

## 不同小干松种源的 SRAP 分析

王骞春 (辽宁省林业科学研究院, 辽宁沈阳 110032)

**摘要** [目的]研究小干松种源遗传多样性,为小干松引种、育种工作提供基础资料。[方法]利用 SRAP 荧光标记技术对引种的 15 个小干松种源进行 SRAP 分析。[结果]9 对荧光标记的 SRAP 引物共产生 1 075 个条带,多态性位点 953 个,平均多态性为 88.7%,每对引物扩增条带 75~146 条,平均每对引物扩增条带 119 条;通过 UPGMA 软件对 15 个种源进行遗传聚类分析,15 个种源的相似系数在 0.761 3~0.876 0,以遗传相似系数 0.850 0 为阈值可将 15 个种源分为 4 个群体,同一地理来源的种源有一定的遗传差异,但大体呈现按地理来源聚类的趋势。[结论]15 个小干松种源具有较高的基因多态性,遗传多样性丰富,小干松变异类型与地理分布有关。

**关键词** 小干松;种源;SRAP

中图分类号 S188<sup>+</sup>.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2017)12-0139-02

SRAP Analysis of 15 Provenances of *Pinus contorta*

WANG Qian-chun (Liaoning Academy of Forestry Science, Shenyang, Liaoning 110032)

**Abstract** [Objective] To study the genetic diversity of *Pinus contorta* provenance for laying the foundation for introduction of *P. contorta* breeding. [Method] Using SRAP fluorescence technique to analyze 15 provenances of *P. contorta*. [Result] 9 SRAP primers for fluorescent labeling produced a total of 1 075 bands, 953 polymorphic loci, the average polymorphism was 88.7%. Each primer amplified bands were from 75 to 146, an average of 119 bands. The similarity coefficients of 15 provenances were 0.761 3-0.876 0 by UPGMA software. Taking the genetic similarity coefficient of 0.850 0 as threshold, 15 provenances were divided into 4 clusters, the provenances with the same geographic origin had some genetic differences, but generally showed a trend of clustering according to geographic origin. [Conclusion] 15 provenances of *P. contorta* had high genetic diversity, abundant genetic diversity, the variation types were related to geographic distribution.

**Key words** *Pinus contorta*; Provenances; SRAP

小干松(*Pinus contorta*)为松科松属植物,原产地为北美,具有良好的抗性和适应性<sup>[1]</sup>。SRAP 标记(Sequence-Related Amplified Polymorphism)是由 Li 等<sup>[2]</sup>在 2001 年提出的一种基于 PCR 的分子标记技术。该方法具有高共显、中产率、多态性高和重复性好的特点,已被广泛应用在遗传多样性分析、遗传图谱构建和基因定位、基因分离、品种鉴定等研究中。该研究采用 SRAP 技术对引进的不同种源小干松进行遗传多样性分析,旨在为小干松的引种、育种工作提供基础资料。

## 1 材料与方

**1.1 材料** 供试材料为从加拿大引进的 15 个种源小干松种子(表 1)。将其播种于辽宁省清原满族自治县国营大孤家林场,繁育家系,每个种源采 10 株不同健康单株上当年生新发针叶,液氮冻存后放于 -80 °C 冰箱保存备用。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 的提取。**采用 CTAB 法(稍加改进)提取小干松基因组 DNA<sup>[3]</sup>。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测提取 DNA 的质量及完整性,UV1102 紫外分光光度计测定 DNA 浓度,在 -20 °C 条件下保存备用。

**1.2.2 PCR 反应。**将每个种源的 10 个家系基因组 DNA 按相同浓度混合作为模板。荧光标记引物由北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司合成。从 64 对引物组合(表 2)中,选择多态性好的 9 对进行扩增,反应总体积为 20 μL,包括: *Taq* 酶 0.5 U,  $Mg^{2+}$  浓度 2.5 mmol/L, dNTPs 浓度 0.15 mmol/L, 模

表 1 小干松种源

Table 1 Provenance of *Pinus contorta*

种源编号 Provenance No.	产地 Place of origin	地理坐标 Geographic coordinates
C1	不列颠哥伦比亚省北部	124.63° W、58.48° N
C2	不列颠哥伦比亚省北部	125.72° W、57.68° N
C3	不列颠哥伦比亚省北部	124.04° W、57.43° N
C4	艾伯塔省北部	118.69° W、57.45° N
C5	艾伯塔省南部	115.68° W、52.27° N
C6	不列颠哥伦比亚省中部	124.37° W、55.21° N
C7	不列颠哥伦比亚省中部	125.51° W、54.80° N
C8	不列颠哥伦比亚省中部	126.85° W、56.46° N
C9	艾伯塔省南部	117.35° W、55.37° N
C10	不列颠哥伦比亚省西南部	126.24° W、53.78° N
C11	不列颠哥伦比亚省西南部	126.83° W、53.14° N
C12	不列颠哥伦比亚省西南部	127.34° W、52.79° N
C13	不列颠哥伦比亚省东南部	120.42° W、52.86° N
C14	不列颠哥伦比亚省东南部	121.16° W、52.67° N
C15	不列颠哥伦比亚省东南部	121.35° W、52.88° N

板 DNA 含量 60 ng,引物 0.2 μmol/L。  $Mg^{2+}$ 、10 × PCR Buffer 和 *Taq* 酶均购自北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司。扩增反应在 PTC-200 型 PCR(BIO-RAD)上进行,扩增程序为 94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 1 min,35 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min,5 个循环;94 °C 变性 1 min,50 °C 复性 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;最后 72 °C 延伸 10 min,4 °C 保存。PCR 产物用 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,ABI377 测序仪检测片段大小,生成胶图。

**1.3 数据统计与分析** 通过 GeneScan 软件对胶图进行分析,有带的地方替换为 1,无带的地方替换为 0,这样构成了 0/1 数据,利用 NTsys 2.10 软件进行 UPGMA 聚类分析并绘制树状聚类图。

**基金项目** 国家林业局“948”项目“北美小干松优良遗传资源及高效育种技术引进”。

**作者简介** 王骞春(1979—),男,黑龙江哈尔滨人,高级工程师,硕士,从事林木遗传育种研究。

**收稿日期** 2017-02-23

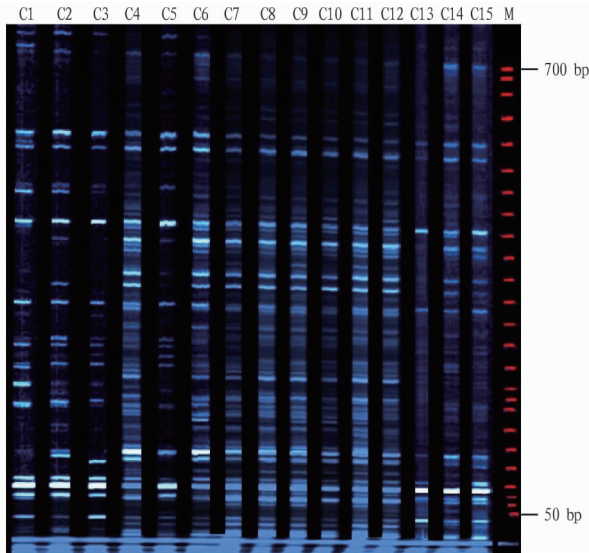
表2 引物组合

Table 2 Primer combination

引物编号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence(5'-3')	引物编号 Primer No.	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTGC
Me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTGA
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA
Me7	TGAGTCCAAACCGGACA	Em7	GACTGCGTACGAATFCAA
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGT	Em8	GACTGCGTACGAATTAGC

2 结果与分析

2.1 小干松种源遗传多样性的SRAP分析 从64对SRAP引物中选取9对扩增产物多态性好、谱带清晰的引物进行PCR扩增,对15个小干松种源进行SRAP分析,电泳图谱见图1。这9对引物共扩增出1 075个条带,平均每对引物可



注:M. DGL 2000 Marker

图1 15个小干松种源用Me3-Em6引物组合扩增产生的SRAP条带

Fig.1 *P. contorta* SRAP band of 15 provenances amplified by Me3-Em6 primer

以扩增出119条带,检测出多态性条带为953条,平均多态性为88.7%(表3)。

表3 不同引物的多态性分析

Table 3 Polymorphism analysis of different primers

引物组合 Primer combination	位点数 Number of loci	多态性位点数 Number of polymorphic loci	多态性 Polymorphism %
Me2-Em6	146	137	93.8
Me3-Em2	135	123	91.1
Me3-Em4	111	97	87.4
Me3-Em6	118	106	89.8
Me4-Em3	103	95	92.2
Me4-Em4	75	67	89.3
Me4-Em6	116	98	84.5
Me5-Em7	138	113	81.9
Me6-Em4	133	117	87.9
总计 Total	1 075	953	—
平均 Average	119	106	88.7

2.2 小干松种源相似性和聚类分析 采用软件NTSYS 2.10,根据9对引物产生的全部位点进行遗传相似系数的计算,15个种源相似系数在0.7613~0.8760(表4)。利用UP-GMA法进行聚类分析得到15个小干松种源的聚类树形(图2),以相似系数0.8500为阈值,将15个种源分为4个群体:种源C1、C2、C3、C5、C13和C15为第一群体;种源C14为第二群体;种源C4、C6、C7和C10为第三群体;种源C8、C9、C11和C12为第四群体。

3 讨论与结论

小干松具有适应性强、生长快的特点,并且抗旱、抗虫性较强,我国的黑龙江、吉林、湖北等地均进行了引种,并进行了一系列的种源试验,发现小干松树高、胸径等指标在种源间差异显著<sup>[4-6]</sup>,说明不同种源的小干松遗传变异较高。

该研究用荧光标记SRAP方法分析了从加拿大引进的15个小干松种源的遗传差异,共得到1 075个条带,检测出多态性条带为953条,平均多态性为88.7%,多态性较高,说明荧光标记的SRAP适合分析小干松种源的遗传多样性。

表4 15个小干松种源的相似系数

Table 4 Similarity coefficient of 15 provenances of *P. contorta*

种源编号 Provenance No.	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C11	C12	C13	C14	C15
C1	1.000 0														
C2	0.849 3	1.000 0													
C3	0.859 1	0.876 0	1.000 0												
C4	0.810 7	0.795 8	0.799 4	1.000 0											
C5	0.851 3	0.860 1	0.868 8	0.824 6	1.000 0										
C6	0.810 2	0.792 2	0.802 0	0.871 9	0.824 1	1.000 0									
C7	0.804 5	0.793 7	0.802 5	0.853 9	0.815 3	0.857 5	1.000 0								
C8	0.769 0	0.762 3	0.764 9	0.855 5	0.775 2	0.849 3	0.842 6	1.000 0							
C9	0.778 8	0.770 1	0.766 5	0.839 5	0.785 5	0.836 9	0.839 5	0.868 8	1.000 0						
C10	0.795 3	0.779 3	0.789 1	0.850 8	0.800 9	0.863 7	0.848 8	0.851 3	0.838 5	1.000 0					
C11	0.774 7	0.763 9	0.761 3	0.840 5	0.783 4	0.840 0	0.841 6	0.856 5	0.836 4	0.842 6	1.000 0				
C12	0.772 6	0.760 8	0.770 6	0.851 9	0.775 2	0.849 3	0.842 6	0.856 5	0.840 5	0.839 5	0.852 9	1.000 0			
C13	0.848 3	0.852 9	0.849 3	0.821 5	0.853 9	0.827 2	0.822 5	0.790 1	0.785 5	0.808 1	0.782 4	0.784 5	1.000 0		
C14	0.823 6	0.810 7	0.813 3	0.805 0	0.816 9	0.817 9	0.823 6	0.799 4	0.796 8	0.816 4	0.800 9	0.804 0	0.841 6	1.000 0	
C15	0.840 0	0.845 7	0.849 3	0.829 7	0.852 9	0.829 2	0.828 7	0.808 6	0.803 0	0.811 2	0.795 8	0.806 1	0.861 1	0.842 6	1.000 0

统碳循环,细根及根系分泌速率在森林系统的物质循环和能量流动中发挥着重要作用。该试验中,根系分泌速率随着细根的增长呈现出“高一低一高”的趋势,同时细根随着季节也呈现出“高一低一高”的趋势,说明细根与根系分泌速率之间存在正相关的关系,细根越多,根系分泌速率越高。

#### 4 结论

该研究结果表明,30年生连香树人工林不同土层的细根分布和生物量在季节变化上存在较大差异,细根生物量的季节变化为单峰曲线,为“低(4月)—高(7月)—低(12月)”的季节变化模式,与居群所处的气候降水条件呈正相关;连香树根系分泌物的分泌速率表现出夏季高冬季低,随着季节的变化表现出明显差异,与细根的生长规律一致,具有季节性规律。目前,对于连香树的保护停留在就地保护,通过营造人工林,在连香树分布周围构建新的种群个体,创造植株繁衍条件。对连香树人工群落地下生态过程的研究将有利于揭示其地下生态的活动规律,为种群的扩大培育提供基础数据。

#### 参考文献

- [1] 王瑞丽,程瑞梅,肖文发,等. 森林细根生产和周转的影响因素[J]. 世界林业研究,2012,25(1):19-24.
- [2] VALVERDE O, RAICH J W, RUSSELL A E. Fine-root mass, growth and nitrogen content for six tropical tree species[J]. Plant & soil, 2007, 290(1/2):357-370.
- [3] 英慧,殷有,于立忠,等. 土壤水分、养分对树木细根生长动态及周转影响研究进展[J]. 西北林学院学报,2010,25(3):36-42.
- [4] 杨玉盛,陈光水,林鹏,等. 格氏栲天然林与人工林细根生物量、季节动态及净生产力[J]. 生态学报,2003,23(9):1719-1730.
- [5] MEINEN C, HERTEL D, LEUSCHNER C. Biomass and morphology of fine roots in temperate broad-leaved forests differing in tree species diversity: Is there evidence of below-ground overyielding? [J]. Oecologia, 2009, 161: 99-111.
- [6] MUSTAJÄRVI K, MERILÄ P, DEROME J, et al. Fluxes of dissolved organic and inorganic nitrogen in relation to stand characteristics and latitude in scots pine and norway spruce stands in Finland[J]. Boreal environment research, 2008, 13(4):3-21.
- [7] 熊丹,陈发菊,梁宏伟,等. 珍稀濒危植物连香树种子萌发的研究[J]. 福建林业科技,2007,34(1):36-39.
- [8] 王磐基. 珍稀濒危树种连香树[J]. 河南大学学报(自然科学版), 1986

- (3):62-64.
- [9] 陈荣珠. 连香树组织培养及其生根过程中内源激素变化研究[D]. 北京:北京林业大学,2012.
- [10] 曹基武,唐文东,朱喜云. 连香树的森林群落调查及栽培技术[J]. 林业科技开发,2002,16(6):30-32.
- [11] 黄绍辉,方炎明. 牛血清白蛋白对连香树 PCR 反应体系的优化[J]. 安徽农业科学,2010,38(26):14260-14261.
- [12] 姚连芳,刘会超,李宏瀛. 濒危物种连香树资源繁育与开发利用[J]. 安徽农业科学,2005,33(11):2060-2061.
- [13] 师春娟,王齐. 连香树愈伤组织诱导研究[J]. 安徽农业科学,2016,44(3):131-132.
- [14] 雷燕. 高海拔地区果菜间套种植技术[J]. 四川农业科技,2014(8):24-25.
- [15] 刘庆,肖娟,李宇飞,等. 一种根系分泌物原位收集装置及系统:201120557060.5[P]. 2011-12-28.
- [16] PHILLIPS R P, ERLITZ Y, BIER R B, et al. New approach for capturing soluble root exudates in forest soils[J]. Functional ecology, 2008, 22(6):990-999.
- [17] 郭银,周丹. 林木细根的研究进展[J]. 防护林科技,2008(2):50-52.
- [18] 严小龙. 根系生物学原理与应用[M]. 北京:科学出版社,2007.
- [19] 王政权,郭大立. 根系生态学[J]. 植物生态学报,2008,32(6):1213-1216.
- [20] NIBAU C, GIBBS D J, COATES J C. Branching out in new directions: The control of root architecture by lateral root formation[J]. New phytologist, 2008, 179(3):595-614.
- [21] 张小全,吴可红. 森林细根生产和周转研究[J]. 林业科学,2001,37(3):126-138.
- [22] 廖利平,陈楚莹,张家武,等. 杉木、火力楠纯林及混交林细根周转的研究[J]. 应用生态学报,1995,6(1):7-10.
- [23] 单建平,陶大立,王淼,等. 长白山阔叶红松林细根周转的研究[J]. 应用生态学报,1993,4(3):241-245.
- [24] TESKEY R O, HINCKLEY T M. Influence of temperature and water potential on root growth of white oak [J]. Physiologia plantarum, 1981, 52(3):363-369.
- [25] 汪洋,代力民,于大炮,等. 长白山白桦林细根的生产力及其周转[J]. 湖南农业科学,2010(7):113-115.
- [26] 李宗峰,李旭光,王永健,等. 不同恢复群落中辽东栎种群空间格局分析[J]. 广西植物,2007,27(4):576-580.
- [27] 田雨,方自力,谢强,等. 岷江上游植被在汶川地震中的损毁及灾后恢复状况[J]. 长江流域资源与环境,2014,23(5):735-740.
- [28] 潘开文,刘照光. 连香树人工幼林群落营养元素含量、积累分配和循环[J]. 林业科学,2001,37(2):1-12.
- [29] YIN H J, LI Y F, XIAO J, et al. Enhanced root exudation stimulates soil nitrogen transformations in a subalpine coniferous forest under experimental warming[J]. Global change biology, 2013, 19(7):2158-2167.
- [30] 刘泽民. 关帝山落叶松人工林细根动态研究[D]. 晋中:山西农业大学,2014.
- [31] 闫美芳,王璐,郭楠,等. 黄土高原杨树人工林的细根生物量与碳储量研究[J]. 中国农学通报,2015,31(35):146-151.

(上接第140页)

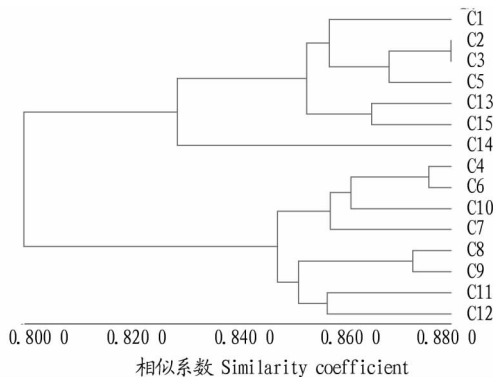


图2 15个小干松种源遗传相似性UPGMA聚类

Fig.2 Genetic similarity clustering of 15 provenances of *Pinus contorta* on UPGMA method

15个种源遗传距离在0.2387~0.1240,相似系数比较高,可能是由于引种地理位置较近所致。

#### 参考文献

- [1] 宋晓东. 抗旱耐寒国外松的选择[J]. 辽宁林业科技,1994(2):9-13.
- [2] LI G, QUIROS C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103(8):455-461.
- [3] WANG X D, WANG Z P, ZOU Y P. An improved procedure for the isolation of nuclear DNA from leaves of wild grapevine dried with silicagel[J]. Plant Mol Biol Rep, 1996, 14(4):369-373.
- [4] 黄登民,王生,周显昌. 小干松引种实验初报[J]. 延边大学农学报, 2003, 25(1):13-15.
- [5] 陆志民,时樱,吴为群,等. 小干松种源实验与研究[J]. 吉林林业科技, 1994(5):41-49.
- [6] 谢祖年,章定清,范亦,等. 小干松引种与种源试验[J]. 林业科技开发, 2000, 14(4):40-42.