

烤烟遗传连锁图构建及 主要农艺性状的 QTL 定位分析

肖炳光¹ 卢秀萍¹ 白永富¹ 李永平¹ 孙玉合² 郭兆奎³ 朱 军⁴

(1、中国烟草育种研究(南方)中心 云南省烟草科学研究所 云南 玉溪 653100;

2、中国农业科学院烟草研究所 山东 青岛 266101;

3、黑龙江省烟草科学研究所 黑龙江 牡丹江 157011;

4、浙江大学 浙江 杭州 310029)

摘 要 以烤烟品种 Speight G-28 和 NC2326 杂种 F₁ 经花药培养得到的 137 个 DH 系为作图群体, 通过 ISSR 和 RAPD 标记的遗传连锁分析, 构建了包括 27 个连锁群、由 11 个 ISSR 标记和 158 个 RAPD 标记组成的烤烟分子标记遗传连锁图。该图谱覆盖长度 2094.6cM, 平均图距 14.8cM。利用 4 个环境下的试验数据进行了株高、节距、叶数、叶长、叶宽、鲜烟叶重等 6 个农艺性状的 QTL 定位分析, 检测到 15 个加性效应 QTL 和 14 对上位性效应 QTL, 其中 7 个加性效应 QTL 和 10 对上位性效应 QTL 存在 QTL 与环境互作效应。该研究为烤烟重要农艺和经济性状的遗传剖析及分子标记辅助选择奠定了良好基础。

关键词 烟草 遗传连锁图 农艺性状 QTL 分析 上位性 QTL 与环境互作

烟草是重要的经济作物, 按栽培调制方法可分为不同类型, 其中烤烟是我国、也是世界上栽培面积最大的烟草类型。目前, 烟草育种一般采用表型选择的方法, 由于表型选择需依赖于性状的表现, 因此受到许多限制。分子遗传学的发展及分子标记技术体系的建立, 使作物遗传育种进入到了一个新阶段。通过分子遗传连锁图的构建及重要性状的基因定位, 找到与目标基因紧密连锁的分子标记后, 就可以通过该标记间接地对目标性状进行选择。

许多重要作物的分子图谱已构建出来, 并开始用于质量和数量性状的基因定位、图位克隆、比较基因组研究和分子标记辅助选择育种等研究。在烟草上, Lin 等^[1] 利用来自烟草野生种间杂交 *N. plumbaginifolia* × *N. longiflora* 的 99 个 F₂ 植株, 构建了第一张烟草分子标记遗传连锁图; Nishi 等^[2] 利用来自白肋烟品种间杂交 W6 × Michinoku 所产生的 125 个 DH 系, 构建了普通烟草种内第一张分子标记遗传连锁图。

烤烟许多重要农艺和经济性状属于数量性状, 以往关于这些性状的遗传分析主要是利用数量遗传学方法来研究其遗传特点及相关性。QTL 定位为数量性状的遗传分析提供了新手段, 可将其剖分为各个 QTL 的遗传效应。尽管 QTL 定位已在许多作物上得到广泛应用, 但烟草农艺性状的 QTL 定位尚未见报道。

本研究的目的是以 DH 群体为材料, 通过 ISSR 和 RAPD 分析, 构建烤烟分子标记遗传连锁图, 并进行几个重要农艺性状的 QTL 定位分析, 为进一步开展烤烟性状的分子标记辅助选择奠定坚实基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

以烤烟品种 Speight G-28 (P₁) 和 NC2326 (P₂) 为亲本配制杂交组合 (F₁), 取 F₁ 花药经花药培养和染色体加倍^[3], 获得 137 个加倍单倍体(DH)系, 组成 DH 作图群体。

1.2 总 DNA 提取

亲本、F₁ 及 DH 系温室育苗, 长至 5~6 叶期时, 每份材料取幼嫩叶片 3g 利用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[4]。

1.3 ISSR 分析

参照 Zietkiewicz 等^[5] 的方法进行, 略作修改。ISSR-PCR 扩增总体积 25μL, 其中包括: 1×PCR 缓冲液, MgCl₂ 1.5 mmol.L⁻¹, dNTPs 各 0.1 mmol.L⁻¹, Taq 酶 1U (PCR 缓冲液、MgCl₂、dNTPs、Taq 酶均购自 Takara 公司), 引物 (Takara 公司合成) 0.5umol.L⁻¹, 基因组 DNA 20ng, 最后加矿物油 20μL 覆盖。PCR 反应程序为: 94℃、4 min; 94℃、45 s, 51℃、1 min, 72℃、2 min, 45 个循环; 72℃延伸 5 min, 4℃保存。PCR 反应在 GeneAmp PCR System 9600 (Perkin Elmer) 上进行。

扩增产物利用 3%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 以 0.5×TBE 作缓冲液, 恒压 5V/cm 进行电泳, 银染检测。银染方法如下: 10%乙酸固定 15 min; 蒸馏水漂洗 3 次, 每次 2min; 染色液 (2g AgNO₃ +3mL 37%甲醛+2L 蒸馏水) 中染色 30 min; 蒸馏水漂洗 1 次, 时间控制在 10s 内; 显色液 (60g 无水 Na₂CO₃ +3mL 37%甲醛+400uL10%硫代硫酸钠+2L 蒸馏水) 中显色至显现清晰条带; 加入 10%冰乙酸终止反应。

1.4 RAPD 分析

参照 Williams 等^[6] 的方法进行, 略作修改。25uL 反应液中包括 10mmol.L⁻¹ Tris-HCl、pH8.3, 50mmol.L⁻¹ KCl, 0.1% Triton X-100, 2.5mmol.L⁻¹ MgCl₂, 4 种 dNTP 各 0.2mmol.L⁻¹, 0.5umol.L⁻¹ 引物, 1U Taq 酶 (Promega), 20ng 基因组 DNA; 上面覆盖 25uL 矿物油。PCR 扩增反应在 GeneAmp PCR System 9600 上进行, 先在 94℃下变性 4min; 然后进行 45 个循环的变性 (94℃下 30s)、退火 (36℃下 30s)、延伸 (72℃下 66s) 步骤; 最后在 72℃下继续延伸 5min。

扩增产物的检测同 ISSR 分析。

1.5 遗传连锁分析

每条扩增带以所用引物及片段大小 (碱基对数) 命名, 如 UBC807-670 指用 ISSR 引物 UBC807 扩增出的长度为 670bp 的扩增带, OPF9-950 指用 RAPD 引物 OPF9 扩增出的长度为 950bp 的扩增带, 其近似分子量用 100bp ladder (Gibco BRL) 估计。条带有无与亲本 G28 相同者记为 “1”, 与亲本 NC2326 相同者记为 “2”, 由此得到分子标记的分离数据, 通过卡方测验 (x²) 检验标记是否符合 1:1 的分离比例。

应用软件 MAPMAKER/EXP Version3.0b^[7] 在 PC 计算机上进行连锁图谱的构建。对于符合 1:1 分离比例的标记, 先用 Group 命令进行标记间连锁分组 (LOD=4.0, r=0.3); 然后在每个连锁群内使用 Order (LOD=3.0, r=0.25) 和 Ripple (或 Compare) 命令进行排序。用 Try 命令插入不符合 1:1 分离比例的标记, 再用 Append 命令加入尚未进入连锁群的标记并排序; 最后用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位 (cM), 用 Map 命令建立连锁图。

1.6 田间试验

2003 年的田间试验在云南玉溪 (中国烟草育种研究 (南方) 中心研和试验基地, E1)、山东青州 (中国烟草遗传育种研究 (北方) 中心试验基地, E2)、黑龙江牡丹江 (中国烟草东北农业试验站基地, E3) 3 个

点进行，2004 年的田间试验只在云南玉溪（中国烟草育种研究（南方）中心研和试验基地，E4）1 个点进行。云南玉溪点的田间试验按随机区组排列，两次重复、单行区、每小区 15~20 株；山东青州、黑龙江牡丹江两个点的田间试验不设重复，单行区、每小区 15~20 株。栽培管理措施、采收调制等与当地大田生产实际相同。按行业标准测定打顶株高、有效叶数、节距、腰叶长宽、鲜烟叶重等农艺性状。

1.7 QTL 分析

利用基于混合线性模型的复合区间作图法（MCIM）^[8] 及相应的软件 QTLNetwork-2.0（<http://ibi.zju.edu.cn/software/qtlnetwork>）进行 QTL 分析，可同时检测加性效应（a）QTL、加上位性效应（aa）QTL 及 QTL 与环境互作效应（ae or aae）。

2 结果与分析

2.1 分子标记分析

以亲本 Speight G-28 和 NC2326 为材料进行引物筛选，然后利用筛选出的引物进行 DH 群体的分子标记分型分析。在 ISSR 分析中，90 条引物中有 5 条引物的扩增产物在亲本间表现明显差异；利用这 5 条引物对 DH 群体进行 ISSR 分析，均能得到在群体中分离较好的条带，共产生多态性标记 12 个，引物 UBC857 的扩增结果见图 1。对 12 个 ISSR 标记的分离比例进行 χ^2 检验，在 $p=0.01$ 水平上发现 4 个标记的分离不符合孟德尔比例（1:1），即表现偏分离，且全部偏向亲本 Speight G-28。

在 RAPD 分析中，从 1040 条引物中共筛选出亲本间扩增产物具有多态性的引物 66 条；利用这些引物对 DH 群体进行 RAPD 分析，其中 62 条能扩增出在群体中发生分离的条带，共产生多态性标记 202 个，引物 OPAE16 的扩增结果见图 1。对 202 个 RAPD 标记的分离比例进行 χ^2 检验，发现 43 个标记表现偏分离。

2.2 遗传连锁图谱的构建

首先利用在 DH 群体中符合 1:1 分离比例的 8 个 ISSR 标记和 159 个 RAPD 标记进行连锁分析，得到 1 张含 27 个连锁群的遗传框架图，包括 8 个 ISSR 标记和 126 个 RAPD 标记；其余 33 个标记无连锁关系。然后将 47 个偏分离标记逐个加入，结果有 35 个标记被添加到该连锁图上，12 个无连锁。

最后得到的烤烟分子标记遗传连锁图由 169 个标记（含 11 个 ISSR 标记和 158 个 RAPD 标记）组成（图

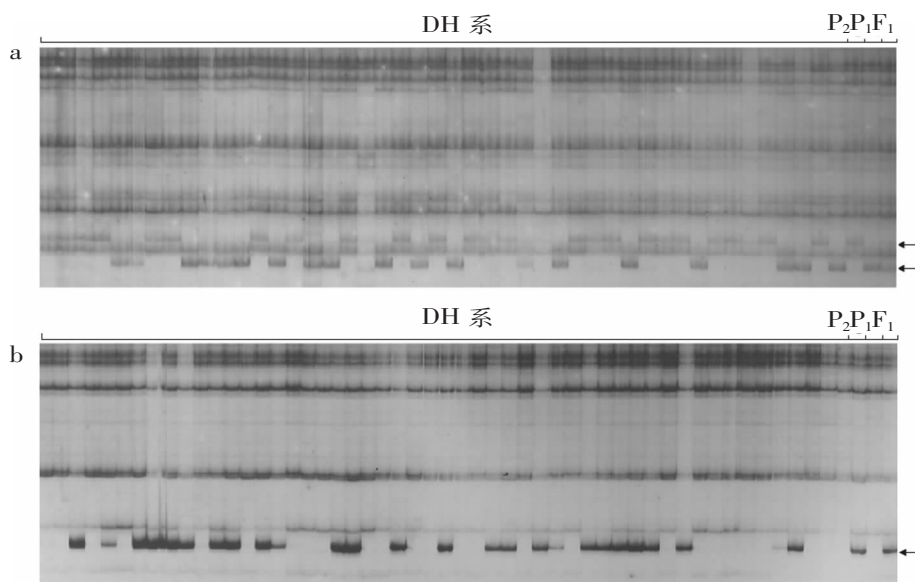


图 1 ISSR 引物 UBC857 (a) 和 RAPD 引物 OPY15 (b) 的部分扩增产物

2), 覆盖长度 2094.6cM, 平均图距 14.8cM。连锁群 LG1~LG13 包括 5~16 个标记, 剩下的 12 个连锁群仅包括 2~4 个标记。

2.3 农艺性状的 QTL 分析

亲本 Speight G-28 和 NC2326 在株高、节距、叶数、腰叶长宽和单株鲜叶重等 6 个农艺性状上具有明显差异。DH 群体各性状表现出超亲分离、近似正态分布, 适合于 QTL 定位分析。

利用 MCIM 进行 QTL 分析, 6 个性状共得到 15 个加性效应 QTL (图 2 和表 1), 每个性状检测到 2~4 个 QTL, 分布于 9 个连锁群的 11 个位置。检测到 15 对上位性效应 QTL (表 2), 分布于 14 个连锁群的 26 个位

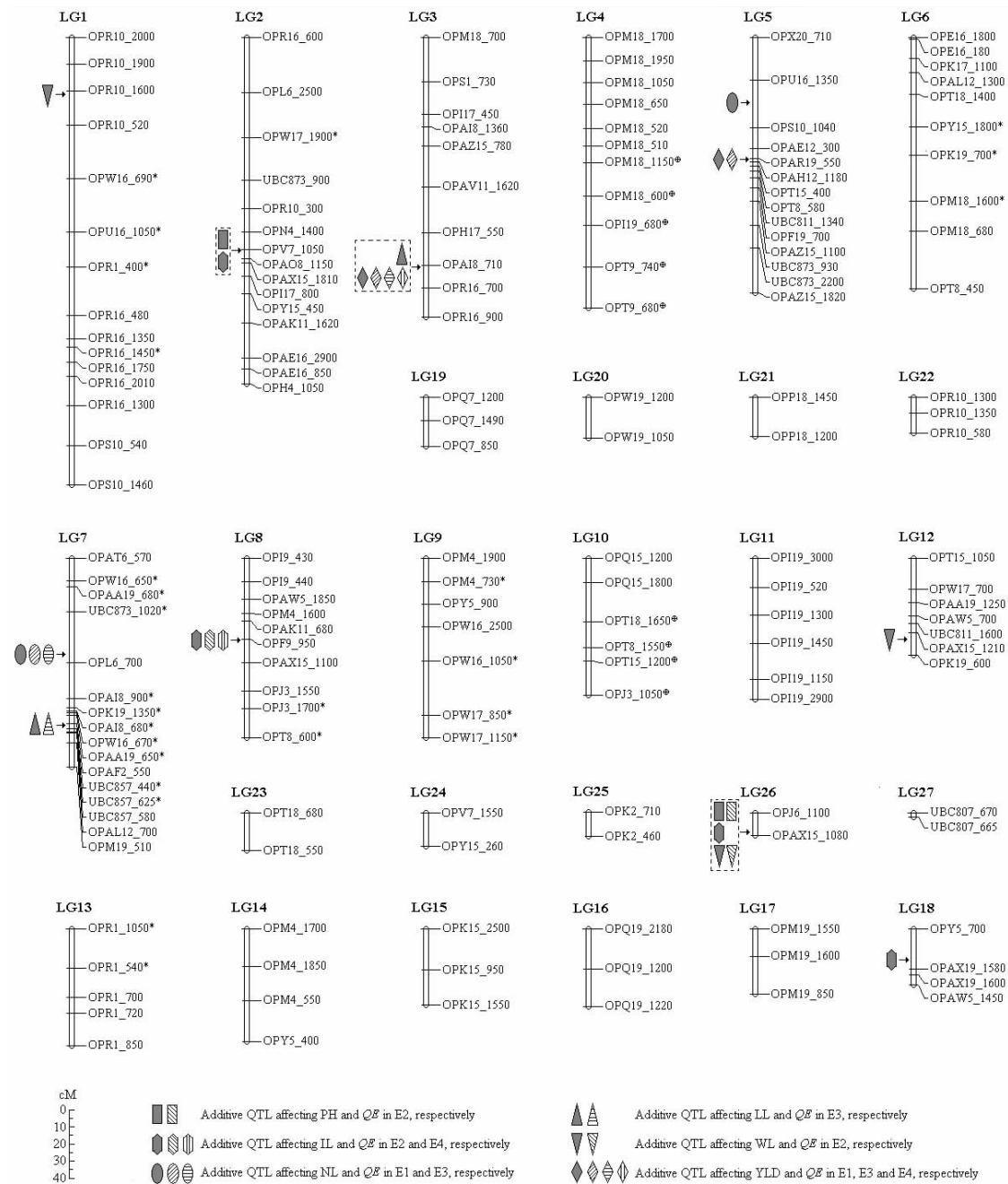


图 2 烤烟分子标记遗传连锁图及 6 个农艺性状的加性 QTL 定位

表1 烤烟6个农艺性状的加性主效应QTL及加性与环境互作效应QTL

Trait	QTL ^a	Interval ⁱ	a ^b	R ^{2c} (%)	ae ₁ ^d	R ^{2c} (%)	ae ₂ ^d	R ^{2c} (%)	ae ₃ ^d	R ^{2c} (%)	ae ₄ ^d	R ^{2c} (%)
PH	ph2	OPV7_1050-OPA08_1150	-1.799	2.88								
	ph26	OPJ6_1100-OPAX15_1080	3.271	9.52		1.174	1.22					
IL	il2	OPV7_1050-OPA08_1150	-0.102	3.86								
	il8	OPF9_950-OPAX15_1100	-0.090	3.04		0.051	0.98				-0.117	5.06
	il18	OPY5_700-OPAX19_1580	-0.104	4.05								
	il26	OPJ6_1100-OPAX15_1080	0.097	3.53								
NL	nl5	OPU16_1350-OPS10_1040	-0.305	4.21								
	nl7	UBC873_1020-OP16_700	-0.301	4.09	0.178	1.43			-0.350	5.54		
LL	ll3	OPA18_710-OPR16_700	0.880	6.00								
	ll7	OPAF2_550-UBC857_440	0.716	3.97					0.790	4.84		
WL	wl1	OPR10_1600-OPR10_520	-0.372	2.11								
	wl12	OPAX15_1210-OPK19_600	-0.380	2.20								
YLD	wl26	OPJ6_1100-OPAX15_1080	0.430	2.82			-0.254	0.98				
	yl3	OPA18_710-OPR16_700	17.667	2.51	-19.134	3.01			-17.550	2.48	44.384	15.87
	yl5	OPAR19_550-OPA112-1180	-10.235	0.84	-29.187	6.87						

^a QTLs表示为性状英文缩略词和相应连锁群

^b a 表示加性主效应QTL

^c R² 表示QTL解释的表型变异的百分比

^d ae₁, ae₂, ae₃和ae₄ 分别表示环境E1, E2, E3 and E4下的加性与环境互作效应

表2 烤烟6个农艺性状的上位性主效应QTL及上位性与环境互作效应QTL

Trait	QTL ^a	Interval ⁱ	QTL ^a	Interval ^j	<i>aa</i> ^b	R^2 ^c	<i>aae</i> ₁ ^d	R^2 ^c	<i>aae</i> ₂ ^d	R^2 ^c	<i>aae</i> ₃ ^d	R^2 ^c	<i>aae</i> ₄ ^d	R^2 ^c
					(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	(%)
PH	<i>ph5a</i>	OPX20_710-OPU16_1350	<i>ph9</i>	OPW16_1050-OPW17_850	-1.484	1.96								
	<i>ph5b</i>	OPT15_400-OPT8_580	<i>ph27</i>	UBC807_670-UBC807_665	-1.460	1.90	-1.521	2.05						
IL	<i>il1</i>	OPR16_480-OPR16_1350	<i>il9</i>	OPW16_2500-OPW16_1050	-0.141	7.41								
	<i>il2</i>	OPV7_1050-OPA08_1150	<i>il27</i>	UBC807_670-UBC807_665			-0.054	1.08					0.106	4.16
NL	<i>il6</i>	OPQ19_1200-OPQ19_1220	<i>il26</i>	OP16_1100-OPAX15_1080	-0.040	0.61	0.054	1.10					-0.110	4.52
	<i>nl1</i>	OPR10_1600-OPR10_520	<i>nl10</i>	OPT5_1200-OPJ3_1050	0.304	4.19					0.600	16.29	-0.323	4.73
LL	<i>nl4</i>	OPM18_520-OPM18_510	<i>nl7</i>	OPAT6_570-OPW16_650							-0.476	10.28		
	<i>ll3</i>	OPH17_550-OPAI8_710	<i>ll7</i>	OPAF2_550-UBC857_440	-0.393	1.20								
WL	<i>wl4</i>	OPM18_1150-OPM18_600	<i>wl8b</i>	OPJ3_1700-OPT8_600	-0.304	1.41	-0.288	1.27						
	<i>wl7a</i>	OPAT6_570-OPW16_650	<i>wl7b</i>	UBC857_625-UBC857_580	-0.502	3.84	-0.428	2.80			0.630	6.04		
YLD	<i>wl8a</i>	OPAX15_1100-OPJ3_1550	<i>wl14a</i>	OPM4_1700-OPM4_1850	0.410	2.57							0.525	4.20
	<i>wl8b</i>	OPJ3_1700-OPT8_600	<i>wl14b</i>	OPM4_1850-OPM4_550	-0.338	1.74	-0.404	2.49						
	<i>yl3</i>	OPAI8_710-OPR16_700	<i>yl7b</i>	UBC857_580-OPAL12_700	13.659	1.50								
	<i>yl4</i>	OPT9_740-OPT9_680	<i>yl7a</i>	OPL6_700-OPAI8_900	-15.122	1.84								
	<i>yl11</i>	OP119_1300-OP119_1450	<i>yl27</i>	UBC807_670-UBC807_665	-8.379	0.57	-12.779	1.31	-16.038	2.07	23.046	4.27		

^a QTLs表示为性状英文缩略词和相应连锁群

^b *aa* 表示上位性主效应QTL

^c R^2 表示QTL解释的表型变异的百分比

^d *aae*₁, *aae*₂, *aae*₃和*aae*₄分别表示环境E1, E2, E3 and E4下的上位性与环境互作效应

置。7个加性效应 QTL 和 10 对上位性效应 QTL 检测到 QTL 与环境互作效应 (QE)。

株高 (PH): 检测到 2 个加性效应 QTL, 共解释 12.40% 的表型变异。其中 ph2 仅检测到加性主效应 (a), 增效基因来自于 NC2326; ph26 检测到加性主效应, 同时在环境 E2 下也检测到了加性与环境互作效应 (ae₂), 其增效基因来自 Speight G-28。检测到 2 对上位性效应 QTL, 共解释 3.86% 的表型变异。ph5a- ph9 仅检测到上位性主效应 (aa), ph5b- ph27 在检测到上位性主效应的同时, 在环境 E1 也检测到上位性与环境互作效应 (aae₁)。

节距 (IL): 检测到 4 个加性效应 QTL, 共解释 14.48% 的表型变异。其中 i/2、i/18 和 in/26 仅检测到加性主效应 (a), 对于 i/2 和 i/18, 增效基因来自于 Speight G-28, 对于 in/26, 增效基因来自于 NC2326; in/8 检测到加性主效应, 同时在环境 E2 和 E4 下也检测到了加性与环境互作效应 (ae₂ 和 ae₄)。检测到 3 对上位性效应 QTL。i/1-i/9 仅检测到上位性主效应 (aa), 解释了 7.41% 的表型变异; i/2-i/27 仅在环境 E1 和 E4 下检测到上位性与环境互作效应; i/16-i/26 在检测到上位性主效应的同时, 在环境 E1 和 E4 下也检测到上位性与环境互作效应。

叶数 (NL): 检测 2 个加性效应 QTL, 共解释 8.30% 的表型变异。其中 n/5 仅检测到加性主效应 (a), 增效基因来自于 NC2326; n/7 检测到加性主效应, 同时在环境 E1 和 E3 下也检测到了加性与环境互作效应 (ae₁ 和 ae₃)。检测到 2 对上位性效应 QTL。n/1-n/10 检测到上位性主效应 (aa) 的同时也检测到上位性与环境互作效应, n/4-n/7 仅检测到上位性与环境互作效应; n/1-n/10 和 n/4-n/7 的上位性与环境互作效应分别解释了环境 E3 下的 16.29% 和 10.28% 的表型变异。

叶长 (LL): 检测到 2 个加性效应 QTL, 共解释 9.97% 的表型变异。其中 l/3 仅检测到加性主效应 (a), l/7 检测到加性主效应的同时在环境 E3 下也检测到了加性与环境互作效应 (ae₃), 增效基因均来自 Speight G-28。检测到 1 对上位性效应 QTL, 即 l/3-l/7, 仅检测到上位性主效应 (aa)。

叶宽 (WL): 检测到 3 个加性效应 QTL, 可解释 7.13% 的表型变异。其中 w/1 和 w/12 仅检测到加性主效应 (a); w/26 检测到加性主效应, 同时在环境 E2 下也检测到了加性与环境互作效应 (ae₂ 和 ae₄)。检测到 4 对上位性 QTL, 在检测到上位性主效应的同时, 也检测到上位性与环境互作效应, 其中上位性主效应共解释 9.56% 的表型变异。

单株鲜烟叶重 (YLD): 检测到 2 个加性效应 QTL, 均检测到加性主效应和加性与环境互作效应, 其中加性主效应共解释 3.33% 的表型变异。对于 y/d3, 加性主效应和环境 E4 下的加性与环境互作效应的增效基因来自于 Speight G-28, 而环境 E2 和 E3 下的加性与环境互作效应的增效基因来自 NC2326; 对于 y/d5, 加性主效应和环境 E1 下的加性与环境互作效应的增效基因来自 NC2326。检测到 3 对上位性效应 QTL, 其上位性主效应解释了 3.91% 的表型变异。y/d3-y/d7b 和 y/d4-y/d7a 仅检测到上位性主效应 (aa); y/d11-y/d27 在检测到上位性主效应的同时, 也检测到上位性与环境互作效应。

3 讨论

3.1 烟草分子标记遗传连锁图

构建分子标记遗传连锁图是性状基因定位及分子标记辅助选择育种的基础, 首先必须要筛选亲本间具有多态性的分子标记。栽培烟草品种间的分子标记多态性水平较低, 如 Ren 等^[9]研究表明栽培烟草间的 AFLP 图谱十分相近。由于烤烟品种间分子标记多样性的缺乏^[10], 从品种间杂交衍生的作图群体很难检测到多态性。本研究筛选了 90 个 ISSR 引物和 1040 个 RAPD 引物, 但仅有 5 个 ISSR 引物和 62 个 RAPD 引物在 DH 群体中扩增出多态性带。

本研究以 DH 群体为材料, 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建了国内第一张烤烟分子标记遗传连锁图, 该图谱包括 169 个标记和 27 个连锁群, 覆盖长度 2094.6cM。由于使用的 DH 群体是永久性作图群体, 因此利于将来加入更多的标记。下一步的工作将是整合更多的分子标记、尤其是位点特异性标记, 以构建高密度分子标记遗传连锁图。

3.2 农艺性状的 QTL 分析

寻找与重要性状相连锁的分子标记可用分子标记辅助选择, 从而允许更精确、有效地选择“超级”基因型^[11], 以减轻早期育种阶段的工作量^[12]。本研究利用构建出的遗传连锁图和 4 个环境下的 DH 群体试验数据, 进行了 6 个农艺性状的 QTL 分析。结果表明, 所鉴定出的 QTL 其加性主效应 (a)、加性与环境互作效应 (ae)、上位性主效应 (aa) 和上位性与环境互作效应 (aae) 可解释不同环境下株高表型变异的 16.26%~18.31%、节距表型变异的 22.50%~36.24%、叶数表型变异的 12.49%~44.60%、叶长表型变异的 11.17%~16.01%、叶宽表型变异的 17.67%~23.25%、单株鲜烟叶重表型变异的 9.33%~23.13%。尽管检测出的 QTL 解释的表型变异所占比例较低, 但本研究获得的 QTL 分析结果将为深入理解烤烟农艺性状的遗传基础提供重要线索。

加性主效应解释了 6 个农艺性状表型变异的 3.33%~14.48%。对于株高、节距、叶宽和单株鲜烟叶重, 具有正向效应的等位基因分布于两个不同亲本中。为了改良这些性状, 应通过分子标记辅助选择将具有正向效应的“有益”等位基因组合在同一后代个体中。

所有 6 个农艺性状均检测到上位性效应, 解释了 1.20%~9.56%的表型变异。上位性的重要性已在大豆^[13]、水稻^[14]和玉米^[15]等几种作物中被揭示出来, 本研究表明在烤烟农艺性状的遗传控制中上位性也具有重要作用。

QTL 与环境互作 (QE) 是影响数量性状的重要遗传因子。本研究中, 6 个性状均检测到加性与环境互作效应和上位性与环境互作效应。在 7 个加性效应 QTL、10 对上位性效应 QTL 中, 不同环境下的 QTL 与环境互作效应方向不一致。如对于 yld3, 在环境 E4 中单株鲜烟叶重的增效基因来自 Speight G-28, 而在环境 E1 和 E2 下其增效基因来自 NC2326。有些情况下, 特定环境下的 QTL 与环境互作效应高于 QTL 主效应。仍以控制单株鲜烟叶重的 yld3 为例, 在环境 E4 下的加性与环境互作效应解释了 15.87%的表型变异, 而其加性主效应仅解释了 2.51%的表型变异。QTL 与环境互作效应是不同环境下基因差异表达的结果, 因此在用于分子标记辅助选择时应针对特定环境条件来进行^[16]。

本研究为大规模鉴定烤烟重要性状 QTL 奠定了基础, 从而有利于深入理解这些性状的遗传基础, 并有望用于烤烟性状的分子标记辅助选择。

参考文献

- [1] Lin, T. Y., Y. Y. Kao, S. Lin, et al. A genetic linkage map of *Nicotiana glauca* / *Nicotiana glauca* based on RFLP and RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 905~911.
- [2] Nishi, T., T. Tajima, S. Noguchi, et al. Identification of DNA markers of tobacco linked to bacterial wilt resistance [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 765~770.
- [3] 朱惠琴, 张宛银, 薛庆中. 开发实用的染色体加倍体系构建烟草 DH 群体 [J]. *分子植物育种*, 2004, 2 (5) : 643~648.
- [4] 杨本超, 肖炳光, 陈学军等. 基于 ISSR 标记的烤烟种质遗传多样性研究 [J]. *遗传*, 2005, 27 (5) : 753~758.
- [5] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20:176~183.
- [6] Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ, Rafalski JA, Tingey SV. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531~6535.
- [7] Lincoln S E, Daly M J, Lander E S. Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER/EXP Version 3.0b. A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report (Whitehead Institute, Cambridge, MA), 1992.
- [8] Wang DL, Zhu J, Li ZK, Paterson AH. Mapping QTLs with epistatic effects and QTL×environment interactions by mixed linear model approaches. *Theor Appl Genet*, 1999, 99:1255~1264.
- [9] Ren N, Timko MP. AFLP analysis of genetic polymorphism and evolutionary relationships among cultivated and

wild *Nicotiana* species. *Genome*, 2001, 44:559~571.

[10] Julio E, Verrier J-L, Dorlhac de Borne F. Development of SCAR markers linked to three disease resistances based on AFLP within *Nicotiana tabacum* L. *Theor Appl Genet*, 2006, 112:335~346.

[11] Yang J, Zhu J. Methods for predicting superior genotypes under multiple environments based on QTL effects. *Theor Appl Genet*, 2005, 110:1268~1274.

[12] Blanco A, Bellomo M P, Cenci A, De Giovanni C, D'Ovidio R, Iacono E, Laddomada B, Pagnotta MA, Porceddu E, Sciancalepore A, Simeone R, Tanzarella OA. A genetic linkage map of durum wheat. *Theor Appl Genet*, 1998, 97:721~728.

[13] Lark KG, Chase K, Adler F, Mansur LM, Orf JH. Interactions between quantitative trait loci in soybean in which trait variation at one locus is conditional upon a specific allele at another. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 4656~4660.

[14] Li ZK, Pinson SRM, Park WD, Paterson AH, Stansel JW. Epistasis for three grain yield components in rice (*Oryza sativa* L.) . *Genetics*, 1997, 145:453~465.

[15] Zhu J, Mickelson SM, Kaeppler SM, Lynch JP. Detection of quantitative trait loci for seminal root traits in maize (*Zea mays* L.) seedlings grown under differential phosphorus levels. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1~10.

[16] Yadav RS, Bidinger FR, Hash CT, Yadav YP, Yadav OP, Bhatnagar SK, Howarth CJ. Mapping and characterisation of QTL \times E interactions for traits determining grain and stover yield in pearl millet. *Theor Appl Genet*, 2003, 106:512~520.

A genetic linkage map of the flue-cured tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) and QTL analysis of several agronomic traits using a doubled haploid population

Bingguang Xiao¹, Xiuping Lu¹, Yongfu Bai¹, Yongping Li¹, Yuhe Sun², Zhaokui Guo³, Jun Zhu⁴

(1.China Tobacco Breeding Research (Southern) Center, Yunnan Institute of Tobacco Science, Nier Road No.47, Yuxi, 653100, China; 2.Institute of Tobacco Science, CAAS, 266101 Qingdao, China; 3.Heilongjiang Institute of Tobacco Science, 157011 Mudanjiang, China; 4.Zhejiang University, 310029 Hangzhou, China)

Abstract: For constructing a genetic linkage map and genetically dissect quantitative trait loci (QTLs) for agronomic traits, an F_1 -derived doubled haploid (DH) population of 137 lines was developed from a cross between the flue-cured tobacco cultivars, Speight G-28 and NC2326. ISSR and RAPD analysis were used to genotype the 137 DH lines. A genetic map was constructed based on 169 markers including 11 ISSR markers and 158 RAPD markers. The map consisted of 27 linkage groups and spanned 2094.6 cM with an average marker distance of 14.8 cM. Data for agronomic traits such as plant height (PH), internode length (IL), number of leaves (NL), length of leaves (LL), width of leaves (WL) and pre-cured yield (YLD) were collected from four environments, and a mixed-model based composite interval mapping method (MCIM) was used for QTL analysis. Fifteen additive effect QTLs and 14 pairs of additive by additive epistatic effect QTLs were detected, and 7 additive effect QTLs and 10 pairs of epistatic effect QTLs were found to involve in QTL by environment interactions (QE). This report on the construction of the molecular linkage map in the flue-cured tobacco and QTL analysis of several agronomic traits provides a starting point for identifying QTLs for agronomically and economically important traits at large scale and understanding the genetic architecture of these traits.

Key words: *Nicotiana tabacum* L.; Genetic linkage map; Agronomic trait; QTL analysis; Epistasis; QTL by environment interaction