

# 基于 AFLP 标记的河八王种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建

刘昔辉<sup>1,2</sup> 张荣华<sup>2</sup> 张革民<sup>2</sup> 周 会<sup>2</sup>  
宋焕忠<sup>2</sup> 方位宽<sup>2</sup> 区惠平<sup>2</sup> 杨丽涛<sup>1,2</sup> 李杨瑞<sup>1,2</sup>

1. 广西大学农学院, 南宁 530004;

2. 广西甘蔗遗传改良重点实验室/中国农业科学院甘蔗研究中心/

广西农业科学院甘蔗研究所/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** 以广西地区的 15 份河八王无性系为材料, 采用 AFLP 标记结合毛细管电泳进行分析, 计算多态性引物的总扩增条带数、多态性条带数和多态性条带比率。进行遗传相似系数和 UPGMA 聚类分析, 并建立分子身份证。25 对 AFLP 引物组合在 15 份河八王种质资源中共扩增出 2 208 个位点, 其中多态性位点 1 914 个, 多态性比率(PPB)为 87.11%。UPGMA 聚类分析表明, 供试的 15 份河八王种质资源其遗传相似系数变化范围在 0.656~0.878, 在相似系数为 0.706 时, 可划分为 3 个类群。结合特征带和不同引物组合方法可有效建立河八王种质资源特异分子身份证, 置信概率达到 99.99%。所供试河八王种质具有较丰富的遗传多样性水平, 基于 3 对 AFLP 引物组合 104 条谱带构建的 15 份河八王种质分子身份证具有唯一性, AFLP 标记是在分子水平上鉴定河八王种质的有效方法。

**关键词** 河八王; 种质资源; 遗传多样性; AFLP 标记; 分子身份证

**中图分类号** S 566.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0007-07

甘蔗是我国最主要的糖料作物, 蔗糖产量占全国食糖总产量的 90% 以上。在数十年甘蔗“高贵化”育种进程中, 造成亲本主要含有热带种、细茎野生种和印度种 3 种血缘, 遗传基础较为狭窄, 加大了突破性品种的选育难度。利用甘蔗野生资源来拓宽亲本的遗传基础被认为是甘蔗育种获突破的关键途径之一。河八王 [*Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor] 属于甘蔗野生种, 又名草鞋密, 原产亚洲, 在我国主要分布在长江以南各省山地的瘦瘠地区, 具有耐瘦、耐旱、粗生、早熟、分蘖力强等优良性状<sup>[1]</sup>。收集河八王种质资源并进行遗传多样性分析, 可为河八王种质资源开发、保存利用及甘蔗种质创新提供理论基础。国内外对河八王的研究很少, 仅见利用其进行杂交获得 F<sub>1</sub> 的相关研究<sup>[2-6]</sup>。近年来, SSR、EST-SSRs、ISSR、AFLP、ScoT 等分子标记技术在研究遗传多样性、后代鉴定及遗传分析、图

谱构建等方面已有较多运用<sup>[7-14]</sup>。如咎逢刚等<sup>[7]</sup>利用 AFLP 标记进行了 98 份国内外甘蔗种质资源遗传多样性分析; Kalwade 等<sup>[8]</sup>利用 EST-SSRs 标记进行了甘蔗基因单链构象多态性分析; Sharma 等<sup>[9]</sup>利用 SSR 标记进行了 40 份甘蔗栽培种遗传多样性分析; Cai 等<sup>[10]</sup>利用 AFLP 标记进行了斑茅遗传多样性分析; 罗霆等<sup>[11]</sup>利用 SCoT 标记构建了割手密遗传图谱; 刘昔辉等<sup>[12]</sup>利用 SSR 和 SRAP 标记进行了斑茅与割手密后代的鉴定和遗传分析。近年来, 国内外利用分子标记对甘蔗栽培种或甘蔗野生资源进行遗传多样性分析虽然较多, 但是关于河八王种质资源收集、遗传多样性分析及分子身份证构建研究, 目前尚未见相关报道。本研究结合 AFLP 标记和毛细管电泳技术, 对广西河八王种质资源进行遗传多样性分析, 并通过构建分子身份证, 初步建立基于分子水平的河八王识别体系, 旨在为今后更

收稿日期: 2016-03-31

基金项目: “863”计划项目(2013AA102604); 国家自然科学基金项目(31101195, 31360357); 国际合作项目(2013DFA31600); 广西基金项目(2012GXNSFBA053048, 2014GXNSFBA118118, 桂科合 14123001-1-4); 广西农科院基金项目(桂农科 2012YZ10, 2013JQ14); 广西“八桂学者”和特聘专家专项(2013)

刘昔辉, 博士研究生, 副研究员。研究方向: 甘蔗种质资源创新利用。E-mail: xihuilu2006@126.com

通信作者: 李杨瑞, 博士, 教授。研究方向: 甘蔗遗传育种。E-mail: liyr@gxaas.net

好地研究和利用河八王种质资源提供理论依据,也为利用割手密、斑茅等野生资源进行甘蔗的遗传改良提供有益参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

从广西不同气候、不同生态地区采集河八王无性系 15 份(表 1),同时测量采集点海拔和经纬度。

表 1 供试河八王无性系的名称及来源

Table 1 Names and resources of tested *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor. clones

序号 NO.	名称 Name	产地 Origin	海拔/m Altitude	纬度/(°) Latitude(N)	经度(°) Longitude(E)	生境 Biotype
1	广西河 1 GXhe 1	广西 Guangxi	/	/	/	不详 Unknown
2	广西河 2 GXhe 2	广西 Guangxi	/	/	/	不详 Unknown
3	灵川 1 Lingchuan 1	广西桂林灵川县五里排 Wulipai, Lingchuan County, Guilin, Guangxi	201	25.36	110.23	半山荒岭 Mid-level wilderness
4	灵川 2 Lingchuan 2	广西桂林灵川县五里排 Wulipai, Lingchuan County, Guilin, Guangxi	197	25.25	110.20	半山荒岭 Mid-level wilderness
5	灵川 3 Lingchuan 3	广西桂林市灵川县横岭 Hengling, Lingchuan County, Guilin, Guangxi	197	25.60	109.11	半山荒岭 Mid-level wilderness
6	灵川 4 Lingchuan 4	广西桂林灵川县横岭 Hengling, Lingchuan County, Guilin, Guangxi	197	25.70	109.22	半山荒岭 Mid-level wilderness
7	灵川 5 Lingchuan 5	广西桂林灵川县 Lingchuan County, Guilin, Guangxi	176	25.65	109.18	荒岭 Wilderness
8	三河 1 Sanhe 1	广西柳州融水县三河村 Sanhe Village, Rongshui County, Liuzhou, Guangxi	118	25.30	109.22	山脚荒地 Low-level wilderness
9	三河 2 Sanhe 2	广西柳州融水县三河村 Sanhe Village, Rongshui County, Liuzhou, Guangxi	118	25.20	109.12	山脚荒地 Low-level wilderness
10	三河 3 Sanhe 3	广西柳州融水县三河村 Sanhe Village, Rongshui County, Liuzhou, Guangxi	117	25.20	109.12	山脚荒地 Low-level wilderness
11	三河 4 Sanhe 4	广西柳州融水县三河村 Sanhe Village, Rongshui County, Liuzhou, Guangxi	140	25.30	109.12	山顶荒地 Hilltop wilderness
12	三河 5 Sanhe 5	广西柳州融水县三河村 Sanhe Village, Rongshui County, Liuzhou, Guangxi	101	25.30	109.13	山脚荒地 Low-level wilderness
13	永福 1 Yongfu 1	广西桂林永福县 Yongfu County, Guilin, Guangxi	302	24.59	109.40	半山上灌丛 Mid-level bushes
14	融安 1 Rong'an 1	广西柳州融安县浮石 Fushi, Rong'an County, Liuzhou, Guangxi	188	25.7	109.22	山坡荒地 Hill wilderness
15	霍家村 1 Huojiajun 1	广西柳州融水县霍家村 Huojia Village, Rongshui County, Liuzhou, Guangxi	375	25.40	109.27	山顶荒地 Hilltop wilderness

E-F: 5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'、E-R: 5'-AATTGGTACGCAGTC-3'和 M-F: 5'-GACGAT-GAGTCCTGAG-3'、M-R: 5'-TACTCAGGACT-CAT-3');对连接产物进行预扩增(引物 E-P: 5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'; M-P: 5'-GAT-GAGTCCTGAGTAAC-3'),反应体系为:总体积 25  $\mu\text{L}$ ,每管含  $10\times\text{PCR buffer } 2.5 \mu\text{L}$ 、30 ng/ $\mu\text{L}$  模板 DNA 2  $\mu\text{L}$ 、dNTPs 0.5  $\mu\text{L}$ 、Pre-ampmix 1  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA polymease 1.5 U。预扩增反应程序为:预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,56  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  80 s,30 个循环;对预

### 1.2 基因组 DNA 提取

以河八王材料幼嫩叶片为材料,SDS 法<sup>[15-16]</sup>提取基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测纯度,低温保存。

### 1.3 AFLP 扩增及毛细管电泳检测

AFLP 扩增采用 Vos 等<sup>[17]</sup>的方法,并适当调整。先用 *Eco*R I 和 *Mse* I 限制性内切酶进行 DNA 酶切;对获得的酶切片段两端连接人工接头(引物为

扩增产物进行选择性的扩增,反应体系为:总体积 25  $\mu\text{L}$ ,每管含  $10\times\text{PCR buffer } 2.5 \mu\text{L}$ 、预扩增稀释样品 2  $\mu\text{L}$ 、dNTPs 0.5  $\mu\text{L}$ 、*Eco*R I 引物 1  $\mu\text{L}$ 、*Mse* I 引物 1  $\mu\text{L}$ 、*Taq* DNA polymease 0.5 U。选择性扩增反应程序为:第 1 轮扩增参数预变性 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,65  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  80 s,以后每轮循环退火温度递减 0.7  $^{\circ}\text{C}$ ,扩增 14 轮,接着按 94  $^{\circ}\text{C}$  30 s,55  $^{\circ}\text{C}$  30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  80 s,23 个循环结束。反应在德产 EPCRp-pendorf Master Cycle Gradient 上进行。实验所用 AFLP 引物的上游序列 5'端均进行 FAM 荧光标

记,然后与下游引物配对(未进行荧光标记),共配对 95 °C 变性 10 min 后进行毛细管电泳检测,由上海成 25 对引物组合进行扩增。选择性扩增产物经 生工完成。

表 2 AFLP 标记选择性扩增引物序列

Table 2 The sequences of selective amplification primers for AFLP marker

编号 Code	正向引物 Forward primers (5'-3')	荧光标记 F labeling	编号 Code	反向引物 Reverse primers (5'-3')
<i>EcoR</i> I-1	GAC TGC GTA CCA ATT CAAC	FAM	<i>Mse</i> I-1	GAT GAG TCC TGA GTA ACAC
<i>EcoR</i> I-2	GAC TGC GTA CCA ATT CAAG	FAM	<i>Mse</i> I-2	GAT GAG TCC TGA GTA ACAG
<i>EcoR</i> I-3	GAC TGC GTA CCA ATT CACA	FAM	<i>Mse</i> I-3	GAT GAG TCC TGA GTA ACAT
<i>EcoR</i> I-4	GAC TGC GTA CCA ATT CACC	FAM	<i>Mse</i> I-4	GAT GAG TCC TGA GTA ACTA
<i>EcoR</i> I-5	GAC TGC GTA CCA ATT CACG	FAM	<i>Mse</i> I-5	GAT GAG TCC TGA GTA ACTC

1.4 数据统计分析

毛细管电泳检测结果采用 Gene Marker version 4.2 (Applied Biosystems, USA) 软件进行统计分析,设置扩增片段的范围、长度及大小等信息对每个分离位点进行人工矫正,有带记为“1”,无带记为“0”。计算总扩增条带数、多态性条带数和多态性条带比率。把得到的二维数字矩阵通过 NTSYS pc-V.2.1 软件,进行 Jaccard 遗传相似性系数和 UPGMA 聚类。从 25 对引物组合筛选波峰清晰、多态性好且分布较均匀的引物组合,构建河八王数字指纹图谱,根据概率公式  $P = 1/2^n$  计算图谱的置信概率。

片段大小选择 80~400 bp,共检测到位点 2 208 个,其中多态性位点 1 914 个,多态性检出率为 87.11%,显示 AFLP 标记在河八王种质资源遗传多样性研究中具有高效性。各引物组合多态性变幅为 16.09%~100%。多态性最低的是引物 *EcoR* I-1/*Mse* I-3 组合,为 16.09%。每对引物组合检测位点数范围 34~123 个,平均为 88 个,其中多态性位点范围 14~111 个,平均为 77 个。总位点数和多态性位点数最多的引物组合分别是 *EcoR* I-1/*Mse* I-4 和 *EcoR* I-1/*Mse* I-2,位点数分别为 123 个和 111 个(表 3)。

2 结果与分析

2.2 河八王无性系间遗传相似性系数

2.1 多态性分析

参试的 15 份材料中,遗传相似系数在 0.656~0.878 之间,平均为 0.706。遗传相似系数最高是广西河 2 和灵川 5,为 0.878;遗传相似系数最低的是霍家村 1 和灵川 4,为 0.656。从各材料遗传相似系

利用 25 对引物组合扩增 15 份供试材料,扩增

表 3 25 对引物组合扩增的 AFLP 条带

Table 3 Amplification bands with twenty-five pairs of AFLP primers

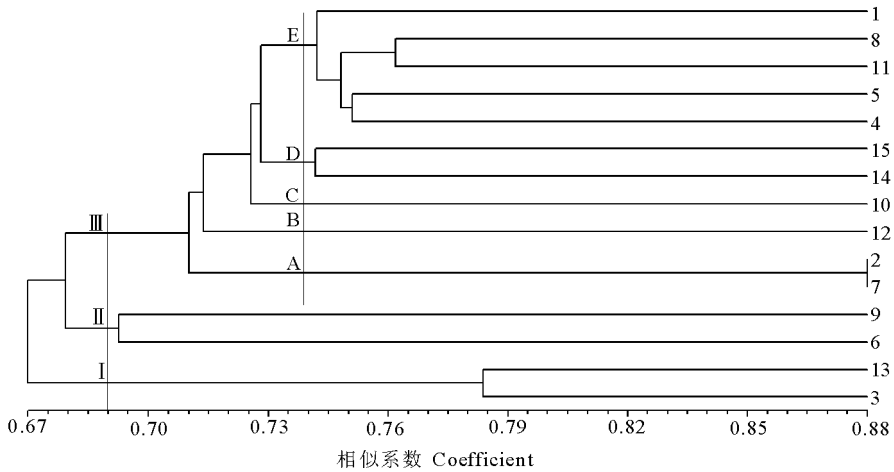
引物编号 Primer code	总条带 Total No. of bands	多态性条带 No. of polymorphic bands	多态性比率/% Percentage of polymorphic bands	引物编号 Primer code	总条带 Total No. of bands	多态性条带 No. of polymorphic bands	多态性比率/% Percentage of polymorphic bands
<i>EcoR</i> I-1/ <i>Mse</i> I-1	48	43	89.58	<i>EcoR</i> I-3/ <i>Mse</i> I-1	67	67	100.00
<i>EcoR</i> I-2/ <i>Mse</i> I-2	120	99	82.50	<i>EcoR</i> I-3/ <i>Mse</i> I-2	62	62	100.00
<i>EcoR</i> I-3/ <i>Mse</i> I-3	118	96	81.36	<i>EcoR</i> I-3/ <i>Mse</i> I-4	102	102	100.00
<i>EcoR</i> I-4/ <i>Mse</i> I-4	110	93	84.55	<i>EcoR</i> I-3/ <i>Mse</i> I-5	94	94	100.00
<i>EcoR</i> I-5/ <i>Mse</i> I-5	96	85	88.54	<i>EcoR</i> I-4/ <i>Mse</i> I-1	85	84	98.82
<i>EcoR</i> I-1/ <i>Mse</i> I-2	111	111	100.00	<i>EcoR</i> I-4/ <i>Mse</i> I-2	97	91	93.81
<i>EcoR</i> I-1/ <i>Mse</i> I-3	87	14	16.09	<i>EcoR</i> I-4/ <i>Mse</i> I-3	81	68	83.95
<i>EcoR</i> I-1/ <i>Mse</i> I-4	123	101	82.11	<i>EcoR</i> I-4/ <i>Mse</i> I-5	71	52	73.23
<i>EcoR</i> I-1/ <i>Mse</i> I-5	107	89	83.18	<i>EcoR</i> I-5/ <i>Mse</i> I-1	34	33	97.06
<i>EcoR</i> I-2/ <i>Mse</i> I-1	103	82	79.61	<i>EcoR</i> I-5/ <i>Mse</i> I-2	69	60	86.96
<i>EcoR</i> I-2/ <i>Mse</i> I-3	106	85	80.19	<i>EcoR</i> I-5/ <i>Mse</i> I-3	54	52	96.30
<i>EcoR</i> I-2/ <i>Mse</i> I-4	105	105	100.00	<i>EcoR</i> I-5/ <i>Mse</i> I-4	60	48	80.00
<i>EcoR</i> I-2/ <i>Mse</i> I-5	98	98	100.00	总和 Total	2 208	1 914	87.11
				平均 Mean	88	77	87.50

数来看,多数来源于相同区域的无性系相似系数高,如灵川 1、灵川 2、灵川 3、灵川 4、灵川 5 来源于桂林市灵川县,相似系数大于 0.700;三河 1、三河 2、三河 3、三河 4、三河 5 来源于广西柳州市融水三河村,相似系数大于 0.692,结果表明,来自于同一采集地的大多数河八王无性系亲缘关系较近,遗传差异程度较低。

### 2.3 聚类分析

在遗传相似性系数的基础上进行 UPGMA 聚类,构建了 15 份河八王无性系的分子系统树。在相似系数约 0.690 切割时,所有供试材料可划分成 3 个类群(图 1)。其中,灵川 1 和永福 1 为第 I 类群;

灵川 4 和三河 2 为第 II 类群;广西河 1、广西河 2、灵川 2、灵川 3、灵川 5、三河 1、三河 3、三河 4、三河 5、融安 1、霍家村 1 等 11 份为第 III 类群。而在相似系数约 0.74 时,又可将第 III 类群划分为 5 个亚群(A、B、C、D、E)。A 亚群包含 2 份无性系:广西河 2 和灵川 5;B 亚群包含 1 份无性系:三河 5;C 亚群包含 1 份无性系:三河 3;D 亚群包含 2 份无性系:融安 1、霍家村 1;E 亚群包含 5 份无性系:广西河 1、灵川 2、灵川 3、三河 1、三河 4。聚类结果表明,来自广西柳州市融水三河村和桂林市灵川县的河八王无性系分别在 2、3 个类群中都有分布,说明这些材料多样性相对较丰富。



1~15: 15 份河八王种质资源编号(材料同表 1)。1-15: Number of 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm(same as Table 1).

图 1 15 份河八王无性系的 UPGMA 聚类图

Fig.1 Dendrogram of 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor by UPGMA

### 2.4 河八王无性系间的地域分布规律

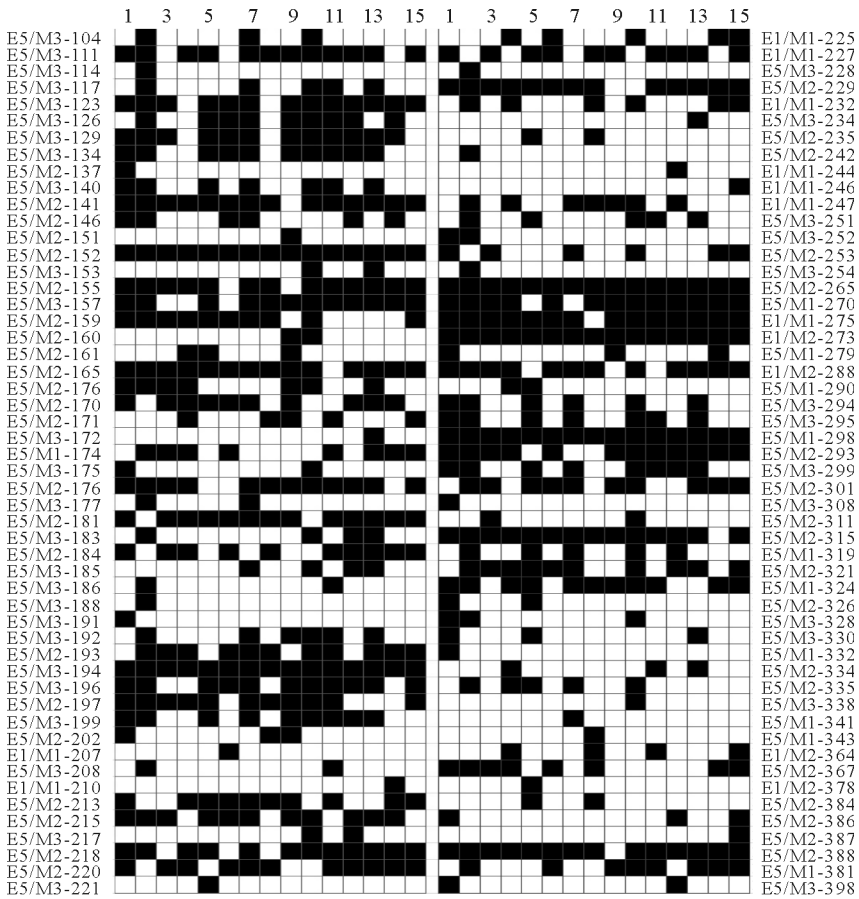
结合河八王无性系的 UPGMA 聚类和采集地情况,可发现聚类关系与采集地存在一定的相关性,呈现出一定的地域分布规律。来源于桂林市的灵川 1、永福 1 归为第 I 类群;在第 III 类中,绝大多数来源于同一地区的河八王无性系聚在同一类,如来源于桂林市灵川县的灵川 2、灵川 3 和灵川 5,柳州市的融水三河村三河 1、三河 3、三河 4、三河 5、融安 1 和霍家村 1。其中来源于柳州市的融安 1、霍家村 1 归在 D 类;来源于桂林市的灵川 2、灵川 3 以及来源于柳州市的三河 1、三河 4 归在 E 类中。但也有少数例外,例如来自广西桂林市灵川县的灵川 4 和广西柳州市融水三河村的三河 2 归在第 II 类群,广西河

2 和桂林的灵川 5 无性系归在 A 类。

### 2.5 分子身份证的构建

一般情况下,可利用特异谱带和多对引物的方法鉴别作物种质资源。为提高标记的准确性,本研究选择片段大小 100 ~ 400 bp,从 25 对引物组合中筛选波峰明显、多态性区域集中的 3 对引物组合 E5/M3、E5/M2 和 E1/M1,获得 104 条谱带,建立 15 份河八王种质资源数字指纹图谱,构建不同河八王无性系特异的分子身份证。

图 2 所示为利用 3 对引物组合 104 条谱带构建的 15 份河八王种质资源分子身份证,依据概率公式  $1/2^n$  计算,带型全部相同的概率为  $4.93 \times 10^{-32}$ ,置信概率达 99.99%。



黑框：谱带存在；1~15：15 份河八王种质资源编号（材料同表 1）。Black block: Banding exits; 1-15: Number of 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm (same as Table 1).

图 2 AFLP 标记构建的 15 份河八王种质资源分子身份证

Fig.2 Molecular identity card of 15 *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm collections set up with AFLP markers

### 3 讨论

#### 3.1 AFLP 标记结合毛细管电泳技术在河八王遗传多样性研究中的运用

目前，在作物种质资源遗传多样性研究上，AFLP 标记作为一种较成熟的技术方法而被广泛应用<sup>[7,19-20]</sup>。管逢刚等<sup>[7]</sup>利用 10 对 AFLP 引物组合进行甘蔗多样性分析，获得了 1 392 条带，其中多态性条带比率为 96.55%；庄南生等<sup>[19]</sup>利用 4 对 AFLP 引物组合对甘蔗种质进行扩增，多态性条带比率高达 98.5%；劳方业等<sup>[20]</sup>利用 15 对 AFLP 引物组合对甘蔗种质进行扩增，多态性条带比率为 79.3%。本研究利用 25 对 AFLP 引物组合结合毛细管电泳技术对广西河八王种质进行扩增分析，获得 2 208 个位点，其中 1 914 个为多态性位点，多态性检出率为 87.11%，具有较高的多态性检出率，也反映出所供试的河八王无性系具有丰富的基因多样

性。遗传相似性分析结果有效地反映了不同河八王种质间的亲缘关系，同时一定程度上反映出无性系间的遗传分化与地理分布具有相关性；河八王无性系之间的遗传基础差异较小，亲缘关系较近，这些材料中采自广西柳州市的三河河八王无性系和桂林市灵川县的河八王无性系分布在第 I、II、III 类群，遗传多态性相对丰富。因此，AFLP 标记结合毛细管电泳检测是研究河八王遗传多样性的有效方法。

#### 3.2 河八王资源的采集与应用

目前甘蔗育种家在利用甘蔗野生种质上，主要集中在于割手密<sup>[1,12,21-23]</sup>、斑茅<sup>[1,11,15,24-25]</sup>，国内外对于河八王的研究不多，国内也仅限于广西有极少量的报道<sup>[2,5-6]</sup>。随着国家对甘蔗野生种质资源的重视，有必要开展河八王种质资源的收集及评价利用，为甘蔗育种提供丰富的野生血缘基础。本研究采集的 15 份河八王无性系，气候类型从湿热到寒冷，土壤类型多样，具有广泛的适应性。通过遗传相似系数



和聚类分析表明,来源于同一个地方的灵川河八王无性系在聚类中相对分散,表明灵川河八王无性系遗传多样性相对较丰富;另外,河八王无性系灵川 1 和永福 1 在相似系数 0.675 就自成第 I 类群,说明其在遗传组成上和其他 13 份河八王无性系有较大差异,这些材料在甘蔗杂交利用中应给予重点关注。

### 3.3 河八王种质资源的数字化身份证构建

DNA 分子标记是在从分子水平上鉴别种质资源的可靠方法,也是作物数字化身份证构建的有效工具<sup>[18,26-30]</sup>。刘倩等<sup>[18]</sup>应用 15 对 SRAP 引物 36 条谱带、汪斌等<sup>[26]</sup>应用 5 对 ISSR 引物、郑海燕等<sup>[27]</sup>利用 19 条 ISSR 引物和 20 条 RAPD 引物分别构建了红麻 DNA 指纹图谱;唐源江等<sup>[28]</sup>利用 17 对 SRAP 引物构建了国兰分子身份证;陈惠端等<sup>[29]</sup>应用 14 对 SRAP 引物构建了黄麻 DNA 指纹图谱;徐雷锋等<sup>[29]</sup>利用 20 对 SSR 引物构建了百合种质资源分子身份证。在本研究中,利用 25 对 AFLP 引物组合对 15 份河八王无性系进行 PCR 扩增,共扩增出 1 914 个多态性位点,能很好地在分子水平上将来源于同一地方或不同地方河八王无性系的遗传差异鉴别开来,而应用筛选的 3 对核心引物组合 104 条谱带所构建的数字身份证差异丰富、多态率高,带型全部相同的概率为  $4.93 \times 10^{-32}$ ,置信率达 99.99%,说明本研究所选引物足以区分所供试的河八王种质资源,也表明可利用 AFLP 标记进行河八王种质资源数字化身份识别体系的有效构建。另外,本研究仅利用所筛选的 3 对 AFLP 引物组合、104 条谱带就可构建河八王种质资源分子身份证,显示出了 AFLP 标记结合毛细管电泳技术的优势。

### 参 考 文 献

- [1] 李杨瑞.现代甘蔗学[M].北京:中国农业出版社,2010.
- [2] 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):38-42.
- [3] RAGHAVAN T S.The genetic behavior of *Sclerostachya* × *Narenga* hybrids and their back-crosses[J].Current science, 1952,21(2):35.
- [4] RAGHAVAN T S.Sugarcane bamboo hybrids[J].Nature, 1952,170(4321):329-330.
- [5] 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 F<sub>1</sub> 无性系的形态学和同工酶分析[J].西南农业学报,1997,10(3):92-96.
- [6] 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.
- [7] 管逢刚,应雄美,吴才文,等.98 份甘蔗种质资源遗传多样性的 AFLP 分析[J].中国农业科学,2015,48(5):1002-1010.
- [8] KALWADE S B,DEVARUMATH R M.Single strand conformation polymorphism of genomic and EST-SSRs marker and its utility in genetic evaluation of sugarcane[J].Physiol Mol Biol Plant,2014,20(3):313-321.
- [9] SHARMA M D,DOBHALL U,SINGH P,et al.Assessment of genetic diversity among sugarcane cultivars using novel micro-satellite marker[J].African journal of biotechnology,2014,13(13):1444-1451.
- [10] CAI Q,AITKEN K S,FAN Y H,et al.Assessment of the genetic diversity in a collection of *Erianthus arundinaceus* [J].Genet Resour Crop Evol,2012,59:1483-1491.
- [11] 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(5):704-710.
- [12] 刘昔辉,方锋学,高轶静,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.
- [13] 张靖国,田瑞,陈启亮,等.基于 SSR 标记的梨栽培品种分子身份证的构建[J].华中农业大学学报,2014,33(1):12-17.
- [14] 胡瑞,包满珠,吴晓庆,等.香石竹表型多样性分析及利用[J].华中农业大学学报,2015,34(2):16-23.
- [15] 刘昔辉,宋焕忠,张革民,等.一种快速高效提取甘蔗及其近缘属基因组 DNA 的方法[J].西南农业学报,2010,23(2):515-518.
- [16] GAO Y J,LIU X H,ZHANG R H,et al.Verification of progeny from crosses between sugarcane (*Saccharum* spp.) and an intergeneric hybrid (*Erianthus arundinaceus*, *Saccharum spontaneum*) with molecular makers[J].Sugar Tech,2015,17(1):31-35.
- [17] VOS P,HOGERS R,BLEEKERM,et al.AFLP: A new technique for DNA fingerprinting[J].Nucleic acids research,1995,23:4407-4414.
- [18] 刘倩,戴志刚,陈基权,等.应用 SRAP 分子标记构建红麻种质资源分子身份证[J].中国农业科学,2013,46(10):1974-1983.
- [19] 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.
- [20] 劳方业,刘睿,何慧怡,等.我国甘蔗亲本遗传多样性的 AFLP 标记分析[J].基因组学与应用生物学,2009,28(3):503-508.
- [21] 张革民,杨荣仲,刘海斌,等.割手密主要数量性状的主成分及聚类分析[J].西南农业学报,2006,19(6):1127-1131.
- [22] 张革民,廖江雄,黄宏套,等.广西割手密遗传多样性的表型分析和 RAPD 分析[J].西南大学学报(自然科学版),2007,29(8):83-88.
- [23] LALITHA R,PREMACHANDRAN M N.Meiotic abnormalities in intergeneric hybrids between *Saccharum spontaneum* and *Erianthus arundinaceus* (gramineae) [J].Japan Mendel Soc,2007,72(3):337-343.
- [24] 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 Genet,1995,91:320-326.

- [25] 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.
- [26] 汪斌, 祁伟, 兰涛, 等. 应用 ISSR 分子标记绘制红麻种质资源 DNA 指纹图谱[J]. 作物学报, 2011, 37(6): 1116-1123.
- [27] 郑海燕, 粟建光, 戴志刚, 等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证[J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3499-3510.
- [28] 唐源江, 曹雯静, 吴坤林. 基于 SRAP 标记的国兰种质资源遗传多样性分析及分子身份证构建[J]. 中国农业科学, 2015, 48(9): 1795-1806.
- [29] 陈惠端, 陈美霞, 蔡金月, 等. 应用 SRAP 分子标记构建黄麻遗传资源 DNA 指纹图谱[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2014, 43(2): 113-118.
- [30] 徐雷锋, 葛亮, 袁素霞, 等. 利用荧光标记 SSR 构建百合种质资源分子身份证[J]. 园艺学报, 2014, 41(10): 2055-2064.

## Genetic diversity and molecular identification card construction of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm based on AFLP markers

LIU Xihui<sup>1,2</sup> ZHANG Ronghua<sup>2</sup> ZHANG Gemin<sup>2</sup> ZHOU Hui<sup>2</sup>

SONG Huanzhong<sup>2</sup> FANG Weikuan<sup>2</sup> OU Huiping<sup>2</sup> YANG Litao<sup>1,2</sup> LI Yangrui<sup>1,2</sup>

1. College of Agronomy, Guangxi University, Nanning 530005, China;

2. Guangxi Key Laboratory of Sugarcane Genetic Improvement/Sugarcane Research Center of Chinese Academy of Agricultural Sciences/Sugarcane Research Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Sugarcane Biotechnology and Genetic Improvement (Guangxi), Ministry of Agriculture, Nanning 530007, China

**Abstract** The genetic diversity of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm collections was studied. The molecular ID card was established to provide technique support for molecular identifications, exploitation, conservation, utilization and innovation of germplasm. The genetic relationships of fifteen samples of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm collected from Guangxi were analyzed with AFLP (amplified fragment length polymorphism) markers and CE (capillary electrophoresis) method. The total bands, polymorphic bands and percentage of polymorphic bands (PPB) were counted. The genetic similarity was used for UPGMA (unweighted pair group method analysis) and PCA (principal component analysis). The molecular identification card of the 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm was constructed. A total of 2 208 bands were amplified with 25 pairs of AFLP primers, of which 1 914 were polymorphic with the percentage of polymorphic bands of 87.11%. The genetic similar coefficients of the 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm were ranged from 0.656 to 0.878. The result of UPGMA based cluster analyses showed that these germplasm accessions were divided into three major groups at the similarity coefficient 0.706. All 15 accessions could be effectively distinguished by specific bands and different primer combinations. The specific molecular identity card of the 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm was established with 99.99% probability of confidence. The unique molecular identification card of the 15 accessions of *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm was established based on the 104 bands amplified with 3 AFLP primer combinations. It is indicated that the AFLP marker will be a powerful tool for identifying *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor germplasm.

**Keywords** *Narenga porphyrocoma* (Hance) Bor; germplasm; genetic diversity; AFLP marker; molecular identification card

(责任编辑: 张志钰)