

11 份割手密遗传多样性的 SSR 分析

刘洪博^{1,2}, 应雄美^{1,2}, 毛 钧^{1,2}, 陆 鑫^{1,2}, 苏火生^{1,2}, 马 丽^{1,2}, 林秀琴^{1,2}, 蔡 青^{2,3}

(¹ 云南省农业科学院甘蔗研究所, 开远 661699; ² 云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 开远 661699;

³ 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223)

摘要: 利用 10 对多态性丰富的 SSR 引物, 以国家甘蔗种质资源圃中保存的 14 份具有代表性的割手密为对照, 对新收集的云南省 11 份割手密 (*Saccharum spontaneum* L.) 资源进行多样性分析。结果共扩增出 233 条 DNA 谱带, 与对照相比, 新采集材料的多态性条带为 207 条, 其中 14 条为特有带, 多态性条带比率为 0.89。遗传相似性系数和 UPGMA 聚类分析表明, 新采集的材料并没有单独聚为一类, 而是比较分散, 在相似性系数为 0.64 处作切割线, 参试材料可分为 3 个类群: 第 I 类群主要由龙门割手密、河边村割手密和福建仙游 1 号组成; 第 II 类群中包含 19 份材料, 其中新采集的样品有上岗割手密、他拉割手密、安乐割手密、勐根割手密、芒美割手密、贺海割手密、回落割手密、里拉割手密和曼亨割手密, 对照材料主要包含了云南、四川、越南、老挝、泰国地区的割手密, 其共同特点是均匀分布在内陆地区; 第 III 类群包括 3 个材料, 分别是海南 1 号、海南 92-2 和广东化州割手密, 其中不包含新采集的材料。而在相似性系数为 0.654 处作切割线又能将上述第 II 类群分为较细的 3 个亚群。由此可见, 新采集的 11 份割手密资源具有丰富的遗传多样性, 与已收集的资源相比, 具有一定的差异性。说明依靠云南高山峡谷等立体气候特点, 分布着遗传差异显著的割手密无性系。

关键词: 割手密; SSR; 遗传多样性

Genetic Diversity Analysis for 11 Clones of *Saccharum spontaneum* L.

LIU Hong-bo^{1,2}, YING Xiong-mei^{1,2}, MAO Jun^{1,2}, LU Xin^{1,2},

SU Huo-sheng^{1,2}, MA Li^{1,2}, LIN Xiu-qin^{1,2}, CAI Qing^{2,3}

(¹ Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 661699;

² Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan 661699;

³ Biotechnology & Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223)

Abstract: In this study, 11 original clones which had never been collected from Yunnan province as well as 14 control clones which had a better polymorphism from national nursery of sugarcane germplasm were amplified with 10 SSR primers. As a result, a total of 233 bands were acquired. Out of these bands, 207 were polymorphic bands and 14 were specific bands for the new collected clones compared to the control materials. The new collected materials could not be separated from the control by the genetic similarity coefficients and UPGMA cluster analysis. The 25 clones were divided into three groups at 0.64 of genetic similarity coefficient. The first group consisted of Longmen, River Village *Saccharum spontaneum* L., and Fujian Xianyou No. 1. The second group consisted of 19 materials from inland areas, including 9 new gathering resources from Shanggang, Tala, Anle, Menggen, Mangmei, Hehai, Huiluo, Lila, and Manheng *Saccharum spontaneum* L., and 10 control from Yunnan, Sichuan, Vietnam, Laos, and Thailand area. The third group included three control materials of Hainan No. 1, Hainan 92-2 and Huazhou of Guangdong *S. spontaneum* L.. The second group was divided into 3 sub-groups at 0.654 of genetic similarity coefficient. These results indicated that the 11 new collections of *S. spontaneum* L. showed abundant genetic diversity in comparison with the control. Therefore, it supposed that there were striking genetic differences among these materials derived

收稿日期: 2012-07-23 修回日期: 2012-10-25 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1736.015.html>

基金项目: 科技基础性工作专项(2006FY110702); 农业部作物种质资源保护项目(NB2012-2130135-18); 云南省应用基础研究计划重点项目(2006C0013Z); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2009C1059); 国家科技部科技基础条件平台

作者简介: 刘洪博, 硕士, 助理研究员。研究方向: 甘蔗种质资源与分子生物学。E-mail: liuhongbo1982@126.com

通信作者: 蔡青, 博士, 研究员。研究方向: 作物种质资源研究与利用。E-mail: caiqingysri@163.com

from the distinctive geographical distribution and climatic circumstances of Yunnan province.

Key words: *Saccharum spontaneum* L.; SSR marker; genetic diversity

甘蔗细茎野生种 (*Saccharum spontaneum* L.) 俗称割手密,是现代甘蔗品种中抗逆性、分蘖性的重要基因来源,染色体数在 40 ~ 128 之间^[1],在我国江西、台湾、云南、湖南、广西、海南、广东、福建、四川、西藏等省(区)都有割手密的分布^[2],遗传多样性也比较丰富^[3-5],因此考察收集和保存不同基因型割手密资源对完善我国甘蔗基因资源库和甘蔗品种改良具有重要意义。云南是我国植物资源非常丰富的地区,邱杨等^[6]、康平等^[7]、张林辉等^[8]、苏火生等^[9]先后多次在云南各县市开展农业生物资源调查工作,获得一些特有资源。H. Chen 等^[10]通过分子聚类分析,推论出我国割手密起源于云南,特别是在云南的高山峡谷中,割手密的分布广泛,遗传多样性较为丰富。杨清辉等^[11]对我国不同纬度、海拔的割手密进行了 RAPD 分析,认为分布于云南西部的割手密具有丰富的多样性,同属于泸水县的 3 份割手密无性系分属于 3 个不同类群。云南边疆少数民族聚居地大多为高山峡谷地带,这些地区自然环境破坏程度较小,分布着大量的甘蔗野生种质资源。因此,加大云南少数民族地区甘蔗细茎野生种质资源的收集保护和利用研究,对丰富我国割手密种质资源的多样性和培育突破性新品种提供重要的抗逆基因源具有重要的意义。利用 SSR 研究甘蔗种质的遗传多样性是比较成熟的方法,齐永文等^[12]利用 SSR 研究了中美重要甘蔗种

质遗传多样性,刘昔辉等^[13]通过 PCR 对割手密的 SSR 反应体系进行了更成熟的优化,为割手密的 SSR 遗传多样性研究奠定了基础。

本研究以未收集入国家甘蔗资源圃,采集于云南少数民族地区,并经过形态学、锤度、生长势等筛选出的 11 份割手密资源为研究对象,以 14 份来自国家甘蔗种质资源圃,分布于不同地区、遗传多样性丰富、具有代表性的割手密为对照,利用 10 对 SSR 引物进行遗传差异及多态性研究,分析采集样品与对照核心材料的多态性差异,一方面为割手密种质资源的多样性、分类鉴定及其利用提供理论依据,另一方面同时可丰富和完善割手密不同基因型的保存,加强其地理类群分布等研究。

1 材料与方法

1.1 材料及来源

11 份样品为 2007 年、2008 年新采集的割手密,主要来自云南省新平县、勐腊县、澜沧县、西盟县等(表 1)。对照来源于国家甘蔗种质资源圃保存的代表不同地域、海拔和形态特征的材料,其中大部分为核心种质材料,一共 14 份。材料分别为 C15-792、福建仙游 1 号、海南 1 号、云南 89-279、四川 79-I-6、云南 76-II-26、老挝 1 号、海南 92-2、四川 88-48、云南 1 号、广东化州割手密、越南 2 号、云南 82-1、泰国 1 号。

表 1 新收集割手密材料采集地及种质名称

Table 1 germplasm name and collected place of *S. spontaneum* L.

序号 No.	种质名称 Germplasm name	种名 Species name	采集编号 Collected code	采集地点 Collected place
1	安乐割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2007534586	云南勐腊县象明乡安乐村石梁子小组
2	河边村割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2007534602	云南勐腊县象明乡河边村小曼赛新村小组
3	回落割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2007534630	云南勐腊县勐伴镇回落村下回落村小组
4	尚岗割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2007534704	云南勐腊县尚勇镇尚岗村尚岗小组
5	龙门割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2007534732	云南勐腊县尚勇镇龙门村金龙小组
6	勐根割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2008532136	云南澜沧县酒井乡勐根大寨
7	里拉割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2008532743	云南西盟县勐梭镇里拉村十三组
8	他拉割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2008534624	云南新平县平甸乡他拉村罗戈斗嘎社
9	曼亨割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2008532751	云南西盟县岳宋乡曼亨村二组
10	芒美割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	2007041004	云南耿马县孟定镇芒美村
11	贺海割手密	<i>S. spontaneum</i> L.	20070417002	云南耿马县孟定镇贺海村

1.2 DNA 的提取

取植株的顶尖幼嫩叶片部位,每份材料取 2 片,

每片 4 ~ 5 cm,并置于液氮罐中速冻,然后放于 -70 °C 保存备用。DNA 的提取采用改良 CTAB 方

法^[14],将叶片剪成小块,并迅速放于预冷的研钵中,倒入液氮进行迅速磨碎,取少许粉末样品放入 1.5 mL 离心管中,迅速加入 500 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 CTAB(2%),并放入 65 $^{\circ}$ C 的水浴锅中温浴,其他步骤与常规 CTAB 法相同。

1.3 SSR 扩增及电泳检测

从 100 多对 SSR 引物中筛选出 10 对适合割手密扩增的多态性引物,根据 H. B. Liu 等^[15]的方法建立割手密 SSR-PCR 反应体系,全部反应在 Eppendorf Master Cycle Gradient 上进行,扩增产物加入等体积的 loading buffer 后于 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,最后取预冷的 PCR 样品 3.5 μ L 在 5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,电泳时间依据不同引物的扩增片段大小而酌情处理,并采用银染方法进行染色。

1.4 数据处理与分析

对 SSR 扩增产物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳,将分离的条带按 0、1 系统记录谱带位置,记录扩增条带的有无,在电泳图上,有清晰条带的记为 1,同一位置无带的记为 0,根据统计条带的结果建立原始数据矩阵。SSR 位点的多态性信息量(PIC, polymorphism information content)的简化计算公式

为 $PIC = 1 - \sum P_i^2$,式中 P_i 表示第 i 个等位位点出现的频率^[16]。应用 Popgen Ver. 1.32^[17] 软件计算不同引物的 Nei 多样性指数 He (expected heterozygosity) 和 Shannon's 信息指数 (I)。采用 NTSYS 2.1 软件系统^[18] 计算 Jaccard (1908) 相似性系数,对供试种质和对照材料采用非加权配对算数平均法 (UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means) 进行聚类,并绘制树状聚类图,利用 Excel 统计采集资源多样性条带与对照材料的差异性分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 扩增产物的多态性与扩增结果

选用对割手密多态性较好的 10 对引物进行 SSR 扩增,扩增的条带均呈现不同程度的多态性,在所有参试材料中共扩增出 233 条 DNA 谱带,与对照相比,新采集割手密的多态性条带为 207 条,其中 14 条为特有条带,多态性条带比率为 0.89, Nei's 多样性指数在 0.1810 ~ 0.3320 之间,多态性信息量为 0.8864 ~ 0.9600, Shannon's 指数为 0.2950 ~ 0.4970, 平均有效等位基因数为 1.3800 (表 2)。

表 2 供试样品 SSR 标记的多态性分析

Table 2 Genetic diversity analysis for amplified bands of collected *S. spontaneum* L. by SSR marker

引物 Primer	总带数 No. of total bands	Nei's 多样性指数 He	Shannon's 指数 I	有效等位基因数 Ne	多态性信息量 PIC	无性系最大相似性系数 The biggest GS of clones
mSSCIR21	19.0	0.3010	0.4670	1.4140	0.9600	0.7000
mSSCIR26	33.0	0.2750	0.4260	1.4490	0.9600	0.9000
mSSCIR36	29.0	0.1860	0.2950	1.3310	0.9600	0.7000
mSSCIR43	25.0	0.1810	0.3000	1.2700	0.9600	0.6667
SMC16	12.0	0.2190	0.3500	1.3360	0.8864	0.7500
SMC22	23.0	0.2200	0.3560	1.3520	0.9504	0.8333
SMC336	25.0	0.1920	0.3090	1.3140	0.9600	0.8750
SMC720	21.0	0.3320	0.4970	1.5700	0.9600	0.7500
SMC851	20.0	0.2540	0.4100	1.3680	0.9600	0.7143
SMC1047	26.0	0.2660	0.4260	1.3980	0.9600	0.5625
平均 Mean	23.3	0.2414	0.3811	1.3800	0.9517	0.7452
合计 Total	233.0	-	-	-	-	-

2.2 与对照样品的比对分析

以对照和供试样本作为 2 个群体,进行多态性比较分析。结果表明:对照的多态性条带为 219 条,样本的多态性条带占对照的 94.5%,对照样品的特异条带为 25 条;而采集样本中含有 14 条对照中没有的特异条带,其中特异条带最多为 SMC336 号引

物(表 3),没有特异条带的引物为 SMC1047。

2.3 聚类分析

利用 NTSYS 软件对 2 组材料进行聚类分析,构建 SSR 分析系统聚类图(图 1)。从图 1 可以看出,整个群体(包括对照)的相似性系数为 0.62 ~ 0.77。新采集的割手密并没有和对照分开而单独聚为一

表 3 样本和对照样品的比对分析

Table 3 Comparison analysis of sample and CK

引物 Primer	条带大小 Band size (bp)	多态性条带数目(样本/对照) No. of polymorphic bands (sample/CK)	多态性条带比率(样本)(%) Polymorphic bands (sample)	特异条带(样本/对照) Difference bands (sample/CK)
mSSCIR21	141 - 178	18/19	95	0/1
mSSCIR26	115 - 137	31/32	94	1/2
mSSCIR36	127 - 161	24/25	83	4/4
mSSCIR43	160 - 260	21/23	84	2/4
SMC16	90 - 130	10/11	83	1/2
SMC22	140 - 170	19/22	83	1/4
SMC336	140 - 190	19/21	76	4/6
SMC720	100 - 130	20/21	95	0/1
SMC851	120 - 140	19/19	95	1/1
SMC1047	110 - 170	26/26	100	0/0
合计 Total		207/219		14/25

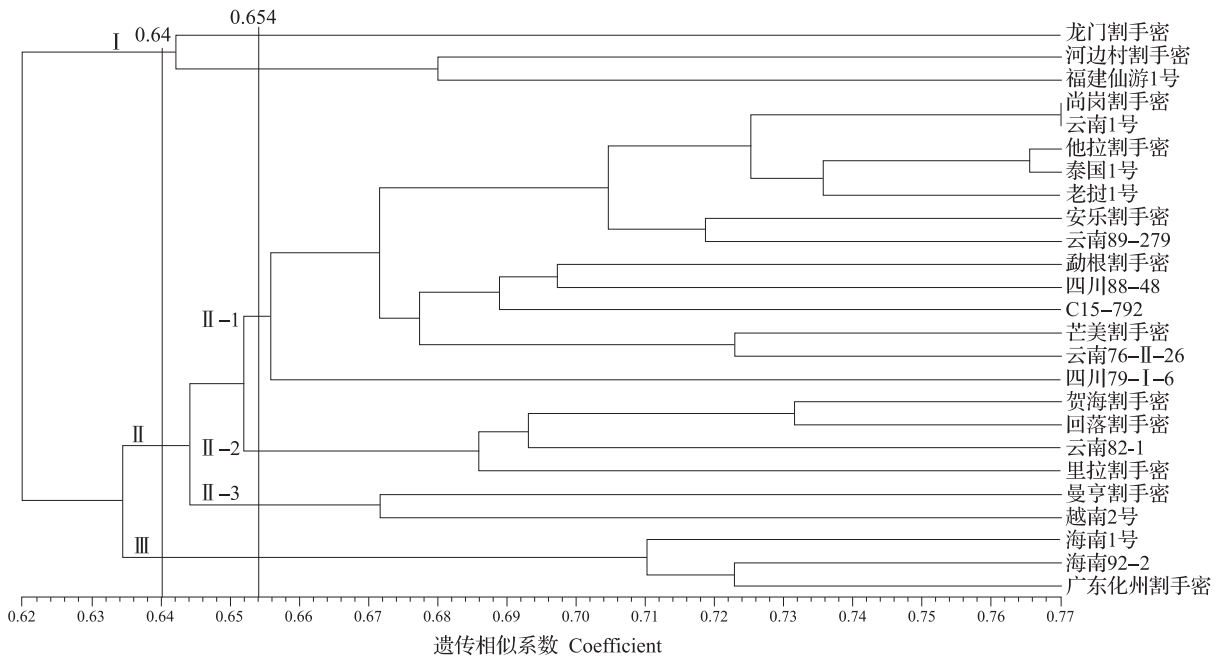


图 1 割手密无性系 UPGMA 聚类图

Fig. 1 Cladogram obtained using UPGMA for *S. spontaneum* L. clones

类,而是比较分散的分布于聚类图中,在相似性系数为 0.64 处作切割线,可分为 3 个类群:第 I 类群主要由龙门割手密、河边村割手密和福建仙游 1 号组成;第 II 类群中包含的材料较多,其中采集的样品有尚岗割手密、他拉割手密、安乐割手密、勐根割手密、芒美割手密、贺海割手密、回落割手密、里拉割手密和曼亨割手密,对照材料主要包含了云南、四川、越南、老挝、泰国地区的割手密,主要分布在内陆地区;第 III 类包括 3 个材料,分别是海南 1 号、海南 92-2 和广东化州割手密,不包含采集的样品材料。而在相似性系数为 0.654 处作切割线,可将上述第 II 类

群又细分为 3 个亚群:首先是以曼亨割手密和越南 2 号与其他无性系分开,其次是以云南本土特有的割手密聚为一个类群,最后是与四川、云南、大湄公河流域的泰国和老挝地区的割手密聚为一类。从总的聚类图看,对照样品较符合地理类群分布,而新采集的割手密分布较为广泛。

2.4 新采集割手密的遗传多样性特点

根据新采集割手密的遗传多样性分析结果,并从分子聚类图中可以看出,云南割手密的多样性较为丰富,在新采集的资源中,除与海南、广东的割手密亲缘关系较远外,与其他对照材料均具有较近的

亲缘关系,例如具有代表性的越南2号与曼亨割手密在相似性系数为0.674处单独聚为一类;老挝1号、泰国1号和他拉割手密在相似性系数为0.733处又聚为一类;四川79-I-6与贺海割手密、安乐割手密与云南89-279的遗传距离也较近。此次新采集的割手密不仅含有云南本土割手密血缘,还与大湄公河次区域地区以及四川割手密有相近血缘。

3 讨论

3.1 SSR 标记对割手密遗传多样性的可靠性分析

目前,我国甘蔗栽培种中割手密血缘比例较高,SSR 标记具有较好的多态性,且区分后代材料较为容易,是杂交后代中真实性鉴定和遗传分析的常用方法^[19-20]。本研究选用经过筛选的10对SSR引物,在所有参试材料中进行扩增,共检测出233个位点,新采集材料的多态性条带为207个,多态性比率为0.89,且引物的扩增质量好,条带清晰,可靠性较高,表明这10对引物具有较高的多态检出率,适合于割手密遗传多样性分析。本研究通过加入14份不同地域分布的、具有代表性的材料作为对照,聚类结果准确地将不同区域和气候类型的资源进行归类,说明所选择的10对SSR引物对割手密进行遗传多样性研究是可靠的,在不同的相似性系数上做切割线都能够较好地解释资源的地理类群分布和归类。

3.2 新采集割手密 SSR 特异条带与基因型分析

在资源的采集、分类、鉴定与评价中,如何区分不同材料间的遗传差异,不仅要依靠形态特征、海拔高度和地理分布等,还需要准确的分子鉴定。本研究中新采集的割手密共检测出14条特有条带,对照检测出25条特有条带,说明从国家甘蔗种质资源圃中选出的14份对照材料具有丰富的遗传多样性。在新采集样本的特有条带中,贺海割手密特有条带占4个,扩增出的引物分别为mSSCIR 26、mSSCIR 36、mSSCIR 43和SMC336号;龙门割手密特有条带占2个,扩增出的引物分别为mSSCIR 36和mSSCIR 43号;尚岗割手密与云南1号的带形相同,可能为同一材料,需要进一步验证。从以上结果可以看出,实际采集地区的割手密具有丰富的遗传多样性,与

四川、福建、泰国、老挝和越南地区割手密血缘相近,且部分材料为新的基因型,对进一步丰富和完善国家甘蔗种质资源圃割手密不同基因型的保存具有重要意义。

参考文献

- [1] 张木清,王华忠,白晨. 糖料作物遗传改良与高效育种[M]. 北京:中国农业出版社,2006:51-52
- [2] Editorial Board of the Flora of China. Flora of China, Vol. 9[M]. Beijing:Sci Press,2002:48-49
- [3] Pan Y B, Burner D M, Legendre B L, et al. An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR[J]. Genet Resour Crop Ev, 2004, 51: 895-903
- [4] 李奇伟. 现代甘蔗改良技术[M]. 广州:华南理工大学出版社,2000:15-17
- [5] 陈如凯,许莉萍,林彦铨,等. 现代甘蔗育种的理论与实践[M]. 北京:中国农业出版社,2003:281-427
- [6] 邱杨,徐福荣,陈洪明,等. 云南省屏边县民族农业生物资源调查[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(4):511-516
- [7] 康平德,徐中志,陈翠,等. 云南普米族地区农业植物资源调查[J]. 西南农业学报,2011,24(1):356-362
- [8] 张林辉,刘光华,刘倩,等. 云南阿昌族地区农业生物资源调查[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(1):49-53
- [9] 苏火生,陈光,唐一春,等. 云南省新平县农业生物资源调查与分析[J]. 植物遗传资源学报,2012,13(4):678-683
- [10] Chen H, Fan Y H, Shi X W, et al. Research on genetic diversity and systemic evolution in *Saccharum spontaneum* L. [J]. Acta Agron Sin, 2001, 27(5):645-652
- [11] 杨清辉,李富生,肖凤回. 割手密 RAPD 指纹图谱分析[J]. 云南农业大学学报,1998,13(4):347-351
- [12] 齐永文,劳方业,张垂明,等. 中美重要甘蔗种质 SSR 遗传多样性比较[J]. 热带作物学报,2011,32(1):99-104
- [13] 刘昔辉,张革民,宋焕忠,等. 割手密 SSR-PCR 反应体系的优化[J]. 西南大学学报:自然科学版,2010,32(6):11-16
- [14] Cai Q, Fan Y H, Aitken K, et al. Assessment of the phylogenetic relationships with in the '*Saccharum complex*' using AFLP markers[J]. Acta Agron Sin, 2005, 31(5):551-559
- [15] Liu H B, Tao L A, Dong L H, et al. Analysis the male's heredity of hybrids F₁ from different *Saccharum spontaneum* [J]. Chin Agric Sci Bull, 2010, 26(18):67-70
- [16] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am J Hum Genet, 1980, 32:314-331
- [17] Yen F C, Yang R C. Poppene Version 1. 31; Microsoft window based freeware for population genetic analysis[M]. Alberta: University of Alberta and Centre for International Forestry Research, 1999
- [18] Rohlf F J. NTSYSpc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2. 0[M]. New York: Exeter Software, Appl Biostatistics Inc, 2000:16-29
- [19] 桃联安,楚连璧,经艳芬,等. 云南割手密 82-114 种间杂交后代 SSR 分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):132-135
- [20] 贺道华,邢宏宜,李婷婷,等. 92 份棉花资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. 西北植物学报,2010,30(8):1557-1564