

陆地棉背景的 Pima 棉染色体片段置换系创制

王云鹏, 王省芬, 李志坤, 杨鑫雷, 张艳, 吴立强, 吴金华, 张桂寅, 马峙英

(华北作物种质资源教育部重点实验室/河北省作物种质资源重点实验室/河北农业大学, 保定 071000)

摘要: 染色体片段置换系 (CSSLs, chromosome segment substitution lines) 基因组内只有 1 个或少数几个纯合的供体亲本染色体片段, 而其余部分与受体亲本相同, 是进行 QTL 分析的理想材料。本研究以陆地棉中棉所 8 号 (CCR18) 为受体亲本, 海岛棉 Pima90-53 为供体亲本在 $BC_3F_{1,3}$ 借助分子标记辅助选择培育了一套 182 个株系构成的染色体片段置换系。这套置换系置换片段平均长度 21.0 cM, 总长度 19957.8 cM, 是棉花基因组总长度 4168.7 cM 的 4.7 倍。每个株系内置换片段长度不一, 最短为 0.7 cM, 最长是 83.2 cM, 导入片段数量为 1~11 个。CSSLs 在纤维品质性状上的分布表现为相对连续的正态分布, 部分株系较 CCR18 有了明显提高。本研究为进一步开展棉花纤维品质 QTL 定位以及陆地棉纤维品质育种研究提供了新材料。

关键词: 棉花; Pima 棉; 染色体片段置换系; 纤维品质; QTL

Development of Pima Cotton Chromosome Segment Substitution Lines with *Gossypium hirsutum* Background

WANG Yun-peng, WANG Xing-fen, LI Zhi-kun, YANG Xin-lei, ZHANG Yan,

WU Li-qiang, WU Jin-hua, ZHANG Gui-yin, MA Zhi-ying

(North China Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Education Ministry/Key Laboratory for Crop Germplasm Resources of Hebei/Hebei Agricultural University, Baoding 071000)

Abstract: Chromosome segment substitution lines (CSSLs) consist of a battery of near-isogenic lines and cover the entire genome of some crops. With the exception of one or a few homozygous chromosome segment transferred from a donor parent, the remaining genome of each CSSL line is the same as the recipient parent. It is an ideal material for QTL mapping. In the present study, we developed a set of CSSLs that constituted of 182 lines, using *G. hirsutum* CCR18 as the recipient parent and *G. barbadense* Pima90-53 as the donor parent, through molecular assisted-selection in $BC_3S_{1,3}$ generations. The genetic length of the substituted segments covered 19957.8 cM with an average segment of 21.0 cM, 4.7 times the total genetic length of upland cotton (4168.7 cM). The substituted segments of each line varied in length, ranging from 0.7 cM in the shortest segment to 83.2 cM in the longest. The number of substituted segments ranged from 1 to 11. Fiber quality of the CSSLs was nearly normally distributed, and a part of the lines have been obviously improved in fiber properties compared to CCR18. These materials provide new genetic resources for further QTL mapping, as well as upland cotton fiber quality improvement.

Key words: cotton; Pima cotton; chromosome segment substitution lines; fiber qualities; QTL

陆地棉 (*Gossypium hirsutum* L.) 和海岛棉 (*G. barbadense* L.) 都是棉花的四倍体栽培品种。生产上栽培的陆地棉表现产量高, 但纤维品质一般。而

海岛棉产量相对较低, 但纤维长度、强度和细度等品质特性优良。我国现有的棉花中缺乏纺高支纱的品种, 尤其缺乏大量纺 60 支纱以上高档纱的原棉^[1]。

收稿日期: 2015-04-01 修回日期: 2015-05-04 网络出版日期: 2015-12-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20151209.0916.030.html>

基金项目: 国家“863”计划课题 (2012AA101108-02)

第一作者研究方向为棉花分子育种。E-mail: wyp345dyx@163.com

通信作者: 马峙英, 研究方向为棉花分子育种。E-mail: mzhy@hebau.edu.cn

实现海岛棉优良基因向陆地棉的高效转移渐渗,对陆地棉纤维品质的遗传改良具有重要意义。

棉花纤维品质性状,包括纤维长度、强度、马克隆值、伸长率和整齐度等都是数量性状,由多基因控制,并且易受环境的影响。分子标记技术的发展为单个数量性状基因座(QTL, quantitative trait locus)提供了新的工具,利用高密度的分子标记连锁图谱可以把控制数量性状的多基因系统分解为单个孟德尔因子,并确定其在染色体上的位置和效应^[2]。QTL 定位通常利用分离群体进行,如 $F_2/F_{2,3}$ 、 BC_1 、 DH 、 RIL ^[3]等群体。过去的十几年间,世界各地的科学家利用这些群体对棉花纤维品质性状进行了 QTL 定位研究^[4-7]。J. K. Rong 等^[8]研究发现应用不同海、陆群体(F_2 、 BC_1 和 RIL)定位的纤维品质有关 QTL 重复性较差。由于数量性状和分离群体背景的复杂性,利用这些分离群体进行 QTL 定位难以取得理想的结果。

染色体片段置换系(CSSLs, chromosome segment substitution lines)是利用亲本杂交、回交,通过分子标记辅助选择(MAS, marker-assisted selection)技术构建的一系列覆盖作物整个基因组的近等基因系。CSSL 基因组内只有 1 个或少数几个纯合的供体亲本染色体片段,而其余部分与轮回亲本一致,是进行 QTL 初步定位、精细定位和图位克隆的一类理想群体,也是研究 QTL 功能和 QTL 之间互作的理想材料。利用 CSSL 进行 QTL 定位已在番茄、水稻和大豆等作物中得到了应用。A. H. Paterson 等^[9]通过 RFLP 标记辅助选择建立了番茄的置换系重叠群,并对植株重、产量和总可溶物量等进行了 QTL 的精细定位。Y. Eshed 等^[10]利用构建的番茄单片段置换系定位了 6 个番茄品质性状相关 QTL。T. Yamamoto 等^[11]利用 RFLP 标记构建了包含 3 个水稻生育时期 QTL 的近等基因系,并对这 3 个基因进行了精细定位。J. M. Bian 等^[12]利用构建的水稻染色体片段置换系定位了 7 个水稻旗叶性状 QTL。Q. Y. He 等^[13]利用 SSR 标记的大豆置换系分别定位了 8 个分枝数和 8 个结荚数相关 QTL。近年来,在棉花中,P. Wang 等^[14]利用 SSR 标记辅助选择首次培育出一套海岛棉染色体片段置换系。王鹏等^[15]利用陆、海种间置换系检测到棉花叶片中光和色素相关性状的 44 个 QTL。付央等^[16]利用海岛棉第 18 染色体片段置换系鉴定出 12 个产量及纤维品质相关 QTL。前人构建的染色体片段置换系群体对于棉花分子改良研究具有极为重要的意义,但由于受体亲本与生产上应用的栽培品种存

在差距,限制了优良的置换系在育种进程中的应用^[14],而部分以栽培陆地棉品种为受体亲本构建的染色体片段置换系导入片段长度大且数量多,覆盖率也不理想^[17-19],仍然需要进一步创制遗传基础丰富的 CSSL 材料。

本研究以农艺性状较好的陆地棉中棉所 8 号为受体亲本,以纤维品质和黄萎病抗性较好的海岛棉 Pima90-53 为供体亲本,通过高代回交,借助分子标记辅助选择,创制了一套陆地棉背景的海岛棉染色体片段置换系,为 QTL 精细定位和陆地棉纤维品质等性状的改良提供丰富的种质资源。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

供试材料由河北农业大学棉花遗传育种研究室提供。轮回亲本为陆地棉品种中棉所 8 号,纤维品质中等,纤维长度 29.60 mm,纤维强度 31.28 cN/tex,马克隆值 5.3;供体亲本为海岛棉品种 Pima 90-53,纤维品质优良,纤维长度 33.19 mm,纤维强度 40.16 cN/tex,马克隆值 4.1。

1.2 染色体片段置换系构建

染色体片段置换系的构建过程(图 1):2009 年在保定将中棉所 8 号与 Pima 90-53 杂交产生 F_1 ;2010 年在保定种植 F_1 和中棉所 8 号,用中棉所 8 号回交得到 BC_1F_1 ,然后每年都用中棉所 8 号在保定进行回交,直到得到 BC_3F_1 ;2013 年种植 BC_3F_1 ,用 46 对分布在染色体上且在亲本间扩增片段大小差异较大的 SSR 引物对 BC_3F_1 的 766 个单株进行基因型检测,挑选杂合位点数在 1~4 个的单株作为候选单株。筛选出的 BC_3F_1 单株继续自交 2 代获得 BC_3F_2 ,这 2 代将标记数增加到 170 对(184 个多态性位点),分别对 638 和 751 个单株继续进行 MAS 选择,构建染色体片段置换系。

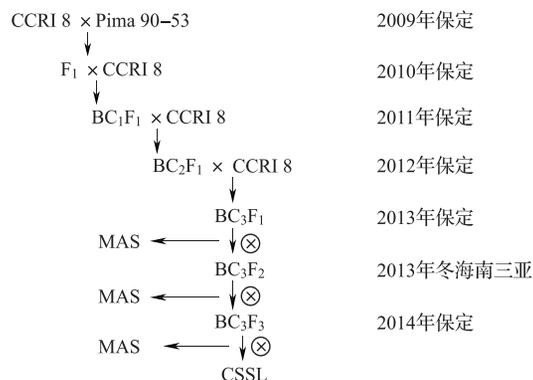


图 1 染色体片段置换系构建过程

Fig. 1 The process for developing CSSLs

1.3 棉花基因组 DNA 提取和置换系基因型分析

棉花叶片基因组 DNA 提取以 A. H. Paterson 等^[20]的 CTAB 法为基础,略作改进。参照本实验室杨鑫雷^[21]的 PCR 体系和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测每个单株的基因型差异。采用 GGT 2.0 (<http://www.dpw.wau.nl/pv/pub/ggt/>) 分析置换系群体的基因型组成。置换片段长度参照 N. D. Young 等^[22]的方法计算。

1.4 纤维品质测定

2014 年,在保定分别收取亲本和染色体片段置换系群体单株棉铃,每个单株不少于 8 个,用于测定纤维品质,包括纤维长度、强度、马克隆值、伸长率和整齐度 5 个性状。纤维品质测定由农业部棉花品质监督检测中心完成。

2 结果与分析

2.1 分子标记的选择

本实验室前期以中棉所 8 号和 Pima 90-53 为作图亲本已经构建了一张包含 579 个标记位点的、以 SSR 标记为主的遗传图谱^[23],覆盖棉花基因组遗传距离 4168.72 cM,标记间平均距离为 7.2 cM。本研究以该图谱为基础,每隔 10~20 cM 左右选择一个 SSR 标记,共选择了 170 个 SSR 标记,包含 184 个多态性位点(图 2)。其中,A5 染色体上标记最多,有 13 个标记,A2、A13、D3 染色体上标记最少,只有 4 个标记。SSR 标记间最小距离为 1.41 cM,最大距离为 55.79 cM,平均距离 18.54 cM。

2.2 染色体片段置换系遗传组成分析

通过 3 个世代的分子标记辅助选择,筛选出由 182 个单株组成的一套 Pima 海岛棉染色体片段置换系(图 3)。这套置换系的置换片段总共覆盖了陆地棉 96.2% 的基因组,其中 A7、A12、D2、D7、D12 未能完全覆盖。CSSLs 导入片段总长度为 19957.8 cM,是棉花基因组总长度 4168.7 cM 的 4.7 倍,单个导入系导入片段最短是 0.7 cM,最长是 83.2 cM,平均长度 21.0 cM。导入片段长度低于 20 cM 的单株有 23 个,占 12.6%,仅有 18 个(9.9%)单株导入片段高于 60 cM(图 4)。

导入片段总数 931 个,导入片段数最少是 1 个,最多是 11 个,平均导入片段数 5 个。其中单片段单株数量是 6 个,占 3.3%,2~4 个片段单株数量是 77 个,占 42.5%,接近 50% 的导入系含有很少的导入片段(图 4)。该置换系群体背景回复率最低的单株达到 91.9%,整个群体中仅有 11 个单株低于理论

背景回复率 93%,只占整个群体的 6.0%。背景回复率最高的单株已经达到 99.6%,且平均背景回复率达到 96.3%,说明代换片段的含量在整个基因组中的比例已经很低。

2.3 染色体片段置换系纤维品质性状分析

在纤维品质性状上,Pima 90-53 表现为“长、强、细”特征,中棉所 8 号纤维品质中等,分析表明,CSSLs 的 5 个纤维品质性状分布表现为相对连续的近正态分布(图 5)。

染色体片段置换系群体纤维品质性状分离变异较大,部分单株的纤维品质较 CCR18 得到明显提高,纤维长度高于轮回亲本的有 52 株,最高的达到 33.48 mm,超过了 Pima 90-53 的纤维长度。纤维强度超过轮回亲本的有 109 株,最高的达到 40.13 cN/tex,与 Pima 90-53 的纤维强度相当。马克隆值在 3.7~4.2 之间的单株有 39 株,其中部分单株纤维强度和长度表现均优于 CCR18(表 1)。

3 讨论

作物 QTL 定位研究需要首先构建目标性状的分离群体。最初进行 QTL 研究使用的都是分离群体,如 F_2/F_3 、BC₁ 群体等。这些材料易于构建,但不能在多年多点进行重复实验。随着技术的发展,出现了永久分离群体,如 DH 群体和 RIL 群体,这些群体中个体及其后代基因型稳定,能够克服分离群体的缺点,增加群体 QTL 定位的准确性。但这类群体的遗传背景比较复杂,对于复杂的数量性状进行精细定位时结果往往不尽所期。染色体片段置换系(CSSLs)只有置换片段与受体亲本之间存在差异,可以消除其他遗传“杂音”的影响,且 CSSLs 具有株系稳定性。利用 CSSLs 进行 QTL 研究可以提高 QTL 定位的准确性,而且一些效应较小的 QTL 也能被检测出,是进行 QTL 研究的理想材料。

在染色体片段置换系构建过程中,亲本的选择十分重要。一般要选择遗传背景差异较大的亲本。棉花现已构建的 CSSLs 选择的亲本主要分为两类,一类是以陆地棉遗传标准系 TM-1 为受体亲本,海岛棉为供体亲本构建的染色体片段置换系,如 P. Wang 等^[14]以 TM-1 为受体亲本,海岛棉海 7124 为供体亲本构建了首套棉花染色体片段置换系。此类置换系群体较为适宜于进行遗传学研究,受体亲本与生产应用品种性状存在较大差异,往往缺乏优良置换系株系可供育种实践应用。另一类是以推广的陆地棉栽培品种为受体亲本,海岛棉为供体亲本构

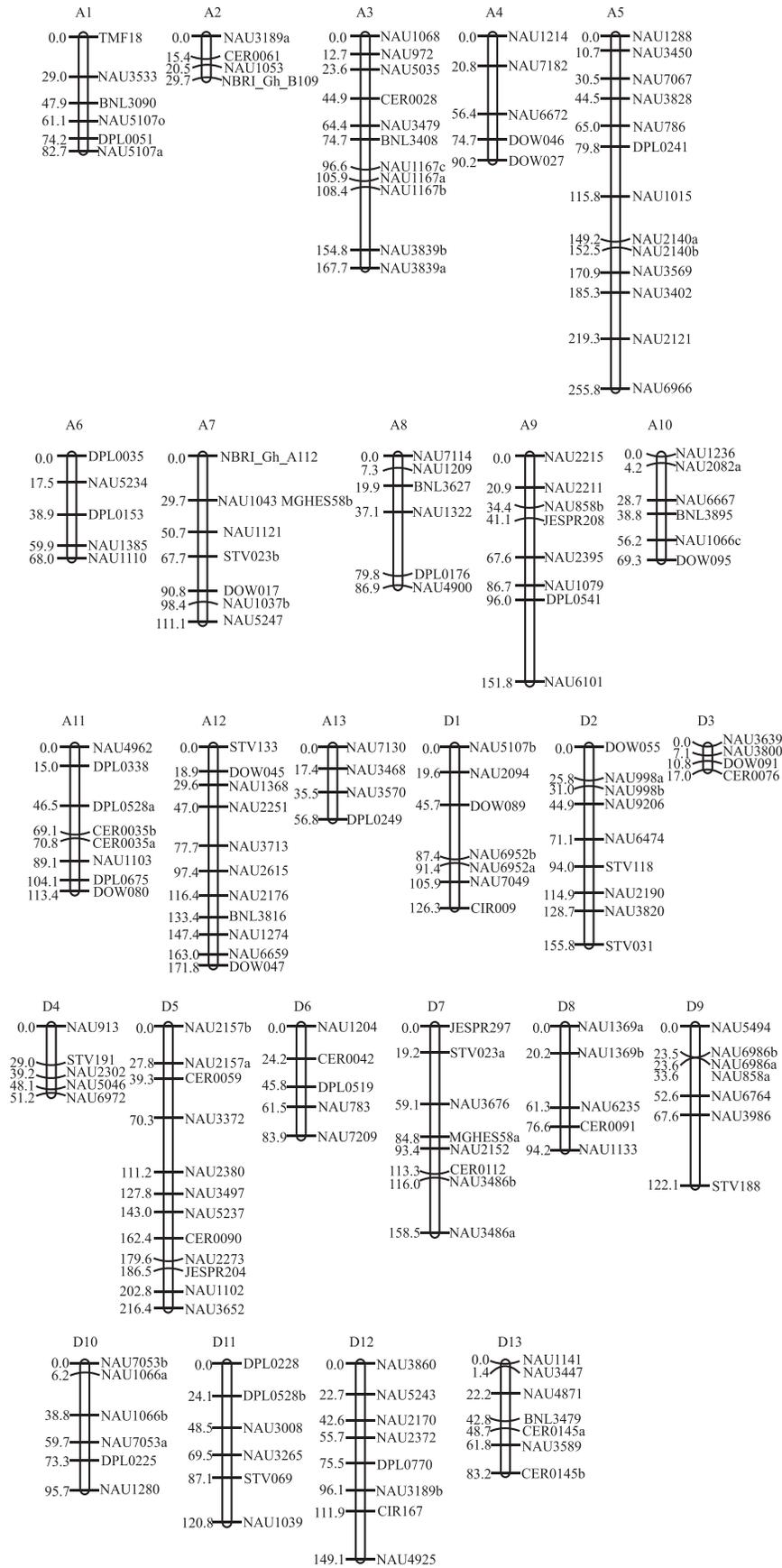
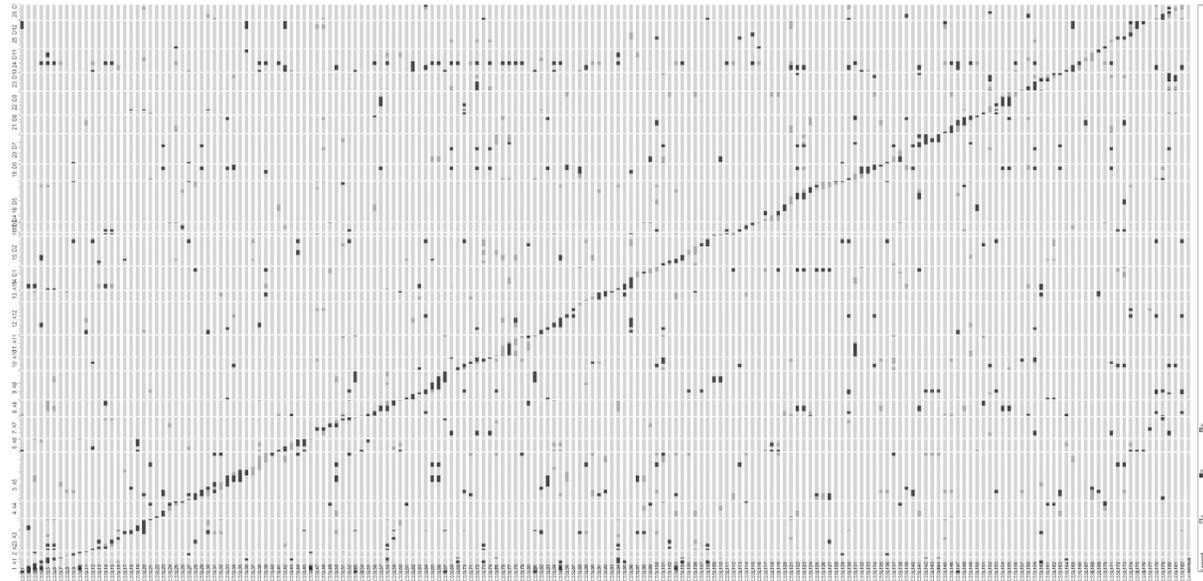


图 2 用于构建染色体片段置换系的 SSR 标记及连锁图谱

Fig. 2 SSR markers and linkage map used for genotype analysis during the CSSLs developing procedure



图左部数字代表染色体编号,图底部数字代表置换系编号, 浅灰 深灰 黑 分别代表受体亲本基因型、纯合供体亲本基因型和杂合基因型

The left number of the figure represents a chromosome, the bottom number represents the CSSLs

浅灰 深灰 黑 represent genotypes of recipient parent, homozygous donor parent, and heterozygous donor parent, respectively

图3 染色体置换片段示意图

Fig. 3 Graphical genotypes of CSSLs

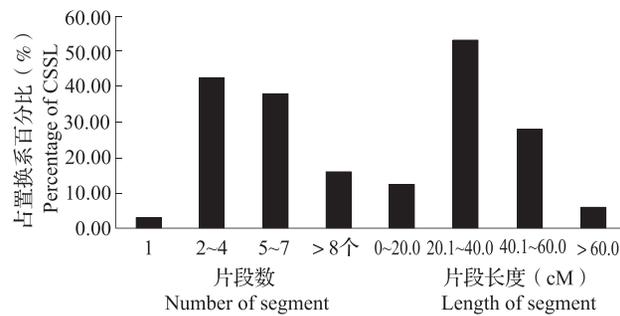


图4 染色体片段置换系置换片段数目和长度统计

Fig. 4 The statistics for the number of substituted segment and the length of substituted segment in CSSLs

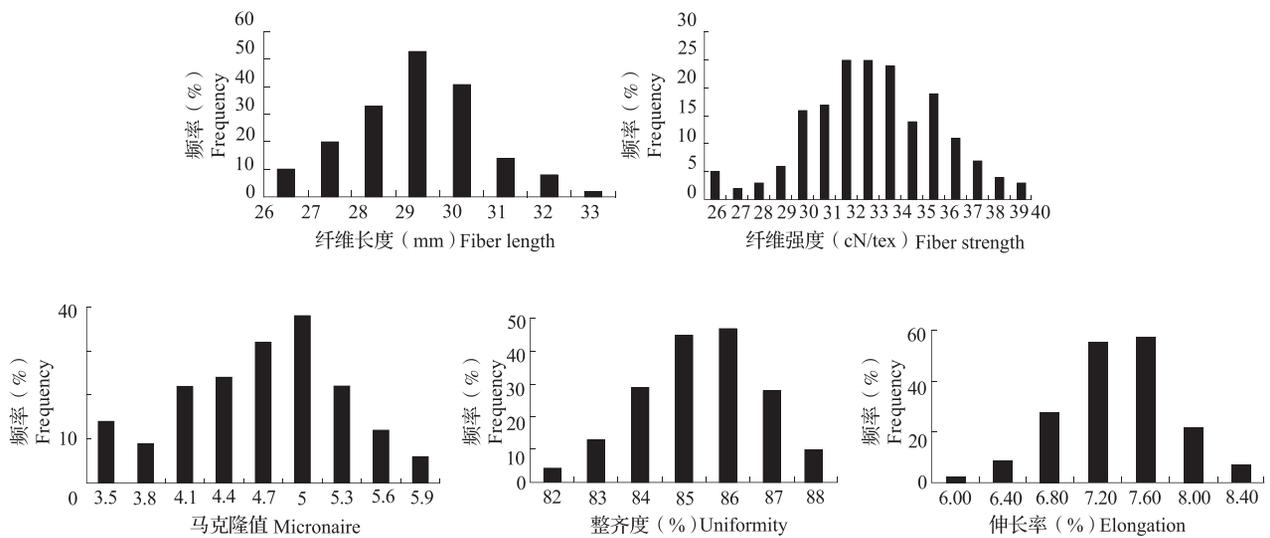


图5 染色体片段置换系纤维品质统计分布图

Fig. 5 Frequency distribution of fiber quality in CSSLs

表 1 纤维品质优良的 CSSLs

Table 1 CSSLs with good fiber quality

置换系 编号	纤维长度 (mm)	纤维强度 (cN/tex)	纤维整齐 度(%)	纤维伸 长率(%)
CSSL code	Fiber length	Fiber strength	Micronaire Fiber uniformity	Fiber elongation
CSSL3	32.80	33.81	3.86	83.10
CSSL46	32.46	33.18	4.25	84.21
CSSL78	33.48	34.72	3.70	85.94
CSSL133	31.59	37.35	4.29	88.53
CSSL156	31.75	33.59	3.96	87.24

建的置换系^[17-19],这些置换系覆盖率最高达到 80.9%;导入片段长度在 3.54~205.4 cM,导入片段平均长度在 17.7~23.8 cM,导入片段数量为 1~10 个,尚不能完全满足育种改良的需要。本研究以综合性状较好的陆地棉中棉所 8 号为受体亲本,纤维品质优异的海岛棉 Pima 90-53 为供体亲本,构建了一套染色体片段置换系,该套置换系覆盖率达到 96.2%,近 50%的株系导入片段数低于 4 个,只有 9.9%的株系导入片段长度大于 60 cM,导入的最长片段为 83.2 cM。

本研究构建的染色体片段置换系为棉花纤维品质遗传改良奠定了基础。利用 CSSLs 作为遗传群体,进一步开展纤维品质性状 QTL 定位研究。如 P. Wang 等^[24]利用陆海种间染色体片段置换系鉴定出纤维品质相关的 43 个加性 QTL 和 6 个上位性效应 QTL,其中有 6 个 QTL 在 4 个环境中稳定存在。其次,CSSLs 可以用于 QTL 精细定位和 QTL 的图位克隆。根据 QTL 初步定位结果,将 QTL-CSSL 与轮回亲本杂交,衍生出 F₂群体用于 QTL 精细定位。还可以将 CSSLs 在不同环境下反复测试,用于研究特定 QTL 与环境的互作效应,以及特定 QTL 之间的互作效应^[25]。尤其重要的是,可以将纤维品质表现优异的 CSSLs 用于常规育种,扩大棉花遗传种质资源库,也可将遗传背景相同的 CSSLs 杂交,使置换片段上的优良基因进一步聚合,培育出具有更多优良性状的新材料,为纤维品质改良的分子育种提供丰富的种质资源。

参考文献

- [1] 项时康,余楠,胡玉昌,等.论我国棉花质量现状[J].棉花学报,1999,11(1):1-10
- [2] Lander E S, Botstein D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps[J]. Genetics, 1989, 121(1):185-199
- [3] McCouch S R, Doerge R W. QTL mapping in rice[J]. Trends Genet, 1995, 11(12):482-487
- [4] Ulloa M, Meredith J W R. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an intraspecific population [J]. J Cot Sci, 2000, 4(3):161-170

- [5] Wang B H, Guo W Z, Zhu X F, et al. QTL mapping of fiber quality in an elite hybrid derived-RIL population of upland cotton[J]. Euphytica, 2006, 152(3):367-378
- [6] 陈利,张正圣,胡美纯,等.陆地棉遗传图谱构建及产量和纤维品质性状 QTL 定位[J].作物学报,2008,34(7):1199-1205
- [7] Tang S Y, Teng Z H, Zhai T F, et al. Construction of genetic map and QTL analysis of fiber quality traits for upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Euphytica, 2015, 201(2):195-213
- [8] Rong J K, Feltus F A, 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[J]. Genetics, 2007, 176(4):2577-2588
- [9] 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 [J]. Genetics, 1990, 124(3):735-742
- [10] Eshed Y, Zamir D. An introgression line population of *Lycopersicon pennellii* in the cultivated tomato enables the identification and fine mapping of yield-associated QTL [J]. Genetics, 1995, 141(3):1147-1162
- [11] 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[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97(1-2):37-44
- [12] Bian J M, He H H, Shi H, et al. Quantitative trait loci mapping for flag leaf traits in rice using a chromosome segment substitution line population[J]. Plant Breeding, 2014, 133(2):203-209
- [13] He Q Y, Yang H Y, Xiang S H, et al. QTL mapping for the number of branches and pods using wild chromosome segment substitution lines in soybean (*Glycine max* (L.) Merr) [J]. Plant Genet Resour-C, 2014, 12(S1):172-177
- [14] Wang P, Ding Y Z, Lu Q X, et al. Development of *Gossypium barbadense* chromosome segment substitution lines in the genetic standard line TM-1 of *Gossypium hirsutum* [J]. Chin Sci Bull, 2008, 53(10):1512-1517
- [15] 王鹏,张天真.利用棉花海陆种间染色体片段导入系剖析光合色素含量的遗传基础[J].作物学报,2012,38(6):947-953
- [16] 付央,苑冬冬,胡文静,等.陆地棉背景下海岛棉第 18 染色体片段置换系的培育及相关农艺性状 QTL 定位[J].作物学报,2013,39(1):21-28
- [17] 杨泽茂,李骏智,李爱国,等.利用高代回交和分子标记辅助选择构建棉花染色体片段代换系[J].分子植物育种,2009,7(2):233-241
- [18] 梁燕.早熟陆地棉染色体片段代换系的构建及 QTL 初步定位[D].安阳:中国农业科学院棉花研究所,2010
- [19] 冯常辉.陆地棉邯郸 208 背景的海岛棉 Pima90 染色体片段导入系的构建及评价[D].武汉:华中农业大学,2009
- [20] Paterson A H, Brubaker C L, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. Mol Biol Rep, 1993, 11(2):122-127
- [21] 杨鑫雷.四倍体棉花纤维品质相关性状 QTL 定位及元分析[D].保定:河北农业大学,2013
- [22] Young N D, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes[J]. Theor Appl Genet, 1989, 77(1):95-101
- [23] Yang X L, Zhou X D, Wang X F, et al. Mapping QTL for cotton fiber quality traits using simple sequence repeat markers, conserved intron-scanning primers, and transcript-derived fragments[J]. Euphytica, 2015, 201(2):215-230
- [24] Wang P, Zhu Y J, Song X L, et al. Inheritance of long staple fiber quality traits of *Gossypium barbadense* in *G. hirsutum* background using CSILs[J]. Theor Appl Genet, 2012, 124(8):1415-1428
- [25] Yamamoto T, Lin H X, Sasaki T, et al. Identification of heading date quantitative trait locus Hd6 and characterization of its epistatic interactions with Hd2 in rice using advanced backcross progeny [J]. Genetics, 2000, 154(2):885-891