

文章编号:1001—7380(2022)01—0001—07

基于 AFLP 标记的薄壳山核桃种 质资源遗传多样性分析

梁 燕¹, 韩传明^{1*}, 孙 超¹, 王翠香¹, 闵旭峰², 王 静¹, 王清海¹

(1. 山东省林业科学研究院, 山东 济南 250014; 2. 枣庄市山亭区自然资源局, 山东 枣庄 277500)

摘要:利用荧光 AFLP 分子标记技术,对引种到山东地区的 30 份薄壳山核桃品种(系)的遗传多样性和亲缘关系进行分析,旨在加深山东地区引进的薄壳山核桃品种资源遗传背景的认识,为以后山东地区薄壳山核桃的品种选育在分子层面提供理论基础。总体上,9 对引物组合共扩增出 1 425 个条带,多态性条带 1 381 个,平均多态性比例为 96.9%,其中有 4 个引物组合的多态性比率达到 100%。30 个薄壳山核桃品种(系)利用 9 对引物组合所检测到的不同位点的等位基因数范围在 1.652 8—1.888 9 之间,平均为 1.710 3;有效等位基因数范围在 1.182 1—1.306 8 之间,平均为 1.240 3;基因多样性范围在 0.120 1—0.190 9 之间,平均为 0.152 2;Shannon 信息指数范围在 0.200 0—0.304 8 之间,平均为 0.245 5。30 个供试样品遗传相似系数范围为 0.746 4—0.885 3,变异范围为小(0.138 9),表明 30 个品种遗传背景宽度较窄。在遗传相似系数 0.796 处,30 个薄壳山核桃品种分为 3 个组,小糙皮系列聚为一类,与其他品种遗传相似系数整体较小,是很好的亲本,值得更深一步研究与利用。

关键词:AFLP 分子标记;薄壳山核桃;遗传多样性;遗传相似系数;山东

中图分类号:Q755;S664.1;S792.13 **文献标志码:**A **doi:**10.3969/j.issn.1001-7380.2022.01.001

Genetic diversity analysis of pecan germplasm resources based on AFLP markers

Liang Yan¹, Han Chuanming^{1*}, Sun Chao¹, Wang Cuixiang¹, Min Xufeng², Wang Jing¹, Wang Qinghai¹

(1. Shandong Academy of Forestry, Jinan 250014, China;

2. Zaozhuang Shanting District Natural Resources Bureau, Zaozhuang 277500, China)

Abstract:To understand the genetic background of pecan varieties and provide basis for breeding at molecular level, the genetic diversity and genetic relationship of 30 pecan varieties (or lines) introduced to Shandong region, were analyzed by using the fluorescent markers and molecular technology. In total, 1 425 bands and 1 381 polymorphic bands (a ratio of 96.9%) were amplified from 9 primers pairs, among which the polymorphism ratio of 4 primer combinations reached 100%. The number of alleles of different loci detected by primers ranged from 1.652 8—1.888 9, with an average of 1.710 3. The number of effective alleles from 1.182 1 to 1.306 8, with an average of 1.240 3. Gene diversity from 0.120 1 to 0.190 9, with an average of 0.152 2. Shannon index from 0.200 0 to 0.304 8, with an average of 0.245 5. The genetic similarity coefficient of the 30 samples from 0.746 4 to 0.885 3, with variation of 0.138 9, indicating that the width of the genetic background of the 30 varieties was relatively narrow. At genetic similarity coefficient of 0.796, 30 pecan varieties were divided into 3 groups. In general, the small roughly series were clustered into one as their smaller genetic similarity co-

收稿日期:2021-11-17;修回日期:2021-12-20

基金项目:国家林业和草原局华东核桃工程技术研究中心;山东省重点研发计划项目“核桃分子辅助杂交育种及抗病优质新品种选育”(2020LZGC0901);山东省泰山产业领军人才工程高效生态农业创新类项目“果材兼用核桃新种质创制及培育关键技术与产业化”(LJNY201805);核桃产业国家创新联盟(NAWI)

作者简介:梁 燕(1985—),女,山东滕州人,工程师,硕士。主要研究方向:经济林育种与栽培。E-mail:272655020@qq.com

* **通信作者:**韩传明(1963—),男,山东莱芜人,研究员,大学本科毕业。主要从事经济林遗传育种与栽培技术研究。E-mail:hanchuanming63@163.com

efficient than that of other varieties. As good parents, they were undoubtedly worthy of further study and utilization.

Key words: AFLP; Pecan; Genetic diversity; Genetic similarity; Shandong

薄壳山核桃 (*Carya illinoensis* K. Koch), 属胡桃科山核桃属, 又名美国山核桃、长山核桃、碧根果和长寿果等, 英文名 pecan^[1], 是优良的经济林树种, 在用材和林果方面表现优异。2017 年, 美国出口的薄壳山核桃价值达到 3 亿美元, 其中有 76.37% 销往中国。薄壳山核桃有比较广泛的栽培分布范围, 适宜于大陆性气候带的地区进行引种栽培, 纬度 25—35° 范围里的地区生长结实情况最佳^[2]。据文献记载, 江西于 1890 年开始引种, 是我国最早引种该树种的省份之一, 后在江苏的江阴、南京、浙江杭州和福建莆田等地栽植^[3]。薄壳山核桃雌雄同株异花, 雌雄异熟, 风媒传粉, 多属于异树异花授粉, 因此, 薄壳山核桃是高度杂合的多年生植物, 优良单株种质资源的收集和分子标记意义重大。

同其他多年生木本植物相比, 目前薄壳山核桃的分子标记研究报道主要有 Grauke 等筛选出 19 对 SSR 引物用于 48 个薄壳山核桃品种的鉴定^[4], 焦思宇等利用 ISSR 技术分析了阜阳林科站引进的 33 个薄壳山核桃品种的遗传多样性^[5], 张日清等进行了美国山核桃群体遗传多样性的 RAPD 分析^[6]。AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) 分子标记技术具有带型丰富、可靠性强、可重复性高、灵敏度高等特点, 在番石榴^[7]、鳄梨^[8]、滇山茶^[9]、楸树^[10]、银杏^[11]等木本植物遗传多样性分析和遗传结构研究中已成熟应用。为了明确山东地区引进的薄壳山核桃种质遗传多样性和亲缘关系, 本研究以山东省林业科学研究院引种的 30 个优良薄壳山核桃品种 (系) 为对象, 利用 AFLP 分析标记技术, 准确了解和评价种质资源的遗传背景、遗传结构、品种间的遗传距离, 建立 DNA 指纹图谱, 为进一步开展薄壳山核桃的新品种选育、品种鉴定和种质资源保护提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

30 份供试材料采自山东省林业科学研究院济南市莱芜区、泰安市岱岳区、聊城市冠县薄壳山核桃种质资源圃, 具体来源见表 1。于 2020 年 4 月分别采集各品种 (系) 树冠外围新梢嫩叶作为试验材料, 用酒精洗净后晾干放入硅胶干燥剂中保存, 带

回实验室备用。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取与检测 取干燥好的叶片材料 0.3 g, 液氮冷冻后研磨成干粉, DNA 采取改良的 CATB 法提取^[12]。配制 0.8% 的琼脂糖凝胶, 电压 180 V 电泳时间 40 min, 在凝胶图像分析系统下进行 DNA 检测。

1.2.2 AFLP 体系的建立 从 64 对引物组合中筛选出 9 对 (见表 2) EcoR I/Mse I 引物用于本次研究。

试验条件: 对供试样品采用 EcoR I/Mse I 双酶切, 酶切和连接、预扩增、选择性扩增参考王东升^[13]紫椴和野核桃 AFLP 遗传多样性研究中的反应体系。

表 1 供试薄壳山核桃品种 (系) 及其来源

编号	品种/品系	取样地点	编号	品种/品系	取样地点
1	3 号	冠县	16	‘卡多’ ‘Caddo’	冠县
2	9 号	冠县	17	YXG	冠县
3	11 号	莱芜	18	安农 3 号	泰安
4	28 号	莱芜	19	安农 5 号	泰安
5	30 号	莱芜	20	‘肖肖尼’ ‘Shoshoni’	莱芜
6	42 号	莱芜	21	‘贝克’ ‘Baker’	莱芜
7	64 号	莱芜	22	‘马罕’ ‘Mahan’	冠县
8	YL	泰安	23	‘金华’ ‘Jinhua’	冠县
9	‘小糙皮 2’ ‘Xiaocaopi 2’	冠县	24	‘星寒巨’	泰安
10	‘绍兴’ ‘Shaoxing’	冠县	25	‘斯图尔特’ ‘Stuart’	冠县
11	‘威奇塔’ ‘Wichita’	莱芜	26	‘钟山’ ‘Zhongshan’	莱芜
12	‘特贾斯’ ‘Tejas’	莱芜	27	‘云光’ ‘Yunguang’	莱芜
13	‘小糙皮 1’ ‘Xiaocaopi 1’	冠县	28	‘莎贝’	泰安
14	‘莫汉克’ ‘Mohawk’	莱芜	29	‘普兹内’ ‘Pyzner’	莱芜
15	‘威斯顿’ ‘Western’	冠县	30	‘波尼’ ‘Pawnee’	冠县

1.2.3 电泳分析 选扩产物的检测 (采用 ABI PRISM 377 sequencer)。预电泳 20—30 min、点样、电泳 2.5 h (电压 1 200 V)。ABI 377 测序仪进行 AFLP 多态性分析。

1.2.4 数据分析 用 GENESCAN3.1 软件打开胶图, 对胶图进行数据提取, 设置参数计算多态性比率 PPBs, 并在假定哈迪-温伯格平衡的前提下计算其有效等位基因 (N_e)、基因多样性 (H) 和 Shannon 信息指数 (I)。通过 Binthere 软件提取样品的各片段大小的结果, EXCEL 转换将表内的数值不为 0 转换为 1 (数值为 0 的不转换), 从而生成由“1”和“0”组成的原始矩阵, 用 NTSYSpc-2.11F 软件进行数据

分析。对原始矩阵用 SimQual 程序求 DICE 相似系数矩阵,并获得相似系数矩阵。用 SHAN 程序中的 UPGMA 方法进行聚类分析,并通过 Tree plot 模块生成聚类图,用 EIGEN 模块进行基于 Jaccard 遗传相似系数的主坐标分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增多态性分析

利用筛选出的 9 对 EcoR I/Mse I 引物组合(见表 2)对 30 个薄壳山核桃基因组 DNA 进行

AFLP 扩增多态性分析(如图 1),扩增获得的条带清晰、位置一致性良好。总体上,9 对引物组合共扩增出 1 425 个条带,多态性条带 1 381 个,其中有 4 个引物组合的多态性比率达到 100%。E-ACG/M-CAA 扩增条带最多,为 192 个,多态性比率亦为 100%,效果最好,E-ACC/M-CAC 扩增条带数 188,多态性条带数为 157,比率为 83. 51%,虽然比例较低,但数量较多。9 对引物组合整体平均条带数为 158. 3,平均多态性比例为 96. 9%,多态性较好,满足试验需要。

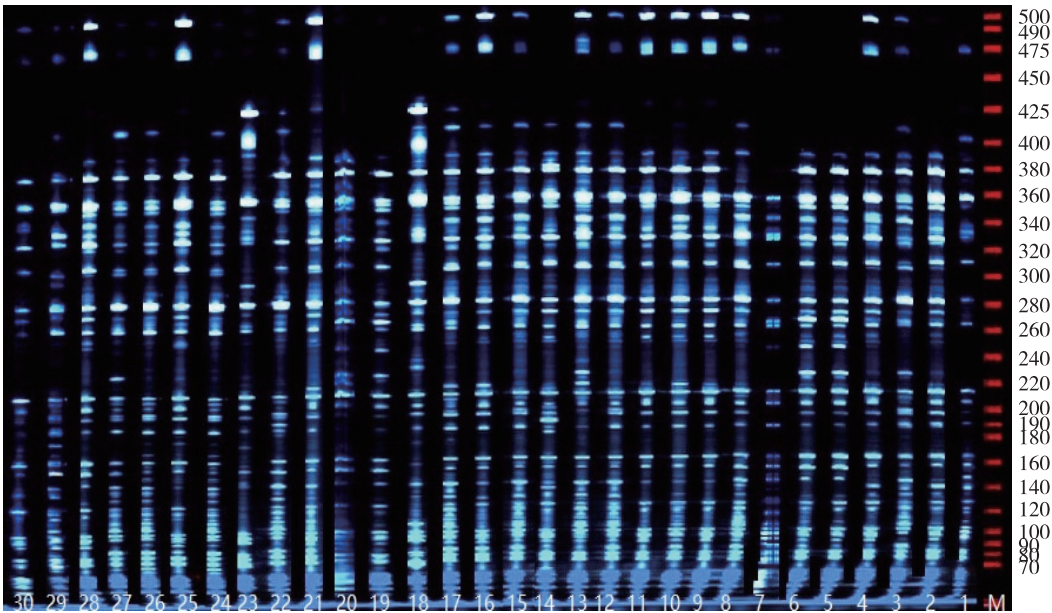


图 1 30 个薄壳山核桃品种(系)的荧光 AFLP 电泳图谱(引物组合 E-ACG/M-CAA)

2.2 遗传多样性分析

基于等位基因频率计算有效等位基因数(N_e)、基因多样性(H)及 Shannon 信息指数(I)是进行遗传多样性水平评估的重要方式^[14]。如表 3 所示,30 个薄壳山核桃品种(系)利用 9 对引物组合所检测到的不同位点的观测等位基因数(N_a)为 1. 652 8—1. 888 9,平均 1. 710 3;有效等位基因数范围 1. 182 1—1. 306 8,平均 1. 240 3;基因多样性范围 0. 120 1—0. 190 9,平均 0. 152 2;Shannon 信息指数范围 0. 200 0—0. 304 8,平均 0. 245 5。9 个引物组合中,E-ACG/M-CAA 与 E-ACA/M-CTT 结果最好,同时 2 个引物组合多态性均为 100%。

表 2 AFLP 分析引物组合及其选择性扩增结果

序号	引物组合	条带总数	多态性条带数	多态性条带百分率/%
1	E-AAG/M-CAC	154	153	99. 35
2	E-ACA/M-CAG	147	141	95. 92
3	E-ACA/M-CTG	144	142	98. 61
4	E-ACA/M-CTT	159	159	100
5	E-ACC/M-CAC	188	157	83. 51
6	E-ACC/M-CAG	145	145	100
7	E-ACG/M-CAA	192	192	100
8	E-ACG/M-CAG	142	142	100
9	E-AGC/M-CTC	154	150	97. 40
平均值	158. 3	153. 4	96. 90	

注:选择性引物核心序列:E 为 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3',M 为 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AC,每条引物的 3'端包含 3 个选择性碱基。

表 3 30 个薄壳山核桃品种(系)遗传多样性指标

引物组合	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	<i>I</i>
E-AAG/M-CAC	1.708 3(0.455 6)	1.265 1(0.339 6)	0.162 0(0.180 3)	0.256 3(0.252 6)
E-ACA/M-CAG	1.652 8(0.477 2)	1.186 7(0.254 5)	0.125 9(0.149 0)	0.209 3(0.219 5)
E-ACA/M-CTG	1.657 4(0.475 7)	1.182 1(0.269 8)	0.120 1(0.151 5)	0.200 0(0.219 3)
E-ACA/M-CTT	1.736 1(0.441 8)	1.306 8(0.331 4)	0.190 9(0.176 5)	0.300 4(0.248 9)
E-ACC/M-CAC	1.726 9(0.446 6)	1.257 8(0.329 5)	0.160 0(0.174 9)	0.255 7(0.245 8)
E-ACC/M-CAG	1.671 3(0.470 8)	1.205 7(0.286 7)	0.133 2(0.160 2)	0.217 9(0.230 5)
E-ACG/M-CAA	1.888 9(0.315 0)	1.299 1(0.324 4)	0.189 0(0.168 8)	0.304 8(0.230 3)
E-ACG/M-CAG	1.657 4(0.475 7)	1.232 1(0.321 1)	0.144 1(0.172 8)	0.230 5(0.245 2)
E-AGC/M-CTC	1.694 4(0.461 7)	1.227 8(0.304 2)	0.145 2(0.165 9)	0.235 3(0.236 6)
平均值	1.710 3(0.446 7)	1.240 3(0.306 8)	0.152 2(0.166 6)	0.245 5(0.236 5)

注:*Na* 为观测等位基因数;*Ne* 为有效等位基因数;*H* 为 Nei's 遗传多样性指数;*I* 为 Shannon's 信息指数。

2.3 遗传相似系数与聚类分析

由表 4 可知,30 个供试样品遗传相似系数范围为 0.746 4—0.885 3,变异范围为 0.138 9。‘钟山’与‘Stuart’的相似系数为 0.885 3,说明 2 个品种遗传关系较近;‘小糙皮 1’与‘金华’遗传相似系数为 0.746 4,2 个品种遗传关系较远;‘小糙皮 2’与‘安农 3 号’遗传相似系数为 0.749 0。与其他品种间相比,小糙皮系列遗传相似系数整体较小。

基于遗传相似系数,对 30 个薄壳山核桃品种(系)聚类,见图 2。在遗传相似系数 0.796 处,30 个薄壳山核桃品种分为 3 个组,A 组中包含 17 个品种,其中有‘Stuart’‘Caddo’‘Shoshoni’‘Tejas’‘Mah-an’‘Pyzner’‘Wichita’‘Western’‘Baker’9 个美国品种,‘Stuart’‘Western’和‘Desirable’‘Wichita’是美国主栽品种的前 4 名^[15-16],聚类在一起,说明其遗传关系较近,具有丰产稳定的特点,3 号、9 号、28 号、YXG、64 号、YL 6 个优株,‘钟山’和‘云光’2 个品种与丰产稳定的美国薄壳山核桃聚在一起,需重点观察其结果丰产特点;B 组含有 11 个品种(系),‘Mohawk’‘San Saba Improved’‘Pawnee’‘Starking Hardy Giant’中‘Mohawk’‘Starking Hardy Giant’‘Pawnee’在美国均表现出坚果早熟的特点^[15-16],根据聚类结果看,‘金华’^[17]与‘Starking Hardy Giant’聚在一起,2 者遗传关系较近,‘绍兴’与‘Mohawk’这 2 者遗传关系较近,‘安农 3 号’与‘安农 5 号’聚在一起,‘安农 3 号’在安徽合肥表现出速生的特点^[18];其中‘小糙皮 1’和‘小糙皮 2’单独分为 C 组,与其他品种距离较远,‘小糙皮 1’与‘小糙皮 2’遗传相似系数为 0.807 1。小糙皮系列与其他品种遗传相似系数整体较小,是很好的亲本。目前,许多科技工作者正在从薄壳山核桃与小糙皮山核桃、

薄壳山核桃与大糙皮山核桃的二代杂种中,选择优良品种,在寒冷地区发展有价值的薄壳山核桃品种^[15]。

2.4 主坐标分析

基于 AFLP 分子标记的主坐标分析(如图 3),30 个薄壳山核桃发散均较好,分布较均匀。30 个薄壳山核桃被更直观地分成 3 组,分别包含 19,9,2 个品种(系)。分组结果和 UPGMA 聚类结果基本一致,稍有不同的是品种‘Pawnee’与‘Starking Hardy Giant’,在图 3 中可以看到 2 个品种在组的边缘,‘Pawnee’处在较为中间的位置,而‘Starking Hardy Giant’与‘Western’、‘Baker’距离较近。小糙皮系列与其他品种距离较远,与已得结果一致。

3 讨论

本研究中筛选的 9 对 AFLP 引物组合平均多态性比例为 96.9%,多态性较好,其中有 4 个引物组合的多态性比率达到 100%。E-ACG/M-CAA 扩增条带最多,为 192 个,多态性比率亦为 100%,效果最好。王东升等利用 AFLP 分子标记技术筛选的 8 对引物组合多态性比率为 97.2%^[19],和本研究中的结果差不多,100%引物组合为 1 对,远低于本研究中的 4 对,说明 9 对引物多态性较好。Hamrick 研究认为基于 AFLP 分析,多数多年生木本植物平均多态性位点比率为 65%,平均每个位点观测等位基因数(*Na*)为 2.2,平均每个位点的有效等位基因数(*Ne*)为 1.24^[20]。本研究中,30 个薄壳山核桃品种(系)利用 9 对引物组合所检测到的不同位点的观测等位基因数 1.710 3,有效等位基因数 1.240 3,基因多样性 0.152 2,Shannon 信息指数 0.245 5,30 个品种观测等位基因数(*Na*)略低于多年生木本植物

表 4 薄壳山核桃品种遗传相似系数

编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29
1	1.000 0																												
2	0.879 1	1.000 0																											
3	0.788 6	0.856 0	1.000 0																										
4	0.813 3	0.806 6	0.789 1	1.000 0																									
5	0.774 7	0.794 8	0.813 3	0.785 5	1.000 0																								
6	0.785 5	0.807 6	0.859 1	0.786 0	0.833 8	1.000 0																							
7	0.781 9	0.791 7	0.783 4	0.827 7	0.786 0	0.792 7	1.000 0																						
8	0.799 4	0.813 3	0.785 5	0.819 4	0.790 1	0.816 4	0.848 8	1.000 0																					
9	0.776 2	0.781 9	0.767 5	0.782 9	0.767 0	0.778 8	0.779 3	0.843 1	1.000 0																				
10	0.776 7	0.775 2	0.787 6	0.755 7	0.804 5	0.808 1	0.765 4	0.798 4	0.782 4	1.000 0																			
11	0.802 5	0.810 2	0.803 0	0.840 0	0.808 6	0.815 3	0.826 1	0.841 6	0.789 6	0.809 7	1.000 0																		
12	0.796 3	0.797 8	0.772 1	0.833 8	0.784 0	0.776 2	0.811 7	0.815 8	0.778 3	0.763 4	0.840 5	1.000 0																	
13	0.766 5	0.773 1	0.767 0	0.769 0	0.759 3	0.762 9	0.767 5	0.795 3	0.807 1	0.768 5	0.780 9	0.775 7	1.000 0																
14	0.782 9	0.786 5	0.803 0	0.779 3	0.818 9	0.817 4	0.770 6	0.792 2	0.781 4	0.854 9	0.813 8	0.772 6	0.776 7	1.000 0															
15	0.805 0	0.803 5	0.787 0	0.849 8	0.805 0	0.802 5	0.822 5	0.804 0	0.778 8	0.782 4	0.841 0	0.828 7	0.764 9	0.812 2	1.000 0														
16	0.813 3	0.807 6	0.807 6	0.834 4	0.808 1	0.800 4	0.809 2	0.815 3	0.797 3	0.796 8	0.849 3	0.832 8	0.805 0	0.821 5	0.863 2	1.000 0													
17	0.816 9	0.814 3	0.791 7	0.838 0	0.798 4	0.791 7	0.810 7	0.812 8	0.789 6	0.775 7	0.816 9	0.843 6	0.792 2	0.793 2	0.838 0	0.877 1	1.000 0												
18	0.769 0	0.779 8	0.789 1	0.782 9	0.791 7	0.805 6	0.782 4	0.780 3	0.749 0	0.809 2	0.815 3	0.775 2	0.753 6	0.827 7	0.815 8	0.810 7	0.792 7	1.000 0											
19	0.787 0	0.799 9	0.805 0	0.799 9	0.812 8	0.820 5	0.784 0	0.792 2	0.764 9	0.818 9	0.826 1	0.791 2	0.758 2	0.841 6	0.829 7	0.816 4	0.801 4	0.855 5	1.000 0										
20	0.809 7	0.798 9	0.788 6	0.807 1	0.784 0	0.787 6	0.797 3	0.817 9	0.781 4	0.782 9	0.841 6	0.830 2	0.795 3	0.798 4	0.817 4	0.838 0	0.830 2	0.784 5	0.807 6	1.000 0									
21	0.800 4	0.789 6	0.797 8	0.825 6	0.788 1	0.805 0	0.825 1	0.812 8	0.762 9	0.794 2	0.858 0	0.818 9	0.766 5	0.814 8	0.829 7	0.836 9	0.806 6	0.813 3	0.829 2	0.834 4	1.000 0								
22	0.808 1	0.803 5	0.794 2	0.813 8	0.789 6	0.790 1	0.830 8	0.820 5	0.787 0	0.784 5	0.842 1	0.824 6	0.784 5	0.792 7	0.817 9	0.834 4	0.841 0	0.781 9	0.795 8	0.862 7	0.843 1	1.000 0							
23	0.786 5	0.794 2	0.789 1	0.798 4	0.784 5	0.792 2	0.770 1	0.780 3	0.759 3	0.795 8	0.806 1	0.779 3	0.746 4	0.818 4	0.821 0	0.801 4	0.802 0	0.814 8	0.844 1	0.786 5	0.808 1	0.787 0	1.000 0						
24	0.791 7	0.799 4	0.781 9	0.824 1	0.780 3	0.787 0	0.799 9	0.792 7	0.768 5	0.786 5	0.825 6	0.828 7	0.758 7	0.805 0	0.833 3	0.827 2	0.826 6	0.822 0	0.834 9	0.799 9	0.821 5	0.807 6	0.848 8	1.000 0					
25	0.819 4	0.813 8	0.779 8	0.863 2	0.788 6	0.797 3	0.833 8	0.827 7	0.793 2	0.775 2	0.836 9	0.855 5	0.774 2	0.791 7	0.848 8	0.846 7	0.859 6	0.796 3	0.802 0	0.816 4	0.811 2	0.829 2	0.788 1	0.862 1	1.000 0				
26	0.811 7	0.803 0	0.777 3	0.840 0	0.785 0	0.777 3	0.825 1	0.813 8	0.778 3	0.781 9	0.820 0	0.849 8	0.777 8	0.792 2	0.828 7	0.835 9	0.840 5	0.785 5	0.795 3	0.812 8	0.810 7	0.835 9	0.786 5	0.840 0	0.885 3	1.000 0			
27	0.853 9	0.816 4	0.778 3	0.833 8	0.778 8	0.784 5	0.795 3	0.797 3	0.776 2	0.777 8	0.828 2	0.822 0	0.774 7	0.788 1	0.810 2	0.830 8	0.821 0	0.768 0	0.793 2	0.835 4	0.830 2	0.825 6	0.785 5	0.799 9	0.829 7	0.838 5	1.000 0		
28	0.795 3	0.810 2	0.808 1	0.776 2	0.810 7	0.830 8	0.769 5	0.792 2	0.763 9	0.829 2	0.815 8	0.785 0	0.755 1	0.840 5	0.793 7	0.800 9	0.786 0	0.823 6	0.843 6	0.794 2	0.818 9	0.786 5	0.811 2	0.807 1	0.793 7	0.786 0	0.798 4	1.000 0	
29	0.814 8	0.815 3	0.781 4	0.845 2	0.789 1	0.784 5	0.811 7	0.797 3	0.775 2	0.751 0	0.824 1	0.832 3	0.763 4	0.761 3	0.832 8	0.837 8	0.830 2	0.773 1	0.798 4	0.807 6	0.817 9	0.817 4	0.788 6	0.834 9	0.850 3	0.829 2	0.849 8	0.787 0	1.000 0
30	0.830 2	0.841 0	0.818 4	0.817 4	0.815 8	0.827 7	0.799 4	0.836 4	0.799 9	0.803 5	0.844 7	0.817 9	0.791 2	0.815 8	0.814 3	0.849 3	0.827 2	0.802 0	0.833 3	0.826 1	0.828 2	0.820 5	0.818 4	0.815 3	0.828 7	0.822 0	0.831 3	0.851 9	0.837 4

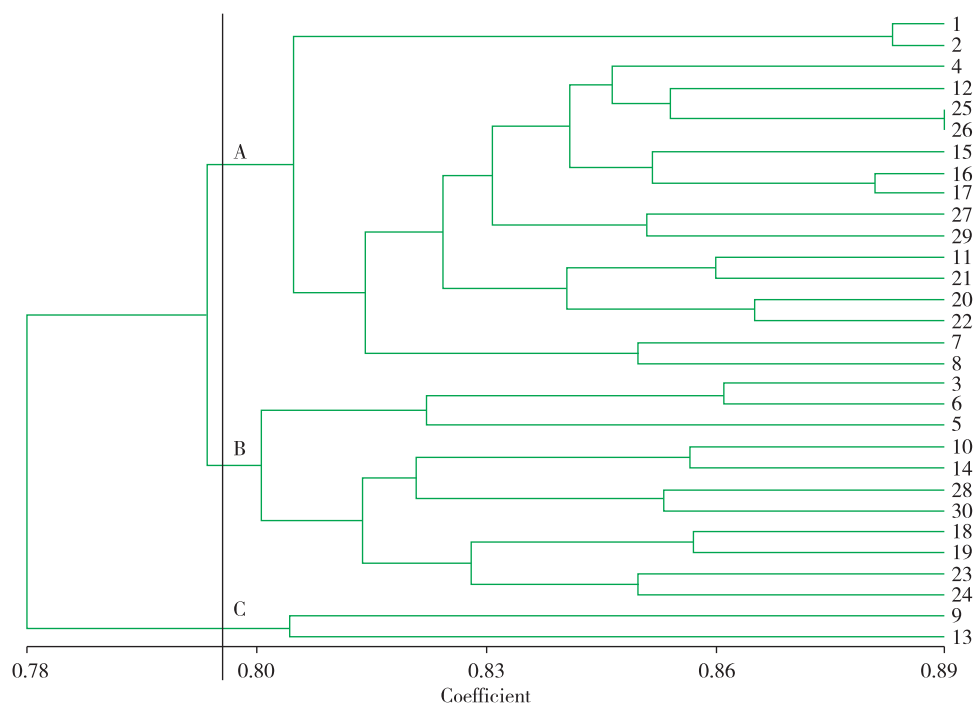


图 2 基于 AFLP 分析的 30 个薄壳山核桃品种(系)UPGMA 聚类图

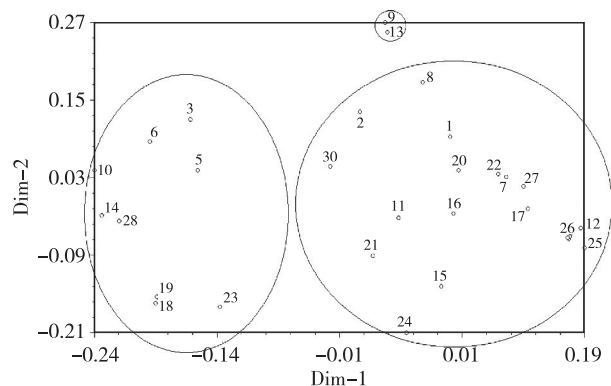


图 3 基于 AFLP 分子标记的 30 个薄壳山核桃品种(系)二维主坐标分析图

平均值, N_e 和多年生木本植物平均值相近,说明 30 个薄壳山核桃的遗传丰富度中等,结果可信。有效等位基因数 (N_e) 其数值越接近观测等位基因数 (N_a),表明等位基因在群体中分布越均匀,遗传多样性越好^[21]。研究中 N_e 与 N_a 数值接近,说明有效等位基因分布较为均匀,但整体数值较小。30 个品种标记结果高于何建等对 30 个新疆核桃品种利用 AFLP 分子标记结果 ($N_e=1.2085$, $H=0.1297$, $I=0.2066$)^[22]。与其他树种相比,低于马庆国等^[23]对 75 个金丝楸 AFLP 分子标记结果 ($N_e=1.36$, $H=0.28$, $I=0.43$)。

薄壳山核桃属于多年生的木本植物,大部分品种雌雄异熟,异树异花授粉。30 个供试样品遗传相似系数范围为 0.746 4—0.885 3,变幅较小,说明样品间亲缘关系较近,遗传距离普遍较小。焦思宇等对 33 份薄壳山核桃 ISSR 分析结果中遗传相似系数变幅为 0.17^[5],与本研究结果相差不大。李晖等以 161 个美国山核桃品种及株系、1 个核桃品种和 1 个山核桃品种为试材,品种间相似系数范围为 0.29—0.94^[24],变幅显著较高,可能与样本中有核桃和山核桃有关。30 个薄壳山核桃对于种质资源来说样本量相对较小,为了达到既定的育种目标,需扩大引种资源范围,进一步调整资源结构。在以后的研究中,宜扩大样品范围,采用高通量技术方法等更深入探讨表型和分子标记的对应联系,为育种提供更加精确的理论基础。

通过 NTSYSpc-2.11F 软件进行的 UPGMA 聚类分析和 PCA 主坐标分析结果表明,以小糙皮系列品种为亲本与其他薄壳山核桃品种杂交,更易获得有利变异,可结合 ‘Stuart’ ‘Western’ ‘Wichita’ 品种的丰产稳定特点,和 ‘Mohawk’ ‘Starking Hardy Giant’ ‘Pawnee’ 坚果早熟的特点,‘安农 3 号’ 速生的特点,培育出适合山东省栽培的优良品种。主坐标分析从不同的方向和层面,提供薄壳山核桃各种质之间和群组之间的关系;在排序图上品种的位置越

近,它们的遗传组成越相似^[25],分析结果可以为育种和种质资源保护提供参考,可以更直观地表现出品种间遗传结构特点。

4 结论

以 AFLP 分子标记对 30 个薄壳山核桃品种的遗传多样性分析,筛选出的 9 对引物组合可获得很好的多态性结果,是可信且准确的分子标记手段。30 个薄壳山核桃品种遗传多样性较好,但需进一步扩大引种资源范围、更合理安排引种结构,以获得更好的遗传变异宽度。

UPGMA 聚类分析和 PCA 主坐标分析结果表明,以小糙皮系列品种为亲本小糙皮系列品种为很好的杂交亲本选择,利用 UPGMA 聚类分析在不同的分组中选择杂交亲本,为优良品种的培育提供理论价值。

参考文献:

- [1] 张计育,李永荣,宣继萍,等.美国和中国薄壳山核桃产业发展现状分析[J].天津农业科学,2014,20(9):47-51.
- [2] 李 健.薄壳山核桃种质资源生物学特性研究及遗传多样性分析[D].杭州:浙江农林大学,2018.
- [3] 殷 巧.薄壳山核桃安农系列选优及繁育[D].合肥:安徽农业大学,2014.
- [4] GRAUKE L J, IQBAL M J, REDDY A S, et al. Developing Microsatellite DNA Markers in Pecan[J]. Journal of the American Society for Horticultural Science. 2003, 128 (3): 374-380.
- [5] 焦思宇,赵璐璐,刘晓倩,等.33 份薄壳山核桃品种种质资源的遗传多样性分析[J].阜阳师范学院学报(自然科学版),2019,36(2):36-39.
- [6] 张日清,何 方,吕芳德,等.美国山核桃群体遗传多样性的 RAPD 分析[J].经济林研究,2001(2):1-6.
- [7] 邵雪花,刘 牛,赖 多,等.基于 AFLP 分子标记对广东省番石榴种质资源多样性分析及指纹图谱构建[J].果树学报,2020,37(3):313-321.
- [8] 董美超,杨 帆,李进学,等.90 份鳄梨种质资源 AFLP 遗传多样性分析[J].福建农业学报,2020,35(1):13-19.
- [9] 甘沛华,沈德周,纵 丹,等.不同花型滇山茶遗传多样性与遗传关系的 AFLP 分析[J].植物生理学报,2019,55(8):1222-1230.
- [10] 李永涛,董玉峰,王振猛,等.楸树优良种质资源的 AFLP 遗传多样性分析[J].中南林业科技大学学报,2019,39(7):37-43.
- [11] 胡亚平,曹福亮,汪贵斌,等.基于 AFLP 遗传多样性和叶片内含物的银杏特异种质资源分析[J].分子植物育种,2020,18(2):466-472.
- [12] WANG H, PAN G, MA Q G, 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):804-806.
- [13] 王东升.山东省紫楸和野核桃 AFLP 遗传多样性研究[D].泰安:山东农业大学,2013.
- [14] 马庆国,王 滑,潘 刚,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.
- [15] 姚小华,常 君,王开良,等.中国薄壳山核桃[M].北京:科学出版社,2014:62-66.
- [16] 李永荣,张计育.两个薄壳山核桃新品种—斯图尔特、威奇塔[J].中国果业信息,2020,37(4):67.
- [17] 杨建华,习学良,董润泉,等.薄壳山核桃品种‘金华’的选育[J].中国南方果树,2018,47(1):149-150.
- [18] 何小艳.薄壳山核桃安农系列品种选育研究[D].合肥:安徽农业大学,2013.
- [19] 王东升,辛 红,邢世岩,等.基于 AFLP 标记的山东省 5 个野核桃群体的遗传多样性分析[J].植物资源与环境学报,2013,22(3):63-69.
- [20] HAMRICK J L. Factors influencing levels of genetic diversity in woody plant species[J]. New Forests, 1992, (6): 95-124.
- [21] 吕 锋.基于果实表型及 SSR 标记的麻栎遗传多样性[D].济南:山东师范大学,2021.
- [22] 何 健,马庆国,雪来提·牙生,等. FISH-AFLP 分析新疆核桃品种遗传多样性[J].林业科学研究,2013,26(6):730-735.
- [23] 马庆国,王治军,徐慧敏,等.金丝楸优良无性系遗传多样性和亲缘关系的 AFLP 分析[J].林业科学研究,2020,33(5):145-153.
- [24] 李 晖,张 瑞,彭方仁,等.美国山核桃种质资源遗传多样性 ISSR 分析[J].南京林业大学学报(自然科学版),2015,39(4):7-12.
- [25] 王 磊,解孝满,李文清,等.山东核桃主要分布区种质资源遗传多样性 AFLP 分析[J].西北林学院学报,2014,29(3):113-118,124.