

网络出版时间:2017-03-31 16:08 DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2017.05.008
网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20170331.1608.016.html>

高丹草杂种及亲本叶片基因差异多样性研究

董 婧^{1a}, 逯晓萍^{1a}, 米福贵^{1b}, 王树彦^{1a}, 薛春雷^{1a}, 韩平安^{1a}, 丛梦露^{1a}, 杨 凯²

(1 内蒙古农业大学 a 农学院, b 生态环境学院, 内蒙古 呼和浩特 010019;
2 呼和浩特市合创农业科技研究中心, 内蒙古 呼和浩特 011500)

【摘 要】 【目的】 探明高丹草杂种及其亲本叶片基因差异的多样性。【方法】 以 4 份高粱不育系和 5 种类型苏丹草为亲本, 按照 NC II 设计组配成 20 个杂交组合, 测量各杂交组合及亲本的田间形态指标和生理生化指标, 采用 cDNA-AFLP 差异显示技术分析其基因差异多样性, 计算 29 份材料的遗传相似系数并进行 UPGMA 聚类分析。【结果】 20 份高丹草杂种及其 9 份亲本材料的 cDNA-AFLP 分析结果显示, 12 对引物组合共扩增出 336 个位点, 其中特异性位点 276 个, 占总数的 82.14%, 平均每对引物组合扩增出特异性位点 23 个。29 份材料的观测等位基因数(N_o) 为 1.870 1, 有效等位基因数(N_e) 为 1.736 5, Nei's 基因多样性指数(H) 为 0.389 8, Shannon 信息指数(I) 为 0.556 9, 显示了高丹草杂种及其亲本苗期叶片基因表达的复杂性。聚类分析结果显示, 29 份材料间的遗传相似系数为 0.508~0.876, 以遗传相似系数 0.54 为基准, 可将 29 份材料分为 4 类, 其中亲本材料主要在第 I 类和第 IV 类, 杂种主要在第 II 类和第 III 类。【结论】 构建了高丹草 cDNA-AFLP 差异显示技术反应体系, 表明高丹草及其亲本苗期叶片基因具有差异多样性。

【关键词】 高丹草叶片; cDNA-AFLP; 杂种优势; 基因表达多样性

【中图分类号】 S540.351 【文献标志码】 A 【文章编号】 1671-9387(2017)05-0048-09

Genetic diversity differences between leaves of Sorghum-sudangrass hybrids and their parents

DONG Jing^{1a}, LU Xiaoping^{1a}, MI Fugui^{1b}, WANG Shuyan^{1a}, XUE Chunlei^{1a},
HAN Pingan^{1a}, CONG Menglu^{1a}, YANG Kai²

(1 a College of Agronomy, b College of Ecological Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot, Inner Mongolia 010019, China; 2 Huhhot Hechuang Agriculture Scientific Research Center, Huhhot, Inner Mongolia 011500, China)

Abstract: 【Objective】 This study investigated the genetic diversity differences in leaves of hybrids and parents of Sorghum-sudangrass. 【Method】 Four sorghum sterile lines and five Sudan grass were used as parents to formulate 20 hybrid combinations based on the NC II design. Field shape indexes and physiological and biochemical indexes of the hybrids and parents were measured. Genetic diversity differences were analyzed using cDNA-AFLP differential display technique, genetic similarity coefficients of the 29 materials were calculated, and cluster analysis was conducted. 【Result】 The cDNA-AFLP analysis of 29 sorghum hybrids and their parents showed that 12 pairs of primer combinations amplified 336 sites, including 276 specific sites with the ratio of 82.14%. The average specific sites of each primer combination was 23. The number of alleles (N_o) was 1.870 1, the effective number of alleles (N_e) was 1.736 5, the Nei's gene di-

【收稿日期】 2016-02-24
【基金项目】 国家自然科学基金项目(31460375); 呼和浩特市科技计划项目(2012-重-计-8-2)
【作者简介】 董 婧(1989—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 在读博士, 主要从事植物遗传育种研究。E-mail: 984012971@qq.com
【通信作者】 逯晓萍(1960—), 女, 内蒙古呼和浩特人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物遗传育种研究。
E-mail: lxp1960@163.com

versity index (H) was 0.389 8, and the Shannon (I) was 0.556 9, indicating the complexity in gene expression of the hybrids and parents. Cluster analysis showed that the genetic similarity coefficients of 29 Sorghum-sudangrass materials were 0.508—0.876. Using 0.54 as standard, the 29 materials can be divided into 4 categories. The parental materials were mainly in types I and IV, and the hybrids were mainly in types II and III. 【Conclusion】 The reactive system of cDNA-AFLP differential display technique was established, and it showed that the leaves of Sorghum-sudangrass hybrids and their parents had genetic diversity at seedling stage.

Key words: Sorghum-sudangrass leaves; cDNA-AFLP; heterosis; diversity of expressing genes

高丹草是饲用高粱和苏丹草杂交育成的一种综合农艺性状优良的 1 年生禾本科牧草^[1-3],它结合了高粱的抗寒、抗旱、耐倒伏、产草量高等特性及苏丹草的分蘖性和再生性强、营养价值高、氰化物含量低、适口性好等优良特性,表现出了显著的种间杂种优势^[4-5]。高丹草一次播种可多次刈割,肥水条件充足时最高鲜草产量可达 195 t/hm²,且营养价值高(粗蛋白含量可达 15%以上)^[6],适宜青贮、青饲,在畜牧业和渔业生产上具有广阔的应用前景^[7]。目前,国内育成了 GB-4-2^[8]、蒙农青饲 1 号、蒙农青饲 2 号和蒙农青饲 3 号^[9]、高丹草-天农青饲 1 号^[10]、皖草 2 号、皖草 3 号^[11]等新品种,在畜牧业中发挥了重大作用。

光合作用是作物产量形成的重要生理过程,而叶片是光合作用的主要器官。徐文华等^[12]对高粱、苏丹草及高丹草产量进行比较后认为,茎和叶是高丹草及其亲本鲜物质产量的主要组成部分。在选育良种和相关栽培调控技术的研究中,选择叶片为考查器官是获得高产优质饲料饲草的基础。因此,通过对高丹草及其亲本叶片基因表达的差异分析,可为阐明高丹草杂种优势的分子机理提供理论依据。

cDNA-AFLP 是将扩增片段长度多态性 AFLP 技术应用于 mRNA 表达差异分析而形成的一种 mRNA 指纹图谱技术^[13]。它结合了 AFLP 和 mR-NA 技术,可对生物体转录组进行较全面、系统的基因差异表达分析,该技术具有假阳性低、重复性好、稳定可靠的特点,目前已普遍应用于植物转录组的

全面、系统分析中^[14-15]。Swanson-Wagner 等^[16]利用芯片技术研究玉米自交系 B73、MO17 及其杂交种 F₁ 的苗期基因表达,发现有 1 367 个 EST (9.8%)在双亲和杂种间表现显著的差异表达;董艳玲^[17]采用 cDNA-AFLP 技术对 2 个小麦品种叶片差异表达基因进行分析,通过 46 对引物分别获得苗期、成株期差异基因约 32 320 个和 34 850 个;黄河等^[18]对抗白锈病菊花品种‘紫荷’的叶片进行 cDNA-AFLP 分析,共筛选出 76 对引物,产生条带 4 950 条;刘志勇等^[19]对高温胁迫下番茄叶片进行 cDNA-AFLP 分析,共得到 6 个下调表达基因和 41 个上调表达基因。因此,本研究也决定采用 cDNA-AFLP 差异显示技术,分析高丹草杂种组合及其亲本叶片表达基因的多样性,为深入开展高丹草杂种优势的相关功能基因筛选、定位、分离与鉴定等研究和材料选取提供科学依据,也为开展高丹草分子辅助育种奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料及田间种植

本试验选用 4 份高粱不育系(包括配套的保持系)和 5 种类型苏丹草(黑壳苏丹草、白壳苏丹草、红壳苏丹草、棕壳苏丹草、21 号杂种),按照 NC II 设计组配成 20 个杂交组合(材料编号及名称见表 1)。对这 20 个杂交种及其亲本共计 29 份材料进行生理生化指标测定和 cDNA-AFLP 分析。

表 1 供试高丹草杂种及其亲本材料编号与名称

Table 1 Number and name of Sorghum-sudangrass hybrids and their parents

材料编号 Material number	材料名称 Material name	材料编号 Material number	材料名称 Material name
1	314A×白壳苏丹草 314A×white shell Sudangrass	16	棕壳苏丹草 Brown shell Sudangrass
2	11A×白壳苏丹草 11A×white shell Sudangrass	17	13A×黑壳苏丹草 13A×black shell Sudangrass
3	11A×21 号杂种 11A×21 hybrid	18	314A×黑壳苏丹草 314A×black shell Sudangrass

表 1(续) Continued table 1

材料编号 Material number	材料名称 Material name	材料编号 Material number	材料名称 Material name
4	11A×黑壳苏丹草 11A×black shell Sudangrass	19	13A×红壳苏丹草 13A×red shell Sudangrass
5	11A×红壳苏丹草 11A×red shell Sudangrass	20	314A×红壳苏丹草 314A×red shell Sudangrass
6	21 号杂种 21 hybrid	21	黑壳苏丹草 Black shell Sudangrass
7	红壳苏丹草 Red shell Sudangrass	22	314A×21 号杂种 314A×21 hybrid
8	白壳苏丹草 White shell Sudangrass	23	2397A×红壳苏丹草 2397A×red shell Sudangrass
9	2397A×白壳苏丹草 2397A×white shell Sudangrass	24	13A×21 号杂种 13A×21 hybrid
10	13A×白壳苏丹草 13A×white shell Sudangrass	25	13A×棕壳苏丹草 13A×brown shell Sudangrass
11	2397A×21 号杂种 2397A×21 hybrid	26	2397A
12	2397A×黑壳苏丹草 2397A×black shell Sudangrass	27	314A
13	2397A×棕壳苏丹草 2397A×brown shell Sudangrass	28	13A
14	11A×棕壳苏丹草 11A×brown shell Sudangrass	29	11A
15	314A×棕壳苏丹草 314A×brown shell Sudangrass		

分别在内蒙古农业大学科技园区和呼和浩特市合创农业科技研究中心种植供试材料。试验采用随机区组设计,每个材料 3 个重复,每重复 4 行区,行长 5.0 m,行距 0.4 m,分别在分蘖期、拔节期和开花期共灌水 3 次,其他栽培管理措施同一般大田生产。

1.2 形态指标和生理生化指标的测定

1.2.1 形态指标 开花期至收获期,分别在 2 个试验地的每个小区中随机选取 10 个样本,测定株高、有效分蘖数、叶长、叶宽、成株期叶片数、单株鲜质量等 6 个农艺性状,每个指标均取各样本平均值。

1.2.2 生理生化指标 取各材料苗期叶片,采用 NBT 光还原法测定超氧化物歧化酶(SOD)活性,采用愈创木酚法测定过氧化物酶(POD)活性,采用紫外吸收法测定过氧化氢酶(CAT)活性。

表 2 本研究中 cDNA-AFLP 用到的引物序列

Table 2 cDNA-AFLP primer and their sequences in this study

引物名称 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	退火 温度/℃ T _m	GC 含量/% GC content	引物名称 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')	退火 温度/℃ T _m	GC 含量/% GC content
E0	GACTGCGTACCAATTC	51.55	50.00	M0	GATGACTCCTGAGTAA	48.99	42.11
E32	GACTGCGTACCAATTCAAC	55.41	47.37	M47	GATGACTCCTGAGTAACAA	53.25	47.37
E33	GACTGCGTACCAATTCAAG	55.41	42.11	M48	GATGACTCCTGAGTAACAC	55.41	47.37
E34	GACTGCGTACCAATTCAAT	53.25	52.63	M49	GATGACTCCTGAGTAACAG	55.41	42.11
E36	GACTGCGTACCAATTCACC	57.56	52.63	M50	GATGACTCCTGAGTAACAT	53.25	47.37
E37	GACTGCGTACCAATTCACG	57.56	47.37	M51	GATGACTCCTGAGTAACCA	55.41	52.63
E38	GACTGCGTACCAATTTCACT	55.41	47.37	M53	GATGACTCCTGAGTAACCG	57.56	47.37
E39	GACTGCGTACCAATTCAGA	55.41	52.63	M54	GATGACTCCTGAGTAACCT	55.41	47.37
E40	GACTGCGTACCAATTCAGC	57.56	52.63	M55	GATGACTCCTGAGTAACCA	55.41	52.63
E41	GACTGCGTACCAATTCACG	57.56	47.37	M57	GATGACTCCTGAGTAACCG	57.56	42.11
E42	GACTGCGTACCAATTTCACT	55.41	43.75	M59	GATGACTCCTGAGTAACCTA	53.25	47.37

1.3.3 谱带统计与分析 按照扩增条带的有、无分

1.3 分子标记

1.3.1 总 RNA 提取与 cDNA 双链合成 采用 TIANGEN 公司 RNAprep Pure PLANT Kit (离心柱型)试剂盒提取 29 份材料叶片的总 RNA,具体操作步骤参照试剂盒说明书进行。cDNA 合成采用 Thermo 公司试剂盒 RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit(k1621),并参照说明完成。

1.3.2 cDNA-AFLP 分析 引物筛选参照逯晓萍等^[20]的研究成果。采用 *Eco*RI/*Mse*I 组合进行 cDNA 的限制性双酶切,酶切产物与接头连接,预扩增反应选用引物组合 E0/M0,选择性扩增反应采用预扩增引物加 3 个碱基的引物组合,具体见表 2。选择性扩增产物在 6%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染法进行指纹图谱的显影。

别记为 1 或 0,形成 0/1 矩阵。本试验只选用 100~

2 000 bp 易于识别的带进行记分,且每对引物的 cDNA-AFLP 均对 2 个试验地的各样品分别做 2 次 PCR 扩增的重复和差异显示,只有 2 次都被检测到的片段才被记录下来。应用 POPGENE 1. 32 软件^[14]对高丹草杂种及其亲本各参数进行分析,计算观测等位基因数(*No*)、有效等位基因数(*Ne*)、Nei’s 基因多样性指数(*H*)和 Shannon 信息指数(*I*)^[21]。用统计软件 NTSYSpc 2. 10 计算供试材料的遗传相

似系数,运用 UPGMA(类平均法)进行聚类分析,生成聚类分析树状图。

2 结果与分析

2. 1 高丹草及其亲本农艺性状的差异

在高丹草成熟时期,经过室外及室内数据收集,29 份高丹草及其亲本材料的形态和生理生化指标分析结果见表 3。

表 3 高丹草杂种及其亲本材料的形态和生理生化指标

Table 3 Morphological and physiological biochemical indexes of Sorghum-sudangrass hybrids and parental materials										
材料 编号 No.	株高/cm Height	有效分蘖数 Tiller number	叶片数 Leaf number	叶长/cm Leaf length	叶宽/cm Leaf width	单株鲜 质量/g Fresh weight	SOD 活性/ (U·g ⁻¹) SOD activity	CAT 活性/ (U·g ⁻¹) CAT activity	POD 活性/ (U·g ⁻¹) POD activity	
1	313±21 a	3±3 b	31±1 a	82±8 a	6±2 c	1 035±121 a	39. 32±2. 01 c	51. 81±3. 49 d	22. 66±0. 58 d	
2	324±15 a	3±2 b	25±3 a	88±6 a	7±1 b	948±62 a	40. 86±4. 05 c	59. 91±1. 67 c	32. 15±4. 20 c	
3	319±19 a	3±3 b	36±2 a	79±5 a	7±3 b	894±91 a	46. 32±3. 47 b	63. 36±5. 20 b	33. 61±2. 37 c	
4	306±20 a	2±0 c	27±4 a	80±6 a	6±2 c	870±59 a	37. 66±7. 23 c	41. 12±4. 61 e	45. 33±5. 02 b	
5	304±23 a	2±0 c	29±2 a	84±4 a	7±3 b	863±103 a	66. 25±6. 92 a	97. 35±6. 28 a	73. 25±4. 39 a	
6	302±14 a	4±1 a	44±5 a	57±5 d	4±4 e	782±74 a	94. 65±3. 78 a	104. 15±8. 50 a	114. 81±5. 24 a	
7	321±19 a	4±2 a	41±4 a	78±6 a	5±3 d	727±69 b	103. 21±8. 47 a	94. 89±7. 34 a	97. 52±1. 99 a	
8	319±20 a	4±1 a	40±2 a	70±5 a	4±2 e	722±38 b	91. 63±3. 68 a	120. 10±9. 22 a	110. 34±6. 21 a	
9	302±23 a	2±0 c	30±3 a	83±4 a	7±1 b	670±94 b	41. 13±4. 31 c	57. 32±3. 64 d	37. 35±3. 58 b	
10	316±17 a	1±1 d	13±1 d	84±6 a	7±0 b	665±57 b	85. 71±6. 47 a	91. 36±5. 27 a	73. 32±4. 26 a	
11	292±16 a	1±1 d	12±2 e	77±7 a	6±2 c	651±62 c	52. 32±5. 22 b	67. 21±4. 89 b	30. 32±1. 05 c	
12	314±16 a	2±2 c	40±3 a	69±5 a	7±1 b	624±101 c	55. 72±3. 58 b	50. 81±4. 72 d	33. 71±2. 44 c	
13	314±17 a	2±1 c	27±3 a	71±6 a	7±2 b	619±114 c	44. 21±4. 26 b	44. 26±5. 46 d	31. 33±3. 02 c	
14	318±21 a	2±0 c	28±2 a	75±4 a	6±3 c	570±58 d	38. 24±1. 97 c	39. 36±2. 67 e	29. 43±0. 97 c	
15	309±13 a	1±1 d	13±4 d	75±4 a	8±3 a	563±92 d	70. 89±4. 95 a	75. 65±8. 01 a	35. 21±1. 83 c	
16	287±9 a	2±2 c	30±2 a	67±2 b	4±2 e	556±57 d	126. 32±11. 60 a	124. 51±7. 45 a	112. 41±7. 23 a	
17	333±14 a	1±1 d	24±5 a	78±5 a	6±4 c	552±49 d	87. 33±8. 22 a	98. 81±6. 24 a	61. 29±1. 68 a	
18	301±11 a	2±1 c	43±5 a	76±4 a	7±3 b	512±67 d	73. 43±2. 64 a	105. 66±7. 68 a	89. 53±2. 77 a	
19	319±15 a	1±1 d	27±3 a	72±4 a	5±4 d	503±36 d	55. 65±1. 87 b	84. 86±5. 28 a	72. 41±6. 22 a	
20	282±8 a	1±0 d	28±4 a	68±3 a	6±2 c	500±82 d	49. 22±5. 61 b	67. 26±4. 71 b	55. 13±4. 24 a	
21	298±10 a	3±3 b	40±2 a	65±2 b	4±3 e	483±45 de	119. 65±7. 31 a	137. 26±9. 24 a	105. 13±6. 70 a	
22	298±12 a	1±1 d	30±4 a	64±3 b	5±3 d	452±46 de	56. 55±4. 28 b	62. 22±5. 04 c	55. 96±4. 82 a	
23	301±15 a	1±1 d	33±2 a	73±4 a	5±2 d	440±37 e	68. 41±5. 24 a	66. 07±3. 16 b	76. 82±5. 13 a	
24	294±21 a	2±1 c	21±5 b	66±5 b	6±1 c	422±59 f	39. 68±3. 17 c	50. 91±2. 73 d	34. 36±0. 59 c	
25	289±16 a	1±1 d	42±5 a	71±5 a	6±4 c	412±94 f	43. 15±3. 68 b	39. 99±1. 26e	38. 00±1. 46b	
26	150±9 b	1±1 d	18±4 c	55±6 e	7±2 b	322±71 g	52. 74±5. 12 b	74. 58±4. 85 b	56. 98±3. 07 a	
27	100±7 b	2±0 c	13±2 d	57±4 d	6±2 c	289±43 g	85. 69±3. 96 a	58. 09±4. 91 d	41. 78±2. 86 b	
28	98±5 b	2±1 c	12±1 e	64±3 b	6±1 c	282±34 g	70. 53±4. 71 a	81. 37±5. 30 a	29. 83±0. 84 c	
29	106±6 b	1±1 d	15±1 d	86±4 c	7±0 b	231±29 h	92. 83±5. 34 a	91. 03±6. 25 a	58. 64±0. 78 a	

注:材料编号及名称同表 1;同列数据后标不同小写字母表示在 $P<0.05$ 水平下差异显著。
Note:The material numbers and names are the same as in Table 1. Values in the same column followed by different lowercase letters indicate significant difference at $P<0.05$.

对表 3 进行综合分析可以看出,4 份母本高粱不育系材料(编号 26—29)均有株高低、有效分蘖数较少、叶片数少、叶宽较宽等特点;5 份父本材料(编号 6,7,8,16,21)均具有株高较高、有效分蘖数较多、叶长短、叶宽窄等特点;以单株鲜质量作为产量指标,20 份高丹草杂交种中表现出较强优势的杂交组合有:314A×白壳苏丹草(1 号)、11A×白壳苏丹

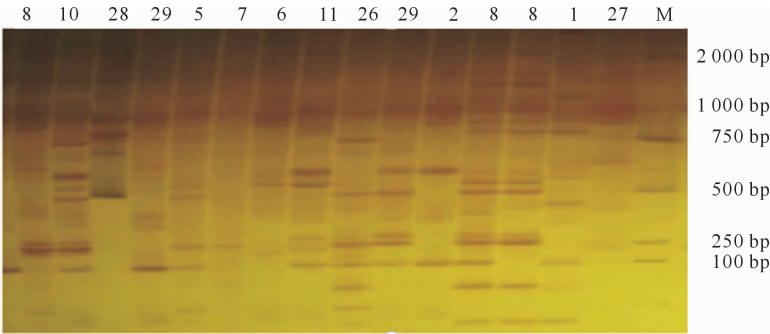
草(2 号)、11A×21 号杂种(3 号)、11A×黑壳苏丹草(4 号)、11A×红壳苏丹草(5 号)、2397A×白壳苏丹草(9 号)、13A×白壳苏丹草(10 号)、2397A×21 号杂种(11 号)等。这些高产杂种遗传了母本叶宽宽、父本株高高和有效分蘖数多等特点。同时发现,有些高产杂种的 SOD、CAT 和 POD 活性较低,这可能与植物某方面抗性较低有关,在今后的品种选

育过程中应综合观察和考虑植物的抗性指标,以筛选高产优质的高丹草品种。

2.2 高丹草及其亲本叶片差异表达基因的多样性

从 100 对引物组合中筛选出扩增条带多、分布均匀、清晰可辨且多态性高的 12 对引物组合

(E41M50、E41M54、E32M59、E34M47、E36M53、E32M47、E40M49、E42M51、E34M57、E36M57、E37M49、E39M54),对高丹草杂种及其父母本进行 cDNA-AFLP 分析,部分供试材料 cDNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果见图 1。



泳带上方数字为材料编号(同表 1);M 为 D2000 Marker
The number above the swimming band is the material number (same as table 1);M is D2000 Marker

图 1 部分供试材料 cDNA 的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis of cDNA of some materials

由表 4 可知,12 对引物组合共扩增出 336 个位点,其中多态性位点 276 个,平均每对引物组合扩增出多态性位点 23 个,多态位点比率达 82.14%。试

验材料酶切位点的分布具有广泛差异,说明供试材料遗传多样性丰富。

表 4 12 对引物对高丹草杂种及其亲本材料的 PCR 扩增结果

Table 4 PCR amplification of Sorghum-sudangrass hybrids and parental materials based on 12 pairs of primers

引物对 Selected primers	选择性序列 Selective nucl	扩增位点数 Amplified sites	多态性位点数 Polymorphic site	多态位点比率/% Ratio of polymorphic sites
E41M50	E-ACG/M-CAT	37	33	89.19
E41M54	E-ACG/M-CCT	21	20	95.24
E32M59	E-AAC/M-CTA	28	21	75.00
E34M47	E-AAT/M-CAA	33	28	84.85
E36M53	E-ACC/M-CCG	23	18	78.26
E32M47	E-AAC/M-CAA	30	22	73.33
E40M49	E-AGC/M-CAG	24	19	79.17
E42M51	E-ACT/M-CCA	31	25	80.65
E34M57	E-AAT/M-CCG	30	25	83.33
E36M57	E-ACC/M-CCG	19	19	100.00
E37M49	E-ACG/M-CAG	34	29	85.29
E39M54	E-AGA/M-CCT	26	17	65.38
合计 Total		336	276	
平均 Average		28	23	82.14

采用 cDNA-AFLP 差异显示技术对 29 份高丹草杂种及其亲本叶片 cDNA 进行分析,结果(表 5)显示,等位基因数(No)为 1.870 1,有效等位基因数(Ne)为 1.736 5,Nei's 基因多样性指数(H)为

0.389 8,Shannon 信息指数(I)为 0.556 9。由此可见,苗期高丹草杂种及其亲本叶片内基因表达的差异性较为丰富。

表 5 高丹草杂种及其亲本的 cDNA-AFLP 分析结果

Table 5 cDNA-AFLP analysis of 29 Sorghum-sudangrass hybrids and parents

项目 Item	样本数 Sample number	No	Ne	H	I
平均 Mean	29	1.870 1	1.736 5	0.389 8	0.556 9
标准差 St. Dev		0.352 3	0.324 8	0.157 2	0.241 7

2.3 高丹草杂种及其亲本的聚类分析

基于 cDNA-AFLP 分析结果,应用 NTSYSpc 2.10 软件计算高丹草杂种及其亲本间的遗传相似系数,结果表明高丹草杂种及其亲本之间的遗传相似系数为 0.508~0.876,平均遗传相似系数为 0.640。其中 9 号(2397A×白壳苏丹草)与 12 号(2397A×黑壳苏丹草)之间的遗传相似系数最大,为 0.876,表明二者之间基因表达的差异性最小;13 号(2397A×棕壳苏丹草)与 20 号(314A×红壳苏丹草)之间的遗传相似系数最小,为 0.538,表明二者之间基因表达的差异性最大。

根据供试材料间的遗传相似系数进行 UPGMA 聚类分析,结果(图 2)显示,以遗传相似系数 0.54 为基准,可将 29 份材料划分为 4 组。第 I 组包含了 21 号杂种、白壳苏丹草、棕壳苏丹草、红壳苏丹草、黑壳苏丹草 5 个父本材料;第 II 组包括了 314A×黑

壳苏丹草、314A×白壳苏丹草、11A×黑壳苏丹草、11A×白壳苏丹草、13A×白壳苏丹草、2397A×21 号杂种、11A×21 号杂种 7 个高丹草杂交组合,全部为筛选出的产量较高的杂交组合,其中 1 号(314A×白壳苏丹草)、3 号(11A×21 号杂种)分别为已通过审定的品种“GB-4-2”和“内杂饲一号”。第 III 组包含了 2397A×棕壳苏丹草、11A×棕壳苏丹草、11A×红壳苏丹草、314A×21 号杂种、13A×21 号杂种、2397A×白壳苏丹草、2397A×黑壳苏丹草 7 个材料,全部为高丹草杂交组合。第 IV 组共包含 10 个材料,其中 4 个高粱亲本材料(2397A、11A、13A、314A)被聚集到了这一类。29 份材料的基因多样性聚类结果与其农艺性状的差异显著性分析结果基本一致,说明各材料表现出的杂种优势强弱、不同株型及在农艺性状上的差别,可能是不同基因型与基因之间相互作用的结果。

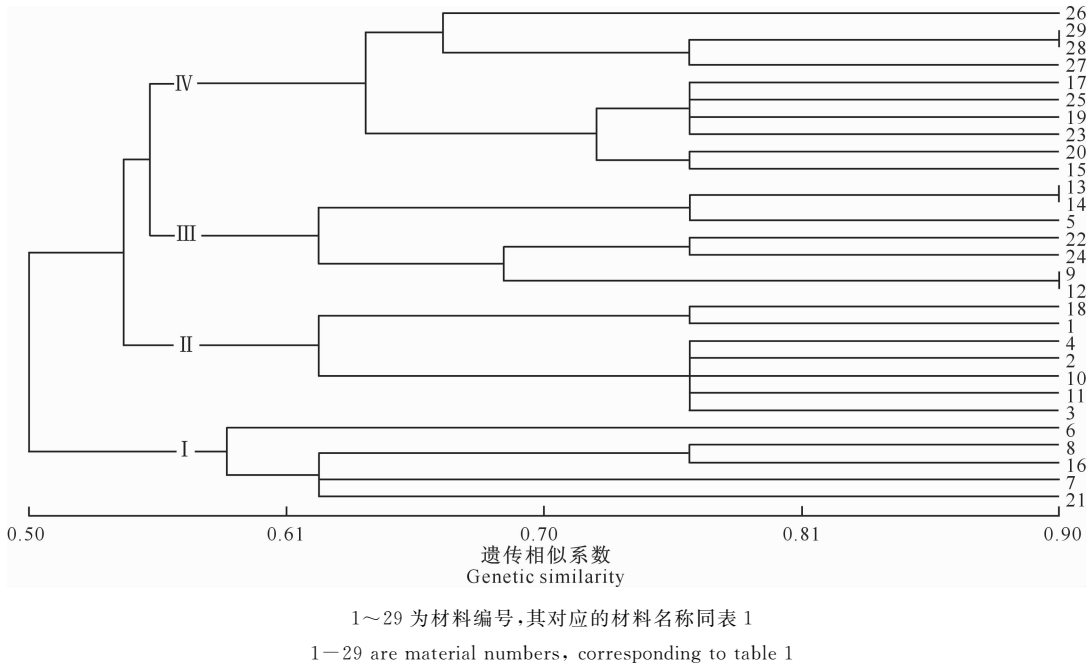


图 2 高丹草杂种及其亲本的聚类结果
Fig.2 Clustering analysis of Sorghum-sudanense hybrids and their parents

3 讨 论

cDNA-AFLP 差异显示法是鉴定未知基因的有效手段之一^[22],特别适合差异表达基因的分离,也是分离组织特异性和发育阶段特异性基因的快速、可靠的方法^[23-24]。本试验中高丹草杂种及其亲本材料栽植于相同环境条件下,所采集的叶片处于植株的相同部位,因此利用 cDNA-AFLP 技术检测到的高丹草及其亲本基因表达的差异性,是不同品种遗传

基础差异导致的结果。本研究中不同高丹草杂交组合及其亲本叶片内功能基因的表达差异性较为丰富,等位基因数(N_o)为 1.870 1,有效等位基因数(N_e)为 1.736 5,Nei's 基因多样性指数(H)为 0.389 8,Shannon 信息指数(I)为 0.556 9,说明高丹草杂种及其亲本间具有较高的遗传多样性。

在环境因素的影响下,植物杂种优势相关性状的表现具有一定的可塑性,但总体而言是受遗传因素控制的^[25-27]。研究表明,高丹草的杂种优势相关

性状受较强的遗传控制,单株鲜质量、株高、叶片数等性状在不同基因型间存在明显差异^[28-29]。本研究中,20 个高丹草杂种及其 9 个亲本之间的遗传相似系数为 0.508~0.876,可以看出品种间的遗传差异性和多态性。从聚类结果可知,9 号(2397A×白壳苏丹草)与 12 号(2397A×黑壳苏丹草)亲缘关系最近,相似系数达 0.876;13 号(2397A×棕壳苏丹草)与 20 号(314A×红壳苏丹草)亲缘关系最远,相似系数仅为 0.538。第Ⅱ类、第Ⅲ类和第Ⅳ类材料包含了 20 个杂交组合,这些材料具有双亲的遗传背景,尽管这 3 类之间的遗传相似系数比较高,亲缘关系较近,但是它们之间也存在变异等位基因位点,并没有表现出相同的聚类规则。说明杂交种实现了亲本间基因的复杂交流,打乱了亲本原有的基因次序,组合形成了新的基因型,这可能是杂交种杂种优势强的重要分子依据。本研究发现第Ⅱ类材料株高总体高于第Ⅰ类,但 SOD 和 CAT 活性明显低于第Ⅰ类。这种现象可能与植物细胞体内的活性氧、羟基等是细胞扩大过程中的关键因子有关,它们有助于增加细胞膜透性而使细胞壁更加松弛。第Ⅰ类材料体内高活性的 SOD、POD 和 CAT,可以通过阻止细胞的扩大而增加植物细胞壁硬度,进而阻止植物生长,这与 Fry^[30]的研究结论一致。

目前,以 cDNA-AFLP 差异显示技术为基础的杂种优势相关机制研究已成为一个热点课题,主要涉及玉米、水稻、大麦等多种主要作物。在国外,Meyer 等^[31]用玉米授精后 6 d 的胚为研究材料,在转录水平上发现明显的杂种基因表达变化。Carmona 等^[32]应用 cDNA-AFLP 技术分析了黑顶柄锈病侵染甘蔗时应答基因表达的差异性,获得了 34 个包含基因表达信息的 TDFs。在我国,刘雪梅等^[33]对白桦雄花突变体早期发育差异表达基因进行 cDNA-AFLP 分析,共获得 81 个 TDFs,其中 51 个 TDFs 为新基因,30 个 TDFs 与已知蛋白具有较高的同源性;申艳红等^[34]利用 cDNA-AFLP 技术对破色期和半黄期的番木瓜果实进行了基因差异表达分析,获得了 50 个与果实成熟相关的差异基因片段,其中 28 个与 GenBank 数据库中的功能基因同源。本研究采用 cDNA-AFLP 技术对 29 份高丹草杂交组合及其亲本叶片转录组进行了分析,筛选出的 12 对引物组合共扩增出 336 个位点,其中特异性位点 276 个,占总数的 82.14%,平均每对引物组合扩增出特异性位点 23 个。其差异基因有父本特异表达、母本特异表达、子代特异表达、亲本特异表达、子代

父本特异表达、子代母本特异表达等多种类型,可能与不同材料的抗逆性(如低温、干旱、病虫等)以及不同株型差别等相关联。因此,本研究结果既证明了应用 cDNA-AFLP 技术进行高丹草杂种优势相关基因的定位、分离及鉴定的可行性,也为后期分离差异表达基因并对其功能鉴定等提供了前期研究基础。

参考文献

- [1] 詹秋文,钱章强.高粱与苏丹草杂种优势利用的研究[J].作物学报,2004,30(1):73-77.
Zhan Q W, Qian Z Q. Heterosis utilization of hybrid between sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] and sudangrass [*Sorghum sudanense* (Piper) Stapf] [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(1): 73-77.
- [2] 钱章强.利用高粱雄性不育系选育饲单新品种[J].中国草地,1990(6):61.
Qian Z Q. Using sorghum male sterile line feeding single breeding [J]. Journal of Chinese Grassland, 1990(6): 61.
- [3] 钟小仙,顾洪如,丁成龙,等.苏丹草与拟高粱远缘杂交初报[J].草地学报,2002,10(1):24-27.
Zhong X X, Gu H R, Ding C L, et al. Sudan grass and quasi sorghum distant hybridization preliminary report [J]. Journal of Grass, 2002, 10(1): 24-27.
- [4] 逯晓萍,米福贵,郭世华,等.高丹草(高粱×苏丹草)主要农艺性状的遗传参数研究[J].华北农学报,2004,19(3):22-25.
Lu X P, Mi F G, Guo S H, et al. Sorghum-sudangrass (*Sorghum* × *Sultangrass*) genetic parameter study of main agronomic traits [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2004, 19(3): 22-25.
- [5] Pedersen J F, Toy J J, Johnson B. Natural outcrossing of sorghum and sudangrass in the great plains [J]. Crop Science, 1998, 38(4): 937-939.
- [6] 舒巧云.夏季牧草新品种:高丹草[J].新农村,2004(3):9.
Shu Q Y. New varieties of summer pasture: Sorghum-sudangrass [J]. New Countryside, 2004(3): 9.
- [7] 詹秋文,钱章强.高粱-苏丹草杂交种的选育和利用[J].种子,1996(6):12-14.
Zhan Q W, Qian Z Q. Sorghum-sudangrass hybrid breeding and utilization [J]. Seeds, 1996(6): 12-14.
- [8] 薛春雷,逯晓萍,温莹,等.高丹草新品种 GB-4-2 选育研究[J].内蒙古农业科技,2013(1):24-27.
Xue C L, Lu X P, Wen Y, et al. Sorghum-sudangrass varieties GB-4-2 breeding research [J]. Journal of Inner Mongolia Agricultural Science and Technology, 2013(1): 24-27.
- [9] 赵娜.蒙农青饲 1、2、3 号与佳宝高丹草杂交后代主要性状研究[D].呼和浩特:内蒙古农业大学,2007.
Zhao N. Mengnong Qingsi No. 1, 2, 3 and Jiabao Pacetter hybridization studies on the main characters [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2007.
- [10] 孙守钧.天农青饲 1 号饲用高粱[J].中国农业科技,2002

- (7);21.
- Sun S J. Tiannongqingsi No. 1 forage sorghum [J]. Chinese Agricultural Science and Technology,2002(7):21.
- [11] 詹秋文,林 平,钱章强. 皖草 3 号的选育及其特征特性 [J]. 作物杂志,2006(4):35-36.
- Zhan Q W, Lin P, Qian Z Q. Anhui grass No. 3 breeding and its characteristics [J]. Journal of Crops,2006(4):35-36.
- [12] 徐文华,王空军,王永军,等. 高粱、苏丹草及高粱-苏丹草杂交种产量和饲用品质的比较 [J]. 作物学报,2006,32(8):1218-1222.
- Xu W H, Wang K J, Wang Y J, et al. Sorghum, sudangrass and sorghum-sudangrass hybrid yield and forage quality comparison [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32 (8): 1218-1222.
- [13] Bachem C, Van-der-Hoeven R, Bruijn S D, et al. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development [J]. Plant Journal, 1996, 9: 745-753.
- [14] Bechham C W B, Ronald J F J, Oomen, et al. Transcript imaging with cDNA-AFLP: a step-by-step protocol [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1998, 16(2):157.
- [15] 韩 斌,彭建营. cDNA-AFLP 技术及其在植物基因表达研究中的应用 [J]. 西北植物学报,2006,26(8):1753-1758.
- Han B, Peng J Y. cDNA-AFLP technology and its application in plant gene expression research [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 2006, 26(8):1753-1758.
- [16] Swanson-Wagner R A, Jia Y, DeCook R, et al. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F₁-hybrid and its inbred parents [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103:6805-6810.
- [17] 董艳玲. 小麦成株抗条锈病差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析及小麦与条锈菌互作相关基因的克隆与特征研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2010.
- Dong Y L. cDNA-AFLP analysis of differentially expressed genes in adult-plant resistance to stripe rust with wheat and characterization study of genes related to the interaction between wheat and stripe rust [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2010.
- [18] 黄 河,王顺利,戴思兰. 利用 cDNA-AFLP 技术鉴定菊花品种‘紫荷’的抗白锈病相关基因 [J]. 中国农业科学,2012,45(5):926-935.
- Huang H, Wang S L, Dai S L. Using cDNA-AFLP technology appraisal chrysanthemum varieties ‘purple lotus’ white rust resistance genes [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2012, 45(5): 926-935.
- [19] 刘志勇,杜永臣,王孝宣,等. 高温胁迫下番茄叶片差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析 [J]. 园艺学报,2008,35(7):1011-1016.
- Liu Z Y, Du Y C, Wang X X, et al. cDNA-AFLP analysis of gene expression in tomato leaves under heat stress difference [J]. Acta Horticulturae Sinica, 2008, 35(7):1011-1016.
- [20] 逯晓萍,云锦凤,肖宇红,等. 高丹草(高粱-苏丹草)产量及其构成因素的 QTL 定位与分析 [J]. 华北农学报,2007,22(4):80-85.
- Lu X P, Yun J F, Xiao Y H, et al. Sorghum-sudangrass (Sorghum-Sudan Grass) and QTL analysis yield component factors [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2007, 22(4):80-85.
- [21] Yeh F C, Boyle T. Population genetic analysis of codominant and dominant markers and quantitative traits [J]. Belgian J Bot, 1997, 129:157.
- [22] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.32: microsoft Windows-based freeware for population genetic analysis, quick user guide [M]. Canada: Center for International Forestry Research, University of Alberta, 1999.
- [23] Johnes J T, Rower H. A comparison the efficiency of differential display and cDNA-AFLP as a tools for the isolation of differentially expressed parasite genes [J]. Fundamental and Applied Nematology, 1998, 21:81-88.
- [24] Dellagi A, Brich P R J, Heilbronn J. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression in the prokaryotic plant pathogen *Erwinia carotovora* [J]. Microbiology, 2000, 146(1):165-171.
- [25] 许晨曦,孙晓梅,张守攻. 基因差异表达与杂种优势形成机制探讨 [J]. 遗传,2013,35(6):714-726.
- Xu C L, Sun X M, Zhang S G. Genes differentially expressed and heterosis formation mechanism is discussed in this paper [J]. Journal of Genetic, 2013, 35(6):714-726.
- [26] David A K. Tree allometry, leaf size and adult tree size in old-growth forests of western Oregon [J]. Tree Physiology, 1991, 9:369-381.
- [27] 王石华. 基因型差异和基因差异表达是杂种优势的遗传基础 [J]. 生物学教学,2010(7):12-13.
- Wang S H. Genotype difference and differentially expressed genes is the genetic basis of heterosis [J]. Journal of Biology Teaching, 2010(7):12-13.
- [28] 张雅慧,逯晓萍,尹 利,等. 高丹草数量性状的多元遗传分析 [J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版),2007,28(4):18-21.
- Zhang Y H, Lu X P, Yin L, et al. multivariate genetic analysis of quantitative characters of Sorghum-sudangrass [J]. Inner Mongolia Agricultural University (Natural Science), 2007, 28(4):18-21.
- [29] 逯晓萍,刘丹丹,王树彦,等. 高丹草遗传效应与杂种表现预测模型 [J]. 作物学报,2014,40(3):466-475.
- Lu X P, Liu D D, Wang S Y, et al. Sorghum-sudangrass genetic effect and hybrid performance prediction model [J]. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(3):466-475.
- [30] Fry S C. Oxidative scission of plant cell wall polysaccharides by ascorbate-induced hydroxyl radicals [J]. Biochem J, 1998, 332:507-515.
- [31] Meyer S, Pospisil H, Scholten S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern [J]. Plant Mol Biol, 2007, 63:381-391.

[32] Carmona E,Vargas D,Borroto C J,et al. cDNA-AFLP analysis of differential gene expression during the interaction between sugarcane and *Puccinia melanocephala* [J]. Plant Breeding,2004,123:499-501.

[33] 刘雪梅,刘 瀛,宋福南,等. 白桦雄花突变体早期发育差异表达基因的 cDNA-AFLP 分析 [J]. 林业科学,2012,48(5):20-28.
Liu X M,Liu Y,Song F N,et al. cDNA-AFLP analysis of genetic differences between male birch mutant early developmental expression [J]. Journal of Forestry Science,2012,48(5):20-28.

[34] 申艳红,陈晓静,卢秉国,等. 番木瓜果实成熟相关基因的 cDNA-AFLP 分析及克隆 [J]. 园艺学报,2011,38(6):1081-1088.
Shen Y H,Chen X J,Lu B G,et al. Papaya fruit mature related gene cDNA-markers analysis and clone [J]. Acta Horticulturae Sinica,2011,38(6):1081-1088.

(上接第 47 页)

[14] 胡明方. 食品分析 [M]. 重庆:西南师范大学出版社,1993:172-174.
Hu M F. Food analysis [M]. Chongqing: Southwest China Normal University Press,1993:172-174.

[15] 郭 燕. 几个苹果品种果实糖酸积累及糖代谢相关酶活性变化的研究 [D]. 陕西杨凌:西北农林科技大学,2012.
Guo Y. Studies on soluble sugar and organic acid accumulation and sugar related enzyme activities in apple fruit [D]. Yanling,Shaanxi:Northwest A&F University,2012.

[16] Lowell C A,Tomlinson P T,Koch K E. Sucrose-metabolizing enzymes in transport tissues and adjacent sink structures in developing citrus fruit [J]. Plant Physiol,1989,90:1394-1402.

[17] 丛靖宇. 甜高粱高产栽培及秸秆贮藏研究 [D]. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2010.
Cong J Y. A study on cultivation conditions for high yield and stalk storage of sweet sorghum [D]. Huhhot:Inner Mongolia Agricultural University,2010.

[18] 毛 鑫,胡瑞芳,韩 鑫,等. 不同甜高粱品种叶片中糖分积累规律的研究 [J]. 沈阳师范大学学报(自然科学版),2015,33(2):305-308.
Mao X,Hu R F,Han X,et al. Sugar accumulation in different varieties of sweet sorghum leaves of law research [J]. Journal of Shenyang Normal University (Natural Science Edition),2015,33(2):305-308.

[19] Karen K. Sucrose metabolism:regulatory mechanisms and pivotal roles in sugar sensing and plant development [J]. Current Opinion in Plant Biology,2004,7:235-246.

[20] 谢 鸣,陈俊伟,程建傲,等. 杨梅果实发育与糖的积累及其关系研究 [J]. 果树学报,2005,22(6):634-638.
Xie M,Chen J W,Cheng J A,et al. Studies on the friut development and its relation in bayberry fruit [J]. Journal of Fruit Science,2005,22(6):634-638.

[21] 乔永旭,刘栓桃,赵智中,等. 甜瓜果实发育过程中糖积累与蔗糖代谢相关酶的关系 [J]. 果树学报,2004,21(5):447-450.
Qiao Y X,Liu S T,Zhao Z Z,et al. Study on correlation of sugar accumulation and sucrose-metabolizing enzymes during developing period of muskmelon [J]. Journal of Fruit Science,2004,21(5):447-450.

[22] Zhu Y J,Komor E,Moore P H. Sucrose accumulation in the sugarcane stem is regulated by the difference between the activities of soluble acid invertase and suerose phosphate synthase [J]. Plant Physiol,1997,115:609-616.