

栗属植物遗传多样性研究进展

韩继成, 刘庆香, 王广鹏, 孔德军, 张新忠

(河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北 昌黎 066600)

摘要: 壳斗科(*Fagaceae*) 栗属(*Castanea*) 植物包括 7 个种, 即中国板栗(*Castanea mollissima* BL.)、茅栗(*Castanea seguinii* Dode.)、锥栗[*Castanea henryi*(skan) Rehd. et Wils.]、日本板栗(*Castanea crenata* Sieb. & Zucc.)、美洲板栗(*Castanea dentate* Marsh.)、美洲榛果栗(*Castanea pumila* Mill.) 和欧洲板栗(*Castanea sativa* Mill.)。不仅可用于木材生产, 而且在坚果生产上也占有独特地位。基于同工酶、子叶储藏蛋白和 RAPD 数据, 通过对分布于亚洲、欧洲和北美的栗属植物的遗传多样性研究表明中国板栗(*Castanea mollissima*) 是世界栗属植物的原始种, 长江流域是中国板栗的遗传多样性中心, 土耳其是欧洲板栗的起源中心之一。

关键词: 栗属(*Castanea* (Tourn.) L); 遗传多样性

中图分类号: S664.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006) 增刊-0129-04

The Progress of the Genetic Diversity Studies on *Castanea* (Tourn.) L.

HAN Ji_cheng, LIU Qing_xiang, WANG Guang_peng, KONG De_jun, ZHANG Xin_zhong

(Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Changli 066600, China)

Abstract: The genus *Castanea*, belonging to the *Fagaceae*, includes seven species, which are *Castanea mollissima* BL., *Castanea seguinii* Dode., *Castanea henryi*(skan) Rehd. et Wils., native to China, *Castanea crenata* Sieb. & Zucc., native to Japanese and Korean Peninsula, *Castanea dentate* Marsh., *Castanea pumila* Mill., native to America, and *Castanea sativa* Mill., native to Europe and West Asia. *Castanea* is the one of the most important tree species to the production of timbers and nuts. Based on isozyme, storage proteins in cotyledon and RAPD data, *Castanea mollissima* is the originated species of the *Castanea*, and the Yangtze River valley is the center of genetic diversity of *Castanea mollissima*, while Turkey is one of the supposed centers of origin of *Castanea sativa*.

Key Words: *Castanea* (Tourn.) L; Genetic diversity

栗属(*Castanea* (Tourn) L) 属于壳斗科(*Fagaceae*) 植物, 共包括 7 个种, 即原产于中国大陆的中国板栗(*Castanea mollissima* BL.)、茅栗(*Castanea seguinii* Dode.) 和锥栗(*Castanea henryi*(skan) Rehd et Wils.); 原产于日本和朝鲜半岛的日本板栗(*Castanea crenata* Sieb. & Zucc.), 原产于北美的美洲板栗(*Castanea dentate* Marsh.) 和美洲榛果栗(*Castanea pumila* Mill.), 原产于欧洲、非洲和西亚的欧洲板栗(*Castanea sativa* Mill.)。由于板栗兼有木材和果实生产, 其研究越来越受到重视, 近几年, 同工酶、RAPD 以及其他方法在栗属植物遗传多样性研究方面有很大

进展, 本文就此进行了总结。

1 同工酶

通过对土耳其、意大利、法国等地的欧洲栗的同工酶研究, 结合形态、生理、生态等因子进行了相关性研究揭示了欧洲栗的遗传变异水平及群体遗传结构, 土耳其类群的同工酶标记的空间自相关分析表明选择性机制在所研究的居群中可能都加重了遗传和形态变异。气候因子, 特别是降雨量影响了板栗的空间结构, 土耳其东部和西部居群有很高的遗传多样性, 中部地区显示典型的杂交区域, 土耳其西部

收稿日期: 2006-08-26

基金项目: 河北省农林科学院重点项目资助(A03-1-01-15)

作者简介: 韩继成(1969-), 男, 副研究员, 主要从事果树分子生物学方面的研究工作。

与意大利等欧洲其他地域的板栗的遗传差异小于土耳其西部与土耳其其他地区的遗传差异。因此, 欧洲板栗的遗传变异的地理空间分布存在明显的自东向西的渐变或双渐变的非随机分布的空间结构, 且表明罗马时代在土耳其的早期扩展缓慢的从东部向中心散播, 而随后又与人类的活动迅速向西、Anatolia 和地中海盆地扩散, 后期在地理隔离地方的微环境选择下进行分化, 但在扩展过程中其遗传资源逐渐枯竭, 几乎没有新的遗传变异^[1-5]。

张辉等^[6]利用水平板淀粉凝胶电泳技术检验了板栗 8 个居群在 6 个同工酶位点上的遗传变异, 在同一水平上, 其遗传多样性水平显著高于欧洲栗。总的基因多样性中, 89.2% 发生在居群内, 10.8% 发生于居群间, 各居群之间的遗传距离为 0.036~0.394, 有些居群分化较大, 尤其在个别位点上更为明显。初步研究表明, 其丰富的遗传变异及其高水平的分化度可能与其生境的多样性、风媒异交等因素造成的长距离的基因漂变有关, 板栗的变异无论从物种水平还是群体水平, 均高于风媒异交种的平均水平。进一步的研究表明, 属于长江流域品种群的居群与东南品种群的居群较其他居群关系更为密切, 东南品种群与西北品种群的亲缘关系最远, 初步推测西南为板栗遗传多样性中心^[7]。而郎萍等^[8]采用超薄板聚丙烯凝胶等电聚焦技术对栗属中国特有的 3 个种即中国板栗、茅栗和锥栗的 30 个居群、12 个酶系统的 20 个位点进行了遗传多样性与遗传结构分析, 揭示了长江流域的神农架及周边地区为中国板栗的遗传多样性中心。板栗在种和居群水平上都具有较茅栗和锥栗高的遗传多样性, 并推测茅栗和锥栗起源于板栗。中国板栗为世界栗属植物的原生种, 不同地域分布的居群间表现出一定的遗传差异, 其遗传多样性高于栗属植物的其他种。秦岭等^[9]采用超薄板聚丙烯凝胶等电聚焦技术对陕西 4 个实生居群进行了遗传多样性及遗传结构分析, 将陕西实生板栗以秦岭为界分为秦岭以南与秦岭以北 2 个自然分布亚区, 西北板栗群体遗传基础不象以前所认为的遗传基础简单的看法。暴朝霞等^[10]采用 9 个酶系统的 15 个同工酶位点对 89 个板栗品种进行遗传多样性分析, 鉴别板栗品种和评价它们之间的遗传关系。在供试的 89 个品种中, 除 5 个品种外, 其余品种均可用多位点同工酶对其做专一性鉴定, 同地域的板栗品种具有遗传关系相近的特征。

李作洲等^[11]对中国板栗华北、长江流域和西南

主要地区的 21 个自然居群间 12 个酶系统 20 个等位酶基因位点的遗传变异的空间自相关分析及 F-统计分析结果表明, 其多数等位基因频率在居群间呈随机分布模式, 缺乏一定的空间结构; 而部分等位基因表现为渐变或双向渐变的非随机分布模式, 又具特定空间结构。中国板栗遗传变异空间结构模式的形成可能是长距离基因流、自然气候、人类活动、地理距离隔离等诸因素综合作用的结果, 居群等位基因分布格局的成因可能是在第四纪冰川后, 中国板栗以长江流域中下游的子遗中心为起点, 等位基因分别沿着向北和向南的不同方向迁移形成现在的居群结构; 季风气候和人类活动干扰是削弱居群分化的主要因素, 而基于环境梯度的选择, 是形成由北向南渐变分布的原因。

Huang 等^[12]通过对栗属种的 PGI 同工酶遗传的分析发现 Pgi 位点(Pgi_1)主要有 3 个等位基因并呈共显性遗传, 还检测到了出现频率较少的另外 2 个等位基因, 长江流域居群 Pgi 杂合度最高, 东南部居群最低。

应用 18 个同工酶系统的 14 个多态性位点的 38 个等位基因以及 RAPD 数据进行分析从 Alabama 到 central New York 沿着 Appalachian 覆盖自然区域内的 12 个美洲板栗居群的研究中, 认为美洲板栗在栗属中的居群和种水平具有较低的遗传分化, 将美国的板栗分为 4 个组: 最南部居群、南部-中部 Appalachian 居群、北部-中部 Appalachian 居群和南部 Appalachian 居群^[13]。Dane 等^[14]应用琼脂糖等点聚焦电泳和单树后代分析方法分析了 DIA 同工酶在美洲板栗和中国板栗种的遗传。发现了 3 个 DIA 位点的两个等位基因是共显性遗传的。Dia1 的遗传变异在 *Castanea pumila* 和 *Castanea seguinii* 中被检测到, Dia2 在 *Castanea dentata* 被检测到, 而 Dia6 的遗传多态性只在 *Castanea pumila* 中被检测到。DIA 阴极位点的表达是组织特异性德, 主要在子叶组织中检测到。同工酶研究表明美洲板栗在中国板栗、茅栗和美洲板栗中是遗传分化最低的种^[15-17]。

应用 10 个同工酶位点的 21 个等位基因和 RAPD 对美洲榛果栗 *Castanea pumila* (L). Mill. var *ozarkensis*(Ashe) Tucker 的 9 个居群进行了遗传多样性分析, 说明该居群比北美大陆其他栗属种的居群有更高的遗传分化。居群内检测到高水平的杂和性, 但居群间的遗传变异没有显著差异^[18]。美国自然区带分布的 12 个板栗(*Castanea pumila* var. *pumila*

(Allegheny chinkapin)) 濒危品种的 12 个居群间的同工酶遗传多样性表明在种的水平上, 多态性位点 (Ps) 为 72.7 %, 每个位点平均等位基因数 (As) 为 1.9, 每个多态性位点的平均等位基因数 (APs) 为 2.3, 每个位点有效等位基因数 (Aes) 为 1.5, 遗传差异 (Hes) 为 0.296。在居群水平上, $P_p = 49.2\%$, $A_p = 1.5$, $A_{ep} = 1.4$, $AP_p = 2.1$ and $H_{ep} = 0.21$ 。 *C. pumila* var. *pumila* 的同工酶变异 (70%) 大部分发生在居群水平。Wright's gene flow rate ($N_m(W)$) 低至 0.57。该种的自然区带分布性的居群差异没有检测到, 其中 Florida 洲居群的遗传差异变化水平最大, Virginia 洲和 Mississippi 洲也有较高的遗传差异^[19]。

通过检测了栗属东亚和北美种群的遗传分化显示在总数为 62 个群体的样品在同工酶位点的等位基因的变异中。中国板栗的遗传变异最大。而美洲板栗的遗传变异最小。最大洲内遗传一致性出现在 Allegheny 和 Ozark chinkapins (0.931) 以及 *C. mollissima* 和 *C. seguinii* (0.870), 较低的遗传一致性出现在美洲的 *C. pumila* 和 *C. dentata* (0.720–0.729)。洲间比较时, 美洲板栗与中国的 *C. mollissima*, *C. seguinii* 和 *C. henryi* 的遗传一致性分别为 0.505, 0.495 和 0.507, 而 Ozark chinkapin *C. pumila* var. *ozarkensis* 与 *C. mollissima* 和 *C. seguinii* 的遗传一致性较低, 分别为 0.469 和 0.435, 与中国栗的 *C. henryi* 的稍高, 为 0.520。 *C. dentata*, *C. mollissima*, *C. pumila* var. *ozarkensis* 和 *C. henryi* 的分化时间估计为 10~13 百万年以前^[20]。

2 RAPD

欧洲板栗的 RAPD 分析的结果与同工酶数据相吻合^[21,22], 并且果园人工种植板栗个体间多样性少, 而高海拔和灌木丛地带分布的板栗具有更大的遗传多样性^[23]。

高捍东等^[24]研究了江苏省溧阳市龙潭林场国家林业局板栗良种基地保存的 46 个中国板栗品种的遗传多样性, 建立了 RAPD 标记的标准程序和 DNA 指纹数据库, 为板栗品种鉴别提供了准确、可靠的标准方法。利用 RAPD 标记对浙江、安徽和湖北等省份的优良板栗品种 (无性系) 和地方特色品种进行指纹分析, 分析了供试板栗品种的系统发育^[25-27], 还运用特殊谱带, 建立了板栗品种分子检索表^[26]。

对中国栗属特有种中国板栗、茅栗和锥栗的 10

个样品的 RAPD 分析, 利用 UPGMA 法构建遗传关系聚类图, 以相似性系数为 0.62 阈值, 板栗与茅栗为一个聚类组, 锥栗为另一个聚类组^[28]。通过 520 多个随机引物分析这三个特有种的保守片段, 筛选出引物 B08 (GTCCACACGG), 该引物在所有供试的中国板栗、茅栗和锥栗中均扩增出各自特异的 DNA 片段, 其片段大小分别为 2050 m, 900 bp 和 1500bp, 这些 DNA 片段在种水平上的高度保守性, 可以用来区分这 3 个种^[29]。

3 其他方法

对欧洲板栗核糖 1, 5- 二磷酸羧化酶的大亚基基因 (*rbcL*) 核苷酸序列和对叶绿体和线粒体基因组的 PCR/RFLP 的分析进一步明确欧洲的板栗几乎没有地理上的结构变化, 人类活动, 特别是罗马文明时期及其后持续数千年的文明实践的长期活动对该种分布的影响^[30], *Fagaceae* 科植物的 *rbcL* 进化速率明显慢于已分析的其他科的一年生植物^[31]。

Alvarez 等^[32]认为板栗种子储存蛋白可以对欧洲板栗遗传多样性进行分析。国内对中国西北、华北、西南、东南和长江流域等 5 个品种群的 33 个板栗品种的贮存蛋白多态性的分析表明西北品种群和华北品种群的品种的谱带分布最为广泛, 其中 V 区的谱带仅限于西北品种群, 南北方品种的带型多样性较明显, 带型与品种原分布的地理区域存在相关关系^[33]。

应用同工酶和 AFLP 分析, 分布于朝鲜的日本板栗不同于分布于日本的, 它可能是中国板栗与日本板栗的杂交种^[34], 但是 SSR 分析表明, 日本板栗是从野生板栗中筛选出来的, 并具有相同的遗传背景^[35]。

板栗作为一个具有独特性质的树木树种, 在木材生产以及坚果生产方面占有独特的地位。在北美曾是主要的木材生产树种之一, 只是由于栗疫病危害才逐渐萎缩, 现在又在逐渐恢复。板栗在我国分布广泛, 各地的地理条件、气候和栽培习惯差异等使我国板栗形成了风味明显不同的品种群, 而目前的遗传多样性研究取材缺乏整体性, 并未覆盖板栗在我国的实际分布。根据我们的研究, 河北省种群又分为燕山和两个明显不同的群体^[36], 我们已在太行山居群筛选出带有“替码”、“垂枝”、“薄皮”等优良农艺性状的品种。因此有必要对我国板栗的遗传多样性进行进一步研究。

参考文献:

- [1] Pigliucci M, Villani F, Benedettelli S. Geographic and climatic factors associated with the spatial structure of gene frequencies in *Castanea sativa* Mill. from Turkey[J]. J Genet, 1990a, 69(3): 141–149.
- [2] Pigliucci M, Villani F, Benedettelli S. Spatial patterns of genetic variability in Italian chestnut (*Castanea sativa* Mill.) [J]. Can J Bot, 1990b, 68(9): 1962–1967.
- [3] Villani F, Pigliucci M, Benedettelli S, et al. Genetic differentiation among Turkish chestnut (*Castanea sativa* Mill.) populations[J]. Heredity, 1991, 66: 131–136.
- [4] Villani F, Pigliucci M, Lauteri M, et al. Congruence between genetic, morphometric, and physiological data on differentiation of Turkish chestnut (*Castanea sativa*) [J]. Genome, 1992, 35: 251–255.
- [5] Villani F, Sansatta A, Cherubini M, et al. Genetic structure of natural populations of *Castanea sativa* Mill. in Turkey: evidence of a hybrid zone[J]. J Evol Biology, 1997, 12: 233–244.
- [6] 张辉, 柳 鑒, Villani F. 板栗在 6 个同工酶位点上的遗传变异[J]. 生物多样性, 1998, 6(4): 282–286.
- [7] 张辉, 柳 鑒. 板栗群体的遗传多样性及人工选择的影响[J]. 云南植物研究, 1998, 20(1): 81–88.
- [8] 郎萍, 黄宏文. 栗属中国特有种居群的遗传多样性及地域差异[J]. 植物学报, 1999, 41(6): 651–657.
- [9] 秦岭, 刘德兵, 范崇辉. 陕西实生板栗居群遗传多样性研究[J]. 西北植物学报, 2002, 22(4): 970–974.
- [10] 暴朝霞, 黄宏文. 板栗主要栽培品种的遗传多样性及其亲缘关系分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 13–19.
- [11] 李作洲, 郎萍, 黄宏文. 中国板栗居群间等位酶基因频率的空间分布[J]. 武汉植物学研究, 2002, 20(3): 165–170.
- [12] Huang Hong wen, Dane F, Jiang Zhengwang. Inheritance and diversity of PGI in chestnut (*Castanea*) [J]. J of Wuhan Botanical Research, 1999, 17(1): 1–4.
- [13] Huang H, Dane F, Kubisiak T L. Allozyme and RAPD analysis of the genetic and geographic variation in wild population of the American chestnut *Castanea dentata* (*Fagaceae*) [J]. Amer J Bot, 1998, 85(7): 1013–1021.
- [14] Dane F, Huang H. Variability and inheritance of Diaphorases in American and Chinese *Castanea* species[J]. Silvae Genetica, 2002, 51(2–3): 128–130.
- [15] Huang H, Dane F, Norton J D. Allozyme diversity in Chinese, Seguin and American chestnut (*Castanea* spp.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 88: 981–985.
- [16] Dane F, Huang H. Evaluation of the genetic diversity *Castanea pumila* var. *ozarkensis* through isozyme analysis and DNA amplification fingerprinting [J]. Hortscience, 1997, 32: 441.
- [17] Huang H, Dane F, Norton J D. Genetic analysis of 11 polymorphic isozyme loci in chestnut species and characterization of chestnut cultivars by multi-locus allozyme genotypes[J]. J Amer Soc Hort Sci, 1994, 119: 840–849.
- [18] Dane F, Hawkins L K, Huang Hong wen. Genetic variation and population structure of *Castanea pumila* var *ozarkensis* [J]. J Amer Soc Hort Sci., 1999, 124(6): 666–670.
- [19] Fu Y, Dane F. Allozyme variation in endangered *Castanea pumila* var. *pumila* [J]. Ann Bot (Lond), 2003, 92(2): 223–30.
- [20] Dane F, Lang P, Huang H, et al. Intercontinental genetic divergence of *Castanea* species in eastern Asia and eastern North America[J]. Heredity, 2003, 91(3): 314–321.
- [21] Galderisi U, Cipollaro M, Bemardo G D, et al. Molecular typing of Italian sweet chestnut cultivars by random amplified polymorphic DNA analysis[J]. J Hort Sci & Biotech, 1998, 73(2): 259–263.
- [22] Fornari B, Taurdini D, Villani F. Genetic structure and diversity of two Turkish *Castanea sativa* Mill populations investigated with isozyme and RAPD polymorphisms[J]. J Genet & Breed, 1999, 53: 315–325.
- [23] Seabra R C, Simoes A M, Baeta J, et al. Evolution of Portuguese chestnut stands by RAPDs [J]. Forest Snow and Landscape Research, 2001, 76(3): 435–438.
- [24] 高捍东, 黄宝龙. 板栗主要栽培品种的分子鉴别[J]. 林业科学, 2001, 37(1): 64–71.
- [25] 翁尧富, 陈 源, 赵勇春, 等. 板栗优良品种(无性系)苗木分子标记鉴别研究[J]. 林业科学, 2001, 37(2): 51–55.
- [26] 项 艳, 朱苏文, 程备久. 14 个板栗品种遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 激光生物学报, 2003, 12(4): 259–263.
- [27] 张新叶, 黄敏仁. 湖北省主栽板栗品种的分子鉴别[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(5): 93–95.
- [28] 杨 剑, 唐旭蔚, 涂炳坤, 等. 栗属中国特有种—板栗、茅栗、锥栗 RAPD 分析[J]. 果树学报, 2004, 21(3): 275–277.
- [29] 沈永宝, 施季森. 中国栗属特有种保守 RAPD 片段分析[J]. 南京林业大学学报(自然科学版), 2004, 28(4): 51–53.
- [30] Fineschi S, Taurdini D, Villani F, et al. Chloroplast DNA polymorphism reveals little geographical structure in *Castanea sativa* Mill. (*Fagaceae*) throughout southern European countries, Molecular Ecology, 2000, 9(10): 1495–1503.
- [31] Frascaria N, Maggia L, Michaud M, et al. The *rbcl* gene sequence from chestnut indicates a slow rate of evolution in the *Fagaceae* [J]. Genome, 1993, 36(4): 668–671.
- [32] Alvarez J B, Munoz- Diez C, Martin- Cuevas A. Cotyledon storage proteins as markers of the genetic diversity in *Castanea sativa* Miller [J]. Theor. Appl. Genet, 2003, 107(4): 730–735.
- [33] 张辉, 柳 鑒. 板栗贮存蛋白多样性的研究[J]. 园艺学报, 1997, 24(4): 319–324.
- [34] Yamamoto T, Shinada T, Kotobuki K, et al. Genetic characterization of Asian chestnut varieties assessed by AFLP [J]. Breeding Science, 1998, 48(4): 359–363.
- [35] Yamamoto T, Tahaka T, Kotobuki K, et al. Characterization of simple sequence repeats in Japanese chestnut [J]. J Hort Sci and Biotech, 2003, 78(2): 197–203.
- [36] 韩继成, 王广鹏, 孔德军, 等. 河北省板栗品种(系)遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 华北农学报, 2005, 20(增刊): 181–183.