

火炬松原生种源和引种群体 RAPD 遗传多样性

税 璐¹, 黄少伟², 陈炳铨²

(1 江门市林业科学研究所, 广东 江门 529000; 2 华南农业大学 林学院, 广东 广州 510642)

摘要: 利用 12 个 10 bp 随机引物对火炬松 *Pinus taeda* 19 个原生种源和国内早期引进的 5 个群体进行 RAPD 扩增. 结果表明, 火炬松原生种源和国内引种群体的遗传多样性均十分丰富, RAPD 多态性位点的比率分别为 81.3% 和 99.2%. 原生种源中共检出 18 条特异性谱带, 分属于 13 个种源, 另有 5 个种源存在特异性缺失谱带, 共 10 条, 这些特异性谱带和特异性缺失谱带可作为种源鉴别的重要依据. 根据原生种源特异性谱带在不同国内群体中出现的频率, 推测国内分 3 次引入的群体起源比较一致, 主要集中于来自美国的北卡罗来纳、佛罗里达和密西西比的 4 个种源.

关键词: RAPD; 火炬松; 种源; 群体; 遗传多样性

中图分类号: S722.31

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)03-0074-03

RAPD analysis on the genetic diversity of original provenances and internal populations of *Pinus taeda*

SHUI Jun¹, HUANG Shao-wei², CHEN Bing-quan²

(1 Forest Research Institute of Jiangmen City, Jiangmen 529000, China;

2 College of Forestry, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Twelve 10 bp random primers were used to amplify DNA samples from 19 original provenances and 5 previously introduced populations of loblolly pine (*Pinus taeda* L.). It was found that the levels of genetic diversity were very high for both original provenances and previously introduced populations by means of RAPD polymorphic locus rate, which were 81.3% and 99.2% respectively. Eighteen specific bands were detected from 13 of the original provenances. Ten specific bands were lost in 5 of the original provenances. These specific bands and particularly lost bands can be the important basis in the determination of provenance. Based on the distribution frequency of specific bands from original provenances, it was deduced that, although the internal populations were introduced in 3 times, the sources were relatively consistent. They mainly originated from 4 provenances in North Carolina, Florida and Mississippi of USA.

Key words: RAPD; *Pinus taeda*; provenance; population; genetic diversity

火炬松 *Pinus taeda* 为亚热带速生树种, 是我国引进成功的外国树种之一, 现已成为我国亚热带低山丘陵地区的重要速生丰产树种. 我国 20 世纪 80 年代初开始, 开展火炬松遗传改良工作^[1,2], 在引种栽培、树种对比试验、种源试验、种子园营建、子代测定、材性变异、早期选择、无性繁殖(扦插、组织培养)等方面都开展了大量工作^[3-10]. 在我国, 火炬松虽然经过 70 多年的引种试验^[11], 但早期引种的批量

小, 种子起源不清. 20 世纪 70 年代开始进行大批量引种和大面积生产性造林, 种子起源仍然混杂不清, 这势必制约这些材料在进一步改良中的应用, 在一定程度上限制了育种效益的提高, 为此, 有必要研究火炬松地理种源的遗传多样性, 弄清国内现有火炬松资源与原产地种源的遗传关系. 本研究采用 RAPD 分子标记技术, 从 DNA 水平上测定火炬松不同地理种源的分子遗传差异, 分析国内不同地点的

育种材料与原产地种源的遗传关系, 旨在为引种工作中选择适当的种源和为今后的育种工作提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 样本的采集

参试材料采自英德市火炬松种子园. 包括来自美国的原生种源和国内不同引种区收集的群体 2 类.

原生种源材料从种源试验林中取样, 包括来自美国 8 个州的火炬松各个种源区的 19 个种源, 代号为 RL^[4], 每种源随机取 5 株. 参试的国内群体有 5 个, 分别为安徽马鞍山(代码为 A), 湖北彭场(P), 江西武功山(W), 广东兴宁水口(S)和广东韶关(G), 从种子园生产区的嫁接产种母树中取样. 5 个群体(A、P、W、S、G)的取样数分别为 21, 28, 27, 15, 14 株. 采集植株嫩梢放入封口塑料袋密封, 迅速带回实验室于一 80 ℃超低温冰箱保鲜备用.

1.2 DNA 的提取

DNA 提取程序参照尹俊明等^[12]的改良 SDS 法, 稍作修改. 采用琼脂糖凝胶电泳法测定 DNA 浓度, 然后稀释成质量浓度为 10 ng/ μ L 工作液备用.

1.3 引物筛选

分别从各个国内群体的所有样本 DNA 中取等量混合配成 5 个混合样本(A, P, W, S, G), 从 19 个原生种源中每一种源的一个单株 DNA 中取等量混合配成样本 Z, 以这 6 个混合样本 DNA 为筛选引物的模板. 从 178 条 S 系列引物(上海生物工程公司)中筛选出 12 个引物(表 1)用于所有样本扩增.

1.4 RAPD 扩增反应及产物的鉴定

RAPD 扩增在 AMPLITRON[®] 型扩增仪上进行. 每 15 μ L 反应体积中含 10 ng 的模板、1 $\times$ PCR 缓冲液、1.5 mmol/L 的 MgCl₂、0.2 mmol/L 的 dNTPs、0.75 U Taq 酶(华美生物工程公司)、5 pmol 引物. 扩增程序为 94 ℃预变性 1 min, 然后进入 38 个循环, 每循环包括 94 ℃变性 30 s, 40 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 2 min, 循环完毕 72 ℃延伸 7 min.

采用 12 mg/mL 琼脂糖凝胶分离扩增产物, pBR322 DNA/*Hae* III Markers 和 λ -DNA/*Eco*R I + *Hind* III Markers 作为分子量标准, 溴化乙啶染色, UVI 紫外凝胶分析系统(GAS 7001X 型)拍照并进行谱带分析(UVIBAND/MAP V.99).

1.5 RAPD 扩增产物的分析

RAPD 扩增谱带用“1”代表有, “0”代表无, 强带和重复性好的弱带均赋值为“1”, 对原生种源、国内群体分别进行汇总形成二元数据表, 供统计分析用.

表 1 用于群体扩增的随机引物及其序列

Tab. 1 Random primers and sequences used for amplification

编号 No.	引物 primer	核苷酸序列 nucleotide sequence	(G+C)比例 (G+C) percentage/ %
1	S376	GAGCGTCGAA	60
2	S199	GAGTCAGCAG	60
3	S492	AGTAGGGCAC	60
4	S477	TGACCCGCCT	70
5	S485	CCGCGTCTTG	70
6	S486	GAGCGCCTTG	70
7	S496	AGTGCAGCCA	60
8	S377	CCCAGCTGTG	70
9	S390	TGGGAGATGG	60
10	S193	GTCGTCCTG	60
11	S299	TGAGGGTCCC	70
12	S336	TCCCCATCAC	60

2 结果与分析

2.1 原生种源 RAPD 多态性

对所有样本, 以筛选出的 12 个引物进行 RAPD 扩增, 共检出 255 条谱带, 每个引物的扩增带数为 10~32 条, 平均 21.17 条. 扩增的 DNA 片段长度大约在 200~2 840 bp.

来自 19 个原生种源的 89 个样本中共检出 219 条谱带, 其中多态性谱带 178 条, 多态位点比率为 81.3%.

19 个原生种源中有 13 个种源具有特异性谱带, 数目不等, 共 18 条. RL2 具有 3 条特异性谱带, 分别为 S376-14, S199-8, S477-8; RL5、RL18、RL23 各具有 2 条特异性谱带, 分别为 S390-8 和 S299-9、S477-1 和 S486-20、S486-30 和 S377-16; RL8、RL12、RL14、RL17、RL19、RL25、RL27、RL28、RL30 各具有 1 条特异性谱带, 分别为 S193-7、S377-1、S477-10、S486-24、S390-5、S299-12、S492-1、S199-15、S477-14.

除了存在特异性谱带外, 在 RL19、RL28、RL6、RL22、RL25 这 5 个原生种源中还存在特异性缺失谱带, 共 10 条. RL19 有 5 条特异性缺失谱带, 分别为 S492-2、S492-7、S492-10、S486-1、S486-25; RL28 有 2 条特异性缺失谱带, 分别为 S485-9、S485-14; RL6、RL22 和 RL25 各具有 1 条特异性缺失谱带, 依次为 S193-2、S377-7、S485-19. 这一结果表明, RL19、RL28 种源与其他种源有较大的差异.

2.2 国内群体 RAPD 多态性及其与原生种源的特征谱带关系

2.2.1 国内群体 RAPD 多态性 5 个国内群体 105 个样本共检出 239 条谱带, 其中多态性谱带 237 条,

多态位点比率为 99.2%。239 条谱带除含有原生种源扩增谱带中的 203 条外,还有 36 条原生种源没有的谱带。分子水平的研究表明,火炬松种源间和种源内的遗传结构复杂,遗传多样性相当丰富,这构成了火炬松良种选育的丰厚物质基础。高的多态位点比例也有力的说明了火炬松被广泛的引种栽培、

适应不同的气候与环境的原因。

2.2.2 原生种源特异性谱带在不同国内群体中的表现 13 个原生种源 18 条特异性谱带中有 6 条没有在国内群体中出现,其余 12 条分别在国内群体不同单株图谱中出现,出现频率不一(表 2)。

表 2 原生种源特异性谱带在不同国内群体中出现的谱带频率¹⁾

Tab. 2 Distribution frequency of the specific bands from original provenance in different previously introduced populations

原生种源	特异谱带	A 群	P 群	W 群	G 群	S 群
original provenance	specific bands	population A	population P	population W	population G	population S
RL2	S376-14		0.222 2(2)		0.214 3(3)	0.357 1(1)
	S199-8		0.037 0(4)			
RL5	S390-8		0.074 1(3)			
	S299-9	0.285 7(2)	0.222 2(2)	0.214 3(1)	0.714 3(1)	0.357 1(1)
RL8	S193-7			0.035 7(2)		
RL14	S477-10	0.047 6(5)	0.074 1(3)		0.142 9(4)	0.142 9(2)
RL17	S486-24	0.142 9(3)			0.500 0(2)	
RL23	S486-30	0.095 2(4)		0.035 7(2)	0.071 4(5)	0.071 4(3)
RL25	S299-12	0.523 8(1)	0.370 4(1)			
RL27	S492-1		0.037 0(4)			
RL28	S199-15		0.037 0(4)	0.035 7(2)		
RL30	S477-14	0.142 9(3)				

1) 括号中的数字表示频率的秩序。谱带频率利用汇总的二元数据表,在 NTSYSpc(2.1 版)软件中用 Standardization 功能计算

2.3 国内群体的起源分析

对原生种源特异性谱带在不同国内群体中出现的频率(表 2)进行分析,发现不同的特异性谱带在 5 个群体的分布频率不一,总的来说,只有 4 条特异性谱带(S299-9、S299-12、S376-14 和 S486-24)在国内群体中出现频率较高,其余的谱带出现频率极低。可以推测,5 个群体的起源可能比较一致(表 3),主要引进了 RL5(产地韦奈,北卡罗来纳)、RL25(产地琼斯,密西西比)、RL2(产地盖斯,北卡罗来纳)和 RL17(产地马里恩,佛罗里达)这 4 个原生种源。虽然引种的种批不同(3 次引种),但不同种批引种的范围比较局限,主要集中引进了这 4 个原生种源。RL5、RL25、RL2 和 RL17 这 4 个原生种源的生长较快^[4],说明早期引进的种源是比较优良的。

3 讨论与结论

尤勇等^[13]对杉木种源的 RAPD 分析中,多态位点比率为 78.9%。Khass 等^[14]对白云杉和恩氏云杉的 RAPD 分析中,多态位点分别占总位点的 74%和 70%。相比而言,本研究获得的火炬松原生种源的多态位点比率(81.3%)在松科植物中属高等水平,说明火炬松具有丰富的 DNA 序列多态性。高的多态位点比率也说明了火炬松对环境的适应能力强,这一结果与火炬松分布区域广泛是相一致的。

原生种源间存在的特异性谱带和特异性缺失谱带为从分子水平上鉴别种源提供了重要依据,可作为种源鉴别的有效方法。

起源比较一致的 5 个国内群体,在引种地生态条件的选择压力下,产生了分化,表现优良的个体充

(下转第 81 页)

表 3 国内各群体可能起源的原生种源

Tab. 3 Original provenances from which previously introduced populations probably originated

群体	代号	特异性谱带出现频率最高的原生种源
populations	code	original provenances with the highest distribution frequency of specific bands
安徽马鞍山 Maanshan, AH	A	RL25, RL5
江西武功山 Wugongshan, JX	W	RL5
湖北彭场 Pengchang, HB	P	RL25, RL5, RL2
广东兴宁水口 Shuikou, XN, GD	S	RL5, RL2
广东韶关 Shaoguan, GD	G	RL5, RL17, RL2

3.2.3 加强科学研究,做好就地保护和迁地保护相结合工作,建立种质保护基因库和驯化基地 要拯救和保存野生珍稀濒危植物及其自然群体,必须加大人工育苗、引种、栽培等方面试验研究,建立种源驯化基地.在基地引种驯化、人工繁殖后,再回植于原生地,使其尽快恢复天然分布,以达到挽救濒危种的目的.同时对经济价值较高的珍稀药材如巴戟天等应鼓励药农进行大规模种植.这样,不但能保护和
发展当地珍稀濒危药用植物,而且能促进农业产业结构调整,增加农民经济收入,产生一定的经济效益和社会效益.

致谢: 本文承蒙中山大学生命科学学院博士生导师叶创兴教授惠予指正,谨致谢意!

参考文献:

[1] 罗迎新. 梅州地理[M]. 广州: 广东省地图出版社,

2001. 20—33.
[2] 张金泉. 广东阴那山自然保护区植物及旅游地理[M]. 广州: 广东教育出版社, 1991. 1—107.
[3] 吴志敏, 林 欢, 肖绵韵, 等. 平远县维管植物资源[J]. 华南农业大学学报, 1993, 14(3): 92—98.
[4] 王发国, 叶华谷, 叶育石, 等. 广东省珍稀濒危植物地理分布研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2004, 12(1): 21—28.
[5] 吴修仁. 广东药用植物简编[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 1989. 12—398.
[6] 李镇魁. 广东省药用珍稀濒危植物资源[J]. 中国林副特产, 2001, (1): 61—62.
[7] 曹 岚, 梁 芳, 姚振生. 井冈山野生珍稀濒危药用植物种类及保护[J]. 时珍国医国药, 2000, 11(2): 189—190.

【责任编辑 李晓卉】

(上接第 76 页)

分适应各自引种地,形成了不同群体的遗传差异. 陈炳铨等指出,在国内选择的优树比直接引进的国外优良基因材料生长表现好. 证明直接引进的国外优良基因材料,须经过适应性试验,经过选择才能有效利用,获得可靠的遗传增益(美国引进的 280 个火炬松家系幼林生长表现——《火炬松系统遗传改良研究——II.火炬松改良种子园营建技术研究》,华南农业大学《火炬松系统遗传改良研究》协作组, 1999. 11, 19-23). 从引进的优良种源而营造的生产林分中选择的优树,由于适应各自的引种区域,生长表现优于直接引进的国外优良基因材料,证实引种存在适应性问题. 在以后的火炬松遗传改良中,除继续重视引进国外优良基因资源外,还要充分利用国内已有的材料,使这些资源起到更重要的作用. 直接引进的优良基因资源必须作适应性试验,择优利用.

参考文献:

[1] 钟伟华,何昭珩,周 达,等. 火炬松自由授粉子代测定研究[J]. 林业科学研究, 1994, 7(3): 277—285.
[2] 钟伟华,周 达,何昭珩,等. 149 个火炬松自由授粉家系的生长表现[J]. 华南农业大学学报, 1998, 19(1): 82—87.
[3] 程广秀,邹 宽,王玉谦,等. 火炬松引种试验技术总结[J]. 山东林业科技, 1994, (3): 26—30.
[4] 潘志刚. 湿地松、火炬松种源试验研究[M]. 北京: 科学

技术出版社, 1992. 1—29.
[5] 陈文有,张习耕,陈 志. 湿地松、火炬松与马尾松生长对比试验[J]. 四川林业科技, 1996, 17(2): 48—55.
[6] 钟伟华,谭碧霞,陈炳铨,等. 火炬松种子园营建技术[A]. 沈熙环: 种子园优质高产技术[C]. 北京: 中国林业出版社, 1994. 70—78.
[7] 虞沐奎,赖天碧,徐六一,等. 火炬松材性变异及优良种源选择研究[J]. 江苏林业科技, 2000, 27(1): 7—12.
[8] 黄少伟,钟伟华,李远球. 火炬松自由授粉家系年度生长相关与早期选择研究[J]. 广东林业科技, 2000, 16(4): 1—5.
[9] 来 端. 火炬松、湿地松和马尾松扦插育苗技术[J]. 福建林学院学报, 2001, 21(3): 249—252.
[10] 阙国宁,房建军,葛万川,等. 火炬松、湿地松、晚松组培繁殖的研究[J]. 林业科学研究, 1997, 10(3): 227—232.
[11] 孙光新. 火炬松栽培[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1983. 1—2.
[12] 尹冬明,韩正敏,黄敏仁. 从针叶树营养体组织中提取高纯度 DNA 的方法[J]. 南京林业大学学报, 1998, 22(4): 87—90.
[13] 尤 勇,洪菊生. RAPD 标记在杉木种源遗传变异上的应用[J]. 林业科学, 1998, 34(4): 32—38.
[14] KHASA P D, DANCIC B P. Rapid identification of white-Engelmann species by RAPD markers[J]. Theor Appl Genet, 1996, (92): 465—472.

【责任编辑 李晓卉】