

锥栗农家品种的遗传多样性及亲缘关系分析

刘国彬¹, 龚榜初^{1*}, 赖俊声², 鼓佳龙³, 谢正成²

(1. 中国林业科学研究院亚热带林业研究所, 浙江 富阳 311400; 2. 浙江省庆元县林业局, 浙江 庆元 323800;
3. 浙江省仙居县林业局, 浙江 仙居 317300)

摘要:采用 ISSR 技术对 37 个锥栗农家品种进行遗传多样性及亲缘关系分析。从 65 条通用引物中筛选出 13 条扩增效果较好的引物进行扩增, 每条引物的扩增谱带从 9(引物 828)~16 条(引物 821)不等, 平均每个引物产生 12 个 ISSR 片段, 共扩增出 156 条谱带, 其中多态性条带 129 条, 占 82.69%, 平均每个引物扩增的 DNA 多态性条带为 9.9 条。结果表明:锥栗农家品种具有丰富的遗传多样性水平;供试农家品种的观测等位基因数 1.826 9, 有效等位基因数 1.509 7, Nei's 基因多样性(H_e)为 0.292 3, Shannon 信息指数为 0.434 4;13 条引物可区分 37 份农家品种及其优株。根据遗传一致度构建反映品种间亲缘关系的 UPGMA 聚类图, 37 个锥栗品种可划分为 2 大类群 7 个亚类。

关键词:锥栗;农家品种;ISSR;遗传多样性;遗传关系

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

Analysis of Genetic Diversity and Genetic Relationships of *Castanea henryi* Native Varieties

LIU Guo-bin¹, GONG Bang-chu¹, LAI Jun-sheng², GU Jia-long³, XIE Zheng-cheng²

(1. Research Institute of Subtropical Forestry, Chinese Academy of Forestry, Fuyang 311400, Zhejiang, China;
2. Forestry Bureau of Qingyuan County, Zhejiang Province, Qingyuan 323800, Zhejiang, China;
3. Forestry Bureau of Xianju County, Zhejiang Province, Xianju 317300, Zhejiang, China)

Abstract: ISSR was used to study the genetic diversity and genetic relationship of 37 *Castanea henryi* native varieties. 13 ISSR primers were selected from 65 universal primers. The number of bands produced by each primer varied from 9 to 16, the average was 12. A total of 156 bands were produced, in which 129 were polymorphic, the percentage of polymorphic loci was 82.69%, in average 9.9 polymorphic bands produced by each primer, and a relatively high level of genetic diversity was revealed by the result. The Observed number of alleles was 1.826 9, the effective number of alleles was 1.509 7, Nei's gene diversity was 0.292 3, Shannon information index was 0.434 4. 37 cultivars were distinguished by 13 ISSR primers. A dendrogram showed that the genetic relationship was constructed through an unweighted pair group method (UPGMA) based on the genetic identity and 37 cultivars were clustered into 2 main groups and 7 subgroups.

Key words: *Castanea henryi*; native varieties; ISSR; genetic diversity; genetic relationship

锥栗 (*Castanea henryi* (Skan) Rehd. et Wils.) Blume), 深受群众喜爱, 是我国重要的经济林树种之一, 也是我国南方著名的木本粮食和果材兼用树种。果实甜香可口, 风味明显优于板栗 (*C. mollissima*)

锥栗在闽北和浙南山区资源分布最为集中,并有大面积人工林。据《松溪县志》记载,400多年前闽北已有关于锥栗品种的记载。江西、湖南、鄂西、广东、桂北、四川、江苏等地有零星分布。长期以来,锥栗由于实生繁殖,加之人工选择的结果,形成了许多优良的农家品种,通过对锥栗主产区农家品种的资源调查,目前已经形成10多个锥栗优良品种^[1];然而,在栽培过程中,由于引种不规范、缺乏有效的登记管理,锥栗品种同名异物、同物异名的现象较为严重,成为育种及苗木繁育销售的障碍,给锥栗生产和科研造成很多不便。

近年来,生物技术迅速发展,同工酶、分子标记技术已经用于栗属(*Castanea* Mill.)分子系统学^[2-6]和板栗遗传多样性及遗传关系^[7-9]研究;将分子标记技术应用于锥栗品种分类的研究已有报道^[10-11]。ISSR分子标记已经成功用于林木种质鉴定^[12]、遗传多样性^[13-14]和遗传关系分析^[15],并已用于栗属植物遗传连锁图谱构建^[16]和板栗遗传多样性研

究^[17]。本文利用ISSR分子标记技术对具有同名异物或同物异名特征的37份锥栗农家品种和优良无性系进行遗传多样性和亲缘关系研究,分析锥栗品种间的遗传距离和遗传相似性,旨在探明锥栗农家品种间的亲缘关系,科学、准确地鉴别同名异物或同物异名品种,为锥栗育种材料的选择和种质资源保存提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料共37份,原采集于福建省建瓯市水源乡、龙村乡、川石乡、南平市浦城县和浙江省庆元县、兰溪市等地。各材料名称均为当地农家名,采集后嫁接于浙江富阳中国林科院亚热带林业研究所锥栗圃(编号见表1)。于2008年5月份采集锥栗幼嫩叶片,干冰运输,迅速带至实验室,冲洗干净后-80℃保存。

表1 37个锥栗农家品种编号

编号	农家品种名	编号	农家品种名	编号	农家品种名
1	庆元1	18	油榛	32	黄榛
2	乌壳长芒	19	红紫榛	34	黄榛
5	兰溪1	20	乌壳长芒	35	黄榛
6	曹荷栗	21	温洋红	36	兰溪2
9	黄榛	22	温洋红	P9	麦塞子
10	黄榛	23	大尖嘴	P10	毛榛
11	黄榛	24	乌壳长芒	P13	P13
12	乌壳长芒	26	大尖嘴	P16	材榛
13	蔓榛	27	黄榛	P17	牛角榛
14	红紫榛	28	薄壳籽	P20	猪屎榛
15	油榛	29	油榛	P21	庆14
16	乌壳长芒	30	油榛		
17	蔓榛	31	龙村6		

1.2 试剂

DNA提取所用Tris试剂、NaCl、EDTA、PVP、 β -巯基乙醇及电泳所用琼脂糖均由北京鼎国生物技术有限责任公司提供。PCR扩增所用的主要试剂Taq DNA聚合酶($5 \text{ U} \cdot \text{uL}^{-1}$)、 $10 \times$ PCR缓冲液、 MgCl_2 ($25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)、dNTPs(各 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)以及标准分子量DNA(DL2000)等由宝生物工程(大连)有限公司提供;引物由上海生工生物工程技术有限公司合成;其它试剂均为分析纯。

1.3 DNA提取及PCR反应

高质量的基因组DNA样品是分子生物学后续

分析的基本前提。本实验锥栗基因组DNA的提取,采用改良CTAB(Cetyl trimethyl ammonium bromide, 十六烷基三甲基溴化铵)法^[18]。

引物序列来自加拿大哥伦比亚大学通用引物,根据其在同科、同属及其它树种中的应用情况,选择69条应用较多的引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。从37个品种DNA中任选5个模板,用于引物筛选,选择较好的引物用于所有37份材料的扩增。经过一系列的重复和对比试验,采用条带清晰、多态性高的13条引物(表2)对37份农家品种进行分析。ISSR反应在ABI-2720型PCR热循

环仪上进行,25 μL 的反应体系中,模板 DNA 50 ng, Mg^{2+} 1.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, dNTPs 0.2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$, Taq DNA 聚合酶 1.0 U,引物 0.3 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。PCR 反应在 ABI-2720 型热循环 PCR 仪上进行,反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$, 预变性,3 min;94 $^{\circ}\text{C}$, 45 s, T_m 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$, 2 min, 32 个循环;72 $^{\circ}\text{C}$, 5 min。

PCR 扩增产物在 0.5 \times TBE 缓冲液中,1.5% 琼脂糖凝胶上,5 V $\cdot \text{cm}^{-1}$, 电泳 60 ~ 90 min, SYBR Gold 核酸凝胶染料染色,然后通过计算机凝胶成像系统(FR-200A 全自动紫外与可见分析装置)观察和摄影记录。

1.4 数据分析

ISSR 是显性标记,同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,根据各位点电泳谱带的有无统计所有的二元数据:同一位点(分子量相同的条带)扩增条带有带的记为“1”,无带的记为“0”。在收集过程中,只记录易于辨认的、可重复的、长度在 150 ~ 3 000 bp 范围内的 ISSR 扩增条带,排除模糊不清的条带。所得结果为二元数据矩阵。

得到的原始数据矩阵用于以下分析:

(1) 假设种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,用 POPGENE 1.32 软件对 37 份材料进行遗传多样性分析,计算多态位点百分率(PPL),观测等位基因数(A_o)、有效等位基因数(A_e)、Shannon 信息指数(I)、Nei's 基因多样性(即平均期望杂合度 H_e) (Nei, 1973) 和遗传距离(D)。

(2) 根据居群遗传一致度或遗传距离,利用 NT-SYS-pc 2.1 软件进行非加权配对算数平均法(UPGMA, unweighted pair group method using arithmetic average) 聚类。

2 结果与分析

2.1 锥栗品种 DNA 扩增结果

筛选出 13 条 ISSR 引物对供试的 37 份材料进行扩增,各引物序列及多态位点比例见表 2。不同引物扩增的带数有所差异,13 条引物扩增的谱带从 9(引物 828)~16 条(引物 821)不等,平均每条引物可扩增 12 条。在扩增的 156 条带中,共有条带 27 条,多态性条带有 129 条,占 82.69%,平均每个引物产生 9.9 条多态性条带。13 条引物中,引物 836 产生多态性条带 14 条,多态性水平最高,达 93.33%,引物 811 次之;引物 825 和 828 产生多态性条带数最少,均为 7 条,但多态性水平却不是最低的;引物 830、845 和 841 各产生 8 条多态性条带,但引物 841 的多态性却是最低,仅 66.67%,也是 13 条引物中多态位点比例最低的。扩增出的 DNA 片段在 200 ~ 2 500 bp 之间,其中以 200 ~ 1 600 bp 较多,说明这些锥栗品种表现多态性的范围较宽。大部分品种具有相同的主扩增谱带,多态性表现在其它谱带上,在一定程度上说明了各品种间具有同源性,也反映出锥栗遗传背景的复杂。所用 13 条引物均扩增出丰富的多态性条带。试验结果中丰富的多态性与供试材料广泛的种质代表性有关。

表 2 ISSR 分析所用引物序列及扩增结果

引物编号	引物序列	$T_m/^{\circ}\text{C}$	总位点数	多态性位点数	多态位点百分率/%
808	AGAGAGAGAGAGAGAC	57	13	10	76.92
811	GAGAGAGAGAGAGAC	57	14	13	92.86
815	CTCTCTCTCTCTCTG	55	13	12	92.31
818	CACACACACACACAG	55	10	9	90.00
821	GTGTGTGTGTGTGTT	57	16	12	75.00
825	ACACACACACACACT	58	10	7	70.00
828	TGTGTGTGTGTGTGA	56	9	7	77.78
830	TGTGTGTGTGTGTGG	59	11	8	72.73
836	AGAGAGAGAGAGAGYA	57	15	14	93.33
841	GAGAGAGAGAGAGAYC	52	12	8	66.67
845	CTCTCTCTCTCTCTRG	58	10	8	80.00
857	ACACACACACACACYG	52	12	11	91.67
880	GGAGAGGAGAGGAGA	53	11	10	90.91
总计			156	129	82.69

注:Y = (C, T)。

2.2 品种间遗传多样性水平分析

经 POPGENE 1.32 软件分析,观测的锥栗等位基因数为 1.826 9,有效等位基因数为 1.509 7,Nei's 基因多样性 (H_e) 为 0.292 3,Shannon 信息指数为 0.434 4,遗传多样性水平达到 82.69%。说明锥栗农家品种存在丰富的遗传多样性。

37 份材料间的遗传距离在 0.080 0 ~ 0.655 4 之间。P13 与 P16 号、29 与 30 号的遗传距离最小,为 0.080 0;其次为 9 与 11 号、10 与 11 号的遗传距离,为 0.087 0;再次为 9 和 10 号品种、P16 与 P20 号品种,为 0.094 0;14 与 18 号品种遗传距离为 0.108 2,显示它们之间亲缘关系较近,具有较大的遗传相似性系数。1 号品种与其它品种间的遗传距离较大,与 28 号的遗传距离最大,达 0.655 4,与 P13、P16 号的遗传距离为 0.607 2;其次为与 12、23 号的遗传距离,为 0.583 9,与 9、10、16 号品种的遗传距离,为 0.572 5,显示出它们彼此间亲缘关系较

远,存在较大的遗传差异。

2.3 锥栗品种的聚类分析

根据 POPGENE1.32 软件计算出的遗传一致度,采用 NTSYS - pc 2.1 软件进行聚类分析,构建分子系统树状图。从图 1 看出:以 0.68 阈值为界,可将 37 份材料划分为 2 个类群,第一大类群 (I) 仅含 1 号优株,其余 36 个品种聚为类群 II。大类群 II 可进一步分为 6 个亚类。5 号优株独为亚类 i;第 ii 亚类包含 21 号、22 号‘温洋红’,26 号‘大尖嘴’及 34 号‘黄榛’;第 iii 亚类为杂合组,6 号‘曹苟栗’、19 号‘红紫榛’和 P9 号‘麦塞子’;第 iv 亚类为‘油榛’组,除 13 号名为‘蔓榛’,P21 号为一优株外,15、29、30 号为‘油榛’;第 v 亚类为一大杂合组,有 12、14、16、17、18、20、31、36、P10、P13、P16、P17、P20 号共 13 个品种;第 vi 亚类主要为‘乌壳长芒’(2、24 号)‘黄榛’(9、10、11、27、32、35 号)及 23 号‘大尖嘴’、28 号‘薄壳籽’。

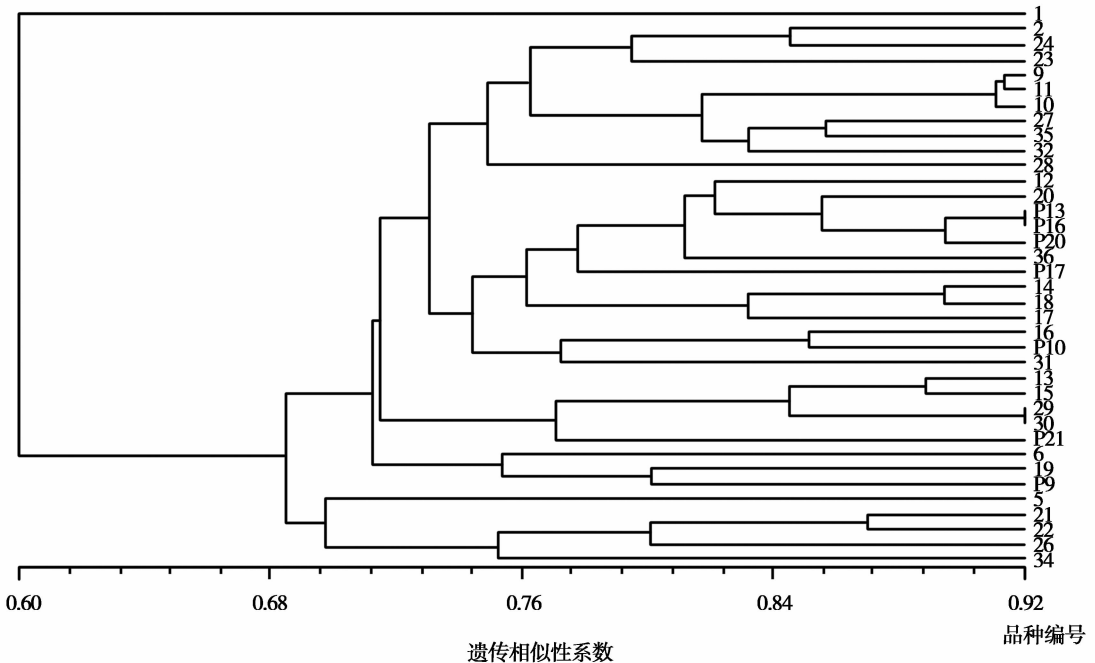
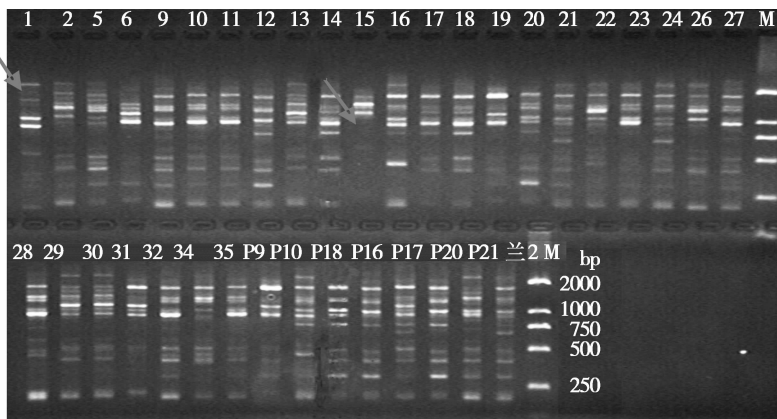


图 1 根据遗传一致度构建的 37 份锥栗品种的亲缘关系树状图

2.4 ISSR 特异性标记

在不同引物的扩增产物中,仅个别品种在某一片段长度有条带出现或条带缺失,这种具有差异性的谱带可作为该种材料的特异标记。如本研究 37 份材料中,1 号品种在 836 ~ 1 500 bp 及 808 ~ 750 bp 处出现缺失条带(图 2 左箭头所示),15 号品种在 836 ~ 1 200 bp 以下片段缺失(图 2 右箭头所示)。

此外,还观察到特异性扩增及无扩增现象,如 21 号品种在 880 ~ 400 bp 处,‘兰溪 2’品种(36 号)在 825 ~ 500 bp 出现特异扩增带,而 18 号和 P16 号品种在引物 808 扩增中无产物等。这些特异性扩增带和特有缺失带可作为重要的分子性状用于锥栗种质的鉴定,在本研究中,所用 13 条引物中任意 2 或 3 条引物组合即可将不同的锥栗种质区分开来。



M:Maker,2 000 bp 标准分子量;1~P21:品种编号

图2 引物836对部分锥栗品种扩增图谱

3 结论与讨论

3.1 锥栗农家品种遗传多样性的影响因素

前人通过对板栗生长及遗传关系分析认为,影响板栗品种遗传多样性水平有2个方面因素:栽培历史及繁殖方式^[8,19]、天然杂种和人工杂交^[20-21],这同样也是影响锥栗品种遗传多样性水平的主要因素。本文所取农家品种主要来自福建省建瓯市及浙江省庆元县等地,这些地区为大果锥栗的主产区,长期采用实生繁殖,单株后代性状变异复杂;锥栗农家品种主要选育方式为实生单株人工选优,大部分属于天然杂种,性状各异;可能还存在栗属植物间的天然杂交,锥栗主产区除锥栗栽培品种外,还生长着野生锥栗、板栗及野生板栗,锥栗在栽培过程中可能与其相互杂交;在锥栗品种选育过程中的人工授粉及选择,这些因素都可导致锥栗农家品种较高的多样性水平。

3.2 锥栗农家品种间的亲缘关系

锥栗品种多为农家品种,由于不完善的管理体制和栽培技术,不同产地同物异名、同名异物现象较为严重,这给锥栗材料的选择和与育种带来极大不便。根据锥栗品种间的遗传相似性系数构建的亲缘关系树状图,本研究将37个锥栗农家品种分为2大类群7个亚类。研究表明,大多数锥栗品种并没有根据名称的异同而聚类,各优株一般单独聚类(如5号‘兰溪1’单株)或与同类中其它单株遗传关系较远(如36号‘兰溪2’单株),统称‘黄榛’的9、10、11、27、34、35号品种并没有完全聚为一类,5个品种聚在了第vi亚类,而34号聚在了第ii亚类,表明34号与其它5份材料可能不属于同一品种。在

亲缘关系上,9、10、11、27、35号关系较近,而与34号较远。15、29、30号3个品种,农家名统称为‘油榛’,在聚类分析中统聚在了亚类iv,表明三者亲缘关系较近,可能为同一品种;与之相反的是P16、P17号和P20号3个品种,农家名分别为‘材榛’、‘牛角榛’、‘猪屎榛’,均聚在了亚类v,说明三者具有相同的遗传组成;在37份材料中,农家品种‘乌壳长芒’聚类结果比较复杂,12、16号及20号虽然聚在了了一类,但彼此间遗传距离较远(16号与20号间的遗传距离达到0.3137),2号和24号则单独聚为一支,并进一步与‘黄榛’组聚为一大类。通过亲缘关系分析,在品种材料的选取上就可根据聚类结果进行选择,而不必全部选择,避免了人力物力资源的浪费。

研究结果显示,利用13条ISSR引物共产生位点156个,其中多态性位点129个,多态位点百分率为82.69%,表明锥栗农家品种间存在丰富的遗传多样性水平,从分子水平揭示了锥栗种质的广泛性和复杂的遗传背景。根据各品种间的遗传关系,从分子水平对37份锥栗农家品种进行聚类分析,将37个品种分为了2大类群7个亚类。在育种中可以根据遗传多样性分析及聚类结果进行亲本选配,选择亲缘关系较远的育种材料,增加后代的遗传变异,以选育出杂种优势更强、综合性状更好、更适合地区气候条件的优良锥栗品种。另外,利用筛选出的13个ISSR引物,可将37份材料中的不同锥栗种质区分开,说明ISSR标记是鉴定和区分锥栗品种的有效手段,也说明了ISSR分子标记技术在锥栗遗传多样性研究及鉴定锥栗品种间亲缘关系方面的可行性。

参考文献:

- [1] 龚榜初,陈增华. 锥栗农家品种资源调查研究[J]. 林业科学研究,1997,10(6):574-580
- [2] Huang H W, Dane F, Norton J D. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotype[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119 (4): 840-849
- [3] Pereira L S, Fernandes L J, Moreno G J. Variability and grouping of northwestern Spanish chestnut cultivars II. isoenzyme traits[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1996, 121(2): 190-197
- [4] 郎 萍,黄宏文. 栗属中国特有种居群的遗传多样性及地域差异[J]. 植物学报,1999,41(6):651-657
- [5] Lang P, Dane F, Kubisiak T L, et al. Molecular evidence for an Asian origin and a unique westward migration of species in the genus *Castanea* via Europe to North America[J]. Mol Phylogenet Evol, 2007, 43(1): 49-59
- [6] 田 华,康 明,李 丽,等. 中国板栗自然居群微卫星遗传多样性[J]. 生物多样性,2009,17(3):296-302
- [7] 暴朝霞,黄宏文. 板栗主产品种的遗传多样性及其亲缘关系分析[J]. 园艺学报,2002,29(1):13-19
- [8] 艾呈祥,余贤美,张力思,等. 山东板栗遗传多样性分析[J]. 果树学报,2006,23(5):681-684
- [9] 黄武刚,程丽莉,周志军,等. 板栗野生居群遗传多样性分析[J]. 果树学报,2010,27(2):227-232
- [10] 雷日平,陈 辉,谢利国. 锥栗不同品种遗传距离的 RAPD 分析[J]. 浙江林学院学报,2002,19(3):240-243
- [11] 沈永宝,施季森,林同龙. RAPD 标记鉴定锥栗栽培品种[J]. 林业科技开发,2004,18(4):24-25
- [12] 张国武,钟文斌,乌云塔娜,等. 油茶优良无性系 ISSR 分子鉴别[J]. 林业科学研究,2007,20(2):278-282
- [13] 李因刚,周志春,范辉华,等. 乳源木莲种源遗传多样性和遗传分化[J]. 林业科学研究,2008,21(4):582-586
- [14] 张 一,储德裕,金国庆,等. 马尾松 1 代育种群体遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 林业科学研究,2009,22(6):772-778
- [15] 倪 穗,李纪元,王 强. 20 个茶花品种遗传关系的 ISSR 分析[J]. 林业科学研究,2009,22(5):623-629
- [16] Casasoli M, Mattioni C, Cherubini M, et al. A genetic linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102(8): 1190-1199
- [17] Ai C X, Zhang L S, Wei H R, et al. Study on the genetic diversity of natural chestnut of Shandong by ISSR [J]. Chin J Biotech, 2007, 23(4): 628-633
- [18] 刘国彬,龚榜初,罗正荣. 锥栗叶样保存时间对 DNA 提取质量的影响[J]. 湖南农业科学,2009(4):8-10
- [19] 柳 鏊,蔡剑华,张宇和. 板栗[M]. 北京:科学出版社,1988
- [20] 明桂冬,张玉英. 板栗优良新品种‘华丰’ [J]. 中国果树,1995(3):1-2
- [21] 马元考,王云尊,许传宝,等. 板栗新品种——沂蒙短枝[J]. 中国果树,1998(1):35-36