

神农架自然保护区核桃居群遗传多样性研究

付光晟¹, 谭学春², 王滑^{1*}

(1.华中农业大学 a.园艺林学学院, b.园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430070; 2.湖北巴东县林业局, 湖北 恩施 444300)

摘 要: 为有效挖掘湖北神农架核桃 (*Juglans regia*) 的种质资源, 采用 12 对多态性高的 SSR 分子标记引物对 3 个神农架核桃居群 90 个单株的遗传多样性及其种群内、种群间的遗传分化进行研究。结果表明: 用 12 对针对核桃属植物基因组设计的 SSR 引物共检测到 108 条谱带, 其中多态带占比为 100%。遗传多样性分析结果显示: 居群总期望杂合度为 0.604, 其遗传多样性水平较高, 很可能蕴含了稀有基因资源。遗传分化系数(F_{st})显示: 有 8.22% 的变异存在于 3 个居群间, 遗传分化程度中等。这可能与 3 个居群的地理距离远有关。部分位点显示出居群总体有杂合不足的现象。聚类分析结果显示: 居群之间的遗传距离与地理距离具有较高的一致性。

关 键 词: 核桃; 神农架自然保护区; 遗传多样性; 种质资源

中图分类号: S664.1

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2017)03-0262-04

Genetic diversity analysis on genetic diversity of *Juglans regia* population in Shennongjia Nature Reserve

FU Guangsheng¹, TAN Xuechun², WANG Hua^{1*}

(1.a.College of Horticulture and Forestry Sciences; b.Key Laboratory of Horticultural Plant Biology, Ministry of Education, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2.Badong County Forestry Bureau, Enshi, Hubei 444300, China)

Abstract: To exploit the walnut (*Juglans regia*) germplasm in Shennongjia Nature Reserve, the genetic diversity and genetic structure of walnut populations were studied based on 12 SSR markers. 108 alleles from 90 walnut trees of three walnut populations were amplified, and the proportion of polymorphism was 100%. The fact that level of total expectation heterozygosity (H_e) was 0.604, showed a moderate genetic diversity, and suggested a high probability of rare germplasm in the populations. Analysis from molecular variance revealed a significant genetic variation ($F_{st}=0.082$) among populations of walnut, which indicated a moderate differentiation of populations, this might cause by geographic isolation on the three populations, and some locus also suggested a heterozygous deficiency among all the samples. The cluster results showed that the genetic distances among the three populations were consistent with their geographic distance.

Keywords: walnut (*Juglans regia*); Shennongjia Nature Reserve; genetic diversity; germplasm

核桃(*Juglans regia*)在湖北地区有着广泛的分布和栽植, 是鄂西南众多地区老百姓的主要经济来源^[1-2]。物种品种选育和资源保护都依赖于遗传资源的多样性。湖北核桃具有丰富的遗传资源。近年来, 由于产业升级和品种化栽培力度增强, 一些多

样性变异丰富的实生农家类型核桃资源和野生核桃种质资源被破坏, 湖北核桃资源的遗传背景有单一化趋势。如果这种状况不得以改善, 那么核桃育种工作可能会面临无遗传材料可用的问题^[3-5]。

湖北神农架自然保护区位于湖北省西部边陲,

收稿日期: 2016-09-01

修回日期: 2016-09-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(31400558)

作者简介: 付光晟(1994—), 男, 湖北武汉人, 硕士研究生, 主要从事种质资源收集与评价研究, 331940561@qq.com; *通信作者, 王滑, 博士, 主要从事核桃种质资源收集与评价研究, near1981@mail.hzau.edu.cn

是针对亚热带珍稀动植物和森林生态系统设立的国家级自然保护区。区域内生物资源丰富,据此推测,该区域可能是第四纪冰川期的生物避难所^[6-7]。该区域内山谷纵横交错,地形特征复杂,不适宜采用集约化栽培模式,也没有大规模砍伐及改接本地实生大树,因此,大量实生繁殖的农家类型核桃资源得以保存。如果这些资源的遗传多样性丰富^[2],那么这些资源可用作核桃育种的重要材料。

SSR 分子标记技术能够较好地满足植物种质资源遗传分析的需求^[8]。SSR 标记已经被广泛应用于对核桃居群进行遗传多样性检测、杂交子代鉴定和品种亲缘关系分析^[9-13]。笔者用 12 对多态性高的 SSR 引物分析神农架自然保护区内 3 个核桃自然居群的遗传结构及遗传多样性,旨在为本地核桃种质资源利用及保护提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料的采集与处理

经资源调查后,选取神农架核桃主要分布区官门山、老君山和青天袍为核桃居群研究对象(表 1)。采取随机取样方式,每个居群采集 30 个样品。采样单株间隔 50 m 以上。刮去一年生休眠枝条的表皮,取韧皮组织提取 DNA,于 -20℃ 条件下保存。

表 1 神农架核桃 3 个居群的地理位置

Table 1 Geographical location of three groups of *Juglans regia* in Shennongjia

居群	经纬度	生境	海拔高度/m
官门山	110°23'37.2"E 31°26'39.8"N	高山, 峡谷	1 559
老君山	110°27'39.6"E 31°32'8.6"N	高山, 峡谷	2 649
青天袍	110°22'26.8"E 31°29'29.3"N	高山, 峡谷	1 543

1.2 总 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取总 DNA^[14]。参照树木韧皮部 DNA 提取方法^[15],用 Smart SpecTM3000 核酸蛋白测定仪所提取 DNA 溶液的浓度。将扩增反应母液稀释至 10 ng/μL。

1.3 引物的筛选及 PCR 反应

用 GeneAmp 9700 Thermal cyclers PCR 仪进行扩增反应。在文献^[16]扩增条件的基础上进行调整,

确保最终扩增效果稳定。调整后得到以下反应体系:总反应体积 15 μL,其中,DNA 模板 30 ng,引物 0.6 μmol/L,1.5 mmol/L MgCl₂,Taq 酶(TaKaRa) 0.9 U,0.2 mmol/L dNTP(Promega USA)各。反应程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,按表 2 退火温度(不同引物的具体退火温度见表 2)退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,共 30 个循环;保持 72℃ 延伸 5 min。SSR 引物筛选反应重复 2 次。选取扩增稳定且条带清晰的 12 对 SSR 引物^[16-18](WGA-1,WGA-4,WGA-42,WGA-70,WGA-71,WGA-72,WGA-76,WGA-89,WGA-225,WGA-276,WGA-321,WGA-376)用于本研究。

1.4 微卫星荧光标记序列分析

通过微卫星荧光标记全自动基因分析仪(3700 DNA Analyzer),用 FAM、NED 及 VIC 3 种颜色的染料对微卫星引物进行标记。将不同颜色的荧光标记、长度差异大的 PCR 扩增产物和内标放在同一泳道中进行毛细管电泳。用 ABI377 对产物进行检测。用 Genotyper 3.7 软件进行图像收集和分析。计算等位基因数、有效等位基因数等指标^[19]。

1.5 数据分析

用 POPGENE Version 1.32 软件^[20]计算以下参数:有效等位基因数(N_e)、多态位点百分率(P)、期望杂合度(H_e)、观察杂合度(H_o)、Nei 遗传距离(D)。采用 UPGMA 进行聚类分析^[21]。单个居群及样本总体在每个位点上的 F 统计量,每个位点上偏离哈迪-温伯格平衡的显著性用 G -Text 进行检验^[22]。居群每代迁移数(N_m)用公式 $N_m=0.25(1-F_{st})/F_{st}$ 进行计算。UPGMA 聚类图用 NTSYSpc2.10 进行构建^[23]。

2 结果与分析

2.1 居群扩增位点的遗传特性

一共有 108 个等位基因被扩增,每个位点观察到的平均等位基因数为 9,平均有效等位基因数为 3.55,多态位点占比达 100.0%。引物 WGA-42 检测到的等位基因数最多,为 15,引物 WGA-225 检测到的最少,为 4(图 1)。各位点期望杂合度为 0.202~0.892,平均为 0.604。3 个居群间的遗传多样性水平差别不大。神农架青天袍居群的遗传多样性最丰富,而官门山的居群遗传多样性较单一(表 2)。

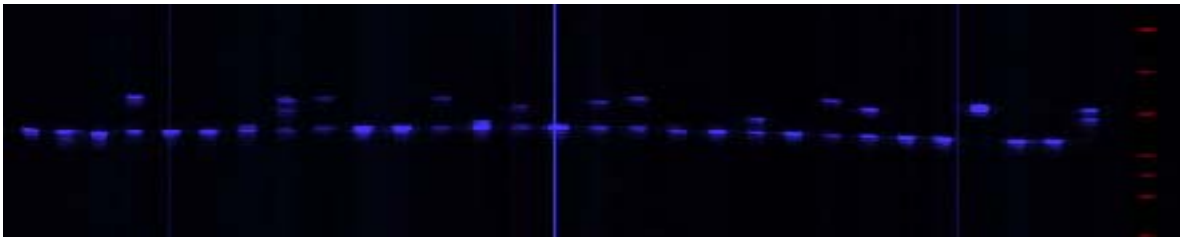


图 1 引物 WGA-89 在青天袍居群扩增的电泳结果

Fig.1 SSR patterns of *J.regia* in Qintianpao population amplified using primer WGA-89

表 2 3 个核桃居群的遗传多样性

Table 2 Genetic variation among three populations of <i>J. regia</i>					
居群	样本数量	观察等位基因数	有效等位基因数	期望杂合度	Nei 指数
官门山	30	3.92±1.83	2.57±1.54	0.507±0.259	0.491±0.251
老君山	30	5.42±2.87	3.34±2.06	0.569±0.309	0.551±0.298
青天袍	30	7.17±2.86	3.49±1.94	0.615±0.257	0.599±0.250
总体	90	9.00±3.67	3.55±2.22	0.604±0.241	0.598±0.239

2.2 居群的遗传分化及哈迪-温伯格平衡状况

12 个 SSR 位点的遗传分化结果见表 3。3 个居群的遗传分化系数(F_{st})为 0.021 8~0.208 0, 平均为 0.082 2, 说明有 8.22% 的变异存在于 3 个居群间, 3 个居群间的基因流为 2.793。 F_{is} 代表单个居群偏离哈迪-温伯格平衡的程度。整个居群的平均 F_{is} 值为 0.072 8, 该值说明居群内的个体总体表现为杂合子轻微不足, 但其间的差异无统计学意义。在 3 个居群中, 利用相似性比例(G 检验)检测到位点 WGA01、WGA04、WGA42、WGA72、WGA76、WGA89 表现出显著偏离哈温平衡($P<0.05$, 表 3, 位点偏离哈温平衡的程度采用相关相似性比例, 即 G 检验进行检测)。

表 3 3 个居群核桃的 F -统计量和基因流

Table 3 F -statistics and gene flow among three natural populations of <i>Juglans regia</i>				
引物	居群内繁育系数	遗传分化系数	P 值	基因流
WGA-01	0.298 0**	0.072 5**	0.015	3.197 3
WGA-42	-0.243 7**	0.021 8	0.031	11.235 7
WGA-70	-0.023 2	0.046 1	0.723	5.170 8
WGA-71	0.167 8**	0.026 2	0.919	9.288 6
WGA-72	0.042 4	0.185 7**	0.016	1.096 6
WGA-76	0.255 5**	0.120 6**	0.021	1.822 8
WGA-89	0.091 4*	0.208 0**	0.000	0.951 6
WGA-04	0.137 4**	0.044 8	0.000	5.333 9
WGA-376	0.311 1**	0.088 3**	0.145	2.582 6
WGA-321	-0.093 1*	0.068 7	0.733	3.389 0
WGA-276	-0.093 3*	0.039 1	0.102	6.147 0
WGA-225	0.022 9	0.028 8	0.063	8.425 2
均值 Mean	0.072 8	0.082 2**		2.792 8

“*”和 “**”为根据数据等位基因的频率及杂合度算出的杂合过度或杂合不足的程度, “*”示 $P<0.05$, “**”示 $P<0.01$; P 值用于衡量采用相关相似性比例 (G 检验)检测位点偏离哈温平衡的程度, $P<0.05$ 时显著偏离, $P<0.01$ 时极显著偏离。

2.3 各居群间的遗传关系

根据 Nei 方法^[24]计算出遗传距离和遗传一致性结果列于表 4。居群间的遗传距离为 0.147~0.194, 其中青天袍居群与老君山居群之间的遗传距离最小, 为 0.147, 老君山居群与官门山居群之间的遗传距离最大, 为 0.194, 居群之间的遗传分化程度不大。

表 4 3 个居群间的遗传距离和遗传相似度

Table 4 Genetic identity and genetic distance of three natural populations			
居群	官门山	老君山	青天袍
官门山		0.824	0.849
老君山	0.194		0.864
青天袍	0.164	0.147	

对角线以上为遗传相似度; 对角线以下为遗传距离。

根据 3 个居群的遗传距离进行 UPGMA 聚类分析, 结果(图 2)表明, 老君山居群和青天袍居群优先聚为一组, 官门山居群和其他 2 个居群的遗传距离相对较大。

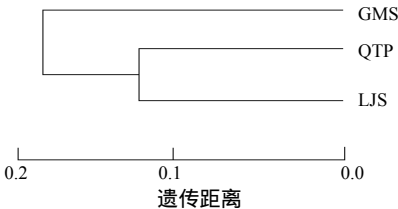


图 2 神农架 3 个核桃居群遗传距离的聚类分析结果

Fig.2 UPGMA dendrogram of *J. regia* populations analyzed from Nei's unbiased genetic distances

3 结论与讨论

近年来, 大量微卫星引物被用于对核桃属植物进行遗传分析^[9-13]。从神农架 3 个核桃居群遗传多样性分析结果来看, 筛选出的 12 对 SSR 引物在 90 个个体中一共检测到了 108 个等位基因, 多态位点占比为 100%。居群总体期望杂合度为 0.604, 与中国西南山区和云南的核桃居群^[12,21]相比, 本研究结果处于中上水平。居群平均等位基因数较多, 平均每个位点有 9 个等位基因, 但有效等位基因平均每个位点只有 3.55 个, 这说明在神农架核桃居群中, 检测到的等位基因中, 大多数的频率较低, 是稀有

等位基因。该结果与对西藏核桃居群遗传多样性的研究结果^[4]相似,说明神农架核桃居群蕴含了丰富的稀有遗传资源,不仅具有丰富的遗传多样性,而且保留了部分稀有基因资源,值得进一步挖掘利用。

由神农架核桃居群间遗传分化系数可知,神农架核桃资源中有 8.22% 的变异存在于居群间。该结果表明神农架核桃居群的遗传变异主要存在于群体内,群体间遗传变异水平较低。这与大多数以异交为主的木本植物的遗传变异模式^[25]类似。神农架核桃居群的遗传分化系数值(遗传结构分化程度)与云南、西藏核桃居群^[4,26]的相近。这 3 个核桃分布区的地形都以高山峡谷为主,说明地理距离对核桃居群造成的遗传分化作用是相似的。聚类分析结果显示,青天袍居群与老君山居群的亲缘关系相对较近,官门山居群与其他 2 个居群的遗传距离相对较远。该聚类结果与 3 个居群的地理距离具有较好的一致性,推测地理距离可能是形成神农架核桃当前遗传结构的重要因素。

参考文献:

- [1] 高焕章,张义,李秋杰,等.世界核桃产销概况与湖北名优产品开发对策[J].湖北农学院学报,2000,20(2):141-143.
- [2] 徕哺辑,肖格林.湖北省核桃品种资源调查研究报告[J].湖北林业科技,1996(1):6-9.
- [3] 裴东,鲁新政.中国核桃种质资源[M].北京:中国林业出版社,2011.
- [4] 王滑.西藏核桃种质资源遗传多样性研究[D].北京:中国林业科学研究院,2010.
- [5] 蒲光兰,肖千文,吴开志,等.四川核桃种质资源表型多样性研究[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2014,40(2):162-167.
- [6] 朱兆泉,宋朝枢.神农架自然保护区科学考察集[M].北京:中国林业出版社,1999.
- [7] 葛继稳,吴金清,朱兆泉,等.神农架生物圈保护区植物多样性及其保护现状的研究(英文)[J].植物科学学报,1997,15(4):341-352.
- [8] 邹喻苹.系统与进化植物学中的分子标记:生命科学专论[M].北京:科学出版社,2001.
- [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] DANG L 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: 348-354.
- [11] EBRAHIMI A, FATAHI R, ZAMANI Z. Analysis of genetic diversity among some Persian walnut genotypes (*Juglans regia* L.) using morphological traits and SSRs markers[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 130(1): 146-151. DOI:10.1016/j.scienta.2011.06.028.
- [12] KARIMI R, ERSADI A, VAHDATI K, et al. Molecular characterization of Persian walnut populations in Iran with microsatellite markers[J]. HortScience, 2010(9): 1403-1406.
- [13] POLLEGIONI P, WOESTE K, OLIMPIERI I, et al. Long-term human impacts on genetic structure of Italian walnut inferred by SSR markers[J]. Tree Genetics & Genomes, 2011, 7(4): 707-723. DOI:10.1007/s11295-011-0368-4.
- [14] WANG H, PEI D, GU R S, et al. Genetic diversity and structure of walnut populations in central and southwestern china revealed by microsatellite markers[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2008, 133(2): 9.
- [15] 杨英军,李学强,张军科.落叶果树韧皮部提取 DNA 的方法研究[J].河南农业大学学报,2001,35(1): 97-98. DOI:10.3969/j.issn.1000-2340.2001.01.027.
- [16] WOESTE K, BURNS R, RHODES O, et al. Thirty polymorphic nuclear microsatellite loci from black walnut[J]. J Hered, 2002, 93(1): 58-60. DOI:10.1093/jhered/93.1.58.
- [17] 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. DOI:10.3321/j.issn:1001-7488.2007.07.020.
- [18] DANG L 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.
- [19] 张赤红,张京.应用 SSR 标记对 61 个国家大麦遗传多样性的研究[J].植物遗传资源学报,2008,9(1): 15-19.
- [20] YEH F C, YANG R C, BOYLE T. Software microsoft window-based freeware for population genetic analysis [M]. Edmonton: University of Alberta, 1997.
- [21] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics, 1978, 89: 583-590.
- [22] CURNOW R N, WRIGHT S. Evolution and the genetics of populations, Volume 4: variability within and among natural populations[J]. Biometrics, 1979, 35(1): 359. DOI:10.2307/2529965.
- [23] ROHLF F J. NTSYS-PC Version 2.10[M]. New York: Applied Biostatistics Inc., 1994.
- [24] GUNN B F, ARADHYA M, SALICK J M, et al. Genetic variation in walnuts (*Juglans regia* and *J. sigillata*, Juglandaceae): species distinctions, human impacts, and the conservation of agrobiodiversity in Yunnan, China[J]. American Journal of Botany, 2010, 97(4): 660-671. DOI:10.3732/ajb.0900114.
- [25] WANG H, PAN G, MA Q, et al. The genetic diversity and introgression of *Juglans regia* and *Juglans sigillata* in Tibet as revealed by SSR markers[J]. Tree Genetics & Genomes, 2014, 11(1). DOI:10.1007/s11295-014-0804-3.
- [26] PENG Y, CHEN K. Phylogeographic pattern of *Populus cathayana* in the southeast of Qinghai-Tibetan Plateau of China revealed by cpSSR markers[J]. Silva Fennica, 2011, 45(4). DOI:10.14214/sf.94.

责任编辑:王赛群
英文编辑:王 库