

烤烟 CMV 抗性基因 QTL 定位

文 轲^{1,2}, 张志明², 任 民¹, 蒋彩虹¹, 申莉莉¹, 程立锐¹, 耿锐梅¹, 陈小翠^{1,2},
冯 莉¹, 杨爱国^{1*}

(1. 烟草行业烟草基因资源利用重点实验室, 中国农业科学院烟草研究所, 青岛 266101;

2. 四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014)

摘 要: 利用 SSR 技术, 在抗 CMV 烟草中发掘与抗病基因紧密连锁的分子标记, 目的是为抗病基因的定位克隆以及培育抗病新品种奠定基础。本研究以抗 CMV 的烤烟品种台烟 8 号、感病品种 NC82 为亲本, 构建 BC₁ 代分离群体, 对其进行抗性遗传分析。对分布于烟草 24 条连锁群上的 2317 个 SSR 位点进行了多态性筛选, 获得了 62 个稳定多态性标记, 利用这些标记对 288 株 BC₁ 群体分型数据, 用 WinQTLCart2.5 进行分析, 找到一个与抗性相关的 QTL, LOD 值为 2.6。研究结论表明, 台烟 8 号对 CMV 的抗性由多基因控制, 标记 53735 与抗性 QTL 紧密连锁, 遗传距离为 0.1 cM, 该 QTL 位于 10 号连锁群, 贡献率为 13%。

关键词: 烟草; CMV; SSR; 抗性基因

中图分类号: S572.01

文章编号: 1007-5119 (2013) 03-0055-05

DOI: 10.3969/j.issn.1007-5119.2013.03.11

QTL Analysis of the Resistance Gene to CMV in Flue-cured Tobacco

WEN Ke^{1,2}, ZHANG Zhiming², REN Min¹, JIANG Caihong¹, SHEN Lili¹, CHENG Lirui¹, GENG Ruimei¹,
CHEN Xiaocui^{1,2}, FENG Li¹, YANG Aiguo^{1*}

(1. Key Laboratory for Tobacco Gene Resources, Tobacco Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Qingdao 266101, China; 2. Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China)

Abstract: In order to obtain gene closely linked with CMV and cultivate resistant varieties, BC₁ segregating population was generated from Taiyan-8 (resistant) and NC82 (susceptible) as parents. The BC₁ population was used for virus artificial inoculation. 167 polymorphism markers were selected from 2317 SSR markers distributed in 24 tobacco linkage populations and then 62 SSR markers with stability and significant polymorphism were obtained. A tobacco genetic linkage map was constructed according to virus test results of 288 BC₁. A QTL related to resistance with LOD equal to 2.6 was obtained through WinQTLCart2.5 analysis. Our results showed that multiple genes caused the resistance of Taiyan-8; marker 53735 was closely linked to resistance QTL with the genetic distance of 0.1 cM, which could explain 13% of the variation.

Keywords: tobacco; CMV; SSR; resistance gene

黄瓜花叶病毒病 (Cucumber mosaic virus, CMV) 是世界性的烟草病害, 在我国各主产烟区均有分布, 由蚜虫和汁液摩擦传播, 主要表现为烟叶花叶和植株矮化, 其流行速度快, 防治难度大, 严重影响烟叶产量。因此, 挖掘抗病基因, 培育抗病品种是防治 CMV 的有效途径。

针对 CMV 的研究多数集中在黄瓜、辣椒等茄科植物。张桂华等^[1]利用黄瓜高感 CMV 亲本 HZL-04 和高抗 CMV 亲本 F-3 组合的 F₂ 群体, 采用 AFLP 技术筛选得到了与 CMV 抗性基因相连锁的特异标记, 该标记与抗性基因遗传距离 9.74 cM。王显辉等^[2]利用 AFLP、SRAP 和 SSR 技术发现黄

基金项目: 中国烟草总公司科技重大专项项目“烟草遗传图谱构建和重要抗病基因精细定位”[110201201003 (JY-03)]; 中国烟草总公司科技重点项目“优质抗病烤烟新品种选育及育种技术研究”(110201002002); 公益性行业(农业)科研专项项目“烟草增香减害关键技术与示范”(201203091)

作者简介: 文 轲, 女, 在读硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: 78149901@qq.com。*通信作者, E-mail: yag-100@163.com

收稿日期: 2012-12-07

修回日期: 2013-04-02

瓜 HZL-04-1 与 F-3 配制的 F₂ 群体中对 CMV 的抗性受隐性单基因控制, 并找到一个与 CMV 抗性相连锁的显性标记, 与黄瓜 CMV 感性基因相连锁。Barrios^[3]发现, 尖椒对 CMV 的抗性由隐性单基因控制。Gil Ortega^[4]研究发现辣椒 Perennial 品种对 CMV 的抗性受多基因控制, 且抗性可遗传给后代。Ben Chaim 等^[5]通过感抗 CMV 辣椒品种 Maor 与 Perennial 构建 F₃ 群体, 利用 AFLP 技术研究抗 CMV 的 QTL 定位, 认为其抗性由一对隐性基因控制。从诸多研究来看, 黄瓜和辣椒的不同品种对 CMV 的抗性遗传方式不同, 有的为单基因控制, 有的为多基因控制^[6]。

国内外学者对烟草 CMV 的研究主要集中在病原学和遗传规律方面, 而且对抗性遗传规律的研究结果也不一致, Ternovskij 等^[7]报道烟草 Immune 580 对 CMV 的抗性是由隐性单基因控制的; Wan^[8]认为抗源材料 Holmes 的抗性是由 5 个基因控制; 范静苑^[9-10]认为烤烟品种台烟 8 号和铁把子对 CMV 抗性均由一对隐性基因控制。目前, 对 CMV 表现抗性的烟草品种相对较少, 在已鉴定出的抗病材料中, 以台烟 8 号抗病性和育种可利用性最为优异^[11], 而对其抗性基因的挖掘却鲜有报道。

SSR(Simple Sequence Repeat) 标记是由 Moore 等建立的以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术, 具有较高多态性、特异性强、标记带型简单及重复性好等优点, 广泛运用于植物遗传分析与基因定位研究领域。2011 年, Bindler 等^[12]构建了四倍体烟草高密度遗传图谱, 该图谱包含 2363 个 SSR 标记位点, 2317 个标记, 所有标记均匀分布在 24 条连锁群上, 可覆盖整个基因组, 标记间的平均距离小于 1.5 cM。本研究以台烟 8 号为抗性材料, 在抗性分离群体中寻找与烟草抗 CMV 基因或主效 QTL 紧密连锁的分子标记, 为抗 CMV 基因的图位克隆奠定基础, 同时为进一步利用分子标记进行分子育种、培育抗病品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 抗 CMV 烤烟品种台烟 8 号(50 株)、感病烤烟品种 NC82(50 株) F₁ 群体(台烟 8 号 × NC82; 50 株) BC₁ 群体[(台烟 8 号 × NC82) × 台烟 8 号; 288 株]。

1.1.2 毒源 CMV 毒源由中国农业科学院烟草研究所病虫害测报综合防治研究中心分离提纯, 接种到枯斑三生幼苗上繁殖保存, 在使用前 15 d 转接到无毒烟苗上复壮, 备用。

1.1.3 SSR 引物 SSR 引物信息来自 Bindler(2011) 发表的烟草 SSR 连锁图谱, 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.1.4 试验时间 试验于 2012 年 4—6 月育苗、接种、鉴定; 2012 年 7—8 月进行分子标记筛选; 2012 年 9 月进行数据处理。

1.2 试验方法

1.2.1 材料准备 按照烟草托盘育苗方法和植物病毒研究的要求进行育苗操作和管理。对育苗盘和假植盘进行消毒处理, 供试烟草种子用 0.1% AgNO₃ 处理 10 min, 清水冲洗并晾干, 播种到 25 cm × 15 cm 育苗盘内, 假植在 50 孔联体聚乙烯假植盘内。待烟苗长至 4~5 片真叶时接种病毒。

1.2.2 接种及抗性鉴定 将携带 CMV 病毒的枯斑三生烟叶研碎, 用双层纱布过滤, 然后按体积比为 1:5 加入磷酸缓冲液, 采用摩擦接种法进行接种。在第 1 次接种 3 d 后进行第 2 次摩擦接种, 两次接种力度一致。第 2 次接种后 14~20 d 进行病情调查, 记录病级。依据全国烟草行业烟草病虫害分级及调查方法 GB/T 23222—2008, 设 0、1、3、5、7、9 级共 6 个级别。病情指数 = $100 \times \sum (\text{各级病叶数} \times \text{各级代表值}) / (\text{调查总叶数} \times \text{最高级代表值})$ ^[13]。

1.2.3 植物基因组 DNA 的提取 从台烟 8 号、NC82、F₁ 及 BC₁ 群体的幼苗剪取适量叶片, 利用 CTAB 法提取叶片基因组 DNA^[14], 利用紫外分光光

度法和琼脂糖凝胶电泳法检测 DNA 质量, 并调整浓度至 30~50 ng/ μL ^[15], 在-20 °C 条件下保存。

1.2.4 PCR 扩增及检测 PCR 反应体系总体积 10 μL , 其中 2 \times Mix 5 μL , 30~50 ng/ μL 的 DNA 模板 1 μL 、2 $\mu\text{mol/L}$ 正反向引物各 1 μL , H_2O 2 μL 。

PCR 反应程序为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 18 s, 57 °C 退火 18 s, 72 °C 延伸 35 s, 35 个循环; 72 °C 延伸 7 min, 4 °C 保存。其中, 根据引物序列不同, 退火温度稍有调整。所有 PCR 均在 ABI Veriti 型多梯度 PCR 仪上完成。

取 5 μL PCR 产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒电压 1000 V 电泳 90 min, 用 NaOH 银染方法^[16] 进行银染、显影。

1.3 数据统计及分析

首先使用基于 R 语言环境的 OneMap 软件包, 利用供试 BC_1 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 WinQTLCart 2.5 软件提供的复合区间作图法进行 QTL 定位, 其中 permutation times 设为 1000。

2 结果

2.1 抗性鉴定结果

采用摩擦接种法对亲本、 F_1 、 BC_1 群体进行 CMV 抗性鉴定。接种 10 d 后开始出现明脉和花叶症状, 接种 15 d 有叶片畸形, 边缘向上卷曲和茸毛脱落叶片革质化等现象, 植株出现不同程度矮化, 大部分叶片有黄绿相间的疱斑 (图 1)。

接种病毒 20 d, 调查发病情况并计算病情指数。结果显示, 台烟 8 号 CMV 病情指数为 14, 表现为高抗; NC82 病情指数为 70, 表现为高感, F_1 病情指数为 54, 表现为中感。 BC_1 群体病情指数基本符合正态分布规律, 结合往年田间试验观察及台烟 8 号的自身抗性表现, 预测台烟 8 号对 CMV 抗性是由多基因控制。 BC_1 群体病级如图 2 所示。

2.2 SSR 标记筛选

以抗感亲本及 F_1 的 DNA 为模板进行 PCR 扩



图 1 CMV 感病与抗病病叶

Fig. 1 The incidence and resistance leaves of CMV on tobacco

注: 左一、左二、左三为感病烟叶; 右一为正常烟叶。

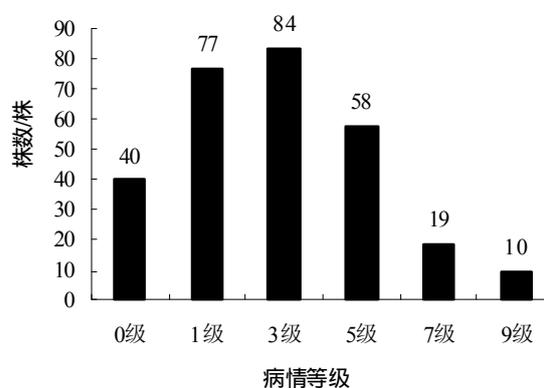


图 2 BC_1 群体单株病级分布图

Fig. 2 The resistance identification of seedling in BC_1 generation

增, 对分布于 24 条连锁群上的 2317 个 SSR 标记进行了多态性筛选, 平均每个连锁群 98 个位点, 总长度 3270 cM, 位点间平均距离 1.41 cM, 共筛选获得多态性引物 127 对, 多态比率为 5.5%。

2.3 CMV 抗性基因的 QTL 分析

从 127 对 SSR 引物中挑选扩增稳定且多态性显著的 62 对引物, 对经过病害鉴定的 288 个 BC_1 单株群体进行扩增, 利用基因型数据构建遗传连锁图谱, 如图 3 所示。共得到 11 个连锁群, 图谱全长 628.76 cM, 包含 38 个标记位点, 平均每个连锁群上约有 3 个 SSR 标记, 标记间平均遗传距离为 15.04 cM, 另外有 24 个标记未能整合到该图谱。根据构建的遗传图谱, 利用复合区间作图法对烟草 CMV 抗性 QTL 进行定位分析, 在 10 号连锁群上检测到一个 QTL, 位于标记 53735 与 54196 之间, 暂命名

为 *qCMV-1*，其峰值 LOD 为 2.6，加性效应 1.50，贡献率为 13.2%，*qCMV-1* 与标记 53735 间遗传距离为 0.1 cM。

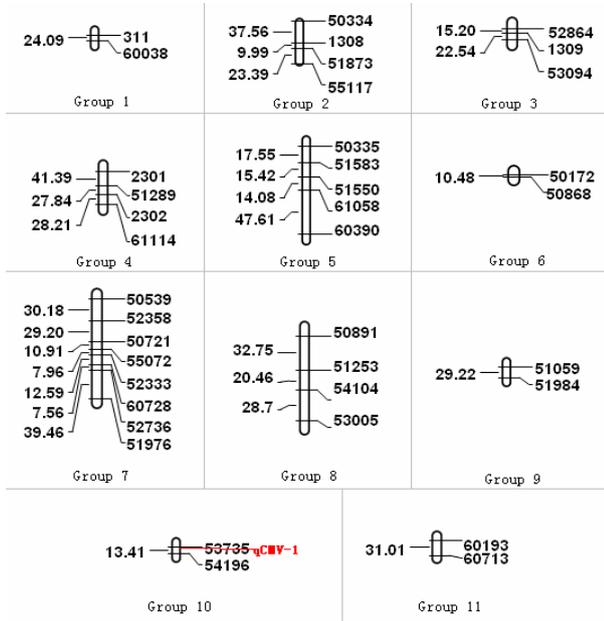


图3 基于 SSR 的遗传连锁图谱

Fig. 3 The genetic linkage map based on SSR markers

3 讨论

目前已明确的抗 CMV 烟草品种较少，台烟 8 号长期作为烟草 CMV 病害鉴定的抗病对照，在 CMV 抗性方面表现优异，而且其田间综合表现、育种可利用性较好^[17]，近年来被作为烟草 CMV 研究的主要对象。另外，亲本之间的遗传差异对构建连锁图谱和基因定位有一定影响，亲本间差异过大，杂种染色体间的配对和重组率偏低、偏分离现象严重，都会降低遗传图谱的实用性^[18]。同时考虑到烟草品种的可利用性和对后期分子育种的指导作用，本研究选择了台烟 8 号和 NC82 两个烤烟品种作为本研究的亲本材料。为了提高基因定位的精度，本研究选用 288 株 BC₁ 单株作为研究群体。BC₁ 群体的优势在于构建时间短、技术方便，每一个分离基因座只有两种基因型，直接反应了 F₁ 代配子的分离比例，优于 F₂ 群体。但是 BC₁ 群体也有其局限性，如分离单位是个体，单株表型鉴定可能存在误差，且不是稳定群体，所以在后期的研究中将构建

BC₁ 单株家系，利用家系整合值，提高数据的准确度。

目前，基于亲本材料遗传背景差异导致的抗性差异、CMV 病毒株系治病能力差异、病害接种与鉴定方式和环境因素等原因，导致对于烟草 CMV 抗性遗传规律的研究还没有一致结论，存在着单基因隐性遗传、多基因遗传、加性-显性基因作用等不同报道^[7-9]。本研究推测台烟 8 号对 CMV 病毒普通株系抗性为多基因控制，与前人的研究有一定的差异^[3,9,19]。其中范静苑^[9-10]认为台烟 8 号对 CMV 的抗性由一对隐性基因控制，与本研究结果不一致，原因可能有：第一，与所选 SSR 引物有关。本研究所用引物来自 2011 年公开发表的高密度连锁图谱，覆盖整个烟草基因组，较范静苑等所用引物数量更大，密度更高；第二，与数据处理方式有关。范静苑等是利用 Kosambi 函数计算遗传图距，分析找到 CMV 抗性相关的标记，本实验是利用 WinQTLCart2.5 软件对实验所得分子数据与表型数据进行分析，结果更为可靠。此外，接种的病毒株系、接种手法和实验环境不同也可能导致实验结果差异。

目前针对烟草 CMV 抗性基因的 QTL 定位研究尚少，范静苑^[10]曾筛选与抗病亲本铁把子、台烟 8 号的抗病基因相连锁的 SSR 标记，并找到一个与抗性基因遗传距离为 3.84 cM 的标记。本研究利用烟草高密度遗传连锁图谱定位到一个位于 10 号连锁群上遗传距离为 0.1 cM 的 QTL，进一步表明台烟 8 号对 CMV 抗性由多基因调控，而且该 QTL 与标记 53735 紧密连锁，在分子标记辅助选择育种中具有一定的应用价值。

4 结论

利用 CMV 抗、感病亲本筛选得到的多态 SSR 引物，对 BC₁ 群体单株进行扩增，找到一个与标记 53735 紧密连锁的 QTL，遗传距离为 0.1cM，位于 10 号连锁群，贡献率为 13%，并推测台烟 8 号对 CMV 抗性由多基因控制。

参考文献

- [1] 张桂华, 黄焕焕, 韩毅科, 等. 与黄瓜感花叶病毒病基因连锁的分子标记[J]. 农业生物技术学报, 2010, 18(2): 280-284.
- [2] 王显辉. 黄瓜 CMV 抗性相关基因的分子标记研究[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007.
- [3] Barrios E P. Inheritance to tobacco etch and cucumber mosaic viruses in *Capsicum frutesce*[J]. Phytopathology, 1971, 61(10): 1318.
- [4] Gil Ortega R. Response of pepper to two Spanish isolates of CMV [J]. *Cap sicum Newsletter*, 1988, 7: 65-66.
- [5] Ben chaim A, Grube R C, Lapiodoe M. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to CMV in *Capsicum annum*[J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 1213-1220.
- [6] Singh R J, Jauhar Prem P. Genetic resources chromosome engineering and crop improvement[M]. CRC Press, 2006: 208.
- [7] Ternovskij M F, Podkin O V, T. Inheritance of resistance to cucumber mosaic virus in tobacco plants [J]. *Tabak*, 1970, 3: 9.
- [8] Wan H. Inheritance of resistance to powdery mildew in *Nicotiana tabacum* L [J]. *Tob Sci*. 1992, 6: 180-183.
- [9] 范静苑. 烟草黄瓜花叶病毒病抗性遗传分析及其分子标记[D]. 北京: 中国农业科学院, 2009.
- [10] 范静苑, 王元英, 蒋彩虹, 等. 烟草 CMV 抗性鉴定及抗性基因的 SSR 标记研究[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 355-359.
- [11] 钱玉梅, 王凤龙, 王劲波, 等. 山东省烟草病毒病种群发生动态及防治对策[J]. 烟草科技, 2001(2): 43-46.
- [12] Gregor Bindler, Jörg Plieske, Nicolas Bakaer. A high density genetic map of tobacco obtained from large scale microsatellite marker development[J]. *Theor Appl Genet*, 2011, 123: 219-230.
- [13] 裘维蕃, 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): 84.
- [14] 王珍, 方宣钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288.
- [15] 王掌军, 马俊. 备用甜瓜基因组的 DNA 提取及质量检测[J]. 宁夏农林科技, 2008(3): 29-30.
- [16] 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.
- [17] 王凤龙, 时焦, 钱玉梅, 等. 烟草种质资源对黄瓜花叶病毒抗性鉴定研究[J]. 中国烟草科学, 2000, 21(3): 1-4.
- [18] 刘旭. 遗传标记和遗传图谱构建[J]. 作物品种资源, 1997(4): 29-32.
- [19] Yang S, Zhang G H. Progress on resistance inheritance of cucumber mosaic virus[J]. *Tianjin Agricultural Sciences*, 2008, 14(2): 55-58.