

周向阳, 赵 亮, 狄佳春, 等. 抗虫杂交棉苏杂 6 号抗虫亲本的 *Bt* 基因类型鉴定与染色体定位[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 987-991.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.005

抗虫杂交棉苏杂 6 号抗虫亲本的 *Bt* 基因类型鉴定与染色体定位

周向阳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/农业部长江下游棉花与油菜重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: 为研究抗虫杂交棉苏杂 6 号抗虫亲本 YL02-1 的 *Bt* 抗虫基因类型, 抗虫性状遗传方式以及 *Bt* 基因在染色体上的插入位置, 首先利用特异引物对抗虫亲本 YL02-1 的 *Bt* 基因来源进行 PCR 鉴定, 结果显示, 其扩增条带符合国产 *Bt* 抗虫基因引物设计的特征片段长度 456 bp。而后以抗虫亲本 YL02-1 与非抗虫海岛棉种质系海 7124 杂交配组获得 F₁, F₁ 自交获得 F₂ 分离群体。对 F₂ 分离群体的分析结果显示, *Bt* 抗虫基因符合 3:1 理论分离比例。进一步利用 F₂ 中含有 *Bt* 和不含 *Bt* 基因的棉株 DNA 构建近等基因混合池, 以覆盖棉花 26 对染色体的 234 对核心引物检测混合池, 共获得 38 对 SSR 多态性引物。将获得的多态性引物检测 F₂ 分离群体基因型, 发现分子标记 NAU2579 与目的基因连锁。已知分子标记 NAU2579 位于棉花第 20 染色体, 对该分子标记上、下 50 cM 之内的其他分子标记进行多态性筛选, 共获得 17 个与 *Bt* 基因连锁的分子标记, 目的基因位于分子标记 Gh564 和 NAU3813 之间, 其遗传距离分别为 2.8 cM 和 12.2 cM。由此, 将亲本 YL02-1 中的 *Bt* 抗虫基因定位于棉花第 20 染色体上。

关键词: 杂交棉; 抗虫棉; *Bt* 基因; 染色体定位; 遗传

中图分类号: S562.024 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-0987-05

Identification and chromosomal mapping of *Bt* gene in the insect-resistant parents of hybrid cotton Suza No.6

ZHOU Xiang-yang¹, ZHAO Liang², DI Jia-chun², CHEN Xu-sheng²

(1. College of Agronomy, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences/Key Lab of Cotton and Rapeseed<Nanjing>, Ministry of Agriculture, Nanjing 210014, China)

Abstract: To determine the *Bt* gene types, the inheritance of insect resistance traits, and chromosomal position of *Bt*

收稿日期: 2016-01-28

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); 转基因特色专用棉新品种选育子课题 (2011ZX08005-005)

作者简介: 周向阳 (1992-), 男, 安徽亳州人, 硕士研究生, 研究方向为棉花遗传育种。(Tel) 15195881731; (E-mail) xiangyzhou@126.com

通讯作者: 陈旭升, (Tel) 025-84390371; (E-mail) njcx@126.com

gene in parental cotton material YL02-1, insect-resistant hybrid cotton Suza No.6, *Bt* genes were firstly identified by PCR using specific primers. The PCR product was 456 bp in length, the same size as domestically-bred insect-resistant *Bt*-transgenic cotton GK19. Then, F₁ generation derived from the cross between insect-resistant parent YL02-1 and non-insect-resistant island cotton Hai7124 generated the F₂ segregating population through selfing. The *Bt*-harboring plants in F₂ population and

non-harboring plants showed a 3:1 segregation ratio, indicating that the insect resistance was controlled by a pair of dominant genes. A total of 38 pairs of SSR polymorphic primers were selected by detecting the mixed gene pool with 234 pairs of primers covering 26 chromosomes, among which, primer NAU2579, found to link to the target *Bt* gene in F_2 generation, was located on chromosome 20. The target gene was located between SSR markers *Gh564* and *NAU3813*, with genetic distance of 2.8 cM and 12.2 cM respectively. Thus, the insect-resistant *Bt* gene from the parent YL02-1 is mapped on the cotton chromosome 20.

Key words: hybrid cotton; insect-resistant cotton; *Bt* gene; chromosomal location; inheritance

外源 *Bt* 毒蛋白基因自发现以来,在转基因抗虫棉的遗传育种中发挥了巨大的作用。郭三堆等在国内首先设计并合成了 *Cry1A* 杀虫晶体蛋白结构基因 *GFM Cry1A*,并整合到棉花基因组中,得到具有良好抗虫能力的转基因棉花,使中国成为仅次于美国的第 2 个具有自主知识产权、能生产转基因抗虫棉的国家^[1]。自 1994 年中国自主研制单价 GK 抗虫棉以来,转基因棉花已在中国推广应用近 20 年^[2],但有关转基因棉花外源基因的染色体定位研究报道较少^[3-4]。

苏杂 6 号是采用国产转 *Bt* 基因抗虫棉种质系 YL02-1 与高产抗病陆地棉种质系 JS1107 杂交配组而选育成功的高产抗虫杂交棉,2009 年通过国家农作物品种审定委员会审定^[5-6]。苏杂 6 号于 2008 年获得在长江流域棉区推广安全证书,2014 年继续获得长江流域生产应用安全证书。该品种在长江流域棉区的突出表现为籽棉皮棉产量高、抗病虫能力强、纤维品质较优^[7]。本研究拟通过对苏杂 6 号抗虫亲本 YL02-1 的 *Bt* 基因进行 PCR 特异性检测以鉴定该种质系的抗虫基因类型,进一步以苏杂 6 号抗虫亲本 YL02-1 作为母本与非抗虫海岛棉种质系海 7124 进行杂交,研究抗虫性状在杂交后代中的遗传规律,并利用 SSR 分子标记对该 *Bt* 基因进行染色体定位。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以抗虫性良好的转 *Bt* 基因陆地棉种质系 YL02-1 为母本,不抗虫的海岛棉种质系海 7124 为父本,通过杂交获得 F_1 代。将 F_1 代自交获得的 F_2 代分离群体作为基因定位群体,群体大小为 177 个单株。

1.2 *Bt* 基因来源的分子检测

用检测 *Bt* 基因的特异性引物对抗虫亲本

YL02-1 以及抗虫棉种质系 GK19、G-6、33B 和非抗虫棉对照泗棉 3 号进行 PCR 扩增。各材料的种子 DNA 提取,参照匡猛等的方法^[8]。*Bt* 基因 PCR 扩增检测的特异性引物序列参照王奕海等^[9]的报道,国产 *Bt* 基因的扩增片段大小为 456 bp,国外产 *Bt* 基因的扩增片段大小为 310 bp。特征引物序列 F-1: 5'-CATCTTCACTCGGTAACATCG-3' (456 bp); F-2: 5'-AGGGAACCTTCATCGTGG-3' (310 bp); R: 5'-ATACGTGCCAAGTGCCAACC-3'。

PCR 扩增产物在恒压 90 V 条件下,使用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳,在凝胶成像系统中观察目的基因片段。

1.3 多态性标记筛选与目的基因的定位

取 F_2 代群体植株真叶提取 DNA,方法参照 CTAB 法^[10]。在 F_2 代分离群体中随机选取含有 *Bt* 基因的单株 10 株和不含有 *Bt* 基因的单株 10 株,建立 2 个近等基因混池^[11]。然后利用本实验室(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^[12](SSR 引物序列均来自公共数据库 Cotton Marker Database,网址 <http://www.cottonmarker.org/>),对双亲和 2 个近等基因池进行 PCR 扩增,综合筛选有多态性的引物。PCR 扩增反应体系为 10.0 μ l,反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,57 $^{\circ}$ C 退火 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。扩增产物在 8.0% 的非变性 PAGE 凝胶上电泳,电泳缓冲液为 1 \times TBE,200 V 恒压电泳。电泳结束后,参照张军等^[13-14]方法进行银染观察。

用获得的多态性引物检测 F_2 代分离群体单株的标记基因型。统计多态性条带,将与海 7124 带型相同的个体基因型记为 1,与抗虫亲本 YL02-1 带型相同的个体基因型记为 2,共显性杂合带型的基因型记为 3,缺失条带或无法辨别条带的基因型记为

0。采用 Join Map4.0 软件进行分子标记的连锁分析和位点排序,从而锁定目标染色体,确定目的基因在染色体上的位置^[15-16]。然后合成目的染色体上的 SSR 引物进行图谱加密,以实现 *Bt* 基因的初步定位。

2 结果与分析

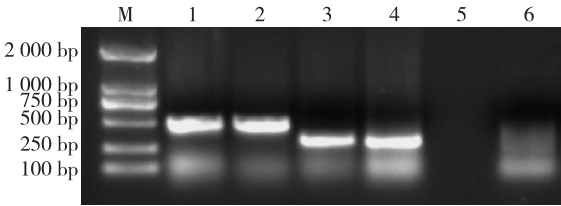
2.1 抗虫亲本 *Bt* 基因的特异性鉴定

利用检测 *Bt* 基因的特异性引物,分别对抗虫亲本 YL02-1 以及抗虫棉种质系 GK19、G-6、33B 进行 PCR 检测,以清水和非抗虫棉材料泗棉 3 号为对照,依据扩增条带特征分子量的大小进行分子鉴定(图 1)。由图 1 可以看出,抗虫亲本 YL02-1 的 PCR 扩增条带,符合国产 *Bt* 抗虫基因引物设计的特征片段长度 456 bp,与国产抗虫棉 GK19 的特征分子量大小一致,说明 YL02-1 为国产转 *Bt* 基因抗虫棉种质系。而 2 个来自美国的抗虫棉 G-6、33B 的扩增条带,则符合美国 *Bt* 抗虫基因引物设计的特征片段长

度 310 bp。清水对照与非抗虫棉泗棉 3 号无特征条带。

2.2 *Bt* 基因的遗传方式

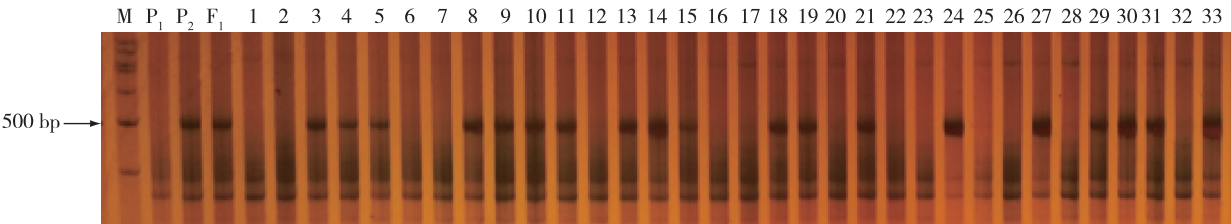
对杂交亲本 YL02-1 和海 7124, F_1 代及其 F_2 代群体的单株,用 *Bt* 特征引物进行 PCR 扩增,然后进行非变性 PAGE 凝胶电泳。结果(图 2)显示,亲本 YL02-1、 F_1 代和 F_2 代群体中含有 *Bt* 基因的个体具有 PCR 扩增条带,条带分子量大小为 456 bp;亲本海 7124 和 F_2 代中不含有 *Bt* 基因的植株,则没有 PCR 扩增条带。



M: DNA marker; 1: YL02-1; 2: GK19; 3: G-6; 4: 33B; 5: 清水; 6: 泗棉 3 号。

图 1 抗虫棉 *Bt* 基因的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of *Bt* gene in insect-resistant cotton



M: DNA marker; P₁: 海 7124; P₂: YL02-1; F₁: 杂交 1 代; 1~33: F_2 代分离群体的部分单株。

图 2 亲本与 F_2 群体部分单株的 *Bt* 基因 PCR 扩增

Fig.2 PCR amplification of *Bt* gene in F_2 population and parents

由表 1 可知,抗虫亲本 YL02-1 全部植株均含有 *Bt* 基因,非转基因亲本海 7124 全部植株均不含有 *Bt* 基因, F_1 代全部植株均含有 *Bt* 基因, F_2 代分离群体中含有 *Bt* 基因和不含有 *Bt* 基因的植株数目符合 3:1 的理论分离比例。说明该 *Bt* 抗虫基因呈现由 1 对显性基因控制的质量性状遗传方式。鉴于该 *Bt* 基因在染色体上属于单位点插入,可利用 SSR 分子标记技术进行染色体定位。

2.3 *Bt* 基因的染色体定位

通过 234 对核心引物对双亲以及近等基因混池进行差异性标记筛选,共得到 38 对多态性引物。以这些多态性引物检测 F_2 作图群体每个单株的标记基因型。通过连锁软件分析发现分子标记 NAU2579

表 1 YL02-1 和海 7124 杂交后代 *Bt* 基因的分离情况

Table 1 *Bt* gene segregation in the offspring of Hai7124 and YL02-1

| 群体 | 亲本及组合 | 含 <i>Bt</i> 基因 的单株数量 | 不含 <i>Bt</i> 基因 的单株数量 | χ^2 值 | χ^2 概率 |
|----------------|--------------------|-------------------------|--------------------------|------------|-------------|
| P ₁ | 海 7124 | 0 | 90 | / | |
| P ₂ | YL02-1 | 92 | 0 | / | |
| F ₁ | YL02-1×海 7124 | 83 | 0 | / | |
| F ₂ | F ₁ 代自交 | 125 | 52 | 1.81 | 0.10~0.25 |

注: $\chi^2_{0.05(1)} = 3.84$

和 *Bt* 抗虫基因连锁,且为共显性标记,两者的遗传

距离约为 11.6 cM。查阅最新棉花遗传图谱^[17],得知分子标记 *NAU2579* 位于第 20 染色体,可初步推断 *Bt* 基因位于棉花第 20 染色体。而后合成位于该分子标记上、下遗传距离 50 cM 区间内的 78 对引物,通过对双亲筛选得到 21 对多态性引物。用这些引物检测 F_2 代群体每个单株的标记基因型,然后通过 Joinmap4.0 软件进行遗传连锁分析,结果表明共有 17 个分子标记与 *Bt* 基因连锁,它们分别是引物 *NAU2579*、*NAU2698*、*NAU2888*、*NAU2915*、*NAU3531*、*NAU3813*、*NAU3907*、*NAU5013*、*NAU5307*、*NAU6219*、*BNL119*、*BNL1253*、*BNL2570*、*BNL3646*、*dPL0108*、*Gh564*、*cgr6022*。位于 *Bt* 基因两侧分子标记分别为 *Gh564* 和 *NAU3813*,遗传距离分别为 2.8 cM 和 12.2 cM。由此,将抗虫亲本 YL02-1 所含的国产 *Bt* 基因定位在棉花第 20 染色体上,其遗传连锁图谱见图 3。

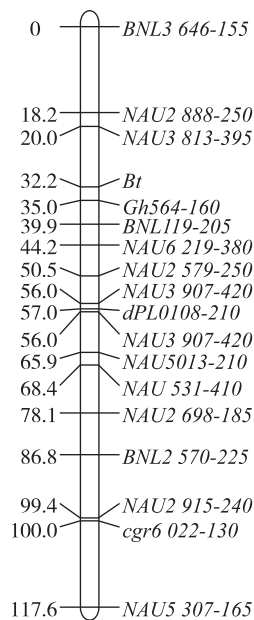


图 3 苏杂 6 号抗虫亲本 YL02-1 所含的 *Bt* 基因连锁遗传图谱

Fig.3 Linkage map of *Bt* gene from insect-resistant parent YL02-1 of Suza No.6

3 讨论

转 *Bt* 基因^[18] 抗虫棉的推广与应用有效地抑制了棉铃虫的危害,是生物技术在农业生产领域取得的重大突破之一;但 *Bt* 基因在染色体上的定位工作却进展缓慢,国内外关于抗虫棉 *Bt* 基因成

功定位的报道很少,迄今为止尚未见国产 *Bt* 基因在染色体上定位的报道。由于海陆杂交 F_2 代群体可以获得较多的多态性标记^[19],因此本研究采用陆地棉抗虫亲本 YL02-1 和海岛棉种质系海 7124 杂交的 F_2 代分离群体作为基因定位群体。特异性 *Bt* 基因引物检测结果显示,抗虫亲本 YL02-1 中所含的 *Bt* 基因为国产抗虫基因。利用相对均匀分布于棉花 26 对染色体上的 SSR 核心引物,对该 *Bt* 基因进行连锁遗传分析,成功地将 *Bt* 基因定位在棉花第 20 染色体上,该基因位于分子标记 *Gh564* 和 *NAU3813* 之间,其中 *Gh564* 与 *Bt* 基因的遗传距离为 2.8 cM, *NAU3813* 与 *Bt* 基因的遗传距离为 12.2 cM。

对于转 *Bt* 基因作物而言,*Bt* 基因能否在后代中稳定遗传和表达是转基因工作成败的关键。外源基因的插入应该以不破坏棉花整体的遗传稳定性为前提。外源基因的拷贝数多少,整合区域的碱基组成和结构特点对于基因的稳定和表达具有重要影响^[19]。不同抗虫棉品种之间,*Bt* 毒蛋白的表达量和抗虫能力是否相同,*Bt* 基因插入的染色体位置是否具有整合偏好,尚需进一步研究。本研究对转基因抗虫棉外源 *Bt* 基因的染色体定位,将为 *Bt* 基因插入位置偏好研究、国产抗虫棉系谱来源追踪以及转基因抗虫棉新品种的选育提供了理论支持。

参考文献:

- [1] 郭三堆,崔洪志. 中国抗虫棉 *GFM Cry1A* 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,王 远,孙国清,等. 中国转基因棉花研发应用二十年[J]. 中国农业科学, 2015, 48(17): 3372-3387.
- [3] CERNY R E, BOOKOUT J T, CAJACOB C A, et al. Development and characterization of a cotton (*Gossypium hirsutum* L.) event with enhanced reproductive resistance to glyphosate[J]. Crop Sci, 2010, 50: 1375-1384.
- [4] 刘吉焄,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] 陈旭升,狄佳春,许乃银,等. 转基因抗虫杂交棉新品种——苏杂 6 号[J]. 江苏农业科学, 2008(6): 100.
- [6] 陈旭升,武淑文,狄佳春. 转 *Bt* 基因抗虫杂交棉苏杂 6 号对棉铃虫的抗性效果分析[J]. 中国棉花, 2009(2): 6-8.
- [7] 陈旭升,狄佳春,马晓杰,等. 转 *Bt* 基因抗虫杂交棉苏杂 6 号的品种特性分析[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(6): 1425-1426.
- [8] 匡 猛,杨伟华,许红霞,等. 单粒棉花种子 DNA 快速提取方法[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 827-831.

- [9] 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.
- [10] PATERSON 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 Bio Rep, 1993, 11(2): 122-127.
- [11] MICHELMORE R W, PARAN L, KESSELI R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(21): 9828-9832.
- [12] 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(12):1393-1397.
- [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,2000,21(5):267-269.
- [14] ZHANG J, GUO W Z, ZHANG T Z. Molecular linkage map of allotetraploid cotton (*Gossypium hirsutum* L. \times *Gossypium barbadense* L.) with a haploid population[J]. Theor Appl Genet, 2002, 105: 1166-1174.
- [15] 倪西源,王学德,程超华,等. 棉花分子标记图谱的构建和一些重要性状的定位[J]. 棉花学报,2007,28(1):71-73.
- [16] 李峰利,狄佳春,赵亮,等. 陆地棉皱缩叶突变体基因 *wr₃* 的初步定位[J]. 遗传,2014(12):1256-1260.
- [17] ZHAO L, LÜ Y D, CAI C P, 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.
- [18] 王立国,李菲,刘勤红,等. 转 *Bt* 基因抗虫棉的生物安全性研究进展[J]. 山东农业科学,2014,46(7): 150-156.
- [19] YIN J M, CHEN X S, XIAO S H, et al. Molecular mapping of a new red mutant gene (*Rs*) in upland cotton[J]. Plant Breeding, 2009, 128(4): 416-419.
- [20] 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.

(责任编辑:张震林)