

花生黄曲霉侵染抗性的 SCAR 标记

雷 永^{1,2}, 廖伯寿¹, 王圣玉¹, 张银波^{1,2}, 李 栋¹, 姜慧芳¹

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; 2. 农业部油料作物遗传改良重点实验室, 武汉 430062)

摘要: 利用与花生黄曲霉侵染抗性基因紧密连锁的 AFLP 标记“E45/M53-440”, 经 PAGE 凝胶电泳后回收、克隆、测序, 并根据测序结果设计 PCR 特异引物, 通过对 PCR 条件的优化, 成功地将 AFLP 标记“E45/M53-440”转化为实验结果稳定, 操作更简单的 SCAR 标记“AFs-412”, 标记与花生黄曲霉侵染抗性间的遗传距离为 6.5 cM。利用获得的 SCAR 标记对抗、感黄曲霉的花生种质资源进行了分子鉴定, 结果表明标记与抗性鉴定结果具有较高的一致性, 证实了该标记应用于研究群体之外的育种潜力。SCAR 标记的建立为开展花生黄曲霉侵染抗性的标记辅助选择育种提供了简便实用的鉴定技术。

关键词: 花生; 黄曲霉; 分子标记; AFLP; SCAR

中图分类号: Q933

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2006)09-1107-05

A SCAR Marker for Resistance to *Aspergillus flavus* in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

LEI Yong^{1,2}, LIAO Bo-Shou¹, WANG Sheng-Yu¹, ZHANG Yin-Bo^{1,2}, LI Dong¹, JIANG Hui-Fang¹

(1. Oil Crops Research Institute of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China; 2. Key Laboratory for Genetic Improvement of Oil Crops of Ministry of Agriculture, Wuhan 430062, China)

Abstract: Aflatoxin contamination is an important constraint to peanut (*Arachis hypogaea* L.) industry worldwide. Genetic improvement for host resistance in peanut to fungal infection and aflatoxin (*Aspergillus flavus*) production is among the approaches for integrated management of the problem. However, the progress in peanut breeding for resistance to aflatoxin is slow due to various reasons, among which, lack of cost-effective method for resistance identification in breeding materials or segregating progenies has been encountered in most breeding programs. Hence there is a need to develop a rapid and reliable screening method for selecting *A. flavus* infection resistance in peanut. Here we report a SCAR (Sequence characterized Amplified Region) marker “AFs-412” converted from AFLP (amplified fragment length polymorphism) marker “E45/M53-440” which closely linked with resistance to *A. flavus* infection. Twenty peanut genotypes with resistance to infection of *A. flavus* were used to verify the reliability of the resistance markers, and high correlation between the molecular markers and the resistance result. The result shows that the potential of the markers which can be used in other resistant peanut genotypes to seed infection by *Aspergillus flavus*.

Key words: peanut (*Arachis hypogaea* L.); *Aspergillus flavus*; molecular marker; AFLP; SCAR

作为世界上重要的植物油脂和蛋白质来源, 花生及其制品的卫生安全性受到广泛关注, 其中黄曲霉毒素污染是我国花生出口贸易的关键性限制因素, 并对国内消费者健康构成了较大的潜在威胁。培育

收稿日期: 2005-09-16; 修回日期: 2006-01-09

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30170561), 农业部油料作物遗传改良重点实验室开放课题(编号: 200405)资助项目[Supported by the National Nature Science Foundation of China(No.30170561) and Key Laboratory for Genetic Improvement of Oil Crops of Ministry of Agriculture (No.200405)]

作者简介: 雷 永(1972—), 男, 助研, 研究方向: 花生遗传育种。Tel: 027-86812725, E-mail: leiyong120401@yahoo.com.cn

通讯作者: 廖伯寿(1963—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向: 花生遗传育种。Tel: 027-86812725, E-mail: lboshou@hotmail.com

和利用抗黄曲霉的花生品种是控制毒素污染最理想的途径^[1,2],但鉴定方法的缺陷性限制了花生抗黄曲霉遗传改良的进展^[3,4]。通常,花生黄曲霉抗性的鉴定是采用实验室接种的方法,但接种后的花生种子即丧失生活力,不能再生成后代植株和种子,因此,已有的花生抗黄曲霉侵染育种技术只能对种子数量较多的资源材料和杂交高世代群体($F_5 \sim F_7$)进行鉴定筛选,而在早期世代($F_2 \sim F_3$)由于种子量较少,很难用于接种鉴定。建立简便有效的分子标记辅助选择技术可实现杂交早期世代的选择、提高选择效率并降低育种成本,是克服现有育种技术障碍的关键。AFLP(amplified fragment length polymorphism)技术所具有的多态性丰富、无须预知基因组序列信息、稳定性好等优点使其在分子标记研究中得到了广泛应用,但由于AFLP实验步骤仍然较多,对实验技术和设备要求高,费用大,难以在杂交后代的大规模群体筛选中应用。SCAR(sequence characterized amplified region)标记是一种十分稳定的分子标记,一般是由RFLP、RAPD、AFLP等标记转换而来,其基本原理是根据已获得的标记片段的序列信息,设计一对长度为 20 bp左右的特异引物,然后通过普通的PCR手段来揭示多态性。SCAR标记在应用上具有迅速、简便、低成本的特点,非常适合于样品的大量分析,已开始植物分子标记辅助育种方面得到应用^[5-8]。在前期的研究工作中,我们采用AFLP技术结合BSA分析方法,以抗、感黄曲霉菌侵染的花生品种“中花 5 号×J11”杂交组合的 $F_{2,3}$ 分离群体为研究材料,获得了与花生黄曲霉菌侵染抗性紧密连锁的AFLP标记E45/M53-440。本研究以此为基础,通过克隆、测序和引物设计,将AFLP标记转化为稳定简单的SCAR标记,以提高分子标记辅助选择的实用性。

1 材料和方法

1.1 材料

以“中花 5 号×J11”的 $F_{2,3}$ 群体为研究材料,共计 114 个株系,其中亲本 J11 为抗黄曲霉侵染的花生材

料,来源于国际半干旱研究所(ICRISAT, 印度),中花 5 号高感黄曲霉侵染,是中国农业科学院油料作物研究所培育的高产高油花生新品种。SCAR 标记可靠性鉴定所选 20 个抗黄曲霉侵染的花生种质资源来自印度国际半干旱研究所和中国农科院油料所品种资源课题组,是国际上公认的抗黄曲霉菌侵染的花生种质资源。

TaqE、dNTP 购自 Biostar, Agarose 凝胶回收试剂盒购自 Omega 公司,其他常规药品为国产试剂。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

采用常规 SDS-酚/氯仿法提取花生叶片 DNA,紫外分光光度计测定 DNA 的浓度和纯度,1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,最后统一调整其浓度至 100 ng/ μ L。用于 SCAR 分析。

1.2.2 黄曲霉侵染抗性鉴定

黄曲霉侵染抗性鉴定参照Mehan V K^[9]描述的实验室接种法。以侵染指数高低划分抗性级别,侵染指数在 0.3 以下的为抗病、0.6 以上的为感病。

1.2.3 AFLP 产物回收、克隆和测序

AFLP片段的回收参照李传友^[10]描述的方法。PCR产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳纯化,与克隆载体 pMD18-T 连接后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,重组子经鉴定后送上海博亚公司测序。

1.2.4 引物设计与 SCAR 分析

1) 引物设计

采用 Primer premier 5.0 软件,设计用于 SCAR 分析的上下游引物 4 个组合,序列长度在 19~25 bp 之间,预期 PCR 产物分子量 250 bp 以上(表 1)。引物由上海 Sangon 生物工程有限公司合成。

2) SCAR 分析

以“中花 5 号×J11”的 $F_{2,3}$ 基因组 DNA 为模板,用表 1 所列引物组按照如下体系进行 PCR 扩增,反应总体积 20 μ L,含 Taq E buffer 2 μ L,primers (each

表 1 用于 SCAR 分析的引物
Table 1 The primers for SCAR analysis

编号 Code	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')	编号 Code	序列 (5'→3') Sequence (5'→3')
A1	TATGCTGTTGAATGAATTGTGAA	C1	ATGGCTAGATTATTGCCGTAT
A2	GCTAACCATTGGACTGTCCCTCT	C2	ACCAITGGACTGTCCCTCT
B1	TTCCCTGGAAGAAAGCAGT	D1	GGATGGCTAGATTATTGCCGTAT
B2	TATAGAGCCAACCCGACAA	D2	AATTCATGTCCCTAGTGGCTGAT

50 ng), *TaqE* 1U, dNTPs(each 0.2 mmol/L), Template DNA 100 ng. 扩增程序: 96°C 5 min, 94°C 30 s, 50°C ~59°C 30 s, 72°C 延伸 1 min, 30 个循环后 72°C 延伸 10 min。参考各组引物的 T_m 值, 调整 PCR 反应的复性温度。

1.2.5 数据处理

标记与抗性间的交换值 $R = \text{交换型个体} / (\text{抗性个体} + \text{感性个体})$ 。在无交叉干扰的情况下, 遗传距离 $GD = 0.25 \times \ln[(1+2R)/(1-2R)]$, 其中 GD 表示遗传距离(cM), R 表示交换值。

2 结果与分析

2.1 测序结果

AFLP 标记 E45/M53-440 特异片段实际测序结果为 448 bp, 与以标准分子量估计的大小相当(440 bp)(图 1), 另外在序列的两端均发现与引物 E45、M53 完全配对或互补的序列, 确证了序列测定结果的准确性。

2.2 SCAR 标记的获得与验证

利用 4 组引物(A1/A2、B1/B2、C1/C2、D1/D2)在 $F_{2,3}$ 群体中进行 PCR 扩增, 通过对 PCR 反应体系的优化, 筛选与抗感鉴定结果表现一致的引物组合。实验表明, 所选 4 组引物在 $F_{2,3}$ 的极端抗性个体中均

能部分或全部扩增出目标大小的片段, 其中 A1/A2 引物组在 11 个抗性极端个体中有 7 个扩增出 283 bp 的目标片段, B1/B2 引物组有 7 个株系扩增出 258bp 的目标片段。引物组 C1/C2、D1/D2 在表现极端抗病的个体中均扩增出目标大小的 DNA 片段, 并且与 AFLP “E45/M53-440” 标记条带的有无表现一致, 2 对引物获得的均是单一大小的 DNA 片段(图 2)。

进一步用 4 组引物对 114 个 $F_{2,3}$ 株系进行 PCR 扩增, 并与 AFLP 分析结果进行比较, 结果表明, A、B 两组引物扩增结果与 AFLP 分析的一致性较差, C 引物组表现不完全一致, 而 D 引物组扩增目标片段的有无与 AFLP 分析结果表现完全一致。通过对 D 引物组扩增获得的 412 bp 的核苷酸测序, 其结果能够与 AFLP 标记的 448 bp 的对应序列完全重合。因此, 利用引物组 D1/D2 已将花生黄曲霉侵染抗性的 AFLP 标记“E45/M53-440”成功地转化为 SCAR 标记, 根据标记的属性及片段大小命名为“AFs-412”。在 $F_{2,3}$ 群体中表现极端抗病的 24 个株系中的 22 个扩增出 412 bp 的条带, 2 株系未扩增出该条带; 22 个感病株系中有 21 个未扩增出 412 bp 条带, 1 株系扩增出该条带(图 3)。两点测验结果, SCAR 标记“AFs-412”与花生黄曲霉侵染抗性的交换值为 6.5%, 标记与黄曲霉抗性的遗传距离为 6.5 cM(表 2), SCAR 分析中 PCR 反应的复性温度为 59°C, 其余反应体系及 PCR 循环参数与实验方法 1.2.4 描述的一致。

```

1  GATGAGTCCTGAGTAACCGTGAGCCGGATGGCTAGATTATTGCCGTAATTACGGCGGAGCCATGATTATGGCTAAGTATAA
      D1
81  ATGCATAATGCTGTTGAATGAAATGTGAATGTTGCACCTCCACTGTTGGAGATGAGAGTTCCCTGGAAGAAAGCAGTGT
      A1 B1
161 ACTAGCCACCACGTGTCCAGGTTGAGACTCGAAGCTCCTTCGACCCTATGTCGTAAGGGTGGCCGGCCACTGTGAAAGC
241 CCCGGATGAGCTCGCCCCGTAATATTCACCAGTGAAGGTGATGGATATAGATCATGATTATAATCACGTTTATGATGA
321 GTATAACTCAAGTTGGGGATGCGCGATAGAGGGACAGTCCAATGGTTAGCTACCAGGACTTGTCCGGTTGGCTCTATAAC
      C2 A2 B2
401 CGACAGATGATATCATCAGCCACTAGGGACATGAATTGGTACGCAGTC (448)
      D2

```

图 1 AFLP 标记“E45/M53-440”测序结果及 SCAR 引物设计

A₁~D₂: 上下游引物在 DNA 片段中的配对位置。

Fig. 1 The sequence of AFLP marker E45/M53-440 and primers for SCAR analysis

A₁~D₂: Primers show the paired location in the DNA fragment.

表 2 AFLP 标记在 F_2 群体中的扩增情况统计

Table 2 The segregation of marker Afs-412 in the $F_{2,3}$ progenies.

标记 Marker	抗病 Resistant		感病 Susceptible		交换值(R, %) Recombination (%)	遗传距离(GD, cM) Genetic distance (cM)
	+	-	+	-		
Afs-412	22	2	1	21	6.5	6.5

+/-: 有/无特异带。

+/-: Presence/absence of specific fragment.

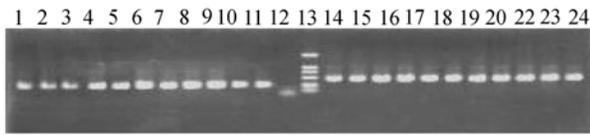


图 2 不同引物组合在 F₂ 抗性极端个体中的扩增结果

1~11: C1/C2 引物组合扩增结果; 12: 空白对照; 13: DNAarker, DL2000; 14~24: D1/D2 引物组合扩增结果。

Fig. 2 The PCR products amplified by different primers in the F₂ lines extremely resistant to *A. flavus*.

1-11: Amplified by primer C1/C2; 12: Blank; 13: Marker, DL2000; 14-24: Amplified with primers D1/D2.

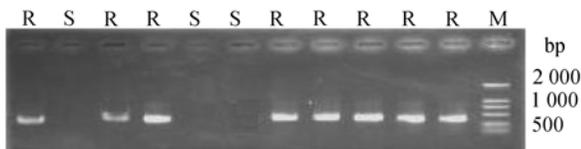


图 3 标记 Afs-412 在 F_{2,3} 株系中的扩增结果

R: 抗病株系; S: 感病株系; M: DNA Marker DL2000。

Fig. 3 The distribution of marker Afs-412 in F_{2,3} progenies.

R: Resistant line; S: Susceptible line; M: Marker, DL2000.

2.3 SCAR 标记在抗病性品种资源中的验证

SCAR 分析表明, 在 20 个抗黄曲霉侵染的花生资源材料中, 有 15 个材料检测到标记 Afs-412, 其余 5 个材料未检测到标记的存在, 标记与抗性的符合率为 75%(表 3)。

3 讨论

尽管国际上花生黄曲霉侵染抗性的研究开展较

早, 但是由于花生种仁发育状态及不同实验室所用菌株的侵染能力差异对抗性鉴定结果的影响, 以及接种鉴定所造成的种仁破坏, 使现有鉴定方法受到很大的局限, 因此利用 AFLP、SCAR 技术获得与花生黄曲霉侵染抗性紧密连锁的分子标记, 进而开展标记辅助选择育种变的尤为重要。SCAR 标记是开展作物分子标记辅助选择育种的有效技术手段。从 AFLP 到 SCAR 标记转化的实现能结合两者的优势, 获得简单、低成本、无损的特定性状检测方法, 非常适合于作物育种中对大量杂交后代材料的分析。花生黄曲霉侵染抗性 SCAR 分子标记的建立, 可以在杂种早期世代进行标记选择, 同时排除环境及花生种仁发育状态等因素对接种鉴定的干扰, 减少田间工作量, 降低育种成本等。另外, 标记选择与接种鉴定的相互验证可以提高选择效率, 增强育种工作的目的性和可靠性。

将标记 DNA 片段提交 NCBI 数据库进行比对, 未发现相似或同源的基因区段, 其原因可能是该片段为花生基因组 DNA 中的基因间或基因内含子序列, 而非表达的 DNA 序列, 我们将继续对该片段进行深入研究。

引物设计是 SCAR 标记转化的关键。根据测序结果设计的引物必须避免与核心接头序列配对, 因该部分是在进行 AFLP 分析时加上的额外序列, 而非

表 3 Marker Afs-412 在抗性资源材料中的检测结果

Table 3 The correspondence between the SCAR marker and resistance in peanut resource genotypes

编号 Code No.	基因型 Genotype	抗性表型 Phenotype	Afs-412	编号 Code No.	基因型 Genotype	抗性表型 Phenotype	Afs-412
1	PI337394F	R	+	15	ICGV89104	R	+
2	PI337409	R	+	16	ICGV91278	R	+
3	C55-437	R	+	17	ICGV91283	R	-
4	ICGV87107	MR	-	18	ICGV91284	R	+
5	ICGV87049	MR	+	19	ICG 70	MR	-
6	ICGV87110	R	-	20	J11	R	+
7	UF71513	R	-	21	Chico	S	-
8	Var 27	MR	+	22	89-15048	S	-
9	Faizpur	MR	+	23	远杂 9102 Yuanza9102	S	-
10	U4-47-7	R	+	24	中花 4 号 Zhonghua No.4	S	-
11	AH7223	MR	+	25	中花 8 号 Zhonghua No.8	S	-
12	VRR 245	MR	+	26	中花 5 号 Zhonghua No.5	S	-
13	ICGV87354	R	+	27	早 18 Zao18	S	-
14	ICGV88145	R	+				

R: 抗黄曲霉侵染; MR: 中抗; S: 感病; +/-: 有/无差异性条带。

R: Resistant to *Aspergillus flavus* infection; MR: Middle resistance; S: Susceptible; +/-: Presence/absence of specific fragment.

基因组本身所固有。一般来说, 考虑到基因组序列的重复性, AFLP 标记的 SCAR 转换中, 引物的设计应包含酶切位点和选择性碱基。但根据这一原则设计的引物往往不能揭示多态性, 可能的原因是在整个基因组序列中存在大量相同的酶切位点, 如果设计的引物包含酶切位点, 可能会导致由于局部序列的配对产生非特异性扩增, 使本应存在的多态性消失。解决的办法是提高退火温度, 以增加 PCR 反应的特异性, 也可通过 PCR 步行的方法分离 AFLP 标记的相邻序列, 然后根据相邻序列信息设计合适的 SCAR 引物。另外, 设计的引物不应有发夹序列, 避免引物自身二聚体或引物间二聚体出现。通常获得的 AFLP 标记片段太小(150~300 bp), 不容易设计合适的 PCR 引物是导致标记转化实验失败的原因之一, 利用相对较长的 AFLP 片段能提高 SCAR 标记转化的成功率。

参 考 文 献 (Reference):

- [1] Mixon A C. Reducing *Aspergillus* species infection of peanut seed using resistant genotypes. *J Environl Quality*, 1986, 15(2): 101~103.
- [2] LIANG Xuan-Qiang, PAN Rui-Chi. The influence factors of aflatoxin in pre-harvest peanut. *Chinese Journal of Oil Crops*, 2000, 22(4): 67~70.
梁炫强, 潘瑞炽. 花生收获前黄曲霉侵染因素研究. *中国油料作物学报*, 2000, 22(4): 67~70.
- [3] XIAO Da-Ren, WANG Sheng-Yu. The progress on peanut aflatoxin contamination research. *Peanut Sci*, 1999, (Supl.): 124~129.
肖达人, 王圣玉. 花生抗黄曲霉毒素污染研究进展. *花生科技*, 1999, (增刊): 124~129.
- [4] Mehan V K, Mcdonald D, Rasagopalan K. Research of peanut genotypes to seed infection by *Aspergillus* in field trials in India. *Peanut Sci*, 1987, 14(2): 17~21.
- [5] LIU Jun-Feng, ZHANG Guo-Zhen, MA Qiu-Juan, PENG Liang-You. Development of A SCAR marker linked to avirulence gene AVR-PIK^m in rice blast fungus *magnaporthe grisea*. *Acta Phytopathol Sinica*, 2003, 33(2): 151~155.
刘俊峰, 张国珍, 马秋娟, 彭良友. 一个与稻瘟病菌无毒基因 AVR-Pik^m 连锁的 SCAR 标记的分离. *植物病理学报*, 2003, 33(2): 151~155.
- [6] LUO Su-Lan, HE Pu-Chao, ZHOU Peng, ZHENG Xue-Qin. Identification of molecular genetics markers tightly linked to downy mildew resistant in Grape. *Acta Genetica Sinica*, 2001, 28(1): 76~82.
罗素兰, 贺普超, 周鹏, 郑学勤. 与葡萄抗霜霉病基因紧密连锁的分子遗传标记. *遗传学报*, 2001, 28(1): 76~82.
- [7] TIAN Yi-Ke, WANG Cai-Hong, DAI Hong-Yi, ZHANG Ji-Shu. Screening of a RAPD marker tightly linked to *Co* gene in allpe and the SCAR marker conversion. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31(9): 919~925.
田义轲, 王彩虹, 戴洪义, 张继澍. 与苹果 *Co* 基因紧密连锁的 RAPD 标记的筛选及其 SCAR 标记转换. *遗传学报*, 2004, 31(9): 919~925.
- [8] YAN Nai-Hong, CHEN Jing, MA Xin-Rong, DENG Guang-Bing, YU Mao-Qun. Conversion of RAPD marker to SCAR marker of wheat cereal Root-knot nematode-resistant gene *Rkn-mnl*. *Chinese J Appl Environ Biol*, 2003, 9(3): 250~253.
阎乃红, 陈静, 马欣荣, 邓光兵, 余懋群. 小麦抗禾谷类根线虫基因及 *Rkn-mnl* 的 SCAR 标记. *应用与环境生物学报*, 2003, 9(3): 250~253.
- [9] Mehan V K, Mcdonald D. Research on the aflatoxin problem in groundnut at ICRISAT. *Plant and soil*, 1984 (79): 255~260.
- [10] LI Chuan-You, FU Jian-Min, JIN De-Min, WENG Man-Li, WANG Bin. Recovery, cloning and identification of polymorphic AFLP products. *Hereditas* (Beijing), 1998, 20(4): 1~4.
李传友, 伏建民, 金德敏, 翁曼丽, 王斌. AFLP 分析中多态性扩增产物的回收、克隆及鉴定. *遗传*, 1998, 20(4): 1~4.