

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.01637

中棉所 12 及其选系配制的 4 个杂交棉幼苗期基因差异表达

朱新霞^{1,2} 朱一超¹ 艾尼江¹ 刘任重¹ 张天真^{1,*}

¹ 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; ² 石河子大学生命科学院, 新疆石河子 832000

摘要: 以中棉所 12 及其 2 个选系为亲本组配的 4 个杂交棉中棉所 28、中棉所 29、湘杂棉 2 号和冀棉 18 苗期的根和顶端叶为研究材料, 采用 cDNA-AFLP 技术分析苗期杂交棉与亲本的根和叶基因差异表达, 并用 Quantitative Real-Time 技术加以验证。结果表明: (1) 在 4 个杂交组合中, 中棉所 12 选系是营养生长杂种优势高值亲本; (2) 杂交种和亲本间存在显著的基因表达差异, 可分为杂交种上调、单亲显性、单亲沉默、杂交种下调 4 种表达型。4 个杂交组合在三叶期根和叶中差异表达基因的 4 种类型比例趋势基本一致, 单亲差异表达型(包括显性和沉默表达)在根和叶中所占比例较高, 杂种下调表达型所占比例较低, 反映出苗期单亲差异表达型在杂种优势形成中起主要作用; 叶部差异表达基因数目和比例(29.20%~46.09%)比根(15.65%~22.49%)高的多, 说明叶中基因差异表达可能比根中基因差异表达对杂种优势形成作用更大; (3) 高值亲本中棉所 12 选系与杂交棉共同表达的基因多于低值亲本与杂交棉共同表达的基因, 从分子水平上证明中棉所 12 选系在杂交棉冀棉 18、中棉所 29 和中棉所 28 的苗期营养生长杂种优势产生中起优势亲本的作用; (4) 4 种杂交组合差异表达基因(包含叶和根)占总表达基因的 27.00%~34.56%, 分析差异表达基因类型和 4 个杂交组合的关系发现, 超显性效应占 3.30%~7.17%, 超亲效应占 2.62%~4.14%, 低亲效应占 5.65%~13.03%, 显性效应和加性效应是主要的杂种优势效应, 占 79.52%~83.79%。多种杂种优势效应的并存说明杂种优势可能是多基因共同作用产生多种效应的结果; (5) 超亲优势组合中棉所 28 的超显性效应占 7.17%, 明显高于其他 3 个表现中亲优势组合, 说明杂交种上调表达型可能对苗期杂种优势产生起重要作用。

关键词: 中棉所 12; 杂交棉; 基因差异表达

Gene Differential Expression at Seedling Stage in Four Cotton Combinations Hybridized by CRI-12 and Its Pedigree-Derived Lines

ZHU Xin-Xia^{1,2}, ZHU Yi-Chao¹, AI Ni-Jiang¹, LIU Ren-Zhong¹, and ZHANG Tian-Zhen^{1,*}

¹ National Key Laboratory of Crop Genetics & Germplasm Enhancement / Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ² College of Life Science, Shihezi University, Shihezi 832003, China

Abstract: CRI-12, an Upland cotton variety with high yield, elite fiber quality and disease resistance, is characterized by its high heritability, combining ability, and genetic stability. CRI-12 and its pedigree-derived lines were used to develop high heterosis cotton hybrids, such as Zhongmiansuo 28, CRI-29, XZM2, and Jimian 18. The roots and leaves at seedling stage of these hybrids and their corresponding parents were sampled for cDNA-AFLP analysis and validation by Quantitative Real-Time PCR. The results were as follows: (1) CIR-12 played a predominant role in the heterosis of vegetative growth in CRI-28, CRI-29, and Jimian18 at seedling stage. (2) Four differential expression types were detected between the hybrid and its parents: I. Up expression only showed in hybrid but not in both parents; II. Dominant expression showed in one of the parents but not in F₁ and another parent, including the expression pattern in female parent and hybrid not in male parent, and the expression pattern in male parent and hybrid not in female parent; III. The gene silenced in one of the parents, including the expression pattern in male parent not in hybrid and female parent and the expression pattern in female parent not in hybrid and male parent; IV. Down expression showed in both parents but not in the F₁ generation. The tendency of proportion in four types was consistent and showed a high ratio in dominant expression and silencing in single parent, but a low ratio in down expression in roots and leaves of hybrids. The type expressed only in one parent and F₁ or only in one parent played main role in heterosis. Differential expression genes in leaves and

本研究由国家重点基础研究发展规划(973)项目(2006CB101708)和高等学校创新引智计划(B08025)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张天真, E-mail: cotton@njau.edu.cn; Fax: 025-84395307

第一作者联系方式: E-mail: zhuxxshz@126.com

Received(收稿日期): 2008-12-09; Accepted(接受日期): 2009-04-24.

roots accounted for 29.20–46.09% and 15.65–22.49%, respectively. The differential expression genes in leaves were more than those in roots, indicating that some genes play more important roles for heterosis than these in roots. (3) Genes co-expressed between hybrids and high value parent CRI-12 and/or its derived lines were much more than those between hybrids and the relative low value parents, indicating that CIR-12 plays a predominant role in the expression of genes responsible for heterosis in CRI-28, CRI-29, and Jimian 18 at seedling stage. (4) Differentially expressed genes in the four hybrids accounted for 27.00–34.56% of total genes detected. Further analysis revealed that the main modes of gene action involved in hybrids were additive and dominant effects accounting for 79.52–83.79%, and the effect of over-dominance accounting for 3.30–7.17%, under-dominance effects accounting for 2.62–4.14% and low-parent dominance effects accounting for 5.65–13.03%. All possible modes of gene action co-existed supported the hypothesis of multiple gene mechanisms contributed to heterosis. (5) The over-dominance effect in CRI-28 which express high parent was 7.17%, which was higher than that in other three middle heterotic crosses at three earlier growing stages. The result suggests that the differential expression type expressed only in F_1 play an important role in heterosis of vegetative growth.

Keywords: CRI-12; Hybrid cotton; Differential expression gene

两个基因型不同的亲本杂交, F_1 代产生杂种优势, 尽管杂种一代的所有基因均来自两个亲本, 其性状表现却与亲本不同, 尤其是杂种一代的一些重要经济性状表现出超亲优势, 其在表型上的变化可能与杂种、亲本之间基因表达上的差异有关^[1-2], 即基因表达方面存在的差异^[3]是导致产生杂种优势的重要原因。

中棉所 12 是以乌干达 4 号为母本与邢台 6871 杂交, 选其优系于枯、黄萎病圃连续定向选择多系混合而成^[4], 是我国首次攻克抗病、高产、优质三者不易结合的难关而育成的优质、抗病、高产品种, 成为我国育成品种中推广面积最大、应用时间最长、适应性最广、经济效益和社会效益最高的品种。该品种不但各主要农艺性状组合较好, 而且具有较强的遗传力、配合力和遗传稳定性。至 2002 年, 直接利用中棉所 12 作亲本, 先后育成品种(系) 84 个, 其中国家和省级审定品种 36 个, 杂交棉 7 个, 抗虫棉品种 6 个, 表现高产优势, 作为棉花育种的种质材料, 显示了巨大的应用价值^[5]。目前关于杂交棉和中棉所 12 选系的大量研究主要集中在遗传育种和生理生化方面, 分子水平探讨中棉所 12 作为杂交种选育的骨干亲本的研究鲜见报道, 随着分子生物学研究手段的日益提高和完善, 从分子水平上探讨中棉所 12 在杂交棉杂种优势产生中的作用具有重要意义。

cDNA-AFLP 是在转录水平研究基因差异表达的有效技术之一, 具有灵敏度高、重复性好的特点^[6]。高丰度表达的基因转录本经 cDNA-AFLP 扩增后条带的强弱能定性地直接反映出基因表达量的差异, 得到的转录衍生片段(trivially distributed file system, TDFs)可最大限度地提供基因编码区的信息^[7], 作为一种研究基因差异表达的高通量技术, 因其可对基因表达状况进行系统筛选、阳性率高而被许多研究者采用。

杂种优势可以表现在植物生长和发育的各个阶段。在苗期杂交棉与常规棉品种相比, 表现为棉苗长势强、株高日增量大、出叶速度快、叶面积大, 有较强的营养生长优势。邢朝柱等^[8]用 DDRT-PCR 技术分析了中棉所 47 与亲本苗期根、叶基因表达差异和产量性状及苗期基因表达差异与产量性状优势之间的关系, 发现苗期单亲基因表达一致型可能对杂交种后期单株成铃数的增加有较大的贡献, 苗期基因表达差异与杂种优势的形成存在着密切关系。本研究运用 cDNA-AFLP 技术, 对杂交棉与亲本在苗期不同组织(根和叶片)基因表达模式及苗期基因表达差异与营养生长杂种优势进行分析, 以期研究优势亲本在杂种优势中的重要作用和基因功能与杂种优势的关系提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以中棉所 12 及其 2 个选系为亲本与其他 4 个材料组配的 4 个杂交棉中棉所 28(中棉所 12×中 4133), 中棉所 29 (P_1 ×中 422-RP4), 湘杂棉 2 号(中棉所 12 系选×8891), 冀棉 18(56 系×石 711-22)共 11 个材料^[9]苗期的根和顶端叶为研究材料。2007 年 4 月, 7 个亲本和 4 个杂交棉各在人工气候箱育苗 20 株, 采用透明营养钵, 内装珍珠岩和蛭石, 16 h 光照/8 h 黑暗, 3 片真叶平展时, 将植株地上部分和地下部分分别在 80℃烘 72 h 后测定干重, 计算杂种优势(中亲优势、对照优势), 中亲优势(%)=(F_1 -双亲平均)/双亲平均×100, 对照优势(%)=(F_1 -对应亲本中棉所 12 选系)/对应亲本中棉所 12 选系×100。同时取其幼苗期(三叶期)顶端平展叶及幼苗期根提取 RNA。

1.2 总 RNA 提取和纯化

参照蒋建雄等^[10]的方法, 以 1.0%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测 RNA 质量、纯度及其含量。

1.3 cDNA 合成及模板制备

以提取的总 RNA 为模板, 用 M-MLV 反转录酶合成第一链 cDNA, 再以第一链 cDNA 为模板按 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit [宝生物工程(大连)有限公司]手册方法合成 cDNA 第二链。

1.4 cDNA-AFLP

参照 cDNA-AFLP 程序^[7], 用限制性内切酶 *Mse*I 和 *Eco*RI 消化等量的双链 cDNA, 然后与两种接头连接, 以 M0 和 E0 为引物进行预扩增, 将预扩增产物稀释 20 倍后用含有 2 个选择性碱基的引物(E1-16, M1-16)进行选择扩增, 产物经 6.0%聚丙烯酰胺凝胶电泳、硝酸银染色。所用引物为 M0 5'-GATGAGTCTAGAACGGT-3'; E0 为 5'-GACTGCGTACCAATCA-3'; M1-16 为 5'-GATGAGTCTAGAACGGTNN-3'; E1-16 为 5'-GACTGCGTACCAATTCANN-3'(N 为任一碱基)。PCR 扩增程序为 94℃ 4 min; 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 60 s, 12 个循环, 每个循环递减 0.7℃, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 60 s, 23 个循环。

1.5 cDNA 扩增产物的分离和克隆

从聚丙烯酰胺凝胶上切下具有明显多态性的条带, 加入 50 μ L ddH₂O, 100℃水浴 10 min。取 2 μ L 上清液作为模板, 用与选择性扩增相同的引物进行 PCR, 扩增条件为 94℃ 2 min; 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 72℃延伸 8 min。用 1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物的真实性。

参照 Sambrook 等^[11]的方法, 用 pMD18-T Clone kit [宝生物工程(大连)有限公司]克隆差异片段。取 3 μ L 二次扩增产物和 pMD18-T 载体 16℃连接过夜, 然后将 5 μ L 连接产物转化到 50 μ L 大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 将转化后的感受态细胞均匀涂到含 X-gal 和氨苄青霉素的 LB 固体培养基上, 37℃倒置培养过夜。挑取白色菌落于 3 mL LB/氨苄青霉素液体培养基中, 37℃ 180 r min⁻¹振荡培养 5 h, 采用引物扩增方法进行鉴定, 将阳性克隆送金思特(南京)公司测序。用 DNASTar 软件去除载体后, 采用 NCBI 网站的 Blastx 和 Blastn 对测序结果进行同源性比对。

1.6 q-PCR 验证

为了验证 cDNA-AFLP 结果, 采用 q-PCR 进行验证。RNA 提取和纯化方法同上, 将 2 μ g RNA 用 M-MLV 反转录酶(TaKaRa)反转录合成 cDNA。qRT-PCR 用 SYBR Green dye (BIORAD)在 iCycler iQ5 detection system (BIORAD, München, Germany) 反应, 每个样本重复 3 次, *EF1 α* 作为内标, 用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$

方法^[12](Livak 等)计算每个基因转录量。qRT-PCR 扩增程序为 95℃ 3 min; 95℃ 10 s, 56℃ 30 s, 72℃ 40 s, 40 个循环; 72℃ 10 min。

2 结果与分析

2.1 4 个杂交棉苗期营养生长杂种优势的表现特性

表 1 表明, 冀棉 18、中棉所 29、湘杂棉 2 号 3 个杂交棉表现正向超中亲优势, 中棉所 28 杂交棉表现超亲优势。其中冀棉 18 P₁ 的地上部分干物质重量比冀棉 18 P₂ 高 64.73%, 比冀棉 18 高 22.92%, P₁ 的地下部分干物质重量比 P₂ 高 54.00%, 比冀棉 18 高 8.41%, 是冀棉 18 的高值亲本; 中棉所 29 P₁ 的地上部分干物质重量比中棉所 29 P₂ 高 12.75%, 比中棉所 29 高 5.02%, P₁ 的地下部分干物质重量比 P₂ 高 34.22%, 比中棉所 29 高 13.32%, 是中棉所 29 的高值亲本; 中棉所 28 P₁ 地上部分干物质重量比中棉所 28 P₂ 低 0.89%, 比中棉所 28 低 19.03%, P₁ 的地下部分干物质重量比 P₂ 高 35.74%, 比中棉所 28 低 4.67%, 是中棉所 28 的高值亲本。

湘杂棉 2 号 P₁ 的地上部分干物质重量比湘杂棉 2 号 P₂ 低 5.17%, 比湘杂棉 2 号低 5.02%, P₁ 的地下部分干物质重量比 P₂ 低 19.73%, 比湘杂棉 2 号低 12.38%, 是湘杂棉 2 号的低值亲本。即在 4 个杂交组合中, 中棉所 12 选系在冀棉 18、中棉所 29 和中棉所 28 中是高值亲本, 对这 3 个杂交棉的杂种优势的产生起重要的作用。

杂交棉冀棉 18 和中棉所 29 与相应亲本中棉所 12 选系相比优势(对照优势)都是负值, 杂交棉中棉所 28 和湘杂棉 2 号与相应亲本中棉所 12 选系相比优势都是正值, 其中, 中棉所 28 与相应的亲本中棉所 12 选系相比表现出超亲优势, 同为中亲优势表现的杂交棉冀棉 18、中棉所 29 和湘杂棉 2 号与相应的亲本中棉所 12 选系相比前两者表现负优势而后者表现正优势, 这是由于中棉所 12 和杂交棉冀棉 18, 中棉所 29 属于黄河流域棉区棉种, 而湘杂棉 2 号及其父本荆 8891 属于长江流域棉区棉种, 具有苗期发芽势强、子叶大、根系发达、长势旺盛等特点。

2.2 杂交棉及其亲本苗期根和叶基因表达分析

为研究杂交棉和亲本之间基因表达差异, 将杂交棉及其亲本的基因表达方式分为 5 大模式和 7 种类型(图 1)。I: 杂交种上调表达, 扩增强带仅出现在杂交棉, 双亲无; II: 单亲显性表达, 扩增强带在双亲之一和杂交棉中出现, 而在另一亲本中不出现,

表 1 杂交棉及其亲本苗期营养单株干重
Table 1 Dry weight of plant in hybrids and parents at seedling stage (g)

材料 Material		地上部分 Above-ground	地下部分 Below-ground	全株 Individual
中棉所 2 CRI-28	P ₁	0.2570±0.0699	0.0398±0.0045	0.2968±0.0715
	P ₂	0.2593±0.0451	0.0293±0.0047	0.2887±0.0477
	F ₁	0.3060±0.0663	0.0417±0.0091	0.3476±0.0673
	中亲优势 Mid-parent heterosis (%)	18.50	20.55	18.75
	对照优势 Control heterosis (%)	17.98	4.68	17.11
冀棉 18 Jimian 18	P ₁	0.3630±0.0734	0.0511±0.009	0.4140±0.0795
	P ₂	0.2204±0.0563	0.0332±0.0068	0.2535±0.0569
	F ₁	0.2953±0.0692	0.0471±0.0087	0.3424±0.0705
	中亲优势 Mid-parent heterosis (%)	1.25	11.84	2.58
	对照优势 Control heterosis (%)	-18.64	-7.76	-17.30
中棉所 2 CRI-29	P ₁	0.2394±0.0524	0.0359±0.0056	0.2753±0.0531
	P ₂	0.2123±0.0396	0.0268±0.0075	0.2391±0.0435
	F ₁	0.2279±0.0272	0.0317±0.0034	0.2596±0.0263
	中亲优势 Mid-parent heterosis (%)	0.91	1.14	0.95
	对照优势 Control heterosis (%)	-4.78	-11.76	-5.69
湘杂棉 2 号 XZM 2	P ₁	0.2570±0.0699	0.0398±0.0045	0.2968±0.0715
	P ₂	0.2703±0.0419	0.0476±0.0052	0.3180±0.0403
	F ₁	0.2699±0.0393	0.0447±0.0037	0.3147±0.0374
	中亲优势 Mid-parent heterosis (%)	2.37	2.29	2.36
	对照优势 Control heterosis (%)	5.02	12.38	6.01

杂交棉母本中棉所 12 选系统一简称为 P₁, 父本简称为 P₂, 杂交种简称为 F₁。
P₁: female parent of hybrids, CRI-12. P₂: male parent of hybrids, F₁: hybrids.

包括母本、杂交棉中有而父本无和父本、杂交棉中有而母本无两种类型; III: 单亲沉默表达, 扩增强带仅出现在亲本之一, 包括仅母本有而其他无和仅父本有而其他无两种类型; IV: 杂交种下调表达, 双亲都有扩增强带而杂交棉没有; V: 基因单态表达, 扩增强带在双亲和杂交棉中均出现。其中 I~IV 型为差异表达基因类型。

4 个组合杂交棉冀棉 18、中棉所 29、湘杂棉 2 号和中棉所 28 与其亲本苗期根和叶部位基因表达表达类型比例如表 2。从表 2 可以看出, 4 个杂交组合在三叶期根和叶中差异表达基因的 4 种类型比例趋势基本一致, 单亲差异表达型(包括显性和沉默表达)在根和叶中所占比例较高, 杂种下调表达型所占比例较低, 反映出苗期单亲差异表达型在杂种优势

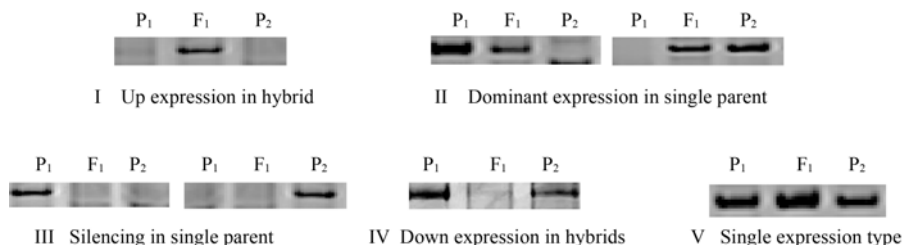


图 1 杂交棉与亲本苗期基因表达类型
Fig. 1 Gene expression types of cotton hybrid and its parents at seedling stage
每种类型从左到右 3 条带分别为母本、杂交棉和父本。

Each type of 3 bands from left to right represents female parent, hybrid, and male parent, respectively.

形成中起主要作用; 在根和叶的基因差异表达丰富程度上, 叶部差异表达基因数目和比例(29.20%~46.09%)比根(15.65%~22.49%)高得多, 说明叶中基因差异表达可能比根部基因差异表达对杂种优势形成的作用更大; 在三叶期基因差异表达中, 除了湘杂棉 2 号外, 其他 3 个杂交组合中的中棉所 12 单亲显性表达型比例高, 而沉默表达型所占比例低, 与中棉所 12 是高值亲本的表现一致, 说明中棉所 12 选系在 4 个杂交棉苗期杂种优势产生中起主导作用。结合三叶期 4 个杂交组合的干重(表 1)和基因差异表达(表 2)分析, 发现高值亲本中棉所 12 选系与杂交棉共同表达的基因要多于低值亲本与杂交棉共同表达的基因(1.10~7.07 倍), 在杂交棉沉默表达的基因要少于低值亲本在杂交棉沉默表达的基因(0.33~0.75 倍), 在 4 个杂交组合中棉所 12 选系在杂交棉表达的基因与在杂交棉沉默表达的基因之差($P_1F_1-P_1$)分别为 7.48%、1.87%、-2.38%和 5.59%, 而相对应的另一亲本在杂交棉表达的基因与在杂交棉下调表达的基因之差($P_2F_1-P_2$)分别为-6.42%、-2.66%、3.18%和-0.82%, 即高值亲本中棉所 12 选系在杂交棉表达的基因明显高于另一亲本, 从分子水平上证明了中棉所 12 选系在杂交棉冀棉 18、中棉所 29 和中棉所 28 的苗期杂种优势产生中起优势亲本的作用。

杂种上调表达型即扩增强带仅出现在杂交棉而非双亲, 表明在杂交棉中扩增强带基因比双亲中表达的强, 表现超显性效应; 杂种下调表达型即双亲都有扩增强带而杂交棉没有, 表明在双亲中扩增强带基因比杂交棉中表达的强和多, 表现超低亲效应; 单亲显性表达型即扩增强带在双亲之一和杂交棉中出现, 而在另一亲本中不出现, 包括母本、杂交棉中有而父本无和父本、杂交棉中有而母本无两种类型, 扩增强出的强带基因是双亲中显性基因表达的, 它既可能包括显性效应, 也可能包括加性效应(中亲型); 单亲沉默表达即扩增强带仅出现在亲本之一, 包括仅母本有而其他无和仅父本有而其他无两种类型, 杂交棉表达此类型基因比亲本的弱, 表明双亲之一的基因表达是沉默的, 即低亲效应(低亲型); 基因单态表达即扩增强带在双亲和杂交棉中均出现, 它既可能包括显性效应, 也可能包括加性效应。4 种杂交组合差异表达基因(包含叶和根)分别占表达基因的 27.00%~34.56%, 分析差异表达基因类型和 4 个杂交组合的关系发现, 超显性效应占 3.30%~7.17%, 超低亲效应占 2.62%~4.14%, 低亲效应占

5.65%~3.03%, 显性效应和加性效应是主要的杂种优势效应占 79.52%~83.79%(基因单态表达和单亲显性表达之和)。其中, 三叶期表现超亲优势的中棉所 28 杂交组合的超显性效应占 7.17%, 明显高于其他 3 个中亲优势组合, 该结果说明杂交种上调表达型可能对杂种优势的产生起重要作用。

4 个杂交组合的差异显性表达基因与沉默和下调表达基因之差($F_1+P_1F_1+P_2F_1-P_1-P_2-P_1P_2$)分别为 3.26%、0.50%、8.19%和 1.37%, 与 4 个杂交组合的杂种优势(中亲优势)2.58%、0.95%、18.75%和 2.36%基本相符, 具体二者之间存在何种比例关系尚待进一步研究。

2.3 测序结果分析及差异表达基因的 q-PCR 验证

随机回收选取的 18 个差异片段, 克隆测序, 经 NCBI 的 EST 数据库 Blast 查询, 表 3 结果表明, 所测 18 个序列中包含 2 个冗余序列(L1161 和 L1168), 9 个无相似序列。在花椰菜和棉纤维次生壁加厚期转录组图谱研究中, 不同的引物组合可以扩增得到同一基因片段^[13]。本研究对差异片段的序列分析结果也发现了类似现象(有 2 个冗余序列), 可能是在不同基因表达的群体中, 位于同一基因座的两个分离的等位基因作为单个基因转录本被有效检测出来^[14]。9 个序列无相似序列说明其转录产物为新的基因片段, 功能未知, 表明棉花杂种优势的形成是一个复杂的过程。

为排除假阳性, 本实验根据差异片段的 cDNA 序列, 用 Premier Primer5 设计了 6 对引物, 采用 q-PCR 的方法对基因差异表达模式进行了验证(图 2)。结果表明, 其中 4 个基因片段的差异表达模式与 cDNA-AFLP 所展示的差异表达趋势一致, 另外 2 个基因差异表达模式不一致, 假阳性率为 33.3%, 在 cDNA-AFLP 实验所能接受的假阳性率范围内, 说明本实验体系结果可信^[15-16]。其中 Y3177 的父本和母本表达值达显著水平, 父本和杂交种表达值达到显著水平; Y3178 的父、母本、杂交种三者之间表达值都达到极显著水平; Y3179 母本分别与父本和杂交种表达值达到显著水平; Y3184 母本和杂交种表达值达到显著水平。

3 讨论

杂种优势可能表现在植物生长和发育的各个阶段, 幼苗可以在严格控制生长条件下生长并表现出杂种优势^[17-20], 因此选择这一时期检测基因表达差

表 2 三叶期根和叶部基因表达类型比例

Table 2 Percentage of gene expression types in roots and leaves at three-leaf stage

器官 Organ	品种 Cultivar	差异表达基因 Differential expression gene										基因单态表达型 Single expression type	
		杂种上调表达 Up expression in hybrid (F ₁) (%)	单亲显性表达(P ₁ F ₁ +P ₂ F ₁) Up expression in single parent (P ₁ F ₁ +P ₂ F ₁) (%)			单亲沉默表达型(P ₁ +P ₂) Down expression in single parent (P ₁ +P ₂) (%)			杂种下调表达型 Down expression in hybrid (P ₁ +P ₂) (%)	总计带数 Total No. of bands	比例 Ratio (%)	带数 No. of bands	比例 Ratio (%)
			P ₁ F ₁	P ₂ F ₁	小计 Total	P ₁	P ₂	小计 Total					
叶片 Leaf	CRI-28	10.01	8.84	3.86	12.71	2.70	3.60	6.30	4.39	631	33.40	1258	66.60
	Jimian 18	5.18	15.04	3.81	18.85	4.83	14.40	19.24	2.83	944	46.09	1104	53.91
	CRI-28	5.98	6.02	5.40	11.42	5.06	9.62	14.68	5.65	902	37.72	1489	62.28
	XZM 2	3.55	5.33	6.39	11.72	6.69	3.94	10.62	3.30	690	29.20	1673	70.80
根 Root	CRI-28	3.39	6.49	0.92	7.40	1.62	3.17	4.80	2.89	262	18.48	1156	81.52
	Jimian 18	4.26	4.26	2.13	6.39	1.18	1.81	3.00	2.29	202	15.93	1066	84.07
	CRI-28	4.50	4.43	2.07	6.50	1.00	2.07	3.07	1.57	219	15.65	1180	84.35
	XZM 2	2.69	1.00	8.26	9.25	5.77	3.38	9.15	1.39	226	22.49	779	77.51
平均 Average	CRI-28	7.17	7.83	2.60	10.43	2.24	3.42	5.65	3.75	893	27.00	2414	73.00
	Jimian 18	4.83	10.92	3.17	14.08	3.44	9.59	13.03	2.62	1146	34.56	2170	65.44
	CRI-28	5.44	5.44	4.17	9.60	3.56	6.83	10.40	4.14	1121	29.58	2669	70.42
	XZM 2	3.30	4.04	6.95	10.99	6.41	3.77	10.18	2.73	916	27.20	2452	72.80

表 3 杂交棉和亲本差异表达的 cDNA 序列
Table 3 cDNA sequences of differential expression fragments between hybrid and parents

编号 Code	引物 Primer	表达模式 Expression type	同源序列蛋白质 Homologous protein	同源序列号 Acc. No.	E 值 E-value
L1145	E8M16	II	无 No significant similarity found		
L1146	E8M1	II	无 No significant similarity found		
L1148	E11M5	III	无 No significant similarity found		
L1161	E11M12	III	黄瓜谷胱甘肽 S-转移酶部分 cDNA 序列 <i>Cucumis sativus</i> clone CU14E03 glutathione S-transferase mRNA, partial cds	ACI16511.1	6×E-50
L1162	E8M16	III	拟南芥泛素羧基末端水解酶家族蛋白/锌指(MYND 型)家族蛋白 <i>Arabidopsis thaliana</i> ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase family protein / zinc finger (MYND type) family protein (AT4G31670)	NP_194895.1	8×E-34
L1163	E11M15	II	无 No significant similarity found		
L1165	E8M1	III	无 No significant similarity found		
L1167	E10M5	I	蓖麻 shaggy-like 激酶部分 cDNA 序列 <i>R. communis</i> mRNA for shaggy-like kinase, partial	CAA72330.1	3×E-45
L1168	E12M12	III	黄瓜谷胱甘肽 S-转移酶部分 cDNA 序列 <i>Cucumis sativus</i> clone CU14E03 glutathione S-transferase mRNA, partial cds	ACI16511.1	1×E-83
L1169	E13M6	III	无 No significant similarity found		
L1170	E13M8	I	拟南芥 SIT4 磷酸酶家族蛋白 SIT4 phosphatase-associated family protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_180403.1	3×E-16
L1171	E4M10	III	烟草假设的蛋白 NitaMp073 Hypothetical protein NitaMap073 (<i>Nicotiana tabacum</i>)	YP_173415.1	1×E-23
L1173	E14M4	III	无 No significant similarity found		
L1174	E14M4	III	无 No significant similarity found		
L1175	E14M4	III	无 No significant similarity found		
L1176	E4M11	I	拟南芥 Zn ²⁺ 结合蛋白 Zn ²⁺ binding protein (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	NP_566278.1	2×E-27
L1177	E10M15	III	烟草胁迫诱导 H1 组蛋白类似蛋白 Stress-inducible H1 histone-like protein (<i>Nicotiana tabacum</i>)	BAC53940.1	6×E-13
L1178	E11M15	II	单脱水抗坏血酸还原酶 Monodehydroascorbate reductase	NP_189420.1	1×E-39

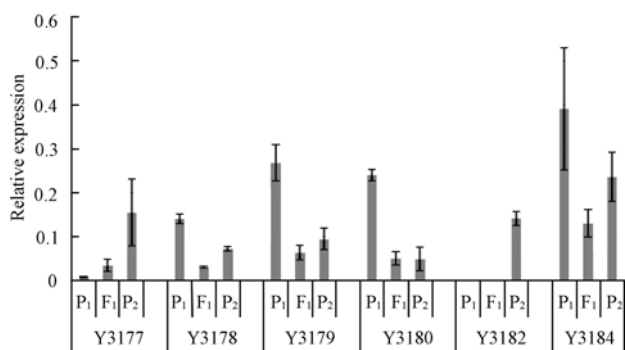


图 2 差异表达基因的相对表达量

Fig. 2 Relative expression level of differential expression genes
P₁: female parent of hybrids; P₂: male parent of hybrids; F₁: hybrids.

异可以避免外界环境等因素对杂种优势基因表达的影响。

3.1 棉花叶和根基因表达模式

叶和根是代表棉花植株地上部分和地下部分的重要营养器官, 根作为植株唯一的地下器官, 生长模式始终如一, 它的生长和发育与地上部分存在很

大差异, 没有茎、叶和花等器官分化与转换, 因此根和叶在基因表达模式上既可能存在共同性也可能存在差异性。本研究结果表明, 根和叶二者基因差异表达类型所占比例的趋势基本一致, 说明两者基因表达方式具共同性。叶部差异表达基因数目和比例(29.20%~46.09%)比根部(15.65%~22.49%)高的多, 说明叶中基因差异表达可能比根中基因差异表达对杂种优势形成作用更大; 特别是在叶中, 杂种基因特异表达型所占比例(3.55%~10.01%)和单亲显性表达型所占比例(11.72%~18.85%)显著高于根基因中特异表达型(2.69%~4.50%)和单亲显性表达型(6.39%~9.25%), 这与邢朝柱等^[8]研究结果一致, 说明根和叶的基因表达上也存在相异性。

3.2 基因表达模式和杂种优势

基因差异表达模式与杂种优势相关性方面已有不少报道, 目前报道均认为基因差异表达模式与产量性状杂种优势存在显著的相关性, 但由于研究的作物不同, 基因表达模式与杂种优势相关性呈现出

不一致性^[21-30], 尽管在不同作物、不同生育期、不同器官中不同差异表达类型所占的比例不同, 但至少表明, 杂交种的遗传表现不是亲本遗传物质的简单相加, 而是两套基因在杂种中相互作用, 引起基因表达质和量两方面的变化, 进而表现出杂种优势。

在本研究中, 4 个杂交组合无论是叶部基因还是根基因, 基因单态表达是最主要的表达模式, 它在叶中占 53.91%~70.80%, 在根中占 77.51%~84.35%, 说明尽管后代的表型差异很大, 但其基因表达与亲本具有较大程度的一致性。在基因差异表达模式中, 4 种杂交组合差异表达基因(包含叶和根)分别占表达基因的 27.00%~34.56%, 其中单亲差异表达模式是主要表达模式, 所占比例较高, 而杂种下调表达型所占比例最低。这与邢朝柱等^[26-27]基因单态表达是最主要的表达模式的研究结果一致。

分析差异表达基因类型和 4 个杂交组合的关系发现, 显性效应和加性效应是主要的杂种优势效应。中棉所 28 杂交组合的超显性效应明显高于其他 3 个杂交组合, 说明杂种上调表达型也许对杂种优势产生起重要作用。多种杂种优势效应的并存说明棉花苗期杂种优势可能是多基因共同作用产生多种效应的结果, 这与 Swanson-Wagner 等^[18]对玉米的研究结果相似。

杂种优势的形成是一个多方面动态积累的过程, 涉及到一系列生理代谢有关基因的表达调控, 优势可以表现在不同发育阶段, 不同器官和不同性状上, 也可以体现在生理生化各种代谢途径上, 同时也受外界环境条件如光、温、水、气等的影响。虽然棉花杂种和亲本基因表达差异取得一些进展^[8,26-27], 但被检测的基因数量有限, 由于棉花基因组序列未知和实验手段本身的局限, 全基因组水平研究基因表达变化的方法^[17-18]在棉花上受到限制。随着棉花基因组测序的进展和全基因组水平研究基因表达变化方法的改进, 棉花杂种优势基因网络, 基因-基因, 基因-环境相互作用的表达分析将会更深入。

4 结论

高值亲本中棉所 12 选系与杂交棉共同表达的基因多于低值亲本与杂交棉共同表达的基因, 在杂交棉下调表达的基因要少于低值亲本在杂交棉下调表达的基因, 即高值亲本中棉所 12 选系在杂交棉表达的基因明显高于另一亲本, 从分子水平上首次证明了中棉所 12 选系是骨干亲本, 在杂交棉冀棉 18、中

棉所 29 和中棉所 28 苗期的营养生长杂种优势产生中起优势亲本的作用。

致谢: 感谢中国农业科学院棉花研究所的邢朝柱研究员、河北省农业科学院张香云研究员、湖南省棉花科学研究所李育强研究员分别提供中棉所 28、中棉所 29、冀棉 18、湘杂棉 2 号杂交棉的育种家亲本种子。

References

- [1] Tasfataris S A. Molecular aspects of heterosis in plants. *Plant Physiol*, 1995, 94: 362-370
- [2] Sun Q X, Wu L M, Ni Z F, Meng F R, Wang Z K, Lin Z. Differential gene expression patterns in leaves between hybrids and their parental inbreds are correlated with heterosis in a wheat diallel cross. *Plant Sci*, 2004, 166: 651-657
- [3] Adams K L. Evolution of duplicate gene expression in polyploid and hybrid plants. *J Heredity*, 2007, 98: 136-141
- [4] Tan L-W(谭联望), Liu Z-D(刘正德). Research on selection and varietal traits of Zhongmian 12. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 1990, 23(3): 12-19 (in Chinese with English abstract)
- [5] Guo X-M(郭香墨), Tan L-W(谭联望), Liu Z-D(刘正德). Evaluating germplasm resource value of Zhongmian 12. *China Cotton* (中国棉花), 2002, 29(12): 12-14 (in Chinese with English abstract)
- [6] Bachem C W, van der Hoeven R S, de Bruijn S M, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser R G. Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: Analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant J*, 1996, 9: 745-753
- [7] Breynne P, Dreesen R, Cannoot B, Rombaut D, Vandepoele K, Rombauts S, Vanderhaeghen R, Inzé D, Zabeau M. Quantitative cDNA-AFLP analysis for genome-wide expression studies. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269: 173-179
- [8] Xing C-Z(邢朝柱), Zhao Y-L(赵云雷), Yu S-X(喻树迅), Zhang X-L(张献龙), Guo L-P(郭立平), Miao C-D(苗成朵). Study on gene differential expression in roots and leaves between hybrid CRI47 and its parents at seedling stage. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2005, 38(6): 1275-1281(in Chinese with English abstract)
- [9] Huang Z-K(黄滋康) ed. Cotton Varieties and Pedigrees in China (中国棉花品种及系谱). Beijing: Science Press, 2007 (in Chinese)
- [10] Jiang J-X(蒋建雄), Zhang T-Z(张天真). Extraction of total RNA in tissues with CTAB-acidic phenolic method. *Cotton Sci* (棉花学报), 2003, 15(3): 166-167 (in Chinese with English abstract)
- [11] Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T, eds. Jin D-Y(金冬雁) trans. Molecular Cloning—A Laboratory Manual (分子克隆实验指南), 2nd edn. Beijing: Science Press, 1998 (in Chinese)
- [12] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. *Methods*, 2001, 25: 402-408

- [13] Pan Y-X(潘玉欣), Ma J(马骏), Zhang G-Y(张桂寅), Han G-Y(韩改英), Wang X-F(王省芬), Ma Z-Y(马峙英). cDNA-AFLP profiling for the fiber development stage of secondary cell wall synthesis and transcriptome mapping in cotton. *Chin Sci Bull (科学通报)*, 2007, 52(17): 2358–2364 (in Chinese)
- [14] Li G, Gao M, Yang B, Quiros C F. Gene for gene alignment between *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168–180
- [15] Kojima T, Habu Y, Lida S, Ogibara Y. Direct isolation of differentially expressed genes from a specific chromosome region of common wheat: Application the amplified fragment length polymorphism-based messenger-RNA fingerprinting (Amf) method in combination with a deletion line of wheat. *Mol Gen Genet*, 2000, 263: 635–641
- [16] Zhang Y(张一), Ni Z-F(倪中福), Yao Y-Y(姚颖垠), Sun Q-X(孙其信). Differential gene expression in uppermost internode between wheat hybrid and its parents. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2008, 34(5): 770–776 (in Chinese with English abstract)
- [17] Hoecker N, Keller B, Piepho H P, Hochholdinger F. Manifestation of heterosis during early maize (*Zea mays* L.) root development. *Theor Appl Genet*, 2006, 112: 421–429
- [18] Swanson-Wagner R A, Jia Y, DeCook R, Borsuk L A, Nettleton D, Schnable P S. All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F₁-hybrid and its inbred parents. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 6805–6810
- [19] Meyer S, Pospisil H, Scholten S. Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol Biol*, 2007, 63: 381–391
- [20] Hoecker N, Keller B, Muthreich N, Chollet D, Descombes P, Piepho H P, Hochholdinger F. Comparison of maize (*Zea mays* L.) F₁-hybrid and parental inbred line primary root transcriptomes suggests organ-specific patterns of nonadditive gene expression and conserved expression trends. *Genetics*, 2008, 179: 1275–1283
- [21] Sun Q X, Ni Z F, Liu Z Y. Differential gene expression between wheat hybrids and their parental inbreds in seedling leaves. *Euphytica*, 1999, 106: 117–123
- [22] Xie X-D(谢晓东), Ni Z-F(倪中福), Meng F-R(孟凡荣), Wu L-M(吴利民), Wang Z-K(王章奎), Sun Q-X(孙其信). Relationship between difference of gene expression in early developing seed of hybrid versus parents and heterosis in wheat. *Acta Genet Sin (遗传学报)*, 2003, 30(3): 260–266 (in Chinese with English abstract)
- [23] Wang Z-K(王章奎), Ni Z-F(倪中福), Meng F-R(孟凡荣), Wu L-M(吴利民), Xie X-D(谢晓东), Sun Q-X(孙其信). Primary study on the relationship between differential gene expression pattern in roots at jointing stage and heterosis in agronomic traits in a wheat diallel cross. *Sci Agri Sin (中国农业科学)*, 2003, 36(5): 473–479 (in Chinese with English abstract)
- [24] Tian Z-Y(田曾元), Dai J-R(戴景瑞). Relationship between differential gene expression patterns in functional leaves of maize inbreds and hybrids at spikelet differentiation stage and heterosis. *Acta Genet Sin (遗传学报)*, 2003, 30(2): 154–162 (in Chinese with English abstract)
- [25] Xiong L Z, Yang G P, Xu C G, Zhang Q F. Relationships of differential gene expression in leaves with heterosis and heterozygosity in a rice diallel cross. *Mol Breed*, 1998, 4: 129–136
- [26] Xing C-Z(邢朝柱), Yu S-X(喻树迅), Zhao Y-L(赵云雷), Guo L-P(郭立平), Zhang X-L(张献龙), Miao C-D(苗成朵), Wang H-L(王海林). Primary study on gene differential expression of Pest-resistant cotton hybrids between different heterosis crosses. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2007, 33(3): 507–510 (in Chinese with English abstract)
- [27] Xing C-Z(邢朝柱), Zhao Y-L(赵云雷), Yu S-X(喻树迅), Zhang X-L(张献龙), Guo L-P(郭立平), Wang H-L(王海林). Relationship between gene differential expression of leaves in full opening flower stages of hybrids & their parents heterosis in pest-resistant cotton. *Acta Genet Sin (遗传学报)*, 2006, 33(10): 948–956
- [28] Wu M-S(吴敏生), Gao Z-H(高志环), Dai J-R(戴景瑞). Studies on differential gene expression of maize (*Zea mays* L.) by means of cDNA-AFLP. *Acta Agron Sin (作物学报)*, 2001, 27(3): 339–342 (in Chinese with English abstract)
- [29] Wu L-M(吴利民), Ni Z-F(倪中福), Wang Z-K(王章奎). Relationship between differential expression patterns of multigene families and heterosis in a wheat diallel crosses. *Acta Genet Sin (遗传学报)*, 2001, 28(3): 256–266 (in Chinese with English abstract)
- [30] Wang Z, Ni Z, Wu H, Nie X, Sun Q. Heterosis in root development and differential gene expression between hybrids and their parental inbreds in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1283–1294