

# RAPD 标记在棉属种间杂种 后代检测中的应用

聂以春, 左开井, 张献龙, 冯纯大, 刘金兰

(华中农业大学作物遗传改良国家重点开放实验室, 武汉 430070)

摘要: 以 $[4x(\text{亚洲棉} \times \text{异常棉})] \times \text{陆地棉}$ 的杂交后代培育的5个种质系和3个亲本为材料, 用22个随机引物进行了 RAPD 分析。结果表明: 3个棉种具有明显的多态性差异。5个种质系均检测到来自不同棉种的 DNA 特异片断; 3个棉种间的遗传相似系数在50% 以下。陆地棉亲本与种质系间和种质系与种质系间的相似系数在0.710~ 0.933之间, 平均为0.808。这些差异与回交亲本、单株选择的定向培育有关。研究结果对棉属远缘杂交育种具有一定的参考价值。

关键词: 棉属; 种间杂交; 种质系; RAPD; 遗传相似性

中图分类号: S562.032 文献标识码: A 文章编号: 0578-1572(2000)05-0025-05

棉属野生种异常棉(*Gossypium anomalum* W anra et Peyr) 抗棉红铃虫、角斑病, 并具有纤维细、强力大的遗传潜力<sup>[1]</sup>, 因而受到育种家的重视。80年代初, 我们利用亚洲棉(*G. arboreum* L) 和异常棉杂交, 对  $F_1$  枝条进行体细胞染色体加倍, 获得异源四倍体枝条, 开花后再用陆地棉(*G. hirsutum* L) 杂交、回交、选择和鉴定, 培育出5个种质系材料。这些种质材料与野生种和栽培种相比, 遗传成分有何变化并不清楚。70年代初, Johnson 和 Cherry 等开始用普通电泳分析棉属种的蛋白质和同工酶的谱带, 研究了不同棉种间的关系<sup>[5,6]</sup>, 后来又被用来分析不同棉种和种间杂种的差异<sup>[2,3]</sup>, 但未涉及到种间杂种后代选育出的种质材料。

为了深入研究栽培种与野生种杂交后代培育的种质材料的遗传成分变化, 本研究利用近几年来发展的 RAPD 技术对从上述3种杂种后代中培育的种质系进行分子标记分析, 检测来自野生种和栽培种血缘的变化, 试图从分子水平上揭示种间杂种后代的遗传变异, 为棉属远缘杂交育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料来源为 $[4x(\text{亚洲棉} \times \text{异常棉})] \times \text{陆地棉}$ 的3种杂种一代再用陆地棉回交、自交的后代中选育的5个种质及其3个不同棉种亲本(表1)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 参照 Peterson 等<sup>[4]</sup>方法, 并部分修改。步骤如下: 从植株上取4d 左右的嫩叶加液氮研磨成粉状。按 $10\mu\text{l/g}$  样品加入  $\beta$ -巯基乙醇, 再按 $4\text{m l/g}$  加入预热的 DNA

收稿日期: 1999-11-12

基金项目: 湖北省自然科学基金(97J053) 和“九五”国家棉花科技攻关资助项目(96-002-02)

作者简介: 聂以春(1953-), 男, 湖北当阳人, 副教授, 主要从事棉花远缘杂交育种工作。

表 1 供试材料的选择世代及主要特性

Table 1 Selecting generation and main characteristics of materials

材料 Material	主要特性 Main characters
亚洲棉(P <sub>1</sub> ) <i>G. arboreum</i>	早熟, 纤维强力大, 抗病虫能力强等 Short season, High fiber strength, Resistant to disease and worm etc.
异常棉(P <sub>2</sub> ) <i>G. anomalum</i>	抗多种虫害、抗角斑病、具潜在优良纤维品质等 Resistant to insect pests and disease, Potentially good quality etc.
陆地棉(P <sub>3</sub> ) <i>G. hirsutum</i>	产量高 High yield
N-16(BC <sub>2</sub> F <sub>4</sub> )	2.5% 跨长: 31.5mm; 麦克隆值4.0 2.5% span length: 31.5mm; Micronaire 4.0
9543(BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub> )	2.5% 跨长: 31.0mm; 麦克隆值4.1; 高抗红铃虫 2.5% span length: 31.0mm; Micronaire 4.1. Highly resistant to bollworm
9540(BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub> )	2.5% 跨长: 31.2mm; 麦克隆值4.0; 抗红铃虫 2.5% span length: 31.2mm; Micronaire 4.0. Resistant to pink bollworm
9539 (BC <sub>3</sub> F <sub>4</sub> )	2.5% 跨长: 29.1mm; 麦克隆值4.4; 抗红铃虫 2.5% span length: 29.1mm; Micronaire 4.4. Resistant to pink bollworm
9487(BC <sub>4</sub> F <sub>3</sub> )	2.5% 跨长: 30.9mm; 比强度 27; 抗红铃虫 2.5% span length: 30.9mm; Fiber strenght 27g/tex. Resistant to pink bollworm

裂解缓冲液迅速搅拌, 再加入等体积的氯仿-异戊醇抽提, 异丙醇沉淀 DNA, 并取出风干后溶于 2ml 的 TE 缓冲液中, 加入 RNAase (10mg/ml) 至终浓度 50 $\mu$ g/ml, 然后用等体积的苯酚-氯仿-异戊醇抽提 1~2 次, 加入 0.1V 的 NaAc 和 2 倍体积的冰冻无水乙醇沉淀 DNA, 76% 乙醇洗盐、风干, 溶于适量体积的 TE 缓冲液中。

1.2.2 引物及来源 使用的 22 个随机引物长度为 10 个核苷酸序列, 分别是 S4、S26、S35、S37、S55、S70、S74、S100、S174、S198、S314~316、S497、S462~469 等, 购于上海生工生物技术公司。

1.2.3 RAPD 分析 PCR 反应物: 40ngDNA, 0.16mmol dNTPs, 0.6mmol 引物, 1.8mmolMgCl<sub>2</sub>, 1 $\times$  反应 buffer, 1.5 单位 Taq DNA 聚合酶, 加 ddH<sub>2</sub>O 至 25 $\mu$ l 反应体积。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 3min, 44 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 2min, 2 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1min, 37 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 1min 45s 共 40 个循环; 94 $^{\circ}$ C 1min, 37 $^{\circ}$ C 1min, 72 $^{\circ}$ C 10min, 1 个循环; 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶电泳 4~5h, 溴化乙锭染色, 紫外照相, 记录结果。

1.2.4 数据分析 根据电泳图谱, 把有带的量化为 1, 无带的量化为 0, 数据输入计算机标准化处理。材料间的相似系数用 NTSYS 软件进行计算。

## 2 结果与分析

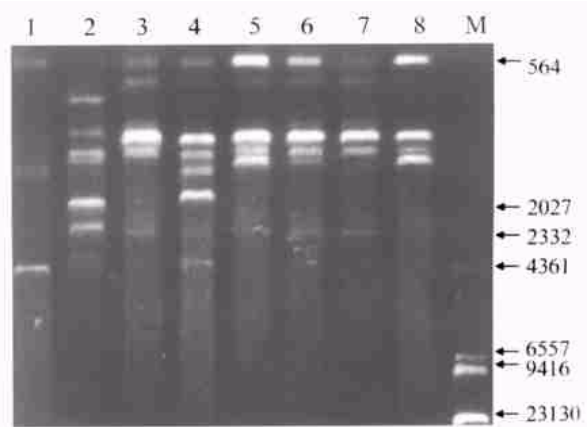
### 2.1 参试材料的多态性分析

用 22 个引物对 8 个材料进行 PCR 扩增, 均有扩增产物。总共扩增出 169 条带, 其中具多态性带 106 条, 占 62.7%。引物不同扩增的片断数也不同, S37 引物扩增的带最多, 为 13 条, S174 引物最少为 3 条, 平均每个引物扩增出 7.7 条。

2.1.1 3 个亲本间的多态性差异比较 22 个引物对亚洲棉、异常棉和陆地棉分别扩增出

124、102和119条带。3个棉种均有本身的特异带型,依次分别是21、12和22条。在22个引物中,S100、S70、S37、S174等14个能够将3个棉种分开,占选用引物的63.6%。充分体现出3个棉种间的遗传差异(图)。

2.1.2 种质系与亲本之间的多态性差异比较 5个种质系以亲本为对照,进行PCR扩增后的多态性比较(表2)。S70能检测出N-16种质系中三亲的特异片段;S37、S174、S198、S463等能分别将5个种质系中来自亚洲棉或异常棉的特异带检测出来。对22个引物扩增出的带进行统计,5个种质系中具亚洲棉特异带的为3~9条,占总带数的2.5%~7.2%,其中N-16和9540占的比重较大,分别是7.2%和6.1%。来自异常棉的带占2.3%~4.8%,具陆地棉特异带的达11.9%~13.0%。种质材料中还检测到双亲(亚洲棉与异常棉、亚洲棉与陆地棉、异常棉与陆地棉)的共有带(图),表明种间杂种后代中存在着丰富的遗传变异。



1. 亚洲棉; 2. 异常棉; 3. 陆地棉; 4. N-16;  
5. 9540; 6. 9539; 7. 9543; 8. 9487; M.  $\lambda$ DNA/H indIII  
1. *G. arboreum*; 2. *G. anomalum*; 3. *G. hirsutum*; 4. N-16;  
5. 9540; 6. 9539; 7. 9543; 8. 9487; M.  $\lambda$ DNA/H indIII

图 S70引物检测到材料的多态性

Fig. RAPD polymorphism amplified with primer S70

表2 22个引物对5个种质材料扩增的带型差异比较<sup>1)</sup>

Table 2 The comparison of RAPD results in five germplasm lines

材料 Material	总带数 Total bands	亲本带比例 Percentage of parent band											
		P <sub>1</sub>		P <sub>2</sub>		P <sub>3</sub>		P <sub>1</sub> +P <sub>2</sub>		P <sub>1</sub> +P <sub>3</sub>		P <sub>2</sub> +P <sub>3</sub>	
		P <sub>1</sub>	%	P <sub>2</sub>	%	P <sub>3</sub>	%	P <sub>1</sub> +P <sub>2</sub>	%	P <sub>1</sub> +P <sub>3</sub>	%	P <sub>2</sub> +P <sub>3</sub>	%
N-16	125	9	7.2	6	4.8	15	12.0	2	1.6	18	14.4	9	7.2
9540	131	8	6.1	3	2.3	17	13.0	3	2.3	18	13.7	10	7.6
9539	126	5	4.0	4	3.2	15	11.9	2	1.6	17	13.5	9	7.1
9543	123	5	4.1	4	3.3	15	12.2	1	0.8	17	13.8	10	8.1
9487	122	3	2.5	4	3.3	15	12.3	2	1.6	15	13.3	9	7.4

<sup>1)</sup> P<sub>1</sub>+P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>+P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>+P<sub>3</sub>分别表示双亲共有带 P<sub>1</sub>: *G. arboreum* P<sub>2</sub>: *G. anomalum* P<sub>3</sub>: *G. hirsutum*;  
P<sub>1</sub>+P<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>+P<sub>3</sub>, P<sub>2</sub>+P<sub>3</sub>: Common bands appeared in the two parents

从不同棉种的特异片段在种质材料中的存在差异看出,由于用陆地棉作回交亲本,因而后代中具陆地棉亲本的带多。陆地棉是一个复合染色体组,由A和D构成,所以,在后代中陆地棉与亚洲棉(A组)的共有带多于陆地棉与异常棉的共有带。以上实验结果表明,利用RAPD技术可以检测远缘杂种后代材料中亲本的遗传成分表现。

## 2.2 8个参试材料之间的遗传相似系数比较

对8个参试材料之间的遗传相似系数分析结果见表3。

亚洲棉与其它7个材料间的相似系数在0.202~0.500之间,其中与异常棉的相似系数最低,仅0.202。异常棉与其它材料间的相似系数在0.367~0.519之间,而陆地棉与种质系

表 3 8个材料之间的遗传相似系数

Table 3 Pairwise genetic similarity of eight materials

	P <sub>1</sub>	P <sub>2</sub>	P <sub>3</sub>	N-16	9540	9539	9543	9487
P <sub>1</sub>	1.000							
P <sub>2</sub>	0.202	1.000						
P <sub>3</sub>	0.402	0.367	1.000					
N-16	0.467	0.393	0.754	1.000				
9540	0.500	0.433	0.800	0.833	1.000			
9539	0.448	0.519	0.780	0.788	0.857	1.000		
9543	0.333	0.480	0.764	0.710	0.788	0.933	1.000	
9487	0.346	0.500	0.755	0.800	0.813	0.897	0.852	1.000

间为0.754~0.800,不同种质系间为0.710~0.933。它们之间的成对相似系数差异表明,亚洲棉、异常棉和陆地棉是在长期自然条件下的进化过程中形成的3个独立种,三者间的植物形态学特性差异很大,因而相似系数也低,说明它们之间的亲缘关系较远。由于5个种质系均来源同一杂交组合,回交亲本相同,差别来源于对分离世代单株的选择和鉴定上。所以,陆地棉亲本与种质系间、不同种质系之间的遗传变异较小。

### 3 讨论

RAPD 分子标记可以用来检测远缘杂交后代中不同棉种血缘的遗传变化。在我们的研究结果中看出,来自于棉花远缘杂种后代的5个种质系均检测到不同棉种的特异片断,而且种质系间的差异也比较明显。种质系间不同棉种遗传物质的变化多少取决于回交亲本、回交次数,而且与分离群体中的单株选择和定向培育有关。在有关研究中,Bommieni(1997)等对硬粒小麦与薄冰草属 *Th. junceiforme* 种的属间杂种一代与硬粒小麦回交的 BC<sub>1</sub> 和 BC<sub>2</sub> 世代利用 RAPD 标记检测到来自 *Th. junceiforme* 种的 DNA 分子特异片断,并转换成 RFLP 标记进一步得到证实<sup>[7]</sup>。因而,RAPD 标记检测远缘杂种后代中来自不同种的血缘是可行的。

利用 RAPD 标记分析遗传相似系数可以研究种间亲缘关系<sup>[9]</sup>,评价品种间的遗传基础<sup>[4]</sup>。通过对不同棉种及种质系间的相似系数研究,亚洲棉、异常棉与陆地棉和种质系间的成对相似系数在0.202~0.500之间,形态特性的遗传差异大。陆地棉亲本和种质系间的相似系数较大,在0.754~0.800的范围,形态特性的差异很小,相互间难以鉴别。在有关研究中,Iqbal等(1997)用 RAPD 标记分析23个棉花品种的遗传相似系数,其中一个中棉品种与22个陆地棉品种的相似系数平均为55.7%,在22个陆地棉品种间(除1个比较特殊外)系数在65.4%~93.4%,绝大多数间的系数又在80.0%~90.0%之间,相似系数的大小与品种的来源和系谱有很大关系<sup>[8]</sup>,这些结果与我们的研究结果类似。应用这一技术研究种间关系和品种间的遗传相似性是稳定可靠的,其结果对育种家合理选择杂交亲本具有一定的参考价值。

试验中选用的5个种质系都具有某些优良性状(见表1),但这些优良性状是否真正来自异常棉或者亚洲棉并不清楚。虽已检测到来自不同棉种的 DNA 特异片断,并不能说明这些片断与某一优良性状的连锁关系。可以把已检测到的不同棉种的特异片断转换成 RFLP,对种质系与陆地棉其它品种杂交的分离世代中的优良性状进行标记,检测优良性状与分子标记的连锁关系,可应用于辅助选择育种,且有利于更准确、有效地评价和鉴定远缘杂种后代。

## 参考文献:

- [1] 梁正兰, 等著. 棉花远缘杂交的遗传与育种 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1~ 2.
- [2] 孙传渭, 梁正兰. 棉属不同种及品种的酯酶同工酶分析 [J]. 植物学报. 1986, 28(3): 263~ 269.
- [3] 张明融. 陆地棉和异常棉及其杂种的酯酶同工酶研究 [J]. 上海农业科技. 1983, (4): 20~ 22.
- [4] 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~ 139.
- [5] Johnson B L and M M Thein. Assessment of evolutionary affinities in *Gossypium* by proteins electrophoresis [J]. Amer. J. Bot. 1970, 57: 1081~ 1092.
- [6] Cherry J P, F R H Katterman and J E Endrizzi. Comparative studies of seed proteins of species *Gossypium* by gel electrophoresis [J]. Evolution. 1970, 24: 431~ 447.
- [7] Bommieni V R, P P Jauhar, T S Peterson, et al. Analysis of hybrids of durum wheat with *Thinopyrum junceiforme* using RAPD markers [J]. Theor. Appl. Genet. 1997, 95: 757~ 763.
- [8] Iqbal M J, N Aziz, N A Saeed, et al. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPD analysis [J]. Theor. Appl. Genet. 1997, 94: 139~ 144.
- [9] Tatinen V, R G Cantrell and D D Davis. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs [J]. Crop Sci. 1996, 36: 186~ 192.
- [10] Peterson A H, L B Curt and J P Wendel. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp) genomic DNA suitable of RFLP or PCR analysis [R]. Plant Molecular Biology Reporter. 1993, 11(2): 122~ 127.

## *Application of RAPD Markers in Differentiating Germplasm Lines from 4x(*Gossypium arboreum* × *G. anomalum*) × *G. hirsutum**

Nie Yichun, Zuo Kaijing, Zhang Xianlong, Feng Chunda, Liu Jinlan  
(National Key Laboratory for Genetic Improvement of Crops, Huazhong  
Agricultural University, Wuhan 430070)

**Abstract:** RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers generated by 22 random decamer primers were used to evaluate polymorphism and genetic similarity of five germplasm lines derived from  $[4x(G. arboreum \times G. anomalum)] \times G. hirsutum$  and their parents. The result showed that there was abundant DNA polymorphism in three parents. Special DNA fragment of parents appeared in five germplasm lines. The similarity coefficients between different *Gossypium* species were lower than 50%, which were related to their center origin and genome difference. The similarity of germplasm lines with upland cotton and germplasm line ranged from 0.710~ 0.933. The high similarity is owing to backcrossing by *G. hirsutum* generation to generation. Meanwhile, individual plant selection with different breeding aims made the five-germplasm lines show difference to some extent.

**Key words:** *Gossypium*; Interspecific hybridization; Germplasm line; RAPD; Genetic similarity