

类番茄茄 LA2951 抗黄瓜花叶病毒 QTL 的定位

周龙溪, 刘磊, 孙玉燕, 杨宇红, 谢丙炎, 冯兰香, 宋燕, 郑峥, 李君明*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 类番茄茄 (*Solanum lycopersicoides*) 高抗黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV)。通过 4 次独立试验, 对来自类番茄茄 LA2951 的渐渗系 (Introgression Line, IL) 采用摩擦接种法, 人工接种 CMV 亚组 II 进行了筛选, 定位了 8 个抗 CMV 的 QTL, 它们分别位于番茄第 2、7、8、9、10、11 和 12 染色体上, 均可显著降低植株的病情指数, 与前人已鉴定的来自多毛番茄 (*S. habrochaites*) LA1777 和智利番茄 (*S. chilense*) LA0458 的抗 CMV 位点不同位, 为抗 CMV 新位点。通过对抗 CMV 的 IL 初步分析发现, 这些 IL 包含的 QTL 呈现不完全显性遗传效应, QTL 聚合为完全加性效应。

关键词: 番茄; 类番茄茄; 渐渗系; 黄瓜花叶病毒; QTL 定位

中图分类号: S 641.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2013) 10-1905-11

Mapping of QTLs Conferring the Resistance to CMV in Wild Tomato Species *Solanum lycopersicoides* LA2951

ZHOU Long-xi, LIU Lei, SUN Yu-yan, YANG Yu-hong, XIE Bing-yan, FENG Lan-xiang, SONG Yan, ZHENG Zheng, and LI Jun-ming*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: *Solanum lycopersicoides* showed high resistance to *Cucumber mosaic virus* (CMV). An introgression line (IL) population derived from a nightshade related species *S. lycopersicoides* LA2951 was used to identify the involved loci for resistance to CMV by rub-inoculation in four independent experiments. In total, 8 QTLs for resistance to CMV located on chromosome 2, 7, 8, 9, 10, 11 and 12 were found respectively. Percentage of disease index (PDI) was significantly decreased in these ILs. All QTLs were new loci when compared those identified previously from *S. habrochaites* LA1777 and *S. chilense* LA0458. The genetic analysis of these QTLs showed incompletely dominant. The interaction of these QTLs presented complete additive effect. The results provide a prospect for breeding of CMV resistance in tomato.

Key words: tomato; *Solanum lycopersicoides*; introgression line; *Cucumber mosaic virus* (CMV); QTL mapping

黄瓜花叶病毒 (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 是雀麦花叶病毒科 (Bromoviridae) 黄瓜花叶病

收稿日期: 2013-05-28; 修回日期: 2013-09-26

基金项目: 公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (201303115); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: lijunming@caas.cn; Tel: 010-82109530)

病毒属 (*Cucumovirus*) 的典型成员, 自 1916 年首次被报道 (Doolittle, 1916; Jagger, 1916) 以来, 世界各地均有传播。CMV 已被列入世界 10 大主要病毒之一 (Scholthof et al., 2011), 寄主范围十分广泛, 可侵染 800 多种植物 (Palukaitis et al., 1992), 其中茄科蔬菜, 特别是番茄和辣椒极容易受 CMV 危害。近几年, 虽然单一 CMV 危害番茄的报道不多, 但一些地区的不同类型病毒混合侵染造成的番茄条斑坏死病毒病危害严重, 其中 CMV 是导致番茄条斑坏死病毒病的主要病毒之一 (常波等, 2006; 陈绍宁等, 2007)。蚜虫和机械损伤是 CMV 传播的重要途径, 目前药剂对病毒病的防治效果仍十分有限。虽然已有野生资源抗 CMV 的报道, 但尚未见抗 CMV 番茄品种育成 (杨洋等, 2005; Cillo et al., 2007)。因此, 深入挖掘番茄近缘野生种中潜在的抗 CMV 位点, 是番茄抗 CMV 乃至抗条斑坏死病毒病遗传改良的有效途径之一。

截至目前为止, 已报道的 CMV 分为两个血清组, 分属亚组 I 和 II, 亚组 I 又可细分为 I A 和 I B 型, 亚组 II 具有更强的毒性 (Palukaitis et al., 1992; Wahyuni et al., 1992; 冯兰香和杨翠荣, 2000; Sudhakar et al., 2006)。由于栽培种番茄 (*Solanum lycopersicum*) 通常对 CMV 感病, 通过对野生资源的筛选鉴定, 现已发现智利番茄 (*S. chilense*)、多毛番茄 (*S. habrochaites*)、小花番茄 (*S. neorickii*)、潘那利番茄 (*S. pennellii*)、醋栗番茄 (*S. pimpinellifolium*)、克梅留斯基番茄 (*S. chmielewskii*) 等资源对 CMV 亚组 I (I A 或 I B) 表现抗性 or 耐性, 但其抗性受一定条件的限制, 如机械损伤、蚜虫群体密度、栽培环境条件等 (Abad et al., 2000; Cillo et al., 2007; Akhtar et al., 2010)。目前, 利用渐渗系 (Introgression Line, IL) 群体已将来自多毛番茄 (*S. habrochaites*) LA1777 耐 CMV 株系 Fny 的位点定位于第 6 染色体上, 侧翼标记为 TG164 和 *sp* (Cillo et al., 2007); 利用分子遗传连锁作图, 将来自 *S. chilense* LA0458 抗 CMV 的 *Cmr* 基因初步定位于第 12 染色体上, 侧翼标记为 TG68 和 CT79, 但后代并未呈现明显单基因遗传 (Stamova & Chetelat, 2000)。对于其它野生种的抗性机制尚不明确。同时, 虽然利用基因工程手段获得了转基因高抗 CMV 甚至免疫的品种, 但其推广仍受制于食品安全问题 (Gal-On et al., 1998; Lin et al., 2010)。

目前已发现类番茄茄 (*S. lycopersicoides*) 抗多种病毒病 (Phills et al., 1977; Chetelat, 2010), 特别是高抗 CMV (Phills et al., 1977; Zhao & Qiu, 2005), 因此为番茄抗 CMV 遗传改良提供了良好的材料。然而, 由于类番茄茄与栽培种番茄的杂交存在不亲和现象, 难以获得杂交种, 或者 F₁ 存在花粉败育以及花粉管排异现象, 因此, 直接利用类番茄茄进行遗传改良存在一定困难 (Chetelat et al., 1997)。为了有效挖掘和利用类番茄茄的潜在优良性状, Chetelat 等 (1997) 和 Canady 等 (2005) 开发了一套类番茄茄 LA2951 的渐渗系群体。该 IL 群体是以番茄栽培种 VF36 为遗传背景, 共包含 90 个渗入类番茄茄 LA2951 染色体片段的个体, 约覆盖该野生种基因组的 96%。利用该渐渗系群体, 已分别定位了抗灰霉病、晚疫病及番茄黄化曲叶病毒病等若干个 QTL 位点 (Guimaraes et al., 2004; Davis et al., 2009; 张春芝等, 2012; 宗园园等, 2012), 也为深入挖掘野生资源抗 CMV 的基因奠定了良好基础。本研究中利用来自类番茄茄 LA2951 的 IL 群体, 接种 CMV 病毒株系 (亚组 II), 定位了该野生种中潜在的抗 CMV 位点, 并对鉴定的 QTL 进行了遗传与互作分析, 将为番茄抗 CMV 病毒病育种奠定一定的基础。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

类番茄茄 (*S. lycopersicoides*) LA2951 的 IL 群体 (Canady et al., 2005) 及其遗传背景材料 *S. lycopersicum* VF36 (栽培种) 由美国番茄遗传资源中心 (Tomato Genetic and Research Center, TGRC)

提供。用于本研究的 IL 群体为其中的 80 个 IL, 详见表 2。类番茄茄 LA2951 的 IL 群体中, 一些 IL 存在不育位点, 只有在杂合状态下, 即与 VF36 回交才能保存 (Canady et al., 2005) (图 1)。本研究所用的 IL 后代均为自交群体, 无标记筛选。

1.2 试验设计

将番茄种子浸种催芽后, 播种于苗盘。基质为草炭和蛭石 (1:1), 并混配适量有机肥和化学肥料。出苗后按照常规管理, 昼夜温度为 22~25 °C/18~20 °C。共进行 4 次独立试验, 分别于 2007、2008、2009 和 2010 年进行。均于 4 月上旬或 9 月下旬在中国农业科学院蔬菜花卉研究所植保室人工气候室播种, 每个 IL 系设置 3 次重复, 每重复 10 株, 重复间完全随机排列。QTL 的遗传与互作分析同上。*S. lycopersicoides* LA2951 渐渗系群体共包含 90 个品系, 约覆盖野生种整个基因组的 96%, 包括核心群体 56 个 IL 及可提高作图的精细度 34 个 IL (Canady et al., 2004)。第 1 次试验包括 38 个核心 IL, 约覆盖野生种基因组的 80% (数据由 TGRC Dr. Chetelat 提供), 均自交可育; 第 2 次为 58 个 IL, 约覆盖野生种基因组的 90%, 均自交可育; 第 3 次和第 4 次均为 80 个 IL, 约覆盖野生种基因组 96%, 13 个 IL 纯合时自交不可育 (Canady et al., 2005)。对照为栽培种番茄 VF36。

1.3 人工接种鉴定

CMV 病毒株系 (亚组 II) 由中国农业科学院蔬菜花卉研究所植保室提供。将低温保存的病毒于烟草三叶期的幼苗进行活化。待番茄幼苗长到 2 片真叶时进行接种。采用摩擦接种法 (Stamova & Chetelat, 2000), 即先将摩擦粉喷洒在番茄幼叶上, 然后用手指蘸取 1:10 (W/V) 的新鲜感病烟草幼叶和冰浴的缓冲液 (pH 7.0 的 0.03 mol·L⁻¹ 磷酸钾缓冲液和 0.1% 的亚硫酸钠按等量混合的溶液) 混合的接种液, 轻轻摩擦幼叶。接种在中国农业科学院蔬菜花卉研究所植保室人工气候室内进行, 温度控制在 22~24 °C。接种 2~3 周后进行调查。病状分为 5 级 (Stamova & Chetelat, 2000)。0: 无病症; 1: 轻度花叶病纹; 2: 花叶、皱纹和一些叶片蕨叶; 3: 多数叶片蕨叶或带状、皱缩; 4: 严重带状病症。

1.4 统计分析

利用 SPSS 13.0 软件对数据进行统计分析。首先将每个 IL 的发病级数转化为病情指数 (Chaerani et al., 2007), 病情指数 $PDI = \sum \text{病级级数} \times \text{该级株数} / (\text{总株数} \times \text{最大病级数}) \times 100$ 。每个 IL 的平均 PDI 按照普通线性模型 (General Linear Model, GML) 计算 (Finkers et al., 2007), $PDI \text{ 均值} = \text{常数} + \text{基因型} + \text{试验} + \text{基因型} \times \text{试验}$ (默认误差 E 为 0), 然后进行 Dunnett 多重比较。IL 与对照 VF36 差异达到显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$), 即确定该 IL 包含抗 CMV 的 QTL。QTL 命名为 *QRCMV* (Quantitative Resistance to CMV), 其后是每个 QTL 在染色体上的位置, 如果一个染色体上有多个 QTL, 分别用 a, b 等字母加以区分。

QTL 的遗传效应参照 Semel (2006) 定性分类方法, 每个抗性显著的 IL 片段被认为包含抗 CMV 的 QTL。当 IL 与 VF36 差异显著, 而 ILH (渐渗系与 VF36 的杂交一代) 的表型值介于 IL 和 VF36 之间时, 则有 3 种可能: (1) ILH 与 IL 差异显著, 但与 VF36 不显著, QTL 为隐性; (2) ILH 与 IL、VF36 均差异显著, 或与二者均差异不显著, QTL 为加性效应; (3) ILH 与 VF36 差异显著, 但与 IL 不显著, QTL 为显性。还有, 若 ILH 显著高于或低于两亲本, QTL 为超显性效应。

QTL 间互作效应分析参照 Eshed 和 Zamir (1996) 的方法。若 $ILHa \times ILHb$ (即渐渗系 a 与渐渗系 b 的杂交一代) 与 VF36 的差异等于 $(ILHa-VF36) + (ILHb-VF36)$ ($ILHa$ 、 $ILHb$ 分别为渐渗系 a、渐渗系 b 与 VF36 的杂交一代), 则两个 QTL 间为完全加性效应; 若 $ILHa \times ILHb$ 与 VF36 的差异小于 $(ILHa-VF36) + (ILHb-VF36)$, 则两个 QTL 间具有明显互作, 呈小于加性效应。

2 结果与分析

2.1 类番茄 LA2951 IL 群体的筛选

对每个独立试验 IL 群体的个体的病状分级经数据转换为 PDI 后进行分布检验发现, 4 次试验结果均趋于正态分布。说明类番茄 LA2951 对 CMV 呈现明显的数量性状抗性, 受数量性状位点 (Quantitative Trait Loci, QTL) 控制。总的来看, 接种 CMV 的 4 次独立试验中, 前 3 次试验的 PDI 均值较高, 分别为 65.4、61.6 和 48.8, 而第 4 次的均值只有 37.3。说明不同年度 4 次独立试验, QTL 受不同年份光照等因素影响。对 4 次独立试验的 PDI 相关分析表明 (表 1), 试验 1、2 和 3 相关性显著或极显著, 试验 4 与试验 3 相关性显著。

表 1 不同试验相关性分析

Table 1 Correlation analysis of the different experiments

试验 Experiment	试验 1 EXP1 (df = 37)	试验 2 EXP2 (df = 57)	试验 3 EXP3 (df = 79)	试验 4 EXP4 (df = 79)
试验 1 EXP1	1	0.40*	0.44**	-0.06
试验 2 EXP2		1	0.48**	0.23
试验 3 EXP3			1	0.26*
试验 4 EXP4				1

** $P < 0.01$; * $P < 0.05$ 。

2.2 抗 CMV QTL 的定位

根据相关系数, 对接种 CMV 的 4 次独立试验, 选取相关性显著的试验 1、2 和 3 进行 QTL 定位。表 2 所示为 IL 群体不同个体及对照 VF36 的 PDI 均值。其中对照 VF36 为 60.0, 渐渗系群体的不同个体 PDI 分布在 28.7 ~ 75.0 之间。Dunnnett 测验方差分析结果表明, 在 80 个筛选的 IL 中, 有 54 个 IL 的 PDI 较对照 VF36 低, 表现出不同程度的抗性, 其中 36 个与对照差异达到显著或极显著水平 (表 2), 初步确认这些 IL 包含抗 CMV 的位点。

表 2 类番茄 LA2951 IL 群体的病情指数 (PDI)

Table 2 PDI for each IL in *S. lycopersicoides* LA2951 IL population

渐渗系 IL	纯合 Homozygous	PDI	渐渗系 IL	纯合 Homozygous	PDI	渐渗系 IL	纯合 Homozygous	PDI
LA3344 ^{3,4}	是 Yes	58.7	LA4231 ^{1,2,3,4}	是 Yes	66.0	LA4261 ^{3,4}	是 Yes	43.3**
LA3345 ^{3,4}	是 Yes	43.3**	LA4232 ^{1,3,4}	是 Yes	67.3	LA4263 ^{1,2,3,4}	否 No	52.0**
LA3668 ^{3,4}	是 Yes	47.3**	LA4233 ^{1,2,3,4}	否 No	47.0**	LA4264 ^{1,2,3,4}	是 Yes	47.1**
LA3866 ^{1,2,3,4}	是 Yes	61.4	LA4234 ^{2,3,4}	否 No	60.7	LA4265 ^{1,2,3,4}	是 Yes	51.1**
LA3867 ^{1,2,3,4}	是 Yes	63.8	LA4235 ^{1,2,3,4}	否 No	62.7	LA4266 ^{1,2,3,4}	否 No	51.1**
LA3869 ^{1,2,3,4}	是 Yes	61.5	LA4236 ^{2,3,4}	否 No	50.3**	LA4267 ^{3,4}	是 Yes	44.8**
LA3870 ^{1,2,3,4}	是 Yes	57.7	LA4238 ^{1,2,3,4}	否 No	56.7	LA4268 ^{2,3,4}	否 No	44.7**
LA3871 ^{1,2,3,4}	否 No	59.5	LA4239 ^{2,3,4}	是 Yes	68.3	LA4269 ^{1,3,4}	否 No	66.0
LA3873 ^{1,2,3,4}	是 Yes	74.3	LA4241 ⁴	否 No	59.3	LA4270 ^{2,3,4}	否 No	60.0
LA3875 ^{3,4}	是 Yes	42.7**	LA4242 ^{2,3,4}	是 Yes	51.3**	LA4271 ^{2,3,4}	是 Yes	68.3
LA3876 ^{1,2,3,4}	是 Yes	70.2	LA4244 ^{1,2,3,4}	是 Yes	66.0	LA4272 ^{2,3,4}	是 Yes	47.3**
LA3877 ^{1,2,3,4}	是 Yes	67.1	LA4245 ^{2,3,4}	是 Yes	55.3	LA4273 ^{3,4}	是 Yes	45.6**
LA3878 ^{1,2,3,4}	是 Yes	62.0	LA4246 ^{1,2,3,4}	否 No	60.7	LA4274 ^{3,4}	是 Yes	44.7**
LA3879 ^{1,2,3,4}	是 Yes	40.6**	LA4247 ^{1,2,3,4}	是 Yes	61.6	LA4275 ^{3,4}	是 Yes	52.7*
LA3881 ^{1,3,4}	是 Yes	59.7	LA4248 ^{2,3,4}	是 Yes	55.3	LA4277 ^{2,3,4}	是 Yes	53.7**
LA3882 ^{2,3,4}	是 Yes	44.0**	LA4249 ^{1,2,3,4}	是 Yes	58.7	LA4278 ^{1,2,3,4}	是 Yes	54.0*
LA3883 ^{1,2,3,4}	是 Yes	52.9**	LA4250 ^{3,4}	是 Yes	36.0**	LA4279 ^{2,3,4}	否 No	63.7
LA3884 ^{1,2,3,4}	是 Yes	54.4*	LA4251 ^{2,3,4}	是 Yes	63.0	LA4282 ^{1,2,3,4}	否 No	45.9**
LA3885 ^{1,2,3,4}	是 Yes	54.4*	LA4252 ^{3,4}	是 Yes	46.0**	LA4283 ^{2,3,4}	是 Yes	59.0

续表 2

渐渗系 IL	纯合 Homozygous	PDI	渐渗系 IL	纯合 Homozygous	PDI	渐渗系 IL	纯合 Homozygous	PDI
LA3886 ^{1,2,3,4}	是 Yes	56.6	LA4253 ^{2,3,4}	是 Yes	65.3	LA4284 ^{2,3,4}	是 Yes	45.0**
LA3889 ^{2,3,4}	是 Yes	50.3**	LA4254 ^{3,4}	否 No	49.3**	LA4306 ^{2,3,4}	是 Yes	57.7
LA3890 ^{1,2,4}	是 Yes	62.1	LA4255 ^{1,2,3,4}	是 Yes	65.8	LA4308 ^{2,3,4}	否 No	49.7**
LA3892 ^{1,2,3,4}	是 Yes	64.3	LA4256 ^{1,2}	是 Yes	75.0	LA4310 ^{3,4}	是 Yes	58.0
LA3894 ^{1,2,3,4}	是 Yes	54.9	LA4257 ^{2,3,4}	否 No	58.2	LA4311 ^{3,4}	否 No	47.8**
LA3895 ^{1,2,3,4}	否 No	51.6**	LA4258 ^{3,4}	是 Yes	28.7**	LA4313 ^{2,3,4}	是 Yes	58.3
LA3906 ^{3,4}	是 Yes	66.0	LA4259 ^{2,3,4}	是 Yes	52.3**	LA4314 ^{3,4}	是 Yes	62.0
LA4230 ^{3,4}	是 Yes	52.0**	LA4260 ^{1,2,3,4}	是 Yes	59.6	VF36 ^{1,2,3,4}	是 Yes	60.0

注: *和**分别表示 IL 与对照 VF36 病情指数差异达到显著水平 ($P < 0.05$) 或极显著水平 ($P < 0.01$)。下同。^{1,2,3,4}表示 4 次试验中分别鉴定的 IL。

Note: * and ** indicated the significant difference of PDI between IL and the control VF36 at 0.05 and 0.01 level respectively. The same as below. ^{1,2,3,4} indicated the IL used in 4 independent experiments respectively.

由于 QTL 易受环境影响, 因此在进一步确定抗 CMV 的 QTL 时遵循以下原则: (1) 在选取的 3 次试验中, 如果 IL 在 2 次独立试验中与对照 VF36 差异显著, 即确定为该 IL 包含目标 QTL; (2) 如果 IL 具有重叠渗入片段, 至少有 2 个 IL 的均值与 VF36 差异显著, 即确定重叠区域包含目标 QTL; (3) 根据重叠渗入片段大小, 将目标位点进行精细定位。根据以上原则分析, 得到 27 个 IL 在 2 次独立试验中的抗性与 VF36 差异显著 (表 3)。

表 3 2 次独立试验中均表现明显抗性的 IL

Table 3 ILs with the resistance over two independent experiments

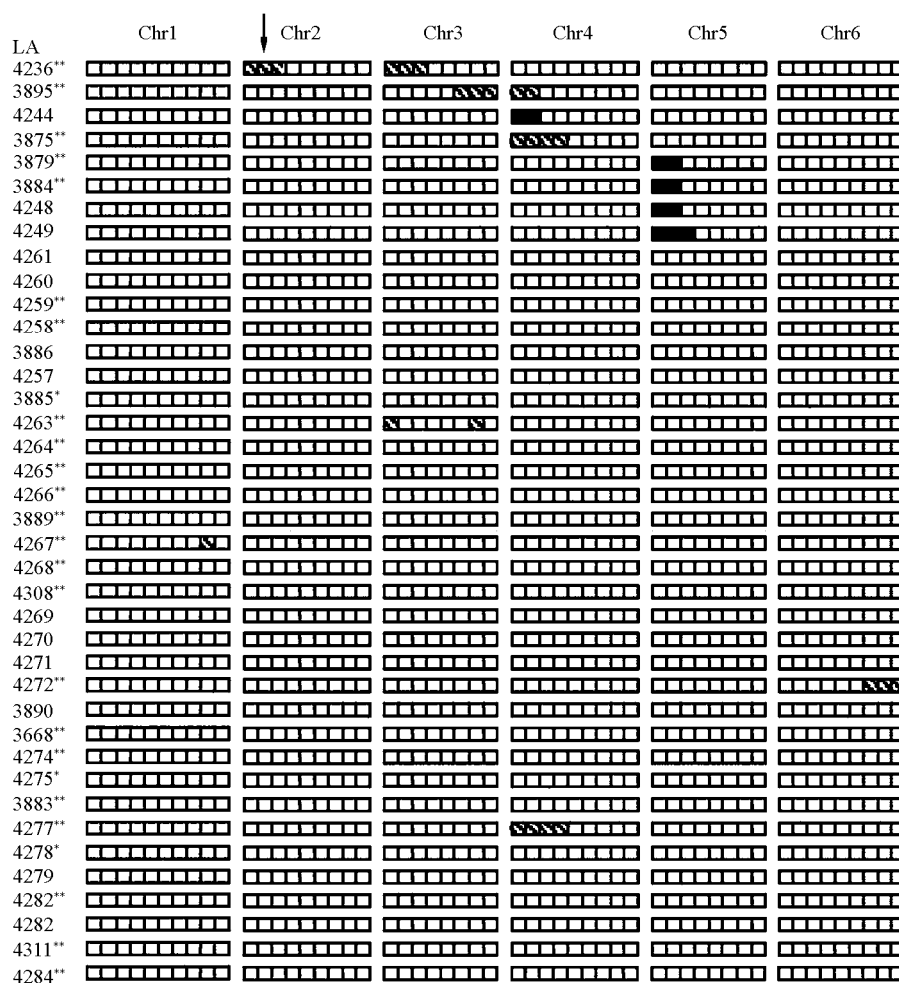
渐渗系 IL	QTL	染色体 Chromosome	侧翼标记 Flanking marker	PDI			
				试验 1 EXP1	试验 2 EXP2	试验 3 EXP3	均值 Mean
LA4236	<i>QRCMV2</i>	2	TG33 ~ TG554	-	54.7**	46.0**	50.3**
LA3884	<i>QRCMV7</i>	7	TG199 ~ TG438	63.3	68.7	31.3**	54.4*
LA3885				64.7	66.7	32.0**	54.4*
LA4258				-	-	28.7**	28.7**
LA4259				-	56.7	48.0*	52.3**
LA4263	<i>QRCMV8a</i>	8	TG624 ~ TG510	58.7	48.7**	48.7	52.0**
LA4264				62.7	48.7**	30.0**	47.1**
LA4265				58.7	56.7	38.0**	51.1**
LA4266	<i>QRCMV8b</i>	8	TG346 ~ TG294	61.3	51.3**	40.7**	51.1**
LA4267				-	-	44.8**	44.8**
LA3889				-	53.3**	47.3*	50.3**
LA3345	<i>QRCMV9a</i>	9	TG18 ~ TG9	-	-	43.3**	43.3**
LA4268				-	50.0**	39.3**	44.7**
LA4308				-	61.3	38.0**	49.7**
LA3668	<i>QRCMV10</i>	10	TG303 ~ Abg	-	-	47.3*	47.3**
LA4274				-	-	44.7**	44.7**
LA4275				-	-	52.7	52.7*
LA3883	<i>QRCMV11</i>	11	TG557 ~ TG523	60.7	66.0	32.0**	52.9**
LA4277				-	61.3	46.0**	53.7*
LA4278				72.0	52.7**	37.2**	54.0*
LA3875	<i>QRCMV12</i>	12	CT156 ~ TG473	-	-	42.7**	42.7**
LA3895				50.7	57.3	46.7*	51.6**
LA4282				48.0	52.0**	37.6**	45.9**
LA4284				-	44.0**	46.0**	45.0**
LA4311				-	47.3**	48.3*	47.8**
LA4272	未知 Unknown	9?	TG424 ~ CT220	-	51.3*	43.3**	47.3**
LA3879	未知 Unknown	11?	TG46 ~ TG393	51.1**	40.0**	30.7**	40.6**
VF36				64.0	64.2	56.0	61.4

参考 Canady 等 (2005) 构建的 *S. lycopersicoides* LA2951 的 IL 群体图谱, 这些 IL 的渗入片段分布在番茄 12 条染色体上, 如图 1 所示。

例如 LA4236, 在试验 2 和 3 中均表现稳定的抗 CMV, PDI 较 VF36 低, 差异达到极显著, 因此确定为包含抗 CMV 的 QTL, 根据染色体的位置, 命名为 *QRCMV2*; LA3884、LA3885、LA4257、LA4258、LA4259 等均含有一段第 7 染色体渗入的片段, 除 LA4257 外, 其余 4 个 IL 均与 VF36 差异达到显著或极显著, 确定这些 IL 包含一个目标 QTL, 又由于 LA4257 在 2 次试验中与 VF36 的抗性基本相当, 根据渗入片段重叠大小, 可以将该 QTL 精细定位于区间 7-D, 侧翼标记为 TG199 和 TG438。以此类推, 共定位了 8 个来自类番茄茄 LA2951 抗 CMV 的 QTL, 它们分别分布在番茄第 2、7、8、9、10、11 和 12 染色体上 (图 1)。

另外, LA3879 在 3 次试验中均表现稳定的抗性, 该 IL 共包含第 5 和 11 染色体的两个渗入片段, 根据第 5 染色体具有重叠片段的 LA4248 和 LA4249, 均表现与 VF36 基本相当的抗性, 初步确定该 IL 包含的 QTL 可能位于第 11 染色体, 然而尚需利用未获得的与该片段重叠的 LA4280, 对该 IL 的抗性 QTL 进一步确定。

同样, LA4272 也表现出稳定的抗性, 而与其片段重叠的 IL 均未表现显著且稳定的抗性, 该 IL 的抗性 QTL 也需进一步验证。



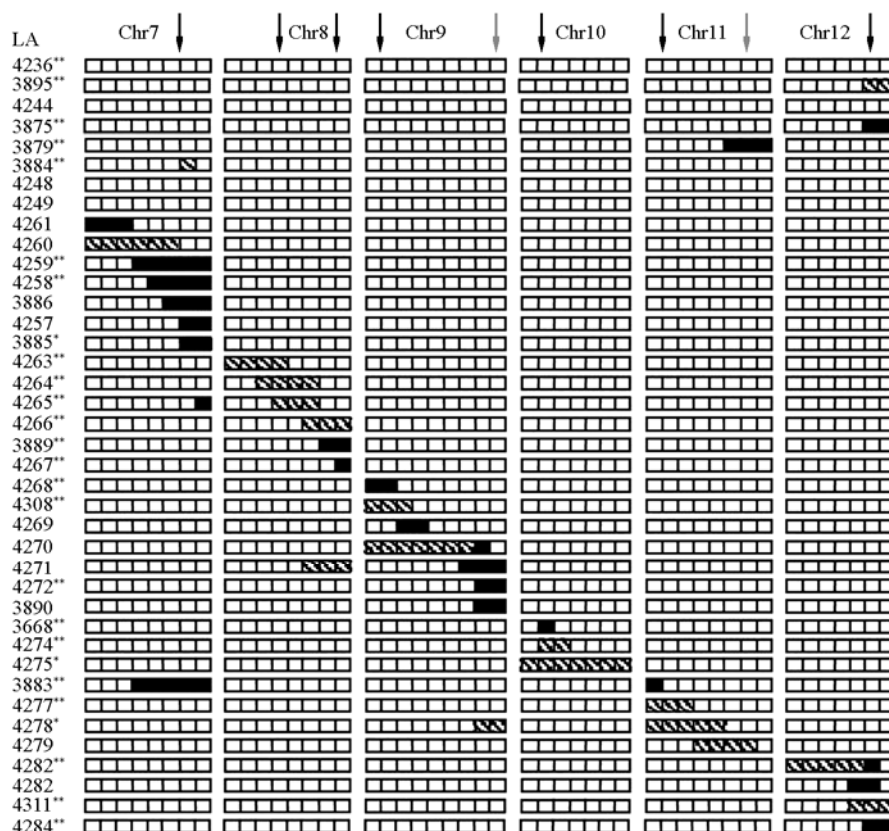


图 1 利用 *S. lycopersicoides* LA2951 的 IL 群体定位抗 CMV 的 QTL

□ 表示染色体刻度。*和**分别表示与栽培种 VF36 遗传背景比较, PDI 差异达到显著 ($P < 0.05$) 和极显著水平 ($P < 0.01$)。黑色片段表示纯合类番茄茄基因型, 斜纹片段表示杂合型。灰色箭头表示 QTL 有待于进一步验证, 黑色箭头表示已确定的 QTL。Chr 代表染色体。侧翼标记位置及染色体刻度参照 Canady 等 (2005)。

Fig. 1 The identified QTLs conferring the resistance to CMV by using *S. lycopersicoides* LA2951 IL population

□ : Scale. * and ** indicated the significant difference of PDI between IL and the control VF36 at 0.05 and 0.01 level respectively. The introgression segments in black color indicated the homozygous *S. lycopersicoides* alleles, segments with diagonals indicated the heterozygous genotype. Gray arrow indicates QTLs need to be addressed further and black arrow indicates the confirmed QTLs. Location of the flanking markers and chromosome scale were based on Canady et al. (2005).

2.3 抗 CMV QTL 遗传的初步分析

利用 VF36 × LA4264、VF36 × LA4268、VF36 × 4284 等 3 个杂交组合进行了初步试验, 以确认包含在这些 IL 中的 QTL 的遗传效应。分析结果表明, 参试的 3 个 IL 与 VF36 杂交种的 PDI 均高于各自的 IL, 低于对照 VF36, 其中 VF36 × LA4264 较 VF36 的 PDI 降低了 8.4%, VF36 × LA4268 和 VF36 × LA4284 均降低了 17.0%, 与 VF36 差异达到了 0.05% 显著水平 (图 2)。参照 Semel (2006) 方法分析, 初步证明这 3 个 IL 所包含的 QTL 为不完全显性遗传。

2.4 抗 CMV QTL 互作的初步分析

利用 LA4264 (a) × LA4268 (b)、LA4268 (a) × LA4284 (b)、LA4284 (a) × LA4264 (b) 等 3 个杂交组合进行初步试验, 以确认这些 QTL 的互作效应。所有 IL 杂交组合的 PDI 分别较对照 VF36 降低了 28.6%、79.8% 和 33.3%, 均达到了极显著差异, 也明显低于不同 IL 与 VF36 的杂交种 (图 3)。参照 Eshed 和 Zamir 的 (1996) 方法, 初步证明不同 QTL 累加呈现完全加性的效应。

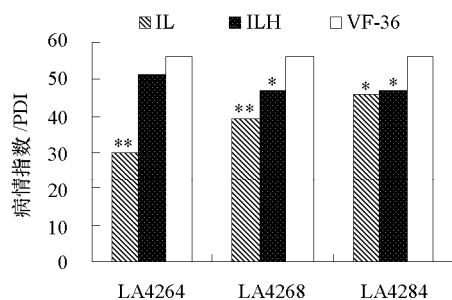


图2 QTL 遗传分析
Fig. 2 Genetic analysis of QTL

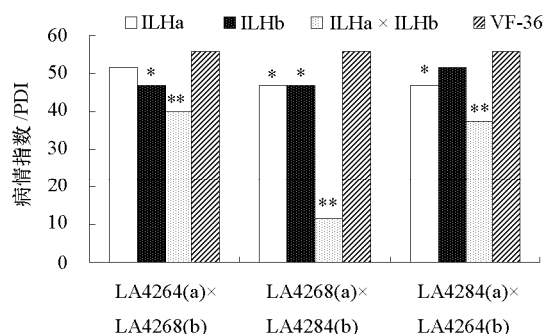


图3 不同 QTL 互作分析
Fig. 3 Interacted effect between QTLs

3 讨论

3.1 类番茄茄 LA2951 抗 CMV QTL 定位

前人研究发现,野生种类番茄茄 LA2951 及其 F_1 抗多种病毒病 (Phills et al., 1977; Chetelat, 2010),特别是高抗 CMV (Phills et al., 1977; Zhao & Qiu, 2005)。本试验中利用来自类番茄茄 LA2951 的 IL 永久群体,通过 4 次独立试验,苗期人工接种 CMV 亚组 II,对抗 CMV 的位点进行了分析,发现该野生种对 CMV 的抗性由 QTL 控制,且受环境影响。这与野生种智利番茄 *S. chilense*,多毛番茄 *S. habrochaites*,小花番茄 *S. neorickii*,潘那利番茄 *S. pennellii*,醋栗番茄 *S. pimpinellifolium*,克梅留斯基番茄 *S. chmielewskii* 等资源仅在一定条件下对 CMV 的 I 亚组表现抗性或耐性 (Akhtar et al., 2010),以及从智利番茄 *S. chilense* LA0458 定位的 *Cmr* 基因并非呈现明显的单基因遗传 (Stamova & Chetelat, 2000) 等结论相一致。说明目前已发现的野生种抗 CMV 的位点不仅存在病毒株系特异性,而且不同程度地受环境条件的影响。另外,本研究中利用的类番茄茄 LA2951 IL 群体只覆盖了约 96% 的类番茄茄 LA2951 基因组,因此一些抗性位点可能丢失;同时,由于一些 IL (13 个 IL) 的纯合状态存在不同程度的不育性,只有在杂合状态下才可以保存 (Canady et al., 2005),而本研究中所用的 IL 均属自交后代,未利用标记进行筛选,因此一些 IL 出现分离,也可能会导致抗病 QTL 的丢失;再者,一些 IL 由于缺乏与之片段重叠的 IL,其包含的 QTL 效应还需进一步验证。本研究中发现来自第 9、10 和 12 染色体的渗入片段所包含的 QTL,不管是不同的 IL 或者通过多次独立试验,均表现较稳定的抗性,而且病情指数较低,自交可育。这些片段将会为番茄抗 CMV 新品种选育奠定一定的基础。

3.2 类番茄茄 LA2951 抗 CMV QTL 遗传效应及互作

渐渗系群体不仅为 QTL 定位提供了有利的工具,而且为分析 QTL 的遗传效应及互作奠定了良好的基础。Gur 和 Zamir (2004) 利用来自野生种 *S. pennellii* LA0716 的渐渗系发现,无论在杂合及纯合状态下,IL7-5-5 有利于提高产量的 QTL 表现为显性;而 IL8-3 只有杂合状态下才表现明显的超显性;IL9-2-5 却呈现典型的加性效应。本试验中对抗 CMV 的 QTL,包括 LA4264、LA4268、LA4284 系包含的 *QRCMV8a*、*QRCMV9a*、*QRCMV12* 等遗传分析结果表明,这些 QTL 的遗传效应均表现不完全显性,这与 Stamova 和 Chetelat (2000) 估测类番茄茄对 CMV 的抗性为不完全显性,易受环境影响相一致。Eshed 和 Zamir (1996) 利用来自 *S. pennellii* LA0716 的渐渗系研究发现,影响产量的 QTL 互作表现明显小于加性的遗传效应。而本研究发现,不同抗 CMV 的 QTL 累加呈完全加性的效

应。上述结果不仅进一步确认了试验中定位的 QTL 的抗性, 而且其遗传呈现不完全显性及互作呈现完全加性效应, 这将会为育成抗 CMV 的番茄品种提供便利条件。

3.3 不同野生种番茄抗 CMV 基因/QTL 的同位分析

本试验中利用类番茄茄 LA2951 的 IL 群体鉴定出位于番茄第 2、7、8、9、10、11 和 12 染色体上的 8 个 QTL。前人研究发现, 来自 *S. chilense* LA0458 的抗 CMV 显性基因 *Cmr* 位于番茄第 12 染色体标记 TG180 和 TG565 间 (Stamova & Chetelat, 2000), 根据番茄遗传连锁图谱 Tomato-EXPEN 2000, 该区域位于第 12 染色体 9.00 ~ 57.60 cM 之间。而本研究中定位到的 QTL 位于第 12 染色体标记 CT156 和 TG473 间、即 97.00 ~ 117.00 cM 之间, 与 *Cmr* 基因不同位。另外, 来自 *S. habrochaites* LA1777 的抗 CMV 位点位于第 6 染色体上标记 TG164 和 *sp* 间 (Cillo et al., 2007)。因此, 通过比较分析发现, 来自 *S. lycopersicoides* LA2951 的抗 CMV 位点与上述两个野生种鉴定的位点均不同位, 为抗 CMV 的新位点。

3.4 茄科蔬菜作物抗不同类型病毒病基因/QTL 的同位分析

病毒不仅种类繁多, 而且株系变异较快。茄科蔬菜特别是番茄、辣椒、马铃薯等作物最易受到病毒的危害。在公认的植物前 10 种病毒中, 危害番茄的病毒占 6 种 (Scholthof et al., 2011)。类番茄茄 LA2951 被证明抗多种病毒 (Phills et al., 1977; Zhao et al., 2005; Chetelat, 2010), 这些病毒不仅种类不同, 而且一些病毒对不同茄科蔬菜均可侵染。作者也对类番茄茄 LA2951 抗番茄黄化曲叶病毒 (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) 的 QTL 进行了定位, 通过比较发现 LA3879、LA3895、LA4311 等兼抗 TYLCV 和 CMV, 虽然 LA3879 所包含的 QTL 尚需进一步确定, 但 LA3895 和 LA4311 包含的抗 CMV 的位点 *QRCMV12* 与抗 TYLCV 的位点 *QRTY12* 同位 (宗园园 等, 2012)。另外, 现已定位了番茄、甜椒、辣椒、马铃薯等作物抗不同类型病毒的基因/QTL。由于茄科作物基因组具有较高的共线性 (<http://solgenomics.net/>), 根据基因组信息发现, 上述几种茄科蔬菜作物可能包含抗不同类型病毒的同位基因/QTL, 包括第 2 染色体上的番茄抗番茄花叶病毒的 *Tm-1*、甜椒抗 CMV 的 *Cmr1* 及本研究鉴定的抗 CMV 的 QTL *QRCMV2* (Levesque et al., 1990; Ohmori et al., 1996; Kang et al., 2010); 第 3 染色体上的番茄抗马铃薯 Y 病毒位点 *Pot-1*、辣椒抗 PVY 的位点 *pvr1* 和甜椒抗 PVY 位点 *pvr2/pvr5* (Murphy et al., 1998; Parrella et al., 2002); 第 4 染色体上的番茄抗 TYLCV 的 *Ty-5*、*QRTY4* 和甜椒抗 CMV 的 QTL *cmv5.1* (Caranta et al., 2002; Anbinder et al., 2009; 宗园园 等, 2012); 第 8 染色体上的马铃薯抗马铃薯 S 病毒的 *Ns* 与本研究鉴定的 *QRCMV8* (Marczewski et al., 2002); 第 11 染色体 a 区马铃薯抗马铃薯 Y 病毒的基因 *Ry_{adg}*、抗马铃薯 A 病毒的基因 *Ra_{adg}* 和抗马铃薯卷叶病毒的 QTL *PLRV.1* (Hämäläinen et al., 1997, 1998; Marczewski et al., 2001); 第 11 染色体 b 区马铃薯抗马铃薯 Y 病毒的基因 *Ry_{sto}*、抗马铃薯 M 病毒的基因 *Rm* 和甜椒抗 CMV 的 QTL *cmv6.1* (Brigneti et al., 1997; Chaim et al., 2001; Marczewski et al., 2006)。这些位点为阐明茄科植物抗不同类型病毒机制提供了可能。仅就番茄来看, 抗不同类型病毒的绝大多数基因/QTL 不同位, 说明不仅抗病毒机制不同, 而且抗多种病毒新品种的育成需要聚合多个位点, 将会是一项较大工程。

References

- Abad J, Anastasio G, Fraile A, García-Arenal F. 2000. A search for resistance to *Cucumber mosaic virus* in the genus *Lycopersicon*. *Journal of Plant Pathology*, 82 (1): 39 - 48.
- Akhtar K P, Saleem M Y, Asghar M, Ahmad M, Sarwar N. 2010. Resistance of *Solanum* species to *Cucumber mosaic virus* subgroup IA and its vector *Myzus persicae*. *European Journal of Plant Pathology*, 128 (4): 435 - 450.
- Anbinder I, Reuveni M, Azari R, Paran I, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Lapidot M, Levin I. 2009. Molecular dissection of *Tomato leaf curl virus*

- resistance in tomato line TY172 derived from *Solanum peruvianum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 519 – 530.
- Brigneti G, Garcia-Mas J, Baulcombe D. 1997. Molecular mapping of the potato virus Y resistance gene *Ry_{sto}* in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (2): 198 – 203.
- Canady M A, Meglic V, Chetelat R T. 2005. A library of *Solanum lycopersicoides* introgression lines in cultivated tomato. *Genome*, 48 (4): 685 – 697.
- Caranta C, Pflieger S, Lefebvre V, M Daubèze A, Thabuis A, Palloix A. 2002. QTLs involved in the restriction of *Cucumber mosaic virus* (CMV) long-distance movement in pepper. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 586 – 591.
- Chaerani R, Groenwold R, Stam P, Voorrips R E. 2007. Assessment of early blight (*Alternaria solani*) resistance in tomato using a droplet inoculation method. *Journal of General Plant Pathology*, 73 (2): 96 – 103.
- Chaim A B, Grube R, Lapidot M, Jahn M, Paran I. 2001. Identification of quantitative trait loci associated with resistance to *Cucumber mosaic virus* in *Capsicum annuum*. *Theoretical and Applied Genetics*, 102 (8): 1213 – 1220.
- Chang Bo, Xiang Ben-chun, Liu Sheng-xue, Han Sheng. 2006. Cloning and sequence analysis of coat protein gene of *Cucumber mosaic virus* isolate from stripe and necrosis virus of processing tomatoes in Xinjiang. *Journal of Shihezi University: Natural Science*, 24 (4): 410 – 414. (in Chinese)
- 常波, 向本春, 刘升学, 韩盛. 2006. 新疆加工番茄条斑坏死病原黄瓜花叶病毒外壳蛋白基因的克隆和序列分析. *石河子大学学报: 自然科学版*, 24 (4): 410 – 414.
- Chen Shao-ning, Chen Ji-shuang, Wu Peng, Du Zhi-you, Zhu Wei-min. 2007. Characterization of viruses causing necrosis disease on tomato. *Acta Phytopathologica Sinica*, 37 (4): 377 – 382. (in Chinese)
- 陈绍宁, 陈集双, 吴鹏, 杜志游, 朱为民. 2007. 引起番茄植株坏死病的病毒研究. *植物病理学报*, 37 (4): 377 – 382.
- Chetelat R T. 2010. TGRC annual progress report. California: Tomato Genetics Resource Center.
- Chetelat R T, Cisneros P, Stamova L, Rick C M. 1997. A male-fertile *Lycopersicon esculentum* × *Solanum lycopersicoides* hybrid enables direct backcrossing to tomato at the diploid level. *Euphytica*, 95: 99 – 108.
- Cillo F, Pasciuto M M, De Giovanni C, Finetti-Sialer M M, Ricciardi L, Gallitelli D. 2007. Response of tomato and its wild relatives in the genus *Solanum* to *Cucumber mosaic virus* and satellite RNA combinations. *Journal of General Virology*, 88 (11): 3166 – 3176.
- Davis J, Yu D, Evans W, Gokirmak T, Chetelat R T, Stotz H U. 2009. Mapping of loci from *Solanum lycopersicoides* conferring resistance or susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 119: 305 – 314.
- Doolittle S. 1916. A new infectious mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6: 145 – 147.
- Eshed Y, Zamir D. 1996. Less-than-additive epistatic interactions of quantitative trait loci in tomato. *Genetics*, 143: 1807 – 1817.
- Feng Lan-xiang, Yang Cui-rong. 2000. The identification of subgroup of CMV from tomato in China by DAS-ELISA. *Acta Horticulturae Sinica*, 27 (6): 418 – 422. (in Chinese)
- 冯兰香, 杨翠荣. 2000. 中国番茄黄瓜花叶病毒血清组的鉴定. *园艺学报*, 27 (6): 418 – 422.
- Finkers R, van den Berg P, van Berloo R, ten Have A, van Heusden A W, van Kan J A, Lindhout P. 2007. Three QTLs for *Botrytis cinerea* resistance in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 585 – 593.
- Gal-On A, Wolf D, Wang Y, Faure J E, Pilowsky M, Zelcer A. 1998. Transgenic resistance to cucumber mosaic virus in tomato: Blocking of long-distance movement of the virus in lines harboring a defective viral replicase gene. *Phytopathology*, 88 (10): 1101 – 1107.
- Guimaraes R L, Chetelat R T, Stotz H U. 2004. Resistance to *Botrytis cinerea* in *Solanum lycopersicoides* is dominant in hybrids with tomato, and involves induced hyphal death. *European Journal of Plant Pathology*, 110: 13 – 23.
- Gur A, Zamir D. 2004. Unused natural variation can lift yield barriers in plant breeding. *PLoS Biology*, 2 (10): 1610 – 1615.
- Hämäläinen J, Watanabe K, Valkonen J, Arihara A, Plaisted R, Pehu E, Miller L, Slack S. 1997. Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theoretical and Applied Genetics*, 94 (2): 192 – 197.
- Hämäläinen J, Sorri V, Watanabe K, Gebhardt C, Valkonen J. 1998. Molecular examination of a chromosome region that controls resistance to potato Y and A potyviruses in potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 96 (8): 1036 – 1043.
- Jagger I C. 1916. Experiments with the cucumber mosaic disease of cucumber. *Phytopathology*, 6: 148 – 151.
- Kang W H, Hoang N H, Yang H B, Kwon J K, Jo S H, Seo J K, Kim K H, Choi D, Kang B C. 2010. Molecular mapping and characterization of a single dominant gene controlling CMV resistance in peppers (*Capsicum annuum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 120 (8): 1587 – 1596.
- Levesque H, Vedel F, Mathieu C, de Courcel A. 1990. Identification of a short rDNA spacer sequence highly specific of a tomato line containing

- Tm-1* gene introgressed from *Lycopersicon hirsutum*. Theoretical and Applied Genetics, 80 (5): 602 - 608.
- Lin C Y, Ku H M, Tsai W S, Green S K, Jan F J. 2010. Resistance to a DNA and a RNA virus in transgenic plants by using a single chimeric transgene construct. Transgenic Research, 20 (2): 261 - 270.
- Marczewski W, Flis B, Syller J, Schäfer-Pregl R, Gebhardt C. 2001. A major quantitative trait locus for resistance to *Potato leafroll virus* is located in a resistance hotspot on potato chromosome XI and is tightly linked to *N*-gene-like markers. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14 (12): 1420 - 1425.
- Marczewski W, Hennig J, Gebhardt C. 2002. The *Potato virus S* resistance gene *Ns* maps to potato chromosome VIII. Theoretical and Applied Genetics, 105 (4): 564 - 567.
- Marczewski W, Strzelczyk-Żyta D, Hennig J, Witek K, Gebhardt C. 2006. Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to potato virus M. Theoretical and Applied Genetics, 112 (7): 1232 - 1238.
- Murphy J F, Blauth J R, Livingstone K D, Lackney V K, Jahn M K. 1998. Genetic mapping of the *pvr1* locus in *Capsicum* spp. and evidence that distinct potyvirus resistance loci control responses that differ at the whole plant and cellular levels. Molecular Plant-Microbe Interactions, 11 (10): 943 - 951.
- Ohmori T, Murata M, Motoyoshi F. 1996. Molecular characterization of RAPD and SCAR markers linked to the *Tm-1* locus in tomato. Theoretical and Applied Genetics, 92 (2): 151 - 156.
- Palukaitis P, Roossinck M J, Dietzgen R G, Francki R I. 1992. *Cucumber mosaic virus*. Advances in Virus Research, 41: 281 - 348.
- Parrella G, Ruffel S, Moretti A, Morel C, Palloix A, Caranta C. 2002. Recessive resistance genes against potyviruses are localized in colinear genomic regions of the tomato (*Lycopersicon* spp.) and pepper (*Capsicum* spp.) genomes. Theoretical and Applied Genetics, 105: 855 - 861.
- Phills B R, Provvidenti R, Robinson R W. 1977. Reaction of *Solanum lycopersicoides* to vital diseases of the tomato. Tomato Genetics Cooperative Report, 27: 18.
- Scholthof K B G, Adkins S, Czosnek H, Palukaitis P, Jacquot E, Hohn T, Hohn B, Saunders K, Candresse T, Ahlquist P, Hemenway C, Foster G D. 2011. Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. Molecular Plant Pathology, 12: 938 - 954.
- Semel Y. 2006. From the cover: Overdominant quantitative trait loci for yield and fitness in tomato. Proceedings of the National Academy of Sciences, 103 (35): 12981 - 12986.
- Stamova B S, Chetelat R T. 2000. Inheritance and genetic mapping of *Cucumber mosaic virus* resistance introgressed from *Lycopersicon chilense* into tomato. Theoretical and Applied Genetics, 101: 527 - 537.
- Sudhakar N, Nagendra-Prasad D, Mohan N, Murugesan K. 2006. First report of *Cucumber mosaic virus* subgroup II infecting *Lycopersicon esculentum* in India. Plant disease, 90 (11): 1457 - 1457.
- Wahyuni W S, Dietzgen R G, Hanada K, Francki R I B. 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of *Cucumber mosaic virus*. Plant Pathology, 41 (3): 282 - 297.
- Yang Yang, Tang Qing-lin, Song Ming. 2005. The headway on research in resistance CMV of tomato crops. Southwest Horticulture, 33: 79 - 81. (in Chinese)
- 杨洋, 汤青林, 宋明. 2005. 番茄 CMV 抗性育种主要进展. 西南园艺, 33: 79 - 81.
- Zhang Chun-zhi, Liu Lei, Sun Yu-yan, Zhou Long-xi, Yang Yu-hong, Xie Bing-yan, Li Jun-ming. 2012. Identification of QTLs conferring resistance to late blight in *Solanum lycopersicoides* LA2951 introgression line population. Scientia Agricultura Sinica, 45 (6): 1093 - 1105. (in Chinese)
- 张春芝, 刘磊, 孙玉燕, 周龙溪, 杨宇红, 谢丙炎, 李君明. 2012. 利用类番茄茄 LA2951 渐渗系群体鉴定番茄抗晚疫病 QTL. 中国农业科学, 45 (6): 1093 - 1105.
- Zhao L, Qiu C. 2005. Investigation of disease resistance and cold tolerance of *Solanum lycopersicoides* for tomato improvement. HortScience, 40 (1): 43 - 46.
- Zong Yuan-yuan, Liu Lei, Li Tao, Sayed Rashad Ali Shah, Zhou Long-xi, Sun Yu-yan, Zheng Zheng, Zheng Qi-gong, Fan Shu-ying, Li Jun-ming. 2012. Mapping of QTLs conferring the resistance to *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) in *Solanum lycopersicoides*. Acta Horticulturae Sinica, 39 (5): 915 - 922. (in Chinese)
- 宗园园, 刘磊, 李涛, Sayed Rashad Ali Shah, 周龙溪, 孙玉燕, 郑峥, 郑启功, 范淑英, 李君明. 2012. 类番茄茄抗番茄黄花曲叶病毒 QTL 的定位. 园艺学报, 39 (5): 915 - 922.