

人工三倍体新桑品种嘉陵 20 号的 AFLP 分析*

徐立, 余茂德**, 鲁成, 吴福安,
王茜龄, 敬成俊, 吴存容

(西南农业大学农业部蚕桑学重点实验室, 重庆 400716)

摘要: 利用 AFLP 分子标记技术, 从 DNA 水平对人工三倍体新桑品种嘉陵 20 号 ($2n = 3x = 42$) 及其亲本以及与嘉陵 20 号同亲本的 2 个三倍体 ($2n = 3x = 42$) 桑树材料与 10 个二倍体 ($2n = 2x = 28$) 桑树材料进行了遗传背景分析。获得了它们的指纹图谱、遗传距离及遗传相似系数, 并绘制出了它们的 UPGMA 聚类图。研究结果发现: 嘉陵 20 号的母本 7920 ($2x; \text{♀}$) 与父本西庆四号 ($4x; \text{♂}$) 间的相似系数为 0.6612。这为今后更具强大杂交优势和多倍体优势的新型人工三倍体新桑品种选育时杂交亲本的选择与组配提供了较有用的参考依据。

关键词: 桑树; 人工三倍体; 遗传背景; AFLP 分析

中图分类号: Q 943 文献标识码: A 文章编号: 0253-2700(2005)02-0187-06

AFLP Analysis of the Newly Breed Artificial Triploid Mulberry

XU Li, YU Mao-De**, LU Cheng, WU Fu-An, WANG Xi-Ling,
JING Cheng-Jun, WU Cun-Rong

(The Key Sericultural Laboratory of Agriculture of Ministry, SWAU, Chongqing 400716, China)

Abstract: In this study, genetic background of Jialing 20, their parents and Jialing 20 brothers are analyzed by the AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), from which the genetic distance, similarity coefficient and UPGMA dendrogram of the materials are obtained. These will provide reliable evidence for the selection and tissue mating of parents. It is found the similarity coefficient between 7920 ($2x; \text{♀}$) and Xiqing 4 ($4x; \text{♂}$), which are parents of Jialing 20, is 0.6612. These will be helpful in the breeding of new artificial triploid mulberry with strong heterosis and multiploid superiority.

Key words: Mulberry; Artificial triploid; Genetic background; AFLP analysis

在桑树品种中, 人工选育的三倍体新桑品种在经济性状和农艺性状上都比二倍体桑品种和自然三倍体桑更为优良。因此选育人工三倍体桑已成为国内外桑树品种选育的重要方向(柯益富, 1997)。要选育产量高、叶质优的新型人工三倍体桑树新品种, 必须大量的选择杂交亲本和在杂交后代中进行大量的筛选, 因此有必要弄清育种材料的遗传背景和性

* 基金项目: 国家丝绸发展风险基金项目第 5 批。国家科技攻关计划: 三峡库区生态环境安全及生态经济系统重建(2001BA604A04)

** 通讯作者: 余茂德(1951-)男, 汉, 教授, 博士生导师, 从事桑树遗传育种及分子生物学研究。Tel: 023-68251228
收稿日期: 2004-09-14, 2004-12-12 接受发表

作者简介: 徐立(1976-)男, 西南农业大学 2003 级在读博士研究生, 主要从事桑树遗传育种及分子生物学研究。

状遗传规律。桑树属于多年生异花授粉木本植物，具有基因型高度杂合、生命周期长、植株个体占地面积大等特点，因此性状遗传规律研究难度较高，采用常规方法很难弄清其遗传背景（柯益富，1997）。由荷兰科学家 Zabeau 和 Vos（1993）在 PCR 和 RFLP 基础上发展起来的 AFLP（Amplified Fragment Length Polymorphism）新技术综合了 RAPD 和 RFLP 的优点，已被国内外学者应用在了植物遗传背景研究及品种选育领域，取得了很好的效果（Van 等，2002；Negi 等，2000；Nami，2000；李向拓等，2004；于歆，2004；范丙友等，2004）。本研究利用 AFLP 分子标记技术，从 DNA 水平对人工三倍体新桑品种嘉陵 20 号及其亲本以及与嘉陵 20 号同父、母本的 2 个三倍体桑品系与 10 个二倍体桑树材料进行了遗传背景分析。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验所使用的材料如表 1 所示。西庆四号和 7920 为父母本，嘉陵 20 号（A）、B、C 为 F_1 代中的三倍体材料，D-M 为 F_1 代中的二倍体材料。在这些材料中，3 个三倍体的经济性状和农艺性状都较二倍体优良，三倍体中，嘉陵 20 号又比 B、C 优良。西庆四号（即桐乡青， $2n = 4x = 56$ ）为秋水仙碱诱变而成的同源四倍体桑树材料（余茂德等，2004）。所有材料皆采自于西南农业大学桑树种质资源圃。

表 1 嘉陵 20 号 AFLP 分析所用材料

Table 1 Materials used in AFLP analysis of Jialing 20

材料	7920	西庆四号	A (嘉陵 20)	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M
Materials		Xiqing 4	Jialing 20												
倍数性	$4(♀)$	$4(♂)$	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1	F_1
Polyploid	2X	4X	3X	3X	3X	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X

1.2 方法

本试验核基因组 DNA 的提取参考李伯龄（1988）所述方法，采用抽提液（10 mmol/L Tris-CL（pH 8.0），10 mmol/L EDTA（pH 8.0），100 mmol/L NaCl，2% SDS，0.039 mol/L dithiothreitol）500 μ l，附加 proteinase K、 β -mercaptoethanol 和 RNase 作为抽提液提取并获得了高质量的基因组 DNA。其余步骤的操作参照 AFLP Analysis System I（GIBCOBRL）和 Q4132 Silver Sequence DNA Staining Reagents（Promega）的说明书进行。

1.3 数据统计及分析方法

所有材料按照同一位置 AFLP 带的有无进行统计，有带的记为“1”，无带的记为“0”，用 Treecon 分析软件对统计结果进行分析，其中遗传距离 D 用 Nei 公式（Nei and Li，1979）计算，即 $D = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ ， N_{xy} 表示两材料间共有带数， N_x 表示材料 X 的 AFLP 带数， N_y 表示材料 Y 的 AFLP 带数。按 $D = -\ln I$ 计算遗传相似系数 I，用 UPGMA（Unweighted Pair Group Method Using Arithmetic Average）法作出聚类图。

2 结果与分析

本试验采用 8 对引物组合进行试验，每个引物组合扩增结果在不同的材料间表现出了丰富的多态性（图 1），就清晰、可分辨的 AFLP 条带数来说，每组引物最多的达 151 条，最少的为 49 条，平均每个引物组合扩增带数为 142 条。但每个引物组合在不同的材料间也出现了一些共同的带，最多达 22 条，最少的 3 条，这充分说明了各材料之间遗传背景的复杂性及共同性。



图 1 部分引物组合的 AFLP 指纹图

Fig. 1 The AFLP by the some primer combination

2.1 供试材料的 AFLP 多态性调查

所有材料按照同一位置 AFLP 带的有无进行统计, 有带的记为“1”, 无带的记为“0”, 统计结果如表 2 所示。从表 2 可以看出: F_1 代中的二倍体材料 ($2n = 2x = 28$; F_1) 中, 个体总带数最少的是材料 H, 为 403 条; 最多的是材料 G, 为 517 条, 相差 114 条; 特有带数最多的材料是 G, 为 20 条, 最少的是材料 M, 为 0 条; 多态性高达 74.43%。这说明尽管它们具有相同亲本, 但遗传物质组成却不尽相同。3 个三倍体 ($2n = 3x = 42$; F_1) 株系中, B 的总带数为 548 条, C 为 460 条, 三者之间的多态性为 63.98%, 这说明它们从亲本那里继承来的遗传物质也各不一样。这些材料虽然亲本相同, 甚至染色体数都相同, 但遗传物质的组成却有较大的差异性。二倍体除了 M 号以外的其余材料都有它们自己的特征条带, 这些都可以用来作为区别于其它材料的标志, 特别是嘉陵

20 号, 它的 12 条特征条带可以作为品种保护的分子标记。

表 2 嘉陵 20 号的 AFLP 多态性

Table 2 AFLP polymorphism of Jialing 20

材料 Material	个体总带数 Individual total bands	特有带数 Special bands	总带数 Total bands	共有带数 Common bands	多态性 Polymorphism (%)	总带数 Total bands	共有带数 Common bands	多态性 Polymorphism (%)
7920	416	10	607	150	75.28			
西庆四号 Xiqing 4	401	9						
3x	A	516	769	277	63.98			
	B	548						
	C	460						
2x	D	492	837	214	74.43	1054	160	85.76
	E	465						
	F	411						
	G	517						
	H	403						
	I	419						
	J	466						
	K	474						
	L	441						
M	404							

2.2 供试材料的遗传距离及相似系数

用 Treecon 分析软件统计分析, 15 个材料的遗传距离和相似系数如表 3 所示。对表 3 归纳统计, 其结果如表 4 所示。

表 4 显示出, 在遗传距离上, 无论与母本还是与父本之间, F_1 代三倍体都要比 F_1 代二倍体小; 与母本之间的遗传距离, 经 t 检验, F_1 代三倍体与 F_1 代二倍体成显著差异 ($t_{测} =$

2.5865 ; $t_{11} = 1.796$) , 这表明三倍体在遗传组成上比二倍体更倾向于亲本。二倍体与三倍体之间的平均遗传距离较小 ; 所有子代与母本的遗传距离都要比与父本之间的小。F₁ 代二倍体在遗传过程中发生了较大的变异 , 有些材料间其遗传距离比亲本之间的都要大。子代与母本的遗传距离比与父本之间的小 , 表明子代从母本那里继承的遗传物质要多一些。总之 , 所有子代与亲本之间的相似系数均比两亲本之间的要大 , 这充分体现了“子似亲”的遗传现象。

表 3 供试材料的遗传距离 (右上) 及相似系数 (左下)

Table 3 The genetic distance (up right) and similarity coefficient (down left)

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
	0.4137	0.3630	0.3838	0.3827	0.3828	0.3899	0.4282	0.4101	0.4140	0.3837	0.3836	0.4056	0.4079	0.3907
0.6612		0.3897	0.3856	0.4253	0.4088	0.4099	0.4265	0.4502	0.4071	0.4238	0.4273	0.4123	0.3850	0.3789
0.6956	0.6773		0.3401	0.3632	0.3443	0.3598	0.3967	0.3594	0.4110	0.4602	0.3878	0.3805	0.3935	0.3557
0.6813	0.6800	0.7117		0.2821	0.2941	0.3236	0.3945	0.3601	0.3630	0.3963	0.3764	0.3485	0.3439	0.3645
0.6820	0.6536	0.6954	0.7541		0.3058	0.3340	0.3363	0.3492	0.3371	0.3519	0.3623	0.3670	0.3131	0.3485
0.6819	0.6644	0.7087	0.7452	0.7365		0.2449	0.2986	0.2883	0.3054	0.3052	0.3206	0.2932	0.2792	0.2608
0.6771	0.6637	0.6978	0.7235	0.7161	0.7828		0.2748	0.3044	0.2814	0.2683	0.3546	0.3060	0.2729	0.2692
0.6517	0.6528	0.6725	0.6740	0.7144	0.7419	0.7597		0.3071	0.2302	0.2879	0.3145	0.3174	0.2671	0.2746
0.6636	0.6375	0.6981	0.6976	0.7053	0.7495	0.7376	0.7356		0.2905	0.2803	0.3160	0.3301	0.2903	0.3010
0.6610	0.6656	0.6630	0.6956	0.7138	0.7468	0.7547	0.7944	0.7479		0.2497	0.3216	0.3157	0.2436	0.2372
0.6813	0.6546	0.6312	0.6728	0.7034	0.7370	0.7647	0.7498	0.7556	0.7790		0.2625	0.2851	0.2423	0.2315
0.6814	0.6523	0.6785	0.6863	0.6961	0.7257	0.7015	0.7302	0.7291	0.7250	0.7674		0.2616	0.2904	0.2995
0.6666	0.6621	0.6835	0.7057	0.6928	0.7459	0.7364	0.7280	0.7188	0.7293	0.7519	0.7698		0.2429	0.2814
0.6650	0.6805	0.6747	0.7090	0.7312	0.7564	0.7612	0.7656	0.7480	0.7838	0.7848	0.7480	0.7843		0.1951
0.6766	0.6846	0.7007	0.6945	0.7057	0.7704	0.7640	0.7599	0.7401	0.7888	0.7934	0.7412	0.7548	0.8227	0.15

注 : 1 到 15 分别是 7920 , 西庆四号、A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M。

Note : number 1 to 15 are 7920 , Xiqing 4 , A、B、C、D、E、F、G、H、I、J、K、L、M。

表 4 供试材料的遗传距离 (右上) 和相似系数 (左下) 分析

Table 4 Analysis of the genetic distance (up right) and similarity coefficient (down left)

平均	母本	父本	三倍体	二倍体	F ₁
Average	Mother	Father	Triploid	Diploid	F ₁
母本 Mother		0.4137	0.3765	0.3997	0.3943
父本 Father	0.6612		0.4002	0.4130	0.4100
三倍体 Triploid	0.6863	0.6703		0.3606	—
二倍体 Diploid	0.6706	0.6618	0.6976		—
F ₁	0.6742	0.6638	—	—	

2.3 供试材料间的亲缘关系及聚类结果

根据所求得的各项材料间的遗传距离和相似系数 , 用 UPGMA 法对 15 个供试材料间的亲缘关系进行了聚类分析 , 所作的 UPGMA 聚类图如图 2 所示。

从图 2 的 UPGMA 聚类图可以看出 , F₁ 代的二倍体各材料尽管都聚在一起 , 但其内部差异性却较大 , 显

示出了二倍体各材料间的遗传多样性和遗传组成的复杂性。F₁ 代的嘉陵 20 号、B、C 3 个三倍体材料中 , 首先是 B、C 聚在一起 , 然后它们再与所有的 F₁ 代的二倍体材料聚类。表明不仅 B、C 间有很高的相似性 , 并且它们与二倍体之间的相似性也大于与嘉陵 20 号之间的相似性。嘉陵 20 号与母本 7920 聚在一起 , 亲缘关系较近 , 这说明嘉陵 20 号的遗传物质来源于二倍体母本的相对较多 , 西庆四号 (4x) 单独聚为一类 , 与其余材料相距较远。

3 讨论

3.1 AFLP 分析对桑树多倍体育种的辅助作用

在多倍体杂交育种中 , 过去那种将形态、经典分类及生态上的差异和科技工作者的育

种经验相结合来判断亲缘关系的方法既费时费力，可预见性又低。本试验的研究结果发现：嘉陵 20 号的亲本间的相似系数为 0.6612，同时，笔者用相同的方法试验得出人工三倍体新桑品种嘉陵 16 号亲本间的遗传相似系数为 0.6607（将另文发表）。从这两个人工三倍体新桑品种及其亲本的 AFLP 分析结果出发，并结合王卓伟等（2001）的研究，可以认为人工三倍体新桑品种选育中亲本间的遗传相似系数在 0.6600 左右较为合适。

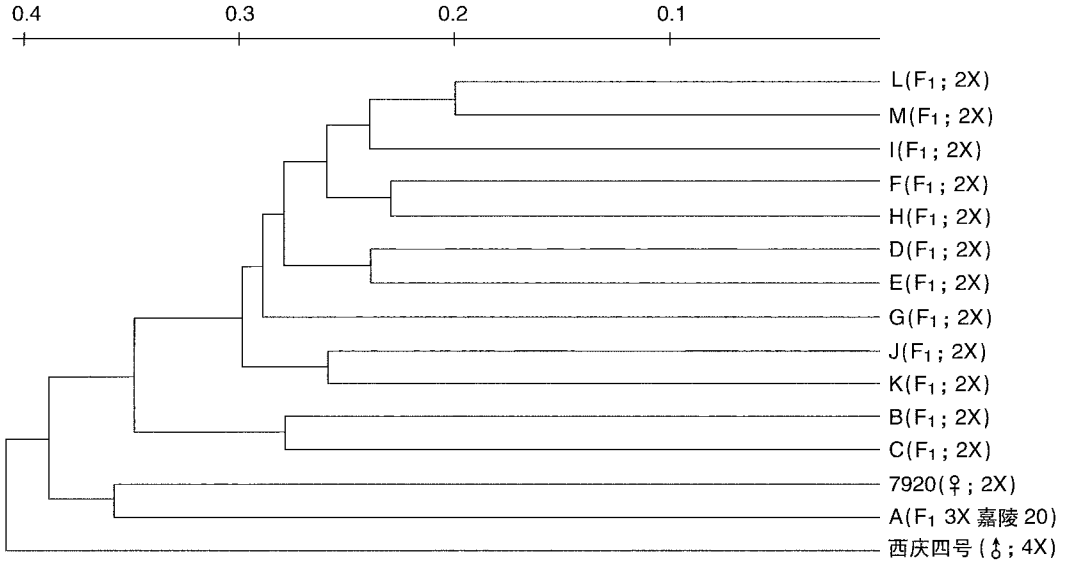


图 2 供试材料的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 Dendrogram generated by UPGMA

本试验 F₁ 代先与二倍体母本 7920 聚合在一起，与四倍体父本相距较远，表明 F₁ 代与二倍体亲本的亲缘关系较近。有可能二倍体与四倍体的杂交 F₁ 代都有这样的趋势，二倍体桑的遗传传递力强于四倍体。

同时，在抗逆、抗病等生活力方面，四倍体不及二倍体，四倍体细胞的分裂速度要比二倍体缓慢得多，这导致了它的生活力较差（季道藩，1984）。二倍体母本交四倍体父本时，由于多倍体效应，父本四倍体的花粉数量成千上万，其中的可育性花粉的数量很多。马国平等（1998）发现：二倍体母本交四倍体父本的受孕率、种子的发芽率都比四倍体母本交二倍体父本高得多。本次试验结果也显示出所有的 F₁ 代都同二倍体亲本的亲缘关系较近，二倍体的遗传传递力比四倍体强。二倍体本身的生活力比四倍体强，同时它不仅提供了卵核，而且提供了卵质、精卵结合以及受精卵的生活、发育环境。又由于生物的某些遗传现象是取决于或部分取决于细胞质内的基因（朱军，2001），二倍体作母本时，它可以将强抗逆性、强生活力等更多的优良性状传递给后代。

因此在今后的人工多倍体杂交育种中，相似系数 0.6600 可以作为选择杂交亲本与组配杂交组合的参考依据。亲本选配时要特别重视二倍体亲本的选择，应选择生活力强、经济性状、农艺性状、生物学特性都较优的二倍体作为杂交亲本之一。并尽可能让二倍体育种材料作母本（♀）。

3.2 二倍体与四倍体的杂交 F_1 代中二倍体材料与三倍体材料的 AFLP 分析

通过本次试验的分析,并结合前人对其细胞水平的染色体分析发现: F_1 代不但在染色体数上出现三倍体、二倍体等染色体倍数的多样性变化,而且三倍体之间和二倍体之间都出现了丰富的多态性和较复杂的聚类现象。图 2 显示出了:3 个三倍体材料聚成两类,多态性为 63.98%,10 个二倍体材料聚成了五小类,多态性为 74.43%。这种复杂的多样性导致了在杂交后代优良三倍体的选择上将要花费大量的人力和物力。然而从另一方面也可以看出:所有 F_1 代材料尽管聚类较复杂,但它们都可以分成两大类,即 10 个二倍体聚为一类,3 个三倍体聚为一类。 F_1 代与母本之间的遗传距离经 t 检验,三倍体与二倍体成显著差异。三倍体与二倍体无论在聚类还是在遗传距离分析结果上,都有很大的不同。因此在桑树人工三倍体新桑品种选育中,可以将 AFLP 分析技术作为筛选鉴定 F_1 代中三倍体植株的辅助技术。今后可以对更多桑树三倍体育种杂交组合杂交 F_1 代进行 AFLP 研究分析,以期找到一个通过对 F_1 代所有材料的全 AFLP 分析,就能够初步区分该材料是否是我们所需要的三倍体材料的途径,以减少在杂交后代优良三倍体的选择上花费的人力和物力。

[参 考 文 献]

- 于歆,徐德昌,崔杰等,2004. 夏红梅双丰系列甜菜品种(系) AFLP 亲缘关系及系谱分析[J]. 分子植物育种, 2(2): 229—234
- 马国平,陆小华,王庆华,1998. 桑树二倍体与四倍体杂交性能的研究[J]. 江苏蚕业, 20(4): 10—12
- 朱军,2001. 遗传学[M]. 北京:中国农业出版社(第3版), 273—293
- 李伯龄,1988. DNA 纹印技术的初步研究—应用 PYNH24 探针分析 $MspI$ 的 RFLP[J]. 中国法医学杂志, 3(1): 4
- 范丙友,刘玉梅,高水平,2004. AFLP 技术在蔬菜作物遗传育种研究上的应用[J]. 北方园艺,(2): 50—51
- 季道藩,1984. 遗传学[M]. 北京:农业出版社(第2版), 160
- 柯益富,1997. 桑树栽培及育种学[M]. 北京:中国农业出版社, 260—267
- Li XT(李向拓), Mao JC(毛建昌), Wu QM(吴权明), 2004. Molecular markers and maize breeding[J]. *Maize Sciences* (玉米科学), 12(1): 26—29
- Nami Goto-Yamamoto, 2000. Phenetic clustering of Grapes (*Vitis* spp) by AFLP analysis[J]. *Breeding Science*, 50: 53—57
- Negi MS, Singh A, Lakshmikumaran M, 2000. Genetic variation and relationship among and within withania species as revealed by AFLP marker[J]. *Genome*, 43: 975—980
- Nei M, Li WH, 1979. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 5269—5273
- Van Droogenbroeck B, Breyne P, Goetghebeur P, et al, 2002. AFLP analysis of genetic relationships among papaya and its wild relatives (Caricaceae) from Ecuador[J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 105(2-3): 289—297
- Wang ZW(王卓伟), Yu MD(余茂德), Lu C(鲁成), et al, 2001. AFLP analysis of genetic background of polyploid breeding materials of Mulberry[J]. *CanYeKeXue* (蚕业科学), 27(3): 170—176
- Yu MD(余茂德), Jing CJ(敬成俊), Wu CR(吴存容), et al, 2004. Breeding of new artificial triploid Mulberry variety "Jialing 20"[J]. *CanYeKeXue* (蚕业科学), 30(3): 225—22
- Zabeau M, Vos P, 1993. Selective restriction fragment amplification: A general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7 (Publication No. 0534858A1)[R]. Paris: European Office