

刘雅辉, 王秀萍, 鲁雪林, 等. 棉花耐盐相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记筛选[J]. 江苏农业学报, 2015, 31(3): 484-488.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2015.03.003

棉花耐盐相关序列扩增多态性(SRAP)分子标记筛选

刘雅辉, 王秀萍, 鲁雪林, 张国新, 李强
(河北省农林科学院滨海农业研究所, 河北 曹妃甸 063200)

摘要: 利用相关序列扩增多态性(SRAP)和群体分离分析法(BSA)对棉花耐盐材料×敏感材料组合的 F_2 群体及26个耐、敏品种(系)进行分析和鉴定, 筛选与棉花耐盐相关的分子标记。在88对正反引物组合中, 筛选出在2个亲本间具有多态性的引物6对, 经 F_2 群体分析, 发现1对引物能够在耐盐单株中扩增出350 bp的特异片段, 而在敏感单株中没有。品种鉴定显示, 耐盐材料均能扩增出该片段, 而敏感材料没有该片段扩增。推测该片段是与棉花耐盐性紧密连锁的分子标记。

关键词: 棉花; 耐盐性; 相关序列扩增多态性(SRAP); 分子标记

中图分类号: S562.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2015)03-0484-05

Selection of sequence-related amplified polymorphism molecular marker associated with salt tolerance of cotton

LIU Ya-hui, WANG Xiu-ping, LU Xue-lin, ZHANG Guo-xin, LI Qiang

(Coastal Agricultural Research Institute, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Caofeidian 063200, China)

Abstract: Twenty-six salt tolerant and sensitive materials, and a F_2 population derived from the cross between a salt tolerant material and a salt sensitive material were analyzed by sequence-related amplified polymorphism(SRAP) marker and bulked segregant analysis(BSA) method to screen markers associated with salt tolerance of cotton. Six pairs of 88 primer combinations were detected polymorphic in both parents, among which, one pair of primer amplified a 350-bp fragment in the tolerant individuals of F_2 population, but no band in the susceptible individuals. The fragment were identified exclusively in 22 salt tolerant varieties. The results suggested that this marker might be closely linked to salt tolerance in cotton.

Key words: cotton; salt tolerance; sequence-related amplified polymorphism(SRAP); molecular marker

土壤盐渍化是影响农业生产的主要胁迫因子。中国的盐渍土近 $1.00 \times 10^8 \text{ hm}^2$, 且盐渍化和次生盐渍化土地面积不断扩大^[1-2]。河北省盐渍土主要分布在沿渤海一带的秦皇岛、唐山、沧州等地, 盐渍化面积大, 盐碱程度高, 土壤结构差, 作物难以正常生长, 严重影响了作物的产量和品质。因此合理开发利用盐碱地是一项迫在眉睫的任务。棉花是中国重要的经

济作物, 在国民经济中占有举足轻重的地位^[3-4]。在粮棉争地矛盾日益突显的情况下, 棉花以其较好的耐盐性, 逐渐成为盐碱地一种新的优势作物。目前, 中国是世界上盐碱地植棉规模最大的国家, 据不完全统计^[5], 中国植棉区内盐碱地约有 $1.67 \times 10^7 \text{ hm}^2$, 其中超过 $2.67 \times 10^6 \text{ hm}^2$ 已先后开发植棉。河北省的棉花种植面积也不断扩大, 逐渐延伸到黑龙港地区和沿渤海一代的盐碱地区域。因此, 培育和推广耐盐棉花新品种是提高盐碱地生产力的长久之计, 也是目前盐碱地利用的一种有效手段。耐盐棉花品种一般需要有较强的出苗能力和抗盐能力, 这给筛选和培育耐盐棉花品种提出了挑战, 而分子标记技术不仅为棉花耐盐

收稿日期: 2014-11-12

基金项目: 河北省自然科学基金资助项目(C2014301038)

作者简介: 刘雅辉(1979-), 女, 河北唐山人, 硕士, 助理研究员, 从事旱作物耐盐鉴定与育种。(Tel) 0315-8723260; (E-mail) bhslyh@126.com

性筛选提供分子鉴定,同时也为新种质或品种的选育开辟了新的技术途径。

植物的耐盐性是一个及其复杂的性状,同时受环境和植物发育时间与空间的影响。有研究发现许多植物耐盐性状受少数主基因控制,存在耐盐主效基因^[6-10],因此通过寻找与耐盐基因密切连锁的分子标记,对于改善植物的耐盐性是可行且十分必要的。目前,在水稻、小麦、大麦、大豆、玉米、苜蓿、结缕草等植物中,已检测到与耐盐相关的分子标记^[11-19],且部分已被定位和克隆^[12-13,20-24]。到目前为止,有关棉花耐盐性分子水平的研究不多,与其相关的分子标记则更少。张丽娜等^[25]通过 SSR 标记筛选出 10 对区分耐盐材料和敏盐材料的 SSR 引物,初步认为采用 SSR 标记可以鉴定棉花耐盐性;郭继坤^[26]采用 SSR 标记以鲁棉 97-8 和苏 12 为亲本及 184 个单株的 F₂ 群体为材料,构建了一个包含 8 个连锁群、25 个标记的遗传图谱,并定位了 4 个控制不同生育期耐盐性的 QTLs。可见,筛选棉花耐盐

性分子标记是切实可行的。

本研究拟以耐盐性差异大的两个亲本为材料利用 SRAP 技术和 BSA 法筛选与棉花耐盐相关的分子标记,然后用其杂交组合的 F₂ 分离群体及 26 份耐、敏盐品种(品系)对标记进行稳定性验证,以期获得与棉花耐盐相关的分子标记,从而为棉花耐盐种质鉴定及耐盐棉花分子标记辅助育种提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 材料

选用耐盐材料 NY1×敏盐材料中棉所 12 的 F₂ 分离群体,及 26 个耐、敏盐性品种(系)作为试验材料。26 个耐(敏)盐品种通过河北省地方标准《棉花耐盐性鉴定评价技术规范》^[27] 鉴定,22 个为耐盐品种,4 个敏盐品种(表 1)。

SRAP 引物参照 Li 等^[28] 公布的通用引物,共组成 88 对引物,引物序列由北京华大基因研究中心合成。

表 1 26 份耐(敏)盐棉花材料名称、来源及耐盐性

Table 1 Names, sources and salinity tolerance of 26 cotton materials

材料类型	名称	来源	材料类型	名称	来源
耐 盐	滨棉 2 号	自主选育	耐盐	衡棉 4 号	河北
	滨棉 3 号	自主选育		中抗 1	河北
	滨棉 6 号	自主选育		绿抗	河北
	NY1	自主选育		冀丰 106	河北
	中棉所 35	中棉所		恒丰抗 1	河北
	中棉所 41	中棉所	敏 盐	鲁棉研 17	山东
	中棉所 49	中棉所		鲁棉研 24	山东
	中棉所 50	中棉所		辽棉 16 号	辽宁
	枝棉 3 号	中棉所		豫棉 21	河南
	邯 4849	河北		新研 96-48	河南
	邯棉 802	河北		中棉所 12	中棉所
	邯棉 103	河北		抗黄萎 164	中棉所
	邯棉 5158	河北		鲁棉 6 号	山东

1.2 试验方法

1.2.1 F₂ 群体的耐盐性鉴定 试验于 2013 年 5 月在河北省农林科学院滨海农业研究所现代农业科技成果转化基地盐碱原土鉴定池进行。在土壤全盐含量 0.1% 的对照池种植 30 株 F₂,在土壤全盐含量 0.4% 的处理池种植 400 株 F₂,待棉花长至 1~2 叶

期时,随机抽取 312 个单株进行耐盐鉴定。按照河北省地方标准《棉花耐盐性鉴定及评价技术规程》中的苗情分类标准(表 2)统计耐盐与敏盐单株,盐害级别为 0、1、2 级的植株全部记载为耐盐,3、4 级的记载为敏盐。

1.2.2 DNA 提取 利用北京康为世纪生物科技

有限公司生产的 CottonGenDNAkit 提取供试材料 DNA, 然后用北京普析通用仪器有限责任公司生产的 TU-1810 紫外分光光度计检测 DNA 纯度与浓度。

1.2.3 DNA 池的构建 从 NY1×中棉所 12 的 F₂ 分离群体中随机选择耐盐植株和敏盐植株各 20 株, 分别提取其基因组 DNA 并测定其浓度, 稀释后分别按等量混合后构建 F₂ 耐盐池和敏盐池。

1.2.4 PCR 扩增和产物检测 PCR 反应总体系为 20.0 μl, 其中 10×Buffer 2.0 μl, 10 mmol/L 的 dNTP

0.4 μl, 5 U/μl 的 Taq 酶 0.2 μl, 30 ng/μl 的模板 DNA 1.0 μl, 正反引物 (50 ng/μl) 各 0.7 μl, PCR 染料 2.0 μl, 然后加双蒸水补齐 20.0 μl。

PCR 反应在 Eppendorf mastercycler gradient 基因扩增仪中进行。PCR 扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 1 min, 35 ℃ 退火 1 min, 72 ℃ 延伸 10 min, 进行 5 个循环后退火变为 50 ℃, 再进行 30 个循环, 最后 72 ℃ 延伸 10 min, 4 ℃ 保存扩增产物, 在 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测带型。

表 2 棉花盐害级别分类标准

Table 2 The classification of salt injury grade in cotton

盐害级别	耐盐性	幼苗长势
0	极强	株高、叶片数与未受盐害棉花相当, 植株健壮, 叶片平展、绿色, 有光泽; 植株生长正常, 没有受害症状。
1	强	株高为未受盐害棉花的 70% ~ 100%, 真叶少 0.5 ~ 1.0 片, 子叶平展, 盐害症状不明显, 生长基本正常。
2	耐	株高为未受盐害棉花的 50% ~ 70%, 真叶少 1.0 片, 子叶边缘卷曲。
3	弱	株高为未受盐害棉花的 50% 以下, 无真叶, 只有心叶存活, 但生长点钝化, 子叶浓绿、皱缩, 边缘卷曲。
4	极弱	子叶脱落, 植株干枯、死亡。

2 结果与分析

2.1 棉花耐盐 SRAP 分子标记的筛选

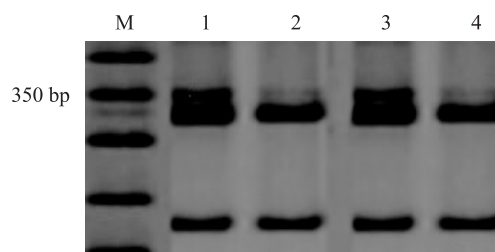
用 88 对 SRAP 引物 (8 个正向引物和 11 个反向引物组成) 对 2 个棉花亲本进行 PCR 扩增, 筛选出清晰稳定、具有多态性条带的引物 6 对。然后用这 6 对引物对 F₂ 群体耐、敏基因池进行扩增, 筛选出 1 对引物 (me3-em5) 在耐盐亲本和耐盐池中均能扩增出一条约为 350 bp 的特异片段, 而在敏盐亲本和敏盐池中未扩增出该片段 (图 1)。

2.2 棉花耐盐 SRAP 分子标记在 F₂ 分离群体中的鉴定

将筛选到的引物组合 me3-em5 对 F₂ 代中随机选取的 312 株耐、敏盐单株 DNA 进行扩增, 进行稳定性验证, 结果 (图 2) 显示, 在 230 株耐盐单株中有 226 株能扩增出此特异片段, 而在 82 株敏盐单株中有 80 株没有扩增出该片段, 2 株扩增出这一片段, 可以看出 F₂ 代分离群体中出现 6 个重组个体, 重组率为 1.92%。

2.3 棉花耐盐 SRAP 分子标记在不同棉花品种中的鉴定

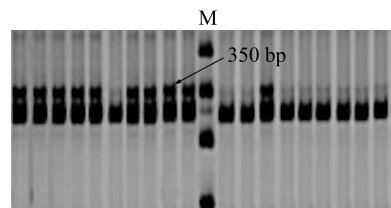
对 22 个耐盐品种和 4 个敏盐品种进行 PCR 分



M: Marker DL2000; 1: 耐盐亲本; 2: 敏盐亲本; 3: 耐盐基因池; 4: 敏盐基因池。

图 1 引物组合 me3-em5 在棉花两亲本及耐、敏池间的扩增

Fig. 1 Amplification of cotton parents, salt tolerant and salt sensitive pools with me3-em5



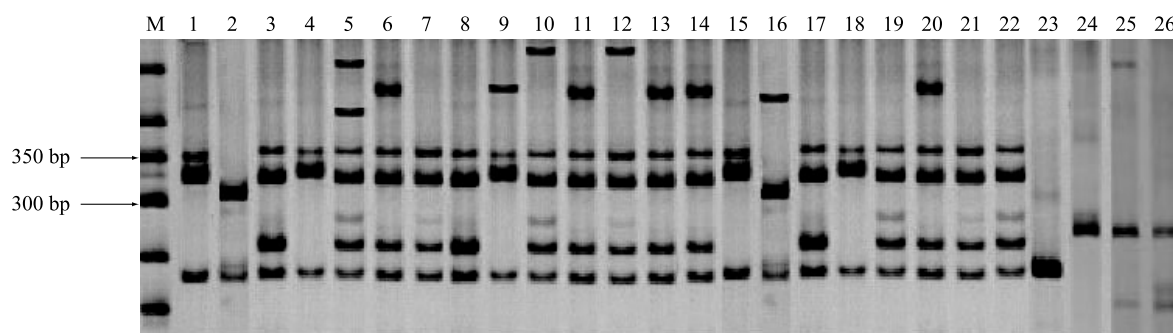
M: Marker DL2000; 条带 M 左边为 F₂ 耐盐单株, 右边为 F₂ 敏盐单株。

图 2 引物组合 me3-em5 在 F₂ 部分耐、敏盐单株间的扩增

Fig. 2 Amplification of salt tolerant and salt sensitive F₂ plants with me3-em5

析,结果(图3)显示,22个耐盐品种中20个品种均扩增出350 bp 特异条带,只有中棉所35和邯棉5158扩增出的条带稍向下移接近300 bp,4个敏盐

品种中均没有扩增出此条带。除了中棉35和邯棉5158有细微差别外,其他品种盐池鉴定结果与分子标记鉴定结果基本一致。



M:Marker DL2000;1~22为抗盐材料,分别是绿抗、中棉所35、中棉所41、中棉所49、枝棉3号、中抗1、中棉所50、衡棉4号、滨棉2号、滨棉3号、滨棉6号、NY1、邯4849、邯棉802、邯棉103、邯棉5158、辽棉16、豫棉21、冀丰106、恒丰抗1、鲁棉研17、鲁棉研24;23~26为敏盐材料,分别是抗黄萎164、鲁棉6号、中棉所12、新研96-48。

图3 引物组合 me3-em5 在不同材料中的扩增

Fig.3 Amplification of salt tolerant and sensitive cotton varieties with me3-em5

3 讨论

棉花的耐盐性不但受到棉花本身遗传因素影响,还受外界环境及栽培措施的影响,其耐盐机制至今还没形成统一认识,很多领域尚存在争论^[29]。沈法富等^[10]通过双列杂交对6个耐盐性不同的品种进行分析,结果表明,棉花的耐盐性存在着加性和显性效应,以加性效应为主,耐盐性呈不完全显性,受一对主效基因控制。张丽娜等^[25]利用SSR技术对两个典型的耐盐品种和敏盐品种进行了多态性引物筛选,初步获得了10对引物,有望成为鉴定棉花耐盐性的标准引物。

为了减少不同遗传背景的影响,本研究利用SRAP标记技术和BSA法寻找棉花耐盐相关的分子标记,共筛选了88对引物,其中有6对引物在两亲本间产生特异带,且带型清晰稳定,重复性较好。然后对筛选出的多态性引物在F₂群体耐盐池和敏盐池间扩增,1对引物在耐盐池产生350 bp大小的条带,而在敏盐池没有扩增出此条带,推测该扩增产物可能是与棉花耐盐性连锁的分子标记。对F₂分离群体大量单株的扩增中,出现了4个重组个体,重组率为1.92%,说明该标记与耐盐性不能共分离,但是与耐盐性连锁程度较为紧密。通过26个耐、敏盐品种(品系)的验证,证实了4个敏盐材料中均没有

扩增出该产物,而22个耐盐材料中基本上扩增了该产物,只是在极个别材料中发生了轻微变化,这种现象说明了在不同的材料中,标记片段的大小会发生改变,这可能是不同的遗传背景或是不同的环境条件所致。通过研究,基本可以断定该片段是与棉花耐盐性状紧密连锁的分子标记。

由于棉花基因组序列很大,一旦获得与耐盐性状紧密连锁的标记,就证明了标记的可行性和可用性。本研究首次应用SRAP分子标记技术对棉花耐盐性进行遗传标记分析,最终筛选获得1个与棉花耐盐密切相关的SRAP分子标记,为棉花耐盐性鉴定提供了一种快速有效的方法,从而促进棉花耐盐性分子标记辅助育种的进程,也为棉花耐盐基因的定位、克隆奠定良好的基础。但是,该研究中只用了一组杂交组合及F₂群体为材料,而耐盐性是一个比较复杂的数量性状,单一耐盐、敏盐亲本的选择,可能会影响到结果的准确性,未来研究应该再增加杂交组合数或建立永久的分离群体,寻找更多与耐盐性连锁的分子标记,以期准确定位与棉花耐盐相关的QTL。

参考文献:

- [1] 杜岩,郭军,江解增,等.有机碳改良剂在次生盐渍化土壤上的使用效果[J].江苏农业科学,2014,42(7):367-370.

- [2] 邓如莹,崔兆杰,殷永泉,等. 石油胁迫对盐渍土壤微生物呼吸作用强度和酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):326-329.
- [3] 肖松华,刘剑光,吴巧娟,等. 优质高产抗虫棉花新品种苏杂208 选育及利用[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):91-92,97.
- [4] 刘吉焘,马晓杰,狄佳春,等. 棉花草甘膦抗性基因 *CP4-EPSPS* 的初步定位[J]. 江苏农业学报,2013,29(3):480-484.
- [5] 魏 东,张祥峰. 让滨海盐碱地种出丰产棉[N]. 科技日报,2010-11-25(1).
- [6] 郭海林,陈静波,陈 宣,等. 结缕草耐盐性的遗传分析[J]. 植物资源遗传学报,2012,13(5):733-738.
- [7] 李艳茹,司龙亭. 黄瓜幼苗耐盐性的遗传分析[J]. 西北农林科技大学学报:自然科学版,2011,39(4):127-131.
- [8] 陈华涛,陈 新,喻德跃,等. 大豆苗期耐盐性的遗传及 QTL 定位分析[J]. 中国油料作物学报,2011,33(3):231-234.
- [9] 邵桂花,常汝镇,陈一舞,等. 大豆耐盐性遗传的研究[J]. 作物学报,1994,20(6):721-726.
- [10] 沈法富,于元杰,毕建杰,等. 棉花耐盐性的双列杂交分析[J]. 作物学报,2001,27(1):50-54.
- [11] LINH L H, LINH T H, XUAN T D, et al. Molecular breeding to improve salt tolerance of rice in the red river Delta of Vietnam[J]. International Journal of Plant Genomics,2012,9(7):e949038.
- [12] 邵 安. 利用小麦 F_2 代(SR3×JN17)群体进行盐胁迫相关主效 QTL 的 SSR 及 EST-SSR 定位[D]. 青岛:山东大学,2010.
- [13] 翁跃进,陈道明. 小麦耐盐基因的标记和标记的克隆[J]. 遗传学报,2002,29(4):343-349.
- [14] XU R G, WANG J M, LI C D, et al. A single locus is responsible for salinity tolerance in a Chinese landrace barley (*Hordeum vulgare* L.) [J]. PLoS One, 2012,7(8):e43079.
- [15] 郭 蓓,邱丽娟,邵桂花,等. 大豆耐盐基因的 PCR 标记[J]. 中国农业科学,2000,33(1):10-16.
- [16] 郭宝生,翁跃进. 大豆耐盐机理及相关基因分子标记[J]. 植物学通报,2004,21(1):113-120.
- [17] 印志同,杨庆华,倪正斌,等. 糯玉米芽苗期耐盐性鉴定及相关分子标记筛选[J]. 江苏农业学报,2012,28(2):278-283.
- [18] 杨青川,韩建国,孙 彦,等. 苜蓿耐盐基因分子标记的筛选[J]. 作物学报,2005,31(9):1157-1161.
- [19] 陈 宣,郭海林,薛丹丹,等. 结缕草属植物耐盐性 SRAP 分子标记研究[J]. 草业科学,2009,18(2):66-75.
- [20] GHOMI K, RABIEI B, SABOURI H, et al. Mapping QTLs for traits related to salinity tolerance at seedling stage of rice (*Oryza sativa* L.): an agrigenomics study of an Iranian rice population [J]. OMICS,2013,17(5):242-251.
- [21] ZHANG W J, NIU Y, BU S H, et al. Epistatic association mapping for alkaline and salinity tolerance traits in the soybean germination stage[J]. Plos One,2014,9(1):e84750.
- [22] XU D H, TUYEN D D. Genetic studies on saline and sodic tolerances in soybean[J]. Breeding Science,2012,61:559-565.
- [23] WANG S L, GAO S R, WANG Z H, et al. Mapping of QTLs associated with salt tolerance of maize inbred line at seedling stage [J]. Agricultural Biotechnology,2012,1(4):34-38.
- [24] GUO H, DING W W, CHEN J B, et al. Genetic linkage map construction and QTL mapping of salt tolerance traits in zoysiagrass (*Zoysia japonica*) [J]. PLoS One,2014,9(9):e107249.
- [25] 张丽娜,叶武威,王俊娟,等. 棉花耐盐性的 SSR 标记研究[J]. 棉花学报,2010,22(2):175-180.
- [26] 郭继坤. 陆地棉抗旱耐盐及产量、形态性状的 QTL 定位[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2007.
- [27] DB13/T1339-2010 棉花耐盐性鉴定评价技术规范[S].
- [28] 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* [J]. Theoretical and Applied Genetics,2001,103:455-461.
- [29] 蒋玉蓉,吕有军,祝水金. 棉花耐盐机理与盐害控制研究进展[J]. 棉花学报,2006,18(4):248-254.

(责任编辑:孙 宁)