

彩色棉品系的 SSR 分子变异研究

吴立强,李志坤,王志伟,孟成生,张桂寅,马峙英*

(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:采用 SSR 分子标记技术对来自 12 个组合的 62 份稳定彩色棉新品系进行分子变异分析。结果表明,从 242 对 SSR 中筛选出的 29 对多态性引物在供试材料中共扩增出 198 个标记。其中,多态性标记 115 个,占总标记数的 58.1%,这些引物能较好地揭示彩色棉的变异位点。MGHES-6 引物扩增的多态性标记最多,其次为 BNL2960、CM43 和 MGHES-66。29 对 SSR 引物的 PIC 值变化在 0.493~0.938 之间,平均 0.790,说明彩色棉 SSR 等位基因丰富度较高。基于 SSR 数据的聚类分析,可将 62 份新品系分为两大类,一类是由彩色棉种质资源经系统选育获得的材料,另一类是通过杂交选育获得的材料。

关键词:彩色棉;SSR;分子变异

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2010)02-0115-05

Molecular Variation of the Colored Cotton Lines Based on SSR Markers

WU Li-qiang, LI Zhi-kun, WANG Zhi-wei, MENG Cheng-sheng, ZHANG Gui-yin, MA Zhi-ying*

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

Abstract: In the study, SSR molecular marker was used to assess the molecular variation of 62 new lines of colored cottons from 12 combinations. The results showed that 29 of 242 pairs of SSR primers could generate polymorphic markers among the tested colored cotton lines. The total number of markers was 195, and the polymorphic markers were 115, accounted for 58.1%. MGHES-6 primer had the most polymorphic markers, followed by BNL2960, CM43 and MGHES-66. These primers could detect the variable SSR sites of the tested cottons very well. The PIC values for SSR primers varied from 0.493~0.938, averaged 0.790. The higher PIC values showed the abundant SSR alleles from the colored cottons. According to the SSR markers, 62 colored cottons were divided into two groups based on UPGMA method. One group included all the lines bred by pedigree selection, the other included the lines bred from hybridization method. The above results laid a foundation for breeding and germplasm utilization of colored cotton.

Key words: colored cotton; SSR; molecular variation

彩色棉是一种棉纤维自身具有天然色素的棉花。彩色棉作为纺织工业的原材料,无需漂染上色,既节约能源又保护环境^[1-2]。由于彩色棉市场潜力巨大,世界主要产棉国都在开展彩色棉研究。目前,彩色棉只有棕色纤维和绿色纤维两种,其它颜色的彩色棉还处于研发阶段。因此,需要加强种质资源的交流,以充分利用优势资源,提高育种水平。我国彩色棉育种虽然起步较晚,但发展较快。通过系统选育、杂交育种、南繁加代及生物技术等手段,已使彩色棉新品系的纤维品质

及产量等指标有了很大的提高。随着分子标记技术的发展,该技术已被用于作物种质资源研究,掌握种质资源更多的遗传信息,就为种质资源的合理利用提供了一种重要手段。在棉花上,利用分子标记技术评价白色棉种质资源分子变异的报道已有很多,取得了一些重要进展^[3-4],但对彩色棉资源开展研究的甚少^[5-7]。郭江勇等利用 RAPD 技术分析了 2 个彩色棉品种和 71 份彩色棉品系或原始材料的遗传多样性。结果表明,品种间的遗传关系与品种自身的系谱有关,大多数

收稿日期:2009-03-30 作者简介:吴立强(1970-),男,副研究员;*通讯作者,mzhy@hebau.edu.cn

基金项目:河北省科技厅重大支撑计划(06220113D)和河北省自然科学基金重大项目(C2006001034)

品种的遗传基础比较狭窄^[6];张美冬等对我国 12 个来源不同的彩色棉资源及 1 个当地白色棉品种进行了 RAPD 多态性分析,发现不同彩色棉品种间具有较大的遗传差异^[7]。河北农业大学棉花遗传育种研究室历经多年,将彩色棉基因导入到具有不同遗传背景的白色棉花品种中,创造了具有不同特色的 62 份彩色棉新品系。本研究拟采用 SSR 标记技术对创新的 62 份彩色棉新品系进行分子变异研究,以期对彩色棉育种和资源利用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试材料是 62 份稳定的彩色棉资源。这些资源是以 19 份国内外彩色和白色棉花为亲本配制杂交组合,经过 6 代田间选择获得,包括 34 份棕色品系和 28 份绿色品系。62 份彩色棉品系名称、所属杂交组合和纤维颜色见表 1。其中,组合 0 是从中国农业科学院棉花研究所征集的彩色棉资源经系统选育获得,1-11 组合为针对彩色棉资

源存在的缺陷组配的杂交组合,其亲本为国内外优势材料。

1.2 棉花基因组 DNA 提取与 PCR 扩增

棉花基因组 DNA 提取按照张桂寅等^[8]所述方法进行。PCR 反应体系为 10 μL ,包括 40 ng 模板 DNA, 2.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 0.8 μL , 0.16 U Taq DNA 聚合酶, 1.0 μL 10 \times Buffer (含 20 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Mg^{2+}), 10 $\text{ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 正向和反向引物各 0.35 μL 。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min, 然后 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ (根据不同引物选取不同退火温度) 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 10 $^{\circ}\text{C}$ 保温。扩增产物与 5 μL Loading buffer 混合, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 min, 立即转移至冰浴冷却,用于电泳。在浓度为 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上 40 W 恒功率电泳 3 h, 用银染法检测 PCR 扩增产物^[9]。

1.3 结果统计和数据分析方法

对电泳结果采用“0-1”系统记录条带位置,有带记为“1”,无带记为“0”。SSR 的多态性信息含量 PIC 根据公式 $PIC=1-\sum p_i^2$ 得出, p_i 为引物 p 的

表 1 彩色棉品系名称、纤维颜色及所属组合

Table 1 Names, combinations and fiber colors of the tested cotton lines

| 品系名称 | 组合号 | 纤维颜色 | 品种名称 | 组合号 | 纤维颜色 | 品种名称 | 组合号 | 纤维颜色 |
|--------|-----|------|--------|-----|------|---------|-----|------|
| AUCC1 | 1 | 棕色 | AUCC41 | 6 | 棕色 | AUCC95 | 9 | 绿色 |
| AUCC2 | 1 | 棕色 | AUCC44 | 6 | 棕色 | AUCC98 | 9 | 绿色 |
| AUCC3 | 2 | 棕色 | AUCC47 | 6 | 棕色 | AUCC99 | 9 | 绿色 |
| AUCC9 | 3 | 棕色 | AUCC51 | 6 | 棕色 | AUCC102 | 9 | 绿色 |
| AUCC11 | 3 | 棕色 | AUCC52 | 6 | 棕色 | AUCC103 | 9 | 绿色 |
| AUCC12 | 3 | 棕色 | AUCC56 | 0 | 绿色 | AUCC104 | 10 | 棕色 |
| AUCC13 | 3 | 棕色 | AUCC58 | 0 | 绿色 | AUCC105 | 10 | 棕色 |
| AUCC14 | 3 | 棕色 | AUCC61 | 0 | 绿色 | AUCC106 | 10 | 棕色 |
| AUCC15 | 3 | 棕色 | AUCC63 | 0 | 绿色 | AUCC107 | 10 | 棕色 |
| AUCC16 | 3 | 棕色 | AUCC64 | 0 | 绿色 | AUCC109 | 11 | 绿色 |
| AUCC19 | 3 | 棕色 | AUCC65 | 0 | 绿色 | AUCC113 | 11 | 绿色 |
| AUCC22 | 3 | 棕色 | AUCC71 | 0 | 绿色 | AUCC118 | 11 | 绿色 |
| AUCC23 | 3 | 棕色 | AUCC72 | 0 | 绿色 | AUCC134 | 11 | 绿色 |
| AUCC27 | 4 | 棕色 | AUCC73 | 0 | 绿色 | AUCC135 | 11 | 绿色 |
| AUCC29 | 4 | 棕色 | AUCC74 | 0 | 绿色 | AUCC136 | 11 | 绿色 |
| AUCC31 | 5 | 棕色 | AUCC77 | 0 | 绿色 | AUCC138 | 11 | 绿色 |
| AUCC32 | 5 | 棕色 | AUCC78 | 7 | 棕色 | AUCC142 | 11 | 绿色 |
| AUCC33 | 5 | 棕色 | AUCC87 | 7 | 棕色 | AUCC143 | 11 | 绿色 |
| AUCC34 | 5 | 棕色 | AUCC89 | 7 | 棕色 | AUCC145 | 11 | 绿色 |
| AUCC38 | 5 | 棕色 | AUCC93 | 8 | 棕色 | AUCC151 | 11 | 绿色 |
| AUCC39 | 5 | 棕色 | AUCC94 | 9 | 绿色 | | | |

第 i 个等位基因的频率。利用 NTSYSpc 2.11a 软件计算 Dice(= Nei and Li)系数,采用 UPGMA 法进行聚类分析。

2 结果与分析

2.1 多态性 SSR 引物筛选与扩增结果分析

利用 6 个不同来源的彩色棉材料 AUCC1、AUCC59、AUCC61、AUCC94、AUCC107、AUCC145 对 242 对 SSR 引物进行筛选,从中筛选出多态性引物 29 对,用于分析 62 份彩色棉材料的分子变异。

29 对多态性 SSR 引物在 62 份彩棉材料中共扩增出 198 个标记,其中多态性标记 115 个,占总标记数的 58.1%(表 2)。11 对 BNL 引物共扩增出 86 个标记,其中多态性标记 45 个;10 对 MGHEs 引物扩增出 62 个标记,多态性标记 36 个;2 对 CSHEs 引物扩增出 17 个标记,多态性标记 8 个;4 对 TMHB 引物扩增出 19 个标记,其中 15 个为多态性标记;1 对 TMHC 引物和 1 对 CM

引物分别扩增出 5 个和 9 个标记,多态性标记分别为 2 个和 9 个。分析不同引物的扩增结果,MGHEs-6 扩增的多态性标记最多,其次为 BNL2960、CM43 和 MGHEs-66,说明这些引物能较好地揭示彩色棉的变异位点。引物 BNL2590 在 62 份彩色棉品系中的扩增结果如图 1 所示。

PIC 值是评价 SSR 等位基因丰富度的指标,反映 SSR 座位多态性的高低。当 PIC 大于 0.5 时,该座位是高度多态座位;当 PIC 在 0.25 与 0.5 之间时,该座位为中度多态座位;当 PIC 小于 0.25 时,该座位是低多态座位。本研究筛选出的 29 对 SSR 引物的 PIC 值变化在 0.493~0.938 之间,平均 0.790,说明供试彩色棉的 SSR 等位基因具有很高的丰富度。

2.2 供试彩色棉基于 SSR 标记的聚类分析

基于 SSR 标记对 62 个彩色棉品系进行分子聚类分析,供试材料被分为两大类(图 2)。第 I 类包括以中国农业科学院棉花研究所 2000z03 为起始材料经 6 代系统选择得到的 11 个品系,即

表 2 29 对 SSR 引物对 62 份彩色棉的扩增结果和 PIC 值

Table 2 The amplification and PIC values of 29 SSR primers on 62 colored cottons

| 引物 | 总标记数 | 多态性标记数 | PIC 值 | 引物 | 总标记数 | 多态性标记数 | PIC 值 |
|----------|------|--------|-------|------------|------|--------|-------|
| BNL530 | 6 | 4 | 0.808 | MGHEs-46 | 4 | 1 | 0.727 |
| BNL1317 | 11 | 7 | 0.892 | MGHEs-52 | 6 | 2 | 0.750 |
| BNL1672 | 7 | 4 | 0.836 | MGHEs-60 | 7 | 2 | 0.857 |
| BNL2590 | 3 | 2 | 0.612 | MGHEs-62 | 7 | 2 | 0.836 |
| BNL2895 | 5 | 2 | 0.797 | MGHEs-66 | 9 | 8 | 0.834 |
| BNL2960 | 10 | 9 | 0.834 | MGHEs-70 | 5 | 3 | 0.783 |
| BNL3065 | 8 | 3 | 0.807 | CSHEs-26 | 5 | 3 | 0.732 |
| BNL3408 | 6 | 3 | 0.826 | CSHEs-27 | 12 | 5 | 0.915 |
| BNL3479 | 5 | 4 | 0.798 | TMHB29-K1 | 7 | 6 | 0.815 |
| BNL3627 | 10 | 3 | 0.888 | TMHB47-MB | 2 | 2 | 0.493 |
| BNL3649 | 15 | 4 | 0.938 | MHB53-K12 | 3 | 1 | 0.666 |
| MGHEs-6 | 11 | 11 | 0.854 | TMHB89-B14 | 7 | 6 | 0.794 |
| MGHEs-31 | 6 | 3 | 0.815 | TMHC2-G8 | 5 | 2 | 0.779 |
| MGHEs-33 | 3 | 1 | 0.667 | CM43 | 9 | 9 | 0.837 |
| MGHEs-40 | 4 | 3 | 0.713 | 合计 | 198 | 115 | |

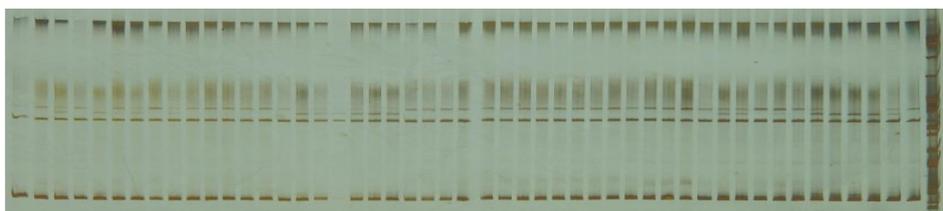


图 1 引物 BNL2590 在 62 份彩色棉品系中的扩增电泳结果

Fig. 1 Electrophoretic products of BNL2590 in 62 colored cottons

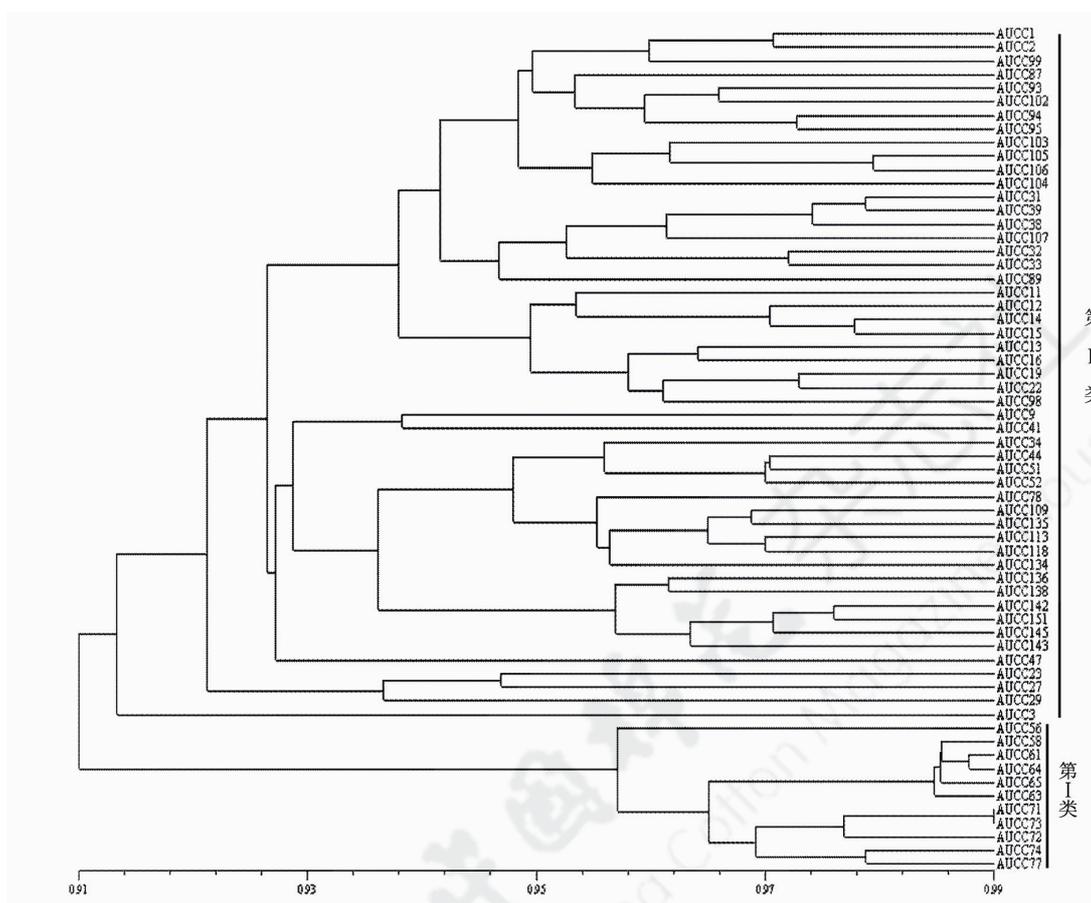


图 2 62 份彩色棉品系基于 SSR 的聚类树状图

Fig.2 Dendrogram of 62 colored cotton lines based on SSR markers

AUCC56、AUCC58、AUCC61、AUCC64、AUCC65、AUCC63、AUCC71、AUCC73、AUCC72、AUCC74、AUCC77,均属于 0 号组合。第 II 类包括 51 个品系,均是通过杂交选育方法获得。在第 II 类中,根据不同阈值又可以划分为不同亚类。分析每个亚类中的彩色棉品系特点,发现来自同一组合的品系绝大多数能较早地聚为一个亚类,说明这些材料间的遗传背景相似,遗传差异较小。如亚类中的 AUCC1 和 AUCC2 均来自组合 1,亚类中的 AUCC136、AUCC138、AUCC142、AUCC143、AUCC145 和 AUCC151 同属于组合 11,类似的还有很多。说明本研究采用的 SSR 标记能较好地揭示材料间的遗传差异。但也发现,一小部分材料即使来源于一个组合也没有聚为一个亚类,如来源于第 9 号组合的 6 个品系 AUCC94、AUCC95、AUCC98、AUCC99、AUCC102、AUCC103 与来源于其它组合的 AUCC1、AUCC2、

AUCC87、AUCC93、AUCC104、AUCC105 和 AUCC106 混合分布在一个亚类中。

3 讨论

针对彩色棉资源匮乏、纤维品质差等问题,本课题组选取具有优良性状的白色棉亲本和彩色棉杂交,对其后代进行选择,把优良性状转育到彩色棉中,创造后备育种材料,获得了 62 份彩色棉新品系。这些品系的亲本材料来源广泛,遗传背景复杂,且田间表现各具特色。为了明确彩色棉新品系的遗传变异,利用 29 对多态性 SSR 引物对其进行了分子变异研究,结果共得到 198 个 SSR 标记,其中多态性标记 115 个。SSR 等位基因在彩色棉品系间具有很高的丰富度,基于 SSR 标记的聚类结果与品系系谱有较高的吻合度。这些彩色棉新品系拓宽了彩色棉的遗传背景,丰富了彩色棉种质资源。

在聚类分析时发现,有少数彩色棉材料如 AUCC23、AUCC47、AUCC78、AUCC89、AUCC98、AUCC107、AUCC99 这 7 份彩色棉品系没有和相同组合聚为一个亚类,属于第 8、9 组合的 AUCC93 和 AUCC102 却聚为一个亚类。分析原因,可能是在选育过程中对材料选择的重点有所不同,受育种环境和育种目标的影响,使育成成品系之间的分子类别划分与来源组合不能完全吻合,也可能是本研究获得的 115 个多态性 SSR 标记不能充分反映 62 份彩色棉材料在基因组水平上的差异。因此,在今后的彩色棉种质资源研究中,我们将有目的地选择覆盖棉花全基因组的引物,以最大程度地揭示彩色棉资源间的遗传差异。

参考文献:

- [1] 胡伯陶. 彩色棉花的昨天今天和明天[N]. 中国纺织报, 2003-01-13.
HU Bo-tao. Yesterday, today and tomorrow of colored cotton[N]. China Spin Newspaper, 2003-01-13.
- [2] 杜雄明, 刘国强, 傅怀勤. 彩色棉种质鉴定及新品种选育[J]. 中国农学通报, 1997,13(6):47-48.
DU Xiong-ming, Liu Guo-qiang, Fu Huai-qin. Germplasm identification and new variety breeding of the colored cotton[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 1997,13(6):47-48.
- [3] 王省芬. 中国棉花抗枯、黄萎病品种的抗性与 DNA 指纹图谱研究[D]. 保定: 河北农业大学, 2003.
WANG Xing-fen. Studies on disease resistance and DNA fingerprinting of Chinese cotton varieties with *Fusarium* and *Verticillium* wilt resistance[D]. Baoding: Agricultural University of Hebei, 2003.
- [4] 姜 伟, 朱宏波, 何觉民. 不同来源棉花种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 棉花学报, 2008,20(5):348-353.
JIANG Wei, Zhu Hong-bo, He Jue-min. Genetic diversity in germplasm resources of cotton from different area based on ISSR markers[J]. Cotton Science, 2008,20(5):348-353.
- [5] 郭江勇, 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.
GUO Jiang-yong, Wang Yi-qin, Wu Ming-gang, et al. Genetic diversity analysis and identification of colored cotton germplasm by RAPD markers[J]. Cotton Science, 2003,15 (5) :269-273.
- [6] 郭江勇, 王义琴, 吴明刚, 等. 棕色棉和绿色棉遗传多样性比较[J]. 遗传, 2004,26(1):63-68.
GUO Jiang-yong, Wang Yi-qin, Wu Ming-gang, et al. Genetic diversity analysis of brown cotton and green cotton[J]. Hereditas, 2004,26(1):63-68.
- [7] 张美冬, 詹先进, 张献龙. 彩色棉品种资源的 RAPD 多态性分析[J]. 华中农业大学学报, 2004,29(5):427-430.
ZHANG Mei-dong, Zhan Xian-jin, Zhang Xian-long. Polymorphic analysis on natural color fiber cotton by RAPD [J]. Journal of Huazhong Agricultural University, 2004,29(5):427-430.
- [8] 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.
ZHANG Gui-yin, Wang Xing-fen, Ma Zhi-ying. A study on glandless cotton germplasm resources of *Verticillium* wilt resistance based on RAPDs[J]. Cotton Science, 2002,14(2):80-84.
- [9] 甄 瑞, 王省芬, 马峙英, 等. 海岛棉抗黄萎病基因 SSR 标记研究[J]. 棉花学报, 2006,18(5):269-272.
ZHEN Rui, Wang Xing-fen, Ma Zhi-ying, et al. A SSR marker linked with the gene of *Verticillium* wilt resistance in *Gossypium barbadense* [J]. Cotton Science, 2006,18(5):269-272. ●