

# 棉花叶皱小突变体的遗传分析及激素含量研究

孙 冉<sup>1,2</sup>, 刘国栋<sup>2</sup>, 宫永超<sup>2</sup>, 郑 玲<sup>2</sup>, 霍雪寒<sup>1,2</sup>, 王芙蓉<sup>2</sup>, 张 军<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> 山东师范大学生命科学学院, 济南 250014; <sup>2</sup> 国家棉花改良中心山东分中心/山东棉花研究中心, 济南 250100)

**摘要:**在海岛棉(*Gossypium barbadense* L.) 品种海 7124 的基因组总 DNA 导入陆地棉(*G. hirsutum* L.) 品种石远 321 的后代中,发现了一个形态性状发生变异的突变体。与正常棉株相比,突变体叶片皱小、茎秆细弱、铃小但种子发育正常。叶表皮显微观察发现,突变体叶表皮细胞增大,突变体叶片变小是由于叶片细胞数目的减少。遗传分析表明,突变体为杂合基因型,突变性状受显性基因控制,并可能具有纯合致死效应。内源激素含量测定显示,突变体茎尖中 IAA 和 ZR 含量显著高于正常棉株,推测突变体的叶片皱缩变小可能与主茎顶芽中 IAA 和 ZR 含量的异常有关。

**关键词:**棉花突变体; 叶皱小; 遗传分析; 叶表皮细胞; 内源激素

## Genetic Analysis and Endogenous Hormone Content in Apical Buds of a Cotton Mutant with Small Crinkled Leaves

SUN Ran<sup>1,2</sup>, LIU Guo-dong<sup>2</sup>, GONG Yong-chao<sup>2</sup>, ZHENG Ling<sup>2</sup>, HUO Xue-han<sup>1,2</sup>,  
WANG Fu-rong<sup>2</sup>, ZHANG Jun<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup> Academy of Biological Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014;

<sup>2</sup> Shandong Subcenter of National Cotton Improvement Center of China/ Shandong Cotton Research Center, Jinan 250100)

**Abstract:** A mutant with small crinkled leaves was discovered in the progeny of the genomic DNA of island cotton (*Gossypium barbadense* L. cv. Hai7124) introduced into the upland cotton (*G. hirsutum* L. cv. Shiyuan321). Compared with the normal cotton plant, the leaves of the mutant were smaller and the stem was thinner, but it can flower and set bolls normally. Microscopic observation showed that cells of the mutant leaf epidermis were significantly larger than that of the wild type plant. The result of genetic analysis indicated that the mutant phenotype was controlled by a dominant allele that may have homologous lethal effect. The endogenous hormone contents showed that the IAA and ZR contents in apical buds were obviously higher in the mutant than that in the wild type plant. It is suggested that the abnormal contents of IAA and ZR in the mutant result in the phenotypic mutation.

**Key words:** Cotton mutant; Small crinkled leaves; Inheritance; Endogenous hormones

突变体作为遗传学材料,在遗传发育研究中具有重要意义。棉花中已鉴定了芽黄<sup>[1]</sup>、棉纤维突变体<sup>[2-4]</sup>。棉花叶皱小突变体也已有报道,但突变性状往往与矮秆同时表达<sup>[5-9]</sup>。Hutchinson 等<sup>[10]</sup>在陆地棉中发现了矮皱突变体,该突变体苗期正常,从第 4 或第 5 片真叶开始叶片皱缩变小。遗传研究表明,该突变性状受 1 对隐性基因控制。陈旭升等<sup>[7]</sup>在陆

地棉中发现一个矮秆突变体,该突变体子叶与真叶卷缩并极度矮化,喷施外源 GA<sub>3</sub> 才能正常开花、结铃。遗传分析显示,该突变性状受 1 对完全隐性基因控制。张朝等<sup>[9,11]</sup>在棉花种间杂交后代中发现一个极端矮化突变体,虽叶型为正常阔叶型,但叶片较正常株小,进一步的分析显示,该突变性状受单个不完全显性基因控制。

收稿日期:2011-08-30 修回日期:2012-01-14

基金项目:国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08005-018B)

作者简介:孙冉,硕士研究生,从事棉花重要经济性状的 QTL 定位研究

通讯作者:张军, E-mail: scrczj@saas.ac.cn

本实验室在利用花粉管通道技术将海岛棉品种总 DNA 导入陆地棉栽培品种石远 321 的后代中,发现一株突变株<sup>[12]</sup>,连续多代进行自交,突变性状已经稳定。本试验在该突变体进行形态学鉴定和遗传分析的基础上,在 DNA 水平上进行了突变株与正常株的多态性扫描,并对突变株与正常株茎尖和主茎叶中内源激素含量进行了比较,为研究导致突变体叶皱小性状发生的分子生物学机制奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

2001 年,在海岛棉品种海 7124 总 DNA 导入陆地棉品种石远 321 的后代中发现一株茎秆细弱、叶皱小的突变株<sup>[12]</sup>,连续自交。2009 年突变株和正常株进行正反交。2010 年调查后代分离情况。

### 1.2 叶表皮压片

取充分展开的叶片,用刀片小心刮除叶肉组织,获得棉花叶片的上表皮,蒸馏水小心冲洗去掉叶肉组织污物,在干净的载玻片上展平后覆以盖玻片,小心压平,直接在 OLYMPUS 双目显微镜下观察,并在

相同放大倍数下统计多个不同视野中表皮细胞的数目。利用显微摄影装置照相<sup>[13]</sup>。

### 1.3 SSR 的 PCR 扩增与银染分析

DNA 提取、SSR 的 PCR 扩增与银染分析参见张军等<sup>[14]</sup>的方法。

### 1.4 激素测定

激素测定采用酶联免疫吸附法(ELISA)进行。试剂盒由中国农业大学提供,试剂配制、测定步骤、激素含量计算参照说明书方法进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 突变体表型观察

子叶期至 4 叶期,突变体叶片平展,与正常植株相比没有明显差别,茎端发育较迟缓但不明显,因此在苗期难以区分正常株和突变株。从第 5 片真叶开始,突变株叶片皱缩变小但叶柄长度较正常株没有差异。茎秆由于叶片小、叶功能弱而变得细弱。蕾小且苞叶发育异常,但花器官发育正常,能正常结铃。铃小,种子数目虽少但均发育正常,能正常发芽(图 1)。

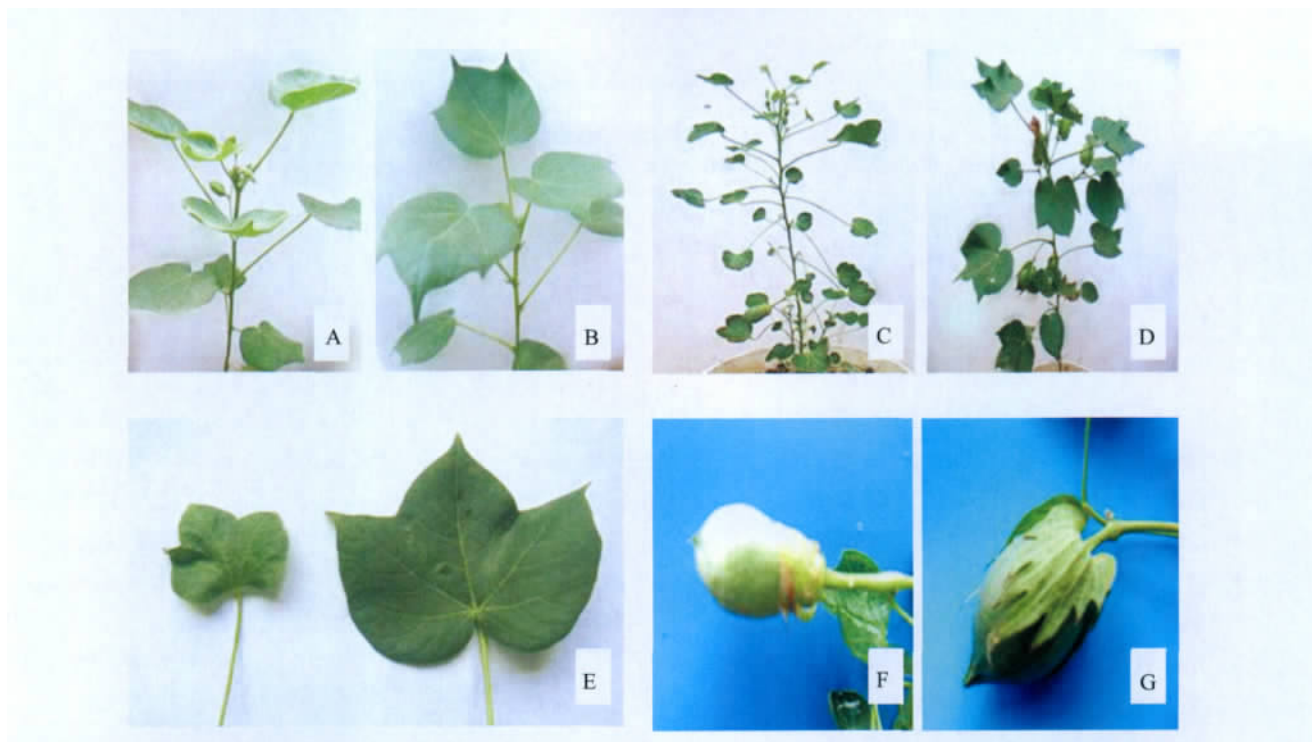


图 1 突变体与正常棉株的形态比较

Fig. 1 Morphology comparison of the mutant cotton plant and the normal plant

A、B: 苗期的突变株和正常株; C、D: 突变株和正常植株型; E: 突变株(左)与正常株(右)叶片; F、G: 突变株和正常株棉铃

A、B: The mutant and the normal plant at seedling stage; C、D: Morphological characters of the mutant and the normal plant at mature stage; E: Comparison of single leaf of the mutant (left) and the normal plant (right); F、G: Boll of the mutant and the normal plant

## 2.2 叶表皮细胞观察

分别取突变株和正常株倒数第4片真叶,在主叶脉附近相同部位刮掉叶肉,获取上表皮,制成表皮细胞临时装片,在光学显微镜下观察。发现突变株叶上表皮细胞和正常株在形态上没有明显差异(图2)。经过多个显微镜视野的观察统计,发现单位面积内突变株叶上表皮细胞数目较正常株显著减少(表1),说明虽然突变株叶片变小,但细胞体积却增大了。

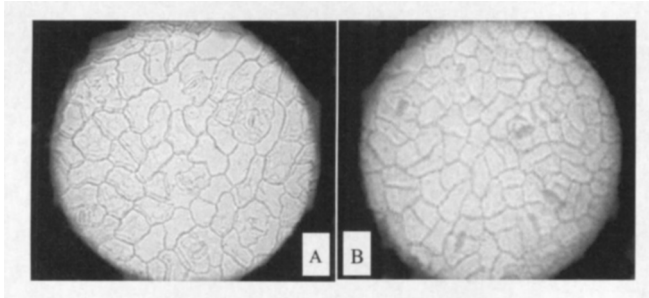


图2 突变体(A)与正常棉株(B)叶上表皮的显微镜观察结果(40×10×)

Fig.2 Microscopic observation on leaf upper epidermis of the mutant (A) and the normal plant (B) (40×10×)

表1 棉花突变株与正常株叶上表皮单位面积的细胞数目比较

Table 1 The cell count per unit area in leaf upper epidermis of the mutant compared with the normal plant

试验材料 Material	统计视野数 Visions	单位面积的细胞数目 (40×10×) Cell count/vision
突变株 Mutant	20	87.6 ± 2.80*
正常株 Normal plant	20	101.7 ± 4.06

\* :  $P < 0.01$

## 2.3 突变体的遗传分析

自2003年开始,对突变株连续多年自交,发现自交后代持续发生分离。后代群体中既有突变株也分离出了正常株。遗传学统计结果显示,突变株与正常株的比例基本为2:1。正常株自交后,后代没有发生分离,均为正常株<sup>[12]</sup>;2009年以突变株为母本,与正常株杂交, $F_1$ 中突变株与正常株的分离符合1:1的比例(表2),反交也符合1:1的分离比例(分析的个体数较少,未在表中呈现)。由此推测,突变性状受显性核基因控制,突变体为杂合基因型。突变基因的纯合可能具有致死效应。

表2 突变体自交以及突变体与正常株杂交后代分离情况分析

Table 2 Segregation of the populations from the selfing mutant and the cross between mutant and the normal plant

群体 Population	总株数 Total individuals	突变株数 Number of mutant	正常株数 Number of normal plant	理论比例卡方值 Chi-square	P 值 P value
突变株自交 Selfing of the mutant	351	233	118	0.0032(2:1)	>0.9
突变株×正常株 Mutant×Normal plant	108	53	55	0.0200(1:1)	>0.9

## 2.4 SSR 多态性分析

突变体连续自交选择到  $M_{10}$ ,分离出的突变株与正常株除突变位点外,其他遗传背景几乎相同,类似于近等基因系,在突变株与正常株间筛选出的多态性标记应是突变性状紧密连锁的标记。因此利用均匀分布于棉花基因组的2000余对在陆地棉与海岛棉之间有多态的SSR引物对突变株与正常株进行多态性扫描,但没有在两者间检测到多态性位点,这可能由于筛选的SSR标记并未覆盖到突变位点的染色体区域,无法鉴定出突变基因位点在DNA水平上的微小差异。另一方面,也从分子水平上证明突变株与正常株的遗传背景是相似的。

## 2.5 叶皱小突变体内源激素含量的变化

突变体形态上的明显差异可能是由于转录或转

录后水平上的变化引起的生理生化变化导致的,首先应该考虑的是与植物生长发育密切相关的植物激素的变化。叶片是茎端分生组织分化产生的第一类侧生器官,植物激素在叶片的生长发育以及形态建成中具有重要的调控作用。由图3可以看出,突变体的茎尖中,IAA和ZR含量显著高于正常株( $P$ 值分别为0.0427,0.0118),主茎叶中,突变体略高于正常株,而GA<sub>3</sub>和ABA含量略低于正常株。

## 3 讨论

在已报道的棉花叶皱小突变体中,矮秆与叶皱小两个性状同时表达,且突变性状多受1对隐性基因控制。本试验中鉴定的突变体苗期叶片发育正常,从第5片真叶开始叶片皱缩变小,株高虽然较正

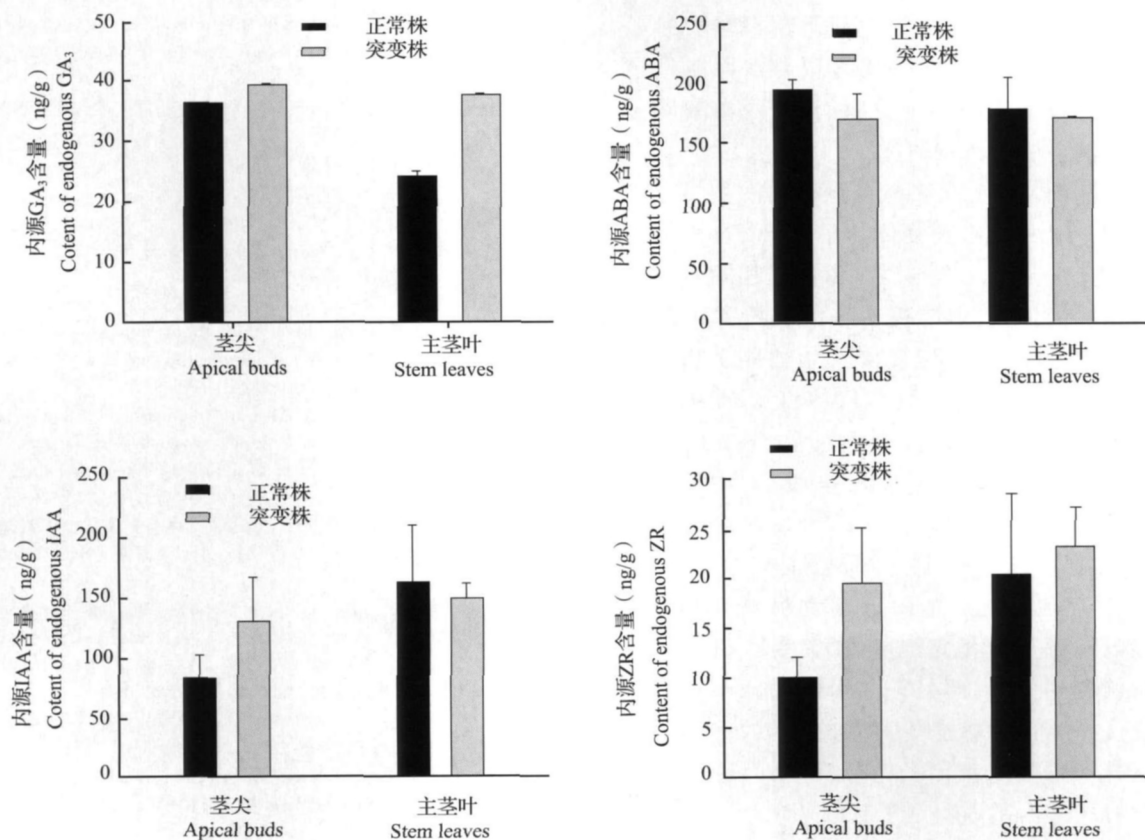


图3 突变株与正常株茎尖及主茎叶叶片激素含量比较

Fig. 3 Photohormone content in apical buds and stem leaves of the mutant compared with the normal plant

常株没有明显差异,但茎秆细弱,这可能是由于突变体叶片较小、光合作用制造的养分较少导致的。遗传学分析表明,突变性状受显性核基因控制,不属于细胞质遗传,该突变体为杂合基因型,突变体自交后代中突变株与正常株的分离比例为2:1,暗示该突变基因位点的纯合可能具有致死效应。

细胞数目和大小决定了器官的大小。突变体的叶片变小应与叶片细胞的数目或细胞大小有关。因此对突变株与正常株的叶上表皮细胞进行了显微观察,发现相同的视野内突变株叶上表皮的细胞数目较正常株显著减少,说明突变株叶表皮细胞比正常株的叶表皮细胞大,叶片细胞数目的减少是导致突变体叶片变小的主要原因。

叶片在发育过程中受体内遗传机制和体外环境因子的双重影响。植物激素尤其是生长素在叶片的形态建成中起着不可或缺的作用<sup>[15]</sup>。研究表明,生长素通过调控细胞分裂决定器官的大小和形状。拟南芥中受生长素诱导的 *ARGOS* 基因,通过调控 *AIN-*

*TEGUMENTA* (*ANT*) 控制器官的大小,在 *axr1-3* 中过量表达 *ARGOS* 基因,能部分恢复 *axr1-3* 的体型小的表型性状<sup>[16]</sup>。另一个受生长素诱导的基因 *AUX-IN RESPONSE FACTOR2* (*ARF2*) 则是通过调控 *ANT* 基因抑制细胞的增殖<sup>[17]</sup>。由此可见,生长素的稳态调控对叶片发育具有重要影响。另一方面,叶片早期的发育主要包括叶原基的起始、叶片腹背性的建立以及叶片的延展<sup>[18]</sup>,叶原基在茎端分生组织中形成并分化,因此主茎茎尖中植物激素浓度影响叶片的正常发育。细胞分裂素在调节植物生长发育过程中起着重要作用,如促进细胞分裂、芽分生组织的生长、形成次生代谢组织、延缓叶片衰老等中起重要的作用。细胞分裂素通过影响顶端分生组织 (*SAM*) 的大小以及调控生长素运输蛋白基因的表达影响生长素在 *SAM* 中的分布间接影响叶片的形态建成及其他发育过程,同时顶端分生组织中细胞分裂素/生长素域值的稳定和变化也可能是调节植物叶及叶序发育的重要因素<sup>[19]</sup>。本研究检测了突变株和正常

棉株的茎尖以及主茎叶中  $GA_3$ 、ABA、IAA 和 ZR 等 4 种激素的含量,发现茎尖中 IAA 和 ZR 含量显著高于正常株。结合突变株叶片表皮细胞数目减少的观察结果,推测茎尖中 IAA 和 ZR 含量异常可能是导致突变株叶片皱缩变小的主要原因,这两类激素影响发育的机制需要进一步研究。

本课题前期的研究曾利用陆地棉与海岛棉之间具有多态的 SSR 标记在突变体的早代( $M_1$  自交衍生的  $M_2$  群体)筛选到了几个与供体海岛棉相同而与陆地棉不同的标记位点,但是进一步的分析并未在群体中发现这些标记位点与突变性状的相关性<sup>[12]</sup>。本试验中的突变株经过连续多代的自交至  $M_{10}$ ,相当于由剩余杂合体衍生的近等基因系,突变株和正常株除突变点外其余遗传背景几乎相同。为了找到与突变性状紧密连锁的基因,利用 SSR 筛选突变株和正常株间的多态性标记,结果没有发现两者在 DNA 水平上存在差异。这一方面说明现有的 SSR 标记可能没有覆盖到突变位点,在突变株和正常株之间无法检测到多态;而另一方面则从分子水平上证明了突变株和正常株遗传背景的相似性,为今后分析突变株和正常株差异表达分析,从而研究与植物叶片发育相关的基因奠定了基础。

#### 参考文献

- [1] 肖松华,张天真,潘家驹. 陆地棉芽黄突变体的遗传及在杂种优势上的利用[J]. 南京农业大学学报, 1995, 18(3): 28-33
- [2] 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
- [3] 于晓红,朱勇清,卢山,等. 陆地棉徐 142 种子无毛突变体的比较研究[J]. 中国科学: C 辑, 2000, 30(5): 517-522
- [4] 朱勇清,许可香,陈晓亚. 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
- [5] Harland S C. On the genetics of crinkled dwarf rogues in Sea Island cotton[J]. West Ind Bull, 1918, 16(1): 82
- [6] Hutchinson J B, Ghose R L M. On the occurrence of "crinkled dwarf" in *Gossypium hirsutum* L. [J]. J Genet, 1937, 34: 437-446
- [7] 陈旭升,狄佳春,许乃银,等. 陆地棉超矮秆突变性状质量遗传规律分析[J]. 遗传, 2007, 4: 471-474
- [8] 何鉴星,孙传渭,姜茹琴,等. 棉花矮化突变体的遗传分析[J]. 遗传学报, 1996, 23(5): 397-402.
- [9] 张超,孙君灵,贾银华,等. 外源激素对一个新的棉花极端矮化突变体 AS98 植株生长和酶活性的影响[J]. 中国农业科学, 2010, 43(7): 1370-1378
- [10] Harland S C. The genetics of cotton. Part IX. Further experience on the inheritance of the crinkled dwarf mutant of *G. barbadense* L. in interspecific cross and their bearing on Fisher theory of dominance[J]. J Genet, 1933, 28(2): 315-325
- [11] Zhang C, Sun J L, Jia Y H, et al. Morphological characters inheritance and response to exogenous hormones of a cotton super-dwarf mutant of *Gossypium hirsutum* [J]. Plant Breeding, 2011, 130(1): 67-72
- [12] 王芙蓉,张军,刘任重,等. 海岛棉 DNA 导入陆地棉栽培品种获得变异种质的初步遗传分析[J]. 中国农业科学, 2005, 38(8): 1528-1533
- [13] 张军,易成新,郭旺珍,等. 棉花半配生殖品系 vSg 诱导倍体的早期鉴定[J]. 棉花学报, 2002, 14(3): 138-142
- [14] 张军,武耀廷,郭旺珍,等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测[J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 267-269
- [15] 李林川,瞿礼嘉. 生长素对拟南芥叶片发育调控的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 459-465
- [16] Hu Y, Xie Q, Chua N H. The Arabidopsis auxin-inducible gene ARGOS controls lateral organ size[J]. Plant Cell, 2003, 15(9): 1951-1961
- [17] Schruoff M C, Spielman M, Tiwari S, et al. The auxin 2 gene of Arabidopsis links auxin signalling, cell division, and the size of seeds and other organs [J]. Development, 2006, 133(2): 251-261
- [18] Smith L G, Hake S. The initiation and determination of leaves [J]. Plant Cell, 1992, 4(9): 1017-1027
- [19] 邓岩,王兴春,杨淑华,等. 细胞分裂素: 代谢、信号转导、交叉反应与农艺性状改良[J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 478-498