

一个与净叶黄抗赤星病基因紧密连锁的 SSR 标记

蒋彩虹, 罗成刚, 任 民, 杨爱国, 冯全福, 王元英*

(烟草行业烟草遗传育种重点实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101)

摘 要: 为了在分子水平上弄清烟草赤星病抗性的遗传规律, 并进行遗传定位, 以抗赤星病品种净叶黄和感赤星病品种 NC82 为亲本, 构建了 F₁、F₂、BC₁ 代群体。通过对该群体进行赤星病接种鉴定和抗性遗传分析, 发现净叶黄对赤星病的抗性由显性多基因控制。通过分子标记群体扩增, 在第 M 号连锁群上, 筛选到一个与净叶黄的赤星病抗性基因紧密连锁的 SSR 标记, 它与抗性基因间的遗传距离为 4 cM。该标记可用于抗赤星病育种的辅助选择。

关键词: 烟草; 净叶黄; SSR; 赤星病

中图分类号: TS413

文章编号: 1007-5119 (2012) 01-0019-04

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2012.01.004

A SSR Marker Tightly Linked to the Resistant Gene of Jingyehuang on Tobacco Brown Spot

JIANG Caihong, LUO Chenggang, REN Min, YANG Aiguo, FENG Quanfu, WANG Yuanying*

(Key Laboratory of Tobacco Genetics and Breeding, Tobacco Research Institute of CAAS, Qingdao 266101, China)

Abstract: In order to study the tobacco brown spot disease resistance inheritance, and genetic mapping, F₂ and BC₁ populations from a cross between Tobacco Brown Spot resistant variety Jingyehuang and susceptible variety NC82 were developed. Values of disease index under artificial inoculations showed that the resistant trait of Jing-yehuang was fitted additive-dominance model. Meanwhile, a further molecular study was carried out using SSR markers based on a former genetic mapping, and a SSR marker which was tightly linked to the tobacco brown spot resistant gene located on M linkage groups with distance of 4 cM was obtained. This marker provides useful information for molecular marker assistant selection of brown spot resistance in breeding program of tobacco.

Keywords: tobacco; Jingyehuang; SSR; Tobacco Brown Spot

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 是一种叶用经济作物, 在我国国民经济中占有重要地位。烟草赤星病是严重危害烟草生产的病害之一, 赤星病菌主要危害成熟期叶片, 一旦气候条件适宜, 极易造成大面积流行, 致使烟草生产遭受重大损失。培育抗烟草赤星病的优良品种是预防该病害最经济有效的措施, 分子标记辅助选择育种又是提高选择效率和加快育种进程的重要手段。

Bindler 等^[1]于 2011 年 4 月公开发表了烟草高密度遗传连锁图谱, 包括 2000 余对 SSR 引物, 这为我们提供了方便有效的研究工具。笔者在前期的

试验中筛选出一个与净叶黄抗赤星病基因连锁的 SSR 标记 SR1160, 它与抗性基因的遗传距离约为 9.37 cM, 根据 Bindler 等^[2-3]的遗传连锁图谱, 可以确定它位于 M 号连锁群上。据此, 在烟草高密度连锁图上, 选择该标记两侧 10 cM 内的 30 对 SSR 引物进行扩增筛选, 希望得到理想的分子标记, 使其与抗性基因的遗传距离进一步缩小。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为抗赤星病品种净叶黄和感病品种

基金项目: 国家烟草专卖局项目“优质抗病烤烟新品种选育及育种技术研究”(110201002002)

作者简介: 蒋彩虹, 女, 助理研究员, 主要从事烟草遗传育种研究。E-mail: jiangcaihong@yeah.net。*通信作者, E-mail: wyytob@126.com

收稿日期: 2011-08-11

修回日期: 2011-10-08

NC82,由中国农业科学院烟草研究所育种研究中心提供,用它们作为亲本构建(净叶黄×NC82)F₁, F₂以及(净叶黄×NC82)×NC82回交BC₁群体。将供试材料在温室内播种,1个月后移栽到花盆中,按常规方法管理。

1.2 赤星病菌液制备与接种方法

烟草赤星病菌种由中国农业科学院烟草研究所植保研究室提供。将烟草赤星病菌种接种在马铃薯琼脂培养基上,28℃培养两周,用无菌水浸泡后,刮下菌丝体,用蒸馏水配成孢子浓度为 1×10^6 /mL浓度的悬浮液,作为接种液备用。

待供试材料长至9~10片叶子时,利用划伤悬滴法接种。每株接种两片底部叶片,在用于接种叶片的主脉两侧用接种针做4~6个十字划伤,在伤口处悬滴一滴接种菌液,保持高温(28℃)、高湿(相对湿度80%以上)培养3周调查发病情况。

1.3 病害抗性划分标准

单株病情划分标准 0级:无症状;1级:有25%的划伤略有浸染,但不扩展;2级:有50%的划伤有浸染,且稍有扩展;3级:80%的划伤有浸染,且形成病斑;4级:100%的划伤有浸染,且形成很大病斑,被浸染处坏死。

群体抗性分类标准 免疫:病级为0级;高抗:病级为1级;中抗:病级为2级;中感:病级为3级;高感:病级为4级。即0级、1级、2级划为抗病群体,3级和4级划为感病群体。

1.4 SSR引物

所用30对SSR引物来自Bindler等2011年4月公开发表的烟草SSR引物序列,这些标记均在M号连锁群上,由上海生物工程公司合成。

1.5 烟草材料DNA提取以及抗感池建立

采用改良的CTAB法提取烟草材料叶片的DNA,利用琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度法检测DNA质量,稀释为30~50 ng/μL,保存在-20℃冰箱中备用。

在抗性鉴定的基础上,将F₂群体的各个单株分别提取DNA。按Michelmore等^[4]提出的分离群体

分组分析法,随机选10个抗病株的DNA等量混合建立抗病基因池;随机选10个感病株的DNA等量混合建立感病基因池。

1.6 PCR反应与凝胶电泳检测

PCR反应总体积为15 μL,其中30~50 ng/μL DNA模板1.5 μL、上下游引物(10 μmol/L)各1.5 μL、dNTP(2 mmol/L)2 μL、10×Taq Buffer 2 μL、MgCl₂(25 mmol/μL)1.2 μL、Taq酶(5 U/μL)0.2 μL、ddH₂O 5.1 μL。

PCR扩增反应使用MJ Research PTC-100型基因扩增仪,程序如下:94℃预变性5 min;94℃变性30 s,56℃退火30 s,72℃延伸45 s,35个循环;72℃延伸6 min,4℃保存。其中退火温度依据引物序列不同稍加调整。

在PCR反应液中加入3 μL的Loading Buffer,取4.5 μL混合液在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上采用恒电压800 v电泳90 min左右。电泳后的凝胶用稍做改进的NaOH银染法染色显影^[5]。

1.7 数据统计与分析

采用Windows QTL Cartographer软件的CIM模块进行数据分析。

2 结果

2.1 供试材料赤星病抗性鉴定结果

采用划伤悬滴法,对亲本、F₁代、F₂群体及BC₁群体的各个单株进行赤星病抗性接种鉴定。

接种第7天划伤周围出现浸染症状,接种第14天发病症状明显(图1)。接种第20天调查发病情况并计算病情指数。结果显示,净叶黄高抗赤星病;NC82高感;F₁代中抗。净叶黄与NC82杂交一代表现抗病,据此认为净叶黄的赤星病抗性为显性遗传。调查显示,在F₂群体和BC₁群体中抗病株和感病株的比例均极显著地偏离期望值(表1),据此认为净叶黄的赤星病抗性是由多基因控制的数量遗传。

2.2 抗性基因的SSR标记筛选

根据前期的试验结果,标记SR1160位于M号



图 1 接菌发病症状

Fig.1 The typical symptom after inoculation with the brown spot pathogen

注：1 感病症状；2 抗病症状

表 1 群体中抗感比例卡方检验

Table 1 Chi-square test of segregation ratio among genetic populations

群体	期望值	实际抗感比	χ^2 检测结果	显著性
F ₂	3 1	94 68	24.897	0.000
BC ₁	1 1	6 21	8.333	0.004

连锁群上，与抗性基因的遗传距离约为 9.37 cM。为了筛选到与净叶黄抗赤星病基因连锁更紧密的标记，在 SR1160 两侧 10 cM 范围内分别选择 15 对 SSR 引物，以抗病和感病亲本 DNA 为模板进行 PCR 扩增，PCR 产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显色，大多数引物组合能扩增出清晰条带。经过 3 次重复

扩增检测，筛选出 1 对在抗感病亲本间稳定表现多态性的引物，编号为 J9。

利用 BSA 法，用多态性引物 J9 在抗感池间进行 PCR 扩增检测，它在抗感池间也表现出多态性，特异片段长约 230 bp，初步确定其与净叶黄的抗赤星病基因有连锁关系。

为了确定标记 J9 与抗病基因的遗传距离，用它对 F₂ 代单株进行扩增（图 2）。带型统计方法如下：与抗病亲本净叶黄带型一致的记做 0，与感病亲本 NC82 带型一致的记做 1，与 F₁ 带型一致的记做 2，建立数据库。用 Windows QTL Cartographer 软件的 CIM 模块进行数据整理分析，得到标记 J9 与来源于净叶黄的赤星病抗性基因间的遗传距离为 4 cM。

3 讨 论

DNA 分子标记是 DNA 水平上遗传多态性的直接反映，是继形态学标记、细胞学标记和生化标记之后，近年来流行的一种新型遗传标记。DNA 标记有很多优点：直接以 DNA 为研究对象，在生物体的各个组织、发育阶段都可检测；标记数量众多，遍布整个基因组；多态性很高，自然存在着较多等位变异；有许多标记为共显性，能够方便地鉴别出纯合基因型和杂合基因型，提供完整的遗传信息。

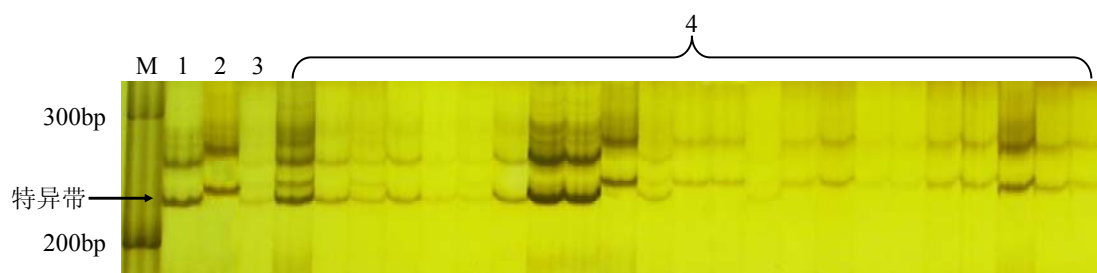
图 2 引物 J9 对部分 F₂ 单株的扩增结果

Fig.2 Polymorphism produced by J9 among the partial F₂ plants
注：M DNA Marker；1 净叶黄；2 NC82；3 F₁ 代；4 F₂ 代部分单株

目前，DNA 标记技术在烟草中的应用主要集中在遗传多样性研究，标记类型以 RAPD、RFLP 等为主^[6-7]，近年来，也有把 SRAP，ISSR，SSR 标记应用于烟草研究的报道^[8-10]，而与烟草抗性基因连锁的分子标记以 RAPD 标记居多。例如，Bai 等^[11]利用 441 个引物，找到了 2 个与烟草根黑腐病抗性

基因紧密连锁的 RAPD 标记。Yi 等^[12]找到了烟草根结线虫抗性基因 Rk 的 RAPD 标记。郭生云等^[13]由引物 S220 得到了一个抗病品种所共有，而感病品种没有的 760 bp 的 DNA 片段，可作为与烤烟抗赤星病基因紧密连锁的 RAPD 标记。Johnson 等^[14]

找到了与烤烟品种 Coker371-Gold 中黑胥病抗性基因 Ph 连锁的 RAPD 标记。

RAPD 标记使用的是随机引物, 成本低, 但实验重复性差, 结果可靠性也较低。SSR 标记是 1991 年由 Moore 等创立的一种 DNA 分子标记技术, 它具有标记带型简单、共显性、高多态性以及覆盖整个基因组等特点^[15]。SSR 标记使用的是根据简单重复序列两端保守的单拷贝序列设计的一对特异引物, 稳定性和重复性都很高。与其他作物相比, 烟草 SSR 标记研究起步较晚, 这主要是因为烟草上开发出的 SSR 引物很少, 限制了该技术在烟草研究中的应用。2007 年, Bindler 等首次报道了烟草的 SSR 标记遗传图谱, 包括 282 对 SSR 引物。2011 年 4 月, Bindler 等公开发表了高密度的烟草遗传连锁图谱, 包括 2000 多对 SSR 引物, 这为对烟草进行深入研究提供了良好的工具。

笔者最先将 SSR 标记技术应用于烟草抗赤星病研究, 利用 Bindler 等 2007 年发表的 SSR 引物, 筛选到一个与净叶黄抗赤星病基因连锁的标记 SR1160, 与抗性基因的遗传距离约为 9.37 cM。由于当时烟草上开发出的 SSR 标记引物较少, 所以筛选出的标记与抗性基因的遗传距离不是很近。分子标记与目标基因之间的遗传距离决定了分子标记辅助选择的准确率, 遗传距离越小准确率越高^[16-17]。为了筛选到连锁更加紧密的标记, 根据 Bindler 等 2011 年发表的高密度遗传连锁图谱, 可以确定 SR1160 位于 M 号连锁群上, 在这个标记的两侧 10 cM 以内分别选择 15 对 SSR 引物进行扩增筛选, 得到一个标记 J9, 它与抗性基因的遗传距离仅为 4 cM, 比原来的标记遗传距离近了 5.37 cM。利用此标记进行辅助选择, 准确率大大提高。而且该标记经过抗感亲本和抗感池的反复筛选, 稳定性和重复性好, 通过进一步验证, 可望将该标记有效地应用于辅助选择, 培育出优良抗赤星病新品种。

参考文献

[1] Bindler G, Plieske J, Bakaher N, et al. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale microsatellite marker development[J].

- Theor Appl Genet, 2011, 123: 219-230.
- [2] Bindler G, van der Hoeven R, Gunduzl, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco[J]. Theor Appl Genet, 2007, 114: 341-349.
- [3] 蒋彩虹, 王元英, 罗成刚, 等. 烤烟净叶黄的赤星病抗性遗传分析及 SSR 标记[J]. 分子植物育种: 网络版, 2011 (9): 1642-1646.
- [4] Michelmores R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregate analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832.
- [5] 任民, 贾兴华, 蒋彩虹, 等. Bassam 和 Sanguinetti 银染方法在 SRAP 和 TRAP 标记中的比较研究[J]. 生物技术通报, 2008 (1): 113-116.
- [6] 汪安云, 肖炳光, 李天飞, 等. 烤烟品种的 RAPD 引物筛选[J]. 中国烟草学报, 2000, 6 (4): 7-11.
- [7] 梁明山, 刘煜, 侯留记, 等. 烟草品种的 DNA 指纹图谱和品种鉴定[J]. 烟草科技, 2001 (1): 34-37.
- [8] 杨本超, 肖炳光, 陈学军, 等. 基于 ISSR 标记的烤烟质遗传多样性研究[J]. 遗传, 2005, 27 (5): 753-758.
- [9] 蒋彩虹. 烟草赤星病抗性分子标记筛选[D]. 北京: 中国农业科学院研究生院, 2007.
- [10] 范静苑, 王元英, 蒋彩虹, 等. 烟草 CMV 抗性鉴定及抗性基因的 SSR 标记研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7 (2): 355-359.
- [11] Bai D, Reeleder R, Brandle J E. Identification of two RAPD markers tightly linked with the Nicotiana glauca debNeyi for resistance to black root rot of tobacco[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1995, 91(8): 1184-1189.
- [12] Yi H Y, Rufty R C, Wernsman E, et al. A Mapping the root-knot nematode, resistance gene (Rk) in tobacco with RAPD markers[J]. Plant Disease, 1998, 82(12): 1319-1322.
- [13] 郭生云, 何川生, 张汉尧, 等. 用 RAPD 技术鉴定烤烟抗赤星病基因连锁标记[J]. 海南师范学院学报: 自然科学版, 2001, 14 (2): 10-13.
- [14] Johnson E S, Wolff M F, Wernsman E A. Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobacco[J]. Plant Disease, 2002, 86(12): 1303-1309.
- [15] Moore S S, Sargeant L L, King T J, et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. Genomics, 1991, 10: 654-660.
- [16] 黄晨, 李思易. 分子标记辅助选择技术的应用研究[J]. 生命科学仪器, 2008, 6 (12): 47-50.
- [17] 郑康乐, 黄宁. 标记辅助选择在水稻改良中的应用前景[J]. 遗传, 1997, 19 (2): 40-44.