

利用 DH 群体构建烤烟分子标记遗传连锁图

肖炳光¹ 徐照丽¹ 陈学军¹ 申爱荣^{1,2} 李永平¹ 朱 军³

[1 中国烟草育种研究(南方)中心,云南省烟草科学研究所 玉溪 653100; 2 云南农业大学 昆明 6502013;

3 浙江大学生物信息学研究所 杭州 310029]

摘要:以烤烟品种 Speight G-28 和 NC2326 杂交得到的 137 个 DH 系为作图群体材料,通过 ISSR 和 RAPD 标记的遗传连锁分析,构建了包括 27 个连锁群,由 10 个 ISSR 标记和 147 个 RAPD 标记组成的烤烟分子标记遗传连锁图。该图谱覆盖长度 1838.2cM,平均图距 14.1cM。连锁群上有 22 个分子标记表现偏分离,其中 10 个集中在连锁群 LG9 上,其余分散在不同连锁群。这是国内外构建的第一张烤烟分子标记遗传连锁图,为烤烟性状的基因定位及分子标记辅助选择奠定了良好基础。

关键词: 烤烟; ISSR; RAPD; 遗传连锁图

中图分类号: S572 文献标识码: A 文章编号: 1004-5708(2006)04-0035-06

Genetic linkage map constructed by using a DH population for the flue-cured tobacco

XIAO Bing-guang¹ XU Zhao-li¹ CHEN Xue-jun¹ SHEN Ai-rong^{1,2} LI Yong-ping¹ ZHU Jun³

[1 China Tobacco Breeding (Southern) Center, Yunnan Institute of Tobacco Science, Yuxi 653100;

2 College of Plant Protection, Yunnan Agricultural University, Kunming 6502013;

3 Institute of Bioinformatics, Zhejiang University, Hangzhou 310029]

Abstract: A molecular genetic map of flue-cured tobacco was constructed with a 137 doubled haploid (DH) population from a cross of 2 flue-cured tobacco varieties Speight G28 and NC2326 by using ISSR and RAPD as markers. The map consisted of 27 linkage groups which included 10 ISSR and 147 RAPD markers, and covered 1838.2 cM with an average distance of 14.1 cM. Among the 22 distorted markers distributed in the map, 10 markers were mapped on the linkage group LG9, and the others were mapped on diverse linkage groups respectively. It is the first molecular genetic linkage map of flue-cured tobacco in the world and is fundamental to the genetic mapping of important traits and marker-assisted selection for flue-cured tobacco.

Key words: flue-cured tobacco; ISSR; RAPD; genetic linkage map

分子标记遗传连锁图表示各标记所对应的 DNA 片段在染色体上的相对位置,是分子标记运用于作物遗传育种的基础,还可帮助人们从分子水平了解植物特性和生长发育规律。许多重要作物的分子图谱已构建出来^[1],并开始用于质量和数量性状的基因定位、图位克隆、比较基因组研究和分子标记辅助选择育种等研究^[2]。在烟草上, Lin 等^[3]利用来自烟草野生种间

杂交 *N. plumbaginifolia* × *N. longiflora* 的 99 个 F₂ 植株,构建了第一张烟草分子标记遗传连锁图; Nishi 等^[4]利用来自白肋烟品种间杂交 W6 × Michinoku 所产生的 125 个 DH 系,构建了普通烟草种内第一张分子标记遗传连锁图。

迄今为止国内外尚未见烤烟分子标记遗传连锁图构建的报道。对于烤烟育种来说,选用烤烟品种间杂交组合得到的群体构建遗传连锁图,将利于烤烟重要性状的基因定位及分子标记辅助选择,从而提高烤烟育种效率,加快烤烟品种培育进程。本研究主要目的是以烤烟品种间杂交组合获得的加倍单倍体 (DH) 群体为材料,采用 ISSR 和 RAPD 标记构建烤烟分子标记遗传连锁图,为进一步开展性状的基因定位奠定坚实基础。

作者简介: 肖炳光 (1971 -), 男, 助理研究员, 博士, E-mail: xiaobg@263.net, 电话: 0877-2664915

基金项目: 国家烟草专卖局科技项目 (110199901003) 和云南省烟草专卖局科技项目 (99A49_05-03) 资助

收稿日期: 2006-03-22

1 材料与方法

1.1 群体构建

以烤烟品种 Speight G-28(P₁)和 NC2326(P₂)为亲本配制杂交组合(F₁),取 F₁花药经花药培养和染色体加倍^[5],获得 137 个加倍单倍体(DH)系,组成 DH 作图群体。

1.2 总 DNA 提取

亲本、F₁及 DH 系温室育苗,长至 5~6 叶期时,每份材料取幼嫩叶片 3g 利用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[6]。

1.3 ISSR 分析

ISSR-PCR 扩增总体积 25 μ L,其中包括:1 \times PCR 缓冲液、MgCl₂ 1.5 mmol L⁻¹,dNTPs 各 0.1 mmol L⁻¹,Taq 酶 1U (PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs、Taq 酶均购自 Takara 公司),引物(Takara 公司合成)0.5 μ mol L⁻¹,基因组 DNA 20ng,最后加矿物油 20 μ L 覆盖。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}$ C、4 min;94 $^{\circ}$ C、45 s;51 $^{\circ}$ C、1 min;72 $^{\circ}$ C、2 min;45 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 反应在 GeneAmp PCR System 9600(Perkin Elmer)上进行。

扩增产物利用 3%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,以 0.5 \times TBE 作缓冲液,恒压 5 V/cm 进行电泳,银染检测。银染方法如下:10%乙酸固定 15 min;蒸馏水漂洗 3 次,每次 2 min;染色液(2 g AgNO₃+3 mL 37%甲醛+2 L 蒸馏水)中染色 30 min;蒸馏水漂洗 1 次,时间控制在 10 s 内;显色液(60 g 无水 Na₂CO₃+3 mL 37%甲醛+400 μ L 10%硫代硫酸钠+2 L 蒸馏水)中显色至显现清晰条带;加入 10%冰乙酸终止反应。

1.4 RAPD 分析

25 μ L 反应液中包括 10 mmol L⁻¹ Tris-HCl、pH 8.3,50 mmol L⁻¹ KCl,0.1% Triton X-100,2.5 mmol L⁻¹ MgCl₂,4 种 dNTP 各 0.2 mmol L⁻¹,0.5 μ mol L⁻¹引物,1U Taq 酶(Promega),20 ng 基因组 DNA;上面覆盖 25 μ L 矿物油。PCR 扩增反应在 GeneAmp PCR System 9600 上进行,先在 94 $^{\circ}$ C 下变性 4 min;然后进行 45 个

循环的变性(94 $^{\circ}$ C 下 30 s)、退火(36 $^{\circ}$ C 下 30 s)、延伸(72 $^{\circ}$ C 下 66 s)步骤;最后在 72 $^{\circ}$ C 下继续延伸 5 min。

扩增产物的检测同 ISSR 分析。

1.5 数据整理和连锁分析

每条扩增带以所用引物及片段大小(碱基对数)命名,如 UBC807-670 指用 ISSR 引物 UBC807 扩增出的长度为 670 bp 的扩增带,OPF9-950 指用 RAPD 引物 OPF9 扩增出的长度为 950 bp 的扩增带,其近似分子量用 100 bp ladder(Gibco BRL)估计。条带有无与亲本 G28 相同者记为“1”,与亲本 NC2326 相同者记为“2”,由此得到分子标记的分离数据,通过卡方测验(χ^2)检验标记是否符合 1:1 的分离比例。

应用软件 MAPMAKER/EXP Version3.0b^[7]在 PC 计算机上进行连锁图谱的构建。对于符合 1:1 分离比例的标记,先用 Group 命令进行标记间连锁分组(LOD=4.0,r=0.3);然后在每个连锁群内使用 Order(LOD=3.0,r=0.25)和 Ripple(或 Compare)命令进行排序。用 Try 命令插入不符合 1:1 分离比例的标记,再用 Append 命令加入尚未进入连锁群的标记并排序;最后用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位(cm),用 Map 命令建立连锁图。

2 结果与分析

2.1 分子标记的多态性

首先以亲本 Speight G-28 和 NC2326 为材料进行引物筛选,然后利用筛选出的引物进行 DH 群体的分子标记分型分析。在 ISSR 分析中,100 条引物中有 4 条引物的扩增产物在亲本间表现明显差异;利用这 4 条引物对 DH 群体进行 ISSR 分析,均能得到在群体中分离较好的条带,共产生多态性标记 11 个(表 1),引物 UBC857 的扩增结果见图 1。

在 RAPD 分析中,从 520 条引物中共筛选出亲本间扩增产物具有多态性的引物 57 条;利用这些引物对 DH 群体进行 RAPD 分析,其中 52 条能扩增出在群体中发生分离的条带,共产生多态性标记 180 个(表 1),引物 OPAE16 的扩增结果见图 1。

表 1 用于遗传连锁图构建的分子标记

分子标记	引物数	多态性标记数	偏分离标记数	连锁标记数	未连锁标记数
ISSR	4	11	3	10	1
RAPD	52	180	35	147	33
合计	56	191	38	157	34

2.2 分子标记的分离分析

对 11 个 ISSR 标记的分离比例进行 χ^2 检验,在 P

= 0.01 水平上发现 3 个标记的分离不符合孟德尔比例(1:1),即表现偏分离(表 1),且全部偏向亲本

Speight G-28。对 180 个 RAPD 标记的分离比例进行 χ^2 检验,发现 35 个标记表现偏分离(表 1),其中 27 个偏向亲本 Speight G-28,8 个偏向亲本 NC2326。总共 191 个标记中,在 $P = 0.01$ 水平上有 38 个标记表现偏分离,占标记总数的 19.9%。

在 137 个 DH 系的作图群体中,统计了 191 个多态性标记(位点)的基因型分布,来自 Speight G-28 的位

点占 47.1%,来自 NC2326 的位点占 52.9%,符合 1:1 的分离比。每个位点上,Speight G-28 的基因频率为 19.0%~83.9%,平均为 48.8%;NC2326 的基因频率为 16.1%~81.0%,平均为 51.2%。两亲本在群体中的分离比例接近,并没有发现群体偏向某一亲本的现象,说明该群体总体上未出现严重的偏分离。

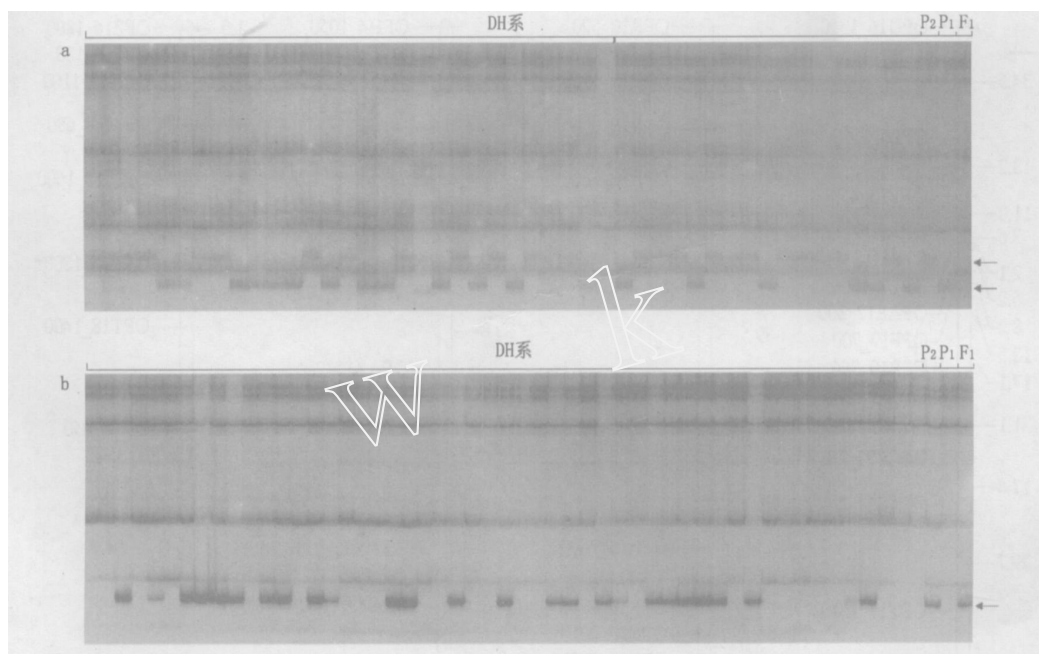


图 1 ISSR 引物 UBC857(a)和 RAPD 引物 OPY15(b)的部分扩增产物

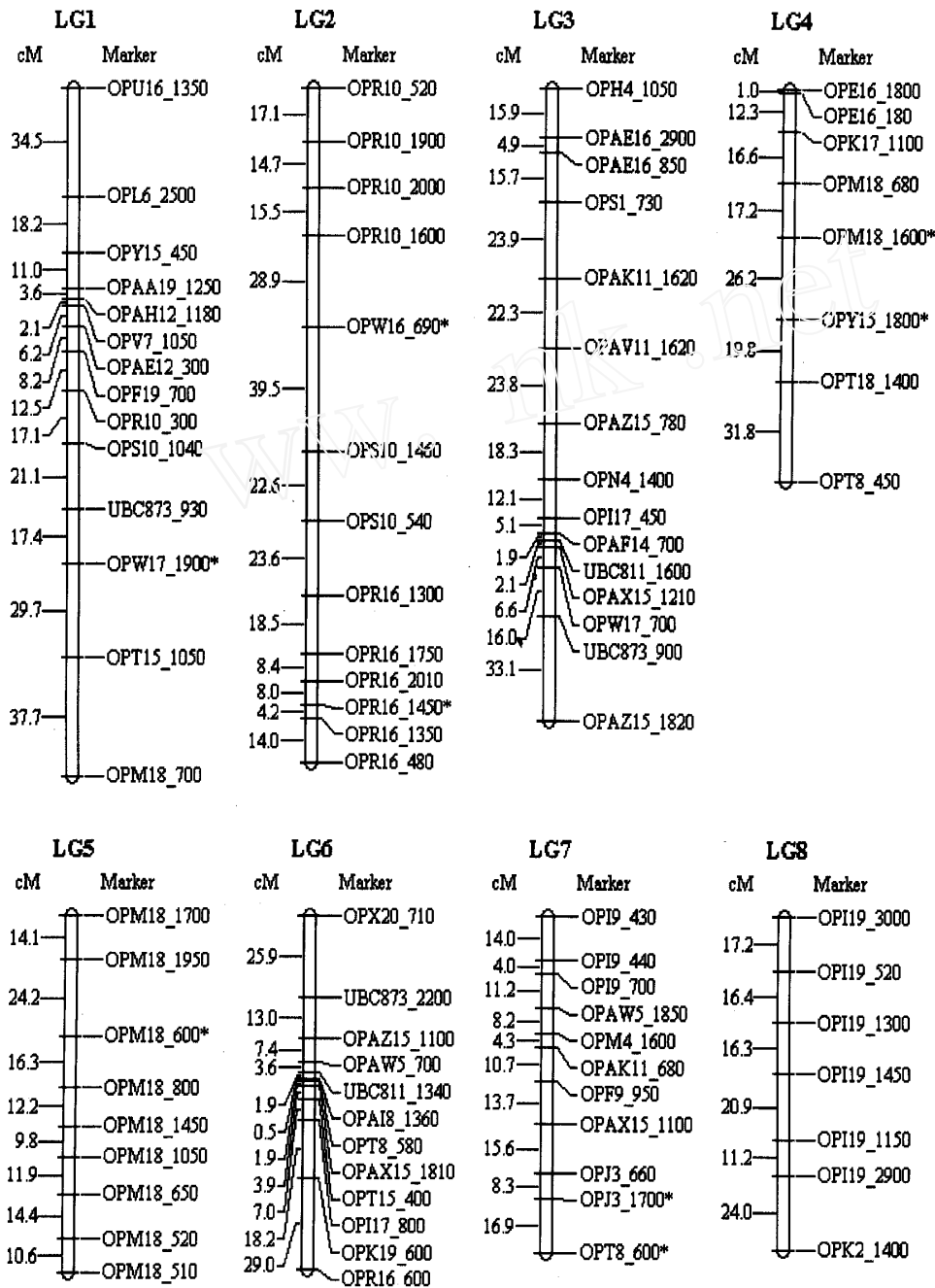
表 2 分子标记在遗传连锁图上的分布

连锁群	长度 (cM)	标记数	平均图距 (cM)	偏分离标记数	连锁群	长度 (cM)	标记数	平均图距 (cM)	偏分离标记数
LG1	219.3	14	16.9	1	LG15	44.7	3	22.4	0
LG2	215.0	13	17.9	2	LG16	45.1	3	22.6	0
LG3	201.7	15	14.4	0	LG17	38.1	3	19.1	0
LG4	124.9	8	17.8	2	LG18	32.4	3	16.2	1
LG5	113.5	9	14.2	1	LG19	28.5	3	14.3	0
LG6	112.3	12	10.2	0	LG20	20.8	3	10.4	0
LG7	106.9	11	10.7	2	LG21	23.7	2	23.7	0
LG8	106.0	7	17.7	0	LG22	21.9	2	21.9	0
LG9	62.8	15	4.5	10	LG23	19.4	2	19.4	0
LG10	68.4	5	17.1	2	LG24	14.4	2	14.4	0
LG11	66.0	4	22.0	0	LG25	15.1	2	15.1	0
LG12	49.8	4	16.6	0	LG26	13.1	2	13.1	0
LG13	37.8	4	12.6	1	LG27	2.7	2	2.7	0
LG14	33.9	4	11.3	0	合计	1838.2	157	14.1	22

2.3 遗传连锁图谱的构建

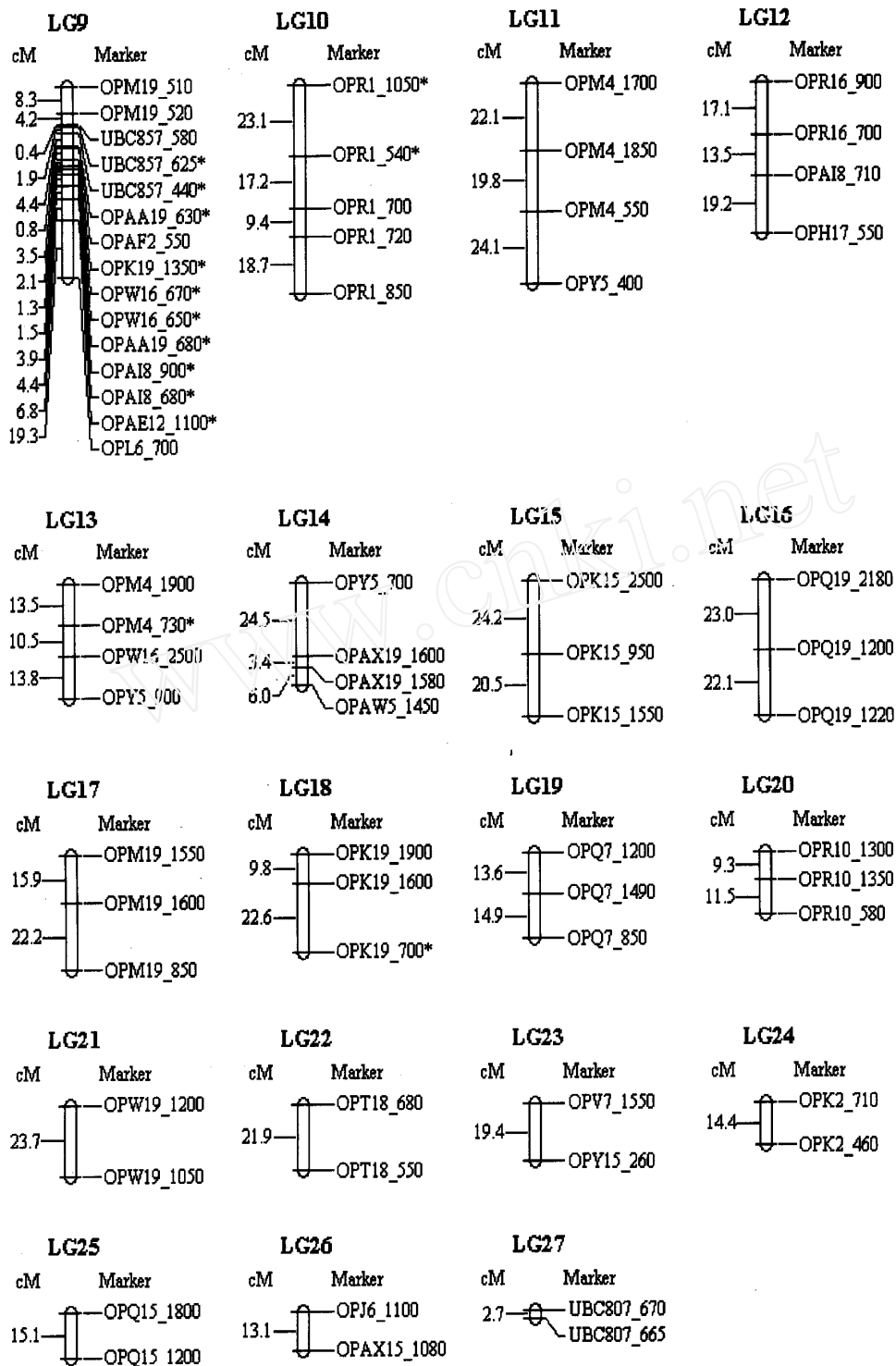
利用在DH群体中符合1:1分离比例的8个ISSR标记和145个RAPD标记进行连锁分析,得到1张含27个连锁群的遗传图谱框架,其中包括8个ISSR标记和127个RAPD标记。然后将偏分离标记逐个加入,

最后得到1张由157个标记组成的烤烟分子标记遗传连锁图(图2),其中偏分离标记22个,占14.0%。该图谱包括10个ISSR标记和147个RAPD标记,覆盖长度1838.2cM,平均图距14.1cM。每个连锁群长度、标记数、平均图距见表2。



注:各连锁群左侧为遗传距离,右侧为标记名称,*为偏分离标记

图2 烤烟分子标记遗传连锁图



续图 2 烤烟分子标记遗传连锁图

试验分析的 191 个多态性标记中,1 个 ISSR 标记和 33 个 RAPD 标记未进入连锁群,占标记总数的 17.8%。在未进入连锁群的标记中,符合 1:1 分离比

的标记有 18 个,占符合分离比标记总数的 11.8%;偏分离标记有 16 个,占偏分离标记总数的 42.1%。有 10 个偏分离标记集中在连锁群 LG9 上,其余 12 个偏

分离标记则分散在不同连锁群上(图2)。

3 讨论

构建分子标记遗传连锁图是性状基因定位及分子标记辅助选择育种的基础。Lin等^[3]利用来自烟草野生种间杂交产生的F₂群体,构建了第一张烟草分子标记遗传连锁图,该图谱由19个连锁群组成,包括69个RFLP标记和102个PARD标记,其中9个主要的连锁群覆盖长度1062 cM,另10个连锁群包括2~4个标记。Nishi等^[4]利用白肋烟品种间杂交产生的DH群体,经AFLP分析筛选了3072个引物组合,构建了包括95个AFLP标记的连锁图,这是普通烟草种内第一张分子标记遗传连锁图,但该图谱只覆盖了10个连锁群,总长度为383 cM。本研究以DH群体为材料,构建了第一张烤烟分子标记遗传连锁图,该图谱由27个连锁群组成,覆盖长度1838.2 cM,包括10个ISSR标记和147个RAPD标记。

分子标记遗传连锁图谱构建的理论基础是交换和重组,分子连锁群的数目应该同相应物种的染色体数目一致。但由于分子标记在染色体上分布的随机性及染色体不同区段交换值的异质性,连锁群上常常会产生较大的间隙,严重者则出现小片段的连锁群^[8]。本研究中有17个连锁群只包括2~4个标记,在Lin等^[3]的研究中也有10个连锁群仅包括2~4个标记,表明还存在相当大的间隙。烤烟染色体数为2n=48,本研究建立的分子标记遗传连锁图有27个连锁群,随着标记密度的加大,其中有些连锁群可能会连成1个连锁群,目前只是由于距离太远而误分为2个或2个以上连锁群;至于遗传连锁群与染色体对应,则有待通过原

位杂交、锚定标记或单体分析来进行。

本研究利用烤烟DH群体及ISSR和RAPD标记构建了国内外第一张烤烟分子标记连锁图,为烤烟性状的基因定位及分子标记辅助选择奠定了良好基础。由于本研究使用的作图群体是DH群体(永久性群体),因此利于将来加入更多的标记,从而逐渐构建相对“饱和”的烤烟分子标记遗传连锁图。

参考文献

- [1] 阮成江,何祯祥,钦佩. 中国植物遗传连锁图谱构建研究进展[J]. 西北植物学报, 2002, 22(6): 1526-1536.
- [2] Kumar L S. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnology Advances* [J]. 1999, 17: 143-182.
- [3] Lin T Y, Kao Y Y, Lin S, et al. A genetic linkage map of *Nicotiana plumbaginifolia* / *Nicotiana longiflora* based on RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 905-911.
- [4] T Nishi, Tajima T, Noguchi S, et al. Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 765-770.
- [5] 朱惠琴,张宪银,薛庆中. 开发实用的染色体加倍体系构建烟草DH群体[J]. 分子植物育种, 2004, 2(5): 643-648.
- [6] 杨本超,肖炳光,陈学军,等. 基于ISSR标记的烤烟种质遗传多样性研究[J]. 遗传, 2005, 27(5): 753-758.
- [7] Lincoln S E, Daly M J, Lander E S. Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0b. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report (Whitehead Institute, Cambridge, MA), 1992.
- [8] 于拴仓,王永健,郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建与分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 190-195.

卷烟纸多孔结构的特性及对CO释放的影响

Thierry LOYEUX, Jean - Marie

Loureau, Christophe Le Moigne and Gilles Le Bourvellec, Papeteries de Mauduit, Quimperle, 法国

卷烟纸对CO释放的影响已在许多研究中有过阐述。有两种机理起主要作用:通过卷烟纸的稀释和扩散。稀释法依靠空气渗透,扩散法则依靠卷烟纸的实际多孔结构。由于无法进行卷烟纸渗透率的测定,要评价其扩散率,可以对具备相同透气度的卷烟纸给予不同的CO释放。本研究的目的是取得一种评价卷烟纸扩散CO能力的工具,以便于更好地解释并控制CO的释放。为此我们研究了各种具有相同透气度的卷烟纸,但给予不同的CO释放,其扩散结果的差异性只能解释为因其多孔结构的不同。我们用以评价这些卷烟纸的方法有:1)直接测定未点燃卷烟的CO释放,2)基于卷烟纸电导系数上的扩散电导指数,3)测定通过卷烟纸的气体扩散,4)水银测孔计。对其方法、实用性和局限性之间进行比较并对使用简单方法测定卷烟纸多孔结构提出建议。

(选自59th TSRC 吴晓芸译,曹建平校)