

棉属遗传多样性 与栽培棉种间杂交研究

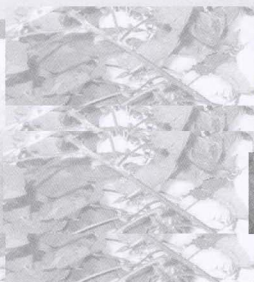
吴玉香 编著



中国农业科学技术出版社

棉属遗传多样性 与栽培棉种间杂交研究

吴玉香 编著



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

棉属遗传多样性与栽培棉种间杂交研究/吴玉香编著. —北京:
中国农业科学技术出版社, 2009
ISBN 978-7-80233-885-2

I. 棉… II. 吴… III. ①棉花—遗传—生物多样性—研究
②棉花—杂交育种—研究 IV. S562.03

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2008) 第 189703 号

责任编辑 张孝安 赵 赟

责任校对 贾晓红

出版发行 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82105144 (发行部)
(010) 82109703 (读者服务部)

传 真 (010) 82109709

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京富泰印刷有限责任公司

开 本 880 mm × 1230 mm 1/32

印 张 6.25

字 数 160 千字

版 次 2009 年 2 月第 1 版

印 次 2009 年 2 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

————— 版权所有 · 侵权必究 —————

前言

PREFACE

棉花是世界上种植面积最大的工业原料作物，年种植面积400万公顷。我国是世界产棉大国之一，棉花是纺织工业的主要原料和重要的战略物资。稳定和发展我国的棉花生产对于国民经济的发展和增加农民收入均具有重大意义。棉花属于锦葵科 (Malvaceae) 的棉属 (*Gossypium*)。棉属中有51个种，其中有4个栽培品种，即亚洲棉 (*G. arboreum* $2n = 26$, A_2)、草棉 (*G. herbaceum* $2n = 26$, A_1)、陆地棉 (*G. hirsutum* $2n = 52$, $[AD]_1$) 和海岛棉 (*G. barbadense* $2n = 52$, $[AD]_2$)。亚洲棉和草棉为二倍体棉种，陆地棉和海岛棉为异源四倍体棉种。陆地棉由于高产和优质而得到广泛栽培，种植面积占总植棉面积的90%以上；海岛棉因其突出纤维品质而仍有一定的栽培面积，而2个二倍体栽培种的种植面积相对较少，草棉已极少栽培。尽管海岛棉、亚洲棉和草棉种植面积相对较少，但却拥有陆地棉所缺乏的一些优良性状，如海岛棉的优质纤维性状和抗黄萎病性状、草棉的极早熟和耐旱性状、亚洲棉抗病虫害性等，因此，棉属栽培种是棉花遗传育种的最重要种质资源，也是棉花遗传改良最有利用价值的物种。对于4个栽培棉种的种间杂交及其相关的研究，不仅可提供丰富的中间优良材料，并可阐明棉花的遗传进化和亲缘关系，对于棉花遗传改良具有重要的理论和实践意义。

棉属有丰富的基因资源,除4个栽培品种外,其余47个均为野生棉,棉属野生种有我们遗传和育种可利用的丰富的种质资源。棉属二倍体分属A、B、C、D、E、F、G和K 8个染色体组,有许多优良性状如纤维品质优良、产量性状、抗病虫害和抗逆性强等,可以用来改良我们现有的栽培品种。所以研究二倍体棉种之间的遗传背景和亲缘关系对我们更好的利用现有的遗传资源起重要的作用。棉属多倍体是研究多倍体基因组进化的良好材料,但是由于杂交和加倍后的多倍体进化历程和机理等原因,棉属异源四倍体种进化过程中的供体种也一直存在着争议。为此,研究棉属A、D染色体组和四倍体棉种的遗传亲缘关系,对于揭示异源四倍体棉种的供体种及其进化历程具有重要意义。

因此,本书将利用现代分子标记及基因组原位杂交技术,研究棉属不同染色体组棉种的遗传亲缘关系和系统发育;同时将4个栽培棉种进行种间杂交和染色体加倍,人工合成四元杂种,以获得综合4个亲本优良性状,且有部分育性的新的种质资源,并对其进行形态学、细胞学、分子标记和育性恢复等研究,以明确4个栽培棉种及其种间杂种的染色体组型和育性恢复机理,进一步了解4个栽培棉种之间的亲缘关系和进化关系,为进一步研究和利用棉花栽培棉种的种质资源提供科学依据,为棉花遗传改良提供中间材料、方法和理论依据。

作者

2008年10月

缩写词表

TABLE OF ABBREVIATION

缩略词 Abbr.	英文全称 English name	中文名称 Chinese name
GA ₃	Gibberellic acid	赤霉素
SSR	Simple sequence repeats	简单序列重复
AFLP	Amplified fragment length polymorphism	扩增片段长度多态性
RFLP	Restriction fragment length polymorphism	限制性片段长度多态性
STS	Sequence tagged site	序列标签位点
EST	Express sequence tag	表达序列标签
SCAR	Sequence characterized amplified region	序列特征扩增片段
CAP	Cleaved amplified polymorphism	酶切扩增多态性
ISSR	Inter simple sequence repeat	简单序列间重复
SNP	Single nucleotide polymorphism	单核苷酸多态性
SSCP	Single strand conformation Polymorphism	单链物质多态性
PMC	Pollen mother cell	花粉母细胞
RTC	Root tip cell	根尖细胞

续表

缩略词 Abbr.	英文全称 English name	中文名称 Chinese name
GISH	Genomic <i>in situ</i> hybridization	基因组原位杂交
FISH	Fluorescent <i>in situ</i> hybridization	荧光原位杂交
ISHB	<i>in situ</i> hybridization banding	原位杂交显带技术
BAC-FISH	BAC-FISH	细菌人工染色体与荧光 原位杂交合成技术
<i>in situ</i> PCR	IS-PCR	原位 PCR
MFISH	Multi-FISH	多色荧光原位杂交
CGISH	comparative genome <i>in situ</i> hybridization	比较基因组原位杂交
NOR	nucleolar organizer region	核仁组织区
PRINS-PCR	Primer <i>in situ</i> PCR	引物原位 PCR
PCR	Polymerase chain reaction	聚合酶链式反应
NAA	α -Naphthalene acetic acid	萘乙酸
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
TBE	Tris-borate EDTA buffer	TBE 缓冲液
RAPD	Random amplified polymorphic DNA	随机扩增多态性 DNA
SRAP	Sequence-related amplified polymor- phism	相关序列扩增多态性
cpDNA	Chloroplast DNA	叶绿体 DNA

目 录

CONTENTS



第一章

绪论

第一节 多倍体植物的起源与进化	3
一、多倍体植物的起源	3
二、多倍体植物的进化	6
三、多倍体植物的研究概况	9
四、人工诱导多倍体的方法	12
五、人工多倍体植物的应用	13
第二节 棉花远缘杂交研究	16
一、棉花栽培种和野生种资源及其利用	16
二、棉花远缘杂交的意义	19
三、棉花种间杂交存在的问题	21
第三节 分子标记在棉花遗传改良中的应用	26
一、分子标记种类及其特点	27
二、分子标记在棉花遗传改良中的应用	31
第四节 棉花原位杂交技术及其应用	41
一、原位杂交技术历史	42

2 棉属遗传多样性与栽培棉种间杂交研究

- 二、原位杂交探针标记方法 43
- 三、原位杂交的类型 45
- 四、棉花原位杂交技术研究现状 51

第二章 棉属遗传多态性与系统发育研究

- 第一节 棉属遗传多态性研究的必要性 60
 - 一、棉属遗传多态性的概念 60
 - 二、棉属遗传多态性研究的常用方法 61
- 第二节 棉属遗传多态性及系统发育供试材料及其方法 62
 - 一、棉属遗传多态性供试材料 62
 - 二、分子标记研究方法 63
- 第三节 棉属遗传多态性分析 70
 - 一、分子标记多态性筛选结果 70
 - 二、二倍体棉种的遗传相似性分析 71
 - 三、异源四倍体棉种供体种鉴定 76
 - 四、棉属不同染色体组棉种的分子聚类分析 ... 81
- 第四节 利用分子标记研究棉属遗传多样性的可靠性 86
 - 一、棉属遗传多样性研究的由来 86
 - 二、利用分子标记研究棉属遗传多样性的特点 89

第三章 四倍体棉种系统进化的 GISH 研究

第一节 原位杂交概述及异源四倍体棉种基因

组起源 94

一、染色体原位杂交的概念 94

二、异源四倍体棉种基因组起源 95

第二节 基因组原位杂交所选棉种与方法 96

一、原位杂交棉种 96

二、原位杂交鉴定方法 97

第三节 棉花基因组原位杂交的几点技术优化 ... 101

一、染色体制片 101

二、杂交液用量 102

三、气泡 102

四、盖玻片的选择 103

五、湿合 103

六、杂交后的漂洗 104

七、拍照 104

第四节 棉属基因组原位杂交分析 104

一、棉花基因组原位杂交中染色体制备
技术 104

二、原位杂交中探针和封阻的比例研究 107

三、异源四倍体棉种 A、D 供体基因组

4 棉属遗传多样性与栽培棉种间杂交研究

分析	108
第五节 棉属系统发育研究现状及展望	110
一、棉属多倍体种起源与进化研究现状	110
二、棉属系统发育研究展望	112

第四章 栽培棉种间四元杂种的 SSR 分子标记鉴定

第一节 栽培棉种间杂交研究及其鉴定方法	118
一、栽培棉种间杂交研究现状	118
二、分子标记鉴定方法	119
第二节 栽培棉种间四元杂种的合成	120
一、四元杂种亲本	120
二、四元杂种的合成	120
第三节 栽培棉种间四元杂种鉴定	123
一、种间杂种和四元杂种的植株形态特性 ...	123
二、四元杂种的 SSR 分子标记分析	124
第四节 四元杂种的利用价值及其鉴定方法	
分析	129

第五章 栽培棉种间四元杂种育性恢复机理研究

第一节 栽培棉种间杂交和种间杂种育性恢	
复研究现状	138

一、栽培棉种间杂交特点研究	138
二、栽培棉种间杂交育性恢复研究现状	139
第二节 栽培棉种间杂交研究	140
一、栽培棉种	140
二、种间杂交方法	141
第三节 栽培棉种间杂种育性及育性恢复研究 ...	142
一、四元杂种的育性表现	142
二、四元杂种花粉活力的测定	143
三、四元杂种花粉母细胞减数分裂观察	146
第四节 四元杂种育性恢复机理探讨	150
一、棉花杂交种育性恢复机理特性	150
二、棉花四元杂种育性恢复机理研究	151
 小结	 154
参考文献	157



第一章

绪 论

棉花 (Cotton) 的拉丁语学名 (*Gossypium* ssp.), 属于离瓣双子叶植物 (Dicotyledons), 是锦葵科 (Malvaceae) 棉属 (*Gossypium*) 植物的种子纤维, 也是最重要的经济作物之一。最新提出的棉属分类系统为 4 个亚属, 共 51 种 (亚种) (Fryxell, 1992)。棉属中包括 46 个二倍体棉种 ($2n = 2x = 26$), 5 个四倍体棉种 ($2n = 4x = 52$)。二倍体棉种的亚洲棉 (*G. arboreum* L. $2n = 26$, A_2) 和草棉 (*G. herbaceum* L. $2n = 26$, A_1)、四倍体棉种的陆地棉 (*G. hirsutum* L. $2n = 52$, $[AD]_1$) 和海岛棉 (*G. barbadense* L. $2n = 52$, $[AD]_2$) 为栽培品种, 其余 47 个均为野生棉种。棉属栽培种和野生种是棉花遗传改良最重要的种质资源, 通过远缘杂交, 可以把不同物种所特有的有益性状进行遗传重组, 创造出品种间杂交无法得到的种质材料, 对于棉花遗传改良具有重要的意义。此外, 棉属中的异源四倍体棉种是分别来自 A 组和 D 组的两个二倍体棉种杂交后加倍形成的多倍体, 它同其他多倍体植物一样经历了漫长的进化历程, 最后形成了现存的 5 个异源四倍体棉种。因此, 探讨自然界多倍体植物的起源与进化对于棉属系统发育研究具有重要的指导意义, 并对于更有效的利用棉属多倍体也具有较好的实践意义。

本书将对多倍体植物的起源与进化、棉花远缘杂交研究、分子标记在棉花遗传改良中的应用、棉花原位杂交技术等方面作一综述, 以便更好的了解这几个领域的背景、研究现状以及在棉花遗传育种中的应用前景。

第一节

多倍体植物的起源与进化

多倍体是自然界中的普遍现象。据统计,高等植物中多倍体占 65% 以上,如小麦、烟草、棉花、马铃薯、甘蔗等都是自然形成的多倍体。在被子植物中约 50% 是多倍体;禾本科植物中 75% 是多倍体;豆科植物 18% 是多倍体(梁山等,1999)。多倍体是具有两套以上完整染色体组的状态。有三套染色体的物种称为三倍体,四套染色体的物种称为四倍体,六套染色体的物种称为六倍体,以此类推(谢雍译,2001)。根据其染色体组来源可分为同源多倍体和异源多倍体。现在通常认为,同源多倍体就是指增加的染色体组来自同一物种,如桑和葡萄等。异源多倍体就是指增加的染色体组来自不同物种,如烟草、菊花、陆地棉和郁金香等(谢兆辉,2002)。

一、多倍体植物的起源

植物多倍体基因组主要起源于 3 种不同的途径:未减数配子的融合、体细胞染色体加倍和多精受精(Ramsey,

1998)。

Thompson 等 (1992) 指出, 自然界绝大多数多倍体是通过未减数 ($2n$) 配子的融合而产生的。杨业华 (2000) 也认为自然发生的多倍体主要是减数分裂过程异常, 产生未减数的配子, 未减数的配子受精结合产生多倍体。同源多倍体可以直接通过未减数的配子相互结合形成, 例如三倍体香蕉、三倍体茶、三倍体桑、三倍体黄花菜等都是以这种方式自然形成的 (杨士华, 1990)。异源多倍体的自然形成过程是先进行种间杂交, 得到杂种, 由于种间染色体组差异很大。因此, F_1 代减数分裂时, 染色体不能配对, 形成的配子染色体数目也相当混乱, 少数配子含有不减数的全套染色体。未减数的配子彼此结合, 则形成异源多倍体。例如萝卜 (*Raphanus Sativus*, $2x = RR = 18 = 9 \text{ II}$) 和甘蓝 (*Brassica oleracea*, $2x = BB = 18 = 9 \text{ II}$) 两个远缘植物杂交, F_1 是 $2n = 2x = RB = 18$, 由于 R 和 B 两个染色体组差异很大, 减数分裂形成配子时各染色体不能配对, 只能随机分配到子细胞中去, 形成的配子高度不育, 少数配子具有 R 和 B 两个染色体组的全部染色体, 即 F_1 产生未减数配子 ($n = 2x = RB$), 未减数配子结合产生 $2n = 4x = RRBB$ 的异源四倍体 (杨业华, 2000)。减数分裂中要求染色体两两配对, 而奇数多倍体不能被平均分成两份, 所以仅偶数多倍体可育 (谢雍译, 2001)。配子的染色体未减数即未减数的雄配子 ($2n$) 与减数的雌配子 (n) 结合, 形成三倍体, 未减数雄配子 ($3n$)

与减数的雌配子 (n) 结合, 形成四倍体。有时未减数的雄配子 ($2n$) 与未减数的雌配子 ($2n$) 结合, 直接形成四倍体。据不完全统计, 已在 85 个属的植物中发现过 $2n$ 配子, 故认为这种方式是自然界多倍体形成的普遍方式 (曾正明等, 2000)。

除远缘杂交产生未减数的配子外, 未经杂交的个体也能产生未减数的配子, 杨业华 (2000) 报道曾有学者在二倍体桃树的大量花粉中挑出大花粉粒 1 202 粒, 并用这些大花粉粒给二倍体桃树授粉, 产生的子代植株中, 有 2 株是同源三倍体, 说明这两株同源三倍体的花粉粒是未减数的小孢子形成的。不同植物的生物学特性不同, 未减数配子的发生频率也不一样, 比如, 营养繁殖的多年生植物通常具有较高的未减数配子的发生频率 (De Haan *et al.*, 1992), Ramsey 等 (1998) 认为这可能是由于营养繁殖方式的存在, 使对有性生殖的选择压力有所松弛, 从而为 $2n$ 配子或其他无功能配子的产生提供了一个宽松的环境, 促进了 $2n$ 配子的形成, 并因此影响到多倍体的发生。

体细胞染色体加倍可以发生在普通薄壁细胞、分生组织细胞、幼胚或合子中, 普通薄壁细胞和分生组织体细胞加倍常常导致产生混倍性的嵌合体, 而合子或幼胚体细胞加倍则导致产生完全的多倍性孢子体。因此, 从细胞学机制看, 体细胞染色体加倍是形成多倍体基因组的途径之一, 但对不同类群植物中体细胞加倍的自然发生频率、影响因素以及在植