

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2008.01901

小扁豆种质资源 SSR 标记遗传多样性及群体结构分析

刘金¹ 关建平¹ 徐东旭² 张晓艳¹ 顾竟¹ 宗绪晓^{1,*}

(¹ 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; ² 张家口市农业科学院作物所, 河北张家口 075131)

摘要: 从 145 对 SSR 引物中筛选到 14 对多态性引物, 对选取国家种质库的 440 份小扁豆种质资源进行 SSR 标记遗传多样性分析, 共检测出 87 个等位变异, 平均每个 SSR 位点 6.2143 个; 平均 Shannon-Weaver 指数(I)为 1.1869。16 个不同地理来源群体间表现出显著的遗传多样性差异, 国外群体的遗传多样性水平(0.9837)远高于国内群体(0.3485)。PCA、UPGMA 法聚类分析和 Structure 群体结构分析结果相互间完全吻合。440 份参试材料从遗传结构上可划分为 8 个组群, 揭示国外群体遗传分化大, 群体间的亲缘关系较远; 国内群体与之相反。研究结果显示, 山西、宁夏和甘肃省是我国小扁豆资源遗传多样性最丰富、遗传关系较复杂的地区, 应对该区域小扁豆资源进一步搜集、保护和研究; 同时, 应继续加强小扁豆资源的国外引种与交流, 做进一步系统研究和开发利用。

关键词: 小扁豆; 种质资源; SSR 标记; 遗传多样性; 群体结构

Analysis of Genetic Diversity and Population Structure in Lentil (*Lens culinaris* Medik.) Germplasm by SSR Markers

LIU Jin¹, GUAN Jian-Ping¹, XU Dong-Xu², ZHANG Xiao-Yan¹, GU Jing¹, and ZONG Xu-Xiao^{1,*}

(¹ National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ² Institute of Crops, Zhangjiakou Academy of Agricultural Sciences, Zhangjiakou 075131, Hebei, China)

Abstract: A total of 440 lentil accessions, randomly chosen from the National Gene Bank, were employed in the experiment. Fourteen polymorphic SSR markers was screened from a total of 145 SSR primer pairs, detected a total of 87 allelic variations. High level of diversity has been detected, with an average allele number of 6.2143 and an average Shannon-Weaver index (I) of 1.1869 by 14 SSR primer pairs. The results indicated significant differentiations among the 16 groups of lentil resources in genetic diversity from diversified geographic origins. The genetic diversity within alien accessions was obviously higher than that within Chinese resources. Population structure within the subcollection of 440 individuals was defined, and 8 clusters were identified based on SSR markers by using Structure 2.2 software. The results of PCA, UPGMA cluster and population structure analyses revealed that the genetic structure was multiplex; the genetic distance was broader among foreign populations than that among Chinese populations. More survey and collecting trips, conservation and study should be made for the lentil genetic resources in Shanxi, Ningxia, and Gansu provinces, where the highest genetic diversity level existed in China. Furthermore, international exchange and introduction of lentil genetic resources should be enhanced, for more systematic studies and exploitation.

Keywords: Lentil; Genetic resources; SSR markers; Genetic diversity; Population structure

小扁豆(*Lens culinaris* Medik, $2n = 2x = 14$)是一年生自花授粉、长日性草本植物, 别名滨豆、兵豆、洋扁豆、鸡眼豆等; 英文名为 lentil 或 split pea^[1]。

考古学研究表明, 小扁豆起源于近东地区, 是世界上最古老的作物之一^[2], 它与小麦和大麦同时被驯化, 是种植在北非、西亚、中东、印度次大陆和北

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD13B05, 2006BAD02B08); 科技部植物种质资源共享平台建设项目(2005DKA21001-06); 农业部作物种质资源保护项目[NB07-2130135-(25-30)-13]; 农业行业标准专项(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: 刘金(1980-), 男, 宁夏中卫人, 硕士, 主要从事小扁豆种质资源研究。E-mail: lj-9000@163.com

* 通讯作者(Corresponding author): 宗绪晓(1964-), 男, 山东莱州, 博士, 研究员, 研究方向为食用豆类种质资源研究与遗传改良。

Tel: 010-62186651; E-mail: zongxx@mail.caas.net.cn

Received(收稿日期): 2008-03-10; Accepted(接受日期): 2008-06-11.

美的重要冷季作物^[3]。作为人类膳食和动物饲料重要的蛋白质来源,小扁豆具有极高的营养价值^[4-5],尤其近20年来,小扁豆已在如澳大利亚、加拿大、美国等发达国家种植,并发展成为重要的农业出口商品^[6]。

小扁豆作为一种小作物,遗传研究基础薄弱。随着分子生物学的飞速发展,分子标记技术为小扁豆的遗传研究注入了新的活力,也使小扁豆遗传图谱得到了不断丰富^[4-5]。到目前为止,Hamwieh等^[7]进一步丰富了Eujayl等^[8]的小扁豆种间遗传图谱,在原图谱的基础上新增加了50个AFLP、39个SSR、21个RAPD和1个形态标记,标记数量达到289个,平均图距2.7 cM,分布在14个连锁群;Rubeena等^[9]构建了首张包含100个RAPD、11个ISSR和3个类抗病基因类似物(RGA)标记的种内遗传连锁图,全长784.1 cM,共9个连锁群。小扁豆遗传图谱的构建与完善促进了通过分子标记技术来标记与定位小扁豆抗性基因的发展,如小扁豆的褐斑萎蔫病^[10](*Ascochyta blight*)、炭疽病^[10-11](*Anthraco*se)、微管束萎蔫病^[7](*Fusarium wilt*)的抗性基因已被标记和定位,分子标记辅助选择将在小扁豆抗性育种中发挥重要作用。基于以上研究进展,小扁豆种质资源遗传多样性的研究也在陆续进行。国外学者采用形态标记^[12-14]、同功酶标记^[12]、种子蛋白标记^[15]、RAPD标记^[16-18]、ISSR标记^[18-20]、SSR标记^[18]进行了研究,但是所采用的标记数量(Sonnante等^[18]在2001年报道中只用了4对SSR小扁豆引物进行扩增)和小扁豆资源都较少,因而未能对小扁豆遗传多样性进行深入探究。由于开发的小扁豆SSR引物较少,利用SSR标记对小扁豆种质资源进行遗传多样性分析至今未有较深入报道^[18]。因此,开发更多的小扁豆SSR引物用以小扁豆种质资源遗传多样性研究是今后小扁豆遗传研究的重要方向。

我国虽有800余份国内外小扁豆资源,但其遗传多样性研究仍是空白,亟待深入研究、开发与利用。SSR标记具有共显性、重复性好、高分辨率、揭示的多态性高、操作相对简单等优点^[21-22],在群体遗传结构和遗传多样性分析、物种进化、遗传图谱构建、基因定位及分子标记辅助育种等研究领域^[7,22]有着广泛应用。本研究拟对保存在国家种质库的小扁豆种质资源进行SSR标记遗传多样性分析,旨在揭示我国小扁豆种质资源遗传多样性地理分布特点和种质资源群间的遗传关系,为我国小扁豆种

质资源的收集、保护、研究和利用提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

自国家种质资源交换库随机抽取参试资源440份,占库存小扁豆资源总数的52.7%。其中国内资源204份,分别来自新疆(54份)、内蒙古(11份)、宁夏(13份)、青海(23份)、山西(58份)、陕西(7份)、甘肃(18份)、湖北(10份)和云南(10份);国外资源257份,分别来自西亚15份(土耳其7份、伊朗3份、黎巴嫩2份、叙利亚2份和约旦1份),南亚6份(印度4份和巴基斯坦2份),欧洲5份(法国、捷克、英国各1份,原苏联2份),美洲5份(加拿大2份、智利2份和美国1份),日本3份,国际干旱地区农业研究中心(ICARDA)98份,以及未知来源的国外资源(标为Unknown)104份。

1.2 DNA提取与检测

田间选取幼嫩叶片组织,采用改良后的CTAB法^[23-24]提取基因组DNA,经1%的琼脂糖凝胶电泳检测其质量,再用紫外分光光度计测定浓度后加入适量0.1×TE溶液,将其稀释成DNA母液于-20℃低温下长期保存备用。

1.3 SSR引物

引物对序列是来自文献报道的35对小扁豆SSR引物^[7,25]和中国农业科学院作物科学研究所食用豆类室提供的110对豌豆(*Pisum sativum* L., $2n = 2x = 14$) SSR引物对,均由上海英骏生物技术有限公司合成。

1.4 PCR扩增体系及电泳

SSR扩增反应在PTC-220热循环仪上进行。10 μL反应体系中含20~50 ng基因组DNA,4.1 pmol引物,0.32 U *Taq* 酶,1×buffer,0.2 mmol L⁻¹ dNTP,2 mmol L⁻¹ Mg²⁺。PCR程序为94℃预变性3 min;94℃变性35 s,各引物相应的退火温度35 s,72℃延伸1 min,33个循环;72℃延伸3 min后于10℃保存。扩增产物在5%聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,硝酸银染色显影。

1.5 数据统计与分析

每个SSR等位变异的有无反别用数字1和0表示,存储成Excel表格,再根据不同分析软件的格式要求作相应转换。应用NTSYS-pc Ver.2.10t进行PCA分析,用Popgen Ver.1.32分析观测等位变异数 N_A 、有效等位变异数 N_E 、Shannon-Weaver多样性指

数 I 等遗传多样性参数, 结合 MEGA 3.1 分析软件对 16 个群体进行基于 UPGMA 法的树状聚类图的绘制。利用 Structure 2.2^[26-27], 采用混合模型和等位变异发生频率相关模型对小扁豆种质进行群体遗传结构分析。所设置的 Structure 参数“Burnin Period”和“after Burnin”为 10 000 次, K 值为 1~19, 每个 K 值运行 10 次^[27-28]。计算每个 K 值对应的“Var[ln P(D)]”值的均值, 然后作出折线图选择最佳 K 值, 即得群体遗传结构的群体数^[29]。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性引物的筛选

选用 12 份不同地理来源、性状差异显著的小扁豆种质, 对 145 对 SSR 引物进行 PCR 退火温度和引物扩增多态性筛选。35 对小扁豆 SSR 引物中, 有 21 对引物扩增出稳定、清晰可辨的谱带, 有效扩增比率为 60.0%, 其中 12 对具有多态性, 多态性引物比率为 57.0%; 而在 110 对豌豆 SSR 引物中, 27 对扩增出清晰稳定的谱带, 有效扩增比率为 24.5%, 其中仅有 2 对 SSR 引物具有多态性, 多态性引物比率为 7.4%。最终确定了谱带清晰稳定且具多态性的 14 对 SSR 引物(表 1), 用于本研究。

2.2 全部参试资源的 PCA 分析

应用 NTSYS-pc Ver.2.10t 对全部参试资源进行 PCA 分析, 得三维空间聚类图(图 1, 前 3 维贡献率为 49.87%)。图 1 显示, 国内资源(椭圆 A)与国外资源(椭圆 B)在空间上的分布是明显分离的, 说明它

们之间的亲缘关系较远, 与资源群的地理来源明显相关。国内资源分布在聚类图的左方略偏中下部, 紧密地混聚在一起, 而国外资源空间结构虽有分化但不明显。说明国内小扁豆种质资源的遗传基础总体一致且较为狭窄, 与国外资源显著不同。然而, 国外资源呈现了宽广、均匀分布的空间特征, 表明它们的遗传背景广泛且多样性分布较国内资源均匀。ICARDA、西亚和未知群体相互之间存在穿插渗透现象, 但是来源于 ICARDA 的资源主要分布在聚类图的右下及右中部, 与南亚和西亚的资源(聚类图顶部和中部)在空间上有隔离; 欧洲资源主要分布于聚类图中部稍偏下, 距西亚和国内资源较近。可见, 国外资源的分布有一定的规律性。

2.3 国内参试资源 PCA 分析

为揭示国内资源遗传多样性是否与其地理来源相关, 对其单独进行了 PCA 分析(图 2, 前 3 维贡献率为 70.0234%)。所得三维聚类图大致由 4 簇构成, C 簇绝大部分资源来源于新疆, 在聚类图左顶部区域, 分布较紧凑, 遗传基础较广泛; D 簇主要为宁夏资源, 在聚类图的左中下部, 呈分散分布, 与新疆部分资源相互重叠、渗透, 表明这部分的资源遗传基础较广且与新疆资源的遗传关系较近; E 簇主要包括来源于内蒙古、青海、甘肃、山西、陕西、云南的资源, 在聚类图的右部, 所占空间比例最大, 遗传基础最广泛。总体上看, 山西和甘肃的资源在大范围内分散分布, 说明其遗传背景宽广; 山西与青海的资源互相重叠严重, 说明其同质性高; F 簇主要来

表 1 筛选到的 SSR 多态性引物
Table 1 The information of polymorphic SSR primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence (F, 5-3)	引物序列 Primer sequence (R, 5-3)	退火温度 Annealing temperature (°C)
SSR19	GACTCATACTTTGTTCTTAGCAG	GAACGGAGCGGTCACATTAG	65
SSR33	CAAGCATGACGCCTATGAAG	CTTCACTCACTCAACTCTC	60
SSR80	CCATGCATACGTGACTGC	GTTGACTGTTGGTGTAAGTG	56
SSR96	GTTATCTTCCAGCGTC	GATATACAATCAGAGATG	53
SSR99	GGGAATTTGTGGAGGGAAG	CCTCAGAATGTCCCTGTC	58
SSR124	GTATGTGACTGTATGCTTC	GCATTGCATTTACAAAACC	58
SSR130	CCACGTATGTGACTGTATG	GAAAGAGAGGCTGAAACTTG	58
SSR156	GTACATTGAACAGCATCATC	CAAATGGGCATGAAAGGAG	58
SSR204	CACGACTATCCCACTTG	CTTACTTTCTTAGTGCTATTAC	58
SSR233	CTTGGAGCTGTGGTC	GCCGCCTACATTATGG	62
SSR302	CAAGCCACCCATACACC	GGGCATTAAGTGTGCTGG	59
SSR317-1	GTGGGTGTAATTATTGCTAC	GTATCAAACCTATGGTAAAATC	50
psac75	CGCTCACAAATGTAGATGATAA	TCATGCATCAATGAAAGTGATAAA	56
psab111	TGGAGCAGTTATGAGGAAAATTTG	TTGCATATGTGAGAATTTATAGCAATTAATG	62

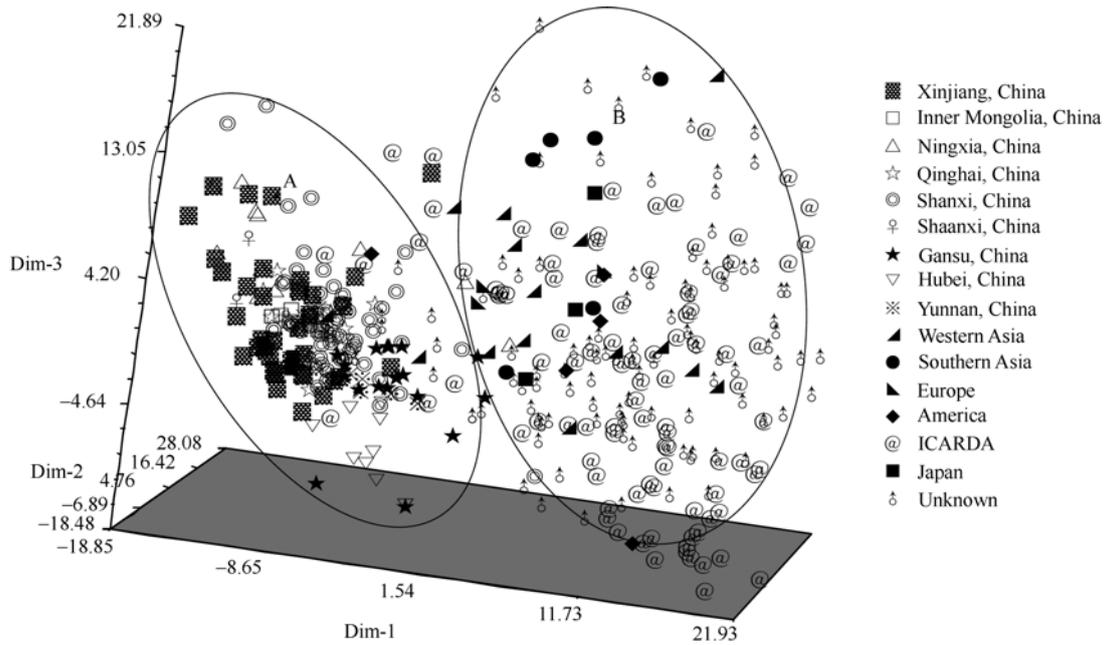


图 1 基于 14 对 SSR 引物的 440 份小扁豆种质三维 PCA 分析图

Fig. 1 Three-dimension principle correspondence analysis of the 440 lentil accessions based on 14 SSR primer pairs

Dim-1 : 最小值(Min) = -18.85, 最大值(Max) = 21.93; Dim-2 : 最小值(Min) = -18.85, 最大值(Max) = 28.08;

Dim-3 : 最小值(Min) = -13.48, 最大值(Max) = 21.89.

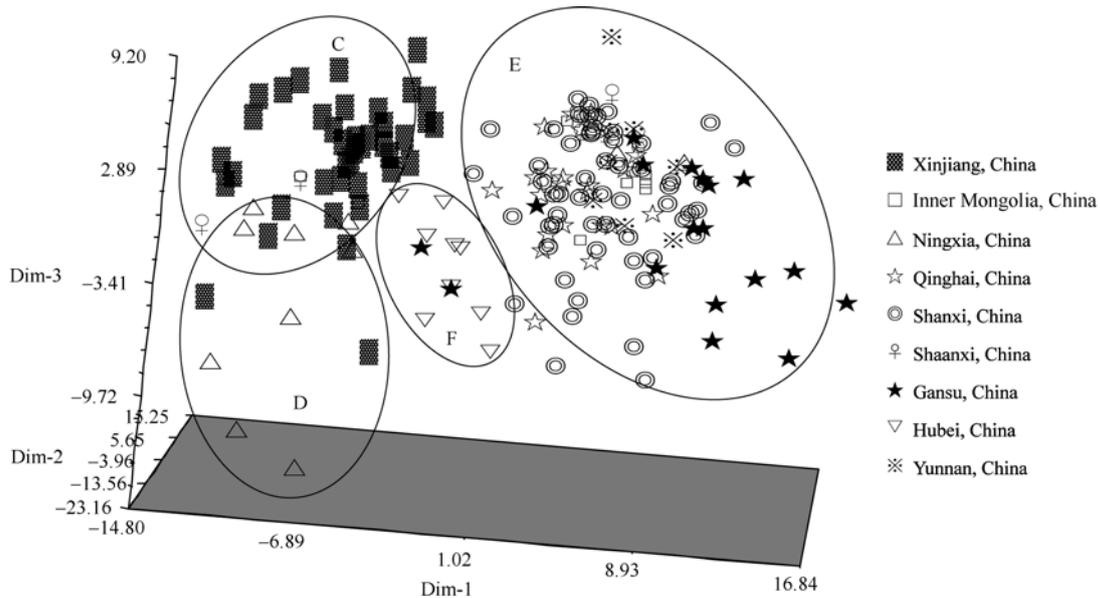


图 2 基于 14 对 SSR 引物的 204 份中国小扁豆种质三维 PCA 分析图

Fig. 2 Three-dimension principle correspondence analysis of the 204 Chinese lentil accessions based on 14 SSR primer pairs

Dim-1 : 最小值 (Min) = -14.80, 最大值(Max) = 16.84; Dim-2 : 最小值(Min) = -23.16, 最大值(Max) = 15.25;

Dim-3 : 最小值(Min) = -16.03, 最大值(Max) = 9.20.

自湖北, 位于立体图形的中心位置, 被单独分离出来但布局松散, 其资源不同于国内其他群体。

2.4 SSR 位点多样性分析

440 份小扁豆种质资源在 14 个 SSR 位点上共检测出 87 个等位变异(表 2), 平均每个位点为 6.2143

个。其中, 位点 SSR33 等位变异最多, 为 13 个, 其有效等位变异数为 7.2388; 其次是 SSR156、SSR204 和 psab111, 其等位变异都是 10 个, 而有效等位基因数分别为 3.4083、3.9728 和 4.6793; 等位变异最少的是 SSR99、SSR124 和 SSR233, 仅检测到 3 个

表 2 440 份小扁豆材料基于 14 对 SSR 引物的遗传多样性分析
Table 2 Analysis of genetic diversity for 440 lentil accessions using 14 SSR primer pairs

SSR 位点间遗传多样性比较 Genetic diversity for locus						群体间遗传多样性比较 Genetic diversity for populations					
位点 Locus	观测等位 基因数 N_A	有效等位 基因数 N_E	多样性 指数 I	观察杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e	群体 Population	观测等位 基因数 N_A	有效等位 基因数 N_E	多样性 指数 I	观察杂 合度 H_o	期望杂 合度 H_e
SSR99	3	1.1158	0.2187	0.0190	0.1040	云南 Yunnan, China	1.4286	1.2723	0.2031	0.0556	0.1331
SSR124	3	1.3684	0.5015	0.0000	0.2700	新疆 Xinjiang, China	2.2857	1.2274	0.2742	0.0606	0.1460
SSR233	3	1.4674	0.5928	0.0350	0.3190	湖北 Hubei, China	1.7143	1.4386	0.3090	0.0389	0.1919
SSR130	4	1.6960	0.7773	0.0930	0.4110	内蒙古 Inner Mongolia, China	1.9286	1.3388	0.3164	0.0260	0.1844
SSR96	4	2.1050	0.9354	0.0200	0.5260	青海 Qinghai, China	1.9286	1.4251	0.3169	0.0898	0.1741
psac75	4	2.2038	0.9504	0.0120	0.5470	陕西 Shaanxi, China	1.7143	1.4972	0.3455	0.0646	0.2306
SSR302	5	2.0986	1.0196	0.0000	0.5240	宁夏 Ningxia, China	2.2143	1.3948	0.4092	0.0636	0.2395
SSR317-1	4	2.8869	1.1902	0.0500	0.6540	甘肃 Gansu, China	2.4286	1.4879	0.4654	0.0540	0.2657
SSR80	7	2.9008	1.4218	0.0200	0.6560	山西 Shanxi, China	3.5000	1.7755	0.4968	0.0748	0.2445
SSR19	7	4.2438	1.5834	0.3920	0.7650	欧洲 Europe	2.2857	1.9833	0.6336	0.0286	0.4349
SSR204	10	3.9728	1.6584	0.1920	0.7490	日本 Japan	2.3571	2.0445	0.7112	0.2500	0.5548
SSR156	10	3.4083	1.7293	0.1120	0.7070	南亚 Southern Asia	2.7857	2.1325	0.8101	0.0952	0.5276
psab111	10	4.6793	1.8538	0.1030	0.7870	美洲 America	3.0000	2.5138	0.8666	0.1107	0.5409
SSR33	13	7.2388	2.1841	0.1320	0.8630	西亚 Western Asia	4.5714	3.5891	1.2621	0.1252	0.6679
						ICARDA	5.7143	3.6896	1.3006	0.1054	0.6336
						产地不明 Unknown	5.6429	3.5396	1.3016	0.0978	0.6425
平均 Mean	6.2143	2.9561	1.1869	0.0842	0.5630	平均 Mean	2.8438	2.0219	0.6264	0.0838	0.3632

N_A : observed alleles; N_E : effective alleles; I = Shannon's information index; H_o : observed heterozygosity; H_e : expected heterozygosity.

等位变异, 其有效等位变异数分别为 1.1158、1.3684、1.4674。Shannon 多样性指数 I 值最大的位点是 SSR33, 最小的为 SSR99, I 值变化范围为 0.2178~2.1841, 平均 1.1869。观察杂合度 H_o 的变化范围是从 0 (SSR124、SSR302)~0.392(SSR19), 平均为 0.0842。期望杂合度 H_e 最大是 0.863(SSR33), 最小为 0.104(SSR99), 平均为 0.563。表明本研究获得的 SSR 位点的遗传多样性丰富。

综合分析比较各参数, 有效等位变异数和 I 值的变化趋势一致。有效等位变异数值大的 SSR 位点, 其 I 值也大。等位变异数相同的 SSR 位点并不具有相等的有效等位变异数, 但是有效等位变异数与等位变异频率相关联, 能够真实地反映群体遗传多样性。因此, 有效等位变异数和 I 值对于遗传多样性分析, 具有更可靠而实际的意义。

2.5 参试群体的遗传变异分析

由表 2 可知, 16 个参试群体的有效等位变异变化范围较大, 最小的是新疆群体, 为 1.2274; 最大的是 ICARDA 群体, 为 3.6896; 平均有效等位变异为 2.0219。总的看来, 国内 9 个群体的有效等位变异远低于国外各群体。有效等位变异最大的山西群

体(1.7755), 其有效等位变异明显低于国外有效等位变异最小的欧洲群体(1.9833)。国内群体间的有效等位变异依次为新疆<云南<内蒙古<宁夏<青海<湖北<甘肃<陕西<山西, 变化范围为 1.2274~1.7755, 极差为 0.5481, 均值为 1.4286, 比全部参试群体的平均有效等位变异低 0.5933。国外群体间有效等位变异依次是欧洲<日本<南亚<美洲<未知群体<西亚<ICARDA, 变化范围为 1.9833~3.6896, 极差是 1.7063, 均值为 2.7846, 比全部参试群体的平均有效等位变异高出 0.7627 个数值。国外群体有效等位变异的极差和均值分别是国内群体的 3 倍和 2 倍。从有效等位变异分析结果得出, 国内群体间的有效等位变异即遗传丰富度差异不大, 国外群体间的遗传丰富度变化较大, 远远高于国内群体。

各参试群体的 I 值平均为 0.6264。 I 值最小的是云南群体, 为 0.2031; 最大的是未知群体, 为 1.3016。国内群体 I 值为云南<新疆<湖北<内蒙古<青海<陕西<宁夏<甘肃<山西, 其中内蒙和青海的 I 值接近, 仅差 0.0005。国内群体 I 值范围为 0.203~0.4968, 极差是 0.2937, 均值为 0.3485, 比全部参试群体的平均 I 值低 0.2779 个数值。国外群体

I 值依次为欧洲<日本<南亚<美洲<西亚<ICARDA<未知群体, 其中 ICARDA 群体与未知群体 *I* 值接近, 仅差 0.001。国外群体 *I* 值范围为 0.6336~1.3016, 极差是 0.668, 均值为 0.9837, 比全部参试群体的平均 *I* 值高 0.3573 个数值。*I* 值分析结果表明, 国内群体间的多样性指数 *I* 即遗传均匀度差异低于国外。

从 Nei's 基因杂合度分析, 观察杂合度 H_o 最小的是国内内蒙古群体, 为 0.026; 最大的是日本群体, 为 0.25; 西亚群体次之, 为 0.1252。平均为 0.0838。国内群体的 H_o 值比国外群体小。期望杂合度 H_e 最小的是云南群体, 为 0.1331; 最大的是西亚群体, 为 0.6679。平均为 0.3632。国内群体的 H_e 值比国外群体小。

不同群体的有效等位变异数和 *I* 值的变化趋势不一致。如国内群体中湖北与内蒙古、宁夏与陕西, 其有效等位变异和 *I* 值的变化趋势是相反的。同样地, 观察杂合度 H_o 和期望杂合度 H_e 的变化趋势也不表现完全一致, 但总的结果是国内群体的 Nei's 基因杂合度低于国外群体。据此, 综合各群体间的遗传参数可知, 国内小扁豆种质的遗传多样性低于国外种质。在国内群体中, 云南、新疆、内蒙古的遗传多样性较低, 山西、甘肃、陕西、宁夏的遗传多样性较高; 国外群体中, 欧洲、日本、南亚和美洲的

遗传多样性较低, 西亚、ICARDA 和未知群体的遗传多样性较高。

2.6 参试群体 UPGMA 法聚类分析

利用 Popgen 软件计算获得的遗传一致度和遗传距离(Nei's, 1978), 结合 MEGA 分析软件, 对 16 个参试群体绘制基于 UPGMA 法的树状聚类图(图 3)。从遗传距离 17.5065 处, 可将所有参试群体切割分为 2 大组群, 分别命名为组群 I 和组群 II。

组群 I 中包含所有的国内群体和欧洲群体。在遗传距离为 5.1111 处, 又可将组群 I 划分为 A、B、C、D 和 E 5 个亚群。亚群 A 包含新疆群体和宁夏群体, 亚群 B 和亚群 E 分别只有欧洲群体和湖北群体, 亚群 C 由内蒙古、青海、山西和陕西群体组成, 亚群 D 由甘肃和云南群体组成。聚类分析表明, 湖北群体与国内其他群体间的遗传关系最远, 新疆、宁夏群体相对于国内其他群体的遗传关系也较远。值得注意的是, 尽管甘肃群体(西北)和云南群体(西南)的地理来源相距遥远, 但是它们间的遗传距离很小, 都被聚在亚群 D 中。聚类结果表明除甘肃和云南群体的遗传关系与地理分布无关外, 国内其他群体的亲缘关系均与地理分布相关。

组群 II 全部由国外群体组成。西亚群体和 ICARDA 群体、未知群体的遗传关系较近, 美洲群

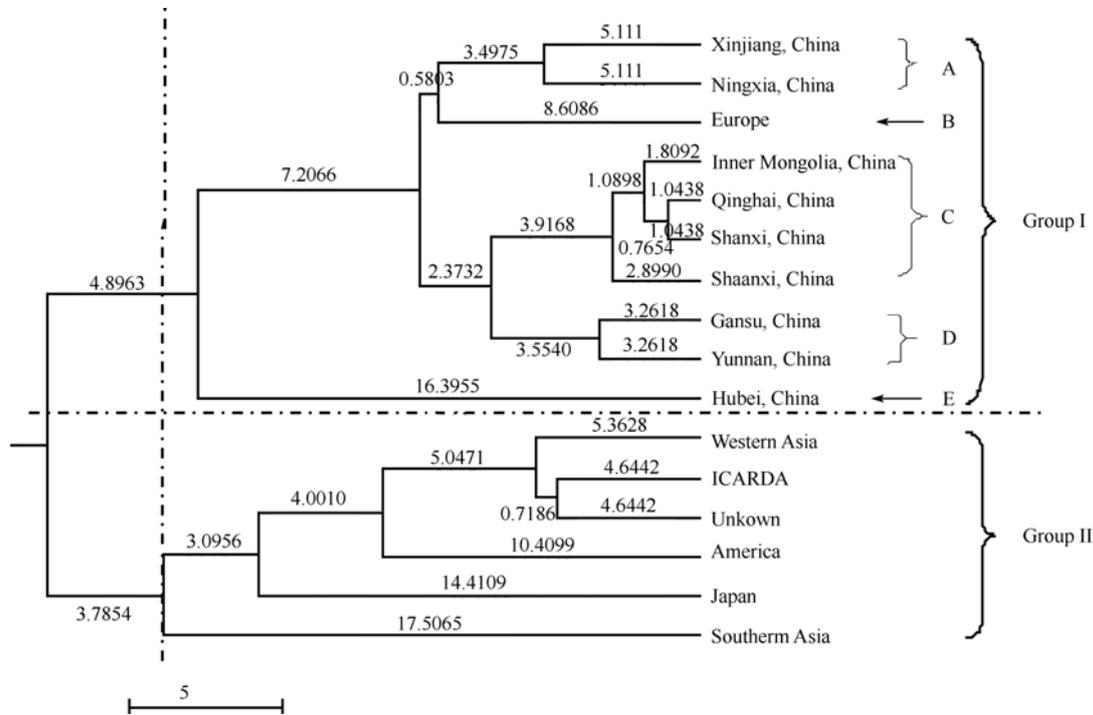


图 3 PopGen 聚类图显示 16 个群体间的关系
Fig. 3 Dendrogram of PopGen cluster showing relationships among the 16 populations

体次之, 日本群体的遗传关系比美洲群体的远, 而南亚群体在组群 II 是遗传关系最远的一个群体。

PCA 和 UPGMA 两种聚类方法的分析结果, 相互印证、吻合一致。

2.7 群体结构分组分析

440 份参试材料最佳分组应为 8 组(图 4, 表 3)。簇(Cluster) I 包含的资源最多, 主要为内蒙古、青海、山西和陕西资源; 簇(Cluster) II 主要包含西亚、ICARDA、未知群体资源; 簇(Cluster) III 主要包含美洲、ICARDA、未知群体资源; 簇(Cluster) IV 主要包含 ICARDA 资源; 簇(Cluster) V 主要包含西亚、南亚、日本和未知群体资源; 簇(Cluster) VI 主要包含新疆、宁夏资源; 簇(Cluster) VII 主要包含未知群体资源; 簇(Cluster) VIII 主要包含甘肃、湖北和云南资源。

国内、国外小扁豆种质资源的群体结构具有明显差异, 国内资源的群体结构比较单一, 而国外资源群体结构复杂, 趋向多元化。国内 9 个群体资源被划分为 3 个组群, 来自内蒙古、青海、山西和陕西 4 个群体资源被聚为一组, 说明他们具有相似的群体结构; 新疆、宁夏资源聚为一组, 表明新疆和宁夏小扁豆资源群体结构相近; 甘肃、湖北和云南资源聚为另一组, 表明他们的群体结构近似, 并且甘肃资源与湖北、云南资源的群体结构与地理无关。国外 7 个群体资源被划分为 5 个组群, 未知群体的群体结构最复杂、最多样化, 被聚到了 4 个组群中; 来源于 ICARDA 资源的群体结构也很复杂和多样, 被聚到了 3 个组群中; 西亚群体被聚到了 2 个组群中,

其中一部分资源的群体结构与南亚、日本的相近。

3 讨论

本研究用 145 对 SSR 引物筛选到 14 对多态性引物, 共检测出 87 个等位基因, 平均每个位点为 6.2143 个等位基因。检测到等位基因最多的位点是 SSR33(13 个等位变异), 其次是 psab111、SSR156 和 SSR204, 均检测到 10 个变异类型。而 Sonnante 等^[18]筛选到的 SSR 引物最多只检测到 5 个等位变异, Fikiru 等^[19]得到的多态性 ISSR 引物最多也只检测到 9 个等位变异。本文得到的 SSR 引物之所以能检测到丰富的变异类型, 在很大程度上是由于参试种质丰富、参试资源来源广泛、群体间的地理位置相距很大; 与 Sonnante、Fikiru 等人采用的 DNA 标记引物相比, 所用的 SSR 引物相对较多, 且能够覆盖更广的基因组范围。与 Nybom^[30]的研究结果一致。

分析表明, 各参试群体间表现出很高的遗传多样性差异。小扁豆起源于近东地区^[2](即地中海东部沿海及附近地区), 遗传多样性的结果验证了来源于起源地的小扁豆种质资源遗传变异丰富, 遗传多样性水平较高的理论。

本研究中小扁豆种质资源的 PCA 分析、UPGMA 法树状聚类图分析和 Structure 遗传结构分析的结果相互间完全吻合。结果显示, 国外各群体间亲缘关系相差较远, 群体内遗传背景宽广、遗传结构复杂, 特别是未知群体的群体结构最为多样化, 被聚到了 4 个簇群中; 来源于 ICARDA 的资源也被聚到了 3 个簇群中。而国内各群体间亲缘关系很近,

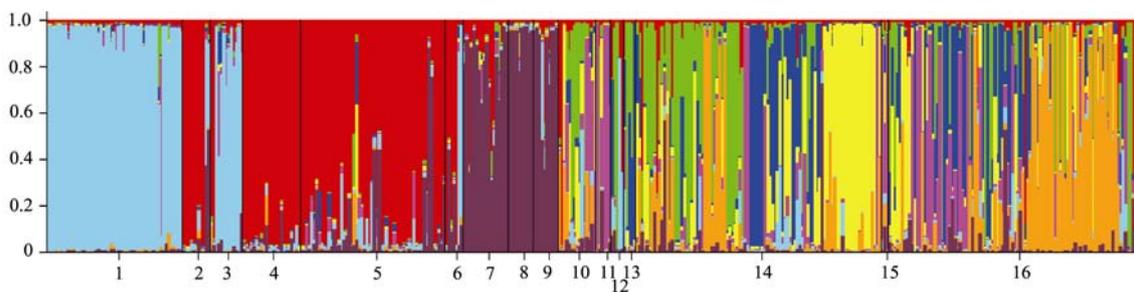


图 4 参试小扁豆种质资源群体结构分组

Fig. 4 Estimated population structure for lentil germplasm resources

图中 8 种颜色表示 8 个不同的组群, 每条彩色竖线代表一份种质, 不同颜色所占比例越大, 则该种质被划分到相应组群的可能性就越大; 1: 新疆; 2: 内蒙古; 3: 宁夏; 04: 青海; 5: 山西; 6: 陕西; 7: 甘肃; 8: 湖北; 9: 云南; 10: 西亚; 11: 南亚; 12: 欧洲; 13: 美洲; 14: ICARDA; 15: 日本; 16: 产地不明。

Each germplasm is represented by a single colour line, there are 8 population groups, the more proportion of the colour, the more possibility of the represented germplasm by the colour divided into the corresponding population; 1: Xinjiang; 2: Inner Mongolia; 3: Ningxia; 4: Qinghai; 5: Shanxi; 6: Shaanxi; 7: Gansu; 8: Hubei; 9: Yunnan; 10: Western Asia; 11: Southern Asia; 12: Europe; 13: America; 14: Japan; 16: unknown.

表 3 Structure 群体遗传结构分组统计结果
Table 3 Statistics of genetic structure for 440 lentil accessions

产地来源 Origin	簇 I Cluster I		簇 II Cluster II		簇 III Cluster III		簇 IV Cluster IV	
	频数	百分比	频数	百分比	频数	百分比	频数	百分比
	Frequency	Percentage (%)	Frequency	Percentage (%)	Frequency	Percentage (%)	Frequency	Percentage (%)
1	—	—	—	—	—	—	—	—
2	9	8.3	—	—	—	—	—	—
3	2	1.9	—	—	—	—	—	—
4	23	21.3	—	—	—	—	—	—
5	55	50.9	—	—	—	—	1	2.1
6	5	4.6	—	—	—	—	—	—
7	2	1.9	—	—	—	—	—	—
8	—	—	—	—	—	—	—	—
9	1	0.9	—	—	—	—	—	—
10	2	1.9	5	9.3	—	—	3	6.3
11	—	—	1	1.9	—	—	1	2.1
12	1	0.9	2	3.7	1	2.1	—	—
13	—	—	2	3.7	3	6.3	—	—
14	2	1.9	24	44.4	22	45.8	33	68.8
15	—	—	—	—	—	—	—	—
16	6	5.6	20	37	22	45.8	10	20.8

产地来源 Origin	簇 V Cluster V		簇 VI Cluster VI		簇 VII Cluster VII		簇 VIII Cluster VIII	
	频数	百分比	频数	百分比	频数	百分比	频数	百分比
	Frequency	Percentage (%)	Frequency	Percentage (%)	Frequency	Percentage (%)	Frequency	Percentage (%)
1	1	3.6	53	76.8	—	—	—	—
2	—	—	1	1.4	—	—	1	2.4
3	—	—	11	15.9	—	—	—	—
4	—	—	—	—	—	—	—	—
5	—	—	—	—	—	—	2	4.8
6	—	—	2	2.9	—	—	—	—
7	—	—	—	—	—	—	16	38.1
8	—	—	—	—	—	—	10	23.8
9	—	—	—	—	—	—	9	21.4
10	4	14.3	1	1.4	—	—	—	—
11	4	14.3	—	—	—	—	—	—
12	—	—	1	1.4	—	—	—	—
13	—	—	—	—	—	—	—	—
14	4	14.3	—	—	11	25.6	2	4.8
15	3	10.7	—	—	—	—	—	—
16	12	42.9	—	—	32	74.4	2	4.8

群体内遗传背景较窄、遗传结构较单一。国内共 9 个群体的资源被划分成 3 个族群，其中遗传多样性高的宁夏、甘肃群体分别与遗传多样性低的新疆、云南群体聚为一组，而且它们也具有相似的亲缘关系，说明相似的遗传结构与亲缘关系未必表现同等的遗传多样性水平。欧洲群体与新疆和宁夏群体的遗传关系最近，南亚群体(主要来自印度)与国内各群体的遗传关系相差甚远，因此“中国的小扁豆从印度引入^[1]”的说法尚存疑问。从遗传关系推断，中国的小扁豆也有从欧洲传入的可能。

4 结论

我国保存的小扁豆种质资源具有较丰富的遗传多样性，国外资源的遗传多样性普遍高于国内。参试资源从遗传结构上被划分为 8 个群。国内群体间亲缘关系比较近，遗传结构也较单一，遗传背景相对狭窄，而国外群体间则相反。“中国的小扁豆从印度引入”的说法尚存疑问，中国的小扁豆也有从欧洲传入的可能。建议对山西、甘肃和宁夏的小扁豆资源进行重点搜集和保护，在对国外资源特别是西

亚、ICARDA 和未知群体深入研究和利用的基础上, 进一步加强对国外资源的引种, 以不断丰富其遗传多样性, 拓宽我国小扁豆资源遗传背景。

References

- [1] Zheng Z-J(郑卓杰), Wang S-M(王述民), Zong X-X(宗绪晓). Food Legumes in China (中国食用豆类学). Beijing: China Agriculture Press, 1997. pp 266–266 (in Chinese)
- [2] Zohary D. The wild progenitor and place of origin of the cultivated lentil *Lens culinaris*. *Econ Bot*, 1972, 26: 326–332
- [3] Erskine W. Lessons for breeders from landraces of lentil. *Euphytica*, 1997, 93: 107–112
- [4] Frederick M, Cho S, Sarker A, McPhee K, Coyne C, Rajesh P, Ford P. Application of biotechnology in breeding lentil for resistance to biotic and abiotic stress. *Euphytica*, 2006, 147: 149–165
- [5] Yuan J(袁娟), Wu T-L(武天龙). Application of molecular marker technology in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Shanghai Jiaotong Univ (Agric Sci)* (上海交通大学学报·农业科学版), 2006, 24(6): 574–579(in Chinese with English abstract)
- [6] Sarker A, Erskine W. Recent progress in the ancient lentil. *J Agric Sci*, 2006, 144: 19–29
- [7] Hamwieh A, Udupa S M, Choumane W, Sarker A, Dreyer F, Jung C, Baum M. A genetic linkage map of *Lens* sp. based on microsatellite and AFLP markers and the localization of *Fusarium vascular* Wilt resistance. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 669–677
- [8] Eujayl I, Baum M, Powell W, Erskine W, Pehu E. A genetic linkage map of lentil (*Lens* sp.) based on RAPD and AFLP markers using recombinant inbred lines. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 83–89
- [9] Rubeena Ford R, Taylor P W J. Construction of an intraspecific linkage map of lentil (*Lens culinaris* ssp. *culinaris*). *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 910–916
- [10] Tar'an B, Buchwaldt L, Tullu A, Banniza S, Warkentin T D, Vandenberg A. Using molecular markers to pyramid genes for resistance to ascochyta blight and anthracnose in lentil (*Lens culinaris* Medik.). *Euphytica*, 2003, 134: 223–230
- [11] Tullu A, Buchwaldt L, Warkentin T, Taran B, Vandenberg A. Genetics of resistance to anthracnose and identification of AFLP and RAPD markers linked to the resistance gene in Pi 320937 germplasm of lentil (*Lens culinaris* Medikus). *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 428–434
- [12] Erskine W, Muehlbauer F J. Allozyme and morphological variability, outcrossing rate and core collection formation in lentil germplasm. *Theor Appl Genet*, 1991, 83: 119–125
- [13] Tullu A, Kusmenoglu I, McPhee K E, Muehlbauer F J. Characterization of core collection of lentil germplasm for phenology, morphology, seed and straw yields. *Genet Resour Crop Evol*, 2001, 48: 143–152
- [14] Gupta D, Sharma S K. Evaluation of wild lens taxa for agro-morphological traits, fungal diseases and moisture stress in northwestern Indian hills. *Genet Resour Crop Evol*, 2006, 53: 1233–1241
- [15] Sultana T, Ghafoor A, Ashraf M. Geographic patterns of diversity of cultivated lentil germplasm collected from Pakistan, as assessed by seed protein assays. *Acta Biol Cracov Series Bot*, 2005, 47: 77–82
- [16] Sharma S K, Dawson I K, Waugh R. Relationships among cultivated and wild lentils revealed by RAPD analysis. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 647–654
- [17] Ford R, Pang E C K, Taylor P W J. Diversity analysis and species identification in *Lens* using PCR generated markers. *Euphytica*, 1997, 96: 247–255
- [18] Sonnante G, Domenico P. Assessment of genetic variation in a collection of lentil using molecular tools. *Euphytica*, 2001, 120: 301–307
- [19] Fikiru E, Tesfaye K, Bekele E. Genetic diversity and population structure of Ethiopian lentil (*Lens culinaris* Medikus) landraces as revealed by ISSR marker. *Afr J Biotechnol*, 2007, 6: 1460–1468
- [20] Sonnante G, Domenico P. The major Italian landraces of lentil (*Lens culinaris* Medik.): Their molecular diversity and possible prigin. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54: 1023–1031
- [21] Li Y(黎裕), Jia J-Z(贾继增), Wang T-Y(王天宇). Type S of molecular markers and their development. *Lett Biotechnol (生物技术通报)*, 1999, 15(4): 19–22 (in Chinese with English abstract)
- [22] Zhang X-L(张献龙), Tang K-X(唐克轩). Plant Biotechnology (植物生物技术). Beijing: Science Press, 2004. pp 401–500(in Chinese)
- [23] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 13–15
- [24] Stewart C N Jr, Via L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. *Bio-techniques*, 1993, 14: 748–749
- [25] Durán Y, Fratini R, Garcia P, Pérez de la Vega M. An intersub-specific genetic map of *Lens*. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1265–1273
- [26] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155: 945–959
- [27] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure using multilocus genotype data: Linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003, 164: 1567–1587
- [28] Rosenberg N A, Burke T, Kari E, Feldman M W, Freidlin P J, Groenen M A M, Hillel J, Maki-Tanila A, Tixier-Boichard M, Vignal A, Wimmers K, Weigend S. Empirical evaluation of genetic clustering methods using multilocus genotypes from 20 chicken breeds. *Genetics*, 2001, 159: 699–713
- [29] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study. *Mol Ecol*, 2005, 14: 2611–2620
- [30] Nybom H. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Mol Ecol*, 2004, 13: 1143–1155