

80 份甘蔗种质 RAMP 标记遗传多样性分析

王 英^{1,2}, 陈守俊¹, 朱相成¹, 庄南生^{1,2}

(¹海南大学农学院, 儋州 571737; ²热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海口 570228)

摘要:采用 RAMP 分子标记技术对 80 份甘蔗种质(32 份祖亲种、48 份栽培品种或品系)的遗传基础进行了分析。从 30 对引物组合中筛选出 4 对多态性较强引物, 构建了甘蔗 80 份种质的 RAMP 指纹图谱, 这 4 对引物组合共扩增出 84 条带, 其多态性为 91.7%。80 份种质的遗传相似系数变化范围在 0.433~0.988, 平均 0.710。聚类分析表明, 随着相似系数结合线的不同, 可分别将参试的甘蔗种质从属间(甘蔗属与斑茅种)、野生种(割手密种、大茎野生种、印度种、中国种)与栽培种(热带种)间、栽培种与杂交栽培品种(或品系)间区别开来。各祖亲种与杂交栽培品种(或品系)的遗传相似性由大到小依次为热带种 > 印度种和中国种 > 大茎野生种 > 云南割手密种 > 其他割手密种 > 斑茅。另外, 本试验首次利用 RAMP 标记, 获得了部分热带种、野生种及斑茅种特异片段, 并发现这些特异片段能不同程度地在具有其血缘的栽培种中得到传递。

关键词:甘蔗; 指纹图谱; RAMP; 相似系数; 特异片段

Genetic Diversity of 80 Sugarcane Germplasm Using RAMP Markers

WANG Ying^{1,2}, CHEN Shou-jun¹, ZHU Xiang-cheng¹, ZHUANG Nan-sheng^{1,2}

(¹Agricultural College of Hainan University, Danzhou 571737; ²Key of Protection and Development Utilization of Tropical Crop Germplasm Resources, Ministry of Education, Haikou 570228)

Abstract: 80 accessions of sugarcane germplasm (32 parental species, 48 cultivars or clones) were analyzed by random amplify microsatellite polymorphisms (RAMP) markers. 4 pairs of primers were selected from 30 pairs, and used to establish the RAMP fingerprints of the germplasm, which amplified 84 polymorphic bands, and were accounting for 91.7%. 80 accessions were clustered with RAMP data using UPGMA method. The genetic similarity coefficients among 80 germplasm ranged from 0.433 to 0.988 with a mean of 0.710. Based on the difference of the similarity coefficients, the sugarcane germplasm could be distinguished among intergenus (*Saccharum* and *E. arundinaceus*), wild species (*S. spontaneum*, *S. barberi*, *S. sinense* and *S. robustum*), cultivated species (*S. officinarum*). cultivated species and cultivars derived from interspecific hybridization. The similarity between cultivars and parental species *S. officinarum* were the highest, and followed by *S. barberi*, *S. sinense*, *S. robustum*, *S. spontaneum* and *E. arundinaceus* in the order from high to low. Clustering based on RAMP showed that the groupings of most cultivars were corresponded to their pedigrees in which a given cultivar and one of its parents was always clustered into the same group. In the meantime, we found some specific DNA fragments of *S. officinarum*, wild species of *Saccharum* spp. and *E. arundinaceus*, which could be recovered in their derived cultivars with different probabilities.

Key words: Sugarcane; Fingerprinting; RAMP; Coefficients; Specific DNA sequence

甘蔗是世界上主要的糖料作物之一,也是热带、亚热带地区的重要经济作物,其遗传背景非常复杂。甘蔗属 (*Saccharum*) 分为热带种 (*S. officinarum*)、印

度种 (*S. barberi*)、中国种 (*S. sinense*)、割手密种 (*S. spontaneum*)、大茎野生种 (*S. robustum*) 等多个原始野生种^[1]。现代甘蔗栽培品种均是经种间杂交育

收稿日期: 2010-08-23 修回日期: 2011-01-11

基金项目: 海南省重点学科建设专项 (No. hdx08-01); 海南大学科技基金 (No. Rnd0704)

作者简介: 王英, 博士, 副教授, 主要研究方向为作物遗传育种及植物分子细胞遗传。E-mail: biotechwangying@163.com

成的含有 2~5 个种血缘的复杂多倍体。甘蔗栽培种及其野生近缘祖先植物均为未知倍性的复杂多倍体植物。甘蔗属植物与其他属植物的最大不同是:种间亲和性大,甚至与近缘属间杂交也不存在障碍。

1994 年 Wu 等^[2]将 5'端锚定微卫星核心序列的锚定微卫星引物与 RAPD 引物结合起来扩增基因组 DNA 从而产生多态性,称为随机扩增微卫星多态性 (random amplify microsatellite polymorphisms, RAMP)。RAMP 是 RAPD 和 SSR 结合的产物,将 5'端引物与 RAPD 引物结合起来,即一端为锚定 ISSR 引物,另一端为 RAPD 引物,所得谱带既显示 RAPD 的多态性又隐含或长或短的核心重复序列,且能增加小分子量区域清晰可辨的带纹数目,故 RAMP 能区分亲缘关系较近的物种,具有多态性高、稳定性强,且成本低廉、检测快速及共显性的特点^[3]。因此,RAMP 技术已在多种植物遗传资源与品种检测中较为广泛地应用^[4-7]。目前,尽管多种分子标记已经在甘蔗研究中得以应用,并取得了许多可喜的成果,但尚未见有关利用 RAMP 标记进行甘蔗种质遗传基础研究的报道。本研究旨在利用 RAMP 标记,构建部分甘蔗祖亲种的 RAMP 指纹图谱,研究甘蔗种质遗传多样性、亲缘关系的远近,并揭示部分现有甘蔗种质的亲缘关系,为甘蔗新品种选育提供一定的理论依据,从而更好地指导现代甘蔗育种。

1 材料与方法

1.1 材料

供试的甘蔗种质共 80 份。其中 32 份亲本种包括热带种、印度种、割手密种、大茎野生种、中国种、斑茅;其他 48 份为杂种 F₁或栽培品种(表 1)。所用甘蔗种质均来自海南大学儋州校区农学院生物技术系甘蔗种质圃。各种质的血缘是根据其育种系谱查证而确定的^[1]。

1.2 方法

1.2.1 基因组总 DNA 的提取 采用王英等^[8]改良的 CTAB 方法进行甘蔗基因组 DNA 的提取。

1.2.2 RAMP 试验程序 参照王英等^[9-10],选用 5'端锚定的引物 10 条、随机引物 3 条组成 30 对引物组合对材料进行扩增,从中筛选出扩增产物条带清晰的 4 个引物组合(表 2),用于甘蔗种质资源遗传多样性研究。

参照 Harvey 等^[6]及王英等^[9-10]介绍的反应条

件,并通过 Taq 酶浓度、primer 浓度、Mg²⁺浓度、dNTP 浓度、DNA 浓度进行优化,最终确立甘蔗 PCR 扩增最佳反应体系,PCR 扩增反应体系的总体积为 20 μ l,包括:10 \times Buffer 2.0 μ l,模板 DNA (10ng/ μ l)3.0 μ l, MgCl₂ (25mmol/L)2.0 μ l, dNTPs (2mmol/L)2.0 μ l,引物 1、2 (5 μ mol/L)各 3.0 μ l, TaqDNA 聚合酶 (5U/ μ l)0.3 μ l, ddH₂O 到 20 μ l;扩增反应程序为:94 $^{\circ}$ C 预变性 3min 后,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,38 $^{\circ}$ C 退火 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 90s,45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。采用 2.0% 的琼脂糖凝胶(加入 EB 使其终浓度为 0.5 μ g/ml)凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.2.3 甘蔗种质遗传基础的 RAMP 标记数据分析 相似系数:在 DNA 电泳图谱中,只记重复出现的条带。在同一迁移位置,有 DNA 扩增带的量化为 1,无扩增带的量化为 0,列出二元数据矩阵,采用 Nei 等的方法^[11]计算相似系数 F (Genetic similarity): $F = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$,其中 N_{xy} 代表 x 和 y 的公共带数; N_x 代表 x 的总带数; N_y 代表 y 的总带数。聚类分析:采用平均数的非加权成对法 (UPGMA),应用 NTSYS-PC 分析软件进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 RAMP 指纹图谱的构建及多态性分析

本试验以热带种的黑车里本与拔地拉,割手密种的崖城割手密与印度割手密,印度种的春尼与那高利,大茎野生种的 NG77/001、NG77/004,中国种的育巴和广西竹蔗,斑茅种质的崖城斑茅 2 号和红花斑茅为引物筛选的材料,从 30 对 RAMP 引物组合中筛选出 4 个多态性较强的引物组合(表 2)用于构建甘蔗 80 份种质的 RAMP 指纹图谱。每条引物均可将参试的 80 份种质区别开来(图 1)。这 4 对引物共扩增出的总带数为 84 条,其中 2 对引物扩增的多态性比率在 80% 以上,另 2 对引物扩增的多态性带比率为 100%,平均每对引物扩增的多态性带比率为 91.7% (表 3)。若不包括斑茅种质(崖城斑茅 2 号和福建 79-1-1),则 4 个引物组合在甘蔗属 78 份种质中扩增出的总带数、多态性条带及平均每对引物扩增的多态性条带比率均与 80 份种质的扩增情况相同。这表明 RAMP 标记能够产生丰富的多态位点,从而揭示甘蔗属种间、种内遗传变异情况。这些多态性条带的引物对于特定的种质和引物位点是稳定的,利用这些条带可将不同

表 1 供试的甘蔗种质

Table 1 The sugarcane germplasm for testing

编号 No.	种质 Germplasm	血缘 Consanguinity	编号 No.	种质 Germplasm	血缘 Consanguinity
1	黑车里本	热带种	41	崖城 58-47	热带种、割手密
2	拔地拉	热带种	42	崖城 96-48	热带种、大茎野生种
3	崖城割手密	割手密	43	崖城 96-46	热带种、斑茅
4	印度割手密	割手密	44	崖城 96-68	热带种、斑茅
5	崖城割手密 11 号	割手密	45	崖城 96-66	热带种、斑茅
6	崖城割手密 12 号	割手密	46	崖城 97-27	热带种、斑茅
7	华南割手密	割手密	47	Cp72-1210	热带种、印度种、割手密
8	云南割手密 75-2-31	割手密	48	B41227	热带种、印度种、割手密
9	云南割手密 76-1-015	割手密	49	闽糖 77-208	热带种、印度种、割手密
10	云南割手密 76-1-012	割手密	50	崖城 82-96	热带种、印度种、割手密
11	云南割手密 75-2-26	割手密	51	F172	热带种、印度种、割手密
12	云南割手密 75-1-8	割手密	52	福农 91-4710	热带种、印度种、割手密
13	云南割手密 75-1-10	割手密	53	福农 81-745	热带种、印度种、割手密
14	云南割手密 75-1-21	割手密	54	福农 91-4621	热带种、印度种、割手密
15	云南割手密 75-2-1	割手密	55	福农 94-0403	热带种、印度种、割手密
16	云南割手密 75-2-2	割手密	56	CP49-50	热带种、印度种、割手密
17	云南割手密 75-2-3	割手密	57	Co281	热带种、印度种、割手密
18	云南割手密 75-2-24	割手密	58	Co290	热带种、印度种、割手密
19	云南割手密 75-2-28	割手密	59	F134	热带种、印度种、割手密
20	云南割手密 76-1-003	割手密	60	粤糖 64-395	热带种、印度种、割手密
21	育巴	中国种	61	崖城 62-40	热带种、印度种、割手密
22	四川芦蔗	中国种	62	崖城 62-70	热带种、印度种、割手密
23	竹蔗	中国种	63	桂 57-624	热带种、印度种、割手密
24	NG77-001	大茎野生种	64	Co244	热带种、印度种、割手密
25	NG77-004	大茎野生种	65	福建 83-36	热带种、印度种、 割手密、中国种
26	57NG208	大茎野生种	66	闽糖 88-103	热带种、印度种、 割手密、中国种
27	那高利	印度种	67	福农 95-1702	热带种、印度种、 割手密、中国种
28	Pansahi	印度种	68	粤糖 93-159	热带种、印度种、 割手密、中国种
29	Nagans	印度种	69	粤糖 81-3254	热带种、印度种、 割手密、中国种
30	春尼	印度种	70	粤糖 57-423	热带种、印度种、 割手密、中国种
31	崖城斑茅 2 号	斑茅种	71	F146	热带种、印度种、 割手密、大茎野生种
32	福建 79-1-1	斑茅种	72	F156	热带种、印度种、 割手密、大茎野生种
33	Co213	热带种、印度种	73	ROC1	热带种、印度种、 割手密、大茎野生种
34	POJ213	热带种、印度种	74	H49-5	热带种、印度种、 割手密、大茎野生种、中国种
35	POJ2878	热带种、割手密	75	Cp84-1198	热带种、印度种、割手密
36	POJ2875	热带种、割手密	76	ROC11	热带种、印度种、割手密
37	Co285	热带种、割手密	77	ROC20	热带种、印度种、割手密
38	Co421	热带种、割手密	78	ROC22	热带种、印度种、 割手密、大茎野生种
39	崖城 55-1	热带种、割手密	79	ROC25	热带种、印度种、割手密
40	崖城 58-43	热带种、割手密	80	ROC26	热带种、印度种、割手密

表2 RAMP引物组合

Table 2 RAMP primer combination sequences

引物组合序号 Primer combination No.	引物序列 Primer sequence
RAMP-12	5'-CAGCCCAGAG-3'
	5'-GCTC AG AG AG-3'
RAMP-14	5'-CAGCCCAGAG-3'
	5'-GGAC AG AG AG-3'
RAMP-16	5'-CAGCCCAGAG-3'
	5'-CTC CAG AGA G-3'
RAMP-18	5'-CAGCCCAGAG-3'
	5'-TG AG AG AG AG-3'

的种质区分开来。扩增片段的大小主要在150~2200bp,且分布较均匀。不同的引物组合扩增出的条带数有一定的差异,17~23条(每个引物组合平均)不等。

从甘蔗种质的指纹图谱可看出,斑茅种质(编号31和32)的图谱与甘蔗属的指纹图谱存在较大的区别,斑茅呈现出甘蔗属所不含有 RAMP 条带,这些特有带有些能在属间杂交的后代中呈现(图1中44与45号样品),这表明斑茅与甘蔗属存在着较大的遗传差异。

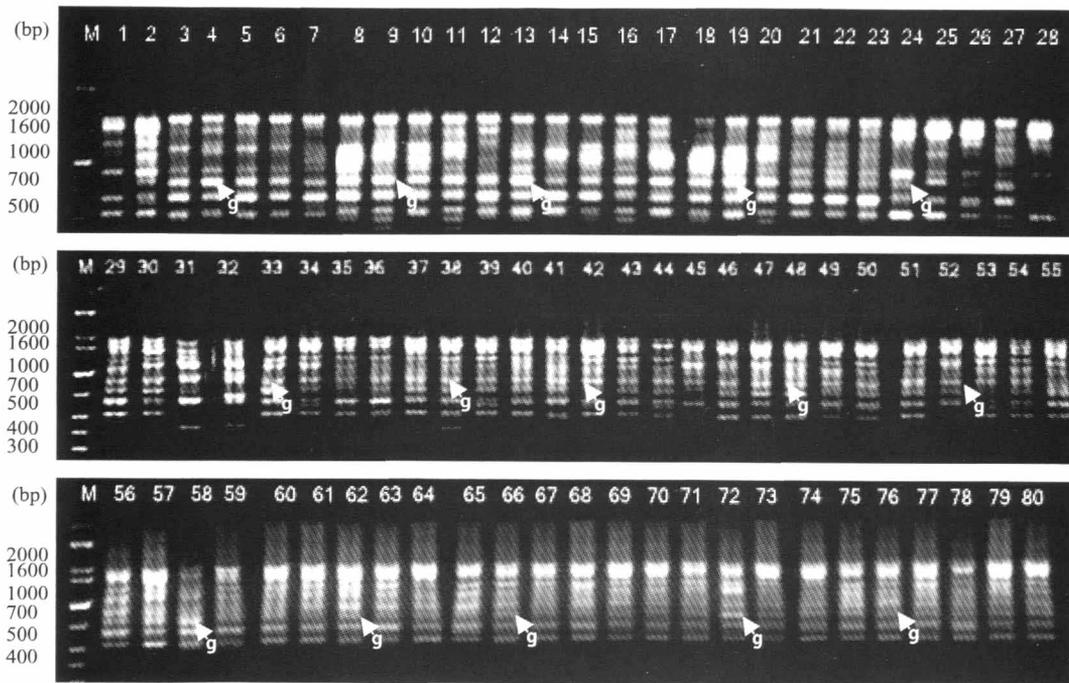


图1 RAMP-16引物组合的RAMP指纹图谱

Fig. 1 The RAMP fingerprint pattern of primer combination RAMP-16

M, 1 kb plus DNA ladder marker; 箭头 g 为分子量约是 800 bp 的野生种特有带

M, 1 kb plus DNA ladder marker; Arrow g, one specific band about 800bp of wild species of *Saccharum spp.*

表3 4组引物扩增80份甘蔗种质的RAMP条带数

Table 3 The number of bands detected by 4 pair of RAMP primers in 80 germplasm

引物组合序号 Primer combination No.	总条带数 Total bands	多态性条带 Polymorphic bands No.	多态性比例(%) Polymorphic bands percentage
RAMP-12	26	22	84.6
RAMP-14	20	17	84.6
RAMP-16	19	19	100
RAMP-18	19	19	100
合计 Total	84	77	91.7

2.2 甘蔗种质间遗传相似性分析

根据 RAMP 扩增结果得出的二元数据,计算出参试的 80 份甘蔗种质间的遗传相似系数。结果表明其相似系数的变化范围为 0.4325~0.9881,平均为 0.7103。其中遗传相似系数最低的为黑车立本与福建 79-1-1 间,仅为 0.4325,这说明黑车立本(属于热带种)与福建 79-1-1(斑茅种)之间的亲缘关系较远。相似性最高的几份种质为育巴和竹蔗、桂 57-624 和 ROC20 等,相似系数均为 0.9881,绝大多数种质间的相似系数大于 0.75,表明甘蔗亲本种与其栽培品种间的遗传差异程度较低,遗传亲缘关系近。

2.3 甘蔗种质间聚类分析

基于遗传相似系数矩阵,利用 UPGMA 方法对数据进行聚类分析,得到了 80 份甘蔗种质的 RAMP 聚类图(图 2)。结果表明,利用 RAMP 标记能将 80 份甘蔗种质完全分开。从图 2 可知,甘蔗属与斑茅是分离的,各自聚为一群。在甘蔗属这一大组中,若以相似系数 0.7512 为结合线,可将甘蔗属分为两大类,一类是割手密种,另一类由热带种、印度种、中国种、大茎野生种以及栽培品种(品系)组成。若以相似系数 0.7621 为结合线,可将甘蔗属分为三大类,第一类为割手密种(主要为云南割手密系列);第二类由热带种(黑车立本和拔地拉)组成,第三类由甘蔗栽培种印度种(那高利、Pansahi 等)、中国种(育巴、竹蔗等)、大茎野生种(NG77-001、57NG208 等)以及栽培品种或品系组成。其中第三类,以相似系数 0.8601 为结合线,又可以分为两类:A 类为两份甘蔗亲本种,包括中国种和大茎野生种,B 类包括印度种及 48 份栽培品种或品系。在 B 类中,以相似系数 0.9102 为结合线,又可分为两类:a 类为印度种,b 类为栽培品种或品系共 48 份。栽培品种和热带种的聚类最近,这表明,栽培品种的基因组中,热带种血缘占主导地位,这主要是甘蔗高贵化育种的结果^[1]。这与 Liu 等^[12]、曾华宗等^[13]、庄南生等^[14]及王英等^[9]分别用 RFLP、RAPD、AFLP 及 ISSR 分析甘蔗品种的亲缘关系时得出的结果是一致的,即栽培品种与热带种的关系较其与割手密的关系密切。

当然,与系谱关系不一致的少数例外情形也是存在的,如那高利为甘蔗亲本种中的印度种,其只含有印度种血缘,却与中国种及大茎野生种聚在了—枝。

2.4 甘蔗种质 RAMP 特异标记及其在后代中的传递

2.4.1 热带种特异扩增带及其在后代的表现 在分别用引物 RAMP-12、RAMP-14 对 80 份甘蔗种质扩增时,从扩增结果中均发现在分子量约为 1600bp 处(图 3 的箭头 c 及见图 4 的箭头 d 所示),两个热带种原种材料(编号 1 和 2)都有一条清晰的区别于其他所有亲本种的特异性扩增带,且在 48 个栽培品种均有出现该扩增带,重现率高达 100%,这 2 条带均可作为甘蔗热带种的特有带。

2.4.2 野生种特异扩增带及其在后代的表现 从引物 RAMP-12 扩增结果可以看出(图 3),在分子量约为 2000bp 处(箭头 a 所示)及 700bp 处(箭头 b 所示),存有热带种无、而野生种有的特异带,这 2 个条带在 48 份栽培品种中的 44 份具野生种血缘均能不同程度地出现特异扩增现象。另外,从引物 RAMP-14 扩增结果可以看出,在分子量约为 2000bp 处(图 4 箭头 e 所示)存有热带种无、而野生种有的特异带,该条带在 48 份栽培品种中的 44 份具野生种血缘均能出现特异扩增现象。从引物 RAMP-16 扩增结果可以看出,在分子量约为 800bp(图 1 箭头 f 所示)处存有热带种无、而野生种有的特异带,该条带也可在 48 份栽培品种中的 44 份具野生种血缘均能出现特异扩增现象。这 4 条带均可作为甘蔗祖亲种野生种的特有带。

2.4.3 斑茅种特异扩增带及其在后代的表现 从引物 RAMP-14 扩增结果可以看出(图 4 箭头 f 所示),在约 360bp 处存有斑茅种的特异带,此特异带仅在其后代 44 号崖城 96-68(热、斑)及 45 号崖城 96-66(热、斑)中出现扩增,重现率达 50%。该条带均可作斑茅种特异带,在一定程度上可用于进行甘蔗与斑茅杂交后代的鉴定。

3 讨论

3.1 RAMP 标记的多态性

生产上应用的甘蔗品种的遗传背景极为复杂,其基因组构成中除热带种血缘外,还含有多种野生种的血缘,如印度种、割手密种、大茎野生种、中国种以及斑茅等^[1]。利用各种分子标记研究现有甘蔗种质的遗传多样性,揭示其间亲缘对指导现代甘蔗育种具有重大的意义。国内外学者先后利用 RAPD、AFLP、ISSR 及 SSR 等标记,对来自不同国家和地区不同份数的甘蔗种质进行了遗传多样性研究。如国内的余爱丽等^[15]应用 ISSR 标记对来自

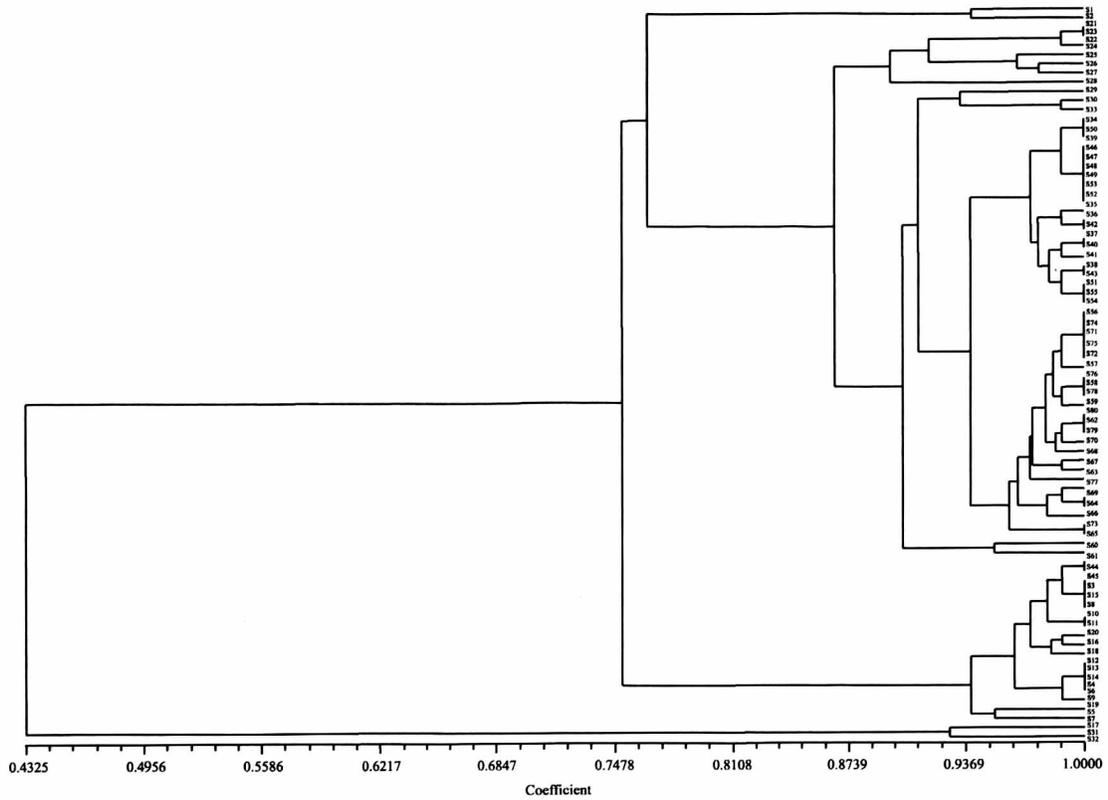


图 2 基于 RAMP 分析产生的甘蔗种质聚类图

Fig.2 Dendrogram of cluster analysis based on RAMP data for sugarcane germplasm

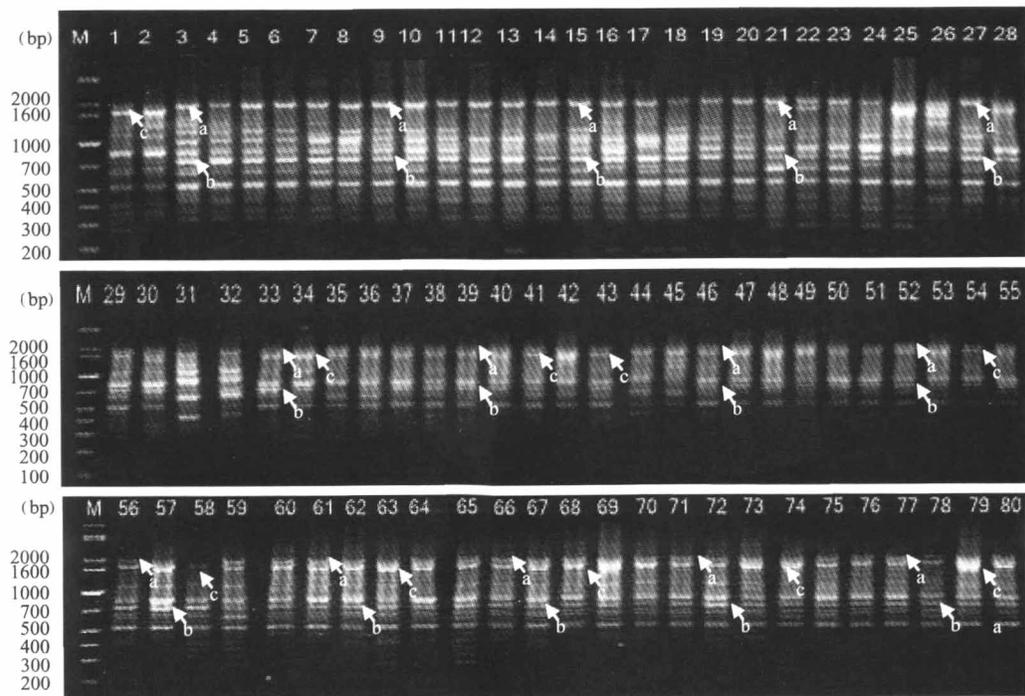


图 3 RAMP-12 引物组合的 RAMP 指纹图谱

Fig.3 The RAMP fingerprint pattern of primercombination RAMP-12

M, 1 kb plus DNA ladder marker; 箭头 a、b 分别为分子量约是 2000bp、700bp 的野生种特有带; 箭头 c 为分子量约是 1600bp 的热带种特有带

M, 1 kb plus DNA ladder marker; Arrow a, one specific band about 2000bp of wild species of *Saccharum spp.*; Arrow b, one specific band about 700bp of wild species of *Saccharum spp.*; Arrow c, one specific band about 1600bp of *S. officinarum*

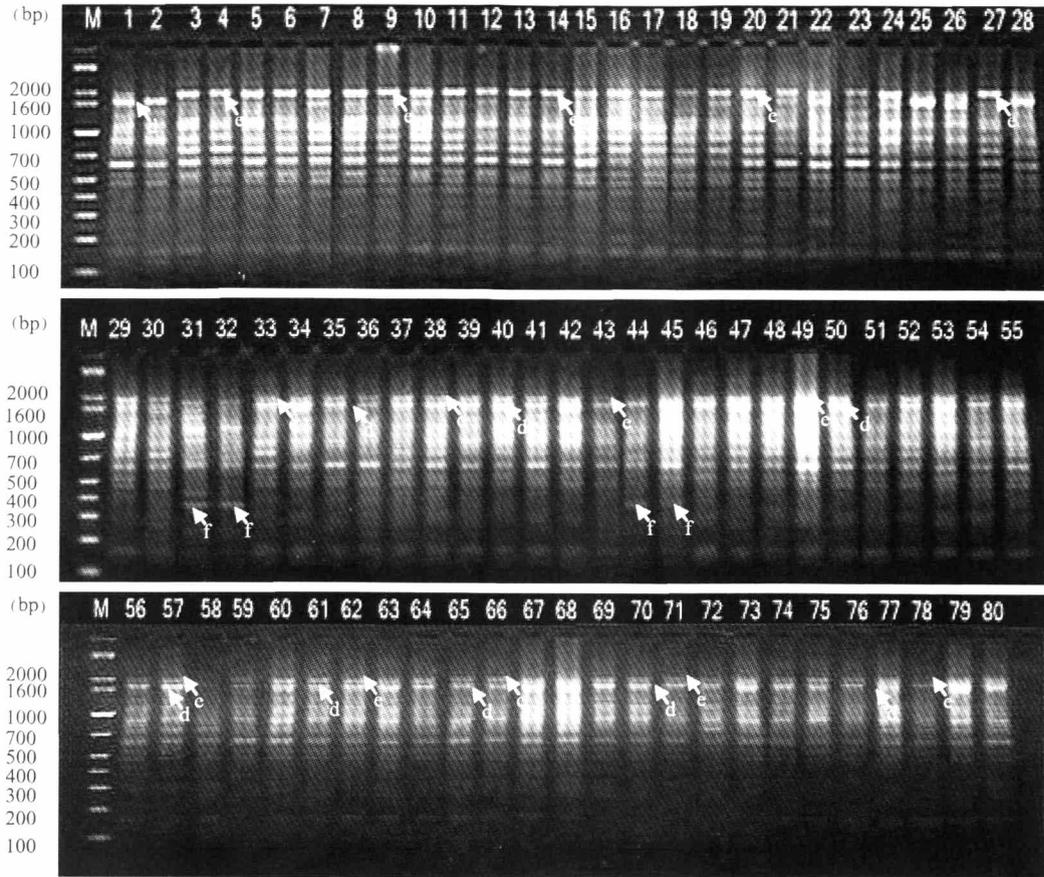


图 4 RAMP - 14 引物组合的 RAMP 指纹图谱

Fig.4 The RAMP fingerprint pattern of primer combination RAMP - 14

M, 1 kb plus DNA ladder marker; 箭头 d 为分子量约是 1600 bp 的热带种特有带;

箭头 e 为分子量约是 2000 bp 的野生种特有带; 箭头 f 为分子量约是 350 bp 的斑茅种特有带

M, 1 kb plus DNA ladder marker; Arrow d, one specific band about 1600bp of *S. officinarum*; Arrow e, one specific

band about 2000bp of wild species of *Saccharum spp.*; Arrow f, one specific band about 350bp of *Erianthus arundinaceus*

不同国家和地区的 11 份甘蔗种质进行了遗传多样性研究, 获得了 20.5% ~ 82.0% (平均 88.5%) 的多态性标记; 曾华宗等^[13]应用 RAPD 标记对来自不同国家和地区的 41 份甘蔗种质进行了遗传多样性研究, 获得了 62.5% ~ 100% (平均 88.5%) 的多态性标记; 李鸣^[16]应用 AFLP 标记对来自不同国家和地区的 24 份甘蔗种质进行了遗传多样性研究, 获得了 11.5% ~ 52.6% 的多态性标记; 庄南生等^[14]应用 AFLP 标记对 54 份甘蔗种质进行了遗传多样性研究, 获得了 11.5% ~ 52.6% 的多态性标记; 王英等^[9]应用 ISSR 标记对来自不同国家和地区的 96 份甘蔗进行了的遗传多样性研究, 获得了 100% 的多态性标记; 本研究应用 RAMP 标记对来自不同国家和地区的 80 份甘蔗进行了的遗传多样性研究, 获得了 84.6% ~ 100% 的多态性标记, 说明 RAMP 标记能很好地揭示甘蔗种质间遗传差异。

3.2 关于甘蔗种质系谱与 RAMP 聚类的关系

大多数甘蔗品种都有比较完整的系谱记录, 是杂交亲本选配的重要依据之一。本研究的 RAMP 聚类结果表明, 多数甘蔗种质的 RAMP 聚类与系谱基本一致, 如多数具有热带种血缘的栽培品种都能够与 2 份热带种亲本聚在一起; 亲缘关系较远的种质则能较好分开, 如参试的 2 份斑茅种质(崖城斑茅 2 号、福建 79-1-1)在遗传相似系数仅为 0.4325 时就聚在一起, 与而其他 78 份种质分开, 这表明 RAMP 标记能从 DNA 水平上揭示甘蔗种质间的遗传差异, 因此, 在甘蔗杂交育种中, RAMP 聚类分析结果可以用来指导选配杂交亲本。在试验中还发现, 同属于印度种的那高利却未能与 Pansahi、Nagans 及春尼等印度种聚在一起, 造成这种现象的原因可能是选用的 RAMP 引物较少造成, 也可能是电泳图谱不是很清晰, 部分条带丢失等造成不良的影

响。这方面尚待进一步研究。

3.3 关于甘蔗属种间的亲缘关系及斑茅种的分类地位问题

目前,对于甘蔗近缘野生种之间的亲缘关系尚存争议。甘蔗系统发育假说认为印度种和中国种是热带种和割手密种的杂交后代^[17]。本试验将大茎野生种、印度种、中国种均与黑车里本和崖城割手密种聚在一起,支持了印度种和中国种是热带种和割手密种的杂交后代的假说^[1]。此外,在研究的 UPG-MA 聚类中,明确地将甘蔗属分为两大类,一类是割手密种,另一类由热带种、印度种、中国种、大茎野生种以及栽培品种(品系)组成,与 Glaszm 等^[18]提出的甘蔗属分为 2 组(即割手密为一组,而其他祖先种以及栽培品种(品系)为另一组)的说法一致。

另外关于斑茅种分类归属问题,现在分歧很多。有人把它列入甘蔗属^[17],有人把它划归蔗茅属^[18],还有学者认为它应另立新属^[19]。本研究的聚类结果显示斑茅和其他甘蔗属种质之间的相似系数较低,为 0.4325,两者存在显著的差异,反映出斑茅与甘蔗属种质间存在较远的亲缘关系。故此认为把斑茅列在甘蔗属中是不适宜的,但具体是划入蔗茅属还是另立新属,还有待进一步探讨。

3.4 甘蔗种质 RAMP 特异扩增条带在后代中的传递问题

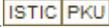
现有甘蔗栽培品种绝大多数都是通过亲本种间杂交选育出的高世代后代,寻找甘蔗祖先种特异 DNA 序列,对甘蔗杂交育种上的杂种早期鉴定是十分有用的^[20]。本研究应用 RAMP 标记对甘蔗种质中进行遗传分析时,获得了部分甘蔗热带种特异、甘蔗野生种特异及斑茅种特异扩增的 RAMP 条带。其中热带种特异的 RAMP 条带(分子量约为 1600bp)在鉴定含的热带种血缘的杂交种的真实性方面已证明是有效的,而且其在后代中的重现率高达 100%,可作为甘蔗热带种的特有带,进而可开发成热带种特异引物,进行甘蔗种质亲缘关系的鉴定;对于本试验获得的 4 条甘蔗祖先种野生种的特有带,由于其在含野生种血缘的后代中重现率高达 91.7%,可作为甘蔗野生种的特有带,进而可开发成野生种特异引物,进行甘蔗种质亲缘关系的鉴定;在试验中发现斑茅种的特异带较多,但很大一部分不能够重现于具有斑茅血缘关系的后代中,这些特异带不能够较好地应用在甘蔗与斑茅杂种鉴定上。造

成这种现象的可能原因一方面是由于现有杂交系谱在一定程度上不完整而导致,也可能由于育种者在用生物学性状对甘蔗与斑茅杂交后代的真假杂种鉴定时,误将假杂种当成真杂种而导致的结果^[1]。

参考文献

- [1] 彭绍光. 甘蔗育种学[M]. 北京:中国农业出版社,1990, 80-113
- [2] Wu K S, Jones R, Danneberger L, et al. Detection of microsatellite polymorphisms without cloning[J]. Nucl Acids Res, 1994, 22(15):3257-3258
- [3] Fisher P J, Gardner R C, Richardson T E. Singlelocus microsatellite isolated using 5' anchored PCR[J]. Nucleic Acids Res, 1996, 24:4369-4371
- [4] Davila J A, Loarce Y, Ferrer E. Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley[J]. Theor Appl Genet, 1999, 98(2):265-273
- [5] 余跃辉, 荣廷昭, 粟生群, 等. 应用 RAMP 分子标记分析小豆栽培型种质资源遗传多样性[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 217-222
- [6] Harvey M, Botha F C. Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between *Saccharum* varieties[J]. EuPhytie, 1996, 89:257-265
- [7] 赵欢, 吴卫, 郑有良, 等. 应用 RAMP 分子标记研究红花资源遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 64-71
- [8] 王英, 邱海燕, 高和琼, 等. 甘蔗基因组 DNA 提取方法的研究[J]. 中国农学通报, 2008, 24(12): 44-49
- [9] 王英, 庄南生, 高和琼, 等. 甘蔗种质遗传基础的 ISSR 分析[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版, 2007, 33(增): 1776-1883
- [10] 王英, 庄南生, 黄东益, 等. 甘蔗祖先种 RAPD 标记的序列特征性片段扩增区域(SCAR)转化分析[J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(4): 713-721
- [11] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76(10):5269-5273
- [12] Liu Z Y, Sun Q X, Ni Z F, et al. Development of SCAR markers linked to the *Pm21* gene conferring resistance to the powdery mildew in common wheat[J]. Plant Breeding, 1999, 118:215-219
- [13] 曾华宗, 郑成木, 朱稳, 等. 甘蔗种质间亲缘关系及特异标记的 RAPD 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(2):99-103
- [14] 庄南生, 郑成木, 黄东益, 等. 甘蔗种质遗传基础的 AFLP 分析[J]. 作物学报, 2005, 31(4):444-450
- [15] 余爱丽, 张木清, 陈如凯. ISSR 分子标记在甘蔗及其近缘属分类上的应用[J]. 福建农林大学学报:自然科学版, 2002, 31(4):494-489
- [16] 李鸣. AFLP 技术在甘蔗品种鉴定和亲缘关系研究上的应用[D]. 南宁:广西大学, 2003
- [17] Dutt N L, Rao J T. The present taxonomic position of *Saccharum* and its engeners[C]//Proc^{7th} Cong ISSCT, 1972:281-293
- [18] Glaszm A N N, Lu Y H, Lanaud C. Variation of nuclear ribosomal DNA in sugarcane[J]. Genetic and Breeding, 1990, 44:191-198
- [19] Al-Janabi S M, Honeycutt R J, McClelland M, et al. A genetic linkage map of *Saccharum Spontaneum* L. 'SES 208' [J]. Genetics, 1993, 134:1249-1260
- [20] 庄南生, 郑成木, 王英, 等. 用 AFLP 片段构建甘蔗祖先种特异 DNA 探针[J]. 热带作物学报, 2004, 25(3):18-23

80份甘蔗种质RAMP标记遗传多样性分析

作者: [王英](#), [陈守俊](#), [朱相成](#), [庄南生](#), [WANG Ying](#), [CHEN Shou-jun](#), [ZHU Xiang-cheng](#), [ZHUANG Nan-sheng](#)
作者单位: [王英, 庄南生, WANG Ying, ZHUANG Nan-sheng \(海南大学农学院, 儋州571737; 热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室, 海口570228\)](#), [陈守俊, 朱相成, CHEN Shou-jun, ZHU Xiang-cheng \(海南大学农学院, 儋州, 571737\)](#)
刊名: [植物遗传资源学报](#) 
英文刊名: [Journal of Plant Genetic Resources](#)
年, 卷(期): 2011, 12(4)

参考文献(20条)

1. [庄南生; 郑成木; 王英 用AFLP片段构建甘蔗祖亲种特异DNA探针 2004\(03\)](#)
2. [王英; 庄南生; 黄东益 甘蔗祖亲种RAPD标记的序列特征性片段扩增区域\(SCAR\)转化分析 2009\(04\)](#)
3. [王英; 庄南生; 高和琼 甘蔗种质遗传基础的ISSR分析 2007\(增\)](#)
4. [王英; 邱海燕; 高和琼 甘蔗基因组DNA提取方法的研究 2008\(12\)](#)
5. [赵欢; 吴卫; 郑有良 应用RAMP分子标记研究红花资源遗传多样性 2007\(01\)](#)
6. [Harvey M; Botha F C Use of PCR-based methodologies for the determination of DNA diversity between Saccharum varieties \[外文期刊\] 1996](#)
7. [余跃辉; 荣廷昭; 粟生群 应用RAMP分子标记分析小豆栽培型种质资源遗传多样性 2006\(02\)](#)
8. [Davila J A; Loarce Y; Ferrer E Molecular characterization and genetic mapping of random amplified microsatellite polymorphism in barley 1999\(02\)](#)
9. [Fisher P J; Gardner R C; Richardson T E Single locus microsatellite isolated using 5' anchored PCR \[外文期刊\] 1996](#)
10. [Al-Janabi S M; Honeycutt R J; McClelland M A genetic linkage map of Saccharum Spontaneum L. 'SES 208 1993](#)
11. [Glaszm A N N; Lu Y H; Lanaud C Variation of nuclear ribosomal DNA in sugarcane 1990](#)
12. [Dutt N L; Rao J T The present taxonomic position of Saccharum and its congeners 1972](#)
13. [李鸣 AFIP技术在甘蔗品种鉴定和亲缘关系研究上的应用 2003](#)
14. [余爱丽; 张木清; 陈如凯 ISSR分子标记在甘蔗及其近缘属分类上的应用 2002\(04\)](#)
15. [庄南生; 郑成木; 黄东益 甘蔗种质遗传基础的AFLP分析 2005\(04\)](#)
16. [曾华宗; 郑成木; 朱稳 甘蔗种质间亲缘关系及特异标记的RAPD分析 2003\(02\)](#)
17. [Liu Z Y; Sun Q X; Ni Z F Development of SCAR markers linked to the Pm21 gene conferring resistance to the powdery mildew in common wheat 1999](#)
18. [Nei M; Li W Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases \[外文期刊\] 1979\(10\)](#)
19. [Wu K S; Jones R; Danneberger L Detection of microsatellite polymorphisms without cloning 1994\(15\)](#)
20. [彭绍光 甘蔗育种学 1990](#)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201104007.aspx