

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2013.00225

高丹草 EST-SSR 标记的开发及其遗传多样性

温莹¹, 逯晓萍¹, 任锐¹, 米福贵², 韩平安¹, 薛春雷¹

1. 内蒙古农业大学农学院, 呼和浩特 010019;
2. 内蒙古农业大学生态环境学院, 呼和浩特 010019

摘要: 对 NCBI 数据库中 210 878 条高粱 EST 序列进行处理, 得到 57 498 条无冗余 EST 序列, 经 SSR 搜索, 发现 3 338 个 SSR 分布于 3 116 条 EST 序列中, 分布频率为 1/11.28 kb, 包括 215 种基元重复类型。其中三核苷酸重复最高, 占 68.33%, 二核苷酸重复占 17.97%。3 338 条 SSR 序列中有 1 694 条序列能够设计出引物, 所占比例为 50.75%。选取 14 对引物进行合成, 对 50 份高丹草、7 份高粱和 3 份苏丹草材料进行了 EST-SSR 扩增, 共检测到 72 个等位变异, 平均每对引物检测出 5.14 个基因位点。每对引物多态性指数范围为 0.54~0.93, 遗传距离的变化范围 0.1646~0.6398。结果显示: 供试材料具有较丰富的遗传多样性, 根据 EST-SSR 数据的聚类分析, 将供试材料按亲缘关系远近分为 5 大类, 来源相同的品种大致聚在一类, 呈现出一定的地域性分布规律。同时发现 4 个特异分子标记, 其中引物 D1763 只对 314A 和白壳苏丹草杂交后代 GB-4-2 高丹草审定品种产生特异性, 此标记已作为该材料的特异性标记用于种质资源的鉴定中, 同时表明, EST-SSR 标记是高丹草遗传多样性及特异性研究的一种有效方法。

关键词: 高丹草; EST-SSR; 标记开发; 遗传多样性; 特异性

Development of EST-SSR marker and genetic diversity analysis in *Sorghum bicolor*×*Sorghum sudanenes*

WEN Ying¹, LU Xiao-Ping¹, REN Rui¹, MI Fu-Gui², HAN Ping-An¹, XUE Chun-Lei¹

1. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China;
2. College of Ecology and Environment, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China

Abstract: A total of 57 498 non-redundant ESTs were identified from 210 878 ESTs of Sorghum in NCBI by sequence analysis. In all, 3 338 SSRs were distributed in 3 116 ESTs with an average frequency of one SSR per 11.28 kb, which included 215 SSR motifs. Analysis of SSR motifs revealed that the trinucleotides were major motifs, accounting for 68.33%. The dinucleotides motifs accounted for 17.97%. There were 1 694 sequences from 3 338 EST-SSR sequences could be designed into primers and the proportion was 50.75%. Fourteen primers were selected to amplify EST-SSR loci with 50 collections of *Sorghum bicolor* × *S. sudanenes*, 7 collections of *S. bicolor* and 3 collections of *S. sudanenes*. Seventy-two allele variations were detected and the frequency was 5.14 gene loci per primer. The polymorphism index of each primer was in the range of 0.54-0.93. The genetic distance ranged from 0.1646 to 0.6398. This showed abundant genetic diversity

收稿日期: 2012-10-04; 修回日期: 2012-12-26

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31160302)资助

作者简介: 温莹, 硕士, 专业方向: 植物遗传育种。E-mail: wenyong122624@126.com

通讯作者: 逯晓萍, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物遗传育种及生物技术。E-mail: LXP1960@163.com

in the materials. The materials were divided into 5 groups with clustering analysis of EST-SSR data. Each group included the varieties with similar parents or similar regional distribution. Meanwhile, 4 specific molecular markers were found. Primer D1763 was specific in the registered variety GB-4-2 which was the progeny of *S. bicolor* 314A \times *S. sudanenes* White Skull. The marker was specific in justification of the germ difference. These results showed that the EST-SSR was an effective marker for genetic diversity analysis and specificity studies on *S. bicolor* \times *S. sudanenes*.

Keywords: *Sorghum bicolor* \times *S. sudanenes*; EST-SSR; marker development; genetic diversity; specificity

高丹草(*Sorghum bicolor* \times *Sorghum sudanenes*)是由高粱(*Sorghum bicolor*)和苏丹草(*Sorghum sudanense*)杂交而成,高丹草综合了高粱茎粗、叶宽、抗寒、抗旱和苏丹草分蘖力、再生力强的优点,杂种优势非常明显。一次播种多次刈割,1/15公顷产鲜草总量0.8万~1.0万kg,肥水条件充足,总产量可达1.4万~2.0万kg。干草中含有粗蛋白15%以上、粗脂肪均高于双亲,含糖量较高,氢氰酸含量低,适宜青贮,在畜牧业生产上具有广阔的应用前景^[1]。

遗传多样性不仅是表现在表型性状上的差异,更重要的是表现在DNA水平上的差异。分子标记的发展为从DNA水平上检测品种及品系间的遗传多样性提供了有利的工具。EST(Expressed sequence tags)即表达序列标签^[2],是指通过对cDNA文库随机挑取的克隆进行大规模测序所获得的cDNA的5'或3'端序列,长度一般为150~500bp^[3~5]。EST计划由美国科学家Venter于1989年首次提出^[6],并首先应用于人类基因组的研究,之后被广泛用于植物基因组的研究。随着EST计划在不同物种间的不断扩展和深入研究,数据库中已积累了大量的EST,为SSR标记的开发带来了新的契机,已成为SSR标记的重要来源^[7,8]。为了区别于传统的gSSR,一般将来源于EST库的SSR标记称为EST-SSR标记,该标记的显著特点是来自基因组的转录区域^[9],同时信息量较高,开发过程既简单又快捷,费用低、通用性好,而且效率也高。因此,EST-SSR作为共显性标记与其他分子标记相比具有诸多优点^[10]。

因此,本研究是在对高丹草遗传图谱构建和产量性状QTL定位以及重组自交系构建与高产种质的创新、近等基因系等研究的基础上^[11~14],利用高粱EST序列开发的SSR引物对高粱、苏丹草和高丹草等

60份材料进行EST-SSR标记的遗传多样性分析及高粱与苏丹草杂交后代特异标记的开发,其目的是为开发与利用高丹草EST资源、丰富高丹草分子标记类型,为遗传多样性分析、功能基因的发现与定位、种质资源鉴定等方面的应用与研究提供技术支持和理论依据;并为下一步进行高丹草特异基因片段的克隆、核心资源构建以及抗性评价提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验材料为国内外引进的遗传背景丰富的高粱、苏丹草和高丹草品种以及实验室选育的高丹草品种(品系)共60份(表1)。

1.2 高粱 EST-SSR 的发掘

从NCBI(National Center for Biotechnology Information, 美国国家生物技术信息中心)数据库中下载高粱EST序列,截止2012年7月,下载210878条高粱EST序列。

由于下载序列中存在小于100bp的低质量片段、带有少量载体序列的片段和存在polyA或polyT尾巴的序列,需要对EST序列进行筛选和优化^[15]。本实验采用EST-trimmer程序去除带有polyA或T尾巴的序列,并截去过短的低质量序列片段。

由于EST是随机选取测序、由不同的研究者登记的,会导致同一基因重复测序的冗余现象和同一表达基因的EST重复出现^[16]。本文采用cap3软件对EST序列进行聚类 and 拼接处理,以获得无冗余EST和尽可能长的重叠序列(contig)。

用perl语言编写的MISA程序(MicroSATellite)对优化后的EST序列进行SSR搜索。筛选标准为:

表 1 供试材料的编号和来源

编号	名称	来源	编号	名称	来源
1	GZ40	内蒙古	31	GZ60	内蒙古
2	GZ40-1	内蒙古	32	GZ98	内蒙古
3	GZ164-2	内蒙古	33	GZ109	内蒙古
4	GZ164-1	内蒙古	34	GZ135	内蒙古
5	GZ61	内蒙古	35	GZ147	内蒙古
6	GZ61-1	内蒙古	36	GZ150	内蒙古
7	GB-1-2	内蒙古	37	GZ155	内蒙古
8	GB-7-1	内蒙古	38	GZ156	内蒙古
9	GZ8	内蒙古	39	GZ186	内蒙古
10	GB-6-1	内蒙古	40	GZ190	内蒙古
11	GZ41	内蒙古	41	GZ192	内蒙古
12	GB-3-5	内蒙古	42	蒙农 1	内蒙古农业大学
13	GB-5-4-1	内蒙古	43	蒙农 2	内蒙古农业大学
14	GZ101	内蒙古	44	蒙农 3	内蒙古农业大学
15	GB-6-2-1	内蒙古	45	蒙农 5	内蒙古农业大学
16	GB-5-4-3	内蒙古	46	白壳苏丹草(苏丹草)	河北
17	GB-4-5	内蒙古	47	黑壳苏丹草(苏丹草)	山西
18	GB-9-2-1	内蒙古	48	棕壳苏丹草(苏丹草)	山西
19	GB-7-2	内蒙古	49	2397A(高粱)	赤峰市农科院高粱所
20	GZ45	内蒙古	50	11A(高粱)	内蒙古
21	GB-1-2	内蒙古	51	314A(高粱)	山西
22	GZ36-1	内蒙古	52	13A(高粱)	内蒙古
23	GZ92	内蒙古	53	甜格雷兹(高粱)	澳大利亚
24	GZ-4-2	内蒙古	54	GB-4-2	内蒙古农业大学
25	GB-4-1	内蒙古	55	健宝	澳大利亚
26	GB-7-4	内蒙古	56	澳华农 A2	澳大利亚
27	GB-46	内蒙古	57	GZ164	内蒙古
28	GZ145	内蒙古	58	澳华农 A1	澳大利亚
29	GZ15	内蒙古	59	TE-706(高粱)	天津
30	GZ20	内蒙古	60	通甜 1 号(高粱)	通辽

注：表 1 中没有标注的为高丹草种质材料。

二核苷酸重复次数≥9 次, 三核苷酸重复次数≥6 次, 四至六核苷酸重复次数≥5 次, 既碱基数保持在 18 个以上, 同时筛选被间隔小于或等于 100 bp 碱基打断 (Interrupted)的复合型 SSR(Compound microsatellite)。

1.3 EST-SSR 引物设计

利用 Primer5.0 软件, 对含有 SSR 位点的 EST 序列进行 EST-SSR 引物设计, 设定标准为 :GC 含量在 40%~60%, *T*_m 在 50 ~70 , 并且上下游引物 *T*_m 值不超过 5 , 引物长度为 18~22 bp, 产物长度在

100~500 bp。从 95 分以上的引物中选取 14 对引物, 尽量避免 Dimer 和二聚体出现, 引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.4 SSR 分析

PCR反应在 20 μL体系中进行, 包括 60 ng DNA, 10×Buffer 2.5 μL, 2.5 mmol/L dNTP 2 μL, 25 mmol/L 的MgCl₂ 2.0 μL, 1.25 U *Tag*酶, 10 μmol/L的引物 1 μL。PCR扩增的条件是：94 预变性 5 min; 94 变性 45 s; 56 复性 45 s; 72 延伸 45 s; 34 个循环; 最

后再 72℃ 延伸 5 min。在 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上采用恒功率 70 W 电泳, 快速银染法染色。统计分子标记的带型: 有带记为 1, 无带记为 0。

1.5 高丹草 EST-SSR 标记的聚类分析

利用 NTSYS-pcversion2.11 软件进行数据处理, 按 UPGMA 方法(UnweightPairGroup Method using Arithmetic Averages)对供试材料条带进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 高粱 EST 中 SSR 出现的频率和特点

采用 MISA 脚本从 57 498 条高粱 Uni-EST 中(其中 contigs 24 911 条, singletons 32 587 条)共搜索到 3 338 个 SSR 位点, 分布在 3 116 条 EST 中, 其中 207 条 EST 含一个以上 SSR, 平均每 11.28 kb EST 出现一个 SSR。

在搜索出的 SSR 中, 二至六核苷酸重复均存在, 但出现频率差异较大。三核苷酸重复最高, 共 2281 个, 占 68.33%, 其次是二核苷酸重复, 600 个, 占 17.97%。四、五、六核苷酸重复率远低于三、二核苷酸重复, 共占 13.7%(表 2)。

在 3 338 个 SSR 位点中, 三基元重复出现频率最高, 其中尤以 CCG 和 GCC 型最为突出, 占总体 SSR 比例分别达到 5.78% 和 5.57%, 其次是 CGC 和 CGG 占总 SSR 位点比例分别为 4.73% 和 4.16%; 二核苷酸重复类型中 GA 出现频率最高, 占总体 SSR 比例为 4.37%, 其次是 CT 和 TC, 占总 SSR 位点比例分别为 3.30% 和 2.43%。四、五、六核苷酸出现频率较低, 四核苷酸中出现频率较高的前 6 种类型分别为 ATCC、CGTA、TCTA、TTTC、ATTA、CCTC。

3 338 个 SSR 序列中共有 215 种基元重复类型, 二基元重复类型有 10 种, 三基元重复类型有 58 种, 四基元重复类型有 73 种, 五基元重复类型有 46 种, 六基元重复类型有 28 种。在 215 种基元重复类型中,

二基元的重复次数都是以重复 9 次为最高次数, 其次为 10 次重复, 二基元的长度范围为(18~108 bp), 三基元重复次数以 6 次为最高, 其次是 5 次重复, 长度范围为(18~87 bp), 四基元重复以 5 次重复为最高, 长度范围为(20~64 bp), 五基元长度范围为(25~60 bp), 六基元长度范围为(30~72 bp)。

2.2 EST-SSR 标记的检测

通过筛选稳定的 PCR 反应体系, 选取开发出的 14 对 EST-SSR 引物对 60 份材料进行扩增分析, 共检测到 72 个等位基因变异, 每对 SSR 引物检测到 2~10 个多态性位点, 平均每对引物检测出 5.14 个多态性位点。引物 D1763 的多态性位点最多为 10 个, 扩增片段介于 100~850 bp 之间, 每一个 SSR 位点的多态性信息量(PIC)按 Smith 等的公式计算, 即 $PIC = 1 - \sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率^[17]。每对 SSR 引物的多态性指数范围在 0.54~0.93 之间, 平均为 0.76(表 3)。

同时发现, 有 11 对引物的多态性位点的百分比达到了 100.0%, 其中, 引物 B236 扩增出 5 个多态性位点, 在 241.5 bp 处, 只有 2 个材料有位点, 引物 B3252 对 60 份材料扩增后, 在 188.4 bp 位置只有 1 个材料有位点; 引物 C12 对供试材料的扩增结果显示, 在 139.3 bp 处只有 1 个材料有位点; 引物 D1763 对 60 份材料进行扩增, 共扩增出 10 个位点, 并且全部为多态性位点; 引物 B4387-1 对供试材料扩增后, 在 120 bp 处有 7 个材料有位点; 引物 C3269-1 对供试材料扩增后在 550 bp 处有 4 个材料有位点。通过 14 对 EST-SSR 引物能够很好的区分 60 份供试种质材料, 说明本文设计的 EST-SSR 引物的多态性很好, 特别是对于区分供试的高丹草材料表现出了较高的效率, 同时也证明了这些引物的通用性很好。

表 2 高粱 EST 中 SSR 出现的频率

基元类型	叠连群	单序	数量	类型数目	占全部 SSR 比例(%)	频率(kb)
二核苷酸	331	269	600	10	17.97	63.30
三核苷酸	1258	1023	2281	58	68.33	16.65
四核苷酸	152	129	281	73	8.42	135.16
五核苷酸	62	55	117	46	3.51	324.62
六核苷酸	34	25	59	28	1.77	643.73

合计	1837	1501	3338	215	100	11.38
----	------	------	------	-----	-----	-------

表 3 60 份材料引物及其扩增结果

引物名称	位点数	多态性位点数	多态性位点百分率(%)	多态性指数(PIC)
B236	5	5	100.0	0.74
B3252	4	4	100.0	0.87
B4387	3	2	66.7	0.91
C12	3	3	100.0	0.75
C3269-1	10	10	100.0	0.79
C3584	5	4	80.0	0.84
C4346	4	4	100.0	0.93
D82	4	4	100.0	0.77
D1763	10	10	100.0	0.73
D2318	6	6	100.0	0.72
D4706	2	2	100.0	0.58
D5750	4	4	100.0	0.54
D5803	3	3	100.0	0.64
F2359	9	5	55.6	0.86
合计	72	66	—	—
平均	—	—	91.7	0.76

通过对 14 对引物的反复验证和分析,发现 4 个特异的分子标记,其中,引物 B3235 和引物 C12 对材料澳华农 A1 都扩增出了特异位点;引物 D2318 只在 GZ192 高丹草品系中表现出特异性,在其他材料中均未出现;引物 D1763 只在 GB-4-2 高丹草审定品种中扩增出特异位点,因此,这些标记具有特异性。引物详情见表 4。

2.3 基于 EST-SSR 的聚类分析

根据 14 对 EST-SSR 引物在 60 份供试材料中获得的 72 个等位基因,按 Nei^[18] 的方法利用 NTSYSpc2.11 统计分析软件计算 60 份材料间的遗传相似系数(GS),其范围在 0.4167 到 0.9861,平均为 0.7862。用 UPGMA 法对 60 份材料进行聚类分析,由图 1 可知,以 0.69 为阈值,可将 60 份材料分为 5 大类群。第一类群共包括 3 个材料,分别为 55(健宝)、56(澳华农 A2)、58(澳华农 A1),3 个材料都来自澳大利亚;第二类群共包括 5 个材料,分别为 50(11A)、49(2397A)、53(甜格雷兹)、60(甜 1)、59(TE-706),其中 50(11A)、49(2397A)为不育系品种,53 是澳大利亚材料,60 是通辽材料,59 是天津材料;第三类群共包括 4 个材料,分别为 44(蒙农 3 号)、42(蒙农 1 号)、45(蒙农 5 号)、47(黑壳苏丹草),其中蒙农系列材料都是以黑壳苏

丹草为母本育成的材料;第四大类群共包括 5 个材料,分别为 12、10、13、25、22;第五大类包括 43 份材料,主要包括实验室自育品系、白壳、棕壳和 314A,这一类在阈值 0.74 处又可分为 3 个亚类,这 3 个亚类将实验室自育品系基本上细分为两类,第一亚类包括了所有实验室自育品系当中以 314A 为母本,以棕壳苏丹草为父本的杂交后代材料;第二、三亚类包括了所有实验室自育品系当中以 314A 为母本,以白壳苏丹草为父本的杂交后代材料。

由以上聚类结果可知,亲缘关系较近的自育材料被聚到了一类中,来自国外的材料单独聚到一起,如澳华农 A1、澳华农 A2 和健宝被聚到一类当中。因此,从不同地区以及国外引进的高丹草种质资源,不仅可以丰富我区的高丹草种质资源,同时也可以为我区高丹草的品种改良提供基因资源。

3 讨论

3.1 EST-SSR 的可移植性

大量的研究表明,EST-SSR 具有良好的移植性,能够在水稻、玉米、高粱中表现出良好的通用性^[19~22]。本研究设计的引物能够在 60 种材料中表现出良好

的扩增效果并表现出一定的差异性。因此, 根据高粱EST序列建立高丹草EST-SSR标记具有可行

表 4 引物序列

引物名称	重复单元	产物大小(bp)	引物序列(5'→3')	复性温度()
B236	(GCA)6	117	ATAGAGCATCTCAAAGCCCACT	50.0
			CAACGACGAGCCATCACC	61.1
B3252*	(TGA)8	125	CGCCGAGTCCCAGTAGTGTT	60.0
			CGAGGGCAATCCAGAGTTCA	60.7
B4387	(GGC)6	123	CCTCACCAAACCGTCTCC	55.2
			CCCACCATTGTTACACCCT	55.0
C12*	(TGA)8	125	CGCCGAGTCCCAGTAGTGTT	60.0
			CGAGGGCAATCCAGAGTTCA	60.7
C3269-1	(TG)10	320	TTTCCACTCGGCTCTTG	54.59
			CCAGTTTGGCAGTTTCG	54.59
C3584	(CTG)8	242	CGTGCCTCAAGTCCATCA	55.9
			GCATCACCTTATCAAACCCCT	56.2
C4346	(GT)24	248	TCAACGCCTCCACCTACA	54.7
			AACCGAGTGCCATCATCC	55.6
D82	(AGA)8	197	AACCGAACCAAAACCAAGC	55.5
			GCAGAGCAACGCACAGAA	55.7
D1763*	(GA)11	101	TCCAACCTCTATCCAATCGC	57.5
			TCCTTTGCTGCTGCTTCC	56.8
D2318*	(GGC)6	125	TTCTTCACCAAACCGTCTC	55.2
			CCCACCATTGTTACACCCT	55.0
D4706	(TGAT)5	349	GCCCAACACTTTCTACCG	53.4
			ACAGACCCACAAACACTCG	53.1
D5750	(TGA)8	125	CGCCGAGTCCCAGTAGTGTT	60.0
			CGAGGGCAATCCAGAGTTCA	60.7
D5803	(TTC)13	240	ATGGAATGGAAGGGGTGG	57.2
			TCTGCGAAACAATCTGGAGT	57.4
F2359	(CCG)6	254	GGATTTCAGCCCTACCA	55.2
			CTTCCACCGATTACCC	55.4

注: 表中带*的为扩增出特异条带的引物。

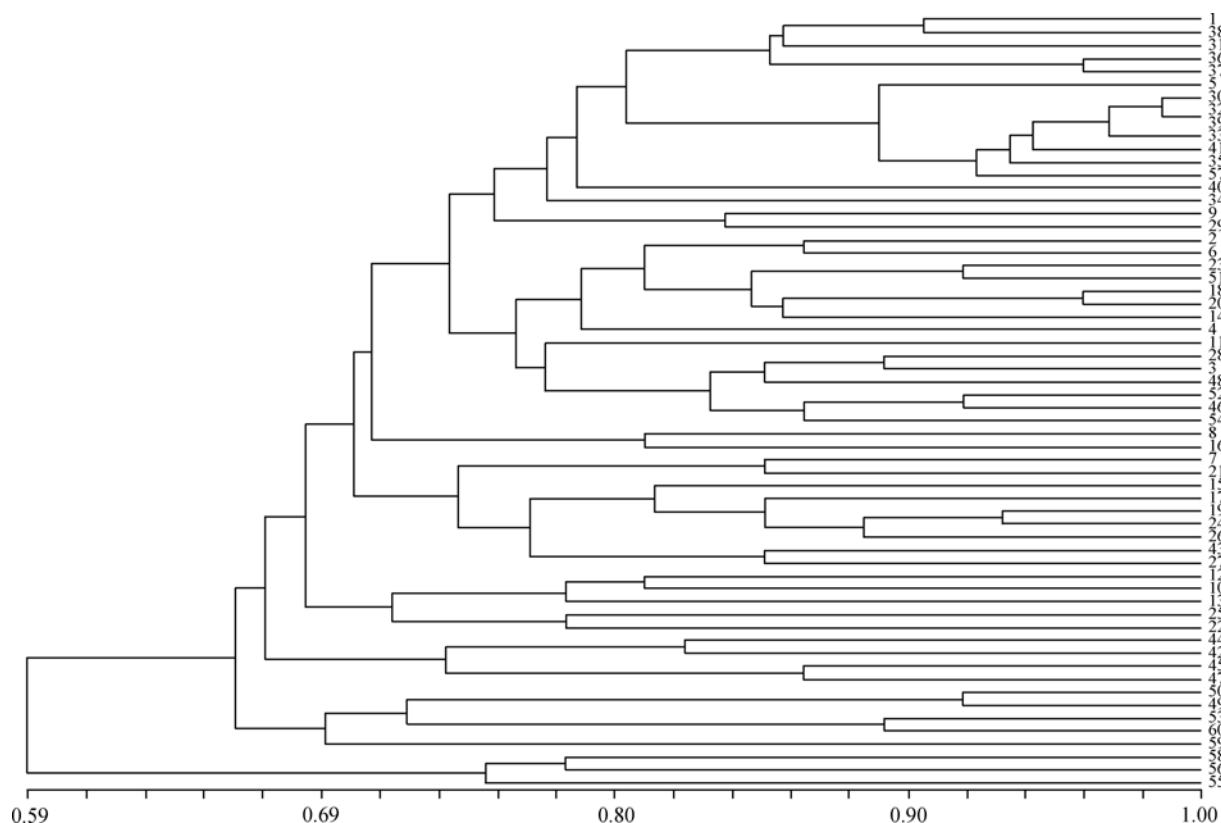


图1 60个品种材料基于EST-SSR的遗传相似性UPGMA聚类图

性,为进一步对高丹草以至禾本科高粱属植物的分子标记研究提供更多的引物信息,同时也为高丹草的进一步研究奠定了良好的基础。

3.2 EST-SSR 标记对高丹草遗传多样性及特异性研究的作用

杨新泉曾提出过采用EST-SSR标记进行遗传多样性研究具有较多优越性,EST-SSR是对基因内部变异的一种直接评价,有可能和形态性状或生理生化特征联系起来,因此,EST-SSR用于遗传差异研究将为鉴定基因的功能多样性提供了可能^[9]。本研究通过利用设计的14对EST-SSR引物,对高丹草等60份材料进行分子标记扩增分析,得到了较多的变异位点,91.7%的扩增片段能够揭示材料间的遗传差异,说明高丹草品种间遗传相似系数和遗传距离的变化范围较大。一般来说,位点的平均PIC可被用来估算群体的遗传多样性水平,PIC平均值越高,表明群体的变异程度越高,遗传多样性越丰富^[23]。本研究的PIC值较大,平均为0.76,所以具有较为丰富的遗传多样性。因此,本研究表明采用EST-SSR标记对高丹草进行遗传多样性分析可以取得较好的研究结果。

同时也表明由高粱EST序列设计的SSR引物应用于高丹草的遗传多样性研究效果良好。特别是经过对14对引物的反复验证和分析,发现了4个特异的分子标记,说明EST-SSR标记在高丹草杂交后代材料鉴别中具有较好的特异性,而且这一结果已经在实验室的后期杂交材料鉴定中得到应用,其中引物D1763对实验室选育并已通过审定的品种GB-4-2起到了鉴定作用,其在167.4 bp处对高丹草GB-4-2扩增出的特异位点能够与其他高丹草材料进行区别,该标记成为GB-4-2这一审定品种的特异性鉴定标记,为在分子水平上对高丹草种质资源进行保护、鉴定和利用提供了依据。

3.3 高丹草遗传多样性研究及思考

从事遗传育种工作,需要有丰富的遗传种质资源做基础,因此,搜集、整理、挖掘、改良和利用新的遗传资源,扩大亲本遗传差异,是杂交育种取得突破的途径,丰富的种质资源是育种工作的基础,而种质资源基础的宽窄与遗传多样性的丰富,亲缘

关系的远近则是育种成败的关键。由于高粱和苏丹草是高粱属的不同种,高丹草是高粱和苏丹草的种间杂交种,亲缘关系较远,但染色体均为 $2n=20$,无生殖隔离,可以自由授粉并产生正常发育的后代,而且其杂种优势非常显著^[11]。但在高丹草新品种的选育过程中,由于侧重于筛选农艺性状、产量等符合育种目标的品种,导致遗传多样性下降。因此,要继续提高育种水平,必须提高育种基础材料的遗传多样性。所以拓宽植物遗传基础已成为当务之急,而且这一问题也越来越为遗传学家和育种学家所重视^[24,25]。因此,通过种质扩增、改良和创新,以提高遗传基础,培育更多的优良品种。

在本研究中,有些品种并未与同一地区或具有亲缘关系的品种聚为一类,其原因可能是由于在选育过程中采用多个亲本复合杂交以及多向选择产生了较大的遗传变异所致。也可能是由于长期种植后,自然条件及栽培环境等的变化所产生的基因变异,有待于进一步的研究。

参考文献(References):

- [1] 詹秋文, 钱章强. 高粱与苏丹草杂种优势利用的研究. 作物学报, 2004, 30(1): 73-77. DOI
- [2] 张延明, 曲敏, 徐香玲, 李集临. 表达序列标签(EST)分析及其在小麦研究中的应用. 黑龙江农业科学, 2007, (1): 82-85. DOI
- [3] 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 油菜EST-SSR标记的建立. 分子细胞生物学报, 2007, 40(2): 137-144. DOI
- [4] 陈全求, 詹先进, 蓝家祥, 黄云, 符家平. EST分子标记在基因组学中应用的研究进展. 中国农学通报, 2010, 26(3): 59-63. DOI
- [5] 晏慧君, 张颢, 谢吉容, 李树发, 蹇洪英, 邱显钦, 王其刚, 王继华, 唐开学. 基于差减cDNA文库EST信息的月季花香突变体SSR标记的开发. 遗传, 2009, 31(9): 962-966. DOI
- [6] Varshney RK, Sigmund R, Bömer A, Korzun V, Stein N, Sorrells ME, Langridge P, Gran A. Interspecific transferability and comparative mapping of barley EST-SSR markers in wheat, rye and rice. *Plant Sci*, 2005, 168(1): 195-202. DOI
- [7] 陈军方, 任正隆, 高丽锋, 贾继增. 从小麦EST序列中开发新的SSR引物. 作物学报, 2005, 31(2): 154-158. DOI
- [8] Thiel T, Michalek W, Varshney RK, Graner A. Exploiting EST databases for the development and characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.).

- Theor Appl Genet*, 2003, 106(3): 411–422. [DOI](#)
- [9] 杨新泉, 刘鹏, 韩宗福, 倪中福, 刘旺清, 孙其信. 普通小麦 Genomic-SSR和EST-SSR分子标记遗传差异及其与系谱遗传距离的比较研究. *遗传学报*, 2005, 32(4): 406–416. [DOI](#)
- [10] 金基强, 崔海瑞, 龚晓春, 陈文岳, 忻雅. 用EST-SSR标记对茶树种质资源的研究. *遗传*, 2007, 29(1): 103–108. [DOI](#)
- [11] Lu XP, Yun JF, Gao CP, Acharya S. Quantitative trait loci analysis of economically important traits in *Sorghum bicolor* × *S. sudanense* hybrid. *Can J Plant Sci*, 2011, 91(1): 81–90. [DOI](#)
- [12] 逯晓萍, 云锦凤, 张雅慧, 薛春雷, 陈强. 高丹草重组自交系群体的遗传变异与高产种质的创新. *华北农学*, 2009, 24(5): 90–95. [DOI](#)
- [13] 逯晓萍, 云锦凤, 米福贵, 陈强, 张雅慧, 薛春雷. 基于性状和分子标记的高丹草近等基因系的分离研究. *中国农业科学*, 2010, 43(3): 468–473. [DOI](#)
- [14] 温莹, 逯晓萍, 米福贵, 薛春雷, 杨凯. 高丹草单株产量主基因+多基因混合遗传模型及效应分析. 见: 北方遗传资源的保护与利用研讨会论文汇编. 北京: 中国遗传学会, 2010. [DOI](#)
- [15] 李永强, 李宏伟, 高丽锋, 何蓓如. 基于表达序列标签的微卫星标记(EST-SSRs)研究进展. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(1): 91–95. [DOI](#)
- [16] 谢皓, 陈学珍, 杨柳, 王建立. EST-SSR标记的发展和在植物遗传研究中的应用. *北京农学院学报*, 2005, 20(4): 73–76. [DOI](#)
- [17] 肖木辑, 李明顺, 李新海, 张世煌. 东北地区主要玉米自交系的SSR遗传多样性分析. *华北农学报*, 2006, 21(增刊): 23–27. [DOI](#)
- [18] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89(3): 583–590. [DOI](#)
- [19] 姜春芽, 廖娇, 徐小彪, 辜青青, 刘善军, 陈金印. 植物 EST-SSR技术及其应用. *分子植物育种*, 2009, 7(1): 125–129. [DOI](#)
- [20] Castillo A, Budak H, Varshney RK, Dorado G, Graner A, Hernandez P. Transferability and polymorphism of barley EST-SSR markers used for phylogenetic analysis in *Hordeum chilense*. *BMC Plant Biol*, 2008, 8: 97. [DOI](#)
- [21] Luro FL, Costantino G, Terol J, Argout X, Allario T, Wincker P, Talon M, Ollitrault P, Morillon R. Transferability of the EST-SSRs developed on Nules Clementine (*Citrus clementina* Hort ex Tan) to other citrus species and their effectiveness for genetic mapping. *BMC Genomics*, 2008, 9: 287. [DOI](#)
- [22] Aggarwal RK, Hendre PS, Varshney RK, Bhat PR, Krishnakumar V, Singh L. Identification, characterization and utilization of EST-derived genic microsatellite markers for genome analyses of coffee and related species. *Theor Appl Genet*, 2007, 114(2): 359–372. [DOI](#)
- [23] 包文斌, 陈国宏, 误信生, 徐琪, 吴圣龙, 束婧婷, Weigend S. 中国红原鸡和泰国红原鸡遗传多样性分析. *遗传*, 2007, 29(5): 587–592. [DOI](#)
- [24] Wang LX, Guan Y, Guan RX, Li YH, Ma YS, Dong ZM, Liu X, Zhang HY, Zhang YQ, Liu ZX, Chang RZ, Xu HM, Li LH, Lin FY, Luan WJ, Yan Z, Ning XC, Zhu L, Cui YH, Piao RH, Liu Y, Chen PY, Qiu LJ. Establishment of Chinese soybean *Glycine max* core collections with agronomic traits and SSR markers. *Euphytica*, 2006, 151(2): 215–223. [DOI](#)
- [25] 李丽华, 魏昕, 潘光堂, 唐保军, 丁勇, 赵发欣. 新选优良玉米自交系SSR遗传多样性分析. *玉米科学*, 2009, 17(4): 24–28. [DOI](#)