

华北落叶松种子园不同世代间遗传多样性变化

于大德¹, 袁定昌¹, 张登荣², 范英明¹, 李旦¹, 张鸿景³, 张金凤¹

(¹ 林木育种国家工程实验室/林木、花卉遗传育种教育部重点实验室/国家林业局树木花卉育种与生物工程重点开放实验室/北京林业大学生物科学与技术学院, 北京 100083; ² 四川省凉山州凉北林业局, 西昌 615000; ³ 河北省林业科学研究院, 石家庄 050061)

摘要: 华北落叶松是我国华北地区营造针叶树丰产林的首选树种, 我国自 20 世纪 60 年代开始营建华北落叶松种子园, 现部分种子园已建至第 3 代。但选优导致的种子园亲子代群体间的遗传多样性水平变化情况并不清楚, 其分子水平的群体遗传基础也不明确, 造成高世代育种及造林工作中种质资源不清等问题。本研究利用 10 对 EST-SSR 引物, 分析了河北省龙头山林场华北落叶松良种基地种子园中 1 代、2 代、3 代优树群体的遗传多样性。每对引物的等位位点数为 2~5 个不等。1、2、3 代的平均有效等位点位数分别为 1.9204 个、1.81 个、2.0693 个, Shannon 指数分别为 0.7127、0.7052、0.7908, 且群体中杂合子过量。结果表明, 1~3 代种子园群体遗传多样性水平没有明显的差异, 子代群体与亲代群体间遗传分化较小, 遗传变异主要存在于每代群体内, 而非世代群体间。

关键词: 华北落叶松; 种子园; 遗传多样性; 微卫星 (SSR)

Genetic Diversity of *Larix principis-rupprechtii* Mayr. Seed Orchard among Generations

YU Da-de¹, YUAN Ding-chang¹, ZHANG Deng-rong², FAN Ying-ming¹, LI Dan¹,
ZHANG Hong-jing³, ZHANG Jin-feng¹

(¹ National Engineering Laboratory for Tree Breeding/Key Laboratory of Genetics and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants, Ministry of Education/The Tree and Ornamental Plant Breeding and Biotechnology Laboratory of State Forestry Administration/College of Biological Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083; ² Liangbei Forestry Administration, Xichang Sichuan 615000; ³ Hebei Forestry Research Institute, Shijiazhuang 050061)

Abstract: *Larix principis-rupprechtii* Mayr. is one of the most proper conifer species for forestation in north China. Seed orchards of *Larix principis-rupprechtii* Mayr. have been built since 1960s in China, and some of which have already contained three generations. However, lack knowledge of genetic variations after selection on molecular level causes some unclearness in breeding and forestation. 10 EST-SSR primers were used in this study to analysis the genetic diversity among three generations in the seed orchard in Hebei. Each primer had 2-5 loci. The numbers of average effective loci for the 1st, 2nd, and 3rd generations were 1.92, 1.81, and 2.07. Shannon index were 0.7127, 0.7052, and 0.7908. Heterozygote excessed in the populations. The value of *Fst* was low, which showed that genetic differences were mainly occurred in one generation rather than among generations.

Key words: *Larix principis-rupprechtii* Mayr.; seed orchard; genetic diversity; microsatellite (SSR)

华北落叶松 (*Larix principis-rupprechtii* Mayr.) 北、山西两省, 为中国特有植物^[1], 是华北地区高山林带的主要造林树种。我国从 20 世纪 60 年

收稿日期: 2013-11-30 修回日期: 2014-01-09 网络出版日期: 2014-08-07

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140807.1021.008.html>

基金项目: 国家自然科学基金项目 (J1103516); 国家林业局林业公益性行业专项 (201004009); 北京市与中央在京高校共建项目 (GJ2011-2)

第一作者主要从事植物遗传育种方向研究。E-mail: yudade8876@sina.com; 袁定昌为共同第一作者

通信作者: 张金凤, 主要研究针叶树良种繁育。E-mail: zjf@bjfu.edu.cn

代就已经开始落叶松的遗传改良工作,70 年代末至 80 年代,开展落叶松种源研究,并且全国各地开始营建各类落叶松子代测定林^[2]。华北落叶松种子园也在此阶段建立,主要分布在河北、山西等北方地区。

落叶松可作为多种工业用材林,分布广,并以早期速生著称,是北半球温带山区与寒温带气候条件下重要的针叶速生用材树种^[3],其遗传基础一直受到我国林木遗传育种工作者的特别关注。国内华北落叶松种源差异较大,且相同种源在不同区域表现不同^[3]。表型观察表明,华北落叶松天然种群间存在明显的遗传差异,且目前的研究主要集中在生理生化方面^[4],相应的分子标记开发很少。虽然落叶松属植物分子水平的遗传多样性研究已获得不少进展,但针对华北落叶松天然或人工种群遗传结构和分子进化的研究极少。

张含国等^[5]利用同工酶对 11 个天然群体长白落叶松进行了多样性分析。张磊等^[6]采用 ISSR 分子标记对兴安、长白和日本落叶松种间以及不同无性系进行了鉴别。曲丽娜^[7]采用 RAPD、ISSR 分子标记以及其他分子生物学技术对兴安落叶松、华北落叶松和长白落叶松进行种间鉴别。李雪峰^[8]利用 ISSR 和 RAPD 两种分子标记,结合表型生长性状,对兴安落叶松的遗传多样性进行了分析。贯春雨^[2]运用 RAPD 和 SSR 分子标记构建日本落叶松×兴安落叶松遗传连锁图谱,并结合生长性状和材性性状进行 QTLs 定位分析,为落叶松分子标记辅助育种提供理论依据。但上述遗传研究均不是以华北落叶松为对象。目前,仅有李晓楠^[4]采用 ALFP 分子标记分析了山西省华北落叶松天然群体的遗传多样性,认为华北落叶松天然群体的遗传变异主要存在于种群内部,种群内个体间的遗传分化程度较高,且种群间基因交流较频繁。

目前,尚没有针对于华北落叶松种子园遗传多样性的相关研究。种子园的建立是针叶树育种最有效的方法之一。种子园通过有性过程生产改良种子,既要获得较高的遗传增益,又须保证有较宽的遗传基础,即遗传多样性的持续^[9]。在华北落叶松种子园建设中,随着高强度的选择,高世代种子园中,世代间遗传多样性是否有变化并不清楚。导致我们无法判断高强度的选择,是否会对未来的育种周期带来遗传基础不足的问题。

由于所有的遗传变异都发生在分子水平^[10],因此分子标记是最直接也是最明确的遗传多样性的研

究技术。本研究利用 10 对 EST-SSR 分子标记对华北落叶松无性系种子园 1~3 代建园群体部分优树的遗传多样性进行分析比较,旨在了解该种子园中随着世代的升高,选择强度的加大,这些优树群体遗传多样性的变化情况,为后期高世代育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料取自于河北省承德市围场县龙头山国家落叶松良种基地落叶松无性系种子园。该种子园始建于 1976 年,位于 117°21'E、42°27'N,海拔 1200 m。1 代无性系种子园 48 hm²,优树无性系 238 个,分别选自围场当地种源人工林、山西恒山天然林、张家口小五台以及保定阜平县等地,其中 138 个无性系已进行了子代测定。在 1 代园子代测定林 138 个半同胞家系中,选出 40 个半同胞家系中的 40 个优良单株,嫁接建成 2 代种子园。2 代种子园的子代测定林于 2002 年建立,子代测定工作仍在进行中。

于 2011 年 5 月及 2012 年 5 月前往良种基地,在 1 代园已进行子代测定的 138 个无性系中选优,采集无性系 50 株(包括 2 代园 40 株的所有母本),另采集 2 代园全部无性系 40 株,以及 2 代园子代测定林中已测定的 3 代优树 30 株。

剪取长有新生嫩叶的短枝 10 cm 左右,每株 3~5 枝,放入装有硅胶的信封中,写好编号,并及时更换硅胶。带回实验室后,将嫩叶从小枝上摘下,放入自封袋中,每号 2 袋,挤出空气封口,放入 -80℃ 冰箱中留存待用。

1.2 DNA 提取及浓度测定

采用 CTAB 法提取总 DNA。采用 1% 的琼脂糖电泳对所提 DNA 进行检测。使用 Nanodrop 2000 核酸测定仪准确测定所提 DNA 浓度,统一稀释至 10 ng/μL 备用。

1.3 引物筛选及 PCR 扩增

从已发表的文献^[2,11-15]中,收集属内其他种落叶松基因组 SSR 引物共 85 对。另在 NCBI 的 dbEST 数据库中下载落叶松属及其近缘属的 EST 序列,经过拼接、去冗余,选择重复次数较多的 SSR 位点,自行设计 EST-SSR 引物 114 对。经过筛选,获得 10 对多态性较好、电泳结果清晰的 EST-SSR 引物(表 1)。

表 1 本试验所用 10 对 EST-SSR 引物
Table 1 10 pairs of EST-SSR primers used in this study

编号 Code	引物序列(5'-3') Primer sequence(5'-3')	预期扩增片 段大小(bp) Expected size	重复片段 Repeat motif	退火温度(℃) Anneal temperature	文献来源 Resource
F1	F:AAGGAGGAGGGTCAGGGAA R:CATGCGGAGGTTGAGTTG	145 ~ 174	(tcagge)5	60	自行设计
F03	F:GTGGATTGTTGACAGGGAG R:GTCGTTGTAATGAGGGTGA	198	(at)8	55	自行设计
F05	F:GGCGATCTCGAACAGAAACG R:GGAAGTATAACAAGAAGCCAAGT	189	(tgc)9	58	自行设计
F21	F:CGCCTTTCAGTCAGTTAGA R:GGTTTACTTAGCCAGTACGAC	208	(gcctgt)5	51	自行设计
F32	F:TCCTGGACTAATATCCCCTTCA R:TGGTCACCTATGGGCTGTAC	173	(at)6 + (aat)5	51	自行设计
F42	F:AACACTTTAATCCCCTCCC R:CTGGACCTGATACTCCTCTTC	168	(caggaa)5	51	自行设计
L9	F:TCATTACAACGCCACGAA R:TGCAGCGTGAAGTTCTCATC	184 ~ 258	(at)8	56	[2]
L53	F:ATTATTGCCCTCTGAGTTTG R:ATTCACCCCAATCCCATC	131	(att)4 + (tgt) 4 + (gtggca)4	56	[11]
L55	F:CCGAAATGAAGTCCGTGAG R:GCAGCAGCAAGTCCTAAAT	140	(catt)4	56	[11]
L56	F:GGCTGAGGTTGCGAAAGA R:CAATTACATAAGTGGGACGAGA	142	(agtc)4 + (gtcca)6	56	[11]

PCR 扩增反应体系,总体积为 20 μ L,其中模板 DNA30 ~ 50 ng,1 $\times$ buffer(含 Mg^{2+}),dNTPs 40 μ mol/L (each),正反向引物各 0.1 μ mol/L, *Taq* 酶 1 U。PCR 扩增程序为:95℃ 预变性 7 min;95℃ 变性 30 s,

最适退火温度 45 s,72℃ 延伸 1 min,循环 35 次;72℃ 延伸 10 min。采用 40% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳对扩增产物进行检测。引物 F1 对于部分 1 代个体的扩增结果见图 1。

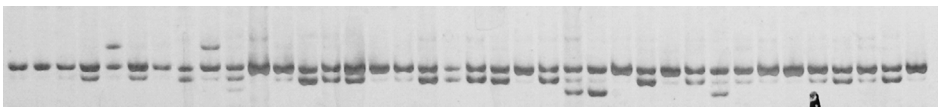


图 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测引物 F₁ 对于种子园 1 代部分个体的扩增结果
Fig.1 The amplification products of primer F₁ detected by polyacrylamide gel electrophoresis

1.4 数据处理及统计分析

根据扩增片段大小,读取基因型,采用 pop-gene1.32 软件分析 1 ~ 3 代的群体多样性。针对每个群体,统计平均每个位点的观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 指数 (I) 以检验群体的遗传多样性。统计观测杂合度 (H_o)、期望杂合度 (H_e)、固定系数 (F)、基因流 (N_m)、 F -统计量 (F -statistic) 等参数以了解群体杂合度及遗传分化等情况^[16-17]。

2 结果与分析

2.1 种子园遗传多样性分析

由表 2 可知,10 对具有多态性的 EST-SST 引物在 1 代 50 个样本中,共检测到 31 个等位基因。每个位点检测到基因数 2 ~ 5 个不等。其中引物 F42 位点检测到 5 个等位基因(图 2),L9、L53 和 F05 检测到 2 个等位基因(图 3),平均为 3.1 个。F32 的有效等位基因数最高,为 3.5286,L9 的有效等位基

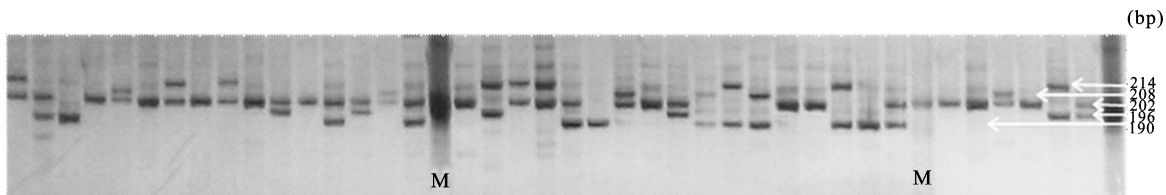
因数最低,为 1.0618,不同位点检测到的有效等位基因数不同,说明各个位点对于种群遗传多样性的测量能力不同。平均有效等位基因数为 1.9204 个,Shannon 指数为 0.7127。

表 2 种子园 1 至 3 代群体在各个位点的遗传多样性

Table 2 Summary of genetic variation statistics for all loci of samples from 1st to 3rd generation

位点	代数 (样本量)	观测等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Shannon 指数 I	位点	代数 (样本量)	观测等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Shannon 指数 I
Locus	Generation (sample size)				Locus	Generation (sample size)			
F1	1(50)	4	1.635	0.728	L9	1(50)	2	1.062	0.135
	2(40)	3	1.819	0.736		2(40)	2	1.078	0.160
	3(30)	4	2.195	0.962		3(30)	2	1.180	0.287
F03	1(50)	3	1.568	0.656	L53	1(50)	2	1.173	0.279
	2(40)	3	1.467	0.591		2(40)	2	1.406	0.464
	3(30)	3	1.921	0.833		3(30)	2	1.600	0.562
F05	1(50)	2	1.676	0.593	L55	1(50)	3	1.858	0.693
	2(40)	2	1.694	0.600		2(40)	3	1.682	0.639
	3(30)	2	1.684	0.596		3(30)	2	2.000	0.693
F21	1(50)	2	1.993	0.691	L56	1(50)	4	1.858	0.731
	2(40)	2	1.941	0.678		2(40)	4	2.010	0.844
	3(30)	2	2.000	0.693		3(30)	4	1.706	0.740
F32	1(50)	4	3.529	1.320	平均	1(50)	3.1	1.920 ^a	0.713 ^b
	2(40)	4	2.656	1.161	Mean	2(40)	3.0	1.810 ^a	0.705 ^b
	3(30)	5	4.000	1.432		3(30)	3.1	2.069 ^a	0.791 ^b
F42	1(50)	5	2.854	1.302	方差		1.1005	0.748	0.374
	2(40)	5	2.348	1.181	St. Dev		1.0541	0.461	0.305
	3(30)	5	2.406	1.109			1.2867	0.759	0.318

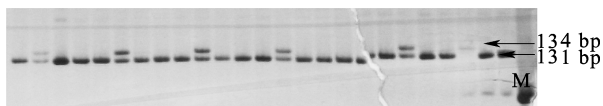
a 为有效等位基因数 N_e 在 3 个世代间的多重比较,b 为 Shannon 指数在 3 个世代间的多重比较,结果均无显著差异
a and b shows the multiple comparisons among generations of N_e and Shannon Index. There are no significant differences



Marker 为 200 bp,5 个位点在右侧 Marker 处用白色箭头标出
Marker is 200 bp, and the alleles are showed by white arrows

图 2 引物 F42 在 1 代部分个体中扩增出 5 个等位位点

Fig.2 The result of 5 alleles of primer F42 in some samples in 1st generation



Marker is 100 bp

图 3 引物 L53 在 1 代部分个体中扩增 2 个等位位点

Fig.3 The result of 2 alleles of primer L53 in some samples in 1st generation

2 代全部 40 个样本中共检测到等位基因 30 个。每个位点的等位基因数 2 ~ 5 个不等,平均为 3 个。F32 的有效等位基因数最高为 2.6556,L9 的有效等位基因数最低为 1.0778,10 对引物平均有效等位基因数为 1.81 个,Shannon 指数为 0.7052。与 1 代相比,多样性指数相差不大,数值略有减小。

在 3 代 30 个样本中,共检测到 31 个等位基因。

每个位点检测到的基因数 2~5 个不等,平均为 3.1 个。其中 F32 在 3 代群体中检测到 5 个等位基因,但在 1、2 代群体中均只有 4 个等位基因,F1 在 2 代中群体仅检测到 3 个等位基因,但在 1 代、3 代群体中均检测到 4 个等位基因,说明 3 代群体的父本来源范围较广。F32 的有效等位基因数最高为 4.000,L9 的有效等位基因数最低为 1.1803,平均有效等位基因数为 2.0693 个,Shannon 指数为 0.7908。与 1、2 代相比,3 代群体的遗传多样性指数均有所提高。

对 1~3 代的各参数进行多重比较,均没有显著差异(表 2)。由于 Shannon 指数可以较为直接

地反映群体遗传多样性,通过对 1~3 代群体的 Shannon 指数进行单因素方差分析(表 3),可知,群体中的变异多来自于每代群体内部,而代间变异较小,差异并不显著。因而,在种子园中,随着选择强度加大,群体数量减小,遗传多样性变化不大,并未出现遗传多样性损失严重的情况。而且,自由授粉高世代群体(3 代)的遗传多样性略高于亲本。另外,有效等位基因数仅为观测等位基因数的 2/3 左右,说明各等位基因可以较好地反映群体遗传多样性水平,但仍有小部分不足以反应群体遗传多样性水平,需要增加多态性更高、更加稳定的位点进行分析。

表 3 1 至 3 代 Shannon 指数单因素方差分析

Table 3 One-way ANOVA of Shannon index among generations

差异源 Difference source	SS	df	MS	F	P-value	F-crit
组间 Among populations	0.044865	2	0.022432	0.201513	0.818711	3.354131
组内 Within populations	3.005632	27	0.11132			
总计 Total	3.050497	29				

2.2 种子园群体杂合度分析

1~3 代群体在每个位点的观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Nei's 指数、遗传杂合度,以及对每个位点进行 Hardy-Weinberg 平衡的卡方检验所得的 p 值(表 4)。由试验结果可知,不同位点的杂合度差别较大。

1 代群体的期望杂合度最小为 L9 位点($\text{Exp_Het} = 0.0588$),最大为 F32 位点($\text{Exp_Het} = 0.7238$),平均 $\text{Exp_Het} = 0.4189$ 。观测杂合度最小为 L9 位点($\text{Obs_Het} = 0.06$),最大为 L56 和 F32 位点($\text{Obs_Het} = 0.66$),平均 $\text{Obs_Het} = 0.452$ 。F05、F21、F32、L55、L56 等 5 个位点经卡方检验,在 0.05 的显著水平下,明显偏离了 Hardy-Weinberg 平衡。其中 F21、F32 更趋向于纯合,其他位点趋向于杂合。2 代群体的期望杂合度最小为 L9 位点($\text{Exp_Het} = 0.0731$),最大为 F32 位点($\text{Exp_Het} = 0.6313$),平均 $\text{Exp_Het} = 0.4182$ 。观测杂合度最小为 L9 位点($\text{Obs_Het} = 0.075$),最大为 L56 位点($\text{Obs_Het} = 0.725$),平均 $\text{Obs_Het} = 0.42$ 。在 0.05 的显著水平下,F1、F05 偏离哈迪-温伯格定律趋向于杂合,F21、F32 偏离 Hardy-Weinberg 平衡趋向于纯合。其他位点均符合 Hardy-Weinberg 定律。3 代群体的期望杂合度最小为 L9 位点($\text{Exp_Het} = 0.1544$),最大为 F32 位点($\text{Exp_Het} = 0.7627$),平均

$\text{Exp_Het} = 0.4786$ 。观测杂合度最小为 L9 位点($\text{Obs_Het} = 0.1667$),最大为 F55 位点($\text{Obs_Het} = 1$),平均 $\text{Obs_Het} = 0.6067$ 。10 个位点中,F1、F05、F32 以及 L55 均在 0.05 的显著水平下,偏离了 Hardy-Weinberg 平衡,趋向于杂合。而 L55 则在所有的个体中均表现为杂合,可能由于该位点本身的遗传基础倾向于杂合,故在经历了两代选择之后,子代整体表现为杂合。

1~3 代群体的平均观测杂合度略高于平均期望杂合度,且相差不大,故整个群体符合随机交配模式,且自交较少。

2.3 F-统计量及基因流

将 1~3 代视为 3 个群体,进行 F-统计量及基因流的计算(表 5)。

平均 F_{is} 及 F_{it} 均小于 0,说明群体中杂合子过量。杂合子在生长过程中相对于纯合子更容易表现出优势,有更大的可能性被选入种子园中,符合本试验研究对象优树群体的特点。 F_{st} 数值较小,最低为 0,最高为 0.0391,平均为 0.0176,说明 3 代之间的分化程度很弱,这与对 Shannon 指数进行的方差分析的结果一致。计算得到的基因流数值 6.14~1000,平均为 13.95,远高于自然群体,也说明了子代群体与亲代群体之间的遗传分化较小。

表 4 种子园 1 至 3 代群体的杂合度

Table 4 Heterozygosity of three generations

位点	代数(样本量)	观测杂合度	期望杂合度	Nei's 期望杂合度	遗传杂合度	卡方检验 p 值
Locus	Generation/(sample size)	Obs_Het	Exp_Het	Nei's expected heterozygosity	Ave_Het	Probability of Chi-square test
F1	1(50)	0.4800	0.3921	0.3882	0.4610	0.5768750
	2(40)	0.6250	0.4560	0.4503	0.4610	0.0485840 *
	3(30)	0.7333	0.5537	0.5444	0.4610	0.000002 **
F03	1(50)	0.4000	0.3661	0.3624	0.3868	0.6338840
	2(40)	0.3250	0.3225	0.3184	0.3868	0.8199820
	3(30)	0.6333	0.4876	0.4794	0.3868	0.1093190
F05	1(50)	0.5600	0.4073	0.4032	0.4063	0.0071040 **
	2(40)	0.5750	0.4149	0.4097	0.4063	0.0129030 *
	3(30)	0.5667	0.4130	0.4061	0.4063	0.0366270 *
F21	1(50)	0.3400	0.5032	0.4982	0.4943	0.0204990 *
	2(40)	0.2250	0.4908	0.4847	0.4943	0.0005170 **
	3(30)	0.5333	0.5085	0.5000	0.4943	0.7853500
F32	1(50)	0.6600	0.7238	0.7166	0.6967	0.0001930 **
	2(40)	0.4000	0.6313	0.6234	0.6967	0.0000260 **
	3(30)	0.8000	0.7627	0.7500	0.6967	0.0068470 **
F42	1(50)	0.6000	0.6562	0.6496	0.6027	0.3297260
	2(40)	0.5750	0.5813	0.5741	0.6027	0.3041760
	3(30)	0.7333	0.5944	0.5844	0.6027	0.8983410
L9	1(50)	0.0600	0.0588	0.0582	0.0944	0.8589700
	2(40)	0.0750	0.0731	0.0722	0.0944	0.8415070
	3(30)	0.1667	0.1554	0.1528	0.0944	0.6585530
L53	1(50)	0.1200	0.1487	0.1472	0.2703	0.1465840
	2(40)	0.2500	0.2924	0.2888	0.2703	0.3436130
	3(30)	0.3667	0.3814	0.3750	0.2703	0.8281030
L55	1(50)	0.6400	0.4665	0.4618	0.4557	0.0194990 *
	2(40)	0.425	0.4104	0.4053	0.4557	0.3998440
	3(30)	1.000	0.5085	0.5000	0.4557	0.0000000 **
L56	1(50)	0.6600	0.4665	0.4618	0.4594	0.0433690 *
	2(40)	0.7250	0.5089	0.5025	0.4594	0.0808570
	3(30)	0.5333	0.4209	0.4139	0.4594	0.7200700
平均 Mean	1(50)	0.4520	0.4189	0.4147	0.4328	
	2(40)	0.4200	0.4182	0.4129	0.4328	
	3(30)	0.6067	0.4786	0.4706	0.4328	
方差 St. Dev	1(50)	0.2199	0.2020	0.2000	0.1660	
	2(40)	0.2051	0.1602	0.1582	0.1660	
	3(30)	0.2330	0.1575	0.1549	0.1660	

表 5 F-统计量及基因流

Table 5 Summary of F-statistics and gene flow

位点	群体大小(个)	近交系数	固定系数	群体分化系数	基因流
Locus	Samplesize	F_{is}	F_{it}	F_{st}	N_m
F1	120	-0.3293	-0.3074	0.0164	14.9593
F03	120	-0.1707	-0.1571	0.0116	21.3012
F05	120	-0.3960	-0.3959	0.0000	1000.0000
F21	120	0.2593	0.2633	0.0053	46.8774
F32	120	0.1101	0.1368	0.0300	8.0762
F42	120	-0.0554	-0.0427	0.0121	20.4067
L9	120	-0.0653	-0.0529	0.0116	21.2315
L53	120	0.0916	0.123	0.0346	6.9829
L55	120	-0.5105	-0.4514	0.0391	6.1388
L56	120	-0.3919	-0.3776	0.0103	23.9700
平均 Mean	120	-0.1392	-0.1191	0.0176	13.9455

3 讨论

目前,种子园遗传多样性的研究主要为种子园、子代测定林、子代人工林、疏伐前后群体遗传多样性的测定等方面。早期的观点认为随着改良选择力度的加大,种子园的遗传基础变窄,遗传多样性遭到破坏;而近年来的研究则认为种子园的遗传基础和遗传多样性并没有变小,相反较天然林群体的遗传多样性还要高一些^[16],本研究结果与后者一致。

J. L. Hamrick 等^[18]总结了用同工酶标记研究 20 个针叶树种群体遗传多样性的结果,发现不同树种的变异水平不同,且相差较大。20 个树种中,多态位点百分数 0 ~ 100.0%,平均为 67.7%;观测等位基因平均数 1.0 ~ 3.87,平均为 2.29;期望杂合度 0 ~ 0.364,平均为 0.210。李晓楠^[4]采用 AFLP 分子标记对山西 6 个华北落叶松天然种群进行研究,种群水平上,Nei's 遗传多样性指数为 0.1801,Shannon 信息指数为 0.2680;在物种水平上,Nei's 遗传多样性指数为 0.2245,Shannon 信息指数为 0.3414。赖焕林等^[19]对马尾松种子园亲、子代群体及种子园附近人工林的遗传多样性进行研究,得出种子园亲、子代群体的遗传多样性均高于天然林。可以认为,种子园亲代由于选优地域范围广阔,其遗传多样性高于限于某一地域的天然林,遗传基础比较宽泛,较少的亲本数量涵盖了大量的天然遗传资源,成为育种、造林的良好材料。

本研究中 1 代造园群体的期望杂合度为 0.4789,2 代群体的期望杂合度 0.4182,3 代群体的期望杂合度为 0.4786,均高于针叶树天然群体的平均值,且代间变化不大。1 ~ 3 代平均 Shannon 信息指数分别为 0.7127、0.7052、0.7908,均大幅高于华北落叶松天然林的水平 0.2284 ~ 0.3074^[4]。隋心^[20]对红松无性系种子园的研究表明,其建园无性系群体具有较高水平的遗传多样性,子代群体同亲代相比,各项多样性参数相近,遗传多样性没有降低。A. E. Szmidi^[21]对欧洲赤松种子园子代与天然林分种子的遗传多样性研究结果表明,与天然林子代相比,种子园子代的遗传多样性并没有显著下降。本研究结果与上述等研究结果相一致,2 代的遗传多样性略低于 1 代,但差异并不显著,而经过两代选育,3 代的遗传多样高于 2 代,与 1 代大致相同。研究结果证明了 N. C. Wheeler 等^[22]的观点,不必担心种子园群体数量有限会导致遗传变异低于天然群体的问题。

赖焕林等^[19]利用同工酶对马尾松种子园的研究认为,种子园及其附近人工林均表现为亲代群体处于遗传平衡,杂合体相对过量,子代偏离遗传平衡,杂合体相对不足。本研究结果与其不同,华北落叶松种子园中 1 ~ 3 代均偏离平衡,呈现为杂合子过量的状态,可能为选优过程中淘汰了大量的纯合子。另本研究中,2 代、3 代优树群体分别为 1 代、2 代优树群体的子代,可能分别继承了相关的等位位点,故其代间的遗传变异较小。

总体而言,建立种子园的首要目标是获得有较高遗传增益的种子,在其基础上保证所生产的种子具有一定的遗传多样性,以使用于育苗造林的种子园种子遗传基础不会过于单一,这对确保所造林分适应多年的气候等环境变化,尤其是避免极端环境因子造成大面积林分死亡至关重要。有研究表明,较少的群体数量,可以获得较高遗传多样性,可能由于部分亲本的多样性较高,虽然数量少,但携带了大量的该物种的等位基因^[23],或是由于外来花粉的侵入提高了种子园子代的遗传多样性^[24-25]。另外,子代测定过程可能淘汰了纯合位点较多的个体,杂合位点较多的个体由于有更高的生长率和更强的发育稳定性被保留下来,从而提高了子代群体的遗传杂合度^[26]。本研究结果显示,亲本的遗传多样性高于天然林平均遗传多样性,种子园中个体可能携带了大量的等位基因,并存在一定的花粉污染,而子代,尤其是 3 代的杂合度较高,可能是选择过程中淘汰了纯合位点所导致,故本研究结果与上述 3 种可能性相吻合。

华北落叶松尚未全基因组测序,目前遗传分析可用的分子标记较少,研究结果在一定程度上比较局限。落叶松属植物基因组较大,根据基因组序列设计的引物通用性较差,其他文献中已发表的西部落叶松^[13-14]、红杉^[12]等与华北落叶松亲缘关系较远的树种的 SSR 引物在华北落叶松中不能扩增出相应的目的片段。而通用性较高的 EST 序列在落叶松属内较少,扩增效果好且具有多态性的引物数量有限,且扩增出的位点的等位标记数较少,对遗传分析等工作带来一定的困难。本实验室从其他已发表的文献中收集落叶松属核基因组 SSR 引物 85 对,选出 5 对扩增结果好且多态性较好的引物。另外自行设计引物 114 对中,仅有 6 对 SSR 引物表现出较好的多态性且扩增稳定,引物多态性比率较低。故今后还需要开发更加高效的分子标记及分析方法,以获得更加准确、全面的结论,为华北落叶松的生

产、造林提供理论依据与指导。

致谢:感谢河北省承德市围场县龙头山国家落叶松良种基地袁德水高级技术员的大力帮助!

参考文献

- [1] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 182-197
- [2] 贯春雨. 日本落叶松×兴安落叶松 RAPD、SSR 遗传图谱构建与 QTL 定位[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010
- [3] 马常耕. 落叶松种和种源选择[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1992
- [4] 李晓楠. 山西省华北落叶松天然种群遗传多样性的 AFLP 分析[D]. 太原: 山西大学, 2011
- [5] 张含国, 周显昌, 高士新, 等. 长白落叶松天然群体遗传结构的研究[J]. 东北林业大学学报, 1995, 23(6): 21-30
- [6] 张磊, 张含国, 李雪峰, 等. 落叶松种间及无性系间 ISSR 鉴别技术的研究[J]. 植物研究, 2008(2): 216-221
- [7] 曲丽娜. 兴安、长白及华北落叶松 RAPD 和 ISSR 分子标记的物种特异性鉴定[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2006
- [8] 李雪峰. 兴安落叶松种源、无性系遗传多样性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009
- [9] 李义良, 赵奋成, 张应中, 等. 分子标记在松树遗传与进化研究中的应用[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 1004-1009
- [10] 沈浩, 刘登义. 遗传多样性概述[J]. 生物学杂志, 2001, 18(3): 5-7
- [11] 杨秀艳, 孙晓梅, 张守攻, 等. 日本落叶松 EST-SSR 标记开发及 2 代优树遗传多样性分析[J]. 林业科学, 2011(11): 52-58
- [12] Yu X, Zhou Q, Qian Z, et al. Analysis of genetic diversity and population differentiation of *Larix potaninii* var. *chinensis* using microsatellite DNA[J]. Biochem Genet, 2006, 44: 491-501
- [13] Chen C, Liewlaksaneeyanawin C, Funda T, et al. Development and characterization of microsatellite loci in western larch (*Larix occi-*
- dentalis* Nutt.) [J]. Mole Ecol Resour, 2009, 9(3): 843-845
- [14] Khasa P D, Newton C H, Rahman M H, et al. Isolation, characterization, and inheritance of microsatellite loci in alpine larch and western larch[J]. Genome, 2000, 43(3): 439-448
- [15] Wanger S, Gerber S, Petit R. Two highly informative dinucleotide SSR multiplexes for the conifer *Larix decidua* (European larch) [J]. Mole Ecol Resour, 2012, 12: 717-725
- [16] 艾畅. 马尾松无性系种子园遗传多样性及其自由授粉子代父本组成研究[D]. 南京: 南京林业大学, 2004
- [17] 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
- [18] Hamrick J L, Mitton J B, Linhart Y B, et al. Levels of genetic variation in trees: Influence of life history characteristics [C]//Proceedings of the symposium on isozymes of north American forest trees and forest insects. Washington: U. S. Government Printing Office, 1981: 35-41
- [19] 赖焕林, 陈天华. 马尾松种子园及其附近人工林的亲子代群体遗传结构分析[J]. 林业科学研究, 1997, 10(5): 490-454
- [20] 隋心. 红松无性系种子园子代的父本分析及遗传多样性的研究[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2009
- [21] Szmidi A E. Genetic studies of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.) domestication[D]. Umea: Swed. Univ. Agri, 1984
- [22] Wheeler N C, Jech K S. The use of electrophoretic markers in seed orchard research[J]. New Forests, 1992, 6: 311-328
- [23] 李悦, 张春晓. 油松育种系统遗传多样性研究[J]. 北京林业大学学报, 2000, 22(1): 12-19
- [24] 沈熙环, 李悦, 王晓茹. 辽宁兴城油松种子园无性系开花习性的研究[J]. 北京林学院学报, 1985, 19(3): 1-13
- [25] Wang X, Lindgren D, Szmidi A E, et al. Pollen migration into a seed orchard of *Pinus sylvestris* L. and the methods of its estimation using allozyme markers[J]. Scand J For Res, 1991, 6: 379-385
- [26] Nei M. Molecular Evolutionary Genetic[M]. New York: Columbia University Press, 1987: 202-207

欢迎订阅 2015 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》由中国科学院遗传与发育生物学研究所和中国生态经济学会主办, 中国科学院主管, 科学出版社出版。系中国期刊方阵双效期刊、中国科技精品期刊、中文核心期刊、RCCSE 中国权威学术期刊, 为中国学术期刊综合评价数据库、中国期刊全文数据库、中国学术期刊文摘、中国科学引文数据库、中国科技论文与引文数据库、CNKI 中国期刊全文数据库源刊, 并被国际农业生物学文摘(CABI)、美国化学文摘(CA)、哥白尼索引(IC)、美国乌利希国际期刊指南等国际数据库及检索单位收录。

主要报道全球环境变化与农业、农业生态系统与生态农业理论基础、农田生态系统与农业资源、生态农业模式和技术体系、农业生态经济学、农业环境质量及环境保护、农业有害生物的综合防治等领域创新性研究成果。适于从事农业生态学、生态学、生态经济学以及环境保护等领域科技人员、高等院校有关专业师生、农业及环境管理工作者和基层从事生态农业建设的技术人员阅读与投稿。

月刊, 国际标准大 16 开本, 128 页, 每期定价 35 元, 全年 420 元。国内外公开发行, 国内刊号 CN13-1315/S, 国际刊号 ISSN1671-3990。邮发代号: 82-973, 全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接汇款至编辑部补订(需另加邮资 50.00 元/年)。

地址: (050022) 河北省石家庄市槐中路 286 号 中科院遗传发育所农业资源研究中心《中国生态农业学报》编辑部

电话: 0311-85818007

传真: 0311-85815093

网址: <http://www.ecoagri.ac.cn>

E-mail: editor@sjziam.ac.cn