

拟三属间杂交品系神农高糖蔗种质来源鉴定

王 平¹, 李和平², 黄永吉¹, 张树河², 余 凡¹, 潘世明², 邓祖湖^{1,3}

(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 福建省农业科学院甘蔗研究所, 漳州 360005;

³ 广西甘蔗与蔗糖产业协同创新中心, 南宁 530004)

摘要: 新品种选育的关键在于优异种质资源的创制和利用, 远缘杂交是创新种质的重要手段。近年来, 有机构宣称培育了一种由高梁、玉米、甘蔗属间杂交而成的神农高糖蔗新品系。为了准确地鉴定其种质来源, 本研究利用形态学、SCoT 标记和 GISH 技术对神农高糖蔗进行了研究。形态学初步鉴定结果表明: 从根、茎、叶等不同器官的形态特征来看, 神农高糖蔗与甘蔗、玉米、高粱都具有较多相似之处, 无法准确地甄别出神农高糖蔗是否为真杂种。根据 SCoT 标记的聚类结果, 可以将 12 份供试材料分成 I、II、III 3 大类, I 类包括 3 份高粱材料和神农高糖蔗, 6 份甘蔗材料均聚为 II 类, 2 份玉米材料聚为 III 类。在整个聚类图中神农高糖蔗和非洲甜高粱的相似系数最大, 说明神农高糖蔗与非洲甜高粱的遗传距离较小, 它们之间存在较小的遗传差异。比较基因组原位杂交结果表明, 神农高糖蔗只含有甜高粱的血缘, 而不含有甘蔗和玉米的血缘。本研究结合 3 种鉴定方法, 可以基本确定神农高糖蔗并非甘蔗、高粱和玉米的属间杂种, 而是甜高粱的一个品系 (品种)。本研究结果不仅揭露了虚假报道, 避免不必要的损失, 还探讨了甜高粱作为甘蔗远缘杂交种质资源的利用前景。

关键词: 甜高粱; 甘蔗; 属间杂交; SCoT; 基因组原位杂交

Identification of a Putative Trigenic Hybrid 'Shennong Gaotangzhe' for its Germplasm Origin

WANG Ping¹, LI He-ping², HUANG Yong-ji¹, ZHANG Shu-he², YU Fan¹, PAN Shi-ming², DENG Zu-hu^{1,3}

(¹ Key Lab of Sugarcane Biology and Genetic Breeding, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002;

² Institute of Sugarcane Sciences, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Zhangzhou 360005;

³ Guangxi Collaborative Innovation Center of Sugarcane Industry, Guangxi University, Nanning 530004)

Abstract: Improvement and innovation of germplasm resources are the keys of breeding new cultivars, and the distant hybridization is an important way in improving germplasm. A new variety named 'Shennong Gaotangzhe' has been promoted in recent years, which is declared as a hybrid of *Sorghum*, maize and sugarcane. In order to identify the real germplasm sources of 'Shennong Gaotangzhe', we used morphology, SCoT markers and GISH technology to analyze the possible genetic origin of 'Shennong Gaotangzhe' in this study. Among them, the results of preliminary identification of morphology indicated that 'Shennong Gaotangzhe' was very similar to sugarcane, maize and sorghum only based on the characteristics of roots, stems, leaves and other organs, so it was unable to accurately distinguish 'Shennong Gaotangzhe' for true hybrids. According to the cluster results of SCoT markers, 12 tested materials could be divided into three categories named I, II and III, the category I included three kinds of *Sorghum* and the 'Shennong Gaotangzhe', the six tested materials of sugarcane belonged category II, and the two kinds of maize belonged category III. From the cluster diagram, the similar coefficient of 'Shennong Gaotangzhe' and African sweet sorghum was the largest. It showed that the genetic distance between 'Shennong Gaotangzhe' and African sweet sorghum was closer and the genetic differences was smaller than the others. The results of comparative-GISH revealed

收稿日期: 2015-02-07 修回日期: 2015-03-28 网络出版日期: 2015-08-04

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150804.1327.028.html>

基金项目: 国家甘蔗产业体系专项资金资助 (CARS-20-1-5); 国家自然科学基金 (31401440)

第一作者研究方向为甘蔗遗传育种, E-mail: wangping629357@163.com; 李和平为共同第一作者, E-mail: hepingli_1982@126.com

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

that 'Shennong Gaotangzhe' shared a common ancestor with sweet sorghum, but without the descendant of sugarcane or maize. Combined with the three methods identified in this study, the 'Shennong Gaotangzhe' was identified as a variety (line) of sweet sorghum, but not a hybrid of sugarcane, sorghum and maize. The results of the study not only reveal the false reports for avoiding unnecessary losses, but also explore the prospect of sweet sorghum as a germplasm resource of sugarcane for distant hybridization.

Key words: sweet sorghum; sugarcane; intergeneric hybrid; SCoT; genomic *in situ* hybridization

现代甘蔗商业栽培品种多由甘蔗属内种间材料杂交而来,造成甘蔗的遗传基础日益狭窄,为此,甘蔗育种家不断开发利用新的种质资源以提高甘蔗种质异质性。其中,玉米、高粱为重要的禾本科不同属的C4作物^[1],具有诸多有利于甘蔗遗传育种改良的优良性状,甘蔗育种家迫切希望将这些优良性状引入到甘蔗中,培育出聚合三者优良性状的突破性新品种。远缘杂交是实现种属间优异基因渐渗和交流的种质创新的主要途径之一,在作物遗传改良育种中扮演着重要的角色^[2-4]。但甘蔗属、高粱属和玉米属远缘杂交时存在不亲和现象,难以获得真实的属间杂种^[5-7]。此外,甘蔗属和高粱属植物均为雌雄同花植物,在有性杂交过程中,完全去雄十分困难,经常会发生母本自交的情况。对所得材料进行杂种真实性鉴定是进一步杂交利用的前提条件,主要鉴定的方法有形态学标记、生化标记、细胞学标记和分子标记等。目标起始密码子多态性(SCoT, start codon targeted polymorphism)标记是一种操作简单、重复性好的用于亲缘关系和遗传多样性研究的分子标记技术^[8]。目前,SCoT标记已成功应用于花生、甘蔗、柳枝稷、番木瓜、柑橘、兰花、菊属等多种植物的遗传学研究^[9-16]。此外,基因组原位杂交(GISH, genomic *in situ* hybridization)技术是一种能够快速、直观且准确地鉴别出外源染色体或外源染色体片段的有效鉴定手段,从而起到鉴定杂交品种真实性的作用^[17-19],该技术已成功应用于许多重要作物的染色体来源研究^[20-21]。禾本科蜀黍族中,高粱属植物与甘蔗属植物亲缘关系较近,相对而言,玉米属植物与甘蔗属植物的亲缘关系则较远^[22]。目前,已有甘蔗与高粱、高粱与玉米的属间远缘杂交成功的报道^[23-25],但尚无甘蔗、高粱和玉米3个属间杂交成功的报道。

台湾光彩促进会和厦门农利华农业开发有限公司于2014年8月18日在厦门举办神农高糖蔗推介会,宣称该新品种是由甘蔗、高粱、玉米等作物属间远缘杂交而成,年可产4~5季,年产量600 t/hm²以上,不仅可作果蔗,并有望取代甘蔗用于制糖产业,

该报道引起了糖料界的关注。本研究通过形态学、SCoT标记以及GISH的方法对神农高糖蔗的真实性进行鉴定,旨在甄别该材料是否为属间杂种,为能否供甘蔗育种进一步杂交利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为台湾光彩促进会何秋荣先生提供的神农高糖蔗,以及由福建省农科院甘蔗研究所和福建农林大学甘蔗综合研究所资源圃保育的3份高粱、6份甘蔗和2份玉米材料(表1)。

表1 12份供试材料

Table 1 12 tested materials

序号 No.	种/品种 Species/Variety	属名 Genus
1	神农高糖蔗	未知
2	山东普通高粱	高粱属
3	非洲甜高粱	高粱属
4	莆田高粱	高粱属
5	CP84-1198	甘蔗属
6	CP95-998	甘蔗属
7	CP96-540	甘蔗属
8	ROC22	甘蔗属
9	ROC16	甘蔗属
10	Badila	甘蔗属
11	超甜28号	玉米属
12	超甜5号	玉米属

1.2 试验方法

1.2.1 形态学鉴定 以植物的外部形态特征为依据,对神农高糖蔗株高、株型、节间、根、茎、叶、芽等进行形态学鉴定。

1.2.2 工农艺性状鉴定 从生长期、节间长度、出汁率、锤度、糖分、纤维含量、重力纯度等方面进行工农艺性状鉴定。

1.2.3 SCoT分析 使用CTAB法进行叶片基因组DNA的提取,DNA溶解后,用RNase A消化。通过实验室前期的预试验,挑选12条多态性较好的SCoT引物(表2),对12份供试材料在eppeendorf Mastercycler PCR扩增仪上进行PCR扩增反应。优

化后的 PCR 反应体系为 25 μ L:10 $\times$ buffer,dNTP 0.25 mmol/L,2.5 M *Taq* DNA 聚合酶,50 ng DNA 模板,0.75 μ mol/L 引物。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,循环 30 次,72 $^{\circ}$ C 终延伸 5 min。PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳(1 $\times$ TAE buffer)、溴化乙锭染色后,在紫外凝胶成像系统上拍照保存。

表 2 筛选出的 SCoT 引物序列及对 12 份供试材料的扩增结果

Table 2 The sequences of reliable SCoT primers and the amplified results for 12 tested materials

引物编号 Primer No.	序列(5'-3') Sequences (5'-3')	扩增条 带数 No. of amplified bands	多态性 条带数 No. of poly- morphic bands	多态性 比率 (%) Poly- morphic ratio
SCoT1	CAACAATGGCTACCACCA	26	25	96.15
SCoT3	CAACAATGGCTACCACCG	25	25	100.00
SCoT5	CAACAATGGCTACCACGA	22	22	100.00
SCoT20	ACCATGGCTACCACCGCG	25	25	100.00
SCoT29	CCATGGCTACCACCGGCC	23	23	100.00
SCoT31	CCATGGCTACCACCGCCT	23	22	95.65
SCoT33	CCATGGCTACCACCGCAG	24	23	95.83
SCoT38	AAGCAATGGCTACCACCG	23	23	100.00
SCoT39	ACGACATGGCGACCACCG	18	16	88.89
SCoT40	ACGACATGGCGACCACGT	24	24	100.00
SCoT42	ACCATGGCTACCACCGAT	22	22	100.00
SCoT46	CCATGGCTACCACCGGCA	25	24	96.00
平均 Mean	—	23.33	22.83	97.86
总数 Total	—	280	274	97.86

根据电泳图结果,对扩增清晰且易于辨认的条带采用 0-1 系统记录其位置,在相同迁移位置有带记为“1”,无带记为“0”,建立 SCoT 标记的 0、1 矩阵。利用 NTSYS-2.0 软件,计算遗传相似系数并按 UPGMA 方法进行聚类分析。

1.2.4 基因组原位杂交 采用酶解去壁低渗法^[26],选取植株根尖分生区细胞进行涂片制备染色体靶细胞。

甜高粱基因组 DNA 用 Digoxigenin 标记,玉米(超甜 28 号)和甘蔗(CP84-1198)基因组 DNA 用 Biotin 标记,按 Roche 公司的 Nick Translation Kit 试剂盒说明书制备探针,斑茅基因组 DNA 和鲑鱼精 DNA 用沸水浴打断作为封阻 DNA。

参照 A. D' Hont 等^[27] 的方法并略有修改。80 $^{\circ}$ C 变性 3 min 后,置于 -20 $^{\circ}$ C 预冷的梯度乙醇脱水,干燥后加杂交液,37 $^{\circ}$ C 杂交过夜。洗脱后,用 Texas Red 抗体(红色荧光)检测玉米和甘蔗基因组

DNA 探针,sheep-anti-Digoxigenin-FITC 抗体(绿色荧光)检测甜高粱基因组 DNA 探针。最后,染色体用 DAPI 复染(蓝色荧光)。荧光信号用 Carl Zeiss 荧光显微镜观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 形态学鉴定

神农高糖蔗的形态特征如下:成熟初期植株直立,茎径平均约 2.0 cm,绵心,叶较宽,叶色绿色,叶片较短,叶片弯垂,节间长度较长,呈圆筒形,无生长裂痕,无木栓斑块(图 1A)。成熟期的茎色呈青绿色,芽卵圆形,芽尖抵生长带,芽翼大,芽沟明显,一排根点有规则排列,难脱叶(图 1B)。成熟晚期的果穗直立而紧实,穗粒多,颖果呈近圆形(图 1C)。



A、B、C 分别为神农高糖蔗的成熟初期植株、成熟期茎、成熟晚期穗
A, B, and C represent the primary ripe plant, the ripe stem
and the later ripespikes of Shennong Gaotangzhe

图 1 神农高糖蔗植株形态图

Fig. 1 Plant morphological figure of Shennong Gaotangzhe

从形态特征来看,神农高糖蔗与甘蔗、高粱、玉米都有很多相似之处。神农高糖蔗茎形呈圆筒形,属于中小茎,比较接近甘蔗,不似玉米茎偏扁;其茎皮呈青绿色且表层有白色蜡粉,玉米的茎皮大多偏黄绿色且蜡粉比较少,甘蔗的茎色有黄色、黄绿色、红色、紫色和白色等且蜡粉较多;甘蔗品种多为实心,神农高糖蔗与部分玉米相似,为绵心;神农高糖蔗的节间长度与玉米相比较长;其根点只有一排,不同于甘蔗有多排根点,而且基部茎节上的根点比较明显,但中上部的根点发育较差,很难出根,其基部根点比甘蔗和玉米同等部位根点更粗壮;神农高糖

蔗叶片较短,叶片弯垂,而甘蔗叶片较长,中脉粗壮。因此,仅根据神农高糖蔗的形态特征难以准确地鉴别出其种质来源。

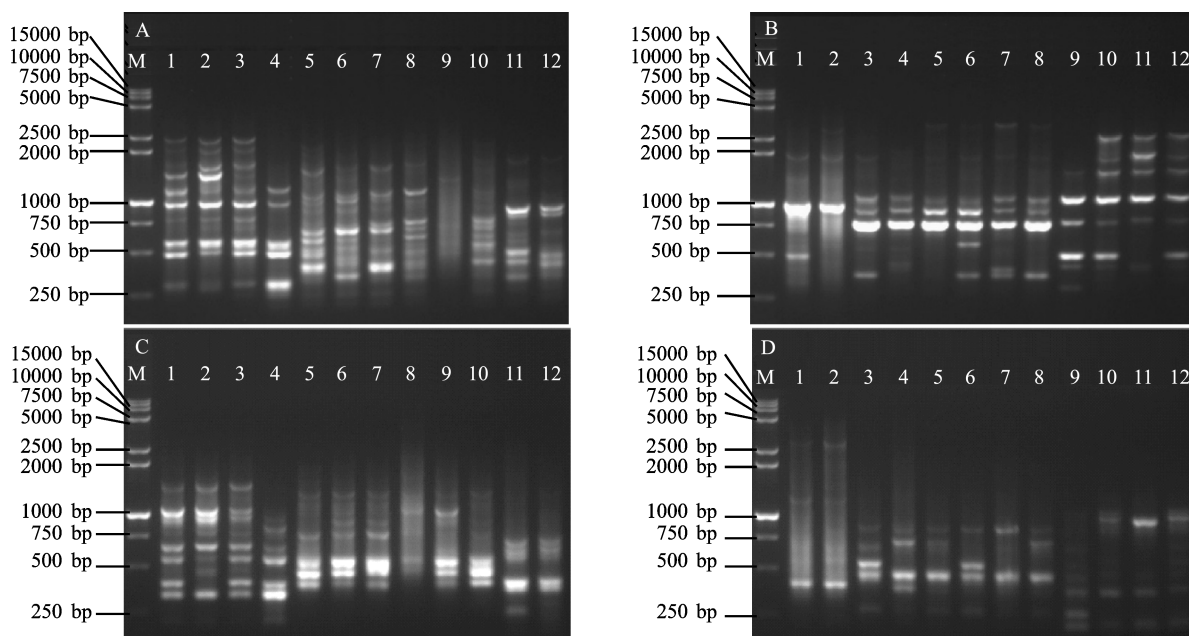
2.2 工农艺性状指标

神农高糖蔗从8月30日播种,9月12日移栽,10月28日开始抽穗。玉米的生长期为100~140 d,甘蔗的生长期长达330 d以上,因此,与甘蔗和玉米相比,神农高糖蔗的生长期要短得多。神农高糖蔗的平均株高244.0 cm,节间长度17.5 cm,茎粗2.0 cm,每 hm^2 茎数约103000条,高峰期锤度17.50%,出汁率57.50%,糖分11.21%,纤维含量10.32%,重力纯度72.05%,说明神农高糖蔗糖分

性状在植物中是相当高的,但其出汁率、糖分、锤度、重力纯度与甘蔗生产品种相比还是有一定的差距。

2.3 SCoT 分析

2.3.1 种间多态性 每条引物在每个DNA样品中扩增出3~11条带(图2),片段大小在100~3500 bp之间。12条SCoT引物对12份供试材料扩增共检测出280个位点,平均每条引物检测出23.33个位点,多态性位点274个,多态性位点百分比达97.86%。多态性最高的是SCoT3、SCoT5、SCoT20、SCoT29、SCoT38、SCoT40、SCoT42这7条引物,多态性高达100%。多态性最低的是SCoT39,多态性为88.89%(表2)。



A、B、C和D分别为SCoT5、SCoT20、SCoT29和SCoT31对12份供试材料的SCoT-PCR扩增结果。

M为15000+2000 bp DNA分子质量标准,1~12同表1中各材料编号

A、B、C和D represent the SCoT-PCR amplification profile of 12 tested materials using SCoT5, SCoT20, SCoT29 and SCoT31, respectively. Lane M shows the 15000+2000 bp DNA ladder, 1~12 lanes represent material codes same to table 1

图2 部分引物对12份供试材料的SCoT-PCR扩增结果

Fig. 2 SCoT-PCR amplification profile of 12 tested materials based on partial primers

2.3.2 SCoT 标记聚类分析 根据各材料间的相似性系数,对12份供试材料进行聚类分析(图3)。结果表明,在相似系数为0.59处可以将12份供试材料分成I、II、III 3大类,I类包括3份高粱材料和神农高糖蔗,6份甘蔗材料均聚在II类,2份玉米材料聚在III类。I和II类在相似系数为0.80处又分为5个亚类,用字母A~E标识,A和B亚类同为高粱属,A亚类包括神农高糖蔗和非洲甜高粱,莆田东桥高粱单独聚为B亚类。而C亚类包含4份甘蔗材料,其中Badila和ROC16在相似系数为0.82处

聚为一类,另外2份在相似系数为0.83处聚为一类。D和E亚类分别为CP95-988和ROC22。III类中的2份玉米材料在相似性系数为0.84处聚在一起。在整个聚类图中神农高糖蔗和非洲甜高粱的相似系数最大,即在0.87处聚在一起,位于整个聚类图的最基部。神农高糖蔗与甜高粱聚类在一起,而未与玉米、甘蔗聚类在一起,说明神农高糖蔗与甜高粱亲缘关系较近,而与玉米的亲缘关系较远。根据赵香娜等^[28]的研究结果,国内外甜高粱品种间的遗传差异较大,相似系数范围在0.32~0.96之

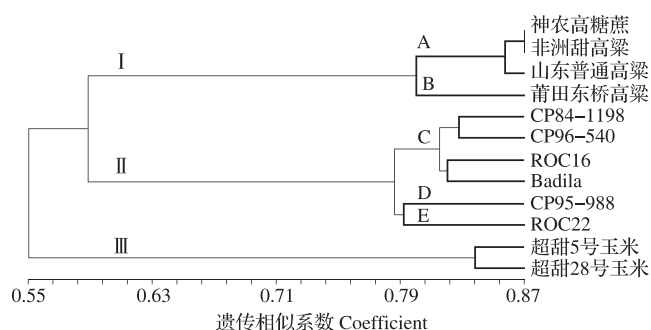
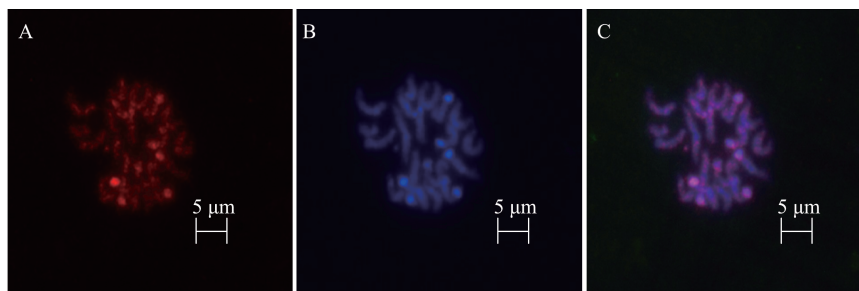


图 3 12 份供试材料的 SCoT 标记聚类图
Fig. 3 Dendrogram of cluster result of 12 tested materials based on SCoT markers



A: 生物素标记的玉米基因组 DNA 探针的杂交信号; B: DAPI 复染的玉米基因组 DNA; C: 红、蓝荧光叠加结果。标尺为 5 μm
A: The hybridization signal of maize genome DNA probe labeled by Biotin, B: The maize genome DNA stained by DAPI,
C: The results of merged red with blue fluorescence. Scale bar = 5 μm

图 4 玉米 self-GISH 结果
Fig. 4 The self-GISH results of maize

2.4.2 甘蔗基因组探针可用性验证 GISH 结果显示:以生物素标记的甘蔗(CP84-1198)基因组 DNA (红色荧光)探针和斑茅(HN92-105)的基因组 DNA 为封阻,对斑茅杂种 YCE01-102 的根尖细胞中期染色体进行 self-GISH 时,来自甘蔗的染色体均显示出强烈的红色荧光杂交信号(图 5A、5C),表明甘蔗基

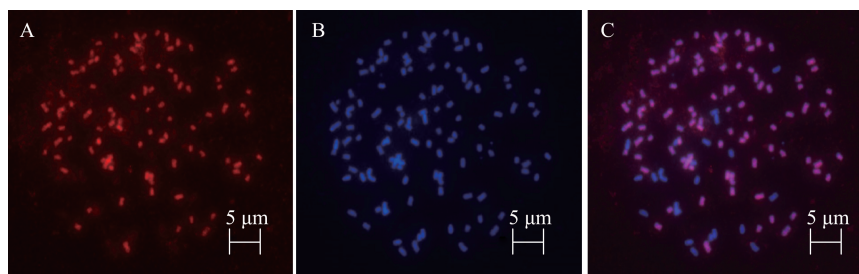
间,所以推测神农高糖蔗可能是甜高粱的一个种或品系(品种)。试验结果说明这些供试材料具有一定的遗传差异,而且还表明 SCoT 标记技术可用于探讨禾本科属种间亲缘关系。

2.4 基因组原位杂交分析

2.4.1 玉米基因组探针可用性验证 以生物素标记的超甜 28 号甜玉米基因组 DNA 为探针,对超甜 28 号甜玉米的根尖细胞中期相染色体进行自身基因组原位杂交(self-GISH, self genomic *in situ* hybridization),结果显示:20 条染色体均有强烈的红色和蓝色荧光杂交信号(图 4A、4B),表明超甜 28 号甜玉米基因组 DNA 探针可用。

因组 DNA 探针可用。

2.4.3 双色探针与神农高糖蔗中期染色体进行比较基因组原位杂交 利用比较基因组原位杂交(comparative-GISH, comparative genomic *in situ* hybridization)验证神农高糖蔗染色体来源。以地高辛标记的甜高粱基因组 DNA(绿色荧光)和生物素标



A: 生物素标记的甘蔗基因组 DNA 探针的杂交信号; B: DAPI 复染的 YCE01-102 基因组 DNA;
C: 红、蓝荧光叠加结果。标尺为 5 μm。YCE01-102 为甘蔗斑茅的 BC₁

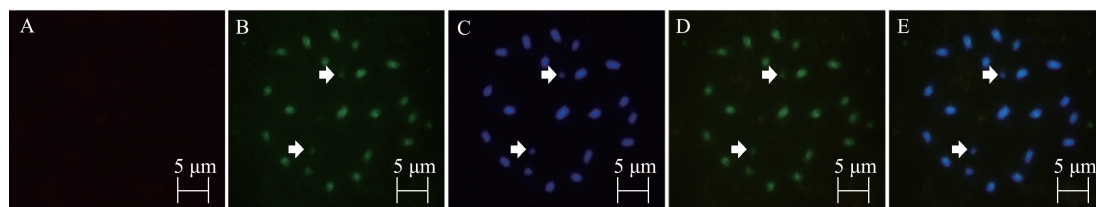
A: The hybridization signal of sugarcane genome DNA probe labeled by Biotin, B: The YCE01-102 genomic DNA stained by DAPI,
C: The results of merged red with blue fluorescence. Scale bar = 5 μm. YCE01-102 is the BC₁ hybrid between sugarcane and *Erianthus arundinaceus*

图 5 甘蔗 self-GISH 结果
Fig. 5 The self-GISH results of sugarcane

记的超甜 28 号甜玉米基因组 DNA(红色荧光)为探针,对神农高糖蔗的根尖细胞中期相染色体进行比较基因组原位杂交,22 条染色体均有强烈的绿色和蓝色荧光杂交信号,而红色荧光杂交信号极其微弱(图 6),表明神农高糖蔗含有高粱血缘,不含有玉米血缘。以地高辛标记的甜高粱基因组 DNA 和生物素标记的甘蔗基因组 DNA 为探针,对神农高糖蔗的根尖细胞中期相染色体进行比较基因组原位杂交,

22 条染色体均有强烈的绿色和蓝色荧光杂交信号,而红色荧光杂交信号极其微弱(图 7),表明神农高糖蔗中含有高粱血缘,不含有甘蔗血缘。

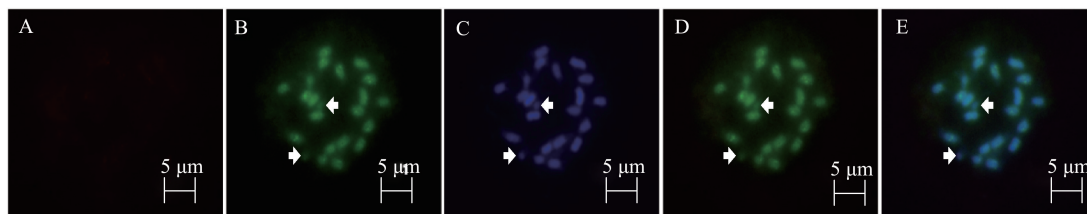
值得注意的是,本研究发现神农高糖蔗的根尖细胞染色体数目有所变动,且 85% 以上为 22 条,而正常的甜高粱染色体 $2n=20$ 条,与之相比,神农高糖蔗多出了 2 条比正常染色体小的染色体(图 6 和图 7 中箭头所示)。



A:生物素标记的玉米基因组 DNA 探针的杂交信号;B:地高辛标记的甜高粱基因组 DNA 探针的杂交信号;
C:DAPI 复染的神农高糖蔗基因组 DNA;D:红、绿荧光叠加结果;E:红、绿、蓝荧光叠加结果。标尺为 5 μm 。下同
A:The hybridization signal of maize genome DNA probe labeled by Biotin,B:The hybridization signal of sweet sorghum genome DNA probe labeled by Digoxigenin,C:The Shennong Gaotangzhe genomic DNA stained by DAPI,
D:The results of merged red with green fluorescence,
E:The results of merged red,green with blue fluorescence. Scale bar = 5 μm . The same as below

图 6 甜高粱和玉米双探针与神农高糖蔗的 GISH 结果

Fig. 6 The GISH results of double probes from sweet sorghum and maize with Shennong Gaotangzhe



A:生物素标记的甘蔗基因组 DNA 探针的杂交信号

A:The hybridization signal of sugarcane genome DNA probe labeled by Biotin

图 7 甜高粱和甘蔗双探针与神农高糖蔗的 GISH 结果

Fig. 7 The GISH results of double probes from sweet sorghum and sugarcane with Shennong Gaotangzhe

3 讨论

3.1 神农高糖蔗的杂种真实性鉴定

杂种真实性鉴定是对创制的杂交材料进一步利用的前提,常用的鉴定方法主要有形态学、细胞学、同工酶及分子标记等方法^[29]。本研究首先从形态学和农艺性状上对神农高糖蔗进行观察、分析、鉴定,无法准确地鉴定出神农高糖蔗是否为甘蔗、高粱和玉米的真实杂种。通常,形态学鉴定适用于具有明显的形态鉴别特征的物种^[30],由于甘蔗、高粱和玉米同属于禾本科植物,尤其是甘蔗和高粱这两个亲缘关系较近的物种,有诸多相似的形态学特征,难以从形态学上清楚地鉴定出真伪杂种。况且,植物的表现型是由其基因型、环境效应和基因型与环境

互作效应共同决定的结果,外观形态特征易受到遗传表达和环境的不稳定性影响^[31-32]。所以形态学和农艺性状在品种鉴定中具有一定的局限性,使得它难以在现代纷繁复杂的杂交品种鉴定中担当主角^[33-34]。

为了准确鉴定神农高糖蔗的杂种真实性,本研究还利用 SCoT 标记和 GISH 技术,从分子标记和细胞遗传学上进一步探讨其亲缘关系和种质来源以及染色体组成。DNA 分子标记技术可客观地反映供试材料在 DNA 分子水平上的真实差异,在品种分析及亲缘关系鉴定等方面有较为广泛的应用^[35]。SCoT 标记可以检测出不同基因型供试材料间的微小差异,准确地反映出其亲缘关系。与其他分子标记(如 SRAP 或 SSR)相比而言,SCoT 标记具有更高

的标记效率和更强的多态性检测能力^[13,36]。本研究中,基于 SCoT 分子标记的遗传距离估计和表征图显示,神农高糖蔗聚在高粱属这一大类中且与非洲甜高粱的相似系数最高,即二者间的遗传差异最小,亲缘关系最近;而与甘蔗、玉米的遗传差异较大,亲缘关系较远。进一步说明神农高糖蔗可能是甜高粱的一个品种(系)。结果还表明,玉米属与甘蔗属的亲缘关系比高粱属与甘蔗属的亲缘关系远,这与 N. Nair 等^[3]的报道结果一致。

GISH 广泛应用于远缘杂种的鉴定及外源染色质的检测,根据 GISH 结果可以了解外源染色体片段的渗入情况^[20,37-39]。本研究利用 GISH 技术探讨神农高糖蔗的染色体来源,用甘蔗、甜高粱和玉米基因组 DNA 为探针进行鉴定时发现,神农高糖蔗所有染色体上有很强的甜高粱基因组 DNA 探针的杂交信号,而甘蔗和玉米的基因组 DNA 探针的杂交信号很弱,表明神农高糖蔗与甜高粱基因组具有高度的同源性,可以确定神农高糖蔗仅含有高粱血缘,而不含有甘蔗或玉米血缘。结合形态学鉴定和 SCoT 标记结果,可以初步断定神农高糖蔗即为甜高粱的一个种。此外,根据神农高糖蔗的染色体数目,可以确定神农高糖蔗比正常的甜高粱($2n = 20$)多了 2 条染色体^[40-41],即染色体总数为 22 条。自然界中部分非整倍体植物存在额外染色体,玉米、黑麦、甘蓝等多种植物中出现过这种现象^[42-44],且额外染色体的数目和类别有所不同。对于有 2 条额外染色体的个体而言,如果是正常二倍体染色体组的 2 对染色体各增加了 1 条同源染色体($2n + 1 + 1$)的生物个体称为双三体,如果是在正常染色体数目 $2n$ 的基础上多了一对同源染色体($2n + 2$)的生物个体称为四体。本研究中神农高糖蔗的 2 条额外染色体在外观形态上明显比其正常染色体小,对于其多出的 2 条染色体的类别和效应还有待进一步研究。

总之,本研究通过形态学鉴定、SCoT 标记和 GISH 方法,对神农高糖蔗进行杂种真实性鉴定,3 种鉴定方法相互印证,取长补短,使鉴定结果更加真实、可靠。

3.2 种质创新

在作物驯化过程中,经过长期的自然选择和人工选择压力,栽培品种逐渐丢失了许多重要的野生种的优异基因,导致栽培品种遗传多样性严重丧失^[45]。此外,随着生产水平的不断提高和新品种的推广,作物育种所利用的基因集中到少数种质上,造成作物品种的单一化,使得作物品种的遗传基础日

趋狭窄,这已严重阻碍了作物遗传育种改良工作的进一步发展^[2]。因此,只有加强种质资源遗传多样性的深入研究,不断拓宽遗传基础,才能解决作物品种基因资源匮乏的问题,使作物种质创新工作取得突破性进展。

种质创新的主要目的就是把优异的野生种质通过各种方法导入生产品种或亲本中,培育具有丰富遗传基础的新亲本、新品种,增加品种的遗传多样性,优异种质资源的改良和创新利用是新品种选育的基础,也是丰富种质资源的重要手段^[46]。禾本科有 620 多属,10000 多种,据报道,其中的斑茅属^[47]、蔗茅属^[48]和高粱^[23]等已与甘蔗杂交获得创新种质,尚有众多潜在利用价值的近缘种属植物种质资源未被开发利用。充分挖掘甘蔗近缘种属植物优良的基因,并利用远缘杂交的手段,将含有优异基因的外源染色质渐渗到甘蔗中,创制新的种质,这是选育突破性品种的有效途径。甘蔗的育种实践表明,新种质的导入和充分利用促进甘蔗的生产水平上一个新台阶。尽管物种间存在生殖隔离,使远缘杂交难以成功,但是随着远缘杂交育种研究的不断深入,已有不少解决远缘杂交生殖隔离的方法。目前,已有大量的物种间远缘杂交成功的报道。本研究中的神农高糖蔗经证实属于甜高粱属,而非甘蔗、高粱和玉米的属间杂种,尽管如此,但它具有的某些优良性状和高生物量,尤其是糖分含量在甘蔗近缘属植物中是最难得的,因而其在甘蔗种质创新和品种选育方面仍具有吸引力和潜在的利用价值。

参考文献

- [1] Devos K M. Grass genome organization and evolution[J]. Curr Opin Plant Biol, 2010, 13: 139-145
- [2] 王述民,李立会,黎裕,等. 中国粮食和农业植物遗传资源状况报告(I)[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 1-12
- [3] Nair N, Selvi A, Sreenivasan T, et al. Molecular diversity among *Saccharum*, *Erianthus*, *Sorghum*, *Zea* and their hybrids[J]. Sugar Tech, 2005, 7(1): 55-59
- [4] 徐宁,王明海,包淑英,等. 小豆远缘杂交研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 666-670
- [5] Hrish N, Marimuthammal S, Das L V. Studies on the causes for seed failure in the intergeneric cross between sugarcane and maize[J]. Proc Indian Acad Sci, 1969, 70(4): 169-177
- [6] Bartek M S, Hodnett G L, Burson B L, et al. Pollen tube growth after intergeneric pollinations of *iap*-homozygous sorghum[J]. Crop Sci, 2012, 52(4): 1553-1560
- [7] 高新起,王秀玲. 植物远缘杂交的障碍及其克服[J]. 生物学通报, 1998, 33(12): 12-14
- [8] Collard B C, Mackill D J. Start codon targeted (SCoT) polymorphism: a simple, novel DNA marker technique for generating gene-targeted markers in plants[J]. Plant Mol Biol Rep, 2009, 27(1): 86-93
- [9] 罗霆,杨海霞,岑华飞,等. SCoT 分子标记在割手密遗传图谱

- 构建中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 704-710
- [10] Xiong F, Jiang J, Zhong R, et al. Application of SCoT molecular marker in genus *Arachis* [J]. Agr Sci China, 2011, 36(12): 2055-2061
- [11] 熊发前, 唐荣华, 陈忠良, 等. 目标起始密码子多态性 (SCoT): 一种基于翻译起始位点的目的基因标记新技术[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 635-638
- [12] 蒋晓梅, 黄琳凯, 张新全, 等. 利用 SCoT 分析柳枝稷遗传资源的多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(1): 89-95
- [13] 蔡元保, 杨祥燕, 陈豪军, 等. SRAP 结合 SCoT 标记分析番木瓜种质的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(2): 292-298
- [14] Zhang H, Bian Y, Gou X, et al. Persistent whole-chromosome aneuploidy is generally associated with nascent allohexaploid wheat [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110(9): 3447-3452
- [15] 高岭, 冯尚国, 何仁锋, 等. 兰属植物目标起始密码子 (SCoT) 遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 2013, 40(10): 2026-2032
- [16] Zhao X, Xu X, Xie H, et al. Fertilization and uniparental chromosome elimination during crosses with maize haploid inducers[J]. Plant Physiol, 2013, 163(2): 721-731
- [17] 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
- [18] Wang X, Yang Q, Li F, 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
- [19] Choisine N, Demange N, Orjeda G, et al. The sequence of rice chromosomes 11 and 12, rich in disease resistance genes and recent gene duplications [J]. BMC Biol, 2005, 3(20): 1-18
- [20] Chenuil A, Desmarais E, Pouyaud L, et al. Does polyploidy lead to fewer and shorter microsatellites in *Barbus* (*Teleostei: Cyprinidae*) [J]. Mol Ecol, 1997, 6(2): 169-178
- [21] 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: 1033-1037
- [22] Dufour P, Deu M, Grivet L, et al. Construction of a composite sorghum genome map and comparison with sugarcane, a related complex polyploid [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94(3-4): 409-418
- [23] De Wet J, Gupta S, Harlan J, et al. Cytogenetics of Introgression from *Saccharum* into *Sorghum* [J]. Crop Sci, 1976, 16: 568-572
- [24] Nair N V. Production and cyto-morphological analysis of intergeneric hybrids of *Sorghum* × *Saccharum* [J]. Euphytica, 1999, 108(3): 187-191
- [25] 苏子潘. “87397”玉米新物种种质核型及分析[J]. 河南职业技术学院学报, 2001, 29(3): 8-11
- [26] Chamala S, Chanderbali A S, Der J P, et al. Assembly and validation of the genome of the nonmodel basal *Angiosperm Amborella* [J]. Science, 2013, 342(6165): 1516-1517
- [27] 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 General Genet, 1996, 250(4): 405-413
- [28] 赵香娜, 岳美琪, 刘洋, 等. 国内外甜高粱种质遗传多样性的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 407-412
- [29] 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
- [30] Sorkheh K, Shiran B, Kiani S, et al. Discriminating ability of molecular markers and morphological characterization in the establishment of genetic relationships in cultivated genotypes of almond and related wild species [J]. J For Res, 2009, 20(3): 183-194
- [31] 马鹏, 王国琴. 玉米遗传多样性研究方法初探[J]. 天津农业科学, 2014, 20(7): 20-24
- [32] 武耀廷, 张天真, 殷剑美. 利用分子标记和形态学性状检测的陆地棉栽培品种遗传多样性[J]. 遗传学报, 2001, 28(11): 1040-1050
- [33] 何秀娟, 邱文明, 徐育海. 利用叶片形态学性状和 RAPD 分子标记检测湖北板栗资源遗传多样性[J]. 中国南方果树, 2014, 43(2): 12-16
- [34] 吴明基, 向海涛, 刘华清, 等. 利用形态学性状及 SSR 分子标记鉴定水稻优良恢复系闽恢 3301 的亲代来源[J]. 福建农业学报, 2012, 27(7): 673-678
- [35] 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
- [36] 李正鹏, 李廷春, 樊洪泓, 等. 棉花遗传多样性 SCoT 和 SRAP 标记的研究及比较分析[J]. 激光生物学报, 2011, 20(2): 236-244
- [37] Deng Z, Zhang M, Lin W, et al. Analysis of disequilibrium hybridization in hybrid and backcross progenies of *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus* [J]. Agr Sci China, 2010, 9(9): 1271-1277
- [38] Bancroft I, Morgan C, Fraser F, et al. Dissecting the genome of the polyploid crop oilseed rape by transcriptome sequencing [J]. Nat Biotechnol, 2011, 29(8): 762-766
- [39] Lipman M J, Chester M, Soltis P S, et al. Natural hybrids between *Tragopogon mirus* and *T. miscellus* (Asteraceae): a new perspective on karyotypic changes following hybridization at the polyploid level [J]. Am J Bot, 2013, 100(10): 2016-2022
- [40] 李宗贤. 高粱体细胞染色体组型分析研究初报[J]. 山西农业科学, 1981(12): 4
- [41] Sun Y, Skinner D, Liang G, et al. Phylogenetic analysis of *Sorghum* and related taxa using internal transcribed spacers of nuclear ribosomal DNA [J]. Theor Appl Genet, 1994, 89(1): 26-32
- [42] Han F, Lamb J C, Birchler J A, et al. High frequency of centromere inactivation resulting in stable dicentric chromosomes of maize [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, 103(9): 3238-3243
- [43] 张荣信, 陈成彬. 黑麦 A, B 染色体着丝粒区同源性的荧光原位杂交分析[J]. 科学通报, 1999, 44(5): 520-524
- [44] 祝海燕, 张成合, 申书兴, 等. 结球甘蓝 1 号和 4 号染色体双三体及其初级三体的分离与鉴定[J]. 园艺学报, 2005, 32(4): 695-697
- [45] 徐世晓, 赵新全, 孙平, 等. 生物资源面临的严重威胁: 生物多样性丧失[J]. 资源科学, 2002, 24(2): 6-11
- [46] 余成章, 傅文泽, 孙汉忠, 等. 泉薯 218 选育与创新利用[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 163-166
- [47] D'hont A, Rao P, Feldmann P, et al. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91(2): 320-326
- [48] Wang X, Yang Q, Li F, et al. Chromosomal constitution and karyotype of intergeneric F_1 hybrids between *Saccharum* spp. and *Erianthus fulvus* based on GISH [J]. Agr Sci China, 2011, 44(6): 1085-1091