

野生土坛树种群遗传多样性的 SRAP 分析

陈杰^{1,2}, 韩维栋², 莫定鸣³, 王秀丽⁴

(1. 湛江市森林公园管理处, 广东 湛江 524012; 2. 广东海洋大学农学院, 广东 湛江 524088;
3. 湛江市农业科学研究院, 广东 湛江 524094; 4. 厦门大学环境与生态学院, 广东 厦门 361102)

摘要: 采用 SRAP 分子标记技术, 对我国野生土坛树种群的遗传多样性进行分析。40 对引物对 8 个土坛树种群共 47 个个体的样品 DNA 进行扩增。结果表明: 物种水平上, 多态位点百分率 PPB 为 40.40%, Nei's 基因多样性指数 H 为 0.4027, Shannon's 信息指数 I 为 0.5874; 在种群水平上, 多态位点百分率平均为 32.77%, Nei's 基因多样性指数平均为 0.2992, Shannon's 信息指数平均为 0.4373; 种群内遗传多样性 Hs 为 0.2992, 种群总的遗传多样性 Ht 为 0.4027。基因分化系数 Gst 为 0.2570, 种群间的遗传分化程度较低; 种群间基因流 Nm 为 1.4455。种群间的平均距离为 0.2118。利用 UPGMA 法聚类可将 8 个群体划分为 2 大类, 高桥独立为一群, 其他为一大群; 证明亲缘关系与地理距离存在一定的相关性。47 个材料按 UPGMA 法聚类分析, 结果不与同一种群的个体聚在一起。初步推测土坛树由三墩和琼山一带向四周扩散而来。

关键词: 土坛树; 种群; 遗传多样性; SRAP

中图分类号: Q346+.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-874X(2015)10-0127-06

Population genetic diversity of wild *Alangium salviifolium* detected by SRAP marks

CHEN Jie^{1,2}, HAN Wei-dong², MO Ding-ming³, WANG Xiu-li⁴

(1. Forest Park Management Office of Zhanjiang, Zhanjiang 524012, China; 2. Agricultural College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 3. Agricultural Science Academy of Zhanjiang, Zhanjiang 524094, China; 4. College of Environment & Ecology, Xiamen University, Xiamen 361102, China)

Abstract: The SRAP markers technology was used to analyze the genetic diversity of wild *Alangium salviifolium* populations in this paper. DNA samples of 47 individuals in eight *A. salviifolium* populations were amplified by 40 primers. Analysis showed that PPB (percentage of polymorphic loci) was 40.40%, H (Nei's genetic diversity) was 0.4027, I (Shannon's information index) was 0.5874 at the species level; PPB was 32.77%, H was 0.2992, I was 0.4373 at the population level; Hs was 0.2992, Ht was 0.4027; Gst (Genetic differentiation coefficient) was 0.2570, indicating that the degree of genetic differentiation was low. The gene flow among the populations was 1.4455 and the mean pair-wise genetic distance was 0.2118. The eight groups could be divided into two broad categories by UPGMA method. Gaoqiao group was independence category, and others joined as one category. It proved that there was certainly relationship between their kinships and geographical distances. According to UPGMA clustering analysis, 47 materials did not join together in the same category with individuals of their own population. Preliminary results indicated that *A. salviifolium* spreaded from Sandun and Qiongsan to the surrounding areas.

Key words: *Alangium salviifolium*; population; genetic diversity; SRAP

土坛树 [*Alangium salviifolium* (Linn. f.) Wanger.] 为八角枫科八角枫属的落叶乔木或灌木,

又名割舌罗, 主要分布于广东西南部、广西南部沿海地区及海南省^[1-3]。土坛树适应性强、耐贫瘠、耐盐碱、耐高温高湿, 且产果量大, 是典型的高蛋白、高纤维、低脂肪果实, 其叶、根、花和果都有一定的药用价值, 根皮可作呕吐剂和解毒剂, 花中提取的甲醇提取物对革兰氏阳性和革兰氏阴性细菌有很好的抗菌活性等^[4]。目前对土坛树的研究主要在果实营养及药用特性方面^[4-5], 土坛树种群多样性方面尚未见报道。遗传多样性是生物多样性的核心, 物种的稳定

收稿日期: 2015-01-02

基金项目: 国家自然科学基金 (31170511)

作者简介: 陈杰 (1990-), 男, 硕士, E-mail: 812242515@qq.com

通讯作者: 韩维栋 (1963-), 男, 博士, 教授, E-mail: 859730249@qq.com

性和进化潜力依赖于遗传多样性,种群遗传多样性水平在一定程度上制约其对环境的适应能力,从而可预测这个种群的发展趋势^[6]。因SRAP分子标记具有技术简便、快速,引物设计简单、多态性和信息量丰富的特点,被广泛应用于生物遗传多样性分析、种质鉴定、遗传连锁图的构建和比较基因组学等方面^[7]。本研究采用了SRAP分子标记分析我国野生土坛树的遗传多样性,可加强土坛树资源的收集、保存与利用,对增加其遗传多样性有重大意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试土坛树采自湛江和海南地区8个自然种群,因调查发现土坛树在低海拔地区呈零星分布,未见成片,因此每个种群采样数不一样,湛江5个种群采样数分别为:高桥4个、下桥4个、三墩5个、硇洲7个、湖光9个;海南3个种群采样数分别为:琼山7个、永兴6个、三亚5个;种群内采集样品应相邻植株间大于30 m。采集幼嫩叶片放于保鲜袋中后装于冰盒中,带回实验室于-70℃冰箱保存。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA的提取及检测

DNA的提取参照陈

昆松等^[8]的CTAB法并进行改良,将氯仿:异戊醇=24:1换成酚:氯仿:异戊醇=25:24:1,所提取的DNA用1%的琼脂糖凝胶电泳检测,并将浓度稀释成10 ng/μL,-20℃冰柜保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR体系及扩增程序 20 μL反应体系包括2.0 μL 10×buffer、0.2 μL 10 mmol/L的dNTPs、1.6 μL 2.5 mmol/L的MgCl₂、引物和模板DNA各20 ng、1.0 U *Taq* DNA聚合酶和灭菌ddH₂O(试剂均购于上海生工生物工程股份有限公司)。在2720 Thermal Cycler PCR仪上进行扩增,扩增程序为94℃预变性5 min;94℃变性1 min,35℃复性1 min,72℃延伸1 min,5个循环;94℃变性1 min,50℃复性1 min,72℃延伸1 min,35个循环;最后72℃延伸10 min,25℃保存。PCR产物用6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测。引物上游下游各19条(表1),由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2.3 数据统计分析 以47个土坛树材料的SRAP电泳图谱中DNA谱带为统计对象,有清晰的条带记为“1”,无条带记为“0”,统计出土坛树的原始0,1矩阵图。矩阵图经PopGen32软件进行分析,计算出种群遗传学相关参数,观察等位基因数

表1 SRAP引物序列及其解链温度

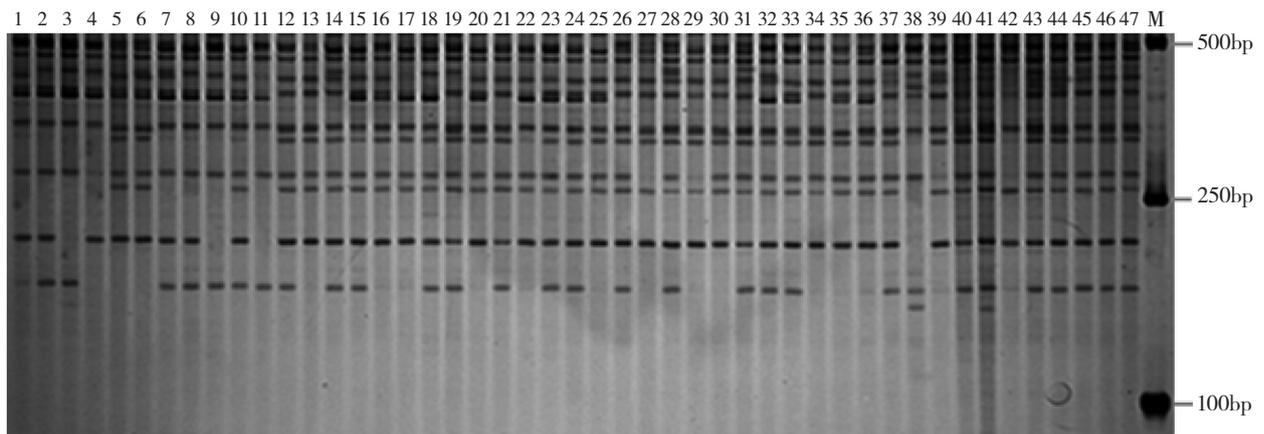
上游引物序列 (5' -3')	退火温度 (℃)	下游引物序列 (5' -3')	退火温度 (℃)
Me1: TGAGTCCAAACCGGATA	52.18	Em1: GACTGCGTACGAATTAAT	50.47
Me2: TGAGTCCAAACCGGAGC	57.01	Em2: GACTGCGTACGAATTTGC	55.02
Me3: TGAGTCCAAACCGGAAT	52.18	Em3: GACTGCGTACGAATTGAC	55.02
Me4: TGAGTCCAAACCGGACC	57.01	Em4: GACTGCGTACGAATTTGA	52.74
Me5: TGAGTCCAAACCGGAAG	54.59	Em5: GACTGCGTACGAATTAAC	52.74
Me6: TGAGTCCAAACCGGACA	54.59	Em6: GACTGCGTACGAATTGCA	55.02
Me7: TGAGTCCAAACCGGACG	57.01	Em7: GACTGCGTACGAATTCAA	52.74
Me8: TGAGTCCAAACCGGACT	54.59	Em8: GACTGCGTACGAATTGAG	55.02
Me9: TGAGTCCAAACCGGAGG	57.01	Em9: GACTGCGTACGAATTTAG	52.74
Me10: TGAGTCCAAACCGGAAA	52.18	Em10: GACTGCGTACGAATTCAT	52.74
Me11: TGAGTCCAAACCGGAAC	54.59	Em11: GACTGCGTACGAATTCTA	52.74
Me12: TGAGTCCAAACCGGAGA	54.59	Em12: GACTGCGTACGAATTTCTC	55.02
Me13: TGAGTCCAAACCGGAAG	54.59	Em13: GACTGCGTACGAATTTCTG	55.02
Me14: TGAGTCCAAACCGGTAG	54.59	Em14: GACTGCGTACGAATTTCTT	52.74
Me15: TGAGTCCAAACCGGCAT	54.59	Em15: GACTGCGTACGAATTTGAT	52.74
Me16: TGAGTCCAAACCGGTCT	54.59	Em16: GACTGCGTACGAATTTGTC	55.02
Me17: TGAGTCCAAACCGGTAA	52.18	Em17: GACTGCGTACGAATTTCCA	55.02
Me18: TGAGTCCAAACCGGTCC	57.01	Em18: GACTGCGTACGAATTTCCA	55.02
Me19: TGAGTCCAAACCGGTGC	57.01	Em19: GACTGCGTACGAATTTCTT	55.02

(observed number of alleles, Na)、有效等位基因数 (effective number of alleles, Ne)、多态位点百分率 (percentage of polymorphic bands, PPB)、Nei's 基因多样性指数 (nei's gene diversity, H)、Shannon's 信息指数 (shannon's information index, I)、遗传距离 (genetic distance, D)、Nei's 的总的遗传多样性 (nei's total gene diversity, Ht)、种群内的遗传多样性 (subpopulation of gene diversity, Hs)、基因分化系数 (coefficient of gene differentiation, Gst) 和基因流 (gene flow, Nm)。采用 NTSYSpc2.2 软件对 47 个材料进行数据统计, 按 UPGMA 法对 8 个种群进行聚类分析, 得到树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 8 个土坛树种群的 SRAP-PCR 扩增结果

筛选出可对 47 个土坛树材料扩增出清晰条带、重复性好且有多态性的 40 对引物, 共检测到多态性条带 160 条, 占总条带数 (396 条) 的 40.40%, 每个引物平均扩增条带数 9.9 条、多态性条带数 4 条。多态性条带大小主要集中在 100~750 bp。引物 M11E3 扩增条带数 12 条, 多态性条带数 6 条 (图 1)。试验显示 SRAP 多态性一般, 表明野生土坛树种群遗传多样性不高, 或 SRAP 分子标记不是用来研究土坛树种群遗传多样性最好的分子标记。



样品来源 1~4: 高桥; 5~8: 下桥; 9~13: 三墩; 14~20: 琼山; 21~26: 永兴; 27~31: 三亚; 32~38: 硃洲; 38~47: 湖光; M: mark
图 1 引物 M11E3 的 PCR 扩增结果

2.2 土坛树的遗传多样性参数分析

矩阵图经 PopGen32 软件分析, 得到 8 个土坛树的遗传多样性指数 (表 2)。在种群水平上, 8 个种群的 PPB 为 24.24%~36.87%、平均 32.77%, 高桥种群最

低、硃洲种群和湖光种群最高; H 为 0.2210~0.3457、平均 0.2992, I 为 0.3169~0.5039、平均 0.4373。在物种水平上, PPB 为 40.40%, H 为 0.4027, I 为 0.5874。从 PPB 来看土坛树种群遗传多样性一般。

表 2 土坛树 8 个种群的遗传多样性

种群	观察等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	Nei's 的基因多样性 H	Shannon's 信息指数 I	多态位点百分率 PPB (%)
高桥 GQ	1.5125±0.5030	1.4112±0.4446	0.2210±0.2280	0.3169±0.3207	24.24
下桥 XQ	1.7500±0.4357	1.5299±0.3897	0.2978±0.1962	0.4357±0.2735	31.82
三墩 SD	1.8000±0.4025	1.5292±0.3619	0.3040±0.1829	0.4491±0.2535	34.34
琼山 QS	1.8625±0.3465	1.6172±0.3484	0.3457±0.1718	0.5039±0.2341	35.86
永兴 YX	1.7500±0.4357	1.5503±0.4055	0.3030±0.2037	0.4399±0.2816	30.30
三亚 SY	1.7250±0.4493	1.4838±0.3731	0.2784±0.1948	0.4106±0.2747	31.82
硃洲 NZ	1.8625±0.3465	1.5996±0.3455	0.3390±0.1707	0.4964±0.2325	36.87
湖光 HG	1.8000±0.4025	1.5472±0.3935	0.3047±0.1972	0.4461±0.2693	36.87
种群水平	1.7578±0.4152	1.5336±0.3828	0.2992±0.1932	0.4373±0.2675	32.77
物种水平	1.9425±0.1942	1.7164±0.2544	0.4027±0.1012	0.5874±0.1152	40.40

Nei's 总的遗传多样性 H_t 为 0.4027, 土坛树 8 个种群的遗传分化指数见表 3。从表 3 可以看出, 种群内的遗传多样性 H_s 为 0.2992, 种群间的分化系数 G_{st} 为 0.2570, 说明总群体 25.70% 的遗传变异来自种群间, 74.30% 的遗传变异存在于种群内, 遗传分化主要

表现在种群内。根据 Shannon's 信息指数分析可知, 土坛树总的遗传多样性 I_{sp} 为 0.5874, 种群内遗传多样性 I_{pop} 为 0.4373, 计算出种群间的分化系数 G_{st} 为 0.2555, 基本上与 Nei's 遗传分化系数基本一致。基因流 N_m 为 1.4455 > 1, 说明各种群间的基因交流很高^[9-10]。

表 3 土坛树 8 个种群的遗传分化

遗传多样性	Shannon's 信息指数 I	基因多样性	Nei's 的基因多样性 H
种群内遗传多样性	0.4373	种群内基因多样性	0.2992
物种水平的遗传多样性	0.5874	物种总的基因多样性	0.4027
种群内遗传多样性比率	0.7445	种群内基因多样性比率	0.7430
种群间遗传分化系数	0.2555	种群间遗传分化系数	0.2570
		基因流	1.4455

2.3 土坛树的种群间遗传一致度和遗传距离

采用 PopGen32 软件分析得到 8 个土坛树种群的遗传一致度及遗传距离(表 4)。遗传一致度 J 在 0.7036~0.9581 之间, 平均为 0.8688, 种群间相似程度高; 遗传距离 D 在 0.0428~0.3516 之间, 平均为

0.1125。高桥与三亚种群间的遗传一致度最小且遗传距离最大, 说明它们的亲缘关系最远; 相反湖光与硃洲种群间遗传一致度最大且遗传距离最小, 说明它们的亲缘关系最近; 证明亲缘关系与地理距离存在一定的相关性。

表 4 土坛树 8 个 Nei's 种群遗传一致度和遗传距离

种群	高桥 GQ	下桥 XQ	三墩 SD	琼山 QS	永兴 YX	三亚 SY	硃洲 NZ	湖光 HG
高桥 GQ		0.8787	0.8907	0.8172	0.8085	0.7036	0.7626	0.8015
下桥 XQ	0.1293		0.9475	0.9313	0.8602	0.8310	0.8867	0.8975
三墩 SD	0.1158	0.0539		0.9380	0.8801	0.8667	0.9094	0.8943
琼山 QS	0.2018	0.0712	0.0641		0.9136	0.8736	0.9127	0.8935
永兴 YX	0.2125	0.1506	0.1277	0.0904		0.8446	0.8832	0.8306
三亚 SY	0.3516	0.1851	0.1430	0.1352	0.1688		0.8809	0.8308
硃洲 NZ	0.2710	0.1202	0.0950	0.0914	0.1243	0.1268		0.9581
湖光 HG	0.2212	0.1081	0.1117	0.1127	0.1856	0.1854	0.0428	

注: 对角线以上为种群遗传一致度, 对角线以下为遗传距离。

2.4 土坛树的聚类结果

基于 Nei's 遗传距离, 采用 UPGMA 对土坛树 8 个种群进行聚类。聚类结果(图 3)将 8 个种群分为两大类群: 高桥种群独立为第一类群, 其他聚成第

二大类群; 下桥和三墩聚成一小组, 再与琼山聚在一起, 硃洲和湖光聚成一小组再与前面聚为一组, 然后依次和永兴、三亚聚为第二大组。聚类显示相近地理区域的土坛树种群聚在一起, 如徐闻下桥种群与三墩种群、湖光种群与硃洲种群, 而最北端的高桥种群独自聚为一类, 最南端的三亚种群也最后与另外 6 个种群聚为一大类; 以上说明土坛树的起源进化表现出一定的地域性。

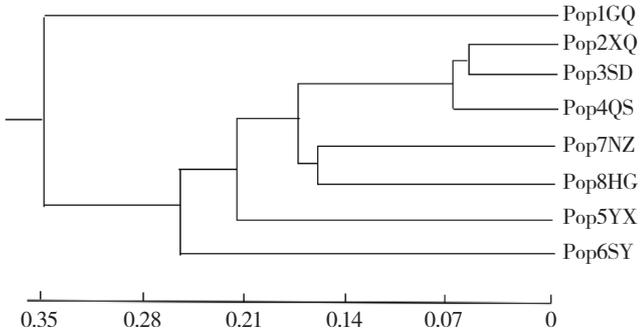


图 3 8 个土坛树种群间 Nei's 遗传距离 UPGMA 聚类结果

采用 NTSYSpc2.2 软件对 47 个材料进行数据统计, 按 UPGMA 法聚类分析, 得到树状聚类图(图 4)。聚类结果主要分为三大类, 下桥的 5 号材料独立聚为一类, 可能是基因突变或实验误差导致的; 三亚的 28、29、30、31 和琼山的 16 号材料聚为一大类,

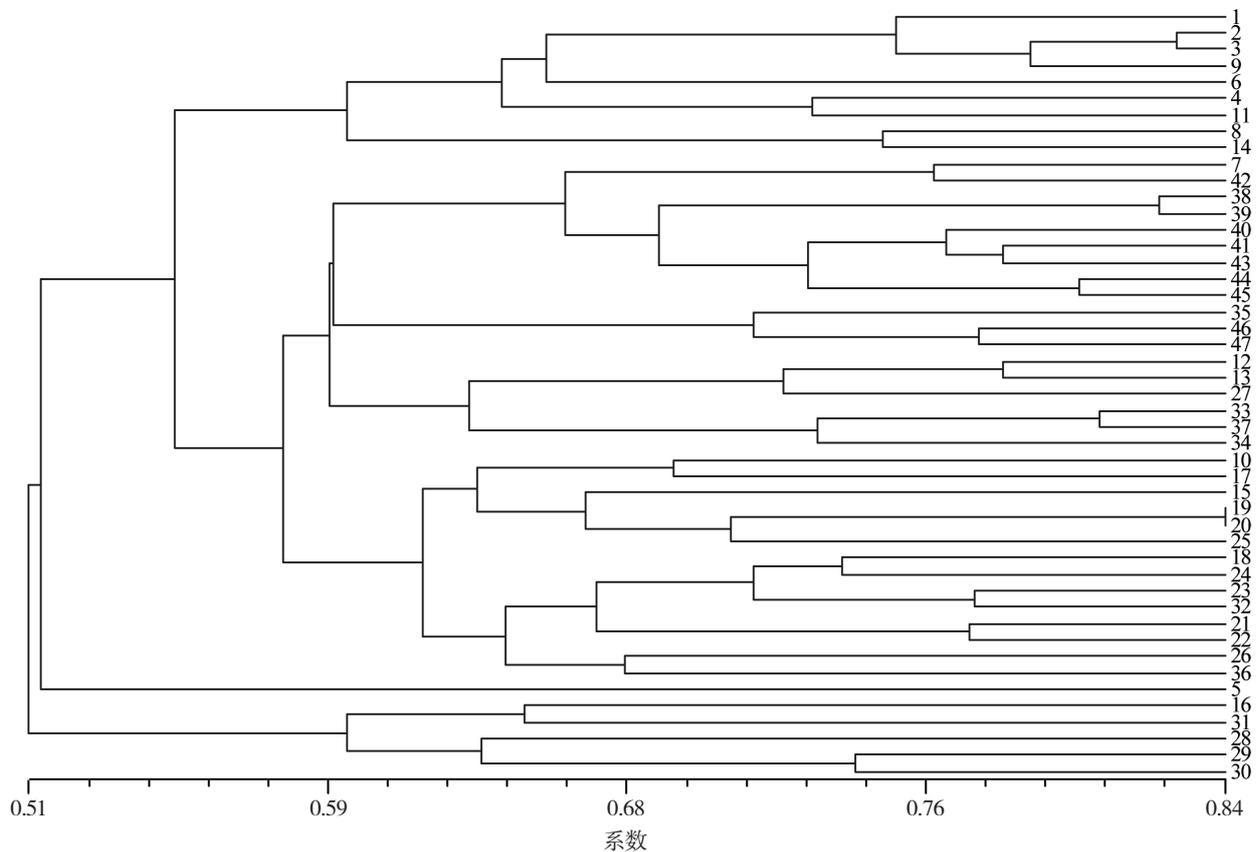


图4 47个土坛树材料的SRAP聚类结果

进一步确定土坛树的起源进化呈现一定的地域性；第三大类包括了8个种群材料，说明土坛树的8个种群相邻之间存在一定的基因交流，第三类中的材料大部分为各种群的材料聚在一起，湖光和硃洲材料聚为一类，琼山和永兴材料聚为一类，三墩的材料则分别与高桥、下桥和琼山、永兴聚在一起，琼山的材料分别与下桥、三墩及永兴、三亚聚在一起。因为到第三纪末期，由于受到喜马拉雅运动的影响，加剧了雷琼断裂的沉降和海水入侵，形成琼州海峡隔离了雷州半岛和海南岛；结合47个材料的聚类分析，可初步推测土坛树是由一个种群扩散而来的。

3 结论与讨论

3.1 土坛树种群遗传多样性

从土坛树的遗传多样性参数分析来看，物种水平上多态位点百分率PPB为40.40%，其遗传多样性一般；但从H和I来看其种群遗传多样性水平较高。Nei's总的遗传多样性和Shannon's信息指数表明土坛树的种群间遗传多样性小于种群内的遗传多样性，其遗传变异大部分来自种群内，遗传分化主要表现在种群内。计算出种群间的分化系数Gst为

0.2555，基本上与Nei's遗传分化系数0.2570基本一致。基因流Nm为1.4455>1，说明各种群间的基因交流很高。土坛树8个种群的遗传一致度很高，平均为0.8688；遗传距离很小，平均为0.1125。高桥与三亚种群间的遗传一致度最小且遗传距离最大，说明它们的亲缘关系最远；相反湖光与硃洲种群间遗传一致度最大且遗传距离最小，说明它们的亲缘关系最近；证明亲缘关系与地理距离存在一定的相关性。

3.2 土坛树的聚类结果

对土坛树种群和各个材料按UPGMA法聚类分析，结果发现土坛树的起源进化表现出了相应的地域性。结合8个种群和47个材料的聚类分析，可初步推测土坛树是由三墩和琼山一带向四周扩散；后经受到喜马拉雅运动的影响，加剧了雷琼断裂的沉降和海水入侵，形成琼州海峡隔离了雷州半岛和海南岛；因土坛树果实可食，可因人类及动物活动进行传播扩散。雷州半岛的土坛树可能由三墩北上到下桥，然后再分散至湖光及高桥，因高桥相对其他7个地方更冷，从而高桥的土坛树为适应相应的寒冷环境经过特殊的遗传进化独立为一类，湖光的土坛树再传入硃洲岛，后可能是地壳运动形成硃洲岛阻碍

了当地的土坛树与外界的土坛树发生基因交流。海南的土坛树可能由琼山一带一直往南生长,直至三亚等地。在不同的环境条件下,各自都经过遗传进化形成了一定的遗传多样性。土坛树遗传多样性一般,也许与所调查的土坛树资源由热带海洋气候地区到北热带海洋气候地区,环境因素相差不是很大有关,符合分布区狭窄的物种遗传多样性水平偏低^[11-12]这一说法。Karron^[13]和 Hamrick 等^[14]认为地理分布范围是决定植物种遗传多样性的主要因素之一,宽分布区的种趋向于具有更高遗传多样性水平,这也证实土坛树遗传多样性水平偏低^[13-14]。

3.3 建议

土坛树是具有经济价值潜力的树种^[4],但一直处于野生或半野生状态下,未被真正重视利用起来。保护好土坛树的野生种质资源,对以后的引种利用、培育、多渠道开发具有重要意义。从本研究来看,我国的土坛树可能是由三墩和琼山地区的土坛树扩散而来,应优先保护;同时因其他地区的土坛树种群产生了一定的遗传分化,且体现了相应的地域性,因此也要重视保护其他地区的土坛树种群。

参考文献:

- [1] 中国科学院华南植物研究所. 广东植物志: 第3卷 [M]. 广州: 广东科技出版社, 1998: 287-288.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第52卷第2分册 [M]. 北京: 科学出版社, 1983: 162.
- [3] 广东省植物研究所. 海南植物志: 第3卷 [M]. 北京: 科学出版社, 1974: 118.
- [4] 陈杰, 韩维栋, 莫定鸣, 等. 野生土坛树资源的利用研究 [J]. 广东林业科技, 2012, 28(6): 77-80.
- [5] 董存柱, 吴清照, 徐汉虹, 等. 海南40种植物甲醇提取物对家蝇的活性筛选 [J]. 江西农业大学学报, 2011, 33(3): 476-481.
- [6] 潘莹, 赵桂仿. 分子水平的遗传多样性及其测量方法 [J]. 西北植物学报, 1998, 18(4): 645-653.
- [7] 徐操, 赵宝华. SRAP分子标记的研究进展及其应用 [J]. 生命科学仪器, 2009(7): 24-27.
- [8] 陈昆松, 李方, 徐昌杰, 等. 改良CTAB法用于多年生植物组织基因组DNA的大量提取 [J]. 遗传, 2004, 26(4): 529-531.
- [9] Wright S. Evolution in Mendelian populations [J]. Genetics, 1931, 16: 97-159.
- [10] Wright S. The genetical structure of populations [J]. Annals of Eugenics, 1951, 15: 323-354.
- [11] Hickey R J, Vincent M A, Guttman S I. Genetic variation in running buffalo clover (*Trifolium stofoniferum*, Fabaceae) [J]. Conservation Biology, 1991, 5(3): 309-316.
- [12] Swensen S M, Allan G J, Howe M, et al. Genetic analysis of the endangered island endemic *Malacothamnus fasciculatus* (Nutt.) Greene var. *Nesioticus* (Rob.) Kearney (Malvaceae) [J]. Conservation Biology, 1995, 9(2): 404-415.
- [13] Karron J D. A comparison of levels of genetic polymorphism and self compatibility in geographically restricted and widespread plant congeners [J]. Evolutionary Ecology, 1987, 1: 47-58.
- [14] Hamrick J L, Godt M J W. Allozyme diversity in plant species [A]. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources [C]. Sunderland: 1990: 43-63

(责任编辑 崔建勋)