

取样策略对 SSR 标记鉴别紫云英品种能力的影响

陈 坚^{1,2}, 林新坚¹, 钟少杰¹

(¹ 福建省农科院土壤肥料研究所, 福州 350013; ² 福建省农科院生物技术研究所, 福州 350003)

摘要: 紫云英属于异花授粉植物, 品种内个体基因型杂合, 品种鉴定难度大。本研究以紫云英闽紫系列 3 个审定品种为材料, 采用 SSR 标记进行取样策略对 3 个品种鉴别能力影响的研究。结果表明: (1) 固定 4 对引物组合, 从 5 ~ 50 进行梯度取样时, 品种内的扩增位点总数、观测等位基因数趋于增多, 但有效等位基因数、Shannon 信息指数、遗传多样性指数增大到最大值后趋于下降, 其中取样量为 30 时总体样品出现最大值; 随着样品量的增加, 品种间 Nei 氏遗传距离以及分子方差分析的品种间期望变异系数比例值 (PhiPT) 均呈减少趋势, 但 PhiPT 值的置信度在增大; (2) 固定品种的样品容量为 30 和 50, 再加入 2 对能扩增出在品种间形成频率差异的标记位点的 SSR 引物对, 基于这 6 对 SSR 引物可以将参试的 3 个紫云英品种有效的区分, 品种间期望变异系数比例值 (PhiPT) 提高且差异的置信度为极显著。主成分分析进一步表明: 3 个参试品种 30 个样品与 50 个样品的散布状况基本一致。对紫云英取样策略的研究表明: 为提高对参试品种的鉴别能力, 样品取样量以 30 株为宜, 即达到较佳鉴别效果又降低分析成本。

关键词: 紫云英; 品种; 取样策略; SSR 分析; 异花授粉

Effect of Sampling Strategy on Identification of Cultivars of *Astragalus sinicus* L. by SSR Marker

CHEN Jian^{1,2}, LIN Xin-jian¹, ZHONG Shao-jie¹

(¹ Institute of Soil and Fertilizer, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013;

² Institute of Biotechnology, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003)

Abstract: *Astragalus sinicus* L. is one of cross-pollinated plants with heterogeneity in cultivar population which results in difficulty for cultivar identification. In this study, 3 cultivars selected from Minzi cultivar series bred in Fujian have been analyzed by using SSR molecular marker and the effect of sampling strategy on cultivar differentiation was investigated. The results showed that: (1) When the primer combination was confirmed by 4 pairs and the sampling amount ranged from 5 to 50 in each cultivar, the amplified loci and the observed number of alleles tended to increase in the cultivar, but the effective number of alleles, Shannon index, and genetic diversity index tended to decline after reaching to a maximum as sampling amount was as much as 30 for total sample. With the increase of the amount of sample, the Nei's genetic distance between cultivars and the PhiPT value among population obtained from AMOVA reduced, but the confidence level of PhiPT was raised. (2) When the sample capacity was constant with either 30 or 50, and the primer number was increased to 6 pairs with the added 2 pairs of primer which could amplify the marking locus showing different frequency among the cultivars, the tested cultivars could be effectively identified because of the higher PhiPT value and more significant confidence level ($P < 0.001$). The analysis of principal component further indicated that the distribution of samples from 3 tested cultivars along principal component axis was similar between sampling amount of 30 and 50. This study of sampling strategy for *Astragalus sinicus* indicated that:

收稿日期: 2014-08-17 修回日期: 2014-12-23 网络出版日期: 2015-10-14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151014.1421.014.html>

基金项目: 国家公益性行业(农业)专项(201103005); 福建省自然科学基金(2011J01104)

第一作者研究方向为植物生化与分子生物学。E-mail: chenjian3@hotmail.com

通信作者: 林新坚, 研究方向为微生物生物技术与土壤培肥。E-mail: xinjianlin@163.net

In order to enhance the ability in identification of cultivar of *Astragalus sinicus* L., the optimum sampling amount was as much as 30 that could achieve the better effect for cultivar identification as well as reduce the cost in analysis.

Key words: *Astragalus sinicus* L.; cultivar; sampling strategy; SSR analysis; cross pollination

紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) 在中国有一千多年的栽培历史,是长江中下游和华南地区主要的稻田绿肥,也是很好的蜜源植物和饲料。紫云英品种全国范围的调查与鉴定始于 1979 年至 1984 年结束,共征集地方品种、选育的新品种(系)以及野生品种等 100 份^[1]。然而 20 世纪 80~90 年代,随着化肥的大量使用以及绿肥种植经济效益下降等因素的影响,紫云英种植面积迅速萎缩,并导致品种陈旧、混杂、蜕化,管理技术失传等诸多问题,研究工作也一直处于停滞或者半停滞的状态^[2]。紫云英在绿肥植物分类学上属于豆科黄芪属越年生草本植物,其形态学性状特征在品种鉴别上所能提供的信息十分有限。加之紫云英异花授粉,异交率较高^[3],不同品种特点的准确描述一直是一项棘手的问题。自 2008 年以来,国家加强了对紫云英等绿肥作物研究和推广的投入,使其在科研与应用上都取得了一系列重大的进展。

2011 年,陈坚等^[4]利用生物素标记的寡聚核苷酸探针从紫云英的基因组中富集微卫星(SSR)序列,初步证明了某些 SSR 位点可对全国不同地域遗传距离较远的紫云英品种进行指纹鉴别。2012 年,孙清信等^[5]也利用分子标记技术进行紫云英 ISSR 引物筛选及 PCR 反应体系的优化。闽紫系列紫云英品种是福建省农业科学院土壤肥料研究所自 20 世纪 80 年代开始陆续通过单株选择、人工杂交等手段育成的地方性品种,已在福建等省推广使用。利用开发的 SSR 标记对这些紫云英品种的特异性和均一性进行鉴定,对辅助紫云英品种的整理和登记,及其种质资源的评价利用都具有一定的指导作用。

鉴于异花和常异花授粉植物群体内遗传多样性丰富,个体间差异较大,用分子标记对其进行居群或品种水平的研究,取样策略就显得十分的重要。一个居群(品种)内究竟应该随机选取多少个单株或个体样本量才具有代表性?对此,前人已有不少的研究,在不同的异交植物中均发现当样品量达到一定数量时,群体内的遗传多样性不再发生变化^[6-8]。然而,以紫云英为材料开展此研究尚未见报道。本研究拟以经福建省审定品种闽紫 5 号、闽紫 6 号和闽紫 7 号为研究对象,通过评估取样量对基于 SSR

标记的品种内个体间遗传多样性状况的影响,分析其与品种差异鉴别能力之间的关系,以期对紫云英品种的准确识别提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试样品为闽紫 5 号、6 号和 7 号均为紫云英中熟高产品种,种子从福建省农科院土壤肥料研究所白沙育种试验基地隔离扩繁采集。(1)闽紫 5 号,母本:湖南省农业科学院土壤肥料研究所选育的中熟高产品种 70-103;父本:浙紫 67-232 与光泽种杂交的杂种第 6 代植株。(2)闽紫 6 号(原 80(6)5-9),母本:江西省南城县的优良种;父本:浙紫 5 号的优良株系浙紫 5 号-13。(3)闽紫 7 号(原 83(24)4-1-1),母本:浙江 78-1543 的迟熟优良选系 78-1543(80)4-2-2;父本:由广西萍宁 72 系统选育而成。每个品种分别取一定数量的种子播种于网室钵钵,发芽 14 d 后取样。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 在每个品种幼苗群体中随机取单株的幼嫩叶片 0.1 g,采用 CTAB 法提取 DNA。通过 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,保存于 -20 ℃ 冰箱,使用前用双蒸水将 DNA 稀释至 10 ng/L。

1.2.2 SSR-PCR 反应 SSR 引物的开发设计见文献^[4],编号为引物 1~9 的 9 对引物由上海生工生物技术有限公司合成。25 μL 的 PCR 反应体系包括提取的 DNA 溶液 1 μL,10 nmol/L 的引物 2 μL,2.5 mmol/L dNTP 2 μL,10 × PCR buffer 2.5 μL, *Taq* DNA 聚合酶 1 U。PCR 反应程序为:94 ℃ 预变性 7 min;随后 30 个循环,每个循环 94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s;最后 72 ℃ 延伸 7 min。扩增产物在 6.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳(电泳缓冲液 1 × TBE,电压 150 V,时间 2 h),电泳结束后对凝胶进行固定、0.1% Ag-NO₃ 染色、显色,然后观察、照相、读带。

1.3 数据统计及分析

筛选 SSR 扩增位点,对获得的清晰 DNA 条带进行统计,在相同迁移位置均出现的带视为同一位

点上的显性等位基因,记为 1,无带记为 0,构成 0,1 矩阵。所获数据以品种为单位统计扩增出的位点数(含多态位点数),并用 Popgene32 软件计算:观察等位基因数 N_a (observed number of alleles),有效等位基因 N_e (effective number of alleles),Nei 氏基因多样性指数 H (Nei's gene diversity),Shannon 氏多态信息指数 I (Shannon's information index)以及品种间成对 Nei 氏遗传距离(Nei's genetic distance)。对不同样品量或引物数处理得到 Nei 氏遗传距离用 Excel 进行单因素方差分析和成对 t 检验。利用 WINAMOVA 1.55 对品种间及品种内进行遗传变异的分子方差分析(AMOVA),得到品种间的期望变异系数占总期望变异系数的比值 $\Phi_{PT}(\Phi_{PT})$,对其显著性采用 1000 次随机置换进行检测^[9]。在 SAS 9.2 统计软件中用 PRINCOMP 进行 SSR 数据的二元主成分分析^[10]。

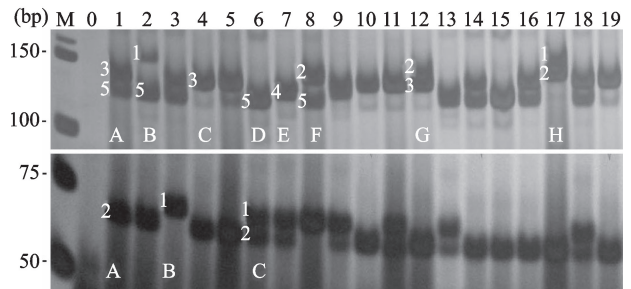
2 结果与分析

2.1 SSR 引物对紫云英参试品种的扩增多态性

已知不同的 SSR 引物在征集自全国不同地域的 9 个紫云英样品间扩增的多态位点数在 2~5 之间、观测等位基因数(N_a)1.19~1.65 之间、有效等位基因数(N_e)1.19~1.65 之间、Shannon 信息指数(I)在 0.22~0.56 之间、遗传多样性指数(H)在 0.13~0.38 之间^[4]。研究发现当样品容量达到一定值时,参试的闽紫品种样品得到与此前基本相同的扩增位点。图 1 是 2 对引物在样品容量为 19 的闽紫 7 号样品群体中的扩增情况。可以看出:在样品量为 8 时,引物 2 在品种中扩增出已知的全部 5 个位点,在样品量达 17 时,可组成 A~H 的 8 种带型表现型(上图);下图的引物 3 在样品量为 3 时就能扩增出 2 个位点,在样品量达 6 时,出现 A~C 的 3 种带型的全部表现类型,但此前它在别的品种中还扩有 1 个位点,对本参试品种样品的扩增未出现。可见,随着紫云英样品容量的增大,引物的扩增位点数及其组合的带型表现类型均会饱和。在这种情况下,对品种鉴别而言,只有在不同品种中存在频率差异的位点才有意义,差异大才能增大品种间的 Nei 氏遗传距离^[11-12]。

2.2 样品量与紫云英参试品种扩增多态性及品种间差异鉴别的关系

以已知扩增位点最多的 4 对引物(引物 1~4)组成固定组合(已知各自可扩增位点数分别为 3、4、4 和 5,总位点数达到 16),分别对参试的 3 个品种



M:分子量标准;0:空白对照;黑体 1~19:样品;白体 1~5:位点,A~H:带型类型
M:MW marker;0:Control;Black font 1-19: Samples; White font 1-5: loci, A-H: Banding patterns

图 1 SSR 引物 2(上图)和引物 3(下图)在紫云英品种的 19 个样品中扩增结果

Fig. 1 Amplified results of SSR primer 2(photo above) and primer 3(photo below) for 19 samples from the cultivar of *Astragalus sinicus*

进行取样量从 5 到 50 的梯度分析,统计每个品种样品群体的扩增位点总数,观测等位基因数 N_a ,有效等位基因数 N_e ,Shannon 信息指数 I ,遗传多样性指数 H 见表 1。可以看出:随着品种样品容量的增大,紫云英 3 个参试品种的 SSR 扩增位点数与等位基因数 N_a 趋于增多,但真正反映样品群体多样性程度的其余 3 个指标在品种间的变化略有不同。其中闽紫 5 号中取样为 5 株时, N_e 、 I 、 H 就达到最大值,随着取样梯度的增大趋于减小,到取样 30 株时最小,而后又略有升高;闽紫 6 号的 N_e 、 I 、 H 值变化趋势与前者不同,在取样量 5~20 时,较为稳定,取样增加到 30 株时达到最大,而后又略有减小;闽紫 7 号除 N_e 值随取样梯度的变化趋势不明显外, I 、 H 值基本随取样梯度的增加而呈上升趋势至取样 40 株时达到峰值,50 株时又略减。说明闽紫 5 号样品基因型的分布较为平衡,少量样品即可为品种群体提供丰富的遗传多样性信息,增大样品量所提供的信息反而受限。而闽紫 6 号、闽紫 7 号个体基因型较不均匀,只有当样品量达到 30~40 个时才能充分反映出品种内的遗传多样性程度。

为探讨不同取样量与品种鉴别能力的关系,将取样量与品种间成对的 Nei 氏遗传距离、AMOVA 品种间的 Φ_{PT} 值总结于表 2。由表可见,随着取样量的增大,品种间 Nei 氏遗传距离减小。对 5 个取样量处理单因素方差分析表明: $F = 6.891$, $P = 0.003$,处理间品种 Nei 氏遗传距离的差异显著。进一步进行的处理间成对 t 检验表明:5 个样品取样处理的品种间 Nei 氏遗传距离显著高于 20 个样品以

表 1 取样量与紫云英品种 SSR 扩增多态性参数之间关系

Table 1 The relationship between sampling amount and parameters of diversity based on SSR amplification among cultivars of *Astragalus sinicus*

扩增参数		取样量 Sampling amount					
Parameters based on SSR amplification		5	10	20	30	40	50
位点数	闽紫 5 号	13	13	13	14	14	14
Amplified loci	闽紫 6 号	9	10	11	11	11	11
	闽紫 7 号	10	10	14	15	15	16
	总体 Total	13	13	14	15	15	16
观测等位基因数 N_a	闽紫 5 号	1.563 ± 0.203	1.563 ± 0.203	1.536 ± 0.203	1.688 ± 0.176	1.688 ± 0.176	1.688 ± 0.176
	闽紫 6 号	0.938 ± 0.232	1.125 ± 0.239	1.188 ± 0.228	1.250 ± 0.233	1.250 ± 0.233	1.250 ± 0.233
	闽紫 7 号	1.063 ± 0.232	1.125 ± 0.239	1.625 ± 0.180	1.750 ± 0.144	1.750 ± 0.144	1.875 ± 0.085
	总体 Total	1.188 ± 0.132	1.271 ± 0.132	1.458 ± 0.119	1.563 ± 0.111	1.563 ± 0.111	1.604 ± 0.106
有效等位基因数 N_e	闽紫 5 号	1.410 ± 0.072	1.380 ± 0.087	1.369 ± 0.086	1.355 ± 0.086	1.371 ± 0.087	1.363 ± 0.086
	闽紫 6 号	1.233 ± 0.085	1.280 ± 0.088	1.259 ± 0.084	1.321 ± 0.098	1.295 ± 0.094	1.301 ± 0.094
	闽紫 7 号	1.319 ± 0.101	1.294 ± 0.093	1.303 ± 0.082	1.314 ± 0.084	1.319 ± 0.084	1.311 ± 0.084
	总体 Total	1.321 ± 0.050	1.318 ± 0.051	1.311 ± 0.048	1.330 ± 0.051	1.329 ± 0.050	1.325 ± 0.050
Shannon 氏信息指数 I	闽紫 5 号	0.397 ± 0.061	0.361 ± 0.063	0.351 ± 0.064	0.348 ± 0.060	0.360 ± 0.060	0.354 ± 0.060
	闽紫 6 号	0.209 ± 0.071	0.256 ± 0.071	0.241 ± 0.070	0.280 ± 0.073	0.263 ± 0.072	0.268 ± 0.072
	闽紫 7 号	0.261 ± 0.078	0.262 ± 0.072	0.311 ± 0.059	0.320 ± 0.058	0.321 ± 0.060	0.317 ± 0.058
	总体 Total	0.289 ± 0.041	0.293 ± 0.040	0.301 ± 0.037	0.316 ± 0.037	0.315 ± 0.037	0.313 ± 0.036
遗传多样性指数 H	闽紫 5 号	0.260 ± 0.041	0.234 ± 0.045	0.227 ± 0.046	0.221 ± 0.044	0.230 ± 0.044	0.226 ± 0.044
	闽紫 6 号	0.140 ± 0.048	0.169 ± 0.049	0.158 ± 0.048	0.186 ± 0.052	0.173 ± 0.051	0.177 ± 0.051
	闽紫 7 号	0.180 ± 0.054	0.174 ± 0.050	0.194 ± 0.042	0.199 ± 0.042	0.201 ± 0.043	0.197 ± 0.043
	总体 Total	0.193 ± 0.028	0.192 ± 0.027	0.193 ± 0.026	0.202 ± 0.026	0.202 ± 0.026	0.200 ± 0.026

表 2 取样量与 SSR 标记的紫云英品种间差异参数之间关系

Table 2 The relationship between sampling amount and parameters of difference among cultivars of *Astragalus sinicus* based on SSR marker

品种差异参数		取样量 Sampling amount					
Parameters of difference among cultivars		5	10	20	30	40	50
Nei 氏遗传距离	闽紫 5 ~ 6 间	0.042	0.034	0.015	0.017	0.015	0.014
Nei's genetic distance	闽紫 5 ~ 7 间	0.038	0.023	0.021	0.009	0.011	0.010
	闽紫 6 ~ 7 间	0.036	0.062	0.013	0.019	0.01	0.01
	平均 Mean	0.039a	0.040ab	0.016b	0.015b	0.012b	0.011b
分子方差分析结果	PhiPT	-0.074	0.048	0.015	0.023	0.020	0.025
The results of AMOVA	P 值 P value	0.874	0.100	0.180	0.048	0.020	0.005

不同字母表明数据间的差异用成对 t 检验形成的均值至少在 $P < 0.05$ 水平显著

Values with different letter were significantly different for at least $P < 0.05$ by a paired sample t test

上的处理;虽然 10 个样品的平均值为最高,但与其他处理差异却不显著。AMOVA 分析得出相同结果:10 个样品取样时观测到品种间 PhiPT 达到最大值。但 AMOVA 的 1000 次随机置换的 PhiPT 大于该观测值的几率却达到 0.1,说明该差异不显著。由于 AMOVA 在计算期望变异系数时考虑到样品量系数,随着样品量增大,PhiPT 值趋于稳定;同时由于样本量提高,置信度也迅速提高,1000 次随机置

换的 PhiPT 大于观测值的几率迅速减小,到 50 个样品时已减小到 0.005 (1000 次置换中 $P < 0.005$ 时为显著水平)。虽然取样量越大,品种鉴别的结果就越可靠,但这将导致检测成本提高。

结合表 1 的数据,表 2 现象可以得到很好的解释:以闽紫 5 号为例,由于品种内个体等位基因丰富且分布平衡,5 ~ 10 样品就已经检测到 80% 以上的标记位点, I 与 H 值分别达到 0.36 和 0.23 以上;而

闽紫 6 号、闽紫 7 号个体间基因型分布差异较大, 5~10 样品时, 有的标记位点未出现(最高检测率为 62.5%), I 与 H 值分别小于 0.27 和 0.18, 这样闽紫 5 号与闽紫 6 号、闽紫 7 号之间的遗传距离必然大; 但随着样品量增大, 闽紫 6 号、闽紫 7 号的 I 、 H 值的升高, 品种间差距在减少。

本研究表明: 基于 SSR 标记的紫云英品种群体的遗传多样性会随着样品量的增大趋于饱和。但由于紫云英不同品种内个体基因型差异程度不同, 标记位点分布状况不同, 样品量的大小与品种差异鉴别能力之间有较大的关联, 当品种内个体基因型差异较大, 标记位点分布不平衡时, 小样品量的比较会放大品种间的差异程度, 而大样品量比较虽然会减小差异, 但差异的统计置信度水平随之增高。因此, 取样策略在紫云英品种鉴别中起到重要的作用, 其中取样量为 30 个样品时, 总体反映的品种群体遗传多样性程度最高, 30 个样品为最适选择。

2.3 基于 6 对 SSR 引物的紫云英参试品种鉴别效果

SSR 引物选择也对紫云英品种鉴别有一定的影响, 要尽可能筛选在不同品种间形成位点频率差异的引物以增大品种间 Nei 氏距离。在样品容量达到

50 的条件下, 计算发现这样的引物位点并不多, 在前面所使用的 4 对引物中, 仅有引物 1 可使得闽紫 5 号与闽紫 6 号之间 Nei 氏距离最大达 0.039, 这是由于该引物的位点 3 在闽紫 5 号、闽紫 6 号和闽紫 7 号中出现频率分别为: 0.412、0.176 和 0.255, 其在闽紫 5 号与闽紫 6 号、闽紫 7 号间频率的明显差异导致遗传距离增大; 在余下的 5 对引物中, 引物 8 位点 1 在 3 个品种中的频率分别为: 0.039、0 和 0.039; 引物 9 位点 1 的频率分别为: 0.02、0 和 0.196, 这也是导致闽紫 5 号与闽紫 6 号之间和闽紫 6 号与闽紫 7 号之间距离增大的关键位点。因此, 本研究通过选择引物 1~4 及引物 8、9 共 6 对 SSR 引物就可以达到对 3 个紫云英品种的鉴别效果。表 3 的 AMOVA 计算结果显示: 30 个样品与 50 个样品 2 种取样策略中, 虽然紫云英品种群体内的变异均占了总变异的 90% 以上, 品种间的变异在 10% 以下。但 PhiPT 值与表 2 中对应取样量的 PhiPT 值相比均明显增大, 其中 30 个取样量的 PhiPT 值还大于 50 个取样量, 说明以 30 个样品取样量对紫云英品种鉴别结果更佳。且两者品种间差异期望值的置信度均大幅提高, 达极显著水平 ($P < 0.001$)。

表 3 基于 SSR 的 3 个紫云英品种分子变异方差分析总结

Table 3 Summary of AMOVA in samples from 3 bred cultivars of *Astragalus sinicus*

样品量 Sampling amount	变异来源 Source	自由度 <i>df</i>	方差总和 SS	均方差 MS	变异系数 CV	分子变异系数百分比 (%) Percentages of Molecular Variance	PhiPT	<i>P</i> 值 Pvalue
30	品种群体间	2	20.867	10.433	0.268	10	0.100	<0.001
	品种群体内	87	209.167	2.404	2.404	90		
50	品种群体间	2	26.107	13.053	0.211	8	0.078	<0.001
	品种群体内	147	365.440	2.486	2.486	92		

2.4 基于 SSR 的紫云英参试品种样品的主成分分析

SSR 标记的作物种质资源样品的性状数据可以用二元或三元的主成分加以分析, 进一步鉴别其遗传多样性结构。对芝麻的二元主成分分析形成的二维样品散布图和对豌豆的三元主成分分析形成的三维样品散布图均表明: 参试样品聚类群与其原有来源的群体遗传结构或基因库类型高度的一致^[13-14]。为进一步明晰 SSR 标记的紫云英 3 个品种中不同样品的结构, 采用主成分分析分别作出 30 个样品与 50 个样品在二元主成分坐标轴 4 个象限上的散布状况图(图 2)。由图 2 可以看出: 3 个品种间存在着样品基因型相互渗透、交叉的情况, 但并非均匀叠加散布。在 30 个样品散布图(上图)中: 闽紫 5 号

样品主要分布于 I、II 象限(达 63%), 其中 I 象限样品最多(10 个), 约占 33%; 闽紫 6 号样品主要分布于 III、IV 象限(达 57%), 其中 VI 象限样品最多(9 个), 约占 30%; 而闽紫 7 号集中度最高, 13 样品分布于 III 象限, 占 43%。在 50 样品散布图(下图)中: 闽紫 5 号样品主要分布于 III、IV 象限, 为 62%, 其中分布于 III 象限样品最多(16 个), 约占 32%; 闽紫 6 号样品主要分布于 I、IV 象限, 为 60%, 其中在 I 象限样品最多(18 个), 约占 36%; 而闽紫 7 号的样品主要分布于 II、III 象限, 为 48%, 其中 II 象限最多(16 个), 占 32%。两种取样策略中样品的主成分散布状况基本相似, 每个品种均有约 30% 或更多的样品集中散布于其中一个不同的象限。但就闽紫 7 号而言, 30 个样品的散布集中度更优于 50 个样品。

在基于所选择的 6 对 SSR 引物的标记状态下,当紫云英品种的取样策略为 30 与 50 个样品时,主成分分析的不同品种的样品的散布虽存在相互重叠的情形,但以品种为标志多数样品还是能在二元主

成分坐标系的一定区域集聚,两种取样策略的样品散布比例状况也基本一致,这是对 3 个参试品种达到良好鉴别效果的基础。总体比较,30 个样品的取样策略的鉴别效果更佳,且分析成本明显降低。

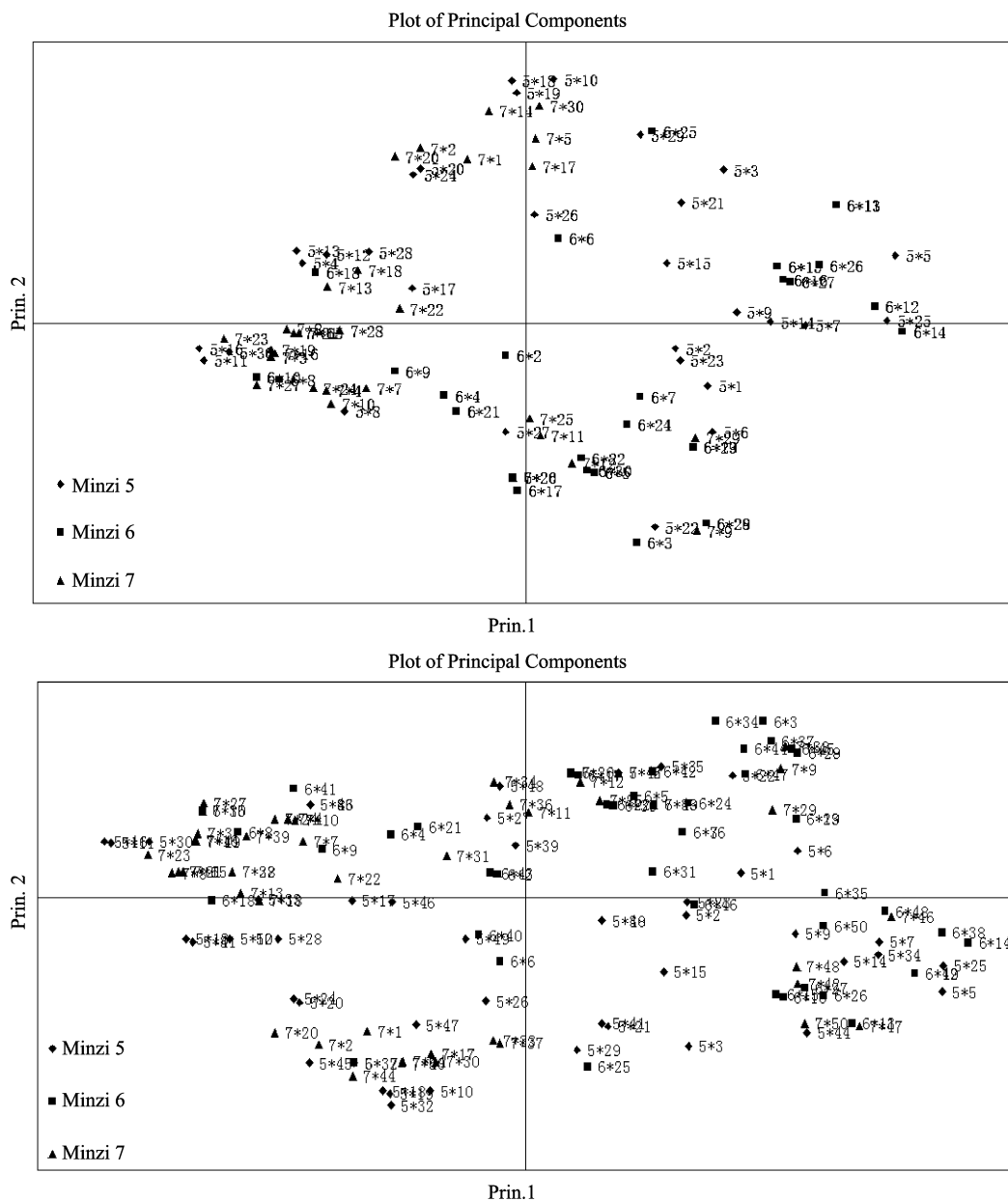


图 2 3 个紫云英参试品种的 30 个样品 (上图) 和 50 个样品 (下图) 的主成分分析

Fig. 2 The principal component analysis of 30 samples (picture above) and 50 samples (picture below) from 3 bred cultivars of *Astragalus sinicus*

3 讨论

豆科植物有性繁殖的授粉方式有 2 种,一种是自花授粉(如豌豆、大豆等),另一种是异花授粉(如苜蓿等)。源于前者的栽培品种子代在世代延续的过程中会导致遗传均一,因此,品种内个体变异小,在品种间发生变异的几率大;源于后者的栽培种则相反,大

多数的遗传变异在品种内发生,使个体标记的基因型趋于复杂化。本研究的对象紫云英不仅是异花授粉,而且是典型的依靠蜜蜂等虫媒传粉的豆科植物,更易导致远距离品种间基因的交流。为利用 SSR 标记对不同紫云英品种作出较为可靠的鉴别,通过研究取样量对品种内个体的遗传多样性及品种整体间差异性的影响,认为以下 3 点需要认真考虑。

3.1 适当的取样量 对异花授粉植物取样策略的研究有 2 种方式:一种是取样后单株分开进行 SSR 标记,再计算群体的遗传多样性指数。刘文献等^[6]发现华山新麦草分析单位的个体数目达到 26 株以上时,指数基本不再发生变化;另一种是通过对单株取样后混合的 DNA 进行 SSR 标记,研究发现当黑麦草混合单株样本在 20 株及以上时, PIC 达到最高值,等位基因数和等位基因种类趋于稳定,电泳图谱表现基本一致^[7];对苜蓿不同品种的取样策略的研究也发现 40 和 60 个单株 DNA 混合样的聚类结果一致^[8]。本研究利用第一种方法发现:反映紫云英遗传多样性的指数达到最高值时的样品取样量在参试 3 个紫云英品种中有所不同,其中闽紫 5 号达到最高值时的样品量为 5 株、而闽紫 6 号为 30 株,闽紫 7 号为 40 株。但对于所有参试样品总体而言,取样量为 30 株时,紫云英遗传多样性的指数达到最高值(见表 1)。这样,如果都以小样品量取样比较则会放大品种间差异。因此,如以品种内遗传多样性指数为基础,最适样品量以 30~40 株为宜。

3.2 筛选合适的引物或标记位点 如何选取标记位点才能反映居群或品种内个体以及居群或品种间的遗传多样性状况的研究不多见,有报道发现 SSR 引物及位点数对陆地棉(非异交作物)种系聚类结果有所影响^[15]。在用 SSR 鉴别异花授粉的苜蓿品种时,前人发现苜蓿品种之间多数的 SSR 位点有基本相同的基因型和等位基因,品种间的区别主要在于等位基因频率的差异,而大部分品种之间频率的差异很小,不能作为鉴定的依据^[16]。结合对紫云英的研究说明:选用高质量引物及位点,使之能在品种间形成基因频率的差异,可以提高异花授粉作物品种间的鉴别能力。

3.3 通过统计学策略检验品种间差异的置信度 对样品 SSR 分子数据的主成分分析可以清晰看出紫云英不同品种样品个体间存在着大量基因型重叠的情况。分子方差分析(AMOVA)不仅可以分析重叠品种(种群)间的差异的来源,而且可以对标记数据的方差组分进行随机置换的统计学分析,测定其大于观测值的几率以明确品种间差异结果的显著性或置信度^[17]。本研究用 AMOVA 对样品量分析结果表明:在引物数与扩增位点有限时,需要大量的样品才能提高统计学的置信度。否则,如表 2 中 10 个样品量所示,即使品种间 Φ_{IPT} 值较大,其检测结果也是不可靠的。

假设很多的样品和大量的信息被充分标记,可

能仍然有大量的基因型重叠阻止品种间的分离,品种间差异没有统计学意义。在这种情况下,则不能否定这种无效假设即个体基因型来自同一品种群体或品种之间已高度混杂。

4 结论

在利用 SSR 分子标记对异花授粉的绿肥作物紫云英的品种进行鉴别时,首先必须确定品种样品的取样量;而后要进行 SSR 标记引物的筛选,尽量利用能在品种群体间形成频率差异的标记位点的引物进行品种的鉴别;最后要对分子标记数据进行统计学分析。只有这样,才能最大程度地显示出待鉴别的品种间的差异程度并提高差异识别的置信度。研究表明:以紫云英品种内遗传多样性指数为基础,每个参试品种最适样品量以 30 株为宜。

参考文献

- [1] 戴平安,郑蓉芬,李莉. 紫云英品种资源收集、整理、鉴定及保存试验总结[J]. 湖南农业科学,1985(6):9-12
- [2] 张辉,曹卫东,吴一群,等. 不同紫云英品种物候期及主要经济性状研究[J]. 草业科学,2010,27(2):109-111
- [3] 林多胡,顾荣申. 中国紫云英[M]. 福州:福建科学技术出版社,2008:69-84
- [4] 陈坚,张辉,朱炳耀,等. 紫云英 SSR 分子标记的开发及在品种鉴别中的应用[J]. 作物学报,2011,37(9):1592-1596
- [5] 孙清信,陈坚,张辉,等. 紫云英 ISSR 引物的筛选及 PCR 反应体系的优化[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(5):870-878
- [6] 刘文献,李立会,刘伟华,等. 华山新麦草居群取样策略的 SSR 分析[J]. 麦类作物学报,2006,26(2):16-20
- [7] 罗永聪,马啸,张新全. 利用 SSR 标记分析一年生黑麦草遗传多样性的取样策略[J]. 草业科学,2013,30(3):376-382
- [8] 班霆,韩鹏,刘翔,等. 苜蓿遗传多样性的取样数目—RAPD 和 SSR 群体标记法[J]. 生命科学研究,2009,13(2):158-162
- [9] 张富民,葛颂. 群体遗传学研究中的数据处理方法 I. RAPD 数据的 AMOVA 分析[J]. 生物多样性,2002(10):438-444
- [10] 胡良平,高辉. SAS 统计分析教程[M]. 北京:电子工业出版社,2010:456-465,536-547
- [11] Nei M. Genetic distance between populations[J]. Am Nat,1972,106:283-392
- [12] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals[J]. Genetics,1978,89:583-590
- [13] 岳文娣,魏利斌,张体德,等. 芝麻种质资源 SSR 标记遗传多样性与群体结构分析[J]. 作物学报,2012,38(12):2286-2296
- [14] 宗绪晓,Rebecca Ford,Robert R Redden,等. 豌豆属(*Pisum*) SSR 标记遗传多样性结构鉴别与分析[J]. 中国农业科学,2009,42(1):36-46
- [15] 高伟,王坤波,刘方,等. SSR 引物及多态性位点对陆地棉野生种系聚类结果的影响[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):237-242
- [16] 王小山,陈志宏,韩建国,等. 采用微卫星(SSR)标记研究苜蓿品种鉴定初报[J]. 草地学报,2007,15(4):344-347
- [17] 林忠平,胡鸾雷,朱先灿,等. 草坪草生物技术及应用[M]. 北京:化学工业出版社,2006:40-41