

浙江柿树种质资源遗传多样性的 RAPD 分析

程诗明¹, 童敏¹, 康志雄¹, 陈友吾¹, 应尚姣², 周长富³

(¹浙江省林业科学研究院, 杭州 310023; ²浙江省永康市林业推广中心, 永康 321300; ³湖南省园艺研究所, 长沙 410125)

摘要:浙江柿树资源丰富, 但品种或类型混杂, 为探究浙江省柿树种质资源多样性, 本研究利用筛选出的 16 条随机引物, 对 7 个柿树类型 40 个单株进行了 RAPD 分析, 共得到 156 条谱带, 其中多态性条带 138 条, 平均多态性位点百分率为 87.76%。类型间遗传多样性 (D_{st}) 为 0.7604, 远高于类型内个体间遗传多样性 ($H_s = 0.0603$), 各类型分化系数 (G_{st}) 为 0.7604, 基因流 (N_m) 为 0.1576。根据各类型间的遗传距离进行聚类分析, 结果表明研究的各类型内遗传结构比较一致, 而不同类型间分化较为严重, 存在较为丰富的遗传多样性, 且有一定的基因交流。今后应收集更全面的柿树种质资源, 为资源保存及良种培育打下基础。

关键词:柿树; 遗传资源; 多样性; RAPD

Genetic Diversity Analysis of Persimmons (*Diospyros kaki* L.) Germplasm Resources in Zhejiang Province Using RAPD Marker

CHENG Shi-ming¹, TONG Min¹, KANG Zhi-xiong¹,

CHEN You-wu¹, YING Shang-jiao², ZHOU Chang-fu³

(¹Zhejiang Academy of Forestry, Hangzhou 310023; ²Forestry Extension Center of Yongkang City in Zhejiang province,

Yongkang 321300; ³Hunan Horticultural Research Institute, Changsha 410125)

Abstract: Persimmon resources are rich in Zhejiang province, but they are complicated between varieties or types. To investigate their genetic diversity, 40 persimmon trees belong to 7 types were analyzed by RAPD maker using 16 selected random primers. In total, 156 fragments were obtained, of which 138 were polymorphic. Average percentage of polymorphic loci was 87.76%, genetic diversity index (D_{st}) among types was 0.7604 and outclassed that within type (H_s) of 0.0603. The coefficient of differentiation (G_{st}) was 0.7604, and the gene flow was 0.1576. At last, 7 types of persimmons resources were clustered according to the genetic distance. The result showed that genetic structure were basically identical within each type, but much more difference existed among 7 types with some gene communications. Widely collection of persimmons resources should be researched in future, so as to lay a foundation for the conservation and fine variety breeding.

Key words: persimmons; germplasm resources; genetic diversity; RAPD

柿树 (*Diospyros kaki* L.) 为柿科 (Ebenaceae) 柿属 (*Diospyros*) 植物, 落叶乔木, 原产于东亚, 果实具有较高的营养价值, 且经济效益高、寿命长。在我国已有 3000 多年的栽培历史, 栽培面积达 20 万 hm^2 。其中浙江本地柿树资源丰富, 且先后从陕西、云南、日本等地引进较多栽培品种^[1], 但长期以来对柿树

品种没有清晰的分类, 造成当前存在很多同名异种和同种异名的现状, 遗传资源是作物育种和遗传研究的基础^[2], 因此明确柿树种质资源的多样性特征是今后柿树良种培育的前提。多位学者对中日两国原产完全甜柿树资源进行过调查, 并用 RAPD 标记进行了初步的分析^[3-5]。部分学者也对浙江的柿树

收稿日期: 2013-08-16 修回日期: 2013-10-15 网络出版日期: 2014-04-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140408.0837.005.html>

基金项目: 国家科技基础条件平台 (2003DEA3N027); 浙江省科技计划项目 (2012F20012); 浙江省森林食品研究重点实验室 (2011F10069); 浙江省果品农业新品种选育重大科技专项 (2012C12904-10)

第一作者研究方向为经济林育种。E-mail: chengsm888@163.com

不同类型表型进行测定及分类^[6-8],而对从分子水平深入探讨浙江柿树种质资源的遗传结构和多样性还未开展。

本研究应用 RAPD 技术,运用群体遗传学、数量遗传学原理,对浙江当前种植面积较广的 7 个优良农家柿树类型的群体间及其群体内不同个体间 DNA 水平的遗传多样性进行探讨,评价浙江柿树群体间、群体内个体间的遗传结构和差异,描述种内遗传多样性量化特征,为浙江柿树构建核心种质、种质评价、保存样本策略以及种质创新利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以浙江省 7 个县市采集的 7 个柿树农家类型共 40 个样品进行试验,样品采集地见表 1。采集秋梢或树冠外围生长健壮、无病虫害枝条上刚展开的幼叶,放入冰盒带回实验室,于 -20℃ 低温保存备用。

表 1 浙江柿树 RAPD 分子标记试验材料表

Table 1 Experiment materials of persimmons resources using RAPD marker in Zhejiang province

序号 Code	地点 Site	农家品种 Farm variety	株数 Plant number
1	千岛湖	千岛湖无核柿(QDH)	6
2	玉环	玉环长柿(YH)	7
3	永嘉	东皋柿(DG)	6
4	天台	朱红柿(TT)	4
5	永康	方山柿(YK)	6
6	兰溪	大红柿(LX)	5
7	杭州蒋村	扁花柿(JC)	6
合计 Total	—	—	40

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取与纯化 采用改良的 SDS-CTAB 法提取样品 DNA^[9],然后经 MagaZorb 试剂盒(Promega)纯化后用 1.5% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,并用紫外分光光度计测定各 DNA 的浓度。

1.2.2 引物筛选 从上海生工生物工程有限公司购买 200 对 RAPD 随机引物,用 2 个柿树 DNA 模板进行第 1 次筛选,选出扩增条带清晰的引物。然后再进行第 2 次筛选,最后选出多态性强、扩增条带清晰的引物用于样品 RAPD 分析。

1.2.3 RAPD-PCR 体系的优化设计 参照 M. Martins 等^[10]的方法并略加修改,最终反应体系为 20 μL,包括 51 ng DNA 模板,25 mmol/L MgCl₂,200 μmol/L dNTP,0.5 μmol/L Primer,1.0 U(5 U/μL) Taq 聚合酶。最佳扩增反应条件为 94℃ 预变性 3 min;

94℃ 变性 30 s,36℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环,最后 72℃ 延伸 7 min,4℃ 保存。PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测,并用自动凝胶成像系统(BIO-RAD)观察拍照。

1.2.4 数据统计 根据电泳结果扩增条带的有无以 1 和 0 的方式记录 RAPD 的原始数据。利用 POPGENE 软件包^[11]对该 RAPD-PCR 的原始数据进行分析,计算出多态性位点百分率(percentage of polymorphic loci)、等位基因频率(allele frequency)、等位基因平均数(A)、有效等位基因平均数(N_e)、基因分化系数(G_{st})、基因流(N_m)、群体间遗传距离(D)、Shannon 多样性指数(I)。最后根据 Nei's 遗传距离运用非加权组平均法(UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means)将不同类型材料进行聚类分析^[12]。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取的检测结果

提取的柿树叶片总 DNA 的 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8 左右,纯度较高,完整性较好,能够满足 RAPD 反应对 DNA 质量的要求(图 1)。

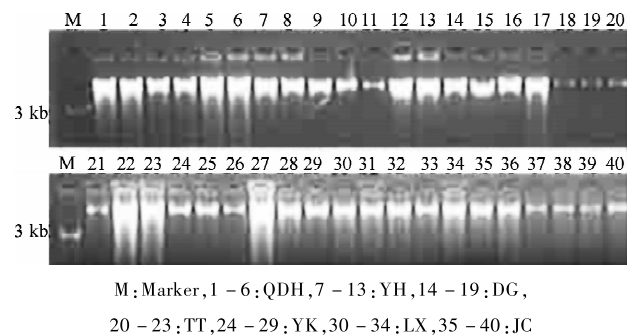


图 1 各样品 DNA 的提取结果

Fig. 1 Extract result of DNA samples

2.2 多态性位点百分率

用 16 个随机引物对 7 个浙江优良农家柿树类型共 40 个个体的基因组 DNA 进行 RAPD 分析,共检测到 156 个位点,其中 138 个为可重复的多态性位点,平均每个引物检测到的多态性位点数为 8.6 个,平均多态性位点百分率为 88.46% (表 2)。

2.3 遗传多样性分析

7 个浙江省优良农家柿树类型的多态性位点数、多态性位点百分率等如表 3,千岛湖无核柿(QDH)类型检测到多态性位点 45 个,多态性位点百分率为 28.85%;玉环长柿(YH)类型检测到多态性位点 9 个,多态性位点百分率为 5.77%;

表 2 柿树单株扩增的多态性片段统计

Table 2 Statistics of polymorphic fragments amplified from single persimmon resource

随机引物 Random primers	RAPD 位点 RAPD loci	多态性位点 Polymorphic loci	多态性位点百分率 (%) Percentage of polymorphic loci
S267	18	16	88.89
S336	16	14	87.50
S2029	5	4	80.00
S260	9	9	100
S274	13	10	76.92
S1378	11	9	81.82
S1302	6	5	83.33
S327	9	9	100
S126	10	10	100
S128	9	9	100
S144	6	5	83.33
S263	9	7	77.78
S310	7	7	100
S42	9	9	100
S108	8	7	87.50
S1304	11	8	72.73
总计 Total	156	138	
平均 Average	9.8	8.6	88.46

东皋柿(DG)类型检测到多态性位点 19 个,多态性位点百分率为 12.18%;朱红柿(TT)类型检测到多态性位点 6 个,多态性位点百分率为 3.85%;方山柿(YK)类型检测到多态性位点 79 个,多态性位点百分率为 50.64%;大红柿(LX)类型检测到多态性位点 3 个,多态性位点百分率为 1.92%;扁花柿(JC)类型检测到多态性位点 17 个,多态性位点百分率为 10.90%。结果表明千岛湖无核柿(QDH)类型和方山柿(YK)类型明显高于玉环长柿(YH)、东皋柿(DG)、朱红柿(TT)、大红柿(LX)和扁花柿(JC)类型。

将每个位点视为 2 个等位基因 M、m,分别为显、隐性,数值 1 代表基因型 MM 或 Mm,数值 0 代表基因型 mm,假设类型内的基因频率处于 Hardy-Weinberg 平衡,计算出基因频率矩阵后,再利用 POPGENE 3.2 软件计算 7 个浙江省优良农家柿树类型内遗传多样性状况,结果显示浙江优良柿树类型内平均基因多样性为 0.0556,表明柿树种内遗传多样性不够丰富,但各类型间遗传多样性有较大的差异,千岛湖无核柿(QDH)类型和方山柿(YK)类型明显大于玉环长柿(YH)、东皋柿(DG)、朱红柿(TT)、大红柿(LX)和扁花柿(JC)类型。

运用 Popgene 3.2 软件得到 40 个浙江省优良农家柿树单株总的遗传多样性为 0.0603;Shannon 信息指数为 0.0889。

表 3 7 个柿树类型的 RAPD 遗传多样性分析

Table 3 Genetic diversity analysis of 7 types of persimmons with RAPD marker

群体名称 Population name	株数 Number	多态性位点数 No. of polymorphic bands	多态性位点百分率 (%) Percent of polymorphic loci	等位基因数 No. of alleles	有效等位基因数 No. of effective alleles	Nei's 遗传多样性 H_s	Shannon 信息指数 I
千岛湖无核柿(QDH)	6	45	28.85	1.2885	1.2084	0.1151	0.1676
玉环长柿(YH)	7	9	5.77	1.0577	1.0464	0.0250	0.0358
东皋柿(DG)	6	19	12.18	1.1218	1.0755	0.0429	0.0639
朱红柿(TT)	4	6	3.85	1.0385	1.0206	0.0124	0.019
方山柿(YK)	6	79	50.64	1.5064	1.3140	0.1758	0.2619
大红柿(LX)	5	3	1.92	1.0192	1.0174	0.0091	0.0128
扁花柿(JC)	6	17	10.90	1.1090	1.0764	0.0420	0.0614

比较 7 个浙江省优良农家柿树类型的遗传多样性参数值(表 3),可以看出方山柿(YK)遗传多样性最高,其 Nei's 遗传多样性为 0.1758,千岛湖无核柿(QDH)次之,为 0.1151,大红柿(LX)遗传多样性最低,为 0.0091。浙江省柿树遗传多样性丰富是经历了长期自然选择的结果,遗传变异导致丰富的遗传多样性。

2.4 浙江省优良农家柿树类型遗传分化分析

供试浙江省优良农家柿树类型内基因多样性(H_s)为 0.0603,类型间基因多样性(D_{st})为 0.7604,基因分化系数(G_{st})为 0.7604,基因流(N_m)为 0.1576。表明浙江省优良农家柿树类型间遗传分化大于类型内分化。

2.5 浙江省优良农家柿树类型遗传一致度 (I) 和遗传距离 (D)

为了定量分析几个类型之间的相似性,计算出类型间的遗传相似性 I 值和遗传距离 D 值,利用各类型内个体间和各类型间 RAPD 片段共享度,可以得到类型间的遗传一致度及 Nei's 遗传距离,结果见表 5。遗传一致度 (I) 和遗传距离 (D) 分别是从小和相反方面度量类型间遗传关系的指标,遗传距离反映居群亲缘关系的远近。从表 5 可以看出,

各类型间的遗传距离都较大,大红柿 (LX) 种群和扁花柿 (JC) 种群之间的遗传距离最小,但也达到了 0.1107,大红柿 (LX) 种群与玉环长柿 (YH) 种群遗传距离最大 (0.3918)。相反地,类型间的遗传一致度以大红柿 (LX) 种群和扁花柿 (JC) 种群最大 (0.8952),大红柿 (LX) 种群与玉环长柿 (YH) 种群最小 (0.6758)。说明浙江省优良农家柿树各类型间遗传距离都较大,其遗传关系都比较远。

表 5 各类型间的遗传一致度 (上三角) 和遗传距离 (下三角)

Table 5 The genetic identity (above the diagonal) and genetic distance (below the diagonal) between each types

类型 Types	千岛湖无核柿 (QDH)	玉环长柿 (YH)	东皋柿 (DG)	朱红柿 (TT)	方山柿 (YK)	大红柿 (LX)	扁花柿 (JC)
千岛湖无核柿 (QDH)	****	0.8433	0.8442	0.7812	0.8097	0.7615	0.8095
玉环长柿 (YH)	0.1704	****	0.7226	0.7588	0.7719	0.6758	0.7347
东皋柿 (DG)	0.1694	0.3248	****	0.6876	0.7991	0.7354	0.7740
朱红柿 (TT)	0.2469	0.2760	0.3746	****	0.7260	0.6908	0.6960
方山柿 (YK)	0.2111	0.2589	0.2243	0.3201	****	0.7851	0.8511
大红柿 (LX)	0.2725	0.3918	0.3073	0.3700	0.2419	****	0.8952
扁花柿 (JC)	0.2113	0.3083	0.2562	0.3624	0.1613	0.1107	****

2.6 各类型间 UPGMA 聚类分析

根据表 5 所列 Nei's 遗传距离运用 UPGMA 法得到聚类树形图 (图 2)。结果表明,7 个浙江省优良农家柿树类型在相似系数 0.25 处可分为 3 大类型,即千岛湖无核柿 (QDH) 与扁花柿 (JC) 都单独归为一类,玉环长柿 (YH)、大红柿 (LX)、东皋柿 (DG)、朱红柿 (TT)、方山柿 (YK) 归为一类。从图中也可以看出,玉环长柿 (YH) 与大红柿 (LX) 为一小类,朱红柿 (TT) 与东皋柿 (DG) 为另一小类,方山柿 (YK) 单独为一小类。

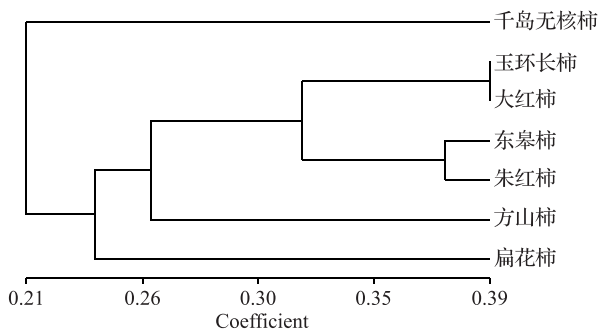


图 2 RAPD 标记聚类分析树状图

Fig. 2 clustering analysis of 7 types of persimmon using RAPD marker

3 讨论

改良的 SDS-CTAB 提取柿树叶片总 DNA,并采用 MagaZorb 试剂盒纯化所得的基因组 DNA,能满足分子标记的 RAPD-PCR 分析。由于柿树叶片中含有大量多糖、酚类物质和色素,导致提取 DNA 比较困难,用改良的 SDS-CTAB 提取后,再用 MagaZorb 试剂盒纯化不仅速度快,耗时少,成本也比较低,而且所得 DNA 纯度高,浓度一致。对于分子标记的 PCR 分析,是一种理想方法。

供试浙江优良农家柿树类型间的遗传多样性 (D_{st}) 为 0.7604,类型内遗传多样性 (H_s) 为 0.0603,类型间分化系数 (G_{st}) 为 0.7604,基因流 (N_m) 为 0.1576。说明各类型遗传结构比较一致,而不同类型间分化较为严重,存在较为丰富的遗传多样性,且有一定的基因交流。供试浙江省优良农家柿树类型间分化比较严重。这可能与长时间以来自然选择有关,因为类型间相对地理位置比较远,地理环境有一定差异。

本研究对 7 个柿树类型代表进行遗传多样性分

析,总结了柿树 RAPD 分子标记方法,为运用分子手段分析柿树遗传资源具有指导意义,在今后的研究中,可以与其他学者的方法进行比较,明确各方法的优劣,比如艾呈祥等^[13]采用 SSR 方法对 32 个主栽品种柿树资源进行分析,并且构建了各品种的指纹图谱。杜晓云等^[14]采用 SSAP 逆转座子分子标记,利用 5 个逆转座子引物的 25 对 SSAP 引物组合对供试 28 份柿属资源进行遗传多样性分析;吴硕等^[15]运用 EST-SSR 分子标记对 9 个柿属种质资源进行分类研究。胡美君等^[16]也采用 SSR 方法构建了浙江光叶柿优株指纹图谱。因此今后可将本研究优化的 RAPD 方法与其他各种分子标记进行比较,从而为不同柿属资源遗传分析提供最佳的分子标记方法。

本研究对 7 个柿树类型进行遗传分析,今后需开展更为广泛的柿树遗传资源调查,将浙江的本地品种与其他地区或国家的柿品种进行比较。明确各品种或类型间的遗传关系,从而为柿树遗传资源的保存提供依据,也为今后开展选育和类型间杂交工作、培育出优良品种打下基础。

参考文献

- [1] 胡青素,龚榜初,谭晓风,等. 柿子的应用价值及发展前景[J]. 湖南农业科学,2010(1):103-106
- [2] 王永康,吴国良,李登科,等. 果树核心种质研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(3):380-385
- [3] 潘德森. 罗田甜柿资源调查及优良株系选育[J]. 1994(12):51-54
- [4] 罗正荣,蔡礼鸿. 柿属植物种质资源及其利用研究现状[J]. 华中农业大学学报,1996(15):381-388
- [5] 罗正荣,米森敬三. 应用 RAPD 技术研究柿品种间的亲缘关系[J]. 果树科学,1998(15):311-316
- [6] 赵献明. 浙江省农家柿品种资源多样性及分类研究[D]. 北京:中国林业科学研究院,2012
- [7] 陈军晓,童敏,程诗明,等. 浙江省柿树种质资源表型多样性研究[J]. 浙江林业科技,2012,32(4):6-10
- [8] 井振华,李皓,邵文豪,等. 浙江柿天然群体表型多样性研究[J]. 植物研究,2010,30(3):325-331
- [9] 刘小勇,田素忠,秦国夫,等. 提取植物和微生物 DNA 的 SDS-CTAB 改进法[J]. 北京林业大学学报,1997,19(3):100-103
- [10] Martins M, Tenreiro R, Oliveira M M. Genetic relatedness of Portuguese almond cultivars assessed by RAPD and ISSR markers[J]. Plant Cell Rep, 2003, 22(1):71-78
- [11] Yeh F C, Yang R, Boyle T B J, et al. POPGENE, the user-friendly shareware for population genetic analysis[D]. Canada: University of Alberta, 1997
- [12] Apostol B L, Black W C, Reiter P, et al. Population genetics with RAPD-PCR markers: the breeding structure of *Aedes aegypti* in Puerto Rico[J]. Heredity, 1996, 76(4):325-334
- [13] 艾呈祥,秦志华,陶吉寒,等. 32 个柿主栽品种 SSR 图谱构建及遗传变异分析[J]. 西北植物学报,2011,31(11):2185-2191
- [14] 杜晓云,张青林,黄建民,等. SSAP 逆转座子分子标记在柿属植物遗传分析中的应用[J]. 农业生物技术学报,2010,18(4):682-688
- [15] 吴硕,傅建敏,乌云塔娜,等. 柿属 EST-SSR 引物设计及遗传多样性研究[J]. 中南林业科技大学学报,2012,32(3):152-157
- [16] 胡美君,应尚蛟,程诗明,等. 浙江光叶柿优株 SSR 指纹图谱鉴定分析[J]. 浙江林业科技,2011,31(5):57-60