

枸杞种质遗传多样性的 AFLP 分析

李彦龙*, 樊云芳, 戴国礼, 安巍, 曹有龙*

国家(宁夏)枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002

摘要:目的 对 15 份枸杞种质(包括 7 个种 3 个变种, 5 个品种品系)的亲缘关系进行初步研究。方法 应用 DNA-AFLP 分子标记技术和 NTSYS 类平均法对枸杞种质进行聚类分析。结果 8 对引物共扩增出 432 条带, 其中多态性条带为 360 条, 多态性比率达 83.3%。NTSYS 类平均法聚类结果显示, 以 0.72、0.79 和 0.85 的相似系数可将全部受试枸杞种质分为 9 种、5 种和 3 种聚合类群。结论 在分子水平上枸杞种间的遗传多样性十分丰富; 雄性不育枸杞 YX-1 与白花枸杞和圆果枸杞亲缘关系较近, 而与宁夏枸杞栽培品种的亲缘关系较远; 3 个变种的聚类结果与传统的形态学分类存在着明显不同。

关键词: 枸杞; 遗传多样性; 亲缘关系; AFLP; 聚类分析

中图分类号: R282.7 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2011)04-0770-04

Analysis of genetic diversity for wolfberry germplasms by AFLP technology

LI Yan-long, FAN Yun-fang, DAI Guo-li, AN Wei, CAO You-long

National (Ningxia) Wolfberry Engineering Research Center, Yinchuan 750002, China

Abstract: Objective To study the genetic relationships of fifteen wolfberry germplasm, including seven wild species, three varieties, and five cultivars and lines. **Methods** Data were analyzed by the technology of genomic DNA-AFLP markers and the NTSYS average similarity cluster analysis. **Results** The statistics showed that 432 bands were amplified using eight pairs of primers, polymorphic bands had account of 360 numbers, and polymorphic rate was 83.3%. All germplasm were classified into nine groups, five groups and three groups as different coefficient of 0.72, 0.79, and 0.85. **Conclusion** This study reveals a diverse basis and their genetic relationship of Chinese wolfberry at the molecular level. The male sterility YX-1 is clustered together with a white flowers wolfberry and a round fruit wolfberry, and YX-1 is more close to the two kinds of wolfberry but farther to the Ningxia wolfberry in the genetic distant. In addition, the classification is obviously different with the traditional morphological one about three variants.

Key words: wolfberry; genetic diversity; genetic relationship; AFLP; male sterility; similarity cluster analysis

枸杞系茄科枸杞属 *Lycium* L. 分枝灌木植物, 是名贵的药食同源植物, 全世界约有 80 个种, 多分布在南、北美洲, 我国的西北和华北地区分布有 7 个种和 3 个变种^[1-4]。作为常异花授粉植物, 枸杞多为自交不亲和, 基因型高度杂合, 一粒种子的繁育就能产生强分离的后代群体。20 世纪 70 年代, 为了保持品种的优良特性, 枸杞种苗的繁育就一直采用硬枝和嫩枝扦插的营养繁殖方式, 品种选育只能采用群体选优的方法, 造成枸杞没有完整的系谱记录, 遗传基础不清楚, 优良种质的特性难以通过品种间杂交被遗传利用。因此, 对枸杞种质之间亲缘关系和遗传基础的研究是开展枸杞杂交育种和种质资源利用的必要条件。

扩增片段长度多态性 (amplified restriction fragment polymorphism, AFLP) 是一种检测 DNA 多态性的方法, 由于该技术多态性高, 可靠性、重复性好, 已经被广泛应用于生命科学, 特别是种质遗传多样性的研究中^[5-14]。本实验将利用 DNA-AFLP 分子标记技术, 对包括雄性不育枸杞 YX-1 在内的 15 份枸杞种质的遗传多样性及亲缘关系进行研究, 从分子水平揭示枸杞种质的遗传基础, 为枸杞的遗传育种研究提供理论依据, 为枸杞的种质资源的鉴定和利用提供快速、有效的分析方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料具有我国代表性的 7 种, 3 变种及常

收稿日期: 2010-08-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30760127)

作者简介: 李彦龙 (1977—), 男, 陕西富平人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物生化与分子生物学研究。Tel: (0951)6886798

*通讯作者 李彦龙 E-mail: yanlongli2008@yahoo.cn 曹有龙 E-mail: youlongchk@163.com

规栽培品种材料全部取自国家枸杞种质资源圃(宁夏银川市芦花苔园林场),材料由宁夏枸杞工程技术研究中心主任曹有龙博士鉴定,见表1。在枸杞盛花期,采摘一年生枝条的嫩叶,用冰壶带回实验室,液氮速冻后置于-80℃冰箱中保存。

表1 15份枸杞种质

Table 1 Fifteen species from wolfberry germplasms

试材	名称	主要特征
7种	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	肉质叶,果实紫黑色
	截萼枸杞 <i>L. truncatum</i>	花萼裂片成截头
	新疆枸杞 <i>L. dasystemum</i>	枝条坚硬
	宁夏枸杞(宁杞1号) <i>L. barbarum</i>	产量高、综合抗性好
	柱筒枸杞 <i>L. cylindrium</i>	花冠筒筒状
	中国枸杞 <i>L. chinense</i>	果实小,枝条有短刺
	云南枸杞 <i>L. yunnanense</i>	匍匐,树体主杆不明显
3变种	红枝枸杞 <i>L. dasystemum</i> var. <i>rubricaulium</i>	老枝条褐红色
	北方枸杞 <i>L. chinense</i> var. <i>potaninii</i>	叶宽大
	黄果枸杞 <i>L. barbarum</i> var. <i>aurantiacarpum</i>	肉质叶,果实橘黄色
品种	YX-1(宁杞5号)	萌芽早,果大,无花粉
品系	宁杞2号	果实先端渐尖
	宁杞3号	果大且含糖量高
	白花枸杞	花瓣白色,圆果
	圆果枸杞	果实圆球形

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 从低温冰箱中取出保存的枸杞叶片,于液氮中研磨成碎末,每0.2~0.5 g碎末样品使用700 mL提取液,于65℃水浴中保温1 h。提取液为2×CTAB,其中含0.1 mol/L Tris-HCl pH 8.0, 1.4 mol/L NaCl, 2.5 mol/L NaCl, 0.02 mol/L EDTA pH 8.0, 2%CTAB, 2%PVP。提取液在使用前加入2%巯基乙醇。水浴期间分次将样品颠倒混匀,结束后先后使用等体积的氯仿-异戊醇(24:1)和氯仿各抽提1次,DNA用异丙醇沉淀,沉淀的DNA用1 mL70%乙醇洗涤2次后风干,用5 g/L RNAase 溶液去除其中的RNA,氯仿再抽提1次,2倍体积无水乙醇沉淀DNA,风干后溶解于100 μL TE 溶液中。DNA 浓度用紫外分光光度计测量,并在0.8%琼脂糖凝胶电泳检测后于-20℃保存备用。

1.2.2 AFLP 程序 AFLP 酶切连接:模板DNA 50~100 ng, EcoR I 37℃酶切5 h, Mse I 65℃再酶切45 min,酶切产物用浓度为 5×10^{-12} mol/L 的 EcoR I adaptor 和 5×10^{-11} mol/L Mse I adaptor 各1 μL, T4 Ligase 1 μL 加连接缓冲液于22℃过夜连接。

预扩及选扩:连接产物5倍稀释后取2 μL 作为预扩增DNA模板,扩增引物为EcoR I adaptor+A 和 Mse I adaptor+C (50 mg/L),体系25 μL, PCR 条件:94℃预变性3 min,随后94℃、30 s, 56℃、30 s, 72℃、60 s,共25个循环,再72℃延伸5 min。预扩增产物50倍稀释后取2 μL 作为选择性扩增模板,PCR 条件为:94℃预变性3 min, 94℃、30 s, 65℃、30 s(每个循环递减0.7℃), 72℃、60 s, 13个循环,随后的25个循环与预扩增时的条件相同。

聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染:用30%丙烯酰胺储液[丙烯酰胺C₃H₅NO-甲基双丙烯酰胺C₇H₁₀N₂O₂ (29:1)]灌制6%的凝胶,0.5×TBE 缓冲液室温下60 W 预电泳30 min 后上样,上样前样品需要95℃热变性5 min,80 W 恒功率电泳3 h 后拆板染色。染色程序为:10%冰醋酸固定20 min,蒸馏水漂洗2次,每次4 min,转至染色液(0.1% AgNO₃, 0.075% HCHO)中染色30 min,染色结束后蒸馏水快速漂洗10 s 后马上显色,显色液为3% Na₂CO₃, 0.075% 甲醛和8 mg/L Na₂S₂O₃,等清晰的电泳条带出现后用10%冰醋酸终止反应,漂洗干净自然晾干。整个电泳和染色操作在室温下进行。

试验于2010年,在国家(宁夏)枸杞工程研究中心功能基因分析研究室进行。

1.2.3 数据统计和处理 电泳结果采用人工读取的方法,选取相对分子质量在100~600 bp 的DNA条带,在相同迁移位置,有带记为“1”,无带记为“0”,对形成的1、0数据信息利用NTSYS2.10e 软件进行相似性运算和聚类分析。品种间相似系数(S) = $2N_{ij} / (N_i + N_j)$,按Dice 参数计算,式中N_i为i品种出现的谱带数,N_j为j品种出现的谱带数,N_{ij}为i品种和j品种共有的谱带数。根据相似系数矩阵,应用算术平均数的非加权成组配对法(unweighted pair group method with arithmetic mean, UPGMA)运算生成聚类图。

2 结果与分析

2.1 AFLP 的引物扩增结果

从Mse I 和EcoR I 引物组合中随机挑选了8对引物组合用于构建枸杞15份种质的AFLP 指纹图谱。不同引物组合扩增出的条带数量不等,变化范围从32条至86条,8对引物组合共扩增出100~600 bp 的条带432条,其中多态性条带360条,占总带数的83.3%(表2)。表明枸杞种间的遗传多样性十分丰富,同时也说明AFLP 方法研究枸杞种质

表 2 8 对引物扩增结果
Table 2 Sequences of eight pairs of primers
and their amplification

引物组合	总带数	共有带数	多态性带数	多态性比率%
M-CAA/E-ATG	86	10	76	88.37
M-CAG/E-ATT	70	8	62	88.57
M-CTA/E-ACA	32	7	25	78.13
M-CCC/E-AGC	44	7	37	84.09
M-CCG/E-AGG	42	7	35	83.33
M-CGT/E-AAG	68	10	58	85.29
M-CCA/E-ACC	50	8	42	84.00
M-CTT/E-AGA	40	15	25	62.50
总计	432	72	360	—
平均	54	9	45	83.33

的遗传多样性非常有效。不足之处在于，8 对引物构建的 15 份枸杞种质的 DNA 图谱，由于预先对引物的多态性没有进行筛选，可能会影响指纹图谱的密度质量。

2.2 种质间亲缘关系聚类分析

15 份枸杞种质的遗传相似系数在 0.50~0.92，平均值为 0.71，黄果枸杞与新疆枸杞间相似性系数最小，仅为 0.50，说明亲缘关系最远；白花枸杞与圆果枸杞之间相似系数最大，达到 0.92，说明亲缘关系最近。利用 UPGMA 法聚类分析得到了 15 份种质的聚类图（图 1），可知，以 0.72 的相似系数为划分，可将分布于我国的枸杞属分为 3 大类群：第 i 类群包含 YX-1、柱筒、截萼、圆果、白花枸杞以及宁夏枸杞的宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号，

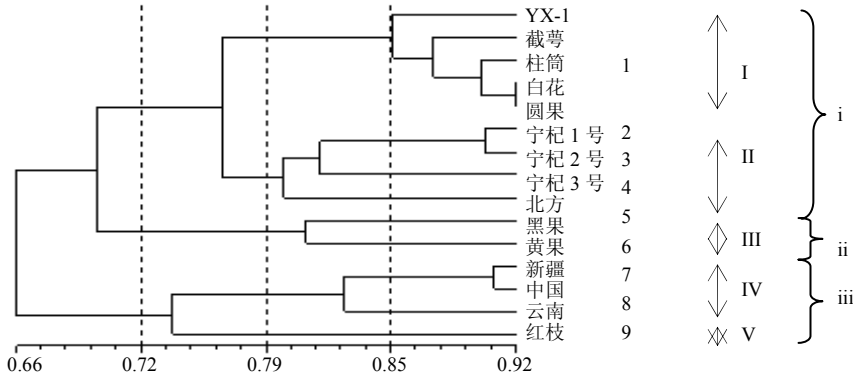


图 1 基于遗传相似系数的类平方聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrogram of wolfberry species based on genetic similarity coefficient

还有北方枸杞。第 ii 类群包含黑果与黄果变种，第 iii 类群则包含新疆、中国、云南和红枝变种。若以相似系数 0.79 划分，15 份种质则可被分为 5 组：第 I 组包括截萼、柱筒以及 YX-1、白花和圆果。第 II 组多为以宁夏枸杞为代表的栽培品种，包括宁杞 1 号、宁杞 2 号、宁杞 3 号，另外还有北方枸杞。第 III 组为野生枸杞黑果枸杞和黄果变种。第 IV 组则包括新疆、中国和云南枸杞，而云南枸杞相对于新疆和中国枸杞的距离要稍远一些。第 V 组仅有红枝一个变种。若以 0.85 的相似系数划分，15 份枸杞种质则被细分为 1~9 种。可见，随着相似系数划分界限的不同，受试的枸杞种质被区分的细致程度不同，0.79~0.85 的相似系数区间可将参试枸杞从种间、野生种与栽培种区别开来。总体来看，宁夏枸杞的栽培种植最为广泛，我国枸杞种质资源已基本形成以第 I 和第 II 类群为主导，以第 III、IV、

V 类群为补充的多元化分布，

本研究的聚类结果显示，黄果枸杞与黑果枸杞聚在一起，北方枸杞与宁夏栽培枸杞聚在一起，而红枝枸杞则与新疆枸杞距离比较远。该研究结果与以往 3 个变种黄果枸杞是宁夏枸杞的变种、北方枸杞是中国枸杞的变种、红枝枸杞是新疆枸杞的变种的分类结果差异较大，关于枸杞的 3 个变种的划分还需要更多的试验证据做更进一步的分析。

雄性不育枸杞 YX-1，现称为宁杞 5 号，由于其果实超大、萌芽早、口感甘甜的特点，自 2005 年发现以来已引起人们特别关注，基本清楚了 YX-1 花粉败育的过程。但 YX-1 的来源和遗传基础尚不清楚，本研究分析证明，YX-1 与白花和圆果枸杞的亲缘关系较近。YX-1 和宁杞 1 号都为紫花，而在 YX-1 和宁杞 1 号杂交 F1 代的回交一代 BC1 中，却发现若干白花植株，而且在 YX-1 与白花杂交的

F1 当代群体中也发现了若干数量的白花植株, 这些现象似乎说明雄性不育枸杞 YX-1 其遗传背景更接近于白花枸杞和圆果枸杞, 而与宁夏的一些栽培品种距离较远, 这为雄性不育枸杞 YX-1 的遗传应用提供了理论参考。

3 讨论

遗传相似系数 (genetic similarity coefficient) 指在数量分类学中, 表示作为对象的 2 个分类单位间相似程度的指标, 有的也用它的互补参数遗传距离 (genetic distance)。相似系数通常介于 0 和 1 之间, 相似系数等于 1 或 0, 说明两个研究单位结构完全相同或完全不同。目前计算遗传相似系数的软件非常之多, 如 SAS、SPSS、NTSYS 和 DPS 等, 但算法基本一样, 计算出的数值几乎没有差异, 因此利用相同的相似性矩阵数据和同一种聚类算法 UPGMA 生成的聚类图也完全一样。然而, 对于相似性系数划分界限和区间一直没有一个科学的标准可以依据, 这使得同一个聚类图由于划分参数大小的不同产生不同的划分结果。比如, 本研究中以 0.71 的相似系数为界可以把 15 份枸杞种质划分为 i~iii 3 大类, 以 0.8 的相似系数标准划分, 则被划分为 I~V 5 个小类, 再以 0.85 为界则划分为 1~9 类。这种情形不仅存在于本研究中, 在其他植物的种间划分中也同样存在着^[12-13]。因此, 按照聚类图来判断植物之间的亲缘关系远近还是十分方便和准确的, 但要进行种与种之间的区分还是有些困难, 采用的划分参数大小不同而引起不同的划分类型。本实验以个别在分类和进化方面研究比较清楚的典型植物为例, 对这一问题进行了探索。

参考文献

[1] 中国科学院中国植物志编委会. 中国植物志 [M]. 北

京: 科学出版社, 1978.

- [2] 宁娜, 韩建军. 地骨皮的化学成分与药理作用 [J]. 现代药物与临床, 2010, 25(3): 172-176.
- [3] 枸杞研究编写组. 枸杞研究 [M]. 银川: 宁夏人民出版社, 1981.
- [4] 吴在生, 李海龙, 刘建辉, 等. 65 个菊花栽培品种遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 南京林业大学学报: 自然科学版, 2007, 31(5): 67-70.
- [5] 黄想安, 董美芳, 阎学燕, 等. 石蒜属种间亲缘关系 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2011, 42(1): 148-152.
- [6] 索风梅, 宋经元, 陈士林, 等. AFLP 分析唐古特大黄、掌叶大黄和药用大黄的亲缘关系研究 [J]. 中草药, 2010, 41(2): 292-296.
- [7] 黄庆阳, 樊锐锋, 常纓. 香鳞毛蕨种质资源遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. 中草药, 2010, 41(6): 971-974.
- [8] 成玉, 陈成彬, 薛梅, 等. 应用 AFLP 技术探讨半夏属五个种的亲缘关系 [J]. 云南植物研究, 2006, 28(6): 559-564.
- [9] 易干军, 谭卫萍, 霍合强, 等. 龙眼品种(系)遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 园艺学报, 2003, 30(3): 272-276.
- [10] 杨朝东, 王健, 张俊卫, 等. 梅花不同样本间亲缘关系的 AFLP 初步分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(10): 2084-2089.
- [11] 王永康, 田建保, 王永勤, 等. 枣树品种品系的 AFLP 分析 [J]. 果树学报, 2007, 24(2): 146-150.
- [12] 王富荣, 佟兆国, 赵剑波, 等. 桃野生种和地方品种种质资源亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 果树学报, 2008, 25(3): 305-311.
- [13] 庄南生, 郑成木, 黄东益, 等. 甘蔗种质遗传基础的 AFLP 分析 [J]. 作物学报, 2005, 31(4): 444-450.
- [14] 祝军, 王涛, 赵玉军, 等. 应用 AFLP 分子标记鉴定苹果品种 [J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 102-106.