

棉花纤维长度主效 QTLs 的分子标记辅助选择及聚合效果研究

董章辉, 石玉真, 张建宏, 王淑芳, 李俊文, 刘爱英, 唐淑荣, 褚平, 袁有禄*

(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)

摘要:以 2 个品种(系)TG41 和 sGK156 以及 3 个纤维品质优异的种质系 7235、HS427-10 和 0-153 为亲本, 配制了 (sGK156 × HS427-10) × (0-153 × 7235)、(TG41 × HS427-10) × (0-153 × 7235) 和 (sGK156 × 0-153) × (sGK156 × HS427-10) 3 套组合的双交 F₁ 及 F₂ 群体, 利用 3 个纤维长度不同 QTLs 相关的 SSR 标记进行辅助选择。结果, 用 3 个标记分别进行单标记辅助选择时, 有/无标记单株平均纤维长度之间的差异在 3 个群体的 F₁ 世代中都可以达到显著或极显著水平, 并且在 F₂ 世代株行中也表现出一定差异, 可以稳定表达。当用 2 个或 3 个标记同时进行聚合选择时, 随着聚合到 QTL 个数的增多, 单株平均纤维长度值增大, 选择效果越来越好, 但在不同群体中表现有差异。可见, 用分子标记辅助选择的方法对棉花纤维长度进行改良是有效的, 聚合多个 QTLs 时, 可以达到更好的效果。有必要培育多个基因聚合并纯合的高代重组自交系材料, 进一步研究多基因聚合的遗传效应。

关键词:棉花; 纤维长度; QTL; 分子标记; 育种

中图分类号:S562.035 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2009)04-0279-05

Molecular Marker-assisted Selection and Pyramiding Breeding of Major QTLs for Cotton Fiber Length

DONG Zhang-hui, SHI Yu-zhen, ZHANG Jian-hong, WANG Shu-fang, LI Jun-wen, LIU Ai-ying, TANG Shu-rong, CHU Ping, YUAN You-lu*

(Cotton Research Institute of the Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: TG41 and sGK156, two commercial cotton cultivars (lines), and HS427-10, 7235 and 0-153, three elite fiber quality germplasm lines, were used as parents to develop three double-cross combinations, (sGK156 × HS427-10) × (0-153 × 7235), (TG41 × HS427-10) × (0-153 × 7235) and (sGK156 × 0-153) × (sGK156 × HS427-10). Three SSR markers, NAU1043, MUSS497 and CM67, which were linked with QTLs of fiber length and derived from 7235 or 0-153, were used to study the effect of molecular marker-assisted selection and pyramiding breeding in the three combinations, respectively. As a result, the fiber length showed significant differences between plants with and without marker in the three combinations. This indicated that the effects of the three QTLs for fiber length were stable in different genetic backgrounds and different generations. When selected the plants with two or three markers, the fiber length of plants with two or three markers were better than that of the plants with only one marker, and the fiber length was the best in the plants with all the three markers. In conclusion, it is effective to increase fiber length through molecular marker-assisted selection and the effect may be increased when more QTLs are pyramided in plants. It is necessary to develop stable recombinant inbred lines of advanced generations which pyramid several fiber-related genes to study the effect for pyramiding more genes.

Key words: cotton; fiber length; QTL; molecular marker; breeding

收稿日期: 2008-04-01

作者简介: 董章辉(1981-), 男, 硕士研究生; * 通讯作者, yuanyl@cricaas.com.cn

基金项目: 国家 973 项目(2004CB117306), 863 计划(2006AA100105550)

棉花纤维品质性状属于数量性状,遗传基础复杂,易受环境影响,加上纤维品质检测繁琐,且与产量性状间存在负相关^[1],用传统的育种方法对其进行改良,存在选择效率低,工作量大,周期长等局限,很难满足人们对纤维品质提高的要求。另外有研究表明,纤维品质主基因普遍存在:长度的主基因显性不明显,多基因显性全为较高的正值,杂合状态下 F_1 纤维长度为中亲值以上^[2-3]。分子标记技术应用于作物遗传育种研究中具有许多表型选择无可比拟的优点。它可以对基因型直接选择,不受发育阶段限制和环境条件的影响,且检测手段简单快捷,易于现代化操作,效率极高^[4]。近年来,随着分子标记技术的发展和育种工作者的努力,已有大量棉花纤维品质相关 QTLs 被定位在分子标记连锁图上,这为标记辅助选择和 QTL 聚合育种提供了条件。沈新莲等^[5-6]利用 F_2 及 $F_{2:3}$ 分离群体,定位了来自高强纤维种质系 7235 与纤维长度相关的 1 个 QTL,与 SSR 标记 NAU1043 连锁,能解释 6.3% 的表型变异。张建宏等^[7-8]同样定位了来自陆地棉优质新品系 0-153 与纤维长度相关的 2 个 QTLs,1 个与 SSR 标记 MUSS497 相连锁,能解释 7.95%

的表型变异,另一个与 SSR 标记 CM67 相连锁,能解释 7.00% 的表型变异。目前,尚无纤维长度分子标记辅助聚合选择的报道。本文以 sGK156、TG41、7235、HS427-10、0-153 为亲本,通过单交、双交配制了 3 组材料,利用这 3 个纤维长度相关 QTLs 的 SSR 标记在这 3 组材料中进行辅助选择,初步明确纤维长度分子标记辅助选择和 QTLs 聚合育种的效果。

1 材料和方法

1.1 实验材料

sGK156 是多年自交得到的抗虫材料,来自国家半干旱农业工程技术研究中心;TG41 是推广的抗虫品种中棉所 41 的选系,纤维品质一般;7235 是棉属野生种异常棉渐渗的高强纤维种质系,种质创造过程中,两个优异种质 PD4381 和 Acala3080 被用来聚合优质基因;HS427-10 是来自于美国农业部南方平原农业研究中心的高强纤维种质系,它的具体系谱不详,据推测很可能来源于 Acala 种质,该材料经多年选单株获得;0-153 来自四川农业大学,为亚洲棉与陆地棉的杂交回交后代,纤维强度和早熟性突出。

表 1 亲本材料纤维长度

Table 1 Parents' fiber length performance

年份	sGK156	TG41	HS427-10	7235	0-153
2006	31.70±0.51	28.37±0.11	31.35±0.34	33.15±0.26	29.12±0.20
2007	31.70±0.31	28.93±0.27	30.76±0.16	33.71±0.38	28.50±0.29

以这 5 个材料为亲本通过单交、双交配制了 [(sGK156×HS427-10)×(0-153×7235)](Pop1)、[(TG41×HS427-10)×(0-153×7235)](Pop2)、[(sGK156×0-153)×(sGK156×HS427-10)](Pop3) 3 个群体材料。2006 年将 3 个群体的 F_1 种子种于河南安阳中国农业科学院棉花所试验基地,行长 8 m,行距 0.8 m,株距 0.25 m,亲本材料各种 2 行,定苗前涂抹卡那霉素,拔除有反应的不抗虫植株,该群体所有单株自交,共获得 988 个单株(Pop1 344 株、Pop2 385 株、Pop3 259 株),收获单株纤维及种子,随机抽取 265 个单株(Pop1 95 株、Pop2 98 株、Pop3 72 株)于 2007 年在安阳种成株行,每 20 行种植 sGK156 或 TG41 作为对照。同样涂抹卡那霉素,拔除有反应的不抗虫植株,收获 F_2 株行纤维。田间管理同大田。

所收获双交 F_1 单株及 F_2 株行纤维由农业部品质测试中心利用 HVI900 系列测定纤维品质。 F_1 单株纤维品质用于分子标记辅助选择效果的鉴定, F_2 代株行纤维品质对其稳定性进行验证。

1.2 DNA 提取及 SSR 标记检测

2006 年 7 月在试验田摘取双交 F_1 单株的幼嫩叶片,采用修改的 CTAB 法提取 DNA^[9]。SSR 反应体系为 10 μ L,其中含 dNTP 5×10⁻⁹ mol,含正反向引物各 4×10⁻¹² mol,含模板 DNA 20 ng,含 Taq DNA 聚合酶 0.5 U。PCR 反应程序为:95℃ 预变性 45 s;94℃ 变性 30 s;55℃ 退火 45 s;72℃ 延伸 1 min,30 个循环,72℃ 延伸 1 min。PCR 扩增在 Cyclor-9600 中进行。PCR 扩增产物用 PAGE / 银染快速检测的方法进行标记检测^[10]。

本研究用来自 0-153 的与纤维长度有关的 2 个标记 MUSS497 和 CM67 及来自 7235 的 1 个与长度有关的标记 NAU1043(<http://www.cottonmarker.org/>)进行辅助选择,根据 3 个 SSR 标记在分离群体中的检测结果,确定其相连锁的 QTLs 在每一个 F_1 单株中的有无,结合 F_1 单株相关的纤维品质数据,通过统计分析,明确分子标记辅助选择效果,最后用 F_2 株行的纤维品质数据验证 QTLs 在不同世代中的稳定性。

2 结果与分析

2.1 单个 QTL 分子标记辅助选择效果及其稳定性研究

用 MUSS497、CM67 和 NAU1043 等 3 个标记在 3 个双交 F_1 群体中进行单标记辅助选择,结果 3 个标记在 3 个不同背景材料中有 / 无标记单株的平均纤维长度值差异都达到了显著或极显著水平;同时,在 3 个群体的双交 F_2 代株行中有标记材料的平均纤维长度值都大于无标记的材料,且标记 CM67 在 Pop1 F_2 中差异达到了极显著水

平,标记 NAU1043 在 Pop1 F_2 和 Pop3 F_2 中差异达到了显著水平, MUSS497 在 3 个群体的 F_2 中差异均达到了显著以上水平(表 2)。

可见,用 NAU1043、CM67 和 MUSS497 对其相应的 QTLs 进行单标记辅助选择时,在 3 个不同群体材料背景下选择效果都能达到显著或极显著水平,并且能在 F_2 世代中得到验证。这表明,这 3 个 QTLs 可以在不同群体、不同世代中稳定表达,这为分子标记辅助选择奠定了基础。

表 2 单标记辅助选择效果分析

Table 2 The effect of single marker-assisted selection for fiber length

标记	群体	基因型	纤维长度/mm	单株(株系)数/个	差值/mm	P
MUSS497	Pop1 F_1	—	31.84	312		
		+-	32.57	32	0.73	<0.01
	Pop2 F_1	—	30.23	322		
		+-	30.64	63	0.41	<0.05
	Pop3 F_1	—	31.39	201		
		+-	32.39	52	1.00	<0.01
	Pop1 F_2	—	31.59	82		
		+-	32.56	13	0.97	<0.05
	Pop2 F_2	—	29.94	80		
		+-	31.23	18	1.29	<0.01
	Pop3 F_2	—	30.60	56		
		+-	32.15	16	1.55	<0.01
CM67	Pop1 F_1	—	31.82	275		
		+-	32.25	69	0.43	<0.05
	Pop2 F_1	—	30.17	287		
		+-	30.67	98	0.50	<0.01
	Pop3 F_1	—	31.41	133		
		+-	32.09	74	0.68	<0.01
	Pop1 F_2	—	31.49	66		
		+-	32.25	29	0.76	<0.01
	POP2 F_2	—	29.90	70		
		+-	30.12	28	0.22	>0.05
	Pop3 F_2	—	30.74	47		
		+-	31.32	25	0.58	>0.05
NAU1043	Pop1 F_1	—	31.47	57		
		++	32.37	80	0.90	<0.01
	Pop2 F_1	—	29.82	67		
		++	30.62	74	0.80	<0.01
	Pop3 F_1	—	31.43	78		
		++	32.52	35	1.09	<0.01
	Pop1 F_2	—	31.47	22		
		++	32.28	18	0.81	<0.05
	Pop2 F_2	—	29.78	16		
		++	29.98	16	0.20	>0.05
	Pop3 F_2	—	30.81	16		
		++	32.17	7	1.36	<0.05

2.2 不同位点 QTL 聚合效果检测

用 CM67 和 MUSS497 共同对 3 个双交 F_1 群体进行标记辅助聚合选择,当聚合到 2 个标记时明显比没有聚合到任何标记的单株平均纤维长度值大,且在 3 个群体中差异都达到了极显著;聚合到 2 个标记的材料与只聚合到 1 个标记的材料相比,平均纤维长度值在 Pop2 F_1 和 Pop3 F_1 中都有所增大,在 Pop3 F_1 中差异都达到了显著水平(表 3),表明 2 个 QTL 的聚合比单个 QTL 选

择效果好。用 CM67、NAU1043 和 MUSS497 3 个标记对 3 个 QTLs 进行聚合选择,结果在 3 个双交 F_1 群体中选择效果都达到了显著或极显著水平,其纤维长度值增大的效果明显增强,在 Pop1 F_1 、Pop2 F_1 和 Pop3 F_1 群体中纤维长度的增值分别达到了 1.76 mm、1.09 mm 和 2.12 mm (表 4)。由此可见,通过分子标记对 QTLs 进行聚合选择可以更好地改良棉花纤维品质。

表 3 2 个不同位点 QTLs 聚合效果分析

Table 3 The effect of two QTLs' pyramiding for fiber length

群体	CM67	MUSS497	纤维长度/mm	单株/个	差值/mm	P
Pop1 F ₁	+-	+-	32.52	14		
	--	--	31.75	275	0.77	<0.01
	--	+-	32.64	18	-0.12	>0.05
Pop2 F ₁	+-	--	32.29	55	0.23	>0.05
	+-	+-	30.85	32		
	--	--	30.13	256	0.72	<0.01
Pop3 F ₁	--	+-	30.42	31	0.43	>0.05
	+-	--	30.58	66	0.27	>0.05
	+-	+-	32.73	26		
	--	--	31.27	154	1.46	<0.01
	--	+-	32.04	26	0.69	<0.05
	+-	--	31.77	47	0.96	<0.01

表 4 3 个 QTLs 聚合效果分析

Table 4 The effect of three QTLs' pyramiding for fiber length

群体	CM67	NAU1043	MUSS497	纤维长度/mm	单株/个	差值/mm	P
Pop1 F ₁	--	--	--	31.47	55		
	+-	++	+-	33.23	3	1.76	<0.05
Pop2 F ₁	--	--	--	29.83	64		
	+-	++	+-	30.92	7	1.09	<0.01
Pop3 F ₁	--	--	--	31.12	59		
	+-	++	+-	33.24	5	2.12	<0.05

综合比较不同个数 QTLs 的聚合效果,同时聚合 3 个标记 MUSS497、CM67 和 NAU1043 的材料在 3 个群体中平均纤维长度值都达到最大,分别为 33.23 mm、30.92 mm 和 33.24 mm,明显高于只聚合到 CM67 和 MUSS497 等 2 个标记的材料;另外,聚合到 2 个标记的单株平均纤维长度值高于只聚合到 1 个标记的单株。由此可见,用 MUSS497、CM67 和 NAU1043 等 3 个标记进行分子标记辅助聚合育种时,选择效果随着聚合标记个数的增多越来越好,并没有因为 QTLs 之间的遗传背景的变化而受到太大的影响。

3 讨论

3.1 QTLs 聚合效果评价

目前,尚未见棉花纤维长度分子标记辅助聚合选择效应的报道。在本实验单标记辅助选择中,选择效应值都达到了显著或极显著水平,但纤维长度值增大的效果并不是很明显,大多在 1.00 mm 以下,明显低于石玉真^[11]和郭旺珍^[12]对棉花纤维强度相关 QTL 的分子标记辅助选择中纤维强度提高的幅度,这可能与实验材料及遗传背景有一定关系。本实验所用亲本材料大多为纤维品质优良的品种或品系,如 sGK156、HS427-10 和 7235 纤维长度都超过了 31 mm,这样在其后代的聚合材料中必然存在较多纤维长度相关 QTL,在所选 QTL 之外可能还存在尚未检测出的对纤维长度起增效作用的 QTL,且这些 QTL 之间可能存在相互作用,致使检测到 QTL 比没有检测到

QTL 的材料纤维长度增加不明显。然而,在利用分子标记辅助选择对棉花纤维品质进行改良的过程中,当纤维品质达到一定高度时想使其进一步提高,从多个优质材料中聚合多个纤维品质相关 QTL 是一个有效途径。

3.2 分子标记辅助选择存在的问题及对策

近年来,随着分子标记技术的发展,棉花分子标记遗传图谱的不断完善、加密,越来越多的基因或 QTL 找到了与其相连锁的标记,然而分子标记在辅助选择中的应用却没有明显增多,这主要是由以下原因造成的:(1)标记并不是基因,它只是与基因相连锁,这样在减数分裂形成配子时,有可能由于重组使标记与目标基因分离,尤其是标记与基因相距较远时分离的机率增大,导致选择偏离方向。(2)在分子标记图谱构建过程中,为了得到高密度的图谱,研究者总是选择目标性状差异较大的亲本构建作图群体,同时筛选 QTL,这样必然使 QTL 的定位与其应用发生一定的脱节^[13-14]。(3)由于 QTL 与环境、QTL 与 QTL 间存在互作^[15],降低了不同环境、不同背景下分子标记辅助选择的效果。针对以上问题,在今后的分子标记及 QTL 研究中我们应该注意以下几方面:(1)构建更饱和的遗传图谱,并不断将其加密,从而能够得到与目标基因或 QTL 更加紧密连锁的标记,以降低标记与目标基因分离的机率。(2)在图谱构建及 QTL 的筛选过程中,尽量选用已经大面积推广的品种构建作图群体,从而使 QTL 定位后可以直接应用于标记辅助选择育种。(3)

有必要培育多个基因聚合并纯合的高代重组自交系材料,进一步研究多基因聚合的 QTL 与 QTL、QTL 与环境之间的互作关系,选择最佳 QTL 组合进行标记辅助选择的多基因聚合育种。

参考文献:

- [1] CULP T W, Harrell D C, Kerr T, et al. Some genetic implications in the transfer of high fiber strength genes to upland [J]. *Crop Sci*, 1979, 19: 481-484.
- [2] 袁有禄, 张天真, 郭旺珍, 等. 棉花高品质纤维性状的主基因与多基因遗传分析[J]. *遗传学报*, 2002, 29(9): 827-834.
- YUAN You-lu, Zhang Tian-zhen, Guo Wang-zhen, et al. Major-polygene effect analysis of super quality fiber properties in upland cotton (*G. hirsutum* L.) [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(9): 827-834.
- [3] 石玉真, 刘爱英, 李俊文, 等. 陆海种间杂交纤维品质性状的遗传及其 F₁ 群体优势分析[J]. *棉花学报*, 2008, 20(1): 56-61.
- SHI Yu-zhen, Liu Ai-ying, Li Jun-wen, et al. Heterosis and genetic analysis of fiber quality traits of interspecific hybrid of *G. hirsutum* L. × *G. barbadense* L. [J]. *Cotton Science*, 2008, 20(1): 56-61.
- [4] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良, 等. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 7.
- FANG Xuan-jun, Wu Wei-ren, Tang Ji-liang, et al. DNA marker-assisted breeding for crop[M]. Beijing: Science Press, 2001: 7.
- [5] SHEN Xin-lian, Guo Wang-zhen, Zhu Xie-fei, et al. Molecular mapping of QTLs for fiber qualities in three diverse lines in upland cotton using SSR markers[J]. *Molecular Breeding*, 2005, 15: 169-181.
- [6] 沈新莲. 陆地棉纤维品质 QTL 的筛选、定位及其应用[D]. 南京: 南京农业大学, 2004.
- SHEN Xin-lian. Molecular tagging, location, and application of QTLs for fiber properties in upland cotton [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2004.
- [7] 张建宏. 陆地棉优异纤维品质相关性状的分子标记及定位[D]. 保定: 河北农业大学, 2007.
- ZHANG Jian-hong. Molecular marker study of fiber quality-related traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [D]. Baoding: Hebei Agricultural University, 2007.
- [8] 张建宏, 王淑芳, 石玉真, 等. 转基因抗虫棉产量相关性状 QTL 的分子标记及定位[J]. *棉花学报*, 2008, 20(3): 177-185.
- ZHANG Jian-hong, Wang Shu-fang, Shi Yu-zhen, et al. Molecular marker and QTL of yield-related traits in transgenic insect-resistant cotton varieties [J]. *Cotton Science*, 2008, 20(3): 177-185.
- [9] PATERSON A H. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium spp.*) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis [J]. *Plant Molecular Biology Report*, 1993, 11(2): 122-127.
- [10] 张 军, 武耀廷, 张天真, 等. 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, Zhang Tian-zhen, et al. Rapid detection of SSR with PAGE / silver staining [J]. *Cotton Science*, 2000, 12(5): 267-269.
- [11] 石玉真, 李俊文, 袁有禄, 等. 与棉花纤维强度连锁的主效 QTL 应用于棉花分子标记辅助育种[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(4): 521-527.
- SHI Yu-zhen, Li Jun-wen, Yuan You-lu, et al. The major QTLs linked to fiber strength for cotton breeding program by molecular marker assisted selection [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2007, 5(4): 521-527.
- [12] 郭旺珍, 张天真, 丁业掌, 等. 分子标记辅助聚合两个棉纤维高强主效 QTLs 的选择效果[J]. *遗传学报*, 2005, 32(12): 1275-1285.
- GUO Wang-zhen, Zhang Tian-zhen, Ding Ye-zhang, et al. Molecular marker assisted selection and pyramiding of two QTLs for fiber strength in upland cotton [J]. *Acta Genetica Sinica*, 2005, 32(12): 1275-1285.
- [13] 方宣钧, 吴为人. 分子选择[J]. *分子植物育种*, 2003, 1(1): 1-5.
- FANG Xuan-jun, Wu Wei-ren. Molecular selection [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 1(1): 1-5.
- [14] 沈新莲, 张天真. 作物分子标记辅助选择育种研究的进展与展望[J]. *高技术通讯*, 2003(2): 105-110.
- SHEN Xin-lian, Zhang Tian-zhen. Advances on molecular marker assisted selection in crop [J]. *High Technology Communication*, 2003(2): 105-110.
- [15] SHEN Xin-lian, Zhang Tian-zhen, Guo Wang-zhen, et al. Mapping fiber and yield QTLs with main, epistatic, and QTL × environment interaction effects in recombinant inbred lines of upland cotton [J]. *Journal of Cotton Science*, 2006, 46: 61-66. ●