

甘蔗×斑茅远缘杂种的鉴别

吴能奕* 戚经文

(农学系)

提 要

本试验采用染色体Giemsa—C带分带和过氧化物酶同工酶电泳频谱分析方法对野生种斑茅 (*Saccharum arundinaceum* Retz.) 与甘蔗的远缘杂交后代进行鉴别分析。结果表明, F₁代崖城73/07 (2n=68)、崖城75/283 (2n=68) 染色体数组成为n+n型, 染色体带型和同工酶谱均表现为父、母本综合型; 崖城57/25 (2n=110)、崖城73/512 (2n=110) 则分别与其母本相似。据此认为, 4个待定材料中, 仅前二者是真实的斑茅远缘杂交后代。

根据上述结果分析了斑茅对甘蔗育种尚无实质性贡献的原因, 认为该野生种之育种性能与其染色体带型有关。最后, 讨论了同工酶分析及染色体分带作为杂种鉴别方法的意义及其局限性。

关键词: 斑茅; 远缘杂种; 染色体C带端带; 着丝点带; 过氧化物酶同工酶; 甘蔗

前 言

栽培作物与野生植物种属间杂种的真实性往往是容易引起争论的问题。这种情况在甘蔗杂种的研究中尤甚。甘蔗育种史上已有过50多例种属间, 甚至是亚科间远缘杂种的报道。但其中大部份是受到怀疑, 或是有争议的^[1]。

1970年, 我国首次报道利用广布野生种斑茅 (*S. arundinaceum* Retz.) 作为原始杂交亲本育出2个优良甘蔗品种, 引起国内外有关学者的极大注意^{[2]~7}。甚至有意见认为, 我国甘蔗野生资源的利用重点应因此而加以调整^[2]。直到最近, 才有见诸于文的对有关杂种的真实性问题提出异议的意见^[8]。

但是, 到目前为止, 这些讨论基本上都是以亲本与杂种的形态特征或染色体数为依据而进行的。已经知道, 甘蔗是异源多倍体, 除少数原种外, 多数亲本品种所产生的配子其染色体数的变化很大。此外, 甘蔗与某些野生种杂交, 会产生染色体数加倍的后代^[9]。显然, 仅以染色体数作为甘蔗杂种鉴别的依据是不可靠的。因此, 严格地说, 有关斑茅杂种讨论的两种意见都未能就此提出充分的论据。

为了准确鉴别我国现有斑茅远缘杂交品系, 正确评价该野生种的杂交利用价值, 我们试采用染色体分带及同工酶分析方法对上述问题加以探讨。

* 本研究是在戚经文教授直接指导下完成的。卢永根、李明启教授、王鉴明高级农艺师、彭绍光研究员及苏广达副教授对论文修改提出宝贵意见, 谨致衷心谢意!

• 现在广西甘蔗研究所工作。

1986年9月27日收稿

材 料 和 方 法

(一) 材料

供试材料8个,包括3个亲本及其F₁代材料4个,并以另一野生种作对照(表1)。

以上材料由轻工部海南甘蔗育种场提供,以种植方式保存,按普通栽培方法管理。

(二) 方法

1. 染色体分带: 根尖细胞染色体分带的方法见前报^[1]。性细胞减数分裂期染色体分带取样时间为上午9~10时。取未抽出之花穗(最上部两叶叶枕距约10~15厘米),用甲醇:冰醋酸固定液(3:1 v/v)固定1小时,经蒸馏水低渗处理3~4小时后,再固定1~2小时。取黄白色花药压片,分带处理程序与根尖染色体同。

每个样品选取染色体完整的细胞10个以上,在15×100倍油镜下作染色体计数及带型观察。用德国产Leize万用显微镜作显微摄影,7°分色胶卷,加深绿色滤光片。

2. 同工酶电泳: 取田间生长的植株正3叶(最高可见叶环叶为0号叶,依次往下数)叶片提取酶液。采用不连续的聚丙烯酰胺凝胶垂直平板电泳法。浓缩胶浓度为4%,分离胶浓度10%。电极冲液为0.05M的Tris—甘氨酸系统,上槽液pH=8.3,下槽液pH=6.7。每样品加粗提酶液50微升,在4~6℃条件下连续电泳3.5~4小时,稳定电流30mA。电泳后的凝胶片用醋酸——联苯胺法染色10分钟。用自来水漂洗胶片2小时。用醋酸——甘油——乙醇(5:2:3)混合液固定15分钟,然后置蒸馏水中保存,供分析用。

表1 分析材料一览表

名 称	学名或亲本	种 性
Badila	<i>S. officinarum</i> L.	栽培原种
CP34/120		栽培品种
斑 茅	<i>S. arundinaceum</i> Retz.	野 生 种
割 手 密	<i>S. spontaneum</i> I ₁	野 生 种
崖城73/07	Badila×斑茅	F ₁ 代
崖城73/512	Badila×斑茅	F ₁ 代
崖城75/283	Badila×斑茅	F ₁ 代
崖城57/25	CP34/120×斑茅	F ₁ 代

结 果 与 分 析

(一) 双亲及其杂种的染色体基本带型

使用BSG分带法,我们在供试材料上获得较清晰的Giemsa-C带图象(图版I)。从图中可以看出,各材料显示的带主要有着丝点带(C带)、末端带(T带)和中间带(I带)。

1. 亲本的染色基本带型: 对其它植物的一些研究表明,I、C、T三种带以I带的表型最为丰富,但其稳定性不及C、T带^[10]。基于这种原因,我们暂不考虑样品间I带的异同,而仅从T、C带的比例对样品进行比较。

以分母表示染色体长臂的带,分子表示短臂的带;各样品染色体基本带型可用C、

T的分式和加以表示(表2)。

可以见到,野生种斑茅的染色体带型与其他两个亲本品种有显著区别。该种60条染色体中有染色深而明显的端粒带(图I—1)其中部份染色体长短臂均显端粒带,而两个栽培品种只有少数染色体显示这种带。

2. 斑茅染色体带型的稳定性:对野生种斑茅和割手密减数分裂偶线期的染色体进行分带处理,并分别与其有丝分裂中期的带型进行比较。从图I—5、6可以看出,斑茅偶线期染色体T带的显现仍然是明显的,而割手密染色体基本上无此特征。这差异与有丝分裂中期两者所表现出的差异是一致的,说明T、C两种带的表现是稳定的。

8. F_1 代的染色体数及带型:4个杂种一代的染色体数及带型如下。

从染色体数看,崖城73/07与崖城75/283基本上是双亲配子染色体数之和,即 $n+n$ 型。崖城57/25与母本同。崖城73/512似乎是 $2n+n$ 型(即 $80+30=110$),但带型分析的结果排除了这种可能性,因为它并未含有以T带为特征的斑茅染色体。

由于双亲带型的差异显著,且具有相对的稳定性,因此,我们无须借助核型分析或精确的带型比较,即可以在杂种细胞中准确地辨认出来自父本或母本的染色体。

与双亲比较,4个杂种的带型可明显地分为两类:①父、母本综合型:崖城73/07、崖城75/283;②偏母本型:崖城57/25、崖城73/512。

从父本斑茅T带的特点及其稳定性来看,我们不难得出结论:前二者是斑茅的真实后代,后者非斑茅杂交后代,至少不能算是细胞水平上的杂交后代。

(二) 过氧化物酶电泳图谱比较

经多次重复电泳,获得了双亲及其杂种的稳定酶谱(图II)。

容易看出,杂种崖城75/283的酶带基本上是双亲酶带的迭加,表现为互补型。崖城73/07的酶带偏似母本,但仍然可以看出,中间一条带明显是来自父本斑茅的。崖城57/25和崖城73/512的酶带分别与其母本相似,没有看到肯定是来自父本的酶带。这种表现与染色体带型分析的结果吻合。

在田间观察到,崖城73/07、崖城75/283的叶片硬直,肥厚带不明显,叶片与茎的夹角很小,叶鞘紧包茎,这些性状与斑茅相似。尤其明显的是,这两个材料的叶片都具有斑茅所特有的63号毛群(位于叶片中脉两侧)。崖城57/25、崖城73/512则无此特征。就这几个材料而言,带型、酶谱与形态学特征是可以互相印证的。

表2 亲本染色体的基本带型

材 料	染色体数 ($2n$)	基 本 带 型
Badila	80	$4C/CT + 76C/C$
斑 茅	60	$52C/CT + 4CT/CT + 4C/C$
PC34/120	110	$4C/CT + 106C/C$

表3 4个杂交种的染色体数和带型

杂种编号	染色体数 ($2n$)	基 本 带 型
崖城73/07	68	$26C/CT + 42C/C$
崖城75/283	68	$30C/CT + 38C/C$
崖城57/25	110	$4C/CT + 106C/C$
崖城73/512	110	$4C/CT + 106C/C$

讨 论

(一) 关于斑茅杂种的真实性及其利用价值

斑茅是一个适应性很强的广布野生种, 其抗逆性, 分蘖力等优良性状久已为世界甘蔗育种家所瞩目。该种在甘蔗远缘杂交育种中最早被用作野生亲本^[11], 至今仍是人们所关注的重点材料之一。然而它对世界甘蔗育种几乎毫无贡献, 在60多年的甘蔗经济杂交中, 尚无利用斑茅成功的例子^[7]。因此, 对于斑茅与甘蔗杂交是否可获得真实杂种, 历来是有怀疑的。

本试验鉴定结果表明, 我国海南甘蔗育种场确实已成功地获得了甘蔗×斑茅的真实杂种, 但仍然未能进一步获得有经济价值的品种。

斑茅始终未能象割手密 (*S. spontaneum* L.)、大茎野生种 (*S. robustum*)、芒 (*Miscanthus* spp.) 等野生种一样成为甘蔗远缘杂交的理想亲本。这种差异可能渊源于其细胞学基础。据我们观察, 后三者的染色体带型与栽培甘蔗颇为相似。斑茅育种性能差可能与该种与甘蔗属植物在染色体带型上的重大差异有关。

有研究表明, 双亲染色体带型差异大, 其杂种常常是不孕的。例如, 普通小麦与黑麦的染色体带型很不相同, 黑麦染色体带明显的端粒带, 而小麦则只显示着丝点带。这两个种的杂交 F_1 代不能正常结实。这种 F_1 代减数分裂中染色体配对的频率很低, 原因是端带染色体与非端带染色体很难配对^[12]。

从本试验的结果看, 斑茅与栽培甘蔗在染色体带型上的差异与黑麦、小麦之间的情形类似, 其在 F_1 代中的效应亦颇为相似。已有研究指出, 斑茅与热带种杂交 F_1 代崖城75/283的花粉量少, 花粉发育率低^[6]。这可能与染色体带型差异造成的减数分裂不正常有关。不难预料, 这种 F_1 代由于难以产生有效配子, 将很难用作回交或进一步杂交的亲本。因此, 企图在更高的代数上获得含有斑茅血缘的经济品种是比较困难的。从这种意义上说, 斑茅对于甘蔗杂交育种的價值需要重新评价。其目标性状固然优良, 但是否可以转移到甘蔗品种上来是值得研究的。

(二) 甘蔗远缘杂种鉴别方法评价

远缘杂种鉴别的最基本方法是从形态特征上对杂种与双亲加以比较, 从而对杂种作出判断。对甘蔗的远缘杂种, 可以从一些稳定的性状, 如芽形、叶耳、毛群等对杂种进行判别。这种方法的特点是简单易行, 但可靠性差。因为目前大多数甘蔗品种至少含三个种以上的血缘, 即使是严格控制自交授粉, 其后代的变异类型也是非常丰富的。这意味着, 可供选择的鉴别性状是极其有限的。

同工酶分析是较理想的鉴别手段, 具有准确、灵敏的特点。借助同工酶技术, 甚至可以鉴别出细胞水平以下的杂种^[8]。但是, 亲本各种酶的同工酶在杂种中的表现很不一样。J.C Waldron等人(1971)曾发现, 来自甘蔗属5个种的31个品种的酯酶酶谱具有特异性, 而好几个种间杂种的酶谱是相似的, 要用亮氨酸氨肽酶作指标才能加以区别^[13]。可见, 鉴别酶类的选择是很重要的。对其它植物和甘蔗的研究表明, 过氧化物

酶同工酶具有丰富的多型性和相对的稳定性^{[4][8]}，而且是由一些共显性基因控制的^[4]。因此，用过氧化物酶作为杂种鉴别依据较为可靠。

用模糊数学方法对上述材料酶谱扫描图进行分析的结果表明，2个真实杂种可分为两种酶谱类型：偏父本型与偏母本型（另文专述）。但其共同特点是：对于任一亲本的特征带（在该组合中父或母本特有的带）至少有一条可在杂种上显现出来。显然，由特征带的出现，可直观地识别出真杂种。

另一方面，杂种崖城73/07和崖城75/283的染色体数都是 $2n=68$ ，但酶谱却有明显差异，前者来自父本的特征带只有一条。不妨设想，如果决定这条特征带的基因只定位于某一条染色体上，那么，当这条染色体丢失，或在父本减数分裂时恰好发生有关染色体片段交换时，情况将会怎样呢？显然，杂种仍然是真实的，但“特征带”已经消失了。可见，亲本的特征酶带是判别杂种的充分条件，但不是必要条件。从这种意义上说，同工酶鉴别方法亦有其局限性。

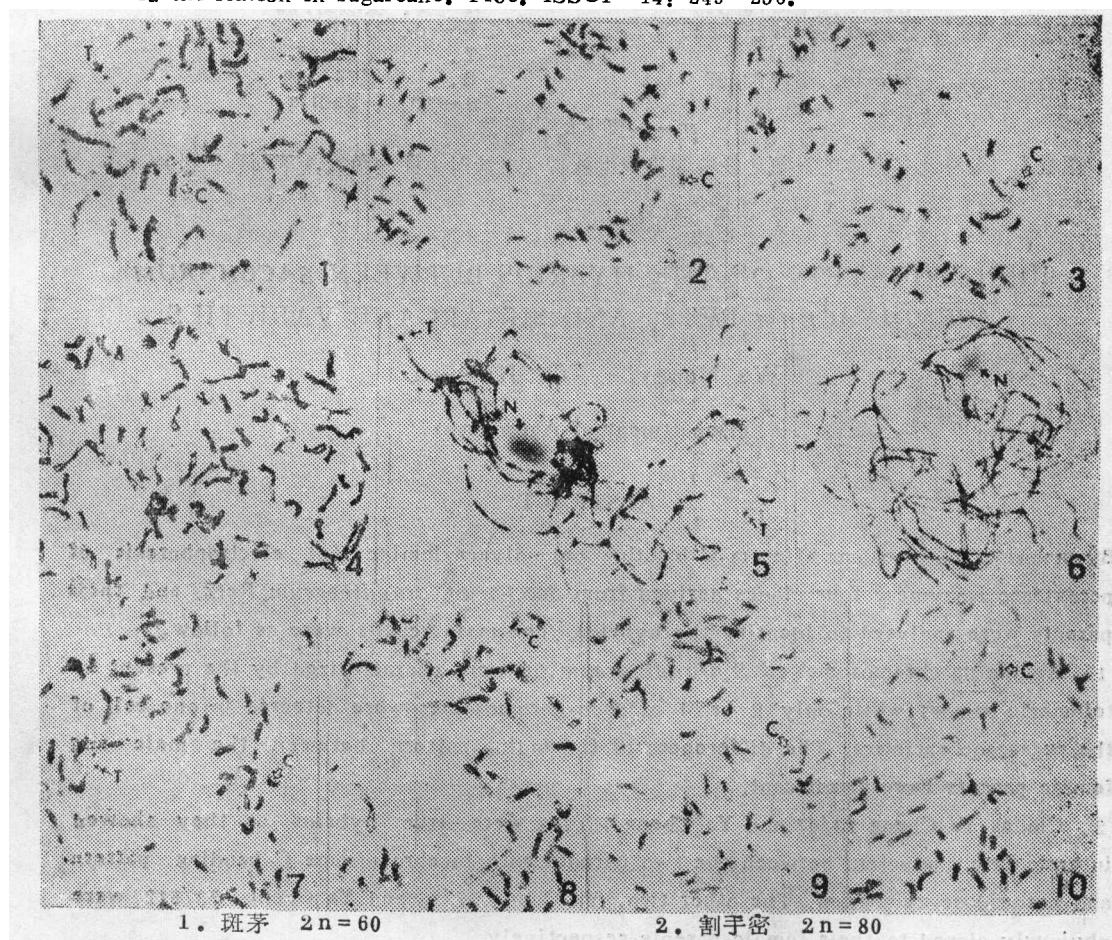
与上述两种方法比较，染色体带型分析法是比较可靠的。因为它是从基因的载体——染色体上，而不是从基因的产物上去寻找亲本的标记，因而排除了许多干扰。此外，由于带型分析不受配子染色体数的影响，因而更适合象甘蔗这样染色体数多的异源多倍体远缘杂种的鉴别。

但是，由于染色体处理、分析的程序比较复杂，不易普及，因而应用范围受一定限制。此外，应该指出，对于带型比较相似的种来说，本试验使用的分带方法其精确度可能不够高。这种技术仍有待进一步发展与完善。

引用文献

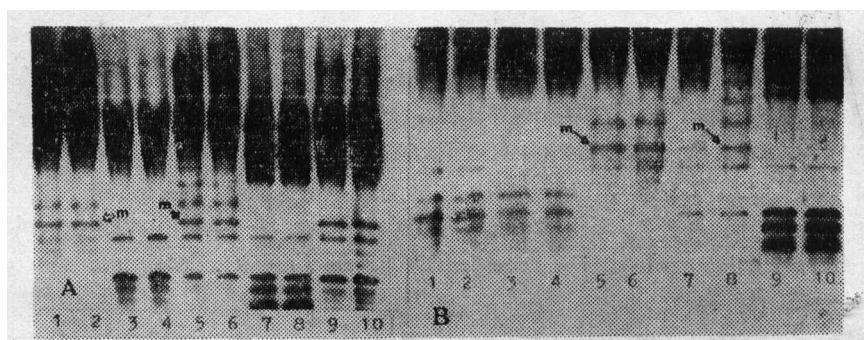
- [1] 吴能奕、戚经文，甘蔗植物染色体Giemsa—C带分带方法的研究及其应用，《广东农业科学》，(2) 1985，17—22。
- [2] 陈逢彩，谈谈蔗茅在甘蔗杂交育种中的价值问题，《甘蔗糖业（甘蔗分刊）》，(1) 1979，12—18。
- [3] 周光宇等，远缘杂交的分子基础——DNA片段杂交假设的一个论证，《遗传学报》，6 (4) 1979，405—412。
- [4] 胡志昂等，裸子植物的生化系统学（一）松科植物的过氧化物酶，《植物分类学报》，21 (4) 1983，423—431。
- [5] 梁士钟，CP34/120×崖城斑茅 (*S. arundinaceum*) 种间杂交系统的变异研究，《湛江甘蔗科技》(4)，1984，5—8。
- [6] 黄启尧，甘蔗远缘花粉诱导产生早熟高糖亲本的研究I。蔗茅属斑茅 [*Erianthus arundinaceus* (Retz.) Jeswiet] 花粉诱导的初步结果，《甘蔗糖业（甘蔗分刊）》，(2) 1984，5—9。
- [7] 骆君庸，《甘蔗学》，221—243，广东甘蔗学会，1984年。
- [8] Ruiz, A. 和 R. H. Maribona (郑德森译)，过氧化物酶同工酶分析，一种大规模鉴定甘蔗品种的方法，《第十八届国际甘蔗技师会议论文集(2)》，34—35，福建农学院甘蔗综合研究所，1984年。

- [9] Jagathesan, D. 1971, Cytogenetics of Sugarcane. Proc. ISSCT. 14, 303—316.
- [10] Sharma, Arun Kumar and Archana Sharma. 1980, Chromosome Techniques Theory and Practice 3rd ed, Butterworth Ltd., 408—437.
- [11] Stevenson, G. C. 1965, Genetics and Breeding of Sugarcane, Longmans Green and Co. Ltd., London, 176—182.
- [12] Thomes, J. B. and P. J. Kaltsikes, 1976, A bouquet—like attachment plate for telomeresine leptotene of rye revealed by heterochromatin staining. Heredity, 36 (2) : 155—162.
- [13] Waldron, J. C, K. T. Glasziou, 1971, Isoenzymes as method of varietal identification in sugarcane. Proc. ISSCT 14, 249—256.

1. 斑茅 $2n=60$ 2. 割手密 $2n=80$ 3. Badila $2n=80$ 4. CP34/120 $2n=110$ 5. 斑茅 $n=30$ (偶线期)6. 割手 $n=40$ (偶线期)7. 崖城73/07 $2n=68$ 8. 崖城75/283 $2n=68$ 9. 崖城57/25 $2n=110$ 10. 崖城73/512 $2n=110$

C——着丝点带 T——端粒带 N——核仁

图版I 杂种及其双亲染色体Giemsa—C带



A 1—2. 斑茅
3—4. 崖城73/512
5—6. 崖城75/283
7—8. Badila
9—10. 崖城73/07

B 1—2. CP34/120
3—4. 崖城57/25
5—6. 斑茅
7. 崖城73/07
8. 崖城75/283
9—10. Badila

m——斑茅的特征带

图版 I 杂种及其亲本的过氧化物酶同工酶电泳带 (电泳时上面为负极, 下面为正极)

IDENTIFICATION OF THE HYBRIDS BETWEEN *SACCHARUM* *ARUNDINACEUM* RETZ. AND SUGARCANE VARIETIES

Wu Nengyi Qi Jingwen

(Department of Agronomy)

ABSTRACT

By means of chromosome Giemsa-C banding and polyacrylamide gel electrophoresis of peroxidase isozymes, four clones derived from *Saccharum arundinaceum* Retz, and their parents were analysed to identify the hybrids. The main results were as follow,

1. Among 60 chromosomes of *S. arundinaceum*, 56 were characterized by the present of telomeric bands, while only 2 or 4 of such chromosomes were detected in one cell of the sugarcane varieties. The differences of C-banding pattern between the male and female parents were significant.

2. Clones Ya Cheng 73/07 and Ya Cheng 75/283 were true hybrids as they showed intermediate characters between the two parents both in chromosome C-banding pattern and peroxidase zymogram. The other two, Ya Cheng 57/25 and Ya Cheng 73/512 were obviously closed to their female parents respectively.

The value and behaviour of *S. arundinaceum* in sugarcane breeding was estimated on the basis of chromosome C-banding patterns, and the advantage and limit of the three methods used in identifying of hybrids were discussed.

Key words, *Saccharum arundinaceum* Retz, distant hybrid, chromosomal C-band, telomeric band, centromeric band, peroxidase isozymes, sugarcane