

罗汉松遗传多样性的 SCoT 分析

韦泳丽¹, 何新华^{1,2*}, 罗聪¹, 陈虎¹

(1. 广西大学, 南宁 530004; 2. 广西作物遗传改良与生物技术重点实验室, 南宁 530007)

摘要: 采用 SCoT 分子标记技术对 8 份罗汉松种质材料进行遗传多样性研究。结果表明, 从 80 条引物中筛选出 10 条重复性好、条带清晰的引物进行 PCR 扩增, 共产生 136 条带, 其中多态性带 122 条(占 88.97%), 8 个罗汉松种质间的遗传相似系数范围在 0.39~0.80 说明罗汉松的遗传多样性丰富。利用 UPGMA 进行系统的聚类分析显示, 将 8 份罗汉松材料分为 2 大类; 主成分分析结果与聚类分析结果相一致。可见, 利用 SCoT 分子标记可有效的分析罗汉松种质资源的遗传多样性, 为罗汉松种质亲缘关系的鉴别和分类提供理论依据。

关键词: 罗汉松; SCoT; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: Q949.66 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)01-0090-04

Genetic diversity of podocarpus by SCoT markers

WEI Yong-Li¹, HE Xin-Hua^{1,2*},

LUO Cong¹, CHEN Hu¹

(1. *Guangxi University*, Nanning 530004, China; 2. *Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences*, Nanning 530007, China)

Abstract: The genetic diversity of 8 podocarpus germplasms was analyzed by SCoT markers. The results showed that a total of 136 bands were produced by 10 primers, of which 122 bands(88.97%) were polymorphic, and the genetic similarity coefficients were between 0.39-0.80. So there were comparatively great genetic diversity among the podocarpus germplasms. A cluster analysis conducted with UPGMA also showed that the 8 podocarpus germplasms could be classified into 2 groups. The result of principal component analysis(PCA) was the same as the results of UPGMA cluster analysis. SCoT markers can be effectively used to evaluate the genetic diversity of podocarpus germplasms, thus providing a theoretical foundation for the identification and classification of podocarpus germplasms.

Key words: podocarpus; SCoT; genetic diversity; cluster analysis

目标起始密码子多态性分子标记(start codon targeted polymorphism, SCoT)作为一种有效的目的基因分子标记技术可用于遗传多样性和亲缘关系研究, 已在水稻(Collard 等, 2009)、花生(熊发前等, 2010)、龙眼(陈虎等, 2009)、芒果(Luo 等, 2010; 2011)等植物上得到应用, 目前尚未见有 SCoT 分子标记在林木上应用的研究报道。罗汉松类植物是裸

子植物中引人注目的类群, 有关罗汉松类植物与竹柏类植物的系统发育分类地位目前仍然存在争论。为此, 本试验以 8 份罗汉松种质为试材, 利用 SCoT 分子标记技术探讨了罗汉松种质遗传多样性以及罗汉松类植物与竹柏类植物的亲缘关系, 以期为进一步探讨罗汉松类与竹柏类植物的分类提供科学依据。

收稿日期: 2011-07-28 修回日期: 2011-11-04

基金项目: 国家科技部农业科技成果转化项目(2010GB2E100361); 广西科学研究与技术开发项目(桂科攻 0992011-12, 桂科转 0998001-23) [Supported by the National Agricultural Science and Technology Achievements Extension Foundation of State Science and Technology Commission (2010GB2E100361); Scientific Research and Technology Development of Guangxi (GKG0992011-12, GKZ0998001-23)]

作者简介: 韦泳丽(1988-), 女, 在读硕士生, 研究方向为林木遗传育种, (E-mail) weiyongli927@163.com。

* 通讯作者: 何新华, 男, 教授, 研究方向为果树(林木)种质资源与种质创新, (E-mail) honest66222@163.com。

1 材料与方 法

1.1 材料及其来源

从贵港市科隆农林高新技术开发有限公司罗汉松资源圃中采集 8 份罗汉松种质资源的幼叶迅速置于液氮中带回实验室,放在 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存(表 1)。

表 1 罗汉松实验材料

Table 1 *Podocarpus germplasm* used for SCoT analysis

实验材料	拉丁名	引种来源
竹柏	<i>P. nageia</i>	广东
兰屿罗汉松	<i>P. costalis</i>	台湾
台湾罗汉松	<i>P. makaii</i>	台湾
短叶罗汉松	<i>P. macrophyllus</i> var. <i>maki</i>	云南
罗汉松	<i>P. macrophyllus</i>	广西北海
狭叶罗汉松	<i>P. macrophyllus</i> var. <i>angustitolius</i>	广东
小叶罗汉松	<i>P. wangli</i>	广西贵港
珍珠罗汉松	<i>P. brevisfolius</i>	广西融水

1.2 试剂

实验用的 SCoT 分子标记 1-36 号引物序列参照 Collard 等(2009)设计的引物合成,37-80 号引物参照 Luo 等(2010)设计的引物合成,所有引物由上海生工合成,琼脂糖和 dNTPs 购于上海生物工程,rTaqDNA 聚合酶和 DL2000 Marker 购于杭州博日科技有限公司。

1.3 实验方法

1.3.1 DNA 提取与检测 采用改良的 CTAB 法(陈虎等,2009)提取罗汉松 DNA,步骤如下:取 0.5 g 叶片加少量 PVP 用液氮研磨后,装入加有 800 μL 2% CTAB 提取液($65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预热)的 2 mL 离心管, $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1)混匀,12 000 r/min 离心 10 min;取上清液,加入等体积氯仿:异戊醇混匀,12 000 r/min 离心 10 min;收集上清液,加入等体积的异丙醇,放入 $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ 沉淀 20 min,12 000 r/min $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 离心 10 min;弃上清,用 75% 乙醇冲洗 2~3 次,自然晾干,加 TE 溶解 DNA,琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 完整性,同时用紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度,稀释至 50 ng/ μL 。

1.3.2 PCR 扩增 SCoT 扩增反应体系为:模板 DNA (50 ng/ μL) 1.0 μL 、 $10\times$ Buffer (含 Mg^{2+}) 2.5 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ dNTP 0.5 μL 、rTaqDNA 聚合酶(5 U/ μL)0.4 μL 、10 $\mu\text{mol/L}$ 引物 1 μL 、加水至 25 μL 。PCR 扩增反应在 Biometra Tprofessional PCR 仪上进行,扩增程序为 $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 4 min;95

$^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, $50\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min, $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 36 个循环;最后 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。扩增反应结束后,取 6 μL 扩增产物在 1.8% 琼脂糖凝胶中电泳,电泳缓冲液为 $1\times$ TAE,EB 染色后,利用凝胶成像系统拍照。

1.3.3 数据统计及分析 应用 GI_S-2010 凝胶成像系统进行电泳谱带检测,手工检带除去因胶板上亮点及点样孔所引起的计算机误检。清晰可辨的电泳条带全部用于统计分析,按扩增条带的有无记数,当某一扩增带出现时,赋值为“1”,不存在时赋值为“0”。根据 Nei-Li(Nei 等,1979)相似系数法分别计算各种质资源的遗传相似系数和遗传距离,聚类用不加权组平均法(UPGMA)(Sneath 等,1973)进行。用 NTSYS-pc(Rohlf,1998)软件将遗传相似系数进行 Dcenter 数据转化,求其特征量和特征向量,生成主坐标三维图,进行主坐标分析。

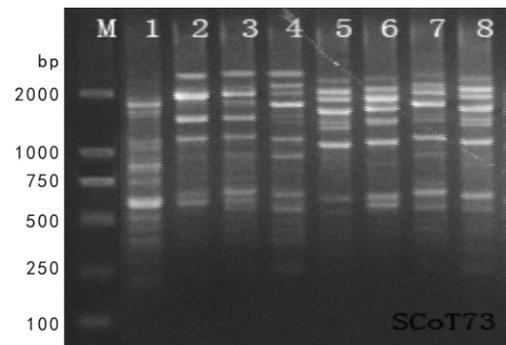


图 1 SCoT 73 号引物扩增结果
Fig. 1 Electrophoresis pattern amplified with primer SCoT 73

M:DL2000 Marker; 泳道 1-8:竹柏,兰屿罗汉松,台湾罗汉松,短叶罗汉松,罗汉松,狭叶罗汉松,小叶罗汉松,珍珠罗汉松。
M:DL2000 Marker; 1-8: *P. nageia*, *P. costalis*, *P. makaii*, *P. macrophyllus* var. *maki*, *P. macrophyllus*, *P. macrophyllus* var. *angustitolius*, *P. wangli*, *P. brevisfolius*.

2 结果与分析

2.1 SCoT 多态性分析

从 80 条 SCoT 分子标记引物中筛选出 10 条用于罗汉松的多态性分析,结果见图 1 和表 2。10 条引物共扩增出 136 条 DNA 带;每条引物扩增的条带数在 10~18 条之间,平均每条引物扩增出 13.6 条带,条带大小为 350~3 000 bp;10 条引物扩增产生的多态性条带为 122 条,这 10 条引物平均多态性为 88.97%,引物 9、47、73、75 号的 PCR 扩增产物

多态性达 100%，能将所有供试样品分开，这 4 条引物可作为鉴定这些罗汉松资源的特异标记引物，引物 74 号的多态性最低，也达到了 75%，说明罗汉松种质之间多态性非常高。

2.2 罗汉松种质间遗传相似性分析

用 NTSYS 软件计算罗汉松种质间的 Jaccard 遗传相似系数(表 3)。表 3 结果表明:8 个罗汉松种

质间的遗传相似系数范围在 0.39~0.80,平均遗传相似性系数为 0.60。其中兰屿罗汉松与台湾罗汉松的遗传相似性系数为 0.80,狭叶罗汉松与罗汉松、小叶罗汉松与狭叶罗汉松的相似性系数分别为 0.73、0.72,说明它们之间的亲缘关系很近。而竹柏与其他种质间的遗传相似性系数小,在 0.39~0.48 之间,说明竹柏与其他罗汉松种质的亲缘关系较远,

表 2 SCoT 分析所用引物序列及扩增结果

Table 2 The primer sequences and amplified results of ScoT analysis

引物编号 SCoT Primer ID	引物序列 Primer sequence (5'-3')	总条带数 Total No. of amplified bands	多态性带数 No. of polymorphism bands	条带大小 (bp)	多态带百分率(%) Percentage of polymorphism bands
9	CAACAATGGCTACCAGCA	14	14	600-2400	100
47	ACAATGGCTACCACTGCC	16	16	500-3000	100
48	ACAATGGCTACCACTGGC	12	10	400-2300	83.3
70	ACCATGGCTACCAGCGCG	12	10	400-2400	83.3
71	CCATGGCTACCACCGCCG	17	14	350-3000	82.3
72	CCATGGCTACCACCGCCC	14	12	400-2300	85.7
73	CCATGGCTACCACCGGCT	18	18	400-2300	100
74	CCATGGCTACCACCGGCA	12	9	500-2400	75
75	CCATGGCTACCACCGGAG	11	11	1000-2400	100
77	CCATGGCTACCACTACCC	10	8	800-2700	80
平均 Mean		13.6	12.2		88.97
合计 Total		136	122	350-3000	

表 3 罗汉松种质间的 Jaccard 遗传相似系数

Table 3 Jaccard's genetic similarity coefficient of 8 *Podocarpus germplasm*

	竹柏 <i>P. nageia</i>	兰屿罗汉松 <i>P. costalis</i>	台湾罗汉松 <i>P. makaii</i>	短叶罗汉松 <i>P. macrophyllus</i> var. <i>maki</i>	罗汉松 <i>P. macro-</i> <i>phyllus</i>	狭叶罗汉松 <i>P. macrophyllus</i> var. <i>angustitolius</i>	小叶罗汉松 <i>P. wangli</i>	珍珠罗汉松 <i>P. brevifolius</i>
竹柏 <i>P. nageia</i>	1.00							
兰屿罗汉松 <i>P. costalis</i>	0.48	1.00						
台湾罗汉松 <i>P. makaii</i>	0.44	0.80	1.00					
短叶罗汉松 <i>P. macrophyllus</i> var. <i>maki</i>	0.43	0.55	0.55	1.00				
罗汉松 <i>P. macrophyllus</i>	0.41	0.55	0.53	0.51	1.00			
狭叶罗汉松 <i>P. macrophyllus</i> var. <i>angustitolius</i>	0.46	0.65	0.62	0.62	0.73	1.00		
小叶罗汉松 <i>P. wangli</i>	0.39	0.64	0.58	0.65	0.69	0.72	1.00	
珍珠罗汉松 <i>P. brevifolius</i>	0.40	0.56	0.45	0.57	0.61	0.64	0.68	1.00

遗传差异较大。

2.3 亲缘关系分析

根据遗传相似系数,采用 UPGMA 法构建了罗汉松种质间的遗传关系聚类图(图 2)。从图 2 可以看出,以相似系数 0.43 来划分,可将 8 个罗汉松种

质分为 A、B 两类,竹柏单独归为 A 组,其它 7 个罗汉松类种质归为 B 组。在 B 组中,若以相似系数 0.64 划分,又可以将 B 组进一步分为 3 个亚组,兰屿罗汉松和台湾罗汉松归为 B1 组,短叶罗汉松为 B2 组,罗汉松、狭叶罗汉松、小叶罗汉松和珍珠罗汉

松归为 B3 组。

2.4 主坐标分析

利用 8 份罗汉松种质的遗传相似性系数进行主坐标分析, 绘制三维散点图(图 3)。从主坐标图可看出, 8 份种质被分为 4 组, 第 1 组为竹柏, 位于主坐标图的右方, 第 2 组为兰屿罗汉松和台湾罗汉松, 第 3 组为短叶罗汉松, 第 4 组为罗汉松、狭叶罗汉松、小叶罗汉松和珍珠罗汉松, 其中第 2、3、4 组距离相对较近, 它们与第 1 组距离较远, 主坐标分析结果显示, 竹柏与罗汉松在分子水平上表现出了较大的遗传差异。

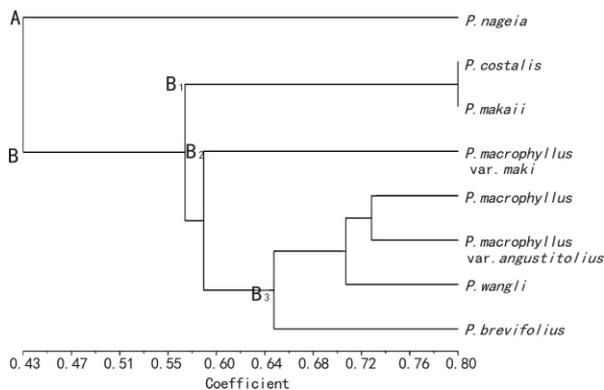


图 2 罗汉松种质资源 SCoT 分子聚类分析
Fig. 2 UPGMA Dendrogram of 8 *Podocarpus* germplasms based on SCoT Markers

比较主坐标分析结果与系统聚类分析结果可以看出, 2 种方法反映出的遗传关系基本一致。但是, 主坐标分析可以从不同方向、不同层面更加直观地显示各品系间的关系。

3 结论与讨论

SCoT 分子标记作为一种基于 PCR 技术的新型分子标记, 具有操作简单、引物具有通用性、成本低廉、多态性高、可获得丰富的遗传信息等诸多优点, 能更好地反映物种的遗传多样性和亲缘关系(Collard, 2009)。同时, SCoT 分析标记是的 ISSR、RAPD 技术的有效补充, 而作为目的基因标记, SCoT 分子标记为研究人员提供了除 SRAP、TRAP 等标记外一种能跟踪性状的新分子标记技术(熊发前, 2010)。所以其在罗汉松分类上具有一定的可靠性。

有关竹柏类分类地位存在不同的意见。Stiler (1912) 把竹柏类植物作为裸子植物中的新属

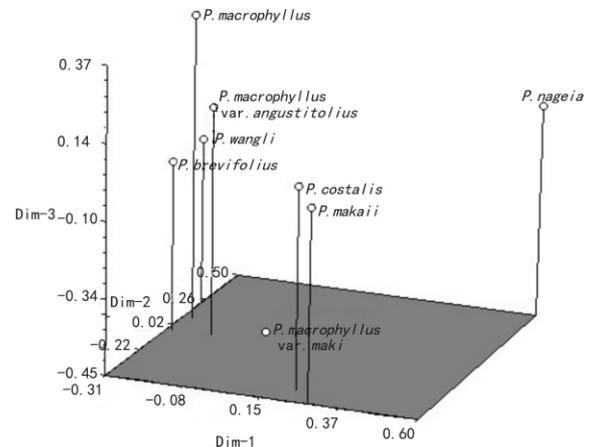


图 3 罗汉松种质资源主坐标分析三维散点图
Fig. 3 Dimensions plot of the principal coordinate analysis of *Podocarpus* germplasms

Nageia; De Laubenfels (1969) 修订罗汉松科时, 把竹柏类列为独立的一个属, 但将属名改为 *Decussocarpus*, 1987 修订时恢复使用 *Nageia* 属名而把 *Decussocarpus* 作为该属的新异名; Page (1988) 确认 *Nageia* 属名的合法性, 认为该属的主要特征为具独特的宽大多脉叶和分枝的生殖器官构造, 并指出该属为极自然的类群。吴征镒等 (2004) 根据叶无中脉而具多数近平行细脉和雌性生殖器官接近原始的枝条状结构, 把竹柏属从罗汉松科中独立出来建立单属新科竹柏科 (Nageiaceae)。郑万钧等 (1978) 在《中国植物志》中将竹柏类植物置于罗汉松科 (Podocarpaceae) 罗汉松属 (*Podocarpus*) 的竹柏组 (sect. *Nageia*) 内; 苏应娟等 (1988) 的 RAPD 研究结果认为竹柏类植物应保留在罗汉松属植物中。

本研究利用 SCoT 分子标记对 8 种罗汉松的遗传多样性进行了研究分析, 总结为以下两点: (1) 10 条 SCoT 分子标记引物对全部罗汉松品种模板 DNA 进行 PCR 扩增, 共扩增出 136 条稳定的 DNA 条带, 其大小为 350~3 000 bp, 73 号引物扩增出的清晰条带最多, 为 18 条; 引物 77 扩增出的条带最少, 仅有 10 条。10 个引物的多态性在 75% 以上, 平均多态性带数百分率为 88.97%, 说明各材料具有丰富的遗传多样性。(2) SCoT 分析在罗汉松资源中的遗传关系研究方面是可行的, 在遗传距离 0.43 为阈值时可以分为 A、B 两大组, A 组为竹柏属的竹柏, 其余罗汉松属品种为 B 组。若以遗传距离 0.64 为阈值时可以将 B 组分为 3 个亚组, B1 组为兰屿罗 (下转第 62 页 Continue on page 62)

敏感,在不同群落中的重要值存在着较大的差异。

参考文献:

- 金振洲, 欧晓昆. 2000. 元江, 怒江, 金沙江, 澜沧江干热河谷植被[M]. 昆明: 云南科学技术出版社
- 吴征镒. 1980. 中国植被[M]. 北京: 科学出版社
- 云南省气象局. 1984. 云南农业气候资料集[M]. 昆明: 云南人民出版社
- Bruna EM. 2003. Are plant populations in fragmented habitats recruitment limited? Tests with an Amazonian herb[J]. *Ecology*, **84**:932-947
- Chen LD(陈利顶), Fu BJ(傅伯杰). 2000. Ecological significance, characteristics and types of disturbance(干扰的类型、特征及其生态学意义)[J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, **20**(4):581-586
- Connell, JH. 1978. Diversity in tropical rain forests and coral reefs [J]. *Science*, **199**:1 302-1 310
- Diaz S, Lavorel S, De Bello F, et al.. 2007. Incorporating plant functional diversity effects in ecosystem service assessments[J]. *Proc Nat Acad Sci, USA*, **104**:20 684-20 689
- Fei SHM(费世民), He YP(何亚平), Wang P(王鹏), et al. 2004. The soil seed bank and seedling patterns of *quercus franchetii* forests in the valleys of Ertan Reservior(二滩库区锥连栋林土壤种子库和幼苗格局初步研究)[J]. *J Sichuan Fore Sci Tech(四川林业科技)*, **25**(2):15-20
- Jin ZHZH(金振洲), Ou PD(区普定). 1981. Sclerophyllous broad-leaved evergreen forests in China(我国的硬叶常绿阔叶林)[J]. *J Yunnan Univ; Nat Sci(云南大学学报·自然科学版)*, **2**:13-20
- Kaul RB. 1985. Reproductive morphology of *Quercus*(Fagaceae) [J]. *Am J Bot* **72**:1 962-1 977
- Liu ZHM(刘志民), Zhao XY(赵晓英). 2002. Relationship between disturbance and vegetation(干扰与植被的关系)[J]. *Acta Pratacult Sci(草业学报)*, **11**(4):1-9
- Ma KP(马克平), Huang JH(黄建辉), Yu SHL(于顺利), et al. 1995. Plant community diversity in Dongling mountain, Beijing, China; II. Species richness, evenness and species diversities(北京东灵山地区植物群落多样性的研究: II 丰富度, 均匀度和物种多样性指数)[J]. *Acta Ecol Sin(生态学报)*, **15**, **9**:268-277
- Wang YJ(王永健), Tao JP(陶建平), Peng Y(彭月). 2006. Advances in species diversity of terrestrial plant communities(陆地植物群落物种多样性研究进展)[J]. *Guihaia(广西植物)*, **26**(4):406-411
- Zhang B(张斌), Shi K(史凯), Liu CQ(刘春琼), et al. 2009. Changes of Seasonal Precipitation of Yuanmou Dry-hot Valley in Recent 50 Years Based on method of DFA(元谋干热河谷近 50 年分季节降水变化的 DFA 分析)[J]. *Sci Geogr Sin(地理科学)*, **29**(4):561-566
- Zhang JP(张建平), Wang DJ(王道杰), Wang YK(王玉宽), et al. 2000. Discusses on eco-environment changes in dry-hot valley of Yuanmou(元谋干热河谷区生态环境变迁探讨)[J]. *Sci Geogr Sin(地理科学)*, **20**(2):148-152
- Zhang XB(张信宝), Yang ZH(杨忠), Zhang JP(张建平). 2003. Lithologic types on hill slopes and revegetation zoning in the Yuanmou hot and dry valley(元谋干热河谷坡地岩土类型与植被恢复分区)[J]. *Sci Silv Sin(林业科学)*, **39**(4):16-22

(上接第 93 页 Continue from page 93)

汉松和金砖罗汉松; B2 组为米叶罗汉松; B3 组为贵妃罗汉松、中叶罗汉松、小叶罗汉松和珍珠罗汉松。

本研究结果显示竹柏与罗汉松属的其他种质在分子水平上表现出较大的遗传差异, 它们可能属于不同的属, 因此建议将竹柏类植物单独作为一个属从罗汉松属中独立出来。

参考文献:

- 刘婷, 汤青林, 王志敏, 等. 2009. 正交设计优化芥菜 ISSR 反应体系研究[J]. *西南师范大学学报(自然科学版)*, **34**(1):115-118
- 苏应娟, 王艇, 杨维东, 等. 1988. 罗汉松属植物 DNA 的提取和 RAPD 分析[J]. *中山大学学报*, **37**(4):13-18
- 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 2009. 龙眼 ScoT-PCR 反应体系的优化 [J]. *基因组学与应用生物学*, **28**(5):970-974
- 郑万钧, 傅立国. 1978. 中国植物志(第 7 卷)[M]. 北京: 科学出版社
- 金则新, 李均敏, 顾奇萍. 2006. 云锦杜鹃自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *园艺学报*, **33**(6):1 263-1 267
- 吴征镒, 陈心启. 2004. 中国植物志(第 1 卷)[M]. 北京: 科学出版社
- 熊发前, 蒋蓓, 钟瑞春, 等. 2010. 目标起始密码子多态性 (SCoT) 分子标记技术在花生属中的应用[J]. *作物学报*, **36**(12):2 055-2 061
- Collard BCY, Mackill DJ. 2009. Start codon targeted(SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plant[J]. *plant Mol Biol Rep*, **27**(1): 86-93
- Luo C, He XH, Chen H, et al. 2010. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers[J]. *Biochem Syst Ecol*, **38**:1 176-1 184
- Laubenfels DJ de. 1969. A revision of the malesian and pacific rainforest conifers, I. Podocarpaceae, in part[J]. *Arnold Arbor*, **50**:274-361
- Laubenfels DJ de. 1987. Revision of the genus *Nageia* (Podocarpaceae)[J]. *Blumea*, **32**:209-21
- Nei M, Li WH. 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Pro Natl Acad Sci USA*, **76**(10):69-73
- Page CN. 1988. New and maintained genera in the conifer families [J]. *Not Roy Bot Gard Edinb*, **45**(2):337-395
- Rohlf FJ. 1988. NTSYS-pc; Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System[M]. Version 2.0. New York; Exeter Software, Applied Biostatistics Inc
- Sneath PH, Sokal RR. 1973. Numerical Taxonomy: the Principles and Practice of Numerical Classification[M]. San Francisco; W. H. Freeman
- Stiler MA. 1912. The Podocarpaceae[J]. *Ann Bot*, **26**:443-514