

DOI:CNKI:61-1390/S.20110711.1723.020

网络出版时间:2011-07-11 17:23:00

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20110711.1723.020.html>

中国扁蓿豆遗传多样性的表型和 SSR 标记分析

李鸿雁¹, 李志勇¹, 米福贵², 师文贵¹, 蔡丽艳¹, 王成海³, 邢建军¹

(1 中国农业科学院 草原研究所 农业部沙尔沁牧草资源重点野外科学观测试验站, 内蒙古 呼和浩特 010010;

2 内蒙古农业大学 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 3 内蒙古乌兰察布市察右后旗畜牧局, 内蒙古 乌兰察布 012400)

[摘要] **【目的】**揭示中国扁蓿豆种质资源的遗传多样性, 为扁蓿豆种质资源的收集、保护及更好地利用提供参考。**【方法】**利用 15 个表型性状(株高、叶长、叶宽、荚果长、荚果宽、种子长、种子宽、千粒质量、花序花朵数、单枝花序数、花序种子数、叶型、花色、叶色和生长习性)和 16 对 SSR 标记, 检测来自中国 7 个省(市)的 44 个扁蓿豆种质资源的遗传多样性。**【结果】**表型性状分析结果表明, 15 个扁蓿豆表型性状表现出较大差异; 花序种子数、种子长、种子宽和单枝花序数等性状是居群间和居群内差异较大的性状, 是造成表型差异的主要因素; 表型聚类将 44 个扁蓿豆划分为 8 个类群, 大部分材料聚在第Ⅱ类群内, 但仍有部分材料独立成群。SSR 标记分析结果表明, 筛选出 16 对蓿豆 SSR 引物, 每对引物可以稳定检测到 3~10 个等位基因, 共扩增 119 条谱带, 平均每个位点 6 个等位基因, 多态性比率为 80.7%, 每对引物产生有效基因 96 个, 平均多态信息含量(PIC)为 0.26; 16 对引物将 44 个扁蓿豆划分为 8 个类群, 大部分材料主要集中在第Ⅲ类群内。Mantel 测验表明, 表型性状欧式遗传距离矩阵与 SSR 标记遗传距离矩阵之间存在极显著正相关, 相关系数 $r=0.013\ 8$, $t=0.188\ 7$, 表明重要的表型性状能够较准确地反映亲缘相近材料的遗传变异。**【结论】**中国扁蓿豆种质资源的遗传多样性水平较高。

[关键词] 扁蓿豆; 种质资源; 表型标记; SSR 标记; 遗传多样性

[中图分类号] S541.024

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2011)09-0065-08

Analtsis of the genetic diversity of *Medicago ruthenica* by phenotype and SSR marker in China

LI Hong-yan¹, LI Zhi-yong¹, MI Fu-gui², SHI Wen-gui¹,
CAI Li-yan¹, WANG Chen-hai³, XING Jian-jun¹

(1 Sharaqin Key Wild Scientific Monitoring Station for Forage Resources of Ministry of Agriculture, Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science, Hohhot, Inner Mongolia 010010, China; 2 College of Ecology and Environmental, Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot, Inner Mongolia 010019, China; 3 Animal Husbandry Bureau of Chayouhouqi, Wulanchabu City, Wulanchabu, Inner Mongolia 012400, China)

Abstract: **【Objective】**The study was done to reveal the on genetic diversity of Chinese *Medicago ruthenica*. **【Method】**Phenotype, SSR marker were used to analyze the genetic diversity of 44 *M. ruthenica* germplasms from 7 provinces in China. **【Result】**15 phenotypic characters displayed significant difference. Principal component analysis indicated that number of seeds/raceme, seed length, seed width, and number of inflorescence/branch were varied significantly in various populations and populations and these 4 characters above were mainly factors which produced morphological variation. Phenotype cluster analysis showed 44 *M. ruthenica* germplasms were divided into eight groups, most of them were clustered into the second

* [收稿日期] 2011-02-18

[基金项目] 农业部农作物种质资源保护与利用项目(NB2010-2130135-32); 农业部牧草种质资源保护项目(2010-43); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项“牧草种质资源收集、评价及创新研究”

[作者简介] 李鸿雁(1964—), 女, 辽宁锦州人, 副研究员, 博士, 主要从事牧草种质资源鉴定、评价与创新研究。

[通信作者] 李志勇(1965—), 男, 内蒙古凉城县人, 研究员, 主要从事牧草种质资源的保护与利用研究。

group, and a few of them were clustered into other groups. SSR marker showed that 16 pairs of primers were obtained. 3—10 alleles were detected in every primer, 119 bands amplified, per locus on average had 6 alleles, of which 80.7% were polymorphism. Every primer produced 96 effective genes, and the average polymorphic information content (PIC) was 0.26. Cluster analysis showed 44 *M. ruthenica* germplasms were divided into eight groups, and most of them still focused on the third group. Compared to morphological and SSR marker, the genetic distance matrix was significantly positive correlated, correlation coefficient $r=0.0138$, $t=0.1887$. 【Conclusion】 There is a higher genetic diversity in *M. ruthenica* germplasm in China.

Key words: *Medicago ruthenica*; germplasm resources; phenotype marker; SSR marker; genetic diversity

扁蓿豆 (*Medicago ruthenica*) 是豆科 (Leguminosae) 苜蓿属 (*Medicago*) 植物^[1], 属苜蓿属的野生种, 主要分布在我国, 具有生态适应性广、耐贫瘠、抗寒、抗旱、营养价值较高的特点^[2]。扁蓿豆抗逆性强, 有望成为改良紫花苜蓿抗逆基因的优质资源原材料^[3]。在前人研究工作的基础上, 中国农业科学院草原研究所于 20 世纪 90 年代始, 对内蒙古野生扁蓿豆的种子硬实率^[4]、抗逆性^[5]、种子贮藏蛋白^[6]、细胞染色体^[7]及 SSR 分子标记^[8-9]进行初步分析。SSR 是目前应用最为广泛的分子标记技术, 具有许多优良特点^[10-11], 已在鸭茅^[12]、披碱草^[13]、紫花苜蓿^[14]和锦鸡儿^[15-16]等牧草的遗传多样性研究上得到广泛应用。目前, 国家牧草种质中期库保存有 210 份野生扁蓿豆种质资源, 但在扁蓿豆种质资

源形态学、细胞学和分子标记等方面的研究仍很滞后, 尚未全面开展系统而深入的研究, 缺乏必要的基因型与表现型相结合的验证分析, 利用表型和 SSR 标记对中国扁蓿豆种质资源遗传多样性的综合研究尚未见报道。为此, 本研究将表型和 SSR 标记相结合, 对中国扁蓿豆的遗传多样性进行了系统研究, 并分析了其遗传背景及亲缘关系, 以期扁蓿豆种质资源的收集、保护及更好地利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 植物材料

扁蓿豆种质资源来自中国农业科学院草原研究所国家牧草种质中期库和内蒙古农业大学, 共 44 份 (表 1), 其中 1—43 号为野生资源, 44 号为登记品种。

表 1 供试扁蓿豆种质资源的来源
Table 1 *M. ruthenica* germplasm origins

编号 Code	采集地点 Origin	编号 Code	采集地点 Origin
1	内蒙古锡林浩特市 Xilinhaote City, Inner Mongolia	23	内蒙古乌兰察布市 Wulanchabu City, Inner Mongolia
2	内蒙古西乌珠穆沁旗 Wuzhumuqin West County, Inner Mongolia	24	内蒙古察右中旗 Chayouzhong County, Inner Mongolia
3	内蒙古阿巴嘎旗 Abaga County, Inner Mongolia	25	内蒙古化德县 Huade County, Inner Mongolia
4	内蒙古白音锡勒 Baiyinxile County, Inner Mongolia	26	内蒙古商都县 Shangdu County, Inner Mongolia
5	内蒙古东乌珠穆沁旗 Wuzhumuqin East County, Inner Mongolia	27	内蒙古土右旗 Tuyou County, Inner Mongolia
6	内蒙古正蓝旗 Zhenglan County, Inner Mongolia	28	内蒙古达茂旗 Damao County, Inner Mongolia
7	内蒙古正镶白旗 Zhengxiangbai County, Inner Mongolia	29	内蒙古和林县 Helin County, Inner Mongolia
8	内蒙古灰腾梁 Huitengliang County, Inner Mongolia	30	内蒙古呼和浩特市 Huhhot City, Inner Mongolia
9	内蒙古多伦县 Doulong County, Inner Mongolia	31	内蒙古清水河县 Qingshuihe County, Inner Mongolia
10	内蒙古巴林右旗 Balinyou County, Inner Mongolia	32	内蒙古武川县 Wuchuan County, Inner Mongolia
11	内蒙古林西县 Linxi County, Inner Mongolia	33	北京市 Beijing
12	内蒙古阿鲁克沁旗 Alukeerqin County, Inner Mongolia	34	山西省太原市 Taiyuan City, Shanxi Province
13	内蒙古科尔沁左翼后旗 Keerqinzouyihou County, Inner Mongolia	35	山西省沁水县 Qinshui County, Shanxi Province
14	内蒙古奈曼旗 Naiman County, Inner Mongolia	36	山西省右玉县 Youyu Areas, Shanxi Province
15	内蒙古科尔沁左翼中旗 Keerqinzouyizhong County, Inner Mongolia	37	山西省平鲁县 Pinglu Areas, Shanxi Province
16	内蒙古伊尔施县 Yiershi County, Inner Mongolia	38	山西省大同县 Datong Areas, Shanxi Province
17	内蒙古阿尔山市 Aersan City, Inner Mongolia	39	河北省围场县 Weichang Areas, Hebei Province
18	内蒙古科右中旗 Keyouzhong County, Inner Mongolia	40	辽宁省辽西县 Liaoxi Areas, Liaoning Province
19	内蒙古鄂温克旗 Ewenke County, Inner Mongolia	41	吉林省公主岭市 Gongzhulin City, Jilin Province
20	内蒙古扎兰屯市 Zalantun City, Inner Mongolia	42	吉林省长春市 Changchun City, Jilin Province
21	内蒙古新巴尔虎左旗 Xinbaerhuzuo County, Inner Mongolia	43	西藏扎达县 Zhada County, Tibet
22	内蒙古四子王旗 Siziwang County, Inner Mongolia	44	直立型扁蓿豆(登记品种) <i>M. ruthenica</i> Zhilixing

于2007年将44份扁蓊豆种子温室育苗并种植于农业部沙尔沁牧草资源重点野外科学观测试验站。该试验站位于呼和浩特市西南约30 km的土默特左旗沙尔沁乡,地理坐标为东经111°45′、北纬40°36′,属于半干旱大陆性气候,海拔1 065 m,土壤类型为砂壤土。

1.2 田间试验设计和性状调查

试验采用随机区组设计,3次重复,小区面积3.5 m²。全生育期浇水3~5次,施肥2~3次,中耕除草4~5次。田间性状调查和数据采集方法按照《苜蓿种质资源描述规范和数据标准》^[17]进行,调查15个表型性状,包括株高、叶长、叶宽、荚果长、荚果宽、种子长、种子宽、千粒质量、花序花朵数、单枝花序数、花序种子数、叶型、花色、叶色和生长习性。

1.3 扁蓊豆的 SSR 标记分析

1.3.1 总 DNA 的提取 扁蓊豆定植1个月后,从单株上取新鲜叶片,分别编号,置-80℃冰箱内保存备用。采用上海华舜生物工程有限公司生产的小量植物基因组DNA试剂盒提取扁蓊豆总DNA,进行8 g/L琼脂糖凝胶电泳检测,并用紫外可见分光光度计测定260和280 nm波长的吸光值(OD_{260} 和 OD_{280}),计算 OD_{260}/OD_{280} ,以检测DNA样品纯度。

1.3.2 PCR 扩增 根据Bernadette等^[18]的报道,从89对紫花苜蓿和截形苜蓿SSR引物中筛选多态性丰富、重复性好的16对引物进行扁蓊豆PCR扩增,引物由上海生物工程技术服务有限公司合成。PCR反应体系为25 μL:10×Buffer(含Mg²⁺) 5.5 μL,5 U/μL Taq DNA聚合酶(由北京天根生物公司合成) 0.5 μL,136 ng/μL模板DNA 3 μL,10 mmol/L dNTP 0.75 μL,10 pmol/L上、下游引物0.75 μL,ddH₂O 14.5 μL。PCR反应程序:95℃预变性3 min;94℃变性25 s,55~66℃(根据不同引物而定)退火30 s,72℃延伸30 s,35个循环;72℃延伸10 min,最后4℃保存。取扩增产物,经6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测(恒功率80 W、30 min)后,进行银染、固定、染色和显影。

1.4 数据处理

对扁蓊豆表型性状数据进行标准化处理,用SPSS11.5^[19]软件进行表型性状数据的方差分析、主成分分析(PCA)和聚类分析(UPGMA);将SSR标记清晰可辨的电泳条带用于统计分析,记录每个样品在每对引物位点上各个等位变异的有无,在相同迁移率位置上,有扩增带的赋值为1,无扩增带的赋值为0。利用NTSYSpc2.1软件^[20]统计表型性状,

并计算SSR的遗传相似系数,UPGMA法进行聚类分析,绘制树状聚类图。采用POPGENE version 1.31软件计算Shannon指数(I)、基因多样性指数(H)、有效等位基因数(N_e)、遗传分化系数(G_{st})和基因流(N_m)。用MXCOMP程序对聚类结果与遗传相似系数进行Mantel检验,以检验聚类结果的可靠性。标记位点的多态信息量(PIC)按下式计算:

$$PIC=1-\sum P_{ij}^2。$$

式中: P_{ij} 为第 j 个位点第 i 个等位基因的频率,即 P_{ij} 为第 j 个引物扩增出的第 i 个多态位点谱带出现的频率。

2 结果与分析

2.1 扁蓊豆表型性状分析

2.1.1 方差分析 F 检验结果(表2)表明,测定的15个扁蓊豆表型性状中,叶长、千粒质量、株高、花序花朵数、单枝花序数、花序种子数、叶型和叶色在居群间表现差异不显著,叶宽、荚果宽、种子长、花色和生长习性在居群间差异显著($P<0.05$),荚果长和种子宽在居群间差异极显著($P<0.01$)。通过比较 F 值可知,15个表型性状在扁蓊豆居群间的差异程度从大到小依次为荚果长、种子宽、花色、生长习性、荚果宽、种子长、叶宽、千粒质量、叶长、花序种子数、花序花朵数、叶色、叶型、株高和单枝花序数。

2.1.2 主成分分析 主成分分析结果(表3)表明,前7个主成分的累计贡献率为72.47%,足以代表原始因子所代表的大部分信息。第1主成分独立贡献率为16.90%,对其作用最大的性状为花序种子数(0.25);第2主成分独立贡献率为12.17%,对其作用最大的性状为种子长(0.30);第3主成分独立贡献率为11.88%,对其作用较大的性状依次为单枝花序数(0.27)和种子宽(0.25);第4主成分独立贡献率为9.65%,对其作用较大的性状依次为生长习性(0.39)、叶长(-0.35)、千粒质量(0.26)和花色(0.28);第5主成分独立贡献率为8.61%,对其作用较大的性状为株高(0.38)、叶色(0.36)和叶型(0.26);第6主成分独立贡献率为6.80%,对其作用最大的性状为荚果长(0.69);第7主成分独立贡献率为6.46%,对其作用较大的性状是花序花朵数(0.48)、叶宽(0.33)、荚果宽(0.32)。其中第1,2和3主成分反映的是生殖器官的特点,第4和5主成分反映的是营养器官的特点。在前7个主成分中,花序种子数、种子长、种子宽和单枝花序数等性状同时也是居群间和居群内差异较大的性状。可见,这些性状是造成表型差异的主要因素。

表 2 44 个扁蓊豆居群重要表型性状的方差分析

Table 2 Variance analysis of the morphological characters of 44 *M. ruthenica*

表型性状 Character	平均值 Mean	标准差 S. D	最小值 Minimum	最大值 Maximum	变异系数 CV/%	F 检验
叶长/cm Length of blade	1.25	0.23	0.75	1.82	5.43	6.73
叶宽/cm Width of blade	0.86	0.15	0.60	1.26	5.73	9.80 *
荚果长/cm Pod length	1.11	0.12	0.88	1.50	9.25	40.00 * *
荚果宽/cm Pod width	0.44	0.04	0.38	0.50	11.00	14.90 *
种子长/mm Seed length	2.27	0.24	1.64	2.96	9.46	11.20 *
种子宽/mm Seed width	1.77	0.15	1.50	2.18	11.80	36.00 * *
千粒质量/g 1 000 seed weight	2.59	0.35	1.98	3.50	7.40	6.91
株高/cm Plant height	62.20	8.66	37.10	80.0	7.18	1.82
花序花朵数 No. of flowers/raceme	7.67	1.35	5.35	11.3	5.68	6.45
单枝花序数 No. of racemes/twig	32.30	9.18	14.90	59.0	3.52	1.81
花序种子数 No. of seeds/ raceme	7.88	1.94	5.10	13.5	4.06	6.73
叶型 Leaf blade shape	1.93	0.89	1.00	3.00	2.17	3.59
花色 Colour of corolla	1.09	0.29	1.00	2.00	3.76	29.50 *
叶色 Colour of leaves	1.34	0.47	1.00	2.00	2.85	4.46
生长习性 Growth habit	1.86	0.35	1.00	2.00	5.31	23.30 *

表 3 扁蓊豆表型性状对前 7 个主成分的特征向量和贡献率

Table 3 The component scores coefficient matrix,eigenvalue and contributive percentage of principal components of *M. ruthenica*

表型性状 Character	第 1 主成分 PC1	第 2 主成分 PC2	第 3 主成分 PC3	第 4 主成分 PC4	第 5 主成分 PC5	第 6 主成分 PC6	第 7 主成分 PC7
叶长 Length of blade	−0.04	−0.08	0.18	−0.35	−0.13	0.15	0.19
叶宽 Width of blade	0.16	0.26	−0.02	−0.10	−0.01	−0.16	0.33
荚果长 Pod length	0.06	0.19	−0.01	0.03	0.14	0.69	0.17
荚果宽 Pod width	−0.06	−0.02	−0.29	0.11	0.27	0.08	0.32
种子长 Seed length	−0.21	0.30	0.11	0.04	0.09	0.11	−0.02
种子宽 Seed width	−0.21	0.18	0.25	0.02	0.01	−0.12	0.15
千粒质量 1 000 seed weight	−0.22	0.13	0.14	0.26	0.18	−0.02	0.02
株高 Plant height	−0.03	−0.11	0.22	−0.17	0.38	−0.32	0.22
花序花朵数 No. of flowers/raceme	0.10	−0.13	0.25	0.16	−0.12	0.01	0.48
单枝花序数 No. of racemes/twig	0.09	0.02	0.27	−0.06	−0.03	0.15	−0.32
花序种子数 No. of seeds/raceme	0.25	0.15	0.14	0.12	0.16	−0.14	0.08
叶型 Leaf blade shape	−0.07	−0.19	−0.13	−0.03	0.26	−0.10	0.20
花色 Colour of corolla	0.01	−0.18	0.12	0.28	−0.31	0.15	0.31
叶色 Colour of leaves	0.07	−0.22	0.11	0.18	0.36	0.26	−0.13
生长习性 Growth habit	−0.01	0.12	−0.11	0.39	−0.16	−0.23	0.01
特征值 Eigenvalue	2.87	2.07	2.02	1.64	1.46	1.16	1.10
独立贡献率/% Individual percent	16.90	12.17	11.88	9.65	8.61	6.80	6.46
累计贡献率/% Accumulated percent	16.90	29.07	40.95	50.60	59.21	66.01	72.47

2.1.3 聚类分析 扁蓊豆表型性状聚类分析结果(图 1)表明,在遗传相似系数为 0.19 时,44 个扁蓊豆居群可划分为 8 个类群:第Ⅰ类群包括 1 号和 25 号居群,分别来自内蒙古锡林浩特市和内蒙古化德县;第Ⅱ类群包括 25 个居群,分别来自于内蒙古锡林郭勒盟的 6 个居群、内蒙古东部区的 7 个居群、内蒙古西部区的 5 个居群以及山西的 3 个居群、河北的 1 个居群、辽宁的 1 个居群、吉林的 2 个居群和直立型扁蓊豆,第Ⅱ类群可以分为 2 个亚群,第 1 亚群包括 8 个居群,第 2 亚群包括 17 个居群;第Ⅲ类群包括 2 个居群,来自于内蒙古阿尔山市和内蒙古扎

兰屯市;第Ⅳ类群包括 2 个居群,来自于内蒙古阿巴嘎旗和内蒙古科尔沁左翼后旗;第Ⅴ类群包括 8 个居群,分别来自于内蒙古正镶白旗、内蒙古乌兰察布市、内蒙古四子王旗、内蒙古清水河县、内蒙古科右中旗、山西省太原市、北京市郊区和西藏扎达县;第Ⅵ类群包括 3 个居群,来自内蒙古察右中旗、内蒙古和林县和山西省沁水县;第Ⅶ类群和第Ⅷ类群分别为来自内蒙古伊尔施县的 16 号居群和山西省大同县的 38 号居群,同其他居群亲缘关系较远。遗传相似系数最大的是来自内蒙古阿巴嘎旗的 3 号居群与内蒙古科右中旗的 18 号居群(9.946),其遗传距离

最远,遗传相似程度最低;遗传相似系数最小的是来自内蒙古武川县的 32 号居群与来自山西省太原市的 34 号居群(1.005),其遗传距离最近,遗传相似程度最高。

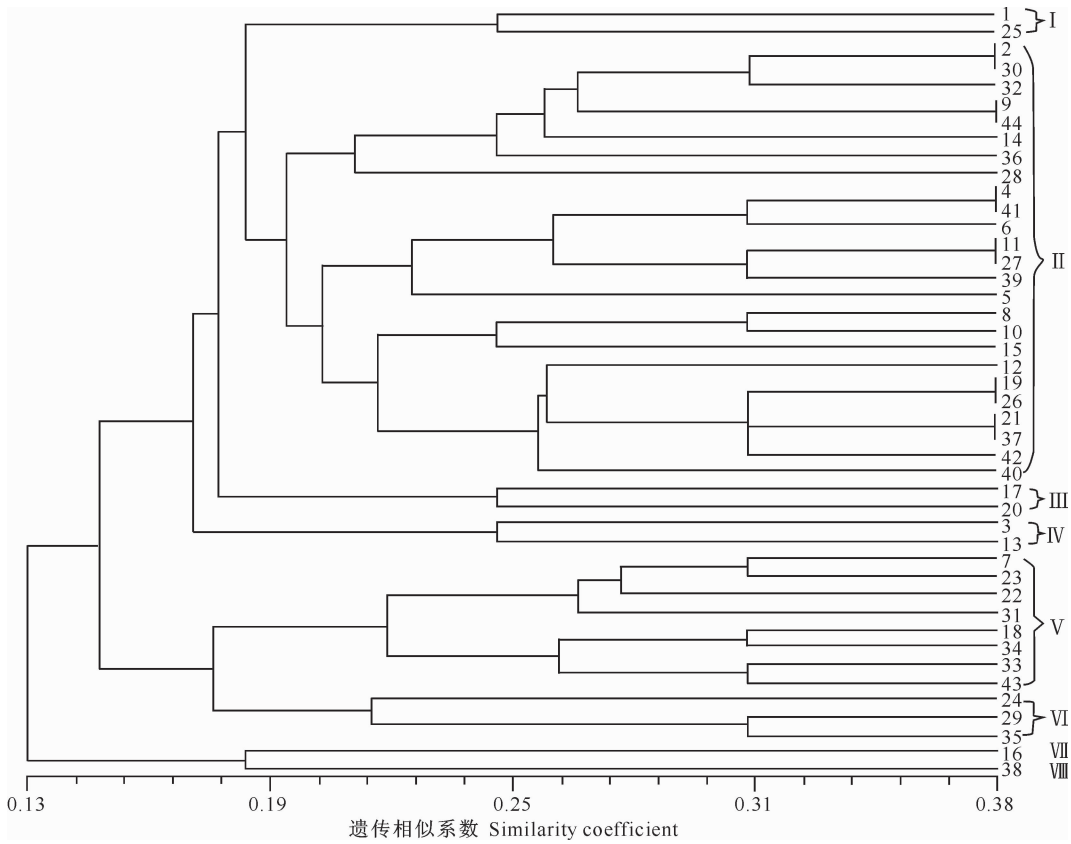


图 1 44 个扁蓊豆居群表型性状的聚类分析
1~44. 材料编号,同表 1

Fig. 1 Dendrogram of 44 *M. ruthenica* derived by UPGMA from the phenotype data
Notes of 1—44 same as table 1

2.2 扁蓊豆 SSR 标记分析

2.2.1 SSR 标记的多态性分析 扁蓊豆总 DNA 的 OD_{260}/OD_{280} 在 1.8~1.9,表明扁蓊豆 DNA 样品纯度能够用于 PCR 扩增。以筛选出的 16 对 SSR 引物对 44 个扁蓊豆进行 PCR 扩增,结果见表 4 和图 2。由表 4 可见,共检测到 119 个等位基因,其中多态性标记 96 个,多态性比率为 80.7%,平均每对

引物所产生的等位基因数为 6 个,其中引物 MTIC432 扩增产生的等位基因数最多,为 10 个。多态信息含量是表示微卫星位点变异程度高低的一个指标。由表 4 可见,16 对引物中多态信息含量最大的为 MTIC77 (0.49),最小的为 MTIC347 (0.15),平均为 0.26,表明 16 对引物可以为 44 个扁蓊豆居群提供较理想的信息。

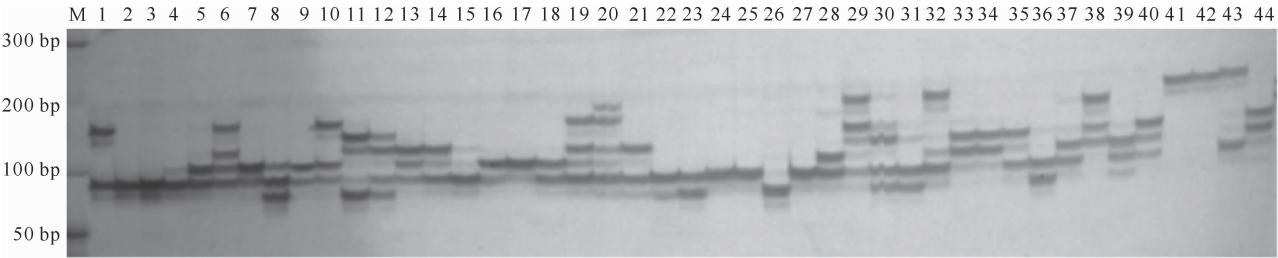


图 2 MTIC272 引物对扁蓊豆扩增产物的电泳图谱
1~44. 材料编号,同表 1;M. DNA Marker

Fig. 2 Amplification results of MTIC272 of *M. ruthenica*
Notes of 1—44 same as the table 1;M. DNA Marker

表 4 参试扁蓊豆 SSR 标记的扩增结果

Table 4 SSR amplification results of *M. ruthenica*

引物 Primer	扩增总带数 Total band	多态性带数 Polymorphic band	多态性比率/% The percentage of polymorphic bands	多态信息含量 Polymorphic information content
AW584539	4	3	75.0	0.30
MTIC347	4	3	75.0	0.15
MTIC258	5	3	60.0	0.26
MTIC77	4	4	100.0	0.49
MSA13293	6	4	66.7	0.30
BI4BO3	6	5	83.3	0.43
MTIC183	8	5	62.5	0.27
MTIC249	6	5	83.7	0.30
MTIC27	7	6	85.7	0.32
MTIC272	7	7	100.0	0.40
MTIC189	10	8	80.0	0.34
MTIC237	11	8	72.7	0.31
MTIC93	12	8	66.7	0.32
MAL369471	9	8	88.9	0.25
MTIC451	10	9	90.0	0.41
MTIC432	10	10	100.0	0.26
平均 Mean	7.4	6	80.7	0.26
总计 Total	119	96		4.14

Shannon 指数和 Nei’s 指数既可以反映条带的丰富程度,又可以反映其均匀程度,而丰富度和均匀度是衡量多样性的 2 个重要指标。由 Nei’s 指数估算的种群内和种群间的基因多样性,其不同位点对基因多样性的贡献率不同。由表 5 可知,44 个扁蓊

豆的平均基因多样性指数为 0.237,遗传分化系数为 0.474,基因流为 0.556,有效等位基因数为 1.363,Shannon 指数为 0.382,表明 44 个扁蓊豆种群间有一定程度的遗传分化。

表 5 16 对引物 SSR 位点的基因多样性指数、有效等位基因数和 Shannon 指数

Table 5 Effective number of alleles,Nei’s gene diversity and Shannon’s information index of 16 primers

引物 Primer	基因多样性 指数 <i>H</i>	遗传分化 系数 <i>Gst</i>	基因流 <i>Nm</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	Shannon 指数 <i>I</i>
AW584539	0.245	0.423	0.682	1.390	0.389
MTIC347	0.073	0.456	0.596	1.080	0.157
MTIC258	0.180	0.455	0.600	1.242	0.305
MTIC77	0.369	0.497	0.506	1.616	0.551
MSA13293	0.260	0.420	0.690	1.382	0.419
BI4BO3	0.234	0.484	0.533	1.369	0.378
MTIC183	0.293	0.401	0.747	1.463	0.454
MTIC249	0.267	0.316	1.082	1.462	0.409
MTIC27	0.289	0.386	0.795	1.469	0.450
MTIC272	0.175	0.389	0.794	1.253	0.299
MTIC189	0.276	0.396	0.763	1.407	0.443
MTIC237	0.223	0.407	0.729	1.314	0.371
MTIC93	0.215	0.505	0.490	1.316	0.353
MAL369471	0.262	0.434	0.652	1.426	0.414
MTIC451	0.261	0.408	0.725	1.404	0.415
MTIC432	0.166	0.376	0.830	1.231	0.282
平均 Mean	0.237	0.474	0.556	1.363	0.382

2.2.2 遗传相似性分析 SSR 结果表明,44 个扁蓊豆遗传相似系数为 0.048~0.309,遗传相似系数最小的是来自内蒙古西乌珠穆沁旗的 2 号居群与登记品种直立型扁蓊豆(0.048),其遗传距离最远,遗传相似程度最低;遗传相似系数最大的是来自内蒙

古化德县的 25 号居群与来自内蒙古武川县的 32 号居群(0.309),其遗传距离最近,遗传相似程度最高。

2.2.3 聚类分析 SSR 聚类结果(图 3)表明,SSR 标记可将 44 个扁蓊豆居群完全区分开。以 0.732 为阈值,44 个扁蓊豆居群大体上可分为 8 大类:第

I 类群包括 3 个居群,分别来自内蒙古的锡林浩特市、西乌珠穆沁旗和阿巴嘎旗;第 II 类群包括 4 个居群,分别来自内蒙古白音锡勒、阿尔山市、鄂温克旗和奈曼旗;第 III 类群包括 20 个居群,分别来自于内蒙古锡林郭勒盟的 5 个居群、内蒙古东北部地区的 7 个居群、内蒙古西部区的 3 个居群、辽宁省的 1 个居群、吉林省的 2 个居群、西藏扎达县的 1 个居群及直立型扁蓊豆;第 IV 类群包括 3 个居群,分别来自于

内蒙古科尔沁左翼后旗、内蒙古土右旗和山西省沁水县;第 V 类群包括 7 个居群,分别来自于内蒙古和林县、内蒙古呼和浩特市、内蒙古武川县、山西省太原市、北京市郊区、内蒙古达茂旗和河北省围场县;第 VI 类群包括 4 个居群,分别来自内蒙古乌兰察布市、内蒙古化德县、内蒙古察右中旗和内蒙古商都县;第 VII 类群包括内蒙古伊尔施县 1 个居群;第 VIII 类群包括山西省平鲁县和大同县的 2 个居群。

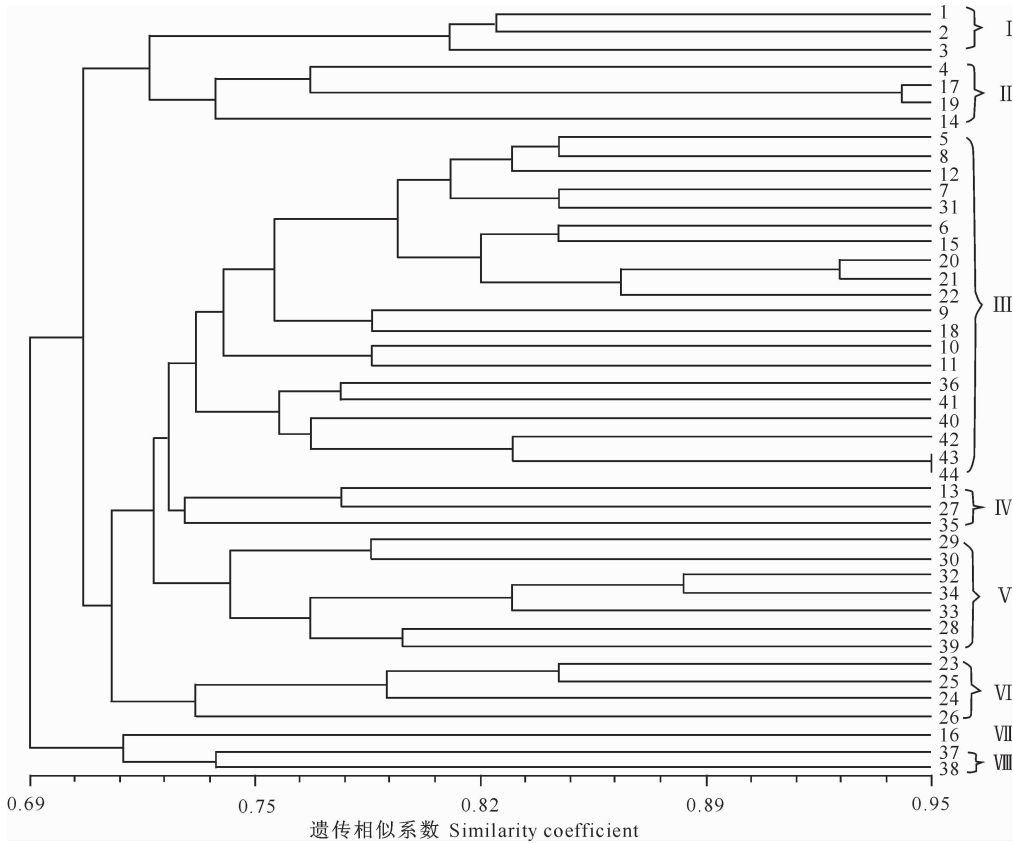


图 3 44 个扁蓊豆居群 SSR 标记的聚类分析

1~44. 材料编号,同表 1

Fig. 3 Dendrogram of 44 *M. ruthenica* derived by UPGMA from SSR markers

Notes of 1—44 same as table 1

2.3 扁蓊豆表型与 SSR 标记遗传距离矩阵间的相关分析

通过 Mantal 测验,对表型性状欧式遗传距离矩阵与 SSR 标记遗传距离矩阵之间的相关性进行分析,结果表明,二者遗传距离矩阵之间存在极显著正相关,相关系数 $r=0.013\ 8$, $t=0.188\ 7$,表明重要的表型性状能够较准确地反映亲缘相近材料的遗传变异。

3 讨 论

扁蓊豆因其优异的特性具有很大的利用潜力。本研究对收集到的野生和登记扁蓊豆资源进行了遗

传多样性分析,结果表明,就表型性状分析来看,扁蓊豆野生居群存在着较高的遗传多样性,如花序种子数、种子长、种子宽和单枝花序数等性状在居群间和居群内差异较大,这些性状是造成扁蓊豆表型差异的主要因素。从表型性状和 SSR 标记的遗传相似系数及 UPGMA 聚类的综合结果来看,扁蓊豆种质资源遗传基础相对狭窄,主要集中在同一个大的类群中,且集中在内蒙古地区,具有一定的同源性,亲缘关系较近。本试验中 SSR 标记表现出较高的多态性。

本研究中,扁蓊豆表型性状欧式遗传距离矩阵与 SSR 标记遗传距离矩阵之间的相关系数 $r=$

0.013 8, $t=0.188\ 7$ 。根据扁蓿豆居群的聚类分析结果,在杂交育种过程中可有目的地进行种质资源的优化组合,通过不断选育而培育出优质的扁蓿豆品种^[21]。主成分分析则可以详细地了解不同物种及样本之间存在差异的主要原因^[22]。本研究第 1、2 和 3 主成分反映的是生殖器官的特点,且大多为正指标,表明他们对综合指标的贡献比较大,可以将其划为第 1 个层次,称种子产量性状因子;第 4 和 5 主成分反映的是营养器官的特点,大多数与植株的生长有关,可以将其划分为第 2 个层次,称为生长性状因子。本研究初步证明,我国的扁蓿豆种质资源在居群间和居群内遗传变异较大,生物多样性丰富。因此,通过表型性状结合 SSR 标记,针对不同育种目标对野生扁蓿豆资源进行有目的的改良和利用,从而扩大扁蓿豆遗传基础,为扁蓿豆在育种等方面的研究提供理论依据。同时本研究采用的方法也可为今后扁蓿豆种质资源的创新利用和遗传多样性研究提供更为合理准确的参考。

[参考文献]

- [1] 张子仪. 中国饲料学 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2002: 612-613.
Zhang Z Y. China feed science [M]. Beijing: Agriculture Press of China, 2002: 612-613. (in Chinese)
- [2] 贾慎修. 中国饲用植物志: 第 1 卷 [M]. 北京: 农业出版社, 1987: 337-340.
Jia S X. Flora Chinese feed: Volume 1 [M]. Beijing: Agriculture Press, 1987: 337-340. (in Chinese)
- [3] 宁 布, 杜一民, 陈 山. 内蒙古扁蓿豆属植物的研究: 草地生物多样性保护研究 [M]. 呼和浩特: 内蒙古大学出版社, 1995.
Ning B, Du Y M, Chen S. The study on plants of *Melilotides* genus distributed in Inner Mongolia; Grassland biodiversity conservation [M]. Huhohot: Inner Mongolia Press; 1995. (in Chinese)
- [4] Eerdungaridi, Noboru Nakata. Seed hard coatedness of *Medicago ruthenica* grown in Middle and East Part of Inner Mongolia [J]. Chinese Journal of Grassland, 2007, 29(6): 1-5.
- [5] 郝建辉, 石凤翎. 不同扁蓿豆材料抗旱性比较研究 [J]. 中国草地学报, 2006, 28(3): 39-43.
Hao J H, Shi F L. Study on drought resistance of *Melilotides ruthenica* accessions [J]. Chinese Journal of Grassland, 2006, 28(3): 39-43. (in Chinese)
- [6] 额尔敦嘎日迪, 中 田, 李造哲. 内蒙古干旱半干旱地区野生扁蓿豆种子贮藏蛋白质的变异 [J]. 中国草地学报, 2006, 28(2): 52-55.
Eerdun G R D, No B R, Li Z Z. Variation in seed storage proteins of *Melilotides ruthenica* in Inner Mongolian dry land [J]. Chinese Journal of Grassland, 2006, 28(2): 52-55. (in Chinese)

- [7] 宁红梅, 米福贵, 李鸿雁, 等. 野生黄花型扁蓿豆染色体核型分析 [J]. 草地学报, 2008, 16(3): 316-318.
Ning H M, Mi F G, Li H Y, et al. Karyotype analysis of wild yellow type *Medicago ruthenica* L. [J]. Acta Agrestia Sin, 2008, 16(3): 316-318. (in Chinese)
- [8] 李鸿雁, 米福贵, 宁红梅, 等. 扁蓿豆遗传多样性的 SSR 分析 [J]. 中国草地学报, 2008, 30(2): 34-38.
Li H Y, Mi F G, Ning H M, et al. Genetic diversity of *Medicago ruthenica* based on SSR markers [J]. Chinese Journal of Grassland, 2008, 30(2): 34-38. (in Chinese)
- [9] 李鸿雁, 李志勇, 米福贵, 等. 利用微卫星标记鉴定扁蓿豆种质资源 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 67-71.
Li H Y, Li Z Y, Mi F G, et al. Appraisal of *Medicago ruthenica* germplasms by SSR markers [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008, 23(3): 67-71. (in Chinese).
- [10] Ziekiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain-reaction amplification [J]. Genome, 1994, 20: 176-183.
- [11] Martin J P, Sanchez-Yelamo M D. Genetic relationships among species of the genus *Diploaxis* (*Brassicaceae*) using inter simple sequences repeat markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 101: 1234-1241.
- [12] 曾 兵, 左福元, 张新全, 等. 利用小麦 SSR 标记分析鸭茅种质资源的遗传多样性 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(4): 677-683.
Zeng B, Zuo F Y, Zhang X Q, et al. Genetic diversity of *Dactylis glomerata* germplasm resources detected by SSR marker [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(4): 677-683. (in Chinese)
- [13] 李永祥, 李斯深, 李立会, 等. 披碱草属 12 个物种遗传多样性的 ISSR 和 SSR 比较分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1522-1527.
Li Y X, Li S S, Li L H, et al. Comparison of genetic diversity of twelve *Elymus* species using ISSR and SSR markers [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2005, 38(8): 1522-1527. (in Chinese)
- [14] 魏臻武. 利用 SSR, ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱 [J]. 草业学报, 2004, 13(3): 62-67.
Wei Z W. DNA fingerprint of *Medicago sativa* variety genomes using SSR, ISSR and RAPD [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2004, 13(3): 62-67. (in Chinese)
- [15] 郭 强, 时永杰, 魏臻武, 等. 河西走廊 14 种锦鸡儿遗传多样性 SSR 分析 [J]. 草地学报, 2008, 16(3): 227-233.
Guo Q, Shi Y J, Wei Z W, et al. Genetic diversity analysis by SSR marker of fourteen species of *Caragana* Fabr. in Hexi corridor area of Gansu [J]. Acta Agrestia Sinica, 2008, 16(3): 227-233. (in Chinese)
- [16] 刘美华, 李忠超, 陈海山, 等. 昆仑锦鸡儿 (豆科) 的遗传多样性研究 [J]. 广西植物, 2005, 25(1): 53-57.
Liu M H, Li Z C, Cheng H S, et al. Genetic variation of *Caragana polourensis* (Leguminosae) [J]. Guihaia, 2005, 25(1): 53-57. (in Chinese)