

37 个新引进的薄壳山核桃品种遗传多样性 SSR 分析

施娟娟¹, 叶生月², 俞世群², 王正加^{1*}

(1. 浙江农林大学亚热带森林培育国家重点实验室培育基地, 临安 311300; 2. 浙江省桐庐县林业技术推广站, 桐庐 311500)

摘要: 对 37 个新引进的薄壳山核桃品种生物学性状进行分析, 采用已开发的薄壳山核桃引物和山核桃引物, 通过 SSR (simple sequence repeat) 技术对这 37 个品种进行遗传多样性分析。结果表明, 引进的 37 个品种遗传多样性不明显, 筛选获得的 14 对 SSR 引物共扩增出 112 个等位基因位点, 平均每对引物获得 8 个等位基因位点, 最多是 20 个, 最少是 3 个, 多态性最高为 100%; 通过 Ntsys2.10 软件对 37 个薄壳山核桃品种进行聚类分析, 得出遗传相似系数为 0.607~0.955, 平均 0.781, Elliott 和 Schley 关系最近, Van Daman 与 Disirable, Van Daman 和 Elliott, Barton 与 Owens, Owens 与 Stuart, Disirable 与 Dependable 间的遗传关系最远。这表明美国薄壳山核桃品种间遗传多样性较低。

关键词: 薄壳山核桃; SSR; 遗传多样性

中图分类号: S664.1

文献标识码: A

文章编号: 1672-352X (2013)01-0042-05

SSR analysis of genetic diversity of the 37 new pecan cultivars

SHI Juan-juan¹, YE Sheng-yue², YU Shi-qun², WANG Zheng-jia¹

(1. State Key Laboratory Breeding Base of Subtropical Forest Culture, Zhejiang Agriculture and Forestry University, Lin'an 311300; 2. Tonglu County Forestry Extension Station, Tonglu 311500)

Abstract: Based on the biological traits of the 37 new pecan cultivars introduced from America, SSR technique was used to amplify the genomic DNA of 37 cultivars of pecan to study the genetic relationship and species genetic diversity. The results were as follows. Using screened 14 pairs of SSR primers, 112 alleles were amplified, and the alleles per locus ranged from 3 to 20 with the mean value of 8; the genetic similarity coefficients between all elite tree individuals ranged from 0.607 to 0.955 with average of 0.781 by using Ntsys2.10 software. Elliott and Schley has a near relationship, while Van Daman and Disirable, Van Daman and Elliott, Barton and Owens, Owens and Stuart, Disirable and Dependable have a far relationship. The results revealed that the 37cultivars of US pecan have low genetic diversity.

Key words: pecan, SSR, genetic diversity

薄壳山核桃 (*Carya illinoensis* K. Koch) 又名美国山核桃、长山核桃, 属胡桃科山核桃属, 是世界重要的干果油料树种和干果树种之一^[1-2]。原产北美密西西比河谷及墨西哥, 美国是薄壳山核桃的中心产区, 现代引种已经使它扩展到了整个北美地区, 世界上如澳大利亚、南非、埃及、秘鲁、巴西、西欧、中东及中国等国家和地区也大量引种。我国引种薄壳山核桃已有 100 多年历史^[3], 薄壳山核桃在浙江各地均表现了较好的适应性, 建德市从 20 世纪

50 年代引种后, 目前已进入了规模化生产, 发展面积已达到 300 余公顷; 金华东方红林场、兰溪市、永康市、富阳市、临安市、杭州余杭区、绍兴、新昌、安吉等地都已开始规模经营。薄壳山核桃在我国表现出了重要的开发利用潜力, 但目前普遍存在品种混乱、杂交配置技术不成熟, 造成产量不稳定, 干果品质差等问题。

简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 又称微卫星 DNA (Microsatellite DNA), 广泛分布

收稿日期: 2012-08-31

基金项目: 国家自然科学基金 (30872047), 浙江省科技厅重大项目 (2011C14010), 浙江省林业厅项目 (2010B09) 和杭州市科技局项目 (20110332H21) 共同资助。

作者简介: 施娟娟, 女, 硕士研究生, E-mail: jiemeixin99@163.com

* 通信作者: 王正加, 男, 博士, 教授。E-mail: wzjh21@163.com

在真核生物基因组的的不同位置, 且分布较为均匀, 由于其重复次数不同或重复程度不完全而形成每个座位的多态性^[4], 具有共显性、多态性高、遗传稳定、重复性好、操作简单等优势, 在家系鉴定、遗传图谱的绘制、群体遗传分析、育种计划及系统发生研究等多个领域得到广泛应用^[5-7]。薄壳山核桃分子标记方面的研究已有不少报道, 如 Conner 等和张日清等利用 RAPD 标记估计了其遗传多样性, 并用于品种的鉴定^[8-10]; Grauke 等已将 SSR 标记用于

薄壳山核桃的遗传研究^[11]。本试验利用 SSR 技术从分子层面对新引进的 37 种薄壳山核桃进行遗传多样性分析, 为国内已栽种的薄壳山核桃品种的鉴定和分析提供理论技术基础。

1 材料与方法

1.1 材料

2011 年 4 月, 从美国得克萨斯州引进 37 个薄壳山核桃的品种枝条, 采用本砧嫁接手段将其保存

表 1 37 个薄壳山核桃品种信息
Table 1 Information of 37 pecan cultivars

编号 Code	品种名称 Name of cultivar	品种特性 Cultivar characteristics
1	Money maker	雌先型, 早熟, 坚果重 6.7 g, 出仁率 44%。坚果圆形、壳厚、色浅, 大枝直立生长, 树皮光磷状。是一高产品种, 大小年现象明显。
2	Chickasaw	雌先型, 果熟期 10 月 5 日, 坚果重 7.2 g, 出仁率 55%。较抗皮痂病, 幼树早熟。
3	Choctaw	雌先型, 果熟期 10 月 26 日, 坚果重 10.1 g, 出仁率 60%。坚果大, 品质好, 但壳薄。
4	Caddo	雄先型, 果熟期 10 月 3 日, 果重 8.6 g, 出仁率 56%。坚果足球型, 极易去壳, 高产, 极抗皮痂病。
5	Moore	雄先型, 早熟, 果重 4.9 g, 出仁率 44%。坚果小, 倒卵形, 大小年现象明显。
6	Wood roof	雌先型, 其坚果比 Stuart 和 Desirable 大, 出仁率低, 幼树生长快, 极抗皮痂病。
7	Nacono	晚熟, 坚果大, 抗疮痂病。
8	Success	雄先型, 果重 9.4 g, 出仁率 50%。坚果大, 呈倒卵形, 鳞状树皮, 树形矮圆型。
9	Divis	雄先型, 坚果重 8.9 g, 出仁率 44%。坚果质量好, 高产, 抗皮痂病。
10	Van Deman	雌先型, 晚熟品种, 果重 7.0 g, 出仁率 41%。坚果长, 顶端尖, 叶片浅绿色。
11	Shawnee	雌先型, 果重 8.0 g, 出仁率 59%。坚果长, 品种好, 极抗皮痂病。
12	Mohawk	雌先型, 果树期 10 月 5 日, 果重 10.5 g, 出仁率 58%。产量高, 成年树大小年现象明显。
13	Kiowa	雌先型, 果实成熟期 10 月 26 日, 果重 10.1 g, 出仁率 58%。坚果大, 质量好, 抗皮痂病。
14	Woodard	雄先型, 出仁率高, 壳极薄且有内壳, 用机械采收时易受损, 易患皮痂病和白粉病。
15	Forket	雌先型, 果熟期 10 月 12 日, 果重 8.2 g, 出仁率 62%。质量好, 产量高, 壳薄。
16	Farley	雌先型, 坚果重 7.3 g, 出仁率 51%。坚果块型, 断面近方形, 坚果小, 晚熟。
17	Colby	雌先型, 果熟期 9 月 28 日, 果重 6.5 g, 出仁率 49%。
18	Moreland	雌先型, 果熟期 10 月 15 日, 果重 7.6 g, 出仁率 60%。坚果质量极好, 抗皮痂病。
19	Shoshoni	雌先型, 果熟期 10 月 5 日, 果重 9.1 g, 出仁率 54%。坚果大, 产量高。
20	Barton	雄先型, 果熟期 10 月 3 日, 坚果重 8.6 g, 出仁率 56%。坚果质量好, 极抗皮痂病。
21	Melrose	雌先型, 果熟期 10 月 15 日, 坚果重 8.2 g, 出仁率 53%。坚果质量极好, 极抗皮痂病。
22	Apalachee	嫁接后 3-6 年结果, 结果早, 可以及早发挥经济效益。
23	Lakota	早熟性, 高产, 果实质量高, 抗赤霉病。
24	Owens	雄先型, 果熟期 10 月 11 日, 果重 9.1 g, 出仁率 48%。坚果大且饱满, 壳厚, 抗皮痂病。
25	Giles	雄先型, 果熟期 10 月 5 日, 果重 6.1 g, 出仁率 53%, 产量高。
26	Wichita	雌先型, 果熟期 10 月 10 日, 果重 8.7 g, 出仁率 60%。高产, 坚果品质好。
27	Cheyene	雄先型, 果熟期 10 月 16 日, 果重 7.1 g, 出仁率 59%。坚果明亮, 有褶皱, 树长势慢, 在美国普遍种植, 有明显的大小年现象, 抗皮痂病。
28	Mandan	雌先型, 果重 9.4 g, 出仁率 52%。果大、长, 壳薄, 大小年现象明显。
29	Disirable	雄先型, 果熟期 10 月 16 日, 果重 9.1 g, 出仁率 53%。坚果大, 质量好, 结果多, 树枝脆弱易断, 抗皮痂病, 在美国东南方普遍种植。
30	Summer	雌先型, 果熟期 10 月 24 日, 果重 8.2 g, 出仁率 53%, 坚果大小中等, 抗皮痂病。
31	Elliott	雌先型, 果熟期 10 月 15 日, 果重 6.2 g, 出仁率 55%, 坚果小, 核仁品质高, 深根品种, 老年时期大小现象明显。
32	Schley	雌先型, 果重 9.1 g, 出仁率 56%, 坚果壳薄易碎。
33	Stuart	雌先型, 果熟期 10 月 16 日, 果重 9.1 g, 出仁率 48%, 抗皮痂病, 该品种植规模为美国商业品种 1/4。
34	Pawnee	雄先型, 早熟, 坚果大, 出仁率高, 花粉成熟早, 需人工授粉, 较抗皮痂病, 比其他品种抗蚜虫病。
35	Excell	适应性极强, 坚果大, 质量好。
36	Dependable	丰产, 稳产, 坚果质量好。
37	Glorria Grande	雌先型, 果熟期 10 月 10 日, 果重 9.4 g, 出仁率 48%。极抗皮痂病。

在浙江农林大学山核桃圃地,具体品种见表1。2011年春天采嫩叶,用CTAB法提取了高质量的基因组DNA,并用紫外分光光度计(型号ND-1000)检测OD值,将DNA稀释到 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.2 试剂

SSR引物的获得分为2个部分。一部分是Grauke开发的19对引物^[11],另一部分是来自于山核桃SSR引物^[12]23对,引物序列见表2。所有引物均由上海生物工程公司合成。*Taq*酶、Buffer、 Mg^{2+} 、dNTP购自上海申能博彩生物公司,试验所用到的其他化学试剂为国内分析纯。

1.3 PCR反应体系

将提取的DNA稀释到 $100\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$,PCR反应体系为 $1\times\text{PCR Buffer}$, 2.0 U Taq 聚合酶, $0.22\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP, $0.13\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物, $1.0\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$

Mg^{2+} , 100 ng 模板DNA,加无菌 ddH_2O 至 $10\text{ }\mu\text{L}$ 。PCR的反应程序: 94°C 3 min,1个循环; 94°C 30 s, T 30 s, 72°C 1 min,35个循环; 72°C 3min, T 表示各引物对的退火温度(见表2)。PCR扩增产物用8%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用 AgNO_3 染色显色技术检测,用BIO-RAD出产的扫描仪(型号GS-800)拍照,然后读带。

1.4 数据统计分析

在相同的迁移位置,选择清晰的条带统计,有带的记为“1”,无带的记为“0”,建立原始矩阵,统计SSR扩增产物总条带数和多态性条带数,计算多态性条带所占比率(PPB)。利用NTSYS2.1计算Nei-Li遗传相似系数(G),根据相似系数进行UPGMA(unweighted pair group method with arithmetic means)聚类分析,构建SSR系统树。

表2 14对SSR引物扩增结果
Table 2 Amplification results of 14 SSR primers

引物名称 Name of primer	序列(5'→3') Sequence from 5' to 3'	总条带数 Band number in total	多态性条带 Polymorphic band	多态率/% Polymorphic rate	退火温度/ $^\circ\text{C}$ Annealing temperature
SSR23	F:CTGTAAGTCAAAAAGACC R:AGGCTATCTCATACCACC	20	20	100	54.4
SSR3085	R:AGGCTATCTCATACCACC F:TGCTGGGAATTTGGAGAC	9	8	88.9	53.2
SSR28a	F:AAACCTTGGCATAGTCATTTGAGAG R:CTTTGTCAAACCTTTGTTTTGGGTGTC	12	12	100	58.7
SSR1298	F:GTAGTGGACGCAGCAAGA R:TCGTAGGAGCACGGAGTT	5	5	100	57.3
SSR3229	F:GGGGATGAACGGCCAGGAT R:ACCCACGGTCACGCCCACTA	5	4	80	61.9
SSR917	F:ATGAGCGTAGGGCATGTAA R:CAACCAACGGCGGTGATA	12	11	91.7	55.4
SSR8	F:GCTCCAAGCGAAAGTCAAGT R:TCATAAACCAACGCCAAAAGA	6	4	66.7	53.7
CA12	F:AGATCGAAAAGCGTGGAGCAAC R:ACACCGAATTCTCAATGAGCCAAAC	6	5	83.3	53.0
CIN4	F:GGCATCAGAGAAGGCTCCT R:CTCACCCGTCCTAGGGCTA	12	12	100	57.0
CIN13	F:CCGCAGATGGTTTGAAGAA R:ACAAATTCCTCACTCCGGAG	6	4	66.7	54.0
CIN23	F:GGAGTTGTGGAAGCAGTGGA R:GGACCATAAGAGTTTTGACCCTT	4	2	50	57.0
GA31	F:TGAACTCCAAAAGCCTCCTCTC R:GTATTGTATTTTTTCTTGAGCTTTCTC	6	6	100	56.0
GA38	F:AAAAGTTTTAGGGTTGTTTGCTCTCT R:GTAAAGCCTACAACCTACAACAGTCTATG	3	3	100	56.0
GA41	F:TCTTCAGAAAAAACCTTACCTCTCT R:GAAAAATATAAACTCCCATACTACCCACAT	6	5	83.3	56.0
平均Mean		8	7.2	90.2	

2 结果与分析

2.1 37个新引进的薄壳山核桃新品种性状

37个新引进的薄壳山核桃品种分雄先型和雌先型2种,果实等相关性状的指标见表1。

2.2 SSR分子标记的多态性分析

以37个薄壳山核桃品种的基因组DNA为模板,用19对已开发的薄壳山核桃引物和23对近缘物种山核桃的引物进行扩增,共14对引物扩增产物的条带清晰、多态性明显。共得到清晰可辨等位

基因位点 112 个(如图 1), 其中多态性位点 101 个, 占 90.2%, 6 对引物扩增出多态性条带为 100%, 占 42.9%。单对引物检测出的等位基因位点 3~20 个,

平均为 8 个, 引物 GA38 扩增的等位基因位点最少, 为 3 个, 引物 S23 扩增基因位点最多, 为 20 个。

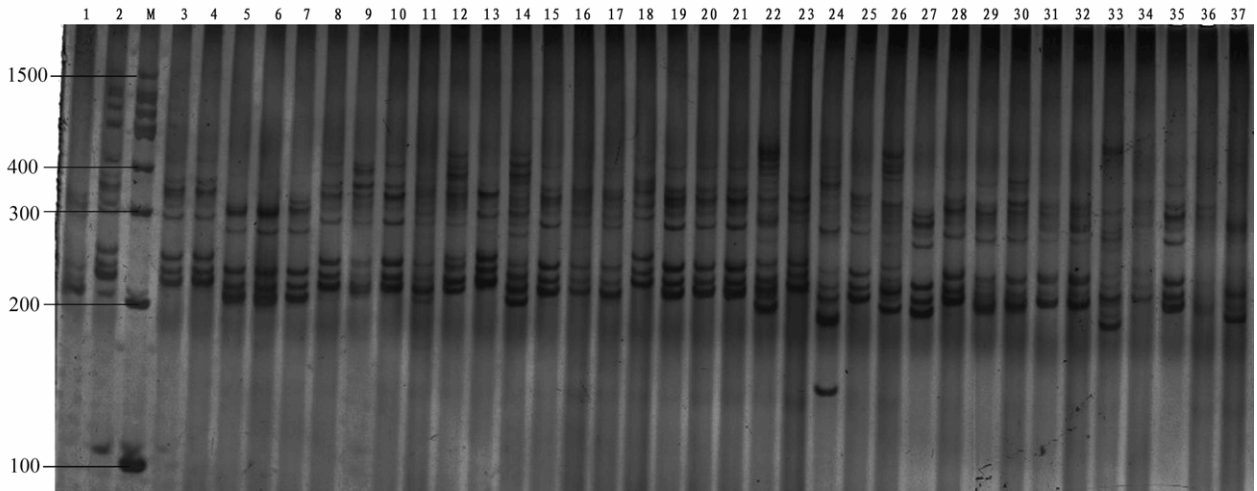


图 1 引物 SSR23 对 37 个薄壳山核桃品种的扩增电泳

Figure 1 Amplification profiles of 37 pecan cultivars using primer SSR23

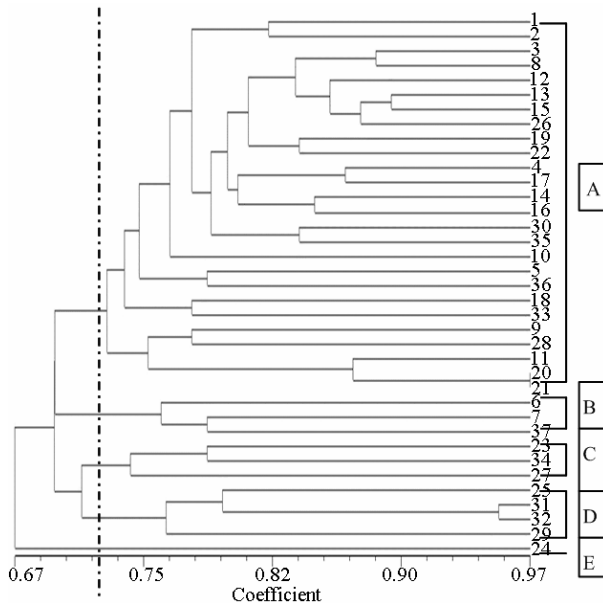


图 2 37 个薄壳山核桃品种 SSR 分析 UPGMA 聚类

Figure 2 UPGMA dendrogram for SSR of 37 pecan cultivars

2.3 SSR 遗传相似系数分析

遗传相似系数越大, 亲缘关系就越近。对这些品种进行遗传相似系数分析, 结果表明, 37 个薄壳山核桃品种间的遗传相似系数为 0.607~0.955, 其中 Elliott 和 Schley 遗传相似系数最大, 为 0.955, 二者亲缘关系最近; Van Daman 与 Disirable, Van Daman 和 Elliott, Barton 与 Owens, Owens 与 Stuart, Disirable 与 Dependable 间的遗传相似系数最小, 同

为 0.607, 亲缘关系最远。表明这 37 个品种差异明显, 具有较为丰富的遗传多样性。

2.4 SSR 聚类分析

用软件 Ntsys2.10 进行聚类分析, 以 112 个位点的谱带原始矩阵构建 SSR 分子系统树(如图 2)。37 个薄壳山核桃品种聚为 A、B、C、D、E 5 大类, A 包括的品种最多共 26 个, E 最少包括 Owens 1 种。

3 小结与讨论

3.1 山核桃 SSR 引物在薄壳山核桃遗传多样性研究中的通用性

SSR 分子标记具有诸多优点, 其传统的开发方法代价昂贵, 且费时费力。由于微卫星序列具有保守性, 其引物在近缘种间有较强的通用性^[13-14]。作者首次用山核桃的引物用于美国薄壳山核桃的 SSR 标记, 从 42 对山核桃引物中初步筛选 22 对, 然后进行 SSR 试验, 结果 22 对引物均能扩出条带, 只有 7 对引物跑出的条带清晰可读, 这一结果说明山核桃 SSR 分子标记在美国薄壳山核桃中的通用性较低, 为 14.3%。

3.2 37 个薄壳山核桃品种的遗传多样性

由图 2 可以看出, 3 号品种(Choctaw)和 8 号品种(Success)的遗传距离较近, 这与资料记载相符, 即 Choctaw 是由 Success 和 Mahan 杂交得来^[15]。本研究利用 SSR 方法分析了 37 个美国薄壳山核桃品种的遗传多样性以及品种之间的遗传相似

系数。37个薄壳山核桃品种的遗传相似系数变化范围为0.607~0.955,表明该37个薄壳山核桃品种的遗传距离较近,遗传多样性较低,从SSR构建的系统树可以看出Eliott和Schley的遗传关系最近,品种Eliott是于1925年在Florida发现的,而Schley来自于Mississippi,其遗传关系最近的原因有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 吴耕民. 中国温带落叶果树[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1993: 719-729.
- [2] 董凤祥, 王贵禧. 薄壳山核桃引种及栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2003.
- [3] 张日清, 陈建华, 夏传格, 等. 我国引种美国山核桃科学研究进展[J]. 湖南林业科技, 2001, 28(2): 6-9.
- [4] 李建武. SSR标记技术在马铃薯遗传育种研究中的应用[J]. 中国蔬菜, 2011(20): 1-8.
- [5] Nielsen E E, Hansen M M, Bach L A. Looking for a needle in a haystack: discovery of indigenous Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) in stocked population [J]. Conservation Genetics, 2002, 2: 219-232.
- [6] Nichols K M, Young W P, Danzmann R G, et al. A consolidated linkage map for rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Anita Genet, 2003, 34(2): 102-115.
- [7] 张于光, 李迪强, 饶力群, 等. 东北虎微卫星 DNA 遗传标记的筛选及在亲子鉴定中的应用[J]. 动物学报, 2003, 49(1): 118-123.
- [8] Conner P J, Wood B W. Identification of pecan cultivars and their genetic relatedness as determined by randomly amplified polymorphic DNA analysis[J]. J Am Soc Horticult Sci, 2001, 126: 474-480.
- [9] 张日清, 何方, 吕德芳, 等. 美国山核桃群体遗传多样性的RAPD分析[J]. 经济林研究, 2001, 19(2): 1-6.
- [10] 张日清, 吕德芳, 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.
- [11] Grauke L J, Iqbal M J, Reddy A S, et al. Developing microsatellite DNA markers in pecan[J]. Amer Soc Hort Sci 2003, 128(3): 374-380.
- [12] 宋双, 黄银芝, 董雷鸣, 等. 山核桃 SSR 标记的初步开发[J]. 浙江农林大学学报, 2012, 29(4): 626-633.
- [13] Wen M F, Wang H Y, Xia Z Q, et al. Development of EST-SSR and genomic-SSR markers to assess genetic diversity in *Jatropha curcas* L.[J]. BMC Research Notes, 2010, 3: 42.
- [14] 林二培, 马海泉, 樊民亮, 等. 百山祖冷杉 SSR 体系的建立及人工辅助授粉子代的初步鉴定[J]. 浙江农林大学学报, 2011, 28(2): 234-240.
- [15] Roger G W. Pecan production in the southeast a guide for growers[M]. Alabama: Alabama Operative Extension Service, Auburn University, 1989.