

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.003

杨章旗, 冯源恒, 吴东山. 细叶云南松天然种源林遗传多样性的 SSR 分析[J]. 广西植物, 2014, 34(1):10-14

Yang ZQ, Feng YH, Wu DS. Analysis of genetic diversity of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* nature populations by SSR marker[J]. *Guihaia*, 2014, 34(1):10-14

细叶云南松天然种源林遗传多样性的 SSR 分析

杨章旗¹, 冯源恒¹, 吴东山²

(1. 广西林业科学研究院, 南宁 530002; 2. 广西大学, 南宁 530005)

摘要: 利用 12 对 SSR 引物对三个不同种源的细叶云南松群体遗传多样性进行研究。结果表明:共检测到 13 个位点 37 个等位基因,每个位点平均观察等位基因数(A)为 2.85,多态率为 100%;平均有效等位基因数(Ne)1.45。各群体内的有效等位基因数平均为 1.447,观察杂合度平均为 0.341,期望杂合度平均为 0.281。三个群体的 Nei's 基因多样性指标的变化范围为 0.256~0.297,Shannon 多样性指数变化范围为 0.448~0.484,各群体间的多态性水平差异不大。细叶云南松群体间的基因分化系数(Gst)为 0.089,群体间的遗传分化水平较低,大部分变异均存在群体内。细叶云南松群体间的基因流(Nm)在不同位点的变化范围从 4.693~122.189,平均为 11.17。说明细叶云南松群体间存在比较充分的基因交流。

关键词: 细叶云南松; SSR 分子标记; 遗传多样性

中图分类号: Q949 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2014)01-0010-05

Analysis of genetic diversity of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* nature populations by SSR marker

YANG Zhang-Qi¹, FENG Yuan-Heng¹, WU Dong-Shan²(1. *Guangxi Academy of Forestry Sciences*, Nanning 530002, China; 2. *Guangxi University*, Nanning 530005, China)

Abstract: SSR markers were used to study genetic diversity of tree different nature populations of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia*. The results showed that 13 sites and 37 alleles were detected. For every site, the average value of observation allele number(A) was 2.85, polymorphism rate was 100% and the average values of effective number of alleles (Ne) was 1.45. The average value of effective number of alleles was 1.447 within each population. *P. yunnanensis* var. *tenuifolia* had a low genetic diversity level among the three populations, the average observed heterozygosity (Ho) was 0.341 and the average expected gene heterozygosity(He) was 0.281. Nei's gene diversities (h) at population level were 0.256 and 0.297. Shannon's information indexes (I) at population level were 0.448 and 0.484. In addition, the three populations deviated from Hardy-Weinberge equilibrium. The average coefficient gene differentiation (Gst) was 0.089. Most of variation appeared inner population and there was not gene differentiations among populations. The range of gene flow of different gene polymorphism sites was 4.693-122.189, the average number was 11.17, which indicated that the habitat of *P. yunnanensis* var. *tenuifolia* was limited and resulted in the limited natural variation, but there were abundant gene exchanges between each population.

Key words: *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia*; SSR molecular marker; genetic diversity

收稿日期: 2013-06-15 修回日期: 2013-09-06

基金项目: 八桂学者专项经费资助(松树资源培育及产业化关键技术创新)

作者简介: 杨章旗(1964-),男,广西资源人,博士,教授级高级工程师,主要从事林木遗传育种研究,(E-mail)yangzhangqi@163.com.

细叶云南松(*Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia*)是云南松的一个地理变种,产于贵州南部、广西西北部海拔 300~1 600 m 及广西西部百色等地,沿河谷形成纯林(李治基等,1981)。细叶云南松为常绿乔木,针叶 3 针 1 束,细柔下垂与思茅松较相似;为减少水份丧失,保证在干燥环境下生存,松针外层包裹角质和腊质外膜。细叶云南松较耐瘠薄,在土壤肥力不高的林区能良好生长,并可达到南方速生丰产林的要求(杨炳强等,1988)。细叶云南松树干通直,出材率高,结构适中细腻,有松脂,较抗病虫害,是一种重要的南方材脂两用树种,也是广西松科资源中重要的一个变种和重要的木材生产原料(钟业聪等,1990)。

细叶云南松研究开始于 20 世纪 80 年代,中国科学院植物研究所对广西细叶云南松的地理分布、群系和群落特点进行了研究,发现细叶云南松主要分布在南盘江下游两岸海拔 300~1 600 m 的丘陵山地,它对气候和土壤的适应性都较强,常常构成大面积的天然森林。细叶云南松林一般可分为乔木层,灌木层和草本地被层。其中,乔木层又分为乔木第一亚层和乔木第二亚层和乔木第三亚层,主要由细叶云南松组成;中间灌木层覆盖度 40%~50%。草本地被层植物覆盖度为 50%~70%。它们的形成和分布与所在地的气候、地貌、土壤和人为生产活动特别是垦殖和烧山的影响有密切的联系(钟业聪等,1990)。由于细叶云南松分布面积有限,对其相关研究较少,但近年来,由于生态环境遭受严重的破坏,其生存遇到了严峻的考验。为此,从遗传水平上对细叶云南松进行研究,了解该物种的总体遗传多样性水平、基因流动和渗入情况,为细叶云南松资源的保护与利用,以及对细叶云南松的遗传育种研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

试验材料包括乐业种源、隆林种源和西林种源的细叶云南松。其中乐业种源含 30 个样本,取自位于广西乐业县境内的雅长林场的大坪、东明、二沟、果麻、花坪、那成、雅庭、益来等 8 个分场(24°47'20" N,106°33'29" E),分布在海拔 400~1 350 m 范围。隆林种源含 31 个样本,取自广西隆林县德峨乡、金钟乡和猪场乡(24°46'25" N,105°20'26" E),分布在

海拔 800~1 750 m 范围。西林群体含 31 个样本,取自广西西林县的古樟林场(24°29'33" N,105°5'28" E),分布在海拔 750~1 150 m 范围。

分别采取新鲜无病害的针叶 20~30 针,装入 50 mL 离心管,用硅胶填充干燥后封口保存。群体内采样树之间的间距在 30 m 以上,尽量平均分布于群体分布区域内,采样树龄接近。

表 1 供试材料及其来源

Table 1 Origin or collection place of materials used in this study

群体名称 Group name	采样地点 Sampling location	采样数目 Sampling No.	平均树高 Average height	平均胸径 DBH	平均轮枝数 Average branch No.
乐业种源 Leye provenance	乐业县 Leye County	30	16.99	20.53	17
隆林种源 Longlin provenance	隆林县 Longlin County	31	15.48	19.12	17
西林种源 Xilin provenance	西林县 Xilin County	31	15.64	19.32	16

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 的提取与纯化 参照张博等(2004) CTAB-硅珠法稍作改动提取样品的 DNA,并对提取的 DNA 进行纯化,用紫外分光光度计和 1%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量和浓度,将提取的 DNA 稀释至统一浓度后,放-20℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增 所设计引物由上海捷瑞基因技术有限公司合成,Taq 酶、dNTPs 购自捷瑞生物工程有限公司。PCR 反应体系为 10 μL:Tris-HCl 10 mmol/L pH 8.0, KCl 50 mmol/L, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, dNTP(dATP、dCTP、dGTP、dTTP 各 0.2 mmol/L),引物 2.5 pmol, Taq 聚合酶 0.08 U, DNA 10~20 ng。扩增反应程序采用 Touch-down PCR:94℃ 15 s, 60℃ 15 s(Δ℃=-0.5), 72℃ 30 s, 16cycles;在进入 94℃ 15 s, 52℃ 15 s, 72℃ 30 s, 10cycles;最后 72℃ 延伸 15 min。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE) SSR-PCR 产物在 8%的聚丙烯酰胺凝胶上电泳,银染检测。银染检测步骤为 PCR 产物加等体积上样缓冲液,8%聚丙烯酰胺凝胶(100 mL 凝胶包括 42 g 尿素, 20 mL 40%丙烯酰胺和 N,N'-亚甲双丙烯酰胺(19:1), 0.5 mL 10%过硫酸铵, 50 μL TEMED, 10 mL 10×TBE 电泳缓冲液)240 V 稳压电泳 1 h 后固定染色;固定 10 min(固定液 10%乙醇, 0.5%乙酸),

ddH₂O 漂洗 2 次每次 2 min;再用 0.15% AgNO₃ 染色 7 min, ddH₂O 漂洗 2 次每次 2 min, 最后显影 (1.5% NaOH, 0.00756% NaBO₄, 1% 甲醛) 至条带清晰, 照相记录。

1.2.4 SSR 引物筛选 本研究所使用的 SSR 引物根据广西林科院对马尾松基因组 DNA 测序所得基因组 DNA 序列设计开发, 共开发 127 对。首先, 利用遗传上相对较远的马尾松、细叶云南松、湿地松、加勒比松的 DNA 样品对 127 对引物进行 PCR 扩增, 筛选出有目的扩增产物, 主带清晰的引物; 然后再用马尾松、细叶云南松 DNA 样品各 8 个样本对初筛所得到的引物进行复筛, 共选取了 12 对具有多态性的 SSR 引物用于本实验的群体遗传多样性研究。

1.2.5 天然群体遗传多样性方法 SSR 为共显性标记, 同一引物扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。采用小源凝胶成像系统, 对所得的图片进行判读, 然后根据所读的数据用 A, B, C, D, E... 按条带长度从大到小进行编号。

采用 POPGENE32 软件 (Yeh *et al.*, 1997) 计算群体间和群体内的观察等位基因数目 (A), 有效等位基因数目 (N_e), Shannon 多样性指数 (I), 各位点的观察杂合度 (H_o) 和期望杂合度 (H_e), Nei 基因多样性 (h), 固定指数 (F)。采用 POPGENE32 软件计算基因分化系数 (F_{st}) 和基因流 (N_m), 用于反映群体间的遗传分化程度; 检测各群体是否符合 Hardy-Weinberg 平衡定律, 度量各群体的连锁不平衡状况; 用 POPGENE32 软件分析得遗传距离。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

首先采用马尾松、细叶云南松、湿地松、加勒比松对设计开发的 127 对引物进行 PCR 扩增, 从扩增结果发现有 122 对引物有主带清晰的扩增产物。之后再利用马尾松和细叶云南松对初选引物进行复选, 其中 23 对引物在细叶云南松中表现出多态性, 18 对引物在马尾松中表现出多态性。从中选取 12 对引物用于本实验, 部分扩增结果如图 1 所示。

2.2 细叶云南松天然群体遗传多样性分析

表 2 显示, 12 对引物共检测到 13 个位点 37 个等位基因, 每个位点平均观察等位基因数 (A) 为 2.85, 多态率为 100%; 有效等位基因数从位点 PF351 的 1.03 到位点 PF406 的 1.97, 平均有效等位

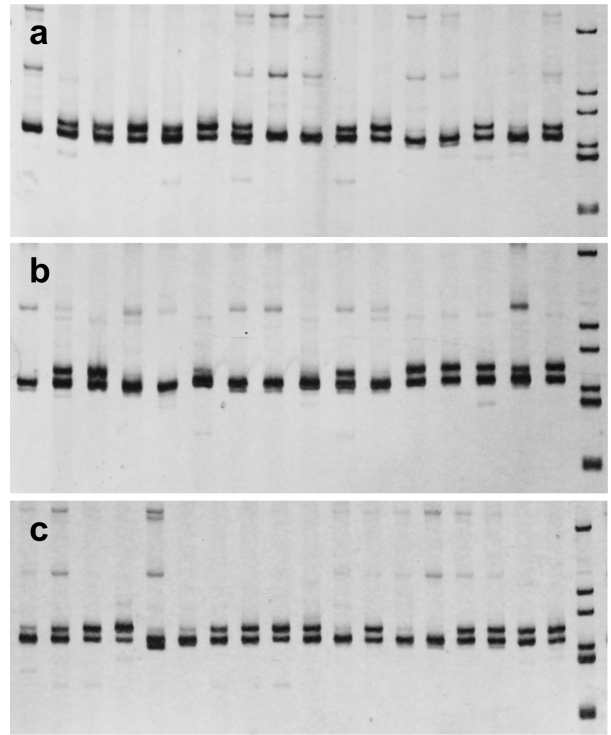


图 1 PF408 号引物对乐业群体(a)、西林群体(b)和隆林群体(c)的扩增结果

Fig. 1 Electrophoresis pattern amplified from Leye population (a), Xilin population (b) and Longlin population (c) with primer PF408

基因数 (N_e) 为 1.45。2 对引物揭示的细叶云南松 Shannon 多样性指数范围在 0.738~0.083 之间, 平均为 0.488。观察杂合度的值范围在 0.032~0.497 之间, 平均为 0.284; 期望杂合度的值从 0.033~0.889, 平均为 0.342, 不同位点的杂合度也存在较大差异。

三个群体的有效等位基因数介于 1.391~1.511 之间, 平均为 1.447。观察杂合度的值从 0.318~0.381, 平均为 0.341; 期望杂合度的值从 0.261~0.302, 平均为 0.281。说明各群体间的多态性水平差异不大。按检测到的有效等位基因数 (N_e) 和期望杂合度 (H_e) 作为标准, 隆林群体的遗传多样性最高, 乐业群体的遗传多样性水平最低 (表 3)。三个群体的 Nei's 基因多样性指标的变化范围为 0.256~0.297, 表明 3 个群体的遗传多样性水平均偏低。按照 Nei's 基因多样性指标对 3 个群体由高到低排序为隆林群体 > 西林群体 > 乐业群体, 总体上与 Shannon 多样性指数分析所得的结论一致。

2.3 群体遗传分化与基因流分析

为确定 SSR 位点上的变异量在群体间及在群体内的分布情况, 采用 F 统计量对群体的遗传变异

表 2 细叶云南松的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia*

扩增位点 Amplified locus	等位基因数 A	有效等位基因数 Ne	多样性指数 I	期望杂合度 Exp_Het	观察杂合度 Obs_Het	多样性指数 Nei
PF351	2	1.033	0.083	0.033	0.032	0.032
PF382	2	1.228	0.333	0.207	0.187	0.186
PF303	4	1.301	0.490	0.232	0.233	0.231
PF312	2	1.870	0.658	0.56	0.468	0.465
PF319	2	1.521	0.526	0.439	0.345	0.343
PF344	2	1.352	0.429	0.256	0.262	0.26
PF349	3	1.071	0.170	0.068	0.067	0.066
PF390	3	1.268	0.388	0.239	0.213	0.212
PF402	5	1.552	0.738	0.198	0.358	0.356
PF403-1	4	1.305	0.522	0.256	0.235	0.234
PF403-2	3	1.463	0.559	0.381	0.318	0.316
PF406	2	1.976	0.687	0.889	0.497	0.494
PF408	3	1.899	0.762	0.685	0.476	0.474
平均 Mean	2.846	1.449	0.488	0.342	0.284	0.282

A = Observed number of alleles; Ne = Effective number of alleles; I = Shannon's information index.

表 3 细叶云南松天然群体的遗传多样性比较

Table 3 Comparison of genetic diversity of the *P. yunnanensis* var. *tenuifolia* populations

群体名称 Group name	样本大小 Sample size	等位基因 Na	有效等位基因数 Ne	多样性指数 I	观察杂合度 Obs_Het	期望杂合度 Exp_Het	多样性指数 Nei
乐业群体 Leye population	31	2.539	1.391	0.448	0.318	0.261	0.256
西林群体 Xilin population	31	2.462	1.439	0.464	0.325	0.281	0.276
隆林群体 Longlin population	30	2.385	1.511	0.484	0.381	0.302	0.297
平均 Mean		2.462	1.447	0.465	0.341	0.281	0.276

进行分析。Fit 和 Fis 分别代表总群体和单个群体偏离哈迪-温伯格平衡的程度。整个细叶云南松群体的平均 Fit 值为-0.210, 平均 Fis 值为-0.237, 说明无论在总体水平还是群体内个体间, 细叶云南松群体都表现为杂合子过剩的现象。

固定指数(Fst)在不同位点的变化范围为 0.002~0.051, 群体平均为 0.022。在 Fst 值的基础上计算细叶云南松群体间的基因流(Nm)在不同位点的变化范围从 4.693~122.189, 平均为 11.17, 说明群体间存在比较充分的基因交流(表 4)。而由表 5 可知, 细叶云南松的遗传多样性中群体内的遗传多样性占 86.4%, 群体间的占 13.6%; 由 h 计算的群体间的基因分化系数(Gst)为 0.089。这表明, 细叶云南松群体间的遗传分化水平较低, 大部分变异均存在群体内。

3 结论与讨论

3.1 细叶云南松遗传多样性分析

基于 13 个等位基因获得的遗传多样性的结果显示, 细叶云南松天然群体平均观察杂合度为 0.341,

表 4 细叶云南松群体的 F 统计量和基因流

Table 4 F-statistic and gene flow of the *P. yunnanensis* var. *tenuifolia* populations

位点 Locus	单个群体偏离度 Fis	总体偏离度 Fit	固定指数 Fst	基因流 Nm
PF351	-0.051	-0.016	0.033	7.375
PF382	-0.125	-0.113	0.010	23.690
PF303	-0.006	0.010	0.015	16.218
PF312	-0.271	-0.207	0.051	4.693
PF319	-0.302	-0.281	0.016	15.054
PF344	-0.007	0.014	0.021	11.651
PF349	-0.047	-0.027	0.019	12.679
PF390	-0.176	-0.130	0.040	6.065
PF402	0.426	0.444	0.030	8.014
PF403-1	-0.106	-0.094	0.011	22.431
PF403-2	-0.248	-0.202	0.037	6.502
PF406	-0.802	-0.798	0.002	122.189
PF408	-0.458	-0.447	0.007	33.605
Mean	-0.237	-0.210	0.022	11.170

期望杂合度为 0.281, Nei's 基因多样性指标为 2.76, Shannon 多样性指数为 0.465。与其它树种相比, 如欧洲云杉(*Picea abies*)杂合度为 0.789(Pfeiffer *et al.*, 1997), 黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)杂合度为 0.673 (Amarasinghe *et al.*, 2002), 欧洲栓皮栎(*Quercus*

表 5 细叶云南松的遗传分化

Table 5 Genetics differentiation of *P. yunnanensis* var. *tenuifolia* populations

指标 Index	Shannon 指数	指标 Index	Nei 指数
群体内遗传多样性 Hpop	0.422	群体内的基因多样性 Hs	0.257
群体总的遗传多样性 Hsp	0.488	群体总的基因多样性 Ht	0.282
群体内遗传多样性所占比值 Hpop/Hsp	0.864	群体内基因多样性所占比值 Hs/Ht	0.911
群体间遗传多样性所占比值 (Hsp-Hpop)/Hsp	0.136	遗传分化系数 Gst	0.089

suber) 杂合度为 0.648(Hornero *et al.*, 2001), 遗传多样性偏低。这一方面与细叶云南松自身的分布面积相对狭小集中连续分布的特点有关, 另一方面也受到了本次研究采用的马尾松 SSR 引物在细叶云南松中位点多态性较低的影响。本次研究采用的马尾松 SSR 引物具有较高的种间通用性, 在应用过程中发现引物在湿地松、加勒比松等狭长分布或岛状分布的松类中多态性较高, 而在马尾松、细叶云南松等连续集中分布的松类中多态性较低且杂合体偏多。导致这种深层次原因还有待以后进行深入研究。而且细叶云南松天然群体的杂合子过剩也可能与其处于云南松与马尾松分布区的交汇地带有关, 其可能受到了外来近缘种的基因迁入与渐渗。而细叶云南松、云南松及马尾松的亲缘关系与进化起源关系同样值得深入研究。

3.2 细叶云南松天然群体遗传结构

遗传变异在群体间小尺度空间上的分布, 甚至群体间大尺度上不同空间的分布是群体遗传结构的重要特征之一, 与进化和生态遗传过程有着不可分割的联系。由于空间遗传结构的形成和改变是生境、自然选择和植物繁育系统共同作用的结果, 因此空间遗传结构的分析有助于探讨各种进化因素的作用和揭示植物的濒危机制, 为最大限度地保护和利用遗传多样性提供参考和依据。

本研究在群体遗传机构分析中得到细叶云南松天然群体间的遗传分化水平较低, 绝大部分变异存在于群体内。群体间的基因流, 平均为 11.17, 表明细叶云南松在相对狭小的分布区内存在比较充分的基因交流。研究结果比云南松、高山松和思茅松各自的居群内遗传变异要高, 相对居群间遗传变异要低(虞泓等, 2000)。每到花期, 松类的花粉随风力传

送, 并在空中形成“花粉云”(pollen cloud), 这如同一个巨大而丰富的基因型混合库, 使松类的交配系统可以保持较高遗传多样性。细叶云南松地理分布上范围狭窄、且集中分布的态势, 则有利于“花粉云”对种群形成覆盖, 从而使群体间的基因交流顺畅。本次采样采集的均是成年的大树, 其展现的遗传信息是多年以前形成的。近年来对细叶云南松生境的人为干扰急剧加重, 细叶云南松生境已经呈现出片段化的趋势, 也改变了原有的基因交流格局。因此应该进行更深入的细叶云南松保育遗传学研究, 以便对这一树种进行科学有效的保护。

参考文献:

- Amarasinghe V, Carlson JE. 2002. The development of microsatellite DNA markers for genetic analysis in Douglas-fir[J]. *Can J For Res*, **32**:1 904-1 915
- Charters YM, Wilkinson MJ. 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germplasm[J]. *Theor Appl Gen*, **100**:160-166
- Hornero J, Gallego FJ, Martínez I, *et al.* 2001. Testing the conservation of *Quercus* spp. Microsatellites in the cork oak, *Q. suber* [J]. *Sil Gen*, **50**(3-4):162-167
- Li ZJ(李治基), Wang XP(李大南). 1981. The distribution of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* in relation to the environmental conditions(广西细叶云南松的地理分布和环境的关糸)*Coll Plant Ecol & Geobotany*(植物生态学与地植物学丛刊)[J], **5**(1):28
- Pfeiffer A, Olivieri AM, Morgante M. 1997. Identification and characterization of microsatellite in Norway spruce(*Picea abies* K)[J]. *Genome*, **40**:411-419
- Yang BQ(杨炳强), Li DN(李大南). 1988. The fertility characteristics of soil in the distribution area of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* in Yazhang, Guangxi(广西雅长细叶云南松分布区土壤的肥力特性)[J]. *J Guangxi Agric*(广西农学院学报), **7**(3):27-33
- Yeh FC, Yang RC, Boyle TB, *et al.* 1997. Popgene, The User-friendly Shareware for Population Genetic Analysis[M]. Edmonton: Molecular Biology and Biotechnology Centre, University of Alberta:25-33
- Yu H(虞泓), Ge S(葛颂), Huang RF(黄瑞复), *et al.* 2000. A preliminary study on genetic variation and relationships of *Pinus yunnanensis* and its closely related species(云南松及其近缘种的遗传变异与亲缘关系)[J]. *J Integr Plant Biol*(植物学报), **42**(1):107-110
- Zhang B(张博), Zhang L(张露), Zhuge Q(诸葛强), *et al.* 2004. A rapid and simple method of total DNA extraction from tree(一种高效的树木总 DNA 提取方法)[J]. *J Nanjing For Univ*(南京林业大学学报), **28**(1):13-16
- Zhong YC(钟业聪), Huang KX(黄开响). 1990. A new species of *Pinus* from Guangxi(广西松属一新种)[J]. *Guihaia*(广西植物), **10**(4):287-289