

世界栽培豌豆 (*Pisum sativum* L.) 资源群体结构与遗传多样性分析

宗绪晓, 关建平, 王海飞, 马 钰

(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: 【目的】评价国家种质库长期保存的国内、外栽培豌豆 (*Pisum sativum* L.) 资源的遗传多样性水平, 揭示其遗传多样性、等位基因和群体结构差异, 据此评估其重要程度及价值, 为中国豌豆资源研究策略和方向的正确选择、国内外资源的充分发掘利用和深入研究提供理论依据。【方法】利用 21 对豌豆多态性 SSR 引物, 对来自国外五大洲 66 个国家和中国 28 个省 (区、市) 的 1 984 份栽培豌豆进行 SSR 标记遗传多样性和群体结构分析; 采用 Structure 2.2 软件完成资源群体结构剖析、推断参试材料的合理组群数、确定每份参试材料的适当群体划入及其相关参数计算; 利用 NTSYSp2.2d 软件估算其遗传距离, 进行主成分分析 (PCA) 并绘制三维空间聚类图; 采用 Popgene V1.32 估算种质群的等位位点分布等参数, 利用 Fstat V2.9.3.2 进行种质群间遗传多样性差异显著性测验。【结果】通过对国、内外栽培豌豆资源群间 SSR 等位基因数 (NA)、有效等位基因数 (NE)、有效等位基因所占比重 (NE/NA)、等位基因丰度 (AR)、基因多样性指数 (GD)、Shannon's 信息指数 (I) 的比较, 发现除等位基因数 (NA) 外, 国内资源的其它 5 个遗传多样性指标全面高于国外资源。在 21 个 SSR 基因位点中, 国内、外资源群在 7 个位点间存在等位基因种类的差异。群体结构分析将 1 984 份世界栽培豌豆资源划分成三大组群。组群 A 包含 96.49% 的国外栽培豌豆参试资源, 可代表典型的国外栽培豌豆资源类型; 组群 B 的资源 88.18% 来源于陕西和内蒙古, 可代表中国典型的春播区栽培豌豆资源类型; 组群 C 的资源 52.05% 源于中国秋播区, 47.44% 源于中国春播区, 可代表中国秋播区和除陕西、内蒙古外的春播区栽培豌豆资源类型。组群间遗传多样性差异达到显著水平。PCA 作图分析也明确显示世界栽培豌豆资源群体中存在 3 个边界明显的资源富集区 (基因库 I、II、III), 且与三大组群的群体结构分析结果精确对应。【结论】国内资源的遗传多样性程度整体上超过国外资源, 国外资源群体内个体间的差异程度平均高于国内资源。群体结构分析检测到世界栽培豌豆资源中存在 A、B、C 共三大资源类群, 类群间的遗传多样性差异达到了显著水平, 且与 PCA 做图分析显示的 3 个边界明显的基因库间存在着精确对应关系: “类群 A” 几乎等同于 “基因库 I”, “类群 B” 几乎等同于 “基因库 II”, 而 “类群 C” 几乎等同于 “基因库 III”; 基因库 I 由国外资源富集而成, 基因库 II 由中国陕西和内蒙古资源富集而成, 基因库 III 由中国秋播区资源和陕西、内蒙古以外的春播区资源富集而成, 由此得出世界栽培豌豆由 3 个基因库构成的结论。国外栽培豌豆种质资源构成了 “基因库 I”, 国内栽培豌豆种质资源构成了 “基因库 II” 和 “基因库 III”, 表明国内、外资源均很重要, 但国内资源甚于国外。

关键词: 豌豆 (*Pisum sativum* L.); 种质资源; SSR; 遗传多样性; 群体结构; 基因库

Population Structure and Genetic Diversity of Global Pea (*Pisum sativum* L.) Germplasm Resources

ZONG Xu-xiao, GUAN Jian-ping, WANG Hai-fei, MA Yu

(Institute of Crop Sciences/The National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

收稿日期: 2009-06-02; 接受日期: 2009-08-31

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项 (nycytx-18)、农业部作物种质资源保护项目 (NB09-2130135-2-09)

作者简介: 宗绪晓, 研究员, 博士。Tel: 010-62186651; E-mail: zongxx@mail.caas.net.cn

Abstract: 【Objective】 Assessing the genetic diversity between Chinese and alien accessions of cultivated pea (*Pisum sativum* L.) sampled from National Gene Bank, analyzing their differentiation on allelic loci and population structure, the study try to evaluate the importance and value of these conserved genetic resources, to provide essential information for guidance on strategy and direction choices for future studies of pea genetic resources in China, and for the effective exploration and utilization of global pea genetic resources. **【Method】** 1 984 cultivated pea accessions from 66 countries of five continents and 28 provinces of China were employed for SSR analysis using 21 polymorphic primer pairs to detect genetic diversity and population structure. The Structure 2.2 software was used for population structure detection, definition of real population number, genotype allocation to its real population, and calculation of related parameters. Calculation of genetic distance, PCA analyses, 3-dimensional PCA graph, was conducted and drawn by NTSYSpc 2.2d statistical package. Allelic statistics were carried out by Popgene V1.32. The significance test between groups of genotypes was carried out by Fstat 2.9.3.2 statistical package. **【Result】** Based on SSR markers, the observed number of alleles (*NA*), the effective number of alleles (*NE*), the ratio of *NE/NA*, the allelic richness (*AR*), the gene diversity (*GD*) and the Shannon's information index (*I*) of pea germplasm resources from China and foreign countries were thoroughly compared. Except the observed number of alleles (*NA*), the values of other parameters on genetic diversity detected from Chinese landraces were all higher than that from foreign germplasm resources. Among the 21 tested SSR loci, the difference between Chinese and foreign germplasm collections appeared in 7 SSR loci. The population structure analysis divided all the 1 984 tested genotypes into 3 populations (Pop A, Pop B and Pop C). Pop A consisted of almost all alien accessions (96.49% genotypes of all alien accessions), referred to foreign germplasm population. Pop B consisted of most accessions from Shaanxi and Inner Mongolia (88.18% genotypes of this population), standing for typical Chinese spring sowing germplasm population. Pop C consisted of majority (52.05% genotypes of this population) from Chinese winter sowing areas, and minority (47.44% genotypes of this population) from Chinese spring sowing areas, standing for Chinese winter sowing and spring sowing (except Inner Mongolia and Shaanxi) germplasm population. There were significant differences among the three populations. 3-dimension PCA graph showed 3 concentrated domains with clear boundaries in between, each of the domain (gene pools I, II and II) approximated to Pop A, Pop B and Pop C. **【Conclusion】** The genetic diversity level of domestic Chinese accessions as a group was generally higher than that of alien group, while the level of difference among genotypes within alien group on each parameter was higher than that within Chinese accession group. Three independent populations named Pop A, Pop B and Pop C were detected by population structure analysis, with significant difference in genetic diversity among them. 3-dimension PCA graph showed 3 concentrated domains (gene pools I, II and II) with obvious boundaries in between. Gene pool I concentrated alien genotypes, Gene pool II concentrated Shaanxi and Inner Mongolian genotypes, and Gene pool III concentrated genotypes from Chinese winter sowing areas and spring sowing areas except Shaanxi and Inner Mongolia. By pairs, the three gene pools detected by PCA almost equal to the three populations identified by Structure 2.2 in genotype composition. Pop A approximated to Gene pool I, Pop B approximated to Gene pool II, and Pop C approximated to Gene pool III. Results from PCA fully supported the findings from population structure analysis, within global cultivated pea genetic resources the three gene pools can be defined. Alien genotypes constructed Gene pool I, Chinese genotypes constructed Gene pool II and Gene pool III, which revealed the importance of Chinese and alien collections and Chinese collection was superior.

Key words: pea (*Pisum sativum* L.); germplasm resources; SSR; genetic diversity; population structure; gene pool

0 引言

【研究意义】 豌豆 (*Pisum sativum* L.) 是世界第四大食用豆类作物^[1-2]。据 FAO 统计资料^[3], 2007 年全世界有 93 个国家生产干豌豆, 栽培面积 689.6 万公顷, 总产 1 012.8 万吨; 80 个国家生产青豌豆, 栽培面积 108.8 万公顷, 总产 826.5 万吨。中国干豌豆栽培面积和总产分别占全世界的 15.2% 和 13.8%, 仅次于加拿大, 居世界第二位; 青豌豆栽培面积和总产分别占全世界的 23.1% 和 30.4%, 仅次于印度, 位居世界

第二。中国现保存有 5 000 余份豌豆资源, 其中约 80% 来源于全国 28 个省区, 20% 源自世界五大洲^[3]。对于上述栽培豌豆资源遗传多样性分布特点的总体了解, 以及国内、外资源遗传多样性间的差异剖析, 对于摸清中国栽培豌豆资源家底和加快上述资源的利用步伐具有积极影响。**【前人研究进展】** 国外曾有过利用农艺性状和分子标记开展豌豆遗传多样性研究的报道。Gemetchu 等^[4]根据资源来源地纬度、降雨量、温度和土壤类型等信息, 从埃塞俄比亚生物多样性保存研究所 (IBCR) 随机抽取 148 份豌豆地方品种, 通过对花

期、成熟期、子粒灌浆期、株高、褐斑病抗性、单株节数、单株结荚节数、每节荚数、单株荚数、单荚粒数、千粒重和小区产量等 12 个农艺性状的多样性分析, 将其分成了 5 组, 显示埃塞俄比亚豌豆地方品种具有较高的遗传多样性, 但其多样性分布规律与地理来源没有明显关联。Vershinin 等^[5]利用序列特异扩增多态性 (SSAP) 鉴定由逆转录转座子产生的插入序列多态性时发现, 4 类豌豆 (*P. fulvum*、*P. elatius*、*P. abyssinicum* 和 *P. sativum*) 有明显的差别。Choudhury 等^[6]采用来源于印度的 24 个豌豆品种, 利用 60 个 RAPD 引物将高秆和矮秆品种区分开, 材料间遗传相似系数范围是 0.60—0.87。Yadav 等^[7]利用 11 个 RAPD 引物, 结合种子特征和地理来源对 15 份豌豆材料 (印度 14 份, 英国 1 份) 进行遗传多样性研究。结果表明材料间的相似系数范围是 0.263—0.793, 在分子水平上, 材料间具有较高的遗传多样性。利用 NTSYSpc 2.0 软件进行聚类分析, 将 15 份材料分成了 A 和 B 两组。然而 SSR 标记在豌豆遗传多样性研究中得到了更多的利用。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 标记引物和 RAMS 标记, 对来自澳大利亚育种项目的 15 份豌豆栽培资源和 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 等^[10]曾利用 RAPD、SSR 和 ISSR 标记, 对 65 份豌豆栽培资源和 21 份野生资源进行遗传多样性分析, UPGMA 聚类及主成分分析 (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]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。宗绪晓等^[12-14]曾利用 SSR 标记, 分别对 731 份国外栽培资源, 1 221 份国内栽培豌豆资源和 103 份野生资源进行过遗传多样性分析, 发现国外栽培资源群体不存在明显的基因库分化, 国内栽培豌豆资源群体分化明显, 野生资源明显分化为 4 个基因库。鉴于 SSR 标记高的多态性、双显性、可重复性和高信息量, 已被广泛应用于豌豆遗传多样性研究和资源类型的划分。【本研究切入点】过去的研究肯定了 SSR 分子标记在揭示豌豆属 (*Pisum*) 生物系统进化^[14-16]

和在遗传多样性研究^[8,17-21]中的作用, 较充分地揭示了豌豆属下分类单位的栽培种和野生种资源群体遗传多样性^[14,22], 但缺乏对国内、外栽培豌豆资源大规模样本间的遗传多样性比较和世界栽培豌豆资源群体结构分析。而不同来源的大规模资源样本间的对比研究, 对于评价和判断中国国家种质库长期保存豌豆栽培资源的重要程度及价值至关重要。【拟解决的关键问题】本研究拟采用 SSR 标记, 对来自国外五大洲 66 个国家和中国 28 个省 (区、市) 的 1 984 份栽培豌豆 (*Pisum sativum* L.) 资源进行遗传多样性分析, 以揭示国内外栽培豌豆资源间遗传多样性和群体结构差异, 据此评价和判断国家种质库长期保存豌豆栽培资源的重要程度及价值, 摸清家底, 为中国豌豆资源研究策略和方向的正确选择、国内外资源的充分发掘利用和深入研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

国外栽培豌豆资源 740 份, 来自五大洲 66 个国家; 中国栽培豌豆资源 1 244 份, 来自春、秋播区的 28 个省 (区、市)。上述参试资源按比例取样自国家种质资源中期库, 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 对每份参试材料, 从 20 个随机单株中取 200—300 mg 叶样, 在液氮中冻干研磨成细粉。参照 Dellaporta 等^[23]和 Doyle 等^[24]创立的 CTAB 法, 作适当修改后, 提取 DNA。对提取到的基因组总 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 作对照, 稀释标定到 $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 放 -20°C 冰箱备用。

1.2.2 SSR 引物 21 对 SSR 引物^[22] (表 1) 由 Invitrogen 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 总体积为 $10 \mu\text{L}$, 含 $1 \times \text{PCR buffer}$, $2.5 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1} \text{ MgCl}_2$, 4 种 dNTP 各 $0.168 \text{ mmol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, $0.5 \text{ U Taq DNA polymerase}$ 酶, Primer F 和 Primer R 引物各 $0.4 \mu\text{mol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 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°C , 先在 94°C 下预变性 3 min; 再进行 38 个循环的变性 (94°C 30 s)、退火 (温度随引物而不同 30 s)、延伸 (72°C 120 s) 步骤; 然后在 72°C 下继续延伸 5.5 min; 最后慢慢冷却至 10°C 。

表 1 21 对豌豆 SSR 核心引物及其相关信息

Table 1 The sequences and their relevant information of 21 STMS primer pairs selected for SSR analysis

代号 Code	名称 Name	碱基数 BP	分子量 MW	碱基序列(5'-3') Sequence	所在的染色体 Located chromosome
PB14	PB14F	25	7678.8	GAGTGAGCTTTTTAGCTTGCAGCCT	LG-VII
	PB14R	22	6759.3	TGCTTGAGAACAGTACTCGCA	
PSAA18	PSAA18F	22	6721.3	CTGTAGACCAAGCCAAAAGAT	LG-II, LG-V
	PSAA18R	22	6823.3	TGAGACACTTTTGACAAGGAGG	
PSAA175	PSAA175F	22	6761.4	TTGAAGGAACACAATCAGCGAC	LG-III, LG-V
	PSAA175R	22	6632.3	TGCGCACAAACTACCATAATC	
PSAC58	PSAC58F	20	6091.9	TCCGCAATTTGGTAACACTG	LG-V
	PSAC58R	22	6682.2	CGTCCATTTCTTTATGCTGAG	
PSAC75	PSAC75F	23	7040.5	CGCTCACCAAATGTAGATGATAA	LG-I
	PSAC75R	24	7392.8	TCATGCATCAATGAAAGTGATAAA	
PSAA219	PSAA219F	23	7018.4	ATTTGTGCAATTGCAATTCATT	LG-IV
	PSAA219R	20	6060.9	CGAAAACGCTTTGCATCCTA	
PSAD83	PSAD83F	22	6814.3	CACATGAGCGTGTGTATGGTAA	LG-II
	PSAD83R	22	6930.5	GGGATAAGAAGAGGGAGCAAAT	
PSAD270	PSAD270F	22	6756.2	CTCATCTGATGCGTTGGATTAG	LG-III
	PSAD270R	22	6848.2	AGGTGGATTTGTTGTTTGTGTTG	
PSAA456	PSAA456F	22	6888.4	TGTAGAAGCATAAGAGCGGGTG	LG-VII
	PSAA456R	22	6731.2	TGCAACGCTCTTGTGATGATT	
PSAB23	PSAB23F	22	6605.2	TCAGCCTTTATCCTCCGAACCTA	LG-V
	PSAB23R	22	6743.3	GAACCTTGTGCAGAAGCATT	
PSAB47	PSAB47F	23	6920.5	TCCACAATACCATCTAAATGCCA	LG-I, LG-V
	PSAB47R	26	7956.0	AATTTGTTCAAGTTGAAATTCGTTTC	
PSAA497	PSAA497F	26	7951.0	TTGTGACTGATTTAGAAAGTTCCAC	LG-V
	PSAA497R	23	7050.4	TTGATGAGTTGCAATTCGTTTC	
PSAD280	PSAD280F	25	7661.8	TGGTGCTCGTGATTAATTCACATA	LG-V
	PSAD280R	25	7580.9	ACTAAACAACCAACTGCCAAAACCTG	
PSAB72	PSAB72F	26	7855.0	ATCTCATGTTCAACTTGCAACCTTTA	LG-II
	PSAB72R	23	7006.5	TTCAAAAACACGCAAGTTTCTGA	
PSAB109	PSAB109F	25	7711.9	GAACCTTGTGTAGAAGCATTGTG	LG-II
	PSAB109R	27	8305.2	GAGCTACTGTGAGTCTGATGCCATTAT	
PSAB141	PSAB141F	23	6887.4	ATCCAATACTCCACCAATGTT	LG-III
	PSAB141R	26	7871.9	AGACTTAGGCTTCCCTTCTACGACTT	
PSAB161	PSAB161F	26	8000.0	CTCAAGTGAAGACTTGGAATTCGTT	未知 Unknown
	PSAB161R	22	7991.0	TTTGGTCTTCTCAAGTGATAAGATG	
AD100	AD100F	21	6353.1	TACACCCAAGACGACAAGCCT	未知 Unknown
	AD100R	21	6379.0	GGAGCTTCCGCTTGATTCTCT	
AD134	AD134F	27	8174.1	TTTATTTTCCATATATTACAGACCCG	LG-II, LG-III, LG-VII
	AD134R	25	7560.8	ACACCTTTATCTCCGAAGACTTAG	
AA303	AA303F	19	5965.8	GGGTGAAGGAAAATCGTGA	未知 Unknown
	AA303R	21	6380.1	GCATCCATAAAAATTGGTTCT	
AA315	AA315F	21	6623.2	AGTGGGAAGTAAAAGGTGTAG	LG-IV
	AA315R	22	6705.2	TTTCACTAGATGATATTCGTT	

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 μ L利用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染检测^[25]。

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)在各参试材料中有或无。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原始数据格式要求确定的^[26-29]。在Popgene 1.32软件包^[24]中完成群体间和群体内某一位点的等位变异数(NA)及有效等位基因数(NE)^[30], Shannon's 信息指数(I)^[31-32]统计; 在Fstat 2.9.3.2软件包^[26]中完成Nei's 基因多样性(GD)^[33], 等位基因丰度(AR)和资源群体遗传多样性差异显著性比较; 在NTSYS-pc 2.20d软件包^[23]中完成参试资源间欧氏距离计算, 主成分分析(PCA)及三维作图^[33-34]; 在Structure 2.2软件包^[29,35]中完成资源群体结构剖析、每份参试材料的适当群体划入及其相关参数计算, Structure软件给出Ln P(D)值用于推断参试材料的合理组群数^[36]。

2 结果

2.1 国内、外栽培豌豆资源群间基因组DNA多态性差异

21对SSR引物在1244份国内资源和740份国外资源中共扩增出113条多态性带(等位变异), 每对引物(位点)平均扩增出5.38个等位变异(NA), 其中有效等位变异数(NE)平均3.50个, 有效等位变异所占比重(NE/NA)为64.4%, 等位基因丰度(AR)平均为5.26, 基因多样性指数(GD)平均为0.69, Shannon's 信息指数(I)平均为1.34(表2)。其中国内资源扩增出104个等位变异(NA)低于国外资源的109个, 在PB14、PSAA18、PSAA175、PSAD83和AD134共5个位点上国内资源等位变异数(NA)少于国外资源, 仅在PSAC75和AA303共2个位点上国内资源等位变异数(NA)多于国外资源, 在其它14个位点上不存在差异; 平均有效等位基因数(NE), 国内资源(3.11)明显高于国外资源(2.96); 有效等位基因所占比重(NE/NA), 国内资源(0.646)明显高于国外资源(0.560); 平均等位基因丰度(AR), 国内资源(5.15)明显高于国外资源(4.89); 平均基因多样性(GD), 国内资源(0.66)明显高于国外资源(0.59); Shannon's 信息指数(I)平均, 国内资

源(1.23)明显高于国外资源(1.16)。

国内外资源群在7个SSR位点间存在等位变异种类的差异。除等位变异数外, 国内资源的其它5个遗传多样性指标均高于国外资源, 同时国内资源5个遗传多样性指标的标准差均低于国外资源(表2)。说明国内资源的遗传多样性程度整体上超过国外资源, 但是国外资源群体内个体间的差异程度平均高于国内资源群体内个体间的差异。

2.2 世界栽培豌豆资源群体结构及特点

采用SSR标记数据, 利用Structure2.2软件, 选择混合模型和等位变异发生频率相关模型, 对1984份栽培豌豆参试资源进行10次重复1到15组群($K=1,2,3, \dots, 15$)的划分结果测试, 将测试过程中软件给出的“Ln P(D)”值平均数, 绘制成散点曲线图(图1), 曲线先陡后缓, $K=3$ 时散点曲线出现第一个拐点(图中以*表示)。根据Evanno等^[36]描述的方法推断出1984份世界栽培豌豆参试资源中真实存在3大组群(表3), 组群A(Pop A)包含798份资源, 组群B(Pop B)包含406份资源, 组群C(Pop C)包含780份资源。

三大组群的资源构成见表3。组群A包含96.49%的国外栽培豌豆参试资源, 代表典型的国外栽培豌豆资源类型。组群B与组群C各包含30.87%和62.38%的国内栽培豌豆参试资源; 组群B的资源几乎全部由中国春播区资源构成(406份中的371份), 而其中的88.18%来源于陕西和内蒙古; 组群C的资源, 52.05%源于中国秋播区, 47.44%源于中国春播区。因此可以认为, 组群B代表典型的国内春播区栽培豌豆资源类型; 组群C代表中国秋播区和除陕西、内蒙古外的春播区栽培豌豆资源类型。

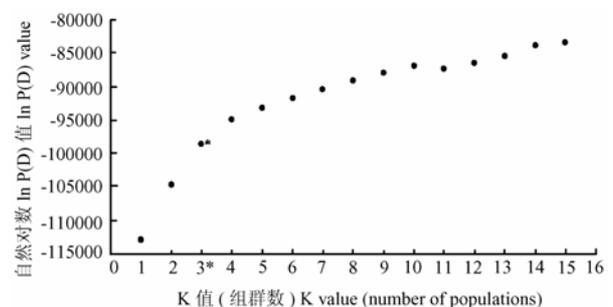


图1 利用作图法推断参试资源的合理组群数划分

Fig. 1 Graphical method allowing detection of the true number of populations

表 2 21 对 SSR 引物在国内外栽培豌豆资源中扩增的等位变异数、有效变异数、等位基因丰度、基因多样性与 Shannon's 信息指数

Table 2 The polymorphic indices in domestic and alien collections of pea based on SSR amplified products

SSR 位点 SSR primer pair	等位变异数(<i>NA</i>)			有效等位变异数(<i>NE</i>)			有效等位变异所占比重			等位基因丰度(<i>AR</i>)			基因多样性(<i>GD</i>)			Shannon's 信息指数(<i>I</i>)		
	Observed number of alleles			Effective number of alleles			Ratio of <i>NE/NA</i>			Allelic richness			Gene diversity			Shannon's information index		
	国内 China	国外 Overseas	整体 All	国内 China	国外 Overseas	整体 All	国内 China	国外 Overseas	整体 All	国内 China	国外 Overseas	整体 All	国内 China	国外 Overseas	整体 All	国内 China	国外 Overseas	整体 All
PB14	3	6	6	2.98	3.03	3.21	0.993	0.505	0.535	3.00	5.99	5.60	0.67	0.67	0.69	1.10	1.28	1.27
PSAA18	5	7	7	3.22	5.59	4.58	0.644	0.799	0.654	5.00	7.00	7.00	0.69	0.82	0.78	1.39	1.80	1.69
PSAA175	5	6	6	3.23	1.93	3.12	0.646	0.322	0.520	5.00	5.90	5.52	0.69	0.48	0.68	1.32	0.97	1.30
PSAC58	8	8	8	4.13	4.60	5.05	0.516	0.575	0.631	7.83	7.77	7.99	0.76	0.79	0.80	1.58	1.66	1.75
PSAC75	8	6	8	4.80	4.20	5.46	0.600	0.700	0.683	7.99	6.00	7.98	0.79	0.76	0.82	1.72	1.56	1.79
PSAA219	4	4	4	2.79	2.53	3.13	0.698	0.633	0.783	4.00	4.00	4.00	0.64	0.61	0.68	1.17	1.11	1.24
PSAD83	4	5	5	2.94	2.85	3.47	0.735	0.570	0.694	4.00	5.00	4.94	0.66	0.65	0.71	1.20	1.21	1.31
PSAD270	8	8	8	4.29	5.50	4.90	0.536	0.688	0.613	7.83	7.97	7.86	0.77	0.82	0.80	1.61	1.79	1.72
PSAA456	4	4	4	2.26	1.41	1.96	0.565	0.353	0.490	4.00	4.00	4.00	0.56	0.29	0.49	0.99	0.59	0.89
PSAB23	5	5	5	4.11	3.24	4.05	0.822	0.648	0.810	5.00	4.99	5.00	0.76	0.69	0.75	1.47	1.26	1.47
PSAB47	5	5	5	2.49	2.59	4.08	0.498	0.518	0.816	5.00	5.00	5.00	0.60	0.62	0.76	1.13	1.13	1.49
PSAA497	4	4	4	3.14	1.38	3.50	0.785	0.345	0.875	4.00	4.00	4.00	0.68	0.28	0.72	1.25	0.56	1.30
PSAD280	6	6	6	3.89	3.47	3.97	0.648	0.578	0.662	5.50	5.93	5.95	0.74	0.71	0.75	1.47	1.37	1.51
PSAB72	4	5	5	2.90	3.62	3.42	0.725	0.724	0.684	4.00	5.00	4.88	0.66	0.73	0.71	1.15	1.38	1.30
PSAB109	5	5	5	3.11	3.59	3.49	0.622	0.718	0.698	5.00	5.00	5.00	0.68	0.72	0.71	1.29	1.37	1.37
PSAB141	4	4	4	1.78	3.28	2.22	0.445	0.820	0.555	3.60	4.00	4.00	0.44	0.70	0.55	0.71	1.27	1.01
PSAB161	4	4	4	3.22	2.36	3.04	0.805	0.590	0.760	4.00	4.00	4.00	0.69	0.58	0.67	1.25	1.06	1.24
AD100	3	3	3	2.14	1.13	2.78	0.713	0.377	0.927	3.00	3.00	3.00	0.53	0.11	0.64	0.84	0.26	1.06
AD134	5	6	6	3.22	1.78	3.43	0.644	0.297	0.572	5.00	5.67	5.31	0.69	0.44	0.71	1.28	0.91	1.35
AA303	6	4	6	2.50	1.54	2.23	0.417	0.385	0.372	5.87	4.00	5.49	0.60	0.35	0.55	1.09	0.68	1.02
AA315	4	4	4	2.05	2.47	2.43	0.513	0.618	0.608	4.00	4.00	4.00	0.51	0.60	0.59	0.87	1.08	1.02
合计 Total	104	109	113	65.21	62.08	73.53												
平均 Mean	4.95	5.19	5.38	3.11	2.96	3.50	0.646	0.560	0.664	5.15	4.89	5.26	0.66	0.59	0.69	1.23	1.16	1.34
标准差 St. Dev.	1.50	1.36	1.47	0.79	1.28	0.95				1.05	1.07	1.08	0.07	0.15	0.07	0.26	0.40	0.26

表 3 Structure 分析推断出的三大组群资源构成

Table 3 Components and average distance of 3 structure populations

组群划分 Structure population	组群内遗传距离 Average distance within population	资源份数 Accession number	资源比例 Percentage (%)	资源来源(份数) Origins of accessions (number of accessions)
组群 A Pop A	0.5925	798		
国外资源 Accessions from outside China		714	96.49	非洲 Africa(56): 布隆迪 Burundi(1), 埃及 Egypt(1), 埃塞俄比亚 Ethiopia(41), 肯尼亚 Kenya(1), 利比亚 Libya(1), 马达加斯加 Madagascar(1), 摩洛哥 Morocco(3), 卢旺达 Rwanda(1), 苏丹 Sudan(1), 坦桑尼亚 Tanzania(1), 突尼斯 Tunisia(1), 乌干达 Uganda(1), 扎伊尔 Zaire(1), 赞比亚 Zambia(1) 美洲 America(152): 玻利维亚 Bolivia(1), 加拿大 Canada(8), 智利 Chile(4), 哥伦比亚 Colombia(1), 墨西哥 Mexico(1), 秘鲁 Peru(1), 美国 United States(136) 亚洲 Asia(141): 阿富汗 Afghanistan(8), 亚美尼亚 Armenia(2), 格鲁吉亚 Georgia(9), 国际干旱地区农业研究中心 ICARDA(8), 印度 India(17), 伊朗 Iran(2), 以色列 Israel(2), 日本 Japan(5), 哈萨克斯坦 Kazakhstan(7), 吉尔吉斯斯坦 Kyrgyzstan(3), 马来西亚 Malaysia(1), 蒙古 Mongolia(1), 缅甸 Myanmar(1), 尼泊尔 Nepal(28), 巴基斯坦 Palestine(7), 巴勒斯坦 Palestine(1), 菲律宾 Philippines(1), 叙利亚 Syria(7), 塔吉克斯坦 Tajikistan(3), 土耳其 Turkey(21), 乌兹别克斯坦 Uzbekistan(7) 欧洲 Europe(212): 阿尔巴尼亚 Albania(2), 奥地利 Austria(1), 白俄罗斯 Belarus(1), 保加利亚 Bulgaria(14), 捷克斯洛伐克 Czechoslovakia(4), 丹麦 Denmark(2), 爱沙尼亚 Estonia(1), 法国 France(12), 德国 Germany(47), 希腊 Greece(6), 匈牙利 Hungary(4), 冰岛 Iceland(1), 意大利 Italy(2), 荷兰 Netherlands(5), 波兰 Poland(12), 葡萄牙 Portugal(2), 罗马尼亚 Romania(7), 俄罗斯 Russian Federation(20), 西班牙 Spain(27), 瑞典 Sweden(5), 乌克兰 Ukraine(3), 英国 United Kingdom(30), 南斯拉夫 Yugoslavia(4) 大洋洲 Oceania(153): 澳大利亚 Australia(146), 新西兰 New Zealand(7)
中国资源 Accessions from China		84	6.75	春播区 Spring sowing area(53): 北京 Beijing(7), 甘肃 Gansu(6), 河北 Hebei(2), 内蒙古 Inner Mongolia(10), 辽宁 Liaoning(2), 宁夏 Ningxia(2), 青海 Qinghai(16), 陕西 Shaanxi(3), 西藏 Tibet(4), 新疆 Xinjiang(1) 秋播区 Winter sowing area(31): 安徽 Anhui(2), 重庆 Chongqing(1), 贵州 Guizhou(1), 河南 Henan(2), 湖北 Hubei(3), 上海 Shanghai(2), 四川 Sichuan(11), 台湾 Taiwan(3), 云南 Yunnan(6)
组群 B Pop B	0.5442	406		
国外资源 Accessions from outside China		22	2.97	非洲 Africa(1): 埃塞俄比亚 Ethiopia(1) 美洲 America(5): 美国 United States (5) 亚洲 Asia(3): 日本 Japan(1), 尼泊尔 Nepal(1), 叙利亚 Syria(1) 欧洲 Europe(11): 保加利亚 Bulgaria(3), 法国 France(1), 德国 Germany(1), 匈牙利 Hungary(1), 俄罗斯 Russian Federation(1), 西班牙 Spain(2), 瑞典 Sweden(1), 英国 United Kingdom(1) 大洋洲 Oceania(2): 澳大利亚 Australia(2)
中国资源 Accessions from China		384	30.87	春播区 Spring sowing area(371): 甘肃 Gansu(3), 内蒙古 Inner Mongolia(186), 青海 Qinghai(5), 陕西 Sha'anxi(172), 西藏 Tibet(2), 新疆 Xinjiang(3) 秋播区 Winter sowing area(13): 安徽 Anhui(1), 广东 Guangdong(1), 贵州 Guizhou(1), 河南 Henan(7), 江西 Jiangxi(1), 四川 Sichuan(2)
组群 C Pop C	0.6222	780		
国外资源 Accessions from outside China		4	0.54	美洲 America(1): 美国 United States(1) 亚洲 Asia(1): 土耳其 Turkey(1) 欧洲 Europe(2): 德国 Germany(1), 西班牙 Spain(1)
中国资源 Accessions from China		776	62.38	春播区 Spring sowing area(370): 北京 Beijing(8), 甘肃 Gansu(24), 黑龙江 Heilongjiang(1), 内蒙古 Inner Mongolia(67), 辽宁 Liaoning(5), 宁夏 Ningxia(1), 青海 Qinghai(168), 山西 Shanxi(19), 陕西 Sha'anxi(34), 西藏 Tibet(39), 新疆 Xinjiang(4) 秋播区 Winter sowing area(406): 安徽 Anhui(32), 重庆 Chongqing(1), 福建 Fujian(1), 广东 Guangdong(6), 广西 Guangxi(14), 贵州 Guizhou(35), 河南 Henan (40), 湖北 Hubei(43), 湖南 Hunan(6), 江苏 Jiangsu(2), 江西 Jiangxi(1), 上海 Shanghai(10), 四川 Sichuan(164), 台湾 Taiwan(1), 云南 Yunnan(49), 浙江 Zhejiang(1)

代表中国秋播区的组群 C 内资源间的平均距离(杂合性期望值, H_e)最大(0.6222), 明显高于组群 A (0.5925) 和组群 B (0.5442) 内资源间的 H_e 值, 表明国内秋播资源基因型间亲缘关系远于国外资源基因型间以及国内春播资源基因型间的亲缘关系, 而国外资源基因型间亲缘关系远于国内春播资源基因型间的亲缘关系。利用 Fstat 2.9.3.2 软件进行的多重比较测验结果表明, 组群 A 与 B、组群 A 与 C、组群 B 与 C, 成对组群间的遗传多样性差异均达到了显著水平(5% 概率)。

同时, Structure 2.2 软件给出的基于等位基因频率的组群间开度值(allele frequency divergence)即净核苷酸距离(net nucleotide distance), 组群 A 与组群 B 间为 0.1003, 组群 A 与组群 C 间为 0.1075, 组群 B 与组群 C 间为 0.1244。说明国外栽培豌豆组群与国内春播区栽培豌豆资源组群间距离最近, 而与国内秋播区栽培豌豆资源组群间距离较近; 国内春播区栽培豌豆

资源组群与国内秋播区栽培豌豆资源组群间的距离最远。

受群体结构检测结果启示, 利用 Structure 2.2 软件, 每份资源以竖直细线条表示, 将 1 984 份参试资源依国外资源、中国春播区资源和国内秋播区资源顺序排队; 红(类群 A)、绿(类群 B)、蓝(类群 C)三色分别代表类群趋向, 每份资源竖直细线条上 3 种色条中最长色条的颜色决定了该份资源所属类群(图 2)。图中显示, 红色线条(类群 A)几乎全部见于国外资源; 国内春播区资源中绿色线条(类群 B)与蓝色线条(类群 C)几乎各占一半, 但以绿色线条偏多; 而国内秋播区资源中蓝色线条(类群 C)占了绝对优势。图中信息表明, 国内、外资源间分界十分明显, 属于绝然不同的组群, 组群划分几乎取决于地理来源; 国内资源不以春秋播区不同形成绝然不同的组群, 而是以内蒙古资源和陕西资源(绿色线条)为主的春播区资源形成一个类群(类群 B), 其它所有省份资源

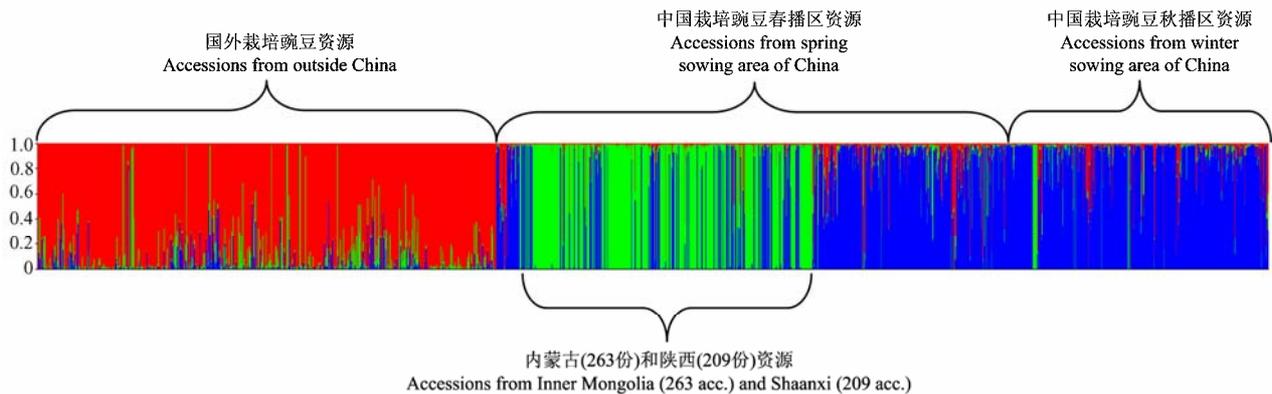


图 2 Structure 2.2 显示不同地理来源资源的类群归属

Fig. 2 Population distribution of genotypes from different geographical origins revealed by Structure 2.2 software

(红色块) 形成另一个族群。

2.3 世界栽培豌豆资源的基因库分化

将国、内外栽培豌豆资源作为一个混合群体进行主成分分析(PCA), 第 1、2、3 三个主成分的累积贡献率为 33.0995%。利用每份参试材料的该 3 个主成分数据绘制成三维 PCA 聚类图(图 3)。该三维 PCA 聚类图显示, 国内、外栽培豌豆资源均分化成 3 个富集区, 之间存在少量相互渗透, 应属于 3 个明显不同的基因库(图 3)。基因库 I 由国外资源富集而成, 基因库 II 由中国春播区资源的一部分(陕西和内蒙古

资源)富集而成, 基因库 III 由中国秋播区资源和陕西、内蒙古以外的春播区资源富集而成。

仔细分析 PCA 聚类检测到 3 个基因库(图 3)的资源构成, 并与 Structure 2.2 软件剖析检测到的 3 个类群的资源构成(表 2、图 2)对比发现: “类群 A”几乎等同于“基因库 I”, “类群 B”几乎等同于“基因库 II”, 而“类群 C”几乎等同于“基因库 III”。PCA 研究结论完全支持群体结构剖析结果, 可以肯定世界栽培豌豆资源已经分化成了 3 个基因库。

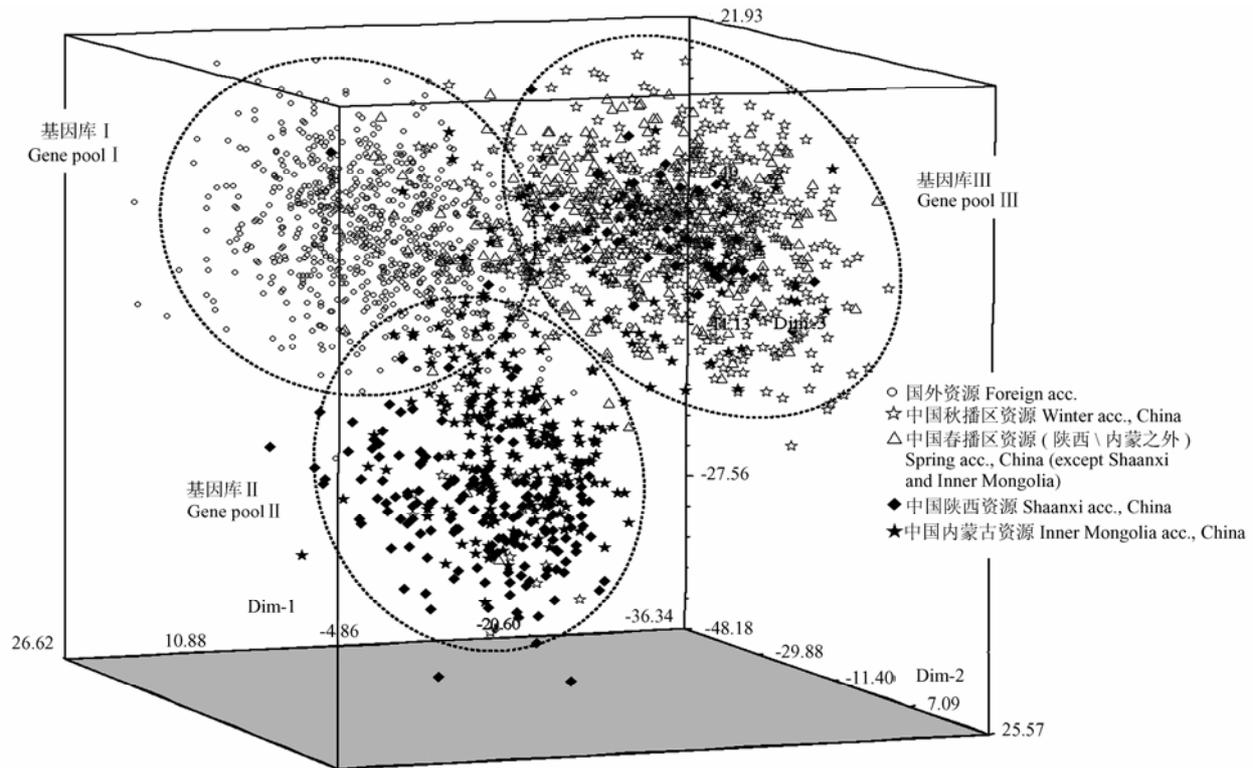


图3 基于国内外1 984份栽培豌豆资源间欧氏距离绘制的三维PCA图

Fig. 3 3D-PCA graph of 1 984 global pea collections using Euclid distance based on SSR analysis

3 讨论

通过对国内外栽培豌豆资源群间SSR有效等位变异数(NE)、有效等位变异所占比重(NE/NA)、等位基因丰度(AR)、基因多样性指数(GD)、Shannon's信息指数(I)的比较,发现国内栽培豌豆种质资源的遗传多样性指标全面高于国外核心种质。国内、外资源群在7个SSR位点间存在等位变异种类的差异。上述结论虽有悖于世界五大洲来源的种质资源多样性应大于国内资源的通常推理,却验证了Zong等^[22]关于豌豆属下中国资源遗传多样性总体高于国外的研究结论。有2 000多年^[1-2]栽培历史的中国传统地方豌豆资源多分布于山高沟深的边远山区,种植地间气候生态、地理环境千差万别且长期处于严格的相互隔离状态;在严格隔离条件下经过了漫长的自然和人工选择过程,造成各自独立进化,应该是造成上述结果的原因。在中国地方资源中,特别是西北干旱省份的山区发现大量极小粒的红花栽培豌豆类型(百粒重仅10 g左右),是国外资源中没有的,佐证了上述推断。而除中国之外的五大洲豌豆主产国,特别是欧、美、前苏

联国家间,一个世纪以前就已经在进行豌豆资源相互引进、筛选和育种利用,已经造成了资源同质化的趋势,是国外豌豆栽培资源遗传多样性趋同化的直接原因。

群体遗传结构和PCA分析均明确表明,国内外资源形成了3个差异显著的基因库。组群A(基因库I)包含96.49%的国外栽培豌豆参试资源,组群B(基因库II)的资源88.18%来源于陕西和内蒙古,组群C(基因库III)的资源52.05%源于中国秋播区、47.44%源于中国春播区,基因库的地理相关性十分明显,验证和丰富了Zong等^[22]关于豌豆属下国内、外种质资源属于不同基因库的结论。栽培豌豆在世界其它地方也形成了相对独特的基因库^[22,37]。在小麦^[38]、蚕豆^[39]等其它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,可能是地理隔离引起生殖隔离造成的。在公认起源地之外,中国栽培豌豆于千差万别的栽培模式、气候生态、地理环境构成的自然和人工选择压力下经历了漫长的独立驯化过程,甚或经历了与野生资源的基因渗透,进而分化成相对独立的基因库^[12,22],应当是上述3个基因

库分化结论的合理解释。如果上述解释成立, 相关的直接证据应能在组群 B 中的陕西和内蒙古资源分布区找到可能存在的豌豆野生类型资源, 这为中国豌豆珍稀资源深入细致的收集调查工作指明了方向。

完全基于 SSR 分子标记探测结果的本项研究, 显示的国、内外资源差异和揭示的 3 个基因库, 表明中国国家种质库长期保存的豌豆栽培资源极其重要, 其重要程度甚至超过了包括起源地在内的世界其它地区豌豆栽培资源的总和。该结论应能得到田间形态性状、农艺性状、抗性和品质性状鉴定数据的规律性差异验证, 但需要工作量更大的田间表形性状数据采集、汇总和统计分析。因此, 随后针对本论文近 2 000 份参试资源的田间形态性状、农艺性状的精准鉴定数据, 以及抗性和品质性状的详细鉴定数据, 都将有利于对本文结论的理解、验证、补充和完善。而且, SSR 标记结果与表形性状的科学对接, 可切实有效地应用于豌豆科研、育种和生产实践。

4 结论

除等位基因数 (NA) 外, 国内栽培豌豆资源的有效等位基因数 (NE)、有效等位基因所占比重 (NE/NA)、等位基因丰度 (AR)、基因多样性指数 (GD) 和 Shannon's 信息指数 (I) 等 5 个遗传多样性指标全面高于国外资源, 同时国内资源 5 个指标的标准差均低于国外资源。表明国内资源的遗传多样性程度整体上超过国外资源, 但是国外资源群体内个体间的差异程度平均高于国内资源群体内个体间的差异。此外, 国内、外资源群在 7 个 SSR 位点间存在等位变异种类的差异。

群体结构分析检测到 1 984 份世界栽培豌豆资源中存在三大组群。组群 A 包含 96.49% 的国外栽培豌豆参试资源, 可代表典型的国外栽培豌豆资源类型; 组群 B 的资源 88.18% 来源于陕西和内蒙古, 可代表中国典型的春播区栽培豌豆资源类型; 组群 C 的资源 52.05% 源于中国秋播区, 47.44% 源于中国春播区, 可代表中国秋播区和除陕西、内蒙古外的春播区栽培豌豆资源类型。组群 C 内资源间的平均距离 (0.6222) 明显高于组群 A (0.5925) 和组群 B (0.5442) 内资源间的平均距离, 表明国内秋播资源基因型间亲缘关系远于国外资源基因型间以及国内春播资源基因型间的亲缘关系, 而国外资源基因型间亲缘关系远于国内春播资源基因型间的亲缘关系。多重比较测验结果表明, 组群 A、B、C 资源间的群体遗传多样性差异达到了

显著水平。

三维 PCA 作图分析明确显示世界栽培豌豆资源群体中存在 3 个边界明显的资源富集区, 应属于 3 个明显不同的基因库, 基因库 I 由国外资源富集而成, 基因库 II 由中国陕西和内蒙古资源 (春播区的一部分资源) 富集而成, 基因库 III 由中国秋播区资源和陕西、内蒙古以外的春播区资源富集而成。

PCA 聚类检测到 3 个基因库与 Structure 2.2 软件剖析检测到的 3 个类群的资源构成存在精确对等关系: “类群 A” 几乎等同于 “基因库 I”, “类群 B” 几乎等同于 “基因库 II”, 而 “类群 C” 几乎等同于 “基因库 III”。PCA 研究结论完全支持群体结构剖析结果, 可以肯定世界栽培豌豆资源已经分化成了 3 个基因库。国外栽培豌豆种质资源构成了 “基因库 I”, 国内栽培豌豆种质资源构成了 “基因库 II” 和 “基因库 III”, 表明国内、外资源均很重要, 但国内资源甚于国外。

References

- [1] 郑卓杰, 王述民, 宗绪晓. 中国食用豆类学. 北京: 中国农业出版社, 1997: 93-140.
Zheng Z J, Wang S M, Zong X X. *Food Legume Crops in China*. Beijing: China Agriculture Press, 1997: 93-140. (in Chinese)
- [2] 宗绪晓, 王志刚, 关建平. 豌豆种质资源描述规范和数据标准. 北京: 中国农业出版社, 2005: 1-2.
Zong X X, Wang Z G, Guan J P. *Descriptors and Data Standard for Pea (*Pisum sativum* L.)*. Beijing: China Agriculture Press, 2005: 1-2. (in Chinese)
- [3] FAO. Statistical Database, Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, Rome. <http://faostat.fao.org>, 2009.
- [4] Gemechu K, Mussa J, Tezera W, Getnet D. Extent and pattern of genetic diversity for morpho-agronomic traits in Ethiopian highland pulse landraces: I. Field pea (*Pisum sativum* L.). *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005, 52: 539-549.
- [5] Vershinin A V, Allnutt T R, Knox M R, Ambrose M J, Ellis T H N. Transposable elements reveal the impact of introgression, rather than transposition, in *Pisum* diversity, evolution, and domestication. *Molecular Biology and Evolution*, 2003, 20(12): 2067-2075.
- [6] Choudhury P R, Tanveer H, Dixit G P. Identification and detection of genetic relatedness among important varieties of pea (*Pisum sativum* L.) grown in India. *Genetica*, 2007, 130: 189-191.
- [7] Yadav V K, Kumar S, Panwar R K. Measurement of genetic dissimilarity in world pea (*Pisum sativum* L.) genotypes using RAPD

- markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2007, 54(6): 1285-1289.
- [8] Burstin J, Deniot G, Potier J, Weinachter C, Aubert G, Baranger A. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum*. *Plant Breeding*, 2001, 120(4): 311-317.
- [9] Ford R, Roux K L, Itman C, Brouwer J B, Taylor P W J. Diversity analysis and genotyping in *Pisum* with sequence tagged microsatellite site (STMS) primers. *Euphytica*, 2002, 124(3): 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(2): 257-272.
- [11] Baranger A G, Aubert G, Arnau G, Laine A L, Deniot G, Potier J, Weinachter C, Lejeune-Hénaut I, Lallemand J, Burstin J. Genetic diversity within *Pisum sativum* using protein- and PCR-based markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(7): 1309-1321.
- [12] 宗绪晓, 关建平, 王述民, 刘庆昌. 中国豌豆地方品种 SSR 标记遗传多样性分析. 作物学报, 2008, 34(8): 1330-1338.
Zong X X, Guan J P, Wang S M, Liu Q C. Genetic diversity among Chinese pea (*Pisum sativum* L.) landraces revealed by SSR markers. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(8): 1330-1338. (in Chinese)
- [13] 宗绪晓, 关建平, 王述民, 刘庆昌, Robert R Redden, Rebecca Ford. 国外栽培豌豆遗传多样性分析及核心种质构建. 作物学报, 2008, 34(9): 1518-1528.
Zong X X, Guan J P, Wang S M, Liu Q C, Redden R R, Ford R. Genetic diversity and core collection of alien *Pisum sativum* L. germplasm. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(9): 1518-1528. (in Chinese)
- [14] 宗绪晓, Rebecca Ford, Robert R Redden, 关建平, 王述民. 豌豆属 (*Pisum*) SSR 标记遗传多样性结构鉴别与分析. 中国农业科学, 2009, 42(1): 36-46.
Zong X X, Ford R, Redden R R, Guan J P, Wang S M. Identification and analysis of genetic diversity structure within *Pisum* genus based on microsatellite markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2009, 42(1): 36-46. (in Chinese)
- [15] 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. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 92-100.
- [16] 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. *Molecular Genetics and Genomics*, 1998, 260 (1): 9-19.
- [17] Simioniu D, Uptmoor R, Friedt W, Ordon F. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding*, 2002, 121(5): 429-435.
- [18] Lu J, Knox M R, Ambrose M J, Brown J K M, Ellis T H N. Comparative analysis of genetic diversity in pea assessed by RFLP- and PCR-based methods. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 93 (7): 1103-1111.
- [19] Posvec Z, Griga M. Utilisation of isozyme polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.). *Euphytica*, 2000, 113 (3): 251-258.
- [20] Loridon K, McPhee K, Morin J, Dubreuil P, Pilet-Nayel M L, Aubert G, Rameau C, Baranger A, Coyne C, Lejeune-Hénaut I, Burstin J. Microsatellite marker polymorphism and mapping in pea (*Pisum sativum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 1022-1031.
- [21] Smýkal P, Hýbl M, Corander J, Jarkovský J, Flavell A J, Griga M. Genetic diversity and population structure of pea (*Pisum sativum* L.) varieties derived from combined retrotransposon, microsatellite and morphological marker analysis. *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117 (3): 413-424.
- [22] Zong X X, Redden R J, Liu Q, Wang S, Guan J, Xu Y, Liu X, Gu J, Yan L, Ades P, Ford R. Analysis of a diverse global *Pisum* sp. collection and comparison to a Chinese local *P. sativum* collection with microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118(2): 193-204.
- [23] Dellaporta S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA mini preparation: version II. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1983, 1: 19-21.
- [24] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 149-151.
- [25] Zong X X, Tomooka N, Kaga A, Tomooka N, Wang X, Han O, Vaughan D. The genetic diversity of the *Vigna angularis* complex in Asia. *Genome*, 2003, 46: 647-658.
- [26] Goudet J. FSTAT (version 1. 2): a computer program to calculate F-statistics. *Journal of Heredity*, 1995, 86 (6): 485-486.
- [27] Rohlf F J. *NTSYSpc: Numerical Taxonomy System (version 2. 2)*. Setauket, New York: Exeter Publishing, Ltd., 2006.
- [28] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. *Popgene Version 1. 31 Quick User Guide*. Canada: University of Alberta, and Centre for International Forestry Research, 1999.
- [29] Falush D, Stephens M, Pritchard J K. Inference of population structure: Extensions to linked loci and correlated allele frequencies. *Genetics*, 2003, 164: 1567-1587.
- [30] Kimura M, Crow J F. The number of alleles that can be maintained in a finite population. *Genetics*, 1964, 49: 725-738.
- [31] Pielou E C. *An Introduction to Mathematical Ecology*. New York:

- Wiley-Interscience, 1969.
- [32] Lewontin R C. The apportionment of human diversity. *Evolutionary Biology*, 1972, 6: 381-398.
- [33] Flury B N. Common principal components in k groups. *Journal of American Statistics Association*, 1984, 79 (388): 892-898.
- [34] Flury B N, Constantine G. The F-G diagonalization algorithm. *Applied Statistics*, 1985, 34: 177-183.
- [35] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155: 945-959.
- [36] Evanno G, Regnaut S, Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 2005, 14: 2611-2620.
- [37] Redden B, Leonforte T, Ford R. Pea (*Pisum sativum* L.) // Singh R J, Jauhar P P, eds. *Genetic Resources, Chromosome Engineering, and Crop Improvement: Volume 1. Grain Legumes*. Boca Raton, USA: CRC Press, 2005: 49-83.
- [38] Rajaram S. Approaches for breaching yield stagnation in wheat. *Genome*, 1999, 42: 629-634.
- [39] Zong X X, Liu X J, Guan J P, Wang S M, Liu Q C, Paull J G, Redden R R. Molecular variation among Chinese and global winter faba bean germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 118: 971-978.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)