

## 海岛棉抗黄萎病基因 SSR 标记研究

甄 瑞, 王省芬, 马峙英\*, 张桂寅, 王 雪

(河北农业大学, 河北省作物种质资源重点实验室, 保定 071001)

**摘 要:**以高抗黄萎病的海岛棉品种 Pima 90-53 和高感黄萎病的陆地棉品种中棉所 8 号的 182 个  $F_2$  单株为标记群体, 在田间病圃中鉴定  $F_2$  单株, 并通过培养室人工接菌法鉴定  $F_{2,3}$  家系, 以进一步确定相应  $F_2$  单株的抗病性, 经  $\chi^2$  适合性测验, 抗病、感病植株比例符合 3 : 1。采用混合分组分析法(BSA)对 768 对 SSR 引物进行筛选, 发现引物 BNL2440 和 BNL3255 在抗、感 DNA 池呈现多态性, 其中 BNL3255 在抗、感 DNA 池之间扩增出一条大小为 208bp 的多态性片段, 定名为 BNL3255-208。以 Mapmaker/Exp(Version3.0b)软件分析  $F_2$  单株检测结果, BNL3255-208 标记与棉花黄萎病抗性位点之间的遗传距离为 13.7 cM。

**关键词:**棉花; 黄萎病; 混合分组分析法(BSA); 分子标记; SSR

**中图分类号:** S435.621.2      **文献标识码:** A

**文章编号:** 1002-7807(2006)05-0269-04

## A SSR Marker Linked with the Gene of *Verticillium* Wilt Resistance in *Gossypium barbadense*

ZHEN Rui, WANG Xing-fen, MA Zhi-ying\*, ZHANG Gui-yin, WANG Xue

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001, China)

**Abstract:** One hundred and eighty-two  $F_2$  individuals from the cross between the susceptible *Gossypium hirsutum* CCRI 8 and the resistant *G. barbadense* Pima 90-53 were exploited to detect the SSR molecular marker linked with gene of *Verticillium* wilt resistance. Each  $F_2$  individual descended its  $F_{2,3}$  line through self crossing. The resistance of the  $F_2$  individuals was determined in the field disease nursery. All of the  $F_{2,3}$  lines were tested in the growth chamber to verify the resistance of the relevant  $F_2$  individuals. The results showed that 140  $F_2$  plants were resistant and 42  $F_2$  plants susceptible. The ratio of  $F_2$  resistant plants and the susceptible was 3 : 1, and it accorded with the  $\chi^2$  test. Genomic DNAs of all plants were extracted by CTAB method. Based on the resistance of  $F_2$  plants, 10 resistant and 10 susceptible plants' DNAs were chosen to make up of the resistant and susceptible gene pools, respectively. Seven hundred and sixty-eight pairs of SSR primers were screened using the gene pools. Out of these primers, BNL2440 and BNL3255 showed polymorphic between resistant and susceptible DNA pools, and the parents also had the same polymorphic markers on the same locus. The polymorphic marker amplified by BNL2440 did not link with the resistance gene. A polymorphic fragment of 208bp amplified by BNL3255 primer was designated as BNL3255-208. It was found that the genetic distance between the locus of *Verticillium* wilt resistance and BNL3255-208 marker was 13.7cM when calculated by Mapmaker/Exp (Version3.0b) software. BNL3255 marker was located on the short arm of No. 5 chromosome (c5sh). It can be used in marker assisted selection (MAS) of breeding resistant varieties and lay a foundation for cloning resistance genes.

**Key words:** cotton; *Verticillium* wilt; bulked segregant analysis(BSA); molecular marker; SSR

**收稿日期:** 2005-11-23      **作者简介:** 甄 瑞(1981-), 女, 在读硕士; \* 通讯作者, mzhy@mail.hebau.edu.cn

**基金项目:** 国家重大基础研究前期研究专项(2004CCA01100); 河北省自然科学基金(C2005000231); 教育部重点科技项目(205018); 河北省普通高等学校博士科研资助基金(B2004113)

黄萎病是影响我国广大棉区棉花高产、稳产、优质的主要病害。实践证明,种植抗病品种是控制棉花黄萎病经济有效的途径。长期以来,棉花抗黄萎病育种未取得明显突破,其主要原因之一是没有突出的抗源材料。研究表明,海岛棉对黄萎病的抗性较强,且受显性单基因或主效基因控制<sup>[1-2]</sup>。因此,可以将海岛棉作为黄萎病抗源材料在棉花抗黄萎病育种中加以利用。

近年来,随着分子标记辅助选择(MAS)育种技术的研究与应用,为克服向陆地棉转育海岛棉优异经济性状所需周期长、准确性差的常规育种难题提供了技术保障。关于棉花黄萎病抗性分子标记的研究,房卫平等<sup>[3]</sup>以陆地棉抗黄萎病品种和感黄萎病品种的  $F_2$  为材料,采用 BSA 法找到 1 个与黄萎病抗性基因连锁的 RAPD 标记。又以 2 个陆地棉近等基因系及其  $F_2$ 、 $F_3$  群体为材料,发现 1 个与黄萎病抗性基因相连锁的 AFLP 标记。齐俊生等<sup>[4]</sup>、杜威世等<sup>[5]</sup>以抗黄萎病海岛棉品种和感黄萎病陆地棉品种的  $F_2$  为材料,分别得到 1 个与抗黄萎病基因相关的 AFLP 和 SSR 标记。

本课题组的遗传研究表明<sup>[1]</sup>,海岛棉品种 Pima 90-53 对强致病力和中等致病力菌系表现为高抗,在与我国陆地棉品种杂交后代中,其抗病性表现为由显性单基因控制的质量遗传方式。因此,该品种被多个研究单位作为棉花遗传图谱构建、抗病基因表达分析、细菌人工染色体(BAC)文库创建的遗传材料。但关于其黄萎病抗性基因分子标记的研究报道甚少。本研究利用 SSR 分子标记技术,以 Pima 90-53 和感病陆地棉品种中棉所 8 号为亲本,利用其  $F_2$  代分离群体寻找与海岛棉黄萎病抗性基因相关的分子标记,为定位和克隆海岛棉黄萎病抗性基因及分子标记辅助选育抗病品种提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

以高抗黄萎病的海岛棉品种 Pima 90-53 为父本、高感黄萎病的陆地棉品种中棉所 8 号为母本,配制杂交组合,获得  $F_2$  代种子;并通过自交  $F_2$  单株获得  $F_{2,3}$  家系。

768 对 SSR 引物均由上海生工生物工程有限公司合成。PCR 反应所需 Taq DNA 聚合酶、dNTP 和 PCR Buffer 等均由 TaKaRa 公司生产。

### 1.2 抗病性鉴定

亲本及  $F_2$  群体的抗病性鉴定在河北农业大学棉花育种田间病圃中进行,分别于 7 月中旬和 8 月中下旬进行两次抗性调查,棉株病情分级标准与品种的抗病类型划分参照中国棉花遗传育种学<sup>[6]</sup>。 $F_{2,3}$  家系抗性鉴定在光温可控的培养室中进行,每个  $F_2$  单株对应的  $F_{2,3}$  家系 25 株棉苗。待棉苗长至两叶一心时采用塑料钵底部菌液灌根法接种,接种前轻微伤根,接种菌系为中等致病力菌系,接种后第 14 天进行棉苗第一次抗性调查,第 25 天和第 35 天进行第二次、第三次抗性调查。采用棉花苗期 5 级制进行黄萎病分级<sup>[7]</sup>。将 0、1、2 级定为抗病,3、4 级植株定为感病。田间和室内抗性鉴定均以最后一次抗性调查为准。

### 1.3 棉花基因组 DNA 提取

在发病前从田间取  $F_2$  群体每个单株的中、上部幼嫩叶片,参考王省芬等<sup>[8]</sup>所述方法,提取棉花基因组 DNA。

### 1.4 BSA(Bulked Segregation Analysis)分池

参照 Michelmore 等<sup>[9-10]</sup>提出的 BSA 方法,从  $F_2$  群体中选取 10 株高抗单株和 10 株高感单株,将其 DNA 分别等量混合,构成抗病和感病 DNA 池,用于引物筛选。

### 1.5 PCR 扩增

PCR 反应体系为 10  $\mu$ L,包括 40 ng 模板 DNA,2.5 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> dNTP 0.8  $\mu$ L,0.16U Taq DNA 聚合酶,1.0  $\mu$ L 10 $\times$  Buffer(含 20 mmol  $\cdot$  L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>),10 ng  $\cdot$   $\mu$ L<sup>-1</sup>。正向和反向引物各 0.35  $\mu$ L。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 预变性 3 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,55 $^{\circ}$ C(可根据不同引物选取不同退火温度)退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,共进行 35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,10 $^{\circ}$ C 保存。扩增反应在 Biometra Tg PCR 仪上进行。扩增产物在浓度为 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳,用银染法检测<sup>[11]</sup>。

### 1.6 数据处理

按照常规的 Mapmaker 数据记录方法统计带型数据,采用 Mapmaker/Exp(Version3.0b)软件对实验结果进行连锁分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 $F_2$ 群体和 $F_{2,3}$ 家系抗性鉴定结果

由表 1 可以看出,高抗黄萎病的海岛棉亲本 Pima 90-53 与高感黄萎病的陆地棉亲本中棉所 8 号的  $F_2$  群体,田间调查抗病株占大多数,感病株

占少部分,呈偏态分布,符合 3 : 1 分离规律。

对 F<sub>2,3</sub>家系抗病性鉴定结果的  $\chi^2$  适合性测验表明,其相应的 F<sub>2</sub> 单株抗、感植株比例符合 3

: 1 分离比例,说明海岛棉品种 Pima 90-53 对中等致病力菌系的抗性表现为显性单基因控制的质量性状遗传。

表 1 F<sub>2</sub> 和 F<sub>2,3</sub>家系抗病性鉴定

Table 1 The identification of resistance to *Verticillium dahliae* of F<sub>2</sub> and F<sub>2,3</sub>

世代	鉴定方法	总株数	抗病株数	感病株数	期望比	$\chi^2$ 值
F <sub>2</sub>	田间病圃	182	145	37	3 : 1	1.875
F <sub>2,3</sub> 家系	培养室接种	182	140	42	3 : 1	0.264

$\chi^2_{(0.05,1)} = 3.84$

2.2 SSR 引物筛选

利用 768 对棉花 SSR 引物,在抗、感 DNA 池间进行初步筛选,有 2 对 SSR 引物在两池间扩增出明显不同的 SSR 标记(表 2),分别为 BNL3255 和 BNL2440。其中多态性引物占引物总数的 0.26%,两对多态性引物在抗、感基因池间共扩增

出 7 条多态性带。

利用 2 对在抗、感基因池间表现出差异的引物对亲本进行扩增,以验证其多态的真实性。引物 BNL3255 和 BNL2440 在亲本间也扩增出明显的多态性带,且抗病亲本与抗病池表现一致,感病亲本与感病池表现一致(表 2)。

表 2 抗、感 DNA 池及亲本 PCR 扩增结果

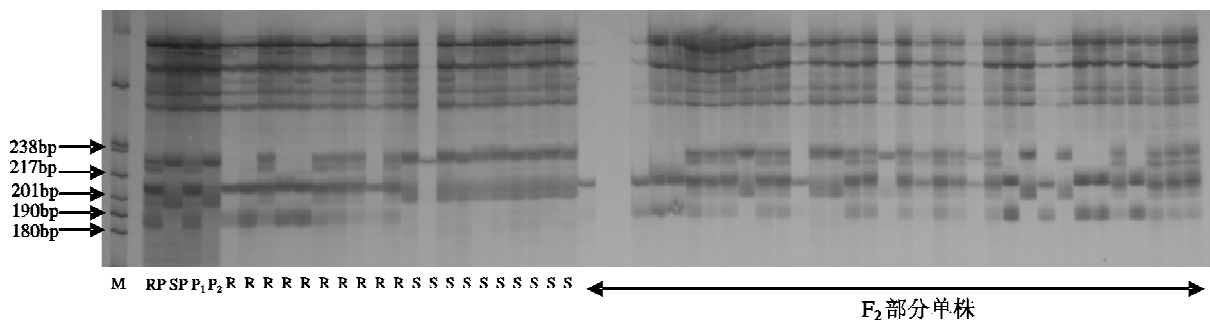
Table 2 Amplification patterns between resistant and susceptible gene pools and between the parents

引物名称	扩增结果(bp)			
	抗病池	抗病亲本	感病池	感病亲本
BNL3255	208	208	—	—
	—	—	195	195
	185	185	—	—
BNL2440	—	—	232	232
	216	216	—	—
	—	—	209	209
	202	202	—	—

2.3 F<sub>2</sub> 群体特异性 SSR 引物扩增结果

利用 2 对特异性引物对 F<sub>2</sub> 群体进行扩增,发现在大多数抗病单株中都存在 BNL3255-208 这一标记,而大多数感病单株中均没有这一标记(图

1)。BNL2440 的多态性标记发生了较多的重组,即有些感病的单株中存在抗病单株的多态性带,有些抗病单株中也存在感病单株上的多态性带。



M-DNA 分子量标记;RP-抗病 DNA 池;SP-感病 DNA 池;P<sub>1</sub>-抗病亲本;P<sub>2</sub>-感病亲本;R-抗病单株;S-感病单株

图 1 SSR 引物 BNL3255 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification result by SSR primer BNL3255

2.4 分子标记与抗黄萎病基因之间的遗传连锁分析

用引物 BNL3255 对 182 个 F<sub>2</sub> 单株 DNA 进行扩增,结果表明,140 个抗病单株中有 129 个扩增出大小为 208bp 的标记(BNL3255-208),另有 10 个抗病单株未扩增出该标记;42 个感病单株中 26 个未

扩增出 BNL3255-208 标记,另有 14 个感病单株扩增出该标记;有 3 个 F<sub>2</sub> 单株没有扩增结果。

利用 Mapmaker/Exp (Version3.0b) 软件分析,在最小似函数值 LOD=3.0,最大遗传距离为 50 cM 时,计算出 BNL3255-208 与抗病基因位点之间的遗传距离是 13.7 cM。BNL2440 与抗病

基因不连锁。可初步认定,海岛棉品种 Pima 90-53 的黄萎病抗性基因与 SSR 标记 BNL3255-208 连锁。

### 3 讨论

$F_2$  单株的抗病性鉴定是利用 BSA 法进行抗病基因定位的重要环节。通常  $F_2$  代群体抗、感植株的确定是以单株病级来划分,0 级、1 级和 2 级单株为抗病单株,3 级和 4 级单株为感病单株。在抗病性鉴定中,单纯针对某一单株的病级来确定其抗、感类型不够准确,因为单株病级除受本身遗传因素影响外,还受其它因素的影响。若对每个  $F_2$  单株产生的  $F_{2,3}$  家系进行抗病性鉴定,以  $F_{2,3}$  家系群体的抗病性评价  $F_2$  单株的抗性,则能更准确地反映出  $F_2$  单株的抗病性<sup>[3,5,12]</sup>。本试验的  $F_2$  代分离群体的抗病性鉴定是在田间病圃进行的,均匀一致的田间病圃保证了发病的可靠性,且通过  $F_{2,3}$  家系的生长室鉴定,使得抗性鉴定结果更为准确。

目前,通过对棉花 EST 数据库的大量筛选,找到了棉花特异性的 SSR 引物,并已广泛应用于遗传作图和基因定位中<sup>[5,12-14]</sup>。高玉千等<sup>[12]</sup>利用 RAPD 及 SSR 标记,以海岛棉和陆地棉的  $F_2$  代作为作图群体,构建了 17 个连锁群,并从中检测出 3 个与黄萎病抗性相关的 QTL。杜威世等<sup>[5]</sup>以高抗黄萎病的海岛棉品种和高感黄萎病的陆地棉品种的  $F_2$  代做为标记群体,采用 BSA 法筛选引物,得到一个与抗黄萎病基因相关的 SSR 标记 BNL3556-147,且标记与位点相距 13.1 cM。王红梅等<sup>[13]</sup>利用感黄萎病陆地棉品种和抗黄萎病海岛棉品种杂交产生的  $F_2$  为材料,采用 SSR 标记构建了 42 个连锁群,检测出与抗黄萎病相关的 6 个 QTL。本研究使用前人研究<sup>[5,13]</sup>中发现的与抗病基因或 QTL 相关的引物进行扩增,本试验材料均无多态性产生,可能与所用材料不同有关。

本研究利用  $F_2$  代群体找到的海岛棉黄萎病抗性基因连锁的分子标记 BNL3255-208,位于第 5 号染色体的短臂上,属于 Guazuncho 2×VH8-4602 群体的 LGA02 连锁群<sup>[14-16]</sup>。该标记为黄萎病抗性的分子标记辅助选择奠定了基础,目前,我们正在培养室中种植一定数量的海陆杂种后代选系,对 BNL3255-208 标记进行应用性验证,进一步确定该分子标记的应用价值。

### 参考文献:

- [1] 马峙英,王省芬,张桂寅,等. 不同来源海岛棉品种黄萎病抗性遗传研究[J]. 作物学报,2000,26(3):315-321.
- [2] 房卫平,祝水金,季道藩. 陆地棉和海岛棉的黄萎病抗性遗传研究[J]. 棉花学报,2003,15(1):3-7.
- [3] 房卫平,许守明,孙玉堂,等. 棉花抗黄萎病的 RAPD 标记[J]. 河南农业科学,2001(9):11-13.
- [4] 齐俊生,马存,赵良忠,等. 海岛棉品种抗黄萎病遗传规律初步研究[J]. 棉花学报,2000,12(4):169-171.
- [5] 杜威世,杜雄明,马峙英. 棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2004,32(3):20-24.
- [6] 黄滋康. 中国棉花遗传育种学[M]. 济南:山东科学技术出版社,2003:477-478.
- [7] 石磊岩,王波,文学. 我国棉花黄萎病菌类型分化及培养特性研究[J]. 植物保护学报,1993,20(3):247-251.
- [8] 王省芬. 中国棉花抗枯、黄萎病品种的抗性与 DNA 指纹图谱研究[D]. 保定:河北农业大学,2003.
- [9] MICHELMORE R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991,88: 9828-9832.
- [10] MACKAY I J, Caligari P D S. Efficiencies of  $F_2$  and backcross generations for bulked segregant analysis using dominant markers [J]. Crop Sci,2000,40:626-630.
- [11] 温小杰,马峙英,王省芬,等. 中国抗枯、黄萎病陆地棉材料分子水平的遗传差异评价[J]. 中国农业科学,2005,38(5):936-943.
- [12] 高玉千,聂以春,张献龙,等. 棉花黄萎病基因的 QTL 定位[J]. 棉花学报,2003,15(2):73-78.
- [13] 王红梅. 棉花黄萎病遗传及分子标记研究[D]. 武汉:华中农业大学,2005.
- [14] NGUYEN T B, Giband M, Brottier P, et al. Wide coverage of the tetraploid cotton genome using newly developed micro-satellite markers [J]. Theor Appl Genet,2004,109:167-175.
- [15] LACAPE J M, Nguyen T B, Thibivilliers S, et al. A combined RFLP-SSR-AFLP map of tetraploid cotton based on a *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense* backcross population [J]. Genome,46:612-626.
- [16] LIU S, Saha S, Stelly D, et al. Chromosomal assignment of microsatellite loci in cotton [J]. The American Genetic Association,2001,91:326-332. ●