

基于 GISH 的甘蔗与斑茅 F₁ 染色体遗传与核型分析

黄永吉¹, 吴嘉云^{1,2}, 刘少谋², 邓祖湖¹, 符成², 林彦铨¹, 李奇伟², 黄忠兴², 陈如凯¹

(¹福建农林大学/农业部福建甘蔗生物学与遗传育种重点实验室, 福州 350002; ²广州甘蔗糖业研究所, 广州 510316)

摘要:斑茅在甘蔗育种的利用是现代甘蔗育种种质创新的热点, 育种者期望把斑茅中优异的特性通过杂交渗透到甘蔗中。甘蔗与斑茅的 F₁ 是斑茅利用研究的难点也是基础。本研究利用基因组原位杂交技术(GISH)分析甘蔗与斑茅的 F₁ 染色体构成和核型, 探讨甘蔗与斑茅 F₁ 染色体的遗传行为。GISH 结果表明, 甘蔗与斑茅杂交 F₁ 的染色体众数 68~69 条, 其中 40 条来自甘蔗热带种 Badila, 28~29 条来自海南斑茅, 未发现有染色体的交换或易位现象。参试材料大部分染色体都属于中部着丝点(m)的染色体, 少数为近中部着丝点(sm), YCE95-41 核型属 2B 型, 其余的核型都为 1B 型。甘蔗与斑茅的染色体按 n+n 的方式传递给 F₁, 本研究结果为斑茅种质在甘蔗育种中的利用及其杂交后代染色体细胞遗传研究提供参考依据。

关键词:甘蔗; 斑茅; 染色体; 基因组原位杂交; 核型

Chromosome Genetic and Karyotype Analysis of F₁ Hybrids between *Saccharum officinarum* and *Erianthus arundinaceus* Based on GISH

HUANG Yong-ji¹, WU Jia-yun^{1,2}, LIU Shao-mou², DENG Zu-hu¹, FU Cheng²,

LIN Yan-quan¹, LI Qi-wei², HUANG Zhong-xing², CHEN Ru-kai¹

(¹Key Lab of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture/Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002; ²Guangzhou Research Institute for Sugarcane Industry, Guangzhou 510316)

Abstract: Utilization of *Erianthus arundinaceus* is a hot topic in modern sugarcane germplasm innovation program. Sugarcane breeders expect to permeate excellent characteristics of *Erianthus arundinaceus* into *Saccharum officinarum* through intergeneric cross. The F₁ hybrids perform a base and importance role in studying and utilization of *Erianthus arundinaceus*. In this study, we characterized the karyotype and chromosome behavior of F₁ hybrids between *Saccharum officinarum* and *E. arundinaceus* using genomic *in situ* hybridization (GISH). The results showed that there were 68 to 69 chromosomes in the F₁ hybrids, of which 40 were from *S. officinarum*, and 28 to 29 were from *E. arundinaceus*. Chromosome translocation and exchange were not observed in the F₁ hybrids. Most of chromosomes were classified as median centromere type (m) and few of chromosomes were submetacentromere type (sm) in 5 F₁ clones. The karyotype of YCE95-41 fell into 2B, the others fell into 1B. GISH result revealed that the F₁ between *S. officinarum* and *E. arundinaceus* resulted from n+n chromosome transmission. Our study provided fundamental information for utilization of *E. arundinaceus* germplasm into sugarcane breeding program.

Key words: *Saccharum officinarum*; *Erianthus arundinaceus*; chromosome; genomic *in situ* hybridization; karyotype

优良新品种的选育推广是提高作物产量和品质最经济最有效的手段。利用甘蔗与野生种质资源杂

交创新种质, 进而选育高产高糖和适应性强的新品种, 是甘蔗育种者一直努力的方向。回顾百余年的

收稿日期: 2013-09-04 修回日期: 2013-09-21 网络出版日期: 2014-01-24

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/10.13430/j.cnki.jpgr.2014.02.025.html>

基金项目: 国家自然科学基金(30671329); 国家甘蔗产业体系专项资金资助(CARS-20-1-5)

第一作者研究方向为甘蔗遗传育种。E-mail: 280691251@qq.com; 吴嘉云为共同第一作者, E-mail: jiayunng@163.com

通信作者: 邓祖湖, 研究方向为甘蔗遗传育种。E-mail: dengzuhu@163.com

甘蔗育种史,突破性甘蔗新品种的育成,都是种质创新的结果。现代甘蔗栽培种大多含有甘蔗属的热带种 (*Saccharum officinarum*)、割手密 (*Saccharum spontaneum*) 和印度种 (*Saccharum barberi*) 或中国种 (*Saccharum sinense*) 3 个种以上的血缘,但由于原始创新亲本不多,长期以血缘相近的材料为亲本进行杂交,造成后代异质性低^[1],很难选育出有突破性的甘蔗新品种。因此,各国甘蔗育种家不断努力寻找可利用的新种质资源,通过远缘杂交向甘蔗导入新种质^[2-6],以拓宽现代甘蔗的遗传基础。

蔗茅属的斑茅 (*Erianthus arundinaceus*) 为甘蔗的近缘属植物,具有很多优异性状如抗病、抗旱、耐涝、强适应性及强宿根性等特点^[7-9],受到国内外的育种家重视。早在 1885 年育种者就开始尝试甘蔗与斑茅的杂交^[10],但是国内外斑茅的杂交利用一直停留在 F_1 ,最主要的原因是 F_1 花粉不育。直到我国海南甘蔗育种场调整思路以 F_1 作为母本才突破了这一瓶颈^[11],并相继获得不同世代的含有斑茅血缘的种质材料^[11-12],为斑茅种质的利用研究提供了宝贵的材料。前人对甘蔗染色体的遗传研究,包括对热带种与割手密的 F_1 、 BC_1 与 BC_2 的染色体遗传的研究^[13],为创建“高贵化”理论奠定基础,也为野生种质的利用提供理论指导。甘蔗与斑茅杂交后代的染色体遗传研究同样对斑茅的开发利用极为重要,引起了很多学者的关注。

因为甘蔗的染色体数目多、体积小、中期相比比例低,给甘蔗染色体研究带来很大的困难,所以相关研究报道也较少。本研究利用基因组原位杂交技术 (GISH, genomic *in situ* hybridization) 对来自甘蔗热带种 Badila 和海南斑茅的 F_1 进行染色体组成和核型分析,为斑茅在甘蔗育种中的利用和染色体遗传研究提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

分别用甘蔗热带种 Badila 和海南斑茅基因组 DNA 进行标记探针;以 Badila × 海南斑茅的 F_1 : YCE95-41、YCE96-40、YCE96-43、YCE96-45 和 YCE96-66 为染色体基因组原位杂交的植物材料,斑茅及其后代无性系均来自广州甘蔗糖业研究所海南甘蔗育种场,保育在福建农林大学甘蔗综合研究所资源圃。

1.2 方法

采用酶解去壁低渗法以根尖分生区细胞制备染色体靶细胞,鲑鱼精 DNA 用沸水浴打断作为封阻

DNA。CTAB 法提取亲本基因组总 DNA,用 Roche 公司 Nick Translation Kit (Cat. No. 10 976 776 001) 产品进行标记,将 Badila 基因组 DNA 用生物素标记,以抗生物素的德克萨斯红 (红色荧光) 检测;将斑茅基因组 DNA 用地高辛标记,以抗地高辛的 FITC (绿色荧光) 进行检测,以 DAPI 复染 (蓝色荧光)。荧光原位杂交过程参照 A. D'Hont 等^[14] 的方法,Carl Zeiss 荧光显微镜观察, AxioVision 4.7 软件拍照测量,核型分析利用 Microsoft Excel 2013 软件分析作图。核型分析参照李懋学等^[15] 的方法,单条分析,不配对。

2 结果与分析

2.1 F_1 染色体组成

经显微镜观察和计数,甘蔗与斑茅杂交 F_1 的染色体数目在 68 ~ 70 条之间,其中 40 条来自甘蔗热带种 Badila, 28 ~ 30 条来自海南斑茅。YCE95-41 染色体众数为 68 条,其中 40 条来自甘蔗热带种 Badila, 28 条来自海南斑茅; YCE96-40、YCE96-43、YCE96-45 和 YCE96-66 染色体总数、众数都为 69 条,其中 40 条来自甘蔗热带种 Badila, 29 条来自海南斑茅。 F_1 的染色体基本是按照 $n + n$ 的方式遗传。

2.2 F_1 染色体参数分析

2.2.1 YCE95-41 染色体核型分析 GISH 结果 (图 1) 表明: YCE95-41 的染色体数为 68 ~ 70 条,其中带绿色荧光的是来自斑茅的染色体,数目为 28 ~ 30 条,众数为 28 条,染色体构成为 $2n = 68 = 40S + 28E$ (S 代表甘蔗, E 代表斑茅, 下同)。染色体绝对长度 1.51 ~ 4.53 μm , 相对长度 0.39 ~ 2.20, 臂比 1.01 ~ 2.11 (图 2), 平均臂比为 1.28, 最长染色体/最短染色体为 3.30, 臂比大于 1.70 的只有 3 条染色体, 第 42 条染色体有随体。YCE95-41 核型属 2B 型, 核型公式为 $2n = 65 m + 3 sm$ 。

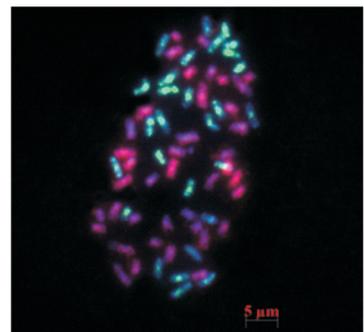


图 1 YCE95-41 GISH 结果

Fig. 1 The GISH result of YCE95-41

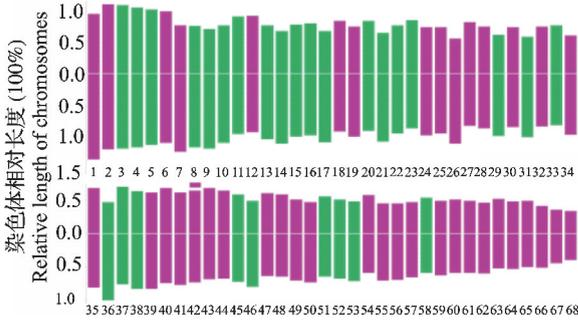


图2 YCE95-41 染色体核型模式图

Fig.2 The karyotype ideogram of YCE95-41

2.2.2 YCE96-40 染色体核型分析 GISH 结果表明:YCE96-40 的染色体数为 68 ~ 70 条,其中带绿色荧光的斑茅染色体数目为 28 ~ 30 条,众数为 29 条。染色体构成为 $2n = 69 = 40S + 29E$ (图 3)。染色体绝对长度 1.55 ~ 5.40 μm ,相对长度 0.79 ~ 2.74,臂比 1.01 ~ 1.85(图 4),平均臂比为 1.17,最长染色体/最短染色体为 3.47,臂比大于 1.70 的只有 2 条染色体。YCE96-40 核型属 1B 型,核型公式为 $2n = 67 m + 2 sm$ 。

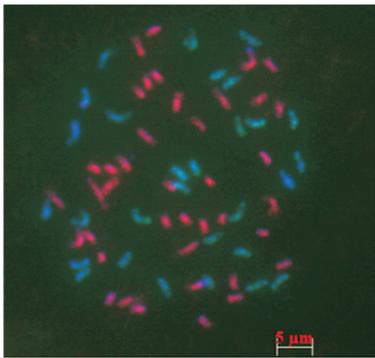


图3 YCE96-40 GISH 结果

Fig.3 The GISH result of YCE96-40

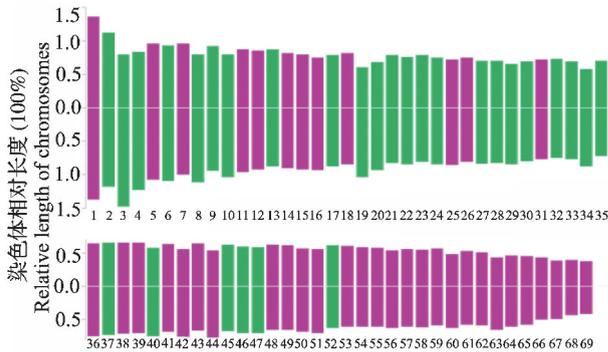


图4 YCE96-40 染色体核型模式图

Fig.4 The karyotype ideogram of YCE96-40

2.2.3 YCE96-43 染色体核型分析 GISH 结果表明:YCE96-43 染色体数为 68 ~ 70 条,其中带绿色荧光的斑茅染色体,其数目为 28 ~ 30 条,众数为 29 条。染色体构成为 $2n = 69 = 40S + 29E$ (图 5)。染色体绝对长度 1.99 ~ 5.40 μm ,相对长度 0.87 ~ 2.38(图 6),臂比 1.01 ~ 1.80,平均臂比为 1.22,最长染色体/最短染色体为 2.72,臂比大于 1.70 的有 2 条染色体。YCE96-43 核型属 1B 型,核型公式为 $2n = 67 m + 2 sm$ 。

光的斑茅染色体,其数目为 28 ~ 30 条,众数为 29 条。染色体构成为 $2n = 69 = 40S + 29E$ (图 5)。染色体绝对长度 1.99 ~ 5.40 μm ,相对长度 0.87 ~ 2.38(图 6),臂比 1.01 ~ 1.80,平均臂比为 1.22,最长染色体/最短染色体为 2.72,臂比大于 1.70 的有 2 条染色体。YCE96-43 核型属 1B 型,核型公式为 $2n = 67 m + 2 sm$ 。

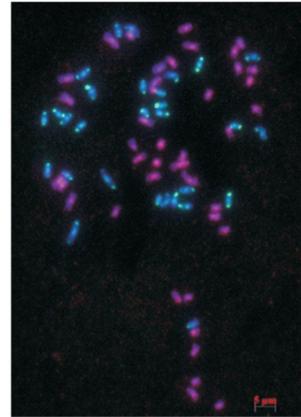


图5 YCE96-43 GISH 结果

Fig.5 The GISH result of YCE96-43

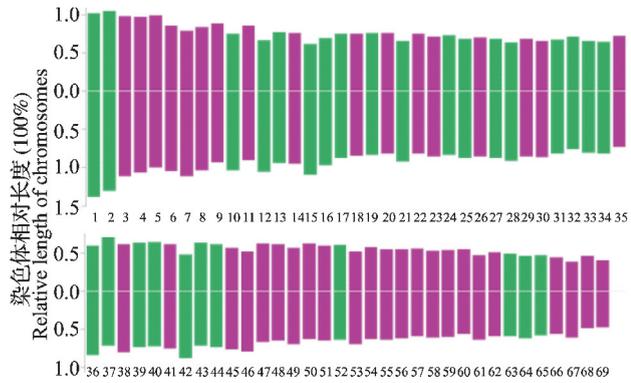


图6 YCE96-43 染色体核型模式图

Fig.6 The karyotype ideogram of YCE96-43

2.2.4 YCE96-45 染色体核型分析 GISH 结果表明:YCE96-45 的染色体数为 67 ~ 70 条,其中带绿色荧光的斑茅染色体,其数目为 27 ~ 30 条,众数为 29 条。染色体构成为 $2n = 69 = 40S + 29E$ (图 7)。染色体绝对长度 1.95 ~ 5.28 μm ,相对长度 0.86 ~ 2.33,臂比 1.01 ~ 1.76(图 8),平均臂比为 1.20,最长染色体/最短染色体为 2.70,臂比大于 1.70 的只有 2 条染色体。YCE96-45 核型属 1B 型,核型公式为 $2n = 67 m + 2 sm$ 。

2.2.5 YCE96-66 染色体核型分析 GISH 结果表明:YCE96-66 的染色体数为 67 ~ 70 条,GISH 结果可以看到其中带绿色荧光的斑茅染色体,其数目为

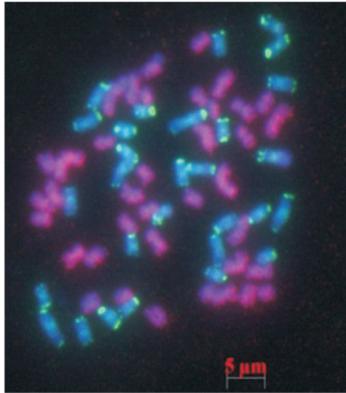


图7 YCE96-45 GISH 结果

Fig.7 The GISH result of YCE96-45

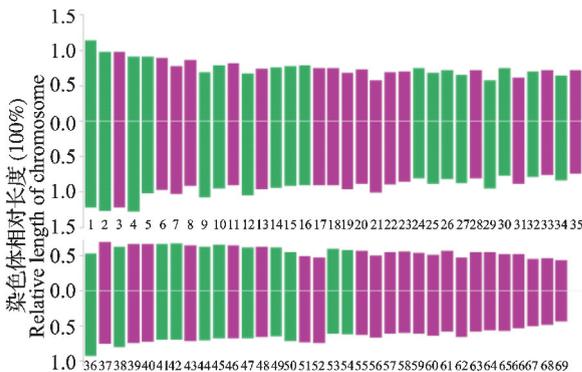


图8 YCE96-45 染色体核型模式图

Fig.8 The karyotype ideogram of YCE96-45

27 ~ 30 条,众数为 29 条。染色体构成为 $2n = 69 = 40S + 29E$ (图 9)。染色体绝对长度 $1.98 \sim 4.89 \mu\text{m}$, 相对长度 $0.92 \sim 2.28$ (图 10), 臂比 $1.01 \sim 1.80$, 平均臂比为 1.24, 最长染色体/最短染色体为 2.47, 臂比大于 1.70 的只有 2 条染色体。YCE96-66 核型属 1B 型,核型公式为 $2n = 67 m + 2 sm$ 。

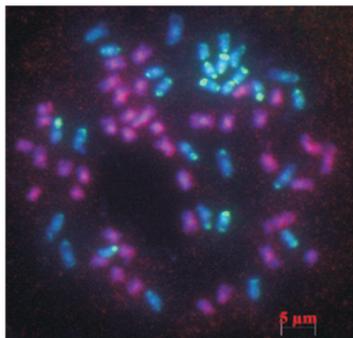


图9 YCE96-66 GISH 结果

Fig.9 The GISH result of YCE96-66

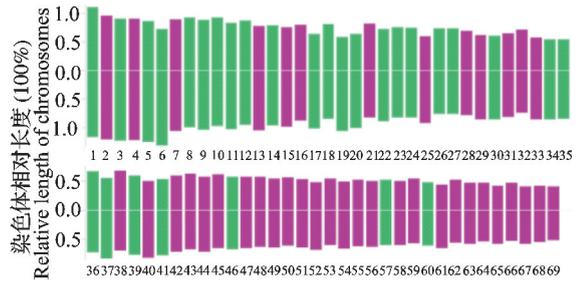


图 10 YCE96-66 染色体核型模式图

Fig.10 The karyotype ideogram of YCE96-66

3 讨论

现代甘蔗商业栽培品种为异源多倍体植物,遗传背景极其复杂,染色体较小,数目众多(80 ~ 140),给甘蔗染色体的研究带来了很多困难。不同的甘蔗无性系材料染色体条数不一样,且染色体虽然大部分以二价体的形式存在,同时还存在单价体甚至是三价体等多价体^[10,16],部分染色体无法正常配对,如果在不确定某个甘蔗染色体是否存在单价体等染色体组成情况下,对甘蔗染色体核型分析采用传统的同源染色体配对方式不太合理。笔者认为,因为甘蔗染色体的特殊性,核型分析不应该按照传统的配对的染色体核型分析的方法,所以本研究参考传统的染色体核型分析方法,但染色体不配对。

前人研究认为甘蔗的核型进化与大多数植物的核型进化规律一致,从对称向不对称发展。祖亲代野生种的核型相对商业栽培种来说,中部着丝点染色体的比例更高^[17-18]。本研究对甘蔗 × 斑茅的 5 个 F_1 无性系进行核型分析,结果表明,这 5 份材料大部分染色体都属于中部着丝点染色体(m),少数为亚中部着丝点染色体(sm)。YCE95-41 核型为 2B 型,其余的为 1B 型。而其父本斑茅属于 1A 型^[19-20],母本 Badila 属于 1B 或 2B 型^[20-21],都属于比较原始的类型,这与前人的研究结果基本一致。另外,5 个甘蔗与斑茅的 F_1 核型模式图还显示(图 2、图 4、图 6、图 8),斑茅染色体长度总体上要比热带种 Badila 染色体长。

对甘蔗 × 斑茅的 5 个 F_1 染色体 GISH 试验显示, F_1 染色体众数为 68 或 69,其中 40 条染色体来自甘蔗属热带种,28 条或 29 条染色体来自海南斑茅,甘蔗热带种和海南斑茅的染色体数分别为 80 和 60^[19,22],其 F_1 染色体数基本符合 $n + n$ 的遗传方式。研究结果直观地证实了前人对甘蔗与斑茅杂交后代染色体按 $n + n$ 传递的推断^[20,23]。甘蔗热带种与割手密杂交, F_1 大多按照 $2n + n$ 的方式遗传^[24],这样

斑茅杂交利用的高贵化进程就比割手密慢,但是斑茅具备优异的特性,育种家仍期待能利用斑茅种质培育出具有突破性品种。

斑茅(*Erianthus arundinaceus*)、蔗茅(*Erianthus fulvus*)和滇蔗茅(*Erianthus rockii* Keng)同为蔗茅属,是甘蔗的近缘属植物,与母本甘蔗属热带种杂交,其 F_1 有着相似的染色体遗传行为。本研究对甘蔗与斑茅的 F_1 材料的 GISH 结果表明, F_1 染色体数基本按照 $n+n$ 的方式遗传,未发现有染色体的交换或易位现象。林秀琴等^[25]对甘蔗与滇蔗茅杂交后代的 GISH 观察, F_1 染色体数也基本按照 $n+n$ 的方式遗传,未发现有染色体的交换或易位现象。也有试验表明在甘蔗与蔗茅杂交后代 GISH 观察,其按照 $2n+n$ 和 $n+n$ 的方式遗传,蔗茅染色体出现消减、断裂和重排现象^[26-27]。

迄今有关甘蔗与斑茅染色体的 GISH 研究有一些报道^[9,28-30],本研究对 5 个甘蔗与斑茅的 F_1 进行的染色体的组成和核型分析,为斑茅种质在甘蔗育种的利用及其后代染色体细胞遗传研究提供参考依据。

参考文献

- [1] Grivet L, Daniels C, Glaszmann J, et al. A review of recent molecular genetics evidence for sugarcane evolution and domestication [J]. *Ethnobot Res Appl*, 2004, 2: 9-17
- [2] Janaki Ammal E. Chromosome numbers in sugarcane \times bamboo hybrids [J]. *Nature*, 1938, 141: 925-925
- [3] 彭绍光. 国内外甘蔗种质资源的采集保育与利用研究概述 [J]. *西南农业学报*, 1990, 3(3): 90-96
- [4] 陆鑫, 毛钧, 刘洪博, 等. 甘蔗野生种滇蔗茅种质创新利用研究 I. 甘蔗与滇蔗茅远缘杂交 F_1 群体构建与 SSR 分子标记鉴定 [J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(2): 321-324
- [5] 高轶静, 方锋学, 刘昔辉, 等. 甘蔗与斑茅割手密复合体杂交后代的分子标记鉴定 [J]. *植物遗传资源学报*, 2012, 13(5): 912-916
- [6] 刘昔辉, 方锋学, 张荣华, 等. 甘蔗与河八王属间杂种的 SSR 标记鉴定 [J]. *西南农业学报*, 2012, 25(1): 38-43
- [7] Li W F, Wang X Y, Huang Y K, et al. Screening sugarcane germplasm resistant to *Sorghum mosaic virus* [J]. *Crop Prot*, 2013, 43: 27-30
- [8] 陈如凯. 现代甘蔗育种的理论与实践 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 13-18
- [9] Piperidis G, Christopher M J, Carroll B J, et al. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus* [J]. *Genome*, 2000, 43(6): 1033-1037
- [10] Price S. Cytogenetics of modern sugar canes [J]. *Econ Bot*, 1963, 17(2): 97-106
- [11] 刘少谋, 符成, 吴其卫, 等. 斑茅杂种甘蔗 BC₁ 选育研究 [J]. *热带农业科学*, 2007, 27(3): 9-12
- [12] 符成, 刘少谋, 吴其卫, 等. 含海南高生型斑茅血缘的甘蔗属间杂种崖城 01-92 回交入选品系评价 [J]. *广东农业科学*, 2012, 39(17): 17-20
- [13] Bremer G. Problems in breeding and cytology of sugar cane [J]. *Euphytica*, 1961, 10(1): 59-78
- [14] D'Hont A, Grivet L, Feldmann P, et al. Characterisation of the double genome structure of modern sugarcane cultivars (*Saccharum* spp.) by molecular cytogenetics [J]. *Mol Gen Genet*, 1996, 250(4): 405-413
- [15] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. *武汉植物学研究*, 1985, 3(4): 297-302
- [16] Janaki Ammal E. Intergeneric hybrids of *Saccharum* [J]. *J Genet*, 1940, 41(2-3): 217-253
- [17] 黄东益, 郑成木, 庄南生, 等. 甘蔗染色体组构成系统演化的研究 [J]. *热带作物学报*, 2000, 21(1): 43-51
- [18] 郑成木, 黄东益, 庄南生. 甘蔗核型变化及其祖亲种血缘构成基本特征的研究 [J]. *云南大学学报: 自然科学版*, 1999, 21(S3): 121-122
- [19] 刘文荣, 邓祖湖, 张木清, 等. 甘蔗斑茅的杂交利用及其杂种后代鉴定系列研究 [J]. *作物学报*, 2004, 30(11): 1093-1096
- [20] Deng Z H, Zhang M Q, Lin W L, et al. Analysis of disequilibrium hybridization in hybrid and backcross progenies of *Saccharum officinarum* \times *Erianthus arundinaceus* [J]. *Agr Sci China*, 2010, 9(9): 1271-1277
- [21] 王英, 高和琼, 庄南生, 等. 崖城割手密 11 号与拔地拉核型比较分析 [J]. *中国农学通报*, 2008, 24(3): 52-57
- [22] 邓祖湖, 李玉蝉, 刘文荣, 等. 甘蔗和斑茅远缘杂交后代的染色体遗传分析 [J]. *热带作物学报*, 2008, 28(3): 62-67
- [23] 吴文婧, 黄东益, 王英, 等. 甘蔗栽培种崖城 96/46 及其近缘亲本种崖城斑茅 2 号的核型分析 [J]. *热带农业科学*, 2006, 26(3): 5-7
- [24] Piperidis G, Piperidis N, D'Hont A. Molecular cytogenetic investigation of chromosome composition and transmission in sugarcane [J]. *Mol Genet Genomics*, 2010, 284(1): 65-73
- [25] 林秀琴, 陆鑫, 刘新龙, 等. 应用 GISH 技术鉴定甘蔗野生种外源染色体 [J]. *分子植物育种*, 2013, 11(5): 1025-1031
- [26] Wang X H, Yang Q H, Li F S, et al. Characterization of the chromosomal transmission of intergeneric hybrids of *Saccharum* spp. and *Erianthus fulvus* by genomic *in situ* hybridization [J]. *Crop Sci*, 2010, 50(5): 1642-1648
- [27] 王宏, 杨清辉, 李富生, 等. 基于 GISH 的甘蔗与蔗茅属间杂交 F_1 后代染色体组成及核型分析 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(6): 1085-1091
- [28] D'Hont A, Rao P, Feldmann P, et al. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* \times *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA *in situ* hybridisation [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91(2): 320-326
- [29] Piperidis N, Chen J W, Deng H H, et al. GISH characterization of *Erianthus arundinaceus* chromosomes in three generations of sugarcane intergeneric hybrids [J]. *Genome*, 2010, 53(5): 331-336
- [30] 陈健文, Piperidis N, 李奇伟, 等. 用基因组原位杂交方法分析甘蔗-斑茅杂种及回交后代的染色体组成 [J]. *分子植物育种*, 2010, 8(2): 293-296