

SSR 引物及多态性位点数对陆地棉野生种系聚类结果的影响

高伟, 王坤波, 刘方, 王春英, 张香娣, 王玉红, 黎绍惠

(中国农业科学院棉花研究所/棉花生物学国家重点实验室, 安阳 455000)

摘要: 利用 SSR 标记分析陆地棉野生种系的遗传多样性, 对材料间相似系数的变异系数进行显著性测验和矩阵相关性测验, 探讨引物和多态性位点数对研究结果准确性的影响。90 对多态性引物在 42 份供试材料间共检测出 530 个等位位点, 其中多态性位点 440 个, 占 83.01%。多态信息含量范围为 0.046 ~ 0.888, 平均为 0.649; Shannon 多样性指数在 0.113 ~ 2.289 之间变动, 平均为 1.248。显著性测验显示, 当引物按 *PIC* 值降序排列时, 利用 25 对引物或者 150 个多态性位点即可获得较准确的结果; 升序排列时, 至少需要 50 对引物或 200 个多态性位点才能获得较准确的结果。矩阵相关性测验显示, 降序时 20 对、升序时 50 对引物或者达到 150 个多态性位点聚类即可达到 90 对引物时的精度。此外, 在引物量较少时, 扩增位点数较多的引物所提供的信息量更大, 随着引物量的增加, 这种差距趋于不明显; 等位位点总数较少时, 引物数量更重要, 随着位点数的增加, 引物信息含量的重要性已高于引物数起主导作用。综上, 若要客观反映出 42 份陆地棉野生种系的遗传关系, 有必要选用多态性引物 30 对, 扩增多态性位点 150 个以上, 增加引物到 50 对以上为佳。

关键词: 陆地棉; 野生种系; SSR; 引物; 多态性位点; 聚类

Effect of the Quantity of SSR Primer and Allele on Cluster Analysis of *Gossypium hirsutum* Linn Races

GAO Wei, WANG Kun-bo, LIU Fang, WANG Chun-ying, ZHANG Xiang-di, WANG Yu-hong, LI Shao-hui

(State Key Laboratory of Cotton biology/Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000)

Abstract: In order to study the influence between the number of markers applied or corresponding polymorphic alleles investigated and the reliability of evaluation the genetic diversity of *G. hirsutum* L. races using SSR markers, significance tests were done base on coefficient of variation (*CV*) about genetic similarity coefficient, the correlation among cophenetic matrices were also examined using Mantel correlation test. A total of 90 pairs of SSR primers were used to amplify the 42 accessions of germplasm. 440 polymorphic bands were obtained, which accounting for 88.5% of the total 530 bands. For 90 primers, the polymorphism information content (*PIC*) was from 0.046 to 0.888, with the average of 0.649. The Shannon-Weaver diversity index (*H'*) ranged from 0.113 to 2.289 and averaged at 1.248. Significance test showed that relatively accurate results could be got by 25 primers or 150 polymorphic alleles when the primers were sorted based on *PIC* in descending order and by at least 50 primers or 200 polymorphic alleles in ascending sort order. The correlation among cophenetic matrices was also examined using Mantel correlation test. The objectively genetic relationships could be reflected with 20 primers in descending sort order or 50 primers in ascending sort order or all 150 alleles. In addition, the primer offered more information which provided more alleles when less primer was used relatively, but the information of each primer provided was becoming not obvious with the adding of primers. When using less allele, the quantity of primer was more impor-

收稿日期: 2012-05-04 修回日期: 2012-06-08 网络出版日期: 2013-01-30

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130130.1621.022.html>

基金项目: 中央级公益性院所基本科研业务费资助项目 (SJA0901, SJA1001)

作者简介: 高伟, 硕士, 研究方向为棉花遗传育种学。E-mail: gaowei03@126.com

通信作者: 王坤波, 博士, 研究员, 博士生导师, 研究方向为棉花种质资源学。E-mail: wkbcri@cricaas.com.cn; wkbcri@163.com

tant, and the information was more important than quantity of primer as the alleles increase. In general, it's necessary to use 30 pairs of primers and amplify 150 alleles, the objectively genetic relationships of 42 accessions of *G. hirsutum* L. races could be reflected, using more than 50 is better.

Key words: *Gossypium hirsutum* Linn; race; SSR; primer; polymorphic allele; cluster analysis

陆地棉野生种系具有优质、多抗等优良特性^[1], 是棉花育种的宝贵种质资源。了解野生种系的遗传变异和亲缘关系, 对合理利用现有资源具有重要的指导意义。到目前为止, 棉花遗传多样性研究中应用较广的分子标记技术主要有 RAPD^[2-5]、AFLP^[6-7]、ISSR^[8-9]、SSR^[10-13] 和 SRAP^[14-15] 等, 而 SSR 标记以其较高的多态性、较好的稳定性以及操作简单等优点日渐成为研究遗传多样性的主流方法。

不同的基因具有不同的进化速率, 确定遗传多样性研究的最少引物使用量, 可以尽可能的减少人力、物力和财力支出, 对今后相关研究有重要参考价值。已经有学者利用多种分子标记对花椰菜^[16]、玉米^[17-18]、西甜瓜^[19]、水稻^[20]、竹子^[21]、大豆^[22] 等植物做过研究, 但因研究对象和供试材料的差异, 结果也相去甚远。对于棉花这种基因组较大的作物来说, 必须使用一定数量的引物以获得足够的基因用于分

析^[23]。本研究对陆地棉野生种系聚类分析结果进行比较, 探究引物及多态性位点数对聚类结果的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

陆地棉野生种系由中国农业科学院棉花研究所野生棉课题组于 2006 年引自美国国家棉花种质库, 共 418 份, 所有材料均种植于海南三亚的国家棉花种质资源圃, 设 1 行区, 每行 10 ~ 15 株, 行距 40 cm, 株距 25 cm。本试验选取其中性状相对稳定且具有代表性的 42 份野生种系材料, 包括 8 份尖斑棉、8 份莫利尔棉、2 份尤卡坦棉、3 份雷奇蒙地棉、9 份玛利加朗特棉、10 份阔叶棉和 2 份帕默尔棉(表 1)。棉花 SSR 引物序列来自 CMD (<http://www.cottonmarker.org/>) 数据库, 由上海生物工程技术服务有限公司合成, TaqDNA 聚合酶和 dNTP 均购自北京鼎国生物公司。

表 1 试验材料编号和名称

Table 1 Codes and the name of the experimental materials

编号 Code	材料名称 Accession	编号 Code	材料名称 Accession
1	尖斑棉 9 <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 9	22	玛利加朗特棉 16 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 16
2	尖斑棉 15A <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 15A	23	玛利加朗特棉 22A <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 22A
3	尖斑棉 15B <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 15B	24	玛利加朗特棉 26 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 26
4	尖斑棉 17 <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 17	25	玛利加朗特棉 34 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 34
5	尖斑棉 19 <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 19	26	玛利加朗特棉 37 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 37
6	尖斑棉 22 <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 22	27	玛利加朗特棉 64 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 64
7	尖斑棉 30 <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 30	28	玛利加朗特棉 69 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 69
8	尖斑棉 31 <i>G. hirsutum</i> race <i>punctatum</i> 31	29	玛利加朗特棉 76B <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 76B
9	莫利尔棉 1 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 1	30	玛利加朗特棉 101 <i>G. hirsutum</i> race <i>marie-galante</i> 101
10	莫利尔棉 4 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 4	31	阔叶棉 6A <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 6A
11	莫利尔棉 4A <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 4A	32	阔叶棉 16 <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 16
12	莫利尔棉 6 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 6	33	阔叶棉 30 <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 30
13	莫利尔棉 7 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 7	34	阔叶棉 69 <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 69
14	莫利尔棉 13 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 13	35	阔叶棉 113 <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 113
15	莫利尔棉 25 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 25	36	阔叶棉 125A <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 125A
16	莫利尔棉 40 <i>G. hirsutum</i> race <i>morrlli</i> 40	37	阔叶棉 145 <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 145
17	尤卡坦棉 4 <i>G. hirsutum</i> race <i>yucatanense</i> 4	38	阔叶棉 154 <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 154
18	尤卡坦棉 5A <i>G. hirsutum</i> race <i>yucatanense</i> 5A	39	阔叶棉 163A <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 163A
19	雷奇蒙地棉 1 <i>G. hirsutum</i> race <i>richmondi</i> 1	40	阔叶棉 174A <i>G. hirsutum</i> race <i>latifolium</i> 174A
20	雷奇蒙地棉 8 <i>G. hirsutum</i> race <i>richmondi</i> 8	41	帕默尔棉 1 <i>G. hirsutum</i> race <i>palmeri</i> 1
21	雷奇蒙地棉 9 <i>G. hirsutum</i> race <i>richmondi</i> 9	42	帕默尔棉 12 <i>G. hirsutum</i> race <i>palmeri</i> 12

1.2 棉花总 DNA 的提取

采用改良的 CTAB 法^[24]。

1.3 PCR 扩增与电泳检测

PCR 体系含 0.5 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs, 0.2 $\mu\text{mol/L}$ Primer, 0.2 U Taq polymerase, 1 $\mu\text{mol/L}$ 10 \times Buffer, 模板 DNA 60 ng, 加 ddH₂O 至总体积 10 μL 。PCR 在 Biometra PCR 仪上进行, 反应程序为, 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.5 min, 循环 28 次, 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 2 min, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3 min。扩增产物经 DYY-6C 型稳压稳流电泳仪上的 8% 聚丙烯酰胺凝胶检测, 恒定电压 180 V, 电泳 50 min, 银染观察并拍照。

1.4 SSR 引物筛选

选用 1050 对 SSR 引物, 对田间形态性状表现差异较大的 12 份陆地棉野生种系进行初步筛选, 得到 130 对差异性引物, 选取其中扩增效果好、条带差异明显、重复性好、信号强、背景清晰的 90 对引物在 42 份供试材料间进行 SSR-PCR 反应。

1.5 谱带记录及数据分析

记录易于辨认的多态性位点, 即有带记为 1, 无带记为 0, 条带模糊不清时记为 2。成对品种相似系数用 Nei 和 Li 计算法^[25], 计算公式为 $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_{ij} 为 2 个品种共有的带数, N_i 和 N_j 分别为第 i 和第 j 品种各自的带数。Simpson 多样性指数即多态信息含量 $PIC = 1 - \sum P_i^2$, Shannon 指数 (H') = $-\sum P_i \ln P_i$, P_i 为第 i 个等位基因变异出现的频率。

采用 Jaccard's 相似系数, 使用 NTSYS-pc2.20q 数据分析软件, 非加权组平均法 (UPGMA) 聚类。利用 Excel 计算相似系数间的变异系数 $CV = SE/y$, 标准误 $SE = \sqrt{SSx/DF}$, 其中 SSx 是离差平方和, DF 是自由度 C_{42}^2 (相似系数个数) - 1 = 860; y 表示所有相似系数的均值。显著性测验 (t 测验) 在 Excel 中进行。用 N. A. Mantel 法^[26] 在 NTSYS 软件中的 Matrix comp. plot 进行矩阵相关性测验。

2 结果与分析

2.1 陆地棉野生种系的 SSR 标记多态性分析

筛选出的 90 对条带清晰的 SSR 引物均能在 42 份野生种系基因组 DNA 中产生明显的扩增差异带, 共检测出 530 个等位位点, 包括多态性位点 440 个, 占 83.01%; 引物等位位点 2~12 个, 平均每对引物 5.89 个, 以引物 NAU4860 扩增等位位点最多; 位点多态性比率以引物 NAU4075 最低 (40.00%), 有 16

对引物的多态性比率达到 100%。多态信息含量范围从 0.046~0.888, 平均为 0.649; Shannon 多样性指数在 0.113~2.289 之间变动, 平均为 1.248。上述 2 个指标变化幅度均较大, 表明 SSR 标记在陆地棉野生种系内可以反映丰富的遗传多样性信息。

分别计算 90 对引物在总体以及 7 个野生种系中的多态信息量、Shannon 多样性指数。在总体中, 引物的多态信息量以 NAU4860 和 NAU5277 为最高, 其 PIC 值分别为 0.888 和 0.887, 且分别在试验材料中扩增出 11 和 10 个多态性位点, 显示其对供试材料有很强的区分能力; 而且这 2 对引物在总体中 Shannon 多样性指数也是最高的, 分别为 2.289 和 2.241。分别从 7 个野生种系来看, 不同的引物则表现出较大差异。例如: NAU1092 在尖斑棉中的多态信息量与 Shannon 多样性指数均为最高; 在莫利尔棉中以 NAU4860 鉴别能力最强; 而在阔叶棉中 NAU4924、NAU4951 和 NAU5262 则表现出很高的多态性。

2.2 引物数目变化对聚类结果的影响

将 90 对引物按 PIC 值降序排列所得聚类图作为母图, 然后以 10 为单位逐步减少引物, 得到 8 个相似系数矩阵和聚类图; 同理按 PIC 值升序重排后可另得到 8 个相似系数矩阵和聚类图。

2.2.1 相似系数的变异系数分析

SSR 是共显性标记, 通过 Nei 和 Li 的公式计算遗传相似系数是比较理想的选择, 利用 NTSYS-pc2.20q 版软件计算品种间相似系数矩阵, 这是聚类分析的基础, 关系到能否客观反映出材料间的遗传关系^[27]。理论上讲, 随着引物数量的增加, 试验结果的准确性将逐步提高, 相似系数的均值应逐渐趋于一个稳定的理论值, 所以其变异系数整体应呈减小趋势。将所得变异系数中任意一个与其他 8 个进行显著性测验 (表 2)。

计算结果表明: 无论按哪种引物排列方式聚类, 随着引物数目的增加, 变异系数基本呈下降趋势, 开始下降较快, 后来下降较慢, 只有个别变异系数大于前一个。对上述 9 个变异系数进行显著性测验后发现, 当引物按照 PIC 值降序排列时, 10 对引物聚类的变异系数与其他变异系数之间存在极显著差异, 而当引物增加到 30 对时, 变异系数之间差异不显著, 说明仅用 30 对引物即可达到 90 对引物聚类的精度; 而当升序排列时, 引物少于 50 对时变异系数之间差异显著, 等于或多于 50 对时各变异系数无明显差异。为进一步确定引物数目的合适区间,

表 2 不同引物数聚类所得相似系数的变异系数及其 t 测验结果

Table 2 The CV of genetic similarity coefficient and significance test of which using different primers

引物数 No. of primers	引物按照 PIC 值 降序排列 Primers sorted in descending order		引物按照 PIC 值升序排列 Primers sorted in ascending order	
	变异系数 CV	t 值 t value	变异系数 CV	t 值 t value
10	0.7100	13.3531 **	0.3579	5.6274 **
20	0.5158	2.6128 *	0.3668	6.9485 **
30	0.4273	0.5038	0.2612	2.3991 *
40	0.3748	0.6731	0.2604	2.4604 *
50	0.3484	1.2766	0.2698	1.7249
60	0.3397	1.4802	0.2674	1.9041
70	0.3057	2.3075	0.2681	1.8555
80	0.3124	2.1389	0.2802	0.9508
90	0.3091	2.2225	0.3091	1.1269

**、* 表示极显著、显著,下同。* and ** mean significance at the 1% or 5% level, respectively, the same as below

对 PIC 值降序排列的 25 对引物的变异系数及升序排列的 45 对引物的变异系数进行显著性检测,结果发现:25 对引物的变异系数与其他系数间无显著差异,而 45 对引物的变异系数与其他系数间差异显著。即当引物按 PIC 值降序排列时,利用 25 对引物即可获得较准确的结果;而升序排列时至少需要 50 对引物才能获得较准确的结果。

2.2.2 矩阵相关性测验 将上述 16 个相似系数矩阵分别与共表型矩阵(母阵)进行相关性测验后发现,无论哪种引物排列方式,随着引物的增多,相关性均呈逐渐上升的趋势。当升序排列时,10 对引物的相似系数矩阵与母阵的相关系数仅为 0.663 ($r < 0.7$),相关性很低;20~40 对时相关系数均在 0.8~0.9 之间,相关性相对较高;而当引物达到 50 对时,相关系数达到 0.919 ($r \geq 0.9$),说明 50 对引物获得的聚类结果几乎与 90 对引物相当;而降序排列时,10 对引物时相关系数已达 0.822 ($0.8 \leq r \leq 0.9$),二者相关性很高;当引物达到 20 对时,相关系数达到 0.917 ($r \geq 0.9$),说明仅用 20 对引物聚类即可达到 90 对引物时的精度。

同时,从图 1 可以看出,引物量较少时降序排列所得矩阵与母阵的相关性明显高于升序,说明扩增位点数较多的引物所提供的信息量更大,此类引物扩增数据聚类后结果准确性会明显提高,随着引物量的增加,这种差距逐渐趋于不明显。

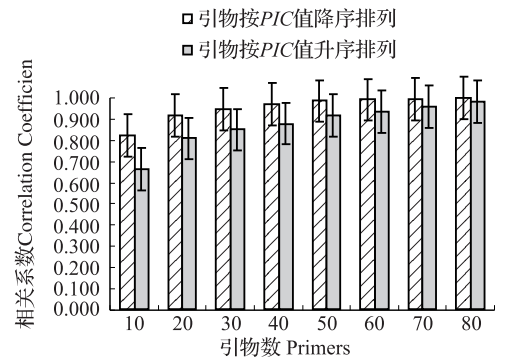


图 1 引物数对矩阵相关性的影响

Fig. 1 The relationship between correlation coefficient and the number of primers

2.3 多态性位点数目变化对聚类结果的影响

将 440 个多态性位点数据(90 对引物)聚类所得聚类图作为母图,按 PIC 值升序排列引物,以 50 为单位逐步减少位点数,得到 8 个相似系数矩阵和聚类图;按 PIC 值降序重排时同理可得另外 8 个相似系数矩阵和聚类图。

2.3.1 相似系数的变异系数分析 由表 3 可以看出,降序排列时,50 个多态性位点数据聚类的变异系数与其他变异系数之间差异极显著,100 个时差异显著,当达到 150 个时,变异系数之间差异已不显著,说明 150 个多态性位点即可满足聚类的精度,但是在多态性位点多于 400 个时变异系数间差异变为显著,根据引物越多聚类结果越准确的理论,可能因为该区间的部分引物对聚类结果产生负效应所致。当升序排列时,50 个多态性位点时变异系数之间差异极显著,150 个时差异仍显著,当达到 200 个时变异系数间无明显差异,说明多态性位点数增加到一定数量时,有趋饱和现象,再增加引物对其聚类结果影响减小。所以,当引物按 PIC 值降序排列时,150 个多态性位点即可获得较准确的结果;而升序时至少 200 个多态性位点才能获得较准确的结果。

2.3.2 矩阵相关性测验 将 440 个多态性位点(即 90 对引物)获得的聚类图作为母图,然后以 50 为单位逐步减少位点数目,可获另外 8 个相似系数矩阵和聚类图。矩阵相关性检测显示,无论升序还是降序,随着引物的增多,相似系数矩阵与母阵的相关性均呈逐渐上升的趋势。100 个多态性位点时相似系数矩阵与母阵的相关系数分别为 0.848(降序)和 0.875(升序) ($0.8 \leq r \leq 0.9$),相关性相对较高;150 个多态性位点时相关系数分别为 0.919(降序)和 0.914(升序) ($r \geq 0.9$),说明 150 个多态性位点聚类即可得到较准确的结果。

表 3 不同多态性位点数聚类所得相似系数的变异系数及其 *t* 测验结果

Table 3 The CV of genetic similarity coefficient and significance test of which using different alleles

多态性位点数 No. of polymorphic sites	引物按照 PIC 值 降序排列 Primers sorted in descending order		引物按照 PIC 值 升序排列 Primers sorted in ascending order	
	变异系数 CV	<i>t</i> 值 <i>t</i> value	变异系数 CV	<i>t</i> 值 <i>t</i> value
50	0.9365	12.0887 **	0.3668	12.5227 **
100	0.6627	2.8473 *	0.2499	2.8535 *
150	0.5186	0.6004	0.2535	2.5133 *
200	0.4359	0.5976	0.2624	1.7203
250	0.4081	1.0054	0.2647	2.3381
300	0.3732	1.5292	0.2652	2.3312
350	0.3455	1.9587	0.2801	2.1598
400	0.3048	2.6218 *	0.2983	2.0196
440	0.3091	2.5498 *	0.3091	1.9680

从图 2 可以看出,等位位点总数较少时降序排列矩阵与母阵的相关性明显低于升序,说明相同位点数引物较多时信息量更大,即引物数量更重要,而随着位点数的增加,降序排列所得矩阵反而比相同位点数升序排列时所得矩阵相关性更高。经查位点数为 200 时,升序排列时包含 56 对引物,降序排列仅有 24 对,说明此时虽然升序排列所含引物数多于降序,但引物信息含量的重要性已高于引物数起主导作用。

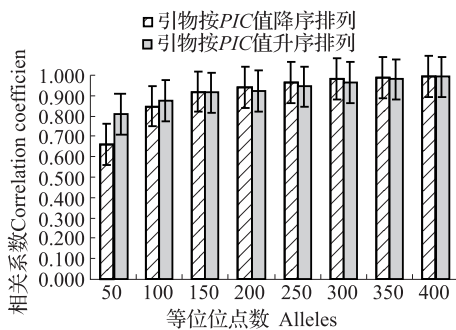


图 2 等位位点数对矩阵相关性的影响

Fig. 2 The relationship between correlation coefficient and the number of alleles

3 讨论

目前很多研究者利用 SSR 标记分析棉花种质之间的遗传变异关系,通常来说,足够的 SSR 信息量成为结果可靠的必要保证,但研究者往往因供试材料及数量的差异,选用的引物数及其检测到的多态性位点数不尽相同,到目前为止标准仍未明确。

从经济原则考虑,有必要在保证一定准确率的前提下适当减少引物数量以降低试验成本^[23],但究竟怎样才能真实反映出各材料间遗传关系的研究却鲜有报道。有学者认为,SSR 引物的种类和数量、位点在基因组中的分布位置以及引物所在分析群体中的多态信息量影响品种之间遗传变异关系分析的结果^[27],本研究认为除此之外还应考虑到供试材料的群体遗传差异和数目,如群体差异大、材料数量多则需要较多的引物才能检测到 DNA 的大多数变异区域,得出的结果才更具说服力,这也许是引物使用量标准以及诸多研究工作结果不一致的重要原因。

从理论上讲,随着引物数量的增加,结合位点也相应增加,则可检测到的位点数在整个基因组中的比例提高,分析的准确率和可靠性也会相应提高^[23]。本研究认为多样性研究过程中引物使用量与结果准确度并非绝对正比关系,某对或某几对引物的增加未必会使精确度提高,甚至会因为引物信息量差异对结果产生负效应,尤其对于多态性位点较少、信息含量较低的引物,这种情况尤为明显。并且认为引物使用量与结果准确度的关系应该呈“S”型曲线变化,引物使用量较少时,随着引物量的增加准确度急剧攀升,随后进入平缓上升期,引物达到一定数量后,曲线几乎减缓至水平线向前无限延伸,但总体而言,在一段区域内随引物数的增加分析准确度和可靠性确实在增加。所以建议在遗传多样性和亲缘关系的研究时,尽可能多地使用引物,如果所用引物在材料群体中的多态性位点较多、多态信息含量较大,则可以适当减少引物使用量。

本研究为保证结果客观可信,充分考虑了引物信息含量的影响,根据 PIC 值降序和升序排列,利用相似系数矩阵的变异系数进行显著性检测以及矩阵相关性测验进行分析比较,研究了引物数量及多态性位点数目对聚类结果的影响。显著性测验显示,当引物按 PIC 值降序排列时,利用 25 对引物或者 150 条多态性条带即可获得较准确的结果;而当引物按 PIC 值升序排列时,至少需要 50 对引物或 200 个多态性位点才能获得较准确的结果。矩阵相关性测验显示,降序时 20 对、升序时 50 对引物或者达到 150 个多态性位点聚类即可达到 90 对引物时的精度。由此可以看出,2 种分析方法几乎没有差异,可以互为补充彼此印证。

综上,得出以下结论:(1)在引物量较少时,扩增位点数较多的引物所提供的信息量更大,随着引物量的增加,这种差距趋于不明显;等位位点总数较

少时,相同位点数含引物多时信息量更大,随着位点数的增加,引物信息含量的重要性已高于引物数起主导作用。(2)利用 SSR 标记分析陆地棉野生种系的遗传多样性时,若要客观反映出 42 份材料之间的遗传变异关系,最少应选用多态性引物 30 对,扩增多态性位点 150 个以上,增加引物到 50 对以上为佳。

参考文献

- [1] 裴以春,刘金兰,刘西钊. 陆地棉×陆地棉半野生种族系后代的枯、黄萎病抗性鉴定和筛选[J]. 华中农业大学学报,1992, 11(4):322-326
- [2] 别墅,孔繁玲,周有耀,等. 中国 3 大主产区棉花品种遗传多样性的 RAPD 及其农艺性状关系的研究[J]. 中国农业科学,2001,34(6):597-603
- [3] 徐秋华,张献龙,裴以春. 长江、黄河流域两棉区陆地棉品种的遗传多样性比较研究[J]. 遗传学报,2001,28(7):683-690
- [4] 郭江勇,王义琴,吴明刚,等. 棕色棉和绿色棉遗传多样性的比较研究[J]. 遗传,2004,26(1):63-68
- [5] 吴玉香,孙玉强,陈崇乾,等. 利用 RAPD 检测棉属种间亲缘关系的研究[J]. 作物学报,2007,33(6):909-913
- [6] 王省芬,张桂寅,李喜焕,等. 黄河、长江流域棉区棉花抗病品种的 AFLP 分析[J]. 遗传学报,2004,31(12):1426-1433
- [7] Hawkins J S, Pleasant J, Wendel J F. Identification of AFLP markers that discriminate between cultivated cotton and the Hawaiian island endemic, *Gossypium tomentosum* Nuttall ex Seeman [J]. Genet Res Crop Evol, 2005, 52: 1069-1078
- [8] 姜伟,朱宏波,何觉民. 不同来源棉花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 棉花学报,2008,20(5):348-353
- [9] 刘新浩,汤玉焯,李军华,等. 棉花资源品系的遗传多样性分析[J]. 中国棉花,2011,38(1):11-24
- [10] 潘兆娥,贾银华,孙君灵,等. 大铃棉中棉所 48 主要经济性状的 QTL 定位分析[J]. 植物遗传资源学报,2011, 12(4): 601-604, 611
- [11] Liu D Q, Guo X P, Lin Z X, et al. Genetic diversity of Asian cotton (*Gossypium arboreum* L.) in China evaluated by microsatellite analysis[J]. Genet Res Crop Evol, 2006, 53: 1145-1152
- [12] 张杰,刘晓杰,孙君灵,等. 棉花种间杂交渐渗系 SSR 及农艺性状分析[J]. 植物遗传资源学报,2009, 10(1): 60-67
- [13] 吴大鹏,房嫌嫌,马梦楠,等. 四个国家海岛棉品种资源的亲缘关系和遗传多态性研究[J]. 棉花学报,2010, 22(2): 104-109
- [14] 李武,倪薇,林忠旭,等. 海岛棉遗传多样性的 SRAP 标记分析[J]. 作物学报,2008,34(5):893-898
- [15] 李驰,卢新雄,张志娥,等. 利用 SRAP 和 SSR 分子标记检测分析 29 份棉花种质遗传完整性[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 21-25
- [16] 马二磊,王燕,刘莉,等. 松花型花椰菜主要品种鉴定的分子标记分析[J]. 植物遗传资源学报,2010, 11(5): 621-624
- [17] Tivang J, Slocum M K. Estimation of sampling variance of molecular-marker data using the bootstrap procedure[J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 259-264
- [18] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbredline detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, AFLPs[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1248-1255
- [19] 包文凤,王吉明,尚建立,等. 西瓜甜瓜质量性状的分子标记与定位研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2009, 10(3): 480-485
- [20] 杨庆文,陈成斌,张万霞,等. SSR 等位变异数对普通野生稻居群遗传结构分析的影响[J]. 中国水稻科学,2005,19(4): 297-302
- [21] 李潞滨,郭晓军,彭镇华,等. AFLP 引物组合数量对准确研究竹子系统关系的影响[J]. 植物学通报,2008,25(4): 449-454
- [22] 刘萌娟,李鸣雷,赵惠贤,等. 陕西大豆资源遗传多样性及变异特点研究[J]. 植物遗传资源学报,2010, 11(3): 326-334
- [23] 胡佳磊,邵雪玲,刘思阳. RAPD 引物数量对施式巴晚遗传多样性评估结果的影响[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(1): 27-31
- [24] 宋国立,崔荣霞,王坤波,等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. 棉花学报,1998,10(5):273-275
- [25] Nei M, Li W H. Probability of identical monomorphism in related species[J]. Genet Res, 1975, 26(1): 31-43
- [26] Mantel N A. The detection of disease clustering and a generalized regression approach[J]. Cancan Res, 1967, 27, 209-220
- [27] 王彪,常汝镇,陶莉,等. 分析中国栽培大豆遗传多样性所需 SSR 引物的数目[J]. 分子植物育种,2003,1(1):82-88
- ferentiation, 1979, 13(2): 133-140
- [20] Ribaut J M, Ragot M. Marker-assisted selection to improve drought adaptation in maize: the backcross approach, perspectives, limitations, and alternatives [J]. J Exp Bot, 2007, 58: 351-360
- [21] Chardon F, Virlon B, Moreau L, et al. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome [J]. Genetics, 2004, 168:2169-2185
- [22] 李雪花,李新海,郝转芳,等. 干旱条件下玉米耐旱相关性状的 QTL 一致性图谱构建[J]. 中国农业科学,2005, 38(5):882-890
- [23] Xu Y, Crouch J H. Marker-assisted selection in plant breeding: from publications to practice [J]. Crop Sci, 2008, 48: 391-407
- [24] 杨华,杨俊品. 利用 phi116 和 umc1044 标记选育抗纹枯病玉米品系[J]. 分子植物育种,2007, 5(3):347-352
- [25] 郝转芳,苏治军,李亮,等. 基于 SNP 标记的关联分析在玉米耐旱研究中的应用[J]. 作物杂志,2009(6):1-7

(上接第 236 页)

- [14] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95:163-173
- [15] Berloo R. The development of software for the graphical representation and filtering of molecular marker data: graphical genotypes (GGT) [J]. J Hered, 1999, 90:328-329
- [16] 李魏强,张正斌,李景娟. 植物表皮蜡质与抗旱及其分子生物学[J]. 植物生理与分子生物学学报,2006, 32(5):505-512
- [17] Sinkangam B, Stamp P, Srinives P, et al. Integration of quality protein in waxy maize by means of simple sequence repeat markers [J]. Crop Sci, 2011, 51(6):2499-2504
- [18] Dang N C. Improvement of protein quality in waxy maize (*Zea mays* L.) by doubled haploid and marker assisted selection techniques[M]. Zürich: ETH/IPW, 2010
- [19] Baum J A, Scandalios J G. Developmental expression and intracellular localization of superoxide dismutases in maize [J]. Dif-