

棉花高强纤维 QTLs 的微卫星标记筛选

张天真, 袁有禄, 郭旺珍

(南京农业大学遗传育种系, 作物遗传与特特种质创新教育部重点实验室, 南京 210095)

John Yu, Russell J Kohel

(美国农业部南方平原农业研究中心作物种质资源研究室, 德州学院站, 77845)

摘要: 利用我国培育的高强纤维种质系 7235 为材料, 开展了棉花高强纤维基因或 QTL 微卫星标记的筛选。通过 211 对 SSR 引物的筛选, 鉴定出与高强纤维 QTL 连锁的 SSR 标记 3 个: NAU/SSR/fs1₁₃₀、NAU/SSR/fs2₁₉₀、NAU/SSR/fs3₂₂₀。NAU/SSR/fs1₁₃₀、NAU/SSR/fs2₁₉₀ 两个标记紧密连锁, 重组率为 2.3cM, 标记的 QTL 占 (7235× TM-1) F₂ 分离群体总遗传变异的 30.9%。此外, 这一标记的 QTL 在不同年份不同环境表现稳定, 这是鉴定出的一个控制棉花高强纤维表现的主效位点。NAU/SSR/fs3₂₂₀ 与另一个高强纤维 QTL 连锁, 但遗传效应值小, 不稳定。单体测验表明, NAU/SSR/fs1₁₃₀、NAU/SSR/fs2₁₉₀ 标记的 QTL 位于第 10 染色体上, 而 NAU/SSR/fs3₂₂₀ 标记的 QTL 位于第 5 染色体上。

关键词: 陆地棉; 纤维强度; 数量性状位点; 分子辅助标记选择

中图分类号: S562.03 文献标识码: A 文章编号: 0578-1752(2001)04-0363-04

SSR Molecular Tagging of QTLs for Fiber Strength in Upland Cotton

ZHANG Tian-zhen, YUAN You-lu, GUO Wang-zhen

(Key Laboratory for Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Ministry of Education,
Department of Genetics & Breeding, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

John Yu, Russell J Kohel

(USDA, ARS, Southern Plain Agriculture Research Center, Crop Germplasm Research Unit,
College Station, TX 77845)

Abstract: A *G. anomalum* introgression line, 7235, characterized as good fiber quality, developed in China, was used to identify SSR (simple sequence repeats) molecular markers linked to fiber strength QTLs. Three SSR molecular markers, NAU/SSR/fs1₁₃₀, NAU/SSR/fs2₁₉₀, and NAU/SSR/fs3₂₂₀ have been identified to be linked with high fiber strength QTLs. NAU/SSR/fs1₁₃₀ and NAU/SSR/fs2₁₉₀ were found to be closely linked with 2.3cM in genetic distance. The tagged QTL by these two SSR markers can explain 30.9% phenotypic variation of (7235× TM-1)F₂. It is stably inherited over various environments and different years. Therefore, it is supposed that it is a major QTL responsible for high fiber strength in upland cotton. Another SSR marker, NAU/SSR/fs3₂₂₀, was linked to another QTL for fiber strength. However, its genetic effect is small and unstable. Monosomic tests indicated that the tagged QTL by NAU/SSR/fs1₁₃₀ and NAU/SSR/fs2₁₉₀ was mapped to chromosome 10 and another QTL by NAU/SSR/fs3₂₂₀ to chromosome 5.

收稿日期: 2000-05-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39830240)、国家转基因植物研究专项(J99-A-023), 教育部跨世纪人才基金和博士点基金, 江苏省自然科学基金资助项目(BK99052)

作者简介: 张天真(1962-), 男, 浙江东阳人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事植物分子育种研究。Tel: 025-4395307; Fax: 025-4395307; E-mail: cotton@njau.edu.cn

Key words: *Gossypium hirsutum* L.; Fiber strength; QTL; MAS

棉纤维是重要的纺织工业原料。近 15 年来我国育成的棉花品种产量略高于美国, 纤维品质则有些差距。我国当家品种的纤维品质中等, 基本能满足纺织工业的要求, 但绒长单一, 纤维强度偏低, 纺高支纱的优质棉需大量进口^[1]。随着纺工部门引入喷气纺、气流纺等高效快速的纺纱技术, 以及人民群众对衣着要求的普遍提高, 对我国棉花品种的总体纤维品质, 尤其是纤维强度提出了更高的要求^[2]。因此尽快提高我国棉花纤维品质, 培育优质棉花品种迫在眉睫。要提高现有陆地棉(*G. hirsutum* L.) 品种的纤维品质水平, 首先要收集具有高纤维强度基因的种质系作亲本与现有的栽培品种进行一系列杂交和互交, 以便打破强度与产量之间的负相关, 但在每轮回交中, 都要通过纤维性状测定, 而且要等到收花期后才能知道结果; 要求育种群体大, 预见性也差。因此品质育种的成本很高, 费时, 难度也较大, 进展就很慢^[3-4]。通过筛选出一个或几个与高强纤维基因紧密连锁且不受环境影响的分子标记用于辅助选择, 可大大提高高强纤维的选择效率。本研究选用一个异常棉(*G. anomalum*) 基因渐渗的优质纤维种质系 7235^[5]开展了棉花高强纤维的 QTL 微卫星分子标记筛选。筛选出一个遗传稳定的高强纤维主效 QTL, 它的应用必将有助于快速提高我国棉花品种的纤维品质水平。

1 材料与方 法

陆地棉高强纤维种质系 7235 引自江苏省农业科学院经济作物研究所。引入后, 通过单株选择, 株行农艺性状的鉴定和纤维品质检验, 选出纯合的 7235 株系用于本项研究。据我们 1998 年测定结果, 7235 纤维强度为 27.3cN/g, 纤维长度为 35mm, 纤维细度(麦克隆值, 下同)为 4.1; TM-1 的纤维强度则为 20.7cN/g, 纤维长度为 30.5mm, 纤维细度为 5.0。陆地棉遗传标准系 TM-1^[6]引自美国农业部南方平原农业研究中心作物种质资源研究室。

1997 年将 7235 与 TM-1 进行杂交, 年底 F₁ 种子送到海南岛, 自交产生 F₂。1998 年将(7235× TM-1)F₂ 分离群体种在南京农业大学江浦试验站。用 CTAB 法提取这一分离群体的单株 DNA^[7]。吐絮后, 单株收花、取样, 进行纤维品质测验。1998 年和 1999 年分别在海南岛三亚和南京农业大学江浦试验站种植(7235× TM-1)F₃ 株行, 以便用 F₃ 株行中

单株纤维强度的平均值来估算(7235× TM-1)F₂ 的单株水平。为了鉴定纤维品质在异地的遗传表现, 1999 年还将来自同一群体的(7235× TM-1)F₂ 种子美国德克萨斯州大学城(College Station)农业部南方平原农业研究中心试验田。所有国内棉样均送到河南安阳农业部纤维品质和种子质量检测中心进行纤维品质检验。美国的棉样则送到田纳西州 Knoxville STARLAB 公司进行纤维品质检验。

细胞学鉴定出的 1、2、3、4、6、7、9、10、12、16、17、18、20、23、26 染色体的单体植株与海岛棉(*G. barbadense* L.) 3-79 进行杂交, 产生 F₁。提取 F₁ 单体株的 DNA 用于鉴定出的分子标记的染色体定位。

211 对微卫星(SSR) 标记引物购自美国 Research Genetics 公司。Taq 酶, dNTPs, PCR 反应的其他试剂均购自 Sigma 公司。SSR 反应体系为 DNA 变性 4min 后, 94°C 变性 1min, 60°C 退火 1min, 72°C 延伸 2min, 循环 35 次, 最后 72°C 延伸 7min。在 PE 9600 扩增仪上进行扩增, 扩增产物在 Metaphor agrose(FML, Maine, USA) 胶上进行分离鉴定。

2 结果与分析

2.1 纤维品质的 QTL 微卫星分子标记筛选

用 211 对 SSR 引物首先对 7235 和 TM-1 亲本的 DNA 多态性进行初步分析。有 26 对(12.32%) SSR 引物在双亲上有差异。对 7235 有特异扩增带的 SSR 引物, 分别选用高纤维强度/低纤维强度池, 长纤维/短纤维池, 低/高麦克隆值池进一步进行扩增鉴定。构建高/低纤维强度等 3 对池时, 同时参照了 1998 年(7235× TM-1)F₂ 的单株表现, 1999 年分别种在海南岛和南京农业大学江浦实验站(7235× TM-1)F₃ 株行单株纤维强度的平均表现, 各选 5~6 株构成。7235 亲本特异扩增带在高强纤维池中能重复, 而在低强池中不表现的引物, 就用 1998 年的(7235× TM-1)F₂ 单株 DNA 进行扩增。

通过筛选共发现有 3 个 SSR 标记 NAU/SSR/fs1₁₃₀(130bp)、NAU/SSR/fs2₁₉₀(190bp)、NAU/SSR/fs3₂₂₀(220bp) 与棉花的高强纤维连锁(表)。利用 MAPMAKER/QTL 3.0 程序对这 3 个标记进行连锁检测, 发现 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 和 NAU/SSR/fs2₁₉₀ 2 个标记表现紧密连锁, 遗传距离为 2.3cM。

NAU/SSR/fs3₂₂₀ 独立遗传。NAU/SSR/fs1₁₃₀ 和 NAU/SSR/fs2₁₉₀ 标记的 QTL 占这一分离群体总遗传变异的 30.9%, 很显然这是一个控制棉花高强纤维表现的主效位点。此外, 该 QTL 隐性遗传, 以加性效应为主。因此, 用分子标记辅助选择可有效地开展棉花的高强纤维育种。

提取 1999 年种植在美国德克萨斯州大学城的 (7235 × TM-1) F₂ 单株 DNA, 选用 NAU/SSR/fs2₁₉₀ 引物进行扩增后也发现, 该标记与高强纤维仍表现为连锁遗传(表)。而 NAU/SSR/fs3₂₂₀ 与高强

纤维 QTL 则表现为独立遗传。因此像 NAU/SSR/fs3₂₂₀ 这种遗传效应值小的 QTL 标记, 环境条件变化后, 就往往检测不到。美国德克萨斯州大学城棉花生长发育中、后期气温高干燥, 纤维成熟度高, 因此纤维强度比中国南京又有明显提高(表)。上述结果表明, 我们筛选到的与 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 和 NAU/SSR/fs2₁₉₀ 连锁的高强纤维 QTL 在不同年份、不同环境下表现稳定, 所占遗传变异高, 是一个改良我国棉花品种纤维强度的有利基因资源。

表 棉花高强纤维的 SSR 标记

Table SSR markers linked with fiber strength QTLs

	NAU/SSR/fs1 ₁₃₀	NAU/SSR/fs2 ₁₉₀	NAU/SSR/fs3 ₂₂₀
(7235 × TM-1) F ₂ ¹⁾	186	179	181
有/无标记纤维强度平均值(cN/g)	24.785/23.038	24.738/23.149	24.504/23.835
Average fiber strength with and without SSR marker			
F 值 F value	30.70	24.74	4.05
P	0.0001	0.0001	0.0456
(7235 × TM-1) F ₂ ²⁾	/	188	188
有/无标记纤维强度平均值(cN/g)	/	26.405/24.990	26.150/25.753
Average fiber strength with and without SSR marker			
F 值 F value	/	11.93	1
P	/	> 0.0007	0.3190

¹⁾种植在南京农业大学; ²⁾种植在 College Station, USA

¹⁾Grown in Nanjing Agricultural University; ²⁾Grown in College Station, Texas, USA

尽管有 2 个 SSR 引物在 7235/TM-1 和低/高麦克隆值、长/短纤维池中, 分别有特异性的扩增产物, 但用(7235 × TM-1) F₂ 单株检测后, 发现它们表现为独立遗传(资料未列)。

2.2 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 分子标记的染色体定位

利用 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 对棉花单体与海岛棉 3-79 杂交的 F₁ DNA 进行扩增, 发现(H10 × 3-79) F₁ 单体株中, 陆地棉 TM-1 具有的与 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 表现为等位的分子量为 160bp 的 SSR 标记不存在。这一结果表明与 7235 品系高强纤维连锁的 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 标记在第 10 染色体上。同样, NAU/SSR/fs3₂₂₀ 这一标记则定位到了棉花第 5 染色体上。

3 讨论

美国棉花品质育种的研究已有 50 多年的历史。Culp 等人从 1946 年开始 PD 种质改良计划, 历时 40 余年, 发放了 30 多个种质系和 3 个品种。这些种质系或品种纤维品质, 尤其是纤维强度有较大的提高, 产量达到推广品种的水平^[5-7]。1982 年以来, 为适应纺织工业设备的改造, 美国加快了对棉花纤维

品质的改良。仅 1982~1986 年度鼓励棉纤维强度育种的奖金就高达 560 万美元。从 1980 年起, 美国纤维比强度每年提高 0.25 tex/g, 到 1991 年平均达到了 28 tex/g(卜氏水平)。

我国棉花品质的产量水平、抗病性、纤维长度等指标居国际先进水平, 但总体上来说, 纤维偏弱, 属中等水平, 纺高支纱的优质棉需大量进口。从 1999 年起国际市场上棉价又将原来的按纤维长度定价改为按纤维强度的高低定价。因此, 如何在近期内大幅度提高我国棉花品种的纤维强度刻不容缓。

随着分子生物学研究的进展, 国内外也很重视开展优质纤维基因的分子标记筛选以用于标记辅助选择。Yu 等(1998)^[8]在构建陆地棉 × 海岛棉种间杂种遗传图谱的基础上, 鉴定出与海岛棉优质纤维基因(QTL)连锁的分子标记 11 个, 其中 3 个纤维强度, 3 个纤维长度和 5 个纤维细度。这些 QTL 可解释(TM-1 × 3-79)海陆杂种 F₂ 总遗传变异的 35%~50%。Jiang 等(1998)^[9]的研究也证明四倍体棉种(AADD)中, 大部分纤维品质、产量的 QTL 位于 D 染色体亚组, 而四倍体棉种中 A 染色体亚组的祖先

是有纤维的,而 D 染色体亚组则是光子,没有纤维。他们鉴定出的 3 个纤维强度 QTL 可解释海陆杂种 F₂ 总遗传变异的 30.9%。上述这两个研究结果都利用种间杂种 F₂ 单株纤维品质表现而得出,重复性如何有待证实。但是,遗传效应值小的 QTL 往往会随着环境的变化而检测不到。Shappley 等(1998)^[10]在陆地棉品种间杂交后代中鉴定出与纤维品质连锁的 RFLP 标记。这些研究结果为纤维品质的辅助选择乃至克隆纤维品质基因打下了基础。本研究在陆地棉的遗传背景上鉴定出两个纤维强度 QTL 连锁的 SSR 标记 3 个,尤其是 NAU/SSR/fs1₁₃₀ 和 NAU/SSR/fs2₁₉₀ 这两个标记的 QTL 所占的遗传变异大,在 3 个轮次的实验中表现稳定,再加上是 SSR 引物,辅助选择方便,应是提高我国棉花品种纤维强度水平的有利基因资源。

致谢:在分子标记筛选之中得到了美国农业部南方平原农业研究中心作物种质资源研究室 Laura I Decanini 博士, Joanne. Lewis 女士的帮助。此外,第一作者在美国研究期间得到了国家留学基金的资助,特此致谢。

References:

- [1] Xiang S K, Yu N, Hu Y C, et al. Discussion on the current situation of cotton quality in China[J]. Acta Gossypii Sinica, 1999, 11(1): 1- 10. (in Chinese)
项时康,余楠,胡育昌,等.论我国棉花质量现状[J].棉花学报,1999,11(1):1- 10.
- [2] Deussen H. Improved cotton fiber properties: The textile industry's key to success in global competition. In Proceedings from Cotton Fiber Cellulose: Structure, Function and Utilization Conference[C]. Memphis, TN: National Cotton Council of American, 1992: 43- 64.
- [3] Culp T W, C C Green. Comparative performance of obsolete and current cultivars and PD germplasm lines of cotton with extra fiber strength[J]. Crop Sci 1992, 32: 35- 41.
- [4] Culp T W. Simultaneous improvement of lint yield and fiber quality in Upland cotton. In Proceedings from Cotton Fiber Cellulose: Structure, Function and Utilization Conference [C]. Memphis, TN: National Cotton Council of American, 1992: 247- 288.
- [5] Qian S Y, Huang J Q, Peng Y J, et al. Studies on the hybrid of *G. hirsutum* L. and *G. anomalum* Wawr. & Peyr. and application in breeding[J]. Scientia Agricultura Sinica, 1992, 25(6): 44- 51. (in Chinese)
钱思颖,黄骏骥,彭跃进,等.陆地棉(*G. hirsutum* L.)与异常棉(*G. anomalum* Wawr. & Peyr.)种间杂种的研究及其在育种上的应用[J].中国农业科学,1992,25(6):44- 51.
- [6] Kohel R J, T R Richmond, C F Lewis. Texas marker-1. Description of a genetic standard for *Gossypium hirsutum* L. [J]. Crop Sci 1970, 10: 670- 671.
- [7] Zhao X, H B Zhang, R A Wing, et al. A simple method for isolation of megabase DNA from cotton[J]. Plant Mol. Biol. Rep. 1994, 12: 126- 131.
- [8] Yu Z H, Y H Park, G R Lazo, et al. Molecular mapping of the cotton genome: QTL analysis of fiber quality properties [C]. Proc. Beltwide Cotton Conf. 1998: 485.
- [9] Jiang C X, R J Wright, KM Elzick, et al. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* cotton[J]. Proc. Natl. Acad. Sci 1998, 95: 4419- 4424.
- [10] Shappley Z W, J N Jenkins, J Zhu, et al. Quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of upland cotton[J]. J. Cotton Sci 1998, 2: 153- 163.

2002 年征订启事

《作物学报》是中国科协主管、中国作物学会和中国农业科学院作物育种栽培研究所共同主办、科学出版社出版的全国性学术期刊。主要刊登与作物科学有关的原始研究论文、简报和中国作物学会的学术活动等。双月刊,大 16 开本,136 页/期,定价 20 元。国内外公开发行,全国各邮局均可订阅,国内邮发代号:82-336。编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号,邮编:100081;联系电话:(010)68918548;传真:(010)68975212;E-mail:xbzw@chinajournal.net.cn

《中国兽医科技》是中国农业科学院兰州兽医研究所主办的兽医学技术类期刊。辟有中西兽医科学研究报告、调查报告、综述专论、新技术、实验技术、临床诊疗、医案分析、动物检疫、学术讨论、知识讲座、科技动态、比较医学、资料、疫情消息、简讯、来稿摘登、新书评介、信息服务等栏目。适用各级畜牧兽医技术人员、农业院校畜牧兽医专业师生,兽医行政部门管理干部,以及城乡养畜养禽企业技术人员及专业户阅读。月刊, A4 开本,48 页,定价 3.00 元,全年 36 元。邮发代号:54-33,国外代号 M 4191,全国各地邮局(所)均可订阅。