

基于 SSR 的高粱光敏特性分析

牛皓^{1,2,3}, 平俊爱^{1,2,3*}, 张福耀^{1,2,3}, 吕鑫^{1,2,3}, 杜志宏^{1,2,3}, 李慧明^{1,2,3}, 王玉斌^{1,2,3}

(1. 山西省农业科学院高粱研究所, 山西晋中 030600; 2. 高粱遗传与种质创新山西省重点实验室, 山西晋中 030600; 3. 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 山西太原 030031)

摘要 [目的] 探明控制高粱抽穗期基因的遗传机理, 为高粱品种选育提供新思路新方法。[方法] 利用已知抽穗性状的 3 个高粱材料晋梁五、Ma、IS722, 对 144 对 SSR 引物进行聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 分析差异, 筛选光敏感特异性引物。[结果] 有 4 对引物产生特异性条带, 分别为 xtxp217、xtxp12、xtxp15、xtxp4, 且片段大小在 100 bp 左右, 其中 xtxp217 位于 10 号染色体、xtxp12 位于 4 号染色体、xtxp15 位于 5 号染色体、xtxp4 位于 2 号染色体。[结论] 该研究为后续对高粱杂交种进行光敏鉴定提供了基础。

关键词 高粱; 光敏感; SSR

中图分类号 S514 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)35-0097-03

Analysis on the Photosensitivity of Sorghum Based on SSR

NIU Hao^{1,2,3}, PING Jun-ai^{1,2,3}, ZHANG Fu-yao^{1,2,3} et al (1. Institute of Sorghum, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Jinzhong, Shanxi 030600; 2. Shanxi Key Laboratory of Sorghum Genetic and Germplasm Innovation, Jinzhong, Shanxi 030600; 3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan, Shanxi 030031)

Abstract [Objective] To elucidate the genetic mechanism of genes controlling heading date of sorghum and provide new ideas and methods for sorghum variety breeding. [Method] Three pairs of sorghum materials, Jinliang No. 5, Ma and IS722, were used to detect 144 pairs of SSR primers by polyacrylamide gel electrophoresis. The difference was analyzed and the photosensitive specific primers were screened. [Result] Four pairs of primers produced specific bands, which were xtxp217, xtxp12, xtxp15 and xtxp4, and the fragment size was about 100 bp. Xtxp217 is on chromosome 10, xtxp12 is on chromosome 4, xtxp15 is on chromosome 5 and xtxp4 is on chromosome 2. [Conclusion] The study provides a basis for subsequent photosensitive identification of sorghum hybrids.

Key words Sorghum; Photosensitivity; SSR

高粱是一种起源于东非的热带短日照单子叶 C₄ 植物, 自 8 000 多年前在埃塞俄比亚和苏丹被驯化后作为食物、饲料、纤维和燃料被广泛种植在全球范围内的不同气候带^[1]。由于高粱具有高产、适应性强、抗旱、耐盐、耐碱等特性, 因而被认为是未来最有价值的作物^[2-3]。时至今日在西非和中非, 高粱依然作为大宗的进口粮食来保障数百万人民的温饱^[4]。高粱的种类比较广泛, 包括饲草高粱、酿造高粱、糖高粱等, 这些不同的高粱分类一定程度上是由影响高粱抽穗期的环境因素决定的。

高粱抽穗期通常用播种到抽穗的天数来表示^[4]。高粱抽穗期的合理调控对现代育种工作的成效至关重要, 特别是作为青贮饲料用途的饲草高粱, 对光照条件要求比较严格, 当生长环境的光照时长超过 12.2 h 则不抽穗, 始终维持营养生长状态, 生物产量比非光敏饲草高粱要高, 同时牲畜的适口性和消化率较普通高粱好^[5-10]。高粱全基因组测序工作已完成, 分子辅助育种技术的应用对了解抽穗期的调控基因和调控机理进而实现“订单化”育种有着重要的意义^[11-14]。笔者以 3 个具有代表性的高粱材料为研究对象, 提取 DNA, 通过聚丙烯酰胺凝胶电泳对 144 对与高粱抽穗期相关的 SSR 引物进行鉴别, 分析差异, 筛选光敏感特异性引物, 为选育光

敏型饲草高粱提供新思路、新方法。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 高粱材料。3 份高粱材料, 分别为酿造粒用高粱晋梁五, 饲草高粱 IS722, 光敏感普通高粱 Ma。

1.1.2 SSR 引物。通过查阅文献共搜集到 144 对分布于高粱 10 条染色体上的 SSR 引物, 其中有 111 对明确位置, 另有 33 对没有查询到具体定位。引物合成由生工生物工程(上海)股份有限公司完成(表 1)。

1.2 方法

1.2.1 育苗。将晋梁五、Ma、IS722 这 3 个材料分别种植于铺有营养土的 96 孔育苗盘中, 浇足底墒水, 待 3~4 片叶时, 用剪刀剪下足量叶片置于 2 mL 离心管中, 液氮速冻后备用。

1.2.2 DNA 提取。3 个材料 DNA 提取是采用生工生物工程(上海)股份有限公司生产的 Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒完成的, 经过纯度和浓度检测后置于 -20 °C 冰箱保存待用。

1.2.3 PCR 扩增。扩增反应在 Thermal Cycler C1000 touch 扩增仪上进行, PCR 反应总体积是 10 μL, DNA 模板 1 μL, 前后引物共 1 μL, Taq PCR Master Mix 3 μL, ddH₂O 补足 10 μL。PCR 反应体系为 94 °C 预变性 4 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 复性 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 共 34 个循环; 72 °C 最后延伸 10 min。4 °C 待机备用。

1.2.4 聚丙烯酰胺凝胶电泳。将晋梁五、Ma、IS722 这 3 个高粱恢复系材料, 按照此顺序组成 1 组, 每组对应 1 对引物。电泳版用双蒸水清洗沥干, 1% 琼脂糖封底待用; 30% 的丙烯酰胺溶液 15 mL, 10×TBE 溶液 6 mL, 双蒸水 24 mL, 20% 过硫

基金项目 高粱遗传育种与种质创新山西省重点实验室青年基金项目 (GLS16-3); 山西省农业科学院优势课题组自选项目 (YYS1706); 现代农业产业技术体系建设专项 (CARS-06-01-01); 酿造专用高粱育种及利用山西省科技创新重点团队项目 (2014131015)。

作者简介 牛皓 (1982—), 男, 河南安阳人, 助理研究员, 在读博士, 研究方向: 高粱遗传育种。* 通讯作者, 研究员, 硕士, 从事高粱遗传育种研究。

收稿日期 2018-07-30

酸铵 300 μL , TEMED 溶液 30 μL , 各成分称量好, 待封底琼脂糖凝固后, 灌胶, 点样, 电压 220 V, 100 min。

表 1 引物信息

Table 1 Primer information

编号 No.	引物名称 Name	所在位置 Location	编号 No.	引物名称 Name	所在位置 Location	编号 No.	引物名称 Name	所在位置 Location
1	XTXP32	Chr01	49	XTXP304	Chr02	97	XTXP105	Chr08
2	XTXP37	Chr01	50	XTXP31	Chr03	98	XTXP210	Chr08
3	XTXP43	Chr01	51	XTXP33	Chr03	99	XTXP250	Chr08
4	XTXP46	Chr01	52	XTXP34	Chr03	100	XTXP292	Chr08
5	XTXP58	Chr01	53	XTXP69	Chr03	101	XTXP294	Chr08
6	XTXP61	Chr01	54	XTXP114	Chr03	102	XTXP321	Chr08
7	XTXP75	Chr01	55	XTXP205	Chr03	103	XTXP354	Chr08
8	XTXP88	Chr01	56	XTXP215	Chr03	104	XTXP67	Chr09
9	XTXP149	Chr01	57	XTXP228	Chr03	105	XTXP230	Chr09
10	XTXP208	Chr01	58	XTXP231	Chr03	106	XTXP258	Chr09
11	XTXP229	Chr01	59	XTXP12	Chr04	107	XTXP289	Chr09
12	XTXP248	Chr01	60	XTXP21	Chr04	108	XTXP20	Chr10
13	XTXP279	Chr01	61	XTXP24	Chr04	109	XTXP141	Chr10
14	XTXP284	Chr01	62	XTXP27	Chr04	110	XTXP217	Chr10
15	XTXP302	Chr01	63	XTXP41	Chr04	111	XTXP331	Chr10
16	XTXP316	Chr01	64	XTXP177	Chr04	112	XTXP45	未知
17	XTXP319	Chr01	65	XTXP212	Chr04	113	XTXP80	未知
18	XTXP325	Chr01	66	XTXP327	Chr04	114	XTXP91	未知
19	XTXP335	Chr01	67	XTXP343	Chr04	115	XTXP98	未知
20	XTXP340	Chr01	68	XTXP14	Chr05	116	XTXP160	未知
21	XTXP350	Chr01	69	XTXP15	Chr05	117	XTXP162	未知
22	XTXP357	Chr01	70	XTXP23	Chr05	118	XTXP267	未知
23	XTXP1	Chr02	71	XTXP65	Chr05	119	XTXP320	未知
24	XTXP3	Chr02	72	XTXP94	Chr05	120	txo711	未知
25	XTXP4	Chr02	73	XTXP225	Chr05	121	txp694	未知
26	XTXP7	Chr02	74	XTXP262	Chr05	122	txxi48	未知
27	XTXP8	Chr02	75	XTXP303	Chr05	123	txxsn1	未知
28	XTXP13	Chr02	76	XTXP6	Chr06	124	txxp696	未知
29	XTXP19	Chr02	77	XTXP17	Chr06	125	txxi61	未知
30	XTXP25	Chr02	78	XTXP57	Chr06	126	txxi62	未知
31	XTXP50	Chr02	79	XTXP95	Chr06	127	txxi63	未知
32	XTXP55	Chr02	80	XTXP97	Chr06	128	txxi49	未知
33	XTXP56	Chr02	81	XTXP104	Chr06	129	txxi55	未知
34	XTXP63	Chr02	82	XTXP145	Chr06	130	txxi73	未知
35	XTXP72	Chr02	83	XTXP176	Chr06	131	txxi68	未知
36	XTXP84	Chr02	84	XTXP219	Chr06	132	txxi58	未知
37	XTXP96	Chr02	85	XTXP265	Chr06	133	txxi66	未知
38	XTXP100	Chr02	86	XTXP274	Chr06	134	txxi20	未知
39	XTXP179	Chr02	87	XTXP317	Chr06	135	txxp599	未知
40	XTXP197	Chr02	88	XTXP36	Chr07	136	txxp598	未知
41	XTXP201	Chr02	89	XTXP40	Chr07	137	txxp434	未知
42	XTXP207	Chr02	90	XTXP159	Chr07	138	PRR37	未知
43	XTXP211	Chr02	91	XTXP168	Chr07	139	PHYC-1	未知
44	XTXP283	Chr02	92	XTXP227	Chr07	140	PHYC-2	未知
45	XTXP286	Chr02	93	XTXP295	Chr07	141	PHYC-3	未知
46	XTXP296	Chr02	94	XTXP312	Chr07	142	PHYC-4	未知
47	XTXP297	Chr02	95	XTXP18	Chr08	143	PHYB	未知
48	XTXP298	Chr02	96	XTXP47	Chr08	144	PHYC	未知

试验选用生工生物工程(上海)股份有限公司 50 ~

1 000 bp DNA Ladder-H2 作为参照, 跑胶结束后用干净玻璃板铺平, 拍照分析。

2 结果与分析

通过聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 结果出现多态性条带的共 96 组即 96 对引物, 与 maker 对照出现特异性条带的引物

共有 4 对,其余组引物并未出现明显多态性(图 1)。

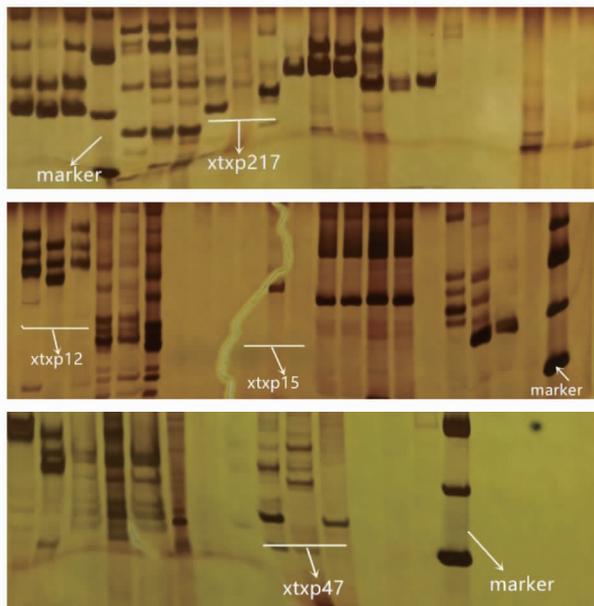


图 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis results

这 4 对引物分别为 xtxp217、xtxp12、xtxp15、xtxp47。对应序列分别为 F:5'-GGCCTCGACTACGGAGTT-3', R:5'-TCG-GCATATTGATTTGGTTT-3'; F:5'-AGATCTGGCGCAACG-3', R:5'-AGTCACCATCGATCATC-3'; F:5'-CACAAACAC-TAGTGCCTTATC-3', R:5'-CATAGACACCTAGGCCATC-3'; F:5'-CAATGGCTTGCACATGTCCTA-3', R:5'-GGT-GCGAGCTAGTTAAGTGGG-3'。

3 结论与讨论

结果表明,产生特异性条带的引物分别为 xtxp217、xtxp12、xtxp15、xtxp4,且片段大小在 100 bp 左右,其中 xtxp217 位于 10 号染色体、xtxp12 位于 4 号染色体、xtxp15 位于 5 号染色体、xtxp4 位于 2 号染色体。国外科学家对高粱的前期遗传研究揭示了 4 个与开花时间(成熟度)相关的遗传位点,命名为 Ma_1 、 Ma_2 、 Ma_3 、 Ma_4 ,其分别位于高粱的第 6 号、2 号、1 号和 10 号染色体上^[15-19]。最近又发现了另外 2 个能增加光周期敏感性,并且能延长饲草及高生物量高粱杂交种营养生长时长的基因 Ma_5 、 Ma_6 ^[20]。该研究将筛选出的这 4 对特异性 SSR 引物用于后代材料的表型鉴定,通过实验室“预判”就可得出材料的抽穗性状,省去田间种植鉴别环节,节省育种的成本,缩短育种时间,提高育种效率。

随着高粱全基因组测序完成和遗传图谱及物理图谱的不断完善,通过分子辅助育种手段就可以进一步明确与高粱抽穗期相关的基因性状,这将在作物改良中发挥巨大的作用。另外,随着全球煤炭、石油和天然气等不可再生能源储量的日趋减少,生物质能源的开发和利用已经成为全球科研焦点,而通过生物技术对高粱抽穗期进行调控进而选育出的高生物量、强抗逆性、种植范围广、乙醇转化率高等优势品种,

必将成为生物质能源必不可少的原材料。

因此,高粱抽穗期基因表达的研究和控制,对于培育饲草高粱和对木质素生物燃料含量要求高的生物质高粱而言具有重要的意义^[17,21]。

参考文献

- [1] 王燕. 高粱抽穗期基因 Ma_1 和 Ma_3 的分子进化及抽穗期的 QTL 分析[D]. 北京: 中国农业大学, 2015.
- [2] ROONEY W L, BLUMENTHAL J, BEAN B, et al. Designing sorghum as a dedicated bioenergy feedstock[J]. *Biofuels Bioprod Bioref*, 2007, 1(2): 147-157.
- [3] VERMERRISM W, SABALLOS A, EJETA G, et al. Molecular breeding to enhance ethanol production from corn and sorghum stover[J]. *Crop Sci*, 2007, 47: 142-153.
- [4] BHOSALE S U, STICH B, FREDERICK H, et al. Association analysis of photoperiodic flowering time genes in west and central African sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench][J]. *BMC Plant Biology*, 2012, 12: 1-10.
- [5] LIN Y R, SCHERTZ K F, PATERSON A H. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the Poaceae, in reference to an interspecific sorghum population[J]. *Genetics*, 1995, 141(1): 391-411.
- [6] NIANGADO O. The state of millet diversity and its use in West Africa [C]//COOPER H D, SPILLANE C, HODGIN T. Broadening the genetic base of crop production. Rome: IPGRI/FAO, 2001: 147-157.
- [7] VAKSMAN M, TRAOÉ S, NIANGADO O. Le photopériodisme des sorghos africains[J]. *Agriculture et développement*, 1996, 9: 13-18.
- [8] CLERGET B, DINGKUHN M, GOZÉ E, et al. Variability of phyllochron, plastochron and rate of increase in height in photoperiod-sensitive sorghum varieties[J]. *Ann Bot*, 2008, 101(4): 579-594.
- [9] HAUSSMANN B I G, BOUREIMA S S, KASSARI I A, et al. Mechanisms of adaptation to climate variability in West African pearl millet landraces: A preliminary assessment[J]. *SAT ejournal*, 2007, 3(1): 1-3.
- [10] SEARLE I, COUPLAND G. Induction of flowering by seasonal changes in photoperiod[J]. *EMBO J*, 2004, 23(6): 1217-1222.
- [11] THOMAS B, VINCE-PRUE B. Photoperiodism in plants[M]. 2nd edition. California: Academic Press, 1997.
- [12] MOURADOV A, CREMER F, COUPLAND G. Control of flowering time: Interacting pathways as a basis for diversity[J]. *Plant cell*, 2002, 14(S1): 111-130.
- [13] SIMPSON G G, DEAN C. *Arabidopsis*, the Rosetta stone of flowering time?[J]. *Science*, 2002, 296: 285-289.
- [14] IZAWA T, TAKAHASHI Y, YANO M. Comparative biology comes into bloom: Genomic and genetic comparison of flowering pathways in rice and *Arabidopsis*[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 113-120.
- [15] HENDERSON I R, DEAN C. Control of *Arabidopsis* flowering: The chill before the bloom[J]. *Development*, 2004, 131(16): 3829-3838.
- [16] BAURLE I, DEAN C. The timing of developmental transitions in plants[J]. *Cell*, 2006, 125(4): 655-664.
- [17] MURPHY R L, KLEIN R R, MORISHIGE D T, et al. Coincident light and clock regulation of pseudoresponse regulator protein 37 (PRR37) controls photoperiodic flowering in sorghum[J]. *PNAS*, 2011, 108(39): 16469-16474.
- [18] ROONEY W L, AYDIN S. Genetic control of a photoperiod-sensitive response in *Sorghum bicolor* (L.) Moench[J]. *Crop Sci*, 1999, 39: 397-400.
- [19] KOURESSY M, NIANGADO O, DEMBÉLÉ T, et al. La sélection de sorghos photopériodiques [M]//BACCI L, REYNIERS F N. Le futur des céréales photopériodiques pour une production durable en Afrique tropicale semi-aride. Montpellier: CeSIA/CIRAD, 1998: 247-262.
- [20] AYDIN S, ROONEY W L, MILLER F R. Identification and characterization of the Ma_5 and Ma_6 maturity loci in sorghum[C]//Proceedings of the international conference on genetic improvement of sorghum and pearl millet. Lubbock, USA: INTSORMIL and ICRISAT, 1997: 641-642.
- [21] CHILDS K L, CORDONNIER-PRATT M M, PRATT L H, et al. Genetic regulation of development in *Sorghum bicolor*. VII. ma_3^R flowering mutant lacks a phytochrome that predominates in green tissue[J]. *Plant Physiol*, 1992, 99(2): 765-770.