

能源作物芒属双药芒组SSR引物的筛选及其评价

马洪峰^{1,2} 李珊珊² 葛 颂² 戴思兰^{1*} 陈文俐^{2*}

1 (北京林业大学园林学院, 北京 100083)

2 (中国科学院植物研究所系统与进化植物学国家重点实验室, 北京 100093)

摘要: 禾本科芒属植物具有在边际性土地(marginal land)上驯化成为高产能源作物的巨大潜力, 其中尼泊尔芒(*Miscanthus nepalensis*)和双药芒(*M. nudipes*)两个双药芒组物种分布于喜马拉雅-横断山地区, 是具有耐寒及抗旱特性的优良种质资源。为了了解其遗传多样性和群体遗传结构, 需要筛选出有效的分子标记。目前在适用于核心芒属植物群体遗传学分析的42对SSR引物中, 有23对来自于核心芒属物种, 19对来自玉米。我们利用来自双药芒组2个种的6个代表性个体, 筛选得到14对可在双药芒组中稳定扩增的引物, 其中有12对来自核心芒属, 显示同属引物的扩增效率为52.2%(12/23)。成功扩增的14个位点中11个为多态。利用所得引物对双药芒组4个自然居群进行群体遗传学初步分析发现, 所获得的SSR引物多态性高、表现稳定, 适于双药芒组物种的群体遗传多样性分析, 可为芒属植物资源的研究和利用提供重要的分子标记。

关键词: *Miscanthus nepalensis*, *M. nudipes*, SSR引物, 能源作物, 多态性

Isolation of SSR markers for two related second-generation energy crop species, *Miscanthus nepalensis* and *M. nudipes* (Poaceae)

Hongzheng Ma^{1,2}, Shanshan Li², Song Ge², Silan Dai^{1*}, Wenli Chen^{2*}

1 College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083

2 State Key Laboratory of Systematic and Evolutionary Botany, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093

Abstract: *Miscanthus* species have shown great potential as second-generation energy crops, especially when planted on marginal land. Within the genus, *M. nepalensis* and *M. nudipes* are much different from other species owing to the presence of only two anthers, and are thus treated as sect. *Diandra* Keng taxonomically. Distributed in the Himalaya and Hengduan Mountains, the two species exhibit a very high level of tolerance to cold and drought stresses. In order to scientifically develop these crop species, the first step would be to carry out a population-genetic investigation to elucidate the genetic basis of phenotypes such as tolerance-related and morphological characteristics. For this purpose, we need to select practical and high-resolution molecular markers. We sequenced six individuals of *M. nepalensis* and *M. nudipes* to validate the efficacious use of 42 previously-used SSR primer pairs. A total of 14 primer pairs were identified as applicable, of which 12 were from *Miscanthus* species, indicating that the amplification ratio within genus *Miscanthus* is 52.2% (12/23). Of the 14 primer pairs, 11 were polymorphic. Screening four natural populations of *M. nepalensis* and *M. nudipes* using the 14 SSR markers, we found that these primers had high power in detecting genetic diversity and population genetic structure in *M. nepalensis* and *M. nudipes*, and thus provide feasible genetic markers for population genetics studies and molecular breeding.

Key words: *Miscanthus nepalensis*, *Miscanthus nudipes*, SSR primers, energy crop, polymorphism

越来越多的证据表明, 第二代能源作物在发展可持续新能源和缓解全球变暖中有重要作用。进行

大规模可持续性的生物能源生产, 需要发展在边际性土地(marginal land)上和恶劣环境下具有较强生

收稿日期: 2011-07-11; 接受日期: 2011-08-24

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-YW-034, KSCX2-YW-Z-0943)

* 共同通讯作者 Co-corresponding authors. E-mail: silandai@gmail.com, chenwl@ibcas.ac.cn

长、繁殖能力的新型作物(Jørgensen & Schwarz, 2000; Sang, 2011)。以我国为分布中心的芒属(*Miscanthus*)植物具有植株高大、多年生、高生物量、高光效(C₄光合途径)等特性,已在生物能源领域得到广泛关注和应用(刘亮, 1997; Hodkinson *et al.*, 2002; Chen & Renvoize, 2006; Clifton-Brown *et al.*, 2008)。我国北部和西北地区拥有1亿多公顷的边际性土地,是种植第二代能源作物、实现可观产值的理想场所(Sang, 2011; Sang & Zhu, 2011)。因此,利用我国原产的芒属植物,以培养第二代能源作物为目标,进行抗旱、耐寒特性的引种驯化、分子育种工作,具有重要的生态学意义和经济价值。

芒属植物隶属禾本科黍亚科须芒草族(trib. Andropogoneae)甘蔗亚族(subtrib. Saccharinae),该属植物有13–20种(Hodkinson *et al.*, 2002; Chen & Renvoize, 2006)。研究表明,目前主要应用于能源作物生产的芒属杂交种*Miscanthus* × *giganteus*不能进行有性繁殖,且对逆境的抗性弱(Clifton-Brown & Lewandowski, 2000),对寒冷和干旱的耐受能力远低于其野生亲本(Clifton-Brown *et al.*, 2002)。主要分布于我国的芒(*Miscanthus sinensis*)、五节芒(*M. floridulus*)、荻(*M. sacchariflorus*)和南荻(*M. lutarioriparius*)等4种芒属植物,因其分布广泛、生境多样,而被视为新一代能源作物的重要种质资源,以下简称核心芒属植物。核心芒属植物多分布于50° N以下、海拔低于1,900 m的平原、丘陵及山地(刘艳春, 2010),缺乏适应于极端寒旱环境的遗传资源。Yan等(2011)分别在内蒙古、甘肃和湖北,对采自我国的93个居群的核心芒属植物进行野外定点栽培试验,以检测 and 对比它们在不同环境条件下的适应能力。结果发现,种植于寒冷和干旱程度最高的内蒙古锡林郭勒地区的材料,成活率明显低于其他两个地点,其中芒和南荻仅有小部分存活,总计存活率不足30%(Yan *et al.*, 2011)。

分布于喜马拉雅—横断山(跨越欧亚板块和印度板块)的尼泊尔芒(*M. nepalensis*)和双药芒(*M. nudipes*),由于仅具2枚花药,且在其他形态特征上也与同属其他植物明显不同,因而在分类上被处理为芒属下的一个组,即双药芒组(sect. *Diandra*) (耿以礼, 1959; Chen & Renvoize, 2006)。双药芒组植物生长于高海拔山区,对寒冷和干旱环境耐受力极强,且其开花物候期与核心芒属植物相近(Chen &

Renvoize, 2006),是培育新能源作物的优良种质资源。但由于缺乏合适的分子标记,目前尚未对其进行遗传学研究。

微卫星标记(SSR)作为一种共显性的分子遗传标记,广泛分布于基因组中,具有多态性检出率高、信息含量大、结果稳定可靠等优点,被认为是生物群体遗传学研究中极有价值的分子标记。由于微卫星位点两翼序列在属内种间甚至在科内属间都具有一定的保守性,因此为节约引物开发成本、缩短引物获得周期,利用近缘类群已有的微卫星引物进行种间扩增的方法,已逐渐应用于各类植物的遗传学研究中(邹喻苹等, 2001; Cristofani-Yaly *et al.*, 2011)。高羊茅(*Festuca arundinacea*)的SSR引物在黑麦草(*Lolium perenne*)、水稻(*Oryza sativa*)、小麦(*Triticum aestivum*)中的扩增率为38%(Saha *et al.*, 2006)。从玉米(*Zea mays*)到芒,从水稻到竹类(*Bambusa*),SSR引物也均被检测出较高的扩增比率(Hernández *et al.*, 2001; Sharma *et al.*, 2008)。

Hernández等(2001)利用玉米微卫星引物,得到19对可在芒中稳定性扩增的多态性引物; Hung等(2009)和Zhou等(2011)利用富集法,分别从芒中分离得到了9个和14个微卫星位点,实验证明这些位点均适用于核心芒属植物的遗传学研究。本研究利用上述共42对微卫星引物,对尼泊尔芒和双药芒代表性个体样本进行了跨种扩增,以探讨SSR引物在芒属不同类群之间的通用性以及各位点的多态性和杂合度水平,寻找适合于双药芒组群体遗传学研究的SSR引物。我们利用筛选出的SSR位点,对分布于我国的尼泊尔芒和双药芒各2个自然居群样本进行了初步的遗传多样性、群体遗传结构和遗传谱系分析,评价这些引物在双药芒组群体遗传学研究中的潜力,以期为深入开展双药芒组的物种形成与演化等研究奠定基础,并为驯化培育芒属能源植物提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 采集与处理

选取尼泊尔芒和双药芒各3份样品用于引物筛选,各2个居群共80个个体(表1)用于检测所得引物的多态性及适用性。野外采集新鲜叶片,用变色硅胶快速干燥,室内置于-20℃低温保存。

1.1.2 引物信息

根据Hernández等(2001)、Hung等(2009)和Zhou等(2011)报道的微卫星引物序列, 由生工生物工程(上海)有限公司合成42对引物。

1.2 方法

1.2.1 DNA提取

取20 mg干燥叶片, 经液氮冷冻后, 研磨粉碎。采用天根生化科技(北京)有限公司的新型植物基因组DNA提取试剂盒提取DNA。

1.2.2 PCR扩增和检测

PCR反应总体积为15.0 μL, 反应体系含有天根生化科技(北京)有限公司生产的2×Taq PCR MasterMix 7.5 μL, 10 μM的上下游引物各0.4 μL, DNA模板1.0 μL, ddH₂O 5.7 μL。PCR反应在Eppendorf扩增仪(由艾本德中国有限公司生产)上进行。反应程序为: 94℃预变性5 min; 94℃变性30 s, 54–58℃退火30 s, 72℃延伸1 min, 共30个循环; 72℃延伸10 min; 4℃保存。扩增产物采用2.0%琼脂糖凝胶(EB染色)检测, 电压100 V, 电流600 mA, 电泳20 min。

1.2.3 克隆测序

用pGEM-T easy vector和Top10 competent cells of *Escherichia coli*连接转化。待菌斑显色后, 挑取白色阳性克隆至含有氨苄的LB液体培养基中, 37℃下150 rpm振荡培养12 h。利用M13通用引物对克隆测

序(北京六合华大基因科技股份有限公司进行)。

1.2.4 荧光引物PCR扩增

对于克隆测序结果比对确定为核心芒属同源SSR位点的引物, 合成时在5'端增加TAM或HEX荧光标记的荧光引物, 对居群样本进行PCR扩增。反应条件如1.2.2所述。PCR扩增产物加入内标GS500LIZ, 测序仪ABI 3730xl (Applied Biosystems, Foster City, California, USA)检测荧光信号(北京擎科新业生物技术有限公司进行)。

1.3 统计分析

用ContigExpress(Lu & Moriyama, 2004)软件在测序结果中搜索微卫星位点, 进行比对分析。利用GeneMapper 4.0(Applied Biosystems, USA)软件对PCR产物荧光信号检测结果进行峰形判读, 得到产物片段长度变异数据。目的片段长度数据用ARLEQUIN 3.1(Excoffier *et al.*, 2005)和Power-Marker (Version 1.31) (<http://statgen.ncsu.edu/powermarker/>)分析。数据经检验不存在连锁不平衡(linkage disequilibrium), 且不偏离哈迪-温伯格平衡, 计算各位点等位基因数(N)、各居群等位基因总数(N_a)、多态信息含量(PIC)、期望杂合度(H_E)、实际杂合度(H_O)。运用Slatkin(1995)提出的遗传分化指数(F_{ST})计算方法以及Raymond和Rousset(1995)所提出的不同居群之间个体随机分布假说(Excoffier *et al.*,

表1 采样位置及生境

Table 1 Sampling localities and habitats of *Miscanthus nudipes* and *M. nepalensis*

样品代号 Sample code	地理位置 Locality	样品数 Sample size	海拔 Altitude (m)	经度 Longitude (E)	纬度 Latitude (N)
引物筛选 Primer selection					
双药芒 <i>M. nudipes</i>					
Nu06-18	中国西藏 Tibet, China	1	2,887	88° 57'00.16"	27° 24'37.20"
Nu08-08	中国云南 Yunnan, China	1	2,751	100°15'40.61"	27° 01'43.77"
Nu18-20	中国四川 Sichuan, China	1	2,466	102° 55'43.46"	32° 07'18.89"
尼泊尔芒 <i>M. nepalensis</i>					
GS01-20	印度北安恰尔邦 Uttaranchal, India	1	2,200	79° 27'14.58"	29° 23'34.70"
Ne11-09	中国云南 Yunnan, China	1	2,270	100° 07'40.00"	25° 42'23.08"
Ne20-05	中国四川 Sichuan, China	1	878	102° 46'44.96"	30° 19'09.16"
适用性检测 Applicability test					
双药芒 <i>M. nudipes</i>					
Nu11	中国四川 Sichuan, China	20	2,235	102° 23'29.66"	27° 52'43.25"
Nu06	中国西藏 Tibet, China	20	2,887	88° 57'00.16"	27° 24'37.20"
尼泊尔芒 <i>M. nepalensis</i>					
Ne09	中国云南 Yunnan, China	20	2,759	98° 42'01.42"	25° 58'40.00"
Ne18	中国四川 Sichuan, China	20	2,047	102° 02'32.08"	28° 25'26.24"

2005), 计算得到近交系数(F_{IS})、居群遗传分化指数(F_{ST})和个体遗传分化指数(F_{IT})等参数。根据Nei(1973)所提出居群两两之间的遗传距离可反映居群之间等级式结构的观点, 应用等位基因频率计算得到的居群间遗传距离数据, 利用UPGMA法构建出尼泊尔芒和双药芒4个自然居群之间的谱系关系。

2 结果

2.1 引物筛选结果

来自核心芒属的42对SSR引物中, 共有14对在双药芒组扩增出了清晰条带(表2)。为验证扩增位点的真实性及其与核心芒属相应SSR位点的同源性, 将PCR扩增产物进行克隆测序, 获得相应目的片段序列及微卫星重复式样(表3), 证明所得位点均为微卫星位点, 且重复单元类型均与原始发表类型(由芒开发得到的位点重复类型)一致(表2, 3), 即为同源扩增。但将目的片段重复式样与源重复式样对比

发现, 双药芒组中微卫星重复单元的重复次数明显小于核心芒属的同源序列, 且所对应各位点的目的片段长度也明显减小。将14对引物5'端添加荧光接头重新扩增, 亦得到清晰条带。将第二次PCR扩增产物进行毛细管电泳检测, 所获得位点特异性好, 电泳结果中不存在高浓度杂峰(图1)。

成功扩增的位点中11个为多态, 其中2个位点(M&M02和M&M39)来自于玉米(表3)。供试的其余23对从芒中开发得到的SSR引物中, 有12对在双药芒组中得到成功、稳定的扩增, 从核心芒属植物到双药芒组的微卫星引物扩增效率为52.2%。

如图1所示, 峰值出现位置为片段长度数值, 左边刻度表示产物浓度, 峰值越高, 表示该长度的PCR产物浓度越高。若同一位点上出现两个峰形, 则说明该样品在该位点上有一对出现长度变异的等位基因, 即杂合现象; 反之则为纯合。在图1所示的3个位点中, DSSR32引物峰值所出现过的位置最多, 说明该位点等位基因长度变异最丰富, 这样的位点

表2 筛选获得的14对SSR引物信息、参考序列重复式样、参考片段长度和PCR扩增退火温度

Table 2 Characteristics of 14 identified microsatellite primers, reference motif, reference length and annealing temperature in PCR amplification

位点名称 Locus	引物序列 Primer sequences (5'-3')	参考重复式样 Reference motif	参考片段长度 Reference length	退火温度 Annealing temperature (°C)
Bgln176	F: AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG R: CGCGCATCGCATGCTTATCCTA	—	140	54
Bgln434	F: GTGCAAAGGGGAGAGAGG R: TCGCCGTTCTTCGCCTTAG	—	85	54
DSSR09	F: CGCACCCTCCCTGACAAT R: GCCAGTAACATCCCCAACG	(AC) ₁₇	294	58
DSSR24	F: AAGGGCGAGGCAAAGCAAG R: AGATTTCTGTGACAAAGGGAGC	(GAT) ₇ (GA) ₂	100	58
DSSR32	F: GATTAGACTGTTGGTAGGGATTC R: CTGGTTTTGCGAGATTTTCAT	(GA) ₂₄	305	54
MSSR10	F: CCTGGGATTCTTTGATTGAG R: GGATTTGGCTTTCGCTGTC	(AG) ₁₉	159	54
MSSR14	F: AACTAAAGGCGAAAGCTAGGAGG R: CAGATGCTGGCTGTTGGTGATGT	(AC) ₁₈ A ₉	155	58
MSSR21	F: TATGGGTGAATGTTGGTTT R: GCCCGTTTGTGCGAGTGC	(AC) ₈ A ₈	187	58
MSSR36	F: TAAGCCCAAACAAAGGAAAT R: CAAATGGCAATAGTGAGCAA	(AG) ₁₃	228	54
MSSR37	F: CAGATGCCATTACTGTAGCGA R: TACCACAACGAAACCAAAAC	(AC) ₅ (AG) ₂ (AC) ₁₁	243	54
MSSR38	F: GAGTGAGCAGTGGCAACG R: ATCTGGCTGGACAACCTTTT	(GAT) ₇	250	54
MSSR42	F: TGCCACGCCTTCTTCACCTATC R: GCATCCAGCCATCCACCTC	(TG) ₈ (AG) ₁₄	179	58
M&M02	F: AAGACGGTGGTAAGCCACTT R: AGACAACACCAAAGTATTATC	(CAC) ₉	110	54
M&M39	F: AGAAATGAAAGTGCAGTGAC R: AAGGAGTGCTTCTCCCTCTC	(AGGC) ₆ (CGCA) ₃	180	54

F: 上游引物序列; R: 下游引物序列 F: Forward primer sequence; R: Reverse primer sequence

表3 筛选获得14个SSR位点在双药芒组中的序列重复式样、等位基因数、序列长度变异范围、多态信息含量、期望杂合度和观察杂合度

Table 3 Repeat motif, the number of alleles, sequence range, polymorphism information content, expected and observed heterozygosity of 14 identified microsatellite loci in *Miscanthus nepalensis* and *M. nudipes*

位点名称 Locus	重复式样 Repeat motif	等位基因数 <i>N</i>	长度变异范围 Sequence range (bp)	多态信息含量 <i>PIC</i>	期望杂合度 <i>H_E</i>	观察杂合度 <i>H_O</i>
Bgln176	(CTAG) ₃ (CT) ₆ (CGGC) ₄	4	146–158	0.6260	0.5189	1.0000
Bgln434	(CT) ₅ C ₄ (CT) ₃	1	84	0.0000	0.0000	0.0000
DSSR09	(AC) ₇	1	272	0.0000	0.0000	0.0000
DSSR24	(GAT) ₇ (GA) ₂	1	94	0.0000	0.0000	0.0000
DSSR32	(GA) ₁₀	21	296–345	0.5198	0.3843	0.2625
MSSR10	(GA) ₂ GC(GA) ₄ T(GA) ₂	6	117–127	0.5970	0.4808	0.8500
MSSR14	(AC) ₄ A ₁₁	7	118–124	0.7189	0.4859	0.2375
MSSR21	T ₇ (CA) ₆ (CA) ₆ (AC) ₄	10	167–208	0.7556	0.6055	0.9375
MSSR36	(AG) ₉	8	218–226	0.6904	0.7210	0.3000
MSSR37	(CA) ₄ GAA(CA) ₅	11	240–261	0.6691	0.3529	0.1625
MSSR38	(GAT) ₄	2	236–239	0.3047	0.2564	0.5000
MSSR42	(AG) ₁₀	8	177–194	0.6329	0.5881	0.8625
M&M02	(CAC) ₅	5	90–106	0.6622	0.7096	0.3750
M&M39	(GAA) ₃ (CGCA) ₂	2	141–154	0.3158	0.3984	0.5375
平均值 Average	–	6	–	0.4637	0.3930	0.4304

N, Number of allele; *PIC*, Polymorphism information content; *H_E*, Expected heterozygosity; *H_O*, Observed heterozygosity.

表4 各居群遗传分化指数

Table 4 Genetic structure indices of *Miscanthus* populations

居群 Population	等位基因总数 <i>N_a</i>	近交系数 <i>F_{IS}</i>	居群分化指数 <i>F_{ST}</i>	个体分化指数 <i>F_{IT}</i>
<i>M. nepalensis</i> (Ne09)	22	-0.0412	0.3854	–
<i>M. nepalensis</i> (Ne18)	28	-0.2940	0.4793	–
<i>M. nudipes</i> (Nu06)	42	-0.1798	0.1775	–
<i>M. nudipes</i> (Nu11)	70	0.0358	0.0464	–
平均值 Average	40.5	-0.1198	0.2722	0.2447

N_a, Total number of alleles of each population; *F_{IS}*, Inbreeding coefficients; *F_{ST}*, Genetic differentiation index of populations; *F_{IT}*, Genetic differentiation index of individuals

对种内、甚至居群内的遗传多样性敏感度高, 有高效的辨别能力; 而所有样品在DSSR24位点, 仅表现出一种长度, 即纯合且单态的现象, 说明这类位点对遗传结构没有辨别能力, 但却可以客观地反映居群的繁育模式及杂合程度; MSSR38位点在尼泊尔芒和双药芒中均表现为单态, 即在种内无变异, 但在种间却表现出长度差异, 可见此类位点可准确地鉴别出种间差异。

2.2 所得引物的适用性

2.2.1 遗传多样性检测能力评价

所获得的14个SSR位点, 等位基因总数为87, 平均每个位点大约具有6个等位基因(表3)。其中

DSSR32位点等位基因数量最多(21个); DSSR09、DSSR24和Bgln434三个位点均表现为单态。

本研究中, 11个多态位点的*PIC*值在0.3047(MSSR38)–0.7556(MSSR21)之间变化, 平均为0.4637。这样高的多态信息含量说明, 所得14对SSR位点的多态性已可满足群体遗传学研究的要求。此外, 本研究所得到的SSR位点, 还在双药芒组居群中检测出个体之间存在中等水平杂合度(*H_E*和*H_O*平均值分别为0.3930和0.4304)。由表4可知, 双药芒的两个居群在14个微卫星位点上的等位基因总数明显大于尼泊尔芒, 这也进一步说明了这些位点对双药芒组的遗传多样性水平能够作出精确的检测。

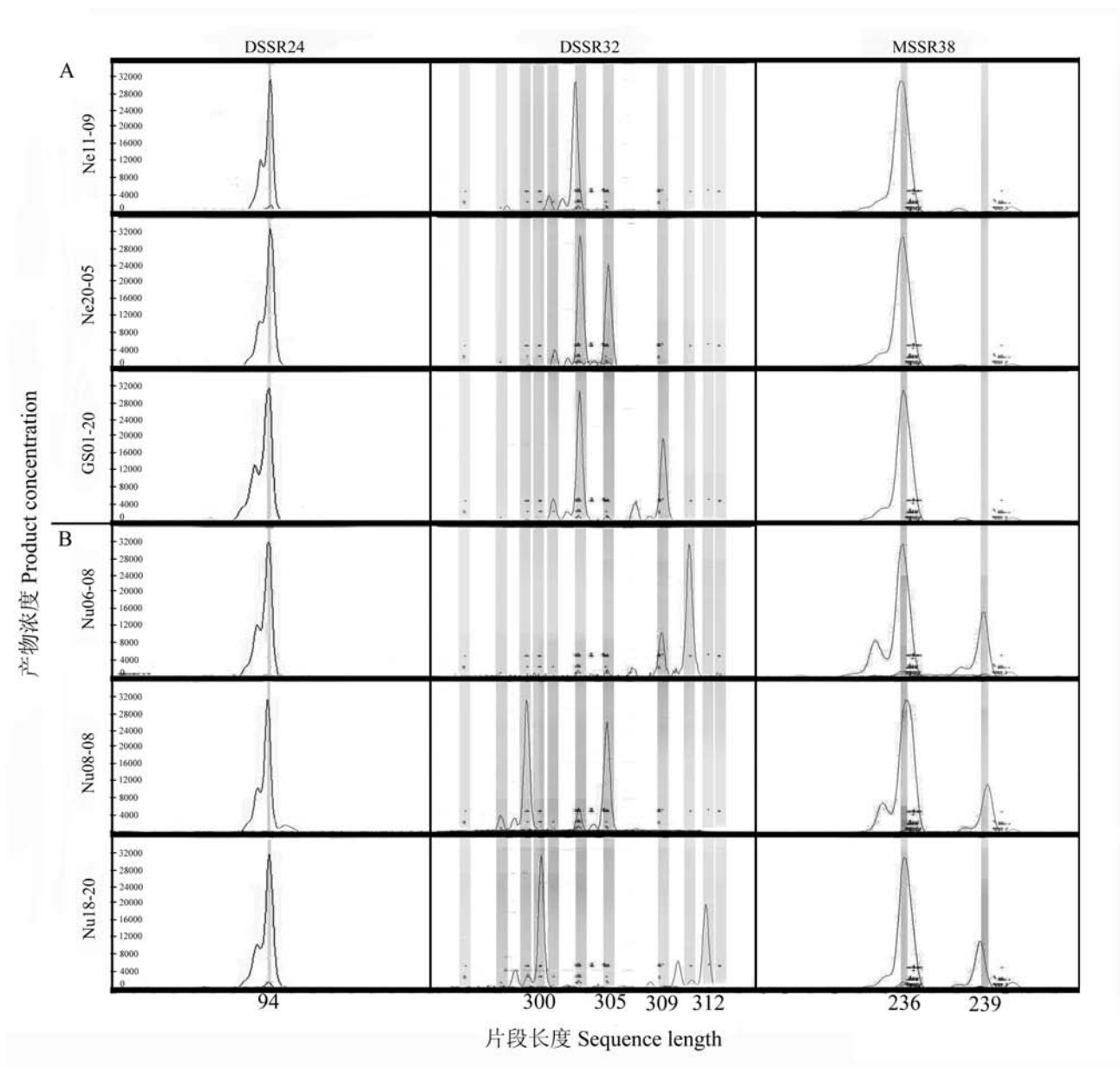


图1 尼泊尔芒(A)和双药芒(B)3个SSR位点的ABI电泳峰值图

Fig. 1 Sequence trace file of three microsatellite loci of *Miscanthus nepalensis* and *M. nudipes* from ABI electrophoresis

2.2.2 群体遗传结构检测能力评价

如表4所示, 居群内个体之间的平均近交系数(F_{IS})值变化范围在-0.2940至0.0358之间, 平均值为-0.1198。这说明SSR位点具有有效检测居群内个体间近交程度的能力。各居群 F_{ST} 平均值为0.2722, 双药芒居群的分化指数较小, 最小值(0.0464)出现于Nu11居群; 尼泊尔芒居群的分化指数则相对较大, 最大值(0.4793)出现于Ne18居群。11对多态性引物

检测出所有样品个体间的平均遗传分化指数(F_{IT})为0.2447, 说明所有供试样本个体之间存在较大的差异。

以上一系列结果表明, 本研究获得的多态性位点对双药芒组的遗传分化结构有很好的检测和分辨能力。

2.2.3 遗传谱系分析能力评价

由图2可知, 利用14对SSR引物, 可将两物种

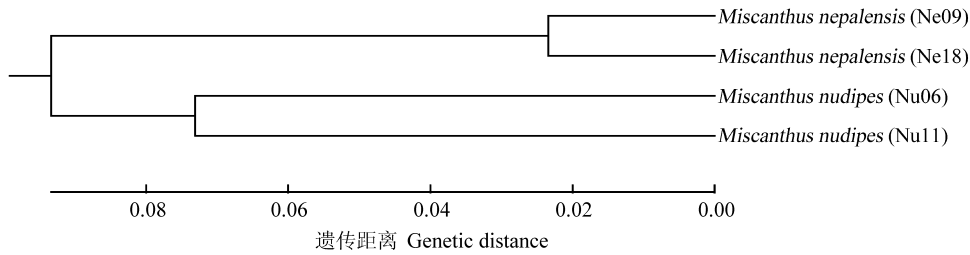


图2 尼泊尔芒和双药芒4个居群的UPGMA系统树

Fig. 2 Dendrogram of the four populations of *Miscanthus nepalensis* and *M. nudipes* based on UPGMA cluster analysis

明确分开, 种内的两个居群各自聚为一支, 且尼泊尔芒居群之间的遗传距离明显小于双药芒。但总体上两个物种之间的遗传距离较短, 说明这两个物种之间具有很近的亲缘关系。由此可知, 本研究所得SSR位点已具备良好的对种间及居群间遗传结构的分辨能力, 可以准确地地区分双药芒组不同物种。

3 讨论

3.1 芒属SSR引物的种间通用性

利用近缘类群的SSR引物进行转移扩增来获得SSR位点的方法, 由于工作量小、费用低等明显优势, 已在许多植物类群的遗传学研究中得到普遍应用。在对禾本科植物的基因组SSR引物进行属内跨种扩增的相关研究中, 从蒲苇(*Cortaderia selloana*)中开发得到的SSR引物, 在蒲苇属其他种中的扩增率从55–100%不等(Ahmand *et al.*, 2006); Nayak和Rout(2005)从印度籼竹(*Bambusa arundinacea*)开发得到的6对微卫星引物, 在同属其他8个物种中可全部成功扩增。本研究中, 核心芒属的SSR位点在双药芒组中的同源扩增比率为52.2%, 小于上述禾本科属内跨种扩增比例。

此外, 本研究所得到的双药芒组微卫星重复单元的重复次数, 明显小于核心芒属的同源序列, 所对应各位点的目的片段长度也明显减小。一般认为, 在微卫星DNA中, 突变的速率与串联重复序列的大小成正相关, 在微卫星位点上检出等位基因的数目与微卫星长度有较好的线性关系, 即微卫星单元的重复次数越多, 检出的等位基因数目越多(邹喻苹等, 2001)。但双药芒组类群的遗传多样性是否会低于核心芒属类群, 还需进一步的研究验证。

本研究筛选所得微卫星位点中, 同时包含多态和单态位点, 且具有可明确区别种间变异的位点,

使所得SSR位点对于双药芒组物种的遗传多样性、群体遗传结构及繁育体系等特点具有准确分辨的能力。

3.2 14个SSR位点在双药芒组遗传学研究中的适用性

利用本研究获得的14对SSR引物, 对分别来自西藏亚东和四川昭觉的2个双药芒居群和分别来自云南泸水和四川冕宁的2个尼泊尔芒居群进行了遗传多样性和群体遗传结构的初步分析。由于样本量过小, 所得数据不足以评价双药芒组整体的遗传差异水平, 仅旨在评价筛选所得SSR位点在双药芒组群体遗传学研究中的适用性。

由PIC值可知, 所得引物具有丰富的多态信息含量。且各位点的平均期望杂合度小于观察杂合度, 这说明双药芒组内的远交程度大于近交, 这一结果也通过表4中的 F_{IS} 值得到印证。这说明筛选所得位点信息量大, 可准确评价双药芒组群体的遗传多样性水平。其次, 14对引物在各居群中所检测出的等位基因数量差异很大(22–70), 且 F_{ST} 值和 F_{IT} 值反映出供试的各居群之间存在不同程度的遗传差异。第三, 所得引物对各个居群之间的遗传谱系关系也能够划分得清晰准确。这些结果均表明, 14对SSR引物对双药芒组的群体遗传结构有高效、精确的检测和评价能力。

本研究所获得的14对SSR引物, 对双药芒组群体遗传参量具有高效的检测能力, 可以作为后续双药芒组群体遗传学研究的有力工具, 从而为第二代能源作物的驯化、育种工作提供依据。

致谢: 感谢中国科学院植物研究所张富民副研究员和桑涛研究员对论文提出的宝贵意见以及周海飞博士对本研究实验设计和实验技术方面给予的大力支持和指导。

参考文献

- Ahmand R, Okada M, Firestone JL, Mallek CR, Jasieniuk M (2006) Isolation, characterization, and evaluation of microsatellite loci for cultivar identification in the ornamental pampas grass *Cortaderia selloana*. *Journal of the American Society for Horticulture Science*, **131**, 499–505.
- Chen SL, Renvoize SA (2006) *Miscanthus* Andersson. In: *Flora of China* (eds Wu CY, Raven PH), Vol. 22, pp. 581–583. Science Press, Beijing, Missouri Botanical Garden Press, St. Louis.
- Clifton-Brown JC, Lewandowski I (2000) Overwintering problems of newly established *Miscanthus* plantations can be overcome by identifying genotypes with improved rhizome cold tolerance. *New Phytologist*, **148**, 287–294.
- Clifton-Brown JC, Lewandowski I, Bangerth F, Jones MB (2002) Comparative responses to water stress in stay-green, rapid and slow senescing genotypes of the biomass crop, *Miscanthus*. *New Phytologist*, **154**, 335–345.
- Clifton-Brown JC, Chiang YC, Hodkinson TR (2008) *Genetic Improvement of Bioenergy Crops* (ed. Vermerris W), pp. 273–294. Springer, New York.
- Cristofani-Yaly M, Novelli VM, Bastianel M, Machado MA (2011) Transferability and level of heterozygosity of microsatellite markers in *Citrus* species. *Plant Molecular Biology Reporter*, **29**, 418–423.
- Excoffier L, Laval LG, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics Online*, **1**, 47–50.
- Hernández P, Dorado G, Laurie DA, Martín A, Snape JW (2001) Microsatellites and RFLP probes from maize are efficient sources of molecular markers for the biomass energy crop *Miscanthus*. *Theoretical and Applied Genetics*, **102**, 616–622.
- Hodkinson TR, Chase MW, Lledó MD, Salamin N, Renvoize SA (2002) Phylogenetics of *Miscanthus*, *Saccharum*, and related genera (Saccharinae, Andropogoneae, Poaceae) based on DNA sequences from ITS nuclear ribosomal DNA and plastid *trnL* intron and *trnL*-F intergenic spacers. *Journal of Plant Research*, **115**, 381–392.
- Hung KH, Chiang TY, Chiu CT, Hsu TW, Ho CW (2009) Isolation and characterization of microsatellite loci from a potential biofuel plant *Miscanthus sinensis* (Poaceae). *Conservation Genetics*, **10**, 1377–1380.
- Jørgensen U, Schwarz KU (2000) Why do basic research? A lesson from commercial exploitation of *Miscanthus*. *New Phytologist*, **148**, 190–193.
- Keng YL (耿以礼) (1959) *Flora Illustralis Plantarum Primarum Sinicarum Gramineae* (中国主要植物图说: 禾本科), pp. 1178. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Liu L (刘亮) (1997) *Miscanthus*, *Diandranthus*, *Triarrhena*. In: *Flora Reipublicae Popularis Sinicae* (中国植物志), Tomus. 10 (ed. Chen SL(陈守良)), pp. 4–27. Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Liu YC (刘艳春) (2010) *The Taxonomic Revision of Saccharinae (Poaceae) in China* (中国甘蔗亚族(禾本科)的分类修订). PhD dissertation, Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences. (in Chinese with English summary)
- Lu GQ, Moriyama EN (2004) Vector NTI, a balanced all-in-one sequence analysis suite. *Birefings in Bioinformatics*, **5**, 378–388.
- Nayak S, Rout GR (2005) Isolation and characterization of microsatellites in *Bambusa arundinacea* and cross species amplification in other bamboos. *Plant Breeding*, **124**, 599–602.
- Nei M (1973) Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, **70**, 3321–3323.
- Raymond M, Rousset F (1995) An exact test for population differentiation. *Evolution*, **49**, 1280–1283.
- Saha MC, Cooper JD, Mian RMA, Chekhovskiy K, May GD (2006) Tall fescue genomic SSR markers: development and transferability across multiple grass species. *Theoretical and Applied Genetics*, **113**, 1449–1458.
- Sang T (2011) Toward the domestication of lignocellulosic energy crops: learning from food crop domestication. *Journal of Integrative Plant Biology*, **53**, 96–104.
- Sang T, Zhu WX (2011) China's bioenergy potential. *Global Change Biology Bioenergy*, **3**, 79–90.
- Sharma RK, Gupta P, Sharma V, Sood A, Mohapatra T, Ahuja PS (2008) Evaluation of rise and sugarcane SSR markers for phylogenetic and genetic diversity analyses in bamboo. *Genome*, **51**, 91–103.
- Slatkin M (1995) A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*, **139**, 457–462.
- Yan J, Chen WL, Luo F, Ma HZ, Meng AP, Li XW, Zhu M, Li SS, Zhou HF, Zhu WX, Han B, Ge S, Li JQ, Sang T (2011) Variability and adaptability of *Miscanthus* species evaluated for energy crop domestication. *Global Change Biology Bioenergy*, doi: 10.1111/j.1757-1707.2011.01108.x
- Zou YP (邹喻莘), Ge S (葛颂), Wang XD (王晓东) (2001) *The Molecular Markers Among Systematic and Evolutionary Botany* (系统与进化植物学中的分子标记). Science Press, Beijing. (in Chinese)
- Zhou HF, Li SS, Ge S (2011) Development of microsatellite markers for *Miscanthus sinensis* (Poaceae) and cross-amplification in other related species. *American Journal of Botany*, **98**, e195–e197.