

研究报告

Research Report

基于人工病圃筛选和分子标记辅助的棉花抗黄萎病育种方法研究与应用

祁伟彦^{1,4}, 张永军², 张天真³, 陈捷胤^{1,4}, 戴小枫^{1,4}

1. 中国农业科学院农产品加工研究所, 北京, 100193;
2. 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京, 100193;
3. 南京农业大学农学院, 南京, 210095;
4. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081

✉ 通讯作者: dxf@caas.net.cn ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 45 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0045

收稿日期: 2012 年 07 月 19 日

接受日期: 2012 年 07 月 26 日

发表日期: 2012 年 09 月 27 日

本文首次发表在《分子植物育种》(2012 年第 10 卷第 5 期 607-612 页)上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

祁伟彦等, 2012, 基于人工病圃筛选和分子标记辅助的棉花抗黄萎病育种方法研究与应用, 分子植物育种(online) Vol.10 No.45 pp.1331-1337 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0045)

引用格式(英文):

Qi et al., 2012, Studies on the Methods for Cotton Resistant Breeding to *Verticillium* Wilt by the Screen of Disease Nursery and Molecular Marker-Assisted Selection, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.45 pp.1331-1337 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0045)

摘要 抗病性较强的中植 372 为研究对象, 和陆地棉感病品种军棉 1 号配制组合构建 F₂ 作图群体, 筛选到和黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269。选育过程中, 以中植 372 为父本或者母本, 通过人工黄萎病圃对种间杂交、回交、加代选育以及再杂交的材料进行了抗病性筛选, 同时每代育种材料均对黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269 进行跟踪检测, 筛选出与黄萎病抗病性状紧密连锁的亲本及其后代材料, 进而培育出抗黄萎病、产量高、品质优良的中植棉 2 号、新植 5 号、中植棉 6 号、中植棉 8 号等 10 余个国审及省审抗(耐)黄萎病棉花新品种。对育成的品种进行检测发现, 中植 2 棉号、中植 6 棉号、中植 8 棉号和新植 5 号均能够检测到与黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269 和已报道的抗黄萎病的分子标记 NAU828 和 NAU1225, 而且这 3 个标记在各个品种材料之间呈共显性分离。结果表明, 基于人工病圃筛选和分子标记辅助育种相结合是选育棉花抗黄萎病材料可行、高效的育种方法。

关键词 工病圃; 抗黄萎病标记; 分子标记辅助育种; 中植 372

Studies on the Methods for Cotton Resistant Breeding to *Verticillium* Wilt by the Screen of Disease Nursery and Molecular Marker-Assisted Selection

Qi Weiyan^{1,4}, Zhang Yongjun², Zhang Tianzhen³, Chen Jieyin^{1,4}, Dai Xiaofeng^{1,4}

1. Institute of Agro-food Science and Technology, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Beijing, 100193;
2. The State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100193;
3. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, 210095;
4. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081

✉ Corresponding author, dxf@caas.net.cn; ✉ Authors

Abstract An intraspecific cross between the resistance cultivar *Gossypium hirsutum* cv. Zhongzhi372 and *Gossypium hirsutum* cv. Junmian1 was developed for map construction. The F₂ population was genotyped with the SSR markers which were reported in previous and the molecular marker NAU1269 that linked to *Verticillium* wilt resistance was identified. In breeding process, cv. Zhongzhi372 was used as maternal or paternal to cross with other cotton cultivars through backcross, additive selection or cross breeding methods. The resistance progeny was further screened by disease nursery and tracked with NAU1269 molecular marker. After these processes, more than 10 resistant cultivars to *Verticillium* wilt were obtained, such as cv. Zhongzhimian2, cv. Xinzhi5, cv. Zhongzhimian6 and cv. Zhongzhimian8. The genotyping analysis showed that NAU1269 and other two molecular markers NAU828 and NAU1225 reported to link to *Verticillium* wilt resistance can be detected and showed could codominant inheritance in cv. Zhongzhimian2, cv. Zhongzhimian6, cv. Zhongzhimian8 and cv. Xinzhi5. These results indicated that disease nursery and molecular marker-assisted selection should be a feasible and efficient method for cotton resistance breeding to *Verticillium* wilt.

Keywords Cotton; Disease nursery; Markers associated with cotton resistance to *Verticillium* wilt; Molecular marker-assisted selection; Cv. Zhongzhi372

研究背景

黄萎病已经遍及中国各主产棉区, 成为自枯萎病得到有效控制之后棉花生产上的第一大病害, 严重影响棉花的产量。20 世纪 90 年代, 黄萎病连续大爆发并在中国各主产棉区大面积流行, 其中 1993 年发病面积高达 $2.67 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 损失皮棉 $1 \times 10^8 \text{ kg}$, 1995 年和 1996 年黄萎病连续爆发, 发病面积达到 $1.6 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 和 $1.33 \times 10^6 \text{ hm}^2$, 尤其是北方棉区部分棉田出现成片病株落叶成光秆的现象, 造成棉花大幅度减产, 以致绝收(简桂良等, 2003, 中国棉花, 30(3): 13-14)。因此, 如何防治黄萎病成为中国棉花生产上的重要研究课题。黄萎病属于土传性维管束真菌病害, 多年实践证明化学防治、生物防治等方法抗病效果不明显, 而培育抗病品种是预防控制该病的唯一出路, 虽经研究人员多年努力, 目前中国尚无高抗黄萎病的高产棉花品种应用于生产实践。

分子标记辅助选择(molecular marker-assisted selection, MAS)是随着现代分子生物学技术迅速发展而产生的新技术, 利用与性状或者表型连锁的分子标记快速准确地分析个体的遗传组成, 实现对基因型的直接选择, 进行分子育种(Lee, 1995; Mohan et al., 1997)。这一技术已经在小麦、水稻、大豆、黄瓜、南瓜等多种农作物上得到应用(白智龙和周鸿, 2008; 谭行之等, 2010; 张芳等, 2010; 王竹林等, 2011; 殷得所等, 2011)。在棉花上, 经过研究者的共同努力, 已经初步构建了高密度的棉花遗传连锁图谱(Shen et al., 2006; Guo et al., 2008; Qin et al., 2008; Yang et al., 2008; Lin et al., 2009; Zhang et al., 2009; 2012; 蒋锋等, 2009, 中国科学, 39(9): 849-861), 并开始尝试应用于棉花分子标记辅助育种, 包括棉花纤维品质(Guo et al., 2005)、抗病性状(王省芬等, 2007)、不育系恢复系改良(李朋波等, 2007)、抗根结线虫基因定位(Shen et al., 2010)等。综上所述, 在育种过程中借助于分子标记技术手段进行辅助选择, 可以有效地提高性状改良的选育效率, 加快育种进程。但是到目前为止, 将分子标记辅助选择技术应用到棉花抗黄萎病育种并获得成功的研究尚未见报道。

有鉴于此, 本研究以抗病性较强的中植 372 为对象, 利用和感病棉种军棉 1 号构建的 F_2 群体, 对已经报道的 SSR 标记进行了筛选, 获得了与中植 372 抗黄萎病性状相关标记 6 个, 其中 1 个标记

NAU1269 与抗黄萎病性状紧密连锁。在此基础上, 以中植 372 为抗性资源父本或者母本, 通过高致病性人工黄萎病病圃高压筛选结合抗黄萎病分子标记 NAU1269 跟踪, 旨在开发出可应用于棉花抗黄萎病分子育种的技术方法和路径。

1 结果与分析

1.1 抗黄萎病品种选育

以建立的人工黄萎病圃对 300 多个棉花材料进行高压筛选, 获得了抗病性稳定的备选育种材料中植 372。通过花粉管通道法导入 Bt 基因和转基因植株筛选后, 海南加代并选育出 65 个具有优良农艺性状的单株; 随后种植于人工黄萎病病圃, 进行单株分离和高压抗性筛选, 选育出兼具抗虫和抗黄萎病单株 106 个; 混种并继续逐年高压抗性选育, 最终获得具有优良农艺性状的抗黄萎病品系中植棉 2 号。

同时, 利用抗病材料中植 372 和感病材料军棉 1 号配制组合构建的 F_2 作图群体, 利用已公布的 SSR 引物筛选获得与黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269。在此基础上, 通过抗病材料中植 372 与不同优良农艺性状的亲本配置组合, 经过回交、海南加代选育、再杂交等过程, 结合病圃高压筛选和黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269 跟踪结果, 选育出了具有优良农艺性状的抗/高耐黄萎病品种, 包括中植棉 6 号、中植棉 8 号、新植杂 2 号、新植 5 号等(图 1)。由此表明, 结合田间病圃高压筛选和分子标记跟踪是一条可行的抗病虫育种方法, 选育过程快速准确, 育成的品种含有与抗黄萎病标记 NAU1269 连锁的区段, 抗(耐)黄萎病性强且性状稳定, 产量高, 适应性广等特点。



中植棉2号
Cv. Zhongzhimian2



新植5号
Cv. Xinzhi5

图 1 中植棉 2 号和新植 5 号

Figure 1 Phenotype of cv. Zhongzhimian2 and cv. Xinzhi5

1.2 中植 372 抗黄萎病连锁标记对不同的抗、感棉种的分析

通过 NAU1269 对 5 个抗病棉种及其亲本中植 372 和 3 个感黄萎病棉种单株的 DNA 进行扩增, 结果表明, 感病棉品种军棉 1 号、新陆早 8 号、冀棉 11 号与抗病棉种新植杂 2 号均能够扩增到 NAU1269 标记的特异性条带, 而亲本中植 372 和其它 4 个抗病棉种中植 2 棉号、新植 5 号、中植棉 6 号和中植棉 8 号均未扩增到该特异条带(图 2)。由此说明, 与 NAU1269 标记连锁的抗黄萎病区段在中植棉选育过程中得到稳定遗传。中植 2 棉号、新植 5 号、中植棉 6 号和中植棉 8 号均是以中植 372 为父本, 通过其与黄萎病连锁的 NAU1269 标记辅助选育出的品种对黄萎病的抗性且稳定, 这也表明与 NAU1269 标记连锁抗黄萎病区段是选育品种黄萎病抗性的重要来源。

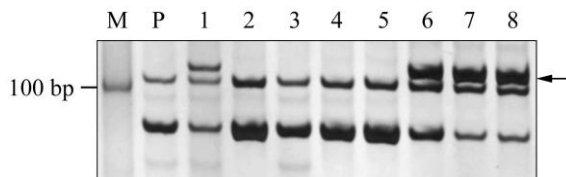


图 2 SSR 引物 NAU1269 在 9 个棉花品种的检测结果
注: M: DNA marker; P: 中植 372; 1: 新植杂 2 号; 2: 中植棉 2 号; 3: 新植 5 号; 4: 中植棉 6 号; 5: 中植棉 8 号; 6: 军棉 1 号; 7: 新陆早 8 号; 8: 冀棉 11 号; 箭头所示为抗感品种差异条带
Figure 2 Detection of NAU1269 SSR primer in nine cotton cultivars
Note: M: DNA marker; P: Cv. Zhongzhi372; 1: Cv. Xinzhiba2; 2: Cv. Zhongzhimian2; 3: Cv. Xinzhi5; 4: Cv. Zhongzhimian6; 5: Cv. Zhongzhimian8; 6: Cv. Junmian1; 7: Cv. Xinluzao8; 8: Cv. Jimian11; The arrow head shows the differential band between resistance and susceptible cultivars

1.3 陆地棉黄萎病抗性相关分子标记对不同的抗、感棉种的分析

黄萎病抗性相关 SSR 引物 NAU828 是通过抗黄萎病海岛棉品种 cv. Hai7124 和陆地棉感病品种 cv. Junmian1 配制杂交组合, 得到一个含 128 个单株的 F₂ 分离群体, 同时与 cv. Junmian1 回交得到含 96 个单株的 BC₁ 群体所开发。该 QTL 定位 D5 染色体上, 加性效应为 0.67, LOD 值为 3.03, 解释的表型变异范围为 10.6% (Yang et al., 2008)。黄萎病抗性相关 SSR 引物 NAU1225 是通过抗黄萎病品系 60182 和感黄萎病品种军棉 1 号为亲本配制杂交组

合, 以其 F₂ 为作图群体所开发。该 QTL 定位 D9 染色体上, 加性效应为-0.65, 显性效应为-0.21, LOD 为 16.06, 解释的表型变异范围为 19.8% (蒋锋等, 2009, 中国科学, 39(9): 849-861)。通过 NAU828 引物和 NAU1225 对 5 个抗病棉种及其亲本中植 372 和 3 个感黄萎病棉种单株的 DNA 进行检测, 结果表明, 类似于 NAU1269 扩增结果, 感病棉种军棉 1 号、新陆早 8 号、冀棉 11 号与抗病棉种新植杂 2 号均能够扩增到 NAU828 标记的特异性条带和 NAU1225 标记的特异性条带, 而亲本中植 372 和其它 4 个抗病棉种中植 2 棉号、新植 5 号、中植棉 6 号和中植棉 8 号均未扩增到该特异条带(图 3)。由此说明, 与 NAU828 和 NAU1225 标记连锁的抗黄萎病位点在中植棉种选育过程中得到稳定遗传, 并且该抗黄萎病连锁的位点与 NAU1269 标记的抗黄萎病连锁位点呈共显性分离。

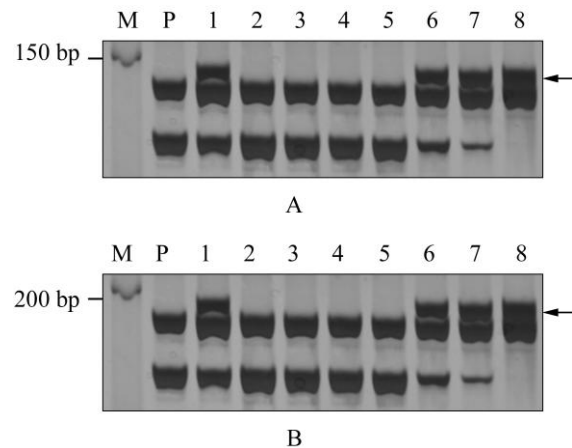


图 3 SSR 引物 NAU828 和 NAU1225 在 9 个棉花品种的检测结果
注: A: NAU828; B: NAU1225; M: DNA marker; P: 中植 372; 1: 新植杂 2 号; 2: 中植棉 2 号; 3: 新植 5 号; 4: 中植棉 6 号; 5: 中植棉 8 号; 6: 军棉 1 号; 7: 新陆早 8 号; 8: 冀棉 11 号; 箭头所示为抗感品种差异条带
Figure 3 Detection of NAU828 and NAU1225 SSR primers in nine cotton cultivars
Note: A: NAU828; B: NAU1225; M: DNA marker; P: Cv. Zhongzhi372; 1: Cv. Xinzhiba2; 2: Cv. Zhongzhimian2; 3: Cv. Xinzhi5; 4: Cv. Zhongzhimian6; 5: Cv. Zhongzhimian8; 6: Cv. Junmian1; 7: Cv. Xinluzao8; 8: Cv. Jimian11; The arrow head shows the differential band between resistance and susceptible cultivars

2 讨论

20 世纪 90 年代以来, 继棉花枯萎病通过抗病

育种的方法得到有效控制之后, 中国棉花黄萎病的发生流行和危害日趋严重, 凸显为棉花生产病害预防控制中的头号问题, 也是世界性的难题, 迫切需要培育抗黄萎病品种以应生产之需。但由于黄萎病致病机理复杂且棉花缺乏有效的抗病材料, 在抗病性鉴定与选育过程中借鉴采用与抗枯萎病育种类似的方法很难奏效, 容易导致后代材料选择不准确, 育成品种抗性不稳定, 产量、纤维等优良性状难以聚合, 选育效率低下等问题。因此, 寻找优良的抗黄萎病材料, 开发或者筛选有效可靠的抗黄萎病分子标记, 并进行分子标记辅助选育, 就成为棉花抗黄萎病育种的重要技术路径。

近年来, 随着棉花分子标记技术的发展, 中国研究人员初步构建了高密度棉花遗传连锁图谱, 获得了与部分农艺性状紧密连锁的可用于分子标记辅助育种的选择标记, 取得了可喜的阶段性进展 (Shen et al., 2006; Guo et al., 2008; Qin et al., 2008; Yang et al., 2008; Lin et al., 2009; Zhang et al., 2009; 2012; 蒋锋等, 2009, 中国科学, 39(9): 849-861)。然而, 分子标记辅助育种技术在棉花抗黄萎病育种方面的应用较少, 主要原因是棉花抗黄萎病机理复杂, 多倍体杂交导致后代性状难以稳定, 抗病性状鉴定稳定性和重复性一般, 导致选育过程中容易出现材料当选或淘汰盲目性较大, 以及育种亲本和杂交后代材料鉴定结果不准确。

为此, 本研究尝试开发了高致病性病圃高压筛选和抗黄萎病分子标记跟踪相结合的方法, 以抗病性较强的中植 372 为抗性资源父本或者母本, 和不同优良农艺性状的亲本配置组合, 经过回交、海南加代选育、再杂交等过程, 通过高致病性人工病圃对杂交及选育后代的每一代材料进行高压筛选, 初步鉴定选育材料的抗病性。同时, 利用抗黄萎病分子标记对的每一代候选抗病材料进行检测跟踪, 由此获得与抗黄萎病性状标记紧密连锁的优良抗性材料, 最终成功选育出中植棉 2 号、新植 5 号等系列抗黄萎病国审棉花品种。该方法能够初步取得成功, 拟有两个前提条件: 一是构建了可用于鉴定棉花抗黄萎病性状的人工黄萎病圃, 保证了候选材料抗病性状鉴定结果的稳定性和可靠性; 二是筛选出了抗病材料中植 372 与黄萎病紧密连锁的分子标记。

近年来, 通过众多研究者的共同努力, 海岛棉和陆地棉抗黄萎病分子标记及分子辅助育种得到了较为快速的发展(房卫平等, 2001; 高玉千等,

2003; 甄瑞等, 2006; 王省芬等, 2007; Yang et al., 2008; 蒋锋等, 2009, 中国科学, 39(9): 849-861)。然而, 由于棉花抗黄萎病遗传背景复杂, 陆地棉与海岛棉抗病的遗传基础、杂交群体、不同棉花品种、不同黄萎病菌系以及不同发育时期都会影响抗黄萎病分子标记的稳定性和可靠性, 给进一步的育种利用和生产应用带来了困难。本研究以抗病材料中植 372 和感病材料军棉 1 号配制组合构建了 F_2 作图群体, 通过已公布的 SSR 引物筛选获得与黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269。在育种实践中, 除了通过人工病圃初步筛选杂交及后代材料之外, 结合抗黄萎病标记 NAU1269 的跟踪检测结果进一步筛选含有该标记的后代材料进行后续选育, 取得了良好的效果, 表明与 NAU1269 标记连锁抗黄萎病区段是黄萎病抗性的重要来源。同时, 利用已知的与黄萎病抗性相关的 SSR 标记 NAU828 和 NAU1225 检测本研究选育的品种也发现, 它们与抗性高度相关, 且三个与抗黄萎病连锁的 SSR 标记呈现共显性分离(图 2; 图 3)。

综上所述, 在抗黄萎病育种过程中通过建立高致病性人工黄萎病圃对选育材料进行高压筛选, 并借助于分子标记手段进行辅助选择, 可以有效地提高抗病性状改良的选育效率、加快棉花抗黄萎病育种进程。但是也要看到, 本研究仅仅是一个初步的尝试, 由于人工病圃在个别年份极端天气条件下对材料抗病性状的鉴定不稳定, 棉花抗黄萎病性状由多个基因或者主效基因控制, 与棉花抗黄萎病连锁的分子标记缺乏, 本研究仅用一个与抗黄萎病性状连锁的标记进行筛选, 存在部分后代选育的材料抗性表现一般的情况, 有待在今后的研究中进一步改进和完善。从未来的发展看, 建立高效的目标性状筛选平台, 筛选或者开发与目标性状紧密连锁的分子标记, 并将两者相结合是棉花分子标记育种方法探索、效率提高、抗病谱拓展、抗性持久与稳定的必由之路。

3 材料与方法

3.1 抗病棉种选育

人工黄萎病圃建立在中国农业科学院植物保护研究所新乡科研中试基地, 属于黄淮海粮棉生态区, 具有良好的自然生态条件和耕作制度代表性, 病圃内发病均匀, 受气候条件的影响较小, 每年在常规抗黄萎病圃中加入采自中国主产棉区之毛棉籽加工后获得致病力强的短绒土残渣粉碎混合

作为黄萎病保持和更新菌种, 用于病圃的棉籽残渣不少于 1 200 g/m² 土壤, 带菌残渣均匀地施入田间, 再翻耕 2~3 遍, 使病菌与土壤混均匀, 保证病圃土壤病菌数量在 200/g 土壤以上, 减缓病圃衰退(张永军等, 2008, 中国专利, ZL200810222492.3)。

选择中植 372 及候选抗病组合材料种植在黄萎病病圃中, 3 次重复, 每个重复 2 行, 按棉花正常的播种时间和田间管理方式进行种植, 田间保持适当湿度, 以利于黄萎病的发生。依据《棉花抗病虫性评价技术规范-第 5 部分: 黄萎病》规定的鉴定标准(GB/T22101.5-2009), 选择病情指数小于 20 的材料进行分子标记跟踪检测, 选用的分子标记为利用抗病材料中植 372 和感病材料军棉 1 号配制组合构建的 F₂ 作图群体所筛选出与黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记 NAU1269。将筛选的含有抗性标记抗病材料后代通过种间杂交、回交、海南加代选育、再杂交并重复辅以病圃高压选择和分子标记跟踪, 直至筛选出具有抗黄萎病、产量高、品质优良的品系材料。

3.2 选育品种与 SSR 引物

选取本研究培育的大面积推广的 5 个抗或者高耐黄萎病棉花品种, 分别为中植棉 2 号、中植棉 6 号、中植棉 8 号、新植杂 2 号和新植 5 号, 以抗病亲本中植 372 及 3 个高感黄萎病棉花品种军棉 1 号、新陆早 8 号和冀棉 11 号为对照(表 1), 鉴定棉花抗黄萎病 SSR 标记与棉种抗性的关系。

NAU1269 为本研究利用抗病材料中植 372 和感病材料军棉 1 号配制组合构建的 F₂ 作图群体所筛选到的与黄萎病抗性紧密连锁的 SSR 标记。与陆地棉黄萎病抗性相关的 SSR 引物 NAU828 (Yang et al., 2008) 和 NAU1225 (蒋锋等, 2009, 中国科学, 39(9): 849-861) 由南京农业大学张天真教授提供。

3.3 DNA 提取

采用天根新型植物基因组 DNA 提取试剂盒(目录号: DP320-02)提取供试材料棉花基因组 DNA。

3.4 PCR 反应体系

PCR 总反应体系为 20 μL, 其中 DNA 模板(40~80 ng/μL) 1 μL, 2.5 mmol/L 的 dNTP 2 μL, 10× Buffer 2 μL, 10 μmol/L 正反向引物各 1 μL, Taq DNA 聚合酶(TAKARA, 货号: DR001A) 0.25 μL, 加 ddH₂O 至 20 μL。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 40 s, 72℃ 延伸 30 s, 32 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

表 1 本研究使用的棉花材料

Table 1 Cotton cultivars used in this study

编号 No.	材料名称 Cultivars name	抗病类型 Resistance type
P	中植 372 Cv. Zhongzhi372	抗病 Resistance
1	新植杂 2 号 Cv. Xinzhiba2	抗病 Resistance
2	中植棉 2 号 Cv. Zhongzhimian2	抗病 Resistance
3	新植 5 号 Cv. Xinzhi5	抗病 Resistance
4	中植棉 6 号 Cv. Zhongzhimian6	抗病 Resistance
5	中植棉 8 号 Cv. Zhongzhimian8	抗病 Resistance
6	军棉 1 号 Cv. Junmian1	感病 Susceptible
7	新陆早 8 号 Cv. Xinluzao8	感病 Susceptible
8	冀棉 11 号 Cv. Jimian11	感病 Susceptible

3.5 电泳检测

取 2 μL PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 200 V 电泳 60 min。采用 NaOH 银染方法对电泳后的聚丙烯酰胺凝胶进行染色显影。各种溶剂的配方和体积为: 银染液, 0.1% AgNO₃ 溶液 1 L; 显影液, 16 g 的 NaOH, 8 mL 的 37% 甲醛, 加去离子水定容到 1 L; 终止液, 0.75% 的 Na₂CO₃ 溶液 1 L。银染程序为: (1) 去离子水漂洗 15 s; (2) 银染 8 min; (3) 去离子水冲洗 15 s; (4) 在显影液中轻摇至显带; (5) 加入终止液, 终止显影。

作者贡献

祁伟彦和张永军是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 张天真参与实验设计和提供引物; 陈捷胤参与数据分析和论文初稿的写作; 戴小枫是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

感谢转基因生物新品种培育科技重大专项项目(2011ZX08005)和国家 863 计划项目(2006AA10Z177)的支持。

参考文献

Bai Z.L., and Zhou H., 2008, Study on cucumber downy mildew and its molecular assisted breeding, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agriculture Sciences),

- 36(7): 2814-2815 (白智龙, 周鸿, 2008, 黄瓜霜霉病及其分子标记辅助育种研究, 安徽农业科学, 36(7): 2814-2815)
- Fang W.P., Xu S.M., Sun Y.T., Tang Z.J., and Wang J.D., 2001, The RAPD maker linked with *Verticillium* wilt resistance in cotton, Henan Nongye Kexue (Journal of Henan Agricultural Sciences), 30(9): 11-13 (房卫平, 许守明, 孙玉堂, 唐中杰, 王家典, 2001, 棉花抗黄萎病的 RAPD 标记, 河南农业科学, 30(9): 11-13)
- Gao Y.Q., Nie Y.C., and Zhang X.L., 2003, QTL mapping of genes resistant to *Verticillium* wilt in cotton, Mianhua Xuebao (Cotton Science), 15(2): 73-78 (高玉千, 聂以春, 张献龙, 2003, 棉花抗黄萎病基因的 QTL 定位, 棉花学报, 15(2): 73-78)
- Guo W., Cai C., Wang C., Zhao L., Wang L., and Zhang T., 2008, A preliminary analysis of genome structure and composition in *Gossypium hirsutum*, BMC Genomics, 9: 314 <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-9-314> PMID: 18590573 PMCID:2481271
- Guo W.Z., Zhang T.Z., Ding Y.Z., Zhu Y.C., Shen X.L., and Zhu X.F., 2005, Molecular marker assisted selection and pyramiding of two QTLs for fiber strength in upland cotton, Acta Genetica Sinica, 32(12): 1275-1285
- Lee M., 1995, DNA markers in plant breeding programs, Advances Agron, 55: 265-344 [http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60542-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60542-8)
- Li P.B., Cao M.L., Yang L.L., Xu A.L., and Liu H.M., 2007, Mapping of fertility restorer gene for cotton cyto-plasmic male sterile line 'Jin A', Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 27(10): 1937-1942 (李朋波, 曹美莲, 杨六六, 许爱玲, 刘慧民, 2007, 棉花“晋 A”细胞质雄性不育恢复基因定位, 西北植物学报, 27(10): 1937-1942)
- Lin Z.X., Zhang Y.X., Zhang X.L., and Guo X.P., 2009, A highdensity integrative linkage map for *Gossypium hirsutum*, Euphytica, 166(1): 35-45 <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-008-9822-2>
- Mohan M., Nair S., Bhagwat A., Krishna T.G., Yano M., Bhatia C.R., and Sasaki T., 1997, Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants, Molecular Breeding, 3(2): 87-103 <http://dx.doi.org/10.1023/A:1009651919792>
- Qin H., Guo W., Zhang Y.M., and Zhang T., 2008, QTL mapping of yield and fiber traits based on a four-way cross population in *Gossypium hirsutum* L., Theor. Appl. Genet., 117(6): 883-894 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-008-0828-x> PMID:18604518
- Shen X., He Y., Lubbers E.L., Davis R.F., Nichols R.L., and Chee P.W., 2010, Fine mapping *QMi-C11* a major QTL controlling root-knot nematodes resistance in upland cotton, Theor. Appl. Genet., 121(8): 1623-1631 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-010-1415-5> PMID:20680610
- Shen X.L., Zhang T.Z., Guo W.Z., Zhu X.F., and Zhang X.Y., 2006, Mapping fiber and yield QTLs with main, epistatic, and QTL \times environment interaction effects in recombinant inbred lines of upland cotton, Crop Sci., 46(1): 61-66 <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci2005.0056>
- Tan X.Z., Cui C.S., and Qu S.P., 2010, Advances in marker-assisted breeding of *Cucurbita Squash*, Zhongguo Guacai (China Cucurbits and Vegetables), 23(3): 37-40 (谭行之, 崔崇士, 屈淑平, 2010, 南瓜作物分子标记辅助育种研究进展, 中国瓜菜, 23(3): 37-40)
- Wang X.F., Zhen R., Ma Z.Y., Zhang G.Y., Zhang Y., and Wang X., 2007, Verification and Cloning of SSR marker linked with the gene of *Verticillium* wilt resistance in *Gossypium barbadense* L., Zhiwu Yichan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources), 8(2): 149-152 (王省芬, 甄瑞, 马峙英, 张桂寅, 张艳, 王雪, 2007, 海岛棉品种抗黄萎病基因 SSR 标记的验证及克隆, 植物遗传资源学报, 8(2): 149-152)
- Wang Z.L., Wang Y.H., Liu L.Z., Xi Y.J., and Liu S.D., 2011, Molecular marker assisted selection for powdery mildew resistance gene *Pm4* in wheat breeding, Mailei Zuowu Xuebao (Journal of Triticeae Crops), 31(5): 819-823 (王竹林, 王艺桦, 刘联正, 奚亚军, 刘曙东, 2011, 小麦抗白粉病基因 *Pm4* 的分子标记辅助育种研究, 麦类作物学报, 31(5): 819-823)
- Yang C., Guo W.Z., Li G.Y., Gao F., Lin S.S., and Zhang T.Z., 2008, QTLs mapping for *Verticillium* wilt resistance at seedling and maturity stages in *Gossypium barbadense* L., Plant Science, 174(3): 290-298 <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2007.11.016>
- Yin D.S., Xia M.Y., Li J.B., Wan B.L., Zha Z.P., Du X.S., and Qi H.X., 2011, Development of STS marker linked to rice blast resistance gene *Pi9* in marker assisted selection breeding, Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science), 25(1): 25-30 (殷得所, 夏明元, 李进波, 万丙良, 查中萍, 杜雪树, 戚华雄, 2011, 抗稻瘟病基因 *Pi9* 的 STS 连锁标记开发及在分子标记辅助育种中的应用, 中国水稻科学, 25(1): 25-30)
- Zhang F., Xie H., and Chen X.Z., 2010, A review of molecular marker-assisted breeding research in soybean, Beijing Nongxueyuan Xuebao (Journal of Beijing Agricultural College), 25(2): 73-77 (张芳, 谢皓, 陈学珍, 2010, 大豆分子标记辅助育种研究进展, 北京农学院学报, 25(2): 73-77)

- Zhang K., Zhang J., Ma J., Tang S.Y., Liu D.J., Teng Z.H., Liu D.X., and Zhang Z.S., 2012, Genetic mapping and quantitative trait locus analysis of fiber quality traits using a threeparent composite population in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Molecular Breeding*, 29(2): 335-348 <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-011-9549-y>
- Zhang Z.S., Hu M.C., Zhang J., Liu D.J., Zheng J., Zhang K., Wang W., and Wan Q., 2009, Construction of a comprehensive PCR-based marker linkage map and QTL mapping for fiber quality traits in upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.), *Molecular Breeding*, 24(1): 49-61 <http://dx.doi.org/10.1007/s11032-009-9271-1>
- Zhen R., Wang X.F., Ma Z.Y., Zhang G.Y., and Wang X., 2006, A SSR Marker linked with the gene of *Verticillium* wilt resistance in *Gossypium barbadense*, *Mianhua Xuebao (Cotton Science)*, 18(5): 269-272 (甄瑞, 王省芬, 马峙英, 张桂寅, 王雪, 2006, 海岛棉抗黄萎病基 SSR 标记研究, *棉花学报*, 18(5): 269-272)