

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 °C 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 μ L, 其中, 8 μ L ddH₂O, 1 μ L DNA 模板, 1 μ L RAPD 引物, 10 μ L 2 \times Taq PCR Master Mix。RAPD-PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 37 °C 退火 40 s, 72 °C 复性 110 s, 35 次循环; 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。

1.4 琼脂糖凝胶电泳

用 50 mL 1 \times 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 μ L 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 | TGAGCGACA | 6 | 4 | 66.67 |
| S62 | GTGAGCGTC | 6 | 5 | 83.33 |
| S65 | GATGACCGCC | 6 | 4 | 66.67 |
| S68 | TGGACCGGTG | 6 | 5 | 83.33 |
| S96 | AGCGTCTCC | 6 | 4 | 66.67 |
| S97 | ACGACCGACA | 6 | 6 | 100.00 |
| 合计 | | 36 | 28 | 77.78 |

观察等位基因数(N_a)为1.9167,有效等位基因数(N_e)为1.6381,Nei's基因多样性指数(H_e)为0.3556,Shannon多样性指数(I)为0.5200;在居群水平上,PPB平均值为27.08%, N_a 为1.2708, N_e 为1.1626, H_e 为0.2605, I 为0.1408。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、 N_a 、 H_e 和 I 最高,说明其遗传多样性最高;乳芒和马亚居群的PPB、 N_a 、 H_e 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(G_{st})

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 | 1.1944 | 1.1169 | 0.0675 | 0.1015 |
| 吉禄 | 11 | 30.56 | 1.3056 | 1.1311 | 0.0858 | 0.1370 |
| 鹰嘴芒 | 10 | 27.78 | 1.2778 | 1.1033 | 0.0719 | 0.1117 |
| 热研16号 | 7 | 19.44 | 1.1944 | 1.1557 | 0.0823 | 0.1182 |
| 攀育2号 | 9 | 25.00 | 1.2500 | 1.1143 | 0.0729 | 0.1151 |
| 红苹 | 10 | 27.78 | 1.2778 | 1.1809 | 1.1017 | 0.1510 |
| 金白花 | 17 | 47.22 | 1.4722 | 1.2784 | 1.1617 | 0.2442 |
| 贵妃 | 11 | 30.56 | 1.3056 | 1.2862 | 0.1453 | 0.2035 |
| 海顿 | 10 | 27.78 | 1.2778 | 1.1615 | 0.0942 | 0.1427 |
| 马亚 | 7 | 19.44 | 1.1944 | 1.1169 | 0.0675 | 0.1015 |
| 热农10号 | 8 | 22.22 | 1.2222 | 1.1835 | 0.0962 | 0.1374 |
| 椰香 | 10 | 27.78 | 1.2778 | 1.1227 | 0.0793 | 0.1260 |
| 平均值 | 10 | 27.08 | 1.2708 | 1.1626 | 0.2605 | 0.1408 |
| 物种水平 | 33 | 91.67 | 1.9167 | 1.6381 | 0.3556 | 0.5200 |

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 |
|----------|----------|--------|--------|
| 0.3556 | 0.0939 | 0.7361 | 0.1793 |

为0.7361,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

品种居群间的居群分化指数(PHI_{st})为0.6217,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0.7292,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。

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(%) | PHI_{st} | P^* |
|-----|-----|----------|----------|-------|----------|------------|--------|
| 居群间 | 9 | 106.6341 | 11.8482 | 1.857 | 62.17 | 0.6217 | <0.001 |
| 居群内 | 2 | 342.5128 | 171.2564 | 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($G_{st}=0.7361$)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0.4846~0.9048之间;Nei's遗传距离范围在0.1000~0.7245之间。其中,金白花居群和鹰嘴芒居群的遗传一致度最大,为0.9048,遗传距离最小,为0.1000;贵妃居群和鹰嘴芒居群遗传一致度最小,为0.4846,遗传距离最大,为0.7245。

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(G_{st})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 G_{st} 在0~0.05之间时,表示遗传分化程度弱;当 G_{st} 在0.05~0.15之间时,表示遗传分化程度中等;当 G_{st} 在0.15~0.25之间时,表示物种遗传分化程度高;当 G_{st} 大于0.25时,表示遗传分化程度很高^[17]。在本研究中, $G_{st}=0.7361$,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%; G_{st} 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(0.7361)、AMOVA方差分析的居群分化指数(0.6217)与Shannon居群分化系数(0.7292)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。

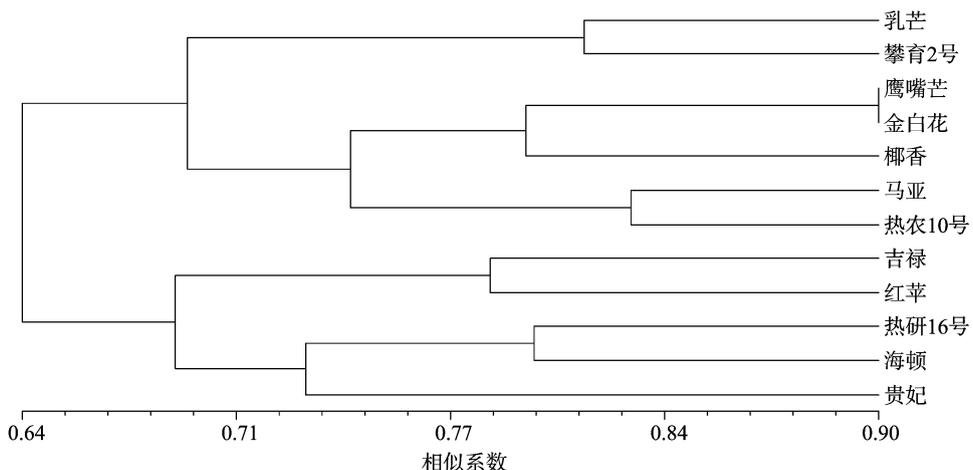


图1 不同芒果品种的UPGMA聚类图

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存在差异,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] 梅嘉谔,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.