

平欧杂种榛主栽品种(系)遗传关系的 ISSR 分析

陈 新¹, 马庆华², 王贵禧², 赵天田², 贾建云¹, 徐 丽¹, 张力思¹, 刘庆忠¹

(¹山东省果树研究所/山东省果树生物技术育种重点实验室, 泰安 271000; 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试验室, 北京 100091)

摘要:采用 ISSR 分子标记的方法, 对达维、辽榛 3 号等 17 个平欧杂种榛主栽品种(系)进行了遗传关系研究。试验从 60 条 ISSR 引物中筛选出 7 条进行电泳分析, 使用 NTSYS pc 2.11F 和 Popgene 1.32 软件进行数据统计分析并作图。结果显示: 7 条 ISSR 引物共获得 58 条谱带, 平均每条引物 8.3 条谱带, 引物平均多态性比率 84.6%; 7 条 ISSR 引物可将所有样品完全分开, 当遗传相似性阈值为 0.687 时可将样品分成 3 个类群: 第 I 类群 14 个品种(系)可分成 4 个亚类, 第 II 类群 1 个品种, 第 III 类群 2 个品系。样品间的遗传相似性系数为 0.448~0.879(平均 0.678)。群体的有效等位基因数、基因多样性、Shannon 信息指数分别为 1.6751、0.3701 和 0.5308。上述结果表明, 平欧杂种榛是一个具有高度遗传多样性的群体, 主栽品种(系)间存在复杂的亲缘关系。该研究结果对于平欧杂种榛的遗传关系研究具有重要意义, 也可为其他榛属植物的相关研究提供参考。

关键词:平欧杂种榛; 亲缘关系; 遗传多样性; ISSR

Analysis of the Genetic Relationship for the Main Cultivars/Varieties of Ping'ou Hybrid Hazelnut by ISSR Markers

CHEN Xin¹, MA Qing-hua², WANG Gui-xi², ZHAO Tian-tian², JIA Jian-yun¹,

XU Li¹, ZHANG Li-si¹, LIU Qing-zhong¹

(¹Shandong Provincial Key Laboratory of Fruit Tree Biotechnology Breeding / Shandong Institute of Pomology, Tai'an 271000; ²State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding / Key Laboratory of Forestry Silviculture of State Forestry Administration/Research Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: The objective of this study is to analyze the genetic relationship for the main cultivars/varieties for Ping'ou hybrid hazelnut. 17 main cultivars/varieties, such as 'Dawei' and 'Liaozhen No. 3', are selected as materials. 7 ISSR primers with high polymorphism, strong signals, and clear bands are selected from 60 primers. NTSYS pc 2.11F and Popgene 1.32 software are used to conduct the data analysis and plotting. Totally 58 bands are obtained. The average number of bands is 8.3 per primer and the average percentage of polymorphic bands is 84.6%. All the samples are divided into 3 groups at the similarity coefficient of 0.687. The first group, containing 14 cultivars/varieties, can be divided into four sub-groups whereas the second and the third group contain 1 and 2 cultivars, respectively. The similarity coefficient of the samples varies from 0.448 to 0.879, with an average of 0.678. The effective number of alleles, Nei's gene diversity, and Shannon's information index of the main cultivars are 1.6751, 0.3701, and 0.5308, respectively. Ping'ou hybrid hazelnut is a high polymorphic population and the genetic relationships of the main cultivars are complex. The result of this study can offer reference for the relative researches in *Corylus*.

Key words: Ping'ou hybrid hazelnut; genetic relationship; genetic diversity; ISSR markers

收稿日期: 2013-05-16 修回日期: 2013-06-18 网络出版日期: 2013-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1309.023.html>

基金项目: 山东省农业良种工程项目(鲁科农字: 2011-086); 国家林业局林业公益性行业科研专项(201304710); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(RIF2012-11); 泰安市科技特派员项目(2012-15)

第一作者主要从事果树种质资源与分子生物学研究, E-mail: 63249324@qq.com; 马庆华为共同第一作者

通信作者: 刘庆忠, 主要从事果树种质资源与生物技术育种, E-mail: qzliu001@126.com

平欧杂种榛(*Corylus heterophylla* × *Corylus avellana*)是我国平榛(*C. heterophylla* Fisch.)和国外欧洲榛(*C. avellana* L.)的种间杂交后代^[1],《中国果树志·榛子卷》中记载了 60 多个品系,现已鉴定了多个优良新品种^[2],其坚果经济性状极佳,适生范围广,被广泛引种到我国从黑龙江到云南、从浙江到西藏的 20 余个省(直辖市、自治区)。然而上述平欧杂种榛品种(系)是一个来源于多个父母本的混合群体^[3],遗传背景复杂。建立便捷、高效,多态性强的分子标记方法研究其品种(系)间的亲缘关系,对研究平欧杂种榛的遗传背景、品种鉴别、遗传多样性等问题具有重要意义。ISSR 分子标记^[4]根据植物基因组中具有丰富的简单序列重复(SSRs, simple sequence repeats)的特点,在 SSR 的 3'或 5'端加锚 1~4 个碱基的单一引物,进行重复序列间的 PCR 扩增,具有操作简单、稳定性高、扩增产物特异性强等优点,已广泛应用于多种植物的遗传多样性、品种鉴定及指纹图谱构建等方面^[5-16]。本研究旨在以 ISSR 标记研究平欧杂种榛主栽品种(系)的遗传关系,评价其遗传背景的复杂程度,为平欧杂种榛的品种鉴别、亲缘关系划分和遗传多样性等研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验样品于 2012 年 6 月采自山东省果树研究所榛子品种资源保存圃,所用 17 份平欧杂种榛均为目前生产上主要栽植的品种(系)。采集的样品为健康、幼嫩的叶片,采后装于塑封袋内,置于冰盒中带回试验室于 -80 ℃ 下保存备用。供试样品的品种名、育种代号和点样顺序见表 1。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取与检测 DNA 提取采用改良 CTAB 法^[17],使用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性,DNA 的纯度与浓度使用紫外分光光度计,测量 OD₂₆₀、OD₂₈₀值,使用 ddH₂O 将 DNA 统一稀释到 10 ng/μL 备用。

1.2.2 ISSR 扩增及电泳 根据文献中报道的 ISSR 引物序列,设计了 60 条引物,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成,经 PCR 扩增和电泳分析,筛选出 7 条扩增产物多态性高、稳定性强的引物,其编号顺序、核苷酸序列及退火温度见表 2。PCR 扩增反应在 PTC-100 梯度 PCR 仪上进行,反应体系共 20.0 μL,其中包括 10 × Buffer 2.0 μL、0.5U *Taq* polymerase、1.0 mmol/L dNTP、1.5 μmol/L ISSR 引物、

表 1 本研究所使用的样品

Table 1 The samples employed in the study

编号 Code	品种(系) Cultivar/Variety	育种代号 Breeding number
1	辽榛 3 号	84-226
2	平欧 28 号	85-28
3	达维	84-254
4	魁香	82-8
5	平欧 402 号	84-402
6	平欧 48 号	84-48
7	平欧 376 号	84-376
8	平欧 33 号	83-33
9	平欧 162 号	85-162
10	平欧 586 号	84-586
11	平欧 88 号	85-88
12	平欧 3 号	B-3
13	平欧 18 号	81-18
14	平欧 21 号	B-21
15	平欧 11 号	B-11
16	平欧 62 号	83-62
17	平欧 617 号	84-617

DNA 模板 5.0 μL,用 ddH₂O 补足 20.0 μL。扩增程序为 94 ℃ 预变性 4 min,94 ℃ 变性 1 min,复性 50 s (退火温度随引物而定),72 ℃ 延伸 2 min,共 36 个循环,72 ℃ 延伸 10 min。扩增反应结束后加入 4.0 μL 溴酚蓝混匀,取 6.0 μL 扩增产物于 2% 的琼脂糖凝胶中电泳,电极缓冲液为 1.0 × TBE,溴化乙锭(EB)染色,染色后在荧光下拍照。所用 dNTPs、*Taq* polymerase、Marker(DL2000)等均购自上海生工生物工程技术服务有限公司。

1.3 数据统计分析

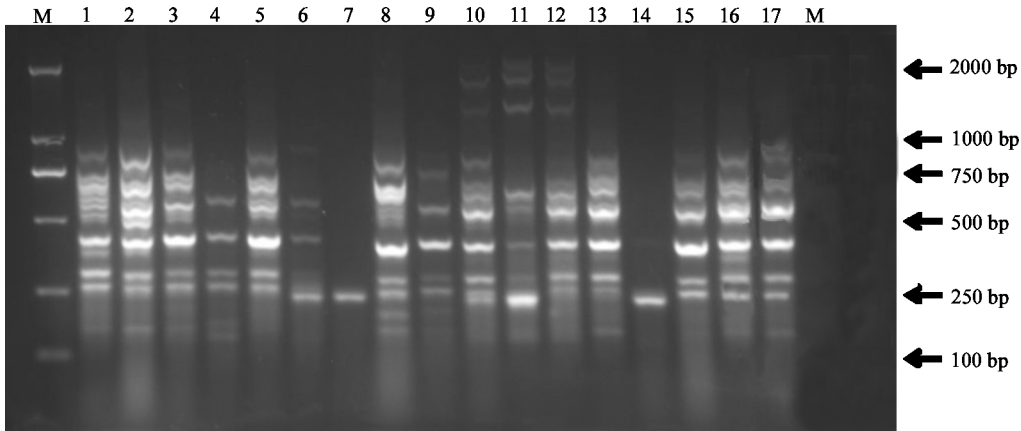
ISSR 为显性标记,按条带的有无分别赋值,将电泳图谱转换为 0-1 矩阵,即有带记为 1,无带记为 0。样品遗传多样性的度量指标使用 Popgene 1.32 软件,计算有效等位基因数(*Ne*)、基因多样性(*H*)及 Shannon 信息指数(*I*);样品的聚类分析和相似性系数计算使用 NTSYS pc 2.11F 软件,对原始矩阵用 SIMQUAL 程序求得 SM 相似系数矩阵,用 SHAN 程序中的 UPGMA(unweighted pair-group method with arithmetic means)方法进行聚类分析,并通过 Treeplot 模块生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物扩增效果及多态性比较

经 PCR 扩增和电泳分析,从设计的 60 条 ISSR 引物中,筛选出 7 条多态性高、稳定性强的引物。ISSR 扩增条带主要集中在 100 ~ 2000 bp 之间,图 1 展示了引物 ISSR08 的扩增效果。7 条 ISSR 引物共产生 58 条谱带,平均每条引物产生 8.3 条谱带,其中多态性谱带 50 条,平均多态性比率 84.6% (表 2),

与其他植物 ISSR 的扩增结果相比处于较高水平^[5,8,10,18-20];不同引物在扩增带数、多态性检出率等方面有所差异,引物 ISSR25 多态性比例达到 100%,引物 ISSR09 和 ISSR36 多态性比例为 90%,其他引物组合的多态性比例也较高,说明平欧杂种榛主栽品种 ISSR 多态性比率相对较高,遗传基础较广。上述研究结果表明,试验筛选得到的 7 条引物可以满足后续试验和数据分析的要求,同时也可用于榛属植物的其他相关研究。



材料编号同表 1,M 代表 marker
Codes of 1-17 are same as table 1,M stands for marker

图 1 ISSR08 扩增产物电泳图谱

Fig.1 Amplification results of ISSR08

表 2 引物序列及其扩增多态性

Table 2 Primer sequence and polymorphism comparison

编号 Code	引物名称 Primer name	核苷酸序列 Sequence	退火温度(℃) Annealing temperature	总条带数(条) No. of total bands	多态性谱带数(条) No. of polymorphic bands	多态性百分率(%) Percentage of polymorphic bands
1	ISSR01	(GA) ₈ Y	50	8	7	87.5
2	ISSR08	(GA) ₈ YC	53	6	5	83.3
3	ISSR09	(AG) ₈ T	50	10	9	90.0
4	ISSR44	(AG) ₈ TT	45	8	6	75.0
5	ISSR36	(AG) ₈ AC	56	10	9	90.0
6	ISSR60	(AG) ₈ GG	54	6	4	66.7
7	ISSR25	(AG) ₈ YT	50	10	10	100
总计 Total				58	50	
平均 Average				8.3	7.1	84.6

2.2 平欧杂种榛 17 个主栽品种的亲缘关系

2.2.1 遗传相似系数和聚类分析 17 个平欧杂种榛主栽品种(系)的相似系数为 0.448 ~ 0.879,平均 0.678,与国内使用 RAPD 技术对榛属植物种质资源的研究取得的结果较为接近^[21],可见作为种间杂交后代,平欧杂种榛品种(系)的遗传背景较为复杂,

多样性较高。其中平欧 18 号和平欧 617 号之间的遗传系数最大(0.879),表明这 2 个品种(系)之间的亲缘关系较近;而平欧 21 号和辽榛 3 号之间的遗传系数最小(0.448),表明这 2 个品种(系)之间的亲缘关系较远。

对供试样品得到的数据矩阵进行聚类分析

(图2),本研究选用的7条ISSR引物所获得的58条谱带,可将所有供试样品完全分开。当阈值为0.687时可将17个品种(系)分成3个类群,第Ⅰ类群含有14个品种(系),第Ⅱ类群含有1个品种(魁香),第Ⅲ类群含有2个品系(平欧21号和平欧376号);当阈值为0.723时第Ⅰ类群可进一步分成4个亚类,即辽榛3号、达维和平欧402号为1个亚类;平欧28号、平欧33号和平欧586号为1个亚类;平欧3号、平欧62号、平欧18号、平欧617号和平欧11号为1个亚类;平欧48号、平欧162号和平欧88号为1个亚类。本研究采用ISSR方法对平欧杂种榛主栽品种的聚类分析仅仅是从遗传角度进行的,在对其植物学性状、坚果特性以及适应性等方面的比较中发现,与本研究的结果并不完全一致,如辽榛3号、达维和平欧402号为1个亚类,三者的坚果果型较为相近,果仁均为光洁、风味上佳,但辽榛3号坚果为黄色,达维和平欧402号坚果为红褐色,平欧402号树姿开张,辽榛3号和达维树姿直立,并且二者的抗寒性均强于平欧402号^[1],上述结果可能与其复杂的亲本来源有关。

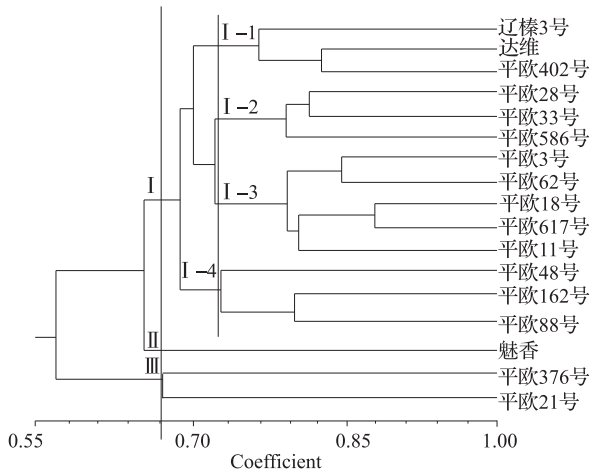


图2 17个平欧杂种榛主栽品种(系)的聚类分析图

Fig.2 Dendrogram of UPGMA cluster analysis the 17 main cultivars/varieties of Ping'ou hybrid hazelnut

2.2.2 遗传多样性分析 遗传多样性的度量指标是进行平欧杂种榛主栽品种(系)间遗传背景评估的重要参数^[22],根据数据矩阵,计算得到不同ISSR引物的遗传多样性指标(表3)。7条引物检测到样品有效等位基因数的范围为1.0000~1.8471,平均为1.6751;基因多样性为0~0.4541,平均为0.3701;Shannon信息指数为0~0.6454,平均为0.5308,均以引物ISSR25数值最高(其扩增谱带数以及多态性比例均为最高)。

目前,榛属植物尚无遗传多样性度量指标的报道,与同类研究的其他树种相比,平欧杂种榛主栽品种(系)间的遗传多样性处于中等较高水平^[11,14,16,23],这与该群体是多亲本组合的混合后代密切相关。

表3 样品遗传多样性的度量指标

Table 3 Estimates of genetic diversity among the samples

编号 Code	有效等位基因数 <i>N_e</i>	基因多样性 <i>H</i>	Shannon 信息指数 <i>I</i>
1	1.5802 ± 0.3169	0.3383 ± 0.1665	0.4988 ± 0.2307
2	1.7158 ± 0.3634	0.3839 ± 0.1901	0.5442 ± 0.2681
3	1.7346 ± 0.3182	0.3987 ± 0.1534	0.5701 ± 0.2112
4	1.6116 ± 0.4095	0.3330 ± 0.2118	0.4761 ± 0.2988
5	1.7427 ± 0.3113	0.4025 ± 0.1512	0.5744 ± 0.2094
6	1.4939 ± 0.4096	0.2803 ± 0.2224	0.4068 ± 0.3192
7	1.8471 ± 0.1716	0.4541 ± 0.0546	0.6454 ± 0.0575
平均 Average	1.6751 ± 0.3286	0.3701 ± 0.1643	0.5308 ± 0.2278

表中数值为平均值 ± 标准差

Data in the table indicates the average value ± the standard deviation

3 讨论

运用ISSR分子标记对微卫星之间的DNA序列进行扩增,扩增区域内微卫星DNA序列的插入或缺失,重复单元数变异等都将导致扩增产物的存在、缺失或长度的多态性^[4],该技术利用了RAPD技术的优点和基因组中丰富的SSR序列信息,具有比RAPD更强的稳定性,多态性产物也更为丰富。国外已应用ISSR标记进行了榛属植物的遗传多样性研究(主要是欧洲榛)^[24-26],但尚无平欧杂种榛主栽品种(系)的遗传关系研究报道。本研究使用ISSR的方法,分析平欧杂种榛主栽品种(系)的遗传关系,从60条ISSR引物中筛选出7条多态性高、稳定性强的引物,平均每条引物产生8.3条谱带,平均多态性比率84.6%,谱带数和多态性与其他植物的ISSR结果相比处于较高水平^[5,8,10,18-20];7条ISSR引物能将所有样品全部分开,说明引物的分辨率较高。

有效等位基因数(*N_e*)、基因多样性(*H*)和Shannon信息指数(*I*)是评价群体遗传多样性水平的重要参数^[22],本研究得到的平欧杂种榛主栽品种(系)的遗传多样性参数为*N_e* = 1.6751, *H* = 0.3701, *I* = 0.5308,与其他树种使用ISSR标记得到的遗传多样性参数相比较,如核桃(*N_e* = 1.5207, *H* =

0.3125, $I=0.4759$)^[14]、丽穗凤梨($Ne=1.5311$, $H=0.3101$, $I=0.4668$)^[16]、大叶种茶树($H=0.3797$, $I=0.5586$)^[11]、蒙古扁桃($H=0.3241$, $I=0.4875$)^[23]等,平欧杂种榛主栽品种(系)的遗传多样性处于中等较高水平。本研究对平欧杂种榛主栽品种(系)遗传相似性系数的结果显示,样品相似系数为0.448~0.879,与使用 RAPD 技术对平榛、欧洲榛、平欧杂种榛以及我国其他榛属植物遗传多样性的研究中取得的结果(0.46~0.88)较为接近^[21],说明平欧杂种榛主栽品种(系)的遗传背景和亲缘关系复杂程度均较高。研究表明,与世界其他榛属植物相比,平榛(*C. heterophylla* Fisch.)和欧洲榛(*C. avellana* L.)的遗传距离相对较近^[27],平欧杂种榛作为种间杂交后代,杂交时产生了大量的重组变异,从而导致了其变异程度接近种间变异的水平;另外,在当年杂交时选择了6个优良平榛单株为母本^[3],而近期的研究表明,平榛居群间和居群内存在不同程度的遗传变异^[28],杂交时给这些平榛授以10个欧洲榛优良品种的混合花粉^[3],进一步增加了杂交后代遗传背景的复杂程度。

本研究选用的17个品种(系)是目前引种栽培非常广泛的品种,在生产上极具代表性;在此基础上,目前国内各研究单位正在开展以加工型、高抗寒型、无萌蘖型等性状为主要目标的第2代平欧杂种榛的选育工作,今后将陆续推出新的品种,也将会使平欧杂种榛群体的复杂程度日益加深,因此,急需构建完善的平欧杂种榛指纹图谱和快速检测技术,为生产和育种服务。另外,构建明确父母本的平欧杂种榛的遗传图谱,研究后代的性状分离规律、进行重要性状的 QTL 定位,对于分子标记辅助育种和榛属植物特异性状基因挖掘均具有重要意义。

参考文献

- [1] 张宇和,柳懿,梁维坚,等.中国果树志:板栗榛子卷[M].北京:中国林业出版社,2005:193-263
- [2] 马庆华,王贵禧,梁维坚,等.我国榛属植物种质资源的研究、利用与创新[J].果树学报,2013(1):159-164
- [3] 梁维坚,许万英.欧洲榛子与平榛种间杂交种后代某些遗传倾向的分析[C]//中国园艺学会.中国园艺学会成立六十周年纪念暨第六届年会论文集(I果树).北京:万国学术出版社,1989:254-257
- [4] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. Genomics, 1994, 20:176-183
- [5] Monte-Corvo L, Goulão L, Oliveira C. ISSR analysis of cultivars of pear and suitability of molecular markers for clone discrimination [J]. J Am Soc Hortic Sci, 2001, 126(5):517-522
- [6] Potter D, Gao F Y, Aiello G, et al. Intersimple sequence repeat markers for fingerprinting and determining genetic relationships of Walnut (*Juglans regia*) cultivars [J]. J Am Soc Hortic Sci, 2002, 127(1):75-81
- [7] Xiao L Q, Ge X J, Gong X, et al. ISSR variation in the endemic and endangered plant *Cycas guizhouensis* (Cycadaceae) [J]. Ann Bot, 2004, 94:133-138
- [8] Balasaravanan T, Chezian P, Kamalakannan R, et al. Determination of inter- and intra-species genetic relationships among six *Eucalyptus* species based on inter-simple sequence repeats (ISSR) [J]. Tree Physiol, 2005, 25:1295-1302
- [9] Pharmawati M, Yan G J, Finnegan P M. Molecular variation and fingerprinting of *Leucadendron* cultivars (Proteaceae) by ISSR markers [J]. Ann Bot, 2005, 95:1163-1170
- [10] Zhao K G, Zhou M Q, Chen L Q, et al. Genetic diversity and discrimination of *Chimonanthus praecox* (L.) link germplasm using ISSR and RAPD markers [J]. HortScience, 2007, 42:1144-1148
- [11] 刘本英,王丽鸳,周健,等.云南大叶种茶树种质资源 ISSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[J].植物遗传资源学报, 2008, 9(4):458-464
- [12] 孙芳,杨敏生,张军,等.刺槐不同居群遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物资源遗传学报, 2009, 10(1):91-96
- [13] 黄文霞,何仪,何觉民,等.高效能源植物绿玉树种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报, 2010, 11(4):487-490
- [14] 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
- [15] 魏玉杰,张金文,何庆祥,等.不同生态区罂粟种质的遗传多样性 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报, 2012, 13(2):239-243
- [16] 葛亚英,张飞,沈晓岚,等.丽穗凤梨 ISSR 遗传多样性分析与指纹图谱构建[J].中国农业科学, 2012, 45(4):726-733
- [17] 陈新.榛子花芽转录组文库的 Solexa 测序及冷调节基因的表达谱分析[D].北京:中国林业科学研究院, 2011
- [18] 高山,许端祥,林碧英,等.38份瓢瓜种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报, 2007, 8(4):396-400
- [19] 黄洁,甘学德,苏明,等.紫、红黄肉甘薯种质遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报, 2011, 12(4):646-650
- [20] 李志勇,李鸿雁,石凤翎,等.中国扁扁豆遗传多样性的 ISSR 分析[J].植物遗传资源学报, 2012, 13(1):48-51, 56
- [21] 冯斌,张希踔,解明,等.榛子种质资源遗传多样性的 RAPD 分析[J].辽宁师范大学学报, 2007, 30(2):216-219
- [22] Yeh F, Yang R C, Boyle T. POPGENE 1.32: A Microsoft windows based freeware for population genetic analysis [M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta, 2000
- [23] 张杰,王佳,李浩宇,等.濒危植物蒙古扁桃不同地理种群遗传多样性的 ISSR 分析[J].生态学报, 2012, 32(14):4443-4452
- [24] Martins S, Silva A P, Santos A A, et al. Diversity in hazelnut using RAPD and ISSR markers [C] //Proceedings of the VIIth international congress on hazelnut. Viterbo: ISHS, 2009:145-150
- [25] Gürçan K, Mehlenbacher S A, Cristofori V. Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers in hazelnut [C] //Proceedings of the VIIth international congress on hazelnut. Viterbo: ISHS, 2009:159-162
- [26] Ferreira J J, García C, Tous J, et al. Structure and genetic diversity of local hazelnut collected in Asturias (Northern Spain) revealed by ISSR markers [C] //Proceedings of the VIIth international congress on hazelnut. Viterbo: ISHS, 2009:163-168
- [27] Erdogan V, Mehlenbacher S A. Phylogenetic relationship of *Corylus* species (Betulaceae) based on nuclear ribosomal DNA ITS region and chloroplast *matK* gene sequences [J]. Syst Bot, 2000, 25(4):727-737
- [28] 王艳梅.利用 SSR 研究榛属种间亲缘关系及平榛居群遗传多样性[D].北京:北京林业大学, 2008