

DOI:10.11829/j.issn.1001-0629.2017-0689

彭语洛,周青平,陈仕勇,陈有军,李亚萍,田莉华.青藏高原垂穗披碱草种质资源遗传多样性的SSR分析.草业科学,2018,35(5):1080-1089.

Peng Y L, Zhou Q P, Chen S Y, Chen Y J, Li Y P, Tian L H. Genetic diversity of *Elymus nutans* germplasm resources from the Qinghai-Tibet Plateau in China detected by SSR markers. Pratacultural Science, 2018, 35(5): 1080-1089.

## 青藏高原垂穗披碱草种质资源 遗传多样性的SSR分析

彭语洛<sup>1</sup>, 周青平<sup>2</sup>, 陈仕勇<sup>1</sup>, 陈有军<sup>2</sup>, 李亚萍<sup>2</sup>, 田莉华<sup>2</sup>

(1.西南民族大学生命科学与技术学院,四川成都610041; 2.西南民族大学青藏高原研究院,四川成都610041)

**摘要:**采用SSR分子标记技术,对采自青藏高原的30份野生垂穗披碱草(*Elymus nutans*)种质进行遗传多样性分析。结果表明,1)筛选出的16对引物共获得了116个等位基因位点,92个多态性位点,多态性位点率(PPB)为79.75%,多态性信息(PIC)含量为0.063~0.325,平均值为0.188,材料间遗传相似系数(GS)介于0.692~0.976,平均值为0.828。2)聚类分析表明,在遗传相似系数0.804处,30份供试材料可聚为四大类,单独聚为一类的09-214表现出与其他材料较远的亲缘关系,主成分分析结果与UPGMA结果基本一致。群体遗传结构分析显示,大部分材料的遗传背景较为单一,群体划分的结果与聚类分析的结果部分保持一致。研究显示,供试种质材料间存在较大的差异,部分材料表现出相对独立的特性,遗传多样性较丰富,可为垂穗披碱草的保护利用、新品种的选育及优良基因的挖掘提供参考依据。

**关键词:**垂穗披碱草;SSR分子标记;遗传多样性;聚类分析;主成分分析;群体结构;UPGMA

**中图分类号:**S543+.903;Q943 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-0629(2018)05-1080-10\*

### Genetic diversity of *Elymus nutans* germplasm resources from the Qinghai-Tibet Plateau in China detected by SSR markers

Peng Yu-luo<sup>1</sup>, Zhou Qing-ping<sup>2</sup>, Chen Shi-yong<sup>1</sup>, Chen You-jun<sup>2</sup>, Li Ya-ping<sup>2</sup>, Tian Li-hua<sup>2</sup>

(1.College of Life Science and Technology, Southwestern University for Nationalities, Chengdu 610041, Sichuan, China;

2.Academy of the Qinghai-Tibetan plateau, Southwestern University for Nationalities, Chengdu 610041, Sichuan, China)

**Abstract:** SSR markers were used to analyze the genetic diversity of 30 accessions of wild *Elymus nutans* collected from the Qinghai-Tibet Plateau. The results showed that: 1) A total of 116 fragments and 92 polymorphic loci were generated from 16 pairs of primers. The polymorphic loci rate (PPB) was 79.75%, with polymorphism information contents (PIC) ranging from 0.063 to 0.325 (mean 0.188). The genetic similarity (GS) coefficient ranged from 0.692 to 0.976 (mean 0.828). 2) A cluster analysis showed that at the genetic similarity coefficient of 0.804, the 30 samples clustered in four major groups. Individually clustered groups of 09-214 showed distant genetic relationships with other accessions. The result of a principal component analysis was generally consistent with those of a UPGMA. The analysis of population genetic structure indicated that most of the samples may originate from the same genetic background, and results of grouping analysis were consistent with those of the cluster analysis. Our results showed a great difference between the tested germplasm samples, with several of the accessions showing relatively independent characteristics and higher genetic diversity, which could provide reference for the protection and utilization of *E. nutans*, the selection of new varieties and

\* 收稿日期:2017-12-20 接受日期:2018-03-16

基金项目:西南民族大学研究生创新型项目(CX2017SZ072);国家重点研发技术(2017YFC0504806);国家牧草产业技术体系青藏高原牧草育种岗位(CAR34);四川省教育厅创新团队(14TD0049)

第一作者:彭语洛(1992-),女,四川宜宾人,在读硕士生,主要从事牧草种质资源研究。E-mail:pengyuluo2016@126.com

通信作者:周青平(1962-),男,甘肃宁县人,教授,博士,主要从事青藏高原牧草育种与栽培研究。E-mail:qingzh@aliyun.com

the discovery of “good genes”.

**Key words:** *Elymus nutans*; SSR marker; genetic diversity; cluster analysis; component analysis; population structure; UPGMA

**Corresponding author:** Zhou Qing-ping E-mail: qpingzh@aliyun.com

垂穗披碱草 (*Elymus nutans*) 是小麦族 (Triticeae) 披碱草属 (*Elymus*) 多年生疏丛型禾草, 又名钩头草, 弯穗草, 在我国东北、华北、西北、西南等地均有野生种的分布。垂穗披碱草营养价值高、适口性好、产草量高、耐寒、耐旱、再生性和分蘖能力强<sup>[1]</sup>、耐践踏、耐瘠薄。近年来, 随着气候的变化、人类的活动及草地畜牧业的发展, 导致草原生态系统出现了不同程度的退化<sup>[2-3]</sup>。垂穗披碱草等物种作为青藏高原的优势植物在草地恢复中发挥着重要作用<sup>[4-7]</sup>。然而, 现阶段我国优质垂穗披碱草的品种数量少, 且在品质上, 无法满足当前生产所需。野生种质资源是育种的重要物质基础<sup>[8]</sup>, 因此, 对垂穗披碱草野生种质资源的收集、评价是当前的重要工作之一。

迄今为止, 已有许多学者从不同的角度对垂穗披碱草种质资源及其近缘物种的遗传多样性进行了研究, 包括育成品种<sup>[9-10]</sup>, 落粒性种质资源<sup>[11]</sup>, 抗旱种质资源<sup>[12]</sup>, 抗寒种质资源<sup>[13]</sup>, 耐盐碱种质资源<sup>[14]</sup>等, 其结果为垂穗披碱草种质资源的评价、保护和利用提供了参考依据。但我国垂穗披碱草种质资源数量大、种类繁多、且分布广泛, 随着新资源数量的增加, 垂穗披碱草遗传多样性研究需要不断的完善和补充, 以满足育种的需求。

种质遗传多样性的评价, 主要包括表型水平、分子水平等方面。相对于表型水平, 分子水平受环境因子影响较小, 重复性及稳定性较高。因此, 从分子水平对种质资源遗传多样性进行分析评价, 可靠性更高。近年来, 国内外众多学者采用 SRAP 标记、RAPD 标记、醇溶蛋白技术等对垂穗披碱草种质资源的遗传多样性进行了研究, 陈智华等<sup>[15]</sup>用 SRAP 标记对采自四川、青海、甘肃、新疆的垂穗披碱草种质进行了多态性分析; 邓竹佳等<sup>[16]</sup>采用 RAPD 标记对来自川西北高原的垂穗披碱草进行了遗传多样性和遗传关系分析; 马啸等<sup>[17]</sup>对采自新疆、青海、四川、西藏的垂穗披碱草种质进行了醇溶蛋白多样性分析。但利用 SSR 分子标记研究垂穗披碱草种质资源多样性的报道较少。SSR (simple sequence repeats) 分子标记既具有 PFLP 标记共显性遗传的优点, 又具有 RAPD 标记操作简单,

DNA 用量少等优点, 是一种进行遗传多样性研究理想的分子标记<sup>[18-19]</sup>, 目前已广泛应用于披碱草属遗传多样性的研究<sup>[20-23]</sup>。为了发掘优异性状的种质资源, 补充对垂穗披碱草种质资源的研究, 本研究拟采用 SSR 分子标记对以青海省为主的 30 份垂穗披碱草种质资源遗传多样性进行研究, 旨在为垂穗披碱草野生种质资源的保护、评价及新品种选育提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

30 份野生垂穗披碱草种质材料采自青海、四川、西藏 3 省, 其中 25 份采自青海、3 份来自四川、2 份采自西藏, 编号采集地情况如表 1 所列。30 份种质材料种植于西南民族大学青藏高原研究院牧草种质资源圃, 并对其进行了形态学鉴定。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取及检测** 随机选取每份垂穗披碱草种质材料的 30 粒种子, 播于试验盆中, 置于 RXZ 型多段可编程智能人工气候箱 (宁波江南), 条件为白天 22 °C/16 h, 夜间 18 °C/8 h, 光照强度为 500 mmol · (m<sup>2</sup> · s)<sup>-1</sup>, 相对湿度为 70%, 生长至三叶期时, 每份材料取 10~15 个单株新鲜健康的叶片均匀混合<sup>[24]</sup>, 用液氮研磨成粉, 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (DP305) (北京天根生化) 提取基因组 DNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度计 (Nano Drop™ Lite, Thermo) 检测其浓度和纯度。

**1.2.2 引物筛选及 SSR 分析** 根据已开发的披碱草属的 EST-SSR 引物序列<sup>[25]</sup>, 从中挑选出 40 对引物 (由南京金斯瑞合成)。选择 4 份质量较高且田间表形性状差异较大的种质材料的基因组 DNA 对 40 对引物进行扩增 (JY-96G 型基因扩增仪) 筛选, 从中选取能够扩增出清晰条带、多态性好、稳定性较高的引物用作 SSR 的研究。

SSR-PCR 反应体系和程序。PCR 反应体系: 总体积 20 μL, 2×Es Tap MasterMix (Dye) 10 μL, 1 μL 上游引物, 1 μL 下游引物, 2 μL DNA 模板, 其余由 ddH<sub>2</sub>O 补充。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min,

表1 供试材料

Table 1 Wild *E. nutans* accessions analyzed in this study

序号 Code	编号 Accession Code	采集地 Location of collection
1	I-1-1-1	青海海南铁卜加(Tiebujia, Hainan State, Qinghai)
2	I-1-1-10	青海海南铁卜加(Tiebujia, Hainan State, Qinghai)
3	I-1-1-13	青海海西乌兰县赛什克乡(Saishenke rural Area, Ulan County, Haixi State, Qinghai)
4	I-1-1-14	青海海南泽库县宁秀乡(Ningxiu Rural Area, Zeku County, Huangnan State, Qinghai)
5	I-1-1-15	青海果洛久治县白玉乡(Baiyu Rural Area, Jiuzhi County, Guoluo State, Qinghai)
6	I-1-1-16	青海果洛久治县索乎日麻乡(Suohurima Rural Area, Jiuzhi County, Guoluo State, Qinghai)
7	I-1-1-17	青海西宁湟源县寺寨乡(Sizhai Rural Area, Huangyuan County, Xining, Qinghai)
8	I-1-1-18	青海果洛玛多县花石峡镇(Huashixia town, Maduo County, Guoluo State, Qinghai)
9	I-1-1-21	青海海南贵南县茫拉乡(Mangla Rural Area, Guinan County, Hainan State, Qinghai)
10	I-1-1-27	青海海南共和县黑马河乡(Hemahe Rural Area, Gonghe County, Hainan State, Qinghai)
11	I-1-1-28	青海果洛久治县哇赛乡(Wasai Rural Area, Jiuzhi County, Guoluo State, Qinghai)
12	I-1-1-30	青海果洛玛多县(Maduo County, Guoluo State, Qinghai)
13	I-1-1-31	青海果洛甘德县柯曲镇(Kequ town, Gande County, Guoluo State, Qinghai)
14	I-1-1-33	青海海南贵南县茫曲镇(Mangqu Town, Guinan County, Hainan State, Qinghai)
15	I-1-1-34	青海海南共和县甘地乡(Gandi Rural Area, Gonghe County, Hainan State, Qinghai)
16	I-1-1-36	青海果洛甘德县青珍乡(Qingzheng Rural Area, Gande County, Guoluo State, Qinghai)
17	I-1-1-37	青海海南共和县江西沟乡(Jiangxi Rural Area, Gonghe County, Hainan State, Qinghai)
18	I-1-1-38	青海海南共和县石乃亥乡(Shinai Rural Area, Gonghe County, Hainan State, Qinghai)
19	I-1-1-39	青海海北三角城种羊场(Sanjiaocheng Sheep Breeding Farm, Haibei State, Qinghai)
20	09-174	青海海南共和县三塔拉(San Tala, Gonghe County, Hainan State, Qinghai)
21	09-214	青海海西天俊县新源镇(Xinyuan town, Tianjun County, Haixi State, Qinghai)
22	09-221	青海海西德令哈尕海镇(Gahai town, Delhi city, Haixi State, Qinghai)
23	09-239	青海海西德令哈柯鲁柯镇(Kelukezhen town, Delhi city, Haixi State, Qinghai)
24	09-292	西藏工布江达加兴乡(Jiaying Rural Area, Gongbujiangda County, Tibet)
25	09-302	西藏工布江达加兴乡(Jiaying Rural Area, Gongbujiangda County, Tibet)
26	09-382	青海海北海晏县青海湖乡(Qinghaihu Rural Area, Haiyan County, Haibei State, Qinghai)
27	14-11-22	四川松潘县牟尼沟景区(Mounigou Scenic Area, Songpan County, Sichuan)
28	14-15-15	四川松潘县川主寺(Chuanzhusi, Songpan County, Sichuan)
29	14-11-25	四川松潘县牟尼沟景区(Mounigou Scenic Area, Songpan County, Sichuan)
30	I-1-1-4	青海海南铁卜加(Tiebujia, Hainan State, Qinghai)

94 °C 变性 60 s, 50~59 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 60 s, 共 35 个循环; 最后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保存。扩增产物采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 1× TBE 电极缓冲液, 250 V 电压预电泳 15 min, 上样量 10 μL, 400 V 电压恒压电泳 1.5 h。电泳结束后, 用蒸馏水漂洗凝胶, 用染色液(0.1% AgNO<sub>3</sub>) 染色 14 min、显影液(0.19 g 四硼酸钠 + 15 g NaOH + 400 mL 甲醛) 显影直至条带清晰并用数码相机拍照保存。

**1.2.3 统计与分析** 根据 SSR 产物银染显影结果, 统计 SSR 扩增条带, 按在相同迁移位置上有无条带进行

记录, 有扩增条带的记为 1, 没有扩增条带的记为 0, 由此构建 0/1 二元数列矩阵, 记录引物扩增条带的信息含量, 统计总扩增条带数(total number of bands, TNB)、多态性条带数(number of polymorphic bands, NPB)、多态位点百分率(percentage of polymorphic bands, PPB)及多态性信息含量指数(polymorphic information content, PIC)。利用 NTSYSpc2.10<sup>[26]</sup> 数据分析软件进行材料间的 Dice 遗传相似系数(genetic similarity coefficients, GS)的计算, 并按非加权组平均数方法(unweighted pair group method using arith-

metic averages,UPGMA)进行聚类分析及主成分分析;采用 STRUCTUREV2.3.4 软件进行群体遗传结构分析<sup>[27]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 引物的筛选及多态性

检测结果显示,30 份垂穗披碱草种质材料的

DNA 提取质量较高。在选择 4 份质量较高的垂穗披碱草种质材料的基因组 DNA 对 40 对引物进行筛选时,共筛选出了 16 对条带清晰、多态性较高的 SSR 引物(表 2)。16 对 SSR 引物扩增结果表明:30 份垂穗披碱草共检测到 116 个等位基因位点,每对引物扩增出的位点变幅为 5~15 个,每对引物扩增出的平均位点数为 7.25 个;其中 92 个多态性位点,引物平均的多态

表 2 SSR 引物序列及名称

Table 2 Sequences and names of SSR primer pairsy

引物 Primers	重复序列 Repeat	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer
Elw0300s019	(GCT)7	TTCATCCATCCAATTCTAGCACAA	GAAGGAGAAGATGGAATCCTTGAA
Elw0669s043	(TGT)4	CATCTCACGGCAAGTAAATGAACA	TGCGAGATGGGGTACAATTTTTTAT
Elw1197s069	(ACAC)4	ATGGCCGTAACCCTTTACCTGTAT	TTTCAAAGCCTTTCCAAGTGAATC
Elw1420s081	(GCTGT)4	GGATAGACCCATGAGCTGACTGAT	CTTTCTCCACAAGTTGAACACAACA
Elw1468s087	(GTT)4	TAGCAATAAGTTGCTGCTGCTGTT	CCACCTCTAAATTAATCACCACGAA
Elw2202s122	(GGT)4	CTGCATTGCTAATCCAGTTTGATG	CGGAAATAAAAATTACAGCAGGCAC
Elw2594s136	(TCTTCT)4	AAATGTCAACGACGAAAAAGGAAA	ATGTAGCCTTGAGAACACTGGTCC
Elw2807s159	(AGA)4	CCCAAGAAGCAAAAAGTGAAGTTGA	ATAATTGCTGTAAAACGGCAGGAA
Elw3207s179	(GCT)4	GTACAAGATCGCCAACCTCGAAGAT	CCTACAGGAAAAGGACTCGTGACT
Elw3264s184	(CTTT)4	TGGACTGCTTTGGGACATAATAGG	CTGAATCATAGCCACCCTGAAAAC
Elw3492s190	(TG)6	TGTTGTTGTTCCAGTTCAGTCTC	AAAAACAACCACACAAGGTTGTCA
Elw3603s196	(CCT)4	ATCAAGACCGTCTACCTCGACAAG	GGGCCTAATCTAGCATGGAGAAGT
Elw3995s226	(CGC)7	CTCTAGGGTTTTGGGATTTTAGCC	GTTGTGGAGGTCGGAGAAGGT
Elw4419s261	(AGTG)4	AGGGTGACTTGTCTTTGGGTGTAA	AGTCAGATGAAGGATGGCTGAAAC
Elw5013s289	(AGC)6	CGGAATGCTCTCGAATGAATAAAC	ATACTTGCAAAGCACCCTGTTGA
Elw5540s317	(GATC)4	GAGGGGCTCACAGAGAGATTG	GCAAAGAGGATCCACTCTTCACTT

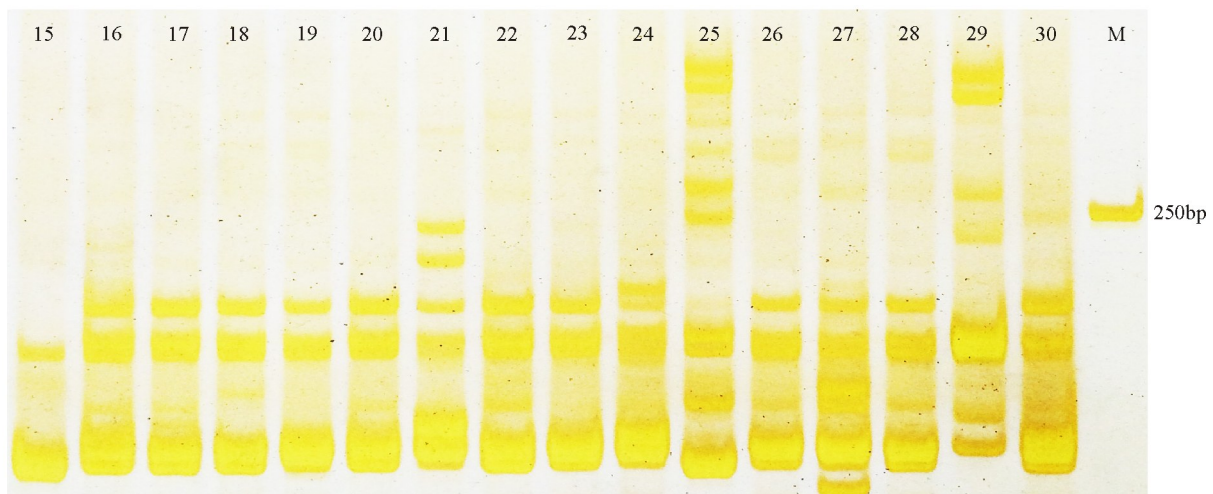


图 1 引物 Elw3264s184 部分材料扩增结果

Fig. 1 Amplification of the sample material using the Elw3264s184 primer

材料编号与表 1 中材料编号相同(图为 15 ~30 号)。下同。

The code of samples is consistent with code in Table 1(the figure is code 15~30); similarly for the following figures.

表3 16对SSR引物在30份供试垂穗披碱草种质材料上的PCR扩增结果  
Table 3 Amplification results of the 16 SSR primers on the 30 *E. nutans* accessions

引物 Primer	总条带数(TB) Total bands	多态性条带数(PB) Polymorphic bands	多态位点百分率(PPB) Percentage of polymorphic bands/%	多态信息含量(PIC) Polymorphic information content
Elw0300s019	6	3	50.00	0.134
Elw0669s043	5	5	100.00	0.284
Elw1197s069	6	6	100.00	0.317
Elw1420s081	10	9	90.00	0.325
Elw1468s087	7	5	71.43	0.208
Elw2202s122	6	4	66.67	0.063
Elw2594s136	7	5	71.43	0.097
Elw2807s159	9	8	88.89	0.218
Elw3207s179	5	4	80.00	0.197
Elw3264s184	9	7	77.78	0.153
Elw3492s190	5	4	80.00	0.252
Elw3603s196	15	11	73.33	0.119
Elw3995s226	5	4	80.00	0.211
Elw4419s261	8	6	75.00	0.104
Elw5013s289	7	5	71.43	0.123
Elw5540s317	6	6	100.00	0.207
总数 Total	116	92		
平均数 Mean	7.25	5.75	79.75	0.188

性比率(PPB)为79.75%。每对引物扩增出的多态性位点变幅为3~11个,每对引物扩增出的多态性平均位点数为5.75个,引物 Elw0300s019 扩增出的多态性位点数最少,为3个,引物 Elw3603s196 扩增出的多态性位点数最多,为11个(表3),引物 Elw3264s184 的扩增结果如图1所示。引物的多态性信息含量 PIC 值变化为0.063(Elw2202s122)~0.325(Elw1420s081),平均值为0.188。这些信息表明,引物 Elw0669s043、Elw1197s069、Elw1420s081 及 Elw5540s317 的多态性较好、PIC 值较高,可用于日后与垂穗披碱草相关的研究。

## 2.2 遗传相似系数分析

基于16对SSR引物构建的0/1原始数据矩阵,通过数据分析软件NTSYS-pc2.10计算出30份供试材料间的相似系数。研究结果显示,30份垂穗披碱草种质资源的遗传相似系数值变幅为0.692~0.977,平均值为0.828,其中来自海西乌兰县的I-1-1-13与来自海南共和县的I-1-1-33的相似系数最小,为0.692,表明他们之间存在较大的遗传差异,亲缘关系最远;来自海南共和县的I-1-1-38与来自海北三角城种羊场I-1-1-39的相似系数最大,为0.976,表明这两份材料亲

缘关系最近。这些结果表明,供试材料之间差异明显,遗传多样性较丰富。

## 2.3 聚类及群体遗传结构分析

对30份垂穗披碱草种质资源进行聚类分析(图2)。聚类分析结果表明,在遗传相似系数0.804处,30份种质材料可聚为四大类,其中有24份材料包含在第I大类中,包括20份采自青海的材料,2份采自西藏的材料和2份采自四川的材料。在相似系数0.832处,可将第I大类划分为4个亚类,第1亚类包含5份材料,其中2份来自果洛,1份来自海南,1份来自海西,1份来自黄南;第2亚类的组成比较混杂包含了17份材料,4份是采自果洛,6份是采自海南,2份采自海北,1份采自海西,其中还包括采自西藏工布达江的2份材料(09-292和09-302)和2份采自四川松潘的材料(14-15-15和14-11-25);第3亚类和第4亚类分别只包括1份材料,分别是来自西宁湟源县的I-1-1-17和来自果洛久治县的I-1-1-28。第II类包括3份采自海南和1份采自海西的材料。第III类仅包括1份材料,来自四川松潘的14-11-22。来自海西蒙古族藏族自治州天俊县的(09-214)单独聚为第IV类(100%支

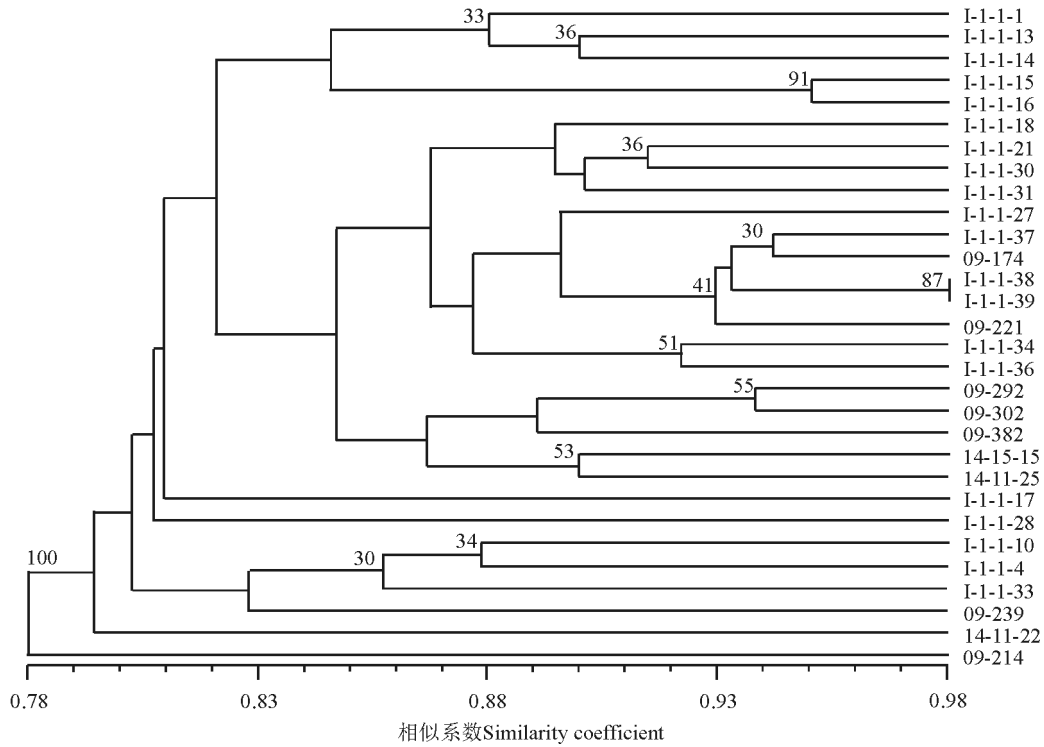


图 2 基于 SSR 标记的 30 个供试材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram constructed from a UPGMA, based on SSR marker for 30 *E. nutans* accessions

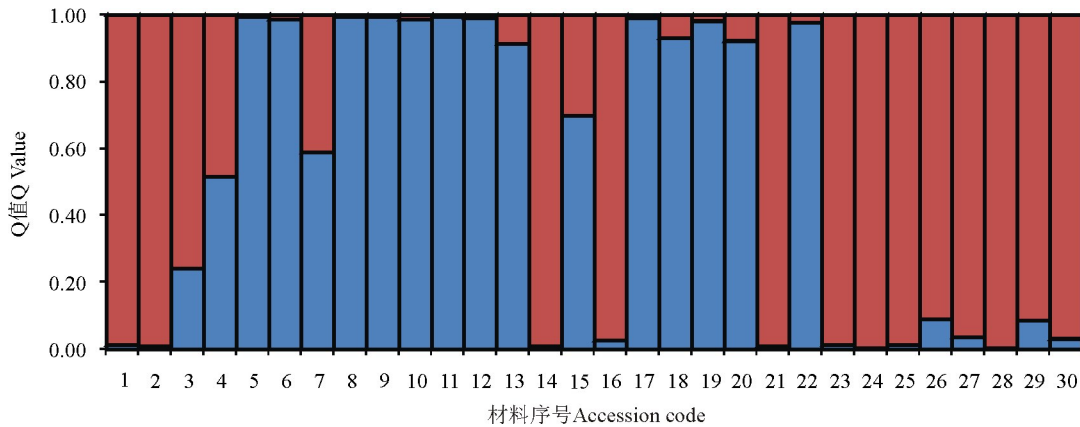


图 3 30 份垂穗披碱草种质群体遗传结构分析(K=2)

Fig. 3 The genetic structure analysis of 30 *E. nutans* accessions used on SSR analysis(K=2)

1,2,3,...30 表示材料序号,同表 1,图 4 同。

1,2,3,...30 indicate accession code in Table 1, similarly for the Fig. 4.

持率),说明这份材料的遗传背景与其他材料存在较大的差异,亲缘关系较远,表现出遗传特异性,这与其形态学的特异性相一致,形态学表现出植株高大,叶量丰富,穗状花序较长等特点。

基于 SSR 数据对供试 30 份垂穗披碱草进行了群体遗传结构分析。当 K=2 时,ΔlnP(D)具有明显的峰值,是最适合的群体划分 K 值(图 3)。大部分材料的遗传背景较为单一,群体划分的结果与聚类分析的

结果部分保持一致,同时也表明本研究中的供试材料的遗传背景与其地理来源没有明显的相关性。

### 2.4 主成分分析

基于遗传相似系数对全部供试垂穗披碱草种质资源进行主成分分析,其中前 3 个主成分的贡献率分别是 82.39%、2.32%和 1.90%。主成分分析三维散点图(图 4)更为直观地反映其遗传亲缘关系,位置相靠近者表示亲缘关系近,远离者表示亲缘关系远。30份供

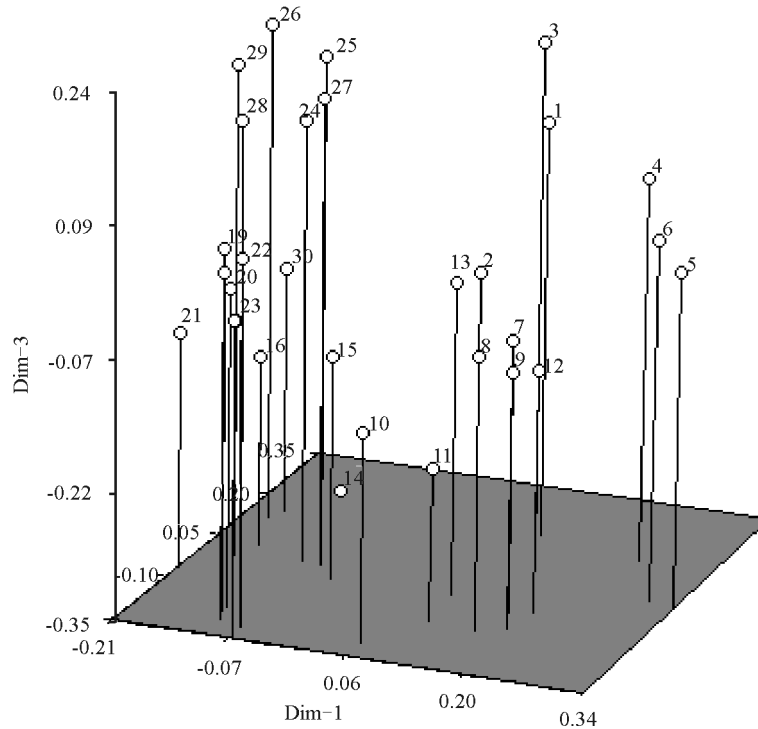


图4 30份垂穗披碱草种质材料依据SSR的三维主坐标分析

Fig. 4 The plot of principal coordinates analysis of 30 *E. nutans* accession based on SSR analysis

试垂穗披碱草种质资源主成分分析结果与聚类分析结果基本一致。

### 3 讨论

#### 3.1 垂穗披碱草种质资源的遗传多样性

作为挖掘种质资源利用深度和广度强有力的手段,分子标记已成为目前评价植物遗传多样研究的主流。目前不同类型的遗传标记已广泛应用于披碱草属种质资源的遗传评价、种间关系、遗传图谱的构建<sup>[28-30]</sup>。对垂穗披碱草遗传多样性进行研究,可对该物种种质资源的保护利用及新品种的选育起到补充作用。本研究用SSR标记技术得到垂穗披碱草的多态性比率(PPB)为79.75%,低于陈智华<sup>[31]</sup>用SSR标记对67份垂穗披碱草种质进行多样性分析99.4%的多态性比率,也低于鄢家俊等<sup>[32]</sup>采用SSR标记技术对青藏高原52份老芒麦(*E. sibiricus*)进行遗传多样性分析86.44%的多态性比率。其原因一方面可能是由于本研究采用的是DNA单株混合提取,从而掩盖了种质内的遗传变异,导致决定种质间遗传关系的多态性位点数降低;另一方面本研究供试材料样本数量有限且采集的地理范围狭窄(主要采自青海),各材料间基因存在一定的交流。但高于张成林等<sup>[33]</sup>采用SSR标记对10份垂穗披碱草种质进行遗传多样性分析

41.77%的多态性比率,吴昊等<sup>[34]</sup>采用SSR标记技术对35份老芒麦野生资源进行分析76.99%的多态性比率。本研究利用16对SSR引物在30份垂穗披碱草种质中共扩增出了116个等位基因,其中92个多态性位点,每对引物扩增出的平均位点数为7.25个,说明了SSR分子标记对垂穗披碱草多样性研究是非常有效的,具有多态性高的特点。多态性信息(PIC)含量为0.063~0.325,平均值为0.188,说明了供试材料间变异程度高。

#### 3.2 供试材料间及地理来源的关系

根据已报道的垂穗披碱草遗传评价结果表明,在大空间尺度条件下,野生的垂穗披碱草种质表现出明显的遗传和地理分化<sup>[35]</sup>。陈智华<sup>[31]</sup>、苗佳敏等<sup>[36]</sup>研究表明,我国西部的垂穗披碱草中来自新疆和青藏高原的垂穗披碱草分化明显,其中青藏高原地区的四川、西藏、青海等地区也存在地理分化。在本研究中,根据聚类、群体结构及主成分等分析表明供试材料的聚类与其地理来源表现出的相关性较低,这可能由于本研究中的材料基本上来自青海各地,具有较为相似的气候及生境条件。这也表明垂穗披碱草在小尺度条件下的变异与其地理来源相关性不高。所以,不同尺度的材料研究更能全面地反映该物种的遗传变异信息,本研究为垂穗披碱草遗传多样性的研究提供了补充。

#### 4 结论

采用 SSR 标记对 30 份野生垂穗披碱草种质资源进行研究,16 对引物共获得了 116 个等位基因位点,92 个多态性位点,多态性位点率(PPB)为 79.75%,多态性信息(PIC)含量为 0.063~0.325,平均值为 0.188,说明了 SSR 标记在垂穗披碱草多样性研究中是非常

有效的,具有多态性高的特点。种质材料间存在较大的差异,遗传多样性较丰富,部分材料(09-214)表现出相对独立的特性,可为垂穗披碱草保护和利用、新品种的选育及优良基因的挖掘提供参考依据。在今后深入开展对垂穗披碱草资源的研究时,不仅要注重样本数量的丰富度,还要充分注重材料地理来源的多样性,充分发掘野生种质的遗传潜力。

#### 参考文献 References:

- [1] Ren F, Zhou H K, Zhao X Q, Han F, Shi L N, Duan J C, Zhao J Z. Influence of simulated warming using OTC on physiological biochemical characteristics of *Elymus nutans* in alpine meadow on Qinghai-Tibetan Plateau. *Acta Ecologica Sinica*, 2010, 30(3): 166-171.
- [2] 王彦星, 郑群英, 晏兆莉, 卢涛. 气候变化背景下草原产权制度变迁对畜牧业的影响: 以青藏高原东缘牧区为例. *草业科学*, 2015, 32(10): 1687-1694.  
Wang Y X, Zheng Q Y, Yan Z L, Lu T. Institutional transition of grassland property rights and its impact on animal husbandry under the background of climate changes: A case study from eastern Qinghai-Tibet Plateau. *Pratacultural Science*, 2015, 32(10): 1687-1694. (in Chinese)
- [3] 韦惠兰, 祁应军. 不同规模草地超载主体的差异性: 以甘肃省玛曲县为例. *草业科学*, 2017, 34(4): 892-901.  
Wei H L, Qi Y J. Differential analysis of herdsmen of different size scales and main contributors to grassland overgrazing: A case study in Maqu, Gansu Province. *Pratacultural Science*, 2017, 34(4): 892-901. (in Chinese)
- [4] 陈桂琛, 周国英, 孙菁, 陈志国, 卢学峰. 采用垂穗披碱草恢复青藏铁路取土场植被的试验研究. *中国铁道学*, 2008(5): 134-137.  
Chen G C, Zhou G Y, Sun J, Chen Z G, Lu X F. Test study on the application of *Elymus nutans* to the vegetation restoration in the Gravel-Soil-Taken field along Qinghai-Tibet railway. *China Railway Science*, 2008(5): 134-137. (in Chinese)
- [5] 陆光平, 聂斌. 垂穗披碱草利用价值评价. *草业科学*, 2002, 19(9): 13-15.  
Lu G P, Nie B. Field evaluation of *Elymus nutans* under alpine grassland conditions. *Pratacultural Science*, 2002, 19(9): 13-15. (in Chinese)
- [6] 马和, 康建军, 张洋东, 朱丽, 谈嫣蓉, 邴丹琿. 祁连山高寒草原醉马草防除后优良牧草补播的土草效应. *草业科学*, 2017, 34(5): 1072-1081.  
Ma H, Kang J J, Zhang Y D, Zhu L, Tan Y R, Bing D H. Effect of soil tillage on re-seeded high quality forages after controlling *Achnatherum inebrians* in alpine grassland. *Pratacultural Science*, 2017, 34(5): 1072-1081. (in Chinese)
- [7] 王庆华, 姬万忠. 天祝高寒退化草地补播恢复治理. *草业科学*, 2015, 32(4): 606-611.  
Wang Q H, Ji W Z. Study on recovering alpine degraded grassland with reseeded in Tianzhu County. *Pratacultural Science*, 2015, 32(4): 606-611. (in Chinese)
- [8] Last L, Widmer F, Fjellstad W, Stoyanova S, Kölliker R. Genetic diversity of natural orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) populations in three regions in Europe. *BMC Genetics*, 2013, 14(1): 102.
- [9] 龙兴发, 蒋忠荣, 李太强, 叶忠明, 刘曦, 杨秀全, 朱连发. 康巴老芒麦新品种选育. *草原与草坪*, 2014, 34(1): 86-89.  
Long X F, Jiang Z R, Li T Q, Ye Z M, Liu X, Yang X Q, Zhu L F. Breeding of new variety of *Elymus sibiricus* cv. Kangba. *Grassland and Turf*, 2014, 34(1): 86-89. (in Chinese)
- [10] 张瑞珍, 张新跃, 刘登锴. 康巴垂穗披碱草品种选育研究. *草业与畜牧*, 2012(2): 8-12.  
Zhang R Z, Zhang X Y, Liu D K. Breeding of *Elymus nutans* Kangba. *Prataculture & Animal Husbandry*, 2012(2): 8-12. (in Chinese)
- [11] 赵永强, 张俊超, 赵旭红, 张宗翰, 张健全, 王彦荣, 谢文刚. 垂穗披碱草落粒性评价及农艺形状的相关分析. *草业科学*, 2017, 34(8): 1711-1720.  
Zhao Y Q, Zhang J C, Zhao X H, Zhang Z H, Zhang J Q, Wang Y R, Xie W G. Assessment of seed shattering and analysis of



- agronomic traits in *Elymus nutans*. Pratacultural Science, 2017, 34(8): 1711-1720. (in Chinese)
- [12] 王传旗, 苗彦军, 王建林, 梁莎, 次旺卓玛, 赵玉红, 徐雅梅. 西藏野生垂穗披碱草苗期抗旱性研究. 中国草地学报, 2017, 39(4): 116-120.
- Wang C Q, Miao Y J, Wang J L, Liang S, Ciwangzhuoma, Zhao Y H, Xu Y M. Studies on drought resistance of wild *Elymus nutans* in Tibet under drought stress at seedling stage. Chinese Journal of Grassland, 2017, 39(4): 116-120. (in Chinese)
- [13] 付娟娟, 刘建, 孙永芳, 褚希彤, 苗彦军, 呼天明, 许岳飞. 冷胁迫对 2 种垂穗披碱草生长和生理特性的影响. 草地学报, 2014, 22(4): 789-795.
- Fu J J, Liu J, Sun Y F, Chu X T, Miao Y J, Hu T M, Xu Y F. Effects of cold stress on the growths and physiological characteristics of two *Elymus nutans* varieties. Acta Agrestia Sinica, 2014, 22(4): 789-795. (in Chinese)
- [14] 杨月娟, 周华坤, 王文颖, 殷恒霞, 姚步青, 余欣超, 赵新全, 王发刚. 盐胁迫对垂穗披碱草幼苗生理指标的影响. 兰州大学学报(自然科学版), 2014, 50(1): 101-106.
- Yang Y J, Zhou H K, Wang W Y, Yin H X, Yao B Q, Yu X C, Zhao X Q, Wang F G. Effect of salt stress on the physiological characteristics of *Elymus nutans*. Journal of Lanzhou University(Natural Sciences), 2014, 50(1): 101-106. (in Chinese)
- [15] 陈智华, 苗佳敏, 钟金城, 马啸, 张新全. 野生垂穗披碱草种质遗传多样性的 SRAP 研究. 草业学报 2009, 18(5): 192-200.
- Chen Z H, Miao J M, Zhong J C, Ma X, Zhang X Q. Genetic diversity of wild *Elymus nutans* germplasm detected by SRAP markers. Acta Prataculturae Sinica, 2009, 18(5): 192-200. (in Chinese)
- [16] 邓竹佳, 苗佳敏, 张新全, 陈智华, 蒋宗荣, 龙兴发, 杨秀全. 川西北高原野生垂穗披碱草 RAPD 变异研究. 草业与畜牧, 2010(12): 17-21.
- Deng Z J, Miao J M, Zhang X Q, Chen Z H, Jiang Z R, Long X F, Yang X Q. Study on genetic diversity of *Elymus nutans* Griseb. in Northwest Plateau of Sichuan Province. Prataculture & Animal Husbandry, 2010(12): 17-21. (in Chinese)
- [17] 马啸, 周永红, 于海清, 张海琴. 野生垂穗披碱草种质的醇溶蛋白遗传多样性分析. 遗传, 2006, 28(6): 699-706.
- Ma X, Zhou Y H, Yu H Q, Zhang H Q. Genetic diversity of gliadin in wild germplasm of *Elymus nutans* Griseb. Hereditas, 2006, 28(6): 699-706. (in Chinese)
- [18] 严学兵, 王堃, 周禾, 王成章, 郭玉霞. 不同来源 SSR 标记在我国披碱草属植物的通用性和效率评价. 草业学报, 2008, 17(6): 112-120.
- Yan X B, Wang K, Zhou H, Wang C Z, Guo Y X. Evaluation of universality and efficacy of microsatellite markers amplified in *Elymus* taxa from China. Acta Prataculturae Sinica, 2008, 17(6): 112-120. (in Chinese)
- [19] 陈仕勇, 陈智华, 马啸, 张新全, 朱永群, 李世丹. 小麦 SSR 标记在垂穗披碱草中的通用性分析. 西南民族大学学报(自然科学版), 2015, 41(3): 265-269.
- Chen S Y, Chen Z H, Ma X, Zhang X Q, Zhu Y Q, Li S D. Analysis on transferability of wheat SSR markers in *Elymus nutans* Griseb. Journal of Southwest University for Nationalities(Natural Science Edition), 2015, 41(3): 265-269. (in Chinese)
- [20] 鄢家俊, 白史且, 张新全, 游明鸿, 张昌兵, 李达旭, 曾怡. 青藏高原老芒麦种质基于 SRAP 标记的遗传多样性研究. 草业学报, 2010, 19(1): 173-183.
- Yan J J, Bai S Q, Zhang X Q, You M H, Zhang C B, Li D X, Zeng Y. Genetic diversity of wild *Elymus sibiricus* germplasm from the Qinghai-Tibetan Plateau in China detected by SRAP markers. Acta Prataculturae Sinica, 2010, 19(1): 173-183. (in Chinese)
- [21] Sun G L, Salomon B. Characterization of microsatellite loci from *Elymus alaskanus* and length polymorphism in several *Elymus* species(Triticeae; Poaceae). Genome, 1998, 41: 455-463.
- [22] 雷云霆, 窦全文. 青藏高原老芒麦和垂穗披碱草 SSR 分子标记鉴别. 草业科学, 2012, 29(6): 937-942
- Lei Y T, Dou Q W. Distinguishing *Elymus nutans* from *Elymus sibiricus* in Qinghai-Tibet Plateau using a SSR marker. Pratacultural Science, 2012, 29(6): 937-942. (in Chinese)
- [23] 郭志慧, 杨红宇, 张成林, 孙铭, 符开欣, 张新全, 马啸. 利用形态性状以及 SSR 标记鉴定 4 个川西北老芒麦品种(系). 草业科学, 2016, 33(9): 1718-1727.
- Guo Z H, Yang H Y, Zhang C L, Sun M, Fu K X, Zhang X Q, Ma X. Identification of four *Elymus sibiricus* cultivar(strains) from Northwest Plateau of Sichuan using morphological traits and SSR markers. Pratacultural Science, 2016, 33(9): 1718-1727. (in Chinese)

- [24] 朱连发,李太强,龙新发,蒋忠荣,马啸.牧草品种鉴定的常用方法.草业与畜牧,2009(12):29-31  
Zhu L F,Li T Q,Long X F,Jiang Z R,Ma X.The general methods identification of forage cultivars.Prataculture & Animal Husbandry,2009(12):29-31.(in Chinese)
- [25] Mott I W,Larson S R,Jones T A,Peel M D.A molecular genetic linkage map identifying the St and H subgenomes of *Elymus* (Poaceae:Triticeae)wheatgrass.Genome,2011,54:819-828.
- [26] Rohlf F J.NTSYS-pc:Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System(Version 2.1).User Guide.Exeter Software,Setauket,New York,2000.
- [27] Falush D,Pritchard J K,Stephens M.Inference of population structure using multilocus genotype data:Linked loci and correlated allele frequencies.Genetics,2003,164(4):1567-1587.
- [28] 闫伟红,马玉宝,张晶然,王凯,孟庆伟.老芒麦遗传多样性分析及核心种质构建.草业与畜牧,2017,14(1):1-12.  
Yan W H,Ma Y B,Zhang J R,Wang K,Meng Q W.The analysis of genetic diversity and the construction of core collection for *Elymus sibiricus* L.Prataculture & Animal Husbandry,2017,14(1):1-12.(in Chinese)
- [29] 顾晓燕,郭志慧,张新全,周永红,白史且,张昌兵,蒋忠荣,刘新,周朝杰,马啸.老芒麦种质资源遗传多样性的 SRAP 分析.草业学报,2014,23(1):205-216.  
Gu X Y,Guo Z H,Zhang X Q,Zhou Y H,Bai S Q,Zhang C B,Jiang Z R,Liu X,Zhou C J,Ma X.Genetic diversity of *Elymus sibiricus* germplasm resources revealed by SRAP markers.Acta Prataculturae Sinica,2014,23(1):205-216.(in Chinese)
- [30] 张俊超,谢文刚,赵旭红,张宗瑜,赵永强,王彦荣.利用 EST-SSR 标记构建中国老芒麦品种 DNA 指纹图谱及种质遗传多样性.草业科学,2017,34(10):2052-2062.  
Zhang J C,Xie W G,Zhao X H,Zhang Z Y,Zhao Y Q,Wang Y R.EST-SSR marker based DNA fingerprinting for cultivar identification and genetic diversity analysis of *Elymus sibiricus* germplasm in China.Pratacultural Science,2017,34(10):2052-2062.(in Chinese)
- [31] 陈智华.青藏高原野生垂穗披碱草种质的遗传多样性研究.雅安:四川农业大学博士学位论文,2009.  
Chen Z H.Studies on genetic diversity in wild germplasm of *Elymus nutans* G.in the Qinhai-Tibetan Plateau,PhD Thesis,Ya'an,Sichuan Agricultural University,2009.(in Chinese)
- [32] 鄢家俊,白史且,常丹,游明鸿,张昌兵,李达旭.青藏高原老芒麦种质遗传多样性的 SSR 分析.中国农学通报,2010,26(9):26-33.  
Yan J J,Bai S Q,Chang D,You M H,Zhang C B,Li D X.Genetic diversity of wild *Elymus sibiricus* L. germplasm from Qinghai-Tibetan Plateau in China detected by SSR markers.Chinese Agricultural Science Bulletin,2010,26(9):26-33.(in Chinese)
- [33] 张成林,郭志慧,张新全,白史且,张昌兵,李平,马啸.利用 SSR 标记对垂穗披碱草和老芒麦进行物种鉴定和遗传异析.植物遗传资源学报,2016,17(3):416-422.  
Zhang C L,Guo Z H,Zhang X Q,Bai S Q,Zhang C B,Li P,Ma X.An analysis of species identification and genetic divergence of drooping wildrye (*Elymus nutans*) and siberian wildrye (*E. sibiricus*) by SSR markers.Journal of Plant Genetic Resources,2016,17(3):416-422.(in Chinese)
- [34] 吴昊,曲志才,闫伟红,张晓庆,马玉宝,王凯,祁娟.老芒麦野生种质资源遗传多样性的 SSR 分析.曲阜师范大学学报(自然科学版),2013,39(4):73-78.  
Wu H,Qu Z C,Yan W H,Zhang X Q,Ma B Y,Wang K,Qi J.Genetic diversity of the wild *Elymus sibiricus* L. germplasm resources detected by SSR markers.Journal of Qufu Normal University (Natural Science),2013,39(4):73-78.(in Chinese)
- [35] 严学兵,郭玉霞,周禾,王堃.青藏高原垂穗披碱草遗传变异的地理因素分析.西北植物学报,2007(2):328-333.  
Yan X B,Guo Y X,Zhou H,Wang K.Effect of geographical factors on genetic variation of *Elymus nutans* indigenous in the Qinghai-Tibetan Plateau.Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica,2007(2):328-333.(in Chinese)
- [36] 苗佳敏,张新全,陈智华,钟金城,陈仕勇,马啸,白史且.青藏高原和新疆地区垂穗披碱草种质的 SRAP 及 RAPD 分析.草地学报,2011,19(2):306-316.  
Miao J M,Zhang X Q,Chen Z H,Zhong J C,Chen S Y,Ma X,Bai S Q.SRAP and RAPD analysis of *Elymus nutans* Griseb. Germplasm from the Qinghai-Tibetan Plateau and Xinjiang,Chinese Journal of Grassland,2011,19(2):306-316.(in Chinese)

(责任编辑 张瑾)