并了解它们的遗传关系, 是进一步研究与利用核桃种质资源的前提条件。

分子标记是目前种质鉴定分类、遗传多样性等方面研究具有应用潜力的技术手段<sup>[6-7]</sup>, 在植物种质资源研究中应用较为广泛, 如通过对阿月浑子(*Pistacia vera*)<sup>[8]</sup>、梨(*Pyrus* spp.)<sup>[9]</sup>、海枣(*Phoenix dactylifera*)<sup>[10]</sup>等园艺作物的相关研究, 能够直接反映不同种质间在分子水平的差异性, 在一定程度上揭示了其种质资源间亲缘关系, 并为育种性状的关联提供理论依据。序列相关扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是基于 PCR 的一种具有高重复性、通用性的简单有效的新型分子标记<sup>[11-13]</sup>, 在植物的遗传多样性评价、品种鉴定、遗传图谱的构建、重要性状的基因定位等多项研究中<sup>[14]</sup>已得到

**第一作者简介:**李亚兰(1989-), 女, 新疆博湖人, 博士研究生, 研究方向为果树种质资源。E-mail: weixiaoliyan@163.com.

**责任作者:**潘存德(1964-), 男, 新疆奇台人, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为森林生态与经营。E-mail: pancunde@163.com.

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31760219, 31460210)。

**收稿日期:**2019-03-20

广泛应用。利用 SRAP 标记能够对马铃薯(*Solanum tuberosum*)杂交子代<sup>[15]</sup>、枣(*Ziziphus jujuba*)杂交子代<sup>[16]</sup>、咖啡(*Coffea arabica*)品种及其杂交子代<sup>[17]</sup>、甘薯(*Ipomoea batatas*)种质资源<sup>[18]</sup>、寒兰(*Cymbidium kanran*)品种<sup>[19]</sup>等多种植物进行有效鉴定,因此将其用于种质鉴定可行性较高<sup>[20]</sup>。但将 SRAP 标记用于国内核桃种质资源相关研究中相对较少。

另一方面,国内外许多学者利用不同类型分子标记对核桃种质的遗传多样性<sup>[21-22]</sup>、亲缘关系<sup>[23]</sup>、自然居群评价<sup>[24]</sup>等方面进行了研究,已取得丰硕成果。但目前针对新疆分布的核桃种质资源进行系统研究则较少,且采用不同方法所得结果不统一。例如,采用 ISSR 分子标记对 163 份新疆核桃种质进行分析后认为,新疆核桃种质资源遗传多样性水平较高且遗传差异主要体现在不同居群之间<sup>[25]</sup>;采用 EST-SSR 和 IST 序列对遗传多样性及系统演化关系进行分析后则认为,新疆核桃种质资源遗传多样性较低,种群之间有一定程度的分化<sup>[26]</sup>。此外,R 语言因其开源性、可

移植性、灵活性等优点,被越来越多的科研人员所喜爱和使用,目前主要用于生态学<sup>[27]</sup>、基因差异表达<sup>[28]</sup>、田间试验数据的分析<sup>[29]</sup>等方面的工作,但鲜有研究者将其应用于种质分类、形态及遗传变异的相关研究。

鉴于此,将 SRAP 标记应用于新疆核桃种质中,并利用 R 语言对扩增结果进行统计分析,旨在揭示能够鉴定新疆人工栽培核桃种质资源的有效 SRAP 引物组合,并为今后 R 语言应用于核桃遗传多样性研究提供新的数据分析方法,以期新疆人工栽培核桃种质资源基础理论与育种研究提供基础资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

以新疆核桃产区南疆盆地和田、喀什、阿克苏地区广泛收集的 50 份人工栽培的核桃种质作为材料。其中包括:栽培品种 40 份,实生优良单株 10 份(表 1)。

表 1 供试核桃种质编号及主要性状

Table 1 The number and major characteristics of walnut germplasm

编号 No.	种质名 Name	核壳厚度 ST/mm	单果质量 MN/g	出仁率 KR/%	编号 No.	种质名 Name	核壳厚度 ST/mm	单果质量 MN/g	出仁率 KR/%
JR01	“新丰”	1.51	13.31	51.33	JR26	“辽 7”	1.23	12.57	57.83
JR02	“新光”	1.95	15.51	47.51	JR27	“辽 3”	2.21	20.22	35.96
JR03	“露仁”	1.05	16.53	44.62	JR28	“新温 138”	1.12	12.49	59.97
JR04	“新排 04”	1.20	15.30	63.97	JR29	“新温 81”	1.52	12.32	53.34
JR05	“温 185”	1.09	9.33	64.49	JR30	“高新 2”	2.01	11.79	39.58
JR06	“乌火”03-1	1.17	12.14	64.99	JR31	“新温 71”	1.21	13.50	55.48
JR07	“库西 01”	1.39	18.23	51.87	JR32	“新温 233”	1.93	23.08	43.86
JR08	“阿林 11”	1.47	14.56	56.45	JR33	“新温 91”	1.64	19.57	54.71
JR09	“阿实 04”	1.37	9.55	47.97	JR34	优良单株-8	1.61	23.30	54.86
JR10	“库阿实 11”	2.72	19.77	47.04	JR35	“吴丰”	1.67	15.29	47.74
JR11	“和春 06”	1.65	21.65	54.37	JR36	“纸皮”	0.81	12.02	63.90
JR12	“阿实 14”	2.18	15.48	43.52	JR37	“乌 417”	1.47	18.94	55.82
JR13	“阿实 01”	1.68	15.79	44.22	JR38	“长新 2”	—	—	—
JR14	优良单株-1	1.20	16.12	52.66	JR39	“浑 80”	1.10	12.80	53.90
JR15	优良单株-2	1.54	12.40	65.02	JR40	“新巨丰”	2.10	22.19	44.45
JR16	优良单株-3	1.38	15.96	45.23	JR41	“272”	—	—	—
JR17	优良单株-4	1.82	15.84	58.92	JR42	优良单株-9	1.03	14.00	58.65
JR18	优良单株-5	1.35	14.69	23.45	JR43	“新萃丰”	1.59	14.64	44.53
JR19	优良单株-6	1.66	13.98	67.43	JR44	“和跃 05”	2.09	17.88	38.66
JR20	优良单株-7	1.86	24.76	52.92	JR45	“阿实 05”	1.43	11.76	44.86
JR21	“礼品 1”	1.46	15.21	54.57	JR46	“和跃 10”	1.79	21.65	42.32
JR22	“辽 4”	1.66	10.18	36.66	JR47	“温 179”	1.65	13.32	57.98
JR23	“果材核桃”	1.50	13.78	54.78	JR48	优良单株 10	2.01	13.15	46.74
JR24	“辽 2”	1.00	12.61	58.76	JR49	“温 10”	1.89	21.65	42.32
JR25	“辽 1”	1.51	13.31	51.33	JR50	“和春 05”	2.25	17.28	51.28

## 1.2 试验方法

### 1.2.1 DNA 的提取

以供试核桃种质的叶片为材料,利用 DNA 提取试剂盒提取核桃基因组 DNA,提取的 DNA 原液用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并利用 Bi-Photomete 蛋白核酸仪,检测 DNA 溶液的浓度和纯度。按编号记录检测数据,然后将各样品 DNA 的浓度调至  $40 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ,于  $-20^\circ\text{C}$  冰箱中保存备用。

### 1.2.2 PCR 的扩增

参照已公布的引物序列<sup>[11]</sup>,从中筛选引物。先用 2 份不同核桃种质材料进行引物初筛,后选用 5 份供试种质进行复筛,最终从 100 对引物组合中选定 16 对扩增条带清晰稳定、多态性丰富、重复性好的引物组合,包括 10 个正向引物和 10 个反向引物(表 2)。试验采用  $20 \mu\text{L}$  扩增体系,  $10 \times \text{Buffer}$   $2.5 \mu\text{L}$ ,模板 DNA  $40 \text{ ng}$ ,引物各  $0.2 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , *Taq* DNA 聚合酶  $1.5 \text{ U}$ ,  $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs。PCR 反应程序为:预变性  $94^\circ\text{C}$  (5 min),变性  $94^\circ\text{C}$  (1 min),退火  $33^\circ\text{C}$  (1 min),延伸  $72^\circ\text{C}$  (1 min),4 个循环;变性  $94^\circ\text{C}$  (1 min),退火  $50^\circ\text{C}$  (1 min),延伸  $72^\circ\text{C}$  (1 min),39 个循环;延伸  $72^\circ\text{C}$  (10 min), $4^\circ\text{C}$  保存。产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上分离,并通过银染染色检测,最后照相。

表 2 SRAP 标记引物序列信息

Table 2 The primer sequences information of SRAP makers

引物	引物序列(5'-3')	引物	引物序列(5'-3')
Primer	Primer sequence(5'-3')	Primer	Primer sequence(5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAC
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAGG	Em4	GACTGCGTACGAATTGCA
Me4	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTTGA
Me6	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em6	GACTGCGTACGAATTCAA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACC	Em8	GACTGCGTACGAATTGCT
Me8	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em10	GACTGCGTACGAATTGCT
Me9	TGAGTCCAAACCGGACA	Em11	GACTGCGTACGAATTCCA
Me13	TGAGTCCAAACCGGACG	Em13	GACTGCGTACGAATTCCA
Me14	TGAGTCCAAACCGGTCA	Em14	GACTGCGTACGAATTTAG

### 1.3 数据分析

对 SRAP-PCR 电泳扩增结果采用人工读带的方法进行统计,具体做法为:以 DGL2000 Marker 为标准条带,在同一迁移位置上,按照扩增条带的有(1)或无(0)进行统计,建立“0,1”原始数据矩阵。计算总扩增的 SRAP 条带(TNB)、多

态性条带数(NPB)、多态性条带百分数(PPB)和引物多态性信息含量(PIC)<sup>[30]</sup>。同时,采用非加权组平均法(unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)方法对原始数据进行聚类分析,并对分类数量的稳定性进行锐度测试(10 000 次迭代,显著性水平为  $\alpha=0.05$ ),以确定最优分类等级;再对其进行热图分析;最后采用多元回归树(multivariate regression tree, MRT)方法通过构建多元回归树,对能够区分供试种质的最少引物组合进行量化。

利用 Microsoft Excel 2016 软件进行原始数据的整理和计算;使用 MULTIV v2.4 软件进行群锐度化测试(test of group sharpness)<sup>[31]</sup>;利用 R 语言对数据进行统计分析并作图。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP 扩增条带统计分析

利用 18 组 SRAP 引物对 50 份新疆核桃种质进行 SPAR-PCR 扩增,对扩增结果进行统计发现(表 3):供试核桃种质共扩增出清晰可辨条带 178 条,其中多态性条带 135 条,多态性条带比率(PPB)为 75.84%。

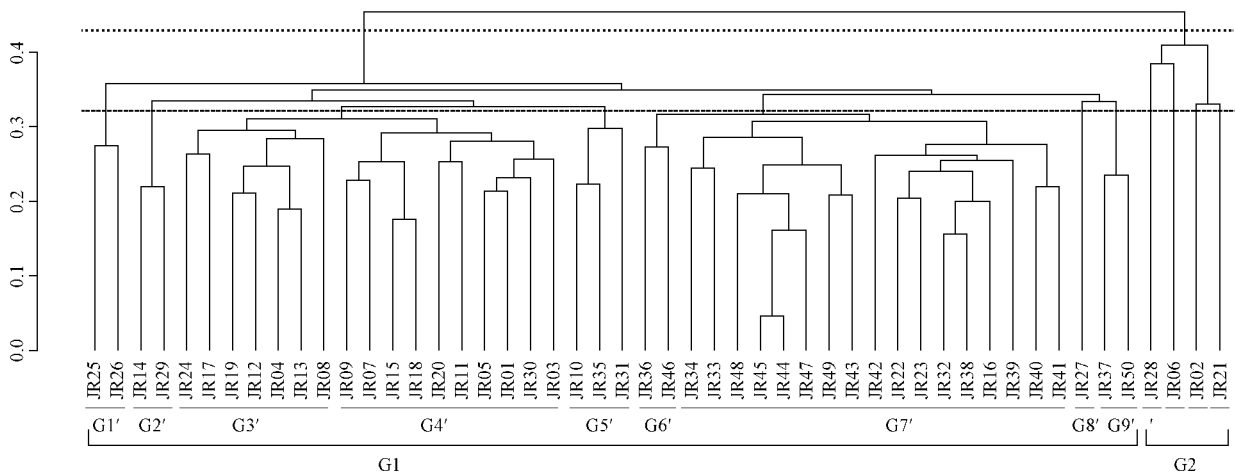
表 3 50 份核桃种质 SRAP-PCR 扩增结果统计

Table 3 The statistics of SRAP-PCR amplification results of 50 walnut germplasms

引物	总扩增条带数	多态性条带数	多态性条带百分数	引物多态性信息含量
Primer	TNB	NPB	PPB	PIC
M1+E3	10	8	80.00	0.322
M2+E4	6	3	50.00	0.251
M2+M5	9	7	77.78	0.364
M2+E11	6	4	66.67	0.152
M3+E4	9	9	100.00	0.355
M3+E11	7	6	85.71	0.328
M3+E10	6	6	100.00	0.303
M3+E13	7	6	85.71	0.222
M4+E4	9	7	77.78	0.262
M4+E13	24	17	70.83	0.260
M7+E1	8	5	62.50	0.282
M7+E3	19	11	57.89	0.247
M7+E5	4	2	50.00	0.243
M12+E13	7	5	71.43	0.189
M13+E4	12	10	83.33	0.313
M13+E5	12	10	83.33	0.310
M14+E4	12	11	91.67	0.179
M14+E13	11	8	72.73	0.237
总数 Total	178	135		
均值 Mean	9.89	7.50	75.96	0.27
标准差 SD	4.90	3.54	14.80	0.06

## 2.2 基于 SRAP 扩增结果的聚类分析

基于 50 份新疆核桃种质 SRAP 扩增结果的 Jaccard's 相似性系数对其进行聚类分析,并以群体锐度测试对分类数量进行检验,结果发现可将供试种质划分为两大类(图 1):G1 包括 46 份种质,G2 仅包括 JR28、JR06、JR02 和 JR21 共 4 份种质。针对 G1 群体再次进行锐度测试,可将其分为 G1' (JR25、JR26), G2' (JR14、JR29), G3' (JR24、JR17、JR19、JR12、JR04、JR13、JR08), G4' (JR09、JR07、JR15、JR18、JR20、JR11、JR05、JR01、JR30、JR03), G5' (JR10、JR35、JR31), G6' (JR36、JR46), G7' (JR34、JR33、JR48、JR45、JR44、JR47、JR49、JR43、JR42、JR22、JR23、JR32、JR38、JR16、JR39、JR40、JR41), G8' (JR27) 和 G9' (JR37、JR50) 共 9 个亚类。



注:第一条虚线表示针对所有供试的最优分类,第二条虚线表示仅考虑 G1 类群的最优分类结果。

Note: The first dashed line represents the optimal classification for all germplasms, and the second dashed line represents the optimal classification results considering only the G1 cluster.

图 1 基于核桃坚果表型的聚类分析(UPGMA)

Fig. 1 The cluster analysis(UPGMA) based on morphological data of walnut

## 2.3 基于 SRAP 扩增结果的热图分析

基于引物组合扩增的位点数据建立聚类热图,纵轴进行计算排序后,得到较为清晰的聚类热图。由图 2 可知,横向为引物扩增信息,纵向为样品信息,左侧的聚类树为供试种质聚类树,上方的聚类树为扩增条带聚类树,位点缺失(0)用灰色表示,位点存在(1)则用红色表示。从种质分类的结果来看,聚类热图结果与 UPGMA 聚类分析结果一致,根据位点缺失(0)或位点存在(1)将其分为 5 类,各个种质的位点差异性显而易见。其中 P17、P18、P31、P33、P34 条带等非多态性条带均聚集为一类。而多态性条带中编号为 P29、P30、P32、P97、P99 的条带分别仅在个别种质中存在,编号为 P11、P12、P38、P108、P113 的条带分别仅在个别种质中不存在。从条带的聚类结果来看,

(JR24、JR17、JR19、JR12、JR04、JR13、JR08), G4' (JR09、JR07、JR15、JR18、JR20、JR11、JR05、JR01、JR30、JR03), G5' (JR10、JR35、JR31), G6' (JR36、JR46), G7' (JR34、JR33、JR48、JR45、JR44、JR47、JR49、JR43、JR42、JR22、JR23、JR32、JR38、JR16、JR39、JR40、JR41), G8' (JR27) 和 G9' (JR37、JR50) 共 9 个亚类。

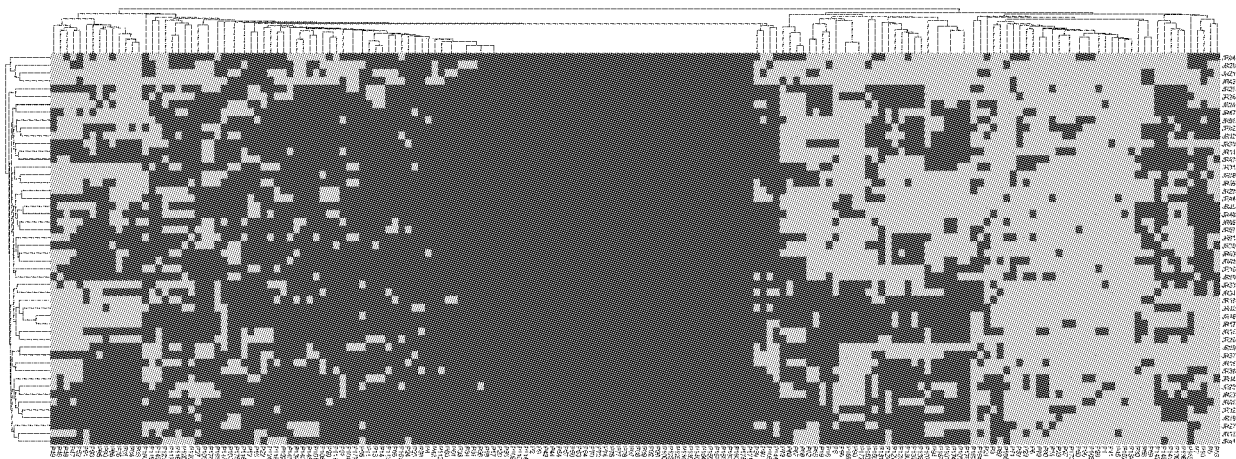
主要分为 2 类:P136、P3、P80、P26、P166 等 52 个条带仅在少数种质中存在扩增,P17、P171、P14、P27、P113 等 126 个条带则仅在少数种质中不存在扩增。

## 2.4 构建多元回归树(MRT)

应用 50 份供试核桃种质的 178 个扩增条带构建 MRT,按照 P33 这一位点为根节点开始划分,最后生成 25 个终结点树状分支图。由图 3 可知,左边的分支表示存在扩增条带,右边的分支表示没有扩增条带,其中不同引物扩增结果中 P67、P19、P8、P29、P30、P66、P28、P37、P120、P39、P32、P37、P107、P5、P47、P38、P116、P30、P112、P19、P108、P126、P36、P55、P113 和 P115 共 26 个扩增条带能够区分供试种质。即引物组合 M4/E4 (P1 ~ P9)、M7/E5 (P16 ~ P19)、M14/E4

(P27~P38)、M2/E11 (P39~P44)、M3/E4 (P45~P53)、M2/E4 (P54~P59)、M12/E13 (P60~P66)、M7/E1 (P67~P74)、M14/E13

(P106~P116)、M1/E3 (P117~P126)共10对引物组合是可以区分供试种质的重要引物组合。

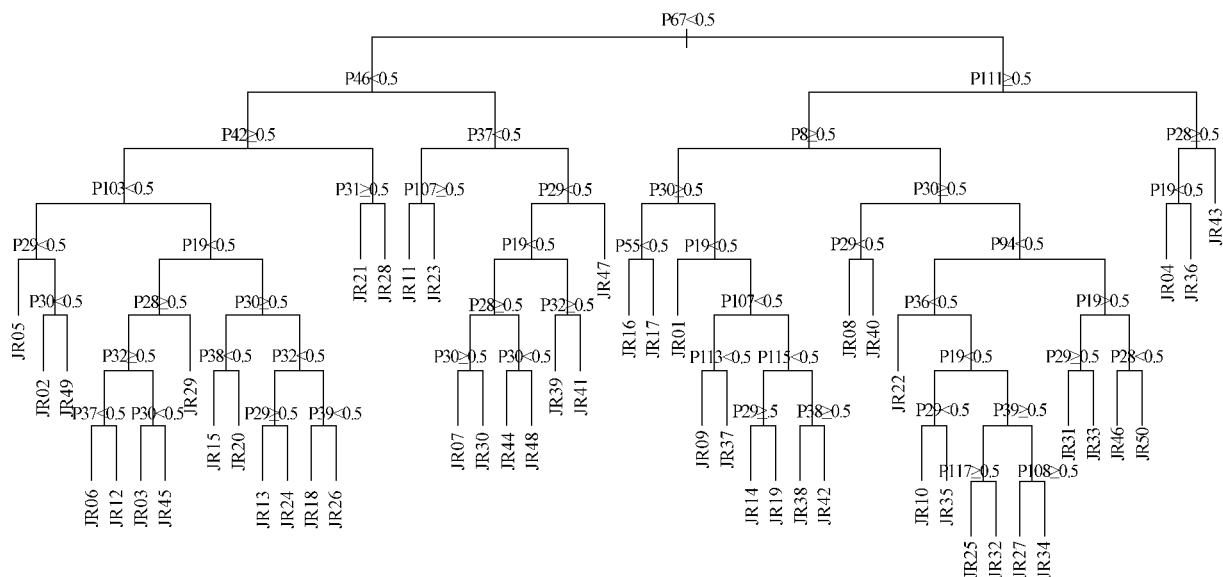


注:位点缺失(0)用灰色表示,位点存在(1)则用红色表示,横向为引物扩增信息,纵向为样品信息,左侧的聚类树为供试种质聚类树,上方的聚类树为扩增条带聚类树。

Note: The absence bands(0) are shown in grey, the presence of bands(1) are shown in red, the grouping of all germplasm (vertical grouping, left); grouping of the amplified bands (horizontal grouping, top).

图2 基于SRAP标记的扩增条带热图

Fig. 2 The heat map of the amplification profile of SRAP markers



注:左边的分支表示存在扩增条带,右边的分支表示没有扩增条带。

Note: Branches on the left indicate absence of bands, while the branches on the right indicate presence of bands.

图3 基于SRAP标记的50份核桃种质的多元回归树

Fig. 3 Multivariate regression trees(MRT) based on SRAP of 50 walnut germplasm studied

### 3 讨论

遗传多样性决定了植物种质对环境的适应能力和利用潜力,因此不仅与种质资源的收集、保存与更新密切相关,还对植物品种选育具有重要的指导意义<sup>[32-33]</sup>。多态性条带比率表明引物在供试种质中的多态性。国内外对核桃遗传多样性研究中,不同分子标记方法得到的条带数量及多态性比率有差异;利用 25 个 ISSR 引物对 8 份种质进行分析,得到每个引物的平均多态性条带为 9.18 条,平均多态性比率为 66.10%<sup>[34]</sup>;有学者使用 25 个 RAPD 引物对 59 份核桃种质进行分析得到每个引物的平均多态性条带为 8.44 条,平均多态性比率为 69.05%<sup>[23]</sup>;而使用 19 个 SSR 引物对 96 份核桃种质进行多样性分析得到的多态性比率则达到 89.6%<sup>[35]</sup>。该研究结果表明,SRAP 标记的 18 对引物共扩增出 178 个位点,其中具有多态性位点有 135 个,多态性比率均值为 72.07%,这比学者对土耳其核桃种质<sup>[36]</sup>的 SRAP 检测中所得出的条带数目(130)要多,且多态性比率也高(53.5%),在一定程度上说明引物选择的有效性,同时也说明 SRAP 标记比 RAPD 更能有效揭示核桃种质资源的遗传多样性。

在利用分子标记进行遗传多样性研究中,聚类分析方法也是重要的分析方法。聚类分析的实质是综合考察大量性状指标,利用多元统计分析将供试对象分到相对同质的群组中的一种数学方法<sup>[37]</sup>,已在植物遗传多样性研究中获得良好效果,为了解植物种质间亲缘关系,揭示种质资源的遗传多样性及种质资源的开发、利用与保护提供理论基础<sup>[38-39]</sup>。但同时聚类分析侧重于种质间关系差异的量化分析<sup>[40]</sup>,采用不同的聚类参数和聚类算法可能得到不同的分类结果,因此有学者提出群体锐度测试<sup>[31]</sup>,来确定最佳的分类数量,这种方法已广泛应用于不同植物分类研究工作中,如菊科(Asteraceae)植物花粉分类研究<sup>[41]</sup>,以及巴西学者对胡椒科(Piperaceae)不同植物的分类<sup>[42]</sup>,目前尚鲜有报道将其运用于园艺作物品种的分类鉴定工作。该研究中引物扩增结果分析后的聚类得到明显区分的两类群(G1、G2),从引物扩增结果来看,G2(JR28、JR06、JR02、JR21)4 份种质与其它种质间表现出较远的亲缘关系,可能

与亲本的不同选择有关。对 G1(46 份种质)群体进行第二次锐度测试,G3'(7 份种质),G4'(10 份种质),G7'(17 份种质)各自聚为一类,类群中种质数量较多,同时这些种质地理来源及遗传背景不同,这可能与亲本来源地较集中及种质的引种选育、驯化方式有关<sup>[43]</sup>。另一方面,对比聚类得到的 2 个类群的表型性状特征,发现其聚类结果与根据单果质量、核壳厚度及出仁率等经济性状分类并没有相关性,这可能是因为表型性状易被环境等多种因素影响呈现多样性,而其外部性状变异不一定能反映基因变化。

聚类热图是将数据的相似性与差异性利用颜色的梯度及相似程度直观的表现出来的一种方法,广泛应用于基因表达量与基因表达的趋势研究中<sup>[44-45]</sup>,同时在遗传多样性研究中,一般被用于对聚类分析结果的验证,以颜色深浅表示遗传距离的大小,直观显示供试种质间亲缘关系远近及物种多样性信息<sup>[46-47]</sup>。该研究将扩增条带的有无以热图的形式显示,能够直观表达供试种质间具有共有条带分布情况<sup>[42,48]</sup>,为揭示重要条带及引物组合提供重要信息。热图显示所有供试种质按照引物扩增结果分为两大类,与 UPGMA 聚类结果一致。扩增条带在不同种质间的独特分布,能够显示出不同引物对种质的区分情况,同时仅在少数种质中存在扩增的条带和未扩增的条带成为区分种质的重要条带。此外,有少数种质间具有相同唯一扩增条带(或唯一未扩增条带),如 P4 条带仅在 JR04、JR05 及 JR08 种质中未存在扩增;P168 条带仅在 JR06、JR08、JR16 及 JR42 种质中存在扩增,但它们并未组成明显的分类群体,其原因可能是聚类过程中更多考虑大部分种质共有的扩增条带(未扩增条带)。

多元回归树的构建能够通过利用交叉验证对分类结果进行剪枝处理,尽量避免树过拟合的现象<sup>[49]</sup>,同时其构建过程,就是变量的选择过程。因此将 MRT 应用于种质间相关关系分析,不仅能够对其进行聚类,而且具有一定的预测功能<sup>[50-51]</sup>,在生态学领域应用较为广泛,如对环境因子与多物种分布的相关关系研究中,能够对植物群落进行合理地数量分类<sup>[52]</sup>。还有学者对海底鱼类群体生态学研究,利用 MRT 量化环境对单一物种及海洋群落的影响<sup>[53]</sup>。该研究利用

16个引物组合对供试种质的扩增结果构建MRT,从MRT分类树状图中能够直观看出标记位点与种质间的关系,P67、P19、P8、P29、P30、P66、P28、P37、P120、P39、P32、P37、P107、P5、P47、P38、P116、P30、P112、P19、P108、P126、P36、P55、P113和P115共26个位点被用于构建MRT,说明其对于供试种质的区分与鉴定贡献较大,而其余位点则因影响较小而未在MRT中出现。因此认为基于核桃种质表型性状鉴定种质中M4/E4(P1~P9)、M7/E5(P16~P19)、M14/E4(P27~P38)、M2/E11(P39~P44)、M3/E4(P45~P53)、M2/E4(P54~P59)、M12/E13(P60~P66)、M7/E1(P67~P74)、M14/E13(P106~P116)、M1/E3(P117~P126)共10对引物组合是种质鉴定中重要的引物组合。此外,P28、P29、P37和P39等位点多次在MRT中出现,同样说明M14-E4(P27~P38)、M2-E11(39~44)引物组合在供试核桃种质鉴定中的重要作用。

SRAP标记是目前遗传多样性研究中常用的标记。它是一种廉价、重复性好、效率高的方法,在鉴定种质的数量性状位点和遗传多样性等植物遗传研究中有广泛的应用<sup>[14]</sup>。与其它标记系统相比,引物没有物种特异性,更贴近植物种源进化史和形态变异,尤其在研究背景缺乏的条件下优势明显<sup>[20]</sup>。该研究中了解优良实生种质与已知栽培种质间遗传关系及种质间鉴定,为进一步的育种研究提供重要依据。

#### 4 结论

50份供试新疆人工栽培核桃种质遗传多样性丰富,所选SRAP引物组合适用于核桃种质资源遗传多样性研究,引物组合中M4/E4、M7/E5、M14/E4、M2/E11、M3/E4、M2/E4、M12/E13、M7/E1、M14/E13和M1/E3共10对引物组合是供试种质鉴定中重要的引物组合。此外,引物组合能够鉴别出该研究中收集到的优良单株(种质),能够为后期育种亲本的遗传背景了解及选择提供理论依据,同时为后续更多核桃种质资源的遗传多样性的研究奠定基础。此外,该研究首次将R语言应用于SRAP标记扩增结果的聚类分析,热图分析及MRT建立,为今后核桃植物形态与遗传变异研究提供新的数据分析方法。

#### 参考文献

- [1] WILKINSON J. Nut grower' guide: The complete handbook for producers and hobbyists[M]. Melbourne: Landlinks Press, 2005: 189-209.
- [2] 郝荣庭, 张毅萍. 中国核桃[M]. 北京: 中国林业出版社, 1992.
- [3] 裴东, 鲁新政. 中国核桃种质资源[M]. 北京: 中国林业出版社, 2011.
- [4] LITZ R E. Biotechnology of fruit and nut crops[M]. USA: CAB International, 2005: 307-314.
- [5] 严兆福. 新疆核桃[M]. 乌鲁木齐: 新疆科技卫生出版社, 1994.
- [6] SRIVASTAVA P S, NARULA A, SRIVASTAVA S. Plant biotechnology and molecular markers[M]. New Delhi: Anamaya Publishers, 2004: 273-276.
- [7] SMYKAL P, WEISING K, NYBOM H, et al. DNA fingerprinting in plants: Principles, methods and applications[M]. Boca Raton: CRC Press, 2005: 54-56.
- [8] KHADIVI A. Assessment of genetic variability in pistachio (*Pistacia vera* L.) with nuclear SSR molecular markers[J]. Erwerbs-Obstbau, 2018, 60(4): 289-294.
- [9] JALILIAN H, ZAREI A, ERFANI-MOGHADAM J. Phylogeny relationship among commercial and wild pear species based on morphological characteristics and SCoT molecular markers[J]. Scientia Horticulturae, 2018, 235: 323-333.
- [10] MIRBAHAR A A, KHAN S, MARKHAND G S, et al. DNA fingerprinting of some pakistani date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cultivars using ISSR markers[J]. Pakistan Journal of Botany, 2016, 48(5): 2005-2010.
- [11] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theoretical & Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [12] COMLEKCIOGLU N, SIMSEK O, BONCUK M, et al. Genetic characterization of heat tolerant tomato (*Solanum lycopersicon*) genotypes by SRAP and RAPD markers[J]. Genetics & Molecular Research, 2010, 9(4): 2263-2274.
- [13] JINGADE P, SANNASI S, JHA C S, et al. Molecular characterisation of *Trichoderma* species using SRAP markers[J]. Archives of Phytopathology and Plant Protection, 2018, 51(3-4): 128-138.
- [14] ROBARTS D W, WOLFE A D. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP) markers: A potential resource for studies in plant molecular biology[J]. Applications in Plant Sciences, 2014, 2(7): 14-17.
- [15] 程永芳, 张明慧, 巩儒, 等. 马铃薯种质资源遗传多样性分析及杂交子代SRAP鉴定[J]. 分子植物育种, 2015, 13(8): 1757-1765.

- [16] 张明慧,宋玉霞,赵世华,等. 冬枣×宁梨巨枣的子代 SRAP 鉴定及遗传多样性分析[J]. 西北植物学报, 2014, 34(11): 2194-2200.
- [17] MISHRA M K, SURESH N, BHAT A M, et al. Genetic molecular analysis of *Coffea arabica* (Rubiaceae) hybrids using SRAP markers[J]. Revista de Biologia Tropical, 2011, 59(2): 607-617.
- [18] 张凯,罗小敏,蒋玉春,等. 甘薯种质资源的 SRAP 鉴定及遗传多样性分析[J]. 核农学报, 2013, 27(5): 568-575.
- [19] 蹇黎,朱利泉. 寒兰品种类型的 SRAP 分子鉴定[J]. 中国农业科学, 2010, 43(15): 3184-3190.
- [20] FERRIOL M, PICO B, NUEZ F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(2): 271-282.
- [21] BAYAZIT S, KAZAN K, GÜLBİTTİ S, et al. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey[J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111(4): 394-398.
- [22] EBRAHIMI A, ZAREI A, LAWSON S, et al. Genetic diversity and genetic structure of Persian walnut (*Juglans regia*) accessions from 14 European, African, and Asian countries using SSR markers[J]. Tree Genetics & Genomes, 2016, 12(6): 114.
- [23] DOĞAN Y, KAFKAS S, SÜTYEMEZ M, et al. Assessment and characterization of genetic relationships of walnut (*Juglans regia* L.) genotypes by three types of molecular markers[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 168: 81-87.
- [24] 刘晓丽,陈学森,张美勇,等. 普通核桃 (*Juglans regia*) 3 个群体遗传结构的 SSR 分析[J]. 果树学报, 2008(4): 526-530.
- [25] 李超,罗淑萍,曾斌,等. 新疆核桃种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(9): 1871-1879.
- [26] 张锐. 新疆核桃资源的遗传多样性及系统进化研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2010.
- [27] 邓建明,秦伯强,王博雯. 广义可加模型在 R 中的快捷实现及蓝藻水华预测分析中的应用[J]. 生态学杂志, 2015, 34(3): 835-842.
- [28] HONG F, BREITLING R, MCENTEE C W, et al. Rank-Prod: A bioconductor package for detecting differentially expressed genes in meta-analysis[J]. Bioinformatics, 2006, 22(22): 2825-2827.
- [29] 张祯勇,高明文,徐国伦,等. 基于 R 语言的 GGE 双标图在玉米品种区域试验中的应用[J]. 中国农学通报, 2014, 30(34): 238-243.
- [30] ARCHAK S, GAIKWAD A B. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India[J]. Genome, 2003, 46(3): 362-369.
- [31] PILLAR V D. How sharp are classifications? [J]. Ecology, 1999, 80(8): 2508.
- [32] 文亚峰,韩文军,吴顺. 植物遗传多样性及其影响因素[J]. 中南林业科技大学学报, 2010, 30(12): 80-87.
- [33] FALK D A T, HOLSINGER K E. Genetics and conservation of rare plants[M]. Oxford: Oxford University Press, 1991: 123-134.
- [34] ERTURK U, DALIKILIC Z. Determination of genetic relationship among some walnut (*Juglans regia* L.) genotypes and their early-bearing progenies using RAPD markers[J]. Romanian Biotechnological Letters, 2011, 16(1): 5994-5952.
- [35] NOOR S U, MIR J I, AHMED N, et al. Assessment of germplasm diversity and genetic relationships among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes through microsatellite markers[J]. Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences, 2018, 17: 339-350.
- [36] UZUN A, COŞKUN Ö F, YAMAN M, et al. Identification of genetic similarities among walnut (*Juglans regia* L.) genotypes selected from Central Anatolia Region of Turkey with SRAP Markers[J]. Alatarim, 2017, 16(1): 26-34.
- [37] HÄRDLE W, SIMAR L. Applied multivariate statistical analysis[M]. Berlin: Springer-Verlag, 2007: 276-278.
- [38] 苏一钧,王娇,戴习彬,等. 303 份甘薯地方种 SSR 遗传多样性与群体结构分析[J]. 植物遗传资源学报, 2018, 19(2): 243-251.
- [39] 杨永,王豪杰,张学军,等. 新疆甜瓜地方种质资源遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(3): 436-448.
- [40] 杨培奎,庄东红,马瑞君,等. 粤东地区橄榄种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国农学通报, 2011, 27(24): 86-92.
- [41] CARRIJO T T, GARBIN M L, PICANÇO LEITE W, et al. Pollen morphology of some related genera of Vernoniae (Asteraceae) and its taxonomic significance[J]. Plant Systematics and Evolution, 2013, 299(7): 1275-1283.
- [42] CHRIST J A, HOLLUNDER R K, CARVALHO M S, et al. DNA fingerprinting based on SSR amplification profiles for piper species identification (Piperaceae)[J]. Acta Botanica Brasiliensia, 2018, 32(4): 511-520.
- [43] THIMMAPPAIAH, SANTHOSH W G, SHOBHA D, et al. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers[J]. Scientia Horticulturae, 2009, 120(3): 411-417.
- [44] GUAN X, XU T, GAO S, et al. Temporal and spatial distribution of auxin response factor genes during tomato flower abscission[J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2014, 33(2): 317-327.
- [45] KHOMTCHOUK B B, HENNESSY J R, WAHLESTEDT C. MicroScope: ChIP-seq and RNA-seq software analysis suite for gene expression heatmaps[J]. BMC Bioinformatics, 2016, 17: 390.
- [46] 张尚雄,荆照,吴菲菲,等. 21 份引进 BMR 饲草高粱不育系的农艺性状和 SRAP 遗传多样性[J]. 草业科学, 2018, 35(5): 1072-1079.
- [47] 陈琼,李贵阳,罗坤,等. 凡纳滨对虾 (*Litopenaeus vannamei*) 亲虾繁殖期水体微生物多样性[J]. 海洋与湖沼, 2017, 48



(1):130-138.

[48] 石蕾. R语言在藓类形态与遗传变异研究中的应用[D]. 上海:上海师范大学,2015.

[49] 张文静,张钦弟,王晶,等. 多元回归树与双向指示种分析在群落分类中的应用比较[J]. 植物生态学报,2015,39(6):586-592.

[50] WEERAKOON S R, SOMARATNE S. Agro-morphological characterization and relationships among mustard germplasm (*Brassica juncea* [L.] Czern & Coss) in Sri Lanka: A classification tree approach[J]. Journal of Agricultural Sciences, 2011, 5(2):87-97.

[51] READ C F, DUNCAN D H, VESK P A, et al. Biocrust morphogroups provide an effective and rapid assessment tool for drylands[J]. Journal of Applied Ecology, 2014, 51(6):1740-1749.

[52] 赖江山,米湘成,任海保,等. 基于多元回归树的常绿阔叶林群丛数量分类:以古田山24公顷森林样地为例[J]. 植物生态学报,2010,34(7):761-769.

[53] RUPPERT J L W, FORTIN M J, ROSE G A, et al. Environmental mediation of Atlantic cod on fish community composition: an application of multivariate regression tree analysis to exploited marine ecosystems[J]. Marine Ecology Progress Series, 2010, 411(6):189-201.

## Identification and Application of SRAP Markers in 50 Common Walnut (*Juglans regia*) Germplasm Resources Planted in Xinjiang

LI Yalan, PAN Cunde, CHEN Hong

(College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University/Key Laboratory of Forestry Ecology and Industry Technology in Arid Region, Education Department of Xinjiang, Urumqi, Xinjiang 830052)

**Abstract:** The 50 walnut germplasms from Xinjiang were used as experimental materials in this study. The genetic diversity of 50 walnut germplasms were analysed by SRAP (Sequence-related amplified polymorphism) markers in order to provide reference for the preservation, identification and comprehensive development of walnut germplasm resources distributed in Xinjiang. The results showed that 16 SRAP primer combinations amplified 178 bands, 135 polymorphic bands, 75.84% polymorphism ratio. The cluster analysis and cluster sharpness tests showed that the test germplasm was divided into 5 groups, and the heat map displayed different primers were used to distinguish germplasm. Multiple regression trees showed that 12 amplified bands in different primers could distinguish 50 accessions. The above studies indicate that the genetic diversity of the tested walnut germplasm was abundant, and the selected SRAP primer combinations are effective for distinguishing the tested germplasm, among which M4/E4, M7/E5, M14/E4, M2/E11, M3/E4, M2/E4, M12/E13, M7/E1, M14/E13 and M1/E3 ten primer combinations were important primer combinations for the identification of germplasm for testing, which can provide basic data for basic theoretical research and breeding research of walnut germplasm resources. At the same time, the application of R language in the statistical analysis of this paper provides a new data analysis method for the future R language applied to the study of walnut plant morphology and genetic variation.

**Keywords:** walnut; SRAP-PCR; heat map; multiple regression trees; R language