

陆地棉极短纤维突变体基因 Li_2 的遗传与定位

刘逢举, 梁文化, 郭旺珍, 张天真*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室/棉花研究所, 江苏 南京 210095)

摘要: Li_2 突变体是在纤维伸长发育阶段纤维极端缩短类型的突变体, 其控制极短纤维表型的基因被命名为 Li_2 。本文以 $(Li_2 \times \text{海 7124})F_2$ 及 $(Li_2 \times \text{sub18})F_2$ 作为标记群体, 结合本实验室最新的海陆种间分子遗传图谱上染色体 18 的标记信息, 对陆地棉纤维突变体 Li_2 的极短纤维性状进行基因定位。在 $(Li_2 \times \text{海 7124})F_2$ 分离群体中, 纤维性状分离比符合孟德尔 3:1 的分离, 证明 Li_2 突变体的极短纤维性状是由一对完全显性单基因控制。而在 $(Li_2 \times \text{sub18})F_2$ 分离群体中, 纤维性状分离比出现异常, 不符合 3:1 的分离比, 这可能与 Li_2 突变体的温敏特性有关。利用 JoinMap 3.0 连锁分析软件, 使用含 623 个单株的 $(Li_2 \times \text{海 7124})F_2$ 群体将 Li_2 基因定位在 18 染色体的端部, 与最近标记 Z08 的遗传距离为 6.051 cM; 使用含 651 个单株的 $(Li_2 \times \text{sub18})F_2$ 群体将 Li_2 基因也定位在了 18 染色体的端部, 与最近标记 Z08 的遗传距离为 9.266 cM。研究结果为进一步精细定位与图位克隆该基因提供了基础。

关键词: 陆地棉; 极短纤维; Li_2 基因; 分子标记; 遗传定位

中图分类号: S562.035 文献标识码: A

文章编号: 1002-7807(2010)05-0398-05

Genetic Mapping of Short Fiber Mutant Gene Li_2 in Upland Cotton

LIU Feng-ju, LIANG Wen-hua, GUO Wang-zhen, ZHANG Tian-zhen*

(National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Institute of Cotton Research, Nanjing, Jiangsu 210095, China)

Abstract: Li_2 is a short fiber mutant found in the fiber elongation procedure, and the gene that controls short fiber mutant phenotype is named Li_2 . Hai7124, developed in China, is a commercial *Verticillium*-resistant variety in *G. barbadense*. Sub 18 is a substitution line with *G. hirsutum* accession (acc.) TM-1 genetic background except that the 18th chromosome (Chr 18) is replaced by the corresponding homozygous chromosome of *G. barbadense* acc 3-79. In cotton, Li_2 gene has been assigned to chr 18 using aneuploid stocks in 2002. The objective of this research was to screen SSR markers tightly linked with Li_2 gene by using two F_2 segregating populations derived from Li_2 mutant and the backbone genetic linkage map from *G. hirsutum* \times *G. barbadense* BC₁ newly updated in our laboratory. Genetic analysis suggested that the segregation ratio of short fiber plants in the $(Li_2 \times \text{Hai7124})F_2$ fit Mendelian 3:1 inheritance, confirming that the short fiber trait in Li_2 mutant was controlled by an complete dominance gene. However, the segregation ratio of short fiber plants in the $(Li_2 \times \text{sub18})F_2$ did not fit Mendelian 3:1 inheritance, and this may be related to the temperature-sensitive characteristic of Li_2 mutant. Genetic mapping of Li_2 was conducted using two F_2 populations mentioned above and JoinMap v3.0 software. In the $(Li_2 \times \text{Hai7124})F_2$, Li_2 gene was located on the end of chr 18, and the nearest marker Z08 had a genetic distance of 6.051 cM from Li_2 . In the $(Li_2 \times \text{sub18})F_2$, Li_2 was also located on the end of chr 18, but the nearest marker Z08 was 9.266 cM from Li_2 . The present mapping of Li_2 mutant provides a starting point for fine-scale mapping and positional cloning.

Key words: upland cotton; short fiber; Li_2 gene, molecular marker; genetic mapping

陆地棉纤维极端缩短类型突变体 Li_2 , 是一类棉纤维伸长发育受阻的突变体。对于这类棉纤维极端缩短类型突变体从基因型到表型的分子机制的研究, 将有助于深入了解棉纤维发育机理这

收稿日期: 2010-05-17 作者简介: 刘逢举(1972-), 男, 博士; * 通讯作者, cotton@njau.edu.cn

基金项目: 国家转基因专项(2008ZX08009-003)

一棉花学界共同关注的课题。其巨大的经济效益和社会效益不言而喻。近年来,随着分子生物学的迅速发展,极短纤维突变体 Li_2 的分子遗传学研究已经取得了一些重大进展。自 Narbuth 等^[1]证明了 Li_2 突变体是单基因显性遗传后,Kohel 等^[2]首次利用非整倍体测验法把 Li_2 基因定位到 18 染色体上。Rong 等^[3-4]在 2004 年所建立的高密度遗传图谱的基础上,将基因 Li_2 定位在了 18 染色体(D13)末端。

基于 DNA 分子标记的遗传图谱为植物遗传学的研究,诸如 QTL 作图、基因精细定位(fine mapping)与图位克隆(position mapping)等,提供了很重要的工具。而随着分子标记遗传图谱饱和度的增加,一些高密度的遗传图谱已经被用来定位棉花上一些重要的质量性状基因或数量性状基因座(QTLs)^[5-9]。

本研究以 Li_2 突变体分别构建了 2 个 F_2 群体,通过分子标记技术,结合本实验室郭旺珍等^[10]构建的一张高密度遗传图谱,对 Li_2 基因进行了遗传定位。

1 材料和方法

1.1 试验材料

本实验所用到的亲本材料为:海 7124、 Li_2 突变体及 sub18。其中 Li_2 突变体、sub18 置换系均引自美国农业部南方平原农业研究中心^[11]。异源四倍体棉花栽培品种海岛棉海 7124,是南京农业大学棉花研究所抗黄萎病遗传研究的一个单株选择后代,具有黄色花冠、花瓣基部有红心、黄色花

药和典型的鸡脚叶。sub18 置换系是利用陆地棉遗传标准系 TM-1 遗传背景的单体作母本与海岛棉遗传标准系 3-79 进行杂交,从杂交后代中选择单体作父本,与相应的单体回交,连续回交多代直到获得理想的纯度。一般经 6、7 代甚至更多代回交后,选单体棉株进行自交,分离出的双体植株即为培育的置换系。sub18 置换系有 25 对染色体属于 TM-1,第 18 染色体则来自 3-79。所有材料均自交繁殖保纯。

1.2 群体构建及性状调查

2006 年、2007 年分别在南京农业大学江浦实验站配置杂交组合($Li_2 \times$ 海 7124) F_1 、($Li_2 \times$ sub18) F_1 ,同年在海南岛基地种植,收获 F_2 代种子;次年南京农业大学江浦实验站种植亲本、 F_1 、 F_2 代群体,并考察记载吐絮期单株的纤维表型性状,归类与统计。

Li_2 突变体构建的 2 个 F_2 群体中,在吐絮期,逐株调查 2 个 F_2 群体的每个单株的棉纤维形态,发现 F_2 群体中表现为 3 种性状分离:①植株各部位铃吐絮均不正常,均表现为极短纤维。②植株某些部位铃吐絮不正常,表现为极短纤维;其余则表现正常。③植株各部位铃吐絮均正常,均表现为正常纤维。但在 Li_2 突变体亲本行中,作者却发现①和②这 2 种情况都存在。鉴于 Li_2 突变体亲本的表现,作者认为:只要植株上有极短纤维的,不管正常吐絮的棉桃存在与否,均划为突变体,记为 1;全部正常吐絮的才能划为正常株,记为 2。正常株海 7124、置换系 sub18 及突变体 Li_2 的棉纤维及其种子的形态见图 1。



注:A. 海 7124;B. sub18;C. Li_2 突变体。

图 1 三个亲本材料的棉纤维及其种子形态

Fig. 1 Cotton fiber and seeds morphology of three parent lines

1.3 DNA 提取及图谱的构建

2007、2008 年,分别提取亲本、 F_1 及 F_2 群体的单株幼嫩叶片的基因组 DNA,DNA 提取参考

Paterson 等人方法^[12]。

1.4 SSR 分析及遗传图谱构建

实验中所用 SSR 引物全部为本实验室的

NAU 编号引物, 引物信息可从 (<http://www.cottonmarker.org>) 网站下载。PCR 扩增在美国 MJ Research 公司的 PTC-225 热循环仪上完成。扩增产物的电泳检测参照 Zhang 等人的报道^[13-14]。对所选引物在亲本、 F_1 及 F_2 作图群体中的分离情况进行调查。带型与 Li_2 突变体一致的记为 1, 与海 7124 或 Sub18 一致的记为 2, 与 F_1 一致的记为 3, 缺失的记为“-”。用 χ^2 检测形态性状标记及 SSR 分子标记在 F_2 分离群体中是否符合孟德尔 3:1 (完全显性) 的分离比率。用 JoinMap 3.0^[15] 来构建遗传连锁图, LOD \geq 3。图谱的绘制用 Mapchart^[16] 完成。

2 结果与分析

2.1 极短纤维性状的遗传分析

2007 年 9—10 月田间调查 ($Li_2 \times$ 海 7124) F_2 群体的吐絮情况。结果发现, 在由 Li_2 突变体配制的 940 株 F_2 分离群体中, 其中 317 株未结铃。在吐絮的 623 株中, 极短纤维株数: 正常纤维株数 = 459:164, $\chi^2_c = 0.5142 < \chi^2_{0.05} = 3.84$, 符合 3:1 的分离比。这进一步证明 Li_2 突变体中的极短纤维性状是由一对完全显性基因所控制的。2008 年 9—10 月田间调查 ($Li_2 \times$ sub18) F_2 群体的吐絮情况。结果发现, 在 685 株 F_2 分离群体中, 共有 651 株已吐絮, 极短纤维株数与正常纤维株数之比为 415:236, $\chi^2_c = 43.3594 > \chi^2_{0.05} = 3.84$, 不符合 3:1 的分离比。这可能与 Li_2 突变体极短纤维性状对温度敏感有关。根据 2008 年海南南繁的调查结果, 发现有 2 株在 ($Li_2 \times$ sub18) F_2 群体中表现为正常纤维的植株, 在 ($Li_2 \times$ sub18) $F_{2.3}$ 株系中却出现了极短纤维株与正常纤维株的分离 (数据未列出)。鉴于 2 次纤维调查时的温度不同, 作者认为 Li_2 突变体在秋季温度较低时可能长出长纤维, 因而再表现为正常纤维。而这势必也将影响到 ($Li_2 \times$ sub18) F_2 群体中极短纤维株与正常纤维株的实际比例。

2.2 Li_2 基因定位

2008—2009 两年, 本实验室分别用组合 ($Li_2 \times$ 海 7124) F_2 、($Li_2 \times$ sub18) F_2 对 Li_2 基因进行了定位。

2008 年, 从 ($Li_2 \times$ 海 7124) F_2 群体中随机取 40 个单株组成 Li_2 基因的初级定位群体。参照本实

验室海陆种间遗传连锁图谱 Chr 18 上的 SSR 标记信息, 首先进行 Li_2 突变体和海 7124 亲本多态性筛选; 发现各 SSR 引物在两亲本间都有差异。然后每隔 5~10 cM 挑选多态标记对 40 个 F_2 单株的 DNA 进行 PCR 扩增, 鉴定每个个体的标记基因型。通过 Joinmap 作图分析, 初步将 Li_2 基因定位在 NAU 4861 与 NAU 2886 之间。距 NAU 2886 约 4.667 cM, 距 NAU 4861 约 13.299 cM。随后, 进一步在 Chr 18 上挑选标记 NAU 2886、NAU 4861 附近上、下相距 10 cM 内的多态性标记, 继续对所有 F_2 单株进行标记基因型的鉴定。最后, 利用 JoinMap 做图软件将 Li_2 基因定位于 18 染色体端部, 距 Li_2 最近的标记为 Z08, 约 6.051 cM (图 2)。

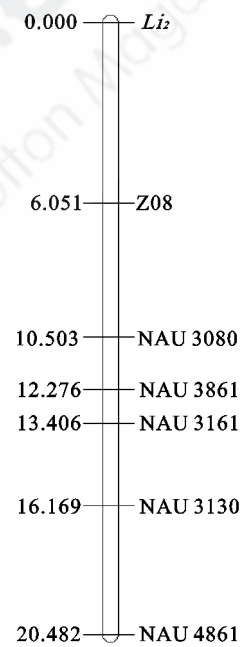


图 2 用 ($Li_2 \times$ 海 7124) F_2 群体定位 Li_2 基因
Fig. 2 Linkage map of Li_2 with ($Li_2 \times$ Hai7124) F_2

2009 年, 从 ($Li_2 \times$ sub18) F_2 群体中随机取 28 个单株组成 Li_2 基因的初级定位群体。用 Li_2 突变体、sub18 2 个亲本对本实验室第 18 条染色体上的所有 SSR 标记进行多态性筛选, 发现各 SSR 标记在 2 亲本间都有差异。然后在第 18 条染色体上平均选取了 23 个 SSR 标记对 28 个 F_2 单株的 DNA 进行 PCR 扩增, 鉴定每个个体的标记基因型。通过 Joinmap 作图分析, 初步将 Li_2 基因定位于 18 染色体端部, 在 NAU 3161 与 NAU 662 之间; 距 NAU 3161 约 2.565 cM, 距 NAU 662 约

9.272 cM。随后,进一步挑选标记 NAU 3161、NAU 662 附近上、下相距 10 cM 内的多态性标记,继续对所有 $(Li_2 \times sub18)F_2$ 单株进行标记基因型的鉴定。最后,利用 JoinMap 做图软件,将 Li_2 基因定位于 18 染色体端部,距 Li_2 最近的标记为 Z08,约 9.266 cM(图 3)。

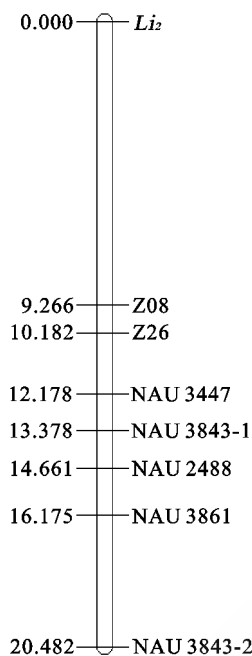


图 3 用 $(Li_2 \times sub18)F_2$ 群体定位 Li_2 基因

Fig. 3 Linkage map of Li_2 with $(Li_2 \times sub18)F_2$

3 讨论

基因的精细定位需要在同质的遗传背景下进行。因此,通常采用近等基因系、剩余杂合体(RHL)等群体进行目标基因的精细定位^[17-18]。在 $(Li_2 \times sub18)F_2$ 群体中,所用的 2 个亲本 Sub18 及 Li_2 突变体均是以陆地棉遗传标准系 TM-1 为背景培育而来的,二者仅在 18 染色体上存在差异,属于同质的遗传背景。这既保证了目标基因所属染色体的海岛棉、陆地棉种间的差异性,可充分利用海、陆种间的遗传图谱信息,又保证了目标基因所属染色体以外的其它遗传背景的相似性,可提高实验的准确性。

另一方面,本实验室 Guo 等在前人的基础上构建了一张包含功能标记最多的高密度遗传图谱^[10],此一标准遗传图谱所用的作图群体为 TM-1 与海 7124 杂交的一个海陆群体。该图谱包含 2247 个位点,覆盖了 3540.4 cM 的遗传距离,标记间的平均遗传距离为 1.58 cM,全部分布于 26

个连锁群上。本研究中所用的 Li_2 突变体具有陆地棉 TM-1 背景,sub18 置换系的第 18 染色体来自海岛棉 3-79^[11]。因此, $(Li_2 \times 海 7124)F_2$ 和 $(Li_2 \times sub18)F_2$ 群体均表现出了海陆杂交的特性。这样,在进行标记筛选的过程中,就可直接参考标准图谱的标记进行筛选。加之根据前人的结论,已经知道 Li_2 基因位于第 18 染色体上^[2],因而只需筛选标准图谱第 18 染色体上的标记即可。这就大大减少了寻找与基因连锁的标记的筛选进程,也省去了利用 NILs 法构建等基因系和利用 BSA 法构建 DNA 池的繁琐性。进一步显示了遗传图谱在实际应用中的优越性。本研究中 2 个大群体最终定位的结果相似,均将 Li_2 基因定位在了第 18 染色体的端部。这一结果与国外 Rong 等用 158 株 $(Li_2 \times Pima S-7)F_2$ 对 Li_2 基因进行定位的结果相似^[4]。本研究中所用的 2 个 F_2 群体更大,所得结果更为可靠,可反映出 Li_2 基因与标记间相对准确的遗传距离。这为 Li_2 基因进一步精细定位打下了基础,也为基于图谱的 Li_2 基因的图位克隆提供了较为可靠的标记信息。

如果有少量分离群体个体的表型鉴定出现错误,将严重影响到目的基因定位的精确度。本研究在 2009 年进行性状调查时发现, $(Li_2 \times sub18)F_1$ 中的表现较为复杂。 F_1 表现为 3 种性状分离:① 植株各部位铃吐絮均不正常,均表现为极短纤维;② 植株某些部位铃吐絮不正常,表现为极短纤维,其余表现正常;③ 与 sub18 的纤维表现相同,植株各部位铃吐絮正常,均表现为正常纤维。根据以前的遗传分析, Li_2 突变体是显性单基因遗传^[1],因此, $(Li_2 \times sub18)F_1$ 的纤维表型理应与 Li_2 突变体的相似,即纤维表现为①或②。第三种表型的出现可能与部分 Li_2 突变体对温度敏感有关。本文 $(Li_2 \times sub18)F_{2,3}$ 株系中纤维的调查结果已经证明了这一现象。这种情形极大地干扰了笔者对 $(Li_2 \times sub18)F_2$ 群体中各单株的棉纤维性状的判断,继而将影响到 $(Li_2 \times sub18)F_2$ 定位的结果。此外,An 等^[19]发现, Li_2 突变体在美国也有同样的表现。

参考文献:

[1] NARBUTH E, Kohel R J. Inheritance and linkage analysis of a

- new fiber mutant in cotton[J]. Journal of Heredity, 1990, 81(2): 131-133.
- [2] KOHEL R J, Stelly D M, Yu J. Tests of six cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutants for association with aneuploids[J]. Journal of Heredity, 2002, 93 (2): 130-132.
- [3] RONG J K, Abbey C, Bowers J, et al. A 3347-locus genetic recombination map of sequence-tagged sites reveals features of genome organization, transmission and evolution of cotton (*Gossypium*)[J]. Genetics, 2004, 166 (1): 389-417.
- [4] RONG J K, Pierce G, Waghmare V, et al. Genetic mapping and comparative analysis of seven mutants related to seed fiber development in cotton[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111 (6): 1137-1146.
- [5] GUO Wang-zhen, Zhang Tian-zhen, Pan Jia-ju, et al. Identification of RAPD marker linked with fertility-restoring gene of cytoplasmic male sterile lines in upland cotton[J]. Chinese Science Bulletin, 1998, 43 (1): 52-54.
- [6] YU J, Kohel R J, Dong J, et al. Toward positional cloning of a major glandless gene in cotton[C]// Proceedings of Beltwide Cotton Conferences. 2000.
- [7] 倪西源, 王学德, 孙志栋. 棉花表型性状基因的 SSR 标记定位[J]. 棉花学报, 2003, 15(6): 357-360.
NI Xi-yuan, Wang Xue-de, Sun Zhi-dong. Molecular mapping of morphological traits with SSR markers in cotton (*Gossypium hirsutum* L.)[J]. Cotton Science, 2003, 15(6): 357-360.
- [8] 王娟, 郭旺珍, 张天真. 渝棉 1 号优质纤维 QTL 的标记与定位[J]. 作物学报, 2007, 33(12): 1915-1921.
WANG Juan, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen. QTL mapping for fiber quality properties in cultivar Yumian 1[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(12): 1915-1921.
- [9] QIAN N, Zhang X W, Guo W Z, et al. Fine mapping of open-bud duplicate genes in homoelogenous chromosomes of tetraploid cotton[J]. Euphytica, 2009, 165 (2): 325-331.
- [10] GUO W Z, Cai C P, Wang C B, et al. A microsatellite-based, gene-rich linkage map reveals genome structure, function, and evolution in *Gossypium*[J]. Genetics, 2007, 176: 527-541.
- [11] 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.
- [12] PATERSON A H, Brubaker C, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(2): 122-127.
- [13] 张军, 武耀廷, 郭旺珍, 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, Guo Wang-zhen, et al. Fast screening of microsatellite markers in cotton with PAGE/silver staining[J]. Cotton Science, 2000, 12(5): 267-269.
- [14] ZHANG J, Guo W Z, Zhang T Z. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. × *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105(8): 1166-1174.
- [15] VAN O, Voorrips R. JoinMap[®] Version 3.0: Software for the calculation of genetic linkage maps[M]. Wageningen, the Netherlands: DLO-Centre for Plant Breeding and Reproduction Research (CPRO-DLO), 2001.
- [16] VOORRIPS R E. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs[J]. Journal of Heredity, 2002, 93(1): 77-78.
- [17] YAMANAKA N, Watanabe S, Toda K, et al. Fine mapping of the *FT1* locus for soybean flowering time using a residual heterozygous line derived from a recombinant inbred line[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110(4): 634-639.
- [18] 范方军, 樊叶杨, 杜景红, 等. 水稻色素原基因 C 的精细定位[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 454-458.
FAN Fang-jun, Fan Ye-yang, Du Jing-hong, et al. Fine mapping of C (Chromogen for Anthocyanin) gene in rice[J]. Chinese Journal of Rice Science, 2007, 21(5): 454-458.
- [19] AN C F, Jenkins J, McCarty J, et al. A typical ligo lintless-2 phenotype in cotton[J]. The Journal of Cotton Science, 2010, 14: 13-16. ●