

## ◆ 濒危植物 ◆

## 珍稀濒危植物石山苏铁的 SSR 引物设计和遗传多样性分析\*

唐健民, 陈泰国, 邹蓉, 盘波, 韦霄\*\*, 韦发南

(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:**揭示珍稀濒危植物石山苏铁(*Cycas sexseminifera*)种群的遗传多样性水平和遗传分化大小,确定优先保护种群,对石山苏铁的有效保护和管理策略的制定具有重要意义。本研究基于简化基因组序列分析设计 Simple Sequence Repeats (SSR)引物,并利用 SSR 引物进行遗传多样性检测。实验共获得 6 对 SSR 引物,6 对引物共检测出 37 个观测等位基因( $N_a$ ),其中最小观测等位基因数目为 3,最大观测等位基因数目为 12,平均每个位点等位基因数目为 6.167。位点 GZST002、GZST055、GZST065、GZST088 是高度多态性位点( $PIC > 0.5$ )。石山苏铁各种群期望杂合度( $H_e$ )为 0.330—0.533,平均值为 0.444,表明石山苏铁遗传多样性处于中等水平;7 个种群的  $H_e$  值大小顺序为广西植物研究所引种(ZWS) > 崇左广河(GH) > 崇左排汝(PR) > 隆安陇怀(LH) > 崇左中干(ZG) > 百色作登(ZD) > 隆安新会(XH)。固定系数( $F$ )为 -0.161—0.480,平均值为 0.074,其中 LH、PR、XH 3 个野生种群为负值,GH、ZD、ZG 3 个野生种群的固定系数则大于 0;7 个种群的  $F$  值大小顺序为百色作登(ZD) > 广西植物研究所引种(ZWS) > 崇左中干(ZG) > 崇左广河(GH) > 隆安陇怀(LH) > 隆安新会(XH) > 崇左排汝(PR)。因此,综合各个遗传指标,石山苏铁需要重点保护和引种的野生种群是遗传多样性相对较高的崇左广河(GH)种群。同时建议开发更多的 SSR 引物和采集更广范围的石山苏铁野生种群,精准筛选遗传多样性高的优良种群,以利于更全面和准确地评估石山苏铁的遗传多样性水平和濒危机制。

**关键词:**石山苏铁;SSR 分子标记;遗传多样性;遗传结构;保护策略

中图分类号:Q75 文献标识码:A 文章编号:1005-9164(2024)01-0139-10

DOI: 10.13656/j.cnki.gxkx.20240417.014

收稿日期:2023-06-07

修回日期:2023-08-17

\* 国家重点研发计划项目(2022YFF1300703),广西自然科学基金项目(2020GXNSFAA259029,2023JJA130412),中国科学院“西部之光”计划(2022),广西林业科技推广示范项目(2023LYKJ03,[2022]GT23),广西植物功能物质与持续利用重点实验室自主项目(ZRJJ2022-2),桂林市创新平台和人才计划项目(20210102-3),桂林市科学研究与技术开发计划项目(20220134-3)资助。

【第一作者简介】

唐健民(1988—),男,副研究员,主要从事喀斯特濒危植物保护生物学与可持续利用研究。

【\*\*通信作者简介】

韦霄(1967—),男,研究员,主要从事濒危植物保护生物学与可持续利用研究,E-mail:wx@gxib.cn。

【引用本文】

唐健民,陈泰国,邹蓉,等.珍稀濒危植物石山苏铁的 SSR 引物设计和遗传多样性分析[J].广西科学,2024,31(1):139-148.

TANG J M, CHEN T G, ZOU R, et al. SSR Primer Design and Genetic Diversity Analysis of the Rare and Endangered Plant *Cycas sexseminifera* [J]. Guangxi Sciences, 2024, 31(1): 139-148.

苏铁类植物含 2 科 10 属, 是现存种子植物最原始的类群之一, 具有重要的科学研究和保护价值, 其中苏铁科(Cycadaceae)只有苏铁属(*Cycas*)一属, 约 120 种。我国苏铁属植物种类丰富, 是世界苏铁属物种多样性中心之一, 我国有苏铁属植物约 20 种, 主要分布在云南、四川、贵州、广西、广东、海南、福建及台湾 8 个省区, 其中云南和广西是我国苏铁种质资源最丰富的省区<sup>[1,2]</sup>。广西的苏铁种质资源主要分布在其西部地区, 该地区也是我国苏铁分类研究较混乱的地区之一, 其中石山苏铁(*C. sexseminifera*)复合群的分类争议最大, 因此有学者对它们进行了归并处理; Chen<sup>[3]</sup>把长孢苏铁(*C. longisporophylla*)、刺孢苏铁(*C. spiniformis*)、七籽苏铁(*C. septemsperma*)和短叶苏铁(*C. brevipinnata*)连同六籽苏铁(*C. miqueli*)一起作为石山苏铁的异名处理。

石山苏铁生长在我国广西西部及越南北部石灰岩地区, 广西当地称其为“山菠萝”或“神仙米”<sup>[4]</sup>。此类植物为小型灌木, 生长非常缓慢, 树高多数在 1 m 以下, 树干光滑呈银灰色或灰褐色, 与苏铁(*C. revoluta*)外形较接近, 但树干不明显, 基部膨大成卵状茎或盘状茎, 上部逐渐缩成圆柱形或卵状圆柱形<sup>[5]</sup>。石山苏铁在广西是个体数量最多、分布面积最广的一类苏铁植物, 大多数生长在陡峭的石壁之上, 少数见于疏林下或灌丛中。但是人为盗采和生境的破坏使其生存繁衍受到了严重的威胁, 被列为国家一级重点保护野生植物。目前, 对石山苏铁的基础研究工作还比较少, 急需对石山苏铁开展保护生物学研究。因此, 本研究采用 Simple Sequence Repeats (SSR) 分子标记技术进行石山苏铁的引物设计和遗传多样性检测分析, 拟了解石山苏铁的遗传水平和种群结构, 并揭示现存遗传多样性高的重点野生种群及其生境, 为石山苏铁的保护提供科学理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验材料来自广西南宁市、崇左市、百色市 6 个野生种群和 1 个广西壮族自治区中国科学院广西植物研究所(以下简称“广西植物研究所”)引种保育种群, 各种群详细信息如表 1 所示。采集 93 株野生植株和 21 株保育植株, 共计 114 株样品的叶置于变色硅胶中干燥保存。所采集的样品由广西植物研究所韦发南研究员鉴定。

### 1.2 DNA 提取和检测

采用默克磁珠法 DNA 提取试剂盒对石山苏铁 DNA 进行提取, 使用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 纯度, 并用 Nanodrop 2000 微量分光光度计检测 DNA 的浓度和质量, 将检测合格的 DNA 样品保存于 -20 °C 冰箱用于后续实验。

表 1 石山苏铁野生种群样品采集信息

Table 1 Sample collection information of wild population of *C. sexseminifera*

地点 Location	种群代号 Population code	经纬度 Latitude and longitude	数量/个 Number of samples/ind.
Xinhui in Long'an, Nanning	XH	107°28'17"E, 23°03'33"N	16
Longhuai in Long'an, Nanning	LH	107°27'25"E, 23°04'39"N	12
Guanghe in Jiangzhou, Chongzuo	GH	107°27'30"E, 23°36'29"N	15
Zhonggan in Jiang- zhou, Chongzuo	ZG	107°21'05"E, 23°37'17"N	20
Pairu in Jiangzhou, Chongzuo	PR	107°24'41"E, 22°33'49"N	22
Zuodeng in Tiandong, Baise	ZD	107°03'33"E, 23°29'38"N	8
Guangxi Institute of Botany, Guilin	ZWS	110°18'03"E, 25°04'10"N	21

### 1.3 引物合成和荧光 PCR 扩增

根据简化基因组序列分析设计 SSR 引物, 引物采用接头法合成, 即合成时在上游引物前加上 21 bp 的接头序列。采用接头法进行 PCR 扩增时, 第一步将带接头的上游引物、下游引物与模板结合, 扩增得到带有接头序列的 PCR 产物; 第二步将带荧光基团的接头引物、下游引物与第一步实验所得的 PCR 产物结合, 扩增得到带有荧光基团和 21 bp 接头序列的 PCR 产物。

在 Veriti 384 PCR 仪上进行 DNA 扩增。PCR 扩增程序设置如下: 95 °C 预变性 5 min; 95 °C 变性 30 s, 62—52 °C 梯度退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 运行 10 个循环; 95 °C 变性 30 s, 52 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 运行 25 个循环; 72 °C 延伸 20 min, 最后 4 °C 保存。PCR 反应结束后, 通过 PCR 产物的带型来判断 SSR 引物扩增的特异性, 通过 PCR 产物条带的亮度来判断 SSR 引物的扩增效率, 按照样本上机检测浓度的要求, 对各荧光 PCR 产物进行稀释, 得到浓度均一的荧光 PCR 产物并上测序仪进行 SSR 样品检测。

## 1.4 原始数据分析

首先使用 ABI 3730xl 仪器检测分析获得的样品位点信息, 并进行数据分类归档, 然后将分类好的数据分别导入到 GeneMarker 分析软件中, 读取基因型数据。

## 1.5 遗传多样性分析

在 GenAlEx version 6.501 软件中<sup>[6]</sup>, 计算 SSR 引物位点多态性的各项遗传多样性指标, 包括观测等位基因 ( $N_a$ )、有效等位基因 ( $N_e$ )、Shannon 指数 ( $I$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、多态性信息指数 ( $PI_C$ ) 和固定系数 ( $F$ )。在 GenAlEx version 6.501 软件中计算群体的各项遗传多样性指标, 包括观测等位基因 ( $N_a$ )、有效等位基因 ( $N_e$ )、Shannon 指数 ( $I$ )、观测杂合度 ( $H_o$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、遗传分化系数 ( $F_{st}$ ), 同时进行分子方差分析 (AMOVA) 和显著性检验; 使用主坐标分析 (PCoA) 来计算样品主坐标成分。基因流 ( $N_m$ ) 按下述公式来计算:  $N_m = 0.25(1 - F_{st})/F_{st}$ 。使用软件 Structure v2.3<sup>[7]</sup> 对全部个体进行群体遗传结构分析, 假定分群数 ( $K$ ) 为 1 - 20, Burn-in 周期为 10 000, MCMC (Markov Chain Monte Carlo) 设为 100 000, 每个  $K$  值重复运行 10 次。利用在线工具 Structure Har-

vester<sup>[8]</sup>, 根据最佳  $K$  值确定最佳分群数。利用软件 Powermarker 对群体间的遗传距离进行计算<sup>[9]</sup>。采用基于 Nei 遗传距离的非加权组平均法 (UPGMA 方法) 进行聚类分析, 并绘制聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选结果

如图 1 所示, 石山苏铁 DNA 条带清晰, 说明其含量合适、纯度适中, 适合进行 PCR 扩增。从基因组序列中一共筛选出 6 对峰型良好、扩增成功的引物, 其 PDF 分型峰如图 2 所示, 具体的引物信息如表 2 所示。

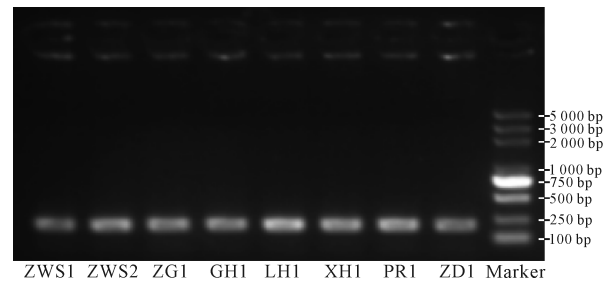
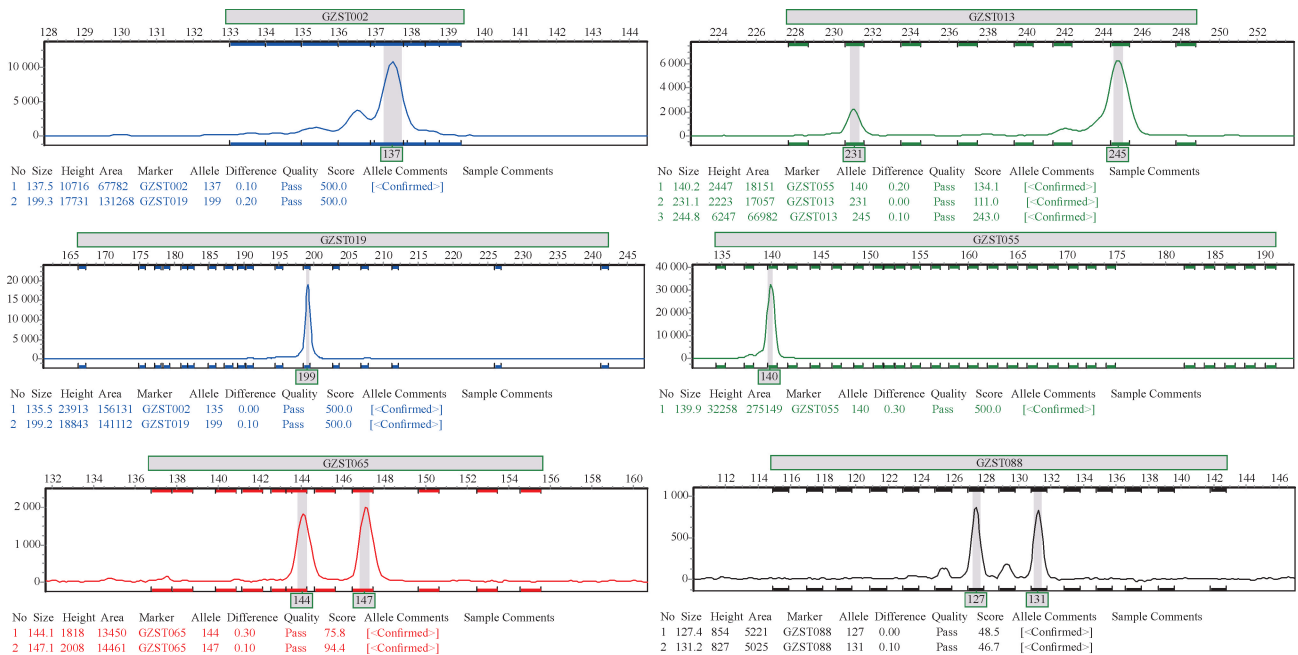


图 1 部分 DNA 扩增电泳图

Fig. 1 Electrophoretogram of partial DNA amplification



Numerical values in the vertical axis represent fluorescence intensities, and those in the horizontal axis represent the size of the amplified fragment.

图 2 分型峰图

Fig. 2 Peak chart

## 2.2 引物多态性分析

由表3可以看出,6对引物共检测出37个观测等位基因( $N_a$ ),其中最小观测等位基因数目为3,最大观测等位基因数目为12,平均每个位点的观测等位基因数目为6.167。有效等位基因( $N_e$ ,等位基因在群体中分布得越均匀, $N_e$ 越接近实际检测到的等位基因的个数)总数为18.285,数值为1.233(GZST013)–5.250(GZST088),平均每个位点的有效等位基因数目为3.048。位点GZST002、GZST055、GZST065、GZST088是高度多态性位点( $PIC > 0.50$ ),位点GZST013是低度多态性位点( $PIC \leq 0.25$ )。I为0.356(GZST013)–1.925(GZST088),平均值为1.191; $H_o$ 为0.009(GZST002)–0.723(GZST088),平均值为0.429; $H_e$ 为0.189(GZST013)–0.810(GZST088),平均

值为0.593; $PIC$ 为0.173(GZST013)–0.788(GZST088),平均值为0.547;固定系数F平均值为0.448,数值为–0.277(GZST019)–0.988(GZST002)。从表3的结果来看,6对引物中有5对显著偏离了哈温平衡(HWE),即实测的引物基因型频率偏离了理论上的基因型频率。但在群体哈温检验中,GH种群的哈温平衡检验结果显示,只有引物GZST002在检验中呈现差异极显著,表明其他引物在GH群体的基因型频率符合哈温平衡;LH种群的哈温平衡检验差异不显著,表明引物在LH群体的基因型频率符合哈温平衡;其余种群中引物出现不同程度的显著性差异(表4),即P值小于0.05,该群体检验不符合哈温平衡,反之,如果P值大于0.05,说明该群体检验符合哈温平衡。

表2 石山苏铁6对SSR引物信息

Table 2 SSR primer information of 6 pairs of *C. sexseminifera*

位点名称 Name of locus	重复单元 Repeat unit	上游引物(5'→3') Forward primer (5'→3')	下游引物(5'→3') Reverse primer (5'→3')	等位基因区间 Allelic interval
GZST002	(GA) <sub>6</sub>	TGTGGAACGTGGAATGGTAA	AGGAATCCCGAAGGAAGAAA	158–160
GZST019	(ATAA) <sub>5</sub>	GATGAGGAAGCCTACGCAGT	GAAAGACCTCACCATCCGAG	212–221
GZST055	(AT) <sub>6</sub>	TCATGAAGATGGCAACCAAC	TCCCTTCCAAGCAAATGTCT	161–184
GZST013	(GAG) <sub>5</sub>	ACCGGTCGACTAGATGGATG	AGGTCCGAAGCTTTCTCTCTC	252–265
GZST088	(AG) <sub>7</sub>	TGGCTTTCGATTTCACACT	GAACGCTCGCTCTCTCTCTC	136–159
GZST065	(CGA) <sub>5</sub>	GCTTGGCTGTACCGTTCTTT	CGCCATTGACAACAACAGAC	157–174

表3 石山苏铁6对SSR引物的多态性

Table 3 Polymorphism of 6 pairs SSR primers of *C. sexseminifera*

位点 Locus	$N_a$	$N_e$	I	$H_o$	$H_e$	F	PIC	P值 P value	显著性 Significant
GZST002	5	3.755	1.381	0.009	0.734	0.988	0.685	0.000	***
GZST013	3	1.233	0.356	0.209	0.189	–0.107	0.173	0.682	ns
GZST019	3	1.926	0.710	0.614	0.481	–0.277	0.374	0.000	***
GZST055	9	3.174	1.495	0.414	0.685	0.395	0.650	0.000	***
GZST065	5	2.947	1.277	0.604	0.661	0.086	0.612	0.042	*
GZST088	12	5.250	1.925	0.723	0.810	0.107	0.788	0.000	***
Mean	6.167	3.048	1.191	0.429	0.593	0.199	0.547		
St Dev.	3.600	1.409	0.566	0.274	0.226	0.448			

Note: ns means not significant, i. e. the population conforms to HWE; \* indicates significant difference,  $P < 0.05$ ; \*\*\* indicates significant difference,  $P < 0.001$ .



表 4 各引物在各种群的 HWE 检验

Table 4 HWE tests of each primer in various populations

种群 Population	位点 Locus	DF	ChiSq	Prob	显著性 Significant
GH	GZST002	6	30.024	0.000	***
GH	GZST013	1	0.355	0.551	ns
GH	GZST019	1	3.649	0.056	ns
GH	GZST055	15	17.517	0.289	ns
GH	GZST065	6	3.441	0.752	ns
GH	GZST088	21	15.683	0.787	ns
LH	GZST002			Monomorphic	
LH	GZST013	1	0.245	0.621	ns
LH	GZST019	1	3.127	0.077	ns
LH	GZST055	6	1.891	0.929	ns
LH	GZST065	10	3.847	0.954	ns
LH	GZST088	21	32.333	0.054	ns
PR	GZST002			Monomorphic	
PR	GZST013	1	0.787	0.375	ns
PR	GZST019	1	18.340	0.000	***
PR	GZST055	21	77.853	0.000	***
PR	GZST065	3	1.658	0.646	ns
PR	GZST088	15	17.355	0.298	ns
XH	GZST002			Monomorphic	
XH	GZST013	3	0.549	0.908	ns
XH	GZST019	1	5.760	0.016	*
XH	GZST055	6	3.360	0.762	ns
XH	GZST065	10	10.491	0.399	ns
XH	GZST088	21	37.375	0.015	*
ZD	GZST002	1	8.000	0.005	**
ZD	GZST013			Monomorphic	
ZD	GZST019	3	8.047	0.045	*
ZD	GZST055	1	5.000	0.025	*
ZD	GZST065	3	1.050	0.789	ns
ZD	GZST088	10	11.800	0.299	ns
ZG	GZST002			Monomorphic	
ZG	GZST013	1	0.013	0.909	ns
ZG	GZST019	1	0.126	0.723	ns
ZG	GZST055	21	49.524	0.000	***
ZG	GZST065	6	8.027	0.236	ns
ZG	GZST088	28	25.980	0.574	ns
ZWS	GZST002	3	42.000	0.000	***
ZWS	GZST013	1	0.124	0.724	ns
ZWS	GZST019	1	0.399	0.528	ns
ZWS	GZST055	10	26.982	0.003	**
ZWS	GZST065	10	14.307	0.159	ns
ZWS	GZST088	28	43.571	0.031	*

Note: ns means not significant, i. e. the population conforms to HWE;

\* indicates significant difference,  $P < 0.05$ ; \*\* indicates significant difference,  $P < 0.01$ ; \*\*\* indicates significant difference,  $P < 0.001$ .

### 2.3 遗传多样性分析

种群遗传多样性参数如表 5 所示。石山苏铁各

种群的  $I$  为 0.630 (ZD)–1.025 (ZWS), 平均值为 0.828。  $H_o$  为 0.254 (ZD)–0.516 (XH), 平均值为 0.417。  $H_e$  为 0.330 (XH)–0.533 (ZWS), 7 个种群的  $H_e$  值大小顺序为广西植物研究所引种 (ZWS) > 崇左广河 (GH) > 崇左排汝 (PR) > 隆安陇怀 (LH) > 崇左中干 (ZG) > 百色作登 (ZD) > 隆安新会 (XH); 平均值为 0.444, 低于叉叶苏铁 (*C. bifida*, 0.543)、德保苏铁 (*C. debaoensis*, 0.484)、长叶苏铁 (*C. dolichophylla*, 0.466), 高于四川苏铁 (*C. szechuanensis*, 0.247)、贵州苏铁 (*C. guizhouensis*, 0.419)、攀枝花苏铁 (*C. panzihuaensis*, 0.328)<sup>[1]</sup>。野生种群中 LH、PR、ZD 和 ZG 种群的  $I$  值低于所有种群的平均水平, ZWS 种群的  $I$  最高 (1.025), 其余 6 个野生种群的  $I$  值大小顺序为 GH > XH > PR = ZG > LH > ZD, 表明迁地保护的方法能高效保存和保留石山苏铁的遗传多样性。固定系数 ( $F$ ) 为 -0.161 (PR)–0.480 (ZD), 其中 LH、PR、XH 3 个野生种群  $F$  值均为负值, 表明这 3 个种群杂合子过剩; GH、ZD、ZG 3 个野生种群的  $F$  值都大于 0, 表明这 3 个种群纯合子过剩; 石山苏铁的平均  $F$  值为 0.074, 意味着观测到的杂合子频率比理论上少 7.4%, 在随机交配的情况下, 位点上的两个等位基因的相关性小。Shannon 指数越大, 生物多样性越高; 杂合度也是基因多样性的体现。因此, 综合各个遗传指标, 石山苏铁需要重点保护和引种的野生种群是遗传多样性相对较高的崇左广河 (GH) 种群。

表 5 石山苏铁各野生种群的遗传多样性参数

Table 5 Genetic diversity parameters of wild *C. sexseminifera* populations

种群 Population	$N_a$	$N_e$	$I$	$H_o$	$H_e$	$F$
GH	4.167	2.069	0.881	0.433	0.469	0.096
LH	3.500	2.088	0.796	0.486	0.435	-0.129
PR	3.500	2.267	0.804	0.498	0.453	-0.161
XH	3.667	2.364	0.852	0.516	0.330	-0.143
ZD	2.667	1.788	0.630	0.254	0.353	0.480
ZG	4.000	2.232	0.804	0.344	0.408	0.100
ZWS	4.167	2.918	1.025	0.390	0.533	0.236
Mean	3.667	2.247	0.828	0.417	0.444	0.074

### 2.4 种群遗传分化分析

由表 6 可知, 种群 ZD 和 LH 之间的遗传分化系数最大, 为 0.248; 种群 GH 与 PR 之间的遗传分化系

数最小, 为 0.038。由此可知, 石山苏铁的遗传分化系数高于中国苏铁属遗传分化系数的平均水平 (22.0%), 同时也高于叉叶苏铁 (11.6%)、德保苏铁 (0.114) 和贵州苏铁 (0.138), 但低于四川苏铁 (0.386)、攀枝花苏铁 (0.331)、长叶苏铁 (0.260)<sup>[1]</sup>。基因流最大的是种群 PR 与 GH, 为 6.303, 这与两个种群之间离地距离较近有关; 另外, XH 和 LH 之间的基因流同样也较大, 也与两者间的地理距离近有关, 表明近距离的野生石山苏铁种群之间基因交流频繁; 基因流最小的是种群 ZD 与 LH, 为 0.757。AMOVA 表明 24% 的遗传变异来源于种群间, 有 76% 的遗传变异来源于个体, 来源个体的变异是总变异的主要来源 (图 3)。基于 7 个种群对石山苏铁进行 AMOVA, 其整体的遗传分化系数  $F_{st}$  为 0.240, 表明石山苏铁遗传分化较大; 种群间存在较大的遗传差异, 差异性最大的达到 0.248; 种群间较大的遗传差异说明石山苏铁属经历了种群缩减事件<sup>[1,3]</sup>。

表 6 群体间的基因流 Nm (上三角) 和遗传分化系数  $F_{st}$  (下三角)

Table 6 Inter-population gene flow Nm (upper triangle) and genetic differentiation coefficient  $F_{st}$  (lower triangle)

	GH	LH	PR	XH	ZD	ZG	ZWS
GH	—	1.199	6.303	1.447	0.967	1.434	3.029
LH	0.173	—	0.921	4.866	0.757	0.970	1.339
PR	0.038	0.213	—	0.929	0.946	0.976	1.777
XH	0.147	0.049	0.212	—	0.805	1.098	2.052
ZD	0.205	0.248	0.209	0.237	—	0.917	1.864
ZG	0.148	0.205	0.204	0.185	0.214	—	3.136
ZWS	0.076	0.157	0.123	0.109	0.118	0.074	—

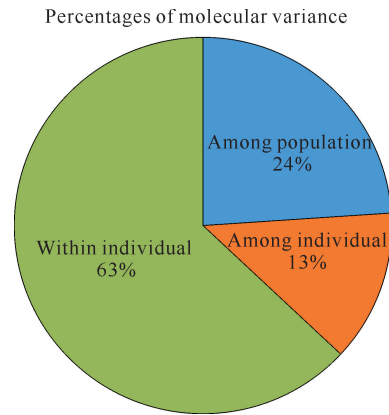


图 3 种群的分子方差分析

Fig. 3 Molecular variance analysis of population

2.5 群体遗传结构

利用 6 对 SSR 引物对 114 个样本的群体遗传结构进行评估。根据似然值最大原则, 按最佳 K 值确定最佳分群数, 当 K 值等于 3 时为最佳 (图 4), 可以将 114 个样本划分为 3 个亚群 (图 5)。种群 LH 和 XH 划为一个亚群, 种群 PR 与 GH 划为一个亚群, 种群 ZD 和 ZG 划为一个亚群。种群 ZWS 为引种种群, 分布于各个亚群, 但集中分布于 ZD 与 ZG 的亚群, 说明种群 ZWS 引种的种源多来自这些种群。

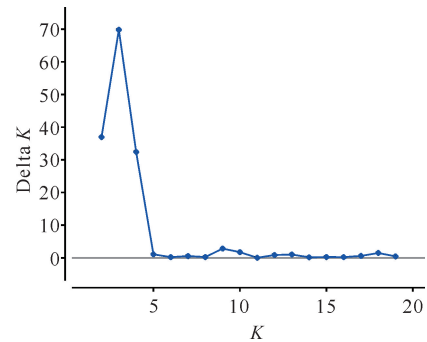


Fig. 4 Structure 分析时的 Delta K 值分布

Fig. 4 Delta K value distribution of structure analysis

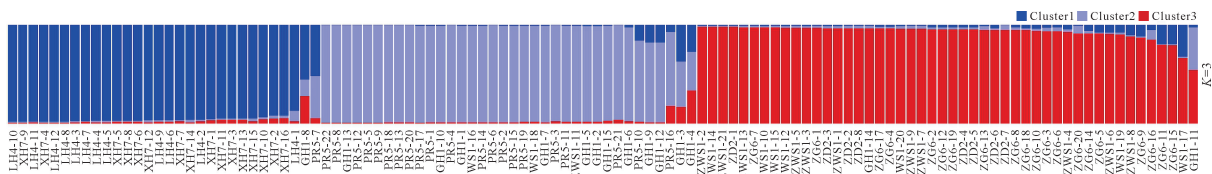


图 5 K=3 时 114 个样品的种群遗传结构

Fig. 5 Population genetic structure of 114 samples at K=3

PCoA 通过直观地比较坐标轴中样本之间的直线距离, 即可反映 2 个 (组) 样本之间的差异性, 2 个 (组) 样本之间的直线距离较近, 则表示这 2 个 (组) 样本的差异性较小; 相反, 若 2 个 (组) 样本之间的直线

距离较远, 则表示它们之间差异性较大。由图 6 可以看出, 种群 XH、LH、ZG、ZWS、ZD 集中在一起, 其种群距离较近; 种群 PR、GH 聚集在一起, 表明这 2 个种群距离较近。

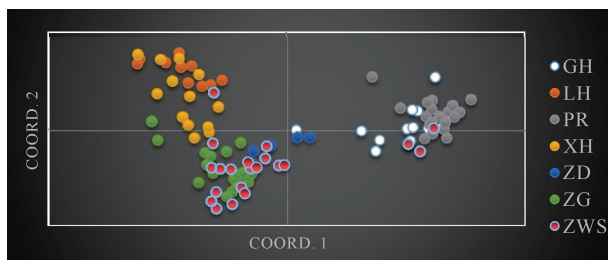


图 6 114 个样本的主坐标分析

Fig. 6 Principal coordinate analysis of 114 samples

## 2.6 遗传距离与聚类分析

6 个野生种群地理距离最近的是 LH 和 XH, 相聚 2.75 km; 距离最远的是 ZD 与 XH, 两者距离 64.06 km (表 7)。6 个野生种群间遗传距离最大为 0.411 (LH 与 ZD), 最小为 0.082 (LH 与 XH)。根据 Mantel 检验, 石山苏铁的遗传距离和地理距离具有显著性的关系 ( $P=0.02 < 0.05$ , 图 7), 地理隔离是造成种群之间高度种间分化的主要因素。采用 UPGMA 进行聚类分析, 结果显示 LH 和 XH 聚类在一起, ZD 单独分支, PR 和 GH 聚类在一起后再与 ZWS、ZG 种群聚类在一起 (图 8)。

表 7 石山苏铁野生群体间的遗传距离 (上三角) 和地理距离 (下三角, 单位: km)

Table 7 Genetic distances (upper triangle) and geographic (lower triangle, unit: km) distances between wild populations of *C. sexseminifera*

	GH	ZD	ZG	LH	XH	PR
GH	—	0.287	0.204	0.286	0.269	0.106
ZD	42.59	—	0.250	0.411	0.386	0.331
ZG	10.99	32.97	—	0.259	0.243	0.257
LH	58.96	61.56	61.39	—	0.082	0.340
XH	61.01	64.06	63.66	2.75	—	0.345
PR	6.87	36.71	8.86	54.22	56.39	—

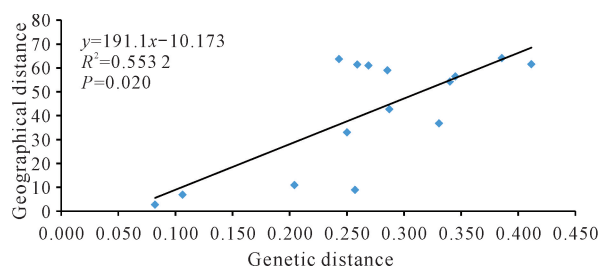


图 7 石山苏铁野生群体间的遗传距离和地理距离的 Mantel 检验

Fig. 7 Mantel test for genetic distance and geographical distance among wild populations of *C. sexseminifera*

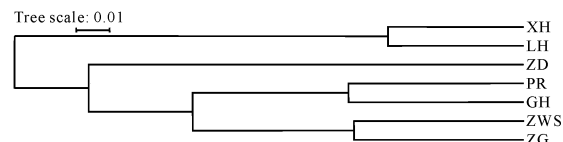


图 8 7 个种群的 UPGMA 聚类结果

Fig. 8 UPGMA clustering results of 7 populations

## 3 讨论

SSR 又称为微卫星 DNA, 是基于简单重复序列多态性的一种分子标记, 是基因组遗传图谱和物理图谱的理想界标<sup>[10-12]</sup>。SSR 标记目前已广泛应用于遗传多样性检测<sup>[13,14]</sup>、遗传图谱的构建<sup>[15,16]</sup>、基因定位<sup>[17,18]</sup>、种质鉴定<sup>[19]</sup>、品种选育<sup>[20]</sup>、系谱分析、物种起源与进化分析<sup>[21,22]</sup>等领域。一般来说, 一个物种的遗传多样性水平越高, 面对环境变化时的适应性就越强<sup>[23,24]</sup>。对石山苏铁的保护遗传学研究显示: 石山苏铁各种群的  $I$  平均值为 0.828,  $H_e$  平均值为 0.444, 超过了中国苏铁属植物  $H_e$  的平均水平 (0.442)<sup>[1]</sup>, 表明石山苏铁遗传多样性处于中等水平。GH、ZD、ZG 3 个种群的  $H_o$  小于  $H_e$ , 说明这些种群的基因特征是由环境而非遗传引起的, 也意味着遗传多样性的降低可能是由于环境的变化导致种群为适应特殊的生存环境而减少遗传多样性, 并造成种群生长不健康、种群年龄结构不合理等问题。LH、PR、XH 3 个种群的  $H_o$  大于  $H_e$ , 表明这些种群的基因特征是由遗传变异引起的, 意味着群体内部存在较高的遗传多样性, 这可能更有利于个体的健康。苏铁属不同物种间并没有一套通用的 SSR-PCR 反应体系, 建立适合石山苏铁的 PCR 反应体系十分必要。因此, 建立适合石山苏铁 PCR 的最佳反应体系、反应程序, 以及设计更多特异性强的 SSR 引物, 可为石山苏铁的遗传多样性分析提供足够多的信息位点。对石山苏铁及其争议种之间进行遗传鉴定及亲缘关系研究, 特别是对石山苏铁复合群亲缘关系的鉴定具有十分重要的意义。

根据分析结果和样品地点可知, 受自然保护区保护的 PR 和 ZG 大种群的遗传多样性没有预期高, 保护区外未受保护的 GH 小种群的遗传多样性也没预期低; 相反, GH 小种群的多样性甚至高于 PR 和 ZG 大种群的遗传多样性, 而且迁地保护的种群遗传多样性高于野生种群, 这些结果显示亟需开展野生种群的人工杂交授粉, 并收集野生石山苏铁种子进行迁地保护, 进而有利于小居群种群数量的增加、生境恢复和

重建。

随着广西经济的快速发展,愈演愈烈的毁林开荒、开山采矿、劈山开路及大量盗挖等活动使得石山苏铁的生境遭到了严重破坏,苏铁分布区被分割得支离破碎,使得其种群数量急剧减少。1996年以前,石山苏铁在崇左江洲区、扶绥县、龙州县、隆安县、大新县和百色平果县的分布面积广、植株数量多,保守估计种群植株个体数量很可能超过5 000株<sup>[4]</sup>。由于石山苏铁树干基部圆盘状,适合用于制作盆景,人们大量采挖,2001—2004年福建、湖南、湖北等省的商贩从广西收购的石山苏铁累计有66 t<sup>[25]</sup>,而2022年南宁隆安县警方从不法分子手中追回1 972株石山苏铁<sup>[26]</sup>。除在保护区外,现在已经很难在其他分布区找到1 m以上的石山苏铁植株。生境的严重破坏和非法盗挖现象使得石山苏铁野生分布区迅速缩小,种群现存个体数量急剧减少,种群结构被破坏,成年苏铁植株急剧减少。同时,受雌球花和雄球花的花期不一致、雌雄比例严重失衡的影响,石山苏铁授粉率和结实率低,这些现象导致石山苏铁种群内的基因交流缓慢,遗传多样性降低,最终可能导致种群灭绝<sup>[27]</sup>。

基于石山苏铁的遗传多样性及各种群的遗传结构、种群动态及濒危特征提出相应的保护策略在石山苏铁保护工作中十分必要。因此,建议采用就地保护与迁地保护相结合的方式对石山苏铁进行保护。(1)就地保护。石山苏铁所在的桂西南石灰岩地区是我国优先保护的17个生物多样性关键地区之一,该地区主导的生态功能就是生物多样性保护,并已经建立了相当数量的自然保护区,比如弄岗国家级自然保护区、广西崇左白头叶猴国家级自然保护区、隆安龙虎山自然保护区等,因此石山苏铁得到了较好的保护<sup>[2,27]</sup>。石山苏铁在百色平果县的分布面积较广、植株数量多,但平果县是我国重要的铝矿生产地,开山采矿使得石山苏铁面临着巨大的生境破坏的危险。而相近的南宁隆安县同样分布有大量的石山苏铁,河池大化县分布有锈毛苏铁(*C. ferruginea*),因此建议在百色平果县、百色田阳区、南宁隆安县、河池大化县三市四县区建立一个苏铁植物的专类保护区,以便更好地保护广西野生石山苏铁类群。(2)迁地保护。在遗传多样性分析检测的基础上,筛选出遗传多样性高的优良种群和个体进行迁地保护,通过优良种群开展石山苏铁传粉机制、繁育系统、种苗扩繁等基础研究。(3)回归保护。积极开展种苗繁育后的回归工作,建立专门的人工培育基地,保存重要的苏铁种质

基因,通过生物技术使其复壮并扩大野生种群数量。(4)加强群众的宣传教育力度,依法保护国家重点保护野生植物。充分利用官媒和自媒体多种形式进行科普宣传,提高人们对野生苏铁保护重要性的认识。同时,加大苏铁植物线上和线下违法销售的执法力度,严厉打击破坏野生苏铁资源的行为。

#### 4 结论

石山苏铁遗传分化较大,种群间存在较大的遗传差异,同一物种具有不同遗传学特征的种群应分别进行重点保护和保育,优先保护遗传多样性较高、单倍型独特的种群。6个野生种群的 $H_e$ 值大小顺序为崇左广河(GH) > 崇左排汝(PR) > 隆安陇怀(LH) > 崇左中干(ZG) > 百色作登(ZD) > 隆安新会(XH),因此需要重点保护和引种的是崇左广河(GH)这一遗传多样性高的野生种群。6对SSR引物中有5对显著偏离了HWE,但是不同种群的哈温平衡不一致,由此推断石山苏铁遗传多样性丧失既有自身因素,又有人类干扰下栖息地丧失的原因,因此亟需对石山苏铁的传粉机制、交配系统和生态适应性机理开展保护生物学研究。

#### 参考文献

- [1] 席辉辉,王祎晴,潘跃芝,等. 中国苏铁属植物资源和保护[J]. 生物多样性, 2022, 30(7): 73-85.
- [2] ZHENG Y, LIU J, FENG X Y, et al. The distribution, diversity, and conservation status of *Cycas* in China [J]. Ecology and Evolution, 2017, 7(9): 3212-3224.
- [3] CHEN C J. Taxonomical and biogeographical studies on *Cycas* L. (Cycadaceae) in China [C]//Biology and conservation of Cycads. Proceedings of the fourth international conference on Cycad biology. [S. l.]: International Academic Publishers, 1999, 1: 10-128.
- [4] 钱丹. 广西石山苏铁复合体的资源调查和分类学研究[D]. 广州: 中山大学, 2009.
- [5] ZHANG H D, ZHONG Y C. New species of *Cycas* from Guangxi [J]. Journal of Sun Yat-sen University (Natural Science Edition), 1997, 36(3): 69-71.
- [6] WANG Z F, YE W H, CAO H L, et al. Identification and characterization of EST-SSRs and cpSSRs in endangered *Cycas hainanensis* [J]. Conservation Genetics, 2008, 9(4): 1079-1081.
- [7] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 2000, 155(2): 945-959.



- [8] EVANNO G, REGNAUT S, GOUDET J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: a simulation study [J]. *Molecular Ecology*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [9] YANG Y, LI Y, LI L F, et al. Isolation and characterization of microsatellite markers for *Cycas debaoensis* Y. C. Zhong et C. J. Chen (Cycadaceae) [J]. *Molecular Ecology Resources*, 2008, 8(4): 913-915.
- [10] 边境, 王晓楠, 曹焜, 等. 大麻 EST-SSR 遗传结构分析及指纹图谱构建[J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(6): 1794-1808.
- [11] ZHANG Y, SLEDGE M K, BOUTON J H. Genome mapping of white clover (*Trifolium repens* L.) and comparative analysis within the Trifolieae using cross-species SSR markers [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2007, 114(8): 1367-1378.
- [12] 秦惠珍, 杨秀德, 唐健民, 等. 极小种群野生植物十万大山苏铁 SSR 和 ISSR 反应体系建立及引物筛选[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(8): 2689-2698.
- [13] PURWOKO D, CARTEALY I C, TAJUDDIN T, et al. SSR identification and marker development for sago palm based on NGS genome data [J]. *Breeding Science*, 2019, 69(1): 1-10.
- [14] GONG W, GU L, ZHANG D X. Low genetic diversity and high genetic divergence caused by inbreeding and geographical isolation in the populations of endangered species *Loropetalum subcordatum* (Hamamelidaceae) endemic to China [J]. *Conservation Genetics*, 2010, 11: 2281-2288.
- [15] ZRAIDI A, STIFT G, PACHNER M, et al. A consensus map for *Cucurbita pepo* [J]. *Molecular Breeding*, 2007, 20(4): 375-388.
- [16] 施平丽, 严华兵, 曹升, 等. 基于 SSR 的 29 份栽培葛遗传多样性分析[J/OL]. *分子植物育种*, 2023: 1-19 [2023-08-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230707.0940.008.html>.
- [17] 王宣, 陈秋夏, 刘宇, 等. 海滨木槿 EST-SSR 分子标记开发及群体遗传多样性评价[J/OL]. *分子植物育种*, 2023: 1-12 [2023-08-17]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20230615.1851.019.html>.
- [18] 高铨铨, 燕丽萍, 吴德军, 等. 基于 SSR 标记的白蜡群体遗传多样性和群体结构分析[J]. *中南林业科技大学学报*, 2023, 43(6): 69-78.
- [19] 刘金洋, 周琰琰, 林云, 等. 南方 90 份秋播区蚕豆粒型性状的 SSR 关联分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2023, 24(6): 1602-1618.
- [20] 苏群, 王虹妍, 刘俊, 等. 基于 SSR 荧光标记构建睡莲核心种质[J]. *园艺学报*, 2023, 50(10): 2128-2138.
- [21] MARYAM J, MITTAL A. Foreign direct investment into BRICS: an empirical analysis [J]. *Transnational Corporations Review*, 2020, 12(1): 1-9.
- [22] UENO S, YOSHIMARU H, TOMARU N, et al. Development and characterization of microsatellite markers in *Camellia japonica* L. [J]. *Molecular Ecology*, 1999, 8(2): 335-336.
- [23] 王峥峰, 彭少麟, 任海. 小种群的遗传变异和近交衰退[J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6(1): 101-107.
- [24] 秦惠珍, 盘波, 赵健, 等. 极小种群野生植物白花兜兰 ISSR 遗传多样性分析[J]. *广西科学*, 2022, 29(6): 1134-1140.
- [25] 黎德丘. 广西野生苏铁资源现状与保护对策[J]. *中南林业调查规划*, 2004, 23(3): 33-36.
- [26] 广西警方追回 1972 株石山苏铁, 这是国家一级重点保护植物! [Z/OL]. (2022-03-14) [2023-06-02]. [https://m.163.com/dy/article/H2ECUSO20517CDN2.html?spss=adap\\_pc](https://m.163.com/dy/article/H2ECUSO20517CDN2.html?spss=adap_pc).
- [27] 龚丽莉, 杨永琼, 余志祥, 等. 苏铁属植物资源的保护及建议[J]. *中国林副特产*, 2022(1): 85-87.

## SSR Primer Design and Genetic Diversity Analysis of the Rare and Endangered Plant *Cycas sexseminifera*

TANG Jianmin, CHEN Taiguo, ZOU Rong, PAN Bo, WEI Xiao<sup>\* \* \*</sup>, WEI Fanan

(Guangxi Institute of Botany, Guangxi Zhuang Autonomous Region and Chinese Academy of Sciences, Guilin, Guangxi, 541006, China)

**Abstract:** Revealing the level of genetic diversity and genetic differentiation of the rare and endangered plant *Cycas sexseminifera* population, and determining the priority populations for protection are of great significance for the effective protection and management strategy of *C. sexseminifera*. In this experiment, Simple Sequence Repeats (SSR) primers were designed based on simplified genome sequence analysis, and SSR primers were used to detect genetic diversity. A total of 6 pairs of SSR primers were obtained in the experiment, and a total of 37 observed alleles ( $N_a$ ) were detected by 6 pairs of primers. The minimum number of observed alleles was 3, the maximum number of observed alleles was 12, and the average number of alleles per locus was 6.167. GZST002, GZST055, GZST065 and GZST088 were highly polymorphic loci ( $PIC > 0.5$ ). The expected heterozygosity ( $H_e$ ) of each population of *C. sexseminifera* was 0.330–0.533, with an average value of 0.444, indicating that the genetic diversity of *C. sexseminifera* was at a moderate level. The  $H_e$  values of 7 populations were in the order of Guangxi Botanical Research Institute (ZWS) > Chongzuo Guanghe (GH) > Chongzuo Pairu (PR) > Long'an Longhuai (LH) > Chongzuo Zhonggan (ZG) > Baise Zuodeng (ZD) > Long'an Xinhui (XH). The fixation coefficient ( $F$ ) ranged from  $-0.161$  to  $0.480$ , with an average value of  $0.074$ . Among them, the three wild populations of LH, PR and XH were negative, and the fixed coefficients of the three wild populations of GH, ZD and ZG were greater than 0. The order of  $F$  value of 7 populations was Baise Zuodeng (ZD) > Guangxi Botanical Research Institute (ZWS) > Chongzuo Zhonggan (ZG) > Chongzuo Guanghe (GH) > Long'an Longhuai (LH) > Long'an Xinhui (XH) > Chongzuo Pairu (PR). Therefore, based on various genetic indicators, the wild population of *C. sexseminifera* that needs to be protected and introduced is the Chongzuo Guanghe (GH) population, which has relatively high genetic diversity. At the same time, it is suggested to develop more SSR primers and collect a wider range of wild populations of *C. sexseminifera*, and accurately screen excellent populations with high genetic diversity, so as to facilitate a more comprehensive and accurate assessment of the genetic diversity level and endangered mechanism of *C. sexseminifera*.

**Key words:** *Cycas sexseminifera*; SSR molecular marker; genetic diversity; genetic structure; protection strategy

责任编辑:米慧芝



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>