

中国扁蓿豆遗传多样性的 ISSR 分析

李志勇¹, 李鸿雁¹, 石凤翎², 王小丽³, 赵成贵⁴, 师文贵¹, 蔡丽艳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 呼和浩特 010010;

²内蒙古农业大学生态环境学院, 呼和浩特 010019; ³中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009;

⁴内蒙古乌兰察布市凉城县畜牧局, 凉城 013700)

摘要: 利用 ISSR 标记, 对来源于中国 7 个省(市)的 44 个扁蓿豆居群的亲缘关系进行了分析。从 80 条 ISSR 引物中筛选出多态性强、重复性好的 16 条引物, 对 44 个扁蓿豆居群基因组 DNA 进行扩增, 共扩增出 133 条谱带, 平均每个引物扩增出 8.31 条带, 其中多态性带 115 条, 多态性位点百分率为 87.08%。扁蓿豆种质间遗传相似系数变化范围在 0.436~0.908 之间。利用 UPGMA 聚类分析, 44 个扁蓿豆居群被划分为 8 个类群, 与地理来源有较高的相关性。

关键词: 扁蓿豆; 种质资源; 亲缘关系; ISSR

Genetic Diversity Analysis of *Medicago ruthenica* by ISSRs in China

LI Zhi-yong¹, LI Hong-yan¹, SHI Feng-ling², WANG Xiao-li³, ZHAO Cheng-gui⁴,
SHI Wen-gui¹, CAI Li-yan¹

(¹Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science/SharaQinKey Wild Scientific Monitoring Station for Forage Resources of Ministry of Agriculture, Hohhot 010010; ²College of Ecology and Environmental,

Inner Mongolia Agriculture University, Huhhot 010019; ³Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Science Zhengzhou 430009;

⁴Animal Husbandry Bureau Liangcheng County Inner Mongolia, Liangcheng 013700)

Abstract: The genetic relationship of *M. ruthenica* populations from seven provinces of China were analyzed by ISSR marker. 16 primers with strong polymorphism and good repeatability were screened from 80 ISSR primers. 133 bands were amplified from 44 populations *M. ruthenica* genomic DNA, with an average of 8.31 bands in each primer, of which (115 bands) 87.08% were polymorphic. The genetic dissimilarity coefficients of *M. ruthenica* germplasm ranged from 0.436 to 0.908. 44 populations *M. ruthenica* germplasm were divided into eight groups with the higher correlation of geography resource by UPGMA cluster analysis.

Key words: *Medicago ruthenica*; Germplasm; Genetic relationship; ISSR

ISSR(Inter Simple Sequence Repeat)是以重复序列的单一引物为主要引物序列的 PCR 标记,由加拿大蒙特利尔大学的 Zietkiewicz 等^[1]1994 年提出。其特点是遗传多态性高、重复性好、显性标记、耗资少、模板用量少等。ISSR 引物设计比 SSR 技术简单,无需知道任何靶标序列的 SSR 背景信息,可揭示比 RFLP、RAPD 和 SSR 更多的多态性,目前国内 ISSR 分子标记已在披碱草^[2]、紫花苜蓿^[3]、新麦

草^[4]、昆仑锦鸡儿^[5]、小花棘豆^[6]、斑茅^[7]、雀麦属^[8]等牧草和乌拉尔甘草^[9]、二色胡枝子^[10]等植物用于遗传多样性、指纹图谱等方面的研究。扁蓿豆是一种优良的多年生豆科牧草,广泛分布于我国北方的高山草原、典型草原和荒漠化草原,具有抗旱、耐寒、耐瘠薄、耐践踏等特点,有较多的生态型,是一种营养价值和产量较高的优良牧草。在适应性、抗旱性和耐寒性等方面优于紫花苜蓿。

收稿日期: 2011-10-25 修回日期: 2011-08-19

基金项目: 农业部农作物种质资源保护与利用项目(NB2010-2130135-32); 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

作者简介: 李志勇, 副研究员, 研究方向为牧草种质资源鉴定、评价与创新。E-mail: zhiyongli1216@126.com

通讯作者: 李鸿雁, 副研究员, 研究方向为牧草种质资源鉴定、评价与创新。E-mail: hongyili1964@126.com

也可与禾本科牧草建立混播人工草场,提高草场的产量和品质。在改良草地、建立人工草地、防治水土流失等方面具有重要意义,尤其是寒冷半干旱、土壤贫瘠区引种植具有特殊意义^[11]。Campbell 等^[12-13]从合理密植、培养直立生长品种、种子活力检测及扁蓿豆基因变异等方面对内蒙古收集的野生扁蓿豆进行了研究。前期已有对野生扁蓿豆在种子硬实率^[14]、抗逆性鉴定^[15]、蛋白质水平^[16]、染色体水平^[17]及 SSR 分子水平^[18-19]等方面进行初步分析。但利用 ISSR 分子标记研究少见报道。本研究旨在利用 ISSR 标记技术对扁蓿豆种

质资源进行遗传多样性分析,为育种者选择亲本和扁蓿豆种质资源的开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

在我国,扁蓿豆主要分布在北方温带和寒带地区,以内蒙古分布最多。试验所用材料均由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提供(表 1)。于 2005 年种植在农业部沙尔沁牧草资源重点野外科学观测试验站。

表 1 供试扁蓿豆种质材料来源

Table 1 *Medicago ruthenica* germplasm origins

编号 Code	采集地点 Origin	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	16	内蒙古伊尔施县	31	内蒙古清水河县
2	内蒙古西乌珠穆沁旗	17	内蒙古阿尔山市	32	内蒙古武川县
3	内蒙古阿巴嘎旗	18	内蒙古科右中旗	33	北京市
4	内蒙古白音锡勒	19	内蒙古鄂温克旗	34	山西省太原市
5	内蒙古东乌珠穆沁旗	20	内蒙古扎兰屯市	35	山西省沁水县
6	内蒙古正蓝旗	21	内蒙古新巴尔虎左旗	36	山西省右玉县
7	内蒙古正镶白旗	22	内蒙古四子王旗	37	山西省平鲁县
8	内蒙古灰腾梁	23	内蒙古乌兰察布市	38	山西省大同县
9	内蒙古多伦县	24	内蒙古察右中旗	39	河北省围场县
10	内蒙古巴林右旗	25	内蒙古化德县	40	辽宁省辽西县
11	内蒙古林西县	26	内蒙古商都县	41	吉林省公主岭市
12	内蒙古阿鲁克沁旗	27	内蒙古土右旗	42	吉林省长春市
13	内蒙古科尔沁左翼后旗	28	内蒙古达茂旗	43	西藏扎达县
14	内蒙古奈曼旗	29	内蒙古和林县	44	直立型扁蓿豆(登记品种,无采集地)
15	内蒙古科尔沁左翼中旗	30	内蒙古呼和浩特市		

1.2 方法

扁蓿豆总 DNA 提取参见李鸿雁等^[18-19]的报道。ISSR 反应体系及扩增条件: 25 μ l 体系中, TaqDNA 聚合酶 1.5U, 10 \times PCR buffer(含 Mg²⁺) 2.0mmol/L, 模板 DNA 0.5ng/ μ l, dNTPs 0.6mmol/L, 引物 0.9 μ mol/L。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3min, 35 个热循环, 每个热循环 94 $^{\circ}$ C 变性 30s, 52 $^{\circ}$ C 退火 45s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5min, 结束循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min, 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增完成后在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳(100V, 50mA), EB(溴化乙锭)染色 20min, 紫外分析仪上检测扩增产物并照相。引物、dNTPs 及 TaqDNA 聚合酶均购自上海生物工程技术服务有限公司。

1.3 数据处理

ISSR 对清晰可辨的电泳条带用于统计分析,按扩增条带有无记数,有扩增带时赋值为 1,无扩增带时赋值为 0,把图形资料转换成数据资料。利用 NT-SYSp2.1 软件^[20]统计 ISSR 数据的遗传相似系数(GS),用 UPGMA 法进行聚类分析并绘制聚类图。

2 结果与分析

2.1 扁蓿豆种质总 DNA 扩增产物的多态性分析

选取扩增条带清晰、稳定性好的 16 条引物进行 PCR 扩增(表 2 和图 1), 共在 133 个位点获得扩增片段, 平均每个引物扩增片段为 8.31 条, 扩增片段

最多的引物是 UBC822, 为 13 条, 最少的引物为 UBC848、UBC854、UBC812 和 UBC825, 分别只有 6 条。多态性带共有 115 条, 多态性比率为 87.08%, 平均每个引物产生 7.18 条多态性带, 多态性在

66.7% ~ 100% 之间, 引物 UBC845、UBC862 和 UBC813 多态性比率最高(100%), 引物 UBC848 和 UBC812 多态性比率最低(66.7%), 说明扁蓊豆居群 ISSR 多态性比率相对较高, 遗传基础较广。

表 2 ISSR 引物序列和多态性比率

Table 2 ISSR primer sequence and percentage of polymorphic

引物编号 Primer code	核苷酸序列 Sequence	退火温度(°C) Annealing temperature	扩增片段数目 No. of Amplified band	多态性位点数 No. of polymorphic Loci	多态性位点的比率(%) Percentage of polymorphic
UBC822	TCTCTCTCTCTCTCA	52	13	11	84.6
UBC845	CTCTCTCTCTCTCTRG	54	10	10	100.0
UBC866	CTCCTCCTCCTCCTCCTC	61	10	9	90.0
UBC823	TCTCTCTCTCTCTCTCC	55	10	9	90.0
UBC813	CTCTCTCTCTCTCTCTT	53	9	9	100.0
UBC843	CTCTCTCTCTCTCTCTRA	50	9	8	88.9
UBC821	GT GT GT GT GT GT GTT	53.5	9	8	88.9
UBC847	CACACACACACACARC	55	8	7	87.5
UBC834	AGAGAGAGAGAGAGAGYT	52	8	7	87.5
UBC862	AGCAGCAGCAGCAGCAGC	62	7	7	100.0
UBC836	AGAGAGAGAGAGAGAGYA	52	8	6	75.0
UBC809	AGAGAGAGAGAGAGAGAGG	52	8	6	75.0
UBC854	TCTCTCTCTCTCTCTCRG	55	6	5	83.3
UBC825	ACACACACACACACT	53.6	6	5	83.3
UBC848	CACACACACACACARG	52	6	4	66.7
UBC812	GAGAGAGAGAGAGAGAA	53	6	4	66.7
总计 Total			133	115	
平均 Average			8.31	7.18	87.08

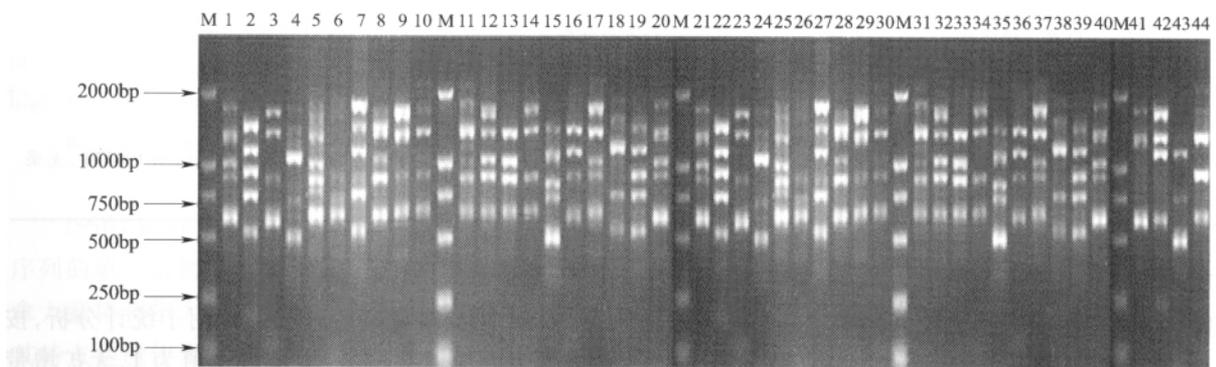


图 1 UBC812 扩增产物电泳图谱

Fig. 1 Amplification results of UBC812

材料编号同表 1, M 代表 marker Notes of 1-44 same as Table 1. M stands for marker

2.2 遗传相似性分析

ISSR 分析结果表明: 利用 16 个 ISSR 引物产生的 115 条 DNA 片段计算了供试材料间的遗传相似系数(GS)。ISSR 标记揭示的材料间 GS 值变化范围为 0.436 ~ 0.908, ISSR 数据结果: 遗传相似系数(GS)最小的是来自内蒙阿巴嘎旗的 3 号居群与登

记品种直立型扁蓊豆(0.436) 遗传距离最远, 遗传相似程度最低; 最大的是来自吉林省公主岭市的 41 号居群与登记品种直立型扁蓊豆(0.908); 遗传距离最近, 遗传相似程度最高。

2.3 聚类分析

ISSR 的聚类结果见图 2。在阈值为 0.65 处, 可

将所有供试材料划分为 8 大类,第 1 类由来自内蒙古锡林郭勒盟各旗县的 9 个居群组成,生态特点为荒漠草原;第 2 类包括 4 个居群,分别来自内蒙古赤峰市 4 个旗县,主要表现为抗逆性较强;第 3 类包括 2 个居群,来自通辽市,主要表现植株的生长习性为半直立;第 4 类包括 17 个居群,其中有来自内蒙古兴安盟各旗县的 4 个居群、海拉尔市的 2 个居群、乌

兰察布市各旗县的 5 个居群、包头市的 2 个居群、呼和浩特市 1 个居群与辽宁省的 1 个居群、吉林省的 2 个居群,第 5 类包括 7 个居群,分别来自内蒙古中西部的 2 个居群与山西、河北的 7 个居群;第 6 类是来自内蒙商都县的 26 号居群;第 7 类是 44 号直立型扁蓊豆;第 8 类是来自西藏的 43 号居群。

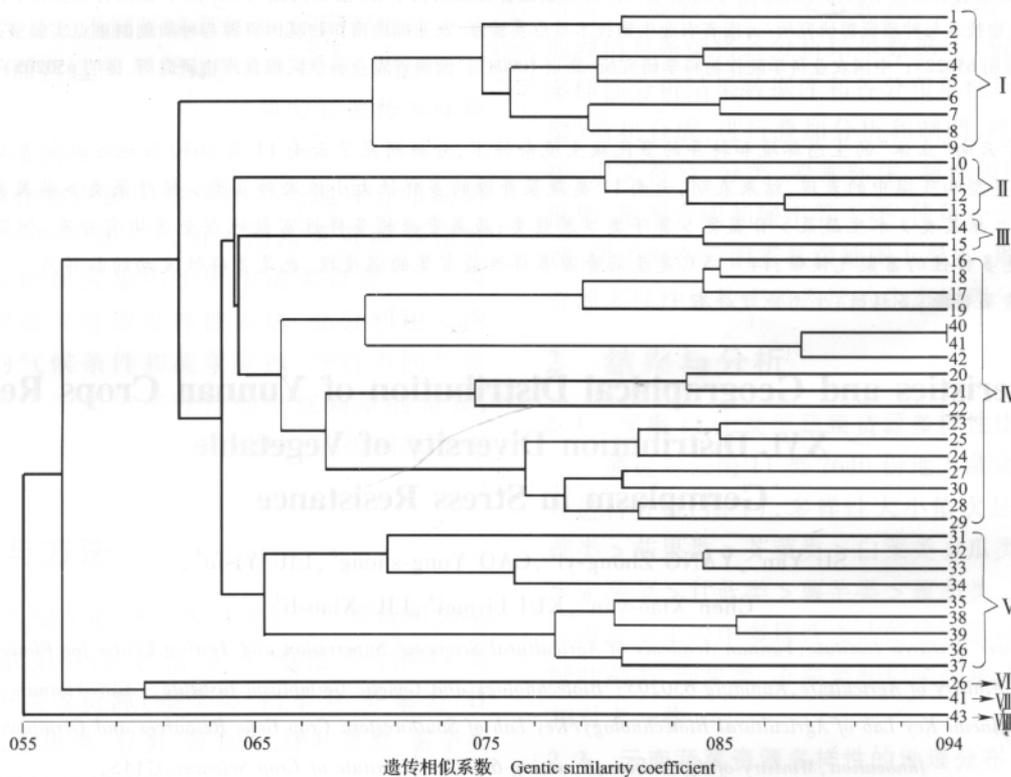


图 2 ISSR 标记的遗传聚类图

Fig. 2 Dendrogram of genetic cluster analysis based on ISSR markers

3 讨论

扁蓊豆因其优异的特性具有很大的利用潜力。本研究表明,从 ISSR 扩增图谱来看,扩增片段多态性最高的为 100%,最少的为 66.7%,平均 87.08%,多态性比例相对较高,说明扁蓊豆遗传基础较广。从遗传相似系数来看,扁蓊豆遗传相似系数分布在 0.436~0.908 之间,表明扁蓊豆的遗传多样性比较丰富,这与李鸿雁等^[18]利用 SSR 技术的研究结果相似。从聚类分析结果可见,多数来源地相同的种质表现出较为密切的亲缘关系。可以针对不同的类群和不同育种目标对野生扁蓊豆资源进行有目的的改良和利用,从而扩大扁蓊豆遗传基础,为扁蓊豆育种积累材料。本研究采用的方法也可今后扁蓊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。

扁蓊豆分布环境的多样性,导致扁蓊豆不同居群之间以及同一居群不同个体之间形态性状变异的多样性。扁蓊豆为苜蓿属中的一个野生种,是改良和育成新品种的巨大基因库,利用分子标记开展多基因聚合育种是未来育种的前途所在,借助截形苜蓿等模式牧草的分子标记研究成果,有助于尽快获得豆科牧草的大量标记和高密度图谱。

参考文献

- [1] Zietkiewicz E, Rafalske A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genome*, 1994, 20: 178-183
- [2] 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

(下转 56 页)

4 讨论

本文主要研究了自然环境对蔬菜资源多样性的影响及表现习性,说明蔬菜资源多样性的形成与自然环境息息相关,同时也进一步证明了自然选择作用。但是,自然环境的构成因素很多,如海拔、经纬度、温度、降雨等,要进一步阐明蔬菜资源多样性的形成,还有大量的工作待做。

蔬菜资源多样性形成离不开人类活动,关于人类活动对生物多样性影响是当前研究的热点,云南是全国少数民族最多的省份,其中人口超过5000并有一定聚居区域的民族有25个。其中白、哈尼、傣、傈僳、佤、拉祜、纳西、景颇、布朗、普米、怒、德昂、独龙、基诺等15个民族为云南所特有。由于地形复杂和垂直高差大等原因,形成了丰富的生存空间,不同的民族有着不同的饮食文化,许多有民族特色的生活习俗仍保留至今,这样的分异空间为研究人类活动对蔬菜资源多样性影响提供了基础。因此,课题组将进一步研究人工选择对蔬菜资源多样性的作用。

参考文献

[1] 孟金贵,曾亚文. 云南珍稀名优蔬菜资源及其开发利用[J]. 资源科学, 2000, 22(2): 475-479

- [2] 杨忠义,曹永生,苏艳,等. 云南作物资源特征特性及生态地理分布研究 I. 云南地方稻种资源中特种稻资源[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 331-337
- [3] 杨忠义,卢义宣,苏艳,等. 云南稻作资源特征特性及生态地理分布研究 VI. 稻瘟病抗性资源的多样性分布研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(4): 936-941
- [4] 奎丽梅,卢义宣,苏艳,等. 云南稻作资源特征特性及生态地理分布研究 VII. 稻白叶枯病抗性资源的多样性分布研究[J]. 西南农业学报, 2009, 22(6): 1501-1504
- [5] 杨忠义,苏艳,曹永生,等. 云南稻种资源多样性的生态地理分布研究[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(4): 475-479
- [6] 杨忠义,苏艳,刘义富,等. 云南作物资源特征特性及生态地理分布研究 X III. 稻抗病性资源的多样性分布研究[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(5): 611-615
- [7] 杨忠义,曹永生,卢义宣,等. 云南稻种资源生态地理分布研究[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2006
- [8] 杨敏杰,龚亚菊,张丽琴,等. 云南野生蔬菜资源调查研究[J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 90-96
- [9] 刘发万,杨敏杰,钟利,等. 云南野生蔬菜资源分布特点及研究利用[J]. 长江流域资源与环境, 2007(16): 55-58
- [10] 中国农业科学院作物品种资源研究所. 中国稻作资源目录(2) [M]. 北京: 农业出版社, 1992
- [11] 中国农业科学院作物品种资源研究所. 中国稻作资源目录(1) [M]. 北京: 农业出版社, 1976
- [12] 韩龙植,魏兴华,曹桂兰,等. 水稻种质资源描述规范和数据标准[M]. 北京: 农业出版社, 2006
- [13] 《云南农业地理》编写组. 云南农业地理[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1981: 31-38
- [14] 云南省测绘局. 云南省地图集[M]. 昆明: 云南省测绘局, 1982
- [15] 云南省农牧渔业厅编. 云南省种植业区划[M]. 昆明: 云南科技出版社, 1992
- [16] 云南省气象局. 云南省农业气候资料集[M]. 昆明: 云南人民出版社, 1983

(上接第51页)

- [3] 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
- [4] 刘永财,孟林,张国芳,等. 新麦草种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(5): 107-112
- [5] 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
- [6] 卢萍,赵萌莉,韩国栋,等. 内蒙古小花棘豆遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 西北植物学报, 2007, 27(6): 1102-1107
- [7] 张木清,洪芝殉,李奇伟,等. 中国斑茅种质资源分子多态性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2004, 13(1): 1-6
- [8] 游国卿,万凤翎,卢新雄,等. 库存和国存对雀麦属种质遗传完整性的影响[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 428-432
- [9] 孙群,佟汉文,吴波,等. 不同种源乌拉尔甘草形态和 ISSR 遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 56-63
- [10] 赵杨,陈晓阳,王秀荣,等. 二色胡枝子遗传多样性 ZSSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(2): 195-199
- [11] 内蒙古植物志编委会. 内蒙古植物志(第3卷)第2版[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1989
- [12] Campbell T A. Molecular analysis of genetic variation among alfalfa (*Medicago sativa*) and *Medicago ruthenica* clones [J]. Plant

Sci, 2000, 80: 773-779

- [13] Campbell T A, Bao G, Xia Z. Completion of the agronomic evaluations of *Medicago ruthenica* germplasm collected in Inner Mongolia [J]. Genet Res Crop Evol, 1999, 46: 477-484
- [14] Eerdungaridi, Noboru NAKATA. Seed Hard-coatedness of *Medicago ruthenica* Grown in Middle and East Part of Inner Mongolia [J]. 中国草地学报, 2007, 29(6): 1-5
- [15] 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
- [16] 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
- [17] 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(简报) [J]. 草地学报, 2008, 16(3): 316-318
- [18] 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
- [19] 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
- [20] Rohlf F F J. NTSYS-pc numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Pub New York, 2000