

肖松,周棱波,张国兵,等. 酱香型白酒用糯高粱种质遗传多样性分析[J]. 江苏农业科学,2016,44(4):45-49.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.012

# 酱香型白酒用糯高粱种质遗传多样性分析

肖松<sup>1</sup>,周棱波<sup>2</sup>,张国兵<sup>2</sup>,邵明波<sup>2</sup>,乙引<sup>1</sup>,张立异<sup>2</sup>

(1. 贵州师范大学生命科学学院,贵州贵阳 550001;2. 贵州省农业科学院旱粮研究所,贵州贵阳 550006)

**摘要:**酱香型白酒又称茅香型白酒,其中最著名的代表就是国酒茅台,主要原料为优质糯高粱。由于其独特的酿造工艺,对高粱品质有特殊的要求。目前,对酱香型酒用糯高粱种质资源遗传多样性缺乏全面的调查,已经妨碍了酒用高粱品种的选育。因此,采用 28 对 SSR 分子引物对 145 个贵州酒用糯高粱种质进行全基因组扫描,共得到 61 个多态位点,引物位点的多态信息含量指数 (polymorphism information content, PIC) 值范围为 0.02 ~ 0.66,平均值为 0.42, Jacard 遗传相似系数 (genetics similarity, GS) 变异范围为 0.60 ~ 0.98,平均值为 0.71。根据高粱资源亲缘关系的远近,非加权组平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic mean, UPGMA) 聚类分析结果显示,在 GS 值为 0.63 水平上主要聚集成 2 个主要的类群 (G I、G II)。进一步进行主坐标分析 (principal coordinates analysis, PCOA) 显示,这批育种资源由大、小 2 个亚群组成。试验结果表明,贵州白酒用糯高粱育种资源具有较高的遗传相似性,遗传多样性水平较低,遗传背景较为狭窄,研究结果对贵州省今后的酱香型白酒用糯高粱的选育具有一定的指导意义。

**关键词:**糯高粱;SSR 分子标记;遗传多样性;聚类分析;主坐标分析

**中图分类号:** S514.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0045-05

高粱 (*Sorghum bicolor* L.) 是全世界种植的第五大禾谷类作物,作为 C<sub>4</sub> 植物的模式作物,因其光合效率高、耐高温干旱、耐贫瘠等优点而备受关注。高粱栽培品种根据用途不同

一般可以分为 3 种类型:甜高粱、饲料高粱以及作为粮食的籽粒高粱,在籽粒高粱中又将直链淀粉含量在 0 ~ 5% 之间的称为糯高粱<sup>[1]</sup>。酿造茅台酒等酱香型高档白酒的主要原料是优质籽粒用糯高粱<sup>[2]</sup>。面对红缨子等贵州省主栽糯高粱品种的产量无法满足生产需求的现状<sup>[3]</sup>,贵州省的酒用糯高粱育种工作开展已经迫在眉睫。全面了解种质资源的遗传多样性信息是选择杂交亲本、建立杂种优势群的基础,对于选育优质、高产和抗病的糯高粱新品种具有指导意义,对于糯高粱遗传多样性的研究、遗传资源的保存与利用有重要意义。

分子标记技术在遗传多样性分析的研究中有着重要地位,主要包括限制性片段长度多态性 (restriction fragment

收稿日期:2015-11-02

基金项目:贵州省农业科学院课题 (编号:黔农科院院专项[2014]034 号、黔农科院院专项[2013]013 号);贵州省科学技术基金 (编号:黔科合 J 字 LKN[2013]26 号);贵州省科技计划 (编号:黔科合农 G 字[2012]4004 号、黔科合 NY[2015]3021-2)。

作者简介:肖松 (1990—),男,贵州铜仁人,硕士研究生,从事植物抗病基因研究。E-mail:15285157430@163.com。

通信作者:张立异,研究员,硕士生导师,主要从事作物分子育种研究。E-mail:lyzhang1997@hotmail.com。

- [16] Zhai L, Sun W, Zhang K, et al. Identification and characterization of argonaute gene family and meiosis-enriched argonaute during sporogenesis in maize [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2014, 56 (11): 1042-1052.
- [17] Wu L, Zhang Q, Zhou H, et al. Rice MicroRNA effector complexes and targets [J]. The Plant Cell, 2009, 21 (11): 3421-3435.
- [18] Zhu H, Hu F, Wang R, et al. Arabidopsis argonaute10 specifically sequesters miR166/165 to regulate shoot apical meristem development [J]. Cell, 2011, 145 (2): 242-256.
- [19] Schmid M, Davison T S, Henz S R, et al. A gene expression map of *Arabidopsis thaliana* development [J]. Nature Genetics, 2005, 37 (5): 501-506.
- [20] Changho E, Lorkovic Z J, Ulf N, et al. AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana* [J]. PLoS One, 2011, 6 (10): e25730.
- [21] Takeda A, Iwasaki S, Watanabe T, et al. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins [J]. Plant & Cell Physiology, 2008, 49 (4): 493-

500.

- [22] Durán-Figueroa N, Vielle-Calzada J P. Argonaute9-dependent silencing of transposable elements in pericentromeric regions of *Arabidopsis* [J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5 (11): 1476-1479.
- [23] Singh M, Goel S, Meeley R B, et al. Production of viable gametes without meiosis in maize deficient for an argonaute protein [J]. The Plant Cell, 2011, 23 (2): 443-458.
- [24] Thomson D W, Pillman K A, Anderson M L, et al. Assessing the gene regulatory properties of Argonaute-bound small RNAs of diverse genomic origin [J]. Nucleic Acids Research, 2015, 43 (1): 470-481.
- [25] Qian Y, Cheng Y, Cheng X, et al. Identification and characterization of Dicer-like, argonaute and RNA-dependent RNA polymerase gene families in maize [J]. Plant Cell Reports, 2011, 30 (7): 1347-1363.
- [26] 许鑫, 李丹丹, 李双江, 等. 玉米 AGO 基因的克隆与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2014, 34 (3): 449-453.

length polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性(rapid amplify polymorphism, RAPD)、简单序列重复长度多态性(simple sequence repeats, SSR)和扩增酶切片段长度多态性(amplification fragment length polymorphism, AFLP)等分子标记技术。在高粱遗传作图、遗传多样性等研究中,分子标记技术有着丰富的理论基础。Chittenden 等于 1994 年利用 276 个 RFLP 位点完成第 1 个高粱连锁图<sup>[4]</sup>。Ayana 等利用 RAPD 标记对埃塞俄比亚、厄立特里亚高粱的遗传多样性进行分析,发现来自不同地区的高粱遗传多样性并不丰富,在聚类中不能按照地域来进行类群划分<sup>[5]</sup>。Boivin 等用 AFLP、RFLP 分子标记,并结合形态学标记对饱和高粱完成了完整遗传图,并且得出了 AFLPs 以及基因组分布不均匀的结论<sup>[6]</sup>。在众多分子标记中,由于 SSR 分子标记具有较高的多态性水平、遍布于整个基因组、检测手段简单快速等特点,自 Brown 等于 1996 年开发了 49 对扩增多态性良好的高粱 SSR 标记引物<sup>[7]</sup>以来,SSR 标记在高粱的遗传多样性研究中得到更多的关注。余传涨等利用 52 个 SSR 标记调查了我国 41 个高粱品种的遗传多样性,并通过聚类分析将这些高粱分为籽粒高粱、甜高粱 2 个类群<sup>[1]</sup>。张晗等利用 SSR 标记对国内外 253 份高粱品种进行遗传多样性分析,得出中国高粱与国外高粱之间遗传分化明显的结论<sup>[8]</sup>。赵香娜等利用 24 对 SSR 引物研究了 206 份国内外甜高粱种质资源的遗传变异,利用遗传相似系数矩阵,按 UPGMA 方法对 206 份甜高粱品种进行聚类分析,将其分为 2 个大的类群<sup>[9]</sup>。倪先林等利用 25 对 SSR 标记评价了 29 份糯高粱种质资源,共得到了 59 个等位基因,通过聚类得出糯高

粱品种的亲缘关系与地理来源关系不大的结论<sup>[10]</sup>。近年来,由于贵州省种植的酒用糯高粱品种单一,红缨子等主栽品种农艺性状较差,产量水平受到限制,不利于机械化生产,因此选育优质高产、适合机械化生产的糯高粱新品种迫在眉睫。高粱种质资源作为其遗传改良的重要来源,是培养高产、优质高粱新品种的重要物质基础。针对贵州省酱香型白酒用高粱的种质资源遗传多样性的研究较少。所以本研究对来自贵州、四川地区的 145 份酱香酒用高粱种质资源进行基因分型,以期了解酒用糯高粱的遗传多样性和群体结构,为拓宽群体遗传基础,组配选育优质高产的抗病、抗虫新品种提供理论支撑。

1 材料与方法

1.1 试验材料

145 份贵州省酒用糯高粱育种资源,均由贵州省农业科学院旱粮研究所高粱研究课题组提供。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 DNA 的提取参照陈宏的 CTAB 法<sup>[11]</sup>,用核酸蛋白测定仪检测 DNA 浓度,并用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测纯度,存于 -20 ℃ 冰箱中备用。

1.2.2 PCR 扩增 试验所用的 28 对 SSR 引物,根据 <http://www.graingenes.org> 公布的引物序列,由上海捷瑞生物工程有限公司合成,详见表 1。在 MJ Research PTC-200 型 PCR 仪上进行扩增反应。10 μL SSR 扩增体系为:1 μL 50 ng/μL DNA,1 μL 10 × buffer,0.6 μL 2.5 mmol/L Mg<sup>2+</sup>,0.15 μL

表 1 28 对 SSR 引物序列

引物名称	正向引物序列 F(5'→3')	反向引物序列 R(5'→3')
txp3	AGCAGGCGTTTATGGAAG	ATCCTCATACTGCAGGACC
txp96	GCTGATGTCATGTTCCCTCAC	CATTCTGGACTCTGTCCG
txp6	ATCGGATCCGTCAGATC	TCTAGGGAGGTTGCCAT
txp105	TGGTATGGGACTGGACGG	TGTTGACGAAGCAACTCCAAT
txp12	AGATCTGGCGGCAACG	AGTCACCCATCGATCATC
txp120	AAAGCTCGGCTGTAGAAATA	CGCTTAACAACTCCTACCATC
txp15	CACAAACACTAGTGCCTTATC	CATAGACACCTAGGCCATC
txp130	TGGGAAGCAGCTCAGG	AGGGTGCTGATGTAGGGA
txp17	CGGACCAACGACGATTATC	ACTCGTCTCACTGCAACTCTG
txp145	GTTCTCTCTGCCATTACT	CTTCCGCACATCCAC
txp21	GAGCTGCCATAGATTTGGTCCG	ACCTCGTCCCACCTTTGTTC
txp168	AGTCAAAACCGCCACAT	GAGAAGGGGAGAGGAGAA
txp38	ACAAACCGCGACGAAGTAAC	ACAAGGCAAAGCACAAAGC
txp210	CGCTTTTCTGAAAATATTAAGGAC	GATGAGCGATGGAGGAGAG
txp47	CAATGGCTTGCACATGTCCTA	GGTGCGAGCTAGTTAAGTGGG
txp217	GGCCTCGACTACGGAGTT	TCGGCATATTGATTGTGTTT
txp50	TGATGTGTACCCCTTCTGG	AGCCTATGTATGTGTTTCGTCC
txp227	TGAAAGTTTTGGCATTGA	TGTAGGATAGCCCAGGTT
txp60	GCTAGCTGACGCACGTCTCTG	TGCAACCCGAGCGGTGACTA
txp289	AAGTGGGGTGAAGAGATA	CTGCCTTTCCGACTC
txp61	GATGCCCATGCCTTGC	CCCACTAACTAAAGCGGACA
txp299	CTCTCCCCCTTTGTCATCCATC	TCTTGCCCAACAGGACTTCTC
txp67	CCTGACGCTCGTGGCTACC	TCCACACAAGATTACGGCTCC
ltxp312	CAGGAAAATACGATCCGTGCCAAGT	GTGAACATCGTGAAGAAGTTGGAGGAAA
txp69	ACACGCATGCTTTGACTG	TTGATAATCTGACGCAACTG
txp331	AACGGTTATTAGAGAGGGAGACA	AGTATAATAACATTTTGACACC
txp75	CGATGCCTCGAAAAAAAACG	CCGATCAGAGCGTGGCAGG
txp358	CAAGGACAAGATTTCATTTTAAGGG	TCACACCTCACAAAATAAAAGTGC

10 mmol/L dNTP, 0. 4 μL 2. 5 μmol/L primer R, 0. 4 μL 2. 5 μmol/L primer L, 0. 1 μL Taq DNA 聚合酶, 用 ddH<sub>2</sub>O 补水至 10 μL。PCR 反应程序为: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 45 s, 50 ~ 60 ℃ 1 min, 72 ℃ 2 min, 35 个循环; 72 ℃ 10 min (退火温度因不同的标记而异)。根据所用分子标记的不同类型, 扩增产物选用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行检测。

1. 2. 3 统计分析 依据 SSR 分子标记对酱香酒用 145 个高粱种质的带型读取遗传多样性, 每个标记的多态性信息含量 PIC 指数的计算公式为:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2。$$

式中:  $P_i$  是群体中含有第  $i$  个等位基因的比例。

根据每个标记的等位基因出现与否, 将标记转换为 0 和 1 的二进制矩阵。将该矩阵作为输入文件, 利用 NTSYSPC V2. 0 软件<sup>[12]</sup>, 计算 Jacard 遗传相似性系数, 进行 PCoA 分析、UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2. 1 分子标记扫描

利用 28 对 SSR 引物对 145 份糯高粱育种资源进行扫描, 一共获得了 61 个多态性位点, 最少扩增多态性片段为 1 条, 最多扩增 5 条, 平均扩增 2. 18 条。引物 txp75 的多态性最高, 扩增了 5 条多态性片段。PIC 值计算结果 (表 2) 显示, PIC 值范围为 0. 02 ~ 0. 66, 平均值为 0. 42; 较多引物的 PIC 值出现在 0. 21 ~ 0. 30 范围, 所占比例为 20%; 而较少的引物 PIC 值

出现在 0 ~ 0. 10、0. 41 ~ 0. 50 这 2 个范围, 其比例均为 10%; PIC 值在 0. 61 ~ 0. 70 之间引物对应 txp38、txp120、txp75、txp50、txp61。其中 PIC 值在 0. 21 ~ 0. 30 范围内的引物最多, 有 6 对, 分别是 txp69、txp217、txp38、txp12、txp47、txp17。

28 对 SSR 引物在 145 份材料中的电泳结果显示, 多态性并不丰富。例如, 在 145 份材料中, 多态性良好的 SSR 引物

表 2 28 对 SSR 引物的多态指数 (PIC) 汇总

SSR 标记	PIC 值	SSR 标记	PIC 值
txp227	0. 02	txp6	0. 33
txp312	0. 04	txp96	0. 35
txp168	0. 08	txp105	0. 35
txp210	0. 13	txp299	0. 39
txp60	0. 15	txp130	0. 41
txp289	0. 17	txp145	0. 48
txp65	0. 19	txp67	0. 52
txp21	0. 20	txp3	0. 55
txp69	0. 23	txp302	0. 57
txp217	0. 23	txp15	0. 58
txp38	0. 26	txp75	0. 61
txp12	0. 27	txp61	0. 64
txp47	0. 27	txp50	0. 64
txp17	0. 29	txp120	0. 66

txp75 只在 4、10、24、41、45、66、71、72、73 等少量材料表现出差异性, 部分电泳结果见图 1。由此推断, 145 份糯高粱材料中大多数材料的来源较为接近, 是相同的品种或者品系, 存在很大的亲缘关系。

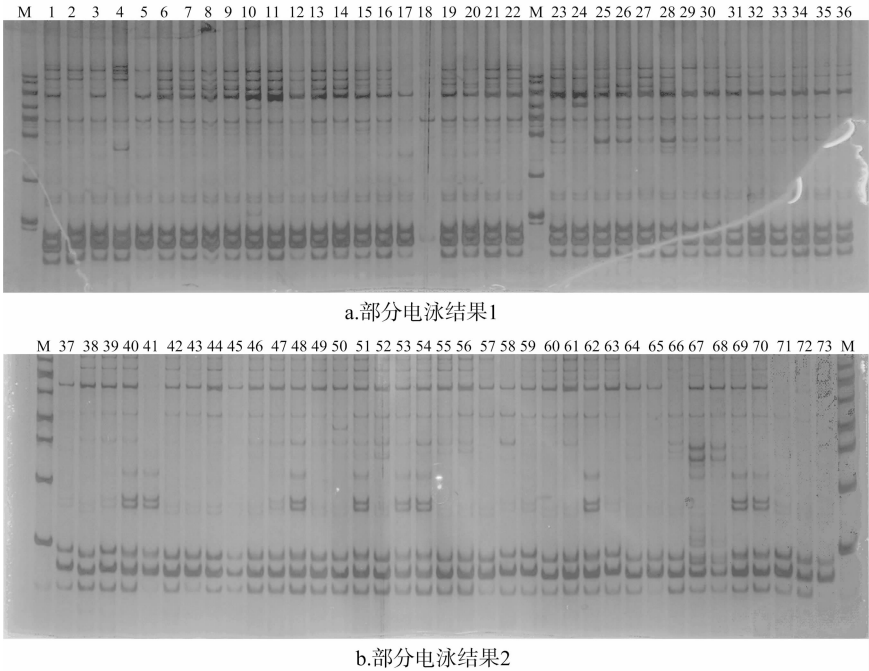


图1 SSR 引物 txp75 在 145 份糯高粱材料中部分电泳结果

2. 2 遗传多样性和群体结构分析

根据 61 个 SSR 标记的基因分型数据, 计算了品种 (系) 间的 Jacard 遗传相似系数 (genetic similarity, GS), 其变异范围为 0. 60 ~ 0. 98, 平均值 0. 71。利用非加权组平均法进行聚类分析, UPGMA 结果显示, 这 1 批糯高粱育种根据亲缘关系的远近聚集在一起 (图 2)。145 份糯高粱资源在 GS 值 0. 63

水平上主要聚集形成 2 个主要的类群: 第 1 个群 (G I) 由 2 个亚群组成, 其中的 1 个亚群主要由贵州高粱主栽品种红高粱的衍生品系所组成, 而且穗型多呈侧披散状; 第 2 个群 (G II) 没有清晰地划分为几个亚群, 主要包含其他不同血缘关系的育种资源。

为了调查试验材料的群体结构, 利用 61 个多态性位点标

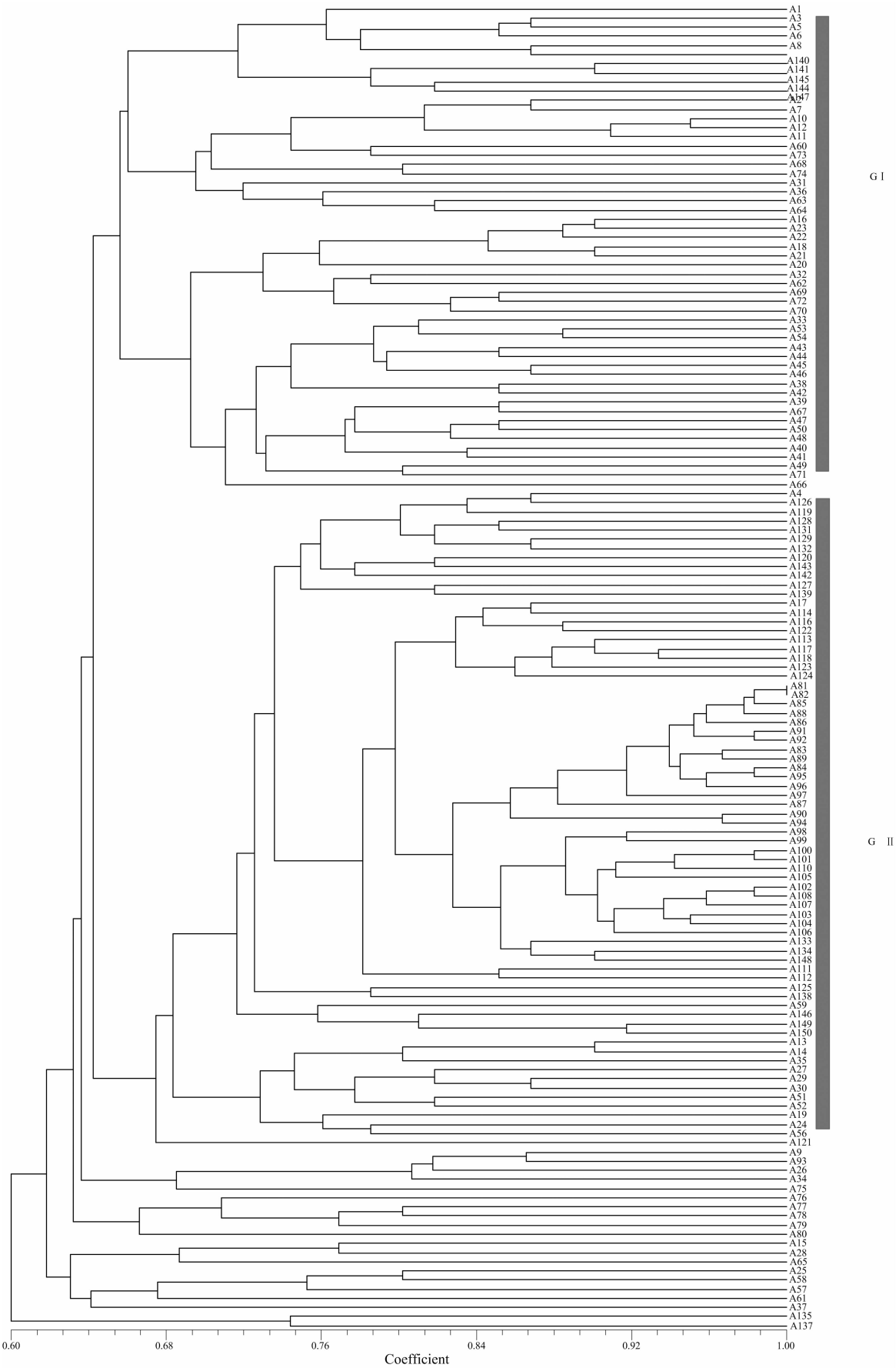


图2 145 份糯高粱资源的UPGMA聚类分析结果

记进行 PCoA 分析。如图 3 所示,第 1 主坐标(PCo-1)、第 2 主坐标(PCo-2)分别解释 5.6%、3.7% 的群体遗传变异。145 份高粱材料聚集形成了 2 个群:右上侧的第 1 类群(group I)包含大多数材料,在 PCo-1、PCo-2 轴的 2 个方向上都较为扩散。左下侧的第 2 类群(group II)只包括了 16 个高粱材料,聚集较为紧密,主要由血缘关系与红缨子等贵州糯高粱品种较远的外省高粱资源组成。

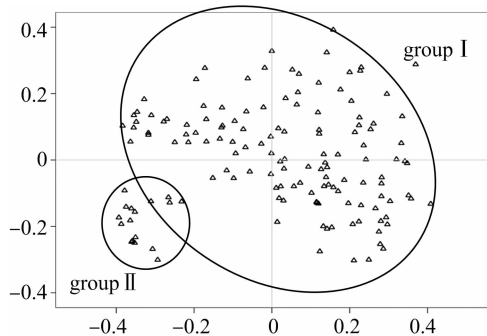


图3 145 份糯高粱资源的 PCoA 分析结果

### 3 讨论

以国酒茅台为龙头的酿酒业是贵州省的传统支柱产业和特色优势产业,也是贵州省财政收入的重要来源之一。虽然贵州省高粱主栽品种红缨子等在产量方面与以往推广品种相比有所提高,但仍不能满足贵州省酿酒发展的迫切需求,且杂交高粱引种表现病虫害严重、转基因安全等问题<sup>[3,13-14]</sup>。因此,应全面了解贵州酱香型酒用高粱种质资源的遗传多样性信息,以期培育优质、高产和抗病的育种工作选出杂交亲本,并为建立杂种优势群提供理论指导。

在本项研究中,利用 SSR 分子标记扫描了 145 份贵州省酒用糯高粱材料,初步了解贵州省糯高粱现有育种资源的遗传多样性水平。试验结果表明,贵州省白酒用糯高粱具有较高的遗传相似性,说明这批育种资源具有较低的遗传多样性。而 UPGMA 聚类不能将这些高粱育种资源清晰地划分成不同的类群,只是在 GS=0.68 的位置大概将其划分为 2 个类群。在其他的研究中也得到相似的结果。Ayana 等对埃塞俄比亚和厄立特里亚高粱的遗传多样性研究中,发现不同地区的高粱遗传多样性并不丰富,在聚类中不能按照地域来进行划分<sup>[5]</sup>。Ritter 等在 2007 年利用 277 个 AFLP 标记对 95 份美国甜高粱、籽粒高粱进行扫描,通过聚类分析发现,并不能将 2 种高粱按照品种的分类而在遗传学上将其分为 2 个类群<sup>[15]</sup>。余传涨等在 2010 年利用 52 个 SSR 标记调查了 41 个高粱品种的遗传多样性,通过聚类分析将这些高粱分为籽粒高粱、甜高粱 2 个类群,但是却不能清晰地划分 2 类高粱之间的遗传界限<sup>[1]</sup>。张晗等在 2011 年利用 SSR 标记,以 69 份国外品种为对照,对 12 个地区 184 份中国高粱地方品种进行的遗传多样性分析结果表明,中国高粱与国外高粱之间遗传分化明显,而中国高粱地方品种地区间和类型间分化极弱,不能将这些高粱按地区或类型分开<sup>[8]</sup>。目前出现的高粱遗传多样性分析不能明确划分类群的原因,可能是由于栽培品种与自然品种高频的异型杂交,这与频繁的人类活动影响密不可分<sup>[5]</sup>。本研究的 PCoA 分析结果显示,贵州省糯高粱育种资源多数

具有红缨子的血缘,表现为植株高大、无效分蘖较多、长穗侧散披状。只有少数外来资源与其血缘关系较远,表现较大的表型差异,植株较矮,穗型直立紧凑。

本研究结果显示,针对贵州省酱香型白酒用糯高粱育种资源具有较高的遗传相似性,遗传多样性水平较低,从分子水平解释了现有糯高粱种质资源贫乏、遗传基础狭窄、产量水平低下等问题。因此,在我们今后的高粱育种中,应该增加种质资源的遗传多样性,利用标记辅助育种等手段,选育优质高产抗病、适合机械化生产、符合酱香型白酒酿造工艺的新品种,更好地为贵州特色优势产业服务。

### 参考文献:

- [1] 余传涨,翟国伟,邹桂花,等. 41 个高粱品种遗传多样性的 SSR 标记检测[J]. 江苏农业学报,2010,26(2):248-253.
- [2] 董怀玉,徐秀德,姜钰,等. 高粱糯质资源创新及其利用研究[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(3):321-324.
- [3] 吴兆发,罗胡科,刘黔,等. 应用灰色关联分析法筛选优质酒用糯高粱种质[J]. 种子,2012,31(6):61-65.
- [4] Chittenden L M, Schertz K F, Lin Y R, et al. A detailed RFLP map of *Sorghum bicolor* × *S. propinquum*, suitable for high-density mapping, suggests ancestral duplication of sorghum chromosomes or chromosomal segments[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1994, 87(8):925-933.
- [5] Ayana A, Bryngelsson T, Bekele E. Genetic variation of Ethiopian and Eritrean sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench] germplasm assessed by random amplified polymorphic DNA (RAPD)[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2000, 47(5):471-482.
- [6] Boivin K, Deu M, Rami J F, et al. Towards a saturated sorghum map using RFLP and AFLP markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999, 98(2):320-328.
- [7] Brown S M, Hopkins M S, Mitchell S E, et al. Multiple methods for the identification of polymorphic simple sequence repeats (SSRs) in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench][J]. Theoretical & Applied Genetics, 1996, 93(1/2):190-198.
- [8] 张晗,王建成,王东建,等. 中国高粱地方品种遗传多样性评价及中、外高粱遗传变异水平比较[J]. 作物学报,2011,37(2):224-234.
- [9] 赵香娜,岳美琪,刘洋,等. 国内外甜高粱种质遗传多样性的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(4):407-412.
- [10] 倪先林,赵甘霖,刘天朋,等. SSR 分子标记在糯高粱种质资源遗传多样性分析中的应用[J]. 江苏农业学报,2015,31(1):16-22.
- [11] 陈宏. 基因工程试验技术[M]. 北京:中国农业出版社,2005.
- [12] Rnhlf F J. NTSYS - pc; numerical taxonomy and multivariate analysis system version 2.1[M]. New York:Exeter Publications,2000.
- [13] 彭秋. 贵州酿造高粱育种现状、问题及对策[J]. 种子,2011,30(2):68-68,71.
- [14] 彭忠华,吴盛黎. 酒用高粱生育特性及产量性状研究[J]. 贵州农业科学,1991(1):29-34.
- [15] Ritter K B, McIntyre C L, Godwin I D, et al. An assessment of the genetic relationship between sweet and grain sorghums, within *Sorghum bicolor* ssp. *bicolor* (L.) Moench, using AFLP markers[J]. Euphytica, 2007, 157(1/2):161-176.