

文章编号: 1674-7054(2014)02-0280-06

海巴戟核心种质的构建方法

程江波 邢诒旺 赖茂良 聂风琴 林道哲 孙仁毅 符文英

(海南大学 农学院 海南 海口 570228)

摘要: 以 126 份海巴戟种质资源为材料,利用生物学性状、农艺学性状、SRAP 分子标记等遗传多样性数据,采用逐步聚类法,开展海巴戟核心种质构建机制的研究。结果表明:海巴戟核心种质的最佳构建方法为 Average 系统聚类, G 策略取样, 15% 的组内取样比例。应用该构建方法初步构建了由 21 个不同种质株系构成的海巴戟核心种质,该核心种质能够代表原种质的遗传多样性。

关键词: 海巴戟; 核心种质; 聚类方法; 取样方法

中图分类号: S 567

文献标志码: A

海巴戟(*Morinda citrifolia*) 俗称诺丽(NONI),具有抗菌、抗氧化、抗肿瘤等功效,被称为植物界的新宠^[1]。目前,海巴戟的研究主要集中在功能性成分的提取和分析上^[2-3],海南岛是我国海巴戟最大的栽培地区,但生产上存在着品种单一、不抗寒两大难题。因此,收集、筛选、评价、利用优质种质资源成为当务之急。核心种质是种质资源的一个核心子集,它能以最少数量的遗传资源最大限度地保存整个资源群体的遗传多样性,同时代表了整个群体的遗传多样性和地理分布。核心种质可以作为种质资源群体研究和利用的切入点,从而提高整个种质库的管理和利用水平。近年来,植物核心种质的研究一直是科研的热点,已经探索和构建了多种植物的核心种质^[4-19],如:野生稻、大豆、甘蔗、苕麻、普通小麦、石榴、普通杏、桃、野生苹果等。但是,对海巴戟的核心种质研究鲜有报道。笔者采用 6 大系统聚类、4 大取样策略和 8 种取样比例进行对比,从中筛选出海巴戟核心种质的最佳构建方法,旨在为我国海巴戟种质资源的保护和利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料 采用的 126 份海巴戟种质资源材料来源于海南万维海巴戟种质资源圃及种植基地,引种地分别为海南省(文昌、万宁、陵水、三亚、白鞍岛、西沙群岛)、夏威夷、大溪地、新加坡、马来西亚、印尼等地。

1.2 方法

1.2.1 生物学和农艺学性状的测定 形态学性状的观察和评价参考李开绵等^[7]的方法。果长、果宽、叶长、叶宽等数据采用数码相机拍照(八成熟的果实,成熟叶片),然后用电脑软件 Adobe PhotoShop CS6 进行测量。每个种质随机选择 3 株 3 龄树作为观测对象并标记定位,随机摘取成熟度达到 8 成的果实 10 个称其单果重,每个单果单独进行发酵试验 2 个月后测定其出汁率(出汁率 = 果汁质量 / 果实质量 × 100%)并取其平均值。随机取样观测生物学和农艺学性状,重复 3 次。

1.2.2 核心种质的构建方法 采用逐步聚类法,在 30% 的取样比例下,通过 6 大系统聚类: AVERAGE (类平均)、CENTROID (重心)、COMPLETE (最长距离)、MEDIAN (中间距离)、SINGLE (最短距离)、WARD (离差平方和),结合 4 种取样策略: 简单比例(P 策略)、平方根比例(S 策略)、对数比例(L 策略)、遗传多

收稿日期: 2014-04-10

基金项目: 国家自然科学基金项目(31360066)

作者简介: 程江波(1987-) 男,海南大学农学院 2011 级硕士研究生, E-mail: happychengjb@126.com

通信作者: 符文英,女,教授,研究方向: 作物遗传育种, E-mail: fwynoni@163.com

样性比例(G 策略) ^[8] 构成 24 组随机组合。用 4 大核心种质评价参数^[9] (均值差异百分率(*MR*)、方差符合率(*SR*)、极差符合率(*RR*)、变异系数符合率(*CR*)]来评价核心种质的代表性。计算公式如下:

$$MR = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{M_{H(i)} - M_{Y(i)}}{M_{Y(i)}} \times 100\% ,$$

式中 *n*: 性状总数 *M_{H(i)}*: 核心种质第 *i* 个性状的平均值 *M_{Y(i)}*: 原种质第 *i* 个性状的平均值。

$$SR = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{S_{H(i)}}{S_{Y(i)}} \times 100\% ,$$

式中 *n*: 性状总数 *S_{H(i)}*: 核心种质第 *i* 个性状的方差 *S_{Y(i)}*: 原种质第 *i* 个性状的方差。

$$RR = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{R_{H(i)}}{R_{Y(i)}} \times 100\% ,$$

式中 *n*: 性状总数 *R_{H(i)}*: 核心种质第 *i* 个性状的极差 *R_{Y(i)}*: 原种质第 *i* 个性状的极差。

$$CR = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n \frac{C_{H(i)}}{C_{Y(i)}} \times 100\% ,$$

式中 *n*: 性状总数 *C_{H(i)}*: 核心种质第 *i* 个性状的变异系数 *C_{Y(i)}*: 原种质第 *i* 个性状的变异系数。

聚类分析、有效性检测等数据处理采用 SAS 软件编程进行统计分析。
SRAP 分子标记检测与分析: 改良 CTAB 法提取 DNA→琼脂糖凝胶电泳检测→DNA 样品的质量浓度测定→SRAP-PCR 扩增体系的建立→SRAP 引物的筛选→聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染→海巴戟 SRAP 分子标记→海巴戟 SRAP 分子标记数据处理及聚类分析。

2 结果与分析

2.1 海巴戟种质的性状变异分析 从表 1 可知,126 个种质在 9 个观测性状中都存在变异,其变异系数为 12.51~48.9,平均变异系数为 23.96,表明海巴戟种质间存在着丰富的遗传多样性,适合遗传多样性构建。与经济性状密切相关的单果重和出汁率,其变异系数都较大,分别是 48.9 和 23.96,说明今后可以通过品种选育来提高产量和加工质量。

表 1 126 个海巴戟种质果实性状的遗传变异
Tab. 1 Genetic variation of 126 accessions of *M. citrifolia* in fruit traits

	平均值	变异幅度	极差	方差	变异系数
	Mean	Variation range	Range	Variance	Variation coefficient
出汁率/% Juice yield	0.59	0.3~0.81	0.51	0.02	23.96
叶形指数 Leaf index	2.15	1.01~4.35	3.34	0.51	33.3
果形指数 Fruit shape index	1.68	0.75~2.85	2.1	0.19	25.98
果实横径/cm Fruit diameter	5.27	3.21~6.87	3.66	1.17	20.58
果实纵径/cm Fruit length	8.75	4.02~12.32	8.3	5.76	27.43
单果重/g Fruit weight	113.82	11.8~189.4	177.6	3097.81	48.9
种子数/粒 Seeds	244.05	182~290	108	932.78	12.51
叶片宽/cm Leaf width	11.86	5.07~18.99	13.92	16.57	34.32
叶片长/cm Leaf length	23.05	14.27~30.68	16.41	24.25	21.37

2.2 海巴戟不同聚类 and 不同取样策略 从表 2 可以看出: 通过 6 种系统聚类方法,在 30% 的组内取样比例下,选择出的核心种质均能很好地代表原种质的遗传多样性。其中, AVERAGE 系统聚类法最好,其

MR 值在不同取样策略下分别为: 0.038 0.042 0.041 0.015; SR 值分别为: 1.059 0.952 0.879 0.979; RR 值分别为: 0.862 0.914 0.895 0.976; CR 值分别为: 1.018 0.944 0.904 0.989。其次为 CENTROID 系统聚类法, 其他的 4 种系统聚类方法差别不大。在 4 种不同的取样策略中, 以 G 策略取样效果最佳, 明显优于其他 3 种取样策略。因此, 在构建海巴戟核心种质过程中选择 AVERAGE 系统聚类方法和 G 策略取样是最佳组合, 该组合构建的核心种质可以代表原种质的遗传多样性。

表2 海巴戟 6 种系统聚类法和 4 种取样策略的有效性评价

Tab. 2 Evaluation of the effectiveness of six cluster methods and four sampling strategies for *M. citrifolia*

系统聚类法 Cluster method	取样策略 Sampling method	MR	SR	RR	CR
类平均 Average linkage	P	0.038	1.059	0.862	1.018
	S	0.042	0.952	0.914	0.944
	L	0.041	0.879	0.895	0.904
	G	0.015	0.979	0.976	0.989
重心 Centroid	P	0.040	0.972	0.922	1.080
	S	0.048	0.960	0.899	1.037
	L	0.048	1.036	0.837	0.962
	G	0.020	1.093	0.950	1.056
中间距离 Median linkage	P	0.114	0.839	0.838	0.844
	S	0.092	0.877	0.857	1.116
	L	0.077	0.824	0.881	0.907
	G	0.067	0.871	0.895	0.989
最短距离 Single linkage	P	0.120	0.802	0.833	1.071
	S	0.092	0.807	0.806	0.946
	L	0.053	0.802	0.829	1.028
	G	0.053	0.850	0.848	0.909
离差平方和 Ward's minimum-variance	P	0.095	0.887	0.872	0.891
	S	0.065	0.825	0.891	1.072
	L	0.079	0.872	0.815	0.848
	G	0.053	0.101	0.934	1.029
最长距离 Complete linkage clustering	P	0.126	1.157	0.806	0.811
	S	0.099	1.195	0.825	0.886
	L	0.013	0.832	0.849	1.068
	G	0.009	0.879	0.868	0.943

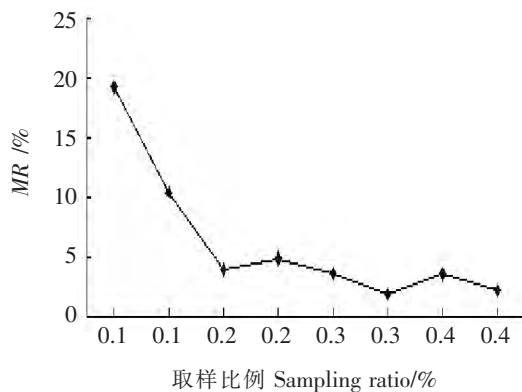
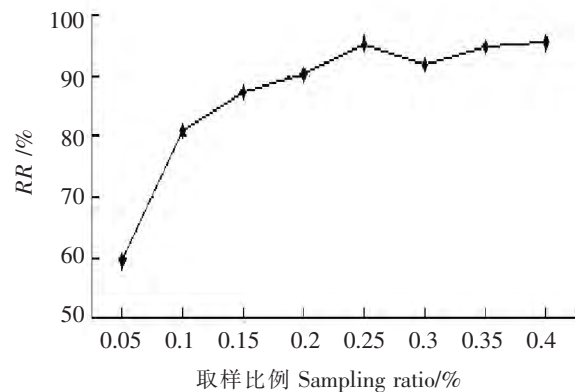
注: MR 为均值差异百分率, SR 为方差符合率, RR 为极差符合率, CR 为变异系数符合率, P 为简单比例, S 为平方根比例, L 为对数比例, G 为遗传多样性比例

Note: MR : means of traits; SR : variance of traits; RR : coincidence rate; CR : Variable rate; P: proportional strategy; S: square root strategy; L: logarithmic strategy; G: genetic and diversity-dependent strategy

2.3 取样比例的筛选

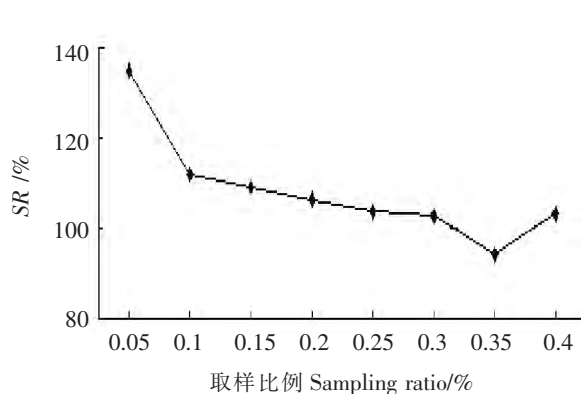
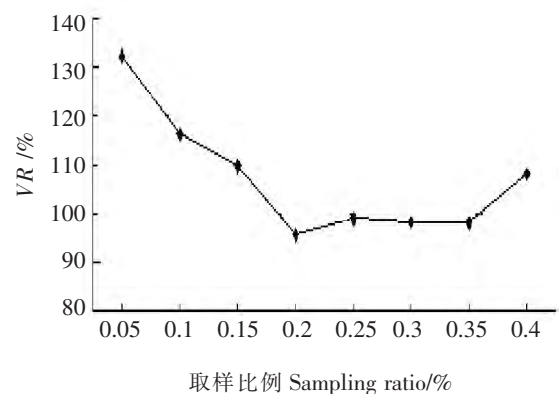
2.3.1 均值差异百分率 从图 1 可以看出, 随着取样比例的增大, 均值差异百分率在逐渐减小。取样比例为 15% 时, MR 值为 4.00%, 已降到很低的水平。取样比例小于 15% 时, MR 值随取样比例增大而减小的速度, 明显高于取样比例大于 15% 的。取样比例在 30% 时, MR 值达到最小, 为 1.93%。依照在最大限

度保留原种质遗传多样性的同时,最大限度的减少遗传冗余的原则,因此,根据 MR 值确定最佳取样比例为 15%。

图1 MR 值的变化Fig. 1 Change of MR value图2 RR 值的变化Fig. 2 Change of RR value

2.3.2 极差符合率 从图2可见,随取样比例的增大,样本和原种质的极差符合率明显提高。取样比例为 5% 时, RR 值只有 60%, 不符合核心种质的标准 ($RR > 80\%$)。取样比例为 10% 时, RR 值略高于 80%。取样比例为 25% 时, RR 值为 95.16%。取样比例为 15%、20% 和 25% 时, 核心种质均能很好代表原种质的遗传多样性。

2.3.3 方差符合率 从图3可见,取样比例为 5% 时,样本的方差符合率 (SR) 为 134.73%, 比原种质高出 34.73%, 不符合低于 20% 的标准。取样比例为 10% 时, SR 值明显下降, 为 111.81%, 与原始种质的差异值为 11.81%, 比取样比例为 5% 时的 SR 值 (34.73%) 明显降低。 SR 值随取样比例的增大越来越趋近 100%。因此, 取样比例为 15% ~ 30% 时, 均可以很好的构建核心种质。

图3 SR 值的变化Fig. 3 Change of SR value图4 VR 值的变化Fig. 4 Change of VR value

2.3.4 变异系数符合率 从图4可知,取样比例为 5% 时,样本的 VR 值为 132.29%, 比原始种质高出 32.29%, 不符合 $VR < 20\%$ 的标准。样本的 VR 值随取样比例的增大越来越接近 100%, 即样本和原始种质的变异系数越来越接近。在取样比例为 15% 时, 样本变异系数和原始种质之间的差值为 9.67%; 在 20% 的取样比例时, 样本和原始种质的 VR 值非常接近, 只差 4.25%。在取样比例为 25% 时, 样本和原始种质的 VR 值都为 98.91%。因此, 构建核心种质的适宜取样比例为 15% ~ 25%。

综合以上 4 种有效性检测数据分析结果, 在最大限度保留原种质的遗传多样性基础上, 最大限度地降低遗传冗余, 笔者认为, 海巴戟核心种质构建的最佳取样比例为 15%。此时, 包含了 18 个不同种质株系, 分别是: DX650, HM305, HM896, HN411, HX136, HX700, HX814, ML131, ML643, MX229, MX844,

MX301, MX856, SJ356, SJ604, SJ772, SJ958, YN745。入选初步核心种质的引种地有: 大溪地、海南省(白鞍岛、万宁、西沙群岛)、马来西亚、夏威夷、新加坡和印尼。未入选的引种地有: 海南省(三亚、陵水、文昌)和老挝。

2.4 结合分子标记和生产需求进一步构建核心种质 通过分子标记进一步降低环境等外在因素对核心种质筛选的影响, 从遗传信息上进一步剔除初选株系中遗传距离较近的株系。笔者借助课题组的 SRAP 分子标记后的聚类, 对在 15% 的取样比例下, 筛选出的包含 18 个株系进行 SRAP 标记和聚类。分子标记结果表明, 遗传距离 >0.15 , 因此, 18 个海巴戟株系之间均存在一定的遗传差异性。结果表明, 在 15% 的取样比例下, 采用 AVERAGE 系统聚类、G 取样策略构建得到的由 18 个海巴戟株系构成的核心种质无明显遗传冗余。

根据生产需要, 增加 3 种未被选入但具有优良遗传性状的株系增加的 3 种株系: 抗寒性较强的株系 HM121, 结果量高的株系 HX320, 抗旱性较强的株系 HN835。最终构建的海巴戟核心种质包含 21 个种质株系: DX650, HM121, HM305, HM896, HN411, HN835, HX136, HX320, HX700, HX814, ML131, ML643, MX229, MX844, MX301, MX856, SJ356, SJ604, SJ772, SJ958, YN745。入选初步核心种质的引种地有: 大溪地、海南省(白鞍岛、万宁、西沙群岛)、马来西亚、夏威夷、新加坡和印尼。未入选的引种地有: 海南省(三亚、陵水、文昌)和老挝, 未被入选的株系留作备用。初步核心种质有效性检测结果为: $MR = 4.00\%$, $RR = 87.19\%$, $SR = 109.03\%$, $VR = 109.67\%$ 。结果表明该子集可以很好的代表原始株系的遗传多样性, 核心种质株系数量占原始株系的 16.7%, 符合核心种质构建中 10% ~ 30% 的要求。

3 讨论

核心种质构建效果的好坏很大程度上取决于原始种质的完整性。Plucknelt 等^[10]认为, 65% 的种质缺乏基本数据, 而缺乏特征及鉴定数据的种质则占 80% ~ 95%。目前, 研究核心种质大都是根据资源圃的材料来展开的^[11-15]。刘遵春等^[8]利用野生苹果的数量性状, 总酸、TSS, 叶片长度等数量性状进行新疆野生苹果核心种质的构建。高志红等^[16]在农艺性状的基础上, 结合了分子标记 RAPD, SSR 以及同工酶来构建中国果梅核心种质。魏志刚等^[17]采用白桦的纤维素含量、树高、胸径、材积的数据来构建白桦的核心种质。沈进等^[18]采用 14 个农艺学性状初步构建了中国石榴的核心种质。董玉琛等^[19]采用 21 个表型性状对中国普通小麦的核心种质构建进行了研究。李银霞等^[20]结合桃的形态、农艺性状等对桃的初级核心种质进行了分析。笔者在欧氏距离下选择 AVERAGE 系统聚类法, 以 G 策略进行组内取样, 取样比例为 15%, 通过 4 大数据检测核心种质的有效性, 参考分子标记剔除因环境因素造成的遗传信息冗余, 同时, 人为筛选对生产实践有用, 但没有被入选的种质, 初步构建了含有 21 个株系的海巴戟核心种质, 该核心种质可以代表 126 份样本的遗传多样性。

本研究团队自 2004 年起, 开展海巴戟的种质资源收集和评价工作, 已从海南、夏威夷、大溪地、新加坡、印尼、泰国、老挝、菲律宾等国家和地区收集了大量海巴戟不同自然群居的种质资源, 并在海南万宁建立了海巴戟种质资源原圃, 对种质资源进行了初步审定, 并建立数据库。核心种质本身就是一个随时间变化而变化的一个动态的资源库^[7], 随着时间的推移, 会不断有新的遗传资源出现。海巴戟的生长环境非常特别, 基本是生长在热带亚热带的岛屿, 这给予样品的收集和统计带来了困难, 有很多没有人类长期居住的热带岛屿上, 也可能存在海巴戟的种质资源。同时, 海巴戟属于多年生植物, 个体存在芽变, 在同一植株上可能存在不同的遗传变异, 这些变异并没有完全被发现。实用性检验是对核心种质有效性的最直接和最具说服力的检验途径, 经得起实践的最终考验的核心种质才是最有效的。因此, 核心种质的有效性和合理性仍然需经生产实践来验证。

参考文献:

- [1] 彭勇, 肖伟. 世界药用植物新宠——海巴戟果[J]. 国外医药(植物学分册), 2007, 22(3): 93-96.
- [2] 张洪财, 王文娟, 刘树民. 诺丽果化学成分的研究进展[J]. 哈尔滨医药, 2011, 31(3): 213-216.
- [3] 龚敏, 符文英, 周静, 等. 诺丽鲜果与诺丽发酵汁的挥发性成分对比研究[J]. 食品科技, 2009, 34(9): 33-35.
- [4] 邱丽娟, 李英慧, 关荣霞. 大豆核心种质和微核心种质的构建[J]. 作物学报, 2009, 35(4): 571-579.

- [5] 卜海东, 张冰冰. 果树核心种质研究进展[J]. 北方园艺, 2010(4): 211–213.
- [6] 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.
- [7] 李开绵, 陈业渊. 热带经济作物种质资源数据质量控制规范[M]. 北京: 中国农业出版社, 2007.
- [8] 李自超, 张洪亮, 孙传清, 等. 植物遗传资源核心种质研究现状与展望[J]. 中国农业大学学报, 1999, 4(5): 51–62.
- [9] 刘遵春, 张春雨, 张艳敏. 利用数量性状构建新疆野苹果核心种质的方法[J]. 中国农业科学, 2010, 43(2): 358–370.
- [10] PLUCKNETT D L, SMITH N J H, WILLIAMS J H, et al. Gene Banks and the World's Food[M]. Princeton: Princeton University Press, New Jersey, USA, 1987.
- [11] 于森, 郝国生, 周春玲, 等. 山东省牡丹核心种质的构建策略研究[J]. 北方园艺, 2008(8): 110–113.
- [12] 章秋平, 刘威生, 刘宁, 等. 普通杏(*Prunus armeniaca*) 初级核心种质资源的构建及评价[J]. 果树学报, 2009(6): 13–16.
- [13] 刘新龙, 蔡青, 马丽, 等. 甘蔗杂交品种初级核心种质取样策略[J]. 作物学报, 2009, 35(7): 1209–1216.
- [14] 陈雨, 潘大建, 杨庆文, 等. 广东高州野生稻应用核心种质取样策略[J]. 作物学, 2009, 35(3): 459–466.
- [15] 栾明宝, 陈建华, 许英. 苕麻核心种质构建方法[J]. 作物学报, 2010, 36(12): 2099–2106.
- [16] 高志红, 章镇, 韩振海. 中国果梅核心种质的构建与检测[J]. 中国农业科学, 2005, 38(2): 363–368.
- [17] 魏志刚, 高玉池, 刘桂丰, 等. 白桦核心种质初步构建[J]. 林业科学, 2009(9): 74–79.
- [18] 沈进, 朱立武, 张水明, 等. 中国石榴核心种质的初步构建[J]. 中国农学通报, 2008, 24(5): 265–268.
- [19] 董玉琛, 曹永生, 张学勇. 中国普通小麦初选核心种质的产生[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(1): 1–8.
- [20] 李银霞, 安丽君, 姜全, 等. 桃(*Prunus persica* L. Batsch.) 品种核心种质的构建与评价[J]. 中国农业大学学报, 2007, 12(5): 22–28.

A Method for Establishing Core Collection of *Morinda citrifolia*

CHENG Jiangbo, XING Yiwang, LAI Maoliang, NIE Fengqin, LIN Daozhe, SUN Renyi, FU Wenying
(College of Agronomy, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: The biological traits and agronomic traits were determined from 126 accessions of *Morinda citrifolia* in Wanning *Morinda citrifolia* Germplasm Repository, and SRAP molecular markers of *M. citrifolia* were identified. These genetic diversity data were analyzed by using the stepwise clustering methods to construct a core collection of *M. citrifolia* germplasm. The results showed that the average linkage (UPGMA) method combined with diversity-dependent strategy (G) sampling at 15% sampling proportion were optimum for construction of a core collection of *M. citrifolia* germplasm. With this method a core collection of *M. citrifolia* with 21 different accessions was constructed, which represents the genetic diversity of the original germplasm of *M. citrifolia*.

Key words: *Morinda citrifolia*; core collection; cluster method; sampling method