

文章编号:1001-1498(2011)02-0189-05

云南省核桃品种遗传多样性的 FISH-AFLP 分析

宁德鲁¹, 马庆国², 张雨¹, 王滑², 陆斌³, 裴东^{2*}

(1. 云南省林业科学院经济林研究所, 云南昆明 650204; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3. 云南省林业技术推广总站, 云南昆明 650224)

摘要:采用 FISH-AFLP 技术, 选取 8 对 E+3 和 M+3 引物组合, 对云南省林木品种审定委员会审(认)定的 17 个核桃品种(无性系)进行了基因组 DNA 分子水平上的检测, 实验结果共获得 987 条可统计的条带, 其中 942 条呈多态性, 多态性带百分率达 95.44%; 17 份供试核桃样品的遗传相似系数范围为 0.606 9~0.796 4, 平均为 0.734 9。本研究分析了云南省审(认)定核桃品种(无性系)的遗传多样性和亲缘关系, 建立了它们的指纹图谱, 为下一步的核桃新品种选育、构建核桃优良种质库提供了理论指导。

关键词:核桃; 品种; 遗传多样性; FISH-AFLP; 聚类分析

中图分类号: S792.13

文献标识码: A

FISH-AFLP Analysis of Genetic Diversity on Walnut Cultivars in Yunnan Province

NING De-lu¹, MA Qing-guo², ZHANG Yu¹, WANG Hua², LU Bin³, PEI Dong²

(1. Research Institute of Economic Forestry, Yunnan Academy of Forestry, Kunming 650204, Yunnan, China;

2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Yunnan General Station of Forestry Technology Extension Station, Kunming 650224, Yunnan, China)

Abstract: The genetic diversities of 17 walnut cultivars (*Juglans sigillata* Dode) authorized or approved by Yunnan Province Forest Tree Cultivar Registration Committee were investigated with FISH-AFLP technical system. Eight pairs of E+3/M+3 primers were used to amplify the genomic DNA. The results showed that 987 AFLP bands were obtained, 942 of them were polymorphic markers and the average percent of polymorphic bands was 95.44%. The genetic similarity indexes among all the 17 cultivars are ranged from 0.606 9 to 0.796 4 with an average of 0.734 9. These investigations would be significant in utilizing walnut germplasm resources and cultivating new varieties.

Key words: walnut (*Juglans sigillata* Dode); cultivar; genetic diversity; FISH-AFLP; cluster analysis

核桃(*Juglans regia* L.)为世界四大干果之一, 云南作为我国核桃主产大省, 截止 2009 年, 云南省核桃种植面积达 160 万 hm², 年产量超过 3 亿 kg, 产

值超过 60 亿元, 种植面积和产量约占全国的 1/3^[1]。云南省在良种选育方面也开展了大量的工作, 选育出的许多优良品种通过了云南省林木品种审定委员

收稿日期: 2010-07-05

基金项目: 林业公益性行业科研专项经费项目: 1. 核桃优异种质资源保存与开发利用技术研究(200704046); 2. 核桃集约及可持续生产关键技术研究(201004048)

作者简介: 宁德鲁(1974—), 男, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事经济林良种选育及栽培技术等方面的研究, E-mail: ningdelu@163.com

* 通讯作者: 裴东(1964—), 女, 博士, 研究员, 中国林业科学研究院博士生导师, 主要从事植物生物技术的研究, E-mail: peidu@caf.ac.cn

会的审(认)定,但总的来看,云南省的良种使用率很低,不到30%。随着核桃种植面积的不断扩展和不同用途品质的要求,必然要在充分分析云南核桃品质特征及开发利用方向的大基础上,开展果用、仁用、油用核桃的定向培育,对核桃的选育和栽培提出了新的更高的要求,对现有核桃品种遗传背景、亲缘关系深入系统的了解,将有助于进一步育种工作的开展。收集保护云南核桃的种质资源,进行遗传多样性分析评价,构建核心种质资源库,是培育核桃新品种的前提基础。

国内外目前关于核桃遗传多样性的研究有少量报道,研究方法主要采用同工酶、RAPD、SSR、IS-SR^[2-6]等技术,由于材料选择、研究手段的局限性及分析方法的不同,获得的结果也不一致^[7-9]。核桃 AFLP 试验体系的研究较多^[10-13], AFLP 技术应用于核桃遗传多样性研究的报道很少^[14-15]。扩增片段长度多态性(Amplified fragment length polymorphism, AFLP)是目前综合效应最高的分子标记方

法,已被广泛用于遗传资源研究^[16]。FISH-AFLP 方法是在 AFLP 技术中引入荧光引物,通过测序仪直接获得图像并进行数据读取和分析,同时具有高灵敏、高通量的优点^[12]。本研究采用 FISH-AFLP 技术,对云南省通过审(认)定的17个核桃品种(无性系)进行遗传多样性分析,为利用该项分子标记技术开展核桃的种质鉴定提供理论依据;同时为种质资源的遗传学研究及生产应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为17个云南省林木品种审定委员会审(认)定的核桃品种(无性系)。2009年12月至2010年1月采其生长健壮、无病虫害的1年生枝条,置于冰盒带回实验室,-20℃保存备用。供试材料的基本情况见表1,于2010年3—5月进行遗传多样性实验。

表1 核桃供试材料及其来源

品种号	供试样品	亲本来源	采集地点
1	云新高原(<i>J. sigillata</i> × <i>J. regi</i> ‘Yunxingaoyuan’)	漾濞泡核桃 × 新疆早实核桃云林 A7 号	嵩明云新高原、云新云林核桃采穗圃
2	云新云林(<i>J. sigillata</i> × <i>J. regi</i> ‘Yunxinyunlin’)	漾濞泡核桃 × 新疆早实核桃云林 A7 号	嵩明云新高原、云新云林核桃采穗圃
3	云新 301(<i>J. sigillata</i> × <i>J. regi</i> ‘Yunxin 301’)	三台核桃 × 新疆早实核桃新早 13 号	昆明树木园
4	云新 303(<i>J. sigillata</i> × <i>J. regi</i> ‘Yunxin 303’)	三台核桃 × 新疆早实核桃新早 13 号	昆明树木园
5	云新 306(<i>J. sigillata</i> × <i>J. regi</i> ‘Yunxin 306’)	三台核桃 × 新疆早实核桃新早 13 号	昆明树木园
6	漾杂 1 号(<i>J. sigillata</i> ‘Yangza 1’)	漾濞泡核桃 × 娘青核桃	云南省漾濞县
7	漾杂 2 号(<i>J. sigillata</i> ‘Yangza 2’)	漾濞泡核桃 × 娘青核桃	云南省漾濞县
8	漾杂 3 号(<i>J. sigillata</i> ‘Yangza 3’)	漾濞泡核桃 × 娘青核桃	云南省漾濞县
9	漾濞泡核桃(<i>J. sigillata</i> ‘Yangbipaohetao’)	铁核桃实生选育	云南省林业科学院漾濞研究站
10	细香核桃(<i>J. sigillata</i> ‘Xixianghetao’)	铁核桃实生选育	云南保山市昌宁县
11	华宁大白壳(<i>J. sigillata</i> ‘Huaningdabaikē’)	铁核桃实生选育	云南玉溪市华宁县
12	华宁大砂壳(<i>J. sigillata</i> ‘Huaningdashake’)	铁核桃实生选育	云南玉溪市华宁县
13	丽 53(<i>J. sigillata</i> ‘Li 53’)	铁核桃实生选育	云南省林业科学院漾濞研究站
14	永 11(<i>J. sigillata</i> ‘Yong 11’)	铁核桃实生选育	云南省林业科学院漾濞研究站
15	维 2 号(<i>J. sigillata</i> ‘Wei 2’)	铁核桃实生选育	云南省林业科学院漾濞研究站
16	漾江 1 号(<i>J. sigillata</i> ‘Yangjiang 1’)	铁核桃实生选育	云南省漾濞县
17	泸 1 号(<i>J. sigillata</i> ‘Lu 1’)	铁核桃实生选育	云南省怒江州泸水县

注:新疆早实核桃(*J. regia* L.),三台核桃(*J. sigillata* ‘Santaihetao’),娘青核桃(*J. sigillata* ‘Niangqinghetao’),铁核桃(*J. sigillata* Dode),新疆早实核桃云林 A7 号(*J. regia* ‘Yunlin A7’),新疆早实核桃新早 13 号(*J. regia* ‘Xinza 13’)。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 制备 采用改良 CTAB 法,从准备好的核桃枝条韧皮部中提取总 DNA^[10]。称取 50 mg 材料,在液氮中研磨成细粉状,立即装入预先加入 1 mL 含有 PVP40、β-巯基乙醇和偏重亚硫酸钠的 CTAB 提取缓冲液的 1.5 mL 离心管中,混匀,4℃下

3 000 r · min⁻¹离心 4 min。弃上清液,加入 700 μL 经过 65℃预热的 CTAB,混匀,65℃水浴 30 min,期间颠倒混匀若干次。水浴完成后,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1,V/V),颠倒混匀。12 000 r · min⁻¹离心 15 min,取上清液,加入等体积的氯仿:异戊醇,颠倒混匀,动作要轻。4℃下 12 000 r · min⁻¹离

心 15 min, 转上清液于新的 1.5 mL 离心管中, 加入 2/3 体积预冷的异丙醇, 混匀, 静置 30 min, 4 °C 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 用 70% 乙醇漂洗 2 次, 室温风干, 加入 400 μL TE (10 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 值 8.0; 1 mmol · L⁻¹ EDTA)。加入 RNase 液 (10 mg · mL⁻¹) 15 μL, 37 °C 水浴 30 min。加入等体积的苯酚: 氯仿 (1: 1, V/V), 4 °C 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 取上清液, 再加入等体积的氯仿: 异戊醇, 4 °C 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 10 min, 取上清液。加入 1/10 体积 3 mol · L⁻¹ NaAc (pH 值 5.2), 2 倍体积预冷的无水乙醇轻轻混匀, 静置 20 min, 4 °C 下 12 000 r · min⁻¹ 离心 15 min, 弃上清, 70% 乙醇漂洗 2 次, 室温风干后加 50 μL TE (pH 值 8.0) 溶解, -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2 FISH-AFLP 分析 参照北京鼎国生物技术公司的 FISH-AFLP 试剂盒及其操作指南进行。

1.2.3 电泳与数据分析 选择扩增后的样品在 ABI 377 自动测序仪上电泳分离检测, 得到 FISH-AFLP 的 DNA 指纹图谱。利用 GeneScan 3.1 软件将 17 个材料 8 对荧光引物产生的电泳胶图转换为“0/1”矩阵 (即按照凝胶上不同材料同一位置带的有无进行统计, 有带记为“1”, 无带记为“0”)。用 NTSYSp-2.11F 软件进行数据分析。对原始矩阵用

SimQual 程序求 DICE 相似系数, 并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的非加权算术平均法 (UPGMA) 进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图。使用 POPGENE32 version 1.32 软件计算多态性比例 PPB (percentage of polymorphic bands)。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

本研究选用六碱基内切酶 EcoR I 和四碱基内切酶 Mse I 对基因组 DNA 进行双酶切, 然后与接头连接; 用 8 对 E + 3/M + 3 引物组合进行选择扩增, 获得了较好的扩增结果 (表 2, 图 1)。由表 2 可见: 8 对引物组合共扩增出 987 条带, 其中 942 条带是多态性条带, 平均多态性比例为 95.44%, 这表明 17 份核桃品种 (无性系) 具有较高比例的多态性条带。其中, 引物组合 E-AAC/M-CTC 所检测的 117 条带均为多态性条带, 多态性比例为 100%; 引物组合 E-ACG/M-CTA 所获得的总条带数最多 (图 1), 为 158 条带, 但多态性比例在选用的 8 对引物中最低, 为 93.67%。可见, FISH-AFLP 检测核桃品种遗传多样性的效率很高, 也充分体现了分析材料具有较高的遗传多样性。

表 2 8 对引物的扩增结果及条带多态性

序号	引物对	总条带数/条	共有带/条	多态性带/条	多态性比例/%
3-5	E-AAC/M-CTA	128	11	117	91.41
3-6	E-AAC/M-CTC	117	0	117	100.00
6-1	E-ACT/M-CAA	118	7	111	94.07
6-7	E-ACT/M-CTG	131	8	123	93.89
6-8	E-ACT/M-CTT	106	1	105	99.06
8-2	E-ACG/M-CAC	116	5	111	95.69
8-5	E-ACG/M-CTA	158	10	148	93.67
8-6	E-ACG/M-CTC	113	3	110	97.35
合计		987	45	942	
平均		123.38	5.63	117.75	95.44

2.2 供试核桃品种的遗传关系

2.2.1 遗传关系分析 17 份供试核桃样品的遗传相似系数范围为 0.606 9 ~ 0.796 4, 平均为 0.734 9, 其中, 云新云林和云新 301 之间的遗传相似系数最大, 为 0.796 4, 表明 2 个品种之间的亲缘关系较近; 而云新 306 和丽 53 之间的遗传相似系数最小, 为 0.606 9, 表明这 2 个品种之间的亲缘关系较远。

2.2.2 聚类分析 用 NTSYSp-2.11F 软件进行数据分析获得相似系数矩阵后, 用 SHAN 程序中的

UPGMA 方法进行聚类分析, 并通过 Tree plot 模块生成聚类图 (图 2)。

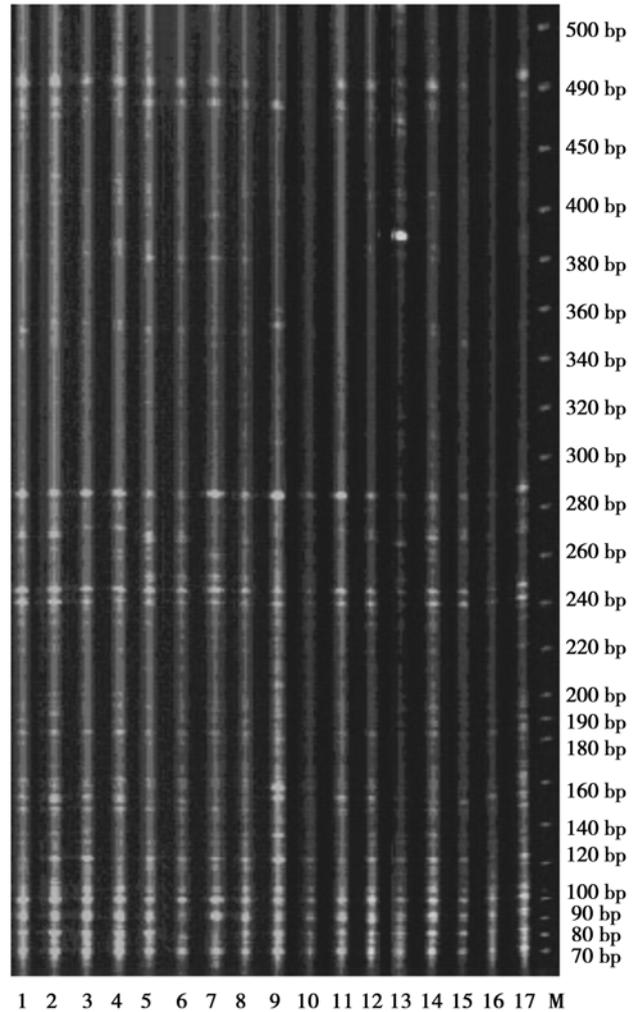
从图 2 中可以看出: 供试样品的相似系数为 0.64 ~ 0.80。当阈值为 0.64 时, 可将 17 个供试样品分成 2 个 AFLP 群 (简称 AG); AG1 仅含有一个核桃品种——丽 53, 为云南省林业科学院经济林研究所通过实生选育出的优良无性系, 树势较强, 抗逆性强, 树冠圆头形, 分枝力强, 坚果近圆球形, 种壳刻纹浅较光滑, 缝合线微隆起, 紧密。另一个 AFLP 群 AG2 则囊括了其他 16 个核桃品种。当阈值为 0.73

时,可将 AG2 分为 6 个组(分别标记为 I~VI),其中,II、III、V、VI组各包含 1 个品种,分别为云新高原、细香核桃、云新 303 和漾杂 2 号。17 个研究材料中,由铁核桃实生选育的品种共有 9 个,除丽 53 归入 AG1 外,其余 8 个品种中漾濞泡核桃、永 11、漾江 1 号、泸 1 号、华宁大白壳、华宁大砂壳 6 个品种聚在 I 组,品种细香核桃单独分为 III 组,维 2 号与杂交品种云新 306(三台核桃 × 新疆早实核桃)聚在 IV 组。相同父母本的杂交品种漾杂 1~3 号(漾濞泡核桃 × 娘青核桃),除漾杂 1 号和漾杂 3 号归入 I 组外,漾杂 2 号单独分为 VI 组。由此可见,即使同为实生选育的铁核桃品种或相同父母本的杂交品种,可能由于云南核桃品种遗传基础较为丰富,具有比较丰富的遗传变异,故而在基因组水平上仍表现出可检测到的较大差异。

3 结论与讨论

本次实验采用 FISH-AFLP 技术,选用 8 对 E + 3 和 M + 3 引物组合首次对云南省 17 个审(认)定核桃品种(无性系)进行了总基因组 DNA 水平上的检测,共获得 942 条多态性条带,多态性带百分率达 95.44%。

陈少瑜等^[7]用 RAPD 和 ISSR 标记对云南省 11 个核桃品种进行的研究中,2 种标记方法检测出的总条带数、多态条带数分别为 86、53 条和 102、62 条,多态条带百分率分别为 61.63% 和 60.78%,二者相近,但 ISSR 标记检测出的总条带数和多态性带



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 M
右侧第 1 泳道为 Marker (M); 其余为 17 个品种的泳道。
图 1 引物组合为 E-ACG/M-CTA 扩增出的部分核桃品种的 FISH-AFLP 电泳图谱

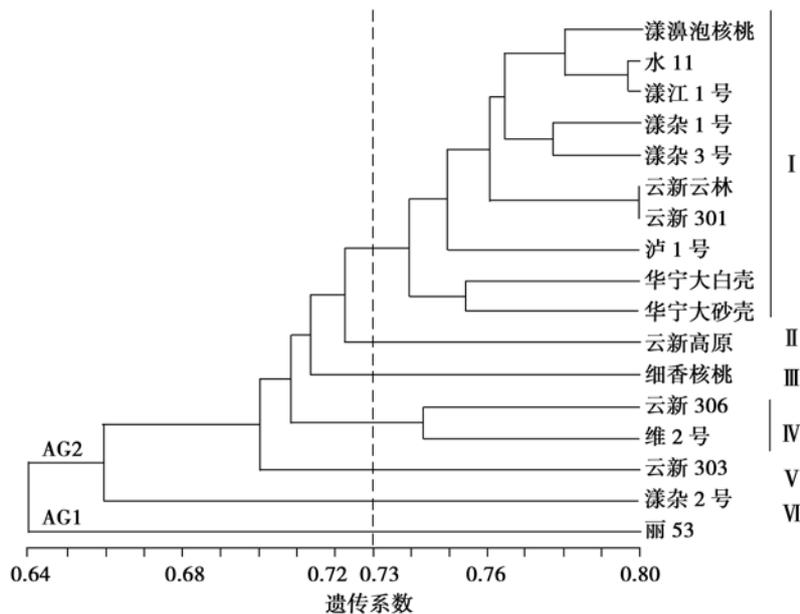


图 2 云南省 17 个审(认)定核桃品种 FISH-AFLP 分析聚类树状图

数更多些,即 ISSR 标记可以揭示更为丰富的遗传信息。本研究每对引物平均获得的总条带数、多态性带数分别为 123 和 118 条,表现出更高的检测效率,说明 FISH-AFLP 方法得到的信息量较大,是一种较好的用于分析遗传多态性和指纹图谱分析的标记方法。金强等^[14]用筛选出的 7 对 AFLP 多态性引物对取自新疆温宿、巩留、和田、若羌、叶城、库车、阿拉尔的 122 份核桃种质材料进行扩增,共获得 21 989 条谱带,其中 8 810 条具有多态性,平均多态性检出率为 40.1%,遗传相似系数范围为 0.120 0~0.931 0。本研究遗传相似系数为 0.606 9~0.796 4,平均为 0.734 9,遗传相似系数相对较高,可能是因为供试材料中的品种是由铁核桃类群实生选育或以铁核桃类群的品种为母本进行杂交选育而成,相互之间的亲缘关系相对较近的缘故。本研究使用的引物 E-AAC/M-CTC、E-ACT/M-CTG 在王林^[12]对核桃的研究中也得到了很好的扩增效果,同时郭金剑等^[13]对山核桃(*Carya cathayensis* Sarg.)的研究中用 E-ACT/M-CTG 也得到了很好的扩增效果。这说明某些引物在核桃的相关 AFLP 研究中具有一定通用性。

核桃在云南省自然分布极为广泛,云南省 124 个县市都有核桃的分布和种植,且核桃属植物的花是风媒花,虽然雌雄花同株,但雌雄异熟,多异交,而云南省地形复杂、气候条件多样,在生态环境多样性条件下,核桃经长期的异花授粉和自然选择,其遗传背景比较复杂^[17]。本研究中也发现同为实生选育的铁核桃品种或相同父母本的杂交品种却聚在不同的组中。核桃遗传多样性研究是核桃种质资源保护及开发利用的基础,对当前核桃种质资源的遗传多样性进行准确的评价可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性的指导,这是关系到育种目标能否成功实现的关键。系统地对核桃品种资源进行调查收集、保存和分类,并且对其主要经济性状深入考察研究,对云南省乃至中国

地区核桃种质资源的分类、人工选育优良品种及杂交育种,改造核桃低产区具有重要的实际意义。

参考文献:

- [1] 陆 斌. 云南核桃的特性与品质[J]. 经济林研究, 2009, 27(2): 137-140
- [2] 杨自湘, 奚声珂. 胡桃属十种植物的过氧化物同功酶分析[J]. 植物分类学报, 1989, 27(1): 53-57
- [3] 吴燕民, 裴 东, 奚声珂. 运用 RAPD 对核桃属种间亲缘关系的研究[J]. 园艺学报, 2000, 27(1): 17-22
- [4] 张日清, 吕芳德, 谭晓风, 等. 美国山核桃主要栽培品种的 RAPD 鉴定[J]. 经济林研究, 2004, 22(4): 1-5
- [5] 杨本芸, 杨敏生, 梁海永, 等. 不同核桃品种的 SSR 分析[J]. 河北农业大学学报, 2008, 31(4): 51-55
- [6] 陈少瑜, 杨 恩, 习学良, 等. 云南主要核桃品种的 ISSR 分子鉴别[J]. 经济林研究, 2006, 24(4): 41-45
- [7] 陈少瑜, 杨 恩, 张 雨, 等. 云南核桃品种遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 标记研究[J]. 河北林果研究, 2007, 22(1): 56-61
- [8] 张虎平, 虎海防, 牛建新, 等. 新疆核桃早实特性及 RAPD 分析[J]. 西北植物学报, 2005, 25(11): 2157-2162
- [9] 马 明, 杨克强, 刘晓菊, 等. 核桃(*J. regia*) SRAP 标记反应体系建立的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2007, 38(2): 189-192
- [10] 李 荣, 牛建新, 王 林, 等. 适合核桃 AFLP 分析用的 DNA 提取方法研究[J]. 西北农业学报, 2006, 15(3): 175-178
- [11] 王红霞, 张志华, 赵书岗, 等. 核桃种质资源遗传多样性研究中的 AFLP 技术优化及引物筛选[J]. 华北农学报, 2008, 23(1): 50-54
- [12] 王 林, 李 荣, 牛建新, 等. 核桃 AFLP 银染技术体系的建立[J]. 西北农业学报, 2007, 16(2): 116-119
- [13] 郭金剑, 池 伟, 赵鑫珠, 等. 山核桃 AFLP 实验技术体系的建立[J]. 浙江林学院学报, 2008, 25(4): 532-537
- [14] 金 强, 杨 宇, 王新建, 等. 新疆核桃种质资源遗传多样性 AFLP 分析[J]. 江苏农业科学, 2009(2): 28-31
- [15] 陈良华, 胡庭兴, 张 帆, 等. 用 AFLP 技术分析四川核桃资源的遗传多样性[J]. 植物生态学报, 2008, 32(6): 1362-1372
- [16] 马庆国, 齐 静, 裴 东. 16 个早实核桃良种遗传多样性的 FISH-AFLP 分析[J]. 林业科学研究, 2010, 23(5): 631-636
- [17] 王永康, 田建保, 王永勤, 等. 枣树品种品系的 AFLP 分析[J]. 果树学报, 2007, 24(2): 146-150