

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2010.00202

云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建

刘新龙^{1,2} 马丽^{1,2} 陈学宽^{1,2} 应雄美^{1,2} 蔡青^{1,3} 刘家勇^{1,2}
吴才文^{1,2,*}

¹ 云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 云南开远 661600; ² 云南省农业科学院甘蔗研究所, 云南开远 661600; ³ 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南昆明 650223

摘要: 以云南 27 份甘蔗自育品种为材料, 从国际微卫星协会提供的 120 对 SSR 引物中筛选出 8 对多态性丰富、品种聚类区分率高、易统计的引物组成核心引物。8 对 SSR 引物共产生 129 条带, 123 个为多态带, 多态条带比例为 95.35%, 多态信息量平均为 0.9445, 品种相似性系数在 0.269~0.767 之间, 其中引物 SMC1047HA, MSSCIR21 不仅多态性丰富, 而且单个引物就可区分所有品种, 是最有效的核心引物。8 对核心引物两两组合的效率分析表明, MSSCIR36/MSSCIR2、MSSCIR16/MSSCIR36 和 MSSCIR36/SMC336BS 是高效引物组合, 可以完全有效区分所有品种, 且品种相似性系数较低; 同时使用蔗区种植面积较大的 10 个主栽品种验证 3 个高效引物组合, 结果表明, MSSCIR16/MSSCIR36 是最佳引物组合, 不仅能有效区分所有云南甘蔗自育品种, 而且能将云南甘蔗自育品种与 10 个主栽品种最有效地区分开。使用品种的国圃号、国家地区代码、育种单位英文缩写、核心引物名称和分子数据组成云南甘蔗自育品种的 DNA 指纹身份证, 不仅包含了品种的重要信息, 而且其中的分子数据可用于品种的真伪鉴定和遗传关系分析, 为品种的知识产权保护提供有效的科学依据。

关键词: 云南甘蔗品种; SSR; DNA; 指纹; 身份证

Establishment of DNA Fingerprint ID in Sugarcane Cultivars in Yunnan, China

LIU Xin-Long^{1,2}, MA Li^{1,2}, CHEN Xue-Kuan^{1,2}, YING Xiong-Mei^{1,2}, CAI Qing^{1,3}, LIU Jia-Yong^{1,2}, and WU Cai-Wen^{1,2,*}

¹ Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan 661600, China; ² Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 661600, China; ³ Biotechnology & Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China

Abstract: To well evaluate and use the cultivars, we should identify them scientifically and accurately by DNA molecular markers. In this paper, 27 cultivars developed by two breeding institutes in Yunnan province were analyzed with SSR marker. Eight pairs of core SSR primers selected from about 120 pairs of SSR primers offered by the International Sugarcane Microsatellite Consortium made up the core primers for DNA fingerprint. A total of 129 bands were acquired by PAGE with the core primers, 123 of which were polymorphic bands, accounting for percentage of polymorphic band (PPB) was 95.35%, and the mean value of polymorphism information content (PIC) reached 0.9445; the genetic similarity coefficient of the cultivars was 0.269–0.767. SMC1047HA and MSSCIR21 with high PIC value could be used to distinguish all cultivars, which were the most efficient single primers. The result of evaluating different primer combinations from eight core primers indicated that MSSCIR36/MSSCIR21, MSSCIR16/MSSCIR36, and MSSCIR36/SMC336BS were very efficient in identifying these Yunnan cultivars, and their similar coefficients were lower than those of other primer combinations. At the same time, three primer combinations were validated with ten main released cultivars. The result showed MSSCIR16/MSSCIR36 was the optimum primer combination, which can be used in constructing DNA fingerprint ID of cultivars. The DNA fingerprint ID was set up, including serial number of National Nursery of Sugarcane Germplasm Resources (NNSGR), country & region code, breeding institute, core primer name and SSR marker data,

本研究由国家科技支撑计划(2007BAD30B02), 现代农业产业技术体系建设专项资金(nycytx-024-01-03), 国家科技基础条件平台工作项目子专题(2007DKA21002-11)和农业部农林动植物育种工程(2006BAD01A06-4-1)项目资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 吴才文, E-mail: gksky_wcw@163.com

第一作者联系方式: E-mail: lxlgood868@163.com

Received(收稿日期): 2009-07-03; Accepted(接受日期): 2009-09-08.

which not only consists of the important information of cultivars, but also helps researchers to identify cultivars efficiently. At the same time, it can provide reliable scientific evidence for the protection of intellectual property right for these cultivars.

Keywords: Yunnan sugarcane cultivar; SSR; DNA; Fingerprint; ID

我国甘蔗品种选育始于 20 世纪 50 年代, 至“十五”期间, 已育成近 200 个甘蔗新品种, 其中以“九五”和“十五”期间发展最快, 通过省级以上审定的品种就有 50 个^[1-2]。随着新育品种的不断增多, 骨干亲本的重复使用, 新基因资源的缺乏, 新育成品种的鉴定难度逐渐加大; 加之蔗区间引种缺乏有效科学的管理和途径, 一些单位受商业利益的驱动掩盖或篡改品种名称, 导致一些品种名称出现混乱, 仅靠表型性状已难于准确区分, 因此建立一套客观、可靠、易操作的鉴别技术对品种的鉴定和知识产权保护具有重要意义。DNA 标记技术的发展和检测技术的日趋完善, 使从 DNA 层次上对品种进行快速、准确、不受环境条件影响的鉴定成为可能^[3]。目前, 国际植物新品种保护联盟(UPOV)已将 DNA 标记的鉴定纳入农作物品种 DUS 测试内容, 我国也将 DNA 水平鉴定作为品种质量监控的重要措施, 为品种保护提供理论基础和法律依据^[4]。在众多 DNA 标记技术中, 前人的研究表明, SSR 指纹技术是目前用于种子纯度和品种真实性鉴定的最适宜技术, 其优点是简便快速、稳定性高、重复性好、费用相对低廉及多态性丰富^[5-6]。目前水稻^[7-9]、玉米^[10,11-13]、小麦^[4,14]、大豆^[3]、油菜^[15-16]等农作物部分品种的 SSR 指纹图谱已相继完成, 为品种的鉴定和知识产权保护提供了有力的保障。在甘蔗品种方面, 2003 年美国农业部 Pan 等^[17]使用 3 个 SSR 引物构建了 Florida 甘蔗育种场 25 个甘蔗商业品种的分子指纹图谱, 通过与 RAPD 标记的比较, 认为 SSR 标记比 RAPD 标记更准确, 多态性信息量更大, 更能准确鉴定不同商业品种, 并于 2007 年使用 21 对 SSR 引物建立了 Louisiana 116 个商业品种的分子指纹数据^[18]。2004 年澳大利亚 BSES 育种公司利用 SSR 标记建立了 180 个甘蔗品种的分子指纹图谱数据, 为澳大利亚甘蔗品种提供了有效的鉴定方法^[19]。国内游建华等^[20]、劳方业等^[21]、庄南生等^[22]和李鸣等^[23]虽使用 AFLP 和 SSR 标记对广西主栽甘蔗品种、崖城系列甘蔗亲本品系及甘蔗种质开展了遗传多样性研究, 探讨了上述种质之间的遗传关系, 但对于甘蔗品种的分子身份证研究还未真正开展起来。本研究拟选用云南甘蔗育种单位自育的 27 份甘蔗品种, 建立其 SSR 分

子指纹身份证, 为品种在分子水平上的鉴定和知识产权保护提供可靠科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

27 份甘蔗良种(表 1)中 19 个品种通过国家、省级审定, 8 个品种进入国家或云南省甘蔗品种区试, 有希望在“十一五”期间通过省级以上审定。同时选取 10 个中国蔗区主栽品种(不包括云南甘蔗自育品种)来检验核心引物组合效率。所有品种叶片组织由国家甘蔗种质资源开远圃(National Nursery of Sugarcane Germplasm Resources, NNSGR)和云南省农科院甘蔗研究所(Yunnan Sugarcane Research Institute, YSRI)提供。

1.2 叶片基因组 DNA 提取与 SSR 分析

参照蔡青等^[24]方法并略加改进提取品种叶片基因组 DNA, 对每个品种采集 10 个无性系单株新叶, 混合后并迅速剪碎并在 -20℃ 冰箱中冷冻, 于次日加入预冷的 CTAB 抽提液在 RECH Mix Mills301 DNA 研磨机上研磨成浆, 其他步骤同常规 CTAB 法。参照 Karen 等^[25]方法进行 SSR 反应及 PCR 扩增。扩增产物经 95℃ 变性后在 5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。采用刘新龙等^[26]建立的快速银染法染色。

1.3 数据统计分析

采用人工读带的方式, 每对 SSR 引物检测 1 个位点, 在相同迁移位置上, 有带记为 1, 无带记为 0, 每条带相当 1 个等位基因建立 0-1 矩阵。使用标记位点的多态性条带比率(percentage of polymorphic bands, PPB), Jaccard (1908)遗传相似性(genetic similarity, GS)、多态信息量(polymorphism information content, PIC)、品种聚类区分率(rate of distinguishing cultivars by cluster, RDCC)鉴别引物, 其中 $PPB = a/(a+b)$, $GS_{ij} = a/(a+b+c)$, a 为两个个体的共享片段数, b 和 c 为 i 个体和 j 个体各自拥有的多态片段数; $PIC = 1 - \sum P_i^2$, P_i 为第 i 个位点的基因型频率^[27], $RDVC = (N - N_i)/N$, N_i 为无法区分品种数, N 为品种总数。遗传相似性与 UPGMA (unweighted pair group method analysis)聚类分析通过 NTSYSpc2.1 软件实现。

表 1 品种名称及来源
Table 1 Name and origin of cultivars

No.	品种名称 Cultivar name	国圃号 Serial No. of NNSGR	品种审定级别 Level of cultivar certification	育成单位 Breeding institute
1	云蔗 64-24 Yunzhe 64-24	CH1257	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
2	云蔗 65-55 Yunzhe 65-55	CH0553	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
3	云蔗 5-225 Yunzhe 65-225	CH0569	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
4	云蔗 68-154 Yunzhe 68-154	CH0542	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
5	云蔗 71-95 Yunzhe 71-95	CH0577	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
6	云蔗 71-545 Yunzhe 71-95	CH0556	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
7	云蔗 71-388 Yunzhe 71-388	CH0570	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
8	云蔗 71-998 Yunzhe 71-998	CH0564	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
9	云蔗 81-173 Yunzhe 81-173	CH0571	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
10	云辐 82-682 Yunzhe 82-682	CH0539	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
11	云辐 84-Fb5 Yunzhe 84-Fb5	CH0535	国家级 State level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
12	云蔗 89-7 Yunzhe 89-7	CH0816	国家级 State level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
13	云蔗 89-151 Yunzhe 89-151	CH0811	国家级 State level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
14	云蔗 89-351 Yunzhe 89-351	CH0814	国家级 State level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
15	云蔗 92-19 Yunzhe 92-19	CH1119	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
16	德蔗 93-88 Dezhe 93-88	CH1206	省级 Province level	云南省德宏州甘蔗科学研究所 DHSRI
17	云蔗 94-375 Yunzhe 92-19	CH1123	国家级 State level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
18	云蔗 98-46 Yunzhe 98-46	待编 No number	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
19	云蔗 99-91 Yunzhe 99-91	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
20	云蔗 99-155 Yunzhe 99-155	CH1200	省级 Province level	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
21	云蔗 99-596 Yunzhe 99-596	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
22	云蔗 99-601 Yunzhe 99-601	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
23	云蔗 02-2332 Yunzhe 02-2332	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
24	云蔗 03-194 Yunzhe 03-194	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
25	云蔗 03-103 Yunzhe 03-103	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
26	云蔗 03-332 Yunzhe 03-332	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
27	云蔗 03-258 Yunzhe 03-258	待编 No number	未审定 No certification	云南省农科院甘蔗研究所 YSRI
28	新台糖 16 ROC16	CH1001	国家级 State level	台湾糖业研究所 TSRI
29	新台糖 25 ROC25	CH1022	省级 Province level	台湾糖业研究所 TSRI
30	新台糖 10 ROC10	CH0473	省级 Province level	台湾糖业研究所 TSRI
31	新台糖 22 ROC22	CH1002	国家级 State level	台湾糖业研究所 TSRI
32	新台糖 20 ROC20	CH1005	省级 Province level	台湾糖业研究所 TSRI
33	桂糖 11 Guitang 11	CH0497	国家级 State level	广西甘蔗研究所 GSRI
34	桂糖 17 Guitang 17	CH1097	国家级 State level	广西甘蔗研究所 GSRI
35	粤糖 86-368 Yuetang 86-368	CH1113	国家级 State level	广州甘蔗糖业研究所 GSIRI
36	粤糖 93-159 Yuetang 93-159	CH1126	省级 Province level	广州甘蔗糖业研究所 GSIRI
37	闽糖 69-421 Mintang 69-421	待编 No number	未审定 No certification	福建甘蔗研究所 FSRI

NNSGR: National Nursery of Sugarcane Germplasm Resources; YSRI: Yunnan Sugarcane Research Institute; DHSRI: Dehong Sugarcane Research Institute; TSRI: Taiwan Sugar Research Institute; GSRI: Guangxi Sugarcane Research Institute; GSIRI: Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute; FSRI: Fujian Sugarcane Research Institute.

1.4 PCR 产物片段大小估算

根据分子量 Marker 的片段大小的对数值与电泳迁移距离绘制出 DNA 分子量标准曲线图, 然后用直

尺量出每个扩增片段在胶板上的迁移距离, 依据 DNA 分子量标准曲线图计算出每个片段的分子量, 同时根据 0-1 矩阵绘制胶板图的标准曲线图。

2 结果与分析

2.1 核心引物区分效率分析

选择合适的引物是开展 DNA 指纹图谱研究的关键因素之一^[28]。DNA 指纹图谱核心引物应具备等位基因数量多、多态性丰富、品种区分率高、易统计和扩增条带稳定等条件。本研究先从国际微卫星协会提供的 120 对 SSR 引物中筛选出 27 对等位基因数量多、多态性比较丰富、扩增条带稳定的 SSR 引物, 然后再从中选出整体表现比较优异的 8 对 SSR 引物(表 2 和表 3)组成构建甘蔗 DNA 指纹身份证的核心引物, SSR 引物扩增胶板见图 1, 胶板的标准化图见图 2。8 对核心引物共获得 129 条带, 其中 123 个为多态带, 多态条带比例为 95.35%, 品种特异条带 7 个(某一品种独有带), 品种最大相似性系数为 0.767, 可完全有效区分所有云南甘蔗自育品种。品种最大相似性系数越高, 品种聚类区分率越低, 表明引物区分效率越低。从单对引物来看, MSSCIR21 的品种最大相似性系数最低, 为 0.833, 聚类区分率为 100%, 可以完全区分所有云南甘蔗自育品种, 是最有效的核心引物, 其次为 SMC1047HA; 而 SMC21SA 的品种最大相似性系数为 1.000, 品种聚类区分率为

74%, 两项指标都最低, 为区分效率最差的核心引物。

2.2 核心引物组合效率分析

虽然部分单对核心引物能够完全区分所有云南甘蔗自育品种, 但品种最大相似性系数达到了 0.833, 随着以后自育品种数量的增多, 单个引物的区分效率将会明显下降, 因此有必要使用多对引物进行鉴定。为了选出有效的引物组合, 将 8 对引物进行两两组合, 从表 4 可以看出, 28 个组合中 26 个组合可以将品种完全区分开, 引物组合 MSSCIR26/SMC336BS, SMC21SA/MSSCIR66 品种最大相似性系数为 1.000, 品种聚类区分率为 93%, 有两个品种无法区分, 因此属于低效的引物组合; 而引物组合 MSSCIR36/MSSCIR21 是最有效的, 品种最大相似性系数为 0.773, 最低, 品种聚类区分率为 100%; 其次为 MSSCIR16/MSSCIR36, 第 3 为 MSSCIR36/SMC336BS。整体来看引物 MSSCIR36 是比较有效的组合引物, 与其他引物组合具有很好的品种区分效果, 其次为 MSSCIR21、SMC336BS、MSSCIR16。由于仅用两对引物就可以将所有参试品种有效区分, 故选用双引物组合产生的分子数据用于云南自育品种的 DNA 指纹身份证构建。

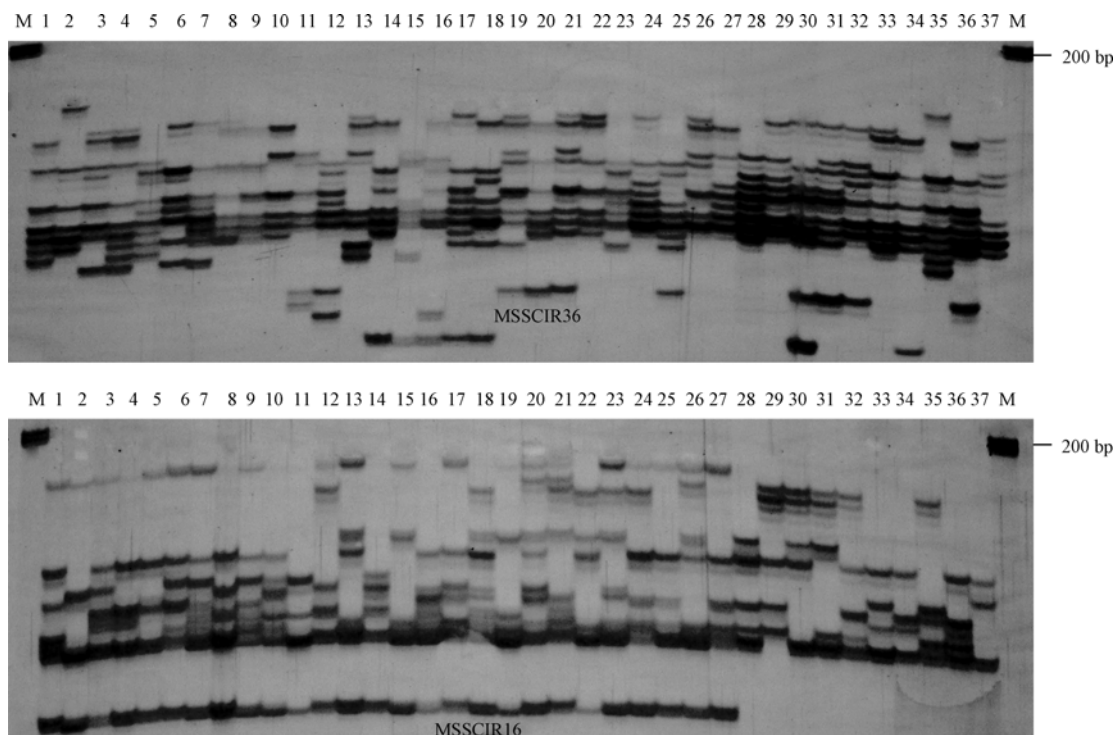


图 1 云南甘蔗自育品种的 SSR 扩增产物电泳图

Fig. 1 Gel map of SSR amplification of primer for Yunnan sugarcane cultivars

图中样品编号同表 1。The numbers for each lane correspond with the numbers for cultivar names listed in Table 1.

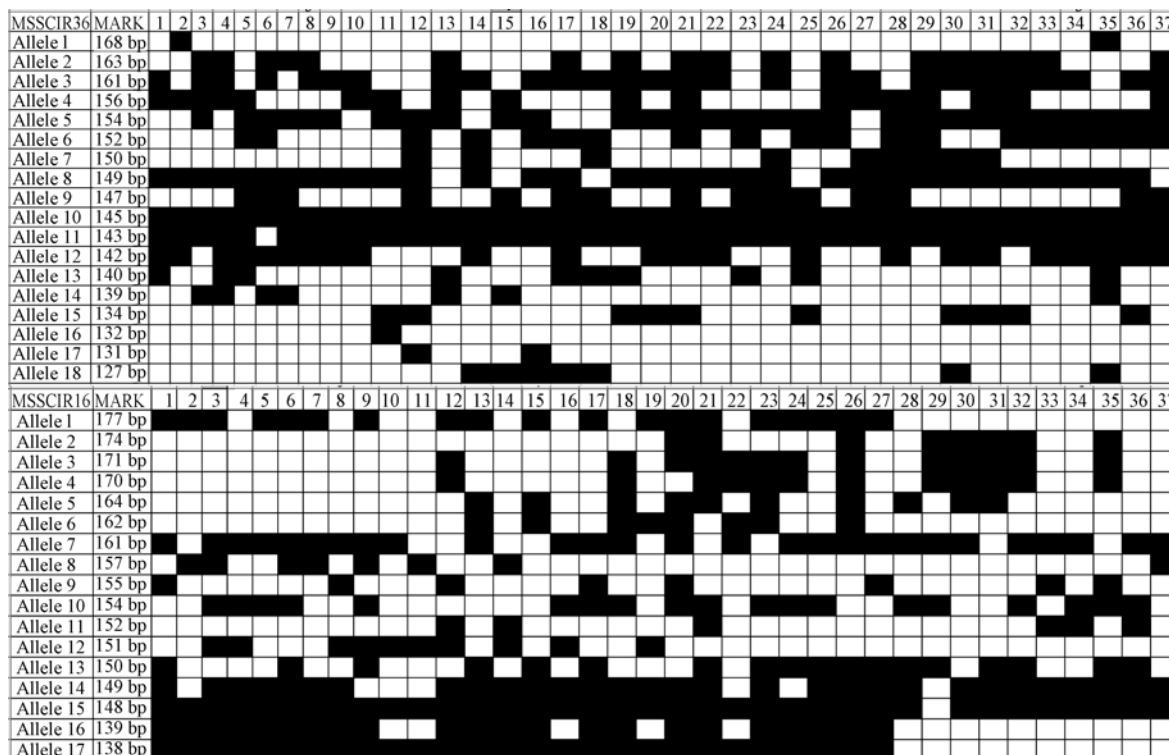


图 2 云南甘蔗自育品种的 SSR 扩增产物标准化图

Fig. 2 Standard map of SSR amplification for Yunnan sugarcane cultivars

图中样品编号同表 1。The numbers for each lane correspond with the numbers for cultivar names listed in Table 1.

表 2 核心 SSR 引物序列

Table 2 Core SSR primers sequences

引物名称 SSR primer	重复单位 Repeat unit	上游引物 (5'-3') Forward primer sequence	下游引物 (3'-5') Reverse primer sequence	退火温度 Annealing temp.(°C)
SMC1047HA	(GA) ₂₆	TGAGCCTAAGCCAGAAAGAAG	GGAAC TAATTCTACGAGAACAC	50
MSSCIR21	(GA) ₂ GG(GA) ₂₃	CGCCAGCCACATAAAAAGG	CGACCAGGAGTTCATCAA	54
MSSCIR16	(GA) ₁₈	TGGGGAGGGCTGACTAGA	GGCGGTATATATGCTGTG	54
MSSCIR36	(GA) ₁₈ GT(GA) ₄	CAACAATAACTTAAGTGGTA	CTGTCCTTTTATTCTCTTT	54
SMC336BS	(TG) ₂₃ (AG) ₁₉	ATTCTAGTGCCAATCCATCTCA	CATGCCAACTTCCAAACAGAC	50
MSSCIR26	(GA) ₁₇	AAAATCAGACAAACAGCAT	AGAAGAAGCAGATACAGGT	54
MSSCIR66	(GT) ₄₃ GC(GT) ₆	AGGTGATTTAGCAGCATA	CACAAATAAACCCAATGA	54
SMC21SA	(GA) ₁₉	CGTGAGCTTGGGTAGCTG	AAACATTCCCATTTGCTATC	50

表 3 核心引物效率情况

Table 3 Efficiency of core primers

核心引物 Core primer	总带数 Total band	多态带 PB	多态条带比例 PPB	特异条带 Specific band	多态信息量 PIC	品种最大相似性系数 The biggest GS between cultivars	品种聚类区分率 RDVC (%)
SMC1047HA	20	19	95.00	2	0.9630	0.900	100
MSSCIR21	20	19	95.00	0	0.9630	0.833	100
MSSCIR16	17	15	88.24	0	0.9602	1.000	93
MSSCIR36	18	17	94.44	2	0.9602	1.000	93
SMC336BS	13	13	100.00	0	0.9465	1.000	85
MSSCIR26	13	12	92.31	2	0.9355	1.000	81
MSSCIR66	14	14	100.00	0	0.9218	1.000	78
SMC21SA	14	14	100.00	1	0.9054	1.000	74
合计 Total	129	123	95.35	7	0.9445	0.767	100

PB: polymorphic band; PPB: percentage of polymorphic bands; PIC: polymorphism information content; GS: genetic similarity; RDVC: rate of distinguishing cultivars by cluster.

表 4 核心引物组合效率
Table 4 Efficiency of core primer combination

引物组合 Primer combination	总带数 Total band	多态带 PB	多态条带比例 PPB	特异条带 Specific band	品种最大相似性系数 The biggest GS between cultivars	品种聚类区分率 RDVC (%)
MSSCIR36/MSSCIR21	38	36	94.74	2	0.773	100
MSSCIR16/MSSCIR36	35	32	91.43	2	0.778	100
MSSCIR36/SMC336BS	31	30	96.77	2	0.786	100
SMC1047HA/MSSCIR36	38	36	94.74	4	0.800	100
MSSCIR21/MSSCIR66	34	33	97.06	0	0.800	100
MSSCIR36/MSSCIR66	32	31	96.88	2	0.800	100
SMC21SA/SMC336BS	27	27	100.00	1	0.800	100
MSSCIR16/MSSCIR21	37	34	91.89	0	0.810	100
MSSCIR26/MSSCIR36	31	29	93.55	4	0.813	100
MSSCIR26/MSSCIR66	27	26	96.30	2	0.824	100
SMC21SA/MSSCIR21	34	33	97.06	1	0.833	100
SMC1047HA/MSSCIR66	34	33	97.06	2	0.842	100
MSSCIR16/SMC336BS	30	28	93.33	0	0.846	100
MSSCIR16/SMC21SA	31	29	93.55	1	0.850	100
SMC1047HA/MSSCIR21	40	38	95.00	2	0.864	100
MSSCIR26/SMC21SA	27	26	96.30	3	0.875	100
SMC21SA/MSSCIR36	32	31	96.88	3	0.875	100
SMC336BS/MSSCIR21	33	32	96.97	0	0.875	100
MSSCIR16/SMC1047HA	37	34	91.89	2	0.875	100
MSSCIR26/MSSCIR21	33	31	93.94	2	0.889	100
MSSCIR16/MSSCIR26	30	27	90.00	2	0.889	100
SMC336BS/MSSCIR66	27	27	100.00	0	0.909	100
MSSCIR16/MSSCIR66	31	29	93.55	0	0.923	100
SMC1047HA/SMC21SA	34	33	97.06	3	0.929	100
SMC1047HA/SMC336BS	33	32	96.97	2	0.929	100
MSSCIR26/SMC1047HA	33	31	93.94	4	0.938	100
MSSCIR26/SMC336BS	26	25	96.15	2	1.000	93
SMC21SA/MSSCIR66	28	28	100.00	1	1.000	93

PB: polymorphic band; PPB: percentage of polymorphic bands; PIC: polymorphism information content; GS: genetic similarity; RDVC: rate of distinguishing cultivars by cluster.

2.3 高效引物组合检验

为了增加所构建分子指纹身份证的实用性, 选取中国蔗区种植面积较大的 10 个主栽品种(不包括云南甘蔗自育品种)与 27 份云南甘蔗自育品种进行相似性和聚类分析, 来检验排名前 3 的引物组合效率(表 5)。评价结果表明, 3 个引物组合对 37 份品种的聚类区分率都为 100%, 都能有效地区分所有参试品种。从 37 份品种最大相似性系数来看, 引物组合 MSSCIR36/MSSCIR21 的最大, 为 0.882, 品种聚类关系表现为云蔗 71-998 与桂 11 最为相似, 为 0.882, 其次为云蔗 65-225 与云蔗 68-154, 为 0.773; 引物组合 MSSCIR16/MSSCIR36、MSSCIR36/SMC336 的品

种最大相似性系数都为 0.800, 从表面来看两个引物组合效率相当, 但从不同引物组合得到的品种聚类关系来看 MSSCIR16/MSSCIR36 的综合区分效率最好, 可作为构建云南甘蔗自育品种分子指纹身份证的最佳引物组合, 因为 MSSCIR16/MSSCIR36 表现出的品种聚类关系中以主栽品种之间最为相似, 如桂 17 与粤糖 93-159 最为相似, 为 0.800, 其次为 ROC22 与 ROC10 为 0.789, 第 3 为云蔗 71-95 与云蔗 03-103, 为 0.778, 与主栽品种最为相似的云南甘蔗自育品种为云蔗 99-596, 为 0.667, 所以在保证能有效区分云南甘蔗自育品种时, 还能十分有效地区分云南甘蔗自育品种和主栽品种; 而 MSSCIR36/

SMC336 表现为云蔗 8-173 与桂 17 最为相似, 为 0.800, 其次为云蔗 65-225 与云蔗 68-154, 为 0.786, 效率不如 MSSCIR16×MSSCIR36。

2.4 DNA 指纹数据库建立

为进一步提高 DNA 指纹身份证的实用性和参考价值, 品种 DNA 指纹代码不仅包含分子数据, 还应纳入品种的重要信息。故选用 5 组代码组成品种 DNA 指纹身份证, 第 1 组为国圃号, 即该品种全国唯一代码, 参见国家甘蔗种质资源圃标准化数据库; 第 2 组为品种育成国家地区, 相应编号参照《现代甘蔗育种的理论与实践》附录 II 品种系列名称对照表^[2]; 第 3 组为品种育成单位, 为育种单位的英文缩写; 第 4 组为核心引物名称; 第 5 组为 SSR 分子标记数据。这里仅列举了 6 个品种的指纹数据作为示范(表 6), 通过这些信息, 研究者可以十分方便地获取品种的有关数据, 用于品种区分鉴定工作。

3 讨论

3.1 核心引物的选择和评价

核心引物的筛选和确定是 DNA 指纹图谱构建的重要步骤^[10], 其中标记引物的选择和核心引物的确定是最关键的两个因素。SSR 标记由于其操作简单快速、实验重复性高、多态信息丰富及费用相对低廉, 目前已成为各大作物 DNA 指纹图谱构建的首选标记, 并得到广泛应用^[5-6]。对于确定核心引

物的参考标准, 二倍体作物由于其基因型相对简单和等位基因频率容易计算, 因此选用多态信息量或多样性指数、有效等位基因数、多态条带比例作为确定核心引物的参考标准^[11-16], 可以看出以上指标的选择主要是从引物的多态性角度考虑, 对单对引物或引物组合的实际鉴别效率考虑较少。鉴于此本研究在选择多态信息量、多态条带比例的同时, 新增品种最大相似性系数、品种聚类区分率两项指标用于评价引物的鉴别效率。同时为了方便标记数据的收集和准确度的把握, 应尽量选择胶板清晰度高、易于统计的 SSR 引物。核心引物确定后, 引物的组合方式评价成为下一个关键问题, 研究表明简单地将多态性最高、区分率最强的引物组合在一起, 并不是最有效的引物组合, 还应对引物的不同组合进行科学评价。笔者建议先对引物两两组合进行效率评价, 如果两个引物组合不足以有效区分所有品种, 可增加引物数量, 对 3 对引物、4 对引物或 5 对引物等组合方式进行评价, 选出区分效率较高的引物组合, 同时使用生产上的主栽品种对评价出的高效引物组合进行效率检验, 最终确定用于 DNA 指纹分子身份证构建的最佳引物组合。本研究通过对核心引物两两组合的效率评价表明引物 MSSCIR16 和 MSSCIR36 为最佳组合, 因此最后选定 MSSCIR16 和 MSSCIR36 作为云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建的关键核心引物。

表 5 高效引物组合效率检验
Table 5 Efficiency analysis of the best primer combinations

引物组合 Primer combination	总带数 Total band	多态带 PB	多态条带比例 PPB	特异条带 Specific band	品种最大相似性系数 The biggest GS between cultivars	品种聚类区分率 RDVC (%)
MSSCIR16/MSSCIR36	35	34	97.14	1	0.800	100
MSSCIR36/SMC336BS	31	30	96.77	1	0.800	100
MSSCIR36/MSSCIR21	38	36	97.37	1	0.882	100

PB: polymorphic band; PPB: percentage of polymorphic bands; PIC: polymorphism information content; GS: genetic similarity; RDVC: rate of distinguishing cultivars by cluster.

表 6 6 个品种的 DNA 指纹 ID
Table 6 DNA fingerprint ID of six cultivars

品种名称 Cultivar name	国圃号+国家地区+育成单位+核心引物名称+SSR 数据 Serial No. of NNSGR + country & region code + breeding unit + core primer name + SSR marker data
云蔗 68-154 Yunzhe 68-154	CHO542-CYZ-YSRI-MSSCIR36-011100010111110000-MSSCIR16-00000010010101111
云蔗 71-388 Yunzhe 71-388	CH0570-CYZ-YSRI-MSSCIR36-010010011111010000-MSSCIR16-10000011000001111
云辐 82-682 Yunzhe 82-682	CH0539-CYZ-YSRI-MSSCIR36-001100010111000000-MSSCIR16-00000010000100101
云蔗 89-7 Yunzhe 89-7	CH0816-CYZ-YSRI-MSSCIR36-00001111110001010-MSSCIR16-10110000101101111
云蔗 92-19 Yunzhe 92-19	CH1119-CYZ-YSRI-MSSCIR36-000110001110010001-MSSCIR16-10001100000011111
云蔗 94-375 Yunzhe 94-375	CH1123-CYZ-YSRI-MSSCIR36-011001011111100001-MSSCIR16-10000010110011111

3.2 DNA 指纹身份证构建方法

目前,我国作物品种资源的生产和经营还很不规范,品种引种混乱或品种造假的现象屡有发生,极大地损害了品种专利拥有者和广大农民的经济利益,因此开展作物品种资源鉴定显得尤为重要^[29]。传统的鉴定方法依据表型特征,虽然简单、经济、快速,但表型特征受环境影响大^[30],鉴别错误率较高,加之品种的相似度越来越高,导致鉴别越来越困难。由于 DNA 遗传物质受环境影响小、多态性高, DNA 技术已成为作物品种鉴定最有效的方法^[5-6]。目前大部分农作物的 SSR 指纹图谱或分子 ID 已相继构建^[7-16],但这些指纹图谱或分子 ID 还仅仅是对分子标记数据的数字化,包含的信息量有限。对于甘蔗品种,美国、澳大利亚等研究者使用毛细管电泳技术(CEQ)完成了部分品种的 SSR 指纹图谱研究,但该技术所用仪器设备昂贵及试剂耗材昂贵,限制了其发展。国外建立的甘蔗品种指纹图谱数据库也仅由分子数据构成,还不能称为真正的 DNA 指纹身份证。本研究借鉴国家居民身份证的格式,将品种的国圃号、国家地区、育种单位、引物名称和分子数据有序地整合在一起,形成每个品种唯一的识别代码,从这个指纹身份证代码,研究者可以很方便地获取品种的重要信息和分子数据用于品种区分鉴定研究。

3.3 品种分子指纹身份证数据的可扩充性

由于甘蔗品种数目不是固定的,每年各遗传育种单位都会育出新的品种充实到品种库,推广到生产,品种的分子指纹身份证数据也必将随着新品种指纹数据的输入而得到不断扩大;同时随着品种数据库的不断增大,现有引物组合的鉴定效率必将受到影响,因此品种分子指纹身份证数据也应该像居民身份证一样具有可扩充性。当现有引物组合不能满足品种鉴定需求时,可增加新的有效核心引物数据进入分子指纹数据库,从而确保数据库的准确性、及时性和实用性。

4 结论

建立了云南甘蔗自育品种的 8 对核心引物;引物 MSSCIR16 和 MSSCIR36 组合可以有效地将所有品种及主栽品种区分开,为 DNA 指纹身份证构建的关键核心引物;使用品种的国圃号、国家地区、育种单位、分子数据建立了品种的指纹身份证数据库,可用于品种的真伪鉴定和知识产权保护。

References

- [1] Deng H-H(邓海华), Zhang Q(张琼). Analysis on the parents of commercial varieties released in Mainland China in recent years. *Guangdong Agric Sci* (广东农业科学), 2006, (12): 7-10 (in Chinese with English abstract)
- [2] Chen R-K(陈如凯). Theory and Practice in Modern Sugarcane Breeding (现代甘蔗育种的理论与实践). Beijing: China Agriculture Press, 2003. pp 2-7 (in Chinese)
- [3] Gao Y-L(高运来), Zhu R-S(朱荣胜), Liu C-Y(刘春燕), Li W-F(李文福), Jiang H-W(蒋洪蔚), Li C-D(李灿东), Yao B-C(姚丙晨), Hu G-H(胡国华), Chen Q-S(陈庆山). Establishment of molecular ID in soybean varieties in Heilongjiang, China. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(2): 211-218 (in Chinese with English abstract)
- [4] Wang L-X(王立新), Li Y-F(李云伏), Chang L-F(常利芳), Huang L(黄岚), Li H-B(李宏博), Ge L-L(葛玲玲), Liu L-H(刘丽华), Yao J(姚骥), Zhao C-P(赵昌平). Method of ID constitution for wheat cultivars. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2007, 33(10): 1738-1740 (in Chinese with English abstract)
- [5] She H-D(余花娣), Chen J-T(陈景堂), Huang Y-Q(黄亚群), Zhu L-Y(祝丽英), Chi S-M(池书敏). Progress on variety identification of crop using DNA fingerprinting. *J Agric Univ Hebei* (河北农业大学学报), 2003, 26(suppl): 28-32 (in Chinese with English abstract)
- [6] Xin J-S(辛景树), Guo J-L(郭景伦), Zhang R-B(张软斌). Compare and analysis of a determination report in the variety authenticity and the purity of seeds by molecular marker. *Seeds* (种子), 2005, 24(1): 58-60 (in Chinese)
- [7] Chen Y-H(陈英华), Hou Y-M(侯昱铭), Li H-Z(李宏宇), Li M-B(李茂柏), Yuan Y(袁媛), Xu Z-J(徐正进). Establishment of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity among japonica rice cultivars attended regional trials in northeast region of China. *Seeds* (种子), 2009, 28(3): 28-34 (in Chinese)
- [8] Li L(李莉), Song S-F(宋书锋), Liu Q-S(刘全胜), Fu Y-F(付岳峰), Fu X-Q(符习勤), Dai H(戴恒). Establishment of fingerprint map of hybrid rice with SSR markers. *J Yangtze Univ(Nat Sci Edn)*(长江大学学报·自然科学版), 2008, 5(4): 67-70 (in Chinese with English abstract)
- [9] Wu W(武文), Deng Q-Y(邓启云), Zhou L-J(周丽洁), Zhu X-Q(朱校奇), Chen C-G(陈春光), Zhuang W(庄文), Jin D-M(金德敏), Wang B(王斌). Establishment of DNA fingerprinting with SSR for Y58S and some other elite parents of two-line hybrid rice. *Hybrid Rice* (杂交水稻), 2008, 23(3): 52-56 (in Chinese with English abstract)
- [10] Zhao J-R(赵久然), Wang F-G(王凤格), Guo J-L(郭景伦), Chen G(陈刚), Liao Q(廖琴), Sun S-X(孙世贤), Chen R-M(陈如明), Liu L-Z(刘龙洲). Series of research on establishing DNA fingerprint pool of Chinese new maize cultivars: II. Confirmation of a set of SSR core primers pairs. *J Maize Sci* (玉米科学), 2003, 11(2): 3-5 (in Chinese with English abstract)
- [11] Wang F-G(王凤格), Zhao J-R(赵久然), Guo J-L(郭景伦), Liu L-Z(刘龙洲). Series of research on establishing DNA finger-

- printing poll of Chinese new maize cultivars: I. The establishment of a standard SSR system fitting for maize cultivars identification. *J Maize Sci* (玉米科学), 2003, 11(1): 3–6 (in Chinese with English abstract)
- [12] Li X-H(李晓辉), Li X-H(李新海), Gao W-W(高文伟), Tian Q-Z(田清震), Li M-S(李明顺), Ma F-M(马凤鸣), Zhang S-H(张世煌). Establishment of DNA fingerprinting database of maize hybrids and its application in parentage identification. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(3): 386–391 (in Chinese with English abstract)
- [13] Wu Y-S(吴渝生), Yang W-P(杨文鹏), Zheng Y-L(郑用琏). Establishment of fingerprinting for three hybrids and their parents by SSR markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2003, 29(4): 496–500 (in Chinese with English abstract)
- [14] Li G-Y(李根英), Dreisigacker S, Warburton M L, Xia X-C(夏先春), He Z-H(何中虎), Sun Q-X(孙其信). Development of a fingerprinting database and assembling an SSR reference kit for genetic diversity analysis of wheat. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2006, 32(12): 1771–1778 (in Chinese with English abstract)
- [15] Lin D-Z(林道哲), Dong S-W(董顺文), Liu C-H(刘朝辉), Wang J(王军), Qiu Y-R(邱有荣), Huang Y(黄纛), Li S-C(李首成). Fingerprinting analysis of twenty six *Brassica napus* inbred lines based on RAPD. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2008, 36(20): 8493–8496 (in Chinese with English abstract)
- [16] Chen B-Y(陈碧云), Wu X-M(伍晓明), Zhang D-X(张冬晓), Liu F-L(刘凤兰), Lu G-Y(陆光远), Xu K(许鲲), Gao G-Z(高桂珍). SSR marker fingerprinting of winter rapeseed varieties in national field trials. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2008, 6(4): 709–716 (in Chinese with English abstract)
- [17] Pan Y B, Miller J, Schnell R, Richard E, Wei Q C. Application of microsatellite and RAPD Fingerprints in the florida sugarcane variety program. San Diego: Plant and Animal Genome XI Conference, 2003. 19–28
- [18] Pan Y B, Scheffler B, Richard E P. High-throughput genotyping of commercial sugarcane clones with microsatellite(SSR)DNA markers. *Sugar Tech*, 2007, 9: 176–181
- [19] Piperidis G, Rattey A R, Taylor G O, Cox M C. DNA markers: A tool for identifying sugarcane varieties. *Austral Sugarcane*, 2004, 8(suppl): 1–8
- [20] You J-H(游建华), Wu G-C(吴凯朝), Liang J(梁俊), Fang F-X(方锋学), Mo L-X(莫磊兴). Assessment of the genetic diversity among sugarcane cultivars by use SSR marker. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 2008, 36(10): 3990–3998 (in Chinese with English abstract)
- [21] Lao F-Y(劳方业), Liu R(刘睿), He H-Y(何慧怡), Deng H-H(邓海华), Chen Z-H(陈仲华), Chen J-W(陈健文), Fu C(符成), Zhang C-M(张垂明), Yang Y-H(杨业后). AFLP analysis of genetic diversity in series sugarcane parents developed at HSBS. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2008, 6(3): 517–522 (in Chinese with English abstract)
- [22] Zhuang N-S(庄南生), Zheng C-M(郑成木), Huang D-Y(黄东益), Tang Y-Q(唐燕琼), Gao H-Q(高和琼). AFLP analysis for sugarcane germplasm. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(4): 444–450 (in Chinese with English abstract)
- [23] Li M(李鸣), Tan Y-M(谭裕模), Li Y-R(李杨瑞), Li R-B(李容柏), Gao G-Q(高国庆). AFLP molecular analysis of genetic difference between cultivars in sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). *Acta Agron Sin* (作物学报), 2004, 30(10): 1008–1013 (in Chinese with English abstract)
- [24] Cai Q(蔡青), Fan Y-H(范源洪), Aitken K, Piperidis G, McIntyre C L, Jackson P. Assessment of the phylogenetic relationships within the “Saccharum Complex” using AFLP markers. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2005, 31(5): 551–559 (in Chinese with English abstract)
- [25] Aitken K S, Jackson P A, McIntyre C L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar. *Theor Appl Genet*, 2005, 110: 789–801
- [26] Liu X-L(刘新龙), Cai Q(蔡青), Bi Y(毕燕), Lu X(陆鑫), Ma L(马丽), Ying X-M(应雄美), Mao J(毛钧). A rapid silver staining method for PAGE used in sugarcane AFLP and SSR molecular markers. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 2009, 25(2): 433–435 (in Chinese with English abstract)
- [27] Pan Y B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing. *Sugar Tech*, 2006, 8: 246–256
- [28] Zhang Y(张彦), Guo S-W(郭士伟), He B(何冰), Gao D-Y(高东迎). Construction of molecular fingerprinting database for hybrid rice using SSR markers. *Jiangsu J Agric Sci* (江苏农业学报), 2006, 22(2): 181–183 (in Chinese with English abstract)
- [29] Wang Z-H(王忠华). DNA fingerprinting technology and its application in crop germplasm resources. *Mol Plant Breed* (分子植物育种), 2006, 4(3): 425–430 (in Chinese with English abstract)
- [30] Liang M-S(梁明山), Zeng Y(曾宇), Zhou X(周翔), Hou L-J(侯留记), Li X(李霞). Genetic markers and their applications in identifying crop cultivars. *Chin Bull Bot* (植物学通报), 2001, 18(3): 257–265 (in Chinese with English abstract)