

广东甘蔗品种遗传多样性的 AFLP 分析

劳方业, 刘睿, 何慧怡, 邓海华,
陈仲华, 陈健文, 符成, 张垂明

(广州甘蔗糖业研究所, 广东省甘蔗改良与生物炼制重点实验室, 广州 510316)

摘要:采用 15 对多态性较好的 AFLP 引物对广东育成的 41 个甘蔗品种的遗传多样性进行分析。结果表明:每对引物的多态性位点平均为 61.5, 多态性位点百分率为 77.40%。41 个甘蔗品种间的遗传相似系数为 0.5210 ~ 0.9211, 平均为 0.6842, 遗传多样性属中等水平。聚类分析把 41 个品种分为 2 大类, 在系谱中亲缘关系密切的大多数品种, 如粤农 81-762 与粤农 85-1285 和粤农 86-295, 粤糖 57-423 与粤糖 85-5 和粤糖 85-177 等都能分别聚在一起。但也有例外, 如粤糖 83-251 和粤糖 83-271, 都是 CP72-1210 × 华南 56-12 组合的后代, 但没有归为同一类。遗传多样性指数分析显示, 不同年代的品种多样性指数差异明显, 最高是 80 年代, 为 0.3072, 最低是 60 年代, 为 0.1162; 不同单位选育的品种遗传多样性指数变化不大, 为 0.2756 ~ 0.3061。加强新种质利用是有效提高甘蔗品种遗传多样性的重要措施。

关键词:甘蔗; 品种; AFLP; 遗传多样性

中图分类号: S566.102.4

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)01-0043-06

AFLP Analysis of Genetic Diversity in Sugarcane Varieties in Guangdong Province

LAO Fang-ye, LIU Rui, HE Hui-yi, DENG Hai-hua, CHEN Zhong-hua,
CHEN Jian-wen, FU Cheng, ZHANG Chui-ming

(Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute, Guangdong Key Lab of Sugarcane Improvement and Biorefinery, Guangzhou 510316, China)

Abstract: The genetic diversity of 41 sugarcane varieties bred in Guangdong Province was studied using 15 AFLP primer pairs. The results showed that the average polymorphic loci per primer pair were 61.5, and the percentage of polymorphism loci was 77.40%. The genetic similarity indexes of 41 varieties ranged from 0.5210 to 0.9211, with an average of 0.6842, which implied that the genetic diversity among the varieties was at middle level. The 41 varieties were clustered into two groups. Most of the varieties with close relationship in family-tree could be clustered into the same groups, such as YN81-762, YN85-1285 and YN86-295, as well as YT57-423, YT85-5 and YT85-177, but some varieties could not, such as YT83-251 and YT83-271 which derived from the same cross "CP72-1210 × Huanan 56-12". The varieties selected at different periods showed remarkable differences in genetic diversity index (GDI). The varieties selected in 1980s were found to be the highest (GDI = 0.3072), and the 1960s the lowest (GDI = 0.1162). GDI of varieties from different Institutes revealed a little bit difference, but still kept in unremarkable level (from 0.2756 to 0.3061). The result indicated the genetic diversity would be increased by using new sources from sugarcane germplasm.

Key words: Sugarcane; Variety; AFLP; Genetic diversity

作物品种多样性是农业生产可持续发展的重要物质基础, 而遗传多样性是品种多样性的核心内

容。过去研究甘蔗品种的亲缘关系及遗传多样性主要是利用系谱图等进行分析推断。一般认为, 现

代糖料甘蔗品种是 3 ~ 5 种的杂交后代^[1], 是高度杂合的异源多倍体, 遗传性非常复杂, 在有性杂交过程中后代会产生高度分离现象, 而且串粉、种子

混杂情况也时有发生。因此, 只从系谱记录来分析推断其遗传组成和血缘关系是不够准确的、甚至是错误的。随着分子生物学技术的飞速发展, 分子标

表 1 参试材料

Table 1 The sugarcane varieties tested

编号 No.	品种 Variety	亲系 Parentage
1	粤糖 57-423 YT57-423	台糖 108 × 台糖 134 F108 × F134
2	粤糖 59-65 YT59-65	Co419 × 台糖 134 Co419 × F134
3	粤糖 63-237 YT63-237	Co419 × CP33-310
4	粤糖 64-395 YT64-395	华南 56-21 × 崖城 58-43 Huanan56-21 × YC58-43
5	粤糖 81-3254 YT81-3254	粤糖 57-423 × CP49-50 YT57-423 × CP49-50
6	粤糖 83-251 YT83-251	CP72-1210 × 华南 56-12 CP72-1210 × Huanan56-12
7	粤糖 83-257 YT83-257	CP72-1210 × 华南 56-12 CP72-1210 × Huanan56-12
8	粤糖 83-271 YT83-271	CP72-1210 × 华南 56-12 CP72-1210 × Huanan56-12
9	粤糖 84-3 YT84-3	Co419 × CP57-614
10	粤糖 85-5 YT85-5	粤糖 57-423 × CP49-50 YT57-423 × CP49-50
11	粤糖 85-177 YT85-177	粤糖 57-423 × CP57-614 + CP72-1312 YT57-423 × CP57-614 + CP72-1312
12	粤糖 85-633 YT85-633	粤糖 59-65 × CP57-614 YT59-65 × CP57-614
13	粤糖 85-1622 YT85-1622	CP72-1210 × 崖城 73-512 CP72-1210 × YC 73-512
14	粤糖 91-976 YT91-976	粤农 73-204 × CP67-412 YN73-204 × CP67-412
15	粤糖 92-1287 YT92-1287	粤糖 85-1722 × 新台糖 10 YT85-1722 × ROC10
16	粤糖 93-159 YT93-159	粤农 73-204 × CP72-1210 YN73-204 × CP72-1210
17	粤糖 95-168 YT95-168	新台糖 1 号 × CP72-1210 ROC1 × CP72-1210
18	粤糖 00-236 YT00-236	粤农 73-204 × CP72-1210 YN73-204 × CP72-1210
19	湛蔗 74-141 ZZ74-141	华南 56-12 × 崖城 58-47 Huanan56-12 × YC58-47
20	湛蔗 79-177 ZZ 79-177	华南 56-21 × 崖城 73-226 Huanan56-21 × YC73-226
21	湛蔗 79-279 ZZ79-279	华南 56-21 × 崖城 58-47 Huanan56-21 × YC58-47
22	湛蔗 80-101 ZZ80-101	粤糖 54-143 × 崖城 73-226 YT54-143 × YC73-226
23	湛蔗 82-339 ZZ82-339	湛蔗 74-141 自交 ZZ74-141 × ZZ74-141
24	湛蔗 84-160 ZZ84-160	台糖 134 × 台糖 172 F134 × F172
25	湛蔗 86-368 ZZ86-368	台糖 160 × 粤糖 71-210 F160 × YT71-210
26	湛蔗 88-64 ZZ88-64	湛蔗 72-426 × 湛蔗 74-141 ZZ72-426 × ZZ74-141
27	湛蔗 90-76 ZZ90-76	新台糖 1 号 × 崖城 84-125 ROC1 × YC84-125
28	湛蔗 92-126 ZZ92-126	湛蔗 80-101 × 新台糖 1 ZZ80-101 × ROC1
29	湛蔗 93-213 ZZ93-213	湛蔗 80-101 × 新台糖 1 ZZ80-101 × ROC1
30	华南 56-12 Huanan56-12	台糖 108 × 台糖 134 F108 × F134
31	华南 56-21 Huanan56-21	台糖 108 × 台糖 134 F108 × F134
32	粤农 73-204 YN 73-204	粤糖 57-423 × CP49-50 YT57-423 × CP49-50
33	粤农 75-191 YN75-191	华南 56-21 × 崖城 62-40 Huanan56-21 × YC62-40
34	粤农 81-342 YN81-342	粤糖 59-65 × 云蔗 65-225 YT59-65 × YZ65-225
35	粤农 81-762 YN 81-762	粤农 73-204 × CP33-310 YN73-204 × CP33-310
36	粤农 85-1285 YN85-1285	粤农 73-204 × 崖城 77-556 YN73-204 × YC77-556
37	粤农 86-295 YN86-295	粤农 73-204 × 崖城 71-374 YN73-204 × YC71-374
38	粤农 88-162 YN88-162	内江 57-416 × 崖城 71-374 NJ57-416 × YC71-374
39	粤农 88-465 YN88-465	崖城 84-125 × CP72-2086 YC84-125 × CP72-2086
40	粤农 89-780 YN89-780	粤农 73-204 × 崖城 84-153 YN73-204 × YC84-153
41	粤农 90-160 YN90-160	粤农 73-204 × 崖城 82-96 YN73-204 × YC82-96

记技术已广泛应用于甘蔗分类进化^[2]、连锁遗传图^[3]、种质遗传多样性^[4]等研究,其中也用于探索甘蔗栽培品种遗传多样性^[5-7],但在国内尚未见到甘蔗栽培品种遗传多样性的相关研究报道。本研究应用 AFLP 标记技术对 41 个广东省甘蔗育种单位育成的甘蔗品种进行遗传多样性分析,从分子水平上揭示其亲缘关系以及遗传多样性状况,为今后甘蔗种质利用、品种选育以及生产提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 材料

参试材料为 20 世纪 50 年代以来广东育成的、近年来常用于杂交育种的主要甘蔗品种,包括粤糖与湛蔗系列(广州甘蔗糖业研究所及其下属湛江甘蔗研究中心育成)、粤农系列(广东省农业科学院作物研究所育成)和华南系列[前华南农科所(现改为广东省农业科学院)育成]共 41 个(表 1)。

1.2 方法

基因组 DNA 的提取 采用 CTAB 法,参照 Besse 等^[8]方法,并略加改进。

AFLP 扩增基因组 DNA 同时采用 *Mse* I 和 *Eco*R I 两种酶,在 37℃ 下双酶切甘蔗基因组 DNA 约 15 h。然后,酶切产物在 22℃ 下用 T4 ligase 酶催化,分别与 *Mse* I 接头和 *Eco*R I 接头连接 2 h;连接完成的 DNA 样品稀释 10 倍后,用 *Mse*I-C 和 *Eco*R I -A 引物对进行预扩增,PCR 扩增程序为:95℃ 2 min,然后 94℃ 60 s,56℃ 60 s,72℃ 60 s,循环 20 次;将预扩增产物稀释 20 倍后作模板,用含 3 个碱基的选择性引物对按如下 PCR 程序进行选择扩增:首先 95℃ 2 min,接着 94℃ 30 s,65℃ 30 s(每个循环降低 0.7℃),72℃ 30 s,循环 13 次,再 94℃ 30 s,56℃ 30 s,72℃ 60 s,循环 23 次。所有的 PCR 反应在 Eppendorf 梯度 PCR 仪上完成。扩增产物经 95℃ 变性 10 min 后,在 5% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳(功率 100 W) 2.5 ~ 3 h。凝胶采用银染方法显带,干燥后,读带、拍照保存。

数据统计及处理 分别统计每对引物扩增的带条数,有带记作“1”,无带记作“0”。应用 NTSYSpc 2.10e 软件分别计算多态性条带比例、遗传相似系数及聚类分析等。应用 PowerMarker3.25 软件计算遗传多样性指数。

2 结果和分析

2.1 引物筛选及位点多态性分析

从 40 对 AFLP 引物中筛选出 15 对多态性较好的引物对预扩增所得的 DNA 模板进行扩增,扩增产物片段大小在 30 ~ 500 bp 之间(图 1)。从表 2 中可以看出,每对引物扩增所得的条带数在 55 ~ 110 条之间,15 对引物在 41 个甘蔗品种中共扩增出 1 192 条带。其中,多态性最好的是 AGG-CAC,高达 99%,而 ACG-CAG 稍差一点,但也有 66.0%,其它引物的多态性比例在 66.0% ~ 99.0%,平均为 77.40%。Lima 等应用 21 对 AFLP 引物研究了 79 个巴西甘蔗品种,多态性比例平均为 50%^[7]。说明了广东甘蔗品种的多态性位点水平较高。

2.2 遗传相似性与聚类分析

用 NTSYSpc 2.10e 软件分析表明,41 个甘蔗品种相互间的遗传相似性系数(GS)在 0.5210 ~ 0.9211 之间,平均为 0.6842,遗传多样性属于中等水平。湛蔗 82-339 与湛蔗 84-160 亲缘关系最近(GS = 0.9211),其次是粤农 73-204 与粤农 75-191(GS = 0.8590),粤农 73-204 与粤农 81-342(GS = 0.8473)位于其后。亲缘关系最远的是粤农 89-780 与粤糖 85-633(GS = 0.5210),然后是粤农 81-762 与

表 2 AFLP 引物扩增结果

Table 2 The amplification results by AFLP primer pairs

编号 No.	引物 Primer	标记条带数 Total loci	多态性条带数 Number of polymorphic loci	%
1	AAC-CAT	100	77	77.00
2	AAG-CAT	60	45	75.00
3	AAG-CTA	70	47	67.10
4	ACC-CAC	56	40	71.40
5	ACC-CTC	110	85	77.30
6	ACC-CTG	71	57	80.30
7	ACC-CTT	104	71	68.30
8	ACG-CAG	71	47	66.20
9	ACG-CTG	66	60	90.90
10	ACG-CTT	87	62	71.30
11	ACT-CTG	55	41	74.50
12	ACT-CTT	83	69	83.10
13	AGC-CAT	92	57	62.00
14	AGC-CTA	67	66	98.50
15	AGG-CAC	100	99	99.00
合计 Total		1192	923	
平均 Mean		79.5	61.5	77.40

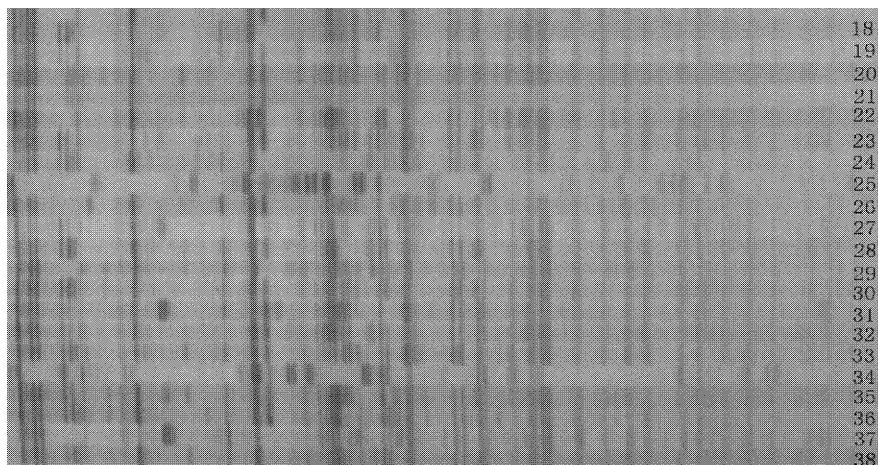


图 1 部分甘蔗品种的扩增结果(引物 ACC/CTT)

Fig. 1 The amplification results of partial sugarcane varieties using ACC/CTT primers

18~38: 品种编号 No. of varieties

湛蔗 74-141(GS = 0.5210), 再次是粤农 89-780 和粤农 75-191(GS = 0.5268)。结合系谱记录分析来看, 亲系相同品种的遗传相似性系数在 0.5629 ~ 0.7810 之间, 并非最高。劳方业等的研究表明, 来自同一组合的品种(系)间的遗传相似性系数都较高^[9]。在本研究的条件下, 遗传相似性系数低于 0.7000 的品种, 可以认为不可能来自同一组合。如粤糖 83-251 与粤糖 83-271(GS = 0.5629), 湛蔗 92-126 与湛蔗 93-213(GS = 0.6820)分别来自“CP72-1210 × 华南 56-12”、“湛蔗 80-101 × 新台糖 1 号”, 但粤糖 83-251 与粤糖 83-271 间的遗传相似性系数较低, 不大可能源自同一组合, 湛蔗 92-126 与湛蔗 93-213 亦然。此外, 遗传相似性系数较低者, 有的 3 代内也可以找到相同的血缘。说明有的系谱记录未能反映真实的亲缘关系。从聚类图(图 2)可以看出, 在遗传相似性系数为 0.64 水平上, 41 个品种被分为两大类, 其中 31 个品种聚为一大类, 另外 10 个品种聚为另一大类。在系谱中亲缘关系密切的品种, 如粤农 81-762、粤农 85-1285、粤农 86-295(三者都是粤农 73-204 的后代), 粤糖 57-423、粤糖 85-5、粤糖 85-177(后两者是前者的后代)等多数都能分别聚在一起。但也有少数例外, 如粤糖 83-251 和粤糖 83-271, 都是 CP72-1210 × 华南 56-12 组合的后代, 但没有归为同一类。这与 Harvey^[5]、Nair^[6] 和王英^[10]、劳方业^[11]等的研究结果类似。遗传相似性和聚类分析结果与系谱记录有出入, 可能与甘蔗的遗传组成有关。因为甘蔗是高度杂合的异源多倍体, 其杂交、回交和自交的后代都会产生高度分

离现象, 从而使得相同组合的后代可能存在较大的遗传差异, 而不同组合的后代也有可能存在较小的遗传差异。另外, 在有性杂交过程中, 自交现象不可避免, 串粉、种子混杂现象时有发生, 也是造成上述现象的重要原因。

2.3 不同年代选育的品种遗传多样性分析

不同年代的甘蔗品种的遗传多样性指数在 0.1162 ~ 0.3072 之间(表 3), 最高是 80 年代, 最低是 60 年代。遗传多样性指数的高低与亲本的使用情况、选育的品种遗传组成和数量有密切关系。50 年代中国大陆甘蔗育种刚起步, 育成的品种少, 使用的亲本也少(主要是台糖 108 和台糖 134 等), 所以遗传多样性较低, 60 年代虽然使用了引进品种和自育创新材料作亲本, 但只有 2 个品种, 因此遗传多样性最低。80 年代是广东省甘蔗育种快速发展的时期, 大量使用引进品种和自育创新材料, 不但育成的品种数量多, 遗传多样性也是最高。90 年代品种数大幅下降, 所使用的亲本数也大幅减少, 但由于使用了一些新种质, 如新台糖系列、CP 系列等, 所以遗传多样性只是稍微下降。

表 3 不同年代甘蔗品种的遗传多样性指数变化

Table 3 The genetic diversity index of the varieties in different periods

年代	品种数量	使用亲本数量	遗传多样性指数
Periods	No. of varieties	No. of parents used	Genetic diversity index
1950s	4	3	0.1923
1960s	2	4	0.1162
1970s	5	7	0.214
1980s	21	26	0.3072
1990s	8	9	0.2762

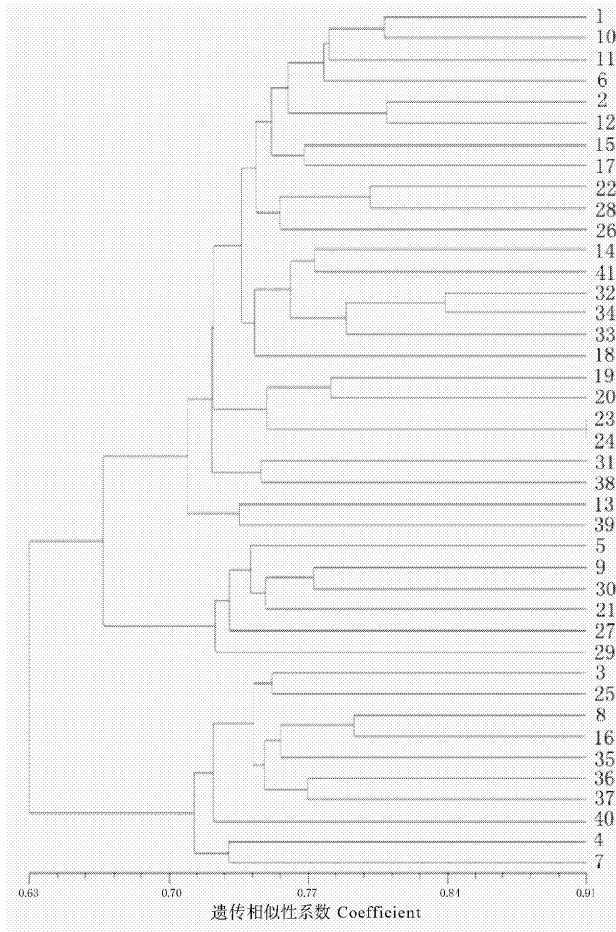


图 2 基于 AFLP 分析的 41 个甘蔗品种的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of cluster result of 41 sugarcane varieties based on AFLP analysis

11~41 见表 1。1~41 see Table 1.

2.4 不同单位选育的品种遗传多样性分析

品种必须与当地的土壤类型、气候条件相适应。从表 4 可以看出,虽然不同单位选育的品种及使用的亲本数量差别不大,甘蔗品种的遗传多样性指数变化也不明显。但选择压对品种遗传多样性也有一定的影响^[11]。广州甘蔗糖业研究所选育的品种主要面向珠江三角洲等水田蔗区,所以遗传多

样性相对较低;湛江甘蔗研究中心的品种主要是针对湛江旱坡地蔗区,故遗传多样性也不高。广东省农业科学院选育的品种是面对全省的蔗区,包括水田、旱地等,所以遗传多样性相对较高。

3 讨论

20 世纪 90 年代初之前,广东省是我国蔗糖生产第一大省。目前虽然甘蔗种植面积有所下降,但仍然是我国主要的食糖生产基地之一。甘蔗品种是甘蔗生产发展的最主要决定因素。广东省所选育的甘蔗品种不管在数量上还是质量上在全国范围内都是名列前茅的,因此,对广东省乃至全国的甘蔗生产起着举足轻重的作用。实践表明,好的品种,一般都是好亲本。其实本研究所用的这些材料,大多数既是生产上的优良品种,也是近年来海南甘蔗育种场常用的杂交亲本。因此,系谱记录未能真实反映品种的亲缘关系,对其作为亲本进一步利用有很大的影响。本研究证实,有些品种的亲缘关系与系谱记录不相符,可能与甘蔗高度异源多倍体及其遗传行为有关,也可能是串粉、种子混杂、亲本弄错等原因造成的。近年来的研究表明,基于 DNA 分子标记的遗传相似性系数是分析品种亲缘关系的较理想指标。目前虽然还没有一个统一的分析标准,但在本研究的条件下,遗传相似性系数高于 0.7500 的品种,可认为亲缘关系较近。遗传相似性系数低于 0.7000 品种,即使系谱记录亲系完全相同,也可以认为不可能来自同一组合。上述标准是本研究首次提出,对判断品种亲缘关系有较好帮助,但怎样才能制定得更准确一点,需要在今后的研究中不断完善。另外,基于不同类型的分子标记遗传相似性系数,划分标准可能会有所不同。

品种遗传多样性在生产上有十分重要的作用。朱有勇等^[12]报道,水稻品种多样性混合间栽对稻瘟

表 4 不同单位选育的甘蔗品种的遗传多样性指数变化

Table 4 The genetic diversity index of the varieties from different Institutes

单位 Institutes	品种数量 Number of varieties	使用亲本数量 Number of parents used	遗传多样性指数 Genetic diversity index
广州甘蔗糖业研究所 Guangzhou Sugarcane Industry Research Institute	15	18	0.2756
湛江甘蔗研究中心 Zhanjiang Sugarcane Research Center	14	16	0.2863
广东省农科院 Guangdong Academy of Agricultural Sciences	12	17	0.3061

病有极为显著的控制效果,就是最好的例证之一。实践证明,品种丰富的遗传多样性在生产上可以有效抵御病虫害、逆境、延长品种寿命等,同时品种遗传多样性也是作物进一步改良的基础。本研究显示,广东省甘蔗品种的遗传多样性属中等水平,为甘蔗生产及品种改良创造了良好的条件。但要使甘蔗生产再上新台阶,甘蔗品种的遗传多样性还需要进一步提高。一般认为,自育品种之间相互杂交会 导致遗传多样性的下降,其实就是近亲繁殖使得品种异质性降低所致。因此,本研究认为遗传相似性系数高于 0.7500 的品种不适宜配制杂交组合。分析显示,50 多年的育种并没有使广东甘蔗品种遗传多样性水平下降,相反,因为大量使用创新种质和引进品种作亲本,品种遗传多样性得到不断提高。由此可见,加强种质创新研究、加大外来优良种质的引进和利用研究等是提高品种遗传多样性的重要措施。目前广州甘蔗糖业研究所下属的海南甘蔗育种场保育了大量优良的甘蔗种质,是甘蔗育种的珍贵材料,也是将来甘蔗育种希望所在。应加大研究力度,充分利用这些育种资源,有效拓宽甘蔗遗传基础,提高品种的遗传多样性,促进甘蔗生产的可持续发展。

参考文献

- [1] Arceneaux G. Cultivated sugarcane of the world and their botanical derivation [J]. Proc Int Soc Sugar Cane Techn, 1965, 12: 844-854.
- [2] Glaszmann J C, Dufour P, Grivet L, et al. Comparative genome analysis between several tropical grasses [J]. Euphytica, 1997, 96: 13-21.
- [3] da Silva J, Sorrells M E, Burnquist W L, et al. RFLP linkage map and genome analysis of *Saccharum spontaneum* [J]. Genome, 1993, 36: 782-791.
- [4] Bessel P, Taylor G, Carroll B, et al. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis [J]. Genetica, 1998, 104: 143-153.
- [5] Harvey H, Hockett B I, Botha F C. Use of polymerase chain reaction and random amplification of polymorphic DNAs for the determination of genetic distances between 21 sugarcane varieties [J]. Proc South Afr Sugar Techn Assoc, 1994, 4: 36-40.
- [6] 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.
- [7] 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 sugar cane (*Saccharum* spp.) [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 30-38.
- [8] Besse P, McIntyre C L, Berding N. Ribosomal DNA variations in *Erianthus*, a wild sugarcane relative (*Andropogoneae - Saccharinae*) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 733-743.
- [9] Lao F Y(劳方业), Liu R(刘睿), He H Y(何慧怡), et al. AFLP analysis of genetic diversity in series sugarcane parents developed at HSBS [J]. Mol Plant Breed(分子植物育种), 2008(3): 517-522.(in Chinese)
- [10] Wang Y(王英), Zhuang N S(庄南生), Gao H Q(高和琼), et al. ISSR analysis for sugarcane germplasm [J]. J Hunan Agri Univ (Nat Sci)(湖南农业大学学报: 自然科学版), 2007, 33: 176-187.(in Chinese)
- [11] Lao F Y(劳方业), Liu R(刘睿), He H Y(何慧怡), et al. Genetic diversity of introduced sugarcane varieties assessed by AFLP analysis [J]. Guangdong Agri Sci(广东农业科学), 2008(4): 13-16.(in Chinese)
- [12] Zhu Y Y(朱有勇), Sun Y(孙雁), Wang Y Y(王云月), et al. Genetic analysis of rice varietal diversity for rice blast control [J]. Acta Gene Sin(遗传学报), 2004(7): 707-716.(in Chinese)