

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

李志辉¹, 陈艺¹, 张冬林¹, 杨模华¹, 蒋燚³, 丁贵杰⁴, 谭晓凤²

(¹中南林业科技大学林学院, 长沙 410004;

²中南林业科技大学经济林栽培与育种重点实验室, 长沙 410004

³广西林业科学研究院, 南宁 530001; ⁴贵州大学林学院, 贵阳 550025)

摘要:从100个ISSR引物中筛选出10个多态性引物,对广西古蓬和浪水两个种源区马尾松天然林5个群体共85份样品进行遗传多样性分析,古蓬种源三个群体47份样品共检测到192个位点,其中多态位点数为177个,浪水两个群体共38个样品检测到168个多态位点。对两个种源区马尾松群体ISSR分析数据采用POPgene 32软件进行分析,结果表明:古蓬马尾松天然林群体内,总的多态位点百分率(P)为94.35%,总的Shannon信息指数(I)为0.4278,Nei's基因多样性指数(h)为0.2765;浪水种源马尾松群体内,总的多态位点百分率(P)为94.38%,总的Shannon信息指数(I)为0.5190,Nei's基因多样性指数(h)为0.3510;这表明马尾松天然林群体内遗传多样性水平高,个体间基因多样性变异大。古蓬马尾松群体间的基因分化系数(Gst)为0.0481,浪水的为0.0363,这表明分别有95.19%和96.37%的变异存在于群体内;古蓬3个群体的基因流为9.8877,浪水两个群体的基因流为13.2643,这表明本研究分析中的种源内群体间存在比较高的近亲交配现象,因此有必要加大对马尾松天然林的保护力度,扩大天然林的保护范围。

关键词:马尾松;天然林;遗传多样性;ISSR

中图分类号:S759.3

文献标识码:A

论文编号:2009-0326

ISSR Analysis of Genetic Diversity of *Pinus massoniana* on Gupeng and Langshui Nature Populations in Guangxi

Li Zhihui¹, Chen Yi¹, Zhang Donglin¹, Yang Mohua¹, Jiang Yi³, Ding Guijie⁴, Tan Xiaofeng²

(¹College of Forestry, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

²Key Laboratory of Non-Wood Forest Products of State Forestry Administration, Central South University of Forestry and Technology, Changsha 410004;

³Guangxi Forestry Research Institute; Nanning 530001;

⁴College of Forestry, Guizhou University; Guiyang 550025)

Abstract:Genetic diversity on five nature populations of *Pinus massoniana* Lamb. in Gupeng and Langshui, Guangxi province, was analyzed by 10 inter simple sequence repeat (ISSR) markers selected from 100 primers. There are 47 individuals within 3 groups in Gupeng and 38 individuals in Langshui population. The results were as follows: (1) There are 177 polymorphic loci among 192 loci in Gupeng and 177 polymorphic loci in Langshui population. (2)The propotion of polymorphic loci (P), the Shannon's diversity indexes(I) and the Nei's diversity indexes(h) were 94.35%, 0.4278 and 0.2765 respectively in Gupeng population. Accordingly the value

基金项目:教育部博士点基金“分子与体胚发育技术在马尾松优质纸浆材选育及快繁中的应用”(20060538004);国家科技支撑计划子课题“马尾松群体遗传多样性及优质纸浆材分子辅助选择育种”(2006BAD24B0301);湖南省教育厅重点项目“马尾松优良家系无性系分子辅助选择育种研究”(07A077);中南林业科技大学芙蓉学者专项基金项目(0595)。

第一作者简介:李志辉,男,1957年出生,湖南益阳人,教授,博士生导师,主要从事林木定向培育方面的研究和教学工作,出版专著3部,发表论文50余篇。通信地址:410004湖南省长沙市韶山南路498号中南林业科技大学林学院, Tel: 0731-5623011, E-mail: lzh1957@126.com。

收稿日期:2009-02-25,修回日期:2009-03-31。

in Langshui population were 94.38%, 0.5190 and 0.3510 respectively. The low coefficient of genetic differentiation ($G_{st}=0.0481$ and $G_{st}=0.0363$) meant that the majority of genetic variations (95.19% and 96.37%) occurred within populations. (3) The gene flow within Gupeng groups was 9.8877 and that of Langshui groups was 13.2643, which means that high degrees of inbreedings existed within the two populations respectively. So we concluded that it was necessary to increase the protection of natural populations and to expand the scope of protection of natural populations on Masson's Pine in Guangxi.

Key words: *Pinus massoniana* Lamb., natural populations, genetic diversity, ISSR

0 引言

马尾松(*Pinus massoniana* Lamb.)是松科松属常绿高大乔木,是我国南方重要的工业原料树种,也是我国主要的优良采脂林树种,其优良的木材特性被广泛应用于制浆造纸、人造板生产、矿柱、建筑、家具、装饰材料等,是针叶树种中分布最广、面积最大、用途最广、全树综合利用程度最高的乡土树种^[1]。近30年来对马尾松的遗传改良^[2]、优良种源的选择^[3]、优良家系和无性系选择^[4-5]、天然林和种子园遗传多样性的研究^[6-9]、马尾松分子标记遗传图谱构建^[10]等都有了大量的研究报告,但这些研究大多是立足于马尾松人工林的经营和改良。天然林是马尾松人工林获得更大遗传增益的资源宝库,所以保存、保护及利用马尾松天然林的遗传多样性就变得尤为重要。马尾松天然林的近况如何,其丰富的基因资源在天然林里的分布及表现程度如何,鲜有报道。杨光登曾于1995年报道了广西马尾松天然林优良种源区的堪忧现状^[11],近十多年过去了,目前的广西马尾松天然林内基因多样性表现程度如何?在天然林生态环境遭到破坏的情况下,现保留下的广西境内珍贵的马尾松优良种源区的天然林种群内,种群的生物多样性是否减少了。笔者采用ISSR分子标记技术首次分析广西古蓬和浪水两个种源区马尾松天然林群体的遗传多样性,以期对马尾松天然林遗传多样性及其遗传资源的保护和管理提供参考数据。

简单重复序列区间分子标记(Inter-simple Sequence Repeat ISSR)是一种建立在PCR反应基础上的随机性DNA分子标记,由Zietkiewicz等人于1994年创建^[12]。它根据基因组内广泛存在的微卫星序列设计18~20 bp的单一引物,对位于微卫星序列之间的基因组DNA进行扩增,扩增的指纹图谱可以同时提供基因组内多个位点的序列信息。其操作性、可重复性、稳定性均优于RAPD,且具有较高的多态性水平和信息容量大的优点,因而得到较快发展。目前ISSR分子标记已广泛应用于林木种质资源分析及遗传多样性的研究^[13-14]。

1 材料和方法

1.1 供试材料

试验材料采自广西古蓬和浪水马尾松天然林中的优树嫩枝叶,古蓬分三个区域小群体采样47株优树,分群体分别记为group1、group2、group3;浪水分两个区域采样38株优树,分群体分别记为group4、group5。

1.2 DNA的提取和扩增

采用杨模华^[15]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/uL保存备用。

扩增反应在美国的ABI公司的PCR仪上进行。

ISSR-PCR反应总体积是20 μ l。包括1.5 μ l的2.5 mmol/L dNTPs, 1.5 μ l的2mmol/L $MgCl_2$, 2.0 μ l的10 \times PCR buffer, 0.6 μ l的引物primer, 0.2 μ l的5 U/ μ l Taq DNA polymerase, 2 μ l的15 ng/ μ l的DNA template, 经优化的PCR最优程序是:94 $^{\circ}C$ 预变性5 min后,PCR扩增35个循环,每个循环94 $^{\circ}C$ 变性30 s, 56 $^{\circ}C$ 变性45 s, 72 $^{\circ}C$ 延伸2 min,最后一个循环结束,然后在72 $^{\circ}C$ 延伸7 min,最后4 $^{\circ}C$ 保存。扩增产物在1.4%的琼脂糖凝胶(含0.1 g/ml 溴化乙锭)中电泳,电泳液为0.5 \times TBE,用Bio-Rad凝胶成像分析系统拍照保存。

1.3 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”,无扩增带赋值为“0”,形成“0/1”矩阵。利用POPgene32软件分种源群体对供试材料进行统计。

2 结果与分析

2.1 马尾松ISSR多态性引物及ISSR-PCR扩增结果

从100条ISSR引物(根据哥伦比亚大学提供的序列,由英俊生物工程有限公司随机合成)中筛选出的10条稳定性强,重复性好,多态性丰富的引物(表1)对来自两个种源的85份材料进行PCR扩增,PCR扩增产物经电泳得到清晰的指纹图谱(如图1)。10个ISSR引物共扩增出192条带(从380到1,600 bp)。

2.2 DNA的多态性分析

浪水种源的多态位点百分率(p)为94.38%,古蓬种源的多态位点百分率(p)为94.35%。(表2),各个种

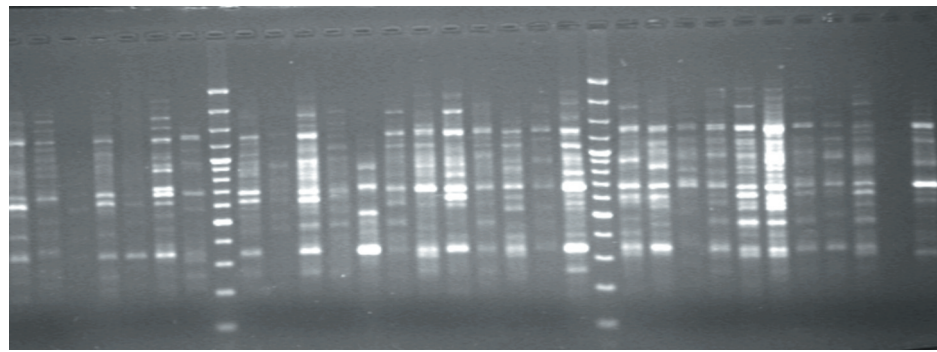


图1 引物811对马尾松群体进行ISSR-PCR的电泳图

表1 马尾松多态性ISSR引物名称及序列

引物名称	序列(5'-3')	引物名称	序列(5'-3')
807	(AG) ₇ AT	826	(AC) ₈ C
808	(AG) ₇ AC	834	(AG) ₈ YT
811	(GA) ₈ C	836	(AG) ₈ YA
817	(CA) ₈ A	855	(AC) ₈ YT
818	(CA) ₈ G	856	(AC) ₈ YA

表2 DNA多态性分析表

种群	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)
古蓬	47	167	94.35	0.4278	0.2765
浪水	38	168	94.38 %	0.5190	0.3510

源的P、I、h都显示出马尾松天然林种群水平具有很高的遗传多样性。且浪水种源的遗传多样性高于古蓬种源的遗传多样性。

表3 古蓬马尾松种源群体遗传相似度和遗传距离

Pop ID	1	2	3
1	****	0.9917	0.9770
2	0.0083	****	0.9848
3	0.0230	0.0152	****

表4 浪水马尾松种源群体遗传相似度和遗传距离

Pop ID	4	5
4	****	0.9750
5	0.0253	****

2.3 遗传距离

利用POPGENE32软件计算的结果可知,古蓬三个群体的遗传相似度平均为0.9845,平均遗传距离为0.0155。group 1和group 2的遗传距离最小,为0.0083,group 1和group 3的遗传距离最大,为0.0230(表3)。这与这三个群体的地理位置分布密切相关,group 1和group 2在地域上相邻,而group 3均与其他两个群体相隔甚远,这也说明了一定差异的地域范围是产生遗传多样性丰富的一个原因。浪水两个群体(group 4和group 5)的遗传相似度为0.9750,遗传距离

为0.0253(表4)。从表3和表4中可以看出,浪水种源群体间的遗传距离小于古蓬种源群体间的遗传距离,遗传相似度高于古蓬种群,这也与采样时两群体地理相邻有关。

3 小结与讨论

生物圈中最普遍的特征之一是生物的多样性,而遗传多样性的大小能够决定物种或种群进化潜力和适应环境的能力。本研究利用ISSR技术对广西古蓬和浪水两个优良种源区马尾松天然林的遗传多样性进行了分析。其古蓬的多态位点百分率(P)达94.35%,Shannon信息指数(I)为0.4278,Nei's基因多样性(h)为0.2765;浪水的多态位点百分率(P)高达94.38%,Shannon信息指数(I)为0.5190,Nei's基因多样性(h)为0.3510。利用Nei's基因多样性指标分析,本研究中的两个天然林群体Nei's基因多样性值均低于艾畅等^[16](2006)对马尾松无性系种子园的研究(0.4556);低于龚佳^[17](2007)对该无性系种子园子代的研究(0.5285)。低于张薇等^[18](2008)对马尾松实生种子园及其自由授粉家系的研究(0.5740),说明本采样群体中的马尾松天然林群体其遗传多样性与种子园的相比,有些下降,该采样区域的天然林生产的良种在遗传多样性上的风险比种子园内的稍大,有必要扩大采样范围,以获得更多的遗传多样性来源。这同时也对马尾松天然林区的保护

提出了一个要求,即必须尽可能的扩大天然林的保护面积和范围,生境破碎必然导致遗传多样性的丧失。当然,实生的种子园或无性系种子园保持着比较高的遗传多样性,可能是因为种子园各亲本来自不同的地理种源,种子园给这些地理环境相异的亲本提供了交流的机会,进而提高了种子园群体的遗传多样性水平。

而古蓬和浪水两个群体的多态位点百分率(P) 94.35%和 94.38%,均大大高于利用同工酶研究湖北马尾松天然林的P值P(68.06%~77.78%)^[7],古蓬群体间的基因分化系数(Gst)为 0.0481,浪水的群体间分化系数为 0.0363,均低于其他研究者对马尾松种子园群体研究的水平(0.050 4~0.0708)^[17-19],表示分别有 4.81%和 3.63%的变异存在于群体间,而群体内的变异高达 95.19%和 96.37%,这表明马尾松的主要变异存在于群体内,反映出古蓬和浪水天然林马尾松种源群体内遗传多样性丰富,处于较高的水平。

根据 Hamrick 等的观点,若基因流 $Nm < 1$,遗传漂变就成为刻划种群遗传结构的主导因素;若 $Nm > 1$,基因流就足以抵制遗传漂变的作用,也同时防止种群间分化的发生^[19]。本研究中古蓬马尾松 3 个群体的基因流为 9.8877,浪水两个群体的基因流为 13.2643。表明马尾松同一种源内群体间基因流交换比较频繁,但其遗传多样性程度表现又比较高,主要体现在其多态位点百分率较高,达 94%以上,其群体间的遗传分化小,马尾松天然林之所以有较高的遗传多样性,与其本身的生物学特性及自然选择有关,马尾松是一种适用性很强的树种,且花粉的传播距离非常的远,这有助于马尾松个体间的基因交流。又由于马尾松的分布范围广,采样区间的小气候,土壤等条件存在一定的差异,在长期自然选择的作用下产生了广泛的遗传变异,人为采样时,种源群体间分布不连续,形成一定程度的隔离。这也从另一方面说明,在马尾松天然林群体内确实保存着非常丰富的遗传变异,基因多样性水平高,将其称之为基因资源的宝库,一点也不过分。具有高水平遗传变异的植物种多为寿命长、地理分布广、风媒授粉、结实性高和处于演替末期的物种^[18],而马尾松具备全部这些特性。

在同等栽培条件下,如何能使林木速生丰产,一直是林木育种和森林培育工作者们的追求目标,选择速生高产的良种种源,并推广运用是最根本的保证。广西古蓬和浪水的马尾松种源是在马尾松全分布区试验评比中最好的几个种源之一^[3]。从实验的结果来看,

浪水和古蓬种源种内的遗传多样性丰富,具备营建遗传品质好、遗传多样性高、稳定性好的马尾松人工林的条件,能满足造林工作的需要。研究和探讨这些多样性的来源、类型和特点,能够为我们保护和利用马尾松天然林优良种质资源和生物多样性的保护提供有用的信息。

参考文献

- [1] 丁贵杰,周志春,王章荣,等.马尾松纸浆用材林培育与利用[M].中国林业出版社,2006:1-5.
- [2] 周志春,秦国峰,李光荣,等.马尾松遗传改良的成就、问题和思考[J].林业科学研究,1997,10(4):435-442.
- [3] 周志春,傅玉狮,吴天林.马尾松生长和材性的地理遗传变异及最优种源区的划定[J].林业科学研究,1993,6(5):556-564
- [4] 龙光生,李午平,葛宜和,等.马尾松半同胞优良家系选择研究[J].中南林学院学报,2002,22(1):17-22
- [5] 胡集瑞.马尾松种子园建园亲本性状遗传变异及优质速生无性系选育[J].福建林业科技,2008,35(2):21-33
- [6] 李丹,彭少麟.三个不同海拔梯度马尾松种群的遗传多样性及其与生态因子的相关性[J].生态学报,2001,21(3):415-421
- [7] 周必成,河野耕藏[日],荣花茂[日].湖北省马尾松天然林同工酶遗传变异的研究[J].湖北林业科技,2000,增刊,46-52.
- [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] 万爱华,徐有明,管兰华,等.马尾松无性系种子园遗传结构的 RAPD 分析[J].东北林业大学学报,2008,36(1):18-19
- [10] 尹佟明,黄敏仁,王明麻.利用 RAPD 标记和单株树大配子体构建马尾松的分子标记连锁图谱[J].植物学报,1997,39(7):607-612
- [11] 杨光登.广西马尾松优良种源现状及保护发展策略探讨[J].广西林业科学,1995,24(3):135-137
- [12] Zietkiwicz E A, Rafalsko and D Labuda. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J].Genomics 1994, 20:176-183.
- [13] 苏何玲,唐绍清.濒危植物资源冷杉遗传多样性研究[J].广西植物,2004,24(5):414-417.
- [14] 葛永奇,邱英雄,丁炳扬,等.子遗植物银杏群体遗传多样性的 ISSR 分析[J].生物多样性,2003,11(4):276-287.
- [15] 杨模华,李志辉,张冬林,等.马尾松针叶 DNA 提取方法研究[J].中南林业科技大学学报,2008,28(3):39-44.
- [16] 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
- [17] 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.
- [18] 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.
- [19] Hamrick J L, Godt MJW, Sherman - Broyles SL. Factors influencing levelsof genetic diversity inwoodyplant species[J]. New For, 1992, 6:95-124.