

中图分类号: S532; S435.32 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)03-0150-04

一个与马铃薯青枯病抗性连锁的 SRAP 标记筛选

雷 剑, 柳 俊*

(园艺植物生物学教育部重点实验室, 湖北省马铃薯工程技术研究中心, 华中农业大学, 湖北 武汉 430070)

摘 要: 以两个马铃薯二倍体分离群体 ED 和 CE 共 105 个基因型为材料, 利用群分法 (Bulked Segregant Analysis, BSA) 筛选与马铃薯青枯病抗性基因连锁的分子标记。在 8 个正向引物和 11 个反向引物组成的 88 对 SRAP 引物组合中, 筛选获得了一个与马铃薯青枯病抗性紧密连锁的 SRAP 标记 M32, 遗传连锁分析表明, 该标记在 ED 群体和 CE 群体中与抗性位点之间的遗传距离分别为 10.2 cM 和 17.3 cM。

关键词: 马铃薯; 青枯病; SRAP 标记

青枯病是由茄科雷尔氏菌 *Ralstonia solanacearum* 引起的一种毁灭性的细菌性土传病害, 在热带、亚热带地区普遍发生, 可以侵染马铃薯在内的 50 多个科 200 多种植物^[1]。青枯病作为马铃薯的主要病害之一, 目前在生产上还没有有效的防治措施, 选育青枯病抗性品种可能是最为经济、有效的途径。然而, 由于青枯病发病表现在很大程度上受温度湿度的影响, 因此, 田间表型鉴定常常不稳定, 使青枯病育种选择效率低下。快速准确的对育种材料进行抗性筛选, 是提高青枯病抗性育种效率的重要途径之一。分子标记辅助选择是现代育种选择技术的重大革命, 然而, 有效的分子标记是其应用的前提。

PCR (Polymerase Chain Reaction) 技术自诞生以来, 由于其快速、高效的优点已广泛用于分子生物学各个领域, 基于 PCR 技术的各种分子标记也不断出现。相关序列扩增多态性 (Sequence - Related Amplified Polymorphism, SRAP) 是一种新型的基于 PCR 技术的分子标记, 它由美国加州大学蔬菜系 Li 与 Quiros^[2] 在芸薹属作物中开发出来。该标记设计了独特的成对引物, 其正向引物长 17 bp, 由 5' 端的填充序列和 3' CCGG 组成核心序列, 3' 端再设计 3 个选择性碱基, 对外显子进行特异性扩增;

而反向引物长 18 bp, 5' 端的前 11 bp 是填充序列, 与其后连接的 AATT 组成核心序列, 3' 端亦接 3 个选择性碱基, 对内含子区域、启动子区域进行特异性扩增。因不同物种、不同基因型的内含子, 启动子与间隔长度不等而产生多态性^[2]。该标记具有简便、高效、稳定、中等产率、易测序、便于克隆目标片段的特点, 并已被应用于遗传图谱构建^[3], 比较基因组学^[4], 遗传多样性分析^[5], 重要性状的标记^[2], 相关基因的克隆^[6]以及种质资源的鉴定评价^[7]等多个领域。本研究通过 SRAP 标记技术筛选一个与马铃薯青枯病抗性紧密连锁的分子标记, 由于该标记的引物特点, 其标记既可用于马铃薯青枯病抗性的辅助选择, 同时也为青枯病抗性基因克隆奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本试验所用的二倍体马铃薯群体 CE 和 ED 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所屈冬玉研究员惠赠, 在本研究中 ED 群体 69 个基因型, CE 群体 36 个基因型。

1.2 DNA 的抽提和抗感池建立

所有基因型材料分别取试管苗叶片提取 DNA, DNA 抽提和纯化依据 Clark 描述的方法。将总基因组 DNA 稀释到 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$, 做为 PCR 模板, 用于后续的 SRAP 分析。根据历年青枯病鉴定结果, 从两个群体中分别选取 3 个极端抗病基因型和极端感

收稿日期: 2006-04-12

基金项目: 国家“863”项目 2003AA207130)

作者简介: 雷剑 (1980-), 男, 硕士研究生, 主要从事马铃薯抗病基因的分子标记筛选。

* 通讯作者: E-mail: liujun@mail.hzau.edu.cn

病基因型, 各基因型取等量 DNA 样品混合, 建立抗病 DNA 池 (R-pool) 和感病 DNA 池 (S-pool), 分别记为 CE-R, CE-S, ED-R 和 ED-S。

1.3 SRAP 分析

引物设计参考 Li 与 Quiros^[2]的方法, 由上海生物工程技术服务有限公司合成。8 个正向引物, 11 个反向引物列于表 1。PCR 反应总体积为 25 μL : 10X buffer 2.5 μL , 25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ Mg²⁺ 1.5 μL , 2 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 2.5 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, 正反向引物各 2 μL , 10 ng $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 模板 DNA 3 μL , 5 U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$ Taq 酶 0.25 μL , 不足部分由水补足。将各反应物混匀后, 加入适量矿物油覆盖。SRAP-PCR 反应程序: 94 3.5 min; 94 30 s, 35 30 s, 72 1.5 min

(5 循环); 94 30 s, 50 45 s, 72 1.5 min (35 循环); 72 10 min, 4 pause。扩增反应在 Whatman 公司生产的 Biometra Uno 型扩增仪上进行。扩增产物分别加入适量上样缓冲液[20% (w: v) Ficoll-400, 0.25% (w: v) 溴酚蓝, 0.25% (w: v) 二甲苯青], 用 1.5% 琼脂糖胶分离, 电泳缓冲液为 1 $\times$ TAE。电泳时功率恒定为 70 W, 电泳 1.5~2.0 h。

1.4 连锁分析

参考胡中立等^[8]的相关分析法确定分子标记与青枯病抗性性状的连锁, 并用 Mapmaker 软件进行验证。根据 Kosambi 作图函数 $MD=\ln[1+2r/(1-2r)]\cdot 1/4$ 将标记与青枯病抗性位点的重组率转化为图谱距离。

表 1 本试验所用的 SRAP 引物

正向引物	反向引物
me1 : 5 TGAGTCCAAACCGGATA 3 '	em1 : 5 GACTGCGTACGAATTAAT 3 '
me2 : 5 TGAGTCCAAACCGGAGC 3 '	em2 : 5 GACTGCGTACGAATTTGC 3 '
me3 : 5 TGAGTCCAAACCGGAAT 3 '	em3 : 5 GACTGCGTACGAATTGAC 3 '
me4 : 5 TGAGTCCAAACCGGACC 3 '	em4 : 5 GACTGCGTACGAATTTGA 3 '
me5 : 5 TGAGTCCAAACCGGAAG 3 '	em5 : 5 GACTGCGTACGAATTAAC 3 '
me6 : 5 TGAGTCCAAACCGGTAA 3 '	em6 : 5 GACTGCGTACGAATTGCA 3 '
me7 : 5 TGAGTCCAAACCGGTCC 3 '	em7 : 5 GACTGCGTACGAATTCAA 3 '
me8 : 5 TGAGTCCAAACCGGTGC 3 '	em8 : 5 GACTGCGTACGAATTCTG 3 '
	em9 : 5 GACTGCGTACGAATTCGA 3 '
	em10 : 5 GACTGCGTACGAATTCAG 3 '
	em11 : 5 GACTGCGTACGAATTCCA 3 '

2 结果与分析

2.1 青枯病抗性在 CE 和 ED 群体中的分离

本实验室连续 3 年的田间接种鉴定表明, ED 群体和 CE 群体均表现一系列的抗感分离, 为便于结果统计, 将感病至中感的表型记为感病, 抗病至中抗的表型记为抗病。在 ED 群体 69 个基因型中, 抗病基因型 41 个, 感病基因型 28 个; CE 群体的 36 个基因型中抗病基因型 14 个, 感病基因型 22 个。

2.2 SRAP 标记筛选

本试验设计的 8 个正向引物和 11 个反向引物

可组合成 88 对组合, 以 ED-R, ED-S 和 CE-R, CE-S 抗感基因池 DNA 为模板, 对 88 对引物进行 PCR 扩增, 每对引物重复扩增 3 次。结果显示, 有 14 对引物未扩增出任何产物, 另外的 74 对引物共扩增出 568 个条带, 平均每对引物在马铃薯基因组中可以扩增出 7.7 条带, 扩增产物大小从 100 bp 到 3000 bp 不等。进一步分析显示, 在 3 个亲本之间, 共有 19 对引物具有多态性带型, 占引物组合的 21.6%, 在 ED-R 和 ED-S 抗感池间, 有 23 对引物扩增出多态性带, 占引物组合的 26.1%, 在 CE-R 和 CE-S 抗感基因池间, 有 20 对引物扩增出多态性带型, 占引物组合的 22.7%。在表现多态性

带型的引物中, 有4对引物的重复性好, 带型稳定。它们是: me3-em2, me5-em5, me6-em4, me8-em4。在4对引物中, 只有me3-em2在2个群体的抗感池中具有不同带型, 表现出抗病池有特异带, 而感病池无特异带。该对引物在以亲本DNA为模板的扩增中显示, 抗性亲本E具有明显的特异带, 感病亲本C和D没有特异带(图1)。将特异带测序分析显示, 该序列为279 bp的核苷酸, 为阐述之便, 本研究将此标记命名为M32。

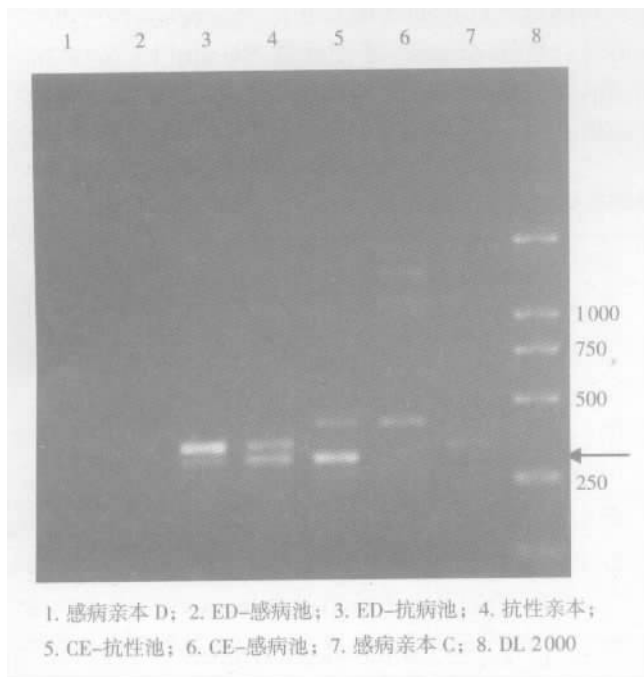


图1 SRAP标记M32(箭头所示)在抗感池及亲本中的扩增情况

2.3 标记与抗性的连锁分析

试验将me3-em2引物对2个群体的所有基因型DNA进行PCR扩增, 扩增产物经电泳后读带, 根据带型和表型鉴定结果共分离的情况进行连锁分析。带型和表型分析显示, 无论是表型还是分子标记鉴定均显示, 马铃薯抗青枯病性状在ED和CE群体中的分离都趋于1:1, 在ED群体中, 41个抗病基因型有38个基因型有特异带, 28个感病基因型只有4个基因型有带, 表型和分子标记的吻合率达到89.86%; 对CE群体而言, 14个抗病基因型有10个基因型具有特异带, 22个感病基因型只有2个有带, 与表型的吻合率为83.33%(表2)。根据ED群体分析的结果表明, 标记M32与青枯病抗性位点的图谱距离为10.2 cM,

在CE群体, 图谱距离为17.3 cM。结合本实验室李林章的研究结果, 依据ED群体的实验资料分析进一步证明, M32位于抗性基因位点 R_{BW} 和S27之间(图2), 与S27标记的遗传距离为7.2 cM。

表2 M32标记带型统计表

群体	基因型数	表型鉴定		标记鉴定		标记与表型的一致性			
		抗	感	抗	感	表型抗		表型感	
						有带	无带	有带	无带
ED	69	41	28	42	27	38	3	4	24
CE	36	14	22	12	24	10	4	2	20
合计	105	55	50	54	51	48	7	6	44

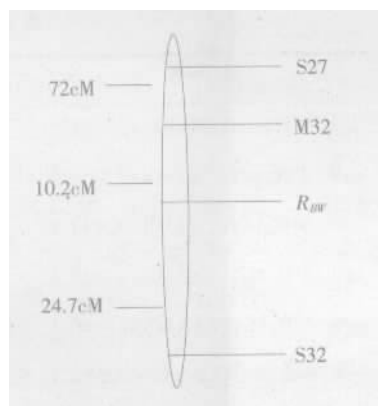


图2 标记M32与抗性基因 R_{BW} 和S27的相对位置

3 讨论

SRAP标记是一种基于PCR的新型标记系统, 使用较长的引物(17~18 bp)和较高的退火温度(50℃)可保证扩增结果的稳定性。通过改变SRAP引物3端的选择性碱基可以设计多种引物, 再通过上游引物和下游引物的自由组合, 从而可以在较少的引物基数中进行多种组合, 大大降低了引物合成成本, 提高了引物使用效率。在已有的文献报道中, SRAP产物通常都是采用变性聚丙烯酰胺凝胶分离^[2], 但是在本试验中, 采用了1.5%的琼脂糖胶分离也得到了很好的结果, 从实验成本可操作的方便性上讲, 采用琼脂糖胶将更有利于此标记系统的实际应用。与使用频率较高的AFLP标记和RAPD标记相比, SRAP标记不仅具有与RAPD相当的简单快捷之优点, 同时还具有与AFLP相当的稳定性和多态性。

分析显示, SRAP标记M32的相对位置位于抗

性基因 R_{BW} 和本实验室之前所筛选的 RAPD 标记 S27^[9] 之间, 因此, M32 与青枯病抗性位点的遗传距离比 S27 更近。在以前的分析中, S27 与 R_{BW} 的距离为 14.7cM, 本研究中, M32 与 R_{BW} 的遗传距离为 10.2 cM, 与 S27 的遗传距离是 7.2 cM, 因此, 按照本研究的结果, R_{BW} 与 S27 的遗传距离为 17.4 cM, 大于原有资料分析的结果。造成这一现象的主要原因是, 本研究中所用的 ED 群体只有 69 个基因型, 而前期研究 ED 群体是 73 个基因型, 由于群体大小的改变, 使得所分析的遗传距离发生一定偏差。从理论上讲, 如果在一个足够大的群体中, 发生偏差的程度就越小, 所以, 本研究所获得的资料对标记和抗性基因位点的分析, 只是一个相对位置, 要进行精确分析和定位还有待建立较大的遗传分离群体。尽管如此, 本研究所筛选的 SRAP 标记 M32 与田间鉴定的结果吻合度较高, 在 ED 和 CE 两个群体的 105 个单株中, 只有 13 个基因田间鉴定结果与标记鉴定结果不吻合, 这些不吻合可能因为标记位点的交换所致, 亦或是有田间鉴定的误差, 但由于总体吻合率达到了 87.62%, 因此, 该标记用于育种辅助选择仍具有较好的实用价值。

[参 考 文 献]

[1] Hayward A C. Biology and epidemiology of bacterial wilt caused by *Pseudomonas solanacearum* [J]. *Annu Rev Phytopathol*, 1991, 29:

65- 87.

- [2] Li G, Quiros C F. Sequence- related amplified polymorphism (SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455- 461.
- [3] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建 [J]. *科学通报*, 2003, 48(15): 1676- 1679.
- [4] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 168- 180.
- [5] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of Cucurbita pepo using SRAP and AFLP markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 271- 281.
- [6] Li G, Quiros C F. Analysis expression and molecular characterization of BOGSL - ELONG, a major gene involved in the Aliphatic Glucosinolate pathway of Brassica species [J]. *Genetics*, 2002, 162: 1937- 1943.
- [7] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, et al. Molecular characterization of Buffalo grass germplasm using sequence related amplified polymorphism markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 328- 324.
- [8] 胡中立, 章志宏, 何瑞锋, 等. 分子标记或质量性状基因座位间连锁遗传分析的相关方法 [J]. *武汉大学学报: 自然科学版*, 1998, 44(4): 517- 520.
- [9] 李林章. 二倍体马铃薯青枯病抗性的分离及分子标记鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学硕士论文, 2004.

Identification of a SRAP Marker Linked to Bacterial Wilt Resistance in Diploid Potato

Lei Jian, Liu Jun

(Key Laboratory of Horticultural Plant Biology Huazhong Agricultural University, Ministry of Education;

Potato Engineering and Technology Research Center of Hubei Province; Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China)

Abstract: In this paper, bulked segregant analysis was used to identify SRAP markers linked to bacterial wilt resistance in the two segregating populations (CE and ED) of diploid potato. A SRAP marker M32 linked to resistant gene R_{BW} was screened from 88 pairs of combination with 8 forward primers and 11 reverse primers. The genetic distance between the M32 and site of bacterial wilt resistance was 10.2 cM and 17.3 cM in ED and CE population, respectively.

Key Words: potato; bacterial wilt; SRAP marker