

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.01330

中国豌豆地方品种 SSR 标记遗传多样性分析

宗绪晓^{1,2} 关建平² 王述民² 刘庆昌^{1,*}

(¹ 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100094; ² 中国农业科学院作物科学研究所 / 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081)

摘要: 利用 21 对豌豆多态性 SSR 引物, 对来自全国春、秋播区 19 省区市的 1 221 份豌豆地方品种进行遗传多样性分析, 共扩增出 104 条多态性带, 每对引物平均扩增出 4.95 个等位变异, 其中有效等位变异占 62.52%。省份间 SSR 等位变异分布均匀, 但是省份间有效等位变异数、Shannon's 信息指数(I)差异明显, 省籍资源群间遗传多样性差异显著。遗传多样性以内蒙古资源群最高, 甘肃、四川、云南和西藏等资源群其次, 辽宁资源群最低。PCA 三维空间聚类图揭示, 我国豌豆地方品种资源分化成 3 个基因库, 基因库 I 主要由春播区的内蒙古、陕西资源构成, 基因库 II 主要由秋播区最北端的河南资源构成, 基因库 III 主要由除上述省份之外的其他省区市的资源构成。UPGMA 聚类分析表明, 不同省份资源群间的遗传距离变化范围为 5.159~27.586, 中国豌豆地方资源据此聚类成 2 个组群 8 个亚组群, 与 3 个基因库的聚类结果相呼应。聚类结果显示, 我国豌豆地方品种资源群间遗传距离与其来源地生态环境相关联。
关键词: 豌豆栽培种(*Pisum sativum* L.); SSR; 遗传多样性; 中国地方品种资源

Genetic Diversity among Chinese Pea (*Pisum sativum* L.) Landraces Revealed by SSR Markers

ZONG Xu-Xiao^{1,2}, GUAN Jian-Ping², WANG Shu-Min², and LIU Qing-Chang^{1,*}

(¹ Department of Plant Genetics and Breeding, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094; ² Institute of Crop Sciences / The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: A total of 1 221 pea (*Pisum sativum* L.) landraces from 19 provinces in spring sowing and winter sowing areas in China were employed for SSR analysis. One hundred and four polymorphic bands were detected by using 21 SSR primer pairs. 4.95 alleles were detected by each SSR primer pair on average, of which, 62.52% were effective alleles for diversity. SSR alleles were uniformly distributed in the landraces among provinces, while the number of effective alleles and Shannon's information index (I) varied much among provincial based groups of genetic resources. Significant difference appeared in the majority of pairwise comparisons for genetic diversity between provincial based groups of genetic resources. Inner Mongolia possessed the highest level of genetic diversity (I = 1.066), followed by Gansu (I = 1.041), Sichuan (I = 1.026), Yunnan (I = 1.017) and Tibet (I = 0.996); Liaoning was the lowest (I = 0.515) in genetic diversity. Three gene pools were detected in Chinese pea landraces, which were polarized during its adaptation and cultivation in thousands years. Gene Pool I mainly consisted of the pea landraces from Inner Mongolia and Shaanxi provinces, Gene Pool II mainly consisted of the pea landraces from Henan province, and Gene Pool III mainly consisted of the pea landraces from other provinces except Shaanxi, Inner Mongolia and Henan. Pairwise Nei78 genetic distance among provincial based groups of pea landraces ranged from 5.159 to 27.586, 2 large cluster groups and 8 cluster sub-groups were identified based on the dendrogram interacting with the three gene pools. The clustering results of Chinese landraces reveal ecologically and geographically close correlation to their genetic diversity.

Keywords: *Pisum sativum* L.; SSR; Genetic diversity; Chinese landraces

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD13B05, 2006BAD02B08); 农业行业专项(nyhyzx07-017); 中澳政府间大型双边国际合作项目(ACIAR: CS1/2000/035)

作者简介: 宗绪晓(1964–), 男, 山东莱州, 研究员, 研究方向为食用豆类种质资源。Tel: 010-62186651; E-mail: zongxx@mail.caas.net.cn

*通讯作者(Corresponding author): 刘庆昌。Tel: 010-62733710; E-mail: liuqc@cau.edu.cn

Received(收稿日期): 2007-12-12; Accepted(接受日期): 2008-03-14.

豌豆(*Pisum sativum* L.)是世界第四大食用豆类作物^[1]。据 FAO 统计资料^[2], 2005 年全世界有 88 个国家生产干豌豆, 栽培面积约 658 万公顷, 总产约 1 126 万吨; 72 个国家生产青豌豆, 栽培面积约 112 万公顷, 总产约 910 万吨。2000—2005 年平均, 全世界干豌豆栽培面积最大的 5 个国家依次是加拿大(约 126 万公顷), 中国(约 91 万公顷), 印度(约 73 万公顷), 俄罗斯联邦(约 71 万公顷)和法国(约 35 万公顷); 青豌豆栽培面积最大的 5 个国家依次是印度(约 33 万公顷), 中国(约 22 万公顷), 美国(约 8 万公顷), 英国(约 3 万公顷)和法国(约 3 万公顷)^[2]。我国已收集豌豆种质资源 5 000 余份, 经过近 30 年的研究, 已长期安全保存国内外豌豆种质资源 4 000 多份, 其中 80%是国内地方品种、育成品种和遗传稳定的品系, 20%资源来自澳大利亚、法国、英国、前苏联、匈牙利、美国、德国、尼泊尔、印度和日本等国^[3]。我国收集保存的国内豌豆资源数量较多、来源广泛, 但对其遗传多样性及不同资源群间和群内的异同点缺乏基本了解, 无法满足育种家对拓宽品种遗传基础的要求。研究我国豌豆地方品种的遗传多样性, 掌握其分布特点及规律, 对于充分发掘、利用现有国内地方豌豆种质, 合理选配亲本、拓宽育成品种遗传基础等具有十分重要的意义。

国外曾有过豌豆遗传多样性研究的报道。Hoey 等^[4]利用同工酶和 RAPD 标记方法, 发现豌豆野生种和栽培种间有明显差别, Ellis 等^[5]利用来源于 Ty1-copia 逆转录转座子的 SSAP 标记方法, 得到了相同的结果。在豌豆栽培种遗传多样性研究中, 单独利用 RAPD 标记^[6]或与 AFLP 标记方法结合使用^[7], 结果都发现栽培豌豆类型间存在明显差别。Burstin 等^[8]根据豌豆简单重复序列信息合成了 43 对 SSR 标记引物, 对 12 个豌豆品系进行分析, 检测到 31 个等位变异, 显示 SSR 标记可用于豌豆遗传多样性研究。Ford 等^[9]利用 12 对位点专一性 SSR 标记(即序列标签 SSR)引物和 RAMS 标记, 对 15 份来自澳大利亚育种项目的豌豆栽培资源和 5 份野生资源, 进行了遗传多样性分析, 聚类结果显示栽培种与野生种区别明显。Tar'an^[10]等曾利用 RAPD、SSR 和 ISSR 标记, 对 65 份豌豆栽培资源和 21 份野生资源进行了遗传多样性分析, UPGMA 聚类分析结果以及主成分分析(PCA)结果均显示, 豌豆栽培种明显区别于野生亚种和野生变种, 野生亚种和野生变种间也有较为明显的区别。Baranger 等^[11]在前人工作的基础

上, 利用同工酶、贮藏蛋白、RAPD、ISSR、SSR 和 STS 标记, 对主要来自于西欧的 148 份豌豆栽培资源和育成品种进行遗传多样性分析, 发现按用途区分的栽培豌豆类型间存在明显差别, 相同系谱来源的育成品种基本聚为一类; 除此之外, Baranger 等^[11]比较不同分子标记在揭示遗传多样性时发现 SSR 与 RAPD 的效果较好, 接近于多种标记综合运用效果。综上所述, SSR 标记对于豌豆资源鉴别、遗传多样性分析十分可靠和有效。

以往研究使用的豌豆资源材料均在 150 份以下, 无法对豌豆资源的遗传多样性及其相互之间的遗传关系进行系统、可靠的分析, 因而难以对亲本选配、尤其是豌豆育种中如何充分利用不同豌豆种质类型的遗传多样性提供有效指导。而且, 至今尚无有关我国栽培豌豆资源遗传多样性的研究报道。本研究拟利用 STMS 标记, 对来自我国春、秋播区 19 个省区市的 1 221 份豌豆地方品种(*Pisum sativum* L.)进行 SSR 遗传多样性分析, 揭示春、秋播区不同省籍来源栽培豌豆资源群间的遗传关系, 以期对豌豆育种亲本合理选配、国内地方资源的充分发掘利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

全国春播区地方豌豆栽培种参试资源共 764 份, 分别来自内蒙古(261 份)、陕西(208 份)、青海(189 份)、西藏(45 份)、甘肃(32 份)、山西(19 份)、北京(15 份)、新疆(8 份)和辽宁(7 份)共 9 个省区市; 全国秋播区地方豌豆栽培种参试资源共 437 份, 分别来自四川(177 份)、云南(55 份)、河南(49 份)、湖北(46 份)、贵州(37 份)、安徽(35 份)、广西(13 份)、上海(12 份)、广东(7 份)和湖南(6 份)。以上参试资源, 按比例取样, 包括粒用和菜用类型, 涵盖我国豌豆传统分布区, 代表了中国绝大部分省区的生态资源, 由中国农业科学院作物科学研究所提供。

1.2 DNA 提取与 SSR 分析

1.2.1 DNA 提取 每份参试材料在 20 个随机选取的单株上取 200~300 叶样, 在液氮中冻干研磨成细粉。参照 Dellaporta 等^[12]和 Doyle 等^[13]的 CTAB 法, 提取 DNA。提取到的基因组总 DNA, 采用 1.4% 琼脂胶电泳, 溴化乙锭(EB)显影, 以已知浓度的 λ DNA 做对照, 稀释标定到 $25 \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$, 放 -20°C 冰箱备用。

1.2.2 STMS 引物 21 对, 代号分别为 PB14、PSAA18、PSAA175、PSAC58、PSAC75、PSAA219、PSAD83、PSAD270、PSAA456、PSAB23、PSAB47、PSAA497、PSAD280、PSAB72、PSAB109、PSAB141、PSAB161、AD100、AD134、AA303 和 AA315, 来自澳大利亚墨尔本大学(源自 *Pisum* microsatellite consortium, Agrogène®, France) [8-9,14], 由 Sigma 公司合成; *Taq* DNA Polymerase、dNTPs 购自 New England 公司; 10 bp DNA ladder marker 购自 Invitrogen 公司。

1.2.3 SSR 反应条件 PCR 反应总体积为 10 μL , 含 1 \times PCR buffer, 2.5 mmol μL^{-1} MgCl_2 , 4 种 dNTP 各 0.168 mmol μL^{-1} , 0.5 U *Taq* DNA polymerase 酶, Primer F 和 Primer R 引物各 0.4 $\mu\text{mol} \mu\text{L}^{-1}$, 25 ng 模板 DNA。PCR 扩增在 PTC-220 型(MJ Research)PCR 仪上进行, 盖温控制在 105 $^{\circ}\text{C}$, 先在 94 $^{\circ}\text{C}$ 下预变性 3 min; 再进行 38 个循环的变性(94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s)、退火(温度随引物而不同 30 s)、延伸(72 $^{\circ}\text{C}$ 120 s)步骤; 然后在 72 $^{\circ}\text{C}$ 下继续延伸 5.5 min; 最后慢慢冷却至 10 $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2.4 产物检测 扩增产物加 1/5 体积的上样缓冲液(40%蔗糖, 0.025%溴酚蓝), 取 3.5 μL 利用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染检测 [15]。

1.3 数据统计与分析

记载同一对 SSR 引物扩增条带(等位变异)在各参试资源中有或无。如果无, 记为 0; 如果有, 则按其分子量从大到小的顺序, 分别记录为 1、2、3、……。此种转换方式是根据 SSR 标记长于揭示等位基因的特点, 配合相应统计软件对 SSR 原始数据格式特殊要求确定的 [16-18]。不同群体间和不同群体内某一位点的等位变异数及等位变异频率, 有效等位基因数 [19], Shannon's 信息指数 [20] 统计计算, 在 Popgen 1.32 软件包 [18] 中完成; 在 Fstat 2.9.3.2 软件包 [16] 中完成资源群体遗传多样性差异显著性比较; 在 Popgen 1.32 软件包 [18] 和 MEGA 3.1 软件包 [21] 中完成参试材料间 Nei78 遗传距离计算及群体间遗传距离聚类图绘制; 在 NTSYS-pc 2.20d 软件包 [17] 中完成参试材料间欧氏距离计算, 主成分分析(PCA)及三维作图; 通过 Microsoft Excel 计算相关系数。

2 结果与分析

2.1 SSR 位点多样性

21 对 SSR 引物在 1 221 份参试材料中共扩增出 104 条多态性带(等位变异); 每对引物平均扩增出 4.95 个等位变异, 其中有效等位变异数 3.10, 有效

等位变异所占比重为 62.52%; 21 对 SSR 引物平均的 Shannon's 信息指数为 1.23。不同指标从不同角度揭示了豌豆 SSR 引物对在揭示遗传多样性方面存在的巨大差异。其中, Shannon's 信息指数 1.5 以上, 等位变异数 8 且有效变异数 4.0 以上, 最有效的 SSR 引物为 PSAC75, PSAD270 和 PSAC58 (表 1)。

2.2 种质群省际间的遗传多样性差异

各省份栽培豌豆资源群的参试材料份数, 所含的等位变异数, 有效等位变异数和 Shannon's 信息指数, 见表 2。材料份数与等位变异数间的相关系数为 0.8228, 达 5% 显著水平, 说明各省份 SSR 等位变异数与其参试材料份数密切相关, SSR 等位变异在各省份间分布均匀。然而, 参试材料份数与有效等位变异数间的相关系数为 0.3188, 参试材料份数与 Shannon's 信息指数间的相关系数为 0.4725, 等位变异数与有效等位变异数间的相关系数为 0.6666, 均未达 5% 显著水平, 说明 SSR 有效等位变异数、Shannon's 信息指数表现明显的省际差异。因此, 等位变异数、有效等位变异数以及有效等位变异所占比重等指标, 可从不同侧面揭示各省份资源群的特点。然而, Shannon's 信息指数则综合反映了各省籍资源群遗传多样性, 其高低自上而下排列于表 2, 内蒙古资源群($I = 1.066$)最高, 甘肃($I = 1.041$)、四川($I = 1.026$)、云南($I = 1.017$)和西藏($I = 0.996$)等其次, 辽宁最低($I = 0.515$)。辽宁资源群主要为蔬菜用资源, 类型单一, 因此多样性程度低。

表 3 表明, 各省份资源群两两之间的遗传多样性差异多数达到显著水平, 仅广东、湖南、上海、辽宁和新疆的资源群与其他省份存在遗传多样性差异不显著的现象。然而, 所有省份的资源群均与陕西资源群存在显著的遗传多样性差异; 除湖南一省外, 所有其他省份的资源群均与除内蒙、青海、新疆之外各资源群间存在显著的遗传多样性差异。说明陕西、内蒙、青海和新疆资源群的独特性。上述结论也佐证了以地理来源为基础对豌豆资源群遗传多样性进行剖析做法的正确性。

2.3 聚类分析

主成分分析获得的前 3 个主成分的累积贡献率为 37.474%, 利用每份参试材料的前 3 个主成分数据绘三维聚类图(图 1)。春、秋播区 19 个省市区来源的栽培豌豆资源, 在 PCA 三维聚类图上形成 3 个显著的空间结构分化, 表明我国豌豆栽培资源分化成了 3 个基因库, 分别命名为基因库 I、基因库

表 1 21 对 SSR 引物扩增的等位变异数、有效变异数与 Shannon's 信息指数
Table 1 The SSR amplified products and their polymorphism in Chinese pea landraces

SSR 位点 SSR primer pair	等位变异数 Observed number of alleles (na)	有效等位变异数 Effective number of alleles (ne)	有效等位变异所占比重 Ratio of ne/na	Shannon's 信息指数 Shannon's information index (I)
PSAC75	8	4.7918	0.5990	1.7245
PSAD270	8	4.2669	0.5334	1.6008
PSAC58	8	4.1211	0.5151	1.5712
PSAB23	5	4.0936	0.8187	1.4696
PSAD280	6	3.8938	0.6490	1.4689
PSAA18	5	3.1818	0.6364	1.3815
PSAA175	5	3.2123	0.6425	1.3136
PSAB109	5	3.1005	0.6201	1.2928
AD134	5	3.2138	0.6428	1.2756
PSAB161	4	3.2219	0.8055	1.2490
PSAA497	4	3.1382	0.7846	1.2439
PSAD83	4	2.9289	0.7322	1.1925
PSAA219	4	2.7943	0.6986	1.1684
PSAB72	4	2.9002	0.7251	1.1547
PSAB47	5	2.4787	0.4957	1.1265
PB14	3	2.9821	0.9940	1.0956
AA303	6	2.4797	0.4133	1.0807
PSAA456	4	2.2596	0.5649	0.9867
AA315	4	2.0450	0.5113	0.8680
AD100	3	2.1455	0.7152	0.8458
PSAB141	4	1.7693	0.4423	0.6916
合计 Total	104	65.0190		
平均 Mean	4.9524	3.0961	0.6252	1.2287
标准差 SD	1.4992	0.7868		0.2588

表 2 21 对 SSR 引物扩增的各省份资源群等位变异数、有效变异数与 Shannon's 信息指数
Table 2 The distribution of SSR amplified products and their polymorphism in groups of Chinese pea landraces

来源省份 Origin	资源份数 Number of accessions	等位变异数 Observed number of alleles (na)	有效等位变异数 Effective number of alleles (ne)	有效等位变异所 占比重 Ratio of ne/na	Shannon's 信息指数 Shannon's information index (I)
内蒙古 Inner Mongolia	261	97	53.264	0.549	1.066
甘肃 Gansu	32	79	55.182	0.699	1.041
四川 Sichuan	177	94	51.007	0.543	1.026
云南 Yunnan	55	83	54.333	0.655	1.017
西藏 Tibet	45	76	53.306	0.701	0.996
北京 Beijing	15	72	52.893	0.735	0.979
新疆 Xinjiang	8	65	53.338	0.821	0.965
青海 Qinghai	189	87	53.111	0.610	0.963
上海 Shanghai	12	64	49.965	0.781	0.908
陕西 Shaanxi	208	88	46.074	0.524	0.903
河南 Henan	49	72	45.574	0.633	0.880
广东 Guangdong	7	58	48.546	0.837	0.855
湖北 Hubei	46	72	44.780	0.622	0.853
广西 Guangxi	13	64	44.762	0.699	0.830
贵州 Guizhou	37	74	43.779	0.592	0.829
山西 Shanxi	19	58	43.676	0.753	0.759
安徽 Anhui	35	60	44.325	0.739	0.734
湖南 Hunan	6	51	41.000	0.804	0.661
辽宁 Liaoning	7	44	37.678	0.856	0.515

表 3 省籍资源群间遗传多样性差异显著性测验结果
Table 3 Significance test results between groups of Chinese pea landraces

	甘肃	广西	贵州	河南	湖北	内蒙	青海	山西	陕西	四川	西藏	云南	北京	广东	湖南	辽宁	上海	新疆
	Gansu	Guangxi	Guizhou	Henan	Hubei	Inner Mongolia	Qinghai	Shanxi	Shaanxi	Sichuan	Tibet	Yunnan	Beijing	Guangdong	Hunan	Liaoning	Shanghai	Xinjiang
安徽	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	*	*	*
Anhui																		
甘肃		*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	*	NS	*
Gansu																		
广西			*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	NS	NS	*
Guangxi																		
贵州				*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	*	*	*
Guizhou																		
河南					*	*	*	*	*	*	*	*	*	NS	*	NS	*	*
Henan																		
湖北						*	*	*	*	*	*	*	*	NS	NS	*	*	*
Hubei																		
内蒙							*	*	*	*	*	*	*	*	NS	*	*	*
Inner Mongolia																		
青海								*	*	*	*	*	*	*	NS	*	*	*
Qinghai																		
山西									*	*	*	*	*	NS	NS	*	*	*
Shanxi																		
陕西										*	*	*	*	*	*	*	*	*
Shaanxi																		
四川											*	*	*	NS	NS	*	*	*
Sichuan																		
西藏												*	*	NS	NS	*	*	*
Tibet																		
云南													*	NS	NS	NS	NS	*
Yunnan																		
北京														NS	NS	NS	NS	*
Beijing																		
广东															NS	NS	NS	*
Guangdong																		
湖南																NS	NS	NS
Hunan																		
辽宁																	NS	*
Liaoning																		
上海																		*
Shanghai																		

*: 0.05水平上差异显著; NS: 差异不显著。

After multiple comparisons for 3 420 permutations, indicative adjusted nominal level (5%) for multiple comparisons is 0.000292. *: denotes significant difference at the 0.05 probability level; NS: non-significant difference.

II 和基因库 III。基因库 I 主要由春播区的内蒙古、陕西资源构成, 基因库 II 主要由秋播区最北端的河南资源构成, 基因库 III 主要由除上述省份之外的其他省区市的资源构成。3 个基因库间存在少量相

互渗透现象。

采用 POPGENE 1.32 计算不同省份豌豆种质间的 Nei78 遗传距离^[18], 借助 MEGA 3.1 的绘图功能^[21]获得洲际间聚类图(图 2), 资源群省份间的遗传距离

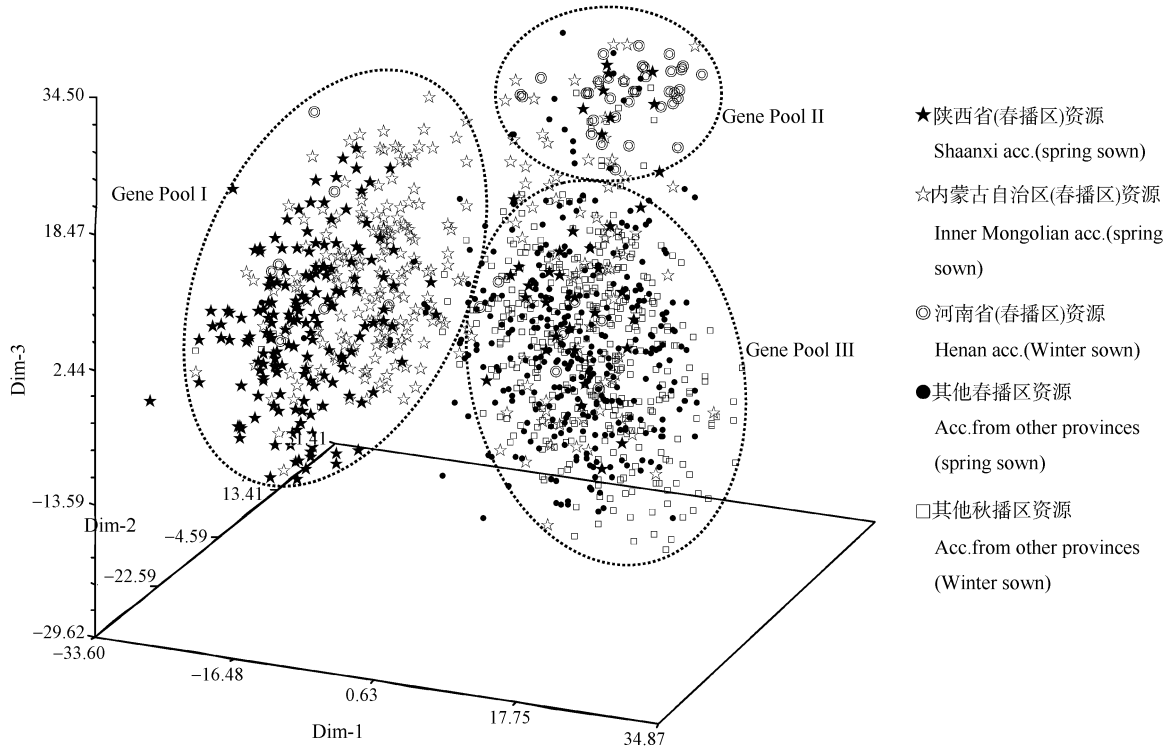


图 1 基于 1 221 份参试种质间欧氏距离绘制的三维 PCA 图
Fig. 1 3D-PCA graph of 1 221 pea landraces from China using Euclid distance based on SSR analysis

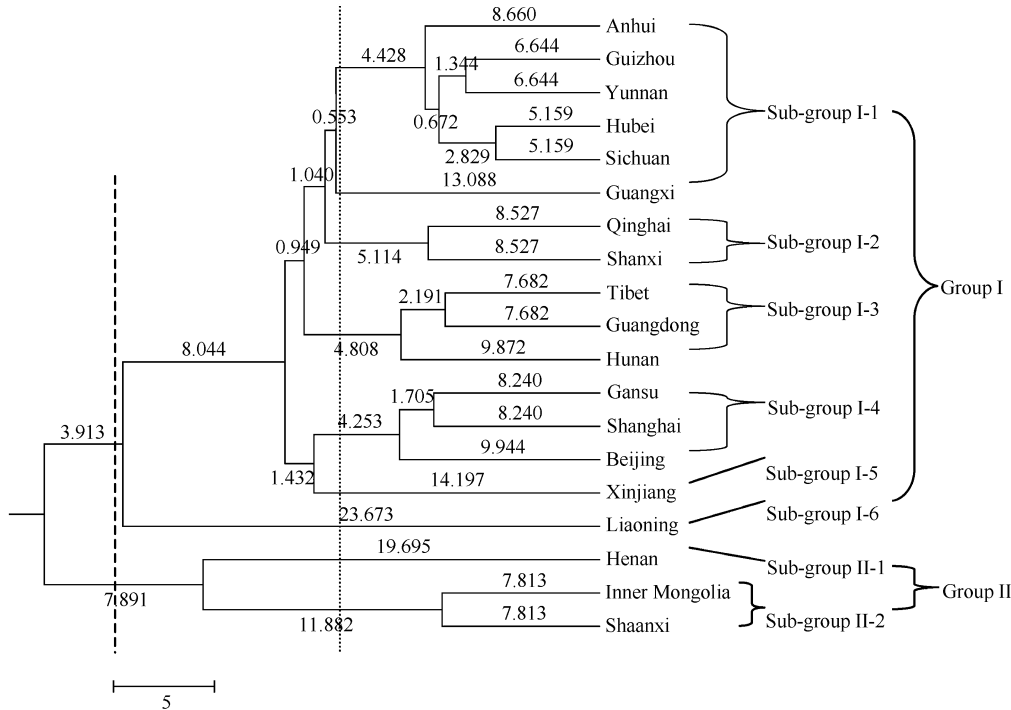


图 2 基于 SSR 标记数据的种质资源省际间遗传距离聚类图
Fig. 2 Dendrogram of provincial groups of pea landraces using UPGMA based on SSR analysis

变化范围为 5.159~27.586, 更进一步显示出 19 个省籍来源的栽培豌豆资源群体间的亲缘关系。从截距 23.673 处分割, 形成组群 I、组群 II, 共 2 个组群(图 2), 组群 I 基本与基因库 III 相对应, 组群 II 则与基因库 I 和基因库 II 相对应。从截距 13.088 处进一步分割, 组群 I 下又分成亚组群 I-1、亚组群 I-2、亚组群 I-3、亚组群 I-4、亚组群 I-5 和亚组群 I-6, 共 6 个亚组群; 而组群 II 以下又分为亚组群 II-1、亚组群 II-2, 共 2 个亚组群(图 2)。组群 I 下的亚组群 I-1 由安徽、贵州、云南、湖北、四川、广西 6 个秋播区省份的资源群组成, 其中 4 个主产省份中云南与贵州、四川与湖北资源群间的遗传距离最小, 上述 4 省与安徽资源群间的遗传距离也很小, 显示生态气候条件相似的秋播省份栽培豌豆资源群间的亲缘关系很近或遗传差异很小; 位于亚热带低海拔的广西自治区的栽培豌豆资源群与其他 5 省份的遗传距离较大, 反映了其较为特殊的生境气候条件。亚组群 I-2 由青海和山西 2 个春播区省份的资源群组成, 期间的遗传距离很小, 显示生态气候条件相似的春播省份栽培豌豆资源群间的亲缘关系很近或遗传差异很小。亚组群 I-3 由西藏、广东和湖南的资源群组成, 三者间的遗传距离很小, 原因有待进一步分析; 亚组群 I-4 由甘肃、上海和北京的资源群组成, 三者间的遗传距离很小, 原因有待进一步分析; 亚组群 I-5 仅由新疆的资源群构成, 该春播省份的气候条件有别于多数春播省区, 可解释其特殊性。亚组群 I-6 仅包括辽宁资源群, 该省豌豆生产面积小且主要为菜用资源, 造就了该特殊亚群。组群 II 下的亚组群 II-1 仅包含河南资源群, 大体对应基因库 II, 因该资源群的原生境位于秋播区的最北端, 与亚组群 II-2 春播类型资源群遗传距离较大, 差异明显; 亚组群 II-2 由内蒙古和陕西资源群组成, 对应着基因库 I。

3 讨论

3.1 SSR 标记分析

对来自 19 个省份空前规模的 1 221 份豌豆地方品种的 SSR 遗传多样性的系统分析, 揭示存在着 3 个基因库, 且省籍资源群间遗传多样性差异显著。SSR 标记的成功应用, 使我们对于中国地方豌豆资源的遗传多样性有了全新认识, 十分有助于我国豌豆遗传资源的进一步研究挖掘和育种利用。本研究建立的 SSR 标记系统, 为我国豌豆资源分子标记研究打下了坚实基础。

3.2 中国豌豆地方品种的 3 个基因库

清晰地揭示了春、秋播区地方豌豆资源间的异同和特点。基因库 I 代表的资源群主要分布于内蒙古全境和与之毗邻的陕北地区, 涵盖蒙古高原气候生态条件的雨养农牧交错区, 位于中国北部, 与其他春、秋播省份明显不同; 河南位于我国豌豆春、秋播区的交汇处, 以秋播豌豆为主, 基因库 II 代表的资源群分布于有灌溉条件且冬季最为寒冷的秋播豌豆区, 位于中国中部; 以秋播豌豆主产区四川、云南、贵州和春播豌豆主产区青海、甘肃等 16 个省区地方豌豆为主构成的基因库 III, 包括了地方豌豆资源的大多数, 是中国地方豌豆种质的主体, 上述省区相连成片, 主要位于中国西部和南部。3 个基因库的分化与其地理分布密切相关。中国豌豆栽培历史已超过 2000 年^[1,3], 地方品种在其漫长的自然和人工选择压力下, 已经分化成了 3 个相对独立的基因库。与此相关的抗逆性鉴定初步结果显示, 基因库 I 的资源耐盐、耐旱性较好, 基因库 II 的资源耐寒性较强(研究结果尚未发表)。上述研究结果, 为抗逆基因充分挖掘和拓宽豌豆育成品种的遗传基础, 指明了方向。

3.3 基因库分化与起源进化

中国地方豌豆资源 3 个基因库的分化, 具有非同一般的特点, 可能隐含进化学意义。通常认为豌豆栽培种(*Pisum sativum* L.)起源于土耳其和伊朗一带^[22], 然而从其有限的染色体变异证据而言, 豌豆在这一地区发生过的驯化事件很少^[23-24]。但是, 中国豌豆地方品种资源群间的显著差异, 却可能隐含着自然和人工选择压力、野生资源的基因渗透, 甚或公认起源地之外的独立驯化过程。作为全世界广泛栽培的豆类作物, 栽培环境的自然气候条件千差万别, 在世界的其他地方也有可能形成相对独特的基因库^[25]。在其他作物遗传多样性的研究中, 也发现同一个栽培种的资源在不同的地区形成了不同的基因库^[26-27], 可能是长期地理隔离引起的生殖隔离造成的。中国地方豌豆资源的基因库分化现象, 应起因于历史上南北交通不便曾经形成长期相互隔离的农业生产系统, 山区雨养农业生态系统更是如此。

3.4 基因库分化与资源改良和育种

中国地方豌豆资源 3 个基因库的发现, 对于豌豆资源改良和育种意义重大。通过人工杂交, 实现春性小麦基因库与冬性小麦基因库间相互渗透, 曾

拓宽了小麦抗病育种和品质改良的遗传基础, 育成品种的适应性得到加强, 单产得到提高^[26-27]。普通菜豆的安第斯基因库遗传背景狭窄, 应与南美基因库相互渗透才能获得重大育种进展^[28]。对中国地方豌豆资源遗传多样性的重新认识和在此基础上的有效利用, 将有效拓宽豌豆育种的遗传背景, 为我国豌豆资源改良和育种的重大突破打下基础。

4 结论

21 对 SSR 引物平均 Shannon's 信息指数为 1.23, 其中 Shannon's 信息指数 1.5 以上, 等位变异数 8 且有效变异数 4.0 以上, 最有效的 SSR 引物为 PSAC75, PSAD270 和 PSAC58。21 对 SSR 引物在 1 221 份参试材料中共扩增出 104 个等位变异, 每对引物平均扩增出 4.95 个等位变异, 其中有效等位变异数 3.10, 有效等位变异所占比重为 62.52%。

SSR 等位变异在各省份间分布均匀, 但是 SSR 有效等位变异数、Shannon's 信息指数(I)省份间差异明显。各省份资源群间的遗传多样性多数情况下差异显著。遗传多样性以内蒙古资源群最高, 甘肃、四川、云南和西藏等其次, 辽宁最低。

我国豌豆地方品种资源分化成 3 个基因库, 基因库 I 主要由春播区的内蒙古、陕西资源构成, 基因库 II 主要由秋播区最北端的河南资源构成, 基因库 III 主要由除上述省份之外的其他省区市的资源构成。

资源群省份间的遗传距离变化范围为 5.159~27.586。据此, 中国豌豆地方资源聚类成 2 个组群 8 个亚组群, 与 3 个基因库的聚类结果相呼应, 与其原生境省区市的地理、气候生态条件密切相关。

References

- [1] Zheng Z-J(郑卓杰), Wang S-M(王述民), Zong X-X(宗绪晓). Food Legume Crops in China (中国食用豆类学). Beijing: China Agriculture Press, 1997. pp 88-127 (in Chinese)
- [2] FAO Statistical Database, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome. <http://www.fao.org>, 2006
- [3] Zong X-X(宗绪晓), Wang Z-G(王志刚), Guan J-P(关建平). Descriptors and Data Standard for Pea (*Pisum sativum* L.)(豌豆种质资源描述规范和数据标准). Beijing: China Agriculture Press, 2005. pp 1-2 (in Chinese)
- [4] Hoey B K, Crowe K R, Jones V M, Polans N O. A phylogenetic analysis of *Pisum* based on morphological characters, allozyme and RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 92-100
- [5] Ellis T H N, Poyser S J, Knox M R, Vershinin A V, Ambrose M J. Polymorphism of insertion sites of Ty1-copia class retrotransposons and its use for linkage and diversity analysis in pea. *Mol Gen Genet*, 1998, 260: 9-19
- [6] Samec P, Našinec V. Detection of DNA polymorphism among pea cultivars using RAPD technique. *Biol Plant*, 1995, 37: 321-327
- [7] Simioniuc D, Uptmoor R, Friedt W, Ordon F. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breed*, 2002, 121: 429-435
- [8] Burstin J, Deniot G, Potier J, Weinachter C, Aubert G, Baranger A. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breed*, 2001, 120: 311-317
- [9] Ford R, Le Roux K, Itman C, Brouwer J B, Taylor P W J. Genome-specific sequence tagged microsatellite site (STMS) markers for diversity analysis and genotyping in *Pisum* species. *Euphytica*, 2002, 124: 397-405
- [10] Tar'an B, Zhang C, Warkentin T, Tullu A, Vandenberg A. Genetic diversity among varieties and wild species accessions of pea (*Pisum sativum* L.) based on molecular markers, and morphological and physiological characters. *Genome*, 2005, 48: 257-272
- [11] Baranger A, Aubert G, Arnau G, Laine A L, Deniot G, Potier J, Weinachter C, Lejeune-Henaut I, Lallemand J, Burstin J. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein and PCR-based markers. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1309-1321
- [12] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol Biol*, 1983, Rep.1: 19-21
- [13] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 149-151
- [14] Lloridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel M L, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Henaut I, Burstin J. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1022-1031
- [15] Zong X-X(宗绪晓), Vaughan D, Kaga A, Tomooka N, Wang X-W(王新望), Guan J-P(关建平), Wang S-M(王述民). Genetic diversity in *Vigna angularis* revealed by AFLP analysis. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(4): 562-568 (in Chinese with English abstract)
- [16] Goudet J. FSTAT (ver. 1.2): A computer program to calculate F-statistics. *J Hered*, 1995, 86: 485-486
- [17] Rohlf F. NTSYSpc: Numerical Taxonomy System (ver. 2.2). Setauket, New York: Exeter Publishing, Ltd. 2006
- [18] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. Popgene Version 1.31 Quick User Guide. University of Alberta, and Centre for International Forestry Research, Canada, 1999

- [19] Kimura M, Crow J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 1964, 49: 725–738
- [20] Lewontin R C. The apportionment of human diversity. *Evol Biol*, 1972, 6: 381–398
- [21] Kumar S, Tamura K, Nei M. MEGA3: Integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform*, 2004, 5: 150–163
- [22] Ambrose M J. From near east center of origin, the prized pea migrates throughout world. *Diversity*, 1995, 11: 118
- [23] Zohary D. The Origin of Cultivated Cereals and Pulses in the Near East. In: Wahrman J, Lewis K R eds. *Chromosomes today*. New York: John Wiley & Sons. Inc, 1973. pp 307–320
- [24] Zohary D. Monophyletic vs. polyphyletic origin of the crops on which agriculture was founded in the near east. *Genet Resour Crop Evol*, 1999, 46: 133–142
- [25] Redden B, Leonforte T, Ford R, Croser J, Slattery J. Pea (*Pisum sativum* L.). In: Singh R J, Jauhar P P, eds. *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Volume 1. Grain legumes*. Boca Raton, USA: CRC Press, 2005. pp 49–83
- [26] Rajaram S. Approaches for breaching yield stagnation in wheat. *Genome*, 1999, 42: 629–634
- [27] Fuentes D, Rajaram G S, Singh G. Inheritance of resistance to karnal bunt (*Tilletia indica* Mitra) in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breed*, 1995, 114: 250–252
- [28] Islam F, Beebe S, Munoz M, Tohme J, Redden R J, Basford K E. Using molecular markers to assess the effect of introgression on quantitative attributes of common bean in the Andean gene pool. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 243–252