

网络出版时间:2020-07-08 09:36 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2021.01.015
网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20200707.1537.015.html

黑果枸杞基因组 SSR 标记开发及遗传多样性分析

黄兴发¹, 尹 跃^{1,2}, 赵建华², 姚佳依¹, 秦小雅², 汪淑芬¹, 曹有龙², 战祥强¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100;

2 宁夏农林科学院 国家枸杞工程技术研究中心, 宁夏 银川 750002)

【摘要】【目的】开发黑果枸杞基因组 SSR 标记并验证其有效性, 为黑果枸杞 SSR 分子开发应用提供依据。**【方法】**利用 Illumina Hiseq 2500 测序平台对 2 年生的黑果枸杞 Lr-01 无性系的基因组进行 PE150 测序, 用 MISA 软件对获得的基因组序列进行检索与分析。在此基础上, 以 18 份宁夏枸杞、1 份中国枸杞、23 份黑果枸杞和 6 份其他枸杞种质为供试材料, 利用 Primer 3.0 设计 SSR 引物, 进行 SSR 引物筛选和多样性验证。**【结果】**在黑果枸杞中共检索到 2 326 条 Scaffolds, 含有 2 494 个 SSR 位点, 每 5.29 kb 就有 1 个 SSR 位点, 优势重复基序为单核苷酸、二核苷酸和三核苷酸, 分别占总 SSR 位点的 59.18%, 27.11% 和 11.75%。重复基元类型共 21 种, 其中类型最多的为单核苷酸重复 A/T, 占总数的 56.05%; 其次为二核苷酸重复 AT/AT, 占总数的 12.35%。从设计的 SSR 引物中, 随机挑选合成 150 对引物进行 PCR 扩增, 筛选出 10 对高多态性 SSR 引物, 分析其在 48 份枸杞种质中遗传参数, 结果共检测到 186 个等位基因, 平均为 19 个; 观察杂合度、期望杂合度和多态信息含量平均值分别为 0.615, 0.834 和 0.817。UPG-MA 聚类分析结果表明, 48 份枸杞种质被分为 2 个类群, 其中类型 I 包括 23 份种质, 全部为黑果枸杞; 类型 II 包括 25 份种质, 主要为宁夏枸杞。分析结果显示, 48 份枸杞种质群体结构和群体种质资源遗传结构均可分为 2 个类群, 与聚类分析结果基本一致。**【结论】**通过高通量测序技术开发黑果枸杞 SSR 标记是一种简单而高效途径, 这些 SSR 标记为黑果枸杞种质资源的遗传多样性分析及遗传图谱构建等研究提供了可靠的标记选择。

【关键词】 黑果枸杞; 基因组; 简单重复序列(SSR); 遗传多样性

【中图分类号】 S567.1⁺9

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2021)01-0126-10

Development of genomic SSR markers and genetic diversity analysis of *Lycium ruthenicum* Murr.

HUANG Xingfa¹, YIN Yue^{1,2}, ZHAO Jianhua², YAO Jiayi¹, QIN Xiaoya²,
WANG Shufen¹, CAO Youlong², ZHAN Xiangqiang¹

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 National Wolfberry Engineering Research Center, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Sciences,
Yinchuan, Ningxia 750002, China)

Abstract: **【Objective】** The development and validation of genomic SSR markers was conducted to provide basis for development and application of SSR molecule of *Lycium ruthenicum* Murr.. **【Method】** Illumina Hiseq 2500 sequencing platform was used to sequence the genome of *L. ruthenicum* by PE150 sequencing, and the obtained genome sequence was screened and analyzed by MISA. On the basis, 18 *L. barbarum*, 1 *Lycium chinense*, 23 *L. ruthenicum* and 6 other *L. barbarum* germplasms were used as test materi-

【收稿日期】 2019-12-09

【基金项目】 国家自然科学基金项目(31760218); 第三批宁夏青年科技人才托举工程项目(TJGC2018022); 全产业链创新示范项目(YES-16-0405); 宁夏农业特色优势产业新品种选育专项(2013NYYZ0101); 陕西省自然科学基金基础研究计划项目(2017JM3019)

【作者简介】 黄兴发(1995-), 男, 山东济南人, 硕士, 主要从事园艺作物分子育种研究。E-mail: 1392638149@qq.com

【通信作者】 战祥强(1977-), 男, 山东莒县人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物逆境生物学、园艺作物耐/抗逆基因挖掘及育种研究。E-mail: zhanxq77@nwsuaf.edu.cn

als. Primer 3.0 was used to design SSR primers for SSR primer screening and diversity verification. 【Result】 A total of 2 326 SSR Scaffolds were obtained and there were 2 494 SSR loci, with one SSR locus per 5.29 kb in black fruit wolfberry berries. The dominant repeat motifs were single nucleotide, dinucleotide and trinucleotide, accounting for 59.18%, 27.11% and 11.75% of the total, respectively. There were 21 types of repeat motifs, the most of which were single nucleotide repeat A/T with contribution of 56.05%, followed by dinucleotide repeat AT/AT with contribution of 12.35%. SSR primers were designed by Primer 3.0, of which 150 pairs were randomly selected and synthesized for PCR amplification. The results revealed that 10 pairs of primers showed high polymorphism, and 186 alleles were detected in 48 germplasms, with an average of 19 alleles. The average values of heterozygosity, expected heterozygosity and polymorphic information content were 0.615, 0.834 and 0.817, respectively. UPGMA cluster analysis showed that 48 germplasms were divided into two groups, of which type I included 23 germplasms, all *L. ruthenicum* and type II included 25 germplasms, mainly *L. barbarum*. Population structure analysis revealed that 48 accessions were also divided into two groups. The results were in line with UPGMA cluster analysis. 【Conclusion】 High throughput sequencing technology is a simple and efficient method to develop SSR markers of *L. ruthenicum*. These SSR markers could provide reliable marker selection for genetic diversity analysis and genetic map construction of *L. ruthenicum*.

Key words: *Lycium ruthenicum*; genome; simple sequence repeat; genetic diversity

黑果枸杞 (*Lycium ruthenicum* Murr.) 系茄科 (Solanaceae) 枸杞属 (*Lycium*) 多年生落叶多棘刺灌木植物, 主根系发达, 具有较强的抗旱性和耐盐性^[1-2], 主要分布在我国新疆、青海、甘肃、宁夏等西北地区盐碱地、沙漠、路边等, 是西北地区水土保持的先锋树种^[3], 其果实富含丰富的花青素和多酚物质, 具有抗氧化、抗衰老等功效^[4-8], 已成为当前国内外研究的热点领域。近年来, 国家枸杞工程技术研究中心收集保存了黑果枸杞种质资源, 但这些资源遗传背景复杂, 限制了黑果枸杞的品种选育和产业发展。因此, 加强黑果枸杞种质资源遗传多样性分析及遗传图谱构建等研究, 对黑果枸杞新品种选育及产业发展具有重要意义。

简单重复序列 (simple sequence repeats, SSR) 又称为短串联重复 (short tandem repeats, STR) 或微卫星 DNA (microsatellite DNA), 广泛存在于真核基因组中。SSR 标记因具有共显性、多态性高、高通量数据易处理及易共享等优点^[9], 已广泛应用于山茶、白蜡等植物遗传多样性评价、核心种质和遗传图谱构建及重要性状定位等研究领域^[10-15]。近年来, 随着高通量测序技术和生物信息学技术的快速发展, 大规模植物已完成全基因组测序^[16], 人们基于全基因组测序数据开发了大量的 SSR 标记, 且建立了 SSR 标记检索数据库^[17-19], 为 SSR 标记的利用提供了快捷的途径。而枸杞 SSR 标记开发及应用

的研究相对滞后, 目前已从红果枸杞中开发了一批多态性高的 SSR 标记, 并应用于品种鉴定、分子指纹图谱构建及遗传多样性评价研究^[20-26]。然而, 由于物种间的扩增效率不一样, 基于红果枸杞开发的 SSR 引物在黑果枸杞属植物扩增效率较低, 难以满足黑果枸杞遗传多样性分析及遗传图谱构建等研究的需要。

基于此, 本研究以 2 年生的黑果枸杞幼嫩叶片为材料, 基于 Illumina Hiseq 2500 测序平台, 采用 MISA 软件对测序组装黑果枸杞基因组进行扫描, 设计开发并筛选出一批黑果枸杞 SSR 标记, 旨在用于黑果枸杞种质资源遗传多样性评价及遗传图谱构建等方面, 为黑果枸杞新品种选育及产业发展奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

高通量测序所用材料为 2 年生的黑果枸杞 Lr-01 无性系 (图 1), 表现为刺多, 花量大, 具有较强抗旱性和耐盐性; 引物筛选和多态性验证的材料为 18 份宁夏枸杞、1 份中国枸杞、23 份黑果枸杞和 6 份其他枸杞种质 (表 1), 以上材料均定植于宁夏农林科学院枸杞种质资源圃 (38°38′49″N, 106°09′10″E)。2018 年 5 月采集幼嫩健康叶片用于基因组 DNA 提取。



A. 整株 Whole plant;B. 花 Flower;C. 果实 Fruit

图 1 黑果枸杞无性系 Lr-01 的生长情况

Fig. 1 Lr-01 plant growing condition of *Lycium ruthenicum*

表 1 供试枸杞材料

Table 1 Materials of *Lycium* used in this study

编号 Code	种质名称 Name	种名 Species	果实颜色 Fruit color	编号 Code	种质名称 Name	种名 Species	果实颜色 Fruit color
1	宁杞 1 号 Ningqi 1	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	25	Lr-06	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
2	宁杞 2 号 Ningqi 2	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	26	Lr-07	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
3	宁杞 3 号 Ningqi 3	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	27	Lr-08	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
4	宁杞 4 号 Ningqi 4	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	28	Lr-09	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
5	宁杞 5 号 Ningqi 5	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	29	Lr-10	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
6	宁杞 6 号 Ningqi 6	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	30	Lr-11	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
7	宁杞 7 号 Ningqi 7	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	31	Lr-12	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
8	宁杞 8 号 Ningqi 8	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	32	Lr-13	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
9	宁杞 9 号 Ningqi 9	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	33	Lr-14	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
10	宁杞 10 号 Ningqi 10	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	34	Lr-15	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
11	宁杞菜 1 号 Ningqicai 1	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	35	Lr-16	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
12	精杞 4 号 Jingqi 4	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	36	Lr-17	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
13	蒙杞 1 号 Mengqi 1	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	37	Lr-18	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
14	蒙杞 2 号 Mengqi 2	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	38	Lr-19	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
15	宁农杞 1 号 Ningnongqi 1	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	39	Lr-20	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
16	宁农杞 9 号 Ningnongqi 9	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	40	Lr-21	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
17	宁夏黄果 Ningxiahuangguo	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	黄色 Yellow	41	Lr-22	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black
18	中科绿川 1 号 Zhongkelvchuan 1	宁夏枸杞 <i>L. bararum</i>	红色 Red	42	Lr-23	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	白色 White
19	Lc-01	中国枸杞 <i>L. chinense</i>	红色 Red	43	W-12-30	未知 Unknown	黄色 Yellow
20	Lr-01	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black	44	W-12-27	未知 Unknown	黄色 Yellow
21	Lr-02	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black	45	W-11-15	未知 Unknown	黄色 Yellow
22	Lr-03	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black	46	W-12-26	未知 Unknown	黄色 Yellow
23	Lr-04	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black	47	天精 3 号 Tianjing 3	未知 Unknown	红色 Red
24	Lr-05	黑果枸杞 <i>L. ruthenicum</i>	黑色 Black	48	天精 5 号 Tianjing 5	未知 Unknown	红色 Red

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 采用试剂盒法(DP305, 天根)从枸杞幼嫩叶片中提取基因组 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量完整性,紫外分光光度计(Eppendorf, Bio Photometer plus)检测 DNA 浓度和纯度,将 DNA 质量浓度稀释至 50 ng/ μ L,置于-20℃保存,用于后续 PCR 试验。

1.2.2 高通量测序与组装分析 对质检合格基因组 DNA 进行文库构建,由北京百迈客生物科技有限公司利用 Illumina Hiseq 2500 测序平台对 DNA 文库进行 PE150 测序。测序完成后,过滤掉接头污染、低质量和含 N 比列大于 5% 的 Reads。利用 SOAP denovo 软件^[27]进行序列拼接和组装。

1.2.3 SSR 位点鉴别与引物设计 使用 MISA 软件(<http://pgrc.ipk-gatersleben.de/misa/>)进行 SSR 位点的搜索,搜索的标准为:重复基元长度 1~6 bp,单核苷酸重复基序的最小重复数为 10;二核苷酸重复基序的最小重复数为 6;三、四、五和六核苷酸重复基序的最小重复数均为 5。两个 SSR 序列间隔最小值为 100 bp,即序列间隔。

运用 Primer 3.0 软件^[28]进行引物批量设计。随机选择 150 对引物按照以下参数设计:引物长度 18~27 bp,GC 含量在 40%~60%,退火温度 50~60℃,上、下游引物的退火温度相差不超过 5℃。在上游引物 5'端添加 18 bp 的 M13 通用引物序列(TGTAAAACGACGCCAGT),3'端保持不变,FAM 和 HEX 两种荧光基团修饰通用引物,所有引物均由英潍捷基贸易有限公司合成。

1.2.4 PCR 扩增及多态性 SSR 引物筛选 PCR 扩增体系 15 μ L:50 ng/ μ L DNA 模板 1 μ L,10 $\times$ Buffer 1.5 μ L,10 μ mol/L dNTP 1.2 μ L,5 μ mol/L 上游引物 1 μ L,5 μ mol/L 下游引物 0.2 μ L,5 μ mol/L M13 荧光引物 0.8 μ L,Taq DNA 聚合酶(5U/ μ L)0.1 μ L,灭菌后去离子水 9.2 μ L。

PCR 反应在 Gene Amp PCR System 9600 (Perkin Elmer,USA)仪上进行,扩增程序为:94℃ 5 min;94℃ 30 s,58℃ 30 s,72℃ 30 s,25 个循环;94℃ 30 s,53℃ 30 s,72℃ 30 s,10 个循环;最后 60℃ 30 min。扩增产物经过 ABI3730XL DNA (Applied Biosystems,USA)检测,采用 LIZ-500 作为分子量内标。

1.3 数据统计与分析

用 GeneMapper 4.0 软件对 ABI3730XL 收集

的原始数据进行分析,获得不同样品扩增片段的长度;采用 DataFormater 软件^[29]将扩增片段转化为 PowerMarker v3.25、NTSYS-pc2.20 和 STRUC-TURE2.3.4 输入格式。由 PowerMarker v3.25 软件^[30]计算等位基因数(number of alleles, N_a)、观察杂合度(observed heterozygosity, H_o)、期望杂合度(expected heterozygosity, H_e)、多态信息含量(polymorphism information content,PIC)遗传多样性参数。用 NTSYS-pc2.20 软件^[31]计算种质间的遗传距离,然后将遗传距离矩阵导入 MEGA 6.06 软件,采用 UPGMA 法进行聚类分析,绘制系统聚类树,并在线软件 iTOL (<https://itol.embl.de/itol.cgi>)编辑美化。用 STRUCTURE2.3.4 软件^[32]对 48 份枸杞材料进行群体结构分析,设置群体数 k 值为 1~10,每个参数运行 10 次,每次运行的 burn-in time 设置为 10 000,重复次数为 100 000,得到 ΔK 值,绘制 k 与 ΔK 的关系图。用 STRUC-TURE HARVESTER 在线软件^[33]对群体种质资源遗传结构进行可视化分析,用个体归属各组群的比例(Q 值)与群体数(k)来研究供试枸杞种质间是否存在基因交流。

2 结果与分析

2.1 黑果枸杞基因组中 SSR 位点数及分布频率

利用 MISA 软件对组装获得 2G 数据量 72 852 条 Scaffolds(序列总长为 13 187 545 bp)进行查找分析,发现含有符合条件的 SSR Scaffolds 有 2 326 条,发生频率为 3.19%。共查到 2 494 个 SSR 位点,分布频率为 3.42%,其中每 5.29 kb 就具有 1 个 SSR 位点。黑果枸杞基因组中 SSR 类型丰富,单核苷酸至六核苷酸重复类型均存在。其中,单核苷酸重复类型数量最多,为 1 476 个,占总 SSR 位点数的 59.18%;其次为二核苷酸和三核苷酸重复类型,分别为 676 和 293 个,占总 SSR 位点数的 27.11%和 11.75%;四、五、六核苷酸重复类型的数量很少,总共仅占总 SSR 位点数的 1.96%。由此可见,黑果枸杞基因组 SSR 重复基元的数量随着碱基重复次数的增加呈降低趋势(表 2)。

在黑果枸杞基因组 SSR 位点中,以 10 次重复次数最多,达 804 个 SSR 位点,占总 SSR 位点数的 32.24%;其次为 6 和 11 次重复,SSR 位点数分别为 389 和 282,占总 SSR 位点数的 15.59%和 11.30%(表 2)。

表 2 黑果枸杞基因组中 1~6 bp 核苷酸重复单元基序的 SSR 数量

Table 2 Number of SSR including one to six-nucleotide repeat motifs in *L. ruthenicum* genome

SSR 类型 SSR type	重复数 Repeat												总数 Total
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15	
单核苷酸 Mononucleotide						769	269	147	109	51	35	96	1 476
二核苷酸 Dinucleotide		332	127	75	45	29	10	8	5	5	2	38	676
三核苷酸 Trinucleotide	166	52	20	11	10	6	3	5	1	3	9	7	293
四核苷酸 Tetranucleotide	9	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	12
五核苷酸 Pentanucleotide	18	2	4	2	2	0	0	0	0	0	0	0	28
六核苷酸 Hexanucleotide	5	2	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	9

2.2 黑果枸杞基因组中 SSR 基序类型和频率 至六核苷酸重复基序类型依次有 2,3,7,2,5 和 2 从黑果枸杞基因组 SSR 基序类型(表 3)来看, 种。 2 494个 SSR 位点中共有 21 种重复基序,单核苷酸

表 3 黑果枸杞基因组 SSR 基序类型的分布

Table 3 Distribution of SSR types in *L. ruthenicum* genome

SSR 类型 SSR type	基序类型数 No. of Repeat motifs	基序类型 Motif type	出现次数 Frequency	占总 SSR 重复基序比列/% Ratio
单核苷酸 Mononucleotide	2	A/T	1 398	56.05
		C/G	78	3.13
二核苷酸 Dinucleotide	3	AC/GT	268	10.75
		AG/CT	100	4.01
		AT/AT	308	12.35
		AAC/GTT	133	5.33
三核苷酸 Trinucleotide	7	AAG/CTT	26	1.04
		AAT/ATT	43	1.72
		ACC/GGT	4	0.16
		ACT/AGT	5	0.20
		AGC/CTG	43	1.72
		ATC/ATG	39	1.56
		AAAG/CTTT	6	0.24
		ACAT/ATGT	6	0.24
四核苷酸 Tetranucleotide	2	AAAAT/ATTTT	1	0.04
		AACAC/GTGTT	2	0.08
五核苷酸 Pentanucleotide	5	AATTC/AATTG	12	0.48
		ACATG/ATGTC	1	0.04
		ATATC/ATATG	12	0.48
		ACATAT/ATATGT	1	0.04
六核苷酸 Hexanucleotide	2	ACTGCT/AGCAGT	8	0.32

单核苷酸中基序类型以 A/T 为主, 占总 SSR 位点类型的 56.05%。二核苷酸重复基序类型有 3 种, 即 AC/GT、AG/CT 和 AT/AT, 其中 AT/AT 基序所占的比例最高, 为 12.35%。三核苷酸重复基序类型有 7 种, 其中 AAC/GTT 重复基序类型最多有 133 个(5.33%), ACC/GGT 重复基序类型最少有 4 个(0.16%)。四核苷酸重复基序类型以 AAAG/CTTT(6 个, 0.24%)和 ACAT/ATGT(6 个, 0.24%)为主。五核苷酸重复基序类型以 AAT-TC/AATTG(12 个, 0.48%)和 ATATC/ATATG

(12 个, 0.48%)为主。六核苷酸重复基序类型以 ACTGCT/AGCAGT(8 个, 0.32%)为主(表 3)。

2.3 枸杞基因组中多态性 SSR 引物的筛选

以表型差异较大的 4 份种质‘宁杞 1 号’、‘Lc-01’、‘天精 5 号’和‘Lr-01’为材料, 对设计合成的 150 对 SSR 荧光引物进行多态性引物筛选, 其中 37 对引物表现出高的多态性, 多态性比率为 24.6%。以引物 LRSSR0018 为例, 其在 4 份种质上扩增荧光毛细管电泳图见图 2。由图 2 可知, 引物 LRSSR0018 在 4 份种质间表现出高多态性。

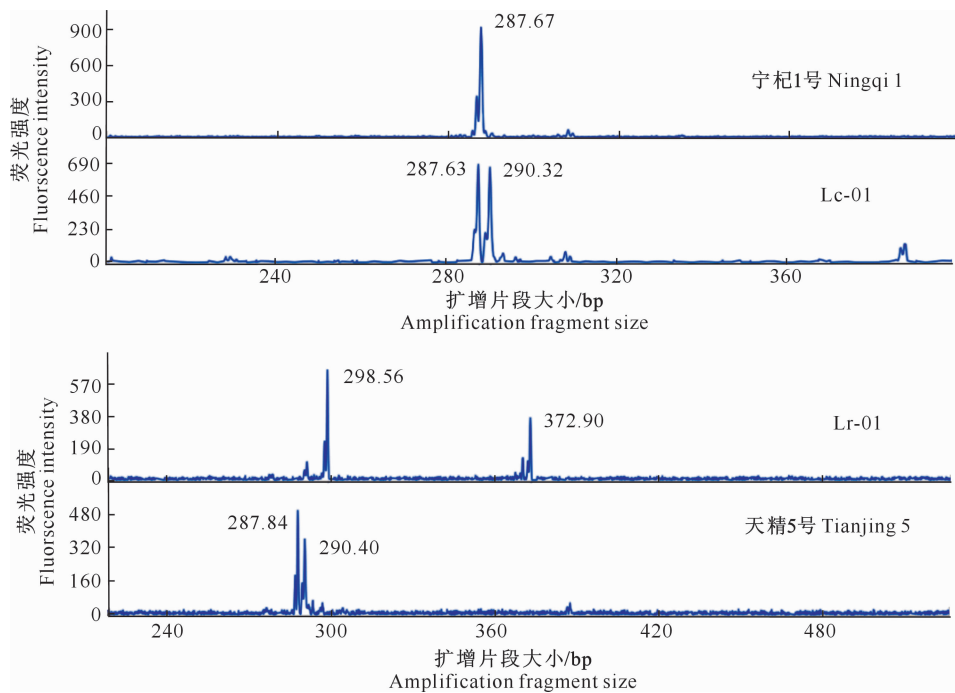


图 2 引物 LRSSR0018 在 4 份枸杞材料中的毛细管电泳检测结果

Fig. 2 Analysis of capillary electrophoresis detection of four *Lycium* accessions by LRSSR0018 primer

2.4 枸杞基因组中 SSR 标记遗传多样性分析

根据多态性结果,从 37 对 SSR 引物中挑选出 10 对,分析其在 48 份材料中的遗传参数,结果(表 4)发现,共检测到 186 个等位基因,最少 12 个,最多

28 个,平均 19 个;观察杂合度为 0.375~0.854,平均为 0.615;期望杂合度为 0.730~0.922,平均 0.834;多态信息含量为 0.692~0.917,平均 0.817。表明供试枸杞种质间具有丰富的遗传多样性。

表 4 10 个 SSR 标记在 48 份枸杞材料中的遗传参数

Table 4 Genetic parameters of 10 SSR markers used in 48 <i>Lycium</i> germplasm						
引物名称 Primer name	重复基序 Repeat motif	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	等位基因数 <i>N_a</i>	观察杂合度 <i>H_o</i>	期望杂合度 <i>H_e</i>	多态信息含量 PIC
LRSSR0018	(TCT) ₂₆	F: TTGAAGAACTGTGGGTCCATC R: TAGCCGTAGCTTGTGGAGAAC	20	0.458	0.780	0.768
LRSSR0026	(TCT) ₂₀	F: GGTTCATCCAATTTCCATAGATC R: TTGATGATGACCCCTTGAAC	28	0.667	0.900	0.893
LRSSR0027	(TCT) ₂₀	F: GGATCCTCATTGTTGTGGCA R: GGATACAAGCCGTGTGAGGC	15	0.667	0.815	0.797
LRSSR0034	(GAA) ₁₉	F: GCAACAAAGACCAGGAACATC R: CCAGATTCCAATTGTCATAGTGC	18	0.854	0.900	0.893
LRSSR0076	(AAT) ₁₆	F: CAATGTTGTAATAGCCGTGTGAT R: GTCCCCACCTTAACCTATCGC	13	0.375	0.730	0.692
LRSSR0101	(CTT) ₁₅	F: GTCTATTGAACTTTGTGAGCATC R: GGAGGCAGAATAGCAAAGTCG	12	0.417	0.735	0.699
LRSSR0112	(TCT) ₁₅	F: GTAGCTGAACCATCTGCTGATG R: GGAAGACAGGGTCTTGGCAG	27	0.813	0.922	0.917
LRSSR0132	(AAT) ₁₈	F: ACATCTTGAGTCATAAGCCAGCT R: TTCGTCCCTGACAACCATCG	16	0.521	0.786	0.760
LRSSR0140	(AAT) ₁₄	F: GCATAAAACACAGACCTTCCGA R: CTGATGCTGATTCAATTGTACGTG	20	0.750	0.876	0.866
LRSSR0146	(CTT) ₁₄	F: ATCCTCGACCGATCATCTACG R: GTTGTTCGAATTGAGAATCTTACG	17	0.625	0.895	0.886
平均 Average			19	0.615	0.834	0.817

2.5 48 份枸杞种质间的系统聚类分析

利用 NTSYS-pc2.20 软件计算 48 份枸杞种质

间的遗传距离,然后用 UPGMA 法绘制系统聚类树(图 3)。

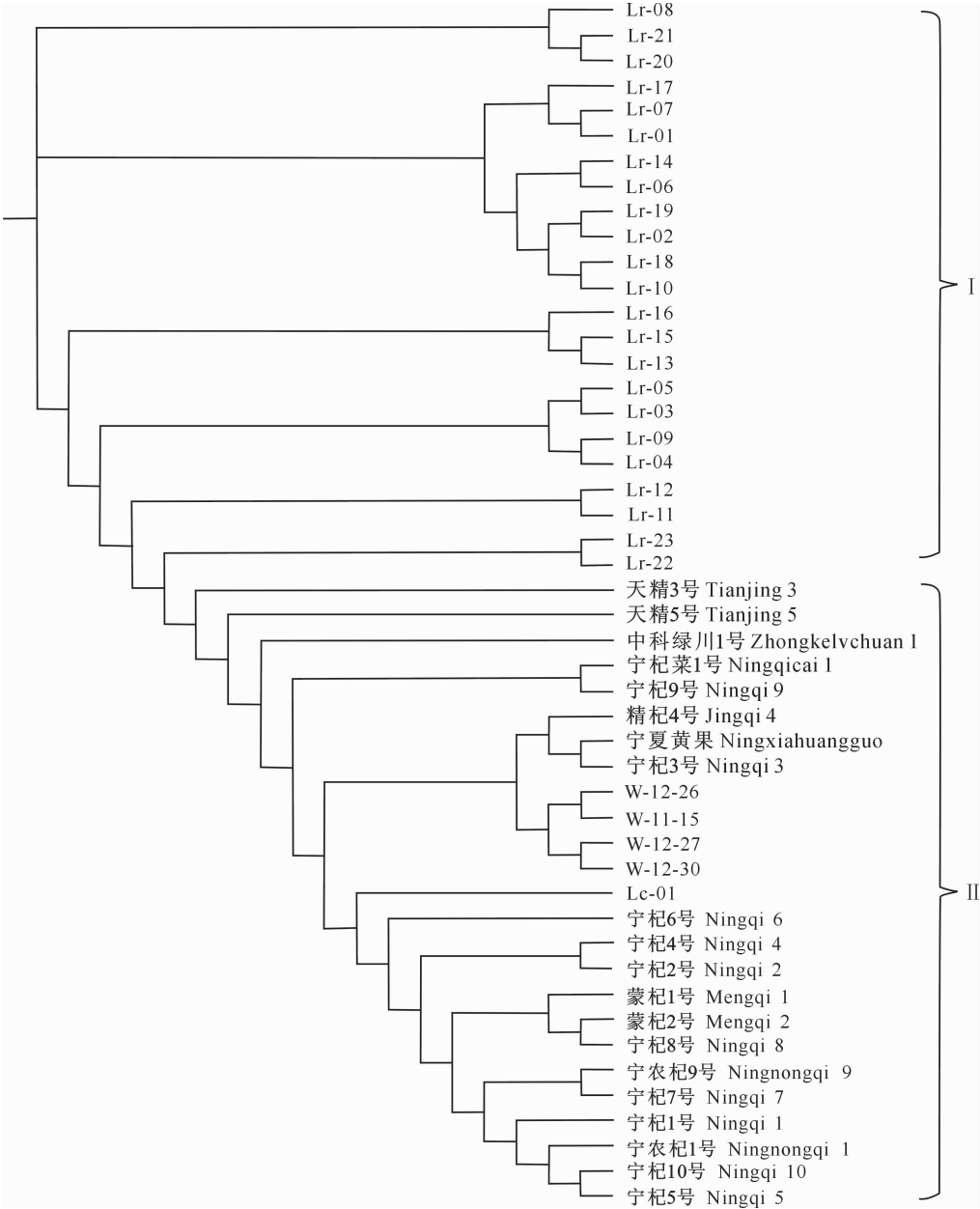


图 3 基于 UPGMA 法构建的 48 份枸杞种质的系统聚类树

Fig. 3 Phylogenetic tree of 48 *Lycium* germplasm based on UPGMA method

由图 3 可知,48 份枸杞种质被划分为 I 和 II 2 个类群。类型 I 中含有 23 份种质,全部是黑果枸杞。类型 II 中包括 25 份种质,大部分为宁夏枸杞,其中宁杞 5 号与宁杞 10 号、蒙杞 1 号与蒙杞 2 号、宁杞菜 1 号与宁杞 9 号亲缘关系最近,这与其来源及遗传背景相符合;5 份黄果枸杞聚为一小分枝,果实颜色均为黄色,果形为近球形。天精 3 号和天精 5 号亲缘关系较近,与其他种质亲缘关系较远,这 2 份种质为软枝型,生长势强,叶片肥大。本研究分类结果与形态聚类结果相一致。

2.6 48 份枸杞种质的群体结构分析

由图 4 可以看出,当 $k=2$ 时, ΔK 值最大,依据 Evanno^[34]提出的 ΔK 值分析方法,48 份供试枸杞种质可划分为 2 个类群。

采用 STRUCTURE HARVESER 在线软件分析后,将 48 份供试枸杞种质分成 2 个不同的群体结构,不同颜色表示不同的类群,分别用 S1(白色)和 S2(灰色)表示(图 5)。

由图 5 可知,S1 类群包括 25 份种质,含有 23 份黑果枸杞、天精 3 号和天精 5 号,占类群总数的

52%。多数种质的 Q 值大于 0.95(除了 18 号种质(中科绿川 1 号)),表明种质来源单一,与其他种质基本无基因交流。18 号种质(中科绿川 1 号)虽隶属宁夏枸杞,但因其含有 40.8%的 S2 遗传背景,因此本研究将其划分在 S2 类群中。

由图 5 还可知,S2 类群包括 23 份种质,含有 18 份宁夏枸杞、1 份中国枸杞和 4 份其他种质,占类群总数的 48%。其中 11 号和 19 号 2 份种质分别含有 39.7%和 46.5%的 S1 遗传背景,而 11 号为三倍体菜用枸杞宁杞菜 1 号,生长势强,发枝量大;19 号为中国枸杞 Lc-01,果实形状与黑果枸杞属植物相近,为圆形果实,适应性强,在全国广泛分布。

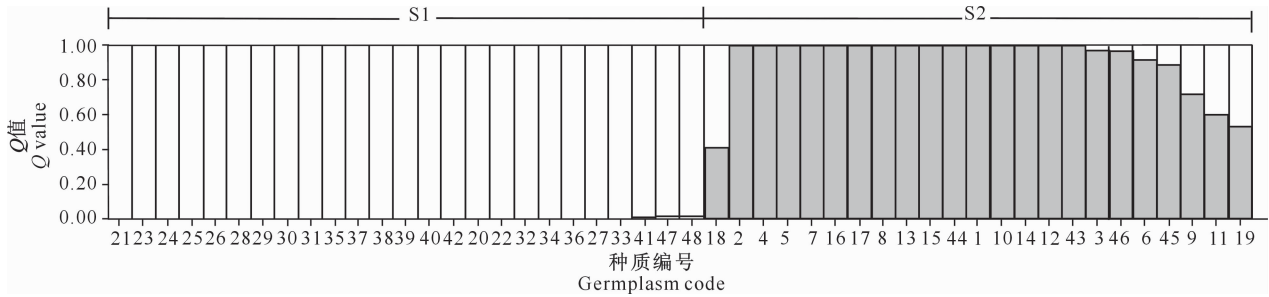


图 5 48 份枸杞种质资源遗传结构
Fig. 5 Genetic structure of 48 *Lycium* germplasms

3 讨 论

本研究利用 Illumina Hiseq 2500 测序平台对黑果枸杞无性系 Lr-01 基因组进行 PE150 测序,获得总数据量为 2G;利用 MISA 软件共检索到 2 494 个 SSR 位点,平均每 5.29 kb 就出现 1 个 SSR 位点,与红果枸杞^[24]及茄科其他植物,如茄子^[35]、辣椒^[36]、马铃薯^[37]和烟草^[38]等植物相比,SSR 位点出现频率较低,这可能与本研究测序数据量大小及检索标准有关^[38]。

本研究中,黑果枸杞基因组中优势重复单元类型为单核苷酸(59.18%)、二核苷酸(27.11%)和三核苷酸(11.75%),而四、五和六核苷酸总计占 1.96%。在重复单元类型中,以 A/T、AC/GT、AT/AT 和 AAC/GTT 出现频率最高,说明黑果枸杞基因组 SSR 序列中富含 A 和 T 碱基。这与红果枸杞、枣等植物中 SSR 基序分布规律一致^[24,39]。

目前,基于高通量测序技术已广泛应用于 SSR 标记开发,而 SSR 标记最广泛应用是种质资源遗传多样性分析^[9,12,40]。本研究从 2 494 个 SSR 位点中设计开发出 150 对 SSR 引物,最终挑选出 10 对多态性高的 SSR 引物应用于 48 份枸杞种质遗传多样性分析,共检测到 186 个等位基因,多态信息含量

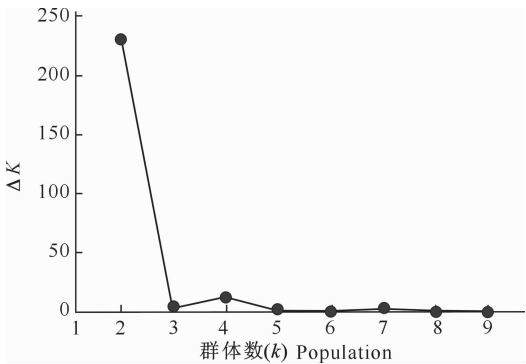


图 4 48 份枸杞种质资源中群体数(k)与 ΔK 关系
Fig. 4 Relationship between k and ΔK of 48 *Lycium* germplasms

(PIC)均大于 0.5,属于高度多态性 SSR 引物^[41]。本研究用筛选出的 10 对 SSR 引物对 48 份种质聚类分析结果与遗传结构分析结果相一致,与基于红果枸杞开发 SSR 标记^[23,26]及 SCoT^[42]和 SRAP 标记^[43]研究结果相一致。说明筛选出的 10 对 SSR 引物质量较高,并且在物种间转移扩增效率较高。

本研究基于高通量测序技术和生物信息分析,开发了黑果枸杞基因组 SSR 标记,统计分析黑果枸杞基因组 SSR 数量、长度、频率等特征,设计开发了一批 SSR 引物,丰富了黑果枸杞分子标记类型。但由于测序数据量小,开发及筛选出具有多态性 SSR 标记较少。因此,今后研究需要加测数据量,筛选出大量具有多态性的 SSR 标记,且建立黑果枸杞 SSR 标记检索数据库,既为黑果枸杞遗传多样性和遗传结构分析提供 SSR 标记支撑,也为黑果枸杞种质资源开发利用提供理论依据,对推动黑果枸杞新品种选育及产业发展具有重要意义。

[参考文献]

[1] 王龙强,米永伟,蒯海明.盐胁迫对枸杞属两种植物幼苗离子吸收和分配的影响[J].草业学报,2011,20(4):129-136.
Wang L Q,Mi Y W,Lin H M,et al.Effect of salt on ion absorption and distribution of two *Lycium* seedlings [J]. Act Prataculturae Sinica,2011,20(4):129-136.

- [2] 许盼盼. 枸杞抗盐种质资源筛选与抗盐基因的克隆鉴定 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2018.
Xu P P. Screening of *Lycium* salt-resistant germplasm resources and identification of salt-resistant genes [D]. Yangling, Shaanxi:Northwest A&F University,2018.
- [3] 王方琳,王 祺,李爱德,等. 荒漠区药用植物黑果枸杞研究现状综述 [J]. 中国水土保持,2019(5):57-60.
Wang F L,Wang Q,Li A D,et al. Review on the research status of *Lycium ruthenicum* Murr,a medicinal plant in desert area [J]. Soil and Water Conservation in China,2019(5):57-60.
- [4] Zheng J,Ding C,Wang L,et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau [J]. Food Chemistry,2011,126(3):859-865.
- [5] Wu T,Li H,Wang F,et al. Characterization of polyphenols from *Lycium ruthenicum* fruit by UPLC-Q-TOF/MS(E) and their antioxidant activity in caco-2 cells [J]. J Agric Food Chem, 2016,64(11):2280-2288.
- [6] Jin H,Liu Y,Yang F,et al. Characterization of anthocyanins in wild *Lycium ruthenicum* Murray by HPLC-DAD/QTOF-MS/MS [J]. Analytical Methods,2015,7(12):4947-4956.
- [7] Xiao X,Ren W,Zhang N,et al. Comparative study of the chemical constituents and bioactivities of the extracts from fruits, leaves and root barks of *Lycium barbarum* [J]. Molecules, 2019,24(8):1585.
- [8] Tang P,Giusti M M. Black goji as a potential source of natural color in a wide pH range [J]. Food Chem,2018,269:419-426.
- [9] Li L,Fang Z,Zhou J,et al. An accurate and efficient method for large-scale SSR genotyping and applications [J]. Nucleic Acids Res,2017,45(10):e88.
- [10] 燕丽萍,吴德军,毛秀红,等. 基于 SSR 荧光标记的白蜡核心种质构建 [J]. 中南林业科技大学学报,2019,39(7):1-9.
Yan L P,Wu D J,Mao X H,et al. Construction of core collection of *Fraxinus* based on SSR molecular markers [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2019, 39(7):1-9.
- [11] 张旻桓,张汉卿,蔡秀兰,等. 山茶属种质资源亲缘关系的 SSR 分析 [J]. 经济林究,2018,36(4):130-134.
Zhang M H,Zhang H Q,Cai X L,et al. SSR analysis of genetic relationship between *Camellia* germplasm resources [J]. Nonwood Forest Research,2018,36(4):130-134.
- [12] Ziya Motalebipour E,Kafkas S,Khodaieaminjan M,et al. Genome survey of pistachio (*Pistacia vera* L.) by next generation sequencing;development of novel SSR markers and genetic diversity in *Pistacia* species [J]. BMC Genomics,2016, 17(1):998.
- [13] Daware A,Das S,Srivastava R,et al. An efficient strategy combining SSR markers-and advanced QTL-seq-driven QTL mapping unravels candidate genes regulating grain weight in rice [J]. Front Plant Sci,2016,7:1535.
- [14] Choi J K,Sa K J,Park D H,et al. Construction of genetic linkage map and identification of QTLs related to agronomic traits in DH population of maize (*Zea mays* L.) using SSR markers [J]. Genes & Genomics,2019,41(6):667-678.
- [15] Hu J,Li J,Wu P,et al. Development of SNP,KASP,and SSR markers by BSR-Seq technology for saturation of genetic linkage map and efficient detection of wheat powdery mildew resistance gene *pm61* [J]. International Journal of Molecular Sciences,2019,20:750.
- [16] Edwards D,Batley J. Plant genome sequencing:applications for crop improvement [J]. Plant Biotechnology Journal,2010, 8(1):31-37.
- [17] Avvaru A K,Sharma D,Verma A,et al. MSDB;a comprehensive,annotated database of microsatellites [J]. Nucleic Acids Res,2020,48(D1):D155-D159.
- [18] Kalyana Babu B,Mary Rani K L,Sarika S,et al. Development and validation of whole genome-wide and genic microsatellite markers in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) :first microsatellite database (OpSatdb) [J]. Sci Rep,2019,9:1899.
- [19] Yu J,Dossa K,Wang L,et al. PMDBase;a database for studying microsatellite DNA and marker development in plants [J]. Nucleic Acids Res,2017,45(D1):D1046-D1053.
- [20] 尹 跃,赵建华,安 巍,等. 利用 SSR 标记构建枸杞品种分子身份证 [J]. 生物技术通报,2018,34(9):195-201.
Yin Y,Zhao J H,An W,et al. Establishment of molecular identity for wolfberry cultivars based on SSR markers [J]. Biotechnology Bulletin,2018,34(9):195-201.
- [21] Chen C,Xu M,Wang C,et al. Characterization of the *Lycium barbarum* fruit transcriptome and development of EST-SSR markers [J]. PLoS One,2017,12(11):e0187738.
- [22] 饶书培,张东智,陈金焕. 红果枸杞 EST-SSR 分子标记开发及应用 [J]. 分子植物育种,2018,16(4):1208-1213.
Rao S P,Zhang D Z,Chen J H,et al. Development and application of EST-SSR molecular marker for *Lycium bararum* L. [J]. Molecular Plant Breeding,2018,16(4):1208-1213.
- [23] 尹 跃,安 巍,赵建华,等. 枸杞品种 SSR 荧光指纹图谱构建及遗传关系分析 [J]. 西北林学院学报,2017,32(1):137-141.
Yin Y,An W,Zhao J H,et al. Fingerprinting and genetic diversity analysis of wolfberry cultivars using fluorescence-labeled SSR markers [J]. Journal of Northwest Forestry University,2017,32(1):137-141.
- [24] 党少飞,王占林,张得芳,等. 枸杞基因组微卫星特征分析 [J]. 西北林学院学报,2016,31(1):97-102.
Dang S F,Wang Z L,Zhang D F,et al. Characteristic analysis of microsatellites of *Lycium bararum* [J]. Journal of Northwest Forestry University,2016,31(1):97-102.
- [25] 李 重,胡伟明,杨天顺,等. 用于枸杞品种鉴定的多重 EST-SSR 标记的建立 [J]. 分子植物育种,2017,15(10):4066-4070.
Li Z,Hu W M,Yang T S,et al. Establishment of multiple EST-SSR markers for identification of Goji cultivars [J]. Molecular Plant Breeding,2017,15(10):4066-4070.
- [26] 樊云芳,尹 跃,安 巍,等. TP-M13-SSR 技术在枸杞遗传多

- 样性研究中的应用 [J]. 西北农业学报,2017,26(6):890-896.
- Fan Y F,Yin Y,An W,et al. TP-M13-SSR technique and its application in analysis of genetic diversity of wolfberry germplasm resources [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2017,26(6):890-896.
- [27] Li R,Zhu H,Ruan J,et al. De novo assembly of human genomes with massively parallel short read sequencing [J]. Genome Res,2010,20(2):265-272.
- [28] You F M,Huo N,Gu Y Q,et al. BatchPrimer3:a high throughput web application for PCR and sequencing primer design [J]. BMC Bioinformatics,2008,9:253.
- [29] 樊文强,盖红梅,孙 鑫,等. SSR 数据格式转换软件 DataFormater [J]. 分子植物育种,2016,14(1):265-270.
- Fan W Q,Gai H M,Sun X,et al. DataFormater,a software for SSR data formatting to development population genetics analysis [J]. Molecular Plant Breeding,2016,14(1):265-270.
- [30] Liu K,Muse S V. Power marker:an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. Bioinformatics,2005,21(9):2128-2129.
- [31] Rohlf F. NTSYSpc numerical taxonomy system ver. 2. 2 [M]. NY:Exeter Publishing Setauket,2005.
- [32] Pritchard J K,Stephens M,Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics,2000,155(2):945-959.
- [33] Earl D A. STRUCTURE HARVESTER:a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method [J]. Conservation Genetics Resources,2012,4(2):359-361.
- [34] 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.
- [35] Portis E,Lanteri S,Barchi L,et al. Comprehensive characterization of simple sequence repeats in eggplant (*Solanum melongena* L.) genome and construction of a web resource [J]. Front Plant Sci,2018,9:401.
- [36] Cheng J,Zhao Z,Li B,et al. A comprehensive characterization of simple sequence repeats in pepper genomes provides valuable resources for marker development in *Capsicum* [J]. Sci Rep,2016,6:018-919.
- [37] 肖桂林,徐竹清,曹红菊,等. 基于全基因组序列的马铃薯 SSR 标记开发与连锁图谱加密 [J]. 园艺学报,2018,45(8):1551-1562.
- Xiao G L,Xu Z Q,Cao H J,et al. Development of SSR markers based on potato genome sequence and construction of higher-density linkage map [J]. Acta Horticulturae Sinica,2018,45(8):1551-1562.
- [38] Wang X,Yang S,Chen Y,et al. Comparative genome-wide characterization leading to simple sequence repeat marker development for *Nicotiana* [J]. BMC Genomics,2018,19(1):500.
- [39] Fu P C,Zhang Y Z,Ya H Y,et al. Characterization of SSR genomic abundance and identification of SSR markers for population genetics in Chinese jujube (*Ziziphus jujuba* Mill.) [J]. Peer J,2016,4:e1735.
- [40] 叶 鹏,李显煌,唐军荣,等. 云南金花茶转录组 SSR 的分布及其序列特征 [J]. 中南林业科技大学学报,2019,39(9):86-91.
- Ye P,Li X H,Tang J R,et al. Distribution and characteristics of SSR in transcriptome of *Camellia fascicularis* [J]. Journal of Central South University of Forestry & Technology,2019,39(9):86-91.
- [41] Botstein D,White R,Skolnick M H,et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics,1980,32(3):314-331.
- [42] 马利奋,尹 跃,赵建华,等. 17 个枸杞品种的 SCoT 遗传多样性 [J]. 浙江农业学报,2018,30(10):1665-1670.
- Ma L F,Yin Y,Zhao J H,et al. Analysis on genetic diversity of 17 Goji(wolfberry) cultivars by SCoT markers [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis,2018,30(10):1665-1670.
- [43] 安 巍,王亚军,尹 跃,等. 枸杞种质资源的 SRAP 分析 [J]. 浙江农业学报,2013,25(6):1234-1237.
- An W,Wang Y J,Yin Y,et al. SRAP analysis of wolfberry germplasm [J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis,2013,25(6):1234-1237.