

文章编号: 1000-5692(2003)01-0023-04

# 黄山松群体遗传多样性分析

唐娟娟<sup>1</sup>, 范义荣<sup>2</sup>, 朱睦元<sup>1</sup>

(1. 浙江大学 生命科学学院, 浙江 杭州 310012; 2. 浙江林学院 园林与艺术学院, 浙江 临安 311300)

**摘要:** 利用 RAPD 分子标记分析了黄山松 10 个家系的遗传多样性。从 206 个随机引物 (组) 中筛选出 17 个引物, 获得 38 个多态位点。Shannon 多样性指数平均为 4.525 1, Shannon 多样性值范围在 0.010 2~0.050 4。家系 (余姚×文石) 遗传多样性水平最高, 其 Shannon 多样性指数为 7.965 8。根据这 38 个多态位点计算遗传距离, 进行聚类分析。在遗传距离 0.42 处可将 10 个家系聚类分成 3 组。图 2 表 3 参 13

**关键词:** 黄山松; 随机扩增多态 DNA; 遗传多样性; 聚类分析

**中图分类号:** S718.46 **文献标识码:** A

遗传多样性研究可以揭示物种或种群的进化历史, 为进一步分析其进化潜力提供重要的资料。黄山松 *Pinus taiwanensis* 为我国特有树种, 呈海岛状不连续分布于我国东南部海拔 700 m 以上的山上, 地理上的隔离与遗传有着密切的关系<sup>[1]</sup>, 是群体研究的好材料。有关黄山松种群数量动态<sup>[2]</sup>、种子园营建<sup>[3]</sup>、飞播造林<sup>[4]</sup>、种苗期酯酶同工酶及核酸代谢<sup>[5]</sup>、种源选择及遗传稳定性<sup>[6]</sup>和遗传参数分析<sup>[7]</sup>等已有较多的报道。童再康和范义荣等<sup>[8]</sup>在黄山松群体谷草转氨酶 (GOT) 水平上进行过遗传变异的初步研究。范义荣等<sup>[9]</sup>探索了黄山松群体酶基因的遗传变异规律。本研究用随机扩增多态 DNA (RAPD) 技术对黄山松群体在 DNA 分子水平上进行遗传多样性分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料来源

采用 10 个黄山松优良家系 (表 1), 其球果采自浙江省天台县种源实验林场 (华顶林场)。

表 1 黄山松家系来源

Table 1 The origins of *Pinus taiwanensis*

| 文中编号 | 杂交亲本编号 (优树所在地)  | 文中编号 | 杂交亲本编号 (优树所在地)  |
|------|-----------------|------|-----------------|
| A    | 11×18 (黄岩×仙居)   | P    | 31×马尾松 (磐黄×马尾松) |
| B    | 17×18 (仙居×仙居)   | Q    | 32×18 (磐黄×仙居)   |
| D    | 17×32 (仙居×磐黄)   | Y    | 41×126 (磐园×文石)  |
| K    | 115×126 (余姚×文石) | Z    | 43×马尾松 (磐园×马尾松) |
| M    | 27×32 (磐黄×磐黄)   | e    | 36×36 (磐安×磐安)   |

收稿日期: 2002-06-12; 修回日期: 2002-09-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100115); 浙江省自然科学基金资助项目 (300255)

作者简介: 唐娟娟 (1975-), 女, 湖北武汉人, 硕士, 从事分子遗传学与基因工程研究。

## 1.2 胚乳 DNA 样品制备

按 Nelson 等<sup>[10]</sup>的方法加以改进。将胚乳组织置于干净研钵中, 加 800  $\mu\text{L}$  提取液 (100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 8.0, 50  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  EDTA pH 8.0, 500  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaCl, 2% SDS, 1%  $\beta$ -巯基乙醇), 充分研磨后倒入 1.5 mL Empdor 管中。于 65  $^{\circ}\text{C}$  水浴 1 h。加入 1/3 提取液体积的 KAc (5  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ), 水浴 2 h。加入等体积的酚:氯仿:异戊醇 (25:24:1), 抽提 2 次。加入 1/10 体积的 NaAc (3  $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , pH 5.2) 及 2.5 倍体积的无水乙醇, -70 $^{\circ}\text{C}$  冷冻 2 h。离心 5 min, 将离心后所得沉淀用 70% 的乙醇洗 2 次, 风干后溶于 200  $\mu\text{L}$  TE 中, 于 -20  $^{\circ}\text{C}$  贮藏。

## 1.3 DNA 扩增

DNA 扩增在 PCR 仪 (Hybaid PCR express thermal cycler) 上进行。20  $\mu\text{L}$  PCR 体系如下: 5~10 ng 模板 DNA, 0.75  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  随机引物 (10 bp), dATP, dTTP, dCTP, dGTP 各为 250  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2  $\mu\text{L}$  10 倍的反应缓冲液 (100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl, 80  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 100  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl pH 9.0, NP-40), 2.5  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 1.5 U Taq DNA 聚合酶。扩增程序为: 94  $^{\circ}\text{C}$  预变性 6 min; 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s, 38  $^{\circ}\text{C}$  退火 40 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 2 min, 35 循环; 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min。本实验用于筛选的引物或引物组合共有 206 个 (或组)。试剂均购自上海 Sangon 公司。

## 1.4 表型多样性水平分析

① Shannon 信息指数为:  $H_o = -\sum P_i \ln P_i$ ,  $P_i$  指某一群体中表现型  $i$  (第  $i$  条谱带) 的频率。② Shannon 多样性值为:  $H = H_o / N$ ,  $N$  为此群体检测到的位点总数。③ 对  $n$  个群体, 其平均表型多样性值为:  $H_{\text{pop}} = 1 / (nH_o)$ 。

## 1.5 遗传距离与聚类分析

任意 2 个个体的遗传差异采用 Nei<sup>[11]</sup> 的方法计算遗传相似度 ( $S$ ) 和遗传距离 ( $D$ ): 遗传相似度  $S_{xy} = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ , 遗传距离  $D_{xy} = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ , 其中  $N_{xy}$  为 2 个样本共有的扩增谱带数,  $N_x$  和  $N_y$  分别为  $x$  和  $y$  样本的总扩增谱带数。

## 2 结果与分析

### 2.1 RAPD 扩增结果

引物筛选后获得 17 个有稳定多态且带型清晰的引物 (组) (表 2)。它们扩增片段的大小在 200~3000 bp 之间, 扩增片段数平均为 9.3 条。17 个引物对 10 个家系 60 个个体进行 PCR 扩增, 检测到 RAPD 总位点数 158 个, 其中多态位点 38 个, 多态位点比例为 24.1%。多态位点平均每引物为 2.2 条。图 1 显示引物 S1425-S21 和 S1459-S43 对部分个体的扩增结果。

表 2 引物名称和序列及其扩增位点数

| 引物名称        | 引物序列 (5'→3')       | 扩增出的总谱带数 | 多态性的谱带数 |
|-------------|--------------------|----------|---------|
| S5          | TGCGCCCTTC         | 9        | 2       |
| S47         | TTGGCACGGG         | 2        | 1       |
| S52         | CACCGTATCC         | 7        | 3       |
| S147        | AGATGCAGCC         | 7        | 2       |
| S283        | ACAGCCTGCT         | 6        | 3       |
| S7-S1427*   | GGTGACGCAB         | 7        | 1       |
| S83-S1427*  | GAGCCCTCCA         | 6        | 1       |
| S134-S1427* | TGCTGCAGGT         | 11       | 1       |
| S246-S1427* | ACCTTTGCGG         | 8        | 1       |
| S248-S1427* | GGCGAAGGTT         | 13       | 1       |
| S249-S1427* | CCACATCGGT         | 11       | 2       |
| S22-S190    | TGCCGAGCTG (S22)   | 14       | 10      |
|             | ACCGTCCAG (S190)   |          |         |
| S48-S246    | GTGTGCCCA (S48)    | 8        | 3       |
|             | ACCTTTGCGG (S246)  |          |         |
| S33-S259    | CAGCACCCAC (S33)   | 10       | 2       |
|             | GTCAGTGGG (S259)   |          |         |
| S21-S1425   | CAGGCCCTTC (S21)   | 13       | 2       |
|             | CTTAGTGGG (S1425)  |          |         |
| S43-S1459   | GTCGCCGTCA (S43)   | 16       | 2       |
|             | CTTGGCACGA (S1459) |          |         |
| S26-S1440   | GGTCCCTGAC (S26)   | 10       | 1       |
|             | ACGGAAGTGG (S1440) |          |         |
| 总和          |                    | 158      | 38      |
| 平均          |                    | 9.3      | 2.2     |

说明: \*S1427 序列为 GTGCCCATG

表 3 黄山松群体表型多样性

Table 3 Phenotypic diversity revealed by 17 RAPD

| 家系 | $H_o$   | $H$     | 家系 | $H_o$    | $H$     |
|----|---------|---------|----|----------|---------|
| A  | 6.624 6 | 0.041 9 | P  | 2.760 5  | 0.017 5 |
| B  | 6.757 5 | 0.042 7 | Q  | 1.619 1  | 0.010 2 |
| D  | 6.751 2 | 0.042 7 | Y  | 2.897 9  | 0.018 3 |
| K  | 7.965 8 | 0.050 4 | Z  | 3.025 5  | 0.019 1 |
| M  | 4.006 5 | 0.025 4 | e  | 2.87 2 5 | 0.018 1 |

## 2.2 遗传多样性

表3示各家系在所有标记位点上的Shannon信息指数( $H_o$ )。10个家系多样度的平均值( $H_{pop}$ )是4.5251。Shannon遗传多样性值 $H$ 范围在0.0102~0.0504。

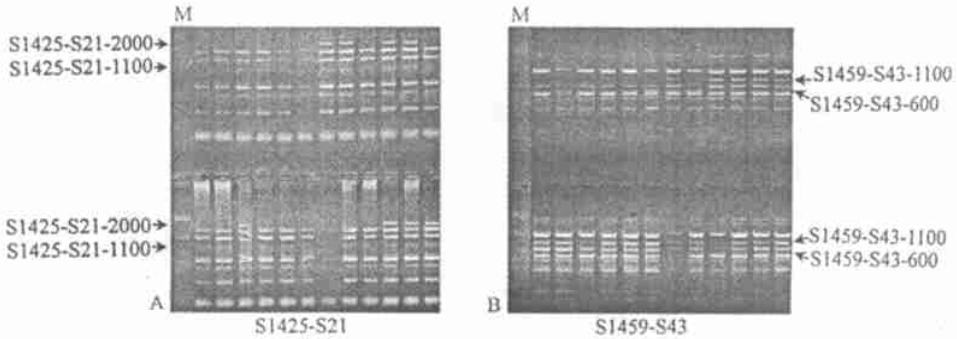


图1 引物S1425-S21 (A) 和S1459-S43 (B) 对黄山松部分个体的RAPD扩增谱带

Figure 1 RAPD profile of S1425-S21 (A) and S1459-S43 (B) on part of individuals

## 2.3 聚类分析

利用10个家系间的遗传距离值,采用了离差平方和法建立了聚类分析图(图2)。从图中可以发现,在遗传距离0.12以下时,各家系都是相互独立的,聚类发生在较大的遗传距离上,以0.42为临界值,可以将10个家系分为3组。亲本地源相近的家系多聚在一起,如M(磐黄×磐黄)与Q(磐黄×仙居),Y(磐园×文石)与Z(磐园×马尾松),A(黄岩×仙居)与B(仙居×仙居)和D(仙居×磐黄)等。完全不同地源的家系也有聚在一起,如K(余姚×文石)与P(磐黄×马尾松)等。

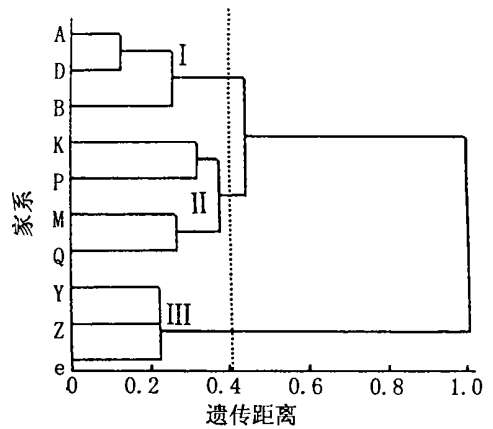


图2 10个黄山松家系间的聚类图

Figure 2 Dendrogram of 10 families of *P. taiwanensis* on RAPD data

## 3 讨论

### 3.1 遗传多样性

物种遗传多样性越高,对环境变化的适应能力就越强,越容易扩展其分布范围和开拓新的环境。群体高水平的遗传变异对保证资源收集的多样性和发展新的品系具有重要意义<sup>[12]</sup>。利用Shannon信息指数( $H_o$ )可以衡量一个群体扩增产物的遗传多样性。 $H_o$ 值愈大则群体的离散性越高,多样性越丰富。本实验结果显示的Shannon信息指数,10个家系中K(余姚×文石) $H_o$ 最高,为7.9658,其多样性较丰富。Shannon遗传多样性值( $H$ )把所测得的座位总数考虑进去,能更客观地反映遗传多样性本质。本实验10个家系 $H$ 值范围在0.0102~0.0504。易能君等<sup>[13]</sup>研究湿地松 *Pinus elliottii* 抗病种子园的遗传多样性时仅取分离的RAPD位点进行分析,其群体 $H$ 范围在0.1095~0.6922;如果本研究只考虑38个分离的RAPD位点,则 $H$ 范围在0.0426~0.2096,比上述湿地松抗病种子园结果偏低一些。本研究所分析的黄山松群体遗传多样性水平不高,但10个家系都是从各天然林经过选择的个体而建立,这些天然林在地理和遗传上有一定的分化,具有一定的遗传基础。

### 3.2 聚类分析

根据不同地区的10个家系建立的聚类分析图,可以将10个家系分为3组。基本反映了亲本地源的关系,相近的家系多聚在一起。由于实验材料均取自浙江省内,松树的风媒授粉使连续地区的群体遗传分化较小,如在更大范围内进行研究,会更准确地了解其遗传变异规律。分子标记提供的遗传变异信息可以辅助制定核心群体收集的策略,以保障育种材料的高水平遗传变异,这对育种群体的长期

经营有重要意义。

本文通讯作者朱睦元, 电话为 0571-88273325, E-mail 为 lsczhumy@mail.hz.zj.cn。

## 参考文献:

- [1] 范义荣, 童再康, 陈科风, 等. 黄山松地理种源性状的变异规律[J]. 浙江林学院学报, 1991, **8** (4): 418-427.
- [2] 吴承祯, 洪伟, 林成来. 黄山松种群数量动态研究[J]. 浙江林学院学报, 1998, **15** (3): 274-279.
- [3] 范义荣, 毛迎春, 方陆明, 等. 黄山松种子园营建技术及初步效果[J]. 浙江林学院学报, 1997, **14** (2): 111-119.
- [4] 史荣金, 陈国富, 吴持平, 等. 马尾松黄山松陈种飞播造林技术研究[J]. 浙江林学院学报, 1992, **9** (2): 170-178.
- [5] 刘世芳, 范义荣, 童再康, 等. 黄山松 5 种源种苗期酯酶同工酶及核酸代谢[J]. 浙江林学院学报, 1993, **10** (4): 378-386.
- [6] 范义荣, 童再康, 余其龙, 等. 黄山松种源选择及遗传稳定性分析[J]. 浙江林学院学报, 1993, **10** (3): 291-196.
- [7] 童再康, 范义荣. 黄山松种群拓广遗传参数的研究[J]. 浙江林学院学报, 1993, **10** (1): 43-48.
- [8] 童再康, 范义荣, 何贤池, 等. 黄山松群体 GOT 同工酶遗传变异的初步研究[J]. 福建林学院学报, 1993, **13** (4): 414-420.
- [9] 范义荣, 毛迎春, 李兰英, 等. 黄山松群体酶基因遗传变异的研究[J]. 东北林业大学学报, 1999, **27** (3): 14-19.
- [10] Nelson C D, Nance W L, Doudrick R L. A partial genetic linkage map of slash pine (*Pinus elliottii* var. *elliottii*) based on random amplified polymorphic DNAs [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, **87**: 145-151.
- [11] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. *Genetics*, 1978, **89**: 583-590.
- [12] 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.
- [13] 易能君, 韩正敏, 尹佟明, 等. 湿地松抗病种子园的遗传多样性分析[J]. 林业科学, 2000, **36** (1): 51-53.

## Analysis of the genetic diversity of *Pinus taiwanensis* populations

TANG Juan-juan<sup>1</sup>, FAN Yi-rong<sup>2</sup>, ZHU Mu-yuan<sup>1</sup>

(1. Faculty of Life Science, Zhejiang University, Hangzhou 310012, Zhejiang, China; 2. Faculty of Landscape Architecture and Art, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China)

**Abstract:** The genetic diversity of 10 *Pinus taiwanensis* families are analyzed by RAPD molecular markers. 17 primers and 38 polymorphic loci are screened from 206 random oligonucleotide primers. The mean Shannon Weveis diversity index is 4.525 1, which ranges within 0.010 2~0.050 4. The genetic diversity level of the family (Yuyao × Wenshi) is the highest and its Shannon Weveis index is 7.965 8. Genetic distance is calculated according to 38 polymorphic loci and clustering analysis is carried out. 10 clustering families can be divided into 3 groups at the point of the genetic distance 0.42.

**Key words:** *Pinus taiwanensis*; random amplified polymorphic DNA (RAPD); genetic diversity; clustering analysis