

番茄分子遗传图谱构建和晚疫病抗性基因簇 *ph-3* 的 QTL 分析

黄晓梅^{1,2}, 许向阳¹, 李景富¹, 陈秀玲¹, 徐艳辉³

(¹东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030, ²哈尔滨工业大学生命科学与工程系, 哈尔滨 150001, ³中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081)

摘要:【目的】挖掘番茄晚疫病抗性基因紧密连锁的分子标记, 为番茄抗晚疫病种质资源的利用及分子标记辅助选择育种提供理论和实践依据。【方法】利用含番茄晚疫病抗性基因 *ph-1, 2, 3* 的 L3708 (*Lycopersicon pimpinellifolium*) 为父本, 感病的优良品系 04968 (*L. esculentum*) 为母本培育的 260 个 F₂ 单株为图谱构建群体, 通过 AFLP、SSR 2 种分子标记进行遗传分析, 构建分子遗传图谱。根据苗期接种番茄晚疫病病原菌生理小种 T1, 2 的抗性反应, 利用复合区间作图法, 进行 QTL 定位。【结果】构建了包含 12 个连锁群的分子遗传图谱, 其中包含 3 个 SSR 标记和 149 个 AFLP 标记。该图谱覆盖整个基因组总长度 1 443.07 cM, 平均图距 9.50 cM。检测到了 5 个与抗性基因簇 *ph-3* 相关的 QTL 位点, 其中 *Qph3-1* 位于第 3 连锁群上, 可以解释的表型变异为 26.59%。*Qph3-2* 位于第 1 染色体上, 可以解释的表型变异为 54.86%, *Qph3-3*, *Qph3-4* 和 *Qph3-5*, 位于第 9 连锁群上, 可以解释的表型变异分别为 9.24%、10.27% 和 36.49%。QTL 遗传效应表现为加性和显性。【结论】所得 5 个分子标记可作为选育抗晚疫病番茄品种的重要分子标记辅助选择工具。

关键词: 番茄; 遗传图谱; SSR; AFLP; 抗晚疫病基因簇 *ph-3*; QTL

Construction of Tomato Molecular Genetic Map and QTL Analysis of Resistance of Gene Cluster *ph-3* to Tomato *Phytophthora infestans*

HUANG Xiao-mei^{1,2}, XU Xiang-yang¹, LI Jing-fu¹, CHEN Xiu-ling¹, XU Yan-hui³

(¹Northeast Agricultural University College of Horticulture, Harbin 150030; ²Department of Life Science and Engineering Harbin Institute of Technology, Harbin 150001; ³Institute of Crop Sciences Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081)

Abstract: 【Objective】 Late blight is a worldwid disease in tomato and can cause serious yield loss. Through construction of tomato molecular genetic map and QTL analysis of gene cluster *ph-3* to find closely linked molecular markers. This will provide a theoretical and practical basis for molecular marker-assisted breeding. 【Method】 L3708 (*L. pimpinellifolium*) accompanied with resistant gene cluster *ph-1, 2, 3* was used as male parent and 04968 (*L. esculentum*) susceptible race with good characters as female parent, the 260 F₂ single plants as construction population, a molecular marker linkage map composed with 12 linkage populations was constructed by SSR and AFLP molecular marker. QTLs were found by applying complex-space mapping and according to seedling-inoculated tomato's resistant response to *Phytophthora infestans* physiological stains T1, 2. 【Result】 The map includes 3 SSR markers and 149 AFLP makers. And the map covers 1 443.07 cM of the whole genome. The average space between markers was 9.50 cM. Five QTLs correlative to *ph-3* were found. *Qph3-1* was on the first chromosome, explainable phenotype variation was 26.59%. *Qph3-2* was on the sixth linkage population and the explainable phenotype variation was 54.86%. *Qph3-3*, *Qph3-4*, *Qph3-5* were on the ninth linkage population and the explainable phenotype variations were 9.24%, 10.27%, and 36.49%. The genetic effect of QTL loci was additive and dominant. 【Conclusion】 The 5 QTL screened in this study can be used as a tool for molecular marker-assisted breeding.

Key words: tomato; genetic linkage map; SSR; AFLP; resistant gene cluster *ph-3*; QTL

收稿日期: 2008-12-16; 接受日期: 2009-03-30

基金项目: 国家“863”计划(2007AA10Z178-4)、黑龙江省高等学校科技创新团队项目

作者简介: 黄晓梅(1966—), 女, 黑龙江五常人, 博士, 研究方向为生物技术与遗传育种。E-mail: hxm2004@126.com。通信作者李景富(1943—), 男, 黑龙江绥化人, 教授, 本科, 研究方向为蔬菜遗传育种与生物技术。Tel: 0451-55190748; E-mail: ljf_2005@126.com

0 引言

【研究意义】番茄 (*Lycopersicon.esculentum* Mill) 是世界范围的主要蔬菜作物, 也是中国的主栽蔬菜之一。番茄晚疫病是由致病疫霉菌 (*Phytophthora infestans* (Mont) de Bary) 引起的真菌性病害, 常导致番茄减产, 甚至绝产, 是一种世界性毁灭病害^[1-5]。近年来随着种植制度的转变, 番茄晚疫病已成为周年频发的重要病害之一^[6]。培育抗病品种是防止晚疫病最经济有效的方法。但常规育种方法培育抗病品种周期长, 同时致病疫霉菌生理小种分化迅速^[7-10], 抗病性鉴定又受环境影响较大, 增大了抗病育种工作难度。而利用番茄晚疫病抗性 QTL 进行分子标记辅助选择, 不受时间、环境限制, 能加速抗番茄晚疫病育种工作的进程, 对于实现病害的持久防治具有重要意义。【前人研究进展】番茄抗晚疫病性状由 2 类不同的基因控制, 一种受显性基因控制的质量性状; 另一种受多基因控制的数量性状, 其抗病性与环境等多种因素有关^[1]。国内外学者对番茄晚疫病抗病基因分子标记及其 QTL 进行了一些研究, 抗番茄晚疫病生理小种 0 的 *ph-1* 基因定位于番茄第 7 条染色体末端。Moreau 等^[1]利用 Hawaii1996×W.Va. 700 杂交的 F₂ 代群体, 把抗生理小种 1 的 *ph-2* 基因定位在第 10 条染色体的长臂上, 并找到了与 *ph-2* 连锁的 AFLP 标记。Anne 等^[11]从 L3708 (*L. pimpinellifolium*) 中鉴定出 3 个抗晚疫病的 QTL, 全部位于第 6 条染色体上, 而 Chunwongse 等^[12]利用 CLN657(susceptible)和 L3708 (resistant) 杂交的 F₂ 群体, 却得出抗番茄晚疫病生理小种 2 的位点位于第 9 条染色体, 仍表现为专一性抗性, 将该基因命名为 *ph-3* 基因, 该基因与 *ph-1* 和 *ph-2* 为非等位基因, 并找到一个 RFLP 标记和 2 个 AFLP 标记。Sylvaine 等^[13-14]从 *L. esculentum*×*L. hirsutum* 杂交的回交群体中鉴定出 8 个和番茄晚疫病抗性相关的 QTL, 它们分别位于染色体 1、3、4、5、6、7、9 和 11。Brouwer 等^[15]利用 RFLP 技术, 发现晚疫病抗性受多基因控制, 抗晚疫病的 QTL 分布在 *L. esculentum*×*L. hirsutum* 杂交的回交群体的所有染色体, 并精确定位了 3 个 QTL (1b4, 1b5b 和 1b11b)。Zhu 等^[16]利用 CLN2037E 的 F₂ 代群体, 得出晚疫病抗性是显性单基因遗传, 并把抗性基因 *ph-ROL* 定位在第 9 染色体上, 找到遗传距离 5.7 cM 的 SSR 标记 TOM236。Flávia 等^[17]研究表明, 番茄对 *P. infestans* 的抗性遗传为微效多基因与显性控制, 并且具有加性

效应。【本研究切入点】由于番茄栽培品种遗传背景十分狭窄, 缺乏抗番茄晚疫病的遗传资源, 加强番茄野生资源抗性基因的挖掘尤为重要。L3708 (*L. pimpinellifolium*) 对晚疫病具有较强的抗性, 并且在其后代中可以分离到抗晚疫病的株系^[18]。L3708 在晚疫病抗性的 QTL 分析方面虽然已经取得了较大的进展, 但是, L3708 的抗病位点仍有待于进一步研究确定和开发利用, 同时中国番茄抗晚疫病育种相对滞后。

【拟解决的关键问题】本试验以抗多个番茄晚疫病病原菌生理小种的 L3708 (*L. pimpinellifolium*) 和优良品系 04968 (*L. esculentum*) 的 F₂ 群体为材料。通过构建番茄遗传连锁图谱, 利用 QTL (quantitative trait loci) 作图技术, 对抗性基因进行 QTL 分析, 找到距离较近的标记, 为番茄晚疫病的抗性基因聚合及分子标记辅助选择 (MAS) 抗病育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 群体构建

含番茄晚疫病抗性基因 *ph-1,2,3* 的 L3708 (*L. pimpinellifolium*) 为父本, 由台湾亚洲蔬菜研究与发展中心王添成博士赠送。感病的优良品系 04968 (*L. esculentum*) 为母本, 由东北农业大学番茄研究所提供。于 2003 年在东北农业大学番茄育种基地进行杂交, 海南育种基地进行自交, 培育的 F₂ 单株作为构建番茄连锁图谱的分离群体。

1.2 番茄晚疫病苗期抗病性鉴定

2004 年在东北农业大学番茄研究所人工气候室内, 对具有 9~10 片真叶的番茄 L3708、04968、F₁ 和 F₂ 幼苗, 以 5×10⁴ 孢子囊/ml 为接种浓度, 用喷雾法接种番茄晚疫病菌生理小种 T1,2。T1,2 由东北农业大学番茄研究所保存。其中亲本 L3708、04968 和 F₁ 各接种 20 株, 3 次重复, F₂ 单株接种 330 株。接种后 24 h 内, 室温保持 20℃左右、黑暗、RH100%, 以后 RH 75%~95%, 每天光照 14 h。接种后第 7 d 调查发病程度, 确定单株病害等级。参照冯兰香等^[19]的分级方法, 单株病害等级:

0 级: 无病症; 1 级: 病斑细小, 叶面积被害率 ≤5%; 2 级: 限制型病斑, 5% < 叶面积被害率 ≤15%; 3 级: 叶部有病斑, 茎部无病斑, 15% < 叶面积被害率 ≤30%; 4 级: 茎部病斑少量, 30% < 叶面积被害率 ≤60%; 5 级: 茎部病斑扩张型, 60% < 叶面积被害率 ≤90%; 6 级: 茎部严重受害, 叶面积被害率 >90%, 甚至植株死亡。

亲本的反应类型参照冯兰香等^[19]的鉴别寄主的反应类型, 制定如下亲本的反应类型:

免疫 (I): 病情指数=0; 抗病 (R): 0<病情指数≤70; 感病 (S): 70<病情指数≤100;

单株病情指数=Σ(各级病株数×各级代表值)/(调查总株数×最高级代表值)×100。

1.3 SSR 和 AFLP 分析

采用 CTAB 法提取基因组 DNA, 参考 Foolad 等^[20]方法略作修改。用 Eppendorf 蛋白核酸测定仪测定 DNA 浓度, 然后用去离子水将其稀释至 50 ng·μl⁻¹。

SSR 分析: 根据许向阳等^[21]和 Wang 等^[22]发表的引物, 由上海生物工程公司合成。

反应体系为 20 μl, 包括模板 DNA 40 ng、1×PCR buffer、Mg²⁺2.0 mmol·L⁻¹, dNTP 0.2 mmol·L⁻¹, 引物 0.3 μmol·L⁻¹, TaqDNA polymerase 0.05 U·μl⁻¹。dNTP 由 Takala 公司生产, TaqDNA polymerase 由 MBI 公司生产, 引物 50 对由上海生工生物工程公司合成。热循环程序为: 94℃预变性 5 min, 然后 94℃ 1 min, Tm 1 min, 72℃ 2 min 下循环 40 次, 72℃延伸 10 min。扩增产物加入变性剂在 PCR 仪中 95℃变性 5 min 后立即置于冰水混合物中。扩增产物在测序电泳槽(Bio-Rad)上用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 100W 电泳约 1 h。最后银染显色分析。

AFLP 分析: 基因组 DNA 采用 *EcoR* I 和 *Mse* I 酶切, 酶切连接反应体系为 50 μl, 包括模板 DNA 100~500 ng、*EcoR* I 和 *Mse* I 各 5U, *EcoR* I adapter (5 pmol·μl⁻¹) 1.0 μl、*Mse* I adapter (50 pmol·μl⁻¹) 1.0 μl、ATP (10 mmol·L⁻¹) 1.0 μl、10×Buffer 5.0 μl、T4 DNA Ligase 3U 和 ddH₂O。37℃酶切与连接 11 h, 然后 70℃停止反应; 预扩增反应体系为 20 μl, 包括 DNA (酶切连接后产物) 2 μl、*EcoR* I -primer (E00 50 ng·μl⁻¹) 0.6 μl、*Mse* I -primer (M00 50 ng·μl⁻¹) 0.6 μl、10×Buffer 2 μl、dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 1.6 μl、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.2 μl、Taq DNA polymerase 1 U 和 ddH₂O。热循环程序为: 94℃预变性 3 min, 然后 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min 下循环 24 次, 72℃延伸 10 min; 选择性扩增反应体系为 20 μl, 包括 DNA (预扩增产物稀释 20 倍) 5 μl、Exx (50 ng·μl⁻¹) 1.0 μl、Mxx (50 ng·μl⁻¹) 1.0 μl、10×Buffer 2 μl、dNTP (2.5 mmol·L⁻¹) 1.6 μl、MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 1.5 μl、Taq DNA polymerase 1 U 和 ddH₂O。Exx 和 Mxx 各 16 条由上海生工合成。热循环程序为: 94℃预变性 3 min, 然后 94℃ 30 s, 65℃ 30 s、每循环降低 0.7℃, 72℃ 1 min

下循环 12 次, 然后再 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 1 min、每循环增加 1 s 下循环 25 次 72℃延伸 10 min; 选择性扩增产物加入变性剂在 PCR 仪中 95℃变性 5 min 后立即置于冰水混合物中。用 6%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 70W 电泳约 2 h。最后银染显色分析。

1.4 数据整理和连锁分析

SSR 为共显性标记, 分离后代来自父本“L3708”的带型记作“1”, 来自母本“04968”的带型记作“2”, 杂合带型记作“3”, 缺失或者带型模糊不清的记作“0”。首先对分离数据进行 χ^2 检验分析, 用符合 1:2:1 分离比例的标记进行连锁图谱框架图构建。

AFLP 主要为显性标记, 分离后代来自父本“L3708”的带型记作“1”, 来自母本“04968”的带型记作“2”, 缺失或者带型模糊不清的记作“0”。首先对分离数据进行 χ^2 检验分析, 用符合 3:1 分离比例的标记进行连锁图谱框架图构建。标记命名为 ExxMyy_z, E 代表用 *EcoR* I 酶切, xx 代表 E 的引物号, M 代表用 *Mse* I 酶切, yy 代表 M 的引物号, z 代表同一 AFLP 引物组合扩增的不同多态性位点, 以 ABC...表示。

SSR 标记和 AFLP 标记用 Mapmaker/Exp version3.0 软件构建分子标记连锁图, 用软件中 group 命令 (LOD=4, 最大图距为 40 cM), 确定各连锁群, 并利用 order, map 命令构建连锁图的框架图。利用 ripple 命令给出最佳排序, 用 Kosambi 函数将重组率转换成图距, 单位厘摩 (centimorgan, cM)。最后用 WinQTLcart 2.5 画出该群体的分子标记连锁图。

1.5 QTL 定位

采用复合区间作图软件 WinQTLcart2.5, 根据 F₂ 各单株苗期接种番茄晚疫病病原菌生理小种 T1,2 的病害等级, 以 LOD 值 2.5 作为阈值对抗性基因簇 *ph-3* 可能存在的 QTLs 进行定位和效应估计。

2 结果与分析

2.1 番茄 F₂ 群体对晚疫病的抗性表现

对接种晚疫病病原菌生理小种 T1,2 后的幼苗进行抗性分析表明: 亲本 L3708 的平均病情指数为 3.7, 表现为抗病, 亲本 04968 的平均病情指数为 92.22, 表现为感病, F₁ 的平均病情指数为 44.07。其抗病程度介于双亲之间。F₂ 群体的 330 个单株病害等级为 0~6 级, 其病害等级频次分布曲线如图 1 所示, 经 SAS 软件分析, 其偏度系数为 -0.06, 峰度系数为 -0.15, 二者的绝对值都小于 0.5, 而且, P1=0.66>0.5,

$P_2=0.58 > 0.5$, 表明其晚疫病抗性为正常分布, 具有数量遗传的典型特征。所以抗性基因簇 *ph-3* 属于数量遗传。

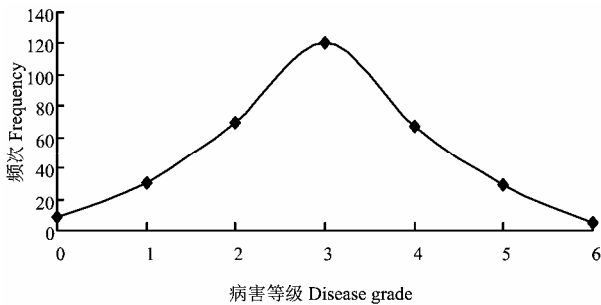


图 1 番茄 F₂ 代群体对晚疫病的抗性鉴定

Fig. 1 Identification of resistance of tomato to *Phytophthora infestans* in F₂ individual plants

2.2 分子标记的多态性分析

对 50 对 SSR 引物进行分析, 其中 14 对引物 (表 1) 在亲本和 F₁ 代中产生的扩增产物多态性明显, 带型清晰且稳定性好, 多态性比例为 28%。

对 256 对 AFLP (E3+M3) 引物进行分析, 选用其中 38 对 (表 2) 在亲本和 F₁ 代中产生的扩增产物条带清晰、多态性高的引物进行 AFLP 分析, 多态性比例为 8.6%。38 对引物共产生 2 090 条带, 平均每对引物扩增出 55 条带, 其中 180 条多态性条带, 平均每对引物扩增出 4.7 条特异带。

2.3 分子标记的分离分析

SSR 分析中, 用筛出的 14 对引物, 以 F₂ 代单株为模板进行 PCR 扩增, 聚丙烯酰胺凝胶检测 (图 2)。产生 14 个多态性位点, 经 χ^2 测验, 12 个多态性位点符合 1 : 2 : 1 的理论分离比, 2 个多态性位点不符合分离比, 偏分离比例占 14.28% (表 3)。

AFLP 分析中, 用筛出的 38 对引物, 以 F₂ 代单株为模板进行 PCR 扩增, 聚丙烯酰胺凝胶检测 (图 3)。扩增出 180 个多态性位点, 经 χ^2 测验, 171 个多态性位点符合 3 : 1 的理论分离比, 9 个多态性位点偏分离, 偏分离比例为 5% (表 3)。

在 F₂ 群体的 145 多态性位点中, 来自父本 L3708 的位点占 53.31%, 来自母本 04968 的位点占 46.69%, 2 个亲本在群体中的分离比例接近, 该群体未出现严重的偏分离, 说明该群体完全符合作图要求。

表 1 父母本筛出的 SSR 特异引物名称及序列

Table 1 Names and sequences of screened SSR primers based on parents

SSR 引物	SSR primer	引物顺序(5'-3')	Nucleotide sequence
TOM a-b			GCCTGTAGGATTTTCGCCTA CCTTGCAGTTGAGGTGAATT
TOM k-l			GCAAGGTAGGTAGCTAGGGA AACAATGTGACGTCTTATAAGGG
TOM 47			CAAGTTGATTGCATTACCTATTG TACAACAACATTCTTCTTCTCTT
TOM 144			CTGTTTACTTCAAGAAGGCTG ACTTTAACTTTATTATTGCGACG
TOM 166			GAGCGAGCAGAAAGGTGAAT GAGCCTGAAAACATAGAAGT
TOM 168			GTAATAATAGTGC GGACAGATAA AAGGTGGCTAATAAAAAGATGAT
TOM 176			TCTCGTTCTCCATCAAATACAAT CAACCATCAGCATAGAAACAT
TOM 178			ACTCTCCGTCGGACCTGTTTA GACCAAGTTTCTGAGACCT
TOM 180			ACGGTCCAGTAAGGTTGATG ATATGAAGATTGGGTTGTAACA
TOM 182			AAGATTGTGTTTTTCTCGTCAT CTTTTGACCCTAATTTTATGATA
TOM 202			TGGTCACCTTCAACTTTTATAC AAATGATAATGAAATGGAGTGA
TOM 236			GTTTTTCAACATCAAAGAGCT GGATAGGTTTCGTTAGTGAAC
TOM 314			TATGGGAAGTTAGTTAGGTA GAGTTCTTTGATTTTAGTG
TOM 320			CAAAGATAATCAAAGAGAAC GAATAAATAAATAGATAAAC

表 2 父母本筛出的 AFLP 特异引物名称

Table 2 Names of screened AFLP primers based on parents

引物名称	引物名称	引物名称	引物名称
Primer name	Primer name	Primer name	Primer name
E32M47	E38M62	E41M47	E55M60
E37M60	E38M81	E71M74	E32M74
E54M60	E40M60	E95M85	E32M85
E37M61	E74M71	E33M81	E54M31
E38M59	E74M81	E32M31	E55M79
E40M59	E37M81	E38M74	E60M85
E37M62	E37M85	E54M59	E35M85
E38M61	E33M79	E54M60	E35M74
E38M60	E55M59	E54M62	
E40M47	E40M61	E55M48	

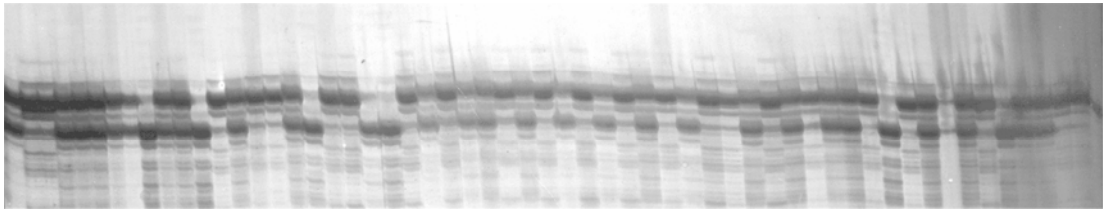
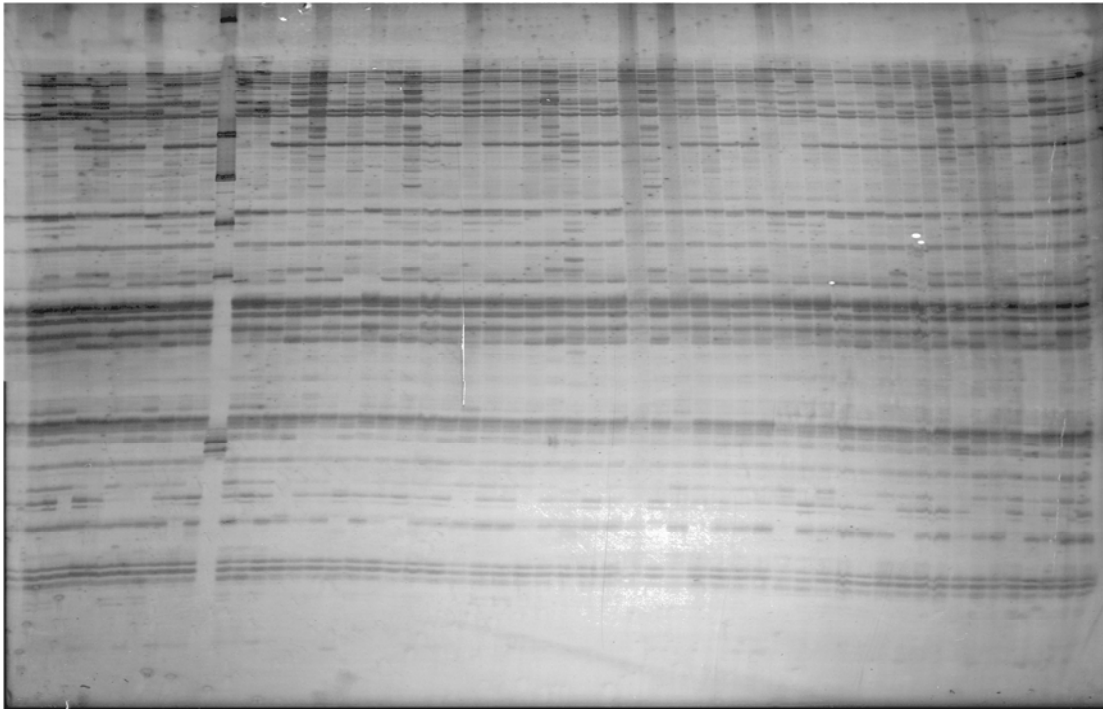
图 2 引物 TOM320 在部分 F₂ 单株中的扩增结果Fig. 2 Amplified products on primer TOM320 on partial F₂ population图 3 引物 E71M74 在部分 F₂ 单株中的扩增结果Fig. 3 Amplified products on primer E71M74 in partial F₂ population

表 3 构建遗传图谱的分子标记

Table 3 Molecular markers used for genetic map construction

分子标记 Molecular markers	引物(对)数 Number of primers or primer combinations	多态性标记数 Number of polymorphic markers	偏分离标记数 Number of distorted segregation markers	偏分离标记比率(%) Ration of distorted segregation markers	连锁标记数 Number of linked markers	未连锁标记数 Number of unlinked markers	未连锁标记比率 Ration of unlinked markers (%)
SSR	14	14	2	14.28	3	11	78.57
AFLP	38	180	9	5	149	31	17.22
总计 Amounts	52	194	11	5.67	152	42	21.64

2.3 遗传图谱的构建

应用在 14 个 SSR 标记和 180 个 AFLP 标记, 进行连锁分析, 得到一张包含 12 个连锁群的遗传图谱框架图 (图 4), 其中包括 3 个 SSR 标记和 149 个 AFLP

标记 (共计 152 个), 该图谱长度 1 443.07 cM, 平均图距 9.50 cM (表 4)。每条连锁群上标记数 3~47 个, 长度在 9.78~426.60 cM, 图谱密度 3.26~12.32 cM。其中连锁群 LG6 对应番茄的第 1 条染色体, 连锁群

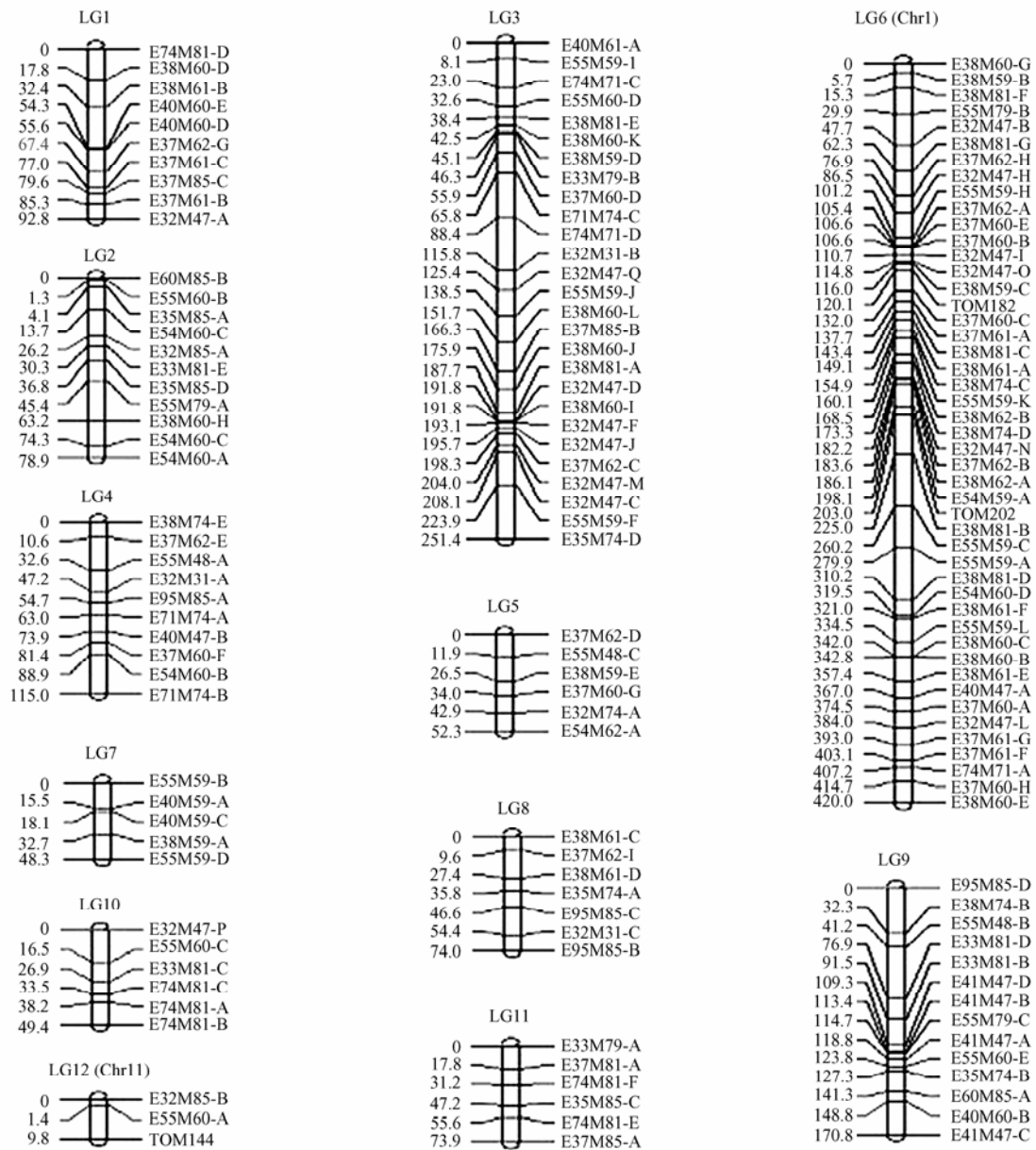


图4 番茄 04968×L3708 群体的分子遗传图谱

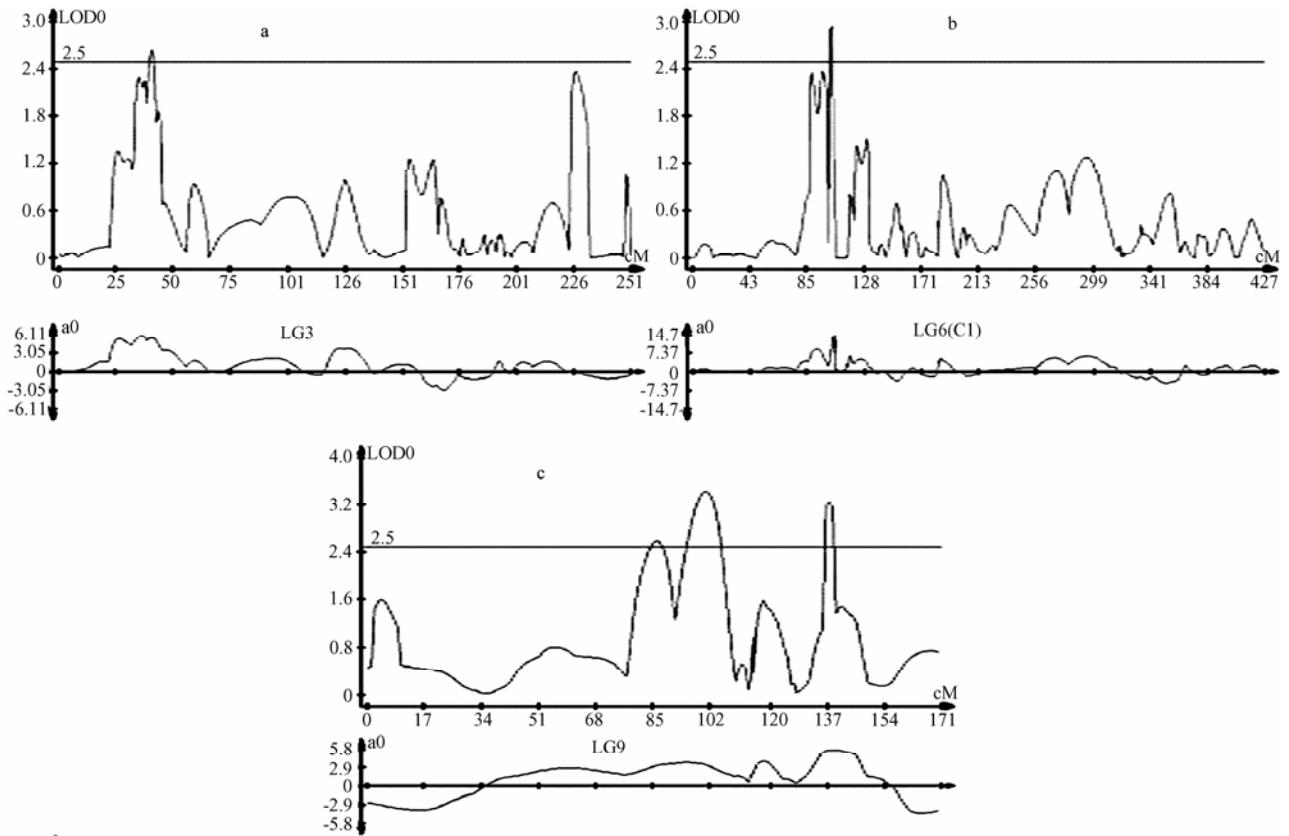
Fig. 4 Tomato genetic map of 04968 x L3708 population

LG12 对应番茄的第 11 条染色体。

2.5 QTL 分析

利用复合区间作图法检测到 5 个与番茄晚疫病抗性基因簇 *ph-3* 相关的 QTL 位点 (图 5, 6)。QTL 遗传效应表现为加性-显性效应。其中 1 个 QTL 定位在第 3 连锁群上, 命名为 *Qph3-1*, 位于区间长度 4.10 cM 的范围内, 与最近的标记 E38M81_E 的距离 2.02 cM。加性效应为 5.6, 可以解释的表型变异为 26.59%, 第 2 个 QTL 定位在第 6 连锁群上, 命名为 *Qph3-2*, 位于

区间长度 4.16 cM 的范围内, 与最近的标记 E55M59_H 的距离 2.02 cM。加性效应为 10.83, 可以解释的表型变异为 54.86%, 另外 3 个 QTL 定位在第 9 连锁群上, 其中 *Qph3-3* (位于区间长度 14.59 cM 的范围内, 与最近的标记 E33M81_B 的距离 5.57 cM)、*Qph3-4* (位于区间长度 17.84 cM 的范围内, 与最近的标记 E41M47_D 的距离 8.83cM) 和 *Qph3-5* (位于区间长度 13.97 cM 的范围内, 与最近的标记 E60M85_A 的距离 3.96 cM), 加性效应分别为 3.17、3.39 和 5.74,



a: 第 3 连锁群上在 40 cM 附近阈值大于 2.5 的 1 个 QTL 位点; b: 第 6 连锁群 (第 1 染色体) 上在 100 cM 附近阈值大于 2.5 的 1 个 QTL 位点; c: 第 9 连锁群上在 80-150 cM 附近阈值大于 2.5 的 3 个 QTL 位点
 a: One QTL with the threshold more than 2.5 was located at 40 cM of the third linkage group; b: One QTL with the threshold more than 2.5 was located at 100 cM of the sixth linkage group(Chromosome 1); c: Three QTLs with the threshold more than 2.5 were located between 80-150 cM at the ninth linkage group

图 5 抗晚疫病基因簇 *ph-3* 的 QTL 扫描结果

Fig. 5 The QTL scanning results of the *ph-3* gene for late blight resistance in tomato

表 4 分子标记在遗传图谱上的分布

Table 4 Distribution of molecular markers on the molecular genetic map

连锁群	长度	标记数	平均距离	偏分离标记数
Linkage group	Length (cM)	Marker number	Average distance (cM)	Number of distorted segregation markers
LG1	92.8	10	9.28	0
LG2	78.88	11	7.17	0
LG3	251.36	27	9.31	0
LG4	115.02	10	11.51	0
LG5	52.33	6	8.72	0
LG6(Cht1)	426.60	47	9.07	1
LG7	48.26	5	9.65	0
LG8	73.97	7	10.57	0
LG9	170.76	14	12.19	1
LG10	49.40	6	8.24	0
LG11	73.91	6	12.32	0
LG12(Cht11)	9.78	3	3.26	0
总计 Amounts	1443.07	152	9.50	2

可以解释的表型变异分别为 9.24%、10.27% 和 36.49%。5 个 QTL 均是主效 QTL，其加性效应均来自于 L3708 的等位基因。其中 *Qph3-2* 定位在第 1 染色体上。

3 讨论

本研究对 L3708 的 F₂ 群体在苗期接种 *P. infestans* 生理小种 T1,2 进行晚疫病抗性鉴定，抗病性表现为连续分布，表明晚疫病抗性属于多基因控制的数量遗传。这一结果与 Anne 等^[11]的研究相似，与李君明^[23]用 *P. infestans* 生理小种 T1,2 接种 *L. hirsutum* 的后代抗病性鉴定结果相同。

较高密度的遗传图谱为 QTL 定位、分子标记辅助选择、图位克隆等提供了有力的工具。目前，国内外学者已构建了多张番茄分子遗传图谱。Tanksley 等^[24]构建了第一张番茄遗传图谱。Foolad 等^[20]用 RAPD 标记以栽培番茄和野生潘那利番茄的 F₂ 为群体构建了

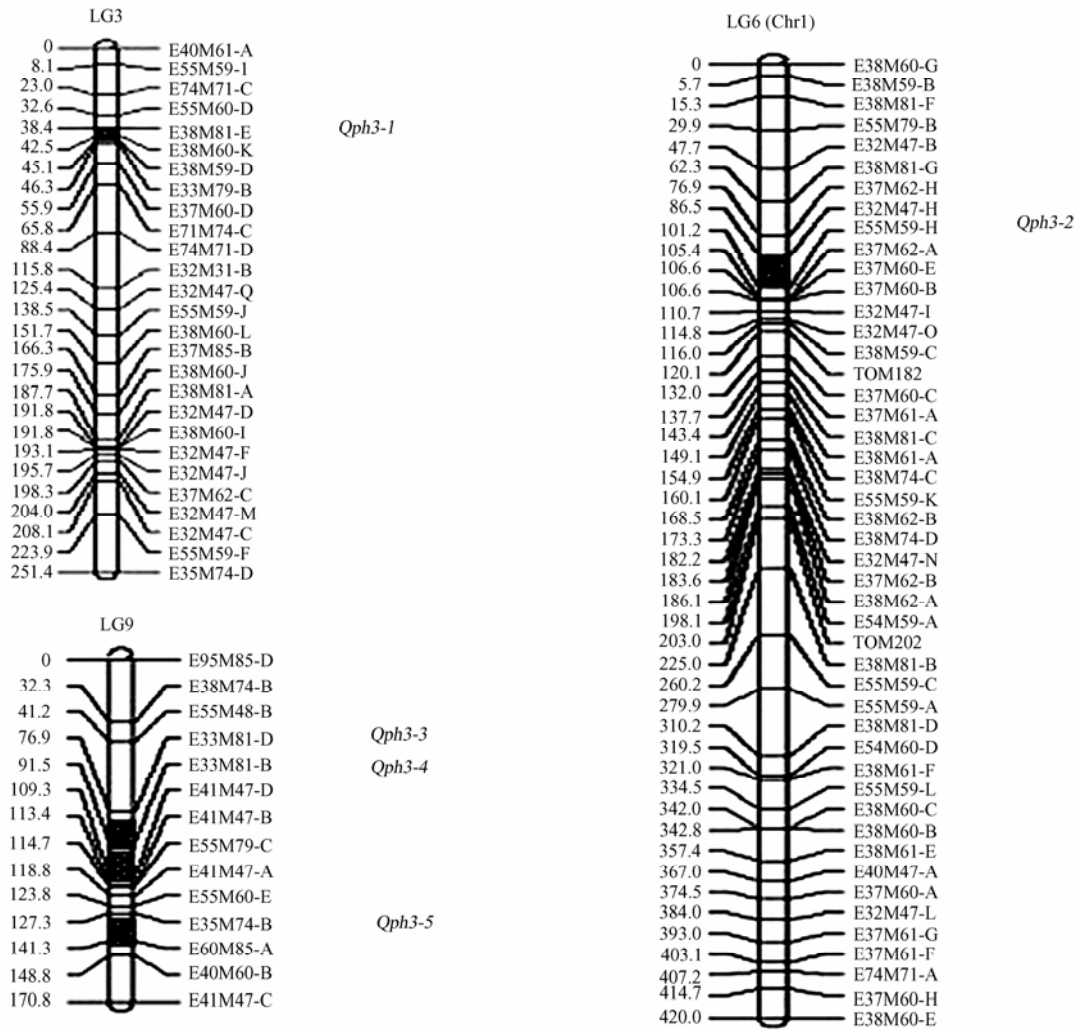


图 6 番茄晚疫病抗性基因簇 *ph-3* 相关的 QTL 的连锁群定位

Fig. 6 Mapping of QTL linkage group associated with *ph-3* gene for late blight resistance in tomato

长度 600 cM 的图谱, Foolad 等^[25]用 RFLP 标记以栽培番茄和野生醋栗番茄的 BC₁ 为群体构建了长度 1 192 cM 的图谱, 张智^[26]用 AFLP 标记以多毛番茄和普通番茄杂交的 BC₁ 为群体构建了长度为 504 cM 的图谱, Liu 等^[27]用 SSR 标记以栽培番茄与野生醋栗番茄杂交的 F₂ 为群体构建了长度为 808.4 cM 的图谱。而本研究构建的图谱长度达到 1 443.07 cM, 仅比 Zhang 等^[28]用 RFLP 标记以栽培番茄和多毛番茄的 BC₁ 为群体构建的长度 1 469 cM 的图谱略短, 平均图距 9.50 cM, 介于上述同类研究 4.5~9.8 cM 之间, 饱和度略低。图谱上有分子标记聚集现象, 这种现象在番茄上已有报道^[29], 其原因可能是由于甲基化程度较高的重复序列区域, 也可能与异染色质区重组率低有关。AFLP 标记多态性高, 适于精细作图, 通常随机分布

在基因组, 但存在成簇分布现象, 这也是造成本研究遗传连锁图谱中分子标记饱和度较低及一些染色体上标记数量对较少的原因, 连锁群上 SSR 标记数量较少, 这在今后的研究中有待进一步加强。

本研究从 L3708 (*L.pimpinellifolium*) 中鉴定出 5 个抗晚疫病的 QTL, 其抗病 QTL 遗传效应表现为加性-显性效应, 这个结果与 Flávia 等^[17]的研究结果相同。Qph3-1、Qph3-2、Qph3-3、Qph3-4 和 Qph3-5 标记距离分别为 2.02、2.02、5.57、8.83 和 3.96 cM。贡献率分别为 26.59%、54.86%、9.24%、10.27% 和 36.49%。其中 Qph3-2 定位到第 1 条染色体上, 这个抗性 QTL 在 L3708 以前的研究中没有发现^[11], 是新检测出的 QTL 位点。并且在检测到的 5 个 QTL 中, 贡献率最高, 加性效应也最大, 是一个在抗晚疫病分

子辅助育种中有应用前景的标记。位于第 3 连锁群 *Qph3-1* 和位于第 9 连锁群 *Qph3-3*、*Qph3-4*、*Qph3-5*, 不能确定是否与 Anne 等^[11]和 Chunwongse 等^[12]的抗病 QTL 相同, 其原因是尚未定位到染色体上, 在今后有待于进一步研究, 但其标记距离较近, 为晚疫病抗性基因的筛选提供了理论和实践基础。

4 结论

本研究以 L3708 为父本, 优良品系 04968 为母本培育的 F₂ 单株为群体。构建了包含 12 个连锁群, 长度 1 443.07 cM 的分子遗传图谱, 平均图距 9.50 cM。检测到了 5 个与抗性基因簇 *ph-3* 相关的 QTL 位点, 5 个 QTL 均为主效 QTL 位点。其中 *Qph3-1* 位于第 3 连锁群上, 标记距离 2.02 cM。*Qph3-3*、*Qph3-4* 和 *Qph3-5*, 位于第 9 连锁群上, 标记距离分别为 5.57、8.83、3.96 cM。*Qph3-2* 定位到第 1 条染色体上, 是新检测出的 QTL 位点, 贡献率 54.86%, 标记距离 2.02 cM。通过分子标记辅助选择等方法重组、聚合这些目标 QTL, 将能加快抗晚疫病番茄品种的选育。

References

- [1] Moreau P, Thoquet P, Olivier J, Laterror J, Laterrot H, Grimsley N. Genetic mapping of *ph-2*, a single locus controlling partial resistance to *Phytophthora infestans* in tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, 11(4): 259-269.
- [2] Rebeca C R, Garbner R G. Inheritance of tomato late blight resistance derived from *Lycopersicon hirsutum* LA 1033 and identification of molecular markers. *Horticultural Science*, 2003, 35(3): 490.
- [3] Goufo P, Mofor T C, Fontem D A, Ngnokam D. High efficacy of extracts of cameroon plants against tomato late blight disease. *Agronomy for Sustainable Development*, 2008, 28: 567-573.
- [4] Fontem D A, Olanya O M, Tsopmbeng G R, Owona M P. Pathogenicity and metalaxyl sensitivity of phytophthora infestans isolates obtained from garden huckleberry potato and tomato in cameroon. *Crop Protection Journal*, 2005, 24: 449-456.
- [5] Lima M A, Maffia L A, Barreto R W, Mizubuti E S G. *Phytophthora infestans* in a subtropical region: survival on tomato debris temporal dynamics of airborne sporangia and alternative hosts. *Plant Pathology*, 2009, 58: 87-99.
- [6] 杨宇红, 冯兰香, 谢丙炎, 冯东昕. 番茄晚疫病菌对甲霜灵的抗性. *植物保护学报*, 2003, 30(1): 57-62.
Yang Y H, Feng L X, Xie B Y, Feng D X. The resistance of *Phytophthora infestans* isolates to metalaxyl. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2003, 30(1): 57-62. (in Chinese)
- [7] Fry W E, Goodwin S B. Resurgence of the Irish potato famine fungus. *Biological Science*, 1997, 47: 363-371.
- [8] Fry W E, Goodwin S B. Re-emergence of potato and tomato late blight in the United States. *Plant Disease*, 1997, 81: 1349-1357.
- [9] Goodwin S B, Smart C D, Sandroock R W, Deahl K L, Punja Z K, Fry W E. Genetic change within populations of *phytophthora infestans* in the united states and Canada during 1994 to 1996: role of migration and recombination. *Phytopathology*, 1998, 88: 939-949.
- [10] Kato M, Mizubuti E S, Goodwin S B, Fry W E. Sentivity to protectant fungicides and pathogenic fitness of clonal lineages of *phytophthora infestans* in the united states. *Phytopathology*, 1997, 87: 973-978.
- [11] Anne F, Elaine G, Joseph J, Roger C, Steven T. Identification of late bight resistance from *L. pimpinellifolium* L3708. *Plant & Animal Genome VII conference*, 1999, 83(2): 17-21.
- [12] Chunwongse J, Chunwongse C, Black I, Hanson P. Molecular mapping of the *ph-3* gene for late blight in tomato. *Journal of Horticultural & Biotechnology*, 2002, 77(3): 281-286.
- [13] Sylvaine K C, Douglas J B, Dina A S C. Evaluation of resistance to late blight in cultivated tomato lines with introgressde QTL alleles from resistant *L. Hirsutum* using detached-leaflet assays. *Plant & Animal Genome IX Conference*, 2001: 13-17.
- [14] Sylvaine K C, Douglas J B, Dina A S C. Evaluation of resistance to late blight in cultivated tomato lines containing marker-selected QTL alleles from resistant *L. hirsutum* using detached leaflet and whole plant assays. *Plant Animal & Microbe GenomesX Conference*, 2002: 12-16.
- [15] Brouwer D J, St Clair D A. Fine mapping of three quantitative trait loci for late blight resistance in tomato using near isogenic lines (NILs) and sub-NILs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108(4): 628-638.
- [16] Zhu H S, Wu T, Zhang Z X. Inheritance analysis and identification of SSR markers linked to late blight resistant gene in tomato. *Agricultural Sciences in China*, 2006, 5(7): 517-521.
- [17] Flávia Barbosa Abreu, Derly José Henriques da Silva, Cosme Damião Cruz, Eduardo Seiti Gomide Mizubuti. Inheritance of resistance to *Phytophthora infestans* (Peronosporales, Pythiaceae) in a new source of resistance in tomato (*Solanum* sp. (formerly *Lycopersicon* sp.), Solanales, Solanaceae). *Genetics and Molecular Biology*, 2008, 31(2): 493-497.
- [18] Kim M J, Mutschler M A. Characterization of late blight resistance derived from solanum pimpinellifolium L3708 against multiple isolates of the pathogen *Phytophthora infestans*. *Journal of the America*

- Society for Horticultural Science*, 2006, 131(5): 637-645.
- [19] 冯兰香, 杨宇红, 谢丙炎, 冯东昕, 杨翠荣. 中国 18 省市番茄晚疫病病原生理小种的鉴定. 园艺学报, 2004, 31 (6): 758-761.
Feng L X, Yang Y H, Xie B Y, Feng D X, Yang C R. Identification of physiological races of *Phytophthora infestans* on tomato in eighteen Provinces of China. *Acta Horticulturae Sinica*, 2004, 31(6): 758-761. (in Chinese)
- [20] Foolad M R, Chen F Q. RAPD markers associated with salt tolerance in an *interspecific* cross of tomato *Lycopersicon esculentum*×*L. pennellii*. *Plant Cell Reports*, 1998, 17: 306-312.
- [21] 许向阳, 孟凡娟, 李景富. 番茄资源对叶霉病的抗性鉴定和 SSR 标记遗传变异分析. 植物病理学报, 2007, 37 (5): 520-527.
Xu X Y, Meng F J, Li J F. Identification of resistance of tomato source to *Cladosporium fulvum* and analysis for genetic variation by SSR. *Acta Phytopathologica Sinica*, 2007, 37 (5): 520-527. (in Chinese)
- [22] Wang A X, Meng F J, Xu X Y, Wang Y, Li J F. Development of molecular markers linked to *Cladosporium fulvum* resistant gene Cf-6 in tomato by RAPD and SSR methods. *Horticulture Science*, 2007, 42(1): 11-15.
- [23] 李君明. 番茄抗灰霉病和晚疫病基因定位及分子标记多基因辅助选育技术研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2008.
Li J M. Mapping of genes resistant to late blight (*Phytophthora infestans*) and gray mold (*Botrytis cinerea*) and multiple gene selection assisted by molecular markers for breeding in tomato (*Lycopersicon esculentum*)[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2008. (in Chinese)
- [24] Tanksley S D, Ganai M W, Prince J P, Vicente M C, Bonierbale M W, Broun P, Fulton T M, Giovannoni J J, Grandillo S, Martin G B, Messeguer R, Miller J C, Miller L, Paterson A H, Pineda O, Roder M S, Wing R A, Wu W, Young N D. High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics*, 1992, 132: 1141-1160.
- [25] Foolad M R. Comparison of salt tolerance during seed germination and vegetative growth in tomato by QTL mapping. *Genome*, 1999, 42: 727-734.
- [26] 张 智. 番茄 AFLP 分子遗传图谱构建及抗灰霉病 QTL 的定位[D]. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2005.
Zhang Z. Construction of AFLP molecular genetic map and QTL mapping of *Botrytis cinerea* resistance in tomato[D]. Huhehaote: Inner Mongolia Agricultural University, 2005. (in Chinese)
- [27] Liu Y, Chen H Y, Wei Y T, Zhuang T M. Construction of a genetic map and localization of QTLs for yield traits in tomato by SSR markers. *Progress in Natural Science*, 2005, 15(9): 793-797. (in Chinese)
- [28] Zhang L P, Khan A, Niño-Liu, Foolad M R. A molecular linkage map of tomato displaying chromosomal locations resistance gene analogs based on a *Lycopersicon esculentum*×*L. ycopersicon hirsutum* cross. *Genome*, 2002, 45(1): 133-146.
- [29] Haanatra J P W, Wye C, Verbakel H, Meijer-Dekens F, van den Berg P, Odinet P, van Heusden A W, Tanksley S, Lindhout P, Peleman J. An integrated high-den-sity RFLP-AFLP map of tomato based on two *Lycopersicon esculentum* × *L. pennellii* F₂ populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999: 54-271.

(责任编辑 毕京翠, 李 莉)