

核桃种质资源遗传多样性的 RAMP 标记分析

张建英^{1,2}, 毛向红^{1,2}, 张莹莹^{1,2}

(1. 河北省林木良种工程技术研究中心, 河北 石家庄 050061; 2. 河北省林业科学研究院, 河北 石家庄 050061)

摘要:以核桃嫩叶为试材,对 34 份核桃种质资源进行了 RAMP 技术分析研究,以期建立基因组 DNA 的有效提取方法。结果表明:利用 11 对引物共扩增出 185 个条带,其中多态性条带 142 个,多态性条带比率 62.5%~93.3%;34 份核桃样品间的相异系数 0.0274~0.4848。表明 34 份核桃种质资源具有较丰富的遗传多样性,用 RAMP 进行核桃资源的 DNA 指纹分析可行;核桃的遗传基础具有一定的地域特征,“石门核桃”种群在遗传关系上是相对独立的栽培群体。

关键词:核桃;RAMP 标记;种质资源;遗传多样性;聚类分析

中图分类号:S 664.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)09-0106-03

核桃(*Juglans regia* L.)属胡桃科胡桃属落叶乔木,分布和栽培遍及世界 50 多个国家和地区,是世界著名的四大坚果之一。核桃在我国栽培历史悠久,分布广泛,种质资源极为丰富,并且经过长期的自然繁衍,产生了大量的变异。但长期以来,核桃一直是实生零星栽培,近年来随着人们生活水平的提高和对干果营养价值的正确认识,加上国家政策的扶持,核桃的品种化和产业化栽培才得到迅猛发展,且市场上迫切需求高产、优质、抗病的优良新品种,这就督促果树工作者不得不加紧育种工作的进程。但其结果也导致了核桃品种苗木的鱼目混珠,挫伤了果农的积极性。RAMP 技术已在仲彬草属、红花、忍冬、黑麦、水稻、大麦、枸杞等种质资源的研究中得到应用^[1-6]。应用 RAMP 技术研究不同地域核桃种质资源的遗传多样性,可以为核桃的引种、杂交育种、实生选种提供理论依据,同时在新品种的鉴定方面 also 具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试样品于 2011 年 7 月采自河北、北京、山西核桃分布区,共 34 份(表 1)。样品取材为新鲜幼嫩叶片,采集后立即在液氮瓶中速冻,保存于-70℃低温冰箱中待用。

所用引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;2×Taq MasterMix 购自北京康为世纪生物科技有限公司。

第一作者简介:张建英(1970-),女,本科,高级工程师,现主要从事经济林育种与栽培工作。E-mail:lkjyl@163.com。

责任作者:毛向红(1961-),男,研究员,现主要从事经济林育种与栽培工作。E-mail:lkymxh@163.com。

基金项目:国家林业公益性行业科研专项资助项目(201004093)。

收稿日期:2013-12-12

表 1 供试核桃材料

Table 1			The tested walnut materials		
编号	样品名称	采样地或品种来源	编号	样品名称	采样地或品种来源
1	元宝(品种)	河北卢龙	18	新立河南 2(实生树)	河北遵化
2	魁香(品种)	河北卢龙	19	王堡村(实生树)	河北遵化
3	硕宝(品种)	河北卢龙	20	上温村(实生树)	河北遵化
4	龙珠(品种)	河北卢龙	21	下温村(实生树)	河北遵化
5	早硕(优系)	河北卢龙	22	白泉水村(实生树)	河北遵化
6	白浆(优系)	河北卢龙	23	白草坪村 1(实生树)	河北平山
7	钓鱼台 1(实生树)	河北卢龙	24	白草坪村 2(实生树)	河北平山
8	钓鱼台 2(实生树)	河北卢龙	25	六亩园(实生树)	河北平山
9	钓鱼台 3(实生树)	河北卢龙	26	野三坡(实生树)	河北涞水
10	重峪口 1(实生树)	河北卢龙	27	九龙镇(实生树)	河北涞水
11	重峪口 2(实生树)	河北卢龙	28	山南村(实生树)	河北涞水
12	尤大岭(实生树)	河北卢龙	29	新 2(品种)	新疆
13	岳各庄(实生树)	河北卢龙	30	温 185(品种)	新疆
14	万庄 1(实生树)	河北卢龙	31	齐家庄村(实生树)	北京门头沟
15	万庄 2(实生树)	河北卢龙	32	协和堡村 1(实生树)	山西汾阳
16	万庄 3(实生树)	河北卢龙	33	协和堡村 2(实生树)	山西汾阳
17	新立河南 1(实生树)	河北遵化	34	晋龙 1 号(品种)	山西汾阳

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用 Sharp 等^[7]改良 CTAB 法提取基因组 DNA。每份材料取 200 mg 新鲜干净核桃叶片于离心管中,加液氮迅速研磨成粉末,加入 1 000 μL CTAB 提取液,混匀。把离心管放入 65℃恒温水浴锅中 30 min,每隔 10 min 颠倒混匀 1 次。10 000 r/min 离心 6 min。取出离心管冷却至室温后,取上清液,加入等体积的酚/氯仿/异戊醇(25:24:1),混匀,12 000 r/min 离心 6 min。上清液移于新的离心管中,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),充分混匀,12 000 r/min 离心 6 min。取上清液,加入 2 倍体积的-20℃的无水乙醇,混匀后在-20℃沉淀 30 min 以上,12 000 r/min 离心 10 min,去上清。沉淀风干后,溶于 50 μL 重蒸水中,溶解后放入-20℃冰箱中备用。

1.2.2 PCR 反应体系 PCR 反应体系见表 2。

表 2 PCR 反应体系

试剂	10 μ L 反应体系
2 \times Taq MasterMix	5 μ L
Forward Primer	0.5 μ L
Reverse Primer	0.5 μ L
Template DNA	30 ng
RNase-Free Water	up to 10 μ L

1.2.3 扩增反应与电泳 扩增程序为 95℃ 5 min;94℃ 1 min;50~55℃ 1 min;72℃ 1 min,30 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min。反应产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,200 V 电泳 1 h 左右,取出进行 0.1% AgNO₃ 染色 10 min,去离子水冲洗 2 遍后,用显色液 (1.5%NaOH,0.4%甲醛)显色,在凝胶成像仪上照相并记录。

2 结果与分析

2.1 34 份核桃种质资源的多态性

应用从 24 对引物中选取的 11 对扩增条带清晰、重复性好、特异性高的引物,对 34 份核桃样品进行 RAMP 扩增,均扩增出了清晰的 DNA 谱带。从表 3 可以看出,不同引物在不同材料中扩增条带的多态性不同,引物 RAMP2-S438 扩增的多态性最高,为 93.3%,引物 RAMP1-S26 扩增的多态性最低,为 62.5%,其余引物的多态性介于二者之间。11 条引物扩增产物均有多态性,共扩增出 185 条 DNA 片段,其中 142 条具有多态性,多态性比率为 76.8%,每个引物扩增出 9~19 条多态性带,平均为 12.9 条,表明 RAMP 标记能揭示参试样品间较高的多态性,样品之间变异较大。

图 1、图 2 为部分样品的 DNA 扩增电泳图谱, RAMP 引物得到的扩增产物片断大小基本上在 130~750 bp 之间。

表 3 11 对有效引物在核桃品种中的扩增效率

引物组合	多态性扩增带数	总的扩增带数	多态性条带的比率/%
RAMP1-S427	15	21	71.4
RAMP1-S372	16	20	80.0
RAMP2-S322	9	13	69.2
RAMP1-S250	15	20	75.0
RAMP2-S250	19	21	90.5
RAMP1-RAMP2F	9	14	64.3
RAMP1-S26	10	16	62.5
RAMP2-S427	11	16	68.8
RAMP2-S381	10	13	76.9
RAMP2-S438	14	15	93.3
RAMP2-S26	14	16	87.5
总计	142	185	76.8

2.2 34 份核桃样品的遗传关系分析

按照 Nei 等^[8]方法利用 11 对引物产生的 185 条扩

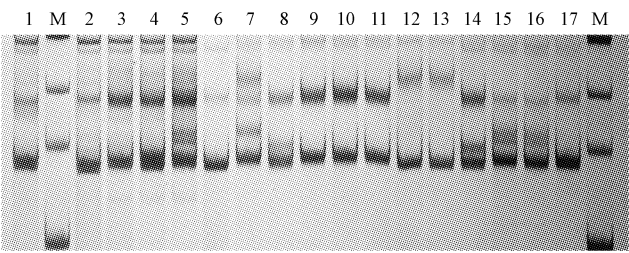


图 1 部分核桃品种 RAMP 扩增电泳图谱
注:M 代表 20 bp DNA,1~34 样品号与表 1 相同。下同。

Fig.1 RAMP amplification electrophoresis of part walnut varieties

Note:M stands for 20 bp DNA; Sample 1~34 in Table 1 with the same. The same below.

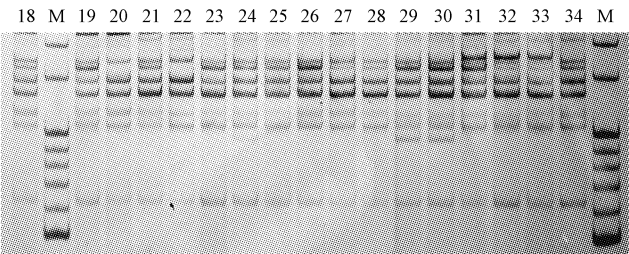


图 2 部分核桃品种 RAMP 扩增电泳图谱
Fig.2 RAMP amplification electrophoresis of Part walnut varieties

增带计算样品间的遗传相似系数 GS 和遗传相异系数 GD。结果表明,34 份核桃样品间的遗传相异系数范围为 0.0274~0.48485,其中,10 号和 34 号间相异系数最大,为 0.48485,表明二者之间的遗传距离相对较远;2 号和 3 号相异系数最小,仅为 0.0274,表明二者之间的亲缘关系最近。

根据 RAMP 标记数据计算的遗传相似系数,采用 UPGMA 法进行聚类分析,得到树状聚类图(图 3)。在遗传距离 0.29 处做结合线,可将 34 份样品划分为四大类:第 1 大类包括 1~17 号样品,其中 1~4 号元宝、魁香、硕宝、龙珠为“石门核桃”优良品种;5 号早硕、6 号白浆为“石门核桃”优良品系;7~16 号为“石门核桃”产地的实生大树;17 号新立河南采自河北遵化,与“石门核桃”产地卢龙县地理位置较近。第 2 大类为 18~28 号、31~33 号样品。这一类样品均为实生大树,采自河北遵化、平山、涞水,北京门头沟和山西汾阳等地,采样地较为复杂。第 3 类为 29、30 号样品。这 2 个样品引自新疆,是典型的新疆核桃类型,栽植于河北省林业科学研究院核桃资源圃。第 4 类为 34 号样品。该样品为山西省从当地晚实核桃实生群体中选育的优良品种,单独聚为一类,表明与其它供试样品间的遗传差异较大。

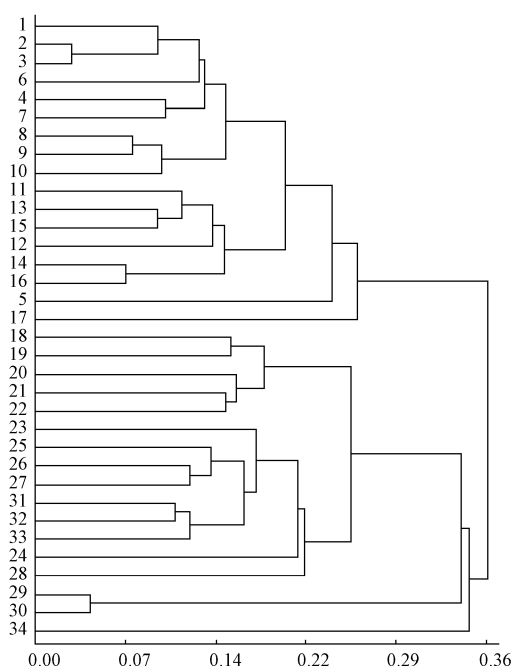


图3 34份核桃样品的聚类图分析

Fig. 3 The clustering figure of 34 walnut samples

3 结论与讨论

RAMP 标记能揭示参试样品间较高的多态性。该研究利用 RAMP 技术,对来自不同地区的 34 份核桃材料进行了初步分析,结果显示多数引物扩增均具有多态性,多态性最高的为 93.3%,多态性最低的为 62.5%。表明用 RAMP 进行核桃资源的 DNA 指纹分析可以揭示 34 份核桃种质资源间的遗传多样性,为核桃品种鉴定和保护研究奠定了基础。

核桃样品间存在丰富的遗传变异。RAMP 标记发现各生态区栽培类型在不同条件下产生了丰富的遗传变异。34 份核桃样品间的遗传相异系数为 0.0274~

0.48485,其中,10 号重峪口 1 和 34 号晋龙 1 号间遗传距离最近,2 号魁香和 3 号硕宝间遗传距离最近。

核桃的遗传基础具有一定的地域特征。聚类分析结果将参试的 34 份样品划分为 4 类:第 1 类 1~17 号样品中,1~16 号样品来自“石门核桃”产地卢龙县,第 17 号样品则采自于与卢龙地缘关系较近的遵化,表明“石门核桃”种群是独立于北京、河北省其它地区核桃和“汾阳核桃”之外的特殊种群;第 2 类 18~28 号、31~33 号样品分别来自于河北燕山地区的遵化、河北省太行山区的涞水、平山、涉县和北京的门头沟、山西汾阳,表明山西的“汾阳核桃”与北京、河北太行山种群遗传关系较为接近;第 3 类的 29、30 号样品是引进的新疆核桃品种,与其它种类的核桃遗传距离相对较远;第 4 类 34 号样品为山西省通过实生选种选育的优良品种,与其它 3 类种群遗传关系较远。

参考文献

- [1] 张玉瑶,张军,梁海永,等. 8 个忍冬品种遗传关系的 RAMP 分析[J]. 安徽农业科学,2011,39(9):5098-5100.
- [2] 赵欢,吴卫,郑有良,等. 应用 RAMP 分子标记研究红花资源遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(1):64-71.
- [3] 梁海永,刘兴菊,杨敏生. 利用 RAMP-PCR 技术对枸杞 10 个品种资源的分析[J]. 中国农学通报,2011,27(16):61-64.
- [4] 刘巧稚,黄富,谢戎,等. 利用 PAMP 标记研究 24 份优质抗稻瘟病水稻种质资源的遗传多样性[J]. 四川农业大学学报,2007,1(25):25-28.
- [5] 尚海英,郑有良,魏育明,等. 应用 RAMP 标记研究黑麦属遗传多样性[J]. 农业生物技术学报,2003,11(6):566-571.
- [6] 张利,周永红,魏育明,等. 应用 RAMP 分子标记探讨仲彬草属的种间关系[J]. 高技术通讯,2003(4):28-33.
- [7] Sharp P J, Kreis M, Shewry P R, et al. Location of β -amylase sequences in wheat and its relatives[J]. Theor Appl Genet, 1988, 75:286-290.
- [8] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in term of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.

Study on the Genetic Diversity of Walnut Germplasm Resources Based on RAMP Marker

ZHANG Jian-ying^{1,2}, MAO Xiang-hong^{1,2}, ZHANG Ying-ying^{1,2}

(1. Hebei Engineering and Technology Research Center of Improved Forest Variety, Shijiazhuang, Hebei 050061; 2. Hebei Academy of Forestry Science, Shijiazhuang, Hebei 050061)

Abstract: Taking walnut as material, 34 walnut germplasm resources were analyzed by RAMP technology, in order to establish genomic DNA extraction method. The results showed that eleven primers amplified 185 DNA bands totally, 142 bands among which were polymorphic. The rate of polymorphic bands were 62.5%~93.3%. The dissimilarity coefficient among samples were 0.0274 to 0.4848, which indicated that 34 walnut germplasm had abundant genetic diversity. RAMP was a feasible approach for DNA fingerprint of walnut germplasm resources. The genetic basis of walnut had a certain regional features, and ‘Shimen’ walnut was a relatively independent cultivated population in genetic relation.

Key words: walnut; RAMP markers; germplasm resources; genetic diversity; cluster analysis