

利用 AFLP 进行“甘蔗属复合体”系统演化和亲缘关系研究

蔡青¹ 范源洪^{1,*} Aitken K² Piperidis G³ McIntyre C L² Jackson P^{2*}

(¹ 云南省农业科学院甘蔗研究所, 云南开远 661600; ² 澳大利亚联邦科学与工业研究组织 (CSIRO) 植物研究中心, 澳大利亚 Brisbane, 4067; ³ 澳大利亚甘蔗试验管理局 (BSES), 澳大利亚 Brisbane, 4068)

摘要: 采用 AFLP 分子标记技术, 对“甘蔗属复合体”中 4 个属 16 个种的 69 份来自中国和澳大利亚的甘蔗种质资源材料进行系统演化和亲缘关系分析。2 对 AFLP 引物共检测到 173 个标记, 其中 172 个为多态标记, 多态率达 99.4%; 通过计算 Jaccard 相似性系数, 用 UPGMA 和 PCA 法构建了分子系统树和效应图。结果表明: (1) 属间亲缘关系中, 甘蔗属与芒属较近, 与河八王属和蔗茅属较远, 而河八王属与蔗茅属较近; (2) 甘蔗属内, 细茎野生种与其他种关系较远, 其中, 栽培品种与热带种关系较近, 中国种和印度种关系较近, 而大茎野生种自聚为一族, 与上述 4 种分离; (3) 蔗茅属内, 除蔗茅种和滇蔗茅种外, 无论是中国斑茅 (云南、海南) 还是印度尼西亚斑茅, 都与蔗茅属其他种聚在一起, 其中与 *E. procerus* 的关系最近, 与 *E. bengalense* 和 *E. sarpet* 种次之; 由斑茅与这 3 个种构成的群体与由 *E. elephantinus* 和 *E. ravennae* 构成的群体相对分离, 形成了明显的 2 个组群。再次表明斑茅应列入蔗茅属, 建议我国甘蔗学者采纳国外分类命名 (*E. arundinaceus*), 以能更好地开展斑茅的研究和杂交育种利用并与国际接轨; (4) 蔗茅和滇蔗茅均没有聚类到蔗茅属类群中, 而分别独立位于系统树 2 大枝系上。蔗茅与甘蔗属亲缘关系较近, 与芒属亲缘关系次之, 与蔗茅属和河八王属关系较远; 滇蔗茅与河八王属亲缘关系较近, 与蔗茅属关系次之, 与甘蔗属和芒属关系较远。表明滇蔗茅 (*rockii*) 可能应该归入河八王属, 蔗茅 (*fulvus*) 可能应该归入甘蔗属。

关键词: 甘蔗属复合体; 系统演化; AFLP

中图分类号: S566

Assessment of the Phylogenetic Relationships within the “Saccharum Complex” Using AFLP Markers

CAI Qing¹, FAN Yuan-Hong^{1,*}, Aitken K², Piperidis G³, McIntyre C L², Jackson P²

(¹ Yunnan Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kaiyuan 661600, Yunnan, China; ² CSIRO Division of Plant Industry, Brisbane, Qld 4067, Australia; ³ David North Plant Research Centre, BSES Limited, Brisbane, Qld 4068, Australia)

Abstract: Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLP) markers were used to assess the phylogenetic relationships within the “Saccharum Complex”. Sixty-nine genotypes from China and Australia, representing sixteen species from 4 genera in the “Saccharum complex” were evaluated (Table 1). Two AFLP primer combinations were used to generate a total of 173 bands, of which 172 were polymorphic between all species (Fig. 1); the frequency of polymorphism was 99.4%. Principal Component Analysis (PCA) and UPGMA clustering were undertaken using Jaccard similarity coefficient (Fig. 2 and Fig. 3). The results showed that: (1) among the 4 genera studied, *Saccharum* has the closed relationship with *Miscanthus*, followed by *Narenga* and *Erianthus*, while the two latter has the closed relationship comparatively; (2) in the *Saccharum* genus, *S. spontaneum* is the most diverse and different species, followed by *S. robustum* and then two branches, one containing cultivars and *S. officinarum*, and the other containing *S. sinense* clustered with *S. barberi*; (3) in the *Erianthus* genus, both *arundinaceus* from China and Indonesia clustered with the other *Erianthus* species, with the exception of *E. fulvus* and *E. rockii*. In this cluster, two branches were divided from six species, one containing *arundinaceus* clustered prior to *E. procerus*, followed by *E. bengalense* and *E. sarpet*, the other containing *E. elephantinus* and *E. ravennae*. From the result we also advise sugarcane researchers in China that the *arundinaceus* should be classified as *Erianthus* species to conform with overseas classification, and also for better utilization of this species; (4) both *E. fulvus* and *E. rockii* were not clustered with *Erianthus* but clustered loosely with *Saccharum* and *Narenga* species. Comparatively, *E. fulvus* has the closed relationship with

*基金项目: 云南省自然科学基金资助项目: 甘蔗主要目标性状基因的分子标记(1999CO022G); 澳大利亚国际农业研究中心 (ACIAR) 资助项目: 甘蔗种质资源的改良和利用研究 (CS1/2000/038)。

作者简介: 蔡青 (1966 -), 女, 副研究员, 研究方向: 种质资源研究利用和分子生物技术。E-mail: caiqingysri@sohu.com; Tel: 0873-7232865

*通讯作者: 范源洪。E-mail: fyhsyri@sohu.com

Received (收稿日期): 2004-04-02, Accepted (接受日期): 2004-09-26.

Saccharum, followed by *Miscanthus*, but is distant from *Erianthus* and *Narenga*, while *E. rockii* is closed to *Narenga* and *Erianthus*, but is the most distant from *Saccharum* and *Miscanthus*. This study also infer that *rockii* could be classified as *Narenga* while *fulvus* to be as *Saccharum*.

Key words: *Saccharum* Complex; Phylogenetic Relationships; AFLP

甘蔗, 属禾本科 (Gramineae) 蜀黍族 (Andropogoneae) 甘蔗亚族 (Saccharastrae) 甘蔗属 (*Saccharum* L.), 与蔗茅属 (*Erianthus* Michx. Sect. *Ripidium* Henrard)、芒属 (*Miscanthus* Anderss. Sect. *Diantra* Keng)、河八王属 (*Narenga* Bor) 和硬穗属 (*Sclerostachya* Hack. A. Camus) 组成了甘蔗育种的一个庞大基因库, 称为“甘蔗属复合体” (*Saccharum* Complex)^[1,2], 是甘蔗种质资源保存和研究的主要对象, 也是现代甘蔗品种改良的主要物质基础。

研究甘蔗种质资源的系统演化和亲缘关系对深入探讨甘蔗种质资源遗传背景, 评价其遗传多样性水平具有重要意义。随着现代分子生物学技术的不断发展, DNA 分子技术以其稳定的遗传特性为遗传多样性研究提供了真实可靠的研究手段和依据, RFLP、RAPD 等技术相继在甘蔗研究领域得到了应用。Besse^[3,4] 利用 RFLP 技术, 对保存在澳大利亚和美国的甘蔗属 2 个种和蔗茅属 11 个种进行了 rDNA (包括 26S + 18S 和 5S) 位点分子标记遗传多样性研究及其属种间遗传分类关系评价; Nair^[5] 利用 RAPD 分子标记对印度保存的“甘蔗属复合体”中 4 个属 9 个种进行了属种间系统分类关系研究; 美国的 Pan^[6] 对甘蔗栽培品种和野生种进行了 5S rRNA 间隔区 (5S rRNA intergenic spacers) PCR 检测, 分析评价了甘蔗品种与野生种的遗传关系。近年来, 我国甘蔗研究机构也相继利用分子标记技术进行了甘蔗种质资源遗传多样性等研究。范源洪等^[7-10] 利用 RAPD 标记技术对甘蔗及其近缘属、甘蔗细茎野生种进行了属种间遗传多样性研究, 通过核糖体 DNA 内转录间隔区 (ITS) 序列测定, 对甘蔗及其近缘属的系统演化和亲缘关系进行了分析, 并在一定程度上揭示了“甘蔗属复合体”内各属种间的遗传分类关系。新近发展起来的 AFLP (amplified fragment length polymorphisms) 分子标记技术, 是 RFLP 和 RAPD 的结合, 既有 RFLP 的可靠性, 又具有 RAPD 的方便性, 被认为是当前较有效的分子标记技术^[11-13], 但在“甘蔗属复合体”属种间的系统分类研究上未见报道。

本研究利用 AFLP 分子标记技术, 研究“甘蔗属复合体”属种间的系统分类和亲缘关系, 分析和评价甘蔗种质资源遗传多样性状况和水平, 并对斑茅、蔗

茅和滇蔗茅等野生近缘种的分类地位和遗传关系进行了分析探讨。

1 材料和方法

1.1 材料及来源

实验用“甘蔗属复合体”4 个属 16 个种共 69 份材料 (见表 1), 分别来自建立于云南省甘蔗研究所 (YSRI) 的“国家甘蔗种质资源圃”和澳大利亚昆士兰州甘蔗试验管理总局 (BSES), 主要包括: (1) 甘蔗属热带种 (*S. officinarum*)、中国种 (*S. sinense*)、印度种 (*S. barber*)、大茎野生种 (*S. robustum*) 和细茎野生种 (*S. spontaneum*) 及栽培品种 5 个种; (2) 蔗茅属斑茅 (*E. arundinaceus*)、蔗茅 (*E. fulvus*)、滇蔗茅 (*E. rockii*) 及 *E. elephantium*、*E. procerus*、*E. ravennae*、*E. bengalense* 和 *E. sarpet* 8 个种; (3) 芒属五节芒 (*M. floridulus*)、芒 (*M. sinensis*) 2 个种; (4) 河八王属河八王 (*N. porphyrocoma*) 1 个种及 1 个外群样本狼尾草属橡草 (*P. schumacheri*)。

1.2 DNA 的提取和纯化

新鲜叶片经液氮迅速冷冻后, 于冻干机中 -40℃ 冷冻干燥。冻干叶片用磨样机研磨成粉, 直接用于 DNA 提取或于 -20℃ 短期保存。DNA 的提取和纯化采用 CTAB 法^[14]。

1.3 AFLP 分析

AFLP 实验根据 Vos 方法^[15] 进行适当调整。经 *EcoR* 和 *Mse* 酶切后的 DNA 与 *EcoR* 和 *Mse* 特定接头连接, 通过 *EcoR* 和 *Mse* 引物 (含 1 个选择性核苷酸) 进行预扩增, 其反应条件为 94℃ 30 s, 56℃ 60 s, 72℃ 60 s, 20 个循环。稀释预扩增产物作为选择性扩增反应的模板, 以含 3 个选择性核苷酸的 *EcoR* 和 *Mse* 引物进行第二阶段扩增。反应前 *EcoR* 引物用 $-\text{[}^{33}\text{P]ATP}$ (2 500 Ci/mL) 在 T4 多核苷酸激酶的作用下进行末端磷酸化标记。PCR 反应程序为 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 60 s, 1 个循环, 然后以每循环复性温度逐级降低 0.7℃ 的梯度进行 12 个循环, 变性和延伸条件同上, 最后以 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 23 个循环结束。本实验全部反应在 Gene Amp^R PCR

System 2700 热循环仪上进行。扩增产物经 95 ℃ 变性后在 5 % 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。凝胶经

干燥后,固定在高敏度的 Kodak Biomax MR X 光胶片上进行放射自显影,冲洗胶片后用于结果分析。

表 1 研究材料属种名称及来源

Table 1 List of the materials used in the study

序号 No.	材料名称 Accession	种 名 Species name	来源 Source	序号 No.	材料名称 Accession	种 名 Species name	来源 Source
1	Q 96	Cultivar	BSES	36	Rockii 83/224	<i>E. rockii</i>	YSRI
2	Q117	Cultivar	BSES	37	Rockii 95/ 19	<i>E. rockii</i>	YSRI
3	TROJAN	Cultivar	BSES	38	Rockii 95/20	<i>E. rockii</i>	YSRI
4	NCO310	Cultivar	BSES	39	YN 82/ 53	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
5	66N2008	Cultivar	BSES	40	YN 82/ 69	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
6	POJ 2878	Cultivar	BSES	41	YN 82/ 85	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
7	Hong Luohan	<i>S. officinarum</i>	YSRI	42	YN 82/118	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
8	Badila	<i>S. officinarum</i>	BSES	43	YN 82/133	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
9	Korpi	<i>S. officinarum</i>	BSES	44	YN 82/143	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
10	Luohanzhe	<i>S. officinarum</i>	YSRI	45	YN 82/156	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
11	Songxi Bainianzhe	<i>S. sinense</i>	YSRI	46	YN 95/21	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
12	Guangxi Zhuzhe	<i>S. sinense</i>	YSRI	47	HN 92/ 84	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
13	Guilin Zhuzhe	<i>S. sinense</i>	YSRI	48	HN 92/ 85	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
14	Qianwei Luzhe	<i>S. sinense</i>	YSRI	49	HN 92/109	<i>E. arundinaceum</i> (China)	YSRI
15	Sichuan Luzhe	<i>S. sinense</i>	YSRI	50	IJ76-476	<i>E. arundinaceum</i> (Indonesia)	BSES
16	Uba	<i>S. sinense</i>	YSRI	51	IK76-22	<i>E. arundinaceum</i> (Indonesia)	BSES
17	Nagans	<i>S. barberi</i>	YSRI	52	IK76- 48	<i>E. arundinaceum</i> (Indonesia)	BSES
18	Pansahi	<i>S. barberi</i>	YSRI	53	IK76- 79	<i>E. arundinaceum</i> (Indonesia)	BSES
19	Nargori	<i>S. barberi</i>	YSRI	54	IS76-126	<i>E. arundinaceum</i> (Indonesia)	BSES
20	Mungo	<i>S. barberi</i>	YSRI	55	SES305	<i>E. elephantium</i>	BSES
21	IJ73-414	<i>S. robustum</i>	BSES	56	SES309	<i>E. procerus</i>	BSES
22	IJ76-352	<i>S. robustum</i>	BSES	57	US67-8-1	<i>E. ravennae</i>	BSES
23	IJ76-411	<i>S. robustum</i>	BSES	58	bengalense	<i>E. bengalense</i>	BSES
24	IJ 76-416	<i>S. robustum</i>	BSES	59	sarpet	<i>E. sarpet</i>	BSES
25	YN 75-1-7	<i>S. spontaneum</i>	YSRI	60	YN 95-9	<i>M. sinensis</i>	YSRI
26	Longchuan 16	<i>S. spontaneum</i>	YSRI	61	YN 95-10	<i>M. sinensis</i>	YSRI
27	Burma	<i>S. spontaneum</i>	BSES	62	YN 95-11	<i>M. sinensis</i>	YSRI
28	Coimbatore	<i>S. spontaneum</i>	BSES	63	YN 95-17	<i>M. sinensis</i>	YSRI
29	Djatirot	<i>S. spontaneum</i>	BSES	64	Wujiemang 82-122	<i>M. flori dulus</i>	YSRI
30	Gagahr-1286	<i>S. spontaneum</i>	BSES	65	YN 82/102	<i>N. porphyrocoma</i>	YSRI
31	IK 76-6	<i>S. spontaneum</i>	BSES	66	YN 83/199	<i>N. porphyrocoma</i>	YSRI
32	Mandalay	<i>S. spontaneum</i>	BSES	67	GD 25	<i>N. porphyrocoma</i>	YSRI
33	YN 97-3	<i>E. fulvus</i>	YSRI	68	GD 64	<i>N. porphyrocoma</i>	YSRI
34	YN 97-4	<i>E. fulvus</i>	YSRI	69	YN 82-21	<i>P. schumach</i>	YSRI
35	Rockii 82/ 93	<i>E. rockii</i>	YSRI				

1.4 数据分析

AFLP 标记以扩增条带出现的有(1)无(0)进行记录,所得数据用于计算 Jaccard(1908)相似系数,即 $G_{s_{ij}} = a / (a + b + c)$, $G_{s_{ij}}$ 是用来衡量两个体 i 与 j 的遗传相似性系数, a 为两个体的共享片段数, b 和 c 为 i 个体和 j 个体各自拥有的多态片段数。根据相似系数进行 UPGMA 聚类分析 (unweighted pair group method analysis) 和 PCA 主效应分析 (principal component analysis), 并构建系统树和效应图。分析软件为 NTSYS (Rohlf 1997)。

2 结果与分析

2.1 AFLP 分子标记多态性及相似系数

选用 2 对 AFLP 引物对 69 份材料进行了扩增

(图 1)。扩增产物条带清晰,共统计到 173 个扩增片段,研究材料个体间的多态片段数为 172 个,多态频率达 99.4%,多态程度较高。参试材料以种为类别进行归类后,统计到的种间特异片段 (species-specific bands) 数见表 2,173 个片段中有 52 个为种间特异片段,多态频率为 30.1%。各属的种间特异片段数从多到少依次为芒属 > 蔗茅属 > 河八王属 > 甘蔗属;在芒属中,五节芒的特异片段数最多,32 个位点中有 13 个为特异片段,多态频率为 40.6%,表明该种与其他种有较远的亲缘关系;在蔗茅属中,蔗茅和滇蔗茅的特异片段最多,与其他种存在较大的差异;而在甘蔗属中,中国种和大茎野生种特异片段数较多,多态频率分别为 2.7% 和 3.4%。

表2 参试材料种间 AFLP 片段总数、种特异片段数及多态频率
Table 2 Total number of markers and the species-specific markers detected by AFLP primers in each species

属名 Genus	种名 Species	标记数 Maker	引物 Primer		片段总数 Total marker number	多态频率 Frequency of polymorphism (%)
			AFLP1 (ACC/CTC)	AFLP2 (ACG/CTG)		
Saccharum	Cultivar	allele	29	34	63	0
		SSMs*	0	0	0	
	<i>S. officinarum</i>	allele	24	32	56	0
		SSMs	0	0	0	
	<i>S. sinense</i>	allele	37	37	74	2.7
		SSMs	2	0	2	
	<i>S. baberi</i>	allele	36	35	71	0
		SSMs	0	0	0	
	<i>S. robustum</i>	allele	26	33	59	3.4
		SSMs	0	2	2	
	<i>S. spontaneum</i>	allele	29	32	61	1.6
		SSMs	1	0	1	
Erianthus	<i>E. fulvus</i>	allele	12	13	25	16.0
		SSMs	3	1	4	
	<i>E. rockii</i>	allele	50	22	72	6.9
		SSMs	4	1	5	
	<i>E. arundinaceus</i>	allele	31	26	57	1.8
		SSMs	1	0	1	
	<i>E. elephantium</i>	allele	21	15	36	0
		SSMs	0	0	0	
	<i>E. procerus</i>	allele	27	17	44	0
		SSMs	0	0	0	
	<i>E. ravennae</i>	allele	23	15	38	0
		SSMs	0	0	0	
<i>E. bengalense</i>	allele	27	17	44	0	
	SSMs	0	0	0		
<i>E. sarpet</i>	allele	21	18	39	0	
	SSMs	0	0	0		
Miscanthus	<i>M. sinensis</i>	allele	33	16	49	26.5
		SSMs	11	2	13	
	<i>M. floridulus</i>	allele	20	12	32	40.6
		SSMs	10	3	13	
Narengar	<i>N. porphyrocoma</i>	allele	35	19	54	20.4
		SSMs	7	4	11	
Pennisetum	<i>P. schumach</i>	allele	15	7	22	0
		SSMs	0	0	0	
Total		allele	108	65	173	30.1
		SSMs	39	13	52	

注:SSMs代表种特异片段数。

Note:SSMs means the species-specific markers.

通过 0、1 矩阵转换计算所得的 Jaccard 相似系数见表 3。相似系数越大,亲缘关系越近;反之,亲缘关系越远。参试材料种间的相似系数最小为 0.06,最大为 0.93,平均为 0.3。

2.1.1 在甘蔗属内,热带种(*S. officinarum*)、中国种(*S. sinense*)种内个体间相似系数最大,分别为 0.82 和 0.83,表明这两个种遗传稳定性较高,种内的系统演化规律较为一致;细茎野生种(*S. spontaneum*)个体间的相似系数相对较小(0.68),种内遗传变异程度高,亲缘关系相对较远。比较种间情况,热带种与栽培品种的相似系数最大(0.77),而与细茎野生种相似系数最小(0.37),说明热带种与栽培品种的亲缘关系近于细茎野生种。

2.1.2 在蔗茅属中,印尼斑茅(*E. arundinaceus*

Indonesia)种个体间相似系数最大(0.93),中国斑茅(*E. arundinaceus* China)种稍小(0.79),表明印尼斑茅种内遗传变异较小,系统演化规律较一致。与其相比,中国斑茅种内遗传变异较大,遗传多样性较为丰富,但也具有一定的遗传稳定性(相似系数达 0.79)。从这两种斑茅间所具有的相似系数 0.79 来看,中国斑茅与印尼斑茅之间仍具有一定的同源性。比较蔗茅属内各种间的相似系数,*E. procerus* 与印度尼西亚斑茅的相似系数最大,为 0.80,与中国斑茅和 *E. sarpet* 均为 0.77,具有一定的系统演化规律。蔗茅(*E. fulvus*)和滇蔗茅(*E. rockii*)与其他 6 个种的相似系数均很小,最大相似系数仅可达 0.17,表明这 2 个种与斑茅及其他 5 个种之间存在较远的亲缘关系。

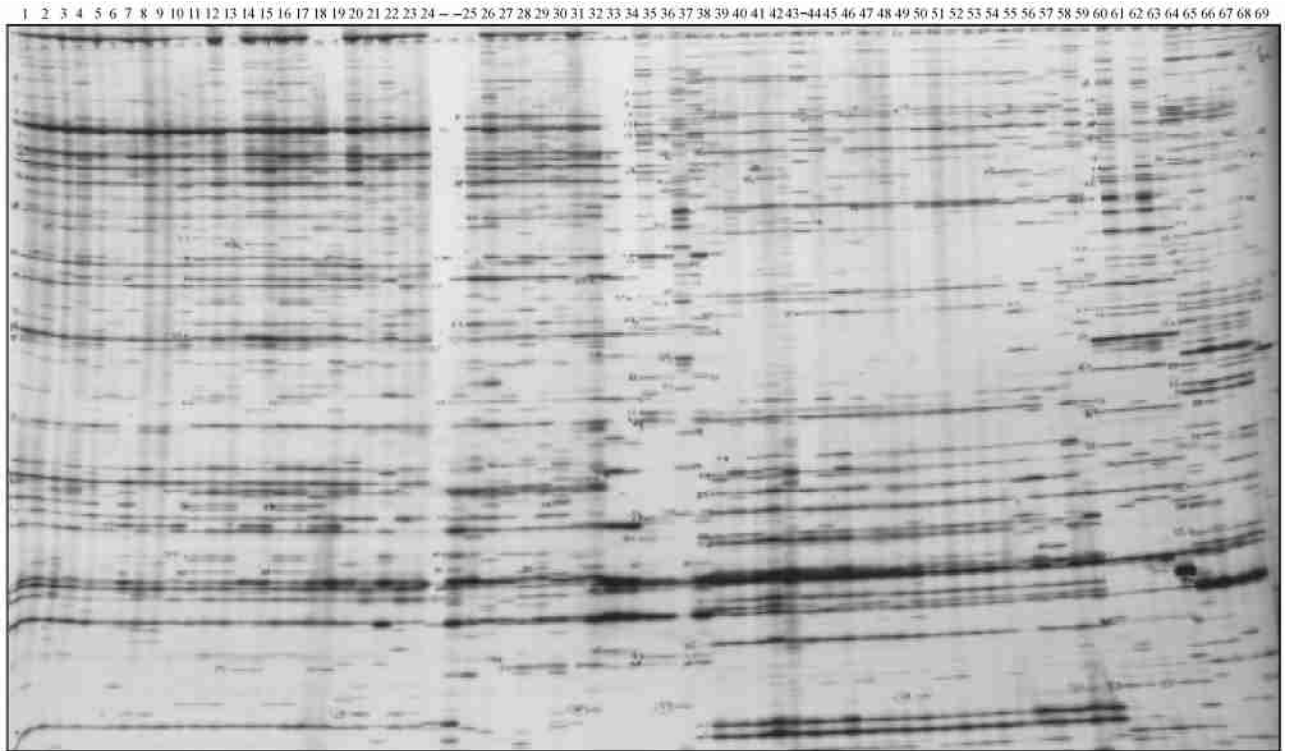


图 1 引物 (ACC/CTC) 的 AFLP 扩增产物电泳图
 Fig. 1 Amplification of AFLP primers (ACC/CTC) in the materials used in the study
 图中样品编号与表 1 一致。 Lane order is as listed in Table 1.

2.1.3 在芒属内,芒 (*M. sinensis*) 个体间的相似系数为 0.64,略高于与五节芒 (*E. floridulus*) 的相似系数 (0.58),表明该属内系统演化较为一致,但种内亲缘关系仍近于种间。

2.1.4 河八属河八王 (*N. porphyrocoma*) 种个体

间的相似系数为 0.76,具有一定的遗传演化稳定性。然而,该种与其他属种材料的遗传相似系数均较低,仅与滇蔗茅和 *E. elephantinus* 有 0.23 的相似性,可见该属、种在“甘蔗属复合体”中与其他属种的亲缘关系较远。

表 3 属种间相似系数计算值
 Table 3 Intra- and inter-specific similarities (Jaccard coefficient) using AFLP

	C	So	Ssi	Sb	Sr	Ss	Ef	Er	EaC	EaI	Ee	Ep	Era	Eb	Es	Ms	Mf	Np	Ps
Cultivar	0.81																		
<i>S. officinarum</i>	0.77	0.82																	
<i>S. sinense</i>	0.68	0.61	0.83																
<i>S. barberi</i>	0.70	0.62	0.74	0.78															
<i>S. robustum</i>	0.61	0.57	0.59	0.64	0.73														
<i>S. spontaneum</i>	0.46	0.37	0.51	0.55	0.49	0.68													
<i>E. fulvus</i>	0.17	0.16	0.17	0.19	0.21	0.25	0.88												
<i>E. rockii</i>	0.18	0.16	0.17	0.18	0.17	0.21	0.16	0.48											
<i>E. arundinaceus</i> (China)	0.11	0.12	0.10	0.11	0.12	0.11	0.14	0.16	0.79										
<i>E. arundinaceus</i> (Indonesia)	0.11	0.11	0.09	0.09	0.10	0.10	0.13	0.17	0.79	0.93									
<i>E. elephantinus</i>	0.10	0.10	0.09	0.08	0.10	0.10	0.13	0.16	0.60	0.72									
<i>E. procerus</i>	0.12	0.12	0.10	0.11	0.12	0.10	0.13	0.16	0.77	0.80	0.70								
<i>E. ravennae</i>	0.12	0.13	0.10	0.12	0.14	0.10	0.15	0.15	0.60	0.65	0.76	0.71							
<i>E. bengalense</i>	0.10	0.10	0.10	0.11	0.12	0.11	0.13	0.17	0.75	0.68	0.57	0.76	0.61						
<i>E. sarpet</i>	0.12	0.13	0.10	0.12	0.12	0.10	0.17	0.17	0.71	0.73	0.63	0.77	0.67	0.69					
<i>M. sinensis</i>	0.13	0.11	0.14	0.14	0.14	0.14	0.11	0.21	0.11	0.10	0.11	0.12	0.12	0.13	0.13	0.64			
<i>M. floridulus</i>	0.09	0.09	0.11	0.11	0.11	0.10	0.10	0.16	0.12	0.09	0.10	0.12	0.13	0.15	0.13	0.58			
<i>N. porphyrocoma</i>	0.14	0.12	0.13	0.14	0.14	0.13	0.15	0.23	0.20	0.19	0.23	0.18	0.17	0.21	0.21	0.18	0.15	0.76	
<i>P. schumach</i>	0.06	0.06	0.06	0.08	0.07	0.09	0.11	0.14	0.15	0.15	0.16	0.16	0.15	0.16	0.15	0.15	0.18	0.21	

Notes: C = Cultivar, So = *S. officinarum*, Ssi = *S. sinense*, Sb = *S. barberi*, Sr = *S. robustum*, Ss = *S. spontaneum*, Ef = *E. fulvus*, Er = *E. rockii*, Ea = *E. arundinaceus*, Ee = *E. elephantinus*, Ep = *E. procerus*, Era = *E. ravennae*, Eb = *E. bengalense*, Es = *E. sarpet*, Ms = *M. sinensis*, Mf = *M. floridulus*, Np = *N. porphyrocoma*, Ps = *P. schumach*. The same below.

2.2 聚类分析

2.2.1 以UPGMA法构建的分子系统树 基于 Jaccard 相似系数所构建的 AFLP 分子系统树如图 2 所示,所有研究材料分别聚在两个大的类群中,即由

甘蔗属、蔗茅属蔗茅和芒属组成的类群 1,由蔗茅属、河八王属及外群所组成的类群 2,两者间相似系数为 0.12。

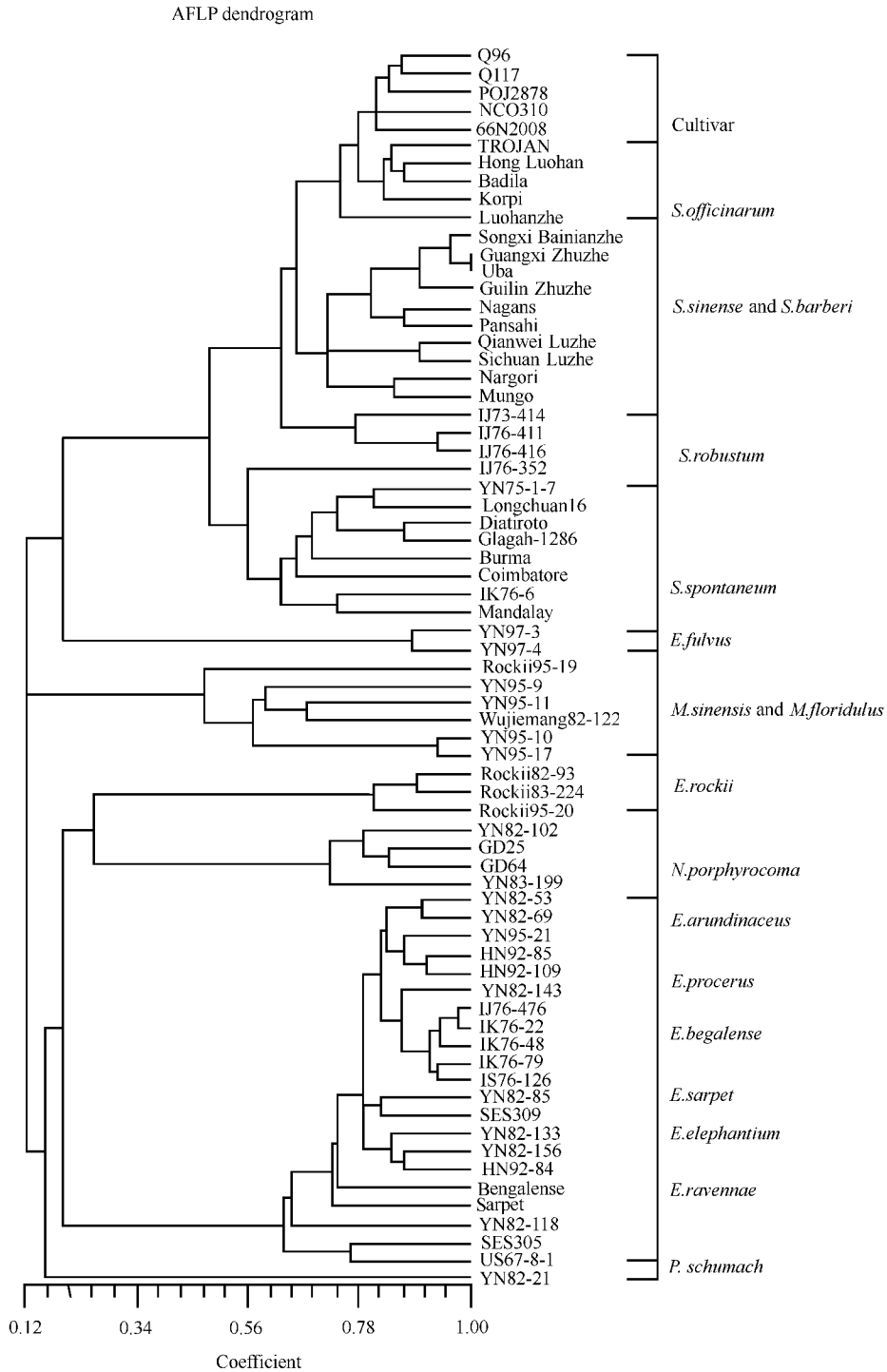


图 2 通过 Jaccard 相似系数和聚类法构建的 AFLP 分子系统树

Fig. 2 Dendrogram obtained using the Jaccard similarity coefficient and UPGMA clustering method on AFLP data

类群 1 包括 2 个组群,以甘蔗属为主的组群 1 和以芒属种为主构成的组群 2 (>0.12)。组群 1 中包含甘蔗属枝系和蔗茅种枝系,两者间相似系数为 0.20;在甘蔗属枝系中,细茎野生种首先分离出来,形成一个相对独立的分枝,另一分枝则包含栽培型种(原种、品种)和大茎野生种,其中热带种和栽培品种聚在一起,中国种和印度种聚在一起,大茎野生种则与上述 4 种分离,形成自己独立的分枝。组群 2 包含芒属的芒和五节芒 2 个种,以及一个滇蔗茅材料,有关该材料的分属问题有待进一步研究。

类群 2 中,外群材料橡草首先被分离出来,其他材料则分为明显的 2 个组群。组群 1 由河八王属与滇蔗茅构成,相似系数为 0.26;组群 2 由蔗茅属各种构成(相似系数 0.63),其中,由斑茅与 *E. sarpet*、*E. procerus*、*E. bengalense* 3 个种组成分枝 1,其同源性大小依次为 *E. procerus* > *E. bengalense* > *E. sarpet*;由 *E. elephantinus* 与 *E. ravennae* 组成分枝 2,两者亲缘关系较近,相似系数高达 0.78。所有参试的斑茅种材料均聚在一起,其中印尼斑茅自聚为一枝,与中国斑茅相对分开。

上述结果表明:(1)甘蔗属与其近缘属之间的系统演化和亲缘关系从近到远依次为甘蔗属—芒属—

河八王属—蔗茅属;(2)甘蔗属中,热带种与其他种之间的亲缘关系从近到远依次为热带种—栽培品种—中国种和印度种—大茎野生种—细茎野生种;(3)蔗茅属中,斑茅与其他种之间的亲缘关系从近到远依次为斑茅(*E. arundinaceus*)—*E. procerus*—*E. bengalense*—*E. sarpet*—*E. elephantinus*—*E. ravennae*;(4)两个在传统分类学上被列为蔗茅属的种蔗茅和滇蔗茅都没有聚到蔗茅属类群中,而以各自相对独立的分枝位于系统树中不同的位置,蔗茅与甘蔗属亲缘关系较近,与芒属亲缘关系次之,与蔗茅属和河八王属关系较远;滇蔗茅与河八王属亲缘关系较近,与蔗茅属关系次之,与甘蔗属和芒属关系较远。有关这两个种的分类归属,是今后进一步研究的重要课题。

2.2.2 主效应(PCA)分析构建的分子效应图

基于 Jaccard 系数,应用 PCA (principal component analysis) 法对 AFLP 分子标记结果进行了主效应分析,所构建的分子效应图显示了不同属、种材料的分类位置(图 3)。所有甘蔗属材料集中在一个区域,形成独立的群体,亲缘关系较为紧密;细茎野生种(*Ss*)、大茎野生种(*Sr*)材料分别聚为各自相对集中的小区域,而中国种(*Ssi*)和印度种(*Sb*)相互有所交

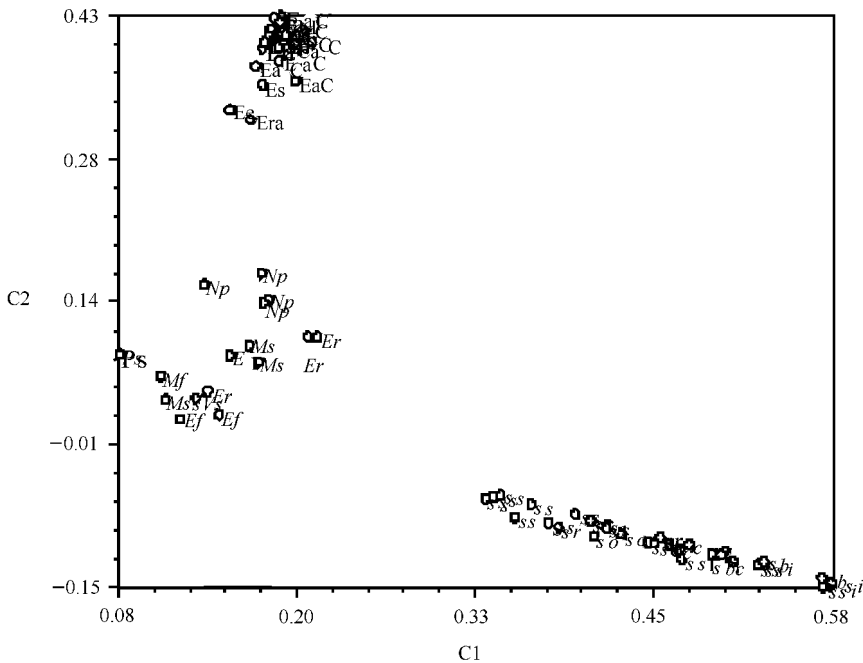


图 3 AFLP 主效应分析图

Fig. 3 Principal component analysis using both AFLP data

C = 栽培品种, So = 热带种, Ss = 细茎野生种, Sr = 大茎野生种, Sb = 印度种, Ssi = 中国种, EaC = 中国斑茅, Ea = 印度尼西亚斑茅, Ep = *E. procerus*, Er = 滇蔗茅, Ef = 蔗茅, Ee = *E. elephantinum*, Era = *E. ravennae*, Eb = *E. bengalense*, Es = *E. sarpet*, Ms = 芒, Mf = 五节芒, Np = 河八王, Ps = 象草。

C = Cultivar, So = *S. officinarum*, Ss = *S. spontaneum*, Sr = *S. robustum*, Sb = *S. barberi*, Ssi = *S. sinense*, Ea = *E. arundinaceus*, Ep = *E. procerus*, Er = *E. rockii*, Ef = *E. fulvus*, Ee = *E. elephantinum*, Era = *E. ravennae*, Eb = *E. bengalense*, Es = *E. sarpet*, Ms = *M. sinensis*, Mf = *M. floridulus*, Np = *N. porphyrocoma*, Ps = *P. schumacheri*.

又,热带种(*So*)和栽培品种(*C*)则相对集中。另一结构紧密的区域为蔗茅属区域,斑茅(中国斑茅 *EaC*, 印尼斑茅 *Ea*)与蔗茅属的5个种(*Ep*, *Eb*, *Es*, *Ee*, *Era*)集中在一起,与上述甘蔗属区域相隔较远。图中还显示,芒属(*Mf*和*Ms*)、河八王属(*Np*)及蔗茅属的蔗茅(*Ef*)、滇蔗茅(*Er*)以较松散的结构聚在一个区域,位于甘蔗属区域和蔗茅属区域之间。分子效应图分析结果与分子系统树的分析结果一致。

3 讨论

甘蔗属、蔗茅属、芒属、河八王属和硬穗属组成“甘蔗属复合体”的概念,已被国内外甘蔗界所接受,“复合体”内所包含的属种,也成为甘蔗种质资源收集保存和研究的主要对象。然而,国内外在对几个属种的分类问题上仍存在不一致的看法,对开展研究及国际间交流造成了较大影响。首先是斑茅的归属,国外甘蔗界已普遍公认是蔗茅属的一个种(*E. arundinaceus*)^[16,17];而在我国,根据1997年出版的中国植物志,斑茅则被归在甘蔗属中(*Saccharum arundinaceum*)。其次,根据分类,在蔗茅属 *Ripidium* 组(*Erianthus* sect. *Ripidium*)的6个种中并不包含原产于我国的蔗茅(*E. fulvus* Nee ex Steud = *E. rufipilus*)和滇蔗茅(*E. rockii* Keng)2个种,Grassl曾建议将它们归入芒属和油芒属(*Eccoilopus*)^[18],但关于这两个种的分类问题国内外仍不统一。萧凤迥对滇蔗茅和蔗茅的形态及同工酶进行了分析研究,结果显示滇蔗茅和蔗茅的差异较大,并认为在分类研究中不应该将其作为蔗茅属的代表种^[19]。由此可见,利用国外不同的蔗茅属、种作为参照来进行斑茅、蔗茅属种的遗传分类研究十分必要。本研究首次将我国特有的蔗茅、滇蔗茅,与国外蔗茅属的5个种(*Ripidium*组中4个种及*E. sarpet*)以及中国斑茅、印尼斑茅作为蔗茅属的研究材料,加上甘蔗属、芒属、河八王属共16个种的材料,利用AFLP分子标记技术,较为系统地进行了“甘蔗属复合体”属种间的系统演化和亲缘关系研究,分析得出了以下重要结论。

3.1 属间遗传关系

甘蔗属与芒属的亲缘关系较近,与河八王属和蔗茅属的亲缘关系较远,而河八王属与蔗茅属具有较近的亲缘关系。

3.2 甘蔗属内种间遗传关系

3.2.1 栽培品种与热带种亲缘关系较近,这与甘蔗

“高贵化”育种过程中不断回交增加了热带种血缘有关。

3.2.2 中国种和印度种关系较为密切,2个种的个体材料间有相互渗透的现象。据记载^[20],这两个种是由杰维斯(Jeswiet J)将巴勃(Baber CA)分类的5组印度甘蔗进行重新划分后,分别定名为*S. baberi*(印度种)和*S. sinense*(中国种)而形成的,但其代表性材料在形态上的差异并不太多,从事植物分类和细胞学研究的人主张合并为1个种。因此,有关这两个种的分类问题存在一些争论。在Nair的RAPD标记技术研究中^[5],印度种、中国种也聚为一个独立分歧,与本研究所得的结果一致。

3.2.3 大茎野生种与上述4个种的亲缘关系比与细茎野生种的关系近,即由热带种、中国种、印度种、大茎野生种组成的一组栽培型原种,与野生型原种细茎野生种构成了2个相对独立的组群。法国的Glaszmann采用生化遗传标记—同工酶技术对甘蔗属内热带种、大茎野生种、细茎野生种及蔗茅属材料的研究结果表明,细茎野生种与大茎野生种和热带种分离,而后两者之间没有彼此分开,这与美国的Tanksley和Irvine等^[21]利用核糖体DNA、叶绿体DNA和线粒体DNA进行RAPD、RFLP等研究所提出的观点一致,可将甘蔗属分为2组,即细茎野生种为1组,其余甘蔗属种为1组。

3.3 蔗茅属内种间遗传关系

无论是中国斑茅(云南、海南)还是印尼斑茅,与蔗茅属其他种都有很近的亲缘关系,与*Ripidium*组4个种及*E. sarpet*种构成明显的同一类群;斑茅与*E. procerus*的关系最近,与*E. bengalense*和*E. sarpet*种次之;同时,斑茅与这3个种之间的亲缘关系又近于与*E. elephantinus*和*E. ravennae*的关系,后两者之间也自聚为一族。该结果与作者进行的SSR研究结果相同(另文报道)。Daniels和Roach认为,斑茅与*E. procerus*的关系最近;Pesse的RFLP研究结果也证实了斑茅与*E. procerus*和*E. bengalense*都有较近的亲缘关系,同时*E. sarpet*与*E. procerus*都被检测到有相同的核糖体单位(ribosomal unit)。此外,Vijayalakshmi^[22]和Pesse的研究都显示,*E. elephantinus*和*E. ravennae*的关系极近,*E. elephantinus*甚至被认为可能是*E. ravennae*的一个变种。本研究再一次证明,斑茅应列入蔗茅属中,建议我国甘蔗学者采纳国外分类命名(*E. arundinaceus*),以能更好地开展斑茅的研究和杂交育种利用,并与国际接轨。

3.4 蔗茅种(*E. fulvus*)和滇蔗茅种(*E. rockii*)的分类

研究所用的蔗茅种和滇蔗茅种没有聚类到蔗茅属类群中,而是以各自相对独立的分枝分别位于系统树的2个不同的大枝系上,蔗茅种与甘蔗属亲缘关系较近(相似系数0.20),与芒属亲缘关系次之(相似系数 >0.12),与蔗茅属和河八王属关系较远(相似系数0.12);而滇蔗茅与河八王属具有较近的亲缘关系(相似系数0.25),与蔗茅属关系次之(相似系数 <0.20),与甘蔗属和芒属关系较远(相似系数0.12)。在开展对蔗茅属杂交后代鉴定研究中(另文报道),当对所有蔗茅属种材料的5S rDNA进行PCR检测时,滇蔗茅不产生所有蔗茅属种(包括斑茅种)共有的种特异标记(该标记已被证实是鉴定蔗茅属杂交后代的特异标记^[23,24])。由此可见,蔗茅和滇蔗茅分属遗传关系较远的两个群体,不应归入同一个属;本研究结果还提示,滇蔗茅(*rockii*)可能应该归入河八王属,蔗茅(*fulvus*)可能应该归入甘蔗属。这与陈辉、范源洪等^[10]对核糖体DNA内转录间隔区(ITS)所做的序列测定分析结果一致。

综上所述,本研究初步阐明了甘蔗属内种间的系统分类和亲缘关系;基于中国斑茅与国外5个蔗茅属内种间的比较及其分子分类依据,明确提出了斑茅应该列入蔗茅属,而蔗茅和滇蔗茅不该归入同一个属,更不能作为蔗茅属的特征种来进行分类研究和利用,至于蔗茅和滇蔗茅的分类地位,需要进一步研究确定。

致谢:本研究在澳大利亚联邦科学与工业研究组织(CSIRO)植物研究中心(PI)Long Pocket实验室完成。来自YSRI的研究材料,在采样和前处理过程中得到陈辉、马丽、王丽萍等同事的支持和协助,在此表示衷心感谢!

References

- [1] Mukherjee S K. Origin and distribution of *Saccharum*. *Bot Gaz*, 1957, **119**:55 - 61
- [2] Daniels J, Roach B T. Taxonomy and evolution. In: Heinz D J ed. *Sugarcane Improvement through Breeding*. New York: Elsevier, 1987. 7 - 84
- [3] Besse P, McIntyre C L, Berding N. Ribosomal DNA variations in *Erianthus*, a wild sugarcane relative (*Andropogoneae-Saccharinae*). *Theor Appl Genet*, 1996, **92**:733 - 743
- [4] Besse P, McIntyre C L, Berding N. Characterisation of *Erianthus* sect. *Ripidium* and *Saccharum* germplasm (*Andropogoneae-Saccharinae*) using RFLP markers. *Euphytica*, 1997, **93**:283 - 292
- [5] Nair N V, Nair S, Sreenivasan T V, Mohan M. Analysis of genetic diversity and phylogeny in *Saccharum* and related genera using RAPD markers. *Genetic Res Crop Evol*, 1999, **46**:73 - 79
- [6] Pan Y B, Burner D M, Legendre B L. An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers. *Genetica*, 2000, **108**:285 - 295
- [7] Fan Y-H(范源洪), Chen H(陈辉), Shi X-W(史宪伟), Cai Q(蔡青), Zhang M(张明), Zhang Y-P(张亚平). RAPD analysis of *Saccharum spontaneum* from different ecosppecific colonies in Yunnan. *Acta Botanica Yunnanica* (云南植物研究), 2001, **23**(3):298 - 308 (in Chinese with English abstract)
- [8] Chen H(陈辉), Fan Y-H(范源洪), Shi X-W(史宪伟), Cai Q(蔡青), Zhang M(张明), Zhang Y-P(张亚平). Research on genetic diversity and systemic evolution in *Saccharum spontaneum* L. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2001, **27**(5):645 - 652 (in Chinese with English abstract)
- [9] Cai Q(蔡青), Fan Y-H(范源洪), Su B(宿兵), Zhang Y-P(张亚平). Study on classification of *Saccharum* species with RAPD. In: *Disquisition Collections in 9th Conference of Sugarcane Association in China*(中国作物学会甘蔗协会第九次学术讨论会论文集). Yunnan, China, 2000. 46 - 51 (in Chinese)
- [10] Chen H(陈辉), Fan Y-H(范源洪), Xiar-Yu J-G(向余颈攻), Cai Q(蔡青), Zhang Y-P(张亚平). Phylogenetic relationships of *Saccharum* and related species inferred from sequence analysis of the nrDNA ITS region. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 2003, **29**(3):379 - 385 (in Chinese with English abstract)
- [11] Wang B(王斌). AFLP principium and its utilization in biological molecular maker in plant. In: *Green Gene for 21st Century* (走向21世纪的植物分子生物学). Beijing: Chinese Science and Technology Press, 2000. 348 - 358 (in Chinese)
- [12] Hill M, Witsentoe H, Zabeau M, Vos P, Kesseli R, Michelmore R. PCR-based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in *Lactuca* spp. *Theor Appl Genet*, 1996, **93**:1202 - 1210
- [13] Besse P, Taylor G, Carrol B, Berding N, Burner D, McIntyre C L. Assessing genetic diversity in a sugarcane germplasm collection using an automated AFLP analysis. *Genetica*, 1998, **104**:143 - 153
- [14] Hoisington D A. Laboratory Protocols. CIMMYT applied molecular genetics laboratory. Mexico D F: CIMMYT, 1992
- [15] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijmans M, Van Der Lee T, Hornes M. AFLP: a new concept for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**:4407 - 4414
- [16] Zhou Y-H(周耀辉). Study on the position of *arundinaceus*. *Sugarcane and Canesugar*(甘蔗糖业), 1989, **6**:4 - 6 (in Chinese)
- [17] Heinz K J. Report of the Standing Committee on Germplasm and Breeding. In: Proc. of the XVII Congress of the ISSCT. Philippines, 1980. LIV-LVI
- [18] Lin Y-X(林约西). Issues on names for *Saccharum* and relative plants. *Sugarcane* (甘蔗), 1989, **89**(1):25 - 35 (in Chinese)
- [19] Xiao F-H(萧凤迥). Comparison between the *E. arundinaceus* and some species under *Saccharum* and *Erianthus* on the plant morphology and isozyme. *Sugarcane*(甘蔗), 1994, **1**(1):22 - 27 (in Chinese with English abstract)
- [20] Luo J-X(骆君骥). *Theory of Sugarcane* (甘蔗学). Beijing: Chinese Light Industry Press, 1992. 38 - 47 (in Chinese)
- [21] Chen R-K(陈如凯). *Theory and Practice in Modern Sugarcane Breeding* (现代甘蔗育种的理论与实践). Beijing: China Agriculture Press, 2003. 19 - 47 (in Chinese)
- [22] Vijayalakshmi U, Rao J T. Phytosterols in the leaves of *Saccharum* and allied genera. *Proc Int Soc Sugar Cane Technol*, 1963, **11**:578 - 582
- [23] D'Hont A, Rao P S, Feldmann P, Grivet L. Identification and characterisation of sugarcane intergeneric hybrids, *Saccharum officinarum* × *Erianthus arundinaceus*, with molecular markers and DNA in situ hybridisation. *Theor Appl Genet*, 1995, **91**:320 - 326
- [24] Piperidis G, Christopher M J, Carroll B J, Berding N, D'Hont A. Molecular contribution to selection of intergeneric hybrids between sugarcane and the wild species *Erianthus arundinaceus*. *Genome*, 2000, **43**:1033 - 1036