

烟草品种 Beinhart1000-1 抗黑胫病基因的 QTL 定位

高亭亭¹, 蒋彩虹¹, 罗成刚¹, 程立锐¹, 李艳丽¹, 代帅帅¹, 刘 魁²

(¹ 中国农业科学院烟草研究所/烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 青岛 266101; ² 云南省中烟工业有限责任公司, 玉溪 653100)

摘要: 为研究烟草黑胫病不同亲本来源的抗性遗传规律, 定位抗性基因位点, 本研究利用抗黑胫病品种 Beinhart1000-1 构建了 220 个 F₂ 分离群体。通过病圃接种鉴定和遗传分析, 确定 Beinhart1000-1 对烟草黑胫病的抗性由多基因控制。利用筛选到的 70 对稳定 SSR 引物对烟草黑胫病抗性进行了 QTL 分析, 绘制了一张包含 14 条染色体的遗传连锁图谱, 且定位到 5 个与烟草黑胫病抗性紧密相关的 QTLs, 分别在 2、3、3、6、12 号染色体上, 其贡献率分别为 6.2%、6.0%、6.7%、5.6% 和 5.1%。此结果使烟草黑胫病抗性研究进一步深入, 推进了烟草黑胫病分子标记辅助选择。

关键词: 烟草; Beinhart1000-1; 黑胫病; SSR; QTL 定位

Mapping of Quantitative Trait Loci Affecting Resistance to Black Shank in Tobacco Line Beinhart1000-1

GAO Ting-ting¹, JIANG Cai-hong¹, LUO Cheng-gang¹, CHENG Li-rui¹, LI Yan-li¹, DAI Shuai-shuai¹, LIU Kui²

(¹ Key Laboratory for Tobacco Gene Resources/Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101; ² China Tobacco Yunnan Industrial Co., Ltd., Yuxi 653100)

Abstract: To study the genetic regularity of tobacco black shank resistance in different parents, and to identify the genomic locations contributing to the resistance, 220 F₂ populations were constructed from a cross between Beinhart1000-1 and susceptible variety, xiaohuangjin1025. Through disease inoculation and genetic analysis, we found that the resistance to black shank in Beinhart1000-1 was controlled by multiple genes. 70 stable SSR primers were used for QTL mapping the resistance to black shank. We got 14 linkage groups which included 52 SSR markers. Five QTLs were discovered on No. 2, No. 3, No. 3, No. 6, and No. 12 genetic linkage groups, and accounted for 6.2%, 6.0%, 6.7%, 5.6%, and 5.1% of the phenotypic variance, respectively. These results could facilitate our understanding on the inheritance of resistance to black shank in tobacco and its breeding by marker-assisted selection.

Key words: tobacco; Beinhart1000-1; black shank; SSR; QTL analysis

烟草黑胫病 (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*) 是烟草最主要的根茎病害, 可侵染所有的栽培烟草种 (烤烟、白肋烟、晒烟、晾烟、香料烟等) [1], 并多与烟草青枯病混合发生 [2], 极大地降低了烟叶的产量和品质, 造成巨大的经济损失 [3]。烟草黑胫病菌的自然寄主只有烟草, 在人工接种条件下也会感染马铃薯、茄子、番茄、辣椒幼苗和海狸豆等茄科

作物 [4]。

目前烟草生产上防治黑胫病的主要途径是培育抗病品种, 中国、美国等主要产烟国一直将抗烟草黑胫病作为烟草育种的重要指标, 且在新品种审定或推广使用中均具有一票否决权。目前抗烟草黑胫病育种主要采用常规育种和田间病圃接种鉴定, 存在病害鉴定、目标性状选择困难、精准度低、育种周期

收稿日期: 2014-04-02 修回日期: 2014-05-04 网络出版日期: 2015-02-06

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150206.1641.013.html>

基金项目: 中国烟草总公司项目 (110201002002); 中国烟草总公司项目 (110201302003)

第一作者主要从事作物遗传育种研究。E-mail: gaotingting111@163.com

通信作者: 罗成刚, 主要从事烟草遗传育种研究。E-mail: luochenggang@caas.cn

长、工作量大等问题,所以抗性遗传和分子育种等理论和新技术的研究亟待深入。

分子标记中的 SSR (simple sequence repeats) 标记具有重复稳定性好的特点,但由于其开发成本较高,以及烟草基因组数据较匮乏等因素^[5-6],限制了其在烟草育种中的应用。直到 G. Bindler 等^[7]公开发表了高密度的烟草遗传连锁图谱,包括 2300 多对 SSR 引物,SSR 标记在烟草上的应用才有了长足发展。

近年来,国外对黑胫病的研究有了很大进展。V. Vontimitta 等^[8]以 Beinhart1000 与 Hicks 为亲本,构建了 118 个 DH 群体,绘制了一张含有 24 个连锁群、200 个标记位点的遗传图谱,并定位到了 6 个与 Beinhart1000 的黑胫病抗性有关的 QTL 位点,分别位于 2、4、8、9、11 和 14 号连锁群上,其中位于 8 号和 4 号连锁群上 QTL 的 LOD 值和贡献率最高。2012 年, V. Vontimitta 等^[9]又以同样的亲本为试验材料,构建 DH 群体,定位了烟草黑胫病不同生理小种(0 号和 1 号)的抗性 QTL:黑胫病 0 号小种的抗性 QTL 分别位于 4、8 和 13 号连锁群上,1 号小种的抗性 QTL 分别位于 4、8、13、15 和 23 号连锁群上,试验说明这 2 个黑胫病生理小种的抗性基因可能具有连锁关系。B. G. Xiao 等^[10]以 Florida301 和 Hicks 为亲本,构建了 $F_{5,6}$ 重组自交系(RIL),经试验分析后,定位到了 11 个黑胫病抗性 QTL,其中 LOD 值和贡献率都较高的 3 个位点分别位于 7、14 和 24 号连锁群上;试验还对温室材料与大田材料的试验结果进行了比较,证明二者所得结果相近,只是温室定位结果的 LOD 值普遍高于大田 LOD 值。

本研究旨在分析优异抗烟草黑胫病种质 Beinhart1000-1 的黑胫病抗性遗传机理,筛选与 Beinhart1000-1 的黑胫病抗性基因紧密连锁的 SSR 标记,并将其抗性基因进行 QTL 定位。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 母本为高抗黑胫病品种 Beinhart1000-1,父本为高感品种小黄金 1025,种质由中国农业科学院烟草研究所提供。

1.1.2 烟草黑胫病菌 用于接种鉴定的黑胫病菌 0 号强毒菌株由中国农业科学院烟草研究所提供。

1.1.3 SSR 引物 所用 SSR 引物来自 G. Bindler 等^[7]公开发表的烟草 SSR 连锁图及其引物序列,且标记所在连锁群已知,由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 群体构建 2011 年用烟草黑胫病抗性品种 Beinhart1000-1 与感病品种小黄金 1025 杂交获得种子,2012 年用 F_1 种子自交获得 F_2 群体,2013 年将亲本、 F_1 、 F_2 种子按常规方法播种,并放入温室培养,60 d 左右后将幼苗移栽至大田,株行距约为 100 cm × 60 cm,等幼苗长至团棵期时接种黑胫病菌,抗病对照为 Beinhart1000-1,感病对照为小黄金 1025。

1.2.2 菌谷的配置 在燕麦培养基上接种烟草黑胫病菌,并将其放在 28 ℃ 恒温培养箱中培养 1 周左右。然后将培养基上的菌丝体刮下,转接到菌谷培养基上,培养 20 d 左右备用。

菌谷培养基的制作方法:将谷子浸泡 6 h 后淘去空谷壳,沥去水分后倒入锅内,加适量清水煮开,当谷粒炸开成半开花状时停止加热,冷却后过滤出谷粒,分装入 500 mL 三角瓶中(不要超过 500 mL 刻度线),然后将三角瓶放入高压灭菌锅中 115 ℃ 高压灭菌 1 h 后备用^[11]。

1.2.3 菌谷的接种方法 在每株烟苗的茎基部用小刀轻轻划一条大小相同的伤口,然后在根部接种 5 g 菌谷,立即覆土,并灌水保湿。接种 45 d 后,调查单株田间发病状况,并计算病情指数。

1.2.4 病情统计标准 依据《烟草病虫害分级及调查方法 GB/T 23222—2008》中的病情划分标准,将抗性鉴定单株的病级划分为 0、1、3、5、7、9 共 6 个级别。其中,病级数 0 级划分为抗病株(R),病级数 1~9 级划分为感病株(S)。病情指数 = $[\sum(\text{病级代表值} \times \text{该级叶片数}) / (\text{调查总叶片数} \times \text{最高级代表})] \times 100$ ^[12],群体抗性划分标准为免疫:病情指数等于 0,无任何症状;高抗: $0 < \text{病情指数} \leq 15$;中抗: $15 < \text{病情指数} \leq 30$;中感: $30 < \text{病情指数} \leq 50$;高感: $50 < \text{病情指数} \leq 100$ 。

1.2.5 DNA 的提取及抗感池的建立 采用 CTAB 法^[13]提取烟草总基因组 DNA,利用紫外分光光度法和琼脂糖凝胶电泳法检测所提 DNA 的质量, -20 ℃ 保存。

抗性鉴定后,在 F_2 分离群体中分别选取 10 株极端抗病单株和 10 株极端感病单株,将其 DNA 分别等量混匀组成抗感池。

1.2.6 PCR 扩增反应和电泳检测 PCR 反应体系总体积为 10 μL ,其中 30 ~ 50 ng/ μL 的 DNA 模板 1 μL 、5 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1 μL 、2 × Mix 5 μL 、ddH₂O 2 μL 。所用试剂购自 MBI。

PCR 反应在 96 孔 ABI Veriti 型多梯度 PCR 仪上运行:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 15 s,55 ℃ 退火 15 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;72 ℃ 延伸 7 min,

4 ℃ 保存^[14]。其中,退火温度根据引物序列不同略作调整。

PCR 反应结束后,取 3 μL PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒功率 60 W 电泳 1.5 h 左右。用改进的 NaOH 银染方法^[15]对电泳后的聚丙烯酰胺凝胶进行染色显色。

1.3 数据统计与分析

首先使用 MAPMAKER 软件包,利用供试 F₂ 群体的 SSR 标记基因型数据,构建遗传连锁图。然后结合遗传连锁图谱和表型鉴定数据,应用 WinQTL-Cart 2.5 软件进行 QTL 定位,其中 permutation times 设为 1000,LOD 阈值设定为 ≥2.5。

2 结果与分析

2.1 黑胫病抗性鉴定结果

首先对抗、感亲本和杂交 F₁ 进行抗性鉴定,结果显示,Beinhart1000-1 的病情指数为 1.1,表现为高抗;小黄金 1025 的病情指数为 97.7,表现为高感;F₁ 病情指数为 6.5,表现为高抗(表 1)。由试验结果推测,Beinhart1000-1 中的黑胫病抗性是由显性基因控制的。

表 1 供试烟草材料接种赤星病菌后发病情况调查表
Table 1 Disease observation of tobacco materials inoculated with the black shank

处理代号 Treatment number	供试材料 Materials	接种株数 No. of inoculated plants	病情指数 Disease index
1	Beinhart1000-1	30	1.1
2	小黄金 1025 Xiaohuangjin1025	39	97.7
3	(Beinhart1000-1 × 小黄金 1025) F ₁ (Beinhart1000-1 × Xiaohuangjin1025) F ₁	34	6.5

2.2 黑胫病抗性遗传分析

按照 1.2.4 中的方法,对 F₂ 分离群体进行黑胫病的抗性鉴定。根据病情划分标准,将 F₂ 单株病级划分为 0、1、3、5、7、9 共 6 个级别,统计结果如图 1。由图 1 可知,抗病群体(0 级)有 125 株,占群体总数的 56.8%;感病群体(1~9 级)有 95 株,占群体总数的 43.2%,其中 9 级单株最多,其他等级所占比例较小。群体中抗病单株与感病单株的数量比约为 1.3:1,这与孟德尔遗传理论中的分离比 1:3 有较大差异。再结合 Beinhart1000-1 的自身抗性表现及以往田间试验观察,预测 Beinhart1000-1 的黑胫病抗性由多基因控制,且显性基因具有上位性。

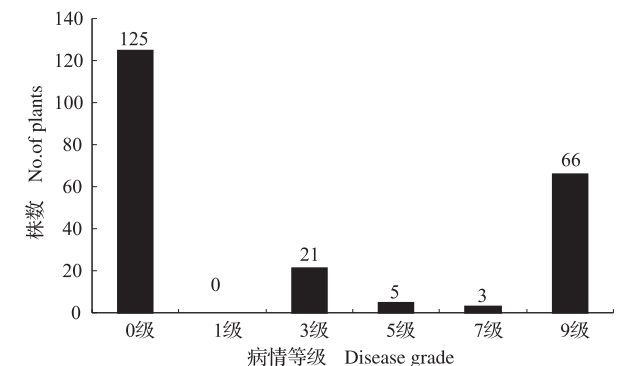


图 1 F₂ 群体单株病情分布图
Fig. 1 The resistance identification of seedling in F₂ population

2.3 抗性基因的 SSR 标记筛选

以抗、感亲本及 F₁ 的 DNA 为模板进行 PCR 扩增,筛选了分布于 24 条连锁群上的 2653 对 SSR 引物,共筛选得到 190 对多态性引物,多态性比率为 7.2%。采用 R. W. Michelmore 等^[16]提出的分离群体分组分析(BSA)法,将筛选到的多态性 SSR 引物在抗感池间进行 PCR 扩增,并将 PCR 产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳银染显色。从 190 对 SSR 引物中挑选出了 70 对扩增稳定且多态性显著的引物。

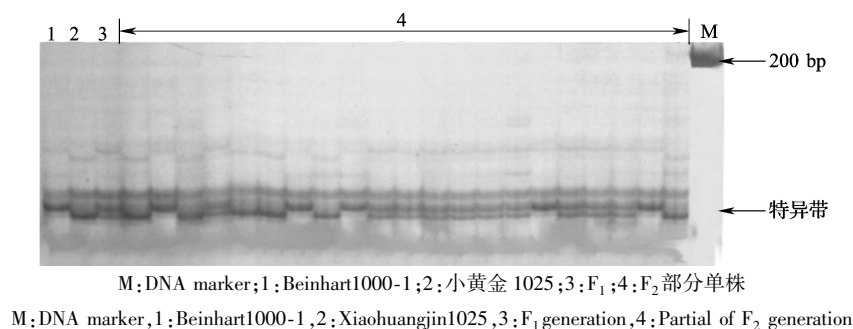


图 2 引物 M790 在部分 F₂ 分离群体中的扩增效果
Fig. 2 Polymorphism produced by M790 primer among the partial F₂ population

2.4 黑胫病抗性基因的 QTL 定位分析

应用该 70 对引物对抗性鉴定完毕的 220 个 F_2 单株进行 PCR 扩增,再利用基因型数据构建遗传连锁图谱,如图 3 所示。共得到 14 个连锁群,图谱全长 702.5 cM,包含 52 个标记位点,平均每个连锁群上有 3.7 个 SSR 标记,标记间平均遗传距离为 13.5 cM,另外有 18 个标记未能连锁到该图谱上。

根据构建的遗传图谱,利用复合区间作图法对烟草黑胫病的抗性 QTL 进行定位分析,共检测到 5 个 QTL 位点:一个位于 2 号连锁群上,在标记 M252 与 61322 之间,其峰值 LOD 为 3.6,贡献率为 6.2%,加性效应 -0.25,暂将其命名为 qBS-2,则 qBS-2 与标记 61322 间的遗传距离较近;另外 2

个 QTLs 位于 3 号连锁群上,分别命名为 qBS-3a 和 qBS-3b,则 qBS-3a 位于标记 M574 与 M790 之间,与标记 M574 间的遗传距离较近,其峰值 LOD 为 3.2,贡献率为 6.0%,加性效应 -1.2; qBS-3b 位于标记 M790 与 M378 之间,其与标记 M790 间的遗传距离较近,其峰值 LOD 为 4.1,贡献率为 6.7%,加性效应 -0.2;剩下 2 个 QTLs 分别位于 6 号和 12 号连锁群上,分别命名为 qBS-6 和 qBS-12,则 qBS-6 位于标记 M355 与 M415 之间,其与标记 M415 间的遗传距离较近,其峰值 LOD 为 2.9,贡献率为 5.6%,加性效应 -0.2; qBS-12 位于标记 M745 与 M706 之间,其与标记 M745 间的遗传距离较近,其峰值 LOD 为 3.4,贡献率为 5.1%,加性效应 -1.3。定位分析最终结果如表 2。

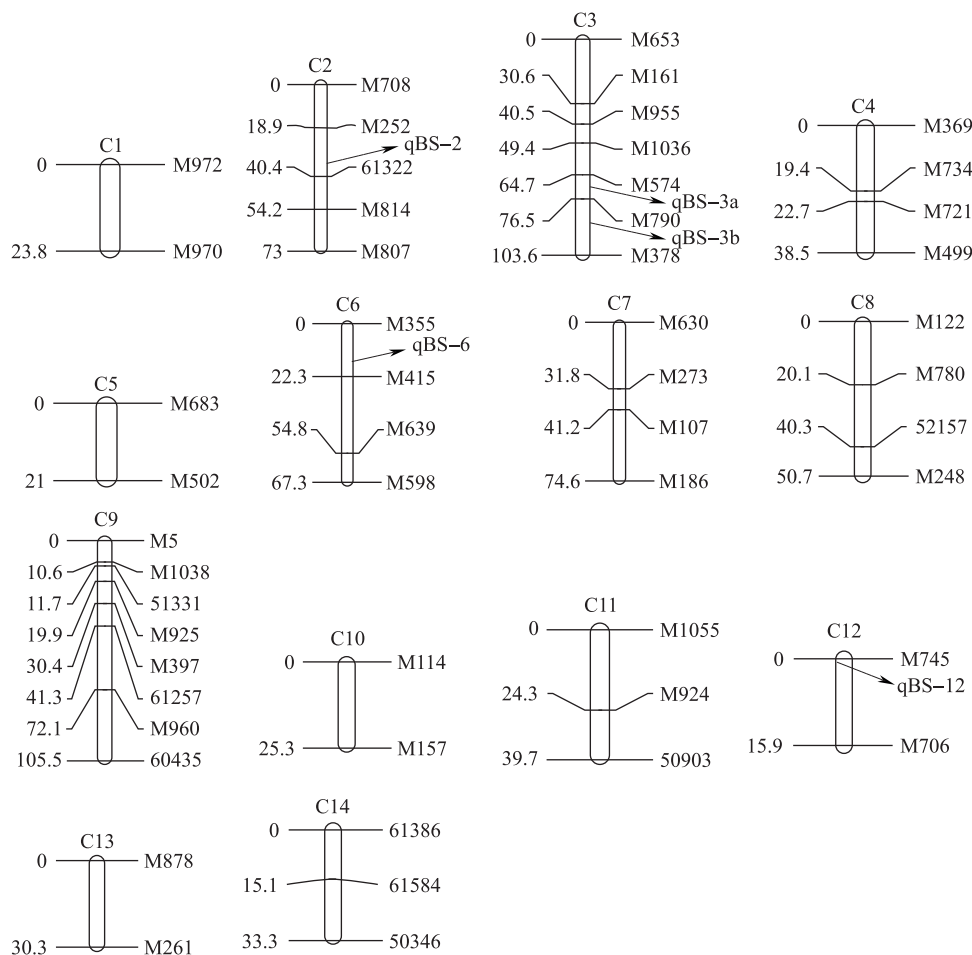


图 3 基于 SSR 的遗传连锁图谱

Fig. 3 Genetic linkage map based on SSR markers

找出试验所得连锁标记的原名(2011 年 G. Bindler 等^[7]公开发表的烟草 SSR 遗传连锁图谱上的名称),定位这些标记的原始连锁群(表 3)。其中

M790 和 M745 是自行设计的新引物,故没有原始名称和原始连锁群。由表 3 可知,各标记的连锁关系与原始图谱中相近,说明本试验结果的可信度较高。

表 2 QTL 定位分析结果
Table 2 Results of QTL analysis

位点 Trait	所在连锁群 Linkage group	位置 Position	上标记 Left marker	下标记 Right marker	LOD 值 LOD	贡献率(%) PVE	加性效应 Additive effect	遗传距离(cM) Genetic distance
qBS-2	2	34	M252	61322	3.6	6.2	-0.25	6.4
qBS-3a	3	68	M574	M790	3.2	6.0	-1.2	3.3
qBS-3b	3	82	M790	M378	4.1	6.7	-0.2	5.5
qBS-6	6	13	M355	M415	2.9	5.6	-0.2	9.3
qBS-12	12	0.1	M745	M706	3.4	5.1	-1.3	0.1

表 3 定位标记原始数据
Table 3 Primitive data of the mapping marker

位点 Trait	连锁引物 Linkage marker	标记原名 Primitive name	原始连锁群 Primitive group	原始标记位置 Primitive position	相近位点 Similar marker
qBS-2	M252	PT52147	22	114.604	
	61322	PT61322a	22	131.878	
qBS-3a	M574	PT54505	17	93.419	PT30314(位置:17.415)
	M790	-	-	-	
qBS-3b	M378	PT53098	17	77.168	PT30173(位置:32.793)
	M355	PT52927	18	52.404	
qBS-6	M415	PT53444	18	54.919	
	M745	-	-	-	
qBS-12	M706	PT55356	6	40.066	

V. Vontimitta 等^[8]定位到的 QTL 中有一个也位于 17 号连锁群上,在标记 PT30314(位置:17.415)和 PT30173(位置:32.793)之间,与本研究所定位到的 2 个位点(qBS-3a 和 qBS-3b)可能有连锁关系,至于各位点是否有重复还需进一步验证。

3 讨论

3.1 抗性遗传分析

李治国等^[17]用烟草黑胥病抗性品种 Florida301、Coker371-Gold 分别与感病品种红花大金元、大白筋 599 作亲本,结果为 Florida301 的烟草黑胥病抗病性是由 1 对隐性基因控制的不完全隐性遗传,Coker 371-Gold 由 1 或 2 对显性基因控制的不完全显性遗传。刘晓侠等^[18]用红花大金元和经辐射诱变、细胞工程技术筛选获得的高抗烟草黑胥病的突变株系作亲本,结果认为烟草黑胥病抗病性是由 1 对主效基因控制的显性遗传。本研究用雪茄烟品种 Beinhart1000-1 作为烟草黑胥病抗病亲本,结果是由多基因控制的显性遗传,这更说明烟草对黑胥病的抗性是由多基因控制,且存在显隐性,不同的抗

性来源其抗性基因存在差异。

3.2 分子标记位点的差异

刘晓侠等^[18]在 2004 年筛选到 2 个与烟草黑胥病抗性基因 *BsI(t)* 连锁的 RAPD 标记,其遗传距离分别为 20.5 cM 和 29.9 cM。本研究则定位到 5 个与黑胥病抗性基因连锁的 SSR 标记,其贡献率分别为 6.2%、6.0%、6.7%、5.6% 和 5.1%,较刘晓侠等^[18]所得连锁标记数目要多。本研究应用的是 SSR 标记,来自 2011 年 G. Bindler 等^[7]公开发表的较高密度连锁图谱,覆盖整个烟草基因组,比刘晓侠等^[18]所用的 RAPD 引物稳定重复性要好,且数量更大,密度也更高^[19];采用 WinQTLCart 2.5 通用软件对试验所得基因型数据与表型数据进行分析,结果更为精细可靠,可定位到效应值较低的多个位点。

3.3 与近期试验结果的比较

与 V. Vontimitta 等^[8-9]和 B. G. Xiao 等^[9]的研究结果相比,本试验所得 QTL 位点的 LOD 值和贡献率相对较低,其可能的原因有:(1)遗传背景的影响:V. Vontimitta 等^[8-9]选择 Beinhart1000 与 Hicks 杂交,B. G. Xiao 等^[10]以 Florida301 和 Hicks 为双亲,

本研究则以 Beinhart1000-1 和小黄金 1025 为亲本, 3 个试验所用亲本材料不同, 遗传背景差异较大。(2) 所选试验群体有差异: V. Vontimitta 等^[8-9]用的是多个 DH 群体, B. G. Xiao 等^[10]构建了 F_{5:6} 重组自交系(RIL), 两群体与 F₂ 群体相比要更稳定, 且前 2 个试验的数据量要比本研究大很多。(3) 试验环境影响试验结果: 在不同环境中起抗性作用的位点可能有所不同, 而在本试验环境中发挥作用的位点可能为多个微效基因位点。(4) 烟草中的遗传狭窄问题: 本研究所用亲本均为烤烟, 双亲间的亲缘关系较近, 所以合成标记在亲本间的多态率很低, 造成遗传图谱的精度不高, 进而影响标记位点的 LOD 值和贡献率等试验结果。

虽然本研究所得 QTL 效应值较低, 需要进行后期的试验验证, 但本研究对前人的试验结果进行了补充和完善, 所得位点对烟草黑胫病的分子标记辅助改良也具有重要意义。

参考文献

- [1] 马国胜, 高智谋, 陈娟. 烟草黑胫病研究进展[J]. 烟草科技, 2001(9): 44-47
- [2] 林燕. 我国烟草黑胫病研究论文计量分析[J]. 贵州农业科学, 2012, 41(1): 131-132
- [3] 陈瑞泰, 朱贤朝, 王智发, 等. 全国 16 个主产烟省(区)烟草侵染性病害调研报告[J]. 中国烟草科学, 1977, 1(4): 1-7
- [4] 尚志强. 烟草黑胫病病原、发生规律及综合防治研究进展[J]. 中国农业科技导报, 2007, 9(2): 73-76
- [5] 尹国英, 杨小燕, 何其波, 等. 鉴定烟草种质资源 SSR 核心引物筛选和验证[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(5): 960-965
- [6] 张雪廷, 童治军, 焦芳婵, 等. 38 份晾晒烟种质资源遗传关系的 SSR 分析[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(4): 653-658
- [7] Bindler G, Plieske J, Bakaher N. A high density genetic map of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from large scale micro-satellite marker development[J]. Theor Appl Genet, 2011, 123: 219-230
- [8] Vontimitta V, Lewis R S. Growth chamber evaluation of a tobacco 'Beinhart1000' × 'Hicks' mapping population for quantitative trait loci affecting resistance to multiple races of *Phytophthora nicotianae*[J]. Crop Sci, 2012, 52: 91-98
- [9] Vontimitta V, Lewis R S. Mapping of quantitative trait loci affecting resistance to *Phytophthora nicotianae* in tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) line Beinhart1000[J]. Mol Breeding, 2012, 29: 89-98
- [10] Xiao B G, Drake K, Vontimitta V, et al. Location of genomic regions contributing to *Phytophthora nicotianae* resistance in tobacco cultivar 'Florida 301'[J]. Crop Sci, 2012, 29: 1-24
- [11] 张洁霞. 抗烟草黑胫病分子标记的筛选及抗性遗传规律的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2009
- [12] 裴维蕃, 梁训生. 调查烟草花叶病病情指数的计算方法[J]. 植物保护, 1963(3): 67-68
- [13] 王珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288
- [14] 潘应花, 刘艳华, 任民, 等. 烟草种质不同群体量遗传完整性的 SSR 研究[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(5): 979-984
- [15] 任民, 贾兴华, 蒋彩虹, 等. Bassam 和 Sanguinetti 银染方法在 SRAP 和 TRAP 标记中的比较研究[J]. 生物技术通报, 2008(1): 113-116
- [16] Michelmore R W, Paran I. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregate analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832
- [17] 李治国, 肖炳光, 于海芹, 等. 两个烟草品种对黑胫病抗性的遗传分析[J]. 云南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 24(6): 799-803
- [18] 刘晓侠, 王荔, 文国松, 等. 烟草黑胫病抗性基因 *BsI(t)* 的 RAPD 标记[J]. 作物学报, 2004, 30(5): 516-518
- [19] 刘艳华, 牟建民, 王志德, 等. 分子标记技术在烟草遗传育种中的应用[J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8(1): 118-122