

与棉花无蜜腺基因紧密连锁 SSR 标记的筛选及 SCAR 标记的转化

李瑞莲¹, 朱四元^{2*}, 陈金湘¹, 张德胜³, 刘爱玉¹, 刘海荷¹

(1.湖南农业大学 棉花研究所, 湖南 长沙 410128; 2.中国农业科学院 麻类研究所, 湖南 长沙 410205; 3.沅江市
四季红镇农业综合服务站, 湖南 沅江 413113)

摘 要:以无蜜腺棉(97014)×TM-1 的正、反交后代 F₁、F₂ 群体为试验材料, 采用 SSR 标记技术, 结合集群分类分析法(BSA)进行了棉花无蜜腺性状基因分子标记的筛选。通过对 203 对 SSR 引物的筛选, 获得 1 个与蜜腺性状基因紧密连锁的 SSR 标记 BNL1673, 连锁距离为 1.33 cM。对该标记片段进行序列测定, 根据序列特点设计 2 对特异引物。PCR 结果显示, 只有 1 组特异引物能扩增出有、无蜜腺性状的特征带。将这 1 组 SCAR 引物进行群体上的分析, 结果表明, 该 SCAR 标记特征带和无蜜腺性状的共分离行为与原 SSR 标记表现一致, 此组合的引物可以作为该 SCAR 标记的特异引物。

关 键 词:棉花; 无蜜腺性状; 分子标记; 转化

中图分类号: S562 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)03-0237-06

Screening of a SSR marker tightly linked to nectariless gene in cotton and the SCAR marker conversion

LI Rui-lian¹, ZHU Si-yuan^{2*}, CHEN Jin-xiang¹, ZHANG De-sheng³, LIU Ai-yu¹, LIU Hai-he¹

(1.Institute of Cotton ,Hunan Agricultural University ,Changsha 410128 ,China ;2.Institute of Bast Fiber Crops ,Chinese Academy of Agricultural Sciences , Changsha 410205, China ; 3.Agriculture Synthetic Service Site of Sijihongzhen , Yuanjiang, Hunan 413113, China)

Abstract: A DNA marker linked to the nectariless gene in cotton was explored based on the population of F₁ and F₂ of 97014×TM-1 by bulk segregant analysis (BSA) and simple sequence repeats(SSRs) technique. A total of 203 SSR primers were screened and a SSR marker(BNL1673) closely linked to nectariless gene(1.33 cM) was identified and then sequenced. Two pairs of specific PCR primers were designed, and the products of SCAR(sequence characterized amplified region)-PCR indicated that only one pair of primers could amplify polymorphic bands between nectary and nectariless traits .The specific pair of primers was chosen to amplify each individual in the F₁ and F₂ population, and the result showed that the segregation pattern of this SCAR marker for nectariless gene was the same as that of the SSR marker, thus these primers could use as the specific primer of SCAR marker for identifying nectariless gene.

Key words: cotton; nectariless trait; molecular markers; conversion

棉花由于蜜腺多、蜜物多、蜜期长而导致虫害较多, 无花外蜜腺性状是抗鳞翅目昆虫的一个标志^[1-5]。目前, 分子标记技术已在棉花育种中广泛应用^[6-18], 而利用分子标记对棉花的表型性状进行基因定位的研究很少。笔者采用 SSR 技术,

结合 BSA 分析方法, 以 97014×TM-1 正、反交组合的 F₁、F₂ 群体等为研究材料, 获得了 1 个与 97014 棉无蜜腺性状基因紧密连锁的共显性 SSR 标记 BNL1673, 将 BNL1673₁₉₃、BNL1673₁₇₀ 标记的特异片段进行回收、克隆、测序, 并根据克

收稿日期: 2010-11-02

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(08JJ3079)

作者简介: 李瑞莲(1967—), 女, 湖南沅江人, 硕士, 副研究员, 主要从事棉花育种与栽培研究, Lrl-4618155@163.com; *通信作者, yanmingxuanzhushiyan2008@yahoo.cn

隆序列设计 SCAR 引物,将 SSR 标记 BNL1673₁₉₃、BNL1673₁₇₀ 转化为稳定、简单的 SCAR 标记,使操作更加简单方便,以提高分子标记技术在无蜜腺性状棉辅助选择育种中的实用性。

1 材料与方法

1.1 材料

2005 年 5 月,在湖南农业大学棉花试验基地种植亲本 97014 和 TM-1,7—8 月配制杂交组合,获得 F₁ 种子;2005 年 10 月至 2006 年 4 月在海南种植 F₁,自交得正、反交 F₂ 各 300 株左右;2006 年 5—9 月,在湖南农业大学棉花试验田种植亲本、正(反)交 F₁ 和 F₂ 试验材料。棉花 SSR 引物序列来自网站 <http://cottondb.org>,选取分布于棉花各条染色体的 SSR 标记引物 203 对,由上海 Sangon 公司合成。Taq 酶、MgCl₂、dNTP 和 10× Reaction Buffer 均购自北京鼎国生物公司。

1.2 方法

1.2.1 表型鉴定

于棉花开花期观察 F₂ 群体的各单株叶片,花萼有无内、外蜜腺,并进行挂牌和记录。以有、无蜜腺的形态性状作为基因定位的表型指标。采用 SPSS12.0 统计软件进行卡方检验。

1.2.2 DNA 的提取及基因池的构建

取直径为 1~2 cm 的幼嫩叶片,采用改良的 CTAB 法^[19],提取两亲本及其正、反交 F₁、F₂ 群体的 DNA,进行 DNA 质量的检测,于 4℃ 冰箱保存备用。根据 Micheltore 等^[20]提出的 BSA 方法,从 F₂ 群体中分别选取各性状表现极端的单株,取 10 个无蜜腺性状单株的 DNA 等量混合构成无蜜腺基因池,取 10 个有蜜腺性状单株的 DNA 等量混合构成有蜜腺基因池,终浓度为 40 ng/μL。

1.2.3 PCR 体系构建及 SSR 标记分析

反应体系总体积为 20 μL,其中包括 10×Buffer (含 Mg²⁺) 2 μL; dNTPs 0.2 mmol/L; 正、反引物各

10 ng/μL; Taq Polymerase 1 U; 模板 DNA 100 ng。反应程序:94℃ 预变性 2 min, 94℃ 变性 50 s, 57℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 1.2 min, 32 个循环; 72℃ 延伸 6 min; 4℃ 保温。扩增产物用 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。凝胶电泳在 DYY-6 型稳压稳流电泳仪上进行,恒定电压 160 V,电泳 2~3 h,银染观察并照相^[20]。所有 SSR 引物在亲本无蜜腺棉(97014)、遗传标准(TM-1)及其 F₁ 中进行筛选,得到带型清晰、重复性较好的 SSR 标记,用 F₂ 代分离群体进行遗传连锁检验,统计各单株的 SSR 标记带型(与亲本 TM-1 一致的带型记为 A,与 97014 一致的带型记为 B,杂合带型记为 H)。用 MapMaker/Exp 3.0 软件^[21]进行连锁分析,用 Kosambi 函数将重组率转换成遗传距离^[22]。

1.2.4 SSR 片段的克隆与测序

采用 Poly-Gel DNA 回收试剂盒(美国 OMEGA 公司)回收 SSR 标记的扩增片段,将特征片段连接到 pMD18-T 载体上,并转化到大肠杆菌(DH5α)中。通过质粒 PCR 检测后,委托上海生工生物工程有限公司进行测序。

1.2.5 SCAR 引物的设计及鉴定

根据克隆的 SSR 标记的两段序列,采用 Primer 5.0 软件,设计合成 SCAR 引物,分别对亲本、F₁ 和 F₂ 进行扩增,鉴定其序列大小的正确性。扩增反应体系同 SSR-PCR 反应体系一致。

2 结果与分析

2.1 棉花无蜜腺品种 97014 的遗传分析

用棉花无蜜腺品种 97014 和遗传标准系 TM-1 进行正、反杂交,获得正、反交 F₁。在海南种植 F₁,经过逐株调查,发现 F₁ 都表现为有蜜腺的显性性状。各组合在海南通过自交繁殖后获得正交 F₂ 和反交 F₂ 群体(表 1),经卡方测验,各组合都符合 15(有蜜腺) 1(无蜜腺)的分离比例,表明 97014 的无蜜腺性状由 2 对隐性基因控制。

表 1 无蜜腺棉品种 97014 的遗传分析

Table 1 Genetic analysis of nectariless cotton in 97014

F ₂ 群体	有蜜腺棉数量/株	无蜜腺棉数量/株	分离比例	χ^2	P 值范围
正交(97014×TM-1)	281	22	12.8 1	0.189 4	0.5 < P < 0.7
反交(TM-1×97014)	279	23	12.1 1	0.898 5	0.25 < P < 0.5

2.2 与无蜜腺性状基因紧密连锁 SSR 标记的筛选

用 97014 和 TM-1 分别对 203 对 SSR 引物进行筛选, 筛选出在亲本间有差异的引物 10 对。利用蜜腺亲本(TM-1)、有蜜腺基因池和无蜜腺亲本(97014)、无蜜腺基因池对上述 10 对引物进行筛选, 筛选出 1 对在它们之间表现多态性的 SSR 引物 BNL1673(图 1)。用该引物分别对正交 F₂ 群体的 283 个单株扩增, 共有 3 种带型, 即有蜜腺亲本带型, 无蜜腺亲本带型和杂合带型(图 2)。

特异标记 BNL1673 的分离比率经卡方检验呈共显性, 符合孟德尔分离比例。用 MapMaker/Exp3.0 软件进行连锁分析, 用 Kosambi 函数将重组率转换成遗传距离。结果表明, 标记 BNL1673 与无蜜腺性状基因的遗传距离为 1.33 cM。

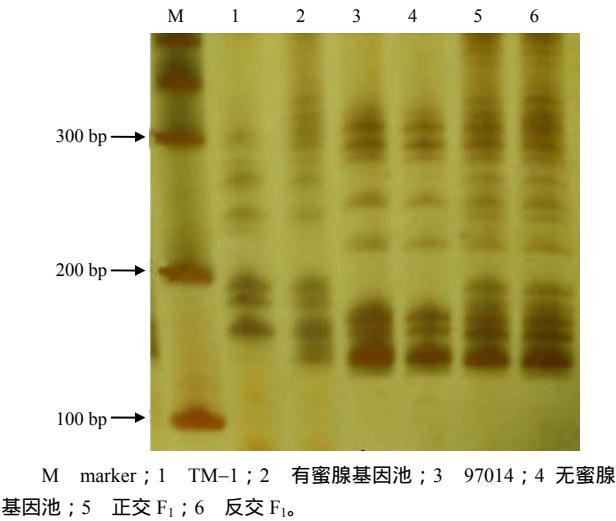


图 1 BNL1673 引物在亲本和有、无蜜腺基因池间 PCR 检测结果

Fig.1 Electrophoresis of PCR products from parents and gene pool with or without nectary character using primer BNL1673

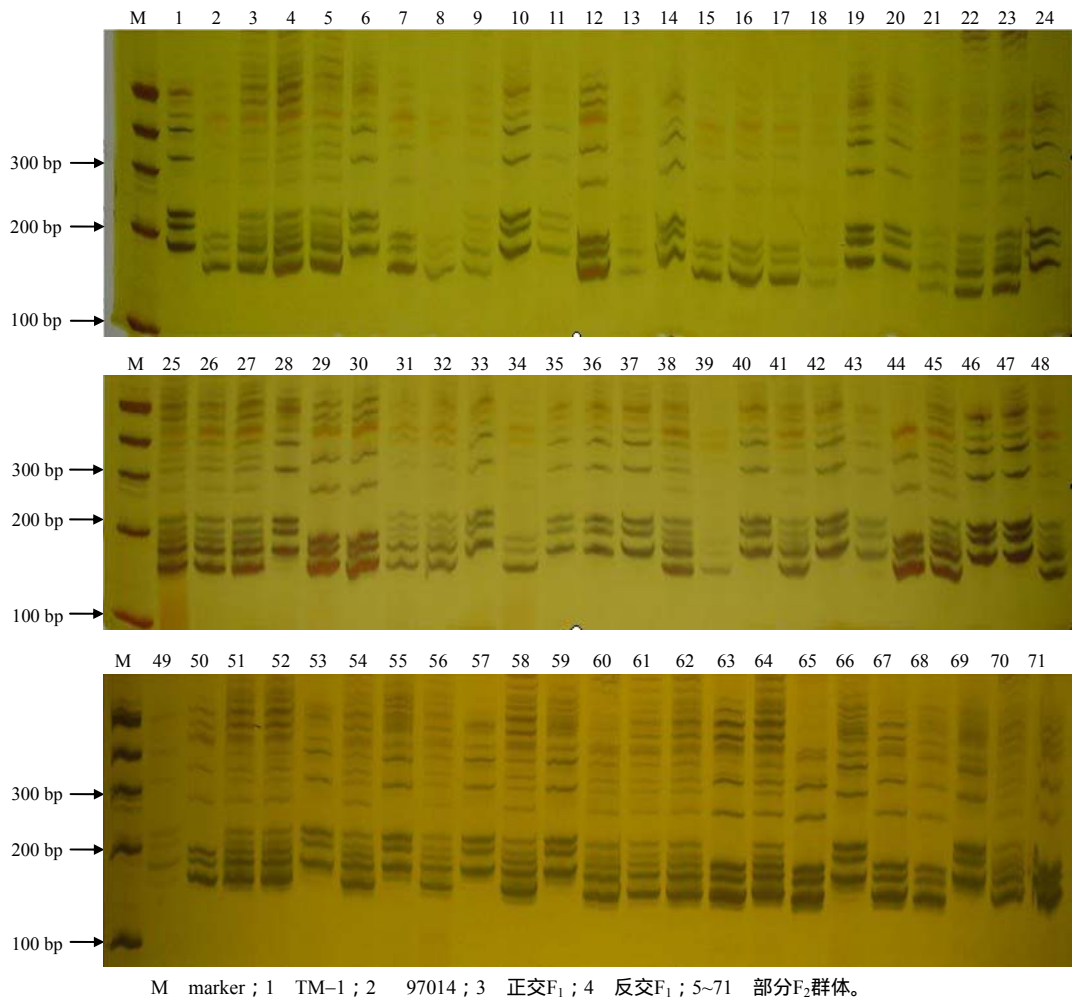


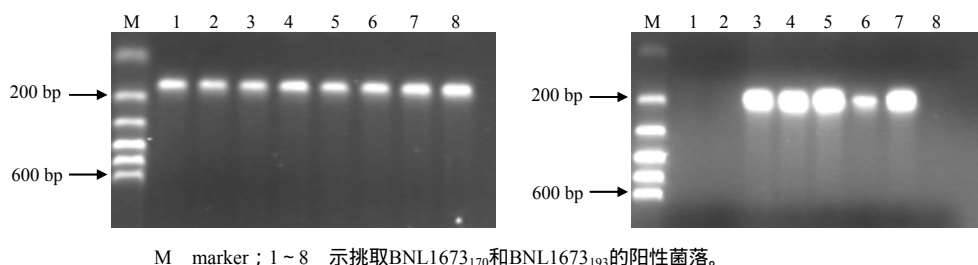
图 2 引物 BNL1673 在双亲、F₁ 及部分 F₂ 群体中的检测结果

Fig.2 SSR profiles generated by primer BNL1673 in two parental lines, F₁ and F₂ population

2.3 SSR 标记的克隆与测序结果

用 Poly-Gel 聚丙烯酰胺 DNA 回收试剂盒分别回收 TM-1 和 97014 的特征片段, 将回收的片段连接到 PMD 18-T Vector, 转化到大肠杆菌 (DH5- α) 中。

蓝白斑筛选显示有白色菌落的阳性克隆出现, 说明特异片段已插入载体, 并获得了重组克隆。通过菌落 PCR 检测, 检测到与目的片段一致的片段 (图 3)。



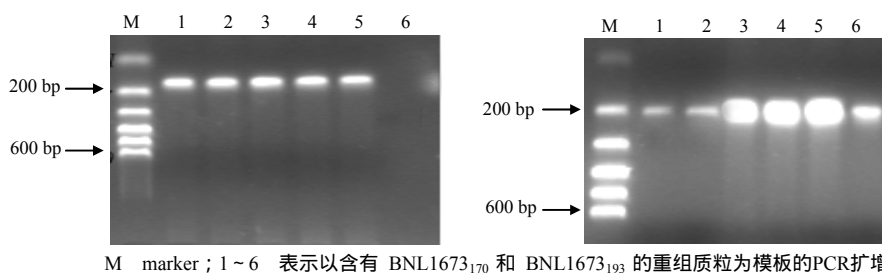
M marker; 1~8 示挑取 BNL1673₁₇₀ 和 BNL1673₁₉₃ 的阳性菌落。

图 3 BNL1673₁₇₀ (左) 和 BNL1673₁₉₃ (右) 的菌落 PCR 检测结果

Fig.3 PCR identification of positive colonies containing BNL1673₁₇₀ (L) and BNL1673₁₉₃ (R)

以 BNL1673 为引物进行质粒 PCR, 得到了 170 和 200 bp 左右的目的片段 (图 4), 进一步证明了重组

质粒中含有目的片段。



M marker; 1~6 表示以含有 BNL1673₁₇₀ 和 BNL1673₁₉₃ 的重组质粒为模板的 PCR 扩增。

图 4 BNL1673₁₇₀ (左) 和 BNL1673₁₉₃ (右) 的质粒 PCR 检测结果

Fig.4 PCR identification of recombinant plasmids containing BNL1673₁₇₀ (L) and BNL1673₁₉₃ (R)

测序结果 (图 5) 显示, 在片段大小所在区域内, 判读结果准确。特异标记 BNL1673₁₇₀ 和

BNL1673₂₀₀ 的实际长度分别为 170 bp 和 193 bp。

BNL1673₁₇₀: 5'-CTCTTAATGCTTGGCCTTGGATAGAGTTGAATTATGTTTGTAGAACAACAAA_____GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGAGTAGTGTATCCTTATGCAGGTGACTTAAGTTTTGGTCTTTGCTCATT TTGACAGAAAGTGTACTACTACTTATATAGTGCCGAGTCCGGTACTA 3'

BNL1673₁₉₃: 5'-CTCTTAATGCTTGGCCTTGGATAGAGTTGAATTATGTTTGTAGAACAACAAA[GAGGGACAGTAGTGTATCCTTATGCAGGTGACTTAAGTTTTGGTCTTTGCTCATT TTGACAGAAAGTGTACTACTACTTATATAGTGCCGAGTCCGGTACTA 3'

图 5 SSR 标记 BNL1673₁₇₀ 和 BNL1673₁₉₃ 的 DNA 测序结果

Fig.5 Sequence of SSR marker BNL1673₁₇₀ and BNL1673₁₉₃

2.4 SSR 标记转化为 SCAR 标记的鉴定

根据 SSR 标记 BNL1673₁₇₀、BNL1673₁₉₃ 的两段序列, 采用 Primer5.0 软件, 设计 SCAR 引物 (SCB1673 正向 5'-CTCTTAATGCTTGGCCTTGGT AG-3', SCB1673 反向 5'-TACCGGACTCGGCACT ATATA-3'), 序列长度在 18~23 bp。用 SCAR 引物对 TM-1 和 97014 两亲本及其正、反交组合的 F₁

进行扩增。结果表明, SCAR 引物 SCB1673 能扩增出 2 条与 SSR 引物 BNL1673 扩增大小相同的特异带 (图 6); SCB1673₁₉₃, SCB1673₁₇₀ 在正交组合的 263 个 F₂ 单株中的带型分布与 BNL1673₁₉₃、BNL1673₁₇₀ 完全一致 (图 7)。因此, 已成功将 SSR 标记转化为 Scar 标注, 此标记可以用于棉花无蜜腺性状的分子标记辅助选择。

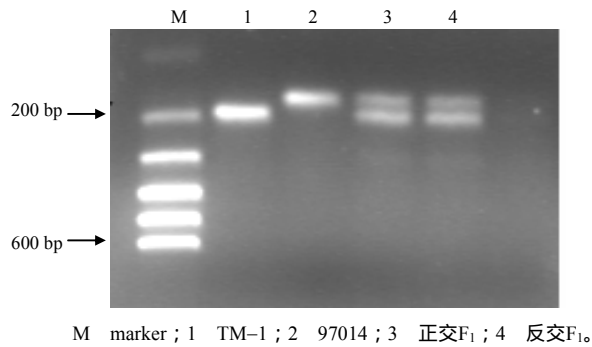


图 6 引物 SCB1673 在亲本及其 F₁ 中的扩增结果

Fig.6 Amplification of two parents and F₁ population with primer SCB1673

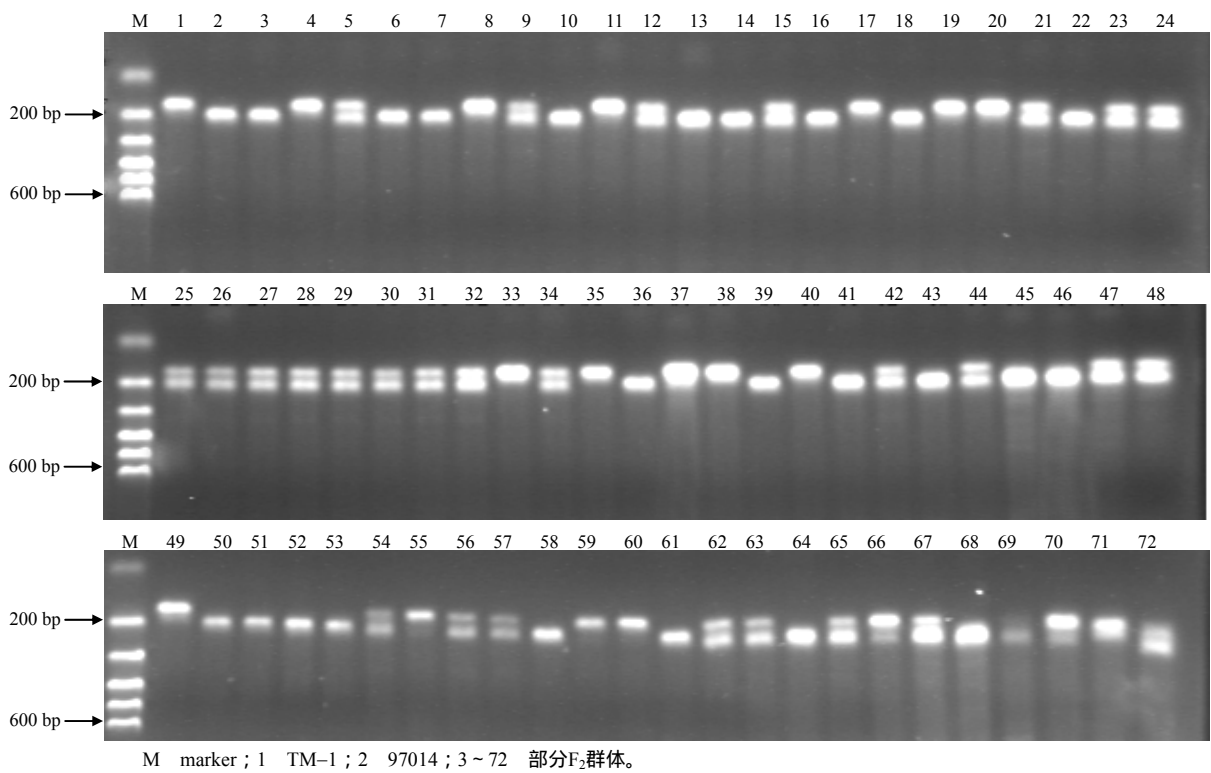


图 7 引物 SCB1673 在部分 F₂ 群体中的扩增结果

Fig.7 Amplification of F₂ population of TM-1×98014 with primer SCB1673

3 结论与讨论

a. 大多数棉花具有花蜜腺、花外蜜腺和叶蜜腺。J.R. Meyer 和 V.G. Meyer^[23]将无蜜腺性状转入陆地棉，并且确定无蜜腺性状受 2 对隐性基因所控制，当 ne₁ 和 ne₂ 纯合时，表现为棉花叶片、苞叶基部、苞叶内均无蜜腺。本研究结果表明：蜜腺性状有、无的比例经过卡方适合性测验，正、反交的 F₂ 代蜜腺性状的有、无均符合 15 : 1 的分离规律，这

表明 97014 棉的无蜜腺性状是由双隐性基因所控制，当 2 对基因纯合表达时，表现为棉花叶片、苞叶基部、苞叶内均无蜜腺。这与 J.R. Meyer 和 V.G Meyer 研究的结果一致，进一步证明了陆地棉的无蜜腺性状是由 2 对隐性基因所控制的质量性状。

b. 陆地棉之间 SSR 多态性很低，本研究合成了 203 对 SSR 引物，其中，在亲本之间具有多态性的引物仅为 5%。利用 BSA 法从 F₂ 分离群体中选取完全纯合的有蜜腺单株和无蜜腺单株，构建 2 个混

合 DNA 样品池, 两池在所选择的的目的基因及其附近的区域存在多态性差异, 而其他区域相同。通过 SSR 标记分析, 在两池中找到了有差异的分子标记 BNL1673, 重复性较好。利用该标记对 283 株 F_2 分离群体进行验证, 通过数据和软件分析, 共显性的 SSR 标记 BNL1673₁₉₃、BNL1673₁₇₀ 与无蜜腺性状基因相距 1.33 cM, 而且 SSR 标记 BNL1673 位于棉花 22 号染色体上, 初步认为无蜜腺性状基因可能位于棉花 22 号染色体上, 其位置还有待于进一步研究。

c. 用 SSR 引物 BNL1673 扩增出的产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳出的条带比较多, 难以分辨有无, 将这些难以分辨的带进行回收、测序, 根据序列重新设计 1 对特异 PCR 引物, 转化为扩增产物有无蜜腺的 SCAR 标记 SCB1673₁₉₃、SCB1673₁₇₀。该引物对 97014× TM-1 正交组合的 F_2 群体扩增结果与 SSR 引物 BNL1673 分析结果完全吻合, 能够明显地区分蜜腺的有无, 表明已经成功地将 SSR 标记 BNL1673 转化为 SCAR 标记。转化之后的 SCAR 标记可以用 1.5% 的琼脂糖电泳分离出明显的差异带, 且成本降低, 特异性和稳定性更高。SCAR 标记 SCB1673₁₉₃、SCB1673₁₇₀ 对于棉花蜜腺基因标记辅助选择育种和抗虫鉴定有广泛的应用前景。

参考文献:

- [1] 潘家驹, 尔·其·柯尔. 陆地棉第 12 染色体易位断点的图谱定位[J]. 南京农业大学学报, 1982, 5(4): 17-22.
- [2] 吴征兵, 张金发, 冯纯大, 等. 棉花抗虫新杂交材料研究[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(4): 307-310.
- [3] 潘家驹, 阎留芳, 刘康, 等. 陆地棉芽黄基因应用于杂种棉的研究[J]. 南京农业大学学报, 1998, 21(3): 7-14.
- [4] 刘文萍, 刘建平, 胡莹. 棉花无腺体指标指示性状杂种优势研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(1): 105-108.
- [5] 朱四元, 陈金湘, 李瑞莲, 等. 陆地棉无蜜腺性状的形态学和细胞学特征[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 36(4): 377-380.
- [6] Hao C Y, Wang L F, Jia J Z, et al. Comparison of fluorescence and silver-staining detection systems of microsatellite markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 144-149.
- [7] 宋振云, 杨志敏, 陈旭升. 陆地棉亚红株突变体基因的初步定位[J]. 作物学报, 2007, 33(3): 511-513.
- [8] Shen X L, Zhu J, Zhang X G, et al. Introgression of *Gossypium klotzschianum* genome into cultivated cotton, *G. hirsutum*[J]. Cotton Science, 2008, 20(4): 256-263.
- [9] 周仲华, 陈金湘. 棉花 QTL 定位原理、方法及研究进展[J]. 江西农业学报, 2005, 17(4): 106-111.
- [10] 薄天岳, 叶华智, 王世全, 等. 亚麻抗锈病基因 *M4* 的特异分子标记[J]. 遗传学报, 2002, 29(10): 922-927.
- [11] 赵晓彦, 王晓鸣, 王述民. 普通菜豆抗炭疽病基因 SCAR 标记鉴定[J]. 作物学报, 2007, 33(11): 1815-1821.
- [12] Wang C H, Wang Q, Dai H Y, et al. Development of a SCAR marker linked to *Co* gene of apple from an AFLP marker[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(2): 100-104.
- [13] 刘俊峰, 张国珍, 马秋娟, 等. 一个与稻瘟病菌无毒基因 AVR-Pik ~ m 连锁的 SCAR 标记的分离[J]. 植物病理学报, 2003, 33(2): 151-155.
- [14] 罗素兰, 贺普超, 周鹏, 等. 与葡萄抗霜霉病基因紧密连锁的分子遗传标记[J]. 遗传学报, 2001, 28(1): 76-82.
- [15] 田义柯, 王彩虹, 戴洪义, 等. 与苹果 *Co* 基因紧密连锁的 RAPD 标记的筛选及其 SCAR 标记转换[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 919-925.
- [16] 阎乃红, 陈静, 马欣荣, 等. 小麦抗禾谷类根线虫基因及 Rkn-mnl 的 SCAR 标记[J]. 应用与环境生物学报, 2003, 9(3): 250-253.
- [17] 雷永, 廖伯寿, 王圣玉, 等. 花生黄曲霉侵染抗性的 SCAR 标记[J]. 遗传, 2006, 28(9): 1107-1111.
- [18] 张增艳, 辛志勇, 陈孝, 等. 源于 L1 的小麦抗黄矮病基因的特异 PCR 标记及辅助育种的研究[J]. 作物学报, 2002, 28(4): 486-491.
- [19] 宋国立, 崔荣霞, 王坤波, 等. 改良 CTAB 法快速提取棉花 DNA[J]. 棉花学报, 1998, 10(5): 273-275.
- [20] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R W. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregate analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832.
- [21] Lander E S, Green E, Abrahamson J, et al. MapMaker: An interactive computer package for constructing primary genetic maps of experimental and natural populations[J]. Genomics, 1987(1): 174-181.
- [22] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values[J]. Ann Eugen, 1944, 12: 172-175.
- [23] Meyer J R, Meyer V G. Origin and inheritance of nectariless cotton[J]. Crop Sci, 1961(1): 167-169.

责任编辑: 杨盛强