

42份高粱与苏丹草及其2个杂交种 DNA指纹图谱的构建

詹秋文¹, 李杰勤¹, 汪保华², 李云飞¹

(1. 安徽科技学院, 安徽 凤阳 233100; 2. 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 选用100个RAPD引物和95对SSR引物进行PCR扩增,旨在构建42份高粱和苏丹草品种资源及2份国审品种高粱-苏丹草杂交种的DNA指纹图谱。结果表明,从100个RAPD引物中筛选到9个多态性高、重复性好的引物,多态性条带比率为64.06%,利用4个核心RAPD引物可以为每份品种构建1张特定的数字指纹,并通过其中1个引物F-01构建了1张能鉴别2个杂交种的RAPD指纹图谱,不过该图谱不能区别皖草3号与其父本Sa。从95对SSR引物中筛选出多态性丰富的引物73对,多态性条带比率为86.06%,通过3对核心SSR引物就可以构建42份高粱和苏丹草的SSR数字指纹,同时利用其中1对SSR引物 $txp18$,寻找到2个杂交种的互补带,从而构建了2个高粱-苏丹草杂交种的SSR指纹图谱,这张SSR指纹图谱不仅能鉴别皖草2号和3号,还可以把杂交种与其亲本区别开来。

关键词: 高粱; 苏丹草; 杂交种; RAPD; SSR; 指纹图谱

中图分类号: S514.032; S544⁺.103.2; Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-5759(2008)06-0085-08

* 高粱(*Sorghum bicolor*)是一种古老的禾谷类作物,苏丹草(*Sorghum sudanense*)是栽培最普遍的一年生禾本科牧草,二者的杂种优势强,其杂交种品质好,抗逆性强,在水产、畜禽养殖及资源利用与环境保护上有广阔的开发利用前景^[1]。由于种子生产、经营管理以及环境等方面因素,高粱-苏丹草杂交种(*S. bicolor* × *S. sudanense*)容易导致假杂种或种子混杂,从而降低种子纯度,给农业生产造成损失。皖草2号和3号是当前推广的2个国审品种,其中皖草2号长期作为国家草型高粱品种区域试验唯一对照品种。因此,高粱-苏丹草杂交种及其亲本种质资源的遗传真实性是种子质量的重要保证,建立快速、标准的种子质量检测方法已成为规范种子市场经济秩序迫切需要的技术之一。传统的种子纯度鉴定技术有田间性状鉴定和籽粒形态鉴定,但耗时长,且易受环境条件的影响。作物指纹图谱多态性丰富,具有高度的个体特异性和环境稳定性,主要有两大类:一类是较早的蛋白质电泳指纹图谱,但受同工酶位点及蛋白质种类限制;另一类是20世纪90年代之后发展起来的DNA(deoxyribonucleic acid,脱氧核糖核酸)分子标记指纹图谱,因其分辨率高、稳定可靠,可以准确鉴定生物个体和群体之间的差异,已成为鉴别品种、品系和选择杂交亲本的有力工具。Tinker等^[2]利用7个RAPD(random amplified polymorphic DNA,随机扩增多态性DNA)引物可区分27个杂交大麦(*Hordeum vulgare*)品系,并认为RAPD方法是区分高度相似性大麦品系的有效方法。Charters等^[3]运用SSR(simple sequence repeat,简单序列重复)引物分析了20个甘蓝油菜(*Brassica napus*)品种,指出SSR是一种多态性很高、重复性很好的指纹库构建方法。之后,许多研究者先后利用RAPD和(或)SSR引物构建了黑麦草-羊茅复合体(*Lolium-Festuca*)^[4]、马铃薯(*Solanum tuberosum*)^[5]、大豆(*Glycine max*)^[6]、玉米(*Zea mays*)^[7]、苜蓿(*Medicago sativa*)^[8]、甘蓝(*Brassica oleracea*)^[9]、小麦(*Triticum aestivum*)^[10]、高羊茅(*F. arundinacea*)^[11]、结缕草(*Zoysia japonica*)^[12]、水稻(*Oryza Sativa*)^[13]、棉花(*Gossypium hirsutum*)^[14]、大麦^[15]和油菜^[16]等作物DNA指纹图谱。目前,高粱与苏丹草及其杂交种DNA指纹图谱的研究未见报道。本研究选取42份高粱与苏丹草种质资源和2个杂交种,旨在筛选出RAPD和SSR核心引物,建立DNA指纹图谱,从而鉴别不同苏丹草和高粱种质资源及其杂交种皖草2号和皖草3号,为高粱-苏丹草杂交种的品种选育和知识产权保护提供理论依据。

* 收稿日期:2007-12-12;改回日期:2008-01-30

基金项目:科技部农业科技成果转化资金项目(No: 2008GB2C300125),安徽省“十一五”科技攻关计划重点项目(No: 06013104B)和安徽省高校学科拔尖人才基金(No: 教秘人[2005]79号)资助。

作者简介:詹秋文(1963-),男,安徽宿松人,教授,博士。E-mail:qwzhan@163.com

1 材料与方法

1.1 植物材料

高粱和苏丹草品种资源 42 份(表 1),另外选取通过全国牧草品种审定委员会审定的高粱—苏丹草杂交种 2 份,即皖草 2 号(Tx623A×S722)和皖草 3 号(Tx623A×Sa)。全部试验材料于 2005 年 4 月种植于安徽科技学院种植科技园。

1.2 DNA 的提取

在幼苗期取 2 g 叶片置于研钵中,加入 800 μ L 经 65 $^{\circ}$ C 预热的 DNA 提取液[100 mmol/L Tris. Cl, pH 值 8.0, 50 mmol/L EDTA- Na_2 (ethylenediaminetetra acetic acid- Na_2 , 乙二胺四乙酸二钠), 500 mmol/L NaCl, 1.25% SDS(sodium dodecyl sulfate, 十二烷基硫酸钠)]和少量石英砂,研磨好后转入 1.5 mL EP(eppendorf, 微量离心)管中,在 65 $^{\circ}$ C 水浴锅中保温 30 min,然后加入 200 μ L 预冷的 5 mol/L KAc(kalium aceticum, 醋酸钾)溶液,混匀后冰浴 20 min;每管中加入 24:1 的氯仿/异戊醇溶液至 1.5 mL,充分混匀后 10 000 r/min 离心 10 min,将上清液转入另一 EP 管中,分别用 70%乙醇和无水乙醇各洗涤 1 次,弃掉洗液挥干,加 200 μ L TE(Tris-EDTA, 三羟甲基氨基甲烷—乙二胺四乙酸)溶解,并用 0.8%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,后保存备用。

1.3 RAPD 的 PCR 扩增和检测

选取来自美国 Operon Technologies 公司设计合成的 100 个 RAPD 引物,这 100 个引物曾被李杰勤等^[17]用于高粱属物种之间遗传差异的研究,并取得了较好的试验结果。

PCR(polymerase chain reaction, 多聚酶链式反应)扩增采用 20 μ L 的反应体系,包括 2 μ L 10×Buffer, 2 μ L dNTPs(deoxy nucleotide triphosphate, 脱氧核苷三磷酸)(2.5 mmol/L), 1 μ L 随机引物(2 μ mol/L), 2 μ mol/L 模板 DNA(50 ng/ μ L); Taq 酶为 1.2 U; Mg^{2+} 浓度为 2.0 mmol/L;最后用 ddH₂O 补足 20 μ L。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 循环 45 次,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应产物在 1.2%琼脂糖胶上检测,电压 100 V,电泳后在 Alpha 紫外凝胶成像系统上观察拍照。

1.4 SSR 的 PCR 扩增和检测

根据 <http://www.gramene.org/db/markers/> 网站提供的高粱引物序列,筛选并合成了 88 对 SSR 引物。其中,在编号为 *txp01*~*txp43* 中选取 31 对,在 *cup01*~*cup74* 中选取 57 对,这 88 对引物覆盖了高粱的 10 条连锁群,并先后被 Kong 等^[18]和 Schloss 等^[19]用于高粱遗传图谱和分子标记研究。另外,本试验利用 Primer 3 程序(<http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/>)设计并合成了 7 对 SSR 引物,这些引物已被 Zhan 等^[20]用于高粱与苏丹草亲缘关系的研究,获得了理想的结果。

PCR 扩增采用 10 μ L PCR 反应体系,包括 10×Buffer 1 μ L, 20 ng 的总 DNA, 1 μ L MgCl_2 (25 mmol/L), 0.2 μ L dNTP(10 mmol/L), 1.0 U Taq DNA 聚合酶,各 0.8 μ L 双向引物(10 μ mol/L)。PCR 扩增程序:95 $^{\circ}$ C 2 min,接着是 94 $^{\circ}$ C 45 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 30 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min。PCR 扩增产物用 6%非变性聚丙烯酰胺(PAGE, polyacrylamide gel electrophoresis)胶在北京六一电泳仪上完成电泳。电泳完成后,用 0.5%冰醋酸溶液固定,然后用 0.2%硝酸银溶液染色,1.5%氢氧化钠溶液显色,后漂洗,经 Alpha 公司成像系统观察、拍照。

1.5 数据处理

以 1 和 0 分别代表某个等位基因位点扩增 DNA 条带的有无,并将 RAPD 或 SSR 图谱转换为由 0 和 1 组成的字符串,构成 DNA 数字指纹。

2 结果与分析

2.1 42 份高粱与苏丹草品种资源的 RAPD 数字指纹

在 100 个 RAPD 随机引物中,有 12 个引物可以扩增出条带清晰、重复性好的 DNA 条带,条带数最少 3 条,最多为 8 条,总扩增带数为 64 条,其中 9 个引物在 42 份高粱和苏丹草中扩增出多态性,多态性条带 41 条,多态性条带比率为 64.06%,多态性水平较高。平均每个 RAPD 引物可获得 3.42 个多态条带,分子量从 700 bp 至 1 100 bp 以上(图 1)。

表 1 42 份高粱和苏丹草的编号、名称、类型和来源

Table 1 Plant material used in the study

编号 No.	名称 Name	类型 Type	来源 Source
1	Sa	苏丹草品系 <i>S. sudanense</i> , strain	安徽 Anhui, China
2	新苏 2 号 Xinsu No. 2	苏丹草品种 <i>S. sudanense</i> , cultivar	新疆 Xinjiang, China
3	M-5	苏丹草种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	安徽 Anhui, China
4	S722 line	苏丹草种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	安徽 Anhui, China
5	3042B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	美国 USA
6	皖恢 AR	高粱恢复系 <i>S. bicolor</i> , restorer line	安徽 Anhui, China
7	Short4	高粱矮秆种质 <i>S. bicolor</i> , short stem	安徽 Anhui, China
8	White5	高粱白粒种质 <i>S. bicolor</i> , white grain	安徽 Anhui, China
9	晋五选系 Jin 5 line	高粱品系 <i>S. bicolor</i> , strain	山西 Shanxi, China
10	Tx623B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	美国 USA
11	16B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	山西 Shanxi, China
12	三尺三 B Sanchisan B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	山西 Shanxi, China
13	Tx2791B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	美国 USA
14	Tx623A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	美国 USA
15	3042A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	美国 USA
16	16A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	山西 Shanxi, China
17	三尺三 A Sanchisan A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	山西 Shanxi, China
18	Tx2791A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	美国 USA
19	V4/F4B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	山西 Shanxi, China
20	三尺三 Sanchisan	高粱品种 <i>S. bicolor</i> , cultivar	山西 Shanxi, China
21	忻梁七 Yiliang 7	高粱品种 <i>S. bicolor</i> , cultivar	山西 Shanxi, China
22	晋梁五 Jinliang 5	高粱品种 <i>S. bicolor</i> , cultivar	山西 Shanxi, China
23	康 60 Combine Kafir 60	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	山西 Shanxi, China
24	Jinsu 1	苏丹草种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	山西 Shanxi, China
25	Jinsu 3	苏丹草种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	山西 Shanxi, China
26	Gw3105	苏丹草引进种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	美国 USA
27	Gw00175	苏丹草引进种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	美国 USA
28	Gw-01684	苏丹草引进种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	美国 USA
29	中国高粱 Gaoliang	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
30	沙鲁 Shalu	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
31	卡佛尔 Kafir	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
32	都拉 Durra	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
33	迈罗 Milo	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
34	菲特瑞塔 Feterite	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
35	亨加利 Hegari	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
36	帚高粱 Broomcorn	高粱帚用种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	辽宁 Liaoning, China
37	青壳洋 Qingkeyang	高粱酒用品种 <i>S. bicolor</i> , cultivar	四川 Sichuan, China
38	7501A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	吉林 Jilin, China
39	A2V4A	高粱不育系 <i>S. bicolor</i> , sterile line	山西 Shanxi, China
40	甚迪亚 Sundhia	高粱种质 <i>S. bicolor</i> , germ plasm	印度 India
41	7501B	高粱保持系 <i>S. bicolor</i> , maintainer line	吉林 Jilin, China
42	Africa-Su	苏丹草种质 <i>S. sudanense</i> , germ plasm	非洲 Africa

2.2 42 份高粱与苏丹草品种资源的 SSR 数字指纹

对 95 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,发现有 91 对 SSR 引物可以扩增出 DNA。91 对 SSR 引物扩增结果的多态性水平有较大差异,条带数最少 1 条,最多达到 12 条,总扩增条带数为 502 条,其中 73 对引物在 42 份高粱和苏丹草中扩增出多态性,多态性条带 432 条,多态性条带比率为 86.06%,多态性丰富。平均每对引物可获得 5.92 个多态条带,分子量 150~500 bp(图 2)。

在 73 对 SSR 引物中,未能找到仅通过 1 对引物就能鉴别全部 42 份资源的 DNA 指纹图谱。而且,在某些引物上,有些品种如苏丹草 2 号与 3 号扩增的图谱相同,高粱不育系与其对应保持系(如高粱 38 号 7501A 与 41 号 7501B;高粱 17 号三尺三 A 与 12 号三尺三 B 等)的谱带也完全一致。即使多态性非常丰富的 SSR 引物,如 *cup57*,其扩增的结果也发现,某些品种扩增的谱带相同(图 2)。这说明某些品种不仅形态学性状(包括植株和籽粒等)相似,而且 DNA 的遗传变异也较小,亲缘关系较近。这从另外一个侧面表明,无论从遗传育种还是种子生产利用上讲,建立一套能鉴别不同品种资源的指纹图谱的必要性。

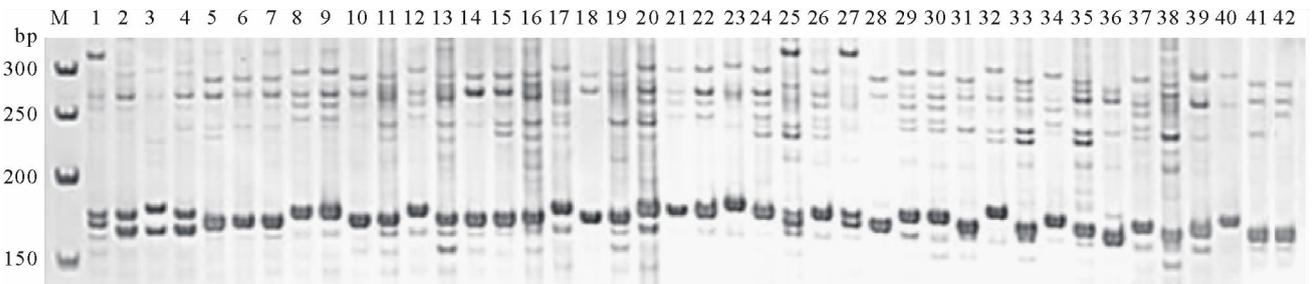


图 2 引物 *cup57* 在 42 份高粱和苏丹草中扩增的结果

Fig. 2 SSR fingerprint amplified by primer *cup57*

根据引物组合方法,筛选出 3 对具有清晰条带,且重复性好的 SSR 核心引物用于 42 份高粱和苏丹草指纹图谱的构建。这 3 对 SSR 引物分别是:*txp18* (系列 F:ACTGTCTAGAACAAGCTGCG;R:TTGCTCTAGCTAGGCATTTTC)、*cup53* (系列 F:GCAGGAGTATAGGCAGAGGC;R:CGACATGACAAGCTCAAACG)、*cup57* (系列 F:CTGCAGAGAGCTAATTGTGC;R:TCTTGAAGAGACGGACCTG)。这样,虽然某 2 个品种在 1 或 2 对引物上的数字指纹完全相同,但只要利用筛选出的 3 对 SSR 核心引物就可以构建 1 个 SSR 数字指纹系列,使得全部供试材料之间的多态性可以通过 0 或 1 字符串的排列顺序得到清楚的表达,获得 42 份品种资源各自独立的 SSR 数字指纹(表 3)。

2.3 2 个高粱—苏丹草杂交种的 DNA 指纹图谱

利用以上构建数字指纹所筛选出的 RAPD 随机引物,对皖草 2 号和 3 号 2 个杂交种进行扩增,结果表明,随机引物 F-01 的条带在两杂交种间差异明显(图 3 左)。试验时,考虑到皖草 2 号和 3 号有相同的母本 Tx623A, RAPD 指纹图谱构建时未加入 Tx623A,只是选择了 2 个杂交种各自父本,即 S722 和 Sa。皖草 2 号及其父本 S722 在分子量超过 1 100 bp 最下处,有 1 条特征带,而皖草 3 号及其父本 Sa 没有这条特征带,据此可以鉴别皖草 2 号和 3 号;S722 在分子量约 900 bp 处有 1 特征带,可以与皖草 2 号、皖草 3 号、Sa 区别开,但皖草 3 号与其父本 Sa 没有特征带,二者间无法区分。针对这一问题,本研究利用筛选出的 SSR 引物,对 2 个杂交种及其亲本进行 PCR 扩增,结果筛选到 1 对 SSR 核心引物 *txp18* 在 2 个杂交种间有明显的互补带,并且可以把 2 个杂交种与其亲本区别开来,从而构建了 1 张皖草 2 号和 3 号及其亲本的 SSR 指纹图谱(图 3 右)。

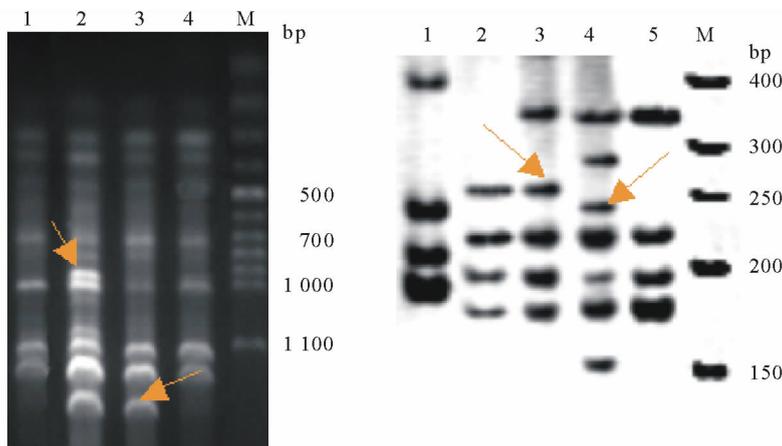
3 讨论

以往研究表明^[17,20],随着苏丹草与高粱参试品种数量的增加,无论 RAPD 或 SSR 标记技术都无法完全区分开苏丹草和高粱两类群。因此,本研究目的并非开展苏丹草与高粱的分类和系谱研究,也不是要鉴别苏丹草和高粱 2 个种群,而是通过 DNA 指纹图谱的构建,鉴定不同苏丹草与高粱品种资源,尤其 2 个国审杂交种。

表 3 利用 3 对 SSR 核心引物构建的 42 份品种资源的数字指纹

Table 3 DNA fingerprint of 42 accessions established by 3 pairs core primers

引物 Primer	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42						
<i>txp18</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1					
	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1					
	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1					
	0	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1					
<i>cup53</i>	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1				
	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0					
	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
<i>cup57</i>	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1				
	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1		
	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	
	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	
	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

图 3 RAPD 引物 F-01(左)和 SSR 引物 *txp18*(右)构建的 2 个杂交种指纹图谱Fig. 3 Fingerprinting of two sorghum-sudangrass hybrids by RAPD primer F-01 (L) and SSR primer *txp18* (R)

箭头表示特征带 The arrows on the figure denote characteristic bands; 1: Sa; 2: S722;

3: 皖草 2 号 Wancao No. 2; 4: 皖草 3 号 Wancao No. 3; 5: Tx623A

必须承认,在研究作物品种资源的遗传亲缘关系时,应选用尽量多的、能够覆盖整个基因组的引物进行 PCR 扩增^[17,20];但在建立作物 DNA 指纹图谱时,若采用超过 20 个(或对)以上引物,则不利于节约资源、降低成本和提高工作效率,也给生产上应用该指纹图谱鉴定作物品种资源或杂交种时带来很大困难。所以,本研究认为虽然有 9 个 RAPD 和 73 对 SSR 引物在 42 份品种资源间表现出很好的多态性,但并不主张选取全部表现多态的引物所构成的数字指纹组合作为指纹图谱,而是通过筛选出尽量少的核心引物,达到事半功倍的效果。

RAPD 和 SSR 标记构建指纹图谱的原理是不同的。RAPD 标记一般表现为显性遗传,所构建的指纹图谱中 1、0 表示特异扩增的 DNA 片段有无。因影响 PCR 扩增反应的各种因素(如 DNA、 Mg^{2+} 、DNTP、Taq、退火温度等)同样影响 RAPD 的扩增效果,其重复性一直受到研究者的关注^[7,8]。研究表明,在反应仪器固定、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,并且利用 4 个 RAPD 核心引物扩增的数字指纹组合,可以鉴定全部 42 份高粱与苏丹草品种资源。作物杂交种的 DNA 图谱有双亲型、偏母型、偏父型、杂种型、互补型和缺失型等,而互补型是鉴定杂交种纯度最可靠最直观的谱带。本研究筛选的 RAPD 核心引物 F-01 虽然能鉴别皖草 2 号和 3 号 2 个杂交种,但未能在 2 个杂交种中找到互补型特征谱带,也难以通过该图谱鉴定皖草 3 号杂交种和其父本 Sa,表明利用 RAPD 技术建立高粱-苏丹草杂交种 DNA 指纹图谱存在不足。SSR 标记呈共显性,数量丰富、信息含量高、重复性好、稳定可靠;所构建的指纹图谱中 0,1 表示位点(loci)上等位基因(allele)的变异。本研究仅利用 3 对 SSR 核心引物组合构建的 DNA 数字指纹,可以鉴定 42 份高粱和苏丹草品种资源,这对 7 种栽培高粱类型(中国高粱、菲特瑞塔、都拉、迈罗、卡佛尔、沙鲁和亨加利)和常用高粱不育系和保持系(如 Tx623A 和 Tx623B, Tx2791A 和 Tx2791B, 3042A 和 3042B, 三尺三 A 和三尺三 B 等)的鉴别和利用具有重要的理论和实际应用价值。更为重要的是,与某些研究者需要利用大量引物组合进行作物品种鉴定不同,本研究只要利用 1 对 SSR 核心引物就可以建立 1 张能够区别皖草 2 号和 3 号及其亲本的 DNA 指纹图谱,显示了 SSR 标记在高粱与苏丹草 DNA 指纹图谱构建中的优势,也说明本研究所筛选的核心 SSR 引物对杂交种品种鉴定的应用价值。

致谢:农业部国家高粱改良中心、辽宁省农业科学院高粱所邹剑秋研究员、卢庆善研究员,山西省农业科学院高粱所张福耀研究员提供部分试验材料,谨致谢忱。

参考文献:

- [1] 詹秋文, 林平, 李军, 等. 高粱-苏丹草杂交种研究与利用前景[J]. 草业学报, 2001, 10(2): 56-61.
- [2] Tinker N A, Fortin M G, Mather D E. Random amplified polymorphisms DNA and pedigree relationships inspring barley[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1993, 85: 976-984.
- [3] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, et al. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L. ssp. *Oleifera*) using 5' anchored simple sequence repeat (SSR) primer[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 92: 442-447.
- [4] Siffelova G, Pavelkova M, Klabouchova A, et al. Computer-aided RAPD fingerprinting of accessions from the ryegrass-fescue complex[J]. Journal of Agricultural Science, 1997, 129: 257-265.
- [5] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98: 107-112.
- [6] 赵洪锬, 李启云, 王玉民, 等. 吉林省大豆骨干亲本及主推品种 DNA 指纹图谱的构建[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(4): 12-16.
- [7] 吴渝生, 杨文鹏, 郑用琏. 3 个玉米杂交种和亲本 SSR 指纹图谱的构建[J]. 作物学报, 2003, 29(4): 496-500.
- [8] 魏臻武. 利用 SSR、ISSR 和 RAPD 技术构建苜蓿基因组 DNA 指纹图谱[J]. 草业学报, 2004, 13(3): 62-67.
- [9] 刘冲, 王曙霞, 任云英, 等. “夏光”、“早夏 16”甘蓝杂交种 DNA 指纹图谱的构建[J]. 上海农业学报, 2006, 22(1): 31-33.
- [10] 李根英, Susanne D, Marilyn L, 等. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 分子标记试剂盒的研发[J]. 作物学报, 2006, 32(12): 1771-1778.
- [11] 马啸, 张新全, 周永红, 等. 高羊茅的分子标记应用进展[J]. 草业学报, 2006, 15(2): 1-8.
- [12] 郭海林, 刘建秀, 高鹤, 等. 结缕草属优良品系 SSR 指纹图谱的构建[J]. 草业学报, 2007, 16(2): 53-59.
- [13] 陆永法, 马荣荣, 王晓燕, 等. 甬优系列杂交水稻 SSR 标记指纹图谱和籼粳属性[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(4): 443-446.
- [14] 殷剑美, 陈旭升, 狄佳春, 等. 杂交棉苏杂 118 的 SSR 指纹图谱构建[J]. 江苏农业科学, 2007, 4: 29-31.
- [15] Varshney R K, Chabane K, Hendre P S, et al. Comparative assessment of EST-SSR, EST-SNP and AFLP markers for e-

valuation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys[J]. *Plant Science*, 2007, 173(6): 638-649.

- [16] 许鲲, 张冬晓, 伍晓明, 等. 国家冬油菜区试新品种 SSR 指纹图谱构建与遗传关系分析[J]. *中国油料作物学报*, 2008, 30(1): 29-34.
- [17] 李杰勤, 王丽华, 詹秋文, 等. 应用 RAPD 标记对高粱属两物种之间遗传差异的研究[J]. *草业学报*, 2007, 16(5): 140-144.
- [18] Kong L, Dong J, Hart G E. Characteristics, linkage map positions, and allelic differentiation of *Sorghum bicolor* (L.) Moench DNA simple-sequence repeats (SSRs)[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 101: 438-448.
- [19] Schloss S J, Mitchell S E, White G M, *et al.* Characterization of RFLP probe sequences for gene discovery and SSR development in *Sorghum bicolor*(L.) Moench[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105: 912-920.
- [20] 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.

Establishment of DNA fingerprinting for 42 sorghum and sudangrass accessions and 2 sorghum—sudangrass hybrids

ZHAN Qiu-wen¹, LI Jie-qin¹, WANG Bao-hua², LI Yun-fei¹

(1. Anhui Science and Technology University, Fengyang 233100, China; 2. National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: 100 RAPD primers and 95 pairs of SSR primers were amplified by PCR to constructed DNA fingerprints of 42 sorghum (*Sorghum bicolor*) and sudangrass (*S. sudanense*) accessions and of two sorghum—sudangrass hybrids. The polymorphism rate of 9 RAPD primers with high polymorphism and repeatability was 64.06%. A special data fingerprint could be constructed for each accession using four RAPD core primers. One RAPD fingerprint was constructed by primer F-01 which could differentiate the two sorghum—sudangrass hybrids, but not Wancao No. 3 and Sa. The polymorphism rate of 73 SSR primer pairs screened from 95 SSR primers was 86.06%. A special data fingerprint could be constructed for every accession using three SSR core primer pairs. Primer *txp18* showed obvious complementary bands between the two hybrids. One SSR fingerprint was constructed using primer *txp18*, which could distinguish Wancao No. 2, from Wancao No. 3 and their parents.

Key words: sorghum (*Sorghum bicolor*); sudangrass (*Sorghum sudanense*); hybrid; RAPD (random amplified polymorphic DNA); SSR (simple sequence repeat); fingerprinting