

68 份国外甘蔗种质资源遗传多样性的 AFLP 分析

刘家勇^{1,2}, 赵培方^{1,2}, 刘新龙^{1,2}, 赵俊^{1,2}, 杨昆^{1,2}, 吴才文^{1,2}, 应雄美^{1,2}, 曾逢刚^{1,2}, 陈学宽^{1,2*}

(1.云南省农业科学院甘蔗研究所, 云南 开远 661699; 2.云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 云南 开远 661699)

摘要:采用 10 对扩增片段长度多态性标记(AFLP)引物,对近年来从澳大利亚、法国、美国和菲律宾引进,并保存于国家甘蔗种质资源圃的 68 份甘蔗种质资源进行遗传多样性研究。结果表明:68 份种质间的遗传相似性系数较高,为 0.497 5~0.887 9,平均为 0.761 2,表明大部分种质之间亲缘关系相近,遗传基础相似,遗传多样性并不丰富;各类种质间的平均遗传相似性系数以 VMC 型(菲律宾)最大,为 0.825,Q 型(澳大利亚)和 CP 型(美国)次之,分别为 0.802 和 0.752,FR 型(法国)最小,为 0.685;在相似性系数 0.676 处可将 68 份种质分为 5 组,A 组含 CP67-412,B 组含 FR94-515,C 组含 FR96-626,D 组含 FR94-126,其余 64 份种质构成 E 组,占全部种质数的 94.1%,A、B、C、D 组 4 份种质与 E 组种质相比,亲缘关系较远,显示了独特的遗传组成;来自法国的种质资源具有较高的分散度,包含了较多的遗传信息。

关键词:甘蔗;国外种质;扩增片段长度多态性;遗传多样性

中图分类号:S566.1 文献标志码:A 文章编号:1007-1032(2013)05-0466-05

Genetic diversity analysis on 68 foreign sugarcane germplasms (*Saccharum* spp.) with AFLP technique

LIU Jia-yong^{1,2}, ZHAO Pei-fang^{1,2}, LIU Xin-long^{1,2}, ZHAO Jun^{1,2}, YANG Kun^{1,2}, WU Cai-wen^{1,2},

YING Xiong-mei^{1,2}, ZAN Feng-gang^{1,2}, CHEN Xue-kuan^{1,2*}

(1.Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Science, Kaiyuan, Yunnan 661699, China; 2.Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan, Yunnan 661699, China)

Abstract: We have studied the genetic diversity of 68 sugarcane (*Saccharum* spp.) germplasms imported from Australia (Q), France (FR), the United States (CP) and Philippines (VMC) and stored in the National Sugarcane Germplasm Resources Garden by taking the amplified fragment length polymorphism (AFLP) marker technique. The result shows that the genetic similarity coefficient (GS) among 68 sugarcane germplasms is quite high, ranging from 0.497 5 to 0.887 9 with a mean value of 0.761 2, indicating that most of them have a close relationship with each other and a similar genetic base with each other, that there is not enough rich genetic diversity among 68 sugarcane germplasms. The order of the average GS coefficient is VMC (0.825), Q (0.802), CP (0.752) and FR (0.685) successively. The analysis by UPGMA indicates that the 68 foreign sugarcane germplasms can be divided into 5 groups (A-E) at a GS coefficient of 0.676. CP67-412, FR94-515, FR96-626 and FR94-126 belonged to group A-D respectively. The rest (64 sugarcane germplasms) fall in the group E, covering a percentage of 94.1% of all the germplasms. CP67-412, FR94-515, FR96-626 and FR94-126 in Group A-D show a distant relative relationship and a special genetic composition, compared with the others. The study has found that the FR germplasms are more divergent and embody more genetic information than the others.

Key words: sugarcane; foreign germplasm; amplified fragment length polymorphism (AFLP); genetic diversity

收稿日期:2012-12-03

基金项目:国家现代农业产业技术体系建设专项(CARS-20-1-1);云南省自然科学基金项目(2010CD003);云南省重点新产品开发计划(2011BB005);云南省甘蔗产业技术体系育种与繁育岗位专家专项(云农科[2009]53号)

作者简介:刘家勇(1976—),男,云南建水人,硕士,副研究员,主要从事甘蔗遗传育种研究,lijjy1976@163.com;*通信作者,ysri_chxk@163.com

甘蔗亲本遗传基础狭窄,严重制约着甘蔗杂交育种的进一步发展。世界各蔗糖生产国都非常重视甘蔗种质资源的收集、评价与创新利用^[1-2],以拓宽育种亲本的遗传基础。

引进和利用国外优良甘蔗种质资源,对促进中国甘蔗育种,蔗糖产业的发展,增强甘蔗育种自主创新意义意义。据不完全统计,中国利用引进种质 Co419、CP49-59、NCo310^[3]、CP72-1210^[4],分别育成了 24、26、27 和 12 个优良甘蔗品种,极大地增强了育种自主创新能力,同时也显示出核心种质在杂交育种中的重要性。邓海华等^[4]对中国 175 个自育甘蔗品种的亲系进行了统计分析,这些品种均含有国外种质血缘,其中,直接利用国外引进种质育成的品种有 116 个,占 60% 以上。

随着对外合作与交流的扩大,大批甘蔗种质资源被陆续引进,中国甘蔗杂交育种基因库不断得到丰富。对种质资源进行评价,以提高引进甘蔗种质的利用效率和针对性显得十分必要。

Karen 等^[5]使用扩增片段长度多态性标记(AFLP)对 270 份热带种和 151 份澳大利亚甘蔗优良品种及主要亲本的遗传多样性进行研究,结果显示,澳大利亚种质资源包含了热带种主要的遗传变异。劳方业等^[6]采用 AFLP 分子标记技术探讨了广东育成的 41 个甘蔗品种的遗传多样性,41 个甘蔗品种间的遗传相似系数为 0.521 0~0.921 1,平均为 0.684 2,遗传多样性属中等水平。庄南生等^[7]采用 AFLP 分子标记技术对 54 份甘蔗种质(14 份祖亲种、40 份栽培品种或品系)的遗传基础进行分析,结果表明,54 份种质的遗传相似性系数变化范围为 0.281~0.943,平均 0.708。此外,刘新龙等^[8]采用 AFLP 分子标记技术对收集自云南保山、腾冲、陇川和盈江等地的 41 份滇蔗茅种质资源进行研究,结果表明,滇蔗茅无性系之间的相似性系数为 0.511~0.827,无性系间存在明显的遗传分化现象。笔者拟采用 AFLP 分子标记技术对近年来从澳大利亚、法国、美国和菲律宾引进,并保存于国家甘蔗种质资源圃的 68 份甘蔗种质资源进行研究,以期发掘血缘异质性大的种质,为提高引进甘蔗种质在杂交育种和种质创新中的利用效率和针对性提供依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为从澳大利亚、法国、美国和菲律宾等国家引进,并保存于国家甘蔗种质资源圃的 68 份甘蔗种质资源(已经过严格的病虫害检疫检测)。其中澳大利亚种质资源 24 份,为 Q 型:Q170、Q141、Q188、Q117、Q205、Q183、Q200、Q96、Q90、Q68、Q190、Q165、Q151、Q124、Q166、Q157、Q152、Q121、Q208、Q135、Q138、Q75、Q83、Q72。法国种质资源 24 份,为 FR 型:FR93-435、FR96-626、FR96-29、FR99-116、FR99-429、FR94-162、FR93-471、FR94-126、FR94-280、FR93-803、FR96-405、FR96-47、FR96-22、FR97-80、FR98-194、FR97-32、FR97-97、FR93-344、FR93-1054、FR93-257、FR94-444、FR94-515、FR96-910、FR96-95。美国种质资源 12 份,为 CP 型:CP72-330、CP85-1308、CP70-321、CP84-1198、CP88-1762、CP7(Hocp91-555)、CP8(Hocp92-648)、CP82-1592、CP74-2005、CP80-1827、CP72-1210、CP67-412。菲律宾种质资源 8 份,为 VMC 型:VMC88-354、VMC71-238、VMC84-524、VMC76-16、VMC87-599、VMC95-37、VMC71-39、VMC86-550。

1.2 方 法

1.2.1 甘蔗基因组 DNA 的提取与纯化

参照 Doyle 等^[9]的方法并略加改进,提取甘蔗基因组 DNA 并纯化。

1.2.2 建立 AFLP 反应体系

AFLP 按 Vos^[10]方法进行适当的调整。经 *EcoR* I 和 *Mse* I 酶切后的 DNA 与 *EcoR* I 和 *Mse* I 特定接头连接,通过 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物(含 1 个选择性核苷酸)进行预扩增,其反应的条件为 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 60 s, 72 °C 延伸 60 s, 20 个循环。稀释预扩增产物作为选择性扩增反应的模板,以含 3 个选择性核苷酸的 *EcoR* I 和 *Mse* I 引物进行第 2 阶段扩增,PCR 的反应程序为 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环,再以每循环复性温度逐级降低 0.7 °C 的梯度进行 12 个循环,变性和延伸条件同上;最后以 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 23

个循环结束。凝胶染色按刘新龙等^[11]构建的快速银染法进行。

1.2.3 引物筛选

以64对 AFLP 引物^[12]为基础,从供试材料中随机选取8个样品(Q183、Q135、Q166、FR93-257、FR96-22、VMC76-16、VMC95-37和CP7),从64对 AFLP 引物中筛选出10对多态性高的引物,对68份国外甘蔗种质资源进行分子标记。筛选出的10对引物为: EACT/M-CAG、EACA/M-CTG、EACT/M-CAA、EACT/M-CAC、EACA/M-CTC、EAAC/M-CAG、EAAC/M-CAC、EACT/M-CTC、EACC/M-CAG、EACA/M-CAA。

1.2.4 数据统计和分析

AFLP 扩增条带在相同迁移位置,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失或不清楚记为“-”。

采用 POPGEN32 软件计算标记位点的多态性条带比率(*PPB*)、标记位点的多态信息量(*PIC*)和有效等位基因数(*Ne*)同时使用 NTSYS2.1 计算 Jaccard(1908)相似性系数,根据相似性系数进行非加权类平均法(UPGMA)聚类分析^[13]。

2 结果与分析

2.1 68份国外甘蔗种质资源 AFLP 扩增多态性

多态性高的10对 AFLP 引物对68份材料进行 PCR 扩增(表1),所得扩增产物条带清晰,共统计到1178个扩增片段,其中多态性条带1013个,多态性条带比率为85.76%;每个位点的平均多态信息量为0.2538,每对引物的有效等位基因数为1.3~1.5个;每个引物扩增的多态性条带平均为101.3条。表明 AFLP 具有较高的多态标记检出率。

表1 10对 AFLP 引物的多态性

引物	总带数/条	多态性带数/条	多态性条带比率/%	多态信息量	有效等位基因数/个
EACT/M-CAG	78.0	63.0	80.77	0.215 4	1.3
EACA/M-CTG	110.0	94.0	85.45	0.293 6	1.5
EACT/M-CAA	180.0	155.0	86.11	0.288 1	1.5
EACT/M-CAC	114.0	106.0	92.98	0.264 4	1.4
EACA/M-CTC	105.0	87.0	82.86	0.225 2	1.4
EAAC/M-CAG	120.0	109.0	90.83	0.255 2	1.4
EAAC/M-CAC	130.0	110.0	84.62	0.232 3	1.4
EACT/M-CTC	106.0	90.0	84.91	0.233 9	1.4
EACC/M-CAG	122.0	108.0	88.52	0.259 2	1.4
EACA/M-CAA	113.0	91.0	80.53	0.270 4	1.4
平均	117.8	101.3	85.76	0.253 8	1.4

2.2 遗传相似性系数

对68份种质材料进行遗传相似性分析,结果表明,68份种质材料的相似性系数较高,为0.4975~0.8879,平均为0.7612,其中Q90与Q83最为相似,相似性系数为0.8879;FR94-126与FR94-515相似性系数最小,为0.4975。计算不同来源材料间的平均遗传相似性系数,VMC型最高(0.825),FR型最低(0.685),Q型(0.802)和CP型(0.752)居中。VMC型种质材料相似性系数为0.787~0.856,平均为0.825,其中VMC76-16与VMC87-599最为相似,为0.856,VMC84-524与VMC71-39之间相似性系数最小,为

0.787。Q型种质材料相似性系数为0.7011~0.8879,平均为0.802,其中Q83与Q96最为相似,为0.8879,Q166与Q141相似性系数最小,为0.7011。CP型种质材料相似性系数为0.6239~0.8785,平均0.752,其中CP8与CP7最为相似,为0.8785,CP82-1529与CP67-412相似性系数最小,为0.6239。FR型种质材料相似性系数为0.4975~0.801,平均0.685,其中FR96-910与FR96-95最为相似,为0.801;FR94-126与FR94-515相似性系数最小,为0.4975。

2.3 聚类分析

对68份种质材料采用UPGMA聚类分析,以1178

个位点的谱带数据为原始矩阵构建聚类分析图(图 1),在相似性系数 0.676 处进行分割,可将 68 份材料分为 5 组(A、B、C、D、E 组)。A 组含 CP67-412, B 组含 FR94-515, C 组含 FR96-626, D 组含 FR94-126,这 4 份种质与其他种质较早分开,体现了较远的亲缘关系,有其独特的遗传组成,在杂交利用中可优先考虑。余下的 64 份种质材料组成 E 组,占全部种质数的 94.1%,体现了大部份种质材料亲缘关系相近,遗传组成相似。

对 E 组 64 份种质材料作进一步分割,在相似性系数 0.752 处,可分为 4 个亚组 E1 亚组含 CP70-321 和 CP84-1198; E2 亚组含 CP82-1592、FR99-116、FR96-29 和 Q141; E3 亚组含 FR93-471 和 FR94-162; 余下 56 份种质组成 E4 亚组。在相似性系数

0.79 处,又可将 E4 亚组分为 6 个次亚组:Q190 和 FR93-257 分别组成 E4-1 和 E4-2 次亚组; E4-3 由 1 个法国种质(FR99-429)和 5 个澳大利亚种质(Q135、Q75、Q183、Q117 和 Q188)组成; E4-4 次亚组含 2 个法国种质(FR98-194 和 FR96-405); E4-5 次亚组含 8 个美国种质(CP85-1308、CP72-1210、CP80-1872、CP74-2005、CP7、CP8、CP88-1762 和 CP72-330)和 8 个菲律宾种质(VMC84-524、VMC71-39、VMC95-37、VMC87-599 VMC76-16、VMC86-550、VMC71-238 和 VMC88-354); E4-6 次亚组由 30 份种质组成,其中 17 个澳大利亚种质, 13 个法国种质。E4-6 次亚组所含种质数占全部种质数的 44.1%。

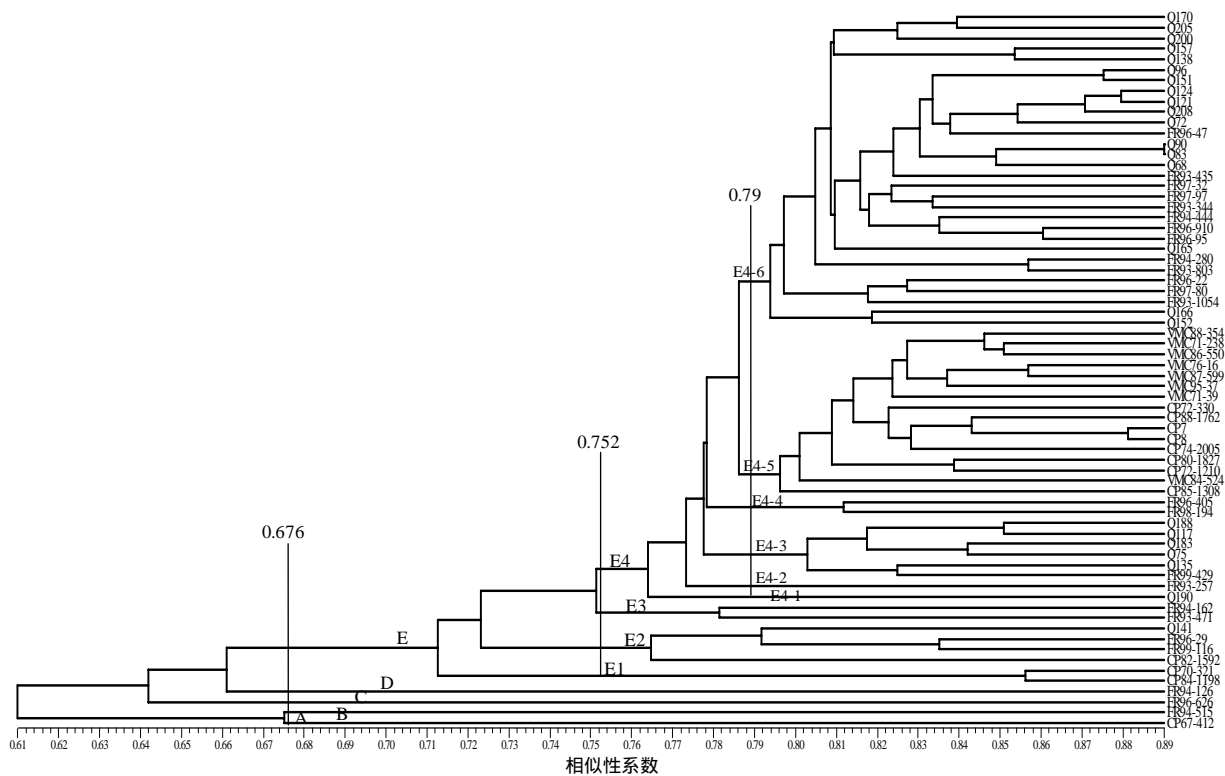


图 1 68份国外甘蔗种质资源AFLP分子系统树

Fig.1 Dendrogram by Jaccard similarity coefficient and UPGMA based on AFLP data

3 讨论

遗传相似性系数和聚类分析结果显示,68 份国外甘蔗种质材料间具有较高的遗传相似性,遗传基础相似,遗传多样性并不丰富;来自法国的种质材料遗传相似性系数最小,聚类分析中分散度较其他种质材料大,包含了较多的遗传信息;聚类分析结

果显示,CP67-412、FR94-515、FR96-626、FR94-126 等 4 份种质与其他种质相比具有较远的亲缘关系,显示了独特的遗传组成,在杂交育种中应给予足够的重视。美国种质与菲律宾种质遗传相似度高,大多聚为一类(E4-5 亚次组),法国和澳大利亚种质遗传相似度高,大多聚为一类(E4-6 亚次组)。

甘蔗系谱记录是甘蔗杂交育种过程中的重要工作。系谱记录可为甘蔗杂交组合的配制提供重要的参考信息,但由于甘蔗是复杂的异源多倍体,且在杂交过程中自交、串粉现象常有发生,导致系谱记录并不能真实反映其亲系关系。相关研究^[14-15]表明,系谱记录一定程度上不能完全反映其真实亲缘关系,仅采用系谱记录作为亲本组合选配过程中衡量亲本间亲缘关系的依据存在一定局限。Lima等^[16]以79份甘蔗种质为研究材料,进行了分子水平上的亲缘关系和系谱之间的相关性研究,表明分子水平上的亲缘关系比系谱更加可靠,且能获得更多的有用参考信息。庄南生等^[7]采用 AFLP 分子标记技术对 54 份甘蔗种质进行研究,结果显示广西 1 号和闽糖 70-611 虽然来自同一杂交组合 CP49-50×F134,但聚类分析并未分在同一组内。刘睿等^[17]采用 SSR 分子标记技术对 18 个粤糖甘蔗品种进行研究,结果显示,粤糖 83-251、粤糖 83-271 和粤糖 83-257 等 3 个品种虽然均来自同一杂交组合 CP72-1210×华南 56-12,但聚类分析并未分在同一组中。本研究中,Q141,Q124,Q121,Q135 虽然来自同一杂交组合 NCO310×QN54-7096,但在聚类分析中并没有全部分在同一组中,除 Q124 和 Q121 被分在同一组(E4-6)外,Q141(E2)和 Q135(E4-3)分别落于不同的组中。由此可见,从分子水平上揭示种质的遗传基础和亲缘关系,可为种质资源的创新利用和杂交组合的选配提供真实可靠的依据。

目前,DAN 分子标记技术已广泛应用于甘蔗种质创新过程中的真实性鉴定、甘蔗指纹图谱、甘蔗种质遗传多样性研究等方面。种质材料之间的遗传距离信息虽然能够从分子水平上了解种质材料之间真实的亲缘关系,有效地指导杂交组合的组配,但是在不同遗传距离范围下组配的杂交组合,其后代在大田条件下的表现状况和性状分离状况的研究却鲜见报道。从指导甘蔗杂交育种和提高育种效率上来说,了解、研究和明确何种遗传距离范围下配制的杂交组合能够产生更多变异和更具优势的杂交后代才显得更具意义。

参考文献:

- [1] 李杨瑞.现代甘蔗学[M].北京:中国农业出版社,2010.
[2] 陈如凯,林彦铨,张木清.现代甘蔗育种的理论与实

践[M].北京:中国农业出版社,2003.

- [3] 李奇伟,陈子云,梁洪.现代甘蔗改良技术[M].广州:华南理工大学出版社,2000:15-18.
[4] 邓海华,李奇伟.CP72-1210 在我国甘蔗育种中的利用[J].广东农业科学,2007(11):18-21.
[5] Aitken K S, Li J C, Jackson P, et al. AFLP analysis of genetic diversity within *Saccharum officinarum* and comparison with sugarcane cultivars[J]. Australian Journal of Agricultural Research, 2006, 57(11): 1167-1184.
[6] 劳方业,刘睿,何慧怡,等.广东甘蔗品种遗传多样性的 AFLP 分析[J].热带亚热带植物学报,2008,17(1):43-48.
[7] 庄南生,郑成木,黄东益,等.甘蔗种质遗传基础 AFLP 分析[J].作物学报,2005,31(4):444-450.
[8] 刘新龙,蔡青,毕艳,等.中国滇蔗茅种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J].作物学报,2009,35(2):262-269.
[9] Doyle J J, Doyle J I. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 149-151.
[10] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new concept for DNA fingerprinting[J]. Nucl Acids Res, 1995, 23: 4407-4414.
[11] 刘新龙,蔡青,毕燕,等.甘蔗 AFLP 标记和 SSR 标记的 PAGE 胶快速银染检测方法[J].江苏农业学报,2009,25(2):433-435.
[12] 刘新龙,毛钧,陆鑫,等.甘蔗 SSR 和 AFLP 分子遗传连锁图谱构建[J].作物学报,2010,36(1):177-183.
[13] Nei M, Kumar S. Molecular evolution and phylogenetics[M]. New York: Oxford University Press, 2000: 87-88.
[14] Nair N V, Selvi A, Sreenivasan T V, et al. Molecular diversity in Indian sugarcane cultivars as revealed by randomly amplified DNA polymorphisms[J]. Euphytica, 2002, 127: 219-225.
[15] 王英,庄南生,高和琼,等.甘蔗种质遗传基础的 ISSR 分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2007,33(S1):176-187.
[16] Lima M L A, Garcia A A F, Oliveira K M, et al. Analysis of genetic similarity detected by AFLP and coefficient of parentage among genotypes of sugarcane (*Saccharum spp.*)[J]. Theor Appl Genet, 2000, 104: 30-38.
[17] 刘睿,劳方业,何慧怡,等.粤糖系列甘蔗品种遗传多样性的 SSR 分析[J].甘蔗糖业,2008(3):1-5.

责任编辑:罗慧敏

英文编辑:张健