

## 短季棉早熟性的分子标记及 QTL 定位

范术丽, 喻树迅, 宋美珍, 原日红

(中国农科院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点实验室, 河南 安阳 455000)

**摘要:**以两个陆地棉品种中棉所 36×TM-1 的 207 个 F<sub>2</sub> 单株为作图群体, 筛选出 73 个多态性引物, 25 个 SSR 标记、35 个 RAPD 标记和 13 个 SRAP 标记, 构建了第一张以研究短季棉为主的包含 43 个标记, 标记间的最小遗传距离为 11.8 cM, 最大遗传距离为 48.9 cM, 总长 1174.0 cM 的遗传连锁图谱, 覆盖棉花基因组总长度的 23.48%。检测到与短季棉早熟性状相关的 12 个 QTLs, 其中有 8 个 QTLs 呈簇分布在 LG1 连锁群上, 找到对表型变异的贡献率在 30% 以上与全生育期、霜前花率和开花期有关的 QTL 各 1 个。

**关键词:**短季棉; 早熟性; 分子标记; QTL 定位

**中图分类号:**S562.035.3 **文献标识码:**A

**文章编号:**1002-7807(2006)03-0135-05

## Construction of Molecular Linkage Map and QTL Mapping for Earliness in Short-season Cotton

FAN Shu-li, YU Shu-xun, SONG Mei-zhen, YUAN Ri-hong

(Cotton Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences; Key Laboratory of Cotton Germplasm Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455004, China)

**Abstract:** CCRI 36, a short season cotton variety, and TM-1 were used to create 207 F<sub>2</sub> segregating population in Anyang, Henan. Two parents were used to screen 73 polymorphism markers from 518 pairs of SSR primers, 1200 RAPD primers and 153 pairs of SRAP primers. 207 F<sub>2</sub> populations were tagged and mapped with 73 polymorphism markers, including 25 SSR, 35 RAPD and 13 SRAP markers. 43 of the informative loci were used in linkage map construction and were assigned into 5 linkage groups. The linkage map was composed of 9 SSR loci, 28 RAPD loci and 6 SRAP loci. The total length was about 1174.0 cM, covering 23.48% of the whole cotton genome. The linkage distance ranged from 11.8 cM to 48.9 cM. The marker number associated with a particular group was from 2 to 23 while 30 loci were not linked to the map. 7.16%~39.73% phenotype variance could be explained in the F<sub>2</sub> generation. 12 QTLs were examined, among them 8 QTLs were clustered on the first linkage group according to our study. More than 30% phenotype variance in the F<sub>2</sub> segregation population was explained by 3 QTLs relating to the sowing to boll opening period, and the sowing to flowering period and the percent of pre-frost lint, respectively. The linkage map construction for study on short season cotton, QTLs against earliness mapping and clustering haven't been reported before. The results are valuable to further research for earliness MAS of short season cotton.

**Keys words:** short season cotton; earliness; molecular marker; QTL mapping

分子标记连锁图谱的构建是开展基因定位、图位克隆和分子标记辅助选择等工作的关键技

收稿日期:2005-10-27

作者简介:范术丽(1969),女,副研究员,博士,主要从事短季棉育种研究. fansl@cricaas.com.cn

基金项目:国家 973 项目(2004CB117300)

术。国外利用 2 个陆地棉组合 96 个  $F_{2,3}$  个家系 129 个探针-酶的组合,得到了 138 个 RFLP 位点。其中利用 120 个建立了 31 个连锁群,覆盖了 865 cM,约占整个棉花基因组的 18.6%<sup>[1-2]</sup>。利用陆陆杂种的 119 个  $F_{2,3}$  家系构建的连锁图,包括 81 个位点涉及 17 个连锁群,覆盖了 700.7 cM<sup>[3]</sup>。我国利用陆陆杂交的 152 个  $F_2$  单株,得到 67 个多态性位点,构建了 8 个连锁群,总长为 1337.4 cM,覆盖了 26.75% 的棉花基因组<sup>[4]</sup>。近年来对棉花基因组研究越来越深入,构建的连锁群越来越精密,获得 QTLs 也越多,对棉花育种起的作用越大<sup>[5]</sup>。在对短季棉早熟性的遗传改良上,一般采用缩短生育期,适当延长前期营养生长期,增加光合产物积累,延缓棉株早衰,增加后期光合作用<sup>[6]</sup>。与早熟性有关的诸性状,如生育期、始花期、铃期和果枝始节 4 个性状以加性效应为主,其次为显性效应,不存在加性上位性效应,霜前花率以显性效应×环境互作效应为主,同时存在显著的加性上位效应<sup>[7]</sup>。应用陆陆杂交  $F_2$  和  $F_{2,3}$  群体,筛选出 49 个位点,鉴定出了控制产量性状变异的主效 QTLs<sup>[8]</sup>。但对短季棉早熟及其相关性状的分子标记和 QTLs 的研究未见报道。利用中棉所 36 为研究材料进行早熟性状的 QTLs 分子标记筛选,以鉴定出与早熟性状 QTLs 连锁的分子标记,为早熟性状分子标记辅助选择和短季棉早熟性改良奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 供试材料

利用短季棉中棉所 36 和美国栽培品种遗传标准系 TM-1, 2000—2001 年在中棉所安阳试验地自交,2002 年人工杂交制种,2002 年冬季到海

南加代取得  $F_2$  代种子,2003 年在中国农业科学院棉花所安阳试验地对  $F_2$  代群体 207 个单株进行观察记载,并以这 207 个单株为作图群体并进行 QTL 分析。

应用 518 对 SSR 引物、1200 条 RAPD 引物和 153 个 SRAP 引物组合,对 207 个  $F_2$  代单株进行分子标记和早熟相关性状的 QTLs 定位。

### 1.2 实验及分析方法

DNA 的提取根据棉花核 DNA 的提取及 RAPD 分析一文中提取 DNA 的方法<sup>[9]</sup>,并作了一些优化。

分子标记的命名,以标记的第一个字母表示标记来源,后面的数字表示引物的编号,如 S153 表示该标记是 RAPD 引物,引物编号是 153; SSR121 表示该标记是来源于 SSR 的引物,引物编号是 121; JSP121 表示该标记是来源于 SSR 的引物,引物编号是 121; M2e15 表示该标记来源于 SRAP 中 Em2 和 Me15 的引物组合。

采用 Mapmaker/Exp(Version 3.0) 数据分析软件构建连锁群, LOD 值最小为 3.0,最大遗传距离为 50 cM。利用 WinQTLCart(Version 2.0) 分析软件定位早熟性及其相关性状基因,当似然比大于 13.80 时 (LOD=3.0),认为该区间存在一个 QTL。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本早熟相关性状的表现

从表 1 可知,两亲本中棉所 36 和 TM-1 的全生育期相差 24.5 d,现蕾期相差 5.6 d,开花—吐絮相差 18.6 d,开花期相差 15.1 d,果枝始节相差 3.6 节,衣分相差 7.54 个百分点,且差异均达到极显著水平;而现蕾—开花、株高及铃重差异不显著。

表 1 亲本早熟性状表现

Table 1 Earliness traits of parents

| 材料<br>编号 | 全生育期<br>/d | 现蕾期<br>/d | 开花期<br>/d | 现蕾—开花<br>/d | 铃期<br>/d | 株高<br>/cm | 果枝始节<br>/节 | 开花期<br>/d | 衣分<br>/% | 铃重<br>/g |
|----------|------------|-----------|-----------|-------------|----------|-----------|------------|-----------|----------|----------|
| 中棉所 36   | 107.67     | 33.64     | 58.25     | 24.80       | 49.23    | 60.87     | 4.99       | 58.25     | 42.39    | 5.02     |
| TM-1     | 132.20     | 39.25     | 73.36     | 25.12       | 67.83    | 59.06     | 8.63       | 73.36     | 34.85    | 5.21     |
| $X^2$    | 49.06**    | 11.22**   | 30.22**   | 0.64        | 37.2**   | -3.62     | 7.28**     | 30.22**   | -15.08** | 0.38     |

对  $F_2$  群体相关性状进行正态分布检测以便进行 QTL 定位分析。为了确定性状是否符合正态分布,对各性状进行峰度和斜度计算,衣分、现蕾—开花不符合正态分布,所以对其进行 lg 转换

并用于 QTL 分析。现蕾—开花经转换后仍不符合正态分布,所以未对现蕾—开花进行 QTL 分析(表 2)。

表 2 F<sub>2</sub> 群体性状表现及正态检验

Table 2 Earliness traits of F<sub>2</sub> population and test of normality

| 性状        | 偏度      | 峰度      | 平均数    | 标准差   | 方差     | 变异系数  |
|-----------|---------|---------|--------|-------|--------|-------|
| 果枝始节      | -0.2121 | 0.0187  | 7.25   | 1.59  | 2.54   | 21.98 |
| 铃期        | -0.2371 | 0.3780  | 56.97  | 6.90  | 47.55  | 12.10 |
| 全生育期      | 0.4678  | -0.2988 | 121.26 | 8.01  | 64.12  | 6.60  |
| 开花期       | 0.3149  | -0.2040 | 64.90  | 5.20  | 26.99  | 8.01  |
| 现蕾期       | -0.9191 | 1.8920  | 39.00  | 3.31  | 10.98  | 8.49  |
| 株高        | -0.2371 | 0.3781  | 62.87  | 11.32 | 128.13 | 12.10 |
| 衣分        | -1.4432 | 12.1725 | 38.84  | 4.45  | 19.81  | 11.46 |
| lg(衣分)    | -0.4786 | 1.3539  | 1.587  | 0.046 | 0.002  | 2.908 |
| 铃重        | 0.0507  | 0.0082  | 4.76   | 1.17  | 1.38   | 24.65 |
| 现蕾-开花     | 4.2152  | 29.5442 | 26.36  | 5.73  | 32.84  | 21.73 |
| lg(现蕾-开花) | 1.5264  | 8.7930  | 1.41   | 0.076 | 0.005  | 5.41  |

2.2 亲本间分子标记的多态性筛选及标记分离

利用 CottonDB 数据库的 207 对 SSR 引物和 JESPR 编号的 311 对 SSR 引物,1200 条 RAPD 引物,和 153 个 SRAP 组合对中棉所 36 和 TM-1 两个亲本进行分子标记的多态性筛选,筛选出多态性较好的 SSR 多态性引物 25 对,SRAP 引物

组合 13 个和较稳定的 RAPD 引物 35 个。分别以这 73 个具有多态性的引物进一步扩增了 F<sub>2</sub> 群体所定株调查早熟性状的单株的总 DNA,鉴定出每一个体的标记基因型。

2.3 连锁分析及图谱构建

对检测到的 73 个多态性标记进行作图分析,

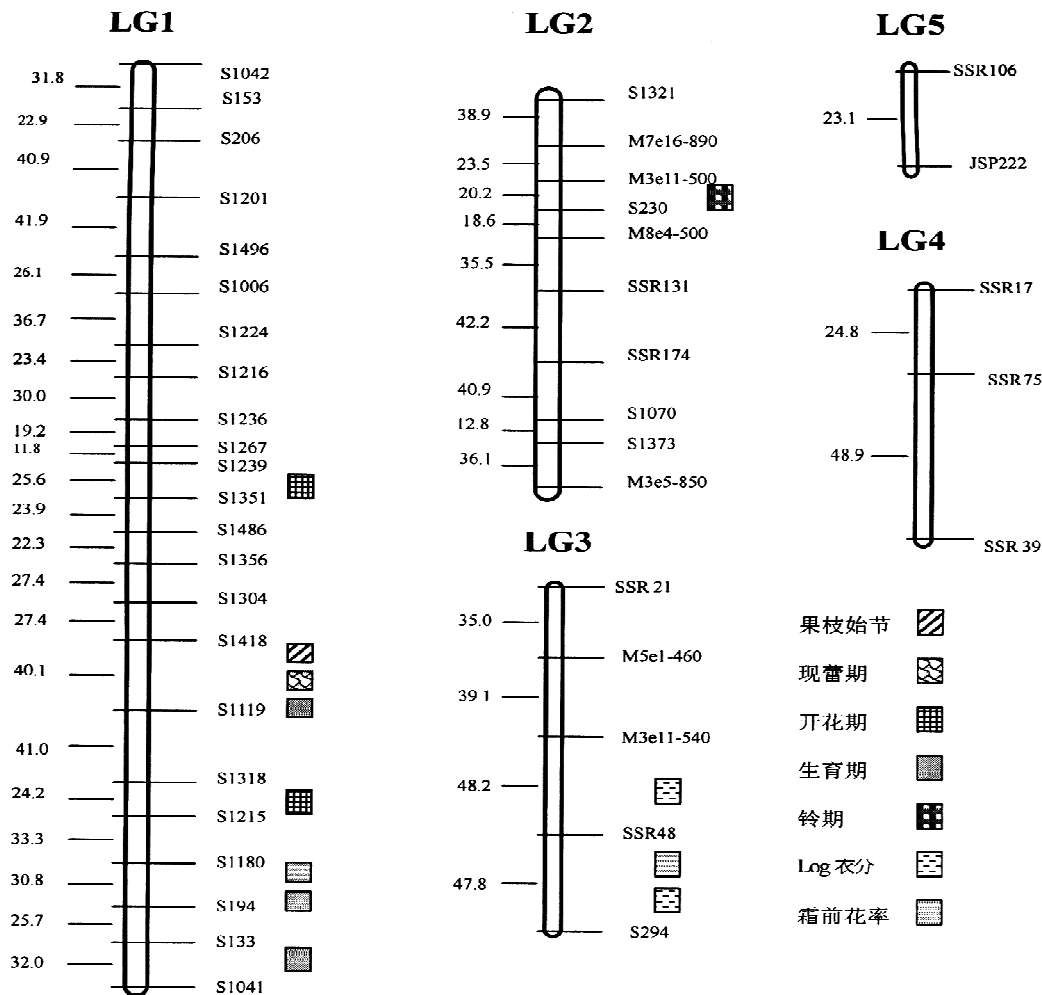


图 1 早熟相关性状的 QTLs 定位各标记的连锁图谱

Fig. 1 Linkage map for SSR, RAPD and SRAP markers with QTL

初步构建了一个包括 43 个位点的分子标记连锁图(图 1)。其中 RAPD 标记 35 个, SSR 标记 25 个, SRAP 标记 13 个。该标记连锁图共有 5 个连锁群( $LOD \geq 3.0$ ), 每个连锁群包含 2~23 个标记。根据连锁群长度从大到小顺序对各连锁群进行命名, 每个连锁群长度在 23.1~638.4 cM, 标记间的最小遗传距离为 11.8 cM, 最大的遗传距离为 48.9 cM, 总长度为 1174 cM, 覆盖棉花基因组总长度的 23.48%。对 43 个标记位点的  $F_2$  分离比例进行  $\chi^2$  测验, 有 78.3% 的标记符合 3:1 或 1:2:1 的分离比例, 其中 M3e5-850、M8e4-500、SSR139、S1070、S1318、S1201、S1496、S294、SSR174 标记存在偏分离。利用 RAPD、SSR、SRAP 标记进行图谱构建工作, 在短季棉上还未见报道。

## 2.4 短季棉早熟相关 QTLs 检测

应用复合区间作图法共检测到 12 个与短季棉早熟相关性状的 QTL ( $LOD \geq 3.0$ ), 分布在 3 个连锁群上, 解析 7.16%~39.73% 的表型变异。其中, 2 个分别与开花期和霜前花率相关且有利于提高早熟性的 QTL, 对表型方差贡献率达到 38.45% 和 39.73%; 5 个分别与果枝始节、现蕾期、全生育期和霜前花率相关且有利于提高早熟性的 QTL, 对表型方差贡献率在 10% 以上。连锁群 LG1 检测到 8 个 QTL, 1 个与果枝始节有关, 1 个与现蕾期相关, 3 个与全生育期相关, 2 个与开花期相关, 1 个与霜前花率相关。QTL 命名原则参考文献[10], 与各性状相关的 QTL 见表 3。

表 3 与短季棉早熟性状相关的 QTL 及其统计特征

Table 3 QTLs mapping for earliness traits on linkage groups

| 性状     | 连锁群 | QTL 位置 | QTL 名称                 | 临近的标记                                  | 标记间距离 | LOD 值 | 加性效应   | 显性效应   | 贡献率   |
|--------|-----|--------|------------------------|--|-------|-------|--------|--------|-------|
| 果枝始节   | 1   | 435.31 | qNFFB1 <sub>-435</sub> | S <sub>1418</sub> -S <sub>1119</sub>   | 40.1  | 6.01  | -1.76  | -0.74  | 10.37 |
| 现蕾期    | 1   | 427.31 | qBD1 <sub>-427</sub>   | S <sub>1418</sub> -S <sub>1119</sub>   | 40.1  | 2.02  | -2.25  | 1.33   | 17.61 |
| 开花期    | 1   | 292.71 | qFD1 <sub>-292</sub>   | S <sub>1239</sub> -S <sub>1351</sub>   | 25.6  | 3.51  | -2.87  | -10.38 | 7.16  |
| 开花期    | 1   | 530.41 | qFD1 <sub>-530</sub>   | S <sub>1318</sub> -S <sub>1215</sub>   | 24.2  | 3.39  | -10.19 | 3.76   | 38.45 |
| 铃期     | 2   | 68.51  | qBOD2 <sub>-68</sub>   | SRAP <sub>415</sub> -S <sub>230</sub>  | 20.2  | 4.84  | -4.62  | 15.02  | 14.27 |
| 全生育期   | 1   | 646.41 | qGD1 <sub>-646</sub>   | S <sub>133</sub> -S <sub>1041</sub>    | 32.0  | 4.22  | 8.59   | -1.07  | 34.74 |
| 全生育期   | 1   | 431.31 | qGD1 <sub>-431</sub>   | S <sub>1418</sub> -S <sub>1119</sub>   | 40.1  | 3.97  | -5.65  | -14.65 | 17.45 |
| 全生育期   | 1   | 573.91 | qGD1 <sub>-573</sub>   | S <sub>1180</sub> -S <sub>194</sub>    | 30.8  | 4.65  | -4.23  | -14.51 | 8.65  |
| 霜前花率   | 1   | 591.91 | qPFLP1 <sub>-591</sub> | S <sub>1180</sub> -S <sub>194</sub>    | 30.8  | 4.71  | -5.78  | 39.52  | 19.64 |
| 霜前花率   | 3   | 140.31 | qPFLP3 <sub>-140</sub> | SSR <sub>18</sub> -S <sub>294</sub>    | 47.8  | 3.70  | -40.87 | 19.95  | 39.73 |
| Log 衣分 | 3   | 134.31 | qLD3 <sub>-134</sub>   | SSR <sub>18</sub> -S <sub>294</sub>    | 47.8  | 5.59  | -2.29  | -4.34  | 13.07 |
| Log 衣分 | 3   | 110.21 | qLD3 <sub>-110</sub>   | SRAP <sub>415</sub> -SSR <sub>18</sub> | 48.2  | 5.17  | -2.20  | -4.14  | 11.79 |

注: NFFB: 果枝始节, GD: 全生育期, LP: Log 衣分, LD: 开花期, BOD: 铃期, BD: 现蕾期, PFLP: 霜前花率。

对未分配到连锁群体的 30 个标记进行了单标记分析(表 4)发现, 有 5 个分子标记 SSR63、SSR1234、SSR63、S495、SRAP107-1990 与开花期、主

茎叶面积和第一次收花率相关分别达极显著水平。随着短季棉连锁遗传图谱分子标记密度的增加, 这些标记可能成为短季棉早熟性的重要分子标记。

表 4 与短季棉早熟性状相关的单标记及其显著性

Table 4 Single marker for earliness traits

| 性状     | marker       | b0      | b1      | LR     | F(1, n-2) | pr(F)   |
|--------|--------------|---------|---------|--------|-----------|---------|
| 开花期    | SSR63        | 6.689   | -0.644  | 7.233  | 7.351     | 0.008** |
| 主茎叶面积  | SSR1234      | 95.282  | 11.618  | 11.441 | 11.878    | 0.001** |
| 主茎叶面积  | SSR63        | 107.344 | -15.133 | 15.56  | 16.499    | 0**     |
| 第一次收花率 | S495         | 6.037   | -2.327  | 7.354  | 7.478     | 0.007** |
| 第一次收花率 | SRAP107-1990 | 5.165   | -2.578  | 8.619  | 8.821     | 0.004** |

## 3 结论与讨论

### 3.1 作图群体较大

以早熟性遗传差异大的品种间杂交群体为作

图群体(207 个  $F_2$  单株), 作图群体单株数量达 200 株以上, 这是以往陆陆杂交作图群体很少达到的<sup>[3-4]</sup>。因此, 在以该  $F_2$  群体构建的连锁图谱中, 分子标记之间的连锁关系更加可靠。

### 3.2 早熟性相关性状成簇分布

以基于 PCR 的标记为基础,初步构建了一张包含 43 个标记,总长 1174.0 cM 的短季棉的遗传连锁图。与以前发表的图谱相比,这是目前以研究短季棉早熟性为主的陆陆杂交的第一张粗略图谱。但利用该图谱可发现早熟性状成簇分布的特点,所研究的早熟相关性状多数分布在第一连锁群,特别是在 S1418-S1119 区间集中分布了全生育期、现蕾期和果枝始节的相关主效 QTL。这结果从分子水平解释了全生育期、现蕾期和果枝始节之间的显著相关关系。本试验通过构建短季棉基因组的连锁群对早熟性状进行定位,而且检测了 QTL 的位置及其遗传效应。收花率及果枝始节相关性状已被定位过,所用的标记均是 RFLP 标记,该标记由于操作复杂,要求高而不易于分子标记辅助选择。而本文用的是基于 PCR 的标记,易于分子标记辅助选择。在所检测到早熟性状的 12 个 QTL 中,有 8 个分布在 LG1 连锁群上,因此应进一步对与早熟相关 QTL 区域进行精细定位,克隆与生育期相关的早熟基因并应用到短季棉早熟性的遗传改良中。

#### 参考文献:

- [1] ZACHARY W, Shappley J N, Jenkies W R, et al. An RFLP linkage map of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 1998 (97): 756-761.
- [2] ZACHARY W, Shappley J N, Jenkies W R, et al. Quantitative trait loci associated with agronomic and fiber traits of upland cotton[J]. The Journal of Cotton Science, 1998(2):153-163.
- [3] 左开井,孙济中,张献龙,等. 利用 RAPD, SSR 和 RFLP 标记构建陆地棉分子标记连锁图[J]. 华中农业大学学报, 2000, 19(3): 190-193.
- [4] Ulloa M, Meredith W R, Shappley Z W, et al. RFLP genetic linkage maps from  $F_2$  populations and a joinmap of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 200-208.
- [5] 郭旺珍,张天真. 棉花基因组育种现状与展望[J]. 棉花学报, 2003, 15(5): 298-303.
- [6] 喻树迅. 我国短季棉 50 年早熟性育种成效研究与评价[J]. 棉花学报, 2005, 17(5): 294-298.
- [7] 宋美珍,喻树迅,范术丽,等. 短季棉主要农艺性状的遗传分析[J]. 棉花学报, 2005, 17(2): 94-98.
- [8] 殷剑美,武耀廷. 陆地棉产量性 QTLs 的分子标记及定位[J]. 生物工程学报, 2002, 18(2): 162-166.
- [9] 沈法富,于元杰,刘凤珍,等. 棉花核 DNA 的提取及其 RAPA 分析[J]. 棉花学报, 1996, 8(5): 246-249.
- [10] RAY J D, Yu L, Mccouch S R, Champoux M C, et al. Mapping quantitative trait loci associated with root penetration ability in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1996, 92: 627-636 ●
- [1] ZACHARY W, Shappley J N, Jenkies W R, et al. An RFLP linkage map of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 1998 (97): 756-761.