

DOI: 10.13718/j.cnki.xdzk.2017.11.003

基于 ISSR 重庆秦巴山区优选核桃的 遗传多样性分析^①

宋 琴¹, 党江波¹, 刘 超¹, 梁国鲁¹

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400715

摘要: 为重庆秦巴山区核桃资源的进一步研究和利用提供参考, 从重庆秦巴山区选出优良的核桃种质, 并对其遗传多样性进行分析. 对重庆秦巴山区城口、巫山、巫溪 3 县实生大龄核桃种质进行初步优选, 利用 ISSR 技术对初步优选得到的种质进行遗传多样性分析. 共选出 114 份较为优良的单株, 从 82 条引物中筛选出 12 条条带清晰、重复性好的引物对 114 份供试材料的基因组 DNA 进行扩增. 共扩增出位点 61 个, 平均每条引物 5.08 个位点, 其中多态性位点 58 个, 多态率达 95.08%, 平均每条引物 4.83 个多态性位点. 平均有效等位基因数(N_e)为 1.657 8, Nei's 基因多样性指数(H)为 0.373 2, Shannon 信息指数(I)为 0.547 1. 通过聚类分析, 种质之间遗传相似性系数为 0.680~0.936, 在 0.750 处, 材料可分为 13 组. 来自 3 县的 3 个核桃群体间遗传距离在 0.032 7~0.046 2 之间, 遗传一致度在 0.954 9~0.967 之间, 基因流(N_m)为 11.197 5. 供试材料具有较丰富的遗传多样性, 而 3 个群体间并未产生明显的分化. 该结果可为重庆秦巴山区核桃资源的进一步研究和利用提供参考.

关键词: ISSR; 重庆秦巴山区; 大龄核桃; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2017)11-0016-07

核桃(*Juglans regia* L.), 又名胡桃, 羌桃, 隶属于胡桃科(Juglandaceae)胡桃属(*Juglans*), 为多年生木本植物. 核桃是主要的木本油料树种之一, 核桃的叶、花序、果仁、木材以及核桃林本身都具有较高的经济价值, 居四大干果之首^[1]. 核桃除含脂肪、蛋白质碳水化合物外, 还含钙、磷、铁、硫胺素、核黄素和尼克酸等多种成分, 具有很高的营养、药用和经济价值. 中国是世界核桃的重要起源地和主产区之一^[2], 核桃资源非常丰富, 包括野生资源、栽培品种资源以及众多地方栽培资源^[3]. 资源是开发新品种的前提, 资源分析则是资源研究的基础. 资源分析的方法包括形态学、细胞学和分子生物学等, 其中分子标记技术的应用越来越多, 结果也作为育种的重要参考. 对于核桃群体的遗传变异分析已有多年研究, 包括形态学指标^[4]、同工酶^[5]、AFLP^[6]、RAPD^[7]、RFLPs^[8]、SSR^[9-10]和 ISSR^[11-12]等, 这些研究覆盖了核桃品种鉴定、亲本鉴定、遗传关系多样性及演化关系等方面.

ISSR(SSR-anchored PCR)是一种新型的分子标记, 是由 ZIETKEIWITCZ 等^[13]在 1994 年发展起来的一种微卫星基础上的分子标记. 该技术主要应用于植物资源的分析研究, 具有快速、高效、操作简单、扩增产物特异性强、稳定性高和成本低等特点, 已广泛应用于梨^[14]、樱桃^[15]、茶树^[16-17]、珙桐^[18]、苹果^[19-20]和桑葚^[21]等树种. 核桃种质资源描述在核桃的研究及生产中必不可缺, 故而采用一个可靠而高效的分子标

① 收稿日期: 2017-03-06

基金项目: 重庆市科委社会民生重点研发专项资助(cstc2017shms-zdyf0102); 重庆市城口县科委项目(城口核桃遗传资源保护利用研究); 重庆市林业局种苗站项目(104190-41032615).

作者简介: 宋 琴(1992-), 女, 四川绵阳人, 博士研究生, 主要从事植物学研究.

记技术应用与资源描述十分重要. 从 POTTER 等对 48 个核桃品种的 ISSR 分子标记研究中可见, ISSR 技术能很好地区别不同核桃品种, 并提供种质资源的起源的证据^[12]. 李国田等^[22]利用 ISSR 技术对新疆核桃元丰、云新核桃、泰山野核桃和陕西核桃 4 个核桃实生居群共 61 份种质进行了遗传多样性分析, 并探讨了居群间不同种质的遗传变异情况.

重庆秦巴山区由于其特殊的地理环境, 植物资源十分丰富, 也是核桃的适宜生长区, 区域内分布着大量野生核桃群落. 该地区栽培核桃的历史悠久, 分布也很广泛, 如位于大巴山核心区的城口县 2011 年被国家林业局命名为“中国核桃之乡”, 毗邻的巫溪县、巫山县核桃资源也比较丰富, 大龄核桃树随处可见, 部分资源在产量、抗病性、口感和品质上有较为突出的表现. 为了更好地为后续优良品种的选育提供参考, 本试验以初步优选的大龄栽培核桃为研究试材, 通过 ISSR 技术分析所搜集的总体核桃资源的遗传多样性, 并探讨不同区域核桃实生群体间的关系, 了解和掌握大龄栽培核桃的遗传特征, 并对后续在育种中的材料利用提供参考依据.

1 材料和方法

1.1 试验材料

基于调查数据, 采集重庆市秦巴山区(包括重庆市城口县、巫山县、巫溪县)经初步优选的 114 株核桃树当年生嫩叶片 10 片以上, 置于装有硅胶干燥剂的自封袋中短暂保存于冰盒中, 运回实验室后将样品放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 超低温冰箱中保存备用. 其中用于引物筛选的 6 份核桃材料分别为 ck10, ck26, ck55, ck65, ck66.

1.2 试验方法

1.2.1 大龄核桃的优选

2014—2015 年, 于重庆市秦巴山区城口、巫山、巫溪 3 县核桃集中分布区域, 根据产量、品质、果形、成熟期、抗逆性等性状筛选其中一个或数个性状表现较优的 30 年以上树龄的实生核桃植株.

1.2.2 DNA 提取与纯化

参照 ROCHE 等^[23]改良的 CTAB 法提取并纯化供试的 114 份核桃基因组 DNA. 采用 1% 的琼脂糖凝胶对所提 DNA 质量进行检测, 并用 Thermo NanoDrop 2000 将所有样品的 DNA 质量浓度稀释至约 $50\text{ ng}/\mu\text{L}$.

1.2.3 ISSR-PCR 反应体系优化及引物筛选

ISSR 引物参照加拿大哥伦比亚大学(UBC)公布的序列(<http://zhidao.baidu.com/question/141178305.html>), 由上海生工生物工程技术有限公司合成. PCR 反应在 Eppendorf Mastercycler 上进行, 通过比较和优化, 得到最终优化后的体系, 具体为: 模板 DNA $1\text{ }\mu\text{L}$ ($50\text{ ng}/\mu\text{L}$), Taq 酶 1.0 U, 引物 $0.223\text{ }\mu\text{mol}/\text{L}$, $10\times\text{buffer}$ $2\text{ }\mu\text{L}$, MgCl_2 $1.50\text{ nmol}/\text{L}$, dNTP $0.25\text{ mmol}/\text{L}$, 用 H_2O 补至 $20\text{ }\mu\text{L}$. 反应程序为: $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 1 min, $50\sim 55\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s(不同引物退火温度不同), $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 35 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存. 扩增产物用含 $0.5\text{ }\mu\text{g}/\text{mL}$ EB 的 1% 琼脂糖(Invitrogen)凝胶于 120 V 电压下电泳分离 70 min. 电泳后在凝胶成像系统上采集图像, 记录扩增谱带, 保存.

1.2.4 数据统计与分析

电泳结果采取 0/1 赋值记带, 强反应带记“1”, 弱反应带重复出现记“1”, 弱反应带出现但不重复记“0”, 无带记“0”. 用 NTsys 2.10e 软件对材料的遗传相似系数(GS)进行分析, 并根据相似系数采用 UPGMA 进行聚类分析, 用 POPGENE32 软件对供试材料的遗传多样性指数进行分析.

2 结果与分析

2.1 核桃初步优选结果

初步选优结果中城口县共选出 74 个优良材料, 主要集中在厚坪乡、明中乡、高观镇和治平乡等部分乡

镇, 主要表现为油脂含量高、高产、稳产、抗病以及果大优良性状; 巫溪县共选出 25 个优良材料, 集中在双阳乡、乌龙乡以及兰英乡等乡镇, 主要优良性状有油脂含量高、高产以及稳产; 巫山县共选出 15 个优良材料, 大多选自竹贤乡、曲尺乡及大庙乡, 主要优良性状有油脂含量高、高产以及果大。

2.2 ISSR 引物筛选

选用 6 个材料的 DNA 为模板, 从 82 条 ISSR 引物中筛选出多态性好, 扩增条带清晰的引物用于后续实验. 部分引物筛选扩增图谱见图 1.

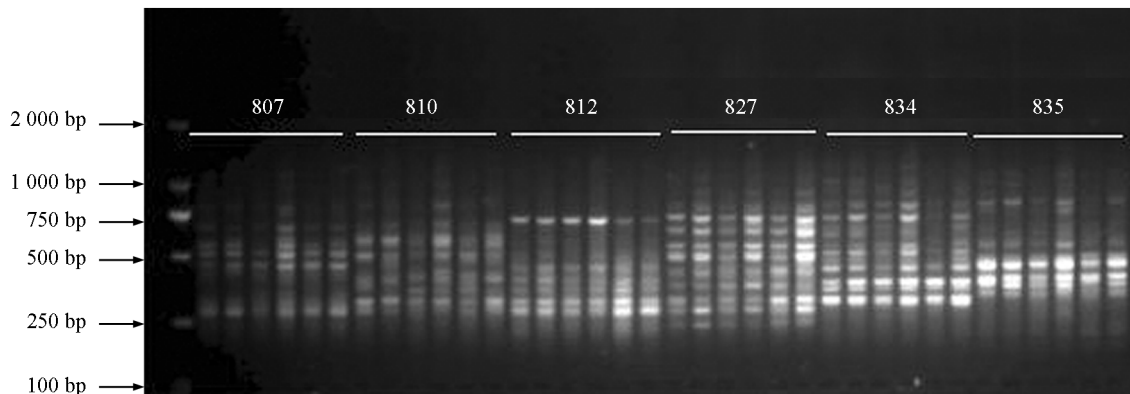


图 1 引物筛选的 PCR 产物电泳图谱

2.3 供试材料遗传多样性分析

利用筛选出的 12 条 ISSR 引物(引物编号分别为 807, 810, 812, 827, 834, 835, 840, 841, 842, 844, 855, 856)对 114 份供试材料进行基因组检测, 12 条引物共检测出 61 个位点, 平均每条引物 5.08 个位点, 其中多态性位点 58 个, 平均每条引物扩增出 4.83 个多态性位点, 多态性比率约 95.08%, 所扩条带分子量分布在 2kb~500bp 之间(图 2).

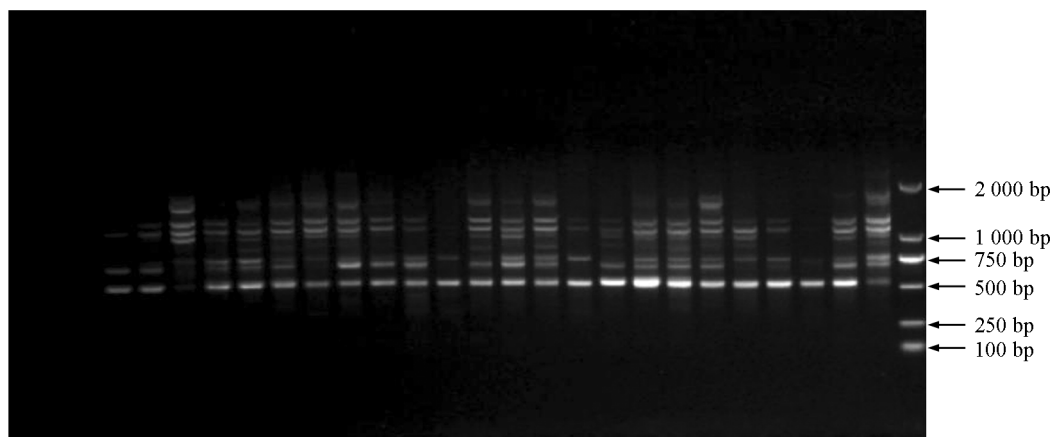


图 2 引物 844 对部分城口县(24 份)材料的扩增结果

利用 Popgene. 32 软件对重庆秦巴山区 114 份核桃属种质的遗传多样性进行了分析, 其平均有效等位基因数(N_e)为 1.657 8, Nei'S 基因多样性指数(H)为 0.373 2, Shannon 信息指数(I)为 0.547 1.

2.4 供试材料遗传相似系数及聚类分析

利用 NTSYS 2.1 软件对 114 份供试材料的 ISSR 数据的结果进行聚类分析(图 3). 结果显示, 供试材料的遗传相似系数的变异范围为 0.680~0.936. 在遗传相似性系数为 0.680 处, 供试材料共分为两组, 第一组材料为 ck27 和 ws9, 其余材料归为一组. 在遗传相似性系数为 0.75 处, 供试材料分为了 13 组.

可见, 供试的 114 份秦巴山区核桃种质遗传多样性丰富, 不同种质之间的遗传信息有一定的差异.

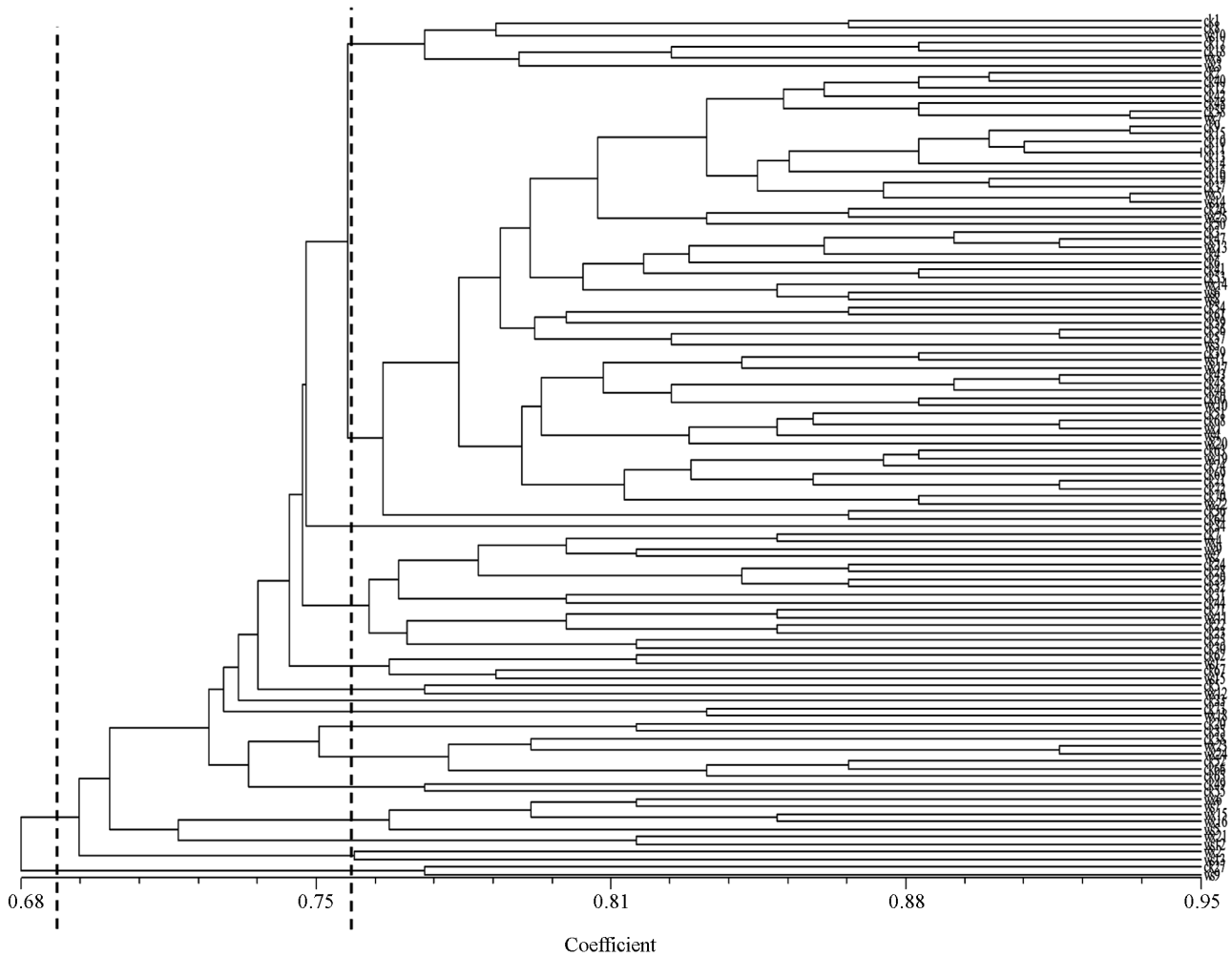


图 3 重庆秦巴山区 114 份核桃属种质的聚类分析图

2.5 不同群体内部及不同群体间的多样性分析

根据采样地点,供试材料可分为城口群体、巫溪群体和巫山群体 3 个群体。采用 Popgene.32 软件对 3 个群分别进行分析,3 个群体的有效等位基因数(N_e)、Shannon 信息指数(I)和遗传多样性指数(H)、多态性位点数(N_{PL}),多态性位点比率(P_{PL})分别见表 1。其中巫溪群体的 N_e (1.625 7), I (0.505 6), H (0.347 2), N_{PL} (52), P_{PL} (85.25%)值最低,故巫溪群体间的遗传多样性最低。3 个群体间遗传距离在 0.032 7~0.046 2 之间,遗传一致度在 0.954 9~0.96 7 之间。表明群体间相似度高,遗传分化程度小。

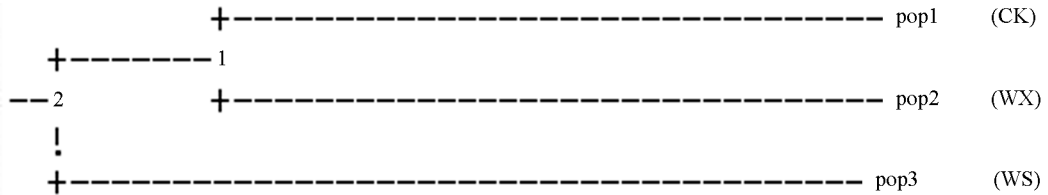
UPGMA 聚类分析结果显示 3 个群体被聚为两大类,城口群体与巫溪群体亲缘关系更近,两个群体的遗传距离为 0.032 7,遗传一致度高达 0.967 8(表 2、图 4)。3 个群体间基因流(N_m)为 11.197 5,表明不同群体间,基因交流度较高。

表 1 不同核桃群体遗传多样性分析

群体	样本数量	有效等位 基因数 N_e	Shannon 信息 指数 I	Nei's 基因多 样性指数 H	多态性位 点数 N_{PL}	多态性位点 比率 $P_{PL}/\%$
城口群体	74	1.644 9	0.537 5	0.367 1	56	91.80
巫溪群体	25	1.615 7	0.505 6	0.347 2	52	85.25
巫山群体	15	1.647 2	0.509 0	0.354 4	50	81.97

表 2 Nei'S 遗传距离(下三角)和遗传一致度(上三角)

群体	城口群体	巫溪群体	巫山群体
城口群体	* * * *	0.967 8	0.954 9
巫溪群体	0.032 7	* * * *	0.966 2
巫山群体	0.046 2	0.034 3	* * * *



CK 为城口群体, WX 为巫溪群体, WS 为巫山群体.

图 4 3 个秦巴山区实生核桃群体的聚类图

3 讨 论

我国拥有丰富的核桃育种资源,更好地对这些资源进行鉴定将为核桃育种工作奠定基础.遗传多样性是指种内个体之间或一个群体内不同个体的遗传变异总和,显示了一个物种在特定环境中基因的丰富程度,是植物研究中的重要部分.分子标记方法在多样性研究中的应用较多,ISSR 分子标记是一种常用的分子标记,在核桃种质资源的分析中也有报道^[22, 24],且与其他标记的研究结果有较高的一致性^[1].ISSR 引物在不同物种间通用,且多态性较 AFLP,SSR 等标记丰富,对遗传背景较为相似的材料更为适合^[24].秦巴山区大龄核桃多为栽培类型,其遗传背景可能较为单一.因此,采用 ISSR 分子标记进行分析是较为合适的,我们的研究结果也证实了这一点.

本研究首次对秦巴山区特殊的生态条件及原始农业管理下的实生核桃种质进行分析.利用 ISSR 分子标记对 3 个不同群体的 114 份重庆秦巴山区大龄栽培核桃进行了分析.结果发现,114 份供试材料的遗传相似性系数在 0.680~0.936 之间.陈良华等^[25]对四川干热河谷核桃资源的遗传多样性分析中发现,其遗传相似性系数在 0.776 5~0.960 3 之间.王红霞等^[26]采用 AFLP 分子标记对普通核桃的遗传多样性进行了分析,结果显示,普通核桃的遗传相似性系数在 0.637~0.928 之间.CHRISTOPOULAS 等^[11]对 56 个世界核桃品种的遗传多样性分析得到,这些品种遗传相似性系数在 0.13~0.93 之间.可见,重庆秦巴山区农家大龄栽培核桃与其他地区的栽培核桃具有较为相似的遗传多样性,其多样性较为丰富.而不同区域间的相似度较高,这说明不同区域间的基因交流较为频繁,这可能是当地人群自发引种所致.

优良单株的筛选,对后续优良株系的培育有所帮助,其中部分优质、高产单株,如:ck1,ck15,wx1 等,可直接用于培育新株系;部分单株,如:CK67,WS11 可用作亲本进行品种改良.

由于本研究材料均为初选的在某一方面或多个方面具有优势的大龄核桃单株,这对于了解该区域核桃的起源、分布和资源流向有一定的参考,此外对优质单株遗传指纹图谱的建立有重要的意义,也将对优质单株以及优良品种的进一步选育有所帮助.

4 结 论

从现有结果来看,重庆秦巴山区的大龄核桃具有较为丰富的遗传多样性,3 个种群之间未产生明显的分化.由于本文所采集材料均为经初选的较优株系,因此,秦巴山区栽培核桃的多样性可能更高.本文利用 ISSR 技术得到 114 份核桃资源的指纹图谱,能直接从 DNA 水平对种质进行鉴定与甄别.本研究可为重庆秦巴山区核桃资源的进一步研究和利用提供参考.

参考文献:

- [1] 肖志娟. 不同核桃遗传多样性的 ISSR 和 SSR 分子标记 [D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2013.
- [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] 路安民. 论胡桃科植物的地理分布 [J]. 中国科学院大学学报, 1982, 20(3): 257—274.
- [4] MALVOLI M E, FINESCHI S, PIGLIUCCI M. Morphological Integration and Genetic Variability in *Juglans regia* L. [J]. Journal of Heredity, 1994, 85(5): 389—394.
- [5] SOLAR A, SMOLE J, ŠTAMPAR F, et al. Characterization of Isozyme Variation in Walnut (*Juglans regia* L.) [J]. Euphytica, 1994, 77(1/2): 105—112.
- [6] BAYAZIT S, KAZAN K, GÜLBİTTİ 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.
- [7] AJMED N, MIR J I, MIR R R, et al. SSR and RAPD Analysis of Genetic Diversity in Walnut (*Juglans regia* L.) Genotypes from Jammu and Kashmir, India [J]. Physiology and Molecular Biology of Plants, 2012, 18(2): 149—160.
- [8] FJELLSTROM R G, PARFITT D E, MCGRANAHAN G H. Genetic Relationships and Characterization of Persian Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars Using Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs) [J]. American Society for Horticultural Science, 1994, 119(4): 833—839.
- [9] DANGL G S, WOESTE K, ARADHYA M K, et al. Characterization of 14 Microsatellite Markers for Genetic Analysis and Cultivar Identification of Walnut [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2005, 130(3): 348—354.
- [10] FORONI I, WOESTE K, MONTI L M, et al. Identification of ‘Sorrento’ Walnut Using Simple Sequence Repeats (SSRs) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54(5): 1081—1094.
- [11] CHRISTOPOULOS M V, ROUKAS D, TSANTILI E, et al. Germplasm Diversity and Genetic Relationships Among Walnut (*Juglans regia* L.) Cultivars and Greek Local Selections Revealed by Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Markers [J]. Scientia Horticulturae, 2010, 125(4): 584—592.
- [12] POTTER D, GAO F, AIELLO G, et al. Intersimple Sequence Repeat Markers for Fingerprinting and Determining Genetic Relationships of Walnut (*Juglans regia*) Cultivars [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2002, 127(1): 75—81.
- [13] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome Fingerprinting by Simple Sequence Repeat (SSR)-Anchored Polymerase Chain Reaction Amplification [J]. Genomics, 1994, 20(2): 176—183.
- [14] 宋燕春. 梨资源 ISSR 分析与花芽休眠解除研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2013.
- [15] 艾呈祥, 张力思, 李国田, 等. ISSR 标记对 34 份樱桃种质资源的遗传分析 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(4): 47—51.
- [16] 姚明哲, 陈 亮, 王新超, 等. 我国茶树无性系品种遗传多样性和亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 作物学报, 2007, 33(4): 598—604.
- [17] MONDAL T K. Assessment of Genetic Diversity of Tea (*Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze) by Inter-Simple Sequence Repeat Polymerase Chain Reaction [J]. Euphytica; Netherlands Journal of Plant Breeding, 2002, 128(3): 307—315.
- [18] 张玉梅, 徐刚标, 申响保, 等. 珙桐天然种群遗传多样性的 ISSR 标记分析 [J]. 林业科学, 2012, 48(8): 62—67.
- [19] 何 平, 王玉霞, 李林光, 等. 二倍体与四倍体苹果的三倍性杂交后代 ISSR 遗传分析 [J]. 山东农业科学, 2015, 47(9): 11—13.
- [20] SMOLIK M, KRZYSZTOSZEK O. Evaluation of Genetic Variability in Chosen Apple (*Malus × domestica* Borkh.) Cultivars by ISSR-PCR Analysis [J]. Genetika, 2010, 46(7): 923—931.
- [21] PRASANTA K K, PREM P S, ARVIND K A, et al. Genetic Variability and Association of ISSR Markers with Some Biochemical Traits in Mulberry (*Morus* spp.) Genetic Resources Available in India [J]. Tree Genetics & Genomes, 2008, 4(1): 75—83.
- [22] 李国田, 艾呈祥, 张力思, 等. 核桃实生居群遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(4): 640—645.
- [23] ROCHE P, ALSTON F H, MALIEPAARD C, et al. RFLP and RAPD Markers Linked to the Rosy Leaf Curling Aphid

Resistance Gene (Sd1) in Apple [J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 1997, 94(3/4): 528–533.

[24] 王建波. ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用 [J]. *遗传*, 2002, 24(5): 613–616.

[25] 陈良华, 胡庭兴, 张 帆. 四川干旱干热河谷核桃资源遗传多样性分析 [J]. *果树学报*, 2009, 26(1): 48–54.

[26] 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.

An ISSR-Based Analysis of the Genetic Diversity of Walnut (*Juglans regia*) Germplasms Primarily Selected from the Qinling-Daba-Mountain Region in Chongqing

SONG Qin, DANG Jiang-bo, LIU Chao, LIANG Guo-lu

School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: In order to provide references for the research and utilization of walnut (*Juglans regia*) resources in the Qinling-Daba Mountain region of Chongqing, 114 good walnut germplasms were screened out from Chengkou, Wushan and Wuxi counties of the municipality, and their genetic diversity was analyzed with the ISSR technology. Twelve primers with clear bands and excellent reproducibility were screened out from 82 ISSR primers to amplify the genome DNA of the 114 germplasms. A total of 61 loci were detected, averaging 5.08 loci per primer, and 58 loci showed polymorphism, with a polymorphic rate of 95.08%. Each primer had 4.83 polymorphic loci on the average. The number of effective alleles (N_e) was 1.657 8, Nei's gene diversity (H) was 0.373 2 and Shannon's information index (I) was 0.547 1. The genetic identity among the germplasms was between 0.680~0.936, and the materials were clustered into 13 groups at the point where the genetic identity was 0.750. The genetic distance of the 3 populations from the 3 counties was between 0.032 7~0.046 2, their genetic identity was between 0.954 9~0.967, and the gene flow(Nm)was 11.197 5. In conclusion, the materials in the experiment have relatively rich genetic diversity, but the 3 populations show no obvious differentiation yet.

Key words: ISSR; Qinling-Daba-Mountain region in Chongqing; older walnut; genetic diversity; clustering analysis

责任编辑 潘春燕

