



不同类型抗虫棉品种基于 RAPD 的遗传多样性分析

朱四元, 陈金湘, 刘海荷, 刘爱玉, 李瑞莲, 周仲华

(湖南农业大学棉花研究所, 长沙 410128)

摘要:以 97014、BR-S-10 和 sGK321 等 14 份不同类型的抗虫棉花品种(系)为基础, 利用 RAPD 分子标记技术, 对这些棉花品种(系)的遗传多样性进行了研究。结果表明, 从 210 个随机引物中筛选出 21 个引物能在 14 份抗虫棉品种(系)间扩增出稳定性较好的多态性片段, 筛选的 21 个引物在该品种(系)群体中共扩增了 137 个 RAPD 标记, 其中多态性标记 57 个, 占总标记数的 42.2%, 平均每条引物扩增 6.52 条带。利用 Jaccard 遗传相似系数计算了 14 份抗虫棉品种(系)的 RAPD 数据的距离矩阵, 按 UPGMA 方法进行聚类, 发现 14 个品种(系)间的遗传距离在 0.0351~1.056 之间。聚类分析表明, 14 个棉花品种可分为 2 大类 4 亚类, 揭示了抗虫棉花品种种质资源的多样性, 大多数品种的遗传基础比较狭窄。

关键词:抗虫棉; RAPD; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号:S562.032 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2007)02-0083-05

Genetic Diversity Analysis and Identification of Insect-resistant Cottons Based upon RAPD Markers

ZHU Si-yuan, CHEN Jin-xiang, LIU Hai-he, LIU Ai-yu, LI Rui-lian, ZHOU Zhong-hua

(Cotton Research Institute, Hu'Nan Agriculture University, Changsha, Hu'nan 410128, China)

Abstract: Genetic diversity analysis and identification of 14 different germplasm varieties (lines) from insect-resistant cotton by the random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) techniques were reported. A total of 210 arbitrary primers were used to the 14 different germplasm varieties (lines) using RAPD techniques and finally 21 primers could produce steady polymorphisms. Total of 137 DNA fragments were scored among all materials, averaging 6.52 for each primer, of which, 57 (42.2%) bands were polymorphic. Cluster analysis by the unweighted pair group method of arithmetic means (UPGMA) showed that 14 varieties (lines) could be divided into two groups with genetic distance from 0.0351 to 1.056. The genetic distance was 0.0351 between JX011 and 33B, which indicated that it is more closely relationship in transgenic pest-resistant cottons than that of others. But the largest genetic distance, was 1.056 between 97014 and sGK321, which showed that the genetic base was narrow. An important reason would be that 97014 was the nectariless pest-resistant cotton, while sGK321 belonged to transgenic Bt+CpTI pest-resistant cotton. Cluster analysis revealed that 14 lines could be divided into two groups. The first group, which included 11 varieties, most were transgenic pest-resistant cotton. The second group, which included 3 varieties, were the nectariless pest-resistant cotton. This experiment demonstrated that RAPD analysis could reliably determine genetic relationships within a diverse array of cotton varieties. Genetic relationships and the genetic similarity obtained from the analysis in present study can help in the selection of parents for breeding purposes and

收稿日期:2006-02-27 作者简介:朱四元(1979-),女,在读博士, zhsy520@126.com

基金项目:湖南省自然科学基金(O2JJY2061)

be used for evaluation of varieties genetic diversity. The analysis revealed that it was corresponding to the geographical distribution and most of the lines had a narrow genetic base.

Key words: insect-resistant cotton; RAPD; genetic diversity; cluster analysis

20 世纪 90 年代以来国内外已在转 Bt 基因抗虫棉的研究及应用方面取得了显著的成就^[1]。但是抗虫转基因植物的大面积应用可能会像喷洒 Bt 制剂一样使目标昆虫对 Bt 产生耐受性^[2]。为了解决这个问题,人们试图通过培育同时表达两种或多种作用机制不同的抗虫蛋白的转基因植物来防止这种情况发生^[3],但对转双价抗虫基因植物的抗虫效果有不同的报道。最近研究发现,以无蜜腺棉与转 Bt 基因品系杂交获得的杂交种在产量、品质和抗虫性方面表现最好,是一种理想的抗虫新材料^[4]。而且,由于形态和 Bt 基因抗虫棉品种在若干性状上呈现互补的特点,可以预见,将 Bt 基因棉与常规的形态抗虫棉杂交,将现代生物技术与常规育种技术相结合,选育既高产优质、又具有多种复合抗虫的棉花品种(系),将是未来抗虫棉研究的主要方向之一。因此,为了选育理想的抗虫棉品种,对不同类型的抗虫棉品种的 RAPD 遗传多样性分析具有重要的意义。

分子标记方法由于不受环境因素影响而被广泛的用于研究棉花品种的遗传多样性和遗传基础分析。王心宇等在对我国 25 个短季棉品种作指纹图谱分析后,认为 RAPD 标记可以区分亲缘关系比较近的品种间的遗传差异^[5]。徐秋华通过 RAPD 分析认为长江和黄河流域两棉区陆地棉品种遗传多样性水平相当^[6],而中棉所育成品种要比河北省育成陆地棉品种遗传多样性丰富^[7]。对抗病棉花品种亦有用 RAPD 方法研究的报

道^[8-9]。实践证明,RAPD 分子标记是棉花遗传多样性和品种遗传基础研究中便捷而有效的方法。本文采用 RAPD 方法,对几种不同类型的抗虫棉品种(系)进行遗传多样性分析,以期为资源利用和抗虫棉选育提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

14 份抗虫棉品种由湖南农业大学棉花研究所和中国农业科学院棉花研究所提供,其中有形态抗虫棉 4 个,分别是 97014、ISA4ne、新 4 和 BR-S-10;转基因抗虫棉 4 个,分别是 sGK321、33B、JX011、97017;其余的为单、双转基因棉配制的品种组合(表 1)。

1.2 实验方法

棉花基因组 DNA 提取采用改良的 CTAB^[10]法,并作必要的改进。棉花 RAPD 体系所用的 RAPD 随机引物购自上海生物工程技术服务有限公司(Sangon),Taq DNA 聚合酶和 dNTP 购自北京鼎国生物公司。

RAPD 反应和电泳:在 PTC-100PCR 仪上进行扩增,反应总体积为 20 μ L,其 Mg^{2+} 2.0 mmol \cdot L⁻¹, dNTPs 0.2 μ mol \cdot L⁻¹, Primer 0.5 μ mol \cdot L⁻¹, Taq polymerase 1.0U, 模板 DNA 40 ng,加 ddH₂O 至总体积 20 μ L。

表 1 供试材料名称及来源

Table 1 Pest-resistant cotton varieties and their sources

编号	材料	材料来源	抗虫特性
1	农杂 417	湖南农业大学棉花研究所	JX011 \times 新 5
2	97014	湖南农业大学棉花研究所	无蜜腺形态抗虫
3	ISA4ne	中国农业科学院棉花研究所	无蜜腺形态抗虫
4	sGK321	中科院遗传所	转 Bt+CpTI 双价基因
5	33B	美国	转 Bt 基因
6	JX011	湖南农业大学棉花研究所	转 Bt+CpTI 双价基因
7	农杂 409	湖南农业大学棉花研究所	JX011 \times 常 5
8	97017	湖南农业大学棉花研究所	转 Bt 基因
9	农杂 296	湖南农业大学棉花研究所	97017 \times 新 10
10	湘棉 10 号	湖南省棉花研究所	常规抗虫棉
11	农杂 413	湖南农业大学棉花研究所	JX011 \times 晋 1
12	新 4	湖南农业大学棉花研究所	多毛形态抗虫
13	BR-S-10	中国农业科学院棉花研究所	无蜜腺形态抗虫
14	农杂 407	湖南农业大学棉花研究所	JX011 \times 97014

PCR 反应程序为:94℃预变性 2 min,94℃变性 30 s,37℃退火 1 min,72℃延伸 1.5 min,循环 40 次,72℃后延伸 5 min。取 10 μL RAPD 扩增反应产物于 1.2%琼脂糖胶上电泳,EB 染色,电泳缓冲液为 1×TAE,电泳 2~3 h,在 DOC-1000 凝胶成像仪上进行观察并照相。

数据统计分析:根据每个位点上谱带的有无分别用“1”、“0”代表。每个引物重复 2~3 次,统计有重复性的扩增带。用 Nei 和 Li 公式 $S = 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 计算品种间相似性系数^[11],其中 N_{xy} 为品种 x、y 共有的带数, N_x 、 N_y 分别为品种 x、y 具有的带数;再用公式 $D = -\ln S$ 计算遗传距离,并用 CLUSTER 软件的 UPGMA 法作聚类分析。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

棉花的基因组较大,陆地棉单倍体基因组 DNA 的大小约为 2246Mb^[12]。本研究随机选择

的 210 条 RAPD 引物中,有的随机引物对 14 份材料不能扩增出任何谱带,有的随机引物扩增出的谱带很弱且仅能对部分材料扩增。实验筛选出 21 个对供试抗虫棉材料扩增谱带具有较好重复性和清晰性的引物,即 S16、S37... 等(表 2)。由于不同引物对品种鉴定和亲缘关系的分析结果有所不同,因此,选择一定数量的引物对供试材料进行扩增是获得客观结果的前提。

2.2 抗虫棉基因组 DNA 扩增

2.2.1 抗虫棉基因组 DNA 的多态性分析。筛选的 21 个随机引物均能在 14 份抗虫棉材料的基因组 DNA 中产生明显的扩增差异带。21 个随机引物在 14 份抗虫棉材料中总扩增出 137 条谱带,多态带有 57 条,占扩增总带数的 42.2%,每条引物扩增的带数除 S96 引物有 2 条外,其它的均在 3~10 条之间,平均为 6.52 条。其中扩增带数最多的为 S23,具 11 条扩增带,但多态条带较少只有 2 条;多态性最好的引物是 S162,多态性比例达到了 85.7%(表 2)。

表 2 21 个随机扩增引物对 14 个抗虫棉品种 DNA 的扩增结果

Table 2 The data of the amplified with 21 random primers for 14 pest-resistant cotton varieties

引物	扩增总带数 /条	多态性带数 /条	多态性比例 /%	引物	扩增总带数 /条	多态性带数 /条	多态性比例 /%
S15	7	2	28.6	S91	9	5	55.5
S16	5	2	40.0	S96	2	1	50.0
S20	7	3	42.9	S173	8	3	37.5
S23	11	2	18.2	S162	7	6	85.7
S26	9	4	44.4	S148	6	2	33.3
S28	3	3	100.0	S177	9	1	11.1
S37	7	4	55.6	S1030	4	3	75.0
S39	6	1	16.7	S1126	4	1	25.0
S48	4	3	75.0	S1335	5	3	60.0
S86	10	2	20.0	S2126	4	3	75.0
S87	10	3	30.0	合计	137	57	42.2

2.2.2 RAPD 标记的聚类分析。从 14 份抗虫棉材料之间的遗传距离矩阵(表 3)和聚类图(图 1)可知,抗虫棉材料间遗传距离变幅较大,变幅范围在 0.0351~1.0561 之间。其中 JX011 与 33B 的遗传距离最小为 0.0351,与农杂 417 的遗传距离也较小,表明它们之间的亲缘关系较近;97014 与 sGK321 之间的遗传距离最大,为 1.0561。表明它们之间的亲缘关系较远,这可能与 97014 为无蜜腺形态抗虫棉而 sGK321 为转基因棉有关。

从聚类图(图 1)可以看出,当遗传距离 = 0.902 时,14 份抗虫棉材料被划分为两大类: I 大

类包括 11 个品种(系),有 33B、JX011、农杂 417 等转基因抗虫棉; II 大类包括三个品种(系),分别是中棉所的 ISA4ne、BR-S-10 和湖南农大的 97014,这 3 个品种都为无蜜腺的形态抗虫棉品种,故较早的聚为一类。其中第 I 大类包括 3 个亚类,第一亚类包括湘棉 10 号、新 4 和 97017 三个品种;第二亚类有农杂 409、农杂 296 和农杂 413 三个品种,这一亚类以农杂系列为主,均为以转基因品种为亲本所配制的品种组合;第三亚类包含的品种数量最多,有 5 个材料,分别是 33B、JX011、农杂 407、sGK321 和农杂 417,其中 JX011

和 sGK321 为转 *Bt*+*CpTI* 双价基因的品种, 农杂 417 和农杂 407 是以 JX011 为亲本配制的杂交组合, 所以它们都聚为此类。

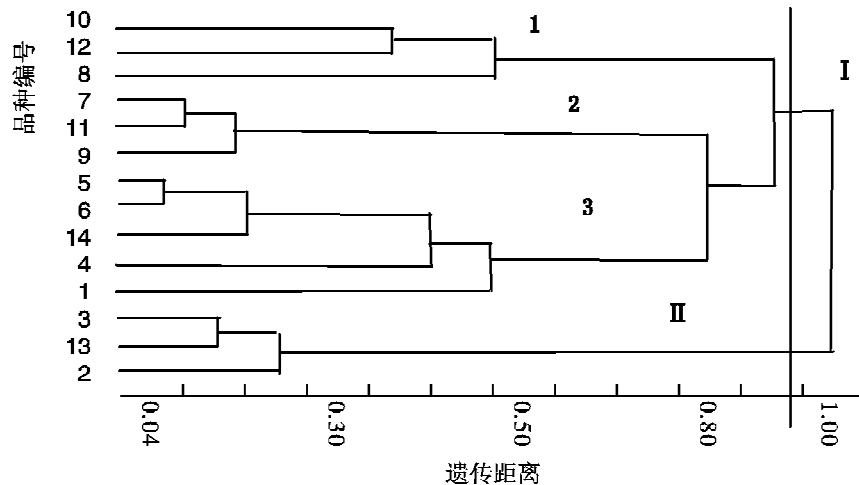


图 1 14 个抗虫棉品种基于 RAPD 的聚类图(品种编号同表 1)

Fig. 1 Dendrogram of 14 Pest-resistant cotton varieties based on RAPD(the codes same to table 1)

表 3 不同类型抗虫棉的 RAPD 遗传距离矩阵

Table 3 Matrix of genetic distance of RAPD in pest-resistant cottons

序号	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1													
2	0.9163												
3	0.5390	0.2231											
4	0.2048	1.0561	0.6568										
5	0.1671	0.6061	0.4855	0.1892									
6	0.1178	0.6506	0.4055	0.1431	0.0351								
7	0.1823	0.9163	0.5390	0.2048	0.2624	0.2048							
8	0.5390	0.9163	0.5390	0.3001	0.3677	0.3001	0.2877						
9	0.2451	0.8650	0.3629	0.3677	0.4463	0.3677	0.2451	0.4964					
10	0.4055	0.9163	0.6931	0.3001	0.1671	0.2048	0.5390	0.4055	0.8329				
11	0.2451	0.8650	0.4964	0.2624	0.3285	0.2624	0.0445	0.2451	0.2007	0.6506			
12	0.4055	0.9163	0.6931	0.4055	0.2624	0.2048	0.5390	0.4055	0.8329	0.2877	0.6506		
13	0.5596	0.1942	0.1542	0.6931	0.3629	0.4055	0.5596	0.5596	0.5108	0.5596	0.5108	0.7419	
14	0.2231	0.7419	0.7340	0.1542	0.1478	0.1542	0.4463	0.5798	0.5390	0.2231	0.5390	0.3285	0.6061

从聚类结果可以看出, 形态抗虫棉基本聚为一类, 且和转基因棉遗传距离较远, 表明它们之间的亲缘关系较远。故在杂种优势利用时可以将形态抗虫和转基因抗虫棉作为亲本选出理想的新型抗虫棉品种。但是多毛的形态抗虫棉和无蜜腺形态抗虫棉没有聚在一起, 可能它们之间的亲缘关系较远。

3 结论与讨论

3.1 用 RAPD 技术对不同类型抗虫棉品种(系)间遗传关系分析的可行性

品种资源的遗传多样性研究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。RAPD 技术的检测结果可为杂种优势的利用提供依据^[13]。一般来说, 在聚类分析树状图中, 距离比较远或聚在不同类型的品种, 其杂交优势较高^[14]。本研究首次对三种不同类型的 14 份抗虫棉进行了 RAPD 分析, 结果表明: 14 个抗虫棉花品种(系)被分成两大类, 第 I 大类又包含 3 个亚类, 这些品种亲缘关系的远近一看便知; 从聚类图可以看出: 3 个无蜜腺的品种 BR-S-10、97014 和 ISA4ne 与其它抗虫棉品种之间存在较大差异, 因此可以利用形态抗虫棉和转基因棉花品种进行杂交, 配制新的抗虫组合、选育优质高产的抗虫棉新品种。

所以,利用这种树状图可以很方便、直观、快速、有效地进行亲本选配,减少盲目性,这对抗虫棉花新品种的选育和杂种优势的利用具有很重要的意义。说明应用 RAPD 技术进行棉花品种(系)间进行遗传关系分析是可行的。

3.2 PCR 反应组分对 RAPD 扩增的影响

利用 RAPD 分析品种的遗传多样性受品种的遗传关系远近的影响。亲缘关系远,少数引物就可揭示其遗传差异;但一些亲缘关系较近的品种则必须用较多的引物才能揭示出遗传差异。因此,利用较多的引物才能揭示品种间较小的差异。RAPD 技术是以 PCR 为基础的,PCR 的假阳性、重复性差的缺点也会存在。但通过制备高纯度的 DNA 模板,严格控制试验条件能获得较高的重复性。本研究发现 Mg^{2+} 浓度和 Taq 酶的质量是 RAPD 扩增的保证, Mg^{2+} 浓度过高会产生严重的拖尾现象;实验用了不同公司的酶做比较,发现酶的活性对 RAPD 扩增影响很大,Taq 酶活性低扩增的带非常弱。因此,Taq 酶活性、 Mg^{2+} 浓度和模板 DNA 纯度是 RAPD 分子标记技术的三个关键的因素。

参考文献:

- [1] 郭三堆,倪万潮,徐琼芳. 编码杀虫蛋白融合基因和表达载体及其应用[P]. 中国专利, ZL95119563. 8, CN12 15/32, 1995-12-28.
- [2] SANTONS M O, Adang M J, Ai J N, et al. Testing transgenes for insect resistance using *Arabidopsis* [J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 182-194.
- [3] 郭三堆,崔洪志,夏兰芹,等. 双价抗虫转基因棉花的研究[J]. *中国农业科学*, 1999, 32(3): 1-7.
- [4] 吴征兵,张金发,冯纯大,等. 棉花抗虫新杂交材料研究[J]. *华中农业大学学报*, 1999, 18(4): 307-310.
- [5] 王心宇,郭旺珍,张天真,等. 我国短季棉品种的 RAPD 指纹图谱分析[J]. *作物学报*, 1997, 23(6): 668-676.
- [6] 徐秋华,张献龙,聂以春. 长江、黄河流域两棉区陆地棉品种的遗传多样性比较研究[J]. *遗传学报*, 2001, 28(7): 683-690.
- [7] 徐秋华,张献龙,冯纯大,等. 河北省和中棉所育成陆地棉的遗传多样性分析[J]. *棉花学报*, 2001, 13(4): 238-242.
- [8] 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性分析[J]. *中国农业科学*, 2002, 35(3): 272-276.
- [9] 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.
- [10] 宋国立,崔荣霞,王坤波,等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. *棉花学报*, 1998, 10(5): 273-275.
- [11] NEIM, Li W H. Probability of identical monomorphism in related species[J]. *Genet Res*, 1975, 26(1): 31-43.
- [12] 王省芬,马峙英,张桂寅,等. 我国棉花抗枯、黄萎病骨干品种(系)基于 AFLP 的遗传多样性[J]. *棉花学报*, 2005, 17(1): 23-28.
- [13] 王学得,潘家驹. 棉花亲本遗传距离与杂种优势间的相关性研究[J]. *作物学报*, 1990, 16(1): 32-38.
- [14] 徐静斐,孙五成,程融,等. 数量遗传学与水稻育种[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1990. ●