

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.06.003

杨春生, 卢永彬, 林燕芳, 等. 广西毛竹种质资源 AFLP 分析[J]. 广西植物, 2014, 34(6): 742—746

Yang CS, Lu YB, Lin YF, et al. AFLP analysis of genetic relationships among *Phyllostachys edulis* germplasm resource in Guangxi[J]. *Guihaia*, 2014, 34(6): 742—746

广西毛竹种质资源 AFLP 分析

杨春生¹, 卢永彬², 林燕芳², 唐绍清², 周海平³, 李晓铁^{3*}

(1. 广西桂林市森林病虫害防治检疫站, 广西 桂林 541001; 2. 广西师范大学生命科学学院、珍稀濒危动植物生态与环境保护省部共建教育部重点实验室, 广西 桂林 541004; 3. 广西桂林市林业科学研究所, 广西 桂林 541004)

摘 要: 采用扩增片段长度多态性分子标记方法, 对收集于广西的 11 个种源 33 份毛竹种质进行了分析。结果表明: 5 对引物组合用于选择性扩增, 共得到 198 条扩增带, 其中多态性带 47 条 (23.74%); 11 个毛竹种源间的亲缘关系较近, 但仍存在着一定的遗传变异, 它们之间的遗传距离 D 在 0.000 6~0.136 9 之间; UPGMA 聚类分析, 可将供试的 11 个毛竹种源分为 4 大类, 其中昭平种源和南丹种源各为一类, 与其它两类较易区分。PCA 分析结果与聚类分析结果相一致; Mantel 检验结果表明毛竹各种源遗传距离与地理距离间相关性显著 ($r=0.555\ 8$, $P=0.016\ 0$)。说明 AFLP 分子标记能将 11 个种源 33 份毛竹种质区分开, 是毛竹种质资源鉴别的有效手段和方法。

关键词: 毛竹; 种质资源; 遗传关系; AFLP**中图分类号:** Q949; S795 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)06-0742-06

AFLP analysis of genetic relationships among *Phyllostachys edulis* germplasm resource in Guangxi

YANG Chun-Sheng¹, LU Yong-Bin², LIN Yan-Fang²,
TANG Shao-Qing², ZHOU Hai-Ping³, LI Xiao-Tie^{3*}(1. Guilin Quarantine Office for Preventing and Controlling the Forest diseases and Insect Pests, Guilin 541004, China;
2. Ministry of Education Key Laboratory for Ecology of Rare and Endangered Species and Environmental Protection, College of Life Sciences, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China;
3. Guilin Research Institute of Forestry, Guilin 541004, China)

Abstract: Thirty-three *Phyllostachys edulis* germplasms from 11 provenances in Guangxi were analyzed by AFLP markers. Five pairs of primer combination were used to amplify the genomic DNA. A total of 198 AFLP bands were obtained, 47 (23.74%) of them were polymorphic. The genetic distance between the 11 provenance ranged from 0.000 6 to 0.136 9. The tested germplasms can be divided into 4 categories by UPGMA clustering analysis. Nandan and Zhaoping provenances were clustered into two categories respectively. They were distinct to other two categories. PCA analysis results were consistent with the results of cluster analysis. Mantel test results showed that the correlations between genetic distance and geographic distance in *P. edulis* provenance sources were significant ($r=0.555\ 8$, $P=0.555\ 8$), and AFLP was an effective marker to identify germplasm of *P. edulis*.

Key words: *Phyllostachys edulis*; germplasm resource; genetic relationship; AFLP**收稿日期:** 2013-10-18 **修回日期:** 2013-12-12**基金项目:** 广西区林业重大项目(桂林科字[2010]第 8 号;桂林科字[2009]第 18 号);广西科技攻关项目(桂科攻 1123004-5);桂林市科技攻关项目(20100509)。**作者简介:** 杨春生(1965-),男,广西恭城县人,高级工程师,主要从事毛竹种质资源研究,(E-mail)glsfycs@163.com。**通讯作者:** 李晓铁,教授级高级工程师,主要从事森林资源培育和技术推广工作,(E-mail)lixiaotie168@126.com。

毛竹(*Phyllostachys edulis*)属于禾本科(Gramineae)竹亚科(Bambusoideae)。毛竹材质好,用途广,是最重要的经济竹种。在中国 19 个省具有毛竹的天然分布和人工栽培,共有 386.83 万公顷(国家林业局森林资源管理司,2010)。广西的毛竹种植面积 20 万公顷以上,仅桂林市达到 12.9 万公顷(桂林市林业局,桂林市森林资源调查报告,2009)。由于毛竹的栽培面积大,在长期的生产经营活动中产生了一系列稳定的变异类型,目前报道的变型或栽培型毛竹共有 12 个(郭小勤等,2009)。在形态学上,毛竹壁厚和生长高度遗传相对稳定(郭起荣等,2003),但毛竹不同种源的发笋数、鲜笋产量和质量、新竹生长以及抗性 etc 存在明显差异,且各种性状之间往往相互影响与联系(陈存及等,2001)。毛竹以无性繁育为主,相近品系间常因形态相似而难于区分,要准确、细致地了解种群的遗传变异状况,仅仅依赖表型性状是远远不够的,还必须进行更深层次的区分差异(夏铭,1999)。分子标记可以在 DNA 水平上对种群、种源进行遗传变异的分析,目前 RAPD、ISSR、SRAP、AFLP 和 SSR 等分子标记已经被应用于毛竹种群间分化、种质鉴别和种源内的遗传多样性等分析(魏瑜,2005;阮晓赛等,2008;郭起荣等,2010)。

限制性扩增片段长度多态性(AFLP, amplified fragment length polymorphism)是在 RFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的一种分子标记方法,其具有较高的可靠性、重复性和高效性,几乎可以检测到整个基因组的遗传信息(房经贵等,2001)。我们应用 AFLP 分子标记分析了桂林市林业科学研究所收集的 11 个种源 33 份毛竹种质样品,目的在于研究分析其遗传关系,为毛竹种质资源的保存和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的毛竹种源来自桂林市林业科学研究所 2010 年毛竹种质收集圃,每个种源 3 个样品共 33 份,各种质的种源信息见表 1。

1.2 DNA 的提取

采集毛竹新长出叶片,装入具有硅胶的自封袋中干燥后放入 -20 °C 冰箱中,采用 CTAB 法(Doyle *et al.*, 1987)进行基因组 DNA 提取。

1.3 AFLP 分析

酶切采用 20 μ L 体系:2 μ L DNA(纯化),10 U *Eco*R I,4 U *Mse* I 和 4 μ L 10 $\times$ Tango buffer,37 °C 2 h 接着 65 °C 2 h 条件下完成。加入 4 μ L 10 $\times$ T4 DNA buffer,1 U T4 DNA Ligase,5 pmol *Eco*RI 接头,15 pmol *Mse*I 接头,40 μ L 体系在 22 °C 连接 3 h。用 Primer-*Eco*RI-A 和 Primer-*Mse*I-C 进行预扩增。选择性扩增体系 20 μ L:2 μ L 10 $\times$ Taq buffer (with Mg^{2+}),0.4 μ L 1 $\times$ dNTPs,0.1 μ L 50 μ mol/L Primer-*Mse*I+3,0.1 μ L 50 μ mol/L Primer-*Eco*R+3,0.2 μ L Taq 酶,5 μ L 预扩稀释液。选择性扩增 PCR 程序:94 °C 30 s,65 °C 30 s,72 °C 2 min,以后每个循环退火温度降低 0.7 °C,共 13 个循环;然后 94 °C 30 s,56 °C 30 s,72 °C 2 min,23 个循环。6% 变性聚丙烯酰胺胶电泳分离,银染显色。

1.4 数据分析

将电泳图谱上清晰的条带记为“1”,同一位置没有出现的带记为“0”,生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。利用 Popgene32(Yeh *et al.*, 1999)软件分析种源间遗传距离 D(Nei, 1972)。用 NTSYS-pc 2.10e(Rohlf *et al.*, 2000)软件计算 DICE 相似性系数(Nei *et al.*, 1979),进行不加权重对算术平均法(UPGMA)聚类分析和主成分(PCA)分析。利用 IBDWS 3.23(Isolation By Distance Web Service)(Jensen *et al.*, 2005)中的 Mantel test 检验地理距离和遗传距离的相关性。

2 结果与分析

2.1 种质多态性分析

从 64 对引物组合中筛选 5 对引物(表 2)用于 33 份广西毛竹种质进行分析,这 5 对引物共扩增出了条带 198 条,其中多态性带为 47 条,多态性位点百分率为 23.74%,平均每对引物产生条带 39.6 条。引物 *Eco*RI-AGG/*Mse*I-CTG 扩增出的条带数最多(46 条),引物 *Eco*RI-AAG/*Mse*I-CAA 扩增到的条带数最少(36 条)。引物对 *Eco*RI-AAG/*Mse*I-CTG 扩增图谱见图 1,从该图可看出某些种质有特异条带或条带缺失。

2.2 聚类分析和主成分坐标分析

11 个毛竹种源两两间的遗传距离 D(Nei's, 1972)在 0.000 6~0.136 9 之间(表 3),平均遗传距离是 0.0719。其中资源县中峰乡八坊村(ZY)和兴

表 1 毛竹种源地理位置及形态性状

Table 1 Location of sampled *Phyllostachys edulis* provenance and their characters

代号 Code	种源地点 Provenance site	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Elevation (m)	林分平均 立竹量 (株/亩) Average amount of bamboo	平均胸径 Average DBH (cm)	平均高 Average height (m)	平均枝下高 Average clear height (m)	11~15 节长 Zip length (cm)	胸径 9~10 cm 原竹 6 m 高处 直径/竹壁 厚度 Diameter and thickness (mm)
ND	南丹山口林场 Shankou Forest farm,Nandan Contury	107°35′	24°55′	890	233	11.0	14.5	7.2	119.2	66/6.8
JX	金秀县忠良乡永和村 Yonghe Village,Zhongliang Township , Jinxu Contury	110°22′	24°10′	690	293	10.1	14.2	8.0	107.9	62/5.4
RS	融水县香粉乡古都村 Gudu Village, Xiangfen Township , Rongshui Contury	109°12′	25°17′	320	227	10.6	13.6	8.2	133.3	64/6.0
SJ	三江县和平乡大寨村 Dazhai Village,Heping Township , Sanjiang Contury	109°37′	25°37′	240	255	9.7	12.7	7.0	124.0	62/6.3
FC	富川县富阳乡涝溪村 Laoxi Village,Fuyang Township , Fuchuan Contury	111°10′	24°49′	540	200	10.6	15.4	7.6	129.6	62/6.2
ZP	昭平县文桥镇纸社村 Zhishe Village,Wenqiao Town , Zhaoping Contury	110°46′	24°13′	160	360	10.5	15.9	9.3	155.7	65/6.3
XA	兴安县华江乡同仁村 Tongren Village,Huajiang Township , Xingan Contury	110°22′	25°35′	340	253	10.6	15.2	7.7	118.5	61/6.2
ZY	资源县中峰乡八坊村 Bafang Village,Zhongfeng Township , Ziyuan Contury	110°38′	25°51′	420	286	11.0	14.9	8.2	124.5	65/6.3
LG	临桂县宛田乡洞头村 Dongtou Village,Wantian Township , Lingui Contury	110°05′	25°37′	420	280	11.6	16.2	9.2	134.5	66/6.2
GC	恭城县西岭乡营盘村 Yingpan Village,Xiling Township , Gongcheng Contury	110°40′	25°05′	380	220	9.6	12.6	7.2	124.4	60/6.1
LC	灵川县大境乡新寨村 Xinzhai Village,Dajing Township , Lingchuan Contury	110°43′	25°12′	860	210	9.4	13.4	6.6	128.4	62/6.0

表 2 AFLP 选择性扩增引物组合及扩增结果

Table 2 Primer combination and polymorphism results for AFLP analysis

引物组合 Primer combination	扩增总 条带数 Total number of bands	多态性 条带数 Number of polymorphic bands	多态性 百分率 Percentage of polymorphic bands (%)
EcoRI-AAG/MseI-CTG	41	18	43.90
EcoRI-AAG/MseI-CTA	38	7	18.42
EcoRI-AGG/MseI-CTG	46	14	30.43
EcoRI-ACG/MseI-CAT	37	7	18.92
EcoRI-AAG/MseI-CAA	36	1	2.78
总和 Total	198	47	23.7
平均 Average	39.6	9.4	—

安县华江乡同仁村(XA)毛竹种质之间的遗传距离最小(0.000 6)。昭平县文桥镇纸社村(ZP)和灵川县大境乡新寨村(LC)之间的遗传距离最大(0.136 9)。

33 份毛竹种质之间的 DICE 相似性系数的变异范围在 0.918 3~1.000 0 之间,UPGMA 聚类结果可将它们分为 4 类(图 2)。第 I 类只有南丹山口林场

(ND)毛竹,与其它种质遗传差异较大。第 II 类包括金秀县忠良乡永和村(JX)、融水县香粉乡古都村(RS)、三江县和平乡大寨村(SJ)、临桂县宛田乡洞头村(LG)、兴安县华江乡同仁村(XA)和资源县中峰乡八坊村(ZY)。第 III 类为富川县富阳乡涝溪村(FC)、恭城县西岭乡营盘村(GC)和灵川县大境乡新寨村(LC),第 III 与第 II 类的遗传差异相对较小。第 IV 只有昭平县文桥镇纸社村(ZP),它与其它 3 类的遗传差异较大。

33 份毛竹主成分分析结果见图 3,南丹山口林场(ND)和昭平县文桥镇纸社村(ZP)的空间距离是最远,各自为一类,与其它样品相比也极易区分。其它 27 份毛竹样品可以分为 2 类,但它们的空间距离较近,难以区分。主成分分析结果与 UPGMA 聚类分析结果是一致的。

2.3 相关性检验

对各种源地理距离与遗传距离相关性进行 Man-

表 3 11 个种源遗传距离
Table 3 Genetic distances of 11 provenances

	ND	JX	RS	SJ	FC	ZP	XA	ZY	LG	GC	LC
ND	*****										
JX	0.107 6	*****									
RS	0.107 1	0.006 2	*****								
SJ	0.130 3	0.039 2	0.031 6	*****							
FC	0.132 9	0.083 6	0.089 3	0.077 9	*****						
ZP	0.117 5	0.127 9	0.130 0	0.128 5	0.100 6	*****					
XA	0.111 6	0.026 2	0.031 5	0.021 7	0.055 8	0.119 1	*****				
ZY	0.112 4	0.026 8	0.032 1	0.021 2	0.055 3	0.119 9	0.000 6	*****			
LG	0.119 0	0.036 6	0.040 7	0.018 2	0.064 1	0.112 5	0.007 9	0.008 5	*****		
GC	0.101 1	0.073 2	0.078 8	0.069 9	0.039 9	0.115 1	0.046 9	0.047 5	0.058 7	*****	
LC	0.096 0	0.085 5	0.080 0	0.069 9	0.061 4	0.136 9	0.068 5	0.069 2	0.065 9	0.042 9	*****

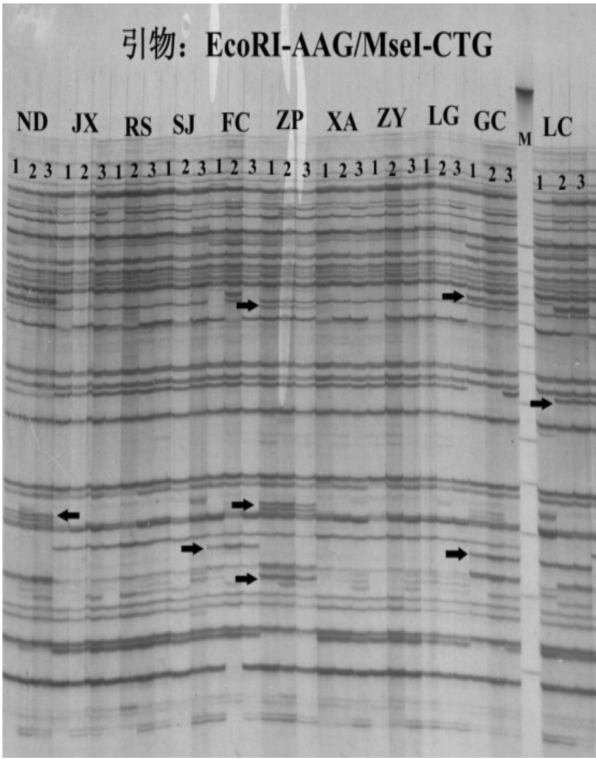


图 1 33 份样品毛竹扩增产物的 AFLP 图谱
引物: EcoRI-AAG/MseI-CTG; 箭头表示多态性条带。
Fig. 1 An AFLP fingerprints of 33 individuals EcoRI-AAG/MseI-CTG; arrows indicate the polymorphic bands.

tel 检验。图 4 结果显示,各种源地理距离与遗传距离间呈显著的正相关性($r=0.555\ 8$, $P=0.016\ 0$)。

3 讨论与结论

研究种质资源多样性、遗传背景、遗传结构及亲缘关系,可以为种质资源的保护开发提供依据,进而制定出合理开发利用方案,这需要一种甚至多种可

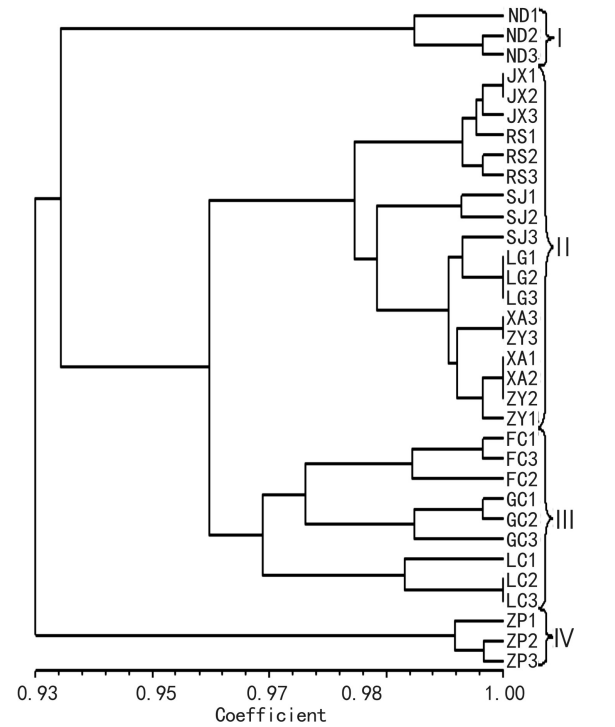


图 2 基于 DICE 相似性系数构建的 UPGMA 聚类分枝图
Fig. 2 UPGMAphenogram based on DICE similarity coefficient

靠的、鉴别力强的分类鉴定手段(唐美琼等,2012)。本研究中采用 AFLP 标记,筛选出 5 对组合引物扩增分析得到了清晰的 AFLP 图谱,可读出各样品的共有条带、特异性带或特异性缺失条带,表明 AFLP 标记是研究毛竹种质的有效方法之一,与阮晓赛等(2008)和李潞滨等(2008)得出的 AFLP 有较强的分辨能力的结果一致。

张守锋等(2007)应用 RAPD 标记对毛竹的研究结果,18 个毛竹种群间遗传距离在 0.080 7~0.503 1之间;魏瑜(2005)利用 RAPD 标记的研究结

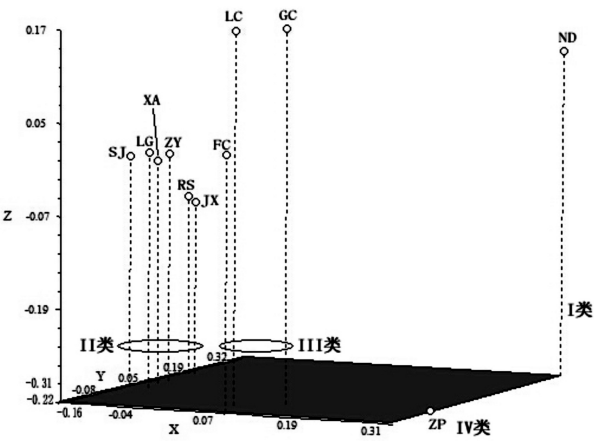


图 3 基于 DICE 相似性系数构建的 PCA 坐标图
I 类只含 ND, II 类包括 JX、RS、SJ、LG、XA 和 ZY,
III 类包括 FC、GC 和 LC, IV 类只含 ZP。
Fig. 3 PCA coordinate graphs based on
DICE similarity coefficient

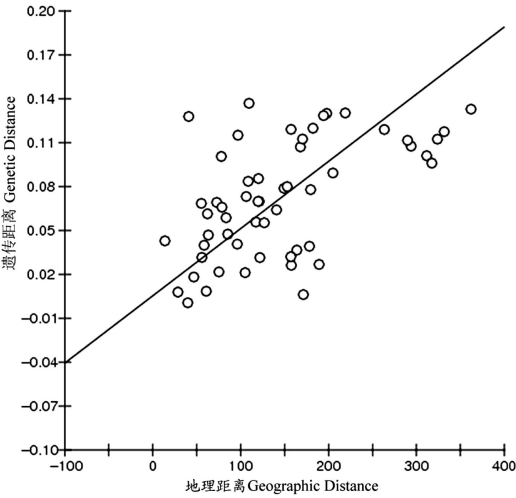


图 4 11 个毛竹种源的遗传距离与地理距离的线性关系
Fig. 4 Plot of geographical distance against genetic distance
for 11 provenances of *Phyllostachys edulis*

果,毛竹种源间的遗传距离较小(0.006 4~0.095 3);阮晓赛等(2008)利用 AFLP 和 ISSR 标记研究了 17 个自然分布种源,它们的遗传距离在 0.020 0~0.182 0 之间,其平均值为 0.067 0;董文娟(2011)利用 SSR 标记研究 17 个毛竹种源,其遗传距离介于 0.000 0~0.754 0 之间;郭起荣等(2010)利用 SRAP、AFLP 和 ISSR 标记分析毛竹种质,发现不同的分子标记得出的遗传距离存在较大差距。本研究利用 AFLP 分子标记对广西 11 个毛竹种源毛竹的研究结果,种源间的遗传距离在 0.000 6~0.136 9

之间,与以上研究结果相比较,广西毛竹种间的遗传变异程度较小。

通过聚类分析和主成分分析,结果可将 11 个种源分为 4 类:地理距离较远的南丹山口林场(ND)和昭平县文桥镇纸社村(ZP)毛竹各自为类,两者与其它种源种质区分明显;而另外 9 个种源可分为 2 类,但各种源种质间的遗传距离相对较小。2010—2012 年,我们对广西各毛竹地理种质进行了全面的形态性状调查分析,结果表明,昭平县文桥镇纸社村分布的毛竹种质资源的平均立竹量、竹高、枝下高和节长均较大,与其它栽培地的毛竹种源种质的形态特征相比具有明显差异。遗传分析结果显示昭平毛竹种源与其它种源的遗传距离在 0.100 6~0.136 9 之间,其平均值(0.120 8)远高于所有种源的平均遗传距离(0.071 9)。但各种源地区的气象因子也会影响种源种质的分布和生长(施建敏等,2007),其中气温主要决定毛竹分布,湿度、雨量主要决定毛竹生长(刘世东等,1992),昭平毛竹种源种质形态学上的差异性,可能是遗传因素与栽培地的生境因子共同作用的结果,也有可能是从外省引种而来,这个问题还需要考证。聚类结果和 PCA 分析结果体现出了一定的地域特征,一般同一种源的各种质最先聚合在一起,较近种源先聚集,但也未完全按分布的地理位置进行先后聚类。毛竹是以无性繁殖为主的植物,传统的栽培方式主要是移竹造林,人们常从较近距离的种源移植,因此较近的地理种源间往往有较近的遗传关系,但也有可能有较远距离的移植。各种源间地理距离与遗传距离相关性 Mantel 检测结果进一步说明了这种关系,种源间地理距离与遗传距离具有显著的相关性($r=0.555\ 8, P=0.016\ 0$)。

参考文献:

Chen CJ(陈存及),Liang YC(梁一池),Qiu EF(邱尔发). 2001. A study on synthetic selection for multi shape and properties of *Phyllostachys heterocycla* cv. *pubescens*(毛竹种源多性状综合选择的研究)[J]. *Sci Silv Sin*(林业科学),**37**(1):18—23
Department of Forest Resources Management, SFA(国家林业局森林资源管理司). 2010. The 7th National Forest Inventory and Status of Forest Resources(第七次全国森林资源清查及森林资源状况)[J]. *For Res Manag*(林业资源管理),**1**:1—8
Doyle JJ, Doyle JL. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantites of fresh leaf Tissue [J]. *Phytochem Bull*,**19**:11—15
Fang JG(房经贵),Qiao YS(乔玉山),Zhang Z(章镇). 2001. Application of AFLP in the cultivar identification of mango(AFLP (下转第 787 页 Continue on page 787)