

文章编号:1001-1498(2013)06-0730-06

FISH-AFLP 分析新疆核桃品种遗传多样性

何健^{1,2}, 马庆国², 雪来提·牙生¹, 孙东¹, 孙世国³, 裴东^{2*}

(1. 喀什地区林业技术推广站, 新疆喀什 844000; 2. 中国林业科学研究院林业研究所, 林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 北京 100091; 3. 阿克苏地区林业科学研究所, 新疆阿克苏 843000)

摘要:采用 FISH-AFLP 技术, 选取 8 对 *EcoR* I + 3 和 *Mse* I + 3 引物组合, 对新疆维吾尔自治区林木品种审定委员会审(认)定的 24 个核桃品种(无性系)、2 株实生古树及 4 个农家类型在 DNA 水平上进行了多态性检测。结果表明: 在获得的 1 011 条谱带中, 981 条呈多态性, 多态性百分率达 97.5%; 不同引物组合的有效等位基因数为 1.188 7~1.234 7, 平均为 1.208 5; 基因多样性为 0.118 3~0.141 2, 平均为 0.129 7; Shannon 信息指数为 0.184 6~0.225 8, 平均为 0.206 6。总体的遗传多样性水平为中等。经 8 对引物检测的 30 个品种及类型均得到数目不等的特异带型, 能将 30 个核桃良种及类型完全区分, 建立了它们的指纹图谱。

关键词:核桃; 品种; 遗传多样性; FISH-AFLP; 亲缘关系

中图分类号: S792.13

文献标识码: A

Genetic Diversity on Walnut Cultivars in Xinjiang Revealed by FISH-AFLP

HE Jian^{1,2}, MA Qing-guo², Xuelaiti · YASIN², SUN Dong¹, SUN Shi-guo³, PEI Dong²

(1. Kashi Forestry Technology Extension Station, Kashi 844000, Xinjiang, China; 2. Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry; State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation, State Forestry Administration, Beijing 100091, China; 3. Akesu Research Institute of Forestry, Akesu 843000, Xinjiang, China)

Abstract: In order to view the genetic basis of Xinjiang walnut germplasm resources, the genetic diversity of 30 walnut cultivars (*Juglans regia* L.) authorized or approved by Xinjiang Uygur Autonomous Region Forest Tree Cultivar Registration Committee were investigated by using FISH-AFLP. Eight pairs of *EcoR* I + 3/*Mse* I + 3 primer combinations were used to amplify the genomic DNA. 981 out of totally 1011 AFLP bands were polymorphic and the average percent of polymorphic bands (PPB) was 97.5%. The value of effective number of alleles (N_e) estimated by different primer combinations ranged from 1.188 7 to 1.234 7 with an average of 1.208 5; Nei's gene diversity (H) ranged from 0.118 3 to 0.141 2 with an average of 0.129 7 and Shannon's information index (I) ranged from 0.184 6 to 0.225 8 with an average of 0.206 6, which revealed a moderate level of genetic diversity. Unique fingerprints for 30 walnut cultivars were established by 8 primer combinations in the research.

Key words: *Juglans regia* L.; cultivar; genetic diversity; FISH-AFLP; sibship

核桃是新疆维吾尔自治区林果业中栽培面积最大、产值最高的坚果树种, 由于优越的光、热、水、土等自然条件和丰富的核桃种质资源, 新疆核桃生产

具有优质、高产的特点, 是我国重要的优质核桃主产区, 截止 2010 年, 新疆核桃种植面积已达 26.47 万 hm^2 , 年产量 18.12 万 t, 产值 36.24 亿元^[1]。新疆自

收稿日期: 2012-11-08

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划“核桃和长山核桃高效生产关键技术与示范”(2013BAD14B01); 国家自然科学基金项目“核桃埋干复幼促根过程中生长素响应基因的 CpG 岛甲基化重编程研究”(31171933)

作者简介: 何健(1967—), 男, 高级工程师, 主要从事经济林良种选育及栽培技术等方面的研究。E-mail: hj6661156@163.com

* 通讯作者: 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物生物技术的研究。电话: 010-62889624, E-mail: peigu@caf.ac.cn

20世纪50年代开始,在良种选育方面开展了大量的工作,选育出许多优良品种并通过了新疆维吾尔自治区林木品种审定委员会的审(认)定,这些优良品种的大面积推广为核桃产业快速发展发挥了重要作用,但是,与国内外核桃遗传育种先进水平相比,还存在差距。要增强新疆核桃的市场竞争力,必须不断改良品种,开展鲜食、仁用、油用核桃及饮料加工用品种的定向培育,开展抗病、抗寒、耐瘠薄、矮化品种的选育。随着核桃良种嫁接改造的逐步深入和扩大,一些适应性强的地方品种和野生种由于不能满足人们对产量和品质等多方面的需求而逐渐被淘汰,物种有向单一化发展的趋势^[1]。由于对现有核桃品种的遗传背景、亲缘关系缺乏深入系统的研究,致使进一步的育种工作受到很大限制。收集保护新疆核桃的种质资源,进行遗传多样性分析评价,可为资源的保护和利用提供可靠有效的理论依据,还可以分析核桃品种亲缘关系,构建核心种质资源库,建立它们的指纹图谱,为核桃遗传育种及遗传规律的研究奠定基础^[2]。

近年来,关于核桃遗传多样性、分子标记辅助选择育种及品种鉴定研究所用的检测技术主要有同工酶、RAPD、SSR、ISSR、AFLP等,分子标记技术发展迅速,其中,AFLP技术是1993年由荷兰的Zabeau Marc和Vos Pieter发展起来的新一代分子标记技术,无需预先知道DNA的序列,并且处理的样品多,检测信息量大,灵敏度高,实验结果稳定可靠^[3]。国内外关于核桃遗传多样性的研究主要采用同工酶、RAPD、SSR、ISSR等技术^[2,4-10],利用AFLP技术进行核桃遗传多样性研究也有报道^[11-15]。Ma等^[16]利用荧光AFLP技术筛选9对引物组合对中国现有的50个核桃品种的基因组DNA进行分析,发现供试核桃品种的遗传多样性水平为中等,并综合特征带、遗传相似系数和聚类分析结果等方面的分析提出‘辽宁1号’等6个品种为具有重要利用价值的品种;张虎平等^[17]用RAPD技术进行新疆核桃早实特性的分子标记研究;叶春秀等^[18]对与新疆核桃早实性相关的SCAR标记在母本和F1代上进行分析,通过对与核桃早实性相关的SCAR标记片段的扩增并测序,获得与早实性相关的SCAR标记片段,大小为762 bp。李超等^[19]采用ISSR标记对新疆核桃5个居群和1个栽培类型共163份样品进行遗传多样性分析,发现新疆核桃的遗传多样性较高。

AFLP技术已经广泛应用于基因追踪、基因分离、品种鉴定、QTL分析、杂种优势预测、分子标记辅助选择育种和生物多样性等方面^[13]。国内外已就AFLP技术对核桃进行了DNA提取^[20]、实验技术体系建立^[21]、遗传多样性分析^[22]等方面的研究,这为本研究用FISH-AFLP方法对核桃进行遗传多样性分析提供了实验技术基础。本研究采用FISH-AFLP技术,对新疆维吾尔自治区通过审(认)定的核桃品种(无性系)进行遗传多样性分析,以期利用该项分子标记技术开展核桃的种质鉴定研究提供理论依据;同时为种质资源的遗传学研究及应用提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

供试材料为30个核桃品种及类型,其中包括24个新疆维吾尔自治区林木品种审定委员会审(认)定的核桃品种(无性系)、2株实生古树和4个未审定的农家类型。2010年3—4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,立即在实验室提取其基因组DNA。供试材料的基本情况见表1。

1.2 试验方法

DNA提取采用CTAB法,AFLP分析采用北京鼎国昌盛生物技术公司的FISH-AFLP试剂盒及其操作指南进行。

1.2.1 总DNA制备 剪取1年生核桃枝条,用改良的CTAB法^[13]从韧皮部中提取总DNA。

1.2.2 FISH-AFLP分析 酶切连接、预扩增和选择性扩增参照Ma等^[16]的方法进行,其中,选择性扩增采用筛选出的8对电泳谱带清晰、多态性好的E+3/M+3引物组合(表2)。

1.2.3 电泳与数据处理 选扩增产物在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30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NTSYSpc-2.11F软件计算DICE遗传相似系数,并采用非加权算术平均法(UPGMA)进行聚类分析。使用POP-GENE32 version 1.32软件计算多态性比例PPB(percentage of polymorphic bands),并在假定哈迪温伯格平衡的前提下计算其有效等位基因数(N_e)、基因多样性(H)和Shannon信息指数(I)^[16]。

表1 核桃供试材料及其来源

序号	供试样品	亲本来源	采集地点
1	吐古其15号	叶城县吐古其乡实生优株	叶城县萨依瓦克乡
2	萨依瓦克5号	叶城县萨依瓦克乡实生优株	叶城县萨依瓦克乡
3	萨依瓦克9号	叶城县萨依瓦克乡实生优株	叶城县萨依瓦克乡
4	和上01号	和田县拉依喀乡实生优株	和田县拉依喀乡
5	和上15号	和田县拉依喀乡实生优株	和田县拉依喀乡
6	和上20号	和田县拉依喀乡实生优株	和田县拉依喀乡
7	和跃04号	和田县拉依喀乡实生优株	和田县拉依喀乡
8	阿浑02号	阿克苏核桃实生优株	阿克苏地区实验林场核桃品种汇集圃
9	库三02号	阿克苏核桃实生优株	阿克苏地区实验林场核桃品种汇集圃
10	乌火06号	阿克苏核桃实生优株	阿克苏地区实验林场核桃品种汇集圃
11	新温81	扎465的半同胞子一代中选出	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
12	新温179	扎63的半同胞子一代中选出	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
13	新温233	和春3号子一代中选出	阿克苏地区核桃林场核桃品种汇集圃
14	新乌417	乌什县城镇私人院内选出	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
15	新新2	新河县依西里克乡吾宗卡其村的2号优树半同胞播种苗中选出	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
16	新翠丰	温宿县10号优树的半同胞播种苗	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
17	新早丰	新疆温宿土木秀克乡	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
18	新巨丰	和春4号优树半同胞播种苗中选出	阿克苏地区核桃林场核桃品种汇集圃
19	新光	新疆核桃实生选育	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
20	新露	新疆核桃实生选育	阿克苏地区实验林场核桃品种汇集圃
21	新丰	新疆核桃实生选育	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
22	温185	新疆温宿卡卡孜实生后代	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
23	扎343	新疆林科院扎木台试验站实生园	叶城县萨依瓦克乡核桃品种汇集圃
24	卡卡孜	新疆核桃实生选育	阿克苏地区核桃林场核桃品种汇集圃
25	叶城核桃王	叶城县萨依瓦克乡实生古树	叶城县萨依瓦克乡
26	吾斯曼	叶城县萨依瓦克乡实生古树	叶城县萨依瓦克乡
27	萨依瓦克7号	叶城县萨依瓦克乡实生优株	叶城县萨依瓦克乡
28	上游-9号	和田县拉依喀乡实生优株	和田县拉依喀乡
29	和上06号	和田县拉依喀乡实生优株	和田县拉依喀乡
30	大木马	新疆核桃实生选育	阿克苏地区实验林场核桃品种汇集圃

2 结果与分析

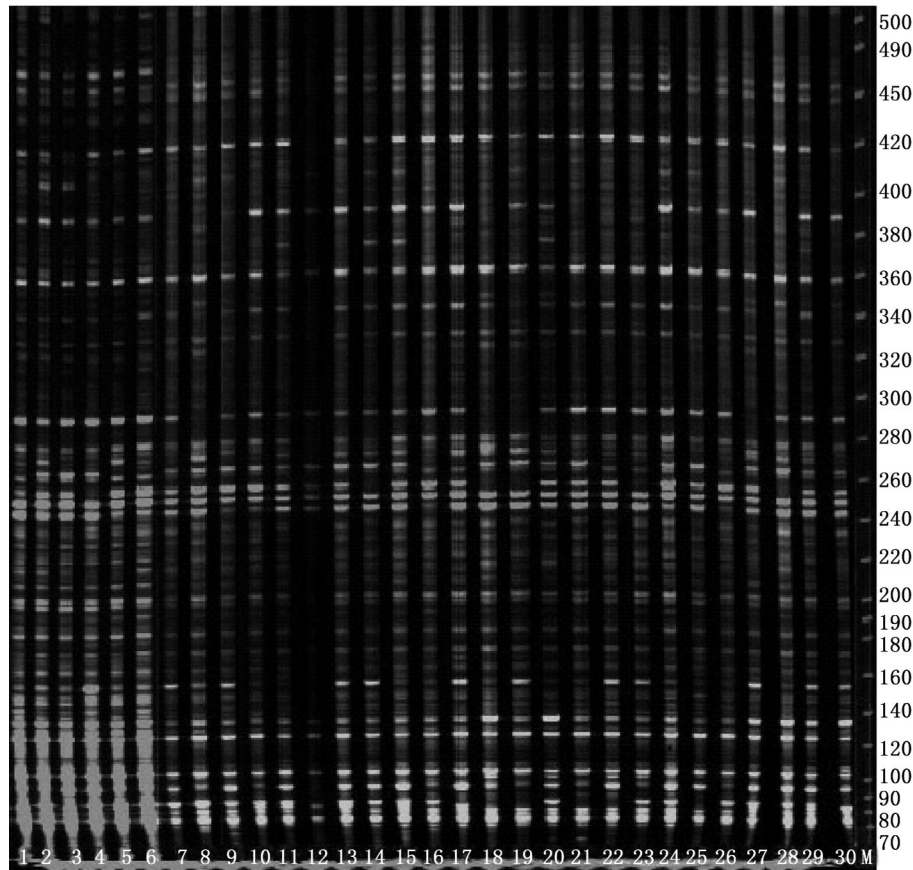
2.1 多态性分析

本研究选用8对E+3/M+3引物组合(表2)进行选择性扩增,共获得1011条带,其中,981条带是多样性条带,平均多态性比例为97.5%,获得了

较好的扩增结果(表2,图1),其中,引物组合E-AAC/M-CTC所检测的150条带以及E-ACT/M-CAA所检测的127条带均为多态性条带,多态性比例为100%。可见,FISH-AFLP检测核桃品种间遗传多样性的效率很高。

表2 FISH-AFLP分析不同引物组合的多态性比较

序号	引物组合	总条带数/条	多态性带/条	PPB/%	N_e	H	I
3-5	E-AAC/ M-CTA	126	119	94.4	1.234 7	0.141 1	0.215 9
3-6	E-AAC/ M-CTC	150	150	100.0	1.207 5	0.132 3	0.216 3
6-1	E-ACT/ M-CAA	127	127	100.0	1.194 4	0.123 4	0.199 4
6-7	E-ACT/ M-CTG	104	101	97.1	1.195 3	0.118 3	0.184 6
6-8	E-ACT/ M-CTT	121	112	92.6	1.193 3	0.122 1	0.194 7
8-2	E-ACG/ M-CAC	125	121	96.8	1.188 7	0.122 0	0.198 5
8-5	E-ACG/ M-CTA	121	115	95.0	1.228 6	0.137 7	0.214 2
8-6	E-ACG/ M-CTC	137	136	99.3	1.225 3	0.141 2	0.225 8
	合计	1011	981	-	-	-	-
	平均	126.4	122.6	97.5	1.208 5	0.129 7	0.206 6



右侧第1泳道为Marker(M, bp);其余30个泳道每个泳道为1个样品(1~30)。
图1 引物组合为E-ACG/ M-CTA扩增出的核桃品种的FISH-AFLP电泳图谱

2.2 遗传距离分析

30份供试核桃样品的遗传相似系数为0.360 3~0.751 0,平均为0.614 1,其中,阿浑02号和大木马之间的遗传相似系数最大,为0.751 0,表明2个品种之间的亲缘关系较近;而新光和新丰之间的遗传相似系数最小,为0.360 3,表明这2个品种之间的亲缘关系较远。

2.3 有效等位基因数、基因多样性及 Shannon 信息指数

有效等位基因数(N_e)、基因多样性(H)及 Shannon 信息指数(I)是衡量遗传多样性水平的3个重要指标^[23]。利用 popgene 软件计算以上参数(表2),结果表明:不同引物组合的有效等位基因数为1.188 7~1.234 7,平均为1.208 5;基因多样性为0.118 3~0.141 2,平均为0.129 7;Shannon 信息指数为0.184 6~0.225 8,平均为0.206 6。这3个参数较 Ma 等^[16]的研究略低($N_e = 1.39, H = 0.44, I = 0.37$),这可能是受样品数量和采样地理范围的影响。

2.4 聚类分析

图2表明:当阈值为0.437 0时,可将30个供试样品分成2个 AFLP 群(AFLP groups,简称AG),其中,AG1仅含有1个核桃品种——新光,为新疆林木种苗总站通过实生选育出的优良无性系;AG2则包括了其他29个核桃品种。

以遗传相似系数0.628 1为阈值,可将AG2分为5个组(分别标记为I~V),其中,IV和V组各包含1个品种,分别为扎343和新温179。由喀什地区叶城县实生选育的品种及优良单株6个,除萨依瓦克5号归入III组外,吐古其15号、萨依瓦克7号、叶城核桃王聚在I组;吾斯曼和萨依瓦克9号归入II组;由和田地区和田县实生选育的6个品种及优良单株,除和上01号归入II组外,其余5个品种和上15号、上游09号、和上06号、和跃04号、和上20号聚在III组。由阿克苏地区种苗站实生选育的4个品种:乌火06号、库三02号、阿浑02号、大木马全部聚在III组。由此可见,新疆核桃除了由阿克苏地区种苗站从分布在阿克苏地区的实生优株中选育的4

个品种亲缘关系较近外,由新疆林科院汇集全疆种质资源实生选育的14个品种,以及由喀什地区和和田地区林业局在本地核桃实生优株中选育的7个品种,在基因组水平上仍表现出可检测到的较大差异,反映出新疆核桃品种遗传基础较为丰富,具有比较丰富的遗传变异。

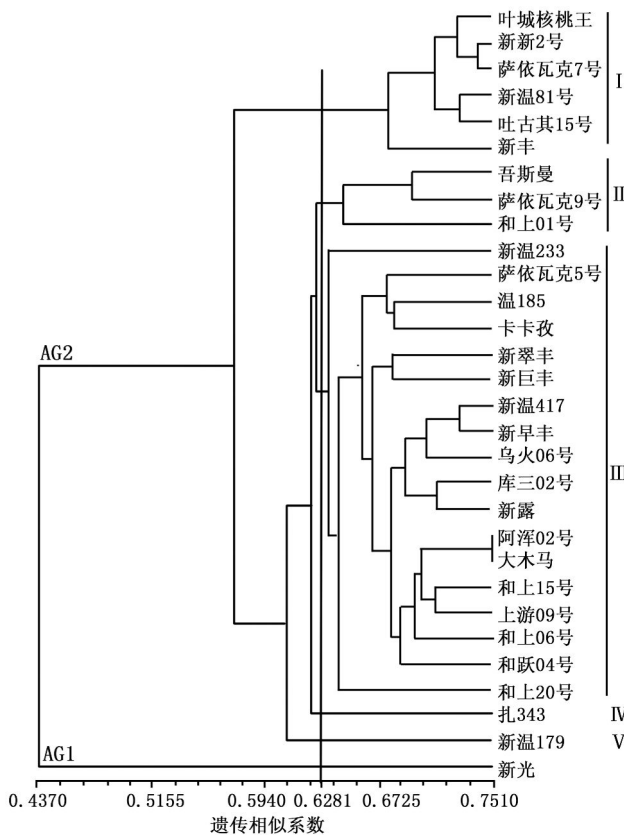


图2 新疆核桃品种 FISH-AFLP 分析聚类树状图

3 结论与讨论

本研究采用 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进行数据分析,具有易于操作、检测信息量大、灵敏度高、快速高效、实验结果稳定可靠等优点。

本研究采用 FISH-AFLP 技术,选用 8 对 E + 3 和 M + 3 引物组合,首次对新疆自治区林木品种审定委员会审(认)定的 24 个核桃品种(无性系),2 株实生古树,4 个未审定的农家品种进行了分子水平上的检测,实验结果共获得 1 011 条带,其中,981 条带是多样性条带,平均多态性比例为 97.5%。供试核桃品种均得到数目不等的特异带型,能够将其完全区分开。8 对引物组合平均获得的总条带数、多态性带数分别为 126.4、122.6 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。新疆核桃品种的遗传相似系数为 0.360 3~0.751 0,平均为 0.614 1,遗传相似系数相对较低,可能是因为供试材料中的品种是由分布在喀什、和田、阿克苏 3 个不同区域的核桃类群实生选育而成,相互之间的亲缘关系相对较远的缘故。从 popgene v1.32 软件计算的有效等位基因数(N_e)、基因多样性(H)及 Shannon 信息指数(I)等 3 个遗传多样性指数可知,在总体水平上,本研究所采用的新疆核桃品种的遗传多样性水平略低于全国尺度上的研究^[16],推测这可能是受样品数量和采样地理范围的影响。本研究中使用的 2 对引物组合 E-AAC/M-CTC、E-ACT/M-CTG 均获得了 100% 的 PPB,在宁德鲁等^[14]对云南核桃的研究中也得到了较好的扩增效果(100% 及 93.89%)。这可能是由于 FISH-AFLP 信息量大、检测灵敏度高导致的,同时也说明在核桃属植物的遗传多样性及亲缘关系分析中,AFLP 引物具有一定的通用性。

参考文献:

- [1] 廖康,殷传杰.新疆特色果树栽培实用技术[M].新疆:新疆科学技术出版社,2011,ISBN 978-7-5466-1131-0
- [2] 裴东,鲁新政.中国核桃种质资源[M].北京:中国林业出版社,2011.
- [3] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. Nucleic Acids Res, 1995, 23: 4407-4414
- [4] 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
- [5] 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
- [6] 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
- [7] Wang H, Pei D, Gu R S, et al. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern China [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2008, 133: 197-203
- [8] 王滑,郝俊民,王宝庆,等.中国核桃 8 个天然居群遗传多样性分析[J].林业科学,2007, 43(7): 120-124
- [9] 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
- [10] 周贝贝,马庆国,王滑,等.核桃亲子鉴定方法的建立[J].中国农业科学,2011, 44(20): 4258-4264
- [11] Bayazit S, Kazan K, Gülbittı S, et al. AFLP analysis of genetic diversity in low chill requiring walnut (*Juglans regia* L.) genotypes from Hatay, Turkey [J]. Scientia Horticulturae, 2007, 111(4): 394-398
- [12] Foroni I, Rao R, Woeste K, et al. Characterisation of *Juglans regia* L. with SSR markers and evaluation of genetic relationships a-

- mong cultivars and the 'Sorrento' landrace [J]. *J Hort Sci & Biotechnol*, 2005, 80(1): 49-53
- [13] 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
- [14] 宁德鲁, 马庆国, 张 雨, 等. 云南省核桃品种遗传多样性的 FISH-AFLP 分析[J]. *林业科学研究*, 2011, 24(2): 189-193
- [15] 王红霞, 赵书岗, 高 仪, 等. 普通核桃遗传多样性的 AFLP 分析[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(7): 1434-1442
- [16] Ma Q G, ZHANG J P, PEI D. Genetic Analysis of Walnut Cultivars in China Using Fluorescent Amplified Fragment Length Polymorphism [J]. *J AMER SOC HORT SCI*, 2011, 136(6): 422-428
- [17] 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
- [18] 叶春秀, 牛建新, 吕建强, 等. 核桃早实性相关的 SCAR 标记在母本和 F1 代上的分析[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(5): 971-975
- [19] 李 超, 罗淑萍, 曾 斌, 等. 新疆核桃种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *中国农业科学*, 2011, 44(9): 1871-1879
- [20] 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
- [21] 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
- [22] 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
- [23] 马庆国, 王 滑, 裴 东, 等. 西藏核桃优良单株的 FISH-AFLP 分析[J]. *北京林业大学学报*, 2011, 33(6): 86-89