

DOI: 10.3969/j.issn.1000-3142.2014.01.004

宋春风, 刘启新, 周义峰, 等. 珊瑚菜居群遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 广西植物, 2014, 34(1): 15–18

Song CF, Liu QX, Zhou YF, et al. Genetic diversity analysis of *Glehnia littoralis* (Apiaceae) revealed by SRAP[J]. *Guihaia*, 2014, 34(1): 15–18

珊瑚菜居群遗传多样性的 SRAP 分析

宋春风, 刘启新*, 周义峰, 吴宝成, 董晓宇

(江苏省中国科学院植物研究所, 南京 210014)

摘要: 利用 SRAP 对伞形科单种属珊瑚菜 7 个野生居群和 1 个栽培居群进行了研究。结果表明: 共筛选出 8 个引物组合, 在珊瑚菜 8 个居群中共扩增出 168 条条带, 其中多态性条带为 118 条, 多态性比率为 70.23%; 平均每对引物扩增的多态性条带为 14.75。各居群之间珊瑚菜遗传相似性系数范围为 0.8306~0.9836, 遗传距离范围为 0.0165~0.1856。聚类分析表明, 以相似性系数大于 0.8 并结合地理分布来看, 所研究的野生珊瑚菜居群可以大体分为 3 类, 辽宁大连的野生居群为一类, 山东威海—山东青岛的居群为一类, 而山东日照—广州深圳之间的为一类。

关键词: 伞形科; 珊瑚菜; SRAP; 居群

中图分类号: Q949.763 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)01-0015-04

Genetic diversity analysis of *Glehnia littoralis* (Apiaceae) revealed by SRAP

SONG Chun-Feng, LIU Qi-Xin*, ZHOU Yi-Feng,
WU Bao-Cheng, DONG Xiao-Yu

(Institute of Botany, Jiangsu Province and the Chinese Academy of Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: Sequence-related amplified polymorphism (SRAP) was used to analyze genetic relationships of eight populations of *Glehnia littoralis* F. Schmidt ex Miquel in China. Among them, seven populations were wild plants and one was cultivar plant. With eight SRAP primer combinations, 168 loci were identified. Among them, 118 were polymorphic and accounted for 70.23% of total amplified loci, showing a high polymorphism. The genetic similarity among these eight populations ranged from 0.8306 to 0.9836 and the genetic diversity was 0.0165–0.1856. Based on the results of cluster and principal coordinate analysis, the eight populations of *G. littoralis* were divided into three groups. The population from Dalian of Liaoning Province was confirmed as Group A, while populations from Shandong Province (excluding Rizhao) were clustered into Group B. Group C comprised populations from Rizhao of Shandong Province to Shenzhen, Guangzhou.

Key words: Apiaceae; *Glehnia littoralis*; SRAP; population

珊瑚菜 (*Glehnia littoralis*) 属于伞形科 (Apiaceae) 单种属珊瑚菜属。珊瑚菜是重要的药用植物, 又称北沙参。在我国主要分布在辽宁、山东、江

苏、浙江、台湾、福建、广东和海南岛沿海岸 (单人骅等, 1992)。由于珊瑚菜具有重要的药用价值、种质资源价值、经济及生态价值, 野生居群不仅受到来自

收稿日期: 2013-07-22 修回日期: 2013-10-31

基金项目: 江苏省中国科学院植物研究所迁地保护实验室项目 (迁 201001); 江苏省农业科技自主创新项目 (CX(11)2053); 江苏省农业科技支撑项目 (BE2012434)。

作者简介: 宋春风 (1979-), 女, 山东成人, 博士, 助理研究员, 主要从事植物系统演化研究, (E-mail) cfsong79@cnbg.net。

*通讯作者: 刘启新, 硕士, 研究员, 从事植物分类学研究, (E-mail) naslxq@yahoo.com.cn。

生境退化甚至丧失的巨大压力,也受到滥采滥挖的严重威胁,居群面积不断缩小,居群数量迅速降低,给居群的繁衍和遗传多样性的维持造成困难,已被列为国家Ⅱ级濒危保护物种(傅立国,1992)。目前对珊瑚菜的研究也有一定基础,但还不够全面和深入,且主要集中在对其栽培和经济价值的研究上(周淑荣等,2008;董芳等,2009,2010;原忠,2009;Xu *et al.*,2010;Li *et al.*,2008),对它的遗传多样性及其保护方面的研究还不够深入,而这正是制定野生居群就地和迁地保护关键技术指标的重要依据。

相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)是一种新的基于 PCR 技术的分子标记,标记简便,结果稳定可靠、多态性好、在基因组分布比较均匀,已广泛应用于种质鉴定、遗传图谱构建和植物遗传多样性分析等各个领域(Riaz *et al.*,2004;Lin *et al.*,2003;Ferriol, *et al.*,2003)。本研究采取相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)的分子标记方法,对来自于国内 8 个居群的珊瑚菜属 80 份个体材料进行遗传多样性分析,以期对珊瑚菜的种质保存和创新提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

珊瑚菜植物 8 个居群的 80 份材料分别采自于深圳、浙江、山东和辽宁等地,每个居群各取 10 个个体,详细采集地点见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 珊瑚菜基因组提取采用改良的 CTAB 法(Stewart *et al.*,1993)。取嫩叶 0.3 g 于液氮中研磨成粉末,研磨过程中加入适量石英砂和 PVP;然后加入 CTAB 裂解缓冲液(2% CTAB,100 mmol·L⁻¹ pH 8.0 Tris-HCl,1.2 mol/L NaCl,10 mmol·L⁻¹ EDTA),65 °C 震荡 1 h;氯仿/异戊醇(24:1)抽提 2 次;用无水乙醇沉淀 DNA,70%乙醇洗涤,DNA 干燥后使用 ddH₂O 溶解,经 0.8%琼脂糖电泳检测后,于-20 °C 保存备用。

1.2.2 SRAP-PCR 及电泳检测 参照齐树杰等(2009),共 12 对引物组合(表 2)。PCR 反应体系为 20 μL,其中 DNA 的量为 80 ng、Mg²⁺ 2.5 mmol·L⁻¹、dNTP 0.25 mmol·L⁻¹、Taq DNA 聚合酶为 1 U、正反向引物浓度均为 0.1 μmol/L。PCR 扩增

程序为 94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s;35 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,5 个循环;94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 1 min,72 °C 延伸 1 min,35 个循环;72 °C 继续延伸 10 min,15 °C 保存。

表 1 材料来源

Table 1 Origin of materials

编号 No.	采集地点 Location	样品数 Sample No.	类型 Type
1	山东威海 Weihai, Shandong	10	野生种 Wild
2	山东日照 Rizhao, Shandong	10	野生种 Wild
3	广州深圳 Shenzhen, Guangzhou	10	野生种 Wild
4	浙江舟山 Zhoushan, Zhejiang	10	野生种 Wild
5	辽宁大连 Dalian, Liaoning	10	野生种 Wild
6	山东莱阳 Laiyang, Shandong	10	栽培种 Cultivar
7	山东青岛仰口 Yangkou, Shandong	10	野生种 Wild
8	山东青岛薛家岛 xuejia island, Shandong	10	野生种 Wild

表 2 试验所用正反向引物(12 对引物)

Table 2 Sequences of forward and reverse primers used in this study

编号 No.	正向引物 Forward primers	编号 No.	反向引物 Reverse primers
Sp1	TGAGTCCAAAC-CGGATA	Ps8	GACTGCGTACCAAT-TCGCC
Sp8	TGAGTCCAAAC-CGGAGG	Ps9	GACTGCGTACCAAT-TCTCA
Sp12	TGAGTCCTTTC-CGGTAA	Ps11	GACTGCGTACCAAT-TATG
		Ps17	GACTGCGTACCAAT-TCCGG

PCR 产物的电泳检测:取扩增产物 5 μL 与等量的 loading buffer 混合后在 8% 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,以 1 × TBE 为缓冲液,用 300 V 的电压电泳约 2 h,银染。数码相机照相、记录。

1.2.3 数据处理与统计分析 根据电泳结果,在聚丙烯酰胺凝胶相同迁移位置上,有条带的标记为“1”,无条带标记为“0”,组成“1,0”矩阵。计算每对引物的多态性位点数和多态性位点百分率,然后采用 POPGENE 1.32 软件计算遗传相似性系数和 Nei'S 遗传距离。利用 NTSYS 2.10e 软件根据遗传相似系数,采用非加权算术平均聚类(UPGMA)方法进行聚类,构建树状图。

2 结果与分析

2.1 引物筛选及多态性分析

从 12 对引物组合中,共筛选出 8 对条带清晰、重复性好、多态性丰富的引物组合(表 3,图 1)。8 个引物组合扩增出的条带数不同,其中 Sp12/Ps8 扩增出的条带数最少为 14 条,Sp1/Ps8 扩增出最多的 26 条带。8 个引物组合共扩增出条带 168 条,其中多态性条带为 118 条,多态性比率为 70.23%;平均每对引物扩增的多态性条带为 14.75。Sp12/Ps17 多态性位点百分率最高,为 84.21%,Sp12/Ps8 多态性位点百分率最低,为 42.86%。由以上结果可知,筛选出的 8 个引物组合可用来分析珊瑚菜的遗传多样性,并能有效区分不同来源的各居群。

表 3 SRAP 引物组合扩增条带多态性统计
Table 3 Polymorphism information of SRAP primer combination

引物组合 Primer combination	总位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点百分率(%) Percentage of polymorphic loci
Sp1/Ps8	26	19	73.08
Sp8/Ps8	23	15	65.22
Sp8/Ps11	22	17	77.27
Sp8/Ps17	25	18	72.00
Sp12/Ps8	14	6	42.86
Sp12/Ps9	20	12	60.00
Sp12/Ps11	19	15	78.95
Sp12/Ps17	19	16	84.21

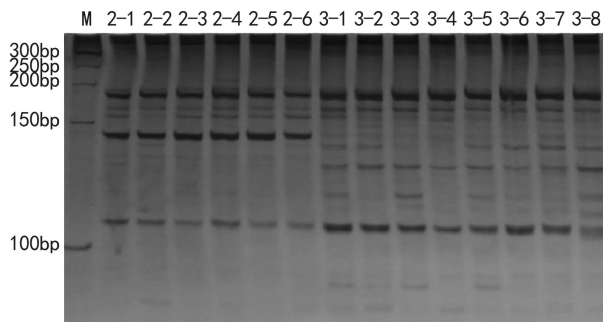


图 1 引物 Sp1/Ps8 组合电泳部分结果 M: Marker; 2-1~2-6: 山东日照居群; 3-1~3-8: 广东深圳居群。

Fig. 1 Electrophoresis of Sp1/Ps8 M: Marker; 2-1-2-6: Population of Rizhao; 3-1-3-8: Population of Shenzhen.

2.2 遗传相似性和遗传距离

根据 8 个居群共 80 个个体,8 对引物组合所得的数据矩阵,计算不同产地的珊瑚菜 8 个居群间的遗传距离和 Nei's 遗传相似系数,结果见表 4。遗

表 4 遗传相似系数(对角线上方)和遗传距离(对角线下方)
Table 4 Nei's genetic identity(above diagonal)
and genetic distance (below diagonal)

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8
1	****	0.894 9	0.966 5	0.963 5	0.937 5	0.982 8	0.967 9	0.983 6
2	0.111 0	****	0.956 1	0.886 6	0.895 4	0.920 6	0.935 1	0.938 3
3	0.034 1	0.044 9	****	0.954 6	0.923 2	0.977 7	0.979 7	0.976 3
4	0.037 2	0.120 3	0.046 4	****	0.830 6	0.966 1	0.936 8	0.964 6
5	0.064 6	0.110 4	0.079 9	0.185 6	****	0.914 8	0.931 8	0.920 9
6	0.017 3	0.082 7	0.022 6	0.034 5	0.089 1	****	0.961 9	0.980 9
7	0.032 6	0.067 1	0.020 5	0.065 3	0.070 6	0.038 8	****	0.980 3
8	0.016 5	0.063 6	0.024 0	0.036 1	0.082 4	0.019 3	0.019 9	****

传相似系数和遗传距离是相反的,相似性越高,遗传距离越小。来自于 8 个不同地方的珊瑚菜遗传相似性系数范围是 0.830 6~0.983 6,遗传距离范围是 0.0165~0.1856。8 个居群之间相似性系数均大于 0.8,说明 8 个不同来源的珊瑚菜居群之间的相似性还是比较高的,它们之间的遗传距离较小。其中来自山东莱阳的栽培居群和来自山东日照,辽宁大连的亲缘关系较远。而和来自山东威海和山东青岛的居群关系较近。这说明山东莱阳的栽培品种,可能是由来自于山东威海或山东青岛的野生居群的栽培驯化选育而成的。而山东日照,浙江舟山和广州深圳三居群之间的相似性系数也比较高,这说明这三个居群之间的亲缘关系较近。其中遗传距离最大的为 0.1856,是浙江舟山的居群和辽宁大连的居群,这表明这两个居群的亲缘关系最远,这与两个居群在地理位置上相隔较远是一致的。

2.3 聚类分析

根据遗传相似系数,采用 UPGMA 法进行聚类,得到珊瑚菜属 8 个居群的聚类图(图 2)。聚类图可分为两个大支,辽宁大连的为 I 支。而其余来

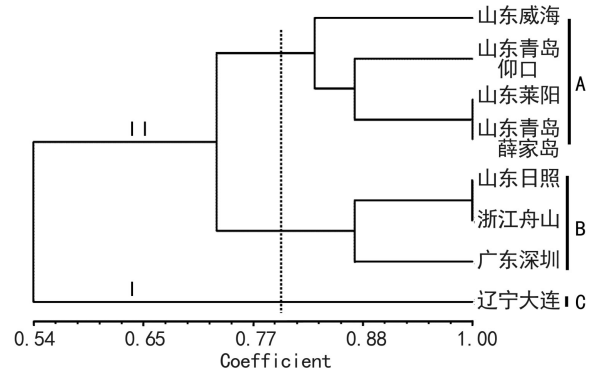


图 2 珊瑚菜不同居群之间的遗传聚类图
Fig. 2 Neighbor joining dendrogram of *Glehnia littoralis*

源的居群聚为 II 支。根据相似性系数大于 0.8 来看,又可以分为 3 大支,其中来自于山东威海,山东莱阳和山东青岛的聚为一支(A);而下级的小的分支中,来自山东莱阳、山东青岛仰口和山东青岛薛家岛的 3 个居群聚为小支。来自于浙江舟山的居群和山东日照的居群聚为一小支后,又和广州深圳的居群聚为一大支(B);辽宁大连的居群单独聚为 C 支。

3 结论与讨论

3.1 SRAP 分子标记适用于珊瑚菜居群遗传多样性分析

SRAP 分子标记是由美国加州大学开发的基于 PCR 反应的新型分子标记技术,应用于基于定位与克隆、种质鉴定、遗传图谱构建和植物种内遗传多样性分析等领域。齐树杰等(2009)首次在北沙参(即珊瑚菜)中,建立并优化了 SRAP 分子标记体系,提出了用于构建北沙参遗传多样性分析和遗传图谱构建的可能性。本研究选取了珊瑚菜 7 个野生居群和一个栽培居群做比较,首次采用 SRAP 分子标记来分析居群之间的变异。结果表明,SRAP 分子标记能很好地鉴定出居群之间的差异,用于珊瑚菜居群之间遗传多样性分析是可行的。

3.2 珊瑚菜不同居群之间的亲缘关系分析

由珊瑚菜不同居群之间的遗传聚类图可知,辽宁大连的居群单独聚为一支(I),而山东、浙江、广州的居群聚为另一大支(II)。这说明辽宁大连的居群和其余居群之间亲缘关系最远。

来自于山东威海、山东青岛的 3 个居群和来自于山东莱阳的栽培居群聚为一支,说明这 3 个居群之间亲缘关系较近。特别需要指出的是,来自于莱阳的居群为栽培居群,它首先和来自于山东青岛的野生居群聚在一起,这说明山东莱阳的栽培居群可能由山东青岛的野生居群种质资源选育而成,并且在栽培过程中并未产生大的变异。

来自山东日照的居群比较特殊,它和浙江、广州的居群聚在了一起,反而和山东的野生居群关系较远。说明山东日照、浙江居群和广州居群有可能来自于一个共同的祖先居群的分化。从地理分布上看,位于其中间位置的江苏原野生居群如果尚存的话,其亲缘关系也应该与之较近。但可惜的是,经过大量的对江苏沿海滩涂及附近岛屿的系统调查,并未发现江苏省现存野生珊瑚菜,江苏野生珊瑚菜居群极大可能已经灭绝(宋春风等,2013)。鉴于和原

种质资源亲缘关系较近,在对江苏沿海珊瑚菜野生居群进行恢复时,可以优先考虑山东日照和浙江普陀山的居群种质材料,以便该种质材料能更好地适应当地的生存环境。

按照学术界通行的标准,相似性系数小于 0.67 为种一级分类单位差异的水平,0.67~0.9 之间为亚种、变种、变型的分类等级的系数指标范围,0.91 以上为种、亚种、变种和变型的各分类等级内的不同个体的遗传物质结构组成差异水平的分子数量指标(Lane *et al.*,1993)。并且按照 3 个植物分类等级,更为细致划分了亚种、变种、变型的分类等级,即 0.67~0.75 为亚种之间的遗传变异范围、0.76~0.82 为变种之间的遗传变异范围、0.83~0.9 为变型之间的遗传变异范围标准(莫鹏巧,2008;农保选,2011)。根据以上标准,本文所研究的珊瑚菜居群遗传相似性系数均大于 0.83,其中辽宁大连和浙江舟山的相似性系数最低为 0.8306,这说明两居群之间变异较大,在 0.83~0.9 之间。而山东日照的居群同山东威海、辽宁大连居群之间的相似性系数均低于 0.9,这也说明山东日照的居群较特殊。结合聚类树,可以推测来自辽宁大连的居群和山东日照的居群可能为珊瑚菜的两个变型。这可能是由于不同地区环境差异,使得种类发生了演化上的遗传性状的较多改变,而且又是稳定的,可遗传的。

综上所述,所研究的珊瑚菜居群相似性系数均大于 0.8,结合地理分布来看,可以大体分为 3 类:辽宁大连的野生居群为一类,山东威海—山东青岛的居群一类,山东日照—广州深圳之间的野生居群为一类。辽宁大连的居群和山东日照的居群可能为珊瑚菜的两个变型。据记载珊瑚菜是环太平洋东亚分布类型,在日本、我国福建、台湾和海南等地也分布有野生珊瑚菜居群,这些居群之间的亲缘关系如何,需要进一步扩大取材范围来进行更深入的研究。

参考文献:

- 单人骅,余孟兰. 1992. 中国植物志(第 55 卷第 2 分册)[M]. 北京:科学出版社:55(3):77
- 莫鹏巧. 2008. 部分苏铁种类亲缘关系的 ISSR 分析及分类学研究[D]. 南宁:广西大学:35
- 傅立国. 1992. 中国植物红皮书-珍稀濒危植物(一)[M]. 北京:科学出版社:698
- Dong F(董芳),Liu HZ(刘汉柱),Xin H(辛华). 2009. Comparison of the coumarin content of roots in the different years of *Glehnia littoralis*(不同生长年份北沙参中香豆素含量的比较研究)[J]. *Chin Agric Sci Bull*(中国农学通报),19:295-297
- (下转第 129 页 Continue on page 129)