

陆地棉产量性状 QTLs 的分子标记及定位

殷剑美 武耀廷 张 军 张天真* 郭旺珍 朱协飞

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室 南京 210095)

摘 要 应用我国的高产栽培品种泗棉 3 号和美国栽培品种 TM-1 为材料,构建 F_2 和 $F_{2:3}$ 作图群体,应用 301 对 SSR 引物和 1040 个 RAPD 引物,对产量性状 QTLs 进行了分子标记筛选,结果共筛选出了 37 对 SSR 多态性引物和 10 个 RAPD 多态性引物的 49 个位点,鉴定出了控制产量性状变异的主效 QTLs。定位于第 9 染色体的连锁群,分别具有控制铃重、衣分和籽指的主效 QTLs,铃重的 2 个 QTLs 分别解释 $F_{2:3}$ 群体表型变异的 18.2% 和 21.0%;在 F_2 群体检测到的 1 个衣分 QTL 解释表型变异的 25%,另一个衣分 QTL 在 F_2 群体和 $F_{2:3}$ 群体都检测到,解释 F_2 群体衣分的 24.9% 的表型变异,解释 $F_{2:3}$ 群体衣分的 5.9% 的表型变异;在 $F_{2:3}$ 群体铃重的一个 QTL 的同一位置同时检测到一个籽指 QTL,它解释 15.6% 的表型变异,是一因多效或是紧密连锁的两个 QTLs,有待进一步研究。本研究标记的产量性状主效 QTLs 可用于棉花产量性状的标记辅助选择。

关键词 陆地棉 产量 QTL 分子标记 区间作图

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2002)02-0162-05

在植物育种过程中,对目标性状进行选择是新品种培育的中心环节。棉花产量性状属于数量性状,其表现型是基因型与环境共同作用的结果,产量性状又与品质性状之间存在显著的负相关^[1],给棉花产量品质的同步改良也带来了难度,致使常规育种依据表型选择的效率受到限制。植物分子育种工作中标记辅助选择(Marker-assisted selection, MAS)利用与目标性状 QTL 紧密连锁的遗传标记,对目标性状进行跟踪选择,可缩小育种群体规模,减少育种过程中选择的盲目性,有利于打破回交过程中的连锁累赘,可逐步将外源优良种质向栽培品种渗透,拓宽品种的遗传基础^[2,3]。由于棉花栽培品种的遗传基础狭窄^[4-6],使棉花标记辅助育种尤其显得更为重要。因此,利用现代分子标记技术对棉花产量品质性状的 QTLs 进行标记筛选是一项十分重要的基础研究工作。Jiang 等^[7]筛选到 2 个与皮棉产量 QTLs 有关的标记,其中 D07 标记解释 12.3% 的变异, A02 标记解释 6.4% 的变异;也筛选到与铃重 QTLs 有关的两个标记,其中一个能解释 54.1% 的变异,另一个解释 7.9% 的变异。Shappley 等^[8]和 Ulloa 等^[9,10]分别鉴定出 5 个和 3 个与衣分有关的 QTLs, 4 个和 2

个与籽指有关的 QTLs。袁有禄^[11]鉴定出 8 个紧密连锁(平均间距 2cM)的标记与纤维强度有关,能解释 35% 的 F_2 纤维强度表型变异和 53.8% 的 $F_{2:3}$ 的纤维强度表型变异;1 个与麦克隆值有关的主效 QTL,能解释 7.8% 的 F_2 麦克隆值表型变异和 25.4% 的 $F_{2:3}$ 的麦克隆值表型变异,这项工作开创了我国棉花育种目标性状的分子标记研究,但目前国内还未见到产量性状 QTLs 的分子标记研究报道。泗棉 3 号是我国选育的陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)高产、多抗、优质品种。从 90 年代初审定起,已在长江流域棉区种植了近亿亩。本研究利用泗棉 3 号作为研究材料进行了产量性状 QTLs 的分子标记筛选,以鉴定出与产量性状 QTLs 连锁的分子标记,为产量性状标记辅助选择奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究选用长江流域棉区广泛栽种高产品种泗棉 3 号作亲本, TM-1 是由美国陆地棉商用品种岱字棉 14 连续自交产生的陆地棉遗传标准系^[12],引自美国农业部南方平原农业研究中心作物种质资源

收稿日期 2001-09-05, 修回日期 2001-11-23。

基金项目 国家杰出青年科学基金(No. 30025029) 国家转基因植物研究专项(No. J99-A-023) 高等学校优秀青年教师教学科研奖励计划和教育部跨世纪优秀人才资助研究项目。

* 通讯作者。 Tel: 86-25-4395311; Fax: 86-25-4395307; E-mail: cotton@cau.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

研究室。

1.2 产量性状的鉴定

1998 年夏季将泗棉 3 号与 TM-1 进行杂交,冬天在海南种植 F_1 ,单株自交产生 F_2 种子。1999 年在南京农业大学江浦试验站种植 F_2 分离群体,随机选择 297 株调查产量性状,并对各株进行自交形成 $F_{2:3}$ 家系种子。2000 年又在南京农业大学江浦试验站种植 $F_{2:3}$ 家系群体,进行产量性状表现的田间鉴定实验。每个家系调查 15 株,以 $F_{2:3}$ 家系的产量性状平均值作为相应的 F_2 个体基因型值的估计值。

1.3 分子标记实验方法

参考 Paterson 等^[13]的 CTAB 方法,从叶片中提取亲本和 F_2 个体的基因组 DNA。SSR, RAPD 的 PCR 扩增与检测见我们前文的报道^[14,15]。

利用 Mapmaker/EXP (Version 3.0b)^[16]确定分子标记间的连锁关系,即构建遗传连锁群,设置 LOD 值最小为 3.0,最大遗传距离为 50cM。运用 Mapmaker/QTL (Version 1.1b)^[17]的区间作图方法将与连锁群标记连锁的 QTL 定位到连锁群上。

1.4 分子标记及相关连锁群的染色体定位

我们实验室为构建异源四倍体棉花的分子连锁

图谱,利用以 TM-1 为遗传背景的一整套单体、端体构建了一个分子标记定位系统,利用该系统对本文中 SSR 标记进行了染色体定位。

2 结果与分析

2.1 标记群体产量性状的表现

泗棉 3 号和 TM-1 的产量性状表现的鉴定结果列表 1。泗棉 3 号的单株铃数、铃重、衣分、籽指和皮棉产量与 TM-1 的差异达到极显著水平,为产量性状 QTLs 的筛选提供了较好的遗传差异基础。对泗棉 3 号和 TM-1 杂交自交产生的 F_2 单株分离群体和 $F_{2:3}$ 家系分离群体产量性状表现的田间试验鉴定结果的简单相关分析(表 2)发现,在 F_2 群体产量构成因素与皮棉产量之间为显著或极显著的正相关,铃重与单株铃数、衣分的负相关未达到显著水平,但在 $F_{2:3}$ 群体只有单株铃数、衣分与皮棉产量的相关达到极显著水平,而铃重与单株铃数、衣分的负相关也达到极显著水平,说明 $F_{2:3}$ 群体的遗传结构与 F_2 群体比较发生了变化,产量性状之间的相关程度有所增加。籽指与铃重呈正相关,与其它性状呈负相关。

表 1 亲本产量性状表现

Table 1 Performance of yield traits for parents

Genotype	No boll/plant	Boll size/g	Lint percent/%	Seed weight/100 g	Lint yield/g
Simian 3	13	4.16	45.96	9.69	22.34
TM-1	8	5.29	33.88	13.19	12.36
Difference	5**	-1.13**	12.08**	-3.50**	9.98**

** Indicates significance at 0.01

表 2 分子标记群体产量性状间的简单相关系数

Table 2 Correlation coefficient between yield traits in F_2 and $F_{2:3}$

	No boll/plant	Boll size/g	Lint percent/%	Seed weight/100 g	Lint yield/g
Boll No. plant		-0.1913*	0.2262**	-0.2734**	0.7809**
Boll size/g	-0.1091		-0.3510**	0.5938**	-0.1360
Lint percent/%	0.1270	-0.0087		-0.5604**	0.3866**
100-seed weight/g	-0.1654*	0.4738**	-0.3383**		-0.3036**
Lint yield/g	0.8418**	0.1484*	0.2976**	-0.1051	

Correlation coefficient between yield traits in F_2 under diagonal and in $F_{2:3}$ above diagonal

*** Indicates significance at 0.05 and 0.01, respectively

2.2 群体基因型的分子标记鉴定

选用 301 对 SSR 引物和 1040 个 10bp 的 RAPD 随机引物筛选泗棉 3 号和 TM-1 亲本分子标记的多态性,结果只筛选到 37 对 SSR 多态性引物和 10 个

RAPD 多态性引物的 49 个非常稳定的多态性位点。分别以这 47 个具有多态性的引物,进一步扩增了 F_2 群体所定株调查产量性状的单株的总 DNA,鉴定出每个个体的标记基因型。图 1 和图 2 分别为标记

OPA15₅₆₄ 与 S3452₁₈₀ 在亲本和 F₂ 分离群体标记基因型的鉴定结果。

2.3 分子标记与产量性状 QTLs 的相关分析

利用 Mapmaker/EXP (Version 3.0b)^[16], 确定分子标记连锁关系, 结果 S2961₂₅₀、S3800₂₅₀、S3474₂₂₀、S229₃₃₀、S229₁₉₀、S252₂₃₀、OPA15₅₆₄、OPQ9₂₂₁₂、OPJ11₁₅₈₄、OPAP12₈₀₀ 和 OPX2₁₃₀₀ 这 11 个标记被构建到染色体 9 上, 遗传长度为 290.6cM, 还有 17 个标记被构建到 4 个连锁群上, 4 个连锁群总的长度 163cM。另有 18 个 SSR 标记和 3 个 RAPD 标记没有被分配到连锁群上。

运用 Mapmaker/QTL (Version 1.1b)^[17] 定位与连锁群标记连锁的 QTLs。将被定位的 QTLs 列表 3 和绘成图 3。

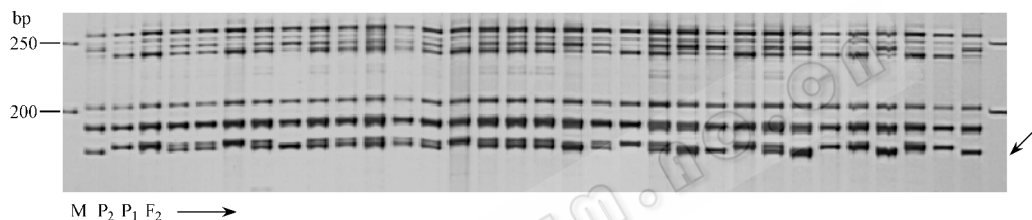


图 2 S3452₁₈₀ 亲本和 F₂ 单株标记基因型

Fig.2 S3452₁₈₀ genotype of parents and individuals in F₂

M. Marker ; P₁. Simian 3 ; P₂. TM-1

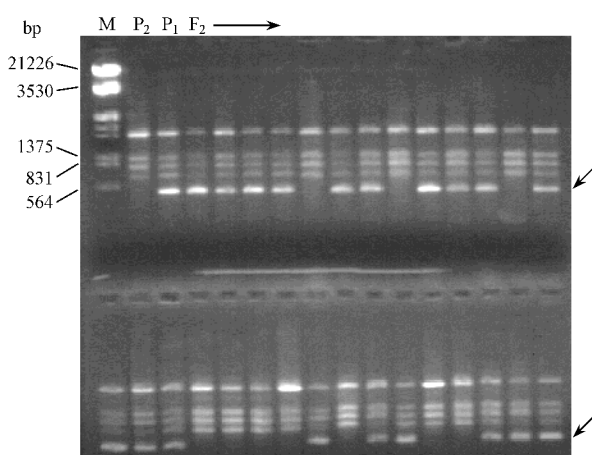


图 1 OPA15₅₆₄ 亲本和 F₂ 单株标记基因型

Fig.1 OPA15₅₆₄ genotype of parents and individuals in F₂

M. Marker ; P₁. Simian 3 ; P₂. TM-1

表 3 产量性状 QTLs 区间作图

Table 3 QTLs mapping for yield traits on linkage groups

Traits	Gene.	Chrom.	Interval	Length	Position	LOD	Var. -explained/%	a	d	d/a
Lint percent/%	F ₂	9	OPJ11 ₁₅₈₄ -S229 ₃₃₀	35.7	28.0	6.12	25.0	11.503	-10.509	0.91
	F ₂	9	OPAP12 ₈₀₀ -OPX2 ₁₃₀₀	27.9	16.0	6.97	24.9	11.463	-10.408	0.91
	F _{2:3}	9	OPAP12 ₈₀₀ -OPX2 ₁₃₀₀	27.9	0.0	2.57	5.9	0.564	0.682	1.21
	F _{2:3}	10	S1495 ₂₁₀ -S1421 ₂₃₀	1.9	0.0	2.99	7.0	0.829	0.105	0.13
Boll No. plant	F _{2:3}	16	OPK9 ₂₀₂₇ -S3650 ₂₇₅	13.8	12.0	2.06	5.6	-0.615	0.780	1.30
	F _{2:3}	10	S1521 ₂₂₀ -S232 ₁₄₀	24.6	12.0	2.03	7.9	0.64	1.067	1.67
Boll size/g	F _{2:3}	9	S2961 ₂₅₀ -S3800 ₂₅₀	43.2	18.0	2.66	18.2	-0.145	0.212	1.46
	F _{2:3}	9	OPX2 ₁₃₀₀ -S252 ₂₃₀	46.1	26.0	2.97	21.0	-0.089	-0.248	2.79
100-seed weight/g	F _{2:3}	9	S2961 ₂₅₀ -S3800 ₂₅₀	43.2	18.0	3.48	15.6	-0.432	0.402	0.93
Lint yield/g	F _{2:3}	16	OPK9 ₂₀₂₇ -S3650 ₂₇₅	13.8	12.0	2.76	7.4	-1.097	1.722	1.57

在染色体 9 的 S2961₂₅₀-S3800₂₅₀ 区间上 F_{2:3} 群体同一位置同时检测到了控制籽指和铃重的主效 QTLs, 解释籽指的表型变异 15.6%, 铃重的表型变异 18.2%, 这两个 QTLs 是一因多效或是紧密连锁有待进一步研究; 在 OPJ11₁₅₈₄ 与 OPX2₁₃₀₀ 之间的 F₂ 群体和 F_{2:3} 群体检测到了控制衣分的主效 QTLs, 其

中两个 QTLs 分别解释 24.9% 和 25.0% 的衣分表型变异, 而且在相邻区域 OPX2₁₃₀₀ 与 S252₂₃₀ 之间的 F_{2:3} 群体检测到了一个控制铃重的主效 QTL, 解释铃重表型变异的 21.0%, 但衣分和铃重的 QTLs 效应对于一亲本而言方向相反。在染色体 10 和染色体 16 连锁群上分别在 F₂ 群体检测到了控制单株铃数

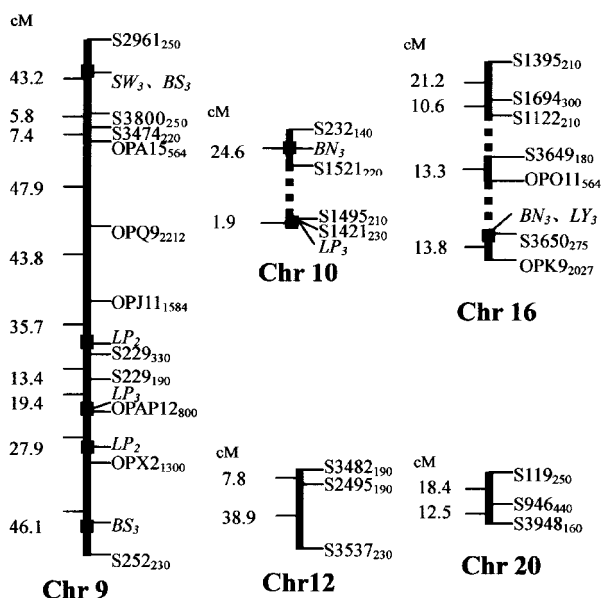


图3 SSR和RAPD标记与QTL连锁图

Fig. 3 Linkage map for SSR and RAPD markers with QTL

LY lint yield/g; LP lint percent/%; BN boll No. plant;

BS boll size/g; SW 100-seed weight/g

的QTL,解释单株铃数表型变异的5.6%和7.9%。

在构建的连锁群上被标记的QTLs的加性效应和显性效应也列于表3中,QTL效应计算是以TM-1亲本为基准。位于OPJ11₁₅₈₄~S229₃₃₀和OPAP12₈₀₀~OPX2₁₃₀₀区间的衣分QTLs具有较大的加性效应,显性效应为负效应,说明杂合子的衣分偏向低亲,但衣分的其它2个QTLs的显性效应为正效应,说明杂合子的衣分偏向高亲。大部分QTLs的显性效应与加性效应的比值大于1,表现出超显性。

2.4 分子标记及标记QTLs的染色体定位

利用染色体定位技术,将构建的连锁群大部分定位到染色体上。分子标记检测到的与产量性状有关的QTLs分别定位在染色体9、染色体10和染色体16连锁群上,而在染色体12、染色体20上的连锁群未检测到与产量有关的QTLs,控制产量性状的许多数量基因可能只存在于少数的几条染色体上。

3 讨论

已有研究表明,陆地棉栽培品种的遗传基础较为狭窄^[5,6,18]。本研究所用的试验材料泗棉3号为我国陆地棉高产品种,TM-1为陆地棉遗传标准系,尽管选用301对SSR引物和1040个10bp的RAPD随机引物筛选两亲本分子标记的多态性,结果仅筛选到10个非常稳定的RAPD标记和39对SSR标记,反映的多态性水平不高。但由于两个亲本在产

量构成因素上差异显著,筛选到的多态性标记,就很有可能与所调查的性状即两亲本差异较大的性状有关,QTL分析的结果也证实了这一点。通过QTL作图和分子标记与性状的关联分析发现,在染色体9上具有与衣分、铃重和籽指有关的主效QTLs位点,但衣分的增效位点来自泗棉3号,而籽指和铃重的增效位点来自TM-1;在低值亲本上也具有增效位点,如染色体16连锁群的单株铃数的增效位点来自TM-1,同时本研究在染色体9上检测到大的衣分、铃重、籽指的主效QTLs,不仅说明控制产量性状的QTLs的效应是不相等的,可能为主基因-多基因遗传模型,而且能够利用QTL位点边界的标记用于标记辅助育种。

本研究中,在染色体9上的标记S2961₂₅₀附近的QTL能解释15.6%的籽指表型变异、18.0%的铃重表型变异,依次相邻的有控制衣分的主效QTLs存在,接着有铃重的主效QTL。在染色体16连锁群上的标记OPK9₂₀₂₇附近的一个QTL能解释的5.6%铃数表型变异、7.4%皮棉产量表型变异,控制产量性状的基因在棉花染色体上成簇分布。在棉花上,Ulloa等^[9,10]在陆陆品种间杂种(MD5678ne × Prema)群体中也发现标记A42B1b附近的1个QTL能解释4.8%的衣分变异、24.6%的纤维强度、11.5%的2.5%跨长和11.3%的纤维周长变异。认为控制纤维品质有关的基因在棉花同一染色体上可能簇生。在其它作物上,Maughan等^[19]认为控制大豆油分、蛋白、蔗糖等种子品质性状的基因可能表现连锁成簇或主效QTL的一因多效。对克隆的抗病基因的结构和在染色体上的分布发现,抗病基因在染色体上的成簇分布已是抗病基因的一个基本特征^[20]。

REFERENCES (参考文献)

- [1] PAN J J (潘家驹). *Cotton Breeding*. Beijing: China Agricultural Press, 1998
- [2] Gupta P K, Varshney R K, Sharma P C et al. Molecular markers and their application in wheat breeding. *Plant Breeding*, 1999, **112**: 369 ~ 390
- [3] Fedak G. Molecular aids for integration of alien chromatin through wide crosses. *Genome*, 1999, **42**: 584 ~ 591
- [4] Tatineni V, Cantrell R G, Davis D D. Genetic diversity in elite cotton germplasm determined by morphological characteristics and RAPDs. *Crop Sci*, 1996, **36**: 186 ~ 192
- [5] Multani D S, Lyon B R. Genetic fingerprinting of Australian cotton cultivars with RAPD markers. *Genome*, 1995, **38**: 1005 ~ 1008
- [6] GUO W (郭旺珍), ZHANG T (张天真), PAN J J (潘家驹). A Preliminary Study on Genetic Diversity of Upland Cotton Cultivars in China. *China Cotton Science* (棉花学报), 1997, **9**(5): 242 ~ 247.

- [7] Jiang C X ,Wright R J ,El-Zik K M *et al.* Polyploid formation created unique convenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). *Proc. Acad. Natl. Sci. ,USA* . ,1998 **95** :4419 ~ 4424
- [8] Shappley Z W ,jenkins J N *et al.* Cotton improvement :quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of upland cotton. *J. of cotton sci.* ,1998 **2** :153 ~ 163
- [9] Ulloa M ,Cantrell R G ,Pency R G ,*et al.* QTL analysis of stomatal conductance and relationship to lint yield in an interspecific cotton. *J. of cotton sci.* . 2000 **4** :10 ~ 18
- [10] Ulloa M ,Meredith W R. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an intraspecific population. *J. of cotton sci.* . 2000 **4** :161 ~ 170
- [11] YUAN Y LI (袁有禄). Inheritance of Super Fiber Quality Characters and Their Molecular Tagging in Upland Cotton. Dissertation ,Nanjing Agricultural University(南京农业大学博士论文) 2000
- [12] Kohel R J ,Richmond T R ,Lewis C F. Texas marker-1 ,Description of a genetic standard for *Gossypium hirsutum* L. *Crop Sci.* ,1970 **10** : 670 ~ 671
- [13] Paterson A H ,Brubaker C L ,Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium*Spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis. *Plant Mol Bio Rep* ,1993 **11**(2) :122 ~ 127
- [14] ZHANG J (张军) ,WU Y TI (武耀廷) ,GUO W ZI (郭旺珍) *et al.* Fast Screening of Microsatellite Markers in Cotton with PAGE/silver Staining. *Cotton Science*(棉花学报) 2000 **12**(5) :267 ~ 269
- [15] WU Y TI (武耀廷) ,ZHANG T ZI (张天真) ,YIN J MI (殷剑美). Genetic Diversity Detected by DNA Markers and Phenotypes in Upland Cotton. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报) ,2001 **28**(11) :1040 ~ 1050
- [16] Lander E S ,Green S P ,Abrahamson J *et al.* MAPMAKER :an interactive computer package for constructing primary linkage maps of experimental and natural population. *Genomics* ,1987 **1** :174 ~ 181
- [17] Lander E S ,Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* ,1989 **121** :185 ~ 199
- [18] WANG X YI (王心宇) ,GUO W ZI (郭旺珍) ,ZHANG T ZI (张天真). Analysis of RAPD fingerprinting on shortseasoned cotton cultivars in China. *Acta Agronomica Sinica*(作物学报) ,1997 **23**(6) : 669 ~ 676
- [19] Maughan P J ,Saghai Maroof M A ,Buss G R. Identification of quantitative trait loci controlling sucrose content in soybean (*Glycine max*). *Mol Breeding* 2000 **6** :105 ~ 111
- [20] Ratnaparkhe M B ,Tekeoglu M ,Muehlbauer F J. Inter-simple-sequence-repeat (ISSR) polymorphisms are useful for finding markers associated with disease resistance gene clusters. *Theo Appl Genet* , 1998 **97** :515 ~ 159

Tagging and Mapping of QTLs Controlling Lint Yield and Yield Components in Upland Cotton (*Gossypium hirsutum* L.) using SSR and RAPD Markers

YIN Jian-Mei WU Yao-Ting ZHANG Jun ZHANG Tian-Zhen* GUO Wang-Zhen ZHU Xie-Fei
(National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement , Nanjing Agricultural University ,Nanjing 210095 ,China)

Abstract Using interval mapping and marker simple regression methods ,the QTLs of yield and its components in (Simian 3 × TM-1) F_2 and $F_{2:3}$ were tagged and Mapped with 39 SSR and 10 RAPD markers having polymorphism between parents screened from 301 pair SSR primers and 1040 RAPD primers. Simian 3 is being grown extensively in Yangtze River cotton-growing valley characterized as high productivity with more bolls and higher lint percent ,whereas TM-1 ,Genetic standard in Upland cotton with more heavy boll weight. In the present report ,two QTLs controlling boll size with 18.2% and 21.0% phenotype variance explained in $F_{2:3}$ generation ,one QTL controlling lint percent with 24.9% phenotype variance explained in F_2 generation and 5.9% in $F_{2:3}$ generation and one QTL controlling 100-seed weight with 15.6% phenotype variance explained in $F_{2:3}$ generation were mapped in Chromosome 9. Additionally ,another QTL responsible for 100-seed weight was identified and mapped at the same position in Chromosome 9 in $F_{2:3}$ generation. It is worth for further to be studied whether it is one QTL for pleiotrophism or two closely linked QTLs. The molecular markers mapped and tagged closely with main QTLs of yield traits in this paper can be used for MAS in cotton high-yield breeding program.

Key words upland cotton , yield , QTL , molecular marker , interval mapping

Received : 09-05-2001

The work was supported by Grant from The National Natural Foundation for Outstanding Youth (No. 30025029) ,The National Transgenic Plant Research Program in China (No. J99-A-023) ,The Teaching and Research Award Program for Outstanding Young Teachers in Higher Education Institutions of MOE ,The trans-century Training Program Foundation for the Talents by MOE.

* Corresponding author. Tel 86-25-4395311 ; Fax 86-25-4395307 ; E-mail : zhangtm@njau.edu.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn