

利用SRAP标记分析彩色棉与白色棉的遗传差异

凌磊,李廷春,李正鹏,蔡沂,孙旭,苏翔,林毅,蔡永萍
(安徽农业大学生命科学学院,合肥 230036)

摘要:为充分利用彩色棉的种质资源培育出具有高品质纤维的彩色棉新品种,利用SRAP分子标记技术对彩色棉遗传多样性进行研究,应用NTSYS软件对30种供试棉花材料的SRAP-PCR结果进行分析,从中筛选得到29对条带清晰的多态性引物,共产生1067条清晰条带,多态性条带132条,平均每个引物组合得到4.55条多态性条带。聚类分析29对引物组合的扩增结果,Jaccard's相似系数在0.5405~0.9109之间,利用SRAP标记可以判明彩色棉和白色棉的遗传差异,为彩色棉育种的亲本选择在分子水平提供了一定的参考依据。

关键词:彩色棉;SRAP;遗传多样性;聚类分析

中图分类号:S562 文献标识码:A 论文编号:2009-0715

Genetic Difference Analysis between Colored Cotton and White Cotton by SRAP Markers

Ling Lei, Li Tingchun, Li Zhengpeng, Cai Yi, Sun Xu, Su Xiang, Lin Yi, Cai Yongping
(School of Life Sciences, Anhui Agricultural University, Hefei Anhui 230036)

Abstract: The genetic diversity of colored cotton was studied by SRAP, and the results of SRAP-PCR of 30 spices of cotton materials were analyzed by NTSYS software. Twenty-nine primer combinations were selected from 88 primer pairs, which amplified 132 polymorphic bands with an average of 4.55 polymorphic bands per primer pair. Cluster analysis by using UPGMA method based on the data of SRAP amplified bands by 29 primer pairs showed that Jaccard's similarity coefficient ranged from 0.5405 to 0.9109. The results indicated that the genetic difference between colored cotton and white cotton can be distinguished by SRAP, and SRAP molecular marker can be applied to study the colored cotton genetic diversity efficiently.

Key words: colored cotton, SRAP, genetic diversity, cluster analysis

0 引言

彩色棉(colored cotton)是一种纤维本身带有自然色彩的棉种,是棉花种间杂交后代中常出现彩色棉变异单株,不须通过化工染色可直接织成具有天然色彩的棉花,又称有色棉,其原始种大多来自美洲大陆和中美洲的短纤维野生彩色棉^[1]。随着世界经济的发展,人们回归自然的愿望也日益迫切,彩色棉因为其天然的色泽优势及抗病虫害、干旱和盐碱的生理特点^[2]受到了广泛重视。目前人工栽培的彩色棉主要是利用现有的彩色棉种质资源与优质白色棉进行杂交、选育或

结合生物工程技术进行改良的结果,主要是棕色棉和绿色棉^[1]。但是,天然彩色棉与白色棉品种相比存在品质较差,纤维强度偏小,比强度偏低,纤维长度较短等缺陷^[3]。虽然国内外的棉花育种学家在彩棉选育和品种改良方面做了大量的工作^[4]。但迄今为止,彩色棉的产量和品质与白色棉仍存在着一定的差距,并且利用常规育种难以取得突破性进展,更难打破彩色棉色泽和绒长之间的负相关性^[5],因此通过棉花种间远缘杂交,打破遗传的稳定性,使双亲的有益性状重新组合,从中选育出新品种和新种质,已成为许多学者研究

基金项目:安徽省教育厅重点项目(KJ2008A044);安徽省“十一·五”科技攻关项目(07010302133)。

第一作者简介:凌磊,男,安徽巢湖人,硕士。通信地址:230036 安徽农业大学生命科学学院, E-mail: linglei7457@126.com。

通讯作者:林毅,男,1957年出生,教授、博士生导师。研究方向:作物遗传育种与分子生物学。E-mail: lylllra@mail.hf.ah.cn。

收稿日期:2009-04-04,修回日期:2009-4-17。

的热点^[6]。

早期通常从系谱分析、形态学水平、生理生化水平对棉花种质资源进行研究,但都存在着一定的技术局限性^[7]。2001年,美国加州大学蔬菜作物系 Li 和 Quiros^[8]提出了 SRAP 标记技术-相关序列扩增多态性。它利用独特的引物设计对 ORFs(open reading frames, 开放阅读框架)进行扩增,正向引物特异扩增外显子,反向引物特异扩增内含子、启动子和间隔序列,因不同个体、物种的内含子、启动子及间隔区长度不同而产生多态性。近年来,SRAP 标记技术已成功应用于多种植物研究中^[9-10],且该技术在棉花遗传多

样性研究中已有应用^[11-12],但对彩色棉种间及与白色棉品种的亲缘关系进行 SRAP 标记研究的报道还较少。该试验将 SRAP 分子标记技术应用于彩色棉的遗传多样性分析,研究彩棉品种间及与白棉品种的亲缘关系,构建亲缘关系的分子系统树,以期为合理利用彩色棉资源,并对新品种选育策略的制定提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

棉花材料来源见表 1,种植于安徽农业大学试验基地,常规管理,苗期取样。

表 1 试验材料

编号	名称	类型	来源	编号	名称	类型	来源
1	棕 1-61	棕色棉	中棉所	16	黄红鸡脚叶 棕絮	棕色棉	中棉所
2	棕 1-59	棕色棉	中棉所	17	绿棉	绿色棉	中棉所
3	棕 1-28	棕色棉	中棉所	18	06-597-9	白色棉	中棉所
4	美 V81-052	棕色棉	中棉所	19	皖棉 416	白色棉	中棉所
5	闵县深紫棕	棕色棉	中棉所	20	HN2067	白色棉	中棉所
6	湖南棕	棕色棉	中棉所	21	HY428	白色棉	中棉所
7	百泉棕絮	棕色棉	中棉所	22	无腺体	白色棉	中棉所
8	AnL-G	棕色棉	本实验室	23	E6	白色棉	中棉所
9	AnL-1	棕色棉	本实验室	24	泗棉 4 号	白色棉	江苏泗阳棉花原种场
10	RT 棕絮	棕色棉	中棉所	25	皖棉 168	白色棉	中棉所
11	中棕单株 3	棕色棉	本实验室	26	06S62	白色棉	中棉所
12	中棕单株 2	棕色棉	本实验室	27	华抗 6 号	白色棉	中棉所
13	棕绒棉	棕色棉	中棉所	28	皖棉 133	白色棉	中棉所
14	棕彩选 1 号	棕色棉	中棉所	29	泗棉 3 号	白色棉	江苏泗阳棉花原种场
15	皖棕 3 号	棕色棉	中棉所	30	有腺体	白色棉	中棉所

1.2 试剂与仪器

CTAB, Tris, β -巯基乙醇, EDTA, 尿素等均购自美国 AMRESCO 公司; dNTPs, 扩增引物(表 2), Taq 酶等均来自上海生工生物工程技术有限公司。美国 Milli PORE 超纯水系统, 德国 Sigma3K-30 冷冻高速离心机, 德国 Whatman Biometra 公司 T1 Thermocycler 扩增仪等。

1.3 总 DNA 的提取

总 DNA 的提取方法参考 CTAB 法^[14]。

(1)称取 100 mg 幼嫩叶片,去除大的叶脉后,用液氮研磨至粉末状,加入 750 μ l 65 $^{\circ}$ C 预热的 2 \times CTAB 提取缓冲液,混匀后,65 $^{\circ}$ C 水浴 40 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm

离心 10 min;

(2)取上清液,等体积 Tris 饱和酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000rpm 离心 10 min;

(3)再吸取上清液,等体积氯仿:异戊醇(24:1)抽提 10 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 10 min;

(4)取上清液,加入 1/10 体积的 3 mol/L 的 NaAc、2 倍体积预冷的无水乙醇;

(5)-20 $^{\circ}$ C 静置 30 min,4 $^{\circ}$ C 12 000 rpm 离心 10 min;

(6)70%乙醇洗沉淀 2 次,室温晾干,加入适量 TE 缓冲液溶解;

(7)重复 3、4 两个步骤,再次加入无水乙醇,可见

表2 试验所用引物的序列

引物名称	序列(5'→3')	引物名称	序列(5'→3')
m1	TGAGTCCAAACCGGATA	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
m2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
m3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
m4	TGAGTCCAAACCGGACC	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
m5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em7	GACTGCGTACGAATTCAA
m6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em8	GACTGCGTACGAATTCTG
m7	TGAGTCCAAACCGGTCC	em9	GACTGCGTACGAATTCGA
m8	TGAGTCCAAACCGGTGC	em10	GACTGCGTACGAATTCAG
em1	GACTGCGTACGAATTAAT	em11	GACTGCGTACGAATTCCA
em2	GACTGCGTACGAATTTGC		

注:m1-m5, em1-em6 参照 Li.G 和 Quiros.C.F[8]报道的序列合成; m6-m8, em7-em11 参照林忠旭等^[13]报道的序列合成。

DNA 的絮状沉淀,用无菌牙签挑出沉淀,70%乙醇洗沉淀2次,无水乙醇洗1次,室温晾干,加入 50 μ l TE 缓冲液溶解,放入-20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

提取的总 DNA,采用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测其纯度及完整性。用 TU-1800SPC 紫外可见分光光度计检测其在 260nm 的吸收值,以及 λ DNA 荧光半定量法标定其浓度到 10 ng/ μ l 备用。

1.4 SRAP-PCR 反应体系与扩增程序

25 μ l 的反应体系中,模板 DNA 量 30 ng、 Mg^{2+} 浓度 2.5 mmol/L、0.8 μ mol/L 的上下游引物、200 μ mol/L 的 dNTPs 以及 Taq 酶 1U。

根据 Li 和 Quiros (2001) 报道的扩增程序进行扩增: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 35 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1min, 5 个循环, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.5 SRAP 扩增产物的电泳检测

扩增产物与 6 \times Loading Buffer (40%蔗糖, 0.25%溴酚蓝, 0.25%二甲苯青 FF) 混匀后,取 10 μ l 用于 6%聚丙烯酰胺凝胶 (7mol/L 尿素) 电泳分析,电泳缓冲液为 5 \times TBE, 500V 电压,至二甲苯青 FF 为胶板 2/3 处。电泳后银染,银染方法参照 Sanguinetti 法^[15]。

1.6 数据分析

SRAP-PCR 扩增结果,每个样品的扩增带按有或无记录,有带赋值为 1,无带赋值为 0,得到原始数据矩阵。用 NTSys-pc2.02 软件计算各品种间的 Jaccard's 遗传相似系数,计算公式为 $GS_{ij} = N_{ij} / (N_{ij} + N_i + N_j)$,其中 N_{ij} 为材料 i 和材料 j 共有谱带数目, N_i 为 i 材料有而 j 材料缺失的谱带数目, N_j 为 j 材料有而 i 材料缺失的谱

带数目。按非加权配对算术平均法 (UPGMA) 建立各品种间亲缘关系的聚类图。

2 结果与分析

2.1 引物的筛选

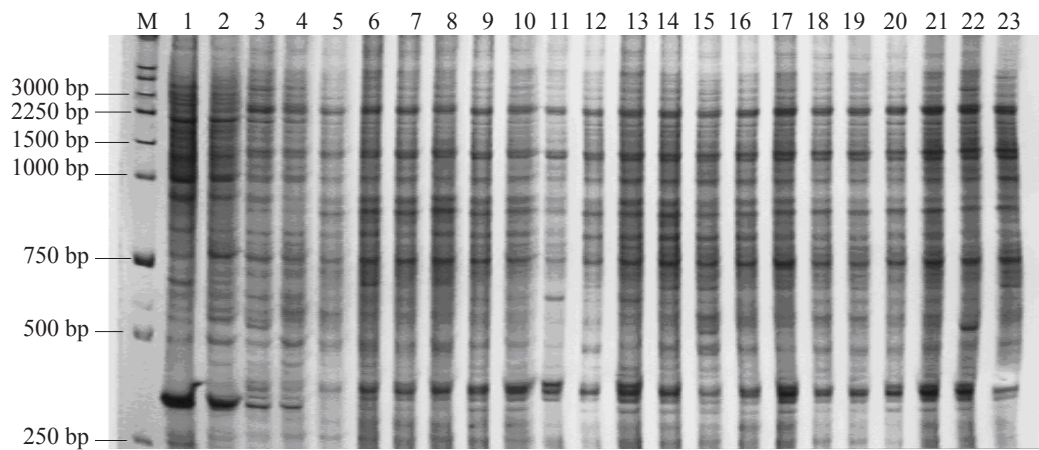
试验中,从 88 对 SRAP 引物中筛选出 29 对扩增条带清晰、稳定,且呈多态性的引物,对 30 个品种进行扩增,结果见表 3。29 对引物组合共产生 1067 条清晰条带,平均每对引物产生 36.8 条。多态性条带 132 条,占总条带数的 14.1%,平均每对引物组合得到 4.55 条多态性条带。代表性带谱见图 1。

2.2 聚类分析

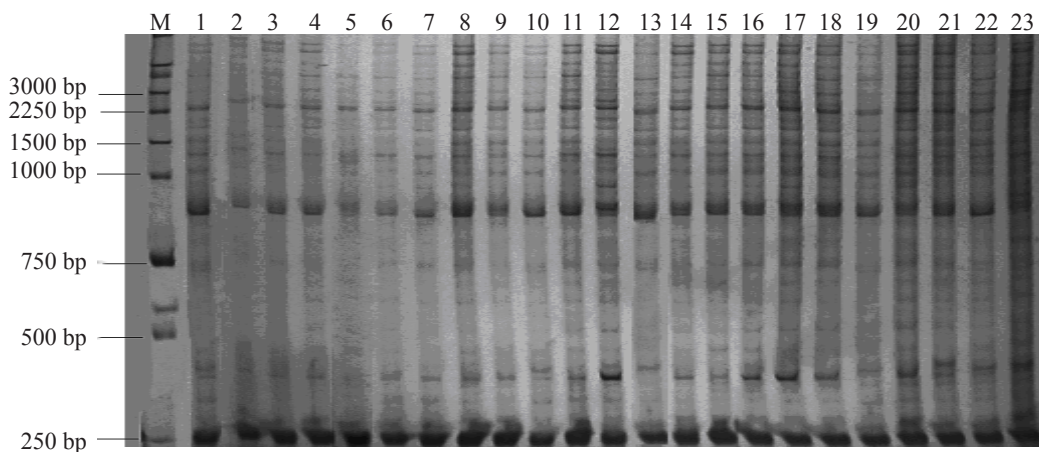
对供试的棉花材料基于上述 29 个引物组合产生的 1067 个标记数据,用 Ntsys-pc2.02 软件计算各品种间的 Jaccard's 遗传相似系数,利用 UPGMA 聚类分析方法构建亲缘关系分子系统树 (图 2)。30 种陆地棉遗传相似系数在 0.5405~0.9109。在遗传相似系数 0.65 的水平上,供试的 30 种陆地棉材料分为 2 个大类: I 和 II。II 类有 2 个品种,分别是美 V81-052 和华抗 6 号,遗传相似系数为 0.7119。I 类包括了剩下的 28 个品种,可分为 A、B 两个小类, A 类包括 ①、②、③、④ 四个组, ②、③、④ 3 个组都只有 1 个品种,分别是 AnL-1、百泉棕絮、皖棕 3 号,都是棕色棉; ① 组有 16 个品种,包括 11 份棕色棉、4 份白色棉和一份绿色棉,其中棕色棉 AnL-G 与白色棉有腺体亲缘关系最近,遗传相似系数为 0.9109; 绿色棉与棕色棉、白色棉的遗传相似系数都是在 0.70000 以上,亲缘关系较近。B 类包括 ⑤、⑥ 两个组, ⑥ 组有两个白色棉品种: 无腺体和 E6; ⑤ 组有 7 个品种,其中有 6 个品种为白色棉,只有黄红鸡脚叶棕絮为棕色棉,与另外 6 个白色棉品种的遗传相似系数

表 3 29 对引物组合的扩增结果

引物对	总的条带数	多态性条带数	引物对	总的条带数	多态性条带数
m1-em2	28	3	m4-em6	41	6
m1-em4	32	4	m4-em8	32	4
m1-em7	29	3	m5-em1	36	5
m1-em10	29	4	m5-em6	29	3
m2-em3	38	5	m5-em8	37	5
m2-em4	40	5	m5-em9	41	6
m2-em6	43	6	m6-em1	35	4
m2-em7	27	3	m6-em4	31	3
m3-em3	35	4	m6-em7	32	4
m3-em6	42	5	m7-em1	41	5
m3-em7	37	5	m7-em6	43	6
m3-em9	43	6	m7-em9	45	7
m4-em1	39	3	m8-em2	41	5
m4-em3	40	5	m8-em6	38	3
			m8-em7	43	5



A: 引物组合 m7-em6



B: 引物组合 m8-em2

图 1 部分 SRAP 引物组合的扩增图谱(电泳图的 marker 用 Photoshop 软件标注)

1:棕彩选 1 号 2:闵县深紫棕 3:RT 棕絮 4:黄红鸡脚叶棕絮 5:中棕单株 3 6:中棕单株 2 7:湖南棕 8:06-597-9
 9:皖棉 416 10:HN2067 11:HY428 12:无腺体 13:E6 14:泗棉 4 号 15:皖棉 168 16:06S62 17:华抗 6 号
 18:皖棉 133 19:泗棉 3 号 20:有腺体 21:美 V81-052 22:百泉棕絮 23:皖棕 3 号

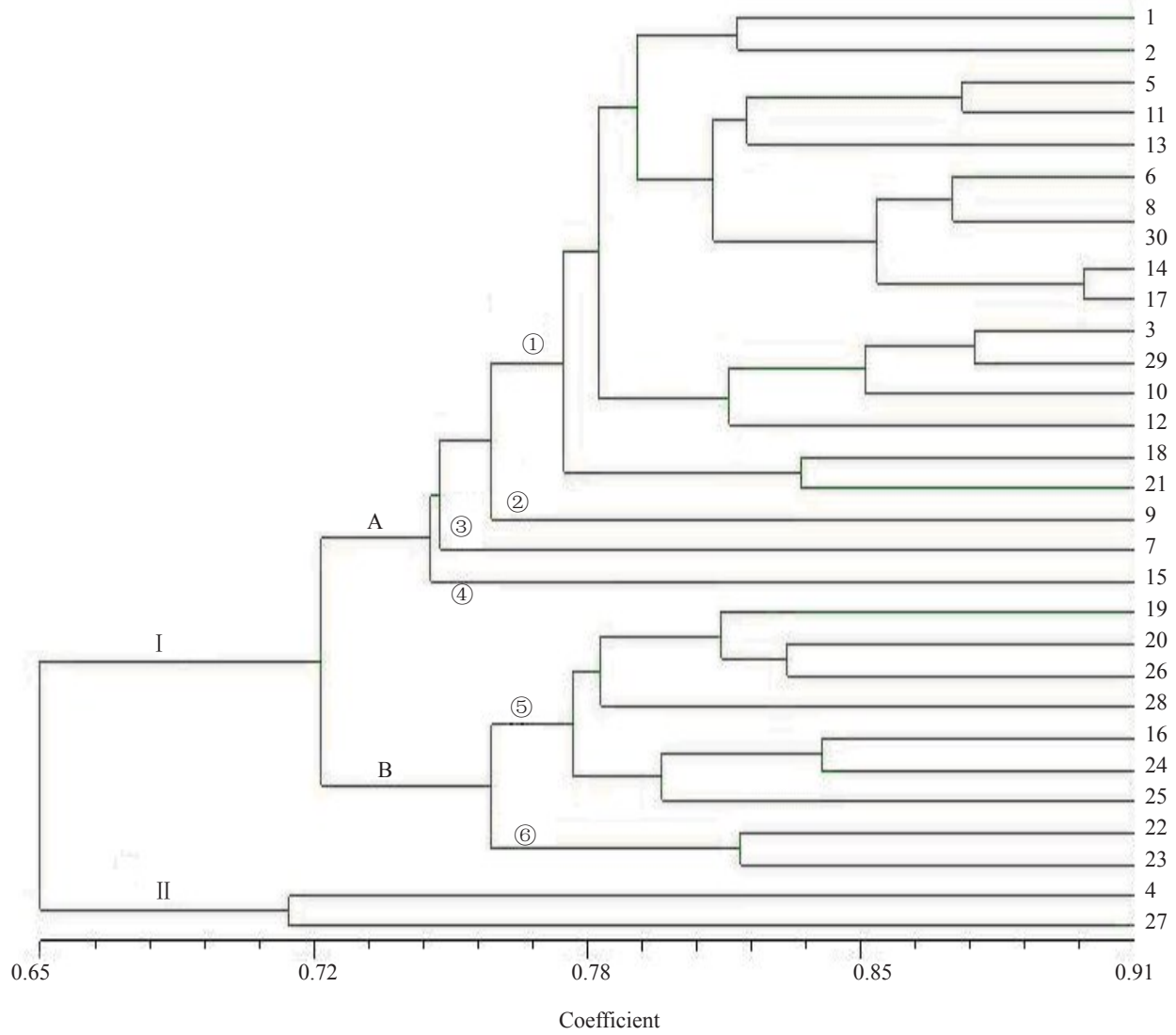


图2 基于SRAP分子标记的棉花品种聚类分析(聚类图是通过0,1矩阵,由NTSYS软件生成)。

表4 供试棉花材料相似系数分布比较

相似系数围	0.5000~0.6000	0.6000~0.7000	0.7000~0.8000	0.8000~0.9000	0.9000~1.0000
相似系数频率					
彩色棉	3	13	72	48	0
白色棉	2	15	45	16	0
棕白棉	5	75	96	31	1

注:0.9000~1.0000:指相似系数在0.9000~1.0000之间,但不包括1.0000,其他类同。

都在0.7500以上。聚类结果的分析表明:大多数供试的彩色棉材料遗传背景比较狭窄。

2.3 遗传距离和相似系数分析

以30份棉花供试材料的分子数据为原始矩阵,获得435个两两不同种质间的遗传相似系数(GS)(表4)和欧式遗传距离(表5)。SRAP分析的GS值在0.5405~

0.9109之间,平均GS值为0.7051,标准差为0.1248,变异系数(CV)为17.70%;欧式遗传距离值在1.0333~5.8808之间,平均值为2.9012。棕色棉品种中棕彩选1号与黄红鸡脚叶棕絮亲缘关系最近,GS值为0.8842,欧式遗传距离为1.2217;棕1-61和美V81-052亲缘关系最远,GS值为0.5789,欧式遗传距离为5.2668。白

表5 供试棉花材料欧式遗传距离分布比较

欧式遗传距离范围	1.0000~2.0000	2.0000~3.0000	3.0000~4.0000	4.0000~5.0000	5.0000~6.0000
遗传距离频率					
彩色棉	22	82	21	9	2
白色棉	5	39	27	6	1
棕白棉	17	67	88	29	5

注:5.0000~6.0000:指欧式遗传距离在5.0000~6.0000之间,但不包括6.0000,其他类同。

色棉品种中06-597-9和HY428亲缘关系最近,GS值为0.8324,欧式遗传距离为1.8266;华抗6号和有腺体亲缘关系最远,GS值为0.5696,欧式遗传距离为5.2242。供试的30个棉花品种中,绿棉与棕色棉棕彩选1号的亲缘关系最近,GS值为0.8990,欧式遗传距离为1.0648;与棕色棉美V81-052亲缘关系最远,GS值为0.5750,欧式遗传距离为5.2436。

3 讨论

3.1 彩色棉的遗传多样性

在此实验观察的范围内,棕色棉材料间相似性在0.7以上的占全部棕色棉的75.21%,棕绿两色彩棉材料的种间相似性在0.7以上的占75.00%,说明供试的棕色棉和绿色棉以及整体彩棉材料间的相似性比较高,亲缘关系比较近。可能是因为共同的基础种质资源、相似的育种方法等造成的结果,与郭江勇等^[1]的研究结果相一致;白色棉材料间相似性在0.7以上的占全部白色棉的73.21%,说明大多数白色棉材料的相似性较高,遗传背景比较狭窄。通过对供试的30个棉花材料的遗传相似性分析可以看出:彩色棉与白色棉的遗传相似性大部分分布在0.7以上,说明彩棉与白棉相似性比较高,亲缘关系比较近。

3.2 SRAP 标记在彩色棉育种中的应用前景

改善品质,仍是今后彩棉育种研究的方向。由于目前彩色棉品质性状与纺织制品质量要求还有很大的差距,而且种植彩棉产量低效益不高。因此培育具有高产量潜力和高纤维品质性能的品种,仍是今后的重点目标^[6]。SRAP 标记因其高频率共显性及在基因组中均匀分布的特性优于其他标记,能够应用于彩色棉遗传图谱的构建,系统研究杂种优势的遗传基础;另一方面,SRAP 标记具有高度的多态性,可以通过ORFs,找出特异性位点,从而能够在彩棉的品质等杂种优势方面筛选出具有该标记基因的个体,培育出符合育种目标的新品种。

在此试验的SRAP 聚类分析中,将30份棉花材料

分为7大类,可以发现除白色棉品种无腺体和E6聚为一类,3个棕色棉品种AnL-1、百泉棕絮、皖棕3号,分别单独聚为一类外,其余均棕白色混杂,其中①类中还包括绿棉。这一方面说明了SRAP 可以检测出纤维色泽差异所造成的遗传差异,但另一方面也说明可能筛选引物的数量还不能完全检测出纤维色泽差异。由于彩色棉在纤维色泽上的基因调控也比较复杂^[7]的。因此,SRAP 标记应用于彩色棉的遗传多样性分析时应严格筛选引物,适当扩充引物数量。

利用SRAP 技术分析彩色棉的遗传多样性,检测不同品种在分子水平上的差异,其结果可为杂种优势的利用提供依据。一般来讲,在聚类分析的树状图中,聚在不同类群或遗传距离比较远的材料,其相互杂交时杂种优势可能较高^[8]。如此实验聚类中的棕色棉美V81-052,它在彩色棉以及与白色棉之间聚类时都显示出了其遗传距离较远。因此,根据该试验的研究结果,利用聚类树状图进行选配亲本组合,对培育出彩棉新品种以及合理利用彩色棉资源具有一定的参考依据。

参考文献

- [1] 郭江勇,王义琴,吴明刚,等.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.
- [2] Lee J. A new spin on naturally colored cottons. Agricultural Research Magazine[J].1996,44(4):20-21.
- [3] 敖光明,于静娟,赵倩.天然彩色棉的研究进展及其有待解决的问题[J].中国农业科技导报,2001,3(1): 64-67.
- [4] 梁理民,王增信,刘有良,等.棉花种间杂交及新品系的育成[J].西北农林科技大学学报,2003,(5):12-15.
- [5] 陈旭升,狄佳春,许乃银,等.海陆杂种棉研究现状及发展趋势[J].江西棉花,2002(4):8-10.
- [6] 崔秀珍,常俊香.棉花海陆杂交种(F1)主要纤维品质性状杂种优势研究[J].辽宁农业科学,2006(5):1-3.
- [7] 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.
- [8] LI G, Quiros CF. Sequence-related amplified polymorphism(SRAP)

- a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103:455-461.
- [9] 李廷春,樊洪泓,高正良,等.丹参遗传多样性的SRAP标记分析[J]. *核农学报*,2008,22(5):576-581.
- [10] 樊洪泓,李廷春,林毅,等.药用石斛遗传多样性的SRAP标记研究[J].*中国中药杂志*,2008,33(1):6-9.
- [11] 李驰,卢新雄,张志娥,等.利用SRAP和SSR分子标记检测分析29份棉花种质遗传完整性[J].*植物遗传资源学报*,2007,8(1):21-25.
- [12] 林忠旭,张献龙,聂以春.新型标记SRAP在棉花F2分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析[J].*遗传学报*,2004,31(6):622-626.
- [13] 林忠旭,张献龙,聂以春,等.棉花SRAP遗传连锁图构建[J].*科学通报*,2003,48(15):1676.
- [14] Zou Y P,Ge S, Wang X D. Molecular Marker for Systematic and Evolutionary Botany[M]. Beijing: Science Press, 2001, 16(10): 154-158.
- [15] Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJ. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels[J]. *Biotechniques* 1994, 17(5):914-921.
- [16] 张祥,张丽,王永慧,等.天然彩色棉研究现状和未来研究方向[J].*安徽农业科学*,2007,35(3):688-689.
- [17] 王国祥.彩色棉的色彩及其遗传分析[J].*甘肃农业科技*,1998(11): 729.
- [18] 徐静斐,孙五成,林毅,等.数量遗传学与水稻育种[M].合肥:安徽科学技术出版社,1990.