

基于表型和核型及分子证据的 甘蔗德阳大叶子属种分析

刘洪博^{1,2}, 林秀琴^{1,2}, 刘新龙^{1,2}, 陆鑫^{1,2}, 毛钧^{1,2},
徐超华^{1,2}, 马丽^{1,2}, 郭跃祥³, 蔡青^{2,4*}

(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; 3 红河学院生命科学系, 云南蒙自 661199; 4 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223)

摘要: 该研究以甘蔗属热带种、中国种、印度种和杂交品种为参照, 对‘德阳大叶子’进行表型、核型和 SSR 分子标记分析, 以明确德阳大叶子的属种关系, 为种间杂交利用奠定基础。结果表明: (1) 表型性状和 SSR 标记聚类结果都能将‘德阳大叶子’、热带种、中国种和杂交品种明显分成 3 个类群; 其中‘德阳大叶子’与热带种、中国种、印度种和杂交品种的表型平均相似性系数分别为 0.51、0.71、0.55 和 0.31, 表型聚类与中国种最近。(2) ‘德阳大叶子’的核型分析显示, 体细胞染色体数为 $2n=116$, 核型公式为: $2n=116=4M+104m+8sm$, 核型属于 2B 型, 符合中国种染色体数范围。(3) 利用 13 对引物进行 SSR 标记的 UPGMA 聚类结果表明, ‘德阳大叶子’与热带种、中国种、印度种和杂交品种间的平均相似性系数分别为 0.70、0.69、0.68 和 0.69, 种间相似性系数相差不明显。研究认为, ‘德阳大叶子’属于中国种或是中国种杂交后代的低世代材料。

关键词: 甘蔗; ‘德阳大叶子’; 属种鉴定

中图分类号: Q343.2⁺2; Q789; Q944.1

文献标志码: A

Species Identification of the Sugarcane Germplasm Deyang Dayezi Based on Phenotypic, Karyotypic and Molecular Evidences

LIU Hongbo^{1,2}, LIN Xiuqin^{1,2}, LIU Xinlong^{1,2}, LU Xin^{1,2}, MAO Jun^{1,2},
XU Chaohua^{1,2}, MA Li^{1,2}, GUO Yuexiang³, CAI Qing^{2,4*}

(1 Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan, Yunnan 661699, China; 2 Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement, Kaiyuan, Yunnan 661699, China; 3 Department of Bioscience, Hong He University, Mengzi, Yunnan 661199, China; 4 Biotechnology & Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China)

Abstract: In this study, the taxonomic status of an elite sugarcane germplasm, ‘Deyang Dayezi’ in the *Saccharum* L. was ascertained by comparing the phenotypical, karyotypical and SSR markers data to that of *S. officinarum* L., *S. sinense* R., *S. barberi* J. and hybrid varieties, to provide a base for the utilization of this germplasm in interspecific hybridization. The results showed that: (1) Both phenotypic trait analysis and SSR marker analysis showed that *S. officinarum*, *S. sinense* and the hybrid varieties were clustered into

收稿日期: 2014-05-21; **修改稿收到日期:** 2014-06-30

基金项目: 农业部作物种质资源保护项目(2014NWB017); 云南省应用基础研究计划重点项目(2006C0013Z); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项目(2009C1059); 国家科技部科技基础条件平台-国家农作物种质资源平台项目; 国家现代农业产业技术体系甘蔗产业技术体系开远综合试验站(CARS-20-6-13); 云南省农业科学院基础性超前预研(2014CZJC007)

作者简介: 刘洪博(1982—), 男, 硕士, 助理研究员, 主要从事甘蔗种质资源与分子生物学研究。E-mail: liuhongbo1982@126.com

* 通信作者: 蔡青, 博士, 研究员, 主要从事作物种质资源利用研究。E-mail: caiqingysri@163.com

three groups, and the average phenotypic similarity coefficients between ‘Deyang Dayezi’ and *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* and the hybrid varieties were 0.51, 0.71, 0.55 and 0.31, respectively, suggesting the closest relativeness between ‘Deyang Dayezi’ and *S. sinense*; (2) The karyotype analysis showed that the karyotype of ‘Deyang Dayezi’ was $2n=116=4M+104m+8sm$, which belonging to the 2B karyotype, and fell into with the chromosome number range of *S. sinense*; (3) The UPGMA cluster analysis of SSR markers derived from the 13 primer pairs showed that the average similarity coefficients between ‘Deyang Dayezi’ and *S. officinarum*, *S. sinense*, *S. barberi* and the hybrid varieties were 0.70, 0.69, 0.68 and 0.69, respectively, and there was not significant difference in these similarity coefficients. These results suggested that ‘Deyang Dayezi’ could be included in the species of *S. sinense* or be considered as a low pedigree material of *S. sinense* hybrids.

Key words: sugarcane; ‘Deyang Dayezi’; species identification

‘德阳大叶子’是国家甘蔗种质资源圃收集自四川的 1 份甘蔗资源,通过多年观测,该种质宿根蔗的平均分蘖率、平均有效茎、锤度和蔗糖糖分分别为 209.3%、17.81 条/m²、22.73% 和 14.84%,与其它中国种(*S. sinense* R.)如竹蔗和芦蔗等具有较明显的优异性^[1]。根据早期记录,该种质为中国种,但并没有进行过深入的种间鉴定,不利于种间的杂交利用,只是依据表型特征认为该种质属于甘蔗属中国种。为了更科学地划分该资源在甘蔗属中的种间关系,有必要进行深入的分子系统学分析。近几年,甘蔗种质资源的表型遗传多样性研究已经报道很多,并能够很好地反映甘蔗资源的表型差异、遗传多样性和地理类群分布规律^[2-4]。利用 SSR 等分子标记来研究甘蔗种质资源的遗传多样性和种群聚类分析,更能从分子水平准确区分种质的亲缘关系^[5-6]。由于甘蔗属中国种的染色体在 116~118 条之间^[7],通过‘德阳大叶子’染色体的核型分析,对区分该种质的种间关系也具有重要作用。目前,甘蔗染色体的鉴定和核型分析已经在甘蔗×斑茅(*E. arundinaceum* J.)^[8-9]、甘蔗×蔗茅(*E. rufipilus* G.)^[10]和甘蔗×滇蔗茅(*E. rockii* K.)^[11]F₁ 代染色体鉴定和遗传分析中得到应用。

鉴于此,本实验选取甘蔗属中具有代表性的热带种(*S. officinarum* L.)、中国种(*S. sinense* R.)、印度种(*S. barberi* J.)和杂交品种作为参照,对‘德阳大叶子’进行表型性状、核型和 SSR 标记等层次的分析,以探明该材料的属种归类,弄清该种质的遗传背景和种间关系,为下一步具有针对性的种间杂交利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究材料

研究材料选自国家甘蔗种质资源圃,共计 24 份

(表 1),包括热带种 5 份,中国种 7 份,印度种 5 份,杂交品种 6 份及‘德阳大叶子’。

表型性状观察以保存在圃内相同条件下种植的植株为调查材料;染色体核型分析,取‘德阳大叶子’的种芽,种植于底部含有珍珠岩的桶内,上层盖上有机土壤,以根尖材料进行染色体核型分析实验;分子标记分析,取国家甘蔗资源圃内种植材料的新鲜叶片进行 DNA 的提取和 SSR 标记研究。

表 1 参试材料名称

Table 1 The materials tested

序号 Sequence number	材料名称 Material name	学名 Scientific name
1	拔地拉 Badila	热带种 <i>S. officinarum</i> L.
2	黑车里本 Black Cheribon	热带种 <i>S. officinarum</i> L.
3	克林斯它林那 Christalina	热带种 <i>S. officinarum</i> L.
4	路打士 Loether	热带种 <i>S. officinarum</i> L.
5	越南牛蔗 Vietnam cow cane	热带种 <i>S. officinarum</i> L.
6	四川芦蔗 Sichuan Reed cane	中国种 <i>S. sinense</i> R.
7	德阳大叶子 Deyang Dayezi	待定 unknown
8	广西竹蔗 Guangxi bamboo cane	中国种 <i>S. sinense</i> R.
9	潭州竹蔗 Tanzhou bamboo cane	中国种 <i>S. sinense</i> R.
10	南丰竹蔗 Nanfeng bamboo cane	中国种 <i>S. sinense</i> R.
11	桂林竹蔗 Guilin bamboo cane	中国种 <i>S. sinense</i> R.
12	永胜蔗 Yongsheng cane	中国种 <i>S. sinense</i> R.
13	友巴 Uba	中国种 <i>S. sinense</i> R.
14	Nagans	印度种 <i>S. barberi</i> J.
15	Pansahi	印度种 <i>S. barberi</i> J.
16	Nagori	印度种 <i>S. barberi</i> J.
17	Katha	印度种 <i>S. barberi</i> J.
18	HATUNI	印度种 <i>S. barberi</i> J.
19	ROC10	杂交种 <i>Saccharum</i> spp.
20	ROC22	杂交种 <i>Saccharum</i> spp.
21	ROC16	杂交种 <i>Saccharum</i> spp.
22	桂糖 11 号 Guitang 11	杂交种 <i>Saccharum</i> spp.
23	粤糖 93-159 Yuetang 93-159	杂交种 <i>Saccharum</i> spp.
24	R570	杂交种 <i>Saccharum</i> spp.

1.2 方 法

1.2.1 表型性状的测定 试验于 2012 年在国家甘蔗种质资源圃进行,每个材料选出 5 株正常生长的植株进行表型性状的调查,具体调查的性状包括叶片长度(cm)、叶片宽度(cm)、节间长度(cm)、气生根、茎形、节间形状、曝光前节间颜色、曝光后节间颜色、蜡粉带、木栓、生长裂缝、生长带形状、蒲心、根点排列、芽形、芽沟、叶姿、叶色、脱叶性、57 号毛群、内叶耳和外叶耳,其中叶片长度、叶片宽度和节间长度取其平均值,其它性状取其众数作为最终结果。具体调查方法和数据均按照《甘蔗种质资源描述规范和数据标准》^[12]和《农作物种质资源鉴定技术规程—甘蔗》^[13]进行。

1.2.2 核型鉴定 依据李懋学等^[14]的标准选取 20 个分散性好的细胞作染色体计数,其中 85% 以上的细胞具有恒定一致的染色体(众数)即可作为该材料的染色体数目。待材料生长到 25 cm 后,开始取根尖材料,每个根尖取 0.2~0.5 cm,用对二氯苯酚饱和溶液与 0.002 mol/L 8-羟基喹啉等体积混合液预处理 4 h,然后再用 0.075 mol/L KCl 低渗 1 h,取现配的卡诺氏固定液于 4 ℃ 冰箱固定 24 h,用蒸馏水清洗 10 min,置于 70% 乙醇溶液中 4 ℃ 保存备用。压片前,用 45% 冰乙酸和 1 mol/L HCl 等体积混合

液于 60 ℃ 水浴锅中解离 10 min,进行常规压片。利用德国蔡司显微镜(Axioskop 2 plus)进行镜检观察,将观察较好的图片通过 CCD 传输至电脑上,进行核型分析。

染色体核型分析选取 2 个分散较好的中期细胞,用 Ikaros Karyotyping System 图像软件分析系统对采集的中期细胞图片进行染色体分割和染色体长度的测量,并依照染色体形状、大小和臂比等进行同源配对,排成核型图,具体的染色体分类和核型分析方法按照 Levan^[15]和李懋学等^[14]建议的统一标准进行,核型类型分析参照 Stebbins^[16]方法,核型不对称系数按 Aranno^[17]的方法,比值越大,核型越不对称。具体计算公式如下:

相对长度(%)=(某号染色体长度/全部染色体长度)×100

臂比=长臂/短臂

染色体长度比=最长染色体/最短染色体

核型不对称系数 $As \cdot K(\%) = \text{全部染色体长臂总和} / \text{全组染色体总长}$ 。

1.2.3 SSR 分子标记 将新鲜叶片剪成小块,并迅速用液氮研磨成细粉末,采用改良的 CTAB 方法^[18]进行 DNA 的提取,SSR 实验所需 PCR 试剂和聚丙烯酰胺凝胶等均购自上海生工生物工程有限公司

表 2 引物序列及退火温度

Table 2 The sequence and annealing temperature of the primers

序号 No.	引物名称 Primer name	序列 Sequence(5'-3')	碱基数 Base number/bp	退火温度 Annealing temperature/℃
1	SMC336_F	ATTCTAGTGCCAATCCATCTCA	22	62
	SMC336_R	CATGCCAACTTCCAAACAGAC	21	
2	SMC22_F	CCATTCGACGAAAGCGTCCT	20	62
	SMC22_R	CAAGCGTTGTGCTGCCGAGT	20	
3	SMC16_F	GCAACCGCGTCCTCATAC	18	58
	SMC16_R	GAGCTTCTGATCGGCCTTC	19	
4	SMC1825_F	CACGTCCTTCCGCCTTGA	18	56
	SMC1825_R	TCATCGTTTCGTCGCACTG	18	
5	SMC278_F	TTCTAGTGCCAATCCATCTCAGA	23	64
	SMC278_R	CATGCCAACTTCCAAACAGACT	22	
6	SMC851_F	ACTAAAAATGGCAAGGGTGGT	20	58
	SMC851_R	CGTGAGCCCCACATATCATGC	20	
7	SMC31_F	CATGCCAACTTCCAATACAGACT	23	62
	SMC31_R	AGTGCCAATCCATCTCAGAGA	21	
8	mSSCIR43_F	ATTCAACGATTTTCACGAG	19	54
	mSSCIR43_R	AACCTAGCAATTTACAAGAG	20	
9	mSSCIR19_F	GGTTCCAAAAATACACAAA	18	48
	mSSCIR19_R	CAATCTTATCTACGCACTT	19	
10	SMC1047_F	TGAGCCTAAGCCAGAAAGAAG	21	58
	SMC1047_R	GGAACATAATTCCTACGAGAACAC	24	
11	SMC1237_F	TTCACGAACACCCACCTA	19	50
	SMC1237_R	GCGCCAGGTAACCTACTGAA	20	
12	mSSCIR36_F	CAACAATAACTTAACTGGTA	20	54
	mSSCIR36_R	CTGTCCTTTTATTCTCTTT	20	
13	SMC720_F	CGCACCGACGCACGTCT	17	56
	SMC720_R	GCCAATGGAACGGGTCTA	18	

(Sangon), 引物合成来自大连宝生物公司 (TaKaRa)。引物序列和退火温度如表 2 所示, 具体的 SSR 实验步骤参照刘洪博等^[19]的方法进行, 聚丙烯酰胺凝胶电泳的时间可根据不同引物扩增片段的大小酌情处理。

1.3 数据分析

利用 Excel 和 NTSYSpc 2.1 软件计算表型性状的 SM (simple matching coefficient) 遗传相似性系数和 SSR 标记的 Jaccard 相似性系数, 并构建 UPGMA 聚类图, 表型性状按照《甘蔗种质资源描述规范和数据标准》^[12]以数字形式统一代替 (表 3), SSR 数据以 0、1 的方式计带; 构建的 UPGMA 聚类图以相似性系数的远近进行种间划分, 以‘德阳大叶子’与各种间最大相似性系数和平均相似性系数进行比较, 并结合‘德阳大叶子’核型分析结果进行分析。

2 结果与分析

2.1 表型聚类分析

通过对 24 份材料的表型性状进行数据统计 (表 3), 利用 NTSYSpc 2.1 软件进行聚类分析结果 (图 1) 表明: 大部分热带种、中国种和杂交品种能够得到很好的区分, 在相似性系数 0.50 左右, 可将种质大体分为 3 个类群, 即热带种 (I 类)、中国种 (II 类) 和杂交品种 (III 类), 只有印度种较为分散, 不能单独归为一类。这说明利用表型性状聚类的方式能够有效区分甘蔗属中的热带种和中国种, 而‘德阳大叶子’与中国种聚在一起, 并与中国种‘南丰竹蔗’和‘桂林

竹蔗’的亲缘关系最近, 相似性系数分别为 0.82 和 0.77。用种间平均相似性系数来衡量, ‘德阳大叶子’与热带种、中国种、印度种和杂交品种间的平均相似性系数分别为 0.51、0.71、0.55 和 0.31, 同样与中国种最近, 与其它种的相似性系数差异显著, 说明‘德阳大叶子’应划分于中国种中。

2.2 细胞学鉴定分析

选取 20 个有丝分裂中期染色体分散较好的细胞进行观察和计数分析, 每个细胞计数 10 次, 根据众数计算的原则计算染色体数目。结果 (图 2) 表明: ‘德阳大叶子’的染色体分布较为清晰, 染色体间

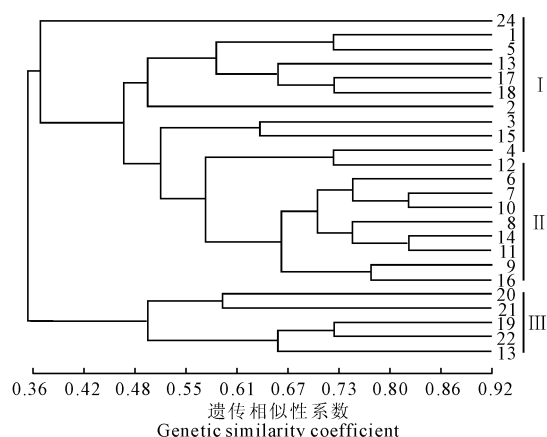


图 1 表型性状 UPGMA 聚类图

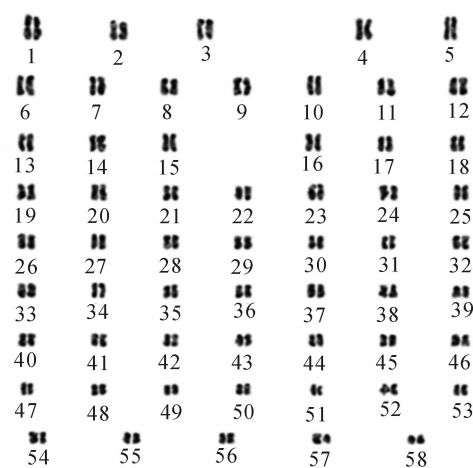
1~24 为材料编号; 同表 1

Fig. 1 UPGMA dendrogram based on simple matching coefficient of phenotypic traits

The material code number 1~24 come from Table 1



A



B

图 2 德阳大叶子根尖染色体及核型图

A. 根尖中期染色体; B. 染色体核型

Fig. 2 Chromosome and karyotype of Deyang Dayezi

A. Chromosome of mitosis metaphase; B. Karyotype

表 3 表型性状数据
Table 3 The phenotypic trait data

表型性状 Phenotypic character	材料编号 Material code number																							
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
气生根 Aerial root	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1
茎形 Stalk shape	1	2	2	1	1	1	1	1	2	2	1	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
节间形状 Internode shape	1	1	1	1	1	4	4	4	4	4	4	1	4	4	1	4	4	3	1	1	1	1	1	1
曝光前节间颜色 Internode colour unexposed	3	6	6	6	3	6	6	5	5	6	6	6	6	6	6	5	4	4	2	2	1	2	2	5
曝光后节间颜色 Internode colour exposed	3	3	2	6	2	3	2	1	7	2	1	3	3	2	2	2	4	5	4	5	3	4	3	6
平均节间长度 Average internode length	1	3	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1	1	2	1	1	1	2	3	2	2	2	2
蜡粉带 Wax band	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	2	2	1	1
木栓 Corky patch	0	0	2	2	0	0	2	2	2	2	2	2	0	0	2	2	0	0	1	0	0	1	0	2
生长裂缝 Growth crack	0	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	0
生长带形状 Growth ring shape	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	1	1	1	2
蒲心 Pith	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0
根点排列 Root primordia	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	2	2	2
芽形 Bud shape	4	4	4	6	6	1	2	1	1	1	1	6	1	1	1	2	1	1	7	7	7	7	6	6
芽沟 Bud furrow	1	2	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2	1	1	0	0	1	1	0	0
叶姿 Angle of lamina to culm	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1	1	1	2
叶色 Lamina colour	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	2	1	2	2	1	1	2	2	3	1	1	3	3	3
平均叶片长度 Average lamina length/cm	132	136	104	145	114	91	96	107	94	82	92	79	111	116	117	45	73	65	150	134	158	152	130	138
平均叶片宽度 Average lamina width/cm	7.0	5.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	3.0	1.2	2.2	6.0	5.0	5.0	6.0	4.9	4.7
脱叶性 Sheath detached from culm	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	3	2	2	2	2	2	3
57号毛群 Hair group 57	2	1	1	3	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	2	0	2	1	2	1	3
内叶耳 Shape of inner auricle	2	1	1	1	5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	1	1	1	4	4	1	1	1
外叶耳 Shape of outer auricle	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	1

注:气生根:0.无+1.少;茎形:1.直立;2.弯曲;节间形状:1.圆筒形;2.腰鼓形;3.细腰形;4.圆锥形;曝光前后节间颜色:1.粉红;2.紫红;3.深紫+4.黄;5.黄绿+6.深绿+7.紫绿条纹;8.紫黄条纹;节间长度:1.<8 cm;2.8~15 cm;3.>15 cm;蜡粉带:1.无;2.薄;3.厚;木栓:0.无;1.条状;2.斑块;生长裂缝:0.无;1.浅;2.深;生长带形状:1.突出;2.不突出;蒲心:0.无;1.轻蒲;2.重蒲;根点排列:1.成行;2.不规则;芽形:1.三角形;2.椭圆形;3.倒卵形;4.五角形;5.菱形;6.圆形;7.卵圆形;芽沟:0.无;1.浅;2.深;叶姿:1.披散;2.挺直叶尖下垂;3.挺直;叶色:1.绿;2.黄绿;3.深绿;4.红紫;脱叶性:1.自动脱落;2.松;3.紧;57号毛群:0.无;1.少;2.较多;3.多;内外叶耳:0.退化;1.三角形;2.倒钩形;3.镰刀形;4.披针形;5.钩形。材料编号同表 1。

Note: Aerial root: 0. Absent; 1. Little; Stalk shape: 1. Straight; 2. Bent; Internode shape: 1. Cylindrical; 2. Barrel; 3. Bobbin-shaped; 4. Conoidal; Internode colour unexposed and exposed: 1. Pink; 2. Purplish red; 3. Dark purple; 4. Yellow; 5. Yellowish green; 6. Dark green; 7. Purple and green stripe; 8. Purple and green stripe; Internode length: 1. <8 cm; 2. 8~15 cm; 3. >15 cm; Wax band: 1. Nil; 2. Thin; 3. Waxy; Corky patch: 0. Absent; 1. Cracks; 2. Patch; Growth crack: 0. Absent; 1. Shallow; 2. Deep; Growth ring shape: 1. Protrude; 2. Flush; Pith: 0. Solid; 1. Slightly; 2. Pithy; Root primordial: 1. Row; 2. Abnormality; Bud shape: 1. Triangular; 2. Oval; 3. Obovate; 4. Pentagonal; 5. Rhomboid; 6. Round; 7. Ovate rotundity; Bud furrow: 0. None; 1. Shallow; 2. Deep; Angle of lamina to culm: 1. Drooping; 2. Erect with curve near tip; 3. Erect; Lamina colour: 1. Green; 2. Yellow green; 3. Dark green; 4. Purple red; Sheath detached from culm: 1. Detached; 2. Easy detach; 3. Hard to detach; Hair group 57: 0. Nil; 1. Sparse; 2. Mediate; 3. Profuse; Shape of inner and outer auricle: 0. Absent; 1. Deltoid; 2. Calcariform; 3. Falcate; 4. Lanceolate; 5. Unciform. The material code number 1~24 come from Table 1.

没有重叠和挤压在一起的现象,说明选择分裂中期的细胞较好,染色体分散性好,染色体分辨清晰,易于观察和计数,能够进行核型分析。从计数结果来看,‘德阳大叶子’染色体数目 $2n=116$ 所占比例最高,在 5 个分辨率最高的细胞中染色体数目最为一致,结果较为准确。

‘德阳大叶子’体细胞染色体测量结果如表 4 所示,染色体核型公式为 $2n=116=4M+104m+$

$8sm$ 。其中第 1 和第 8 对染色体为正中部着丝点染色体,第 52、55、56 和 58 对染色体为近中部着丝点染色体,其余为中部着丝点染色体。染色体绝对长度范围为 $1.11\sim2.76\ \mu\text{m}$,臂比介于 $1.00\sim2.04$ 之间,平均臂比为 1.33,其中臂比大于 2 的染色体比例为 0.017,最长与最短染色体的比值为 3.73,核型不对称系数为 56.48%,核型属于 2B 型,与中国种报道的染色体数目相比,‘德阳大叶子’的染色体数

表 4 ‘德阳大叶子’染色体核型分析参数

Table 4 Chromosome karyotype parameters of ‘Deyang Dayezi’

编号 Number	相对长度 Relative length/%			臂比 Arm ratio	类型 Type
	短臂 Short arm	长臂 Long arm	总长 Total length		
1	1.38	1.38	2.76	1.00	M
2	1.23	1.37	2.61	1.11	m
3	1.15	1.26	2.41	1.10	m
4	1.14	1.23	2.37	1.08	m
5	1.06	1.23	2.29	1.15	m
6	1.02	1.19	2.21	1.16	m
7	1.02	1.19	2.21	1.17	m
8	1.07	1.07	2.13	1.00	M
9	0.98	1.16	2.13	1.18	m
10	0.97	1.16	2.13	1.20	m
11	0.95	1.11	2.05	1.17	m
12	0.94	1.11	2.05	1.18	m
13	0.93	1.12	2.05	1.20	m
14	0.91	1.06	1.97	1.17	m
15	0.91	1.07	1.97	1.18	m
16	0.90	1.07	1.97	1.19	m
17	0.89	1.09	1.97	1.23	m
18	0.85	1.04	1.90	1.22	m
19	0.82	1.04	1.86	1.26	m
20	0.81	1.01	1.82	1.24	m
21	0.80	1.02	1.82	1.27	m
22	0.79	0.95	1.74	1.21	m
23	0.77	0.97	1.74	1.25	m
24	0.77	0.97	1.74	1.26	m
25	0.77	0.97	1.74	1.27	m
26	0.76	0.98	1.74	1.29	m
27	0.75	0.99	1.74	1.32	m
28	0.74	1.00	1.74	1.34	m
29	0.74	0.92	1.66	1.25	m
30	0.73	0.93	1.66	1.29	m
31	0.68	0.94	1.62	1.39	m
32	0.69	0.89	1.58	1.30	m
33	0.69	0.89	1.58	1.30	m
34	0.68	0.90	1.58	1.32	m
35	0.66	0.92	1.58	1.40	m
36	0.67	0.87	1.54	1.31	m
37	0.63	0.91	1.54	1.44	m

续表 4 Continued Table 4

38	0.63	0.87	1.50	1.36	m
39	0.63	0.87	1.50	1.37	m
40	0.61	0.89	1.50	1.44	m
41	0.61	0.89	1.50	1.45	m
42	0.61	0.89	1.50	1.45	m
43	0.61	0.89	1.50	1.45	m
44	0.58	0.88	1.46	1.50	m
45	0.58	0.85	1.42	1.47	m
46	0.53	0.89	1.42	1.69	m
47	0.56	0.82	1.38	1.48	m
48	0.56	0.79	1.34	1.42	m
49	0.54	0.81	1.34	1.50	m
50	0.52	0.82	1.34	1.57	m
51	0.51	0.83	1.34	1.61	m
52	0.50	0.85	1.34	1.71	sm
53	0.50	0.76	1.26	1.52	m
54	0.48	0.78	1.26	1.63	m
55	0.45	0.82	1.26	1.83	sm
56	0.43	0.83	1.26	1.94	sm
57	0.47	0.76	1.22	1.61	m
58	0.36	0.74	1.11	2.04	sm

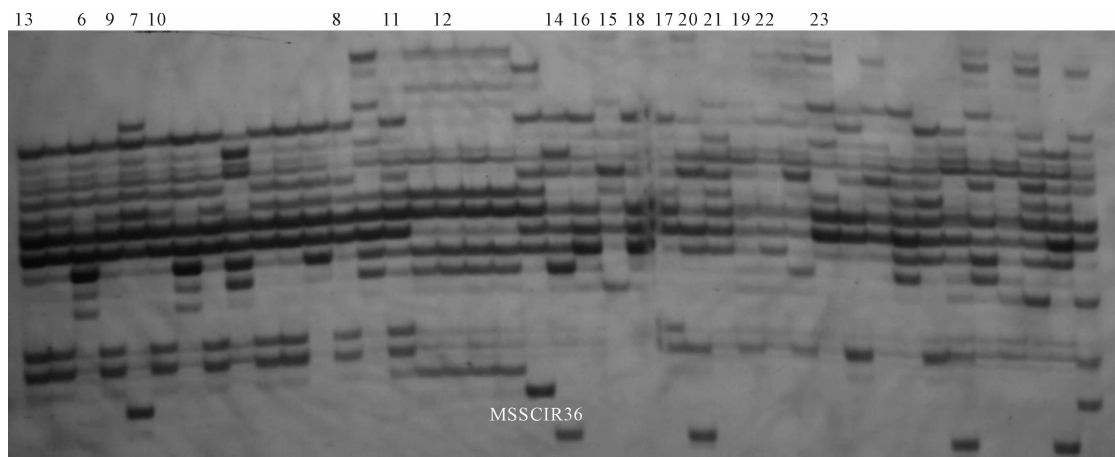


图 3 部分材料 SSR 电泳图
图中数字为材料编号,同表 1;无编号的泳道为资源圃中的其他材料
Fig. 3 SSR electrophoretogram of partial materials
The code number for the graph come from Table 1;None code number materials are other materials from sugarcane resource nursery

目符合中国种的染色体数目范围^[7],但其它中国种的核型还没有报道。

2.3 SSR 聚类分析

选用 13 对多态性好的 SSR 引物进行 PCR 扩增,不同种间呈现不同的多态性,在所有参试材料中,共扩增出 491 条 DNA 谱带,其中热带种 311 条、中国种 345 条、印度种 364 条、杂交品种 403 条,而‘德阳大叶子’共扩增出 196 条 DNA 谱带,其中

热带种、中国种、印度种和杂交品种与‘德阳大叶子’的共有条带分别占‘德阳大叶子’总条带比列的 82.65%、86.73%、91.84%和 94.39%,说明‘德阳大叶子’更接近于杂交种质。从单一引物的扩增图谱来看,MSSCIR36 号引物扩增的结果显示‘德阳大叶子’的图谱与中国种类似(图 3)。通过所有引物聚类分析,如图 4 所示,参试的热带种、中国种、杂交品种各材料均按“种”各自聚类,如热带种‘拔地拉’、

表 5 种间相似性系数比较

Table 5 The similarity coefficient comparison of inter-species

种 Species	德阳大叶子 Deyang Dayezi			
	表型性状聚类 Phenotypic character cluster		SSR 聚类 SSR cluster	
	平均相似性系数 Average similarity coefficient	最大相似性系数 Max similarity coefficient	平均相似性系数 Average similarity coefficient	最大相似性系数 Max similarity coefficient
热带种 <i>S. officinarum</i> L.	0.51	0.59	0.70	0.74
中国种 <i>S. sinense</i> R.	0.71	0.82	0.69	0.71
印度种 <i>S. barberi</i> J.	0.55	0.73	0.68	0.77
杂交品种 <i>Saccharum</i> spp.	0.31	0.36	0.69	0.75

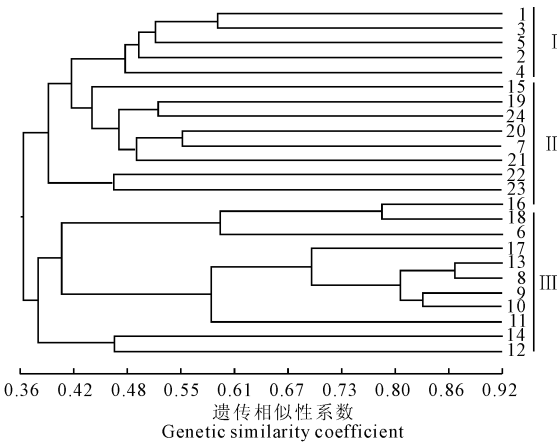


图 4 SSR 分子聚类图
1~24 为材料编号,同表 1

Fig. 4 UPGMA dendrogram base on
Jaccard coefficient of SSR

The material code number 1~24 come from Table 1

‘克林斯它林那’、‘越南牛蔗’、‘黑车里本’和‘路打士聚’在 I 类中;‘ROC10’、‘R570’、‘ROC22’、‘ROC16’、‘桂糖 11’和‘粤糖 93-159’聚在 II 类中,其中包含‘德阳大叶子’;而中国种的竹蔗和芦蔗品种则更近的聚在 III 类中;印度种 5 个材料分别与杂交种质和中国种相聚。表 5 中种间平均相似性系数显示,‘德阳大叶子’与热带种、中国种、印度种和杂交品种间的平均相似性系数分别为 0.70、0.69、0.68和0.69,与‘ROC22’和‘Pansahi’的相似性系数最大,分别为 0.75 和 0.77,虽然‘德阳大叶子’在聚类图中与杂交品种聚在一起,但种间相似性系数相差

3 讨 论

甘蔗属于异源多倍体植物,可以与甘蔗属及其近缘属进行杂交,导致甘蔗的居群较多,种属间很难进行区分,不利于甘蔗的杂交利用。本研究通过结

合表型性状、SSR 标记数据和核型分析的方法,从 3 个层次反映了‘德阳大叶子’的属种关系,避免了单一方法所带来的误差,能清楚地解释该种质的属种归类、遗传背景和种间关系。从 3 种分析结果来看,‘德阳大叶子’的核型分析,证明该种质的染色体数目为 116 条,属于 2B 型,符合中国种染色体数目范围^[7];通过对‘德阳大叶子’的表型和 SSR 标记数据进行分析,种间遗传相似性系数(表 5)表明 SSR 聚类将‘德阳大叶子’归属于杂交品种,与杂交品种的最大相似性系数较高,但‘德阳大叶子’与几个种的种间平均相似性系数相差较小,最高也仅有 0.02 的系数差异,从‘德阳大叶子’与中国种和杂交品种的种间相似性系数比较结果可以得出,虽然杂交品种的最大相似性系数高于中国种,但平均相似性系数二者相同,说明 SSR 标记所用的引物量可能较少,多态性不够,区分效率不是很高,在引物量较少的条件下,相似性系数差异不显著,同时中国种属于热带种与割手密(*Saccharum spontaneum* L.)天然杂交的后代,在血缘上与杂交种较为相近,中国种的低世代材料也可能出现 SSR 分析数据的结果;从表型性状聚类的 SM 相似性系数来看,‘德阳大叶子’与中国种的平均相似性系数和最大相似性系数均高达 0.71 和0.82,远高于其它种,而与杂交品种的平均相似性系数和最大相似性系数为 0.31 和 0.36,差异显著。

从实际角度分析,‘德阳大叶子’在种间划分上只有两种可能,一种是杂交品种,从专业的甘蔗研究所引到当地;另一种是古代的热带种与割手密(*S. spontaneum* L.)天然杂交的后代,经过自然和人工选择而形成的中国种^[20]。‘德阳大叶子’的表型性状与中国种高度聚类在一起,与中国种的 SM 遗传相似性系数最高,同时核型分析得到的染色体数目也符合中国种的染色体数目范围,因此表型性状的

分析结果排除了人为误差而导致的不准确因素;虽然分子标记聚类结果将‘德阳大叶子’划为杂交种,但‘德阳大叶子’与各种间的平均相似性系数差异不显著,分辨率不足,反映了单一使用 SSR 标记方法

带来的不准确因素,不能充分证明该种质的属种划分。因此基于以上研究证据认为,‘德阳大叶子’隶属中国种或是中国种杂交后代的低世代材料。

参考文献:

- [1] LIU H B(刘洪博), YING X M(应雄美), LIU X L(刘新龙), *et al.* Evaluation of ratoon characteristics in sugarcane cultivation protospecies[J]. *Plant Diversity and Resources*(植物分类与资源学报), 2013, **35**(5): 621—629(in Chinese).
- [2] LIU X L(刘新龙), MA L(马 丽), CAI Q(蔡 青), *et al.* Genetic diversity analysis of phenotypic traits in Yunnan sugarcane varieties[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报), 2010, **11**(6): 703—708(in Chinese).
- [3] LIU J Y(刘家勇), ZHAO P F(赵培方), LIU X L(刘新龙), *et al.* Genetic diversity analysis on 68 foreign sugarcane germplasms (*Saccharum* spp.) with AFLP technique[J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Nat. Sci. Edi.) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2013, **39**(5): 466—470(in Chinese).
- [4] XU CH H(徐超华), LU X(陆 鑫), MA L(马 丽), *et al.* Phenotypic traits and genetic diversity of *Erianthus arundinaceum* germplasm[J]. *Journal of Hunan Agricultural University* (Nat. Sci. Edi.) (湖南农业大学学报·自然科学版), 2014, **40**(2): 117—121(in Chinese).
- [5] WU H L(吴海兰), WANG X H(王先宏), HE L L(何丽莲), *et al.* Genetic diversity analysis of Yunnan sugarcane cultivars on SSR marker[J]. *Molecular Plant Breeding*(植物分子育种), 2014, **12**(1): 144—151(in Chinese).
- [6] PAN Y B. Highly polymorphic microsatellite DNA markers for sugarcane germplasm evaluation and variety identity testing[J]. *Sugar Tech.*, 2006, **8**(4): 246—256.
- [7] GRASSL C O. Introgression between *Saccharum* and *Miscanthus* in New Guinea and the Pacific area[C]//The Third Proceedings of International Society of Sugar Cane Technologists. San Juan, Puerto Rico: International Society of Sugar Cane Technologists Committee, 1965: 995—1 003.
- [8] XIAO F H(萧凤回), LI Q W(李奇伟), DAI R B(戴耀波). Observations on the agronomic, milling and botanical characters and the chromosome in commercial cane×*E. arundinaceus* hybrid and its parents[J]. *Journal of Yunnan Agricultural University*(云南农业大学学报), 1995, **10**(1): 29—34(in Chinese).
- [9] D'HONT A, RAO P S, FELDMANN P, *et al.* Identification and characterization of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridization[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, **91**(2): 320—326.
- [10] LI F SH(李富生), HE L L(何丽莲), YANG Q H(杨清辉), *et al.* Evaluation of some special characters of *Erianthus fulvus* and identification of sugarcane hybrids based on chromosome number and RAPD[J]. *Molecular Plant Breeding*(分子植物育种), 2003, **1**(6): 775—781(in Chinese).
- [11] LIN X Q(林秀琴), LU X(陆 鑫), MAO J(毛 钧), *et al.* GISH analysis of intergeneric F₁ hybrids between *Saccharum officinarum* and *Erianthus rockii*[J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*(西南农业学报), 2013, **26**(4): 1 327—1 331(in Chinese).
- [12] 蔡 青, 范源洪. 甘蔗种质资源描述规范和数据[S]. 北京: 中国农业出版社, 2006: 7—40.
- [13] 蔡 青, 范源洪. 农作物优异种质资源评价规范——甘蔗[S]. 北京: 中国农业出版社, 2008: 1—4.
- [14] LI M X(李懋学), CHEN R Y(陈瑞阳). A suggestion on the standardization of karyotype analysis plants[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research*(武汉植物学研究), 1985, **3**(4): 297—302(in Chinese).
- [15] LEVAN A. Nomenclature for centromere position in chromosome[J]. *Hereditas*, 1964, **52**(2): 201—220.
- [16] STEBBINS G L. Chromosome Evolution in High Plants[M]. London: Edward Arnold, 1971: 87—90.
- [17] ARANNO H. Cytological studies in subfamily *Carduoideae* (Compositae) of Japan[J]. *Robot Magazine* (Tokyo), 1963, **76**(1): 419—427.
- [18] CAI Q(蔡 青), FAN Y H(范源洪), AITKEN K, *et al.* Assessment of the phylogenetic relationships with in the “*Saccharum complex*” using AFLP markers[J]. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报), 2005, **31**(5): 551—559(in Chinese).
- [19] LIU H B(刘洪博), YING X M(应雄美), MAO J(毛 钧), *et al.* Genetic diversity analysis for 11 clones of *Saccharum spontaneum* L. [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*(植物遗传资源学报), 2013, **14**(3): 542—546(in Chinese).
- [20] 陈如凯. 现代甘蔗遗传育种[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010: 20—24.