

亚比棉 × 海岛棉杂种 F_1 的遗传分析

渠云芳,黄晋玲

(山西农业大学 农学院,山西 太谷 030801)

摘要: 为了验证杂种的真实性,利用常规压片法和 RAPD 技术对亚比棉 × 海岛棉杂种 F_1 及其亲本进行了研究。细胞学研究表明 3 种杂种(亚洲棉 × 比克氏棉) × 海岛棉的核型公式为: $2n = 4x = 52 = 44m(2SAT) + 8sm(2SAT)$ 相对长度变异范围为 6.91% ~ 1.99%,臂比值为 1.01 ~ 2.31 之间,平均臂比为 1.37,核型类型为 2B。RAPD 分析表明,亚比棉 × 海岛棉杂种 F_1 共扩增出 60 条 DNA 带,其中具亚洲棉特异带的占总带数的 3.3%;来自比克氏棉的带占 8.3%;具海岛棉特异带占 18.3%;来自亚比棉的特异带占 10%;杂种的特异带占 8.3%。

关键词: 亚比棉 × 海岛棉; 杂种; 遗传分析

中图分类号: S562.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2010)03-0064-04

Genetic Analysis of Hybrid F_1 from(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*

QU Yun-fang, HUANG Jin-ling

(College of Agronomy, Shanxi Agricultural University, Taigu 030801, China)

Abstract: To verify the truth of hybrid (*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense* and its parents were studied through conventional compression method and RAPD technology. The result of cytology showed that the karyotype formula of tri-hybrid(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense* is $2n = 4x = 52 = 44m(2SAT) + 8sm(2SAT)$, the range of relative length is 6.91 ~ 1.99%, the range of arm ratios is 1.01 ~ 2.31, mean arm ratios is 1.37. The type of karyotype is 2B. The analysis of RAPD showed: A total of sixty DNA bands were amplified in(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*, 3.3% DNA bands came from the specifical bands of *G. arboreum*, 8.3% was from the specifical bands of *G. bickii*, 18.3% DNA bands came from the specifical bands of *G. barbadense* and 8.3% came from the special bands of tri-specific hybrid.

Key words: (*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*; Hybrid; Genetic analysis

通常将植物分类学上属于不同种、属或亲缘关系更远的植物类型间所进行的杂交称为远缘杂交^[1]。通过远缘杂交,可以把不同物种所特有的有益性状进行遗传重组,从而创造出品种间杂交无法得到的种质材料^[2,3]。朱青竹等^[4]利用 RAPD 方法对来自不同国家棉花的种质资源进行了分析,并鉴定了不同种质资源材料之间的亲缘关系。原产澳洲的棉属野生种比克氏棉,具有子叶腺体延缓形成特性,即休眠种子中种仁内无腺体,种子萌发后出现腺体^[5]。世界各植棉国的遗传育种者都希望将这一宝贵性状转育到栽培陆地棉种上,进而培育种子低棉酚而植株高棉酚棉花新类型。但因澳洲 G 染色体组与亚洲 A 染色体组及美洲 D 染色体组的染色体结构差异很大,减数分裂不能配对,导致陆地棉与比克氏棉直接杂交有困难。

山西农业大学棉花育种项目组将亚洲棉(*G. arboreum*) 与比克氏棉(*G. bickii*) 杂交,并经过染色体加倍,首次获得了可育的亚比棉异源四倍体。该杂种稳定地保留了种子无腺体而植株有腺体的优良特性,然后再用该双二倍体与栽培种海岛棉(*G. barbadense*₁) 杂交,获得了 3 种杂种。本研究从细胞学及 RAPD 分子标记技术方面,对亚比棉与海岛棉合成的 3 种杂交种进行了遗传分析,并对 3 种杂交种中野生棉与栽培棉的遗传成分进行了检测,旨在为比克氏棉优良基因的加速利用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料如表 1 所示。

收稿日期: 2010-03-08

基金项目: 山西省科技攻关项目(20080311001-4); 山西农业大学科技创新基金(2004082)

作者简介: 渠云芳(1973-),女,山西祁县人,讲师,硕士,主要从事棉花细胞遗传与染色体工程育种研究工作。

通讯作者: 黄晋玲(1965-),女,山东邹城人,教授,博士,主要从事棉花细胞遗传与染色体工程育种研究工作。

表 1 试验材料
Tab. 1 Test material

编号 Number	材料名称 Material name	基因组符号 Genome symbol	主要特征 Main character
1	亚洲棉	A ₂	花为黄色,基部有红斑,茸毛短而少
2	比克氏棉	G ₁	浅粉红色花,基部有红斑,茸毛多而长
3	亚洲棉 × 比克氏棉异源二倍体	A ₂ G ₁	粉红色花,基部有红斑,茸毛多
4	亚洲棉 × 比克氏棉双二倍体	A ₂ A ₂ G ₁ G ₁	粉红色花,基部有红斑,茸毛多而长
5	海岛棉	[AADD] ₂	花为黄色,基部有红斑,无茸毛
6	亚比棉异源二倍体 × 海岛棉	A ₂ A ₂ G ₁ G ₁ × [AADD] ₂	深粉红色花,基部有红斑,无茸毛

1.2 试验方法

1.2.1 细胞学方法 预先浸种 1 d,于 25 ~ 30℃ 条件下发芽,待根尖长至 2 ~ 3 cm 长时,截取 2 ~ 3 mm 的根尖,饱和对二氯苯溶液预处理 2.0 ~ 2.5 h,卡诺固定液(无水乙醇:冰乙酸 = 3:1)固定 2 ~ 24 h,2% 纤维素酶和果胶酶混合水溶液在 28 ~ 35℃ 下酶解 30 ~ 60 min,0.5 mol/L 经预热 60℃ 的 HCl 解离约 8 ~ 15 min,卡宝品红染色压片。

核型分析方法参照李懋学^[6]的报道,每一棉种统计 50 个以上可准确计数染色体的细胞,以确定该棉种的染色体数目。分别从 5 个以上根尖压片中,选择缢痕清晰而又分散良好的 5 ~ 12 个细胞,供核型分析。将照相所得染色体图像进行编号,并测量其长臂、短臂值,根据所得数据进行同源染色体的人工配对,并按染色体的长度从长至短顺序编号,最后取 5 ~ 12 个细胞染色体数的平均值作为该棉种的染色体数。

1.2.2 RAPD 分子标记方法

总 DNA 的提取参照 CTAB 法进行^[7]。使用的 15 个随机引物(长度为 10 个核苷酸序列)分别是 S33、S37、S39、S40、S1709、S1285、S1485、S1287、S1288、S1290、S1292、S1295、S1296、S1297、S1299,均购于上海生物技术公司。

PCR 反应在 PTC-400 热循环仪上进行。PCR 反应体积为 25 μL,其中含 1 × Buffer,1.5 mmol/L MgCl₂,0.4 μmol/L 引物,50 ng DNA,1.0 U Tag 酶,用双蒸水补足 25 μL,上覆 30 μL 矿物油。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 2 min;94℃ 变性 30 s,36℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 70 s,共 10 个循环;89℃ 变性 20 s,36℃ 退火 20 s,72℃ 延伸 60 s,共 35 个循环;72℃ 延伸 7 min,4℃ 保温 10 min。扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳,胶中加入 0.5 g/L EB。电泳结束后,紫外检测,凝胶成像分析系统扫描照相。每次试验均重复 2 次,只有 2 次重复均相同的扩增带才被用作特征带分析。

1.2.3 数据统计分析 RAPD 扩增产物以 0,1 统计建立数据矩阵,即在相同迁移位置上有带的记为

1,无带的记为 0,采用 DPS 软件中系统聚类的类平均法进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 亚比棉 × 海岛棉杂种 F₁ 的核型分析

对 50 个以上可计数染色体的细胞计数可知,表明 3 种杂种(亚比棉 × 海岛棉)的染色体数目为 2n = 4x = 52,其染色体形态、核型图与核型模式如图 1、2、3 所示,染色体参数如表 2 所示。表 2 结果表明,该杂种染色体相对长度的变异范围为 6.91% ~

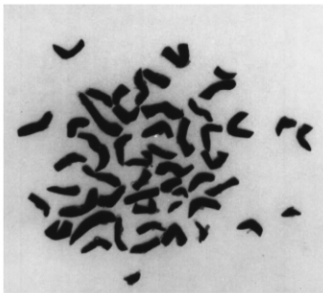


图 1 3 种杂种(亚比棉 × 海岛棉) F₁ 的染色体形态
Fig. 1 Chromosome morphology figure of tri-hybrid
(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*

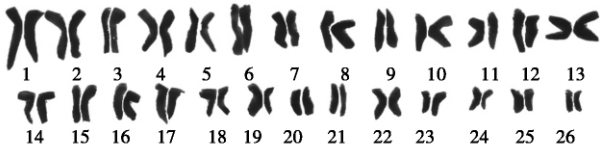


图 2 3 种杂种(亚比棉 × 海岛棉) F₁ 的核型
Fig. 2 Chromosome karyotype figure of tri-hybrid
(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*

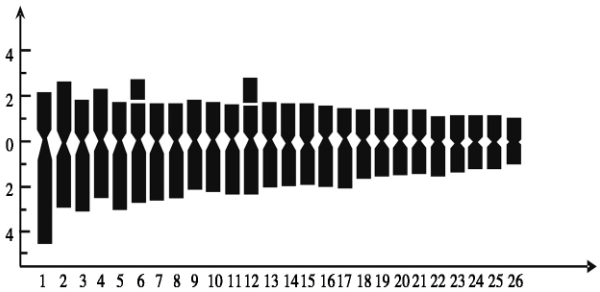


图 3 3 种杂种(亚比棉 × 海岛棉) F₁ 的核型模式
Fig. 3 Chromosome karyotype model figure of tri-hybrid
(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*

1.99%。臂比值为 1.01 ~ 2.31 ,平均臂比为 1.37。其中,第 1 3 5 6 对为亚中着丝粒(sm) 染色体,第 1 对为近端着丝粒染色体,其他 22 对均为中着丝粒(m) 染色体。在第 6,12 对染色体短臂上各带有 1 对随体,核型类型为 2B,其核型公式为:2n = 4x = 52 = 44m(2SAT) + 8sm(2SAT) 。

表 2 (亚洲棉 × 比克氏棉) × 海岛棉杂种 F₁ 的染色体参数
Tab.2 The chromosome parament of
(*G. arboreum* × *G. bickii*) × *G. barbadense*

染色体编号 Number of chromosome	相对长度 / % Relative length (长臂 + 短臂 = 总长) (Long arm + short arm) = Total length	臂比 Arm ratio	类型 Kind
1	4.82 + 2.09 = 6.91	2.31	sm
2	2.93 + 2.78 = 5.71	1.05	m
3	3.23 + 1.84 = 5.07	1.76	sm
4	2.67 + 2.34 = 5.01	1.13	m
5	3.11 + 1.73 = 4.84	1.79	sm
6	2.84 + 1.63 = 4.47 (0.84)	1.73	sm (SAT)
7	2.63 + 1.67 = 4.30	1.58	m
8	2.56 + 1.66 = 4.22	1.53	m
9	2.18 + 1.81 = 3.99	1.21	m
10	2.31 + 1.67 = 3.98	1.38	m
11	2.43 + 1.48 = 3.91	1.65	m
12	2.40 + 1.46 = 3.86 (1.10)	1.64	m (SAT)
13	2.11 + 1.71 = 3.82	1.23	m
14	1.95 + 1.80 = 3.75	1.08	m
15	1.88 + 1.82 = 3.70	1.03	m
16	2.20 + 1.45 = 3.65	1.51	m
17	2.23 + 1.31 = 3.54	1.70	m
18	1.75 + 1.35 = 3.10	1.30	m
19	1.50 + 1.42 = 2.92	1.06	m
20	1.46 + 1.37 = 2.83	1.06	m
21	1.39 + 1.36 = 2.75	1.02	m
22	1.59 + 1.03 = 2.62	1.54	m
23	1.26 + 1.12 = 2.38	1.12	m
24	1.17 + 1.07 = 2.24	1.09	m
25	1.17 + 1.02 = 2.19	1.15	m
26	1.00 + 0.99 = 1.99	1.01	m

2.2 RAPD 分析

2.2.1 不同引物对参试材料的扩增多态性 用 15 个引物对 6 个材料进行 PCR 扩增,均有扩增产物,总共扩增出 117 条 DNA 带,其中多态性带为 81 条,多态性比例占 69.2%。引物不同扩增的片段数也不同,平均每个引物可扩增出 7.8 条 DNA 带。从表 3 可以看出,不同引物扩增出的 DNA 带差异极大,最多的可扩出 13 条带(S33),最少的仅有 4 条(S40),而且多态性也不同,多态性带所占比例变化幅度较大。多态性位点比例最高的为 100%,最低的为 50%。这是因为 3 种杂种分别属于 3 个不同的染色体组的野生种与栽培种,其亲缘关系比较远,

所以参试材料表现出丰富的多样性。

表 3 不同随机引物扩增 6 个材料的多态性
Tab.3 Amplified polymorphism of six
materials from different random primers

引物 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增带(多态性数) Amplified band (Number of polymorphism)
S33	CAGCACCCAC	13(11)
S37	GACCGCTTGT	10(9)
S39	CAAACGTCGG	9(9)
S40	GTTGCCATCC	4(2)
S1709	TCGCAGCGAG	5(3)
S1485	CCCGATCAGT	5(3)
S1285	GTGAGCGTGG	6(3)
S1287	CTACCAGGGA	5(4)
S1288	TGAGAAGCGG	10(7)
S1290	ACCCCTGGCA	8(4)
S1292	AGCCGTCGAA	8(7)
S1295	GGCAGCAGGT	4(3)
S1296	GACAAGGACC	6(4)
S1297	CTCGAACCCC	10(8)
S1299	CTCGATCACC	10(9)

2.2.2 (亚比棉 × 海岛棉) F₁ 及其亲本的多态性差异比较 亚洲棉、比克氏棉、亚比棉与杂种的多态性差异比较如图 4 5 所示。从 15 个引物对 3 种杂种及其各个亲本的扩增结果看,(亚比棉 × 海岛棉) F₁ 共扩增出 60 条 DNA 带,其中具亚洲棉特异带的为 2 条,占总带数的 3.3%;来自比克氏棉的带为 5 条,占 8.3%;具海岛棉特异带的为 11 条,占 18.3%;来自亚

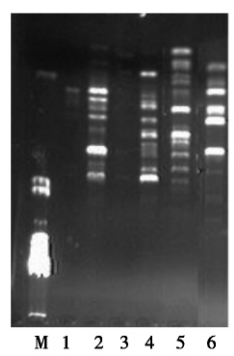


图 4 引物 S37 的扩增结果
Fig.4 Amplified products of S37

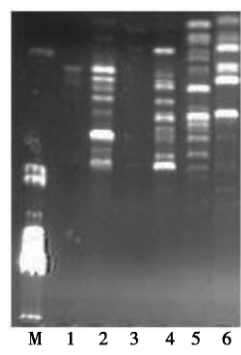


图 5 引物 S39 的扩增结果
Fig.5 Amplified products of S39

比棉的特异带为 6 条,占 10%,在杂种后代中还有一些其他带型。如与亚洲棉和比克氏棉相同的带占 10%;与比克氏棉和海岛棉相同的带占 18.3%;杂种的特异带为 5 条,占 8.3%,而材料中还检测到双亲的共有带。表明后代中存在着丰富的遗传变异,以上结果也表明,利用 RAPD 技术可以检测远缘杂种材料中亲本的遗传成分。

3 讨论

3.1 3 种杂种(亚比棉×海岛棉) F_1 与亲本的核型差异

三种杂种(亚比棉×海岛棉) F_1 是亚比棉双二倍体与海岛棉杂交得到的。由以前的研究得知,亚比棉的核型公式是 $2n = 4x = 52 = 50m(6SAT) + 2sm$;海岛棉的核型公式是 $2n = 4x = 52 = 40m + 10sm(2SAT) + 2st(SAT)$ 。而在本试验中经过研究发现,(亚比棉×海岛棉) F_1 的核型公式为: $2n = 4x = 52 = 44m(2SAT) + 8sm(2SAT)$ 。

(亚比棉×海岛棉) F_1 的染色体数目为 52 条,与亲本海岛棉、亚比棉的染色体数目相同,但染色体类型变化很大。亚比棉双二倍体中有 50 条中部着丝粒染色体(m),有 2 条亚中着丝粒染色体(sm);海岛棉染色体中有 40 条中部着丝粒染色体(m),10 条亚中着丝粒染色体(sm),2 条近端着丝粒染色体(st)。而 3 种杂种(亚比棉×海岛棉) F_1 中,有 8 条亚中着丝粒染色体,介于野生种与栽培种之间。另一方面,根据所得的染色体参数及随体情况,可初步判定杂种的第 1 对染色体可能来自比克氏棉的第 11 对,杂种的第 17 对染色体可能来自亚比棉的第 16 对,(亚比棉×海岛棉) F_1 的第 11、18、25 对可能来自海岛棉的第 13、18、26 对。从核型类型来看,亚比棉为 1A,海岛棉为 2B,而 3 种杂种为 2B,倾向于父本。

3.2 RAPD 用于分析远缘杂种后代的可行性

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进化。从本研究可以看出,(亚比棉×海岛棉)杂种 F_1 中来自海岛棉的带占 18.3%,来自亚比棉的带占 10%,在 3 种杂种中还可以检测到不同棉种的特异片段。吴玉香等^[8]用 RAPD 标记对棉属的 24 个种进行了遗传多样性分析,并对 20 个二倍体棉种的亲缘关系进行了鉴定。罗伏青等^[9]用 RAPD 标记对南瓜新品种锦栗、红栗

的杂交种纯度从分子水平上进行了鉴定,其研究结果与大田鉴定结果完全吻合。李景环等^[10]用 RAPD 标记对加拿大披碱草和老芒麦及其杂种 F_1 、 F_2 进行了研究,研究结果充分验证了杂种的真实性。聂以春等^[11]用 RAPD 标记对(亚洲棉×异常棉)×陆地棉的杂交后代的 5 个种质系的研究结果表明,棉花远缘杂种后代的 5 个种质系均可检测到不同棉种的特异片段。因此,RAPD 标记检测远缘杂种后代中来自不同棉种的血缘是可行的。

总之,本研究结果表明,3 种杂种 F_1 中含(有亚洲棉×比克氏棉)双二倍体的遗传物质。因此可以认为,对远缘杂种进行细胞学标记和分子标记的鉴定,是一种切实可行的有效方法。

参考文献:

- [1] 张天真. 作物育种学总论 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 114.
- [2] 郭宝生, 韩泽林, 耿军义, 等. 陆、海、瑟棉花远缘杂交后代的遗传改良 [J]. 华北农学报, 2007, 22(增刊): 85 - 87.
- [3] 梁正兰. 棉花远缘杂交的遗传与育种 [M]. 北京: 科学出版社, 1999: 1 - 17.
- [4] 朱青竹, 赵国忠, 赵丽芬, 等. 不同来源棉花种质资源基于 RAPD 的遗传变异 [J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(4): 16 - 19.
- [5] Allan Edwards G, Anwar Mirza M. Genomes of the Australian Wild Species of Cotton II the Designation of A New [J]. Genome for *G. bickii*. Genome, 1979, 21(3): 367 - 372.
- [6] 聂如芝, 李懋学. 棉属植物核型研究 [M]. 北京: 科学出版社, 1993: 17 - 19.
- [7] Clark M S. 植物分子生物学 - 实验手册 [M]. 柏林: 施普林格出版社, 1998: 7.
- [8] 吴玉香, 孙玉强, 陈崇乾, 等. 利用 RAPD 检测棉属种间亲缘关系的研究 [J]. 作物学报, 2007, 33(6): 909 - 913.
- [9] 罗伏青, 孙小武, 董亚静, 等. RAPD 标记鉴定南瓜种子纯度的研究 [J]. 华北农学报, 2008, 23(3): 63 - 66.
- [10] 李景环, 云锦凤, 邵丽华, 等. 加拿大披碱草和老芒麦及其杂种 F_1 、 F_2 的 RAPD 分析 [J]. 华北农学报, 2007, 22(6): 77 - 80.
- [11] 聂以春, 左开井, 张献龙. RAPD 标记在棉属种间杂种后代检测中的应用 [J]. 中国农业科学, 2000, 19(5): 385 - 394.