## 环塔里木盆地果棉间作棉花品种遗传多样性分析

赵光磊<sup>1</sup>,朱红菊<sup>1</sup>,刘春惊<sup>2</sup>,陈瑞萍<sup>2</sup>,曹春波<sup>2</sup>,谭永军<sup>2</sup>,陈耀锋<sup>1</sup>

[摘 要] 【目的】研究环塔里木盆地果、棉间作棉花品种的遗传多样性,为该地区间作棉花品种的培育和选配提供理论依据。【方法】应用 RAPD 标记技术,对环塔里木盆地 23 个果、棉间作棉花品种的遗传多样性及其相似性进行分析,并对其分子聚类结果进行探讨。【结果】经筛选发现,在 70 个随机引物中,有 27 个引物能在 23 个间作棉花品种间扩增出较好的多态性片段,共扩增出 136 条多态性条带,占总条带数的 67.3%。环塔里木盆地 23 个间作棉花品种之间的平均成对相似系数为 0.665,成对相似系数大于 0.7 的品种对有 66 个,占总数的26.09%,而成对相似系数小于 0.5 的品种对仅占总数的 6.72%。23 个棉花品种可聚为 2 个大类 5 个亚类。【结论】环塔里木盆地果、棉间作棉花品种遗传相似性较高,遗传基础比较狭窄。

[关键词] 果棉间作;棉花品种;RAPD标记;遗传多样性;分子聚类分析

[中图分类号] S562.02

「文献标识码 A

[文章编号] 1671-9387(2010)03-0113-06

# Analysis of genetic diversity in cotton varieties of intercropping of apricot and cotton around Tarim Basin

ZHAO Guang-lei<sup>1</sup>, ZHU Hong-ju<sup>1</sup>, Liu Chun-jing<sup>2</sup>, CHEN Rui-ping<sup>2</sup>, CAO Chun-bao<sup>2</sup>, TAN Yong-jun<sup>2</sup>, CHEN Yao-feng<sup>1</sup>

(1 College of Agriculture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Agriculture Technical Extension Centre, Luntai, Xinjiang 841600, China)

Abstract: [Objective] This study was to illustrate genetic diversity of main cotton varieties in intercropping of fruit and crop, which provided a theoretical basis for breeding and selection of cotton varieties. [Method] The randomly amplified polymorphic DNA procedure (RAPD) was used to assess the genetic diversity of 23 cotton varieties of the intercropping in the Tarim Basin in this study, and the software of NT-SYS-pc version 2. 10 was used to calculate similarity coefficients and construct a dendrogram. [Result] A total of 70 arbitrary primers were screened using RAPD markers with the 23 cotton species and finally 27 primers which could produce steady polymorphism were obtained. 136 polymorphic bands were amplified and the polymorphic rate was 67. 3%. Mean similarity among 23 cotton varieties of the intercropping was 0.665, in which more than 0.7 accounted for 26.09% and less than 0.5 was only 6.72%. Cluster analysis revealed that these 23 cotton species could be divided into 2 classes and 5 subclasses, which clarified the genetic diversity of these species. [Conclusion] There was a low level of genetic diversity among these cotton varieties of the intercropping in the Tarim Basin.

**Key words:** intercropping of fruit and crop; cotton variety; RAPD analysis; genetic diversity; cluster analysis

<sup>\* [</sup>收稿日期] 2009-09-08

<sup>[</sup>基金项目] "十一五"国家科技支撑计划项目(2007BAD36B03-3)

<sup>[</sup>作者简介] 赵光磊(1984一),男,河南新蔡人,在读硕士,主要从事作物遗传育种研究。

<sup>[</sup>通信作者] 陈耀锋(1956-),男,陕西岐山人,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail;chenyf3828@126.com

新疆环塔里木盆地农业产区地理、生态条件特殊,果、农间作已成为当地一个重要的农业生产模式,其中果、棉间作是果、农间作的重要方式之一。与非间作条件下的棉花相比,果、棉间作对间作棉花的产量和品质有一定影响,使棉花的生产特性发生了较大变化。因此,果、棉间作对棉花品种的要求较高。近年来,在果、棉间作的生产实践中已筛选出了一批间作特性较好的棉花品种,也已有关于该地区果、棉间作的研究报道,如杨波等[1]、晁海等[2]主要研究了间作对棉花产量或小气候的影响。但至今尚未见针对间作棉花品种遗传特性的研究报道。

随着分子生物学的发展,分子标记技术已在种 质资源遗传多样性分析、品种鉴定、杂种优势研究以 及作物抗病、虫分子标记的辅助育种等方面得到了 广泛应用[3-6]。而在分子标记方法中,由 Williams 等[7]和 Welsh 等[8]几乎同时提出的随机扩增多态 性 DNA (Random amplified polymorphic DNA, RAPD)分子标记技术,由于具有快速、简便、通用性 好及对 DNA 的需求量小、质量要求低等优点,一经 问世便得到了广泛应用,目前已成为生物遗传多样 性研究的重要方法之一,在棉花遗传多样性研究方 面也有很多报道。如别墅等[9]研究了我国 3 大主产 棉区有代表性的 30 个陆地棉棉花品种的遗传距离 和遗传相似系数;徐秋华等[10]对在生产上有较大影 响的 51 个抗枯萎病陆地棉品种进行了遗传多样性 分析:于雯雯等[11] 对我国 29 份不同年代不同生态 区的早熟短季棉品种进行了遗传多样性的比较分 析;张美冬等[12]对 12 个来源不同的彩色棉资源以 及1个当地主栽白棉花品种进行了多态性分析;范 玲[13] 也对新疆棉花栽培种进行了遗传多样性分析。 总的来看,上述这些研究大多是在宏观上从不同棉 区及不同棉花品种(抗枯萎品种、短季棉、彩色棉)类 型方面对棉花品种进行了研究,而针对南疆果、棉间 作棉花品种的遗传多样性分析还鲜见报道。为此, 本研究应用 RAPD 分子标记技术,对在南疆环塔里 木盆地广泛种植的23个果、棉间作棉花品种进行了 遗传多样性分析,旨在进一步了解果、棉间作棉花品 种的遗传特性及多样性,以期为果、棉间作棉花品种 的选配和遗传育种提供理论依据。

## 1 材料与方法

#### 1.1 材料及试剂

供试间作棉花品种为23个在环塔里木盆地广泛 种植且具有一定代表性的品种,分别为204、293、958、 18-3、297-5、新陆早 13、新陆早 19、新陆早 24、新陆早 26、新陆早 30、新陆早 33、新陆早 36、益农 2 号、润棉 1 号、润棉 4 号、润棉 5 号、新陆中 35、中棉 26、中棉 40、中棉 42、中棉 43、中棉 49 和鲁棉 28,均由新疆西部种业有限公司和新疆轮台县农技中心提供。

Taq DNA 聚合酶和 dNTP, 天根公司产品; RAPD引物,购自 Operon 公司,由上海生工生物技术公司合成。其他试剂均为进口分装或国产分析纯。

### 1.2 方 法

1.2.1 棉苗的培育 将硫酸脱绒棉籽用温水浸泡 12~14 h 后,置于培养皿上,盖几层湿纱布并喷水 保湿,于28℃条件下催芽。选取出芽的种子经消毒 后接种于 1/2 MS 培养基上,在昼温为 28 ℃、夜温 为 18 ℃的条件下培育至大部分棉苗子叶完全展开。 1.2.2 DNA 提取与 RAPD 分析 DNA 的提取按 照宋国立等[14]的方法进行。PCR 反应体系为 20  $\mu$ L,其中含有 10 × buffer 2  $\mu$ L, 0. 2 mmo1/L dNTPs 2 μL, 10 μmol/L 随机引物 1 μL, 15 mmo1/L Mg<sup>2+</sup> 2 μL,1 U Taq DNA 聚合酶 0.3 μL,40 ng 模板 DNA 1 μL,用双蒸水补足 20 μL。 热循环参数设置为:94 ℃预变性 2 min;94 ℃变性 30 s,37 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 90 s,42 个循环;72 C延伸 5 min, 4 ℃保存。PCR 反应产物经 14 g/L 琼脂糖凝胶电泳(电泳缓冲液为1×TAE,于电压90 V 条件下电泳 2 h), EB 染色观察, 紫外灯下照相记 录,保存结果。

1.2.3 数据处理 将电泳图谱上有带的记为 1,无 带或有模糊条带的记为 0。根据 RAPD 数据计算 Jaccard's 遗传相似系数 (J),如对作物 i、j,其成对遗传相似系数  $J_{ij}$ 为:  $J_{ij} = a/(n-d)$ ,其中 a 为 i 品种共有的带数,n 为 RAPD 的总带数,d 为 i 品种和 j 品种都记为 0 的带数。根据公式  $D = -\ln J$ 估计遗传距离。利用遗传距离,使用 NT-SYS-pc 2.10 软件进行 UPGMA 法聚类分析。

## 2 结果与分析

#### 2.1 23 个间作棉花品种的遗传多态性分析

利用已建立的 RAPD 反应体系,进行 RAPD 扩增并筛选多态性引物,结果从 70 个随机引物中筛选 到 27 个具有多态性的 RAPD 引物,共扩增出 202 条 DNA 带,其中多态性条带为 136 条,占总条带的 67.3%(表1)。从表 1 可以看出,不同引物扩增的条带数差异很大,其中 S270 扩增的多态性条带最

#### 表 1 不同随机引物对 23 个棉花品种扩增条带数的比较

Table 1 Numbers of DNA fragments amplified with different primers in 23 cotton cultivars

引物 Primer	碱基序列(5'→3') Sequence(5'→3')	扩增带数 (多态性条带数) No. of amplified bands (No. polymorphic)	引物 Primer	碱基序列(5'→3') Sequence(5'→3')	扩增带数 (多态性条带数) No. of amplified bands (No. polymorphic)
OPB-05	TGCGCCCTTC	7(5)	OPS-03	CAGAGGTCCC	7(7)
OPF-02	GAGGATCCCT	8(5)	OPU-08	GGCGAAGGTT	10(5)
OPF-12	ACGGTACCAG	7(4)	OPU-09	CCACATCGGT	7(4)
OPF-20	GGTCTAGAGG	9(5)	OPW-19	CAAAGCGCTC	9(7)
OPH-09	TGTAGCTGGG	6(4)	OPZ-11	CTCAGTCGCA	5(3)
OPH-11	CTTCCGCAGT	7(4)	U-09	CCACATCGGT	10(6)
OPI-08	TTTGCCCGGT	11(7)	U-11	AGACCCAGAG	10(7)
OPN-08	ACCTCAGCTC	3(2)	I-16	TCTCCGCCCT	5(4)
OPN-09	TGCCGGCTTG	8(6)	I-20	AAAGTGCGGG	4(4)
OPO-05	CCCAGTCACT	6(4)	S90	AGGGCCGTCT	12(7)
OPP-01	GTAGCACTCC	7(3)	S170	TCAACGCGAG	7(4)
OPP-02	TCGGCACGCA	7(5)	S270	GTCCTGGGTT	10(10)
OPP-04	GTGTCTCAGG	9(6)	S407	CCGTGACTCA	7(5)
OPP-05	CCCCGGTAAC	4(3)	合计 Total		202(136)

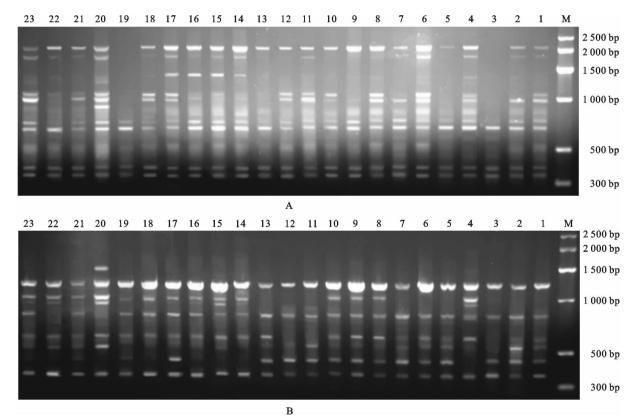


图 1 引物 U-11 和 OPW-19 扩增的 RAPD 图谱

A. 引物 U-11 扩增的 RAPD 图谱; B. 引物 OPW-19 扩增的 RAPD 图谱; M. DNA 分子量标记; 1~23. 分别代表 293、297-5、18-3、中棉 49、新陆早 24、益农 2 号、中棉所 42、新陆早 19、新陆早 26、中棉 26、新陆早 13、新陆早 30、新陆早 33、润棉 4 号、润棉 5 号、润棉 1 号、958、204、新陆中 35、中棉 43、中棉 40、新陆早 36 和鲁棉 28

Fig. 1 Profile of the amplified primer U-11 and OPW-19

A. Profile of the amplified primer U-11; B. Profile of the amplified primer OPW-19; M. DNA Marker; 1-23. represents 293,297-5, 18-3, Zhongmian 49, Xinluzao 24, Yinong 2, Zhongmian 42, Xinluzao 19, Xinluzao 26, Zhongmian 26, Xinluzao 13,

Xinluzao 30, Xinluzao 33, Runmian 4, Runmian 5, Runmian 1,958,204, Xinluzhong 35, Zhongmian 43,

Zhongmian 40, Xinluzao 36 and Lumian 28

#### 2.2 23 个间作棉花品种的相似性分析

对 23 个间作棉花品种的相似性进行分析,结果 见图 2。由图 2 可知,23 个间作棉花品种之间的平 均成对相似系数为 0.665,成对相似系数最小的是 0.382(新陆早 30 和润棉 4 号),成对相似系数大于 0.7 的品种对有 66 个,占总数的 26.09%,有 67.19%的品种对的成对相似系数为 0.5~0.7,成 对相似系数小于 0.5 的品种对仅占 6.72%。上述结果说明,环塔里木盆地果、棉间作棉花品种的相似性较高,遗传多样性程度较低。

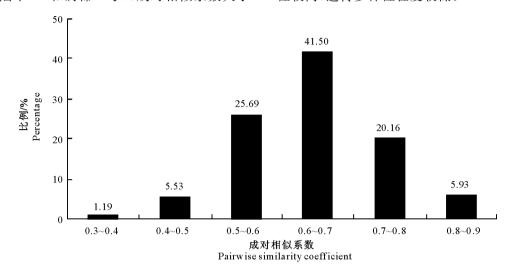


图 2 23 个间作棉花品种间成对相似系数的分布

Fig. 2 Frequency distribution of pairwise similarity coefficients of 23 cotton varieties

#### 2.3 23 个间作棉花品种的聚类分析

应用 UPGMA 方法和 NTSYS-pc 2.10 软件对 RAPD 结果进行聚类分析。由图 3 可知,供试的 23

个间作棉花品种可划分为 2 大类,其中第 Ⅰ 类包括 13 个品种,第 Ⅱ 类包括其余 10 个品种。

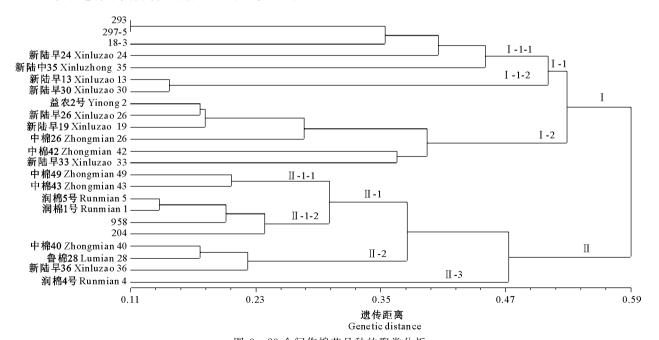


图 3 23 个间作棉花品种的聚类分析

Fig. 3 Dendrogram of 23 cotton varieties of intercropping by using UPGMA analysis

Ⅰ类可分为2个亚类: I-1 亚类包括7个品种,其又可分为2个亚亚类,即 I-1-1和 I-1-2。 I-1-1有5个品种,即293、297-5、18-3、新陆早24和新陆

中 35; I-1-2 则包括 2 个品种,即新陆早 13 和新陆早 30。 I-2 亚类有 6 个品种,即益农 2 号、新陆早 26、新陆早 19、中棉 26、中棉 42 和新陆早 33。

Ⅱ类又可分为3个亚类: II-1 亚类包括6个品种,其又可分为2个亚亚类,其中II-1-1包括中棉49和中棉43; II-1-2包括润棉5号、润棉1号、958和204。II-2亚类有3个品种,即中棉40、鲁棉28和新陆早36。II-3亚类仅有1个品种,即润棉4号。

从聚类结果可以看出,中棉 49 和中棉 43 这 2 个品种很早就聚到了一起,说明这 2 个品种的亲缘关系较近,对这 2 个品种的系谱调查结果与该聚类结果吻合,并且其与新陆早系列其他棉花品种的遗传距离较远,表明它们之间的亲缘关系较远。因此,通过聚类分析得出的树状图,可以方便、直观、有效地进行亲本选配,减少了选育工作的盲目性。

## 3 讨论

RAPD 技术是基于 PCR 反应的一项技术,因而 其受 PCR 反应条件的影响较大,如 PCR 反应的温 度、试剂浓度、DNA质量等,甚至会出现假阳性现 象,因此有报道认为 RAPD 重复性不好,会对结果 有一定的影响[15]。但本研究认为,只要制备出高纯 度的 DNA 模板,严格地控制试验条件,规范地进行 试验操作,防止污染,RAPD的假阳性及重复性较差 的不足是可以克服的。并且前人的研究也表明, RAPD 标记技术在资源评价中比较可靠,如 Williams等[7]以蚕豆(soybean)为材料,对66个后代材 料进行了遗传分析,结果说明 RAPD 标记是一种有 效的分子标记,符合孟德尔遗传规律;随后,Echt 等[16]、Tinker等[17]分别在苜蓿和春大麦的研究中 进一步证明,RAPD标记是一种有效的遗传标记。 同时, Tatineni 等[18]、郭旺珍等[19]、左开井等[20] 对 棉花品种遗传多样性的研究结果也表明,RAPD分 析结果与其品种系谱相吻合,证明了 RAPD 技术在 棉花遗传多样性研究中的可靠性。

本研究尽管有 67.3%的随机引物扩增出了多态性条带,但是通过分析发现,所选的间作棉花品种的遗传相似性很高,遗传基础狭窄,这一结果与Iqbal等<sup>[21]</sup>的结果一致。由于南疆间作棉花品种主要来源于疆外引进的品种以及新疆自育品种,新疆自育品种又主要起源于国外引进品种、疆外引进品种及自育的优良品种,而部分疆外引进品种也是通过国外引进的。因此,导致南疆间作棉花品种整体上亲缘关系较近。另外,有的品种虽然是引进品种,但是可能由于受到环境、人工选择或本身遗传的影响,使这些本具较远亲缘关系的品种发生了遗传变异,从而在聚类分析时聚在同类之中。因此,为了丰

富南疆间作棉花品种的遗传多样性,在今后的工作中应当加大引种力度,有规律、有目的地引入生态适应性要求较高的品种,同时也要加速对优良新品种的选育,促进南疆棉花生产的持续发展。

## 4 结 论

本研究结果表明,从70个随机引物中筛选出了27个能在供试23个间作棉花品种中扩增出多态性条带的引物,共扩增出202条 DNA带,其中多态性条带136条,占总条带数的67.3%。聚类分析表明,23个间作棉花品种可聚为2大类5亚类,I大类包括13个品种,II大类包括其余10个品种。相似性分析结果表明,供试的23个间作棉花品种之间的平均成对相似系数为0.665,成对相似系数小于0.5的品种对仅占总数的6.72%,表明环塔里木盆地果、棉间作棉花品种间的遗传基础狭窄,遗传多样性总体水平较低。

#### [参考文献]

- [1] 杨 波,龚 鹏,车玉红,等. 扁桃棉花间作对棉花产量的影响 [J]. 中国农学通报,2009,25(17);93-97. Yang B,Gong P,Che Y H, et al. Study on almond and cotton intercropping to yield of cotton [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin,2009,25(17);93-97. (in Chinese)
- [2] 晁 海,张大海,徐 林,等. 杏棉间作系统小气候水平分布特征研究[J]. 新疆农业大学学报,2007,30(1):35-39.

  Chao H, Zhang D H, Xu L, et al. Study on microclimatic horizontal distribution law of apricot-cotton intercropping system [J]. Journal of Xinjiang Agricultural University, 2007, 30(1): 35-39. (in Chinese)
- [3] 景建洲,张 勇,李东亮,等. 利用 RAPD 分子标记分析玉米种质遗传多样性 [J]. 中国农学通报,2006,12(12);405-408.

  Jing J Z, Zhang Y, Li D L, et al. Assessment of genetic diversity of maize detected by RAPD molecular markers [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 12(12);405-408. (in Chinese)
- [4] 周延清,田苗苗,鲍 丹,等.河南栽培大豆的 RAPD 品种鉴定和聚类分析 [J]. 华北农学报,2006,21(2):37-41.

  Zhou Y Q, Tian M M, Bao D, et al. RAPD-based identification and cluster analysis of soybean cultivars in Henan [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica,2006,21(2):37-41. (in Chinese)
- [5] 刘宏伟,刘秉华,张改生,等. RAPD 分子标记与小麦杂种优势相关性研究 [J]. 麦类作物学报,2005,25(6):1-5.

  Liu H W, Liu B H, Zhang G S, et al. Relationship between heterosis and genetic distance based on RAPD marker in hybrid wheat [J]. Journal of Triticeae Crops, 2005, 25(6):1-5. (in Chinese)
- [6] 郭海江,王跃进,张剑侠,等. 葡萄抗病无核胚挽救育种及分子标记辅助选择[J]. 西北植物学报,2005,25(12):2395-2401.

Chinese)

- Guo H J, Wang Y J, Zhang J X, et al. Development of resistant and seedless grape germplasms by embryo rescue and marker-assisted [J]. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2005, 25 (12):2395-2401. (in Chinese)
- [7] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplification by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18:6531-6535.
- [8] Welsh J, Mcclelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18, 7213-7219.
- [9] 别 墅,孔繁玲,周有耀,等. 中国 3 大主产棉区棉花品种遗传 多样性的 RAPD 及其与农艺性状关系的研究 [J]. 中国农业科 学,2001,34(6):597-603. Bie S,Kong F L,Zhou Y Y,et al. Genetic diversity analysis of representative elite cotton varieties in three main cotton regions in China by RAPD and its relation with agronomic characteris-

tics [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2001, 34(6): 597-603. (in

- [10] 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.

  Xu Q H, Zhang X L, Nie Y C, et al. Genetic diversity evaluation of cultivars resistant to Fusarium wilt by RAPD markers [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(3):272-276. (in Chinese)
- [11] 于雯雯,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. Yu W W,Yu S X,Wang W,et al. Genetic diversity evaluation of shorted-season upland cotton cultivars in China with RAPD markers [J]. Cotton Science, 2006, 18(3):186-189. (in Chinese)
- [12] 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,2003,22(5):427-430.

  Zhang M D, Zhan X J, Zhang X L. Genetic diversity evaluation of colored cotton by RAPD markers [J]. Journal of Huazhong Agricultural University,2003,22(5):427-430. (in Chinese)
- [13] 范 玲. 新疆棉花栽培种遗传多样性研究 [D]. 乌鲁木齐: 新

- 疆农业大学,2004.
- Fan L. Genetic diversity studies on cultivated cotton in Xinjiang [D]. Urumqi. Xinjiang Agricultural University, 2004. (in Chinese)
- [14] 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.

  Song G L,Cui R X,Wang K B,et al. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA [J]. Acta Gossypii Sinica,1998,10(5);273-275. (in Chinese)
- [15] 赵姝华,张 波. RAPD 标记技术的实用性及稳定性探讨 [J]. 国外农学-杂粮作物,1999,19(4):13-15.

  Zhao S H, Zhang B. Study on practicability and stability of RAPD markers [J]. Rain Fed Crops,1999,19(4):13-15. (in Chinese)
- [16] Echt C S, Erdahl L A, Mccoy T J. Genetic segregation of random amplified polymorphic DNA in diploid cultivated alfalfa [J]. Genome, 1992, 35;84-87.
- [17] Tinker N A, Fortin M G, Mather D E. Random amplified polymorphic DNA and pedigree relationships in spring barley [J]. Theor Appl Genet, 1993, 85:976-984.
- [18] Tatineni V, Cantrell R G, Davis D D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs [J]. Crop Science, 1996, 36(1):186-192.
- [19] 郭旺珍,张天真,潘家驹,等. 我国陆地棉品种的遗传多样性研究初报 [J]. 棉花学报,1997,9(5);242-247.

  Guo W Z,Zhang T Z,Pan J J,et al. Analysis of the genetic diversity in upland cotton cultivars from China [J]. Acta Gossypii Sinica,1997,9(5);242-247. (in Chinese)
- [20] 左开井,孙济中,张金发,等. 用 RAPD 标记评估我国棉花品种遗传多样性 [J]. 遗传学报,2000,27(9);817-823.

  Zuo K J,Sun J Z,Zhang J F,et al. Genetic diversity evaluation of some Chinese elite cotton varieties with RAPD markers [J]. Acta Genetica Sinica,2000,27(9);817-823. (in Chinese)
- [21] Iqbal M J, Aziz N, Saeed N A, et al. Genetic diversity evaluation of some elite cotton varieties by RAPDs analysis [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94:139-144.