

## 棉花第 14 染色体分子标记连锁群的构建及其应用

栾明宝<sup>1,2</sup>, 郭香墨<sup>2\*</sup>, 张永山<sup>2</sup>, 姚金波<sup>2</sup>, 陈保锋<sup>3</sup>

(1. 中国农业科学院麻类研究所, 农业部茎纤维生物质与工程微生物重点开放实验室, 长沙 410205; 2. 中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南安阳 455000; 3. 川北医学院生物教研室, 四川南充 637007)

**摘要:** 利用置换系 CSB14Sh 与 TM-1 杂交产生 F<sub>2</sub> 分离群体, 以 SSR 标记构建连锁图对置换系进行分子鉴定。利用从覆盖全基因组的 3800 对引物筛选出的 15 对多态性引物对群体进行扩增, 产生 23 个分子标记位点。其中, 21 个分子标记进入了同 1 个连锁群。通过与前人的分子图谱比较, 将该连锁群定位在第 14 染色体上。表明 TM-1 与 CSB14Sh 在第 14 条染色体上有差异, 而在其它染色体上没有差异。再结合染色体置换系构建的过程, 可以认为 CSB14Sh 确实为第 14 条染色体短臂的置换系。

**关键词:** 陆地棉; 染色体置换系; 分子标记; SSR

**中图分类号:** S562.035.3 **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2009)03-0196-05

## Construction and Application of Molecular Linkage Group of the 14th Chromosome of Cotton

LUAN Ming-bao<sup>1,2</sup>, GUO Xiang-mo<sup>2\*</sup>, ZHANG Yong-shan<sup>2</sup>, YAO Jin-bo<sup>2</sup>, CHEN Bao-feng<sup>3</sup>

(1. Institute of Bast Fiber Crops, CAAS, Key Laboratory of Stem-fiber Biomass and Engineering Microbiology, Ministry of Agriculture, Changsha, Hunan 410205, China; 2. Cotton Research Institute, CAAS, Key Laboratory of Cotton Germplasm Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China; 3. Department of Medical Biology, North Sichuan Medical College, Nanchong, Sichuan 637007, China)

**Abstract:** Development of each alien species chromosome substitution line in upland cotton involves three stages: (a) development of the respective TM-1-like hypoaneuploid stock, (b) use of the cytogenetic stock as recurrent parent in a recurrent backcrossing program to create a monosomic or monotelodisomic substitution stock, followed by (c) inbreeding to recover a euploid disomic substitution line. Up to now, 17 CSB lines have been developed, in which a pair of chromosomes (or chromosome arms) of *G. hirsutum* inbred cultivar, TM-1, are replaced by corresponding pair of *G. barbadense* line, 3-79. It is important to determine the chromosome substitution lines introduced. CSB14Sh, which are nearly the same as their recurrent parent TM-1, except the 14th chromosome short arms, crossed with TM-1, and the F<sub>2</sub> population was produced. A total of 3800 SSR primer pairs covering whole genome were used to screen polymorphism between two parents, TM-1 and CSB14Sh, which resulted in 15 polymorphic primer pairs. These 15 pairs amplified 23 marker loci. Linkage test indicated 21 of 23 loci could be mapped to one linkage group and covered distance of 65.3 cM. Compared with the map constructed previously, the linkage group was mapped to the 14th chromosome. These results showed that the only difference between CSB14Sh and TM-1 is in the 14th chromosome. Considering to the development of chromosome substitution line and results above, CSB14Sh is the very 14th chromo-

收稿日期: 2008-01-08

作者简介: 栾明宝(1978-), 博士, luanmingbao2002 @126.com; \* 通讯作者, gxm214 @126.com

基金项目: 国家支撑计划项目(2006BAD01A05)

some short arm of *G. hirsutum* inbred cultivar, TM-1.

**Key words:** upland cotton; chromosome substitution line; molecular markers; SSR

利用海岛棉的一对同源染色体或染色体臂置换陆地棉相应的染色体或染色体臂,构建陆地棉染色体置换系,是实现利用海岛棉改良陆地棉的一条重要途径,可克服陆海杂种分离世代长、易产生两极分化的弊端。因其遗传背景仅含海岛棉的某对同源染色体或染色体臂,为研究海岛棉染色体的遗传效应提供了重要材料<sup>[1-5]</sup>。现有的 17 个陆地棉置换系是在陆地棉标准系 TM-1 的染色体组中,以单体为媒介,置换进一对海岛棉 3-79 的染色体<sup>[6]</sup>,这些置换系具有 25 对陆地棉染色体和 1 对海岛棉染色体。培育置换系需要 3 个基本程序:(1)将原始单体材料与受体杂交,并与受体回交 5 代以上,构建以受体为遗传背景的单体。陆地棉置换系的培育,是以单体材料与标准系 TM-1 杂交并连续回交。(2)利用陆地棉标准系 TM-1 遗传背景的单体作母本与海岛棉染色体供体 3-79 杂交,从杂交后代中通过镜检选择单体作父本,与 TM-1 的单体连续回交多代,直到获得理想的纯度。由于棉花的  $n-1$  配子一般不能通过父本传递,因此,可以保证置换的染色体为海岛棉的染色体。(3)经 6~7 代甚至更多代连续回交后,选单体植株进行自交,分离出的双体植株即为所要培育的置换系<sup>[6-7]</sup>。2005 年,中国农业科学院棉花研究所从美国农业部作物学实验室引进了 16 个陆地棉置换系。证明其真实性,是置换系研究和利用的前提。为此,本文以置换系 CSB14Sh 为例,通过与 TM-1 杂交产生  $F_2$  分离群体,利用分子标记的方法对置换系进行了验证。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

2005 年冬天在海南以 TM-1 作母本,以 CSB14Sh 为父本配置杂交组合产生  $F_1$  种子,2006 年夏天在河南安阳种植  $F_1$ ,自交产生  $F_2$ ,2006 年冬天在海南种植 63 个  $F_2$  单株。CSB14Sh 表示 TM-1 的第 14 条染色体的短臂被 3-79 的第 14 条染色体的短臂所置换。

### 1.2 SSR 分析

2006 年冬天在海南采集 63 个  $F_2$  单株的幼嫩叶片,参照改良 CTAB 法<sup>[8]</sup>提取 DNA。利用

覆盖整个基因组的 3800 对引物对两个亲本进行引物多态性筛选。PCR 扩增体系 10  $\mu$ L,其中 DNA 50 ng, Taq 酶 0.5 U, buffer 1  $\mu$ L,正向引物和反向引物各 25 ng, dNTP 0.5  $\mu$ L,用 ddH<sub>2</sub>O 补至 10  $\mu$ L。PCR 扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 1 min,然后(94 $^{\circ}$ C 30 s,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 1 min)30 个循环,最后 94 $^{\circ}$ C 2 min,55 $^{\circ}$ C 45 s,72 $^{\circ}$ C 3 min,4 $^{\circ}$ C 保存。筛选出的多态性引物在  $F_2$  群体中扩增。扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,采用张军<sup>[9]</sup>的方法进行银染。

### 1.3 带型数据整理

对于共显性标记,采用 ABH 记录法。即:TM-1 的纯合带型记为“A”,CSB14Sh 的纯合带型记为“B”,杂合带型记为“H”,缺失数据记为“-”。对于显性标记,若 TM-1 无带时,只有 A 和 C,有带记为“C”,无带记为“A”。若 CSB14Sh 无带时,只有 B 和 D,有带记为“D”,无带记为“B”。

### 1.4 遗传连锁图谱的构建

采用 JoinMap 3.0 分析软件对实验室所得数据进行分析,LOD 值最小为 3.0,最大遗传距离为 50 cM。

## 2 结果与分析

### 2.1 CSB14Sh 与 TM-1 之间分子标记的多态性

为了验证 CSB14Sh 是否是染色体置换系,选取覆盖整个基因组的 3800 对 SSR 引物,使试验结果更有说服力。用 TM-1 和 CSB14Sh 对 3800 对 SSR 引物进行多态性筛选,结果发现 15 对具有多态性(图 1),多态性比率为 0.40%,远远低于海陆之间的引物多态性比率(一般为 30%),也远低于陆陆之间的引物多态性比率(一般为 2%)。因此,从多态性比率来看,CSB14Sh 有可能为置换系。

### 2.2 $F_2$ 遗传图谱的构建

15 对多态性引物在  $F_2$  群体中扩增,产生 23 个多态性分子标记(图 2)。利用 Joinmap 3.0 对多态性分子标记构建遗传图谱,结果共产生 1 个连锁群,该连锁群连锁上了 21 个分子标记,占多态性分子标记总数的 91%,长度 65.3 cM,标记间平均间距 3.3 cM。最小间距为 0.3 cM,最大间距为 14.8 cM(图 3)。

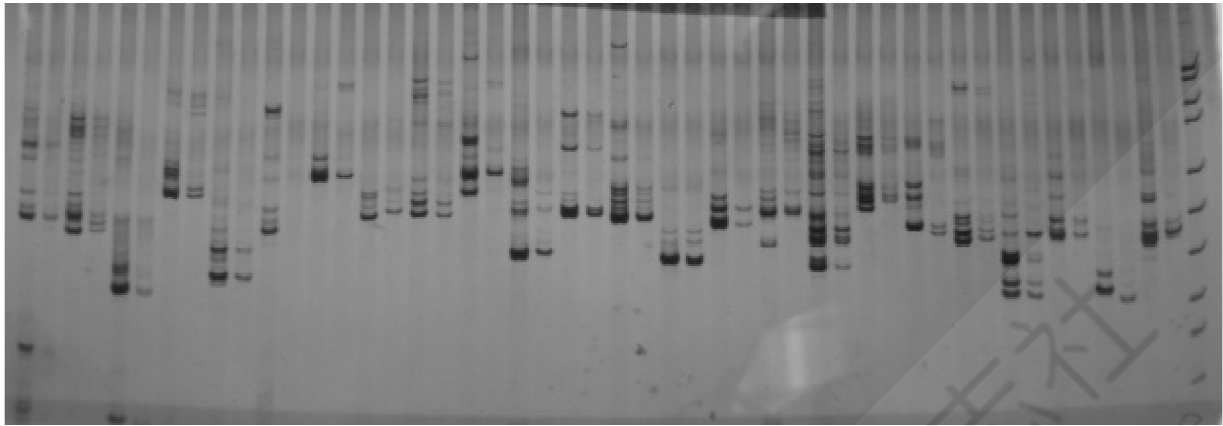


图 1 筛选多态性引物

Fig. 1 Polymorphism marker screening

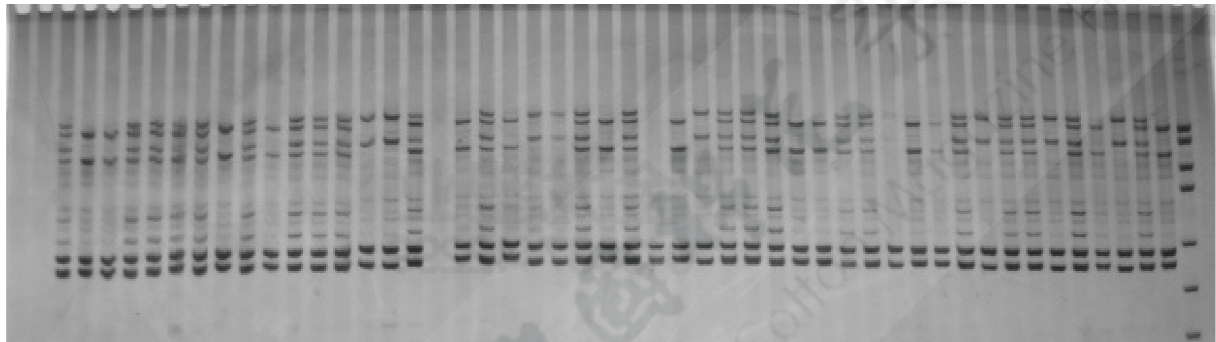
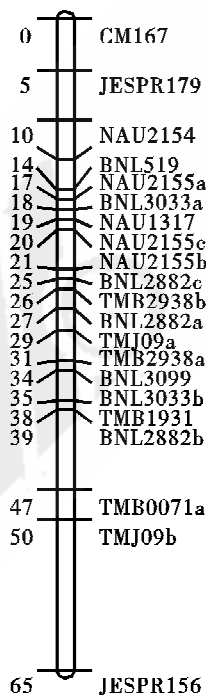
图 2 TM-1 × CSB14Sh F<sub>2</sub> 扩增Fig. 2 Polymorphic primer pairs amplified in F<sub>2</sub> of TM-1 × CSB14Sh

图 3 染色体 14 连锁图

Fig. 3 The linkage group of chromosome 14

### 2.3 连锁群的染色体定位

对所得到的连锁群利用已在网上 (<http://www.mainlab.clemson.edu/cmd/cmap/>) 公布数据的五张含有 SSR 标记的分子连锁图谱: BC<sub>1</sub>: [(*G. hirsutum* TM-1 × *G. barbadense* Hai7124) × *G. hirsutum* TM-1], 以下简称 T7 图谱; BC<sub>1</sub>: [(*Guazuncho2* × VH8-4602) × *Guazuncho2*], 以下简称 Fr 图谱; RIL: (TM-1 × 3-79), 简称为 T3 图谱; F<sub>2</sub>: (*G. hirsutum* race “Palmeri” × *G. barbadense* “K101”), 简称为 PK 图谱; BC<sub>1</sub>: [(*G. hirsutum* TM-1 × *G. barbadense* Hai7124) × *G. hirsutum* TM-1], 简称为 New 图谱, 以及王红梅发表的图谱<sup>[10]</sup>, 简称为 Wang 图谱, 进行连锁群的染色体定位。发现该连锁群上的多个分子标记被定位在第 14 染色体(表 1), 另外在本连锁群上有 4 个标记与 New 图谱的第 14 染色体的分子标记相同, 而且排序一致。故该连锁群被定位在第 14 染色体上。

表 1 分子标记的染色体定位

Table 1 Chromosomal location of molecular markers

分子标记	染色体	依据图谱
CM167	未知	
JESPR179	2、14	Fr 图谱
NAU2154	14	New 图谱
BNI.519	未知	
NAU2155a	14	New 图谱
BNL3033a	未知	
NAU1317	未知	
BNL2882c	14	Fr 图谱、PK 图谱、T3 图谱、New 图谱
TMB2938b	未知	
TMJ09a	14	New 图谱
BNI.3099	14	Wang 图谱
TMB1931	未知	
TMB0071a	未知	
JESPR156	14	Wang 图谱

### 3 讨论

陆地棉染色体置换系都是以单体为媒介构建的,从细胞遗传学原理来看,构建的置换系是毋庸置疑的。但是,由于陆地棉和海岛棉在分类学上属于不同的种,二者之间存在着种间隔离和异源染色体排斥的情况。染色体置换系经几代繁殖后,其异染色体是否仍稳定存在于受体需有科学证据。因此,一般做染色体置换系鉴定时,需做细胞学鉴定。研究尝试了细胞学观察,由于置换系是整倍体,置换系与 TM-1 在细胞学上无法鉴别出来。染色体原位杂交是用标记的 DNA 分子或序列为探针,与染色体制片上的 DNA 杂交,用来检测目标染色体(质)的方法。总基因组 DNA 为探针进行原位杂交可用来区分杂种中的异源染色体,原位杂交技术已在鉴定作物置换系中得到利用<sup>[11-12]</sup>。我们曾设想利用海岛棉 3-79 的 DNA 作为探针,以陆地棉 TM-1 的 DNA 作为封阻 DNA,以置换系的根尖体细胞分裂中期进行染色体原位杂交。但由于海岛棉和陆地棉都是四倍体棉种,亲缘关系较近,因此无法看到特异染色体杂交信号,不能鉴定出外源染色体。而利用染色体单拷贝序列作为探针进行原位杂交,筛选特异序列是一个难题,存在一定难度。

分子标记是直接 DNA 水平上对基因组进行多态性检测,DNA 水平的多态性主要表现核苷酸序列的差异,对于任何类型的核苷酸序列的差异都可用分子标记技术对其进行检测。简单重复

序列(Simple Sequence Repeat, SSR),又称微卫星序列(Microsatellite),是目前应用比较广泛、发展迅速的,基于 PCR 技术上的分子标记。SSR 标记呈现出以下优点<sup>[13]</sup>:(1) SSR 在真核生物基因组中分布广、多态性丰富;(2)其产物进行测序电泳分离时单碱基分辨率高、共显性标记遗传信息量大;(3)呈孟德尔式遗传,具有很好的稳定性,DNA 用量少,技术要求低,成本低廉,PCR 扩增的可重复性高。因此,SSR 标记已用于多种作物的遗传图谱构建<sup>[14-15]</sup>。由于以上优点,本试验利用 SSR 标记进行了验证置换系的尝试。

TM-1 与 CSB14Sh 之间,由于仅有 14 染色体短臂有差异,因此,利用 TM-1 与 CSB14Sh 做亲本构建的分离群体绘制的遗传图谱,所构建的连锁群都应该被定位在 14 染色体上。而且如果标记在足够多的情况下,应该为 1 条。为了保证试验的准确性,我们假定 CSB14Sh 不是置换系,因此,选择覆盖整个基因组的 3800 对引物对 TM-1 和 CSB14Sh 进行多态性筛选,共筛选出 15 对多态性引物,在 F<sub>2</sub> 群体中扩增后,产生 23 个分子标记位点,并利用其进行了遗传图谱的构建。本试验利用的 F<sub>2</sub> 群体单株为 63 个,群体相对较小;筛选出的多态性标记为 23 个,相对也比较偏少。一般来说,群体越小,多态性引物越少,多态性标记越不容易进入连锁群。但是本试验结果发现 23 个标记中的 21 个形成了 1 个连锁群,仅有 2 个标记没有进入,进一步表明这 1 个连锁群的可靠性。通过比较这 1 个连锁群上的分子标记与前人分子标记染色体定位的结果发现,该连锁群被定位在第 14 染色体上。

虽然利用 SSR 标记构建连锁群并没有完全验证 CSB14Sh 为染色体置换系,但是至少可以肯定 TM-1 与 CSB14Sh 在第 14 条染色体上有差异,而在其它染色体上没有差异。再结合染色体置换系构建的过程,可以认为 CSB14Sh 确实为第 14 条染色体短臂的置换系。另外,还对 CSB22Sh 利用上述方法进行了验证,结果筛选出的 65 个多态性标记中有 63 个标记进入 1 个连锁群,而且也发现该连锁群确实为第 22 染色体。

#### 参考文献:

- [1] KOHEL R J, Endriaai J E, White T G. An evaluation of *Gossypium barbadense* L. chromosome 6 and 17 in

- the *G. hirsutum* L. genome[J]. *Crop Science*, 1977, 17(3):404-406.
- [2] 马家璋, Kohel R J. 棉花六个代换系的评价[J]. *作物学报*, 1983, 9(3):145-150.  
MA Jia-zhang, Kohel R J. An evaluation of six substitution lines of *Gossypium barbadense* chromosomes in *G. hirsutum*[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 1983, 9(3):145-150.
- [3] 任立华, 张天真. 陆地棉 7 个置换系的遗传评价[J]. *作物学报*, 2001, 27(6):993-999.  
REN Li-hua, Zhang Tian-zhen. Genetic evaluation of seven substitution lines in upland cotton[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2001, 27(6):993-999.
- [4] SAHA S, Wu Ji-xiang. Effect of chromosome substitutions from *Gossypium barbadense* L. 3-79 into *G. hirsutum* L. TM-1 on agronomic and fiber traits[J]. *J Cotton Science*, 2004, 8:162-169.
- [5] 栾明宝, 郭香墨, 张永山. 利用陆地棉置换系进行海岛棉主要性状基因的染色体定位[J]. *棉花学报*, 2008, 20(1):70-72.  
LUAN Ming-bao, Guo Xiang-mo, Zhang Yong-shan. Gene location of main traits in specific chromosome or chromosome arms of *G. barbadense* by using chromosome substitution line in upland cotton[J]. *Cotton Science*, 2008, 20(1):70-72.
- [6] STELLY D M, Saha S. Registration of 17 upland cotton germplasm lines disomic for different *G. barbadense* chromosome or arm substitutions[J]. *Crop Science*, 2005, 45:2663-2665.
- [7] 潘家驹. 棉花育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 120-127.  
PAN Jia-ju. Cotton breeding[M]. Beijing: Chinese Agricultural Press, 1998: 120-127.
- [8] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. *棉花学报*, 1998, 10(5):273-275.  
SONG Guo-li, Cui Rong-xia, Wang Kun-bo. A rapid improved CTAB method for extraction of cotton genomic DNA[J]. *Acta Gossypii Sinica*, 1998, 10(5):273-275.
- [9] 张 军, 武耀廷, 郭旺珍. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测[J]. *棉花学报*, 2000, 12(5):267-269.  
ZHANG Jun, Wu Yao-ting, Guo Wang-zhen. Fast screening of microsatellite markers in cotton with page/silver staining[J]. *Acta Gossypii Sinica*, 2000, 12(5):267-269.
- [10] 王红梅. 棉花抗黄萎病遗传及分子标记研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2005.  
WANG Hong-mei. Study on the inheritance and QTLs mapping of *Verticillium* wilt in cotton [D]. Wuhan, Huazhong Agricultural University, 2005.
- [11] 唐祈林, 李晚忱, 宋运淳. 玉米与四倍体多年生玉米代换种质的选育及其基因组原位杂交鉴定[J]. *遗传学报*, 2004, 31(4):340-344.  
TANG Qi-lin, Li Wan-chen, Song Yun-chun. The production and multi-color genomic *in situ* hybridization identification of maize-*Z. perennis* substituted material[J]. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(4):340-344.
- [12] 王黎明, 林小虎, 张平杰. 小麦-中间偃麦草二体异代换系山农 0095 的选育及其鉴定[J]. *中国农业科学*, 2005, 38(10):1958-1964.  
WANG Li-ming, Lin Xiao-hu, Zhang Ping-jie. Breeding and characterization of wheat-thinopyrum intermedium alien substitution line Shannong 0095 [J]. *Scientia Agricultural Sinica*, 2005, 38(10):1958-1964.
- [13] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 1-9.  
FANG Xuan-jun, Wu Wei-ren, Tang Ji-liang. DNA marker assisted selection in crop breeding[M]. Beijing: Science Press, 2001: 1-9.
- [14] 王竹林, 刘曙东, 刘惠远. 百农 64×京双 16 遗传连锁图谱的构建[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(5):886-892.  
WANG Zhu-lin, Liu Shu-dong, Liu Hui-yuan. Genetic linkage map in 'Bainong 64'×'Jingshuang 16' of wheat[J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2006, 26(5):886-892.
- [15] 张洁夫, 戚存扣, 栗根义. 甘蓝型油菜遗传图谱构建与无花瓣性状 QTL 定位[J]. *作物学报*, 2007, 33(8):1246-1254.  
ZHANG Jie-fu, Qi Cun-kou, Li Gen-yi. Genetic map construction and apetalousness QTLs identification in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2007, 33(8):1246-1254. ●