

宁夏栽培枣树品种(品系)的 RAPD 分析研究

陈晓军^{1,2}, 陈虞超^{1,2}, 李 苗^{1,2}, 甘晓燕^{1,2}, 刘挺俊³, 宋玉霞^{1,2}

(1. 宁夏农业生物技术重点实验室 宁夏 银川 750002; 2. 宁夏农林科学院 农业生物技术研究中心,

宁夏 银川 750002 3. 宁夏林业厅经济林开发中心, 宁夏 银川 750000)

摘要:以宁夏 27 份栽培枣树为试材,改进方法提取高质量 DNA,通过 34 条 RAPD 引物利用 RAPD-PCR 技术系统分析了材料间的遗传关系。结果表明:试验所筛选的 16 条 RAPD 引物可以用于枣树遗传资源鉴定,较为准确地将种间材料聚类;同心圆枣与灵武长枣、中宁圆枣亲缘关系较远,灵武长枣同中宁圆枣亲缘关系较近。

关键词:枣树; RAPD; 遗传多样性; 宁夏

中图分类号: S 665.1(243) **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)01-0014-03

枣树是原产我国的特有果树,不仅是我国的第一大干、鲜兼用果树树种,更是重要的药用植物和生态经济树种。枣树分布于我国北方广大地区,一般生长在中温带与寒带过渡带,近年来成为黄河中下游流域退耕还林和发展经济林果的主要树种之一。枣美味可口,营养丰富,枣的医疗保健价值我国研究最早。枣树在宁夏分布较广泛,尤其在灵武、中宁和同心 3 个不同地方分布密度比较高。

枣树种质资源是枣演化和分类的物质基础和育种材料,能为枣生产提供优良的品种(类型)。在漫长的栽培驯化和选育过程中,优良的自然环境和地理资源形成了宁夏地区品种繁多的地方品种(系),加之不同地域间的品种交换,导致宁夏枣树品种同物异名和同名异物现象十分普遍,这给枣的生产带来很大损失,也严重影响了枣种质资源的合理开发利用及新品种的选育和推广。因此进行枣种质资源的鉴别和分类研究十分必要。

随着科技进步与社会发展,分子生物学及分子克隆技术的进一步发展和完善,诞生了直接从 DNA 水平上进行遗传分析的分子标记技术。研究枣树种质资源的遗传多样性,将为枣树新品种的定向选育、加速育种进程和提高选育效率提供分子水平的参考资料。

该研究采用 RAPD(随机扩增片段多态性)分子标记,研究中宁、同心、灵武 3 个地方的不同聚居群枣品种的亲缘关系和遗传多样性,旨在探讨 RAPD 分子标记在

枣树亲缘关系鉴定和遗传多样性应用研究,为宁夏枣树品种分类管理和档案记载提供分子水平的参考资料;并为枣树良种的高效快速分子标记辅助选育以及优良性状的开发利用研究奠定坚实的基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

灵武长枣优 1~优 7 样本采自灵武市临河镇,优 8、优 9 采自灵武市东塔镇;灵选 2、7、8 采自中宁兴林公司;中宁圆枣中选 1~7 采自中宁县,同心圆枣同圆 1~6 采自同心县喊叫水乡;另外在中宁采集梨枣材料 2 份,分别为梨枣 1、梨优,共计 27 份材料。引物由北京奥科生物公司合成, DNA 分子量 Marker DL 2000、Taq 酶, dntp 为北京天更生物公司购进,其它化学试剂均为化学纯。

表 1 34 条引物序列

Table 1 List of 34 primers

名称 Name	序列 Sequence	名称 Name	序列 Sequence
S7	GGTGACGCAG	S232	ACCCCCCACT
S8	GTCCACACGG	S277	GTCCTCGGTT
S12	CCTTGAAGCA	S301	CTGGCACGA
S27	GAAACGGGTG	S303	TGGCCAGATG
S34	TCTGTGCTGG	S314	ACAGGTGCTG
S70	TGTC TGCGTG	S366	CACCTTTCCC
S73	AAGCCTCGTC	S375	CTCCTGCCAA
S104	GGAAGTCGCC	S376	GAGCGTCGAA
S105	AGTCGTCCCC	S380	GTGTCGCGAG
S107	CTGCATGTTG	S368	GAACACTGGG
S108	GAAACACCCC	SBS-W12	TGGGCAGAAAG
S120	GGGACACATC	SBS-W11	CTGATGCGTG
S149	CTTCACCGGA	SBS-W16	CAGCCTACCA
S154	TGCGGCTGAG	SBS-Q9	GGCTAACCGA
S171	ACATGCCGTG	SBS-Q19	CCCCTATCA
S174	TGACCGCGGT	SBS-W9	GTGACCGAGT
S176	TCTCCGCCCT	SBS-W18	TTCAGGGCAC

1.2 试验方法

1.2.1 枣树 DNA 的提取 DNA 提取方法参考李登科

第一作者简介:陈晓军(1977-),男,硕士,助理研究员,现主要从事植物分子生物学应用研究工作。E-mail: smallgene@sohu.com.

通讯作者:宋玉霞(1963-),女,研究员,现主要从事特色野生植物资源利用研究工作。E-mail: songyx666@163.com.

基金项目:宁夏回族自治区科技攻关资助项目(KGZ-16-07-02)。

收稿日期: 2009-08-20

等(2005)的改良 CTAB 方法。

1.2.2 试验所用引物 该试验中所用 34 条引物序列见表 1。

1.2.3 反应体系及程序 PCR buffer 2.5 μL, DNTPs (2.5 mM) 2.0 μL, Primer(10 μM) 1.0 μL, Taqpolymerase 0.5 μL, DNA 1.5 μL, H₂O 17.5 μL, 总体积 25.0 μL; 反应程序: 94℃, 5 min; 94℃, 60 s; 36℃, 60 s; 72℃, 90 s; 循环 40 次, 最后 72℃延伸 10 min。吸取反应产物 15 μL 跑 2%琼脂糖电泳。

1.2.4 聚类分析 将不同材料间明确清晰地多态性位点信息分别采用 0-1 系统计数, 采用 DPS 统计软件, 分子数据利用多元分析中聚类分析的 Jaccard 聚类距离, UPMAG 方法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果

试验表明, 常规 CTAB (十六烷基三甲基溴化铵)法提取的 DNA 沉淀难以溶解, 溶液极黏稠, 移液枪吸取困难, 取量不准。在该试验中, 叶片材料研磨后, 采用无 CTAB 的缓冲液漂洗 2 次, 直到上清中无粘稠状液体(结果见图 1)。

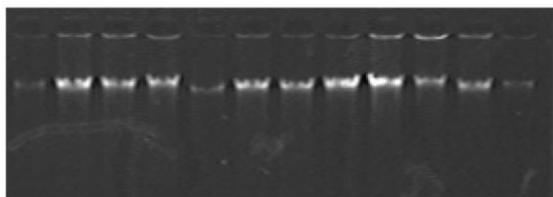


图 1 枣树叶片 DNA 0.8%琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.1 DNA 0.8% agarose gel electrophoresis of jujube leaves

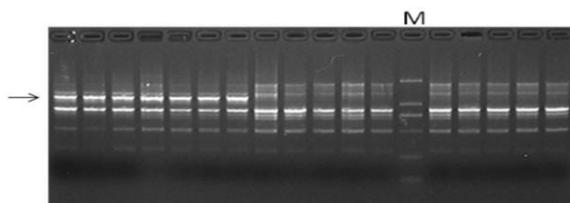


图 2 引物 SBS-W12 RAPD-PCR 结果

注: 箭头所指为多态性条带, M 为 DNA 分子量 Marker DL 2 000。

Fig.2 Results of SBS-W12 RAPD-PCR primer

Note: The arrow indicates the polymorphic bands

M for DNA Marker DL 2 000.

2.2 RAPD-PCR 结果

34 条 RAPD 引物中, 16 条引物扩增出多态性条带, 它们分别为 S8、S34、S73、S105、S107、S108、S174、S176、S232、S277、S301、S376、S380、SBS-W12、SBS-Q9、SBS-Q19、SBS-W18 部分引物 RAPD 结果见图 2、3; 16 条有

效引物提供的遗传信息见表 2; 其它 18 条引物在所供材料间扩增条带无明确多态性。

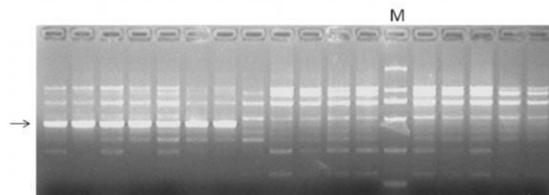


图 3 引物 SBS-W18 RAPD-PCR 结果

注: 箭头所指为多态性条带, M 为 DNA 分子量 Marker DL 2 000。

Fig.3 Results of SBS-W18 RAPD-PCR primer

Note: The arrow indicates the polymorphic bands

M for DNA Marker DL 2 000.

表 2 16 条有效引物 RAPD 结果统计

引物名称 Primer name	扩增条带 Amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态率 Rate of multi-state
S12	8	4	0.5
SBS-Q9	10	1	0.1
SBS-W18	10	7	0.7
SBS-Q19	5	1	0.2
S8	6	1	0.16
S34	9	1	0.1
S73	11	2	0.18
S105	12	2	0.16
S108	7	1	0.14
S174	8	2	0.25
S176	8	1	0.13
S232	8	1	0.13
S277	8	1	0.13
S301	8	2	0.25
S376	9	1	0.1
S380	4	1	0.25

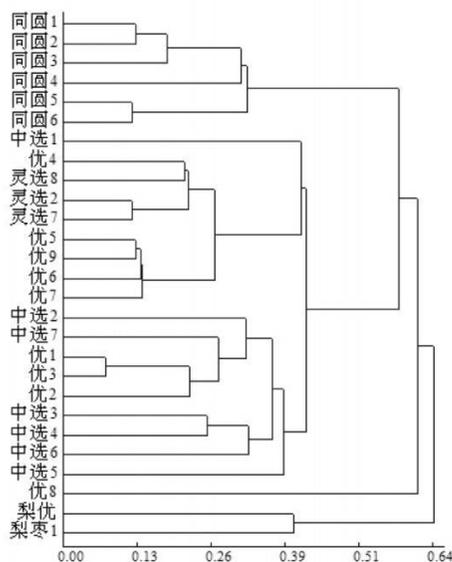


图 4 27 份枣树材料聚类分析结果

Fig.4 Results of cluster analysis of 27 jujube materials

2.3 遗传差异分析

供试 27 份枣树材料聚类分析结果见图 4。在相似系数为 0.51 时, 供试材料可以分成 4 组, 第 1 组为同心圆枣, 同圆 1~6 聚为一类; 第 2 组为灵武长枣和中宁圆枣, 其中又被分成 2 个小组, 中选 1、灵选 2、灵选 7、灵选 8、优 4、优 5、优 6、优 7、优 9 聚为一类, 优 1、优 2、优 3、中选 2、中选 3、中选 4、中选 5、中选 6、中选 7 聚为一类; 优 8 与其它宁夏栽培品种(系)遗传关系较远, 单独聚为一类; 2 个梨枣品种被聚为一类。

3 讨论

3.1 枣树 DNA 的质量

高质量的 DNA 是获得稳定、准确试验结果的前提, 该试验中参考了李登科^[1]、王永康^[2]、卢华英^[3]等方法, 该研究认为多糖类物质的去除是提取高质量的 DNA 的关键。试验中用 CTA Bfree 缓冲液 (0.2 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 0.05 mol/L EDTA, 0.25 mol/L NaCl) 清洗细胞外杂质, 达到了较好的效果。

3.2 RAPD-PCR 的优越性与稳定性

遗传标记是分析遗传多样性的有效手段。迄今, 遗传标记主要分为 4 种类型, 即形态标记、细胞学标记、生化标记和分子标记。同传统的形态标记、细胞标记和生化标记等遗传标记相比, DNA 分子标记具有直接以物质的遗传形式 DNA 表现、不受季节与环境限制、数量多、多态性高、表现中性、不影响目标性状表达、许多标记表现为共显性、以及能区别纯合体和杂合体等特点。

DNA 分子标记发展迅速, 30 多 a 内已经产生了 20 多种分子标记方法, 应用较广的有 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、ISSR 等。虽然枣树的 AFLP、ISSR 也有报道^[4-6], 但该研究认为 RAPD 技术有着操作简单、成本较为低、

对所试材料的遗传背景要求低等很多优点^[7-8]。因 DNA 质量、引物浓度、PCR 反应缓冲溶液等多种因素影响, 它的稳定性和重复性较差。但在该试验中, 利用大体积保存所提 DNA, 尽量使用同一批次试剂盒等方法克服这一缺点, 达到了较好的结果。

3.3 遗传关系分析

通过该项研究, RAPD-PCR 技术能较好地宁夏当地栽培枣树品种种质资源的鉴别和分类。宁夏中宁、同心、灵武 3 个地方的不同聚居群枣品种的亲缘关系为: 同心圆枣与灵武长枣、中宁圆枣亲缘关系较远, 灵武长枣同中宁圆枣亲缘关系较近。其中灵武长枣优 8 样品同其它长枣表现出较远的亲缘关系, 需要在今后试验中进一步调查和研究。

参考文献

- [1] 李登科, 黄丛林, 田建保, 等. 高质量枣树基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 分子植物育种, 2005(4): 579-583.
- [2] 王永康, 王永勤, 田建保, 等. 高质量枣基因组 DNA 提取方法[J]. 果树学报, 2006(2): 310-312.
- [3] 卢华英, 刘和. 影响枣基因组 DNA 提取因素的探讨[J]. 北方园艺, 2007(7): 65-67.
- [4] 王永康, 田建保, 王永勤, 等. 枣树品种品系的 AFLP 分析[J]. 果树学报, 2007(2): 146-150.
- [5] 刘兴菊, 汤新彩, 梁海永, 等. 枣树 ISSR 反应体系的建立及优化[J]. 西北林学院学报, 2007(5): 62-65.
- [6] 文亚峰, 何钢. 枣叶片 DNA 的提取以及 AFLP 反应体系的建立[J]. 中南林业科技大学学报, 2007(3): 25-28.
- [7] 赵锦, 刘孟军. 枣树 RAPD 分析条件的优化研究[J]. 果树学报, 2001(6): 329-332.
- [8] 赵锦, 刘孟军. 枣树品种、品系及其近缘种的 RAPD 分析[J]. 中国农业科学, 2003(5): 590-594.

The RAPD Analysis of *Zizyphus jujube* Cultivars in Ningxia

CHEN Xiao-jun^{1,2}, CHEN Yu-chao^{1,2}, LI Miao^{1,2}, GAN Xiao-yan^{1,2}, LIU Ting-jun³, SONG Yu-xia^{1,2}

(1. Key Lab of Agricultural Biotechnology of Ningxia Yinchuan, Ningxia 750002; 2. Academy of Agriculture and Forestry Sciences Agricultural Biotechnology Center, Yinchuan, Ningxia 750021; 3. Ningxia Forestry Development Center of Economic Forestry, Yinchuan, Ningxia 750000)

Abstract: The paper extracted high quality DNA by development method, employed RAPD-PCR by 34 primers and analyzed the genetics relationship between the experimental materials. The result showed that 16 RAPD primers could be used in appraise Chinese date genetics resource and clustering the experimental materials correctly, Tongxin date was farther than Lingwu date or Zhongning date in genetics background, Linwu date was closer to Zhongning date.

Key words: *Zizyphus jujube* cultivars; RAPD; genetics diversity