

甘蔗与斑茅割手密复合体杂交后代的分子标记鉴定

高轶静, 方锋学, 刘昔辉, 张荣华, 宋焕忠, 杨荣仲, 罗 霆, 段维兴, 游建华, 张革民

(广西农业科学院甘蔗研究所/广西甘蔗遗传改良重点实验室/农业部广西甘蔗生物技术与遗传改良重点实验室, 南宁 530007)

摘要:为有效利用甘蔗野生种质拓宽甘蔗遗传基础, 本研究利用甘蔗与斑茅割手密复合体进行杂交, 同时应用序列相关扩增多态性(SRAP)和微卫星(SSR)分子标记技术鉴定其后代。两种分子标记鉴定结果相互印证表明: 3个杂交组合的后代中, 经表型鉴定含斑茅血缘的34个后代为真杂种。该真杂种后代为进一步综合利用斑茅、割手密的优异基因改良甘蔗品种提供了优良的创新种质。

关键词:甘蔗; 斑茅割手密复合体; 分子标记; 鉴定

Identification of Progeny from Crosses between Sugarcane (*Saccharum* spp.) and Intergeneric Hybrid Complex (*Erianthus arundinaceus* × *Saccharum spontaneum*) with Molecular Markers

GAO Yi-jing, FANG Feng-xue, LIU Xi-hui, ZHANG Rong-hua, SONG Huan-zhong,

YANG Rong-zhong, LUO Ting, DUAN Wei-xing, YOU Jian-hua, ZHANG Ge-min

(Sugarcane Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement

(Guangxi), Ministry of Agriculture, Nanning 530007)

Abstract: To get potential gene resources from wild germplasm for broadening sugarcane genetic base, crosses between sugarcane (*Saccharum* spp.) and intergeneric hybrid complex (*Erianthus arundinaceus* × *Saccharum spontaneum*) were carried out and their progenies were then identified by microsatellites (SSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers in this study. 34 true hybrids were identified and the results confirmed that utilizing both *S. spontaneum* and *E. arundinaceus* in introgression breeding programs to improve sugarcane was viable.

Key words: Sugarcane; Intergeneric hybrid complex; Molecular markers; Identification

国内外现代甘蔗栽培品种都是源于热带种 (*Saccharum officinarum*) 和少数割手密 (*Saccharum spontaneum*) 的杂交后代, 长期的杂交和定向选择使甘蔗栽培品种的遗传基础趋于单一化。而甘蔗野生种质具有抗逆性强、适应性广、多蘖、宿根性强等许多优良特性, 因此, 引入野生种质基因拓宽甘蔗遗传

基础已成为甘蔗育种界的共识。

割手密 (*Saccharum spontaneum*) 和斑茅 (*Erianthus arundinaceus*) 是甘蔗野生种质中研究和利用最多的类型。其中, 由于割手密具有种类数量庞大、遗传多样性丰富、利于杂交利用等优点, 已被我国海南甘蔗育种场和云南省农科院甘蔗研究所分别利用与

收稿日期: 2011-09-07 修回日期: 2012-02-27

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971837, 30860150, 31101195); 广西自然科学基金项目 (桂科自 0991009Z, 2010GXNSFD013034, 2010GXNSFB013027, 2011GXNSFF018002, 2012GXNSFBA053036); 现代农业产业技术体系 (CARS-20-3); 广西农业科学院科技发展基金项目 (200906Z, 桂农科 2011JM06); 广西农科院基本科研业务专项项目 (桂农科 2011YT01, 桂农科 2011YT04); 广西甘蔗研究所基本科研业务专项项目 (G2010005, G2009010)

作者简介: 高轶静, 硕士, 助理研究员。研究方向: 甘蔗育种及种质创新研究。E-mail: yijinggao@yahoo.com.cn

通讯作者: 张革民, 学士, 研究员。研究方向: 甘蔗育种及种质创新研究。E-mail: zhanggm68@gxaas.net

甘蔗杂交和回交并获得了大批优秀亲本材料和一些优良杂交后代^[1-3],但从近年国内利用海南崖城等割手密育成的品种看,综合性状水平不高,突出问题是抗旱性和黑穗病抗性不佳;此外,国内外对斑茅的研究利用已逾 50 年,至今仍未育成斑茅真实杂种、可供生产或育种应用的品种或亲本材料^[4-5],其原因主要是斑茅与甘蔗杂交 F_1 大多无花粉或花粉量少且不育,其回交后代蔗糖分改良相对较慢,而且伴有侧芽多、气根多、难脱叶、蒲心大、57 号毛群发达等缺点^[6-7]。

可见,割手密与斑茅作为甘蔗的重要野生种质资源,各有其优缺点,因此,利用斑茅与割手密杂交获得杂种 F_1 ,再与甘蔗进行杂交和回交,就有可能聚合两类型野生种质的优良基因,使其优缺点互补,改良甘蔗品种的多个目标性状。基于该思路,本研究利用甘蔗与经形态特征和分子标记技术鉴定证实为真杂种的斑茅割手密复合体 GXAS07-6-1 (inter-

generic hybrid complex)^[8]进行杂交,并结合近年来在遗传多样性分析^[9-10]、遗传图谱构建^[11-12]、种质鉴定^[13-15]等研究领域得到广泛应用的 SSR 和 SRAP 分子标记技术鉴定其杂种后代,为斑茅割手密复合体在甘蔗育种上的有效利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 供试材料 供试材料为粤糖 93-159、桂糖 01-53、桂糖 02-761;2006-2007 年在广西农科院甘蔗研究所利用斑茅 GXA87-36 和割手密 GXS79-9 杂交获得的真杂种 GXAS07-6-1^[8];3 个杂交组合获得的后代中,经过主要性状表型(蒲心较重、茎径偏小、纤维分含量高、自然条件下花期早)鉴别含斑茅血缘的 34 个后代(表 1)。以上杂交过程均母本去雄并套笼隔离。

表 1 甘蔗与 GXAS07-6-1 杂交组合后代

Table 1 The progeny of *Saccharum* spp. and GXAS07-6-1

杂交组合 Crossing combination	鉴定材料 Material
粤糖 93-159 × GXAS07-6-1	08-1-1,08-1-2,08-1-3,08-1-4,08-1-5,08-1-6,08-1-7,08-1-8,08-1-9,08-1-10,08-1-11
桂糖 01-53 × GXAS07-6-1	08-2-1,08-2-2,08-2-5,08-2-6,08-2-10,08-2-22,08-2-24,08-2-33,08-2-37,08-2-52,08-2-54
桂糖 02-761 × GXAS07-6-1	08-3-1,08-3-2,08-3-3,08-3-5,08-3-6,08-3-7,08-3-8,08-3-10,08-3-11,08-3-12,08-3-13,08-3-35

1.1.2 试剂和仪器 Taq 酶为杭州博日公司产品, dNTP 为上海生工公司产品, DNA Marker - B 为加拿大 BioBasic 公司产品,引物均由上海捷瑞公司合成,其他试剂按常规方法配制。PCR 仪型号为德国 Biometra 公司的 T - gradient,电泳槽型号为北京六一公司的 DYCZ - 30,电泳仪电源型号为美国 Bio - rad 公司的 Powerpac HC。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 SDS 法参照文献^[16],并略加改进。取约 0.2g 甘蔗嫩叶,剪碎,加液氮研磨,将粉末移入 1ml 预热至 65℃ 的 DNA 提取液(pH 8.0 Tris-HCl 100mmol/L, pH 8.0 EDTA 50mmol/L, NaCl 500mmol/L, SDS 3%),65℃ 水浴 30min,期间颠倒混匀 2 次,然后 12000r/min 离心 10min,将上清转入 2ml 离心管中,加入等体积酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 1 次,12000r/min 离心 10min,再将上清转入 2ml 离心管中,加入等体积氯仿抽提 1 次,12000r/min 离心 10min,将上清转入 1.5ml 离心管中,加入 500μl 异丙醇,颠倒混匀, -20℃ 沉淀

10min,12000r/min 离心 10min,弃上清,75% 酒精洗沉淀 2 次,加入 100μl TE 溶解,即为基因组 DNA 溶液。

1.2.2 SRAP 分析 SRAP 引物序列参照文献^[17]。PCR 反应体系为 20μl,其中 10 × Buffer(含 2mmol/L MgCl₂) 2μl, dNTP 0.2mmol/L,上、下游引物各 10μmol/L,模板 DNA 40ng, Taq 酶 1U。PCR 扩增参数为:95℃ 预变性 5min;94℃ 变性 1min,35℃ 退火 50s,72℃ 延伸 50s,共 6 个循环;94℃ 变性 30s,50℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,共 35 个循环;72℃ 延伸 5min。

1.2.3 SSR 分析 SSR 引物序列来自国际甘蔗生物技术联合会(ICSB)^[18]和文献^[19]。PCR 反应体系同上,PCR 扩增参数为:95℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,53℃ 退火 30s,72℃ 延伸 1min,共 35 个循环;72℃ 延伸 5min。

SRAP 和 SSR 扩增产物于 7% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳(电压 140V,功率 20W)1h,银染后扫描成像保存。

2 结果与分析

2.1 甘蔗与 GXAS07-6-1 杂交后代的 SRAP 鉴定

分别以各组合的两个亲本为模板,用 SRAP 引物进行扩增,从中选出能在父本中扩增出区别于母本的特征带的引物对后代进行鉴定,并进一步筛选可同时鉴定出最多数目真杂种的引物。引物 Me7/Em6 的鉴定结果显示(图 1~图 3),所有后代的条

带均来自父本和母本,并且 02-761 × GXAS07-6-1 组合还表现出了丰富的多态性。其中,每个后代均含有母本的特征带(略小于 300bp 处),并且除了 08-1-3、08-1-4、08-1-7、08-1-9、08-1-10、08-2-1、08-2-5、08-2-22、08-2-24、08-2-52、08-3-2 共 11 个后代外,其余 23 个杂种后代都含有父本的特征带(图中箭头所示,位于 200bp 和 300bp 之间),为真杂种。

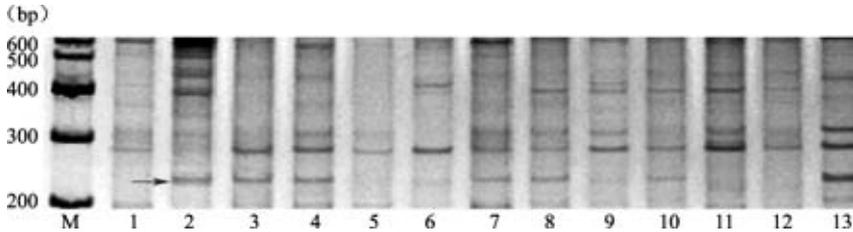


图 1 粤糖 93-159 × GXAS07-6-1 杂交后代的 SRAP 鉴定图谱

Fig. 1 SRAP electrophoretogram of the hybrid progenies of yuetang93-159 × GXAS07-6-1

1: 粤糖 93-159; 2: GXAS07-6-1; 3: 08-1-1; 4: 08-1-2; 5: 08-1-3; 6: 08-1-4;
7: 08-1-5; 8: 08-1-6; 9: 08-1-7; 10: 08-1-8; 11: 08-1-9; 12: 08-1-10; 13: 08-1-11

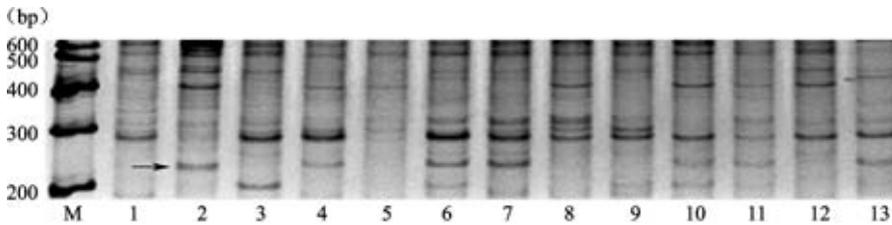


图 2 桂糖 01-53 × GXAS07-6-1 杂交后代的 SRAP 鉴定图谱

Fig. 2 SRAP electrophoretogram of the hybrid progenies of guitang01-53 × GXAS07-6-1

1: 桂糖 01-53; 2: GXAS07-6-1; 3: 08-2-1; 4: 08-2-2; 5: 08-2-5; 6: 08-2-6;
7: 08-2-10; 8: 08-2-22; 9: 08-2-24; 10: 08-2-33; 11: 08-2-37; 12: 08-2-52; 13: 08-2-54

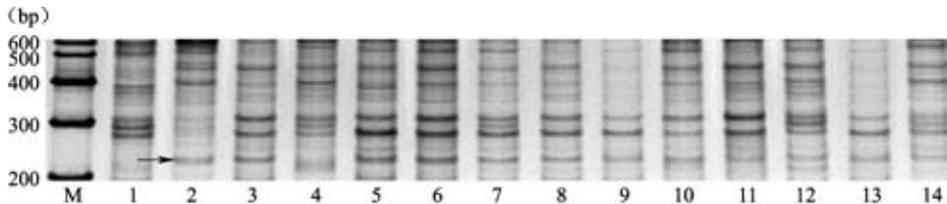


图 3 桂糖 02-761 × GXAS07-6-1 杂交后代的 SRAP 鉴定图谱

Fig. 3 SRAP electrophoretogram of the hybrid progenies of guitang02-761 × GXAS07-6-1

1: 桂糖 02-761; 2: GXAS07-6-1; 3: 08-3-1; 4: 08-3-2; 5: 08-3-3; 6: 08-3-5; 7: 08-3-6;
8: 08-3-7; 9: 08-3-8; 10: 08-3-10; 11: 08-3-11; 12: 08-3-12; 13: 08-3-13; 14: 08-3-35

2.2 甘蔗与 GXAS07-6-1 杂交后代的 SSR 鉴定

引物筛选和后代鉴定原理同 SRAP 分子标记鉴定。结果显示,通过引物 SMC720BS 的鉴定(图 4~图 6),所有后代的条带均来自父本和母本,并表现出丰富的多态性。除 08-2-54 外,其余 33 个杂交后代都含有父本的特征带(图中箭头所示,略大于 100bp 处),为真杂种。

SSR 和 SRAP 两种分子标记技术的鉴定结果表明:粤糖 93-159 × GXAS07-6-1 组合的 08-1-1、08-1-2、08-1-5、08-1-6、08-1-8、08-1-11,桂糖 01-53 × GXAS07-6-1 组合的 08-2-2、08-2-6、08-2-10、08-2-33、08-2-37 和桂糖 02-761 × GXAS07-6-1 组合的 08-3-1、08-3-3、08-3-5、08-3-6、08-3-7、08-3-8、08-3-10、08-3-11、08-3-12、08-3-13、08-3-35 共 22 个后代在两种

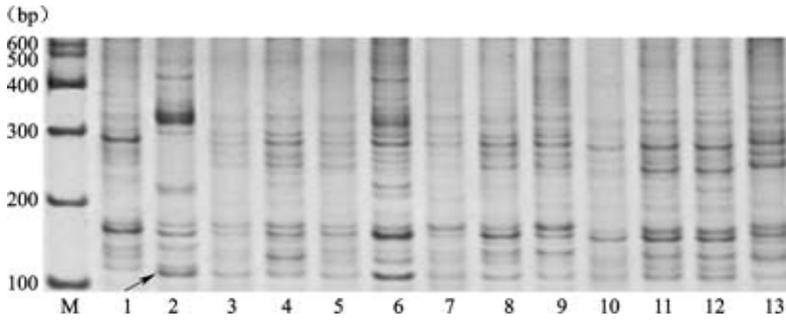


图4 粤糖 93-159 × GXAS07-6-1 杂交后代的 SSR 鉴定图谱

Fig. 4 SSR electrophoretogram of the hybrid progenies of yuetang93-159 × GXAS07-6-1

1: 粤糖 93-159; 2: GXAS07-6-1; 3: 08-1-1; 4: 08-1-2; 5: 08-1-3; 6: 08-1-4;
7: 08-1-5; 8: 08-1-6; 9: 08-1-7; 10: 08-1-8; 11: 08-1-9; 12: 08-1-10; 13: 08-1-11

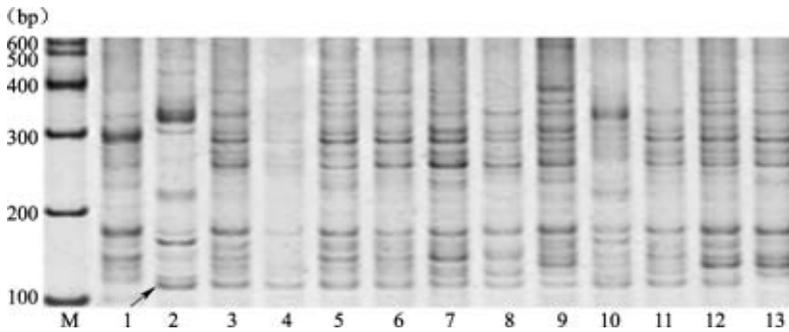


图5 桂糖 01-53 × GXAS07-6-1 杂交后代的 SSR 鉴定图谱

Fig. 5 SSR electrophoretogram of the hybrid progenies of guitang01-53 × GXAS07-6-1

1: 桂糖 01-53; 2: GXAS07-6-1; 3: 08-2-1; 4: 08-2-2; 5: 08-2-5; 6: 08-2-6;
7: 08-2-10; 8: 08-2-22; 9: 08-2-24; 10: 08-2-33; 11: 08-2-37; 12: 08-2-52; 13: 08-2-54

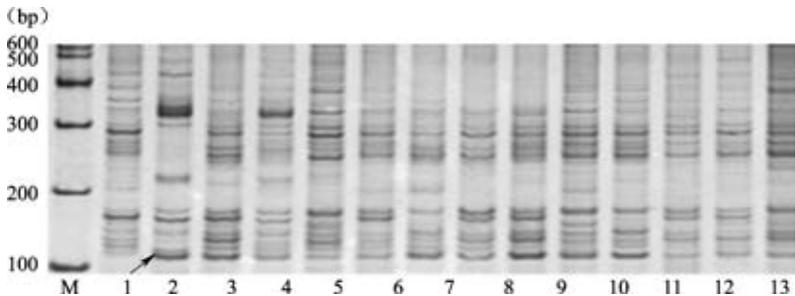


图6 桂糖 02-761 × GXAS07-6-1 杂交后代的 SSR 鉴定图谱

Fig. 6 SSR electrophoretogram of the hybrid progenies of guitang02-761 × GXAS07-6-1

1: 桂糖 02-761; 2: GXAS07-6-1; 3: 08-3-1; 4: 08-3-2; 5: 08-3-3; 6: 08-3-5; 7: 08-3-6;
8: 08-3-7; 9: 08-3-8; 10: 08-3-10; 11: 08-3-11; 12: 08-3-12; 13: 08-3-13; 14: 08-3-35

分子标记的鉴定图谱中均含有父本的特征带,确定为真杂种;其余的12个后代通过两种分子标记技术鉴定结果的相互印证,也确定为真杂种。

因此,两种分子标记技术的鉴定结果相互印证表明:3个杂交组合的后代中,经表型鉴定含斑茅血缘的34个后代为真杂种。

3 讨论

突破性甘蔗新品种选育的重要基础是创造突破

性的创新种质。利用甘蔗属及其近缘属种野生种质资源,拓宽甘蔗育种血缘基础,强化种质异质性,发掘野生优良性状基因,选育突破性的创新种质和亲本,增强甘蔗品种抗逆性,选育高产、高糖、高效的甘蔗新品种,一直是国内外甘蔗育种家努力和奋斗的目标。本研究通过利用甘蔗和斑茅割手密复合体杂交,获得含有斑茅及新割手密血缘(基因)的育种新材料 GXASF₁08-1-1、GXASF₁08-2-1、GXASF₁08-3-1等,且该后代材料大都表现出了生势好、茎蒲心程度

相对较轻、无57号毛群、茎径大、茎汁锤度高等聚合双亲优点的综合农艺性状,花粉育性也综合了斑茅、割手密的优点,为进一步综合利用斑茅、割手密的优异基因改良甘蔗品种提供了优良的创新种质。

此外,利用SSR和SRAP分子标记技术鉴定甘蔗杂种真实性,操作较简单易行,结果可靠、重复性高,是甘蔗种质创新中杂种真实性鉴定的有效手段。

参考文献

- [1] 邓海华,张琼.我国大陆近年育成甘蔗品种的亲本分析[J].广东农业科学,2006(12):7-10
- [2] 王丽萍,马丽,夏红明,等.甘蔗细茎野生种(*S. spontaneum*)在杂交育种中的利用[J].中国糖料,2006,2(1):1-4
- [3] 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
- [4] 廖兆周,唐明德.甘蔗、斑茅及其杂种的过氧化物酶、同工酶[J].植物学报,1988,30(2):214-219
- [5] 吴能突,戚经文.甘蔗斑茅远缘杂种的鉴别[J].华南农业大学学报,1987,8(2):28-31
- [6] 刘少谋,符成,陈勇生.近十年海南甘蔗育种场斑茅后代回交利用研究[J].甘蔗糖业,2007(4):1-6
- [7] 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
- [8] 刘昔辉,方锋学,高铁静,等.斑茅割手密杂种后代真实性鉴定及遗传分析[J].作物学报,2012,38(5):914-920
- [9] 游建华,吴凯朝,梁俊,等.利用SSR标记评价甘蔗品种遗传

- 多样性[J].安徽农业科学,2008,36(10):3990-3992,3998
- [10] 梁俊,李杨瑞,方锋学.利用SSR标记与毛细管电泳对甘蔗属进行的遗传分析[J].广西植物,2010,30(1):106-111
- [11] 刘新龙,马丽,陈学宽,等.云南甘蔗自育品种DNA指纹身份证构建[J].作物学报,2010,36(2):202-210
- [12] 李媛媛,沈金雄,王同华,等.利用SRAP、SSR和AFLP标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J].中国农业科学,2007,40(6):1118-1126
- [13] 郑雪芳,张木清,李奇伟,等.甘蔗斑茅的杂交利用及其杂种后代鉴定系列研究(二):甘蔗斑茅远缘真实杂种的分子鉴定[J].分子植物育种,2004,2(1):35-42
- [14] D'Hont A, Rao P S, Feldmann P, et al. Identification and characterization of intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and in situ hybridization[J]. Theor Appl Gene, 1995, 91:320-326
- [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] 黄东亮,覃肖良,廖青,等.高质量甘蔗基因组DNA的简便快速提取方法研究[J].生物技术通报,2010(5):101-106
- [17] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. Theor Appl Gene, 2001, 103:455-461
- [18] Cordeiro G M, Taylor G O, Henry R J. Characterisation of microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.), a highly polyploid species[J]. Plant Sci, 2000, 155:161-168
- [19] Parida S K, Kalia S K, Kaul S, et al. Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane[J]. Theor Appl Gene, 2009, 118:327-338

欢迎订阅2013年《作物学报》

《作物学报》是中国科学技术协会主管、中国作物学会和中国农业科学院作物科学研究所共同主办、科学出版社出版的有关作物科学的学术期刊。前身可追溯到1919年创办的《中华农学会丛刊》。主要刊载农作物遗传育种、耕作栽培、生理生化、种质资源以及与作物生产有关的生物技术、生物数学等学科基础理论或实践应用性的原始研究论文、专题评述和研究简报等。办刊宗旨是报道本领域最新研究动态和成果,为繁荣我国作物科学研究、促进国内外学术交流、加速中国农业现代化建设服务。读者对象是从事农作物科学研究的科技工作者、大专院校师生和具有同等水平的专业人士。

《作物学报》从1999年起连续12年获“国家自然科学基金重点学术期刊专项基金”的资助。2006-2011年连续6年获“中国科协精品科技期刊工程项目(B类)”资助。从2002年起连续10年被中国科技信息研究所授予“百种中国杰出学术期刊”称号。2011年获“第二届中国出版政府奖期刊奖提名奖”,2005年获“第三届国家期刊奖提名奖”。2008和2011年被中国科学技术信息研究所授予“中国精品科技期刊”称号。2009年被中国期刊协会和中国出版科学研究所授予“新中国60年有影响力的期刊”称号。据北京大学图书馆编著的《中文核心期刊要目总览》(2004、2008和2011年版)登载,《作物学报》被列入“农学、农作物类核心期刊表”的首位。

月刊,2013年定价50元/册,全年600元。可通过全国各地邮局订阅,刊号:ISSN 0496-3490, CN 11-1809/S, 邮发代号:82-336。也可向编辑部直接订购。

地址:(100081)北京市海淀区中关村南大街12号,中国农业科学院作物科学研究所《作物学报》编辑部

电话:010-82108548;传真:010-82105793;网址:<http://www.chinacrops.org/zwxp/>

E-mail: zwxp301@mail.caas.net.cn; xzbw@chinajournal.net.cn