

不同来源棉花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析

姜 伟, 朱宏波*, 何觉民

(广东海洋大学农业生物技术研究所, 湛江 524088)

摘要: 采取 ISSR 分子标记对 48 份棉花种质资源的遗传多样性进行分析, 从 60 条 ISSR 引物中筛选出 11 条引物, 这 11 条引物共扩增出 92 个条带, 平均每条引物扩增出 8.36 个条带; 其中多态性带 77 个条带, 多态率达 83.70%。UPGMA 聚类分析显示, 48 份材料的相似性系数 (GS) 变化范围在 0.27~0.93 之间。聚类将 48 个种质资源划分为 4 个大类 (GS=0.55), 湛江野生棉、廉江野生棉与其它品种在遗传上有很大差别, 属于较原始类型, 归为一类; 长绒棉与陆地棉品种存在明显的遗传差异也单独归为一类; 其它不同省份的陆地棉品种在遗传上有较高的相似性, 归为其它类型。分析结果表明, ISSR 具有丰富遗传多样性和稳定性, 是一种较好的遗传分子标记, 适宜于棉花品种遗传多样性分析。

关键词: 棉花; 品种资源; ISSR 标记; 遗传多样性

中图分类号: S562.02 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)05-0348-06

Genetic Diversity in Germplasm Resources of Cotton from Different Area Based on ISSR Markers

JIANG Wei, ZHU Hong-bo*, HE Jue-min

(Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang, guangdong 524088, China)

Abstract: The genetic diversity of 48 cotton accessions were analyzed by using ISSR markers. 11 primers were screened out of 60 primers. Total of 92 bands were detected, 77 of them were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 83.70%. UPGMA Cluster analysis based on ISSR data showed that the genetic similarity (GS) coefficient of 48 accessions ranged from 0.27 to 0.93. 48 germplasm resources could be categorized into four major groups, wild cotton of Zhanjiang and Lianjiang, Guangdong province, showed great genetic difference from other materials, fell into one group, belong to primitive group. *G. barbadense* cotton were obvious genetic different from *G. hirsutum*, also fell into one group, and high similarity among the rest cultivars from different provinces formed other groups. The study indicated that ISSR molecular marker is an efficient tool with high polymorphism and stability for analysis the genetic diversity and relationship of cotton germplasm resources.

Key words: cotton; germplasm resources; ISSR marker; genetic diversity

目前已有多种 DNA 分子标记, 如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等分子标记已被用于各种物种的分子连锁图的构建、遗传多样性分析、品种鉴定、分子标记辅助育种等方面的研究^[1,8-15]。利用分子标记进行棉花多样性的研究虽起步较晚, 但发展迅速。郭旺珍等^[2-6]先后对不同区域、不同材

料、不同性状的棉花品种进行了遗传多样性研究, 并利用 RAPD 技术对不同类型的抗虫棉品种进行了遗传多样性分析; 孙君灵^[7]利用 SSR 标记对棉花 γ 射线诱变后代的遗传多样性进行了研究。于雯雯等利用 RAPD 对 29 份短季棉品种进行了遗传多样性分析^[17]; 王省芬等利用 SSR 和 AFLP

对 58 个品种进行了鉴定^[18]。以上标记方法各有特点,但都有一定局限性,如 RAPD 标记引物序列较短、退火温度低、重复性难以保证;SSR 标记对技术要求高、费用昂贵等。为了更好地进行品种资源亲缘关系的鉴定,开发更多多态性高、稳定性好、易于操作的 DNA 分子标记是有必要的。

锚定简单序列重复(Inter-simple sequence repeat, 简称 ISSR)是由 Zietkiewi C Z^[9] 1994 年创建的一种新型分子标记,它无需预先克隆和测序而又广泛存在 SSR 的特点。有研究表明,ISSR 序列一般都在 15~24 bp,反应的退火温度为 52~57℃,比 RAPD 的 36~40℃高出较多,因而具有更高的重复性且比 SSR 操作简单、技术更加稳

定可靠,已在很多作物的遗传研究中得到了应用^[9-10],但 ISSR 标记在棉花研究上报道不是很多。本研究收集了 48 份棉花种质资源,利用新型的 ISSR 标记方法对它们进行品种资源遗传多样性分析,旨在揭示不同来源材料之间的关系,比较遗传差异,进一步为 ISSR 标记在棉花遗传多样性上的应用提供理论依据和技术支持。

1 材料和方法

1.1 材料

实验中 48 份棉花品种资源(表 1)均由广东海洋大学农业生物技术研究所雄性不育实验室提供。

表 1 参试品种及其来源

Table 1 Cotton varieties and their sources

序号	材料来源	品种(系)名	序号	材料来源	品种(系)名
c1	山东棉花研究中心	鲁棉研 17	c25	美国	DP99B
c2	山东棉花研究中心	鲁棉研 18	c26	浙江农业大学	浙杂 166
c3	河北新乡	邯 333	c27	山西农科院	晋棉 26
c4	河北新乡	邯 284	c28	山东棉花研究中心	鲁棉研 21
c5	中棉所	中棉所 23	c29	中国农科院中棉所	中棉所 45
c6	中棉所	中棉所 29	c30	河北农科院	晋棉 25
c7	中棉所	中棉所 35	c31	河南郑州	农大同 A
c8	中棉所	中棉所 36	c32	河北石家庄农科院	冀棉 21
c9	中棉所	中棉所 41	c33	新疆兵团	军棉 1 号
c10	河北农科院	石远 321	c34	新疆兵团	中绒棉 205
c11	河南新乡	中 30-31 系	c35	山西农科院	晋棉 33
c12	河北农科院	冀棉 17	c36	新疆兵团	新海 17
c13	河南农科院	豫生 8 号	c37	新疆兵团	新海 18
c14	河南农科院	豫研 9 号	c38	新疆兵团	新海 21
c15	新疆兵团	中绒棉 96-21	c39	新疆兵团	新海 22
c16	河南豫园	豫棉 15-981	c40	新疆兵团	长绒棉 203
c17	中棉所	中棉所 42	c41	广东廉江	廉江野生棉
c18	美国	美抗 II	c42	河南民权县	新植 1 号
c19	河北农科院	冀棉 25	c43	河北农科院	锦科 133
c20	美国	棕色棉	c44	河南新乡	国抗 36
c21	新疆兵团	新陆中 7 号	c45	河南新乡	农乐棉 1 号
c22	广东湛江	湛江野生棉	c46	新疆兵团	新陆早 3 号
c23	山东农业大学	97-52	c47	中棉所	中棉所 43
c24	山东聊城	山东丰抗棉 6 号	c48	河南农科院	双抗保铃棉

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取、纯化。每个参试材料分别随机选取 10 个单株的幼嫩部分叶片混合后,采用改进的 SDS 法获得棉花品种的总 DNA 并纯化^[11]。纯化后加 TE 溶解,定量稀释成终浓度为 20 mg · L⁻¹, -20℃ 放冰箱保存备用。

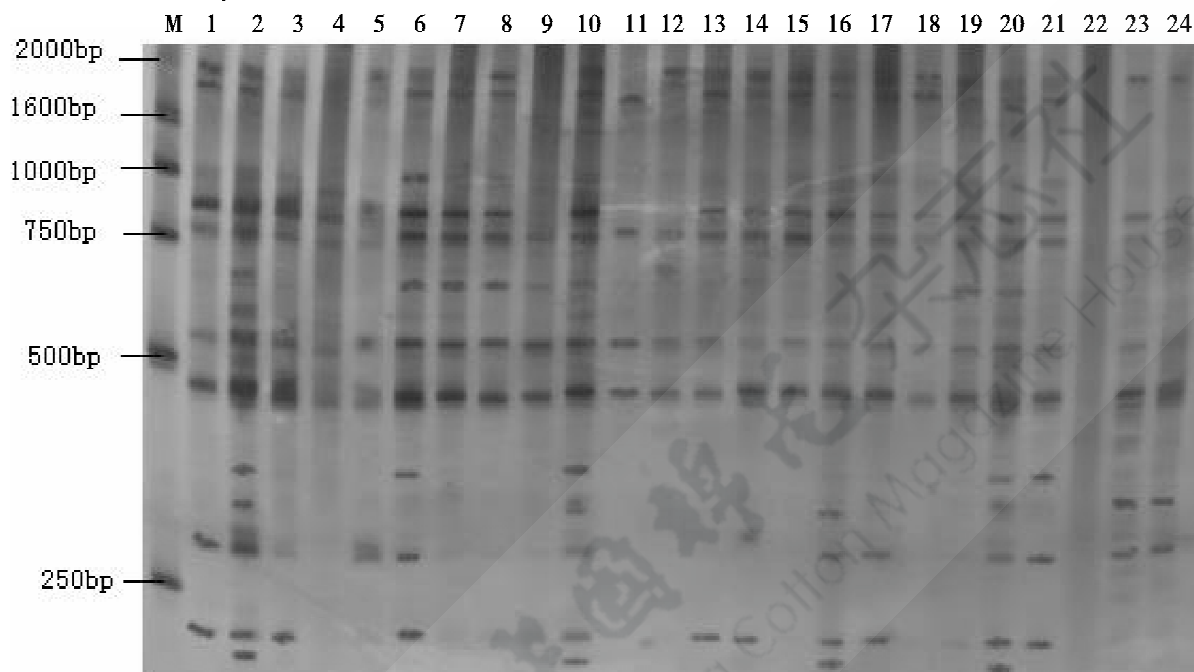
1.2.2 ISSR 引物的筛选。实验从哥伦比亚大学提供的 96 条常用 ISSR 引物序列中选出 60 条通用引物,交由上海生工生物工程技术有限公司合成,为了得到有效的 ISSR 分子标记,对已合成的 60 个 ISSR 引物进行了前期预筛选试验。

以中棉所 36、新海 17、鲁棉研 18 三个品种进行预筛选,最终从 60 个引物中选出 11 个扩增条带清晰、重复性好及多态性高的 ISSR 引物(表 2)用于 48 个棉花材料的 PCR 扩增及多态性研究。

1.2.3 ISSR 反应体系的建立及程序。反应体系总体积为 25 μL,包括 10 × PCR Buffer(含 200 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, 2.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 500 mmol · L⁻¹ KCl pH 8.3) 2.5 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂ 2 μL, Taq 酶(1.5 U · μL⁻¹) 2 μL, 2.5 mmol · L⁻¹ dNTP 1.5 μL(酶和 dNTP 购自北京鼎国生物技术有限公司), 20 mg · L⁻¹ 模板

DNA $2 \mu\text{L}$, $33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 引物 $2 \mu\text{L}$,加 ddH_2O 至 $25 \mu\text{L}$ 。反应程序为: 94°C 预变性 5 min ; 94°C 变性; $52\sim 56^\circ\text{C}$ 退火(对不同引物的退火温度进行了优化) $30\sim 45 \text{ s}$; 72°C 延伸 2.5 min ; 2~4 步骤循环 3~6 次; 72°C 延伸 5 min ; 4°C 下保存, PCR 扩增在 Thermo Hybaid PCR 仪上进行。

1.2.4 PCR 扩增及凝胶电泳。参考 Williams 等^[12]聚丙烯酰胺凝胶电泳硝酸银银染法,实验采用 5%非变性聚丙烯酰胺凝胶(将和甲叉丙烯酰胺按 19:1 配成 30%的丙烯酰胺,然后用蒸馏水稀释至 5%)每孔点样 $6 \mu\text{L}$,以 100W 恒定功率电泳 2~3 h,电泳完后银染检测,把凝胶晾干照相保存(图 1-2)。



M: 分子量标准

图 1 引物 809 对 1~24 号棉花品种的扩增结果

Fig. 1 The PCR amplified results using primer 809 on 1~24 accessions of cotton

M 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47 48

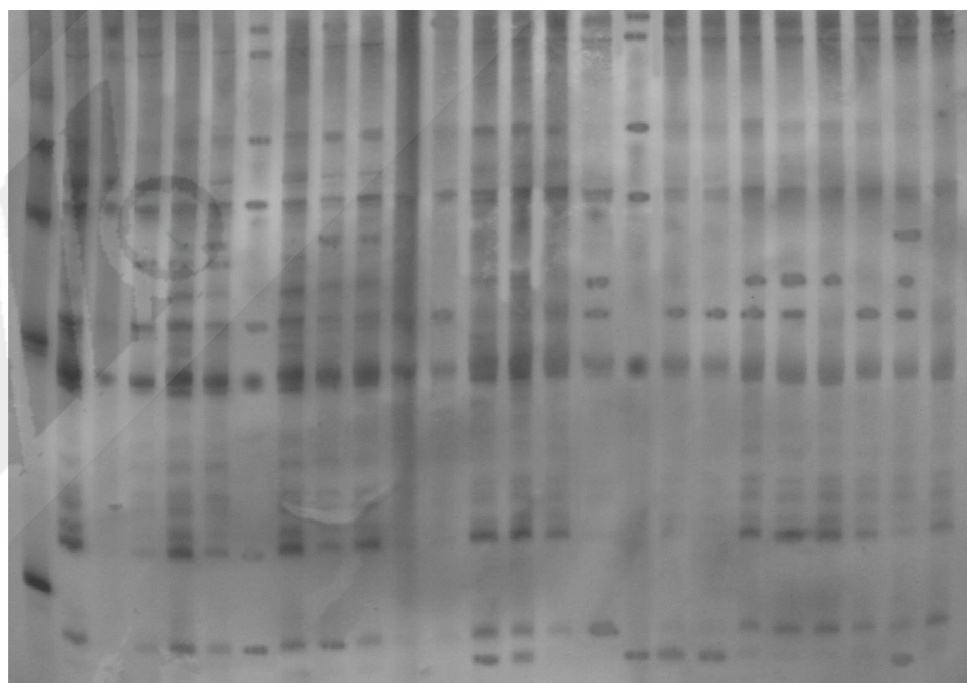


图 2 引物 809 对 25~48 号棉花品种的扩增结果

Fig. 2 The PCR amplified results using primer 809 on 25~48 accessions of cotton

1.2.5 数据处理与分析。根据电泳结果记录清晰可重复的条带,采取 0/1 赋值计带,ISSR 是显性标记,对于同一引物的扩增产物,迁移率相同的条带记为 1 个位点,扩增阳性(有条带出现)赋值为“1”,扩增阴性(无条带出现)赋值为“0”,缺失的记为“2”,所得数据输入 Excel 2003 建立原始表征数据矩阵,用 NTSYSp-2.02J 软件中的 SimQuaL 法计算品种的遗传相似系数(GS),用 SHAN 法进行 UPGMA 聚类分析绘制树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 扩增产物的多态性分析

在扩增筛选出的 11 个引物中(表 2),有 10 个二核苷酸重复序列,一个四核苷酸重复序列,其中(GA)_n重复序列出现了五次,(AG)_n、(AC)_n各出现了两次,在所选引物中,多态性最高的(GA)_n重复序列的引物有 UBC811、UBC840 和 UBC841 可分别扩增出 11 和 10、15 条带,且多态

性比率分别达 100%、90%和 80%。因此,如果对棉花品种进一步做 ISSR 研究,其引物应首选该二核苷酸重复序列。另外,通过与 Marker 的分析比较,棉花的 ISSR 扩增片断大约集中在 200 bp 至 2000 bp 之间。

2.2 ISSR 多态性分析

另从表 2 可以看出,11 个 ISSR 引物在 48 个材料中共扩增出 92 条带,其中 77 条为多态性条带。每个引物扩增的 DNA 带的数量范围为 5~15 条,平均 8.48 条,其中引物 UBC841 扩增出来的带最多,为 15 条;UBC808、UBC824、UBC891 扩增出的带最少,各为 5 条。引物的位点多态性最高达 100%,最低为 60%,平均位点多态性达 83.7%。由此表明,ISSR 扩增出来的棉花 DNA 片断具有较高的多态性。这也说明了 ISSR 能检测较多的遗传位点,配以高敏感度的聚丙烯电泳检测,能获得多态性较好的 PCR 扩增结果。

表 2 引物序列及多态性比较

Table 2 The sequence of primers used and their polymorphism comparison

编号	引物序列(5'→3')	退火温度/℃	总条带 No.	多态性带	多态性百分率/%
UBC808	(AG) ₈ C	52	5	4	80.0
UBC809	(AG) ₈ G	56	13	10	76.9
UBC811	(GA) ₈ C	55	11	11	100
UBC815	(CA) ₈ T	52	7	6	85.7
UBC824	(AC) ₈ T	54	9	8	88.9
UBC826	(AC) ₈ G	52	6	5	83.3
UBC840	(GA) ₈ YT	56	10	9	90.0
UBC841	(GA) ₈ YC	56	15	12	80.0
UBC842	(GA) ₈ AYG	52	5	3	60.0
UBC873	(GACA) ₄	52	6	6	100
UBC891	HVH(TG) ₇	52	5	3	60.0
总和			92	77	
平均			8.36	7.0	83.7

注:H=(A,C或T);V=(A,C或G);Y=(C或G)。

2.3 供试材料的遗传关系

2.3.1 遗传相似性分析。将扩增结果输入软件得到供试材料的相似性矩阵表后看出,各品种(系)的 GS 值在 0.27~0.93 之间,平均 GS 值为 0.62。在 48 份棉花材料中廉江野生棉(41)与中棉所 35(7)、豫棉研 9 号(14)和豫棉 15-981(16)三个品种的遗传相似系数均小于 0.30,说明它们之间的基因组差异较大,遗传距离及亲缘关系较远。而遗传相似系数最高的为新海 17(36)、新海 18(37),值为 0.93,说明了它们之间基因组组成

与核苷酸序列比较相似,它们间的遗传亲缘关系最近。此外,由遗传相似性分析可知,来自我国黄河流域棉区的 32 份陆地棉材料,其遗传相似系数范围在 0.45 到 0.91 之间,而大多数品种间相似性系数在 0.75 以上,说明我国大多数陆地棉栽培具有较高的遗传相似性,亲缘关系较为接近。5 个长绒棉之间的遗传系数在 0.62~0.93 之间,表明它们之间具有类似的遗传基础。在遗传上表现出一定的相似性,也说明品种改良有利于提高品种的一致性,但同时也导致了遗传多样性丢失。

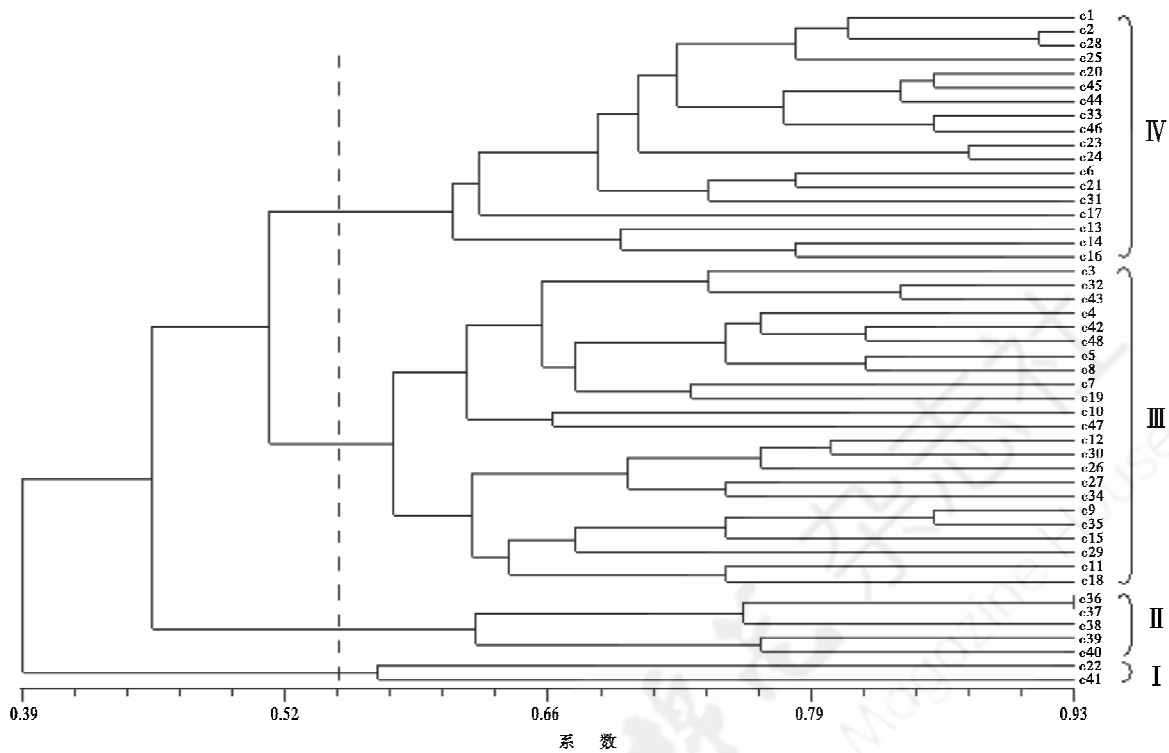


图3 UPGMA法分子聚类图

Fig. 3 Dendrogram illustrating the phylogenetic relationship based on UPGMA cluster analysis methods

2.3.2 聚类分析。基于遗传相似系数,利用UPGMA法对供试材料进行聚类分析(图3)。聚类图0.55阈值处可以把48份棉花品种(系)聚为4类,其中野生棉与长绒棉(海岛棉)被分为差异明显的第I类和第II类;而第III类、第V类均为陆地棉品种,从而说明野生棉、海岛棉与陆地棉三种棉属之间存在着较大的遗传差异。在第III类和第V类陆地棉品种中表现出以下几个特点:①大多数含有共同亲本或亲子血缘关系的品种如97-52(23)与山东丰抗棉6号(24)、鲁棉研18(2)与鲁棉研21(28)可首先聚和;②同一省份的地方品种,如豫棉系列,虽其系列品种间具有明显的相似性,但大部分地方品种并未聚在相同类型或亚类里;③传统的常规品种,如中棉系列,则分散在第III类、第V类不同组分中。以上结果说明棉花种质的地域特性已被打破,另一方面也说明仍可能存在地方小生境的品种资源。

3 讨论

ISSR标记与SSR标记相比,ISSR引物可以在不同的物种间通用,不像SSR标记具有较强的种特异性,因此ISSR引物的开发费用大大降低;与RAPD和RFLP相比,ISSR揭示的多态性较高,可获得几倍于RAPD的信息量,精确度几乎

可与RFLP相媲美,检测非常方便,因而是一种非常有发展前途的分子标记^[13]。但ISSR为显性标记,不能检测显性纯合基因型、杂合基因型和更多的等位基因差异,这点是与共显性SSR标记相比的不足之处,一定范围内阻碍了其发展和使用^[13-15]。然而,其作为种或品种鉴定的分子标记,并不受其影响。之前已有研究表明,ISSR标记不仅应用于种间鉴定,而且也用于品种内亲缘关系的鉴定^[9-10]。本实验通过选用的11个ISSR引物在48个棉花种质资源的扩增图谱分析表明,ISSR引物表现出较高的遗传多态性,多态性带型达到了83.7%,而且扩增结果均具有很好的重复性。因此,ISSR分子标记作为研究棉花品种遗传多样性分析、品种鉴定有效方法有着很好的发展前景。

另由遗传相似性分析发现,陆地棉品种间其遗传多样性相对较小、遗传基础狭窄,这与前人用RAPD、SSR等标记对棉花种质多样性研究结果基本相同^[2-7]。这可能是由于棉花属常异花授粉作物,经过长期自然混交、人工选择栽培措施的影响,使各品种间的亲缘关系越来越近的缘故。这就需要进一步加强亲缘较远的种质资源的引入,特别是棉属野生种质的输入,以进一步丰富其遗传基因库,克服棉花品种间亲缘关系较近的不足,

打破现今陆地棉育种的瓶颈。

根据聚类分析结果,在今后的遗传育种利用上,应选择不同聚类群间的品种进行杂交,并注意充分利用原始型与进化型,其基因型遗传差异有利基因的互补性^[16]。采摘自湛江本地的两个野生棉种湛江野生棉和廉江野生棉(据查为上世纪早期当地引进棉种,有类似亚洲棉特性,并推测其为适应本地环境,在进化过程中个别基因可能发生了变异)单独聚为一类,它们具有栽培棉种所不具有的一些特异的变异,可成为今后重要的种质资源加以保护、利用。

参考文献:

- [1] 贾继增. 分子标记种质资源鉴定和分子标记育种[J]. 中国农业科学, 1996, 29(4): 1-10.
- [2] 郭旺珍, 张天真, 潘家驹, 等. 我国棉花主栽品种的 RAPD 指纹图谱研究[J]. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 129-134.
- [3] 聂以春, 左开井, 张献龙, 等. RAPD 标记在棉属种间杂交后代检测的应用[J]. 中国农业科学, 2000, 33(5): 25-29.
- [4] 郭江水, 王义琴, 吴明刚, 等. 利用 RAPD 标记对彩色棉遗传多样性的分析[J]. 棉花学报, 2003, 15(5): 269-273.
- [5] 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.
- [6] 朱四元, 陈金湘, 刘海荷, 等. 不同类型抗虫棉品种基于 RAPD 的遗传多样性分析[J]. 棉花学报, 2007, 19(2): 83-87.
- [7] 孙君灵, 杜雄明, 孙其信, 等. 棉花 γ 射线诱变后代的 SSR 标记遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2006, 39(10): 1967-1976.
- [8] ZIETKIEWE C Z, Rafalak I A, Labud A, et al. Genome fingerprinting by simple sequence repeat(SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomic*, 1994, 20(2): 176-183.
- [9] ASASOLI M, Attioni C M, Illani F V. A genetic Linkage map of European chestnut (*Castanea sativa* Mill.) based on RAPD, ISSR and isozyme markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, (102): 1190-1199.
- [10] 杜金昆, 姚颖垠, 倪中福, 等. 普通小麦、斯卑尔脱小麦、密穗小麦和轮回选择后代材料 ISSR 分子标记遗传差异研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 445-452.
- [11] 孙志栋, 王学德, 倪西源. 棉花 DNA 提取方法的探讨[J]. 浙江农业学报, 2004, 16(4): 177-181.
- [12] WILLIAMS J G K, Kubelik A R, Livak K J. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(22): 6531-6535.
- [13] LAIGOU G A. Genetic relationships in cultivated tea clones and native wild tea in Taiwan using RAPD and ISSR markers[J]. *Bot Bull Acad Sin*, 2001, 42: 93-100.
- [14] 邱英雄, 傅承新, 孔航辉. 不同品种的 ISSR 分析[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(4): 344-346.
- [15] 张立荣, 徐大庆, 刘大群, 等. SSR 和 ISSR 分子标记及其在植物遗传育种研究中的应用[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(1): 90-94.
- [16] 买买提·莫明, 李雪源, 孙国清, 等. 新疆棉花自育品种优越性与外引品种互补性[J]. 中国棉花, 2003, 30(11): 10-13.
- [17] 于霁雯, 喻树迅, 王 武, 等. 应用 RAPD 对短季棉品种遗传多样性的初步评价[J]. 棉花学报, 2006, 18(3): 186-189.
- [18] 王省芬, 马峙英, 张桂寅, 等. SSR 和 AFLP 技术鉴定棉花遗传资源的比较研究[J]. 棉花学报, 2006, 18(6): 391-393. ●