

生物技术

一个与烟草 TMV 抗性基因 *N* 紧密连锁的共显性 SSR 标记栗阳萌^{1,2}, 童治军², 李梅云², 焦芳婵², 耿素祥³, 李永平²

1 湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙, 410128;

2 云南省烟草农业科学研究院, 烟草生物技术育种重点实验室, 国家烟草基因工程研究中心, 昆明, 650021;

3 山东中烟工业有限责任公司, 济南, 250014

摘要: 烟草普通花叶病 (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV) 是烟叶生产的主要病害, 为建立烟草抗 TMV 分子标记辅助选择体系, 本研究以高抗 TMV 烤烟品种 Coker176 和易感 TMV 烤烟品种 Y3 以及它们的 BC1F1 群体为试材, 采用分离集团分组分析法 (Bulked Segregation Analysis, BSA) 和简单序列重复 (Simple Sequence Repeat, SSR) 标记技术, 筛选与 TMV 抗性基因 *N* 紧密连锁的共显性 SSR 标记。通过对 18764 对 SSR 引物的分析表明, 有 396 对 SSR 引物在两亲本间有多态, 选出 1 对 SSR 引物 TM508-007 扩增出的标记与 TMV 抗性的 *N* 基因紧密连锁, 遗传连锁距离为 0.41 cM, 证实获得的与 TMV 抗性基因 *N* 紧密连锁的共显性 SSR 标记稳定可靠, 可用于烟草抗 TMV 分子标记辅助选择。

关键词: 烟草; 烟草花叶病; 分离集团分组分析法; 共显性 SSR 标记

引用本文: 栗阳萌, 童治军, 李梅云, 等. 一个与烟草 TMV 抗性基因 *N* 紧密连锁的共显性 SSR 标记 [J]. 中国烟草学报, 2017, 23 (2)

烟草普通花叶病是由烟草花叶病毒 (*Tobacco Mosaic Virus*, TMV) 引起的, TMV 是第一个被鉴定的单链正义病毒^[1], 属于花叶病毒家族^[2], 具有传染活性^[3]。可侵染包括烟草在内的茄科作物, 影响烟叶的产量和品质, 选育抗病品种、提高烟草的抗病性是防治 TMV 的根本途径。*N* 基因是编码烟草花叶病毒抗性的显性单基因^[4], 属 TIR-NBS-LRR 类抗病基因, 通过转座子标签法从烟草野生种粘毛烟草 (*Nicotiana glutinosa*) 克隆得到^[5]。*N* 基因很容易进入育种程序且能够很快在选育品种中稳定下来, 仅仅导入 *N* 基因就可使烟草具有 TMV 抗性^[6-7]。因此, 通过选择具有 *N* 基因的育种材料可选出有抗性的基因型^[8]。基于烟草普通花叶病抗性基因 *N* 的基因组序列, 国内外的研究者成功地开发出多个用于检测烟草 TMV 抗性的分子标记^[9-13], 同时建立了相应的检测体系^[14], 并将其中的部分检测标记及方法申请了以下三个专利: ZL201010140771.2、ZL201110067006.7、ZL201410135454.X^[15-17]。但上述所有基于 *N* 基因开发的分子标记均是显性标记, 不能区分材料中 *N* 基因

的全部基因型, 即上述显性标记只能分辨出材料中是否含有抗性基因 *N*, 而无法进一步地区分出纯合抗性 (NN) 和杂合抗性 (Nn)。有部分标记是基于 *N* 基因的全长 cDNA 进行设计的, 在实际检测中涉及到 RNA 的提取、cDNA 的合成及长片段 DNA 的 PCR 扩增等过程, 检测体系繁琐, 而 SSR 标记重复性好、共显性、易用 PCR 分析。本研究利用 Coker176 (抗病亲本, 其 TMV 抗性由 *N* 基因控制) 和 Y3 (综合性状优良但易感 TMV) 构建回交一代 (BC1F1) 作图群体, 采用分离群体分组分析 (Bulked Segregant Analysis, BSA) 法, 筛选与烟草普通花叶病 (TMV) *N* 基因连锁的共显性 SSR 标记。旨在加速分子标记辅助选择 (Marker Assistant Selection, MAS) 在烟草 TMV 抗性品种选育中的利用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

2014 年, 以综合性状优良易感 TMV 的烤烟 Y3 为母本, 抗 TMV 烤烟材料 Coker176 (其抗性由 *N* 基

基金项目: 中国烟草总公司云南省公司科技项目 (2016YN27)

作者简介: 栗阳萌 (1991—), 硕士研究生, 研究方向为烟草遗传育种, Email: 412404935@qq.com

通讯作者: 李永平 (1966—), 研究员, 主要从事烟草育种工作的研究, Email: liyongping@yntsti.com

收稿日期: 2016-11-01; **网络出版时间:** 2017-03-23

因控制)为父本,杂交获得 F1,2015 年以 Y3 为轮回亲本,获得回交一代(BC1F1)群体。2016 年种植两亲本、F1 和 BC1F1 世代材料用于群体分析。以上烤烟种质资源均由云南省烟草农业科学研究院提供。

1.2 亲本、F1 代及 BC1F1 分离群体 TMV 抗性鉴定

参试试验材料成苗后移栽至大田,行株距为 100 cm × 50 cm;移栽 3 周后参照李梅云等方法接种 TMV^[18]。病害严重度的分级标准按国家标准 GB/T 23222-2008^[19],0~1 级定为抗病植株,3~9 级定为感病植株。

1.3 SSR 标记分析

烟苗 4 片真叶时,采用改良的 CTAB 法提取所有参试材料的基因组 DNA^[20],用 1% 的琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计测定 DNA 提取物浓度和纯度。

分离群体分组分析法(Bulked Segregation Analysis, BSA):选取 BC1F1 分离群体中的极端抗病(0 级抗病)单株和极端感病(9 级感病)单株各 15 株的基因组 DNA,等量混合构建抗、感池,进行引物多态性筛选和标记连锁分析。

SSR-PCR 的体系配制、产物扩增及扩增产物的 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(6%-non-PAGE)检测,参照童治军等的方法进行^[21]。SSR 标记(引物)由两部分构成,共 18764 对,其中,PT 系列引物 5119 对^[22],TM 系列引物 13645 对^[20,23]。

1.4 数据分析

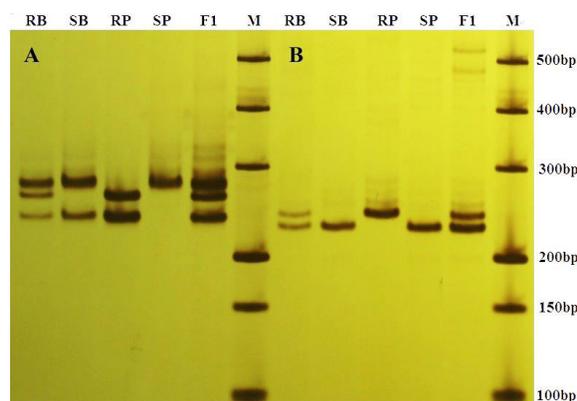
利用 BC1F1 群体的 123 个单株验证 PCR 扩增条带在两亲本、F1 和抗、感池之间具有多态性并且带型一致的引物。对各个单株的带型进行数据统计,抗病杂合条带标记做“H”,感病条带标记做“A”,条带不清晰或者无扩增条带的记做“U”,使用 JoinMap 4.0 软件对 BC1F1 分离群体中 TMV 抗性基因 *N* 和共显性 SSR 标记的分离数据进行遗传连锁分析,计算其连锁距离并绘制连锁图。

2 结果与分析

2.1 烟草 TMV 抗性 *N* 基因 DNA 池多态性分析

利用 18764 对 SSR 引物对抗病亲本 Coker176、感病亲本 Y3、两亲本间杂交子一代(F1)、抗病池和感病池共 5 份材料进行 PCR 扩增,高达 99% 的引物(18570 对)能进行有效扩增获得目的片段,在两亲本间有多态且在 F1 上呈共显性的标记有 396 个,其中与目的基因不连锁标记如 TM508-103(图 1A),由此可知,SSR 标记在该群体的两亲本间的多态率极低,仅有 2.11%(396/18764)。在产生共显性多态的

396 个 SSR 标记中,经抗、感池的进一步分析,最终仅获得 1 个标记在抗、感亲本间的多态性与抗、感池间的多态性一致(图 1B)。从图 1 中可见,引物 TM508-007(F:CACCATGGTTTGGCTTTCAT,R:GCAAAATGCAAAAAGGCAAT)在感病池与感病亲本中的带型完全一致,仅出现 1 条约 220 bp 的特异性条带;在抗病池与 F1 中的带型完全一致,呈现出共显性的两条特异性条带(同时具有抗、感亲本的特异性条带,既具有抗病亲本约 228 bp 的特异性条带,又具有感病亲本约 220 bp 的特异性条带)。该结果与烟草 TMV 抗性基因 *N* 属于显性单基因的事实相吻合。



注:A,在两亲本间有多态,但与 *N* 基因不连锁 SSR 标记 TM508-103;B,与 *N* 基因连锁的共显性 SSR 标记 TM508-007;RB,抗病池;SB,感病池;RP,抗病亲本(Coker176);SP,感病亲本(Y3);F1,两亲本间的杂交子一代;M,500 bp DNA ladder

Note: A indicates the polymorphisms during two parents and F1 but not linked to the target gene *N*(TM508-103); B indicates the co-dominant SSR marker (TM508-007) linked to gene *N*; RB, resistant DNA pools; SB, susceptible DNA pools; RP, resistant parent (Coker176); SP, susceptible parent (Y3); F1, F1 generation; M, 500bp DNA ladder

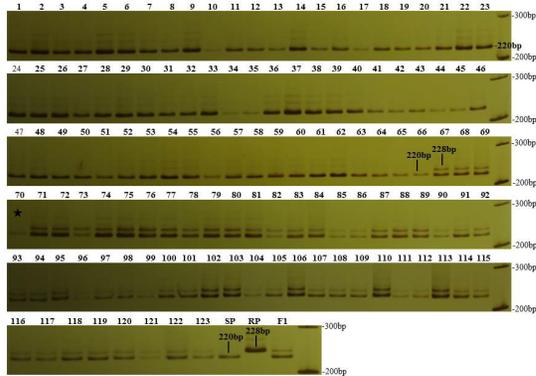
图 1 不同 SSR 标记在 5 份材料中的 PCR 扩增结果

Fig.1 The banding pattern of PCR amplification products for five tobacco materials by different SSR markers

2.2 连锁标记的群体单株验证

将获得的与烟草 TMV 抗性基因 *N* 连锁的共显性 SSR 标记对 123 株 BC1F1 单株进行验证(图 2)。其中,有 66 个单株的抗性鉴定结果为感病(编号:1~66),剩余的 57 个单株的抗性鉴定结果为抗病(编号:67~123)。标记 TM508-007 的基因型分析结果为:全部的 66 个感病单株的基因型均与感病亲本 Y3 一致(扩增出一条约 220 bp 的特异性条带);57 个抗病单株中,有 56 个呈现共显性条带(与 F1 带型一致,抗、感病带型同时呈现),而有 1 个单株(编号:70)则呈现出单交换,即抗性鉴定的结果为抗性单株,

而基因型分析的结果却为感病（仅出现感病基因型的特异条带）。利用 Joinmap 4.0 作图软件计算得到该共显性标记（TM508-007）与烟草 TMV 抗性基因 *N* 的连锁距离约为 0.41 cM（图 3）。



注：编号 70（带黑色星星）为单交换单株；1-123 为 BC1F1 单株编号，其中 1-66 是感病单株编号，67-123 是抗病单株编号；RP 代表抗病亲本 Coker176；SP 代表感病亲本 Y3；F1 代表杂交子一代；M 代表 500bp DNA marker，从下往上分别为 200bp 和 300bp。

Note: the accession No. 70 (black star) indicates a single crossing; 1-123, BC1F1 individuals, among which 1-66 were the susceptible individuals and 67-123 were the resistant individuals; RP, resistant parent Coker176; SP, susceptible parent Y3; F1, F1 generation; M, 500bp DNA ladder with the size of 200bp and 300bp from down to up

图 2 共显性 SSR 标记 TM508-007 在 123 个 BC1F1 单株中的 PCR 扩增结果

Fig. 2 The results of PCR amplification products of 123 BC1F1 individuals with the co-dominant SSR marker TM508-007

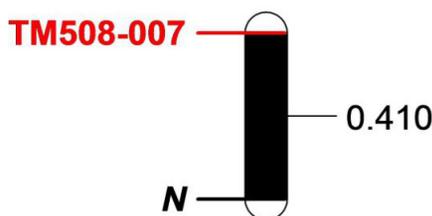


图 3 共显性 SSR 标记 T508-007 与烟草 TMV 抗性基因 *N* 的连锁关系

Fig.3 Linkage relationship between the TMV resistant gene *N* of tobacco and co-dominant SSR marker TM508-007

3 讨论与结论

迄今，利用 *N* 基因开发的标记进行烟草标记辅助育种在国内外已有报道。高玉龙等根据烟草 TMV 抗性基因 *N* 的核苷酸序列设计特异性引物，通过 PCR 反应能够在含有 TMV 抗性基因 *N* 的烟草中扩增出 1 条 1200 bp 左右的特征条带，并依据能否扩增出该

特征条带来检测烟草品种是否具有 TMV 抗性^[24]。Lewis 等设计了 *N* 基因的特异性引物，并且用所设计的特异引物对 12 个抗烟草花叶病毒品种进行 PCR 扩增，12 个抗 TMV 品种都能够扩增出目的条带^[9]。张亮等设计了一系列 *N* 基因的特异性引物，有效地分辨出 *N* 基因缺失和含有 *N* 基因的烟草个体^[25]。刘磊等根据 *N* 基因 cDNA 序列设计出 4 对引物，经过试验验证后所获得 2 对有效引物，通过对供试的 11 个烤烟品种进行 PCR 扩增，结果在 4 个烤烟品种中扩增出了目的条带，与已知的 *N* 基因在这 11 个烤烟品种中的分布结果一致，成功地建立了检测 *N* 基因的 PCR 扩增体系^[14]。然而上述基于 *N* 基因开发的分子标记均是显性标记，无法一次性清晰地区分出材料中全部的三种基因型（抗病纯合基因型（NN）、感病纯合基因型（nn）和抗病杂合基因型（Nn））。本研究筛选获得的与烟草 TMV 抗性基因 *N* 紧密连锁的 SSR 标记 TM508-007，能有效区分三种基因型（抗病纯合基因型（NN）、感病纯合基因型（nn）和抗病杂合基因型（Nn）），且具有稳定可靠且简易高效的特点。同时利用该标记的序列信息并结合 Bindler 等^[22] 公开发表的含有 2363 个位点的高质量烟草遗传图谱及中国烟草基因组数据库中红花大金元的基因组数据（数据尚未对外公开），最终将标记 TM508-007 分别定位在第 11 号连锁群的顶端和红花大金元基因组的第 1 号染色体上（约 75.51 Mb 处），在该处的 1.18 Mb 区域（75.42Mb-76.24Mb）内共发现了 6 个基因（其在红大基因组上的基因 ID 为：Ntab0849210、Ntab0849560、Ntab0849570、Ntab0849690、Ntab0849770 和 Ntab0849780），其注释功能均与 TMV 抗性相关（基因注释：expressed protein, similar to TMV resistance protein）。

本研究利用回交一代（BC1F1）分离群体，采用分离群体分组分析（BSA）法和 SSR 标记技术，筛选获得共显性的 SSR 多态性标记 TM508-007，经对 123 个 BC1F1 分离群体进行基因型分析验证，结果表明这种共显性多态均稳定存在，该共显性标记与目的基因 *N* 的遗传连锁距离为 0.41 cM。由此推断，该标记与烟草 TMV 抗性基因 *N* 紧密连锁。

参考文献

- [1] Beijerinck MW. Ueber ein contagium vivum fluidum als ursacheder fleckenkrankheit der tabaksblatter [J]. Verh Kon Akad Wetensch, 1898, 5: 3-21.
- [2] Dawson WO, Lehto KM. Regulation of tobamovirus gene

- expression [J]. *Adv. Virus. Res.*, 1990, 8: 307-342.
- [3] Erickson FL, Holzberg S, Calderon-Urrea A, et al. The helicase domain of the TMV replicase proteins induces the N-mediated defence response in tobacco [J]. *Plant J.*, 1999, 18: 67-75.
- [4] Gerstel DU. Inheritance in *Nicotiana tabacum*. XIX. Identification of the tabacum chromosome replaced by one from *N. glutinosa* in mosaic-resistant holmes samsoun tobacco [J]. *Genetics*, 1945, 30: 448-454.
- [5] Whitham S, Dinesh-Kumar SP, Choi D, et al. The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to Toll and the Interleukin-1 Receptor [J]. *Cell*, 1994, 78: 1101-1115.
- [6] Ternovsky MF. Interspecific hybridization in tobacco and Makhorka (*N. rustica*) breeding [J]. *The A.I. Mikoyan pan Soviet Sci. Res. Inst. Tob. & Indian Tob. Ind. Krasnodar Publ*, 1941, 143: 99-125.
- [7] Ternovsky MF. Methods of breeding tobacco varieties resistant to tobacco mosaic and powdery mildew [J]. *The A.I. Mikoyan pan Soviet Sci. Res. Inst. Tob. & Indian Tob. Ind. Krasnodar Publ*, 1945, 143: 126-141.
- [8] Wernsman EA. Sources of resistance to virus diseases [J]. *Coresta Inf. Bull.*, 1992, 3: 113-119.
- [9] Lewis RS, Milla SR, Levin JS. Molecular and genetic characterization of *Nicotiana glutinosa* L. chromosome segments in tobacco mosaic virus resistant tobacco accessions [J]. *Crop Sci.*, 2005, 45(6): 2355-2362.
- [10] 袁清华, 陈俊标, 李淑玲, 等. 抗 TMV 烟草种质资源的 N 基因片段序列研究 [J]. *广东农业科学*, 2011, 1(29): 96-99.
YUAN Qinghua, CHEN Junbiao, LI Shuling, et al. Study on partial sequence of N gene in tobacco germplasm resources with TMV resistant [J]. *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011, 1(29): 96-99.
- [11] 陈爽, 朴世领, 金爱兰. 烟草抗 TMV N 基因及其在分子标记辅助育种中的应用 [J]. *延边大学农学学报*, 2012, 34(4): 355-361.
CHEN Shuang, PAIO Shiling, JIN Ailan. N gene and its application on marker-assisted breeding for tobacco resistant to TMV [J]. *Agricultural Science Journal of Yanbian University*, 2012, 34(4): 355-361.
- [12] 张玉, 蒋彩虹, 冯莉, 等. 3 个烤烟品系对 TMV 抗性的遗传规律分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(5): 971-974.
ZHANG Yu, JIANG Caihong, FENG Li, et al. Inheritance for resistance to TMV in three tobacco lines [J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2013a, 14(5): 971-974.
- [13] 张玉, 罗成刚, 殷英, 等. 烟草 N 基因及其在烤烟遗传育种中的应用 [J]. *中国农学通报*, 2013, 29(19): 89-92.
ZHANG Yu, LUO Chenggang, YIN Ying, et al. Tobacco N gene and its application in genetic breeding [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2013b, 29(19): 89-92.
- [14] 刘磊, 郭兆奎, 万秀清, 等. N 基因标记基因 PCR 检测方法的建立及其在遗传育种中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 167-171.
LIU Lei, GUO Zhaokui, WAN Xiuqing, et al. Establishment of PCR detection system for marker gene N gene and its application in genetic breeding [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(1): 167-171.
- [15] 高玉龙, 肖炳光, 卢秀萍, 等. 分子标记检测 N 基因控制的烟草 TMV 抗性的方法 [P]. 中国专利: ZL201010140771.2, 2012-04-04.
GAO Yulong, XIAO Bingguang, LU Xiuping, et al. Method for detecting TMV resistance of tobacco controlled by N gene by molecular marker [P]. China patent: CN101892304B, 2012-04-04.
- [16] 杨军, 张俊祺, 罗朝鹏, 等. 一步法复合检测烟草普通花叶病毒与马铃薯 Y 病毒的方法及其引物 [P]. 中国专利: ZL201110067006.7, 2012-12-05.
YANG Jun, ZHANG Junqi, LUO Chaopeng, et al. Method and prime for multiply detecting tobacco mosaic virus and potato virus Y by one-step method [P]. China patent: CN102140546B, 2012-12-05.
- [17] 张玉, 罗成刚, 杨爱国, 等. 用于检测烟草对 TMV 抗性的 N 基因特异性引物对、检测方法及其试剂盒 [P]. 中国专利: ZL201410135454.X, 2015-09-16.
ZHANG Yu, LUO Chenggang, YANG Aiguo, et al. Specific primer pair, test method and kit for detecting N gene controlling TMV resistance of tobacco [P]. China patent: CN103866038B, 2015-09-16.
- [18] 李梅云, 许美玲, 焦芳婵, 等. 不同类型烟草种质资源对 TMV 的抗性鉴定 [J]. *烟草科技*, 2016, 49(11): 7-13.
LI Meiyun, XU Meiling, JIAO Fangchan, et al. Tobacco mosaic virus (TMV) resistance characterization in new tobacco germplasm resources [J]. *Tobacco Science & Technology*, 2016, 49(11): 7-13.
- [19] GB/T 23222-2008, 烟草病虫害分级及调查方法 [S].
GB/T 23222-2008, Grade and investigation method of tobacco diseases and insect pests [S].

- [20] Tong ZJ, Yang ZM, Chen XJ, et al. Large-scale development of microsatellite markers in *Nicotiana tabacum* and construction of a genetic map of flue-cured tobacco [J]. *Plant Breeding*, 2012, 131: 674-680.
- [21] 童治军, 焦芳婵, 肖炳光. 普通烟草及其祖先种基因组 SSR 位点分析 [J]. *中国农业科学*, 2015, 48(11): 2108-2117.
TONG Zhijun, JIAO Fangchan, XIAO Bingguang. Analysis of SSR loci in *Nicotina tabacum* genome and its two ancestral species genome [J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2015, 48(11): 2108-2117.
- [22] 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(2): 219-230.
- [23] Tong ZJ, Xiao BG, Jiao FC, et al. Large-scale development of SSR markers in tobacco and construction of a linkage map in flue-cured tobacco [J]. *Breeding Science*, 2016, 66: 381-390.
- [24] 高玉龙, 肖炳光, 童治军, 等. 烟草抗 TMV 基因连锁分子标记的筛选及在抗病资源筛选中的应用 [J]. *分子植物育种*, 2011, 9(5): 585-591.
GAO Yulong, XIAO Bingguang, TONG Zhijun, et al. Identification of molecular markers linked to TMV resistance gene in tobacco and its application in screening resistance varieties [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2011, 9(5): 585-591.
- [25] 张亮. 烟草 TMV 抗性基因 N 基因的突变及进化分析 [D]. 华中农业大学硕士论文, 2011.
ZHANG Liang. Mutation and evolution analysis of TMV resistance N gene in tobacco [D]. Dissertation for M.A., Huazhong agricultural university, 2011.

Co-dominant SSR marker closely linked to TMV resistance gene *N* of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

SU Yangmeng^{1,2}, TONG Zhijun², LI Meiyun², JIAO Fangchan², GENG Suxiang³, LI Yongping^{2*}

¹ College of Biological Science and Technology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China;

² Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Sciences, Key Laboratory of Tobacco Biotechnological Breeding, National Tobacco Genetic Engineering Research Center, Kunming 650021, China;

³ China Tobacco Shandong Industrial Co., Ltd., Jinan 250014, China

Abstract: Tobacco mosaic virus (TMV) was one of the major diseases in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) production. Separate progenies (BC1F1 population) from a cross between a resistant parent Coker176 and susceptible parent Y3 were used to establish TMV resistance gene *N* molecular marker-assisted selection system by bulked segregation analysis (BSA) method and simple sequence repeat (SSR) technology techniques. Among 18,764 SSR primer pairs, 396 SSR primers were polymorphic between parents, while only one SSR marker TM508-007 amplified products was closely linked to TMV-resistant gene *N* and the genetic distance between TM508-007 and gene *N* was 0.41 cm. The co-dominant SSR marker screened in this study enriched the number and types of molecular markers in terms of tobacco's resistance to TMV, and they are expected to be used as marker-assisted selection in tobacco's resistance to TMV disease.

Keywords: Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.); tobacco mosaic virus (TMV); bulked segregation analysis (BSA); co-dominant SSR marker

Citation: SU Yangmeng, TONG Zhijun, LI Meiyun, et al. Co-dominant SSR marker closely linked to TMV resistance gene *N* of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) [J]. *Acta Tabacaria Sinica*, 2017, 23(2)

*Corresponding author. Email: liyongping@yntsti.com