

新疆棉花纤维品质性状的 QTL 分析

艾先涛, 李雪源*, 莫明, 吐尔逊江, 王俊铎, 孙国清, 沙红
(新疆农科院经济作物研究所, 乌鲁木齐 830091)

摘要:以自育高品质中长绒棉品种(新陆中 9 号提高系)9-1696 为母本,与主栽品种中棉所 35 为父本配置单交组合,筛选出 12 对 SSR 引物在 F_2 群体和 B_1 群体进行纤维长度、整齐度、比强度和伸长率 4 个纤维品质性状的 QTL 分析,采用区间作图法($LOD > 2.0$),在 F_2 群体中检测到 6 个与纤维品质性状连锁的 QTL 位点。其中,检测到纤维长度、纤维整齐度、伸长率各 1 个 QTL 位点,比强度检测到 3 个 QTL。在 B_1 群体中检测到 2 个 QTL,分别与比强度和纤维长度连锁。

关键词:陆地棉;纤维品质;SSR;QTL

文献标识码:S562.035 中图分类号:A

文章编号:1002-7807(2008)-06-0473-04

QTL Analysis on Cotton Fiber for Quality Traits in Xinjiang

AI Xian-tao, LI Xue-yuan*, MO Ming, TU Er-xun-jiang, WANG Jun-duo, SUN Guo-qing, SHA Hong
(Economic Crop Research Institute, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi, 830091, China)

Abstract: The parents used are 9-1696 and CCRI 35, that 9-1696 is high quality mid-length fiber cotton by over-breeding and CCRI 35 is major-plant in Xinjiang. Based on the cross and 12 SSR makers information of 180 plants of F_2 population and 135 plants of B_1 population, the inheritance of 4 fiber quality traits were studied by the methods of QTLs. The major results are as follows: Six QTLs were detected and linked to four fiber quality traits by using F_2 population and interval mapping method (at the level of $LOD > 2$). One QTL was linked to Fiber length; three QTLs were linked to strength; one QTL was linked to uniformity, one QTL was linked to elongation. Two QTLs were identified based on B_1 population, and linked to fiber length and strength respectively.

Key words: upland cotton; fiber quality; SSR; QTL

利用分子标记技术对棉花品质性状 QTL 标记是一项十分重要的基础研究工作,国内外学者作了大量相关的研究^[1-5]。棉花是新疆的优势特色主导产业,利用高新技术开展棉花育种是新疆棉花可持续发展的重要技术支撑。本研究对陆地棉高品质纤维基因的分子标记进行筛选,以期鉴定出与纤维品质性状 QTLs 连锁的分子标记,用于对纤维品质性状的分子标记辅助选择育种。

1 材料和方法

1.1 群体构建

以纤维品质性状上差异极显著的自育中长绒棉新陆中 9 号改良稳定系 9-1696 为母本(P_1),中棉所 35 为父本(P_2)配制杂交组合, F_1 自交获得 F_2 群体, F_2 分别与 2 个亲本回交得到 B_1 和 B_2 群体。

1.2 DNA 提取与纯化

分别收取 P_1 、 P_2 、 F_1 、 F_2 、 B_1 和 B_2 六个世代叶片,参照宋国立^[6]法提取和纯化 DNA,只是将叶片用量改为 1 g,并将离心转速改为 $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

1.3 SSR 标记分析

选用 496 对 SSR 引物对亲本进行多态性筛

收稿日期:2007-06-25

作者简介:艾先涛(1979-)男,助理研究员;yixiantao@sina.com; * 通讯作者,yixiantao@sina.com

基金项目:新疆维吾尔自治区“十五”高新技术项目(200311101)

选,用亲本间有差异的 SSR 引物对 F_2 、 B_1 群体的所有单株进行 PCR 扩增和电泳检测。PCR 反应体系为 $10 \mu\text{L}$: $10\times$ buffer(20 mmol MgCl_2) $1 \mu\text{L}$, dNTPs($10\times 10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $0.5 \mu\text{L}$, 正反向引物($5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)各 $0.6 \mu\text{L}$, Taq 酶($2 \text{ U}\cdot\mu\text{L}^{-1}$) $0.25 \mu\text{L}$, 30 ng 模板 DNA, 不足部分由 ddH_2O 补充。在 Biomtra PCR 仪上进行扩增。SSR 扩增程序为: 95°C 3 min ; 94°C 45 s ; $50\sim 55^\circ\text{C}$ 45 s ; 72°C 1 min ; 30 个循环; 然后 72°C 7 min ; 4°C 保温备用。

扩增反应在 Biomtra PCR 扩增仪上进行。PCR 扩增产物用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶在 $1\times$ TBE 缓冲液中电泳, 150 V 稳压 4 h , 银染检测。

1.4 性状考察

分单株收获霜前花测定纤维品质, 纤维品质由农业部纤维品质监督检验测试中心利用 HVI900 仪测试完成, 包括上半部平均长度、比强度、整齐度、麦克隆值和伸长率等指标。

1.5 目标性状极值库的建立

据 Michelmore 提出的 BSA 方法, 分别选取 F_2 群体中品质性状极端表现的一定数目单株, 提取 DNA 并等量混合组成各对极值 DNA 混合池。

1.6 QTL 定位

利用 MAPMAKER/EXP Version 3.0 b、MAPMAKER/QTL VERSION 1.1b^[7] 和 Window QTL cartographer version 2.0 软件的单标记分析、区间作图、复合区间作图法来进行 QTL 定位。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性筛选

选用 496 对 SSR 引物在 9-1696 和中棉所 35

两亲本间进行多态性筛选, 检测到 12 对多态性 SSR 引物, 其中 6 对是共显性标记, 有 6 对是显性标记。

2.2 遗传连锁图谱构建

2.2.1 基于 F_2 群体连锁图谱构建。 用 MAPMAKER/EXP VERSION 3.0 b 对 F_2 群体分子数据进行连锁群分析。因为 12 对有多态性的 SSR 引物中部分标记是显性标记, 所以 12 对引物全部检测。在 F_2 群体中, 13 个多态性位点的分离比例经 χ^2 测验(表 1), 全部符合正常分离比例。经连锁分析, 得到 4 个连锁群, 并且 13 个标记全部进入连锁群。连锁图谱总长 117.3 cm , 标记间平均距离为 9.02 cm 。

2.2.2 基于 B_1 群体连锁图谱构建。 在 B_1 群体中, 10 个标记用于连锁分析, 这些标记在 B_1 群体中的分离比例经 χ^2 测验(表 2), 全部符合正常分离比例。经连锁分析, 得到 3 个连锁群, 有 8 个标记进入连锁群(图 2)。连锁图谱总长 151.4 cm , 标记间平均距离为 18.93 cm 。

2.3 品质性状 QTL 分析

2.3.1 t 测验法。 利用 Window QTL cartographer version 2.0 软件的单标记分析法在 F_2 群体上进行 QTL 检测(表 3)。结果表明, 11 个标记与纤维品质性状连锁, 5 个标记与纤维长度连锁, 其中标记 H1511 解释纤维长度的变异最大, 达到 10.7% , 其余 4 个标记解释变异非常小。整齐度检测到 2 个标记与之连锁, 但解释其变异都很小, 解释变异最大的标记是 H177, 达到 5.7% 。比强度有 9 个标记与之连锁, 其中标记 H129 解释其变异最大, 达到 12.7% 。伸长率有 3 个标记与之连锁, 解释其变异最大的标记是 H275, 达 13.1% 。

表 1 SSR 分子标记在 F_2 群体中分离比例的 χ^2 测验*

Table 1 χ^2 test of SSR of separate ratio among F_2 population

标记	A	B	H	C	D	χ^2
H55	41	36	99	-	-	3.03
H95	42	49	89	-	-	0.57
H101	42	-	-	134	-	0.205
H103	38	-	-	140	-	1.08
H111	47	40	92	-	-	0.687
H129	42	-	-	138	-	0.185
H1511	-	42	-	-	136	0.12
H1512	46	-	-	133	-	0.02
H177	-	42	-	-	135	0.05
H161	42	45	93	-	-	0.32
H211	42	46	93	-	-	0.31
H275	-	47	-	-	127	0.28
H363	52	44	84	-	-	1.51

* $\chi^2_{0.051}=3.84$ $\chi^2_{0.052}=5.99$

表 2 SSR 分子标记在 B₁ 群体中分离比例的 χ^2 测验*
Table 2 χ^2 test of separate ratio of SSR in B₁ population

标记	A	H	χ^2
H55	58	72	1.3
H95	72	62	0.61
H101	58	78	2.82
H103	68	61	0.279
H111	70	61	0.49
H129	62	66	0.07
H1512	69	62	0.275
H161	57	78	2.96
H211	71	65	0.184
H363	69	66	0.03

* $\chi_{0.051}^2=3.84$

表 3 单标记与性状连锁 t 测验的概率 P 及其决定系数 R²
Table 3 probability P and its decided coefficient of t test by single mark and trait linkage

标记	纤维长度		整齐度		比强度		伸长率	
	P	R ²	P	R ²	P	R ²	P	R ²
H55			0.008	0.0146				
H103	0.042	0.0314			0.009	0.0804	0.0008	0.076
H111	0.0095	0.0018			8.16E-07	0.0149		
H129					6.64E-05	0.127		
H1511	0.001	0.107						
H1512					0.02	0.032		
H177			0.0066	0.057	0.0005	0.062		
H161	5.09E-06	0.042			0.015	0.011		
H211	2.94E-05	0.042			0.004	0.043		
H275					0.006	0.049	0.0002	0.131
H363					0.001	0.015	6.98E-06	0.023

表 4 DNA 混合池中各纤维品质性状的平均值
Table 4 Average value of all fiber traits in DNA mixed pool

性状	低 值 库		高 值 库	
	株数	平均值±标准差	株数	平均值±标准差
纤维长度/mm	10	27.94±0.183	10	33.53±0.097
整齐度/%	11	83.87±0.265	10	87.87±0.099
比强度/(cN·tex ⁻¹)	10	27.41±0.255	10	34.49±0.292
伸长率/%	10	6.70±0.063	10	8.06±0.016

2.3.3 区间作图法。用 Mapmaker/QTL VER-SION 1.1b 程序中区间作图法进行分析。

基于 F₂ 群体的 QTL 定位(表 5)。基于 B₁ 群体的 QTL 定位(表 6)。

2.4 F₂ 和 B₁ 两个分离群体 QTL 定位比较

从总体看出, F₂ 群体定位到的 QTL 数目比使用 B₁ 群体多, 在分别使用两个群体构建的连锁图谱中, 标记之间的连锁关系基本相同, 检测到的 QTL 具有一定的一致性。从单个性状来看, 对于纤维长度, 使用 F₂ 群体定位到一个 QTL, 在标记 H211 和 H1511 之间, 与标记 H211 连锁; 而 B₁ 群体仅定位了一个 QTL, 在标记 H161 和 H211

2.3.2 BSA 法。在 F₂ 群体中, 根据四个纤维品质性状的表型值, 构建了 4 对性状极值 DNA 混合池, 每个 DNA 混合池由 10 个单株的 DNA 均等混合, 池间差异见表 4。12 对 SSR 引物中仅有 3 对在构建的性状极值 DNA 混合池间检测时有差异, 标记 H111、H1511 和 H275 分别在比强度、纤维长度和伸长率的 DNA 混合池间存在差异, 说明这三个标记可能分别与控制纤维比强度、纤维长度和伸长率性状的基因连锁。整齐度表型值构建的 DNA 混合池间, 未检测到有多态性的标记。

之间, 也与标记 H211 连锁。由此可见, 在两个定位群体中都被检测到标记 H211 与控制纤维长度的 QTL 连锁。对于比强度, F₂ 群体定位了 3 个 QTL, 其中一个 QTL 解释 F₂ 群体表型变异的 20.8%, 可看作是比强度的主效 QTL。该 QTL 在标记 H129 和 H111 之间, 与标记 H111 连锁; 使用 B₁ 群体检测到 1 个 QTL, 解释 B₁ 群体表型变异的 11.1%, 同样该 QTL 与标记 H111 连锁。由此可见, 在两个定位群体中都被检测到标记 H111 与控制比强度的 QTL 连锁。对于整齐度和伸长率两个品质性状来说, 使用 F₂ 群体对这两个纤维品质性状各检测到 1 个 QTL, 而使用 B₁ 群体没有检测到 QTL。

利用 B₁ 群体做连锁分析时, 标记 H103 没有进入连锁群, 因此对该标记在 B₁ 群体中作单标记 t 测验分析, 结果是标记 H103 与比强度性状连锁, 能解释其表型变异 9.18%。该标记在 F₂ 群体中进行的单标记 t 测验分析, 也与比强度性状连锁, 能解释 F₂ 群体表型变异的 8.04%。因此可以推断该标记与控制比强度性状的 QTL 连锁。

表5 区间作图 QTL 定位结果 (LOD>2.0) (F₂ 群体定位结果)

Table 5 the orientated result of QTL in interzone construct

性状	区间	距离(cM)	QTL 位置	加性	显性	LOD	解释变异
纤维长度	H211-H1511	5.3	4.0	-1.0065	-0.1199	4.58	17.6%
整齐度	H55-H177	20.2	18.0	-0.6802	-0.2979	3.66	16.8%
比强度	H129-H111	11.2	6.0	-1.3148	-0.2211	6.19	20.8%
比强度	H363-H103	14.0	12.0	-1.0238	-0.1287	3.07	11.8%
比强度	H211-H1511	5.3	4.0	-0.8760	-0.6158	2.29	10.3%
伸长率	H275-H363	4.7	2.0	0.4015	-0.0721	5.11	18.9%

表6 区间作图 QTL 定位结果 (LOD>2.0) (B₁ 群体定位结果)

Table 6 Orientational result of QTL in interzone drawing

性状	区间	距离(cM)	QTL 位置	加性	LOD	解释变异
纤维长度	H161-H211	26.3	8.0	-1.5866	9.32	31.1%
比强度	H55-H111	35.0	28.0	-1.3737	2.50	11.1%

3 结论

3.1 QTL 定位方法

本研究利用四种方法同时进行 QTL 定位。在单标记的 t 测验法进行 QTL 分析,初步确定标记与纤维品质性状的 QTL 连锁关系。利用 BSA 方法,检测到了三个标记与纤维品质性状连锁,且这三个标记在区间作图法和复合区间作图法中也被检测到与纤维品质性状连锁,并能解释较大的遗传变异。采用复合区间作图法,其所得结果与区间作图法基本一致。在用 BSA 法中筛选到的与纤维品质性状 QTL 连锁的分子标记 H111、H1511 和 H275,在 t 测验中均达到了极显著水平。在区间作图法中,标记 H111 与比强度的一个 QTL 连锁。标记 H1511 与纤维长度的一个 QTL 连锁。标记 H275 与伸长率性状的一个 QTL 连锁。另外在 t 测验和区间作图法和复合区间作图法检测到了一些效应较小的 QTL,并通过区间作图法估计出了 QTL 的位置及效应大小。

3.2 棉花纤维品质性状的 QTL 定位

用 F₂ 群体的 180 个单株和 B₁ 群体的 135 个单株作为 QTL 定位群体,结果表明,F₂ 群体与 B₁ 群体建立的连锁图谱基本一致,并与张军^[8]构建遗传图谱进行比对。发现在 F₂ 群体或 B₁ 群体构建的连锁图谱中,第一连锁群上的分子标记位于第十号染色体上。在 F₂ 群体中定位了 6 个 QTL,其中与纤维长度性状连锁的有 1 个 QTL,与比强度性状连锁的有 3 个 QTL,与整齐度、伸长率性状连锁的各 1 个 QTL。在 B₁ 群体中定位了 2 个 QTL,分别与纤维长度和比强度连锁。没有检测到与整齐度和伸长率连锁的 QTL,是因为在 F₂ 群体中检测到的与整齐度和伸长率的 QTL

连锁的分子标记没有在 B₁ 群体中使用。对于纤维长度性状来说,在 F₂ 群体中检测到的与之连锁 QTL 与在 B₁ 群体中检测到的不同,但都与标记 H211 连锁。同样对于比强度性状来说,在两个定位群体中都检测到标记 H111 与纤维比强度的 QTL 连锁,并且该 QTL 能较大的解释群体遗传变异。从 F₂ 群体和 B₁ 群体定位到的 QTL 解释变异的大小来看,说明纤维品质性状存在主基因控制,这与前人研究得到的纤维品质性状普遍存在主基因控制的结果相同。

参考文献:

- [1] 左开井,孙济中,张献龙,等. 利用 RFLP、SSR 和 RAPD 标机构建陆地棉分子标记连锁图谱(英)[J]. 华中农业大学学报,2000,19:190-193.
- [2] 袁有禄,张天真,郭旺珍,等. 棉花高品质纤维性状 QTLs 的分子标记筛选及其定位[J]. 遗传学报,2001,28(12):1151-1161.
- [3] 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.
- [4] 袁有禄,张天真,郭旺珍. 棉花纤维品质性状的遗传稳定性分析[J]. 棉花学报,2002,14(2):67-70.
- [5] 袁有禄. 陆地棉优质纤维品质性状遗传与分子标记[D]. 南京:南京农业大学,2002.
- [6] 宋国立,崔荣霞,王坤波,等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. 棉花学报,1998,10(5):273-275.
- [7] LANDER E S, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative trait using RFLP linkage maps[J]. Genetics,1989, 121:185-199.
- [8] 殷剑美,武耀廷,张 军,等. 陆地棉产量性状 QTLs 的分子标记及定位[J]. 生物工程学报,2002,18(2):162-166.