

棉花黄萎病抗性基因 SSR 标记研究^{*}

杜威世^{1,2}, 杜雄明¹, 马峙英²

(1 中国农业科学院 棉花研究所, 河南 安阳 455004; 2 河北农业大学 农学院, 河北 保定 071001)

[摘 要] 以高抗黄萎病的海岛棉品种“II 15-3493”和高感黄萎病的陆地棉品种“石河子 875”的 F_2 代单株作为标记群体, 采用 BSA 法筛选多态性引物, 构建了 1 个包括 3 个 SSR 引物在内的连锁群。通过 Mapmaker 软件将与黄萎病抗性有关的 1 个位点定位在该连锁群, 该位点与 SSR 标记 BNL 3556 相距 13.1 cM, 可解释表型变异方差的 50.1%, 为主效基因位点。

[关键词] 棉花; 黄萎病; 分子标记; 连锁图; SSR

[中图分类号] S435.621.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)03-0020-05

棉花黄萎病是世界公认的棉花主要病害之一, 在我国已遍布各大棉区, 成为棉花高产、稳产、优质的主要障碍。实践证明, 种植抗黄萎病品种是控制棉花黄萎病经济有效的唯一途径。长期以来, 在棉花黄萎病育种工作中未取得明显突破, 其主要原因之一是没有突出的抗原材料。用传统育种方法培育抗黄萎病材料需要的周期过长, 无法满足生产上的迫切需要。

近年来, 随着分子生物学技术在棉花上的应用, 为通过基因工程手段创制新抗源打下了坚实基础。分子标记是探寻植物基因的常用方法, 也是定位和克隆基因的基础。目前已构建了多张棉花分子标记遗传连锁图, 并对一些重要农艺性状进行了定位^[1~7]。本研究利用 SSR 分子标记, 以海岛棉×陆地棉为杂交亲本, 利用其 F_2 代寻找与黄萎病抗性基因有关的标记检测, 为分子标记辅助选择育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以高抗黄萎病的海岛棉品种“II 15-3493”为母本, 高感黄萎病的陆地棉品种“石河子 875”为父本, 于河南安阳中国农科院棉花所配制杂交组合, 收获杂交种子, 同年在海南岛基地种植, 收获 F_2 代种子; 次年在河南安阳种植亲本品种和 F_2 代群体, 并通过 F_2 单株自交获得 F_3 家系。

216 对 SSR 引物序列来自 Cotton DB 数据库 (<http://algodon.tamu.edu/htdocs-cotton/cottondb.html>) 的 BNL (Brookhaven National Laboratory) 序列, 由上海 Sangon 公司合成。反应所用 *Taq* 酶、dNTP 和 PCR Buffer 等由北京鼎国公司生产。

1.2 抗病鉴定

亲本抗病抗性鉴定采用无底纸钵菌液蘸根法, 于苗期在中国农科院棉花所植保室河南安阳棉花黄萎病人工病圃中进行, 棉苗病情分级标准、病情指数与品种的抗病类型划分参照文献^[8]。

病圃为长 20 m, 宽 2.5 m 的人工接种病池。每个供试亲本品种为 1 行区, 行距 50 cm, 株距 20 cm, 3 次重复, 随机排列。以冀棉 11 为感病对照, 豫棉 2067 为抗病对照。病原菌为安阳菌系, 具有中等致病力。在播种沟内按 10 g/m 接入黄萎病菌棉籽接种物, 播种时与土壤充分混匀。

$F_{2:3}$ 家系抗病性鉴定在温室中进行, 采用无底纸钵菌液蘸根法接种, 接种菌系为致病力中等的安阳菌系, 由中国农科院棉花所植保室提供。在群体普遍发病后进行病情调查, 以 $F_{2:3}$ 病情指数作为 F_2 代抗性标准。

1.3 棉花基因组 DNA 提取

参考 Paterson^[9]、宋国立等^[10]、张金发等^[11] 的方法, 提取棉花叶片 DNA。

^{*} [收稿日期] 2003-08-27

[基金项目] “十五”国家重点科技攻关项目(2001BA511B05)

[作者简介] 杜威世(1977-), 男, 河北石家庄人, 在读硕士, 主要从事棉花黄萎病抗性遗传研究。

[通讯作者] 杜雄明(1963-), 男, 四川南充人, 副研究员, 博士。主要从事作物遗传育种和棉花种质资源研究。E-mail: ducui@public.aypht.ha.cn

1.4 BSA (Bulked Sergeant Analysis) 分池

参照M ichelmore 提出的BSA 方法, 根据 F_{2:3} 家系温室鉴定的病情指数, 从 F₂ 群体中选取 10 株高抗单株, 10 株高感单株, 将其DNA 分别等量混合, 构成抗病、感病基因池。

1.5 PCR 扩增

PCR 反应体系 10 μL, 包括 1.0 μL 10×Buffer (含 20 mmol/L Mg²⁺), 50 ng 模板 DNA, 0.2 mmol/L dNTP, 0.4 U Taq 酶, 0.35 μmol/L 正向和反向引物。扩增程序为: 94℃预变性 5 min, 然后 94℃变性 1 min, 60℃(可根据不同引物选取不同退火温度)退火 50 s, 72℃延伸 50 s, 共进行 30 个循环, 最后 72℃延伸 7 min, 4℃保存。扩增反应在 PTC-100™ PCR 仪上进行。

扩增产物在质量分数 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳, 用 PAGE、银染法检测^[12]。

1.6 数据处理

采用M apmaker/Exp (Version 3.0b) 软件进行

连锁分析, 按照常规的M apmaker 数据记录方法统计带型数据。用M apmaker/Q TL (Version 1.1b) 软件进行基因定位分析。

1.7 标记引物命名方法

标记引物前 3 个字母表示标记引物来源, 后面数字表示标记引物在BNL 中的编号。“-”后数字表示该引物在 F₂ 代所扩增出的纯合抗病带的分子质量。

2 结果与分析

2.1 田间与温室鉴定结果

由表 1 可以看出, 海岛棉高抗病亲本 II 15-3493 与陆地棉高感病亲本石河子 875 的 F₂ 代群体中, 田间调查抗病株占绝大多数, 感病株占少部分, 调查数据呈偏态分布, 不符合 3:1 规律。

表 1 抗黄萎病的田间病圃与温室接种鉴定结果

Table 1 The identification result of resistance to *Verticillium dahliae* in the field and in the greenhouse

世代 Generations	鉴定方式 Identification methods	总株数 Number of all plants	抗病株数 Number of resistant plants	感病株数 Number of non-resistant plants	期望比 Expected ratio	χ ² 值 χ ² value
F ₂	田间病圃 Field	175	146	29	3:1	6.188*
F _{2:3}	温室接种 Greenhouse	175	124	51	3:1	1.388

注(Notes): χ_{0.05,1} = 3.84, χ_{0.01,1} = 6.63。

为了进一步确定抗黄萎病的遗传规律, 采用了更为准确的 F_{2:3} 家系温室鉴定方法。从表 1 可以看出, 在单一中等致病力的安阳菌系接种条件下, F_{2:3} 家系的温室鉴定结果表明, 抗、感植株比例符合 3:1 的 χ² 适合性测验。说明海岛棉品种 II 15-3493 对中等致病力的安阳菌系的抗性, 表现为显性单基因控制的质量性状遗传。

可以认为, 田间调查中 F₂ 代抗病株偏多的原因是: 在海岛棉抗病品种 II 15-3493 的遗传背景下, 杂交后代更多的偏向于海岛棉类型, 抗病机制倾向于海岛棉, 因此后代在田间表现抗病。

2.2 亲本 SSR 引物筛选

用 216 对棉花 SSR 引物, 在海岛棉抗病亲本“II 15-3493”和陆地棉感病亲本“石河子 875”之间进行初步筛选, 有 53 对 SSR 引物在两品种间扩增出明显不同的 SSR 标记, 多态性引物占 24.5%。53 对引物在两亲本间共扩增出 128 条多态性带。

2.3 抗、感基因池筛选结果

利用 53 对在两亲本间有差异的引物对抗、感基

因池进行扩增, 引物 BNL 786、BNL 1414、BNL 3535 和 BNL 3556 在抗感基因池间扩增出明显不同的多态性带(表 2)。

表 2 抗、感基因池 PCR 扩增结果

Table 2 Amplified results between resistant pool and susceptible pool

引物名称 Name of primers	扩增结果/bp Amplified results	
	抗病池 Resistant pool	感病池 Non-resistant pool
NL 786	118	100
BNL 1414	142	130
BNL 3535	150	139
BNL 3556	147	144

注: 泳带分子质量大小根据DNA Marker 估计得出。

Note: The molecular weights of the bands in table 2 are evaluated by DNA Marker

2.4 F₂ 代群体特异性 SSR 引物扩增结果

利用 4 对特异性引物对 F₂ 群体进行扩增(图 1), 经 M apmaker/Exp (Version 3.0b) 软件分析, 在最小似函数值 LOD = 3.0, 最大遗传距离为 50 cM 时, 构建了 1 个由 3 个 SSR 标记位点 BNL 786、BNL 1414 和 BNL 3556 组成的连锁群, 全长为 88 cM。

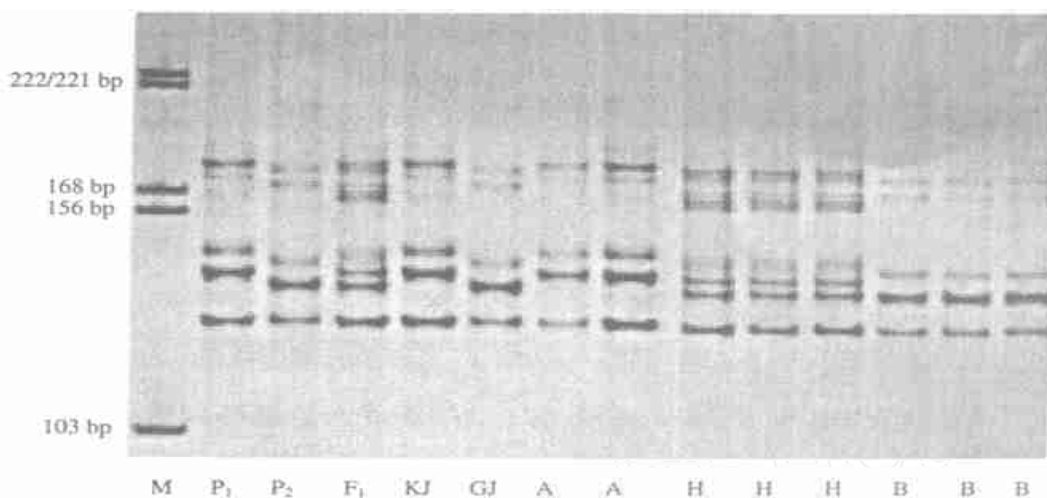


图 1 SSR 引物BNL 3556PCR 扩增结果

M. DNA 分子量标记; P₁ 抗病亲本; P₂ 感病亲本; KJ. 抗病基因池; GJ. 感病基因池; A. F₂ 代纯合抗病; H. F₂ 代杂和带型; B. F₂ 代纯合感病

Fig 1 PCR amplification result by SSR primer BNL 3556

M. DNA molecular weight markers; P₁. Resistant parent; P₂ Non-resistant parent; KJ. Resistant gene pool; GJ. Non-resistant gene pool;

A. Pure resistant pattern in F₂; H. Combined resistant pattern in F₂; B. Pure non-resistant pattern in F₂

运用Mapmaker/QTL (Version 1.1b) 软件, 以 F_{2:3} 家系抗黄萎病性状(病情指数) 对该连锁图进行扫描, 当最大LOD 值为 13.879 时, 检测到 1 个黄萎病抗性的 QTL 位点, 位于 SSR 标记位点 BNL 1414 和 BNL 3556 之间, 该位点距 BNL 1414 为 28 cM, 距 BNL 3556 为 13.1 cM (图 2)。

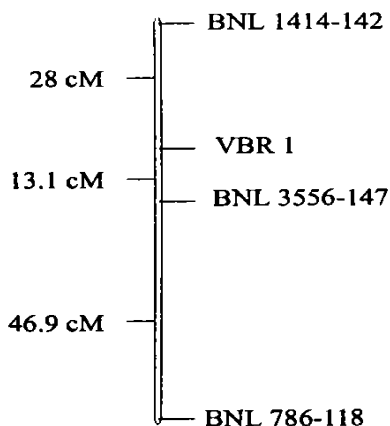


图 2 海岛棉黄萎病抗性基因的 SSR 标记连锁

Fig 2 Linkage of QTL with *Verticillium* resistance of *G. barbadense* to microsatellite marker

该位点可以解释的表型变异方差为 50.1%, 其中显性效应的 LOD 值为 19.133, 可解释的变异率为 49.7%, 加性效应的 LOD 值为 8.38, 隐性效应的 LOD 值为 1.66。可初步认定, 海岛棉品种 II 15-3493 的黄萎病抗性基因(暂命名为 VBR1) 与 SSR 标记 BNL 3556-147 有关。

3 讨论

如何确定抗、感标准是抗性鉴定中的一个重要问题。先前大多棉花黄萎病温室鉴定都是直接应用 F₂ 代分离群体, 通过该群体抗、感分离比例来说明亲本抗性基因的遗传规律^[13~15]。F₂ 代群体抗、感植株的确定是通过单株病级来划分的, 通常人为规定病级为 0 级、1 级和 2 级的单株为抗病单株, 病级为 3 级和 4 级的单株为感病单株^[8]。但现行棉花品种黄萎病抗病性指标是以一个品种抗性鉴定时的病情指数作为抗、感的划分标准^[8, 14, 15]。笔者认为, 在抗病性鉴定中, 单纯针对某一单株的病级来确定其抗、感类型并不准确, 因为单株病级除受本身遗传因素影响外, 还容易受到其他许多因素的影响, 一旦影响到病级的形成, 就会影响抗、感类型的归属, 进而影响抗、感群体的数量比例。所以, 黄萎病抗性基因定位时, 采用 F₂ 单株进行抗性鉴定并不是理想选择。若把每个 F₂ 单株延续到 F₃ 株系, 以 F₃ 株系群体的抗病性作为 F₂ 单株的抗病性, 则能更准确地鉴定 F₂ 单株的抗病性。F_{2:3} 家系群体可以消除遗传因素外的其他因素对抗性鉴定的影响, 使得到的抗性鉴定结果更加准确, F₂ 代单株的抗、感划分更加合理, 有利于根据其结果进行抗性基因的标记。该方法的关键是 F_{2:3} 家系的大小问题, 如果群体过小则不能正确反映 F₂ 代抗性; 如果群体过大, 则使工作量成倍增加, 耗费极大的人力、物力, 同时也使得同一营

养钵内单株间的竞争加剧, 株间生长不整齐, 根系生长差异大, 使接种和发病结果受到不良影响。因此, 根据不同的杂交组合选择合适的 $F_2:3$ 家系的大小, 是获得准确的抗性鉴定结果的重要保证。根据本试验实际操作观察, 笔者认为每个 $F_2:3$ 家系为 30 株时能得到较客观的鉴定结果。

浙江大学农业与生物技术学院的房卫平^[14]和中国农科院植保所的齐俊生^[15], 分别利用 AFLP 技术对抗性基因进行了标记。房卫平以陆地棉近等基因系 Z5629 和 Z421 为标记对象, 找到了一个与陆地棉黄萎病抗性基因相连锁的标记。齐俊生以海岛棉与陆地棉杂交组合后代为标记群体, 利用 AFLP 技术, 在海岛棉中找到了 4 个与抗病基因相关, 1 个与感病基因相关的标记。但 AFLP 标记操作过程较复杂, 试验成本较高。而微卫星 (SSR) 作为分子标记具有非常大的优越性: SSR 是共显性标记, 可以在连锁分析中提供比显性标记更为丰富的信息; SSR 基于 PCR 技术, 有利于标记分析的自动化; SSR 标记稳定性和重复性比 RAPD 好且操作简便。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种质

鉴定等。华中农业大学的高玉千等^[13]利用 RAPD 及 SSR 标记, 以海岛棉“Pima 90”和陆地棉“邯鄲 208”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。

与前人^[13~15]相比, 本研究主要有两点不同: 首先, 在抗性鉴定时, 采用 $F_2:3$ 家系为鉴定群体, 使得抗性鉴定结果更为可靠, $F_2:3$ 家系群体可为每 1 个 F_2 代单株形成 1 个病指, 该病指作为 F_2 代单株 QTL 作图时的标准更为准确, 可为分子标记提供有力的保障。其次, 本研究采用 BSA (Bulked Sergeant Analysis) 法, 建立了由 F_2 代单株 DNA 混合形成的抗、感基因池。又通过抗、感基因池对在亲本间有差异的引物进行了筛选, 从而减少了需要检测的多态性引物的数量, 使得筛选到的引物与黄萎病抗性基因之间有很大的相关性, 便于找到与目标性状紧密连锁的分子标记, 避免了构建大量连锁图谱所耗费的人力、物力和财力。本研究所得到的与黄萎病抗性基因相关的位点和前人所找到的分子标记是否相同, 还有待于对标记所处连锁群及其具体位置进行比较后才能确定。

致谢: 在试验进行和论文撰写过程中, 中国农科院棉花研究所的孙君灵、马轩、朱荷琴、袁有禄等老师和同事给予了极大的帮助, 在此表示衷心感谢!

[参考文献]

- [1] Reinisch A J, Dong J M, Brubaker C L, et al A Detailed RFLP map of cotton, *Gossypium hirsutum* × *Gossypium barbadense*: chromosome organization and evolution in a disomic polyploid genome[J]. Genetics, 1994, 138: 829- 847.
- [2] Jiang C X, Wright R J, El-Zik K M, et al Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* [J]. Proc Natl Acad Sci, 1998, 95: 1419- 1424
- [3] Shappley ZW, Jenkins L N, Meredith W R Jr, et al A RFLP linkage map of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 756- 761.
- [4] Ulloa M, Cantrell R G, Percy R G. QTL analysis of stomata conductance and relationship to lint yield in an interspecific cotton [J]. The Journal of Cotton Science, 2000, 4: 10- 18
- [5] Ulloa M, Meredith W R J, Shappley ZW, et al RFLP genetic linkage maps from $F_2:3$ populations and a joinmap of *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 200- 208
- [6] Wright R J, Thaxton P M, El-Zik K M, et al D-subgenome bias of *Xan* resistance genes in *Tetraploid gossypium* (cotton) suggests that polyploid formation has created novel avenues for evolution [J]. Genetics, 1998, 149: 1987- 1996
- [7] Zhang J, Guo W E, Zhang T Z Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. × *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population [J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 1166- 1174
- [8] 沈其益 棉花病害——基础研究与防治 [M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [9] 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 [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1993, 11(3): 122- 127.
- [10] 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
- [11] Zhang J F, James M S. Economical and rapid method for extracting cotton genomic DNA [J]. Journal of Cotton Science, 2000, 4: 193- 201.
- [12] 张 军, 武耀廷, 郭旺珍, 等 棉花微卫星标记的 PAGE/银染的快速检测 [J]. 棉花学报, 2000, 12(5): 267- 269

- [13] 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
- [14] 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.
- [15] 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.

Studies on SSR markers of resistance gene of *Verticillium* wilt in cotton

DU Wei-shi^{1,2}, DU Xiong-ming¹, MA Zhi-yong²

(1 Cotton Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Science, Anyang, Henan 455004, China;

2 College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

Abstract: 175 F₂ individuals developed by a cross of *G. barbadense* II 15-3493 × *G. hirsutum* Shihezi 875 were employed for a molecular marker population in this paper. After the polymorphic primers were screened by bulked segregant analysis (BSA), a linkage map that included three SSR loci was constructed. A locus related to *Verticillium* wilt resistance was located at this linkage map by MAPMAKER software. The distance between this locus and the SSR marker BNL 3556 was 13.1 cM, and this locus explained 50.1% of the phenotypic variance. It was a major gene locus.

Key words: cotton; *Verticillium* wilt; molecular marker; linkage map; SSR

(上接第 19 页)

Effect of nitrogen and soil moisture on nutrient absorption and quality of rice

CHEN Xin-hong¹, LIU Kai², XU Guo-wei¹, WANG Zhi-qin¹, YANG Jian-chang^{1*}

(1 Department of Agronomy, Agriculture College, Yangzhou University, Yangzhou, Jiangsu 225009, China;

2 College of Agronomy, Xinjiang Agriculture University, Urumqi, Xinjiang 830052, China)

Abstract: Nutrient absorption and quality of rice on Wuyujing 3 were investigated by different nitrogen levels and irrigation methods on field. The results showed that N and P content of organs were enhanced with increasing of nitrogen levels, and N, P content by conventional watering was higher than those by water-saving irrigation, but water-saving irrigation promoted transfer of nutrients from vegetative organs to grains. K content of organs was insignificant among treatments. There had no significant effect on the milling quality by nitrogen levels and irrigation methods; Percentage of chalky kernel and chalkiness were enhanced with the increasing levels and soil moisture. The protein content of rice was positively correlated with nitrogen level, and it by saving irrigation was lower than conventional irrigation in the same nitrogen level; the change of amylose content was negative with protein content. The yields between water-saving and conventional irrigation were insignificant when nitrogen levels was 300 or 450 kg/hm²; the percentage of filled grain and harvest index by water-saving irrigation were higher than that by conventional irrigation.

Key words: nitrogen levels; soil moisture; rice; nutrient content; quality of rice