

十二个油松种群遗传多样性的 RAPD 分析

赵 飞¹, 樊军锋¹, 杨培华¹, 刘永红¹, 徐 华²

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省种苗工作站, 陕西 杨陵 712100)

摘 要:运用 RAPD 分子标记技术, 对 12 个油松天然居群中 192 个单株进行遗传多样性分析。用筛选出的 20 条引物共扩增出 289 个条带, 其中多态性条带 220 个, 多态性条带百分率为 76.12%。用 NTSYS-PC 软件计算遗传相似性系数进行聚类分析。结果表明: 192 份油松材料间的 SC 值变化范围为 0.598 6~0.965 4, 平均为 0.737 9。采用 UPGMA 法, 在 SC 值为 0.76 的水平上可将供试材料聚为 3 类。表明我国油松天然种群间产生一定程度的变异, 在分子水平上呈现出遗传多态性。

关键词:油松; RAPD; 遗传多样性; 遗传距离; 聚类分析

中图分类号:S 791.254 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)11-0112-05

油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.) 为松科松属常绿乔木。作为我国北方最主要的针叶树种, 油松喜光, 树干挺拔, 根系发达, 适应性强, 材质好, 耐干旱、抗风、抗瘠薄, 有良好的美化环境和保持水土的功能, 生态功能强大, 在木材产业与松脂、医药产业有巨大的利用价值。油松天然林分布极为广阔, 跨越我国北方大部分省(区)^[1], 生态分布区达 300 万 km², 是我国特有的树种。我国天然油松林分布面积最大的省份是陕西, 占全国分布区总面积的 44.28%, 山西占 25.91%, 甘肃占 5.13%,

内蒙古约占 2%^[2]。近 30~40 a 来, 随着生物学的飞速发展, 分子生物学得到广泛的应用, 可以用多种分子标记方法对遗传多样性检测, 如: RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等, 发展较早又最常用的是 RAPD 标记技术^[3]。目前, 国内外有不少应用 RAPD 标记进行遗传多样性研究的报道, 在松属植物中, 应用 RAPD 技术的研究包括黄山松、红松、落叶松、马尾松等, 而应用 RAPD 技术对油松进行遗传多样性的研究并不多。

该试验应用 RAPD 技术, 对我国油松主要分布区(陕西、内蒙古、甘肃、山西)的油松种质资源遗传多样性从分子水平上做分析探讨, 为后续的种质改良与种质资源保存工作提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 样品采集与处理

选择陕西、内蒙古、甘肃、山西四省油松天然林作为试验材料, 选取 12 个能够代表当地油松种质特异性的

第一作者简介:赵飞(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为林木遗传育种林业生物技术。E-mail: kitty-chao@163.com。

责任作者:樊军锋(1963-), 男, 博士, 研究员, 研究方向为林木遗传育种。

基金项目:国家林业公益性科研资助项目(200704039); 西北农林科技大学唐仲英育种基金专项资助项目(2009-78)。

收稿日期:2011-03-25

Study the Rapid PCR Detection System of Jujube Phytoplasma

GAO Jing-tao, NIU Jian-xin, WANG Xue-lian, LIU Na, YE Chun-xiu, ZHANG Fei

(Department of Horticulture, Agricultural College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000)

Abstract: In this paper, five pairs primers (NTF1/NTR1, NTF2/NTR1, NTF3/NTR1, NTF1/NTR2, NTF2/NTR2, NTF3/NTR2) were designed according to the 16 S rDNA conservative sequence, in previous studies it was obtained and analyzed. Through compared and set the different temperature and other conditions of PCR system, the optimum reaction conditions of this PCR detection system was found, and used this method to detect some materials of Xinjiang province, and there were phytoplasma in individual samples of Grey dates. Therefore, this system used in detecting phytoplasma of jujube was feasible, and could provide some formation for relevant study in theory.

Key words: jujube infected; phytoplasma; detect

天然居群,其中陕西 8 个,内蒙古 1 个,甘肃 1 个,山西 2 个。按照 2 个单株之间相隔 50 m 以上的原则,每个种群在不同的位置随机确定单株^[4],将从单株上采集到的球果以单株为单位独立分装,置于干净实验台上晾干,选取其中较为饱满的籽粒,用大约 35℃ 温水浸泡 10~15 h,然后放于垫有湿润滤纸的培养皿中,待胚芽长至约 1 cm 时即可用于提取 DNA。具体的材料来源及编号见表 1,共采集到 192 个单株,可提取 192 份 DNA。

1.2 总 DNA 的提取及检测

用改良 CTAB 法^[5]提取 DNA,将胚芽仔细剥去外皮,称取 0.15 g 放入研钵,倒入液氮,迅速研磨成粉末,分装入 2 mL 离心管中;加入已预热至 65℃ 的 CTAB 提取液 800 mL,再加入 β -巯基乙醇 10 μ L;置于 65℃ 水浴

40 min,每隔 10 min 充分混匀 1 次;取出离心管,加入 800 mL 氯仿-异戊醇混合液(V 氯仿:V 异戊醇=24:1),充分摇匀 10 min;在 4℃ 下离心 10 min (11 000 r/min),取上清液 500 mL,置于另一个 2 mL 离心管中,加入 800 mL 氯仿-异戊醇混合液(V 氯仿:V 异戊醇=24:1),充分摇匀 10 min;在 4℃ 下离心 10 min (11 000 r/min),取上清液 300 mL,置于另一个 1.5 mL 离心管中,加入异丙醇 600 mL,充分摇匀,−20℃ 下放置 30~60 min;用移液枪小心吸取已经成团的 DNA,置于 1.5 mL 离心管中,加入 75% 乙醇 500~600 mL,充分洗涤 2 次;将洗好成团的 DNA 小心拨入 1.5 mL 离心管中,自然风干(大约需 6 h),加入 100~200 mL TE 溶解 DNA。置于 4℃ 冰箱保存。

表 1 供试材料编号及来源

居群地	样品编号	经纬度分布	海拔/m	年降水量/mm	年均气温/℃
陕西府谷三道沟林场	FG1-FG16	E109°38.245~110°39.248 N39°12.217~39°13.111	1 262	455.0	9.2
陕西黄陵桥山林业局	HL1-HL16	E109°47.431~109°55.282 N36°31.216~36°36.548	1 195	567.0	9.5
陕西黄龙黄龙山	LH1-LH16	E107°42.711~109°56.434 N45°45.519~45°58.173	1 217	606.0	8.7
陕西留坝营盘林场	LB1-LB16	E107°42.031~107°42.982 N31°35.216~31°36.548	1 629	885.3	11.5
陕西洋县华阳镇	YX1-YX16	E109°54.031~109°56.982 N30°33.716~30°36.508	1 435	1 319.0	16.9
陕西周至厚珍子林场	ZZ1-ZZ16	E108°49.566~108°54.934 N31°50.871~31°53.945	1 318	851.0	11.5
陕西柞水红崖寺	ZS1-ZS16	E108°30.529~108°32.686 N35°46.204~35°48.340	1 290	740.0	12.5
陕西洛南寺耳乡	LN1-LN16	E110°28.116~110°28.697 N34°16.923~34°26.213	1 287	707.0	11.2
内蒙古宁城	NI-N16	E118°28.044~118°37.682 N42°33.216~42°35.548	1 086	556.0	8.1
甘肃小陇山	GI-G16	E106°24.317~106°25.882 N34°17.665~34°19.430	1 559	805.0	10.8
山西沁源	QY1-QY16	E112°05.181~112°05.803 N36°36.737~36°37.784	1 639	583.0	8.8
山西文水	WS1-WS16	E111°43.513~111°44.600 N37°34.184~37°34.780	1 545	607.0	9.2

用核酸蛋白检测仪与紫外分光光度计检测提取到 DNA 的浓度与纯度,并将其稀释至 25 ng/ μ L,于 4℃ 条件下保存备用。

1.3 引物筛选

从上海生物工程有限公司共购买 127 条 10 bp 的随机引物,根据产物清晰、多态性高且重复性好的原则,经过初选与复选,最终确定 20 条引物用于正式 PCR 扩增,引物序列见表 2。

1.4 RAPD 扩增

参考 Williams 等方法^[6]进行 PCR 扩增反应,扩增反应总体积为 25 μ L,包括:10×PCR buffer (Tris-HCl 200 mmol/L, pH 8.3, KCl 500 mmol/L) 2.5 μ L, Mg^{2+} 2.0 mmol/L, dNTP (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L) 0.5 μ L, Taq 酶 0.5 U, 10 μ mol/L 随机引物

2.0 μ L,模板 DNA 40 ng,双蒸水补足 25 μ L。

扩增反应程序:94℃ 预变性 2 min,然后进入 35 个 PCR 循环(每个循环为:94℃ 变性 30 s,37℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 30 s),最后 72℃ 终延伸 5 min。扩增反应在 Bio-Rad S-1000 型 PCR 扩增仪上进行。

检测:扩增产物在 100 V 电压下用 2.0% 琼脂糖凝胶在 1×TBE 缓冲液中电泳 60 min,经 EB 染色,放入凝胶成像系统中观察照相。

1.5 数据分析

根据在相同电泳位置上 RAPD 扩增条带的有和无^[7],无条带的赋 0,有条带的赋 1,将电泳结果转化为二元矩阵。统计出每个引物扩增出的总条带数和多态性条带数,计算试验材料的遗传相似性系数(similar coefficient, SC): $SC = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 和遗传距离

(genetic distance, GD): $GD = -\ln SC$ 。采用非加权配对算数平均法 UPGMA 对材料进行聚类分析, 建立聚类图。假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下, 采用 PopGen1.32 分析软件对 12 个种群做遗传参数分析^[8]。

表 2 随机引物序列及其扩增结果

引物名称	引物序列 (5'-3')	扩增总 带数	多态性 带数	多态性 比例/%
S19	ACCCCGAAG	18	17	94.44
S20	GGACCTTAC	11	6	54.55
S37	TTGGCACGG	10	6	60.00
S46	ACCTGAACGG	10	10	100.00
S52	CACCGTATCC	16	14	87.50
S91	TGCCGTCGT	16	8	50.00
S331	CTCAGTCGCA	15	8	53.33
S332	TCAACGGGAC	15	9	60.00
S344	CCGAACACGG	15	7	46.67
S346	TGCTTCCGCA	12	7	58.33
S485	CCGCGTCTTG	13	9	69.24
S499	CCCCATATCA	20	16	80.00
S1180	CCCGATACA	15	13	86.67
OPA-12	TGCCGAGCTG	11	8	72.73
OPD-12	CACCGTATCC	15	14	93.33
OPF-6	GGGAATCGG	15	12	80.00
AW56136	AGCGTGCTCTG	16	15	93.75
184	CAAACGGCAC	18	15	83.33
213	CAGCGAACTA	14	12	85.71
519	ACCGGAACT	14	14	100.00
总数		289	220	76.12

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增结果

用筛选得到的 20 个引物对油松 192 个单株材料进行扩增, 共扩增出 289 条带, 其中有 220 条是多态性条带(表 2), 占总扩增条带数的 76.12%, 显示了油松群体内具有丰富的遗传多样性和复杂性。每个引物的扩增带数从 10~20 条不等, 平均每个引物能够扩增出 14.45 条带。扩增条带数最少的引物为 S37 与 S46, 只有 10 条; 而扩增条带数最多的引物为 S499, 多达 20 条。引物 S46 与 519 所扩增的多态性带百分率最高, 达到 100.00%; 而引物 S344 多态性带百分率最低, 仅为 46.67%。扩增出的 DNA 片段的长度范围为 100~2 000 bp, 尤以 150~1 500 bp 最多。图 1 与图 2 分别为引物 S19 对部分单株(ZS)的扩增结果和引物 S1180 对部分单株(LH)的扩增结果, 这表明供试油松个体间具有丰富的遗传多样性。

2.2 种群内多态性分析

采用 NTSYS-PC 2.0 软件计算遗传相似系数 SC 与遗传距离 GD, 进行 UPGMA 聚类分析。结果表明, 在 192 份油松材料中, GD 值在 0.035 21~0.513 1 之间, 表明 192 份油松单株间存在较大的遗传差异。同地区内的不同单株之间均出现了不同程度的差异, 其中以陕西

洛南(LN)最为明显, 是同种群内差异最大的; 洛南的 16 个单株中, LN-6 与 LN-8 之间的遗传距离最大, 达到 0.245 9; LN-3 与 LN-8 之间的遗传距离最小, 为 0.049 66。洛南(LN)16 个单株之间的平均遗传距离为 0.140 0, 远高于其它同地区内单株间的平均遗传距离(甘肃小陇山(G)单株间平均遗传距离为 0.072 4, 洋县(YX)单株间平均遗传距离为 0.049 1)。

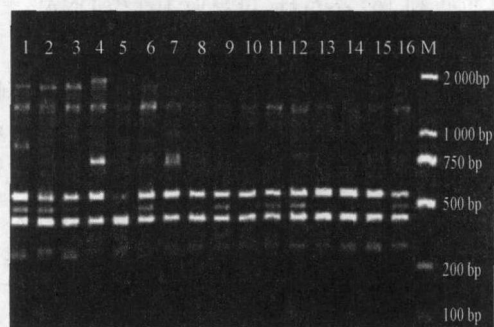


图 1 引物 S19 对部分模板(柞水 ZS)扩增结果
注: M: 标准分子量; 1-16: 单株编号。下同。



图 2 引物 S1180 对部分模板(黄龙 LH)扩增结果

2.3 种群间多态性分析

由表 3 可知, 20 条引物在 12 个种群中检测出的多态位点数在 116~179 之间, 平均为 156.17; 多态性位点百分率(PPL)为 54.03%, 等位基因数(N_a)为 1.540 3, 有效等位基因数(N_e)的平均值为 1.335 9, 各种群的 PPL 介于 40.14% 和 61.93% 之间。洛南(LN)种群的上述 3 个指标均为最高, 而洋县(YX)的均为最低。12 个种群的 Nei's 遗传多样性指数(H)在 0.212 4~0.286 4 之间, 平均值为 0.254 5; Shannon 多样性指数(I)在 0.325 7~0.426 1 之间, 平均值为 0.384 8。Nei's 遗传多样性指数和 Shannon 多样性指数表明, 12 个油松种群遗传多样性的分布规律是: LN>ZS>N>FG>WS>HL>LB>LH>QY>ZZ>G>YX。12 个油松种群物种水平上的遗传多样性为 $N_a = 1.761 2$, $N_e = 1.425 9$, $H = 0.315 7$, $I = 0.468 3$, $PPL = 76.12\%$ 。

在这 12 个种群中, 列出平均 GD 值与 SC 值(表 4)以及 UPGMA 聚类图(图 3)。GD 范围为 0.102 5~0.442 8, 留坝(LB)与沁源(QY)之间的 GD 值最大, 为 0.442 8, 表明两地材料的亲缘关系相对较远; 洋县(YX)

与周至(ZZ)之间的GD值最小,为0.102 5,说明两地材料之间的亲缘关系最近。而且,SC值的变化范围为0.598 6~0.965 4,平均为0.737 9。其中材料LB-7(陕西留坝)与QY-3(山西沁源)之间的遗传相似系数最小,为0.598 6。而两地区的SC值平均为0.642 3,小于全体平均值;而材料LB-13与LB-14(陕西留坝)遗传相似系数SC最大,达到0.965 4。周至(ZZ)与洋县(YX)两地区的平均SC值最大,均为0.902 6。

表 3 12 个种群基于 RAPD 的遗传多样性

种群	多态位 点数	多态位点 百分率 /%	等位基 因数 (Na)	有效等位 基因数 (Ne)	Nei's 基因 多样性 指数 (H)	Shannon 多样性 指数 (I)
FG	165	57.09	1.570 9	1.276 5	0.268 7	0.412 6
HL	157	54.32	1.543 2	1.248 5	0.261 2	0.390 3
LH	150	51.9	1.519	1.218 2	0.248 5	0.375 9
LB	154	53.28	1.532 8	1.230 7	0.257 6	0.387 6
YX	116	40.14	1.401 4	1.107 1	0.212 4	0.325 7
ZZ	143	49.48	1.494 8	1.197 5	0.235 5	0.348 6
ZS	174	60.2	1.602	1.300 8	0.282 2	0.423 7
LN	179	61.93	1.619 3	1.319 8	0.286 4	0.426 1
N	169	58.47	1.584 7	1.282	0.273	0.418 1
G	139	48.09	1.480 9	1.186 3	0.225 8	0.342 9
QY	146	50.52	1.505 2	1.202 5	0.236 2	0.356 1
WS	162	56.05	1.560 5	1.260 5	0.265 9	0.409 5
平均	156.17	54.03	1.540 3	1.335 9	0.254 5	0.384 8
物种水平	220	76.12	1.761 2	1.425 9	0.315 7	0.468 3

表 4 12 个油松种群之间的平均 GD(对角线下)和平均 SD(对角线上)

种群	陕西 留坝 LB	甘肃 小陇山 G	陕西 洋县 YX	陕西 周至 ZZ	陕西 柞水 ZS	陕西 洛南 LN	陕西 黄龙 HL	陕西 黄陵 LH	陕西 府谷 FG	山西 沁源 QY	山西 文水 WS	内蒙古 宁城 N
陕西留坝 LB	***	0.881 1	0.802 5	0.8113	0.744 3	0.745	0.693 7	0.660 1	0.737 4	0.642 3	0.727 8	0.698 6
甘肃小陇山 G	0.126 6	***	0.782 2	0.797 3	0.762 2	0.760 7	0.6846	0.644 1	0.727 0	0.678 0	0.756 7	0.700 2
陕西洋县 YX	0.220 0	0.2456	***	0.902 6	0.737 5	0.726 8	0.6773	0.665 1	0.690 7	0.651 7	0.706 6	0.684 0
陕西周至 ZZ	0.209 1	0.226 6	0.102 5	***	0.7417	0.745 8	0.683 9	0.674 6	0.698 9	0.662 5	0.711 8	0.688 4
陕西柞水 ZS	0.295 4	0.271 5	0.304 5	0.298 9	***	0.829 6	0.744 6	0.739 3	0.695 4	0.698 9	0.738 4	0.674 8
陕西洛南 LN	0.294 4	0.273 5	0.319 1	0.293 4	0.186 8	***	0.752 7	0.737 8	0.711 8	0.706 8	0.746 8	0.688 6
陕西黄龙 HL	0.365 7	0.378 9	0.389 6	0.379 9	0.294 9	0.284 1	***	0.807 5	0.758 8	0.698 0	0.701 8	0.673 8
陕西黄陵 LH	0.415 4	0.440 0	0.407 8	0.393 7	0.302 1	0.304 1	0.213 8	***	0.741 9	0.714 8	0.678 9	0.661 6
陕西府谷 FG	0.304 6	0.318 9	0.370 1	0.358 2	0.363 2	0.339 9	0.27 6	0.298 6	***	0.669 0	0.713 2	0.727 6
山西沁源 QY	0.442 8	0.388 6	0.428 1	0.411 7	0.358 2	0.347	0.359 6	0.335 8	0.402 0	***	0.772 1	0.701 8
山西文水 WS	0.317 7	0.278 8	0.347 3	0.339 9	0.303 3	0.291 9	0.354 1	0.387 2	0.338 0	0.258 6	***	0.715 7
内蒙古宁城 N	0.358 6	0.356 4	0.379 7	0.373 4	0.393 3	0.373 2	0.3948	0.413 1	0.318 0	0.354 1	0.334 5	***

3 结论与讨论

物种的遗传多样性水平越高,它对生态环境的适应能力就越强,分布范围也越大^[9]。因此,具有高水平遗传变异的植物物种多具有风媒异花授粉、结实量大、寿命长、地理分布广、基因交流频繁且处于演替末期等特征^[10],这些生物学特性有利于植物的快速扩散和繁殖,可以促进种群间的基因交流,增加优良基因的数量,并能够有效减少基因漂变带来的影响。油松天然分布在我国 14 个省(区),其水平分布的最突出特点就是非连续性,造成这种非连续性的原因包括:山地与平原的间隔分布、气候因素、还有人为因素。所以,种源地较近的油松群体会表现出对同一种气候的适应性,经过长期的自然选择也会产生相类似的基因型。

2.4 聚类分析

由图 3 可知,当 SC 值在 0.76 水平上可将供试材料聚为 3 类:甘肃小陇山(G)与留坝(LB)、洋县(YX)、周至(ZZ),柞水(ZS)、洛南(LN)聚为一类,黄龙(LH)、黄陵(HL)、府谷(FG)聚为一类,沁源(QY)、文水(WS)、内蒙古宁城(N)聚为一类。说明相近地区的油松居群之间有一定的遗传相似性,不同地区的居群之间存在着一定的地理隔离和遗传分化。

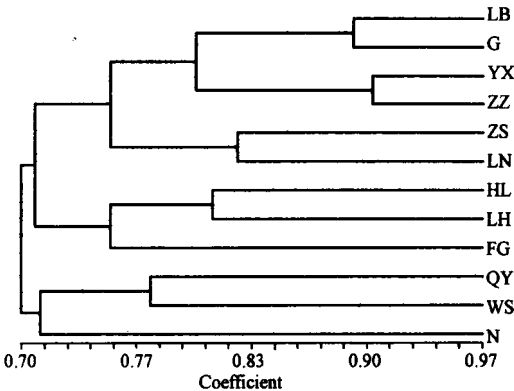


图 3 油松 12 个种群的 UPGMA 聚类图

该研究采用 RAPD 分子标记、遗传多样性分析和聚类分析的方法,对 192 株油松材料的遗传多样性和遗传基础进行分析,共扩增出 289 条谱带,其中具有多态性的条带为 220 条,占总扩增条带数的 76.12%,显示了油松群体内丰富的遗传多样性。试验 12 个不同种群 192 株油松单株间的 SC 值最低为 0.598 6,最高为 0.965 4,接近 0.90,说明这 12 个油松种群间产生了一定程度的变异,在分子水平上呈现出一定的遗传多态性。对各居群的聚类发现,同一居群的单株首先聚到一起,然后较近的种源地的居群再聚到一起。在 SC 值为 0.76 水平上,12 个居群可以划分为 3 类,其中第 1 类是甘肃小陇山(G)与陕西留坝(LB)、陕西洋县(YX)、陕西周至(ZZ),聚为一类,陕西柞水(ZS)、陕西洛南(LN)聚为一类,然后这 6 个

居群聚合到一起。说明这 6 个居群在遗传上较为相似。这主要是由于它们均位于我国秦岭地区,地理分布较近,气候条件也相似,而基因之间的交流也比较频繁,从而导致遗传组成比较接近。第 2 类是陕西黄陵(HL)与陕西黄龙(LH)聚为一类,然后与陕西府谷(FG)聚合到一起;这也应与地理位置较近,气候条件类似有关。第 3 类为山西沁源(QY)与文水(WS)聚为一类,然后与内蒙古宁城(N)聚合到一起。主要由于这 3 个地区年均气温与年降水量比较接近,这与油松分布受分布区内湿润条件和年降水量等气候条件的严格制约是一致的。试验结果表明,种源地较近的油松居群之间有一定的遗传相似性,能够产生相类似的分子遗传特征;而不同地区的居群之间存在着一定的遗传分化,说明地理隔离以及气候条件会使不同居群产生遗传差异。

从 12 个种群的多态位点百分率(PPL)、等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、Nei's 遗传多样性(H)、Shannon 遗传多样性指数(I)等多个指标综合来看,洛南(LN)种群的各项遗传参数均为最大。这可能是由于洛南县地处秦岭东段南麓,位于秦岭与蟒岭之间,地势较复杂,同时,油松属于风媒异花授粉植物,在特定的地理环境下,遗传背景相对也会复杂,遗传多样性较为丰富。此 12 个种群在物种水平上的多态位点百分率(PPL)为 76.12%,表明供试油松具有丰富的遗传多样性。物种水平上的遗传多样性为 $N_a=1.7612$, $N_e=1.4259$, $H=0.3157$, $I=0.4683$, 种群间水平上的各遗传参数值均高于种群内平均水平。12 个油松种群的 Nei's 遗传多样性指数(H)排序与 Shannon 多样性指数(I)排序相同,遗传多样性的分布规律是:LN>ZS>N>FG>WS>HL>LB>LH>QY>ZZ>G>YX。

研究表明,各油松居群之间存在一定的差异,但总体上具有一定的规律性,较近种源地的油松居群间的遗传多样性要低于较远种源地居群间的遗传多样性。用 RAPD 技术配合遗传作图,可以对油松的优良性状基因定位,能够帮助对油松种质资源进行合理利用和保护,对育种居群的长期经营、种质改良与种质资源保存工作有重要意义。

参考文献

- [1] 徐化成. 油松[M]. 北京:中国林业出版社,1990:18-20.
- [2] 徐化成. 油松地理变异和种源选择[M]. 北京:中国林业出版社,1992:6-14.
- [3] Williams J G K, Hanafey M K, Rafalski J A, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Research, 1990, 18: 6531-6533.
- [4] 邓辉胜, 文胜. 油松种子胚乳 DNA 的提取[J]. 柳州师专学报, 2006, 21(3): 108-110.
- [5] 侯万伟, 樊军锋, 周飞梅, 等. 与毛白杨性别相关的 RAPD 标记[J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 6(3): 81-83.
- [6] Williams J, Kubelik A, Livak K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Research, 1990(18): 6531-6535.
- [7] 蔡诚, 徐建平, 汪洁明. 滩地 13 个杨树无性系遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 中国农学通报, 2007, 23(6): 222-226.
- [8] Nei M. Genetic distance between populations [J]. The American Naturalists, 1972, 106(949): 83-92.
- [9] Kaundum S S, Zhyvoloup A, Park Y G. Evaluation of the genetic diversity among elite tea (*Camellia sinensis* var. *sinensis*) accessions using RAPD markers[J]. Eubhytica, 2000, 115: 7-16.
- [10] Gurics R P, Ledig F T. Genetic structure of populations and differentiation in forest tree [R]. California: University of California-Berkeley CA, 1981.

Analysis on Genetic Diversity of Twelve Populations in *Pinus tabulaeformis* Carr. by the Method of RAPD

ZHAO Fei¹, FAN Jun-feng¹, YANG Pei-hua¹, LIU Yong-hong¹, XU Hua²

(1. College of Forestry, Northwest Agricultural and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100; 2. Shaanxi Seedling Station, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers were used to measure genetic diversity of 192 individuals from 12 natural populations of *Pinus tabulaeformis* Carr. A total of 289 loci were identified from 20 RAPD primer, among which 220 loci were polymorphic and accounted for 76.12 percent. Similar coefficients were calculated and a dendrogram was generated by unweighted pair group method of arithmetic average using NTSYS-PC. The results showed that the genetic similarity coefficients ranged from 0.598 6 to 0.965 4 with an average of 0.737 9. All the 192 materials were classified into 3 groups at level 0.76; And results revealed an abundant genetic diversity of *Pinus tabulaeformis* Carr. natural populations in China, and most of the genetic variation existed in intrapopulation.

Key words: *Pinus tabulaeformis* Carr.; RAPD; genetic diversities; genetic distance; cluster analysis