

中国十倍体割手密资源抗逆功能 标记的遗传多样性分析

李旭娟¹, 徐超华¹, 刘洪博¹, 林秀琴¹, 马丽¹, 刘新龙^{1,2*}

(1 云南省农业科学院甘蔗研究所/云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 云南开远 661699; 2 福建农林大学 作物科学学院, 福州 350002)

摘要: 整倍体割手密是现代甘蔗品种重要的野生亲本和抗逆性状基因源, 为了明确其抗逆相关基因的遗传背景, 该研究选用来自脱水因子 DREB、水通道蛋白 AQP、热激蛋白 HSP70、WRKY1 转录因子和随机引物组成的 5 对抗旱和耐高温相关功能标记, 以 63 份甘蔗常用亲本材料和 8 份甘蔗原种作为对照, 对中国保育的 50 份十倍体割手密 (*Saccharum spontaneum* L.) 进行遗传多样性分析。结果显示: (1) 5 对引物共获得 119 个扩增片段, 其中 110 个为多态性条带, 平均多态性条带比例为 92.44%, 平均多态信息量为 0.9253, 十倍体割手密抗旱功能标记多态性最高, 甘蔗常用亲本材料耐高温功能标记多态性最高。(2) 十倍体割手密在抗旱功能标记上具有较低的平均相似性系数 (0.541) 和最大的分布范围 (0.347~0.800), 且主要集中在 0.400~0.600 之间, 而在耐高温功能标记上甘蔗常用亲本材料虽拥有最大的分布范围 (0.238~1.000), 但甘蔗原种具有最低的平均相似性系数 (0.481), 且相似性系数范围主要集中在 0.400~0.600 之间。(3) UPGMA 聚类可将参试材料划分为较明显的两个大组, 十倍体割手密与甘蔗常用亲本和甘蔗原种在聚类关系上表现出明显的不同。研究表明, 十倍体割手密资源无论是在抗旱功能标记 DBF、Aqua 方面, 还是在耐高温功能标记 SCB174、SCB190 方面都与甘蔗常用亲本和甘蔗原种具有较大的遗传差异, 而且在抗旱功能标记方面表现出更为丰富的遗传变异, 因此在后续甘蔗品种抗逆性状改良和亲本创新上应进一步加大十倍体割手密资源的利用。

关键词: 割手密; 十倍体; 抗逆性; 功能标记; 遗传多样性

中图分类号: Q789

文献标志码: A

Genetic Diversity of Decaploid *Saccharum spontaneum* L. in China According to Functional Markers Related Stress Tolerance

LI Xujuan¹, XU Chaohua¹, LIU Hongbo¹, LIN Xiuqin¹, MA Li¹, LIU Xinlong^{1,2*}

(1 Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan, Yunnan 661699, China; 2 College of Crop Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: Orthoploidy *Saccharum spontaneum* L. is an important wild parent and gene pool related stress tolerance of modern sugarcane varieties, in order to understand their genetic background of resistant genes, we screened 50 clones of decaploid *S. spontaneum* L. with 63 sugarcane commonly used parents and 8 original species as control in genetic diversity by using these functional markers derived from DREB, AQP, HSP70, WRKY1 and arbitrary primers, of which are related to drought and high temperature tolerance. The results showed that: (1) 119 bands were gained, 110 of which belong to polymorphic ones, and the mean percentage of polymorphic bands and polymorphism information content reached to 92.44% and

收稿日期: 2014-03-24; 修改稿收到日期: 2014-05-23

基金项目: 云南省自然科学基金(2011FB120); 国家自然科学基金(31360359)

作者简介: 李旭娟(1987—), 女, 硕士, 研究实习员, 主要从事甘蔗分子遗传学研究。E-mail: lixujuan2011@163.com

* 通信作者: 刘新龙, 副研究员, 主要从事甘蔗分子遗传学研究。E-mail: lxlgood868@163.com

92.53% respectively. The polymorphic level of decaploid *S. spontaneum* L. in the functional markers related drought tolerance was the richest; however the commonly used parents exhibited the most diversity in functional markers related high temperature tolerance. (2) In terms of Jaccard coefficient, decaploid *S. spontaneum* L. showed low mean value (0.541) and big distribution range (0.347–0.800) in the functional markers of drought tolerance, and most focused on the interval region of 0.400–0.600; for functional markers of high temperature tolerance, the biggest distribution range (0.238–1.000) appeared in commonly used parents, whereas the lowest value of coefficient (0.481) was found in the original materials mainly distribute with the interval region of 0.400–0.600. (3) By using UPGMA cluster method, all accessions could be divided into two big groups, one was consisted of decaploid *S. spontaneum* L. accessions, which exhibited evident difference from others; the other was composed by commonly used parents and original species. Overall, our results proofed that the decaploid *S. spontaneum* L. accessions have big genetic differences in functional markers of DBF, Aqua, SCB174 and SCB190 from commonly used parents and original species, and possess more abundant genetic variances in functional markers of drought tolerance. So in future, decaploid *S. spontaneum* L. resources should be utilized in improving stress tolerance of sugarcane varieties, especially in the impact of drought tolerance.

Key words: *Saccharum spontaneum* L.; decaploid; stress resistance; functional markers; genetic diversity

割手密 (*Saccharum spontaneum* L.) 又叫细茎野生种, 是现代甘蔗品种重要的野生原种, 分布广泛、类型多样, 是一种较为复杂的多倍体植物^[1], 研究表明其染色体基数为 8, 染色体数在 40~128 之间, 其中以 $2n=64$ 、80、96、112 和 128 等 5 种染色体类型为多^[2-3]。割手密相比较“甘蔗属复合体”其它野生种, 更易与甘蔗栽培原种或品种杂交, 主要表现为染色体亲和力和重组率高, 后代在抗逆性、适应性、分蘖力、长势等性状上表现更为优异, 因此, 割手密被认为是最具育种价值和研究价值的甘蔗野生种之一^[4]。经过长期的杂交利用, 现代甘蔗品种染色体组成中有 10%~20% 的染色体来自割手密^[5-6]。近年来, 国内外研究者从表型^[7-9]和 DNA 层次^[10-14]对不同地区的割手密资源进行了遗传多样性研究, 证实了割手密资源类型多样, 遗传变异丰富, 是甘蔗品种改良的重要基因源。

整倍体割手密是甘蔗杂交育种中利用最成功的野生资源, 如爪哇割手密 ($2n=112$, 十四倍体)、印度割手密 ($2n=64$, 八倍体) 和崖城割手密 ($2n=64$ 、八倍体, $2n=80$ 、十倍体), 它们不仅拓宽了现代甘蔗品种的血缘基础, 而且对品种产量和抗逆性改良具有突破性贡献^[1,4]。中国是割手密资源适生区, 在 $N18^{\circ}15' \sim 33^{\circ}20'$, $E97^{\circ} \sim 122^{\circ}$, 海拔 1~2 460 m 的广大地区都有分布^[15], 而且中国云南省可能是割手密资源的重要起源中心, 随后逐步扩展到四川、贵州、广西、广东、海南、福建、江西等省份^[11-12]。

经过多年的收集保育, 目前中国国家甘蔗种质资源圃里保育的割手密资源已达 700 余份, 成为中国甘蔗种质创新、遗传育种和优异基因发掘的重要

基因宝库。蔡青等^[16]对中国保育的割手密资源开展染色体数量分析, 结果表明共有 11 种染色体类型 ($2n=60$ 、64、70、72、76、78、80、92、96、104、108), 其中 $2n=80$ (十倍体) 的染色体类型最多; 刘新龙等^[17]对十倍体割手密资源的表型遗传多样性研究表明, 这类资源数量性状变异十分丰富, 且性状变异与海拔和纬度呈现明显相关性。为了从分子水平了解该类资源在抗逆方面的遗传多样性状况, 本研究拟选用从植物抗旱和耐高温相关基因 (脱水绑定因子 DREB^[18]、水通道蛋白 AQP^[19]、热激蛋白 HSP70^[20]、WRKY1 转录因子^[21]) 中开发的功能标记评价十倍体割手密资源抗逆性状的遗传多样性状况, 为该类资源在遗传育种和种质创新中的有效利用提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究选用采集地理信息数据完整的十倍体割手密资源为研究对象, 根据其采集地信息, 按照每市县取 1 份的原则, 选取 50 份材料, 材料名称和详细信息见表 1; 同时选用 63 份甘蔗常用亲本和 8 份甘蔗原种作为对照材料, 材料清单见表 2, 所有材料由中国国家甘蔗种质资源圃提供。

1.2 实验方法

1.2.1 叶片基因组 DNA 提取 实验选取上述 121 份材料植株幼嫩叶片, 使用液氮速冻并研磨成粉末, 使用改良的 CTAB 法^[22]提取叶片基因组 DNA, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶和 Bio Drop Lite PC 超微量可见紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度, 并用无菌去离子水稀释至质量浓度为 20 ng/ μ L 后即用或保

表 1 十倍体割手密资源种质名称和采集地情况

Table 1 Material names and collecting locations of decaploid *S. spontaneum*

序号 No.	种质名称 Material name	采集地 Collecting location	序号 No.	种质名称 Material name	采集地 Collecting location
1	福建东山 Fujian-dongshan	福建东山县 Dongshan County, Fujian	26	云南 76-2-26 Yunnan 76-2-26	四川雷波县 Leibo County, Sichuan
2	福建 92-1-11 Fujian 92-1-11	福建福州市 Fuzhou City, Fujian	27	四川 79-2-1 Sichuan 79-2-1	四川泸县 Lu County, Sichuan
3	福建 87-1-14 Fujian 87-1-14	福建莆田市 Putian City, Fujian	28	四川 79-1-4 Sichuan 79-1-4	四川南充市 Nanchong City, Sichuan
4	福建 89-1-21 Fujian 89-1-21	福建厦门市 Xiamen City, Fujian	29	云南 76-2-32 Yunnan 76-2-32	四川平山县 Pingshan County, Sichuan
5	广东 21 Guangdong 21	广东博罗县 Boluo County, Guangdong	30	四川 88-48 Sichuan 88-48	四川射洪县 Shehong County, Sichuan
6	广东 56 Guangdong 56	广东德庆县 Deqing County, Guangdong	31	四川 79-2-13 Sichuan 79-2-13	四川万县市 Wanxian City, Sichuan
7	广东 16 Guangdong 16	广东广州市 Guangzhou City, Guangdong	32	四川 88-46 Sichuan 88-46	四川资阳市 Ziyang City, Sichuan
8	广东 42 Guangdong 42	广东河源市 Heyuan City, Guangdong	33	四川 88-49 Sichuan 88-49	四川资中县 Zizhong County, Sichuan
9	广东 35 Guangdong 35	广东化州市 Huazhou City, Guangdong	34	云南 83-196 Yunnan 83-196	云南大观县 Daguan County, Yunnan
10	广东 71 Guangdong 71	广东开平市 Kaiping City, Guangdong	35	云南 75-1-21 Yunnan 75-1-21	云南耿马县 Gengma County, Yunnan
11	广东 31 Guangdong 31	广东陆河县 Luhe County, Guangdong	36	云南 83-171 Yunnan 83-171	云南广南县 Guangnan County, Yunnan
12	广东 60 Guangdong 60	广东清远市 Qingyuan City, Guangdong	37	云南 75-2-35 Yunnan 75-2-35	云南河口县 Hekou County, Yunnan
13	广东韶关 Guangdong-shaoguan	广东韶关市 Shaoguan City, Guangdong	38	云南鹤庆 Yunnan-heqing	云南鹤庆县 Heqing County, Yunnan
14	广东 67 Guangdong 67	广东英德市 Yingde City, Guangdong	39	云南 82-125 Yunnan 82-125	云南江城县 Jiangcheng County, Yunnan
15	贵州 78-3-01 Guizhou 78-3-01	贵州册亨县 Ceheng County, Guizhou	40	云南 76-3-2 Yunnan 76-3-2	云南景洪市 Jinghong City, Yunnan
16	贵州 78-2-04 Guizhou 78-2-04	贵州榕江县 Rongjiang County, Guizhou	41	云南 82-12 Yunnan 82-12	云南陇川县 Longchuan County, Yunnan
17	贵州 78-1-31 Guizhou 78-1-31	贵州思南县 Sinan County, Guizhou	42	云南 83-215 Yunnan 83-215	云南泸水县 Lushui County, Yunnan
18	贵州 78-1-5 Guizhou 78-1-5	贵州习水县 Xishui County, Guizhou	43	云南 83-204 Yunnan 83-204	云南马龙县 Malong County, Yunnan
19	云南 84-260 Yunnan 84-260	贵州兴义市 Xingyi City, Guizhou	44	云南 82-24 Yunnan 82-24	云南腾冲县 Tengchong County, Yunnan
20	海南乐东 Hainan-ledong	海南黄流镇 Huangliu County, Hainan	45	云南 75-2-1 Yunnan 75-2-1	云南新平县 Xinping County, Yunnan
21	四川 79-1-26 Sichuan 79-1-26	四川达县 Da County, Sichuan	46	云南寻甸 Yunnan-xundian	云南寻甸县 Xundian County, Yunnan
22	四川 89-3 Sichuan 89-3	四川德昌县 Dechang County, Sichuan	47	云南 83-242 Yunnan 83-242	云南元谋县 Yuanmou County, Yunnan
23	四川 88-41 Sichuan 88-41	四川金堂县 Jintang County, Sichuan	48	云南 82-44 Yunnan 82-44	云南中甸县 Zhongdian County, Yunnan
24	四川 79-1-17 Sichuan 79-1-17	四川阆中市 Langzhong City, Sichuan	49	云南 76-1-024 Yunnan 76-1-024	重庆米易县 Miye County, Chongqing
25	四川 92-49 Sichuan 92-49	四川乐山市 Leshan City, Sichuan	50	四川 79-2-16 Sichuan 79-2-16	重庆云阳县 Yunyang County, Chongqing

表 2 常用亲本和原种名单

Table 2 List of commonly used parents and original species

序号 No.	种质名称 Material name	类型 Material type	序号 No.	种质名称 Material name	类型 Material type
1	Co1001	常用亲本 Commonly used parent	23	ROC1	常用亲本 Commonly used parent
2	Co290	常用亲本 Commonly used parent	24	ROC10	常用亲本 Commonly used parent
3	Co419	常用亲本 Commonly used parent	25	ROC11	常用亲本 Commonly used parent
4	CP34-120	常用亲本 Commonly used parent	26	ROC16	常用亲本 Commonly used parent
5	CP65-357	常用亲本 Commonly used parent	27	ROC20	常用亲本 Commonly used parent
6	CP67-412	常用亲本 Commonly used parent	28	ROC22	常用亲本 Commonly used parent
7	CP72-1210	常用亲本 Commonly used parent	29	ROC25	常用亲本 Commonly used parent
8	CP72-1312	常用亲本 Commonly used parent	30	ROC9	常用亲本 Commonly used parent
9	CP84-1198	常用亲本 Commonly used parent	31	川糖 57-416 Chuantang 57-416	常用亲本 Commonly used parent
10	CP85-1308	常用亲本 Commonly used parent	32	川糖 61-408 Chuantang 61-408	常用亲本 Commonly used parent
11	F108	常用亲本 Commonly used parent	33	福农 91-21 Funong 91-21	常用亲本 Commonly used parent
12	F134	常用亲本 Commonly used parent	34	赣蔗 95-108 Ganzhe 95-108	常用亲本 Commonly used parent
13	F146	常用亲本 Commonly used parent	35	赣蔗 75-65 Ganzhe 75-65	常用亲本 Commonly used parent
14	F160	常用亲本 Commonly used parent	36	赣蔗 8 Ganzhe 8	常用亲本 Commonly used parent
15	F172	常用亲本 Commonly used parent	37	桂糖 11 Guitang 11	常用亲本 Commonly used parent
16	FR93-435	常用亲本 Commonly used parent	38	桂糖 12 Guitang 12	常用亲本 Commonly used parent
17	FR96-405	常用亲本 Commonly used parent	39	桂糖 17 Guitang 17	常用亲本 Commonly used parent
18	FR97-137	常用亲本 Commonly used parent	40	桂糖 21 Guitang 21	常用亲本 Commonly used parent
19	POJ213	常用亲本 Commonly used parent	41	桂糖 82-271 Guitang 82-271	常用亲本 Commonly used parent
20	POJ2878	常用亲本 Commonly used parent	42	闽糖 69-263 Mintang 69-263	常用亲本 Commonly used parent
21	PT43-52	常用亲本 Commonly used parent	43	闽糖 69-421 Mintang 69-421	常用亲本 Commonly used parent
22	Q96	常用亲本 Commonly used parent	44	闽糖 92-649 Mintang 92-649	常用亲本 Commonly used parent

续表 2 Continued Table 2

序号 No.	种质名称 Material name	类型 Material type	序号 No.	种质名称 Material name	类型 Material type
45	选三 Xuansan	常用亲本 Commonly used parent	59	云瑞 99-155 Yunrui 99-155	常用亲本 Commonly used parent
46	崖城 71-374 Yacheng 71-374	常用亲本 Commonly used parent	60	云蔗 65-225 Yunzhe 65-225	常用亲本 Commonly used parent
47	崖城 73-512 Yacheng 73-512	常用亲本 Commonly used parent	61	云蔗 94-343 Yunzhe 94-343	常用亲本 Commonly used parent
48	崖城 82-96 Yacheng 82-96	常用亲本 Commonly used parent	62	云蔗 99-91 Yunzhe 99-91	常用亲本 Commonly used parent
49	崖城 84-125 Yacheng 84-125	常用亲本 Commonly used parent	63	湛蔗 74-141 Zhanzhe 74-141	常用亲本 Commonly used parent
50	崖城 96-48 Yacheng 96-48	常用亲本 Commonly used parent	64	克林斯它林那 Christalina	原种 Original species
51	粤糖 00-236 Yuetang 00-236	常用亲本 Commonly used parent	65	拔地拉 Badila	原种 Original species
52	粤糖 57-423 Yuetang 57-423	常用亲本 Commonly used parent	66	广西竹蔗 Guangxi-zhuzhe	原种 Original species
53	粤糖 59-65 Yuetang 59-65	常用亲本 Commonly used parent	67	广东竹蔗 Guangdong-zhuzhe	原种 Original species
54	粤糖 79-177 Yuetang 79-177	常用亲本 Commonly used parent	68	Mango	原种 Original species
55	粤糖 82-339 Yuetang 82-339	常用亲本 Commonly used parent	69	Nagans	原种 Original species
56	粤糖 84-3 Yuetang 84-3	常用亲本 Commonly used parent	70	51NG63	原种 Original species
57	粤糖 86-368 Yuetang 86-368	常用亲本 Commonly used parent	71	51NG208	原种 Original species
58	粤糖 93-159 Yuetang 93-159	常用亲本 Commonly used parent			

表 3 功能标记引物信息
Table 3 Information of functional markers

引物名称 Primer name	基因名称 Gene name	功能特点 Functional characteristic	Gene Bank 登录号 Accession No. of gene bank	序列(5'-3') Sequence(5'-3')
SCB174	<i>HSP70</i>	耐高温相关 High temperature resistance related	CAA47948	GGAGATGCTGCGGAGGTGGTT GCCGCTTCCTCATCATATTCTTCTC
SCB190	<i>WRKY1</i>	耐高温相关 High temperature resistance related	NM_001112367	TTCTTCTGTGTCACCATTCATTG CCCCTCGATGCTGATTGTTAC
DBF/Arb1 DBF/Arb2	<i>DREB</i>	抗旱相关 Drought resistance related	CA077947	CTCTGCCACCAACACCTC GACTGCGTACGAATTAAT CTCTGCCACCAACACCTC GACTGCGTACGAATTGAC
Aqua/Arb1	<i>AQP</i>	抗旱相关 Drought resistance related	CA086489	ATCTCCGGCGGCCACAT GACTGCGTACGAATTAAT

存于-20 ℃备用。

1.2.2 功能标记引物和 PCR 反应体系 根据前人研究报道,选用 Marconi 等^[23]和 Creste 等^[24]开发的 5 对功能标记引物和随机引物进行 PCR,引物详细信息见表 3。PCR 反应体系和程序参照 Marconi 等^[23]和 Creste 等^[24]研究报道。扩增产物经 95 ℃变性后在 5.0%的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,并采用刘新龙等^[22]建立的快速银染法染色观察。

1.2.3 数据处理与分析 通过人工计带,选择清晰可辨的电泳条带进行统计,在相同迁移位置,有带记为“1”,无带记为“0”,并将统计结果输入 Excel 2007 中进行分析,计算多态性条带比例(PPB)和多态信息量(PIC),其中 $PPB = a / (a + b)$, $GS_{ij} = a / (a + b + c)$,其中, a 为两个个体的共有条带数, b 和 c 为 i 个体和 j 个体各自拥有的多态条带数; $PIC = 1 - \sum (P_i)^2$,其中, P_i 为第 i 种等位位点占总等位位点的比率。数据分析用 NTSYSpc 2.1,计算 Jaccard 遗传相似性系数(GS),然后用非加权配对算术平均法(UPGMA)进行聚类分析并绘制分子聚类图。

2 结果与分析

2.1 抗逆功能标记引物多态性分析

使用 5 对功能标记引物对十倍体割手密、甘蔗常用亲本和甘蔗原种共计 121 份材料进行 PCR 扩增,共获得 119 个扩增片段,平均每对引物获得 24 个条带(表 4);所有条带中有 110 个属于多态性条带,平均每对引物获得 22 个;类型材料特有带共 17 个,平均每对引物 3 个。5 对引物的平均多态性条带比例为 92.44%,平均多态信息量为 92.53%。

从耐高温相关功能标记引物(SCB174 和 SCB190)看,引物多态性表现最好的是甘蔗常用亲本,其次为十倍体割手密,说明在耐高温相关基因方面,甘蔗常用亲本材料拥有更丰富的遗传变异。从抗旱功能标记引物(DBF/Arb1、DBF/Arb2、Aqua/Arb1)来看,十倍体割手密材料引物的多态性最高,其次为甘蔗常用亲本材料,甘蔗原种表现较低,表明十倍体割手密可能在抗旱相关基因(*BREB*, *AQP*)方面拥有更为丰富的遗传变异,因此,未来在甘蔗品种抗旱

表 4 功能标记引物多态性统计结果

Table 4 Result of polymorphic analysis of functional markers

引物名称 Primer name	种质类型 Resource type	总条带数 Band number	多态性带数 Polymorphic band number	类型材料特有带数 Specific band number of materials	多态性条带比例 Percentage of polymorphic bands/%	多态信息量 Polymorphism information content/%
SCB174	十倍体 Decaploid	15	15	4	100.00	79.84
	常用亲本 Commonly used parents	14	13	1	92.86	91.40
	原种 Original species	11	8	0	72.73	87.50
SCB190	十倍体 Decaploid	20	19	6	95.00	96.96
	常用亲本 Commonly used parents	12	12	0	100.00	97.70
	原种 Original species	13	12	0	92.31	84.40
DBF/Arb1	十倍体 Decaploid	24	16	1	66.67	97.52
	常用亲本 Commonly used parents	23	12	0	52.17	97.40
	原种 Original species	23	10	0	43.48	87.50
DBF/Arb2	十倍体 Decaploid	30	29	5	96.67	97.92
	常用亲本 Commonly used parents	26	23	0	88.46	98.36
	原种 Original species	26	20	0	76.92	87.50
Aqua/Arb1	十倍体 Decaploid	26	23	0	88.46	98.00
	常用亲本 Commonly used parents	26	19	0	73.08	98.40
	原种 Original species	21	13	0	61.90	87.50
平均 Mean		24	22	3	92.44	92.53
合计 Total		119	110	17	—	—

性状改良方面十倍体割手密资源拥有更大的利用潜力,而耐高温方面可倚重甘蔗常用亲本。从类型材料特有条带数量看,耐高温功能标记方面,十倍体割手密有 10 条特有条带,甘蔗常用亲本只有 1 条,原种 0 条;抗旱功能标记方面,十倍体割手密有 6 条特有条带,常用亲本和原种都为 0 条,表明十倍体割手密还有一些遗传变异未渗入现代甘蔗品种血缘中,未来应加大该类资源的利用。

2.2 相似性系数分析

根据抗旱和耐高温功能标记数据获得十倍体割手密材料、甘蔗常用亲本和甘蔗原种之间的 Jaccard 相似性系数分布范围见表 5、表 6。对于抗旱相关功能标记,十倍体割手密材料间相似性系数在 0.347~0.800 之间,差值为 0.453,平均值为 0.541,主要集中在 0.400~0.600 之间;常用亲本材料间相似性系数在 0.450~0.868 之间,差值为 0.418,平均值为 0.644,主要集中在 0.600~0.800 之间;原种材料间相似性系数在 0.533~0.765 之间,差值为 0.232,平均值为 0.654,主要集中在 0.600~0.800 之间。

对于耐高温相关功能标记,十倍体割手密材料间相似性系数在 0.250~1.000 之间,差值为 0.750,平均值为 0.598,主要集中在 0.400~0.600 和 0.600~0.800 之间;常用亲本材料间相似性系数在

0.238~1.000 之间,差值为 0.762,平均值为 0.602,主要集中在 0.400~0.600 和 0.600~0.800 之间,但 0.400~0.600 之间所占比例更大;原种材料间相似性系数在 0.333~0.923 之间,差值为 0.590,平均值为 0.481,主要集中分布在 0.200~0.400 和 0.400~0.600 之间,其中 0.400~0.600 之间更多。

综合来看,十倍体割手密材料在抗旱功能标记上具有最大的相似性系数分布范围,相似性系数值主要分布在一个较低的水平,表明该类资源材料间遗传差异较大,在 *DREB* 和 *AQP* 基因上蕴含着更为丰富的遗传变异,可为甘蔗品种抗旱性状改良提供丰富的基因源。在耐高温功能标记相似性系数方面,甘蔗原种之间相似性最低,其次为十倍体割手密,但甘蔗常用亲本间相似性系数范围最宽,表明它们在 *HSP70* 和 *WARK1* 基因上蕴含更为丰富的遗传变异,其次为甘蔗原种材料,这些材料可为甘蔗品种的耐高温性状改良提供丰富的基因源。

2.3 分子聚类分析

依据抗旱和耐高温功能标记获得的 Jaccard 相似性系数对十倍体割手密、甘蔗常用亲本材料和甘蔗原种进行 UPGMA 分子聚类,结果见图 1、2。仅依据抗旱功能标记数据,可将 121 份材料划分为 2 个明显的大组(A1 和 A2),A1 组全部由十倍体割手密组成,其下又可分为 3 个明显的亚组(A1-1、A1-

表 5 十倍体割手密、常用亲本和原种功能标记数据的 Jaccard 相似性系数范围比较

Table 5 The distributing range comparing of Jaccard coefficient among decaploid *S. spontaneum*, commonly used parents and original species

种质类型 Material type	抗旱功能标记 Functional marker of drought tolerance			耐高温功能标记 Functional marker of high temperature tolerance		
	相似性系数范围 Range of coefficient	差值 Difference	平均值 Mean	相似性系数范围 Range of coefficient	差值 Difference	平均值 Mean
十倍体 Decaploid	0.347~0.800	0.453	0.541	0.250~1.000	0.750	0.598
常用亲本 Commonly used parents	0.450~0.868	0.418	0.644	0.238~1.000	0.762	0.602
原种 Original species	0.533~0.765	0.232	0.654	0.333~0.923	0.590	0.481

表 6 十倍体割手密材料、常用亲本材料和原种功能标记的 Jaccard 相似性系数值分布频率情况

Table 6 The distributing frequency of Jaccard coefficient value among decaploid *S. spontaneum*, commonly used parents and original species

		Jaccard 相似性系数值组距 Group interval of Jaccard coefficient value				
		0.000~0.200	0.200~0.400	0.400~0.600	0.600~0.800	0.800~1.000
抗旱功能标记 Jaccard 相似性系数值 Jaccard coefficient value of functional markers related drought tolerance	十倍体 Decaploid	0	22	977	226	0
	占总数的比例 Proportion of total/%	0.00	1.80	79.76	18.45	0.00
	常用亲本 Commonly used parents	0	0	430	1 516	7
	占总数的比例 Proportion of total/%	0.00	0.00	22.02	77.62	0.36
	原种 Original species	0	0	5	23	0
耐高温功能标记 Jaccard 相似性系数值 Jaccard coefficient value of functional markers related high temperature tolerance	占总数的比例 Proportion of total/%	0.00	0.00	17.86	82.14	0.00
	十倍体 Decaploid	0	64	595	517	49
	占总数的比例 Proportion of total/%	0.00	5.22	48.57	42.20	4.00
	常用亲本 Commonly used parents	0	55	983	827	88
	占总数的比例 Proportion of total/%	0.00	2.82	50.33	42.35	4.51
	原种 Original species	0	6	19	2	1
	占总数的比例 Proportion of total/%	0.00	21.43	67.86	7.14	3.57

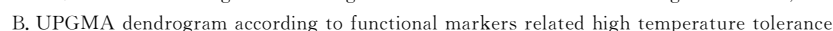
2、A1-3)(图 1);而甘蔗常用亲本和甘蔗原种构成 A2 组。仅依据耐高温功能标记,也可将所有材料划分为 2 个明显的大组(B1 和 B2),其中 B1 组包含了所有的十倍体割手密材料、2 份中国种(Guangxi-zhuzhe 和 Guangdong-zhuzhe)、1 份大茎野生种(51NG63)和 1 份印度种(Nagans);B2 组主要由甘蔗常用亲本和其它甘蔗原种组成。将抗旱和耐高温标记数据汇总后进行聚类分析,同样可将所有材料分为 2 个大组(C1 和 C2),C1 组全部由十倍体割手密组成,其下可分为 3 个亚组(C1-1,C1-2,C1-3),C2 组由甘蔗原种和甘蔗常用亲本构成。

综上所述,本研究所选抗逆功能标记在分子聚类上,无论是抗旱功能标记,还是耐高温功能标记,十倍体割手密都与甘蔗常用亲本和甘蔗原种存在较为明显的聚类差异,而甘蔗常用亲本和甘蔗原种具有较近的聚类关系,说明十倍体割手密资源在本研究所用抗旱和耐高温相关基因方面与现代甘蔗品种存在较大的遗传差异,可能还有许多遗传变异未被开发利用,因此未来应加大十倍体割手密资源在甘

蔗品种抗逆性状改良和亲本创新上的利用力度。

3 讨 论

干旱、极端温度等非生物胁迫是限制甘蔗产量的主要因素,随着全球温室效应加剧,干旱、高温或低温灾害发生越来越频繁,对甘蔗产业健康稳定发展带来巨大的冲击;同时由于优势作物的竞争,耕地面积的减少,甘蔗种植区域已开始向种植条件较差的坡地发展,生产上对抗逆品种的需求也越来越迫切,因此甘蔗品种抗逆性状改良将是现在及未来品种选育的重要目标之一^[4]。育种历史表明,野生资源是现代甘蔗品种抗逆性状改良的重要基因源,品种每一次抗逆性状的突破都与野生资源的利用密不可分,因此野生资源对于品种抗逆性状改良具有重要利用价值,而如何有效评价野生资源,为育种和种质创新提供优良野生亲本将是甘蔗资源研究的重要课题。公共数据库中大量核苷酸序列信息的积累为资源评价提供了丰富的遗传标记,其中功能标记因来源于功能基因序列内部,相比较非功能分子标记



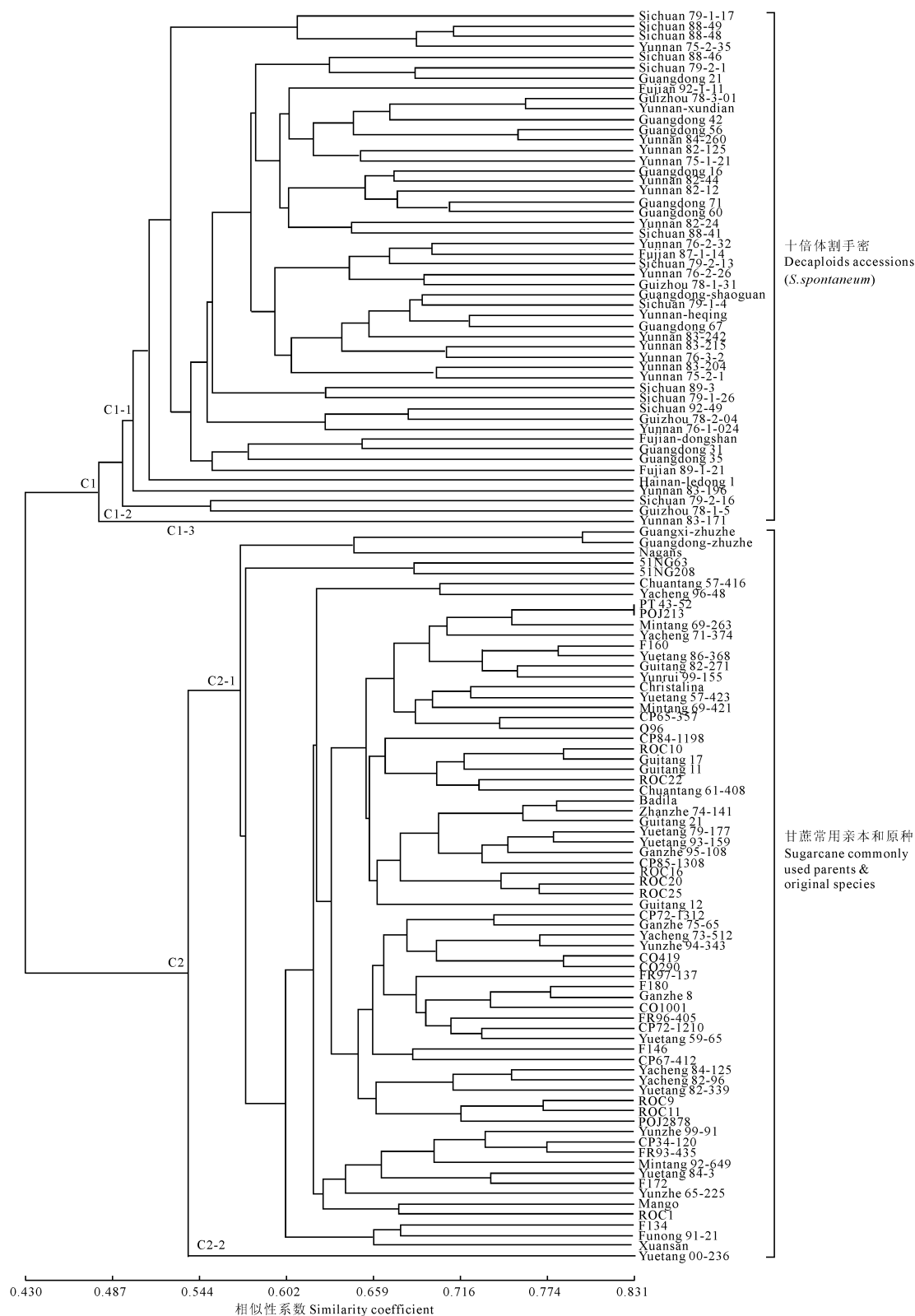


图 2 十倍体割手密、甘蔗常用亲本材料和甘蔗原种抗旱和耐高温标记汇总 UPGMA 聚类图

Fig. 2 The summary molecular UPGMA dendrogram of decaploid accessions of *S. spontaneum*, sugarcane commonly used parent materials and original species based on functional markers related drought and high temperature tolerance

能在资源表型与标记多态性间建立联系,为资源的准确评价和高效利用提供重要指导,近年来功能标记在作物资源评价方面得到越来越广泛的利用^[25]。针对甘蔗种质资源,Alwala 等^[26]和阙友雄

等^[27]用糖分和耐寒相关基因的 EST 序列开发的 TRAP 功能标记对不同类型甘蔗资源的遗传多样性研究证实,功能标记可以很好地反映资源间的遗传关系和多样性水平;Creste 等^[24]用 TRAP 功能标记对糖分和抗旱相关基因在甘蔗种质资源中的遗传变异及亲缘关系研究表明,抗旱功能标记的遗传变异高于糖分功能标记。本研究选用与植物耐高温密切相关的热激蛋白 70、WRKY1 类转录因子和与抗

旱密切相关的脱水绑定因子 DREB、水通道蛋白 AQP^[18-21]中开发的功能标记对十倍体割手密的研究表明,十倍体割手密资源在抗旱和耐高温功能标记上与常用亲本和原种具有较大差异,在抗旱相关功能标记上比常用亲本和原种有更丰富的遗传变异,而且十倍体割手密资源中还有许多抗逆相关基因遗传变异未渗入到现代甘蔗品种中,因此在甘蔗品种抗逆性状改良上,该类资源具有重要的利用价值。

参考文献:

- [1] 张木清,王华忠,白晨.糖料作物遗传改良与高效育种[M].北京:中国农业出版社,2006:51—52.
- [2] SREENIVASAN T V, AHLOOWALIA B S, HEINZ D J. Cytogenetics[M]//HEINZ D J. Sugarcane Improvement through Breeding. Elsevier Press; Amsterdam, 1987: 211—253.
- [3] PANJE R R, BABU C N. Studies in *Saccharum spontaneum* distribution and geographical association of chromosome numbers[J]. *Cytologia*, 1960, 25: 152—72.
- [4] 陈如凯.现代甘蔗遗传育种[M].北京:中国农业出版社,2011:1—19.
- [5] D'HONT A. Unraveling the genome structure of polyploids using FISH and GISH; examples of sugarcane and banana[J]. *Cytogenetic and Genome Research*, 2005, 109(1—3): 27—33.
- [6] CUADRADO A, ACEVEDO R, DELA E S M D, et al. Genome remodelling in three modern *S. officinarum* × *S. spontaneum* sugarcane cultivars[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 55(398): 847—854.
- [7] YANG R ZH(杨荣仲), WU C W(吴才文), HUANG J K(黄久凯). Clustering classification of Sichuan *S. spontaneum*[J]. *Sugarcane* (Fujian)(甘蔗(福建)), 2001, 8(2): 1—6(in Chinese).
- [8] ZHANG G M(张革民), YANG R ZH(杨荣仲), LIU H B(刘海斌), et al. Principal component analysis for 7 quantitative traits and cluster analysis based on 7 quantitative traits of *Saccharum spontaneum* L. [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), 2006, 19(6): 127—131(in Chinese).
- [9] QI Y W(齐永文), FAN L N(樊丽娜), HE H Y(何慧怡), et al. Genetic diversity assessment of *Saccharum spontaneum* L. native to Guangdong area with agronomic traits[J]. *Sugarcane and Cane Sugar* (甘蔗糖业), 2009, (3): 7—10, 20(in Chinese).
- [10] ZHANG G M(张革民), LIAO J X(廖江雄), HUANG H T(黄宏套), et al. Genetic diversity of *Saccharum spontaneum* L. with high sugar content in Guangxi based on phenotypic traits and RAPD markers[J]. *Journal of Southwest University* (Nat. Sci. Ed.) (西南大学学报·自然科学版), 2007, 29(8): 83—88(in Chinese).
- [11] CHEN H(陈辉), FAN Y H(范源洪), SHI X W(史宏伟), et al. Research on genetic diversity and systemic evolution in *Saccharum spontaneum* L. [J]. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2001, 27(5): 645—652(in Chinese).
- [12] FAN Y H(范源洪), CHEN H(陈辉), SHI X W(史宏伟), et al. RAPD analysis of *Saccharum spontaneum* from different ecospecific colonies in Yunnan[J]. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2001, 23(3): 298—308(in Chinese).
- [13] PAN Y B, BURNER D M, LEGENDRE B L, et al. An assessment of the genetic diversity within a collection of *Saccharum spontaneum* L. with RAPD-PCR[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2005, 51(8): 895—903.
- [14] MARY S, NAIR N V, CHATURVEDI P K, et al. Analysis of genetic diversity among *Saccharum spontaneum* L. from four geographical regions of India, using molecular markers[J]. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53(6): 1221—1231.
- [15] 何顺长.甘蔗野生种质资源考察采集日记[M].昆明:云南科技出版社,2003,2:188—200.
- [16] CAI Q(蔡青), WEN J CH(文建成), FAN Y H(范源洪), et al. Chromosome analysis of *Saccharum* L. and related plants[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences* (西南农业学报), 2002, 15(2): 16—19(in Chinese).
- [17] LIU X L(刘新龙), SU H SH(苏火生), et al. Phenotypic correlation and genetic diversity of decaploids of *Saccharum spontaneum* [J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Nat. Sci. Ed.) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2013, 38(6): 574—579(in Chinese).
- [18] ZHANG J H(张建华), JI H T(姬虎太), ZHANG D Y(张定一), et al. Research progress of DREB gene in plant[J]. *Journal of Wheat Research* (小麦研究), 2012, 33(1): 8—15(in Chinese).
- [19] LI H M(李红梅), WAN X R(万小荣), HE SH G(何生根). Advances in plant aquaporins[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics* (生物化学与生物物理进展), 2010, 37(1): 29—35(in Chinese).
- [20] QI Y(齐妍), XU ZH SH(徐兆师), LI P S(李盼松), et al. Research progress on molecular mechanism and application of HSP70 in plants[J]. *Journal of Plant Genetic Resources* (植物遗传资源学报), 2013, 14(3): 507—511(in Chinese).
- [21] WU L T(伍林涛), DU C F(杜才富), ZHANG M Q(张敏琴), et al. The structure and function of WRKY transcription factors in abiotic and biotic stress[J]. *Molecular Plant Breeding* (分子植物育种), 2013, 11(4): 634—638(in Chinese).
- [22] LIU X L(刘新龙), CAI Q(蔡青), BI Y(毕燕), et al. A rapid silver staining method for PAGE used in sugarcane AFLP and SSR molecular markers[J]. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences* (江苏农业学报), 2009, 25(2): 433—435(in Chinese).
- [23] MARCONI T G, COSTA E A, MIRANDA H R, et al. Functional markers for gene mapping and genetic diversity studies in sugarcane [J]. *BMC Research Notes*, 2011, 4(1): 264.
- [24] CRESTE S, ACCORONI K A G, PINTO L R, et al. Genetic variability among sugarcane genotypes based on polymorphisms in sucrose metabolism and drought tolerance genes[J]. *Euphytica*, 2010, 172(3): 435—446.
- [25] POCZAI P, VARGA I, LAOS M, et al. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review[J]. *Plant Methods*, 2013, 9(1): 6.
- [26] ALWALA S, SUMAN A, ARRO J A, et al. Target region amplification polymorphism (TRAP) for assessing genetic diversity in sugarcane germplasm collections[J]. *Crop Science*, 2006, 46(1): 448—455.
- [27] QUE Y X(阙友雄), CHEN T SH(陈天生), XU L P(许莉萍), et al. Genetic diversity among key sugarcane clones revealed by TRAP markers[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology* (农业生物技术学报), 2009, 17(3): 496—503(in Chinese).