棉花种间杂交渐渗系创新效果评价及特异种质筛选

庞朝友[①②]　杜雄明[①*]　马峙英[②*]

(① 中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 安阳 455112; ② 河北农业大学, 保定 071001. * 联系人, E-mail: duxm@cricaas.com.cn, mzhy@mail.hebau.edu.cn)

摘要　收集了 155 份棉属种间杂交基因渐渗系, 试图评价棉花远缘杂交对陆地棉种质创新的效果, 筛选出具有较大利用价值的特异种质, 促进该类种质在棉花育种改良中广泛有效利用. 通过对主要农艺性状的鉴定, 结果表明, 不同野生种在陆地棉优质纤维、抗病、抗逆和抗虫种质改良上发挥了不同的作用. 利用SSR分子标记检测种间杂交渐渗系中的外源种遗传成分, 在15对SSR引物中发现了两类25个SSR特异位点, 海岛棉、亚洲棉、瑟伯氏棉等 8 个棉属外源种的外源遗传成分向陆地棉种质有不同程度的渗入. 制定了利用分子标记高效筛选具有外源基因特异种质的策略, 并筛选了 18 份优质纤维特异种质和 4 份耐枯黄萎病特异种质.

关键词　棉属种间杂交　种质创新　特异种质　**SSR**

棉属有 51 个种[1], 除陆地棉栽培种之外的其他栽培种、野生种系、野生种等远缘种属, 由于其分布区域的环境及长期的自然选择, 具有丰富的遗传多样性, 含有可被棉花育种应用的许多优良基因, 如抗旱、抗病虫、抗寒、种子无腺体植株有腺体、雄性不育以及纤维细强的潜在特性等[2,3]. 国内外育种专家广泛开展了棉属远缘杂交野生棉特性转育工作, 获得了 20 余种野生资源与陆地棉的高代杂种, 从中选育了大批性状基本稳定的陆地棉型优异种质系[4~9], 包括优质纤维、抗病、自然抗虫、高衣分等系列种质, 并将这些陆地棉种质称之为棉属种间杂交基因渐渗系陆地棉种质, 简称种间杂交渐渗系. 种间杂交渐渗系拓宽了现有陆地棉种质资源的遗传基础, 可用于打破现今陆地棉育种的瓶颈, 具有巨大的利用价值. 但是, 该类种质无论在常规育种应用方面, 还是在理论研究领域, 都只有少量的应用, 没有发挥其应有的重大作用[10]. 为此, 本研究收集了 155 份种间杂交渐渗系, 这些种质的外源种亲本涉及 3 个栽培种、5 个陆地棉半野生种系、7 个野生种, 通过重要农艺性状的鉴定, 用SSR分子标记检测种间杂交渐渗系中的外源种成分, 试图评价棉花远缘杂交对陆地棉种质创新的效果, 筛选出具有较大利用价值的特异种质, 促进棉属种间杂交渐渗系在棉花育种改良中有效利用.

1　材料与方法

(ⅰ) 实验材料.　收集了我国棉花种质资源中期库中有代表性的种间杂交渐渗系 155 份和部分远缘杂交陆地棉亲本或回交亲本 10 份(表 1)以及种间杂交渐渗系的部分外源种亲本海岛棉、亚洲棉、瑟伯氏棉和比克氏棉等. PCR 反应所用 Taq 酶, dNTP, 10×PCR 均由北京鼎国生物技术公司生产; 216 对 SSR 引物序列来自 CottonDB 数据库(http://algodon.tamu.edu/htdocs-cotton/cottondb.html), 由上海 Sangon 公司合成; Tris, EDTA 等购自北京鼎国生物技术公司, 且为 Gibco 分装产品; 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、CTAB 及 PVP40 为 Sigma 分装产品; 其他常规试剂由北京双环化学试剂厂生产.

(ⅱ) 农艺性状鉴定.　2004 年, 165 份供试陆地棉材料的纤维品质性状由农业部棉花品质监测中心检测, 设两次重复; 枯萎病抗性、黄萎病抗性和抗棉铃虫性由中国农业科学院棉花研究所植物保护研究室鉴定; 抗旱、耐盐性状由中国农业科学院棉花研究所种质鉴定课题组鉴定.

(ⅲ) SSR分析方法.　参照Patersond等人[11]所述方法提取棉花gDNA. PCR反应在PTC-100TM型PCR仪上进行, 反应体系 10 μL, 包括 1.3 μL 10×Buffer(含 20 mmol/L Mg^{2+}), 50 ng模板DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 0.4 U *Taq*酶, 0.35 μmol/L 3′和 5′引物. 反应程序为: 95 ℃预变性 3 min; 94℃, 45s, 57℃, 45 s, 72℃, 1, min, 30 个循环; 72℃延伸 7 min, 4℃保存. 然后, 对PCR反应产物进行 8%非变性聚丙稀酰胺电泳(PAGE)[12]. 最后参考张军等人[13]方法对凝胶进行银染, 并使用SYNGENE凝胶成像系统拍照.

表1 供试材料及其野生血缘[a)]

代号	品种名称	野生血缘	代号	品种名称	野生血缘	代号	品种名称	野生血缘
3	108F	无	48	科远 4	亚洲棉	93	苏 7158 远缘	异常棉
4	岱字棉 15	无	49	辽棉 3 号	亚洲棉	94	苏远 7235	异常棉
5	洞庭 1 号	无	50	秦荔 514	亚洲棉	95	苏远 7252	异常棉
6	波棉 2 号	海岛棉	51	陕 3619	亚洲棉	96	晋棉 21	异常棉，瑟伯氏棉
7	鄂棉 9 号	海岛棉	52	陕棉 5 号	亚洲棉	97	廊黄 F10 W99	黄褐棉
8	山农 3 号	海岛棉	53	石远 134	亚洲棉	98	廊黄 F10	黄褐棉
9	邯 74 选 209	海岛棉	54	石远 345	亚洲棉	99	廊黄 F8	黄褐棉
10	邯 81-272	海岛棉	55	豫 668	亚洲棉	100	廊棉 4 号	无
11	邯郸 333	海岛棉	56	豫棉 11	亚洲棉	101	TM-1	无
12	红叶棉 2	海岛棉	57	中 5881	亚洲棉	102	棕 1-59	李奇蒙德氏棉
13	红叶棉 3	海岛棉	58	中棉所 23 号	亚洲棉	103	棕 1-61	李奇蒙德氏棉
14	冀 182	海岛棉	59	中棉所 9 号	亚洲棉	104	棕 1-62	李奇蒙德氏棉
15	冀 574	海岛棉	60	中远 9113	亚洲棉	105	RT 白絮	李奇蒙德氏棉
16	冀棉 12 号	海岛棉	61	鄂 E80-11	亚洲棉	106	棕絮 1 号	李奇蒙德氏棉
17	鲁棉 12 号	海岛棉	62	鄂 E913	亚洲棉，草棉	107	晋棉 27	比克氏棉，瑟伯氏棉
18	鲁无 401	海岛棉	63	鄂 T458	亚洲棉，草棉	108	冀远 12-13	比克氏棉
19	豫棉 17	海岛棉	64	鄂 I578	草棉	109	石远 638	比克氏棉
20	麻城 96-1	海岛棉	65	H67	斯特提棉	110	中遗 B25	比克氏棉
21	莘棉 5 号	海岛棉	66	HL07	斯特提棉	111	中遗红 2	比克氏棉
22	莘棉 718	海岛棉	67	秦远 91406	斯特提棉	112	中遗红 8	比克氏棉
23	莘棉 9 号	海岛棉	68	芽黄 9101	斯特提棉，亚洲棉	113	中遗红 9	比克氏棉
24	莘棉 8 号	海岛棉	69	芽黄 9102	斯特提棉，亚洲棉	114	科遗 181	无
25	新陆 101	海岛棉	70	芽黄 9103	斯特提棉，亚洲棉	115	F(PDline)	瑟伯氏棉，亚洲棉
26	新陆 202	海岛棉	71	中远 9111	斯特提棉，亚洲棉	116	FJA(PDline)	瑟伯氏棉，亚洲棉
27	中 1276	海岛棉	72	中远 9112	斯特提棉，亚洲棉	117	FTA(PDline)	瑟伯氏棉，亚洲棉
28	中 206	海岛棉	73	中远 9117	斯特提棉，亚洲棉	118	PD2165	瑟伯氏棉，亚洲棉
29	中 521	海岛棉	74	中远 9118	斯特提棉，亚洲棉	119	PD3246	瑟伯氏棉，亚洲棉
30	中棉所 13 号	海岛棉	75	中远 9119	斯特提棉，亚洲棉	120	PD3249	瑟伯氏棉，亚洲棉
31	中无 383	海岛棉	76	中远 HAS-1	斯特提棉，亚洲棉	121	PD2164	瑟伯氏棉，亚洲棉
32	中棉所 17 号	海岛棉	77	中远 HST1	斯托克斯氏棉	122	AC239	瑟伯氏棉，亚洲棉
33	中棉所 19 号	海岛棉	78	中远 HST2	斯托克斯氏棉	123	AC-241	瑟伯氏棉，亚洲棉
34	中棉所 8 号	海岛棉	79	中远 9116	尖斑棉	124	PD4381	瑟伯氏棉，亚洲棉
35	冀棉 20	海岛棉，瑟伯氏棉	80	中远 9115	莫利尔氏棉	125	邯 8957	瑟伯氏棉，亚洲棉
36	冀 A-1-7	海岛棉，瑟伯氏棉	81	司-4727	无	126	PD0109	瑟伯氏棉，亚洲棉
37	冀 A-6-7	海岛棉，瑟伯氏棉	82	塔什干 1 号	墨西哥半野生棉	127	PD0111	瑟伯氏棉，亚洲棉
38	冀 A-7-8	海岛棉，瑟伯氏棉	83	塔什干 6 号	墨西哥半野生棉	128	PD0113	瑟伯氏棉，亚洲棉
39	川 109	海岛棉，亚洲棉	84	中远 9114	墨西哥半野生棉	129	SC-1	瑟伯氏棉，亚洲棉
40	川 109-1	海岛棉，亚洲棉	85	中远 9120	墨西哥半野生棉	130	PD6142	瑟伯氏棉，亚洲棉
41	86-1	亚洲棉	86	中远 HM1	墨西哥半野生棉	131	PD6179	瑟伯氏棉，亚洲棉
42	QB1	亚洲棉	87	中棉所 10	无	132	PD6186	瑟伯氏棉，亚洲棉
43	长绒 2 号	亚洲棉	88	中棉所 12	无	133	PD9223	瑟伯氏棉，亚洲棉
44	江苏棉 1 号	亚洲棉	89	中棉所 16	无	134	PD9232	瑟伯氏棉，亚洲棉
45	江苏棉 2 号	亚洲棉	90	苏 3290 远缘	异常棉	135	PD9363	瑟伯氏棉，亚洲棉
46	江苏棉 3 号	亚洲棉	91	苏 7036 远缘	异常棉	136	PD9364	瑟伯氏棉，亚洲棉
47	科远 1	亚洲棉	92	苏 7133 远缘	异常棉	137	PD8619	瑟伯氏棉，亚洲棉

续表 1

代号	品种名称	野生血缘	代号	品种名称	野生血缘	代号	品种名称	野生血缘
138	AcalaSJ-1	瑟伯氏棉, 亚洲棉	148	冀远 23-24	瑟伯氏棉	158	L142-9	雷蒙德氏棉, 亚洲棉
139	AcalaSJ-2	瑟伯氏棉, 亚洲棉	149	冀远 55	瑟伯氏棉	159	L231-24	雷蒙德氏棉, 亚洲棉
140	AcalaSJ-3	瑟伯氏棉, 亚洲棉	150	冀棉 25	瑟伯氏棉, 亚洲棉	160	L299-10	雷蒙德氏棉, 亚洲棉
141	邯 8901	瑟伯氏棉, 亚洲棉	151	冀 668	瑟伯氏棉, 亚洲棉	161	鄂 Q1038	蓬蓬棉
142	AcalaSJ-4	瑟伯氏棉, 亚洲棉	152	晋远 1081	瑟伯氏棉	162	中远 HP1	蓬蓬棉
143	Acala SJ-5	瑟伯氏棉, 亚洲棉	153	秦远 93089	瑟伯氏棉, 亚洲棉	163	鄂 E901	蓬蓬棉
144	邯 8904	瑟伯氏棉, 亚洲棉	154	红叶棉 1	瑟伯氏棉, 海岛棉	164	鄂 E910	蓬蓬棉
145	AcalaSJC-1	瑟伯氏棉, 亚洲棉	155	石远 321	瑟伯氏棉, 海岛棉	165	鄂 E911	蓬蓬棉
146	代尔柯特 277-5	瑟伯氏棉, 亚洲棉	156	ISA205B396	雷蒙德氏棉, 亚洲棉	166	鄂 Q1116	蓬蓬棉
147	华中 T72001	瑟伯氏棉	157	ISABC2	雷蒙德氏棉, 亚洲棉	167	蓬混-1	蓬蓬棉

a) 代号为 3, 4, 5, 81, 87, 88, 89, 100, 101, 114 的材料是常规陆地棉品种, 其余皆为种间杂交渐渗系

(ⅳ) SSR 特异位点命名. 利用 155 份种间杂交渐渗系的野生棉亲本海岛棉、亚洲棉、瑟伯氏棉、比克氏棉、斯特提棉、异常棉、蓬蓬棉、黄褐棉和 10 份常规陆地棉品种的基因组 DNA 作对照, 将某一种质在电泳凝胶上出现的特殊且稳定的 DNA 条带, 而常规陆地棉品种不具有该条带, 称之为该种质的特异位点. 种间杂交渐渗系 SSR 特异位点命名方法如下, 如果特异位点为“BNL3031-145”, 则“BNL3031”为引物编号, “145”为特异 DNA 条带分子量.

2 结果与分析

2.1 种间杂交渐渗系农艺性状鉴定结果分析

(ⅰ) 棉属远缘杂交对陆地棉纤维品质的改良效果. 通过对各类种间杂交渐渗系和 10 份常规品种的纤维品质性状平均值及优质纤维种质(长度大于 30 mm 或比强度大于 30 cN/tex)占各类总种质数的百分数的比较分析发现(表 2): (1) 从种间杂交渐渗系整体上看, 种间杂交渐渗系和常规品种均表现纤维整齐度较高, 麦克隆值合适, 但种间杂交渐渗系比常规品种的纤维长度和比强度均有一定程度的提高, 说明棉属远缘杂交在陆地棉种质资源的纤维品质改良上起到了一定的作用. 但是, 从 155 分种间杂交渐渗系筛选到的优质纤维特异种质较少, 纤维长度大于 32 mm 的长纤维种质仅有 4 份, 纤维比强度大于 32 cN/tex 的高纤维种质仅有 7 份. (2) 不同野生资源在陆地棉种质纤维品质改良上有不同的作用. 从陆地棉种质纤维长度改良上看, 海岛棉和异常棉有较大的作用, 它们的纤维长度平均值高于常规品种 1.77 mm 以上, 也均高于全部种间杂交渐渗系的纤维长度平均值, 而且异常棉和海岛棉血缘的种质中纤维长度大于 30 mm 的种质所占百分数也比较高. 虽然瑟伯氏棉血缘类纤维长度平均值也高于常规品种 1.42 mm, 但该类种质中 72%的种质均还有海岛棉血缘的渗入, 有可能是海岛棉成分发挥的作用, 不能判断瑟伯氏棉的作用. 从纤维强度改良上, 异常棉、瑟伯氏棉有较大的作用, 而海岛棉和亚洲棉的作用相对较

表 2　各类种间杂交渐渗系的纤维品质性状平均值及优质纤维种质所占百分数的比较

种间杂交渐渗系类型	份数	长度/mm	整齐度(%)	比强度/cN/tex	伸长率(%)	麦克隆值	长度大于 30 的种质比率(%)	比强度大于 30 的种质比率(%)
瑟伯氏棉血缘	45	29.46	84.52	29.02	6.67	4.44	32	25
国内瑟伯氏棉血缘	13	29.32	84.32	27.49	7.18	4.50	31	0
国外瑟伯氏棉血缘	32	29.52	84.60	29.66	6.45	4.41	32	35
海岛棉血缘	29	29.80	84.17	26.56	7.01	4.19	40	0
亚洲棉血缘	21	28.60	84.12	26.60	6.93	4.35	15	0
斯特提棉血缘	12	28.93	84.13	27.22	6.80	4.56	0	9
异常棉血缘	6	31.21	83.39	30.21	6.59	4.31	50	50
全部种间杂交渐渗系	155	29.21	84.27	27.73	6.83	4.39	25	14
常规陆地棉品种	10	28.03	84.25	26.83	6.63	4.56	11	0

小，西南农业大学选育的渝棉一号的纤维品质较现有陆地棉有大幅度提高，这可能说明对于陆地棉×海岛棉的组合增加纤维强度选择压，也可以选择出强度优良的种质. 通过对瑟伯氏棉血缘类种质中国内和国外两个群体比较发现，国内利用瑟伯氏棉进行陆地棉种质纤维强度改良上几乎没有作用，国外利用瑟伯氏棉进行进行纤维强度改良上作用突出，这可能是国外，特别是美国对纤维强度指标更加重视的缘故.

(ⅱ) 棉属远缘杂交对陆地棉抗病虫、抗逆性的改良效果. 通过各类渐渗系中抗病虫、抗逆种质占各类总种质数的百分数的比较可以发现(表 3): 在抗旱改良方面，常规品种中也有较多的高抗旱抗源，各野生棉对抗旱种质改良几乎没有起作用；在耐盐种质改良方面，亚洲棉发挥了较大作用；在远缘杂交抗黄萎病育种方面，没有筛选得到免疫或高抗的种质，仅得到 4 份抗级种质，它们是海岛棉血缘的红叶棉 3 及中 521，瑟伯氏棉血缘的 Acala SJ-4 和斯特提棉血缘的中远 9112，分析耐黄萎病种质在各类种质中的比例发现斯特提棉、蓬蓬棉与陆地棉的杂交后代中较易选出耐黄萎病种质；在抗枯萎病种质创造方面，斯特提棉有显著的作用，而未发现亚洲棉的优势；在远缘杂交抗棉铃虫种质培育方面，亚洲棉有较大的作用.

2.2 野生棉遗传成分 SSR 分子标记检测

(ⅰ) 引物的筛选. 用冀 A-7-8，科远 1，中远 HAS-1 等 8 个具有不同外源血缘且亲缘关系较远的种间杂交渐渗系对 216 对 SSR 引物进行筛选，得到有多态性且稳定性好的 44 对 SSR 引物，用于检测种间杂交渐渗系中的野生棉遗传成分.

(ⅱ) 种间杂交渐渗系 SSR 特异位点. 在 15 对 SSR 引物位点上发现了种间杂交渐渗系的两类 25 个 SSR 特异位点(表 4). 一类是外源种特征位点，它们在普通陆地棉种质中没有而在外源种亲本和种间杂交渐渗系中有，是外源种亲本 SSR 特异位点，这类位点共 9 个. 这可以充分说明这些种质渗入了其外源种亲本的遗传成分. 如海岛棉特征位点 JESPR152-215(图 1).

另一类是种间杂交渐渗系特异位点，它们虽然在外源种亲本中没有，但在没有经过远缘杂交的普通陆地棉种质中也没有，是外源种与陆地棉杂交后代品系的特有位点，这说明通过远缘杂交可能使陆地棉的 SSR 序列分子量发生了变化，具有这些 SSR 特异位点的种质也很有可能渗入了外源亲本遗传成分.

在检测种间杂交渐渗系野生棉成分时发现，某些引物位点在很多野生资源与陆地棉的杂交后代中出现了变异. 如用引物 BNL1672，发现了 5 个特异位点 BNL1672-103，BNL1672-100，BNL1672-98，BNL1672-96，BNL1672-95，这些位点出现在含有亚洲棉、海岛棉、黄褐棉、莫利尔氏、尖斑棉血缘的许多种质中，用引物 BNL3031 发现了 3 个特异位点 BNL3031-145, BNL3031-142, BNL3031-139(图 2)，这些位点出现在含有亚洲棉、瑟伯氏棉、黄褐棉、莫利尔氏、尖斑棉血缘的许多种质中，而在有的引物位点上只发现较少的变异，如引物 BNL2634，BNL3997，TMP20，仅出现在某一杂交组合的个别种质中. 出现这些现象，可能是因为种间杂交渐渗系的不同外源种具有不同的同源序列，不同野生资源与陆地棉的种间杂交时，在不同的染色体区段的基因交换频率也就不同.

(ⅲ) 各类种间杂交渐渗系野生棉成分渗入状况分析. 利用 44 对 SSR 引物对 155 份种间杂交渐渗系进行检测，共在 15 对引物中找到特异位点 25 个，其中具有特异位点的材料 70 份，占总材料数的 45.2%，每份材料中有 1~5 特异位点，平均 1.8 个. 可见，种间

表 3 各类种间杂交渐渗系中抗病虫、抗逆种质所占百分数

种质类型	份数	高抗旱(%)	耐盐性(耐盐级)(%)	抗黄萎病(耐病)(%)	抗枯萎病(抗病)(%)	抗棉铃虫(抗级)(%)
瑟伯氏棉血缘	45	46.67	9.09	48.89	15.56	15.56
海岛棉血缘	29	13.79	10.34	17.24	14.29	21.43
亚洲棉血缘	21	25.00	20.00	35.00	10.00	55.56
斯特提棉血缘	12	20.00	0.00	60.00	40.00	20.00
蓬蓬棉血缘	7	14.29	0.00	71.43	0.00	0.00
全部种间杂交渐渗系	155	25.85	10.27	39.73	15.17	21.83
常规品种	10	40.00	0.00	40.00	10.00	0.00

表 4　具有 SSR 特异位点的种间杂交渐渗系

特异 SSR 位点	特征位点类型	品系名称
BNL193-105	瑟伯氏棉特征位点	冀 A-7-8, 中远 9115, 塔什干 6 号, 苏 7036 远缘, 苏远 7235, 苏远 7252, FJA, PD3246, PD3249, PD2164, AC239, AC-241, PD4381, PD0109, PD0111, PD0113, PD9223, PD9232, PD9364
JESPR152-195	海岛棉特征位点	华中 T72001, 代尔柯特 277-5
JESPR152-215	海岛棉特征位点	红叶棉 3, 冀 182, 冀 574, 鲁无 401, 麻城 96-1, 莘棉 5 号, 莘棉 718, 莘棉 9 号, 莘棉 8 号, 新陆 202, 中无 383, 中棉所 8 号, 冀棉 20, 冀 A-6-7, 冀 A-7-8, F, FJA , PD6179, Acala SJ-1, Acala SJ-2, Acala SJ-3, 邯 8901, 邯 8904, Acala SJC-1, 晋远 1081, 红叶棉 1
BNL1705-167	海岛棉特征位点	邯 81-272, 莘棉 5 号, 中棉所 13 号, 中棉所 8 号, 冀 A-1-7,
TMP20-218	海岛棉特征位点	中棉所 8 号
BNL1672-95	海岛棉特征位点	冀棉 12 号, 鲁棉 12 号, 莘棉 5 号, 莘棉 8 号, 冀棉 20, FJA, PD2164 , AC239, 邯 8957,
BNL1672-100	黄褐棉特征位点	廊黄 F10 W99(白絮), 廊黄 F10(棕絮), 廊黄 F8(棕絮)
BNL3031-142	黄褐棉特征位点 亚洲棉特征位点	廊黄 F10(棕絮), 廊黄 F10 W99(白絮), 中远 HAS-1, 中远 9119, 中远 9118, 中远 9113
BNL1672-103	亚洲棉特征位点	中远 9113, 中远 9118, 中远 9119, 中远 HAS-1, 苏 7158 远缘, 苏远 7252, F(PDline), PD3246, PD3249
BNL1434-214	渐渗系特异位点	红叶棉 2, 红叶棉 1
BNL2449-154	渐渗系特异位点	AC239
BNL2634-310	渐渗系特异位点	中遗红 9, 中遗红 8, 中遗红 2
BNL3031-145	渐渗系特异位点	中远 9116
BNL3031-139	渐渗系特异位点	中远 9115, 苏 7158 远缘, 苏远 7252, F(PDline), PD3246, PD3249,
BNL3442-132	渐渗系特异位点	L299-10, ISA205B396, 晋远 1081, PD9223, SC-1(GP72)
BNL3442-137	渐渗系特异位点	红叶棉 1
BNL3948-93	渐渗系特异位点	冀 A-6-7, 川 109, Acala SJ-5
JESPR152-222	渐渗系特异位点	PD3249
BNL3649-218	渐渗系特异位点	山农 3 号, 冀棉 12 号
BNL1423-138	渐渗系特异位点	莘棉 5 号, 中无 383
BNL1423-132	渐渗系特异位点	PD3246, 华中 T72001
BNL3997-160	渐渗系特异位点	PD3249,
BNL1721-185	渐渗系特异位点	中远 9115, 中远 9116
BNL1672-96	渐渗系特异位点	中远 9115
BNL1672-98	渐渗系特异位点	中远 9116

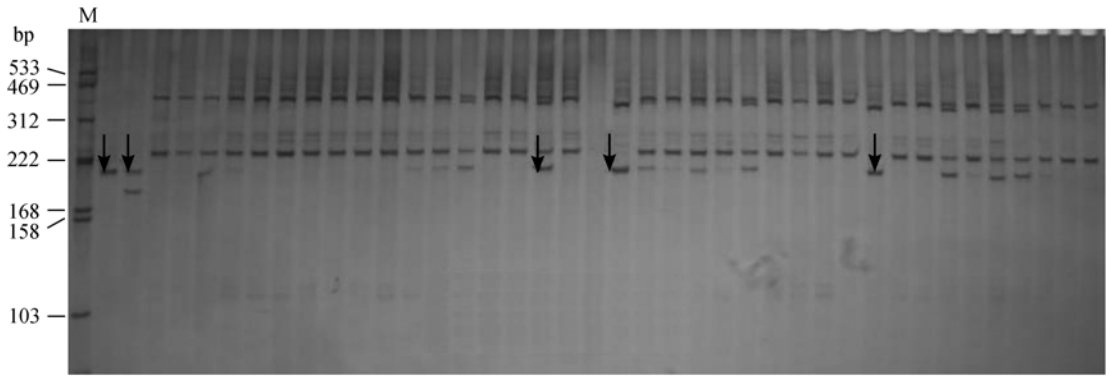

图 1　引物 JESPR152 在陆地棉与海岛棉种间杂交渐渗系中的检测

检测到海岛棉特征位点 JESPR152-215. 箭头所指品系从左至右依次为海 7124, 5476-И, 鲁无 401, 莘棉 5 号和中无 383 (其他为常规品种和其余种间杂交渐渗系)

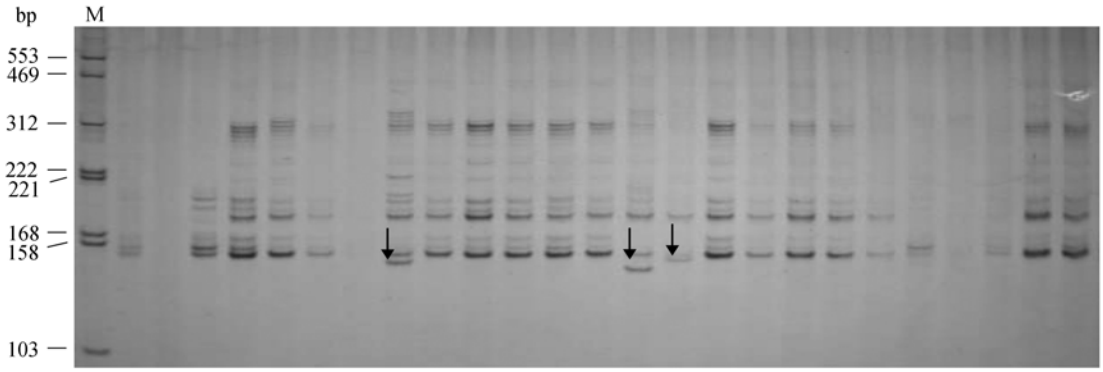

图 2 引物 BNL3031 在具有不同野生棉基因的品系中的检测

在中远 9113, 中远 9116, 中远 9115 中分别检测到的特征位点 BNL3031-145, BNL3031-142, BNL3031-139. 箭头所指品系从左至右依次为中远 9113, 中远 9116 和中远 9115(其他常规品种和其余种间杂交渐渗系)

表 5 各类种间杂交基因渐渗系外源基因特异 SSR 位点分析

种质类型	份数	特异 SSR 位点数	具有 SSR 特异位点的材料数	具特异位点的材料百分率(%)	具特异位点的材料平均特异位点数	具特异位点的材料特异位点个数范围
种间杂交渐渗系	155	25	70	45.2	1.8	1~5
海岛棉血缘	29	8	18	62.1	2.6	1~4
亚洲棉血缘	21	2	1	4.8	2.0	2
瑟伯氏棉血缘	45	15	32	71.1	1.7	1~5
国内瑟伯氏棉血缘	13	10	7	53.8	2.0	1~3
国外瑟伯氏棉血缘	32	12	25	78.1	1.2	1~5
斯特提棉血缘	12	2	3	25.0	2.0	2
比克氏棉血缘	7	1	3	42.9	1.0	1
异常棉血缘	7	3	4	57.1	1.8	1~3
黄褐棉血缘	3	2	3	100.0	1.7	1~2
墨西哥半野生棉血缘	5	1	1	20.0	1.0	1
莫利尔氏棉血缘	1	4	1	100.0	4.0	4
尖斑棉血缘	1	3	1	100.0	3.0	3
雷蒙德氏棉血缘	5	2	2	40.0	1.0	1

杂交渐渗系材料中野生棉成分很少, 每份材料渗入野生棉成分的多少有较大差异. 但从种间杂交渐渗系材料整体上来讲, 已经在 34.1%的 SSR 位点中发现了变异, 可见该类种质的重要性.

对各类种间杂交渐渗系的野生棉成分渗入状况进行比较分析(表 5), 得到以下结果:

(1) 共发现海岛棉、亚洲棉、瑟伯氏棉、黄褐棉、比克氏棉、墨西哥半野生棉、莫利尔氏、尖斑棉 8 个野生资源向陆地棉种质中有不同程度的渗入. 从种间杂交渐渗系发现了海岛棉、亚洲棉、瑟伯氏棉、黄褐棉的特征位点. 从比克氏棉、墨西哥半野生棉、莫利尔氏、尖斑棉与陆地棉的杂交后代中发现了特异位点. 海岛棉遗传成分渗入陆地棉种质中的最多, 黄褐棉、莫利尔氏棉、尖斑棉与陆地棉杂交后代材料数目虽然较少, 但也检测到较多的特异位点, 说明它们向陆地棉种质中渗入成分也较多, 这可能是因为这些棉种与陆地棉的亲缘关系较近, 使远缘杂交容易成功, 野生棉成分容易向陆地棉渗入.

特别应该提出的是, 虽然亚洲棉与陆地棉容易杂交成功, 但在亚洲棉与陆地棉的杂交后代 21 份材料中, 仅在一份材料检测到了 2 个特异位点, 说明该类种质含有亚洲棉成分很少. 没有从陆地棉与草棉、斯托克斯氏棉、蓬蓬棉、李奇蒙德氏棉杂交后代中发现特异位点, 说明这些种间杂交渐渗系细胞核基因组中的外源亲本成分较少甚至没有.

虽然从斯特提棉血缘类、异常棉血缘类种质种质发现了特异位点, 但不能肯定其中是否有斯特提棉、异常棉基因的渗入. 因为有特异位点的 3 个斯特提棉

血缘类材料全是 HAS(陆地棉×亚洲棉×斯特提棉)三元杂种, 并且发现的 2 个特异位点均是亚洲棉特异位点; 同样, 有特异位点的 3 个异常棉血缘类材料都用了 PD4381(含有三元杂种 HAT(陆地棉×亚洲棉×瑟伯氏棉)的血缘)作回交亲本, 其特异位点 BNL1672-103 和 BNL193-105 分别是亚洲棉、瑟伯氏棉的特征带.

(2) 三元杂种可能更有利于种质创新. 在亚洲棉与陆地棉的杂交后代很难检测到亚洲棉成分的渗入, 但在含有三元杂种(瑟伯氏棉×亚洲棉×陆地棉)血缘的瑟伯氏棉血缘类种质和 HAS(陆地棉×亚洲棉×斯特提棉)三元杂种后代中却容易检测到亚洲棉成分的存在. 如在中远 HAS-1, 中远 9119 和中远 9118 中检测到亚洲棉特征位点 BNL3031-142, 在 F(PDline), PD3246 和 PD3249 中检测到亚洲棉特征位点 BNL1672-103.

(3) 各类种质中, 瑟伯氏棉血缘类种质材料最多, 具有特异位点的材料比例最高, 发现特异位点的数目最多, 遗传变异最为丰富. 其次, 海岛棉血缘类种质也有较丰富的遗传变异, 说明这两类种质创新效果明显.

(ⅳ) 种间杂交渐渗系特异位点与其优异性状的相关性及特异种质筛选. 通过对各类种间杂交渐渗系的农艺性状鉴定与分析发现, 海岛棉血缘类种质在纤维长度上表现优异. 那么该类种质的优异纤维长度性状是否是海岛棉遗传成分发挥的作用. 29 份海岛棉血缘类种质中有特异位点的种质 18 份和无特异位点的种质 11 份的纤维长度平均值分别为 29.95 和 29.48 mm, 前者比后者高了 0.47 mm. 有特异位点和无特异位点两类种质中纤维长度大于 30 mm 的种质所占比率分别为 47%和 25%, 可见有特异位点种质中长纤维种质比率明显提高, 说明了海岛棉成分在该类种质所表现的纤维长度特异性中发挥了重要作用. 系谱分析可知, 29 份海岛棉血缘种质是来自许多海陆远缘杂交组合的, 经检测有特异 SSR 位点且纤维长度大于 30 mm 的 8 份种质, 来自于 5 个海岛棉与陆地棉杂交组合, 进一步说明, 纤维长度优异性很容易随着海岛棉成分的渗入而在陆地棉种质中表达.

同样, 国外瑟伯氏棉血缘类种质的纤维比强度比较优异, 那么该类种质的优异纤维品质是否是其外源亲本遗传成分发挥的作用. 32 份国外瑟伯氏棉血缘类种质中有特异位点的种质和无特异位点的种质比强度平均值分别为 30.15 和 28.01 cN/tex, 前者比后者增加了 2.14 cN/tex. 32 份国外瑟伯氏棉血缘类种质中纤维比强度大于 30 cN/tex 的 11 份种质全部都有特异 SSR 位点, 说明瑟伯氏棉外源成分在该类种质所表现的纤维品质特异性中发挥了重要作用. 分析这类种质系谱来源可知, 它们的高强纤维特性都来自于 1940 年 Beasley 等人得到 HAT(陆地棉×亚洲棉×瑟伯氏棉)三元杂种后代.

以上两个例子为利用分子标记筛选具有由野生棉基因控制的特异性状的特异种质提供了有效策略. 因为: (1) 已有较多远缘杂交实践证明, 某一野生种容易将某些特性向陆地棉中转育, 那么从具有该野生棉血缘的种质群体中筛选特异种质是高效的; (2) 已知某些种质就是从具有某些特性的远缘杂交后代中选育而来的, 那么从这类种质群体中筛选特异种质是高效的.

根据上述策略, 利用本研究检测到的特异 SSR 位点, 筛选了既具有较多特异位点又有优质纤维特性的特异种质 18 份和耐枯黄萎病特异种质 4 份, 包括纤维长度和比强度分别大于 30 mm 和 30 cN/tex 的种质 11 份. 这些种质的性状特异性很有可能是其外源亲本成分引起的.

3 讨论

3.1 利用分子标记可以检测种间杂交渐渗系中的野生棉遗传成分

刘根齐等人[14,15]和聂以春等人[16,17]分别利用RAPD分子标记技术, 对少数种间杂交系进行了分析, 结果均表明, 种间杂交种质系中均发现野生亲本的特征带, 认为利用RAPDz标记技术可以检测到种间杂交系中的野生亲本遗传成分. SSR在棉花基因组中的分布是十分广泛的. 本研究则利用SSR技术对 155 个种间杂交渐渗系进行了野生棉遗传成分的检测, 得到了较好的结果. 这说明利用SSR分子标记也可以检测种间杂交渐渗系中的野生棉遗传成分. 这不但可以评价棉属远缘杂交种质创新效果, 探讨棉属远缘杂交机理; 还可用于从远缘杂交后代中高效筛选特异种质, 促进种间杂交渐渗系在常规育种、理论研究等领域的有效利用.

3.2 具野生棉外源基因的陆地棉特异种质的筛选

本研究收集的材料多是回交转育中没有选择压或是凭经验进行选择的, 哪些种质被转移进了外源基因组成分长期以来一直未能得到分析. 国内外棉花远缘杂交工作者已经积累了大量的远缘杂交种质

创造经验[10]，可以用于指导分子标记特异种质筛选. 通过对大量种间杂交渐渗系的农艺经济性状和SSR分子标记分析，初步获得了利用SSR分子标记辅助选择具优质、抗病虫和抗逆境等野生棉优异性状的方法. 这充分说明今后的种质创造中如结合分子标记辅助选择，可能会显著提高种质创新效果.

从野生资源中发掘有益基因，在水稻和番茄上已经获得成功[18,19]. 大量筛选具野生棉外源基因的陆地棉特异种质，就可以构成陆地棉遗传改良的优异外源基因库. 首先这些种质可直接用于常规育种性状转育. 其次，可用于种质遗传特性研究，发掘来自不同棉种的优异基因源. 最后，还可进一步用于优异性状的分子标记定位，确定外源特异位点与优良性状的连锁关系，用于分子辅助选择育种，甚至可直接用于优异基因克隆. 应特别说明的是，这些种质的优异性状来自于外源野生种，它们所具有特异标记位点与优异性状有比较直接的关系，可能会更高效进行优异性状的分子标记定位. 例如，南京农业大学利用含异常棉基因的种质系苏远 7235 进行棉花高品质纤维性状QTLs分子标记，得到 8 个标记可能与高强有关，1 个标记与低强有关，3 个标记与麦克隆值有关，1 个与绒长有关[20~22].

3.3 继续加强棉属种间杂交有益基因的发掘与利用

SSR 标记只能扩增部分棉花基因组，如果再与其它标记 RAPD, AFLP 和 SRAP 等相结合，能从大量种间杂交渐渗系中检测出更多的野生棉遗传成分，更加有利于具野生棉外源基因的陆地棉特异种质的筛选和利用. 特异种质的优异性状还需用特异标记位点进一步定位. 从目前的分析看，获得性状改良的种质系仅局限于少数外缘种和部分优异性状，大量棉属野生种质资源的可利用的特征特性还未得到利用. 所以，必须继续加强发掘与利用种间杂交渐渗系和棉属野生资源中的有益外源基因，打破现今陆地棉育种的瓶颈，培育出大量适合生产需要的优良品种.

致谢 感谢马轩博士对该文的评阅和翻译方面的帮助. 本工作为国家“十五”重点科技攻关计划(批准号: 2004BA525B05)资助项目.

参 考 文 献

1 Fryxell P A. A revised taxonomic interpretation of *Gossypium* L. (Malvaceae). Rheedea, 1992, 2: 108~165

2 梁正兰，著. 棉花远缘杂交的遗传与育种. 北京：科学出版社，1999. 1~2

3 胡绍安，崔荣霞，王春英，等. 陆地棉野生种系的利用研究. 棉花学报, 1994, 6(增刊): 15~18

4 周宝良，陈松，沈新莲，等. 陆地棉高品质纤维种质基因库的拓建. 中国农业科学, 2003, 29(4): 514~519

5 梁正兰，姜茹琴，钟文南，等. 棉花种间杂交技术创新及育种程序的建立. 中国科学, C 辑, 2001, 31(2): 120~124

6 胡绍安，崔荣霞，王坤波，等. 棉属野生棉与栽培棉种间杂交新种质创造研究. 棉花学报, 1993, 5(2): 7~13

7 钱思颖，黄骏骐，周宝良，等. 陆地棉(*G. hirsutum* L.)×克劳茨基棉(*G. klotzschianum* An-derss)的研究和利用. 江苏农业科学, 1996, 12(4): 18~22

8 杜雄明，刘国强，石玉真，等. 彩色棉棕絮 1 号及其选育关键技术. 中国棉花, 2000, 27(7): 10~11

9 华金平，张成，易先达，等. 棉花远缘核质杂种的培育与育种应用. 湖北农业科学, 2003, 4: 25~28

10 庞朝友，杜雄明，马峙英. 具有野生棉外源基因的陆地棉特异种质创造与利用进展. 棉花学报, 2005, 17(3): 171~177

11 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. Plant Mol Biol Rep, 1993, 11(2): 122~127

12 萨姆布鲁克 E F, 弗里奇 T, 曼尼阿蒂斯 H, 等著. 金冬雁，等译. 分子克隆实验指南(第 2 版). 北京：科学出版社，1992. 327~330

13 张军，武耀廷，郭旺珍，等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测. 棉花学报, 2000, 12(5): 267~269

14 刘根齐，焦传珍，姜茹琴，等. 用同工酶和 RAPD 技术研究棉花三元杂种石远 321 新品种的遗传特性. 遗传学报, 2000, 27(11): 999~1005

15 刘根齐，焦传珍，姜茹琴，等. 陆地棉×比克氏棉育成种质系的同工酶和 RAPD 分析. 遗传学报, 2000, 27(12) : 1094~1099

16 聂以春，左开井，张献龙，等. RAPD 标记分析棉花种间杂种后代的遗传相似性. 华中农业大学学报, 2000, 19(6) : 523~527

17 聂以春，左开井，张献龙，等. RAPD 标记在棉属种间杂种后代检测中的应用. 中国农业科学, 2000, 33(5): 25~29

18 Xiao J, Gradillo S, Ahn S N, et al. Genes from wild rice improve yield. Nature, 1996, 384: 223~224[DOI]

19 Tanksley S D. Seed banks and molecular maps:unlocking genetic potential from the wild. Science, 1997, 277: 1063~1066[DOI]

20 袁有禄，张天真，郭旺珍，等. 棉花高品质纤维性状 QTLs 的分子标记筛选及其定位. 遗传学报, 2001, 28(2): 1151~1161

21 张天真，袁有禄，郭旺珍. 棉花高强纤维 QTLs 的微卫星标记筛选. 中国农业科学, 2001, 34(4): 363~366

22 沈新莲，袁有禄，郭旺珍，等. 棉花高强纤维主效 QTL 的遗传稳定性及它的分子标记辅助选择效果. 高科技通讯, 2001, 10: 13~16

(2005-09-24 收稿, 2005-11-22 接受)