

利用 SCoT 分析柳枝稷遗传资源的多样性

蒋晓梅, 黄琳凯, 张新全, 张瑜, 聂刚, 杨盛婷, 赵欣欣, 严海东

(四川农业大学草业科学系, 雅安 625014)

摘要:本研究利用 SCoT 标记对 96 份柳枝稷种质的亲缘关系和遗传变异进行了研究。筛选出 20 条引物对 96 份供试材料进行 PCR 扩增, 共获得 445 条带, 其中多态性条带 402 条, 平均多态性条带比率 (PPB) 达 90.31%, 多态性信息含量 (PIC) 为 0.166~0.410, 平均值为 0.332, 标记指数 (MI) 为 10.20。遗传相似系数 (GS) 为 0.498~0.912, 平均值为 0.688。表明 SCoT 标记能够揭示柳枝稷种质间的遗传变异。通过 UPGMA 分析表明, 96 份种质资源聚为高地型和低地型两大类。经 POPGENE 1.32 软件分析结果显示: 96 份柳枝稷基因多样性指数 (H) 为 0.285, Shannon 指数 (I) 为 0.431, 表明供试的种质间遗传多样性丰富, 遗传多样性水平高。经 AMOVA 1.55 方差分析揭示: 96 份柳枝稷生态型内的遗传变异占总变异的 72.85%, 生态型间遗传变异占总变异的 27.15%, 结果表明 SCoT 可用于柳枝稷遗传多样性研究, 该研究结果可为柳枝稷种质资源的进一步开发利用提供重要信息。

关键词: 柳枝稷; SCoT; 遗传多样性

Genetic Diversity of Switchgrass (*Panicum virgatum* L.) Germplasms Detected by SCoT Markers

JIANG Xiao-mei, HUANG Lin-kai, ZHUANG Xin-quan, ZHANG Yu, NIE Gang,

YANG Sheng-ting, ZHAO Xin-xin, YAN Hai-dong

(Department of Grassland Science, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014)

Abstract: The genetic variation and relationship of 96 switchgrass germplasms were analyzed by SCoT molecular markers. 20 SCoT primer pairs were used to amplify SCoT fragments for 96 switchgrass germplasms. The primers generated a total of 445 bands among which 402 bands were found to be polymorphic, with an average of 90.31%. The value of locus polymorphism information contents (PIC) ranged from 0.166 to 0.410, with an average of 0.332. Marker index was 10.20. The genetic similarity coefficient among the germplasms ranged from 0.498 to 0.912, and the average content was 0.688, indicating that the genetic variation could be revealed using SCoT markers. 96 switchgrass germplasms were clustered into upland and lowland groups by the cluster analysis. The results of POPGENE version 1.32 analysis showed that the genetic diversity index (H) and Shannon index (I) was 0.285 and 0.431, respectively which indicating that there was comparatively great genetic diversity and high genetic variation among the switchgrass germplasms. Analysis of molecular variance (AMOVA 1.55) indicated that 72.85% of total variability came within populations level, while 27.15% came among populations level. The results indicated that SCoT markers were feasible and effective to analyze the genetic diversity of switchgrass and the results would facilitate the exploitation and utilization of switchgrass germplasms.

Key words: switchgrass (*Panicum virgatum* L.); SCoT; genetic diversity

随着人类社会的发展, 能源需求逐年增加, 能源形势日趋严峻, 消费矿物燃料所导致的大气污染、全

收稿日期: 2013-05-07 修回日期: 2013-06-13 网络出版日期: 2013-12-19

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20131219.1312.032.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (31201845); 科技部“十二五”“863”计划 (2012AA101801-02); 四川农业大学大学生创新计划 (121062603)

第一作者主要从事草种质资源创新及育种研究。E-mail: jiangxiaomei830@163.com

通信作者: 黄琳凯, 从事草种质资源创新及育种研究。E-mail: 3165443@qq.com

张新全, 从事草种质资源创新及育种研究。E-mail: zhangxq@sicau.edu.cn

球气候变暖等一系列环境问题日益严重,所以研究新的可再生清洁能源成为摆在人类面前的一项迫在眉睫的工作。生物质能源为可再生能源,具有可贮藏性及连续转化能源的特征,成为最有前景的替代能源^[1]。

柳枝稷(*Panicum virgatum*)为禾本科(Gramineae)黍属(*Panicum*)多年生 C₄暖季型丛生植物,原产于北美大陆,是美国大平原及东部大部分地区的优势种,从墨西哥到加拿大皆有分布^[2]。20 世纪 90 年代初期,美国和加拿大已将柳枝稷开发为生产燃料乙醇和燃烧发电的模式草本植物^[3]。柳枝稷在长期的进化过程中,形成了 2 种生态型即高地型(upland)和低地型(lowland)^[4-5]。由于柳枝稷适应性强、有较高的产量潜力和耐旱耐脊能力、对环境友好等^[6-7],国内外许多学者认为柳枝稷是一种具有较大潜力的能源植物^[8]。种质资源的遗传多样性是对一种植物开发利用的基础信息,目前国内外用于柳枝稷研究的分子标记技术主要有相关序列扩增多态性(SRAP, sequence related amplified polymorphism)、限制性片段长度多态性(RFLP, restriction fragment length polymorphism)、扩增片段长度多态性(AFLP, amplified fragment length polymorphism)、随机扩增多态性(RAPD, random amplified polymorphic DNA)、简单重复序列(SSR, simple sequence repeat)、单核苷酸多态性(SNP, single nucleotide polymorphism)以及表达序列标签(EST, expressed sequence tags)等^[9],而目标起始密码子多态性(SCoT,

start codon targeted polymorphism)分子标记用于柳枝稷的研究尚未见报道。

SCoT 分子标记是 B. C. Y. Collard 等^[10]在水稻(*Oryza sativa* L.)上提出的基于单引物扩增反应(SPAR, single primer amplification reaction)的一种新型、有效的目的基因分子标记技术,广泛用于亲缘关系和遗传变异研究^[11]。此标记结合 ISSR^[12]与 RAPD^[13]优点,是一种能跟踪性状,具有操作简单、成本低廉、多态性丰富、有效产生与性状关联标记等特点的技术^[14],有利于辅助育种。目前 SCoT 标记已成功用于甘蔗(*Saccharum officinarum* L.)^[15],罗汉松(*Podocarpus macrophyllus* (Thunb.) Sweet)^[16],龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)^[17],中国野生白灵菇(*Pleurotus eryngii* var. *tuoliensis* C. J. Mou)^[18]等植物的遗传多样性或基因差异表达研究。

本研究选用 SCoT 引物对 96 份柳枝稷种质资源的基因组 DNA 进行 PCR 扩增,分析其遗传多样性,旨在探讨 SCoT 引物用于柳枝稷的可行性,并揭示部分现有柳枝稷种质的亲缘关系,为柳枝稷资源的进一步开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试的 96 份柳枝稷种质资源(表 1)均来源于美国植物种质资源库。每份材料取 15 粒种子,置于培养皿内的吸水滤纸上萌发。萌发后的幼苗移栽于四川农业大学崇州试验基地。

表 1 供试材料

Table 1 The materials used for SCoT analysis

| 编号 | PI 号 | ID 号 | 生态型 | 编号 | PI 号 | ID 号 | 生态型 | 编号 | PI 号 | ID 号 | 生态型 |
|------|-----------|---------------|---------|------|-----------|--------------|---------|------|-----------|-------------|---------|
| Code | Accession | Plant ID | Ecotype | Code | Accession | Plant ID | Ecotype | Code | Accession | Plant ID | Ecotype |
| 1 | PI315723 | BN-1358-62 | 低地型 | 15 | PI422001 | STUART | 高地型 | 29 | PI476297 | Caddo | 高地型 |
| 2 | PI315724 | BN-10860-61 | 高地型 | 16 | PI422003 | PMT-785 | 高地型 | 30 | PI477003 | Nbraska 28 | 高地型 |
| 3 | PI315727 | BN-11357-63 | 高地型 | 17 | PI422006 | ALAMO | 低地型 | 31 | PI478002 | T6011 | 高地型 |
| 4 | PI414065 | BN-14668-65 | 低地型 | 18 | PI422016 | KY1625 | 高地型 | 32 | PI537588 | DACOTAH | 高地型 |
| 5 | PI414066 | GRENVILLE | 高地型 | 19 | PI431575 | KY1625 | 高地型 | 33 | PI549094 | TRAILBLAZER | 高地型 |
| 6 | PI414067 | BN-8624-67 | 高地型 | 20 | PI442535 | 156 | 高地型 | 34 | PI591824 | SHAWNEE | 高地型 |
| 7 | PI414068 | BN-18758-67 | 高地型 | 21 | PI469228 | Cave-in-Rock | 高地型 | 35 | PI598136 | SUNBURST | 高地型 |
| 8 | PI414069 | BN-309-69 | 高地型 | 22 | PI476290 | T2086 | 高地型 | 36 | PI607837 | TEM-SLC | 低地型 |
| 9 | PI414070 | BN-12323-69 | 高地型 | 23 | PI476291 | T2099 | 高地型 | 37 | PI607838 | TEM-SLC | 低地型 |
| 10 | PI421138 | Carthage | 高地型 | 24 | PI476292 | T2100 | 高地型 | 38 | PI642190 | FALCON | 高地型 |
| 11 | PI421520 | Blackwell | 高地型 | 25 | PI476293 | T2101 | 高地型 | 39 | PI642191 | SUMMER | 高地型 |
| 12 | PI421521 | KANLOW | 低地型 | 26 | PI476294 | T4613 | 高地型 | 40 | PI642192 | PATHFINDER | 高地型 |
| 13 | PI421901 | MIAMI | 高地型 | 27 | PI476295 | T4614 | 高地型 | 41 | PI642195 | 70SG 003 | 高地型 |
| 14 | PI421999 | AM-314/MS-155 | 高地型 | 28 | PI476296 | T16971 | 高地型 | 42 | PI642196 | 70SG 004 | 高地型 |

表 1(续)

| 编号 | PI 号 | ID 号 | 生态型 | 编号 | PI 号 | ID 号 | 生态型 | 编号 | PI 号 | ID 号 | 生态型 |
|------|-----------|----------|---------|------|-----------|----------|---------|------|-----------|----------|---------|
| Code | Accession | Plant ID | Ecotype | Code | Accession | Plant ID | Ecotype | Code | Accession | Plant ID | Ecotype |
| 43 | PI642197 | 70SG 005 | 高地型 | 61 | PI642233 | 70SG 045 | 高地型 | 79 | PI642259 | 70SG 073 | 高地型 |
| 44 | PI642198 | 70SG 006 | 高地型 | 62 | PI642234 | 70SG 046 | 高地型 | 80 | PI642260 | 70SG 074 | 高地型 |
| 45 | PI642199 | 70SG 007 | 高地型 | 63 | PI642235 | 70SG 047 | 高地型 | 81 | PI642261 | 70SG 075 | 高地型 |
| 46 | PI642200 | 70SG 008 | 高地型 | 64 | PI642236 | 70SG 048 | 高地型 | 82 | PI642262 | 70SG 076 | 高地型 |
| 47 | PI642201 | 70SG 010 | 高地型 | 65 | PI642237 | 70SG 049 | 高地型 | 83 | PI642264 | 70SG 078 | 高地型 |
| 48 | PI642203 | 70SG 012 | 高地型 | 66 | PI642242 | 70SG 055 | 高地型 | 84 | PI642265 | 70SG 079 | 高地型 |
| 49 | PI642204 | 70SG 013 | 高地型 | 67 | PI642243 | 70SG 056 | 高地型 | 85 | PI642267 | 70SG 081 | 高地型 |
| 50 | PI642207 | 70SG 016 | 高地型 | 68 | PI642244 | 70SG 057 | 高地型 | 86 | PI642268 | 70SG 082 | 高地型 |
| 51 | PI642208 | 70SG 017 | 高地型 | 69 | PI642245 | 70SG 058 | 高地型 | 87 | PI642269 | 71SG 001 | 高地型 |
| 52 | PI642209 | 70SG 018 | 高地型 | 70 | PI642247 | 70SG 060 | 高地型 | 88 | PI642270 | 71SG 002 | 高地型 |
| 53 | PI642210 | 70SG 019 | 高地型 | 71 | PI642248 | 70SG 061 | 高地型 | 89 | PI642271 | 71SG 004 | 高地型 |
| 54 | PI642212 | 70SG 021 | 高地型 | 72 | PI642249 | 70SG 062 | 高地型 | 90 | PI642272 | 71SG 005 | 高地型 |
| 55 | PI642213 | 70SG 022 | 高地型 | 73 | PI642250 | 70SG 063 | 高地型 | 91 | PI642275 | 71SG 008 | 高地型 |
| 56 | PI642214 | 70SG 023 | 高地型 | 74 | PI642251 | 70SG 064 | 高地型 | 92 | PI642276 | 71SG 009 | 高地型 |
| 57 | PI642217 | 70SG 026 | 高地型 | 75 | PI642252 | 70SG 065 | 高地型 | 93 | PI642277 | 71SG 010 | 高地型 |
| 58 | PI642218 | 70SG 028 | 高地型 | 76 | PI642254 | 70SG 067 | 高地型 | 94 | PI642278 | 71SG 011 | 高地型 |
| 59 | PI642229 | 70SG 041 | 高地型 | 77 | PI642256 | 70SG 069 | 高地型 | 95 | PI642279 | 71SG 012 | 高地型 |
| 60 | PI642232 | 70SG 044 | 高地型 | 78 | PI642257 | 70SG 071 | 高地型 | 96 | PI642280 | 71SG 013 | 高地型 |

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 的提取和浓度测定 选取刚长出的幼叶采用王英等^[19]改良的 CTAB 法提取基因组 DNA,并用 2.0% 琼脂糖凝胶电泳和超微量分光光度仪检测其浓度和纯度,经提纯合格后稀释至 20 ng/μL, -20 ℃ 冷藏备用。

1.2.2 SCoT 反应体系的建立及优化 参照何庆元等^[20]和韩国辉等^[21]发表的 SCoT 反应体系,利用单因素梯度组合试验的方法,优化后 PCR 扩增体系为 15 μL,包括 DNA 模板 1 μL (20 ng/μL), Primer 1.6 μL (10 pmol/μL), Mix 混合液 7.5 μL (含有 10 ×

PCR buffer、Mg²⁺、dNTPs) (天根科技生化公司), *Taq* 酶 0.4 μL (2.5 U/μL) (天根科技生化公司), 补加 ddH₂O 4.5 μL。

1.2.3 SCoT 引物筛选 引物序列参照 C. Luo 等^[22-23]的设计,所有引物由上海生工生物工程有限公司合成。实验选取 4 个 DNA 质量较高且田间试验性状差异较大的材料 PI607837 (低地型)、PI421521 (低地型)、PI642209 (高地型), PI642192 (高地型) 对整套引物进行筛选,最终选出 20 条条带清晰、稳定性高、多态性好的引物用于 96 份柳枝稷材料的 PCR 扩增 (表 2)。

表 2 引物信息表

Table 2 Information of SCoT primers

| 引物号 | 引物序列(5′-3′) | 引物号 | 引物序列(5′-3′) |
|-------------|-----------------------------|-------------|-----------------------------|
| Primer code | Primer sequence (5′-3′) | Primer code | Primer sequence (5′-3′) |
| SCoT2 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCACCC | SCoT15 | ACGAC <u>ATG</u> GCGACCCGCA |
| SCoT3 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCACCG | SCoT16 | ACC <u>ATG</u> GCTACCACCGAC |
| SCoT4 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCACCT | SCoT18 | ACC <u>ATG</u> GCTACCACCGCC |
| SCoT5 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCACGA | SCoT21 | ACGAC <u>ATG</u> GCGACCCACA |
| SCoT6 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCACGC | SCoT28 | CC <u>ATG</u> GCTACCACCGCCA |
| SCoT7 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCACGG | SCoT31 | CC <u>ATG</u> GCTACCACCGCCT |
| SCoT9 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCAGCA | SCoT34 | ACC <u>ATG</u> GCTACCACCGCA |
| SCoT10 | CAACA <u>ATG</u> GCTACCAGCC | SCoT35 | C <u>ATG</u> GCTACCACCGCCC |
| SCoT12 | ACGAC <u>ATG</u> GCGACCAACG | SCoT37 | CA <u>ATG</u> GCTACCACTAGCC |
| SCoT13 | ACGAC <u>ATG</u> GCGACCATCG | SCoT48 | ACA <u>ATG</u> GCTACCACTGGC |

1.2.4 PCR 扩增及电泳检测 PCR 扩增体系优化为 15 μL ; DNA 模板 1 μL (20 ng/ μL), Primer 1.6 μL (10 pmol/ μL), Mix 混合液 7.5 μL (含有 10 \times PCR buffer、 Mg^{2+} 、dNTPs) (天根科技生化公司), *Taq* 酶 0.4 μL (2.5 U/ μL) (天根科技生化公司), 补加 ddH_2O 4.5 μL 。在 Bioradicycle PCR 仪上进行 PCR 扩增, 扩增程序: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min, PCR 扩增产物于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。采用 2% 琼脂糖凝胶电泳和紫外凝胶成像仪进行观察照相并记录结果。

1.3 数据统计与分析

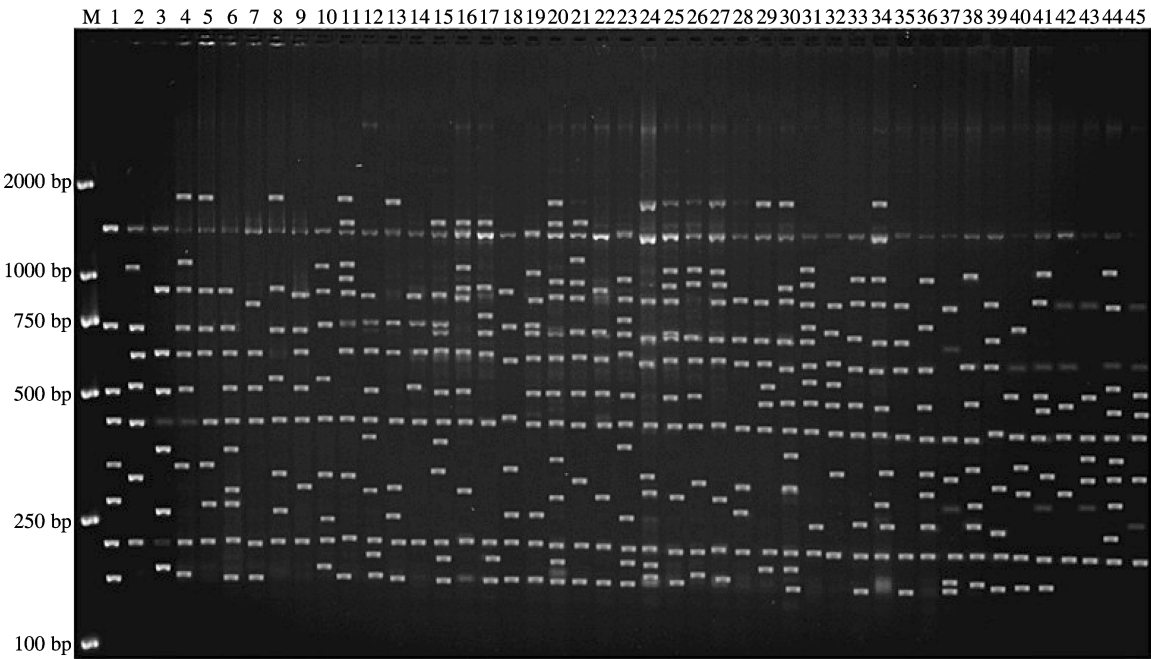
将 SCoT 扩增产物每个条带视为 1 个位点, 对获得的 DNA 条带进行统计, 统计位点总数和多态性位点数。在相同迁移率的位置有带记为 1, 无带记为 0, 构成二元数据矩阵。根据二元数据矩阵, 统计 SCoT 扩增产物的条带总数和多态性条带数, 计算多态性条带所占的比率 (*PPB*) 和引物多态性信息含量 (*PIC*), $PIC_i = 2f_i(1 - f_i)$, 公式中 PIC_i 表示引物 *i* 的多态性信息含量, f_i 表示有带所占的频率, $(1 - f_i)$ 表示无带所占的频率^[24]。采用 NTSYS-pc V 2.10 软件进行聚类分析, SimQual 程序求 Nei 相似系数, SHAN 程序中的 UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) 进行聚类分析, 并通过

Treeplot 模块生成聚类图。在 Hardy Weinberg 平衡的基础上, 应用软件 POPGENE 1.32^[25] 计算各生态型 Nei 基因多样性指数 (*H*、*I*)。用 AMOVA 1.55 分析计算生态型群内和生态型群间的变异分布。根据 S. Archak 等^[26] 的方法, 计算两种标记的分子标记指数 (*MI*, marker index), 比较不同标记的标记效率。*MI* 值是位点平均信息量 *I*_{band} (average band information) 和有效多元比率 (EMR, effective multiplex ratio) 的乘积。

2 结果与分析

2.1 SCoT 扩增产物的多态性分析

利用 20 条多态性较高的 SCoT 引物, 对 96 份柳枝稷种质 DNA 进行扩增, 扩增的 DNA 片段主要集中在 100 ~ 1000 bp (图 1), 共得到 445 条清晰可辨的扩增条带, 平均每条引物扩增的条带为 22.25 条, 其中引物 SCoT3 扩增的条带最多为 34 条, 引物 SCoT2 扩增的条带最少为 17 条。其中多态性条带 402 条, 平均每对引物扩增的多态性条带为 20.10 条, 多态性条带位点百分率为 90.31%。同时, 不同引物 PCR 扩增产物的多态性比率变化范围为 82.35% ~ 96.00% (表 3)。表明 SCoT 分子标记能检测柳枝稷较多的遗传位点, 获得较好的 PCR 结果。



M: 2000 bp marker; 1-45 : 试验材料
M: 2000 bp marker, 1-45: The materials in the study

图 1 引物 SCoT2 在部分品种中的扩增图谱

Fig. 1 PCR results of some accessions amplified by primer SCoT2

表 3 SCoT 标记引物扩增结果

Table 3 Amplification result of SCoT primers

| 引物组合 Primer combinations | 扩增总条带数 Total bands | 多态性条带数 Polymorphic bands | 多态性比率 (%) Percentage of polymorphic bands | 多态性信息含量 PIC |
|-----------------------------|-----------------------|-----------------------------|--|----------------|
| SCoT2 | 17 | 14 | 82.35 | 0.347 |
| SCoT3 | 34 | 31 | 91.18 | 0.410 |
| SCoT4 | 21 | 19 | 90.48 | 0.298 |
| SCoT5 | 21 | 19 | 90.48 | 0.282 |
| SCoT6 | 22 | 20 | 91.91 | 0.384 |
| SCoT7 | 22 | 20 | 91.91 | 0.363 |
| SCoT9 | 20 | 19 | 95.00 | 0.410 |
| SCoT10 | 21 | 20 | 95.00 | 0.393 |
| SCoT12 | 25 | 24 | 96.00 | 0.350 |
| SCoT13 | 25 | 22 | 88.00 | 0.306 |
| SCoT15 | 18 | 16 | 88.89 | 0.264 |
| SCoT16 | 26 | 24 | 92.31 | 0.226 |
| SCoT18 | 20 | 18 | 90.00 | 0.166 |
| SCoT21 | 21 | 19 | 90.48 | 0.277 |
| SCoT28 | 25 | 22 | 88.00 | 0.351 |
| SCoT31 | 22 | 19 | 86.36 | 0.206 |
| SCoT34 | 21 | 19 | 90.48 | 0.375 |
| SCoT35 | 21 | 19 | 90.48 | 0.347 |
| SCoT37 | 23 | 20 | 86.96 | 0.366 |
| SCoT48 | 20 | 18 | 90.00 | 0.351 |
| 平均 Average | 22.25 | 20.10 | 90.31 | 0.332 |
| 合计 Total | 445 | 402 | | |

2.2 SCoT 遗传相似性分析

对扩增结果用 Nei-Li 相似系数 (GS) 的计算方法,得到相似性矩阵。用 SCoT 技术分析柳枝稷材料的 GS 值为 0.498~0.912,平均值为 0.688。由相似系数矩阵可以看出,在供试的 96 份柳枝稷种质资源中,PI642276 和 PI642275 之间的遗传相似系数最大,为 0.912,表明二者之间的亲缘关系最近;PI642279 和 PI422006 之间的遗传相似系数最小,为 0.498,表明二者之间的亲缘关系最远。试验结果表明柳枝稷种质资源之间存在的差异明显,具有较为丰富的遗传多样性。

表 4 柳枝稷不同生态型类群遗传多样性指数

Table 4 Genetic polymorphism index of switchgrass

| 生态型 Ecotype | 样本数 No. of Sample | NPB No. of polymorphic bands | PPB (%) Percentage of polymorphic bands | H Nei's genetic diversity | I Shannon's information index |
|----------------|----------------------|---------------------------------|--|------------------------------|----------------------------------|
| 低地型 Lowland | 7 | 299 | 61.27 | 0.222 | 0.330 |
| 高地型 Upland | 89 | 381 | 78.07 | 0.271 | 0.406 |

表 5 柳枝稷种质生态型类群分子变异方差分析

Table 5 Analysis of molecular variance (AMOVA) of two geographic groups of switchgrass germplasms

| 变异来源 Source of variance | 自由度 df | 偏差平方和 Sum of squares | 变异组分 Variance component | 变异百分率 (%) Percentage variance | P 值 Pvalue |
|----------------------------|-----------|-------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------|
| 类群间 Among groups | 1 | 422.910 | 27.000 | 27.15 | $P < 0.001$ |
| 类群内 Within groups | 94 | 6811.871 | 72.467 | 72.85 | $P < 0.001$ |
| 总计 Total | 95 | 7234.781 | 99.467 | | |

2.3 SCoT 聚类分析

基于 (Nei-Li) 遗传相似系数,利用 UPGMA 法对 96 份柳枝稷种质资源进行聚类分析(图 2)。在 $GS = 0.60$ 处可将柳枝稷材料聚为两大生态类型:低地型为第 I 类,材料为 PI315723、PI414065、PI421521、PI421999、PI422006、PI607837、PI607838;高地型为第 II 类。在 $GS = 0.70$,高地型被聚为 6 个亚类。

2.4 遗传结构分析

经 POPGENE 1.32 软件分析得出(表 4),高地型材料遗传多样性水平较高,多态性条带数 (NPB) 为 381,多态性位点百分率 (PPB) 78.07%,Nei's 遗传多样性指数 (H) 为 0.271,Shannon 信息多样性指数 (I) 为 0.406;低地型材料的遗传多样性水平较低,多态性条带数 (NPB) 为 299,多态性位点百分率 (PPB) 61.27%,Nei's 遗传多样性指数 (H) 为 0.222,Shannon 信息多样性指数 (I) 为 0.330。经 AMOVA 1.55 分析结果表明(表 5),72.85% 的遗传变异存在于生态型类群内,27.15% 的遗传变异存在于生态型类群间,生态型群间和生态型群内的差异有统计学意义。

3 讨论

3.1 SCoT 的遗传多样性分析

遗传资源间的遗传关系研究和遗传多样性分析对于作物育种具有十分重要的意义^[27]。本研究中 96 份柳枝稷种质资源的遗传相似系数变化范围在 0.498~0.912 之间,遗传相似性高,多态性信息含量 (PIC) 为 0.166~0.410,平均值为 0.332,表明遗传多样性丰富。从 SCoT 聚类结果看(图 2),在遗传距离 $GS = 0.60$ 阈值时可以分为两大类,即低地型和高地型;在 $GS = 0.70$ 阈值时将高地型分为 6 个亚类;表明具有相同生态型的种质资源趋向于聚在一起。

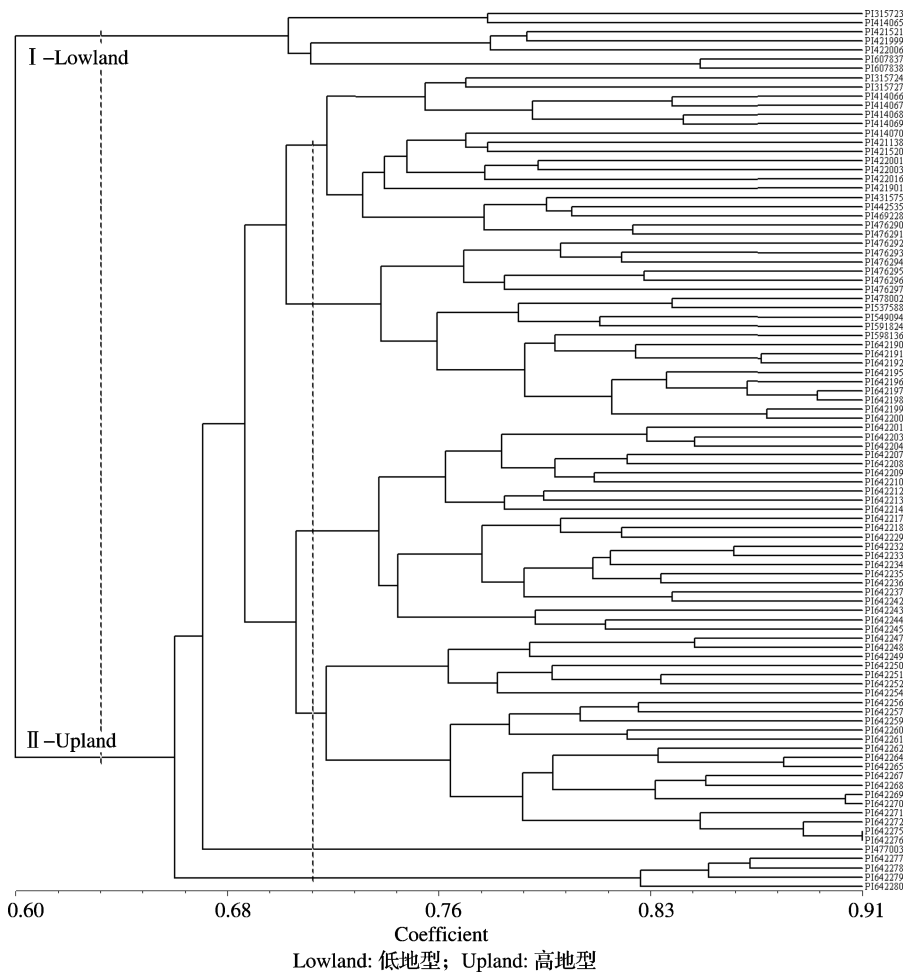


图2 SCoT 标记对 96 份柳枝稷种质亲缘关系的聚类分析图

Fig. 2 UPGMA cluster dendrogram of 96 switchgrass relationships based on SCoT markers

3.2 生态型类群的遗传结构分析

目前,关于柳枝稷遗传资源的多样性研究国外已有报道。虽然由于所选材料以及分子标记技术的不同,使得出的试验结果存在一定的差异,但大致趋势相同。J. Todd 等^[28]利用 AFLP 标记对 7 份高地型材料和 49 份低地型材料的遗传多样性进行分析,生态型内的遗传变异为 79.00%,生态型间的遗传变异为 21.00%;B. Narasimhamoorthy 等^[29]利用 EST-SSR 标记,对 31 个种质资源的 186 个柳枝稷单株的遗传多样性进行分析,分子方差分析表明生态型内有较高的遗传变异达 80.00%,生态型间的遗传变异仅为 20.00%;M. C. Laura 等^[30]对 20 份柳枝稷种质材料进行遗传多样性分析,分子方差分析得出结果:64.00%的遗传变异存在于类群内,36.00%的遗传变异存在于类群间。本试验以 96 份柳枝稷为材料,采用 SCoT 标记进行遗传多样性分析,经分子方差分析,柳枝稷生态型内的遗传变异占总变异的 72.85%,生态型间遗传变异占总变异的 27.15%。不

同的分子标记都说明了柳枝稷两种生态型间(低地型和高地型)存在明显的遗传分化,两种生态型在表型和基因型都存在明显差异,高地型耐寒,低地型高产,通过杂交育种聚合两种生态型的优良基因将是柳枝稷育种的一个重要方向。

3.3 SCoT 引物在柳枝稷遗传多样性研究中的有效性

随着分子标记技术的发展,植物种质资源遗传多样性的评价已不再局限于形态学、细胞学以及生化标记,RAPD、SSR、ISSR、AFLP、SRAP 及新近开发的 SCoT 分子标记技术已广泛应用于本领域^[24],RAPD、SSR、ISSR、AFLP 4 种标记都是传统意义上的随机分子标记,而 SRAP、SCoT 标记为目的基因分子标记,得到的位点可能是目的基因的一部分或与目的基因紧密连锁,更利于分子标记辅助育种。由于每种分子标记针对基因组不同区域进行扩增,其多态性检测效率也各不相同。从 SCoT 标记对甘蔗、罗汉松、龙眼等物种的遗传多样性分析结果看,

SCoT 单引物扩增可获得丰富的多态性条带。就柳枝稷而言,国内种质资源的分子评价研究较少,在国外,AFLP、RAPD、EST-SSR、SRAP 与 SSR 分子标记已用于柳枝稷的研究^[26-29],但目前为止,尚未见采用 SCoT 新型标记探讨柳枝稷遗传多样性的研究报道。基于 SRAP 标记^[31]揭示的 22 份柳枝稷种质资源遗传多态性条带比率为 96.74%,位点平均信息含量(I_{av})为 0.23,标记指数为(MI)4.20;基于 SSR 标记揭示的 22 份柳枝稷种质资源遗传多态性条带比率为 94.73%,平均信息含量(I_{av})为 0.21,标记指数为(MI)2.45;基于 AFLP 标记^[28]揭示的 56 份柳枝稷种质资源遗传多态性条带比率为 68.70%,基于 RAPD 标记^[30]对 14 个柳枝稷种群种质资源进行遗传多样性分析,共得到 91 个多态性位点;基于 SRAP 标记^[32]对来自美国的 94 份柳枝稷种质资源进行遗传多样性分析,多态性条带比率为 79.90%。本试验应用 20 条 SCoT 引物在 96 份栽培柳枝稷资源中检测到较丰富的遗传多态性,平均多态率达到 90.31%,位点平均信息含量(I_{av})为 0.51,标记指数(MI)为 10.20,高于基于 SRAP 标记和 SSR 标记揭示的柳枝稷种质资源的标记指数,说明 SCoT 标记的多态检测效率较高,能揭示较多柳枝稷种质间的遗传差异,因此,SCoT 标记适用于柳枝稷种质资源遗传多样性的分子评价及下一步的分子辅助育种。

参考文献

- [1] Hoogwijk M, Faaij A, Broek R, et al. Exploration of the ranges of the global potential of biomass for energy [J]. Biomass Bioenerg, 2003, 25(2): 119-133
- [2] Huang S, Su X, Haselkorn R, et al. Evolution of switchgrass (*Panicum virgatum* L.) based on sequences of the nuclear gene encoding plastid acetyl-CoA carboxylase [J]. Plant Sci, 2003, 164(1): 43-49
- [3] 刘吉利, 朱万斌, 谢光辉, 等. 能源作物柳枝稷研究进展 [J]. 草业学报, 2009, 18(3): 232-240
- [4] Porter C L. An analysis of variation between upland and lowland switchgrass (*Panicum virgatum* L.) in central Oklahoma [J]. Ecology, 1996, 47(6): 980-992
- [5] Riley R D, Vogel K P. Chromosome numbers of released cultivars of switchgrass, indianagrass, big bluestem, and sand bluestem [J]. Crop Sci, 1982, 22(5): 1081-1083
- [6] 杨世琦, 王道龙, 杨正礼, 等. 国外能源作物研究进展与焦点问题 [J]. 中国农业科技导报, 2009, 11(1): 13-18
- [7] Sanderson M A, Reed R L, McLaughlin S B, et al. Switchgrass as a sustainable bioenergy crop [J]. Bioresource Technol, 1996, 56(1): 83-93
- [8] 侯新村, 范希峰, 武菊英, 等. 草本能源植物修复重金属污染土壤的潜力 [J]. 中国草地学报, 2012, 34(1): 1673-5021
- [9] 齐兰, 王效宁, 张吉贞, 等. 利用 SRAP 标记研究海南野生稻的遗传多样性与遗传分化 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 402-406
- [10] Collard B C Y, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) poly-

morphism; a simple, novel DNA maker technique for generating gene-targeted makers in plants [J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93

- [11] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638
- [12] 朱建华, 潘丽梅, 秦献全, 等. 不同生态类型龙眼种质亲缘关系的 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1): 65-69
- [13] 杨利平, 李蕊, 程千钊. 百合远缘杂交育种及其真实性鉴定 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 896-903
- [14] Guo D L, Zhang J Y, Liu C H, et al. Genetic diversity in some grape varieties revealed by SCoT analyses [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(5): 5307-5313
- [15] 陈平华, 陈如凯, 许莉萍, 等. 甘蔗单花粉全基因组扩增 (WGA) 与 SCoT 分子标记研究 [J]. 热带作物学报, 2011, 32(11): 2069-2075
- [16] 韦泳丽, 何新华, 罗聪, 等. 罗汉松遗传多样性的 SCoT 分析 [J]. 广西植物, 2012, 32(1): 90-93
- [17] 陈虎, 何新华, 罗聪, 等. 龙眼 SCoT 反应体系的优化 [J]. 基因组学与应用生物学, 2009, 28(5): 970-974
- [18] 赵梦然, 陈强, 黄晨阳, 等. 中国野生白灵菇遗传多样性的 SCoT 分析 [J]. 园艺学报, 2012, 39(12): 2475-2482
- [19] 王英, 邱海燕, 高和琼, 等. 甘蔗基因组 DNA 提取方法的研究 [J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 44-49
- [20] 何庆元, 王吴斌, 杨红燕, 等. 利用 SCoT 标记分析不同秋眠型苜蓿的遗传多样性 [J]. 草业学报, 2012, 21(2): 133-140
- [21] 韩国辉, 向素琼, 汪卫星, 等. 柑橘 SCoT 分子标记技术体系的建立及其在遗传分析中的应用 [J]. 园艺学报, 2011, 389(7): 1243-1250
- [22] Luo C, He X H, Chen H, et al. Genetic diversity of mango cultivars estimated using SCoT and ISSR markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2011, 39(4-6): 676-684
- [23] Luo C, He X H, Chen H, et al. Analysis of diversity and relationships among mango cultivars using Start Codon Targeted (SCoT) markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2010, 38(6): 1176-1184
- [24] 贾巧君, 朱靖环, 汪军妹, 等. 浙江赤霉病抗性不同的大麦地方品种遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(3): 472-478
- [25] Zolgharnain H, Salari-Aliabadi M A, Forougmmand A M, et al. Genetic population structure of Hawksbill turtle (*Eretmochelys imbricata*) using microsatellite analysis [J]. Iran J Biotechnol, 2011, 9(1): 56-62
- [26] Archak S, Gaikwad A B, Gautam D, et al. Comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR and AFLP) for genetic analysis of cashew (*Anacardium occidentale* L.) accessions of India [J]. Genome, 2003, 46: 362-369
- [27] 魏玉杰, 张金文, 何庆祥, 等. 不同生态区粟种质的遗传多样性 ISSR 分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(2): 239-243
- [28] Todd J, Wu Y Q, Wang Z, et al. Genetic diversity in tetraploid switchgrass revealed by AFLP marker polymorphisms [J]. Genet Mol Res, 2011, 10(4): 2976-2986
- [29] Narasimhamoorthy B, Saha M C, Swaller T, et al. Genetic diversity in switchgrass collections assessed by EST-SSR markers [J]. Bioenerg Res, 2008, 1(2): 136-146
- [30] Laura M C, Joshua H, Chris M, et al. Genetic diversity of twelve switchgrass populations using molecular and morphological markers [J]. Bioenerg Res, 2010, 3(3): 262-271
- [31] Huang L K, Bughara S S, Zhang X Q, et al. Genetic diversity of switchgrass and its relative species in *Panicum* genus using molecular markers [J]. Biochem Syst Ecol, 2011, 39(4-6): 685-693
- [32] 黄琳凯. 柳枝稷种质资源评价、分子标记开发及遗传连锁图谱构建 [D]. 成都: 四川农业大学, 2010