



中型狼尾草种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

张怀山¹,夏曾润²,栗孟飞³,王春梅¹,杨世柱¹

(1 中国农业科学院兰州畜牧与兽药研究所,农业部兰州黄土高原生态环境重点野外科学观测试验站,兰州 730050;2 兰州大学草地农业科技学院,草地农业生态系统国家重点实验室,兰州 730020;3 甘肃农业大学 生命科学技术学院,干旱生境作物学重点实验室,兰州 730070)

摘要:运用 ISSR 标记对采自云南的 25 份野生种质和 4 份驯化新品系中型狼尾草材料进行遗传多样性分析。结果显示:(1)50 条 ISSR 引物中共筛选出 10 条能扩增出清晰条带且多态性明显的引物,29 份材料 DNA 共获得 72 个扩增位点,其中多态性位点 62 个,多态性比率为 87.4%,平均每条引物扩增位点为 7.2 个;平均观察等位基因数(Na)、有效等位基因数(Ne)、Shannon 多样性信息指数(I)和 Nei's 基因多样性指数(H)分别为 1.861 1、1.742 8、0.561 0 和 0.395 9;种质材料间的遗传相似性系数变幅为 0.236~0.903,表现出丰富的遗传多样性。(2)利用 UPGMA 聚类分析,以遗传相似系数 0.51 为界,29 份材料划分为 4 大类,但 Mantel 检测表明 29 份种质材料的遗传聚类和地理距离之间不存在显著的正相关关系($r=0.437 0, P=0.204 6$)。研究结果首次从分子水平揭示了中型狼尾草的遗传多样性和变异水平,为合理地引种、驯化、保护和利用中型狼尾草野生资源提供了重要的参考依据和数据支持。

关键词:中型狼尾草;ISSR 标记;种质资源;遗传多样性

中图分类号:Q346⁺.5;Q789 文献标志码:A

Genetic Diversity of *Pennisetum longissimum* var. *intermedium* Germplasm Resources Using ISSR Markers

ZHANG Huaishan¹, XIA Zengrun², LI Mengfei³, WANG Chunmei¹, YANG Shizhu¹

(1 Lanzhou Institute of Husbandry and Pharmaceutical Sciences CAAS, The Lanzhou Scientific Observation and Experiment Field Station of Ministry of Agriculture for Ecological System in Loess Plateau Areas, Lanzhou 730050, China; 2 College of Pastoral Agriculture Science and Technology, Lanzhou University, State Key Laboratory of Grassland Agro-ecosystems, Lanzhou 730020, China; 3 College of Life Science and Technology, Gansu Agricultural University, Gansu Provincial Key Laboratory of Aridland Crop Science, Lanzhou 730070, China)

Abstract: The genetic diversity of the 29 accessions of *Pennisetum longissimum* var. *intermedium* from Gansu and Yunnan were analyzed by ISSR makers. The results showed that: (1) 10 primers were selected from 50 primers which had clear, stable polymorphic bands. A total of 72 loci were obtained, including 62 polymorphic loci. On average, amplification site of each primer was 7.2 and the percentage of polymorphic loci (PPL) was 87.4%. The mean observed number of alleles (Na), effective number of alleles (Ne), Shannon information index (I) and Nei's genetic index (H) were 1.861 1, 1.742 8, 0.561 0 and 0.395 9, respectively. The genetic similarity coefficient (GS) ranged from 0.236 to 0.903, which shows rich genetic diversity among the materials of *P. longissimum* var. *intermedium*. (2) Cluster analysis with UPGMA method

收稿日期:2013-11-16;修改稿收到日期:2014-01-02

基金项目:国家自然科学基金(31201841);甘肃省农业科技创新项目(GNCX-2013-58);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(1610322014015, 1610322013011);兰州市科技计划项目(2011-1-167)

作者简介:张怀山(1969—),男,博士,助理研究员,主要从事草类植物种质资源与育种研究。E-mail:zhanghz2007@163.com

showed that the 29 tested accessions were divided into 4 groups at the level GS 0.51, but there was no correlation ($r=0.4370, P=0.2046$) between genetic and geographic distance among the germplasms studied. The results of this research were the first time to reveal genetic diversity and variation of *P. longissimum* var. *intermedium* at the molecular level, which provided theoretical and data evidence for the introduction, domestication, conservation and exploitation of wild *P. longissimum* var. *intermedium* germplasm resources.

Key words: *Pennisetum longissimum* var. *intermedium*; ISSR markers; germplasm resources; genetic diversity

中型狼尾草(*Pennisetum longissimum* var. *intermedium*)是陈守良等在1984年发现并命名的长序狼尾草新变种^[1],为禾本科(Gramineae)狼尾草属(*Pennisetum*)多年生疏丛型草本植物,中国云南、四川、贵州、湖南、甘肃等地均有分布。中型狼尾草茎秆较粗壮,根系发达,具有适应性广、再生能力强、容易栽培、产草量高、少有病害等优良特性^[2],营养成分相对较高,是一种重要的饲草资源,其抗旱、耐湿性较强,并具有适度的耐盐碱性,也是一种良好的水土保持、防风固沙植物,具有较高的生态价值。

遗传多样性不仅表现在表型性状上的差别,更重要的是表现在蛋白质、染色体和DNA水平上的差异。分子标记的发展为从DNA水平检测种质资源的遗传多样性提供了有利的工具。ISSR (intersimple sequence repeats)是由加拿大蒙特利尔大学的Zietkiewicz等^[3]于1994年提出的一种建立在PCR反应基础上的新型微卫星类分子标记技术。该技术具有无需预知基因组背景信息、DNA样品用量少、信息量大、结果记录方便、实验成本低、操作简单、重复性好等优点,可以揭示出比AFLP、RAPD、SSR更丰富的多态性,而且不受季节、环境等外在因素的影响^[4-5]。ISSR目前已被广泛运用于植物种质资源鉴定、基因定位、遗传作图、进化、系统发育、物种分类及分子标记育种等研究中,是植物遗传多样性分析中的主要技术手段之一^[6-10]。

中型狼尾草属于典型的异花授粉植物,分布甚广,在其演化过程中无疑存在着种间杂交或平行进化等复杂现象,揭示其演化途径和不同地域野生种间的明确亲缘关系是一项繁复而持久的探究工作。国内目前对中型狼尾草的研究主要侧重于形态分类^[11]、引种驯化^[12]、生产性能^[13]、生理生态特性^[14-15]等方面,而从分子水平对中型狼尾草遗传多样性的研究还未见报道。基于此,本研究利用ISSR分子标记手段对从采自云南的25份野生种质和4份驯化新品系的中型狼尾草材料进行种间遗传多样性分析,旨在探索ISSR分子标记法在中型狼尾草

品种鉴定与分类、系统发育等研究中的可行性,同时也为中型狼尾草种质资源的开发利用及新品种培育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

29份中型狼尾草材料均采自云南、甘肃两省各地。其中,1~4号材料是人工驯化品系,原材料来自云南昆明,2008年引种栽培于甘肃兰州大洼山牧草试验基地,2011年收种;5~29号材料于2009~2010年采自云南各地的野生种质,具体来源见表1。

1.2 DNA提取及定量

每份材料随机取10~15个单株的新鲜幼嫩叶片,等量混合,采用改良SDS(sodium dodecyl sulfate,十二烷基硫酸钠)法^[16]提取植物总DNA。用1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测DNA质量,经紫外可见分光光度计(TU-1901)测定其浓度和相对纯度后,最终用TE稀释至10 ng/μL,−20℃保存备用。

1.3 ISSR引物的筛选

本试验根据加拿大哥伦比亚大学(University of British Columbia, UBC)核酸蛋白服务工作室公布的100对ISSR引物(UBC801-UBC900)序列设计,挑选50条交由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。最终筛选出10条扩增条带较多、结果稳定、背景清晰的引物用于中型狼尾草ISSR-PCR反应(表2)。

1.4 ISSR-PCR反应体系的建立与优化

将筛选引物分别在野生大麦(*Hordeum vulgare*)^[17]、早熟禾(*Poa pratensis*)^[18]、沙鞭(*Psamnochloa villosa*)^[19]和小花棘豆(*Oxytropis glabra*)^[20]的ISSR反应体系和反应程序下进行扩增,通过预试验,建立了一套中型狼尾草ISSR分析的优化反应体系及反应程序。20 μL反应体系包括:9.74 μL ddH₂O, 2.0 μL 10×PCR Buffer, 0.2 mmol/L dNTP, 0.5 μmol/L ISSR引物, 5 U Taq DNA聚合酶, 40 ng DNA模板。反应程序为:94

表 1 试验材料及来源
Table 1 Detailed information of experimental materials

编号 No.	采集地点 Location	海拔 Altitude/m	经纬度 Longitude and latitude
1	甘肃兰州大洼山 Dawashan, Lanzhou, Gansu	1 750	36°01'N, 103°45'E
2	甘肃兰州大洼山 Dawashan, Lanzhou, Gansu	1 750	36°01'N, 103°45'E
3	甘肃兰州大洼山 Dawashan, Lanzhou, Gansu	1 750	36°01'N, 103°45'E
4	甘肃兰州大洼山 Dawashan, Lanzhou, Gansu	1 750	36°01'N, 103°45'E
5	云南昆明官渡区福保村 Fubao, Guandu, Kunming	1 892	24°55'N, 102°41'E
6	云南昆明西山区采莲河 Cailian, Xishan, Kunming	1 891	25°00'N, 102°40'E
7	云南昆明呈贡区中和村 Zhonghe, Chenggong, Kunming	1 893	24°49'N, 102°46'E
8	云南昆明呈贡区罗家村 Luoja, Chenggong, Kunming	1 890	24°49'N, 102°46'E
9	云南昆明晋宁县杨家河 Yangjia, Jinning, Kunming	1 892	24°45'N, 102°43'E
10	云南昆明西山区河尾村 Hewei, Xishan, Kunming	1 887	24°59'N, 102°39'E
11	云南昆明官渡区新河村 Xinhe, Guandu, Kunming	1 889	24°59'N, 102°39'E
12	云南昆明呈贡区滇池边 Dianchi, Chenggong, Kunming	1 890	24°51'N, 102°44'E
13	云南嵩明县腰站村 Yaozhan, Chongming, Yunnan	2 003	24°14'N, 102°06'E
14	云南嵩明县苔才村 Taicai, Chongming, Yunnan	2 075	24°20'N, 102°46'E
15	云南嵩明县青龙潭 Qinglongtan, Chongming, Yunnan	1 998	24°17'N, 102°52'E
16	云南宜良县凤鸣村 Fengming, Yiliang, Yunnan	1 783	24°57'N, 103°02'E
17	云南禄劝县施宽村 Shikuan, Luquan, Yunnan	2 250	25°58'N, 102°47'E
18	云南安宁县八街镇 Bajie, Anning, Kunming	1 946	24°39'N, 102°21'E
19	云南武定县高桥镇 Gaoqiao, Wuding, Yunnan	1 986	25°36'N, 102°11'E
20	云南澄江县小窑村 Xiaoyao, Chengjiang, Yunnan	1 735	24°38'N, 102°53'E
21	云南澄江县廖官营 Liaoguanying, Chengjiang, Yunnan	1 755	24°40'N, 102°54'E
22	云南姚安县栋川镇 Dongchuan, Yaoan, Yunnan	1 881	25°30'N, 101°14'E
23	云南禄劝县撒营盘 Sayingpan, Luquan, Yunnan	2 275	25°59'N, 102°31'E
24	云南宜良县清水沟 Qingshui, Yiliang, Yunnan	1 584	24°54'N, 103°07'E
25	云南嵩明县水海村 Shuihai, Chongming, Yunnan	1 896	25°37'N, 103°19'E
26	云南祥云县王家山 Wangjiashan, Xiangyun, Yunnan	1 997	25°28'N, 100°33'E
27	云南祥云县红土坡 Hongtupo, Xiangyun, Yunnan	2 014	25°28'N, 100°32'E
28	云南马龙县中小屯 Zhongxiaotun, Malong, Yunnan	2 004	25°31'N, 103°30'E
29	云南马龙县通泉镇 Tongquan, Malong, Yunnan	2 046	25°25'N, 103°34'E

℃预变性 3 min, 94 ℃变性 1 min, 50 ℃退火 1 min, 72 ℃延伸 1.5 min, 共 34 个循环; 72 ℃延伸 10 min, 4 ℃保存。

扩增产物在含有 0.5 μ g/mL EB(ethidium bromide, 溴化乙锭)的 1.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶 66 W 恒功率电泳约 75 min, 电泳结束后于紫外凝胶成像系统(Tanon 2500)拍照并分析。

1.5 数据统计及分析

ISSR 通常被认为是显性标记, 视每条多态性为一个等位基因。凝胶上相同迁移率位置上有 DNA 条带的记为 1, 没有 DNA 条带或模糊不清的记为 0, 将结果输入 Excel 表格, 得到 ISSR 表型数据矩阵。采用 POPGENE 32 (Version 1.32) 软件计算 ISSR-PCR 扩增产物的多态位点数、多态位点比率 (PPL)、Shannon 多样性信息指数 (I)、Nei's 基因多样性指数 (H)、观察等位基因数 (Na) 及有效等位

基因数 (Ne)。利用 NTSYS-PC (Version 2.10e) 软件的 Similarity 程序-Qualitative data 对原始数据矩阵进行 Nei 遗传相似性系数 (genetic similarity, GS) 计算, 应用 Clustering 中 SNAN 程序的非加权成组配对算术平均法 (UPGMA) 对中型狼尾草材料进行遗传相似性聚类分析, 最后在 Graphic 中的 Tree plot 程序下建立树状图^[21]。运用 TFPGA (Version 1.3) 软件^[22] 对种质地理距离与遗传聚类之间的相关性进行 Mantle 检验。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增产物及多态性分析

按照最优反应体系及程序最终筛选出的重现性好、特异性高、多态性明显的 10 条 ISSR 引物, 用于 29 份中型狼尾草材料 DNA 的 PCR 扩增(图 1)。表 2 显示, 10 条引物共扩增出 72 个位点, 其中多态

性位点 62 个,平均多态性比率(*PPL*)达 87.4%;每条引物扩增位点 4~15 个不等,平均 7.2 个,其中多态性位点 3~12 个不等,平均 6.2 个;多态性比率最高的达 100%,最低的为 75%,引物 UBC899 扩增位点最多,为 15 个,UBC855 和 UBC895 位点最少。这说明供试中型狼尾草种质资源间存在较高的遗传变异,且 ISSR 标记能有效地从分子水平上揭示材料间的多态性。

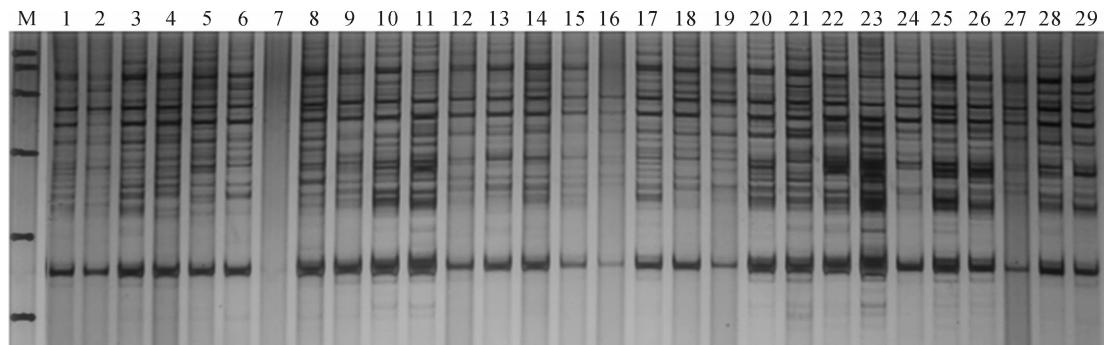


图 1 引物 UBC899 扩增的中型狼尾草 ISSR 图谱

1~29 为中型狼尾草材料,编号同表 1;M. Marker III

Fig. 1 ISSR amplification result of *P. longissimum* var. *intermedium* with primer UBC899
1~29. Accessions of *P. longissimum* var. *intermedium*, numbers were showed in Table 1; M. Maker III

表 2 引物序列及位点多态性

Table 2 Sequence and amplified loci polymorphism of 10 primers

引物 Primer	序列 Sequence(5'-3')	退火温度 Annealing temperature/℃	位点数 No. of loci	多态位点数 No. of polymorphic loci	多态位点比率 Proportion of polymorphic loci/%
UBC826	(AC) ₈ C	50	9	7	77.8
UBC829	(TG) ₈ C	50	6	6	100.0
UBC846	(CA) ₈ RT	51	8	7	87.5
UBC847	(CA) ₈ RC	53	6	6	100.0
UBC855	(AC) ₈ YT	51	4	3	75.0
UBC856	(AC) ₈ YA	51	7	6	85.7
UBC866	(CTC) ₆	55	5	4	80.0
UBC879	(CTTCA) ₃	50	8	7	87.5
UBC895	AGAGTTGGTAGCTCTTGATC	53	4	4	100
UBC899	CATGGTGGTGGTCATTGTTCCA	56	15	12	80.0
平均 Average			7.2	6.2	87.4
总计 Total			72	62	

Note: R=(A, G); Y=(C, T).

表 3 29 份中型狼尾草材料遗传多样性指数

Table 3 Genetic diversity indexes of 29 *P. longissimum* var. *intermedium* accessions

项目 Item	样本 Sample size	观测等位基因数 Observed allele number (<i>Na</i>)	有效等位基因数 Effective number of alleles (<i>Ne</i>)	Shannon 多样性信息指数 Shannon's index (<i>I</i>)	Nei 基因多样性指数 Nei's index (<i>H</i>)
平均 Mean	29	1.861 1	1.742 8	0.561 0	0.395 9
标准差 St. Dev		0.348 3	0.327 8	0.231 3	0.165 6

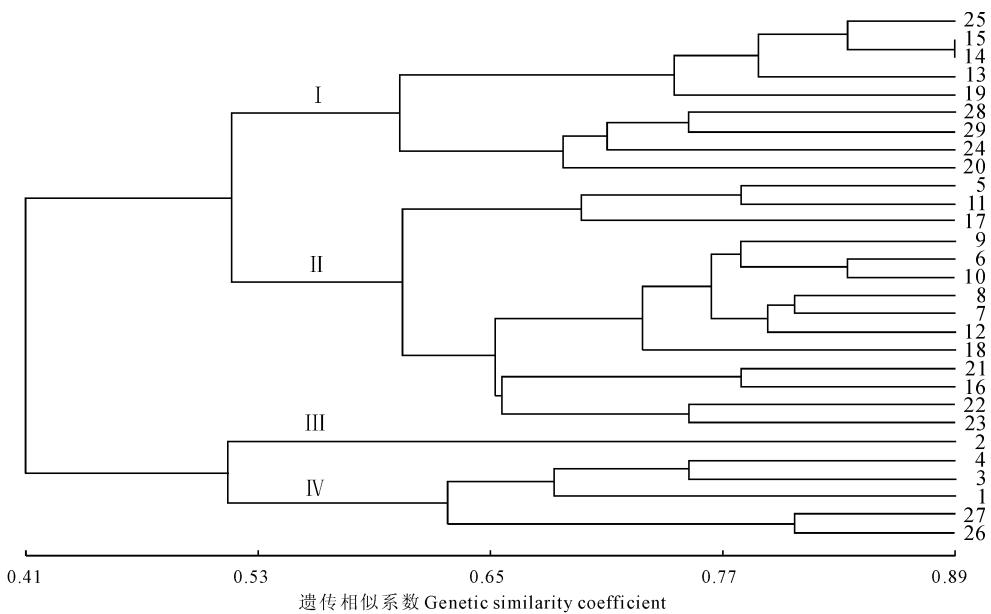


图2 基于ISSR标记的29份中型狼尾草种质资源聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis based on ISSR of 29 *P. longissimum* var. *intermedium* germplasm resources

2.3 遗传相似性系数分析

Nei遗传相似性系数(GS)是用来比较群体或个体间相似程度的度量参数,平均相似系数越高,说明相似程度越大,遗传背景一致性越强^[23]。29份中型狼尾草材料之间的Nei遗传相似性系数变化范围为0.236~0.903(表4)。其中,亲缘关系最近的是来源于云南昆明市官渡区新河村的11号材料和安宁县八街镇的18号材料,GS值为0.903;遗传相似性系数最低的是来源于云南昆明市禄劝县施宽村的17号材料与来源于云南曲靖市马龙县中小屯的28号材料,GS值为0.236,亲缘关系最远。29份中型狼尾草种质材料中,大多数来自相同或相近地理位置的材料间Nei遗传相似性系数较大,亲缘关系较近;但由于采样地理分布较广,生境相差较大,有一小部分材料之间GS值较小,从而使得供试材料间整体存在较大的遗传差异。

2.4 聚类分析

利用UPGMA法对29份中型狼尾草材料进行聚类分析,建立聚类分支树状图(图2)。供试材料以遗传相似系数0.51为分类界限,聚为4大类:第I类有9份材料,按地理来源划分为2个亚类,来自云南崇明县的25号、15号、14号、13号材料与来自武定县的19号材料为第1亚类,来自云南马龙县的28号、29号材料与来自宜良县的24号材料及来自澄江县的20号材料为第2亚类;第II类有14份材料,大部分都来自云南昆明市城郊附近,又分为2个

亚类,第1亚类包括来自昆明市官渡区的5号、11号及来自禄劝县的17号共3份材料,第2亚类有11份材料,分别是来自昆明市晋宁县的9号材料、西山区的6号、10号材料、呈贡区的8号、7号和12号材料以及来自安宁市的18号材料、澄江县的21号材料、宜良县的16号材料、姚安县的22号材料和禄劝县的23号材料;第III类只包含1份来自甘肃兰州的2号材料;第IV类有5份材料,也是划分为2个亚类,来自甘肃兰州的4号、3号和1号材料为第1亚类,来自云南祥云县的27号和26号材料为第2亚类。经Mantle检验,中型狼尾草种质的地理距离和遗传聚类之间并不存在显著的相关性($r=0.4370, P=0.2046$)。

3 讨 论

鉴定、分析材料的遗传多样性是研究物种起源进化、发现新的基因资源、改良现有育种材料的基础性工作。分子标记是从DNA水平上揭示品种及种群间差异性和相关性的有效工具之一,运用它可以确定样本材料之间的遗传多样性和亲缘关系,通过聚类分析可以划分出杂种优势群,提高杂交优势的应用效率,对种质资源保护和品种改良具有重要意义。

中型狼尾草作为一种兼具饲草、生态型的优良草种而受到禾草学家的高度重视。张怀山等^[11]研究表明,采自云南祥云的中型狼尾草种子在昆明地

表 4 ISSR 标记的 29 份材料之间的遗传相似系数
Table 4 Genetic similarity coefficient of 29 accessions based on ISSR

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28
2	0.556																											
3	0.694	0.583																										
4	0.819	0.625	0.569																									
5	0.597	0.569	0.681	0.444																								
6	0.458	0.597	0.486	0.333	0.778																							
7	0.361	0.389	0.417	0.458	0.493	0.514																						
8	0.681	0.542	0.542	0.611	0.444	0.556	0.514																					
9	0.792	0.542	0.486	0.694	0.417	0.528	0.486	0.806																				
10	0.389	0.583	0.611	0.264	0.708	0.708	0.639	0.542	0.458																			
11	0.708	0.542	0.764	0.750	0.528	0.333	0.542	0.611	0.500	0.458																		
12	0.639	0.556	0.528	0.736	0.292	0.347	0.694	0.796	0.708	0.389	0.625																	
13	0.556	0.528	0.500	0.542	0.431	0.542	0.778	0.597	0.681	0.528	0.486	0.750																
14	0.597	0.514	0.347	0.639	0.361	0.528	0.764	0.750	0.722	0.458	0.583	0.764	0.792															
15	0.472	0.611	0.528	0.569	0.403	0.569	0.639	0.792	0.597	0.500	0.569	0.778	0.750	0.764														
16	0.458	0.514	0.625	0.639	0.361	0.389	0.708	0.667	0.611	0.514	0.694	0.736	0.653	0.639	0.736													
17	0.722	0.722	0.806	0.542	0.764	0.569	0.305	0.569	0.514	0.667	0.708	0.416	0.389	0.375	0.417	0.458												
18	0.861	0.528	0.611	0.847	0.514	0.375	0.500	0.653	0.653	0.306	0.903	0.722	0.583	0.736	0.611	0.597	0.583											
19	0.764	0.569	0.458	0.694	0.417	0.472	0.597	0.805	0.778	0.458	0.583	0.763	0.681	0.833	0.653	0.528	0.542	0.736										
20	0.736	0.403	0.569	0.667	0.444	0.444	0.472	0.597	0.805	0.805	0.458	0.611	0.792	0.708	0.778	0.736	0.639	0.458	0.764	0.833								
21	0.611	0.417	0.500	0.542	0.319	0.486	0.722	0.763	0.736	0.472	0.542	0.806	0.667	0.792	0.694	0.653	0.444	0.583	0.792	0.819								
22	0.611	0.611	0.750	0.597	0.653	0.4588	0.556	0.292	0.402	0.583	0.680	0.556	0.583	0.486	0.444	0.542	0.722	0.639	0.430	0.486	0.472							
23	0.486	0.681	0.514	0.361	0.694	0.805	0.486	0.639	0.611	0.736	0.417	0.431	0.569	0.611	0.557	0.472	0.652	0.402	0.611	0.500	0.513	0.486						
24	0.792	0.458	0.569	0.833	0.556	0.417	0.542	0.583	0.583	0.292	0.722	0.736	0.597	0.611	0.569	0.528	0.514	0.875	0.667	0.722	0.597	0.597	0.278					
25	0.667	0.528	0.611	0.847	0.569	0.403	0.583	0.458	0.542	0.333	0.708	0.667	0.639	0.653	0.556	0.500	0.806	0.597	0.653	0.528	0.750	0.431	0.764					
26	0.431	0.458	0.514	0.306	0.583	0.694	0.736	0.472	0.556	0.819	0.333	0.569	0.653	0.556	0.514	0.500	0.486	0.347	0.500	0.583	0.653	0.653	0.611	0.417	0.403			
27	0.431	0.512	0.486	0.556	0.333	0.417	0.847	0.639	0.583	0.597	0.667	0.708	0.736	0.833	0.708	0.750	0.431	0.569	0.667	0.611	0.736	0.569	0.556	0.444	0.625	0.583		
28	0.514	0.458	0.347	0.639	0.361	0.500	0.792	0.667	0.431	0.444	0.819	0.792	0.750	0.764	0.639	0.236	0.597	0.694	0.722	0.736	0.375	0.417	0.722	0.569	0.611	0.667		
29	0.597	0.708	0.542	0.778	0.444	0.528	0.486	0.639	0.583	0.292	0.583	0.736	0.597	0.611	0.792	0.667	0.486	0.681	0.611	0.583	0.597	0.514	0.500	0.694	0.708	0.361	0.527	0.694

区栽培种植,第一年干草量为 $7\ 425\ \text{kg}/\text{hm}^2$,第二年干草量达 $1.07 \times 10^4\ \text{kg}/\text{hm}^2$,并且每年可刈割 2~3 茬;在甘肃兰州地区引种结果,在施用水肥条件下,当年干草量就达 $1.95 \times 10^4\ \text{kg}/\text{hm}^2$ 。拔节孕穗期粗蛋白含量 18.36%,赖氨酸含量 1.16%。对中型狼尾草进行引种驯化和遗传改良极有希望培育出对畜牧业发展和生态建设发挥突出作用的禾草新品种。然而,狼尾草属牧草分子方面的研究起步较晚,目前主要集中在 RAPD 分子标记。解新明等^[24]采用 RAPD 标记对狼尾草属 8 个品种遗传多样性的研究发现,品种间已有一定的遗传分化,具有较高的遗传变异。钟小仙等^[25]对 83 份狼尾草属牧草资源进行 RAPD 遗传多态性聚类分析表明,筛选出的 10 条随机引物共扩增出 71 个位点,其中 66 个多态性位点,将 83 份材料聚为 5 大类。朱钩^[26]对狼尾草属优质牧草的 RAPD 分析研究表明,8 条引物共扩增出 82 条谱带,多态性位点百分率在 57.1%~85.7% 之间。乔良普^[27]运用 RAPD 和 ISSR 分子标记对 45 份狼尾草属牧草遗传多态性、亲缘关系的研究显示,8 条 RAPD 引物共检测到 70 个位点,其中多态位点占 88.6%,Nei's 基因多样度为 0.308 0,Shannon 信息指数为 0.533 4;9 条 ISSR 引物共检测到 83 个位点,其中多态位点占 92.8%,Nei's 基因多样度为 0.283 2,Shannon 信息指数为 0.428 0。RAPD 标记和 ISSR 标记聚类图谱大体趋势相同,但不完全一致。

本研究通过 ISSR 标记对 4 份兰州地区栽培中型狼尾草材料及 25 份云南地区野生中型狼尾草材料进行遗传多样性分析表明,10 条 ISSR 引物共扩增出 72 个位点,平均多态性位点比率为 87.4%;29 份材料的平均 Shannon 多样性信息指数和 Nei's 遗传多样性指数分别为 0.561 0 和 0.395 9,遗传相似性系数变幅为 0.236~0.903,这表明中型狼尾草在长期的适应和进化过程中形成了广泛的遗传变异,不同种质材料间存在着丰富的多态性。中型狼尾草具有较高的遗传多样性,可能是由其自身的生物学特性决定的。中型狼尾草是多年生草本植物,风媒传粉,而且它产生的花粉量极大,花粉粒小而干燥、重量极轻,利于远距离传播,使个体之间基因流动频繁,为基因重组提供了广阔的空间和机会。此外,一般来说植物的多样性中心可能是该物种的起源中心^[28],因此,中国西南地区(云南)可能是中型狼尾草的部分起源中心或是第四纪冰期避难所。中型狼尾草在云南省从南至北都有分布,而云南地形地貌

复杂,南北之间在气温、土壤、水肥、植被等生态因子上差异较大,也可能导致不同地区种质由于适应环境的需要产生不同的表型和基因型,从而扩大了中型狼尾草的遗传多样性水平。本研究结果表明采用 ISSR 分子标记进行中型狼尾草种质资源遗传多样性的分析是可行的,并且具有较高的多态性检测水平,这些多态性对了解中型狼尾草的遗传背景、为中型狼尾草牧草资源的开发利用、新品种培育和生产提供了理论依据。

UPGMA 聚类分析显示,以遗传相似系数(GS)约 0.51 为界,将 29 份材料划分为 4 大类,来自于相同或相近地理生态型的多数资源可以聚于同一类或亚类,呈现出一定的地域性分布规律,这可能是长期自然选择使个体中发生的不定向变异演变为群体遗传结构的定向变异从而导致同一地区的大部分中型狼尾草种质基因型趋于相似的结果。但是,来自兰州大洼山的栽培种质与来自云南祥云县的野生种质归为一类,而同样栽培于大洼山的 2 号材料却独聚一类,形成“大杂居、小聚居”的现象,表现出较大的地域分布差异性,即各种质材料间遗传分化程度较大,并且没有依据地理位置的渐变而呈现出遗传距离上的渐变规律,与前人相关野生资源的分析结论不尽一致^[29]。2 号材料单独聚为一类,说明其遗传上具有一定的特殊性,可能是由于材料在引种驯化过程中有个别基因发生了适应当地环境的基因突变,引种地兰州地处黄土高原西端,气候干燥,蒸发量远大于降水量,风沙活动频繁,土壤碱化贫瘠,水土流失严重,相对于原产地雨量充沛、土壤肥沃的优越生境,这种不利的环境使得种质发生了较大变异,产生了比较独特的基因型。Cozzolino 等^[30]研究表明,高山或河道的物理隔离对生物居群间的遗传分化有一定的影响。然而,本研究中,基于种质地理距离和遗传聚类的 Mantel 检测表明,中型狼尾草种质的遗传分化与 Wright^[31]提出的地理距离分化模式不太相符,即地理分布与遗传多样性分布没有直接的相关性,这与 Harmrick 等^[32]的研究结果相一致。同样地,实验中遗传相似系数最大、亲缘关系最近的来源于云南昆明市官渡区的 11 号材料和安宁县的 18 号材料虽然聚为一类,但却分属于两个不同的亚类,而地理距离最近、均来自于宜良县的 16 号和 24 号材料更是聚于两个不同的大类,进一步表明中型狼尾草的遗传聚类与地理来源无严格的一致性关系。由此可以看出,中型狼尾草种质的遗传分化受距离的影响不大,云南地区野生中型狼尾草资源遗

传变异的形成并非主要是由地理距离产生的遗传漂变所致,可能跟其生殖方式和基因的突变等有关。中型狼尾草属于异花传粉植物,花粉串粉导致天然杂交,使得相同生态型的种质产生特异的基因型;另一方面,环境筛选作用引起地区间偶然的基因交流导致某些基因在不同地区的入渗,造成不同地理环境中种质材料性状的交叉,使得野生中型狼尾草的遗传距离与地理来源的关系复杂化。Santhosh 等^[33]在腰果(*Anacardium occidentale*)种质资源遗传多样性的研究中认为不同地区之间的相互引种可能导致种质的聚类结果与种质地理来源没有直接联系。同样,易杨杰等^[34]在狗牙根(*Cynodon dactylon*)种质遗传多样性的 SRAP 研究中发现一些地理来源及遗传背景不一的品种聚在一起,这可能与江河冲刷、人类活动等将其转入异地进行无性扩繁有关。

物种的遗传多样性是大自然最珍贵的自然资源,是人类赖以生存的基础。遗传多样性可以用来

描述种群遗传变异和维持变异的机制,其丰富程度决定了物种对环境的适应能力与进化潜力。通过遗传聚类了解中型狼尾草遗传变异在地理上的分布格局对于制定科学的保护策略并促进其开发利用具有极为重要的作用。云南野生中型狼尾草存在较为丰富的遗传变异与分化。虽然多数资源在聚类上呈现一定程度的地域分布规律,但是中型狼尾草的遗传关系和地理距离之间并不存在显著的正相关关系。因此,在实际开发利用研究过程中,应该重点对中型狼尾草种质资源实施异地保护,并在迁地栽培后加快对中型狼尾草的繁育技术、引种驯化研究,保持并扩大中型狼尾草资源的多态性丰富程度。此外,对中型狼尾草野生资源的原生境保护工作也不能松懈,在广泛深入评价的基础上进一步建立中型狼尾草地方种质资源库,与此同时需要加强当地农户的科普教育,防止人类活动造成的基因混杂,以保护其独特的基因资源,为中型狼尾草的生物分子进化、地理分异和物种形成等研究奠定必要的材料基础。

参考文献:

- [1] CHEN SH L(陈守良),JIN Y X(金岳杏). New taxa in subgenus of *Setaria viridis* and *Cenchrus echinatus*[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),1984,4(1):65—68(in Chinese).
- [2] ZOU SH W(邹胜文),XUE T Y(薛太元),WEN X M(文晓梅),et al. Establishing technique of *Pennisetum longissimum* var. *intermedium* and *Pennisetum quanningense*[J]. *Journal of Grass and Livestock*(草与畜杂志),1996,(3):29—30(in Chinese).
- [3] ZIETKIEWICZ E,RAFALSKI A,LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*,1994,20(2):176—183.
- [4] LI H SH(李海生). ISSR molecular marker technology and its application in plant genetic diversity analysis[J]. *Bulletin of Biology*(生物学通报),2004,39(2):19—21(in Chinese).
- [5] ZHANG Y X(张云香),HU H Y(胡灏禹),HE X J(何兴金). Genetic diversity of *Urophysa rockii* Ulbrich, an endangered and rare species, detected by ISSR[J]. *Acta Bot. Boreal. -Occident. Sin.*(西北植物学报),2013,33(6):1 098—1 105(in Chinese).
- [6] WANG Y(王瑜),YUAN Q H(袁庆华). Establishment and optimization of ISSR reaction system for alfalfa[J]. *Acta Agrictr Sinica*(草地学报),2007,15(3):212—215(in Chinese).
- [7] GODWIN I D,AITKEN E A B,SMITH L W. Application of inter simple sequence repeat (ISSR) markers to plant genetics[J]. *Electrophoresis*,1997,18(9):1 524—1 528.
- [8] AMMIRAJU J S S,DHOLAKIA B B,SANTRA D K,et al. Identification of inter simple sequence repeat (ISSR) markers associated with seed size in wheat[J]. *Theoretische und Angewandte Genetik*,2001,102(5):726—732.
- [9] XIAO L(肖黎),LI X L(李晓玲),WANG Y B(王玉兵),et al. Analyses of the genetic relationships among 22 species of *Manglietia* plants using ISSR markers[J]. *Bulletin of Botanical Research*(植物研究),2011,31(4):489—494(in Chinese).
- [10] JOSHI P,DHAWAN V. Analysis of genetic diversity among *Swertia chirayita* genotypes[J]. *Biologia Plantarum*,2007,51(4):764—768.
- [11] ZHANG H SH(张怀山),ZHOU X H(周学辉),QIAO G H(乔国华),et al. Studies on *Pennisetum* wild species and its utilization value [J]. *China Herbivores*(中国草食动物),2010,30(1):41—44(in Chinese).
- [12] LU X SH(卢欣石),SHEN Y L(申玉龙). The adaptive observation and analysis in the loess plateau region of *Pennisetum* wild species [J]. *Pratacultural Science*(草业科学),1991,8(3):33—36(in Chinese).
- [13] CHEN L L(陈卢亮). Introduction of main cultivated varieties characteristics for Chinese *Pennisetum* forages[J]. *China Dairy Cattle*(中国奶牛),2012,(3):5—8(in Chinese).

- [14] JIAO SH Y(焦树英), LI Y Q(李永强), SHAYILA · SEHT(沙依拉·沙尔合提), et al. Seeds germination and seedling growth about 3 *Pennisetum* ornamental grasses under drought stress[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2009, **29**(2): 308—313 (in Chinese).
- [15] ZHANG H SH(张怀山), QIAO G H(乔国华), WANG CH M(王春梅), et al. Main characteristics and ecological adaptability of cultivated *Pennisetum* new lines[J]. *China Herbivores* (中国草食动物), 2010, **30**(3): 50—54 (in Chinese).
- [16] SHAN ZH(单志), WU H L(吴宏亮), LI CH L(李成磊), et al. Studies on extraction to a variety of plants genomic DNA by reformative SDS method[J]. *Guangdong Agricultural Sciences* (广东农业科学), 2011, **38**(8): 113—115 (in Chinese).
- [17] ZHANG T(张韬), NIE H L(聂洪丽), CHEN Y X(陈颖晓), et al. Research on orthogonal optimization of ISSR-PCR reaction system in wild barley[J]. *Anhui Agricultural Sciences* (安徽农业科学), 2007, **35**(32): 10 248—10 249 (in Chinese).
- [18] LIU M(刘美), ZHAO G Q(赵桂琴), LIU H(刘欢), et al. Optimization of ISSR amplification system in *Poa*[J]. *Chinese Journal of Grassland* (中国草地学报), 2009, **31**(5): 107—111 (in Chinese).
- [19] LI A, GE S. Genetic variation and clonal diversity of *Psammochloa villosa* (Poaceae) detected by ISSR markers[J]. *Annals of Botany*, 2001, **87**(5): 585—590.
- [20] LU P(卢萍), ZHAO M L(赵萌莉), HAN G D(韩国栋), et al. Genetic diversity studies of *Oxytropis glabra* by ISSRs in Inner Mongolia[J]. *Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin.* (西北植物学报), 2007, **27**(6): 1 102—1 107 (in Chinese).
- [21] NEI M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. *Genetics*, 1978, **89**(3): 583—590.
- [22] MILLER M P. Tools for population genetic analyses (TFPGA) vision 1.3: A windows program for the analysis of allozyme and molecular genetic data[EB/OL]. Department of Biological Sciences, Northern Arizona University, Flagstaff, 1997. Available from <http://bioweb.usu.edu/mpmbio/tfga.asp>
- [23] LIU H(刘欢), MU P(慕平), ZHAO G Q(赵桂琴). Study on genetic diversity of *Avena sativa* germplasm resources by ISSR marker[J]. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 2012, **21**(4): 116—124 (in Chinese).
- [24] XIE X M(解新明), LU X L(卢小良). Analysis of genetic relationships of cultivars in *Pennisetum* by RAPD markers[J]. *Acta Prataculturae Sinica* (草业学报), 2005, **14**(2): 52—56 (in Chinese).
- [25] ZHONG X X(钟小仙), GU H R(顾洪如), XIANG Y H(向阳海), et al. Analysis of forage resources in *Pennisetum* by RAPD molecule marker[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (江苏农业学报), 2003, **19**(2): 109—113 (in Chinese).
- [26] 朱钧. 狼尾草属优质牧草的形态学及其 RAPD 分析研究[D]. 重庆: 西南大学, 2007.
- [27] 乔良普. 狼尾草属牧草遗传多样性的 RAPD 和 ISSR 分析[D]. 福州: 福建农林大学, 2010.
- [28] VAVILOV N I. Wild Progenitors of the Fruit Trees of Turkistan and the Caucasus and the Problem of the Origin of Fruit Trees[M]. London: Pocr Gtb Int Hort Cong, 1930: 58.
- [29] WU Y Q, TALIAFERRO C M, BAI G H, et al. AFLP analysis of *Cynodon dactylon* (L.) Pers. var. *dactylon* genetic variation[J]. *Genome*, 2004, **47**(4): 689—696.
- [30] COZZOLINO S, CAFASSO D, PELLEGRINO G, et al. Fine-scale phylogeographical analysis of Mediterranean *Anacamptis palustris* (Orchidaceae) populations based on chloroplast minisatellite and microsatellite variation[J]. *Molecular Ecology*, 2003, **12**(10): 2 783—2 792.
- [31] WRIGHT S. Isolation by distance[J]. *Genetics*, 1943, **28**(2): 114.
- [32] HAMMRICK J L, GODT M J W. Allozyme Diversity in Plant Species[M]. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resources, 1990: 43—63.
- [33] SANTHOSH W G, SHOBHA D, MELWYN G S. Assessment of genetic diversity in cashew germplasm using RAPD and ISSR markers[J]. *Scientia Horticulturae*, 2009, **120**(3): 411—417.
- [34] YI Y J(易杨杰), ZHANG X Q(张新全), HUANG L K(黄琳凯), et al. Genetic diversity of wild *Cynodon dactylon* germplasm detected by SRAP markers[J]. *Hereditas* (遗传), 2008, **30**(1): 94—100 (in Chinese).