

# 基于微卫星的喀斯特地区长梗吊石苣苔和吊石苣苔的遗传多样性研究\*

缪振鹏<sup>1</sup>, 丁莉<sup>2\*\*</sup>

(1. 安徽大学资源与环境工程学院, 安徽合肥 230601; 2. 广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所, 广西桂林 541006)

**摘要:**长梗吊石苣苔 *Lysionotus longipedunculatus* (W.T. Wang) W.T. Wang 是我国吊石苣苔属中的一个比较罕见的物种, 目前濒危等级被评估为极危 CR Blac ( i, ii, v ), 而同属的吊石苣苔 *L. pauciflorus* Maxim. 分布范围非常广泛、生境变化多样, 濒危等级为无危 LC。本研究通过筛选出 16 个微卫星位点对长梗吊石苣苔的两个居群进行遗传多样性研究, 并对比相近地区的吊石苣苔居群, 比较研究导致长梗吊石苣苔濒危的原因。结果显示二者的遗传多样性都较低, 有较高自交现象, 但吊石苣苔具有明显的走茎, 可以有效地克隆繁殖, 相较之下, 长梗吊石苣苔较弱的克隆繁殖能力可能是导致其濒危的原因之一。

**关键词:** 吊石苣苔属 喀斯特地貌 石灰岩地区 微卫星 遗传多样性

中图分类号: Q949.4 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2019)01-0146-06

## 0 引言

长梗吊石苣苔 *Lysionotus longipedunculatus* (W. T. Wang) W.T. Wang 最早仅记载分布于我国云南屏边县<sup>[1]</sup>, 最近在广西发现了其分布<sup>[2]</sup>, 以其具有直立的亚灌木体态、花萼 5 裂至基部、种子的附属物为钻形等特征, 表现出了较为原始的特征。因此最早的时候被划分为原唇柱苣苔属的一员, 但在随后的修订中被转置于吊石苣苔属, 且作为长梗吊石苣苔组的模式种, 代表了吊石苣苔属中较为原始的一个类群。该种分布在山谷溪边, 郁闭度较高的山坡或林边的岩壁上。该种各处居群数量极少, 被列入《中国物种红色名录》极危 CR Blac ( i, ii, v ) 等级<sup>[3-4]</sup>,

且近几年云南居群严重退缩, 在模式产地基本上已经找不到活体, 并且自 2004 年至今已经没有该种的可靠采集记录。目前已经发现和确认位于广西通灵大峡谷景区和邦亮长臂猿国家级自然保护区的两个广西新分布点, 成为该种仅有的两个已知居群, 在研究物种地域分化和濒危保育方面具有极高的研究价值。吊石苣苔 *L. pauciflorus* Maxim. 为中国-日本植物区系的一个典型代表<sup>[1]</sup>, 广布于华东、华中、华南和西南等地, 越南北部和日本也有分布, 分布极为广泛, 生境变化多样, 常生于丘陵或山地林中阴处的石崖上。

分子标记技术是分子生物学领域一项重要的研究技术<sup>[5]</sup>。其中简单重复序列 (Simple Sequence

\*广西自然科学基金项目 (2015GXNSFBA139105) 资助。

【作者简介】

缪振鹏 (1993—), 男, 硕士, 主要从事植物遗传学方面研究。

【\*\*通信作者】

丁莉 (1980—), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事保护生物学方面研究, E-mail: 317481729@qq.com。

【引用本文】

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20190307.006

缪振鹏, 丁莉. 基于微卫星的喀斯特地区长梗吊石苣苔和吊石苣苔的遗传多样性研究 [J]. 广西科学, 2019, 26(1): 146-151.

MIAO Z P, DING L. Study on the genetic diversity of *Lysionotus longipedunculatus* and *L. Pauciflorus* in karst limestone area based on microsatellite loci [J]. Guangxi Sciences, 2019, 26(1): 146-151.

Repeat, SSR)一般以1~6个碱基为重复单位,且在不同物种中的长度、重复单元次数、突变情况有所不同,在染色体上的分布也存在差异,等位基因的多样性也由此形成<sup>[6-9]</sup>;故广泛应用于种群遗传学、动植物群体分析、构建DNA指纹图谱、品种鉴定以及辅助育种等多个方面。并且Gao等<sup>[9]</sup>研究表明植物的SSR序列可能在环境和人工选择压力下变短,所以可以通过杂交和多倍化诱导微卫星的基因变异,增加植物对环境的适应能力。近年来国内外都有通过SSR技术对植物的遗传多样性进行研究:如邵丹等<sup>[10]</sup>对凉水国家自然保护区天然红松种群的遗传多样性在时间尺度上的变化进行了遗传分析,发现红松的遗传多样性分化主要存在于龄级内;Chen等<sup>[11]</sup>对苧麻属的7个种的聚类分析将其划分为3类;Kumari等<sup>[12]</sup>发现麻疯树的种质的遗传多样性较低,从而表明麻风树属植物的保育工作需要扩大基因库、增加遗传多样性。虽然SSR技术在国内有很多研究和应用,但是在苦苣苔科(Gesneriaceae)植物的遗传多样性方面的相关研究却进行不多,Wang等<sup>[13]</sup>对瑶山苣苔 *Dayaoshania cotinifolia* W.T.Wang(现并入马铃苣苔属,瑶山苣苔 *Oreocharis cotinifolia* (W.T.Wang) Mich.Möller & A.Weber)的遗传多样性进行了研究,显示瑶山苣苔的濒危很可能是由于人类活动导致的,建议进行就地保护,并采用人工授粉的手段扩大种群数量。Wang等<sup>[14]</sup>通过转录组对大花旋蒴苣苔 *Boea clarkeana* Hemsl.(现已经被修订为大花萼唇苣苔 *Damrongia clarkeana* (Hemsl.) C.Puglisi)的微卫星序列进行筛选,为后续大花旋蒴苣苔/大花萼唇苣苔的保护遗传学研究奠定了基础。

本研究旨在通过微卫星的手段对仅在喀斯特地区分布的狭域类群长梗吊石苣苔和其近缘广布种吊石苣苔的不同居群进行研究,尝试对狭域分布种和广布种居群的遗传多样性的对比,从而为其后续的保护生物学研究奠定基础,也可为喀斯特石灰岩地貌下特殊小生境对植物适应性分化现象验证提供一定的数据支持。

## 1 材料与方法

长梗吊石苣苔目前已知的两个居群仅分布于广西壮族自治区百色市靖西市的靖西通灵大峡谷(以下缩写为B居群)和邦亮长臂猿国家级自然保护区(以下缩写为BL居群),对这两个居群进行采样,并在邻近地区对吊石苣苔进行采样。吊石苣苔的A居群位于与广西通灵大峡谷相邻的靖西市化峒镇,另一个F居群与长梗吊石苣苔的BL居群同位于邦亮长臂猿国家级自然保护区。采集了二者的植物材料,并按物种、居群分别编号。根据居群方式取样,同一居群材料选取互不相邻的单株取其幼叶,每个种群取30株,不足30株的全部取完,用变色硅胶迅速干燥保存,之后在实验室采用改良CTAB法提取总DNA。

设计引物、PCR扩增、电泳,并送北京诺赛基因组研究中心有限公司(SinoGenoMax)进行分型。将分型好的数据用软件GeneMarker v1.85读取,判读的数据整理好后输入到EXCEL表格中,对引物特征进行分析并记录。各个居群的期望杂合度、观测杂合度、平均等位基因数以及各个居群的近交系数采用Genetix v4.05.2和POPGENE version 1.32进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 微卫星位点分析

16个微卫星位点一共包含162对等位基因,每个位点的平均等位基因数是10.125,等位基因数的范围从6(LL-10)到24(LL-17)。期望杂合度的取值范围在0.709 5(LL-2)和0.942 3(LL-17)之间,观测杂合度从0(LL-10, LL-12, LL-16, LL-27, LL-29)到0.448 3(LL-23)之间,多态性信息的值从0.662 9(LL-2)到0.932 0(LL-17)(表1)。本研究使用的16个微卫星位点的多态性信息均大于0.5,根据Botstein等的标准,都呈现出高度多态性。因此,这些位点可以提供的遗传信息相对较多,在长梗吊石苣苔和吊石苣苔的遗传多样性研究中作为分子标记

的可信度比较高。

表1 长梗吊石苣苔和吊石苣苔的微卫星特征位点分析

Table 1 Characteristics of analysis of microsatellite markers of *Lysionotus longipedunculatus* and *L. pauciflorus*

位点 Loci	引物序列 5'-3' Primer sequences 5'-3'	重复单元 Repeat motif	GC	等位 基因数 $N_A$	有效等位 基因数 $N_E$	产物大小 Product size (bp)	期望杂 合度 $H_E$	观测杂 合度 $H_O$	多态性 信息 PIC
L-1	F: CGATACCTTCAA ATGGACTTCAC R: AGTGATTGGAGA- AGAGTCGATGA	(GTGATG) <sub>4</sub>	43	8.000 0	4.235 2	151	0.768 2	0.011 4	0.726 3
L-2	F: ACTGCTTAATTC- CGTTTCTAGGG R: CGGATAAACAC- GAAGACCTATCA	(GAGTCG) <sub>4</sub>	43	8.000 0	3.403 3	143	0.709 5	0.028 3	0.662 9
L-10	F: ATAAAGGCAGTA- AAGGAAGTGGG R: CTAAAGATGTGA- AAGGAGACCGA	(TAAATA) <sub>4</sub>	43	6.000 0	3.985 3	113	0.752 7	0.000 0	0.708 0
L-12	F: GTCTTCTCCATC- TCCACCACTT R: CACCTACAGCA- CTCTTCTTCGAT	(CACAGG) <sub>4</sub>	50	7.000 0	3.948 4	153	0.750 6	0.000 0	0.708 3
L-13	F: GTCTTCTCCATC- TCCACCACTT R: TACAGCACTCTT- CTTCGATAGGC	(CACAGG) <sub>4</sub>	50	9.000 0	5.119 6	149	0.808 5	0.009 5	0.778 3
L-14	F: TCTTCTCCATCTC- CACCACCTC R: CACCTACAGCAC- TCTTCTTCGAT	(CACAGG) <sub>4</sub>	50	10.000 0	4.728 8	152	0.792 2	0.027 5	0.758 4
L-16	F: TGCATTCAGCAC- CTCAAGTTAC R: CAGCAGCAGAT- GATACAACACTT	(TGCTGA) <sub>4</sub>	45	7.000 0	4.618 4	156	0.787 2	0.000 0	0.749 1
L-17	F: ATAAACGTATC- CCTTCTTCGCTC R: CTGAGTTCAGGT- TTGATTCCAAG	(TGGTGC) <sub>4</sub>	43	24.000 0	15.530 9	112	0.942 3	0.071 4	0.932 0
L-21	F: CTTGGCTTCTT- CTTCTTCTCCT R: AGGGATGAAGT- TCTTGTCCAGT	(CTCCTT) <sub>4</sub>	43	12.000 0	6.672 6	121	0.854 0	0.270 3	0.833 8

续表 1

Continued table 1

位点 Loci	引物序列 5'-3' Primer sequences 5'-3'	重复单元 Repeat motif	GC	等位 基因数 $N_A$	有效等位 基因数 $N_E$	产物大小 Product size (bp)	期望杂 合度 $H_E$	观测杂 合度 $H_O$	多态性 信息 PIC
L-22	F: CTTGGCTTCTT- CTTTCTTCTCCT	(CTCCTT) <sub>4</sub>	43	15.000 0	6.885 5	117	0.859 2	0.422 7	0.839 3
	R: ATGAAGTTCTT- GTTCCAGTGTC								
L-23	F: CTTGGCTTCTT- CTTTCTTCTCCT	(CTCCTT) <sub>4</sub>	43	13.000 0	9.414 2	119	0.898 9	0.448 3	0.884 3
	R: GGATGAAGTTCT- TGTTCCAGTGT								
L-24	F: TTGGCTTCTTCTT- TCTTCTCCTC	(CTCCTT) <sub>4</sub>	43	10.000 0	5.022 8	120	0.804 5	0.225 2	0.775 0
	R: AGGGATGAAGTT- CTTGTTCCAGT								
L-25	F: TTGGCTTCTTCT- TTCTTCTCCTC	(CTCCTT) <sub>4</sub>	43	11.000 0	6.297 9	116	0.845 1	0.156 0	0.822 4
	R: ATGAAGTTCTT- GTTCCAGTGTC								
L-26	F: TCCTCTCAGCC- CTTCGACT	(CTTGTC) <sub>4</sub>	58	7.000 0	3.751 8	158	0.736 7	0.008 9	0.688 3
	R: TACTTCTAATGG- CGAATCTGCTG								
L-27	F: ATTCTACCAGCT- GTTTCAGGAAGG	(CCTCCA) <sub>4</sub>	43	8.000 0	4.762 7	158	0.793 6	0.000 0	0.760 7
	R: CAACTAGAAG- CAAACAC								
L-29	F: ATTCTACCAGCT- GTTTCAGGAAGG	(CCTCCA) <sub>4</sub>	43	7.000 0	4.199 4	160	0.767 1	0.000 0	0.725 3
	R: GACAACTAAAG- CAGGAAGCAAAC								

## 2.2 遗传多样性分析

长梗吊石苣苔 B 居群的  $H_E$  最大, 为 0.693 9, BL 居群的  $H_O$  最大, 为 0.123 7。长梗吊石苣苔的两个居群的近交系数均值都大于 0.8, 每个位点的近交系数均大于 0, 表明了长梗吊石苣苔的两个居群均有较高的自交现象(表 2)。吊石苣苔 A 居群的  $H_E$  最大,

为 0.773 2, F 居群的  $H_O$  最大, 为 0.146 8。两个居群的近交系数均值都大于 0.8, 每个位点的近交系数均大于 0, 表明了吊石苣苔的两个居群均有较高自交现象(表 2)。

表2 长梗吊石苣苔、吊石苣苔的遗传多样性和近交系数

Table 2 *Fis* and genetic diversity in *L. longipedunculatus* and *L. pauciflorus*

居群 Population	期望杂合度 $H_e$	观测杂合度 $H_o$	平均等位基因 $MN_A$	近交系数 <i>Fis</i> (95% IC)
B	0.693 9	0.060 9	5.125	0.912 3 (0.311 0~1.000 0)
BL	0.657 7	0.123 7	5.250	0.811 9 (0.024 4~1.000 0)
A	0.773 2	0.103 4	7.313	0.866 3 (0.478 3~1.000 0)
F	0.770 6	0.146 8	7.250	0.809 5 (0.148 4~1.000 0)

### 3 讨论

长梗吊石苣苔和吊石苣苔这2个物种的各采样点所在的地区均是喀斯特地貌,该地区是全球生物多样性研究和保护的关键地区和热点地区<sup>[15-17]</sup>。长梗吊石苣苔是一个濒危物种,其自交系数高可能是导致其濒危的原因之一。吊石苣苔是一个广布种,但是微卫星的结果显示其具有很高的自交系数和很低的观测杂合度,这可能是样本采集地特殊的地理环境造成的。广西靖西市化峒镇和邦亮长臂猿国家级自然保护区接近中越边境,属于石灰岩地区。石灰岩山地由于特殊的生境条件,如基质特殊、环境封闭、传粉昆虫少等,起到了微生境“隔离”作用<sup>[18]</sup>,使其不能或是很难向周边扩散,从而加大了自交现象的发生概率。此外,长梗吊石苣苔和吊石苣苔还可能由于某些自然因素(如风力、重力、流水等)通过匍匐茎进行无性繁殖又长成了新的植株,而我们采集样本时无法保证采集的个体最初是否是来自同一个母株。因此,这种情况也可能是导致二者自交系数很高的因素之一。不过,吊石苣苔具有很强的克隆繁殖能力,在野外观察中我们可以发现吊石苣苔能够在岩石面上形成一整片类似于“纯林”的群落;而长梗吊石苣苔则常在立地中以“点”状出现在整个植物群落中,其克隆能力较弱。另外,吊石苣苔的花期发生于气候较温热的夏季,群体花期长,花朵硕大,单株花量也大,可以有效吸引传粉昆虫,相对来说长梗吊石苣苔的花期集中在11—12月,这个时间段气温严重偏低,传粉昆虫活动少,或是直接导致其结实率低下的的重要原因。本研究为长梗吊石苣苔和吊石苣苔后续的保护生物学研究提供了一定的支持,并为石灰岩溶岩地貌对植物遗传多样性的影响提供一定的数据参考。而长梗吊石苣苔和吊石苣苔对于石灰岩地区的适应机制以及相应的适应性进化历程,还需要做进一步研究。

### 参考文献

- [1] 王文采. 中国吊石苣苔属校订[J]. 广西植物, 1983, 3(4): 249-284.
- [2] 许为斌. 广西岩溶洞穴植物的初步研究[D]. 桂林: 广西师范大学, 2007.
- [3] 汪松, 解焱. 中国物种红色名录: 第1卷: 红色名录[M]. 北京: 高等教育出版社, 2004.
- [4] 韦毅刚. 华南苦苣苔科植物[M]. 南宁: 广西科学技术出版社, 2010.
- [5] 周国强, 严成其, 杨勇, 等. 分子标记技术的发展及其在水稻抗白叶枯病研究中的应用[J]. 浙江农业学报, 2010, 22(4): 533-538.
- [6] 王玲玲, 陈东亮, 黄丛林, 等. SSR分子标记技术在植物研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2017, 45(36): 123-126, 130.
- [7] 朱英, 陶刚, 刘作易. SSR分子标记的发展及其在动植物遗传育种中的应用[J]. 贵州农业科学, 2006, 34(增刊): 93-95.
- [8] VARSHNEY R K, GRANER A, SORRELLS M E. Genic microsatellite markers in plants: Features and applications [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(1): 48-55.
- [9] GAO C H, TANG Z L, YIN J M, et al. Characterization and comparison of gene-based simple sequence repeats across *Brassica* species [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2011, 286(2): 161-170.
- [10] 邵丹, 裴赢, 张恒庆. 凉水国家自然保护区天然红松种群遗传多样性在时间尺度上变化的cpSSR分析[J]. 植物研究, 2007, 27(4): 473-477.
- [11] CHEN P, YU C M, WANG Y Z, et al. Analysis of genetic relationship among boehmeria varieties using cpSSR markers [J]. Agricultural Biotechnology, 2015, 4(3): 24-26.
- [12] KUMARI M, GROVER A, YADAV P V, et al. Development of EST-SSR markers through data mining and their use for genetic diversity study in Indian accessions of *Jatropha curcas* L.: A potential energy crop [J]. Genes & Genomics, 2013, 35(5): 661-670.



- [13] WANG H W, ZHANG B, CHENG Y Q, et al. Genetic diversity of the endangered Chinese endemic herb *Dayaoshania cotinifolia* (Gesneriaceae) revealed by simple sequence repeat (SSR) markers [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2013, 48: 51-57.
- [14] WANG Y, LIU K, BI D, et al. Characterization of the transcriptome and EST - SSR development in *Boea clarkeana*, a desiccation-tolerant plant endemic to China [J]. *Peer J*, 2017, 5: e3422.
- [15] 许为斌, 黄俞淞, 吴望辉, 等. 典型喀斯特区域植物物种多样性研究——以广西中越边境喀斯特地区种子植物为例[J]. *广西科学*, 2018, 25(5): 611-619.
- [16] MYERS N, MITTERMEIER R A, MITTERMEIER C G, et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities [J]. *Nature*, 2000, 403(6772): 853-858.
- [17] HOU M F, LOPEZ-PUJOL J, QIN H N, et al. Distribution pattern and conservation priorities for vascular plants in Southern China: Guangxi Province as a case study [J]. *Botanical Bulletin-Academia Sinica Taipei*, 2010, 51(3): 377-386.
- [18] 陆益新, 黄广宾, 梁畴芬. 广西特有植物的研究(续完) [J]. *广西植物*, 1989, 9(3): 201-210.

## Study on the Genetic Diversity of *Lysionotus longipedunculatus* and *L. Pauciflorus* in Karst Limestone Area based on Microsatellite Loci

MIAO Zhenpeng<sup>1</sup>, DING Li<sup>2</sup>

(1. School of Resource and Environmental Engineering, Anhui University, Hefei, Anhui, 230601, China; 2. Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

**Abstract:** *Lysionotus longipedunculatus* (W.T. Wang) W.T. Wang is a relatively rare species of *Lysionotus* in China. The current endangered grade is assessed as critically endangered CR Blac (i, ii, v). However, the congeneric plant *L. pauciflorus* Maxim. has a wide range of distribution, diverse habitats and the endangered grade is non-risk LC. In this study, 16 microsatellite loci were screened to study the genetic diversity of two populations of *L. longipedunculatus* and *L. pauciflorus*, and the populations of the genus *Lysionotus* in the similar area were compared to study the endangerment cause of *L. longipedunculatus*. The results showed that the genetic diversity of these two species was low and they all had a higher proportion of inbreeding. However, *L. pauciflorus* had rhizome and could be effectively cloned and reproduced. In contrast, the weaker clone reproduction ability of *L. longipedunculatus* perhaps was one of the reasons leading to its endangerment.

**Key words:** *Lysionotus*, karst landform, limestone area, microsatellite loci, genetic diversity

责任编辑: 陆 雁



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gkxkbj@vip.126.com

投稿系统网址: <http://gkx.ijournal.cn/gkx/ch>