

王晓丽, 高成杰, 李昆. 基于 SRAP 分子标记的材用云南松种质保存库构建策略[J]. 植物科学学报, 2019, 37(2): 211~220

Wang XL, Gao CJ, Li K. Strategy for constructing *Pinus yunnanensis* germplasm bank for timber based on the SRAP molecular marker [J]. *Plant Science Journal*, 2019, 37(2): 211~220

基于 SRAP 分子标记的材用云南松种质保存库构建策略

王晓丽^{1,2}, 高成杰¹, 李昆^{1*}

(1. 中国林业科学研究院资源昆虫研究所, 昆明 650224; 2. 西南林业大学林学院, 昆明 650224)

摘要: 以云南松 (*Pinus yunnanensis* Franch.) 全分布区内干形优良的 780 株样株作为原种质, 基于 SRAP 分析的位点作为种质保存库构建数据, 设 10%、20%、30%、40% 4 个抽样比例, 采用改进的最小距离逐步取样法构建其种质子集。结果显示: 种质子集的多态位点保留率均在 90% 以上且等位基因保留率皆大于 95%, 5 个遗传多样性评价参数最小值均为 10% 抽样比例种质子集, 且该子集居群内的遗传多样性小于原种质; 在种质子集与原种质的均值 *t* 检验中, 10% 抽样比例种质子集有 2 个指标与原种质间存在显著差异; 方差 *F* 检验中, 20% 和 10% 抽样比例种质子集的分别有 1 个和 6 个遗传多样性指标与原种质有显著差异且方差小于原种质; 种质子集的遗传多样性均值与原种质的相关系数全部达到 0.99 以上, 40% 和 30% 抽样比例种质子集的遗传多样性方差与原种质的相关系数均大于 0.80; 30% 抽样比例种质保存库的平均遗传距离较原种质提高了 52.16%, 保持了原种质的方差分量分配模式, 以较大的遗传距离实现了与原种质相似的聚类。本研究确认 30% 抽样比例种质保存库可以作为材用云南松种质资源的代表性子集。

关键词: 云南松; 材用种质保存库; 取样策略; SRAP 分子标记

中图分类号: S791.257

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2019)02-0211-10

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2019.20211

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Strategy for constructing *Pinus yunnanensis* germplasm bank for timber based on the SRAP molecular marker

Wang Xiao-Li^{1,2}, Gao Cheng-Jie¹, Li Kun^{1*}

(1. Research Institute of Resources Insects, Chinese Academy of Forestry, Kunming 650224, China;

2. College of Forestry, Southwest Forestry University, Kunming 650224, China)

Abstract: The genetic loci of the SRAP molecular marker in 780 *Pinus yunnanensis* Franch samples from the whole distribution area were used to establish a high-quality *P. yunnanensis* timber germplasm bank. Four *P. yunnanensis* germplasm subsets were constructed by improved least distance stepwise sampling at four sampling proportions, i. e., 10%, 20%, 30%, and 40%. Results showed that polymorphic locus retention rate of the four germplasm subsets was above 90% and the allele retention rate was greater than 95%. The minimum values of the five genetic diversity parameters were obtained from the germplasm subset constructed using the 10% sampling proportion, and the genetic diversity in the population of this subset was smaller than that of the original germplasm. Mean *t*-tests between the original and germplasm subsets showed significant differences between the 10% sampling ratio

收稿日期: 2018-09-05, 退修日期: 2018-10-10。

基金项目: 中国林业科学研究院基本科研业务费专项(CAFYBB2017SY030); 十三五农村领域国家科技计划(2015BAD07B0404)。

This work was supported by grants from the Special Foundation of Basic Research of Chinese Academy of Forestry (CAFYBB2017SY030) and 13th Five-Year National Science and Technology Program in Rural China (2015BAD07B0404)。

作者简介: 王晓丽(1976-), 女, 博士研究生, 副教授, 研究方向为森林资源培育(E-mail: 1144607944@qq.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: caflkun@163.com)。

germplasm subset and the original. Furthermore, for the variance *t*-tests, several indicators of genetic diversity demonstrated significant differences between the original germplasm and the 10% and 20% germplasm subsets, respectively, and the variances of these germplasm subsets were smaller than those of the original. The correlation coefficients of the mean genetic diversity between the original germplasm and the four germplasm subsets all reached 0.99. The correlation coefficients of genetic diversity between the original and the 40% and 30% germplasm subsets were more than 0.80. The average genetic distance of the 30% germplasm subset was 52.16% higher than that of the original germplasm; at the same time, the distribution pattern of variance components of the original germplasm was well maintained and similar clustering to the original germplasm was achieved with a large genetic distance. Therefore, the 30% sampling proportion germplasm subset could be used as a representative subset of the germplasm resources of *P. yunnanensis*.

Key words: *Pinus yunnanensis*; Germplasm bank for timber; Sampling strategy; SRAP marker

云南松(*Pinus yunnanensis* Franch.)是我国西南地区特有的材用树种,该物种以云南省为分布中心,四川的西南部、西藏的东南部、贵州和广西的西部皆有分布,在我国西南地区形成了大面积的天然林和人工林,是一个生态、经济和社会效益较高的树种。但是,其天然林长期遭受人为粗放择伐等破坏,人工林也面临采种的负向选择或造林用种质来源不清等问题,导致当前该树种林分衰退日益严重,林分中低矮、弯曲、扭曲等不规整个体的比例偏大^[1]。因此,如何更好地保存现有云南松优良种质资源,成为当前云南松天然林保护和人工林发展过程中急需解决的问题。

林木种质资源在其育种、培育及其他相关研究中具有重要作用。国家林业局先后于 2009 年和 2016 年分两批确定并公布了 99 处国家林木种质资源库,但云南松未在其列^[2]。依托云南松生产性育种工作,云南省林业厅分别在楚雄一平浪林场和大理弥渡县建立了云南松一代无性系种子园^[3]。建园时无疑应该选择优良的种质资源,但是为了降低其生态不适应可能带来的风险,收集的种质资源在遗传基础上存在较大的局限性。林木种质资源数量庞大,这给种质资源收集、保存、评价和利用带来很大的困难^[4],因此对于暂时没有建立林木种质资源库的树种来说,确定其种质资源保存的抽样策略,筛选合适的样本量,选取具有代表性的样本,有利于其种质资源的保存^[3, 4]。因此,借鉴植物核心种质构建的方法和抽样策略,探讨材用云南松种质资源保存的抽样策略,将会极大促进云南松

优良种质资源的保存和利用。

遗传多样性是种质资源保存和核心种质构建研究的基础。在云南松种质资源遗传多样性研究方面,金振洲等^[1]结合云南松的形态、生长力等指标的地理变异规律,对云南松进行了种源区划; Xu 等^[5]对云南省范围内分布的 20 个云南松天然居群遗传多样性分析结果显示,不同群体间的遗传分化较低,绝大多数变异存在于群体内,不具有明显的地理隔离;同样,杨章旗等^[7]利用 SSR 标记对云南松变种细叶云南松(*P. yunnanensis* Franch. var. *tenuifolia* Cheng et Law)进行群体遗传多样性分析,也发现其群体间遗传分化较小,群体间存在较大的基因流;刘占林等^[6]利用分子标记技术,比较了巴山松(*P. henryi* Mast.)、黄山松(*P. taiwanensis* Hayata)、油松(*P. tabulaeformis* Carr.)、马尾松(*P. massoniana* Lamb.)和云南松的遗传多样性,认为 5 种松树种间分化明显且皆呈现较高的遗传多样性,但云南松的遗传多样性最低。以往对云南松遗传多样性的研究,所用样品不管来自较少的居群(3 ~ 10 个),还是较多的居群(15 ~ 20 个),其所选居群皆来自云南松自然分布区的部分区域,且大部分为云南区域的居群,而对云南松全分布区的相关研究未见报道。

种质资源保存和核心种质构建的主要内容就是对其找出有效的管理和保存方法,很多学者对此进行了探讨,认为与大随机方法相比,将整个种质按某一原则(地理及农业生态、分类体系、育种体系等)分为互不重迭小组的分组方法构建核心种质更

具有代表性^[8]。分组完成后，接下来就要考虑组内取样策略，组内取样时系统取样明显优于完全随机取样^[8]，系统取样的多样性指数法在确定各组的取样量时以组内多样性占整体多样性的比例为依据，而等数法、对数法、比例法和平方根法均仅以组内的样品数量为依据，所以多样性指数法较这 4 种方法更为可靠^[9]。系统取样法确定各组的取样量，但是各组具体哪个样品进入核心种质，则是由取样方法来解决的，取样方法有多次聚类随机取样、多次聚类优先取样、多次聚类偏离度取样、最小距离逐步取样和改进的最小距离逐步取样，改进的最小距离逐步取样每次确定删除一个遗传距离最小的样品，所以该方法更具针对性、可靠性和简便性^[10, 11]。对实验材料的分析完成后，在抽样前要确定总体抽样比例，总体抽样比例决定了核心种质的大小，决定其能否代表种质资源的多样性，不同植物核心种质的总体抽样比例一般应为原群体的 5% ~ 30%^[9]。

相关序列扩增多态性 (SRAP) 是一种无需任何序列信息即可直接进行 PCR 扩增的分子标记，通过设计独特的双引物，检测基因组中开放阅读框 (ORFs) 的多态性，该标记具有简便、花费少、标记分布均匀和重复性好等特点，已经广泛应用于植物种质资源保存和核心种质构建等方面的研究^[12-17]。国内外依据分子标记数据保存林木种质

资源、构建林木核心种质的研究主要集中在经济林木^[14, 16, 18-25]，而对材用林木方面的研究相对较少^[4, 26-28]。关于松类树种核心种质库构建和云南松优良种质资源保存抽样策略方面的研究，目前尚未见报道。本文基于 SRAP 标记数据，参考赵冰等^[8]、刘宁宁^[10]的方法，对云南松的种质保存库构建方法进行探讨，通过比较 4 种抽样比例，筛选适合云南松种质保存库构建的抽样策略，得到其代表性种质，以为云南松种质的保护和利用提供取样策略，同时也为优化和高效保存云南松优良种质资源，拓展林木种质资源保存策略和方法的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

以云南松种源区划^[1]为主，结合其地理分布情况，在分布区内选取代表性的材用天然居群 26 个 (表 1)，其中南部种源区 9 个、中部种源区 13 个、西北部种源区 3 个、西藏察隅种源区 1 个。

每个云南松天然居群选取 30 个样株，样株的选取原则为年龄 25 ~ 30 年生、干形优良、在林中生长正常的个体，各样株在林中的间隔为 5 倍树高以上^[5]。每样株采集 10 g 当年生针叶，放入硅胶保存。

表 1 材用云南松种质资源取样信息						Table 1 Sampling information of the germplasm resources of <i>Pinus yunnanensis</i> high-quality timber					
种源区 Region	采样点 Location	采样份数 Sample	北纬 Latitude	东经 Longitude	海拔 (m) Altitude	种源区 Region	采样点 Location	采样份数 Sample	北纬 Latitude	东经 Longitude	海拔 (m) Altitude
南部	云南龙陵	30	24.4251°	98.9539°	1367.4	中部	云南新平	30	24.0361°	101.7778°	2179.0
	云南双江	30	23.4202°	99.7420°	1244.8		云南曲靖	30	25.3590°	103.8233°	2121.6
	云南双江	30	23.3777°	99.7801°	1047.2		云南双柏	30	24.5497°	101.6494°	1785.7
	云南马关	30	23.0358°	104.4038°	1445.6		云南永仁	30	26.1750°	101.5250°	1615.0
	云南元江	30	23.7641°	102.0321°	1564.7		云南云龙	30	26.0339°	99.2681°	2452.5
	云南富宁	30	23.4249°	105.3542°	1315.7		云南禄丰	30	25.2389°	101.8888°	2017.5
	广西乐业	30	24.8593°	106.3238°	1018.4		四川米易	30	26.9945°	102.0054°	1905.9
	广西乐业	30	24.8838°	106.2992°	852.1		四川西昌	30	27.8944°	102.1049°	2109.1
	广西隆林	30	24.6998°	104.8989°	1123.7		贵州兴义	30	25.0703°	104.9873°	1206.5
西北部	云南香格里拉	30	26.9978°	99.9897°	2178.0		贵州册亨	30	24.8462°	105.9301°	792.4
	云南福贡	30	26.5550°	98.9386°	2397.0		贵州大方	30	26.9588°	105.7655°	1248.0
	云南丽江	30	27.2944°	100.3683°	2867.8		贵州水城	30	26.2333°	104.7731°	1634.4
西藏察隅	西藏察隅	30	28.6210°	97.3199°	2071.0		云南镇雄	30	27.3747°	104.8911°	1696.5

1.2 实验方法

1.2.1 SRAP 分子标记

采用改良的 CTAB 法^[29]提取云南松的基因组 DNA；SRAP 标记的引物参照 Budak 等^[13]的研究,筛选出扩增条带数量多、清晰、重复性好的 10 对荧光标记(HEX)引物用于扩增(表 2)；SRAP-PCR 反应体系和扩增程序的建立参考玉苏甫·阿不力提甫^[16]的方法并加以改进；PCR 扩增产物采用荧光标记毛细管电泳检测(以 GS1200Liz 为内参,采用 3730 × 1 DNA Analyzer 仪器检测)。

1.2.2 种质保存库的构建

参考赵冰等^[8]和徐宁等^[30]在核心种质构建中以地理来源分组的方法,结合云南松的种源区划^[1],本文将原种质资源按种源区分为 4 组,在组内按地理来源分为 26 个小组(表 1)。以小组为单位,利用 10 对引物的 669 个多态位点对分子标记数据进行聚类分析,样株间遗传距离采用 Nei's 距离^[31],通过 NTSYSpc2.10e 软件^[5]进行不加权类平均法(UPGMA)聚类。完成总的种质资源个体的聚类分析后,对总的种质资源确定总体抽样比例,本实验设定 10%、20%、30%、40%共 4 个抽样比例。各组具体哪个样株进入种质保存库,参考刘宁宁等^[10]抽样策略的筛选方法,采用改进的最小距离逐步取样法(根据每次聚类结果找出遗传距离最小的一个组,分别计算该组中这两个样品与种质群体其他样品间的遗传距离之和,删除该组中与种质群体其他样品间的遗传距离之和较小的样品)

构建种质子集。

1.2.3 种质保存库的检测评价

通过 PopGene32 软件^[5]获取多态位点数(NPL)、多态位点百分率(PPL)、等位基因数(*Na*)、有效等位基因数(*Ne*)、Nei's 遗传多样性指数(*H*)、Shannon's 多样性信息指数(*I*)、群体总的遗传多样性(*Ht*)和居群内的遗传多样性(*Hs*)等遗传多样性指标。并通过 Excel 2007 软件计算等位基因保留率(RRA),从而分析原种质与不同抽样比例种质子集的遗传多样性的异同。参考玉苏甫·阿不力提甫^[16]、张丹^[32]对核心种质代表性检测所用方法和参数,通过 SPSS 17.0 和 Excel 2007 软件完成对原种质与不同抽样比例种质子集遗传多样性评价参数的均值 *t* 检验、方差 *F* 检验和相关系数分析,以检测原种质与种质子集遗传多样性指标均值是否具有差异、变异是否同质以及相关性的是否得到了保持,对不同抽样比例种质子集的代表性进行评价。

1.2.4 种质保存库的确认

采用 PopGene32 软件^[5]计算遗传距离(最小、最大和平均遗传距离),并利用 NTSYSpc2.10e^[5]进行 UPGMA 聚类分析以及用 GenA1Ex 6.14^[5]进行分子方差分析(居群间和居群内的均方、方差分量及方差分量百分比)。比较原种质与种质子集的特征,从遗传多样性和样品间的聚类分布关系方面,评价种质子集的代表性和实用性,对所构建的种质保存库进行确认。

表 2 SRAP 引物序列及实验所用引物组合

Table 2 Sequences of primers used in the SRAP-PCR system and results of screened primer combinations

编号 No.	序列 Sequence	编号 No.	序列 Sequence	引物组合 Primer pair
Me1	TGAGTCCAAACCGGATA	Em1	GACTGCGTACGAATTAAT	Me2+ Em1
Me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	Em2	GACTGCGTACGAATTTGC	Me4+ Em1
Me3	TGAGTCCAAACCGGCAG	Em3	GACTGCGTACGAATTGAC	Me5+ Em1
Me4	TGAGTCCAAACCGGACC	Em4	GACTGCGTACGAATTTGA	Me7+ Em2
Me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	Em5	GACTGCGTACGAATTAAC	Me8+ Em2
Me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	Em6	GACTGCGTACGAATTGCA	Me9+ Em2
Me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	Em7	GACTGCGTACGAATTCAA	Me9+ Em7
Me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	Em8	GACTGCGTACGAATTCTT	Me10+ Em5
Me9	TGAGTCCAAACCGGAAC	Em9	GACTGCGTACGAATTGAG	Me3+ Em10
Me10	TGAGTCCAAACCGGTAG	Em10	GACTGCGTACGAATTGCC	Me6+ Em10

2 结果与分析

2.1 原种质与不同抽样比例种质保存库遗传多样性比较

本研究采用 10 对 SRAP 引物对 780 株云南松材用种质进行扩增，共扩增出 669 个多态位点，平均每对引物获得 66.9 个多态位点，用于构建材用云南松种质保存库。研究结果显示(表 3)：与原种质相比，材用云南松 4 个抽样比例(40%、30%、20%、10%)种质子集的多态位点数(648 ~ 608)、多态位点保留率(96.85% ~ 90.88%)、观测等位基因数(1.969 ~ 1.909)和等位基因保留率(98.43% ~ 95.4%)均随着抽样比例的减小而降低，但多态位点保留率仍保持在 90%以上且等位基因保留率均大于 95%；有效等位基因数、Nei's 遗传多样性指数、Shannon's 多样性信息指数、群体总的遗传多样性和居群内的遗传多样性 5 个评价参数，均随着抽样比例的减小呈先增大后减小的变化趋势，且最小值均为 10%抽样比例种质子集，同时该子集居群内的遗传多样性小于原种质。因此，从遗传多样性来看，40%、30%和 20%抽样比例种质子集相较于 10%抽样比例种质子集对原种质的代表性更好。

2.2 原种质与不同抽样比例种质保存库遗传多样性指标的均值 t 检验和方差 F 检验

本研究在不同抽样比例 4 个种质子集与原种质的 6 个遗传多样性指标的均值 t 检验中，发现 4 个

种质子集的有效等位基因数、Nei's 遗传多样性指数、Shannon's 多样性信息指数和群体总的遗传多样性 4 个指标皆与原种质间无显著差异；4 个种质子集的等位基因数全部与原种质间存在显著差异；10%抽样比例构建的种质子集居群内的遗传多样性与原种质间具有显著差异，其余 3 个种质子集与原种质间皆无显著差异(表 4)。从 t 检验来看，10%抽样比例种质子集有 2 个指标与原种质间存在显著差异，因此该种质子集对原种质的代表性相较其余 3 个种质子集更差。方差 F 检验中，4 个种质子集等位基因数与原种质间全部具有显著差异，且方差也皆大于原种质，表明 4 个种质子集较原种质在该指标上样本取值分散程度更大，即获得了更大的变异；20%抽样比例种质子集中居群内的遗传多样性与原种质间差异显著，但方差小于原种质，说明该种质子集在该指标上比原种质具有更小的变异；10%抽样比例种质子集有 6 个遗传多样性指标与原种质间差异显著，且方差全部小于原种质，因此该种质子集在所检测的全部遗传多样性指标上皆比原种质具有更小的变异(表 4)。结合对均值 t 检验和方差 F 检验结果分析，表明不同抽样比例 4 个种质子集中，40%和 30%抽样比例种质子集更为有效。

2.3 原种质与不同抽样比例种质保存库的相关系数比较

本研究发现，原种质中基于 SRAP 分子标记的遗传多样性，在不同抽样比例 4 个种质子集中都得到了较高度度的保存(图 1)。4 个种质子集的遗传

表 3 材用云南松原种质与不同抽样比例种质子集的遗传多样性
Table 3 Results of genetic diversity between original germplasm and germplasm subsets of *P. yunnanensis*

评价参数 Evaluation parameter	原种质 Original germplasm	种质子集(40%抽样比例) Germplasm subset (40% sample proportion)	种质子集(30%抽样比例) Germplasm subset (30% sample proportion)	种质子集(20%抽样比例) Germplasm subset (20% sample proportion)	种质子集(10%抽样比例) Germplasm subset (10% sample proportion)
QG	780	312	234	156	78
NPL	669	648	643	633	608
PPL(%)	100.00	96.86	96.11	94.62	90.88
Na	2.0000	1.9686	1.9611	1.9462	1.9088
RRA(%)	100.00	98.43	98.06	97.31	95.44
Ne	1.2898	1.3010	1.3010	1.3023	1.2954
H	0.1825	0.1902	0.1912	0.1930	0.1911
I	0.2933	0.3055	0.3076	0.3107	0.3091
Ht	0.1825	0.1902	0.1912	0.1930	0.1911
Hs	0.1641	0.1693	0.1682	0.1651	0.1456

注：QG，种质数量；NPL，多态位点数；PPL，多态位点百分率；Na，等位基因数；RRA，等位基因保留率；Ne，有效等位基因数；H，Nei's 遗传多样性指数；I，Shannon's 多样性信息指数；Ht，群体总的遗传多样性；Hs，居群内的遗传多样性。下同。
Notes: QG, Quantity of germplasm; NPL, Polymorphic band number; PPL, Percentage of polymorphic bands; Na, Observed number of alleles; RRA, Reserved rate of alleles; Ne, Number of effective alleles; H, Nei's gene diversity index; I, Shannon's information index; Ht, Populations genetic diversity; Hs, Genetic diversity within population. Same below.

表 4 材用云南松原种质与不同抽样比例种质子集的遗传多样性指标平均值、方差的比较及检验
Table 4 Results of mean *t*-test and variance *F*-test between original germplasm and germplasm subsets of *P. yunnanensis*

种质群体 Germplasm group		评价参数 Evaluation parameter					
		等位基因数 (<i>Na</i>)	有效等位基因数 (<i>Ne</i>)	Nei's 遗传 多样性指数 (<i>H</i>)	Shannon's 多样性 信息指数 (<i>I</i>)	群体总遗传 多样性 (<i>Ht</i>)	居群内遗传 多样性 (<i>Hs</i>)
原种质	平均值 ± 标准差	2.0000 ± 0.0000	1.2898 ± 0.3229	0.1825 ± 0.1714	0.2933 ± 0.2367	0.1825 ± 0.1714	0.1641 ± 0.1528
种质子集 (40%抽样比例)	平均值 ± 标准差	1.9686 ± 0.1745	1.3010 ± 0.3205	0.1902 ± 0.1698	0.3055 ± 0.2335	0.1902 ± 0.1698	0.1693 ± 0.1500
	<i>t</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.526	NS/0.406	NS/0.342	NS/0.410	NS/0.529
	<i>F</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.895	NS/0.832	NS/0.697	NS/0.835	NS/0.661
种质子集 (30%抽样比例)	平均值 ± 标准差	1.9611 ± 0.1934	1.3010 ± 0.3166	0.1912 ± 0.1679	0.3076 ± 0.2309	0.1912 ± 0.1679	0.1682 ± 0.1465
	<i>t</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.523	NS/0.349	NS/0.262	NS/0.352	NS/0.615
	<i>F</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.563	NS/0.520	NS/0.388	NS/0.522	NS/0.206
种质子集 (20%抽样比例)	平均值 ± 标准差	1.9462 ± 0.2258	1.3023 ± 0.3118	0.1930 ± 0.1662	0.3107 ± 0.2289	0.1930 ± 0.1662	0.1651 ± 0.1406
	<i>t</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.473	NS/0.255	NS/0.170	NS/0.257	NS/0.892
	<i>F</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.335	NS/0.310	NS/0.215	NS/0.312	* /0.007
种质子集 (10%抽样比例)	平均值 ± 标准差	1.9088 ± 0.2881	1.2954 ± 0.3007	0.1911 ± 0.1621	0.3091 ± 0.2245	0.1911 ± 0.1621	0.1456 ± 0.1207
	<i>t</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	NS/0.744	NS/0.347	NS/0.210	NS/0.350	* /0.014
	<i>F</i> 检验/ <i>P</i> 值	* /0.000	* /0.034	* /0.037	* /0.030	* /0.037	* /0.000

注：“*”，在 0.05 水平上差异显著；NS，在 0.05 水平上差异不显著。
Notes：“*”，significantly different at 0.05 probability level；NS，not significant at 0.05 probability level.

多样性指标均值与原种质的相关系数全部达到 0.99 以上，说明 4 个种质子集对原种质的均值代表性很高。随着抽样比例的降低，种质子集遗传多样性指标方差与原种质的相关系数呈下降趋势，40%和 30%抽样比例种质子集与原种质的相关系数分别为 0.881 和 0.804，表明这两个种质子集与原种质的方差具有强相关性，而 20%抽样比例种质子集与原种质的相关系数为 0.615，说明该种质子集与原种质的方差具有弱相关性，同时 10%抽样比例种质子集与原种质的相关系数为 0.171，显然该种质子集与原种质的方差不具相关性。从相关系数来看，40%和 30%抽样比例种质子集皆可代表原种质。

综合原种质与不同抽样比例种质保存库遗传多样性、均值 *t* 检验和方差 *F* 检验以及相关系数比较的结果，同时考虑种质资源保存时的人力、物力等成本问题，本研究以为 30%抽样比例种质保存库可以作为材用云南松种质资源的代表性子集。

2.4 种质保存库的确认

以 SRAP 分子标记位点为源数据，本研究分别计算原种质(780 个样株)和 30%抽样比例种质子集(234 个样株)的 Nei's 遗传距离^[31]，结果显示(表 5)，种质子集(30%抽样比例)的最小遗传距离、最大遗传距离和平均遗传距离均大于原种质，且种质子集(30%抽样比例)的平均遗传距离较原种质提高了 52.2%，表明该种质子集有效地去除了原种质中的冗余材料，因而其代表性和实用性更强。分子方差分析结果表明(表 6)，原种质的遗传变异主要存在群体内，方差分量占 87.19%，群体间方差分量只占 12.81%，种质子集(30%抽样比例)很好地保持了原种质的方差分量分配模式。基于 SRAP 分析的聚类图可以看出(图 2)，种质子集(30%抽样比例)与原种质的聚类情况相似，26 个居群间的聚类既符合地理相邻同时又体现了水热条件的相似，只是种质子集(30%抽样比例)居群间的遗传距离更大。通过上述分析，本研究确认基于 SRAP 分析的 30%抽样比例种质保存库可作为材用云南松种质资源的代表性子集。

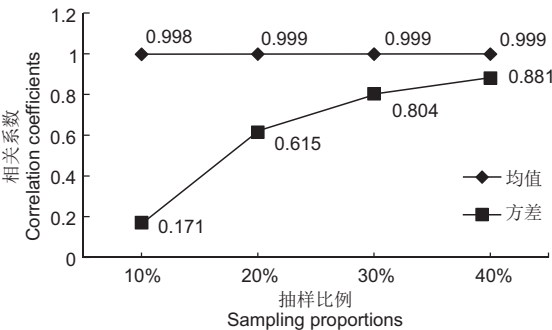
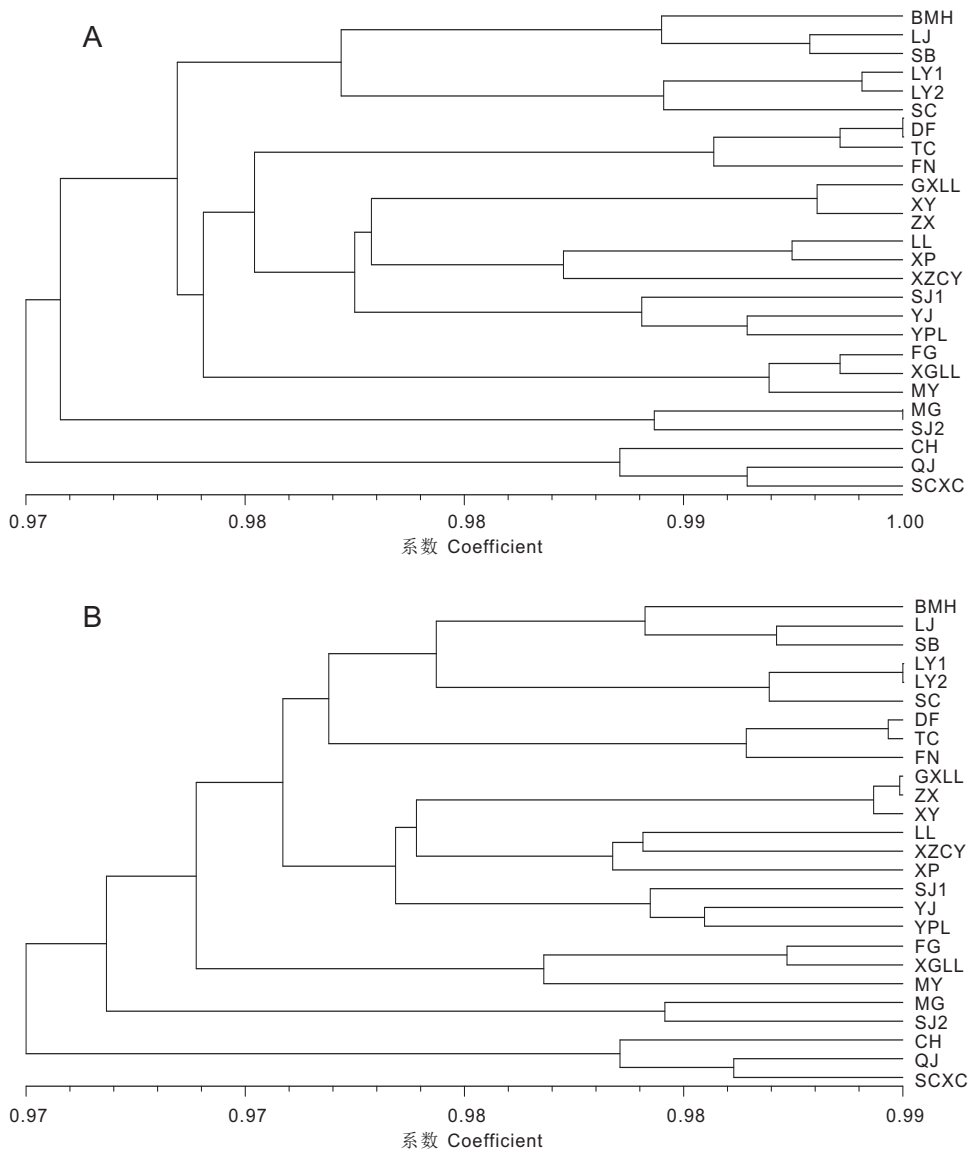


图 1 不同抽样比例种质子集与原种质间的遗传多样性相关系数

Fig. 1 Correlation coefficients of genetic diversity between original germplasm and germplasm subsets of *P. yunnanensis*



BMH: 云南永仁白马河; LJ: 云南丽江; SB: 云南双柏; LY1: 广西乐业 1; LY2: 广西乐业 2; SC: 贵州水城; DF: 贵州大方; TC: 云南云龙天池; FN: 云南富宁; GXLL: 广西隆林; XY: 贵州兴义; ZX: 云南镇雄; LL: 云南龙陵; XP: 云南新平; XZCY: 西藏察隅; SJ1: 云南双江 1; YJ: 云南元江; YPL: 云南禄丰一平浪; FG: 云南福贡; XGLL: 云南香格里拉; MY: 四川米易; MG: 云南马关; SJ2: 云南双江 2; CH: 贵州册亨; QJ: 云南曲靖; SCXC: 四川西昌。
BMH: Baimahe forest farm, Yongren county, Yunnan province; LJ: Lijiang city, Yunnan province; SB: Shuangbai county, Yunnan province; LY1: Leye county, Guangxi Zhuang Autonomous Region 1; LY2: Leye county, Guangxi Zhuang Autonomous Region 2; SC: Shuicheng county, Guizhou province; DF: Dafang county, Guizhou province; TC: Tianchi Nature Reserve, Yunlong county, Yunnan province; FN: Funing county, Yunnan province; GXLL: Longlin county, Guangxi Zhuang Autonomous Region; XY: Xingyi city, Guizhou province; ZX: Zhenxiang county, Yunnan province; LL: Longling county, Yunnan province; XP: Xiping county, Yunnan province; XZCY: Chayu county, Tibet Autonomous Region; SJ1: Shuangjiang county, Yunnan province 1; YJ: Yuanjiang county, Yunnan province; YPL: Yipinglang forest farm, Lufeng county, Yunnan province; FG: Fugong county, Yunnan province; XGLL: Shangri-La city, Yunnan province; MY: Miya county, Sichuan province; MG: Maguan county, Yunnan province; SJ2: Shuangjiang county, Yunnan province 2; CH: Ceheng county, Guizhou province; QJ: Qujing city, Yunnan province; SCXC: Xichang city of Sichuan province.

图 2 原种质 (A) 与种质子集 (30% 抽样比例) (B) 基于 SRAP 分析的 UPGMA 聚类图
Fig. 2 Cluster analysis map for original germplasm (A) and germplasm subset (30% sample proportion) (B) of *P. yunnanensis* by SRAP data

表 5 材用云南松原种质与种质子集(30%抽样比例)遗传距离的比较
Table 5 Comparison of genetic distance between original germplasm and germplasm subset (30% sample proportion) of *P. yunnanensis*

种质群体 Population of germplasm	种质数量 Quantity of germplasm	最小遗传距离 Min genetic distance	最大遗传距离 Max genetic distance	平均遗传距离 Average genetic distance
原种质	780	0.0040	0.0428	0.0232
种质子集(30%抽样比例)	234	0.0150	0.0575	0.0353

表 6 材用云南松原种质与种质子集(30%抽样比例)方差分量的比较
Table 6 Comparison of variance components between original germplasm and germplasm subset (30% sample proportion) of *P. yunnanensis*

种质群体 Population of germplasm	均方(自由度) Mean square (df)		方差分量 Variance component		方差分量百分比(%) Variance component percentage	
	居群间 Intergroup	居群内 Intragroup	居群间 Intergroup	居群内 Intragroup	居群间 Intergroup	居群内 Intragroup
原种质	362.226(25)	67.673(744)	9.946	67.673	12.81	87.19
种质子集(30%抽样比例)	163.849(25)	74.137(208)	7.476	74.137	9.16	90.84

3 讨论

云南松作为我国西南地区主要的乡土造林树种，其分布范围较广，且边缘分布区具有更大的遗传变异^[5]，因而在对其进行种质资源收集和保存时，主分布区和边缘分布区皆不可或缺。本研究选取的原种质群体既涵盖了云南松的全分布区域，又包括了绝大部分种子园建设材料的来源区域，该取样方式很大程度覆盖了该树种的种质资源基础。本研究采用 10 对 SRAP 引物对 780 株云南松材用种质进行扩增，共检测出 669 个多态位点，平均每对引物多态位点数多达 66.9 个。然而以往很多学者在利用 SRAP 标记数据构建植物核心种质库时，多采用凝胶电泳检测 PCR 扩增产物，如白瑞霞^[14]利用 6 对 SRAP 引物对 177 份枣(*Ziziphus jujuba* Mill.)种质进行扩增，共扩增出 62 条多态性谱带，平均每对引物扩增出 10.3 条谱带；玉苏甫·阿不力提甫^[16]采用 14 对 SRAP 引物对 95 份梨(*Pyrus sinkiangensis* Yu.)种质进行扩增，共扩增出 160 条多态性谱带，平均每对引物扩增出 11.4 条谱带；张丹^[32]通过 29 对 SRAP 引物对 258 份蓖麻(*Ricinus communis* L.)种质进行扩增，共扩增出 254 条多态性谱带，平均每对引物扩增出 8.8 条谱带。可见，凝胶电泳检测方法虽然成熟，但其分辨率远低于荧光标记毛细管电泳检测。

研究表明，分组方法构建的种质保存库和核心

种质对整个种质资源具有更好的代表性^[33]。本研究将原种质资源按种源区分为 4 组，在组内按地理来源分为 26 个小组，以小组为单位分组构建云南松种质保存库。组内取样时系统取样法明显优于完全随机取样^[8]，取样方法中改进的最小距离逐步取样法比随机删除法更具针对性和可靠性^[10, 11]。抽样比例决定了种质保存库和核心种质的大小及其能否代表种质资源的多样性，研究认为不同植物种质保存库和核心种质的抽样比例一般应为原群体的 5% ~ 30%^[9]，对不同的种质资源，抽样比例应根据实际情况作相应的调整，因此本研究设定 10%、20%、30%、40%共 4 个抽样比例作进一步筛选。4 个抽查比例中，本研究确认适合的抽样比例为 30%，符合李自超等^[9]提出的核心种质抽样比例的要求，且与欧洲黑杨(*Populus nigra* L.) 30.2%最佳取样比例^[4]和新疆梨的 30%最适宜取样比例^[16]等研究构建核心种质的抽样比例相当。

本研究采用高分辨率的荧光标记毛细管电泳检测获得了大量多态位点，构建了材用云南松种质保存库，对前期以表型性状数据构建的材用云南松种质资源保存库的研究(另文发表)进行了有效补充，进一步提高了云南松优良种质资源保存和利用的有效性。随着后续研究的开展，可以进一步利用整合表型性状数据和分子标记数据构建材用云南松种质保存库，为云南松优良种质资源保存库的建立提供理论指导。

参考文献:

- [1] 金振洲, 彭鉴. 云南松[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2004.
- [2] 第二批国家林木种质资源库名单公布[J]. 园林科技, 2016, 142(4): 47-48.
- [3] 李莲芳, 郑晔, 韩明跃, 苏俊武. 云南松遗传改良进展及其育种策略剖析[J]. 西部林业科学, 2010, 39(2): 104-110. Li LF, Zheng W, Han MY, Su JW. Progress of genetic improvement of *Pinus yunnanensis* and breeding strategy analysis[J]. *Journal of West China Forestry Science*, 2010, 39(2): 104-110.
- [4] 曾宪君, 李丹, 胡彦鹏, 黄秦军, 苏晓华. 欧洲黑杨优质核心种质库的初步构建[J]. 林业科学, 2014, 50(9): 51-58. Zeng XJ, Li D, Hu YP, Huang QJ, Su XH. A preliminary study on construction of high-quality core collection of *Populus nigra*[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2014, 50(9): 51-58.
- [5] Xu YL, Cai NH, Keith W, Kang XY, He CZ, et al. Genetic diversity and population structure of *Pinus yunnanensis* by simple sequence repeat markers[J]. *For Sci*, 2016, 62(1): 38-47.
- [6] 刘占林, 杨雪. 5 种松树的遗传多样性和遗传分化研究[J]. 西北植物学报, 2007, 27(12): 2385-2392. Liu ZL, Yang X. Genetic diversity and differentiation of five pines using cpSSR and AFLP markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2007, 27(12): 2385-2392.
- [7] 杨章旗, 冯源恒, 吴东山. 细叶云南松天然种源林遗传多样性的 SSR 分析[J]. 广西植物, 2014, 34(1): 10-14. Yang ZQ, Feng YH, Wu DS. Analysis of genetic diversity of *Pinus yunnanensis* var. *tenuifolia* nature populations by SSR marker[J]. *Guihaia*, 2014, 34(1): 10-14.
- [8] 赵冰, 张启翔. 中国蜡梅种质资源核心种质的初步构建[J]. 北京林业大学学报, 2007(S1): 16-21. Zhao B, Zhang QX. Preliminary construction of the core germplasm of *Chimonanthus praecox* in China[J]. *Journal of Beijing Forestry University*, 2007(S1): 16-21.
- [9] 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 杨忠义, 申时全, 等. 云南地方稻种核心种质取样方案研究[J]. 中国农业科学, 2000, 33(5): 1-7. Li ZC, Zhang HL, Zeng YW, Yang ZY, Shen SQ, et al. Study on sampling schemes of core collection of local varieties of rice in Yunnan, China[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2000, 33(5): 1-7.
- [10] 刘宁宁. 植物资源核心种质构建与评价新方法的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2007.
- [11] 徐海明. 种质资源核心库构建方法的研究及其应用[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [12] Peter O, Nyaboga EN, Bargul JL. Analysis of genetic diversity of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims) genotypes grown in Kenya by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers[J]. *Ann Agr Sci*, 2018, 16: 367-375.
- [13] Budak H, Shearman RC, Parmaksiz I, Gaussoin RE, Riordan TP, et al. Molecular characterization of buffalo grass germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108(2): 328-334.
- [14] 白瑞霞. 枣种质资源遗传多样性的分子评价及其核心种质的构建[D]. 保定: 河北农业大学, 2008.
- [15] 彭婵, 李振芳, 向珊珊, 张新叶. 乌柏种质资源分子标记评价及核心种质初步构建[J]. 分子植物育种, 2017, 15(4): 1455-1460. Peng C, Li ZF, Xiang SS, Zhang XY. Molecular marker evaluation and construction of primary core collection of *Sapium sebiferum*[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(4): 1455-1460.
- [16] 玉苏甫·阿不力提甫. 新疆的梨种质资源评价及核心种质库构建[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2014.
- [17] Fatemeh G, Mehdi R. Genetic structure and variation in different Iranian myrtle (*Myrtus communis* L.) populations based on morphological, phytochemical and molecular markers[J]. *Ind Crops Prod*, 2018, 123: 489-499.
- [18] Pereira-Lorenzo S, Ramos-Cabrera AM, Teresa B, Claudia M, Fiorella V, et al. Database of European chestnut cultivars and definition of a core collection using simple sequence repeats[J]. *Tree Genet Genomes*, 2017, 13(5): 114.
- [19] Balas FC, Osuna MD, Domínguez G, Pérez-Gragera F, López-Corrales M. Ex situ conservation of underutilised fruit tree species: establishment of a core collection for *Ficus carica* L. using microsatellite markers (SSRs)[J]. *Tree Genet Genomes*, 2014, 10(3): 703-710.
- [20] Guruprasad R, Krishnan R, Dandin SB, Girish NV. Groupwise sampling: a strategy to sample core entries from RAPD marker data with application to mulberry[J]. *Trees*, 2014, 28(3): 723-731.
- [21] Leroy T, De Bellis F, Legnate H, Musoli P, Kalonji A, et al. Developing core collections to optimize the management and the exploitation of diversity of the coffee *Coffea canephora*[J]. *Genetica*, 2014, 142(3): 185-199.
- [22] 杨培奎, 庄东红, 马瑞君. 粤东橄榄资源核心种质取样方案的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20(3): 277-284. Yang PK, Zhuang DH, Ma RJ. Studies on sampling schemes of core collection of *Canarium album* L. in eastern Guangdong, China[J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*, 2012, 20(3): 277-284.
- [23] 袁海涛. 新疆野核桃种质资源基础数据库的建立与核心种质构建方法研究[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2012.
- [24] 张维瑞, 袁王俊, 尚富德. 基于 AFLP 分子标记的桂花品种

- 核心种质的构建[J]. 西北植物学报, 2012, 32(7): 1349–1354.
- Zhang WR, Yuan WJ, Shang FD. Development of core collection of *Osmanthus fragrans* Lour. cultivars based on AFLP molecular markers[J]. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2012, 32(7): 1349–1354.
- [25] 王健兵. 白蜡核心种质及绒毛白蜡无性系 SSR 评价体系建立[D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2014.
- [26] Naoko M, Masako O, Atsushi W. Construction of a core collection and evaluation of genetic resources for *Cryptomeria japonica* (Japanese cedar)[J]. *J Forest Res-Jpn*, 2015, 20(1): 186–196.
- [27] 白卉. 山杨遗传多样性研究与核心种质构建及利用[D]. 哈尔滨: 东北林业大学, 2010.
- [28] 倪茂磊. 美洲黑杨遗传多样性分析与核心种质库构建[D]. 南京: 南京林业大学, 2011.
- [29] Porebski S, Bailey LG, Baum BR. Modification of a CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1997, 15(1): 8–15.
- [30] 徐宁, 程须珍, 王素华, 王丽侠, 赵丹. 以地理来源分组和利用表型数据构建中国小豆核心种质[J]. 作物学报, 2008, 34(8): 1366–1373.
- Xu N, Cheng XZ, Wang SH, Wang LX, Zhao D. Establishment of an adzuki bean (*Vigna angularis*) core collection based on geographical distribution and phenotypic data in China[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(8): 1366–1373.
- [31] Nei M, Li WH. Mathematical models for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1979, 76: 5269–5273.
- [32] 张丹. 华南野生蓖麻遗传多样性研究与核心种质构建[D]. 湛江: 广东海洋大学, 2010.
- [33] Diwan, Baughan GR, McIntosh MS. A core collection for the United States annual Medicago[J]. *Crop Sci*, 1995, 34: 279–285.

(责任编辑: 周 媛)