

棉花分子标记图谱的构建和一些重要性状的定位

Constructing of DNA Molecular Marker Linkage Map and Mapping of Qualitative and Quantitative Traits in Upland Cotton

倪西源, 王学德*, 程超华, 王晓玲, 张昭伟

(浙江大学农业与生物技术学院农学系, 杭州 310029)

在棉花上,虽然已有若干张不同的分子标记连锁图发表,但在育种中它们仍较难被应用,主要是因为现有的分子标记连锁图谱中能用于育种的重要农艺性状的 DNA 分子标记尚不多。为此,本研究选用具有 13 个质量性状标记的两个陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 多标记基因系 T582 和 T586 作为亲本,用 SSR 和 AFLP 的 DNA 分子标记技术,对 F_2 的作图群体进行 DNA 分子标记连锁图谱的构建,对棉花重要质量性状基因和数量性状的 QTLs 进行定位和标记,并建立分子标记连锁群与染色体的对应关系,为棉花分子标记辅助选择育种提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

分子标记作图群体为杂种 F_2 群体,其亲本为 2 个陆地棉多基因标记系 T582 和 T586。其中, T582 含有丛生铃 (cl_1)、窄卷苞叶 (fg)、杯状叶 (cu)、茎秆无腺体 (gl_1) 和芽黄 (v_1) 5 个隐性基因控制的性状, T586 含有鸡脚叶 (L_2^0)、花瓣有红心 (R_2)、光子 (N_1)、棕色纤维 (Lc_1)、红色植株 (R_1)、植株茸毛 (T_1)、黄色花粉 (P_1) 和黄色花瓣 (Y_1) 8 个显性基因控制的性状,这 13 个基因所属的连锁群和在染色体上的位置已知。

1.2 方法

1.2.1 作图群体的构建和形态性状的观察。

2000 年冬,在海南三亚以 T582 为母本与 T586 杂交获得 F_1 棉 40 株;2001 年夏在浙江大学农业试验场对 F_1 代植株自交,并考察 2 个亲本和杂交后代 F_1 植株性状;2001 年冬, F_1 的自交种子在海南三亚种植,获得 F_2 代群体,共 237 株,从中随机选出 120 株作为标记群体,并考察记载每株的质

量性状及数量性状;2002 年夏在浙江大学种植和观察 F_3 代株系的性状是否有分离,以进一步验证对应 F_2 代个体性状的基因型。

1.2.2 SSR 和 AFLP 的分析。CTAB 法提取棉花 DNA,材料为 T582、T586、 F_1 (T582 × T586) 和 F_2 群体单株的嫩叶。选用的 106 对 SSR 引物由上海生工公司合成。PCR 反应体系为 94℃ 预变性 1 min 后,进入 35 个循环,即:94℃ 变性 45s,55℃ 退火 45 s,72℃ 延伸 1 min 30 s;35 个循环结束后,72℃ 延伸 8 min,最后 4℃ 保存 PCR 产物。AFLP 分析采用的两个限制性内切酶为 EcoR I 和 Mse I, DNA 酶切片段的接头、预扩增引物和选择性扩增引物由上海生工公司合成,反应体系参照 GBICO 公司 AFLP 试剂盒说明书建立。SSR 和 AFLP 的 PCR 产物采用 6% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳结束后采用银染的方法进行显色。

1.2.3 图谱的构建及数量性状的 QTL 分析。用 Mapmaker/exp3.0b 对标记的数据进行连锁分析,构建遗传图谱,设定连锁的最低 LOD 值为 2.0,最大遗传距离设为 50.0 cM。用 Mapmaker/QTL1.0 软件对数量性状数据和标记数据进行分析。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

106 对 SSR 引物的 PCR 扩增产物电泳时均能有条带产生,但只有 11 对 SSR 引物的 PCR 产物在两亲本之间表现出多态性,共产生 30 个分子标记。在 64 个 AFLP 引物组合中,有 39 个引物组合的扩增产物显示出多态性,共产生 69 个多态性标记。

收稿日期:2006-01-28 作者简介:倪西源(1978-),男,硕士。* 通讯作者,xdwang@zju.edu.cn

基金项目:国家“863”计划项目(2004AA212104)、国家“973”项目(2004CB11730502(1))和浙江省重点项目(2005C22G2010011)。

2.2 遗传图谱的构建

对作图群体 120 个单株的 30 个 SSR 标记、69 个 AFLP 标记和 13 个形态标记的数据进行连锁分析,结果得到了一张由 24 个 SSR 标记、41 个 AFLP 标记和 8 个形态标记共 73 个标记的棉花遗传图谱(图 1),该图谱由 18 个连锁群组成,分别用 LG1、LG2、LG3、...和 LG18 表示,总遗传距离为 2006cM,平均遗传距离为 24.2cM。

在本图谱 8 个形态标记中,已知茸毛基因(T_1)位于第 6 染色体上,植株红茎基因(R_1)与簇生铃基因(cl_1)均位于第 16 条染色体上,窄卷苞

叶基因(fg)位于第 3 条染色体上,花瓣红基点基因(R_2)和棕色纤维基因(Lc_1)位于第 7 条染色体上,黄色花粉基因(P_1)位于第 5 条染色体上,黄色花瓣基因(Y_1)位于异源四倍体棉种 A 染色体组上。根据遗传学概念,可以把含有上述形态标记的分子标记连锁群与染色体对应起来。例如:分子标记连锁群 LG1 中含有茸毛基因 T_1 ,而 T_1 已知位于第 6 染色体上,由此可认为 LG1 归属于第 6 染色体。依此类推,LG2 归属于第 16 染色体,LG6 归属于第 3 染色体,LG10 归属于第 7 染色体,LG18 归属于第 5 染色体。

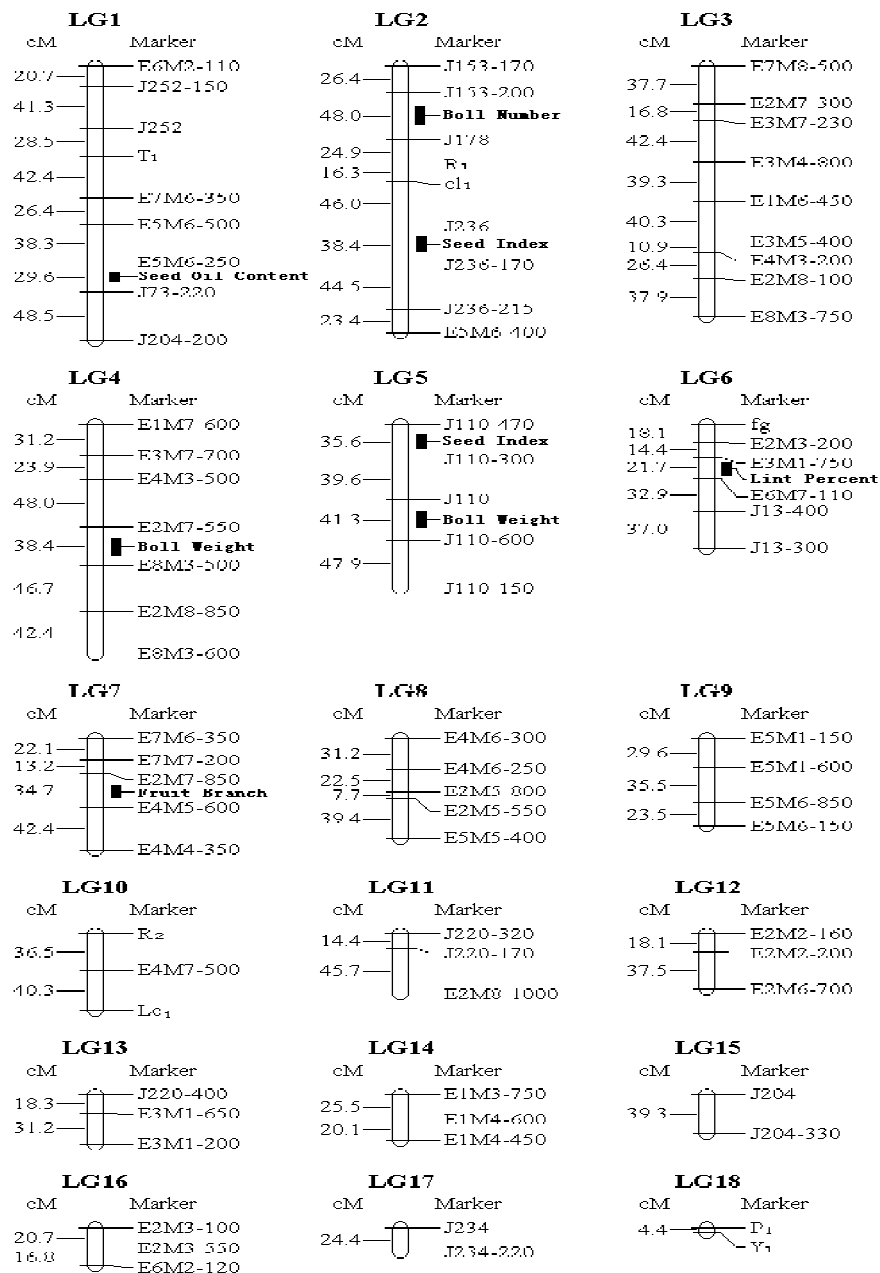


图 1 陆地棉的 SSR、AFLP 和形态标记连锁图谱

Fig. 1 A linkage map of SSR, AFLP and morphological markers in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.)

2.3 质量性状基因与分子标记的连锁

通过 13 个质量性状基因与 99 个分子标记的连锁分析,在构建的连锁图谱中,发现有 6 个形态标记与 DNA 分子标记存在连锁关系(图 1)。它们是茸毛基因(T_1)与 J252 及 E7M6-350 连锁,遗传距离分别为 28.5 cM 和 42.4 cM;红茎基因(R_1)与 J178 及簇生铃基因(cl_1)连锁,遗传距离分别为 24.9 cM 和 16.3 cM,簇生铃基因(cl_1)还与 J236 连锁,遗传距离为 46.0 cM;窄卷苞叶基因(fg)与 E2M3-200 连锁,遗传距离为 18.1 cM;花瓣红基点基因(R_2)和棕色纤维基因(Lc_1)均与 E4M7-500 连锁,遗传距离分别为 36.5 cM 和 40.3 cM。

2.4 数量性状的 QTL 定位

通过对 12 个数量性状的数据进行统计分析,9 个性状的数据具有呈正态分布的特点,这些性状是株高、果枝数、铃数、子指、纤维长度、衣分、铃重、子棉产量和棉子含油量。通过利用 Mapmaker/QTL1.0 软件对这些性状的数据和标记的数据进行分析,结果发现 6 个性状的 8 个 QTL 位点与分子标记有连锁,这里 6 个性状是铃数、铃重、衣分、棉子含油量、子指和果枝数。

3 讨论

本研究以 T582 和 T586 作为作图亲本,利用 SSR 和 AFLP 标记技术构建了由 24 个 SSR 标记、41 个 AFLP 标记和 8 个形态标记组成的连锁图谱,该图谱由 18 个连锁群组成,其中 5 个连锁群分别与第 3、5、6、7、16 染色体有对应关系,6 个质量性状和 8 个 QTL 位点分别与分子标记有连锁。这一研究结果对棉花遗传学研究和分子育种均具有重要的参考意义。

对已经构建的连锁群进行染色体定位是图谱构建中很重要的工作,通常采用的方法是单体鉴定法,或者利用已经染色体定位的分子标记作为桥梁标记用于连锁图谱的构建。综观这两种方法,单体鉴定法虽能对所有连锁群进行染色体的定位,但操作起来比较繁琐;选用桥梁标记可以较简单地对连锁群进行染色体的定位。本研究选用的作图亲本 T582 和 T586 中含有 13 个形态标记,由于这些标记已经在染色体上定位,可以作为桥梁标记,将含有这些形态标记的连锁群定位到相应的染色体上,是连锁群染色体定位的一种简单和有效的方法。 ●