

研究报告

A Letter

山杨种源遗传多样性的 SSR 分析

王艳敏[✉], 白卉[✉], 李春明[✉], 李正华[✉], 邢亚娟[✉]

黑龙江省林业科学研究所, 哈尔滨, 150081

✉ 通讯作者: xingyajuan@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 27 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0027

收稿日期: 2010 年 12 月 01 日

接受日期: 2011 年 02 月 28 日

发表日期: 2011 年 03 月 07 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

王艳敏等, 2011, 山杨种源遗传多样性的 SSR 分析, 分子植物育种 Vol.9 No.27 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0027)

摘要 利用 SSR 分子标记技术对山杨(*Populus davidiana* Dode) 6 个种源的 208 个个体的遗传多样性和遗传变异进行了分析, 结果表明: 6 对引物在预期产物大小片段处共扩增出 29 个位点, 每对引物扩增的 DNA 条带的数目在 3-7 条之间, 平均为 4.83 条, 其中所有条带均具有多态性, 多态位点百分率达到 100%, 表明本次研究的各种源山杨具有较大的遗传多样性。所研究的山杨种源总的 Nei 遗传多样性指数(H)为 0.5957, Shannon 指数(I)为 1.1001。遗传变异分析表明, 6 个山杨种源间的基因分化指数 $G_{st}=0.1143$, 基因流 N_m 为 1.9366。山杨种源内的遗传多样性占总群体的 88.57%, 种源间遗传多样性占总群体的 11.43%。UPGMA 聚类结果显示: 湖上种源和江山娇种源的遗传距离比较近被聚为一类, 方正种源与苇河种源距离比较近, 聚为一类。

关键词 山杨; 遗传多样性; SSR

SSR Analysis on Genetic Diversity of Populations of *Populus Davidiana* Dode

Wang Yanmin[✉], Bai Hui[✉], Li Chunming[✉], Li Zhenghua[✉], Xing Yajuan[✉]

Forestry Research Institute of Heilongjiang Province, Harbin, 150081, P.R. China

✉ Corresponding author, xingyajuan@163.com; ✉ Authors

Abstract Genetic diversity and genetic variation of 6 *Populus davidiana* Dode provenances including 208 individuals were analyzed with SSR molecular markers. Twenty-nine loci were amplified by 6 SSR primers in expected product size of the fragment. Each of the primers amplified 3~7 DNA bands, with an average of 4.83. All the bands amplified were polymorphic, and the percentage of polymorphic loci was 100%, which indicates that the sources of *P. davidiana* Dode have a large genetic diversity. The Nei genetic diversity index (H) of total *P. davidiana* Dode was 0.5957, Shannon index (I) was 1.1001. Genetic variation analysis showed that genetic differentiation (G_{st}) between the six provenances was 0.1143, and the gene flow coefficient (N_m) was 1.9366. Genetic diversity in the six provenances was 88.57% in the total population, and that among provenances is 11.43%. UPGMA cluster analysis showed that the genetic distance between HS provenance and JSJ provenance were relatively close, which can be clustered into one group. So were FZ provenance and WH provenance.

Keywords *P. davidiana* Dode; Genetic diversity; SSR

研究背景

研究林木基因资源遗传多样性是基因资源保存的前提, 对培育林木新品种具有重要的指导意义。遗传多样性是伴随基因传递过程产生的同一物种个体间的变异, 包括极其微小的、不易见到的变异(朱大保, 1994)。保护基因资源可以满足不同育种目标和未来的良种需要, 包括应对特殊环境和病虫害都有赖于丰富的遗传多样性(魏润鹏, 1995)。

山杨木材结构均匀、质轻而软、颜色淡白, 不用填充其他原料即可用于造纸(刘培林和赵其基,

1991)。随着社会对这一树种需求量的日趋增加, 天然林已不敷需求, 而多代萌生的山杨天然林心腐又很严重, 不能满足培育纸浆用速生丰产林的需要。

传统的林木育种方法周期长、见效慢, 不可能在短时期内培育出符合实际生产需要的山杨造纸用造林新品种, 而分子标记技术的快速发展及其在林木育种中的应用, 为在短时期内培育出纤维性状优良、生长快的山杨纸浆材优良新品种提供了可能性。SSR即微卫星DNA, 由于SSR标记技术呈共显性遗传, 符合孟德尔遗传规律, 能用PCR扩增、提

供高质量的信息以及在单个微卫星位点上可做共显性的等位基因分析, 试验重复性好, 结果可靠性高等优点, 是当今流行的分子标记技术之一(黄秦军等, 2002; 李新军等, 1999; 唐荣华等, 2002)。

本研究对东北地区 6 个山杨纸浆材优良种源的 21 个家系 208 株山杨个体进行遗传多样性分析, 为深入研究山杨良种选育、杂交育种、杂种优势的利用、山杨定向培育奠定基础。

1 结果与分析

1.1 SSR 引物的筛选

查阅相关文献, 寻找相关引物 39 对用于本次实验, 以 6 个种源的山杨基因组 DNA 为模板, 对引物进行筛选, 每个样品重复 2 次, 从中选出 6 对引物用于本次实验, 引物名称与序列见表 1。

表 1 SSR 引物名称与序列

Table 1 Name and sequence of SSR primer

引物名称 Primer code	重复序列 Repeat sequence	引物序列 Sequence of primer	退火温度 Tm/°C
PN1297289	GTCATCCC	ACACGACCAGCAGCAGTA TCCGATGATGACCCTTTA	50
PN1297291	CAC	TGTTTCCGACACCAGAGT CATAGGACATAGCAGCATC	48
PMGC-2675	GA	CACACCGACAAATTATGAGTG TTTTAGAGTGAATTTTCCTGCG	55
PTR14	(TGG) ₅	TCCGTTTTTGCACTCTCAAGAATCAC ATACTCGCTTTATAACACCATTGTC	55
WPMS01	(GA) ₂₀	AACCACTATGCCACCTTCTT AACTAACTCCATTTCATTGCTAAA	50
WPMS011	(GT) ₂₆	TAAAGATGATGGACTGAAAAGGTA TAAAGGAGAATATAAGTGACAGTT	55

1.2 各引物在不同种源的扩增情况

利用选择的 6 对 SSR 引物(见表 1)对 6 个种源的 208 株个体进行分析, 所有引物均能够在供试品种中扩增出稳定明显的条带, 说明选择的引物是适合的。图 1 为引物 WPMS011 对部分个体扩增结果。

本研究结果表 2 表明: 本研究中从文献中找到的 39 对引物中筛选出的 6 对引物对所有 6 个种源 208 株个体中进行 PCR 检测, 在引物预期产物大小片段处共扩增出 29 个位点, 其中所有条带均具有多态性, 多态位点百分率达到 100%, 每对引物扩增的 DNA 条带的数目在 3~7 条之间, 平均为 4.83 条。可见, 本次研究的各种源山杨具有较大的遗传多样性。

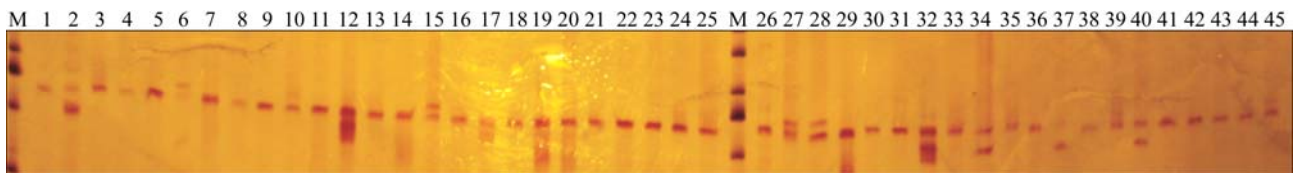


图 1 引物 WPMS011 对部分个体扩增结果

注: M: 标准分子量 100 bp DNA Ladder; 1~45: 不同山杨个体代码

Figure 1 The result of PCR for some individuals by primer WPMS011

Note: M: marker Ladder Plus 100 bp DNA Ladder; 1~45: Different codes of *P. davidiana*

表 2 6 对有效引物在 6 个种源中的扩增情况

Table 2 The amplification result of 6 effective primers in 6 provenances

引物名称	扩增条带数	多态性条带数	多态位点百分率(%)
Primer code	Number of amplified bands	Number of polymorphic bands	Percentage of polymorphic loci (%)
PN1297289	4	4	100.00
PN1297291	4	4	100.00
PMGC-2675	7	7	100.00
PTR14	7	7	100.00
WPMS01	3	3	100.00
WPMS011	4	4	100.00
合计	29	29	
Total			
均值	4.83	4.83	100.00
Mean			

1.3 山杨遗传多样性分析

利用 PopGen32 软件对山杨种源进行遗传多样性分析, 由表 3 可知, 山杨总体的 Shannon 指数为 1.1001, 各个种源的 Shannon 多态性信息指数变化范围在 0.7508~1.1111 之间, 其中方正种源最大, 铁力种源最小。Shannon 指数总体平均值为 0.9038。

根据 Shannon 指数各种源排序为: 方正>湖上>苇河>曙光>江山娇>铁力。山杨种源总的 Nei 遗传多样性指数为 0.5957, 不同种源的 Nei 指数分布在 0.4421~0.5944 范围内。不同种源根据 Nei 指数排列的顺序与 Shannon 指数排列的顺序基本上一致。

表 3 山杨 6 个种源的多态性及遗传差异统计

Table 3 The polymorphic loci and genetic diversity in 6 provenances of *P. davidiana*

种源	多态位点比率	等位基因数	有效等位基因数	Shannon 指数	Nei 指数
Provenance	Percent of polymorphic loci	N_a^*	N_e^*	I^*	H^*
方正	100.00	4.5000	2.9472	1.1111	0.5879
FZ					
湖上	100.00	3.6667	2.6562	1.0596	0.5944
HS					
江山娇	100.00	3.0000	1.9874	0.7528	0.4421
JSJ					
苇河	100.00	3.3333	2.2728	0.9042	0.5262
WH					
铁力	100.00	3.0000	2.0664	0.7508	0.4427
TL					
曙光	100.00	3.3333	2.1635	0.8443	0.4825
SG					
总计	100.00	5.0000	2.6951	1.1001	0.5957
Total					

由表 4 可以看到: 山杨的平均基因杂合度 (Ave_Het) 为 0.5126。总体期望杂合度 (Exp_Het*) 为 0.5971, 不同种源间的变化范围为 0.4534~0.6096, 其中江山娇种源最低, 湖上种源的期望杂合度的值最高。总体期望纯合度 (Exp_Hom*) 为 0.4029, 不同

种源间的变化范围为 0.3904~0.5466, 其中湖上种源最低, 江山娇种源最高。观察杂合度 (Obs_Het) 在 0.4833~0.6083 之间, 其中江山娇种源最低, 湖上种源最高。观察纯合度 (Obs_Hom) 变化范围为 0.3917~0.5167, 其中湖上种源最低, 江山娇种源最

高(表 4)。

Nei 遗传多样性指数的变化范围在 0.4421~0.5944 之间, 其中江山娇种源最低, 湖上种源最高。

1.4 山杨各种源间的遗传分化分析

6 个山杨种源间的基因分化指数 $G_{st}=0.1143$, 基因流系数 N_m 为 1.9366。山杨种源内的遗传多样性占总群体的 88.57%, 种源间遗传多样性占总群体的 11.43%, 这说明山杨种源内变异占较大比例。

1.5 山杨各种源间的聚类分析

山杨种源间的遗传一致度(I)和遗传距离(D)见表 5。从表中可以看出, 遗传一致度(I)和遗传距离(D)的变化范围分别为 0.6079~0.9801 和 0.0201~0.4978。其中, 湖上种源与江山娇种源的遗传距离最小, 曙光种源与方正种源的遗传距离最大。

由遗传相似系数, 进行 UPGMA 聚类分析, 构建出 6 个不同山杨种源的遗传关系图(图 2)。其中, 湖上种源和江山娇种源的遗传距离比较近, 聚为一类, 方正种源与苇河种源距离比较近, 聚为一类。

2 讨论

应用分子标记研究生物间的遗传关系时, 引物数目和标记位点数对研究结果会有一些影响。从理论上讲, 所用引物数目越多、检测的位点数越多, 提供的信息越可靠。但在实际操作中, 受生物本身情况及时间、经费等因素制约, 供分析利用的引物等采用 5 对 SSR 引物对 52 个山杨杂种无性系进行了遗传多样性检测, 结果表明在研究的 5 个位点上

表 4 不同山杨种源的基因杂合度

Table 4 Genic heterozygosity frequency of different origins of *P. davidiana* resources

种源 Provenance	观察纯合度 Obs_Hom	观察杂合度 Obs_Het	总体期望纯合度 Exp_Hom*	总体期望杂合度 Exp_Het*	基因多样性 Nei**	平均基因杂合度 Ave_Het
方正 FZ	0.4626	0.5374	0.4070	0.5930	0.5879	0.5126
湖上 HS	0.3917	0.6083	0.3904	0.6096	0.5944	0.5126
江山娇 JSJ	0.5167	0.4833	0.5466	0.4534	0.4421	0.5126
苇河 WH	0.4786	0.5214	0.4670	0.5330	0.5262	0.5126
铁力 TL	0.4917	0.5083	0.5459	0.4541	0.4427	0.5126
曙光 SG	0.4252	0.5748	0.5126	0.4874	0.4825	0.5126
总计 Total	0.4579	0.5421	0.4029	0.5971	0.5957	0.5126

表 5 山杨种源间遗传距离(下三角)与遗传相似度

Table 5 Nei's genetic distance (below diagonal) and genetic identity of provenances of *P. davidiana*

ID	FZ	HS	JSJ	WH	TL	SG
FZ	****	0.7894	0.6887	0.7065	0.6369	0.6079
HS	0.2365	****	0.9801	0.9431	0.8822	0.9279
JSJ	0.3729	0.0201	****	0.9650	0.9114	0.9623
WH	0.3474	0.0586	0.0357	****	0.9550	0.9552
TL	0.4511	0.1254	0.0928	0.0460	****	0.8732
SG	0.4978	0.0748	0.0385	0.0458	0.1356	****

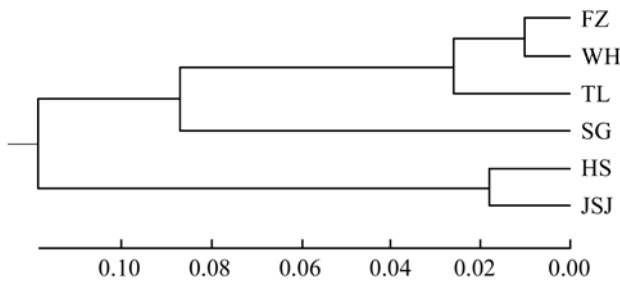


图 2 山杨种源间遗传关系聚类图

Figure 2 Genetic clustering of *P. davidiana*. based on genetic distance

SSR 标记多态位点百分率为 100%，平均等位基因数为 4.4 个，这说明 SSR 标记在山杨杂种中有很高的遗传多态性。本研究中筛选出的 6 对引物对所有 6 个种源 208 株个体中进行 PCR 检测，在引物预期产物大小片段处共扩增出 29 个位点，其中所有条带均具有多态性，多态位点百分率达到 100%，每对引物扩增的 DNA 条带的数目在 3~7 条之间，平均为 4.83 条。可见，本次研究的各种源山杨具有较大的遗传多样性。

山杨种源间遗传分化指数 $G_{st}=0.1143$ ，说明种群间遗传分化较大。遗传结构通过物种种群内和种群间的遗传分化来实现，基因流的大小也可以反映种群遗传分化的大小。Wright 认为，当 $N_m>1$ 时，证明种群间存在一定的基因流动，山杨 6 个种群间的基因流 N_m 为 1.9366，证明山杨种群间存在一定的基因流动，能够降低局部变异，防止适应性分化。Harmrick 和 Godt(1990)的研究表明，居群的地理分布和遗传多样性分布没有直接的相关性。但也有研究表明遗传距离与地理距离之间有显著的相关性，如 Alpert 等在研究 *Frogaria chiloensis* 种群间的遗传分化时发现，遗传距离与种群间的空间距离高度相关 (Alpert et al.,1993)。本研究结果表明：山杨不同种源的遗传多样性分布与地理居群没有显著的关联性。

3 材料与方法

3.1 材料

实验材料采自方正(FZ)种源、湖上(HS)种源、江山娇(JSJ)种源、苇河(WH)种源、铁力(TL)种源、曙光(SG)种源，于 1993 年定植于黑龙江省林口县青山林场山杨纸浆材优良种源保存林。2008 年冬从优良种源采取山杨枝条，开展室内切枝水培，采取

新鲜叶片于 -20°C 保存。

3.2 实验方法

3.2.1 DNA 提取

采用北京庄盟国际生物基因科技有限公司生产的 ZP309-3 植物基因组 DNA 提取试剂盒提取杨树基因组 DNA，在 1%琼脂糖凝胶中电泳检测其 DNA 样品的浓度和纯度。

3.2.2 SSR 引物的筛选

查阅相关文献(Schoot et al., 2000; Rahman et al., 2000; 李世峰等, 2006)，寻找相关引物用于本次实验，以 6 个种源的山杨基因组 DNA 为模板，对引物进行筛选，每个样品重复 2 次，从中选出适合引物用于本次实验。

3.2.3 SSR 反应体系

用于 SSR-PCR 反应的 *Taq* 酶、dNTP、 Mg^{2+} 均购自 MBI 公司，引物购自上海生工生物工程公司。标准分子量 100 bp DNA Ladder 购自博大泰克公司。SSR-PCR 扩增反应在美国 ABI 公司的 VERITI 型 PCR 仪上进行。

采用 20 μL 反应体系，其中含有 0.5 U/ μL 的 *Taq* 酶，1.5 mmol/L 的 Mg^{2+} ，30~50ng 的模板 DNA，0.15 mmol/L 的 dNTP，0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 SSR 引物，1 \times PCR Buffer。SSR 扩增热循环参数见张金然的方法(张金然等, 2006)。扩增产物在 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳，7 W 下电泳 150 min，银染后观察并照相。

3.2.4 SSR 标记电泳谱带的记录与数据处理

根据电泳条带分析数据，一条为纯合，两条为杂合。然后用 PopGen32 软件进行分析，种群群体间的遗传距离及遗传一致度等；遗传距离的聚类分析用 Mega2 软件中的 UPGMA 聚类法。

作者贡献

王艳敏、白卉、李春明、李正华是本研究的实验设计和实验研究的执行人；王艳敏、白卉完成数据分析，论文初稿的写作；李春明、李正华参与实验设计，试验结果分析；邢亚娟是项目的构思者及负责人，指导实验设计，数据分析，论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由黑龙江省财政厅自拟项目“利用 SSR 标记技

术进行山杨优良种源遗传多样性研究”; 国家林业局林业公益性行业科研项目(201004060); 黑龙江省科技攻关重大项目(GA09B202-02); 中华人民共和国科学技术部农业科技成果转化资金项目(2009GB2B200103)资助。


本实验在黑龙江省林业科学研究所速生林木培育重点实验室完成, 特此感谢!

参考文献

- Alpert P., Lumaret R., and Digiusto F., 1993, Population structure inferred from allozyme analysis in the clonal herb *Fragaria chiloensis*, *American Journal of Botany*, 80: 1002-1006
- Huang Q.J., Su X.H., and Zhang X.H., 2002, Microsatellite marker and its application in tree genetics and breeding, *Shijie Linye Yanjiu (World Forestry Research)*, 15(3): 14-21 (黄秦军, 苏晓华, 张香华, 2002, SSR 分子标记与林木遗传育种, *世界林业研究*, 15(3): 14-21)
- Li S.F., Zhang B., Chen Y., Pan H.X., and Huang M.R., 2006, Analysis of Genetic Diversity of *Populus deltoides* Germplasm by SSR, *Journal of Nanjing Forestry University (Natural Sciences Edition)*, 30(4): 10-14 (李世峰, 张博, 陈英, 潘惠新, 黄敏仁, 2006, 美洲黑杨种质资源遗传多样性的 SSR 分析, *南京林业大学学报(自然科学版)*, 30(4): 10-14)
- Li X.J., Huang M.R., Pan H.X., and Wang M.X., 1999, Microsatellite Markers and Application in the Forestry Genome, *Nanjing Linye Daxue Xuebao (Journal of Nanjing Forestry University)*, 23(5): 64-69 (李新军, 黄敏仁, 潘惠新, 王明麻, 1999, 林木基因组中的微卫星 (SSR) 及其应用, *南京林业大学学报*, 23(5): 64-69)
- Liu P., and Zhao Q.J., 1991, Improved variety breeding of *Populus davidiana*, Science and Technology Press, Bei Jing, China, pp.116-141(刘培林, 赵其基, 1991, 山杨良种选育, 科学技术出版社, 中国, 北京, pp.116-141)
- Rahman M.H., Dayanandan S., and Rajora O.P., 2000, Microsatellite DNA markers in *Populus tremuloides*, *Genome*, 43: 293-297
- Schoot J., van der Pospíšková M., Vosman B., and Smulders M.J.M., 2000, Development and characterization of microsatellite markers in black poplar (*Populus nigra* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 101: 317-322
- Tang R.H., Zhang J.C., and Wu W.R., 2002, Progress in the way to develop SSR molecular marker, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 15(4): 106-109 (唐荣华, 张君诚, 吴为人,

2002, SSR 分子标记的开发技术研究进展, *西南农业学报*, 15(4): 106-109)

- Wang Z.L., Yang C., Zhao L.L., Hu H.F., Du J.C., and Bai M.Q., 2010, Genetic difference and genetic diversity analysis of *melilotoides ruthenica* strains based on ISSR markers, *Zhongguo Caoye Xuebao (Chinese Journal of Grassland)*, 32(1): 11-17(王照兰, 杨持, 赵丽丽, 胡卉芳, 杜建材, 白美琴, 2010, 扁蓿豆不同品系 ISSR 标记遗传差异和遗传多样性, *中国草地学报*, 32(1): 11-17)
- Wei R.P., 1995, How to manage genetic diversity in long-term tree breeding programs, *Shijie Linye Yanjiu (World Forestry Research)*, 8(3): 13-20(魏润鹏, 1995, 如何管理林木长期育种项目中的遗传多样性, *世界林业研究*, 8(3): 13-20)
- Zhang J.R., Shang J., and Wang Q.Y., 2006, Genetic diversity among the clones of aspen hybrid detected by simple sequence repeat DNA marker, *Zhiwu Yanjiu (Bulletin of Botanical Research)*, 26(4): 447-460 (张金然, 尚洁, 王秋玉, 2006, 山杨杂种无性系的 SSR 分子标记遗传多样性, *植物研究*, 26(4): 447-460)
- Zhu D.B., 1994, Biodiversity and tree breeding, *Chinese Biodiversity*, 2(3): 157-161 (朱大宝, 1994, 生物多样性与林木育种, *生物多样性*, 2(3): 157-161)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>