

棉花 SRAP 遗传连锁图构建

林忠旭 张献龙* 聂以春 贺道华 吴茂清

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070. * 联系人, E-mail: xlzhang@mail.hzau.edu.cn)

摘要 应用 SRAP 标记构建棉花分子遗传连锁图, 作图群体为邯鄯 208 与 Pima90 杂交产生的 129 个 F_2 单株. 筛选多态性较好的 76 个引物组合进行群体检测, 共得到 285 个多态性条带, 平均每个引物组合产生 3.75 个多态性条带, 最多的产生 13 条多态性条带. 对 285 个标记用 MAPMAKER/EXP3.0 构建连锁群, 237 个标记进入 39 个连锁群($LOD \geq 3.0$), 总长 3030.7 cM, 覆盖整个棉花基因组的 65.4%, 标记平均间距 12.79 cM. 在整个连锁群中, 标记分布比较均匀, 没有聚集现象.

关键词 棉花 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 分子标记 分子标记遗传连锁图

分子标记尤其是 DNA 标记已广泛应用于植物分子遗传连锁图的构建. 棉花分子标记连锁图的构建始于 1994 年, Reinish 等人^[1]应用 RFLP 标记构建了一张包含 705 个多态性位点, 分布于大小不同的 41 个连锁群的图谱, 总长 4675 cM. 随后, 出现了多张分子标记遗传连锁图^[2~7], 但图谱密度都达不到这张图谱的水平.

较高密度的分子标记图谱能有效地应用于数量性状基因定位、图位基因克隆、比较基因组学研究以及分子标记辅助育种中. 就目前而言, 棉花的分子标记连锁图密度还不够, 必须增加标记才能满足应用的需要. 用于构建棉花分子遗传连锁图的 DNA 标记主要有 RFLP, SSR 和 RAPD, 但这些标记对增加图谱密度的能力有限, 必须应用新的标记. Li 和 Quiros^[8]发展了一种新标记 SRAP (sequence-related amplified polymorphism). 该标记通过独特的引物设计对 ORFs (open reading frames) 进行扩增, 上游引物长 17 bp, 5' 端的前 10 bp 是一段填充序列, 紧接着是 CCGG, 它们组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对外显子进行特异扩增. 下游引物长 18 bp, 5' 端的前 11 bp 是一段填充序列, 紧接着是 AATT, 它们组成核心序列及 3' 端 3 个选择碱基, 对内含子区域、启动子区域进行特异扩增. 因个体不同以及物种的内含子、启动子与间隔区长度不等而产生多态性. 该标记具有简便、稳定、产率高、便于克隆目标片段的特点, 并已被应用于图谱构建^[8]、比较基因组学^[9]和遗传多样性分析^[10]. 本文将 SRAP 应用于棉花分子遗传连锁图构建.

1 材料和方法

(i) F_2 分离群体的构建. 以 Pima90(海岛棉) 为父本, 邯鄯 208(陆地棉) 为母本配制杂交组合得 F_1 代, 对 F_1 自交得 F_2 代. 将 F_2 单株种植, 获得 129 株单株,

作为作图群体.

(ii) 总 DNA 提取方法. 取刚展开的嫩绿叶片, 参照 Paterson 等人^[11]的方法提取亲本及群体的总 DNA.

(iii) SRAP 标记分析. 除采用 Li 和 Quiros 等人^[8]发表的引物外, 还自行设计引物 (me6~me9, em7~em17), 见表 1, 由上海生工生物工程技术有限公司合成. PCR 反应体系为: 60 ng DNA 模板, 引物各 30 ng (参照文献[12]), 200 μ mol/L dNTPs, 1 $\times$ 反应缓冲液, 1.5 mmol/L $MgCl_2$, 1 U Taq 酶(购自 MBI 公司), 总体积为 20 μ L, 不足部分用 ddH₂O 补足. DNA 扩增程序参照文献[8]. 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳(6%, 7 mol/L 尿素) 分离, 电泳缓冲液为 0.5 $\times$ TBE. 电泳时, 先用 2000 V 电压预电泳至电流为 30 mA, 上样后用 2500 V 恒压电泳 1.5~2 h 至二甲苯青到胶板 2/3 处, 电泳过程中确保胶板板不高于 50 $^{\circ}$ C. 电泳后银染, 参照吴冠芸等人^[13]的方法.

(iv) 标记的命名及连锁分析. 采用“引物组合 + 标记片段长度”的方法对标记进行命名, 如 m1e1-550, “m1e1”表示引物组合 me1 和 em1, “550”表示该标记的片段长度为 550 bp; 引物组合后面的“K”表示该标记的片段长度为 1000 bp. 应用 MAPMAKER/EXP3.0^[14]构建棉花分子标记连锁图. 利用 Kasambi 函数将重组率转换为遗传图距(centimorgan, cM).

2 结果与分析

2.1 亲本间多态性 DNA 标记的筛选

用 136 个引物组合对两亲本进行筛选, 每个组合可产生 50~100 个清晰可辨的条带. 选取多态性好的 76 个引物组合进行群体分析, 共得到 285 条多态性条带, 每组合的多态性条带数从 1~13 不等. 平均每个引物组合产生 3.75 个多态性条带(图 1).

表 1 本实验中应用的 SRAP 引物

上游引物 5'→3'		
me1: TGAGTCCAAACCGGATA	me2: TGAGTCCAAACCGGAGC	me3: TGAGTCCAAACCGGAAT
me4: TGAGTCCAAACCGGACC	me5: TGAGTCCAAACCGGAAG	me6: TGAGTCCAAACCGGTAG
me7: TGAGTCCAAACCGGTTG	me8: TGAGTCCAAACCGGTGT	me9: TGAGTCCAAACCGGTCA
下游引物 5'→3'		
em1: GACTGCGTACGAATTAAT	em2: GACTGCGTACGAATTTGC	em3: GACTGCGTACGAATTGAC
em4: GACTGCGTACGAATTTGA	em5: GACTGCGTACGAATTAAC	em6: GACTGCGTACGAATTGCA
em7: GACTGCGTACGAATTATG	em8: GACTGCGTACGAATTAGC	em9: GACTGCGTACGAATTACG
em10: GACTGCGTACGAATTAG	em11: GACTGCGTACGAATTTGC	em12: GACTGCGTACGAATTGTC
em13: GACTGCGTACGAATTGGT	em14: GACTGCGTACGAATTCAG	em15: GACTGCGTACGAATTCTG
em16: GACTGCGTACGAATTCGG	em17: GACTGCGTACGAATTCCA	

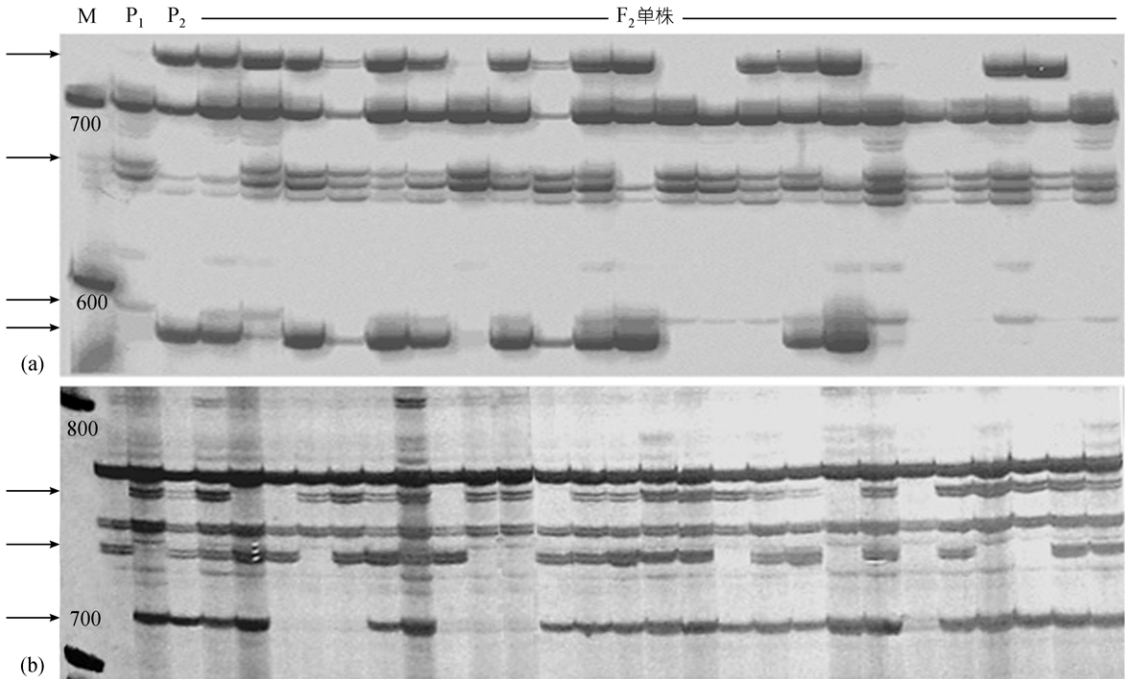


图 1 SRAP 引物在部分 F₂ 群体上的扩增图

(a) 引物组合 m3e14 在部分 F₂ 群体上的扩增图; (b) 引物组合 m7e2 在部分 F₂ 群体上的扩增图. M 示 100 bp Ladder, P₁ 示邯郸 208, P₂ 示 Pima90, 箭头示多态性条带

2.2 棉花 SRAP 分子标记连锁图的构建

对得到的 285 个多态性标记用 MAPMAKER/EXP3.0^[14]构建遗传连锁图. 237 个标记进入 39 个连锁群(LOD ≥ 3.0), 48 个独立, 总长 3030.7 cM, 覆盖整个基因组的 65.4%(图 2). 每个连锁群有 2~13 个标记, 最长的连锁群为 227.4 cM, 最短的连锁群为 5 cM. 标记间最大间距为 42.8 cM, 最小间距为 0.2 cM, 标记间平均间距 12.79 cM. 标记在整个连锁群中分布比较均匀, 没有标记聚集在一起的现象. 这是首张用 SRAP 构建的棉花分子遗传连锁图.

3 讨论

SRAP 标记是基于 PCR 的标记系统, 因而操作简便, 使用长 17~18 bp 的引物以及 50℃的退火温度, 保证了扩增结果的稳定性. 通过改变 SRAP 引物 3'端 3 个选择碱基可得到更多的引物, 由于上游引物与下游引物可自由组配, 因此用少数的引物可进行多种组合, 大大减少了合成引物的费用, 同时也大大提高了引物的使用率.

本文采用快速简便的银染技术进行显带, 如果对引物进行同位素标记, 利用放射自显影技术显带

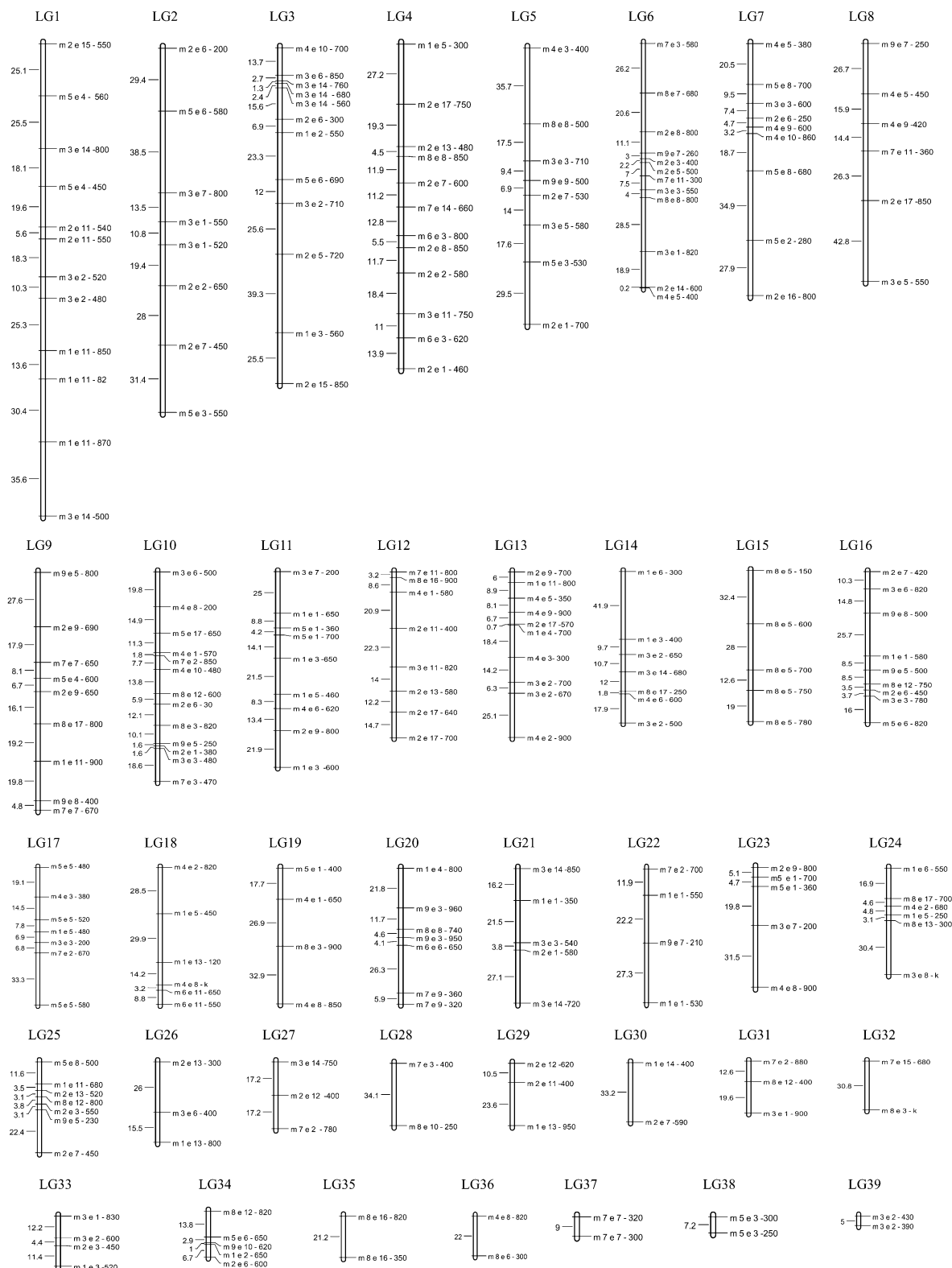


图2 棉花 SRAP 分子标记连锁图

可检测到更多的条带. 由于 SRAP 标记是对 ORFs 进行扩增, 因而对基因相对较少的着丝粒附近以及端粒的扩增会较少. 如果结合可扩增这些区域的 SSR 标记, 将可获得覆盖整个基因组的连锁图. 目前, 在棉花中已经分离到不同的 cDNA^[15~17], 利用这些 cDNA 作探针进行 RFLP 分析, 结合 SRAP 标记进行染色体构图, 会收到更好的效果.

SRAP 是一种新型标记, 迄今为止, 只有一篇关于此标记 PCR 反应体系的详细报道^[10]. 本文利用 PCR 反应体系结合 PCR 的一般特性和 AFLP 的特点, 经过多次实践并结合文中的电泳参数, 得到了很好的扩增效果.

SRAP 标记已经在马铃薯、水稻、茼蒿、油菜和大蒜等植物研究中使用, 具有简便、稳定、中等产率的特点, 在基因组中分布均匀, 适合于基因定位、基因克隆等分子生物学研究^[8], 但在棉花中没有相关报道. 在遗传多样性研究中, SRAP 比 AFLP 更能反映表型的多样性及进化历史. 此标记的应用在国内尚未见报道, 国际上的报道也较少^[8~10].

我们构建的这张连锁图只是一个框架图, 目的是检测 SRAP 标记在棉花中是否可行. 实验证明, SRAP 可用于棉花分子生物学研究. 此标记也将应用于棉花数量性状基因定位、遗传多样性研究以及目标片段克隆. 到目前为止, 已经构建的多张棉花分子标记连锁图^[1~7], 但应用的 DNA 标记主要是 RFLP, SSR 和 RAPD, AFLP 标记尚未见报道. RFLP 标记具有共显性、信息完整、重复性和稳定性好等优点, 但其实验操作过程较复杂, 不易实现自动化, 并且 DNA 的要求高, 用量大, 对大群体进行分析的费用大. RAPD 标记操作简单易行, 但易受实验条件影响, 重复性差, 产率低. SSR 是一种很好的标记, 但棉花的 SSR 有限, 而开发 SSR 很费时又很昂贵. 在 AFLP 技术还不成熟的情况下, SRAP 是一种比较好的标记. 本研究中每个引物组合平均产生 3.75 个多态性条带, 最多可达 13 个, 并且实验操作简单、重复性好, 有益于大幅度增加棉花分子遗传连锁图的密度. 同时, SRAP 可用于其他植物、其他领域的研究. SRAP 将成为植物研究领域的一个有力的工具.

致谢 本工作为国家高技术研究发展计划(批准号: 2001AA211121 和 2002AA211031) 和国家“948”引进国际先进农业科学技术(批准号: 201012)资助项目.

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. *Genetics*, 1994, 138: 829~847
- 2 Shappley Z W, Jenkins J N, Meredith W R, et al. An RFLP linkage map of upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 756~761
- 3 Jiang C X, Wright R J, El-Zik K M, et al. Polyploid formation created unique avenues for response to selection in *Gossypium* (cotton). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 1419~1424
- 4 Ullia M, Meredith W R. Genetic linkage map and QTL analysis of agronomic and fiber quality traits in an intraspecific population. *J Cotton Sci*, 2000, 4: 161~170
- 5 左开井, 孙济中, 张献龙, 等. 利用 RAPD, SSR 和 RFLP 标记构建陆地棉分子标记连锁图. *华中农业大学学报*, 2000, 19(3): 190~193
- 6 Ulloa M, Meredith W R, Shappley Z W, et al. RFLP genetic linkage maps from F_{2:3} populations and a joinmap of *Gossypium hirsutum* L. *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 200~208
- 7 Zhang J, Guo W, Zhang T. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L × *Gossypium barbadense* L) with a haploid population. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 1166~1174
- 8 Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455~461
- 9 Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168~180
- 10 Ferriol M, Picó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *Cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271~282
- 11 Paterson A H, Curt L B, Wendel J F. A rapid method for extraction of cotton (*Gossypium* spp) genomic DNA suitable for RFLP and PCR analysis. *Plant Mol Biol Rep*, 1993, 11: 112~127
- 12 Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucl Acid Res*, 1995, 23: 4407~4414
- 13 吴冠芸, 潘华珍, 吴羽. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册. 北京: 科学出版社, 1999
- 14 Lincoln S, Daly M, Lander E S. Construction genetic maps with MAPMAKER/EXP 3.0. In: Whitehead Institute Technical Report, 2nd ed. Cambridge: Whitehead Institute, 1992
- 15 Ji S J, Lu Y C, Feng J X, et al. Isolation and analyses of genes preferentially expressed during early cotton fiber development by subtractive PCR and cDNA array. *Nucl Acid Res*, 2003, 31: 2534~2543
- 16 Li C H, Zhu Y Q, Meng Y L, et al. Isolation of genes preferentially expressed in cotton fibers by cDNA filter arrays and RT-PCR. *Plant Science*, 2002, 163: 1113~1120
- 17 郭旺珍, 孙敬, 张天真. 棉花纤维品质基因的克隆与分子育种. *科学通报*, 2003, 48(5): 410~417

(2003-05-06 收稿, 2003-06-18 收修改稿)