

# 油松二代种子园遗传多样性 RAPD 分析

王 虎, 樊军锋, 杨培华, 刘永红, 李 慧

(西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100)

**摘 要:**运用 RAPD 分子标记技术,从 100 条引物中筛选出 15 条多态性引物,对二代油松种子园的 120 份样品进行遗传多样性分析。结果表明:种群水平具有较高的遗传多样性,共 201 个扩增条带中 152 个为多态性条带,多态位点百分率为 75.62%;总的 Shannon 信息指数(I)为 0.4352, Nei's 基因多样性指数(H)为 0.3821。采用 UPGMA 法,在遗传距离 0.15 处的水平上可将供试材料聚为 3 类。表明该二代种子园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;二代种子园;RAPD;遗传多样性

**中图分类号:**S 791.254 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0117-04

油松(*Pinus tabulaeformis* Carr.)在植物分类学上属于松科松属,为我国特有的针叶树种之一,且根系发达,耐干旱、耐寒、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,成为我国北方地区主要的造林树种,并广泛分布于内蒙古、山西、陕西、辽宁等地<sup>[1]</sup>。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<sup>2</sup><sup>[2]</sup>,目前种子园多数已经进入第二代阶段。种子园是生产改良种子的重要途径,是育种与育林的桥梁。种子园遗传多样性的丰富程度是所有育种工作者最关心的问题,也是评价一个种子园建园方式是否可取以及管理是否得当的重要指标。近年来,随着分子生物学的高速发展,利用分子标记技术可以在 DNA 水平上直接反映种子园无性系遗传多样性的真实情况,克服外界环境的影响。目前,在松属植物中,RAPD 技术主要应用在马尾松<sup>[4-5]</sup>、红松<sup>[5-6]</sup>等的遗传多样性研究上,而对油松进行遗传多样性的研究相对较少<sup>[8-9]</sup>。该研究采用 RAPD 分子标记技术对油松二代种子园进行了遗传多样性的研究,以期二代种子园的经营与管理提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

于 2011 年 3 月在陕西宝鸡陇县八渡二代油松种子

园选取油松的嫩枝,共取 120 个无性系,每个无性系 1 株,放入冰盒带回实验室于超低温冰箱中保存。

**表 1 试验材料及来源**

无性系群体	样本数	来源地
JP	20	铜川焦平水海子林场
LN	20	洛南巡检林场
HC	15	韩城雷寺庄林场
ND	15	宁东旬阳坝林场
YX	16	耀县柳林林场
GZ	16	黄龙官庄林场
CJ	18	黄龙蔡家川林场
总计	120	

### 1.2 试验地概况

陕西省宝鸡市八渡初代种子园始建于 20 世纪 70 年代,是我国建立的第一批油松种子园之一,陇县八渡二代油松种子园于 1994 年建设完成。地理坐标为北纬 34°33',东经 106°21',海拔约 1 000 m 左右,母岩为砾岩,土壤为褐土,pH 6.5~7.5。该地属暖温带半湿润季风气候区,年均气温 8.6℃,极端高温 35℃,极端低温 -19.9℃,无霜期 184 d,年均降水量 672 mm,雨热同季。

### 1.3 试验方法

**1.3.1 总 DNA 的提取及检测** 采用改进的 CTAB 法提取 DNA:取 -80℃ 保存的油松嫩枝约 0.2 g 在研钵中加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 μL;置于 65℃ 水浴 50 min,其间颠倒混匀数次;加入 800 mL 氯仿-异戊醇混合液(V<sub>氯仿</sub>:V<sub>异戊醇</sub>=24:1),充分摇匀 10 min;在 4℃ 下离心 10 min(12 000 r/min),取上清液 600 mL,置于另一个 2 mL 离心管中;重复上一步操作,取上清液 300 mL,置于另一个 1.5 mL 离心管中,加入 2/3 体积的 -20℃ 冰浴的异丙醇,充分摇匀, -20℃ 下放置 30 min 使 DNA 沉淀成团;用移液枪小心

**第一作者简介:**王虎(1985-),男,在读硕士,现主要从事林木遗传育种和林业生物技术研究工作。E-mail:wanghu605@126.com。

**责任作者:**樊军锋(1963-),男,博士,研究员,现主要从事林木遗传育种工作。

**基金项目:**国家林业公益性科研资助项目(200704039)。

**收稿日期:**2011-11-19

吸取已经成团的 DNA,如不能吸出可用 8 000 r/min 离心 10 min,置于 1.5 mL 离心管中,加入 70%乙醇 500~600 mL,充分洗涤 2 次,充分吹干,沉淀用 100 mL TE 溶解 DNA。置于-20℃冰箱保存。用核酸蛋白检测仪与紫外分光光度波长 260 nm 测定其光吸收值,检测提取到 DNA 的浓度与纯度,0.8%琼脂糖凝胶电泳,EB 染色后,用自动凝胶成像系统观察条带,最后用 TE 将其稀释至 20 ng/ $\mu$ L 的浓度,于 4℃条件下保存备用。

**1.3.2 PCR 扩增** 从上海生物工程有限公司共购买 100 条 10 bp 的随机引物,经过初选与复选,最终确定选取其中能扩增出清晰明亮的谱带且重复性好的 15 个引物用于正式 PCR 扩增,引物名称及序列见表 2。PCR 扩增参考 Williams 等<sup>[10]</sup>方法,扩增反应总体积为 25  $\mu$ L,包括 10 $\times$ PCR buffer(Tris-HCl 200 mmol/L,pH 8.0,KCl 500 mmol/L)2.5  $\mu$ L,MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L) 2.5  $\mu$ L,dNTP (dATP、dCTP、dGTP 和 dTTP 各 2.5 mmol/L)0.5  $\mu$ L,Taq DNA Polymerase (5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L 10  $\mu$ mol/L 随机引物 2.0  $\mu$ L,模板 DNA 40 ng,双蒸水补足。扩增反应程序为 94℃ 2 min,然后进入 38 个 PCR 循环,每个循环为 94℃变性 30 s,37℃ 30 s,72℃ 30 s,最后 72℃ 5 min。扩增反应使用 Bio-Rad S-1000 型 PCR 扩增仪进行。扩增产物检测采用 1.5%的琼脂糖凝胶,以 2 000 bp Marker(分子量 100~2 000 bp)为标准分子量,用 100 V 电压下在 1 $\times$ 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。

#### 1.4 数据分析

根据 RAPD 反应产物在相同凝胶电泳对应位置上条带的有无,有带记为“1”,无带记为“0”,将电泳结果转化为一个二元矩阵,得到 RAPD 分析的原始数据。使用 POPGEN 1.32 软件计算该二代种子园多态位点百分率、Shannon 指数和 Nei 指数用以估算基因多样性,根据基因频率矩阵,使用 POPGEN 3.2 软件和 NTSYS-PC 2.0 软件计算遗传距离并用 UPGMA 法(Unweighted pair group method using arithmetic average,非加权配对算术平均法)进行聚类分析,构建聚类关系图。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 引物序号及扩增结果

从上海生物工程有限公司共购买 100 条 10 bp 的随机引物,经过初选与复选,最终确定选取其中能扩增出清晰明亮的谱带且重复性好的 15 个引物用于正式 PCR 扩增,引物名称及序列见表 2。利用筛选后得到的 15 条有稳定的多态以及带型清晰的引物对 120 个单株样品进行 RAPD 扩增,共扩增得到 201 条稳定条带,其中多态性条带为 152 条,占总扩增条带数的 75.62%,显示了油松无性系间丰富的遗传多样性和复杂性。不同引物扩增的片段数目不等,扩增条带数最少的引物为 S19,只

有 11 条;而扩增条带数最多的引物为 S193,数量为 16 条。每个引物扩增位点数为 11~16,平均每条引物扩增的位点数为 13.4 个,扩增片段 DNA 长度在 200~2 000 bp。图 1 为引物 S19 对部分单株的扩增结果。

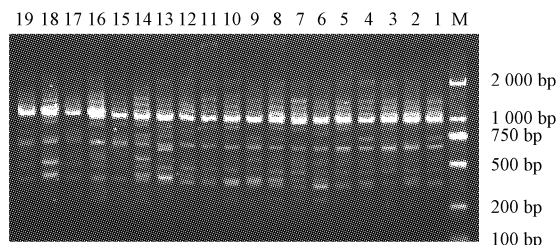


图 1 引物 S19 对部分模板扩增结果

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/%
S03	CATCCCCCTG	14	11	78.57
S19	ACCCCCGAAG	11	7	63.64
S20	GGACCCCTTAC	12	10	83.33
S46	ACCTGAACGG	13	12	92.31
S50	GGTCTACACC	12	8	66.67
S52	CACCGTATCC	13	11	84.62
S91	TGCCCGTCGT	12	8	66.67
S193	GTCGTTCTCTG	16	13	81.25
S243	CTATGCCGAC	14	9	64.29
S248	GGCGAAGGTT	15	12	80.00
S283	ACAGCCTGCT	14	11	78.57
S299	TGAGGGTCCC	15	12	80.00
S384	GACTGCACAC	12	10	83.33
S485	CCGCGTCTTG	15	13	86.67
S499	CCCCCTATCA	13	8	61.54
总数 Total		201	152	75.62

### 2.2 二代油松种子园无性系群体多样性分析

假定种群处于 Hardy-Weinberg 平衡状态下,利用 POPGENE 3.2 软件对 7 个无性系群体 120 个无性系个体进行群体数据遗传多样性分析(表 3),结果表明 Shannon 信息指数(I)为 0.4352,Nei's 基因多样性指数(H)为 0.3721,总的多态位点百分率为 77.11%,其中,7 个无性系群体的 Shannon 信息指数(I)最高为 0.4172,最低为 0.3921;Nei's 基因多样性指数(H)在高为 0.3567,最低为 0.3352;多态位点百分率为 75.23%~70.68%,均说明该二代油松种子园具有较高的遗传多样性。

表 3 无性系群体遗传多样性分析

无性系群体	样本数	多态位点	多态位点(P)/%	Nei's 基因多样性指数(H)	Shannon 信息指数(I)
焦平水海子(JP)	20	117	73.27	0.3375	0.4064
洛南巡检(LN)	20	123	75.87	0.3498	0.4203
韩城雷寺庄(HC)	15	114	70.68	0.3252	0.3921
宁东旬阳坝(ND)	15	116	72.62	0.3344	0.4028
耀县柳林(YX)	16	119	74.57	0.3436	0.4109
黄龙官庄(GZ)	16	120	75.23	0.3467	0.4132
黄龙蔡家川(CJ)	18	118	73.92	0.3406	0.4101
总计	120	152	75.62	0.3821	0.4352

### 2.3 基于 RAPD 标记的聚类分析

遗传相似系数能够反映群体亲缘关系的远近,相似系数越接近 1 时,亲缘关系越近,反之就越远。由表 4 可知,各群体之间的遗传相似系数为 0.8030~0.9215,其中宁东旬阳坝(ND)与洛南巡检(LN)之间最高为 0.9215。遗传距离最小的为宁东旬阳坝(ND)与洛南巡检(LN)(0.0817),遗传距离最大的耀县柳林(YX)与南巡检(LN)(0.2194)。

表 4 遗传距离和遗传一致度

群体	焦平水 海子 (JP)	洛南 巡检 (LN)	韩城雷 寺庄 (HC)	宁东旬 阳坝 (ND)	耀县 柳林 (YX)	黄龙 官庄 (GZ)	黄龙蔡 家川 (CJ)
焦平水海子(JP)	***	0.8050	0.8763	0.8606	0.8893	0.8483	0.8115
洛南巡检(LN)	0.2169	***	0.8305	0.9215	0.8030	0.8305	0.8455
韩城雷寺庄(HC)	0.1173	0.1858	***	0.8533	0.8544	0.8389	0.8293
宁东旬阳坝(ND)	0.1502	0.0817	0.1586	***	0.8345	0.8286	0.8304
耀县柳林(YX)	0.1173	0.2194	0.1574	0.1809	***	0.8413	0.8303
黄龙官庄(GZ)	0.1646	0.2003	0.1757	0.1910	0.1728	***	0.9017
黄龙蔡家川(CJ)	0.2089	0.1678	0.1872	0.1858	0.1860	0.1035	***

注:对角线下方为遗传距离,对角线上方为遗传相似系数。

根据 Nei's 遗传距离利用 NTSYS-PC2.0 软件构建的种源区遗传关系 UPGMA 聚类图见图 2。当在遗传距离为 0.15 处可将供试材料聚为 3 类,焦平水海子(JP)、耀县柳林(YX)与韩城雷寺庄(HC)聚为一类;黄龙蔡家川(CJ)与黄龙官庄(GZ)聚为一类;宁东旬阳坝(ND)与洛南巡检(LN)聚为一类。说明相近地区的油松居群之间遗传距离大小与地理位置呈正相关,不同地区的居群之间存在着一定的遗传分化和地理隔离。

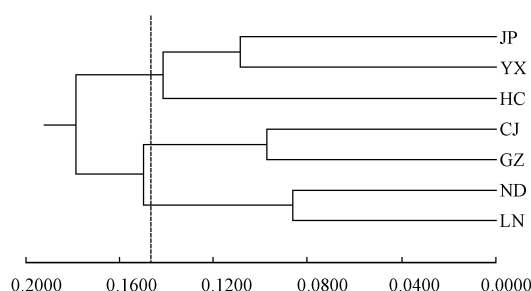


图 2 油松种群的 UPGMA 聚类图

### 3 结论与讨论

该研究利用 RAPD 分子标记技术对二代油松种子园的遗传多样性进行了研究分析,从 100 条 10 bp 的随机引物筛选出的 15 个引物共检测到 201 条带,其中多态性带 152 个,DNA 片段大小范围在 200~2 000 bp,总多态位点比率为 75.62%,充分说明了该油松种子园无性系之间具遗传背景的复杂性和多样性;该二代油松种子

园 Shannon 信息指数为 0.4352(I),Nei's 基因多样性指数(H)为 0.3821 说明该二代油松种子园具有很高的遗传多样性。当在遗传距离为 0.15 处可将供试材料聚为 3 类,焦平水海子(JP)、耀县柳林(YX)与韩城雷寺庄(HC)聚为一类;黄龙蔡家川(CJ)与黄龙官庄(GZ)聚为一类;宁东旬阳坝(ND)与洛南巡检(LN)聚为一类。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。该建园方式没有因为建园材料的优中选优使得遗传多样性降低,说明此种建园方式,能够为以后的种子园建园提供参考。

该研究结果同时也验证了 Wheeler 等<sup>[12]</sup>的观点,育种学家们不需要担心种子园由于群体数量有限可能导致遗传多样性较天然种群低的问题。因此,在建立种子园时,无性系的选择是关键所在,在着重表型性状选择的同时全面地收集基因资源也是尤为重要的,并且做到最大限度地从更多个种源选育无性系,这样就避免低频率等位基因的丢失,还可以保持较高的遗传多样性水平。

### 参考文献

- [1] 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.
- [2] 樊军锋,杨培华,郭树杰,等. 陕西油松遗传改良研究进展[J]. 西北农林科技大学报(自然科学版),2006(1):45-50.
- [3] 杨玉洁,张冬林,杨模华,等. 湖南桂阳马尾松种子园遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中南林业科技大学学报,2010(3):85-89.
- [4] 万爱华,徐有明,管兰华,等. 马尾松无性系种子园遗传结构的 RAPD 分析[J]. 东北林业大学学报,2008(1):18-19.
- [5] 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(3):1-5.
- [6] 吕建洲,吴隆坤,刘德利,等. 凉水、丰林自然保护区红松居群遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 植物研究,2005(2):192-196.
- [7] 张恒庆,刘德利,金荣一,等. 天然红松遗传多样性在时间尺度上变化的 RAPD 分析[J]. 植物研究,2004(2):204-210.
- [8] 周飞梅,樊军锋,侯万伟. 陕西地区油松天然群体遗传结构的 RAPD 分析[J]. 东北林业大学学报,2008(12):1-3.
- [9] 陈建中,葛水莲,杨明建. 太行山东麓油松种子园遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 北方园艺,2010(7):130-132.
- [10] 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.
- [11] Wright S. Evolution in Mendelian population [J]. Genetics,1931,16:97-159.
- [12] Wheeler N, Jeck C. The use of electrophoretic markers in seed orchard research [J]. New Forests,1992(6):311-328.



# 软枣猕猴桃植株的过氧化物酶同工酶酶谱差异研究

王 宁<sup>1</sup>, 杨玉红<sup>1</sup>, 康宗利<sup>1</sup>, 张春红<sup>2</sup>, 刘长江<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学 生物科学与技术学院, 辽宁 沈阳 110866; 2. 沈阳农业大学 食品学院, 辽宁 沈阳 110866)

**摘 要:**对软枣猕猴桃 7 个样品的过氧化物酶同工酶酶谱的差异进行了分析。结果表明:同工酶标记对软枣猕猴桃幼苗性别鉴定是有帮助的,但还需要继续加深此类研究才能更精确地进行幼苗性别鉴定,并对今后的研究重点和解决办法提出了建议。

**关键词:**软枣猕猴桃;过氧化物酶同工酶;聚丙烯酰胺凝胶电泳;酶谱;幼苗性别鉴定

**中图分类号:**S 663.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0120-03

我国是猕猴桃的主要优势资源国和原产地,野生种群资源丰富<sup>[1]</sup>。猕猴桃维生素 C 含量很高,具有极高的营养价值和药用价值,被称为“水果之王”;需求量正日益增大,具有极高的经济价值。其中,软枣猕猴桃是猕猴桃属中具有重要价值的种类之一,分布于东北、华北、西北及长江流域<sup>[2]</sup>,含有大量的维生素 C、维生素 B 族、氨基酸、类胡萝卜素等<sup>[3]</sup>,它抗虫、抗病害能力强,耐寒能力强,可在-8℃下安全越冬,软枣猕猴桃是猕猴桃品种改良的重要种质资源<sup>[4]</sup>。猕猴桃以产果实为主,雌株经济价值明显要高于雄株,在栽培中合理选择雌雄个

体有助提高经济效益;猕猴桃成熟需要 3~5 a,童期漫长,雌雄异株和幼苗期雌雄无法辨别给猕猴桃的改良和育种带来巨大的困难。因此猕猴桃性别鉴定的研究在生产和遗传育种方面都有重要的意义。

同工酶标记是 20 世纪 60 年代出现的分子标记,其本质是具有同一底物专一性的不同分子形式,同工酶有组织、发育及物种的特异性,反映了编码这些酶的等位基因间的差异<sup>[5]</sup>,由于同工酶是分子水平的指标,是基因差异在表达水平的体现,在一定程度上可以反映出雌雄株间的本质差异,是植物性别鉴定的有效途径之一<sup>[6]</sup>,在猕猴桃性别鉴定中起着重要作用。例如,Hirsch 等<sup>[7]</sup>较早发现中华猕猴桃花芽过氧化物酶同工酶谱带的雄性特有带;晁无疾<sup>[8]</sup>在猕猴桃叶片中过氧化物酶同工酶酶谱上观察到了雄性植株特有的“性酶带”;王姝清等<sup>[9]</sup>对猕猴桃雌雄植株叶片中过氧化物同工酶的电泳分析测定表明,雌雄植株间同工酶酶谱存在明显的差

**第一作者简介:**王宁(1985-),男,在读硕士,现主要从事生物化学与分子生物学研究工作。E-mail:wn101@sina.com。

**责任作者:**康宗利(1973-),男,博士,副教授,现主要从事植物生理与分子生物学研究工作。E-mail:kzlyangyuhong@163.com。

**基金项目:**农业部公益性行业科研专项资助项目(200903013)。

**收稿日期:**2011-10-28

## Genetic Diversity Analysis on Second-generation Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr. by RAPD Markers

WANG HU, FAN Jun-feng, YANG Pei-hua, LIU Yong-hong, LI Hui

(College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

**Abstract:** Genetic diversity and genetic differentiation of Second-generation Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr. were analyzed by using random amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. To better understand their genetic diversity and further utilize them for breeding 120 samples were collected and analyzed using 15 screened RAPD primers. The results showed that the genetic diversity at species level was relatively high. The results showed that a total of 201 markers from 200 to 1 000 bp were generated and 152 of them(75.62%)were polymorphic markers. Shannon information index (I) was 0.4352 and Nei's gene diversity (H) was 0.3821. Using unweighted pair group method with arithmetic average (UPGMA) were classified into 3 groups at level 0.15, result revealed an abundant genetic diversity of Second-generation Seed Orchard of *Pinus tabulaeformis* Carr.

**Key words:** *Pinus tabulaeformis* Carr.; second-generation seed orchard; RAPD; genetic diversities