

# 抗寒苜蓿品系生产性能评价及 ISSR 遗传多样性分析

魏双霞, 师尚礼, 康文娟, 谭谌淼

(1. 甘肃农业大学 草业学院/草业生态系统教育部重点实验室/甘肃省草业工程实验室/中-美草地畜牧业可持续发展研究中心, 甘肃 兰州 730070)

**摘要:**对 3 个紫花苜蓿品系 GNKH-1, GNKH-2 和 GNKH-3 在高寒湿润气候区进行了连续两年的品系比较试验, 研究其生产性能和遗传基础差异, 以俄罗斯杂花, 金皇后和阿尔冈金紫花苜蓿为对照。结果表明: GNKH-3 的年平均越冬率最高(85.55%); 干草产量最高(5.74 t/hm<sup>2</sup>); 株高、生长速度、分枝数、叶茎比均比对照表现良好, 分别为 62.03 cm、0.80 cm/d、15.3 个/株、1.02。ISSR 分子标记结果为, 引物的多态位点百分率 62.07%, 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数的平均值分别为 0.267 6 和 0.384 2。3 个抗寒苜蓿品系与对照的遗传相似性都比较小, 介于 0.482 8~0.666 7。聚类分析表明: 8 条 ISSR 引物在遗传距离 0.78 处将供试苜蓿材料分为 2 类, 第 1 类包含 3 个抗寒苜蓿品系材料, 在高寒湿润气候区具有高产、生产性能强的特点; 第 2 类包含 3 个对照材料, 其产量、生产性能相对第 1 类材料较低。主成分分析法评价紫花苜蓿的生产性能, 综合排序为: GNKH-3>GNKH-2>GNKH-1>阿尔冈金>俄罗斯杂花>金皇后。

**关键词:**苜蓿; 新品系; 生产性能; ISSR; 主成分分析

**中图分类号:** S541 **文献标志码:** A **文章编号:** 1009-5500(2019)03-0015-11

苜蓿具有产量高, 粗蛋白含量高, 适口性好的特点, 在世界范围内广泛种植<sup>[1-2]</sup>。青藏高原素有“世界屋脊”和“世界第三极”之称<sup>[3]</sup>, 是我国重要的草地畜牧业基地之一, 但过度放牧使天然草地产量下降, 毒杂草滋生, 牧草品质降低<sup>[4]</sup>, 造成严重的经济损失。解决这一问题, 需要了解紫花苜蓿对寒冷地区的适应性特征和规律。因此, 深入研究苜蓿的生产性能和遗传基础, 选育出适应于该地区种植的苜蓿新品系, 扩大其种植范围, 提高生产力, 具有举足轻重的意义。

目前, 我国关于苜蓿品种适应性评价的研究主要在干旱半干旱地区, 朱博等<sup>[5]</sup>、王虹等<sup>[6]</sup>通过综合评价筛选出在西北荒漠地区种植的高产优质苜蓿品种。而

对苜蓿品种在高寒地区适应性的研究很少, 其中丁培俊等<sup>[7]</sup>在甘南州进行了苜蓿引种品比试验, 挑选出适宜于青藏高原种植的传统苜蓿材料金皇后和阿尔冈金。杨墨等<sup>[8]</sup>在东北寒冷地区对引种的 16 个苜蓿材料应用灰色关联度进行生产性能评价, 筛选出适应性较好的品种有俄罗斯西伯利亚杂花等。采用 3 份抗寒苜蓿品系和 3 份对照苜蓿材料, 进行生长适应性对比试验, 综合评价生产性能, 以期高寒牧区培育多年生抗寒苜蓿新品系, 发展苜蓿产业提供技术依据。

分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记, 在苜蓿生物技术育种和种质资源评价中的地位不可忽视<sup>[9]</sup>。李哲等<sup>[10]</sup>用 ISSR 在遗传距离 0.266 处将供试苜蓿材料聚为 5 大类, 为其后代株系杂交组合育种的研究提供理论支持。杨墨等<sup>[11]</sup>用 ISSR 在遗传距离 0.833 处将供试抗旱苜蓿材料分为高产、优质和营养价值相对较低 2 大类。应用 ISSR 分子标记方法研究 3 份抗寒苜蓿品系和 3 份对照苜蓿材料俄罗斯西伯利亚杂花、金皇后、阿尔冈金之间的亲缘关系远近和遗传多样性, 确定不同品系之间的遗传差异及遗传背景, 为选育工作提供分子水平的理论依据和技术支持。

**收稿日期:** 2018-11-15; **修回日期:** 2019-05-13

**基金项目:** 国家重点研发计划项目“青藏高原社区生态畜牧业技术研究与集成示范”(2018YFD0502400) 资助

**作者简介:** 魏双霞(1988-), 女, 甘肃白银人, 硕士研究生。

E-mail: 3529825121@qq.com

师尚礼为通讯作者。

E-mail: shishl@gsau.edu.cn

# 1 材料和方法

## 1.1 试验地概况

试验于2013年4月~2015年5月在高寒湿润气候区的甘南州夏河县牧草试验站进行。夏河县位于甘南藏族自治州西北部, E 101°54'~103°25', N 34°32'~35°34', 地处青藏高原东北边缘, 地势由西北向东南倾斜, 海拔3 000~3 800 m, 属于寒冷湿润性气候, 土壤类型为高寒草甸土, 有明显的腐殖质积聚, 腐殖质层厚10 cm, 呈灰棕至黑褐色粒状-扁核状结构, 土壤有机质含量45 140 mg/kg, pH 7.87, 速效氮50.83 mg/kg, 速效磷10.57 mg/kg, 速效钾230.0 mg/kg, 土壤肥力

均匀。

## 1.2 试验材料

供试材料GNKH-1(Cold resistance No. 1 of alfalfa)、GNKH-2(Cold resistance No. 2 of alfalfa)和GNKH-3(Cold resistance No. 3 of alfalfa 3)为甘肃农业大学草业学院选育的3个抗寒苜蓿新品系, 具有较强的抗寒能力和优质高产性能。对照材料为抗寒能力强的俄罗斯西伯利亚杂花苜蓿(*M. sativa* subsp. *varia*)(FD. 2)、金皇后苜蓿(*M. sativa* cv. Golden Empress)(FD. 3)和阿尔冈金紫花苜蓿(*M. sativa* cv. Algonquin)(FD. 3), 均由甘肃农业大学草业生态系统教育部重点实验室提供(表1)。

表1 供试苜蓿材料

Table 1 Information of tested alfalfa materials

编号	名称	类型	材料产地及来源
I	GNKH-1	品系	阿尔冈金集团选择育种, 甘肃农业大学草业学院选育
II	GNKH-2	品系	陇东苜蓿集团选择育种, 甘肃农业大学草业学院选育
III	GNKH-3	品系	金皇后集团选择育种, 甘肃农业大学草业学院选育
IV	俄罗斯西伯利亚杂花苜蓿	杂花苜蓿	对照, 俄罗斯
V	金皇后紫花苜蓿	紫花苜蓿	对照, 美国
VI	阿尔冈金紫花苜蓿	紫花苜蓿	对照, 加拿大

## 1.3 试验设计

田间试验采用随机区组设计, 小区面积3 m × 5 m, 3次重复, 采用深开沟, 浅覆土, 冬前耙平的播种技术: 人工开沟条播, 沟深12~15 cm, 覆土1~2 cm, 冬前耙平埋颈, 行距30 cm, 播量1.7 g/m<sup>2</sup>。适时对试验地进行锄草及病虫害防治等田间管理。

于2013年12月在实验室内沙培种植, 放置于光照充足、温度适宜的组织培养室内, 期间定期定量加入Hogland营养液。待出苗后30 d采集各供试苜蓿材料幼嫩叶片提取DNA待用。

## 1.4 测定项目及方法

1.4.1 生产性能 (1) 物候期特征比较 对每个品种生长第1年和第2年的出苗期(返青期)、分枝期、现蕾期、初花期进行观测记录。苜蓿品种每小区留2行进行物候期观测, 鉴别的标准是50%的植株达到某一个生育阶段为某生育期; 10%~20%的植株达到为初期, 70%~80%达到为盛期<sup>[18]</sup>。

(2) 越冬率 采用随机取样法进行调查, 避开边缘地段, 在小区株行内随机选取长为1 m的样段, 调查每一样段内的株数。翌年植物返青后调查原样段内返青的株数, 然后计数返青后存活的株数和越冬前总株数, 用下式计算越冬率。

$$\text{越冬率} = \frac{\text{返青株数}}{\text{样段内植株总数}} \times 100\%$$

(3) 干鲜比和干草产量 干鲜比 测产时, 每个小区称鲜草500 g, 自然风干后称重, 计算干鲜比, 干鲜

比 = 苜蓿风干重/苜蓿鲜重; 干草产量 在每茬初花期, 每小区随机取样1 m<sup>2</sup>, 重复3次, 刈割后称重量, 留茬高度3~5 cm, 取平均值为鲜草产量, 根据干鲜比计算干草产量。青藏高原高寒湿润气候区2013年刈割1茬, 2014年刈割2茬, 年度产量为各茬草产量之和。

(4) 株高和生长速度 株高 在第1茬初花期测产前, 每个小区随机选取10株, 测量植株绝对高度(拉直测定); 生长速度 第1茬草从分枝期开始, 每个小区随机选取10个单株, 做好标记, 直到初花期测定生长高度, 两次生长高度之差除以生长天数即为生长速度。

(5) 分枝数和叶茎比 分枝数 魏臻武等<sup>[35]</sup>的方法, 每年第1茬初花期测定地表根茎部形成的分枝数。

叶茎比 测产时, 取500 g全株鲜草将茎叶分离, 称量叶片和茎秆鲜重, 105℃杀青15 min, 并置于65℃下烘至恒重, 冷却后取出用1%天平称量叶片和茎秆干重。

1.4.2 遗传特征 (1) DNA提取 每份材料随机取10个单株的幼嫩叶片0.5 g, 洗净叶片后等量混合, 采用柱式植物基因组抽提试剂盒提取苜蓿总DNA。

(2) DNA检测 在浓度2.0%的琼脂糖凝胶上对提取的DNA进行电泳, 于紫外凝胶成像仪中拍照; 用紫外分光光度计于D<sub>260 nm</sub>与D<sub>280 nm</sub>检测所提取的DNA浓度。

(3) 引物合成与筛选 试验初期选择了10条引物, 由上海生工有限公司合成。经引物筛选试验, 筛选了PCR扩增效果好、条带清晰的8条引物用于6份苜

蓐的遗传多样性研究。

(4)ISSR 扩增与检测 采用 25  $\mu$ LPCR 反应体系,模板 DNA 2  $\mu$ L、ISSR 合成引物 1  $\mu$ L,Dream Taq Green PCR Master Mix 12.5  $\mu$ L,双蒸水 9.5  $\mu$ L。扩增条件为预变性 94 $^{\circ}$ C 4 min,然后循环,94  $^{\circ}$ C 1 min,45~60 $^{\circ}$ C 40 s,72 $^{\circ}$ C 1~2 min,共 40 轮循环。循环结束后,72 $^{\circ}$ C 10 min,最后在 4 $^{\circ}$ C 条件下保存。取 PCR 产物 7  $\mu$ L 于 1.6% 的琼脂糖胶上电泳,在 0.5 $\times$ TBE 缓冲液中电泳约 1.5 h,在紫外凝胶成像仪中拍照。

## 1.5 数据处理和评价方法

1.5.1 生产性能评价 用 SPSS 19.0 统计软件和 EXCEL 进行数据处理及分析;应用主成分分析法对多个指标进行综合评判。先把参与主成分分析的  $n$  个指标变量进行标准化,计算出特征值和贡献率以及主成分,最后比较总得分值  $F$  的大小, $F$  值越大表明该苜蓿材料生产性能适应性越强。

1.5.2 遗传特征分析 对强带以及清晰可辨的弱带进行统计赋值,采取 0/1 赋值的记带方法,即有带计为“1”,无带计为“0”,从而实现 PCR 扩增产物的条带总数和多态性条带数的统计。

多态性位点比率: $p = i/j \times 100\%$

表 2 高寒湿润气候区供试苜蓿材料的物候期  
Table 2 Phonological phase of tested alfalfa materials

品质名称	年份	物候期/(月-日)									
		播种期	出苗期返青期	分枝期	现蕾期	初花期	开花期	结荚期	成熟期	枯黄期	生长天数/d
I	2013	05-17	05-29	07-02							
	2014		04-22	04-30	07-28	08-05	08-17	09-05		11-08	199
II	2013	05-17	05-29	07-02	09-10						
	2014		04-20	04-28	07-25	08-02	08-15	09-01		11-10	203
III	2013	05-17	05-28	07-02	09-10						
	2014		04-20	04-27	07-25	08-02	08-15	09-01		11-10	203
IV	2013	05-17	06-01	07-12							
	2014		4-27	05-06	07-30	08-07	08-20	09-10		10-30	186

续表 2

品质名称	年份	物候期/(月-日)									
		播种期	出苗期返青期	分枝期	现蕾期	初花期	开花期	结荚期	成熟期	枯黄期	生长天数/d
V	2013	05-17	06-01	07-12							
	2014		04-30	05-09	07-30	08-07	08-20	09-10		10-27	180
VI	2013	05-17	06-01	07-12							
	2014		04-25	05-04	07-28	08-05	08-17	09-08		10-30	188

2.1.2 生产性能指标特征分析 播种当年,供试苜蓿材料均能安全越冬,但越冬率较低,苜蓿材料平均越冬率为 60.32%,其中 GNKH-3 和 GNKH-2 的越冬率最高,达到了 76.66%,72.34%,显著高于其他苜蓿品种 ( $P < 0.05$ ),GNKH-1 次之,阿尔冈金最低 (40.39%)。播种的第 2 年,供试苜蓿材料的越冬率均超过 90%,显著高于播种当年的越冬率 ( $P < 0.05$ ),GNKH-3 的越冬率也最高,为 94.43%,显著高于对照苜蓿俄罗斯西伯利亚杂花苜蓿 ( $P < 0.05$ ),GNKH-2 次之,为

式中: $i$  为多态性位点的数目, $j$  为统计出的总位点数目。

使用软件 Ntsys-pc 2.1 软件进行分析,计算 Nei's 遗传距离,使用 UPMGA 法进行聚类分析,建立聚类图。使用软件 POPGEN 32 计算 ISSR 扩增产物多态信息含量。

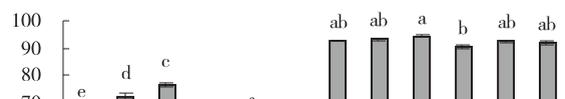
## 2 结果与分析

### 2.1 生物学特性及生产性能比较

2.1.1 物候期比较 高寒湿润气候区各苜蓿材料物候期差异很大,各苜蓿材料于 2013 年 5 月 17 日播种,5 月 25 日出苗,截止 6 月 1 日齐苗,7 月初开始分枝,抗寒苜蓿品系分枝期比对照苜蓿品种早 10 d。播种第 1 年,GNKH-2 和 GNKH-3 出苗期最早,比对照材料提前 5~10 d;GNKH-3、GNKH-2 有现蕾并有开花,但开花数不足 10%,其他品种均只生长到分枝期。播种第 2 年,3 个抗寒苜蓿品系返青、分枝、现蕾、开花、结荚、枯黄各物候期时间较为一致,对照品种俄罗斯西伯利亚杂花、金皇后和阿尔冈金各物候期时间较为一致,但 GNKH-3 和 GNKH-2 较其他材料提前 5 d 进入现蕾期。播种第 2 年,各品种均能结荚,种子均未成熟(表 1)。

93.21%。GNKH-3、GNKH-2、GNKH-1 两年的平均越冬率分别为 85.55%、82.78%、78.99%,均高于对照(图 1)。

综合分析供试苜蓿材料在高寒湿润气候区的越冬率表现,GNKH-3 为适宜高寒湿润气候区的越冬率最高的苜蓿材料,GNKH-2 和 GNKH-1 为高寒湿润气候区越冬率较高的苜蓿材料。



供试苜蓿材料干鲜比随着生长年限的增加均呈减小趋势。播种当年平均干鲜比为 0.28,其中阿尔冈金干鲜比最高(0.29),俄罗斯西伯利亚杂花最低(0.26)。播种第 2 年,供试苜蓿材料的干鲜比均为 0.25,其中 GNKH-2 干鲜比最高,为 0.27,显著高于俄罗斯西伯利亚杂花和阿尔冈金 ( $P < 0.05$ ),俄罗斯西伯利亚杂花也最低(0.23)。GNKH-2、GNKH-1 两年的平均干鲜比分别为 0.27、0.27,均高于对照(图 2)。

综合分析供试苜蓿材料在高寒湿润气候区的干鲜比表现,GNKH-2 为适宜高寒湿润气候区的干鲜比最高的苜蓿材料,GNKH-1 为高寒湿润气候区干鲜比较高的苜蓿材料。

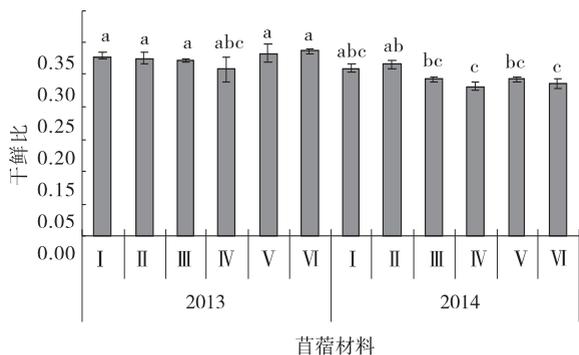


图 2 干鲜比

Fig. 2 Ratio of dry to fresh mater

播种当年,供试苜蓿材料由于生育期没有达到初花期,干草产量较低,随着生长年限的增加,不同苜蓿材料的干草产量均呈增加趋势。播种当年平均干草产量为 2.20 t/hm<sup>2</sup>,其中 GNKH-2 干草产量最高,为 2.95 t/hm<sup>2</sup>,显著高于对照俄罗斯杂花和金皇后 ( $P < 0.05$ ),GNKH-1 和 GNKH-3 次之,分别为 2.77、2.67 t/hm<sup>2</sup>,俄罗斯西伯利亚杂花最低,为 1.38 t/hm<sup>2</sup>。播种第 2 年,抗寒苜蓿材料的干草产量显著高于播种当年 ( $P < 0.05$ ),对照苜蓿材料的干草产量相对于播种当年有所增加,但是不显著。供试苜蓿材料的干草产量平均为 5.15 t/hm<sup>2</sup>,其中 GNKH-3 干草产量最高,为 8.81 t/hm<sup>2</sup>,显著高于 GNKH-1 和对照苜蓿材料 ( $P < 0.05$ ),GNKH-2 和 GNKH-1 次之,也显著高于对照苜蓿材料 ( $P < 0.05$ ),金皇后最低(1.94 t/hm<sup>2</sup>)。GNKH-3、GNKH-2 和 GNKH-1 两年的平均干草产量分别为 5.74、5.49 和 4.94 t/hm<sup>2</sup>,均高于对照(图 3)。

综合分析供试苜蓿材料在高寒湿润气候区的干草产量表现,GNKH-3 为适宜高寒湿润气候区的干草产量最高的苜蓿材料,GNKH-2 和 GNKH-1 为高寒湿

润气候区干草产量较高的苜蓿材料。

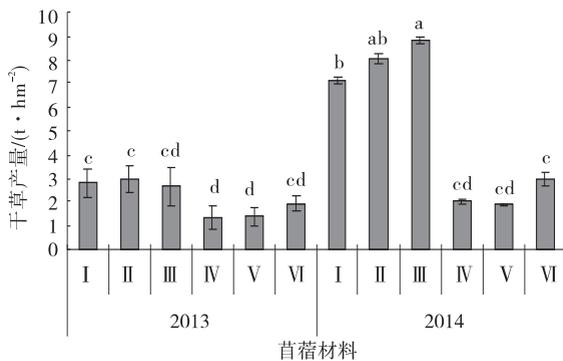


图 3 干草产量

Fig. 3 Hay yield

(3) 株高和生长速度 播种当年,供试苜蓿材料的平均株高为 48.10 cm,其中 GNKH-3、GNKH-2 株高最高,分别为 53.45 cm、52.42 cm,显著高于对照材料俄罗斯西伯利亚杂花和金皇后 ( $P < 0.05$ ),金皇后最低(41.33 cm)。播种第 2 年,供试苜蓿材料的株高显著高于播种当年 ( $P < 0.05$ ),平均株高为 64.66 cm,其中 GNKH-3 株高最高,为 70.62 cm,显著高于对照苜蓿材料 ( $P < 0.05$ ),GNKH-2、GNKH-1 次之,为 68.32、65.57 cm,均高于对照材料(57.49 ~ 64.21 cm)。GNKH-3、GNKH-2 和 GNKH-1 两年的平均株高分别为 62.03、60.37 和 58.56 cm,均高于对照(图 4)。

供试苜蓿材料在高寒湿润气候区生长缓慢,生长速度低,播种当年只能收获 1 茬,第 2 年只能收获 2 茬。播种当年,供试苜蓿材料的生长速度平均值为 0.65 cm/d,其中 GNKH-3、GNKH-2 生长速度显著高于对照俄罗斯杂花和金皇后 ( $P < 0.05$ ),分别为 0.74、0.73 cm/d,GNKH-1 次之,为 0.70 cm/d,金皇后最低(0.55 cm/d)。播种第 2 年,供试苜蓿材料的平均生长速度为 0.77 cm/d,供试苜蓿材料的生长速度有所增加,其中 GNKH-3、GNKH-2 生长速度也显著高于对照俄罗斯杂花和金皇后,分别为 0.86、0.83 cm/d,GNKH-1 次之,为 0.82 cm/d,金皇后最低(0.66 cm/d)。GNKH-3、GNKH-2、GNKH-1 两年的平均生长速度分别为 0.80、0.78 和 0.76 cm/d,均高于对照(图 5)。

综合分析供试苜蓿材料在高寒湿润气候区的株高和生长速度表现,GNKH-3 为高寒湿润气候区的株高和生长速度最高的苜蓿材料,GNKH-2 和 GNKH-1 为高寒湿润气候区株高和生长速度均较高的苜蓿材料。

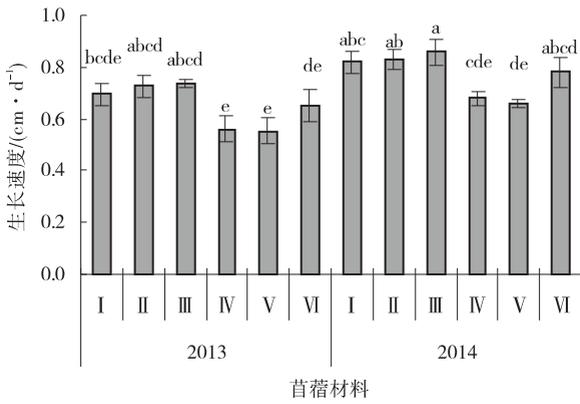


图 5 生长速度

Fig. 5 Growth rate

综合分析供试苜蓿材料在两个气候区的分枝数和叶茎比表现,GNKH-3 为高寒湿润气候区的分枝数和叶茎比最高的苜蓿材料,GNKH-1、GNKH-2 为高寒湿润气候区的分枝数和叶茎比较好的苜蓿材料。

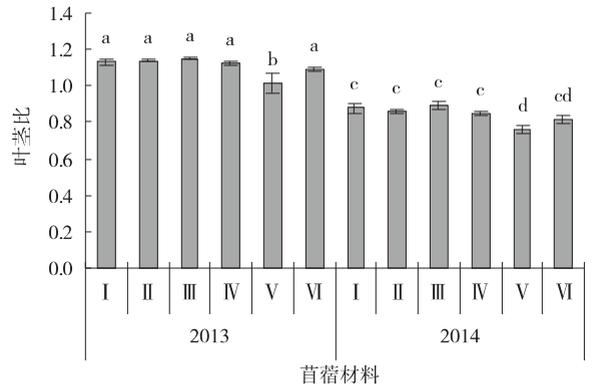
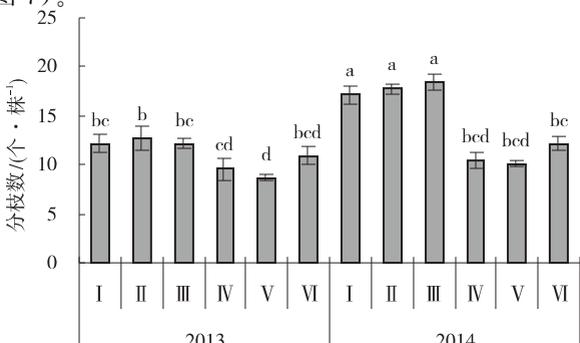


图 7 叶茎比

Fig. 7 Leaf to stem ratio

(4) 分枝数和叶茎比 播种当年,供试苜蓿材料的分枝数平均为 11.0 个/株,其中 GNKH-2 分枝数显著高于俄罗斯杂花和金皇后 ( $P < 0.05$ ),为 12.7 个/株、GNKH-1、GNKH-3 次之,分别为 12.2、12.1 个/株,金皇后最少(8.7 个/株)。播种第 2 年,供试苜蓿材料的平均分枝数为 14.3 个/株,抗寒苜蓿材料的分枝数显著高于播种当年 ( $P < 0.05$ ),对照苜蓿材料的分枝数相对播种当年也有所增加,其中 GNKH-3、GNKH-2、GNKH-1 分枝数显著多于对照苜蓿材料 ( $P < 0.05$ ),分别为 18.5、17.8 和 17.1 个/株。GNKH-3、GNKH-2、GNKH-1 两年的平均分枝数分别为 15.3、15.2 和 14.7 个/株,均高于对照(图 6)。

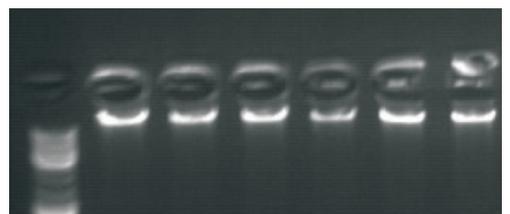
播种当年,供试苜蓿材料的叶茎比平均为 1.11,其中 GNKH-3、GNKH-2 和 GNKH-1 叶茎比均比对照多,分别为 1.15、1.14 和 1.13,金皇后最小(1.01),显著低于其他苜蓿材料 ( $P < 0.05$ )。播种第 2 年,供试苜蓿材料的叶茎比显著低于播种当年 ( $P < 0.05$ ),平均叶茎比为 0.84,其中 GNKH-3、GNKH-1 和 GNKH-2 叶茎比均大于对照苜蓿材料,分别为 0.89、0.88 和 0.86。GNKH-3、GNKH-1 和 GNKH-2 两年的平均叶茎比分别为 1.02、1.01 和 1.00,均高于对照(图 7)。



## 2.2 遗传多样性分析

2.2.1 DNA 检测 分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记,在苜蓿生物技术育种和种质资源评价中的地位不可忽视。因此,在苜蓿常规育种的基础上,结合分子标记辅助育种,进行种质资源评价,可为我国苜蓿种质资源的科学利用和育种工作提供更为可靠的技术支持。简单重复序列间扩增分子标记技术能够更好的检测出生物遗传物质的多态性,因此,在遗传上有远景<sup>[13]</sup>,ISSR 标记为显性标记,可以揭示整个基因组的一些特征,符合孟德尔遗传规律,具有稳定性好,多态性高,试验操作简单、快速、用时少等优点,该技术被广泛用作研究植物种质资源遗传多样性及亲缘关系的有效手段<sup>[14-15]</sup>。

挑选每个材料条带清晰、无降解、无拖尾现象的 DNA 样品进行检测。6 份参试材料 DNA 条带清晰,点样孔干净,表明 DNA 片段大小比较均一,纯度比较高,总 DNA 稍带乳白色,在  $D_{260\text{ nm}}$  及  $D_{280\text{ nm}}$  处的  $D$  值为 1.80~1.88,浓度 2.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果比较理想,能够达到 ISSR 分子标记分析的要求(图 8)。



2.2.2 PCR 扩增产物多态性 用通过引物筛选试验得到的 8 条多态性好的引物,对 6 份苜蓿材料进行扩增,并对扩增图谱进行统计分析。结果表明 8 个引物共扩增出 87 条清晰谱带,平均每个引物能扩增出 10.9 个条带,平均多态性比率(PPB)为 62.07%。不同引物扩增出来的片段数不同,除了引物 844 和 847 的条带较少,分别为 7 个和 9 个;引物 822,845 和 888 的条带数均大于 10 个,他们的扩增产物多态性最丰富,图谱也很清晰,并且扩增产物的多态性比率均在 80%,多态性信息含量较高。其他 3 个引物 825,855

和 885 的条带数也均大于 10 个,他们的扩增产物多态性也较丰富,图谱也清晰。6 份材料的有效等位基因数为 1.494 3、基因多样性指数为 0.2676 和 Shannon's 信息指数为 0.3842(表 3)。

2.2.3 遗传相似性系数分析 6 份材料间的遗传相似性系数在 0.482 8~0.954 0,GNKH-1 和 GNKH-2 的遗传相似性最大,为 0.954 0,GNKH-1 与亲本阿尔冈金的遗传相似性为 0.517 2;GNKH-3 与阿尔冈金间的遗传相似性最小,为 0.482 8,说明它们在亲缘关系上离得最远,GNKH-3 与亲本金皇后的遗传相似性

表 3 ISSR 分析所用引物序列和扩增结果

Table 3 Primer sequences and amplified results of ISSR analysis

引物	引物序列	扩增总条带	多态性条带数	多态性位点百分率/%
822	(TC)8A	15	12	80.0
825	(AC)8T	15	8	53.3
847	(CA)8RC	9	3	33.3
845	(CT)8RG	10	8	80.0
855	(AC)8YT	10	5	50.0
885	(GA)8BHB	11	6	54.5
844	(CT)8RC	7	3	42.9
888	(CA)7BDB	10	9	90.0
合计		87	54	62.07
平均		10.88	6.75	62.07
有效等位基数(Ne)			1.494 3	
基因多样性指数(H)			0.267 6	
Shannon's 信息指数(I)			0.384 2	

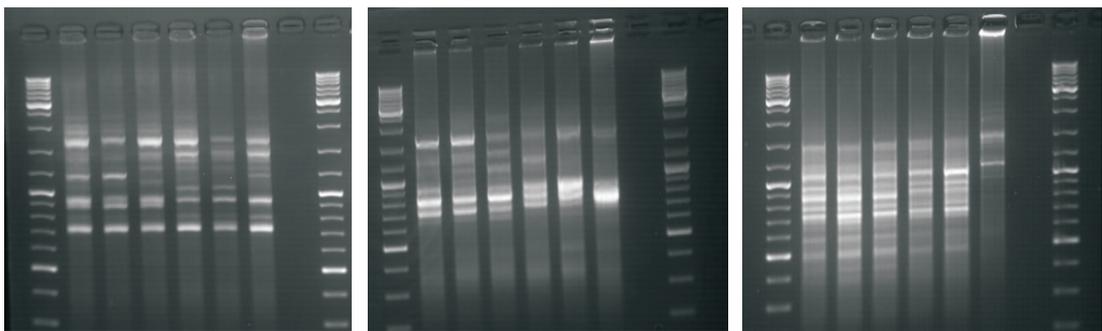


图 9 引物 822,845 和 888 ISSR 扩增

Fig. 9 Amplification map of 822,845,888 ISSR

注:从左到右依次为 M,GNKH-1,GNKH-2 和 GNKH-3,俄罗斯西伯利亚杂花苜蓿,金皇后苜蓿,阿尔冈金苜蓿

为 0.551 7;与 GNKH-3 遗传相似性最高的是俄罗斯西伯利亚杂花,为 0.6667。3 个抗寒苜蓿品系与对照材料的遗传相似性都比较小,为 0.482 8~0.666 7,表明抗寒苜蓿品系与对照材料的亲缘关系相对较远,具有相对独立的遗传特性。整体分析,6 份苜蓿材料间遗传异质性丰富(表 4)。

2.2.4 ISSR 遗传多样性分析 利用 ISSR 遗传相似

性系数矩阵,根据 UPGMA 法进行聚类分析,构建了 6 份参试苜蓿材料的亲缘关系系统树状图。在遗传距离 0.78 处,6 份苜蓿材料被分为 2 个大类,第 1 个大类包括了 GNKH-1,GNKH-2 和 GNKH-3 抗寒苜蓿品系,第 2 大类包括俄罗斯西伯利亚杂花,金皇后和阿尔冈金。在遗传距离 0.86 处,6 份苜蓿材料被分为 3 个大类,第 1 个大类包括了 GNKH-1,GNKH-2 和 GNKH-

表 4 6 份苜蓿材料遗传相似系数矩阵

Table 4 Genetic similarity matrix based on ISSR polymorphism among 6 alfalfa materials

编号	I	II	III	IV	V	VI
I	1.000 0					
II	0.954 0	1.000 0				
III	0.873 6	0.896 6	1.000 0			
IV	0.609 2	0.586 2	0.666 7	1.000 0		
V	0.563 2	0.540 2	0.551 7	0.862 1	1.000 0	
VI	0.517 2	0.517 2	0.482 8	0.747 1	0.816 1	1.000 0

3 抗寒苜蓿品系,第 2 大类包括俄罗斯西伯利亚杂花和金皇后,第 3 大类只有阿尔冈金。在遗传距离 0.88 处,6 份苜蓿材料被分为 4 个大类,第 1 个大类包括了 GNKH-1、GNKH-2、GNKH-3 抗寒苜蓿品系,第 2 大类只有俄罗斯西伯利亚杂花,第 3 大类只有金皇后,第 4 大类只有阿尔冈金。在遗传距离 0.90 处,GNKH-3 单独聚类(图 10)。

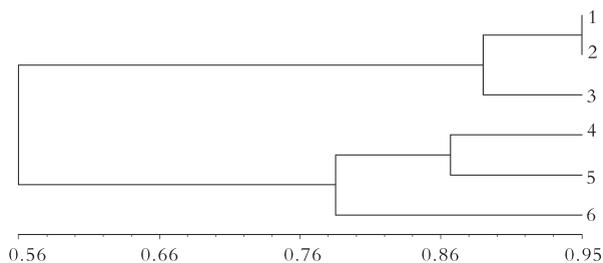


图 10 6 份苜蓿材料基于 ISSR 的遗传相似性 UPGMA 聚类

Fig. 10 UPGMA cluster analysis based on ISSR genetic identities among 6 alfalfa materials

注:1-GNKH-1,2-GNKH-2,3-GNKH-3,4-俄罗斯西伯利亚杂花苜蓿,5-金皇后苜蓿,6-阿尔冈金苜蓿

### 2.3 生产性能综合评价

由于供试苜蓿材料的来源不同、基因型不同,其在形态特征和产量及品质指标上变化非常大,很难用一个或几个指标对其作出准确的评价。因此,选择影响生产性能的主要因子越冬率、干草产量、株高、生长速度、分枝数、叶茎比,采用主成分分析法对 6 份苜蓿种质材料连续两年的生产性能进行综合评价。

根据综合评价函数,计算各种质材料的综合得分(表 5),给予供试苜蓿材料定量化的描述,综合得分越大,表明综合表现越好。高寒湿润气候区各苜蓿材料主成分分析综合得分值排名为:GNKH-3>GNKH-2>GNKH-1>阿尔冈金>俄罗斯西伯利亚杂花>金皇后。GNKH-3 的综合得分最高,在高寒湿润气候区的适应能力最强;其次是 GNKH-2 和 GNKH-1,它们在高寒湿润气候区的适应能力较强;俄罗斯西伯利亚杂花和金皇后的综合得分最低,它们在高寒湿润气候区的适应能力最弱(表 5)。

## 3 讨论

### 3.1 物候期及农艺性状差异

植株整个生育期的生长是植物自身对外界生态因子适应性的反应。供试苜蓿材料在高寒湿润气候区生

表 5 在高寒湿润气候区供试苜蓿材料综合得分及排名

Table 5 Composite scores and ranking of tested alfalfa materials

材料	第一主成分 $F_1$	得分 $F$	排名
III	1.131	0.956	1
II	0.867	0.734	2
I	0.618	0.523	3
VI	-0.462	-0.391	4
IV	-0.914	-0.773	5
V	-1.240	-1.049	6

育期差异显著,GNKH-3、GNKH-2 返青期最早,阿尔冈金返青期最迟,比抗寒苜蓿品系晚 5 d。3 个抗寒苜蓿品系的物候期与畅云喜等<sup>[16]</sup>在青藏高原观测的抗寒苜蓿新品系的物候期差别不大。

潘正武等<sup>[17]</sup>于 2009~2011 年在天祝高寒湿润气候区和西藏“两江两区”进行品种比较试验,挑选出了适应性较高的抗寒苜蓿品种苜蓿王等<sup>[18]</sup>。陈玲玲等<sup>[19-27]</sup>对国外苜蓿的研究表明,其物候期、株高、产量、分枝数、叶茎比等农艺性状的差异较大,这与青藏高原的高寒环境有着直接的关系,由于海拔高、气候多变、温差较大、降水时间不均匀,适宜苜蓿生长的时间相对较短(5~8 月),致使苜蓿生长缓慢,无法完成整个生育期。越冬率是最重要的一个抗寒生理指标,其大小可以反映苜蓿品种的抗寒能力。在低温胁迫下,植株的越冬率越高,抗寒性越强,越能适应高寒气候。试验所用的抗寒苜蓿品系在高寒湿润气候区两年平均越冬率比对照材料高,其中,GNKH-3、GNKH-2 越冬率均超过 80%。高寒湿润气候区两年的平均干草产量均是抗寒苜蓿品系显著高于对照苜蓿材料( $P < 0.05$ ),其中 GNKH-3 最高,GNKH-2、GNKH-1 次之。有研究表明植株高度是衡量牧草生长状况的重要指标,与产量呈正相关,高植株通常有更高的相对产量潜力<sup>[21-22]</sup>,这与试验结果相一致;高寒湿润气候区 3 个抗寒苜蓿品系株高比对照的 3 个苜蓿材料高,他们之间差异不显著。生长速度在一定程度上反映苜蓿生长能力的强弱<sup>[23]</sup>,高寒湿润气候区两年的平均生长速度为抗寒苜蓿品系高于对照苜蓿材料。牧草分枝(分蘖)数的多少在一定程度上影响其生产性能的高低<sup>[24]</sup>,苜蓿由于分枝数的增多,干物质产量也随之增加,高寒湿润气候区两年的平均分枝数抗寒苜蓿品系多于对照苜蓿材料,因此,干草产量也较高。供试材料高寒湿润气候区两年的平均叶茎比以 GNKH-3 最高,达到了 1.02。

### 3.2 ISSR 分子标记的检测效率及材料的遗传多样性分析

分子标记已经成为苜蓿育种中的重要辅助选择手

段。用 8 对引物在供试苜蓿材料中共获得 87 条扩增带,其中 54 条具有多态性,引物的多态位点百分率 62.07%。李红等<sup>[15]</sup>用 10 个引物对 30 份苜蓿材料共扩增出 112 条带,其中 59 条带是多态性条带,多态性比率的平均值为 74.5%。李哲等<sup>[16-17]</sup>用 4 条引物对 39 份苜蓿材料共扩增 22 条带,其中 21 条为多态性条带,多态性比率为 95.45%。张颖娟等<sup>[25]</sup>用 13 条引物对 12 份苜蓿材料共扩增出 346 条带,多态性条带 332 条,多态性条带百分比为 95.95%。扩增产物的多态性,能反映材料的遗传多样性<sup>[26]</sup>,以此为依据,供试苜蓿种质资源具有较丰富的遗传多样性。与多态位点百分率相比,基于 *Nei's* 基因多样性指数和基于条带表型频率的 Shannon's 信息指数更能客观地衡量材料的遗传多样性水平<sup>[27]</sup>,研究的 *Nei's* 基因多样性指数和 Shannon's 信息指数分别为 1.494 3 和 0.384 2,进一步表明供试苜蓿种质资源具有一定水平的遗传多样性。

### 3.3 供试材料间的亲缘关系分析

遗传相似系数是反映个体之间遗传相似程度和遗传背景一致性的度量值。3 个抗寒苜蓿品系间的遗传相似性为 0.873 7~0.954 0,对照材料间的遗传相似性为 0.747 1~0.862 1,材料间的遗传相似程度较高,亲缘关系较近。此次研究亲本材料阿尔冈金、陇东苜蓿、金皇后苜蓿在海拔 3 050 m 的青藏高原连续种植很多年,抗寒性能得到长期驯化,在选育过程中移植到暖温带,又移植到青藏高原高寒地区,进行多带驯化,抗寒能力得到提高,选育的抗寒苜蓿新品系与亲本材料形成明显的差异,GNKH-1 与亲本阿尔冈金的遗传相似性为 0.517 2;GNKH-3 与亲本金皇后的遗传相似性为 0.5517,遗传距离增大,遗传多样性丰富。GNKH-3 与阿尔冈金间的遗传相似性最小,为 0.482 8,说明它们在亲缘关系上离得最远,3 个抗寒苜蓿品系与对照材料的遗传相似性都比较小,介于 0.482 8~0.666 7,表明抗寒苜蓿品系与对照材料的亲缘关系相对较远,具有相对独立的遗传特性。

根据 6 份供试苜蓿材料的亲缘关系系统树,在遗传距离 0.78 处将 6 个苜蓿供试材料分为 2 类。第 1 类包含 GNKH-1,GNKH-2 和 GNKH-3 3 个抗寒苜蓿品系材料,具有高产、越冬率高、生产性能强的特点;第 2 类包含俄罗斯西伯利亚杂花、金皇后、阿尔冈金苜蓿 3 个对照品种材料,其产量、越冬率、生产性能相对第 1

类材料较低。在遗传距离 0.90 处,GNKH-3 单独聚类,为青藏高原地区抗寒苜蓿品种的选育提供了理论基础。GNKH-1 和 GNKH-2 各方面表现仅次于 GNKH-3。因此,在常规育种实践中,采用集团选择法在原有种质资源中发掘新的、有变异的种质资源及遗传特性相对独立的材料具有重要意义。

青藏高原缺乏适应性能好、高产优质的苜蓿品种,GNKH-3,GNKH-1 和 GNKH-2 的选育为在东北缘区域实现苜蓿的产业化提供了物质基础,有望解决青藏高原东北缘区豆科饲草缺乏的问题,实现高寒牧区家畜的营养平衡和健康养殖。

## 4 结论

(1)高寒湿润气候区各苜蓿材料主成分分析综合得分值排名为:GNKH-3>GNKH-2>GNKH-1>阿尔冈金>俄罗斯西伯利亚杂花>金皇后。GNKH-3 的综合得分最高,在高寒湿润气候区的适应能力最强;其次是 GNKH-2 和 GNKH-1。

(2)在遗传距离 0.78 处将 6 个供试苜蓿材料分为 2 类。第 1 类包含 GNKH-1,GNKH-2 和 GNKH-3 抗寒苜蓿品系材料,在高寒湿润气候区具有高产、越冬率高、生产性能强的特点;第 2 类包含俄罗斯西伯利亚杂花、金皇后、阿尔冈金苜蓿 3 个对照品种材料,其产量、越冬率、生产性能相对第 1 类材料较低。在遗传距离 0.90 处,GNKH-3 单独聚类。GNKH-3 为高寒湿润气候区最理想的优良苜蓿品系,GNKH-2 次之。

### 参考文献:

- [1] 魏双霞. 3 个抗寒苜蓿新品系地基本南高寒地区的适应性及生产性能评价[D]. 兰州:甘肃农业大学,2016.
- [2] 刘慧霞,王康英,郭正刚. 不同土壤水分条件下硅对苜蓿生理特性及品质的影响[J]. 中国草地学报,2011,33(3):2-27.
- [3] 李蕴玉. 畜禽生产[M]. 石家庄:河北科技出版社,2009:179-191.
- [4] 韩立辉,尚占环,任国华,等. 青藏高原“黑土滩”退化草地植物和土壤对秃斑面积变化的响应[J]. 草业学报,2011,20(1):1-6.
- [5] 朱博,师尚礼,倪磊,等. 12 个苜蓿材料速生性能综合评价[J]. 植物遗传资源学报,2014,14(2):436-440.
- [6] 王虹,师尚礼,刘正璟. 优质、速生、抗虫苜蓿多元杂交后代优良株系的性状分离与评价筛选[J]. 植物遗传资源学报,2015,15(6):1330-1337.
- [7] 丁培俊,索燕萍,李冬红,等. 甘南高寒牧区苜蓿引种试验

- 初报[J]. 中国草地学报, 2006, 28(5): 113-117.
- [8] 杨翌, 李红, 黄新育, 等. 应用灰色关联度综合评价 16 个引进苜蓿品种的生产性能[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2015(1): 105-108.
- [9] 李红, 李波, 赵洪波, 等. 苜蓿种质资源遗传关系的 ISSR 分析[J]. 草地学报, 2012, 20(1): 96-101.
- [10] 李哲, 师尚礼, 王虹. 苜蓿多元杂交后代的遗传多样性[J]. 草原与草坪, 2013, 33(4): 1-6.
- [11] 杨翌, 张新全, 李向林, 等. 应用灰色关联度综合评价 17 个不同休眠级苜蓿的生产性能[J]. 草业学报, 2009, 18(5): 67-72.
- [12] 韩清芳, 贾志宽. 苜蓿种质资源评价与筛选[M]. 杨凌: 西北农林科技大学出版社, 2004.
- [13] 孙洪, 程静, 詹克慧, 等. ISSR 标记技术及其在作物遗传育种中的应用[J]. 分子植物育种, 2005(1): 123-127.
- [14] 郭江波, 赵来喜. 中国苜蓿育成品种遗传多样性及亲缘关系研究[J]. 中国草地, 2004, 26(1): 9-13
- [15] 王晓娟, 孙月华, 杨晓莉, 等. 苜蓿遗传图谱构建及其应用[J]. 草业学报, 2008, 7(3): 119-127
- [16] 畅喜云, 范月君, 王晓力, 等. 青藏高原高海拔地区极抗寒苜蓿新品系选育报告[J]. 草业与畜牧, 2013(6): 101-106.
- [17] 潘正武, 富新年, 张起荣, 等. 天祝高寒地区苜蓿引种试验[J]. 草业科学, 2013, 21(10): 1589-1593.
- [18] 杨晓, 李锦华, 朱新强, 等. 西藏 "一江两河" 地区苜蓿生产性能灰色关联综合评价[J]. 中国农学通报, 2015, 02: 80-84.
- [19] 陈玲玲, 杨秀芳, 乌艳红, 等. 35 个苜蓿品种在内蒙古赤峰地区的生产性能评价[J]. 草业科学, 2012, 20(5): 11-13.
- [20] 郑红梅. 22 个苜蓿品种生长和品质特性研究及综合评价[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2005.
- [21] Davis R L, Baker R J. Predicting yields from associated characters in *Medicago sativa* L. [J]. Crop sci, 1966(2): 492-494.
- [22] 孟昭仪. 苜蓿品种引种鉴定及其推广应用的研究[C]// 中国国际草业发展大会论文集. 北京: 中国农业出版社, 1986.
- [23] 马彦麟, 齐广平, 汪精海, 等. 西北荒漠灌区紫花苜蓿产量和营养品质对水分调控的影响[J]. 甘肃农业大学学报, 2018, 53(6): 171-179.
- [24] 孙建华, 王彦荣, 余玲. 苜蓿生长特性及产量性状相关性研究[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 80-86.
- [25] 张颖娟, 王斯琴花. 不同苜蓿种质材料的 ISSR 分析及遗传多样性研究[J]. 中国草地学报, 2014, 03: 35-39.
- [26] 段永红, 渠云芳. 遗传标记在植物研究中的应用[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 210-221.
- [27] 刘晓生, 郑道序, 周春娟, 等. 潮汕余甘子种质资源遗传多样性与亲缘关系的 ISSR 分析[J]. 中国南方果树, 2014, 43(1): 18-22.

## Production performance evaluation and ISSR analysis of genetic diversity of cold-resistant *Medicago sativa*

WEI Shuang-xia, SHI Shang-li, KANG Wen-juan, TAN Shen-miao

(College of Pratacultural Science /Key Laboratory of Grassland Ecosystem of Ministry of Education/ Sino-U. S. Center for Grazingland Ecosystem Sustainability, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China)

**Abstract:** The production performance and genetic diversity of 3 cold-resistant materials (GNKH-1, GNKH-2 and GNKH-3) of *Medicago sativa* was studied in cold humid climate zone and *M. sativa* subsp. *varia*, *M. sativa* cv. Condens Empress and *M. sativa* cv. Algonquin were used as controls. Result showed that the average wintering rate and hay yield of GNKH-3 were the highest (85.55% and 5.74 t/ha), which was 70.19%, 70.83%, 56.72% digger than that of *M. sativa* subsp. *varia*, *M. sativa* cv. Golden Empress and *M. sativa* cv. Algonquin. The plant height (62.03 cm), growth rate (0.80 cm/d), branch number (15.3) and leaf-stem ratio (1.

02) of GNKH-3 were higher than controls. According to the ISSR molecular marker results, the polymorphic loci was 62.07%. The average value of gene diversity index and Shannon's information index were 0.267 6 and 0.384 2 respectively. The low genetically similarity between 3 cold-resistant materials and controls ranged from 0.482 8 to 0.666 7. The tested materials were divided into two groups based on clustering analysis at genetic distance of 0.78 by eight primers. The cold-resistant materials were clustered in Group 1 for their high yield and production performance. Group two included 3 materials in control group for their low productivity. PCA comprehensive rank of tested materials was GNKH-3>GNKH-2>GNKH-1>*M. sativa* cv. Algonguin>*M. sativa* var. varia>*M. sativa* cv. Golden Empress.

**Key words:** alfalfa; new strains; production performance; ISSR; principal component analysis

.....  
(上接 14 页)

## Comprehensive evaluation of wintering characterization of 10 alfalfa varieties in Ningxia Yellow River Irrigation Area

LI Tao, LI Ming-yu, LIU Guang-rui, BI Sheng-nan, LAN Jian

(College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China)

**Abstract:** The wintering performance of different alfalfa (*Medicago sativa*) varieties was evaluated in Yellow River Irrigation Area in Ningxia through measuring the agronomic traits (plant height, branch number, root crown depth and diameter) of 10 varieties. And the data were analyzed by using grey correlation method and system cluster analysis for comprehensive evaluation and classification. The results showed that the order of correlation degree of 5 agronomic traits and wintering rate of alfalfa was as follows: dry matter yield > wintering rate > plant height > root crown diameter > root crown depth > branch number, and the grey correlation degree was WL354HQ > WL903 > WL326GZ > WL353HQ > WL363HQ > WL343HQ > WL319HQ > WL366HQ > WL168HQ > WL298HQ. The wintering characterization of 10 alfalfa varieties could be divided into 2 groups and 4 subgroups by systematic cluster analysis. The comprehensive analysis showed that the wintering ability of WL326GZ, WL354HQ, WL903 and WL353HQ was strong.

**Key words:** alfalfa; wintering characterization; grey correlation analysis; comprehensive evaluation