

我国棉花抗枯、黄萎病骨干品种(系)基于 AFLP 的遗传多样性

王省芬, 马峙英*, 张桂寅, 李喜焕, 李瑞奇, 李爱丽

(河北农业大学河北省作物种质资源重点实验室, 河北保定 071001)

摘要: 利用 AFLP 分子标记技术, 对我国 20 世纪 50 年代开展抗枯、黄萎病育种以来培育的 105 份骨干品种(系)的遗传多样性进行了研究。结果表明, 筛选的 20 个 AFLP 引物组合在该品种群体中扩增了 1498 个 AFLP 标记, 其中多态性标记 232 个, 占总标记数的 15.5%。单一引物组合扩增的 DNA 标记数变化在 49~111 之间, 平均每个引物组合扩增的总标记和多态性标记分别为 74.9 和 11.6。在该抗病品种群体中, 有 46 个品种(系)具有特异标记, 占品种总数的 43.81%, 其中引物组合 E41/M50 可使 10 个品种产生特异标记。品种(系)之间的成对欧氏距离总平均值为 4.353, 变幅为 1.732~6.708, 单一品种欧氏距离平均值变幅为 3.531~5.705, 高于总平均值的品种数不足 50%, 表明该陆地棉抗病品种群体的遗传多样性较低。基于 AFLPs 多态性数据的聚类分析, 105 个品种(系)被划分为 5 个陆地棉品种类群(Upland cotton groups, UCGs), 每个 UCG 包含的品种数目不同。

关键词: 棉花; 抗枯、黄萎病; 遗传多样性; AFLP

中图分类号: S562.032 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2005)01-0023-06

Genetic Diversity of Chinese Key Cottons with *Fusarium* and *Verticillium* Wilts Resistance Based upon AFLPs

WANG Xing-fen, MA Zhi-ying*, ZHANG Gui-yin, LI Xi-huan, LI Rui-qi, LI Ai-li

(Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei Province, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: Genetic diversity of 105 Chinese key cottons with *Fusarium* and *Verticillium* wilts resistance was studied based on AFLP markers. Twenty primer combinations were selected to perform the AFLP fingerprinting from 100 primer combinations. A total of 1498 DNA fragments were scored among all materials, averaging 74.9 for each primer combination, of which, 232 (15.5%) bands were polymorphic. The number of DNA bands per primer combination ranged from 49 to 111, with the average of 11.6 polymorphic markers. Forty-six cultivars, as much as 43.81% of the 105 materials, had specific bands. The primer combination, E41/M50, made 10 materials produce specific markers. Mean pairwise genetic distance of 105 cultivars (lines) was 4.353, with the range of 1.732 to 6.708. Range of mean genetic distance for each variety was 3.531~5.705. Less than 50% of materials were below mean genetic distance. The limited genetic diversity was revealed by these results in the population. Based on dendrogram of AFLPs, 105 cultivars (lines) were classified into five upland cotton groups (UCGs). The number of cottons was different in each UCGs, and their geographic origins and descents were diverse.

Key words: cotton; *Fusarium* and *Verticillium* wilts resistance; genetic diversity; AFLP

收稿日期: 2004-07-02, * 通讯作者, mzhy@mail.hebau.edu.cn

作者简介: 王省芬(1970-), 女, 博士, 副教授, 从事棉花遗传和分子育种研究。

基金项目: 教育部重点科技项目(01015)、国家留学归国人员基金、河北省自然科学基金(301167)

枯萎病和黄萎病是危害棉花最为严重的两种病害,选育和应用抗病品种是防治两种病害最为经济有效的手段^[1]。对品种资源进行深入研究,掌握品种资源遗传信息,是培育和利用抗病品种的重要基础。自20世纪50年代以来,我国已育成上百个抗枯、黄萎病品种,这些材料已成为我国进一步开展棉花抗病遗传育种研究的基本资源材料。前人利用RAPD技术对其中部分材料的遗传多样性、抗病性和系谱关系进行了研究^[2-4],但利用AFLP技术对我国抗枯黄萎病骨干品种群体分子水平遗传多样性系统研究的报道甚少。AFLP分子标记技术具有一次性扩增片段数量多、多态性高、稳定性强、重复性好等优点。该技术自诞生以来已被广泛应用于种质资源研究^[5-11],为种质资源的评价与合理利用提供了一种重要手段。本研究拟采用AFLP技术建立我国棉花骨干抗枯黄萎病品种分子指纹图谱,在分子水平上进一步分析我国棉花抗病品种资源的遗传多样性,为资源有效利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

1999—2000年从中国农业科学院国家棉花中期种质库和河北农业大学棉花遗传育种研究室收集棉花品种(系)162份,这些材料均为我国自20世纪50年代开展棉花抗病育种以来培育的抗枯、黄萎病品种(系)。2000年和2001年分别将这些材料种植在河北农业大学试验站枯、黄萎病圃,进行抗病性鉴定。根据品种推广面积、地理来源、抗病性表现和育成年代,选择在生产上先后推广的105个棉花抗枯、黄萎病品种(系)作为试验材料。其中20世纪50年代品种(系)2个,60年代11个,70年代20个,80年代32个,90年代36个,其它4个,分别来自黄河流域棉区、长江流域棉区、西北内陆棉区和北部特早熟棉区等,遍布16个省(自治区)。

1.2 试验方法

棉花基因组DNA提取按照张桂寅等^[12]所述方法进行。棉花AFLP体系采用赵宏等^[13]方法进行。AFLP体系中的限制性内切酶(EcoRI和MseI)和T4 DNA连接酶分别购自New England Biolabs公司和Promega公司,AFLP引物、接头由上海生工生物工程有限公司合成,Taq DNA聚

合酶和dNTP购自大连宝生物(TaKaRa)生物工程有限公司。

AFLP结果统计:假定凝胶上所有迁移位置相同条带均来自同一位点上的同一等位基因。对扩增产物的电泳结果采用“0-1”系统记录谱带位置,观察某一扩增条带的有无,有带记为“1”,无带记为“0”。数据分析方法:利用SPSS(11.5版)分析软件进行数据处理与聚类分析。105个品种(系)作为研究的样本单元(分类单位),DNA条带作为变量(分类性状),计算两两品种(系)之间的欧氏距离,并用离差平方和法(Ward's method)进行系统聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

棉花的基因组较大,单倍体基因组DNA的大小陆地棉约为2246Mb。前人研究表明^[14],基因组大于 1×10^8 bp的生物,在进行AFLP实验时,采用具有3个选择性核苷酸的引物扩增效果较好,本研究采用EcoRI和MseI具有3个选择性核苷酸的引物各10个,即E32-AAC、E33-AAG、E35-ACA、E36-ACC、E37-ACG、E38-ACT、E40-AGC、E41-AGG、E57-CGG、E71-GGA、M47-CAA、M48-CAC、M49-CAG、M50-CAT、M59-CTA、M60-CTC、M61-CTG、M62-CTT、M71-GGA、M82-TAT,组成100个引物组合。

选用形态上遗传差异较大的9个品种,即陕3619、苏棉4号、86-4、湘棉16号、陕棉4号、川57-681、中棉所12、中31和冀棉20,对100个AFLP引物组合进行筛选,共筛选出20个条带清晰、多态性好的引物组合。

2.2 不同引物组合的扩增结果与多态性比较

利用筛选出的20个引物组合构建105份抗病品种(系)的指纹图谱。20个引物组合共扩增出1498个AFLP标记,其中多态性标记232个,占总标记数的15.5%。单一引物组合扩增的DNA标记数变化在49~111之间,平均每个引物组合扩增的总标记和多态性标记分别为74.9和11.6。引物组合E35/M59扩增的标记最多,达111个,多态性标记也最多,为37;以E37/M59引物组合扩增的标记数最少,为49(表1)。标记一般位于50~650bp之间。

表 1 105 份抗枯、黄萎病品种(系)的 AFLP 扩增结果
Table 1 AFLP amplifications of 20 primer combinations on 105 cottons

引物组合	总标记数	多态性标记数	多态性百分率	引物组合	总标记数	多态性标记数	多态性百分率
E33/M59	88	12	13.64	E33/M82	78	3	3.85
E35/M59	111	37	33.33	E41/M82	78	8	10.26
E36/M59	63	16	25.40	E32/M61	75	7	9.33
E37/M59	49	15	30.61	E33/M61	67	5	7.46
E40/M59	62	8	12.90	E41/M61	54	20	37.04
E41/M59	79	26	32.91	E40/M47	72	16	22.22
E71/M59	53	6	11.32	E36/M50	65	6	9.23
E32/M48	96	5	5.21	E38/M50	70	2	2.86
E33/M48	95	4	4.21	E41/M50	71	19	26.76
E32/M82	110	13	11.82	E40/M62	62	4	6.45

2.3 供试棉花品种(系)的 AFLP 特异标记

分析 105 个品种(系)的 AFLP 指纹图谱发现,有 46 个品种(系)具有特异标记,占品种总数的 43.81%,其中引物组合 E41/M50 可使 10 个品种产生特异标记(表 2)。在每对引物组合中,

每个品种(系)具有特异标记的数目不同,如在 E35/M59 中,盐棉、陕棉 5 号和中棉所 30 分别具有 2 个特异标记,豫棉 22 号具有 3 个特异标记,其它品种只有 1 个特异标记。在 20 对引物组合中,绝大多数品种(系)只有 1 个特异标记。

表 2 具有特异标记的棉花品种(系)及相应引物
Table 2 The cottons with specific bands and corresponding primer combinations

引物组合	品种(系)名称	引物组合	品种(系)名称
E33/M59	鲁 1024(2)、86-1(1)	E36/M50	鄂抗 1 号(1)、中 206(1)
E35/M59	苏棉 8 号(1)、盐棉 48(2)、豫棉 22 号(3)、陕棉 5 号(2)、中棉所 30(2)、豫棉 11(1)、陕 3563(1)、李台 8 号(1)、泗棉 3 号(1)	E41/M50	晋棉 26(1)、中棉所 19(3)、苏棉 2 号(1)、中植 372(1)、泗棉 3 号(1)、豫棉 11(1)、鲁无 401(1)、湘棉 16(1)、鲁棉 11(1)、中 3474(1)
E36/M59	绵无 4176(1)、中棉所 21(1)	E38/M50	晋棉 26(1)、川 73-27(1)
E37/M59	中棉所 23(1)、中棉所 21(1)、南抗 2 号(1)	E41/M82	冀棉 15(1)、中 6331(1)、鲁无 401(1)
E41/M59	中棉所 21(3)、绵无 4276(1)、晋棉 14(2)、鲁 1024(1)、鲁棉 11(1)、冀植 17(3)、苏棉 6 号(2)、苏棉 2 号(1)	E32/M82	鲁无 401(1)、川 52-128(1)、川 73-27(1)、川 磅 2 号(1)、苏棉 6 号(1)、中棉所 21(1)、陕 401(1)
E40/M59	中抗 5(1)、冀棉 3 号(2)、川 73-27(1)、中 8004(1)	E33/M61	晋棉 26(1)、苏棉 28(1)、苏棉 6 号(1)、豫 2067(1)
E71/M59	川 73-27(1)	E32/M61	陕 401(1)、321 双抗(1)
E40/M47	豫无 1309(1)、冀棉 3 号(2)、晋棉 18(1)	E33/M48	平棉 28(1)、冀棉 7 号(1)
E41/M61	中 8004(1)、平棉 28(1)、晋棉 26(1)、豫棉 4 号(1)、冀棉 26(1)、豫棉 10(1)、321 双抗(1)、苏棉 2 号(1)		

2.4 105 个抗枯、黄萎病品种(系)的遗传多样性分析

利用 SPSS11.5 分析软件,对扩增出的 232 个多态性标记,计算 105 个品种(系)两两之间的欧氏距离,并以离差平方和法进行聚类,建立聚类树状图。

品种间的欧氏距离结果(未列出)表明,105 个抗枯、黄萎病品种(系)之间的成对欧氏距离介于 1.732~6.708 之间,欧氏距离总平均值为 4.353,单一品种欧氏距离平均值变幅为 3.531~5.705。其中,陕 5245 和川棉 109 的成对欧氏距离最小为 1.732,表明两个品种之间的亲缘关系

最近,遗传差异小;冀植 17 和陕 401 之间的欧氏距离最大为 6.708,表明两个品种之间的亲缘关系最远,遗传差异大。分析单一品种欧氏距离平均值可以发现,高于欧氏距离总平均值的品种共 52 个,不足供试品种(系)总数的 50%。与欧氏距离总平均值相差最大的是冀植 17(5.705)和陕

401(5.445),相差最小的是川 414(4.378)和钱江 9 号(4.394)。表明不同品种之间具有一定的异质性,但总的来看,该棉花抗病品种群体的遗传多样性较低。

105 个陆地棉品种(系)的系统聚类分析表明(图 1),在阈值取 15.0 时,105 个品种(系)被划分

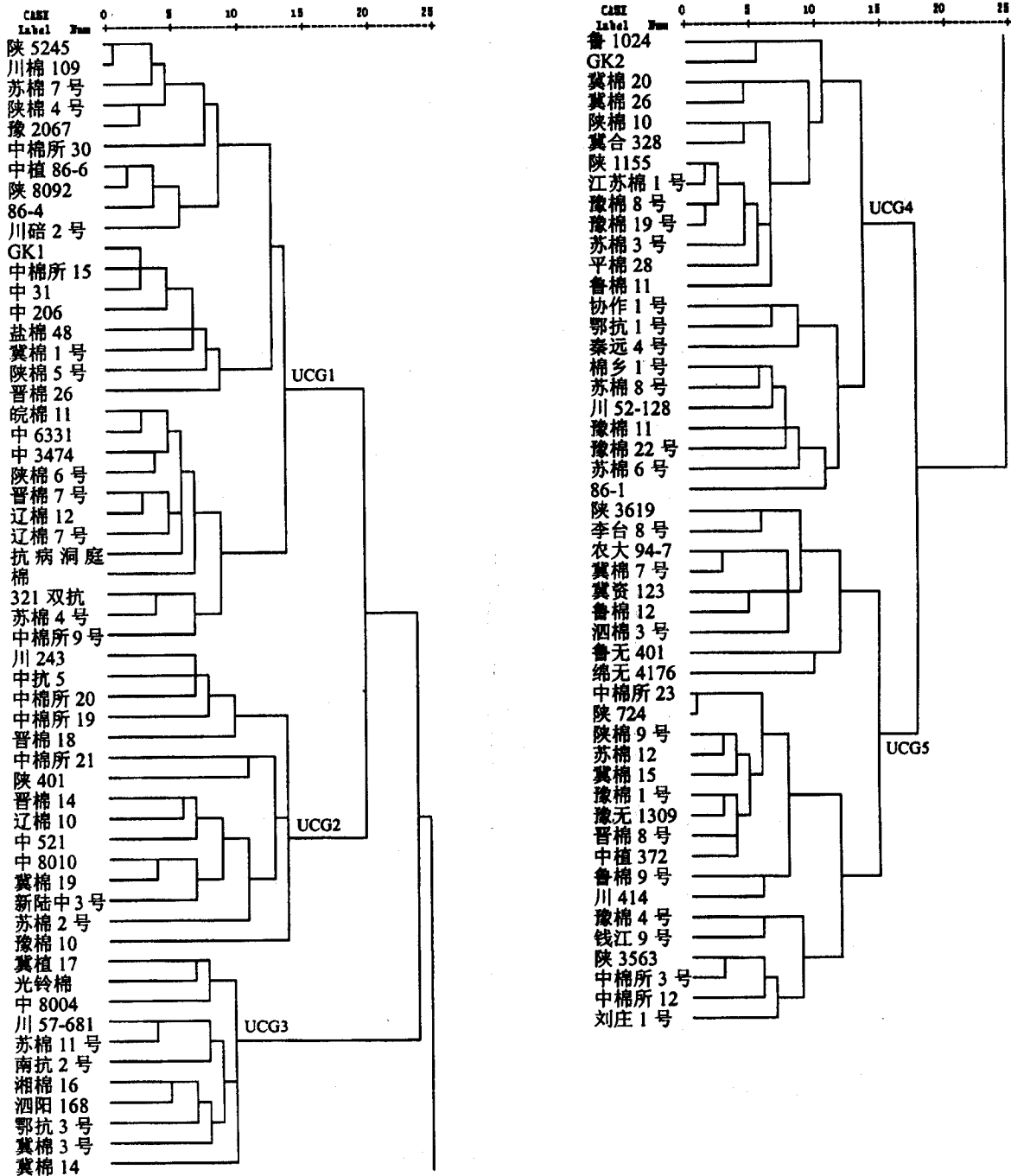


图 1 105 个品种(系)基于 AFLPs 的聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram of 105 varieties(lines) based on AFLPs

为 5 个类群(upland cotton groups, 简称 UCGs)。

UCG1 包括 30 个品种, 有陕 5245、川棉 109、苏棉 7 号、中棉所 9 号、川 243 等品种(系)。与品种系谱关系吻合的有陕 5245(陕棉 4 号×陕棉 6 号)和陕棉 4 号、中植 86-6(中棉所 12×86-4)和 86-4。

UCG2 包括中抗 5、中棉所 20、中棉所 19、豫棉 10、冀植 17 等共 15 个品种(系)。与品种系谱关系吻合的有中抗 5(陕棉 401×冀棉 1 号)和陕棉 401。

UCG3 包括 11 个品种(系), 有光铃棉、中 8004、冀棉 14、川 73-27 等。

UCG4 包括 23 个品种(系), 为鲁 1024、GK2、冀棉 20、冀棉 26、苏棉 6 号、86-1 等品种(系)。

UCG5 包括陕 3619、李台 8 号、农大 94-7、中棉所 12、刘庄 1 号等在 26 个品种(系)。

在所有类群中, 不同地理来源和具有不同血统的品种相互交叉在一起, 如在 UCG1 群中既有来源于岱字棉的, 如陕 5245、川棉 109、苏棉 7 号、86-4 等, 也有来源于斯字棉的陕 8092、盐棉 48、冀棉 1 号、陕棉 5 号等和来自金字棉的中棉所 30 等品种; 有的品种属于长江流域棉区, 如川棉 109、川碛 2 号; 有的属于北部特早熟棉区, 如辽棉 12、辽棉 7 号; 但绝大部分品种来自黄河流域棉区。在每一类群中, 同一单位育成的品种有时较早地聚在一起, 如在 UCG1 群中, 中国农业科学院棉花研究所育成的品种中棉所 15、中 31、中 206 在阈值小于 5 时聚为一类; 中抗 5、中棉所 20、中棉所 19 也较早地聚在一起。

3 讨论

研究品种资源的遗传多样性不仅可以为新品种选育策略的制订和品种的合理化布局提供参考依据, 而且可以为亲本选配、后代遗传变异程度及杂种优势水平的预测提供预见性指导。结合系谱分析, 105 个中国抗病品种(系)中, 具有岱字棉血统的共 36 个, 占 34.3%; 含斯字棉血统的有 16 个, 占 15.2%; 含乌干达棉血统的有 15 个, 占 14.3%; 含福字棉血统的有 11 个, 占 10.5%; 具金字棉血统的有 10 个, 占 9.5%; 其它来源的 17 个, 占 16.2%。说明在我国抗枯、黄萎病品种中, 来自岱字棉血统的品种占有很大比重, 其次是来自斯字棉、乌干达棉、福字棉和金字棉的品种, 我

国陆地棉抗病品种(系)的遗传基础较为狭窄。冯纯大等^[3]对我国抗枯萎病品种的调查分析表明, 我国现有的抗枯萎病品种虽多, 但其遗传基础相当狭窄, 52-128、岱字 15、中棉和乌干达棉为我国抗枯萎病品种的主要抗源。本研究利用 AFLP 多态性标记计算的遗传距离结果表明, 我国陆地棉抗病品种的遗传多样性较低, 从分子水平上证明我国陆地棉抗病品种群体的遗传基础相对狭窄。因此, 加强棉花抗病品种资源的创新研究势在必行。

前人研究表明^[15-18], 利用分子标记技术对棉花品种类群的划分与系谱分析基本一致。本研究利用 AFLP 多态性标记对 105 个品种(系)的聚类分析表明, 品种类群的划分与系谱分析结果难以统一。分析前人研究可以看出, 前人在进行遗传多样性和遗传变异研究时使用的材料一般较少(少于 40 份), 而且品种类群的划分与系谱的一致性程度主要体现在种质系统水平(岱字棉、斯字棉等)上。别墅等用 30 个中国三大主产棉区不同年代有代表性的陆地棉品种, RAPD 分析结果表明品种间的遗传关系与品种自身系谱有关^[15]。武耀廷等^[17]对国内外 36 份陆地棉栽培品种 SSR 遗传多样性的研究表明, 分子标记确定的遗传关系基本上与品种系谱的种质系统一致, 但并不能按系谱或种植生态区域简单地确定品种的归属。郭旺珍等对 21 个陆地棉品种的 RAPD 分析表明^[18], 来自岱字棉系统、斯字棉系统、金字棉系统、乌干达棉系统的棉种作了很好的聚类。本研究类群划分与系谱关系不吻合的可能原因, 一是供试品种材料数目大, 且绝大多数品种是经过复合杂交选育而成, 有些品种的系谱不详或模糊, 加之受育种环境和育种目标的影响, 使育成品种之间的类别划分已不能完全依赖于品种系谱; 二是 20 个引物组合扩增出的 232 个多态性标记, 不能充分反映 105 份棉花材料基因组水平上的差异。对此有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 马峙英, 李兴红, 孙济中, 等. 棉花黄萎病菌致病力分化与寄主抗病性遗传研究进展[J]. 棉花学报, 1996, 8(4): 172-176.
- [2] 刘后利. 作物育种学论丛[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2002.
- [3] 冯纯大, 张金发, 刘金兰, 等. 我国抗枯萎病棉花品种

- (系)的系谱分析[J]. 棉花学报, 1996, 8(2): 65-70.
- [4] 徐秋华, 张献龙, 聂以春, 等. 我国棉花抗枯萎病品种的遗传多样分析[J]. 中国农业科学, 2002, 35(3): 272-276.
- [5] MELLISH A, Coulman B, Fernandez Y. Genetic relationships among selected crested wheatgrass cultivars and species determined on the basis of AFLP markers[J]. Crop Sci, 2002, 42: 1662-1668.
- [6] INCIRLI A, Akkaya M S. Assessment of genetic relationship in durum wheat cultivars using AFLP markers[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2001, 48(3): 233-238.
- [7] KIM M S, Moore P H, Zee F, et al. Genetic diversity of *Carica papaya* as revealed by AFLP markers [J]. Genome, 2002, 45(3): 503-512.
- [8] TOMKINS J P, Wood T C, Barnes L S, et al. Evaluation of genetic variation in the daylily (*Hemerocallis spp*) using AFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 489-496.
- [9] SOLEIMANI V D, Baum B R, Johnson D A. AFLP and pedigree-based genetic diversity estimates in modern cultivars of durum wheat [*Triticum turgidum* L. subsp. *durum* (Desf.) Husn.][J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 350-357.
- [10] ABDALLA A M, Reddy O U K, El-Zik K M, et al. Genetic diversity and relationships of diploid and tetraploid cottons revealed using AFLP[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 222-229.
- [11] PRASHANTH S R, Parani M, Mohanty B P et al. Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. Indica as revealed by AFLP markers [J]. Genome, 2002, 45(3): 451-459.
- [12] 张桂寅, 王省芬, 马峙英. 抗黄萎病低酚棉品种资源 RAPD 分析[J]. 棉花学报, 2002, 14(2): 80-84.
- [13] 赵宏, 王省芬, 张桂寅, 等. 棉花 AFLP 技术体系的摸索与建立[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 1-4
- [14] 袁有禄, 张天真, 郭旺珍, 等. 棉花高品质纤维性状 QTLs 的分子标记筛选及其定位[J]. 遗传学报, 2001, 28(12): 1151-1161.
- [15] 别墅, 孔繁玲, 周有耀, 等. 中国三大主产棉区棉花品种遗传多样性的 RAPD 及其与农艺性状关系的研究[J]. 中国农业科学, 2001, 34(6): 597-603.
- [16] 刘文欣, 孔繁玲, 郭志丽, 等. 建国以来我国棉花品种遗传标记的分子标记分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(6): 560-570.
- [17] 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.
- [18] 郭旺珍, 张天真, 潘家驹, 等. 我国陆地棉品种的遗传多样性研究初报[J]. 棉花学报, 1997, 9(5): 242-247. ●