

烟草 Ti245 抗烟草花叶病毒的遗传分析及抗性基因定位

许石剑^{1,2}, 肖炳光¹, 高玉龙¹, 李永平^{1*}

(1.中国烟草育种研究(南方)中心 云南省烟草农业科学研究院, 云南 玉溪 653100; 2.湖南农业大学 农学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 以含抗烟草花叶病毒(TMV)基因的烟草 Ti245 为抗病亲本, 以 K326 为感病亲本, 经杂交得到 F₁, F₁ 自交得到 F₂ 群体, 分析了 Ti245 抗 TMV 的遗传规律, 并对抗性基因进行 SSR 标记定位。结果表明: Ti245 对 TMV 的抗性由 1 对隐性基因控制; 基因定位发现, Ti245 抗 TMV 的位点位于 LG9 连锁群, 标记*Tp217₂₀₀ 距目的基因最近, 遗传距离为 3.3 cM。

关 键 词: 烟草; 烟草花叶病毒; 遗传分析; 基因定位

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0123-04

Genetic analysis and mapping of resistance to TMV for tobacco variety Ti245

XU Shi-jian^{1,2}, XIAO Bing-guang¹, GAO Yu-long¹, LI Yong-ping^{1*}

(1.China Tobacco Breeding Research (Southern) Center, Yunnan Academy of Tobacco Agricultural Science, Yuxi, Yunnan 653100, China; 2.College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Group F₁ and F₂ were constructed through hybridization and selfing by using Ti245 as the resistant parents and K326 as the susceptible parent. The inheritance of resistance to TMV from tobacco variety Ti245 was analyzed, and then SSR markers linked to the resistant gene were identified. The results showed the resistance of Ti245 to TMV was controlled by one pair of recessive genes. The region of the resistance of Ti245 to TMV was mapped on LG9; The distance between the *Tp217₂₀₀ and the objective gene was the nearest, and the genetic distance was 3.3cM from the region of resistance to TMV.

Key words: tobacco; tobacco mosaic virus; genetic analysis; gene mapping

烟草普通花叶病毒(tobacco mosaic virus ,TMV)病严重影响烟草产量和品质^[1], 在生产上主要采用化学试剂进行防治, 但是防治效果不理想, 防治该病的最有效方法是选育抗病品种。已利用野生种黏烟草的 TMV 抗性育成了大批高抗品种^[2-8], 但应用于生产的不多, 其主要原因是抗性基因与不利基因存在一定的连锁关系^[9-10]。本研究以 Ti245 为抗 TMV 亲本, 以 K326 为感 TMV 亲本, 经杂交、自交后建立 F₂ 遗传作图群体, 进行田间抗性鉴定和遗

传分析, 通过 SSR 分子标记分析, 鉴定与 TMV 抗性基因紧密连锁的 SSR 分子标记, 以期为抗 TMV 标记辅助选择育种提供有效的分子标记。

1 材料和方法

1.1 材 料

用感 TMV 亲本 K326(P₁)45 株和抗 TMV 亲本 Ti245(P₂)45 株(种子均由中国烟草育种研究(南方)

收稿日期: 2010-05-06

基金项目: 云南省农业科技攻关计划项目(2006NG07)

作者简介: 许石剑(1984—), 男, 云南曲靖人, 硕士研究生, 主要从事烟草遗传育种研究, xujay003@163.com; *通信作者, lyp@tobacco-seed.com

中心提供),经杂交后获得 F_1 代。种植 F_1 代50株,经自交得到作图群体 F_2 代,成活160株。SSR引物来源分两部分:一部分来自 Bindler^[11]报道的278对烟草微卫星引物(PT系列);另一部分为利用美国TGI最初公开的部分烟草基因组数据开发的2555对SSR引物(浙江大学农业与生物技术学院和云南省烟草农业科学研究院童治军等研发,待发表),两部分共2833对引物。以上引物均由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.2 方法

亲本、 F_1 和 F_2 成苗后移栽,行株距为75 cm×30 cm,3周后进行人工接种:将带TMV病的叶片磨碎后稀释至1%,采用高压喷枪接种病毒稀释液,喷射压力为1.5~2.0 kg/m²,每株接种时间为5 s。

1.2.1 田间抗病性调查

现蕾前开始调查病情,每周调查1次,直至底叶成熟采收,取最后1次的调查数据作为抗性鉴定依据。病情分级标准采用YC/T39—1996。

1.2.2 烟草基因组DNA提取

烟草基因组DNA提取参照文献[12]的CTAB法,并稍作改进。

1.2.3 SSR分子标记分析

所有引物在亲本K326、Ti245及其 F_1 中进行筛选。筛选出具有多态的引物对 F_2 群体进行检测。经过预备试验得到最佳反应条件为:PCR反应体系为20 μL,其中模板DNA为3 μL(50 ng/μL),引物2 μL, *Taq*酶0.15 μL(5 U/μL),dNTP 1.6 μL(10 mmol/L),10×Buffer(含Mg²⁺)2 μL,补充ddH₂O至20 μL,石蜡油覆盖。PCR反应程序为:94℃预变性5 min;94℃变性1 min,60℃退火1 min,72℃延伸1 min,35个循环;72℃保温7 min。PCR产物中加入4 μL 6×Loading Buffer,取3 μL混合液在6%聚丙烯酰胺胶上400 V恒压电泳1.5 h,分离扩增产物,然后银

染检测。

扩增产物经非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,读图数据通过卡方测验检验标记是否符合1:3的分离比例。应用软件MapMaker/Exp Version3.0在PC计算机上进行连锁图谱的构建,然后用MapDraw2.1进行遗传作图。将 F_2 群体的抗性鉴定结果利用Append命令分别加入上述各连锁群检测是否连锁,鉴定与抗TMV连锁的标记,并用Kosambi函数 $\left(D = (1/4)\ln \frac{1+2r}{1-2r} \times 100\right)$ 将重组率转换成图距单位(cM),最后找到距目的基因较近的一些标记,计算遗传距离。

2 结果与分析

2.1 亲本抗性鉴定

田间调查亲本抗性,结果表明抗性亲本Ti245平均病级为0.622,表现为88.89%不发病;K326平均病级为2.057,表现为91.11%发病。经卡方检验,均符合理论抗感比。故设定病级0级和1级为抗病(此两级均小于感病亲本K326的平均病级);2、3和4级定为感病。确定了抗病的发病等级和感病的发病等级之后,对 F_2 群体进行抗感性统计。

2.2 Ti245抗TMV的遗传分析

Ti245、K326及杂交 F_1 、 F_2 代在接种TMV后至现蕾期的抗性鉴定结果见表1。Ti245共45株,40株表现为抗病,5株表现为感病;K326共45株,4株表现为抗病,41株表现为感病; F_1 共45株,5株表现为抗病,40株表现为感病; F_2 群体中,鉴定的181个单株中抗病株51株,感病株130株。 $\chi^2_{0.05(1)}=3.84 > 0.51$,抗感比为1:3,符合1:3的孟德尔遗传分离规律。以上结果表明:Ti245的抗性是由1对隐性基因控制的。

表 1 Ti245 与 K326 组合的各世代抗性鉴定结果

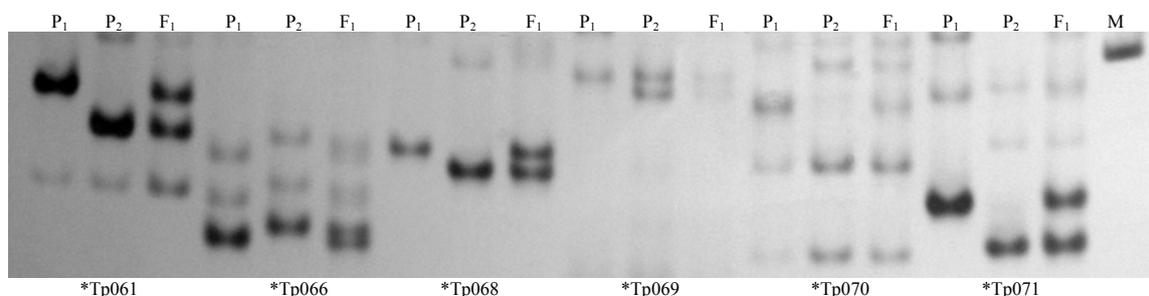
Table 1 TMV resistance to the cross of Ti245 with the susceptible parents

材 料	世 代	株数/株					实际比	理论比	χ^2_c
		抗		感					
		0	1	2	3	4			
Ti245		25	15	2	3	0	40 5	1 0	
K326		1	3	23	16	2	4 41	0 1	
K326×Ti245	F ₁	2	3	5	34	6	5 45	0 1	
K326×Ti245	F ₂	28	23	19	101	10	51 130	1 3	0.51

2.3 分子标记分析

以 K326、Ti245 及其 F₁ 的 DNA 为模板，用所有合成的 SSR 引物对模板进行扩增，从 2 833 对 SSR 引物中筛选得到 200 对多态性引物，其中 Tep 系列引物 12 对，Tp 系列引物 168 对，PT 系列引物 20 对。

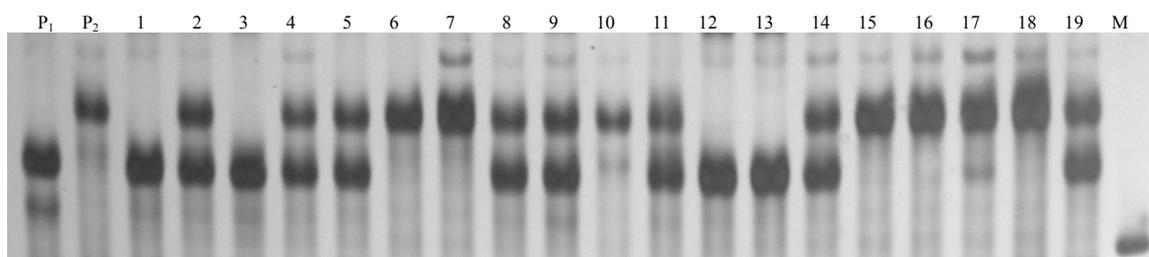
图 1 中为部分引物的筛选结果，其中大多数有多态性的标记，都为共显性标记，可以用于 F₂ 分离群体的标记分析。利用筛选出的引物对 F₂ 群体 160 个样品 DNA 进行 PCR 扩增。图 2 为引物 Tp034 在 F₂ 群体部分单株中的扩增情况。



P₁ 为亲本 K326；P₂ 为亲本 Ti245；M 为 200 bp marker。

图 1 部分引物在抗、感亲本及其 F₁ 间的扩增结果

Fig.1 Profile produced by a partial of primers among the parents and F₁



P₁ 为亲本 K326；P₂ 为亲本 Ti245；M 为 100 bp marker；1~19 为部分群体。

图 2 引物 Tp034 在部分 F₂ 群体中的检测结果

Fig.2 Detection results of primers Tp034 in some F₂ plants

2.4 抗性连锁标记分析

200 对引物产生的标记有 166 对多态性较高，并且其表现相对稳定。通过遗传作图，有 160 个标记定位在 25 个连锁群上。TMV 抗性位点及 4 个标

记(*Tp075₁₇₀、*Tp157₁₆₀、*Tp217₂₀₀、*Tp385₁₈₀)被定位于连锁群 LG9 上(图 3)，其中距目的基因最近的标记为*Tp217₂₀₀，其遗传距离为 3.3 cM；目的基因另一侧的标记为*Tp385₁₈₀，遗传距离为 15.8 cM。

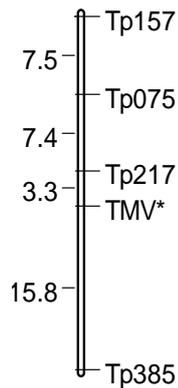


图3 含 TMV 抗性位点的遗传图谱

Fig. 3 Linkage group with the region of resistance to TMV and SSR markers

3 讨论

关于 Ti245 抗 TMV 的遗传分析已有报道, 解芬等^[13]的研究结果表明, Ti245 的抗性由 2 对隐性基因控制, 但笔者发现 Ti245 对 TMV 的抗性由 1 对隐性基因控制, 可能是接种后环境不同对发病产生较大影响, 也可能是所使用抗、感界定标准不同所致, 因而 Ti245 抗 TMV 的遗传研究还有待利用更多世代、更大群体规模进行分析。

参考文献:

- [1] 张仲凯, 李毅. 云南植物病毒[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 17-19.
- [2] 杨铁钊. 烟草育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2003: 231.
- [3] 苏德成. 烟草育种[M]. 北京: 中国财政经济出版社, 2000: 179.
- [4] 申艳霞, 范景清, 冯国忠, 等. 烤烟雄性不育一代杂交种辽烟 15 号的选育及其特征特性[J]. 中国烟草, 1996(1): 6-9.
- [5] 王东胜, 刘贯山, 李章海, 等. 烟草栽培学[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 2002: 135.
- [6] 李永平, 卢秀萍, 王颖宽, 等. 烤烟新品种云烟 202 的选育及特征特性[J]. 中国烟草科学, 2005(4): 16-18.
- [7] 卢秀萍, 李永平. 烤烟新品种云烟 201 的选育及特征特性[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(4): 378-381.
- [8] 焦芳婵, 卢秀萍, 李永平, 等. 烤烟新品种云烟 203 的主要特性[J]. 西南农业学报, 2010, 23(3): 625-628.
- [9] Chaplin J F, Matzinger D F, Mann T J. Influence of the homozygous mosaic-resistance factor on quantitative characters of fire-cured tobacco[J]. Tob Sic, 1996, 10: 81-84.
- [10] Chaplin J F, Mann T J. Evaluation of tobacco mosaic resistance factor transferred from burley to fire-cured tobacco[J]. Jour Hherd, 1987, 71: 723-725.
- [11] Bindler G, vander Hoeven R, Gunduz I, et al. A microsatellite marker based linkage map of tobacco[J]. Theo Appl Genet, 2007, 114: 341-349.
- [12] 朱生伟, 史芝文. 快速提取烟草 DNA 的方法[J]. 东北农业大学学报, 1998, 29(3): 275-278.
- [13] 解芬, 肖炳光, 高玉龙, 等. 烟草品种 Coker176 和 Ti245 抗 TMV 的遗传分析[J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2010, 25(2): 170-172, 182.

责任编辑: 杨盛强
英文编辑: 易来宾