

## 研究报告

### Research Report

# 烤烟净叶黄的赤星病抗性遗传分析及 SSR 标记

蒋彩虹<sup>✉</sup>, 王元英<sup>✉</sup>, 罗成刚<sup>✉</sup>, 杨爱国<sup>✉</sup>, 任民<sup>✉</sup>, 王静<sup>✉</sup>, 王绍美<sup>✉</sup>

中国农业科学院烟草研究所, 青岛, 266101

✉ 通讯作者: ctsqz@163.net ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 90 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0090

收稿日期: 2011 年 05 月 12 日

接受日期: 2011 年 06 月 29 日

发表日期: 2011 年 07 月 06 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

蒋彩虹等, 2011, 烤烟净叶黄的赤星病抗性遗传分析及 SSR 标记, 分子植物育种(online) Vol.9 No.90 pp.1642-1646 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0090)

引用格式(英文):

Jiang et al., 2011, Genetic Analysis of Cured Tobacco Jing-yehuang on Tobacco Brown Spot and Resistant Locus Mapping with SSR Markers, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.90 pp.1642-1646 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0090)

**摘 要** 本研究的目的是有两个: 一是研究净叶黄对赤星病抗性的遗传规律, 二是筛选出与此抗病基因连锁的 SSR 标记。试验以抗赤星病品种净叶黄和感赤星病品种 NC82 为亲本, 构建 F<sub>1</sub>、F<sub>2</sub>、BC<sub>1</sub> 代群体, 并进行赤星病接种鉴定和抗性遗传分析, 结果表明净叶黄对赤星病的抗性由显性加性基因控制。依据混合群体分组分析法(BSA 法), 从 F<sub>2</sub> 代群体植株中选取单株建立赤星病抗感基因池, 利用 280 对 SSR 引物进行分子标记分析, 得到标记 SR1160 与来源于净叶黄的赤星病抗性基因有连锁关系, 遗传距离为 9.37 cM, 该标记可用于抗赤星病育种的辅助选择。

**关键词** 烟草; 赤星病; SSR; 抗性遗传分析

## Genetic Analysis of Cured Tobacco Jing-yehuang on Tobacco Brown Spot and Resistant Locus Mapping with SSR Markers

Jiang Caihong<sup>✉</sup>, Wang Yuanying<sup>✉</sup>, Luo Chenggang<sup>✉</sup>, Yang Aiguo<sup>✉</sup>, Ren Min<sup>✉</sup>, Wang Jing<sup>✉</sup>, Wang Shaomei<sup>✉</sup>

Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao, 266101, P.R. China

✉ Corresponding author, ctsqz@163.net; ✉ Authors

**Abstract** The study was mainly aiming to two parts: (1) Testing the hereditary pattern of the Brown Spot resistant genes from Jing-yehuang; (2) Establishing F<sub>2</sub> population and using bulked segregant analysis to screen SSR markers linked to the resistant genes. It was carried out using F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>, BC<sub>1</sub> populations from a cross between Tobacco Brown Spot resistant variety Jing-yehuang and susceptible variety NC82. They were identified by artificial inoculation and the inheritance of resistance were analyzed. Results showed that the resistant character of Jing-yehuang is not controlled by single gene. DNAs of F<sub>2</sub> population were extracted to develop into a resistant pool and a sensitive pool based on the BSA. 280 pairs SSR primers were used for molecular marker analysis. The results show that the genetic distance between SR1160 and resistant gene from Jing-yehuang is 9.37 cM. This characteristic SSR marker can be used in marker assisted selection.

**Keywords** Tobacco; Tobacco Brown Spot; SSR; Genetic analysis of resistance

### 研究背景

烟草(*Nicotiana tabacum*)不仅是一种模式植物, 更是一种重要的叶用经济作物, 在我国国民经济中占有重要地位。烟草叶部病害, 尤其是烟草赤星病(*Alternaria alternata*)直接危害成熟叶片, 不仅造成烟叶产量的重大损失, 而且造成烟叶质量下降, 如烟

叶化学成分失调、口感变差等, 降低了烟叶使用价值, 若遇上适宜赤星病发病的气候, 极易造成大面积流行, 使烟草生产遭受重大的损失。近年来生产上已有一些抗赤星病品种使用, 但由于该抗性与不利的品质性状连锁, 目前抗病品种的数量和抗性水平还不能满足烟叶生产的要求, 仍然需要大量使用

化学农药防治该病害, 造成烟叶农药残留超标和环境污染, 因此, 急需深入研究烟草赤星病抗性遗传规律, 选育优质高抗的新品种。

净叶黄是河南省农科院烟草研究所于1965年从地方品种长脖黄中系统选育而成的, 是我国最早育成的抗赤星病品种, 也是我国抗赤星病育种利用的主要抗源。利用净叶黄的赤星病抗性, 先后育成多个抗耐赤星病品种, 包括许金4号、单育2号、中烟15、辽烟14、中烟86、中烟90等, 对我国的烟草生产起到了很大的促进作用(佟道儒, 1997)。

为了深入研究净叶黄对赤星病的抗病遗传规律, 以便更好地利用净叶黄的赤星病抗性, 本研究通过人工接种鉴定的方法, 系统研究了净叶黄对赤星病的抗性遗传。通过BSA (bulked segregant analysis) 法和SSR (simple sequence repeats) 标记技术, 寻找净叶黄中与抗赤星病基因连锁的SSR标记, 用于今后的分子标记辅助选择, 加强对目标性状的选择和鉴定, 提高育种效率, 缩短育种年限, 而且为克隆抗病基因奠定基础。

## 1 结果与分析

### 1.1 亲本及F<sub>1</sub>代赤星病抗性鉴定结果

采用划伤悬滴法接种, 对亲本、F<sub>1</sub>代进行了赤星病抗性鉴定。接种7 d划伤周围开始出现浸染症状, 接种14 d发病症状明显(图1)。接种后20 d时, 调查发病情况, 计算病情指数(表1)。净叶黄的病情指数为

表1 亲本及F<sub>1</sub>接种赤星病菌后病情调查表

Table 1 Disease observation of parents and F<sub>1</sub> inoculated with the Brown Spot pathogen

处理编号	材料名称	接种数量	病情指数
Treatment number	Materials	Number of plants inoculated	Disease index
1	净叶黄 Jing-yehuang	25	10
2	NC82	25	71
3	(净叶黄×NC82) F <sub>1</sub> (Jing-yehuang×NC82) F <sub>1</sub>	50	37

表2 赤星病在群体中抗感分离比例卡方检验

Table 2 Chi-square test of segregation ratio of Brown Spot resistance among the populations

群体	抗病株数	感病株数	期望比例	χ <sup>2</sup> 检验	显著性
Population	Resistant plants	Susceptible plants	Expectation value	Chi square test	Significance
F <sub>2</sub> 群体	94	68	3:1	24.897	0.000
F <sub>2</sub> population					
BC <sub>1</sub> 群体	6	21	1:1	8.333	0.004
BC <sub>1</sub> population					

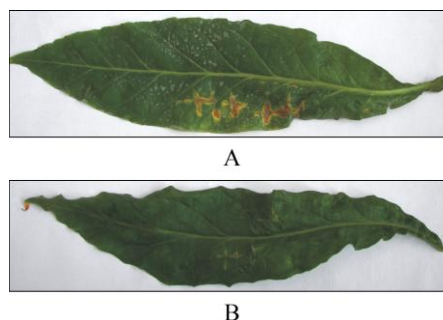


图1 接种赤星病菌后发病症状

注: 1: 感病症状; 2: 抗病症状

Figure 1 The symptom inoculated with the Brown Spot pathogen

Note: 1: Susceptible symptom; 2: Resistant symptom

10, 表现为高抗; NC82的病情指数为71, 表现为高感; F<sub>1</sub>代的病情指数为37, 表现为中抗。净叶黄与NC82杂交一代表现抗病, 据此认为净叶黄的抗病基因为显性遗传。

### 1.2 烟草赤星病抗性遗传分析

对F<sub>2</sub>群体和BC<sub>1</sub>代回交群体的各个单株分别进行赤星病抗性鉴定。对鉴定结果进行卡方检验, 在F<sub>2</sub>群体中, 抗病株数与感病株数的比例极显著的偏离3:1; 在BC<sub>1</sub>群体中, 抗病株数与感病株数的比例极显著的偏离1:1, 卡方检验结果见表2。推测净叶黄的赤星病抗性不是由单基因控制, 而是由加性基因控制。

### 1.3 抗病基因的SSR标记

本研究选用280对SSR引物, 以净叶黄和NC82的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3次重复扩增检测, 筛选出在抗感病亲本间表现多态的引物40对, 多态性比例为14%。

利用BSA法, 把筛选到的多态性引物在抗感池中进行扩增, 引物SR1160在抗感池间表现多态性, 特异片段长约160 bp, 初步确定其与净叶黄的抗赤星病基因有连锁关系。

用筛选到的多态性引物对F<sub>2</sub>代单株进行扩增(图2)。根据3.6中的公式计算重组率和遗传距离, 得到标记SR1160与来源于净叶黄的赤星病抗性基因间的遗传距离为9.37 cM, 位于第10条染色体。

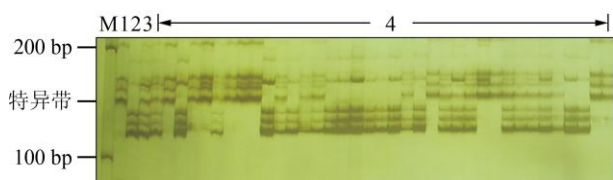


图2 引物SR1160在部分F<sub>2</sub>分离群体中的扩增结果  
注: M: DNA marker; 1: 净叶黄; 2: NC82; 3: F<sub>1</sub>代; 4: F<sub>2</sub>代部分单株

Figure 2 Polymorphism produced by SR1160 among the partial plants of F<sub>2</sub> population

Note: M: DNA marker; 1: Jing-yehuang; 2: NC82; 3: The F<sub>1</sub> generation; 4: Partial F<sub>2</sub> plants

## 2 讨论

### 2.1 净叶黄的抗性遗传

对于净叶黄的赤星病抗性, 前人进行了一定的研究(王素琴等, 1995, 烟草科技, (1): 30-32), 对净叶黄的抗性遗传进行了测定, 研究结果显示净叶黄的赤星病抗性由部分显性的加性基因控制, 且与不易烤特性有一定的连锁关系。郭永峰等(1997)对包括净叶黄在内的7个烟草品种的赤星病抗性进行了研究, 结果表明参试烟草品种的抗性特点差异很明显, 为多个基因控制的水平抗性。本研究根据净叶黄与NC82的杂交F<sub>1</sub>代, F<sub>2</sub>代, BC<sub>1</sub>代的接菌鉴定结果推断, 净叶黄的赤星病抗性并非由单基因控制, 而是由显性的加性基因控制的, 这与王素琴等(1995)的研究结果相符。

### 2.2 分子标记与烟草抗病育种

自上世纪80年代以来, 随着分子生物学的快速发展, 出现了很多种DNA分子标记技术。目前, 国内的DNA分子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, 近年来, 也有把ISSR标记应用于烟草的报道。而与烟草抗性基因连锁的分子标记以RAPD标记居多。例如, Bai (1995)等利用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 (1998)等找到了烟草根结线虫抗性基因Rk的RAPD标记。郭生云(2001)等由引物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 (2002)等找到了与烤烟品种Coker371-Gold中黑胥病抗性基因Ph连锁的RAPD标记。

SSR标记技术是Moore等(1991)创立的一种新型DNA标记技术, 它具有高多态性、带型简单、共显性以及稳定性好等特点。本研究最先采用SSR分子标记技术对烟草赤星病进行了研究, 找到了与净叶黄抗赤星病基因连锁的SSR标记, 遗传距离为9.37 cM, 而且该标记经过抗感亲本和抗感池的反复筛选, 稳定性和重复性较好, 通过进一步验证, 可望将该标记有效的应用于辅助抗病育种, 培育优良抗病品种。

由于烟草上开发出的SSR标记引物较少, 所以筛选到的标记与抗病基因的遗传距离不是非常近。然而随着分子生物技术在烟草上的深入研究应用, 相信不久的将来会建立密度较高的遗传图谱, 通过该标记确立连锁群, 一定会找到遗传距离更近的标记, 而且最终克隆出此抗赤星病基因。

## 3 材料和方法

### 3.1 材料

供试烟草材料净叶黄和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) F<sub>1</sub>, F<sub>2</sub>以及(净叶黄×NC82)×NC82回交BC<sub>1</sub>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。

### 3.2 接种菌液制备和接种方法

烟草赤星病菌种, 由中国农业科学院烟草研究所植保室提供。把菌种接种在马铃薯琼脂培养基

上, 在培养箱中28℃培养两星期。接种前用无菌水浸泡, 轻轻将菌丝体刮下倒在烧杯中, 用蒸馏水配成孢子浓度约为 $1 \times 10^6$  mol/mL的悬浮液, 作为接种菌液备用。

供试材料长到9~10片子叶时, 采用划伤悬滴法接种。每株材料接种两片底部叶片, 用接种针在接种叶片的主脉两侧做4~6个十字划伤, 在划伤处悬滴一滴接种菌液, 保持相对湿度80%、温度28℃, 连续培养3周后调查发病情况。

### 3.3 SSR引物

选用280对SSR引物, 它们均来自Mueller等(2005)和Bindler等(2007)发表的烟草SSR引物序列, 而且SSR标记位于的染色体是已知的, 委托上海生工合成。

### 3.4 DNA提取方法及抗病池的建立

本研究采用改良的CTAB法提取DNA, 用琼脂糖凝胶电泳法和紫外分光光度法检测DNA质量, 稀释到浓度为30~50 ng/ $\mu$ L, 保存在-20℃冰箱中备用。

在抗性鉴定的基础上, 将F<sub>2</sub>群体的单株分别提取基因组总DNA。按Michelmore等(1991)提出的分离群体分组分析法(BSA法), 随机选择10株抗病株的DNA等量混合建立抗病池, 随机选择10株感病株的DNA等量混合建立感病池。

### 3.5 扩增反应程序及电泳显色程序

PCR体系总体积25  $\mu$ L, 其中10 $\times$  Taq Buffer 2  $\mu$ L、MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/ $\mu$ L) 2  $\mu$ L、dNTP (2 mmol/L) 2  $\mu$ L、Taq酶(5 U/ $\mu$ L) 0.2  $\mu$ L、30~50 ng/ $\mu$ L DNA样品 2  $\mu$ L、上下游引物(10  $\mu$ mol/L)各1.5  $\mu$ L、ddH<sub>2</sub>O 13.8  $\mu$ L。试验所用试剂购自MBI。

PCR反应程序: 94℃变性6 min; 94℃变性40 s, 60℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 38个循环; 72℃延伸8 min, 4℃保存。退火温度根据引物序列差异略作调整。

PCR反应结束后, 在反应液中加入3  $\mu$ L Loading Buffer, 取4  $\mu$ L PCR产物在8%非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压1 000 v电泳约1 h。参考任民等(2008) NaOH银染法对电泳后的凝胶进行染色显影。

### 3.6 数据处理分析

卡方检验采用软件SPSS 12.0进行。

遗传距离(D)计算方法如下: (1)交换值(r)=(交换株数/总株数) $\times$ 100%; (2)按照Kosambi (1994)函数算出遗传距离(D),  $D=25 \times \ln[(1+2r)/(1-2r)]$ 。

### 作者贡献

蒋彩虹是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 王元英、罗成刚是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 杨爱国、任民协助完成数据分析, 论文初稿的写作; 王静、王绍美参与实验的过程。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家烟草专卖局项目(110201002002)资助。

### 参考文献

- Bai D., Reeleder R., and Brandle J.E., 1995, Identification of two RAPD markers tightly linked with the Nicotiana debneyi for resistance to black root rot of tobacco, *Theor. Appl. Genet.*, 91(8): 1184-1189
- Bindler G., Hoeven R., Gunduz I., Plieske J., Ganai M., Rossi L., Gadani F., and Donini P., 2007, A microsatellite marker based linkage map of tobacco, *Theor. Appl. Genet.*, 114(2): 341-349
- Guo S.Y., He C.S., Zhang H.Y., Xu M.L., and Xu J.M., 2001, Identification of brown spot disease resistance gene from flue-cured tobacco by RAPD technique, *Hainan Shifan Xueyuan Xuebao (Ziran kexueban)*, 14(2): 10-13 (郭生云, 何川生, 张汉尧, 许美玲, 许介眉, 2001, 用RAPD技术鉴定烤烟抗赤星病基因连锁标记, *海南师范学院学报(自然科学版)*, 14(2): 10-13)
- Guo Y.F., Zhu X.C., Kong F.Y., Shi J.K., and Wang N., 1997, Comparison of resistance in various brown spot resistant varieties, *Zhongguo Yancai Kexue (Chinese tobacco Science)*, 1: 1-6 (郭永峰, 朱贤朝, 孔凡玉, 石金开, 王年, 1997, 赤星病抗源的抗性比较, *中国烟草科学*, 1: 1-6)
- Jonhson E.S., Wolff M.F., and Wernsman E.A., 2002, Marker-assisted selection for resistance to black shank disease in tobaccoPlant, *Disease*, 86(12): 1303-1309
- Kosambi D.D., 1944, The estimation of map distance from recombination value, *Ann. Eugen.*, 12: 172-175
- Michelmore R.W., and Paran I., 1991, 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, *Process Natural Academic Science USA*, 88: 9828-9832
- Moore S.S., Sargeant L.L., King T.J., Mattick J.S., Georges M., and Hetzel D.J., 1991, The conservation of dinucleotide


microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species, *Genomics*, 10(3): 654-660

Mueller L.A., Solow T.H., Taylor N., Skwarecki B., Buels R., Binns J., Lin C., Wright M.H., Ahrens R., Wang Y., Herbst E.V., Keyder E.R., Menda N., Zamir D., and Tanksley S.D., 2005, The SOL genomics network: A comparative resource for solanaceae biology and beyond, *Plant Physiology*, 138: 1310-1317

Ren M., Jia X.H., Jiang C.H., Yang A.G., and Wang R.X., 2008, Comparison study of bassam and sanguinetti silver staining in the detecting of SRAP and TRAP, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 1: 113-116 (任民, 贾兴华, 蒋彩虹, 杨爱国, 王日新, 2008, Bassam和Sanguinetti银染方法在SRAP和TRAP标记中的比较研究, *生物技术通报*, 1: 113-116)

Tong D.R., ed., 1997, *Yancao Yuzhongxue (Tobacco Breeding)*, China Agricultural Press, Beijing, China, pp.432-438 (佟道儒, 编著, 1997, 烟草育种学, 中国农业出版社, 中国, 北京, pp.432-438)

Yi H.Y., Ruffy R.C., Wernsman E., and Cookling M.C 1998, Mapping the root-knot nematode, resistance gene (Rk) in tobacco with RAPD markers, *Plant Disease*, 82(12): 1319-1322



**5<sup>th</sup>Publisher**是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5<sup>th</sup>Publisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>