

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

陆鑫¹, 毛钧¹, 刘洪博¹, 刘新龙¹, 马丽¹, 苏火生¹, 蔡青^{1,2,3}

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, 开远 661600;

²云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 昆明 650223; ³云南大学生命科学院, 昆明 650091)

摘要: 利用光周期调控技术诱导甘蔗热带种路打士开花, 并与滇蔗茅云南 95-19 进行远缘杂交, 培育实生苗 76 株, 大田移栽成活 62 株, 成活率 81.6%; 选用 4 对引物对获得的 62 份杂交后代进行 SSR 分子标记鉴定, 结果表明, 62 份杂交后代全部为真杂种, 所选 SSR 引物对滇蔗茅后代群体具有较高的鉴定效率。该杂交组合后代杂种真实率为 100%, 是目前数量最大的滇蔗茅 F_1 群体。

关键词: 滇蔗茅; 种质创新; 杂交后代; SSR 标记

Innovation Germplasm of *Erianthus rockii*

I. Establishment of F_1 Intergeneric Distant Hybridization of *Saccharum officinarum* L. and *Erianthus rockii* and the Identification of F_1 by SSR Molecular Markers

LU Xin¹, MAO Jun¹, LIU Hong-bo¹, LIU Xin-long¹, MA Li¹, SU Huo-sheng¹, CAI Qing^{1,2,3}

¹Yunnan Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement / Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 661600; ²Biotechnology & Genetic Resources Institute, Yunnan Academy of Agriculture Sciences, Kunming 650223; ³School of Life Sciences, Yunnan University, Kunming 650091)

Abstract: Using photoperiod pathway controlling techniques induced *S. officinarum* Ludashi to bloom, and distant crossing with *Erianthus rockii* Yunnan 95-19. 62 seedlings have been transplanted and survived in the field. The survival rate was 81.6%. 4 pairs of SSR primers were chosen to use for authenticity identification of progenies. The results showed that all of the 62 progenies were genuine hybrids, and these SSR primers are quite efficient for identification of *Erianthus rockii* progenies. The genuine hybrids rate of this cross was 100%, and the F_1 population of *Erianthus rockii* progenies was the biggest one at present.

Key words: *Erianthus rockii*; Innovation germplasm; Hybrid progenies; SSR marker

现代甘蔗品种大多含有热带种、割手密和印度种的血缘, 除此之外还含有中国种和大茎野生种中的 1~2 个种血缘, 但各类型种质中仅有较少

部分作亲本利用^[1-3], 因而其遗传基础较为狭窄^[4]。细胞学研究表明, 甘蔗品种体细胞染色体数目介于 100~120 之间, 其中 80% 的染色体来自

收稿日期: 2011-05-27 修回日期: 2011-07-11

基金项目: 国家科技支撑计划(2006BAD13B05-2-10); 云南省应用基础研究计划重点项目(2006C0013Z); 云南省重点新产品开发计划项目(2010BB011); 云南省中青年学术技术带头人后备人才培养项(2009CI059); 国家人事部留学人员科技活动优秀项目; 作物种质资源保护项目(NB2011-2130135-18)

作者简介: 陆鑫, 助理研究员, 主要从事甘蔗种质资源创新与利用研究。E-mail: xinlu_ky@126.com

通讯作者: 蔡青, 研究员, 主要从事作物种质资源研究。E-mail: caiqingysri@163.com

热带种, 10% ~ 15% 来自割手密, 5% ~ 10% 来自二者交换重组^[5-6], 这种有限的遗传基础在很大程度上限制了甘蔗的育种效益。长期以来我国多沿用现有品种为亲本进行杂交育种, 不可避免地产生了近亲交配, 致使育成品种的生活力和宿根性普遍下降^[7]。因此, 各甘蔗育种机构均广泛开展种质创新研究, 以期利用甘蔗野生种质进行基因渗入, 拓宽遗传基础。属间、种间杂交是种质创新的主要途径, 在甘蔗品种改良中扮演着重要角色。其中, 利用甘蔗属野生种(细茎野生种、大茎野生种、芒)与甘蔗进行种间杂交的研究最多, 并取得了较好进展^[8-12]。属间杂交则相对较难, 但对遗传改良的突破最具潜力, 也是近年来世界各国开展种质创新研究的重点, 尤以利用甘蔗的近缘植物蔗茅属进行种质创新的研究最多, 其中蔗茅属斑茅^[13-15]、蔗茅^[16-17]的杂交利用已取得了一定进展, 但对蔗茅属的另一个野生种滇蔗茅的利用, 国外未见报道, 国内的研究也极为有限。

蔗茅属滇蔗茅^[18] (*Erianthus rockii* Keng) 是分布于四川、云南、西藏^[19]的一种野生植物资源, 在分类上属于蔗茅属内 8 个种之一, 国外未见研究报道, 仅在中国收集保存并开展了利用研究^[20]。由于滇蔗茅具有耐旱、耐瘠、宿根性强、抗锈病性强等优良特性^[21-22], 成为甘蔗抗性育种的理想基因源。滇蔗茅的创新利用始于 20 世纪 90 年代^[23-24], 从 1998 年开始, 云南省甘蔗研究所开展了大量的滇蔗茅杂交利用工作, 通过利用甘蔗属热带种、地方种、杂交品种, 与滇蔗茅进行人工杂交, 获得了甘蔗与滇蔗茅属间远缘杂交 F_1 材料^[25-26], 是甘蔗与蔗茅属远缘杂交研究中除斑茅、蔗茅之外取得的另一突破。然而, 由于远缘杂交不亲和性等因素, 甘蔗与滇蔗茅的杂交花穗通常结实率很低, 所获后代材料数量少, 给深入开展滇蔗茅创新利用研究带来很大困难。

本研究通过人工光周期调控技术, 诱导大茎、高糖的优良种质路打士(甘蔗属热带种)孕穗开花, 作

表 1 SSR 引物序列与退火温度

Table 1 SSR primers sequences and annealing temperature

引物名称 Primer name	上游引物(5'-3') Forward primer sequence	下游引物(5'-3') Reverse primer sequence	退火温度(°C) Annealing temp
MSSCIR15	CTTGGACCCGTTCTTGGATG	AGCACTGAGGCGACTTACCC	62
MSSCIR21	CGCCAGCCACATAAAAGG	CGACCAGGACTTCATCAA	54
MSSCIR26	AAAATCAGACAAACAGCAT	AGAAGAAGCAGATACAGCT	54
SMC1752	GGCTGATTTACATGAAACTGTTCT	AAAGCTGGTATCCCAGCATACT	64

为母本与滇蔗茅云南 95-19 进行杂交, 并对杂交后代真实性进行分子鉴定, 进一步研究探索滇蔗茅种质创新利用的技术方法, 为提高杂交效率、扩大滇蔗茅利用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为热带种路打士、滇蔗茅云南 95-19 及其 62 份杂交后代材料, 其中路打士与云南 95-19 均由国家甘蔗种质资源圃提供。

1.2 方法

1.2.1 F_1 群体的构建 母本路打士于 2007 年 4 月种植于桶内, 从苗期开始至次年 3 月, 每月施复合肥 15g, 4 月 1 日起停止施肥, 每日固定 11h 35min 暗期处理至 9 月 30 日, 从 10 月 1 日起每日暗期递增 30s, 待暗期达 12h 后, 再以此时长固定处理至 12 月中旬可使路打士孕穗开花; 光周期诱导期间, 晴天每天 12:00 起喷雾 2 ~ 3h, 及时清除枯叶及多余分蘖苗, 并做好病虫害防治工作。

路打士经光周期诱导孕穗至大笔管状时, 在其植株中上部进行高压包茎, 并搬入杂交温室, 温室白天温度控制在 22 ~ 28°C, 夜间温度不低于 20°C; 待花穗抽出后, 从包茎部位下端剪断蔗茎, 剪除叶片和已开放的小花后插入流水中并套笼隔离; 次日上午, 从国家甘蔗种质资源圃中采集盛花的云南 95-19 花穗, 收集其花粉, 并采用常规方法^[27]进行人工授粉; 授粉 7d 后, 将路打士花穗套袋, 待种子成熟脱落后, 将其收集并进行实生苗培育和大田移栽; 植株分蘖后进行 SSR 鉴定。

1.2.2 DNA 提取、PCR 扩增与电泳检测 采集父母本及 62 份后代材料的幼嫩叶片, 参照应雄美等^[28]CTAB 法提取基因组 DNA。采用 Aitken 等^[29]方法进行 SSR 反应及 PCR 扩增, 扩增产物经 95°C 变性后在 5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离, 并采用快速银染法^[30]进行染色。所选用的 4 对引物(表 1)均为上海生工公司合成。

1.2.3 判定方法 根据引物扩增结果,对双亲与后代的扩增条带进行比对:后代扩增条带均来自父母本,判定为真杂种;后代扩增条带中含有父母本以外的杂带,判定为假杂种;后代扩增条带仅含有母本条带,可能为自交种,需结合其他引物扩增结果进一步分析。

2 结果与分析

2.1 杂交后代成活率

2009年3月将收获的13.6g杂交种子全部播种于育苗箱,出苗92株,死亡16株;5月中旬对剩

余的76株实生苗进行大田移栽,成活62株,大田移栽成活率为81.6%。

2.2 杂交真实性鉴定分析

图1和图2为引物MSSCIR15的扩增结果,从图中可以看出,父母本扩增带具有多态性,且无共有带,62份杂交后代的扩增带均来自双亲,判定62份杂交后代均为真杂种;引物MSSCIR21的扩增结果表明,父母本扩增带具有多态性,父本与母本相比较具有3条特征带和1条共有带,62份杂交后代具有较好的多态性,扩增带均来自双亲,判定62份杂交后代均为真

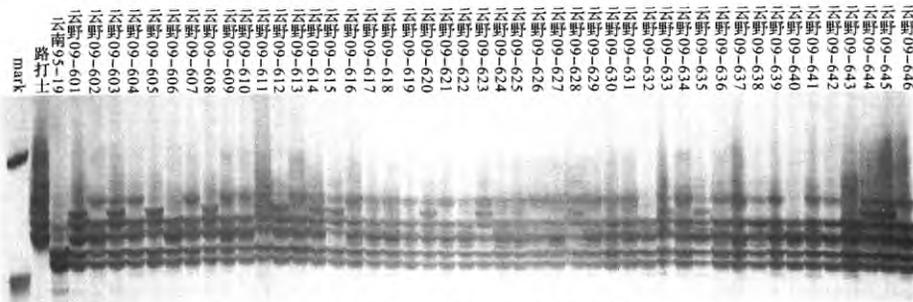


图1 引物MSSCIR15对46份杂交后代的扩增结果

Fig.1 Amplification of primer MSSCIR15 in 46 hybrids

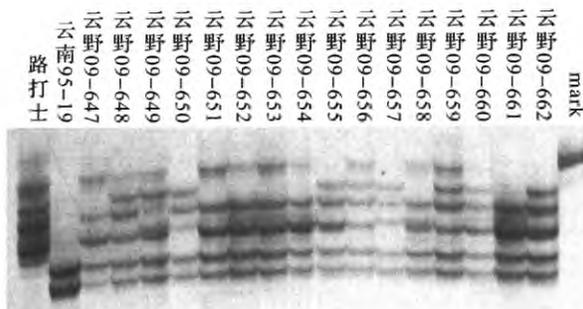


图2 引物MSSCIR15对16份杂交后代的扩增结果

Fig.2 Amplification of primer MSSCIR15 in 16 hybrids

杂种;引物MSSCIR26的扩增结果显示,父母本扩增带具有多态性,且无共有带,62份杂交后代均来自于双亲,且均含有父本的4条特征带,判定62份杂交后代均为真杂种;引物SMC1752的扩增结果表明,父母本扩增带具有多态性,父母本具有1条共有带,杂交后代云野09-612只有1条父母本共有带,可能为自交种,需结合其他引物扩增结果做出判定,其余杂交后代扩增带均来自双亲,判定为真杂种。

综合4对引物扩增结果,可判定 F_1 群体的62份杂交后代全部为真实杂交种,杂交真实率达100%。

3 讨论

高贵化育种法是甘蔗进行品种改良的主要方法和途径,这种方法得益于热带种能够以 $2n$ 的方式将

配子传递给后代,这种现象出现在 F_1 、 BC_1 和部分 BC_2 中^[31],其结果是杂种后代能够快速恢复糖分和产量,但同时也造成了甘蔗品种血缘单一。从基础种质亲系看,我国自育甘蔗品种的细胞质源仅来自于6个热带种,分别是黑车里本、斑扎马新黑谭、拔地拉、克林斯他琳娜、灰毛里求斯和卡路打不廷^[32]。这反映了我国现有的甘蔗品种不仅细胞质源种类贫乏,且野生种血缘单一、遗传基础狭窄。本研究选用热带种路打士为母本,与滇蔗茅云南95-19进行属间远缘杂交,并获得了一批真实杂交种,为增加我国甘蔗品种细胞质源种类和野生种血缘、发掘利用滇蔗茅优良抗逆性创制了理想的研究材料。

热带种与滇蔗茅分别为两个不同的属,二者之间杂交属于属间远缘杂交,前人^[23-26]与本研究中均获得真杂种 F_1 ,证明热带种与滇蔗茅远缘杂交过程中不存在受精前隔离。但我们发现在实生苗培育阶段和大田移栽过程中均有植株夭亡、 F_1 花粉量少且败育,这可能是热带种与滇蔗茅远缘杂交时打破了各自长期进化过程中形成的稳定遗传系统,造成受精后隔离现象。本研究较前人^[23-26]获得了更多的 F_1 真杂种,这可能与在杂交过程中连续反复大量授粉有关。

对杂交后代进行早期筛选,淘汰假杂种是种质创新工作中的重要环节。甘蔗属与蔗茅属属间的远缘杂交较难实现,常伴有大量自交或因花粉污染而

产生的后代,通过形态学进行真实性鉴定较为困难^[26],且鉴定结果不可靠。运用分子标记鉴定技术手段筛选真实杂交种是一种更为快速、高效、准确的途径。SSR为共显性分子标记,具有多态性丰富和PRC结果重现性高的优点,在甘薯^[33]、烟草^[34]、水稻^[35-36]、甘蔗^[37]、玉米^[38]等作物的杂种鉴定和遗传多样性研究上均广泛应用。本研究所选用的4对引物在双亲之间均具有多态性,后代扩增条带清晰,具有较高的鉴定效率,所鉴定出的62份真实杂交种为目前数量最大的滇蔗茅F₁群体。

参考文献

- [1] 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: 11-12
- [2] 彭绍光. 甘蔗高贵化育种对品种改良的意义[J]. 种子, 1987(4): 41-44
- [3] 李海明, 杨焜正, 吴水金. 浅谈甘蔗CP系列亲本的育种效果[J]. 甘蔗糖业, 2005(3): 1-4, 34
- [4] Berding N, Boach B T. Germplasm collection, maintenance, and use[M]. //Heinz. Sugarcane improvement through breeding, Leiden; Elsevier press, 1987: 143-210
- [5] 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 Genet, 1996, 250: 405-413
- [6] Piperidis G, D'Hont A. Chromosome composition analysis of various *Saccharum* interspecific hybrids by genomic *in situ* hybridization (GISH) [J]. Proc Int Soc Sugar Cane Technol, 2001, 2: 565-566
- [7] 陈义强, 邓祖湖, 郭春芳, 等. 甘蔗常用亲本及其衍生品种的抗旱性评价[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1108-1117
- [8] Lo C C, Chen Y H, Huang Y J, et al. Recent progress in *Miscanthus* mobilization process [J]. Proc Int Soc Sugar cane Technol, 1986, 19: 514-521
- [9] 桃联安, 经艳芬, 董立华, 等. 云南甘蔗细茎野生种82-114测交后代主要性状遗传分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 419-424
- [10] 吴才文, Jackson P, 刘家勇, 等. 甘蔗野生种割手密远缘杂交后代品质性状的遗传研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 59-63
- [11] Heinz D J. Wild *Saccharum* species for breeding in Hawaii [J]. Proc Int Soc Sugar Cane Technol, 1967, 12: 1037-1043
- [12] 陆鑫, 蔡青, 王丽萍, 等. 大茎野生种57NG208杂种后代综合评价[J]. 中国糖料, 2008(3): 15-17
- [13] 刘文荣, 邓祖湖, 张木清, 等. 甘蔗斑茅的杂交利用机器杂种后代鉴定系列研究Ⅲ. 甘蔗斑茅远缘杂交后代细胞遗传分析[J]. 作物学报, 2004, 30(11): 1093-1096
- [14] 王丽萍, 蔡青, 范源洪, 等. 甘蔗(*Saccharum*)与斑茅(*Erianthus arundinaceus*)远缘杂交利用研究[J]. 西南农业学报, 2007, 20(4): 721-726
- [15] Cai Q, Aitken K, Deng H H, et al. Verification of the introgression of *Erianthus arundinaceus* germplasm into sugarcane using molecular markers [J]. Plant Breeding, 2005, 124: 322-328
- [16] 王先宏, 杨清辉, 李福生, 等. 基于GISH的甘蔗与蔗茅属间杂交F₁后代染色体组成及核心分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(6): 1085-1091
- [17] Wang X H, Yang Q H, Li F S, et al. Molecular identification of *Saccharum* spp. × *Erianthus fulvus* hybrids using sequence-characterized amplified region markers [J]. Crop Sci, 2009, 49: 864-870
- [18] Keng. *Erianthus rockii* Keng [J]. Sinensis, 1939, 10: 291
- [19] 中国科学院中国植物志编辑委员会. 中国植物志: 第九卷 [M]. 北京: 科学技术出版社, 2002: 48-49
- [20] Cai Q, Aitken K, Fan Y H, et al. A preliminary assessment of the genetic relationship between *Erianthus rockii* and "Saccharum complex" using microsatellite (SSR) and AFLP markers [J]. Plant Sci, 2005, 169: 976-984
- [21] 李文凤, 蔡青, 黄应昆, 等. 甘蔗野生资源对蔗茅柄锈菌的抗性鉴定[J]. 植物保护, 2005, 31(2): 51-53
- [22] 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
- [23] 诸葛莹, 黄吉森. 甘蔗属及其野生近缘植物杂交研究初报[J]. 广西农业科学, 1996(1): 5-6
- [24] 黄家雍, 廖江雄, 诸葛莹. 甘蔗与河八王、五节芒、滇蔗茅属间交配性及杂种F₁无性系的形态学和同工酶分析[J]. 西南农业学报, 1997, 10(3): 92-98
- [25] 王丽萍, 蔡青, 陆鑫, 等. 甘蔗近缘属野生种滇蔗茅(*Erianthus rockii*)的种质创新利用[J]. 中国糖料, 2008(2): 8-11
- [26] Aitken K, Li J, Wang L, et al. Characterization of intergeneric hybrids of *Erianthus rockii* and *Saccharum* using molecular markers [J]. Genet Resour Crop Evol, 2007, 54: 1395-1405
- [27] 邓海华, 廖兆周, 李奇伟, 等. 斑茅F₂杂种选育与同工酶标记辅助选择[J]. 甘蔗糖业, 2002(1): 1-5
- [28] 应雄美, 蔡青, 毕艳, 等. 两种不同甘蔗基因组DNA提取方法的比较[J]. 中国糖料, 2009(4): 22-23
- [29] Aitken K, Jackson P, McIntyre C L. A combination of AFLP and SSR markers provides extensive map coverage and identification of homo(eo)logous linkage groups in a sugarcane cultivar [J]. Theor Appl Genet, 2005, 100: 789-801
- [30] 刘新龙, 蔡青, 毕艳, 等. 甘蔗AFLP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
- [31] Bremer G. Problems in breeding and cytology of sugar cane [J]. Euphytica, 1961, 10: 59-78
- [32] 刘新龙, 马丽, 陈学宽, 等. 利用系谱图和SSR标记分析云南自育优良甘蔗品种的遗传关系[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(6): 613-619
- [33] 赵冬兰, 郑立涛, 唐君, 等. 甘薯种质资源遗传稳定性及遗传多样性SSR分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 389-395
- [34] 聂琼, 刘仁祥. 23份烟草种质遗传多样性的SSR和ISSR标记分析[J]. 西南农业学报, 2011, 24(1): 15-19
- [35] 程保山, 杨加银, 洪德林. 5个梗稻杂交组合及亲本的SSR多态性分析[J]. 西南农业学报, 2010, 23(6): 1790-1793
- [36] 李书柯, 江川, 王金英. 用SSR标记分析福建漳浦野生稻的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 75-79, 85
- [37] 桃联安, 楚连璧, 经艳芬, 等. 云南割手密82-114种间杂交后代SSR分子标记鉴定[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 132-135
- [38] 杨文鹏, 关琦, 杨留启, 等. 贵州70份玉米自交系的SSR标记遗传多样性及其杂种优势群分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 241-248

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F1群体构建与SSR分子标记鉴定



作者: [陆鑫](#), [毛钧](#), [刘洪博](#), [刘新龙](#), [马丽](#), [苏火生](#), [蔡青](#), [LU Xin](#), [MAO Jun](#), [LIU Hong-bo](#), [LIU Xin-long](#), [MA Li](#), [SU Huo-sheng](#), [CAI Qing](#)

作者单位: [陆鑫,毛钧,刘洪博,刘新龙,马丽,苏火生,LU Xin,MAO Jun,LIU Hong-bo,LIU Xin-long,MA Li,SU Huo-sheng\(云南省农业科学院甘蔗研究所/云南省甘蔗遗传改良重点实验室,开远,661600\)](#), [蔡青,CAI Qing\(云南省农业科学院甘蔗研究所/云南省甘蔗遗传改良重点实验室,开远661600;云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所,昆明650223;云南大学生命科学院,昆明650091\)](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#)

英文刊名: [Journal of Plant Genetic Resources](#)

年,卷(期): 2012,13(2)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201202028.aspx