

## • 药材与资源 •

## 罗汉果遗传多样性与群体结构及核心种质研究

莫长明<sup>1</sup>, 谢文娟<sup>2#</sup>, 郭文锋<sup>1</sup>, 张燕玲<sup>3</sup>, 黄江<sup>2</sup>, 张馨丹<sup>3</sup>, 李忠<sup>1</sup>, 唐其<sup>4\*</sup>, 马小军<sup>5\*</sup>

1. 广西壮族自治区农业科学院广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007
2. 桂林医学院, 广西桂林 541001
3. 桂林吉福思罗汉果生物技术股份有限公司, 广西桂林 541006
4. 湖南农业大学园艺学院, 湖南长沙 410128
5. 中国医学科学院北京协和医学院药用植物研究所, 北京 100193

**摘要:** 目的 分析罗汉果 *Siraitia grosvenorii* 种质遗传基础, 以为其资源保护、品种改良和性状遗传结构解析提供依据。方法 采用 SSR 荧光分子标记对 325 份罗汉果及其近缘物种资源进行亲缘关系鉴定, 并且进一步分析罗汉果遗传多样性、群体结构和构建其核心种质。结果 优选出的 15 对 SSR 荧光引物共检测到 185 个等位基因 (平均为 12.33 个), 平均香农信息指数 (Shannon's information index,  $I$ ) 为 1.67, 多态性信息含量指数 (polymorphism information content, PIC)  $\geq 0.54$ ; 325 份种质亲缘关系聚类在遗传距离 0.95 附近被划分为赤爬、翅子罗汉果和罗汉果 3 个亚群, 其中罗汉果亚群发现大量几乎无遗传差异个体, 共鉴别获得 140 份具遗传差异的罗汉果初级核心种质。这些初级核心种质遗传分化系数 (genetic differentiation coefficient,  $F_{ST}$ ) 为 0.140, 群体间、群体内、个体内遗传变异分别占总变异的 14.0%、19.0% 和 67.0%, 野生、地方和栽培种平均遗传距离分别为 0.802 1、0.576 8、0.422 0,  $I$  分别为 1.798、1.092、0.603; Jaccard 遗传距离聚类分析在遗传距离 0.8 处被划分为 9 个亚群, 群体结构和主成分分析均被划分为 4 个亚群。通过 10%~70% 比例随机抽样法, 构建了 32 份核心种质, 其采集地点占原始种质的 94.12%, 等位基因数与原始种质的符合率为 96.13%,  $I$  值为 1.944 9。结论 优选出的 15 对 SSR 荧光引物多态性高, 能有效鉴别罗汉果及其近缘物种赤爬、翅子罗汉果。罗汉果初级核心种质存在中等程度遗传分化, 遗传变异主要来自群体与个体内部, 野生种与地方种遗传多样性高, 栽培种遗传多样性低, 存在 4 个明显基因库。构建的 32 份核心种质能充分代表原始种质地理来源与遗传多样性。

**关键词:** 罗汉果; SSR 荧光标记; 遗传多样性; 群体结构; 核心种质

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-6040-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.022

## Study on genetic diversity and population structure and core collection of *Siraitia grosvenorii*

MO Chang-ming<sup>1</sup>, XIE Wen-juan<sup>2</sup>, GUO Wen-feng<sup>1</sup>, ZHANG Yan-ling<sup>3</sup>, HUANG Jiang<sup>2</sup>, ZHANG Xin-dan<sup>3</sup>, LI Zhong<sup>1</sup>, TANG Qi<sup>4</sup>, MA Xiao-jun<sup>5</sup>

1. Guangxi Key Laboratory of Crop Genetic Improvement Biotechnology, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China
2. Guilin Medical University, Guilin 541001, China
3. Guilin GFS Monk Fruit Corporation, Guilin 541006, China
4. College of Horticulture, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China
5. Institute of Medicinal Plant Development, Chinese Academy of Medical Sciences, Peking Union Medical College, Beijing 100193, China

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点项目 (U20A2004); 国家自然科学基金项目 (32270398); 广西农业科学院科技发展基金项目 (桂农科 2022JM65, 桂农科 2018JZ36); 湖南省重点研发项目 (2022NK2004)

作者简介: 莫长明, 男, 博士, 副研究员, 研究方向为植物遗传资源评价与分子育种。E-mail: mochming@126.com

\*通信作者: 唐其, 男, 博士, 副教授, 博士生导师, 从事药用植物遗传育种研究。E-mail: tangqi@hunau.edu.cn

马小军, 男, 博士, 研究员, 博士生导师, 从事分子生物学研究。E-mail: xjma@implad.ac.cn

#共同第一作者: 谢文娟 E-mail: xiewenjuan@glmc.com

**Abstract: Objective** To analyze the genetic basis of *Siraitia grosvenorii* germplasm resources in order to provide the basis for germplasm protection, variety improvement, and genetic structure of traits. **Methods** The genetic relationship of 325 germplasm resources of *S. grosvenorii* and its relative species were analyzed by fluorescently labeled SSR markers. Based on this, the genetic diversity and population genetic structure of *S. grosvenorii* were analyzed and its core collection was constructed. **Results** A total of 185 alleles were detected by 15 pairs of optimized SSR fluorescent primers (average 12.33 per pair of SSR primer) in these 325 germplasm resources, average Shannon's information index of these alleles was 1.67, and polymorphism information content (PIC) were equal to or above 0.54. The 325 germplasm resources were divided into three subgroups by relative clustering analysis, namely *Thladiantha dubia*, *Siraitia siamensis* and *S. grosvenorii* at a genetic distance of 0.95. Among them, a great number of individuals of the *S. grosvenorii* subgroup were found to have almost no genetic differences. A total of 140 germplasm resources of *S. grosvenorii* with genetic differences were identified as a raw core collection. The genetic differentiation coefficient  $F_{st}$  of this raw core collection was 0.140. The percentages of genetic variation among populations, within populations, and among individuals in total variation of raw core collection were 14.0%, 19.0%, and 67.0%, respectively. The average genetic distance was respectively 0.802 1, 0.576 8 and 0.422 0, and Shannon's information index  $I$  were respectively 1.798, 1.092, 0.603 for wild species, landraces, and cultivars. The raw core collection was divided into nine subgroups where genetic distance was 0.8 by clustering analysis of Jaccard genetic distance and four subgroups by population structure and principal component analysis. Random sampling ratios of 10%—70% were performed to establish a core collection with 32 germplasm resources. The core collection accounted for 94.12 % of original germplasm, and the coincidence rate between the allele number and the original germplasm was 96.13%, and Shannon's information index was 1.944 9. **Conclusion** The polymorphism of selective 15 pairs of SSR fluorescent primers was high and could effectively identify *S. grosvenorii* and its related species, *T. dubia* and *S. siamensis*. The raw core collection of *S. Grosvenorii* is moderately genetically differentiated, with genetic variations mainly occurred within populations and individuals, high genetic diversity between wild and local species, low genetic diversity between cultivated species, and the existence of four distinct gene pools. The constructed 32 core collection could fully represent the original germplasm resources' geographical origin and genetic diversity.

**Key words:** *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey; SSR fluorescent markers; genetic diversity; population structure; core collection

罗汉果 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 是具有重要经济价值的葫芦科珍稀药用与甜料植物,其干燥果实为驰名中外的传统中药材,享有“东方神果”的美誉,为第一批国家药食两用中药材品种,也是《中欧地理标志协定》保护的中国地理标志产品,具有祛痰止咳<sup>[1]</sup>、清热润肺、利咽开音、滑肠通便<sup>[2]</sup>、降糖调脂<sup>[3]</sup>、抗炎平喘<sup>[4-5]</sup>、抗氧化<sup>[6]</sup>、抗癌<sup>[7]</sup>、抗纤维化<sup>[8]</sup>和增强免疫<sup>[9]</sup>等功效,其重要药理活性物质罗汉果甜苷还是世界上高强度非糖甜味物质之一。其中,罗汉果苷IV、苷V、赛门苷I和异罗汉果苷V甜度分别是0.5%蔗糖溶液的300、378、465<sup>[10]</sup>和500倍<sup>[11]</sup>。罗汉果甜苷是为数不多源自中药的非营养型、高甜度、低热量、安全无毒<sup>[12-14]</sup>、无后苦味、稳定易溶的功能性天然甜味剂,可为糖尿病和肥胖症人食用,2011年便通过美国FDA的GRAS认证成功进入美国市场<sup>[15]</sup>,目前已获得超过20国家的市场准入,应用产品超过5000种,具有广阔的市场前景。但是,由于罗汉果甜苷在鲜果中含量较低(0.45%左右),原料成本过高问题一直困

扰着其甜味剂产业发展,急需培育优良品种提高种植效率来破解这一难题。种质资源是作物优良品种选育的重要物质基础,其亲缘关系、遗传多样性、群体结构和核心种质构建研究,对指导作物种质资源保护和育种利用具有重要意义,已有多种粮食、饲料、蔬菜作物和花卉、林果植物开展了相关研究,例如青稞、糜子、新麦草、扁豆、建兰、山荆子、千年桐、核桃<sup>[16-23]</sup>。2005年,彭云滔<sup>[24]</sup>和周俊亚<sup>[25]</sup>也利用扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)、随机扩增多态性DNA(random amplified polymorphism DNA, RAPD)、简单序列重复区间(inter-simple sequence repeat, ISSR)分子标记分别对170份野生和75份栽培罗汉果种质分析显示,野生种质遗传多样性高、居群间遗传分化大、居群内遗传多样性低,栽培种质遗传多样性低、仅少数品种遗传差异较大。解兵斌<sup>[26]</sup>通过叶绿体间隔区序列片段 *trnR-atpA*、*trnH-psbA*、*trnL-trnF* 和单拷贝核基因 *CHS*、*EDL2*, 对13个野生种群和21个栽培品种共151个种质分

析也显示,野生种群遗传多样性高、种群间遗传分化大,栽培品种遗传多样性明显降低,并推测罗汉果在第4纪冰期存在广西东北部、萌渚岭、大庾岭与武功山和云开山脉4个避难所。与 AFLP、RAPD、ISSR 等分子标记相比,SSR 标记由于多态性高、重复性好、共显性遗传和操作简单等优点,已成为开展上述研究的理想分子标记。王要芳<sup>[27]</sup>利用 24 份野生和 74 份栽培种质开发了 15 对罗汉果 SSR 引物。王娟等<sup>[28]</sup>利用一个野生居群的 21 份样品开发了 27 对罗汉果 EST-SSR 引物。但是,SSR 荧光分子标记分析罗汉果亲缘关系、遗传多样性、群体结构和构建其核心种质的研究未有报道。此外,受开荒种植、伐木修路等影响,罗汉果野生资源仍遭受着严重的持续破坏;受病虫害流行和市场对果实品质要求严苛等影响,罗汉果地方与栽培品种资源也在不断锐减,拉江果、爆棚果、长滩果等品种已几乎灭绝。前人研究过程中对种质保存重视不够,多年过去以后,现有罗汉果种质资源遗传基础与育种潜力状况不明。再有,生产中具有一定规模的育苗场就有数十家,各自声称其种苗为自家培育品种,品种名称繁多然而性状表现则大同小异,因而栽培品种状况也不明朗。因此,本研究首次广泛收集并保存野生与栽培区罗汉果近缘种、野生种、地方种和栽培种等种质资源,并运用检测通量更大、准确度更高、灵敏度更好的 SSR 荧光分子标记,分析罗汉果种质资源亲缘关系、遗传多样性和群体结构,并构建其核心种质库,以摸清罗汉果这一中国特有物种资源现有家底,更好指导罗汉果种质资源保护及育种利用、优质栽培和性状遗传研究,也为其产业可持续发展提供重要物质保障。

## 1 材料与仪器

### 1.1 材料

广泛收集野生与栽培区罗汉果 *S. grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey 的野生种 (YSZ)、地方种 (DFZ) 和栽培种 (ZPZ), 以及其近缘属 (JYS) 赤廔 *Thladiantha* L.、近缘种 (JYZ) 翅子罗汉果 *S. siamensis* 的种质 325 份。实验材料经中国医学科学院药用植物研究所马小军研究员鉴定。其中,近缘属包括采自广西金秀县、黑龙江哈尔滨市的 4 份赤廔种质,近缘种为采自那坡县的 1 份翅子罗汉果;野生种包括江西省九江市、龙南县、信丰县、安福县,湖南道县、双牌县,广西区贺州市、三江县、兴安县、临桂区、永福县、柳州市、

金秀县、博白县,以及广东省南雄市、乳源县采集的 171 份种质;地方种均为早年栽培中心收集保存的,共计 69 份种质;栽培种包括罗汉果主产区广西区和湖南省不同育苗场采集的 80 份种质。通过 SRR 荧光分子标记从中鉴别出 140 份具遗传差异的初级核心种质(表 1)用于进一步遗传多样性和群体结构等分析。

### 1.2 仪器

KingFisher™ Flex 型核酸提取仪(美国 ThermoFisher 公司), Mikro 120 型台式离心机(德国 Hettich 公司), DYY-6C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司), NanoDROD 8000 型超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司), Veriti 384 well 型 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司), 3730XL 型基因分析仪(美国 Applied Biosystems 公司)。

## 2 方法

### 2.1 基因组 DNA 提取与质量检测

采用天根生化磁珠法植物基因组提取试剂盒,配合 King Fisher™ Flex 核酸提取仪和 Mikro 120 台式离心机对罗汉果嫩叶样本进行基因组 DNA 核酸提取。取 2 μL 提取 DNA 样本添加 2 μL 6×Loading Buffer,于 DYY-6C 电泳仪进行浓度 1%、电压 120 V、时间 20 min 的琼脂糖凝胶电泳检测核酸完整性。取 2 μL DNA 样本,采用 NanoDROD 8000 超微量分光光度计进行核酸浓度和纯度检测。

### 2.2 SSR 引物合成与筛选

采用接头荧光 PCR 法,从发表的引物<sup>[27-28]</sup>中选取 37 对多态性引物,由天一辉远公司合成上游接头引物(添加 21 bp 序列 5'-GAAGGTGACCA-AGTTCATGCT-3')或荧光接头引物(接头引物添加荧光基团),以及下游普通引物,针对 25 个表型遗传差异大的品种样本,在 Veriti 384 well PCR 仪上,分别进行 2 轮 PCR 扩增。PCR 反应体系: GeneTech 2×Taq PCR Master Mix 7.5 μL、Mix primer 2.0 μL、DNA 模板 1 μL、ddH<sub>2</sub>O 4.5 μL。PCR 扩增程序设置为: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,扩增产物采用 3730XL 基因分析仪进行荧光毛细管电泳检测。上样混合物: Applied Biosystems Hi-Di Formamide 10

表 1 初级核心种质信息

Table 1 Information of primary core collections

种质编号	群体类型	采集地点	采集年份	种质编号	群体类型	采集地点	采集年份	种质编号	群体类型	采集地点	采集年份
1	YSZ	广西永福县	2021	48	YSZ	广西贺州市	2021	95	YSZ	广东南雄市	2021
2	YSZ	广西三江县	2021	49	YSZ	广西贺州市	2021	96	YSZ	湖南道县	2021
3	YSZ	广西永福县	2021	50	DFZ	广西永福县	2005	97	YSZ	广东南雄市	2021
4	DFZ	广西永福县	2004	51	DFZ	广西雁山区	2017	98	YSZ	广东南雄市	2021
5	DFZ	广西临桂区	2008	52	DFZ	广西雁山区	2018	99	YSZ	湖南道县	2021
6	DFZ	广西临桂区	2004	53	DFZ	广西雁山区	2018	100	YSZ	湖南道县	2021
7	DFZ	广西龙胜县	2004	54	DFZ	广西雁山区	2019	101	YSZ	广东南雄市	2021
8	DFZ	广西临桂区	2004	55	DFZ	广西雁山区	2019	102	YSZ	江西信丰县	2021
9	DFZ	广西永福县	2004	56	DFZ	广西雁山区	2019	103	YSZ	江西信丰县	2021
10	DFZ	广西龙胜县	2004	57	DFZ	广西雁山区	2019	104	YSZ	湖南道县	2021
11	DFZ	广西永福县	2004	58	DFZ	广西雁山区	2019	105	YSZ	湖南道县	2021
12	DFZ	广西永福县	2004	59	DFZ	广西临桂区	2017	106	YSZ	湖南道县	2021
13	DFZ	广西龙胜县	2004	60	DFZ	广西雁山区	2019	107	YSZ	湖南道县	2021
14	DFZ	广西临桂区	2004	61	DFZ	广西雁山区	2019	108	YSZ	湖南道县	2021
15	DFZ	广西永福县	2004	62	DFZ	广西雁山区	2019	109	YSZ	广西贺州市	2021
16	DFZ	广西永福县	2004	63	DFZ	广西临桂区	2017	110	YSZ	广西博白县	2021
17	DFZ	广西永福县	2004	64	DFZ	广西永福县	2017	111	YSZ	广西博白县	2021
18	DFZ	广西永福县	2007	65	DFZ	广西兴安县	2018	112	ZPZ	广西雁山区	2020
19	JYZ	广西那坡县	2021	66	DFZ	广西临桂区	2017	113	ZPZ	广西永福县	2018
20	DFZ	广西永福县	2004	67	DFZ	广西永福县	2019	114	YSZ	广西临桂区	2021
21	DFZ	广西永福县	2004	68	DFZ	广西永福县	2019	115	YSZ	湖南双牌县	2021
22	DFZ	广西龙胜县	2004	69	YSZ	广西三江县	2017	116	YSZ	湖南双牌县	2021
23	DFZ	广西永福县	2004	70	YSZ	广西金秀县	2016	117	YSZ	广西兴安县	2021
24	DFZ	广西永福县	2004	71	DFZ	广西临桂区	2017	118	YSZ	广西永福县	2021
25	DFZ	广西临桂区	2004	72	YSZ	广西金秀县	2021	119	YSZ	广西贺州市	2021
26	DFZ	广西永福县	2004	73	YSZ	广西金秀县	2021	120	YSZ	广西临桂区	2021
27	DFZ	广西临桂区	2004	74	YSZ	广西永福县	2021	121	YSZ	江西九江市	2021
28	DFZ	广西永福县	2004	75	YSZ	广西金秀县	2021	122	YSZ	广东南雄市	2021
29	YSZ	广西临桂区	2018	76	YSZ	广西金秀县	2021	123	YSZ	广西贺州市	2021
30	DFZ	广西永福县	2004	77	YSZ	江西九江市	2021	124	YSZ	广西贺州市	2021
31	DFZ	广西永福县	2004	78	YSZ	湖南道县	2021	125	YSZ	广西永福县	2021
32	ZPZ	广西永福县	2021	79	YSZ	江西龙南县	2021	126	YSZ	广西永福县	2021
33	YSZ	江西信丰县	2021	80	YSZ	广东乳源县	2021	127	YSZ	广西永福县	2021
34	YSZ	江西龙南县	2021	81	YSZ	江西龙南县	2021	128	YSZ	广西永福县	2021
35	YSZ	江西龙南县	2021	82	YSZ	江西龙南县	2021	129	YSZ	广西三江县	2021
36	YSZ	江西龙南县	2021	83	YSZ	江西龙南县	2021	130	YSZ	广西三江县	2021
37	YSZ	江西信丰县	2021	84	YSZ	江西龙南县	2021	131	YSZ	广西三江县	2021
38	YSZ	广东南雄市	2021	85	YSZ	江西信丰县	2021	132	YSZ	广西兴安县	2021
39	YSZ	广西永福县	2021	86	YSZ	江西信丰县	2021	133	YSZ	广西兴安县	2021
40	YSZ	广西兴安县	2021	87	YSZ	江西信丰县	2021	134	YSZ	广西兴安县	2021
41	YSZ	广西兴安县	2021	88	YSZ	江西信丰县	2021	135	YSZ	江西龙南县	2021
42	YSZ	广西博白县	2021	89	YSZ	江西信丰县	2021	136	YSZ	江西龙南县	2021
43	DFZ	广西临桂区	2008	90	YSZ	江西信丰县	2021	137	ZPZ	广西永福县	2021
44	YSZ	广西永福县	2021	91	YSZ	江西信丰县	2021	138	YSZ	湖南双牌县	2021
45	YSZ	广西贺州市	2021	92	ZPZ	广西雁山区	2021	139	ZPZ	湖南武冈市	2021
46	YSZ	广西金秀县	2021	93	YSZ	湖南道县	2021	140	ZPZ	湖南武冈市	2021
47	YSZ	广西临桂区	2021	94	YSZ	湖南道县	2021				

μL、Applied Biosystems GeneScan 500 LIZ Size Standard 内标 0.5 μL、PCR 产物 1.0 μL。使用 GeneMarker3.0.0 软件对结果进行分析，从中筛选到 15 对多态性良好的引物（表 2）。

### 2.3 群体样本 SSR 分型

在筛选出的 15 对引物的上游引物 5' 端加上不同的荧光标记，与下游普通引物一起，采用直接荧光 PCR 法，对 325 份罗汉果种质样本进行 PCR 扩增。PCR 扩

表2 优选出的15对多态性引物信息

Table 2 Information of 15 pairs of selective polymorphic primers

荧光引物	重复单元	正向引物 (5'→3')	反向引物 (5'→3')	产物大小/bp
Sg3-FAM	(CT) <sub>10</sub>	TCTGGAGAGGAAAACCTTAGAAATG	ACAAAATAGGAGATCCCTGAAACC	191~226
Sg7-FAM	(GA) <sub>x001E_11</sub>	TGCCGACATCCTTCTATTCC	CTCCTCTCCGTAGCTCCATC	167~178
Sg13-HEX	(CT) <sub>12</sub>	CTTCCATCTCCTTGAAAACA	GACTCCTCCATTCTTCCTCT	143~170
Sg14-HEX	(TC) <sub>8 ... (TC)<sub>6</sub></sub>	GACTCAACGACGAACGGGA	AAGAAAAGCAAACACCACC	316~347
Sg25-FAM	(TTC) <sub>10</sub>	ATTATTTGTGCGGGTTGTGG	TGGAGATGGGTTCTGAGTTG	194~222
Sg26-TAMRA	(CAA) <sub>6</sub>	TCCACAACCCAAAATCAT	ACAAGGGAGACCCACAAT	200~218
Sg27-FAM	(CT) <sub>6</sub>	TCCATCAACAGTAGCCCT	AGAGGGACGAAATGAAGA	138~149
Sg29-HEX	(CT) <sub>6</sub>	TGCCTGCCTTCACTTCA	GCAAAAACAGAGGGACGA	130~140
Sg31-HEX	(CCA) <sub>6</sub>	ATGATTCAGAACCCAGCA	TCGGTATCGGTGGAGTTA	185~194
Sg34-HEX	(AT) <sub>12</sub>	AACTGTGGAAAAGAACCCT	TACCCTCTCTAACCATTCCAA	241~268
Sg35-FAM	(CT) <sub>14</sub>	ATCCCAAGTTCACAGCGTA	TCGTCTACTCTTTTGGGTA	250~269
Sg36-HEX	(GA) <sub>13</sub>	TCATGCCTCTGAGTAAAACGA	CTGCCTCTCTTGTGGTTT	264~277
Sg37-HEX	(GA) <sub>16</sub>	CACAGGAAAATTGGTGCTCT	GTTTTCGCCATCAAGATCAGG	222~248
Sg38-TAMRA	(GA) <sub>9</sub>	AAACAACCGCCCTCCGCCTT	TGGTGGCTCCTTGTAGTCCT	206~249
Sg42-HEX	(CT) <sub>13</sub>	CTCCATTGAAGCCCCATA	TGATGCCAACTTTGTGCGC	192~211

增产物通过荧光毛细管电泳检测。PCR 扩增反应体系、反应条件和荧光毛细管电泳检测方法同“2.2”项引物筛选实验。检测结果通过 GeneMarker3.0.0 软件分析获得每份种质样本的等位基因数、峰图和基因型。

## 2.4 数据分析

采用 Excel 2019 软件整理基因型数据，统计标记位点等位基因在不同群体的百分数和私有等位基因数，按照不同软件要求进行相应数据格式转换。采用 GenAlex6.5 软件计算种质标记位点和群体的有效个体数 (effective number of alleles,  $N$ )、等位基因数 (observed number of individuals,  $N_a$ )、有效等位基因数 (effective number of alleles,  $N_e$ )、香农信息指数 (Shannon's information index,  $I$ )、观测杂合度 (observed heterozygosity,  $H_o$ )、期望杂合度 (expected heterozygosity,  $H_e$ )、固定指数 (fixation index,  $F$ )、遗传分化系数 (genetic differentiation coefficient,  $F_{ST}$ )、基因流 (gene flow,  $N_m$ ) 和基因差异分化系数 (gene differentiation coefficient,  $G_{ST}$ ) 等遗传多样性参数。采用 Cervus3.0.7 软件计算多态信息含量指数 (polymorphism information content, PIC)。

种质间系统聚类使用 NTsys2.10e 软件根据 Jaccard 遗传距离分析画树。群体间系统聚类根据 Nei's 遗传距离，运用 Phylip 软件对其进行 UPGMA 方法画树。群体间的遗传距离，以及分子方差分析

采用 GenAlex6.5 软件计算。群体结构分析使用 STRUCTURE 2.3.4，设置  $K=3\sim 10$ ，Burn-in 周期为 10000，Markov Chain Monte Carlo 设为 100000，每个  $K$  值运行 20 次，并利用在线工具 STRUCTURE HARVESTER (<https://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) 算出最佳  $\Delta K$  值 (即为最佳群体分群数)。根据最佳  $K$  值结果，使用 CLUMMP 和 DISTRICT 软件绘制结果图。种质主坐标分析 (principal co-ordinate analysis, PCoA) 利用 GenAlex 6.5 软件。

采用随机取样法，利用 R package corehunter 对每个类群按照个体数量的 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70% 抽样比例来提取核心种质子集。其中，外群各组样本数量很少，且与其他样本差异较大，故无需提取子集，直接保留作为核心种质。使用软件 Popgene32 分析获得的每个抽样子集的  $I$ ，从中选取最优的子集作为核心种质。

## 3 结果与分析

### 3.1 SSR 荧光标记引物优选评价

3.1.1 引物扩增罗汉果及其近缘物种多态性评价从 37 对普通引物中筛选出 15 对扩增位点多态性好的 SSR 荧光标记引物 (表 3)。利用此 15 对引物对 325 份罗汉果及其近缘种质进行扩增，每对引物扩增的有效个体数在 284 个以上，平均  $N$  为 318 个；

所有引物对共扩增出 185 个等位基因，每对引物扩增出的  $N_a$  在 6 个以上、平均  $N_a$  为 12.33 个；各对引物在不同群体中扩增出等位基因的百分数存在明显差异，但均为野生种 > 地方种 > 栽培种，其中野生种中扩增出等位基因的百分数在 80.00% 以上、平均值为 91.92%。每对引物扩增位点的  $I$  在 0.70~2.12、平均值为 1.67， $PIC$  在 0.54~0.81、平均值 0.70， $F_{ST}$  在 0.041 4~0.248 7、平均值为 0.128 0， $G_{ST}$  在

0.038 7~0.244 2、平均值为 0.124 5。185 个等位基因中有 21 个为私有等位基因（表 4），其中那坡县近缘种种质 19 携带私有等位基因数最多、达到 7 个，其次乳源县和南雄市野生种种质 80、98 均携带 3 个私有等位基因，再有金秀县和双牌县野生种种质 70、138 则均携带 2 个私有等位基因，信丰县、南雄市和临桂区野生种种质 37、87、101、114 也各携带 1 个私有等位基因。

表 3 15 对引物的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of 15 pairs of primers

荧光引物	$N$	$N_a$	群体等位基因百分数/%			$I$	$PIC$	$F_{ST}$	$G_{ST}$
			野生种	地方种	栽培种				
Sg3-FAM	284	10	80.00	50.00	20.00	1.64	0.73	0.195 8	0.191 7
Sg7-FAM	317	10	90.00	30.00	20.00	1.60	0.70	0.131 4	0.128 2
Sg13-HEX	323	15	93.33	26.67	13.33	1.97	0.78	0.055 7	0.052 3
Sg14-HEX	322	11	90.91	45.45	18.18	1.58	0.68	0.099 7	0.096 2
Sg25-FAM	319	13	100.00	61.54	15.38	1.88	0.75	0.041 4	0.038 7
Sg26-TAMRA	318	15	80.00	46.67	13.33	1.85	0.76	0.146 9	0.143 7
Sg27-FAM	321	7	85.71	57.14	57.14	1.46	0.71	0.108 5	0.105 6
Sg29-HEX	318	7	85.71	57.14	57.14	1.44	0.70	0.112 6	0.109 5
Sg31-HEX	322	6	100.00	66.67	33.33	1.09	0.54	0.248 7	0.244 2
Sg34-HEX	322	20	95.00	30.00	15.00	2.08	0.80	0.178 5	0.173 8
Sg35-FAM	321	16	93.75	31.25	12.50	2.02	0.81	0.122 7	0.120 2
Sg36-HEX	322	10	90.00	30.00	10.00	0.70	0.27	0.096 4	0.092 6
Sg37-HEX	321	18	100.00	22.22	11.11	1.93	0.73	0.125 6	0.122 9
Sg38-TAMRA	319	18	94.44	27.78	22.22	2.12	0.81	0.084 6	0.080 4
Sg42-HEX	321	9	100.00	55.56	33.33	1.62	0.71	0.171 6	0.167 3
平均值	318	12.33	91.92	42.54	23.47	1.67	0.70	0.128 0	0.124 5

表 4 种质携带的私有等位基因

Table 4 Private alleles of germplasms

种质编号	群体类型	采集地点	基因数量	私有等位基因名称
19	JYZ	那坡县	7	<i>Sg3-FAM-172</i> 、 <i>Sg3-FAM-176</i> 、 <i>Sg7-FAM-142</i> 、 <i>Sg14-HEX-322</i> 、 <i>Sg26-TAMRA-191</i> 、 <i>Sg26-TAMRA-195</i> 、 <i>Sg36-HEX-240</i>
80	YSZ	乳源县	3	<i>Sg31-HEX-161</i> 、 <i>Sg34-HEX-238</i> 、 <i>Sg34-HEX-250</i>
98	YSZ	南雄市	3	<i>Sg27-FAM-115</i> 、 <i>Sg29-HEX-106</i> 、 <i>Sg35-FAM-267</i>
70	YSZ	金秀县	2	<i>Sg13-HEX-139</i> 、 <i>Sg35-FAM-233</i>
138	YSZ	双牌县	2	<i>Sg26-TAMRA-186</i> 、 <i>Sg35-FAM-249</i>
37	YSZ	信丰县	1	<i>Sg36-HEX-260</i>
87	YSZ	信丰县	1	<i>Sg13-HEX-127</i>
101	YSZ	南雄市	1	<i>Sg42-HEX-194</i>
114	YSZ	临桂区	1	<i>Sg34-HEX-233</i>

编号与表 1 中种质编号对应，以下同

The germplasm codes in the table represent the germplasm codes in Table 1, same as below

**3.1.2 引物对罗汉果及其近缘物种鉴定评价** 325 份种质亲缘关系 Jaccard 遗传距离系统聚类结果鉴定结果见图 1，在遗传距离 0.95 附近所有种质可分为 3 个亚群。其中，亚群 I 为罗汉果近缘属物

种赤爬的 4 份种质，亚群 II 为罗汉果近缘种翅子罗汉果的 1 份种质，亚群 III 则均为罗汉果种质。3 个亚群亲缘关系由远及近依次为赤爬、翅子罗汉果和罗汉果。罗汉果种质群体中存在大量几乎

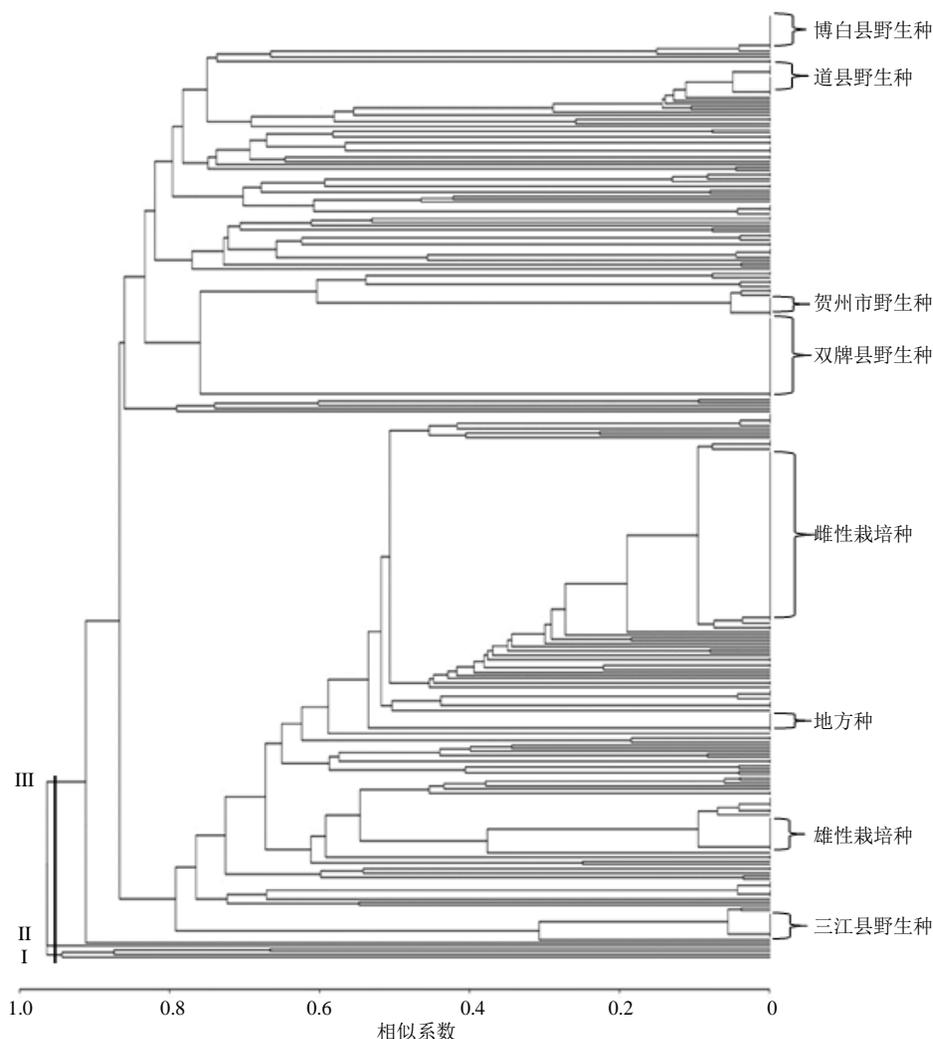


图1 罗汉果及其近缘物种亲缘关系鉴定

Fig. 1 Genetic relationship identification of *S. grosvenorii* and its relatives

无遗传差异的个体，例如三江县、贺州市和道县等野生种群体，而且个体数量较少的双牌县和博白县野生种群体这一现象会更明显。地方种群体也存在一定数量几乎无遗传差异的个体。栽培种群体种质间几乎无遗传差异的现象最为突出，主产区不同育苗场繁育的雌性和雄性栽培种群体均存在大量几乎无遗传差异的个体，采集的80份种质中雌性栽培品种只剩下1个大面积种植的青皮果品种和2个少量种植的红毛果品种，雄性栽培品种也仅有4个品种。

### 3.2 初级核心种质遗传分析

**3.2.1 群体间遗传分化分析** 因罗汉果种质资源稀少，所以去除325份种质中近缘属与几乎无遗传差异的种质后，将剩余140份存在遗传差异的种质作为罗汉果初级核心种质（表1）。这140份初级核心

种质群体间亲缘关系由远及近依次为近缘种、野生种、地方种、栽培种（图2）， $F_{ST}$ 由大到小分别为近缘种与栽培种群体、近缘种与地方种群体、近缘种与野生种群体、野生种与栽培种群体、地方种与栽培种群体、野生种与地方种群体，Nei's遗传距离由大到小顺序除野生种与地方种群体和地方种与栽培种群体互换外，其余与 $F_{ST}$ 排序一致（表5）。当 $0 < F_{ST} < 0.05$ 、 $0.05 \leq F_{ST} < 0.15$ 、 $0.15 \leq F_{ST} < 0.25$ 、 $0.25 \leq F_{ST} < 1$ 时，分别表明群体间具有较弱、中等、较强或非常强的遗传分化<sup>[29]</sup>。分子方差分析结果（表6）表明，这些初级核心种质群体间 $F_{ST}$ 为0.140，存在中等程度遗传分化；大多数变异来自群体与个体内部（86.00%），而群体间的变异仅贡献了14.00%（表6）；群体间 $N_m = 1.535 > 1$ （表6），存在一定频率的基因交流。

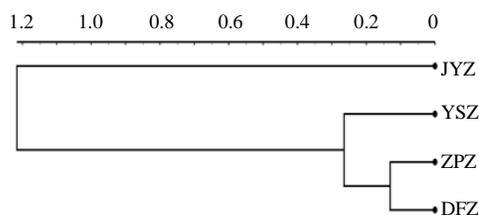


图2 初级核心种质群体的遗传分化关系

Fig. 2 Genetic differentiation of primary core collection populations

表5 初级核心种质群体间遗传分化系数和遗传距离

Table 5 Genetic differentiation coefficient and genetic distance among primary core collection populations

群体类型	JYZ	YSZ	DFZ	ZPZ
JYZ	0	2.372	2.401	2.523
YSZ	0.329	0	0.401	0.657
DFZ	0.409	0.084	0	0.261
ZPZ	0.511	0.177	0.123	0

对角线下方数据为遗传分化系数  $F_{ST}$ , 对角线上方数据为 Nei's 遗传距离

The data below the diagonal is  $F_{ST}$  Values, and above the diagonal is Nei's genetic distance

表6 初级核心种质群体分子方差分析

Table 6 Molecular analysis of variance of primary core collection populations

变异来源	自由度	变异组分	变异百分数/%	$F_{ST}$	$N_m$	$P$ 值
群体间	2	0.846	14.0	0.1401	1.535	0.001
群体内	136	1.166	19.0			
个体内	139	4.032	67.0			
总数	277	6.044	100.0			

**3.2.2 群体内遗传多样性分析** 原始种质近缘种、野生种、地方种和栽培种入选初级核心种质个体比例由高到低分别为近缘种 100%、地方种 68.12%、野生种 49.12%、栽培种 8.75%，其中野生种和栽培种中种质重复比例均很高（表 7）。安福县和双牌县野生居群入选比例非常低，且二者存在种质重复现象（表 7）。野生种、地方种和栽培种群体遗传距离范围分别为 0.038 5~0.979 2、0.035 7~0.829 3、0.041 7~0.743 6，平均遗传距离分别为 0.802 1、0.576 8、0.422 0（表 7）。其中，野生种 16 个县区居群入选初级核心种质个体数多且比例高的为信丰县、龙南县、永福县居群，遗传距离范围较宽的为永福县、兴安县和贺州市居群，其遗传距离范围分别为 0.041 7~0.902 4、0.043 5~0.900 0、0.040 0~0.878 0，平均遗传距离较大的为双牌县、

临桂区和龙南县居群，其平均遗传距离分别为 0.878 2、0.732 9、0.686 1（表 7）。野生种、地方种和栽培种群体遗传多样性参数  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $I$ 、 $H_e$  等由大到小均分别为野生种、地方种、栽培种群体，其中  $N_a$  平均值分别为 11.333、5.533、2.133， $I$  平均值分别为 1.798、1.092、0.603（表 8）。

**3.2.3 群体聚类分析** 140 份初级核心种质在遗传距离 0.8 处可分为具有较明显地理来源的 9 个亚群（见图 3）。亚群 I 为来自那坡县的 1 份近缘种。亚群 II 为来自乳源县的 1 份野生种。亚群 III 包括 74 份野生、地方和栽培种质，其中野生种来自双牌县 2 份、临桂区 3 份、永福县 9 份、三江县 1 份、兴安县 5 份，地方种 47 份，栽培种 7 份，主要为永福县、临桂区和兴安县种质。亚群 IV 为 5 份野生种质，其中来自三江县 4 份、南雄市 1 份，基本为三江县种质。亚群 V 为来自南雄市的 4 份野生种。亚群 VI 为 8 份野生种质，其中来自双牌县 1 份、永福县 1 份、贺州市 6 份，基本为贺州市种质。亚群 VII 为 32 份野生种质，其中来自南雄市 1 份、道县 11 份、龙南县 8 份、信丰县 1 份、贺州市 1 份、博白县 3 份、临桂区 1 份、金秀县 6 份，主要为道县、龙南县、金秀县和博白县。亚群 VIII 为 4 份野生种质，其中来自龙南县 2 份、九江市 2 份。亚群 IX 为来自信丰县的 11 份野生种。虽然除翅子罗汉果和乳源县野生种分别单独聚为一个亚群外，其余同一地理来源或遗传群体种质均与 1 个以上其他地理来源或遗传群体种质聚为 1 个亚群，但是种质分布仍呈现一定程度的地理来源或遗传群体类型相关性，邻近的县区市种质趋向形成 1 个亚群，同时可能通过自然传播或人工引种方式与其它亚群存在一些基因交流。例如，亚群 III 主要为永福、临桂和兴安邻近县区种质，同时包含外围三江县和双牌县少量种质；亚群 VII 包括道县、龙南县及其外围南雄市、信丰县、贺州市种质，这可能是由于种质自然传播所致，以及包括与二者相距较远的金秀县、博白县种质，这可能与人工引种有关。

**3.2.4 群体结构分析** 罗汉果为异花授粉植物，杂合度较高，不仅群体间存在遗传变异，群体内个体遗传变异也不尽相同，为了揭示罗汉果种质的遗传组分，参考 Evanno 等<sup>[30]</sup>的方法当  $\Delta K$  值变化出现明显的峰值时  $K$  值作为最优群体数的方法，对 140 份初级核心种质进行类群划分。将  $K$  设置为 3~10，绘制  $K$  与  $\Delta K$  的关系图，当  $K=4$  时， $\Delta K$  出现最大峰值（图 4），因此罗汉果初级核心种质可划分为 4

表7 初级核心种质4个类型群体及野生居群内遗传距离

Table 7 Genetic distance within four types of populations and wild populations of primary core collections

群体分群	采样数量	入选数量	入选比例/%	遗传距离范围	平均遗传距离
JYZ	1	1	100.00	ND	ND
YSZ	171	84	49.12	0.038 5~0.979 2	0.802 1
DFZ	69	47	68.12	0.035 7~0.829 3	0.576 8
ZPZ	80	7	8.75	0.041 7~0.743 6	0.422 0
九江市居群	2	2	100.00	ND	ND
龙南县居群	15	10	66.67	0.045 5~0.833 3	0.686 1
信丰县居群	16	11	68.75	0.038 5~0.833 3	0.669 9
安福县居群	3	0	0.00	ND	ND
道县居群	21	11	52.38	0.050 0~0.741 9	0.393 3
双牌县居群	29	3	10.34	0.756 8~0.977 8	0.878 2
贺州市居群	16	7	43.75	0.040 0~0.878 0	0.555 3
三江县居群	12	4	33.33	0.038 5~0.354 9	0.189 9
兴安县居群	8	6	75.00	0.043 5~0.900 0	0.625 9
临桂区居群	5	4	80.00	0.611 1~0.809 5	0.732 9
永福县居群	14	10	71.43	0.041 7~0.902 4	0.659 7
柳州市居群	1	1	100.00	ND	ND
金秀县居群	8	5	62.50	0.080 0~0.822 2	0.550 7
博白县居群	14	3	21.43	0.041 7~0.153 8	0.105 2
南雄市居群	6	6	100.00	0.095 2~0.864 9	0.676 4
乳源县居群	1	1	100.00	ND	ND

ND 表示无相应数据

ND represent no date

表8 初级核心种质群体遗传多样性参数

Table 8 Genetic diversity parameters of primary core collection populations

群体类型	<i>N</i>	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>I</i>	<i>H<sub>o</sub></i>	<i>H<sub>e</sub></i>	<i>F</i>
YSZ	84.000±0.543	11.333±1.120	5.100±0.670	1.798±0.127	0.530±0.037	0.752±0.030	0.291±0.047
DFZ	46.667±0.504	5.533±0.446	2.562±0.176	1.092±0.085	0.579±0.057	0.572±0.042	0.014±0.058
ZPZ	5.733±0.267	2.133±0.236	1.926±0.198	0.603±0.122	0.522±0.115	0.375±0.075	0.411±0.125
平均值	45.467±4.826	6.333±0.698	3.196±0.313	1.164±0.098	0.543±0.044	0.566±0.038	0.001±0.060

个亚群(图5)。Cluster1亚群共包括37份近缘种与野生种种质,其中近缘种来自那坡县1份,野生种来自信丰县10份、龙南县10份、南雄市4份、贺州市1份、金秀县6份、九江市2份、乳源县1份、道县1份;Cluster2亚群共包括28份野生种与地方种种质,其中野生种来自永福县9份、三江县4份、兴安县5份、临桂区2份、南雄市1份、双牌县1份,地方种6份;Cluster3亚群为23份野生种种质,其中来自博白县3份、永福县1份、贺州市6份、道县11份、南雄市1份、双牌县1份;Cluster4亚群共包括52份野生种、地方种和栽培种种质,其中

野生种来自临桂区2份、柳州市1份、双牌县1份,地方种41份,栽培种7份。

STRUCTURE群体结构分析中,当某一种质在某类群中的 $Q \geq 0.6$ 时,则认为该种质血缘关系相对比较单一,否则认为该种质血缘关系来源复杂<sup>[31]</sup>。图5显示,Cluster1亚群除贺州市和金秀县野生种种质45、75、76的 $Q$ 值分别为0.3842、0.5837、0.5981外,其余种质 $Q$ 值均大于0.6。Cluster2亚群除地方种种质23、66和南雄市野生种种质97的 $Q$ 值分别为0.5026、0.5058、0.3839外,其余种质 $Q$ 值均大于0.6。Cluster3亚群除博白县野生种种质42的 $Q$ 值为0.561,永福

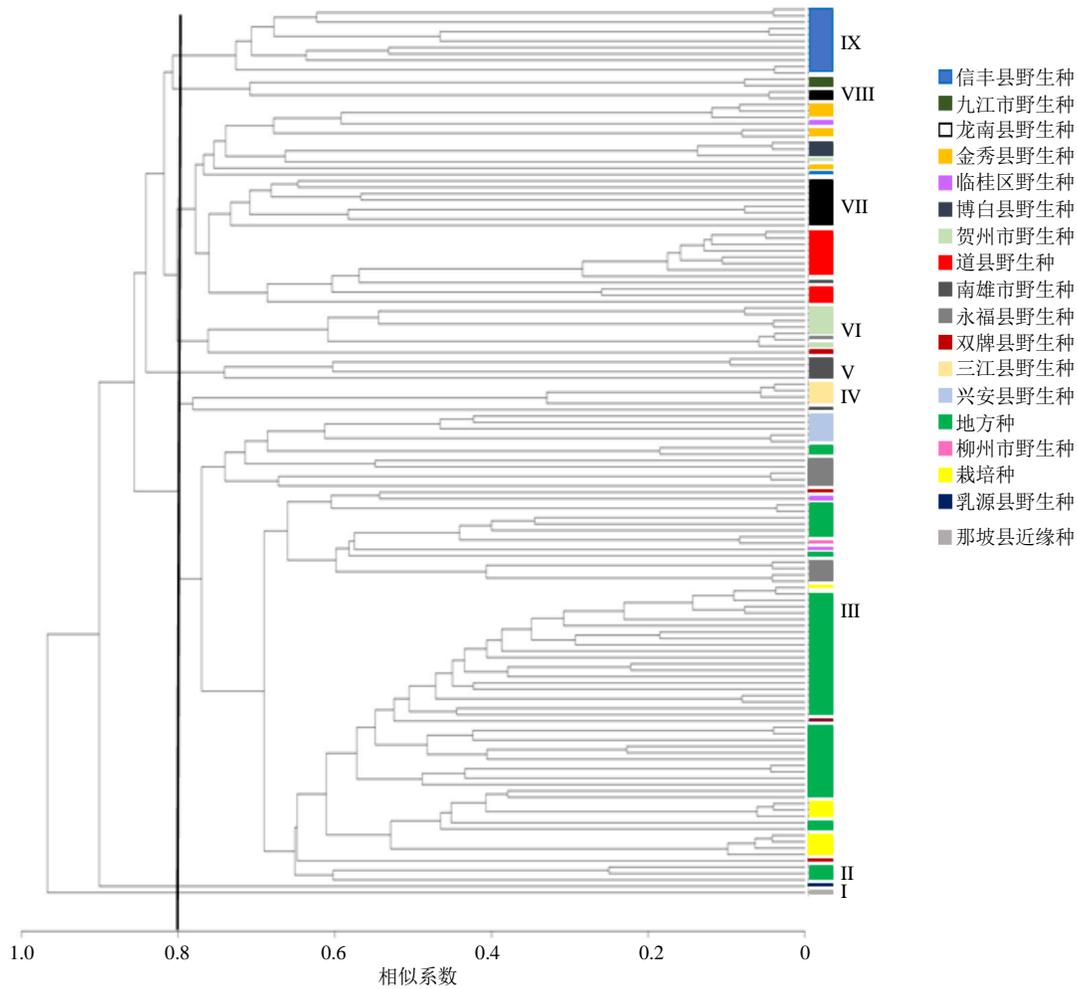


图3 140个初级核心种质系统进化树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 140 accessions of primary core collections

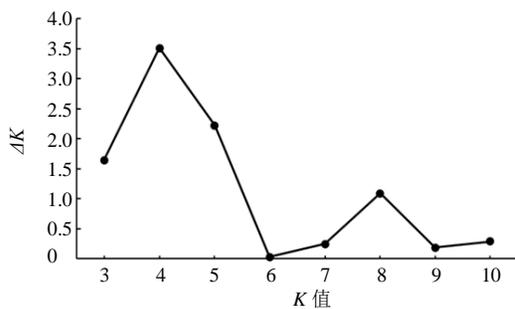


图4 140个初级核心种质  $\Delta K$  随  $K$  值变化的分布

Fig. 4 Distribution of 140 accessions of primary core collections  $\Delta K$  with changes in  $K$  value

县野生种种质 44 的  $Q$  值为 0.498 4, 贺州市野生种种质 48、49 和 109、119、123、123 的  $Q$  值为 0.499 4、0.495 5、0.499 6、0.498 4、0.495 6、0.497 8, 双牌县野生种种质 138 的  $Q$  值为 0.479 4 外, 其余种质  $Q$  值均大于 0.6。Cluster4 亚群除地方种种质 7、21 的  $Q$  值为 0.570 9、0.571 2, 临桂区野生种种质 114

的  $Q$  值为 0.495 6 外, 其余种质  $Q$  值均大于 0.6。140 份初级核心种质中有 122 份种质  $Q \geq 0.6$ , 占有种质材料的 87.14%。这些说明罗汉果初级核心种质及其各亚群中大部分种质血缘关系比较单一, 但是也有少数种质含有其他亚群基因成分, 尤其是 Cluster3 亚群来自贺州市野生种种质。

Cluster1 亚群种质对应聚类分析的亚群 I、II、V、VII、VIII 和 IX 种质。Cluster2 亚群种质对应聚类分析的亚群 III、IV 和 VII 种质。Cluster3 亚群种质对应聚类分析的亚群 VI 和 VII 种质。Cluster4 亚群种质对应聚类分析的亚群 III 种质。其中, 因亚群间基因交流而血缘关系混杂, 使得亚群 III 种质归属 Cluster2 和 Cluster4 2 个亚群, 亚群 VII 种质归属 Cluster1、2 和 3 3 个亚群外, 其余聚类分析划分亚群种质均单一归属群体结构分析划分的 1 个亚群。

**3.2.5 群体主坐标分析** 140 份罗汉果初级核心种质主坐标分析显示, 第 1、第 2、第 3 主坐标

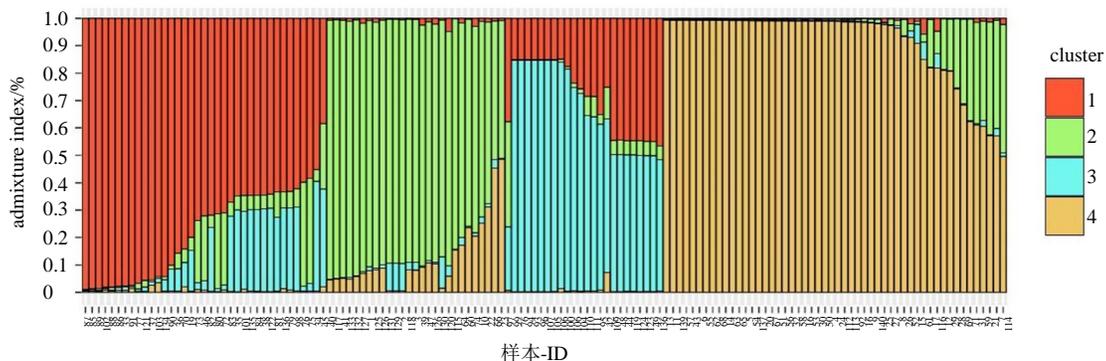


图5 140份初级核心种质遗传群体结构

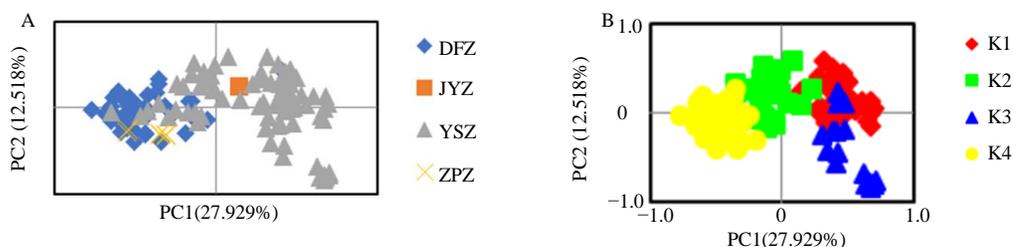
Fig. 5 Genetic population structure of 140 accessions of primary core collections

分别能解释这些种质 27.929%、12.518%、10.853%的遗传变异。按照近缘种、野生种、地方种和栽培种分群，它们被明显划分成 2 个亚群 (图 6-A)，其中近缘种、野生种成为 1 个亚群，地方种、栽培种成为 1 个亚群。若按照群体结构分析划分的 4 个亚群分群 (图 6-B)，则与群体结构划分的亚群结果相吻合，被明显划分成与群体结构分析 Cluster1、2、3、4 亚群相对应的 K1、K2、K3、K4 共 4 个亚群。2 种分群方式主坐标分析结果相比较发现，地方种与栽培种亚群对应 K4 亚群，近缘种与野生种亚群则进一步被划分成 K1、K2、K3 3 个亚群。K1、K2、K3、K4 4 个亚群间  $N_m = 1.128 > 1$ ，说明亚群间存在低频率的基因交流情况。

### 3.3 核心种质构建分析

采用最大限度保留多态性位点的随机取样方法，从去除赤爬后 321 份罗汉果及近缘种种质中分别构建抽样比例 70%、60%、50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10% 的 11 个候选核心种质子集，表 9 结果显示，当抽样比例减少

至 15% 时， $N_a$  开始减少；当抽样比例小于 35% 后， $N_e$  和  $I$  均逐渐增加。抽样量过少会导致丢失过多遗传变异，抽样量过大又会增加遗传冗余度和重复度从而拉低核心种质遗传多样性，Brown<sup>[32]</sup> 认为多数植物核心种质的抽样比例为 5%~10%。10% 抽样比例时罗汉果核心种质子集  $N_a$  为 174 个，与原始种质  $N_a$  (181 个) 相符率达 96.13%， $N_e$  (5.726 7) 和  $I$  值 (1.944 9) 最高，符合 Brown<sup>[32]</sup> 提出的原始样本的 5%~10% 所构成的核心种质代表 70% 以上的遗传变异的标准。因此，最终确定抽样比例为 10%，共获得 32 份罗汉果核心种质 (表 10)。这些核心种质包括近缘种 1 份、野生种 28 份、地方种 3 份，分别占原始种质中相应遗传群体种质数量的 100%、16.37%、4.35%，它们来源于 16 个县市区，占原始种质来源地点 (17 个县市区) 的 94.12%，能很好地代表原始种质的遗传和地理多样性。栽培种系统聚类、群体结构和 PCoA 分析时均与地方种形成 1 个亚群，无栽培种入选核心种质，这可能是其均由地方种衍生而来所致。



A-按遗传类型 JYZ、YSZ、DFZ、ZPZ 分群 B-按遗传群体结构 K1、K2、K3、K4 分群

A-grouping JYZ、YSZ、DFZ、ZPZ by genetic types B-grouping K1、K2、K3、K4 by genetic population structure

图6 140份初级核心种质 PCoA

Fig. 6 Principal co-ordinates analysis of 140 accessions of primary core collections

表 9 不同抽样比例核心种质遗传多样性参数

Table 9 Genetic diversity parameters of core collections with different sampling percentages

抽样比例/%	<i>N</i>	<i>N<sub>a</sub></i>	<i>N<sub>e</sub></i>	<i>I</i>
70	225	181	3.984 6	1.611 0
60	193	181	3.994 4	1.625 1
50	160	181	3.831 8	1.607 8
45	144	181	4.088 7	1.663 7
40	128	181	3.885 2	1.634 9
35	112	181	4.267 9	1.707 5
30	96	181	4.447 0	1.747 4
25	80	181	4.706 9	1.799 3
20	64	181	5.131 3	1.865 2
15	48	178	5.428 5	1.891 9
10	32	174	5.726 7	1.944 9

#### 4 讨论

药材生产和育种过程中明确其基原植物的种属范围至关重要，以防止不当选材培育品种和种苗而影响药材药效，导致类似“金银花与山银花真假药之争”的著名事件。1941年，美国学者 Swingle 将罗汉果划归为葫芦科苦瓜属植物。1979年，英国植物学家 C. Jeffrey 又将罗汉果从苦瓜属转移到赤爬亚属。中国科学院植物研究所路安民则认为罗汉果类群植物的雌雄花梗均无苞片，雄蕊5枚、果皮平滑，明显不同于苦瓜属雄蕊3枚、果皮有瘤状凸起，不应该放在苦瓜属，另外其雄蕊药室弓曲或折曲，种子显著大，也明显不同于赤爬亚属成员，归属赤爬亚属也不恰当，提出应将罗汉果类群植物从赤爬亚属独立出来。在与中国学者们探讨后，1980年

表 10 32份核心种质信息

Table 10 Information of 32 accessions of core collections

种质编号	群体类型	采集地点	入选比例/%	种质编号	群体类型	采集地点	入选比例/%
19	JYZ	那坡县	100.00	100	YSZ	道县	
1	YSZ	永福县		101	YSZ	南雄市	
37	YSZ	信丰县		109	YSZ	贺州市	
39	YSZ	永福县		114	YSZ	临桂县	
70	YSZ	金秀县		115	YSZ	双牌县	
76	YSZ	金秀县		121	YSZ	九江市	
80	YSZ	乳源县		124	YSZ	贺州市	
82	YSZ	龙南县		125	YSZ	永福县	
83	YSZ	龙南县	16.37	129	YSZ	三江县	
84	YSZ	龙南县		132	YSZ	兴安县	
87	YSZ	信丰县		134	YSZ	信丰县	
88	YSZ	博白县		136	YSZ	龙南县	
90	YSZ	信丰县		138	YSZ	双牌县	
91	YSZ	信丰县		15	DFZ		4.35
95	YSZ	南雄市		17	DFZ		
98	YSZ	南雄市		50	DFZ		

C. Jeffrey 在其《东方葫芦科植物》一书中重新确立了 Merrill 提出的罗汉果属 *Siraitia* L.，并将赤爬亚属的种类转隶到 *Siraitia* 中，将罗汉果学名定为 *Siraitia grosvenorii* (Swingle) C. Jeffrey。谢文娟<sup>[33]</sup> 基于 ITS2 进化分析显示苦瓜属单独成支，赤爬属与罗汉果属在一个分支；LEAFY 内含子 2 进化分析则显示，罗汉果属单独成支，赤爬属与苦瓜属在 1 个分支。葫芦科转录组和基因组测序进化分析显示赤

爬属、罗汉果属、苦瓜属单独成支，进化先后顺序为赤爬属、罗汉果属、苦瓜属<sup>[34]</sup>。这些研究结果表明罗汉果与其近缘种属物种的系统进化地位仍存在一定的不确定性。本研究优选出的 15 对 SSR 荧光标记引物 PIC 值均大于 0.5，具有高度多态性，将罗汉果及其近缘物种种质划分成赤爬、翅子罗汉果和罗汉果 3 个亚群，进化关系为赤爬、翅子罗汉果和罗汉果，与前人葫芦科转录组和基因组测序系统

进化研究结果一致,支持罗汉果单独成属的观点,还发现罗汉果种质存在大量重复种质,说明这些 SSR 荧光标记引物不仅能在种属水平有效鉴别罗汉果及其近缘物种,还能在种下水平有效鉴别其种质亲缘关系。由于罗汉果野外开花结果少,其野生资源采集时物种识别具有一定困难,因此这些 SSR 荧光标记引物将可为罗汉果种质收集和育种过程中材料鉴定提供了有效方法。

罗汉果雌雄异株,花粉具粘性且花朵缺乏蜜露,风媒与虫媒传粉困难,种植需要人工授粉才能结果。此外,罗汉果野生植株开花结果数量有限,且种子失水活力丧失较快,还存在明显近交衰退现象。这些表明罗汉果野外通过有性繁殖后代能力可能有限。种质采集过程中发现野生罗汉果植株茎端伸入湿润枯枝落叶和岩石、土壤缝隙中膨大形成带不定根小薯块的现象普遍。本研究发现三江县、贺州市和道县等野生种居群,尤其是居群较小的双牌县和博白县野生种居群均存在大量几乎无遗传差异个体,这些个体应是通过茎无性克隆繁殖而来,表明通过茎无性克隆繁殖是野生罗汉果扩张种群的重要方式,改变了长期以来人们以为罗汉果野外主要依靠种子繁衍群体的认识。地方种群也存在一定数量几乎无遗传差异的个体,栽培种群体种质间几乎无遗传差异的现象则最为突出,雌性和雄性栽培种群体均存在大量几乎无遗传差异的个体,尤其是主栽雌性青皮果品种已变得非常单一,这些表明罗汉果种植过程中不同产区和不同育苗场间存在过度相互引种问题,是栽培种遗传基础变得较为狭窄的重要原因。

罗汉果不同群体进化关系依次为近缘种、野生种、地方种、栽培种,符合作物由野生种到地方种再到栽培种的一般驯化规律。野生种、地方种、栽培种群体  $N_a$ 、 $N_e$ 、 $I$ 、 $H_e$  等遗传多样性参数由大到小均分别为野生种、地方种、栽培种,其中  $N_a$  分别为 11.333、5.533、2.133,  $I$  分别为 1.798、1.092、0.603, 平均遗传距离分别为 0.802 1、0.576 8、0.422 0。这些结果均表明野生种保留了最丰富的遗传多样性,地方种的遗传多样性次之,栽培种遗传多样性已较低,与前人研究结果类似<sup>[24-26]</sup>。因此,要培育具有突破性的良种,罗汉果育种过程中要充分发掘野生种和地方种优异基因资源来拓宽栽培种的遗传基础以获取更高的杂种优势。再有,如上所述,野生罗汉果主要以茎无性克隆方式繁衍种群,那么其遗传

进化速度将会比较慢。种质采集过程中发现,因垦荒、伐木和修路活动影响,文献原记载的肇庆市、兴安县和博白县居群已遭毁灭,三江县和乳源县居群个体数量也已锐减,永福县和金秀县居群正濒临破坏。因此,及早从不同亚群中野生居群,尤其像遗传关系远、携带私有等位基因较多、个体稀少的乳源县居群,以及永福县和龙南县等遗传丰富且距离差异大的居群中,鉴定出存在遗传差异个体进行收集保存,对防止罗汉果种质遭破坏而遗传多样性流失具有重要作用,也可为探究罗汉果起源进化历史留存关键材料。

虽然 140 份罗汉果初级核心种质在遗传距离 0.8 处可分为 9 个亚群,但是群体结构和主坐标分析均将这些种质最终划分为四个亚群,其中近缘种与野生种可划分为 3 个亚群,地方种及栽培种归属一个亚群,表明罗汉果种质存在 4 个明显基因库,虽然与解兵斌<sup>[26]</sup>推测罗汉果在第 4 纪冰期存在广西东北部(广西兴安县、三江县、永福县、临桂区和金秀县)、萌渚岭(湖南道县、广西贺州市和广东肇庆市)、大庾岭与武功山(广东韶关市、江西龙南县、广东乳源、江西萍乡)和云开山脉(广西浦北县) 4 个避难所数量相吻合,但是除 Cluster1、2、3 亚群分布区域分别与大庾岭与武功山、广西东北部、萌渚岭 3 个避难所基本一致外,Cluster4 亚群种质则主要为源自永福县与临桂区两个栽培起源中心地方种、栽培种和临桂区、柳州市、双牌县野生种,其分布区域与云开山脉避难所广西合浦县不一致。二者不一致的原因可能是本研究分析的为核基因组而非细胞器基因组,使得 2 个避难所群体种质因基因交流合并为 1 个亚群,或是未采集到云开山脉避难所广西浦北县群体种质所致。Cluster4 亚群种质来自广西东北部避难所区域,但与同来自该避难所区域兴安县、三江县和永福县的 Cluster2 亚群种质划分为不同亚群,表明其是该避难所区域中以往尚未发现的 1 个新基因库,可能由罗汉果栽培起源中心人们在栽培过程中引种临桂区等野生种质并有性繁殖而形成。

重要性状基因发掘是作物种质资源分子评价的重要内容。GWAS 为近年作物重要性状基因挖掘、连锁标记开发和遗传结构解析等研究广泛应用的有效方法,其具有使用自然群体作为研究材料、分析精度达到单基因水平、同时分析多个性状等优势,有助于克服罗汉果杂合度高、生长周期长、遗传连

锁作图群体构建难度大等问题,也必将在罗汉果重要性状遗传结构解析和连锁标记开发中获得重要应用。遗传基础广、变异丰富、代表性强遗传群体材料可减少 GWAS 研究所需种质数量和提高其分析精度与效率。本研究广泛收集代表性区域近缘种、野生种、地方种和栽培种等资源 325 份,通过 SSR 荧光标记从中鉴别获得 140 份具有遗传差异的罗汉果初级核心种质,为罗汉果重要性状的 GWAS 和群体遗传进化等研究提供了重要基础材料。但是,这 140 份初级核心种质与 GWAS 所需的理想种质数目存在一定差距,并且群体结构和主坐标分析表明它们存在由 4 个血缘较单一亚群组成的遗传分层结构,亚群间基因交流频率低 ( $N_m=1.128$ ),加之罗汉果野生居群小而且个体数量相差很大,这可能导致亚群间等位基因频率分布不均衡, GWAS 分析时增加染色体间连锁不平衡性,产生大量的假阳性关联。为了控制复杂群体结构对罗汉果性状 GWAS 分析结果的影响,除了可以使用不同统计分析模型外,从构建的 32 份核心种质中选取代表性种质构建罗汉果巢式关联群体 (nested association mapping, NAM) 或者多亲本高级世代互交系群体 (multi-parent advanced generation inter-cross, MAGIC) 用于研究是一个理想选择。这既可为罗汉果性状 GWAS 分析提供充足个体数量,也有利于保留罗汉果进化过程中累积的重组事件,降低群体连锁不平衡性,提高分析精度。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 唐昫彤,侯小涛,杜正彩,等.罗汉果化学成分与药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析[J].中草药,2021,52(9):2843-2850.
- [2] 中国药典[S].一部.2020:221-222.
- [3] Zhang Y L, Zhou G S, Peng Y, et al. Anti-hyperglycemic and anti-hyperlipidemic effects of a special fraction of Luohanguo extract on obese T2DM rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 247: 112273.
- [4] Pan M H, Yang J R, Tsai M L, et al. Anti-inflammatory effect of *Momordica grosvenori* Swingle extract through suppressed LPS-induced upregulation of iNOS and COX-2 in murine macrophages [J]. *J Funct Foods*, 2009, 1(2): 145-152.
- [5] Song J L, Qian B, Pan C L, et al. Protective activity of mogrosin V against ovalbumin-induced experimental allergic asthma in Kunming mice [J]. *J Food Biochem*, 2019, 43(9): e12973.
- [6] Qi X Y, Chen W J, Zhang L Q, et al. Mogrosin extract from *Siraitia grosvenori* scavenges free radicals *in vitro* and lowers oxidative stress, serum glucose, and lipid levels in alloxan-induced diabetic mice [J]. *Nutr Res*, 2008, 28(4): 278-284.
- [7] Takasaki M, Konoshima T, Murata Y, et al. Anticarcinogenic activity of natural sweeteners, cucurbitane glycosides, from *Momordica grosvenori* [J]. *Cancer Lett*, 2003, 198(1): 37-42.
- [8] Tao L J, Yang J Y, Cao F Y, et al. Mogrosin III, a novel anti-fibrotic compound, reduces pulmonary fibrosis through toll-like receptor 4 pathways [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2017, 361(2): 268-279.
- [9] 陈维军,宋方方,刘烈刚,等.罗汉果皂甙提取物对1型糖尿病小鼠细胞免疫功能的影响[J].营养学报,2006,28(3):221-225.
- [10] Murata Y, Yoshikawa S, Suzuki Y A, et al. Sweetness characteristics of the triterpene glycosides in *Siraitia grosvenori* [J]. *J Food Sci Technol Res*, 2006, 53(10): 527-533.
- [11] Jia Z H, Yang X G. A minor, sweet cucurbitane glycoside from *Siraitia grosvenorii* [J]. *Nat Prod Commun*, 2009, 4(6): 769-772.
- [12] Pawar R S, Krynskiy A J, Rader J I. Sweeteners from plants: With emphasis on *Stevia rebaudiana* (bertoni) and *Siraitia grosvenorii* (swingle) [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2013, 405(13): 4397-4407.
- [13] Qin X, Xiaojian S, Ronggan L, et al. Subchronic 90-day oral (Gavage) toxicity study of a Luo Han Guo mogrosin extract in dogs [J]. *Food Chem Toxicol*, 2006, 44(12): 2106-2109.
- [14] Jin M L, Muguruma M, Moto M, et al. Thirteen-week repeated dose toxicity of *Siraitia grosvenori* extract in Wistar Hannover (GALAS) rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2007, 45(7): 1231-1237.
- [15] Marone P A, Borzelleca J F, Merkel D, et al. Twenty eight-day dietary toxicity study of Luo Han fruit concentrate in Hsd: SD rats [J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(3): 910-919.
- [16] 寇淑君,霍阿红,付国庆,等.利用荧光SSR分析中国糜子的遗传多样性和群体遗传结构[J].中国农业科学,2019,52(9):1475-1487.
- [17] 原红军,曾兴权,徐其君,等.青稞种质资源遗传多样性分析与核心种质群体的构建[J].麦类作物学报,2018,38(8):922-928.
- [18] 张晨,云岚,李珍,等.新麦草种质的SSR遗传多样性及群体结构分析[J].植物遗传资源学报,2019,20(1):48-59.
- [19] 孟珊,狄佳春,苏彩霞,等.江苏省扁豆地方种质资源遗传多样性评价[J].植物遗传资源学报,2021,22(5):1258-1272.
- [20] 艾叶,陈璐,谢泰祥,等.基于SSR荧光标记构建建兰品种核心种质[J].园艺学报,2019,46(10):1999-2008.

- [21] 高源, 王昆, 王大江, 等. 7 个来源地区山荆子的遗传多样性与群体结构分析 [J]. 中国农业科学, 2018, 51(19): 3766-3777.
- [22] 赵盼, 栗丹阳, 马锦林, 等. 油料树种千年桐的 SSR 标记开发、遗传多样性与群体结构分析 [J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(11): 50-61.
- [23] 吴涛, 陈少瑜, 肖良俊, 等. 基于 SSR 标记的云南省核桃种质资源遗传多样性及核心种质构建 [J]. 植物遗传资源学报, 2020, 21(3): 767-774.
- [24] 彭云滔. 野生罗汉果遗传多样性的 ISSR 和 RAPD 分析 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2005.
- [25] 周俊亚. 栽培罗汉果遗传多样性的 ISSR、RAPD 和 AFLP 分析 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2005.
- [26] 解兵斌. 罗汉果的谱系地理学研究 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2019.
- [27] 王要芳. 磁珠富集法开发罗汉果微卫星引物 [D]. 桂林: 广西师范大学, 2011.
- [28] 王娟, 韦素娟, 李丽云, 等. 罗汉果 EST-SSR 引物开发 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(12): 3449-3452.
- [29] Curnow R, Wright S. *Evolution and the genetics of populations, volume 4: Variability within and among natural populations* [M]. Chicago: The University of Chicago Press, 1978.
- [30] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study [J]. *Mol Ecol*, 2005, 14(8): 2611-2620.
- [31] 刘秀云, 李慧, 刘志国, 等. 基于 SSR 标记的 255 个枣品种亲缘关系和群体遗传结构分析 [J]. 中国农业科学, 2016, 49(14): 2772-2791.
- [32] Brown A H D. Core collections: A practical approach to genetic resources management [J]. *Genome*, 1989, 31(2): 818-824.
- [33] 谢文娟. 罗汉果及同科 15 属植物分子细胞遗传学研究 [D]. 南宁: 广西大学, 2018.
- [34] Guo J, Xu W B, Hu Y, *et al.* Phylotranscriptomics in cucurbitaceae reveal multiple whole-genome duplications and key morphological and molecular innovations [J]. *Molecular Plant*, 2020, 13(8): 1117-1133.

[责任编辑 时圣明]