

陆地棉遗传标准系 TM-1 背景的海岛棉染色体片段置换系的培育

王鹏, 丁业掌, 陆琼娴, 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

* 联系人, E-mail: cotton@njau.edu.cn

2007-12-18 收稿, 2008-03-17 接受

国家自然科学基金(批准号: 30730067)、教育部长江学者和创新团队发展计划(批准号: IRT0432)及高等学校学科创新引智计划(批准号: B08025)资助项目

摘要 染色体片段置换系(chromosome segment substitution lines, CSSL)基因组内只含有一个来自供体亲本的染色体片段, 而基因组的其余部分与轮回亲本相同, 并能把 QTL 拆分为单个的孟德尔因子, 因此 CSSL 是进行基因组分析, 特别是 QTL 分析的理想材料. 本研究以陆地棉遗传标准系 TM-1 为受体亲本, 海岛棉海 7124 为供体亲本在 BC₅S₁ 代借助分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)培育了一套染色体片段置换系. 这套置换系由 330 个株系构成; 1~4 个不同的株系携带相同的染色体片段, 置换片段的平均长度为 10.9 cM, 总长度为 5271.9 cM, 是棉花基因组总长度 3514.6 cM 的 1.5 倍. 每个株系内被替换的染色体片段长度不一, 最短为 3.5 cM, 最长为 23.2 cM. 由于还有些区段缺失供体亲本的染色体片段, 所以这个替换系群体没有完全覆盖棉花基因组.

关键词

棉花
染色体片段置换系
纤维品质
叶形
QTL

棉花是世界性的重要经济作物. 中国是世界上最大的棉花生产、消费和纺织国, 每年的棉花产量占全世界的 24%, 消费量占 38%, 棉纱和棉布的产量居世界首位^[1], 2006 年纺织品出口为 1440 亿美元^[2]. 目前, 我国对棉花的需求越来越大, 品质要求也越来越高.

陆地棉(*Gossypium hirsutum* L.)和海岛棉(*G. barbadense* L.)是棉花的 2 个四倍体栽培种. 陆地棉产量高, 纤维品质中等. 海岛棉产量低但纤维细强, 可纺 100~200 支纱, 是纺高支纱的原料. 我国现在自育的棉花品种中缺少纺高支纱和低支纱的原棉, 尤其是大量纺 60 支纱以上高档纱的原棉极度缺乏^[3]. 因此急需提高我国棉纤维的品质, 这就需要把陆地棉和海岛棉的优点聚合. 但多年的育种实践证明, 将海岛棉的优良纤维基因转移到陆地棉中工作往往收效甚微, 很难出现理想的重组类型.

棉花纤维品质性状, 包括纤维长度、纤维强度、纤维细度、纤维整齐度等都是数量性状, 由多基因控制

且易受环境的影响. Rong 等^[4]发现应用不同海岛棉与陆地棉群体(F₂, BC 和 RIL)定位的与纤维品质有关的 QTL 多达 224 个, 但是重复性差. 由于常规群体无法进行多年多点的实验, 因此也就无法验证这些 QTL 的稳定性.

染色体片段置换系(chromosome segment substitution lines)是利用杂交、回交和分子标记辅助选择(marker-assisted selection, MAS)构建的覆盖作物整个基因组的一系列近等基因系. 它的基因组内只有来自供体亲本的一个纯合的染色体片段, 而基因组的其余部分与轮回亲本相同. 它是进行基因组研究, 特别是 QTL 定位的理想材料. 利用 CSSL 进行 QTL 精细定位已在番茄、油菜和水稻等作物中得到应用. Paterson 等^[5]利用 RFLP 标记辅助选择建立番茄的导入系重叠群进行了一些 QTL 的精细定位. Eshed 和 Zamir^[6]利用他们构建的番茄替换系定位了 6 个番茄品质性状的 QTL. Yamamoto 等^[7]利用 RFLP 标记构建

了包含 3 个水稻生育期QTL的近等基因系, 并对这 3 个基因进行了精细定位. 刘冠明等 [8]用包含 12 个单片段替换系的群体定位了水稻 18 个农艺性状的 77 个 QTL.

本研究采用杂交、连续回交结合 MAS 将海岛棉品系海 7124 的染色体片段导入到陆地棉遗传标准系 TM-1 的遗传背景中, 培育出第一套海岛棉的染色体片段置换系. 这套材料的培育为优质 QTL 的精细定位, QTL 间的互作, QTL 的生理功能和克隆奠定了基础, 也为纤维品质改良的分子设计育种提供了丰富的种质资源.

1 材料与方法

() 分子标记的选择. 本实验室以TM-1 和海 7124 为作图亲本已经构建了一张包含 1790 个标记位点的、以微卫星标记(simple sequence repeats, SSR)为主的遗传图谱, 覆盖棉花基因组遗传距离 3425.8 cM, 标记间的平均距离为 1.91 cM [9,10]. 本研究以该图谱为基础, 每隔 10 cM左右选择一个SSR标记, 共选择了 330 个SSR标记. 其中第 5 染色体上的标记最多, 有 20 个标记, 第 1, 2, 8 染色体最少, 都是 8 个标记. SSR标记间的最小距离为 3 cM, 最大距离为 25 cM.

() 置换系的培育. TM-1 是陆地棉遗传标准系, 来自美国德州农业部南方平原农业研究中心作物种质资源研究室 [11], 纤维品质中等(纤维长度: 28.56 mm; 纤维强度: 30.53 cN/tex; 纤维细度: 5.4); 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, 纤维品质优良(纤维长度: 31.24 mm; 纤维强度: 36.25 cN/tex; 纤维细度: 4.2).

染色体片段置换系的培育过程(图 1): 2001 年夏季在南京江浦 TM-1 与海 7124 杂交产生 F₁, 同年冬季在海南三亚与 TM-1 回交得 BC₁; 2002 夏季在南京江浦种植 BC₁ 和 TM-1, 用 TM-1 回交得 BC₂, 然后每年都用 TM-1 在南京和海南进行回交, 直到得到 BC₅; 2004 年夏季 BC₅ 在南京自交得 BC₅S₁, 同年夏季在南京江浦种植 BC₅S₁. 取 BC₅S₁ 代的单株的 DNA 进行分子标记辅助选择(MAS). MAS 选择的标准是: 选择遗传背景为 TM-1、且含有 1~2 个纯合片段的 BC₅S₁ 植株. BC₅S₁ 代杂合的单株自交 1~2 代得 BC₅S₂₋₃ 继续进行 MAS 选择, 把 BC₅S₁ 代缺失的片段补上.



图 1 棉花 CSSL 的构建过程

() DNA 库的构建和置换系的基因型分析. 三级库: BC₅S₁ 的单株 DNA, 由 2100 个 DNA 组成; 二级库: BC₅S₁ 的单株按行混取构成二级库的 DNA, 即 BC₅ 的 DNA, 由 803 个 DNA 组成. 为了保证每株的 DNA 的含量相同: 首先取每株相同部位的叶片 2 片, 接着用打孔器在中央叶脉的两侧各打 3 个孔, 再用液氮磨碎; 一级库: 二级库 DNA 按照系谱关系混合为一级库的 DNA, 即 BC₄ 的 DNA, 由 93 个 DNA 组成.

用 GGT 软件(<http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/ggt/>)分析置换系群体的基因组型.

() 表型性状的调查. 2005 年夏季在南京江浦种植 BC₅S₁ 和 TM-1, 每隔 20 行 BC₅S₁ 种植一行 TM-1 为对照, 种植方式为育苗移栽. (1) 叶片形态的调查. 2005 年于盛花期调查了 BC₅S₁ 单株的叶片形态, 且把叶片形态作为一个质量性状. (2) 纤维品质性状测定. 2005 年测定了亲本和 BC₅S₁ 的 3 个纤维品质性状: 纤维长度, 纤维比强度和纤维细度. 纤维品质测定由河南省棉花品质监督检验测试中心完成.

2 结果与讨论

2.1 CSSL 的培育方法

染色体片段置换系的培育方法有两种: 一种是两亲本杂交然后用轮回亲本进行回交, 在 BC₃ 代用分子标记选择, 根据标记选择结果进行回交和自交直到构建覆盖全基因组的片段置换系, 如郝伟等 [12] 构建的覆盖野生稻基因组的置换系; 另一种是以重组自交系(RIL)为基础, 用其中的一个亲本与重组自交系回交并用分子标记进行选择, 由于重组自交系的遗传基础较简单并且其每个家系的标记已知, 因此

这种方法的工作量较前一种的小, 构建速度较快, 如 Kubo等 [13]构建的梗稻和籼稻亚种间的置换系。

用以上两种方法培育的置换系存在着两个问题: () 置换系所替换的片段仍较大(>20 cM), 这样大的区间含有多个连锁的 QTL, QTL 的精细定位与图位克隆需进一步构建次级群体, 费用高, 周期长; () 置换系中除目标替换片段外, 其他位置的替换片段较多(>3)。因此我们对置换系的培育方法进行了改进。

我们培育置换系的方法特点是: () 我们培育置换系的标记是SSR标记。这种标记检测快速简单, 多态性高, 比选用AFLP标记培育的置换系 [14,15]要有优势; () BC₁~BC₅不用MAS辅助选择, 只是连续的回交, 在 BC₅S₁ 代用MAS进行选择, 相比较于在BC₃ 开始选择的做法, 这样做的优点是省缺了每年都鉴定的步骤, 减少了人力, 同时由于回交代数高且群体比较大(群体大小为 2100), 则选到含有单片段纯合的株系的概率大大增加且导入的片段长度变短; 缺点就是工作量大。

为了克服工作量大的缺点, 我们构建了三级DNA 库。首先用选择好的 SSR 标记筛选一级库的DNA, 然后根据一级库的筛选结果筛选二级库的DNA, 最后根据二级库的筛选结果筛选三级库的DNA 即 BC₅S₁ 单株 DNA 从而确定各单株的基因型, 完成染色体片段置换系的构建。应用这种方法把确

定单株基因型的工作经过 3 次分解后, 大大地减少了工作量。这不仅节省了大量的经费, 而且加快了构建的速度。

2.2 CSSL 的表型

在纤维品质性状上, 海 7124 表现出典型的海岛棉的“长、细、强”特征, TM-1 纤维品质中等。在叶片形态上, 海岛棉裂片较长, 相对较窄, 裂片间的开张角度大于陆地棉。CSSL 的表型(图 2)在品质性状上的分布表现为相对连续的近正态分布(图 2(a)~(c)), CSSL-50, CSSL-85, CSSL-90(图 2(d))都表现出海 7124 的叶形。

2.3 CSSL 的评价

BC₅S₁ 有 2100 个单株, 我们用分子标记鉴定后确定了每个单株的基因型。800 个单株没有导入海 7124 的片段, 导入 1~2 个纯合片段的单株有 220 个, 1~2 个杂合片段的单株有 600 个, 3~4 个杂合片段的单株有 320 个, 导入片段在 4 个以上的单株有 160 个。2007 年对 200 个含有杂合片段的 BC₅S₂ 单株进行分子标记辅助选择, 从中进一步选择到了 110 个含有 1~2 个纯合片段的 BC₅S₃ 单株。

按照每个株系只含有 1~2 个纯合片段为标准从 BC₅S₁ 的单株中选取 220 个单株, 以及从 BC₅S₃ 中选择了 110 个单株, 总计 330 个不同株系的单株构成染

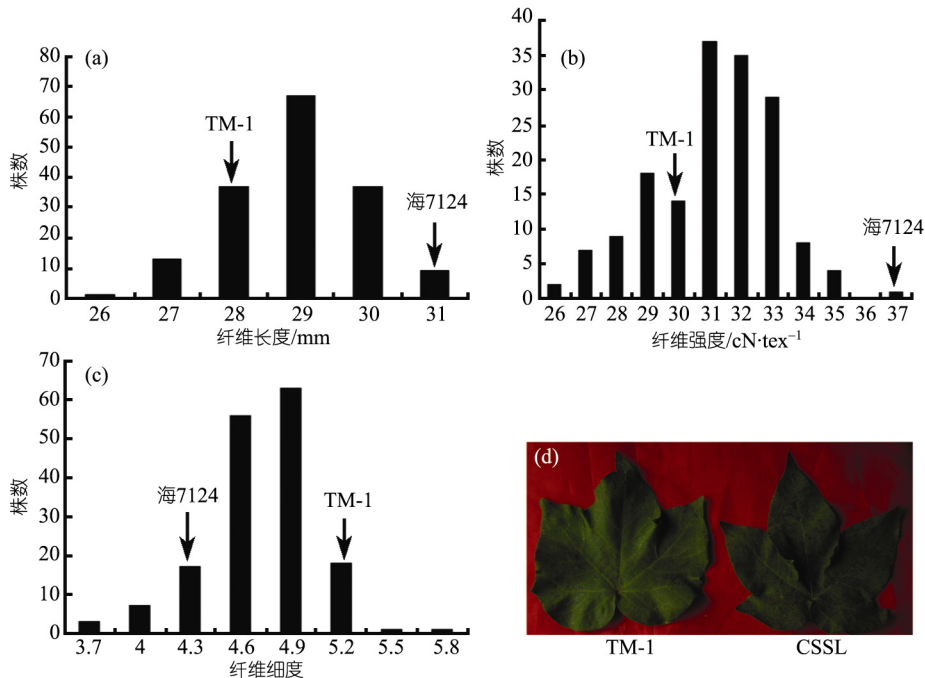


图 2 CSSL 的表型(2005)

(a) 纤维长度; (b) 纤维强度; (c) 纤维细度; (d) 叶形

染色体片段置换系. 在这套染色体片段替换系中, 一般1~4个不同的株系携带相同的染色体片段, 因此只选择其中含有不同染色体片段的148个株系图示海

7124染色体片段置换情况(图3). 这套置换系置换片段的平均长度为10.9 cM, 总长度为5271.9 cM, 是棉花基因组总长度3514.6 cM^[10]的1.5倍. 每个株系内

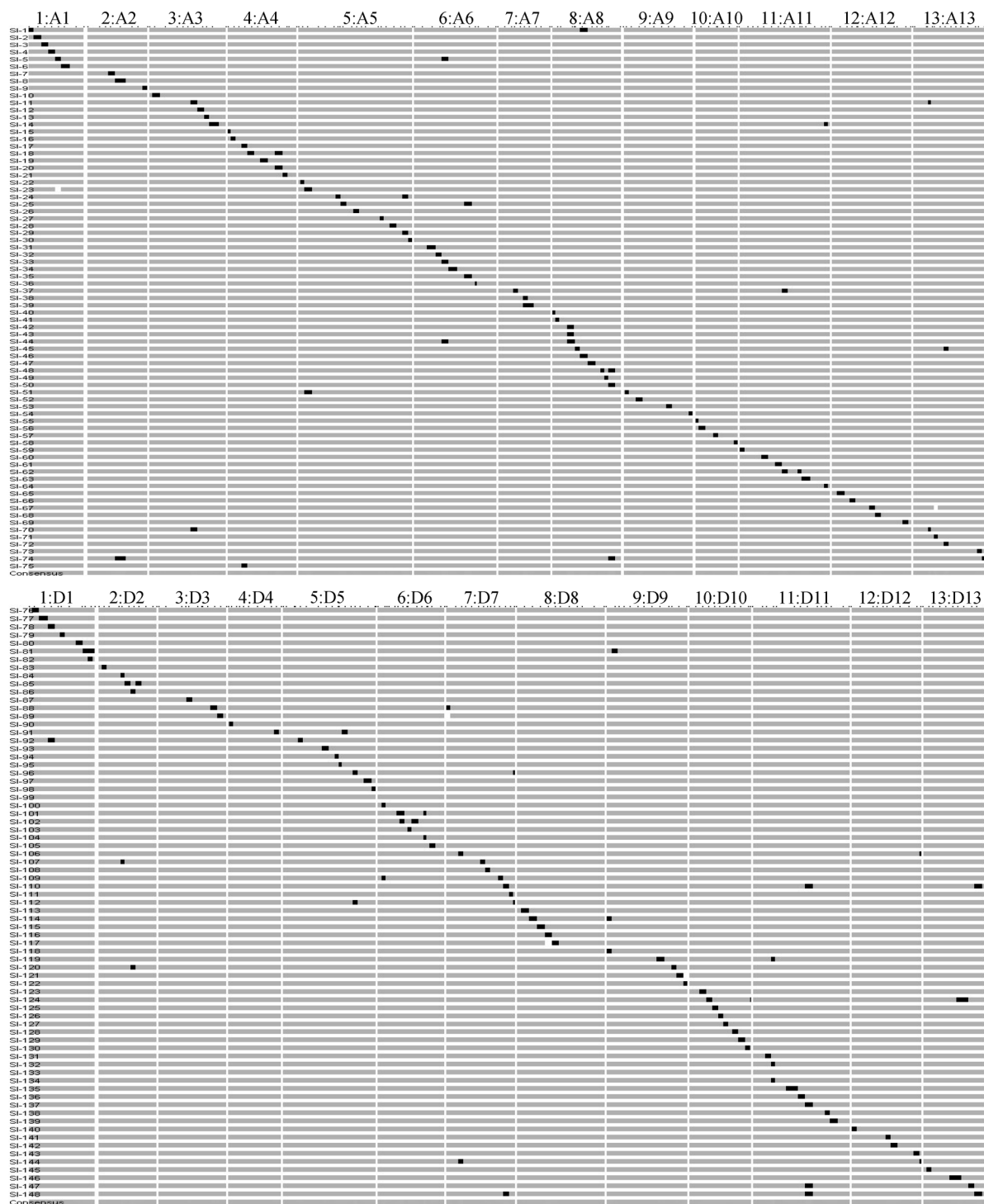


图3 染色体置换片段的示意图

图顶部数字表示的是染色体的编号, 左边的数字是CSSL的编号, □, 受体亲本基因型, ■, 纯合供体基因型

被替换的染色体片段长度不一, 最短为 3.5 cM, 最长片段为 23.2 cM.

2.4 染色体片段置换系的完善

在这套置换系中, 由于还有些区段缺失供体亲本的染色体片段(图 3), 所以这个置换系群体没有完全覆盖棉花整个基因组, 对后续的 QTL 的鉴定带来一定的影响. 这些片段的缺失有两个方面的原因: 一方面可能是由于已经回交了 5 代, 导致某些海 7124 片段的丢失; 另一方面可能由于只自交了一代, 许多单株上含有的片段是杂合的. 为了最终使我们构建的这套置换系能完全覆盖棉花基因组, 提高 QTL 的鉴定的准确性, 我们目前正在做置换系的完善工作. 我们把杂合的 BC₅S₁ 单株自交在 BC₅S₃ 进行分子标记的鉴定以期把缺失的供体片段补上, 从而构建完全覆盖海岛棉海 7124 基因组的置换系. 目前这部分工作正在进行中.

染色体片段置换系能减少位于不同替换片段上的 QTL 之间的互作效应, 将 QTL 拆分为单个孟德尔因子进行遗传分析, 提高 QTL 定位的精确度, 因而是进行 QTL 分析的理想材料. 棉花的基因组大, 遗传基础复杂导致棉花 QTL 的准确性和稳定性差, 培育一套染色体片段置换系是解决问题的途径之一. 但是由于培育棉花置换系的难度比较大, 一直没有人培育出一套棉花的片段置换系. 本实验以现有的比较饱和的图谱为基础 [10], 历经 7 年的时间培育了第一套陆地棉背景的海岛棉的染色体片段置换系. 这套置换系的培育可以大大提高棉花 QTL 定位的准确性和稳定性, 并为开展棉花 QTL 精细定位的研究及研究 QTL 间的互作、生理功能和克隆奠定了坚实的基础, 也为纤维品质改良和抗病方面的分子设计育种提供了丰富的种质资源.

参考文献

- 1 马淑萍. 明确棉花定位发展国内生产. 中国棉麻流通经济, 2007, 151(4): 25—29
- 2 吴雄英, 边红彪. 美国第 242 号通报对我国纺织品出口影响. WTO 经济导刊, 2007, 51(9): 78—79
- 3 项时康, 余楠, 胡育昌, 等. 论我国棉花质量现状. 棉花学报, 1999, 11(1): 1—10
- 4 Rong J K, Feltus A F, Waghmare V N, et al. Meta-analysis of polyploid cotton QTL shows unequal contributions of subgenomes to a complex network of genes and gene clusters implicated in lint fiber development. Genetics, 2007, 176: 2577—2588[DOI]
- 5 Paterson A H, Deverna J W, Lanini B, et al. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes in an interspecies cross of tomato. Genetics, 1990, 124: 735—742
- 6 Eshed Y, Zamir D. An genomic library of *Lycopersicon pennellii* in *L. esculentum*: a tool for fine mapping of genes. Euphytica, 1994, 79: 175—179[DOI]
- 7 Yamamoto T, Kuboki Y, Lin S Y, et al. Fine mapping of quantitative trait loci *Hd-1*, *Hd-2* and *Hd-3*, controlling heading date of rice, as single Mendelian factors. Theor Appl Genet, 1998, 97: 37—44[DOI]
- 8 刘冠明, 李文涛, 曾瑞珍, 等. 水稻亚种间染色体片段代换系的建立. 中国水稻科学, 2003, 17(3): 201—204
- 9 Han Z G, Wang C B, Song X L, et al. Characteristics, development and mapping of *Gossypium hirsutum* derived EST-SSRs in allotetraploid cotton. Theor Appl Genet, 2006, 112: 430—439[DOI]
- 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*. Genetics, 2007, 176: 527—541[DOI]
- 11 Kohel R J, Lewis C F, Richmond T R. Texas marker-1: Description of a genetic standard for *Gossypium hirsutum* L. Crop Sci, 1970, 10: 670—671
- 12 郝伟, 金健, 孙世勇, 等. 覆盖野生稻基因组的染色体片段置换系的构建及其米质相关数量性状基因座位的鉴定. 植物生理与分子生物学学报, 2006, 32(3): 354—362
- 13 Kubo T, Nakamura K, Yoshimura A. Development of a series of *indica* chromosome segment substitution lines in *japonica* background of rice. Rice Genet Newsletter, 1999, 16: 104—106
- 14 Howell P M, Marshall D F, Lydiate D J. Towards developing intervarietal substitution lines in *Brassica napus* using marker-assisted selection. Genome, 1996, 39: 348—358[DOI]
- 15 Temnykh S, Par W D, Ayres N, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). Theor App Genet, 2000, 100: 697—712[DOI]