

黄连木居群遗传多样性的SSR标记分析*

吴志庄^{1,2} 张志翔^{1**} 汪泽军³ 李金霞⁴ 王学勇⁴

(¹北京林业大学生物科学与技术学院 北京 100083)

(²国家林业局竹子研究开发中心 杭州 310012)

(³河南省林业技术推广站 郑州 450002)

(⁴河北省林业科学研究院 石家庄 050061)

摘要 为系统揭示黄连木天然居群在遗传多样性水平上的差异及遗传分化状况,采用SSR (Simple sequence repeats) 分子标记对其8个居群进行遗传多样性分析.在建立良好的反应体系基础上,从已有的阿月浑子SSR引物中筛选出9对适合进行黄连木遗传分析的引物,在8个黄连木居群中共检测到43条等位基因,位点平均等位基因数为4.78,平均多态位点百分率达90.28%.各居群内平均有效等位基因数为2.08,平均期望杂合度(H_e)为0.472,说明各居群的遗传多样性处于中等水平.按检测到的有效等位基因数(N_e)和期望杂合度(H_e),各居群的遗传多样性由高至低依次为安康>唐县>顺平>辉县>略阳>栾川>林州>涉县.居群间的遗传分化系数(F_{ST})平均为0.319,说明居群内变异是黄连木变异的主要来源,并根据遗传距离将8个居群分为三大类.图2 表5 参17

关键词 黄连木;居群;SSR;遗传多样性;遗传分化

CLC Q949.754.403

SSR Analysis on Genetic Diversity of Natural Populations of *Pistacia chinensis* Bunge*

WU Zhizhuang^{1,2}, ZHANG Zhixiang^{1**}, WANG Zejun³, LI Jinxia⁴ & WANG Xueyong⁴

(¹College of Biological Sciences and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

(²China National Bamboo Research Center, Hangzhou 310012, China)

(³Forestry Technology Promotion Stations of Henan Province, Zhengzhou 450002, China)

(⁴Hebei Academy of Forestry, Shijiazhuang 050061, China)

Abstract Simple sequence repeat (SSR) molecular marker systems were used to analyze the genetic diversity and genetic structure of 8 natural populations of *Pistacia chinensis*. Based on establishment of optimized PCR reaction system, nine pairs of SSR primers were selected from the primers which were designed for *Pistacia vera* L. Totally, 43 alleles at average of 4.78 for per locus were observed in the 8 populations and the average of polymorphic locus percentage (P) was 90.28%. The average of effective allele number per locus was 2.08, and the average of expected heterozygosity was 0.472, which showed the total genetic diversity of the populations at a moderate level. According to effective allele number and expected heterozygosity, the genetic diversity of the 8 populations from high to low were AK>TX>SP>HX>LY>LC>LZ>SX. The proportion of genetic differentiation among the populations accounted for 0.319, which indicated that *P. Chinensis*'s variation mainly resulted from variation among populations. The 8 populations were divided into three types according to genetic distance. Fig 2, Tab 5, Ref 17

Keywords *Pistacia chinensis* Bunge.; natural population; SSR; genetic diversity; genetic differentiation

CLC Q949.754.403

黄连木为我国特有的乡土树种,生长历史悠久,分布区域广阔,当前已被列为我国主要的能源树种之一,具有广阔的开发利用前景^[1].遗传多样性是生物多样性的的重要组成部分,对任何一个物种来说,其遗传多样性越丰富,对环境变化的适应能力就越强,就越容易扩展其分布范围和开拓新的环境,因此遗传多样性研究是种质资源保存的基础和核心^[2].SSR (Simple sequence repeats) 标记或微卫星标记具有多态性较高、共显性分离、位点专化性、标记覆盖整个基因组且

分布均匀、DNA样本用量少等优点,目前已广泛用于小麦、水稻、葡萄、阿月浑子等农作物和林木的群体遗传多样性分析、亲缘关系比较和鉴定、物种进化和系统发生研究、基因连锁图谱构建等方面^[3-10].有关黄连木遗传多样性的研究还尚未见报道,因此本研究采用SSR分子标记技术,对黄连木8个天然居群进行遗传多样性及亲缘关系分析,旨在揭示我国主要分布区黄连木群体的遗传分化、多样性水平及遗传结构,以期为黄连木种质资源收集、保存、鉴定、评价以及遗传改良提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

在广泛调查的基础上,分别从河北、河南、陕西等地按随机取样的原则,采集黄连木8个居群的果实,采样点地理

收稿日期: 2009-07-30 接受日期: 2010-09-12

*国家“十一五”科技支撑计划项目 (No. 2006BA007A04) 和国家林业局“十一五”科技支撑项目 (No. 2006BAD18B0101) 资助 Supported by the Sci-tech Pillar Project of the “11th 5-year Plan” of China (No. 2006BA007A04) and the Sci-tech Project of the “11th 5-year Plan” of the State Forestry Administration of China (No. 2006BAD18B0101)

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: zxzhang@bjfu.edu.cn)

表1 黄连木采样点地理位置及生态因子
Table 1 Geographical locations and ecological factors of *P. chinensis*

居群 Population	采样地点 Location	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)	海拔 Altitude (h/m)	年均温 Annual mean temperature (θ/℃)	年降水量 Annual Precipitation (mm)	日照时数 Sunshine time (t/h)
TC	河北唐县 Tangxian, Hebei	113.92	38.51	952.3	11.4	512	2268.2
SP	河北顺平 Shunping, Hebei	115.05	39.26	752.4	12.2	525	2547
SX	河北涉县 Shexian, Hebei	113.71	36.61	875	13.2	508.6	2213
LZ	河南林州 Linzhou, Henan	113.87	36.03	785	12.7	650	2480.6
HX	河南辉县 Huixian, Henan	113.8	35.48	1020	14	640.4	2293.4
LC	河南栾川 Luanchuan, Henan	111.51	33.92	510	14.0	694.5	2295.9
AK	陕西安康 Ankang, Shaanxi	109.19	32.59	375.6	15.5	950	1800
LY	陕西略阳 Lueyang, Shaanxi	106.12	33.46	660	13	860	1550

位置及生态因子见表1。每个居群随机取样10~15株，每株间保证50 m以上的距离，要求样株树龄30 a以上，生长正常，无明显缺陷，病虫害少。采集的果实自然风干，混合后随机抽取300粒果实，经过浸种催芽，放在塑料盘中育苗，随机取30株幼苗用于实验分析。

1.2 DNA提取

采用改良CTAB法提取DNA，提取的DNA用0.8%琼脂糖胶电泳检测，紫外分光光度计检测其浓度和纯度（图1）。调整DNA浓度至200 ng μL⁻¹（以200 ng μL⁻¹的λDNA为对照），并用GIS凝胶成像分析系统拍照定量，-20℃保存备用。

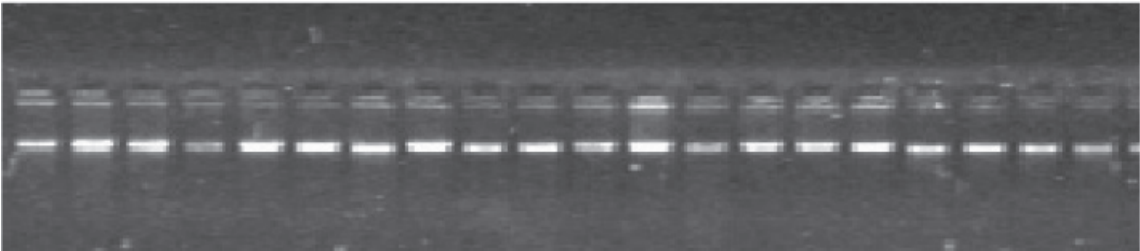


图1 辉县黄连木居群样本基因组DNA电泳检测图
Fig. 1 Electrophotogram of genetic DNA of the HX population samples

1.3 引物筛选和PCR反应体系优化

微卫星位点可能在属内种间甚至在科内属间是保守的，因此可以使用近缘种的引物。随机选用8个居群的试材对已发表的14个阿月浑子（*Pistacia vera* L.）SSR引物^[1]，根据Riaz Ahmad等SSR原始扩增条件^[11]进行引物筛选，经过对比分析，选取扩增条带清晰、重复性好、多态性高的9个引物作为本实验的引物。经过多次试验和综合比较，获得了最佳扩增反应体系和步骤，选用12 μL反应体系，各成分的最佳浓度确定为：MgCl₂ 2 mmol/L，引物250 nmol/L，dNTPs 200 μmol/L（Promega USA），Tag酶（TaKaRa）1 U，DNA模板30 ng。经优化的PCR扩增反应程序为：94℃预变性3 min，1个循环；94℃变性1 min，*T_m*℃退火（引物具体退火温度见表2）1 min，72℃延伸2 min，共45个循环；72℃延伸10 min，1个循环。

1.4 电泳和数据分析

采用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离扩增片段，银染检测扩增反应结果，根据每个样品的扩增产物按凝胶电泳的带型差异，记为AABB\AB\CC\DD等，构建数据矩阵，用POPGENE version 1.32软件^[12]计算多态位点百分率、有效等位基因数、期望杂合度、观察杂合度、Nei的遗传距离等参

数，并采用算术平均数的非加权成组配对法（UPGMA）进行聚类分析，建立系统分支树状图^[13-14]。

2 结果与分析

2.1 居群的等位变异和多样性

筛选出的9对SSR引物在8个黄连木居群中共检测到43条等位基因，位点平均等位基因数为4.78，平均有效等位基因数为3.27，平均多态位点百分率达90.28%。引物ptms-3检测到等位基因数最多，为8个，而引物ptms-10最少，为3个。

有效等位基因数（*N_e*）和杂合度（*H*）是目前应用较为广泛的遗传多样性指数，杂合度不仅是衡量居群遗传多样性

最常用的指标，同时也反映居群中等位基因的丰富度和均匀程度。在黄连木8个居群中，各居群内的有效等位基因数介于

表2 黄连木SSR的9对引物序列及特征
Table 2 Characteristics of the nine pairs of SSR primers of *P. chinensis*

引物 Primer	重复基元 Repeat motif	等位基因长度 Allele size (bp)	退火温度 Annealing temp (θ/℃)	引物序列 Primer sequence (5'→3')
ptms-3	(CA) ₁₆	132~145	55	TGATGAACAAGTCCAAAAGGG AAAACAGCAGCATGCATC
ptms-7	(CA)	189~208 217~225	55	TGATGCTCTTGGTGTGCTC CCTGAGTAGCTCCAGTTCCG
ptms-9	(CA)	165~185	55	TTGACCGTGGACTTGAAGC AACCTCCTCTCTTCTTTGCC
ptms-10	(CT)	140~142 330~342	55	CAGGATGCTTGTGGTGATG ACAGTGGATACAAATGCTGTC
ptms-33	(CA) ₁	155~165	55	TTCTGCTGGTCAATGGGGC TGCCATTAAACCCAAAGGAG
ptms-41	(CT)	230~245	55	AGAAGAGGGGAACAGGGAGA CTGAGGACTGGGCAGAAATGT
ptms-40	(CTT)	200~212	55	CAGCTCTCACTGATCCGATTC TTCGAAAGCCAGTCTCAGGT
ptms-42	(CTT)	150~162	55	AAACAGGTGTTCCCGTTTCAG ACGACAGGATTGGATGATGG
ptms-45	(CAA) ₃ (CA) ₄	145~152 185~196	55	GCTTGTGTGTTTAGCTCGAAAT AGCAATGCTTAACATTTTCCAA

表3 黄连木居群的遗传多样性
Table 3 Genetic diversity within the populations of *P. chinensis*

居群 Population	多态位点比率 Polymorphic loci percentage (<i>P</i>)	观察等位基因 Observed number of alleles per locus (<i>N_a</i>)	有效等位基因 Effective number of alleles per locus (<i>N_e</i>)	Shannon's指数 Shannon's index (<i>I</i>)	观察杂合度 Observed heterozygosity (<i>H_o</i>)	期望杂合度 Expected heterozygosity (<i>Nei</i>)
TX	100	2.111	2.051	0.724	0.944	0.510
LY	100	2.000	1.956	0.679	0.944	0.486
HX	77.78	2.444	2.089	0.701	0.778	0.439
LZ	100	2.000	1.937	0.674	0.898	0.481
AK	100	2.889	2.451	0.886	0.840	0.549
LC	77.78	2.111	2.019	0.637	0.622	0.415
SP	88.89	2.556	2.237	0.795	0.773	0.491
SX	77.78	2.111	1.900	0.614	0.681	0.404
平均 Mean	90.28	2.278	2.080	0.714	0.810	0.472

表4 黄连木居群的 F -统计指数及基因流
Table 4 F -statistics and gene flow among the populations of *P. chinensis*

位点 Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
9	1.000	0.580	0.210	0.941
42	0.849	0.021	0.471	0.281
7	0.705	0.185	0.305	0.570
3	0.463	0.028	0.297	0.591
41	0.496	0.329	0.112	1.993
40	0.718	0.324	0.230	0.839
45	0.955	0.143	0.415	0.352
10	0.778	0.158	0.526	0.225
33	0.646	0.070	0.350	0.465
平均 Mean	0.712	0.166	0.319	0.534

F_{IS} : 固定指数或内繁系数; F_{IT} : 近交系数; F_{ST} : 遗传分化系数; N_m : 基因流, $N_m = 0.25(1-F_{ST})/F_{ST}$
 F_{IS} : Inbreeding coefficient at the population level; F_{IT} : Inbreeding coefficient at the total sample level; F_{ST} : Proportion of differentiation among populations; N_m : Gene flow, $N_m = 0.25(1-F_{ST})/F_{ST}$

1.94~2.45之间, 平均为2.08。各居群内观察杂合度(H_o)值变动范围为0.622~0.944, 平均为0.81。期望杂合度(H_e)值变动范围为0.404~0.549, 平均为0.472, 8个居群总的期望杂合度为0.668, 说明各居群间的多样性水平差异较大。按检测到的有效等位基因数(N_e)和期望杂合度(Nei)作为标准, 安康黄连木居群的遗传多样性水平最高, 涉县居群的最低, 遗传多样性水平由高至低依次为安康>唐县>顺平>辉县>略阳>栾川>林州>涉县(表3)。

2.2 居群的遗传分化

黄连木居群在9个SSR位点的遗传分化结果见表4。8个居群的遗传分化系数(F_{ST})的变化范围为0.112~0.526, 平均0.319, 说明居群内变异是导致黄连木遗传多样性的主要来源, 8个居群间基因流(N_m)为0.534。 F_{IT} 和 F_{IS} 分别代表总体水平和单个居群内个体间近亲交配的指标, 黄连木居群的平均 F_{IT} 值为0.166, 平均 F_{IS} 值为0.712, 居群内个体间的杂合现象远高于居群间的杂合水平, 说明黄连木在居群内个体选择可以获得较大的增益。

2.3 遗传相似系数和聚类分析

根据Nei的方法计算遗传距离 D (表5), 居群的遗传距离在0.159 1~1.262 6之间, 平均值为0.635。其中, LZ居群与HX居群的遗传距离最短, 遗传相似度达到0.852 9, 相似性水平最高, 而LC居群与LY居群的遗传相似性水平最低, 遗传分化程度最大。

为进一步探讨居群间的遗传关系, 利用黄连木的遗传距离进行UPGMA聚类分析, 得到8个群体间的聚类图(图2)。

8个居群被明显聚为三大类: 其中河北唐县、顺平和涉县居群聚为一大类, 河南林州、栾川和陕西安康、略阳居群聚为一大类, 辉县居群为单独一类。在第二大类的4个居群中, 栾川居群和其它3个居群距离较远, 可将它们分成两个亚类。

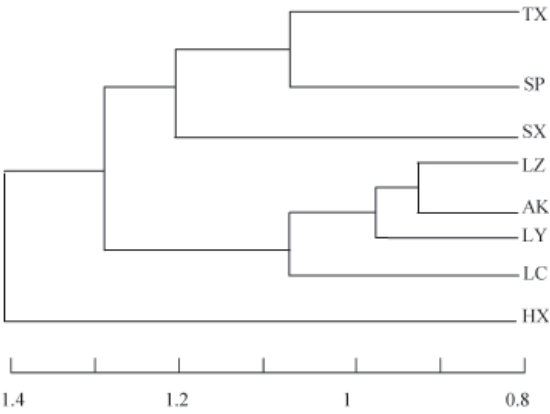


图2 基于遗传距离的UPGMA聚类图
Fig. 2 UPGMA dendrogram of *P. chinensis* using Nei's genetic distance

3 讨论

黄连木广泛分布于我国25个省区, 分布区内生态、气候条件的差异及地理阻隔, 使其在长期进化中逐渐形成生长形态、结实特征差异的自然种群类型。Weight研究指出遗传分化系数 $F_{ST} > 0.25$, 则群体间存在的遗传差异很大^[15]。本试验通过遗传多样性指数和等位基因数目的分析, 发现黄连木各群体的遗传多样性较高。黄连木居群的平均遗传分化系数达

表5 黄连木居群间遗传距离及遗传相似度
Table 5 Genetic distances and genetic identities among the populations of *P. chinensis*

居群 Population	TX	LY	HX	LZ	AK	LC	SP	SX
TX	****	0.6646	0.4064	0.4639	0.5352	0.4153	0.5784	0.5489
LY	0.4086	****	0.5079	0.3855	0.4196	0.3547	0.3814	0.4667
HX	0.9004	0.6774	****	0.8529	0.4259	0.2829	0.3985	0.4455
LZ	0.7682	0.9532	0.1591	****	0.3699	0.5925	0.7343	0.4162
AK	0.6252	0.8684	0.8535	0.9946	****	0.7248	0.8236	0.5933
LC	0.8788	1.0366	0.3219	0.5235	1.2626	****	0.6819	0.4332
Sp	0.5475	0.9639	0.9201	0.3088	0.1941	0.3829	****	0.6037
SX	0.5999	0.7620	0.8086	0.8766	0.5220	0.8366	0.5047	****

对角线上为遗传相似度, 对角线下为遗传距离 Above diagonal: Nei's genetic identities; Below diagonal: Genetic distances

0.319, 表明居群间的遗传分化程度很高, 在居群间进行选择也能取得较大的遗传增益. 8个居群多样性水平表现出了明显的地域特征, 秦岭南部安康居群及太行山北部唐县、顺平居群的遗传多样性明显高于太行山南部地区林州、涉县居群, 这可能与该地区的地理环境有关, 秦岭地区群山起伏, 汉江嘉陵江纵横其中, 地貌特征丰富, 气候类型多样, 可能是居群具有较高遗传多样性的主要原因, 而太行山南北居群的差异可能与当地长期的人为干扰和采种取样有关.

黄连木分布面积很大, 大部分为天然次生林, 个体间交配近于随机, 为了保证本研究的结果能最大程度地反映黄连木各居群在进化过程中形成的特定时空遗传结构, 在采样的过程中, 采用随机取样, 并提高样本数和等位基因位点数, 防止检测到的变异偏低或者甚至检测不到变异. 另外, 由于本研究采用同属种阿月浑子的引物对黄连木进行SSR分析, 应对PCR产物进行克隆测序, 以确定微卫星的同源性^[16], 但本研究只在实验前, 随机选用8个居群的试材对已发表SSR引物进行筛选, 因此本研究拟在今后的实验中进一步测序验证阿月浑子微卫星在属内扩增的同源性及其有效性.

群体的遗传多样性是生命进化和物种分化的基础, 任何一个物种或一个生物个体都蕴涵着大量的基因, 它所包含的基因变异越丰富, 对环境的适应能力就越强, 进化的潜力也越大^[17]. 本研究采用黄连木子代幼苗进行SSR分子标记技术研究, 建立了良好的黄连木SSR反应程序, 筛选出9对SSR引物, 以PCR扩增条带的有无为原始依据进行聚类分析, 排除了传统形态分类学上形态特征不易区分的干扰, 从DNA水平上揭示了黄连木的遗传多样性. 该方法还可结合生态因子筛选出分布区内不同区域生长的黄连木优良类型, 为进一步开展黄连木资源的保存和合理利用奠定基础.

致谢 本研究在王涛院士的指导下完成, 中国农业科学院作物科学研究所贾继增教授、顾艳春老师、尚世界等在实验中也给予了大力支持和无私帮助.

References

- Wang T (王涛). A survey of the woody plant resources for biomass fuel oil in China. *Sci & Technol Rev* (科技导报), 2005, **23** (5): 12~14
- Wang HX (王洪新), Hu ZA (胡志昂). Plant breeding system genetic structure and conservation of genetic diversity. *Biodiv Sci* (生物多样性), 1996, **4** (2): 92~96
- Zou Y (邹游), Ding J (丁建), Shen Y (申瑛), Zhao J (赵建), Yang ZR (杨志荣), Wu C (吴成). Analysis of random amplified polymorphic DNA in 11 *Actinidia* varieties. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2007, **13** (2): 172~175
- Stephenson P, Bryan G, Kirby J, Collins A, Devos K, Busso C, Gale M. Fifty new microsatellite loci for the wheat genetic map. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 946~949
- Struss D, Plieske J. The use of microsatellite markers for detection of genetic diversity in barely populations. *Theor Appl Genet*, 1998, **97**: 308~315
- Vyhnánek T, Nevrtalová E, Slezáková K. Detection of the genetic variability of triticale using wheat and rye SSR markers. *Cereal Res Commun*, 2009, **37** (1): 23~29
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fugimura T. Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 1996, **93**: 1071~1077
- Plaschke J, Ganal MW, Roder MS. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theor Appl Genet*, 1995, **91**: 1001~1007
- Bertin P, Gregoire D, Massart S, de Froidmont D. Genetic diversity among European cultivated spelt revealed by microsatellite. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**: 148~156
- Wang CY (王长有), Ji WQ (吉万全), Wang QY (王秋英), Xue XZ (薛秀庄), Ren ZL (任志龙), Zhang H (张宏), Cai DM (蔡东明). Development of microsatellite markers in wheat genetics and breeding research. *J Triticeae Crops* (麦类作物学报), 2004, **24** (1): 70~74
- Ahmad R, Ferguson L, Southwick SM. Molecular marker analyses of pistachio rootstocks by simple sequence repeats and sequence-related amplified polymorphisms. *J Horticult Sci & Biotechnol*, 2005, **80** (3): 382~386
- Yeh FC, Yang RC, Boyle T. POPGENE Version 1.32, Software Microsoft Window-Based Freeware for Population Genetic Analysis. Edmonton, Canada: University of Alberta, 1997
- Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, **89**: 583~590
- Sun CQ (孙传清), Wang XK (王象坤), Yoshimura A, Doi K, Iwata N. RFLP analysis of nuclear DNA in common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.). *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1997, **30** (4): 37~44
- Weight S. Evolution and the Genetics of Population Variability Within and Among Natural Population. Chicago, USA: University of Chicago Press, 1987. 4
- Cheng LL (程丽莉), Huang WG (黄武刚), Zhou ZJ (周志军), Liu JL (刘建立), Wang YM (王艳梅), Su SC (苏淑叔), Zhai MP (翟明普). Genetic diversity of six *Corylus* species in China detected with microsatellite isolated from *Corylus avellana*. *Sci Silv Sin* (林业科学), 2009, **45** (2): 23~26
- Wang CZ (王长忠), Liang HW (梁宏伟), Zou GW (邹桂伟), Luo XZ (罗相忠), Li Z (李忠), Tian H (田华), Hu GF (呼光富). Genetic variation analysis of two silver carp populations in the middle and upper Yangtze River by microsatellite. *Hereditas* (遗传), 2008, **30** (10): 1341~1348