

◆海洋科学◆

基于微卫星标记的小花老鼠簕遗传多样性研究*

高霆炜, 童立豪, 钟云旭, 阎冰, 陈思婷**

(广西科学院, 广西海洋科学院(广西红树林研究中心), 广西红树林保护与利用重点实验室, 广西北海 536000)

摘要:为探究导致小花老鼠簕(*Acanthus ebracteatus*)濒危的原因,本研究通过荧光标记毛细管电泳检测方法,筛选出9个多态性微卫星位点对小花老鼠簕的4个群体进行遗传多样性研究。结果表明:9个多态性微卫星位点在4个群体中共检测到61个等位基因,平均每个位点6.778个,多态性信息含量(PIC)为0.589。群体平均等位基因为3.167,观测杂合度(H_o)和期望杂合度(H_e)的平均值分别为0.396和0.442。分子方差分析(AMOVA)结果显示,4个小花老鼠簕群体间变异为36%,群体内变异为64%,遗传变异主要来自群体内不同的个体间。聚类分析和主成分分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA)结果具有一致性,4个群体被分为两大类,广东广州单独聚为一类,广东湛江、广西防城港和海南文昌聚为一类。4个群体均具有较高的遗传多样性,分类结果与各群体地理位置分布基本一致。小花老鼠簕濒危并非遗传多样性低引起,可能是人类活动、繁育以及病虫害等导致的。本研究为小花老鼠簕的保护及开发利用提供理论依据。

关键词:小花老鼠簕;微卫星;遗传多样性;种群特征;保护策略

中图分类号:Q949.4 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2024)04-0754-09

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20241206.014

小花老鼠簕(*Acanthus ebracteatus*)生长在潮间带,该地区是海洋生态系统和陆地生态系统之间的过渡带,不仅具有调节气候、抗风消浪^[1]、维持生物多样性^[2]及碳汇^[3]等生态功能,还具有提供旅游、渔业及土地资源的经济价值^[4]。小花老鼠簕天然分布于印度、中南半岛、印度尼西亚等地。我国的广西北仑河口,海南海口、儋州、万宁、琼海、文昌及广东广州、湛

江有明确分布记录^[5-8]。小花老鼠簕是我国真红树植物之一,属爵床科(Acanthaceae)老鼠簕属(*Acanthus*),别名黄鱼簕、海簕根等。小花老鼠簕生境与老鼠簕(*A. ilicifolius*)类似,一般生长于潮沟两侧、红树林内缘,有时也形成小面积纯林^[7]。根据世界自然保护联盟(International Union for Conservation of Nature and Natural Resources, IUCN)的标准,小花

收稿日期:2023-01-28

修回日期:2024-04-10

* 广西重点研发计划项目(桂科 AB21220020),国家自然科学基金地区基金项目(32060282)和广西红树林保护与利用重点实验室基金项目(GKLMC-21A01)资助。

【第一作者简介】

高霆炜(1988—),男,助理研究员,主要从事保护生物学研究。

【**通信作者简介】

陈思婷(1986—),女,副研究员,主要从事植物学研究, E-mail: c105043041@126.com。

【引用本文】

高霆炜,童立豪,钟云旭,等. 基于微卫星标记的小花老鼠簕遗传多样性研究[J]. 广西科学, 2024, 31(4): 754-762.

GAO T W, TONG L H, ZHONG Y X, et al. Genetic Diversity of *Acanthus ebracteatus* Based on Microsatellite Markers [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(4): 754-762.

老鼠簕在我国属于濒危 (Endangered, EN) 等级^[7]。小花老鼠簕近年来在部分自然栖息地出现灭绝现象, 如海南三亚的小花老鼠簕^[5]。

分子标记技术是分子生物学领域一项重要的研究技术^[9]。植物的简单重复序列 (Simple Sequence Repeat, SSR) 可能在人工选择和环境压力下变短, 所以可以通过多倍化和杂交诱导微卫星的基因发生变异, 增加植物对环境的适应能力^[10]。白晓倩等^[11]利用 SSR 标记及表型性状构建板栗品种的分子身份证, 研究板栗品种的遗传多样性, 为板栗种质资源的品种鉴定、合理利用及保护提供理论依据。Ha 等^[12]通过对 38 份紫苏 (*Perilla frutescens*) 种质 29 个 SSR 标记和 3 个种子性状的关联分析, 检测到 6 个与种子萌发率 (Seed Germination Rate, SGR) 相关的 SSR 标记、8 个与种子硬度 (Seed Hardness, SH) 相关的标记、7 个与种子大小 (Seed Size, SS) 相关的 SSR 标记。Li 等^[13]基于 SSR 标记基因型数据及形态性状的表型数据得到遗传距离的聚类分析, 将 127 份大蒜 (*Allium sativum*) 材料分为 3 个聚类。虽然 SSR 技术在国内有很多研究及应用, 但是在爵床科 (Acanthaceae) 植物遗传多样性方面的相关研究却不多。公培民等^[14]利用 Illumina HiSeq™2000 对马蓝 (*Baphicacanthus cusia*) 转录组进行高通量测序, 使用软件 MICOsaTEllite (MISA) 分析转录组中的 SSR 位点信息, 发现马蓝 SSR 出现的频率高, 重复种类丰富, 为研究马蓝品质改良、基因定位及遗传多样性提供了科学依据。李俊仁等^[15]通过基因功能注释发现, 穿心莲 (*Andrographis paniculata*) 含 SSR 的 Unigene (广泛通用的基因数据库) 主要与基础代谢功能相关。

微卫星标记在红树植物遗传多样性研究中得到了广泛的研究和应用。Geng 等^[16]利用核微卫星标记和叶绿体微卫星标记对华南沿海地区占主导地位的 7 个红树物种进行了基因分型, 估计了这 7 个红树物种的历史和当代基因流、遗传多样性、种群结构, 结果表明这 7 个物种都表现出很少的单倍型、低水平的遗传多样性和高水平的近亲繁殖, 这可能是由于它们的边缘地理分布、人类驱动、自然压力导致的栖息地丧失和破碎化。Cerón-souza 等^[17]用 11 个微卫星位点分析了 980 株亮叶白骨壤 (*Avicennia germinans*), 并用 6 个微卫星位点分析了 940 株美洲红树 (*Rhizophora mangle*), 并对两个非编码 cpDNA 区域进行了二次采样, 以了解巴拿马加勒比海和太平洋

海岸 4 个主要河口区域这两个物种的种群结构和基因流, 发现红树林中的基因传播通常局限于河口, 沿海地貌和罕见的远距离传播事件也会影响其结构水平。阮宇等^[18]通过 SSR 标记, 利用近似贝氏计算 (Approximate Bayesian Computation, ABC) 推测海峡两岸 4 个分布区域秋茄的起源及其拓殖路线, 得出海峡两岸秋茄的拓殖路线是从大陆东南的南方种群随黑潮迁移至台湾北部, 再从台湾北部拓殖到台湾南部的结论。Millán-aguilar 等^[19]在墨西哥锡那罗亚州 3 个潟湖系统研究了亮叶白骨壤的遗传多样性和精细遗传结构, 发现受干扰和保留的地点之间的遗传多样性和总体遗传结构相似, 然而却观察到了较低水平的精细尺度空间遗传结构, 并将此归因于每个潟湖系统的局部动态、其保护状态和碎片化程度的差异, 此外, 低连通性和干扰的影响可能会限制传粉者的移动和种子的传播能力, 导致遗传多样性水平低、出现近亲繁殖的现象。Hu 等^[20]通过对银叶树 (*Heritiera littoralis*) 的转录组分析, 鉴定了 1 393 个单核苷酸多态性 (SNP) 和 433 个 SSR 标记, 其中 36 个 SNP 标记中的 19 个通过裂解扩增多态性序列 (Cleaved Amplified Polymorphic Sequences, CAPS) 得到了验证, 24 个 SSR 标记中的 16 个通过荧光毛细管电泳得到了确认。但目前仍缺乏对小花老鼠簕遗传多样性的研究。

本研究拟选择 9 对多态微卫星标记, 分析广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌的小花老鼠簕的遗传多样性, 为小花老鼠簕遗传多样性保护及创新利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

对广东广州 (GDGZ: Guangzhou, Guangdong; 22°54′36.38″N, 113°32′52.40″E)、广东湛江 (GDZJ: Zhanjiang, Guangdong; 21°27′43.70″N, 109°58′25.26″E)、广西防城港 (GXFC: Fangchenggang, Guangxi; 21°30′59.30″N, 108°13′36.09″E) 及海南文昌 (HNWC: Wenchang, Hainan; 19°37′40.29″N, 110°47′13.71″E) 的小花老鼠簕进行采样。小花老鼠簕形态如图 1 所示。

1.1.2 试剂

试验所用主要试剂为植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305, 天根生化科技有限公司); DL2000

DNA Marker(TSJ011-100,北京擎科生物科技股份有限公司);LIZ 标记分子量内标(美国 ABI 公司);Taq 酶(加拿大 Fermentas 公司);DEPC 水(深圳市吉真科技有限公司);脱氧核糖核苷三磷酸(dNTP,加拿大 Fermentas 公司)。



图1 小花老鼠簕形态

Fig.1 Morphology of *Acanthus ebracteatus*

1.1.3 仪器

试验所用主要仪器设备为高通量组织研磨机(SLGT-48,南京中科科学器材有限公司),电热恒温水浴锅(DK-S24,上海精宏实验设备有限公司),涡旋振荡器(G560E,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),高速冷冻离心机(iCEM-24R,杭州奥盛仪器有限公司),超微量分光光度计(OD-1000+,美国 One Drop 公司),电泳仪(JY300C,北京君意东方电泳设备有限公司),凝胶成像仪(Tanon-1600,上海天能生命科学有限公司),移液器(Research plus,德国 Eppendorf 公司),PCR 仪(黑金刚 EDC-810,北京东胜

表1 9对微卫星引物信息

Table 1 Information of 9 SSR primers

位点 Locus	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	$T_m/^\circ\text{C}$	荧光染料 Fluorescent dye
Acil13	ATAATTTATCATGGCCATCG AATGTGGAGAATTTGGCATCTGGTGCG	55	FAM
Acai02	ACACACACACACTCTCTCTCTC CCATCTGAAAATAGATGGTAGGAC	56	HEX
Acai08	TCTCTCTCTCACACACACAC GAGGTACTAGGGTTTCAACATGAT	56	TAMRA
Acai11	TCTCTCTCTCACACACACAC CCCCATATTTGTATATGTTTTG	52	TAMRA
Acai12	TCTCTCTCTCACACACACAC CCACCAATGGTGCTGAATACATTG	58	TAMRA
Acai13	TCTCTCTCTCACACACACAC CCGACAAGCTCCTCCAGTATTTTTG	60	TAMRA
Acaicp02	GCATTTACCTATTATAGAGA CGTAAAACCGAGAGAAATTC	48	HEX
Acaicp03	CAGAGAAGCCTATGTATGAA AAATGAAGCACTCCAGATAC	52	FAM
Acaicp04	CATAGACAGCGTAATCTAAA AGATGCTGTCTTGCTAAGAC	50	HEX

创新生物科技有限公司),基因测序仪(3730XL,美国 ABI 公司),台式高速冷冻离心机(Allegra 25R,美国 Beckman 公司),微量台式离心机(Micro 17R,美国 Thermo Fisher Scientific 公司),电热恒温水槽(DK-8B,上海精宏实验设备有限公司),立式压力蒸汽灭菌器(YXQ-LS-50SII,上海博迅实业有限公司医疗设备厂)。

1.2 方法

1.2.1 样品采集

在每个地点对 40 个个体进行采样,共计 160 个个体。采样间隔至少 10 m,采集部位为幼叶。所有样品立即放入装有冰袋的泡沫箱中带回实验室,并在 -80°C 下储存。用干冰运输到南京集思慧远生物科技有限公司进行 STR 遗传标记检测分析。

1.2.2 核和叶绿体微卫星基因分型

用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取样品总 DNA,并在 -80°C 下保存。

为进行微卫星分析,用 6 个多态核微卫星(nSSR)标记以及 3 个叶绿体微卫星(cpSSR)标记对小花老鼠簕的样本进行基因分型。所用的 nSSR 标记为 Acil13、Acai02、Acai08、Acai11、Acai12、Acai13^[21], cpSSR 标记为 Acaicp02、Acaicp03、Acaicp04^[22](表 1)。PCR 扩增条件如下:15 μL PCR 反应体系含有 1 μL DNA、1 \times 缓冲液、2.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.2 mmol/L dNTP、1 $\mu\text{mol/L}$ 引物和 1.5 U Taq DNA 聚合酶。PCR 条件为 94°C 3 min,35 个循环(94°C 15 s, 55°C 15 s, 72°C 30 s), 72°C 延伸 3 min。

将含有 12.5 μL 超纯去离子甲酰胺、0.25 μL ROX 标记的分子量标记和 1.5 μL 10 倍稀释的 PCR 产物的待测样品,置于基因测序仪样本架上检测。

1.2.3 遗传多样性指标统计

1.2.3.1 单位点遗传多样性指标统计

SSR 分型数据根据各软件格式要求进行转换。使用 GenAlEx 6.51b2 软件计算单个 SSR 位点在样本整体的等位基因数(N_a)、有效等位基因数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)和 Shannon's 多样性指数(I)。使用 Popgene 1.32 软件计算各位点近交系数(F_{is})、各位点分化系数(F_{st})、各位点平均近交系数(F_{it})。使用 Powermarker 3.25 软件中的 Summary Statistics 功能计算各位点的多态性信息含量(PIC)和基因多样性(Gene diversity),使用 GenePOP 4.7 软件计算无效等位基因频率(F_{na})。多态性信息是等位基因频率和等位基因数的变化函数。多态性信息含量越高,在一个群体中,该座位上杂合子比例则越大,提供的遗传信息就越高。Botstein 等^[23]提出了衡量基因变异程度高低的多样性信息指标,当 $\text{PIC} > 0.50$ 时,该位点为高度多态位点;当 $0.25 < \text{PIC} < 0.50$ 时,该位点为中度多态位点;当 $\text{PIC} < 0.25$ 时,为低度多态位点。

1.2.3.2 居群遗传多样性指标统计

利用 GenAlEx 6.51b2 软件分析每个群体的等位基因数、有效等位基因数、观测杂合度、期望杂合度、Shannon's 多样性指数、群体内近交系数(F)。

1.2.3.3 Jaccard 遗传相似系数矩阵计算

使用 Ntsys 2.10e 软件中的 Qualitative data 功能计算 Jaccard 遗传相似系数(Jaccard similarity coefficient);基于 Jaccard 遗传相似系数,使用软件中的 Clustering 功能下的 SAHN 进行非加权类平均聚类法(UPGMA)聚类;使用软件中的 Graphics 功能下的 Tree plot 功能进行绘图。

1.2.4 聚类分析

1.2.4.1 个体聚类分析

个体聚类分析使用 PowerMarker 3.2.5 软件中的 Compute Frequency 功能计算各样本下各标记的等位基因频率,然后使用 Frequency Based Distance 功能基于等位基因频率计算 Nei's(1983)遗传距离,最后使用软件的 UPGMA/NJ Tree 功能进行 UPGMA 和邻位相连聚类法(Neighbor-Joining clustering)两种方法绘制聚类树,并使用 MEGA 7.0 软件

对聚类树进行编辑美化。

1.2.4.2 群体聚类分析

群体聚类分析使用 PowerMarker 3.2.5 软件计算基于等位基因频率的 Nei's(1983)遗传距离,使用邻位相连聚类法和 UPGMA 两种方法绘制聚类树。

1.2.5 分子遗传变异方差分析(AMOVA)

利用 GenAlEx 6.51b2 软件进行分子遗传变异方差分析,计算总体群体间和群体内的分子遗传变异平方和(SS)、均方(MS)、变异方差(EST. Var.),并设置 999 次 permutation。

1.2.6 群体结构分析及二维主坐标分析

利用 Structure 软件分析来自广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌 4 个群体的 160 个小花老鼠筋基因型的群体结构。利用 GenALEX 6.51b2 软件计算遗传距离矩阵,基于 GD 矩阵进行二维主坐标分析(Principal Co-ordinates Analysis, PCoA),并绘制主坐标 1 和主坐标 2 的 PCoA 散点图,并将预设群体用不同颜色在图中标注,导出前 10 个主成分对应的 PCoA 矩阵。

1.2.7 哈迪温伯格检测

利用 Genepop 4.7 软件进行各群体和总体标记的哈迪温伯格检测和无效等位基因分析。

2 结果与分析

2.1 微卫星位点分析

从表 2 可以看出,9 个微卫星位点一共包含 61 个等位基因,每个位点的平均等位基因数是 6.778,等位基因数的范围从 2(Acaicp02)到 14(Acail3)。Shannon's 多样性指数为 0.304(Acaicp04)–2.067(Acail2)。观测杂合度在 0.000(Acaicp02, Acaicp03, Acaicp04)和 0.744(Acail3)之间。期望杂合度的取值在 0.150(Acaicp04)和 0.840(Acail2)之间,平均值为 0.638。多态性信息含量在 0.1407(Acaicp04)和 0.8230(Acail2)之间。6 个核微卫星位点(Acail3、Acai02、Acai08、Acai11、Acai12、Acai13)的多态性信息含量均大于 0.50,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。小花老鼠筋的 cpSSR 遗传多样性处于中低水平,Acaicp02 ($\text{PIC} = 0.3740$)和 Acaicp03 ($\text{PIC} = 0.4673$)为中度多态位点,Acaicp04($\text{PIC} = 0.1407$)为低度多态位点。

表2 小花老鼠筋的微卫星特征位点分析

Table 2 Analysis of microsatellite characteristic loci of *A. ebracteatus*

位点 Locus	等位基 因数 N_a	有效 等位 基因数 N_e	Shannon's 多样性 指数 I	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	各位点 近交 系数 F_{is}	各位点 平均近 交系数 F_{it}	各位点 分化 系数 F_{st}	多态性 信息 含量 PIC	基因 多样性 Gene diversity	无效 等位 基因率 F_{na}	基因流 N_m
Acil13	14	6.204	2.005	0.744	0.839	-0.484	0.113	0.403	0.819 4	0.838 8	0.051 8	0.371
Acai02	9	3.378	1.543	0.644	0.704	-0.281	0.085	0.286	0.672 8	0.703 9	0.056 4	0.624
Acai08	6	3.556	1.421	0.688	0.719	-0.060	0.044	0.098	0.670 4	0.718 8	0.059 8	2.313
Acai11	6	3.442	1.399	0.400	0.710	-0.239	0.436	0.545	0.660 3	0.709 5	0.473 6	0.209
Acai12	12	6.248	2.067	0.681	0.840	-0.120	0.189	0.276	0.823 0	0.839 9	0.176 2	0.656
Acai13	6	3.571	1.386	0.406	0.720	-0.348	0.436	0.581	0.671 5	0.720 0	0.201 5	0.180
Acaicp02	2	1.992	0.691	0.000	0.498	1.000	1.000	0.117	0.374 0	0.498 0	0.684 7	1.884
Acaicp03	3	2.281	0.902	0.000	0.562	1.000	1.000	0.077	0.467 3	0.561 6	0.726 6	2.982
Acaicp04	3	1.177	0.304	0.000	0.150	1.000	1.000	0.089	0.140 7	0.150 2	0.958 6	2.561
Mean	6.778	3.539	1.302	0.396	0.638	0.163	0.478	0.275	0.588 8	0.637 9	0.376 6	1.309

2.2 遗传多样性分析

遗传多样性评估结果(表3)显示,各群体等位基因数范围为2.444(GDGZ)到4.111(HNWC),平均值为3.167。有效等位基因数为1.881—2.262。Shannon's多样性指数最低为0.632(GDGZ),最高为0.851(GDZJ),观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为0.396和0.442。

表3 基于9个微卫星标记的4个小花老鼠筋群体的遗传多样性评估

Table 3 Genetic diversity estimates of 4 *A. ebracteatus* populations based on 9 microsatellite loci

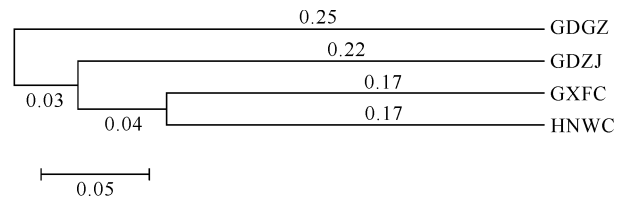
群体 Popu- lation	等位 基因数 N_a	有效等 位基因数 N_e	Shan- non's多 样性指数 I	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e
GDGZ	2.444	1.881	0.632	0.453	0.399
GDZJ	2.889	2.262	0.851	0.667	0.522
GXFC	3.222	2.003	0.763	0.186	0.443
HNWC	4.111	2.062	0.754	0.278	0.405
Mean	3.167	2.052	0.750	0.396	0.442

Note: GDGZ indicates Guangzhou, Guangdong; GDZJ indicates Zhanjiang, Guangdong; GXFC indicates Fangchenggang, Guangxi; HNWC indicates Wenchang, Hainan.

2.3 聚类及遗传结构分析

利用PowerMarker 3.2.5软件,基于Nei's遗传距离对4个群体构建UPGMA树(图2),聚类结果显示4个群体被分为两大类,广东广州单独聚为一类,广东湛江、广西防城港和海南文昌聚为一类。第二大

类中,广西防城港和海南文昌先聚为一类,再与广东湛江聚为一类。



GDGZ: Guangzhou, Guangdong; GDZJ: Zhanjiang, Guangdong; GXFC: Fangchenggang, Guangxi; HNWC: Wenchang, Hainan.

图2 基于UPGMA的小花老鼠筋4个群体的遗传聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 4 *A. ebracteatus* populations based on UPGMA

2.4 群体间的遗传分化与群体结构估计

4个群体的SSR数据的分级AMOVA显示,4个小花老鼠筋群体间变异为36%,群体内变异为64%,遗传变异主要来自群体内不同的个体间(表4)。

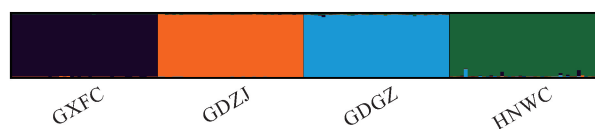
2.5 群体结构分析

由于Structure软件在 $K=4$ 时能较好地分为4个主要色块,表明最优 K 值为4。海南文昌的色块相较于其他群体的色块底部更复杂一些(图3),表明海南文昌的小花老鼠筋遗传多样性最高。由于海南文昌小花老鼠筋的等位基因数(4.111)高于其他群体(表3),结合等位基因数及Structure软件分析,证明海南文昌的小花老鼠筋遗传多样性最高。

表 4 通过微卫星标记估计的小花老鼠簕的 AMOVA

Table 4 AMOVA of *A. ebracteatus* estimated by microsatellite markers

变异来源 Source of variation	自由度 Degree of freedom	离差平方和 Sum of squares	均方 MS	估计方差 Estimated variation	变异百分比/% Percentage of variation/%
Among populations	3	281.863	93.954	1.149	36
Within populations	316	636.663	2.015	2.015	64
Total	319	918.526		3.164	100



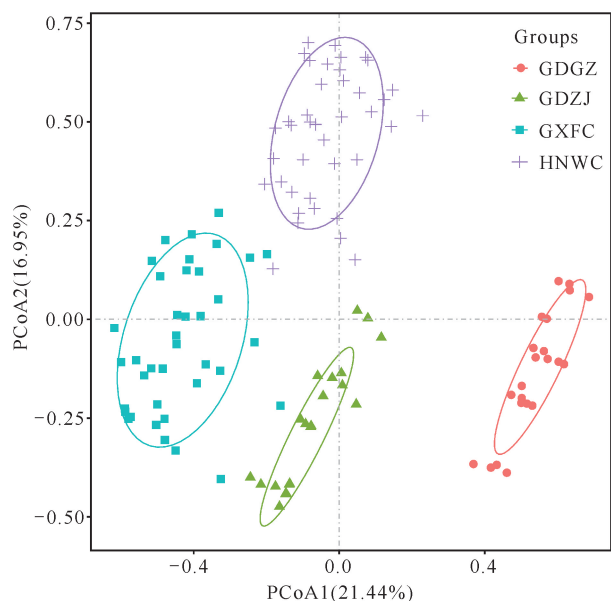
GDGZ: Guangzhou, Guangdong; GDZJ: Zhanjiang, Guangdong; GXFC: Fangchenggang, Guangxi; HNWC: Wenchang, Hainan

图 3 160 个小花老鼠簕基因型的群体结构

Fig. 3 Population structure of 160 genotypes of *A. ebracteatus*

2.6 二维主坐标分析

利用 GenALEX 6.51b2 软件对 160 份样本进行主成分分析(图 4),进一步验证 Structure 的群体分析结果,主坐标 1 和主坐标 2 分别揭示总变异的 21.44% 和 16.95%。其结果与 UPGMA 树基本一致(图 4),GDGZ 与其他群体之间有明显的遗传分化,其余 3 个群体之间较接近。



GDGZ: Guangzhou, Guangdong; GDZJ: Zhanjiang, Guangdong; GXFC: Fangchenggang, Guangxi; HNWC: Wenchang, Hainan

图 4 二维主坐标分析结果

Fig. 4 Plot of principal co-ordinates analysis

3 讨论

小花老鼠簕在我国海南、广东和广西均有分布。海南文昌清澜港是其集中分布区,三亚榆林河的小花老鼠簕已经灭绝,儋州湾和东寨港有少量分布^[24]。王日明等^[25]报道钦江河口潮滩分布有部分小花老鼠簕,但是笔者采样时没有找到小花老鼠簕群落。因此,本研究仅探讨广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌 4 个小花老鼠簕群体。

本研究选用 9 对 SSR 标记对广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌的小花老鼠簕进行遗传多样性分析。9 个微卫星标记均来自小花老鼠簕的近缘种老鼠簕,其中 6 个核微卫星标记的引物与 Geng 等^[21]开发的老鼠簕的核微卫星引物一致,3 个叶绿体微卫星标记的引物与 Geng 等^[22]开发的老鼠簕叶绿体微卫星引物一致。Geng 等^[21]从老鼠簕和榄李 (*Lumnitzera racemosa*) 中分别分离到 8 和 9 个核微卫星基因座,每个基因座的等位基因数在老鼠簕中有 2 到 8 个不等,在榄李中从 2 到 9 个不等,老鼠簕的观测杂合度为 0.200—0.875,榄李为 0.025—0.350,这些核微卫星标记能有效分析这两种红树植物的遗传多样性和种群遗传结构。Geng 等^[22]从老鼠簕、桐花树 (*Aegiceras corniculatum*)、海榄雌 (*Avicennia marina*) 和榄李中开发多态性叶绿体微卫星标记,对 229 株老鼠簕、509 株桐花树、369 株海榄雌和 216 株榄李进行研究,发现每个标记有 2—4 个等位基因,基因多样性在 0.005 到 0.675 之间,这些 cpSSR 标记将有助于分析这 4 个物种的母系分布和种群遗传结构。本研究所用标记检测到的等位基因数为 2—14 个。本研究使用的 6 个核微卫星位点的多态性信息含量均大于 0.50,根据 Botstein 等^[23]的标准,均呈现出高度多态性。因此,这些位点可以提供的遗传信息相对较多。小花老鼠簕的 cpSSR 遗传多样性处于中低水平, Acaicp02 (PIC = 0.374 0) 和 Acaicp03 (PIC = 0.467 3) 为中度多态位点, Acaicp04 (PIC =

0.140 7)为低度多态位点。综合考虑等位基因数、多态性信息含量及 Shannon's 多样性指数 3 个指标, Acil13、Acai02、Acai08、Acai11、Acai12、Acai13 等核 SSR 位点表现出较高的遗传多样性,表明这些位点较好地反映了广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌的小花老鼠簕的遗传多样性,适合应用于广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌的小花老鼠簕的遗传多样性检测。

群体遗传多样性表明,4 个小花老鼠簕群体的遗传多样性较丰富,等位基因数为 2.444—4.111,平均值为 3.167。观测杂合度和期望杂合度的平均值分别为 0.396 和 0.442。广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌 4 个群体的小花老鼠簕的遗传多样性相比较,海南文昌的小花老鼠簕的等位基因数(4.111)高于其余 3 个群体。在 Structure 分析中,海南文昌的色块相较于其他群体的色块底部更复杂一些(图 3),表明海南文昌的小花老鼠簕的遗传潜力较大,物种的杂合程度较高。

聚类 and 主成分分析结果与各群体的地理位置分布较为一致,4 个群体被分为两大类,除广东广州的小花老鼠簕外,广东湛江、广西防城港及海南文昌的小花老鼠簕聚为一类,符合各群体地理位置分布。本结果显示广东广州的小花老鼠簕与其他各群体遗传分化最大。

本研究采用 6 对 nSSR 标记及 3 对 cpSSR 标记,利用全自动 DNA 测序仪取代传统的垂直聚丙烯酰胺凝胶电泳进行 SSR 基因分型。SSR 荧光标记毛细管电泳检测方法能够直接读出目标 DNA 片段的准确大小。显然,相比于常规的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,SSR 荧光标记毛细管电泳检测数据更为精确,同时解决了大规模不同批次 DNA 指纹鉴定数据准确比较及有效整合的难题^[26]。然而,若要更全面反映小花老鼠簕的遗传多样性,应将更多的小花老鼠簕群体纳入进来。

在过去的几十年中,小花老鼠簕种群的数量和规模急剧减少。小花老鼠簕现在是一种濒危植物,但是群体遗传多样性表明,4 个小花老鼠簕群体的遗传多样性较丰富。尽管本研究中使用了有限的基因座,但为小花老鼠簕的遗传多样性提供了基础数据。在这项研究中,基因座之间的基因流差异较大(表 2),这可能与这些基因座上的选择压力差异有关。

小花老鼠簕面临濒危可能是由于人类活动对其栖息地的破坏、繁育能力差以及病虫害等导致的,而

非缺乏遗传多样性。由于笔者曾在野外发现虾塘污水排放导致小花老鼠簕烂根,所以推测人为干扰可能是小花老鼠簕面临的巨大威胁。建议采用以下保护措施:(1)优先采用就地保护策略,如防止药用用途的非法采挖,同时加强对小花老鼠簕生境的保护。(2)通过人工繁殖来扩大种群规模。可以通过人工育种培育出大量的小花老鼠簕,然后将它们移植到野外,以达到扩大种群规模的目的。(3)采取迁地保护战略,在其他地区建立新的种群。(4)加强对小花老鼠簕繁殖生物学的研究。运用繁殖生物学的原理与方法,对小花老鼠簕授粉受精、胚珠发育、种子萌发、花部特征及交配系统等方面进行分析研究,如采用荧光染色观察花粉粒萌发及花粉管生长,采用石蜡切片法对胚珠结构进行观察,研究小花老鼠簕是否为需光种子,对温度的适应性,抗盐能力,在自然生境下的萌发率及幼苗成活率,花果期、群体花期及单花花期,花粉活力及柱头的可授性,杂交指数、花粉胚珠比,结合人工控制授粉试验,判断小花老鼠簕群体内是否存在以异交为主的混合交配系统,是否存在部分自交亲和现象,是否需要传粉媒介(如昆虫和风)等。(5)加强对小花老鼠簕病虫害防治方面的研究。

4 结论

本研究通过 9 对 SSR 引物对广东广州、广东湛江、广西防城港及海南文昌 4 个群体的小花老鼠簕进行遗传多样性分析。9 对 SSR 引物共检测到 61 个等位基因。本研究使用的 6 个核微卫星位点的多态性信息含量均大于 0.50,都呈现出高度多态性。4 个群体被分为两大类,聚类结果较好地反映了各群体的地理位置分布。9 个多态性微卫星位点揭示了 4 个小花老鼠簕群体的遗传多样性较丰富。小花老鼠簕的濒危可能是由于人类活动、繁育能力差以及病虫害等导致的。建议优先采用就地保护策略,并采用人工繁殖来扩大种群规模,加强对小花老鼠簕繁殖生物学以及病虫害防治方面的研究。本研究结果为小花老鼠簕的保护、评价以及开发利用提供了科学依据。

参考文献

- [1] 吴威,李彩霞,陈雪初.基于生态系统服务的海岸带生态修复工程成效评估:以鸚鵡洲湿地为例[J].华东师范大学学报(自然科学版),2020(3):98-108.
- [2] 李晶,雷茵茹,崔丽娟,等.我国滨海滩涂湿地现状及研究进展[J].林业资源管理,2018(2):24-28,137.
- [3] CHEN B Q, XIAO X M, LI X P, et al. A mangrove for-

- est map of China in 2015: analysis of time series Landsat 7/8 and Sentinel-1A imagery in Google Earth Engine cloud computing platform [J]. *ISPRS Journal of Photogrammetry and Remote Sensing*, 2017, 131: 104-120.
- [4] COSTANZA R, D'ARGE R, GROOT R D, et al. The value of the world's ecosystem services and natural capital [J]. *Nature*, 1997, 25(1): 3-15.
- [5] 范航清, 王文卿. 中国红树林保育的若干重要问题[J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 2017, 56(3): 323-330.
- [6] TOMLINSON P B. *The botany of mangroves* [M]. Cambridge: Cambridge University Press, 1986.
- [7] 王文卿, 王瑁. *中国红树林* [M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [8] 廖宝文, 张乔民. 中国红树林的分布、面积和树种组成[J]. *湿地科学*, 2014, 12(4): 435-440.
- [9] 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.
- [10] 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: 161-170.
- [11] 白晓倩, 陈于, 张仕杰, 等. 基于表型性状和 SSR 标记的板栗品种遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. *植物遗传资源学报*, 2022, 23(4): 972-984.
- [12] HA Y J, SA K J, LEE J K. Identifying SSR markers associated with seed characteristics in *Perilla* (*Perilla frutescens* L.) [J]. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 2021, 27(1): 93-105.
- [13] LI X X, QIAO L J, CHEN B R, et al. SSR markers development and their application in genetic diversity evaluation of garlic (*Allium sativum*) germplasm [J]. *Plant Diversity*, 2022, 44(5): 481-491.
- [14] 公培民, 宁书菊, 叶齐, 等. 马蓝转录组中 SSR 位点信息特征分析[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(12): 4000-4008.
- [15] 李俊仁, 陈秀珍, 汤小婷, 等. 穿心莲转录组 SSR 位点信息分析[J]. *中国中药杂志*, 2018, 43(12): 2503-2508.
- [16] GENG Q F, WANG Z S, TAO J M, et al. Ocean currents drove genetic structure of seven dominant mangrove species along the coastlines of Southern China [J]. *Frontiers Genetics*, 2021: 12615911.
- [17] CERÓN-SOUZA I, BERMINGHAM E, MCMILLAN W O, et al. Comparative genetic structure of two mangrove species in Caribbean and Pacific Estuaries of Panama [J]. *BMC Evolutionary Biology*, 2012, 12: 205.
- [18] 阮宇, 吕佳, 李俊清, 等. 利用近似贝氏计算推论台湾海峡沿岸秋茄种群的拓殖路线[J]. *生态学报*, 2015, 35(13): 4304-4313.
- [19] MILLÁN-AGUILAR O, MANZANO-SARABIA M, NETTEL-HERNANZ A, et al. Genetic diversity of the black mangrove *Avicennia germinans* (L.) stearn in northwestern Mexico [J]. *Forests*, 2016, 7(9): 197.
- [20] HU W M, WANG S W, JIAN S G, et al. Discovery and comparative assessment of SNPs and SSRs for genetic diversity analysis of wild *Heritiera littoralis* Dryand (Sterculiaceae), an endangered mangrove tree species [J]. *Conservation Genetics Resources*, 2015, 7(3): 663-668.
- [21] GENG Q F, LIAN C L, TAO J M, et al. Permanent Genetic Resources: development of microsatellite markers for two nonviviparous mangrove species, *Acanthus ilicifolius* and *Lumnitzera racemosa* [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(2): 377-380.
- [22] GENG Q F, KIMURA M K, LIAN C L, et al. Isolation and characterization of chloroplast microsatellite markers in four mangrove species, *Aegiceras corniculatum*, *Avicennia marina*, *Acanthus ilicifolius* and *Lumnitzera racemosa* [J]. *Conservation Genetics*, 2009, 10(4): 1133-1140.
- [23] BOTSTEIN D, WHITE R L, SKOLNICK M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. *American Journal of Human Genetics*, 1980, 32(3): 314-331.
- [24] 张颖, 陈光程, 钟才荣. 中国濒危红树植物研究与恢复现状[J]. *应用海洋学学报*, 2021, 40(1): 142-153.
- [25] 王日明, 梁喜幸, 周晓妍, 等. 钦江河口潮滩红树林群落空间分布[J]. *遥感学报*, 2022, 26(6): 1143-1154.
- [26] 程本义, 夏俊辉, 龚俊义, 等. SSR 荧光标记毛细管电泳检测法在水稻 DNA 指纹鉴定中的应用[J]. *中国水稻科学*, 2011, 25(6): 672-676.

Genetic Diversity of *Acanthus ebracteatus* Based on Microsatellite Markers

GAO Tingwei, TONG Lihao, ZHONG Yunxu, YAN Bing, CHEN Siting* *

(Guangxi Key Laboratory of Mangrove Conservation and Utilization, Guangxi Academy of Marine Sciences (Guangxi Mangrove Research Center), Guangxi Academy of Sciences, Beihai, Guangxi, 536000, China)

Abstract: Nine polymorphic microsatellite loci were selected to study the genetic diversity of 4 populations of *Acanthus ebracteatus*, and the endangerment causes of *A. ebracteatus* were identified. The results showed that 61 alleles were detected at 9 polymorphic microsatellite loci in 4 populations, with an average of 6.778 alleles per locus and the Polymorphism Information Content (PIC) of 0.589. The mean number of alleles per population was 3.167, and the mean observed Heterozygosity (H_o) and expected Heterozygosity (H_e) were 0.396 and 0.442, respectively. The analysis of molecular variance (AMOVA) showed that 36% and 64% of genetic variation were among and within populations, respectively, which indicated that the genetic variation mainly came from different individuals within populations. The results of cluster analysis and Principal Coordinates Analysis (PCoA) were consistent. The four populations were classified into two groups. The population from Guangzhou, Guangdong was clustered into one group, while those from Zhanjiang, Guangdong, Fangchenggang, Guangxi and Wenchang, Hainan were clustered into the other group. The four populations had rich genetic diversity, and the clustering results were consistent with the geographical distribution of each population. The endangerment of *A. ebracteatus* may be caused by human activities, breeding, diseases and insect pests rather than the low genetic diversity. This study provides a theoretical basis for the conservation, development and utilization of *A. ebracteatus*.

Key words: *Acanthus ebracteatus*; microsatellite; genetic diversity; population characteristics; conservation strategies

责任编辑: 陆媛峰



微信公众号投稿更便捷

联系电话: 0771-2503923

邮箱: gxxk@gxas.cn

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