

双向等位基因特异性 PCR 技术在烟草 SNP 分型中的应用

林世锋¹, 王仁刚^{1*}, 潘飞², 王自力¹, 元野³, 李尊强³, 任学良¹,
龙明锦¹, 张吉顺¹, 曾吉凡¹, 史跃伟¹

(1. 贵州省烟草科学研究院, 烟草行业分子遗传重点实验室, 贵阳 550081; 2. 上海农科种子种苗有限公司, 上海 201106;
3. 黑龙江省烟草公司牡丹江烟草科学研究所, 哈尔滨 150076)

摘要: 为提高抗 PVY 烟草品种的分子育种效率, 本研究针对抗病种质资源半坤村晒烟中隐性抗病基因 *eIF4E1* 的 SNP 位点 G149C 建立一种简单快速的双向等位基因特异性 PCR (Bi-directional PCR amplification of specific alleles, Bi-PASA) 检测方法, 并对该检测方法的特异性、准确度及实际应用效果进行验证。结果表明, 建立的 Bi-PASA 检测方法能够在 PCR 反应中有效区分 *eIF4E1* 基因 G149C 位点 3 种基因型: 野生型 GG、杂合突变型 GC、纯合突变型 CC。利用 Bi-PASA 检测方法可以对 K326 × 半坤村晒烟 F₂ 分离群体的基因型进行有效鉴别, 且鉴定结果与普通的等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR) 以及直接测序法的鉴定结果一致。综上所述, 本研究建立的 Bi-PASA 检测方法特异性强、准确度高、操作简便, 可更好地应用于 *eIF4E1* 基因的分子标记辅助育种。

关键词: 烟草; *eIF4E1* 基因; 双向等位基因特异性 PCR; SNP 分型

Application of Bi-directional PCR Amplification of Specific Alleles in Single Nucleotide Polymorphism Genotyping of Tobacco

LIN Shifeng¹, WANG Rengang^{1*}, PAN Fei², WANG Zili¹, YUAN Ye³, LI Zunqiang³, REN Xueliang¹,
LONG Mingjin¹, ZHANG Jishun¹, ZENG Jifan¹, SHI Yuewei¹

(1. Guizhou Academy of Tobacco Science, Key Laboratory of Molecular Genetics, CNTC, Guiyang 550081, China; 2. Shanghai Agricultural Scientific Seed & Seedling Co., Ltd, Shanghai 201106, China; 3. Mudanjiang Tobacco Science Research Institute, Heilongjiang Provincial Tobacco Company, Harbin 150076, China)

Abstract: In order to improve the efficiency of molecular marker assisted breeding for PVY-resistant tobacco varieties, we dedicated to establish a simple and rapid bi-directional PCR amplification of specific alleles (Bi-PASA) method for detecting the single nucleotide polymorphism (SNP) G149C of the recessive PVY resistance gene *eIF4E1* of the resistant germplasm Bankuncunshaiyan, and to verify the specificity, accuracy and practicality of the established detection method. It turned out that the established Bi-PASA detection method can effectively distinguish the three different genotypes for the G149C SNP of the *eIF4E1* gene in a single PCR reaction: wildtype (GG), heterozygous mutant (GC) and homozygous mutant (CC). The genotypes of *eIF4E1* in the F₂ population derived from K326/Bankuncunshaiyan were successfully identified by the Bi-PASA method. In addition, the genotypes of the F₂ population identified by the established Bi-PASA method were all the same with that identified by the conventional allele-specific PCR (AS-PCR) and direct sequencing, which suggested that the established Bi-PASA method is characterized by strong specificity, high accuracy and simple operation. Therefore, it can be better applied in the *eIF4E1* gene marker assisted breeding.

Keywords: tobacco; *eIF4E1*; bi-directional PCR amplification of specific alleles; SNP genotyping

由马铃薯 Y 病毒 (Potato virus Y, PVY) 引起的烟草马铃薯 Y 病毒病是烟草生产中的严重病害之一^[1]。抗性基因的挖掘和利用是抗 PVY 育种的基础^[2-3]。研究显示, 在栽培烟草中, 真核翻译起始因子 4E1 (eukaryotic translation initiation factor 4E1, *eIF4E1*) 基因为烟草 PVY 隐性抗病基因, 即感 PVY 基因, 该基因的缺失或突变使烟草获得 PVY 抗性^[4]。

2020 年, 本课题组^[5]对抗 PVY 烟草品种半坤村晒烟中的 PVY 抗性基因进行等位性检测, 结果显示半坤村晒烟的 PVY 抗性同样由 *eIF4E1* 基因控制。进一步序列分析表明, 相较于感病品种, 半坤村晒烟的 *eIF4E1* 基因编码区存在一个单核苷酸多态性 (SNP) 位点, 即第 149 位碱基由 G 突变为 C, 属于错义突变, 编码的氨基酸由色氨酸突变为丝氨酸,

基金项目: 中国烟草总公司贵州省公司科技项目 (201601、201830、201901); 中国烟草总公司黑龙江省公司科技项目 (202030000200126)

作者简介: 林世锋 (1978-), 男, 副研究员, 博士, 研究方向为烟草遗传育种与分子生物学。E-mail: linshifeng1978@163.com

*通信作者, E-mail: rengangwang@126.com

收稿日期: 2021-06-22

修回日期: 2021-10-25

进而造成半坤村晒烟对 PVY 产生抗病性, 该单碱基突变为进行 *eIF4E1* 等位基因分型提供了依据。

SNP 基因分型是进行 SNP 分子标记辅助选择育种的首要条件^[6]。目前, SNP 基因分型的方法有基于 PCR 技术的传统分型方法和基于大型仪器的高通量检测方法^[7]。基于 PCR 技术的传统分型方法, 如限制性片段长度多态性 (PCR-RFLP)、单链构象多态性 (PCR-SSCP)、单核苷酸引物延伸法 (single nucleotide primer extension, SNuPE) 和等位基因特异性 PCR (allele-specific PCR, AS-PCR)^[7-8]。PCR-RFLP 由于受限制性内切酶识别位点的影响, 其应用具有很大的局限性; PCR-SSCP 和 SNuPE 技术操作繁琐且重复性差。基于大型仪器的高通量检测方法, 如高分辨率熔解曲线分析 (high resolution melt, HRM)、变性高效液相色谱 (denaturing high performance liquid chromatography, DHPLC) 和基因芯片等技术^[9-10], 检测效率高, 但仪器设备昂贵、成本高、较难普及。相比之下, 利用 AS-PCR 技术对 SNP 进行分型快速、简便、成本低^[8]。2020 年, 本课题组^[11]针对半坤村晒烟 *eIF4E1* 基因 SNP G149C 位点建立起 AS-PCR 分子标记检测体系, 利用该标记对 K326 × 半坤村晒烟 F₂ 代抗感分离群体进行的基因分型结果与抗病表型鉴定结果完全一致, 进一步说明半坤村晒烟的 PVY 抗性是由 *eIF4E1* 基因所控制, 同样利用该标记可以对 PVY 抗性供体亲本回交转育后代的基因型进行准确选择, 但每个单株基因型的检测需要进行 2 个单一 PCR 扩增, 操作步骤较为复杂。

双向等位基因特异性 PCR (bi-directional PCR amplification of specific alleles, Bi-PASA) 是在等位基因特异性 PCR 的基础上发展出来的一种更为简捷的 SNP 分型方法, 其依据的基本原理是: 针对 1 个 SNP 位点设计 2 条延伸方向相反的内侧引物和 2 条外侧引物, 用这 4 条引物在同一 PCR 反应中进行扩增, 即通过 1 次 PCR 反应即可检测出已知突变位点的类型^[12-13]。最近几年, 双向等位基因特异性 PCR 技术在生命科学领域尤其是动植物遗传育种领域的应用已经越来越多地受到研究者的重视^[14], 其中在与植物抗病性状相关 SNP 研究中, 研究者分别建立了辣椒^[15]、水稻^[16]、苦瓜^[17]等抗病基因的双向等位基因特异性 PCR 检测方法。但双向等位基因

特异性 PCR 要求在同一反应体系中同时对不同的基因类型进行特异性扩增, 因而影响其扩增效果的因素较多, 对退火温度差、引物配比、反应温度等参数均具有较高的要求^[18]。

本文在半坤村晒烟 *eIF4E1* 基因序列分析检测到 SNP G149C 位点的基础上, 研究利用双向等位基因特异性 PCR 技术进行 *eIF4E1* 基因 SNP 分型, 为烟草抗 PVY 育种 SNP 标记的研究和应用提供一种更加省时、省力、经济有效的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究供试烟草材料均由贵州省烟草科学研究院新品种选育三组提供。以感 PVY 烟草品种 K326、红花大金元、云烟 87 作母本和抗 PVY 烟草品种半坤村晒烟作父本进行杂交获得各自 F₁ 代杂交种材料, 其中 K326 × 半坤村晒烟组合 F₁ 代再通过自交产生 F₂ 及回交世代, 经汁液摩擦接种法^[19]进行抗性鉴定后, 用于标记分析。

1.2 试验方法

1.2.1 烟草基因组 DNA 的提取 采用 AxyPrep 基因组 DNA 小量制备试剂盒 (Axygen) 提取烟草基因组 DNA, 并通过紫外分光光度法 (Nanodrop) 和琼脂糖凝胶电泳法初步检测基因组 DNA 的提取质量。

1.2.2 双向等位基因特异引物设计 针对课题组先前在半坤村晒烟 *eIF4E1* 基因上发现的 SNP 位点, 设计适合双向等位基因特异性 PCR 扩增的 4 条引物 (图 1, 表 1)。设计方法如下: 在 SNP 位点设计特异引物, 包括外引物 2 条, 内引物 2 条。先在 SNP 突变位点上下游 200~500 bp 处分别设计正、反向外引物 (Outer primer), 然后在所检测的变异位点处设计 2 个包含变异碱基的正、反向内引物 (Inter primer), 即 2 个内引物的 3' 末端碱基分别与 SNP 位点的 1 个碱基相同 (或互补), 同时还在内引物的 3' 末端倒数第 2 位 (-2 位) 或第 3 位 (-3 位) 人为引入了 1 个错配碱基 (表 1 引物序列中小写字母是特别设计的错配碱基) 以提高扩增反应的特异性。将 4 个引物链组成的 3 对引物在 1 个 PCR 反应中进行扩增, 扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测, 出现 2 条带的是纯合型 (GG 或 CC), 出现 3 条带的是杂合型 (GC), 如图 1 所示。

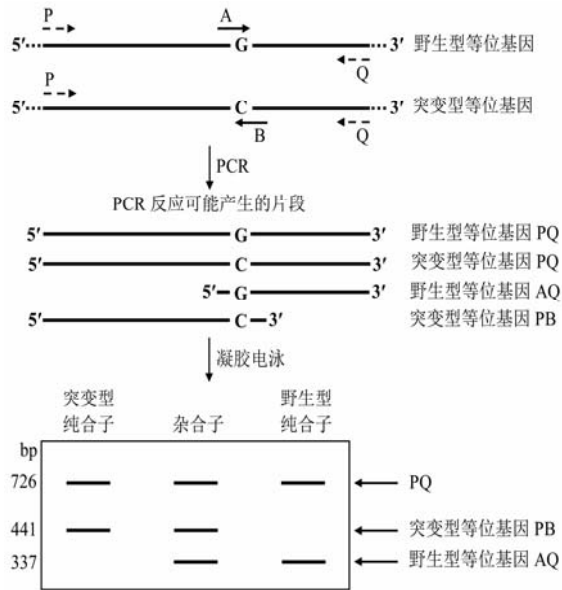


图 1 双向等位基因特异性 PCR 扩增原理^[12-13]

Fig. 1 The amplification principle of bi-directional PCR amplification of specific alleles

1.2.3 双向等位基因特异性 PCR 扩增及产物检测
双向等位基因特异性 PCR 反应体系为 20 μ L, 包括 Primix Taq 酶 (TaKaRa 公司) 10 μ L, 正、反向内、外引物 (10 μ mol/L) 各 0.4 μ L, 模板 DNA 1 μ L。PCR 扩增程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s (30 个循环), 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。取 5 μ L 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶 (含 GelRed 核酸染料) 上电泳, 自动凝胶成像仪观察结果并拍照测序。

1.2.4 F_2 单株的基因型鉴定及测序验证 分别使用 Bi-PASA 及普通的 AS-PCR 方法^[5] (引物序列见表 1) 对 F_2 分离群体 22 个单株进行鉴定分型; 同时, 以 22 个单株的 DNA 为模板, 使用 Bi-PASA 外侧引物 P 和 Q 进行 PCR 扩增 (退火温度 55 $^{\circ}$ C), 然后将扩增产物送至上海生工测序, 验证 Bi-PASA 分型结果的准确性。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Primers used in this study

引物用途 Purpose	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')
半坤村晒烟 <i>eIF4E1</i> 基因 Bi-PASA 遗传标记	内引物 A	CCTAAGCATCCATTAGAGAATTCgTG
	内引物 B	CCATAGGATTATCAAACCAAAAAGTgG
	外引物 P	CAAAATAAGCTGATTTCTCCAGCTTG
	外引物 Q	CGCTTCGTCCCAATTTACATTAG
半坤村晒烟 <i>eIF4E1</i> 基因 AS-PCR 遗传标记	FW	CCTAAGCATCCATTAGAGAATTCcTG
	Fm	CCTAAGCATCCATTAGAGAATTCgTC
	RWm	CAGGAGCTATTCAAAACCATAATTC AAC

注: 引物序列中大写字母碱基为互补序列, 小写字母碱基为引入的错配碱基。

Note: Uppercase letters indicate complementary sequences. Lowercase letters within a primer sequence indicate mismatched bases.

1.2.5 Bi-PASA 分子标记在烟草种质资源中的有效性检测 选取 24 个已知抗性的烟草品种 (表 2) 制备基因组 DNA (方法同 1.2.1); 采用构建的 Bi-PASA 分子标记体系进行 PCR 扩增 (方法同 1.2.3); 取 5 μ L 扩增产物在 2% 的琼脂糖凝胶 (含 GelRed 核酸染料) 上电泳, 自动凝胶成像仪观察结果并拍照分析。

2 结果

2.1 烟草 *eIF4E1* 基因 Bi-PASA 遗传标记的建立

引物设计是 Bi-PASA 分子标记成功的关键, 根据 Bi-PASA 引物设计的基本原则, 对烟草 *eIF4E1* 基因的 SNP 突变位点进行引物设计, 共设计出 45 组 Bi-PASA 引物, 经 PCR 验证筛选出 1 组引物扩增效果最好, 特异性条带最清晰、明亮, 扩增产物含量最高 (资料未列出)。从图 2a 可以看出, P/B 引物对在突变纯合型个体 (半坤村晒烟) 和突变杂合型个体

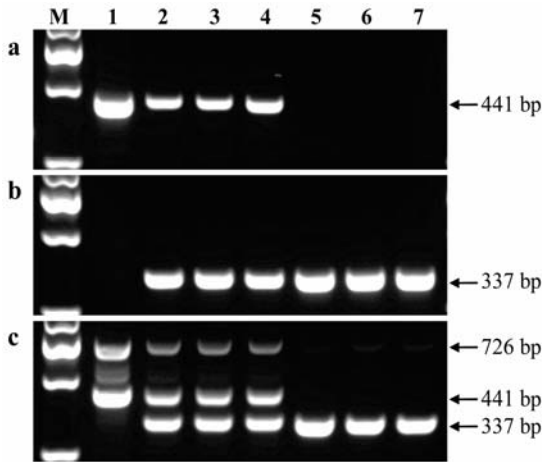
(K326 \times 半坤村晒烟、红花大金元 \times 半坤村晒烟、云烟 87 \times 半坤村晒烟) 中扩增出 1 条 441 bp 的电泳条带, 在野生纯合型个体 (K326、红花大金元、云烟 87) 中没有扩增出电泳条带。从图 2b 可以看出, A/Q 引物对在突变纯合型个体中没有扩增出电泳条带, 在突变杂合型个体和野生纯合型个体中扩增出 1 条 337 bp 的电泳条带。图 2c 为加入 A/Q/P/B 引物组合的 Bi-PASA 遗传标记检测结果, 在突变纯合型个体中扩增出 441 bp 和 726 bp 两条电泳条带, 显示标记个体基因型为 CC 型; 在突变杂合型个体中扩增出 337、441 和 726 bp 三条电泳条带, 显示标记个体基因型为 GC 型; 在野生纯合型个体中扩增出 1 条 337 bp 的电泳条带, 显示标记个体基因型为 GG 型, 由于外引物组合扩增效率低 (扩增不平衡) 使外引物扩增产物电泳条带 (726 bp) 未显示, 但并不影响 SNP 分型检测结果。

表 2 24 份已知 PVY 抗性的烟草种质资源

Table 2 Twenty-four tobacco germplasm accessions previously identified as resistant or susceptible to PVY

编号 No	种质名称 Germplasm name	种质类型 Germplasm type	种质来源 Germplasm origin	抗性 Resistance
1	毕纳 1 号	烤烟	中国贵州	S
2	长脖黄	烤烟	中国河南	S
3	大白筋 599	烤烟	中国山东	S
4	广黄 55	烤烟	中国广东	S
5	贵烟 5 号	烤烟	中国贵州	S
6	辽烟 20 号	烤烟	中国辽宁	S
7	南江 3 号	烤烟	中国贵州	S
8	中烟 100	烤烟	中国山东	S
9	许金二号	烤烟	中国河南	S
10	PVH 09	烤烟	巴西	S
11	RGH 51	烤烟	巴西	S
12	Coker 176	烤烟	美国	S
13	G28	烤烟	美国	S
14	K730	烤烟	美国	S
15	NC 82	烤烟	美国	S
16	公会晒烟	晒烟	中国广西	S
17	松选 3 号	晒烟	中国浙江	S
18	镇远小花烟	晒烟	中国贵州	S
19	半坤村晒烟	晒烟	中国云南	R
20	C151	烤烟	中国广东	R
21	NC55	烤烟	美国	R
22	TN86	白肋烟	美国	R
23	TN90	白肋烟	美国	R
24	Criollo Salteno 11	雪茄烟	美国	R

注：R，抗病种质资源；S，感病种质资源。Note: R, resistant germplasm; S, susceptible germplasm.



注：M，DL2000 marker；1，半坤村晒烟；2，K326×半坤村晒烟；3，红花大金元×半坤村晒烟；4，云烟 87×半坤村晒烟；5，K326；6，红花大金元；7，云烟 87；a，P/B 引物扩增结果；b，A/Q 引物扩增结果；c，A/Q/P/B 引物扩增结果。

Note: M, DL2000 marker; 1, Bankuncunshaiyan; 2, K326×Bankuncunshaiyan; 3, Honghuadajinyuan×Bankuncunshaiyan; 4, Yunyan87×Bankuncunshaiyan; 5, K326; 6, Honghuadajinyuan; 7, Yunyan87; a, PCR amplification with primers P and B; b, PCR amplification with primers A and Q; c, PCR amplification with primers A, Q, P and B.

图 2 Bi-PASA 遗传标记引物对抗、感材料基因组 DNA 扩增情况

Fig. 2 Bi-directional PCR amplification of specific alleles was performed on the genomic DNA of tobacco resistant and susceptible materials

上述结果表明，单引物 A/Q 和 P/B 具有很好的特异性和稳定性，双重引物 A/Q/P/B 扩增结果是单引物扩增结果的叠加，且能通过 1 次 PCR 反应和 1 次凝胶电泳，便能区分供试材料的 3 种基因型，因此成功建立了检测烟草 *eIF4E1* 基因 SNP 位点基因型的 Bi-PASA 检测方法。

2.2 F₂ 群体的 AS-PCR 分型结果

分别使用一对等位基因特异性 (allele-specific, AS) 的正向引物 (FW 和 Fm) 与共用反向引物 (RWm) 对 F₂ 分离群体的 22 个随机单株进行 PCR 扩增，通过电泳分析对应的 PCR 产物来判断 *eIF4E1* 基因型。结果如图 3 所示，4、6、10、14、21 具有单一的 ASM-m 标记特异条带，是突变纯合型 (CC) 植株；3、7、11、16、17、18 具有单一的 ASM-W 标记特异条带，是野生纯合型 (GG) 植株；其余单株同时具有 ASM-m 和 ASM-W 标记特异条带，是突变杂合型 (GC) 植株。

2.3 F₂ 群体的 Bi-PASA 分型结果

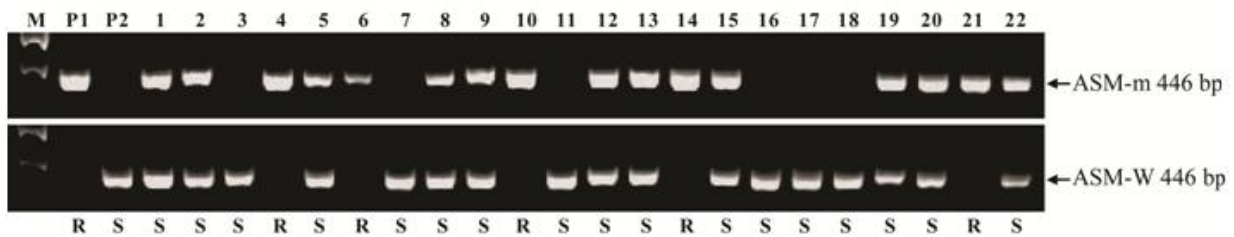
利用 Bi-PASA 方法对 F₂ 分离群体的 22 个随机单株进行分型，结果如图 4 所示，1、2、5、8、9、

12、13、15、19、20和22号单株扩增出337 bp、441 bp和726 bp三条电泳条带,为突变杂合型单株(GC);4、6、10、14和21号单株扩增出441 bp和726 bp两条电泳条带,为突变纯合型单株(CC);3、7、11、16、17和18号单株扩增出1条337 bp的电泳条带,为野生纯合型单株(GG)。所有单株的等位基因特征条带明亮、清晰,分型结果与AS-PCR法的结果一致,说明所建立的Bi-PASA方法完

全可以取代AS-PCR法,用于*eIF4E1*基因G149C多态性位点的分型检测。

2.4 测序结果

为了验证Bi-PASA分子标记检测到的F₂代烟株基因型的正确性,对22个Bi-PASA分型单株进行测序,利用Chromas 2.3查看测序结果。测序结果表明(图5),Bi-PASA分型结果与测序结果的一致性达到100%,说明Bi-PASA方法准确、可靠。



注: P₁, 半坤村晒烟; P₂, K326; 1~22, F₂代单株; R, 抗病单株; S, 感病单株, 下同。
Note: P₁, Bankuncunshaiyan; P₂, K326; 1-22, F₂ individuals; R, resistant individual; S, susceptible individual, the same below.

图3 两套AS-PCR引物在F₂群体和亲本中的扩增

Fig. 3 Amplification results of the F₂ segregation population and parents with two sets of AS-PCR primers

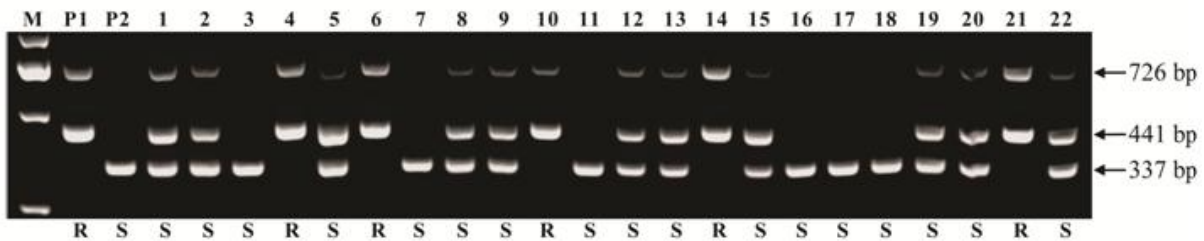
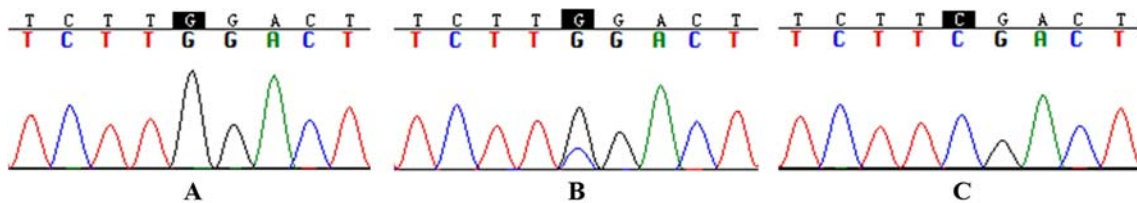


图4 Bi-PASA遗传标记在F₂群体和亲本中的扩增

Fig. 4 Bi-directional PCR amplification of specific alleles was performed in the F₂ segregation population and parents



注: A, GG型样本的测序结果; B, GC型样本的测序结果, SNP位点处显示重叠峰; C, CC型样本的测序结果。图中所示均为正义链的测序结果。
Note: A, Sequencing result of GG genotype; B, Sequencing result of GC genotype, and the SNP locus was identified as two overlapping nucleotide peaks; C, Sequencing result of CC genotype. The sequencing results shown in the figure were all derived from sense strands.

图5 PCR产物直接测序结果

Fig. 5 The sequencing results of the PCR product

2.5 Bi-PASA分子标记在烟草种质资源中的有效性检测

利用Bi-PASA分子标记引物组合对24个烟草品种进行PCR扩增(图6),在17个PVY感病品种中扩增出337 bp特异条带,而在半坤村晒烟中扩

增出441 bp特异条带,与预期结果一致。除半坤村晒烟外,在其他PVY抗病品种中均未显示出任何电泳条带,这是因为在这些PVY抗病品种中*eIF4E1*基因发生了完全缺失,在此情况下,本研究所构建的Bi-PASA分子标记作为显性分子标记将这些抗

病品种与半坤村晒烟及其他感病品种区分开来。

2.6 分子标记在烟草 PVY 抗性回交改良中的应用

为了使烟草 PVY 抗性回交改良子代鉴定工作简单高效可重复,并尽可能区分纯合、杂合基因型,采用 Bi-PASA 遗传标记引物组合对 K326 × 半坤村晒烟杂交代回交群体进行 PCR 扩增,并进行水平电泳,照相记录结果。然后按照如下标准判断烟草回交后代单株是否携带突变型 PVY 隐性抗病基因:电泳结果出现 441 bp 特异条带,初步判断该单株携

带突变型 PVY 隐性抗病基因。如图 7 所示,回交后代单株有 2 种基因型:1、4、5、7、8、11、14、16、17、19、21、22 单株为杂合突变型(GC),电泳结果出现 337 bp 和 441 bp 特异条带;其余单株为纯合野生型(GG),电泳结果只出现 337 bp 特异条带而没有出现 441 bp 特异条带。筛选出的杂合突变型单株可与受体亲本继续回交或供下一步育种利用,表明所构建的 Bi-PASA 分子标记可用于烟草 PVY 抗性回交改良。

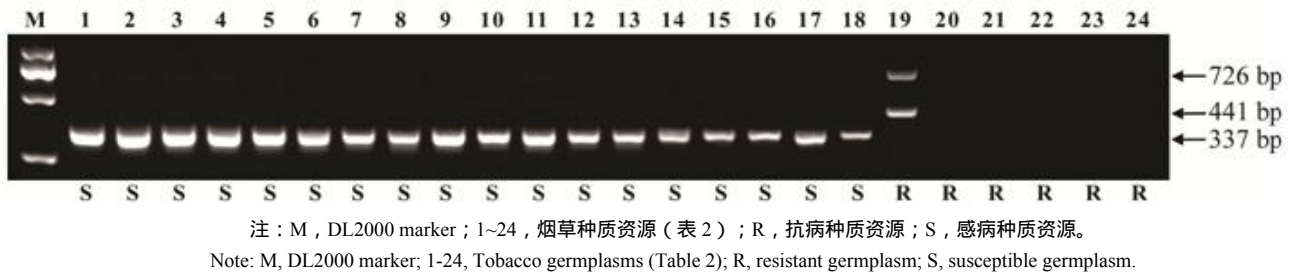


图 6 利用 Bi-PASA 分子标记对不同烟草品种进行 PCR 扩增检测结果

Fig. 6 Bi-directional PCR amplification of specific alleles was performed in different tobacco varieties

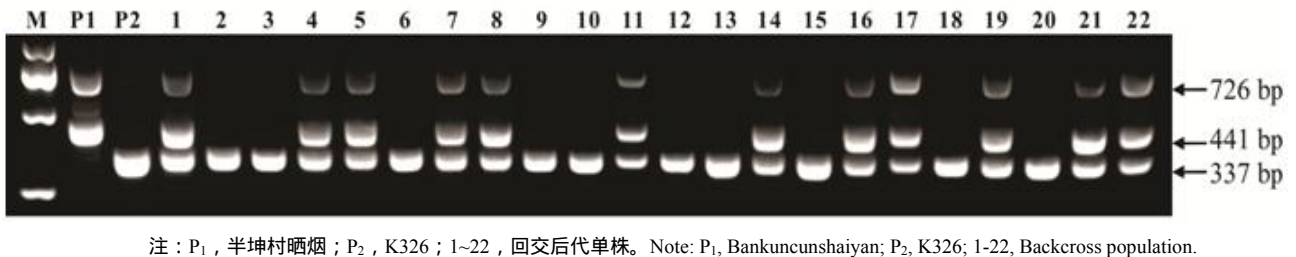


图 7 Bi-PASA 遗传标记在回交后代中对部分单株的检测结果

Fig. 7 Bi-directional PCR amplification of specific alleles was performed in some individuals of backcross population

3 讨论

采用 Bi-PASA 技术进行 SNP 分型,仅需一次 PCR 扩增和一次琼脂糖电泳即可达到目的,是一种快速经济的 SNP 检测方法。本研究基于品种资源半坤村晒烟中隐性抗病基因 *eIF4E1* 序列上的 SNP 位点成功设计并开发了 1 个 Bi-PASA 标记,用于 *eIF4E1* 抗病等位基因的分子标记辅助选择,以期烟草抗 PVY 分子标记辅助育种提供更加有力的技术支持。

目前烟草 PVY 抗病育种利用的抗源多数衍生自 VAM,利用 VAM 及其衍生种育成的抗病品种往往围绕 *eIF4E1* 基因发生大片段缺失,带来的基因组变异尺度远远大于 SNP 或小片段缺失^[20]。上述

原因不仅造成上百个功能基因的缺失,而且由于无法获得缺失连接片段信息造成 *eIF4E1* 突变位点共显性分子标记无法开发,不利于隐性突变基因的连续回交定向转育。半坤村晒烟的 PVY 抗性是由 *eIF4E1* 基因发生 SNP 突变产生的,本研究针对该 SNP 位点建立了 Bi-PASA 分子标记作为共显性分子标记,能够快速区分纯合子和杂合子 SNP 分型,因此利用该标记在烟草 PVY 抗性分子标记辅助选择育种中能够缩短选择时间,对隐性突变基因可以进行不间断的回交转移,从而提高基因回交转移速度,加快育种进程。与其他分子检测方法相比,Bi-PASA 还具有许多优点。Bi-PASA 作为以普通 PCR 为基础的简单方法,实施过程中仅需一台 PCR 扩增

仪、一套电泳设备和一些其他常用的 PCR 操作工具。与 PCR-RFLP 和传统的 AS-PCR 不同, Bi-PASA 只需一次 PCR 扩增和一次琼脂糖电泳即可达到分型的目的^[12-13]。此外, 尽管目前出现的基于大型仪器的高通量检测方法比 Bi-PASA 效率高, 如基因芯片技术、DHPLC、TaqMan MGB 和高分辨溶解曲线分析法, 但由于这些方法成本较高, 无法常规使用^[9-10]。

Bi-PASA 引物设计是决定该技术检测灵敏度和准确性的关键。YE 等^[13]研究认为, 在内引物的 3' 末端第 2 位引入错配碱基, 并且通过选择错配碱基类型, 可以提高扩增反应的特异性。卫波等^[21]分别第 2 位和第 3 位引入错配碱基, 发现对于不同的 SNP 突变类型, 加入错配碱基的位置和类型不同扩增效果不同。本研究在 Bi-PASA 引物设计时, 在各个内引物 3' 末端的第 2 位或第 3 位分别引入不同类型错配碱基, 然后通过 PCR 引物组合筛选获得 1 组引物扩增效果较好。结合已有研究报道和前期积累发现, 在 Bi-PASA 内引物 3' 末端引入错配碱基是增加 SNP 基因分型准确性的必要措施。

内外引物的浓度比是反应体系优化的重要内容, 不同研究中优化结果差别比较大。王齐旭等^[17]在苦瓜抗白粉病分子标记开发中优化内外引物浓度比为 10 : 1; 郑炜佳等^[22]在棉花 SNP 分型的研究中优化内外引物浓度比为 4 : 1; KOU 等^[23]在甘薯的研究中优化内外引物浓度比为 2 : 1; 郝志明等^[24]在小麦研究中, 内外引物浓度比为 3 : 2; 田孟祥等^[25]、姚姝等^[26]和陈国鑫等^[27]在水稻的研究中均将内外引物的浓度比确定为 1 : 1, 这与本试验的设置的内外引物浓度比一致。对于本试验烟草 SNP 的检测, 在 Bi-PASA 反应体系中 4 条引物浓度比设置为 1 : 1 : 1 : 1 便获得了满意的特异性条带, 这可能还与引物的位置、T_m 值和扩增片段大小等有关。

退火温度也是影响 PCR 特异性的因素, 温度过高扩增不出特异性条带, 过低则杂带多。本研究前期从大量引物组合中筛选出 1 组引物组合进行更加深入的 PCR 反应条件优化, 通过不断提高退火温度, 可以有效降低非特异性条带的扩增, 当退火温度达到 58 °C 时, 等位基因特征条带清晰、明亮, 扩增产物含量最高, 尽管外侧引物扩增产物电泳条带减弱或消失(图 2、4、5、6、7), 但并不影响 SNP 分型检测结果。

4 结 论

本研究针对烟草 PVY 隐性抗病基因 *eIF4E1* 已知的 G149C SNP 位点建立了一种双向等位基因特异性 PCR 分型方法, 同时与传统的等位基因特异性 PCR 方法进行了比较分析。研究表明, 引物的合理设计和扩增条件的优化是成功建立双向等位基因特异性 PCR 检测方法的关键。相较于传统的等位基因特异性 PCR 方法, 本研究建立的双向等位基因特异性 PCR 方法能够在 1 个 PCR 反应中检测出 *eIF4E1* 基因 SNP 位点的 3 种基因型 (GG、GC、CC), 操作简便, 省时省力, 可以更好地促进烟草抗 PVY 种质资源的利用和新品种选育。

参考文献

- [1] TIAN Y P, LIU J L, ZHANG C L, et al. Genetic diversity of potato virus Y infecting tobacco crops in China[J]. *Phytopathology*, 2011, 101(35): 377-387.
- [2] 林奇英, 谢联辉, 黄如娟, 等. 烟草品种对病毒病的抗性鉴定[J]. *中国烟草科学*, 1987 (3) : 18-19.
LIN Q Y, XIE L H, HUANG R J, et al. Identification of the resistance of tobacco varieties to viruses[J]. *Chinese tobacco science*, 1987(3): 18-19.
- [3] 陈荣平, 焦庆明, 兰荣利, 等. 烟草抗 PVY 育种材料的筛选与应用[J]. *中国烟草科学*, 2000, 21 (1) : 1-4.
CHEN R P, JIAO Q M, LAN R L, et al. Selection and utilization of resistant tobacco materials to PVY[J]. *Chinese tobacco science*, 2000, 21(1): 1-4.
- [4] JULIO E, COTUCHEAU J, DECORPS C, et al. A eukaryotic translation initiation factor 4e (eif4e) is responsible for the "va" tobacco recessive resistance to potyvirus[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2015, 33(3): 609-623.
- [5] 林世锋, 李尊强, 元野, 等. 与烟草 PVY 抗性紧密连锁的分子标记、引物及应用: CN112094942A[P]. 2020-12-18.
LIN S F, LI Z Q, YUAN Y, et al. Molecular marker closely linked with tobacco PVY resistance and primer and application: CN112094942A[P]. 2020-12-18.
- [6] 赵琼一, 李信, 周德贵, 等. 后基因组时代下作物的 SNP 分型方法[J]. *分子植物育种*, 2010, 8 (1) : 125-133.
ZHAO Q Y, LI X, ZHOU D G, et al. SNP genotyping methods for crops in post-genomic era[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(1): 125-133.
- [7] GANAL M W, ALTMANN T, RDER M S. SNP identification in crop plants[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2009, 12(2): 211-217.
- [8] 陈吉宝, 景蕊莲, 员海燕, 等. 等位基因特异 PCR 技术的研究与应用[J]. *植物遗传资源学报*, 2005, 6 (4) : 469-473.
CHEN J B, JING R L, YUAN H Y, et al. Development of allele-specific PCR[J]. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2005, 6(4): 469-473.
- [9] 汪维鹏, 倪坤仪, 周国华, 等. 单核苷酸多态性检测方法的研究进展[J]. *遗传*, 2006, 28 (1) : 117-126.
WANG W P, NI S Y, ZHOU G H, et al. Approaches for SNP genotyping[J]. *Hereditas*, 2006, 28(1): 117-126.
- [10] ALKAN C, COEL B P, EICHLER E E. Genome structural variation discovery and genotyping[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2011, 12(5): 363-376.
- [11] 林世锋, 李尊强, 元野, 等. 与烟草 PVY 抗性紧密连锁的分子标记、引物及应用: CN112094942A[P]. 2020-12-18.

- LIN S F, LI Z Q, YUAN Y, et al. Molecular marker closely linked with tobacco PVY resistance and primer and application: CN112094942A[P]. 2020-12-18.
- [12] QIANG L, THORLAND E C, HEIT J A, et al. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes[J]. *Genome Research*, 1997, 7(4): 389-398.
- [13] YE S, SAHAR D, KE X, et al. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms[J]. *Nucleic Acids Research*, 2001, 29(17): E88-8.
- [14] 余钧剑, 迟美丽, 贾永义, 等. 四引物扩增受阻突变体系 PCR 技术及其在动植物遗传育种研究中的应用[J]. *生物技术通报*, 2020, 36(5): 32-38.
- YU J J, CHI M L, JIA Y Y, et al. Tetra-primer amplification refractory mutation system PCR and its application in fauna and flora genetics and breeding research[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2020, 36(5): 32-38.
- [15] RUBIO M R, CARANTA C C, PALLOIX A P. Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the *pvr2-eIF4E* locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR[J]. *Genome*, 2008, 51(9): 767-771.
- [16] 陈涛, 孙旭超, 张善磊, 等. 稻瘟病广谱抗性基因 *Pigm* 特异性分子标记的开发和应用[J]. *中国水稻科学*, 2020, 34(1): 28-36.
- CHEN T, SUN X C, ZHANG S L, et al. Development and verification of specific molecular markers for *Pigm* gene associated with broad-spectrum resistance to rice blast[J]. *Chinese Journal of Rice Science*, 2020, 34(1): 28-36.
- [17] 王齐旭, 冯诚诚, 梁家作, 等. 四引物扩增受阻突变体系 PCR 在苦瓜抗白粉病分子标记开发中的应用[J]. *北方园艺*, 2018(5): 39-46.
- WANG Q X, FENG C C, LIANG J Z, et al. Application of tetra-primer ARMS PCR in development of molecular markers for powdery mildew resistance of bitter melon[J]. *Northern Horticulture*, 2018(5): 39-46.
- [18] 林世锋, 王仁刚, 任学良, 等. 检测烟草 *eIF4E-1* 基因单碱基插入突变的 Bi-PASA 标记引物及方法 CN110129479A[P]. 2019-08-16.
- LIN S F, WANG R G, REN X L, et al. Bi-PASA marker primer and method for detecting tobacco *eIF4E-1* gene single base insertion mutation CN 110129479A [P]. 2019-08-16.
- [19] 田波, 裴美云. 植物病毒研究方法[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 1-11.
- TIAN B, PEI M Y. Research methods of plant virus[M]. Beijing: Science Press, 1987: 1-11.
- [20] DLUGE K L, SONG Z B, WANG B W, et al. Characterization of *Nicotiana tabacum* genotypes possessing deletion mutations that affect potyvirus resistance and the production of trichome exudates[J]. *BMC Genomics*, 2018, 19(1): 484.
- [21] 卫波, 景蕊莲, 王成社, 等. 用等位基因特异 PCR 检测普通小麦 (*Triticum aestivum* L.) 的单核苷酸多态性[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(7): 1313-1320.
- WEI B, JING R L, WANG C S, et al. Assaying single nucleotide polymorphism in wheat (*Triticum aestivum* L.) with allele-specific PCR[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(7): 1313-1320.
- [22] 郑炜佳, 曲延英, 谢元元, 等. ARMS-PCR 对棉花 SNP 分型的研究[J]. *新疆农业科学*, 2013, 50(12): 2182-2188.
- ZHENG W J, QU Y Y, XIE Y Y, et al. Study on SNP genetic typing of sea-island cotton genome group[J]. *Xinjiang Agricultural Sciences*, 2013, 50(12): 2182-2188.
- [23] KOU M, XU J L, LI Q, et al. Development of SNP markers using RNA-seq technology and tetra-primer ARMS-PCR in sweetpotato[J]. *Journal of Integrative Agriculture*, 2017, 16(2): 464-470.
- [24] 郝志明, 章悦, 张力菁, 等. 小麦抗麦红吸浆虫候选基因 *TraesCS4A01G437800* 的四引物 ARMS-PCR 标记开发[J]. *河北农业大学学报*, 2020, 3(2): 5-14.
- ZHENG Z M, ZHANG Y, ZHANG L J, et al. Development of tetra-primer ARMS-PCR marker of candidate gene *TraesCS4A01G437800* for resistance to *Sitodiplosis mosellana* in bread wheat[J]. *Journal of Agricultural University of Hebei*, 2020, 3(2): 5-14.
- [25] 田孟祥, 张时龙, 余本勋, 等. 基于四引物扩增受阻突变体系 PCR 快速鉴定水稻 *S5* 基因的籼粳属性[J]. *作物杂志*, 2015(6): 48-53.
- TIAN M X, ZHANG S L, YU B X, et al. Rapid detection of indica-japonica attribute of *S5* gene based on tetra-primer amplification refractory mutation system PCR in rice[J]. *Crops*, 2015(6): 48-53.
- [26] 姚姝, 陈涛, 张亚东, 等. 利用分子标记辅助选择聚合水稻 *Pi-ta*、*Pi-b* 和 *Wx-mq* 基因[J]. *作物学报*, 2017, 43(11): 1622-1631.
- YAO S, CHEN T, ZHANG Y D, et al. Pyramiding *Pi-ta*, *Pi-b*, and *Wx-mq* genes by marker-assisted selection in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2017, 43(11): 1622-1631.
- [27] 陈国鑫, 陈冰, 李昊澍, 等. 四引物分子标记鉴定水稻光合效率基因 *TAC1* 的不同基因型[J]. *分子植物育种*, 2020, 18(7): 163-170.
- CHEN G X, CHEN B, LI H S, et al. Identification of different genotypes of *TAC1*, a photosynthesis efficiency related gene, by a Tetra-primer marker[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2020, 18(7): 163-170.