

# 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性的AFLP分析

王锦楠<sup>1\*</sup> 陈进福<sup>2\*</sup> 陈武生<sup>2</sup> 周新洋<sup>3</sup> 许东<sup>1</sup> 李际红<sup>1\*\*</sup> 亓晓<sup>1</sup>

<sup>1</sup>山东农业大学林学院农业生态与环境重点实验室, 山东泰安 271018; <sup>2</sup>青海省林业科学研究所, 西宁 810016; <sup>3</sup>山东大学药学院, 济南 250012

**摘要** 采用扩增片段长度多态性(AFLP)分子标记技术对青海省柴达木地区5个野生黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)种群的120份样品的遗传多样性进行分析。结果表明: 柴达木地区野生黑果枸杞具有很高的遗传多样性, 9对选扩引物共得到1 691条清晰条带, 其中多态性条带1 678条, 多态性变异率为99.23%, 种群间的有效等位基因数为1.471 2, Nei's基因多样性为0.324 5, Shannon信息指数为0.436 7。分子方差分析(AMOVA)结果表明: 柴达木地区5个黑果枸杞种群的遗传变异主要存在于种群内部(92%), 种群间的遗传分化较小(8%, 遗传分化系数0.08)。黑果枸杞种群间的遗传相似系数介于0.970 9–0.992 2之间, 平均值为0.983 5。种群间的聚类及Mantel检验( $\gamma = 0.336\ 8$ ,  $p = 0.806\ 4$ )均表明柴达木地区黑果枸杞种群地理距离与遗传距离之间的相关性不明显; 黑果枸杞个体间的聚类表明同一种群的个体不能完全聚在一起。对同一种源的遗传多样性分析发现, 诺木洪奥斯勒草场的种源内部的遗传变异更为丰富, 这或许可以推断诺木洪可能为柴达木地区野生黑果枸杞种质资源的中心产区。

**关键词** 黑果枸杞, 柴达木地区, 遗传多样性, AFLP

**引用格式:** 王锦楠, 陈进福, 陈武生, 周新洋, 许东, 李际红, 亓晓 (2015). 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性的AFLP分析. 植物生态学报, 39, 1003–1011. doi: 10.17521/cjpe.2015.0097

## Population genetic diversity of wild *Lycium ruthenicum* in Qaidam inferred from AFLP markers

WANG Jin-Nan<sup>1\*</sup>, CHEN Jin-Fu<sup>2\*</sup>, Chen Wu-Sheng<sup>1</sup>, Zhou Xin-Yang<sup>3</sup>, XU Dong<sup>1</sup>, LI Ji-Hong<sup>1\*\*</sup>, and QI Xiao<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Agricultural Ecology and Environment, College of Forestry, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China; <sup>2</sup>Forestry Research Institute of Qinghai Province, Xining 810016, China; and <sup>3</sup>School of Pharmaceutical Sciences, Shandong University, Jinan 250012, China

### Abstract

**Aims** *Lycium ruthenicum* is a perennial shrub plant. It grows among rocks in deserts, and its populations are spatially scattered in the distribution range. The objectives of this study were investigating the population genetic diversity and genetic structure of *L. ruthenicum* in Qaidam and determining relationships between genetic diversity and environmental factors.

**Methods** We analyzed the genetic diversity of 120 individuals from 5 natural populations using amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers.

**Important findings** We obtained 1 691 unambiguous bands from the nine pairs of selected primers, 1 678 bands (99.23%) of which were polymorphic across all individuals. At the species level, the Nei's gene diversity was 0.364 9, and the Shannon's information index was 0.542 2. Analysis of molecular variance (AMOVA) analysis indicated that most variations (92.0%) existed within populations, with only a small proportion of total variations residing among populations (8.0%, genetic differentiation coefficient is 0.08). The genetic similarity among the populations ranged from 0.970 9 to 0.992 2 with an average of 0.983 5. Results of the Mantel test ( $\gamma = 0.336\ 8$ ,  $p = 0.806\ 4$ ) and unweighted pair group method with arithmetic mean (UPGMA) cluster of the Qaidam populations indicated that the correlation between geographical distance and genetic distance was not significant. Principal coordinate analysis of all sampled individuals showed that individuals from each population did not cluster together. The genetic diversity of the same population indicated that the *L. ruthenicum* of Nomhon had high level of genetic variations, which indicated Nomhon is the center of the Qaidam wild *L. ruthenicum* populations.

收稿日期Received: 2015-05-16 接受日期Accepted: 2015-09-08

\* 共同第一作者 Co-first authors

\*\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jhli@sda.edu.cn)

**Key words** *Lycium ruthenicum*, Qaidam, genetic diversity, AFLP

**Citation:** Wang JN, Chen JF, Chen WS, Zhou XY, Xu D, Li JH, Qi X (2015). Population genetic diversity of wild *Lycium ruthenicum* in Qaidam inferred from AFLP markers. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 39, 1003–1011. doi: 10.17521/cjpe.2015.0097

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)为茄科枸杞属多年生灌木,是我国西北荒漠地区一种特有的野生植物,主要分布于青海、新疆、宁夏、甘肃等省区(陈海魁等, 2008)。这种植物耐盐、抗旱,多分布于盐碱地和荒地,对盐渍土壤有很强的适应性(杨志江等, 2008; 姜霞, 2012)。黑果枸杞成熟果实中含有大量的花色素,稳定性好,着色性强,是理想的食用天然花色苷(李进等, 2007; 李淑珍等, 2008),黑果枸杞多糖含量高,具有较强的降低血糖作用(汪建红等, 2009);而柴达木地区黑果枸杞较其他地区含有更高的还原糖和其他营养成分,具有更重要的药用开发价值(矫晓丽等, 2011)。近年来对于黑果枸杞的研究主要集中在其营养成分及繁育技术上(汪河滨等, 2006; Zheng *et al.*, 2011; 林丽等, 2013; 马金平等, 2013; 闫亚美等, 2014),而对其遗传多样性研究相对较少。柴达木地区分布有大量的黑果枸杞,这些黑果枸杞大多处于野生状态,其种群间的遗传结构尚不清楚,因此对柴达木地区黑果枸杞种质资源的研究具有重要意义。Liu等(2012)采用SRAP分子标记对分布在青海、甘肃、新疆和宁夏的黑果枸杞种群进行遗传多样性分析,以揭示上述黑果枸杞种群之间的遗传关系。青海野生黑果枸杞种质在遗传分化等方面显示出其在西北黑果枸杞种质中占有重要地位。柴达木是青海野生黑果枸杞的主要分布区,其分布面积广,分布区内株型、叶型、分枝状态及结实量、果实大小均存在明显差异(章英才和张晋宁, 2004; 孙奎, 2011; 卢文晋等, 2014),学者推测柴达木地区野生黑果枸杞或为西北地区黑果枸杞的中心产区,然而对柴达木地区野生黑果枸杞种群内部遗传多样性和遗传分化结构的研究尚未有报道,故探讨柴达木地区的野生黑果枸杞种群间遗传多样性及亲缘关系具有重要的意义,对于柴达木地区野生黑果枸杞种质资源的发掘、保护及利用具有深远的意义。

扩增片段长度多态性(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(郭雄明等, 2006),已经广泛应用于遗传多样性分析(陈良华等, 2008; 张云红等, 2010),遗传图谱

的构建(金梦阳等, 2006; 姜志燕等, 2015)及亲缘关系的鉴定(陈红, 2008; 宋小丽, 2008)。李彦龙等(2011)利用AFLP标记对宁夏的15份枸杞(*Lycium chinense*)种质进行了遗传多样性分析,表明AFLP技术可以有效地对枸杞的遗传多样性进行分析。本实验利用DNA-AFLP分子标记技术,对柴达木地区野生黑果枸杞主要分布区德令哈怀头他拉、诺木洪贝壳梁、诺木洪奥斯勒草场、格尔木乌图美仁、格尔木鱼水河5个种群120份野生黑果枸杞样品的遗传多样性及遗传结构进行研究,从分子水平揭示柴达木地区野生黑果枸杞种质的遗传基础,分析柴达木地区野生黑果枸杞种群的遗传分化,为黑果枸杞的遗传育种研究提供理论依据,对柴达木地区野生黑果枸杞的种质资源的鉴定和利用具有一定的实践指导意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 种群取样

2013年5月在青海柴达木地区对野生黑果枸杞进行样品采集。由于柴达木盆地的黑果枸杞主要集中在柴达木盆地的南半部分,东起德令哈怀头他拉,西至格尔木乌图美仁的线状区域内,种群主要分布在德令哈、格尔木和诺木洪等地(陈进福等调查结果),所以种群采样时共采集了5个种群,分属于德令哈怀头他拉(DLH1)、诺木洪贝壳梁(NMH1)、诺木洪奥斯勒草场(NMH2)、格尔木乌图美仁(GEM1)、格尔木鱼水河(GEM2)(表1)。根据随机取样原则,每个种群取样24株,个体株距在5 m以上。采样地点的地理位置、经纬度及各种群内所采集的样品数见表1,本研究共采集120个植株的幼叶样品,将所采集的材料装入盛有硅胶的封口袋进行密封干燥保存,带回实验室用于提取DNA。

柴达木地区5个黑果枸杞种群之间的地理距离介于21–330 km之间,其中以诺木洪奥斯勒草场为中心,诺木洪贝壳梁、格尔木鱼水河、德令哈怀头他拉和格尔木乌图美仁的距离分别为21、135、95和301 km,而格尔木鱼水河到诺木洪贝壳梁、诺木洪奥斯勒草场、德令哈怀头他拉和格尔木乌图美仁

表1 黑果枸杞种群采样地和生境

Table 1 Habitats and localities of the sampled *Lycium ruthenicum* populations

种群 Population	海拔 Altitude (m)	纬度 Latitude (N)	经度 Longitude (E)	样品数 Sampling size
德令哈怀头他拉 Huaitoutala, Delingha (DLH1)	2 810	37.25°	96.83°	24
诺木洪贝壳梁 Beikeliang, Nomhon (NMH1)	2 703	36.50°	96.22°	24
诺木洪奥斯勒草场 Osler grassland, Nomhon (NMH2)	2 770	36.45°	96.45°	24
格尔木乌图美仁 Urt Moron, Glomud (GEM1)	2 890	36.88°	93.12°	24
格尔木鱼水河 River water, Glomud (GEM2)	2 750	36.48°	94.95°	24

的距离114、135、188和169 km。德令哈怀头他拉与格尔木乌图美仁之间的距离最大(330 km); 诺木洪奥斯勒草场与诺木洪贝壳梁的距离最小, 仅为21 km; 各个种群间的地理距离能够使黑果枸杞种群产生遗传分化。

## 1.2 黑果枸杞DNA的提取及AFLP实验

### 1.2.1 DNA提取

利用CTAB法提取黑果枸杞的总DNA, DNA的纯度与浓度用1.0%琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop核酸蛋白分析仪检测, 保存于-20℃下备用。

### 1.2.2 AFLP实验

AFLP分析流程参照Vos (1995)的cDNA-AFLP方法并经修改进行, 用*EcoR* I + *Mse* I内切酶组合对基因组DNA进行酶切, 从64对AFLP引物中筛选出能获得清晰条带、多态性高的9对引物组合(*E-AAG/M-CAC*、*E-AAG/M-CAG*、*E-ACA/M-CAA*、*E-ACA/M-CAC*、*E-ACT/M-CTT*、*E-AGG/M-CAA*、*E-AGG/M-CAC*、*E-AGG/M-CAG*、*E-AGG/M-CTG*)进行AFLP选择性扩增。AFLP-PCR的产物取2.0 μL选择性扩增产物加9.2 μL甲酰胺和0.2 μL ROX, 在94℃变性4 min后迅速置于-20℃冷却, 取变性的PCR产物进行4%的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

### 1.2.3 数据分析

聚丙烯酰胺凝胶电泳的图谱经ABI PRISM 377 sequencer测序仪检测片段大小, GENESCAN软件通过内参泳道进行一定程度的校正, 然后根据荧光信号和片段泳动的位置, 可以得到片段的原始大小。将原始数据中有带的换成“1”, 无带的换成“0”, 构建“01”矩阵, 然后根据“01”矩阵, 用PopGen 32软件计算以下遗传多样性参数: 多态位点百分率(PPB)、有效等位基因数( $N_e$ )、Nei's基因多样性指数( $H$ )、Shannon多态性信息指数( $I$ )、以及Nei's遗传一致度和遗传距离(Nei, 1978); 利用WINAMOVA 1.55软件(Excoffier, 1993)计算遗传分化系数和分子变

异, 该软件的输入文件由DCFA制作, 显著性检验是通过1 000次置换; 利用Mantel检验进行种群间遗传距离和地理距离相关性分析; 利用NESTY软件(Rohlf, 1988)进行主坐标分析和非加权配对算数平均法(UPGMA)聚类分析。

## 2 结果和分析

### 2.1 柴达木地区黑果枸杞遗传多样性

选用9对选扩增引物进行扩增, 共产生1 691条谱带(表2), 平均每对引物扩增产生211.4条谱带, 其中多态带合计为1 678条, 平均多态带比例达到99.23%。不同引物产生的谱带数量存在一定的差异, 其中*E-ACT/M-CTT*引物产生的谱带最多(201条), 而*E-AGG/M-CAC*引物产生的谱带最少(177条)。引物组合*E-AAG/M-CAC*、*E-ACA/M-CAC*和*E-AGG/M-CAC*的多态性比例最高(100%), 引物组合*E-AGG/M-CTG*的多态性比例最低(98.40%)。这表明, 所选择的引物在黑果枸杞间表现了较高的多态性水平, 柴达木地区120个黑果枸杞样品间的遗传多样性较高, 120份黑果枸杞样品间存在着丰富的变异。

多样性指数是衡量种群遗传多样性水平的重要指标。由表3可知, 120份黑果枸杞种质 $N_e$ 平均值为1.471 2,  $H$ 平均值为0.324 5,  $I$ 平均值为0.436 7; 其中引物组合*E-AGG/M-CAC*的 $N_e$  (1.501 4)、 $H$  (0.342 4)、 $I$  (0.461 9)最大, 引物组合*E-ACT/M-CTT*的 $N_e$ 、 $H$ 、 $I$ 分别为1.432 9、0.302 2、0.406 1, 均最小。以上数据表明柴达木地区野生黑果枸杞的多态性丰富, 黑果枸杞的遗传多样性处于一个较高的水平。

### 2.2 柴达木地区黑果枸杞种群内遗传多样性

利用PopGen 32软件对5个黑果枸杞种群内部的遗传多样性进行分析。由表4可知, NMH2的 $N_e$  (1.373 4)、 $H$  (0.231 1)、 $I$  (0.366 1)均最大, 这表明种群NMH2内的遗传多样性最高, DLH1的 $N_e$

表2 AFLP选择性扩增引物产生的条带多态性  
Table 2 Polymorphism of AFLP bands obtained by selective amplification based on the primer combinations

引物组合 Primer combination	总带数 Total No. of bands	多态带数 No. of polymorphic bands	多态带比例 Percentage of polymorphic bands (%)
E-AAG/M-CAC	182	182	100.00
E-AAG/M-CAG	192	189	98.43
E-ACA/M-CAA	190	189	99.47
E-ACA/M-CAC	180	180	100.00
E-ACT/M-CTT	205	201	98.05
E-AGG/M-CAA	193	193	100.00
E-AGG/M-CAC	177	177	100.00
E-AGG/M-CAG	184	182	98.91
E-AGG/M-CTG	188	185	98.40
合计 Summation	1 691	1 678	
平均 Mean	211.40	209.75	99.23

表3 基于不同引物组合的黑果枸杞遗传多样性水平  
Table 3 Genetic diversity level of *Lycium ruthenicum* based on different primer combinations

引物组合 Primer combination	有效等位 基因数 $N_e$	Nei's基因 多样性指数 $H$	Shannon多态性 信息指数 $I$
E-AAG/M-CAC	1.500 1	0.337 9	0.453 5
E-AAG/M-CAG	1.456 4	0.318 6	0.430 2
E-ACA/M-CAA	1.473 2	0.322 5	0.431 3
E-ACA/M-CAC	1.494 9	0.335 0	0.450 0
E-ACT/M-CTT	1.432 9	0.302 2	0.406 1
E-AGG/M-CAA	1.491 9	0.336 7	0.453 6
E-AGG/M-CAC	1.501 4	0.342 4	0.461 9
E-AGG/M-CAG	1.445 2	0.311 2	0.419 9
E-AGG/M-CTG	1.444 5	0.314 2	0.424 2
平均 Mean	1.471 2	0.324 5	0.436 7

$N_e$ , the number of effective alleles;  $H$ , Nei's gene diversity;  $I$ , Shannon's information index.

(1.343 4)、 $H$  (0.216 9)、 $I$  (0.349 6)均最小, 表明种群DLH1内的遗传多样性相对较低; 利用SPSS软件对5个种群的 $N_e$ 、 $H$ 和 $I$ 的差异进行显著性分析(显著性水平为0.05), 结果表明在 $N_e$ 、 $H$ 和 $I$ 差异显著性分析中, 种群NMH2与NMH1之间遗传多样性的差异是不显著的, 而NMH2和NMH1与种群GEM1、GEM2和DLH1之间遗传多样性的差异是显著的(表4), 这说明诺木洪可能为柴达木地区野生黑果枸杞种群种质资源的中心产区。

2.3 柴达木地区黑果枸杞种群的遗传分化与遗传距离

采用PopGen 32软件对柴达木地区黑果枸杞5个

表4 5个黑果枸杞种群内遗传多样性水平和显著性分析  
Table 4 Genetic diversity of the five *Lycium ruthenicum* populations

种群 Population	有效等位 基因数 $N_e$	Nei's基因 多样性指数 $H$	Shannon多态性 信息指数 $I$
DLH1	1.343 4 <sup>b</sup>	0.216 9 <sup>b</sup>	0.349 6 <sup>b</sup>
NMH1	1.366 2 <sup>ab</sup>	0.225 9 <sup>ab</sup>	0.359 5 <sup>a</sup>
NMH2	1.373 4 <sup>a</sup>	0.231 1 <sup>a</sup>	0.366 1 <sup>a</sup>
GEM1	1.347 5 <sup>b</sup>	0.222 8 <sup>b</sup>	0.357 5 <sup>b</sup>
GEM2	1.351 0 <sup>b</sup>	0.224 8 <sup>b</sup>	0.349 2 <sup>b</sup>

同列不同小写字母表示种群间差异显著( $p < 0.05$ )。种群同表1。  
 $N_e$ , The number of effective alleles;  $H$ , Nei's gene diversity;  $I$ , Shannon's information index. Different small letters in same column indicate significant difference among populations ( $p < 0.05$ ). For the abbreviation of populations (Population column), see Table 1.

种群的分析结果表明, 总基因多样性指数( $H_0$ )为0.177 9, 种群内的基因多样性指数( $H_s$ )为0.164 3, 种群间的基因多样性指数( $G_{st}$ )为0.075 6, 基因流( $N_m$ )为6.551 1, 这表明柴达木地区黑果枸杞种群间存在着广泛的基因交流, 同时利用WINAMO-VA1.55软件对柴达木地区5个种群的分析结果(表5)表明, 种群间的基因分化系数( $F_{ST}$ ) = 0.080, 即柴达木地区黑果枸杞总的变异中仅有8%来自于种群间, 种群内的遗传变异占总变异的92%, 柴达木地区黑果枸杞种群间和种群内的变异都极显著( $p < 0.001$ )。

柴达木地区5个黑果枸杞种群间遗传一致度在0.970 9–0.992 2之间, 平均值为0.983 5; 遗传距离介于0.007 8–0.029 7之间, 平均值为0.023 8。NMH1与NMH2的遗传一致度最大(0.992 2), 遗传距离最小(0.007 8), 说明二者的亲缘关系最相近, 遗传差异性最小。DLH1与GEM2的遗传一致度最小(0.970 9), 遗传距离最大(0.029 7), 说明二者的亲缘关系最远, 差异性最大(表6)。Mantel检验发现遗传距离和地理距离没有显著的相关性( $\gamma = 0.336 8$ ,  $p = 0.806 4$ )(图1)。同时柴达木地区5个黑果枸杞种群的遗传一致度均较高, 这也说明柴达木地区5个黑果枸杞的遗传变异主要存在于种群内部, 种群之间的遗传变异较低。

2.4 柴达木地区黑果枸杞种质资源的聚类分析和主坐标分析

根据AFLP分析结果, 计算遗传一致度矩阵, 按UPGMA法构建了材料间的遗传关系聚类图。结果表明在遗传一致度为0.98处, 可以将柴达木地区5个野生黑果枸杞种群分为3大类, DLH1为第I类, NMH1、GEM1和NMH2为第II类, GEM2为第III类

表5 柴达木地区黑果枸杞种群的遗传分化

Table 5 Genetic divergence of *Lycium ruthenicum* populations in Qaidam area

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	基因多样性指数 Gene diversity index	占总变异百分率(%) Percentage of total variation	<i>p</i>
种群间 Among populations	9	0.075 6	8	<0.001
种群内 Within populations	70	0.164 3	92	<0.001

表6 基于AFLP检测的5个黑果枸杞种群间遗传一致度和遗传距离

Table 6 genetic identity and genetic distance between five *Lycium ruthenicum* populations based on AFLP

种群 Population	DLH1	NMH1	NMH2	GEM1	GEM2
DLH1	—	0.986 3	0.977 2	0.970 9	0.971 0
NMH1	0.013 9	—	0.992 2	0.986 4	0.986 1
NMH2	0.023 1	0.007 8	—	0.989 8	0.984 7
GEM1	0.029 5	0.014 4	0.009 7	—	0.990 2
GEM2	0.029 7	0.014 5	0.015 5	0.009 5	—

种群同表1。—上方为遗传一致度, 下方为遗传距离。

For the abbreviation of populations, see Table 1. Above — for genetic identity, below — for genetic distance.

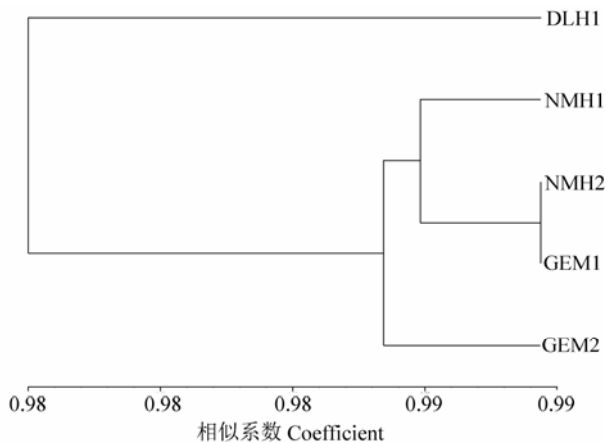


图1 柴达木黑果枸杞种群地理距离和遗传距离相关性的 Mantel 检验。DLH1、NMH1、NMH2、GEM1、GEM2, 同表1。

Fig. 1 Correlation between geographical distance and genetic distance revealed by Mantel test. DLH1, NMH1, NMH2, GEM1, GEM2, see Table 1.

(图2)。聚类结果表明, 柴达木地区野生黑果枸杞种群之间的遗传距离与地理距离之间不存在显著性的关系, 地理距离较近的种群并没有优先聚在一起。主坐标分析结果表明, 柴达木地区120个野生黑果枸杞材料大致按照种群的不同分为5类, DLH1的24份材料聚合在一起, 说明其种群内部的遗传变异相对稳定, 这一结果与PopGen 32软件所得到的 $N_e$ 值、 $H$ 值和 $I$ 值结果相同; 而种群GEM1和种群NMH2的材料没有完全分开, 这表明在个体的主坐标分析中

GEM1和NMH2的个体间的遗传一致度较高, 这一结果与种群的聚类结果相同(图2)。

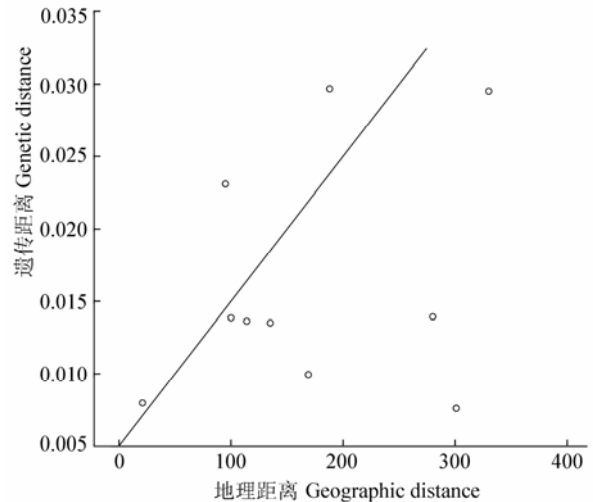


图2 基于AFLP分析的5个黑果枸杞种群的UPGMA聚类分析。

Fig. 2 Dendrogram of UPGMA analysis of the five populations of *Lycium ruthenicum* based on AFLP makers.

### 3 讨论

#### 3.1 柴达木地区野生黑果枸杞种群遗传多样性

本研究采用9对适宜的AFLP引物对柴达木地区5个野生黑果枸杞种群的120份材料进行分析, 结果显示120份材料共扩增得到1 691条条带, 多态性条带1 678条, 多态性百分率为99.23%,  $N_e$ 、 $H$ 、 $I$ 分别为1.471 2、0.324 5、0.436 7, 这一结果与Liu等(2012)利用SRAP标记对来自甘肃、宁夏、青海和新疆4省区黑果枸杞代表种群的遗传多样性研究和阿力同·其米克等(2013)利用ISSR标记对新疆南部(库尔勒地区)的黑果枸杞进行种群多样性研究所得到的结果相同, 这说明柴达木地区的野生黑果枸杞种群具有较高的遗传多样性。而异交的繁育系统被认为是物种维持较高遗传多样性水平的重要因素(Nybom, 2004), 黑果枸杞具有自交不亲和的特性(Savage & Miller, 2006; 尚洁等, 2010), 这都保证黑果枸杞种群的高度遗传多样性。而柴达木地区野生

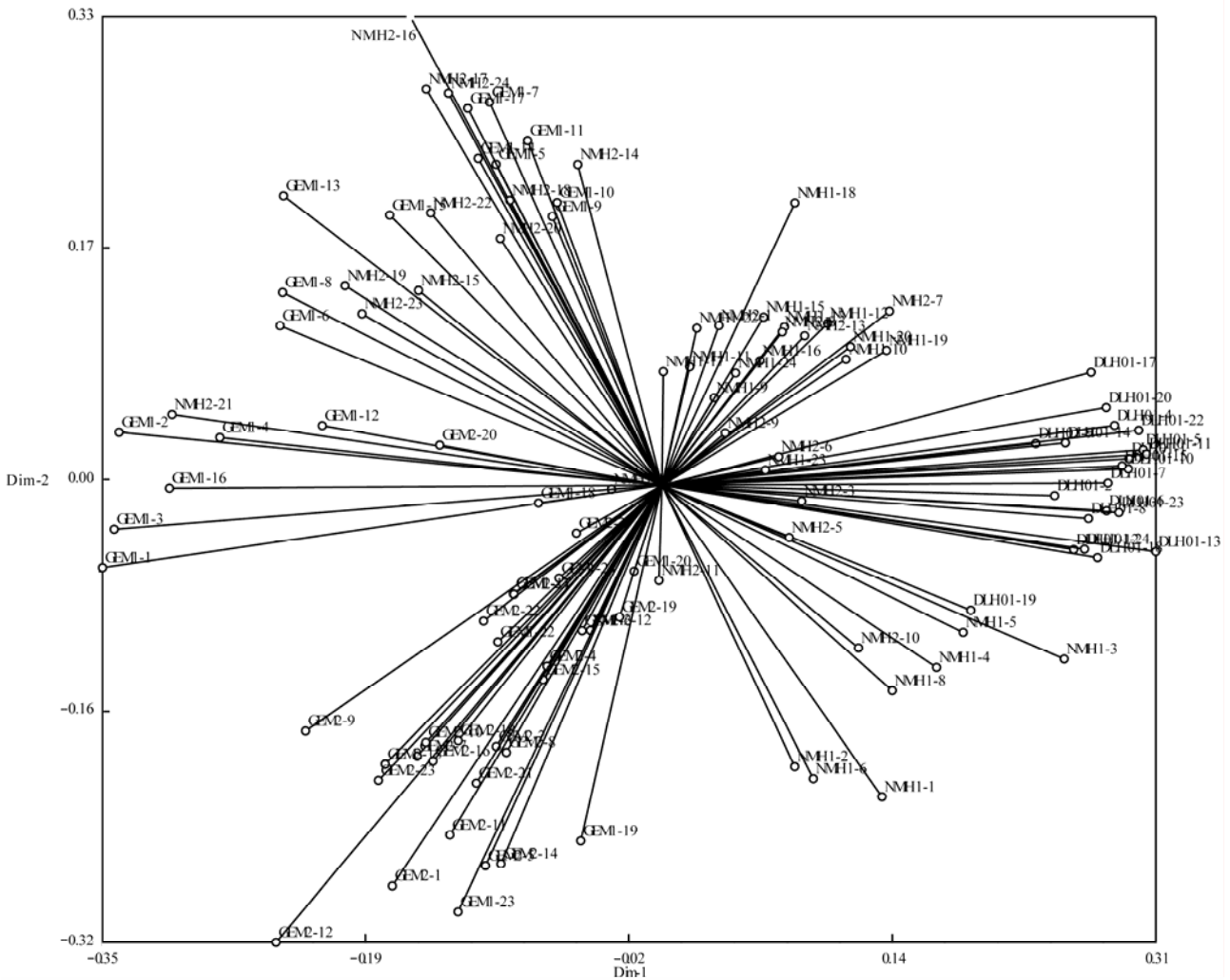


图3 基于AFLP分析的120个黑果枸杞样品的主坐标分析。  
Fig. 3 Coordinate analysis of the 120 samples of *Lycium ruthenicum* based on AFLP markers.

黑果枸杞种群较高的遗传多样性也表明目前人们过度的采摘只是影响了局部地区内黑果枸杞的数量和遗传多样性,就在物种水平上柴达木地区的野生黑果枸杞种质资源目前很可能没有受到生境破坏和人为破坏的影响。

### 3.2 柴达木地区野生黑果枸杞种群内部遗传多样性

对5个野生黑果枸杞种群内部的遗传多样性分析发现,诺木洪奥斯勒草场的黑果枸杞种群的 $N_e$ 、 $H$ 、 $I$ 最大,分别为1.373 4、0.231 1、0.361 1;而德令哈怀头他拉的 $N_e$ 值、 $H$ 值、 $I$ 值均最小,分别为1.343 4、0.216 9、0.349 6,这说明在柴达木地区的5个黑果枸杞种群中诺木洪奥斯勒草场的黑果枸杞种群内部的遗传变异最多,而德令哈怀头他拉的黑果枸杞种群内部的遗传变异则相对较少。显著性分析也表明, NMH2种群内部的多样性与NMH1之间的

差异是不显著的,而NMH2和NMH1种群内部的遗传多样性与种群GEM1、GEM2和DLH1之间的差异是显著的,这都说明诺木洪可能为柴达木地区野生黑果枸杞种质资源的核心产区,这也从侧面说明诺木洪黑果枸杞品质优良,营养价值高(陈进福等调查结果)的原因。

### 3.3 柴达木地区黑果枸杞种群的遗传分化和遗传结构

种群的遗传结构就是遗传变异或者说基因和基因型在时空上的分布式样,它受突变、基因流、自然选择和遗传漂变的共同作用,同时还与物种的进化历史和生物学特性有关(刘占林和赵桂仿, 1999)。本研究对柴达木地区5个野生黑果枸杞种群间的遗传多样性进行分析,结果表明, 5个种群间的遗传一致度在0.970 9–0.992 2之间。大量研究表明,不同物

种在遗传变异分布格局上有所差异,如明党参(*Changium smyrnioides*)(邱英雄等, 2000)的遗传变异主要存在于种群间,而黄花红砂(*Reaumuria tri-gyna*)(张颖娟和王玉山, 2008)的遗传变异主要存在于种群内;在本研究中AMOVA分析表明柴达木地区野生黑果枸杞种群的遗传分化系数为0.08,这说明柴达木地区野生黑果枸杞种群间的遗传变异仅占总变异的8%,种群内的遗传变异占总变异的92.0%,这一结果与阿力同·其米克等(2013)在新疆南部库勒地区所得到的结果相同(种群间的变异仅占总变异的23%)。黑果枸杞主要由昆虫和风传粉,其种子主要靠鸟类和啮齿动物传播,而这样的传粉和种子传播方式有利于种群间基因流的产生。基因流根据 $N_m$ 值的大小可划分为高( $\geq 1.0$ )、中(0.250–0.990)、低(0.0–0.249) 3个等级水平(Govindaraju, 1988),基因流 $N_m$ 值与种群间的遗传分化呈负相关,即大的基因流可以阻止种群间的遗传分化,由PopGen 32软件所得到的柴达木地区黑果枸杞种群间的基因流为6.551 1,表明黑果枸杞种群间存在着较大的基因交流。

对柴达木地区黑果枸杞种群进行Mantel检验发现其遗传距离和地理距离没有显著的相关性( $\gamma = 0.336\ 8$ ,  $p = 0.806\ 4$ ),这说明地理距离在柴达木地区野生黑果枸杞种群的遗传分化中的作用不明显。根据种群间的遗传一致度得到的种群间的UPGMA聚类结果也表明地理距离较近的种群并没有优先聚在一起。这一结果与阿力同·其米克(2013)在新疆南部黑果枸杞种群所得到的结果相同。总之,本研究所取的材料主要集中在柴达木地区,各个种群之间没有明显的高山或湖泊等地理阻隔,种群间的基因交流相对容易,从而使柴达木地区各个种群的地理隔离和遗传分化并不明显。柴达木地区黑果枸杞个体间的主坐标分析也表明,同一种群的个体并不能完全聚在一起,进一步说明各个种群间存在基因流。

综上所述,我们利用AFLP分子标记检测出柴达木地区野生黑果枸杞种群具有较高的遗传多样性,种群间的地理距离并没有影响种群间的基因交流,所以种群内的遗传多样性远高于种群间的遗传多样性,种群的多样性与地理距离并没有显著性关系,即地理分布近的种群遗传距离并不一定相近。柴达木地区的野生黑果枸杞仍维持着较高的遗传多样性水平,而种群间的遗传分化很低,这些遗传多

样性是该物种适应环境以及进化的基础(Ellstrand & Elam, 1993),因此我们认为,尽管目前人为的过度采摘和生境的破坏还没有对柴达木地区野生黑果枸杞种群产生较大破坏,但如不进行有效的控制,势必会导致遗传多样性的大量丧失。同时种群内部的遗传多样性表明NMH1和NMH2种群内部多样性与其他种群的差异显著,这说明诺木洪的野生黑果枸杞的种群内部遗传变异较多,证明诺木洪种群在柴达木地区野生黑果枸杞种源中的重要地位。但由于只是采用了DNA分子标记的检测,结果还需得到其他方法的检验。

**基金项目** 国家星火计划项目(2012GA870001)和青海省科技支撑计划(2012-N-1370)。

## 参考文献

- Alitong QMK, Wang QF, Yang CF, Chen JM (2013). ISSR analysis on genetic diversity of medically important *Lycium ruthenicum* murr. in Xinjiang. *Plant Science Journal*, 31, 517–524. (in Chinese with English abstract) [阿力同·其米克, 王青峰, 杨春峰, 陈进明 (2013). 新疆产药用植物黑果枸杞遗传多样性的ISSR分析. *植物科学学报*, 31, 517–524.]
- Chen H (2008). *Analysis of Genetic Diversity and Relationship among Chaenomeles germplasm using RAPD and AFLP Makers*. Master degree dissertation, Shandong Agricultural University, Tai'an. (in Chinese with English abstract) [陈红 (2008). 木瓜属种质资源的RAPD、AFLP亲缘关系鉴定及遗传多样性分析. 硕士学位论文, 山东农业大学, 泰安.]
- Chen HK, Pu LK, Cao JM, Ren X (2008). Current research state and exploitation of *Lycium ruthenicum* Murr. *Heilongjiang Agricultural Sciences*, (5), 155–157. (in Chinese with English abstract) [陈海魁, 蒲凌奎, 曹君迈, 任贤 (2008). 黑果枸杞的研究现状及其开发利用. *黑龙江农业科学*, (5), 155–157.]
- Chen LH, Hu TX, Zhang F, Li GH (2008). Genetic diversities of four *Juglans* populations revealed by AFLP in Sichuan Province, China. *Journal of Plant Ecology (Chinese Version)*, 32, 1362–1372. (in Chinese with English abstract) [陈良华, 胡庭兴, 张帆, 李国和 (2008). 用AFLP技术分析四川核桃资源的遗传多样性. *植物生态学报*, 32, 1362–1372.]
- Ellstrand NC, Elam DR (1993). Population genetic consequences of small population size: Implications for plant conservation. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24, 217–242.
- Excoffier L (1993). *Analysis of Molecular Variance*. version 1.



55. Genetics and Biometry Laboratory, University of Geneva, Switzerland.
- Govindaraju DR (1988). Relationship between dispersal ability and levels of gene flow in plants. *Oikos*, 52, 31–35.
- Guo XM, Xue X, Chen H (2006). Progress in research on amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 16, 369–372. (in Chinese with English abstract) [郭雄明, 薛霞, 陈华 (2006). 扩增片段长度多态性(AFLP)研究进展. 中国比较医学杂志, 16, 369–372.]
- Jiang X (2012). Studies on the Physiological Mechanism Underlying Salt Tolerance of *Lycium ruthenicum* murr. Master degree dissertation, Northwest A&F University, Yangling. (in Chinese with English abstract) [姜霞 (2012). 黑果枸杞耐盐机理的相关研究. 硕士学位论文, 西北农林科技大学, 杨凌.]
- Jiang ZY, Yu XX, Yu Z, Liu ZH, Hao ZM, Li XL (2015). Construction of an AFLP-based genetic linkage map of tetraploid hybrid wheatgrass. *Journal of Triticeae Crops*, 35, 457–463. (in Chinese with English abstract) [姜志燕, 于肖夏, 于卓, 刘志华, 郝治满, 李小雷 (2015). 四倍体杂交冰草AFLP遗传连锁图谱的构建. 麦类作物学报, 35, 457–463.]
- Jiao XL, Chi XF, Dong Q, Xiao YC, Hu FZ (2011). Analysis of the nutritional components of *Lycium ruthenicum*. *Amino Acids & Biotic Resources*, 33(3), 60–62. (in Chinese with English abstract) [矫晓丽, 迟晓峰, 董琦, 肖远灿, 胡凤祖 (2011). 柴达木野生黑果枸杞营养成分分析. 氨基酸和生物资源, 33(3), 60–62.]
- Jin MY, Liu LZ, Fu FY, Zhang ZS, Zhang XK, Li JN (2006). Construction of a genetic linkage map in *Brassica napus* based on SRAP, SSR, AFLP and TRAP. *Molecular Plant Breeding*, 4, 520–526. (in Chinese with English abstract) [金梦阳, 刘列钊, 付福友, 张正圣, 张学昆, 李加纳 (2006). 甘蓝型油菜SRAP、SSR、AFLP、和TRAP标记遗传图谱构建. 分子植物育种, 4, 520–526.]
- Li J, Yuan H, Zeng XC, Han B, Shi DH (2007). Toxicological assessment of pigment of *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Science*, 28(7), 470–474. (in Chinese with English abstract) [李进, 原惠, 曾献春, 韩彬, 时德红 (2007). 黑果枸杞色素的毒理学研究. 食品科学, 28(7), 470–474.]
- Li SZ, Li J, Yang ZJ, Yuan H (2008). Technology of extracting and refining total flavonoids from *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Research and Development*, 29(8), 82–87. (in Chinese with English abstract) [李淑珍, 李进, 杨志江, 原惠 (2008). 黑果枸杞类黄酮的提取和精制工艺研究. 食品研究与开发, 29(8), 82–87.]
- Li YL, Fan YF, Dai GL, An W, Cao YL (2011). Analysis of genetic diversity for wolfberry germplasms by AFLP technology. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 42, 770–773. (in Chinese with English abstract) [李彦龙, 樊云芳, 戴国礼, 安巍, 曹有龙 (2011). 枸杞种质遗传多样性的AFLP分析. 中草药, 42, 770–773.]
- Lin L, Li J, Ding CL (2013). Determination of anthocyanins in fruits of *Lycium ruthenicum* Murr. By HPLC. *Food Science*, 34(6), 164–166. (in Chinese with English abstract) [林丽, 李进, 丁成丽 (2013). 高效液相色谱法测定黑果枸杞果实中花色苷的含量. 食品科学, 34(6), 164–166.]
- Liu ZG, Shu QY, Wang L, Yu MF, Hu YP, Zhang HG, Tao YD, Shao Y (2012). Genetic diversity of the endangered and medically important *Lycium ruthenicum* Murr. revealed by sequence-related amplified polymorphism (SRAP) markers. *Biochemical Systematics and Ecology*, 45, 86–97.
- Liu ZL, Zhao GF (1999). Population genetics and its implications for conservation of rare and endangered plants. *Chinese Biodiversity*, 7, 340–346. (in Chinese with English abstract) [刘占林, 赵桂仿 (1999). 居群遗传学原理及其在珍稀濒危植物保护中的应用. 生物多样性, 7, 340–346.]
- Lu WJ, Wang ZL, Fan GH (2014). Morphological variation of *Lycium ruthenicum* under artificial cultivation conditions. *Nonwood Forest Research*, 32(1), 171–174. (in Chinese with English abstract) [卢文晋, 王占林, 樊光辉 (2014). 黑果枸杞在人工栽培条件下的形态变异. 经济林研究, 32(1), 171–174.]
- Ma JP, Li JG, Wang X, Chen X, Wang J (2013). Rapid propagation of seedlings and technology of planting of Black Wolfberry. *North Horticulture*, (9), 185–187. (in Chinese with English abstract) [马金平, 李建国, 王孝, 陈曦, 王佳 (2013). 黑果枸杞苗木快速繁育及建园技术. 北方园艺, (9), 185–187.]
- Nei M (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583–590.
- Nybom H (2004). Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology*, 13, 1143–1155.
- Qiu YX, Huang AJ, Fu CX (2000). Studies on genetic diversity in *Changium myrsinoides* Wolff (Umbelliferae). *Acta Phytotaxonomica Sinica*, 38(2), 111–120. (in Chinese with English abstract) [邱英雄, 黄爱军, 傅承新 (2000). 明党参的遗传多样性研究. 植物分类学报, 38(2), 111–120.]
- Rohlf FJ (1988). *NTSYSpc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter Software, Setauket, New York.
- Savage AE, Miller JS (2006). Gametophytic self-incompatibility in *Lycium parishii* (Solanaceae): Allelic diversity, genealogical structure, and patterns of molecular evolution



- at the *S-RNase* locus. *Heredity*, 96, 434–444.
- Shang J, Li S, Zhang KW (2010). Genetic diversity analysis of *Lycium barbarum* L. by RAPD. *Bulletin of Botanical Research*, 30, 116–119. (in Chinese with English abstract) [尚洁, 李收, 张靠稳 (2010). 宁夏枸杞遗传多样性的 RAPD 分析. *植物研究*, 30, 116–119.]
- Song XL (2008). *AFLP Identification of 12 Close Genetic Relationships of Cultivars in Capsicum frutescens* L. Master degree dissertation, Zhejiang University, Hangzhou. (in Chinese) [宋小丽 (2008). 亲缘关系密切的 12 个辣椒品种的 AFLP 鉴定. 硕士学位论文, 浙江大学, 杭州.]
- Sun K (2011). Study on the extracting technology of pigments from *Lycium ruthenicum* in Qaidam Basin. *Hubei Agricultural Sciences*, 50, 2318–2320. (in Chinese with English abstract) [孙奎 (2011) 柴达木盆地黑果枸杞色素最佳提取工艺研究. *湖北农业科学*, 50, 2318–2320.]
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Lee TVD, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M (1995). AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407–4414.
- Wang HB, Bai HJ, Wang JL, Chu ZQ, Wang Q (2006). Study on scavenging free radical activity of pigment in *Lycium ruthenicum* Murr. *Food Research and Development*, 27(11), 8–10. (in Chinese with English abstract) [汪河滨, 白红进, 王金磊, 褚志强, 王奇 (2006). 黑果枸杞色素清除自由基活性的研究. *食品研究与开发*, 27(11), 8–10.]
- Wang JH, Chen XQ, Zhang WJ (2009). Study on hypoglycemic function of polysaccharides from *Lycium ruthenicum* Murr. fruit and its mechanism. *Food Science*, 30(5), 244–248. (in Chinese with English abstract) [汪建红, 陈晓琴, 张蔚佼 (2009). 黑果枸杞果实多糖降血糖生物功效及其机制研究. *食品科学*, 30(5), 244–248.]
- Yan YM, Dai GL, Ran LW, Luo Q, Li XY, Qin K, Wu PJ (2014). The polyphenols composition of *Lycium ruthenicum* Murr. from different places. *Scientia Agricultura*, 22, 4540–4550. (in Chinese with English abstract) [闫亚美, 戴国礼, 冉林武, 罗青, 李晓莺, 秦垦, 巫鹏举 (2014). 不同产地野生黑果枸杞资源果实多酚组成分析. *中国农业科学*, 22, 4540–4550.]
- Yang ZJ, Li J, Li SZ, Zhang Y, Ling LH (2008). Effect of different sodium salt stress on the seed germination of *Lycium ruthenicum* murr. *Seed*, 27(9), 19–22. (in Chinese with English abstract) [杨志江, 李进, 李淑珍, 张尧, 陵林辉 (2008). 不同钠盐胁迫对黑果枸杞种子萌发的影响. *种子*, 27(9), 19–22.]
- Zhang YC, Zhang JN (2004). Studies on morphological structure characteristics of leaves of *Lycium ruthenicum* in two salinity environments. *Journal of Ningxia University (Natural Science Edition)*, 25(4), 365–367. (in Chinese with English abstract) [章英才, 张晋宁 (2004). 两种盐浓度环境中的黑果枸杞叶的形态结构特征研究. *宁夏大学学报(自然科学版)*, 25(4), 365–367.]
- Zhang YH, Hou Y, Lou AR (2010). Population genetic diversity of *Rhodiola dumulosa* in Northern China inferred from AFLP makers. *Chinese Journal of Plant Ecology*, 34, 1084–1094. (in Chinese with English abstract) [张云红, 侯艳, 娄安如 (2010). 华北地区小丛红景天种群的 AFLP 遗传多样性. *植物生态学报*, 34, 1084–1094.]
- Zhang YJ, Wang YS (2008). Genetic diversity of endangered shrub *Reaumuria trigyna* population detected by RAPD and ISSR markers. *Scientia Silvae Sinicae*, 44(12), 43–47. (in Chinese with English abstract) [张颖娟, 王玉山 (2008). 濒危小灌木长叶红砂种群的遗传多样性. *林业科学*, 44(12), 43–47.]
- Zheng J, Ding CX, Wang LS, Li GL, Shi JY, Li H, Wang HL, Suo YR (2011). Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau. *Food Chemistry*, 126, 859–865.

特邀编委: 张明理 责任编辑: 李 敏