

## 基于 SSR 分子标记的青檀自然居群交配系统分析

范佳佳, 盛继露, 李晓红, 张小平<sup>①</sup>

(安徽师范大学生命科学学院, 安徽 芜湖 241000)

**Analysis on mating system of natural population of *Pteroceltis tatarinowii* based on SSR molecular marker** FAN Jiajia, SHENG Jilu, LI Xiaohong, ZHANG Xiaoping<sup>①</sup> (College of Life Sciences, Anhui Normal University, Wuhu 241000, China), *J. Plant Resour. & Environ.*, 2018, 27(4): 110-112

**Abstract:** In order to figure out the mating pattern of natural population of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim., amplification reaction of DNA from leaf of progenies of 10 lines in Qingtan Temple of Shandong was carried out by using SSR molecular marker technology. On the basis, single-locus outcrossing rate, multi-locus outcrossing rate, biparental inbreeding coefficient, parental inbreeding coefficient, and inbreeding depression value of each line were analyzed. The results show that means of single-locus outcrossing rate and multi-locus outcrossing rate of each line in this natural population are 0.959 and 0.987, respectively, and multi-locus outcrossing rate of most lines is higher than their single-locus outcrossing rate. Mean of biparental inbreeding coefficient is 0.028, indicating that there is a certain degree of inbreeding among each line in this natural population. Mean of parental inbreeding coefficient is -0.066, indicating that heterozygotes in this natural population are excess in general. In addition, inbreeding depression values of 4 lines are relatively high (1.793-4.588). Combining biological characteristics of *P. tatarinowii*, outcrossing is mainly in mating system of this natural population of *P. tatarinowii*, and there is a relatively high inbreeding depression. Therefore, in order to prevent population depression, measures of *in situ* and *ex situ* conservation and so on are recommended to prevent inbreeding.

**关键词:** 青檀; 交配系统; 保护; SSR 分子标记

**Key words:** *Pteroceltis tatarinowii* Maxim.; mating system; conservation; SSR molecular marker

中图分类号: Q946-33; S792.99 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2018)04-0110-03

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2018.04.14

从保护遗传学角度来看,保护物种的遗传和进化潜力是其保护和复壮的重点。交配系统(mating system)是植物种群内2代个体间遗传联系的有性系统,决定了其后代居群的基因型分布,与植物演化密切相关,对植物的分布、群体有效大小、遗传结构、基因流和选择、种群演化等均有影响<sup>[1]</sup>,因此,深入了解植物的繁殖信息对遗传育种方法选择和植物保护策略制定具有重要的指导意义<sup>[2]</sup>。

青檀(*Pteroceltis tatarinowii* Maxim.)隶属于青檀属(*Pteroceltis* Maxim.)<sup>[3]</sup>,为中国特有的单种属植物,雌雄同株异花,风媒传粉。该树种虽然在中国温带和亚热带地区广泛分布,但由于其对生长条件要求严格,再加上人为干扰的影响,现存种群多呈间断岛屿状分布<sup>[4]</sup>,种群数量和规模呈下降趋势。目前,虽然关于青檀的研究较多<sup>[5-7]</sup>,但尚未见其交配系统类型方面的研究报道,不利于制定其有效保护策略。

SSR 分子标记已被广泛用于植物交配系统研究<sup>[8]</sup>。作者利用12对多态性较高的SSR引物对山东枣庄青檀寺内青檀

自然居群的10个家系子代进行了PCR扩增,在此基础上对其交配模式进行了分析,以期分析其交配系统的影响因子,预测其原位保护居群的生存风险,从而为青檀的原位和异位保存以及其遗传多样性保持和繁育体系制定提供科学依据。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

在山东枣庄青檀寺内的青檀自然居群中随机选10株青檀作为母本,株距1~50 m;分别采集各母株饱满成熟种子50~100粒,同株种子为1个家系,置于硅胶中带回实验室;采用变温层积法<sup>[9]</sup>进行催芽,种子发芽后移到花盆中;幼苗具5枚以上真叶时,采集所有叶片,置于硅胶中保存、备用。

#### 1.2 方法

采用改良CTAB法<sup>[10]</sup>提取10个家系子代237株单株叶片的基因组DNA,置于-20℃冰箱中保存、备用。

收稿日期: 2018-05-16

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30970292; 41401062)

作者简介: 范佳佳(1992—),女,安徽桐城人,硕士研究生,主要从事青檀资源保护与利用方面的研究工作。

<sup>①</sup>通信作者 E-mail: pinghengxu@sina.com

利用 12 对多态性较高的 SSR 引物(表 1),采用 TP-M13-SSR 技术<sup>[11]</sup>进行 PCR 扩增反应。扩增体系总体积 15.0  $\mu\text{L}$ , 包括模板 DNA 2.5 ng、2.5 mmol  $\cdot\text{L}^{-1}$  dNTPs Mix 1.2  $\mu\text{L}$ 、25  $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$  MgCl<sub>2</sub> 1.2  $\mu\text{L}$ 、10  $\times$  PCR buffer (Mg<sup>2+</sup> Free) 1.5  $\mu\text{L}$ 、5 U  $\cdot\mu\text{L}^{-1}$  Taq DNA 聚合酶 0.1  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$  TP-M13 荧光引物 0.3  $\mu\text{L}$ 、10  $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$  正向引物 0.4  $\mu\text{L}$ 、

10  $\mu\text{mol} \cdot\text{L}^{-1}$  TP-M13 反向引物 0.1  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 补足体积。扩增程序: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 4 min; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、相应温度退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 27 个循环; 95  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s、53  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s、72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 10 个循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 8 min。

将质量体积分数 1% 琼脂糖凝胶电泳检测合格的扩增产物交上海点晶生物科技有限公司进行测序。

表 1 用于青檀各家系叶片 DNA 扩增反应的 SSR 引物序列及退火温度

Table 1 Sequence and annealing temperature of SSR primers used for amplification reaction of DNA from leaf of each line of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim.

引物编号 No. of primer	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')		退火温度/ $^{\circ}\text{C}$ Annealing temperature
	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	
QT-1	CATATTTCTCTTCCCCTAA	ACAGCTCACCCATACCTTC	55
QT-2	CACCTTTGCTTACTCCCTG	AATGTAAGTAAATGAACC	56
QT-3	AGCGACTGAGGGTTTCATG	GCTTCTGCTCCGCCTTCT	62
QT-4	CAGGGCACTCCAATAGAATAG	ATGGTGCTGGGATGGGAAG	60
QT-5	CATTTGGATACACCAGGAAGG	CAGCCATTGATGCTTAGTCC	60
QT-6	TCTAGGCTGTATAAAGGGAC	GATGAAGTAAATGGGAATC	54
QT-7	CATGTCACCATTACCGAAC	ACACAGTAAGAAAACACACC	55
QT-8	TGGCGATGTGAAGCCCTAAG	TCATTTCAACGGTCAAGATTAC	56
QT-9	CAATAATAGCCTTGCATCTC	CTCCCTTTGAACAAACCTC	56
QT-10	CCTGTCCAGCTACTAATTTG	GTCTGCGATGGTATCTGTT	56
QT-11	CAGGTCCAGAGGGAGAAAC	CCCAGGGTCAAATAGGTAAT	60
QT-12	GCTTCTTGGGTCTCATCC	TCCACAGACGAGTAGTCTCC	56

1.3 数据分析

以 LIZ500 为内标,用 GeneMarker 软件判读扩增产物测序结果,获得微卫星基因型数据,并进行人工校正。基于最大似然法,用 MLTR v3.2 软件<sup>[12]</sup>计算交配系统参数,包括单位点异交率( $t_s$ )、多位点异交率( $t_m$ )、双亲近交系数( $t_m - t_s$ )和亲本近交系数( $F$ ),重复取样 1 000 次。假定条件:1) 每个交配事件为随机的远交( $t$ )或自交( $s = 1 - t$ ); 2) 异交率与母本基因型独立; 3) 花粉库与母本同质; 4) 受精和子代基因型的检测时间

无选择; 5) 各位点等位基因随机分离。近交衰退值( $\delta$ )为 1 减去自交种子相对于异交种子的相对适合度,当不同世代间的亲本近交系数基本不变时, $\delta = 1 - 2F \cdot t / [(1 - t) \cdot (1 - F)]$ 。

2 结果和分析

实验结果(表 2)表明:供试 10 个青檀家系的双亲近交系数均值为 0.028, 大于 0, 表明该青檀自然居群存在一定的近交。

表 2 基于 SSR 分子标记的青檀各家系的交配系统参数和近交衰退值

Table 2 Mating system parameters and inbreeding depression value of each line of *Pteroceltis tatarinowii* Maxim. based on SSR molecular marker

家系 Line	样本数 Number of sample	单位点异交率 Single-locus outcrossing rate	多位点异交率 Multi-locus outcrossing rate	双亲近交系数 Biparental inbreeding coefficient	亲本近交系数 Parental inbreeding coefficient	近交衰退值 Inbreeding depression value
QTS-1	24	0.942	1.000	0.058	0.027	-0.099
QTS-2	24	1.120	1.002	-0.118	-0.200	-3.480
QTS-3	24	0.969	1.000	0.031	0.129	-6.024
QTS-4	24	0.623	0.929	0.306	-0.200	1.793
QTS-5	24	1.086	1.000	-0.086	0.076	2.774
QTS-6	24	0.764	0.981	0.217	-0.200	2.554
QTS-7	22	1.028	0.957	-0.071	-0.153	-11.953
QTS-8	24	0.914	1.000	0.086	0.264	-3.130
QTS-9	23	0.882	1.000	0.118	-0.200	4.588
QTS-10	24	1.259	1.002	-0.257	-0.200	-1.333
均值 Mean	24	0.959	0.987	0.028	-0.066	-1.431

10个家系的单位点异交率和多位点异交率均较高,其中,家系QTS-2、QTS-5、QTS-7和QTS-10的多位点异交率低于单位点异交率,双亲近交系数小于0,说明这4个家系存在较高比例的异交;其余6个家系的多位点异交率高于单位点异交率,双亲近交系数大于0,说明这6个家系存在亲缘关系较近个体间的异交,即存在程度较低的近交。家系QTS-2、QTS-4、QTS-6、QTS-7、QTS-9和QTS-10的亲本近交系数小于0,说明这6个家系有过剩的杂合子,但缺少纯合子,异交优势较大;而家系QTS-1、QTS-3、QTS-5和QTS-8的亲本近交系数大于0,说明这4个家系有过剩的纯合子,近交优势较大。虽然实际上世代间亲本近交系数不变的情况不存在,但近交衰退值仍能在一定程度上反映各家系的近交衰退程度。计算结果显示:家系QTS-4、QTS-5、QTS-6和QTS-9的近交衰退值较高,分别为1.793、2.774、2.554和4.588。

### 3 讨论和结论

本研究结果表明:供试青檀自然居群各家系间存在一定的近交(双亲近交系数均值为0.028),这可能是由于青檀的无性生殖能力较强,如根基萌蘖(克隆),由此产生的个体可与母株交配,进而提高自交比例。但是,供试青檀自然居群家系间单位点异交率和多位点异交率的均值均较高(分别为0.959和0.987),这可能是家系间随花粉传播的较强基因流所致,并且,基因流取决于青檀典型的风媒传粉生物学特征(如先叶开花、雌雄同株异花、花药伸出花被片、花粉粒轻且量大、雌蕊柱头呈羽毛状以及不具香味和蜜腺等)。供试青檀自然居群的亲本近交系数均值为-0.066,小于0,说明该青檀自然居群的杂合子过剩。综合上述研究结果及青檀的生物学特征,认为青檀是以异交为主的树种。近交衰退程度、授粉成本和交配机会是影响植物种群自交和异交程度的决定因子<sup>[13]</sup>,并且,较高的近交衰退可能使植物形成适应近交的机制<sup>[14]</sup>。从生物学特征来看,单性花为青檀避免近交的机制,但雌雄同株却导致这一机制不完全。在供试的10个青檀家系中,有4个家系的近交衰退值较高,因此,虽然该青檀自然居群的杂合子过剩,异交率较高,但是仍需对其各原位保护居群的遗传多样性进行长期监测。

总体来看,防止青檀种群衰退的重要途径为防止近交。首先应对已有种群开展原位保护,设立自然保护区,有效保护适宜青檀生长的石灰岩生境,减少人为破坏和干扰;其次应加

强青檀造林技术研究和管理工作(如引种其他种群的青檀植株,人为加强各种群间的基因交流),提高种群的遗传多样性和活力,最大限度地保存青檀的遗传和进化潜力;再次在引种育苗时广泛收集青檀种子,建立优质种质资源库,尽量种植不同植株或种群的子代,从而更好地开展异地保护。

### 参考文献:

- [1] 叶平扬,董姗姗,卢宝荣,等.普通野生稻小种群的交配系统与遗传多样性[J].生态学报,2008,28(4):1608-1615.
- [2] 张大勇,姜新华.植物交配系统的进化、资源分配对策与遗传多样性[J].植物生态学报,2001,25(2):130-143.
- [3] YANG M Q, VAN VELZEN R, BAKKER F T, et al. Molecular phylogenetics and character evolution of Cannabaceae[J]. Taxon, 2013, 62(3): 473-485.
- [4] 覃文更,韦国富,谭卫宁.广西木论自然保护区青檀群落特征及其多样性研究[J].广西林业科学,2004,33(3):126-129.
- [5] 张莉,张小平,陆畅,等.安徽琅琊山青檀种群空间格局[J].林业科学,2012,48(2):9-15.
- [6] 方升佐.青檀的栽培及檀皮采集加工技术[J].林业科技开发,1996(4):40-42.
- [7] LI X H, SHAO J W, LU C, et al. Chloroplast phylogeography of a temperate tree *Pteroceltis tatarinowii* (Ulmaceae) in China[J]. Journal of Systematics and Evolution, 2012, 50(4): 325-333.
- [8] GEBREMICHAEL D E. Estimation of outcrossing rate in Ethiopian sesame (*Sesamum indicum* L.) using SSR markers[J]. International Journal of Novel Research in Life Sciences, 2017, 4(1): 19-27.
- [9] 张兴旺,操景景,龚玉霞,等.珍稀植物青檀种子休眠与萌发的研究[J].生物学杂志,2007,24(1):28-31.
- [10] 王珍,方宣钧.植物DNA分离[J].分子植物育种,2003,1(2):281-288.
- [11] SCHUELKE M. An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(2): 233-234.
- [12] RITLAND K, JAIN S. A model for the estimation of outcrossing rate and gene frequencies using  $n$  independent loci[J]. Heredity, 1981, 47(1): 35-52.
- [13] SCHEMSKE D W, LANDE R. The evolution of self-fertilization and inbreeding depression in plants. II. Empirical observations[J]. Evolution, 1985, 39(1): 41-52.
- [14] 陈小勇,林鹏.厦门木麻黄种群交配系统及近交衰退[J].应用生态学报,2002,13(11):1377-1380.

(责任编辑:佟金凤)