

刁 毅. 攀枝花芒果遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 江苏农业科学, 2019, 47(13): 35–38.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.009

攀枝花芒果遗传多样性的 RAPD 分析

刁 毅

(攀枝花学院生物与化学工程学院/干热河谷特色生物资源开发四川省高等学校重点实验室, 四川攀枝花 617000)

摘要:采用 RAPD 分子标记技术对 12 个芒果品种进行遗传多样性研究。结果发现, 6 条 RAPD 引物共检测到 36 条清晰谱带, 其中多态性条带占比为 77.78%。芒果在物种水平上遗传多样性较高, 而在居群水平上遗传多样性相对较低; 居群间遗传变异较高, 在居群水平上, 金白花的遗传多样性最高, 遗传分化程度最低; 乳芒和马亚的遗传多样性最低, 遗传分化程度最高。聚类分析结果表明, 相似系数为 0.72 时, 12 种芒果品种可分为 4 个大类群, 金白花和鹰嘴芒的遗传一致度最大, 贵妃和鹰嘴芒遗传一致度最低。

关键词:芒果; RAPD; 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: S667.701 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)13-0035-03

芒果 (*Mangifera indica* L.) 起源于东南亚, 属漆树科 (Anacardiaceae) 芒果属 (*Mangifera*), 是热带、亚热带水果之一, 在亚洲被誉为“水果之王”^[1-2]。我国是世界上十大芒果生产国之一, 芒果种植主要分布在年气温较高的海南、台湾、广西、广东、云南、四川、福建等地区。海南、广西和云南等地是世界芒果原产地之一, 拥有丰富的野生芒果资源^[3-5]。四川省芒果主产区主要分布在攀西干热河谷地带, 该区域全年热量充足, 日照时数长, 昼夜温差大, 干湿季明显, 冬春气温高, 全年基本无霜, 芒果花期无梅雨, 挂果期风量少, 是全国少有的适宜种植芒果的地区^[6-7]。本研究以云南、广西芒果品种作对照, 分析攀枝花主栽芒果品种的遗传多样性, 旨在为攀枝花芒果种质资源利用、引种、育种、种植提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

12 份芒果种质嫩叶采集后, 放入冰盒中, 在 -20 ℃ 冰箱保存。12 个芒果品种名称与产地信息见表 1。

1.2 DNA 提取

DNA 提取采用改良十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法^[8-9]。

1.3 RAPD-PCR 扩增

随机扩增多态性 DNA (RAPD) - PCR 扩增采用马艳芝等报道的方法^[10]。

RAPD-PCR 反应体系为 20 μL, 其中, 8 μL ddH₂O, 1 μL DNA 模板, 1 μL RAPD 引物, 10 μL 2 × Taq PCR Master Mix。RAPD-PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 37 ℃ 退火 40 s, 72 ℃ 复性 110 s, 35 次循环; 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

用 50 mL 1 × TAE 和 0.5 g 琼脂糖配制 1.0% 琼脂糖凝胶, 煮沸并适度冷却后加入 5 μL Goldview I 型核酸染色剂, 摇匀后倒胶。120 V 电泳 30 min 后, 在凝胶成像系统中扫描成像。

表 1 芒果品种及产地

编号	品种	产地
1	乳芒	四川省攀枝花市
2	吉禄	四川省攀枝花市
3	鹰嘴芒	四川省攀枝花市
4	热研 16 号	广西壮族自治区南宁市
5	攀育 2 号	四川省攀枝花市
6	红苹	云南省昆明市
7	金白花	四川省攀枝花市
8	贵妃	四川省攀枝花市
9	海顿	四川省攀枝花市
10	马亚	云南省昆明市
11	热农 10 号	云南省昆明市
12	椰香	四川省攀枝花市

1.5 数据分析

根据凝胶电泳条带的有无计数, 有带 (显性) 记为 1, 无带 (阴性) 记为 0, 强带和弱带均赋值为 1, 从而形成 RAPD 表型原始数据矩阵。对 RAPD 表型原始数据矩阵用 POPGENE32、AMOVA-PREPI.01、NTSYS2.10e 等软件进行遗传多样性分析与聚类分析^[11-15]。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及多态性

从表 2 可以看出, 从 30 条 RAPD 引物中筛选出 6 条谱带清晰、多态性高、重复性好的 RAPD 引物; 用 6 条 RAPD 引物对 12 个不同芒果品种 DNA 进行扩增, 共检测到 36 个条带, 其中多态性条带 28 条, 多态率为 77.78%。

2.2 芒果遗传多样性分析

用 POPGENE32 软件计算得到的芒果各品种居群遗传参数见表 3。在物种水平上, 多态位点百分率 (PPB) 为 91.67%,

收稿日期: 2018-03-24

基金项目: 四川省教育厅科研项目 (编号: 16ZA0414)。

作者简介: 刁 毅 (1975—), 男, 四川南充人, 博士, 教授, 主要从事应用微生物与植物抗病性方面的研究。E-mail: diaoy163@163.com。

表 2 RAPD 引物序列及扩增的多态性条带数

引物名称	引物序列 (5'→3')	总带数 (条)	多态性带数 (条)	多态率 (%)
S45	TGACGCGACA	6	4	66.67
S62	GTGAGCGGTC	6	5	83.33
S65	GATGACCGCC	6	4	66.67
S68	TGGACCGGTG	6	5	83.33
S96	AGCGTCCTCC	6	4	66.67
S97	ACGACCGACA	6	6	100.00
合计		36	28	77.78

表 3 12 个芒果品种的遗传多样性分析

项目	多态位点	多态位点百分率(%)	观察等位基因数	有效等位基因数	Nei's 基因多样性指数	Shannon 多样性指数
居群名称						
乳芒	7	19.44	1.194 4	1.116 9	0.067 5	0.101 5
吉禄	11	30.56	1.305 6	1.131 1	0.085 8	0.137 0
鹰嘴芒	10	27.78	1.277 8	1.103 3	0.071 9	0.111 7
热研 16 号	7	19.44	1.194 4	1.155 7	0.082 3	0.118 2
攀育 2 号	9	25.00	1.250 0	1.114 3	0.072 9	0.115 1
红苹	10	27.78	1.277 8	1.180 9	1.101 7	0.151 0
金白花	17	47.22	1.472 2	1.278 4	1.161 7	0.244 2
贵妃	11	30.56	1.305 6	1.286 2	0.145 3	0.203 5
海顿	10	27.78	1.277 8	1.161 5	0.094 2	0.142 7
马亚	7	19.44	1.194 4	1.116 9	0.067 5	0.101 5
热农 10 号	8	22.22	1.222 2	1.183 5	0.096 2	0.137 4
椰香	10	27.78	1.277 8	1.122 7	0.079 3	0.126 0
平均值	10	27.08	1.270 8	1.162 6	0.260 5	0.140 8
物种水平	33	91.67	1.916 7	1.638 1	0.355 6	0.520 0

表 4 12 个芒果品种的遗传多样性 Nei's 分析

居群总遗传多样性	居群间遗传多样性	遗传分化系数	基因流强度
0.355 6	0.093 9	0.736 1	0.179 3

为 0.736 1,说明芒果居群间的变异占总变异的 73.61%,居群内变异占总变异的 26.39%。由表 5 可以看出,12 个芒果

表 5 12 个芒果品种的 AMOVA 分析

项目	自由度	方差	平均方差	变异组分	变异百分率(%)	<i>PHIst</i>	<i>P</i> *
居群间	9	106.634 1	11.848 2	1.857	62.17	0.621 7	<0.001
居群内	2	342.512 8	171.256 4	1.130	37.83		<0.001

注:*为 1000 次置换的显著性检验。

由表 6 可知,对居群间遗传多样性所占比例(Shannon 居群分化系数)与遗传分化系数(*Gst* = 0.736 1)作对比得出,金白花 Shannon 居群分化系数最低,低于遗传分化系数;马亚和乳芒 Shannon 居群分化系数最高,高于遗传分化系数,说明金白花居群遗传分化程度最低,马亚居群和乳芒居群遗传分化程度最高。

2.4 遗传距离与聚类分析

遗传一致度和遗传距离可以反映群体间遗传亲缘关系,12 个芒果品种居群间的遗传距离与遗传一致度见表 7。12 个品种居群间的遗传一致度在 0.484 6~0.904 8 之间;Nei's 遗传距离范围在 0.100 0~0.724 5 之间。其中,金白花居群和鹰嘴芒居群的遗传一致度最大,为 0.904 8,遗传距离最小,为 0.100 0;贵妃居群和鹰嘴芒居群遗传一致度最小,为 0.484 6,遗传距离最大,为 0.724 5。

观察等位基因数(*Na*)为 1.916 7,有效等位基因数(*Ne*)为 1.638 1,Nei's 基因多样性指数(*He*)为 0.355 6,Shannon 多样性指数(*I*)为 0.520 0;在居群水平上,*PPB* 平均值为 27.08%,*Na* 为 1.270 8,*Ne* 为 1.162 6,*He* 为 0.260 5,*I* 为 0.140 8。说明芒果物种水平遗传多样性比居群水平高。从表 3 还可以看出,在居群水平上,金白花居群的 *PPB*、*Na*、*He* 和 *I* 最高,说明其遗传多样性最高;乳芒和马亚居群的 *PPB*、*Na*、*He* 和 *I* 均最低,说明其遗传多样性最低。

2.3 遗传分化与基因流分析

由表 4 可以看出,12 个芒果品种的遗传分化系数(*Gst*)

品种居群间的居群分化指数(*PHIst*)为 0.621 7,说明在总的遗传变异中,62.17%的遗传变异发生在居群间,37.83%的遗传变异发生于居群内。由表 6 可以看出,12 个芒果品种的 Shannon 居群分化系数平均值为 0.729 2,说明居群间的遗传变异占总变异的 72.92%,群体内所占比例为 27.08%。由以上分析可知,芒果居群间遗传变异大于居群内。

根据 POPGENE32 软件得出的遗传一致度用 NTSYS2.10e 软件进行聚类分析。由图 1 可知,相似系数为 0.72 时,12 种芒果品种可分为 4 个大类群:乳芒和攀育 2 号为一类群;鹰嘴芒、金白花、椰香、马亚和热农 10 号为一类群;吉禄和红苹为一类群;热研 16 号、贵妃和海顿为一类群。

3 讨论

分子标记是以生物大分子的多态性为基础的遗传标记,是继形态标记、细胞标记、生化标记之后发展起来的新技术,其操作简单、快速,不受基因表达与季节、环境条件的影响,被广泛应用于遗传多样性检测、构建核心种质、种质资源鉴定与分类、亲缘关系分析、杂种鉴定、遗传图谱构建等方面。RAPD 技术是用随机引物对 DNA 未知序列基因组进行多态性分析的技术,该技术具有操作简单、检测速度快、灵敏度高,

表 6 12 个芒果品种的 Shannon 多样性指数分析

居群名称	物种水平多样性指数	居群水平基因多样性指数	Shannon 居群分化系数
乳芒	0.52	0.101 5	0.804 8
吉禄	0.52	0.137 0	0.736 5
鹰嘴芒	0.52	0.111 7	0.785 2
热研 16 号	0.52	0.118 2	0.772 7
攀育 2 号	0.52	0.115 1	0.778 7
红苹	0.52	0.151 0	0.709 6
金白花	0.52	0.244 2	0.530 4
贵妃	0.52	0.203 5	0.608 7
海顿	0.52	0.142 7	0.725 6
马亚	0.52	0.101 5	0.804 8
热农 10 号	0.52	0.137 4	0.735 8
椰香	0.52	0.126 0	0.757 7
平均值	0.52	0.140 8	0.729 2

注:Shannon 居群分化系数 = (物种水平多样性指数 - 居群水平基因多样性指数)/物种水平多样性指数。

可以不依赖物种特性和基因组结构进行的优点^[16]。

本研究选用 8 份攀枝花芒果主栽品种,同时用 3 份云南昆明芒果品种与 1 份广西南宁芒果品种作对照,通过 RAPD 技术分析发现,芒果在物种水平上遗传多样性参数均高于居群水平平均值,说明芒果在物种水平上遗传多样性高。

遗传分化系数(*Gst*)是衡量群体遗传分化最常用的指标,其数值表示在总的遗传变异中群体间变异所占的比例。当 *Gst* 在 0 ~ 0.05 之间时,表示遗传分化程度弱;当 *Gst* 在 0.05 ~ 0.15 之间时,表示遗传分化程度中等;当 *Gst* 在 0.15 ~ 0.25 之间时,表示物种遗传分化程度高;当 *Gst* 大于 0.25 时,表示遗传分化程度很高^[17]。在本研究中,*Gst* = 0.736 1,说明芒果居群间的变异占总变异的 73.61%,居群内变异占总变异的 26.39%;*Gst* 大于 0.25,说明芒果品种遗传分化程度很高。

芒果遗传分化系数(0.736 1)、AMOVA 方差分析的居群分化指数(0.621 7)与 Shannon 居群分化系数(0.729 2)在数值上略有差异,但所表现的遗传趋势基本一致,表明芒果居群间的遗传变异与遗传分化大于居群内。

表 7 群体遗传一致度与遗传距离

品种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1		0.715 0	0.687 8	0.682 6	0.814 6	0.544 4	0.654 7	0.715 6	0.729 4	0.580 8	0.620 3	0.664 6
2	0.335 4		0.767 1	0.687 5	0.739 2	0.785 7	0.680 2	0.641 1	0.798 9	0.682 0	0.764 0	0.673 2
3	0.374 2	0.265 1		0.571 9	0.821 4	0.559 8	0.904 8	0.484 6	0.686 8	0.723 5	0.740 1	0.812 4
4	0.381 9	0.374 7	0.558 8		0.636 5	0.706 7	0.601 7	0.784 1	0.799 2	0.716 6	0.610 0	0.518 9
5	0.205 0	0.302 2	0.196 8	0.451 8		0.611 7	0.777 3	0.627 2	0.713 4	0.669 2	0.705 0	0.747 6
6	0.608 1	0.241 1	0.580 1	0.347 2	0.491 4		0.617 9	0.670 0	0.631 3	0.654 4	0.611 3	0.581 4
7	0.423 6	0.385 3	0.100 0	0.507 9	0.251 9	0.481 4		0.566 7	0.615 4	0.731 0	0.712 6	0.781 2
8	0.334 6	0.444 5	0.724 5	0.243 2	0.466 5	0.400 5	0.568 0		0.674 6	0.606 7	0.600 5	0.576 3
9	0.315 5	0.224 6	0.375 7	0.224 1	0.337 7	0.460 0	0.485 6	0.393 7		0.685 2	0.725 6	0.612 4
10	0.543 3	0.382 7	0.323 6	0.333 2	0.401 6	0.424 1	0.313 3	0.499 7	0.378 1		0.829 1	0.741 4
11	0.477 6	0.269 2	0.301 0	0.494 2	0.349 6	0.492 1	0.338 8	0.510 0	0.320 8	0.187 4		0.810 0
12	0.408 5	0.397 0	0.207 7	0.656 1	0.290 8	0.542 2	0.247 0	0.551 2	0.490 3	0.299 2	0.210 8	

注:表中左下数据表示遗传距离;右上数据表示遗传一致度。

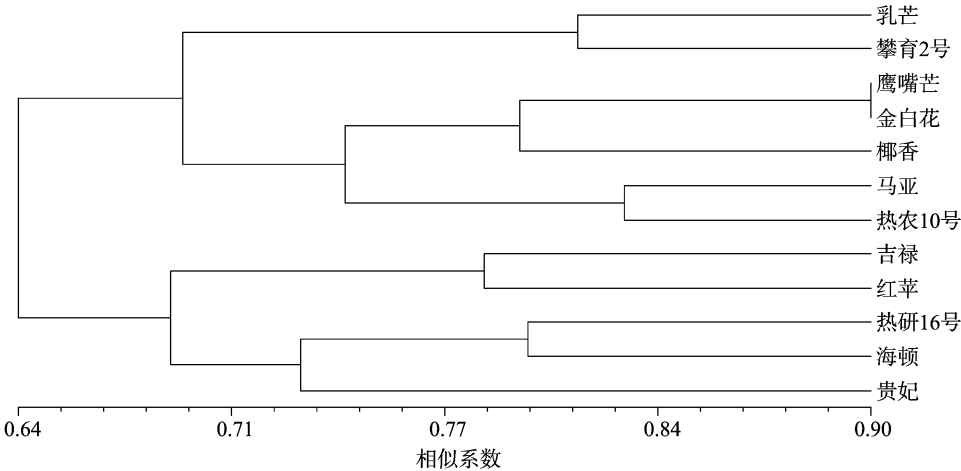


图1 不同芒果品种的 UPGMA 聚类图

聚类分析结果可以看出,12 份芒果品种的遗传一致度在 0.7 ~ 0.9 之间,说明这些芒果主栽品种具有丰富的遗传多样性;但鹰嘴芒与金白花之间遗传遗传一致度约为 0.9,说明它

们之间的亲缘关系比较接近。对攀枝花芒果主栽品种遗传多样性的深入研究,将有助于攀枝花芒果引种、育种、种植的有序开展,从而促进攀枝花芒果产业的发展。

刘敬贤,黄亚群,陈景堂,等. 基于高密度连锁图谱定位玉米株高 QTL[J]. 江苏农业科学,2019,47(13):38-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.13.010

基于高密度连锁图谱定位玉米株高 QTL

刘敬贤,黄亚群,陈景堂,祝丽英,赵永锋,郭晋杰
(河北农业大学农学院/国家玉米改良中心河北分中心,河北保定 071000)

摘要:为了解析株高性状的遗传基础,以 X178 和 NX531 为亲本构建的 124 份 RIL 群体为研究材料,基于高密度 SNP 标记构建的包含 7 278 个 bin 的 bin-map 连锁图谱,对辛集、保定 2 个地点 RIL 群体的株高、穗位高、穗位系数 3 个性状进行 QTL 定位分析,共检测到 16 个 QTL 位点,有 9 个 QTL 的表型贡献率大于 10.00%。其中辛集检测到 7 个,单个 QTL 表型贡献率范围 4.67%~13.94%;保定检测到 9 个,单个 QTL 表型贡献率范围 0.35%~25.56%。在 2 个环境下检测到 *qEHX3* 和 *qEHB3* 的置信区间存在重叠。在第 1 连锁群上 289.16~296.77 Mb 发现控制株高的 *qPHB1* 和穗位高的 *qEHB1-2* 定位区间相邻。在 bin1.07 定位到的 *qPHX1-1* 区间内存在 *br2(brachytic2)* 基因,bin1.09~1.1 定位到的 *qPHX1-2* 区段内存在 *d8(dwarf8)* 基因,bin3.07 定位到的 *qEHX3* 区段内存在 *ccd8* 基因,这 3 个基因影响节间的伸长,与株高、穗位高的发育相关。该研究结果为株高相关性状 QTL 精细定位、克隆提供理论依据。

关键词:玉米;株高;穗位高;穗位系数;高密度连锁图谱

中图分类号:S513.03 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2019)13-0038-04

随着我国农业的快速发展,全程机械化生产是解决“三农”问题的关键。玉米倒伏直接影响机械化生产,而品种自身抗倒能力的强弱直接决定了能否采用机械化生产。在玉米的诸多株型性状中,株高、穗位高与玉米抗倒能力密切相关。Horner 等以 F44 和 F6 为材料进行 7 轮回交选择,发现穗位降

低 9%,倒伏率减少 25%^[1]。张泽民等研究表明,通过降低穗位系数,可以提高其抗倒性^[2]。付志远等研究发现,穗上节间数与穗位高及穗位系数显著相关,可以通过增加穗上节间数来减小穗位系数,增强玉米的抗倒性能^[3]。而选育抗倒、适合于机械化收获的玉米品种,必须了解株高、穗位高等性状的遗传机制。

一些研究者已发现株高、穗位高性状受主基因+多基因控制,且基因的加性、显性和上位性效应均起作用;在不同的遗传群体中这些基因作用的大小有差异,以基因的加性效应为主^[4-6]。严建兵等利用简单序列重复(SSR)等分子标记对株高等性状进行定位研究,发现了一些与玉米株高、穗位高有关的数量性状基因座(QTL)^[7-10]。这些相关 QTL 因其定位

收稿日期:2018-04-05

基金项目:河北省科技计划(编号:16226323D-2);农作物种质资源保护项目(编号:2016-2017NWB036-0405)。

作者简介:刘敬贤(1990—),女,河北保定人,硕士研究生,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail:liujingxian116@163.com。

通信作者:黄亚群,硕士,教授,主要从事玉米遗传育种研究。E-mail:hyqun@hebau.edu.cn。

参考文献:

- [1] 蔚红,雷新涛,臧小平. 芒果无公害生产技术[M]. 北京:中国农业出版社,2002:8-10.
- [2] 黄剑锋,赵志常,党志国. 香花芒的性状描述与评价[J]. 热带作物学报,2015,36(8):1380-1384.
- [3] 叶子. 中国芒果生产现状[J]. 世界热带农业信息,2004,3(4):10-11.
- [4] 黄丽芳,闫林,范睿,等. 芒果实生资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 热带作物学报,2011,32(10):1828-1832.
- [5] 陈华蕊,陈业渊,尼章光,等. 芒果生物技术研究进展[J]. 江西农业学报,2009,21(12):90-94.
- [6] 黄云,刘斌,杜邦,等. 2013 年攀枝花芒果冻害调查报告[J]. 中国热带农业,2014,21(2):51-54.
- [7] 伍从银. 攀枝花芒果产业发展研究[D]. 雅安:四川农业大学,2016.
- [8] 王家保,王令霞,刘志媛,等. 芒果 DNA 提取方法比较及 ISSR 反应体系的优化[J]. 生物技术,2005,15(5):37-41.
- [9] 张宇,黄国弟,唐志鹏,等. 芒果总 DNA 提取方法比较分析

- [J]. 经济林研究,2014,32(2):62-65.
- [10] 马艳芝,陈桂平. 11 份荆芥种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中药材,2017,40(2):311-314.
- [11] 孙晓梅. 利用 RAPD 标记评价百合品种间的遗传多样性[M]. 北京:中国林业出版社,2005:312-342.
- [12] Yeh F C, Yang Y, Boyle T J, et al. POPGENE version 1.32, the user-friendly shareware for population genetic analysis[J]. University of Alberta, 1999, 12(11):143-165.
- [13] Nei M. Genetic distance between populations[J]. American Naturalist, 1972, 106(949):283-292.
- [14] 梅嘉洛,黄小霞. 关于狼尾草属牧草遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[J]. 福建农林大学作物科学学院, 2016, 26(12):265-269.
- [15] 邓明文. 岷江百合种质资源遗传多样性研究[D]. 南京:南京林业大学,2008.
- [16] 赵英. 分子标记在芒果上的应用研究[J]. 农业研究与应用, 2013, 148(5):19-23.
- [17] Wright S. The genetical structure of populations[J]. Annals of Eugenics, 1951, 15(4):323-354.