

文章编号: 1001-1498(2008)01-0060-04

引进泰国甜角基因资源多样性的 RAPD 分析

杨时宇¹, 何承忠², 赵一鹤¹, 刘娟¹, 王兵益¹

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 云南 昆明 650224; 2. 西南林学院资源学院, 云南 昆明 650224)

摘要:采用 RAPD 分子标记技术,对引进的 10 个泰国甜角栽培品种进行分析,研究其遗传变异及遗传关系。筛选出的 8 个引物共扩增出 52 条带,其中多态性条带为 34 条,多态带比率为 65.38%。多态性标记百分率 PPL 、观测等位基因数 A_o 、有效等位基因数 A_e 、Nei's 基因多样性指数 H 和 Shannon 信息指数 I 在物种水平分别为 65.38%、1.653 8、1.199 9、0.137 1 和 0.227 9,而在栽培品种水平分别为 25.96%、1.259 6、1.164 7、0.094 6 和 0.140 3。基因分化系数 $G_{ST} = 0.163$,表明有 83.7% 的遗传差异来自栽培品种内。10 个栽培品种间的遗传距离变幅在 0.013 1~0.124 4 之间,平均为 0.047。UPGMA 聚类分析结果显示,以遗传距离 0.02 来划分,10 个栽培品种可以分为 3 组,Zichupoton, Buangka, Barchan, Shampoo, Ziton 栽培品种聚为一组, Sritong, Srichompo, Prakaythong, Sritongbao 栽培品种构成一组,而 Bargeton 单独聚为一组。

关键词:泰国甜角; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: S718.46

文献标识码: A

Analysis of the Genetic Diversity of Sweet Thai Tamarind Introduced from Thailand Based on RAPD Markers

YANG Shi-yu¹, HE Cheng-zhong², ZHAO Yi-he¹, LIU Juan¹, WANG Bing-yi¹

(1. Research Institute of Resources Insects, CAF, Kunming 650224, Yunnan, China;

2. Faculty of Resources, Southwest Forestry College, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) was employed to study the genetic variation and genetic relationship of 10 sweet Thai tamarind (*Tamarindus indica*) cultivars introduced from Thailand. The RAPD analysis showed that 34 of 52 amplified bands (65.38%) were polymorphic within the species, while the mean percentage of polymorphic bands within cultivars was 25.96%. The number of alleles A_o , effective number of alleles A_e , Nei's gene diversity H , and Shannon's information index I for the species were 1.653 8, 1.199 9, 0.137 1 and 0.227 9, respectively, and for the cultivars were on average 1.259 6, 1.164 7, 0.094 6 and 0.140 3, respectively. The largest proportion of the total RAPD diversity was found within, rather than among the cultivars ($G_{ST} = 0.163$). The genetic distance between cultivars ranged from 0.013 1 to 0.124 4, and on average was 0.047. An analysis of 10 cultivars using UPGMA showed that the introduced sweet Thai tamarind cultivars could be divided into three groups by 0.02 genetic distance, the first group included Zichupoton, Buangka, Barchan, Shampoo and Ziton cultivar, the second group included Sritong, Srichompo, Prakaythong and Sritongbao cultivar, and the third group included only Bargeton cultivar. The basic data were provided for further development and improvement of the cultivars in this study.

Key words: *Tamarindus indica*; RAPD; genetic diversity

收稿日期: 2007-07-13

基金项目: 国家林业局“948 引进项目“甜酸角良种培育及种植园规范化经营技术引进”(2003-4-12), 国家林业局重点项目“泰国甜角丰产栽培及区域性试验”(2006-01)

作者简介: 杨时宇(1957—),男,云南大理人,副研究员。

泰国甜角 (*Tamarindus indica* L.) 为酸豆属 (*Tamarindus* Linn.) 植物,是集多种用途于一身的重要树种,在泰国广为栽植。泰国甜角果实味甜,可生食,是一种热带特色水果,深受消费者的喜爱,价高畅销,泰国每年向欧洲及东南亚其他国家出口大量的果实^[1]。果肉也是加工保健食品和风味饮料的良好原料;种子富含罗望子多糖,是类似果胶但又优于果胶的良好食品增稠剂和稳定剂;叶含牡荆素、荜草素等黄酮类化合物,可作饮水漂白剂,或作蔬菜食用;木材质地坚硬致密,边材黄白色,心材黑紫带棕色,被誉为“马德拉红木”^[2]。我国近年已成功开展了泰国甜角不同栽培品种的引种和栽培试验^[3],并对部分引进栽培品种的果实营养成分进行了分析^[4]。但是,目前国内外对泰国甜角相关栽培品种资源遗传多样性的分析尚未见报道。本研究采用 RAPD 分子标记技术,从 DNA 水平对引种的 10 个泰国甜角栽培品种资源的遗传多样性进行了分析,以期对泰国甜角新的栽培品种选育提供依据。

1 材料与方法

1.1 研究材料和引种地概况

2000 年 1 月,从泰国甜角主产地泰国 Pechaburi 省的 Phrae 甜角人工种植园引进了 4 个优良栽培品种,分别为 Sritong, Srichompo, Prakaythong, Sritongbao。从泰国甜角另一主产地泰国 Pechaburi 省的 Chanika 甜角人工种植园引进了 6 个优良栽培品种,分别为 Zichupoton, Ziton, Bargeton, Shampoo, Barchan, Buangka。引进后于当年定植于中国林科院资源昆虫所元江试验站内,地处云南省中南部的元江县,属北热带干热河谷气候类型,年平均温度 23.7℃,5—10 月湿季月平均气温仅为 27.3℃,11 月—翌年 4 月的干季月平均气温 20.4℃;极端最高气温 42.3℃,极端最低温 -0.1℃,10 年积温 8 690.2℃;年平均降水量 787 mm,年平均蒸发量 2 750.9 mm,年平均相对湿度 68%,砂红壤,呈微酸性至中性,土质疏松,石砾含量高。目前,引进的 10 个栽培品种均已开花结实。

1.2 总 DNA 提取

分别采取供试材料的嫩叶约 50 g,置于硅胶内带回实验室。叶片充分干燥后,每个栽培品种称取约 0.5 g,采用改良 SDS 法依照标准酚/氯仿流程提取总 DNA^[5],用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测其质

量,用紫外分光光度计 (Spekl - 1300) 检测其浓度,最后分取各样本 50 μ L DNA 样品稀释至 20 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,保存于 -20℃ 冰箱备用。

1.3 RAPD 扩增反应

从每个栽培品种的样本中随机选取 3 个个体,共计 30 个样本的 DNA 样品进行引物筛选,从 60 个引物中,共筛选出 8 条能够获得清晰条带、重复性好、反应稳定的随机引物 (上海生工合成 OPERON 公司序列) (表 1)。参照王军等^[6]的体系和程序进行 RAPD 扩增反应,退火温度为 40℃,扩增反应在 MJR 公司 PTC200 PCR 仪上进行。扩增产物在含有溴化乙锭的 2% 琼脂糖凝胶中电泳分离约 100 min,电泳结束后在 UVP 公司 GONGDS8000 凝胶成像系统上对 RAPD 谱带进行凝胶成像。

1.4 数据统计与分析

RAPD 属于显性标记,电泳图谱的每一条带看作一个位点,同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。因此,按照电泳图谱中同一位置上 RAPD 条带的有无进行统计,有带记为 1,无带记为 0,形成 0/1 矩阵图输入计算机。应用 POPGENE32 软件进行遗传参数的统计^[7]。应用 W NAMOVA1.55 软件进行分子变异方差分析和计算基因分化系数 (G_{ST})^[8]。POPGENE32 软件和 W NAMOVA1.55 软件的输入文件由 DCFA1.1 软件制作^[9]。W NAMOVA1.55 分析的显著性检验采用 1 000 次置换。

表 1 RAPD 引物序号与序列

引物	5'-3' 序列	引物	5'-3' 序列
S8	GTCCACACGG	S26	GGTCCCTGAC
S12	CCTTGACGCA	S38	AGGTGACCGT
S18	CCACAGCAGT	S46	ACCTGAACGG
S20	GGACCCCTAC	S52	CACCGTATCC

2 结果与分析

2.1 基因资源多样性

从 60 个引物中筛选出的 8 条 RAPD 引物对引进的 10 个泰国甜角栽培品种的 95 份 DNA 样品进行了 PCR 扩增。8 条引物扩增出的条带数从 4 条至 9 条不等,共扩增出 52 条谱带,其中多态性谱带为 34 条,多态带百分率为 65.38%。Srichompo 栽培品种的多态性最低,为 7.69%,而 Ziton 和 Bargeton 栽培品种的多态性最高,均为 44.23% (表 2)。

从表 2 可以看出,在物种水平上,Nei's 基因多样性指数 (H) 和 Shannon 信息指数 (I) 分别为 0.137 和 0.227 9。而在 10 个栽培品种中,Nei's 基因多样性指数 (H) 以 Prakaythong 栽培品种最低, Bargeton 栽培品种最高。10 个栽培品种的基因多样性指数从大到小依次为 Bargeton 栽培品种 (0.179) > Ziton 栽培品种 (0.156 3) > Barchan 栽培品种 (0.113 3) > Shampoo 栽培品种 (0.112 9) > Sritongbao 栽培品种 (0.110 2) > Zichupoton 栽培品种 (0.097 4) > Buangka 栽培品种 (0.071 7) > Sritong 栽培品种 (0.052 2) > Srichompo 栽培品种 (0.032 5) > Prakaythong 栽培品种 (0.020 6)。10 个栽培品种的 Shannon 信息指数表现出与 Nei's 基因多样性指数基本相同的变化趋势。

2.2 分子方差分析与遗传分化

W NAMOVA 分析结果表明,引进的 10 个泰国甜角栽培品种间的遗传变异分量为 0.458 4,栽培品种内遗传变异分量为 2.361 8,基因分化系数 $G_{ST} = 0.163$,即总的遗传变异中有 16.3% 的变异存在于各栽培品种间,栽培品种内的遗传变异占总遗传变异的 83.7%,栽培品种间和栽培品种内的变异达极显著水平 (表 3)。对两两栽培品种间遗传分化的

W NAMOVA 分析结果表明,泰国甜角 10 个栽培品种间的遗传分化系数 (F_{ST}) 在 0.002 0 ~ 1.242 9 之间,Ziton 栽培品种与 Barchan 栽培品种之间的遗传分化程度最低 ($F_{ST} = 0.002 0, P < 0.001$), Prakaythong 栽培品种与 Barchan 栽培品种之间的遗传分化程度最高 ($F_{ST} = 1.242 9, P < 0.001$) (表 4)。

2.3 遗传关系

POPGENE 分析结果显示,泰国甜角 10 个栽培品种间的遗传距离 (D) 在 0.013 1 ~ 0.124 4 之间,平均为 0.047。其中,Zichupoton 栽培品种与 Buangka 栽培品种间的遗传距离最小, $D = 0.013 1$,表明这两个栽培品种间的亲缘关系较近。而 Prakaythong 栽培品种与 Bargeton 栽培品种间的遗传距离最大, $D = 0.124 4$,说明这两个栽培品种间的遗传差异较大 (表 4)。基于 Nei's 遗传距离^[10],采用 UPGMA 方法对 10 个泰国甜角栽培品种的聚类结果表明,当以遗传距离 0.02 来划分时,泰国甜角 10 个栽培品种可以划分为 3 组,第一组由 Zichupoton、Buangka、Barchan、Shampoo 和 Ziton 栽培品种构成,第二组包含 Sritong、Srichompo、Prakaythong 和 Sritongbao 栽培品种,而 Bargeton 栽培品种单独构成一组 (图 1)。

表 2 泰国甜角 10 个栽培品种的遗传多样性

品种	样本数	多态性标记百分率 PPL/%	观测等位基因数 A_o	有效等位基因数 A_e	Nei's 基因多样性 H	Shannon 信息指数 I
Sritong	9	15.38	1.153 8	1.090 0	0.052 2	0.078 3
Srichompo	8	7.69	1.076 9	1.060 5	0.032 5	0.046 7
Prakaythong	7	11.54	1.115 4	1.025 9	0.020 6	0.036 9
Sritongbao	9	26.92	1.269 2	1.195 3	0.110 2	0.160 0
Zichupoton	10	26.92	1.269 2	1.174 1	0.097 4	0.143 7
Ziton	10	44.23	1.442 3	1.266 5	0.156 3	0.233 2
Bargeton	11	44.23	1.442 3	1.327 2	0.179 0	0.259 0
Shampoo	11	30.77	1.307 7	1.195 1	0.112 9	0.167 4
Barchan	10	28.85	1.288 5	1.197 9	0.113 3	0.166 4
Buangka	10	23.08	1.230 8	1.114 8	0.071 7	0.110 9
栽培品种水平		25.96	1.259 6	1.164 7	0.094 6	0.140 3
物种水平	95	65.38	1.653 8	1.199 9	0.137 1	0.227 9

表 3 栽培品种间和栽培品种内分子变异的 AMOVA 分析结果

变异来源	自由度	变异组分	总变异百分率 /%	P 值
栽培品种间	9	0.458 4	16.26	< 0.001
栽培品种内	85	2.361 8	83.74	< 0.001
总计	94			

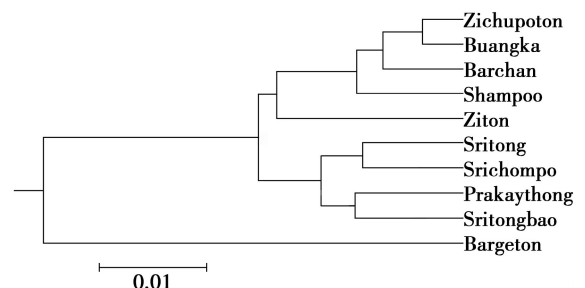


图 1 泰国甜角 10 个栽培品种遗传距离的 UPGMA 聚类

表 4 10 个栽培品种间的遗传分化(对角线下方)和 Nei's 遗传距离(对角线上方)

栽培品种	Sritong	Srichompo	Prakaythong	Sritongbao	Zichupoton	Ziton	Bargeton	Shampoo	Barchan	Buangka
Sritong		0.024 3	0.029 6	0.036 7	0.051 3	0.056 3	0.096 4	0.042 1	0.041 1	0.030 2
Srichompo	0.468 3		0.027 4	0.034 2	0.043 8	0.048 3	0.089 8	0.048 8	0.046 4	0.024 5
Prakaythong	0.391 1	0.605 7		0.025 6	0.035 7	0.057 5	0.124 4	0.056 2	0.055 2	0.032 9
Sritongbao	0.232 8	0.409 9	0.099 1		0.031 9	0.048 3	0.091 5	0.045 8	0.048 1	0.030 6
Zichupoton	0.323 3	0.315 6	0.035 5	0.064 4		0.047 4	0.086 8	0.026 4	0.020 7	0.013 1
Ziton	0.146 5	0.125 9	0.129 3	0.186 4	0.088 2		0.067 7	0.039 4	0.043 0	0.031 6
Bargeton	0.162 7	0.232 2	0.314 7	0.282 4	0.225 0	0.051 1		0.054 0	0.067 2	0.077 7
Shampoo	0.121 6	0.363 0	0.296 1	0.253 5	0.174 7	0.067 8	0.016 6		0.027 6	0.022 0
Barchan	0.199 1	0.291 6	1.242 9	0.280 2	0.084 3	0.002 0	0.097 4	0.063 0		0.020 3
Buangka	0.272 7	0.307 4	0.248 4	0.291 9	0.099 9	0.007 5	0.187 0	0.177 1	0.016 6	

3 结论与讨论

采用 RAPD 标记技术,对泰国甜角 10 个栽培品种遗传差异分析表明,引进的泰国甜角基因资源多样性处于中等水平。多态性标记百分率 PPL、观测等位基因数 A_o 、有效等位基因数 A_e 、Nei's 基因多样性指数 H 和 Shannon 多样性指数 I ,在物种水平分别为 65.38%、1.653 8、1.199 9、0.137 1 和 0.227 9;而在栽培品种水平分别为 25.96%、1.259 6、1.164 7、0.094 6 和 0.140 3。甜角在泰国广泛栽培,并且在同一主产地多个栽培品种同时种植。此外,引进栽培品种的数量较少。这些因素都可能是导致泰国甜角具有中等水平遗传丰富度的原因。

W NAMOVA 分析结果显示,10 个泰国甜角栽培品种之间、以及栽培品种内不同个体间的遗传分化均达到极显著水平 ($P < 0.001$)。因此,无论是引种的泰国甜角栽培品种之间,还是各个栽培品种的不同植株之间,均表现出一定程度的遗传差异,说明引进泰国甜角资源遗传基础具有一定的宽广性。基因分化系数 G_{ST} 为 0.163,表明引进的泰国甜角种质资源中,有 83.7% 的遗传差异存在于各栽培品种的不同个体之间,栽培品种内不同个体间的这种遗传变异丰富度,使各栽培品种具有较高的适应能力,是确保引种成功的因素之一。从 UPGMA 方法的聚类分析结果可以看出,除 Bargeton 栽培品种外,其他各栽培品种均可以按照引种主产地分别聚为一类,说明各主产地的栽培品种具有较强的区域特色,而且一致性较好。因此,在今后进一步引种泰国甜角时,要注意扩大引种地点。

引进外来优良栽培品种可以丰富本地栽培资源,也可以为本地优良栽培品种的培育提供种质材料^[11]。而外来资源育种作用的大小,取决于其本身遗传多样性的高低、与本地资源互补性强弱等。泰

国甜角各栽培品种间的遗传差异,不仅表现在生长、物候、开花量、果实产量和品质等方面,还表现在果实营养成分中的总糖、还原糖、维生素 C、氨基酸等含量的不同^[3-4]。丰富的遗传多样性、主产地栽培品种的一致性、栽培品种间的遗传分化、以及栽培品种内不同个体间的遗传差异性均表明,所引进的泰国甜角为进一步培育优良新栽培品种储备了一定量的种质资源材料。

参考文献:

- [1] Chindaprasert T S. Tamarindus plant genetic resources in Thailand [J]. Thai Journal of Agricultural Science, 1996, (1): 1 - 11
- [2] Shankaracharya N N. Tamarind-Chemistry, Technology and Uses-A critical appraisal [J]. Journal of Food Science & Technology, 1998, 35(3): 193 - 208
- [3] 赵一鹤,杨时宇. 泰国甜角引种栽培试验 [J]. 浙江林业科技, 2005, 25(1): 53 - 55
- [4] 赵一鹤,杨时宇,李昆. 泰国甜角不同栽培品种果实营养成分分析 [J]. 植物资源与环境学报, 2005, 14(3): 57 - 58
- [5] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high-molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321 - 4325
- [6] 王军,葛玉香,贺普超. RAPD 标记在山葡萄种质鉴定中的应用 [J]. 植物研究, 2004, 24(4): 473 - 476
- [7] Yeh F, Yang R C, Boyle T. POPGENE: A User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis [M]. Molecular and Biotechnology Center University of Alberta, Edmonton, 1997
- [8] Excoffier L. Analysis of Molecular Variance (AMOVA) Version 1.55 [M]. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland, 1993
- [9] 张富民,葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I: RAPD 数据的 AMOVA 分析 [J]. 生物多样性, 2002, 10(4): 438 - 444
- [10] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583 - 590
- [11] 曹家树,申书兴. 园艺植物育种学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2001