

贵州都匀马尾松 1.5 代种子园交配系统分析

何可权¹, 邵苗苗², 赵 杨^{2*}, 谢维斌³

(1. 独山县国有林场, 贵州独山 558200; 2. 贵州大学林学院, 贵州贵阳 550025; 3. 都匀马鞍山国有林场, 贵州都匀 558000)

摘要 利用 SSR 分子标记对都匀马寨马尾松 1.5 代无性系种子园交配系统进行分析。结果显示, 无性系种子园的多位点异交率 $t_m = 1.000$ ($SD = 0.000$), 单位点异交率 $t_s = 0.996$ ($SD = 0.001$), 双亲近交比 $t_m - t_s = 0.004$ ($SD = 0.000$), t_m 与 t_s 值之间的差值反映双亲近交程度, $t_m - t_s = 0.004$ 接近 0, 表明马尾松 1.5 代种子园交配系统以异交为主。

关键词 马尾松; 种子园; SSR; 交配系统

中图分类号 S791.248 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)08-0123-02

Analysis on Mating System of 1.5 Generation Seed Orchard of *Pinus massoniana* in Duyun, Guizhou

HE Ke-quan¹, SHAO Miao-miao², ZHAO Yang² et al (1. Dushan State Forest Farm, Dushan, Guizhou 558200; 2. College of Forestry, Guizhou University, Guiyang, Guizhou 550025)

Abstract Using SSR molecular marker to analyze the mating system of 1.5 generation seed orchard of *Pinus massoniana* in Duyun Guizhou. The results showed that the multilocus outcrossing rate t_m was 1.000 ($SD = 0.000$), the single-locus outcrossing rate t_s was 0.996 ($SD = 0.001$), inbreeding parents $t_m - t_s$ was 0.004 ($SD = 0.000$), the difference between t_m and t_s reflected the parents inbreeding extent, $t_m - t_s$ was 0.004 and it was close to zero, which indicated that most of the mating system of 1.5 generation seed orchard of *P. massoniana* seed orchard was based on outcrossing.

Key words *Pinus massoniana*; Seed orchard; SSR; Mating system

马尾松 (*Pinus massoniana* Lamb.) 系松科松属常绿乔木, 马尾松分布广, 生长迅速, 适应性强, 用途广泛, 是我国南方地区主要的造林树种。种子园是马尾松主要的良种繁育基地, 是育种系统中不可缺少的组成部分。交配系统是指生物有性繁殖过程中配子结合类型、模式、影响因素和机制的状态反应, 包含传粉受精的全部过程, 异交率是交配系统的特征参数。张薇等^[1]用 SSR 分子标记对福建白砂林场马尾松实生种子园进行交配系统分析, 该种子园异交率较高, 不同冠层和方位上的异交率不同, 与其花量调查的结果相吻合。林木种子园是生产高质量种子的基地, 林木种子园种子的遗传增益不仅取决于建园亲本的遗传特性, 而且还与整个种子园交配系统密切相关^[2-3]。贵州省作为马尾松重要分布区之一, 具有独特的位置和地理条件, 孕育遗传品质多样的马尾松资源。目前已建立马尾松种子园 4 个, 其中国家林木良种基地 2 个, 均已进入结实盛期。研究表明, 马尾松自交易衰退, 人们也在担心这些马尾松良种基地是否存在着自交、近交情况。因此, 利用 SSR 分子标记技术, 对贵州省都匀马尾松 1.5 代种子园交配系统进行研究, 以期为该种子园经营管理提供指导。

1 材料与方法

1.1 试验材料 试验材料均来自贵州都匀马寨马尾松 1.5 代无性系种子园, 该种子园建于 1992 年, 位于贵州省都匀市奉合乡 (26°16' N, 107°31' E), 属中亚热带湿润区, 年平均气温 15.8 °C, 最低气温 -6.9 °C, ≥10 °C 积温 4 979 °C, 年均降水量 1 423 mm。种子园由 48 个优良无性系采用顺序错位设

计配置而成。选择种子园内高产的 10 个无性系, 每个无性系随机选择 20 个子代, 共 200 个子代, 及种子园 48 个无性系亲本, 用试剂盒提取这 248 个样本的 DNA 低温保存备用。

1.2 引物的筛选和 PCR 扩增 从马尾松上已开发、使用的 SSR 引物中^[1,4-5], 选择 58 对交由上海生工生物工程股份有限公司合成。从中筛选出 10 对引物用于交配系统分析试验, PCR 扩增反应在 PTC-200 的 PCR 仪上进行。PCR 扩增反应体系共 20 μL, 其中模板 DNA 2 μL (约 50 ng)、10 × buffer 2 μL、上下游引物浓度各 10 μmol/L、Tap Polymerase 0.1 U, 双蒸水补齐至 20 μL。反应程序为: 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 4 min; 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 2 min; 4 °C 保存备用。琼脂糖凝胶电泳, 采用人工读带法, 排除模糊不清和无法准确标识的带。

1.3 数据分析 异交率的测定有多种方法, Fyfe 等^[6]提出的混合交配模型是最基本的异交率估测模型等, 其他学者基于混合交配模型导出的多个独立位点异交率估测模型是目前最普遍的估测程序^[7-9]。运用 Ritand 的混合交配系统模型 MLTR 程序估计固定指数 (F)、单位点异交率 t_s 、多位点异交率 t_m 及其标准差等^[8]。混合交配系统适用于共显性标记的多位点异交率分析软件 MLTR3.4 对马尾松的 10 个无性的 200 株幼苗系交配系统参数分别进行估计。在亲本基因型已知的前提下, 采用最大期望值法, 在 99% 的置信区间 ($CI = \text{mean} \pm 1.96 \times s.e.$) 下经过 100 次重复取样 (bootstrap) 分别估计以下参数: 单位点 (t_s) 和多位点 (t_m) 异交率; 双亲近交系数 ($t_m - t_s$); 父本相关性 (r_p), 包括单位点相关性 [$r_p(s)$] 和多位点相关性 [$r_p(m)$]。其中 $t_m - t_s$ 是双亲近交水平的估计值, 数值越大表明父母本个体之间亲缘关系越近。

2 结果与分析

2.1 种子园整体交配系统参数 利用 MLTR 软件程序对马

基金项目 贵州省重大科技专项 (黔科合重大专项字 [2012] 6011 号); 贵州大学引进人才科研项目 (2012-031)。

作者简介 何可权 (1972—), 男, 贵州独山人, 工程师, 从事林木良种繁育与栽培研究。* 通讯作者, 教授, 博士, 从事林木良种繁育与栽培研究。

收稿日期 2017-12-16

尾松种子园高产的 10 个无性系 200 个单株进行分析(表 1)。估算出多位点异交率 $t_m = 1.000$ ($SD = 0.000$), 单位点异交率 $t_s = 0.996$ ($SD = 0.001$), 双亲近交比例 $t_m - t_s = 0.004$ ($SD = 0.000$), t_m 与 t_s 值之间的差值反映双亲近交程度, $t_m -$

表 1 种子园整体交配系统参数

参数 Parameter	估计值 Estimated value	标准差 (SD)
固定指数(F) Fixed index	0.963	0.000
多位点异交率 Multilocus outcrossing rate	1.000	0.000
单位点异交率 Single - locus outcrossing rate	0.996	0.001
双亲近交比例 Parents inbreeding rate	0.004	0.000

表 2 10 个家系的交配系统参数

Table 2 Mating system parameters of 10 families					
序号 No.	家系 Family	固定指数 Fixed index	多位点异交率 Multilocus outcrossing rate	单位点异交率 Single-locus outcrossing rate	双亲近交比例 Parents inbreeding rate
1	岑 12	0.845(0.033)	1.000(0.000)	0.999(0.003)	0.001(0.000)
2	黄 40	0.845(0.033)	1.000(0.000)	0.999(0.001)	0.001(0.000)
3	黄 2	0.845(0.033)	1.000(0.000)	0.998(0.000)	0.002(0.000)
4	岑 8	0.845(0.033)	1.000(0.033)	1.000(0.033)	0.000(0.000)
5	黄 23	0.000(0.000)	0.524(0.199)	0.879(0.010)	-0.355(0.189)
6	黄 34	0.000(0.000)	0.524(0.199)	0.882(0.009)	-0.351(0.191)
7	黄 24	0.000(0.000)	0.148(0.060)	0.854(0.029)	-0.706(0.035)
8	黄 3	0.002(0.001)	0.533(0.199)	0.884(0.009)	-0.351(0.191)
9	黄 1	0.016(0.006)	0.533(0.199)	0.877(0.010)	-0.344(0.189)
10	岑 2	0.000(0.000)	0.524(0.199)	0.878(0.010)	-0.355(0.189)

3 结论与讨论

利用 SSR 分子标记对种子园交配系统进行分析,估算出多位点异交率 $t_m = 1.000$ ($SD = 0.000$), 单位点异交率 $t_s = 0.996$ ($SD = 0.001$), 双亲近交比例 $t_m - t_s = 0.004$ ($SD = 0.000$), t_m 与 t_s 值之间的差值反映双亲近交程度, $t_m - t_s = 0.004$ 接近 0,说明马尾松 1.5 代种子园子代亲本的近交现象不显著,多位点异交率大于单位点异交率。固定指数 $F = 0.963$ 大于 0,表明居群中有过剩的纯合子,并且相对异交而言近交很少。对该种子园 10 个高产的无性系分别进行交配系统分析,发现多位点异交率(t_m)相差比较大,而单位点异交率(t_s)相差不大,不过都处于较高水平,说明该种子园的家系选择和家系选型配置上比较理想。

交配系统是以种群为研究对象,是群体遗传学研究的重点。植物交配系统不仅决定着植物种群的遗传特征,影响植物物种的进化方向与速度,还间接影响地球上其他物种的演化历程。可以说植物交配系统的进化意义关系到地球上整个生命界的演变。植物交配系统本身并不是固定不变的而是动态的,受到来自植物本身及周围各种外界因素的影响,于是植物在异交和自交之间相互转换协调,这不仅发生在种间,同时也发生于种下水平,这在进化研究中极为重要。异交率作为研究交配系统的重要参数,在以往的研究表明,松属树种具有典型的高异交率。例如:日本柳杉的异交率为 0.944^[6],红松为 0.966^[9],欧洲赤松为 0.950^[10],北美乔松和扭叶松分别为 1.020 和 1.000^[11]。谭小梅等^[12]研究的马尾

ts = 0.004 接近 0,说明马尾松 1.5 代种子园子代亲本的近交现象不显著,多位点异交率大于单位点异交率。固定指数 $F = 0.963$ 大于 0,表明居群中有过剩的纯合子,并且相对异交而言近交很少。

2.2 10 个家系的交配系统参数 对种子园 10 个高产的无性系分别进行交配系统分析,发现多位点异交率(t_m)相差比较大,变化幅度为 0.148 ~ 1.000,而单位点异交率(t_s)相差不大,变化幅度为 0.854 ~ 1.000(表 2)。不同无性系的交配指数不同,这与个体自交可育程度的差异、自身花粉充裕程度以及所处地理环境有关。对家系间异交率的差别分析要分清其自交是遗传因素导致的,还是环境因素导致的,准确的结论可为家系选择提供帮助。

松的异交率为 1.098。冯源恒等^[13]在广西马尾松种子园交配系统动态分析中也发现马尾松种子园存在很高的异交率。影响植物异交率的因素有很多,比如株距、散粉授粉时花粉的数量及密度,授粉时风力及风向、温度及湿度等情况。不同年份同一种群的异交水平不尽相同,与当年的自然环境因素有很大的关系。自交亲和的物种在种群密度低时,外源植株提供的有效花粉减少,从而近交和自交的机会增多使导致异交率降低;种群密度高时,相邻植物间的联系加大,异交水平高^[14]。马尾松种子园常存在亲本开花结实量不均衡,花期不遇等,在春季散粉时期,要注意观察天气情况,适当进行人工授粉。该种子园目前异交率很高,但该种子园随着树体生长扩大,林分开始郁闭,也可能造成异交率下降,尚需要对种子园进行子代测定,对亲本进行疏伐,选择优良亲本进行辅助授粉,以保持良好的交配系统,生产优质种子。

参考文献

[1] 张薇,龚佳,季孔庶. 马尾松实生种子园交配系统分析[J]. 林业科学, 2009,45(6):22-26.
[2] 杨汉波,张蕊,周志春. 木荷种子园的遗传多样性和交配系统[J]. 林业科学,2016,52(12):66-73.
[3] 程祥,张梅,毛建丰,等. 有限种群油松种子园的遗传多样性与交配系统[J]. 北京林业大学学报,2016,38(9):8-15.
[4] 艾畅,徐立安,赖焕林,等. 马尾松种子园的遗传多样性与父本分析[J]. 林业科学,2006,42(11):146-150.
[5] 张冬梅,杨娅,沈熙环,等. 油松 SSR - PCR 引物筛选及反应体系的建立[J]. 北京林业大学学报,2007,29(2):13-17.
[6] FYFE J L, BAILEY N T J. Plant breeding studies in leguminous forage crops I. Natural cross-breeding in winter beans [J]. The journal of agricultural science,1951,41(4):371-378.

进行正交试验,其结果见表 5。

采用极差分析法,根据各因素的 k 、 R 值的大小,对试验结果进行分析。分析结果表明: $R_A > R_D > R_B > R_C$,即在 4 个因素中黑枸杞添加量为主要影响因素,奶粉添加量次之。由直观分析表明,较好的组合为 $A_1D_3B_3C_3$,即黑枸杞 6.25%,奶粉 31.25%,紫薯 31.25%,麦芽糊精 31.25% (以 20 g 基准

物质中各成分的百分比计)。

为了验证试验结果的可靠性,选取上述最佳工艺条件黑枸杞 6.25%,奶粉 31.25%,紫薯 31.25%,麦芽糊精 31.25% 进行试验,得到的咀嚼片质量指标如下:外观 9 分,色泽 9 分,口感 9 分,杂质 9 分,总分 36 分。

表 5 咀嚼片制备工艺正交试验结果
Table 5 Results of orthogonal test for preparation of chewing tablets

试验号 Test No.	因素 Factor				评价指标得分 Score of evaluation index//分				
	A	B	C	D	外观 Appearance	色泽 Color and lustre	口感 Texture	杂质 Impurity	总分 Total score
1	1	1	1	1	8	7	5	7	27
2	1	2	2	2	8	8	7	9	32
3	1	3	3	3	9	8	8	9	34
4	2	1	2	3	8	6	8	8	30
5	2	2	3	1	7	8	4	7	26
6	2	3	1	2	8	8	8	9	33
7	3	1	3	2	6	6	4	8	24
8	3	2	1	3	6	6	7	8	27
9	3	3	2	1	5	4	8	8	25
k_1	31.0	27.0	29.0	26.0					
k_2	29.7	28.3	29.0	29.7					
k_3	25.3	30.7	28.0	30.3					
R	5.7	3.7	1.0	4.3					

最佳工艺条件下制成的咀嚼片紫红色、表面光滑、色泽均匀一致,具有特有的风味、入口柔顺、酸甜协调、崩解性好。片重(0.50 ± 0.05)g,花青素含量 4.773 mg/片,硬度 30 N,水分含量 4.42%,大肠菌群小于 3 MPN/g,菌落总数 15 CFU/g,致病菌未检出。

3 结论

所制得复合咀嚼片口感细滑,无粗糙感,甜味适中,且有较好的奶香味,咀嚼片富含的花青素具有增强视力、消除疲劳、预防心血管疾病等功能,而且咀嚼片在口腔中被嚼碎或吮服后,其表面积增大,能促进其溶解和吸收,具有极高的营养价值,市场前景广阔。

参考文献

[1] 杨斌,王向未. 黑枸杞及其功能性成分在食品工业中的应用及开发进

展[J]. 轻工科技,2014,19(10):22-23.
[2] 张玲艳,王宏权. 黑枸杞花青素的提取及其抗氧化活性研究[J]. 食品工业,2014,35(12):88-91.
[3] 冯晓群. 紫薯的保健功能及其应用前景[J]. 甘肃科技,2011,27(9):160-161.
[4] 蔡湛,兰余,赵淑娟,等. 紫薯的抗氧化及活性成分研究[J]. 粮食与油脂,2015,28(1):43-48.
[5] 白津榕. 紫薯产品的开发研究现状[J]. 食品工程,2013,10(4):4,17.
[6] 冯晓群. 紫薯的保健功能及其应用前景[J]. 甘肃科技,2011,27(9):160-161.
[7] 中华人民共和国卫生部. 食品中水分的测定:GB 5009.3—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
[8] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 大肠菌群计数:GB 4789.3—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
[9] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 霉菌和酵母计数:GB 4789.15—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.
[10] 中华人民共和国卫生部. 食品微生物学检验 菌落总数测定:GB 4789.2—2010[S]. 北京:中国标准出版社,2010.

(上接第 124 页)

[7] RITLAND K, JAIN S, RITLAND K, et al. A model for the estimation of out-crossing rate and gene frequencies using an independent loci[J]. Heredity, 1981, 47(1):35-52.
[8] RITLAND K. A series of FORTRAN computer programs for estimating plant mating systems[J]. Journal of heredity, 1990, 81(3):235-237.
[9] MORIGUCHI Y, YAMAZAKI Y, TAIRA H, et al. Mating patterns in an indoor miniature *Cryptomeria japonica* seed orchard as revealed by microsatellite markers[J]. New forests, 2009, 39(3):261-273.
[10] FENG F J, ZHAO D, SUI X, et al. Study on mating system of *Pinus ko-*

raiensis in natural population based on cpSSR technology[J]. Advanced materials research, 2011, 183/184/185:700-704.
[11] 王崇云,党承林. 植物的交配系统及其进化机制与种群适应[J]. 武汉植物学研究, 1999, 17(2):163-172.
[12] 谭小梅,周志春,金国庆,等. 马尾松二代无性系种子园遗传多样性和交配系统分析[J]. 林业科学, 2012, 48(2):69-74.
[13] 冯源恒,杨章旗,贾婕,等. 马尾松种子园交配系统的时间动态变异[J]. 东北林业大学学报, 2017, 45(6):1-4, 11.
[14] 葛菁萍,林鹏. 红树植物木榄 (*Bruguiera gymnorhiza*) 种群的交配系统[J]. 植物生态学报, 2001, 25(1):50-56.