

湖南城步马尾松种子园遗传多样性的 ISSR 研究

张冬林^{1a,2}, 杨玉洁^{1a}, 杨模华^{1a*}, 李志辉^{1a}, 唐效蓉³, 丁贵杰⁴, 谭晓风^{1b}

(1. 中南林业科技大学, a. 林学院 b. 经济林育种与栽培国家林业局重点实验室, 湖南长沙 410004;

2. 缅因大学, 美国 04469; 3. 湖南省林业科学院, 湖南长沙 410004; 4. 贵州大学林学院, 贵州贵阳 550025)

摘要: 利用 ISSR 分子标记技术, 对湖南城步马尾松种子园的 4 个种源区的 117 个无性系的马尾松遗传多样性进行了研究。采用了 10 个 ISSR 引物扩增共获得了 218 个标记位点, 其中有 210 个为多态位点, 多态位点比率为 96.33%。不同种源区多态位点百分率在 88.99% ~ 90.37% 之间。其中两广种源区的多态位点百分率最高, 达 90.37%, 说明其种源内遗传变异水平在 4 个种源区中是最高的。总的 Shannon 多样性指数为 0.5030。Nei's 遗传多样性指数为 0.3347。各个种源区的遗传一致度的变化范围在 0.9689 ~ 0.9812 之间, 各群体间的基因分化系数为 0.0393, 基因流为 12.2219。4 个种源区间 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类分析结果表明, 遗传距离 (0.0190) 最小的为雪峰山地种源区与贵州种源区首先聚类, 雪峰山地种源区、贵州种源区与南岭山脉种源区依次聚类, 遗传距离最大 (0.0316) 的是两广种源区与贵州种源区, 两广种源区在遗传距离上与其他 3 个种源区的聚类相距较远, 这与其地理分布格局大致吻合。本研究的初步结果为无性系种子园的经营和择伐提供了一定的理论依据。

关键词: 马尾松; 种子园; 遗传多样性; ISSR

中图分类号: S791.248; Q943

文献标志码: A

文章编号: 1673-923X(2010)12-0006-05

Genetic diversity of *Pinus massoniana* Lamb. seed orchard of Chengbu(Hunan) using ISSR markers

ZHANG Dong lin^{1a,2}, YANG Yur jie^{1a}, YANG Mo hua^{1a*}, LI Zhi hui^{1a}, TANG Xiao rong³, DING Gui jie⁴, TAN Xiao feng^{1b}

(1. Central South University of Forestry and Technology, a. School of Forestry,

b. The Key Laboratory of Non-timber Breeding and Cultivation of National Forestry Ministry,

Changsha 410004, Hunan, China; 2. University of Maine, USA Orono 04469; 3. Hunan Forestry Academy,

Changsha 410004, Hunan, China; 4. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang 550025, Guizhou, China)

Abstract: Genetic diversity of 117 clones in 4 populations of *Pinus massoniana* Lamb. seed orchard in Chengbu, Hunan Province was studied using ISSR markers. Ten ISSR primers, selected from 100 UBC primers, were applied to amplify all clones and a total of 218 markers were obtained. Among them, 210 are polymorphic loci and the rate of polymorphic loci is 96.33%. The percentage of polymorphic loci between populations shared a range of 88.99% ~ 90.37% and the highest (90.37%) was between Guangdong and Guangxi populations, which explained its ability adapts to circumstances or environment strongly and the hereditary change level is the highest among the populations. The Shannon diversity index and the Nei's diversity index were 0.5030 and 0.3347 (why different?). The percentage of genetic identity of the 4 populations ranged from 0.9689 to 0.9812 and the coefficient of genetic differentiation and gene flow were 0.0393 and 12.2219, respectively. The dendrogram based Nei's genetic distance shows that a high similarity was between Xuefeng and Guizhou populations with the distance of 0.0190. But there

收稿日期: 2010-01-10

基金项目: 教育部博士点基金项目 (20060538004); “十一五”国家科技支撑计划课题 (2006BAD24B0301); 湖南省教育厅重点项目 (07A077); 湖南省教育厅优秀青年项目 (09B112) 资助

作者简介: 张冬林 (1962-), 男, 湖北浠水人, 教授, 主要从事森林培育、植物学及生态学教学与科研工作

通讯作者: 杨模华 (1974-), 女, 湖南常德人, 副教授, 博士研究生, 主要从事林业生物技术研究

was a lower similarity between Guizhou and Guangdong Guangxi populations with the distance of 0.0316. The results reveal their geographic origination, which Xuefeng, Nanling, Guizhou populations are adjacent to each others, while the genetic distance of Guangdong Guangxi population was farther away from that of the above 3 populations. This result provides a scientific evidence for the management and choosing in *Pinus massoniana* Lamb. seed orchard.

Key words: *Pinus massoniana* Lamb.; seed orchard; genetic diversity; ISSR

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 属于裸子植物松科 (Pinaceae) 松属 (*Pinus*) 常绿高大乔木, 是我国南方集体林区最为重要的用材林树种之一, 也是我国东南湿润亚热带地区分布最广、资源储蓄最丰富的森林类型。主要分布于淮河和汉水流域, 湖南为马尾松资源分布的中心产区^[1]。种子园是生产改良种子的重要途径, 是育种与育林的桥梁。目前, 从生长特性对马尾松种子园的研究已有很多报道^[2-3]。遗传多样性是林木良种选育的基础, 一个物种的经济和生态价值也是依赖其特有的基因组成。因此, 目前对于遗传多样性的分子研究已成为科研热点, 当然马尾松也不例外^[4-5]。选择湖南城步马尾松种子园的优树群体为研究对象, 用 ISSR 分子标记技术测定种子园内的马尾松总 DNA, 分不同群体对马尾松进行聚类分析, 为马尾松种子园的管理、种质鉴定和育种等今后的发展提供基本的参考数据和科学的理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本实验以湖南城步马尾松种子园内的种源为研究对象, 在湖南城步马尾松种子园内分四大种源区取样 (两广种源区、雪峰山地种源区、南岭山脉种源区、贵州种源区), 采集幼嫩针叶。将幼嫩针叶用硅胶干燥带回, 用 -20℃ 冰箱保存。每个种源取 28~31 个无性系, 共 117 个。

1.2 DNA 的提取

采用杨模华^[6]改良的 CTAB 法提取总的 DNA, DNA 经 0.8% 的琼脂凝胶电泳进行质量检测, 对每个样品 DNA 稀释到 15 ng/μL 保存备用。

1.3 ISSR-PCR 反应体系和扩增反应

扩增反应在美国 ABI 公司的 PCR 扩增仪 (Ge

neAmp PCR System 9700) 上进行。PCR 反应所用试剂中的 Taq 酶及其反应体系的各成分购自宝生物技术公司, 其他试剂购自上海生工生物技术有限公司, 100 条 ISSR 引物序列采用哥伦比亚大学的 UBC800-UBC900, 引物由上海英骏生物技术公司合成。

ISSR-PCR 反应体系的总体积为 20 μL。组成如下: 1.5 μL 的 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs, 1.5 μL 的 2 mmol·L⁻¹ MgCl₂, 2.0 μL 的 10× PCR buffer, 0.6 μL 的引物 primer, 0.2 μL 的 5u·μL⁻¹ Taq DNA polymerase, 2 μL 的 15ng·μL⁻¹ 的 DNA template。经优化的 PCR 最优程序是: 94℃ 预变性 5 min 后, PCR 扩增 35 个循环, 每个循环 94℃ 变性 30 s, 56℃ 变性 45 s, 72℃ 延伸 2 min, 最后一个循环结束, 然后在 72℃ 延伸 7 min, 最后 4℃ 保存。扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶 (含 0.1 g·mL⁻¹ 溴化乙锭) 中电泳, 电泳液为 0.5× TBE, 用 BioRad 凝胶成像分析系统拍照保存。

1.4 数据统计与分析

每个样品的扩增条带按有或无记录, 有扩增条带赋值为“1”, 无扩增条带赋值为“0”, 形成 0/1 数据矩阵图。利用 POPgene32 软件分群体对供试材料对该 ISSR 数据进行统计分析。参数主要包括 ①多态性位点百分率 (*P*), ② Nei 基因多样性指数 (*h*), ③ Shannon 信息多样性指数 (*I*), ④ 基因流 (*N_m*) 和基因分化系数 (*G_{st}*), ⑤ Nei 遗传距离 (*D*) 和遗传一致度 (*I*)。

2 结果与分析

2.1 马尾松 ISSR 引物序号及扩增效果

采用选出的 ISSR 反应体系对 100 条引物进行筛选。获得 10 条 PCR 扩增条带重复性好、多态性

高、条带清晰的引物(见图 1),这 10 条引物对 117 个无性系扩增共获得 218 条条带(200~2000 bp)。

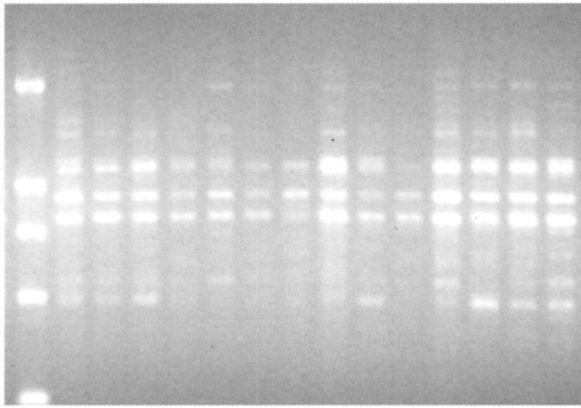


图 1 引物 807 对马尾松无性系的 ISSR PCR 反应扩增条带

Fig. 1 The electrophoresis of ISSR PCR amplification for primer 807

2.2 马尾松群体多态性分析

利用 POPGENE32 软件对 4 个种源区 117 个无性系个体进行群体数据遗传多样性分析(结果见表 2),结果表明城步马尾松种子园的总多态位点数为 210,总多态位点百分率(P)达到 96.33%,总 Shannon 信息指数(I)和总 Nei's 基因多样性(h)分别为 0.5030、0.3347,均显示该马尾松种子园具有极高的遗传多样性。4 个种源区的多态位点数范围在 194~197 之间,多态位点百分率在 88.99%~90.37% 之间,其中两广种源区的多态位点百分率最高,达 90.37%,说明其适应环境的能力最强,遗

10 条马尾松 ISSR 多态性引物编号与序列见表 1。

表 1 DNA 多态性引物编号与序列

Table 1 DNA polymorphisms primer number and sequences

引物编号	序列(5' - 3')	引物编号	序列(5' - 3')
807	(AG)8T	820	(GT)8C
808	(AG)8C	825	(AC)8T
811	(GA)8C	826	(AC)8C
817	(CA)8A	828	(TG)8A
818	(CA)8G	834	(AG)8YT

传变异水平也是 4 个种源区中最高的。Shannon 信息指数变化范围从 0.4679 至 0.4881, Nei's 基因多样性从 0.3315~0.3268。

在 4 个分析群体中,多态位点百分率分别为 88.99%、89.45%、89.91%、90.37%,其中两广种源区群体的多态位点百分率最高达到 90.37%。城步种子园的总群体基因多样性(H_t)是 0.3349,群体内的基因多样性(H_s)是 0.3218,基因分化系数(G_{st})为 0.0393,表示存在于群体间的变异占 3.93%,而群体内的变异高达 96.07%。基因流(N_m)为 12.2219。

表 2 群体遗传多样性分析

Table 2 Genetic analysis of *Pinus massoniana*

群体	样本数	多态位点数	多态位点百分率 (P) / %	Shannon 信息指数 (I)	Nei's 基因多样性 (h)	观察等位基因数 (N_a)	有效等位基因数 (N_e)
雪峰	31	194	88.99	0.4679	0.3115	1.8899	1.5248
南岭	28	195	89.45	0.4786	0.3210	1.8945	1.5470
贵州	30	196	89.91	0.4885	0.3279	1.8991	1.5591
两广	28	197	90.37	0.4881	0.3268	1.9037	1.5551
总计	117	210	96.33	0.5030	0.3347	1.9633	1.5632

2.3 马尾松不同群体的遗传关系

遗传距离是显性频率的函数,用于分析群体间的遗传相似性,由表 3 反应了不同种源区间的遗传距离和遗传一致度,各种源区的遗传一致度的变化范围在 0.9689~0.9812 之间。其中雪峰山地种

源区与贵州种源区遗传一致度最高,达到 0.9812。遗传距离最大的是雪峰山地种源区与两广种源区(0.0316),最小的为雪峰山地种源区与贵州种源区(0.0190)。

根据 Nei's 遗传距离利用 POPGENE32 软件构建的种源区遗传关系 UPGMA 聚类图如图 2 所示。

表 3 遗传距离 (D) 和遗传一致度 (I)
Table 3 Genetic distance and genetic identity

popID	1	2	3	4
1	* * * *	0.979 1	0.981 2	0.970 4
2	0.021 1	* * * *	0.975 0	0.970 2
3	0.019 0	0.025 3	* * * *	0.968 9
4	0.030 1	0.030 3	0.031 6	* * * *

1 雪峰山地种源区 2 南岭山脉种源区 3 贵州种源区 4 两广种源区

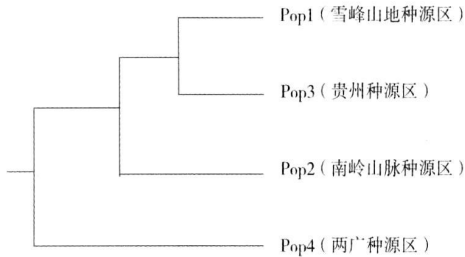


图 2 四个马尾松种源区遗传聚类图

Fig. 2 Genetic dendrogram of four *Pinus massoniana* provenances

3 结论与讨论

利用 ISSR 分子标记技术,对湖南城步马尾松种子园内 4 大种源区(两广种源区、雪峰山地种源区、南岭山脉种源区、贵州种源区)的遗传相关性和遗传多样性进行研究,在本研究中群体总的 Nei's 基因多样性指数(0.334 7)接近于李志辉等^[7]对于广西古蓬和浪水马尾松天然林的研究(0.351 0、0.276 5),说明本采样种子园群体与马尾松天然林相比,其遗传多样性并没有下降,而且城步马尾松种子园的嫁接穗条本来是采自于全国天然林中的表型特征(特别是胸径)优异的个体。虽然经过了选优,但并未对群体的遗传多样性产生太大的影响。因此,其遗传多样性仍保持比较高的水平。

总群体间的基因分化系数(G_{st})为 0.039 3,表示存在于群体间的变异占 3.93%,而群体内的变异高达 96.07%,说明马尾松的变异主要存在于群体内部,这与李志辉等对马尾松天然林的研究是一致的。基因分化系数低于张薇^[8]和龚佳^[9]对马尾松种子园的研究(0.050 4; 0.051 5),以及王鹏良^[10]和艾畅等^[11]对于无性系种子园的研究(0.070 8; 0.076 7),说明该种子园群体的遗传具有相当好的稳定性。本研究中 4 个群体间的基因流(N_m)为

12.221 9,从基因流水平来评价,马尾松种子园群体无性系间的基因流是比较大的,接近于李志辉等对于马尾松天然林的研究(9.887 7, 13.264 3)。Wright^[12]认为,当 $N_m > 1$ 时,基因流就可以防止由遗传漂变引起的家系间的遗传分化。进一步证明,该马尾松种子园具有相当好的遗传稳定性。

各种源区的遗传一致度的变化范围在 0.968 9~0.981 2 之间。其中雪峰山地种源区与贵州种源区遗传一致度最高,达到 0.981 2。遗传距离最大的是两广种源区与贵州种源区(0.031 6),遗传距离最小的为雪峰山地种源区与贵州种源区(0.019 0),这与其地理分布格局大致吻合,因为雪峰山地和贵州是处在相同的地理纬度,属亚热带湿润气候类型,其气候条件和水热条件基本一致,物种的进化是自然选择的结果,某个种群的生存也是与环境条件相适应的结果,相同的环境选择压力表现在物种或种群的基因组上,便获得了相似的进化趋势。这与万爱华等^[13]对于马尾松群体的亲缘关系的远近与纬度的相关性最为明显的研究结论是一致的。因此,雪峰山地种源区与贵州种源区其亲缘关系最近,遗传一致度最大,遗传距离最小。雪峰山地种源区与南岭山脉种源区虽然同属于湖南境内,但两地的地理环境、海拔高度等不同^[14]造成基因型的变异而没有首先聚类。两广种源区的无性系受环境选择的影响,主要受地理位置和充足的水热条件的影响,环境的选择压力迫使基因型发生变异,以致于与其他 3 个种源区的遗传距离最远。

从 4 个种源的依次聚类顺序和聚类的遗传距离可以看出,两广种源区在遗传距离上与其他 3 个种源的聚类相距较远,雪峰、贵州种源区与南岭山脉种源区依次聚类,这从另一方面印证了环境对基因型的选择作用。水热丰富的气候条件在促进物种基因型的进化过程中起到了相当重要的作用。

通过对城步马尾松无性系种子园 4 大种源区 117 个无性系 ISSR 标记的初步分析得知,为保持种子园遗传增益的持续性获得,极大的保留种源区无性系是相当有必要的,以此保留珍贵的基因资源,通过基因交流增强种子园无性系子代对环境的适应能力。

参考文献:

- [1] 李午平,唐效蓉,汤玉喜,等.湖南马尾松工业原料林基地建设的优势与策略[J].湖南林业科技,1995,22(4):18-22.
- [2] 杨章旗.马尾松种子园优良家系生长性状选择[J].福建林业学院学报,2006,26(1):45-48.
- [3] 张任好.马尾松第二代种子园建园无性系选育与应用[J].福建林业科技,2008,35(1):1-5.
- [4] 丁小飞,曹健,陈红林,等.湖北省马尾松天然群体的遗传变异和遗传多样性研究[J].安徽农业科学,2006,34(13):3057-3059.
- [5] 尹俊明,李东,陈颖,等.马尾松表达序列标签多态性初步分析[J].林业科学,2004,40(6):771-971.
- [6] 杨模华,李志辉,张冬林,等.马尾松针叶 DNA 提取方法[J].中南林业科技大学学报,2008,28(3):39-44.
- [7] 李志辉,陈艺,张冬林,等.广西马尾松天然林古蓬和浪水种源群体遗传多样性 ISSR 分析[J].中国农学通报,2009,25(16):116-119.
- [8] 张薇,龚佳,季孔庶.马尾松实生种子园遗传多样性分析[J].分子植物育种,2008,6(4):717-723.
- [9] 龚佳.马尾松实生种子园遗传多样性研究[D].南京:南京林业大学,2007:20-30.
- [10] 王鹏良.马尾松无性系种子园多年份子代遗传多样性分析[D].南京:南京林业大学,2006.
- [11] 艾畅,徐立安,赖焕林,等.马尾松种子园的遗传多样性与父本分析[J].林业科学,2006,42(11):146-150.
- [12] Wright S. Evolution mendelian population[J]. Genetics, 1931,(16):97.
- [13] 万爱华,徐友明,管兰华,等.马尾松种子园无性系遗传结构的地理变异[J].东北林业大学学报,2006,34(4):12-14.
- [14] 李午平,伍家荣,李东,等.湖南省马尾松产区区划[J].湖南林业科技,1995,22(2):1-8.

[本文编校:罗列]

欢迎订阅 2011 年《中南林业科技大学学报》

《中南林业科技大学学报》是自然科学综合性学术期刊,全国优秀高校学报,教育部优秀高校学报;湖南省优秀高校学报,湖南省一级期刊;国家科技部中国科技论文统计源期刊,中国科学引文数据库来源期刊,中国学术期刊综合评价数据库来源期刊;中国学术期刊(光盘版)数据库,中国期刊论文全文数据库、中文科技期刊数据库首批入选期刊。

为了满足校内外作者发表科研和学术论文的要求,加快科技信息的传播速度,提高期刊的出版速度和办刊效率,为广大科技工作者开展学术交流搭建一个速度快、空间大、与时俱进的理想平台,经湖南省新闻出版局、湖南省教育厅批准,我校自科版学报从 2010 年起由双月刊变更为月刊,每月底出版发行,年出版 12 期。

本刊主要刊登森林培育、经济林、森林保护、水土保持、林学基础学科(林木遗传育种、植物学、土壤学、植物生理生化、森林生态学、森林气象学等)、生物科学与技术、森林工程;木材科学、家具与室内设计、木材学、林产品加工和化学、环境科学与工程、食品科学与工程、林业机械等。

从 2010 年起我刊已增开生态旅游、家具设计、园林园艺、林业遥感信息工程、林业经济管理 etc 栏目。我刊封面采用彩色铜版纸、内页采用单色哑粉纸印刷,封二、封三将刊登特色学科、学院推介、学者风采和成果展示等内容。

欢迎广大科技和教育工作者相互转告,踊跃投稿,联系封二、封三刊登业务。我们将热诚为广大教师和科技工作者服务,认真做好期刊编辑工作,进一步提高期刊质量和水平。

本刊为国内外公开发行期刊。每期订价 20 元,全年订价 240 元。

本刊的国外总发行:中国出版对外贸易总公司(北京 782 信箱,邮编 100011)。国内订阅读网址 www.kankan.com.cn。订阅本刊的单位或个人可从以上地址订阅,也可将订费从邮局汇至:湖南省长沙市韶山路 498 号中南林业科技大学期刊社,邮编 410004。联系人韩老师,联系电话 0731-85623395。