

安百伟, 赵 亮, 狄佳春, 等. 陆地棉 *Bt* 抗虫基因类型鉴定与染色体定位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(2): 262-266.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2016.02.004

陆地棉 *Bt* 抗虫基因类型鉴定与染色体定位

安百伟¹, 赵 亮², 狄佳春², 陈旭升²

(1. 南京农业大学农学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏 南京 210014)

摘要: 为明确 *Bt* 抗虫棉种质系 N099 的抗虫性状遗传方式、抗虫基因类型以及抗虫基因插入染色体的位置, 用 N099 为父本与非抗虫海岛棉海 7124 杂交, 分析了 F₂ 分离世代遗传方式, 结果表明该抗虫棉的抗虫性状呈简单的 1 对显性基因控制的质量遗传方式。进一步在 *Bt* 毒蛋白和 DNA 2 个层面对该抗虫基因类型进行鉴定, 结果显示 N099 所含抗虫基因为双价 *Bt* 基因 *CryIAC*+*Cry2A*。而后利用 234 对核心引物对 F₂ 代抗、感株组成的近等基因混池进行多态性筛选, 发现其中 1 对多态性引物 NAU2912 与该 *Bt* 基因连锁。已知引物 NAU2912 位于棉花第 26 染色体上, 通过该引物上、下 50.0 cM 之间的其他引物进行多态性筛选, 共获得 16 对引物与双价 *Bt* 基因相连锁, 目的基因位于分子标记 *dc40260* 和 *cgr6702* 之间, 其遗传距离分别为 1.8 cM 和 2.9 cM, 因此将双价 *Bt* 基因定位在棉花第 26 染色体上。

关键词: 陆地棉; 双价 *Bt* 基因; SSR 分子标记; 染色体定位

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)02-0262-05

Identification and chromosomal mapping of insect-resistant gene *Bt* in upland cotton

AN Bai-wei¹, ZHAO Liang², DI Jia-chun², CHEN Xu-sheng²

(1. College of Agriculture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to define the inheritance of insect-resistant traits, insect-resistant gene types and the position of the insect-resistant gene on chromosomes in a *Bt* transgenic cotton germplasm N099, the insect resistance and susceptibility was evaluated in a F₂ population of non-resistant N099 and resistant Hai7124 (*Gossypium barbadense*). Results showed that the resistance was controlled by a single pair of dominant gene. N099 was identified by *Bt* protein strip and DNA-PCR to contain bivalent *Bt* insect-resistant gene, *CryIAC*+*Cry2A*. A pair of polymorphic primer NAU2912 two hundred and thirty-four pairs of primers covering 26 cotton chromosomes was found in a near-isogenic pool consisting of resistant & susceptible F₂ cotton plants to be linked with the *Bt* gene *CryIAC*+*Cry2A*. Known the primer on cotton chromosome 26, then other primers on the chromosome flanking 50 cM from the primer

were screened, which received 16 pairs of primers linked with the *Bt* gene. It was located between SSR marker *dc40260* and *cgr6702*, with genetic distance 1.8 cM and 2.9 cM respectively. Thus, the bivalent *Bt* gene is mapped on the cotton chromosome 26.

Key words: upland cotton; bivalent *Bt* gene; SSR marker; chromosomal mapping

收稿日期: 2015-07-27

基金项目: 转基因生物新品种培育科技重大专项子课题
(2014ZX08005-001)

作者简介: 安百伟(1989-), 男, 山东五莲人, 硕士研究生, 研究方向为棉花遗传育种。(Tel) 15150566251; (E-mail) anbaiw@126.com

通讯作者: 陈旭升, (Tel) 025-84390371; (E-mail) njcx@s126.com

中国自 1989 年开展转基因抗虫棉研究以来,在转基因抗虫棉遗传育种领域取得了巨大成就。1994 年国产转 *Bt* 基因抗虫棉的成功研制,使中国成为继美国之后第 2 个拥有抗虫基因自主知识产权的国家^[1]。迄今有不少关于抗虫基因转化成功的报道,除了大家熟知的转单价 *Bt* 基因抗虫棉外,还有转其他抗虫基因类型的抗虫棉,比如双价 *Bt* 基因 *CryIAc*+*Cry2A* 以及混合双价抗虫基因 *Bt*+*CpTI*、*Bt*+*GNA* 等^[2-5]。

关于抗虫基因的遗传模式已有许多研究报道。国内外研究者普遍认为,转基因棉花的抗虫性状呈简单的质量性状遗传方式,抗虫性状是受 1 对显性基因控制的质量性状^[6-9],但关于抗虫基因定位的研究报道很少。前人曾试图利用经典遗传学的连锁测定方法对 *Bt* 抗虫基因进行染色体定位,但未能成功^[10]。迄今为止也未见使用分子遗传学的方法将抗虫基因成功定位到棉花某特定染色体上的报道。

本课题组于 2011 年对 3 份外来陆地棉品种资源进行大田不治虫筛选,获得 1 份抗虫性特别优良的新种质,编号 N099。本研究拟在 *Bt* 毒蛋白和 DNA 分子水平上鉴定该种质的抗虫基因类型,进而以该种质系与海岛棉杂交获得 F_2 分离群体,采用 SSR 分子标记技术对该抗虫基因进行染色体定位,旨在为下一步深入理解外源抗虫基因插入染色体机理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

研究材料为陆地棉种质系 N099 和海岛棉海 7124 及其杂交 F_1 和 F_2 ,其中 N099 为抗虫陆地棉,海 7124 为不抗虫的海岛棉。

1.2 方法

1.2.1 遗传群体的抗、感单株调查 选择非抗虫海岛棉海 7124 作为母本,抗虫种质系 N099 作为父本进行杂交,收获 F_1 种子。种植 F_1 ,通过自交获得 F_2 种子。在江苏省农业科学院试验基地种植亲本和 F_1 、 F_2 群体,种植方式为营养钵育苗移栽,行距为 80 cm,株距为 40 cm。在棉花现蕾期,用 5 mg/ml 卡那霉素涂抹各群体单株,并结合大田不治虫条件下的单株生物学抗性表现,调查各群体的抗性株与非抗性株数量,而后对分离群体进行 χ^2

适合性测验。

1.2.2 DNA 提取与 SSR 分子标记的 PCR 扩增 取亲本及 F_2 群体单株幼嫩叶片,采用 CTAB 法^[11]提取 DNA。SSR 分子标记的 PCR 扩增反应在 PTC-200 (MJ research)上进行。PCR 反应程序为:94 °C 预变性 2 min;94 °C 变性 40 s,56 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,30 个循环;最后 72 °C 延伸 7 min^[12]。扩增产物进行 8.0% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳,电泳缓冲液为 1×TBE,200 V 恒压电泳。电泳结束后,参照张军等^[13]方法进行染色。

1.2.3 转 *Bt* 基因植株的毒蛋白试纸条检测 采用由上海佑隆生物科技有限公司生产的 *Bt* 基因 *CryIAb*/*Ac* 和 *Cry2A* 速测试纸条,具体操作步骤严格按照说明书进行。

1.2.4 转 *Bt* 基因的分子检测 利用 *CryIAc*、*Cry2A* 两个特异引物分别进行 *Bt* 基因扩增。*CryIAc* 的特异性引物序列 (F: 5'-AGGGAACCTTCATCGTGG-3'; R: 5'-ATACGTGCCAAGTGCCAACC-3') 参照王奕海等的报道^[14],扩增片段大小为 310 bp;*Cry2A* 的特异引物序列 (F: 5'-AGATTACCCCAGTTCCAGAT-3'; R: 5'-GTTCCCGAAGGACTTTCTAT-3') 参照 Bushra 等的报道^[15],扩增片段大小为 600 bp。PCR 扩增产物在恒压 90 V 条件下,使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳,最后在荧光灯下观察目的片段,鉴定父本、母本和 F_1 及 F_2 群体中部分单株的抗虫基因。

1.2.5 多态性标记筛选与目的基因定位 在 F_2 群体中随机选取抗性植株和不抗植株各 10 株,每单株取等量叶片,将抗性单株和不抗单株的叶片混合,提取总 DNA 作为近等基因池^[16]。利用本实验室 (农业部长江下游棉花与油菜重点实验室) 前期从 1 350 对引物中筛选获得的分布于棉花 26 对染色体上的 234 对 SSR 核心引物^[17],先筛选 F_2 近等基因混池的多态性差异标记,而后检测 F_2 群体共 172 个单株的基因型。统计多态性条带,与海 7124 带型相同的个体基因记为 1,与 N099 带型相同的记为 2,共显性杂合带型记为 3,缺失记为 0。采用 Join Map4.0 软件进行分子标记的连锁分析和位点排序,确定目的基因在染色体上位置。

2 结果与分析

2.1 N099 抗虫性状在海陆杂交群体中的分离规律 调查海陆杂交的 4 个世代群体在大田中的抗虫

性状分离情况(表 1)。由表 1 可知,母本海岛棉海 7124 全部植株表现为不抗,父本陆地棉 N099 全部植株表现为抗性。 F_1 植株均表现为抗性, F_2 中抗虫植株与不抗植株数目符合 3:1 的分离比例。以上结果证明,该抗虫性状是由 1 对显性基因控制的质量性状。

表 1 N099 和海 7124 杂交后代抗虫性的分离

Table 1 The insect-resistance separation in the offspring of Hai7124 and N099

世代	亲本及组合	抗虫单株数	不抗单株数	χ^2 值	χ^2 概率
P_1	海 7124	0	71		
P_2	N099	47	0		
F_1	海 7124×N099	59	0		
F_2	F_1 自交	125	47	0.496 1	0.25~0.50

$\chi^2_{0.05,1} = 3.84$ 。

2.2 抗虫棉 N099 的抗虫基因类型

利用 *Bt CryIAb/Ac* 和 *Cry2A* 速测试纸分别对抗虫棉 N099 和不抗虫的海岛棉海 7124 进行检测。结果表明,N099 2 种基因速测试纸条的检测结果显示阳性,而海 7124 则都显示阴性(图 1)。说明抗虫棉种质系 N099 中含有外源 *Bt* 抗虫基因 *CryIAb/Ac* 和 *Cry2A*。

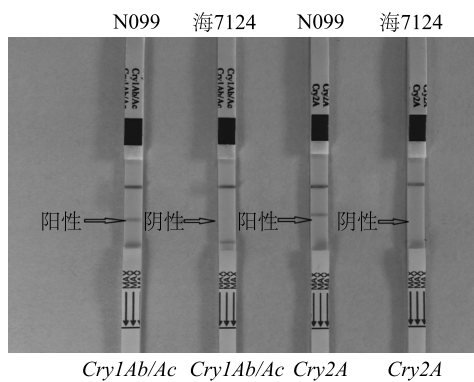
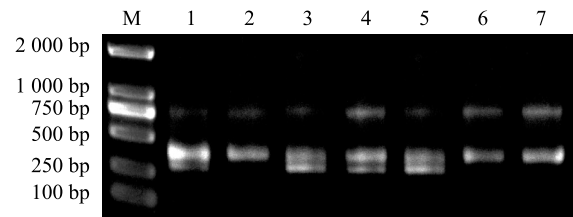


图 1 试纸条检测棉花植株中 *Bt* 抗虫基因类型

Fig.1 *Bt* strip detecting the type of *Bt* genes in cotton plants

利用检测 *CryIAc* 的特异性引物分别对父本 N099、母本海 7124、 F_1 和 F_2 抗性和感性植株进行分子检测。结果(图 2)显示,父本、 F_1 和 F_2 抗性植株具有 PCR 扩增条带,符合特征引物设计的片段长度 310 bp,母本和 F_2 感性植株没有 PCR 扩增条带。由

此可见,抗性植株中含 *Bt* 抗性基因 *CryIAc*。

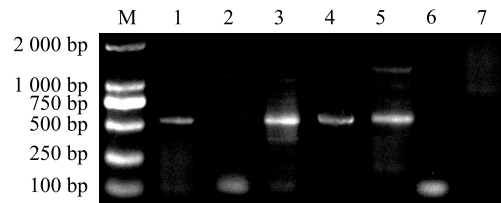


1、2 和 3 分别为父本、母本和 F_1 , 4 和 5 为 F_2 抗性植株, 6 和 7 为 F_2 感性植株。

图 2 棉花植株中 *CryIAc* 基因的 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *CryIAc* gene in cotton plants

再用检测 *Cry2A* 的特异性引物分别对抗虫父本 N099、母本海 7124、 F_1 和 F_2 抗虫和感性植株进行基因分子检测。结果(图 3)表明,父本、 F_1 和 F_2 抗虫植株均具有 PCR 扩增条带,其大小符合 *Cry2A* 基因特征引物设计的片段长度 600 bp,母本和 F_2 感性植株均没有 PCR 扩增条带,说明抗虫植株中含有 *Bt* 抗性基因 *Cry2A*。



1、2、3 分别为父本、母本和 F_1 , 4 和 5 为 F_2 抗性植株, 6 和 7 为 F_2 感性植株。

图 3 棉花植株中 *Cry2A* 基因的 PCR 扩增

Fig.3 PCR amplification of *Cry2A* gene in cotton plants

综合以上关于抗虫棉 N099 抗性性状的经典遗传学分析结果以及对抗虫基因类型进行的 *Bt* 毒蛋白与 DNA 分子检测结果,可以证明:抗虫棉种质系 N099 中所含的外源抗虫基因为 2 个 *Bt* 抗性基因整合形成的单一显性抗虫基因,即双价 *Bt* 抗虫基因 *CryIAc+Cry2A*。

2.3 双价 *Bt* 基因的染色体定位

经典遗传学研究结果已经显示,双价 *Bt* 基因控制的抗性性状呈简单 1 对显性基因控制的质量性状遗传方式,即属于外源基因单位点整合方式,因此可利用 SSR 分子标记技术进行基因定位。

利用本实验室前期筛选获得的 234 对核心引物(这些引物具有良好多态性,分布于棉花 26 条染色体上,每染色体平均 9 对引物),通过对双亲与 F_2 的抗-感近等基因混池进行差异标记筛选,共得到 22 对多态性引物。以这 22 对多态性引物检测 F_2 作图群体每个单株的基因型,发现标记 *NAU2912* 与 *Bt* 抗性基因连锁,两者的遗传距离为 12.7 cM。查看 Zhao 等^[18] 的棉花遗传图谱,*NAU2912* 位于第 26 染色体上。根据该引物的位置合成了上下距离 50.0 cM 区间的 56 对引物,经过对双亲本的筛选得到 31 对多态性引物。用获得的引物检测 F_2 群体每个单株的基因型,通过 Join Map4.0 软件进行连锁遗传分析,结果表明共有 16 个标记与目的基因 *Bt* 相连锁,分别是 *NAU2912*、*NAU3920*、*NAU2372*、*NAU2251*、*NAU4912*、*NAU3236*、*cgr6471*、*NAU5321*、*cgr6702*、*CIR085*、*dc40260*、*dPL0380*、*cgr5793*、*dPL0796*、*HAU1292*、*HAU2027*。位于目的基因 *Bt* 两侧的分标记分别为 *dc40260* 和 *cgr6702*,其中标记 *dc40260* 与目的基因的遗传距离为 1.8 cM,标记 *cgr6702* 与目的基因的遗传距离为 2.9 cM。因此,将目的基因定位在棉花第 26 染色体上(图 4)。

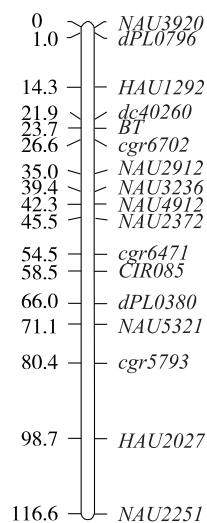


图 4 双价 *Bt* 抗虫基因 *CryIAC+Cry2A* 的连锁图

Fig.4 Linkage mapping of bivalent *Bt* gene *CryIAC+Cry2A*

3 讨论

关于转基因抗虫棉外源基因的染色体定位,前人已有报道。肖松华等^[10]曾使用经典遗传学方法,

对国产抗虫棉 GK-12 与国外抗虫棉 33B 的 *Bt* 基因进行定位,但未能成功。究其原因,是因为采用的遗传标准系 T586 和 T582 连锁群上的形态标记基因数太少,连锁定位的几率很低。迄今为止,国外也未见关于抗虫棉 *Bt* 基因成功定位的公开报道。本研究针对一份未知抗虫基因来源的抗虫棉种质系 N099,通过经典遗传学分析发现该抗虫性状呈简单的质量遗传方式,受 1 对显性基因控制。进一步对抗虫基因类型进行分子鉴定,结果显示其抗虫基因为双价 *Bt* 基因 *CryIAC+Cry2A*。利用分布于棉花 26 对染色体上的 SSR 分子标记,对该抗虫基因进行连锁标记定位,成功地将目的基因定位在棉花第 26 染色体上,该基因位于标记 *dc40260* 和 *cgr6702* 之间,与这 2 个标记的遗传距离分别为 1.8 cM 和 2.9 cM。

至于外源抗虫基因到底是完全随机地整合到棉花染色体上,还是对某些染色体具有定向插入偏好,目前尚无定论^[19]。棉花作为长期进化形成的物种,具有保持自身遗传稳定性的天然秉性,外源基因插入棉花染色体,应以不破坏其整体的遗传稳定性为前提。因此可以推测,被外源基因插入的染色体区域,其碱基序列结构应该具有保持其功能自稳定的特性。无疑,外源基因的插入与成功整合是物种基因组进化的主要动力之一^[20]。本研究对转基因棉花外源 *Bt* 基因进行的染色体定位,以及后续开展的外源插入基因侧翼序列的相关研究,将有助于在分子水平上理解棉种基因组进化的内在机制。

参考文献:

- [1] 郭三堆,崔洪志. 中国抗虫棉 GFM *CryIA* 杀虫基因的合成及表达载体构建[J]. 中国农业科技导报, 2000, 2(2): 21-25.
- [2] 郭三堆,倪万潮. 双价抗虫转基因棉花研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3): 1-7.
- [3] 陈旭升,郭三堆. 双价抗虫杂交棉苏杂 3 号杀虫蛋白时空表达规律分析[J]. 江苏农业科学, 2006(3): 44-45.
- [4] 刘志,郭旺珍,朱协飞,等. 转 *Bt+GNA* 双价基因抗虫棉对棉铃虫抗性的遗传分析[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(4): 388-393.
- [5] BAKHSH A, RAO A Q, SHAHID A A, et al. Insect resistance and risk assessment studies in advance lines of Bt cotton harboring *CryIAC* and *Cry2A* genes[J]. Am Eur J Agric Environ Sci, 2009, 6: 1-11.
- [6] 唐灿明,朱协飞,张天真,等. 转 *Bt* 基因抗虫棉 R19 品系的棉铃虫抗性表现及抗虫性遗传研究[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 194-200.

- [7] 李汝忠,沈法富,王宗文,等. 转 *Bt* 基因抗虫棉抗虫性遗传研究[J]. 棉花学报, 2001,13(5):268-272.
- [8] 袁小玲,唐灿明,张天真.转 *Bt+CpTI* 双价基因抗虫棉棉铃虫抗性的遗传分析[J].棉花学报, 2001,13(6):342-345.
- [9] BAKHSH A, RAO A Q, SHAHID A A, et al. CaMV35S is a developmental promoter being temporal and spatial in expression pattern of insecticidal genes (*cryIAc* & *cry2A*) in cotton[J]. Aust J Basic Appl Sci, 2010,4:37-44.
- [10] 肖松华,狄佳春,刘剑光,等. 转基因抗虫棉 *Bt* 基因的遗传连锁分析[J].棉花学报,2002, 14(3):134-137.
- [11] PARTERSON A H, BRUBAKER C, WENDEL J F. A rapid method for extraction of cotton(*Gossypium* spp.) genomic DNA suitable for RFLP or PCR analysis[J]. Plant Mol Biol Rep,1993,11(2):122-127.
- [12] 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.
- [13] 张 军,武耀廷,郭旺珍,等. 棉花微卫星标记的 PAGE/银染快速检测[J].棉花学报,2000,12(5):267-269.
- [14] 王奕海,谢家建,张永军,等. 一种检测抗虫棉中不同 *Bt* 基因表达盒结构的 PCR 方法[J]. 农业生物技术学报, 2009,17(5):914-919.
- [15] BUSHRA R, ZAFAR S, TAYYAB H. Transformation and inheritance of *Bt* genes in *Gossypium hirsutum*[J]. Journal of Plant Biology, 2008, 51(4):248-254.
- [16] 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 genomic region by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991,88:9828-9832.
- [17] 景 超,马晓杰,狄佳春,等. 陆地棉超矮秆突变体基因的初步定位[J].遗传,2011,33(12):1393-1397.
- [18] ZHAO L, LV Y, CAI C, et al. Toward allotetraploid cotton genome assembly: integration of a high-density molecular genetic linkage map with DNA sequence information[J]. BMC Genomics, 2012, 13:539-570.
- [19] 左开井,张献龙,聂以春,等. 转基因抗虫棉 *Bt* 基因插入区碱基组成分析[J]. 遗传学报, 2002,29(8):735-740.
- [20] KYNDT T, QUISPEA D, ZHAI H, et al. The genome of cultivated sweet potato contains *Agrobacterium* T-DNAs with expressed genes: An example of a naturally transgenic food crop[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2015,112(18):5844.

(责任编辑:张震林)