

密级:

论文编号:

中国农业科学院 学位论文

棉纤维发育突变体 SSR 标记
定位和遗传相似性分析

**SSR marker location and analysis of genetic
Similarity of fiber development mutants in cotton**

硕 士 研 究 生： 王 素 会
指 导 教 师： 杜 雄 明 研究员
申 请 学 位 类 别： 理 学 硕 士
专 业： 生物化学与分子生物学
研 究 方 向： 棉纤维生理生化研究
培 养 单 位： 中国农业科学院棉花研究所

提交日期： 2004 年 6 月

**Master Degree Thesis of
Chinese Academy of Agricultural Sciences**

**SSR marker location and analysis of genetic Similarity of
fiber development mutants in cotton**

By Wang Su-hui

Supervisor: Prof. Du Xiong-ming

Degree: Master of Science

Major: Biochemistry and Molecular Biology

Research: Fiber Biochemistry and Molecular Biology

Institute: Cotton Research Institute, CAAS

Submission time: June, 2004

棉纤维发育突变体 SSR 标记 定位和遗传相似性分析

SSR marker location and analysis of genetic Similarity of fiber development mutants in cotton

硕士 研究生： 王 素 会
指导 教师： 杜雄明 研 究 员
申请学位 类别： 理学 硕士
专 业： 生物化学与分子生物学
论文提交 日期： 2004 年 6 月
论文答辩 日期： 2004 年 6 月
学位授予 单位： 中国农业科学院研究生院
答辩委员会主席： 马峙英 教 授
答辩委员会成员： 汪若海 研究员
郭香墨 研究员
王清连 教 授
祝水金 教 授
评 阅 人： 郭旺珍 教 授
袁有禄 副研究员

中国农业科学院研究生院

2004 年 6 月

独 创 性 声 明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的研究成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业科学院或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：

时间： 年 月 日

关于论文使用授权的声明

本人完全了解中国农业科学院有关保留、使用学位论文的规定，即：中国农业科学院有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业科学院可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

（保密的学位论文在解密后应遵守此协议）

研究生签名：

时间： 年 月 日

导师签名：

时间： 年 月 日

摘要

本研究应用传统遗传学方法,分析了新纤维发育突变体GZnn的遗传方式,确定了GZnn是受一对隐性基因控制的质量性状。并利用SSR分子标记技术将该光子基因定位到10号染色体上,与已经发现的光子 N_1 (位于12号染色体), n_2 (位于26号染色体)所在染色体不一样,鉴于美国近年新发现了 n_3 光子基因,故将我们发现的新的隐性光子基因命名为 n_4 ,该光子基因与分子标记sloc1紧密连锁,距离为10.8cM,而距sloc2-1位点为20.4 cM。

利用Mapmaker exp /3.0 软件,对TM-1×GZnn的 F_2 代筛选到的22个多态性SSR等位位点进行连锁图谱的构建,结果有12个多态性SSR等位位点分布到2个连锁群上,全长198.4 cM,运用winQTLcart 2.0 软件,采用复合区间作图法,对TM-1×GZnn的 F_2 代衣分、子指、纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值等7个数量性状进行全基因组的QTL扫描,取LOD值为3.0时,分别发现了一个与子指有关的微效QTL (SI02)和一个与纤维长度有关的微效QTL (FL02),可解释的表型方差变异分别为4.64%和0.19%,并将FL02和 SI02都定位于第12号染色体上。

对三组不同纤维发育突变体的近等基因系,利用SSR分子标记技术,进行了分子水平上的多态性分析及遗传相似性和聚类分析,并分类构建了这些纤维发育突变体的SSR指纹图谱。结果表明新乡小吉无絮与中棉12的相似系数是0.471,与豫棉4号的相似系数是0.587,二者差异明显达到显著水平,初步认为新乡小吉无絮可能来源于豫棉4号;徐州142无絮(XZ142w)和新乡小吉无絮(Xin)突变体表型变异相同,而且,两个无絮无絮突变体SSR标记的遗传相似性达90%,然而,SSR指纹图谱表明两个突变体具有不同的分子特征,可能是由不同的遗传背景所致;SSR遗传相似性分析还表明四个近等基因系GZnn、H154、GZNn与TM-1的相互间差异明显(相似系数范围为0.5-0.62),这说明基因显隐性的突变差异可以导致较大的遗传差异。两个隐性纤维发育突变体H-154与GZnn的相似系数达到了0.94,这与纤维性状的表现及其遗传方式极其符合,这说明具有相同的表现型也具有一定的遗传相似性。

采用NTSYS 1.8 数据分析软件对TM-1、GZnn、H-154、GZNn、XZ142w和Xin六个种质进行了聚类分析,并绘制品种亲缘关系树状图。在距离为3的时候,这六个种质聚为三类:GZNn、H154、GZnn聚为一支,三个品种均表现为无短绒有长纤维,与三者间有共同的血缘相吻合;而同为无短绒无长纤维的突变体Xin与XZ142w聚为一支,表现为相同遗传表型的种质聚在一起,说明SSR标记技术可以获得很好的按表型聚类的品种聚类图。

关键词:棉纤维发育突变体, SSR 标记, 指纹图谱, QTL 定位

Abstract

The new fiber mutant GZnn was analyzed using traditional genetic method and it was sure that GZnn was qualitative trait controlled by one recessive gene. Using SSR molecular marker technology, we located this gene on chromosome 10. Since its position was different from N_1 (on chromosome 12), n_2 (on chromosome 26) and n_3 that was found recently in America, we named it n_4 . The gene was closely linked with marker *sloc1* and their distance was 10.8 cM. The gene was also linked with *sloc2-1* with their distance of 20.4 cM.

22 loci were found after SSR screening the F_2 of TM-1 $\times$ GZnn. Using software Mapmaker exp 3.0, we found 12 of them were distributed on 2 linkage populations that covered 198.4 cM. Using software WinQTLcart, we scanned the whole genome QTLs related to 7 quantity traits (Lint percent, seed index, fiber length, uniformity ratio, fiber strength, elongation, Micronaire value). When LOD is 3.0, one QTL (FL02) relevant to fiber length and one QTL (SI02) relevant to seed index were found. They could explain the phenotypic variance of 0.19% and 4.64% respectively. Therefore, we located FL02 and SI02 on chromosome 12.

Using SSR marker technology, we undertook polymorphism analysis, genetic similarity and cluster analysis on 3 groups of fiber mutant NIL (Near Isogenic Line) and their SSR fingerprint atlas had been also built. The similarity coefficient between Xin and Zh12, Xin and Yu4 were 0.471 and 0.587. They differed from each other significantly. Therefore, Xin maybe originates from Yu4. Mutation of XZ142w was the same as Xin and their SSR genetic similarity reached 90 percent. However, their SSR fingerprint atlas showed they had different characters, which maybe due to their different genetic background. SSR genetic similarity analysis also revealed the difference between 4 NIL was significant and the similarity coefficient ranged from 0.5 to 0.62. This proved that dominant or recessive mutation could lead to large genetic difference. The similarity coefficient of 2 recessive fiber mutation H-154 and GZnn reached 0.94. This strengthen their similarity of fiber characters and genetic ways and also proved that the same phenotype was of large intent of genetic similarity.

With the application of software NTSYS 1.8, cluster analysis was also carried out on TM-1, GZnn, GZnn, H-154, Xin and XZ142w and the Dendrogram of these 6 lines was also built. When the genetic distance is 3, the 6 lines could be divided into 3 groups. GZnn, H-154 and GZnn belonged to one group and all of them have fuzzless and linted. Meanwhile, the mutant Xin and XZ142, which were fuzzless and lintless lines, were clustered in another group.

Key word : cotton fiber mutant, SSR marker, fingerprinting map, QTL location

目录

第一章 引言	1
1.1 几个纤维发育突变体特征及来源	1
1.2 徐州-142 无绒无絮突变体 (XZ142w)	2
1.2.1 纤维分化发育期细胞学和生物化学差异	2
1.2.2 胚珠离体培养诱导纤维的差异	2
1.2.3 遗传和分子生物学研究	3
1.3 超短纤维突变体Ligon lintless	5
1.3.1 Li-1 的形态及生理学	5
1.3.2 Li-1 的遗传及分子生物学	6
1.3.3 Li-2	6
1.4 本文研究的目的与意义	6
第二章 新光子基因的传统遗传学和SSR标记定位	8
2.1 材料与方法	8
2.1.1 供试材料:	8
2.1.2 田间试验及性状调查	8
2.1.3 总DNA提取与纯化	9
2.1.4 SSR标记方法	10
2.1.5 标记位点的命名方法及遗传图谱的构建	13
2.2 试验结果与分析	13
2.2.1 光子基因的传统遗传分析	13
2.2.2 光子基因的SSR标记分析	14
2.2.3 光子基因 n_4 的连锁分析	16
2.3 讨论	17
2.3.1 GZnn是一个新的对棉纤维分化和发育机理研究具有重要价值的突变体	17
2.3.2 整合分子标记连锁图和性状遗传连锁图以高效定位新基因	18
第三章 光子突变体遗传群体的纤维性状QTLs定位	19
3.1 材料与方法	19

3.1.1	供试材料	19
3.1.2	方法	19
3.1.3	数据分析和QTL定位	19
3.1.4	标记位点及QTL位点的命名方法	19
3.2	结果分析	20
3.2.1	F ₂ 群体的纤维性状的频数分布特征	20
3.2.2	连锁图谱的构建	22
3.2.3	QTL定位分析	24
3.3	讨论	24
第四章	若干纤维发育突变体的SSR多态性分析	25
4.1	材料与方法	25
4.1.1	供试材料：	25
4.1.2	方法	26
4.1.3	数据分析方法	26
4.2	结果与分析	26
4.2.1	光子GZNn与毛子NN2-2的SSR多态性及其指纹图谱	26
4.2.2	徐州142无絮和徐州142的SSR多态性和指纹图谱	28
4.2.3	徐州142无絮与新乡小吉无絮的SSR多态性和指纹图谱	29
4.2.4	新乡小吉无絮突变体及其原始型来源分析	31
4.2.5	不同类型纤维发育突变体遗传差异比较	34
4.3	讨论	37
第五章	结论	38
	参考文献	40
	致谢	44
	作者简介	45

第一章 引言

棉纤维是由纤维(lint)和短绒(fuzz)组成。而棉子表面没有短绒或(和)没有纤维的性状称为光子。具有光子性状的突变体称为纤维发育突变体。光子又分为几种类型：带有纤维和短绒但纤维很短的光子(简称有绒超短絮突变体)，例如Li-1(Ligon lintless-1)；无短绒无纤维的光子(简称无绒无絮突变体)，例如徐州-142 无绒无絮突变体(XZ142w)；无短绒有纤维的光子(简称无绒有絮突变体)，例如N₁；还有端毛，稀毛和端稀毛等。

由于光子一般表现为较原始的退化性状如铃较小、衣分低、皮棉产量低、纤维短，纤维细度、断裂长度、强力等品质，都随光子性状不同而变化，因而，光子突变体的育种利用受到了很大限制。但另一方面，与毛子棉相比，光子具有对播种有利，不易传播病菌、吸水快、出苗好等优点，而且陆地棉光子性状遗传背景复杂，遗传差异大，纤维强度好，是提高纤维强力的重要资源^[2]，故光子性状的新品种选育工作逐渐开展起来。

由于棉纤维是由种子表皮单细胞发育而来，是研究基因表达的好材料。纤维发育突变体及其原始型作为研究棉纤维分化发育的分子机理及形成纤维品质的分子基础的材料，具有重要的意义。

1.1 几个纤维发育突变体特征及来源

自1927年以来(Kearney,1927)^[37]，人们陆续发现了许多纤维发育突变体，其中无绒无絮突变体主要有徐州-142 无絮、新乡小吉无絮等，其中研究较为深入的是徐州-142 无絮；无绒稀絮突变体主要有稀絮H10和得州9107；无绒有絮突变体主要有光子N₁、光子Nn和光子n₂；长纤维突变系目前发现两个：Li-1和Li-2。现将用于研究的几个主要纤维发育突变体列于表1。

表1：几个纤维发育突变体的简介
Tabel 1 : Main introduction of several fiber mutants

名称 name	简名 Abbr	基因型 genotype	特征 charecter	产地 producing area	来源 origin
徐州-142 无絮	XZ142w	n ₁ n ₁ n ₂ n ₂ li ₃ li ₃ li ₄ li ₄	无绒无絮	中国	徐州农科所
新乡小吉无絮	Xin	— —	无绒无絮	中国	新乡小吉镇
L-70	L-70	— —	无绒无絮	美国	— —
L-40	L-40	— —	无绒无絮	苏联	Musaev et al . 1972
Mcu5	Mcu5	2-4 对基因	无绒无絮	印度	Peter et al .1984
稀絮 H10	H10	FFiLL ₁ L ₁ l ₂ l ₂ li ₁ li ₁	无绒稀絮	中国	Nadarajan.N et al .1988
得州 9107	T9107	— —	无绒稀絮	中国	中国农科院棉花所
光子 Nn	GZNn	FFiLL ₁ L ₁ l ₂ l ₂ li ₁ li ₁	无绒有絮	中国	中国农科院棉花所
光子 n2	n2	n ₂ n ₂	无绒有絮	美国	Ware et al . 1947
光子 N1	N1	FFiLL ₁ L ₁ l ₂ l ₂ li ₁ li ₁	无绒有絮	美国	Kohel et al . 1973
Ligon lintless-1	Li-1	FFiiL ₁ L ₁ L ₂ L ₂ Li ₁ Li ₁	有绒超短絮	美国	Kearney et al ,1927
Ligon lintless-2	Li-2	— —	有绒超短絮	美国	L. L. Ligon . 1929
					Narbuth & Kohel 1990

1.2 徐州-142 无绒无絮突变体 (XZ142w)

徐州-142 无绒无絮突变体是从陆地棉徐州-142 中发现的, 简称XZ142w (w: 无绒无絮)。除了种子无短绒无纤维外, 突变体XZ142w在表型上与野生型徐州 142 (简称XZ142) 没有区别, 遗传分析表明XZ142w突变体是产生于XZ142 的一个隐性突变^[61]。这两个材料之间可视为近等基因系, 对它们进行遗传生理生化等比较研究, 有利于排除与纤维发育无关的遗传背景的干扰, 探索纤维发育的本质机理。

1.2.1 纤维分化发育期细胞学和生物化学差异

XZ142 和XZ142w的胚珠在纤维分化发育的不同时期表现出不同的特征特性。在纤维原始细胞分化期, XZ142w的胚珠表面未见突起, 表皮细胞无亮暗细胞分化, 亚细胞结构变化不大, 这说明XZ142w胚珠表皮细胞并未分化为纤维原始细胞^[16]。这一结论在生物化学上也得到证实: XZ142 胚珠中可溶性蛋白含量峰值出现在-3~-1DPA (开花后天数), 这与纤维初始分化发育相关基因的表达有关, 突变体XZ142w则在此时段没有表达, 在-2~+1DPA大量合成蛋白质, 这将消耗大量的能量和代谢中间产物, 显然不利于纤维的伸长^[14]。纤维原始细胞分化期XZ142 中可溶性POD活性变化较平缓, +2DPA后迅速下降, 而XZ142w中可溶性POD活性在-5~-1DPA一直较低, 随后急剧上升, IAA氧化酶活性XZ142 显著低于突变体XZ142w。研究证实^[14]: 0DPA的胚珠内源IAA含量的急剧上升, 是纤维突起和伸长所必需的, 胞内高POD活性直接或间接地严重抑制纤维和短绒的突起和伸长, 因而XZ142w表现为无纤维原始细胞的分化。故XZ142w胚珠表皮细胞正常旺盛分裂且结构致密, 胞间连丝较多, 无特化的细胞, 最终发育成无纤维的光子^[16]。

XZ142 和XZ142w的胚珠在纤维发育分化的不同时期表现出不同的特征特性, 研究认为纤维伸长主要与细胞壁结合的离子型POD、IAA氧化酶有关, 而与可溶性酶关系不明显。刘康等 (1998) ^[14]报道了XZ142w与其野生型相比有高含量的POD和IAA氧化酶, 高POD活性可能通过促进了细胞壁中木质素的合成和 (或) 细胞壁内的结构蛋白、半纤维素和果胶的交联, 从而阻碍了细胞壁的伸长^[13], 故高含量的POD和IAA氧化酶阻碍了纤维细胞的伸长与发育^[21], 是XZ142w纤维和短绒不能突起和伸长的一个重要原因^[14], 所以认为胚珠中IAA氧化酶通过调节IAA的有效含量而POD影响细胞初生壁的构成可能是棉纤维初始发育过程中二个重要因素。

XZ142w的胚珠不仅生化物质动态变化有较大的差异, 而且其生化物质的组成差异也很大: 纤维发育突变体的纤维素含量和种仁蛋白质含量低, 脂肪含量高, 纤维素含量与种仁内脂肪含量呈显著或极显著负相关; 与纤维可溶性糖、纤维蛋白质呈显著负相关^[11]。

1.2.2 胚珠离体培养诱导纤维的差异

70 年代初, Beasley 等 (1971) ^[30]体外培养棉花胚珠取得了成功, 使棉纤维发育的研究有了一个可控的手段。Meinet等 (1977) ^[45]证明了体外培养的纤维和植株上发育的纤维在生化组分和发育过程等方面是相同的, 纤维伸长规律是一致的, 也呈S型曲线, 且变化规律均符合Logestic

方程,从最终形成的纤维长度看,离体培养纤维仅为自然长度的一半左右,说明离体条件下整个纤维发育进程缩短了^[1]。从而使离体培养条件下得出的结论在解释纤维发育方面有了可靠性^[20]。

XZ142w离体胚珠及其纤维的诱导 孙振元等(1992)^[20]研究表明XZ142w胚珠无论受精与否,均不能在BT培养基上正常生长,但当补充了GA₃或者GA₃+IAA后则生长良好,当只添加GA₃时,珠柄端和受伤部位均产生绒状细胞群,这说明离体的XZ142w胚珠不具有足够胚珠发育的GA₃+IAA,在自然状态下,XZ142w却有正常的胚珠(种子),他们认为:XZ142w营养体提供的激素或激素组合合适于胚珠发育,却不适于产生纤维。张天真等(1992)^[25]采用BT基本培养基另外添加生长素(IAA)和赤霉素(GA₃)对陆地棉徐州-142无絮突变体进行纤维初始发育的体外诱导研究:GA₃对XZ142w纤维初始发育具有强的诱导作用,IAA则对它没有什么诱导作用,并且当和GA₃混合使用时,表现出对GA₃具有某种抑制作用^[25]。

但是突变体胚珠并没有诱导出真正意义上的纤维。XZ142w纤维发育的体外诱导还需进一步研究。

胚珠衍生细胞的诱导 孙振元(1992)^[19]、柏长青(1993)^[1]将+2DPA的XZ142w胚珠培养在含有GA₃的BT-培养基中,结果珠柄端细胞伸长,进一步培养可获得相似于培养12天的正常纤维。因此认为,XZ142w的非胚珠表皮细胞也具有分化为成熟纤维的能力,然而,突变体胚珠衍生细胞诱导不出正常基因型的纤维细胞。Davidonis(1989)^[31]曾对正常基因型胚珠衍生细胞进行伸长培养(BT-培养基+5.0umol/L GA₃),发现有一部分细胞可以伸长到0.6-1.0mm,孙振元等(1992)^[20]认为对胚珠衍生的伸长细胞的进一步培养能够获得成熟纤维。如果通过培养基及其它营养物质的调整实现了这一目标,那么将是向棉纤维工厂化生产迈出了重要一步。

多细胞纤维的诱导 杜雄明(2000)^[3]利用XZ142w胚珠离体培养技术诱导出了多细胞的絮状纤维。这是继Van't Hof等(1996)首次发现多细胞纤维以来,又一种新型的多细胞纤维,二者主要差别是:该种类型的多细胞以念珠状横向排列为主,同时也进行纵向增生,只能产生于含GA₃的BT培养基上,而Van't Hof的多细胞仅进行横向分裂,呈线状排列,且产生于无激素的BT培养基上,GA₃抑制多细胞的产生。

如果进一步研究,或许可以获得与控制细胞分裂的有关的基因。

1.2.3 遗传和分子生物学研究

1.2.3.1 XZ142w的遗传方式

张天真等(1991)^[61]对XZ142w进行了等位性测验结果表明:XZ142w的基因型可能为li₃li₃n₁n₁n₂n₂,可能产生于XZ142(li₃li₃n₁n₁N₂-)的隐性突变。Du等(2001)^[32]研究表明:XZ142w的短绒与纤维的有无是由4对相互作用的基因控制,均位于不同的染色体上,分别命名为N₁、N₂、Li₃、Li₄。其中N₁N₁控制短绒的有无,N₂N₂控制短绒的分化与发育,Li₃Li₃Li₄Li₄决定着纤维的有无,li₃li₃li₄li₄同型时还抑制短绒的发育。这样XZ142w的基因型即为n₁n₁n₂n₂li₃li₃li₄li₄。

1.2.3.2 XZ142w 及其野生型纤维发育的分子生物学

John & Crow (1992)^[35]首次报道克隆出纤维特异表达基因E6, 其编码蛋白具有细胞壁结构蛋白的特点。利用反义RNA技术使棉纤维中E6 蛋白减少 60%~98%, 但并未影响到纤维品质。于晓红等 (2000)^[24]对不同发育时期XZ142 及XZ142w的E6 基因的转录作RT-PCR分析: 0DPA时, XZ142 中的E6 基因稳态的mRNA水平最高, 之后持续增加至约+15DPA, 在+22DPA后下降, 而XZ142w中 0~+30DPA间只有很低水平的E6 转录子。Wang 等 (2002)^[54]对XZ142w的珠被细胞和XZ142 的纤维-珠被细胞中克隆的E6 基因进行了核苷酸序列分析, 二者存在差异: 1) 短序列GGCTCA的重复次数不同; 2) XZ142w的E6 基因发生了碱基缺失突变和 7 个核苷酸的突变, 而二者间的差异可能与XZ142w的E6 基因的低表达有关。尽管XZ142 中E6 基因编码的蛋白在纤维细胞的分化与发育中的功能尚且不清楚, 但是现有数据研究表明突变体XZ142w中的E6 基因可以抑制珠被表皮细胞分化成纤维细胞^[54]。虽然E6 基因结构和表达方式上与表型性状存在平行的变异关系, 但是这种变异与纤维细胞发育的异常关系可能不是直接的。因为从DNA变异到表型变异间尚有很多环节, 这些环节的相互连接关系有待进一步研究。

Xiao等 (2002)^[57]对比研究了XZ142w和XZ142 的胚珠中基因表达的情况, 结果获得了棉花多聚磷酸肌醇的结合蛋白基因 (Gh-sh2) 的全长cDNA序列: 有 955 个碱基对, 其中包含可编码 247 个氨基酸的 744 个碱基对的ORF序列。结果表明, 在纤维分化期XZ142 的Gh-sh2 基因得到表达, 而在XZ142w中无表达; 在中期和后期, Gh-sh2 基因的翻译产物积累在下胚轴、纤维和胚珠中, 而在根和叶片中没有积累。以上可见, Gh-sh2 基因可能与纤维分化发育有关。

以XZ142w为材料, 获得了棉花 23808 个cDNA的克隆, 并通过微阵列 (microarray) 技术获得约 40 个与纤维有关的特异基因^[62]。Suo等 (2002)^[52]构建了一个从棉花胚珠cDNA库中随机筛选的cDNA 微阵列, 并用通过逆转录法从XZ142 及XZ142w的胚珠RNA中获得的探针, 进行差异杂交筛选。结果表明: 在胚珠形成过程中有 10 个选择性表达的cDNA, 其中Gh IAA16 编码一个 208 个氨基酸的蛋白质 (命名为Gh IAA), 其转录峰值出现在-3DPA的胚珠中, 此时正是棉纤维初始分化时期, 然后在无絮突变体中迅速减少而在野生型胚珠中则保持了一个稳定的表达量。因此 Gh IAA基因可能对棉纤维初始分化起着一定的作用。

Zhu等 (2002)^[62]、Ji等 (2003)^[33]利用RDA技术, 利用从陆地棉纤维中提取获得的cDNA作为待测组 (tester), XZ142w中获得的cDNA作为对照组 (driver), 筛选出属于 13 个功能组的 280 多个在纤维分化发育期特异表达的cDNA片段, 进一步研究获得了一些在XZ142w中不能表达的全长cDNA: 编码S-腺苷甲硫氨酸合成酶的cDNA, 编码F1-ATP酶 β -亚基的cDNA, 编码的蛋白类似成束蛋白的cDNA。经分析, 有 172 个基因在棉纤维伸长期表现出明显的正调节作用。有 29 个cDNA在纤维快速伸长期都得到活化^[33], 包括推定具有液泡H⁺-ATPase催化亚基的、类似驱动蛋白的钙调素结合蛋白的cDNA, 几个阿拉伯半乳糖蛋白和参与长链脂肪酸生物合成的关键酶cDNA, 和几个上游路径, 例如生长素信号转导、MAPK通路、抑制蛋白和导致细胞壁松弛的Expansin蛋白等。

Ji等 (2002)^[34]利用cDNA差异表达法分离出一个在XZ142 胚珠中表达而在XZ142w中不表达的cDNA, 并命名该基因为Gh-BTubL, 该基因与棉纤维伸长模式有关。经分析, 在XZ142w的胚

珠中没有检测到Gh-BTubL基因的mRNA,而在XZ142 的胚珠中很容易检测到,因此认为该基因在纤维伸长方面具有重要作用。

Liang等(2002)^[42]利用Myb蛋白保守的R₂、R₃结构域设计了一对引物,分离出72个Myb同系物,并从中发现了一个GhMYb9基因。表达分析表明:GhMYb9编码的蛋白的转录表达峰值出现在-3DPA的胚珠中,然后在XZ142及其突变体中都迅速下降。这说明GhMYb9基因对纤维分化也有一定作用。Luo等(2001)^[44]应用AFLP技术对XZ142w和XZ142进行多态性分析,结果有一个片段(CF1)在XZ142中稳定表达,分析发现CF1片段与纤维发生存在一种共分离关系,表明CF1片段可以作为一个纤维发生的分子标记。

综上所述,徐州142无絮突变体与野生型相比,其纤维发育差异主要表现在开花前纤维细胞分化上,其间突变体胚珠表皮细胞结构、IAA氧化酶、POD酶活性、蛋白质含量都发生了显著变化。其胚珠离体培养难以获得成熟纤维,却能产生多细胞纤维。遗传研究表明,XZ142w的无絮突变是由2对以上基因控制并存在互作。通过对突变体与野生型进行分子标记和基因表达差异研究表明:突变体中与纤维分化有关的基因发生突变或受到抑制而不表达,导致产生了无絮光子。因而,XZ142w和XZ142这一对近等基因系是研究纤维分化基因差异表达的理想材料,对其作深入研究有助于揭示纤维细胞的表达模式以及相关基因的生物学功能,对提高棉花产量、改良纤维品质乃至发展人工棉纤维都具有重要意义。

1.3 超短纤维突变体 Ligon lintless

1.3.1 Li-1 的形态及生理学

Ligon lintless-1和Ligon lintless-2是两个长纤维(fiber)突变系。Ligon lintless-1(Li-1)是Ligon在30年代发现并命名的棉纤维变短的突变系,其植株形态特征是叶片和茎呈扭曲状,发育迟缓。Karaca等(2002)^[36]研究表明:纤维发育早期没有差别,Li-1基因可能在纤维伸长期表达。马家璋等(1993)^[15]研究发现Li-1在-1DPA~+6DPA期间,纤维细胞分化、伸长及长度与TM-1相似,但纤维前端是突出的萎缩。可认为这是纤维停止继续延伸的先兆。Kohel等(1974)^[40]报道Li-1在+14DPA纤维长度达最长,TM-1在+28DPA纤维长度达最长。杜雄明(1998)^[4]研究发现Li-1是棉子上密被长6mm左右的短纤维和短绒的突变系,其内源GA₁₊₃增加速率的最大时期在受精后,而TM-1在受精前,且在+1DPA有很高的ABA(脱落酸),抑制了纤维的伸长。朱勇清等(2003)^[26]研究发现Li-1突变体茎的形成层和韧皮部分化发育不完全,生长素由顶端向基部的极性运输能力下降,仅为野生型植株的大约三分之一。推测棉花Li-1突变体包括纤维发育不良在内的多效性异常表型,与其生长素极性运输能力的下降有关。Kohel等(1993)^[38]利用放射性¹⁴C标记葡萄糖,并结合初生壁和次生壁形成中的结晶纤维素,研究结晶纤维素微纤维形成和沉积的方式与突变体异常生长和发育的关系。结果发现突变体纤维在次生壁形成期间,与野生型相比,纤维每伸长1mm,结晶纤维率累积率增加5倍。这说明了Li-1由于基因突变,使结晶纤维素微纤丝形成率发生变化,也影响了棉纤维的生长发育。蒋淑丽等(2002)^[10,12]研究发现Li-1胚珠在GA₃或者

GA₃+IAA的BT培养基上均有较高的纤维诱导率，且GA₃对Li-1 的纤维诱导作用好于IAA。在0DPA~+15DPA间纤维的纤维素含量与TM-1 几乎一致，+15DPA~+20DPA间，其纤维沉积速率快于TM-1，随后至成熟吐絮，其纤维内纤维素含量几乎不增加，最终纤维素含量为 61.71%，这可能与Li-1 的纤维伸长时期较短有关。

1.3.2 Li-1 的遗传及分子生物学

Narbuth 等 (1979) ^[48]研究表明：Li-1 为单基因显性遗传并有纯合显性致死效应。杜雄明 (1998) ^[4]研究表明Li-1 的基因型为iiFzFzL₁L₁L₂L₂Lili，蒋淑丽 (2002) ^[12]研究表明Li-1 的基因型为iiFzFzL₁L₁L₂L₂Lili。本文认为Li-1 的基因型为iiFzFzL₁L₁L₂L₂Lili较为合理。

对正常的长纤维遗传，Musaev等 (1990) ^[47]指出纤维遗传有上位和互补作用的多基因或伴随等效异位、互作和修饰基因效应。

Karaca等 (2002) ^[36]研究发现TM-1 和Li-1 间有多态性的SSR标记 38 个，并进行了F₂群体作图，结果在Li-1 中有 22 个SSR位点存在连锁关系，并建立了 8 个连锁群，覆盖了 218.3cM的遗传距离。

由上可见，纤维发育突变体 Li-1 在+6DPA 前与 TM-1 无差异，+6DPA 时 Li-1 的纤维前端萎缩，这与其+1DPA 时内源 ABA 高含量可能有一定关系；而 Li-1 发育迟缓，可能源于生长素极性运输能力的下降。Li-1 对于研究纤维伸长的机理及激素在纤维伸长中的作用具有较大意义。

1.3.3 Li-2

Li-2 是新发现的另一个陆地棉长纤维突变体，与Li-1 不同的是，它的植株形态为正常型。经 Narbuth 等 (1990) ^[48]研究表明Li-2 也为单基因显性遗传，但没有报道Li-2 的纯合显性基因是否有致死效应。Kohel(1974,1992)^[39, 40]将Li-2 与Li-1 比较研究得出纤维干重比Li-1 轻，但长度上与Li-1 无显著差异，因此单位长度的干重也明显小于Li-1，纤维干重差异源于两个突变体次生壁发育的不同。Kohel(2002)^[41]研究得出Li-2 位于 18 号染色体。

1.4 本文研究的目的与意义

由于棉纤维在发育过程中细胞处于停止分裂状态，在较长的时间内（约 55 天）只进行初生壁与次生壁的加厚，而不发生细胞的分裂与分化。因此，不同类型的纤维发育突变体是研究棉纤维细胞分化、伸长和细胞壁加厚期的生理生化特点，纤维发育的遗传规律的理想材料。随着分子生物学的蓬勃发展，以纤维发育突变体为材料，进行生理、生化、遗传及其分子生物学等方面的研究，对阐明纤维分化发育的机理，利用基因工程手段培育品质更好、更适合当前及今后棉纺织业需求的优质棉品种具有重要意义。

本研究利用经典遗传学和现代生物技术相结合，对我们收集和发现的不同类型纤维发育突变体进行遗传学和分子生物学鉴定，以确定新的纤维发育突变体的遗传方式及其与其他纤维发育突

变体基因的遗传关系，进而将新基因定位到染色体上；利用新光子材料构建的 F_2 群体，进行了与纤维品质、衣分、子指等性状相关的QTL分析和定位，这为棉纤维品质和产量的QTL分析提供了更多的信息；对若干纤维发育突变体及其近等基因系进行了SSR多态性分析，进一步确证突变体的来源和多样性。

总之，本研究通过经典遗传学与分子标记相结合的手段，为阐明纤维发育突变体的遗传多样性，突变基因的遗传规律和分子生物学特性开辟了新的思路，同时，为棉纤维品质和产量的 QTL 分析提供了更多的信息。

第二章 新光子基因的传统遗传学和 SSR 标记定位

新基因的定位现在主要有两种方法：一是经典遗传学的方法。使具有新基因材料与多个遗传材料配制杂交组合，获得 F_1 、 F_2 或(和) BC_1 群体，分析性状表型的分离比例，确定新基因的遗传方式及连锁关系。二是分子标记定位方法。首先对目标杂交组合双亲和分离世代BSA基因池进行分子标记引物多态性筛选，然后，对 F_2 或 BC_1 群体的单株进行多态性分析，获得标记在 F_2 或 BC_1 群体的分离情况，并结合变异性状表型的分离比例，利用计算机软件，确定分子标记与突变性状的连锁关系。而本研究将两种方法结合起来，利用经典遗传学方法分析新纤维发育突变体GZnn的遗传方式，利用分子标记技术，将控制GZnn的隐性基因 n_4 定位到了染色体上。并通过查找遗传连锁图确定了 n_4 基因与其他已知的控制纤维发育突变体的基因是独立遗传关系。

2.1 材料与方法

2.1.1 供试材料：

本实验所用的植物材料有陆地棉遗传标准系 TM-1、遗传标记材料 T586、突变体材料光子 GZnn。

突变体光子nn（简称GZnn）是中国农科院棉花研究所 1998 年在安阳实验田里，从无绒有絮突变体GZNn棉田中，发现的一种新表现型的无绒有絮（俗称光子）棉株突变体。GZNn表现为植株高大、抗病，而GZnn表现为植株矮小、不抗病(图 1)。将GZNn和GZnn分别与TM-1 杂交，获得的 F_1 代，TM-1×GZNn的 F_1 棉子表现为显性的光子性状，而TM-1×GZnn的 F_1 棉子表现为隐性的光子性状。说明GZnn确实为新的纤维发育突变体。自 1998 年起一年两次连续对GZnn进行自交选纯。

前人已研究确定控制GZNn光子性状的基因为显性 N_1 ^[54]，而T586 中也具有显性光子基因 N_1 ，故配制了杂交组合GZnn × T586，以分析控制GZnn的基因与显性光子基因 N_1 的遗传关系。于 2001 年在河南安阳配制两个杂交组合，分别为TM-1× GZnn、GZnn × T586，并收获杂交种子；同年，在海南岛种植 F_1 代，自交获得 F_2 代种子。选取的TM-1× GZnn F_2 代 206 株作为分子标记研究群体。

2.1.2 田间试验及性状调查

2002 年 4 月在河南安阳种植亲本、 F_1 、 F_2 代，每个 F_2 群体种植 10 行，行长 8 米，行距 0.8 米，于成株期和吐絮期调查各个组合单株的目标生物学性状。田间调查各棉株纤维、短绒有无，数量多少等情况，按棉株种子上短绒的差异，划分五级短绒类型：1：无短绒；2：端毛；3：稀毛；4：端稀毛；5：有绒。为了简化遗传分析，对某些中间性状分类归组。前二者通称光子，后三种通称毛子。或者说，短绒性状可分为两组：无绒（包括无绒和端毛）和有绒（包括稀毛、端稀毛和有绒）。



图 1 显性光子突变体 GZNn 和隐性光子突变体 GZnn

Fig.1 the dominant fiber-mutant GZNn and the recessive fiber-mutant GZnn

2.1.3 总 DNA 提取与纯化

棉花基因组DNA提取采用Zhang等（2000）^[59]CTAB法，并根据实际情况稍加修改。

2.1.3.1 少量法提取棉花总 DNA 与检测

少量鲜叶片样品，放入 1.5ml 离心管中。

↓加 500 μ l DNA 提取缓冲液（在 4°C 冷冻过），用电钻充分搅碎。

↓离心（2700g，4°C，20 分钟，4°C）。弃去上清液，保存沉淀。

↓60°C 预热核裂解缓冲液。

↓加入 600 μ l 核裂解缓冲液（60°C 水浴过），充分摇动混匀。

↓60~65°C 水浴 30~60 分钟。水浴时摇动离心管（每 10 分钟一次），以混匀缓冲液。

↓加等体积氯仿：异戊醇（24：1），缓慢翻转离心管 50 次以上至混匀。

↓离心（16000g，4°C，10 分钟）。将上清液转移到 1.5ml 离心管中。

↓重复 8~10 步至少一次。（如上清清亮，也可不重复）

↓加 0.6 倍体积冰冷的异丙醇。

↓缓慢颠倒离心管，直到有絮状 DNA 沉积，静置 10 分钟。

- ↓ 离心 (10000g, 4°C, 5 分钟)。
- ↓ 倒掉上清液, 70%乙醇 400 μ l 洗 DNA 1~2 次。倒掉酒精, 100%乙醇 400 μ l 再洗 DNA 1 次, 风干 (蒸发 20~30 分钟)。
- ↓ 加入 400 μ l TE, 溶解 DNA (65°C水浴, 10~30 分钟)。
- ↓ 离心 (10000g, 15°C, 10 分钟)。
- ↓ 上清液转入 1.5ml 离心管中, 加 0.1 倍体积的 3M 醋酸钠 (pH5.2), 加等体积的异丙醇后翻转 30 次, 静置 30 分钟, 离心 (5000g, 5 分钟)。加 400 μ l 70%乙醇洗 DNA 小团, 转入 0.5ml 的离心管中, 离心 (5000g, 5 分钟)。弃上清液, 自然风干。
- ↓ 加 300 μ l TE 缓冲液 (pH8.0) 溶解 DNA。
- ↓ -20°C保存。

2.1.3.2 总 DNA 浓度和纯度测定

将 30 μ l DNA 原液稀释成 3 ml TE 中, 充分混合后置于比色杯中进行比色, 在 UV mini1240 紫外分光光度计上, 读取 A260 和 A280 吸光值。DNA 浓度 (ng/ μ l) = 稀释倍数 $\times$ 50 $\times$ A260, 可根据 A260/A280 值判断 DNA 浓度, 比值若在 1.7-2.0 之间, 证明 DNA 纯度较好, 可用于 PCR 分析。

吸取适量 DNA 原液在 0.8% (W/V) 琼脂糖凝胶上电泳检测 DNA 纯度, 若只有一明显条带, 无拖尾现象, 则证明 DNA 质量较好。

2.1.4 SSR 标记方法

2.1.4.1 试剂与仪器

398 对 SSR 引物序列由 USDA, ARS, College Station, Texas 提供, 并由上海 Sangon 公司合成, 部分引物从南京农业大学购买。反应所用 Taq 酶, dNTP, 10 $\times$ PCR 均由北京鼎国公司生产。

Tris、EDTA 购自鼎国公司, 由 Bebcos 分装;

CTAB、Acr、Bis、PVP40 由 sigma 分装;

其他常规试剂由北京双环化学试剂厂生产;

仪器设备: 本试验所用 PCR 仪为 PTC-100TM 由 MJ Research Inc.公司生产;

电泳系统: DYY-III-5 型稳压稳流电泳仪

DYY-III-30 型电泳槽由北京六一仪器公司生产;

纯净水系统由 MILLIPORE 公司制造。

2.1.4.2 PCR 反应体系和扩增

PCR 反应体系的配方及反应试剂用量见表 2。

表 2 PCR 反应体系
Table 2 Reaction System of PCR

PCR 反应试剂	体积
10×PCR buffer (含 20mMMg ²⁺)	1.0 μl
dNTP(10mM)	0.2 μl
Taq 酶(2U/μl)	0.3 U
ddH ₂ O	6.2 μl
F.P.(5 μM)	0.65 μl
R.P. (5 μM)	0.65 μl
模板 DNA(50ng/μl)	1 μl
总体积	10 μl

PCR 扩增程序:

- Step 1 95°C denature 3 min; 1 cycle
 Step 2 95°C denature 1min , 57°C 45 sec , 72°C 50sec; 29 cycle
 Step 3 72°C extension 7min
 Step 4 soak at 4°C;
 反应在 PTC-100TM 扩增仪上进行。

2.1.4.3 垂直板电泳分离

2.1.4.3.1 电泳溶液配制

(1) 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶的配方

电泳所用凝胶为 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶，具体配法如表 3：

Acr：Bis (20：1)：丙烯酰胺 28.57 克，N'-甲叉双丙烯酰胺 1.43g，去离子水定容至 100ml。

5×TBE：Tris 54g，硼酸 27.5g，0.5M EDTA 20ml，去离子水定容至 1000ml。

10% AP (引发剂)：1g AP，去离子水定容至 10ml。

表 3 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶配方
Table 3 Comprising of 8% polyacrylamide gel

试剂	用量
Acr：Bis (20：1)	5.4ml
5×TBE	4ml
ddH ₂ O	10.6ml
10% AP	280 μl
TEMED (加速剂)	10 μl
总量	20ml

(2) 上样缓冲液组分

0.25% 溴酚蓝，0.25% 二甲苯青 FF，40% 蔗糖水溶液。

(3) 银染配方

银染所需试剂配方如表 4 所示：

0.2%硫代硫酸钠：硫代硫酸钠 0.2g，去离子水定容至 100ml。

表 4 银染试剂配方
Table 4 Comprising of silver staining reagent

名称	药品及用量	终体积
固定液	无水乙酸 2ml	400ml
	无水乙醇 40ml	
渗透液	硝酸银 0.6g	300ml
	氢氧化钠 6g	
显色液	甲醛 4ml	400ml
	0.2%硫代硫酸钠 4ml	
终止液	无水碳酸钠 3g	400ml

2.1.4.3.2 电泳步骤

(1) 8%非变性聚丙烯酰胺凝胶制备

用清水将玻璃板、胶条和梳子浸泡并用纱布反复擦洗干净，然后用清水和蒸馏水冲洗，置于烘箱中烘干备用。

取出已洗净烘干的玻璃板，按要求组装，并用 1%琼脂糖封底，(1%琼脂糖：1g 琼脂糖，用 100ml 1×TBE 溶解)；底封好后，将其固定在电泳槽上。按凝胶配方配制凝胶，并迅速灌胶，灌胶时避免出现气泡，灌满后插上梳子。放置 1 小时，准备电泳。

电泳前要在 PCR 扩增产物中加入 2 μ l 上样缓冲液。

(2) 电泳

↓拔掉梳子，将电泳缓冲液（1×TBE）分别加入正极电泳槽和负极电泳槽中。缓冲液液面一定要超过短玻璃板上沿。

↓清除胶面沉积的碎胶和气泡，在 150 伏恒电压下预电泳 15 分钟。

↓每个点样孔加 2 μ l 样品，170 伏恒电压电泳约 1 小时。

↓电泳结束后，小心分开两块玻璃板，在固定液中轻微摇晃，可将胶与玻璃板分离。

(3) 银染显色

↓固定：将胶放入固定液中，轻摇 7~8 分钟。

↓渗透：倒掉固定液，加入渗透液，轻摇 12 分钟。

↓倒掉渗透液，用蒸馏水水洗 30 秒。

↓显色：倒掉蒸馏水后，加入显影液，轻摇至 DNA 条带显出为止。

↓倒掉显色液，用蒸馏水水洗一次。

↓终止：倒掉蒸馏水，加入终止液终止反应，统计带型和照相。

2.1.4.4 SSR 带型统计方法

简单重复序列 (simple sequence repeat, 简称SSR) 是根据真核生物基因组中普遍存在的 2-4 个核苷酸简单重复的特点, 利用不同材料SSR重复数的差异和SSR两端序列的高度保守性, 设计合成特异性引物。所以每个SSR泳带都可作为一个等位位点, 进行研究材料的多态性分析。本研究SSR带型统计方法为在某一条泳带上 (即等位位点上), 对照筛选亲本间差异引物时的带型, 将亲本TM-1(P₁)的带型记为D, 亲本GZnn(P₂)的带型记为B。

2.1.5 标记位点的命名方法及遗传图谱的构建

标记位点的命名方法是以 S 开头, 代表是 SSR 引物, 紧跟其后的为 loc, 代表是用于连锁分析的位点, 再用序号区别不同的位点 (引物), 如果某位点有多个等位位点, 则加“-”, 后面紧跟等位位点的序号。例如 Sloc2-1。

采用 Mapmaker exp/3.0 数据分析软件, LOD 值最小取 3.0, 最大遗传距离为 50cM, 进行连锁图谱的构建。

2.2 试验结果与分析

2.2.1 光子基因的传统遗传分析

2001 年在河南安阳中棉所试验田里, 对亲本材料 TM-1、GZnn、T586 等进行材料纯度的调查。结果表明各个亲本材料完全纯正, 无杂株。

调查杂交组合TM-1×GZnn和 T586×GZnn的F₁代各 25 株, 结果TM-1×GZnn的F₁代全部为毛子, T586×GZnn的F₁代全部为光子。

调查杂交组合TM-1×GZnn和 T586×GZnn的F₂群体短绒分离情况, 分析新突变体光子棉 GZnn的遗传方式。结果如下表:

表 5 GZnn 遗传方式的鉴定
Table 5 The identification of the inheritance style of n₄

群体	世代	分离植株数		理论比	X ² 值	X ² _{0.05, 1}
		无绒	有绒			
TM-1×GZnn	F ₂	54	173	1:3	0.1189*	3.84
T586×GZnn	F ₂	164	52	13:3	3.4177*	

注: “*”表示该F₂群体的分离符合理论比例

note: “*” present that the ration of segregation of fuzzless and fuzzed seed in F₂ population fit the ration of theory

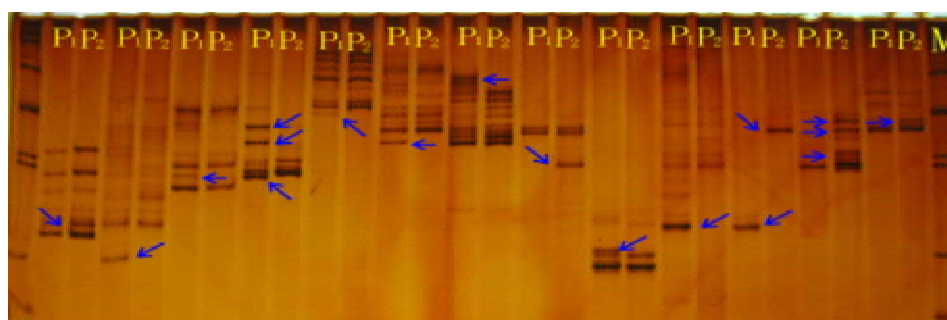
组合TM-1×GZnn的F₁表现亲本TM-1 的毛子特性, 说明光子GZnn的光子特性是受隐性基因控制的性状, 在TM-1×GZnn组合的F₂中, 短绒分离比例符合 3:1, 说明GZnn的光子是单基因控制的质量性状 (表 5); 在组合T586×GZnn中有两个基因共同控制着光子性状, 所以不能按照 3:

1 的一对基因的分离比例来分析, 而要用两个基因共同控制一个性状的理论比分析。在组合 T586 × GZnn 中有两个控制光子性状的基因, 即 N_1 和 n_4 (本研究新发现的光子基因), N_1 基因为显性光子, 而 n_4 为隐性光子, 这两个基因同时控制光子性状时, 如果光子的分离比例符合 13 : 3, 说明这两个光子基因是独立遗传的。而在组合 T586 × GZnn 中的短绒分离比例符合 13 : 3, 说明 GZnn 与控制显性性状的光子基因 N_1 是独立遗传关系。所以 GZnn 是单基因控制的隐性质量性状, 并且与控制显性性状的光子基因 N_1 是独立遗传关系, 将控制 GZnn 的隐性光子基因暂时命名为 n_{40} 。

2.2.2 光子基因的 SSR 标记分析

2.2.2.1 亲本间 SSR 多态性引物筛选

本试验用 398 对棉花 SSR 引物, 在组合 TM-1 × GZnn 的亲本 TM-1 和 GZnn 之间进行 SSR 引物差异性初步筛选。结果, 有 52 对 SSR 引物在两亲本间扩出多态性带型, 多态性引物占 13.06%。筛选的部分特异引物电泳结果如下图:



注: (1) M: 分子量标记; 箭头所示为多态性条带;

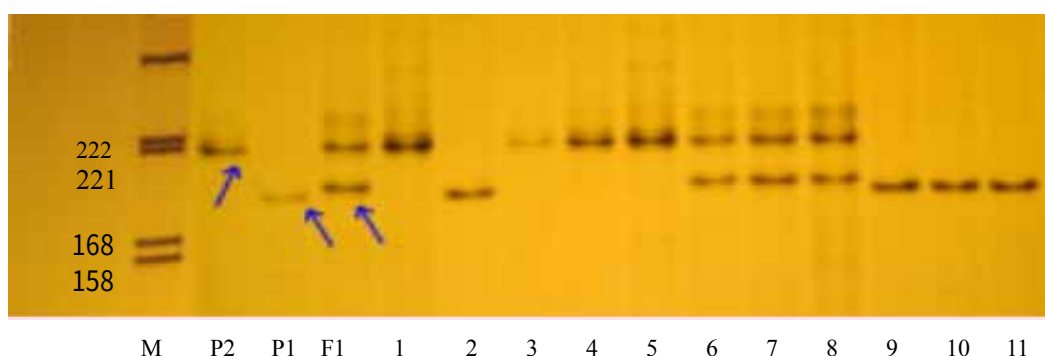
(2) P₁: 毛子 (TM-1)、P₂: 光子 (GZnn)

NOTE: (1) M represent DNA Molecular Weight Markers, Arrow shows the band with polymorphism;

(2) P₁: Parent fuzzed seed(TM-1) P₂: Naked seed(fuzzless) Parent(GZnn)

图 2 杂交组合 TM-1 × GZnn 的亲本 SSR 引物筛选

Fig.2 Screen of SSR primers for parents in cross of TM-1 × GZnn



1、3、4、5 为光子基因池扩增带型; 2、6、7、8、9、10、11 为毛子基因池扩增带型

note: Arrow shows the band with polymorphism

1、3、4、5 is the style of fuzzless bulk; 2、6、7、8、9、10、11 is the style of fuzzed bulk

图 3 TM-1 × GZnn 的 F₂ 毛子、光子基因池 SSR 引物筛选

Fig.3 Screen of SSR primers between fuzzed and fuzzless bulk of F₂ population of TM-1 × GZnn

2.2.2.2 BSA (Bulked Segregant Analysis) 分池与 SSR 多态性筛选结果

参照Michelmore(1991)^[46]提出的BSA方法, 根据TM-1×GZnn的F₂代田间表现, 选取 10 株无绒有絮的F₂代单株DNA等量混合建成DNA光子池, 选取 10 株有绒有絮F₂代单株DNA等量混合建成DNA毛子池, 利用可以在TM-1 和GZnn间扩增出多态性条带的 52 对特异性SSR引物, 对DNA光子池、DNA毛子池进行引物筛选。结果在 52 对多态性引物中筛选到 13 对差异的引物。部分结果如图 3。

2.2.2.3 F₂群体SSR引物扩增的多态性分析

利用光、毛基因池间有差异的 13 对SSR引物对组合TM-1×GZnn的F₂代群体进行SSR产

表 6 组合TM-1×GZnn的F₂群体等位位点的分离

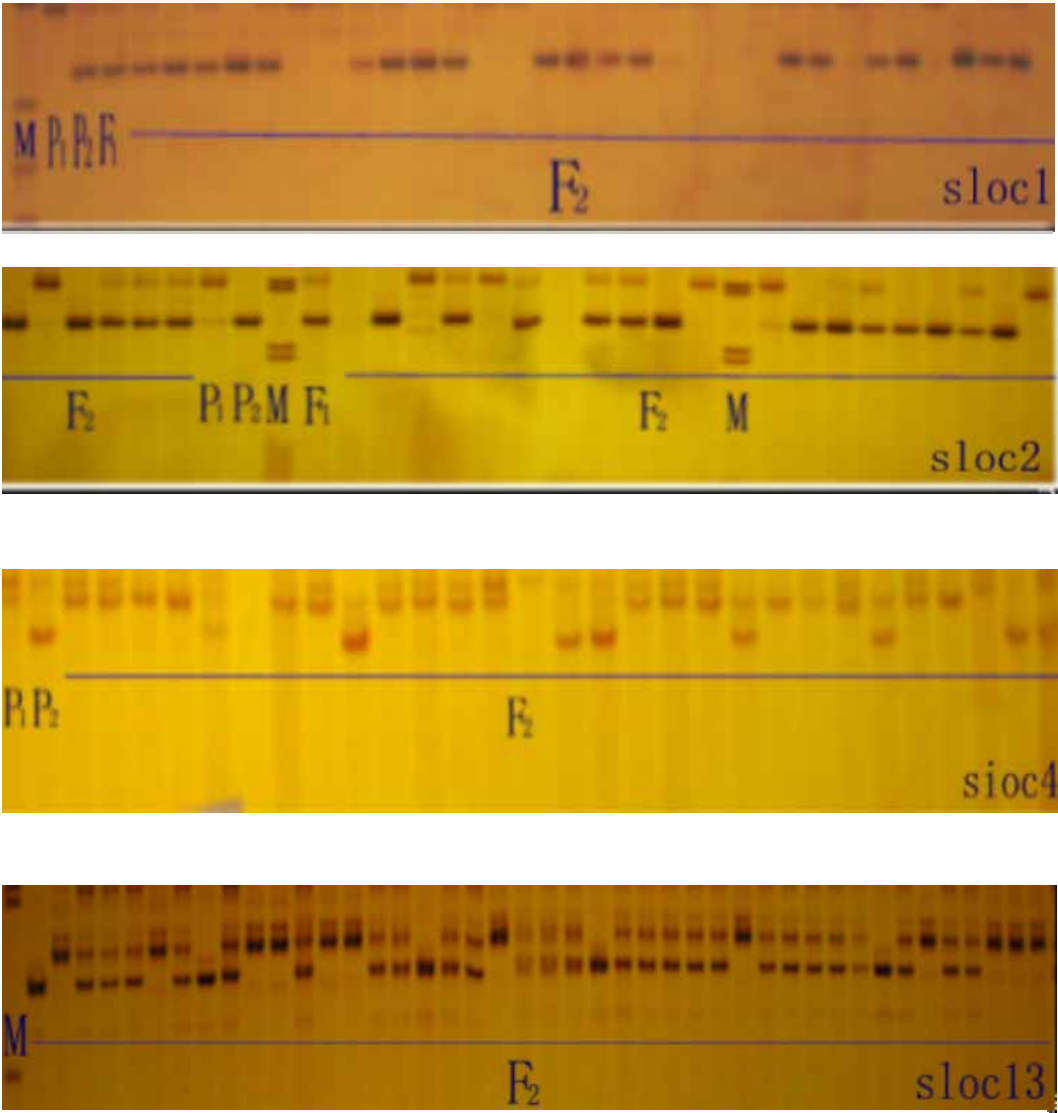
Table 6 Segregation of allele loci in F₂ population of TM-1×GZnn

等位位点	分离位点的数量		理论比	X ² 值	
Allele loci	Numbers of segregation loci		theory ration	X ² value	X ² _{0.05, 1}
	B	D			
sloc1	49	157		0.162*	
sloc2-1	161	45		0.727*	
sloc2-2	48	158		0.317*	
sloc3-1	79	127		19.579	
sloc3-2	79	127		19.579	
sloc3-3	106	101		75.827	
sloc4-3	121	86		123.557	
sloc5-1	46	161		0.852*	
sloc5-2	46	161		0.852*	
sloc6-3	79	127		19.579	
sloc12-4	161	46	1 : 3	307.518	3.84
sloc13-1	118	88		114.492	
sloc9-3	55	151		0.317*	
sloc9-4	55	151		0.317*	
sloc9-5	55	151		0.317*	
sloc9-6	55	151		0.317*	
sloc9-7	55	151		0.317*	
sloc10-2	43	163		1.871*	
sloc11-2	59	147		1.456*	
sloc7-2	166	40		339.424	
sloc7-3	166	40		339.424	
sloc8-1	142	64		212.045	

注：“*”表示该F₂群体的分离符合理论比例
D: 与亲本TM-1(P₁)相同的位点, B: 与亲本GZnn (P₂) 相同的位点。

物扩增, 各差异引物在组合TM-1×GZnn的F₂代都扩增出多态性的PCR带型(图 4), 而且, 得到了 22 个多态性等位位点(表 6)。对具有SSR多样性特征的F₂单株DNA扩增带型进行记载和统计, SSR带型统计方法为: F₂群体各单株的各电泳泳带有无按 1、0 记带, 再将与亲本TM-1(P₁)相同的泳带记为D, 与亲本GZnn (P₂) 相同的泳带记为B。按B:D=1:3 的比例将F₂群体中各个等位位点的分离比例进行了X²测验, 结果见表 6。结果表明组合TM-1×GZnn的F₂群体的等位位点sloc1、sloc2-2、sloc5-1、sloc5-2、sloc9-3、sloc9-4、sloc9-5、sloc9-6、sloc9-7、sloc10-2、sloc11-2 符合 3:1 的分离比例。其他标记位点是偏分离的, 有的甚至是严重偏分离, 例如sloc12-4、sloc7-2、

sloc7-3 等。分析认为符合 3：1 分离比例的位点可能与某些质量性状具有连锁遗传关系，而不符合 3：1 分离比例的位点，可能与数量性状具有一定遗传关系。



M：分子量标记 P₁：TM-1（毛子亲本） P₂：GZnn（光子亲本）
F₁：F₁代的带型 F₂：部分F₂代的带型
M: maker, P₁：TM-1（the parent of fuzzed seed） P₂：GZnn（the parent of fuzzless seed）
F₁：the band type of F₁ F₂：some type bands of F₂
图 4 部分差异引物在组合TM-1×GZnn的F₂代PCR扩增的部分结果
Fig. 4 PCR amplification result of primer in F₂ of cross TM-1×GZnn

2.2.3 光子基因_{n4}的连锁分析

传统遗传分析已经表明GZnn的光子性状是单基因控制的隐性质量性状，故将TM-1×GZnn的F₂代光子的分离按分子标记的质量位点的分离来考虑，并假设光子的基因位点为Sloc14。为此，本研究对TM-1×GZnn的F₂代光子基因位点Sloc14 与其 22 个分子标记等位位点，运用Mapmaker

exp/3.0 数据分析软件进行连锁分析, LOD值最小为 3.0, 最大遗传距离为 50cM。结果表明Sloc14 (n_4 基因) 被定位到第一个连锁群, 当似然值 (log-likelihood) 为 -64.82 时, 基因 n_4 距离位点sloc1 有 10.8 cM, 距离位点sloc2-1 为 20.4cM, 三者的线性关系为 n_4 、sloc1 和sloc2-1, 且sloc1 和sloc2-1 是符合 3 : 1 分离比例的。位点sloc1 与位点sloc2-1 间距为 9.6 cM, 这与Zhang等 (2002) [60]所构建的分子标记连锁图谱中二者的距离是吻合的, 且位于 10 号染色体上。故认为基因 n_4 位于第 10 号染色体, 与位点sloc1 紧密连锁, 其遗传距离为 10.8 cM。图 5 是光子基因 n_4 的连锁图谱。

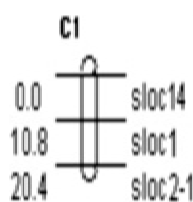


图 5 光子基因 n_4 (Sloc14) 的连锁群

Fig 5 The linked group of the naked-seed gene n_4 (sloc14)

前人发现的控制短绒发育的光子基因 N_1 位于 12 号染色体, n_2 位于 26 号染色体^[9], 基因 n_4 位于第 10 号染色体, 所以可以认为GZnn是发现的一个新的纤维发育突变体, 是单基因控制的隐性性状。

2.3 讨论

2.3.1 GZnn 是一个新的对棉纤维分化和发育机理研究具有重要价值的突变体

2.3.1.1 GZnn 是新突变体：

本研究利用传统遗传研究表明GZnn的光子性状是由隐性基因控制的, 组合T586×GZnn的 F_2 无绒和有绒分离比例符合 13 : 3, 说明GZnn与控制显性性状的光子基因 N_1 是独立遗传关系。利用SSR技术, 筛选到 2 个与光子基因 (n_4) 紧密连锁的标记sloc1 和sloc2-1, 根据Zhang等 (2002) [60] 构建的分子标记图谱, 把新基因 n_4 定位到 10 染色体上。

前人发现的控制短绒发育的光子基因 N_1 位于 12 号染色体, 基因 n_2 位于 26 号染色体^[9], n_3 基因是与 n_2 基因有一定的遗传关系, 而与 N_1 是独立遗传关系, 但是没有定位到染色体上^[53]。而本研究发现的基因 n_4 位于第 10 号染色体, 所以可以初步认为GZnn是发现的一个新的纤维发育突变体, 是单基因控制的隐性性状。

2.3.1.2 GZnn与GZnn、 N_1 、 n_2 、TM-1 等形成近等基因材料系

近等基因系是具有相似遗传背景, 只有一个或极少数突变基因差异的品系。近等基因系各具不同的标记基因, 而且这些基因在共同的遗传背景上表现其性状, 因而不同等基因系应该表现明显不同的农艺性状, 又能对不同的农艺性状发生不同的影响。这为遗传和农艺性状研究提供了更为有效的工具。

GZnn的光子特性是由显性基因 N_1 控制的性状 (Du(2001)^[32]), 而GZnn是从其中分离出来的

一个隐性光子, n_2 又是来自于TM-1 的一个隐性光子。故GZnn与GZNn、 N_1 、 n_2 、TM-1 形成近等基因材料系, 为棉纤维的分化发育机理的研究提供了极好的材料。

2.3.1.3 纤维发育突变体及其近等基因对纤维分化和发育机理研究具有重要价值

不同的纤维发育突变体控制不同的表型性状, 如无绒无絮突变体 XZ142w 控制短绒和纤维的分化, 而无绒有絮突变体 GZnn 控制短绒的分化, 无绒超短絮突变体 ligon Lintless 则控制纤维的发育。另外, 虽然表型性状相同的纤维发育突变体, 其控制纤维分化发育的机理也不同, 例如 GZNn 是显性光子, 而 GZnn 是隐性光子。所以这些不同的纤维发育突变体有助于揭示纤维分化发育不同时期的发育机理。

纤维发育突变体与其近等基因材料系有着相近的遗传背景, 以其为材料进行纤维分化发育的研究, 能够消除背景噪音。因而纤维发育突变体及其近等基因对纤维分化和发育机理研究具有重要价值。

2.3.2 整合分子标记连锁图和性状遗传连锁图以高效定位新基因

本研究应用传统遗传学方法, 结合分子标记图谱, 高效地定位了一个新基因, 为新基因的定位研究开辟了新思路。

应用传统遗传学方法定位新基因, 需要有众多的遗传标记材料, 而且众所周知, 在育种过程中对于一个新发现的突变基因, 要判断它是新的突变基因, 还是原有突变基因的等位基因, 一般须进行遗传试验 (genetical test)、对性试验 (allelic test) 和连锁试验 (linkage test) 才能确定。而这些工作需要大量的人力物力和时间。

传统遗传学结合分子标记图谱定位新基因, 则可省略对性试验和连锁试验的工作, 提高了定位新基因的效率。而到目前为止共发现的二倍体栽培棉质量性状基因 90 个 (含重叠基因), 7 个连锁群; 异源四倍体棉质量性状基因 198 个 (含重叠基因)。而棉花分子遗传图谱的建立工作进展相对较快。如Reinish等 (1994) ^[49]的第一张种间详尽的棉花图谱, Shapley等 (1996, 1998) ^[50, 51]的第一张陆地棉种内棉花图谱, Altaf等 (1997, 1998) ^[27, 28]的第一张根据棉花三种杂交后代分离群体绘制的基因图谱, Zhang等 (2002) ^[60]利用其培育的第一个异源四倍体栽培棉种加倍单倍体永久性分离群体绘制的SSR及PAPD分子图谱。

目前发现的分子标记连锁图和性状遗传连锁图还没有整合到一起, 这是传统遗传学结合分子标记图谱定位新基因的限制条件, 因此建立健全分子标记连锁图和性状遗传连锁图是今后的工作重点。

第三章 光子突变体遗传群体的纤维性状 QTLs 定位

国内外已经对纤维品质进行了QTL定位,但随着利用的遗传研究群体的不同,同一数量性状的QTL及其定位结果也有较大差异,为此,本文利用新发现的光子突变体GZnn与原始型的近等基因系TM-1 杂交构建的F₂遗传群体,对纤维品质、衣分、子指等纤维性状进行SSR标记的QTL定位,以便为这些性状的QTL分析提供更多的遗传信息。

3.1 材料与方法

3.1.1 供试材料

选取TM-1、 GZnn及 TM-1× GZnn 的F₁、F₂代 150 个单株作为研究群体。

3.1.2 方法

2002 年 4 月在河南安阳种植的TM-1× GZnn 的F₂代于吐絮成熟后,150 株收花,室内考种测定衣分、子指(100 粒种子的重量),纤维品质性状包括纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值,该五项指标委托国家农业部棉花品质监督检验测试中心检验。检验条件为 20℃,相对湿度为 65%。

SSR 标记数据采用第二章的结果。

3.1.3 数据分析和 QTL 定位

采用SAS软件对 7 个数量性状作正态分布的假设测验,以偏斜度(Skewness)和峰度(Kurtosis)在-1—+1 区间时,为小概率事件,认为其符合正态分布^[6]。并将所有的数据用频数分布进行分组,作出各性状频数分布图。

采用Mapmaker exp/3.0 数据分析软件进行连锁图谱的构建,LOD值最小为 3.0,最大遗传距离为 50cM。运用winQTLcart软件,采用复合区间作图法进行全连锁图谱的QTL扫描定位,当LOD值大于 3.0 时,认为该位置存在QTL位点^[5]。

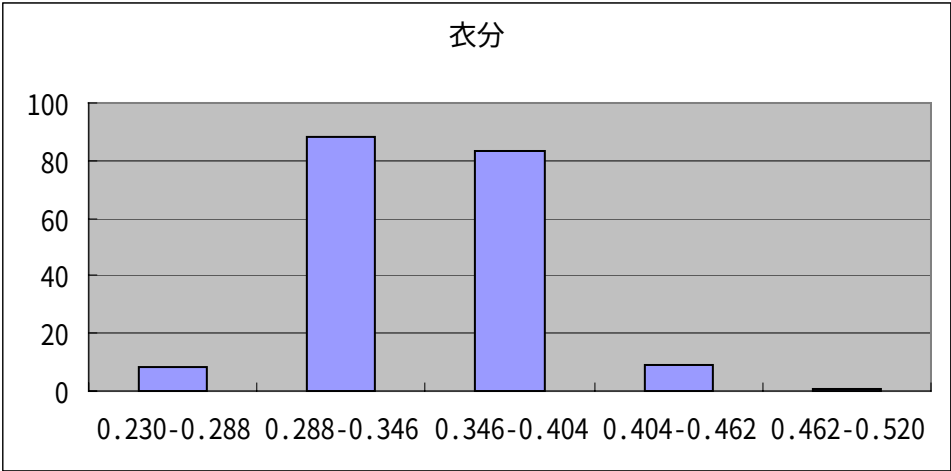
3.1.4 标记位点及 QTL 位点的命名方法

标记位点的命名方法与第二章相同。QTL 位点的命名方法以性状名称的英文缩写开头,紧跟其后的为连锁群序号。在连锁群上,使用斜字体及长线标法以示与标记位点区别。举例:FL02。

3.2 结果分析

3.2.1 F₂群体的纤维性状的频数分布特征

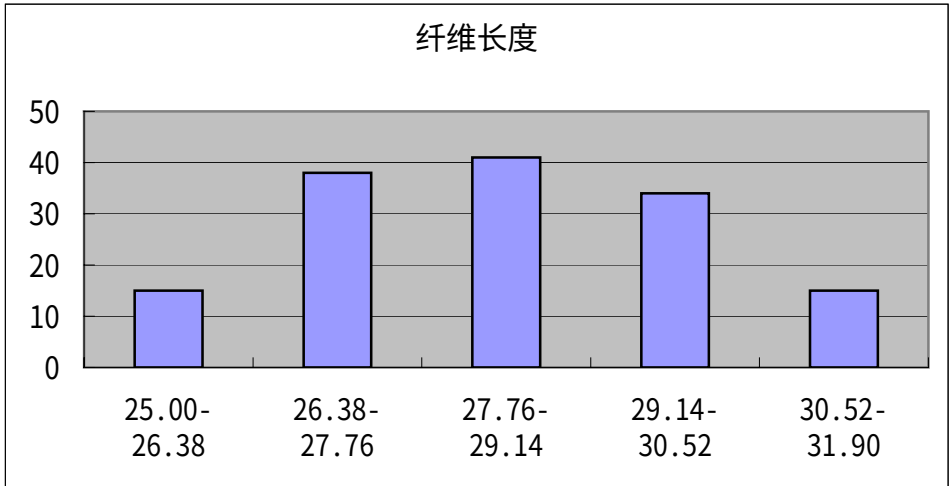
从衣分、子指、纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值的频数分布图（图 6-图 12），可以看到在TM-1 × GZnn 的F₂代中，除衣分的频数分布不符合正态分布外，子指、纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值的频数分布都符合正态分布。



X：跨度为 0.59 的衣分组，Y：对应跨度的衣分频数
X： The range of lint is 0.59, Y： The number of the frequency of lint

图 6 F₂代衣分频数分布图

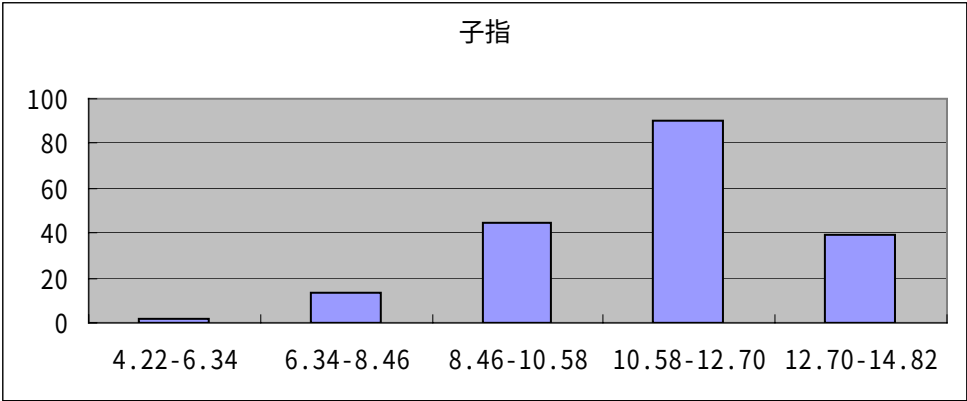
Fig 6 Frequency distribution for lint percentage in F₂



X：跨度为 1.40 的纤维长度组，Y：对应跨度的纤维长度频数
X： The range of fiber length is 1.40, Y： The number of the frequency of lint

图 7 F₂代长度频数分布图

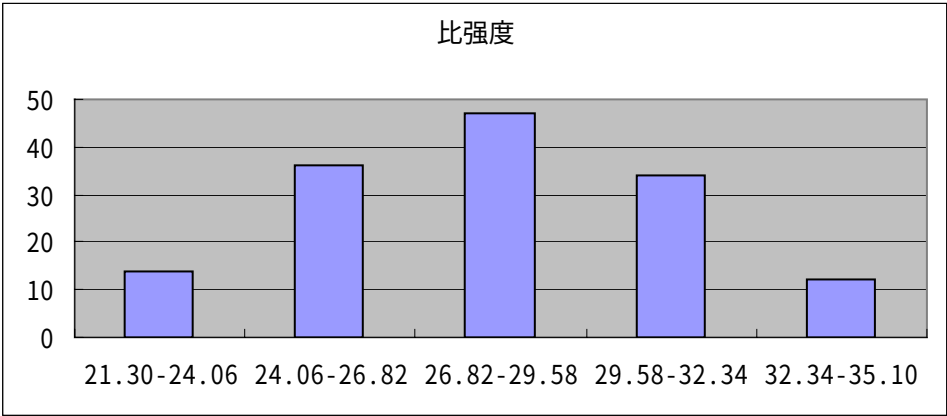
Fig 7 Frequency distribution for fiber length in F₂



X：跨度为 1.20 的子指组，Y：对应跨度的子指频数
X： The range of seed index is 1.20, Y： The number of the frequency of seed index

图 8 F₂代子指频率分布图

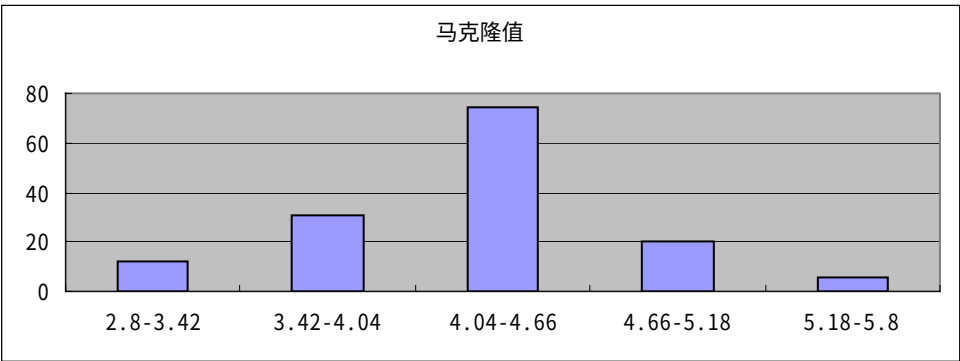
Fig 8 Frequency distribution for seed index in F₂



X：跨度为 2.7 的比强度组，Y：对应跨度的比强度频数
X： The range of fiber strength is 2.7, Y： The number of the frequency of fiber strength

图 9 F₂代比强度频率分布图

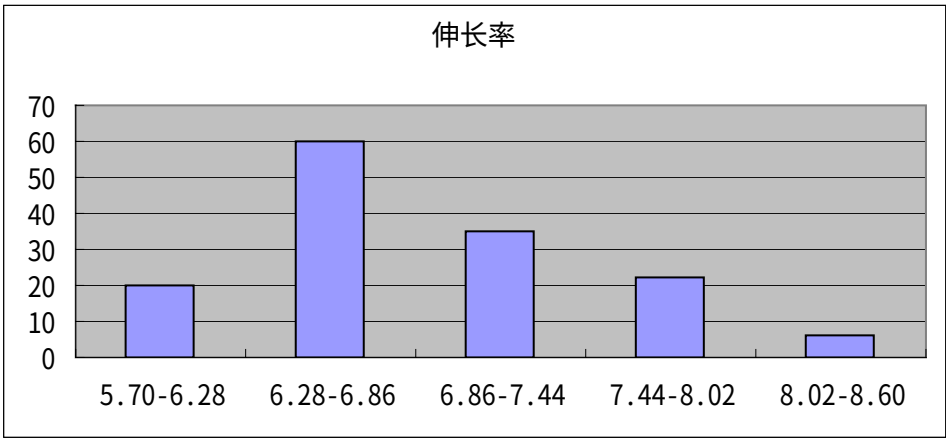
Fig 9 Frequency distribution for fiber strength in F₂



X：跨度为 0.6 的马克隆值组，Y：对应跨度的马克隆值频数
X： The range of fiber strength is 0.6, Y： The number of the frequency of fiber strength

图 10 F₂代马克隆值频率分布图

Fig 10 Frequency distribution for Micronaire value in F₂

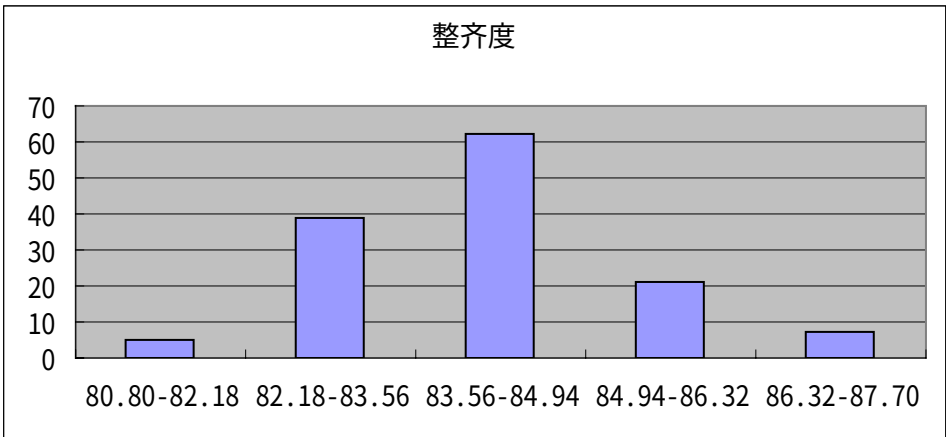


X： 跨度为 0.58 的伸长率组，Y：对应跨度的伸长率频数

X： The range of elongation is 0.58 , Y： The number of the frequency of elongation

图 11 F₂代伸长率频率分布图

Fig 11 Frequency distribution for elongation in F₂



X： 跨度为 1.38 的整齐度组，Y：对应跨度的整齐度频数

X： The range of uniformity ration is 1.38 , Y： The number of the frequency of uniformity ration

图 12 F₂代整齐度频率分布图

Fig 12 Frequency distribution for unitormity ration in F₂

对衣分、子指、纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值等数量性状进行了正态分布的假设测验（表 7），结果也表明衣分的峰度值高达 2.719，大于 1，其分布不符合正态分布，而其他六个性状的偏斜度和峰度值都在-1—+1 之间，说明符合正态分布。虽然衣分的数据不符合正态分布，也将其进行了全连锁群的 QTL 扫描定位。

3.2.2 连锁图谱的构建

利用Mapmaker exp /3.0 软件，对TM-1×GZnn的F₂代筛选到的 22 个多态性SSR等位位点进行连锁图谱的构建，LOD值最小为 3.0，最大遗传距离为 50cM。结果有 12 个多态性SSR等位位点

分布到 2 个连锁群上，全长 198.4 cM，另外 10 个位点独立。2 个连锁群中，等位位点间图距最大的为 39.5 cM，最小的为 0 cM（图 13）。

表 7 7 个数量性状的统计分析 & 正态分布测验
Table 7 statistic analysis and normal diveration test for 7 quantative traits

性状	样本平均值	变异系数	方差	偏斜度	峰度
trait	Mean	CV	Variance	Skewness	Kurtosis
子指	11.14511	16.38223	3.333608	-0.84798	0.783467
衣分	0.34288	10.6095	0.001323	0.225374	2.719116
伸长率	6.875735	9.139407	0.394888	0.766483	0.223727
纤维长度	28.39493	5.19917	2.179463	-0.11162	-0.64125
马克隆值	4.193333	12.66316	0.28197	-0.54048	-0.31482
比强度	28.16544	10.90967	9.441834	0.037332	-0.60433
整齐度	84.06176	1.432072	1.449194	0.332038	0.261566

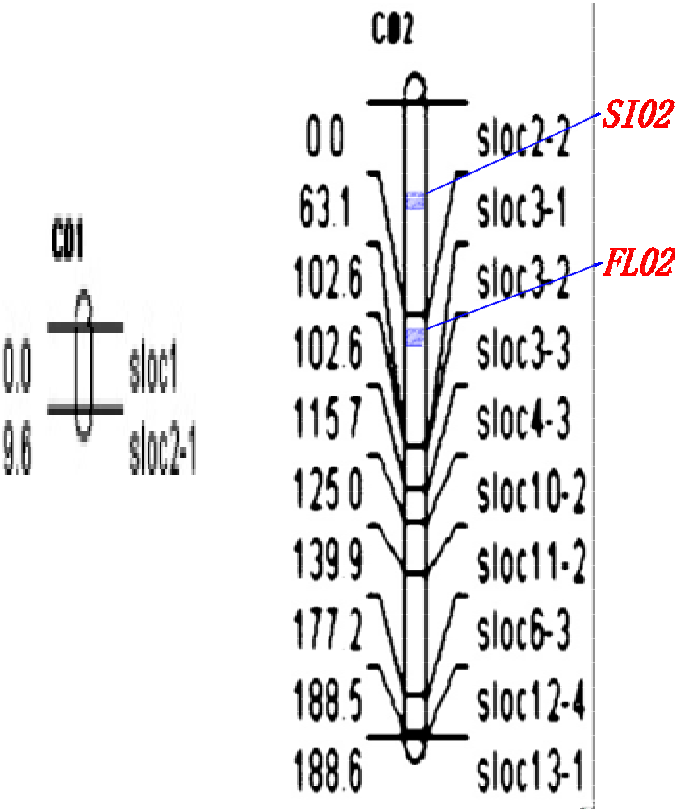


图 13 棉花分子标记遗传连锁图和两个 QTL 定位

FIG 13 outlook of linkage map and QTLs

3.2.3 QTL 定位分析

运用winQTLcart 2.0 软件,采用复合区间作图法,对TM-1×GZnn的F₂代衣分、子指、纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值等 7 个数量性状进行全基因组的QTL扫描,取LOD值为 3.0 时,检测到 2 个QTLs,均位于C02 连锁群上,一个是与纤维长度有关的QTL (命名为FL02),另一个是与子指有关的QTL (命名为SI02),可解释的表型变异方差分别为 0.19%和 4.64% (表 8),是两个微效QTLs。 FL02 距离等位点sloc3-1 有 0.01cM ,加性效应为 0.13,为增效QTL,显性效应为-0.094,说明杂合子的性状偏向低亲。 SI02 距离等位点sloc3-1 有 29.01cM,加性效应为 0.64,为增效QTL,显性效应为-0.797,说明杂合子的性状偏向低亲。引物sloc3 在第 12 号染色体上^[60],故可以认为FL02 和 SI02 都位于第 12 号染色体。

表 8 复合区间作图分析检测到的 QTLs

Table 8 QTLs detected by composite interval mapping (CIM)

性状	染色体	标记区间	位置	LOD 值	贡献率 phenotypic variance explained	加性效应	显性效应
traits	chromosome	Flanking marker	position	LOD value		additive effect	dominant effect
纤维长度	12	sloc3-1, loc3-2	0.01cM	3.4	0.19%	0.1303511	-0.0944862
子指	12	sloc2-2, sloc3-1	34.01cM	4.4	4.64%	0.6404981	-0.7974138

3.3 讨论

本研究所用的实验材料 TM-1 为陆地棉遗传标准系,而发育突变体 GZnn 来源于 TM-1,所以二者是一对近等基因系,二者遗传差异主要源于纤维方面的,与纤维性状极其相关。而从 398 对 SSR 引物中筛选到 13 对引物又是从光子基因池和毛子基因池中获得,反应的多态性水平不高,但是与光子性状具有紧密的相关性,可以研究光子性状对纤维性状的影响,以用来检验光子性状与纤维品质的关系,从而为利用光子性状作为标记性状进行育种提供了性状选择的理论基础,以及为发掘纤维发育突变体的优良品质基因提供了更多信息。

本研究中,定位在第 12 染色体上的标记sloc3-1 附近的QTL能解释子指的表型变异为 4.64%,解释纤维长度的变异为 0.19%,表现出类似的成簇分布,与殷剑美等 (2002) ^[23]研究的结果具有一致性,不同之处在于本研究发现的两个微效QTLs位于第 12 号染色体上,说明 12 号染色体有控制与纤维性状相关的微效QTLs。

除了纤维发育突变体 GZnn 外,目前还有不少来源于陆地棉的特色纤维发育突变体,例如 GZNn、GZnn、H-154、H-155、新乡小吉无絮、徐州 142 无絮等,利用这些突变体进行与纤维性状相关的 QTLs 定位,容易消除遗传背景噪音,更容易发现与光子性状紧密相关的 QTLs。

第四章 若干纤维发育突变体的 SSR 多态性分析

棉花是常异花授粉作物，异质性程度比较高，不同品种容易测定遗传多态性。亲缘关系相近的品种利用同一引物扩增时，其 DNA 带型相似性高，结合两品种间相似性程度和多态性分析，可了解不同品种间遗传关系。而 SSR 扩增技术具有简便快捷、重复性好和准确度高等优点。该方法可以有效地对棉花品种资源进行鉴定。目前，发现了大量纤维发育突变体，而对其的研究仅限于短绒与纤维的表型性状及遗传规律的差异。本研究选用了若干纤维发育突变体，利用 SSR 分子标记技术，进行了分子水平上的多态性分析及遗传相似性和聚类分析。

4.1 材料与方法

4.1.1 供试材料：

本实验所选用的材料名称及系谱或来源见表 9，这些实验材料中有三组近等基因系，它们分别是：1) 陆地棉遗传标准系 TM-1、光子 GZNn、光子 GZnn、H-154 (n_2) 和毛子 NN2-2；2) 徐州 142 无絮和徐州 142；3) 新乡小吉无絮可能是中棉所 12 或豫棉 4 号的突变体，目前，还没有定论。本研究将分组对不同类型的突变体进行 SSR 多态性分析，并构建了各类近等基因系的 SSR 指纹图谱。

表 9 供试的棉花种质及其系谱

Table 9 a list of tested cotton cultivars and their pedigree

名称	简称	特征	系谱
光子 GZNn	GZNn	显性光子	TM-1
毛子 NN2-2	GZNN2-2	毛子	TM-1
光子 GZnn	GZnn	隐性光子	TM-1
H-154	H-154	光子	TM-1
TM-1	TM-1	毛子	岱字棉 14 连续自交
中棉所 12	ZH12	毛子	乌干达 4 号 × 邢台 6871
新乡小吉无絮	Xin	无绒无絮	豫棉 4 号？
豫棉 4 号	Yu4	毛子	(河南 67 × 陕 1155) × (河南 67 × 陕 401-27)
徐州 142 无絮	XZ142w	无绒无絮	徐州 142 系选
徐州 142	XZ142	毛子	徐州 58 系选

4.1.2 方法

2003 年 4 月在河南安阳中棉所试验田种植上述材料, 每个材料种植 1 行, 行长 8 米, 行距 0.8 米, 于棉铃吐絮成熟后调查各个材料的纤维和短绒有无和多少, 并于收获后室内考种, 考种方法同前。

DNA 提取方法和 SSR 标记方法与本文第二章所用的相同。

4.1.3 数据分析方法

根据 PCR 扩增产物的电泳结果, 在凝胶的某个相同迁移率位置上有 DNA 条带的记为 1, 无 DNA 条带的记为 0, 每条带的分子量可由凝胶成像系统算出。每一个 SSR 标记位点的多态信息量 (Polymorphism information content, PIC) 按公式 $PIC = 1 - \sum p_i^2$ 计算, P_i 为某个 SSR 引物的第 i 个等位变异出现的次数占该引物全部等位变异出现次数的百分比; $i=1$ 时, 第 1 个等位位点变异出现的次数占该引物全部等位位点出现次数的百分比^[8]。平均多态信息量按公式 $H = \sum PIC / r$ 计算, r 为检测的引物数。

采用 NTSYS 1.8 数据分析软件, 根据质量 (Qualitative) 相似法计算材料间相似系数^[22], 按非加权组平均法进行聚类, 绘制种质亲缘关系树状图。

成对种质间遗传距离计算公式为 $1 - (N_{ij}) / (N_i + N_j) - N_{ij}$ 。公式中 N_{ij} 为两种质共有的位点, N_i 和 N_j 分别为 i 种质和 j 种质各自总位点^[7]。

4.2 结果与分析

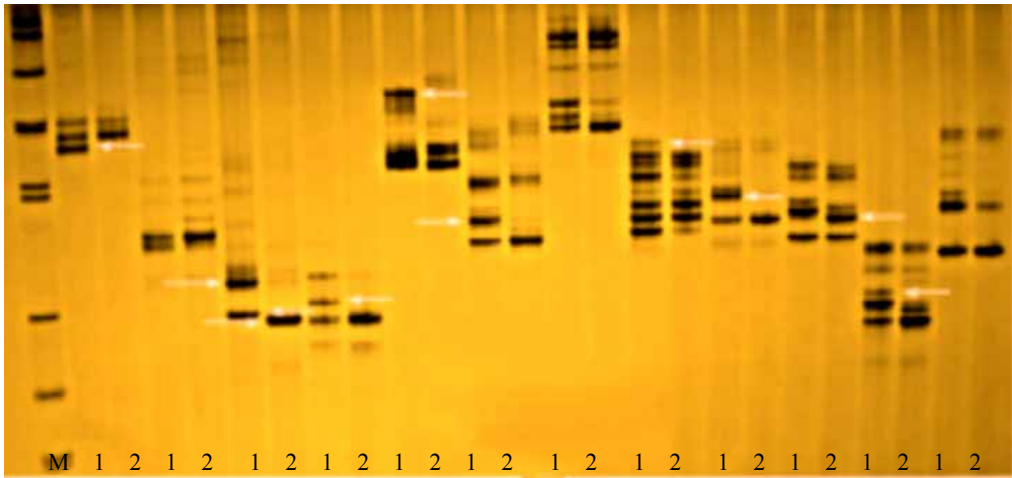
4.2.1 光子 GZNn 与毛子 NN2-2 的 SSR 多态性及其指纹图谱

利用 398 对 SSR 引物对近等基因系光子 GZNn 与毛子 NN2-2 进行多态性引物筛选 (图 14), 结果有 25 对引物有多态性, 共检测出 95 个等位位点, 其中多态性位点为 52 个, 占等位基因总数的 54.74%, 每对引物检测出 2-7 个等位位点, 平均 3.8 个。其中引物 S6、S8、S21、S23 的等位位点最少, 为 2 个, 而引物 S18 和 S19 的等位位点最多, 为 7 个。多态性引物的多态信息量 (PIC) 变幅为 0.44-0.861, 平均值为 0.679 (表 10)。

本实验利用 25 对 SSR 引物筛选的 52 个多态性位点, 初步建立了 GZNn 和 GZNN2-2 的 SSR 指纹图谱 (图 15)。结果表明两个种质种质均有本身特异的等位位点, 突变体光子 GZNn 有 12 个, 其原始型 GZNN2-2 有 40 个。

表 10 引物对 GZNn 与毛子 NN2-2 的 PCR 扩增的等位基因数及 PIC 值
Table 10 The number of alleles and *PIC* value of the SSR primers

等位基因数			等位基因数		
SSR 引物编号	(多态性数)	PIC 值	SSR 引物编号	(多态性数)	PIC 值
No. of SSR primers	No. of alleles	PIC value	No. of SSR primers	No. of alleles	PIC value
	(No. polymorphic)			(No. polymorphic)	
S1	5 (2)	0.78	S14	4 (1)	0.74
S2	3 (1)	0.64	S15	3 (2)	0.63
S3	3 (2)	0.63	S16	5 (4)	0.78
S4	4 (3)	0.72	S17	4 (3)	0.72
S5	4 (3)	0.75	S18	7 (4)	0.84
S6	2 (2)	0.50	S19	7 (4)	0.84
S7	3 (1)	0.64	S20	3 (1)	0.64
S8	2 (1)	0.44	S21	2 (1)	0.44
S9	5 (4)	0.78	S22	3 (2)	0.63
S10	4 (1)	0.74	S23	2 (1)	0.44
S11	4 (2)	0.86	S24	5 (2)	0.78
S12	5 (1)	0.79	S25	2 (1)	0.44
S13	4 (3)	0.72			



注：箭头示差异带 M: Marker 1: GZNn 2: GZNN2-2

图 14 部分引物对 GZNn 和 GZNN2-2 的 PCR 扩增差异
Fig 14 The difference between five fiber mutant and TM-1 by Part of SSR primers

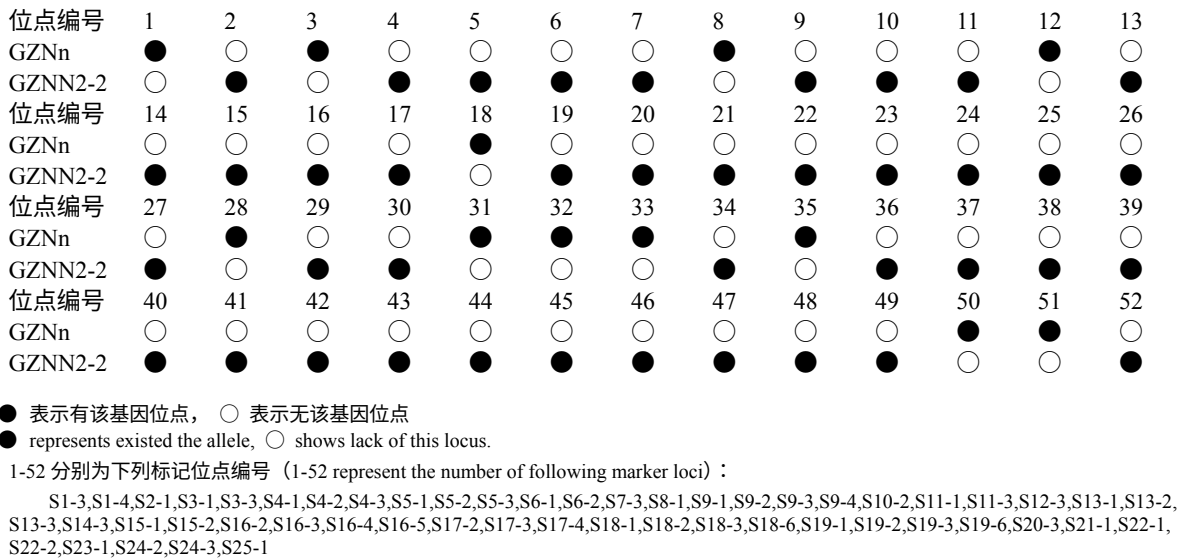


图 15 纤维发育突变体 GZNn 和原始型 GZNN2-2 的 SSR 指纹图谱
Fig.15 SSR fingerprint between GZNn and GZNN2-2

4.2.2 徐州 142 无絮和徐州 142 的 SSR 多态性和指纹图谱

利用 398 对 SSR 引物对近等基因系徐州 142 无絮和徐州 142 进行多态性引物筛选 (图 15)，结果有 77 对引物有多态性，检测出 306 个等位位点，其中多态性位点为 181 个，占等位基因总数的 59.15%，每对引物检测出 2-9 个等位位点，平均 3.97 个。其中引物 S15、S18、S22、S40 等的等位位点最少，为 2 个，而引物 S1 的等位位点最多，为 9 个。多态性引物的多态信息量 (PIC) 变幅为 0.45-0.88，平均值为 0.69 (表 11)。

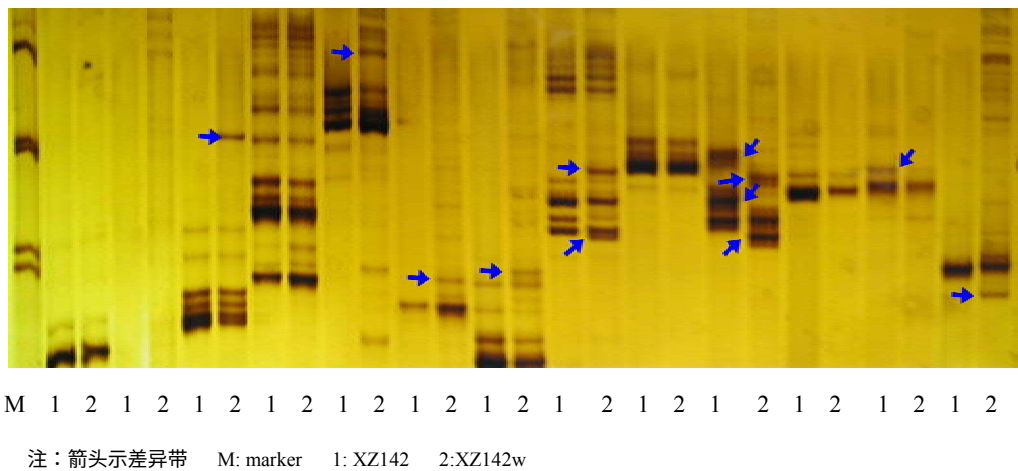


图 16 部分引物对徐州 142 无絮和徐州 142 的 PCR 扩增差异
Fig 16 The difference between five fiber mutant and TM-1 by Part of SSR primers

本实验利用 77 对 SSR 引物筛选的 181 个多态性位点，初步建立了徐州 142 无絮与徐州 142

的 SSR 指纹图谱 (图 17)。两个种质均有本身特异的带型, 分别为 41 个和 140 个。说明虽然徐州 142 无絮来源于徐州 142, 只有纤维和短绒的发育差异, 但二者还是存在很大的遗传差异性。

表 11 引物扩增的等位基因数及 *PIC* 值
Table 11 The number of alleles and *PIC* value of the SSR primers

SSR 引物编号 No. of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No. polymorphic)	<i>PIC</i> 值 <i>PIC</i> value	SSR 引物编号 No. of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No. polymorphic)	<i>PIC</i> 值 <i>PIC</i> value
S1	9(7)	0.88	S40	2(1)	0.44
S2	5(2)	0.78	S41	2(1)	0.44
S3	7(4)	0.84	S42	5(5)	0.80
S4	3(2)	0.63	S43	2(1)	0.44
S5	3(1)	0.64	S44	5(3)	0.78
S6	5(1)	0.79	S45	5(4)	0.78
S7	4(3)	0.72	S46	5(4)	0.78
S8	5(4)	0.78	S47	5(3)	0.78
S9	3(1)	0.64	S48	4(3)	0.72
S10	4(3)	0.72	S49	3(1)	0.64
S11	6(2)	0.82	S50	4(2)	0.72
S12	5(1)	0.79	S51	5(1)	0.79
S13	7(6)	0.84	S52	4(3)	0.72
S14	3(1)	0.64	S53	3(1)	0.64
S15	2(1)	0.44	S54	5(3)	0.78
S16	3(2)	0.63	S55	3(2)	0.63
S17	2(2)	0.50	S56	3(1)	0.64
S18	2(1)	0.44	S57	6(1)	0.83
S19	4(2)	0.72	S58	5(2)	0.78
S20	2(2)	0.50	S59	6(4)	0.81
S21	7(7)	0.86	S60	5(3)	0.78
S22	2(1)	0.44	S61	4(2)	0.72
S23	3(1)	0.64	S62	5(3)	0.78
S24	3(2)	0.63	S63	3(2)	0.63
S25	4(2)	0.72	S64	6(3)	0.81
S26	5(2)	0.78	S65	2(1)	0.44
S27	3(2)	0.63	S66	6(2)	0.82
S28	3(1)	0.64	S67	3(2)	0.63
S29	4(2)	0.72	S68	3(2)	0.63
S30	2(2)	0.50	S69	3(3)	0.67
S31	4(3)	0.72	S70	4(3)	0.72
S32	5(4)	0.84	S71	3(3)	0.67
S33	4(3)	0.72	S72	3(1)	0.64
S34	6(4)	0.81	S73	5(4)	0.78
S35	4(1)	0.73	S74	4(2)	0.72
S36	2(2)	0.50	S75	4(3)	0.72
S37	4(2)	0.72	S76	3(2)	0.63
S38	3(1)	0.64	S77	3(2)	0.63
S39	3(2)	0.63			

4.2.3 徐州 142 无絮与新乡小吉无絮的 SSR 多态性和指纹图谱

利用 398 对 SSR 引物对徐州 142 无絮与新乡小吉无絮进行多态性引物筛选 (图 18), 结果有 10 对引物有多态性, 检测出 36 个等位位点, 其中多态性位点为 15 个, 占等位基因总数的 41.67%,

每对引物检测出 2-5 个等位位点, 平均 3.6 个。其中引物 S2 和 J6 的等位位点最少, 为 2 个, 而引物 S1 的等位位点最多, 为 5 个。多态性引物的多态信息量 (PIC) 变幅为 0.45-0.78, 平均值为 0.67 (表 12)。

标记位点	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
xz142w	●	○	○	●	●	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
xz142	○	●	●	○	○	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
位点编号	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34
xz142w	○	○	●	○	○	○	●	●	○	○	○	●	○	○	○	○	●
xz142	●	●	○	●	●	●	○	○	●	●	●	○	●	●	●	●	○
位点编号	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51
xz142w	○	●	●	○	○	●	○	○	●	○	○	○	●	○	●	●	●
xz142	●	○	○	●	●	○	●	●	○	●	●	●	○	●	○	○	○
位点编号	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68
xz142w	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	●	○	●	○	○	○	○
xz142	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	○	●	○	●	●	●	●
位点编号	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85
xz142w	○	●	○	○	○	○	○	○	●	●	○	○	●	○	●	○	○
xz142	●	○	●	●	●	●	●	●	○	○	●	●	○	●	○	●	●
位点编号	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102
xz142w	○	●	○	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	●	○	○	○
xz142	●	○	●	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	○	●	●	●
位点编号	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119
xz142w	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
xz142	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
位点编号	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136
xz142w	○	○	○	○	○	●	○	○	●	○	●	○	○	○	○	○	○
xz142	●	●	●	●	●	○	●	●	○	●	○	●	●	●	●	●	●
位点编号	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153
xz142w	○	○	○	○	○	○	●	○	○	○	○	○	○	○	○	●	●
xz142	●	●	●	●	●	●	○	●	●	●	●	●	●	●	●	○	○
位点编号	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170
xz142w	○	○	○	●	○	○	●	○	●	○	●	○	○	○	●	○	○
xz142	●	●	●	○	●	●	○	●	○	●	○	●	●	●	○	●	●
位点编号	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181						
xz142w	○	○	●	○	○	○	○	●	○	●	●						
xz142	●	●	○	●	●	●	●	○	●	○	○						

1-181 分别为下列标记位点编号 (1-181 represent the number of following marker loci) :

S1-1, S1-4, S1-5, S1-6, S1-7, S1-8, S1-9, S2-2, S2-5, S3-3, S3-4, S3-6, S3-7, S4-2, S4-3, S5-1, S6-2, S7-2, S7-3, S7-4, S8-1, S8-3, S8-4, S8-5, S9-1, S10-1, S10-3, S10-4, S11-4, S11-6, S12-4, S13-1, S13-2, S13-3, S13-4, S13-5, S13-7, S14-1, S15-2, S16-1, S16-2, S17-1, S17-2, S18-1, S19-1, S19-2, S20-1, S20-2, S21-1, S21-2, S21-3, S21-4, S21-5, S21-6, S21-7, S22-1, S23-3, S24-1, S24-2, S25-2, S25-3, S26-2, S26-3, S28-1, S27-1, S27-2, S29-1, S29-2, S30-1, S30-2, S31-1, S31-2, S31-3, S32-1, S32-2, S32-3, S32-4, S33-1, S33-2, S33-3, S34-2, S34-3, S34-4, S34-5, S35-2, S36-1, S36-2, S37-1, S37-2, S38-1, S39-1, S39-2, S40-1, S41-1, S42-1, S42-2, S42-3, S42-4, S42-5, S43-1, S44-1, S44-3, S44-4, S45-1, S45-2, S45-3, S45-4, S46-1, S46-2, S46-3, S46-4, S76-1, S76-3, S47-1, S47-2, S47-5, S48-1, S48-3, S48-4, S49-1, S50-1, S50-2, S51-3, S52-1, S52-2, S52-3, S53-3, S54-1, S54-3, S54-5, S55-1, S55-3, S56-1, S57-6, S58-3, S58-4, S59-1, S59-4, S59-5, S59-6, S60-1, S60-3, S60-5, S61-3, S61-4, S62-3, S62-4, S62-5, S63-1, S63-2, S64-1, S64-3, S64-6, S65-1, S66-1, S66-4, S67-1, S67-2, S68-1, S68-2, S69-1, S69-2, S69-3, S70-1, S70-2, S70-3, S71-1, S71-2, S71-3, S72-3, S73-1, S73-2, S73-3, S73-4, S74-1, S74-2, S75-1, S75-2, S75-4, S77-2, S77-3

● 表示有该基因位点, ○ 表示无该基因位点

● represents existed the allele, ○ shows lack of this locus.

图 17 纤维发育突变体 XZ142w 和 XZ142 的 SSR 指纹图谱

Fig.17 SSR fingerprint between

表 12 引物扩增的等位基因数及 PIC 值
Table 12 The number of alleles and PIC value of the SSR primers

SSR 引物编号 No. of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No. polymorphic)	PIC 值 PIC value	SSR 引物编号 No. of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No. polymorphic)	PIC 值 PIC value
S1	5 (2)	0.78	S6	2 (1)	0.44
S2	2 (1)	0.44	S7	4 (2)	0.72
S3	4 (1)	0.74	S8	3 (1)	0.64
S4	4 (3)	0.72	S9	4 (1)	0.74
S5	4 (1)	0.74	S10	4 (2)	0.72

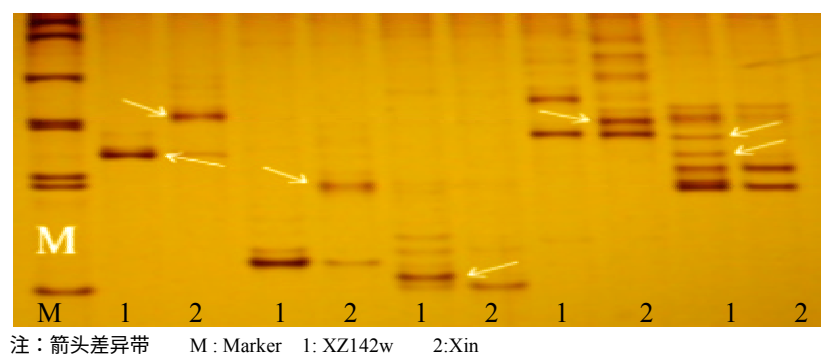


图 18 部分引物对徐州 142 无絮与新乡小吉无絮的 PCR 扩增差异
Fig18 The difference between five fiber mutant and TM-1 by Part of SSR primers

本实验利用 10 对 SSR 引物筛选的 15 个多态性位点,初步建立了徐州 142 无絮与新乡小吉无絮的 SSR 指纹图谱 (图 19)。两个种质种质均有本身特异的带型,分别为 8 条、7 条。证明徐州 142 无絮与新乡小吉无絮虽表型变异相同,具有不同的遗传背景和较为明显的分子特征差异。

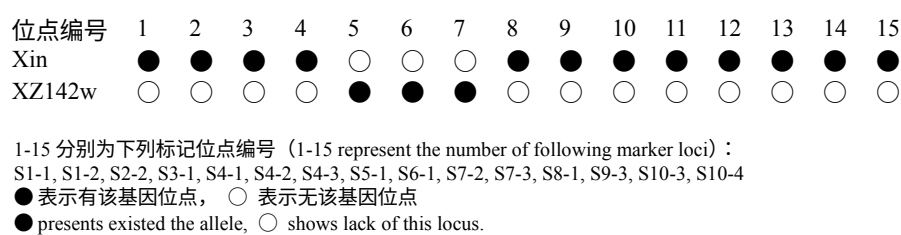


图 19 纤维发育突变体 Xin 和 XZ142w 的 SSR 指纹图谱
Fig.19 SSR fingerprint between Xin and XZ142w

4.2.4 新乡小吉无絮突变体及其原始型来源分析

4.2.4.1 新乡小吉无絮的来源

新乡小吉镇某农业科技员在年在棉田里发现了一株表现为无绒无絮的纤维发育突变体,他确定该突变体可能来源于中棉所 12 或豫棉 4 号田里,在我们获得这一突变体后,我们命名为新乡

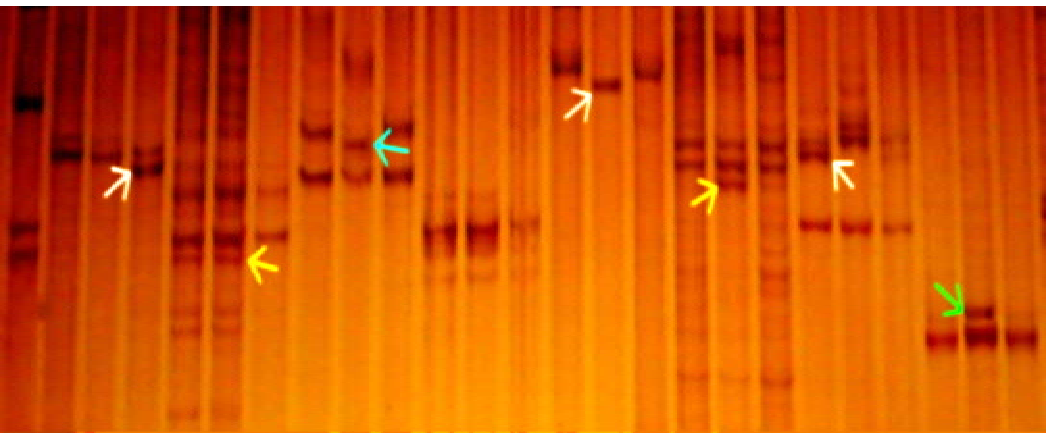
小吉无絮，然而，多年来一直没有确定其真正来源，为此，本研究利用 SSR 标记技术对新乡小吉无絮及其可能的原始型材料中棉所 12 和豫棉 4 号进行来源分析。分析结果表明新乡小吉无絮可能来源于豫棉 4 号。

4.2.4.2 多态性分析和指纹图谱构建

利用 398 对 SSR 引物对中棉 12、新乡小吉无絮和豫棉 4 号进行多态性引物筛选（图 20），结

表 13 引物扩增的等位基因数及 PIC 值
Table 13 The number of alleles and PIC value of the SSR primers

SSR 引物编号 No. of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No. polymorphic)	PIC 值 PIC value	SSR 引物编号 No. of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No. polymorphic)	PIC 值 PIC value
S1	8 (1)	0.87	S19	7 (3)	0.84
S2	5 (5)	0.78	S20	5 (1)	0.80
S3	4 (3)	0.69	S21	3 (1)	0.66
S4	3 (2)	0.65	S22	5 (3)	0.76
S5	4 (2)	0.69	S23	5 (5)	0.79
S6	5 (4)	0.77	S24	5 (5)	0.78
S7	7 (5)	0.84	S25	4 (2)	0.74
S8	3 (2)	0.61	S26	4 (3)	0.72
S9	5 (1)	0.78	S27	2 (1)	0.48
S10	5 (4)	0.77	S28	4 (1)	0.72
S11	6 (3)	0.82	S29	3 (2)	0.61
S12	3 (2)	0.61	S30	4 (2)	0.74
S13	3 (2)	0.56	S31	2 (2)	0.44
S14	6 (4)	0.81	S32	6 (3)	0.79
S15	2 (2)	0.44	S33	4 (3)	0.69
S16	5 (4)	0.78	S34	2 (2)	0.44
S17	5 (4)	0.78	S35	5 (2)	0.78
S18	2 (1)	0.38	S36	4 (3)	0.72

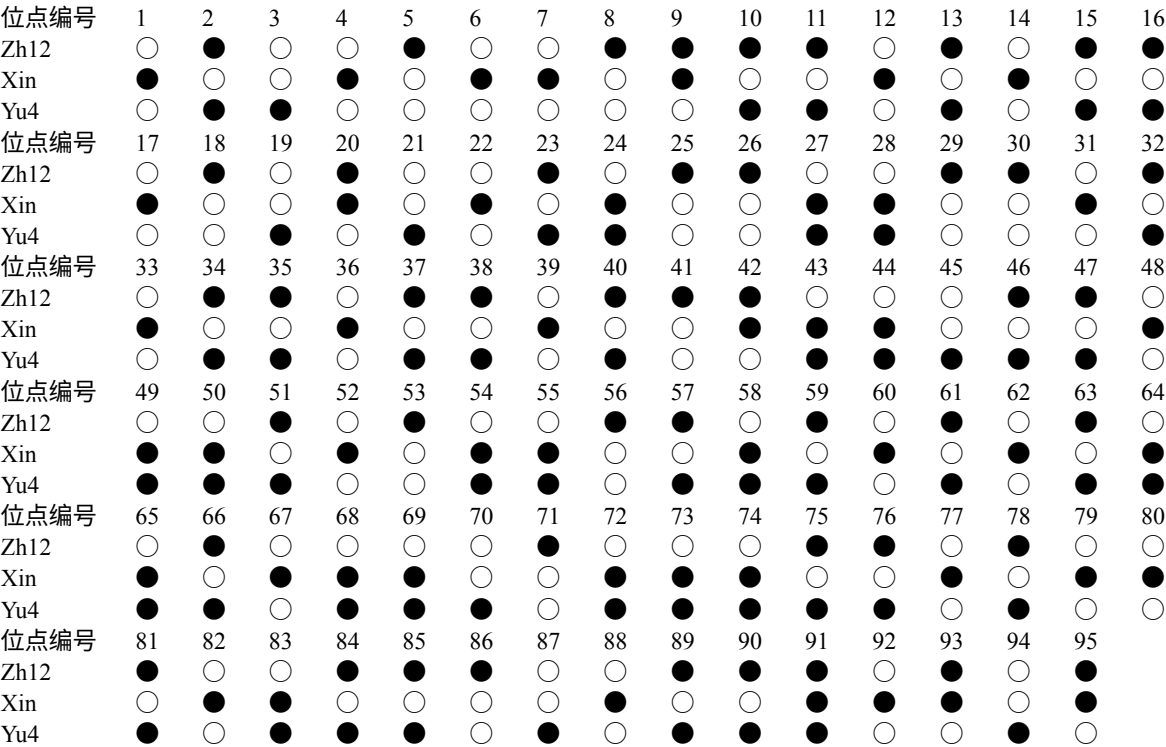


M 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3
注：箭头差异带 M: Marker 1: Zh12 2: Xin 3: Yu4

图 20 部分引物对中棉所 12、新乡小吉无絮与豫棉 4 号的 PCR 扩增差异
Fig 20 The difference between five fiber mutant and TM-1 by Part of SSR primers

果有 36 对引物有多态性，检测出 155 个等位位点，其中多态性位点为 95 个，占等位基因总数的 61.29%，每对引物检测出 2-8 个等位位点，平均 4 个。其中引物 S27、S31、S34 等的等位位点最少，为 2 个，而引物 S1 的等位位点最多，为 8 个。多态性引物的多态信息量 (PIC) 为 0.38-0.87，平均值为 0.71 (表 13)。

本实验利用 36 对 SSR 引物筛选的 95 个多态性位点，初步建立了 3 个种质的 SSR 指纹图谱 (图 21)。3 个种质均有本身特异的带型，分别为 47 个、46 个和 54 个。在 36 对引物中，有 11 对引物能将 3 个种质分开，占多态性引物的 30.6%。



1-95 分别为下列标记位点编号 (1-95 represent the number of following marker loci) :
S31-1,S31-2,S32-3,S32-4,S32-6,S5-1,S5-2,S6-1,S6-2,S6-3,S6-5,S7-1,S7-2,S7-3,S7-5,S7-6,S8-2,S8-3,S9-1,S10-1,S10-2,S10-3,S10-4,S11-2,S11-3,S11-5,S12-1,S12-2,S14-4,S13-1,S13-3,S14-2,S14-3,S14-4,S14-5,S15-1,S15-2,S16-1,S16-2,S16-3,S16-5,S17-1,S17-2,S17-4,S17-5,S18-1,S19-5,S19-6,S19-7,S20-5,S21-1,S22-1,S22-4,S22-5,S23-1,S23-2,S23-3,S23-4,S23-5,S24-1,S24-2,S24-3,S24-4,S24-5,S25-3,S25-4,S26-1,S26-2,S26-4,S27-1,S28-4,S29-1,S29-3,S30-1,S30-2,S2-1,S2-2,S2-3,S2-4,S2-5,S3-2,S3-3,S3-4,S4-1,S4-2,S33-1,S33-2,S33-3,S33-4,S34-1,S34-2,S35-3,S35-4,S35-5,S36-2,S36-3,S36-4,
● 表示有该基因位点, ○ 表示无该基因位点
● represents existed the allele, ○ shows lack of this locus.

图 21 中棉所 12、新乡小吉无絮与豫棉 4 号的 SSR 指纹图谱
Fig.21 SSR fingerprint of Zh12,Xin and XZ142w

4.2.4.3 新乡小吉无絮的原始型来源分析

从遗传相似系数 (表 14) 方面比较，可以看出新乡小吉无絮与中棉 12 的相似系数是 0.47，与豫棉 4 号的相似系数是 0.59，二者差异明显达到显著水平，所以可以认为新乡小吉无絮可能来源于豫棉 4 号。中棉 12 与豫棉 4 号的相似系数是 0.72，这与二者都是毛子，区别于无绒无絮的

新乡小吉无絮的事实相符。

表 14 中棉所 12、新乡小吉无絮与豫棉 4 号的成对相似系数比较

table 14 comparison of pair wise similarity coefficient of Zh12,Xin and XZ142w

	zh12	Xin	Yu4
Zh12	1.00		
Xin	0.47	1.00	
Yu4	0.72	0.59	1.00

4.2.5 不同类型纤维发育突变体遗传差异比较

4.2.5.1 纤维发育突变体的 SSR 多态性分析和指纹图谱构建

用 398 对 SSR 引物对五个纤维发育突变体（光子 Nn、H-154、光子 nn、新乡小吉无絮、徐州 142 无絮）和陆地棉标准系 TM-1 进行多态性引物筛选（图 22），结果有 12 对引物检测到了多态性，检测出 50 个等位位点，其中多态性位点为 36 个，占等位位点总数的 72.0%，每对引物检测出 2-8 个等位位点，平均 4 个，其中引物 S7 的等位位点最少，为 2 个，而引物 S3 的等位位点最多，为 8 个。多态性引物的多态信息量（PIC）变幅为 0.48-0.81，平均值为 0.67（表 15）。

6 个种质均有本身特异的带型，GZnn 有 16 个，H-154 有 14 个，GZNn 有 18 个，TM-1 有 23，Xin 有 19 个，XZ142w 有 14 个。在 12 对引物中，有 2 对引物就能将 6 个种质分开，占多态性引物的 16.16%，充分体现了 5 个突变体间具有较大的遗传差异（图 22）。

4.2.5.2 纤维发育突变体的 SSR 聚类 and 遗传相似性分析

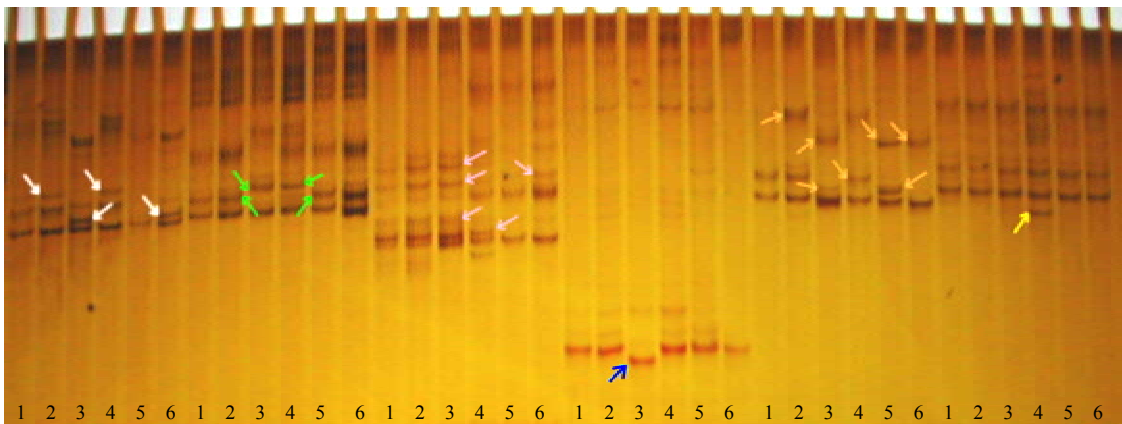
从遗传相似系数表（表 16）两个无绒无絮突变体 Xin 和 XZ142w 的相似系数达到了 0.90，而两个隐性纤维发育突变体 H-154 与 GZnn 的相似系数也达到了 0.94，这与纤维性状的表现及其遗传方式极其符合，这说明具有相同的表现型具有较大的遗传相似性。种质 GZnn、H154、GZNn 与 TM-1 的相互间的相似系数范围为 0.5-0.62，差异明显。在原始型材料 TM-1 的无短绒突变体中，有两个突变体是隐性基因突变，一个是显性基因突变，这说明基因显隐性的突变差异可以导致较大的遗传差异。在五个纤维发育突变体之中，徐州 142 无絮与 H-154 的相似系数是 0.58，为最小，差异最大，这是因为徐州 142 无絮与 H-154 不仅具有不同的纤维突变基因型，而且，还具有不同的遗传背景。

采用 NTSYS 1.8 数据分析软件进行聚类分析，按非加权组平均法进行聚类，绘制不同突变体亲缘关系树状图。从图 24 可以看出，该树状图对无短绒无纤维突变体（Xin 和 XZ142w）、无短绒有纤维突变体（GZnn、H154 和 GZNn）、有短绒有纤维种质（TM-1）作了很好的聚类。在距离为 2 的时候，GZnn 和 H154 聚到了一起，说明 GZnn 与 H154 有着很相近的遗传基础。在距离

为 3 的时候，六个种质聚为三类。GZnn 和 H154 与 GZNn 聚为一支，三个种质均表现为无短绒有长纤维，与三者间有共同的血缘相吻合；而同为无短绒无长纤维的突变体 Xin 与 XZ142w 聚为一支，而有绒有絮的 TM-1 单独为一类，表现为相同遗传表型的种质聚在一起，达到了预期的聚类结果。

表 15 引物扩增的等位基因数及 PIC 值
Table 15 The number of alleles and PIC value of the SSR primers

SSR 引物编号 No.of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No.polymorphic)	PIC 值 PIC value	SSR 引物编号 No.of SSR primers	等位基因数 (多态性数) No. of alleles (No.polymorphic)	PIC 值 PIC value
S1	5 (3)	0.77	S7	2 (1)	0.48
S2	5 (4)	0.77	S8	3 (1)	0.57
S3	8 (6)	0.81	S9	3 (2)	0.64
S4	3 (2)	0.63	S10	3 (3)	0.57
S5	3 (2)	0.56	S11	4 (3)	0.66
S6	6 (5)	0.81	S12	5 (4)	0.79



注：箭头差异带 1: GZnn 2: H-154 3: GZNn 4: TM-1 5: Xin 6: XZ142w

图 22 部分引物对五个纤维发育突变体与 TM-1 的 PCR 扩增差异
Fig 22 The difference between five fiber mutant and TM-1 by Part of SSR primers

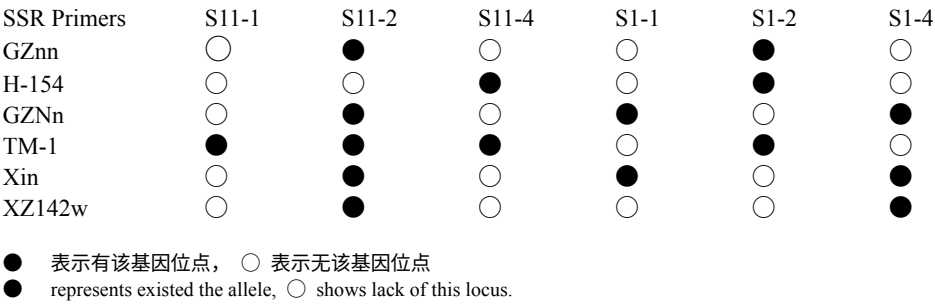


图 23 五个纤维发育突变体与 TM-1 的 SSR 指纹图谱
Fig.23 SSR fingerprint of the five fiber mutants and TM-1

	GZnn	H154	GZNn	TM-1	Xin	XZ142w
GZnn	1.00					
H154	0.94	1.00				
GZNn	0.68	0.66	1.00			
TM-1	0.50	0.52	0.62	1.00		
Xin	0.66	0.60	0.70	0.60	1.00	
XZ142w	0.64	0.58	0.68	0.58	0.90	1.00

表 16 五个突变体材料（光子）与陆地棉遗传标准系（毛子）TM-1 的遗传相似系数

Fig 16 genetic similarity coefficient between TM-1 and five fiber mutants

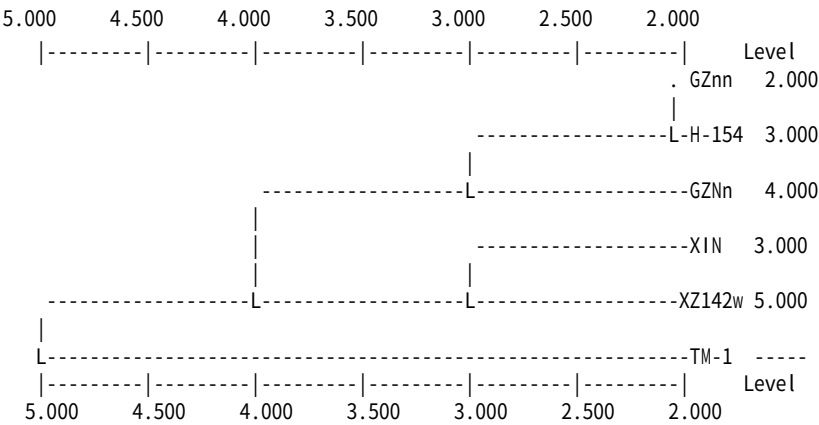


图 24 五个纤维发育突变体与 TM-1 的 SSR 聚类图

Fig 24 Tree depict of five fiber-mutants and TM-1 by SSR markers.

4.2.5.3 六个种质的成对遗传距离

成对遗传距离计算结果见表 17。表中数字数值越小，两种质距离越小、越相似。正如预期的那样，GZnn 和 H154 的遗传距离为 0.19，Xin 和 XZ142w 的遗传距离为 0.15。而 TM-1 和 GZnn 的遗传距离最大，为 0.54，这与二者的相似性最低（0.5）相符合。

表 17 6 个种质的遗传距离
Table 17 Genetic distance for 6 cotton germplasm

	GZnn	H154	GZNn	TM-1	Xin	XZ142w
GZnn	*					
H154	0.19	*				
GZNn	0.41	0.5	*			
TM-1	0.54	0.52	0.43	*		
Xin	0.43	0.17	0.38	0.44	*	
XZ142w	0.47	0.6	0.42	0.49	0.15	*

4.3 讨论

早期用于棉花品种或品系亲缘关系及系谱的分子标记,主要是RAPD技术[17, 18]。刘文欣等(2003)^[43],利用RAPD分子标记技术,通过对不同棉种、不同品种类型、不同种植区域和不同来源的棉花品种(系)遗传差异的比较表明RAPD可以提示棉花品种间遗传差异。徐秋华等(1994)^[58]、别墅等(2001)等^[29]、王心宇等(1997)^[55]等都利用RAPD技术进行了棉花品种的遗传多样性和遗传基础的分析。武耀廷等(2001)^[56]利用RAPD、ISSR和SSR三种分子标记和形态学性状对36个陆地棉品种遗传多样性的研究,结果表明,对于检测类内品种间遗传差异分子标记比形态学性状更加有效。

SSR技术相对于RAPD技术有稳性好的优势,大力开展用SSR技术构建指纹图谱及遗传关系的确定具有更广阔的应用前景及可行的实际意义。实践证明SSR分子标记是棉花品种的遗传多样性和遗传基础研究中便捷而有效的方法。

本研究证明品种的表型变异度与SSR聚类分析结果间有很好的吻合度。我们共用398对SSR引物,对五个不同类型的纤维发育突变体进行多态性分析,由于所用材料都是陆地棉,且某些材料为近等基因系(TM-1与GZNn和GZnn),结果获得的多态性SSR引物能将相同遗传方式的纤维发育突变体先聚为一类,继而将表型相同的突变型与原始型区分开来。说明SSR标记技术可以获得很好的按表型聚类的品种聚类图。

综上所述,SSR标记技术是分析种质间遗传差异和遗传多样性的有效方法。

第五章 结论

棉纤维是由种子表皮的单细胞发育而来,由纤维(lint)和短绒(fuzz)组成,是研究基因表达的好材料。而不同类型的纤维发育突变体是研究棉纤维细胞分化、伸长和细胞壁加厚期的生理生化特点,纤维发育的遗传规律的理想材料。随着分子生物学的蓬勃发展,以纤维发育突变体为材料,进行生理、生化、遗传及其分子生物学等方面的研究,对阐明纤维分化发育的机理,利用基因工程手段培育品质更好、更适合当前及今后棉纺织业需求的优质棉品种具有重要意义。

本研究我们发现的不同类型纤维发育突变体进行遗传学和分子生物学鉴定,以确定新的纤维发育突变体的遗传方式及其与其他纤维发育突变体基因的遗传关系,进而将新基因定位到染色体上;利用新光子材料构建的 F_2 群体,进行了与纤维品质、衣分、子指等性状相关的QTL分析和定位,这为棉纤维品质和产量的QTL分析提供了更多的信息;对若干纤维发育突变体及其近等基因系进行了SSR多态性分析,进一步确证突变体的来源和多样性。

总之,本研究总体目标是揭示不同纤维发育突变体的遗传多态性,突变基因的遗传规律和分子生物学特性,从而为利用光子性状作为标记进行育种性状选择奠定了理论基础,以及为发掘和克隆纤维发育相关的优良基因提供了更多信息。本研究获得的主要研究结果和相关分析如下:

1. 发现了一个新的纤维发育突变体 GZnn,确定了它是受一对隐性基因控制的质量性状,并利用分子标记方法,将该基因定位在 10 号染色体上。

应用传统遗传学方法,分析了新纤维发育突变体GZnn的遗传方式,确定了GZnn是受一对隐性基因控制的质量性状,将该基因命名为 n_4 。并利用SSR分子标记技术将该光子基因定位到 10 号染色体上,与已经发现的光子基因进行比较,确定了 n_4 基因是一个新的基因。本研究为新基因的定位研究开辟了新思路。GZNn的光子特性是由显性基因 N_1 控制的性状,而GZnn是从其中分离出来的一个隐性光子, n_2 又是来自于TM-1 的一个隐性光子。故GZnn与GZNn、 N_1 、 n_2 、TM-1 形成近等基因材料系,为棉纤维的分化发育机理的研究提供了极好的材料。

2. 利用纤维突变体构建的 F_2 群体,对纤维品质、衣分、子指等性状相关的 QTL 分析和定位,分别发现了一个与子指和纤维长度有关的微效 QTL,并将这两个 QTL 都定位于第 12 号染色体。

用Mapmaker exp /3.0 软件,对从TM-1×GZnn F_2 代的光子、毛子基因池中获得的 22 个多态性SSR等位点进行连锁图谱的构建,结果获得 2 个连锁群,全长 198.4 cM,运用winQTLcart 2.0 软件,对TM-1×GZnn的 F_2 代衣分、子指、纤维长度、整齐度、比强度、伸长率、马克隆值等 7 个数量性状进行全基因组的QTL扫描,取LOD值为 3.0 时,分别发现了一个与子指有关的微效QTL 和一个与纤维长度有关的微效QTL,可解释的表型方差变异分别为 4.64%和 0.19%,并将FL02 和 SI02 这两个都定位于第 12 号染色体。

前人研究认为 12 号染色体上没有控制与纤维性状相关的 QTLs,而本研究确定了 12 号染色体存在与纤维性状相关的 QTLs。本研究所获得的 QTLs 与光子性状具有紧密的相关性,从而在分子水平上研究了光子性状对纤维性状的影响,为利用不同的近等基因系的纤维发育突变体进行更深入的研究,提供了研究思路和理论基础。由于不同的近等基因系的纤维发育突变体控制短绒和纤维的方式不同,且近等基因系间有着相同的遗传背景,利用这些突变体进行与纤维性状相关

的 QTLs 定位, 容易消除遗传背景噪音, 更容易发现与光子性状紧密相关的 QTLs, 从而为研究和克隆与纤维品质相关的基因提供了更多信息。

3. 本研究还对三组不同纤维发育突变体的近等基因系, 利用 SSR 分子标记技术, 进行了分子水平上的多态性分析及遗传相似性和聚类分析, 并分类构建了这些纤维发育突变体的 SSR 指纹图谱。

三组近等基因系分别是: 1) 陆地棉遗传标准系 TM-1、无绒有絮突变体光子 Nn、光子 nn、H-154 (n_2) 和毛子 NN2-2。2) 无绒无絮突变体徐州 142 无絮和徐州 142, 3) 无绒无絮突变体新乡小吉无絮可能是中棉所 12 或豫棉 4 号的突变体, 目前, 还没有定论。

研究结果表明新乡小吉无絮与中棉 12 的相似系数是 0.471, 与豫棉 4 号的相似系数是 0.587, 二者差异明显达到显著水平, 初步认为新乡小吉无絮可能来源于豫棉 4 号; 徐州 142 无絮 (XZ142w) 和新乡小吉无絮 (Xin) 突变体表型变异相同, 而且, 其 SSR 标记的遗传相似性达 90%, 然而, SSR 指纹图谱表明两个突变体具有不同的分子特征, 可能是由不同的遗传背景所致; SSR 遗传相似性分析还表明四个近等基因系 GZnn、H154、GZNn 与 TM-1 的相互间差异明显 (相似系数为 0.5-0.62), 这说明基因显隐性的突变差异可以导致较大的遗传差异。两个隐性无绒有絮突变体 H-154 与 GZnn 的相似系数达到了 0.94, 这与纤维性状的表现及其遗传方式极其符合, 这说明具有相同的表现型也具有一定的遗传相似性。

采用 NTSYS 1.8 数据分析软件对 TM-1、GZnn、H-154、GZNn、XZ142w 和 Xin 六个种质进行了聚类分析, 并绘制品种亲缘关系树状图。在距离为 3 的时候, 这六个种质聚为三类: GZNn、H154、GZnn 聚为一支, 三个品种均表现为无短绒有长纤维, 与三者间有共同的血缘相吻合; 而同为无短绒无长纤维的突变体 Xin 与 XZ142w 聚为一支, 表现为相同遗传表型的种质聚在一起, 说明 SSR 标记技术可以获得按表型聚类的树状图。

早期用于棉花品种或品系亲缘关系及系谱的分子标记, 主要是 RAPD 技术, SSR 技术相对于 RAPD 技术有稳性好等优势, 大力开展用 SSR 技术构建指纹图谱及遗传关系的确定具有更广阔的应用前景及可行的实际意义。本研究为利用 SSR 分子标记技术在棉花品种的遗传多样性及遗传基础研究作了初步探讨, 结果表明 SSR 标记技术是分析种质间遗传差异和遗传多样性的有效方法。

参考文献

- [1]. 柏长青, 徐楚年等. 棉花纤维的发育进程探讨及单细胞培养, 1993, 棉花学术讨论会论文
- [2]. 杜雄明, 刘国强等. 陆地棉光籽品种资源分析和评价[J], 河南职技师院学报, 1994, 3: 10-13
- [3]. 杜雄明, 潘家驹. 一种新型多细胞棉纤维的诱导及特征, 中国科协第二届学术年会征文, 2000
- [4]. 杜雄明. 陆地棉纤维初始发育和纤维突变体遗传研究[D], 博士学位论文, 南京, 南京农业大学, 1998
- [5]. 高玉千, 聂以春等. 棉花抗黄萎病基因的 QTL 定位[J]. 棉花学报 2003, 15 (3): 73-79
- [6]. 郭龙彪, 罗利军等. 水稻汕优 63 重组自交系重要农艺性状的 QTLs 和互作分析[J], 农业生物技术通报, 2002, 10 (4): 327—333
- [7]. 郭旺珍, 张天真等. 我国陆地棉品种的遗传多样性研究初报[J], 棉花学报, 1997, 9 (5): 242-247
- [8]. 何风华, 曾瑞珍等. 不同 Waxy 基因型水稻的遗传多样性 [J], 植物分子育种, 2003, 1 (2): 179-186
- [9]. 季道藩, 汪若海等. 棉花知识百科, 北京, 中国农业出版社, 2001, P44
- [10]. 蒋淑丽, 王学德. 5 个棉花纤维突变体胚珠和纤维的离体诱导[J], 棉花学报, 2002, 14 (2): 71-75
- [11]. 蒋淑丽、王学德. 棉花纤维突变体胚珠发育过程中主要生物物质的积累特征[J], 浙江大学学报 (农业与生命科学版) 2002 28 (1): 16-21
- [12]. 蒋淑丽. 几个陆地棉纤维突变体的纤维发育和遗传分析[D], 硕士学位论文, 杭州, 浙江大学, 2000
- [13]. 李雄彪, 吴奇等. 植物细胞壁, 北京大学出版社, 1993, 北京
- [14]. 刘康, 张天真等. 棉纤维初始发育过程中过氧化物酶和吲哚乙酸氧化酶的活性[J], 植物生理学通讯 1998 34 (3): 175-197
- [15]. 马家璋, 吕昌华等. 棉花几种典型基因型的纤维发生和发育研究, 国际棉花学术讨论会文集, 中国农业科技出版社, 1993, 184-190
- [16]. 马欣荣, 徐楚年等. 棉花胚珠纤维细胞分化的研究[J], 北京农业大学学报, 1992, 增刊
- [17]. 聂以春, 左开井等, RAPD 标记分析棉花种间杂种后代的遗传相似性[J], 华中农业大学学报, 2000, 19 (6): 523-527
- [18]. 聂以春, 左开井等. RAPD 标记分析棉属种间杂种后代检测中的应用[J], 中国农业科学, 2000, 33 (5): 25-29
- [19]. 孙振元, 郑湘如等. 从棉胚珠衍生细胞培养纤维的研究[J], 北京农业大学学报, 1992, 143-145
- [20]. 孙振元, 郑湘如等. 吲哚乙酸和赤霉素在离体棉花胚珠生长和纤维发育中的作用[J] 北京农业大学学报, 1992, 增刊
- [21]. 王水平, 沈曾佑等. 棉纤维细胞伸长生长与过氧化物酶和 IAA 氧化酶的关系[J], 植物生理学报, 1985, 11 (14): 409-417
- [22]. 闫哲, 常汝镇等. 不同来源大豆同名品种“满仓金”表现型及 SSR 标记的异同性分析[J], 植物遗传资源学报, 2003, 4 (2): 128-133
- [23]. 殷剑美, 武耀廷等. 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
- [24]. 于晓红, 朱勇清等. 陆地棉徐-142 种子无毛突变体的比较研究[J], 中国棉花, 2000, 30 (5): 517-522.

- [25]. 张天真, 孙敬等. 陆地棉无絮突变体初始发育的体外诱导[J], 棉花学报, 1992 (4): 84
- [26]. 朱勇清, 许可香等. 棉花 li 突变体生长素极性运输的减弱 [J], 植物生理与分子生物学学报, 2003, 29 (1): 15-20
- [27]. Altaf M K, Stewart J M, et al. Molecular and morphological genetics of a trispecies F2 population of cotton [J]. Proc Beltwide cotton conference .1997,448-452
- [28]. Altaf M K, Zhang J F, et al. Integrated molecular map based in a tripspecific F2 population of cotton[J]. Proc Beltwide cotton conference .1998,491-492
- [29]. Be S, Kong F L, et al. Genetic Diversity Analysis of Representative elite Cotton Varieties in There main cotton Regions in china by RAPD and Tis relation with Agronomic Characteristics [J]. Scientia Agricultural sinica. 2001,30(6): 597-603
- [30]. Beasley C A, Ting I P, et al. Test tube cotton. California Agriculture [J]. 1971, 25:6-8
- [31]. Davidonis G H. Fiber development in Preanthesis cotton ovules [J]. Physiol Plant ,1989,75:290~294
- [32]. Du X M, Pan J J, et al. Genetic analysis of presence and absence of lint and fuzz in cotton [J]. Plant Breeding, 2001, 120(6): 519-522
- [33]. Ji S J, Lu Y C, et al. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array [J]. Nucleic Acids Research, 2003, 31(10): 2534-2543
- [34]. Ji S, Lu Y, et al. A beta-tubulin-like expressed specifically in elongating cotton fibers induces longitudinal growth of fission yeast [J]. Biochem Biophys Res commun, 2002, 296(5): 1240-1250.
- [35]. John M E, Crow L J. Gene expression in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber: cloning of the mRNAs [J] Proc Natl Acad Sci USA. 1992, 89(13): 5769-5773
- [36]. Karaca M, Saha S, et al. Simple sequence repeat (SSR) markers linked to the Ligon lintless (Li-1) mutant in cotton [J]. J Hered, 2002, 93(3): 221-224
- [37]. Kearney T H, Harrison G J, Inheritance Of Smooth Seeds In Cotton. Journal Of Agricultural Research. 1927 35(3): 193-217
- [38]. Kohel R J, Benediet C R, et al. Incorporation of [14C] glucose into crystalline of cellulose in aberrant fibers of a cotton mutant [J]. Crop Sci , 1993 , 33 (5) :1036-1040
- [39]. Kohel R J, Narbuth E V, et al, Fiber development of ligonlintless-2 mutant of cotton [J], Crop Sci, 1992, 32:733-735
- [40]. Kohel R J, Quisenberry J E, et al. Fiber elongation and dry weight changes in mutant lines of cotton [J]. Crop Sci ,1974,14 (3) :471-474
- [41]. Kohel R J, Stelly D M, et al. Tests of six cotton (*Gossypium hirsutum* L.) mutants for association with aneuploids [J]. J Hered, 2002, 93(2): 130-132.
- [42]. Liang Xiao-e, Suo Jin-feng, et al. Characterization of Members of the MYB Gene Family Expressed in Cotton Ovules [J]. 棉花学报 2002 14 (增刊): 59

- [43]. Liu W X, Kong F L, et al. An Analysis About Genetic Basis of Cotton Cultivars in China Since 1949 With Molecular Markers [J]. Acta Genetic Sinica, 2003, 30 (6) : 560-570
- [44]. Luo M, Li M Y. et al. An AFLP marker related to fibrogenesis in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. 遗传学报 2001; 28(7): 677-682
- [45]. Meinert M C. Delmer D P. Changes in biochemical composition of the cell wall of the cotton fiber during development [J]. Plant Physiol. 1977,50(6): 1088~1097
- [46]. Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis : a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregation populations . Proc Natl Acad Sci USA [J], 1991,88:9828-9832
- [47]. Musaev D A, et al. Genetic control of seed hair cover in the cotton *Gossypium hirsutum* L. [J], Plant Breeding Abstracts, 1998, 60 (4): 406
- [48]. Narbuth E V, Kohel R J. Inheritance and linkage analysis of a new fiber mutant in cotton [J]. J. Hered, 1990, 81(2): 131-133
- [49]. Reinish U J, Dong J M. et al. A detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* × *Gossypium babadense* chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome [J], genetics ,1994,138:829-847
- [50]. Shappley Z W, Jenkins J N, et al. An RFLP linkage group of Upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. [J]. Thero Appl Genet , 1998,97:756-761
- [51]. Shappley Z W, Jenkins J N, et al. Establishment of molecular markers and linkage group in two F2 population of Upland cotton [J], Thero Appl Genet, 1996,92:1166-1174
- [52]. Suo J F, Liang X E, et al. Expressional Profiling of Genes Related to Cotton Fiber Initiation and Isolation of GhIAA16 Homologus to Arabidopsis IAA16 [J]. 棉花学报, 2002, 14 (增刊) :46
- [53]. Turley R B, Kloth R H. Identification of a third fuzzless seed locus in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. J Hered, 2002, 93(5): 359-364
- [54]. Wang X D, Jiang S L, et al. A Suppressed Gene in integument Cells of a Fiberless seed Mutant in Upland cotton [J] 棉花学报, 2002, 14 (增刊) :53
- [55]. Wang X Y, Guo W Z, et al. Analysis of RAPD Fingerprinting on Shortseasoned Cotton Cultivars in China [J]. Acta Genetic Sinica, 1997, 23(6): 668-676
- [56]. Wu Y T, Zhang T Z, et al. Genetic diversity detected by DNA markers and phenotypes in Upland cotton [J]. Acta Genetic Sinica, 2001,28(11): 1040-1050
- [57]. Xiao Y H, Luo M, et al. Cloning and Characterization of Polyphosphoinositide Binding Protein (Gh-sh2) Gene from Cotton [J] 棉花学报, 2002, 14 (增刊) :66
- [58]. Xu Q H, Zhang X L, et al. Genetic Diversity Evaluation of Cultivars (*Gossypium hirsutum* L.) from the Changjiang River Valley and Yellow River Valley by RAPD Markers [J]. Acta Genetic Sinica, 2001, 28(7): 683-690
- [59]. Zhang J F, James McD, et al. Economical and rapid method for extracting cotton Genomic DNA [J]. Journal of

- Cotton Science, 2000, 4:193-201
- [60]. Zhang J, Guo W, et al. Molecular linkage map of allotraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. × *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population [J]. *Theor Appl Gene* (2002) 105:1166-1174
- [61]. Zhang T Z, Pan J J. Genetic analysis of fuzzless-lintless mutant in *Gossypium hirsutum* L. [J]. *江苏农业学报*, 1991. 7 (3) : 13-16
- [62]. Zhu Y X, Ji S J, et al. Current Status and Progresses in chinese Cotton Genomic Research [J] *棉花学报*, 2002, 14 (增刊) : 36

致谢

本文是在杜雄明研究员的悉心指导下完成的，本研究的每一环节都凝结着恩师所倾注的心血与汗水。导师严谨的治学态度，开拓创新的思维方式，忘我的工作作风和对科学孜孜不倦的敬业精神，将永远激励着我以后的工作和学习；在论文工作期间导师不仅在工作、学习上给予我指导和帮助，而且在生活上也给予我无微不至的关心和照顾，值此论文完成之际向导师表示衷心的感谢和敬意。

本研究的田间实验部分得到了本课题组的刘国强老师、周忠丽老师、孙君灵老师、庞保印老师、方红艳老师的大力帮助，在此谨向他们表示诚挚的谢意。

本研究的室内试验在中国农科院棉花研究所农业部棉花遗传改良重点开放实验室完成。这部分实验得到了潘兆娥老师、宋国立老师、刘方老师多方面的指导与帮助。

中国农科院棉花所范术丽老师在实验结果分析过程中给予了热情的帮助。

中国农科院棉花研究所硕士研究生王香河、马轩、陈光、庞朝友、李华盛，长江大学的 1999 级本科生杨喜元、王常伟、2000 级本科生何晶晶、卢东柏等同学，安阳大学的赵梅同学在试验完成过程中提供了极大的帮助。在此谨向他们表示诚挚的谢意。

特别感谢我的小师妹陈光同学，她不仅在实验上给予我极大的帮助，而且在生活上也给予了我无微不至的关怀。

感谢我的父母和丈夫王良及亲友！，在我的整个求学过程中，一直作为我的精神支柱，给予我无穷的精神动力。

在此学业即将完成之际，特向所有曾给予过我帮助、指导、支持和理解的师长、同学和朋友致以真诚的谢意。

本研究得到“十五”国家重点科技攻关计划项目：棉花、麻类种质资源创新与利用研究(编号：2001BA511B05)；863 计划课题：棉花遗传工具材料收集、鉴定、保存和利用(编号：2001AA227161)的资助。

王素会

2004 年 6 月

作者简介

本人王素会，女，1977年2月出生于内蒙古自治区赤峰市。1996年9月-2000年7月在沈阳农业大学蚕学专业学习，本科学历，学士学位。1996年军训期间被评为“优秀学员”称号，1998年被校团委评为“优秀宣传工作者”称号，2000年本科毕业论文被评为优秀毕业论文。2001年9月至今在中国农业科学院研究生院攻读硕士学位，师从中国农业科学院棉花研究所杜雄明研究员。硕士论文主要方向是棉花纤维发育突变体的分子标记研究。

近期发表文章:

王素会,杜雄明. 两个棉纤维发育突变体分子生物学研究进展. 棉花学报,2003,15(6):376-379