

高加索三叶草与白三叶杂交 F₁ 代株系的 ISSR 分析

周莹¹, 王明玖¹, 陈国清¹, 黄帆²

(1. 内蒙古农业大学 草原与资源环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019; 2. 中国农业科学院 草原研究所, 内蒙古 呼和浩特 010010)

摘要:为了培育出能够在内蒙古地区大面积推广的优良三叶草品种,以高加索三叶草(2n=6×=48)为母本,白三叶(2n=4×=32)为父本,通过远缘杂交及胚拯救技术得到了杂种 F₁ 代,选择 9 个杂交 F₁ 代稳定株系,以亲本为对照,采用 ISSR 分子标记技术分析其遗传差异性。结果表明:16 个适宜引物共扩增出 111 条条带,多态性条带 72 条,多态性条带百分率为 64.86%;11 个供试材料间的遗传距离变幅为 0.073 4~0.477 1,平均值为 0.241 2;9 个杂种 F₁ 代的株系与父本白三叶之间的遗传距离较大,遗传相似系数较小,表明 9 个杂种 F₁ 代的株系表达了更多源于母本的遗传信息。

关键词:高加索三叶草;白三叶;杂种 F₁ 株系;ISSR 分析

中图分类号:S 541+.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2017)12-0103-05

高加索三叶草(*Trifolium ambiguum* Bieb.)原产于寒冷的高加索山地、土耳其东部和伊朗北部等地区^[1],主根入土深,是三叶草属牧草中唯一具有根瘤的种。该三叶草适应性强,有良好的耐旱、抗寒、耐频繁刈割及耐放牧等特性,是目前唯一可以在内蒙古地区正常越冬及栽培利用的长寿命三叶草种^[2-3],但其固氮能力差,在自然状况下不能形成根瘤进行生物固氮^[4-5],只有通过专一性根瘤菌接种或通过与白三叶杂交育种后才可能形成固氮能力^[6]。白三叶(*T. repens* L.)为多年生草本植物,是世界上广泛栽培的三叶草种,目前已经形成多个品种。白三叶具匍匐生长特性,主根入土浅,侧根发达,再生性好,固氮能力强。但其抗寒、抗旱能力差,在内蒙古等北方寒冷干燥地区难以进行大面积推广应用^[7-11]。在内蒙古地区,野生白三叶为逸生种,仅存在于冬季积雪较厚的大兴安岭林区等地。目前,由高加索三叶草(母本)和白三叶(父本)杂交形成了多个形态特征稳定的 F₁ 代株系^[11],希望以此为基础选育出具有理想性状的新品系,尤其是选育出继承白

三叶固氮性状的品系。所以,确定 F₁ 代株系的遗传特性对于加快新品系的培育进程具有重要意义。

ISSR 分子标记技术是目前常用的分子生物学分析手段^[12],是基于微卫星 DNA(SSR)发展起来的一种新型简单序列重复区间 DNA 扩增多态性检测技术^[13]。该研究拟利用该技术对高加索三叶草与白三叶的 9 个杂交 F₁ 代株系的 DNA 多态性位点进行分析,以此鉴定各株系的杂交真实性及与父母本之间的遗传关系,以期揭示杂种 F₁ 代株系与亲本在 DNA 水平上的遗传差异,从分子水平确定其遗传差异程度,为亲缘关系评价和辅助育种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试高加索三叶草(Ta)和白三叶(Tr)及 9 个杂种 F₁ 代株系(A1、A2、B1、B2、C1、C2、D1、D2、E1)取自内蒙古农业大学校内试验田。所有选择的 F₁ 代株系都具有与父、母本相似的形态特征,结实率和发芽率较高(表 1)。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取与保存 选取供试材料各 10 株,随机摘取花期幼嫩叶片,用植物基因组试剂盒提取 DNA。用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度,根据电泳检测结果,将 DNA 浓度调整为

第一作者简介:周莹(1992-),女,硕士研究生,研究方向为草地生态学。E-mail:zhouy511@163.com.

责任作者:王明玖(1961-),男,博士,教授,博士生导师,研究方向为草地生态学。E-mail:wangmj_0540@163.com.

收稿日期:2017-03-07

表 1 高加索三叶草和白三叶及 9 个杂种 F₁ 代株系的形态特征Table 1 Morphological characteristics of *Trifolium ambiguum* Bieb., *T. repens* L. and 9 hybrid F₁

材料	叶形	叶斑	叶缘	花	种子形状	发芽率	结实率
Material	Leaf shape	Tikka	Leaf margin	Flower	Seed shape	Germination rate/%	Setting rate/%
Ta	倒卵形	灰白色 V 型斑纹	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	72	86.0
Tr	倒心形	白色 V 型叶斑	锯齿状	白色	心脏形	92	84.0
A1	椭圆形	灰白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或深粉色	卵形至长椭圆形	84	62.4
A2	卵形	白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	86	66.8
B1	卵形	白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	85	62.0
B2	卵形	灰白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	91	51.0
C1	卵形	白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	80	53.0
C2	卵形	白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	85	37.0
D1	卵形	灰白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	83	66.0
D2	卵形	白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	83	84.0
E1	卵形	灰白色 V 型叶斑	锯齿状	白色或淡粉色	卵形至长椭圆形	76	78.0

20 ng · μL⁻¹, 置 -20 °C 保存备用。

1.2.2 ISSR-PCR 反应体系及程序 参照刘欢等^[14]、王育青等^[15]、沙伟等^[16]、石凤玲等^[17]方法,在 20 μL 的反应体系中,含有模板 DNA 1 μL、引物 1 μL、2 × Taq PCR Master Mix 10 μL 和 ddH₂O 8 μL。PCR 扩增程序为 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 50~72 °C (根据不同引物确定) 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 共 35 个循环; 此后 72 °C 延伸 10 min, 4 °C 保温备用。

1.2.3 电泳检测及引物筛选 取 5 μL 预扩增产物, 用 2% 的琼脂糖凝胶进行电泳, 电压为 150 V, 电泳时间为 55 min。之后使用核酸染料进行染色并在 Uvitec 凝胶成像系统(Biospectrum 410)中照相保存。以高加索三叶草和白三叶的基因组 DNA 为模板, 进行 ISSR 适宜引物的筛选。从 32 个待选引物(梓熙生物有限公司合成)中筛选出条带清晰、稳定性好、多态性丰富的适宜引物用于 ISSR 的扩增(表 2)。

表 2 ISSR 待筛选的引物序列

Table 2 ISSR primers sequence selected in the study

序号	引物名称	引物序列(5'-3')	序号	引物	引物序列(5'-3')
Number	Primer	Primer sequence	Number	Primer	Primer sequence
1	S2	(AG)8GC	17	UBC848	(CA)8RG
2	S7	(AC)8CG	18	UBC849	(GT)8YA
3	S10	(GA)8CC	29	UBC850	(GT)8YC
4	S20	(TC)8CC	20	UBC851	(GT)8YG
5	S22	(CT)8G	21	UBC807	(AG)8T
6	S25	(CG)8	22	UBC810	(GA)8T
7	S27	(AG)8AC	23	UBC812	(GA)8A
8	S28	(AG)8TC	24	UBC817	(CA)8A
9	S30	(AC)8GA	25	UBC822	(TC)8A
10	S33	(AC)8GT	26	UBC825	(AC)8T
11	S34	(AC)8CT	27	UBC826	(AC)8C
12	S35	(AC)8AG	28	UBC834	(AG)8CTT
13	S37	(GA)8CT	29	UBC835	(AG)8CTC
14	S41	(CT)8A	30	UBC846	(CA)8RAGT
15	S43	(CT)8TC	31	UBC856	(AC)8CTA
16	UBC841	(GA)8YC	32	UBC848	(CA)8RG

注: R=(A,G), Y=(C,T)。

Note: R=(A,G), Y=(C,T)。

1.3 数据分析

按照供试材料点样的顺序统计胶板上清晰可重复的条带, 对 11 个供试材料的多态性条带进行分析比对。在有差异谱带的位置, 若“无带”则记作“0”, “有带”则记作“1”, 若没有多态的位点只记录相同引物扩增的条带总数。把这些信息输入 Excel 2007 中, 构建“0,1”矩阵, 计算相关遗传系数^[18]: 多态性条带百分率(P, %) = $K/N \times 100$, 其中 K 为扩增出的多态条带数目, N 为扩增出的条带总数。遗传相似系数(GS) = $2N_{ij}/(N_i + N_j)$, 其中 N_{ij} 是指材料 i 和材料 j 共有的片段数目, $N_i + N_j$ 指在 2 个材料中出现的片段数目之和。遗传距离(GD) = $1 - GS$, 运用 NTSYS 2.10 软件和 PopGen 32 软件进行统计分析。

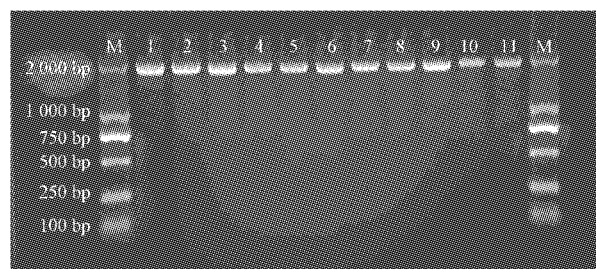
2 结果与分析

2.1 DNA 纯度检测

通过植物基因组试剂盒提取, 获得了清晰、无弥散现象的 11 个供试材料的 DNA 电泳条带, 说明所提取的 DNA 纯度较高, 无降解现象, 满足 ISSR 分析的要求(图 1)。

2.2 ISSR 扩增产物多态性分析

从 32 条引物中筛选出 16 个条带清晰的引物, 用于 11 个供试材料的 PCR 扩增。共检测到 111 条条带, 平均每个引物扩增出 6.94 条条带。其中, 多态性条带为 72 条, 多态位点比率为 64.86%, 扩增片段大小为 100~2 000 bp(图 2)。不同引物扩增的条带数为 2~11, 多态性条带数为 1~10, 多态性条带百分率在 40.00%~90.91%。16 个引物中, 以引物 S30 和 BUC810 扩增的条带最多, 为 11 条; 引物 S43 扩增的条带最少, 为 2 条(表 3)。



注: M, DNA Marker; 1. A1; 2. A2; 3. B1; 4. B2; 5. C1; 6. C2; 7. D1; 8. D2; 9. E1; 10. Tr; 11. Ta. 下同。

Note: M, DNA Marker; 1. A1; 2. A2; 3. B1; 4. B2; 5. C1; 6. C2; 7. D1; 8. D2; 9. E1; 10. Tr; 11. Ta. The same below.

图1 高加索三叶草和白三叶及9个杂种

F₁代株系的基因组DNA电泳检测

Fig.1 Genomic DNA electrophoresis of *Trifolium ambiguum* Bieb., *T. repens* L. and 9 hybrid F₁

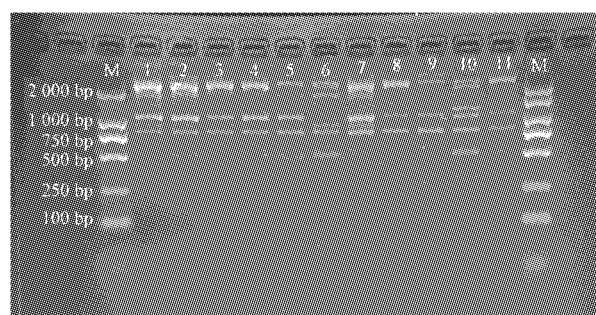
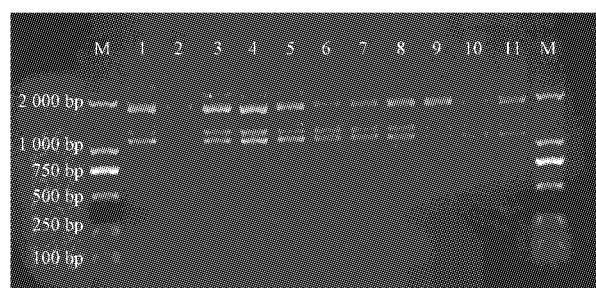


图2 高加索三叶草和白三叶及9个杂种

F₁代株系部分引物的ISSR扩增结果

Fig.2 ISSR result of *Trifolium ambiguum* Bieb., *T. repens* L. and 9 hybrid F₁ with partial primers

表3 筛选出的引物序列及扩增结果

Table 3 Primers sequence and amplification results

引物 Primer	序列(5'-3') Primer sequence	退火 温度 T _m /℃	扩增条带数 Number of amplified bands	多态性条带数 Number of polymorphic bands	多态性位点比例 Percent of polymorphic locus/%
S2	(AG)8GC	54.6	4	3	75.00
S10	(GA)8CC	57.3	6	3	50.00
S20	(TC)8CC	57.3	5	4	80.00
S22	(CT)8G	54.6	7	5	71.43
S30	(AC)8GA	55.0	11	10	90.91
S33	(AC)8GT	55.0	7	6	85.71
S41	(CT)8A	52.2	5	2	40.00
S43	(CT)8TC	55.0	2	1	50.00
UBC807	(AG)8T	52.2	8	4	50.00
UBC810	(GA)8T	52.2	11	9	81.82
UBC822	(TC)8A	52.2	9	7	77.78
UBC834	(AG)8CTT	55.4	7	3	42.86
UBC835	(AG)8CTC	57.6	10	6	60.00
UBC841	(GA)8YC	55.0	9	4	44.44
UBC849	(GT)8YA	52.7	5	3	60.00
UBC850	(GT)8YC	55.0	5	2	40.00
合计 Total			111	72	64.86

2.3 遗传相似系数与遗传距离

为明确 11 个试验材料之间的遗传关系,根据 Nei 计算方法得到高加索三叶草、白三叶和 9 个杂种 F₁ 代植株间的 GS,并根据 GS 计算得到 GD(表 4)。其中,D1 和 E1 的 GS 最大为 0.926 6,表示 2 个材料的遗传性状最相似;D1 和白三叶的 GS 最小为 0.522 9,则说明杂种 D1 与白三叶的遗传性状差距较大;9 个杂种 F₁ 株系与高加索三叶草之间的 GS 在 0.715 6~0.853 2,与白三叶之间的 GS 在 0.522 9~0.596 3。这在遗传关系的角度上,杂种 F₁ 代更接近于母本高加索三叶草,更多的遗传了高加索三叶草的遗传信息。

11 个供试材料间的 GD 在 0.073 4~0.477 1,平均值为 0.241 2。其中,杂种 F₁ 代的 D1 与 E1 的 GD 最小为 0.073 4,即 D1 和 E1 的遗传性状最相似;C1 与白三叶的 GD 最大是 0.467 9,杂种 C1 与白三叶的遗传性状差距最大。9 个杂种 F₁ 代与高加索三叶草的 GD 在 0.146 8~0.284 4,与白三叶的 GD 在 0.403 7~0.477 1,9 个杂种 F₁ 的株系与高加索三叶草的 GD 都小于与白三叶的 GD,所以 9 个杂种 F₁ 代更多的表达了母本的遗传性状。

2.4 高加索三叶草与白三叶杂交的 9 个杂种 F₁ 代株系的聚类分析

根据遗传相似系数,采用 UPGMA 法构建遗传关系聚类图。当 GD=0.93,D1 和 E1 划为一类,其它各自为一类,D1 和 E1 的形态特征也极其相像;当

$GD=0.89$, A1、B2、Ta、Tr 各为一类, A2 和 B1 为一类, C1 和 C2 为一类, D1、D2 和 E1 为一类; 当 $GD=0.86$, A1、Ta、Tr 各为一类, A2、B1 和 B2 为一类, C1、C2、D1、D2 和 E1 为一类; 当 $GD=0.77$, 11 个供试材料可以分为三大类, 第一类为 A1、A2、B1 和 B2, 第二类为 C1、C2、D1、D2、E1 和 Ta, 表明 D1、D2 和 E1 与

父本 Ta 遗传性状更相近, 第三类为 Tr; 当 $GD=0.76$, 可分为两大类, 即 Tr 单独为一类, 其余的 10 个材料归为一大类。由此可以看出, 杂交 F_1 代的 C1、C2、D1、D2 和 E1 比 A1、A2、B1 和 B2 更接近于母本高加索三叶草的遗传性状, 在形态特征上也更为相近(图 3)。

表 4 高加索三叶草、白三叶及 9 个杂种 F_1 代株系的遗传相似系数和遗传距离

Table 4 Genetics similarity and distance of *Trifolium ambiguum* Bieb., *T. repens* L. and nine plants of hybrid F_1

材料 Material	A1	A2	B1	B2	C1	C2	D1	D2	E1	Tr	Ta
A1		0.201 8	0.201 8	0.284 4	0.256 9	0.238 5	0.247 7	0.220 2	0.229 4	0.449 5	0.229 4
A2	0.798 2		0.128 4	0.137 6	0.256 9	0.220 2	0.174 3	0.220 2	0.192 7	0.431 2	0.284 4
B1	0.798 2	0.871 6		0.174 3	0.256 9	0.220 2	0.229 4	0.256 9	0.229 4	0.431 2	0.229 4
B2	0.715 6	0.862 4	0.825 7		0.211 0	0.229 4	0.238 5	0.247 7	0.256 9	0.403 7	0.256 9
C1	0.743 1	0.743 1	0.743 1	0.789 0		0.128 4	0.119 3	0.146 8	0.156 0	0.467 9	0.174 3
C2	0.761 5	0.779 8	0.779 8	0.770 6	0.871 6		0.137 6	0.146 8	0.137 6	0.449 5	0.192 7
D1	0.752 3	0.825 7	0.770 6	0.761 5	0.880 7	0.862 4		0.137 6	0.073 4	0.477 1	0.165 1
D2	0.779 8	0.779 8	0.743 1	0.752 3	0.853 2	0.853 2	0.862 4		0.101 0	0.449 4	0.156 0
E1	0.770 6	0.807 3	0.770 6	0.743 1	0.844 0	0.862 4	0.926 6	0.899 0		0.440 4	0.146 8
Tr	0.550 5	0.568 8	0.568 8	0.596 3	0.532 1	0.550 5	0.522 9	0.550 5	0.559 6		0.385 3
Ta	0.770 6	0.715 6	0.770 6	0.743 1	0.825 7	0.807 3	0.834 9	0.844 0	0.853 2	0.614 7	

注: 对角线以上为 GD , 对角线以下为 GS 。

Note: Genetic similarity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

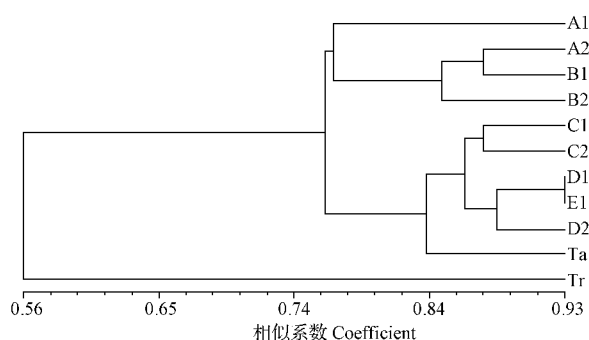


图 3 高加索三叶草、白三叶及 9 个杂种 F_1 代株系的聚类分析

Fig. 3 Cluster analysis of *Trifolium ambiguum* Bieb., *T. repens* L. and 9 hybrid F_1

3 讨论与结论

ISSR 分子标记技术操作简单, 所显示的遗传多态性高且重复性好, 在植物遗传作图、基因定位、种质资源分类学与种系发生学等方面得到了迅速而广泛的应用^[15,20]。刘青松等^[21]通过 ISSR 分子标记技术成功地将不同农艺性状的苜蓿分成四大类。孟丽娟等^[22]建立了红三叶的 ISSR-PCR 优化体系。但是该方法有需要注意的地方, 在进行 PCR 扩增时, 引物的设计是一个关键环节, 会直接影响到扩增产物的多态性, 这与索志立等^[23]用 ISSR 标记研究牡丹所得到的结论相似。

杂交可以使后代继承父母本的优良性状或创造出新的优良性状, 丰富物种遗传多样性, 拓宽生境, 进而促进基因组进化和物种进化^[24]。在高加索三叶草与白三叶杂种后代鉴定中, 确定杂种后代的真实性十分必要, 这样在早期就可预测后代的性状更趋向母本还是父本, 进而可以确定杂种是否需要继续培育和选择, 以降低育种成本^[25]。经研究鉴定 9 个杂种 F_1 代株系的性状均更趋向于母本高加索三叶草。

高加索三叶草与白三叶的杂交 F_1 代若能继承父本的固氮能力将会是巨大的突破。黄帆^[11]的研究表明杂种 F_1 代经过根瘤菌的接种可以正常的生长根瘤, 也可与白三叶或豆科牧草混播进行氮替换^[6]。该研究从 32 个 ISSR 引物中筛选出了多态性丰富和重复性好的引物 16 个, 通过对高加索三叶草、白三叶以及 9 个杂种 F_1 代株系基因组 DNA 的 PCR 扩增, 结果表明, 亲本间、亲本与杂种 F_1 代之间均存在较大的遗传差异, 杂种 F_1 代均更多的表达了母本高加索三叶草的遗传信息和遗传性状, 即有适应性强、抗寒、抗旱、耐刈割等优良特性, 但还是不能固氮, 仍需要更进一步的研究。

植物杂种优势的产生在一定程度上取决于亲本之间的遗传差异, 遗传差异大说明其亲缘关系较远, 其杂交后代的杂种优势较大^[26-27]。周亚星等^[28]在对散穗高粱与苏丹草杂种的研究中提到植物表型性状

是基因表达的结果,但表型性状因受环境条件的影响,仅从表型上有时难以判断亲本间遗传差异的大小,并难以预测其后代杂种优势的强弱。

参考文献

- [1] 殷秀杰.高加索三叶草在内蒙古地区适应性和利用价值研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2004.
- [2] 魏春秋,王明玖.高加索三叶草青贮饲料的制作及质量变化[J].草业科学,2010(2):134-138.
- [3] 殷秀杰,王明玖,石凤翎.高加索三叶草和白三叶幼苗期抗旱性生理研究[J].内蒙古农业大学学报,2004,25(2):119-123.
- [4] 魏春秋.高加索三叶草生长特性及影响品质变化的因素[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
- [5] 崔英.三种三叶草的耐盐性和抗寒性研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2006.
- [6] ABBERTON M T, MACDUFF J H, MARSHALL A H, et al. Nitrogen fixation in hybrids of white clover (*Trifolium repens* L.) and Caucasian clover (*Trifolium ambiguum* M. Bieb.) [J]. Blackwell Wissenschafts-veflag Gihoh, 2000, 105(4): 241-247.
- [7] 杨珍.高加索三叶草与白三叶草及其杂交胚离体培养技术的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2008.
- [8] 陈丽丽,王明玖,何丽君,等.高加索三叶草、白三叶及其杂种 F₁ 代的 RAPD 分析[J].中国草地学报,2011(5):40-44.
- [9] 梁晓敏.两种三叶草杂交胚离体培养与 F₁ 代扩繁及其鉴定[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2009.
- [10] 黄帆,王明玖,何丽君,等.高加索三叶草、白三叶及其杂种 F₁ 代的 ISSR 分析[J].中国草地学报,2012(6):107-112.
- [11] 黄帆.高加索三叶草与白三叶杂交后代遗传特性及育性恢复的研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2012.
- [12] ZIETKIEWICZ E, RAFSLSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994(20): 176-183
- [13] 黄帆,王明玖,何丽君,等.白三叶×高加索三叶草 F₁ 代茎段离

体培养器官发生的研究[J].草业科学,2010(5):85-90.

- [14] 刘欢,慕平,赵桂琴,等.燕麦 ISSR 反应体系的建立与优化[J].中国草地学报,2010,32(4):80-85.
- [15] 王育青,王晓晶,王建光.马蔺 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].中国草地学报,2010,32(2):80-85.
- [16] 沙伟,藤兆岩,倪红伟.正交设计优化星星草 ISSR-PCR 反应体系研究[J].中国草地学报,2006,28(6):52-55.
- [17] 石凤玲,石凤翎,高翠萍,等.人工老化紫花苜蓿种子活力变化与 ISSR 标记[J].中国草地学报,2015(6):30-34.
- [18] NEI M, LI W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Nat Acad Sci, 1979, 76: 5269-5273.
- [19] 王瑜,袁庆华.紫花苜蓿 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].草地学报,2007,15(3):212-215.
- [20] 王方,袁庆华.冰草 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].草地学报,2009,17(3):354-357.
- [21] 刘青松,陈立波,李志勇,等.不同苜蓿农艺性状研究及 ISSR 分子标记分析[J].华北农学报,2014,29(3):109-114.
- [22] 孟丽娟,赵桂琴.红三叶 ISSR-PCR 反应体系的建立与优化[J].草原与草坪,2015,35(2):21-25.
- [23] 索志立,张会金,张治明,等.紫斑牡丹与牡丹种间杂交后代的 DNA 分子证据[J].云南植物研究,2005(1):42-48.
- [24] 乔燕春,林顺权,何小龙.普通枇杷种内和种间杂种苗的 RAPD 鉴定[J].果树学报,2010(3):385-390.
- [25] 胡凤荣,何国仁,王斐,等.利用 ISSR 分子标记方法鉴定风信子杂种后代[J].分子植物育种,2015(6):1336-1342.
- [26] 秦泰辰.杂种优势利用原理和方法[M].南京:江苏科学技术出版社,1981.
- [27] 李竞雄,周洪生.作物雄性不育及杂种优势研究进展(I)[M].北京:中国农业出版社,1996.
- [28] 周亚星,于卓,马艳红,等.散穗高粱与苏丹草杂种的 ISSR 分析[J].草地学报,2009(6):718-722.

ISSR Analysis for Hybrid F₁ of *Trifolium ambiguum* Bieb. and *T. repens* L.

ZHOU Ying¹, WANG Mingjiu¹, CHEN Guoqing¹, HUANG Fan²

(1. College of Grassland and Resource and Environmental Science, Inner Mongolia Agricultural University, Hohhot, Inner Mongolia 010019; 2. Grassland Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Hohhot, Inner Mongolia 010010)

Abstract: With *Trifolium ambiguum* Bieb. (2n=6×=48) as female parent and *T. repens* L. (2n=4×=32) as male parent, by outcrossing and embryo rescue technology, their hybrid F₁ plants were obtained. Genetic difference degree of 9 strains hybrids F₁ and their parents were analyzed via ISSR molecular markers. The results showed that 111 bands of ISSR markers were amplified with 16 primers, and length of DNA fragment ranged from 100 bp to 2 000 bp, 72 bands were polymorphic, and percentage of polymorphic bands reached 64.86%. The genetic distance(GD) of 11 tested plant materials ranged from 0.073 4 to 0.477 1, with average of 0.241 2. The genetic distance among 9 strain hybrids F₁ and *T. repens* L. was larger. The genetics similarity among 9 strain hybrids F₁ and *T. repens* L. was less than *Trifolium ambiguum* Bieb., 9 strain hybrids F₁ expressed more parental genetic information.

Keywords: *Trifolium ambiguum* Bieb.; *T. repens* L.; F₁ hybrids; ISSR analysis