

DOI: 10.13332/j.1000-1522.20180057

基于 SSR 标记的山西省油松山脉地理种群遗传结构与地理系统

武文斌¹ 贺快快¹ 狄皓¹ 钮世辉¹ 马彦光² 张子杰¹ 李悦¹

(1. 北京林业大学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, 北京 100083;

2. 山西省关帝山国有林管理局, 山西 吕梁 030500)

摘要:【目的】分析油松种源区的遗传结构能够为油松起源探索和引种地人工林种群溯源等提供理论依据。【方法】本文利用 SSR 分子标记分析了山西油松 5 个山脉地理种群的遗传结构和地理系统。试验方法分别用了 8 对多态性较高引物和 4 对卡方检测差异显著性引物进行分析。【结果】结果显示:关帝山遗传变异最丰富,中条山遗传变异最低;8 对引物分析显示 5 个山脉地理种群分化较小($F_{ST} = 0.0328$),4 对引物分析显示 5 个山脉种群存在中等程度分化($F_{ST} = 0.0519$);5 个山脉种群遗传距离和地理距离存在显著相关性;遗传多样性参数与 1 月均温有负相关趋势,年均降水与 1 月均温比值和遗传多样性参数有正相关趋势。【结论】研究发现山西省主要山脉油松地理种群间有相对较小的遗传分化和种群内有丰富的遗传多样性;SSR 标记可以有效显示各种群的遗传结构特点,而筛选得到的有限差异显著标记能更有效的用于油松的种群遗传分析;生境气象因子的水热相对水平对种群遗传多样性有主导影响,相对较高的水热比利于种群保持较高的遗传多样性。

关键词:油松;地理种群;SSR 标记;遗传结构;遗传多样性;地理系统

中图分类号:S791.254 文献标志码:A 文章编号:1000-1522(2018)10-0051-09

引文格式:武文斌,贺快快,狄皓,等. 基于 SSR 标记的山西省油松山脉地理种群遗传结构与地理系统[J]. 北京林业大学学报,2018,40(10):51-59. Wu Wenbin, He Kuaikui, Di Hao, et al. Genetic structure and geographic system of geographical population of *Pinus tabulaeformis* mountain range based on SSR in Shanxi Province of northern China[J]. Journal of Beijing Forestry University, 2018, 40(10): 51-59.

Genetic structure and geographic system of geographical population of *Pinus tabulaeformis* mountain range based on SSR in Shanxi Province of northern China

Wu Wenbin¹ He Kuaikui¹ Di Hao¹ Niu Shihui¹ Ma Yanguang² Zhang Zijie¹ Li Yue¹

(1 National Engineering Laboratory for Forest Tree Breeding, Key Laboratory of Genetic and Breeding in Forest Trees and Ornamental Plants of Ministry of Education, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2 National Forestry Bureau in Guandi Mountain, Lüliang 030500, Shanxi, China)

Abstract: [Objective] Analysis of genetic structure of *Pinus tabulaeformis* provenance can provide a theoretical basis for the exploration of the origin and trace to the source of *Pinus tabulaeformis* artificial forest. [Method] In this paper, SSR molecular markers were used to analyze the genetic structure and geographic system of the five *Pinus tabulaeformis* populations in Shanxi Province of northern China. The test methods were analyzed with eight pairs of polymorphic primers and four differentially significant primers for chi-square detection. [Result] Genetic variation in Guandi Mountain was the most abundant,

收稿日期:2018-02-14 修回日期:2018-07-03

基金项目:“十三五”国家重点研究计划(2017YFD0600500),中央高校基本科研业务费专项(2015ZCQ-SW-02)。

第一作者:武文斌。主要研究方向:森林遗传学与针叶树遗传改良。Email:wwb474802665@163.com 地址:100083 北京市海淀区清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:李悦,博士,教授。主要研究方向:森林遗传学与针叶树遗传改良。Email:liyue@bjfu.edu.cn 地址:同上。

本刊网址: <http://j.bjfu.edu.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

and that in Zhongtiao Mountain was the lowest. Eight pairs of primer analysis showed that the differentiation of five mountains was smaller ($F_{ST}=0.0328$) and four pairs of primers analysis showed that there was a moderate degree of differentiation in five mountain populations ($F_{ST}=0.0519$). There was a significant correlation between the genetic distance and geographical distance of the five mountain populations; the genetic diversity parameters had a negative correlation trend with temperature in January. The ratio of annual mean precipitation and temperature in January had a positive correlation trend with genetic diversity parameters. [**Conclusion**] The study reveals that there are relatively small genetic differentiation and rich genetic diversity among the geographical populations of *Pinus tabuliformis* in the main mountains of Shanxi Province. SSR markers can effectively display the genetic structure characteristics of various populations, and the limited difference marked markers can be more effectively applied to the population genetic analysis of *Pinus tabuliformis*. The relative level of water and heat of habitat meteorological factors has a dominant influence on the genetic diversity of population, and a relatively high ratio of water and heat is conducive to maintaining a higher genetic diversity of population.

Key words: *Pinus tabuliformis*; geographic population; SSR marker; genetic structure; genetic diversity; geographic system

树种内自然群体间的地理变异 (geographic variation) 在 18 世纪中叶已被认识, 欧洲和北美在 20 世纪初开展了系统研究, 揭示了种内不同原产地种群间在生长与适应性等遗传变异的普遍性, 并在树种地理变异规律的研究基础上, 通过种子区 (seed zone) 和育种区 (breeding zone) 区划规定了各产地种子的安全调拨与利用范围^[1]。油松 (*Pinus tabuliformis*) 是我国北方分布广泛的重要乡土用材树种。山西省是我国油松分布的中心, 属于油松种子区的中部区和北部区^[2], 也是周边省区油松人工林培育的重要种源。据调查, 京、冀、辽等地自 20 世纪 30 年代至 80 年代营建的油松人工林种子多来自山西省, 但具体种源不清。研究显示油松不同地理种源在河北与辽宁的适应性与生长表现均有极显著差异^[3-5], 油松的种源选择对于人工林质量十分重要。山西省呈南北走向, 天然油松主要分布在太行山、吕梁山、中条山、关帝山和管涔山等山脉, 山脉间有平原与农区形成的地理隔离, 不同山脉油松地理种群的进化具有相对独立性。对五大山脉天然林分的调查^[6]及其子代对比试验结果显示, 不同山脉油松地理种群间生长差异十分显著, 而在山脉内差异不明显^[7], 说明山脉间种群变异是山西省油松变异的主要来源。

从分子水平进一步揭示山西省不同山脉油松地理种群间的遗传差异、遗传结构与地理系统, 对该油松核心区种质资源的保育和改良有重要参考价值。研究者分别用 RAPD 和 ISSR 标记, 以山西 5 个山脉油松种群各一个林分为样本做了遗传多样性研究, 发现山西天然油松种群变异主要在种群内^[8]; 利用线粒体 DNA 单倍型对油松全分布区代表性种群分

析显示山西油松有 3 个种群属分布区最广的单倍型组内^[9], 对进一步认识山西省油松种群遗传变异提供了有利参考。由于 RAPD 和 ISSR 标记存在随机性和非共显性的局限^[10-11], 基于测序技术的 SSR 标记已成为目前生物群体遗传研究更可靠有效的分子检测手段, 并且广泛运用于植物群体遗传结构和遗传多样性分析中^[12-16]。从引种区油松林分的种源溯源考虑, 标记的可靠性是其重要的技术依据。本文借助开发的油松特异 SSR 标记和群体遗传分析方法, 以多林分群体为山脉样本, 进一步解析山西五大山脉油松地理种群的 (1) 分子变异特征和遗传多样性; (2) 地理种群的遗传结构; (3) 阐明种群间的地理系统; (4) 探讨影响种群遗传多样性因素及其与林分生长的可能联系, 并为引种区油松人工林种质溯源研究筛选更有效的地理种群鉴别 SSR 引物, 为优良种源选择利用等提供技术依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试各山脉油松地理种群样本为各山脉 2 个以上林分群体的混合样本, 每个林分随机样本数 10 个左右。各种群分析所用针叶样品均采自山西天然林分子代对比试验林^[7]。代表山脉分别为管涔山 (GCS)、中条山 (ZTS)、太岳山 (TYS)、关帝山 (GDS) 和太行山 (THS) 林区。供试林分均为各山脉面积较大的优良天然林, 并且为当地人工造林的采种林分。其中 GCS 和 GDS 种群样本分别来自 6 个不同林分, THS 种群样本来自 3 个林分, YYS 和 ZTS 种群样本分别来自 2 个林分。供试油松山脉种群的地理位置、气候条件和样本数见表 1。

1.2 油松样本采集及处理

秋季于山脉种群供试林分子代对比试验林中随机选取样株, 各山脉采集样本数和林分数见表 1。

采集样株当年生新枝 1 个(针叶样本 50 个以上), 分别标记和装袋。取回后放置在低温冰箱(-20℃)内保存备用。

表 1 供试油松山脉种群地理位置、气候条件和样本数

Tab.1 Geographical location, climatic conditions and sample number of the *Pinus tabuliformis* mountain range populations to be tested

山脉 Mountain range	经度范围 Longitude range	纬度范围 Latitude range	年均温 Annual mean temperature/ ℃	1 月均温 Average temperature in January/℃	7 月均温 Average temperature in July/℃	年均降雨量 Annual mean precipitation/ mm	样本数/林分数 Sample number/stand number
GCS	111°15' ~ 112°33'E	38°10' ~ 38°55'N	7.3	-8.7	21.5	447.6	52/6
GDS	110°40' ~ 111°50'E	36°48' ~ 37°42'N	8.4	-7.2	22.0	489.6	66/6
THS	113°24' ~ 113°41'E	35°48' ~ 38°47'N	7.1	-7.6	20.2	509.9	32/3
TYS	112°01' ~ 112°06'E	36°37' ~ 38°36'N	10.5	-5.3	24.2	402.5	20/2
ZTS	111°53' ~ 112°08'E	35°32' ~ 35°55'N	10.5	-3.4	23.2	567.8	18/2

注:GCS 代表管涔山,GDS 代表关帝山,THS 代表太行山,TYS 代表太岳山,ZTS 代表中条山。下同。Notes: GCS stands for Guancen Mountain, GDS stands for Guandi Mountain, THS stands for Taihang Mountain, YYS stands for Taiyue Mountain, ZTS stands for Zhongtiao Mountain. The same below.

1.3 基因组 DNA 的制备

利用 DNA 提取试剂盒(艾德莱)分别从每个样株针叶中提取 DNA,1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。

1.4 引物筛选

本次引物的筛选是在实验室已有的松属

(*Pinus*)引物的基础上^[17],选出有产物、主带明显的引物,再经反复筛选得到 8 对稳定扩增且多态性高的引物(表 2)。

1.5 SSR-PCR 反应

PCR 反应体系为 20 μL,包括 2 μL DNA 样本,1 μL 前引物,3 μL 后引物,4 μL 荧光,10 μL 2 × Taq

表 2 油松 PCR 检测 SSR 引物

Tab.2 SSR primers for PCR detection of *P. tabuliformis*

引物名称 Primer name	前引物序列 Forward primer sequence(5'→3')	后引物序列 Back primer sequence(5'→3')	荧光修饰 Fluorescent modification	片段长度 Fragment length/bp
J9	GTTTGCAGTGAAAGCATGAAAG	GCACCAATTCCTTCTCAAATTC	HEX	244 ~ 250
J10	GTCGACACTCCAGGGTAGATTC	ATATCATCAGCTAATTGTGCGG	TAMRA	254 ~ 257
J12	TATGCATGTAACGGTAGCCTTG	GCAATTGTCTATGTCAGGGT	ROX	471 ~ 477
J20	CACCTCCGTAGTTTGATGTTCC	CGATGTATCGTGTACACAGCCT	FAM	150 ~ 171
J29	AGTCCGAATGTCTTCTTTCTGC	TATGGAACGAATCAGAGATGACG	FAM	191 ~ 200
J42	AACCTGTCATCCAGTTCCTGTT	TTGTCAAATCCAATTCAGCAC	TAMRA	251 ~ 269
J48	GAAGAGGAAGACGAAATGGATG	CTTTACATTTACCGCCTCTGCT	ROX	262 ~ 268
J50	TCATCCATTTCAATAGCACGAC	GTAGCTGCTTGGCCTGATTATC	HEX	235 ~ 244

PCR MasterMix(Biomed)。PCR 扩增反应程序为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,50 ~ 60℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s,循环 20 次;然后再 94℃ 变性 30 s,50℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 45 s,循环 20 次;最后 72℃ 延伸 5 min;4℃ 保存。扩增产物用电泳仪(ABI370x1)进行电泳检测,获取所有扩增产物的峰型电泳图谱,用于后续分析。

1.6 数据分析

用 Excel 2016 软件对群体中等位标记频率差异

进行卡方检验;运用 POPGENE1.32 软件分析遗传多样性参数观测等位标记数(N_a)、有效等位标记数(N_e)、Shannon 多样性指数(I)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、杂合性基因多样度的比率(F_{ST})、个体相对于总居群的固定指数(F_{IT})、个体所在居群的固定指数(F_{IS})、基因流(N_m),计算 Nei 氏遗传距离;运用 NTSYS-pc2.10s 软件生成遗传距离 UPGMA 聚类图并做 Mental 检测检验遗传距离与地理距离之间的关系;运用 SPSS19.0 软件分析遗传多样性参

数与气候因子间的 Pearson 相关性。

2 结果与分析

2.1 单位点基因频率与卡方分析

从5个山西省山脉油松种群的等位标记及频率看(表3),各位点等位标记数目范围为2~6个,平

均单位点等位标记数目为3.375个。除J12位点在ZTS群体中为单态外,其余位点在各群体中均为多态性较高。相同位点的各等位标记频率在群体间有差异,其中低频基因差异较大。稀有等位标记在GDS中出现频率最高,其次为GCS,在ZTS中出现频率最低,这可能与群体林分样本量大小有关。

表3 山西5山脉油松种群各位点等位标记频率

Tab.3 Frequency of the mark in five mountain populations of *P. tablifomis* in Shanxi Province

标记 Marker		群体 Population					标记 Marker		群体 Population				
位点 Loci	等位标记 Allele	GCS	GDS	THS	TYS	ZTS	位点 Loci	等位标记 Allele	GCS	GDS	THS	TYS	ZTS
J9	A	0.144 2	0.242 2	0.218 8	0.150 0	0.166 7	J42	A	0.038 5	0.045 5	0.171 9	0.025 0	0.027 8
	B	0.855 8	0.757 8	0.781 2	0.850 0	0.833 3		B	0.211 5	0.303 0	0.390 6	0.225 0	0.222 2
J10	A	0.692 3	0.676 9	0.609 4	0.675 0	0.750 0	C	0.740 4	0.628 8	0.406 2	0.750 0	0.750 0	
	B	0.307 7	0.323 1	0.390 6	0.325 0	0.250 0	D	0.000 0	0.022 7	0.000 0	0.000 0	0.000 0	
J12	A	0.823 5	0.882 8	0.937 5	0.875 0	1.000 0	E	0.009 6	0.000 0	0.015 6	0.000 0	0.000 0	
	B	0.176 5	0.117 2	0.062 5	0.125 0	0.000 0	F	0.000 0	0.000 0	0.015 6	0.000 0	0.000 0	
J20	A	0.040 0	0.072 6	0.048 4	0.075 0	0.093 8	J48	A	0.200 0	0.269 2	0.312 5	0.289 5	0.027 8
	B	0.890 0	0.774 2	0.806 5	0.800 0	0.593 8		B	0.750 0	0.723 1	0.687 5	0.684 2	0.972 2
	C	0.070 0	0.137 1	0.129 0	0.075 0	0.312 5	C	0.050 0	0.007 7	0.000 0	0.026 3	0.000 0	
	D	0.000 0	0.016 1	0.016 1	0.050 0	0.000 0	J50	A	0.000 0	0.015 2	0.000 0	0.000 0	0.000 0
J29	A	0.009 6	0.015 2	0.000 0	0.000 0	0.000 0		B	0.125 0	0.159 1	0.187 5	0.175 0	0.166 7
	B	0.932 7	0.878 8	0.984 4	0.950 0	0.944 4	C	0.875 0	0.818 2	0.812 5	0.825 0	0.833 3	
	C	0.048 1	0.098 5	0.000 0	0.050 0	0.055 6	D	0.000 0	0.007 6	0.000 0	0.000 0	0.000 0	
D	0.009 6	0.007 6	0.015 6	0.000 0	0.000 0								

对5个山脉油松种群等位标记频率差异性进行卡方检测,结果见表4,J42、J48位点等位标记频率在5个群体之间差异极显著($P < 0.01$);J12、J20位点等位标记频率差异显著($P < 0.05$);J9、J10、J29、J50位点等位标记频率差异不显著($P > 0.05$)。

根据 Hartl^[18] 建议,通过卡方检测群体中等位标记频率差异显著水平可以反映群体是否存在遗传分化。故在之后的研究中,分别运用8对引物和4对差异性显著引物进行分析比较。

表4 8个位点等位标记频率差异显著性 χ^2 检测表

Tab.4 Eight pairs of polymorphic primers for chi-square detection

引物 Primer	J20	J9	J42	J12	J29	J50	J10	J48
P 值 P value	0.019 *	0.344	0.002 **	0.034 *	0.452	0.857	0.676	0.007 **

注: * 代表群体中等位标记频率差异显著($P < 0.05$), ** 代表群体中等位标记频率差异极显著($P < 0.01$)。Notes: * represents allelic frequency in populations is significantly different ($P < 0.05$), ** represents allelic frequency in populations is very significantly different ($P < 0.01$).

2.2 遗传多样性分析

对5山脉油松种群进行遗传多样性分析结果如表5所示。8对引物分析结果显示,每个群体的观测等位标记数和有效等位标记数分别为2.13~3.13和1.42~1.64,平均2.63和1.51,其中观测等位标记数(N_a)GDS最高,ZTS最低,有效等位标记数(N_e)THS最高,ZTS最低。观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)在5个群体中的变化范围分别为0.249~0.388和0.260~0.356,平均0.325和

0.313,平均 H_o 稍高于 H_e 。Shannon 多样性指数(I)变化范围为0.419~0.597,平均为0.518。从 N_e 、 H_e 和 I 3个指标来看,GDS变异丰富,ZTS变异较低。4对差异显著引物分析结果与8对引物分析结果相似,且绝大多数参数值高于8对引物。

2.3 种群间遗传分化

对5山脉油松种群遗传分化分析结果见表6。8个位点间的油松种群分化系数有一定差异,J48位点的分化程度最大(0.061),J50位点的分化程度最

表 5 山西 5 山脉油松种群遗传多样性参数

Tab. 5 Genetic diversity parameters of five mountain populations of *P. tabuliformis* in Shanxi Province

山脉 Mountain range	N_a		N_e		I		H_o		H_e	
	8 对引物 Eight pair primers	4 对引物 Four pair primers	8 对引物 Eight pair primers	4 对引物 Four pair primers	8 对引物 Eight pair primers	4 对引物 Four pair primers	8 对引物 Eight pair primers	4 对引物 Four pair primers	8 对引物 Eight pair primers	4 对引物 Four pair primers
	GCS	2.750 0	3.000 0	1.436 7	1.499 2	0.500 0	0.573 3	0.311 3	0.319 8	0.291 8
GDS	3.125 0	3.250 0	1.582 5	1.646 4	0.597 0	0.648 5	0.372 2	0.386 0	0.355 9	0.377 4
THS	2.625 0	3.250 0	1.644 2	1.814 0	0.553 6	0.667 9	0.387 6	0.400 2	0.340 7	0.388 5
TYS	2.500 0	3.000 0	1.485 4	1.562 1	0.520 9	0.612 9	0.303 0	0.280 9	0.317 5	0.358 8
ZTS	2.125 0	2.250 0	1.419 3	1.467 0	0.418 7	0.417 8	0.249 1	0.178 8	0.259 7	0.253 1
均值 Mean	2.625 0	2.950 0	1.513 6	1.597 7	0.518 0	0.584 1	0.324 6	0.313 1	0.313 1	0.340 8

注: N_a . 观测等位标记数; N_e . 有效等位标记数; I . Shannon 多样性指数; H_o . 观测杂合度; H_e . 期望杂合度。下同。Notes: N_a , observed allelic marker number; N_e , effective allelic marker number; I , Shannon diversity index; H_o , observational heterozygosity; H_e , expected heterozygosity. The same below.

低(0.003 5), 8 个位点分析种群间杂合性基因多样度的比率(F_{ST})为 0.032 8, 遗传变异主要在种群内发生(96.7%)。4 个位点分析种群间 F_{ST} 为 0.051 9, 遗传变异也主要发生在种群内(94.8%)。根据 Wright 等^[1] 的建议, F_{ST} 为 0 ~ 0.05、0.05 ~ 0.15、0.15 ~ 0.25 和大于 0.25 分别代表群体间的遗传分化很小、中等、较大和很大。按 8 对引物均值来考虑, 种群间存在较低的遗传分化, 从 4 对引物均值来

考虑, 群体间存在中等遗传分化。基因流(N_m)是衡量群体间基因产生流动的指标, 当 $N_m > 1$ 时, 则可以防止两个群体间由于遗传漂变引起的分化。8 个 SSR 位点在 5 个种群中的 N_m 平均为 7.381, 4 个 SSR 位点在 5 个群体中的 N_m 平均为 4.570, 均远远大于 1, 说明它们之间的基因流动较大。因此, 这 5 个山脉种群不易因遗传漂变而引起遗传分化。

表 6 各位点在山西 5 山脉油松种群中的 F 统计量

Tab. 6 F -statistic for each locus in the five mountain populations of *P. tabuliformis* in Shanxi Province

标记 Locus	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}	N_m
J20	0.330 8	0.362 8	0.047 8	4.980 7
J9	-0.238 6	-0.226 0	0.010 1	24.383 3
J42	0.100 0	0.146 4	0.051 6	4.590 5
J48	-0.232 3	-0.157 1	0.061 0	3.848 0
J29	0.492 9	0.502 5	0.019 0	12.935 5
J50	0.000 5	0.004 0	0.003 5	70.972 6
J10	-0.482 8	-0.469 0	0.009 3	26.725 3
J12	0.014 5	0.055 6	0.041 6	5.755 2
8 个位点平均值 Mean value of eight locus	-0.056 5	-0.021 9	0.032 8	7.380 8
4 个位点平均值 Mean value of four locus	0.053 8	0.102 9	0.051 9	4.570 3

注: F_{ST} . 杂合性基因多样度的比率; F_{IT} . 个体相对于总居群的固定指数; F_{IS} . 个体所在居群的固定指数; N_m . 基因流。Notes: F_{ST} , ratio of heterozygosity gene diversity; F_{IT} , fixed index of individual relative to total population; F_{IS} , fixed index of the population in which the individual resides; N_m , gene flow.

2.4 种群间遗传距离和聚类分析

种群间遗传距离分析结果如表 7。8 对引物结果显示遗传距离变化范围为 0.003 2 ~ 0.040 7, 地理距离变化范围为 82.30 ~ 314.10 km。经过 Mantel 检验, 5 个山脉种群间地理距离和遗传距离存在显著相关性($r = 0.694 42, P = 0.944 8$)。4 对引物分析结果经过 Mantel 检验, 也显示 5 个山脉种群间地理距离和遗传距离存在显著相关性($r = 0.704 47, P = 0.947 0$)。4 对引物可以获得与 8 对引物相似

的遗传距离与地理距离关系信息。

根据 Nei 氏遗传距离构建种群间 UPGMA 聚类图(图 1)。8 对引物分析聚类结果显示, GCS 和 TYS 先聚为一类, 再与 GDS 聚为一类, 之后与 THS 聚类, 最后与 ZTS 聚类, 说明 GCS 和 THS 亲缘关系最近, GCS 与 ZTS 亲缘关系最远。4 对引物聚类分析结果(图 1 右)与 8 对引物计算遗传距离聚类结果(图 1 左)相同, 说明用筛选的 4 对引物可以获得与 8 对引物同样的种群间遗传差异的检测效果。

表7 油松种群遗传距离和地理距离

Tab.7 Genetic distance and geographic distance among populations of *P. tabuliformis* in Shanxi Province

山脉名称 Mountain name	GCS	GDS	THS	TYS	ZTS
GCS	—	155.570 3	200.878 1	106.797 6	314.101 4
GDS	0.006 7/0.009 8	—	203.807 6	82.298 1	182.698 4
THS	0.022 9/0.041 9	0.011 2/0.017 2	—	134.989 2	221.989 3
TYS	0.003 2/0.005 6	0.004 6/0.005 7	0.018 8/0.036 1	—	208.215 3
ZTS	0.026 2/0.051 2	0.021 2/0.038 9	0.040 7/0.074 4	0.025 4/0.049 3	—

注:表格左下方为油松种群遗传距离,表格右上方为地理距离,km。遗传距离中“/”符号左方数据为8对引物分析结果,右方数据为4对引物分析结果。Notes: the bottom left of the table is the genetic distance of *Pinus tabuliformis* population. The upper right side of the table is geographic distance/km. The genetic distance data on the left of slash was analyzed by eight primers, and the genetic distance data on the right of slash was analyzed by four primers.

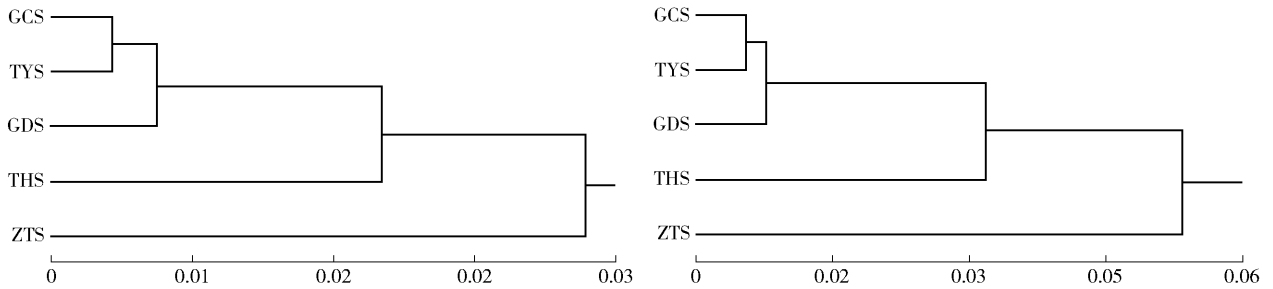


图1 8对引物(左)/4对引物(右)分析油松种群的遗传距离UPGMA聚类图

Fig.1 Eight pairs of primers (left)/four pairs of primers (right) for analyzing genetic distance among populations of *P. tabuliformis* in Shanxi Province by UPGMA clustering

2.5 遗传多样性参数与环境因子之间的关联

对8对引物得出的遗传多样性参数和气象因子做了相关性分析(表8)。虽然均未达到显著相关水平,但是观测等位标记数(N_a)与1月均温相关系数绝对值大

于0.7呈现出负相关的趋势,Shannon多样性指数(I)与1月均温相关系数绝对值大于0.6呈现负相关趋势,观测杂合度(H_o)与年均温、1月均温、7月均温相关系数绝对值均大于0.7呈现负相关趋势。

表8 油松种群的遗传多样性参数与气象因子之间相关分析

Tab.8 Correlation analysis on genetic diversity parameters and meteorological factors of *P. tabuliformis* populations

指标 Index	N_a		N_e		I		H_o		H_e	
	8对引物 Eight pair of primers	4对引物 Four pair of primers	8对引物 Eight pair of primers	4对引物 Four pair of primers	8对引物 Eight pair of primers	4对引物 Four pair of primers	8对引物 Eight pair of primers	4对引物 Four pair of primers	8对引物 Eight pair of primers	4对引物 Four pair of primers
年均温 Annual mean temperature	-0.598	-0.662	-0.532	-0.565	-0.517	-0.581	-0.727	-0.790	-0.451	-0.532
1月均温 Average temperature in January	-0.761	-0.801	-0.430	-0.432	-0.644	-0.711	-0.709	-0.822	-0.539	-0.651
7月均温 Average temperature in July	-0.417	-0.511	-0.623	-0.671	-0.409	-0.457	-0.707	-0.710	-0.394	-0.430
年均降水 Annual mean precipitation	-0.367	-0.535	0.040	-0.040	-0.392	-0.535	-0.155	-0.277	-0.322	-0.503
年均降水与1月均温比值 Ratio of annual mean precipitation and average temperature in January	0.780	0.922	0.470	0.459	0.776	0.875	0.722	0.831	0.693	0.830
年均降水与7月均温比值 Ratio of annual mean precipitation and average temperature in July	-0.118	-0.180	0.340	0.367	-0.115	-0.194	0.210	0.109	-0.057	-0.178
年均降水与年均温比值 Ratio of annual mean precipitation and annual mean temperature	0.280	0.307	0.528	0.573	0.242	0.252	0.570	0.551	0.237	0.230

我们利用年降水量与温度的比值来反映生境水分相对状况。年均降水与 1 月均温比值和 Shannon 多样性指数(I)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)的相关性系数均为大于 0.69 的正相关;年均降水与年均温比值和各种群遗传多样性参数的正相关系数变化在 0.23 ~ 0.57 间,并与有效等位标记数(N_e)和 H_e 的正相关系数大于 0.5,显示了一定的规律性;而年降水与 7 月均温比值和各种群遗传多样性参数的相关系数除与 N_e 相关在 0.34 ~ 0.36 外,与其他参数的相关系数多在 0.1 左右,没有规律性趋势。用 4 对引物相关性分析结果与用 8 对引物分析结果相同,并且相关系数绝对值更大,说明选出的 4 对引物同样能反映油松种群与气象因子的关系。

山西省的 5 个山脉种群遗传多样性参数与产地水热气象指标的相关分析结果显示:1 月份的均温对于遗传多样性参数有较大影响,1 月均温越低,种群的遗传多样性越高;而年均降水与 1 月均温比值越高则种群遗传多样性参数值亦高,其实质是生境水分相对状况对种群遗传多样性有更大影响。

3 讨 论

3.1 山西油松 5 山脉地理种群分子变异和遗传多样性

本研究结果显示了山西省油松种群具有较高的遗传多样性。在 5 个山脉中 GDS 油松种群的变异最丰富,ZTS 种群变异较低。对各位点等位标记频率分析发现,等位标记频率在各种群间具有一定差异,这与李鑫等^[8]用 RAPD 和 ISSR 标记对山西 5 个山脉油松天然林分的分析结果相似,说明等位标记分布的差异是山西省山脉油松种群遗传多样性的主要来源。Shannon 多样性指数(I)可评价遗传多样性的高低,指数越大,表明种群遗传多样性水平越高。李明等^[19]用 ISSR 标记在对油松分布 8 省 10 地区的研究中得出平均 I 为 0.216 5。本研究 8 对引物分析结果和 4 对引物分析结果平均 I 分别为 0.518 04 和 0.584 08,均高于 0.216 5 和 0.308 5,说明山西油松遗传多样性较高,这与山西是油松分布中心区,具有油松最适宜生存环境有关。从遗传多样性的分析结果来看,5 个山脉油松种群中 GDS 种群变异最丰富,ZTS 种群变异较低,这与对华北 5 个地区油松种群研究得出的 GDS 种群的遗传多样性最高的结果相一致。GDS 林区拥有优越的自然条件,植被类型众多且保存完整,气候条件适宜,对遗传变异的积累和维持有积极作用。

3.2 山西 5 山脉油松种群的遗传结构和地理系统

对山西省山脉油松种群的遗传分化研究显示遗

传变异主要发生在群体内且遗传距离和地理距离之间存在显著相关性。变异在地理上具有渐变性,说明该地区的油松种群变异与分化主要受选择、迁移等系统性遗传过程影响,显示了山西省的油松种群有来自同一基础种群的特征^[1],并说明山西省的油松种群有较宽的群体内遗传变异基础,且较其他地区的种群间遗传分化程度要低^[9],同时显示了利用 SSR 标记检测的山脉油松种群间遗传差异的客观合理性。用 SSR 标记分析种群遗传结构得出的遗传变异主要发生在群体内,与张新波等^[7]得出的山脉间种群变异是山西省油松变异主要来源的结果不同,是因为生长性状的变异主要受生境综合因素适应性进化与种群的奠基者效应等因素影响,SSR 标记的变异除了可能的进化效应外,相对地理隔离状态下的中性变异也占有重要地位,所以出现了与生长适应性不同的变异特点。利用 SSR 标记可有效揭示油松种群间遗传差异与种群遗传结构特点,并可为油松人工林的种源分析提供主要技术支撑。

3.3 山西油松 5 山脉地理种群遗传多样性与气候因子的相关性

对油松全分布区研究发现温度是影响油松生长的重要因素^[20],而由于山西油松分布区地理大小的局限性,山西油松年均温和降水虽有不同,但是远远超出了天然林生长所需最低条件,气温和降水都不是其分布的限制因子,相反适宜的水热环境条件在维持遗传多样性上起了一定的促进作用^[21]。因此,我们用水热比代表生境的相对水分状况,来分析有限地理区域内影响山脉油松地理种群遗传多样性的气象因素。研究发现山脉种群的遗传多样性有随 1 月均温降低而增加的趋势,但年均降水与 1 月均温比值和各种群的遗传多样性参数也为中等的正相关,这个结果说明了冬季低温减少了土壤贮存水分的散失,更利于春季天然更新的种子萌发和植株生长,而半湿润地区的春季干旱则恰是影响树木适合度的主要因素。年均降水与年均温比值和各遗传多样性参数的正相关趋势也说明,温度与降水的绝对量并不对种群遗传多样性构成限制条件,而水热的相对比值则是影响该区域油松地理种群遗传多样性的主要因素。山西省油松及河北、辽宁和内蒙古等省(区)油松林分在阴坡、半阴坡普遍比阳坡有更好的适合度与生长表现,这是因为阴坡和半阴坡的温度相对低于阳坡,使得土壤水分蒸发量较少,油松生长发育可有相对较多的水分利用。这对认识山西省内各山脉水热比对油松地理种群遗传多样性影响提供了参考。

3.4 山西5山脉油松遗传结构理论分析的应用

山西省内有丰富的油松种质资源和优质林分,是山西省及相邻省份的主要油松供种来源^[7]。Chen等^[9]利用叶绿体和线粒体DNA对30个来自油松全分布区的地理种群进行分析发现了种群间的变异与关联,并且提出了在最后一次冰川时期,由于独立的避难所的存在,而使中北部的油松得以保存,这就为山西是油松起源地之一提供了有力的证据。另有资料记载油松其他分布区如京、冀、辽的油松适生区的天然林种质多来自山西省,但是具体种源不清楚。因此,本研究对山西油松遗传结构的解析为油松种群溯源提供了理论基础。

对山西省天然油松林分的生长调查和天然林的子代对比试验结果显示^[6-7],位于GDS的油松种群有最好的林分表现与生长势,是山西省的优良种源,而且通过对各山脉油松地理种群的遗传多样性分析发现GDS种群的遗传多样性也相对较高。对油松无性系群体育种值与遗传多样性进行研究,结果显示高育种值的无性系群体其遗传多样性亦高^[22]。虽然地理种群的遗传多样性与生长表现之间的关联缺乏研究报道,但也预示了该种源地油松种群在油松种质资源保育、改良与推广中可有较高的适合度与生产力。

此外,研究中我们分别用8对随机引物和4对差异显著引物分析了各山脉油松种群的遗传多样性与遗传结构,并且得到了两组引物趋势一致的结果,而差异显著引物对于种群遗传分析更有效,说明了Hartl^[18]建议的合理性。SSR标记与ISSR、RAPD标记相比,后者或存在随机性和非共显性问题,SSR标记为共显性,变异区段测序更精确性,因此结果较已用标记分析结果更可靠。利用4对差异引物可以更高效分析种群遗传结构与遗传多样性,对进一步的引种地人工林种群溯源研究提供更经济有效的技术参考与支撑。

本研究采用的各山脉多个林分混合样本可以更好的代表山脉种群特点,未用林分进行分析主要是因为林分子代试验显示山脉种源间有显著差异而山脉内林分间没有显著差异,并且进一步人工林溯源分析也要以山脉种源为基础。利用SSR标记显示的山脉种群遗传变异及其与气象因子关系的客观合理性,也反映了该标记较其他完全显性标记更准确与有效。

4 结 论

本研究发现山西省主要山脉油松地理种群间有相对较小的遗传分化和种群内有丰富的遗传多样

性,利用SSR标记可以有效显示各种群的遗传结构特点,而筛选得到的有限差异显著标记能够更有效的用于油松种群的遗传分析。山西省主要山脉油松地理种群间随地理距离而发生遗传渐变,系统性过程为种群变异的主导进化力;生境气象因子的水热相对水平对种群遗传多样性有主导影响,相对较高的水热比利于种群保持较高的遗传多样性。研究显示的山西省主要山脉油松地理种群遗传变异规律与地理系统学关系将为该油松中心分布区的油松种质资源保育与利用提供有益的参考。

参 考 文 献

- [1] White T L, Adams W T, Neale D B. Forest genetics [M]. London: CABI Publishing, 2007.
- [2] 徐化成, 孙肇凤, 郭广荣, 等. 油松天然林的地理分布和种源区的划分[J]. 林业科学, 1981, 17(3): 258-270.
Xu H C, Sun Z F, Guo G R, et al. Geographic distribution of *Pinus tabulaeformis* and classification of provenance regions [J]. Scientia Silvae Sinicae, 1981, 17(3): 258-270.
- [3] 孙祝宾, 王喜文, 刘珍, 等. 油松种源试验幼林阶段研究初报 [J]. 辽宁林业科技, 1991(4): 3-8.
Sun Z B, Wang X W, Liu Z, et al. Preliminary study on the stage of young plantation of *Pinus tabulaeformis* in different source [J]. Liaoning Forestry Science and Technology, 1991(4): 3-8.
- [4] 翁殿伊, 王同立, 杨井全, 等. 油松种源试验报告 [J]. 河北林业科技, 1986(2): 1-8.
Weng D Y, Wang T L, Yang J Q, et al. Test report on the provenance of *Pinus tabulaeformis* [J]. The Journal of Hebei Forestry Science and Technology, 1986(2): 1-8.
- [5] 油松种源试验协作组. 油松种源试验 [J]. 林业科技通讯, 1984(3): 1-4.
Cooperation group of provenance test of *Pinus tabulaeformis*. Provenance test of *Pinus tabulaeformis* [J]. Forest Science and Technology, 1984(3): 1-4.
- [6] 富裕华, 张新波, 廉志刚, 等. 山西省油松天然林的分布特点和自然地理区的划分 [J]. 山西林业科技, 1988(1): 6-15.
Fu Y H, Zhang X B, Lian Z G, et al. The distribution characteristics of natural forest of *Pinus tabulaeformis* and the division of natural geographical area in Shanxi [J]. Shanxi Forestry Science and Technology, 1988(1): 6-15.
- [7] 张新波, 李悦, 袁虎威, 等. 山西油松天然林分21年子代生长性状遗传变异研究 [J]. 北京林业大学学报, 2014, 36(3): 104-109.
Zhang X B, Li Y, Yuan H W, et al. Genetic variations of growth traits in a 21-year-old stand progeny of Shanxi natural *Pinus tabulaeformis* forests [J]. Journal of Beijing Forestry University, 2014, 36(3): 104-109.
- [8] 李鑫, 柴宝峰, 王孟本. 华北地区油松种群遗传多样性分析 [J]. 植物研究, 2006, 26(1): 99-103.
Li C, Chai B F, Wang M B. Analysis of genetic diversity of *Pinus tabulaeformis* population in North China [J]. Bulletin of Botanical Research, 2006, 26(1): 99-103.

- [9] Chen K. , Abbott R J, Milne R I, et al. Phylogeography of *Pinus tabulaeformis* Carr. (Pinaceae), a dominant species of coniferous forest in northern China [J]. *Molecular Ecology*, 2008, 17 (19) : 76-88.
- [10] Mougel C, Thioulouse J, Perrière G, et al. A mathematical method for determining genome divergence and species delineation using AFLP [J]. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 2002, 52 (2) : 573-586.
- [11] Krauss S L. Accurate gene diversity estimates from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers [J]. *Molecular Ecology*, 2000, 9 (9) : 1241-1245.
- [12] Guzman F A, Segura S, Aradhya M, et al. Evaluation of the genetic structure present in natural populations of four subspecies of black cherry (*Prunus serotina* Ehrh.) from North America using SSR markers [J]. *Scientia Horticulturae*, 2018, 232 : 206-215.
- [13] 强海平, 余国辉, 刘海泉, 等. 基于 SSR 标记的中美紫花苜蓿品种遗传多样性研究 [J]. *中国农业科学*, 2014, 47 (14) : 2853-2862.
Qiang H P, Yu G H, Liu H Q, et al. Genetic diversity and population structure of Chinese and American alfalfa (*Medicago Sativa* L.) germplasm assessed by SSR markers [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2014, 47 (14) : 2853-2862.
- [14] Urrestarazu J, Errea P, Miranda C, et al. Genetic diversity of Spanish *Prunus domestica* L. germplasm reveals a complex genetic structure underlying [J]. *PloS One*, 2018, 13 (4) : e0195591 [2018-07-12]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0195591/>.
- [15] Gutiérrez-Ozuna R, Hamilton M B. Identification and characterization of microsatellite loci in the tuliptree, *Liriodendron tulipifera* (Magnoliaceae) [J]. *Applications in Plant Sciences*, 2017, 5 (8) : 1700032.
- [16] Anestiadou K, Nikoloudakis N, Hagidimitriou M, et al. Monumental olive trees of Cyprus contributed to the establishment of the contemporary olive germplasm [J/OL]. *PloS One*, 2017, 12 (11) : e0187697 [2018-02-12]. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0187697/>.
- [17] 程祥, 张梅, 李悦, 等. 油松种子园配置区无性系群体的遗传多样性与交配系统 [J]. *北京林业大学学报*, 2016, 38 (9) : 10-11.
Cheng X, Zhang M, Li Y, et al. Gene diversity and mating system of design zone's clone population in *Pinus tabuliformis* seed orchard [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2016, 38 (9) : 10-11.
- [18] Hartl D L. *A primer of population genetics* [M]. Sunderland: Sinauer Associates, 2000.
- [19] 李明, 王树香, 高宝嘉. 油松天然次生林居群遗传多样性及与产地地理气候因子的关联分析 [J]. *生态学报*, 2013, 33 (12) : 3602-3610.
Li M, Wang S X, Gao B J. Analysis of genetic diversity of Chinese pine (*Pinus tabuliformis*) natural secondary forest population and correlation with their habitat ecological factors [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2013, 33 (12) : 3602-3610.
- [20] 徐化成, 郭广荣, 冯林, 等. 油松天然林的生长与地理-气候因素的关系 [J]. *北京林业大学*, 1981, 3 (4) : 9-13, 82.
Xu H C, Guo G R, Feng L, et al. The relativity between natural *Pinus tabulaeformis* forest growth and geographical climatic factors [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1981, 3 (4) : 9-13, 82.
- [21] 李鑫. 油松天然种群遗传多样性及系统地位分析 [D]. 太原: 山西大学, 2008.
Li C. Genetic variation of natural populations of *Pinus tabuliformis* Carr. and its systematic position [D]. Taiyuan: Shanxi University, 2008.
- [22] 李悦, 张春晓. 油松无性系群体育种值与遗传多样性研究 [J]. *北京林业大学学报*, 1989, 20 (4) : 12-17.
Li Y, Zhang C X. A study on genetic diversity and breeding value of a series of clonal groups in *Pinus tabuliformis* [J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 1989, 20 (4) : 12-17.

(责任编辑 崔艳红
责任编委 卢孟柱)