

中国斑茅种质资源分子多态性分析

张木清^{1,①}, 洪艺珣¹, 李奇伟², 刘少谋², 张垂明², 杨荣仲¹

(1. 福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室,福建 福州 350002; 2. 广州甘蔗糖业研究所,广东 广州 510316)

摘要 采用 ISSR 分子标记技术,对采自我国 8 省区的 30 个斑茅 [*Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw.] 无性系的分子多态性进行了分析,共扩增出 87 条多态带,平均每个引物扩增的多态带数为 5.1 条,多态性条带比率(PPB)为 64.89%,多态信息量(PIC)为 0.58,说明我国斑茅具有较丰富的遗传多样性。根据研究结果进行聚类和主成分分析,可将 30 个斑茅无性系归为 4 大类,同一地区的斑茅无性系基本聚在同一类,呈现出一定的地域性分布规律。

关键词: 斑茅;ISSR;分子多态性

中图分类号: S566.9.02; Q346. +5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2004)01-0001-06

Molecular polymorphic analyses for the germplasms of *Erianthus arundinaceus* collected in China
ZHANG Mu-qing^{1,①}, HONG Yi-xun¹, LI Qi-wei², LIU Shao-mou², ZHANG Chui-ming², YANG Rong-zhong¹ (1. Key Lab of Eco-physiology and Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China; 2. Guangzhou Sugarcane Industry Institute, Guangzhou 510316, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2004, 13(1): 1~6

Abstract: Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) molecular markers were used to detect the genetic diversity among 30 clones of *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw. collected from eight provinces and regions in China. Eighty-seven polymorphic bands were produced totally, average 5.1 bands from each pair of ISSR primers, average percentage of polymorphic bands was 64.89%, and mean polymorphism information content was 0.58, which were indicating the rich genetic diversity of *E. arundinaceus* in China. Based on the cluster and principal component analyses on the genetic characteristics, all the clones could be divided into 4 groups according to the nearest phylogenetic relationship. In most cases, the clones from the same region were in the same group and only the clones from few regions could not be clustered into the same group, which considerably presented the geographical distribution of genetic diversity of the tested clones.

Key words: *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw.; ISSR marker; molecular polymorphism

甘蔗近缘植物斑茅 [*Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw.] 属蔗茅属 (*Erianthus* Michaux.), 具有较强的抗病虫性、抗旱性、抗涝性及耐瘠性,宿根性好,分蘖性强,极粗生,适应性广^[1~5],通过远缘杂交,利用斑茅的强抗逆性基因,极有可能获得一批多抗的甘蔗新种质,从而扩大甘蔗育种的遗传基础。目前,我国已与澳大利亚、美国、巴西等国家合作开展斑茅种质资源收集、评价和杂交利用等研究,取得了一定进展,选育出一些具有斑茅亲缘的后代^[6~8]。

ISSR 标记或微卫星标记具有较高的多态性、共显性分离、位点专一性、标记覆盖整个基因组且分布均匀、DNA 样本用量少等优点,在小麦、水稻、玉米、大豆、高粱、大麦和甘蔗等主要作物中广泛用于构建连锁遗传图谱、进行遗传变异等研究^[9,10]。本研究拟在余爱丽等^[11]研究基础上,利用 ISSR 标记对采

自中国 8 个省区的 30 个斑茅无性系进行遗传多样性分析,以期为我国斑茅种质资源的保存与杂交利用提供可资借鉴的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

30 份斑茅无性系来源见表 1。分别保育在海南甘蔗育种场的资源圃。2002 年 12 月取生长正常的斑茅叶片用于 DNA 的提取,以甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 品种‘拔地拉’作为对照。

收稿日期: 2003-07-07

基金项目: 国家“863”计划课题糖料新品种选育(2001AA241191)和国家自然科学基金(30170590)资助项目

作者简介: 张木清(1966-),男,福建周宁人,博士,博士生导师,研究员,主要研究方向为作物生理遗传与分子育种。

① 通讯作者 zmuqing@163.com

表1 供试斑茅无性系的名称及来源

Table 1 Names and sources of tested *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw. clones

编号 No.	名称 Names	来源 Sources	编号 No.	名称 Names	来源 Sources
1	江西 79-29 Jiangxi 79-29	江西 Jiangxi	16	广东 15号 Guangdong 15	广东 Guangdong
2	贵州 78-I-8 Guizhou 78-I-8	贵州 Guizhou	17	梅县斑茅 Meixianbanmao	广东 Guangdong
3	德宏 2号 Dehong 2	云南 Yunnan	18	贵州 78-II-10 Guizhou 78-II-10	贵州 Guizhou
4	白沙坡大白草 Baishapodabaicao	海南 Hainan	19	广东 51号 Guangdong 51	广东 Guangdong
5	云南 76-II-10 Yunnan 76-II-10	云南 Yunnan	20	贵州 78-II-03 Guizhou 78-II-03	贵州 Guizhou
6	四川 79-I-9 Sichuan 79-I-9	四川 Sichuan	21	江西 94-1 Jiangxi 94-1	江西 Jiangxi
7	崖城 2号 Yacheng 2	海南 Hainan	22	云南 76-I-013 Yunnan 76-I-013	云南 Yunnan
8	江西 83-4 Jiangxi 83-4	江西 Jiangxi	23	海南 92-79 Hainan 92-79	海南 Hainan
9	崖城 1号 Yacheng 1	海南 Hainan	24	海南 92-109 Hainan 92-109	海南 Hainan
10	四川 79-I-11 Sichuan 79-I-11	四川 Sichuan	25	海南 92-102 Hainan 92-102	海南 Hainan
11	四川 79-I-22 Sichuan 79-I-22	四川 Sichuan	26	海南 92-105 Hainan 92-105	海南 Hainan
12	福建 79-I-1 Fujian 79-I-1	福建 Fujian	27	云南 82-133 Yunnan 82-133	云南 Yunnan
13	崖城 3号 Yacheng 3	海南 Hainan	28	海南 92-106 Hainan 92-106	海南 Hainan
14	贵州 78-II-06 Guizhou 78-II-06	贵州 Guizhou	29	广西 87-31 Guangxi 87-31	广西 Guangxi
15	四川 79-I-29 Sichuan 79-I-29	四川 Sichuan	30	云南 82-69 Yunnan 82-69	云南 Yunnan

1.2 基因组 DNA 的提取

参考 Dellaporta、Wood 和 Hicks 法(1986)略加改进^[12]。

1.3 ISSR 扩增及其产物检测

在余爱丽等^[11]筛选的引物基础上,选 24 个来自 University of British Columbia Biotechnology Lab(UBCBL) 的系列引物 UBC # 9,这些引物大多有 16 或 17 个碱基(引物序列见表2)。PCR 反应体系 20 μL,包括 1.5

表2 用于斑茅无性系 ISSR 分析的引物序列

Table 2 Primer sequences used in ISSR analyses of *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw. clones

ISSR 引物 ISSR primer	引物序列 Primer sequence
UBC # 5	AGG TCG CGG CCG C(CTG) AT G
UBC # 6	ACA GTT GGT AGC TCT TGA TC
UBC # 10	(ACT)(ACG)(ACT) (TG),
UBC # 13	(CGT)(AGT)(CGT) (CA),
UBC # 20	(GGTG),
UBC # 23	(GGAT) ₄
UBC # 28	(GACA) ₄
UBC # 46	(AC) ₈ (CT)T
UBC # 47	(TC) ₈ (AG)G
UBC # 49	(TC) ₈ (AG)A
UBC # 51	(GT) ₈ (CT)C
UBC # 56	(CT) ₈ (AG)G
UBC # 61	(GA) ₈ (CT)T
UBC # 65	(AG) ₈ (CT)A
UBC # 66	(AG) ₈ (CT)C
UBC # 93	(AG) ₈ C
UBC # 94	(AG) ₈ T

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ MgCl_2 、dNTP 混合物 $0.15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、引物 $200 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、DNA 模板 $0.5 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 和 *Taq* 酶 1 单位。PCR 扩增反应在 Eppendorf Mastercycler Gradient 扩增仪上进行,扩增程序为:94℃预变性 7 min 1 个循环;94℃ 30 s,50℃ 45 s,72℃ 2 min,45 个循环;72℃延伸 7 min,1 个循环。扩增结束后,以 GeneRuler 100 bp DNA Ladder Plus 为 marker,用含有 0.1% EB 的 1.5% 凝胶电泳,在电压 $160 \text{ V}(4 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1})$ 、水浴制冷的条件下,电泳 2 h, VILBER LOURMAT 公司凝胶成像系统照相并保存。

1.4 数据统计与分析

应用 VILBER LOURMAT 公司的凝胶成像系统 BioID⁺⁺ 图像分析软件,对图像进行分析。首先对图像条带进行自动扫描,手检法去除因胶上亮点、加样扩增条带粘连等引起的计算机误检,然后将条带图像转换成匹配图。在相同迁移位置,有带记为 1,无带记为 0。

$$\text{遗传相似系数: } a = 2n_{xy}/(n_x + n_y)$$

其中 n_x, n_y 分别表示 x 行和 y 行各自所具有的条带数目; n_{xy} 表示 x 行和 y 行的共有带数目。聚类分析和主成分分析利用 SAS 统计分析软件进行^[13]; 标记位点的多态信息量 (polymorphism information content, PIC) 按公式 $PIC = 1 - \sum p_i^2$ 计算^[9]; 标记系统的有效等位基因数 (effective number of allele, N_e) 按公式 $N_e = 1/\sum p_i^2$ 计算^[10], 其中 p_i 表示 i 位点的基因频率。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的多态性

30份斑茅种质资源的ISSR-PCR部分引物的扩增结果见图版I。在所研究的24个ISSR引物中,有17个引物的扩增条带清晰可辨,其中有10个二核苷酸重复序列、2个四核苷酸重复序列、2个五核苷酸重复序列、1个简并核苷酸重复序列引物、2个其他引物,扩增片断集中在300 bp至2 000 bp之间。这些引物共扩增出87条多态带,平均每个引物扩增的多态带数为5.1条,多态性条带比率(PPB)为64.89%;多态信息量(PIC)为0.58;平均每个位点的有效等位基因数(N_e)为2.82(见表3)。

表3 斑茅无性系ISSR标记的多态性分析

Table 3 Polymorphic analysis for banding patterns amplified of *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw. clones by different ISSR primers

引物 Primer	多态性 带数目 Number of polymorphism band	条带大小 /bp Band size	多态信息量 Polymorphism information content	有效等位 基因数 Number of effective allele per locus
UBC # 5	3	300~800	0.65	2.84
UBC # 6	1	900~1 800	0.40	1.66
UBC # 10	7	500~1 000	0.66	2.92
UBC # 13	2	600~900	0.52	2.06
UBC # 20	4	800~1 400	0.48	1.91
UBC # 23	6	600~1 400	0.56	2.26
UBC # 28	11	400~1 800	0.82	5.43
UBC # 46	5	800~1 400	0.69	3.23
UBC # 47	2	800~1 300	0.42	1.71
UBC # 49	8	900~1 400	0.53	2.15
UBC # 51	6	500~1 400	0.75	4.03
UBC # 56	8	600~1 800	0.69	3.21
UBC # 61	6	400~1 200	0.76	4.13
UBC # 65	9	500~1 400	0.77	4.26
UBC # 66	0	1 031	0.00	1.00
UBC # 93	6	400~1 100	0.70	3.37
UBC # 94	3	500~1 300	0.46	1.85
平均 Mean	5.1	/	0.58	2.82

2.2 斑茅无性系间亲缘关系与分类

2.2.1 聚类分析 应用VILBER LOURMAT公司凝胶成像系统的图形分析软件,按Nei-Li的方法,当置信度为1%时,对16张图进行聚类分析,结果如图1所示。以相似系数72%作为基准,将30个斑茅无性系分为4类:江西79-29和四川79-I-9等15个斑茅

无性系为第Ⅰ类;贵州78-I-8、江西83-4、梅县斑茅、崖城1号和崖城3号为第Ⅱ类;广西87-31和贵州78-II-03等9个无性系为第Ⅲ类;崖城2号单独聚为第Ⅳ类。在第Ⅰ类中,江西79-29和四川79-I-9最为接近;第Ⅱ类中,贵州78-I-8和江西83-4最为接近;第Ⅲ类中,海南92-109与海南92-105最为接近。通过对该聚类图进行分析可发现,来源于同一地区的部分斑茅无性系聚在同一类,呈现出一定的地域性分布规律。如来自江西的江西79-29及江西91-4归在第Ⅰ类中;来自四川的四川79-I-9、四川79-I-11和四川79-I-29同在第Ⅰ类中;来自云南的德宏2号和

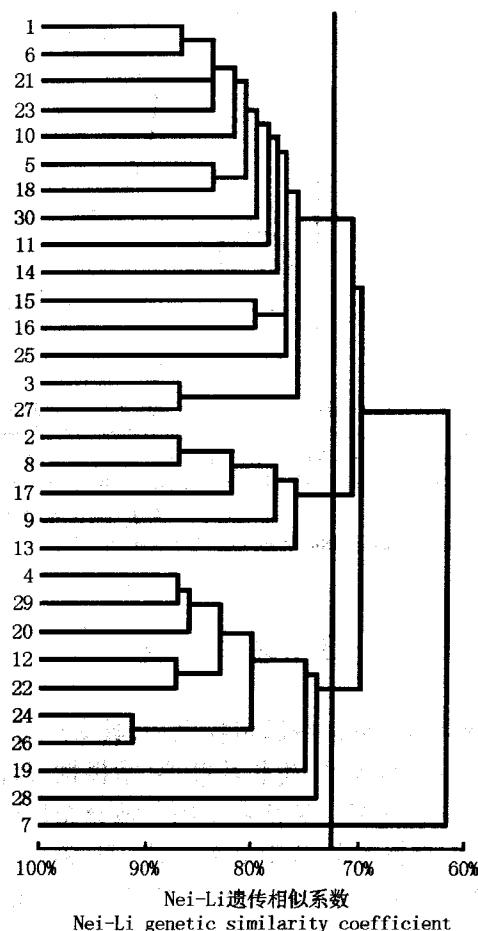
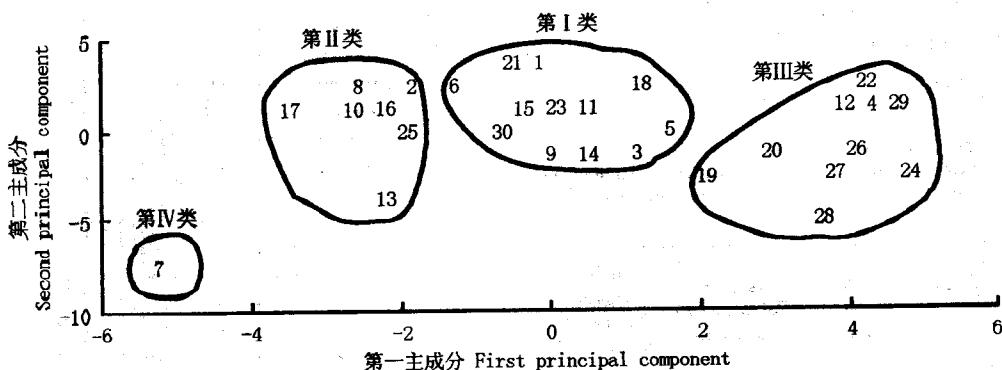


图1 基于Nei-Li遗传相似系数的供试斑茅无性系的聚类图
Fig. 1 Dendrogram of 30 *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw. clones based on ISSR data using Nei-Li's genetic similarity coefficients

云南 82-I-133 同在第Ⅰ类;来自海南的海南 92-102 和海南 92-79 同在第Ⅰ类;来自贵州的贵州 78-II-06 和贵州 78-II-10 聚在第Ⅰ类;来自海南的崖城 1 号和崖城 3 号聚在第Ⅱ类;来自海南的白沙坡大白草、海南 92-109、海南 92-105 和海南 92-106 聚在第Ⅲ类。但也有少数无性系例外,如来自广东的无性系广东 15 号、梅县斑茅及广东 51 号未聚在同一类中;来自四川的四川 79-I-22 并没有与其他 3 个来自四川的无性系共在第Ⅰ类中,而是归到第Ⅲ类中,最为明显的是来自海南的崖城 2 号与其他来源于海南的

斑茅无性系之间的相似系数甚低,独立成为一类。

2.2.2 主成分(PCA)分析 基于相似系数,在 SAS 软件上对不同斑茅无性系进行主成分分析,并根据第一、第二主成分进行作图(R 分析),所形成的各无性系的位置分布如图 2 所示,位置相靠近者表示关系密切,远离者表示关系疏远,将位置靠近的斑茅无性系划归在一起,结果表明主成分分析结果与聚类分析结果基本一致,同一地区的大部分无性系聚在一起,主成分分析结果更直观地表明了不同斑茅无性系之间的亲缘关系。



1. Jiangxi 79-29; 2. Guizhou 78-I-8; 3. Dehong 2; 4. Baishapodabaicao; 5. Yunnan 76-II-10; 6. Sichuan 79-I-9; 7. Yacheng 2; 8. Jiangxi 83-4; 9. Yacheng 1; 10. Sichuan 79-I-11; 11. Sichuan 79-I-22; 12. Fujian 79-I-1; 13. Yacheng 3; 14. Guizhou 78-II-06; 15. Sichuan 79-I-29; 16. Guangdong 15; 17. Meixianbannao; 18. Guizhou 78-II-10; 19. Guangdong 51; 20. Guizhou 78-II-03; 21. Jiangxi 91-4; 22. Yunnan 76-I-013; 23. Hainan 92-79; 24. Hainan 92-109; 25. Hainan 92-102; 26. Hainan 92-105; 27. Yunnan 82-133; 28. Hainan 92-106; 29. Guangxi 87-31; 30. Yunnan 82-69

Fig. 2 Associations among ISSR-PCR bands from 30 *Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jesw. clones revealed by principal component analyses (PCA)

3 讨 论

斑茅是甘蔗近缘属植物之一,具有广泛的适应性和很强的抗逆性,生长势旺盛,宿根性好,深受甘蔗育种界的重视。斑茅在全国各地分布广泛,杨清辉等^[14]、菜青等^[15]分别对采自滇、蜀、闽、粤、赣、琼和黔等省区的 35 份和 46 份斑茅无性系的染色体数目和植物学性状进行了观察,发现染色体数目有 $2n = 20$ 、 $2n = 40$ 和 $2n = 60$ 等 3 种类型,其中 $2n = 20$ 和 $2n = 40$ 类型的斑茅无性系很少,分布在西藏和贵州等地。本研究从海南甘蔗育种场保育的斑茅无性系中选取来源于滇、蜀、闽、粤、桂、琼、赣和贵等地区的 30 个典型斑茅无性系进行 ISSR 分子标记多样性分析,结果表明,平均每个引物扩增的多态带数为 5.1 条,多态性条带比率(PPB)为 64.89%;多态信息

量(PIC)为 0.58;平均每个位点的有效等位基因数(Ne)是 2.82。从而在分子水平上证实了不同斑茅无性系之间差异较大,遗传多样性较丰富。

聚类分析和主成分分析结果表明,供试斑茅无性系呈现出一定的地域性分布规律,如来自江西的江西 79-29、江西 91-4 聚在第Ⅰ类;来自四川的四川 79-I-9、四川 79-I-11 和四川 79-I-29 同在第Ⅰ类中;来自海南的白沙坡大白草、海南 92-109、海南 92-105 和海南 92-106 聚在第Ⅲ类。但也有例外,最明显的是来自海南的崖城 2 号与其他来自海南的斑茅无性系间的相似系数甚低,独立为一类,ITS 标记分析结果也表明其扩增谱带明显不同于其他无性系(郑雪芳,私人通讯)。推测可能是由于斑茅在进化过程中受到自然界选择淘汰,自然选择的结果使得个体中所发生的不定向变异造成群体遗传结构的定向变异^[16],这样经过长时间的进化演变,同一地区的大

部分斑茅无性系其基因型就可能趋于相似。但是也有少数地方的斑茅无性系分散且无法归为一类,其原因可能是:①基因突变,物种在进化过程中,有个别的基因发生变异,且发生变异后,若该突变体仍可较好地适应当地的环境,则可以使其基因型得以保存下来;②由于花粉串粉而导致天然杂交。

分子标记在种质资源研究中的应用主要有以下几个方面:分析种质资源的遗传多样性;研究种质间的遗传变异和亲缘关系;鉴定某种质所属的类群;建立指纹图谱用于品种保护等。根据刘万勃等^[17]的研究表明,ISSR 的多态性检测水平高于 RAPD,是 1 种很有价值的分子标记技术。由于 ISSR 标记所用的引物长度一般在 15~24 bp 之间,退火温度为 52℃ 以上,这样就保证了引物扩增的重复性和特异性,提高了分类结果的准确性,因此,ISSR 标记在甘蔗种质分类和进化研究中不失为 1 种理想的分子标记。

参考文献:

- [1] 何顺长. 云南省甘蔗野生资源开发利用前景的探讨[J]. 云南农业大学学报, 1987, 2(1): 105~111.
- [2] 沈万宽. 斑茅的杂交利用价值探讨[J]. 甘蔗(福建), 2002, 9(3): 1~5.
- [3] 陈逢彩. 谈谈蔗茅在甘蔗杂交育种中的价值问题[J]. 甘蔗精业, 1979(1): 12~18.
- [4] Nagai C. Somaclonal varieties of an intergeneric hybrid: *Saccharum* × *Ripidum* [A]. D J Heing. Annual Report of Experiment Station of Hawaii Sugar [C]. Aiea, Hawaii: Planter's Association, 1983: 9~10.
- [5] Sreenivasan T V. Sugarcane genetic resources activities in India and in vitro germplasm conservation [A]. K M Naidu, et al. Sugarcane Varietal Improvement [C]. Coimbatore, India: Sugarcane Breeding Institute, 1989: 177~194.
- [6] 廖兆周, 劳方业, 周耀辉, 等. 具有斑茅种质的耐旱甘蔗品系的选育[J]. 作物学报, 2002, 28(6): 841~846.
- [7] 邓海华, 廖兆周, 李奇伟, 等. 斑茅 F2 杂种选育与同工酶标记辅助选择[J]. 甘蔗糖业, 2002(1): 1~5.
- [8] 杨业后, 符成, 张重明, 等. 斑茅 F1 品系崖城 96-66 与 CP84-1198 杂交后代的鉴别[J]. 甘蔗糖业, 2002(4): 11~14.
- [9] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular marker in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 163~173.
- [10] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. Mol Breeding, 1996, 2: 225~238.
- [11] 余曼丽, 张木清, 陈如凯. ISSR 分子标记在甘蔗及其近缘属分类上的应用[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2002, 31(4): 484~489.
- [12] Geoff D, Brian S E. A Handbook of Statistical Analyses Using SAS, Second Edition[M]. Chapman & Hall: CRC Press, 2001. 398.
- [13] Dellaport S L, Wood J, Hicks J B. A plant DNA minipreparation: Version II [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1983, 1(14): 19~21.
- [14] 杨清舞, 李富生, 肖凤圆, 等. 斑茅染色体和植物学性状观察研究[J]. 云南农业大学学报, 1997, 12(4): 253~256.
- [15] 莱青, 文建成, 范源洪, 等. 甘蔗属及其近缘植物的染色体分析[J]. 西南农业学报, 2002, 15(2): 16~19.
- [16] 刘祖洞. 遗传学(下)[M]. 北京: 高等教育出版社, 1991. 338.
- [17] 刘万勃, 宋明, 刘富中, 等. RAPD 和 ISSR 标记对甜瓜种质遗传多样性的研究[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 231~236.

图版说明 Explanation of Plates

图版 I 1. 江西 79-29; 2. 贵州 78-I-8; 3. 德宏 2 号; 4. 白沙坡大白草; 5. 云南 76-II-10; 6. 四川 79-I-9; 7. 崖城 2 号; 8. 江西 83-4; 9. 崖城 1 号; 10. 四川 79-I-11; 11. 四川 79-I-22; 12. 福建 79-I-1; 13. 崖城 3 号; 14. 贵州 78-II-06; 15. 四川 79-I-29; 16. 广东 15 号; 17. 梅县斑茅; 18. 贵州 78-II-10; 19. 广东 51 号; 20. 贵州 78-II-03; 21. 江西 91-4; 22. 云南 76-I-013; 23. 海南 92-79; 24. 海南 92-109; 25. 海南 92-102; 26. 海南 92-105; 27. 云南 82-133; 28. 海南 92-106; 29. 广西 87-31; 30. 云南 82-69; 31. 拔地拉(对照)。

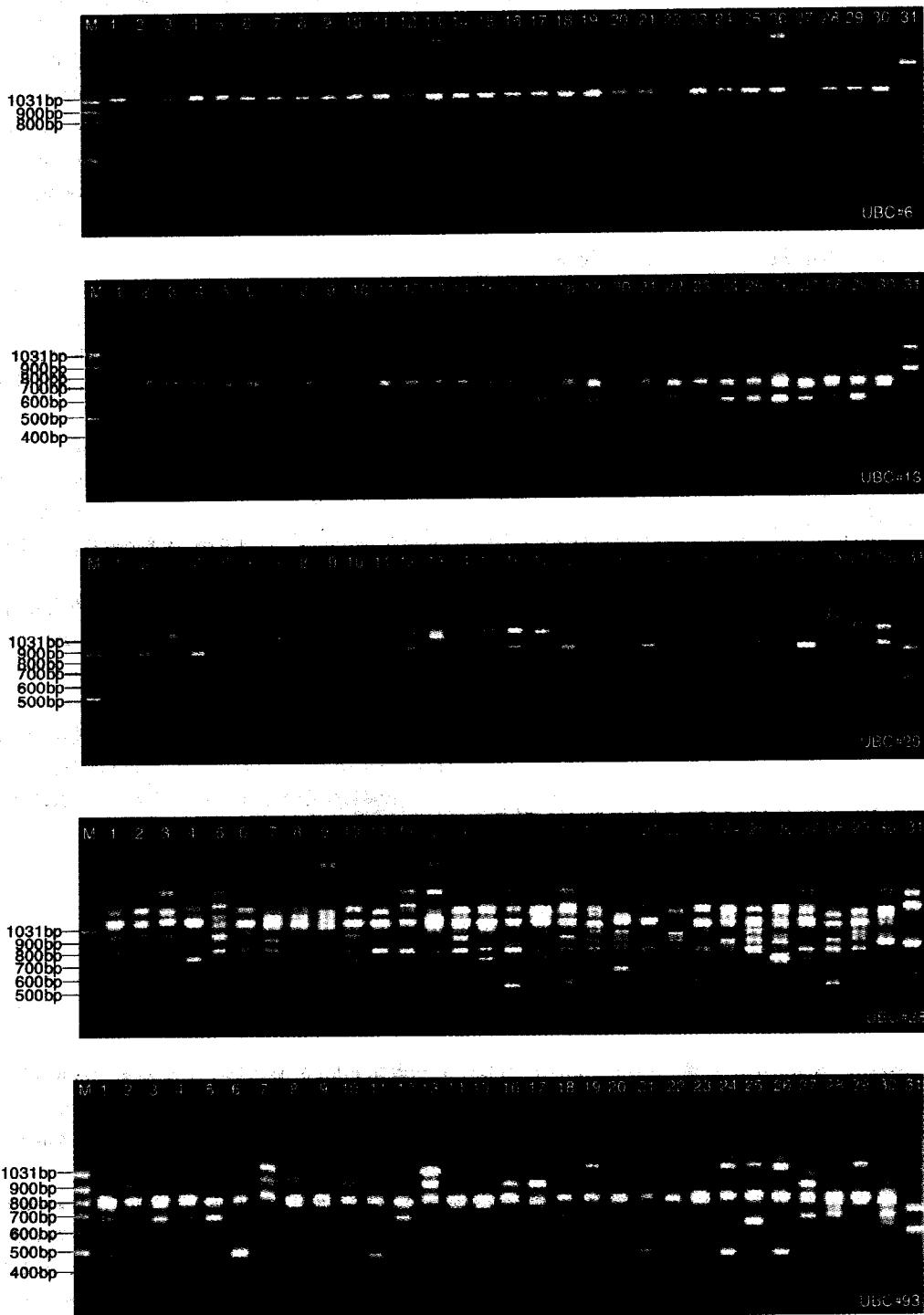
Plate I 1. Jiangxi 79-29; 2. Guizhou 78-I-8; 3. Dehong 2; 4. Baishapodabaicao; 5. Yunnan 76-II-10; 6. Sichuan 79-I-9; 7. Yacheng 2; 8. Jiangxi 83-4; 9. Yacheng 1; 10. Sichuan 79-I-11; 11. Sichuan 79-I-22; 12. Fujian 79-I-1; 13. Yacheng 3; 14. Guizhou 78-II-06; 15. Sichuan 79-I-29; 16. Guangdong 15; 17. Meixianbanmo; 18. Guizhou 78-II-10; 19. Guangdong 51; 20. Guizhou 78-II-03; 21. Jiangxi 91-4; 22. Yunnan 76-I-013; 23. Hainan 92-79; 24. Hainan 92-109; 25. Hainan 92-102; 26. Hainan 92-105; 27. Yunnan 82-133; 28. Hainan 92-106; 29. Guangxi 87-31; 30. Yunnan 82-69; 31. *Saccharum officinarum* L. cv. Badila (CK)

张木清等:中国斑茅种质资源分子多态性分析

ZHANG Mu-qing et al: Molecular polymorphic analyses for the germplasms of *Erianthus arundinaceus* collected in China

图版 I

Plate I



See the explanation of the end of text