

基于 RAPD 分子标记与表型标记的 柴松分类地位研究

解 庆¹, 刘志红¹, 李周岐^{1*}, 原忠林², 王忠钰²

(1. 西北农林科技大学林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 辽宁省鞍山市千山风景区管委会林业局, 辽宁 鞍山 114045)

摘要: 采用 RAPD 分子标记方法与表型标记的方法对柴松的分类地位进行了研究, 结果表明: 20 条随机引物共扩增出 176 条条带, 其中多态性带为 172 条, 多态性百分率为 97.73%。同时对 24 个形态性状进行了统计分析。对 RAPD 试验结果和形态统计的结果分别采用 UPGMA 法聚类分析, 聚类的结果类似, 认为柴松尚未达到油松变种或近缘种一级的分类水平。

关键词: 柴松; RAPD; 表形标记; 分类地位

中图分类号: S718.46 文献标识码: A

Analysis of the Taxonomical Position of *Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Based on RAPD Markers and Morphological Traits

XIE Qing¹, LIU Zhi-hong¹, LI Zhou-qi¹, YUAN Zhong-lin², WANG Zhong-yu²

(1. College of Forestry, Northwest A&F University, Shaanxi 712100, China;

2. Forestry Bureau of Qianshan Scenic Area, Liaoning 114045, China)

Abstract: In this study, the taxonomical position of *Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsu was estimated on the basis of morphological characters and RAPD data. For RAPD analysis, 20 random primers were selected and 176 bands, within 172 polymorphic bands and a polymorphism rate of 97.73%, were obtained. Twenty four morphological characters data were also recorded. The RAPD and morphological characters data were then respectively analyzed with an unweighted pair-group method using an arithmetic average (UPGMA). The results based on different data are similar and it indicates that the *Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsu has not yet reached a variant or relatives of *Pinus tabulaeformis*.

Key words: *Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsu; RAPD; morphological traits; taxonomical position

柴松 (*Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsu) 为松科 (Pinaceae)、松属 (*Pinus*) 植物, 其仅分布于陕西富县桥北林业局和尚源林场大麦秸沟, 总面积约 337.3 hm²。与油松相比, 柴松具有生长快、树皮光滑、树体高大、树干通直、天然整枝好、材质较软、单株及林分高、径、蓄积生长量均较高等特点, 被誉为黄土高原上的珍贵遗传资源, 国家

林业局“西北地区珍贵树种保护与林业非木质资源高效栽培”项目已将其作为主要保护对象。柴松作为陕北黄土高原天然林中的重要建群种, 对当地森林群落的稳定发展以及生态环境的改善都起着举足轻重的作用, 应积极加以保护并对其进行合理有效的开发利用。

目前有关柴松的研究报道主要包括形态学和分

收稿日期: 2012-11-09

基金项目: 国家自然科学基金“柴松分类地位及其遗传多样性研究”(30972382)

作者简介: 解庆(1983—), 男, 陕西咸阳人, 在读博士, 主要从事林木遗传育种研究。

* 通讯作者: 李周岐(1962—), 男, 陕西凤翔人, 教授, 博士生导师, 林木遗传育种专家。E-mail: Lzhouqi@yahoo.com.cn.

类学^[1-2]、群落学^[2-4]及生态学^[5]等方面。乐天宇先生首次将柴松命名为(*Pinus tabulaeformis* f. *Shekannesis* Yao et Hsü),认为它是油松的变型^[1];朱志诚从生态学角度出发,对柴松的形成进行了分析,认为其属于油松在黄土区的生态型^[2];但在《中国植物志》^[6]、《中国树木志》^[7]、《黄土高原植物志》^[8]及《陕西树木志》^[9]等权威性著作中均无有关柴松的记载。关于柴松的分类地位问题在学术界尚有争议。由于分类地位的不清,严重制约了对这一优良遗传资源的系统研究和有效保护利用。

当前应用于植物分类地位研究的主要方法有表型标记、同工酶标记和分子标记等,有鉴于各种标记在分析植物分类地位时存在各自的优缺点,如表型标记虽然简单易行、可操作性强,但费时、费工且易受外界环境条件的影响;同工酶标记虽然可以弥补表型标记应用上的某些局限性,但其结果受不同组织特异和发育阶段的影响^[10];分子标记的结果不受外界环境条件的影响,准确率较高,但应用成本高,且不同的标记也存在各自的局限性。因此,采用不同的标记综合研究的方法显得尤为重要。本研究采用表型标记和 RAPD 分子标记两种方法对柴松的分类地位进行研究,旨在确定其分类地位,明确其与油松在进化上的关系,从而为制定科学的物种遗传资源保护策略及合理的利用措施提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

根据研究需要,选取柴松、油松、油松的 2 个变种(黑皮油松和扫帚油松)与油松的 2 个近缘种(巴山松和马尾松)各一个较大的自然居群进行采样(表 1)。采样时,从每个居群中随机并兼顾均匀地选取 50 株(扫帚油松仅有 2 株)生长正常的成年个体,株间距 50 m 以上。

表 1 采样情况

物种	采样地	样本量
柴松 <i>P. tabulaeformis</i> f. <i>Shekannesis</i> Yao et Hsü	陕西富县	50
巴山松 <i>P. henryi</i> Mast.	陕西南郑	50
马尾松 <i>P. massoniana</i> Lamb.	陕西洋县	50
油松 <i>P. tabulaeformis</i> Carr.	陕西黄龙	50
扫帚油松 <i>P. tabulaeformis</i> Carr. var. <i>umbraculifera</i> Liou et Wang	辽宁鞍山	2
黑皮油松 <i>P. tabulaeformis</i> var. <i>mukdensis</i> Uyeki	辽宁鞍山	50

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取方法及 RAPD 反应程序 选取柴

松 30 个样株(从上述 50 个样株中随机选取)及油松、黑皮油松、巴山松和马尾松各 30 个样株(从上述 50 个样株中随机选取) 扫帚油松 2 个样株,于春季采集幼嫩针叶各 60~80 针,采用快速、少量提取 DNA^[11]的方法提取基因组 DNA,用于柴松分类地位的 RAPD 分析。

PCR 反应在 PTC-200 型 PCR 仪(美国 MJ Research 公司)上进行。25 μ L 反应体系包括:10 \times Buffer(10 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl, pH8.3; 50 mmol \cdot L⁻¹ KCl) 2.5 μ L, 25 mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 2.5 μ L, 10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP(TaKaRa 公司) 0.5 μ L, Taq 聚合酶(MBI 公司) 2.0 U, 模板 40 ng, 5 μ mol \cdot L⁻¹ 引物(上海生工生物工程有限公司) 1.0 μ L, 用灭菌双蒸水补足 25 μ L。

扩增程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 然后 94 $^{\circ}$ C 变性 20 s; 38 $^{\circ}$ C 退火 1 min; 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 40 个循环; 最后于 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。

在解庆等^[12]的研究基础上选取 50 条 RAPD 引物对 6 个物种中各随机取出的 1 个 DNA 样品共 6 个 DNA 样品进行筛选,选出扩增带型清晰、多态性强、重复性好的引物用于全部基因组 DNA 样品扩增。取扩增产物 10 μ L 在 1.5% (质量分数) 琼脂糖凝胶上, 1 \times TBE 缓冲液中电泳, 稳压电泳 1.5 h 左右, DNA Marker DL2000 做分子量标准, 用凝胶成像仪拍照检测。

1.2.2 表型性状的统计 采用上述 6 个物种的各单株为统计样本。野外调查各样株的树高、胸径、树干中央直径、树皮厚度、枝下高、侧枝直径、针叶长度、针叶宽度、雄球花长度、雄球花直径及球果长度和直径等指标,并采集上述球果室内阴干脱粒后测定各样株的球果干质量、种子干粒质量、种鳞长和宽、种翅长和宽,种子长和宽等指标。选取针叶长、针叶宽、球果长和球果直径、球果干质量、干粒质量、雄球花长与雄球花直径、种鳞长、种鳞宽、种翅长、种翅宽、种子长、种子宽、树干中央直径/胸径、枝下高/树高、树皮厚度/胸径、侧枝直径/胸径、球果长/球果直径、雄球花长/雄球花直径、针叶长/针叶宽、种鳞长/种鳞宽、种翅长/种翅宽和种子长/种子宽共 24 个指标(表 2), 各指标 30 次重复。

1.2.3 数据统计与计算 RAPD 数据统计与计算 RAPD 扩增谱带按有(1)和无(0)记录,根据 Nei 相似系数计算任意两物种间的相似系数 $F = 2NXY / (NX + NY)$, NXY 为物种 X 和 Y 经 RAPD 扩增反应

表 2 主要性状及统计方法

性状	统计方法	性状	统计方法
针叶长	直接测量	球果长	直接测量
针叶宽	直接测量	球果直径	直接测量
针叶长/针叶宽	直接计算	球果长/球果直径	直接计算
种翅长	直接测量	球果干质量	称量
种翅宽	直接测量	种鳞长	直接测量
种翅长/种翅宽	直接计算	种鳞宽	直接测量
种子长	直接测量	种鳞长/种鳞宽	直接计算
种子宽	直接测量	雄球花长	直接测量
种子长/种子宽	直接计算	雄球花直径	直接测量
千粒质量	称量	雄球花长/雄球花直径	直接计算
枝下高/树高	测量后计算	侧枝直径/胸径	测量后计算
树干中央直径/胸径	测量后计算	树皮厚度/胸径	测量后计算

分子量相同的谱带总和, NX 、 NY 分别代表物种 X 、 Y 经 RAPD 扩增反应的谱带总数, 遗传距离 $GD = 1 - F$ 再根据遗传距离利用 UPGMA 法构建遗传聚类图, 计算运用 Popgen32 软件进行^[13-14]。

形态数据统计与计算 运用 SPSS 17.0 软件, 采用欧氏距离系数 (Square euclidean distance) 和离差平方和法 (Ward's method) 作 Q 聚类, 分析各物种间的表型性状相似程度, 从而考量各物种间的亲缘关系远近。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果与 UPMGA 聚类结果

从 50 条引物中筛选出多态性好、稳定性高的 20 条引物作为柴松分类地位分析的 RAPD 引物 (表 3)。利用这 20 条 RAPD 引物对所有样品基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 176 条带, 其中多态性带为 172 条, 多态性百分率为 97.73%。引物与基因组 DNA 随机结合, 最多扩增出 13 条带, 最少有 6 条带, 图 1 为引物 S11 和 S19 对部分样品 DNA 的扩增图片。

根据扩增结果计算出了柴松及其近缘种或变种共计 6 个物种间的遗传相似系数 (见表 4), 并构建树状聚类图 (图 2)。遗传相似系数的变幅从 0.024 到 0.211, 平均 0.104; 2 个变种黑皮油松与扫帚油松与油松的遗传相似系数分别为 0.036 和 0.077, 平均为 0.057; 2 个近缘种巴山松与马尾松与油松的遗传相似系数分别为 0.069 和 0.178, 平均为 0.124; 柴松与油松的遗传相似系数为 0.024, 说明柴松与油松的亲缘关系较 2 个变种和 2 个近缘种与油松的亲缘关系近, 未达到油松的变种或近缘种的范畴。

表 3 RAPD 引物序列

引物	引物碱基序列 (5'-3')	位点总数	多态性位点 点数	多态性位点 比例 /%
S11	GTAGACCCGT	11	11	100
S19	ACCCCGAAG	8	8	100
S29	GGTAACGCC	6	6	100
S36	AGCCAGCGAA	11	10	90.91
S37	GACCGCTTGT	9	8	88.89
S52	CACCGTATCC	9	9	100
S66	GAACGGACTC	13	13	100
S67	GTCCCGACGA	10	10	100
S73	AAGCCTCGTC	8	8	100
S88	TCACGTCCAC	6	6	100
S91	TGCCCGTCGT	6	6	100
S101	GGTCCGAGAA	7	7	100
S237	ACCGGCTTGT	10	9	90
S249	CCACATCGGT	6	6	100
S297	GACGTGGTGA	11	11	100
S332	TCAACGGGAC	9	8	88.89
S341	CCCGGCATAA	10	10	100
S356	CTGCTTAGGG	9	9	100
S418	CACCATCCCT	8	8	100
S471	AACCGTCGG	9	9	100

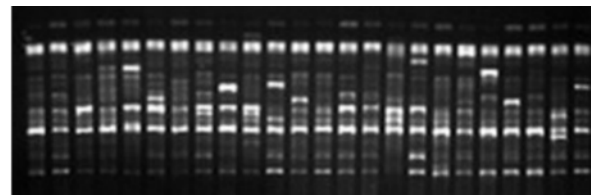


图 1 RAPD S11 引物扩增产生的条带

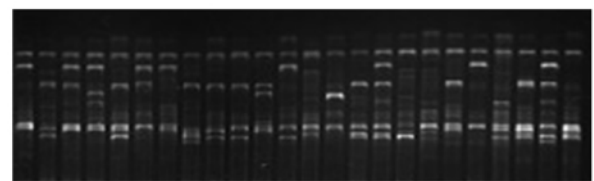


图 2 RAPD S19 引物扩增产生的条带

表 4 Nei's 遗传距离系数

物种	柴松	油松	马尾松	巴山松	黑皮油松	扫帚油松
柴松	***	0.976	0.837	0.933	0.965	0.926
油松	0.024	***	0.831	0.922	0.953	0.913
马尾松	0.178	0.186	***	0.864	0.826	0.810
巴山松	0.069	0.081	0.146	***	0.942	0.902
黑皮油松	0.036	0.049	0.192	0.059	***	0.948
扫帚油松	0.077	0.091	0.211	0.103	0.054	***

从聚类图可以看出, 柴松首先与油松聚成一类, 其他 4 个物种依次与之相聚, 顺序为黑皮油松、巴山

松、扫帚油松和马尾松。此结果基本与传统经典形态分类观点相一致,即油松的2个变种黑皮油松和扫帚油松首先与之相聚,2个近缘种巴山松与马尾松再与之相聚。6个物种间的遗传相似系数同聚类结果表明,柴松未达到油松的变种或近缘种的范畴,其只是油松在黄土高原区的一个生态型,与朱志诚的研究结果相一致。

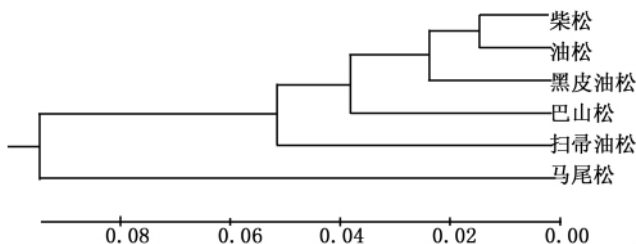


图3 柴松及其近缘种或变种的聚类分析

2.2 形态数据分析结果

表型数据计算出的各物种间的相似性矩阵见表5,从表5可以看出6个物种间欧氏距离的平方的变幅从19.761到92.705,平均44.807。2个变种黑皮油松与扫帚油松与油松之间的欧氏距离的平方分别为24.749和66.332,平均为45.541。

2个近缘种巴山松与马尾松与油松之间的欧氏距离的平方分别为53.331和92.705,平均为73.018;柴松与油松之间的欧氏距离的平方为25.651,表明柴松与油松之间的欧氏距离近于2个变种和近缘种与油松之间的欧氏距离,说明柴松未达到油松的变种或近缘种的层面。

表5 相似性矩阵

物种	欧氏距离系数					
	柴松	黑皮油松	扫帚油松	巴山松	马尾松	油松
柴松	0.000	20.740	34.960	19.761	53.719	25.651
黑皮油松	20.740	0.000	36.308	50.368	73.415	24.749
扫帚油松	34.960	36.308	0.000	38.556	78.539	66.332
巴山松	19.761	50.368	38.556	0.000	50.868	53.331
马尾松	53.719	73.415	78.539	50.868	0.000	92.705
油松	25.651	24.749	66.332	53.331	92.705	0.000

形态数据聚类结果如图3,从聚类图(图3)可以看出,柴松先与巴山松聚成一类,再与扫帚油松相聚,油松先与黑皮油松聚成一类,再与柴松、巴山松和扫帚油松所聚的一大类相聚,最后与马尾松相聚。此结果与传统经典形态分类观点相差较大,这可能是因为应用欧氏距离聚类分析时未考虑各指标间的相关性所造成的偏差。

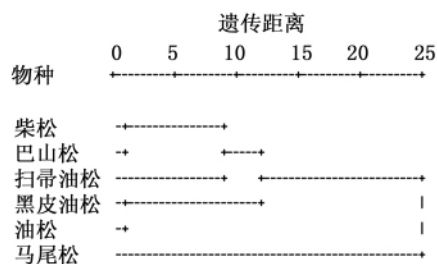


图4 柴松及其近缘种或变种的聚类分析

3 结论与讨论

随着分子标记技术的发展,RAPD技术与其他分子标记技术相比,逐渐显示出了一些缺点,主要是为显性标记、重复性较差、扩增条带有限、可靠性较差,但因为其原理简单、操作容易、成本较低,且是直接揭示DNA水平上的差异,具有一定的可靠性,仍然在植物的种质资源研究方面得到了广泛的应用^[15-16]。在实践中,为提高分析结果的可靠性,可将形态数据的分析与RAPD数据相对照,起到相互验证的作用^[17-18]。该试验即采用这种对照方法,结果表明二者的相似性较高,说明RAPD用于柴松分类地位的研究,具有一定的可靠性。

本研究采用RAPD分析同表型标记分析相结合的方法对柴松的分类地位进行了探讨,两者所得结果相一致,都支持朱志诚^[2]的观点,即柴松尚未达到油松变种或近缘种一级的分类水平,仅是油松在黄土高原区的生态型(Ecotype)。生态型是同种植物对不同环境条件趋异性适应的结果,生态型的分化是新物种形成的开始。

陕北黄土高原南部及其邻近地区(柴松分布区)是油松分布的几何中心,与油松其它的分布区相比较,这里具有深厚的黄土层,充足的降水(年降水量在600~700mm),且属暖温带气候,特别是从基质条件来看,黄土要比各类岩质土对油松的生长发育优越。因而可能由于这些缘故,导致油松在黄土高原发生了相应的变异,这种分析与柴松所表现的大部分特征相一致,例如其针叶翠绿、树皮光滑等,都是相对水热较好的标志;村干通直、枝形平展,这些也都是在相对较好水热条件下,长期处于密度较大的林分中,所形成的一些特点。

参考文献:

- [1] 乐天宇. 陕甘宁盆地植物志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1957: 59

- [2] 朱志诚. 柴松-少脂油松生态型形成的初步分析[J]. 陕西林业科技, 1987(4): 1-2
- [3] 刘政鸿. 黄土高原天然柴松林群落学特性的初步研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1486-1490
- [4] 王凯博, 上官周平. 黄土高原子午岭天然柴松林种群结构与动态研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26(12): 2553-2559
- [5] 韦兰英, 上官周平. 黄土高原子午岭天然柴松林细根垂直分布特征[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2007, 35(7): 69-74
- [6] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第七卷)[M]. 北京: 中国科学出版社, 1978: 251-253
- [7] 郑万钧. 中国树木志(第一卷)[M]. 北京: 中国林业出版社, 1983: 286-289
- [8] 西北植物研究所. 黄土高原植物志(第一卷)[M]. 北京: 中国科学出版社, 2000: 17
- [9] 牛春山. 陕西树木志[M]. 北京: 中国林业出版社, 1990: 20-21
- [10] 许玉兰, 蔡年辉, 康向阳. 云南松种质资源遗传多样性研究概况[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 982-985
- [11] CHEN D H, RONALD P C. A Rapid DNA Minipreparation Method Suitable for AFLP and Other PCR Applications[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17: 53-57
- [12] 解 庆, 刘志红, 李周岐. 柴松遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(4): 112-116
- [13] Angela Rubio Moraga, David Candel Perez, Manuel E LucasBorja, et al. Genetic Diversity of *Pinus nigra* Arn. Populations in Southern Spain and Northern Morocco Revealed By inter-Simple Sequence Repeat Profiles [J]. Int J Mol Sci, 2012, 13: 5645-5658
- [14] 茹广欣, 袁金玲, 张 朵 等. 运用 AFLP 技术分析箬竹种群遗传多样性 [J]. 林业科学研究, 2010, 23(6): 850-855
- [15] Ozkan Aksakal, Serap Sunar, Yusuf Kaya, et al. Genetic Diversity Within and Among *Lepidium draba* Populations from Eastern Anatolia Based on RAPD Analysis [J]. Biochem Genet, 2010, 48: 603-611
- [16] Rathore Mangal Singh, Chikara J, Mastan Shaik G. Assessment of Genetic Stability and Instability of Tissue Culture-Propagated Plantlets of *Aloe vera* L. by RAPD and ISSR Markers [J]. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2011, 165(5): 1356-1365
- [17] Mitrick A, Johns, Paul W, et al. Gene pool classification of common bean landraces from Chile based on RAPD and morphological data [J]. Crop Sci, 1997, 37: 605-613
- [18] Pereira Ana L, Martins Madalena, Margarida Oliveira, et al. Morphological and genetic diversity of the family Azollaceae inferred from vegetative characters and RAPD markers [J]. Plant Systematics and Evolution, 2011, 297(4): 213-226