

太行山东麓油松种子园遗传多样性的 RAPD 分析

陈建中¹, 葛水莲², 杨明建¹

(1. 邯郸市植物研究所 河北 邯郸 056005; 2. 邯郸学院 生物科学系 河北 邯郸 056005)

摘要: 对太行山东麓油松种子园内 40 个无性系之间的遗传多样性进行分析, 并用 UPGMA 聚类分析就无性系间亲缘关系进行研究。结果表明: 从 150 个 10 mer 随机引物中筛选出 11 个共检测到 95 个位点, 多态位点有 77 个多态位点率为 81.05%; *Nei's* 遗传多样性指数和 *Shannon* 信息指数平均值分别为 0.3881 和 0.5678, 各引物的多样性指数差别较大, 遗传变异在基因组中分布不均衡; 聚类分析结果证明无性系间的遗传亲缘关系较近, 遗传背景狭窄。

关键词: 油松; 种子园; RAPD; 遗传多样性

中图分类号: S 791.254.04 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)07-00130-03

油松 (*Pinus tabulaeformis*) 为我国特有的重要针叶树种, 也是北方干旱山区主要造林树种。20 世纪 80 年代前后, 陕西、辽宁、河南、河北、山西等 7 个省(区)先后建立 17 个油松初级种子园, 建园面积达 450 余 hm^2 ^[1], 目前种子园多数已经进入第 2 代或更高世代阶段。对种子园来说它既是良种繁殖基地, 直接为生产提供大量优质种子, 又是不断发展的育种系统中一个重要环节。近年对其遗传多样性进行了一些研究, 多数认为表型选择不会显著降低群体的遗传多样性水平^[2], 但传统表型选择因受环境条件、生长气象因子等影响, 一定程度上不能真实反映各无性系的种性。分子标记技术能够克服环境等因素的影响, 在 DNA 水平上直接反应各无性系的遗传类型。现国内外对油松在分子水平上遗传多样性的试验性研究报道还处于空白阶段, 该试验利用 RAPD 技术研究油松种子园内 40 个无性系间遗传结构及多样性, 用 UPGMA 法鉴定无性系间亲缘关系, 为筛选遗传优良的无性系和种子园去劣疏伐提供可靠依据, 以缩短林木改良循环选择的时间, 达到改良和提高种子园的目的。

1 材料与方法

1.1 实验基地

辉县油松初级无性系种子园营建于 1988 年, 面积 34 hm^2 , 主要为晋南豫北亚区用材林和防护林营建提供良种。油松优树来自该亚区的沁源、凌川和辉县种源, 其中, 沁源和凌川的选优林分为天然起源, 辉县林分是

源于沁源的人工驯化种群。试验地位于河南辉县城西太行山东麓的白云寺林场(113°10'E, 35°18'N), 海拔高度 1 400 m 左右, 土壤为森林褐土, pH 6.5~7.5, 土层厚度大于 50 cm, 为该种子亚区典型油松造林用地, 气候属于北亚热带与暖温带过渡区, 四季分明雨热同期, 年降雨量 641 mm, 年平均温度 14℃, 极端低温 -16.7℃, 极端高温 43℃, 无霜期 212 d。该区植被划属于暖温带落叶阔叶林区, 常见植被有辽东栎 (*Quercus liaotungensis* Koidz)、酸枣 (*Ziziphus acidujuba*)、刺槐 (*Robinia pseudoacaci*)、荆条 (*Verbenaceae*); 草本有白草 (*Pennisetum flaccidum*)、马齿苋 (*Herba Portulacae*) 等^[3]。

1.2 试验材料

供试材料为取自河南辉县城西太行山东麓白云寺林场的抽梢时期的 40 个油松无性系成年植株的嫩叶, 每个无性系中随机选取 10 株, 共 400 个样本。分别放入有硅胶的保鲜袋中, 于阴凉处 48 h 处理后, 置于 -70℃ 冰箱保存备用。

1.3 试验方法

采用优化的 CTAB 法^[4]提取油松基因组 DNA, 提取物用 100 μL 去离子水溶解, 用分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度, 0.18% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 完整性, -20℃ 保存备用。使用前将 DNA 原液稀释为 40 ng/ μL 。PCR 反应在 PTC-200 型梯度热循环仪上进行。PCR 扩增反应体系为: 基因组 DNA 50~100 ng, 引物 0.1 $\mu\text{mol/L}$, dNTP 200 $\mu\text{mol/L}$, Tris HCl (pH 9.0) 10 mmol/L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, KCl 50 mmol/L 和 Taq 酶 1 U, 反应总体积为 25 μL 。PCR 扩增程序为 94℃ 5 min, 94℃ 1 min, 38℃ 1 min, 72℃ 1 min, 循环 42 次, 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测, 经 EB 染色后, 用 Alpha 2 200 凝胶成像。

第一作者简介: 陈建中(1978-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事生物学教学与科研工作。

基金项目: 国家杰出青年基金资助项目(30325006); 邯郸学院硕博启动基金资助项目(2007002)。

收稿日期: 2009-12-14

1.4 数据处理与统计分析

对扩增出来的条带选取清晰、重复性好的进行计数。有带赋值为 1, 无带赋值为 0。把图形资料转化为数据资料, 统计每个引物扩增出的位点总数和多态位点数, 在此基础上计算出多态位点率。用 *Nei* 公式计算品种间 *Nei's* 标准遗传距离 (*D*)^[5]。根据 RAPD 多态性的标准遗传距离, 用 PopGen 32 软件, 按 UPGMA 法对 40 个无性系进行聚类分析, 构建聚类关系图。

2 结果与分析

2.1 RAPD 结果分析

表 1 引物的编号、序列及扩增带数

引物号	引物序列	位点总数	多态位点	多态位点比/%	引物号	引物序列	位点总数	多肽位点	多态位点比率/%
R-01	TGCGGTCCT	10	8	80.0	Z-18	AGGTCTGTG	6	4	66.7
AM14	TGGTTGCGGA	9	8	88.9	T-20	GACCAATGCC	9	8	88.9
PI0	TCCCGCCTAC	8	7	87.5	S-03	CAGAGGTCCC	9	8	88.9
C09	CTCACCGTCC	7	5	71.4	B08	GTCCACACGG	9	7	77.8
F04	GGTGATCAGG	9	8	88.9	E02	GGTGCGGGAA	10	7	70.0
N07	CAGCCCAGAG	9	7	77.8	合计		95	77	81.1

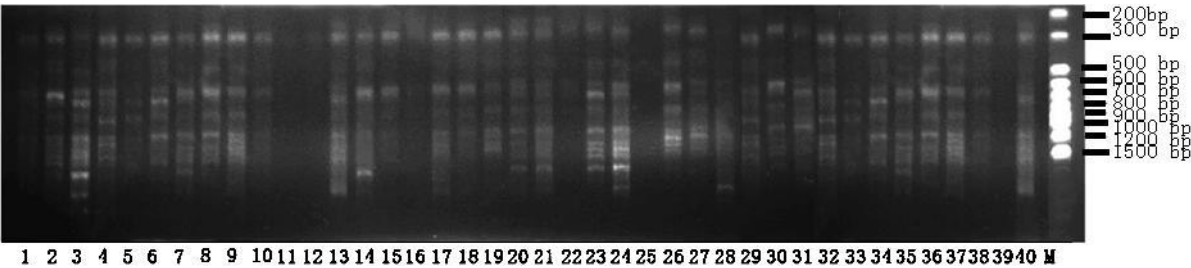


图 1 引物 S-03 对 40 个油松无性系的 RAPD 扩增图

2.2 油松无性系间遗传多样性分析

Nei's 指数是通过某一位点上 2 个等位基因, 依据各自的基因频率来反映等位基因的丰富程度和均匀程度, 即基因多样性。Shannon's 指数根据扩增产物的存在频率采确定某一 DNA 片段的表型频率。

利用 *Nei's* 指数和 Shannon 指数估算结果, 平均值分别为 0.3881 和 0.5678, 各条引物的多样性指数差别较大, 指数最高的引物是 S-03 (0.4643, 0.6568) 最低的是 B08 (0.2916, 0.4423), 这表明遗传变异在油松基因组中分布不均。

表 2 油松无性系群 RAPD 标记的遗传多样性指数

引物	<i>Nei's</i> 指数	Shannon 信息指数	引物	<i>Nei's</i> 指数	Shannon 信息指数
R-01	0.4386	0.6281	Z-18	0.3795	0.5621
AM14	0.4115	0.5954	T-20	0.4422	0.6335
PI0	0.4038	0.5883	S-03	0.4643	0.6568
C09	0.3998	0.5851	B08	0.2916	0.4423
F04	0.3926	0.5743	E02	0.338	0.5102
N07	0.3084	0.4698	平均	0.3881	0.5678

2.3 基于 RAPD 标记的聚类分析

油松种子园中无性系的相似系数能够反应无性系间的亲缘关系, 即相似系数越高, 彼此亲缘关系越近。

150 条 10 mer 随机引物中有 11 条扩增出多态性丰富、重复性好的谱带。11 个引物共检测到 95 个位点, 多态位点有 77 个, 多态位点率为 81.05%; 每个引物扩增位点数在 6 ~ 10 之间, 平均每条引物扩增的位点数为 8.64 个, 扩增片段 DNA 长度在 200 ~ 1 500 bp 之间, 说明 40 个无性系个体间存在着较大的遗传差异, 油松种子园内存在着丰富的遗传多样性。

通过 RAPD 数据, 计算每个样本间的相似系数值, 用 UPGMA 法对这 40 个无性系进行聚类分析, 以相似系数参照线 *S* = 0.49 为截值, 将种子园中 40 个无性系分成四大组, 第 1 组: 无性系 158、29 和 73 划为一类, 第 2、3 组: 无性系 129 和 123 分别划为一类, 第 4 组: 剩余的共 35 个无性系划归一类。从总体聚类结果来看大部分无性系聚类比较密集, 说明油松种子园无性系间亲缘关系比较近, 遗传基础较窄。

3 讨论

RAPD 标记的变异水平很高, 取样应具有代表性, 用一个体代替种或用一个种代表一个属, 都可能对结果造成很大的偏差^[8]。该试验中供试材料为生长在同一种子园内同一树种间不同无性系, 因此消除了以个体代表种或种属而可能出现的偏差。

传统的以表型性状来估计遗传型的方法往往受到环境、生长发育时期等因素的影响, 不一定能真实反映遗传型的优良, 因此准确性比较低。与此相比分子标记具有多态性高、不受环境影响和在 DNA 水平上直接检测并计算相关参数等优点^[9-10]。该试验以种子园内油松基因组 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 只要选用合适的

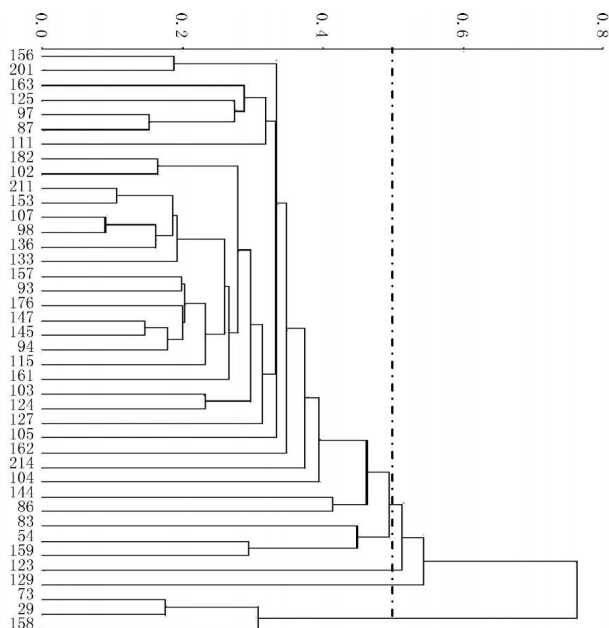


图2 40个无性系的UPGMA聚类分析结果

引物就可以覆盖整个基因组DNA,其结果代表了整个基因组的差异。对于油松种子园RAPD的遗传多样性进行估算,11条引物的遗传多样性指数差别较大,同时 $Nei's$ 指数和 $Shannon$ 指数最高值是最低值的1.59和1.49倍,充分说明油松种子园无性系间的遗传变异在整个基因组中分布很不均衡。

UPGMA聚类是基于RAPD标记在DNA分子水平上不受环境条件等因素影响。对40个无性系进行的分类,对于油松种子园的优良无性系的筛选具有借鉴意义。通过油松无性系种子园40个无性系的聚类分析可知,当前初级种子园中大部分无性系聚类集中且密集,说明建园之初油松优树在种源地理位置和生态位置比

较相似,从而导致种子园大部分无性系亲缘比较近,遗传基础比较窄,陈建中^[11]研究表明种子园中40个无性系存在明显的雌雄花开花不同步的问题,这直接导致雌雄配子贡献不均衡,少数无性系花粉垄断,在整个配置库中占据绝大部分份额,这一问题也相应的证实种子园的遗传亲缘关系较近,遗传基础较窄。第2代种子园的改建,优良无性系的筛选是关键,该试验结果给种子园改建的去劣疏伐工作提供很好的参考。

参考文献

- [1] 杨培华,樊军锋,刘永红,等.我国油松种子园研究现状[J].林业科技开发,2006,20(6):5-9.
- [2] 郑勇平,孙鸿有,董汝湘,等.杉木不同世代不同类型种子园遗传改良增益研究[J].林业科学,2007(3):20-27.
- [3] 陈建中,李悦,李国锋,等.油松优树半同胞家系子代遗传变异与选择[J].河南农业大学学报,2006,40(2):146-151,160.
- [4] Stewart C N Jr, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications[J]. Biotechniques, 1993, 14(5): 748-750.
- [5] Glazko G V, Nei M. Estimation of divergence times for major lineages of primate species[J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(3):424-434.
- [6] 朱必凤,陈德学,陈虞禄,等.广东韶关马尾松种子园遗传多样性分析[J].福建林业科技,2007,34(3):1-5.
- [7] Vellend M, Geber M A. Connections between species diversity and genetic diversity[J]. Ecology Letters, 2005, 8(7): 767-781.
- [8] Grattapaglia D, Sederoff R. Genetic linkage maps of *Eucalyptus grandis* and *Eucalyptus urophylla* using a pseudo-testcross: mapping strategy and RAPD markers[J]. Genetics, 1994, 137(4): 1121-1137.
- [9] 汪小全,邹喻苹,张大明. RAPD应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. 植物学报, 1996, 38(12): 954-962.
- [10] 刘永红,樊军锋,杨培华,等.油松种子园子代变异和遗传稳定性的分析[J].东北林业大学学报,2009,37(1):6-7.
- [11] 陈建中,葛水莲,叶嘉,等.油松无性系数量性状的遗传变异分析[J].浙江林业科技,2008,28(1):10-13.

Genetic Diversity Analysis on Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* in the Southern Taihang Mountainous by RAPD Markers

CHEN Jian-zhong¹, GE Shui-lian², YANG Ming-jian¹

(1. Handan Plant Research Center, Handan, Hebei 056005; 2. Bio-Science Department, Handan College, Handan, Hebei 056005)

Abstract: The thesis used RAPD molecule marker to estimate the genetic diversity of seed orchard of *Pinus tabulaeformis*. The results showed that 11 random primers produced 95 loci in total, 77 of which were polymorphic loci, the percentage was 81.05%. The genetic background complexity and diversity of seed orchard of *Pinus tabulaeformis* were shown clearly. $Nei's$ genetic diversity analysis showed the efficiency number of alleles was 0.3881 and $Shannon's$ information index was 0.5678 on average. Largely contrast were in $Nei's$ genetic diversity and $Shannon's$ information index, clustering analyses result indicated the genetic relationship was comparatively close and the genetic background was narrow, Genetic variation displayed the special disproportion in genome

Key words: *Pinus tabulaeformis*; seed orchard; RAPD markers; genetic diversity