

基于 AFLP 分子标记的我国不同生态栽培产区枸杞资源遗传多样性分析

张芳¹, 陆瑞华¹, 傅焕哲¹, 张文华², 李重², 任钢³, 陈占平³, 赵玉玲⁴, 郭盛¹, 钱大玮¹, 段金廛^{1*}

1. 南京中医药大学药学院, 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心/中药资源产业化与方剂创新药物国家地方联合工程研究中心, 江苏 南京 210023
2. 宁夏百瑞源枸杞股份有限公司, 宁夏 银川 750200
3. 青海省海西蒙古族藏族自治州农业科学研究所, 青海 德令哈 817000
4. 新疆维吾尔自治区博尔塔拉蒙古自治州精河县枸杞产业发展中心, 新疆 博尔塔拉 833399

摘要: 目的 利用荧光标记辅助的扩增片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP) 技术, 从基因组 DNA 水平上分析我国 6 个栽培生产区域 52 份枸杞 *Lycium chinense* 样本的遗传多样性。方法 对提取的枸杞 DNA 样本进行酶切、连接、预扩增和选扩增等步骤, 扩增产物经毛细管电泳系统分离和数据采集后, 利用 Popgene 软件计算遗传多样性参数, 利用 GenAlex 软件计算遗传距离并进行主坐标分析, 利用 MEGA-X 软件根据遗传距离进行聚类分析, 利用 Structure 软件进行群体遗传结构分析。结果 共筛选得到 10 对 AFLP 选择性扩增引物组合, 扩增得到 328 条扩增片段, 其中多态性片段 121 条, 且在不同产地枸杞居群间多态性位点分布不均匀。分析显示不同栽培产区枸杞的遗传多样性较低, 等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、观测杂合度 (Nei's gene diversity, H) 和香浓信息指数 (Shannon information index, I) 分别为 1.438 0、1.231 6、0.140 7 和 0.215 2, Nei's 遗传相似性范围为 0.835 4~0.890 2。结论 不同栽培生产区域的枸杞居群间存在较为频繁的基因交流, 遗传分化程度中等。居群内部遗传变异是枸杞遗传变异的主要来源, 居群间遗传变异不显著, 同时遗传距离与地理距离没有明显相关性。可为枸杞的遗传背景信息积累、引种栽培、种质资源保护、核心种质库构建以及可持续开发策略的制定和管理提供科学依据。

关键词: 枸杞属; 扩增片段长度多态性; 种质资源; 遗传多样性; 栽培生产区域

中图分类号: R286.2 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2023)18-6074-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.18.025

Genetic diversity analysis of *Lycium chinense* samples from different cultivation areas based on AFLP molecular markers

ZHANG Fang¹, LU Rui-hua¹, FU Huan-zhe¹, ZHANG Wen-hua², LI Zhong², REN Gang³, CHEN Zhan-ping³, ZHAO Yu-ling⁴, GUO Sheng¹, QIAN Da-wei¹, DUAN Jin-ao¹

1. School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization/ National and Local Collaborative Engineering Center of Chinese Medicinal Resources Industrialization and Formulae Innovative Medicine, Nanjing 210023, China
2. Bairuiyuan Gouqi Co., Ltd., Yinchuan 750200, China
3. Haixi Agricultural Science Research Institute of Mongolian and Tibetan Autonomous Prefecture, Delingha 817000, China
4. Jinghe Gouqi Industry Development Center of Bortala Mongolian Autonomous Prefecture, Bortala 833399, China

Abstract: Objective The genetic diversity of 52 *Lycium chinense* samples from six cultivation areas in China was analyzed at the genomic DNA level by using the fluorescence assisted amplified fragment length polymorphism (AFLP) technique. **Methods** After the successive steps of enzyme digestion, ligation, pre-amplification and selective amplification of the extracted DNA samples, the PCR products were

收稿日期: 2023-02-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81773837); 江苏省中药资源产业化过程协同创新中心重点项目 (ZDXM-2020-02, ZDXM-2022-36); 国家中医药管理局中医药创新团队及人才支持计划项目 (ZYXCXTD-D-202005); 中央本级重大增减支项目 (2060302); 宁夏自然科学基金项目 (2022AAC03215)

作者简介: 张芳, 博士, 副教授, 研究方向为中药生物技术。Tel: (025)85811516 E-mail: fangzhang@njucm.edu.cn

*通信作者: 段金廛, 教授, 博士生导师, 研究方向为中药资源化学与资源循环利用。Tel: (025)85811917 E-mail: dja@njucm.edu.cn

separated by capillary electrophoresis system. The collected data were then analyzed by Popgene software to calculate the genetic diversity parameters, GenAlex software was used to calculate genetic distances and perform principal coordinate analysis, cluster analysis based on genetic distance was performed using MEGA-X software and population genetic structure analysis was performed using Structure software. **Results** A total of ten pairs of selective amplification primers were screened, and 328 amplified fragments were amplified, including 121 polymorphic fragments, which were unevenly distributed among *Lycium* populations from different habitats. The genetic diversity of *L. chinense* in different habitats was relatively low. The allele number N_a , effective allele number N_e , observed heterozygosity H , and Shannon information index I were 1.438 0, 1.231 6, 0.140 7 and 0.215 2, respectively. Nei's genetic consistency ranged from 0.835 4 to 0.890 2. There were frequent gene exchanges among populations of *L. chinense* in different cultivation and production areas. **Conclusion** There were relatively frequent gene exchanges between *Lycium* populations in different cultivation and production areas, and the degree of genetic differentiation was moderate, and the genetic variation within populations was the main source of genetic variation of *L. chinense*. Furthermore, no significant correlation between genetic distance and geographical distance was observed. This study will provide scientific basis for the accumulation of genetic background information, introduction and cultivation, protection of germplasm resources, construction of core germplasm bank and formulation and management of sustainable development strategy of *L. chinense*.

Key words: *Lycium* L.; amplified fragment length polymorphism; germplasm resources; genetic diversity; cultivation areas

遗传多样性是指种内不同群体或同一群体不同个体之间通过长期进化积累的遗传变异的总和,是该物种在自然压力下适应外部复杂环境变化、维持生存和进化潜力的物质基础,也是评价物种生物多样性、生物资源状况的重要指标^[1]。在适应生存环境变化的过程中,一个物种(或群体)的遗传多样性越丰富,表明环境适应能力、生存能力和进化潜力越强,越容易开拓新的生长环境并扩展自然分布范围。相反,低水平的遗传多样性往往伴随遗传杂合度降低和近交衰退,并进一步制约物种或种群的环境变化适应能力和进化潜能,增加种群灭绝的风险^[2]。

DNA 分子标记技术已成为分析遗传多样性时必不可少的手段,主要包括基于 Southern 杂交的限制性内切酶片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)标记技术,基于 PCR 的随机扩增多态性(random amplified polymorphism, RAPD)标记技术、简单重复序列(simple sequence repeats, SSR)标记技术和简单重复序列间区(inter-simple sequence repeat, ISSR)标记技术、相关序列扩增多态性(sequence-related amplified polymorphism, SRAP)标记技术^[3-4],以及基于 PCR 与限制性酶切技术结合的分子标记,如扩增片段长度多态性(amplified fragment length polymorphism, AFLP)标记技术和酶切扩增多态性序列(cleaved amplified polymorphic sequences, CAPS)标记技术^[5]。这些标记技术各有优势,其中 AFLP 技术是基于限制性酶切和 PCR 扩增的全基因组 DNA 扩增片段长度多态性检测方法^[6]。AFLP 技

术扩增结果稳定,标记多态性条带比例高,获得信息量大,不受物种基因组来源、复杂程度和环境条件的影响,尤其适用于遗传背景模糊、材料来源广泛的物种遗传资源的标记分析,是进行种质资源遗传多样性和遗传结构研究的最为有效的分子标记技术之一,目前已在多种动植物资源的遗传图谱构建、种质资源鉴定和评价、遗传多样性分析、遗传变异规律分析及品种家系分析等领域得到广泛应用。近年来,AFLP 技术逐渐引入中药资源研究领域,并在薏苡^[7]、忍冬^[8]、乌头^[9]、厚朴^[10]、三叶木通^[11]等中药材的遗传多样性分析中发挥了重要作用。

枸杞 *Lycium chinense* Mill. 是茄科(Solanaceae)枸杞属 *Lycium* L. 多年生多分枝落叶灌木,是我国重要的药食两用植物资源,其果实枸杞子早在《神农本草经》已被列为上品。枸杞属植物约有 80 余种,我国有 7 个种和 2 个变种^[12],自然分布于我国西北干旱地区温带荒漠区域和温带草原区域。枸杞对恶劣环境适应能力强,具有较强的抗旱耐寒耐盐碱特性。近年来,我国枸杞的引种栽培产业十分活跃,核心产区由宁夏回族自治区逐步向外辐射至我国新疆、青海、甘肃、内蒙等省区,多数品种(系)在不同区域均有种植。在长期的自然演化、资源交流、地理隔离、遗传漂变和人工选育等多种因素共同作用下,枸杞的基因型高度杂合,遗传背景复杂,表型变异丰富,同物异名或同名异物现象普遍。

目前有关我国枸杞资源地理分布范围内遗传多样性水平和遗传结构变异领域的研究较为缺少。尹跃等^[13]建立和优化了枸杞的 SRAP 反应体系,唐燕等^[14]对宁夏中宁县 26 份枸杞属种质资源的 27 个表

型性状进行分析后发现, 供试种质的遗传多样性较为丰富, 李彦龙等^[15]采用 AFLP 技术对宁夏银川地区的 15 份枸杞进行分析, 发现不同品种的枸杞样本之间遗传多样性较为丰富, 任重等^[16]采用 SSR 分子标记, 发现红果枸杞栽培品种之间遗传差异较小, 鲍红春等^[17]利用 ISSR 技术对 10 个枸杞品种的遗传差异进行研究, 发现宁夏地区和内蒙古地区的枸杞品系存在较大差异, 但种群内部遗传相似性较高。余意等^[18]采用 SSR 技术分析我国 4 个省区 17 个栽培宁夏枸杞居群的 178 个个体样本后, 发现栽培已经引起枸杞遗传多样性明显下降。

本研究收集了我国 6 个主要生产栽培产区的 52 份枸杞样本, 借助荧光标记辅助的毛细管电泳检测技术, 建立基于枸杞全基因组遗传多样性特征的 AFLP 分析技术体系, 从基因组 DNA 分子水平上分析枸杞主要生态产区不同栽培品系的遗传多样性和遗传结构差异, 以充分了解和掌握其遗传多样性和

遗传特征信息及亲缘关系, 为枸杞的遗传背景信息积累、引种栽培、种质资源保护、种质创新、核心种质库构建以及可持续开发策略的制定和管理提供科学依据。

1 仪器与材料

1.1 仪器

ABI3730x1 毛细管电泳系统 (美国 Applied Biosystems 公司); PowerPac HC 高电流电泳仪及 Mini-Sub Cell DT 电泳系统 (美国 BIO-RAD 公司); C1000 Touch PCR 仪 (美国 BIO-RAD 公司); ChemiDoc XRS+ 化学发光凝胶成像系统 (美国 BIO-RAD 公司); Nano Drop 2000c 型微量核酸检测仪 (美国 Thermo Scientific 公司), MicroCL 21R 微量离心机 (美国 Thermo Scientific 公司)。

1.2 材料

供试样本 52 个 (表 1), 由本课题组于 2019 年 7 月至 2019 年 8 月采集自我国枸杞的主要栽培产

表 1 供试样品信息

Table 1 Sample information

序号	样品名称	采集地	序号	样品名称	采集地
1	宁农杞 2 号	宁夏银川	27	短日照宁杞 1 号	甘肃玉门
2	宁农杞 9 号	宁夏银川	28	未知种	甘肃玉门
3	宁杞 2 号	宁夏银川	29	宁杞 5 号	甘肃玉门
4	菜用枸杞	宁夏银川	30	玉门未知种	甘肃玉门
5	中科绿川 1 号	宁夏银川	31	宁杞 5 号	甘肃玉门
6	珍珠枸杞	宁夏银川	32	宁杞 1 号	甘肃玉门
7	宁杞 5 号	宁夏银川	33	宁杞 1 号	甘肃玉门
8	蒙杞 1 号	宁夏银川	34	蒙杞 1 号	甘肃靖远
9	中华枸杞	宁夏银川	35	靖远宁杞 7 号	甘肃靖远
10	宁杞 7 号	宁夏银川	36	宁杞 5 号	甘肃靖远
11	中科黄果 1 号	宁夏银川	37	宁杞 1 号	甘肃靖远
12	黄果枸杞	宁夏银川	38	宁杞 5 号	青海德令哈
13	黑枸杞	宁夏银川	39	宁杞 1 号 5 年	青海德令哈
14	宁杞 1 号	宁夏银川	40	宁杞 7 号	青海德令哈
15	宁杞 1 号	宁夏银川	41	宁杞 1 号	青海德令哈
16	蒙杞 1 号	新疆精河	42	科杞 608	内蒙古巴彦淖尔
17	宁杞 1 号	新疆精河	43	中科绿川 1 号	内蒙古巴彦淖尔
18	精河枸杞 4 号	新疆精河	44	宁杞 7 号	内蒙古巴彦淖尔
19	精河枸杞 5 号	新疆精河	45	宁杞 2 号	内蒙古巴彦淖尔
20	宁农杞 4 号	新疆精河	46	宁杞 9 号	内蒙古巴彦淖尔
21	宁杞 3 号	新疆精河	47	宁杞 10 号	内蒙古巴彦淖尔
22	宁杞 7 号	新疆精河	48	蒙杞 1 号	内蒙古巴彦淖尔
23	宁杞 5 号	新疆精河	49	当地品种	内蒙古巴彦淖尔
24	宁农杞 5 号	新疆精河	50	宁杞 5 号	内蒙古巴彦淖尔
25	宁农杞 1 号	新疆精河	51	宁杞 4 号	内蒙古巴彦淖尔
26	宁杞 1 号	新疆精河	52	宁杞 1 号	内蒙古巴彦淖尔

区宁夏银川平原 (15 株, 海拔 1126 m, 38°40' N, 106°03' E)、新疆维吾尔自治区博尔塔拉蒙古自治州精河县 (11 株, 海拔 320 m, 44°36' N, 82°54' E)、甘肃省酒泉市玉门市 (7 个, 海拔 1517 m, 40°18' N, 97°24' E)、甘肃省白银市靖远县 (4 株, 海拔 1406 m, 36°36' N, 104°44' E)、青海省海西州德令哈市 (4 株, 海拔 2996 m, 37°23' N, 97°22' E)、内蒙古自治区巴彦淖尔市 (11 株, 海拔 1034 m, 40°58' N, 107°00' E)。采集时选取生长旺盛的成年单株盛果期植株, 采集从上至下第 5 对健康、无病虫的展开叶片, 用蒸馏水冲洗表面并用滤纸干燥后迅速放入带有标签的自封袋中, 干冰保存运输。所有样品由南京中医药大学段金廛教授鉴定为茄科枸杞属植物枸杞 *L. chinense* Mill. 的叶。

1.3 试剂

限制性内切酶 *EcoRI* 和 *MseI* 购自 New England BioLabs 公司; DNA 连接酶 DNA Ligation Kit < Mighty Mix > 和 DNA 聚合酶 *Taq*TM Hot Start Version, DNA Marker DL5 000 和 DL15 000 均购自 TaKaRa 公司; 扩增引物由南京金斯瑞生物科技有限公司合成; 羧基荧光素 (5'-FAM) 修饰引物由北京睿博兴科生物科技有限公司合成; 其余试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 样品 DNA 提取

取各地样品约 100 mg, 采用改良的 CTAB 法进行基因组总 DNA 的提取, 具体方法参考本课题组前期报道^[19], 取 1 μL DNA 用 Nano Drop 2000c 微量核酸蛋白检测仪检测 DNA 的质量和浓度, A₂₆₀/A₂₈₀ 比值应在 1.7~1.9; 另取琼脂糖电泳另取 5 μL DNA 样品进行 1% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪下观察, 检测 DNA 的完整性和纯度。

2.2 AFLP 体系建立与分析

2.2.1 酶切和连接体系

(1) 酶切: DNA 样品分别用 *MseI* 与 *EcoRI* 进行酶切: 酶切反应体系 25 μL, 包括 DNA 300 ng, *EcoRI* 和 *MseI* 各 15 IU, 酶切缓冲液 CutSmart 2.5 μL, 补 ddH₂O

至 25 μL, 37 °C 水浴酶切 10 h, 65 °C 灭活 20 min。

(2) 连接反应: 根据接头引物表 (表 2), 将 *EcoRI* 单链接头和 *MseI* 单链接头分别稀释后变性并退火形成双链接头。连接反应体系 25 μL, 包括 5 μL 酶切产物, 7.5 μmol/L 双链接头, 1U DNA 连接酶, 16 °C 连接过夜。

(3) 预扩增反应: 预扩增反应体系 25 μL, 包括 2 μL 稀释后连接产物, 1 U *Taq* HS DNA 聚合酶, 1 μL dNTP (2.5 mmol/L), 5 μmol/L E00 和 M00 预扩增引物 (表 2)。PCR 反应条件: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 15 min。

(4) 选择性扩增反应: 选择性扩增反应体系 25 μL, 包括 1.5 μL 稀释后预扩增产物, 1 U DNA 聚合酶, 2 μL dNTP (2.5 mmol/L), 5 μmol/L *EcoRI* 选择性扩增引物, 1.5 μmol/L *MseI* 选择性扩增引物。PCR 反应条件分为 3 个阶段: 第 1 阶段为 13 个循环, 94 °C 预变性 5 min, 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 (每个循环退火温度递减 1 °C), 72 °C 延伸 1 min; 第 2 阶段为 23 个普通 PCR 循环, 94 °C 变性 30 s, 53 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 1 min; 最后阶段 72 °C 延伸 10 min。选择性扩增完成后, 根据琼脂糖电泳结果筛选特异性条带清晰且数量适宜的引物对。

2.2.2 毛细管电泳检测 根据选择性扩增引物筛选结果, 运用荧光标记技术在筛选出的引物中对 *EcoRI* 引物序列末端进行 5'-FAM 荧光标记, 并根据已建立的酶切、连接及 PCR 扩增反应体系完成所有样本的选择性扩增, PCR 产物用 ABI 3730x1 毛细管电泳系统进行分离, 采用激光诱导荧光采集数据。电泳结果在 Gene marker 2.2.0 软件中进行可视化处理, 获得多态性 DNA 片段电泳图谱及扫描峰图。

2.3 遗传多样性数据分析

2.3.1 电泳结果矩阵转换 使用 Gene marker 2.2.0 软件电泳峰值图进行扫描和判读, 选取大小在 50~500 bp 的片段进行统计, 同一迁移位置有表征片段

表 2 接头和引物序列信息

Table 2 Sequence information of adaptors and primers

接头与引物	<i>EcoRI</i> (5'-3')	<i>MseI</i> (5'-3')
接头 I	CTCGTAGACTGCGTACC	GACGATGAGTCCTGAG
接头 II	AATTGGTACGCAGTCTAC	TACTCAGGACTCAT
预扩引物	GACTGCGTACCAATTC (E00)	GATGAGTCCTGAGTAAC (M00)

位点记为“1”，无表征片段位点记为“0”，进行结果“0/1”赋值并构建多态性位点“0/1”矩阵。

2.3.2 遗传多样性数据计算 利用Popgene 32软件计算多态性位点数 (number of polymorphic loic, A_p)、多态性位点百分比 (percentage of polymorphic loic, P)、观测等位基因数 (observed number of alleles, N_a)、有效等位基因数 (effective number of alleles, N_e)、Nei's 基因多样性指数 (Nei's gene diversity, H)、香农多样性信息指数 (Shannon information index, I)、总基因多态性 (H_t)、群体内基因多态性 (H_s)、遗传分化指数 (G_{st})、基因流 (estimate of gene flow from G_{st} , N_m)，以及各居群间遗传距离 (genetic distance) 和遗传相似性，分析居群内和居群间的遗传变异分布。利用 Arlequin V3.5.2.2 软件进行分子方差分析 (analysis of molecular variance, AMOVA) 计算遗传变异在各产地居群间及居群内所占百分比。

2.3.3 主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA)、遗传距离与地理距离相关性分析 利用 GenAlex 6.502 软件计算个体间遗传距离并进行 PCoA，根据降维处理的信息评估遗传多样性的分化。采用 MEGA-X 软件根据遗传距离进行个体间的非加权组成配对法 (unweighted pair group method analysis, UPGMA) 聚类分析并构建聚类图。根据 GenAlex 6.502 软件根据各栽培产区的经纬度计算各产区之间的地理距离，并进行所有枸杞样本地理距离与遗传距离的相关性分析。

2.3.4 群体遗传结构分析 利用 Structure V2.3.4 进行基于贝叶斯算法的样本来源判断，以反映群体的遗传结构。设定群组数 (K) 为 2~10，每个 K 重复 10 次模拟运算，MCMC 重抽样设为 10 000，分析结果导入在线工具 Structure Harvester (<http://taylor0.biology.ucla.edu/structureHarvester/>) 计算 ΔK 预测最优居群数，然后利用 Distruct 1.1 软件生成枸杞遗传结构条形堆积图。

3 结果与分析

3.1 枸杞 AFLP 体系建立

用 *EcoR*+*MseI* 组合后对枸杞基因组 DNA 进行酶切，图 1-a 和图 1-b 分别是酶切后和预扩增后的代表性电泳图谱，可见经双酶切后原基因组 DNA 主条带消失，在原主带下方出现均匀弥散带，经酶切产物进行预扩增后，PCR 产物在 500 bp 以下区域形成连续的均匀弥散带，在高相对分子质量区无扩增产物，表明 DNA 消化彻底，预扩增结果合理，符合 AFLP 选择性扩增的要求。

图 1-c 为代表性选择性扩增图谱，共设计了 10 个 *EcoRI* 选扩引物和 9 个 *MseI* 选扩引物，组合后得到 90 对选扩引物组合，根据选扩图谱，从中筛选出 10 对选扩谱带清晰、数量适宜、多样性位点丰富的 10 对选扩引物对，10 对选扩引物及其序列见表 3。

3.2 选扩条带的多态性分析及遗传多样性分析

图 2 为代表性 DNA 扩增片段电泳图谱及扫描峰图，对特征性条带进行“0/1”赋值并转换为数据矩阵用于遗传多样性分析。

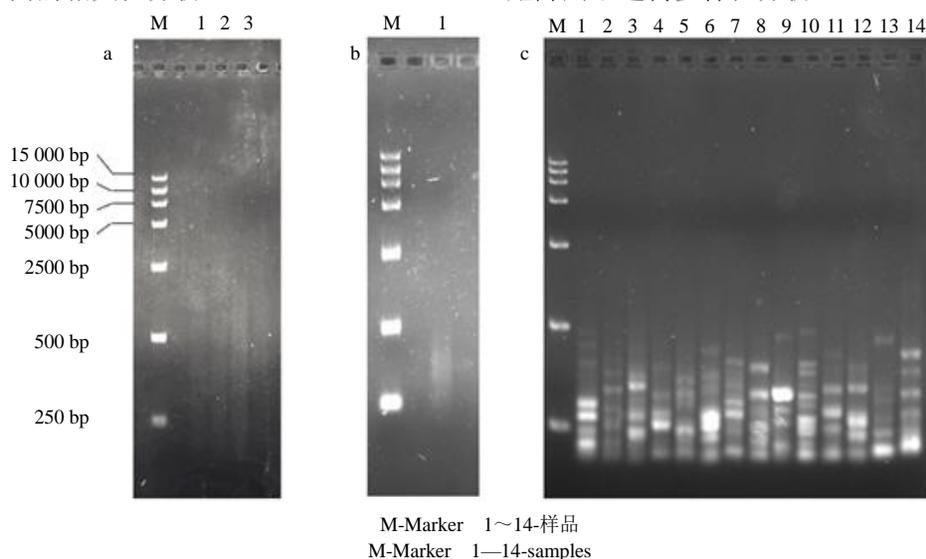


图 1 枸杞基因组 DNA 酶切 (a)、预扩增 (b) 及选择性扩增 (c) 后琼脂糖电泳图谱

Fig. 1 Agarose electrophoresis results of DNA enzyme digestion (a), pre-amplification (b) and selective amplification (c) of genomic DNA of *L. chinense*

表3 选择性扩增引物组合

Table 3 Selective amplification primers

编号	EcoRI (5'-3')	MseI (5'-3')
p1	GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACAC
p2	GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAACAA
p3	GACTGCGTACCAATTCACC	GATGAGTCCTGAGTAAC TA
p4	GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAACCA
p5	GACTGCGTACCAATTCAGG	GATGAGTCCTGAGTAAC TT
p6	GACTGCGTACCAATTCAGG	GATGAGTCCTGAGTAACCA
p7	GACTGCGTACCAATTCACG	GATGAGTCCTGAGTAAC TT
p8	GACTGCGTACCAATTCAGC	GATGAGTCCTGAGTAACCA
p9	GACTGCGTACCAATTCAGA	GATGAGTCCTGAGTAAC TA
p10	GACTGCGTACCAATTC AAC	GATGAGTCCTGAGTAACCA

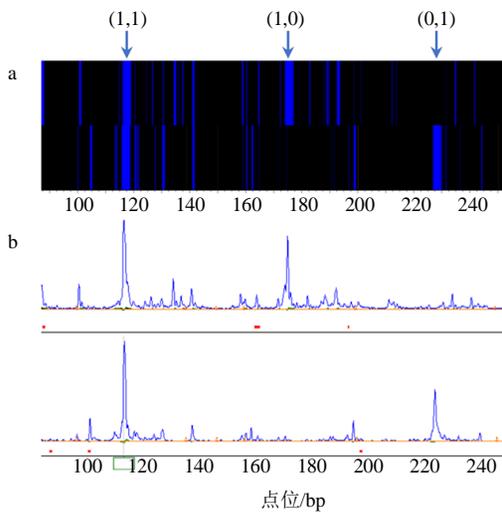


图2 枸杞DNA的AFLP分析选择性扩增代表性电泳图谱(a)及扫描峰图(b)

Fig. 2 Representative electrophoretic map (a) and scanning peaks (b) of *L. chinense* genome DNA after selective amplification

筛选后的10对选扩引物组合对6个不同产区52个枸杞DNA参试样本进行扩增,结果见表4。结果表明,在50~500 bp共扩增出328条选择性扩增片段,其中多态性片段121条,在不同产地枸杞居群多态性位点分布不均匀,各居群枸杞多态性位点百分比为25.30%~71.65%,平均为60.32%,说明本研究筛选出的选扩引物和建立的AFLP标记方法在参试枸杞样本中检测到较为丰富的多态性,适于分析其遗传多样性和遗传结构分析。

不同居群枸杞的 N_a 变化范围为1.253 0~1.716 5,平均为1.438 0, N_e 变化范围为1.276 2~1.481 8,平均为1.231 6。各居群内部 N_a 略高于 N_e ,表明各居群中等位基因的分布较为均匀,遗传差异较小,但存在有效种群规模变小和有效等位基因丢失的情况。同时,不同居群间的 N_a 和 N_e 的变化范围较小,说明我国不同生态产区的枸杞居群间存在着一定的遗传差异性,但差异程度较低。 H 变化范围为

表4 不同栽培生产区域枸杞居群间的遗传多样性指数

Table 4 Genetic diversity of different populations of *L. chinense*

产地	AP	P/%	N_a	N_e	H	I
宁夏银川 ($n=15$)	235	71.65	1.716 5±0.451 4	1.248 8±0.276 6	0.166 6±0.150 8	0.273 8±0.217 6
新疆精河 ($n=11$)	145	44.21	1.442 1±0.497 4	1.224 7±0.317 0	0.138 3±0.177 4	0.213 1±0.260 1
甘肃玉门 ($n=7$)	126	38.41	1.384 1±0.487 1	1.220 8±0.330 0	0.132 7±0.181 6	0.200 9±0.266 1
甘肃靖远 ($n=4$)	83	25.30	1.253 0±0.435 4	1.187 2±0.336 1	0.105 9±0.184 8	0.153 9±0.266 6
青海德令哈 ($n=4$)	109	33.23	1.332 3±0.471 8	1.231 1±0.342 5	0.134 5±0.193 4	0.197 2±0.281 9
内蒙古巴彦淖尔 ($n=11$)	164	50.00	1.500 0±0.500 8	1.277 0±0.348 1	0.166 1±0.189 5	0.252 4±0.274 3
群体间	121	36.89	1.368 9±0.483 2	1.240 1±0.350 2	0.140 1±0.192 4	0.207 8±0.279 5

0.105 9~0.166 6,平均为0.140 7。 I 范围为0.153 9~0.273 8,平均为0.215 2,呈现出一定的遗传异质性但是水平较低、遗传同质性较高的多样性特点,说

明我国枸杞种质的遗传基础较为狭窄,遗传多样性不显著。其中宁夏银川居群内部多样性相对较高,群内遗传分化处于相对较高水平,与宁夏地区作为

我国主要的枸杞引种起源中心的实际情况相一致。

3.3 群体变异的 AMOVA 分析

由表 5 所示的枸杞居群 AMOVA 分析结果表明, 不同居群的枸杞居群间存在一定程度的遗传分化。在总的遗传变异中, 不同栽培生产区域的各居群间的变异仅有 6.09%, 居群内的变异率为 93.91%, 居群内部的遗传变异率远大于不同产地间居群间的变异率, 说明居群内部变异是枸杞居群变异的主要来源, 这与前述遗传多样性的分析结果相一致。

表 5 不同栽培生产区域枸杞居群的分子方差分析 (AMOVA)

Table 5 Molecular variance analysis (AMOVA) among different populations of *L. chinense*

变异来源	自由度	平方和	方差分量	变异百分率/%
居群间	5	47.170	0.294 72	6.09
居群内	98	445.523	4.546 15	93.91

3.4 遗传分化分析

基因多样性是衡量遗传多样性的重要指标。从遗传分化数据来看, 6 个不同栽培生产区域居群枸杞的 H_t 为 0.123 1, 居群内部 H_s 为 0.106 2, 占 86.27%。居群间 G_{st} 为 0.137 4, 呈现中等程度的遗传分化。 N_m 为 3.140 3, 说明不同栽培生态产区各居群间基因交流和渗透较为充分, 在一定程度上降低了居群间遗传分化现象的发生。总遗传多样性仅有 13.74% 来源于居群间遗传变异, 进一步验证群内遗传分化是枸杞遗传多样性的主要因素。

如表 6 所示, 枸杞 6 个居群的 Nei's 遗传相似性在范围为 0.835 4~0.890 2, 遗传距离范围为 0.116 3~0.183 5, 各居群间遗传相似性较高。如宁夏银川与新疆精河实际地理距离较远, 间隔 2000 多 km, 但两地枸杞群体间仍具有高度的遗传相似性 (0.887 2) 和较小的遗传距离 (0.119 7),

表 6 成对的不同栽培生产区域枸杞居群间的遗传相似性和遗传距离

Table 6 Pairwise genetic identity values and genetic distance among different populations of *L. chinense*

产地	宁夏银川	新疆精河	甘肃玉门	甘肃靖远	青海德令哈	内蒙古巴彦淖尔
宁夏银川	****	0.887 2	0.832 3	0.853 7	0.850 6	0.872 0
新疆精河	0.119 7	****	0.841 5	0.868 9	0.835 4	0.887 2
甘肃玉门	0.183 5	0.172 6	****	0.881 1	0.872 0	0.862 8
甘肃靖远	0.158 2	0.140 5	0.126 6	****	0.868 9	0.890 2
青海德令哈	0.161 8	0.179 9	0.137 0	0.140 5	****	0.844 5
内蒙古巴彦淖尔	0.137 0	0.119 7	0.147 6	0.116 3	0.169 0	****

Nei's 遗传相似性 (上三角) 和遗传距离 (下三角)

Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal)

说明这 2 个居群间亲缘关系接近, 群间变异较小。

3.5 PCoA 和聚类分析

以每一个样本名为观测指标, 进一步对 6 个不同栽培生产区域的 52 份枸杞样本进行 PCoA, 并构建可视化二维平面图, 分析所有样本的整体分布趋势和自然聚集预览, 同时采用 UPGMA 法根据遗传距离构建遗传关系聚类图。

由图 3-a 所示 PCoA 图可见, 除宁夏产区枸杞样本在第一主成分上主要分布在第一和第四象限外, 其他所有样本分区不明显, 6 个居群的样本间存在大量重叠, 没有形成明显的分离群体。类似地, 根据遗传距离构建的 UPGMA 聚类图 (图 3-b) 中, 各栽培生产区域的 52 份枸杞参试样本没有明显的区域趋势和特征, 地理距离较近的居群没有优先聚在一起, 而是分布在整个聚类图中。还可发现, 不同产地的同一品种, 如宁杞 1 号、宁杞 5 号、宁杞 7 号等, 也没有聚为一簇, 而是分散在整个聚类结果中。同时, 同一聚类分支中的材料品种和地域分布规律性不明显, 有来自于同一地区的, 也有来自于不同区域的, 有相同品种, 也有不同品种, 由此形成了相对复杂的遗传关系。这些结果进一步验证了前述遗传多样性和遗传分化的结果, 在一定程度上反映出各产地间枸杞居群存在频繁的基因交流, 不同栽培产区居群间的地理隔离和遗传分化不明显, 导致各地枸杞样本间均质化程度较为严重, 存在明显的种质混杂现象。

3.6 群体遗传结构分析

根据在线软件 Structure Harvester 的计算结果, 当 $K=6$ 时, ΔK 值最低 ($\Delta K=0$), 此时居群划分结果符合本研究的枸杞居群实际分布情况。 ΔK 值达到最大时, 对应的模拟最优群体数 $K=7$, 表明本研究中

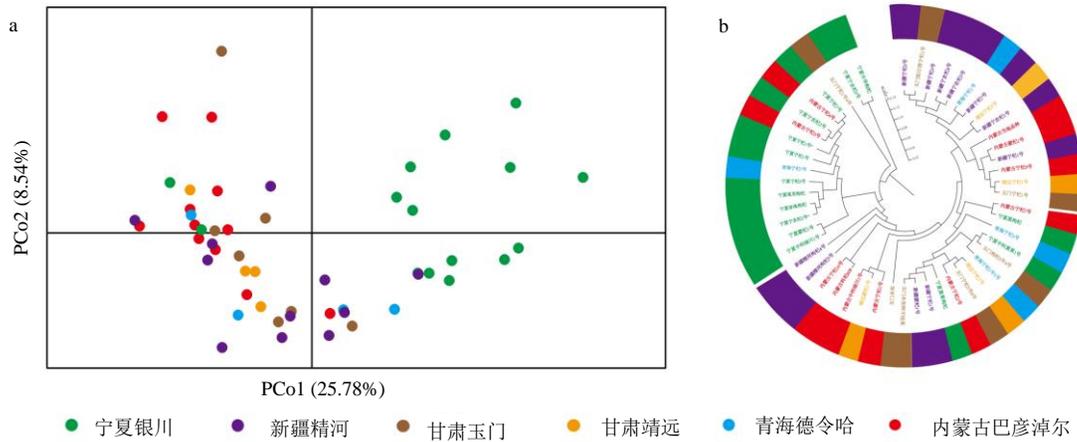


图3 不同栽培生产区域枸杞样本间 PCoA 模型得分散点图 (a) 和聚类图 (b)

Fig. 3 Score scatter plot of PCoA model (a) and cluster analysis (b) among *L. chinense* samples from different cultivation and production areas

来自不同栽培生产区域的 52 个枸杞个体 DNA 样本按照基因型可以分为 7 种类型，因此在 $K=7$ 的模式下分析所有枸杞样本的群体遗传结构。从图 4-a 可以看出，所有参试枸杞样本没有按照地理居群形成明显的分区，不同基因型在各栽培产区居群中均有分布，资源杂合度较高。各产区均有一定数

量的单一基因型样本，其中青海德令哈居群单一基因型的比例较高。当按照基因型进行分类时（图 4-b），相似的遗传结构类别不具有明显的地理居群特征，各产区样本在不同遗传结构类别中均有分布，同时相同的品种也没有集中排列在遗传结构相似的类别中。

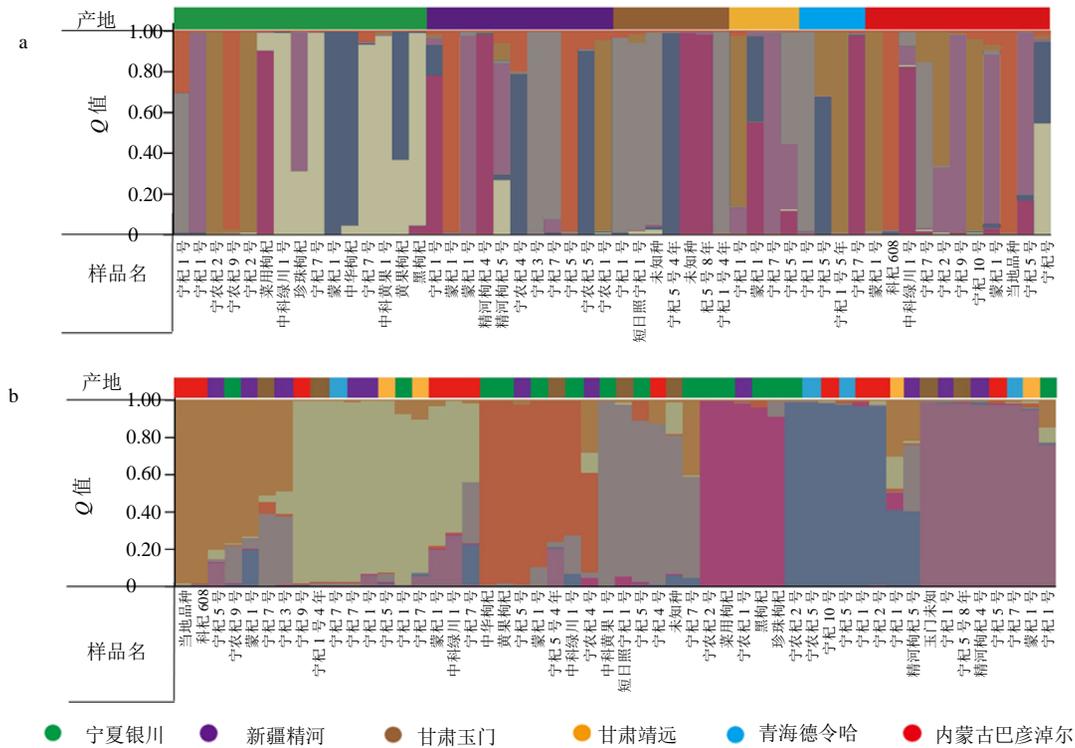


图4 按照产区排列 (a) 和按照遗传结构相似性排列 (b) 对不同栽培生产区域枸杞样本遗传结构分析

Fig. 4 Genetic structure analysis based on habitats (a) and structure similarity (b) of DNA samples from different populations of *L. chinense* samples

3.7 遗传距离与地理距离相关性分析

为了解居群遗传距离和实际地理距离间是否存在相关性,进行群体配对遗传分化和地理距离的 Mantel 分析(图 5)。结果显示相关系数为 $R=-0.131$ ($P=0.270$),表明我国各产区枸杞居群间遗传距离与地理距离没有显著的相关性,地理距离在枸杞遗传分化中的作用不明显,说明居群间基因交流充分,尚未形成明显的离群群体。

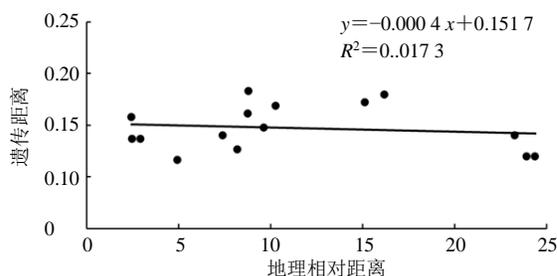


图 5 不同栽培生产区域枸杞居群间遗传距离与地理距离相关性

Fig. 5 Correlation between genetic distance and geographic distance of *Lycium* populations in different cultivation and production areas

4 讨论

枸杞在我国有着悠久的历史。早在两千多年前,《小雅·北山》中就有“陟彼北山,言采其杞”的记载。“神草如蓬世不知,壁间墙角自离离。”野生枸杞自秦汉起开始在民间移植栽种,唐代《千金翼方》中已系统记载了宁夏枸杞的栽培方法^[19-20]。宁夏回族自治区是宁夏枸杞的道地产区,所产枸杞子品质上乘,作用广泛而温和,符合“治未病”的健康新模式,不但作为常用大宗药材在临床上发挥重要作用,在民间也有具有极高的认同感和接受度。近年来,随着枸杞子消费市场的持续扩大,我国枸杞栽培地域和面积扩展迅速,在我国宁夏、内蒙、甘肃、青海及新疆等已建成大规模枸杞规范化种植基地,为枸杞的产业化应用提供了良好的生产环境,缓解了枸杞子供应的市场压力,也成为各地发展高效农业和精准扶贫的重要抓手。然而,为满足终端市场对于枸杞子高产、形优等经济性性状需求而进行的人工定向选育,使栽培枸杞的遗传多样性逐步下降,如我国各产区枸杞主流栽培品种均以宁杞 5 号和宁杞 7 号为主。同时,枸杞是风媒和虫媒同株异序或异株授粉植物,其种子主要依靠鸟类和啮齿类动物传播,使处于较远地理距离的不同居群间保持

合理的基因流动,提高居群间遗传多样性,从而促使群内个体发展出更强的适应能力,同时也为创新育种提供更加充裕的资源。然而,发达便利的现代化交通运输,极大地弱化了地理距离带来的阻隔效应,促进了各栽培生产区域间枸杞种质的频繁交流,人为加大了基因流并引起居群内和居群间的种质混杂和均质化。此外,枸杞植株寿命长、自然更新缓慢,加之现代化枸杞种植产业精耕细作,减轻了枸杞野外自然生长环境中的多种逆境胁迫效应,在一定程度上降低了枸杞的遗传多样性。

较低的遗传多样性一方面利于保持药材基原和品质,但另一方面也会由于种质退化而导致耐逆性和稳定性逐渐减弱,不利于物种的延续和进化。因此,为积累丰富的枸杞遗传多样性种质资源,发挥其多方面的潜在优势,在开展枸杞人工种植扩大资源产量、保证供给的同时,加强种质资源保护,根据枸杞生长发育规律和对生长环境条件的要求,模拟原始生态环境进行拟态种植,保障种植枸杞与原产地枸杞药效相当,是推动我国枸杞产业可持续和高质量发展的必经之路。

本研究采用荧光标记辅助 AFLP 技术,筛选出 10 对选扩引物,对来自我国 6 个枸杞栽培生产区域的 52 份枸杞材料进行选择扩增多态性扩增得到 328 条扩增多态条带,并根据扩增多态性结果判断各 DNA 样本之间的遗传多样性。结果显示,我国不同生产栽培区域的枸杞居群间存在频繁的基因流,各样本遗传多样性较低,存在较高的遗传均质化现象。本研究结果与余意等^[18]通过微卫星序列进行的我国栽培枸杞遗传多样性结果一致。相反的,唐燕等^[14]、李彦龙等^[15]分别通过表型分析和 AFLP 进行的研究则表明我国枸杞具有较为丰富的遗传多样性,得到与本研究相反的结论,这种差异可能是由于使用的分子标记及样本采集差异造成的。

本研究供试样本同期进行了基于甲基化敏感扩增多态性技术(methylation-sensitive amplified polymorphism, MSAP)的基因组 DNA 甲基化水平和模式多样性的差异分析,发现不同栽培生产区域所有样本中非甲基化敏感性位点展示出较低的遗传多样性,这与本研究结果相一致。与此形成鲜明对比的是,甲基化敏感性位点表现出较高的表观遗传多样性和产地内部方差,说明在遗传背景相对稳定的条件下,枸杞基因组发生了较为丰富的表观遗传变异。主成分分析和聚类分析发现各产地枸杞的表

观遗传特性各不相同,存在明显的地域相关性,并受到温度、降水量和土壤酸碱度等生态因子的调控^[21]。因此推测,遗传背景一致的枸杞经引种栽培至其他生态产区后,通过改变自身DNA甲基化模式及水平,并调控下游相关蛋白质及代谢产物的表达,以提高自身对于不同环境的适应能力,可能是枸杞在不同生态环境下适应能力的内在驱动力。

作为一种较为成熟的群体遗传学分子检测手段,AFLP技术要求足够数量的分析样本,以保证结果的科学性和可靠性。本研究中,受采样规模限制,仅分析了我国6个枸杞主要栽培生产区域的52份枸杞DNA样本,且均采集自人工种植基地,缺少野生枸杞样本。因此,后续还需要对我国枸杞资源分布情况进行深度调查,扩大样本收集范围,并结合形态性状学、内源性代谢成分分析、表观遗传学及其他类型分子标记,以获得更加全面、准确的我国枸杞种质资源遗传多样性研究全景图。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Ellegren H, Galtier N. Determinants of genetic diversity [J]. *Nat Rev Genet*, 2016, 17(7): 422-433.
- [2] Volk G M, Byrne P F, Coyne C J, et al. Integrating genomic and phenomic approaches to support plant genetic resources conservation and use [J]. *Plants (Basel)*, 2021, 10(11): 2260.
- [3] Tello J, Forneck A. Use of DNA markers for grape *Phylloxera* population and evolutionary genetics: From RAPDs to SSRs and beyond [J]. *Insects*, 2019, 10(10): 317.
- [4] Amiteye S. Basic concepts and methodologies of DNA marker systems in plant molecular breeding [J]. *Heliyon*, 2021, 7(10): e08093.
- [5] Azizi M M F, Lau H Y, Abu-Bakar N. Integration of advanced technologies for plant variety and cultivar identification [J]. *J Biosci*, 2021, 46: 91.
- [6] Sheeja T, Kumar V, Giridhari A, et al. Amplified fragment length polymorphism: applications and recent developments [A] // *Methods in Molecular Biology* [M/OL]. 2021: 187-218. https://link.springer.com/protocol/10.1007/978-1-0716-0997-2_12.
- [7] 杨成龙, 周明强, 班秀文, 等. 薏苡种质资源的 AFLP 遗传多样性分析 [J]. *分子植物育种*, 2020, 18(15): 5134-5142.
- [8] 葛丽丽, 李伟, 薛俊刚, 等. 长白山不同海拔蓝靛果忍冬 AFLP 遗传多样性分析 [J]. *北方园艺*, 2021(18): 48-53.
- [9] 杜春华, 普春霞, 刘小莉, 等. 短柄乌头遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *中草药*, 2018, 49(2): 439-443.
- [10] 蒋燕锋, 潘心禾, 朱虹, 等. 基于 AFLP 标记的不同群体厚朴遗传多样性分析 [J]. *安徽农业科学*, 2016, 44(27): 131-134.
- [11] 张铮, 蹇君艳, 王喆. 陕西秦岭地区三叶木通遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *中草药*, 2016, 47(21): 3890-3895.
- [12] 董静洲, 杨俊军, 王瑛. 我国枸杞属物种资源及国内外研究进展 [J]. *中国中药杂志*, 2008, 33(18): 2020-2027.
- [13] 尹跃, 曹有龙, 陈晓静, 等. 枸杞 SRAP 反应体系建立和优化 [J]. *福建农林大学学报: 自然科学版*, 2013, 42(3): 297-301.
- [14] 唐燕, 火艳, 宋敏, 等. 基于表型的枸杞属种质遗传多样性分析 [J]. *分子植物育种*, 2021, 19(22): 7618-7628.
- [15] 李彦龙, 樊云芳, 戴国礼, 等. 枸杞种质遗传多样性的 AFLP 分析 [J]. *中草药*, 2011, 42(4): 770-773.
- [16] 任重, 汪贵斌, 杨晓明, 等. 基于 SSR 分子标记的枸杞遗传多样性研究 [J]. *经济林研究*, 2020, 38(3): 95-103.
- [17] 鲍红春, 李小雷, 王建平, 等. 枸杞遗传多样性的 ISSR 分析 [J]. *华北农学报*, 2014, 29(1): 89-92.
- [18] 余意, 王凌, 孙嘉惠, 等. 基于微卫星群体遗传学的栽培枸杞遗传多样性和遗传结构评价 [J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(4): 838-845.
- [19] Zhao W G, Chung J W, Cho Y I, et al. Molecular genetic diversity and population structure in *Lycium* accessions using SSR markers [J]. *Comptes Rendus Biol*, 2010, 333(11/12): 793-800.
- [20] 陈栋杰, 郭盛, 伊艳玲, 等. 枸杞属植物酰胺类成分及其生物活性研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 317-333.
- [21] 张芳, 卢有媛, 尚尔鑫, 等. 基于 MSAP 技术的不同栽培生产区域宁夏枸杞 DNA 甲基化多态性分析 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(2): 392-402.

[责任编辑 时圣明]