

20 份甜高粱遗传多态性的 RAPD 和 SSR 分析

徐 影 詹秋文 董书军 李杰勤 林 平

(安徽科技学院,安徽 凤阳 233100)

摘要: 利用 RAPD 和 SSR 分子标记技术,旨在探讨来自不同地区的 20 份甜高粱杂交种和品种资源遗传多态性及亲缘关系。试验结果表明,筛选出 31 条 RAPD 引物在 20 份甜高粱的 DNA 中产生稳定清晰条带数为 202 条,其中多态性片段 167 条,多态率为 82.67%,品种间的遗传相似系数(GS)为 0.613~0.870,平均值为 0.744;筛选出 91 对 SSR 引物在 20 份品种资源的 DNA 中扩增片段数为 297 条,其中多态性片段 267 条,多态率为 89.90%,品种间的遗传相似系数(GS)为 0.555~0.837,平均值为 0.695;20 份甜高粱的 2 种分子标记的单独聚类分析结果表现出一定差异,但 2 种趋势大致相近;结合 RAPD 和 SSR 这 2 种标记联合数据的品种聚类分析结果,更能全面客观地反映品种间的遗传多态性及亲缘关系。

关键词: 甜高粱;聚类分析;SSR;RAPD;多态性

中图分类号: S514.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)01-0012-07

Genetic Polymorphism of 20 Sweet Sorghum Cultivars as Revealed by RAPD and SSR Markers

XU Ying ZHAN Qiu-wen DONG Shu-jun LI Jie-qin LIN Ping

(Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China)

Abstract: This study analyzed the genetic polymorphism and relationship of 20 sweet sorghum cultivars by RAPD and SSR molecular markers. The results showed that 31 polymorphism primers were obtained from the screening using RAPD marker analysis. A total of 202 bands were obtained; 167 of them showed polymorphisms, with a polymorphism rate of 82.67%; the genetic similarity(GS) coefficients among the studied cultivars ranged from 0.613 to 0.870; the average genetic similarity coefficient was 0.744. A total of 297 bands were amplified from these 91 pairs of SSR primers, and 267 bands showed polymorphisms, with a polymorphism rate of 89.90%, and genetic similarity coefficients ranging from 0.555 to 0.837 among the 20 sweet sorghum varieties were obtained, and the average value was 0.695. This result displayed a similar trend with results from the 2 individual data analyses discussed above for RAPD and SSR molecular markers, with some differences. The results based on combined data could more comprehensively and objectively reflect the fundamental genetic differences among these varieties.

Key words: Sweet sorghum; Cluster analysis; SSR; RAPD; Polymorphism

进入 21 世纪以后,国际能源消耗飞速增长,价格攀升,能源短缺和污染问题日趋突出,以燃料酒精为代表的替代能源在技术、经济和环保等方面取得了突破性进展,目前已确定 40 多种有价值的能源作物。甜高粱具有抗旱、耐涝、耐盐碱、耐贫瘠、含糖量高的特点,是生产乙醇的最佳原料之一,是一个再生地面油田^[1]。另外,甜高粱还是重要甜料作物和优良的饲料作物,具有可观的经济价值。在众多的能

源作物中,甜高粱被誉为“能源系统中的最有竞争力者”^[2],对其开发和利用越来越受到重视^[1-2]。近几年来,要求参加全国甜高粱品种区域试验的品种与前几年相比急剧增加,2008 年为 13 个,2009 年达到 14 个,2010、2011 年分别为 13、10 个。选育品种增多是一件可喜的事情,但这些新育成品种的遗传多样性及亲缘关系如何?它们与国际上通用的甜高粱种质资源的亲缘关系怎样?应该进行研究。因

收稿日期: 2012-10-27

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071470);科技部“十二五”农村领域国家科技计划课题(2011BAD17B03);科技部农业科技成果转化资金项目(2008GB2C300125);安徽省“115”产业创新团队(皖人才办[2009]2号)

作者简介: 徐 影(1989-),女,安徽阜南人,在读硕士,主要从事分子遗传研究。

通讯作者: 詹秋文(1963-),男,安徽宿松人,教授,博士,主要从事饲料及能源作物遗传育种研究。

为只有了解新选育甜高粱品种的遗传差异,才能了解我国品种资源的遗传基础,也利于在未来的育种工作中有针对性地选择亲本,从而在杂种一代获得最大遗传优势,或许这对我国甜高粱的遗传改良和突破性育种具有重要意义。以往,甜高粱育种主要从系谱来源和农艺性状上来判断品种间的遗传差异,虽然有效,但易受到环境条件和经验的限制,不能准确地反映育种材料的遗传差异。DNA 分子标记技术的出现和发展,为遗传差异的选择和分析提供了新的研究方法,尤其 RAPD 和 SSR 标记已广泛应用于作物的分类研究、品种鉴定、系谱分析、遗传图谱构建和基因标记等研究^[2-14]。RAPD(Random amplified polymorphism DNA)即随机扩增多态性 DNA,是利用一系列随机引物对基因组 DNA 进行 PCR 扩增,每一特定引物都有其特定的结合位点,扩增片段多态性即反应基因组相应区域 DNA 多态性,因需样品量少、易操作、快捷简便,被广泛应用^[2-8];SSR(Simple sequence repeats)即简单重复序列或卫星标记,其重复性好、稳定性高和多态性丰富,近年来已成为研究者首选的分子标记^[6-14]。目前利用 2 种分子标记联合分析新育成甜高粱品种遗传亲缘关系的研究未见报道。

本研究利用 SSR 和 RAPD 这 2 种分子标记技术,对来自不同地区的 20 份甜高粱品种进行遗传多样性及亲缘关系分析,旨在为甜高粱遗传基础的拓展以及指导甜高粱育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料见表 1。其中 1~13 号品种为中国近年来选育的青贮/能源型甜高粱杂交种(试验种子由国家高粱改良中心提供),17~19 号品种为国际上通用的甜高粱种质资源,14~16 号及 20 号为本单位收集的安徽省农家甜高粱种质资源。

1.2 试验方法

1.2.1 总 DNA 的提取 试验材料于 2010 年 5 月种植于安徽科技学院种植科技园,苗期取叶片,用于 DNA 提取。DNA 的提取采用 SDS 法^[8],并作部分修改。取 2 g 左右叶片剪碎置于研钵中,加入适量的 SDS 提取液和少量的石英砂,研磨至匀浆,将研磨液转入 1.5 mL 的 EP 管中,约 0.3 mL,再加入 SDS 提取液,约 0.5 mL,摇动 EP 管,使其充分混匀,盖上盖子。将 EP 管放入 65 ℃ 的恒温水浴锅中,记下时间,加热 30 min,每隔 5 min 摇一次。加热完成后,取出 EP 管,用移液枪加入 200 μ L 预冷的 KAC,

盖上盖子,冰水浴 20 min。取出加入氯仿:异戊醇(24:1)至满,盖上盖子,上下颠倒摇晃约 5 min。4 ℃ 低温离心,10 000 r/min、10 min。取出 EP 管,用移液枪吸取上清液并转入另一个 EP 管(已加入约 0.3 mL 预冷的无水乙醇)中,再加适量冷无水乙醇,摇匀,使其充分混合,放在通风的地方,约 15 min,让 DNA 析出。如果 DNA 析出较多且成块,可用牙签挑出;如果少且不明显,再次加入预冷的无水乙醇至满,低温离心,4 ℃、10 000 r/min、5 min。离心后,倒出无水乙醇,用 75% 的乙醇冲洗 DNA 3 次,每次间隔 5 min,最后用无水乙醇清洗 1 次。倒出无水乙醇,通风处自然挥发,约 12 h 加入 ddH₂O 200 μ L,振荡仪震荡溶解 DNA,置于 -18 ℃ 冰箱保存备用。

表 1 试验材料名称及来源

Tab.1 The names and origins of 20 sweet sorghum cultivars tested

编号 Code	品种 Name	来源 Origin
1	辽甜 11	辽宁省农科院高粱所
2	辽甜 8 号	辽宁省农科院高粱所
3	锦甜 2 号	辽宁省锦州市农科院高粱所
4	辽甜 10 号	辽宁省农科院高粱所
5	科甜 3 号	中国科学院植物研究所
6	晋甜杂 2 号	山西省农科院高粱所
7	辽饲杂 1 号	辽宁省农科院高粱所
8	济甜杂 1 号	山东省农业科学院作物所
9	沈饲杂 11 号	沈阳市农业科学院作物所
10	辽甜 9 号	辽宁省农科院高粱所
11	吉甜杂 1 号	吉林省农科院作物所
12	科甜 2 号	中国科学院植物研究所
13	济甜 1 号	山东省农业科学院作物所
14	XCTG	安徽宣城
15	TGL	安徽(具体地区不详)
16	THTG	安徽太湖
17	M81E	美国
18	Rio	美国
19	Roma	美国
20	ZYTG	安徽枞阳

1.2.2 RAPD 扩增条件 选取 96 个随机引物在 20 份品种之间进行 PCR 扩增。反应体系为 25 μ L 体系,包括:DNA 模板 2 μ L,引物 2 μ L,10 \times Buffer 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L,2.5 mmol/L dNTP 2 μ L,1 U Taq DNA 聚合酶 0.2 μ L,ddH₂O 14.8 μ L。扩增程序为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 20 s,58 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 30 s,共 15 个循环;94 ℃ 变性 20 s,55 ℃ 退火 1 min,72 ℃ 延伸 30 s,共 28 个循环;最后 72 ℃ 延伸 10 min。降温后取出加 1.5 μ L 左右的溴酚兰,放入离心机离心。反应产物在 1.2% 琼脂糖凝胶上检测,电压 100 V,电泳 2 h 左右,大约 1 h 时用紫外凝胶成像系统拍照,再放入电泳槽继续电泳,每隔 0.5 h 观察一次,保存图片用于标记带数。

1.2.3 SSR 扩增条件 筛选出 91 对多态性高、重复性好的引物,在 20 份品种之间进行了 PCR 扩增。反应体系为 25 μL ,包括: DNA 模板 2 μL 、引物 2 μL 、 $10\times$ Buffer 2 μL 、25 mmol/L MgCl_2 2 μL 、2.5 mmol/L dNTP 2 μL 、1 U *Taq* DNA 聚合酶 0.2 μL 、ddH₂O 14.8 μL 。扩增程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 、变性 20 s、58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 15 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 20 s、55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1 min、72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 30 s,共 28 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。降温后取出加 1.5 μL 左右的溴酚蓝,放入离心机离心。反应产物在 3% 琼脂糖凝胶上检测,电压 110 V,电泳 2 h 左右,大约 1 h 时用紫外凝胶成像系统拍照,之后再放入电泳槽继续电泳,每隔 0.5 h 观察一次,保存图片用于标记带数。

1.2.4 数据处理 RAPD 和 SSR 扩增有带的记为 1,无带的记为 0,形成各自的数据矩阵。统计分析软件为 NTSYS-PC 2.10e,其中相似系数测度为 DICE,选用 UPGMA(非加权成对平均数,Unweighted pair-Group method with arithmetic average)法^[15]进行聚类

分析和系统树状图的构建。

2 结果与分析

2.1 20 份品种 RAPD 多态性及亲缘关系分析

选取 96 个 RAPD 随机引物进行 PCR 扩增,筛选出条带清晰、稳定、重复性较好、多态性明显的 31 个引物用于进一步分析。31 个 RAPD 引物在 20 份品种的总扩增带数为 202 条(表 2),其中多态性带 167 条,多态率为 82.67%。平均每个 RAPD 引物可获得 5.39 个多态性条带。加入 Marker,发现分子量为 500~1 500 bp(图 1)。

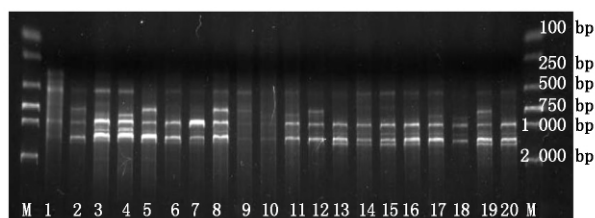


图 1 RAPD 引物 E08 在 20 份甜高粱品种中扩增结果

Fig.1 RAPD amplified results using primer E08 in 20 sweet sorghum cultivars

表 2 引物序列和扩增结果

Tab.2 Primers sequences and amplified results

引物 Primers	序列(5'-3') Sequences	扩增带数 Amplified bands	多态性带数 Polymorphic bands	多态性带百分率/% Polymorphic percentage
A01	CAGGCCCTTC	6	6	100.00
A03	AGTCAGCCAC	8	8	100.00
A05	AGGGGTCTTG	6	6	100.00
A12	TCGGCGATAG	6	6	100.00
A14	TCTGTGCTGG	6	4	66.67
A15	TTCCGAACCC	7	7	100.00
A17	GACCGCTTGT	7	5	71.42
A18	AGGTGACCGT	6	6	100.00
B04	GGACTGGAGT	5	3	60.00
B05	TGCGCCCTTC	8	5	62.50
B07	GGTGACGCAG	5	4	80.00
B08	GTCCACACGG	3	1	33.33
B18	CCACAGCAGT	5	4	80.00
C01	TTCGAGCCAG	6	5	83.33
C02	GTGAGGCGTC	7	7	100.00
C04	CCGCATCTAC	7	5	71.43
C07	GTCCCGACGA	3	3	100.00
C13	AAGCCCTGTC	3	3	100.00
C19	GTTGCCAGCC	6	6	100.00
D07	TTGGCACGGG	9	7	77.78
D16	AGGGCGACTT	5	4	80.00
D20	ACCCGCTCAC	5	5	100.00
E03	CCAGATGCAC	10	4	50.00
E04	GTGACATGCC	8	4	50.00
E05	TCAGGGAGGT	7	6	85.71
E07	AGATGCAGCC	10	10	100.00
E11	GAGTCTCAGG	6	5	83.33
E12	TTATCGCCCC	6	6	100.00
E16	GGTACTGTG	8	5	62.50
E18	GGACTGCAGA	8	8	100.00
E20	AACGGTGACC	10	9	90.00
总计 Total/Mean		202	167	82.67

根据带型统计分析结果,计算出 20 份品种间的遗传相似性系数,得出品种间的遗传相似系数(GS)为 0.613~0.870,平均值为 0.744。据此建立分子系统树状图(图 2)。以遗传相似系数(GS)0.740 为阈值,可以将 20 份品种分为四大类,辽甜 11 和辽甜 8 号聚为一类,说明 2 个杂交种的亲缘关系较近;辽甜 10 号和科甜 3 号为一类,可能与亲本来源相近有关;

Rio 单独聚为一类,是来自美国的种质资源;其余的 15 份品种聚为一大类,这些不同地区的杂交种和种质资源的聚类,与亲本的来源和引种的地域有某种关系;其中辽甜 11 和济甜 1 号亲缘关系最远,相似系数为 0.613,XCTG 和 THTG 亲缘关系最近,相似系数为 0.870,这 2 个种质资源均来自安徽省境内,具有极近的亲缘关系,或许为同一祖先亲本演化而来。

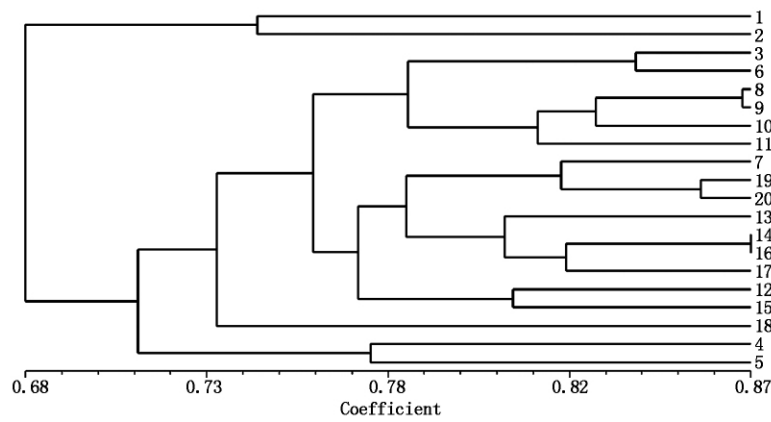


图 2 基于 RAPD 标记的品种聚类结果

Fig. 2 The dendrogram of 20 cultivars generated by RAPD

2.2 20 份品种 SSR 多态性及亲缘关系分析

20 份甜高粱品种的 SSR 扩增结果清晰,总扩增带数 297 条,其中多态性有 267 条(表 3),多态性率为 89.90%,平均每对 SSR 引物可获得 2.93 个多态

性条带。SSR 标记应用于甜高粱多态性分析,多态性较高,通过加入 Marker,发现主要标记的分子量为 100~500 bp(图 3)。

表 3 引物序列和扩增结果

Tab.3 Primers sequences and amplified results

引物 Primers	正向引物(5'-3') Sequence of forward primer	反向引物(5'-3') Sequence of reverse primer	总条带数 Amplified bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性率 Polymorphic rate
txp24	TTGTGTAGTCCATCCGATGC	TTCTAAGCCCACCGAAGTTG	3	3	100.00
txp25	CCATTGAGCTTCTGCTAT CTC	CATTTGTCACCACTAGAA CCC	4	4	100.00
txp44	TGCTCGCCTACATCGCTGAT	AACCACTGTCATCGGCAAG AAC	1	1	100.00
txp45	CTCGCGGCTCCCTCTC	GGTCAAAGCGCTCTCCTC CTC	3	3	100.00
txp48	AATAACACGCGTCTAGTT GTC	CCATCATCGTCCATCC	2	1	50.00
txp59	GAAATCCACGATAGGTAAGG	GACCCAGAATAGAAGAGAGG	6	6	100.00
txp67	CCTGACGCTCGTGCTACC	TCCACACAAGATTCAGGCTCC	3	3	100.00
txp75	CGATGCCTCGAAAAAAAACG	CCGATCAGAGCGTGCCAGG	3	2	66.67
txp77	ACTGGACGTATGGCATTATTG	TGCAGGACAGTAGCCTAGG	3	2	66.67
txp78	GCCAACACAAATTGAAGATG	TGCGATTAATCAGCGACC	3	2	66.67
txp79	CTCCACAGCCAGAACATT	GAAGCAGTGCCAGGATTCAGT	5	5	100.00
txp80	GCTGCACTGTCTCCACAA	CAGCAGGCGATATGGATGAGC	4	3	75.00
txp81	TCGATATTGTTGGCAAGATTG	CATTGGCTCAGCATTGG	3	3	100.00
txp82	GCAGCGTTCTCTGTGCC	ATTATACTCGGCTTCCTTTAG	3	3	100.00
txp84	CCGATCAGCACACCAG	GTAAGTGGTCCAATCCAGC	4	4	100.00
txp85	TCCTCTTGCTGCCTTGC	TTTGAACCTTCGTTGACTACGC	3	3	100.00
txp91	GGTCTCTGGATACTAGGTG	AAGTAATAGACGAGTGAAAAGC	2	2	100.00
txp94	TTTCACAGTCTGCTCTCTG	AGGAGAGTTGTTCTGTTA	2	2	100.00
txp96	GCTGATGTCATGTTCCCTCAC	CATTGCTGGACTCTGTCCG	2	2	100.00
txp98	GCCAGCTTATCGGAAACAAG	GTGTCCACTAGAGCGGCTATG	3	2	66.67
txp99	CACAAAGGCACCGAACAAAAC	CAGAGGCCGAGGACGAG	6	3	50.00
txp100	CCGGCCGGCCAACCAACCAC	TGCCCCAACGCTCAGCTCCC	6	6	100.00
txp101	CCCAGAGGCCGAGACTACAAC	CCAACCCATCTTCGTTCC	3	3	100.00

续表 3:

引物 Primers	正向引物(5'-3') Sequence of forward primer	反向引物(5'-3') Sequence of reverse primer	总条带数 Amplified bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性率 Polymorphic rate
txp104	TAACCTATGCGGATAAAACAG	GAATCGCTGCCAAATAAA	1	1	100.00
txp112	TCTACGACCGCATCAACGAC	GCTCTCGCTCTAATCGCACAC	4	4	100.00
txp113	CTCAGCTAATTTAGCCATAG	CAAGTAATAGACGAGTGAAG	2	2	100.00
txp116	TGGTGGCAATGCAAGCTACAG	AGCGAGACCATCGACAGGG	2	1	50.00
txp131	AAGCCCGATCACATCAA	AGCCGAGCCTCATCCC	6	6	100.00
txp136	GCGAATAGCATCTTACAACA	ACTGATCATTGGCAGGAC	3	3	100.00
txp141	TGTATGGCTAGCTTATCT	CAACAAGCCAACTAAA	2	2	100.00
txp144	GCTACTAACCGCACACAGACAC	CTGCCTGCAATCGAAGAAC	4	4	100.00
txp145	GTTCTCTCTGCCATTACT	CTTCCGCACATCCAC	4	4	100.00
txp149	AGCCTTGCATGATGTTCC	GCTATGCTTGGTGTGGG	4	2	50.00
txp150	CATGATTGCCTTTCCTTC	TTGGCATTGGACAGATTT	1	1	100.00
txp158	GCCATCAGGGATTGAC	GAGCTTCGCTGAGTAAGG	2	1	50.00
txp159	ACCCAAAGCCCAAATCAG	GGGGGAGAAACGGTGAG	2	2	100.00
txp162	CCCGATATCTCTCCTGAC	CCCCAGTTTAGCCAACT	2	1	50.00
txp179	TAAGCTGATTTGGGGACAT	GCTGATCGAGTCCGGACTA	8	8	100.00
txp196	CAGCGAGTGAAGGA	CGAAGCTGGCGAAGT	7	7	100.00
txp201	GCGTTTATGGAAGCAAAAT	CTCATAAGGCAGGACCAAC	3	3	100.00
txp208	AAGGCCGTGAGGATG	AAGCAGCCAAGAGCAG	1	1	100.00
txp212	TTTCCCTCTTTCTTGTGTC	CTCGCGCTCGTCCTA	2	1	50.00
txp213	AACATTTCTCCAGGCTC	GGAAGCAGTGCAGGAT	4	4	100.00
txp216	GTTCAATTTGCCACTCATTC	TATATTGGATAGCGCTGTTG	3	3	100.00
txp218	CCGAAAACCTGCTACTG	ACGCCGAAGGAGAAG	7	7	100.00
txp221	GCAACGGGAACCAAAA	TGACGACGGCGAGAG	3	2	66.67
txp228	ACAGGTTGGCGATGTTTCTCT	TTCTTTTTCGAATTCATTCCTTTT	3	3	100.00
txp230	GCTACCGCTGCTGCTCT	AGGGGGCATCCAAGAAAT	2	2	100.00
txp231	GGAAATCCAGGATAGGGT	AGGCAAAGGTCATCA	1	1	100.00
txp248	GGGTGTCCAATGTTCTCTGC	GGCCGTACTGTCCCTTACTCA	6	6	100.00
txp250	GCACATCTCTAAAACTACTT AGT	GAACAGGACGATGTGATAGAT	3	3	100.00
txp262	TGCTGCCCGACCTG	TTGCTGTCTCCGCTTTCC	5	5	100.00
txp265	GTCTACAGGCGTCAAATAAAA	TTACCATGCTACCCCTAAAAGTGG	2	2	100.00
txp267	TTTTTGGGAAGCGTCCTC	GCGATTTGGCTGAGCACT	1	1	100.00
txp270	AGCAAGAAGAAGGCAAGAAGA AGG	GCGAAATTATTTGAAATGGAGTT GA	7	7	100.00
txp273	GTACCCATTAAATGTTTGC AGTAG	CAGAGGAGGAGGAAGAGAAGG	6	6	100.00
txp274	GAAATTACAATGCTACCCCTA AAAGT	ACTCTACTCCTCCGTCCACAT	2	2	100.00
txp283	CGCCCGAAGCTCTTCTTAAATCT	ATTATGCCCTAACTGCCCTTGA	3	2	66.67
txp285	ATTTGATTCTTCTTGCTTTGC CTGT	TTGTCATTTCCCTCTTCTTTCTTT T	2	2	100.00
txp290	CGCCGTTCCTCTCTC	TAAACCAGTGGCAAAACTA	1	1	100.00
txp298	GCATGTCTCAGATGATCTGGT GA	GCTGTTAGCTTCTTCTAATCGTCG GT	3	3	100.00
txp317	CCTCCTTTTCTCCTCCTCCC	TCAGAATCCTAGCCACCGTTG	4	4	100.00
txp319	TAGACATCTGAATTAAGGAGC	CATGCCCTGAAAGAGA	1	1	100.00
txp323	TATATGCATGTTTAGGTCC	CTGTTGTTCTTTCTTCC	7	6	85.71
txp327	ACCACTGCTCACGCTCAC	GCGGTGTACAGCTTCGTC	1	1	100.00
txp328	ACGACGACGAGGTGG	TTCAACAAAGGAAAGGATTC	6	3	50.00
txp331	AACGGTTATTAGAGAGGGAGA	AGTATAATAACATTTGACACCCA	4	4	100.00
txp337	GGGGATCAACTTATTG	CCAAACTATAGCTGAGAG	2	2	100.00
txp339	CCGCACTCTCCACTCT	CGGAACACAGGGAAGG	7	4	57.14
txp340	AGAACTGTGCATGTATTCCGTCA	AGAACTCCAATTATCATCCATCA	4	4	100.00
txp343	CGATTGGACATAAGTGTTT	TATAAACATCAGCAGAGGTG	3	3	100.00
txp344	ACAGAGAAGTAGGTTGAAGA	CTTCTATTTTCTACTCTCATCC	2	1	50.00
txp353	CTCCAACATGCTCTGCTG	GGATCAACTTATTGGGGATG	3	3	100.00
txp355	TGGTTGGAAAGATAATCAAG	GCCCTAATGAGTCTCTAC	2	1	50.00
txp357	CGCAGAAATACGATTG	GCTATCTGGAGTAACTGTGT	1	1	100.00
txp358	CAAGGACAAGATTCATTTTAA GGG	TCACACCTCACAAAATAAAAGTGC	2	1	50.00
AH14	CATCGCCAGCATCGTCA	TCCAGCACCACAAGACCG	5	5	100.00

续表 3:

引物 Primers	正向引物(5'-3') Sequence of forward primer	反向引物(5'-3') Sequence of reverse primer	总条带数 Amplified bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性率 Polymorphic rate
AH106	CCCTTGCTTGCCGAAAGA	TTCGTATGTTGTGGGATTGTGAG	2	2	100.00
AH107	GAAATTACAATGCTACCCCTAAAAGT	ACTCTACTCCTTCCGTCCACAT	2	2	100.00
AH108	ATTCTGACTTAACCCACCCCTAAA	AGCTCATCAATGTCCCAAACC	2	2	100.00
AH109	CATTTGCGAAGTTACAACATTGCT	CATTCCTGACTGCCCTCTCC	6	6	100.00
AH112	GAAAAATCTCCGTCAATCCCAAAAATAA	CGCTGAACAACGAAAGGAATAAGTG	2	2	100.00
AH113	CTCGGCGGTTAGCACAGTCA	GCCCATAGACAGACAGCAAAGCC	2	2	100.00
AH114	GCCAAGAGAAACACAAACAA	AGCAATGTATTTAGGCAACACA	1	1	100.00
AH116	GCATAATGACGGCGTGCTC	CTTCCAAGTGAAAGAAACCATCA	2	2	100.00
Y748	CCCAGCCTTCCTCTGATAC	GTACCGACTCCAATCCAACG	3	3	100.00
Y759	GCAGGAGTATAGGCAGAGGC	CGACATGACAAGCTCAAACG	6	6	100.00
Y760	AGCTGCTCTGCTTCCAGTTC	TCTTCGTCAACGTGCTCATC	6	4	66.67
Y771	TACCTCACCCACTCCTACCG	AACCTCACCTGCAATCAACC	2	1	50.00
Y775	GGTTCTGTCGTCATCACCAG	ATCTTTAGCGCCACATGAC	4	4	100.00
BAC2	AAACAAATAATGAGCCCAAGTC	TTCGCTAGTGGTGAATGAGTG	2	2	100.00
总计 Total			297	267	89.90

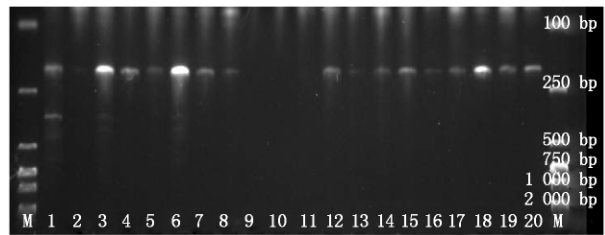


图 3 SSR 引物 txp101 在 20 份甜高粱品种中扩增结果

Fig. 3 The amplified results by SSR primer txp101 in 20 sweet sorghum cultivars

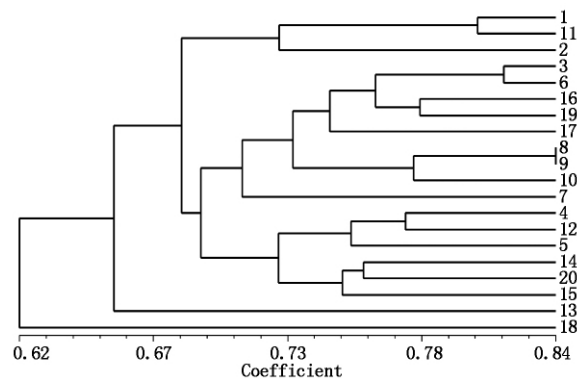


图 4 基于 SSR 标记的品种聚类结果

Fig. 4 The dendrogram of 20 cultivars generated by SSR

通过 NTSYS-pc 软件,获得 20 份甜高粱品种间的 SSR 遗传相似系数,发现品种间的遗传相似系数(GS)为 0.555~0.837,平均值为 0.695,据此建立聚类图如图 4 所示。以遗传相似系数(GS)0.680 为阈值,可将 20 份品种分为四大类。其中 Rio 和济甜 1 号均单独聚为一类,Rio 是来自美国的种质资源,单独聚作一类的结果与 RAPD 标记结果一致;辽甜 11、吉甜杂 1 号和辽甜 8 号 3 份杂交种聚为一类,其相似系数较为接近,与 RAPD 标记的结果相近,其余 15 份品种为一大类。其中 Rio 和济甜 1 号亲缘关系最远,相似系数为 0.555,济甜杂 1 号和沈饲杂

11 号亲缘关系最近,相似系数为 0.837。而在 RAPD 标记中 2 份品种的相似系数为 0.868,亲缘关系也较近。

2.3 2 种分子标记联合数据的综合分析

依据 RAPD 和 SSR 电泳谱带 0.1 数据构成联合数据阵,利用 NTSYS-pc 软件获得 20 份品种的聚类图见图 5。结果品种间遗传相似系数(GS)在 0.625~0.849 之间,平均值为 0.724。以 0.71 为阈值,可以将 20 份品种分为四大类,Rio、辽甜 8 号和济甜 1 号分别单独聚为一类,其中 Rio 来自美国,在 3 个聚类分析图中都单独聚为一类,说明 Rio 与其他 19 份品种的亲缘关系最远;济甜 1 号也单独聚为一类,与 SSR 聚类结果一致。其余 17 份品种聚成一大类,其聚类图的结构与 SSR 的聚类图非常相似。其中,济甜杂 1 号和沈饲杂 11 号亲缘关系最近。与前述 2 种单独标记结果比较,济甜杂 1 号、沈饲杂 11 号与辽甜 9 号,辽甜 11 与吉甜杂 1 号,锦甜 2 号与晋甜杂 2 号,辽甜 10 号、科甜 3 号与科甜 2 号的聚类结

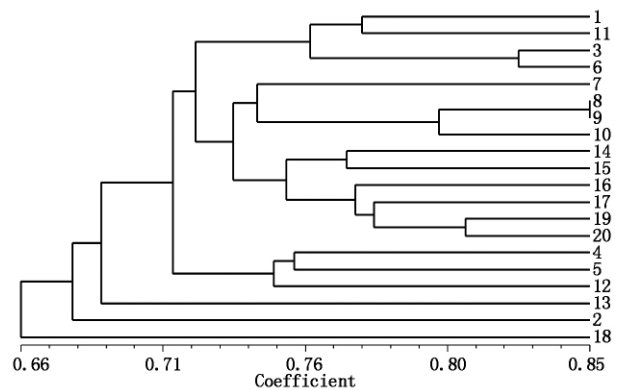


图 5 基于 2 种分子标记联合数据的聚类结果
Fig. 5 Cluster dendrogram of the 20 cultivars based on combined data by 2 molecular markers

构都是一致的。这一结果与杂交种系谱亲本来源调查结果和生物学特征观测结果基本一致。因此,结合 RAPD 和 SSR 这 2 种标记联合数据的品种聚类分析结果,更能全面客观地反映品种间的遗传多态性及亲缘关系。

3 讨论

3.1 关于单一分子标记与联合分子标记数据分析比较

RAPD 标记与 SSR 标记扩增原理不同。前者因影响 PCR 扩增反应的各种因素同样影响 RAPD 的扩增效果,其重复性一直受到研究者的质疑,但只要反应仪器固定、试剂来源和型号一致、保证 DNA 模板质量的前提下,对试剂用量和扩增条件加以严格控制,重复结果是可以得到的^[8],而且 RAPD 引物没有严格的种属界限,具有广泛性和通用性,且需样品量少、易操作、快捷简便,所以目前仍被广泛采用^[2-7]; SSR 标记已成为遗传多态性研究首选分子标记技术^[6-14],但是开发 SSR 标记必须针对每个染色体座位的微卫星,从其基因组文库中发现可用的克隆进行测序,以其两端的单拷贝序列设计引物,相对于 RAPD 标记来说费用较高。关于联合分子标记数据与单一分子标记数据研究甜高粱遗传多态性研究未见报道,不过 Yang 等^[13]对收集到的 34 份中国高粱品种进行亲缘关系分析时发现, RFLP、RAPD 和 ISSR 对资源的区分不同,归因于单独对每种技术资料组都太小;而后将 RFLP、RAPD 和 ISSR 提供的 100 个标记联合,能够独立地确认所有品种,包括那些来源地点不同的同名品种。本研究发现,联合数据分析结果与单一分子标记结果揭示的品种亲缘关系趋势大致相近,但不完全一致,且 SSR 标记结果与联合标记结果更加相近,所以若因试验条件限制,只能选择单一分子标记时,建议优先选用 SSR 标记, RAPD 标记可以作为甜高粱遗传多态性及亲缘关系研究的补充。考察参试杂交种系谱亲本来源及生物学性状特征,采用 RAPD 和 SSR 扩增谱带的联合数据分析,可以更加全面客观地反映品种间的遗传本质差异,很好地揭示来自不同地区以及同一地区不同育种单位甜高粱品种的亲缘关系。

3.2 关于中国当前选育甜高粱杂交种的遗传多态性

本研究结果表明,我国新育成甜高粱杂交种与国际上通用的甜高粱遗传资源 Rio(18 号)遗传差异相对较大,亲缘关系相对较远。但从整体看,国内选育杂交种的多态性较差,且部分杂交种与 2 份国际上通用的遗传资源 M81E(17 号)和 Roma(19 号)相似性较高,特别是来自相同或相近地区的品种相似

性较高。因此,国内甜高粱育种形势严峻,若不引起重视,将可能导致甜高粱品种的增产潜力、抗性难以改善,不仅对农业生产不利,更导致甜高粱遗传基础变得越来越狭窄。未来中国甜高粱遗传育种研究,应重视育种材料的创新和发掘,以拓宽种质资源,防止甜高粱遗传资源的枯竭。中国农家有丰富的甜高粱种质资源,建议进行搜集、整理、扩繁和保存,另外可引进国外新的种质,或通过回交转育及分子生物学手段创造甜高粱新品系,尤其创制新的甜高粱雄性不育系。

参考文献:

- [1] 卢庆善. 甜高粱[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2008: 1-25.
- [2] 李南珠, 李玥莹. RAPD 分子标记技术在甜高粱基因组研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(15): 6881-6883, 6886.
- [3] 李莹, 刘莹, 陶思源. RAPD 技术在甜高粱品种基因组分析上的应用[J]. 沈阳师范大学学报, 2007, 25(4): 499-502.
- [4] 谭雪, 郭爽, 郑少薇, 等. 菜薹种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(增刊): 18-22.
- [5] 蒋建平, 杨懋勋, 黄永芳. 广东省野百合天然居群的随机扩增多态性 DNA(RAPD) 分析[J]. 华北农学报, 2011, 26(4): 130-134.
- [6] 崔莹莹, 郭安平, 王晓玲, 等. RAPD 和 SSR 标记检测海南普通野生稻籼粳分化的比较研究[J]. 热带作物学报, 2009, 30(6): 773-780.
- [7] 邱红波, 彭忠华, 张文龙. 利用 RAPD 和 SSR 分析 36 个贵州主要玉米种质的比较研究[J]. 种子, 2009, 28(12): 39-43.
- [8] 詹秋文, 李杰勤, 汪保华, 等. 42 份高粱与苏丹草及其 2 个杂交种 DNA 指纹图谱的构建[J]. 草业学报, 2008, 17(6): 85-92.
- [9] 骈跃斌, 许晶, 武岩军, 等. SSR 分子标记技术在玉米杂种优势群划分中的应用[J]. 山西农业科学, 2012, 40(5): 439-441, 444.
- [10] 柴美清, 原佳敏. SSR 分子标记在玉米种质研究中的应用[J]. 山西农业科学, 2011, 39(9): 1017-1019.
- [11] 乔军, 王利英, 石瑶. 利用 SSR 进行品种纯度鉴定的研究进展[J]. 天津农业科学, 2011, 17(4): 45-51.
- [12] 张庶, 周新成, 李利斌, 等. 利用 EST-SSR 标记鉴定大白菜杂交种纯度的研究[J]. 天津农业科学, 2010, 16(6): 1-4.
- [13] Yang W P, de Oliveira A C, Godwin I. Comparison of DNA marker technologies in characterizing plant genome diversity: variability in Chinese sorghums [J]. Crop Sci, 1996, 36: 1669-1676.
- [14] Zhan Q W, Zhang T Z, Wang B H et al. Diversity Comparison and Phylogenetic Relationships of *S. bicolor* and *S. sudanense* as Revealed by SSR Markers [J]. Plant Science, 2008, 174(1): 9-16.
- [15] Rohlf F J. NTSYS-pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 2.10e [CP]. Applied Bio-statistics Inc, New York, 2000.