

陆地棉抗黄萎病性状的遗传及分子标记研究

葛海燕, 汪业春, 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, 南京 210095)

摘要:以陆地棉抗黄萎病品系常 96 和感病品种军棉 1 号为研究材料, 构建了一个含有 138 个 F_2 单株的作图群体。利用强致病力菌株 VD8 对 P_1 、 P_2 、 F_1 、 $F_{2,3}$ 群体进行营养钵接种, 估算各世代的相对病指。应用主基因-多基因混合遗传模型分析得出该组合的最适遗传模型为 C-0 模型, 即加性-显性-上位性多基因模型。对 1998 对 SSR 引物和 230 对 SRAP 引物进行筛选, 获得 148 个 SSR 和 6 个 SRAP 多态性标记位点, 进一步利用 MAPMAKER 作图软件, 构建了一张含 122 个标记位点的陆地棉杂种遗传连锁图。利用复合区间作图法在第 9 染色体 NAU462-JESPR114 区间内, 检测到 1 个抗黄萎病 QTL, 可解释的表型变异为 13.8%。

关键词: 棉花; 黄萎病; 遗传; QTL 定位

中图分类号: S562.035 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2008)01-0019-04

Inheritance and Molecular Tagging of Resistance against *Verticillium* Wilt in Upland Cotton

GE Hai-yan, WANG Ye-chun, GUO Wang-zhen, ZHANG Tian-zhen*

(State Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Molecular marker-assisted selection was effective to quickly breeding cultivars resistant to *Verticillium* wilt. In this research, the upland cotton strain Chang 96, which is resistant against *Verticillium* wilt, and the susceptible variety, Junmian 1, were used as experimental materials, a tagging population with 138 F_2 individual plants was developed. By artificially inoculating the strongly pathogenic fungi strain to the populations P_1 , P_2 , F_1 , $F_{2,3}$, the relative disease indexes of each generation was estimated. Using the method of the major gene plus polygene mixed genetic model analysis between major gene and multiple genes, the optimum genetic model of that combination was discovered to be C-0 model, i. e., the multiple gene model among additive-dominant-epistatic genes. A total of 1998 pairs of SSR primers, and 230 pairs of SRAP primers were screened, 148 SSR and 6 SRAP polymorphism marker loci were obtained. Furthermore, by utilizing Mapmaker software, a genetic linkage map based on intraspecific F_2 populations with 122 marker loci was constructed. According to the composite interval principle to scan total cotton genome by Mapmaker/QTL program, one resistance QTL was detected and localized on chromosome nine between the interval of the NAU462 and JESPR114, 13.8% phenotypic variance in $F_{2,3}$ of which might be explained.

Key word: cotton; *Verticillium* wilt; inheritance; QTL mapping

棉花黄萎病是世界性的重大病害, 严重危害和阻碍着棉花生产的发展。近年来, 该病在我国广大棉区迅速蔓延, 危害极为严重。选育和利用

抗黄萎病品种是解决这一难题最经济有效的途径。然而, 由于抗黄萎病的遗传机制比较复杂, 棉花黄萎病的发生与多种因素有关, 加之我国高抗

收稿日期: 2006-11-28 作者简介: 葛海燕(1978-), 女, 助教; * 通讯作者, cotton@njau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金(30270806; 30370899); 教育部长江学者与创新团队计划(IRT0432)。

黄萎病的棉花资源缺乏,给黄萎病育种带来了很大的难度。利用分子标记技术,筛选到一个不受环境因子影响,并与我国现有的抗黄萎病种质的抗性基因紧密连锁的分子标记,就可应用于辅助选择抗病育种,以加速抗黄萎病育种的进程。

国内外遗传育种研究人员一直致力于棉花抗黄萎病资源发掘和抗性基因分子标记筛选的研究。Lyon等^[1]利用 AFLP 技术分析得到与主效抗性单基因紧密连锁的两个分子标记。华中农业大学^[2]以高感陆地棉和高抗海岛棉品种杂交,构建 F₂ 作图群体,获得与黄萎病抗性相关的 3 个 QTLs。中国农科院棉花所^[3]以高抗海岛棉和高感陆地棉品种构建 F₂ 群体,采用 BSA 法筛选多态性引物,得到一个与黄萎病抗性有关的 QTL 主效位点,该位点可解释表型变异方差达 50.1%。但是目前所筛选到的抗黄萎病 QTL 主效位点与标记之间的距离相对较远,且抗病 QTL 均来自海岛棉亲本,因此,利用分子标记技术辅助目标基因选择来加速陆地棉抗病育种进程仍有较长距离。

本研究以陆地棉抗病品系常 96 和感病品种军棉 1 号为研究材料构建 F₂ 群体,筛选 1998 对 SSR 引物和 230 对 SRAP 引物,以期直接从陆地棉中获得与黄萎病抗性更紧密连锁的标记,用于标记辅助抗黄萎病育种。

1 材料和方法

1.1 研究材料

常 96 是本室通过多年黄萎病混合病谱选择获得的抗病材料,其相对病指是 17.02。来源于新疆棉区的陆地棉品种军棉 1 号高感黄萎病,其相对病指是 49.98。2004 年配制杂交组合(常 96 × 军棉 1 号)得到 F₁,同年冬天在海南种植 F₁,单株自交产生 F₂ 群体。2005 年在南京农业大学江浦试验站种植双亲、F₁、F₂。获 F₂ 单株 138 株,F₂ 单株自交收 F_{2,3} 的种子。于 2005 年冬天在温室种植 F_{2,3} 家系群,对 F_{2,3} 家系群进行抗病性鉴定,其 F_{2,3} 家系的病指平均值作为相应的 F₂ 单株的病指值。

1.2 研究方法

1.2.1 抗病性鉴定及遗传分析。利用强致病力菌株 VD8 对 P₁、P₂、F₁、F_{2,3} 群体进行营养钵接种。待棉株长到两叶一心时,对各材料用 VD8 黄

萎病菌的分生孢子悬浮液进行接种,浓度为每毫升 5 × 10⁶ 个孢子,每营养钵 20 mL,接种前需搬钵伤根以利于病菌侵染和发病均匀一致。接种后保持棉苗环境温度 23~28℃,以利于发病。接种后 10 d 开始观察棉株发病状况并记录,至 42 d 时统一查苗,确定各单株级别,按照五级分类标准分类,并计算相对病情指数。具体标准参考周兆华^[4]、吴征彬^[5]等方法。

抗病性状的遗传分析参考章元明、盖钧镒等^[6-7]等方法进行。

1.2.2 SSR 标记和 SRAP 标记的筛选。亲本、F₁ 及 F₂ 单株 DNA 提取参考 Paterson 等^[8] CTAB 法,并稍加修改。SSR 标记的 PCR 扩增与 PAGE/银染分析参考张军等^[9]方法进行。

SRAP-PCR 扩增参照林忠旭等^[10]方法进行。凝胶电泳、银染同 SSR 扩增产物检测程序。

利用 1998 对 SSR 引物和 230 对 SRAP 引物对亲本进行多态性筛选,亲本间有差异的引物再对 F₂ 单株进行扩增检测。

1.2.3 遗传连锁图的构建, QTLs 分析及定位。对于多态性的分子标记,利用 MAPMAKER/EXP (Version 3.0b) 构建连锁群, LOD 值最小为 3.0,最大遗传距离为 50 cM。

利用 Mapmaker/QTL (Version 1.1b) 检测 QTLs,将抗黄萎病性状标记到上述连锁群上, LOD 值为 2.0。

与 QTL 相关的连锁群染色体定位参考本单位实验室已构建的异源四倍体棉花的遗传图谱^[11-12]。

2 结果与分析

2.1 棉花抗黄萎病性状的遗传分析

由于 F₂ 群体为暂时性群体,且单株进行抗性鉴定结果易受主观影响,因此本试验利用 F_{2,3} 家系的病指平均值作为相应的 F₂ 单株病指值。利用菌株 VD8 对 P₁、P₂、F₁、F_{2,3} 群体进行温室接种,从而估算出 P₁、P₂、F₁、F₂ 四世代的相对病指。采用 P₁、P₂、F₁、F₂ 四世代的联合分析的方法进行遗传分析。结果表明,该抗病亲本的抗黄萎病性状最适遗传模型为 C-0,即加性-显性-上位性多基因模型。由于该模型无主效基因存在,控制抗病性状的基因效应较小,抗病性状的表现 F₂ 分离世代为单一正态分布或近似为单一正态分布。

2.2 分子标记连锁图谱的构建及黄萎病抗性 QTLs 定位分析

为了进一步利用该群体进行抗病 QTL 的筛选,选用 1998 对 SSR 引物与 230 对 SRAP 引物对其进行 QTL 定位研究。共获得 170 个多态性位点,其中 SSR 位点 164 个,SRAP 位点 6 个。对 170 个多态性位点在 F_2 世代的分离比例进行 χ^2 测验,结果表明,有 16 标记位点不符合 1:2:1 或 3:1 比例,154 个符合孟德尔分离比例。

在 170 个多态性位点中,考虑到偏分离的标记位点有可能会错误连锁,因此在本实验中除去 16 个偏分离的标记位点,用符合孟德尔分离比例的 154 个标记位点进行分子连锁图谱构建。结果表明:122 个标记位点被分配到 33 个不同的连锁群上,32 个标记位点没有分配到连锁群上;其中有 15 个连锁群为 2 个标记,其余 18 个连锁群超过三个标记。33 个连锁群总长度 1172.7 cM,覆

盖 23.5% 的棉花基因组。

运用 Mapmaker/QTL(Version 1.1b)软件,利用复合区间作图法对 F_2 单株的相对病指进行全基因组扫描,在 NAU 462-JESPR 114 区间,检测到 1 个 QTL,定位于第 9 染色体上(图 1)。在 6.4 cM 的标记区间上,该 QTL 距离 NAU 462 标记位点 2.0 cM;可解释的表型变异为 13.8% (表 1)。对 JESPR 114 单标记分析表明, F_2 单株来源于常 96、军棉 1 号和杂种 F_1 特征带的相对病指平均数分别是 37.31、45.66 和 37.50,两亲本之间达到极显著差异。同样对 NAU 462 也进行单标记分析, F_2 单株来源于常 96、军棉 1 号和杂种 F_1 特征带的相对病指平均数分别是 37.35、46.36 和 37.49,两亲本之间也达到极显著差异,杂合体的抗病能力与抗病纯合体相似。说明来源于亲本常 96 的抗性 QTL 能显著降低病指,可以有效减轻黄萎病的危害。

表 1 复合区间作图分析检测到常 96 的抗病 QTL

Table 1 QTL of disease resistance detected by composite interval method in Chang 96

连锁群	区间	长度/cM	位置	LOD	贡献率%	加性效应	显性效应
Chrom9	NAU 462~ JESPR 114	6.4	2.0	2.97	13.8	-0.04	-0.07

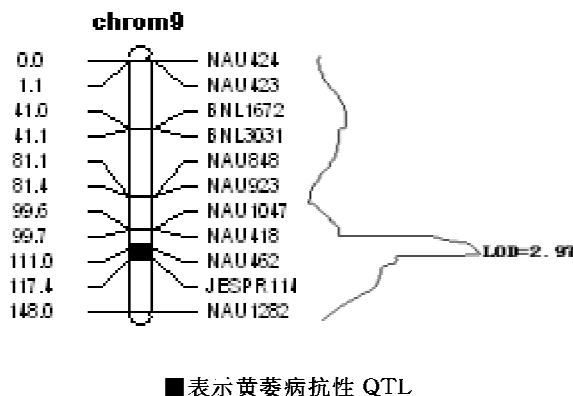


图 1 棉花第 9 染色体分子标记连锁图谱和黄萎病抗性基因 QTL 定位

Fig. 1 Molecular linkage map of cotton on chromosome 9 and QTL mapping related to resistance

3 讨论

对于农艺性状的定位,在抗病性鉴定中,单纯针对一个单株的病级来确定其抗、感类型并不准确,因为单株病级除受本身遗传因素影响外,还容易受到环境、人为等因素的影响,如果影响到病级的形成,就会影响抗、感的比例,致使鉴定的结果不可靠。所以黄萎病抗性基因定位时,采用 F_2 群体不是理想的选择,一般采用 $F_{2:3}$ 家系作为 F_2 单

株的抗病性, $F_{2:3}$ 家系群体可以消除遗传因素外的其它因素对抗性鉴定的影响,使得到的抗性鉴定结果更可靠^[13]。本研究是利用 $F_{2:3}$ 家系群体来判断 F_2 群体单株的抗病性,结果比较可靠。

根据四世代的联合分析,该分离群体呈 C-0 模型遗传方式,即加性-显性-上位性多基因模型,也就是无主基因存在的多基因模型。本研究在构建遗传图谱的前提下,采用复合区间作图法原理,

提高了发现 QTL 的能力,增加了 QTL 作图的准确性和可靠性。但结果只检测到一个 QTL,这可能由于:(1)遗传图谱不饱和。本研究所构建的遗传图谱仅仅覆盖棉花基因组 23.5%,而且标记在图谱上分布不均匀。(2)病菌鉴定和田间调查等因素的误差。病菌的筛选及性状的鉴定受人为、环境因素影响很大,不同人不同年份得出的结果差异也很大。我们将开发更多的分子标记用于该图谱饱和,同时抗病性检测将继续在多环境条件下完成,以揭示多个抗黄 QTL。

已有的很多报道黄萎病的抗性研究争论很大,没有共同结果。一般选用的研究材料是陆地棉和海岛棉的种间杂交,得到的控制黄萎病抗性基因是受主基因控制的。选用陆陆杂交群体,得出的结果可能是受多基因控制的^[14-16]。本实验中所选用的抗病材料常 96 是经过病圃多年选育而成的陆地棉品系,病指在 17 左右达到国家标准抗级以上,不是垂直抗性材料,其抗黄萎病基因可能是微效多基因控制的,这与抗性的遗传分析相符合。本研究获得的来源于常 96 的抗黄萎病 QTL 分子标记将被用于以常 96 为供体的陆地棉抗黄新材料选育。后续试验中,我们将应用本实验室新开发的 SSR 标记,结合 AFLP 标记进行亲本的多态性筛选,进一步加密该连锁图,寻找紧密连锁或共分离的分子标记,以增强分子标记辅助抗黄萎病基因选择的准确性,并为图位克隆该 QTL 奠定基础。

参考文献:

- [1] LYON B R. DNA markers and the molecular breeding of cotton [J]. The Australian Cotton Grower, 1999, 20(5):80-83.
- [2] 高玉千,聂以春,张献龙. 棉花抗黄萎病基因的 QTL 定位[J]. 棉花学报,2003,15(2):73-78.
- [3] 杜威世,杜雄明,马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2004,32(3):20-24.
- [4] 周兆华. 大丽轮枝菌在棉花品种间的致病力分化及有关问题的研究[D]. 南京:南京农业大学,1999.
- [5] 吴征彬,李静,冯纯大,等. 棉花抗黄萎病鉴定技术研究[J]. 湖北农业科学,1999,(5):16-19.
- [6] 章元明,盖钧镒,张孟臣. 利用 $P_1F_1P_2F_2$ 或 $F_{2,3}$ 家系的联合分离分析[J]. 西南农业大学学报,2000,22(1):6-9.
- [7] 章元明. 植物数量性状遗传分离分析法的改进与拓展[D]. 南京:南京农业大学,2001.
- [8] PATERSON A H, Curt L B, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium-spp*) genomic DNA suitable for RFLP and PCR analysis[J]. Plant Mol Bio Reporter, 1993,11(2):122-127.
- [9] 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.
- [10] 林忠旭,张献龙,聂以春,等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建[J]. 科学通报,2003,48(15):1676-1679.
- [11] ZHANG Jun, Guo Wang-zhen, Zhang Tian-zhen, et al. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. \times *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population[J]. Theor Appl Genet,2002,105:1166-1174.
- [12] HAN Zhi-guo, Wang Chang-biao, Song Xian-liang, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 430-439.
- [13] 甄瑞,王省芬,马峙英,等. 海岛棉抗黄萎病基因 SSR 标记研究[J]. 棉花学报,2006,18(5):269-272.
- [14] 杜威世,杜雄明,马峙英. 棉花黄萎病抗性遗传和分子生物学研究进展[J]. 棉花学报,2002,14(5):311-317.
- [15] 齐俊生,马存,赵良忠. 海岛棉品种抗黄萎病遗传规律初步研究[J]. 棉花学报,2000,12(4):169-171.
- [16] 王芙蓉,刘任重,王留明,等. 陆地棉品种抗黄萎病性状的分子标记及其辅助选择效果[J]. 棉花学报, 2007,19(6):424-430. ●