

# 利用 SSR 及 ISSR 分子标记研究苜蓿属及其近缘植物的亲缘关系\*

李飞飞<sup>1</sup>, 羊海军<sup>2</sup>, 崔大方<sup>2,3</sup>

- (1. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081;
2. 华南农业大学公共基础实验教学中心, 广东 广州 510642;
3. 华南农业大学林学院, 广东 广州 510642)

**摘要:** 利用 30 对 SSR 引物和 12 个 ISSR 引物对苜蓿属 (*Medicago*) 及其近缘植物共 11 个物种的亲缘关系进行研究。通过遗传多样性研究及 UPGMA 聚类分析显示, “阔荚类群”(subgen. *Platycapos*) 的 4 个种在两种分子标记下都聚为一支, 符合其相似的形态学特征; “阔荚类群”在 SSR 分子标记中与胡卢巴属 (*Trigonella*) 聚成一支, 网脉胡卢巴 (*T. cancellata*) 在 ISSR 分子标记中聚在“阔荚类群”中; 两种分子标记中, “紫花苜蓿复合体”(*Medicago sativa* complex) 3 个种间的遗传距离都最短; 南苜蓿 (*M. polymorpha*) 在两种分子标记下的聚类结果有所不同, SSR 分子标记下与胡卢巴属的亲缘关系更近。研究说明苜蓿属与胡卢巴属具有很近的亲缘关系, 苜蓿属内不同物种与胡卢巴属的亲缘关系有远有近, 其中苜蓿属中的“阔荚类群”与胡卢巴属的关系最近, 苜蓿属中其他物种与胡卢巴属的亲缘关系较远。

**关键词:** 苜蓿属; 近缘植物; 分子标记; 亲缘关系

中图分类号: Q949.7 文献标志码: A 文章编号: 0529-6579 (2014) 01-0113-08

## Genetic Relationships Among 11 Species of *Medicago* and Relative Species Using Microsatellite (SSR and ISSR) Markers

LI Feifei<sup>1</sup>, YANG Haijun<sup>2</sup>, CUI Dafang<sup>2,3</sup>

- (1. College of Life and Environmental Science, Central University for Nationalities, Beijing 100081, China;
2. Center of Experimental Teaching for Common Basic Courses, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
3. College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** The genetic relationships among 11 species of *Medicago* and relative species were studied by using 30 pair of SSR primers and 12 ISSR primers. Based on genetic diversity analysis and UPGMA cluster analysis the results showed that 4 species of subgen. *Platycapos* were clustered together, related to their similar morphological characteristics; species of subgen. *Platycapos* were clustered with *Trigonella*, while *T. cancellata* were nested in subgen. *Platycapos* clade; the genetic distances among 3 species of *M. sativa* complex were shortest; *M. polymorpha* was closer to *Trigonella* in ISSR results. Thus *Trigonella* had close genetic relationship with *Medicago*, especially species of subgen. *Platycapos*, and relatively farther from other species in *Medicago*.

**Key words:** *Medicago*; relative species; microsatellite markers; genetic relationships

\* 收稿日期: 2013-07-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670145)

作者简介: 李飞飞 (1983 年生), 女; 研究方向: 系统与演化植物学; 通讯作者: 崔大方; E-mail: cuidf@scau.edu.cn

苜蓿属 (*Medicago*) 是属于豆科 (Leguminosae) 车轴草族 (Trifolieae) 的一年生或多年生草本。因其富含蛋白质、维生素和多种矿物质, 其营养价值为各类牧草之首, 并在我国种植已有 2000 多年历史, 对我国畜牧业做出了重要贡献。其中, 紫花苜蓿 (*M. sativa*) 更被誉为“牧草之王”, 在我国栽培最为广泛。自瑞典植物学家林奈在 18 世纪创立苜蓿属以来, 全世界至今已记载苜蓿属植物达 100 多种<sup>[1]</sup>, 分布在欧、亚、非三洲, 《中国植物志》将我国苜蓿属植物分为 13 个种, 1 个变种, 主要分布于黄河流域的华北、西北地区<sup>[2]</sup>。

苜蓿属及其近缘植物的分类学问题主要存在于两个方面。①苜蓿属有些种与胡卢巴属 (*Trigonella*) 在形态、生长习性及染色体数目上相似, 形成大量的中间类群。②苜蓿属内种间由于自然杂交或环境饰变而出现许多复合体类群, 如 Quiros & Bauchan (1988) 利用蛋白标记根据紫花苜蓿的进化路线, 将 Lesins & Lesins (1979) 系统中与紫花苜蓿可以天然杂交的黄花苜蓿、多变苜蓿、*Medicago cretacea* M. Bieb.、*Medicago tunetana* (Murb.) A. W. Hill 和 *Medicago glutinosa* M. Bieb. 5 个种合并称为“紫花苜蓿复合体” (*Medicago sativa* complex) 等。因此按照历史上不同分类学家的处理, 苜蓿属及其近缘植物的分类曾一度错综复杂。国内外学者对苜蓿属及其近缘植物在分类学上做了一定的研究: Urban I.<sup>[3]</sup> 最早将苜蓿属分为 11 个组 (section) 共包括 46 个种, 并把幼苗子叶片和子叶柄之间有无明显的关节作为区分苜蓿属和胡卢巴属重要的依据; Lesins K. A. 等<sup>[4]</sup> 从形态学、细胞学和杂交实验等方面对苜蓿属做了更为详尽的研究, 建立了一个包含 56 个种的系统; Small E. 等<sup>[5]</sup> 发现许多胡卢巴属植物在花的综合性状、种子形态结构等方面具有较高的相似性, 在聚类分析中常与苜蓿属聚到一起, 因此将 Lesins K. A. 和 Lesins I. 系统中的部分种类进行合并, 又将先前被认为是胡卢巴属的 23 个与苜蓿属有共同特征的种“medicagooid”划归到苜蓿属中, 使苜蓿属种数扩大到 83 个种, 分成 12 个组; 但我国学者多将“medicagooid”中的角型果组 sect. *Bucerates* 放在胡卢巴属中; 而 Bena G.<sup>[6]</sup> 利用分子系统学方法, 比较了 Small E. 系统中从胡卢巴属中转移过来的 10 个种与苜蓿属其他 53 个种的亲缘关系, 认为这些中间类群宜归于苜蓿属, 提出建立一个新组的观点。

与欧美所不同的是, 我国在分属上还有较大歧

义, 其中多年生阔荚类植物的分类问题最多, 主要表现在扁蓿豆属 (*Melissitus*) 和黑荚豆属 (*Turukhania*) 的设立上。《中国植物志》则摒弃扁蓿豆属和黑荚豆属 2 个属, 将其中的种分别归入苜蓿属和胡卢巴属内, 共收录我国境内胡卢巴属 9 种, 苜蓿属 13 种<sup>[2]</sup>; 崔大方等<sup>[7]</sup> 将多年生阔荚类群 (包含扁蓿豆属和黑荚豆属) 归属苜蓿属, 并建立阔荚亚属 (subgen. *Platycapos*), 包含由西向东通过青藏高原、蒙古高原、华西台地向着荒漠草原的种类演化的阔荚苜蓿 (*Medicago platycarpus*)、克什米尔苜蓿 (*M. cachemiriana*)、青海苜蓿 (*M. archiducis-nicolai*)、花苜蓿 (扁蓿豆) (*M. ruthenica*) 以及偏南趋向暖热谷地的毛荚苜蓿 (*M. edgeworthii*); 韦直<sup>[8]</sup> 认为自然存在的仅有苜蓿属和胡卢巴属, 而扁蓿豆属无论作为属或属下等级都不合乎分类系统的事实, 但近来受欧美分类思想的影响有重新归属中间类群的趋向。此外, *Melissitus*、*Pocockia* 常被认为是胡卢巴属的异名; *Turukhania* 则被作为苜蓿属的异名。Eig A.<sup>[9]</sup> 将 *Trigonella aschersoniana* 从胡卢巴属中分离出来成为一个单种属 *Factorovskya*; Vassilczenko I. T.<sup>[10]</sup> 将 *Medicago arborea* 从苜蓿属中分离出来建立一个单种属 *Rhodusia*。Small E. 等<sup>[11]</sup> 对上述两属并不支持, 指出 *Rhodusia* 的成属依据相当不充分, 而 *Factorovskya* 在亲缘关系上也依然是扑朔迷离。事实上, 在查阅文献过程中, 我们都很少见到这 2 个属被引证的情况。

20 世纪 70 年代起, 分子系统学研究进入了核酸水平时期。SSR、ISSR、AFLP 及其他分子标记技术被广泛的应用于动植物的遗传多样性研究中<sup>[12-14]</sup>, 分子标记技术从 20 世纪 90 年代初就开始应用于苜蓿种质资源研究中, 国内外许多学者都曾使用 RAPD、AFLP、SSR、ISSR 等分子标记对紫花苜蓿的栽培品种的遗传结构及指纹图谱进行了分析和研究, 证明了分子标记在苜蓿属植物遗传研究上的可行性。刘磊等<sup>[15-16]</sup> 通过 ISSR 分子标记研究黄花苜蓿、紫花苜蓿、扁蓿豆及胡卢巴属植物的亲缘关系时发现, 扁蓿豆与胡卢巴关系更近, 但并未说明二者应归于一属。

苜蓿属植物作为世界性的牧草资源, 其系统分类学的研究不仅具有重要的系统分类学意义更具有经济学意义。本研究利用 SSR 及 ISSR 分子标记, 研究苜蓿属及其近缘植物遗传多样性及亲缘关系, 为苜蓿属及其近缘植物的种质资源评定和利用方面的研究提供基础数据。

## 1 材料和方法

### 1.1 研究材料及引物

包括二倍体、四倍体在内的苜蓿属及胡卢巴属 11 种植物为材料，每个种按单株采样，各采集 15 份植株，分别放入装有硅胶的封口袋中，材料来源及倍性见表 1。40 对 SSR 引物来源于 Bernadette 等发表的紫花苜蓿 SSR 引物<sup>[17]</sup>，37 个 ISSR 引物来源于 UBC 大学公布的 100 个通用引物。

表 1 苜蓿属及其近缘植物材料信息

Table 1 The information of *Medicago* L. and its relatives

物种	倍性	采集地
胡卢巴属 <i>Trigonella</i> L.		
胡卢巴 <i>T. foenum-graecum</i> L.	2n	新疆 (栽培)
网脉胡卢巴 <i>T. cancellata</i> Desf.	2n	新疆
苜蓿属 <i>Medicago</i> L.		
紫花苜蓿 <i>M. sativa</i> L.	2n, 4n	新疆 (栽培)
黄花苜蓿 <i>M. falcata</i> L.	2n, 4n	新疆
多变苜蓿 <i>M. varia</i> Martyn	2n, 4n	新疆
天蓝苜蓿 <i>M. lupulina</i> L.	2n, 4n	新疆
花苜蓿 <i>M. ruthenica</i> (L.) Trautv. *	2n	宁夏
毛茛苜蓿		
<i>M. edgeworthii</i> Sirj. ex Hand. -Mazz. *	2n	四川
阔荚苜蓿 <i>M. platycarpus</i> (L.) Trautv. *	2n	新疆
南苜蓿 <i>M. polymorpha</i> L.	2n	Australia
青海苜蓿 <i>M. archiducis-nicolai</i> Sirj. *	2n	宁夏

\* 为阔荚类苜蓿

### 1.2 实验方法

采用改良 CTAB (Hexadecyltrimethyl-ammonium Bromide) 法提取单个样品总 DNA，并用  $w = 1.0\%$  的琼脂糖电泳检测 DNA。利用 Eppendorf AG 22331 Hamburg 紫外分光光度计检测单个样品的 DNA 浓度，再将每个种的 15 份单株 DNA 等量混合成为一个种的 DNA 池。

SSR 反应体系：总体积 20  $\mu\text{L}$ ，包括  $10 \times \text{Buffer}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ，10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 0.3  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物各 1  $\mu\text{L}$ ，Taq 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ ，30  $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ，去离子水 13.5  $\mu\text{L}$ 。SSR 反应程序：94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min；94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s，54  $^{\circ}\text{C}$  退火 1 min，72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min，35 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min；4  $^{\circ}\text{C}$  保存。ISSR 反应体系：总体积 20  $\mu\text{L}$ ，包括  $10 \times \text{Buffer}$  (含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2  $\mu\text{L}$ ，10  $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTP 0.25  $\mu\text{L}$ ，10  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  引物 1  $\mu\text{L}$ ，Taq 酶 ( $5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ ) 0.2  $\mu\text{L}$ ，30  $\text{ng} \cdot$

$\mu\text{L}^{-1}$  DNA 模板 2  $\mu\text{L}$ ，去离子水 14.55  $\mu\text{L}$ 。ISSR 反应程序：94  $^{\circ}\text{C}$  变性 5 min；94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s，54  $^{\circ}\text{C}$  退火 45 s，72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1.5 min，42 个循环；72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min；4  $^{\circ}\text{C}$  保存。

SSR 扩增产物采用  $w = 6\%$  的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测，ISSR 扩增产物采用  $w = 2\%$  琼脂糖凝胶电泳检测。电泳结果至凝胶成像仪拍照观察，并记录结果。

### 1.3 数据统计分析

由于苜蓿属植物中既含有二倍体又含有四倍体，所以二倍体等位基因的频率统计公式并不适合本研究，目前统计四倍体的方法还未完善，部分统计指数还需进一步研究。且本研究所采的植株为野生型，如紫花苜蓿种群内既存在四倍体又存在二倍体，无法简单区分。因此本实验统一采用 0/1 法统计，以扩增条带在相对迁本实验统一采用 0/1 法统计，以扩增条带在相对迁移位置有无，赋以“1”或“0”，生成分子数据矩阵。利用 PopGene 1.32 软件<sup>[18]</sup>进行电泳谱带差异和各项遗传指数的统计分析，包括：多态位点百分率 (PPB)、遗传相似系数 ( $I$ )、遗传距离 (GD)。利用 GeneALEX 软件 AMOVA 计算方差分量<sup>[19]</sup>，Mental 检测相关系数 ( $r$ )。利用 Excel 计算 SSR/ISSR 标记效率指数 MI (marker index) 采用公式计算<sup>[20-22]</sup>。其中  $I_{\text{bav}}$  为位点平均信息量 (average band informativeness)， $P_i$  代表样品第  $i$  个扩增位点所占比例， $n$  代表扩增位点总数；EMR 为有效多元比率 (effective multiplex ratio)，计算公式为  $\text{EMR} = \text{多态位点数} / \text{引物数}$ 。并利用 NTSYS 软件采用非加权平均聚类法 (UPGMA) 绘制聚类图<sup>[23]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 和 ISSR 分子标记的标记效率分析

本研究从 40 对紫花苜蓿 SSR 引物和 37 个 ISSR 通用引物中筛选出 30 对具多态性、可扩增出清晰带谱的 SSR 引物，占总数的 75%；12 个具多态性、清晰且重复性好的 ISSR 引物，占总数的 32% (表 2)。

众多研究者对 RFLP、SSR、RAPD 及 AFLP 4 种分子标记技术进行了比较分析，综合考虑遗传稳定性和标记系统机制，提出了标记指数 MI，标记指数 MI 是衡量不同类型标记扩增效率和扩增产物信息含量的综合指标，并包含了鉴定亲缘关系的有效性这一层意思<sup>[24]</sup>。11 个种间 ISSR 标记的 MI 值 (2.00) 与 SSR 标记 MI 值 (1.95) 相差不大，而

SSR 标记 Ibav 值 (0.34) 是 ISSR 标记 Ibav 值 (0.10) 的 3.41 倍, 但 ISSR 标记 EMR 值 (20.08) 却是 SSR 标记 EMR 值 (5.73) 的 3.5 倍。因此 EMR 差异是导致 ISSR 标记 MI 值高于 SSR 标记的主要原因 (表 3)。

表 2 30 对 SSR 和 12 个 ISSR 引物

Table 2 30 pair of SSR primers and 12 ISSR primers

标记类型	引物
SSR	FMT13、MTIC447、MTIC258、MTIC451、MTIC278、MTIC354、MTIC189、MTIC237、MTIC169、MAA660456、MTIC326、B14B03、MTIC58、MTIC93、MTIC153、MTIC248、MTIC251、AFct45、MAL369471、MTIC27、MTIC94、MTIC183、MTIC188、MTIC232、MTIC238、MTIC249、MTIC250、MTIC272、MTIC331、MTIC343
ISSR	814、815、817、822、823、825、873、880、881、889、890、891

表 3 SSR 和 ISSR 分子标记的标记效率比较

Table 3 Compare the efficiency of SSR and ISSR primers

项目	SSR	ISSR
引物数	30	12
总位点数	172	241
平均位点数	5.733	20.083
多态性比率 (PPB/%)	100	100
位点平均信息量 (Ibav)	0.341	0.1
有效多元比率 (EMR)	5.733	20.083
标记指数 (MI)	1.954	2

利用 Mantel 检测对 SSR 和 ISSR 分子标记的遗传距离矩阵进行了相关性检验, 基于 11 个物种的分析, SSR 和 ISSR 分子标记的遗传距离存在显著相关性 ( $r=0.709$ ,  $t=3.016$ )。

## 2.2 遗传多样性分析

11 个种 PCR 扩增结果显示: ①30 对 SSR 引物扩增出 172 条带, 多态性比率 PPB 为 100%, 平均每个种扩增出 51 条多态性条带, 一年生、多年生种平均多态性条带分别为 46 和 53 条, 多年生种多态性条带平均数略多于一年生种; 二倍体、二倍体四倍体共有种平均多态性条带分别为 44 和 63, 二倍体四倍体共有种多态性条带平均数略多于二倍体种。②12 个 ISSR 引物共扩增出 241 条带, 多态性比率 PPB 为 100%, 每个种平均扩增出 45 条多态性条带, 一年生、多年生种多态性条带分别为

49 和 43 条, 一年生种多态性条带平均数略多于多年生种; 二倍体种、二倍体四倍体共有种平均多态性条带分别为 43 和 48, 二倍体四倍体共有种多态性条带平均数略多于二倍体种。表明在 11 个种间两种标记都表现出了较高的多态性。

SSR 和 ISSR 分子标记在 11 个所选种间的 Nei's 遗传距离  $GD$  变幅分别为 0.05 (多变苜蓿与紫花苜蓿) ~0.67 (紫花苜蓿与花苜蓿) 和 0.07 (多变苜蓿与紫花苜蓿) ~0.47 (紫花苜蓿与胡卢巴), 平均值分别为 0.47 和 0.36, SSR 标记大于 ISSR 标记, 表明 11 个物种间存在相当程度的分化 (表 4, 5)。

UPGMA 聚类表明 (图 1, 2), SSR 和 ISSR 分子标记分别得到了相近但不完全相同的聚类树。紫花苜蓿、黄花苜蓿以及多变苜蓿在两个分子标记下遗传距离均最小。花苜蓿、毛茛苜蓿、阔荚苜蓿以及青海苜蓿属于“阔荚类群”的 4 个种在两种分子标记下均可以聚为一支。不同的是, 在基于 SSR 分子标记的聚类树中, 分为主要的两支, 其中一支包含紫花苜蓿、黄花苜蓿、多变苜蓿以及天蓝苜蓿。“阔荚类群”和胡卢巴属的两个种聚为另外一支, 在这支下“阔荚类群”形成一个亚支, 胡卢巴属两个种和南苜蓿形成了另外一个亚支。而在基于 ISSR 分子标记的聚类树中, 胡卢巴与其他物种明显区别开, 单独形成一支, 在其他物种的分支内, “阔荚类群”和网脉胡卢巴聚为一个亚支, 而“紫花苜蓿复合体”的三个种与天蓝苜蓿聚为一个亚支。

Thorpe 曾指出, 当一个种群的分类地位用其他方法难以解决时, 应使用遗传相似系数  $I$  信息<sup>[25]</sup>。为了进一步揭示“阔荚类群”同苜蓿属其他种及胡卢巴属之间的遗传关系, 表 6 列出了两种分子标记下, “阔荚类群”4 个种同苜蓿属余下的 5 个种及胡卢巴属 2 个种之间的平均遗传相似系数。Thorpe 通过分析研究后认为: 遗传相似系数  $I < 0.85$  的两种群, 不可能是同一物种; 同科属间  $I$  范围是 0.1~0.5; 种间  $I$  范围为 0.2~0.8; 而同种种群间  $I$  的范围是 0.8~0.97<sup>[25]</sup>。本结果显示, 在两种分子标记中苜蓿属 (除“阔荚类群”外) 与胡卢巴属平均遗传相似系数  $I$  分别为 0.60 (SSR) 和 0.64 (ISSR), “阔荚类群”与苜蓿属其他种平均遗传相似系数  $I$  分别为 0.56 (SSR) 和 0.63 (ISSR), “阔荚类群”与胡卢巴属平均遗传相似系数  $I$  分别为 0.63 (SSR) 和 0.66 (ISSR)。可见结果中  $I$  值均略大于 0.5, 表明苜蓿属与胡卢巴属亲缘关系很近, “阔荚类群”与两个属之间的平均遗传相似系数  $I$  相差不大, 与胡卢巴属两个种亲缘关系更近一些。

表 4 基于 SSR 分子标记苜蓿属 11 个种的 Nei's 遗传距离 GD(左下角)及遗传相似系数 I(右上角)

Table 4 Nei's genetic distance(left corner)and genetic similar coefficient(right corner)of 11 *Medicago* species based on SSR markers

物种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.58	0.61	0.61	0.60	0.67	0.58	0.63	0.76	0.69	0.65
2	0.55	****	0.91	0.51	0.66	0.58	0.95	0.53	0.55	0.60	0.53
3	0.49	0.10	****	0.56	0.67	0.61	0.92	0.59	0.60	0.62	0.58
4	0.49	0.67	0.58	****	0.53	0.75	0.52	0.71	0.53	0.58	0.80
5	0.50	0.42	0.40	0.64	****	0.56	0.67	0.55	0.57	0.61	0.52
6	0.39	0.55	0.49	0.29	0.58	****	0.58	0.76	0.64	0.66	0.78
7	0.55	0.05	0.08	0.65	0.40	0.55	****	0.55	0.55	0.60	0.54
8	0.46	0.63	0.52	0.34	0.59	0.27	0.60	****	0.67	0.59	0.78
9	0.28	0.59	0.51	0.64	0.56	0.45	0.59	0.40	****	0.69	0.62
10	0.37	0.50	0.48	0.54	0.49	0.42	0.50	0.52	0.37	****	0.58
11	0.43	0.64	0.55	0.23	0.65	0.25	0.61	0.24	0.48	0.55	****

1: 胡卢巴 *Trigonella foenum-graecum* L. ; 2: 紫花苜蓿 *Medicago sativa* L. ; 3: 黄花苜蓿 *M. falcata* L. ; 4: 花苜蓿 *M. ruthenica* (L.) Trautv. ; 5: 天蓝苜蓿 *M. lupulina* L. ; 6: 毛茛苜蓿 *M. edgeworthii* Sirj. ex Hand. - Mazz. ; 7: 多变苜蓿 *M. varia* Martyn; 8: 阔荚苜蓿 *M. platycarpus* (L.) Trautv. ; 9: 网脉胡卢巴 *T. cancellata* Desf. ; 10: 南苜蓿 *M. polymorpha* L. ; 11: 青海苜蓿 *M. archiducis-nicolai* Sirj.

表 5 基于 ISSR 分子标记苜蓿属 11 个种的 Nei's 遗传距离 GD(左下角)及遗传相似系数 I(右上角)

Table 5 Nei's genetic distance(left corner)and genetic similar coefficient(right corner)of 11 *Medicago* species based on ISSR markers

物种编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1	****	0.63	0.69	0.67	0.64	0.70	0.64	0.64	0.69	0.68	0.64
2	0.47	****	0.83	0.67	0.69	0.70	0.93	0.64	0.66	0.69	0.63
3	0.37	0.19	****	0.75	0.70	0.78	0.87	0.70	0.72	0.75	0.71
4	0.40	0.40	0.29	****	0.68	0.79	0.71	0.70	0.73	0.69	0.73
5	0.44	0.37	0.35	0.38	****	0.69	0.71	0.68	0.65	0.68	0.66
6	0.35	0.35	0.25	0.24	0.37	****	0.71	0.73	0.76	0.73	0.76
7	0.44	0.07	0.14	0.35	0.34	0.34	****	0.67	0.68	0.70	0.64
8	0.44	0.44	0.35	0.36	0.38	0.32	0.40	****	0.65	0.65	0.76
9	0.37	0.41	0.33	0.32	0.43	0.28	0.38	0.43	****	0.71	0.69
10	0.38	0.37	0.29	0.37	0.39	0.32	0.35	0.43	0.34	****	0.66
11	0.45	0.46	0.35	0.31	0.42	0.27	0.45	0.27	0.37	0.42	****

1: 胡卢巴 *Trigonella foenum-graecum* L. ; 2: 紫花苜蓿 *Medicago sativa* L. ; 3: 黄花苜蓿 *M. falcata* L. ; 4: 花苜蓿 *M. ruthenica* (L.) Trautv. ; 5: 天蓝苜蓿 *M. lupulina* L. ; 6: 毛茛苜蓿 *M. edgeworthii* Sirj. ex Hand. - Mazz. ; 7: 多变苜蓿 *M. varia* Martyn; 8: 阔荚苜蓿 *M. platycarpus* (L.) Trautv. ; 9: 网脉胡卢巴 *T. cancellata* Desf. ; 10: 南苜蓿 *M. polymorpha* L. ; 11: 青海苜蓿 *M. archiducis-nicolai* Sirj.

表 6 “阔荚类群”、苜蓿属 (*Medicago*) (除“阔荚类群”外) 及胡卢巴属 (*Trigonella*) 平均遗传相似系数 I

Table 6 The average genetic similarity coefficient (I) of subgen. *Platycarpus*, *Medicago* (except subgen. *Platycarpus*) and *Trigonella*

种群名	SSR 标记			ISSR 标记		
	阔荚类群 <i>Platycarpus</i>	胡卢巴属 <i>Trigonella</i>	苜蓿属 <i>Medicago</i>	阔荚类群 <i>Platycarpus</i>	胡卢巴属 <i>Trigonella</i>	苜蓿属 <i>Medicago</i>
阔荚类群 <i>Platycarpus</i>	0.763 6 *			0.753 0 *		
胡卢巴属 <i>Trigonella</i>	0.627 9	0.755 8 *		0.661 0	0.704 6 *	
苜蓿属 <i>Medicago</i>	0.562 2	0.602 3	0.721 0 *	0.634 9	0.642 9	0.740 9 *

\* 标注的为同一类群种间的平均遗传相似系数 I

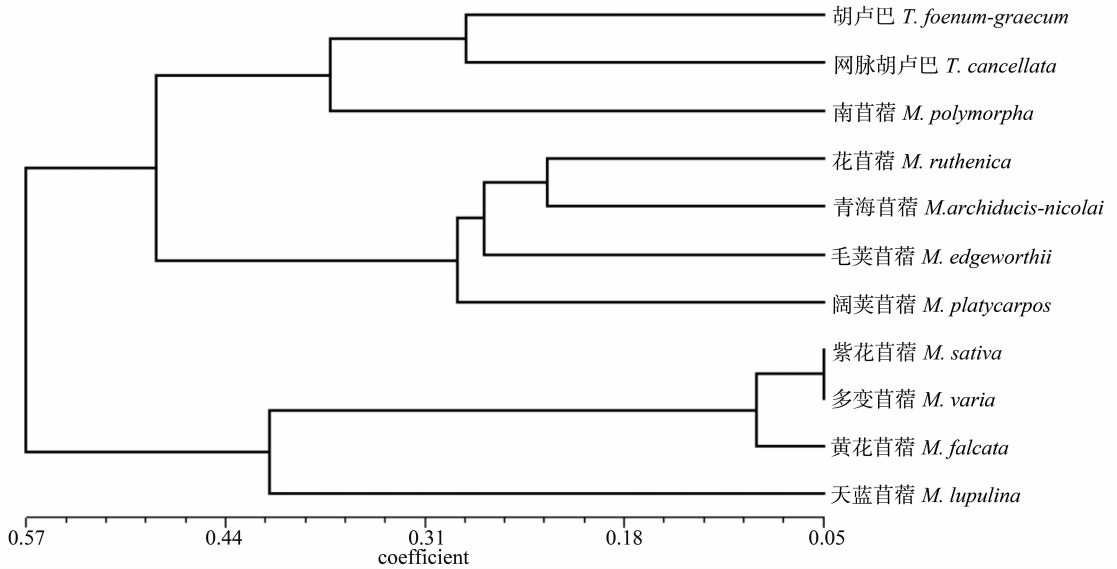


图 1 基于 SSR 标记苜蓿属 (*Medicago* L.) 及胡卢巴属 (*Trigonella* L.) 11 个种聚类图

Fig. 1 UPGMA dendrograms of the genetic relationships among 11 species of *Medicago* L. and *Trigonella* L. constructed from estimated simple matching genetic distance based on SSR markers

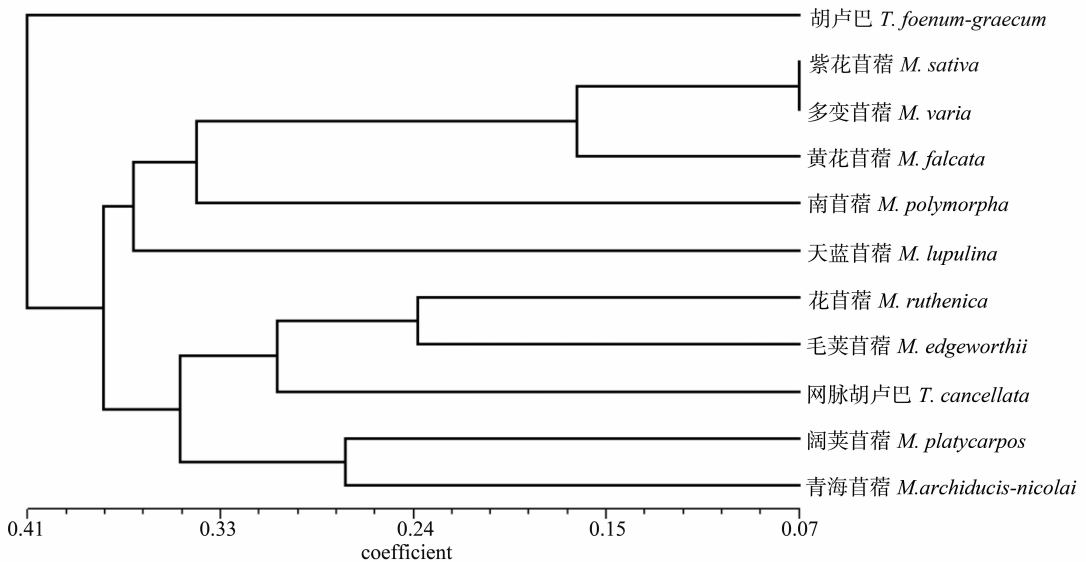


图 2 基于 ISSR 标记苜蓿属 (*Medicago* L.) 及胡卢巴属 (*Trigonella* L.) 11 个种聚类图

Fig. 2 UPGMA dendrograms of the genetic relationships among 11 species of *Medicago* and *Trigonella* constructed from estimated simple matching genetic distance based on ISSR markers

## 3 讨论

### 3.1 SSR 与 ISSR 分子标记评价

分子标记的应用性评价是开展遗传多样性分析的基础工作之一<sup>[26]</sup>。由于所用标记技术和材料的不同,得到的结果会不一致。1995 年 7 月 30 日召开的美国园艺学会 (ASHS) 第 92 届年会上,与会专家一致认为四大标记系统综合效用大小应该是 AFLP > SSR > RAPD > RFLP。Belaj 等通过研究橄榄

*Canavium album* 遗传关系比较 RAPD、AFLP 和 SSR 标记的效用,结果发现 SSR 标记具有更高的多态性并获得更多的信息<sup>[27]</sup>。Archak 等<sup>[22]</sup>的研究表明,AFLP 标记较 ISSR、RAPD 标记更适于腰果的遗传多样性分析。

在本研究中,对比两种标记在 11 个种间和 *M. sativa* complex 3 个种间的标记指数,结果表明 ISSR 标记 MI 值略高于 SSR 标记,说明前者比后者具有较高的标记效率。MI 组成参数的比较发现,ISSR 标

记具有更多的多态性位点, 即具有高的 EMR 值, 这是 ISSR 标记的 MI 值高于 SSR 标记的主要原因, 而 SSR 的 I<sub>bav</sub> 值高于 ISSR 标记。同 11 个种间相比在复合体类群内部的物种间两种标记的 EMR 值大幅减小, 而 I<sub>bav</sub> 值却有所升高。I<sub>bav</sub> 是多样性指数的一种修正计算方法<sup>[22]</sup>, 是扩增位点多态性程度的直接体现, 因此认为 SSR、ISSR 标记在复合体种间具有高度的多态性, 适于亲缘关系较近的种群分析。但由于 SSR 是共显性标记, 而在本研究中由于所测 DNA 是 15 个样品等量 DNA 的混合以及四倍体的存在, 故采用显性标记统计方法, 使得共显性标记的优势大大下降, 这可能也是 SSR 标记指数略低于 ISSR 标记指数的主要原因之一。

两个分子标记下的遗传距离具有明显的相关性, 并且对比基于 SSR 与 ISSR 分子标记的遗传多样性研究结果, 11 个种间聚类图虽不完全相似, 但都能有效的区分出“阔荚类群”与紫花苜蓿、黄花苜蓿及多变苜蓿这 3 个“紫花苜蓿复合体”种, 与物种的倍性水平和形态学相似程度存在较高的一致性, 表明两种标记在苜蓿属植物种间分析是有效的。

### 3.2 苜蓿属及其近缘植物亲缘关系分析

在基于两种分子标记的 UPGMA 聚类图中, 可以看出胡卢巴属物种与苜蓿属物种并不能有效的区分出来。SSR 标记中, 胡卢巴属两个种虽然遗传关系较近, 但却与南苜蓿及“阔荚类群”的 4 个种聚成了一个分支, 与苜蓿属其他种区分明显。ISSR 标记中, 胡卢巴与苜蓿属其他物种区分开, 而网脉胡卢巴却聚在了“阔荚类群”中。这与刘磊等<sup>[15-16]</sup>通过 ISSR 研究扁蓿豆 (*M. ruthenica*) 与胡卢巴关系更近的结果相似。Baum<sup>[28]</sup>指出, 胡卢巴属的花丝联合部上缘则近截平, 内部维管束无增厚, 花丝分离处不加宽, 与 Larkin 和 Graumann<sup>[29]</sup>研究的苜蓿属雄蕊的特征不同, 从而可将这 2 个属划分开来, 此区分特征后被 McComb<sup>[30]</sup>否定, 因为天蓝苜蓿的花丝分离部的下端仅有轻微的趋宽迹象。而在聚类树上, 天蓝苜蓿与胡卢巴属的亲缘关系都较远。对比“阔荚类群”, 苜蓿属 (除“阔荚类群”外) 同胡卢巴属间的平均遗传相似系数, 均已超出 Thorpe<sup>[25]</sup>认为的一般类群属间平均遗传相似系数范围, 并且“阔荚类群”与胡卢巴属间的平均遗传相似系数最高。邢建军等利用细胞染色体技术对苜蓿属及胡卢巴属亲缘关系研究的发现: 胡卢巴属植物与苜蓿属的扁蓿豆材料亲缘关系较近, 与苜蓿属的其它材料亲缘关系较远<sup>[31]</sup>。本研究中 SSR 标记的聚类分析显示南苜蓿与胡卢巴属的两个种遗传距离较

近, 而在 ISSR 标记中与紫花苜蓿复合体及天蓝苜蓿聚成一支, 可见与胡卢巴属遗传关系相近的并不仅有“阔荚类群”。因而本研究结果更加证实了胡卢巴属与苜蓿属在亲缘关系上的密切性, 但由于分析方法的不同与前人的研究结果有相似性但也有一定的差异。

两种标记中, 花苜蓿、青海苜蓿、毛茛苜蓿以及阔荚苜蓿这 4 个果实形态特征为荚果扁、阔镰形、矩圆形或椭圆形的种均可聚为一类, 进一步说明了“阔荚类群”无论从形态上还是分子水平上都应当归为一个类群。而紫花苜蓿复合体的 3 个种在两种分子标记下, 都是遗传距离最近的种。且二倍体、四倍体共有种在两种分子标记下都聚在一支上, 除与其他仅有二倍体的物种有所区分, 该结果也与细胞学的研究结果相符合<sup>[31]</sup>。

## 4 结 论

本研究从分子水平上可以看出苜蓿属与胡卢巴属亲缘关系很近, 尤其是苜蓿属中“阔荚类群”在两种分子标记下呈现了与胡卢巴属较近的亲缘关系。而“紫花苜蓿复合体”3 个种及天蓝苜蓿与胡卢巴属亲缘关系较远, 南苜蓿在两种分子标记下与胡卢巴属的亲缘关系有所不同。而胡卢巴在 ISSR 分子标记下也呈现了与其他物种较远的亲缘关系。可见苜蓿属内不同物种与胡卢巴属的亲缘关系有所区别, 且基于不同的研究手段结果也有所区别。因此胡卢巴属与苜蓿属的分类地位需随两个属内物种材料的进一步丰富及将不同的分析手段结合从而得到进一步解决。

### 参考文献:

- [1] 耿华珠. 中国苜蓿[M]. 北京: 中国农业出版社, 1995: 60-72.
- [2] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志(第 42 卷第 2 分册)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 304-328.
- [3] URBAN I. Prodrum einer Monographie der Gattung *Medicago* L. [M]. Verhandlungen des Botanischen Vereins der Provinz Brandenburg, 1873, 15: 1-85.
- [4] LESINS K A, LESINS I. Genus *Medicago* (Leguminosae): A taxogenetic study [M]. The Hague: W. Junk Press, 1979: 66-214.
- [5] SMALL E, JOMPHE M. A synopsis of the genus *Medicago* (Leguminosae) [J]. Canadian Journal of Botany, 1988, 67: 3260-3294.
- [6] BENA G. Molecular phylogeny supports the morphologically based taxonomic transfer of the “medicagoid” *Trigonella* species to the genus *Medicago* L. [J]. Plant Systematics

- and Evolution, 2001, 229: 217 – 236.
- [7] 崔大方, 丘安经. 中国苜蓿属的起源、演化与地理分布 [C] // 中国植物学会 65 周年年会学术报告及论文摘要汇编. 北京: 中国林业出版社, 1998: 58 – 59.
- [8] 韦直. 胡卢巴属与苜蓿属分类界限 [C] // 中国植物学会 65 周年年会学术报告及论文摘要汇编. 北京: 中国林业出版社, 1998: 137.
- [9] EIG A. On the vegetation of Palestine [M]. Tel Aviv: Tel Aviv University, 1927: 1 – 88.
- [10] VASSILCZENKO I T. Synopsis of the species of the genus *Trigonella* [J]. Academy of Science, URSS Institute of Botany, VL Komarovii, 1953, 1(10): 124 – 269.
- [11] SMALL E, CROMPTON C W, BROOKES B S. The taxonomic value of floral characters in tribe Trigonelleae (Leguminosae), with special reference to *Medicago* [J]. Canadian Journal of Botany, 1981, 59: 1578 – 1598.
- [12] 杨丽萍, 蒙子宁, 刘晓春, 等. 中国大鲵 5 个野生种群的 AFLP 分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2011, 50(2): 99 – 104.
- [13] 陈省平, 丁少雄, 陈嘉慧. 赤点石斑鱼群体遗传结构的微卫星分析 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2012, 51(3): 83 – 89.
- [14] 田胜尼, 王峥峰, 高三红, 等. 用 ISSR 分子标记检测不同尾矿废弃地白茅居群的遗传多样性 [J]. 中山大学学报: 自然科学版, 2006, 45(4): 87 – 92.
- [15] 刘磊, 王宗礼, 李志勇, 等. 利用 ISSR 标记解析胡卢巴和扁蓿豆、黄花苜蓿的亲缘关系 [J]. 华北农学报, 2012, 27(4): 85 – 88.
- [16] 刘磊, 王宗礼, 李志勇, 等. 利用 ISSR 标记解析紫花苜蓿、黄花苜蓿和胡卢巴属植物的亲缘关系 (英文) [J]. Agricultural Science & Technology, 2012, 13(10): 2076 – 2079.
- [17] BERNADETTE J, SANDRINE F, PHILIPPE B, et al. Construction of two genetic linkage maps in cultivated tetraploid alfalfa (*Medicago sativa*) using microsatellite and AFLP markers [J]. Plant Biology, 2003, 3: 9.
- [18] YEH F C, YANG R-C, BOYLE T B J, et al. Popgene: Microsoft windows? -Based freeware for population genetic analysis, Version 1.32 [M]. University of Alberta and Centre for International Forestry Research, Canada, 1997.
- [19] PESKALL R, SMOUSE P E. GENEALX 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research [J]. Molecular Ecology Notes, 2006, 6: 288 – 295.
- [20] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. Molecular Breeding, 1996, 2: 225 – 238.
- [21] MILBOURNE D, MEYER R, BRADSHAW J E, et al. Comparison of PCR based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato [J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 127 – 136.
- [22] ARCHAK S, GAIKWARD A B, GAUTAM D, et al. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India [J]. Genome, 2003, 46: 362 – 369.
- [23] ROHLF F J. NTSYS pc2. 1. <http://www.exetersoftware.com/cat/ntsyspc/ntsyspc>, 2000.
- [24] 缪颖. AFLP 分子标记及其应用 [J]. 亚热带植物通讯, 1999, 28(2): 55 – 60.
- [25] THORPE J P. The molecular clock hypothesis: Biochemical evolution, genetic differentiation, and systematic [J]. Annual Review of Ecology And Systematics, 1982, 13(1): 139 – 168.
- [26] MILBOURNE D, MEYER R, BRADSHAW J E, et al. Comparison of PCR based marker systems for the analysis of genetic relationships in cultivated potato [J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 127 – 136.
- [27] BELAJ A, SATOVIC Z, CIPRIANI G, et al. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107: 736 – 744.
- [28] BAUM B R. A clarification of the generic limits of *Trigonella* and *Medicago* [J]. Canadian Journal of Botany, 1968, 46: 741 – 749.
- [29] LARKIN R A, GRAUMANN H O. Anatomical structure of the alfalfa flower and an explanation of the tripping mechanism [J]. Botanical Gazette, 1954, 116: 40 – 52.
- [30] MCCOMB J A. Annual *Medicago* species with particular reference to those occurring in Western Australia [J]. The Journal of The Royal Society of Western Australia, 1974, 57(3): 81 – 96.
- [31] 邢建军, 李志勇, 蔡丽艳, 等. 利用细胞染色体技术对苜蓿属和胡卢巴属亲缘关系的鉴定 [J]. 内蒙古草业, 2011, 23(4): 28 – 32.