

# 基于 SRAP 分子标记新疆野核桃的遗传多样性分析

张捷, 李勤霞, 张萍, 余甜

(新疆农业大学林学与园艺学院/新疆教育厅干旱区林业生态与产业技术重点实验室, 乌鲁木齐 830052)

**摘要:** 利用 SRAP 分子标记技术对新疆野核桃遗传多样性进行分析。通过筛选出的 15 对具有多态性的 SRAP 引物组合进行 PCR 扩增, 得到新疆野核桃遗传分化系数  $G_{st}$  为 0.1152, 说明新疆野核桃的遗传变异绝大部分存在于区域内部, 占总变异的 88.48%; 多态位点百分率为 94.07%, Shannon's 信息指数  $I=0.4954$ , 等位基因平均数  $N_a=1.9454$ , 表明新疆野核桃具有较高的遗传多样性; 各区域间遗传相似系数在 0.8981~0.9496 之间, 遗传距离在 0.0553~0.1075 之间, 说明新疆野核桃资源间存在着丰富的遗传变异。通过聚类分析可聚为 2 类, 进一步明确了新疆野核桃各区域之间的亲缘关系。

**关键词:** SRAP; 新疆野核桃; 遗传多样性

## A Study on Genetic Diversity of Xinjiang Wild Walnut Based on SRAP Molecular Markers

ZHANG Jie, LI Qin-xia, ZHANG Ping, YU Tian

(College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University/Key laboratory of Forestry Ecology and Industry Technology in Arid Areas of Xinjiang Education Department, Urumqi 830052)

**Abstract:** This experiment analyzed the genetic diversity of wild walnut in Xinjiang by using SRAP molecular markers. Through 15 pair of SRAP primers for PCR amplification get the genetic differentiation coefficient ( $G_{st}$ ) Xinjiang wild walnut was 0.1152, which suggested that the genetic variation of wild walnut exist within the region and accounts for 88.48% of total variance; percentage of polymorphic loci was 94.07%, Shannon's information index  $I=0.4954$ , average allele  $N_a=1.9454$ , all data above showed that Xinjiang wild walnut with high genetic diversity; genetic similarity coefficient among various regions between 0.8981 to 0.9496, genetic distance between 0.0553 to 0.1075, which showed that there are abundant rich genetic variation between wild walnut resources. Cluster analysis results can be grouped into two categories, these further clarify the genetic relationship between the various.

**Key words:** SRAP; Xinjiang wild walnut; genetic diversity

新疆野核桃 (*Juglans regia*) 是栽培核桃的野生种, 为胡桃科胡桃属植物, 全世界大面积分布的天然野核桃林仅有两处, 新疆伊犁野核桃林是其中之一<sup>[1]</sup>。大陆寒温带干旱气候伴随着长日照和逆温层的保护<sup>[2-3]</sup>, 使新疆野核桃 (下称新疆野生核桃) 遗存至今。然而随着气候的不断变化和人类活动的增加, 使新疆野生核桃的数量不断减少, 种质资源的流失令人担忧。

分子标记技术随着分子生物学的不断延深, 已

经成为遗传领域不可或缺的研究方法。相关序列的多态性扩增 (SRAP, sequence-related amplification polymorphism) 是 G. Li 等<sup>[4]</sup>研发出的一种基于 PCR 技术的新型分子标记技术, 利用自身对引物特异的设计进行扩增, 具有操作简便、多态性强、DNA 模板用量少、扩增稳点和重复性好等特点, 与 RAPD、AFLP 等其他分子标记相比, 更适用于检测亲缘关系较近的 2 个或多个品种之间的差异<sup>[5]</sup>, 现已被广泛用于遗传变异分析<sup>[6]</sup>、遗传连锁图谱构建<sup>[4,7]</sup>等

收稿日期: 2015-04-15 修回日期: 2015-06-10 网络出版日期: 2016-01-28

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20160128.1545.036.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31260187); 新疆维吾尔自治区森林培育重点学科资助

第一作者从事林木种质资源研究。E-mail: 373264568@qq.com

通信作者: 张萍, 从事林木遗传育种研究。E-mail: zhang2003215@126.com

方面。然而对于新疆野核桃而言,利用分子标记对其遗传多样性所做的研究甚少<sup>[8]</sup>。本试验首次采用 SRAP 分子标记技术对新疆野生核桃的遗传多样性进行分析,以期新疆野生核桃种质资源的搜集、保存与利用和野核桃遗传图谱的构建奠定基础,为进一步有效保护新疆野生核桃提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

本试验所用材料为新疆伊犁巩留县野核桃沟内 4217 份新疆野核桃的幼嫩叶片的 DNA(表 1)。整个研究区域被划分为 4 个沟,每个沟又被划分为 A 面和 B 面,其中主 A 为主沟 A 面,主 B 为主沟 B 面,以此类推<sup>[8]</sup>。2014 年 4-5 月采集野核桃新梢幼叶 3~5 片,按照野核桃树上的铝牌号分别装入预先编号的自封袋中,用硅胶干燥法迅速处理,密封保存于遮光、干燥的低温环境<sup>[9]</sup>。

### 1.2 引物

根据 G. Li 等<sup>[4]</sup>提出的 SRAP 引物设计原则,本

试验用于 SRAP 分子标记反应的引物是从 100 个引物组合中,经过筛选能够扩增出条带清晰、重复性好且多态性较丰富的 15 个引物组合(表 2),由华大科技生物公司合成,每对引物合成 4OD,于 -20℃ 冰箱保存备用。

表 1 野核桃幼嫩叶片采集统计

Table 1 Leaf collection statistics of wild walnut

区域 Area	株数 Number	实际采集 叶片株数 Actual number	树木编号 The serial number of the trees
主 A Main A	432	387	1 ~ 437
主 B Main A	698	632	501 ~ 1209
西 A West A	1539	1404	1301 ~ 2959
西 B West B	175	157	3101 ~ 3283
中 A Middle A	841	771	3401 ~ 4264
中 B Middle B	503	453	4401 ~ 4923
东 A East A	209	192	5001 ~ 5200
东 B East B	249	221	5301 ~ 5560
总计 Total	4646	4217	—

表 2 筛选所用的 SRAP 引物序列

Table 2 The primer sequences used in SRAP analysis

编号 Serial number	正向引物序列 Forward primers sequence	编号 Serial number	反向引物序列 Reverse primers sequence
F1	5' - TGAGTCCAAACCGGATA - 3'	R1	5' - GACTGCCTACGAATTAAC - 3'
F2	5' - TGAGTCCAAACCGGAGC - 3'	R2	5' - GACTGCCTACGAATTAAT - 3'
F3	5' - TGAGTCCAAACCGGAGG - 3'	R3	5' - GACTGCCTACGAATTGAC - 3'
F4	5' - TGAGTCCAAACCGGAGC - 3'	R4	5' - GACTGCCTACGAATTGCA - 3'
F5	5' - TGAGTCCAAACCGGAAG - 3'	R5	5' - GACTGCCTACGAATTGTA - 3'
F6	5' - TGAGTCCAAACCGGAGA - 3'	R6	5' - GACTGCCTACGAATTATT - 3'
F7	5' - TGAGTCCAAACCGGACC - 3'	R7	5' - GACTGCCTACGAATTCAA - 3'
F8	5' - TGAGTCCAAACCGGTAG - 3'	R8	5' - GACTGCCTACGAATTGTC - 3'
F9	5' - TGAGTCCAAACCGGAAT - 3'	R9	5' - GACTGCCTACGAATTTCAG - 3'
F10	5' - TGAGTCCAAACCGGTCA - 3'	R10	5' - GACTGCCTACGAATTGCT - 3'

### 1.3 DNA 的提取与检测

新疆野核桃基因组 DNA 的提取方法参照王肇延等<sup>[10]</sup>的改良高盐低 pH 法,提取的 DNA 用 1xTE 溶解后于 -20℃ 冰箱保存,备用。用紫外法和琼脂糖凝胶电泳法对所提取的 DNA 进行检测<sup>[11]</sup>。

### 1.4 PCR 扩增

新疆野核桃 SRAP-PCR 反应体系的总体积为 20 μL,其中模板 DNA 浓度 50 ng、引物浓度 0.4 μmol/L、Mg<sup>2+</sup> 浓度 2 mmol/L、dNTPs 浓度 0.2 mmol/L、Taq 酶浓度 0.5 U;剩余体积用双蒸水补齐。PCR 扩增

程序为(以引物对 F2 + R3 为例):95℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 45 s,35℃ 复性 45 s,72℃ 延伸 1 min,5 个循环;94℃ 变性 45 s,54℃ (在探究退火温度对反应体系的影响时,根据 PCR 仪设置退火温度梯度)复性 45 s,72℃ 延伸 1 min,35 个循环;72℃ 延伸 8 min,4℃ 保存。最佳 PCR 扩增程序的退火温度为 54℃ (具体参考每对引物的退火温度)。

### 1.5 SRAP-PCR 扩增产物的电泳检测

灌制 8% 聚丙烯酰胺凝胶,约 30 min 待凝胶凝固后,取 5 μL 扩增产物与 2 μL 溴酚蓝混合后点入凝胶

点样孔中,加入  $1 \times$  TBE 电泳缓冲液,120 V 的电压电泳 1 h,至溴酚蓝跑至凝胶 2/3 处,取下凝胶进行银染<sup>[8]</sup>处理:分别按顺序倒入提前配好的固定液和  $\text{AgNO}_3$  溶液,摇洗、银染 10 min;后用双蒸水清洗 2 次,将残留的  $\text{AgNO}_3$  溶液洗掉;倒入显影液,直到出现的条带清晰可见,最后用双蒸水进行冲洗,2~3 次即可(以上步骤均在摇床上进行),结果拍照保存。

### 1.6 数据的记录与处理

对 SRAP-PCR 电泳图谱上的条带进行统计,将容易识别且不同于其他的条带视为多态性条带,图谱上重复出现的清晰条带记为“1”,相同位置上没有出现条带的记为“0”,从而生成原始数据矩阵<sup>[12]</sup>,将数值统计结果录入计算机,利用群体遗传学计算软件 PopGen1.32<sup>[13]</sup>计算出所研究区域的各种遗传参数特征值,包括:多态位点的百分率(*PPL*)、有效等位基因数(*Ne*)、区域内和区域间 Shannon's 信息指数(*I*)、基因多样性(*Ht*)、Nei's 多样性指数(*H'*)、基因流(*Nm*)、遗传分化系数(*Gst*)、遗传相似系数(*Jn*)、遗传距离(*D*)等<sup>[14]</sup>,最后通过 Nei's 遗传距离对全部区域进行 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 聚类分析,并构建树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 质量检测结果

试验所提取的新疆野生核桃 DNA 沉淀呈半透

明纯白色,经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,结果表明:提取的 DNA 不存在拖尾、降解的现象,主条带清晰,说明 DNA 质量较好,提取过程几乎无损伤(图 1)。

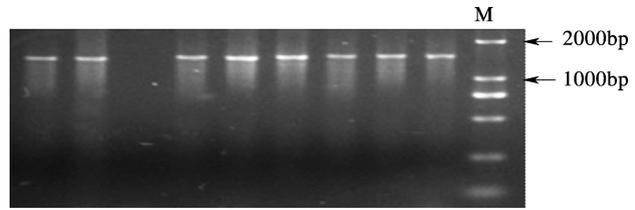


图 1 提取的新疆野核桃样品总 DNA 电泳检测结果

Fig. 1 Electrophoretic results of genomic DNA of *Juglans regia*

用蛋白质核酸分析仪对新疆野生核桃的基因组 DNA 进行检测<sup>[12]</sup>,测定比值  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  在 1.8~2.0 之间,进一步说明本试验提取的 DNA 质量较高,蛋白质及 RNA 等杂质去除的比较干净,野核桃的 DNA 可以满足 SRAP 标记中 PCR 扩增反应的要求。

### 2.2 SRAP 引物筛选

应用本试验所建立的新疆野生核桃 SRAP-PCR 反应体系,利用合成的 100 对 SRAP 引物组合对 48 份新疆野生核桃的样品 DNA 进行了 SRAP-PCR 的预扩增试验,并运用相同的反应体系和程序重复 3 次试验,最后选取重复性较好且主条带清晰的结果进行统计分析,共筛选出新疆野生核桃 SRAP 引物 15 对(表 3)。

表 3 15 对 SRAP 引物组合及其退火温度

Table 3 15 pairs of SRAP primers and annealing temperature

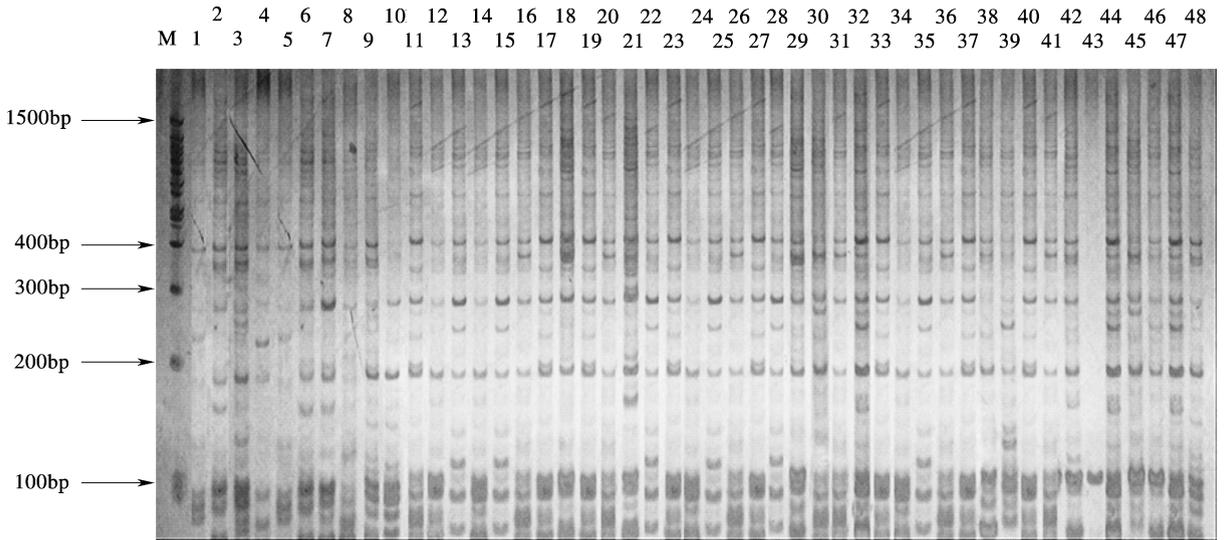
组合编号 Combination cord	引物组合 Primer combination	退火温度(°C) Annealing temperature	组合编号 Combination cord	引物组合 Primer combination	退火温度(°C) Annealing temperature
1	F1 + R2	52	9	F3 + R4	54
2	F1 + R5	51	10	F5 + R1	52
3	F1 + R7	52	11	F5 + R2	51
4	F2 + R2	52	12	F5 + R5	52
5	F2 + R3	54	13	F6 + R8	53
6	F2 + R4	54	14	F6 + R9	54
7	F3 + R2	52	15	F6 + R10	53
8	F3 + R3	54			

### 2.3 新疆野核桃 SRAP 遗传多样性分析

本试验利用已筛选出的 15 对主条带清晰且多态性强的 SRAP 引物,对新疆野生核桃全部基因组 DNA 进行 SRAP-PCR 扩增,图 2 是引物对 F3 + R2 扩增的多态性结果。

新疆野生核桃 SRAP 扩增结果(表 4)表明:15 对不同引物扩增出的野核桃 Nei's 多样性指数最大值为 0.4394,最小值为 0.3033,均值为 0.3868;

Shannon's 多样性指数的最大值为 0.6310,最小值为 0.4718,均值为 0.5720。通过这 2 个遗传参数值可看出,各引物位点都具有很丰富的多态性。群体基因的分化系数(*Gst*)的均值为 0.1152,表明新疆野生核桃大多数的遗传变异在群体区域的内部,占群体总变异的 88.48%。新疆野生核桃的总基因平均多样性指数为 0.3821。



1~48为48株新疆野核桃样品编号

The figure 1-48 is 48 samples of Xinjiang wild walnut

图2 引物对 F3 + R2 对新疆野核桃 48 个样品 DNA 的 SRAP 扩增电泳图

Fig. 2 The SRAP amplified band patterns of 48 Xinjiang wild walnut samples by the primers F3 + R2

表4 新疆野核桃不同位点的遗传多样性水平

Table 4 The level of genetic diversity of Xinjiang wild walnut in different sites

引物组合 Primers combination	Nei's 多样性指数 $H'$	Shannon's 多样性指数 $I$	区域内基因多样性 $H_t$	遗传分化系数 $G_{st}$	基因流 $N_m$
1	0.3933	0.5802	0.3795	0.1341	4.2543
2	0.3488	0.5257	0.3431	0.1156	4.5002
3	0.3516	0.5302	0.3351	0.1731	2.7075
4	0.3806	0.5673	0.3790	0.0666	8.3400
5	0.3832	0.5705	0.3785	0.0991	8.9750
6	0.3973	0.5860	0.3905	0.0639	10.2534
7	0.3676	0.5488	0.3518	0.1446	6.9518
8	0.4158	0.6035	0.4192	0.1479	7.5132
9	0.3033	0.4718	0.3004	0.2242	2.8531
10	0.3961	0.5839	0.3937	0.1369	3.3378
11	0.3779	0.5575	0.3819	0.1269	5.7707
12	0.4394	0.6310	0.4321	0.0894	6.9448
13	0.4189	0.6094	0.4174	0.0578	14.8211
14	0.4075	0.5958	0.4099	0.0757	15.3394
15	0.4209	0.6177	0.4189	0.0723	8.5192
平均 Average	0.3868	0.5720	0.3821	0.1152	/

从表4可看出新疆野生核桃各区域的基因分化系数均值为0.1152,利用Popgene等遗传软件可估算出种级水平总基因流( $N_m$ )的值,基因流数值的大小反应在对群体遗传分化的强弱水平,具有重要影响。M. D. Loveless等<sup>[15]</sup>认为,当基因流估算值 $N_m < 1$ 时,群体会产生较强的分化; $N_m > 1$ 时,群体

能克服因遗传漂变所产生的显著影响; $N_m > 4$ 时,则说明群体内部随机交配<sup>[16-17]</sup>。通过表4可知,新疆野生核桃群体的 $N_m$ 远大于1,说明新疆野生核桃林群体间存有适当的基因交流。

## 2.4 新疆野核桃不同区域遗传多样性分析

新疆野生核桃 SRAP 标记的扩增片段为 100 ~

410 bp,多态位点百分率为 94.07%,Shannon's 信息指数  $I=0.4954$ ,等位基因的平均数  $N_a=1.9454$ ,这些数据表明新疆野生核桃具有较高的遗传多样性;群体内各个区域的平均有效等位基因数  $N_e$  的最大值为 1.7068,最小值为 1.4872,最大均差为 0.2196,表明新疆野生核桃群体各区域在多态性方面具有较高的相似程度(表 5)。

试验结果表明,新疆野生核桃各个区域的基因多样性平均值最大为 0.3982,最小为 0.2838,其数值由高到低排列顺序为:主 B(主沟 B 面) > 主 A(主沟 A 面) > 中 A(中沟 A 面) > 东 B(东沟 B 面) > 中

B(中沟 B 面) > 东 A(东沟 A 面) > 西 A(西沟 A 面) > 西 B(西沟 B 面)(表 5),主 B 和主 A 两个区域的基因多样性数值较大,西 A 和西 B 两个区域的基因多样性数值较小。

Shannon's 多样性指数是用来反映不同区域群体遗传的多样性大小,本试验中新疆野生核桃的 Shannon's 多样性指数最大为 0.5790,最小为 0.4283,且各个区域的 Shannon's 多样性指数从高到低的排列顺序与其基因多样性数值的排序相一致,主 B 最高,西 B 最低(表 5)。

表 5 新疆野核桃不同区域遗传多样性水平

Table 5 The level of genetic diversity of Xinjiang wild walnut in different areas

区域 Area	多态位点百分率 (%) PPL	平均观察等位基因数 $N_a$	平均有效等位基因数 $N_e$	平均基因多样性 $H_t$	平均 Shannon's 信息指数 $I$
中 A Middle A	93.33	1.9333	1.6081	0.3476	0.5127
中 B Middle B	94.67	1.9467	1.5797	0.3299	0.4901
主 A Main A	91.33	1.9133	1.5965	0.3572	0.5245
主 B Main B	96.67	1.9667	1.7068	0.3982	0.5790
西 A West A	94.67	1.9567	1.5151	0.3005	0.4528
西 B West B	92.67	1.9267	1.4872	0.2838	0.4283
东 A East A	95.00	1.9800	1.5308	0.3139	0.4790
东 B East B	94.00	1.9400	1.5951	0.3357	0.4966

## 2.5 新疆野核桃群体间的遗传一致度和遗传距离

遗传距离数值和遗传一致度值的大小能反映出群体间遗传分化的程度,通常也可作为物种遗传变异水平衡量的重要指标。结果表明(表 6):新疆野生核桃 8 个区域间的遗传一致度数值最大为 0.9462,最小

为 0.8981,其中主 A 和主 B 区域之间的相似度最高(0.9462),东 B 和西 B 区域之间最小(0.8981);遗传距离数值最大为 0.1075,最小为 0.0553,其中主 A 和主 B 区域之间的遗传距离值最小(0.0533),东 B 和西 B 区域之间的遗传距离值最大(0.1075)。

表 6 新疆野核桃 SRAP 标记群体间遗传一致度和遗传距离

Table 6 Genetic consistency and genetic distance between groups of SRAP marks

区域 Area	中 A Middle A	中 B Middle B	主 A Main A	主 B Main B	西 A West A	西 B West B	东 A East A	东 B East B
中 A Middle A	****	0.9129	0.9275	0.9399	0.9225	0.9062	0.9413	0.9235
中 B Middle B	0.0912	****	0.9221	0.9225	0.9222	0.9106	0.9281	0.9279
主 A Main A	0.0752	0.0811	****	0.9462	0.9192	0.9446	0.9401	0.9244
主 B Main B	0.0620	0.0807	0.0553	****	0.9165	0.9203	0.9360	0.9197
西 A West A	0.0807	0.0810	0.0842	0.0872	****	0.9275	0.9414	0.9190
西 B West B	0.0985	0.0937	0.0570	0.0830	0.0753	****	0.9340	0.8981
东 A East A	0.0605	0.0746	0.0617	0.0661	0.0604	0.0683	****	0.9251
东 B East B	0.0796	0.0748	0.0786	0.0837	0.0844	0.1075	0.0778	****

上三角为遗传相似系数( $J_n$ ),下三角为遗传距离( $D$ )

The below diagonal of the genetic similarity coefficient( $J_n$ ),above diagonal for the genetic distance( $D$ )

## 2.6 新疆野核桃群体间亲缘关系的聚类结果分析

基于 15 个不同引物组合对新疆野生核桃 SRAP 分子标记的数据,用 PopGene 软件计算可得到各区

域样品间的遗传相似系数与遗传距离矩阵(表 6),用 NTSYS-PC 软件对数据进行聚类分析,构建结果树状图(图 3)。由图 3 可看出,在 0.10 处可以将新

疆野生核桃的8个群体区域划分成2个大类,其中主A和主B区域的遗传距离最近,为0.0553;东B和西B区域的遗传距离最远,为0.1075。

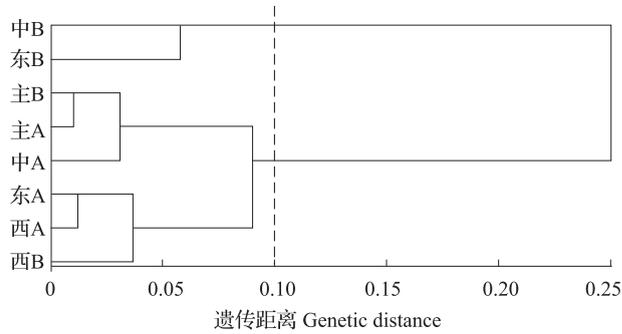


图3 8个区域SRAP聚类图谱

Fig. 3 The SRAP cluster map of 8 populations

## 3 讨论

### 3.1 新疆野核桃群体的遗传结构

群体的遗传结构受遗传漂变和基因流等很多因素的影响,基因流值与遗传分化系数等都是评价群体遗传结构的重要参数和指标<sup>[12]</sup>。本研究利用SRAP分子标记技术分析新疆野生核桃8个区域内和区域间的遗传变异,遗传分化系数( $G_{st}$ )的均值为0.1152,一般定义<sup>[18]</sup>, $G_{st}$ 值介于0.05~0.15之间,说明群体间存在中等的遗传分化<sup>[19]</sup>;8个小区域内的遗传多样性占新疆野生核桃总遗传多样性的86.61%,这说明新疆野生核桃总的变异主要存在于8个区域的内部,这一结论与众多林果类树种的遗传变异结论相符<sup>[20-22]</sup>。王肇延<sup>[8]</sup>在研究新疆野生核桃遗传多样性水平时获得的SSR分子数据表明,新疆野生核桃8个区域间的遗传变异占总变异的1.94%,而本研究中8个区域间的遗传变异占总变异的13.39%,与前人研究的结果不同。在以往的果树研究中也出现过当利用不同的分子标记对群体之间的遗传分化系数进行计算时出现结果不一致的现象;张春雨等<sup>[23]</sup>在利用SRAP分子标记研究新疆野苹果遗传多样性时得出新疆野苹果群体间遗传变异占总变异的22.1%,而C. Y. Zhang等<sup>[24]</sup>利用SSR标记新疆野苹果群体间遗传变异占总变异的6.4%,2种标记结果也不同。这可能是由于不同的分子标记技术扩增基因组的部位不同,统计条带时所读的数据不同,所以2种分子标记的结果也不同。本研究中根据遗传参数指标测得群体间基因流 $Nm$ 数值远大于1,说明影响新疆野核桃8个区域群体遗传结构的主要因素极有可能是因为群体间存在适

当的基因交流。本研究所涉及的8个区域群体均为自然保护区的天然林区,可推测河流和以野核桃果为生的松鼠等鸟兽是基因交流远距离传播的主要方式,陈娇等<sup>[20]</sup>在四川野生中国樱桃的研究中也有类似的推测。本试验与前人的研究结果都显示,新疆野生核桃的遗传变异主要存在野核桃林区域内部。

新疆野核桃SRAP和SSR分析<sup>[8]</sup>都显示,新疆野核桃8个区域中,主A和主B区域遗传距离最小(0.0533)。实地调查中发现,主A和主B是主沟的2个侧面,实际地理位置很近,野核桃在此沟分布的地形地势和生长环境很相似,基因交流的机会大,致使其进化方向也相似,因此被聚到了一起,而这也是主A和主B区域间遗传关系最近的主要原因。东B和西B两个区域新疆野核桃的生长环境差异很大,是其遗传相似程度偏低的主要原因,同时,在8个区域里东B和西B的遗传距离最大,这与东A和西B的实际距离最大稍有差异。以上对比分析表明:新疆野生核桃8个区域间的遗传一致度与它们生长的环境存在直接相关性,而遗传距离与它们实际的生长距离不存在相关性。

本研究中SRAP分子标记的聚类图显示,东A和西A被聚在一起,东B和西B的遗传距离最远,与前人研究结果不同。一方面是由于SRAP分子标记方法主要扩增基因组DNA相对其他较保守的编码区,进化缓慢<sup>[6]</sup>,而SSR分子标记主要扩增基因组DNA中内含子区的简单重复序列,这些简单重复序列通过扩大和转移后进化更迅速;另一方面,据前人实地调查研究记载,东沟A面被分成了2个小区域,其中约占东沟A面野核桃总数60%的区域野核桃生长较为集中,这与8个区域中唯独野核桃生长最集中的西沟环境很相像,加之蜜蜂、鸟、兽等的传粉活动,导致东沟A面在野核桃遗传关系聚类中与西沟A面关系较近,被聚到了一起;西沟是保护区内接受光照时间最短、湿度最大的区域,而东沟B面朝正东,无较高遮挡物,野核桃接受光照时间较长,因此东B和西B之间的遗传相似程度相对较低,遗传距离相比较远,亲缘关系也相对较远。

### 3.2 新疆野核桃群体的遗传多样性和保护

本试验基于SRAP分子标记研究表明,新疆野生核桃群体多态位点百分率为94.07%,Shannon's信息指数 $I=0.4954$ ,不同引物组合位点的Nei's多样性指数均值为0.3868,说明各引物位点的多态性很丰富,新疆野生核桃具有很高的遗传多样性。王

肇延<sup>[8]</sup>利用 SSR 分子标记方法对新疆野生核桃群体的遗传多样性研究结果也显示,新疆野生核桃具有很高的遗传多样性。

新疆野生核桃 8 个区域的平均基因多样性数值最大为 0.3982,最小为 0.2838,从高到低的排列顺序为:主 B(主沟 B 面) > 主 A(主沟 A 面) > 中 A(中沟 A 面) > 东 B(东沟 B 面) > 中 B(中沟 B 面) > 东 A(东沟 A 面) > 西 A(西沟 A 面) > 西 B(西沟 B 面)(表 5)。基因多样性能反应出群体中等位基因的丰富程度,其数值对比主沟和西沟,发现主沟的两个区域(主 A、主 B)地势平坦开阔,呈多元化地形,也有“V”字形的陡坡地段,有利于对光照的吸收利用和光合作用;而西沟的整体地形相对较单一,其中,西沟 A 面多数呈现“V”字形地势,只有 B 面的地势相对较平坦<sup>[25]</sup>。对比分析可知,新疆野生核桃物种的基因多样性与野核桃林所生长和分布的地形有一定的关系。调查采样时发现西沟 B 面(西 B)的野核桃数量较少,这也是西 B 区域遗传多样性数值较低的原因之一。Shannon's 多样性指数通常是用来估算群落多样性的高低,反映不同群体遗传多样性的大小,本研究中新疆野核桃 8 个区域的 Shannon's 多样性数值由高到低的排列顺序与其基因多样性的排序相一致,而这也更加证明了结论中地形与多样性的关系。

新疆伊犁巩留的野果林是非常罕见的“海洋性”阔叶林类型<sup>[26]</sup>,而新疆野生核桃做为荒漠地带中出现的特殊树种,是巩留野果林的重要组建树种之一。有研究表明,新疆野生核桃是栽培核桃的直接祖先,是我国非常珍稀的重要野生植物资源<sup>[27]</sup>。在亚洲,成片分布的野生核桃林只在新疆伊犁州巩留县的野核桃沟自然保护区<sup>[25]</sup>,然而伊犁巩留县的野核桃沟既是自然保护区,又是旅游区,气候的变化和人类活动的增加无疑会对新疆野核桃的种质资源造成潜在的威胁,本研究的结果在前人研究成果的基础上进一步补充和完善了新疆野生核桃的种质资源遗传多样性,同时也对这一珍贵资源的科学保护和有效利用以及丰富的遗传多样性提供重要的科学依据。

#### 参考文献

- [1] 张维,贾风勤,纳森巴特,等.新疆西天山峡谷不同坡向野核桃幼苗种群动态及生长分析[J].生态学杂志,2014,33(10):2596-2602
- [2] 徐德炎,朱晓专.新疆野核桃生存繁衍的生态条件研究[J].中国林副特产,1991(4):1-6
- [3] 曾斌.新疆野生核桃资源的现状与发展[J].北方果树,2005(4):1-3
- [4] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker System based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theore Appl Genet,2001,103:455-461
- [5] 徐宗大,赵兰勇,张玲,等.玫瑰 SRAP 遗传多样性分析与品种指纹图谱构建[J].中国农业科学,2011,44(8):1662-1669
- [6] 盖树鹏,盖伟玲,黄进勇,等. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究[J].植物遗传资源学报,2011,12(3):468-472
- [7] 司鹏.苹果分子遗传图谱构建及其部分性状 SRAP 分析[D].北京:中国农业科学院,2010
- [8] 王肇延.新疆野核桃资源及遗传多样性的分析[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2011
- [9] 温景辉.基于 SSR 分子标记的山葡萄种质遗传多样性研究与核心种质构建[D].长春:吉林农业大学,2011
- [10] 王肇延,董玉芝,陈虹,等.适用于新疆野核桃 SSR-PCR 的快速提取 DNA 的方法[J].北方园艺,2011(19):100-103
- [11] 肖亮,薛德,蒋建雄,等.中国芒(*Miscanthus sinensis*)种质资源 SSR 标记遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报,2013,14(1):36-41
- [12] 徐刚标,吴雪琴,蔣桂雄,等.濒危植物观光木遗传多样性及遗传结构分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(2):255-261
- [13] Yeh F C, Boyle T, Ye Z, et al. POPGENE version 131; Microsoft Window-based freeware for population genetic analysis[M]. Edmonton, Canada; University of Alberta and Center for International Forestry Research, 1999
- [14] 董研,张军,任亚超,等.中国新疆野苹果天然群体遗传多样性 SSR 分析[J].植物遗传资源学报,2013,14(5):771-777
- [15] Loveless M D, Hamrick J L. Ecological determinants of genetic structure in plant populations[J]. Ann Rev Ecol System, 1984, 15:65-69
- [16] Wright S. Evolution in mendelian population[J]. Genetics, 1931(16):97-103
- [17] 阮成江,何祯祥,周长芳.植物分子生态学[M].北京:化学工业出版社,2005:76
- [18] Souza J G, Souza V A, Lima P S. Molecular characterization of *Platania insignis* Mart. (“bacurizeiro”) using inter simple sequence repeat (ISSR) markers[J]. Mol Biol Rep, 2012, 40(5):3835-3845
- [19] Wright S. The interpretation of population structure by F-statistics with special regard to systems of mating[J]. Evolution, 1965, 19:395-420
- [20] 陈娇,王小蓉,汤浩茹,等.基于 SSR 标记的四川野生中国樱桃遗传多样性和居群遗传结构分析[J].园艺学报,2013,40(2):333-340
- [21] Li Y H, Li W, Zhang C, et al. Genetic diversity in domesticated soybean (*Glycine max*) and its wild progenitor (*Glycine soja*) for simple sequence repeat and single-nucleotide polymorphism loci [J]. New Phytologist, 2010, 188(1):242-253
- [22] 燕雪飞.中国野生大豆遗传多样性及其分化研究[D].沈阳:沈阳农业大学,2014
- [23] 张春雨,陈学森,林群,等.新疆野苹果群体遗传结构和遗传多样性的 SRAP 分析[J].园艺学报,2009(1):7-14
- [24] Zhang C Y, Chen X S, He T M, et al. Genetic structure of *Malus sieversii* population from Xinjiang, China, Revealed by SSR markers[J]. J Genetd Genom, 2007, 34(10):947-955
- [25] 董玉芝,朱小虎,陈虹,等.新疆巩留野核桃林调查及其分析[J].植物遗传资源学报,2012,13(3):386-392
- [26] 张新时.伊犁野果林的生态地理特征和群落学问题[J].植物学报,1973(2):239-253
- [27] 袁海涛.新疆野核桃种质资源基础数据库的建立与核心种质构建方法研究[D].乌鲁木齐:新疆农业大学,2012