

利用大白菜 DH群体构建 AFLP遗传连锁图谱

张晓芬^{1,2} 王晓武^{1*} 娄平¹ 张晓伟³ 王永清² 原玉香³ 赵建军^{1,4} 孙日飞¹

(¹中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ²四川农业大学林学院园艺学院, 雅安 625014; ³河南省农业科学院生物技术研究所, 郑州 450002; ⁴河北农业大学园艺学院, 保定 071001)

摘要: 以大白菜 '汴早 - 26' 和 '光 90E16' 的 F₁ 代进行游离小孢子培养所获得的含有 59 个株系的 DH 群体为试材, 利用 AFLP 技术通过 63 对引物筛选共获得 346 个 AFLP 多态性标记, 运用 JoinMap 3.0 软件构建大白菜遗传连锁图谱。该图谱主要包括 10 个连锁群, 总图距为 708 cM, 平均图距为 2.0 cM。

关键词: 大白菜; DH 群体; AFLP; 遗传连锁图谱

中图分类号: S 634.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 03-0443-06

An AFLP-based Genetic Linkage Map of Chinese Cabbage Using Double Haploid (DH) Population

Zhang Xiaofen^{1,2}, Wang Xiaowu¹, Lou Ping¹, Zhang Xiaowei³, Wang Yongqing², Yuan Yuxiang³, Zhao Jianjun^{1,4}, and Sun Rifei¹

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² College of Horticulture and Forestry, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China; ³ Institute of Biotechnology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; ⁴ College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China)

Abstract: A genetic linkage map of *B. rassaica rapa* was constructed using AFLP markers, based on a F₁-derived doubled-haploid (DH) population with 59 lines. The map consists of 10 main linkage groups, including 346 AFLP markers generated by 63 primer combinations, and covers 708 cM with an average genetic distance of 2.0 cM.

Key words: Chinese cabbage; Double haploid; AFLP; Genetic linkage map

大白菜 [*B. rassaica rapa* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson] 起源于中国, 是中国栽培和食用面积最大的蔬菜作物。白菜类的遗传作图研究始于 20 世纪 90 年代, Song 等^[1]以大白菜 (Michihili) 及其变种 (Spring broccoli) 杂交的 F₂ 代群体为试材, 构建了第 1 张白菜类作物 RFLP 图谱; Matsumoto 等^[2]以大白菜的 DH 群体为材料, 构建了含有 63 个 RFLP 标记、覆盖基因组长度 735 cM 的遗传图谱; 张鲁刚等^[3]以芜菁和大白菜杂交的 F₂ 群体为材料通过 RAPD 技术构建了国内第 1 张连锁图谱; 于拴仓等^[4]以大白菜重组自交系为作图群体, 构建了含 265 个 AFLP 标记和 87 个 RAPD 标记的连锁图谱, 王美等^[5]利用大白菜 DH 群体构建的遗传图谱包括 346 个标记, 连锁群总长为 809.1 cM, 平均图距为 2.2 cM。这些遗传图谱利用的有 F₂ 群体、DH 群体及重组自交系, 采用 RFLP、RAPD 及 AFLP 等标记。本研究以大白菜不同品种杂交后代进行游离小孢子培养所获得的 DH 群体为试材, 运用 AFLP 标记技术构建了中国大白菜较高密度遗传图谱, 为大白菜分子育种及重要农艺性状的定位奠定基础。

1 材料与方法

1.1 作图群体

以大白菜 '汴早 - 26' 和 '光 90E16' 的杂交后代游离小孢子培养获得的 DH 群体为试材。'汴

收稿日期: 2004 - 07 - 22; 修回日期: 2004 - 10 - 09

基金项目: 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室资助项目

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangxw@mail.caas.net.cn)

早 - 26' 自交亲和指数低, 早熟, 叶面有毛 (毛叶), 抽薹性一般, 叶色较浅, 不耐热, 抗病, 包球类型为叠抱, 球稍高。'光 90E16' 自交亲和, 抗软腐病, 叠抱, 球略扁圆 (类似甘蓝)。DH群体为 59 个株系, 由河南省农业科学院生物技术研究所提供。

1.2 基因组总 DNA 的提取

取大白菜鲜嫩幼叶 90 ~ 100 mg, 采用 Retch 磨样机磨样, DNA 的提取采用改良的 CTAB 法。

1.3 AFLP 分析

AFLP 的分析参照 Vos 等^[6]的方法。本研究采用远红外荧光标记的 E + 3 和非荧光标记的 M + 3 引物组合进行选择扩增, 选择性扩增反应体系为 10 μ L, 包括 5 μ L 预扩增产物 30 倍稀释液、0.5 U Taqase、1 μ L 10 \times PCR buffer、15 mmol/L MgCl₂、2 mmol/L dNTPs、15 ng Mse 引物和 0.5 μ L 1.0 mmol/L RD 荧光标记引物。选择性扩增产物加等量 10 \times loading buffer, 于 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 在冰上迅速冷却。运用 LICOR 公司的 NEN Global Edition R² DNA Analyzer (Model 5200 LICOR Biosciences, Lincoln, NE) 检测 DNA 多态性。在 6% 变性聚丙烯酰胺胶上电泳 2.5 h, 荧光扫描获得 DNA 多态性图片。

1.4 数据统计与分析

分离后代中条带与母本相同的记为 "a", 与父本相同的记为 "b", 带型不清或缺失者记为 "n"。运用 JoinMap 3.0 构建遗传图谱, 先用 "New Project" 命令创建一个新的文件夹, "Load data" 命令导入标记数据, 再用命令 "Individual genot freq" 排除缺失数据过多的单株, 用 "Locus genot freq" 命令分析标记的偏分离情况, 然后用 Group 命令进行分组, 最后用 Map 命令构建连锁图谱, 采用 Kosambi 函数计算图距。

2 结果与分析

2.1 引物筛选

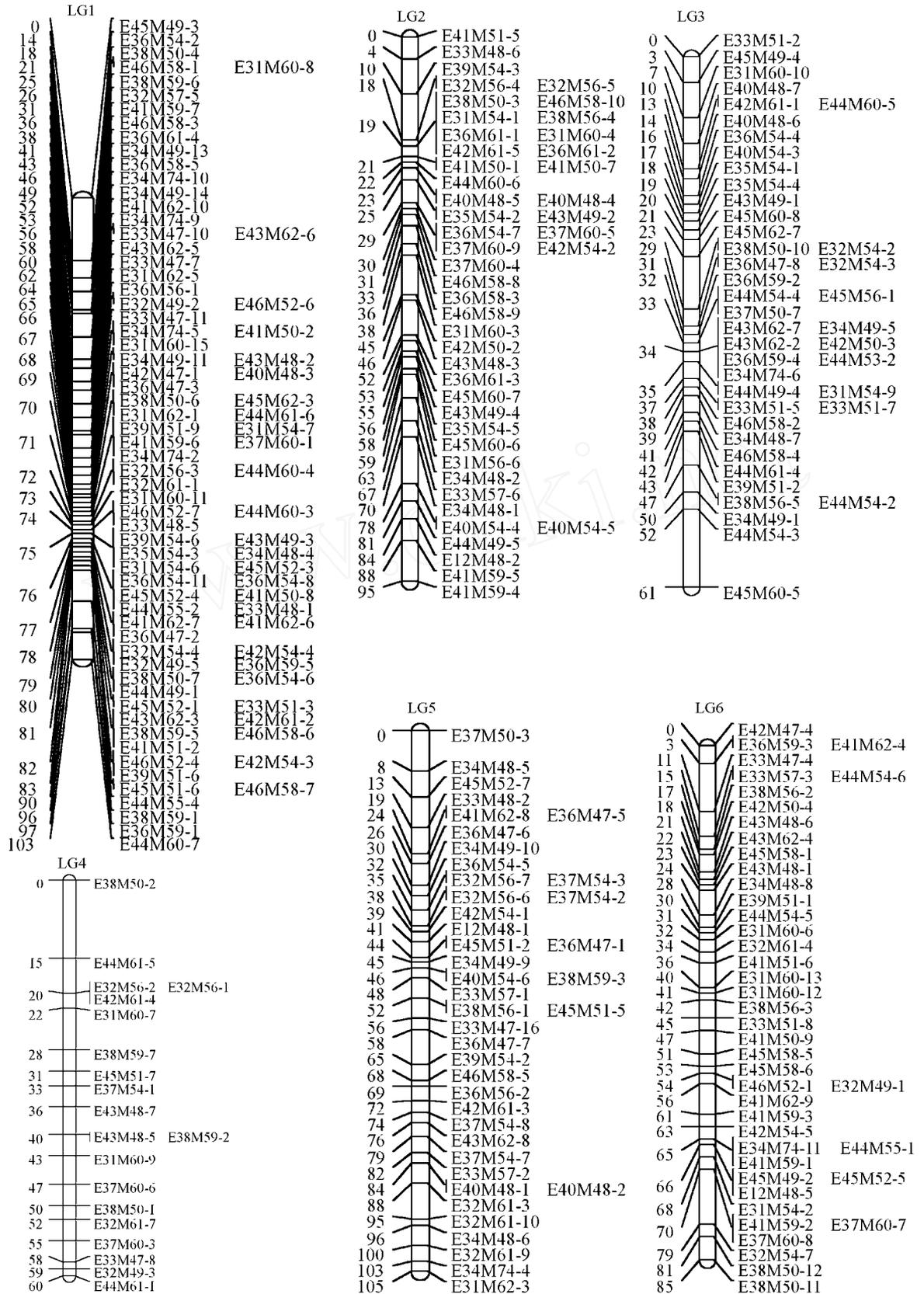
采用 (E + 3) / (M + 3) 引物组合 (其中 E + 3 为荧光标记引物) 进行 AFLP 分析。首先利用双亲对 16 个荧光标记引物和 16 个非荧光标记引物产生的 256 对引物组合进行筛选, 共筛选出 83 对多态性较好的引物组合, 多态性标记共有 482 个, 平均每个引物组合产生多态性标记 5.8 个。本研究运用其中的 63 对引物组合进行 AFLP 分析, 共产生多态性标记 426 个, 平均每对引物组合产生多态性标记 6.8 个。

2.2 AFLP 标记的分离

对获得的 426 个 AFLP 标记进行分析, 其中有 165 个标记来自母本 '汴早 - 26', 150 个标记来自父本 '光 90E16'。该 DH 群体中, 50.9% ($P < 0.05$) 的标记表现为 1:1 的分离比率, 符合孟德尔分离比例。在偏分离的 210 个标记中, 127 个标记位点来自 '汴早 - 26', 83 个位点来自 '光 90E16'。

2.3 分子连锁图谱的构建

利用 JoinMap 3.0 软件对该群体进行连锁分析, 获得包含 10 个连锁群, 长度为 708 cM, 平均图距为 2.0 cM 的连锁图谱 (图 1, 表 1)。10 个连锁群长度在 39.0 ~ 105.0 cM 之间, 其中 LG5 最长 105 cM, LG9 最短 39 cM。各连锁群平均图距集中在 1.18 ~ 4.33 cM 之间, LG1 平均图距仅为 1.18 cM, LG9 平均图距 4.33 cM。连锁群上分子标记数平均 34.6 个, LG1 上分子标记数最多, 为 87 个, LG9 分子标记数分布最少, 只有 9 个。AFLP 分子标记在连锁群上的分布不均匀, 在 LG1、LG6 和 LG7、LG9 及 LG10 上分别出现了 15、14 和 10 cM 的空隙, 而在 LG2、LG3, 同时在 LG1 和 LG10 出现了不同程度的分子标记密集区。其中在 LG1 的 14 ~ 83 cM 区段, 分布有 1 个标记密集区, 包括 81 个标记, 平均图距为 0.85 cM, 同时在 LG1 有 1 个 14 cM 的空隙; 在 LG2 有两个标记密集区, 1 个在 18 ~ 25 cM 区段, 分布有 17 个标记, 平均图距 0.41 cM, 另一个在 29 ~ 38 cM 区段, 包括 9 个标记, 平均图



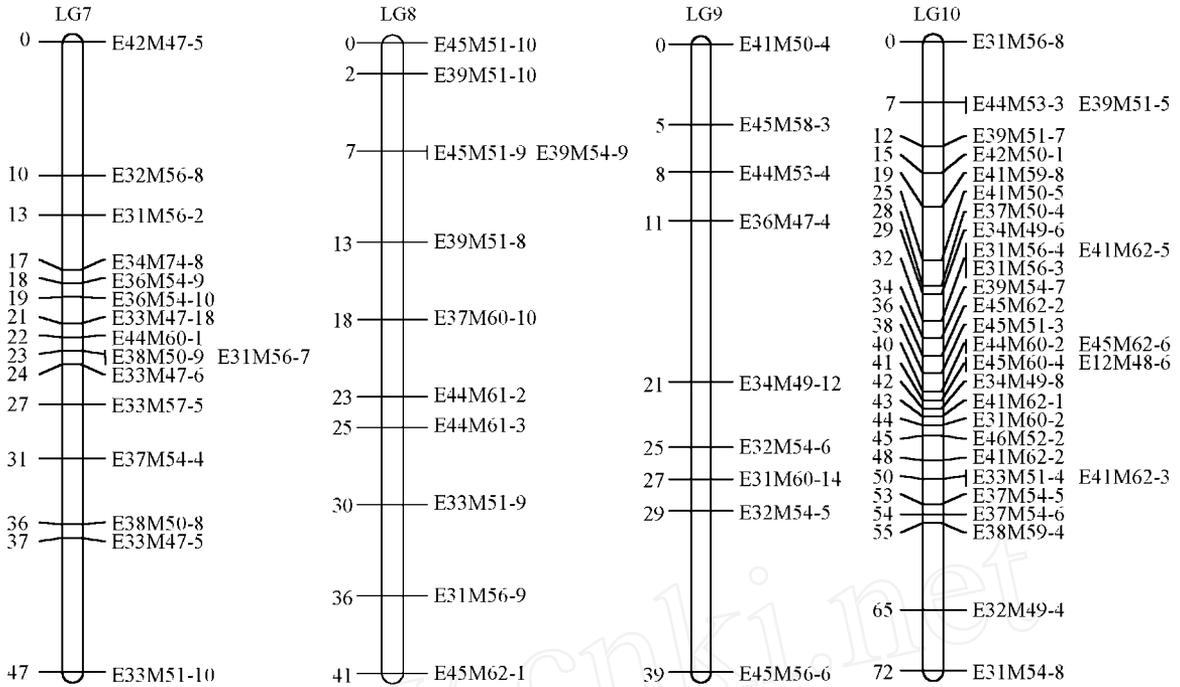


图 1 大白菜 AFLP遗传连锁图谱

左侧为绝对图距 (cM), 右侧为分子标记 (用引物组合名称加该标记在电泳图中的排序表示)。

Fig. 1 Linkage map of Chinese cabbage based on AFLP markers

Genetic distances in centMorgans are indicated on the left side of the linkage groups and locus names are on the right side.

距 1.0 cM, LG2上未出现较大的空隙, 最大空隙为 8 cM; 在 LG3的 29~43 cM区段, 出现 1个标记密集区, 含 24个标记, 平均图距 0.58 cM, 出现的最大空隙为 9 cM, LG3的其它区域标记分布比较均匀; LG4只有 1个标记密集区, 在 65~70 cM之间, 分布有 10个标记, 平均图距 0.50 cM, 最大空隙为 9 cM, 在 LG4的其它区域标记分布较均匀。

在 426个 AFLP标记中, 有 80个标记未进入连锁群, 未连锁标记比率为 18.78%。连锁并进入遗传图谱的偏分离标记集中分布在几个连锁群上, 其中在 LG1上聚集了 61个偏分离标记, LG2和 LG5上分别有 18个和 12个偏分离标记, 在其他的连锁群上也有零星分布。

表 1 大白菜分子遗传图谱的基本特征

Table 1 Main characteristic of genetic linkage map of Chinese cabbage

连锁群 Linkage group	长度 Length (cM)	分子标记数 Number of markers	平均图距 Average distance (cM)	偏分离标记数 Number of distorted markers
LG1	103	87	1.18	61
LG2	95	46	2.07	18
LG3	61	43	1.42	6
LG4	85	43	1.98	8
LG5	105	41	2.56	12
LG6	60	20	3.00	1
LG7	47	16	2.94	9
LG8	41	11	3.73	2
LG9	39	9	4.33	2
LG10	72	31	2.32	3
总计 Total	708	346	2.00	122

3 讨论

本研究虽然使用了较少的 DH系, 但获得了一个覆盖率和标记密度较高的遗传图谱。原因在于充分考虑了遗传标记数目和图谱精度之间的合理平衡, 保证了在一定精度的条件下获得高密度的遗传图谱。理论上, 在一个 59个株系的群体中发生 1个交换, 检测到的图距约为 1.7 cM, 本研究建立的遗传图谱平均图距为 2.0 cM, 与该预期值接近。作为骨架图, 该遗传密度已能满足大多数研究的需求。

本研究获得的遗传图谱覆盖基因组长度 708 cM, 与 Ajisaka等^[7]用白菜品种间的组合 (覆盖基因组长度 860 cM, 115个 RAPD标记和 2个同工酶标记)、Matsumoto等^[2]以大白菜 DH群体为作图群体

所构建的连锁图谱 (735 cM, 63个 RFLP标记) 和王美等^[5]利用大白菜 DH群体构建的图谱 (809.1 cM, 263个 AFLP标记、150个 RAPD标记和 17个 SSR标记) 相近, 而与 Song等^[1]以大白菜 (1 850 cM, 360个标记), 张鲁刚等^[3]以芜菁和大白菜杂交的 F₂ 群体 (1 632.4 cM, 99个 RAPD标记) 及于拴仓等^[4]利用大白菜重组自交系所构建的连锁图 (2 665.7cM, 224个 AFLP标记和 79个 RAPD标记) 相差较大。这主要是因为以往所构建的图谱实际上大都是利用 Haldane函数计算图距, 而本研究采用 Kosambi函数来计算遗传图谱的图距。

AFLP标记在该遗传连锁图上的分布不太均匀, 在 LG1、LG6、LG7、LG9和 LG10上分别出现了大于 10 cM的空隙, 可以选择在空隙区域上有差异的双亲来建立作图群体, 构建遗传图谱以相互补充。而在 LG1、LG2、LG3、LG4、LG5和 LG10上则出现了不同程度的标记聚集区。本研究采用的是 EcoR I Mse I AFLP标记, 这种标记检测的位点多聚集在着丝粒两侧甲基化程度较高的重复序列区域。在以往的研究中也出现了这种现象, 在大白菜^[4,5]、马铃薯^[8]、大麦^[9]、大豆^[10]上均发现了 EcoR I Mse I AFLP标记簇。聚集的原因尚不太清楚, 可能与异染色质区重组率低有关, 也有观点认为由于 EcoR I Mse I限制性酶切位点在异染色质区分布不均匀, 还有观点认为是由于高度重复序列在着丝粒及端粒附近区域的分布导致 AFLP标记的聚集^[11-13]。可以采用其它的内切酶组合如 Pst I Mse I或利用其它特性互补的分子标记如 SSR分子标记构建图谱以相互补充。

在 426个 AFLP标记中, 有 210个标记表现为偏分离, 占总标记数的 49.3%。高于 Song等^[1]的 3.0%、Chyi等^[14]的 24.0%、Teutonico等^[15]的 23.0%、Matsumoto等^[2]的 19.0%及于拴仓等^[4]的 13.9%, 与王美等^[5]的 42.5%相差不大。这可能与所用作图群体为 DH群体有关。DH群体的获得受遗传因素影响较大, 小孢子胚状体的发生会对基因型产生选择效应, 从而破坏 DH群体完整的遗传结构, 造成偏分离现象。在本研究中, 偏分离标记聚集出现, 主要分布在 LG1、LG2和 LG5上。

白菜类蔬菜的遗传图谱到目前为止已构建了 10余个, 但饱和度均不高, 对于 QTL分析等不具备实际的应用价值, 而且大部分是在不同的实验室利用 F₂等不同的作图群体构建的, 相互之间难以参考利用。遗传图谱的整合能大大增加标记位点的数量和有效作图群体的大小, 特别是分子遗传图谱与经典遗传图谱的整合, 对于重要经济性状的准确定位和图位克隆目的基因等都是十分必要的。本项研究以大白菜 DH永久性群体为作图群体, 采用的 (E + 3) / (M + 3) 引物组合及 AFLP分析技术均为大家所公用, 同时所构建的分子连锁图谱的平均图距为 2.0cM, 饱和度较高, 这些都为本研究所建分子连锁图应用于遗传图谱的整合及基因定位奠定了良好的基础。

参考文献:

- 1 Song KM, Suzuki J Y, Slocum M K, Williams P H, Osborn T C. A linkage map of *B. rassaica rapa* base on restriction fragment length polymorphism loci Theor Appl Genet, 1991, 82: 296 ~ 304
- 2 Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*B. rassaica rapa* ssp. *pekinensis*). Euphytica, 1998, 104: 2, 79 ~ 86
- 3 张鲁刚, 王 鸣, 陈 杭, 刘 玲. 中国白菜 RAPD分子遗传图谱的构建. 植物学报, 2000, 42 (5): 484 ~ 489
Zhang L G, Wang M, Chen H, Liu L. Construction of RAPD's molecular genetic map of Chinese cabbage. Acta Botanica Sinica, 2000, 42 (5): 485 ~ 489 (in Chinese)
- 4 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建与分析. 中国农业科学, 2003, 36 (2): 190 ~ 195
Yu S C, Wang Y J, Zheng X Y. Construction and analysis of a molecular genetic map of Chinese cabbage (*B. rassaica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Scientia Agricultura Sinica, 2003, 36 (2): 190 ~ 195 (in Chinese)
- 5 王 美, 张凤兰, 孟祥栋, 刘秀村, 赵岫云, 樊治成. 中国白菜 AFLP分子遗传图谱的构建. 华北农学报, 2004, 19 (1): 28 ~ 33
Wang M, Zhang F L, Meng X D, Liu X C, Zhao X Y, Fan Z C. A linkage map construction for Chinese cabbage based on AFLP markers using DH population, Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2004, 19 (1): 28 ~ 33 (in Chinese)
- 6 Vos P, Hogers R, Bleeker M, Frijters A, Pot J, Pelman J, Kuiper M, Zabeau M, Van de Lee T. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting Nucleic Acids Research, 1995, 23 (21): 4407 ~ 4414
- 7 Ajijsaka H, Kuginuki Y, Hida K, Enomoto S, Hirai M. A linkage map of DNA markers in *B. rassaica campestris* Breed Sci, 1995, 45 (Suppl): 195

- 8 Van Eck H J, Van der Voort J R, Van Zandvoort P, Van Enckevort E. The inheritance and chromosomal localization of AFLP markers in a non2inbred potato offspring. *Mol Breed*, 1995, 1: 397 ~ 410
- 9 Powell W. Analysis of quantitative traits in barley by the use of amplified fragment length polymorphisms. *Heredity*, 1996, 79: 48 ~ 59
- 10 Keim P, Schupp J M, Travis S E, Clayton K, Zhu T. A high-density soybean genetic map based on AFLP marker. *Crop Sci*, 1997, 37: 537 ~ 543
- 11 Qi X, Stan P, Lindout P. Use of locus-specific AFLP markers to construct a high-density molecular map in barley. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 376 ~ 384
- 12 Liu Z J, Karsi A, Li P, Cao D F, Dunham R. An AFLP-based genetic linkage map of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) constructed by using an interspecific hybrid resource family. *Genetics*, 2003, 165: 687 ~ 694
- 13 Ky C L, Barre P, Lorieux M, Trouslot P, Akaffou S, Louam J, Charrier A, Hamon S, Noirot M. Interspecific genetic linkage map, segregation distortion and genetic conversion in coffee (*Coffea* sp.). *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 669 ~ 676
- 14 Chyi Y S, Hoenecke M E, Semyk J L. A genetic map of restriction fragment length polymorphism loci for *B. russia rapa* (syn *campestris* L.) using DNA polymorphism. *Breed Sci*, 1999, 49: 187 ~ 192
- 15 Teutonico R A, Osborn T C. Mapping of RFLP and quantitative trait loci in *B. russia rapa* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea* and *A. thaliana*. *Theor Appl Genet*, 1994, 89: 885 ~ 894

15种杀虫植物叶片对南方根结线虫防治效果及对蔬菜生长影响初报

王晋华^{1*} 赵肖斌¹ 徐小利¹ 北上达² 西野富² (¹河南省农业科学院园艺所, 郑州 450002; ²日本三重县科学技术振兴中心, 三重 515-2316)

Effect of 15 Insecticidal Plant Leaves on Southern Root-knot Nematode and Vegetable Growth

Wang Jinhua^{1*}, Zhao Xiaobin¹, Xu Xiaoli¹, Kitagami Tooru², and Nishino Minoru² (¹ Institute of Horticulture, Henan Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou 450002, China; ² Mie Prefectural Science and Technology Promotion Center, Mie 515-2316, Japan)

关键词: 杀虫植物; 南方根结线虫; 病情指数

中图分类号: S 436 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 03-0448-01

天然杀虫植物具有分解快、残留低、污染少、毒性小等特点, 因此将其利用在南方根结线虫 (*Meloidogyne incognita*) 综合防治中具有广阔发展前景。

选用番茄品种: 强力米寿 (易感品种)、ハウス桃太郎 (耐抗品种); 黄瓜品种: つばさ做为试验材料。15种杀虫植物为夹竹桃 (*Nerium indicum* Mill)、橙 (*Citrus unshiu*)、茶 (*Thea sinensis* L.)、樱 (*Prunus donarium sieb var spontanea* Makino)、洋葱 (*Allium fistulosum* L.)、枫 (*Acer palmatum var matsumurae* Matiuo)、松 (*Pinus densiflora*)、银杏 (*Ginkgo biloba* L.)、蒜 (薹) (*Allium sativum* L.)、万寿菊 (*Tagetes patula*)、茄子 (*Solanum melongena* L.NN.)、莴苣 (*Lactuca sativa* L.NN. var *capitata* L.NN.)、桑 (*Morus alba* L.)、日本杉 (*Cryptomeria japonica* D. DON)、柿 (*Diospyros kaki* Thunb.)。将 15 种植物叶片粉碎后冷藏。番茄、黄瓜直播育苗。本试验设计 16 个处理, 不加任何植物叶片的处理设为对照, 3 次重复, 随机排列。接种时将育苗基质与线虫土 (500 个/g 土) 按 4:1 比例充分翻动; 再把粉碎的植物叶片按与其 (线虫土 + 基质) 1:9 比例混匀, 放置 3 d。幼苗长到 2~3 片真叶, 定植于该混合基质中。南方根结线虫防治效果于定植后 36 d 调查病情指数。病情分级标准: 1 级无根瘤; 2 级根系上有 1~2 个根瘤; 3 级根系上有 3~30 个根瘤; 4 级根系上有 31~100 个根瘤; 5 级根瘤数 > 100 个。不同杀虫植物对蔬菜生长影响于定植后 36 d 调查植物生长高度; 并进行差异显著性分析。

结果表明: 15 种杀虫植物叶片对南方根结线虫的防治效果程度不同。其中日本杉叶片对南方根结线虫有显著防治效果, 该处理 3 种蔬菜品种病情指数与对照相比分别下降 16.7%、25.0%、16.7%, 其它处理与对照差异不显著。

从 3 种蔬菜品种植株生长高度调查结果, 观察不同处理对其生长的影响。蒜 (薹)、洋葱、莴苣叶片对蔬菜生长有一定促进作用; 但茶、日本杉叶片对蔬菜生长有显著抑制效果。

不同蔬菜品种对南方根结线虫的抵抗力不同。本试验中 つばさ、强力米寿、ハウス桃太郎的病情指数分别为 49.0、47.9、43.2。由此得出番茄抵抗力 > 黄瓜。

收稿日期: 2005-02-15; 修回日期: 2005-04-17

基金项目: 农业部 '948' 项目 (2002-201-11)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wjh1@vip.371.net)