

利用 SSR 和 TRAP 分子标记对棉花

海陆群体基因型的初步分析

作者：李龙云

指导教师：喻树迅 研究员

冯佰利 教授

摘 要 论文以棉花的陆地棉品种、海岛棉品种以及它们的杂种 F_1 和 F_2 后代 186 个单株为材料，对棉花的 SSR 和 TRAP 两种分子标记技术的体系进行摸索和分析，比较两种标记在棉花材料中多态性的特点。同时利用 SSR 和 TRAP 两种多态性的分子标记，进行陆地棉×海岛棉后代 F_2 群体 186 个单株的基因型分析，初步构建棉花分子标记连锁图谱。

关键词：棉花；分子标记；TRAP；SSR；遗传连锁

棉花是一个重要的经济作物，在我国国民经济中占重要地位。随着分子生物学的发展，DNA 分子标记技术的产生已经成为生命科学研究的重要工具，国内外都在大力开展分子标记的研究。目前，已经发展很多类型的分子标记，例如，RAPD、SSR、AFLP、SRAP、TRAP 等等。在棉花中，分子标记已被应用于遗传连锁图谱构建、基因定位与克隆、数量性状研究、杂种优势分析、遗传多样性研究、比较基因组分析等方面。在分子标记技术中，SSR 标记技术因为具有多态性多和共显性等特点，被广泛应用各个农作物研究。而 TRAP 是新型分子标记，是基于 ESTs 或 cDNA 而来，多态性高，具有良好的应用前景。

1. 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用的两个亲本是实验室提供的“中棉所 36”和海岛棉“海 7124”，“中棉所 36”是我国选育的陆地棉优质短季棉品种，现已成为新疆北疆的主推短季棉品种；海岛棉品种“海 7124”是南京农业大学金陵研究院棉花研究所抗黄萎病遗传研究的一个单株选择后代。陆地棉×海岛棉后代 F_1 和 F_2 群体 186 个单株都是实验室已有的群体。

1.2 实验方法

(1) DNA 抽提：取田间嫩绿叶片，DNA 的抽提方法参照 Paterson 等(1993)程序，并作少许修改。

(2) SSR 标记分析

(3) TRAP 标记分析 引物设计：于雯雯根据与棉花纤维发育相关的 EST，设计了 57 条固定引物，引物由上海生物技术有限公司合成。随机引物利用 SRAP 的下游引物，(em7-em17)是华中农业大学张献龙教授自行设计的，由上海生工生物工程技术有限公司合成。选取其中的 12 条固定引物和 17 条随机引物进行组合。

(4) 带型记载及标记命名 共显性标记：和母本“中棉所 36”带型相同的单株记作 A，和父本“海 7124”带型相同的单株记作 B，杂合的（同时具有“中棉所 36”和“海 7124”带型）的单株记作 H。显性带型标记：母本“中棉所 36”为显性(有带)以及分离群体中和母本“中棉所 36”带型相同的单株记作 D，纯合“海 7124”带型单株记作 B；父本“海 7124”为显性(有带)以及分离群体中和父本“海 7124”带型相同的单株记作 C，纯合“中棉所 36”带型单株记作 A。缺失数据记作“—”。

TRAP 标记采用引物组合方法对标记进行命名，abc 表示同一对引物组合扩增得到的不同

位点。SSR 标号是引物名称后加 abc, NAU 表示引物的来源。

(5) 连锁图谱分析 在 Windows98 下运行 MapMaker/EXP. 3.0 (Lander and Botsterin, 1989) 作图软件, 首先设置软件的运行环境, 如 “print names on”, “Error Detection On”, “Use Three Point”, “Triple Exclusion Criteria 4.0”, “Triple Error Detection on”, “cent func kos” 等。在 LOD 值大于等于 3 时, 最后确定 9 个连锁群。

2. 结果与分析

2.1 多态性引物筛选及 F_2 基因型分析

2.1.1 SSR 标记

本研究共对 160 对 NAU 系列的部分 SSR 引物在双亲间进行了多态性筛选, 共得到 43 对多态性 SSR 引物。挑选能扩增清晰带型的 17 对 SSR 引物在 F_2 群体中进行检测, 共得到 26 个带型清晰的标记。平均每对引物产生 1.5 个多态性位点。其中共显性标记 7 个, 显性标记 20 个。17 对 SSR 引物中有 11 对引物检测到 1 个位点, 5 对引物检测到 2 个位点, 1 对引物检测到 5 个位点。

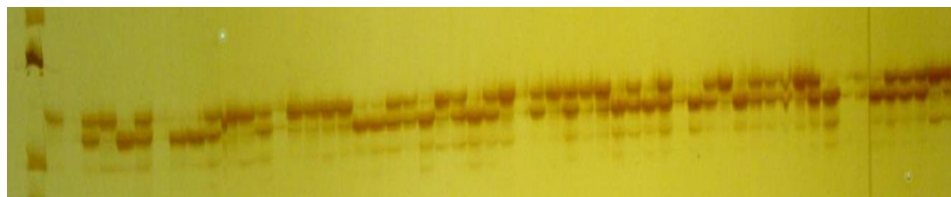


图 2.1 SSR 标记在中棉所 36×海 7124 群体中的扩增图

2.1.2 TRAP 标记

10 条 TRAP 的锚定引物, 和 17 条 SRAP 的随机引物组合成 64 对引物组合, 对两亲本进行多态性筛选, 其中 24 对引物组合能检测到较好的多态性。利用其中 12 对 TRAP 引物组合对 F_2 群体进行基因型分析, 总共得到 18 个多态性位点。平均每对引物产生 1.5 个多态性位点。其中共显性标记 2 个, 显性标记 16 个。12 对引物中有 7 对引物检测到 1 个位点, 4 对引物检测到 2 个位点, 1 对引物检测到 3 个位点。



图 3.2 TRAP 标记在中棉所 36×海 7124 群体中的扩增图

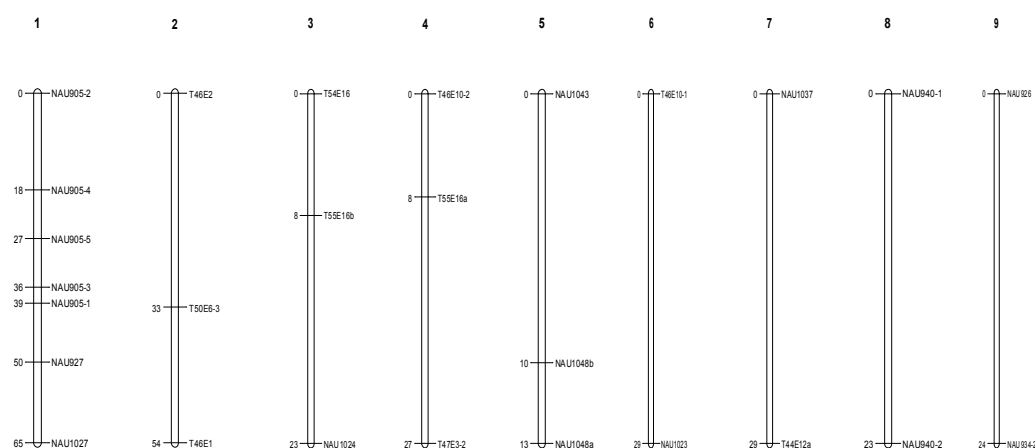
总的来说, 本研究共得到 44 个分子标记位点, 包括 SSR 标记 26 个, TRAP 标记 18 个。其中共显性标记 9 个, 显性标记 35 个, 显性标记中父本“海 7124”为显性的标记 22 个, 母本的显性标记 13 个。

2.2 偏分离标记检验

对 F_2 群体检测所得到的 44 个分子标记位点进行 χ^2 适合性检验, 检测共显性标记是否符合 1:2:1、显性标记是否符合 3:1 的孟德尔分离比例。在 5% 的水平上共有 17 个 (38.6%) 标记位点不符合孟德尔分离比例, 表现显著偏分离。SSR、TRAP 的偏分离标记分别有 9 个和 8 个, 偏分离百分比分别为 20.4 % 和 18.2 %。

2.3 连锁分析及图谱构建

本研究共得到 44 个分子标记位点, 其中包括 SSR 26 个, TRAP 18 个。最终有 27 个标记进入 9 个连锁群, 包括 SSR 17 个, TRAP 1 个。所构建的图谱长度为 287cM, 标记间平均距离为 10.6 cM。



3.讨论

3.1 SSR 标记和 TRAP 标记

TRAP 标记相对于 SSR 标记是一种比较新型的标记, 两种标记方法都有其各自的优缺点。SSR 和 TRAP 都是以 PCR 为基础的标记系统。从多态性和稳定性的角度看, TRAP 标记系统和 SSR 一样, 是以总 DNA 为模板。在两种标记都稳定性都比较好的情况下, TRAP 标记产生多态性位点的效率比 SSR 标记大很多, 一个反应 SSR 只能得到几个多态性位点, 而 TRAP 能产生和 AFLP 相当的位点。另外, TRAP 标记比 SSR 标记具有很大的灵活性, 固定引物与随机引物自由组配, 可得到多种引物组合。

3.2 TRAP 标记电泳分离方法以及显色方法的改变

本研究使用非变性 PAGE 凝胶代替了变性 PAGE 凝胶分离 TRAP 标记的扩增产物, 同样取得了比较好的效果, 更重要的是非变性 PAGE 凝胶分离扩增产物更为快捷、简单、方便。使用非变性 PAGE 凝胶代替变性 PAGE 凝胶分离 TRAP 标记的扩增产物后, 显色的方法步骤也随之改变, 更为省时省力, 使用超纯水的数量也大为减少, 在一定程度上减少了成本。但是, 使用同一个引物组合, 使用变性 PAGE 凝胶分离就比使用非变性 PAGE 凝胶分离时所产生的多态性位点多很多。

3.3 遗传连锁图

本研究构建的连锁图只是一个初级的遗传图谱, 共包含 44 个标记、9 个连锁群的遗传图谱。标记在每个连锁群中有 2-7 个。构建进入遗传连锁图谱的标记共 27 个, 占参加图谱构建总标记的 61.4%。还有近 38.6% 的标记未能进入到连锁群中, 原因主要有以下几点: 1、该图谱尚未完全覆盖整个棉花基因组, 这也是标记未能进入图谱的主要原因; 2、部分标记虽然与进入到连锁群中的标记同属于一个染色体, 但是由于两个标记间的间隙太大, 在相应的作图标准下缺少足够的连锁关系, 也不能进入到连锁图谱之中。

4.4 分子标记的偏分离

本研究的作图亲本是海陆群体, 遗传差异大, 因此双亲遗传物质不协调及染色体重排可能是导致该研究中偏分离的原因之一。所以, 有必要发展来源于不同杂交组合产生的作图群体, 结合多种标记技术一起增加连锁群上的分子标记密度, 以完善饱和连锁图谱。