

利用 EST-SSR 标记分析西南扁穗牛鞭草种质的遗传多样性

陈永霞^{1,2}, 张新全^{1*}, 谢文刚¹, 马啸¹, 刘影¹

(1. 四川农业大学草业科学系, 四川 雅安 625014; 2. 西昌学院, 四川 西昌 615000)

摘要:利用禾谷作物 EST-SSR 标记对采自我国西南地区的 40 份野生扁穗牛鞭草和 3 份扁穗牛鞭草国审品种的遗传变异和亲缘关系进行了研究。试验筛选出 23 对引物对 43 份供试材料进行扩增, 共获得 323 条带, 其中多态性条带 261 条, 多态性条带比率(PPB)达 80.4%, 多态信息含量(PIC)为 0.354~0.500, 平均值为 0.474, 遗传相似系数(GS)为 0.690~0.913, 表现出丰富的遗传多样性。聚类分析结果表明, 各供试材料间的聚类与其地理来源及形态特征具有一定的相关性。5 个扁穗牛鞭草地理类群间的分子方差分析(AMOVA)揭示了供试的扁穗牛鞭草类群内的遗传变异占总变异的 95.32%, 类群间变异占总变异的 4.68%。表明禾谷作物的 EST-SSR 能用于扁穗牛鞭草遗传多样性研究, 是一种有效的分子标记。本研究结果为扁穗牛鞭草种质的收集、利用及育种提供了理论依据。

关键词:扁穗牛鞭草; EST-SSR; 遗传多样性

中图分类号: S812-05; Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2011)06-0245-09

* 简单序列重复(single sequence repeats, SSR), 又称微卫星 DNA, 是由 1~6 个碱基组成串联重复的 DNA 序列, 广泛应用于遗传图谱构建、种质鉴定和分子标记辅助育种等领域。由于引物开发成本高, 目前, 仅有小麦(*Triticum aestivum*)、玉米(*Zea mays*)等农作物及模式植物开发了 SSR 引物, 在草上应用较少, 仅应用于柱花草(*Stylosanthes guianensis*)^[1]、紫花苜蓿(*Medicago sativa*)^[2]、披碱草(*Elymus dahuricus*)^[3]、鸭茅(*Dactylis glomerata*)^[4]等少数草类。

EST-SSR(expressed sequence tags SSR)是存在于表达序列标签(expressed sequence tags)中的简单重复序列^[5], 具有 SSR 多态信息含量高、重复性好和特异性强等特点^[6]。由于 EST-SSR 侧翼序列在物种之间高度保守, EST-SSR 标记可在不同物种之间通用^[7-10]。Mian 等^[6]和 Wang 等^[11]的研究证实, 禾谷作物的 EST-SSR 引物可用于禾本科草资源的遗传多样性研究及遗传图谱构建, 且在竹子(*Arundinaria*)^[12]、柳枝稷(*Panicum virgatum*)^[13]、鸭茅^[14]、黑麦草(*Lolium*)^[15]等植物上成功应用。

扁穗牛鞭草(*Hemarthria compressa*)为禾本科牛鞭草属多年生暖季型优良饲草, 是我国南方发展草地畜牧业的骨干草种, 在长江中下游各省推广百万余亩^[16], 取得显著的经济和生态效益。同时, 在环境绿化、生态治理上显示出广阔的应用前景^[17,18]。我国西南地区地貌复杂, 气候类型多样, 蕴藏着丰富的野生扁穗牛鞭草资源。但目前对野生扁穗牛鞭草种质的遗传背景及分子遗传分析方面研究报告较少, 仅采用 AFLP(amplified fragment length polymorphism, 扩增片段长度多态性)^[19]、ISSR(inter-simple sequence repeat, 简单序列重复区间)^[20,21]、SRAP(sequence-related amplified polymorphism, 相关序列扩增多态性)^[22]等对其进行研究。可用的标记有限, 亟需开发新的标记。在 Genbank 数据库上没有关于牛鞭草的任何基因信息, 不能开发 EST-SSR 引物。

鉴于此, 本研究选用禾谷作物的 EST-SSR 引物对来自我国西南区不同生态类型的扁穗牛鞭草基因组 DNA 进行扩增, 分析其遗传多样性, 目的在于探讨禾谷作物 EST-SSR 引物用于扁穗牛鞭草的可行性, 并为扁穗牛鞭草种质资源的收集利用和新品种选育提供理论依据。

* 收稿日期: 2010-09-15; 改回日期: 2010-11-03

基金项目: 国家科技支撑计划(2011BAD17B03)和科技部农转资金(2010GB2F000402)资助。

作者简介: 陈永霞(1978-), 女, 四川西昌人, 讲师, 在读博士。E-mail: chyongxia@126.com

* 通讯作者。E-mail: zhangxq@sicau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料为四川农业大学收集保存的野生扁穗牛鞭草无性系 40 份(表 1),其中重庆 10 份、四川 24 份、贵州 5 份、云南 2 份及“广益”、“重高”、“雅安”3 个国审品种,保存于四川农业大学教学农场种质资源圃。

表 1 扁穗牛鞭草无性系来源

Table 1 Source of the clones of *H. compressa* clones

编号 Code	来源地 Origin	地理类群 Geographic groups	编号 Code	来源地 Origin	地理类群 Geographic groups
H002	重庆 Chongqing	CQ	H037	四川达县 Daxian, Sichuan	SCPZ
H003	四川雅安 Ya'an, Sichuan	SCPZ	H038	重庆梁平 Liangping, Chongqing	CQ
H004	四川名山 Mingshan, Sichuan	SCPZ	H039	重庆垫江 Dianjiang, Chongqing	CQ
H005	四川雅安 Ya'an, Sichuan	SCPZ	H040	重庆涪陵 Fuling, Chongqing	CQ
H007	四川洪雅 Hongya, Sichuan	SCPZ	H041	贵州独山 Dushan, Guizhou	GZ
H009	四川洪雅 Hongya, Sichuan	SCPZ	H043	贵州独山 Dushan, Guizhou	GZ
H010	重庆南山 Nanshan, Sichuan	CQ	H044	贵州独山 Dushan, Guizhou	GZ
H011	南充嘉陵江 Jialing river	SCPZ	H045	贵州荔波 Libo, Guizhou	GZ
H014	四川大邑 Daye, Sichuan	SCPZ	H047	贵州荔波 Libo, Guizhou	GZ
H016	四川眉山 Meishan, Sichuan	SCPZ	H048	云南巧家 Qiaojia, Yunnan	YN
H017	四川乐山 Leshan, Sichuan	SCPZ	H049	云南巧家 Qiaojia, Yunnan	YN
H019	四川雅安 Ya'an, Sichuan	SCPZ	H050	四川宁南 Ningnan, Sichuan	SCPX
H021	四川绵阳 Mianyang, Sichuan	SCPZ	H052	四川自贡 Zigong, Sichuan	SCPZ
H023	四川绵阳 Mianyang, Sichuan	SCPZ	H053	四川自贡 Zigong, Sichuan	SCPZ
H025	四川绵阳 Mianyang, Sichuan	SCPZ	H054	四川乐山 Leshan, Sichuan	SCPZ
H026	四川宁南 Ningnan, Sichuan	SCPX	H056	重庆江津 Jiangjin, Chongqing	CQ
H028	四川宁南 Ningnan, Sichuan	SCPX	H057	重庆大足 Dazu, Chongqing	CQ
H029	四川宁南 Ningnan, Sichuan	SCPX	H060	四川西昌 Xichang, Sichuan	SCPX
H030	四川宜宾 Yibin, Sichuan	SCPZ	GY	四川雅安 Ya'an, Sichuan	SCPZ
H033	重庆万洲 Wanzhou, Chongqing	CQ	YA	四川雅安 Ya'an, Sichuan	SCPZ
H034	重庆梁平 Liangping, Chongqing	CQ	CG	四川雅安 Ya'an, Sichuan	SCPZ
H035	重庆梁平 Liangping, Chongqing	CQ			

CQ:重庆 Chongqing; SCPZ:四川盆周山区 The mountain areas around the Sichuan; SCPX:四川攀西地区 Panxi region, Sichuan; GZ:贵州 Guizhou; YN:云南 Yunnan; GY:广益 Guangyi; YA:雅安 Ya'an; CG:重高 Chonggao.

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 2010 年 5 月,取扁穗牛鞭草幼嫩叶片,按植物基因组 DNA 提取试剂盒(北京天根生物公司)说明书提取 DNA,用 0.8%的琼脂糖凝胶检测 DNA 质量,合格 DNA 样品于 -20°C 保存。

1.2.2 EST-SSR 引物的筛选 根据 Wang 等^[11]的报道,选取 47 对 EST-SSR 引物,其中来自玉米 24 对、水稻(*Oryza sativa*)12 对、高粱(*Sorghum vulgare*)11 对,所有引物由上海生工合成。利用 H050、“广益”、“雅安”3 份材料对所有 47 对 EST-SSR 引物进行筛选,选择条带清晰,多态性好的 23 对 EST-SSR 引物(表 2),再对所有扁穗牛鞭草材料基因组 DNA 进行扩增。

1.2.3 PCR 扩增及产物检测 PCR 反应体系(20 μL)包括 DNA 20 ng、引物 0.8 mmol/L、Taq 酶 1 U、dNTP 0.1 mmol/L、 MgCl_2 0.75 mmol/L,1 \times PCR buffer 10 μL ,用灭菌水补足 20 μL 。PCR 程序^[11]为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 4

min;94℃变性 1 min,50℃复性 30 s,72℃延伸 40 s,共 10 个循环;94℃变性 1 min,45℃复性 30 s,72℃延伸 40 s,共 35 个循环;72℃延伸 10 min;4℃保存。在 bio-rad icycle PCR 仪上进行 PCR 扩增。用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(丙烯酰胺:甲叉=19:1,7.5 mol/L 尿素,1×TBE 缓冲液)在北京六一电泳仪厂的 DYY-6C 电泳仪上 400 V 恒压电泳,至指示带距胶底部 3~5 cm,停止电泳;0.1% AgNO₃ 染色,NaOH 溶液中显影;照相观察并记录结果。

表 2 引物信息表

Table 2 Information of EST-SSR primers

引物编号 Code	EST 登录号 EST marker No.	上游引物 F-primer	下游引物 R-primer
M4	AI691437	CACAACCTCCATCAGAGGACAGAGA	CTGCTACGACATACGCAAGGC
M7	AW067031	CTCGATAGCTCTTGCTGCTTCCTC	CAACACCAGCCCTACCCAGA
M8	AW091461	TAAAGCTATGATGGCACTTGCAGA	CATATTTGCCTTTGCCCTTTTGTA
M10	AW067275	TAATACTACACCACTCGCGCAAA	GTGTCGTGTTGGGAGAACATGAG
M11	AW330738	GTGGCATT TTTATCTGCAACACAG	TGTAACCTAATCGTCGGCAGAACC
M16	AJ011615	TTTCATGTGCTTGCAGAGTTTGAC	GTCATGCAAGTATCCGCTGTCTT
M17	AI948008	AAGAAAACAGGTAACGGGCATGTA	TGGAATTTCTTCTGACTACCCCAAG
M26	AF019146	CTGTCGTAAGAGGCCAACAG	TCTGAACGATGAACAGTACACGC
M31	AI855352	GAAGTCGCGATGAGAACGTAACC	GCTAGCTAGTGTGAGTTCTCCCG
M34	AI770592	GCATCTGTAGCCTTTTTGTGTGTG	CTCAGCTTGCAGGTTATCGCTT
M36	AW400071	CAGAACAACAACCAGAACCAGAAG	CCATTAGCCATCTTGCGCTT
M37	AW424565	AGACGAACCCACCATCATCTTTC	CGCTTGGCATCTCATGTATATCT
M48	AI854917	TGGACGATCTGCTTCTTCAGG	GAAGGCTTCTTCCCTCGAGTAGGTC
R2	AA753906	AAGTCCGTCGACAGGATGAG	GCTGCTCTTCCCTGTGGCTA
R5	AU030789	AGCAATGAGGCAGTTCGTCT	AGCATGAAGTGCATGACCC
R34	BI802494	GGCTGTGCCAAATACAAGT	AGCAAGCTTCTGTGGGTGTT
R38	BM420928	GTCATCTACCACACCAGCC	CTTGGTCCAACCCGAACCTTA
S9	CNL168	GGAGCTGAGGATCGAGAGTG	AGTCGGAACCTTTGAGGACGA
S13	CNL172	CGCAAGGCAACATCAGTATC	TCAGGAGGAGTGCAGCATCT
S17	CNL176	GCCATGAGCTACCAAGCAG	GTCGTCGCTCTCGAAGCA
S21	CNL180	CACAATAATGATCCCACCA	GTAGTCCTCCAGCAGGATCG
S24	CNL183	AGGGAAGGAACCAAGACCAT	CTCAGTCACCTCCACCGAAG
S27	CNL186	GGGATTTGGGGAATTTGGATTT	ATCGACTGGTAGAATCAACG

M:玉米 Maize;R:水稻 Rice;S:高粱 Sorghum.

1.3 统计分析

在相同迁移位置,对强带和清晰弱带进行统计,有带记为“1”,无带记为“0”,建立原始矩阵。根据表征矩阵,统计 SSR 扩增产物的条带总数和多态性条带数,计算多态性条带所占的比率 (PPB) 和引物多态性信息含量 (PIC)^[23], $PIC_i = 2f_i(1-f_i)$,式中, PIC_i 表示引物 i 的多态性信息含量, f_i 表示有带所占的频率,($1-f_i$) 表示无带所占的频率。使用 NTSYS 2.1 计算 Nei-Li 遗传相似系数 (G_s), $G_{s_{ij}} = a/(a+b+c)$, $G_{s_{ij}}$ 是个体 i 和 j 的遗传相似性系数, a 为两个体的共享片段数, b 和 c 为 i 个体和 j 个体各自拥有的多态片段数。根据相似性系数进行 UPGMA (unweighted pair group method analysis) 聚类分析,构建系统树^[24]。

在 Hardy-Weinberg 平衡的基础上,采用 POPGENE 1.31 计算各地理类群 Nei 基因多样性指数 (H) 和 Nei 氏无偏估计的遗传一致度与遗传距离,再用 NTSYS 2.1 绘制 UPGMA 聚类图^[25]。用 AMOVA 1.55 分析计算地理类群内和地理类群间的变异分布^[26]。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR 扩增的多态性

试验利用筛选出的 23 对来自高粱、玉米、水稻的 EST-SSR 引物,对 43 份供试材料基因组 DNA 进行扩增,共得到 323 条清晰可辨的条带(图 1),其中多态性条带 261 条,多态性条带比率达 80.4%。单对引物扩增条带数变幅为 7 条(M16)~20 条(M17),每对引物平均扩增 14.0 条,多态性条带 11.3 条。同时,单对引物的多态信息含量(PIC)变幅为 0.354 (S21)~0.500(M17、R5 和 R38),平均值为 0.474(表 3)。表明 EST-SSR 能检测较多的遗传位点,获得多态性较好的 PCR 结果。

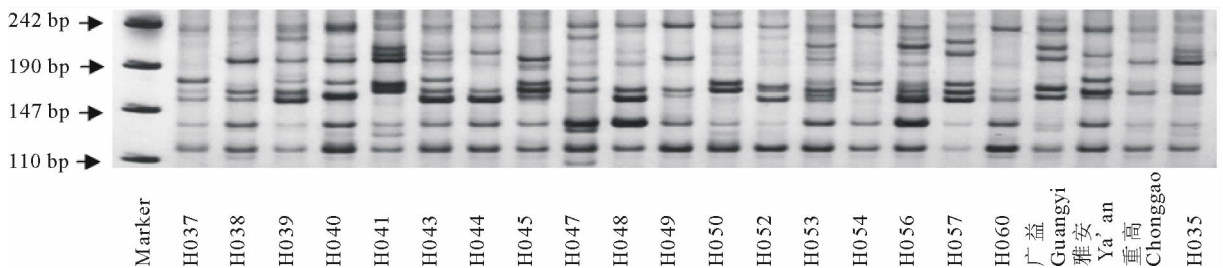


图 1 M11 扩增产物部分电泳图

Fig. 1 An amplification profile using EST-SSR primer pair M11

表 3 23 对 EST-SSR 引物在供试材料中的扩增情况及多态性

Table 3 Amplification and polymorphism of the PCR products with 23 pairs of EST-SSR primers

引物编号 Code	总条带 Number of total band	多态性条带 Number of polymorphic bands	多态性比率(PPB) Percentage of polymorphic bands (%)	多态信息含量(PIC) Polymorphic information content
M4	12	11	91.7	0.485
M7	10	7	70.0	0.470
M8	11	5	45.5	0.445
M10	13	11	84.6	0.460
M11	18	14	77.8	0.496
M16	7	6	85.7	0.484
M17	20	17	85.0	0.500
M26	16	14	87.5	0.496
M31	18	11	61.1	0.498
M34	17	12	70.6	0.469
M36	15	14	93.3	0.464
M37	16	16	100.0	0.472
M48	11	7	63.6	0.493
R2	12	9	75.0	0.499
R5	16	11	68.8	0.500
R34	9	6	66.7	0.425
R38	14	12	85.7	0.500
S9	14	14	100.0	0.499
S13	16	16	100.0	0.464
S17	17	8	47.1	0.464
S21	19	17	89.5	0.354
S24	12	12	100.0	0.498
S27	10	10	100.0	0.471
总和 Total	323	260		
平均值 Mean	14.0	11.3	80.4	0.474

2.2 EST-SSR 遗传相似性分析

遗传相似系数越大,亲缘关系越近。对所有无性系进行遗传相似系数分析,结果表明,43 份扁穗牛鞭草无性系间的遗传相似系数为 0.690~0.913,其中 H039(重庆垫江)和 H040(重庆涪陵)遗传相似系数最大,为 0.913,二者亲缘关系最近;H010(重庆南山)和 H052(四川自贡)遗传相似系数最小,亲缘关系最远。表明供试材料间差异明显,具有较为丰富的遗传多样性。

2.3 EST-SSR 聚类分析

采用非加权平均法(UPGMA)进行聚类分析,以 323 个位点的谱带原始矩阵构建 SSR 分子系统树图(图 2)。43 份扁穗牛鞭草聚为 5 类,A 类包括 3 个国审品种和 H002、H019,B 类主要是来自云南和贵州。来自重庆和四川的材料主要分布于 C、D、E 三类中,在聚类过程中存在较多交叉。结合陈永霞等^[27]对表型的划分,聚为 A 类的 H002、“广益”和“雅安”3 份材料为高大直立型,H019 与“重高”2 份材料为粗壮低矮型,聚入其他 4 类的材料均为纤细低矮型。A 类中,H002 与“广益”亲缘关系很近,具有“广益”独特的灰绿色叶片,可作为“广益”的复份材料保存。“雅安”是四川农业大学从“广益”人工草地变异单株中选育的新品种,聚类结果显示,二者具有较近的亲缘关系。可见,扁穗牛鞭草 ESR-SSR 聚类与采集地有一定的相关性,能反映扁穗牛鞭草的生态适应性和外部形态特征,正确评价种质间的遗传进化关系。同时,也反映出有 3 个品种遗传基础较窄。

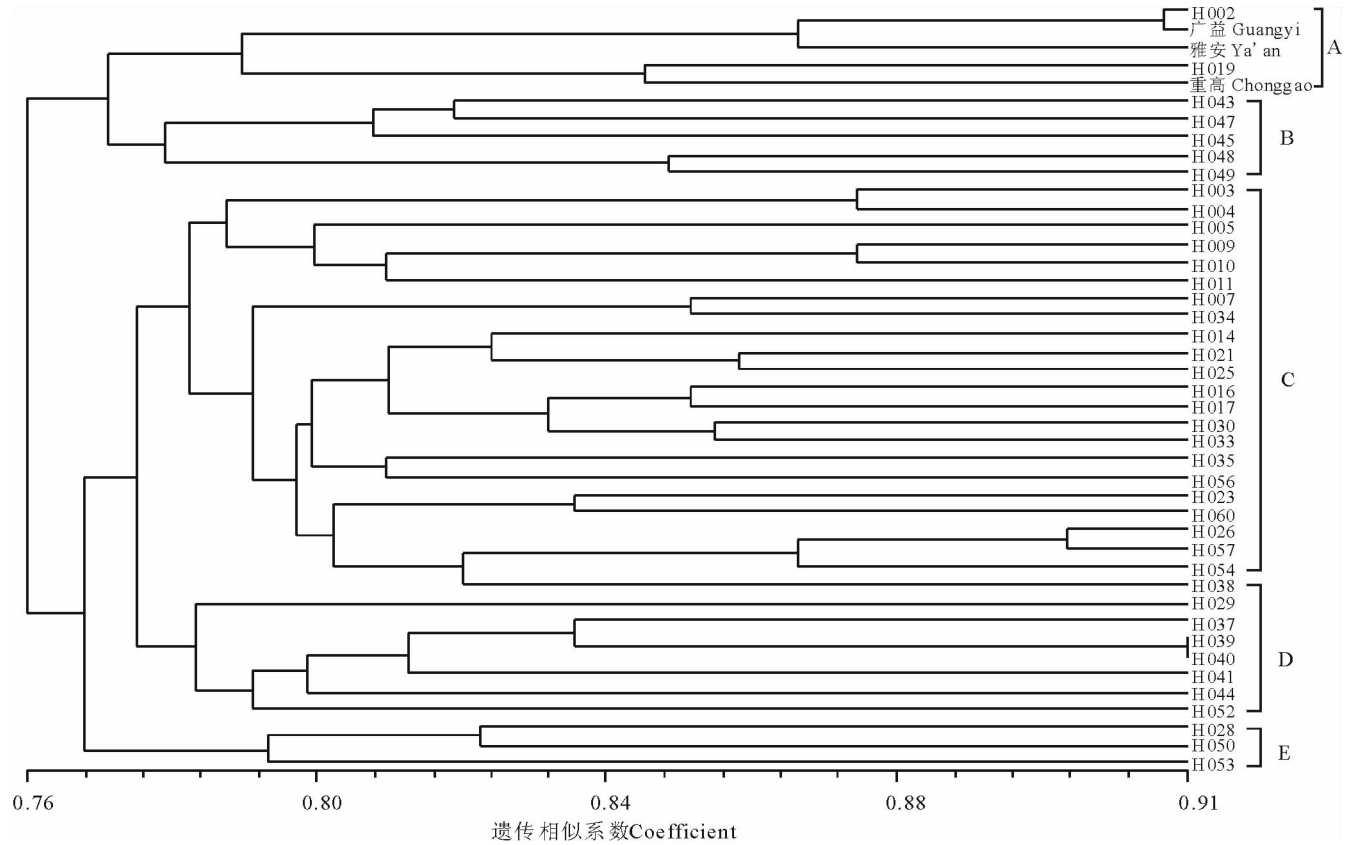


图 2 扁穗牛鞭草 EST-SSR 的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrogram for EST-SSR of *H. compressa* clones

2.4 地理类群遗传结构分析

参考赵汝植^[28]对西南区自然区划的划分,结合采集地生态地理环境,将供试的 43 份扁穗牛鞭草划分为 5 个地理类群,即重庆、四川攀西地区、四川盆周山区、贵州、云南。从 Nei 氏遗传多样性指数(H)和香农信息指数(I)看,四川盆周山区和重庆扁穗牛鞭草资源的遗传多样性水平最高,最低的是云南的材料(表 4)。AMOVA 分析结果表明,95.32%的遗传变异存在于地理类群内部,仅 4.68%的遗传变异存在于地理类群间,群体间和群体内的变异均为极显著($P < 0.01$)(表 5)。

表 4 扁穗牛鞭草不同地理类群遗传多样性指数

Table 4 Genetic polymorphism index for five geographic groups

地理类群 Groups	样本数 Sample amount	PB	<i>H</i>	<i>I</i>
重庆 Chongqing	10	189	0.183 9	0.279 9
四川攀西地区 Panxi region, Sichuan	5	144	0.152 2	0.229 8
四川盆周山区 The mountain areas around the Sichuan	21	216	0.184 1	0.286 7
贵州 Guizhou	5	140	0.140 7	0.215 3
云南 Yunnan	2	50	0.064 1	0.093 6

PB: 多态性条带数 Numbers of polymorphism bands; *H*: Nei 氏遗传多样性指数 Nei's genetic diversity; *I*: 香农信息多样性指数 Shannon's information index.

表 5 扁穗牛鞭草种质地理类群分子变异方差分析 (AMOVA)

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of five geographic groups of *H. compressa*

变异来源	自由度	偏差平方和	变异组分	变异百分率	<i>P</i> 值
Source of variance	<i>df</i>	Sum of squares	Variance component	Percentage variance (%)	<i>P</i> value
类群间 Among groups	4	190.006	1.718	4.68	<0.001
类群内 Within groups	38	1 328.924	34.971	95.32	<0.001
总计 Total	42	1 518.930	36.689		

2.5 地理类群遗传距离及聚类分析

为了解各个生态地理类群间的关系,利用 Popgen 软件计算出各类群间的 Nei 氏一致度和遗传距离的无偏估计值(表 6),然后用 NTSYS 2.1 绘制 UPGMA 聚类图(图 3)。5 个类群间的遗传一致度较高,均大于 0.850。各类群间遗传距离的变幅为 0.019 9(重庆与四川盆周山区)~0.117 3(云南与贵州),重庆类群与四川盆周山区类群遗传距离最小,首先聚为一类,后依次与四川攀西地区、贵州、云南类群聚在一起。云南类群与其他类群的距离较远,表现出一定的特异性。地理类群的聚类结果与 43 份材料的 UPGMA 聚类均显示出重庆和四川的扁穗牛鞭草材料遗传一致度较高。

表 6 各地理类群间 Nei 氏遗传一致度和遗传距离

Table 6 Nei's genetic identity and genetic distance between five geographic groups

地理类群	重庆	四川攀西地区	四川盆周山区	贵州	云南
Group	Chongqing	Panxi region	The mountain areas around the Sichuan	Guizhou	Yunnan
重庆 Chongqing	—	0.964 4	0.980 3	0.944 4	0.892 7
四川攀西地区 Panxi region	0.036 3	—	0.972 0	0.935 1	0.890 8
四川盆周山区 The mountain areas around the Sichuan	0.019 9	0.028 4	—	0.955 3	0.903 2
贵州 Guizhou	0.057 2	0.067 1	0.045 7	—	0.889 3
云南 Yunnan	0.113 5	0.115 6	0.101 8	0.117 3	—

注:Nei 氏遗传一致度 GS(对角线上方)和遗传距离 GD(对角线下方)。

Note: Nei's genetic identity(above diagonal) and genetic distance(below diagonal).

3 讨论

3.1 禾谷作物 EST-SSR 引物在扁穗牛鞭草遗传多样性研究中的可行性

自 Gupta 等^[29]报道普通小麦 EST-SSR 标记不仅在禾本科作物的单一种内通用,而且在相关种间也具有

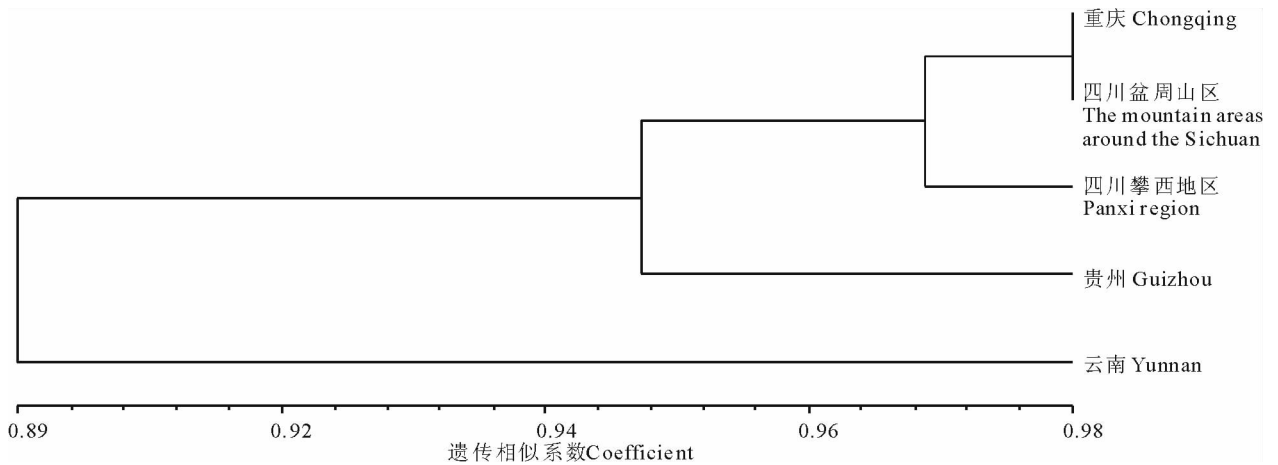


图 3 5 个地理类群基于 Nei 氏一致度的聚类图

Fig. 3 Dendrogram of five geographic groups based on unbiased measures of genetic identity

通用性以来, EST-SSR 引物的跨种扩增在多种植物的遗传多样性研究中得到成功应用。本研究首次将玉米、水稻、高粱等禾谷作物 EST-SSR 引物用于扁穗牛鞭草的 SSR 标记, 100% 的引物能从扁穗牛鞭草基因组 DNA 扩出条带, 其中 48.9% (23 对) 能扩增出条带清晰、多态性好的 PCR 电泳图谱。23 对 EST-SSR 引物对 43 份扁穗牛鞭草基因组 DNA 进行扩增, 共获得 323 个扩增片段, 多态性条带比率 (PPB) 为 80.4%, 多态信息含量 (PIC) 为 0.474。可见, EST-SSR 有较高的多态检出率。表明禾谷作物的 EST-SSR 能用于扁穗牛鞭草遗传多样性研究, 是一种有效的分子标记。本研究中 EST-SSR 多态性条带比率略低于 AFLP 的 88.6%^[19]、ISSR 的 84.2%^[20] 和 SRAP 的 91.5%^[22]。这与 EST-SSR 扩增的是 DNA 的转录区, 发生变异有限有关^[30]。但与 AFLP、SRAP、ISSR 等标记相比, EST-SSR 标记有大量的 EST-SSR 引物可供选择, 引物开发成本低, 而且 EST 序列来自基因表达区域, 保守性高, 可以与功能基因建立联系^[31]。因此, 对牛鞭草等 Genbank 上没有基因组相关信息的植物来说, 根据禾谷作物的 EST 数据开发 EST-SSR 标记不失为一种方便、快捷的方法, 而且 Genbank 上不断增长的各类 EST 数据, 为 EST-SSR 标记提供了丰富的资源。

3.2 EST-SSR 的遗传多样性

43 份扁穗牛鞭草无性系间的遗传相似系数变化范围为 0.690~0.913, 表明西南区扁穗牛鞭草具有较丰富的遗传多样性, 这与通过 AFLP^[20]、SRAP^[23] 的研究结果一致。供试材料间的亲缘关系与生态地理环境具有一定的相关性和规律性, 扁穗牛鞭草在长期适应相似的环境条件过程中, 形成了相似的生态类型, 采用 SRAP 和 AFLP 分子标记研究野生狗牙根的遗传多样性时, 也得到相似的结论^[32,33]。川渝地区属于盆地丘陵类型, 具有相似的环境地理条件, 来自该地区的材料聚类时相互交叉; 云南、贵州为高原, 贵州多阴雨, 而云南干湿分明, 日照充足, 各自形成了其独特的生态地理环境, 来自云南、贵州的材料都是本地区的先聚在一起。但这种关系并不是绝对的, 如来自贵州的 H041、H044 和四川的材料聚为一类。聚类和地理来源不一致的原因可能是: 1) 扁穗牛鞭草具有很强的无性繁殖能力, 通过水流、交通、人为引种等交流, 使其转入异地扩展繁殖。2) 可能发生了基因突变, 物种在进化过程中, 有个别的基因发生了变异, 且该突变体能较好地适应当地的环境, 这个变异基因就能得到保存; 3) 尽管扁穗牛鞭草结实率很低, 但仍然能进行天然杂交, 可能导致其基因型的改变, 使得野生扁穗牛鞭草的遗传相似性和地理来源关系复杂化。

3.3 地理类群间的遗传关系

扁穗牛鞭草地理类群内的遗传变异 (95.32%) 高于类群间 (4.68%), 该结果与范彦等^[22] 通过 SRAP 方法研究发现扁穗牛鞭草地理类群内有较高的遗传变异 (85.59%) 的结论吻合。Huang 等^[21] 通过 ISSR 分析我国西南地区 12 个扁穗牛鞭草自然居群的遗传分化, 发现 48.2% 的变异存在于不同居群间, 这是因为本研究供试材料不是按照自然居群采样, 来自不同地点的种质增加了类群内的变异。根据 Nei 氏遗传多样性指数 (H) 和香农信息

指数(I)计算结果,四川盆周山区和重庆类群的遗传多样性水平最高,其次是四川攀西地区和贵州类群,遗传多样性最低的是云南类群。有研究表明,遗传多样性水平和群体样本数量间存在明显的相关性^[34-36],可能正是因为贵州、云南类群采集的样本数量少,特别是云南类群的2份材料来自同一采集点,导致类群内较低的遗传多样性。因此,在对遗传多样性丰富地区进一步收集扁穗牛鞭草资源的同时,加强对材料少、代表性差的贵州、云南地区的扁穗牛鞭草野生资源的收集力度,以丰富扁穗牛鞭草的基因源。

参考文献:

- [1] 蒋昌顺,马欣荣,邹冬梅,等. 应用微卫星标记分析柱花草的遗传多样性[J]. 高技术通讯, 2004, 14(4): 25-30.
- [2] 张阿英,胡宝忠,姜述君,等. 影响紫花苜蓿 SSR 分析因素的研究[J]. 黑龙江农业科学, 2002, (1): 15-17.
- [3] 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.
- [4] 谢文刚,张新全,马啸,等. 中国西南区鸭茅种质资源遗传变异的 SSR 分析[J]. 草业学报, 2009, 18(4): 138-146.
- [5] Gupta P K, Balyan H S, Sharma P C. Microsatellite in plants: a new class of molecular markers[J]. Current Science, 1996, 70: 45-54.
- [6] Mian M A R, Saha M C, Hopkins A A, et al. Use of tall fescue EST-SSR markers in phylogenetic analysis of cool-season forage grasses[J]. Genome, 2005, 48: 637-647.
- [7] Holton T A, John T. Identification and mapping of polymorphic SSR markers from expressed gene sequences of barley and wheat[J]. Molecular Breeding, 2002, 9: 63-71.
- [8] Zhang L Y, Bernard M, Leroy P. High transferability of bread wheat EST-derived SSRs to other cereals[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111: 677-687.
- [9] Gutierrez M V, Vaz Patto M C, Huguet T, et al. Cross-species amplification of *Medicago truncatula* microsatellites across three major pulse crops[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110(7): 1210-1217.
- [10] Malay C, Saha M A, Mian R, et al. Tall fescue EST-SSR markers with transferability across several grass species[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 109(4): 783-791.
- [11] Wang M L, Barkley N A, Yu J K, et al. Transfer of simple sequence repeat (SSR) markers from major cereal crops to minor grass species for germplasm characterization and evaluation[J]. Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization, 2005, 3: 45-57.
- [12] Barkley N A, Newman M L, Wang M L, et al. Assessment of the genetic diversity and phylogenetic relationships of a temperate bamboo collection by using transferred EST-SSR markers[J]. Genome, 2005, 48: 731-737.
- [13] Narasimhamoorthy B, Saha M C, Swaller T, et al. Genetic diversity in switchgrass collections assessed by EST-SSR markers[J]. Bioenergy Research, 2008, 1(2): 136-146.
- [14] Xie W G, Cai H W. Genetic diversity analysis and transferability of cereal EST-SSR markers to orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2010, 6(9): 740-749.
- [15] Sim S C, Yu J K, Jo Y K, et al. Transferability of cereal EST-SSR markers to ryegrass[J]. Genome, 2009, 52: 431-437.
- [16] 杨春华,张新全,李向林,等. 牛鞭草属种质资源及育种研究[J]. 草业学报, 2004, 13(2): 7-12.
- [17] 龙忠富,唐成斌,刘秀峰,等. 喀斯特地区高等级公路边坡等侵蚀劣地草种筛选研究[J]. 公路, 2006, 11: 187-193.
- [18] 廖世纯,韦桥现,蒙炎成,等. 4 种植物的耐淹耐旱性及在消落带中的应用[J]. 中国水土保持, 2009, 5: 13-14.
- [19] 刘金平,张新全,彭燕. AFLP 分析西南区扁穗牛鞭草种质资源[J]. 安徽农学通报, 2006, 12: 46-47.
- [20] 范彦,张新全,李芳. 扁穗牛鞭草种质遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 草业学报, 2007, 16(4): 76-81.
- [21] Huang L K, Zhang X Q, Ma X, et al. Genetic differentiation among *Hemarthria compressa* populations in south China and its genetic relationship with *H. japonica*[J]. Hereditas, 2008, 145: 84-91.
- [22] 范彦,徐远东,蒋安,等. 中国西南区扁穗牛鞭草种质遗传多样性的 SRAP 分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(1): 63-70.
- [23] Roldan-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E. AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.)[J]. Molecular Breeding, 2000, 6: 125-134.

- [24] Nei M, Kumar S. Molecular Evolution and Phylogenetics[M]. New York: Oxford University Press, 2000: 87-88.
- [25] Rohlf F J. NTSYS-pc: Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System (Version 2. 0)[M]. New York: Exter Software, 1994.
- [26] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distance among DNA haplotypes: Application to human mitochondria DNA restriction sites[J]. Genetics, 1992, 131: 479-491.
- [27] 陈永霞, 张新全, 杨春华, 等. 野生扁穗牛鞭草种质资源形态多样性研究[J]. 中国草地, 2005, (1): 77-79.
- [28] 赵汝植. 西南区自然区划探讨[J]. 西南师范大学学报(自然科学版), 1997, 22(2): 193-198.
- [29] Gupta P K, Rustgi S, Sharma S, *et al.* Transferable EST—SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2003, 270(4): 315-323.
- [30] Scott K D, Egger P, Seaton G, *et al.* Analysis of SSRs derived from grape ESTs[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2000, 100: 723-726.
- [31] 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 油菜 EST 资源的 SSR 信息分析[J]. 中国油料作物学报, 2007, 29(1): 20-25.
- [32] 凌瑶, 张新全, 齐晓芳. 西南五省区及非洲野生狗牙根种质基于 SRAP 标记的遗传多样性分析[J]. 草业学报, 2010, 19(2): 196-203.
- [33] 齐晓芳, 张新全, 凌瑶. 野生狗牙根种质资源的 AFLP 遗传多样性分析[J]. 草业学报, 2010, 19(3): 155-161.
- [34] Gaudett M, Salomon B, Sun G L. Molecular variation and population structure in *Elymus trachycaulus* and comparison with its morphologically similar *Elymus alaskanus*[J]. Plant Systematic Evolution, 2005, 250: 81-91.
- [35] Díaz O, Sun G L, Salomon B, *et al.* Levels and distribution of allozyme and RAPD variation in populations of *Elymus fibrosus* (Schrenk) Tzvel. (Poaceae)[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47(1): 11-24.
- [36] Godt M J W, Johnson B R, Hamrick J L. Genetic diversity and population size in four rare southern appalachian plant species[J]. Conservation Biology, 1996, 10: 796-805.

Genetic diversity of *Hemarthria compressa* germplasm from southwestern China based on EST—SSR markers

CHEN Yong-xia^{1,2}, ZHANG Xin-quan¹, XIE Wen-gang¹, MA Xiao¹, LIU Ying¹

(1. Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; 2. Xichang College, Xichang 615000, China)

Abstract: Using EST—SSR with primers from cereal crops, the genetic diversity was assessed in 40 wild *Hemarthria compressa* clones from southwestern China and three varieties. After amplification with 23 pairs of EST—SSR primers of Poaceae, 323 fragments were detected, of which 261 were polymorphic, accounting for 80.4% of the total. The polymorphic information content was from 0.354 to 0.500. The genetic similarity coefficient of 43 accessions ranged from 0.690 to 0.913. Clustering analysis also revealed that the clustering among tested materials was related to their geographic origins, ecological types and morphological characteristics. AMOVA (analysis of molecular variance) of five geographical groups of *H. compressa* revealed that 95.32% of total variance occurred within these groups and 4.68% of total variance occurred between them. It is suggested that using EST—SSR primers from cereal crops, is feasible and effective for analyzing the genetic diversity of *H. compressa*.

Key words: *Hemarthria compressa*; EST—SSR marker; genetic diversity