

枸杞属(茄科)新类群杂交起源初探

吴莉莉^{1*}, 韦若勋^{2*}, 杨庆文^{3**}, 张志耘^{2**}

(1. 黔南民族师范学院 生命科学系, 贵州 都匀 558000; 2. 中国科学院 植物研究所 系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093; 3. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 为探讨枸杞属新类群的起源及国产枸杞属植物的亲缘关系, 该文使用核基因颗粒性结合淀粉合成酶基因(GBSSI)片段, 对国产7个类群的枸杞属植物进行了分子系统学研究。结果表明: 中国分布的枸杞属植物属于旧世界类群并分为4个强烈支持的分支, 而新类群的形成与杂交密切相关。此外, 初步分析还显示宁夏枸杞有较高的遗传分化。

关键词: 枸杞属; 新分类群; 杂交; 分子系统学; GBSSI 基因

中图分类号: Q949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2011)03-0304-08

A preliminary study on the hybrid origin of new taxa in *Lycium* (Solanaceae)

WU Li-Li^{1*}, WEI Ruo-Xun^{2*}, YANG Qing-Wen^{3**}, ZHANG Zhi-Yun^{2**}

(1. Department of Biology, Qianan Normal College for Nationalities, Duyun 558000, China; 2. State Key Laboratory of Systematic & Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China; 3. Laboratory of Wild Rice Research, Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The wolfberry is an important medicinal plant. Clarifying the origin of new taxa and the phylogenetic relationship among Chinese *Lycium* species (Solanaceae) will provide a scientific basis to guide research on the germplasm and variety breeding. In the present paper, we reported the results of a preliminary phylogenetic study of the seven Chinese taxa in *Lycium* using the DNA sequence data from the nuclear granule-bound starch synthase I gene (GBSSI). Maximum-likelihood(ML) analysis of the data showed that species of Chinese *Lycium* belonged to a monophyletic Old World clade and are placed in four strongly supported subclades. The phylogenetic results suggested that hybridization may play an important role in the origin of new taxa in *Lycium*. In addition, our result also indicated that *L. barbarum* is highly divergent among the seven taxa of *Lycium*.

Key words: *Lycium*; new taxa; hybrid; molecular systematics; GBSSI

枸杞子是我国名贵中药之一, 既可用于治疗多种疾病, 又可作为滋补品直接使用(王亚军等, 2008)。枸杞子系茄科(Solanaceae)枸杞族(Lycieae)枸杞属(*Lycium* L.)枸杞(*L. chinense* Mill.)和宁夏枸杞(*L. barbarum* L.)2个种的干燥成熟果实,

这2个种在我国栽培历史悠久, 并已在全国广泛栽培(匡可任等, 1978)。

枸杞属植物共80余种, 主要分布在南美洲、北美洲西南部和非洲, 少数种分布于欧亚大陆温带(Miller, 2002), 我国仅7种, 主要分布于我国北部

收稿日期: 2010-08-19 修回日期: 2010-12-26

基金项目: 国家农业部财政专项(农业野生植物保护与可持续利用)[Supported by Special Fund for Protection and Sustainable Utilization of Agricultural Wild Plants, State Ministry of Agriculture]

*第一作者: 吴莉莉(1977-), 女, 贵州福泉市人, 讲师, 从事系统植物学研究, (E-mail) wulili7720@yahoo.com.cn; 韦若勋, (E-mail) weiruo@ibcas.ac.cn.

**通讯作者: 杨庆文, 博士, 研究员, 主要研究方向为保护生物学, (E-mail) qwyang@mail.caas.net.cn; 张志耘, (E-mail) zhangzy@ibcas.ac.cn.

(匡可任等, 1978)。最近在我国枸杞子的主产区宁夏中宁地区发现了 3 个枸杞属植物新类群: 清水河枸杞 (*Lycium qingshuiheense* X. L. Jiang et J. N. Li) (李吉宁等, 待发表)、密枝枸杞 (*L. barbarum* L. var. *implicatum* T. Y. Chen et X. L. Jiang) 和小叶黄果枸杞 (*L. parvifolium* T. Y. Chen et X. L. Jiang) (陈天云等, 待发表)。这 3 个新类群的发现为枸杞资源的开发和品种改良提供了种质资源。尽管前人曾对枸杞属植物的系统发育进行了多方面的研究 (Fukuda 等, 2001; Miller, 2002; Levin 等, 2005, 2007; Olmstead 等, 2008; Miller 等, 2009)。但是, 中国分布的枸杞属植物系统关系仍需深入地研究, 特别是新发现的 3 个类群与枸杞属其它类群的亲缘关系。为了对重要药用植物枸杞的种质资源开发利用和品种改良提供科学依据, 很有必要对这 3 个新类群的起源及其与国产枸杞属其它类群的亲缘关系有较清楚的认识。核基因颗粒性结合淀粉合成酶基因 (GBSSI) 片段已很好地应用于茄科枸杞族和枸杞属的分子系统学研究 (Levin 等, 2005, 2007; Yuan 等, 2006)。因此, 结合作者和前人对茄科其它 43 个类群的 GBSSI 序列以及最大似然法系统发育重建的研究结果, 本研究选取了 GBSSI 基因进行系统发育重建, 以更好地揭示包括 3 个新类群在内的国产枸杞属的亲缘关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料

从野外采集 7 份样品, 代表枸杞属 7 个不同的类群: 枸杞、宁夏枸杞、黑果枸杞 (*L. ruthenicum* Murr.)、新疆枸杞 (*L. dasystemum* Pojark.)、清水河枸杞、密枝枸杞和小叶黄果枸杞 (图 1, 表 1)。从 GenBank 中选取了茄科其它 43 个类群的 GBSSI 序列, 这些类群包括了大多数旧世界分布的枸杞属植物 (23 个类群) 和部分美洲分布的类群 (15 个类群), 以及 2 种枸杞族的其它成员 *Phrodus microphyllus* (Miers) Miers, *Grabowskia boerhaviaefolia* (L. fil.) Schltdl. 和 3 个外类群 *Nolana werdermannii* I. M. Johnst., *Nolana coelestis* (Lindl.) Miers ex Dunal 和 *Atropa belladonna* L.。

由于清水河枸杞、密枝枸杞和小叶黄果枸杞 3 个新类群所在的地理分布区正好位于宁夏枸杞和黑果枸杞分布的重叠区, 因此特地从 3 个新类群所分

布的宁夏地区采集实验样品。此外, 还将此前作者研究所用的 2 条宁夏枸杞的 GBSSI 序列及 GenBank 中宁夏枸杞和枸杞各 1 条 GBSSI 基因片段 (表 1) 用于本研究的分子系统学分析。

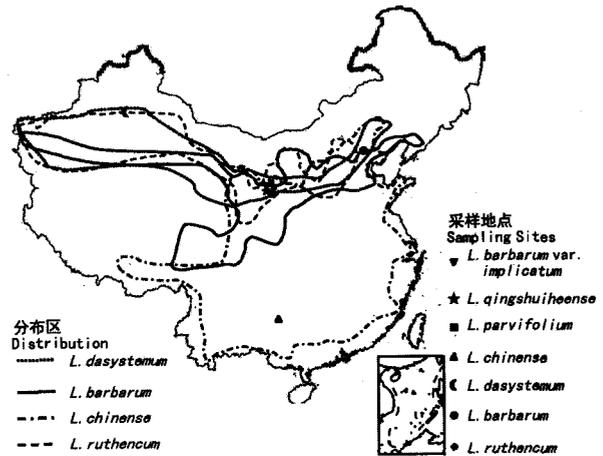


图 1 中国枸杞属 4 个种的地理分布及本研究样品的取样地点

Fig. 1 Distribution of four species of Chinese *Lycium* and the collecting places of taxa examined

物种分布资料来自中国数字植物标本馆
Data from the Chinese Virtual Herbarium

(<http://www.cvh.org.cn/>)

1.2 实验方法

1.2.1 植物基因组总 DNA 提取 使用植物总 DNA 提取试剂盒 (天根生化公司, 北京) 从硅胶干燥的叶片中提取 DNA, 具体操作按产品使用说明执行。

1.2.2 PCR 扩增、纯化 扩增了 GBSSI 基因第三外显子到第八外显子的区域, 引物为 Levin 等 (2005) 使用的 GBSSB (CACTGCTATAAACGTGGGGT-TGA) 和 Crmod (GGCATAGTATGGGCTCAGTAA)。PCR 扩增采用 25 μ L 反应体系, 其中包括 10 \times exTaq Buffer 2.5 μ L, 200 μ mol/L dNTP, 正反向引物均为 0.3 μ mol/L, 0.75 U 的 exTaq (TaKaRa), 模板 DNA 为 10~50 ng。PCR 反应在 Tpersonal 热循环仪 (Biometra, Germany) 进行, 具体程序如下: 94 $^{\circ}$ C 变性 2 min, 接 10 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 35 s (每个循环退火温度下降 0.4 $^{\circ}$ C), 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 45 s, 再接 25 个循环的 94 $^{\circ}$ C 变性 35 s, 52 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min 45 s, 循环完成后再接 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物使用 1.5% 琼脂糖凝胶回收, 回收片段经 DNA 纯化试剂盒 (天根生化公司, 北京) 纯化后用于克隆。

1.2.3 克隆 由于大多数枸杞属植物为自交不亲和

植物,且该属植物杂交现象较为普遍(Miller等, 2008),因此,核基因出现杂合子的频率较高。为筛选 PCR 产物中不同序列类型,我们没有将纯化的 PCR 产物直接用于测序,而是采取克隆测序的策略

以鉴定和获得不同的序列类型。本研究使用 pGEM-T Easy 载体系统(Promega corporation, Madison, WI, USA)对 PCR 纯化产物进行克隆测序,具体操作根据产品使用说明进行。

表 1 本研究中使用的类群和序列

Table 1 Taxa and sources of sequences included in the study

序列名称 Name of sequence	类群 Taxon	来源 Origin	凭证标本 Voucher	长度 Length	GC 含量 GC content	序列号 Accession No.
<i>L. barbarum_W</i>	<i>L. barbarum</i>	宁夏	张志耘(Z. Y. Zhang)2009-01	971	0.386	HQ615058**
<i>L. barbarum_C12*</i>		北京		980	0.385	DQ069269
<i>L. barbarum_C14*</i>		北京		981	0.384	DQ069268
<i>L. barbarum</i> var. <i>implicatum_A</i>	<i>L. barbarum</i> var. <i>implicatum</i>	宁夏	蒋旭亮、李清善(X. L. Jiang, Q. S. Li)2010-03	971	0.386	HQ615059**
<i>L. barbarum</i> var. <i>implicatum_B</i>		宁夏		980	0.384	HQ615065**
<i>L. parvifolium_A</i>	<i>L. parvifolium</i>	宁夏	蒋旭亮、李清善(X. L. Jiang, Q. S. Li)2010-02	980	0.385	HQ615061**
<i>L. parvifolium_B</i>		宁夏		983	0.381	HQ615067**
<i>L. qingshuiheense_A</i>	<i>L. qingshuiheense</i>	宁夏	蒋旭亮、李清善(X. L. Jiang, Q. S. Li)2010-01	980	0.384	HQ615060**
<i>L. qingshuiheense_B</i>		宁夏		983	0.380	HQ615066**
<i>L. ruthencum_W</i>	<i>L. ruthencum</i>	宁夏	张志耘(Z. Y. Zhang)2009-02	983	0.381	HQ615064**
<i>L. chinense_L</i>	<i>L. chinense</i>	贵州	韦若勋(R. X. Wei)2009-01	981	0.382	EF137767
<i>L. chinense_W</i>		贵州		981	0.382	HQ615062**
<i>L. dasystemum_W</i>	<i>L. dasystemum</i>	新疆	周桂玲(G. L. Zhou)0902	981	0.382	HQ615063**
<i>L. intricatum</i>	<i>L. intricatum</i>	—		986	0.384	EF137778
<i>L. decumbens</i>	<i>L. decumbens</i>	—		981	0.383	EF137770
<i>L. pumilum</i>	<i>L. pumilum</i>	—		981	0.383	EF137786
<i>L. depressum</i>	<i>L. depressum</i>	—		982	0.383	EF137771
<i>L. mascarenense</i>	<i>L. mascarenense</i>	—		981	0.380	EF137780
<i>L. shawii</i>	<i>L. shawii</i>	—		981	0.385	EF137791
<i>L. schweinfurthii</i>	<i>L. schweinfurthii</i>	—		981	0.383	EF137790
<i>L. villosum</i>	<i>L. villosum</i>	—		981	0.385	DQ124548
<i>L. hirsutum</i>	<i>L. hirsutum</i>	—		981	0.384	EF137777
<i>L. boscii folium</i>	<i>L. boscii folium</i>	—		981	0.384	EF137759
<i>L. eenii</i>	<i>L. eenii</i>	—		981	0.384	EF137772
<i>L. acutifolium</i>	<i>L. acutifolium</i>	—		972	0.385	EF137753
<i>L. pili folium</i>	<i>L. pili folium</i>	—		981	0.382	EF137785
<i>L. oxycarpum</i>	<i>L. oxycarpum</i>	—		981	0.380	EF137784
<i>L. cinereum</i>	<i>L. cinereum</i>	—		981	0.383	EF137769
<i>L. schizocalyx</i>	<i>L. schizocalyx</i>	—		981	0.382	EF137789
<i>L. grandicalyx</i>	<i>L. grandicalyx</i>	—		981	0.383	EF137776
<i>L. ferocissimum</i>	<i>L. ferocissimum</i>	—		981	0.384	GQ301195
<i>L. afrum</i>	<i>L. afrum</i>	—		981	0.383	EF137754
<i>L. amoenum</i>	<i>L. amoenum</i>	—		981	0.383	EF137755
<i>L. strandveldense</i>	<i>L. strandveldense</i>	—		980	0.387	EF137793
<i>L. tenue</i>	<i>L. tenue</i>	—		981	0.385	EF137794
<i>L. gariepense</i>	<i>L. gariepense</i>	—		981	0.386	EF137775
<i>L. ameghinoi</i>	<i>L. ameghinoi</i>	—		983	0.386	DQ124501
<i>L. ciliatum</i>	<i>L. ciliatum</i>	—		984	0.387	EF137768
<i>L. chilense</i>	<i>L. chilense</i>	—		984	0.385	EF137766
<i>L. nodosum</i>	<i>L. nodosum</i>	—		983	0.386	EF137783
<i>L. vimineum</i>	<i>L. vimineum</i>	—		983	0.385	EF137796
<i>L. californicum</i>	<i>L. californicum</i>	—		983	0.390	DQ124509
<i>L. berlandieri</i>	<i>L. berlandieri</i>	—		982	0.380	DQ124506
<i>L. exsertum</i>	<i>L. exsertum</i>	—		981	0.384	DQ124521
<i>L. andersonii</i>	<i>L. andersonii</i>	—		981	0.385	DQ124503

续表 1

序列名称 Name of sequence	类群 Taxon	来源 Origin	凭证标本 Voucher	长度 Length	GC 含量 GC content	序列号 Accession No.
<i>L. elongatum</i>	<i>L. elongatum</i>	—		981	0.382	DQ124520
<i>L. minimum</i>	<i>L. minimum</i>	—		981	0.389	EF137781
<i>L. cestroides</i>	<i>L. cestroides</i>	—		983	0.386	DQ124513
<i>Phrodus microphyllus</i>	<i>P. microphyllus</i>	—		983	0.385	EF137801
<i>L. cooperi</i>	<i>L. cooperi</i>	—		983	0.386	DQ124518
<i>L. macrodon</i>	<i>L. macrodon</i>	—		983	0.387	DQ124530
<i>L. pallidum</i>	<i>L. pallidum</i>	—		983	0.387	DQ124534
<i>Grabowskia boerhaviaefolia</i>	<i>G. boerhaviaefolia</i>	—		983	0.386	EF137750
<i>Nolana werdermannii</i>	<i>N. werdermannii</i>	—		985	0.393	EF137799
<i>N. coelestis</i>	<i>N. coelestis</i>	—		979	0.391	EF137800
<i>Atropa belladonna</i> *	<i>A. belladonna</i>	—		982	0.393	DQ069253

注: 带“**”的序列为本研究中新得到的序列; 带“*”的序列来自本文作者此前的研究(Yuan 等, 2006)。

Note: “**”indicates newly generated sequences in this study; “*”indicates the sequence from Yuan *et al.*, 2006.

1.2.4 测序 目标序列使用 ABI 3730 自动测序仪 (Applied Biosystems Inc, Foster city, CA, USA) 测序, 每份 PCR 样品测序 5~8 个克隆, 特别是对 3 个枸杞属的新类群(清水河枸杞, 密枝枸杞和小叶黄果枸杞), 我们均先测序 6 个克隆(此时无法筛选到不同拷贝的概率明显低于 5%), 然后根据筛选到的序列类型再增加样品测序。测序时先使用通用引物 T7 进行测序, 由于片段长度在 950 bp 左右, 单向测序不一定得到测序质量很好的序列, 因此, 对单向测序质量不好的片段再通过引物 SP6 进行反向测序。随后, 根据此前测序的结果来确定不同的序列类型, 并对每种序列类型进行反向测序, 从而保证每种序列类型其序列的可靠性和准确性。

1.2.5 序列编辑和比对 序列原始峰图使用 Chromas 软件 (Technelysium Pty Ltd, Brisbane, QLD, Australia) 查看和编辑, 然后使用 Vector VTI 9.0 软件包 (Informax Inc, North Bethesda, MD, USA) 中的 ContigExpress 程序拼接序列。由于采用克隆测序, 我们先用 Bellerophon 程序 (Huber 等, 2004) 来鉴定 PCR 重组序列并舍弃之。对于在这些克隆序列中存在的单突变位点, 我们认为是 PCR 错配序列或等位基因并将之归于同一种序列类型。最后, 把来自同一样品相同序列类型的一致序列用于后续分析。所有序列经 muscle3.6 (Edgar, 2004) 比对后在 Bioedit 7.0 中 (Hall, 1999) 再次进行手工比对和编辑。

1.2.6 系统发育分析 对上述序列的系统发育重建, 我们使用 PhymL 2.44 (Guindon & Gascuel, 2003) 进行了最大似然法 (Maximum Likelihood, ML) 分析。在 ML 分析前, 先用 jMODELTEST

0.1.1 (Posada, 2008) 检测合适的模型。根据模型检测结果, 选用 HKY+G 模型执行 ML 分析, 并通过自展检验 (bootstrap) 重复抽样 1 000 次以推测系统发育树的可靠性。

2 结果与分析

所取的 7 份材料测序后获得 43 条 GBSSI 序列, 通过序列的比较分析, 确定其中 4 份材料(枸杞、宁夏枸杞、黑果枸杞和新疆枸杞)均只有一种序列类型, 但其它 3 份材料(即 3 个新分类群: 清水河枸杞、密枝枸杞和小叶黄果枸杞)则存在两种序列类型。这样, 共获得了 10 种不同的序列类型。本研究获得的序列连同过去研究所获得的 GBSSI 序列共计 56 条, 分别来自 50 个不同的类群。这些序列的长度从 971~986 bp 不等, 比对长度为 998 bp, GC 含量为 38.0%~39.3%, 平均为 38.5% (表 2)。

基于 HKY+G 模型的最大似然法 (ML) 分析, 我们用 GBSSI 基因重建了枸杞属植物的系统发育关系 (图 2)。根据系统发育树, 枸杞属植物并非一个单系类群, 而是与 *Phrodus* 和 *Grabowskia* 形成一个支持率很高的单系 (bootstrap = 100%), 即枸杞族, 其姐妹类群是 *Nolana*。中国分布的枸杞属植物与其它旧世界分布的枸杞属植物聚为一个单系, 其支持率为 87%, 说明旧世界枸杞属植物是单次起源的, 但旧世界分布的各类群形成多系, 这与前人的分子系统学研究结果相一致 (Levin 等, 2007)。中国分布的枸杞属植物并没有形成一个单系而是分为四支, 即: 枸杞的 GBSSI 序列单独聚为一支, 获得很高的支持 (100%); 宁夏枸杞的其中一条 GBSSI 序

列与新疆枸杞的聚为一支,支持率为 88%,该分支与枸杞分支聚在一起,但支持率仅为 73%;宁夏枸杞的其它序列类型与密枝枸杞的两种类型及清水河枸杞和小叶黄果枸杞各一个拷贝,形成支持率(87%)很高的一支,此分支再与枸杞、新疆枸杞及宁夏枸杞所在的分支形成姐妹类群,但其支持率较低(60%);小叶黄果枸杞和清水河枸杞的另一个拷贝与黑果枸杞聚为一支,支持率为 97%。我们将依据目前 GBSSI 片段所构建的系统发育关系来分析中

国分布的枸杞属类群之间的亲缘关系。

2.1 杂交与枸杞属新类群产生的相关性

根据中国分布的枸杞属植物序列的相似性(表 2),3 个新类群(清水河枸杞、小叶黄果枸杞和密枝枸杞)的 GBSSI 基因均具有 2 种拷贝。系统发育分析显示,来自每个类群的 2 种拷贝并没有聚为单独的一支,而是分别与其它类群的序列聚在一起,说明这 3 个新类群的 2 种拷贝之间的亲缘关系较远,它们应来自不同的亲本。

表 2 国产枸杞属植物 GBSSI 基因的序列相似度

Table 2 Pairwise sequence identity of GBSSI gene among the *Lycium* species from China

序列 Asequence*	<i>barbarum</i> _W	<i>implicatum</i> _A	<i>parvifolium</i> _A	<i>barbarum</i> _C12	<i>implicatum</i> _B	<i>qingshuiheense</i> _A	<i>chinense</i> _L	<i>chinense</i> _W	<i>dasystemum</i> _W	<i>barbarum</i> _C14	<i>qingshuiheense</i> _B	<i>ruthencum</i> _W	<i>parvifolium</i> _B
<i>barbarum</i> _W	1	0.998	0.985	0.985	0.986	0.985	0.977	0.979	0.981	0.979	0.973	0.974	0.975
<i>implicatum</i> _A	0.998	1	0.986	0.986	0.987	0.986	0.978	0.980	0.982	0.980	0.974	0.975	0.976
<i>parvifolium</i> _A	0.985	0.986	1	1.000	0.998	0.997	0.987	0.989	0.991	0.989	0.983	0.984	0.985
<i>barbarum</i> _C12	0.985	0.986	1.000	1	0.998	0.997	0.987	0.989	0.991	0.989	0.983	0.984	0.985
<i>implicatum</i> _B	0.986	0.987	0.998	0.998	1	0.998	0.988	0.99	0.992	0.990	0.984	0.985	0.986
<i>qingshuiheense</i> _A	0.985	0.986	0.997	0.997	0.998	1	0.987	0.989	0.991	0.989	0.985	0.986	0.985
<i>chinense</i> _L	0.977	0.978	0.987	0.987	0.988	0.987	1	0.997	0.991	0.989	0.981	0.982	0.983
<i>chinense</i> _W	0.979	0.980	0.989	0.989	0.990	0.989	0.997	1	0.993	0.991	0.983	0.984	0.985
<i>dasystemum</i> _W	0.981	0.982	0.991	0.991	0.992	0.991	0.991	0.993	1	0.997	0.985	0.986	0.987
<i>barbarum</i> _C14	0.979	0.980	0.989	0.989	0.990	0.989	0.989	0.991	0.997	1	0.983	0.984	0.985
<i>qingshuiheense</i> _B	0.973	0.974	0.983	0.983	0.984	0.985	0.981	0.983	0.985	0.983	1	0.998	0.997
<i>ruthencum</i> _W	0.974	0.975	0.984	0.984	0.985	0.986	0.982	0.984	0.986	0.984	0.998	1	0.998
<i>parvifolium</i> _B	0.975	0.976	0.985	0.985	0.986	0.985	0.983	0.985	0.987	0.985	0.997	0.998	1

注:由于表中序列均来自于我国分布的枸杞属植物,序列名称上仅显示了种名或变种名。

Note: Because all sequences are from the genus *Lycium*, only species and variety names are shown in the table.

分子系统学结果表明,清水河枸杞有一个拷贝位于宁夏枸杞所在的分支上,另一个拷贝则与黑果枸杞聚为一支(支持率为 78%)。在形态性状上,清水河枸杞与黑果枸杞接近,但前者枝条直伸,无“之”字形弯曲,花冠筒与花冠裂片近等长,花冠筒内以及雄蕊无毛或仅被稀疏短柔毛;浆果深红褐色,扁圆球形而不同于后者(李吉宁,待发表;匡可任等,1978)。从地理分布看,黑果枸杞分布在我国陕西北部、宁夏、甘肃、青海、新疆和西藏,宁夏枸杞分布在我国河北北部、内蒙古、山西北部、陕西北部、甘肃、宁夏、青海和新疆(匡可任等,1978),这两者的地理分布区高度重叠。我们的调查显示,清水河枸杞正好分布在黑果枸杞和宁夏枸杞分布的重叠区上(图 1)。综合这些证据,揭示了清水河枸杞的杂交起源,其一个亲本来自宁夏枸杞,另一个亲本则来自黑果枸杞,也即清水河枸杞是宁夏枸杞和黑果枸杞的杂交后代。

相似地,小叶黄果枸杞有一个拷贝与宁夏枸杞的其中一条序列聚为支持率很高的一支(100%),另

一个拷贝则位于黑果枸杞所在分支上。在形态性状上,小叶黄果枸杞也与黑果枸杞相似,不同之处在于前者的枝条上每节几乎没有裸露棘刺,后者枝条上每节具裸露棘刺;小叶黄果枸杞与宁夏枸杞的区别是前者的叶片较小,常为条形或条状倒披针形,长 1~2.5 cm,宽 1.5~2 mm,而后的叶片较大,常为披针形或长椭圆状披针形,长 2~4 mm 或更长,宽 4~6 mm(陈天云等,待发表;匡可任等,1978)。由此可见,小叶黄果枸杞的形态介于黑果枸杞和宁夏枸杞之间。如上所述,黑果枸杞和宁夏枸杞的地理分布区重叠,小叶黄果枸杞的地理分布区正处于黑果枸杞和宁夏枸杞的重叠地理区域(图 1)。因此,我们推测小叶黄果枸杞也是宁夏枸杞和黑果枸杞的杂交后代。

尽管清水河枸杞和小叶黄果枸杞均为宁夏枸杞和黑果枸杞的杂交后代,但从本研究的分子证据看,它们的序列并没有聚在一起而是分别位于两大分支的不同位置。表明这是两次独立的杂交事件,其亲

本分别来自不同的黑果枸杞和宁夏枸杞。为进一步了解这 2 种新类群的起源,今后使用不同遗传来源的分子标记(双亲遗传的核基因和母系遗传的叶绿体

基因)进行谱系生物地理学研究将是非常有必要的。关于密枝枸杞,它的 2 种拷贝均位于宁夏枸杞所在的分支上,但分别位于该分支不同位置,联系到

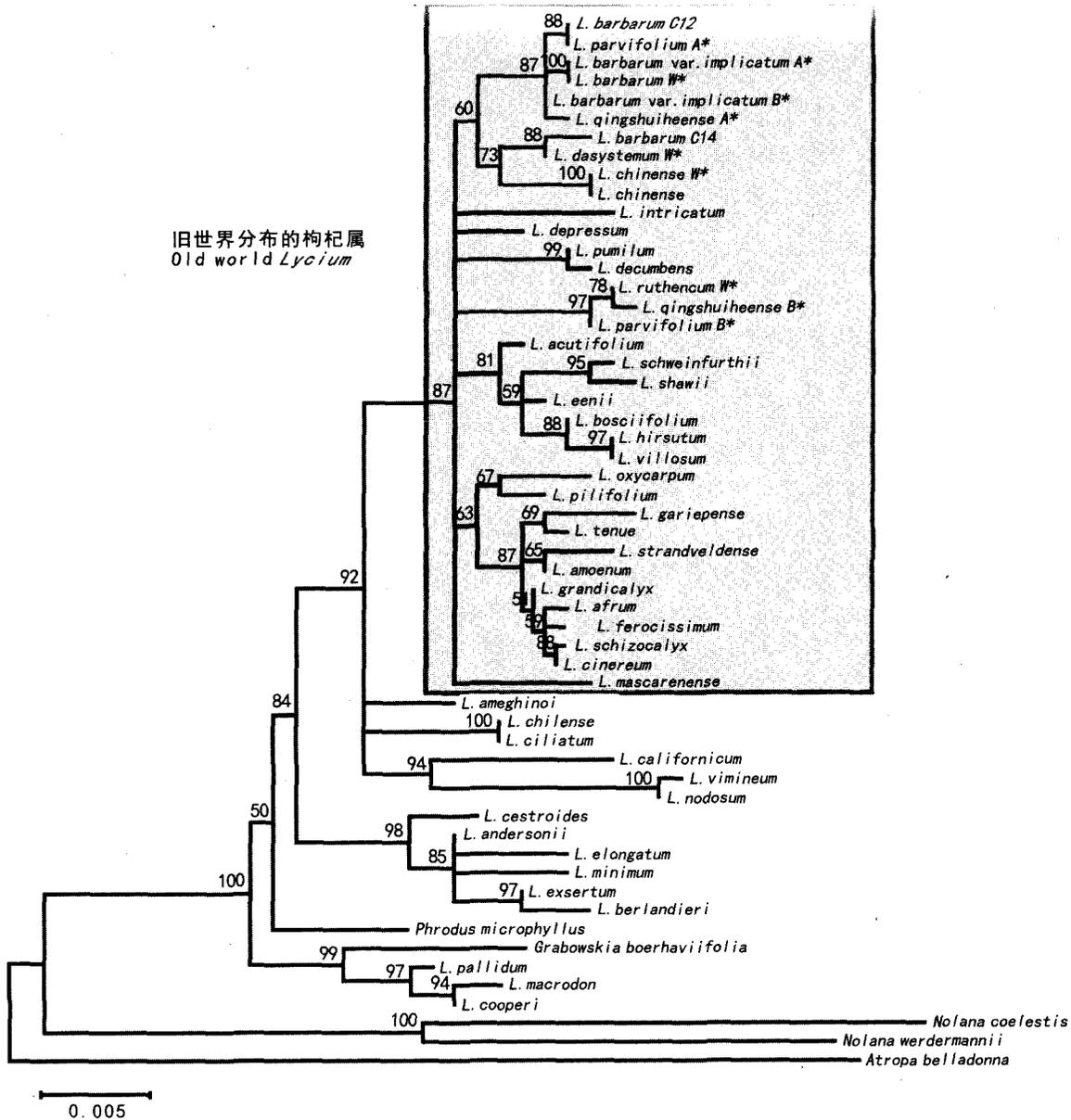


图 2 使用 GBSSI 基因片段推测的 *Lycium* 系统发育关系

Fig. 2 Maximum-Likelihood tree from GBSSI sequence data using HKY+G evolutionary model

系统发育分析是基于 HKY+G 模型进行的最大似然法分析,自展重复 1 000 次,分支长度表示核苷酸替换速率,分支上方所显示的是 50% 以上的自展自持率;“*”所示序列是本研究新获得的序列,灰色类群为中国分布的类群。

The length of branches indicates the nucleotide substitution rates and ML bootstrap values >50% are shown above the branches; An asterisk “*” indicates taxa of which the sequences were newly generated in the present study, taxa colored in gray are distributed in China.

密枝枸杞的地理分布区也正好在宁夏枸杞分布范围内(图 1),我们推测密枝枸杞很可能是宁夏枸杞种内杂交的后代。但从形态上看,密枝枸杞不同于宁夏枸杞而与黑果枸杞较为相似,这与本文的分子系

统学研究结果不大一致。对于这种分子证据与形态证据相矛盾的原因,有以下 3 种可能的解释。第一种解释是根据形态证据,认为密枝枸杞源自黑果枸杞而与黑果枸杞有更近的亲缘关系。如果这种解释

成立,密枝枸杞的 GBSSI 基因应该与黑果枸杞聚为一支,但分子系统学的结果却显示,密枝枸杞 GBSSI 基因的 2 种拷贝与宁夏枸杞的基因片段聚为一支。因此,这就应该有宁夏枸杞向密枝枸杞的基因流存在,而且如此的基因流至少要有 2 次,且均发生在 GBSSI 位点上。如此事件发生的概率非常低,因此排除了密枝枸杞源自黑果枸杞的可能。第二种解释则认为密枝枸杞是黑果枸杞和宁夏枸杞的杂交后代。尽管作为杂交后代,但密枝枸杞仍在形态上更多保留了黑果枸杞的特征,同时在 GBSSI 位点上通过回交、自交或种间基因流,使来自黑果枸杞的 GBSSI 基因丢失。最后一种解释认为密枝枸杞是宁夏枸杞种内杂交的结果。由于杂交的缘故可能产生一些新的性状,甚至在杂交后可能存在黑果枸杞向宁夏枸杞的基因流,从而导致密枝枸杞在这些形态性状上与黑果枸杞相似。但要深入探讨密枝枸杞究竟是宁夏枸杞种内杂交的后代还是宁夏枸杞和黑果枸杞杂交的后代,今后需要使用多个分子标记进行分析。如果大多数分子标记仍显示密枝枸杞的基因源自于宁夏枸杞,则其应为种内杂交的后代;但如果大多数标记显示其分别来自于宁夏枸杞和黑果枸杞,则密枝枸杞应为种间杂交的后代。此外,进一步开展相关的形态学研究将有助于澄清密枝枸杞与宁夏枸杞和黑果枸杞的关系。

一些学者对枸杞属其它植物的研究说明多倍化事件曾在该属内多次发生,并导致雌雄花的适应性进化(Miller 等,2003,2008;Levin 等,2005;Yeung 等,2005)。我们的结果显示,中国分布的枸杞属植物可通过种间或种内杂交产生新的类群。由此也带来了诸多问题,如杂交类群的亲本来源、杂交是否伴随多倍化事件、杂交后是否发生新类群的适应性进化以及杂交后形态上的变异等。这些问题需要今后在群体水平上开展形态学、细胞学、传粉生物学和分子生物学的综合研究,从而有助于我们认识种间或种内杂交的进化机制,同时也能加深我们对枸杞属植物种质资源的了解,进而为药用枸杞的开发利用和品种改良提供科学依据。

2.2 其它国产枸杞属植物的系统发育关系

根据本研究,宁夏枸杞的 GBSSI 存在 3 种不同的序列类型,连同清水河枸杞、小叶黄果枸杞和密枝枸杞等杂交类群中来自宁夏枸杞的序列类型,则宁夏枸杞在本文的分析中包括七种序列类型。系统发育分析显示宁夏枸杞并非一个单系类群,它的序列

分别位于 2 种不同分支上,其中有六条序列单独聚为一支,明显与其它枸杞属植物分开(87%的支持率);另外一条序列(*L. barbarum_C14*)则与新疆枸杞的序列聚为一支,即两者间有最近的亲缘关系(88%的支持率)。因此,目前宁夏枸杞的系统位置仍不明确,今后更大范围的取样和多分子标记的分析将有助于此问题的解决。此外,不明确的系统发育关系也说明宁夏枸杞可能具有较高的遗传分化,这与宁夏枸杞有较高的形态多样性相一致(匡可任等,1978)。从序列的相似度看,它们的序列相似度甚至在 98% 以下(*L. barbarum_C14* 和 *L. barbarum_W* 之间,97.9%,表 2),即它们在本研究所测的序列中存在近 20 个位点的序列差异,其相似度甚至低于宁夏枸杞与新疆枸杞的序列相似度(98.1%),即使是在 2 种序列相似度较高的类型中,它们的序列相似度也在 99% 以下。由于 *L. barbarum_C14* 明显不同于其它宁夏枸杞的序列,但在排除 *L. barbarum_C14* 序列的情况下,宁夏枸杞仍然显示了较低的序列相似度(98.5%,表 2)。与之相反的是,枸杞的两条序列相似度为 99.7%(表 2)。因此宁夏枸杞很可能有较高的遗传分化水平,但还需进一步增加取样以确定其遗传多样性的水平。

从地理分布来看,黑果枸杞与宁夏枸杞高度重叠(图 1),但分子系统学的结果显示它们分别位于旧世界枸杞属植物的不同分支上,说明两者之间亲缘关系较远,这在它们的形态特征上也有所体现,即两者在形态上明显不同。然而,它们相似的地理分布式样使得这 2 种存在于相似的生态环境中并适应之,即它们均适应于中国西北地区干旱少雨的气候。因此,这 2 种均呈现出相似的适应旱生环境的形态特征。究竟哪些分子机制导致了这两种植物的旱生适应?且这些分子机制在这 2 个种中是否相同?这些问题需要今后在群体水平上,结合形态和分子等多方面证据进行系统的研究。

根据本研究的分子系统学分析,枸杞与新疆枸杞和宁夏枸杞有较近的亲缘关系。此外,从系统发育关系和序列的一致性看,该类群形成一个单系并有较低的遗传多样性。此外,分子证据已说明新疆枸杞与宁夏枸杞有最近的亲缘关系。但由于目前取样有限,因此需要进一步更大范围的取样和研究。

综上所述,本研究表明:中国分布的枸杞属植物为旧世界分布的类群,但没有形成一个单系;枸杞属新类群的产生与植物种间或种内杂交相关;宁夏枸

杞存在较高的遗传分化。我们今后有必要在群体水平上开展谱系生物地理学等方面的深入研究,以阐明中国分布的枸杞属植物的进化历史及杂交类群形成的进化机制。

致谢 本文得到谢磊博士(北京林业大学)提出宝贵修改意见,向秋云博士(North Carolina State University, USA)修改英文。在此一并致谢。

参考文献:

- 王亚军,安巍,石志刚,等. 2008. 枸杞药用价值的研究进展[J]. 安徽农业科学, **36**(30):13 213—13 218
- 匡可任,路安民. 1978. 中国植物志第 67 卷第 1 分册(茄科) [M]. 北京:科学出版社
- 陈天云,蒋旭亮,张志耘. 宁夏茄科一新种和一新变种[J]. 广西植物(待发表)
- 李吉宁,蒋旭亮,李志刚,等. 清水河枸杞,宁夏茄科一新种[J]. 广西植物(待发表)
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput[J]. *Nucleic Acids Res*, **32**(5):1 792—1 797
- Fukuda T, Yokoyama J, Ohashi H. 2001. Phylogeny and biogeography of the genus *Lycium*(Solanaceae): inferences from chloroplast DNA sequences[J]. *Mol Phylogenet Evol*, **19**(2):246—258
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood[J]. *Syst Biol*, **52**(5):696—704
- Hall TA. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT[J]. *Nucl Acids Symp Ser*, **41**:95—98
- Huber T, Faulkner G, Hugenholtz P. 2004. Bellerophon: a program to detect chimeric sequences in multiple sequence alignments[J]. *Bioinformatics*, **20**(14):2 317—2 319
- Levin RA, Miller JS. 2005. Relationships within tribe *Lycieae* (Solanaceae): paraphyly of *Lycium* and multiple origins of gender dimorphism[J]. *Am J of Bot*, **92**(12):2 044—2 053
- Levin RA, Shak JR, Miller JS. 2007. Evolutionary relationships in tribe *Lycieae*(Solanaceae)[J]. *Acta Hort*, **745**:225—240
- Miller JS. 2002. Phylogenetic relationships and the evolution of gender dimorphism in *Lycium*(Solanaceae)[J]. *Syst Bot*, **27**(2):416—428
- Miller JS, Venable DL. 2003. Floral morphometrics and the evolution of sexual dimorphism in *Lycium*(Solanaceae)[J]. *Evolution*, **57**(1):74—86
- Miller JS, Levin RA, Feliciano NM. 2008. A tale of two continents: Baker's rule and the maintenance of self-incompatibility in *Lycium*(Solanaceae)[J]. *Evolution*, **62**(5):1 052—1 065
- Miller JS, Kamath A, Levin RA. 2009. Do multiple tortoises equal a hare? The utility of nine noncoding plastid regions for species-level phylogenetics in Tribe *Lycieae*(Solanaceae)[J]. *Syst Bot*, **34**(4):796—804
- Olmstead RG, Bohs L, Migid HA, et al. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae[J]. *Taxon*, **57**(4):1 159—1 181
- Posada D. 2008. ModelTest: Phylogenetic model averaging[J]. *Mol Biol Evol*, **25**:1 253—1 256
- Yeung K, Miller JS, Savage AE, et al. 2005. Association of ploidy and sexual system in *Lycium californicum*(Solanaceae)[J]. *Evolution*, **59**(9):2 048—2 055
- Yuan YW, Zhang ZY, Chen ZD, et al. 2006. Tracking ancient polyploids: a retroposon insertion reveals an extinct diploid ancestor in the polyploid origin of belladonna[J]. *Mol Biol Evol*, **23**(12):2 263—2 267
- Plant Res Environ*(植物资源与环境), **3**(3):1—8
- Zhang XH(张新华), Xia NH(夏念和). 2008. Pollen morphology of *Michelia* and its systematic significance(含笑属(木兰科)植物花粉形态及其系统学意义)[J]. *Guihaia*(广西植物), **28**(3):311—316
- Zhao XF(赵兴峰), Sun WB(孙卫邦), Yang HB(杨华斌), et al. 2008. Mega- and microsporogenesis and development of female and male gametophytes of *Michelia coriacea* (Magnoliaceae), a globally critical endangered plant in South-East Yunnan of China (极度濒危植物西畴含笑的大小孢子发生及雌雄配子体发育)[J]. *Acta Bot Yunan*(云南植物研究), **30**(5):549—556
- Zhu LM(朱丽梅), Ai SY(艾素云), Zhou RY(周瑞阳). 2007. A cytological study on microsporogenesis of cytoplasmic male sterile lines in Kenaf (*Hibiscus cannabinus*) (红麻细胞质雄性不育系小孢子败育的细胞学观察)[J]. *Acta Agron Sin*(作物学报), **33**(6):999—1 003

(上接第 317 页 Continue from page 317)