

省沽油群体遗传多样性的 AFLP 分析

李凤鸣 张华新 杨秀艳

(中国林业科学研究院 北京 100091)

摘要: 利用 4 对 AFLP 引物对来自安徽石台、湖北大悟和河南桐柏的 3 个省沽油群体进行遗传多样性分析,共扩增出 489 条带,其中多态性条带 460 条,多态性百分比为 93.99%。不同群体 Nei's 基因多样性指数(H)和 Shannon's 信息指数(I)变化范围分别为 0.1920~0.2046 和 0.2937~0.3151,其中湖北大悟群体遗传多样性最高。物种水平和种群水平的 H 分别为 0.2190 和 0.1964,群体内变异占总变异的 89.68%,表明省沽油遗传变异主要存在于各群体内部。3 个群体的平均遗传距离为 0.0292,UPGMA 聚类分析结果说明省沽油各群体间亲缘关系较近并和地域具有相关性。建议省沽油的遗传资源保护应以种内遗传多样性的保护为主。

关键词: 省沽油; 群体; AFLP; 遗传多样性

Populations Genetic Diversity Analysis of *Staphylea bumalda* Based on AFLP Markers

LI Feng-ming, ZHANG Hua-xin, YANG Xiu-yan

(Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091)

Abstract: Genetic diversity of 3 populations of *Staphylea bumalda* that sampled from Hubei, Anhui and Henan was detected by employing amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers. 489 clear bands were amplified with 4 pairs of primer and 460 (93.99%) of them were polymorphic. Nei's gene diversity and Shannon's information index ranged from 0.1920 to 0.2046 and from 0.2937 to 0.3151, respectively. The highest population genetic diversity was Dawu from Hubei Province. Nei's gene diversity for the species and population were 0.2190 and 0.1964, respectively. The analysis of variance showed that the main variance within populations was 89.68%. The mean genetic distance among the 3 population was 0.0292. The results of UPGMA cluster analysis based on genetic distance revealed there was high genetic similarity between the population and the genetic distance was closely related to its distribution area. The research suggests that the important way for *Staphylea bumalda* conservation will be conserving the high genetic diversity populations.

Key words: *Staphylea bumalda*; Population; AFLP; Genetic diversity

省沽油 (*Staphylea bumalda*) 属于省沽油科 (*Staphyleaceae*) 省沽油属 (*Staphylea* L.) 多年生落叶灌木或小乔木,别名水条、珍珠花,是优良的木本油料、可食用灌木和园林绿化树种^[1-2]。省沽油主要分布于中国、日本和朝鲜半岛,在我国广泛分布于东北、黄河流域和长江流域^[3-4]。省沽油的食物和药用价值高,20 世纪 90 年代研究发现其嫩

叶、嫩梢和花蕾中粗脂肪、总氨基酸和必需氨基酸等营养成分含量很高^[5];种子和根均可入药^[6];种子油脂中含有丰富的不饱和脂肪酸^[7-8],可作为保健用油、食用油或化妆品的新油源,具有广泛的应用前景。

国内对省沽油的研究主要集中在种子繁殖技术^[9-15]、组织培养^[15-16]、营养成分测定^[7-8, 17-19]以及

收稿日期: 2011-06-09 修回日期: 2011-07-26

基金项目: 农业科技成果转化资金项目(2009GB24320481); 国家林业局重点项目(2006-04)

作者简介: 李凤鸣, 硕士研究生, 主要从事林木遗传育种的研究。E-mail: lifengming-nnd@163.com

通讯作者: 张华新, 研究员, 主要从事林木遗传育种的研究。E-mail: zhanghx1998@126.com

生物学特性^[20-21]方面。省沽油作为木本油料作物分布广泛,种质资源丰富,然而省沽油的遗传基础研究方面却十分薄弱。扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记技术是一种检测 DNA 多态性的有效方法^[22]。该标记具有快速、灵敏、稳定,所需 DNA 量少,多态性检出率高、重复性好等优点。现已广泛应用于遗传图谱构建、遗传多样性研究、基因定位及品种鉴定等方面^[23]。为了解省沽油种质资源的分布情况,本文以 AFLP 分子标记为工具,对于省沽油的遗传多样性开展研究,为今后该种的利用与遗传改良提供可靠信息。

表 1 省沽油取样情况

Table 1 The sampling situation of *Staphylea bumalda*

群体 Population	样本数 Sample size	经度 Longitude	纬度 Latitude	平均海拔(m) Altitude	年均气温(°C) Annual mean temperature	年均降水量(mm) Annual precipitation	无霜期(d) Frost free period
湖北大悟	10	114°17′	31°45′	400	15.4	1140	235
安徽石台	9	117°33′	30°14′	600	17.0	1583	230
河南桐柏	9	113°24′	32°21′	210	15.0	933 ~ 1181	211 ~ 231

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取与检测 采用天根生物科技有限公司新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取所需 DNA。将提取的 DNA 经 TE 稀释 100 倍后,用紫外分光光度计测定波长为 260nm 及 280nm 处的光吸收值(OD 值),确定 DNA 的纯度和浓度。用 1 × TAE 缓冲液和 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量。

1.2.2 AFLP 分析 AFLP 体系建立参照 Vos 等^[23]的方法。选用 EcoRI、MseI 两种酶和 T4DNA 连接酶,酶切和连接一步完成。预扩增产物经 1.2% 琼脂糖电泳检测预扩增效果,剩余产物用 TE-buffer 按 1:20 稀释后进行选择性扩增。通过预备试验,筛选出扩增产物稳定、重复性好、多态性高且分辨能力强的引物对所有个体的基因组 DNA 预扩产物进行选择性扩增。选择性扩增采用 25 μl 反应体系:预扩增稀释样品 2 μl、10 × PCR 缓冲液 0.5 μl、dNTPS 2.5 μl、EcoRI 引物和 MseI 引物各 1 μl、Taq 酶 0.5 μl、ddH₂O 17.5 μl。选择性扩增 PCR 反应程序:94℃ 变性 30s, 65 ~ 55℃ (每次循环降低 0.7℃ 或 1℃) 退火 30s, 72℃ 延伸 80s, 共 10 ~ 12 个循环; 然后 94℃ 变性 30s, 55℃ 退火 30s, 72℃ 延伸 80s, 共 23 个循环。所有 PCR 扩增反应均在 ABI9700 型 PCR 扩增仪上进行。选择性扩增产物经过 95℃ 变性

1 材料与方 法

1.1 试验材料

2009 年 8 月从省沽油分布较为集中的湖北大悟、安徽石台、河南桐柏 3 个省区进行采种,采种地点详细资料见表 1。采种母株年龄为 5 ~ 6 年生,母株选取标准为生长正常、无病虫害植株,同一群体采种母株之间相距 50m 以上。由于人为活动和农业生产的影响,使得省沽油的分布极为分散,群体较小,因此能选择采样母株数量很少。将所采种子分群体标记后带回实验室,于当年 10 月经沙藏露白后移入大棚栽植,取其嫩叶用于基因组 DNA 的提取。

5min 后,用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。电泳采用北京东方君意公司生产的测序电泳槽,在 85W 恒功率的条件下电泳 90min。电泳结束后采用银染检测方法进行 AFLP 指纹显色反应。

1.3 数据处理与统计分析方法

对扩增后清晰且易于辨认的谱带采用“0,1”系统记录其位置,有带标记为 1,无带标记为 0,建立样品 AFLP 标记的 0,1 矩阵。用 POPGENE 1.32 软件计算以下遗传多样性参数:多态带数(AP)和多态带百分率(P);等位基因平均数(Na);有效等位基因数(Ne);Nei's 基因多样性指数(H),Shannon 信息指数(I);Nei's 遗传距离(D)和遗传一致度(IN)。采用非加权算术平均法(UPGMA)进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 AFLP 扩增多态性

本试验从 64 对引物中筛选出 4 对多态性较高的引物,对 28 份省沽油材料进行 AFLP 扩增(表 2),共扩增出 489 条带,平均每对引物扩增的总条带数为 122.25 条,其中多态性条带 460 条,平均每对引物扩增出 115 条多态性条带,多态性百分比为 93.99%。

2.2 省沽油群体遗传多样性

由表 3 可以看出,省沽油 3 个群体的多态位点百分率 P 在 62.37% ~ 68.71% 之间;大悟群体多态

位点百分率最高,桐柏群体多态位点百分率最低。Shannon's 信息指数(I) 在 0.2937~0.3151 之间,Nei's 基因多样性指数(H) 在 0.1920~0.2046 之间。省沽油物种水平和种群水平的 I 分别为 0.3493 和 0.3023; 物种水平和种群水平的 H 分别为 0.2190 和

0.1964 均表明省沽油群体间遗传多样性小于群体内遗传多样性,说明省沽油遗传多样性主要存在于种群内部。这两种指数所揭示的省沽油遗传变异规律是一致的,均表现为大悟群体最高($H=0.2046$, $I=0.3151$) 桐柏群体最低($H=0.1920$, $I=0.2937$)。

表 2 AFLP 选择性扩增引物产生的条带多态性

Table 2 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on the four primer-combinations

引物组合 Primer combination	扩增谱带数 No. of amplified bands	多态谱带数 No. of polymorphic bands	多态性谱带百分比(%) Percent of polymorphic bands
E-AAC/M-CAC	117	110	94.02
E-ACG/M-CAG	109	104	95.41
E-ACG/M-CTA	149	142	95.30
E-AGG/M-CAA	114	104	91.23
合计 Total	489	460	-
平均 Mean	122.25	115	93.99

表 3 AFLP 检测省沽油 3 个群体的遗传多样性水平

Table 3 Genetic diversity of the three populations of *Staphylea bumalda* detected by AFLP

群体 Population	样本量 N	多态条带数 AP	多态条带百分率 (%) P	等位基因 平均数 N_a	有效等位基因数 N_e	Nei's 基因多样性 指数 H	Shannon 信息 指数 I
物种水平 Populations level	28	460	94.07	1.9407	1.3500	0.2190	0.3493
湖北大悟	10	336	68.71	1.6871	1.3389	0.2046	0.3151
安徽石台	9	318	65.03	1.6503	1.3156	0.1926	0.2981
河南桐柏	9	305	62.37	1.6237	1.3214	0.1920	0.2937
平均 Mean		319.67	65.37	1.6537	1.3253	0.1964	0.3023

2.3 群体间遗传关系的聚类分析

进一步以 Nei's 遗传距离(D) 和遗传一致度(IN) 评价省沽油各群体之间的遗传分化程度(表 4)。省沽油各群体的遗传一致度在 0.9649~0.9763 之间,遗传距离在 0.0240~0.0357 之间,平均遗传距离为 0.0292,说明省沽油种群各群体间遗传一致度较高,遗传距离偏小。大悟群体与桐柏群体 Nei's 遗传一致度最高(0.9763),遗传距离最小(0.0240);石台群体与桐柏群体 Nei's 遗传一致度最低(0.9649),遗传距离最大(0.0357)。

根据各群体之间的遗传距离采用 UPGMA 聚类对省沽油 3 个群体进行聚类分析,如图 1 所示。大悟群体与桐柏群体间遗传距离最小,亲缘关系较近;石台群体与桐柏群体间遗传距离最大,亲缘关系较远。

3 讨论

3.1 省沽油群体遗传多样性

制定一个物种的科学保护与利用措施必需以了

表 4 AFLP 检测省沽油 3 个群体的遗传距离及遗传一致度
Table 4 Nei's genetic identity and genetic distance in three populations of *Staphylea bumalda* detected by AFLP

群体 Population	HBDW	AHST	HNTB
HBDW	-	0.9725	0.9763
AHST	0.0279	-	0.9649
HNTB	0.0240	0.0357	-

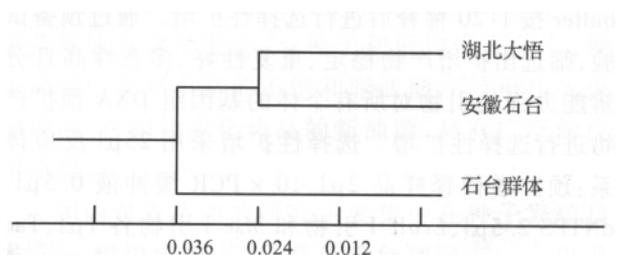


图 1 省沽油各群体基于遗传距离的 UPGMA 聚类图
Fig. 1 Dendrogram of UPGMA analysis for 3 *Staphylea bumalda* populations based on Nei's genetic distance

解其遗传资源状况为基础。本研究发现在湖北、安徽和河南所收集的 3 个省沽油群体的遗传多样性主

要存在于各群体内部, 群体内遗传多样性占总遗传多样性的 86.54%, 表明省沽油遗传变异主要来源于群体内, 群体间的遗传变异较小。这种结果可能缘于省沽油为虫媒花, 群体之间通过有性繁育系统进行基因交流, 从而降低了群体间的遗传变异。另一方面, 人为活动与农业生产常常使同一群体被分隔化而呈现小面积零星分布, 造成群体内遗传变异增加。

3.2 省沽油群体间亲缘关系

省沽油群体间亲缘关系分析结果表明各群体遗传一致度很高, 参试省沽油各群体间亲缘关系较近。大悟群体与桐柏群体亲缘关系最近; 石台群体与桐柏群体亲缘关系最远, 石台群体与大悟群体间亲缘关系介于两者之间。从地理分布来看, 湖北大悟与河南桐柏两群体相隔距离较近, 而与石台群体距离较远, 前两个群体间基因交流机会较多, 因而它们的遗传距离也较近。总体来看, 3 个群体的遗传一致度较高, 遗传分化较小, 这一方面与采样群体较少且所处地域距离较近有关, 同时也表明省沽油资源由于长期未受到合理保护, 有些基因资源可能已经消失。

通过以上研究结果认为, 省沽油的遗传资源保护应以种内遗传多样性的保护为主。根据目前省沽油的分布状况建议尽快开展全分布区内全部群体遗传多样性的评价, 对遗传多样性高的群体加以保护, 以免这一优良植物种遗传资源的更大流失。

参考文献

- [1] 中国科学院植物所. 中国高等植物图鉴[M]. 北京: 科学出版社, 1980
- [2] 中国科学院植物所. 高等植物科属检索[M]. 北京: 科学出版社, 1983
- [49] Cohen C K, Fox T C. The role of iron-deficiency stress responses in stimulating heavy-metal transport in plants [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116: 1063-1072
- [50] Li P, Qi J L, Wang L, et al. Functional expression of MxIRT1, from *Malus xiaojinensis*, complements an iron uptake deficient yeast mutant or plasma membrane targeting via membrane [J]. *Plant Sci* 2006, 171: 52-59

- [3] 戴宝合. 野生植物资源学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003
- [4] 贾良智, 周俊. 中国油脂植物[M]. 北京: 科学出版社, 1987
- [5] 周芳. 汉中山区山野菜资源调查及特色品种的营养成分分析与评价[D]. 临汾: 陕西师范大学生物技术与工程学院, 2004: 52-59
- [6] 江苏新医学院. 中药大辞典[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1998
- [7] 毛多斌, 贾春晓, 金保全, 等. 省沽油种子油中脂肪酸的 GC-MS 分析[J]. *中国油脂* 2004, 29(3): 64-66
- [8] 贾春晓, 毛多斌, 孙晓丽, 等. 省沽油种子油中亚麻酸、亚油酸的分析[J]. *营养学报* 2004, 26(5): 410-411
- [9] 刘幼琪, 洪艳艳, 罗颖, 等. 珍珠花种子发芽条件的研究[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 1999, 21(1): 81-83
- [10] 张玉洁, 邓建钦, 菅根柱, 等. 省沽油育苗及栽培技术[J]. *林业科技开发* 2001, 15(6): 34-35
- [11] 胡士军, 韩凯, 薛阳坡, 等. 省沽油种子育苗技术[J]. *河南林业科技* 2000, 20(1): 23-24
- [12] 胡干枝, 张立青, 方习海. 珍珠菜繁殖栽培技术[J]. *安徽林业* 2003(4): 19
- [13] 高广梅, 王家田, 刘峰, 等. 珍珠花种植技术[J]. *河南林业科技* 2001, 21(4): 46-48
- [14] 刘道梅. 珍珠花种子育苗技术[J]. *河南科技* 2002(12): 27
- [15] 刘正祥, 张华新, 刘涛. 省沽油嫩枝扦插生根特性[J]. *南京林业大学学报: 自然科学版* 2007, 31(5): 75-80
- [16] 刘幼琪, 洪艳艳, 陈永勤, 等. 珍珠花丛生芽的诱导及生根条件的研究[J]. *湖北大学学报: 自然科学版*, 2000, 22(3): 289-291
- [17] 刘幼琪, 汤行春, 洪艳艳, 等. 珍珠花胚性愈伤组织的诱导[J]. *湖北工学院学报* 2000, 15(3): 60-62
- [18] 刘正祥, 张华新, 刘涛. 省沽油种子油脂分析与功能评价[J]. *林业科学* 2008, 44(2): 48-54
- [19] 刘正祥, 张华新, 刘涛, 等. 省沽油种子营养成分分析与评价[J]. *经济林研究* 2008, 26(3): 68-73
- [20] 张兴军, 蔡明历, 洪小平. 大别山省沽油形态特征与生态特征初步调查[J]. *湖北农业科学*, 1996(6): 58-61
- [21] 刘正祥, 张华新, 刘涛. 省沽油生物学特性研究[J]. *林业科学研究* 2007, 20(5): 705-709
- [22] Zabeau M, Vos P. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7, (publication No. 0534858A) [P]. European Patent Office, Paris, 1993
- [23] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A flexible technique for DNA fingerprinting[J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 24: 65-73

(上接第 129 页)

- [51] 董玉琛, 曹永生, 张学勇, 等. 中国普通小麦初选核心种质的产生[J]. *植物遗传资源学报* 2003, 4(1): 1-8
- [52] 邱丽娟, 郭勇, 黎裕, 等. 中国作物新基因发掘: 现状、挑战与展望[J]. *作物学报* 2011, 37(1): 1-17
- [53] Raboy V. Progress in breeding low phytate crops [J]. *J Nutri*, 2002, 132: 503-505
- [54] Otegui M S, Capp R, Staehelin L A. Developing seeds of Arabidopsis stored different minerals in two types of vacuoles and in the endoplasmic reticulum[J]. *Plant Cell* 2002, 14: 1311-1327