

# 用 SSR 分子标记分析无融合生殖龙须草的遗传多样性

黎 蓉 姚家玲

华中农业大学生命科学技术学院, 武汉 430070

**摘要** 采用磁珠富集法构建龙须草微卫星文库, 并开发出 27 对具有多态性的 SSR 引物, 利用其中具有扩增差异的 8 对稳定的 SSR 引物, 对龙须草 11 个居群和 71 个单株进行聚类分析。结果表明: 居群间共检测到 123 个等位基因, 每对引物可以稳定检测到 6~34 个多态性片段。居群间的遗传相似系数为 0.70~0.97, 聚类分析将 11 个居群划分为 4 个类群, 表明龙须草大多数居群之间的分化程度较低, 与无融合生殖的特性相吻合。采用 UPGMA 法将分散在龙须草 11 个居群的 71 个单株分为 3 个群, 与以居群为单位的研究结果相近; 但是, 星子居群内的 3 个单株、洋县居群的 1 个单株分别与本居群亲缘关系较远并与其他居群亲缘关系较近, 显示在这 2 个居群内不同单株间存在较大的遗传差异, 这种差异可能是居群内单株间无融合生殖程度不同所致。因此, 在这 2 个居群内可能存在有性生殖频率较高的单株。

**关键词** 无融合生殖; 龙须草; SSR; 遗传多样性; 磁珠富集法; 聚类分析

**中图分类号** Q 949.99 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2013)06-0001-07

植物无融合生殖是指不经过减数分裂和受精作用而形成种子的一种特殊的生殖方式。无融合生殖植物的子代和母本的基因型相同, 可以为植物育种提供重要的研究方式<sup>[1]</sup>。如果将近缘野生种的无融合生殖基因通过基因工程的方法转入栽培作物中, 可以固定农作物的杂种优势, 将引起一次意义深远的无融合生殖革命<sup>[2-3]</sup>。

龙须草(*Eulaliopsis binata*)是一种禾本科无融合生殖植物, 是禾谷类作物利用无融合生殖固定杂种优势的潜在资源。姚家玲等<sup>[4-5]</sup>通过胚胎学研究, 确定了龙须草属于配子体无孢子生殖的无融合生殖类型; 胚来自未减数卵细胞的孤雌生殖, 胚乳由极核不受精自主分裂形成。细胞学研究表明龙须草为具有 40 条染色体的异源四倍体植物<sup>[6]</sup>。近年来, 刘传虎等<sup>[7]</sup>、姚家玲等<sup>[8]</sup>分别利用 RAPD、AFLP 分子标记结合形态学观察, 将分布于中国的 12 个龙须草居群划分为 4 种类型。前期的研究发现, 虽然龙须草的无融合生殖程度很高(95%以上), 但居群间和单株间生殖方式和无融合生殖程度存在差异, 既有专

性无融合生殖类型(同一植株所有种子都来自于无融合结实), 又有兼性无融合生殖类型(同一植株中部分种子来自无融合生殖, 部分种子来自有性生殖)<sup>[5]</sup>。确定有性生殖居群或单株是进一步研究其无融合生殖遗传调控机制和分离相关基因的基础。

SSR(simple sequence repeats)又称作微卫星 DNA, 广泛分布于各类真核生物基因组中, 与传统的 RAPD、AFLP 等分子标记相比, SSR 的重复次数和重复程度不同, 使得 SSR 呈现高度的多态性, 而且每个微卫星位点上重复数量的差异在多个等位基因间都可以显示出多态性, 因此, SSR 技术已被广泛应用于植物遗传多样性分析、分子作图、基因定位和系谱分析之中<sup>[9-10]</sup>。刘丽等<sup>[11]</sup>通过锚定 PCR 开发复合 SSR 引物、数据库检索和近缘物种 SSR 引物的引用等 3 种方法开发了龙须草的 SSR 引物, 并利用筛选得到的 SSR 多态性引物鉴别了龙须草 2 个居群间杂交后代生殖方式的差异。前期研究开发的引物数量较少, 对居群内部遗传多样性的检出效率不足, 采用其他方法开发出更多更有效的 SSR 引

收稿日期: 2012-08-01

基金项目: 国家自然科学基金项目(30670127)

黎 蓉, 硕士研究生, 研究方向: 植物生殖发育学, E-mail: lirong450@sina.com

通讯作者: 姚家玲, 博士, 教授, 研究方向: 植物生殖发育生物学和资源植物, E-mail: yaojlm@mail.hzau.edu.cn

物,将有利于辨析龙须草居群内生殖方式的差别,以发现有性生殖个体;如果能进一步累积足够的位点,建立生殖方式与分子标记之间的连锁关系,可为研究无融合生殖调控机制奠定基础。磁珠富集法是简单有效的筛选微卫星 DNA 的方法,在开发物种特异的 SSR 引物方面可大大节约时间和成本。本研究利用磁珠富集法开发了龙须草 SSR 多态性引物,对其不同居群和不同单株进行多态性检测和聚类分析,以期鉴定不同生殖方式的龙须草和深入研究龙须草遗传机制提供技术基础,同时也为无融合生

殖植物的遗传规律和多样性研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

11 个龙须草居群均种植在华中农业大学试验基地,来自河南淅川、内乡、西峡,陕西山阳、洋县,湖北郧西、丹江、郧县,湖南衡阳,广东星子及广西百色等地;在龙须草 11 个居群中随机取 71 个单株,作为居群内不同单株分析的试验材料。各居群及单株的具体信息见表 1。

表 1 龙须草居群和单株

Table 1 The populations and accessions in *E. binata*

居群 Population	单株编号 Accession number
广东星子 Xingzi, Guangdong	星子 1、星子 2、星子 3、星子 4、星子 5、星子 7、星子 8、星子 11、星子 12、星子 13、星子 14、星子 18、星子 19 Xingzi 1, Xingzi 2, Xingzi 3, Xingzi 4, Xingzi 5, Xingzi 7, Xingzi 8, Xingzi 11, Xingzi 12, Xingzi 13, Xingzi 14, Xingzi 18, Xingzi 19
陕西洋县 Yangxian, Shaanxi	洋县 1、洋县 2、洋县 5、洋县 6、洋县 7、洋县 9 Yangxian 1, Yangxian 2, Yangxian 5, Yangxian 6, Yangxian 7, Yangxian 9
河南淅川 Xichuan, Henan	淅川 2、淅川 3、淅川 4、淅川 5、淅川 6 Xichuan 2, Xichuan 3, Xichuan 4, Xichuan 5, Xichuan 6
陕西山阳 Shanyang, Shaanxi	山阳 1、山阳 2、山阳 4、山阳 5、山阳 6、山阳 8、山阳 9 Shanyang 1, Shanyang 2, Shanyang 4, Shanyang 5, Shanyang 6, Shanyang 8, Shanyang 9
湖南衡阳 Hengyang, Hunan	衡阳 1、衡阳 2、衡阳 3、衡阳 4、衡阳 5、衡阳 7、衡阳 9、衡阳 10、衡阳 11 Hengyang 1, Hengyang 2, Hengyang 3, Hengyang 4, Hengyang 5, Hengyang 7, Hengyang 9, Hengyang 10, Hengyang 11
河南内乡 Neixiang, Henan	内乡 1、内乡 4、内乡 5、内乡 10 Neixiang 1, Neixiang 4, Neixiang 5, Neixiang 10
河南西峡 Xixia, Henan	西峡 5、西峡 6、西峡 7、西峡 10 Xixia 5, Xixia 6, Xixia 7, Xixia 10
湖北郧西 Yunxi, Hubei	郧西 1、郧西 2、郧西 3、郧西 4、郧西 5、郧西 6、郧西 7、郧西 8、郧西 9 Yunxi 1, Yunxi 2, Yunxi 3, Yunxi 4, Yunxi 5, Yunxi 6, Yunxi 7, Yunxi 8, Yunxi 9
广西百色 Baise, Guangxi	百色 2、百色 3 Baise 2, Baise 3
湖北丹江 Danjiang, Hubei	丹江 1、丹江 2、丹江 3、丹江 4、丹江 5、丹江 6、丹江 7、丹江 8 Danjiang 1, Danjiang 2, Danjiang 3, Danjiang 4, Danjiang 5, Danjiang 6, Danjiang 7, Danjiang 8
湖北郧县 Yunxian, Hubei	郧县 1、郧县 2、郧县 5、郧县 6 Yunxian 1, Yunxian 2, Yunxian 5, Yunxian 6

### 1.2 DNA 提取

采用 CTAB 法提取 DNA<sup>[12]</sup>,用紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和质量。

### 1.3 基因组 DNA 双酶切及酶切片段的选择回收

取基因组 DNA 300 ng 以 *Bam*H I 和 *Hind* III 在 37 °C 下酶切 4~6 h,电泳检测酶切程度;然后在 65 °C 下灭活内切酶。1%的琼脂糖凝胶电泳 1 h,EB 染胶,切胶回收 300~1 000 bp 的 DNA 片段,并用 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 300~1 000 bp 的 DNA 片段。

### 1.4 接头制备、连接、产物回收和检测

4 条寡核苷酸链和接头(Adaptor)序列如下:

*Hind* III OligoA 5'-TACTGGTACTAATGCGGT-3';

OligoB 3'-ATGACCATGATTACGCCATCGA-5';

*Bam*H I OligoC 5'-ATGACCATGATTACGC-

CAG-3';

OligoD 3'-TACTGGTACTAATGCGGTCTCTAG-5'

按 T4-DNA 连接酶试剂盒操作步骤链接完毕后,65 °C 10 min 灭活 T4 DNA Ligase,在-20 °C 保存备用。

### 1.5 磁珠捕获

双酶切的 DNA 及接头连接产物在 PCR 仪上 98 °C 热变性 10 min,冰浴冷却 10 min。按 Promega 公司 Streptavidin coated-beads 试剂盒方法加入准备好的磁珠、探针及 SSC(终浓度为 6×SSC) 65 °C 预杂交 30 min,70 °C 杂交过夜。洗涤,用磁力架吸附磁珠后,弃上清。最后从磁珠上解吸附后收集含有目标微卫星重复序列的单链 DNA 片段。用 PCR 扩增获得含有目标重复的 DNA 片段,1.5%琼脂糖凝胶电泳检测,切胶回收 300~1 000 bp 的 DNA 片段,并用 GenClean 柱式琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂

盒回收 300~1 000 bp 的 DNA 片段。

由于连上接头的双酶切 DNA 片段长度为 300~1 000 bp,故 PCR 产物长度为 300~1 000 bp,就证明磁珠成功捕获目的片段。

### 1.6 目的片段的克隆、筛选及鉴定

将纯化的目的片段和 pMD-18T 载体连接,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞(天根),转化液涂抹在含有 IPTG 和 X-gal 的 LB 固体培养基平板上进行蓝白斑筛选,得到微卫星基因组文库。

选择白色菌落,挑至含 50~100  $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 LB 液体培养基中,37  $^{\circ}$ C 250 r/min 振荡培养 4 h。以载体引物 RV-M、M13-47 和探针的寡核苷酸链作为 PCR 检测的引物,以过夜培养的菌液为模板,用 PIMA (PCR isolation of microsatellite arrays) 法筛选阳性克隆。

阳性克隆(有 2 条或 2 条以上的条带)的菌液送交华大基因有限公司用 M13 通用引物进行单向测序。

### 1.7 微卫星筛查、SSR 引物设计和检测

用 SSRIT (<http://www.gramene.org/db/markers/ssrtool>) 找出测序结果中的微卫星序列,然后用引物设计软件 Primer5.0 设计 SSR 引物。

SSR 引物由上海生物工程服务有限公司合成,PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,模板 DNA 150 ng,10 $\times$  Taq Buffer(Tian-gen 公司含 Mg<sup>2+</sup>) 2  $\mu$ L, dNTPs (10 mmol/L) 0.4  $\mu$ L, Taq 酶(5 U) 0.2  $\mu$ L,正反向 SSR 引物各 0.5  $\mu$ L (10 mmol/L),加去离子水至总体积 20  $\mu$ L。循环参数为 94  $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94  $^{\circ}$ C 1 min,退火(表 2) 30 s,72  $^{\circ}$ C 1 min,35 个循环,72  $^{\circ}$ C 10 min,4  $^{\circ}$ C 保存。扩增产物用 8% 变性 PAGE 凝胶电泳分离,银染检测,拍照保存。

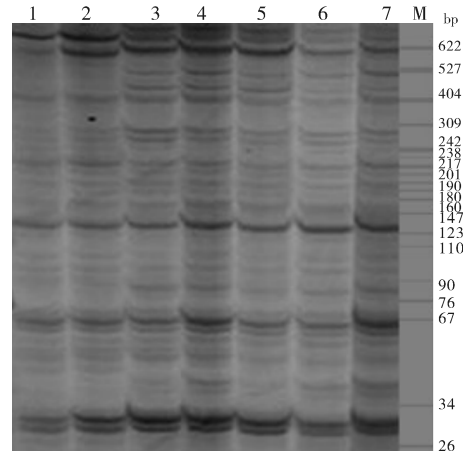
### 1.8 数据统计分析

SSR 分析中,在相同的迁移位置上(相同的分子质量片段)有带记为 1,无带记为 0,缺失记为 9,建立数据库。采用 Jaccard 系数的方法计算遗传相似系数  $C_{GS}$ ,  $C_{GS} = X_{ij} / (X_i + X_j + X_{ij})$ ,其中  $X_{ij}$  为第  $i$  个材料和第  $j$  个材料共有的条带数; $X_i$  和  $X_j$  分别为第  $i$  个材料和第  $j$  个材料特有条带数。按 UPGMA 方法进行聚类分析,数据处理由 NTSYS-pc2.1 软件完成<sup>[13]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 引物开发和多样性检测

从 1 228 个菌斑中筛选到 98 个阳性克隆,经测序有 85 条序列含有微卫星,但是其中 15 条序列的微卫星侧翼序列长度小于 20 bp,无法设计引物,共设计 70 对微卫星引物,经过 PCR 扩增和 PAGE 胶检测后,其中有 27 对 SSR 引物扩增出多态性条带(表 2),8 对引物在供试龙须草居群间呈现扩增差异性,引物的有效开发效率为 38.5%。图 1 是使用微卫星引物 EBEMF 扩增龙须草 DNA 的 PCR 产物经过变性聚丙烯酰胺凝胶检测的电泳结果,说明这些引物多态性较高。



泳道 1 至 7 依次为星子 1、星子 4、洋县 2、浙川 3、浙川 4、西峡 5, M 为 PBR322 marker。Lane 1 to 7 sequentially Xingzi 1, Xingzi 4, Yangxian 2, Xichuan 3, Xichuan 4, Xixia 5, M is PBR322 marker.

图 1 使用微卫星引物 EBEMF 扩增龙须草基因组 DNA 的 PCR 产物变性聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 Profile of the amplification products from genomic DNAs of *E. binata* using primer EBEMF

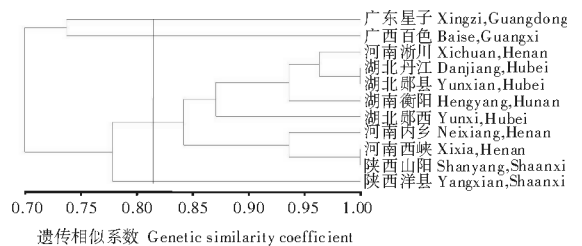


图 2 11 个龙须草居群的 SSR 聚类树状图

Fig. 2 Dendrogram by cluster analysis based on SSR genetic similarity of 11 *E. binata* groups

表 2 27 对多态性微卫星引物的相关信息

Table 2 Twentyseven polymorphic microsatellite markers and relevant information

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	重复序列 Repeat motif	长度/bp Size	退火温度/°C Annealing temperature
FIEb	Sense 5'-AAGCCTTCGCTCATCATTTTC-3' Anti-sense 5'-CCCTCCCTATCACTCTGTTC-3'	(TAGC) <sub>4</sub>	413	50.0
Zmwus1	Sense 5'-CGCTCTGATGCTGGACACGA-3' Anti-sense 5'-TAACTGCCTGCTGGGACTGG-3'	(CGG) <sub>7</sub>	276	61.6
AtSPL	Sense 5'-GAGGATTGGGTGTAGCGAAG-3' Anti-sense 5'-GTGTCACAGCGATTATTGGA-3'	(GAA) <sub>5</sub>	337	53.5
AtNZZ	Sense 5'-ATAATCGCTGTGACACTTGC-3' Anti-sense 5'-TCCTCCATTGGTCCCTAAAC-3'	(TCC) <sub>3</sub> (ATC) <sub>3</sub>	462	48.5
60S-1	Sense 5'-CGTGAGGACACAGCCATCT-3' Anti-sense 5'-TTTCGTCGGCATCAACAAGG-3'	(CT) <sub>10</sub>	265	60.0
Xu-1	Sense 5'-GTAGGACCAAACCGCATAAA-3' Anti-sense 5'-CTGGATTGATTGCTCTTCTG-3'	(CA) <sub>3</sub> TCGAT(TG) <sub>3</sub>	360	52.0
Xu-4	Sense 5'-CTAAGCCGTCCGTCCTCTGA-3' Anti-sense 5'-AAGGGAACGCAAGGGCAAAG-3'	(ATCTC) <sub>4</sub> (TC) <sub>3</sub> CAT(CA) <sub>3</sub>	290	60.0
ZcwE05	Sense 5'-CTTGTTGAAAGAGATAGGAA-3' Anti-sense 5'-ATAACCGTATTACCGCATTG-3'	(AC) <sub>19</sub>	639	52.0
EB7459	Sense 5'-CTTGCCGATTAGAACCAGAG-3' Anti-sense 5'-TAGGTAGTGAACCAGGAGGG-3'	(AG) <sub>21</sub>	279	55.0
EB7205	Sense 5'-TCGTTCTGATACGGTTCCTG-3' Anti-sense 5'-TATGAGCGTGATTATGCCTG-3'	(TC) <sub>16</sub>	157	50.6
EB7206	Sense 5'-TTACCCAGGTTCCAGACAAG-3' Anti-sense 5'-AAGGTGCCAAGAATGGAGAC-3'	(CT) <sub>15</sub>	300	52.7
EB7204a	Sense 5'-TGGTCTTCTGGTTCTTATG-3' Anti-sense 5'-CGTTTATTTATGTTTCTCTGC-3'	(TC) <sub>30</sub>	351	53.5
EB7204b	Sense 5'-CTAACTCGCTCGCAGGAAAC-3' Anti-sense 5'-CACAGGGAGACAGTGACAAC-3'	(TC) <sub>7</sub> (AT) <sub>7</sub>	430	52.7
EB81939	Sense 5'-AATGCTGTGTTCCCTGGGCTT-3' Anti-sense 5'-TGATTATGGCTGGCTACTGC-3'	(TC) <sub>19</sub>	124	51.4
EB92533a	Sense 5'-GGTGACAAGATTTGGAGGAC-3' Anti-sense 5'-GGAACCGACTGTAACATGA-3'	(TC) <sub>20</sub>	426	51.4
EB92533b	Sense 5'-TAGTTACTGGCGGTTCTCTG-3' Anti-sense 5'-CTTGCTTGTAGGTGGACGAT-3'	(TC) <sub>12</sub>	195	51.9
EB92541b	Sense 5'-ACTTAGTTGCTGTCCGTTCC-3' Anti-sense 5'-TCGCAGGTGAGTGCTTGAT-3'	(TC) <sub>4</sub> (CT) <sub>3</sub> (TC) <sub>3</sub>	193	51.7
EBrolBT	Sense 5'-GAACAAGAAGGTGGAAGCAA-3' Anti-sense 5'-CAAGGTAGTCCCTCGTAGCC-3'	(AGTTCGTC) <sub>15</sub>	478	53.0
EB9252a	Sense 5'-CTGAAAAGAGGAACCGACTG-3' Anti-sense 5'-TACTGGGCTAATGCTGTGAT-3'	(AG) <sub>31</sub>	400	52.3
EB9252b	Sense 5'-ATGATTATGCCACCTCCGC-3' Anti-sense 5'-CTGATGTGATGTTCCCTGTGTC-3'	(CT) <sub>15</sub>	111	49.5
MEZ	Sense 5'-CCTTATTAGTTCCCTTTCCT-3' Anti-sense 5'-GTAGCACCCCTTTTTTTCACA-3'	(AT) <sub>23</sub>	465	47.2
EB111437	Sense 5'-GCGTGGTGAACCGCCGAAAA-3' Anti-sense 5'-AAGACGAGCAAACAGGGGAC-3'	(GT) <sub>5</sub> (TG) <sub>3</sub>	446	50.9
EB111480	Sense 5'-AGACTGGAGGGACAACGAGA-3' Anti-sense 5'-AGTTAGTGGGAGGGGCTTAG-3'	(TTC) <sub>5</sub>	304	48.9
EB1129	Sense 5'-TGTTTCAGTTGTCGCACCTA-3' Anti-sense 5'-ATACCTCCGCAGATGGCTTT-3'	(AAC) <sub>5</sub>	133	49.8
EBEMF	Sense 5'-TCCCTATTGTTTCTTCGTTG-3' Anti-sense 5'-CACAGTGCTAAGCCATTTCA-3'	(GA) <sub>8</sub>	458	49.4
EBMEZ	Sense 5'-TGGTTCCCAAGTTCTCAAGC-3' Anti-sense 5'-GCCTGCGTCAGATAACACAC-3'	(TTTTTG) <sub>4</sub>	456	51.6
EB92532	Sense 5'-GGAACATTGGAACCTCTTGC-3' Anti-sense 5'-ACTGAGTTACCTACAGCGTG-3'	(AG) <sub>20</sub>	135	50.0

表 3 龙须草的微卫星标记

Table 3 Microsatellites markers selected for *Eualiopsis binata*

引物名称 Primer name	重复序列 Repeat motif	实际长度/bp Actual size	退火温度/℃ Annealing temperature	每个位点的等位基因数(A) Number of alleles per locus	多态信息含量(PIC) Polymorphic information content
FIEb	(TAGC) <sub>5</sub>	413	50.0	9	0.848
EB92533a	(TC) <sub>20</sub>	426	51.4	14	0.912
EB92533b	(TC) <sub>12</sub>	195	51.9	18	0.910
EB92541b	(TC) <sub>4</sub> (CT) <sub>3</sub> (TC) <sub>3</sub>	193	51.0	10	0.762
EB9252a	(AG) <sub>31</sub>	400	52.3	34	0.953
EB9252b	(CT) <sub>15</sub>	111	49.5	21	0.937
EBEMF	(GA) <sub>8</sub>	458	49.4	11	0.848
EB81939	(TC) <sub>19</sub>	124	51.4	6	0.806

从用磁珠富集法构建的龙须草微卫星文库中筛选出稳定性好、条带清晰且有差异扩增的 8 对引物(表 3)。在 11 个居群中共检测出 123 个等位基因变异,每对引物可以检测到 6~34 个等位基因,平均每个位点为 15.375 个等位基因。

### 2.2 龙须草不同居群的遗传多样性分析

根据 SSR 数据矩阵,按照 UPGMA 对 11 个居群进行聚类分析(图 2),结果显示各居群间遗传相似性系数在 0.70~0.97 之间,选取 0.80 为阈值,11 个居群大体上可分为 4 个类群,其中第 I 类群、第 II 类群、第 IV 类群都只包括 1 个居群,分别是星子、百色、洋县居群;第 III 类群包括 8 个居群,可以分为 2 个亚群,浙川、丹江、郧县、衡阳、郧西居群;第二亚

群为内乡、西峡、山阳居群。

### 2.3 龙须草 11 个居群中 71 个单株的聚类分析

利用 UPGMA,根据 SSR 数据矩阵对 71 个龙须草单株进行聚类分析(图 3)。从图 3 可看出,各单株间遗传相似性系数为 0.65~1.00。选取 0.71 为阈值,71 个单株大体上可分为 3 个群,其中第 I 群全部为星子居群的单株;第 II 群可以分为 2 个亚群,第 1 亚群以洋县居群的单株为主,另外还有 3 个星子居群的单株,星子 14、星子 18、星子 19;第 2 亚群包括山阳和浙川居群的单株,除此之外还有洋县 9;第 III 类群可以分为 2 个亚群,第 1 亚群包括衡阳、内乡、西峡、郧西、丹江、郧县居群的单株;第 2 亚群

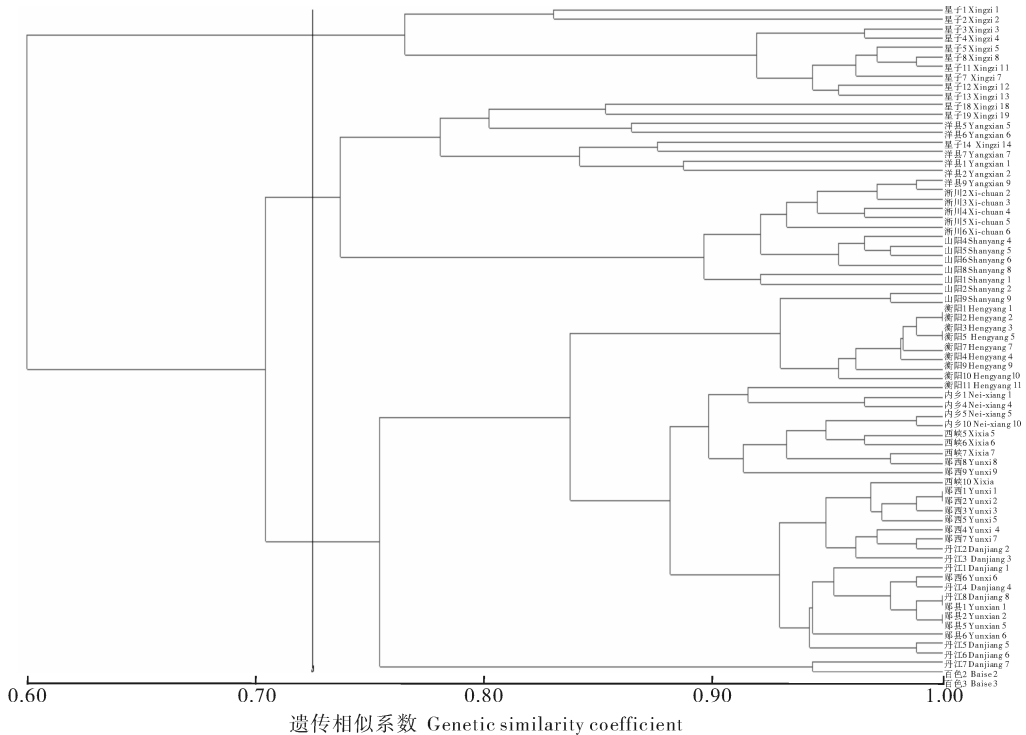


图 3 71 个龙须草单株的 SSR 聚类树状图

Fig. 3 Dendrogram by cluster analysis based on SSR genetic similarity of 71 *Eualiopsis binata* lines

包括百色居群的单株。各个单株的聚类分析与居群的聚类分析基本一致,但星子居群的 3 个单株被聚类到洋县的群中,洋县居群的 1 个单株(单株号为 9)聚在山阳和浙川居群所在的群中,表明这些单株与其居群内其他单株间的遗传距离远于居群间,可能暗示其生殖方式的差异。

### 3 讨 论

Kandpal 等<sup>[14]</sup>提出了磁珠富集法,由于磁珠富集后克隆测序量大幅下降,因而能够提高富集微卫星 DNA 的效率,而且所开发的引物都是目标物种的特异引物。因此,磁珠富集法在筛选物种的微卫星引物中得到广泛应用。邓欣等<sup>[15]</sup>采用磁珠富集法分离亚麻基因组 SSR 引物,微卫星序列的富集效率达到 22.99%,引物开发效率为 33.3%。陈焯焯<sup>[16]</sup>采用磁珠富集法对银杏的微卫星序列进行开发,引物开发效率为 22%。本研究用磁珠富集法构建龙须草微卫星文库,其中 27 对 SSR 引物成功扩增出多态性条带,引物的有效开发效率为 38.5%。进一步证明磁珠富集法是一种高效简便地筛选物种特异微卫星的方法。

在龙须草的遗传多样性分析中,姚家玲等<sup>[8]</sup>通过 AFLP 分子标记技术、叶片纤维素含量测定和形态学观察等方法,将 9 个龙须草居群聚为 4 种类型。刘传虎等<sup>[7]</sup>用 RAPD 分子标记把 5 个省的 12 个龙须草居群划分成 4 种类型:将河南、湖北、陕西等 9 个居群划为一个类型,而将广东星子、陕西洋县、广西百色居群分别划为一个类型。本研究从 27 对具有稳定扩增多态性的引物中选用 8 对有扩增差异性的引物,并利用这 8 对引物对 11 个龙须草居群和 71 个龙须草单株进行了遗传多样性分析。聚类分析的结果显示这 11 个居群也被分为 4 个群,其中来自浙川、丹江、郧县、衡阳、郧西、内乡、西峡、山阳居群划分在一个群内,而将来自星子、百色、洋县居群分别划为一个群,与姚家玲等<sup>[8]</sup>和刘传虎等<sup>[7]</sup>进行聚类分析的结果是一致的。该结果为供试龙须草居群间的遗传多样性以及类型划分提供了进一步的分子标记证据。但利用 SSR 分子标记对 11 个居群中不同单株进行分析,虽然在大多数居群内,各个单株聚类在同一个群中,但星子居群、洋县居群内的少数单株却聚在其他居群的群内,显示其与所在居群其他单株之间存在较大的遗传差异。刘丽等<sup>[11]</sup>利用筛选得到的龙须草 SSR 多态性引物对来自星子和

衡阳居群的正反交 F1 代的 12 个单株进行检测,鉴别出子代中与母本带型完全一致的无融合生殖后代占 58%,但以星子居群 3 个单株为母本的子代却具有双亲带型,表明这 3 个单株具有较高的有性生殖能力。本研究对同一居群不同单株之间遗传差异的 SSR 分析,不仅为我们确证星子居群的几个单株可能为有性生殖提供了进一步的实验证据,而且为我们寻找其他生殖方式的单株提供了有用的线索。

关于无融合生殖植物种内遗传多样性产生的机制,Maki 等<sup>[17]</sup>认为可能来自种群的多起源。我国龙须草主要分布在陕西汉中、安康地区,湖北西北部的十堰地区,河南南阳地区,湖南西南部,广西西北部以及广东连洲地区等<sup>[18]</sup>。从其主要分布区来看,龙须草可能也是多个不同的基因型个体建立起来的,因而能够保持一定的遗传差异。虽然在龙须草中尚未发现有性生殖的居群,但已研究过的居群多为兼性无融合生殖类型,即保留了部分有性生殖能力,近期我们在兼性无融合生殖龙须草居群内发现了少数有性生殖程度较高的单株(未发表的数据),可能是龙须草遗传多样性产生和维持的原因之一。Silander<sup>[19]</sup>提出,兼性无融合生殖植物存在有性重组的机会,提供了可供自然选择的遗传变异,产生新的有利基因型可以通过无融合生殖迅速占领某个地区,从而补充了因无融合生殖而降低的遗传多样性,以提高居群间的遗传变异水平。

### 参 考 文 献

- [1] KOLTUNOW A M, JOHNSON S D, BICKNELL R A. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilization[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108:1345-1352.
- [2] SPILLANE C, CURTIS M D, GROSSNIKLAS U. Apomixis technology development- virgin births in farmers fields[J]. *Nat Biotechnol*, 2004, 22:687-691.
- [3] OZIAS-AKINS P. Apomixis: developmental characteristics and genetics[J]. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2006, 25:199-214.
- [4] YAO J L, YANG P F, HU C G, et al. Embryological evidence of apomixis in *Eulaliopsis binata* [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2004, 46:86-92.
- [5] YAO J L, ZHOU Y, HU C G. Apomixis in *Eulaliopsis binata*: characterization of reproductive mode and endosperm development[J]. *Sex Plant Reprod*, 2007, 20:151-158.
- [6] 刘传虎, 张秋平, 姚家玲, 等. 龙须草核型分析和花粉母细胞减数分裂的细胞学研究[J]. *中国农业科学*, 2007, 40(1):27-33.
- [7] 刘传虎, 周兆喜, 周云, 等. 不同居群龙须草 RAPD 分析及其分

- 类研究[J]. 西北植物学报, 2006, 26: 915-920.
- [8] 姚家玲, 洪柳, 张友德, 等. 龙须草生态型的划分及其遗传差异的 AFLP 分析[J]. 中国农业科学, 2004, 37: 1699-1704.
- [9] LIAN C L, OISHI R, MIYASHITA N Y, et al. High somatic instability of a microsatellite locus in a clonal tree, *Robinia pseudoacacia* [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 836-841.
- [10] 程运江. 柑橘体细胞胞质遗传及叶绿体 SSR 引物开发[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(6): 780-783.
- [11] 刘丽, 张金智, 梅丽, 等. 兼性无融合生殖龙须草 SSR 引物开发及杂交后代的检测[J]. 西北植物学报, 2008, 28(10): 1947-1953.
- [12] SAGHAI-MAROOF M A, BIYASHEV R M, YANG G P, et al. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal location and population dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 5466-5470.
- [13] ROHLF F J. NTSYS-P C numerical taxonomy and multivariate analysis systems, version 2. 02. setauket[M]. New York: Exeter Publishing, 1997.
- [14] KANDPAL R P, KANDPAL G, WEISSMAN S M. Construction of libraries enriched for sequence repeats and jumping clones, and hybridization selection for region specific markers [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 88-92.
- [15] 邓欣, 陈信波, 龙松华, 等. 用磁珠富集法分离亚麻基因组卫星分子标记[J]. 作物学报, 2008, 34(12): 2099-2105.
- [16] 陈焯焯. 银杏微卫星文库的构建和遗传多样性分析[D]. 杭州: 浙江大学图书馆, 2008.
- [17] MAKI M, MORITA H, OIKI S. The effect of geographic range and dichogamy on genetic variability and population genetic structure in *Tricyrtis* section *Flavae* (Liliaceae) [J]. American Journal of Botany, 1999, 86: 287-292.
- [18] 刘亮. 论禾本科黍亚科的系统分类与演化[J]. 植物分类学报, 1988, 26(1): 11-28.
- [19] SILANDER J A. Micro-evolution and clone structure in spartina-patens[J]. Science, 1979, 203: 658-660.

## Analyzing the genetic diversity of apomictic *Eulaliopsis binata* with SSR markers

LI Rong YAO Jia-ling

College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

**Abstract** *Eulaliopsis binata*, a newly found apomictic species belonging to Poaceae, was proven to have diverse degree of apomixis among populations as well as individual. A microsatellite-enriched library was constructed by capture with streptavidin coated-beads magnetic beads adsorption. Twentyseven pairs of polymorphic SSR primer were developed. Genetic diversities of 11 populations and 71 individuals of *E. binata* were analyzed by 8 SSR primers producing 123 alleles. Each SSR marker amplified 6-34 polymorphic fragments. The eleven populations of *E. binata* had a genetic similarity coefficients ranging from 0.70 to 0.97 and could be classified into 4 clusters, indicating the most populations of *E. binata* had high similarity consistent with its apomictic reproduction mode. By UPGMA analysis, 71 *E. binata* individuals could be classified into 3 groups consistent with results of population classification. However, three individuals from Xingzi population and one individual from Yangxian population were deviated from their own clusters of population respectively and nested in a different location, indicating that the genetic diversity was appeared in different individual of same population and the genetic difference may be reflected the varying degrees of apomixis of plant.

**Key words** apomixis; *Eulaliopsis binata*; SSR; genetic diversity; streptavidin magnetic beads adsorption; UPGMA cluster analysis

(责任编辑: 张志钰)