

菜薹分子标记利用的研究进展

许兰桂^{1,2}, 夏岩石^{1,2}, 李荣华^{1,2}, 戴维^{1,2}, 徐小强^{1,2}, 张华³, 黄红弟³,
郑岩松³, 郭培国^{1,2,*}

(¹广州大学作物抗逆国际合作研究中心, 广州 510006; ²广州大学生命科学学院, 广州 510006; ³广州市农业科学研究院, 广州 510308)

摘要: 介绍了近年来菜薹研究中使用的几种分子标记的基本原理及特点, 综述了分子标记技术在菜薹种质资源多样性分析、指纹图谱构建及杂种纯度鉴定、遗传连锁图谱构建及 QTL 定位分析等方面的研究进展和所取得的成绩, 分析讨论了分子标记技术在菜薹应用研究中的存在的问题及今后的发展方向。

关键词: 菜薹; 分子标记; 分子标记辅助选择

中图分类号: S 634.5

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 09-1739-10

Progresses on Application of Molecular Markers in Flowering Chinese Cabbage

XU Lan-gui^{1,2}, XIA Yan-shi^{1,2}, LI Rong-hua^{1,2}, DAI Wei^{1,2}, XU Xiao-qiang^{1,2}, ZHANG Hua³, HUANG Hong-di³, ZHENG Yan-song³, and GUO Pei-guo^{1,2,*}

(¹International Center for Crop Resistance, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; ²School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China; ³Guangzhou Academy of Agricultural Science, Guangzhou 510308, China)

Abstract: Molecular marker as a new type of genetic marker has been gradually used in flowering Chinese cabbage in recent years. The principles and characteristics were introduced for several molecular markers utilized in the study of flowering Chinese cabbage. The progresses and achievements have been reviewed on genetic diversity analysis, fingerprinting and identification of hybrids, genetic linkage map and QTL detection. The problems presented and the perspectives in the use of molecular markers in flowering Chinese cabbage were analyzed and discussed.

Key words: flowering Chinese cabbage; molecular marker; marker-assisted selection (MAS)

菜薹 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee) 又称菜心, 是华南地区栽培面积最大、具有优势和标志性的蔬菜种类之一 (张华和刘自珠, 2010)。优质、抗逆和丰产性状是菜薹育种的主要目标, 尽管利用传统表型评价的方法在菜薹育种方面取得了不少成绩, 但由于其大多优良性状为数量性状遗传, 受基因型、环境和基因型互作等因素的影响较大, 应用表型作为选择性标记受到很多限制; 此外, 现有菜薹遗传资源背景狭窄, 种质资源的创新利用研究尚未深入地开

收稿日期: 2012-07-05; 修回日期: 2012-09-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871526); 广州市科技计划项目 (1212011541); 国家级大学生创新训练项目 (201211078029); 广东省大学生创新实验项目 (1107811011)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guopg@yahoo.com, guopg@gzhu.edu.cn)

展,难以满足育种的要求,导致优良品种的选育进展缓慢(张华和刘自珠,2010;李光光等,2011)。

DNA 分子标记技术的快速发展为作物的研究和应用领域开辟了新途径,这种标记技术已在水稻、小麦、大麦及黄瓜、葡萄等作物的种质资源鉴定评价、种缘进化关系、遗传图谱构建、基因定位、分子标记辅助选择育种、进化及分子生态学研究中得到成功应用(McCouch & Doerge, 1995; 徐炎等, 2003; Bai & Shaner, 2004; 张桂华等, 2004; Fan et al., 2006; Guo et al., 2006; Xia et al., 2012)。尽管分子标记技术在菜薹的研究中处于起步阶段,但已在其遗传多样性、种质资源保存与管理、亲本的合理选择和选配、遗传图谱构建、基因定位与辅助选择育种等研究方面均取得了一些成绩(王丽等, 2006; 孙雪梅等, 2007; 谭雪等, 2009; 陈兆贵和王愈, 2010; 孙雪梅等, 2010; 张金艳等, 2010; Shi et al., 2011; 史卫东等, 2011)。本文中对分子标记技术在菜薹研究中的应用现状进行了综述, 以期今后的研究和应用提供参考。

1 应用于菜薹的分子标记类型及特点

现阶段应用于菜薹的分子标记主要包括随机扩增的多态性 DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD)、简单重复序列区间扩增多态性 (inter simple sequence repeats, ISSR)、扩展片段长度多态性 (amplified fragment length polymorphism, AFLP)、相关序列扩增多态性 (sequence-related amplified polymorphism, SRAP) 和微卫星锚定片段长度多态性 (microsatellite-anchored fragment length polymorphism, MFLP) 等几种。

RAPD 标记技术是以基因组 DNA 为模板, 通常以 8~12 个随机核苷酸序列作为引物, 通过 PCR 扩增, 每个引物可以产生 3~10 个不连续 DNA 片段(图 1, a); 一般认为这些产物是由不同的遗传位点产生的, 可用于检测基因组 DNA 序列的多态性。与其他标记相比(表 1), RAPD 技术操作简便, 已大量应用于品种鉴定、遗传图谱的构建及进化关系研究(Kuginuki et al., 1997; 徐炎等, 2003; 谭雪等, 2009; Ramchiary & Lim, 2011), 存在稳定性和重现性较低的不足(Jones et al., 1997)。

ISSR 是根据基因组内广泛存在的微卫星序列设计单一引物, 对两侧具有反向排列的简单重复序列(SSR)的一段 DNA 序列进行扩增(图 1, b); 用于 ISSR 扩增的引物长度通常为 16~18 个碱基序列, 包括由 1~4 个碱基组成的串联重复和几个非重复的锚定碱基组成。ISSR 技术揭示的多态性比 RAPD 标记相对较高, 操作亦较简单, 已被广泛应用(Fang et al., 1998; 孙雪梅等, 2010; Sarwat, 2012)。但该技术扩增产物的重现性和稳定性类似于或略高于 RAPD (McGregor et al., 2000), 且同样存在分辨率较低的情况, 难以将种质材料进行细分(Behera et al., 2008)。

AFLP 标记技术是运用 2 种限制性核酸内切酶(一个识别位点为 4 个碱基, 如 *Mse* I; 另一个识别位点为 6 个或以上碱基, 如 *Eco*R I) 切割基因组 DNA, 将具 2 种酶切位点的接头连接到切割 DNA 片段末端, 通过带接头序列的引物的识别, 特异性片段得到扩增, 最后通过聚丙烯酰胺凝胶电泳观察酶切片段的多态性(图 1, c)。该技术可在不了解某物种任何 DNA 信息情况下用于 DNA 多态性的检测, 且多态性丰富, 重复性高, 稳定性好, 是一种较为理想和有效的分子标记(表 1), 被广泛地应用于遗传图谱构建、遗传多样性分析、基因表达调控研究等(Guo et al., 2003; Zhao et al., 2005; Ramchiary & Lim, 2011; Shi et al., 2011)。但操作相对较为复杂, 成本较高, 通常需要同位素、荧光或银染观察多态性, 且多态性条带较难以转换成操作简单的 PCR 标记(Guo et al., 2003)。

SRAP 标记针对基因的阅读框、内含子及启动子区域设计引物, 其中正向引物长为 17 bp, 反向引物长 18 bp; 正向引物中的核心序列为 CCGG, 反向引物的核心序列为 AATT(图 1, d); 通过改变正向与反向引物 3'端 3 个选择性碱基可得到更多的引物组合, 采用复性变温法改变 PCR 反应中退火温度, 保证扩增结果的稳定性。该标记技术重现性较好、多态性较丰富(表 1), 已在种质资源鉴

定、种缘进化关系、遗传图谱构建、基因定位、重要性状标记以及比较基因组学方面得到应用 (Li & Quiros, 2001; Sun et al., 2007; 刘丽娟 等, 2009; 乔燕春 等, 2011; Ramchiary & Lim, 2011)。但该种技术对引物的长度要求很严格, 缺失几个碱基则重复性和稳定性差, 多几个碱基则难以辨别扩增产物, 较适合于采用同位素或银染方法检测扩增产物, 但对于采用操作简便、环保和较经济的加尾荧光 PCR 检测技术 (白盼 等, 2012; 何其芳 等, 2012) 来讲可能存在影响。

MFLP 标记是利用 AFLP 和 SSR 锚定引物技术的双重原理创立的新技术 (图 1, e), 其实质是同时探查限制性内切酶酶切位点和限制性片段内碱基序列、微卫星重复基元的变异, 具有 AFLP 标记技术的多态性丰富和 SSR 标记的共显性等优点, 且重复性和稳定性高、特异性强 (表 1)。另外, MFLP 易于转换成序列特异性的 SSR 或 STS 标记 (Yang et al., 2001; Lin et al., 2009)。该标记技术已广泛应用于植物遗传多样性分析、指纹图谱与品种鉴定、遗传图谱的构建和分子标记辅助育种等研究和应用领域 (曹丽华 等, 2008; Lin et al., 2009; Sadeghzadeh et al., 2010; 何其芳 等, 2012)。

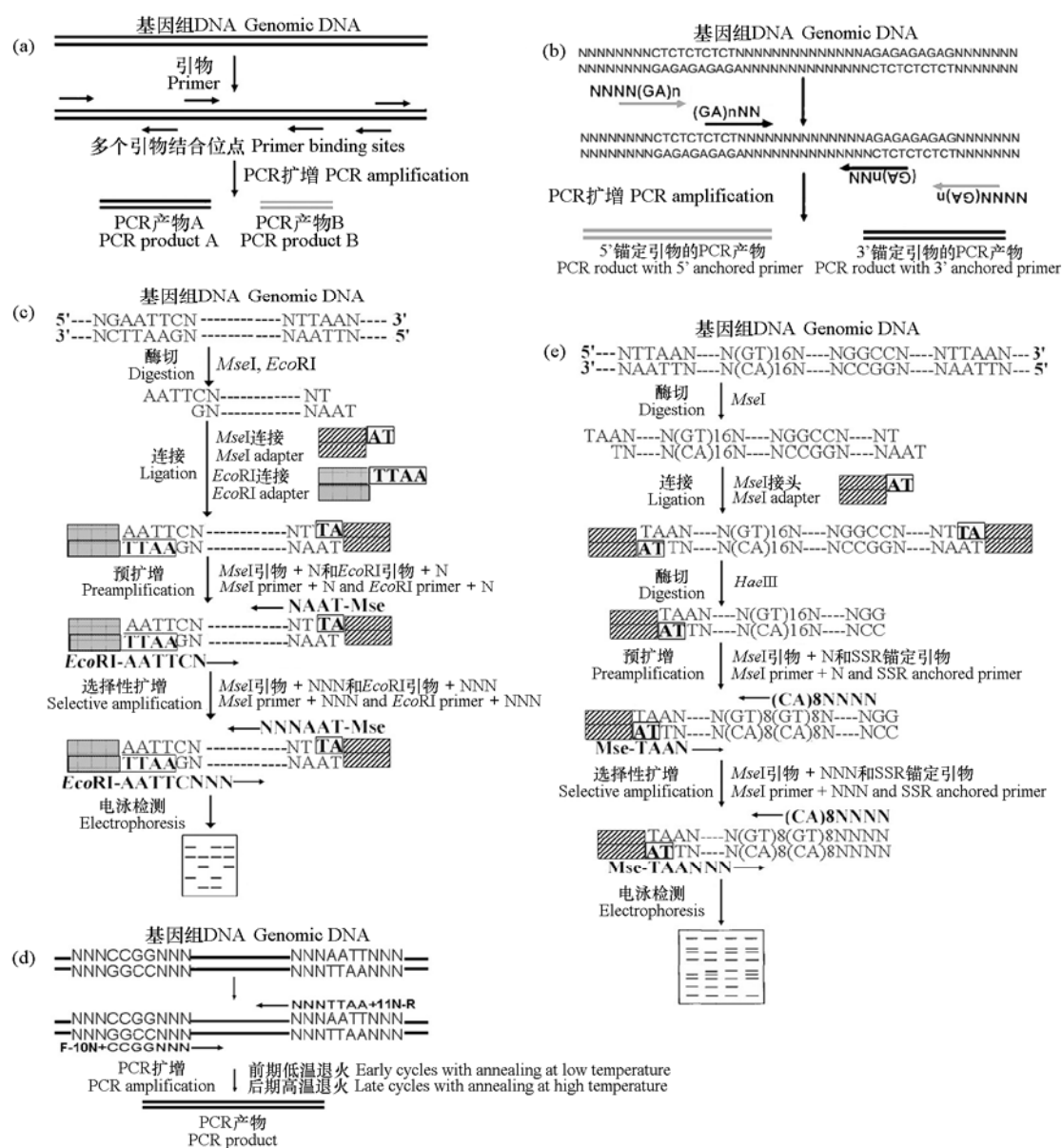


图 1 应用于菜薹的 5 种分子标记技术的基本原理

Fig. 1 The principle for the techniques of five molecular markers used in flowering Chinese cabbage

(a): RAPD; (b): ISSR; (c): AFLP; (d): SRAP; (e): MFLP.

表 1 应用于菜薹的 5 种分子标记技术及主要特点的比较

Table 1 Comparison of the techniques and main characteristics for 5 molecular markers used in flowering Chinese cabbage

特点 Characteristics	RAPD	ISSR	AFLP	SRAP	MFLP
检测技术 Detection technique	随机扩增 Random amplification	特异扩增 Specific amplification	选择性扩增 Selective amplification	选择性特异扩增 Selective specific amplification	选择性特异扩增 Selective specific amplification
技术难度 Technical difficulty	易 Easy	易 Easy	中等 Moderate	易 Easy	中等 Moderate
DNA 质量和用量 DNA quality and quantity	低, 少 Low, less	低, 少 Low, less	较高, 中等 Higher, moderate	低, 少 Low, less	较高, 中等 Higher, moderate
费用 Cost	低 Low	低 Low	中 Moderate	低 Low	中 Moderate
位点数 Numbers of loci	中 Moderate	中 Moderate	多 More	较多 Moderate to more	多 More
重现性 Reproducibility	低 Low	低 Low, > RAPD	高 High	高 High	高 High
多态数 Polymorphic number	中 Moderate	较多 Moderate to more	多 More	较多 Moderate to more	多 More
多态类型 Polymorphic type	显性 Dominant	显性为主, 共显性少 Dominant, less codominant	显性为主, 共显性少 Dominant, less codominant	显性为主, 共显性少 Dominant, less codominant	显性为主, 共显性比例高 Dominant, higher ratio of codominant
标记转化 Conversion of marker	难 Difficult	难 Difficult	难 Difficult	难 Difficult	较易 Moderate
首次报道文献 Reference reported for the first time	Williams et al., 1990	Zietkiewicz et al., 1994	Vos et al., 1995	Li & Quiros, 2001	Yang et al., 2001
成功应用案例 Case applied successfully	Kuginuki et al., 1997	Fang et al., 1998	Guo et al., 2003	Sun et al., 2007	Sadeghzadeh et al., 2010

2 菜薹种质资源的遗传多样性与亲缘关系分析

目前我国对菜薹种质材料的鉴定主要通过农艺和形态表型性状进行, 鉴定周期长, 误差大, 性状差异小, 而难以将种质材料完全区分开 (Holden, 1984; Bretting & Widrechner, 1995)。运用分子标记技术对种质资源材料进行分析, 可弥补上述不足, 评价结果具有较高的个体特异性和环境稳定性 (Bretting & Widrechner, 1995; 王黎明 等, 2011)。

目前报道较多的是利用 RAPD 和 ISSR 标记分析菜薹种质的遗传多样性。如在王丽等 (2006) 报道建立菜薹 RAPD 技术体系的基础上, 谭雪等 (2009) 利用 RAPD 标记分析了 31 个菜薹品种, 结果表明 15 个 RAPD 引物扩增出 43 个多态性条带; 数据分析显示 31 个菜薹品种间的遗传距离在 0.0465 ~ 0.5261 之间, 相似系数在 0.5909 ~ 0.9545 之间; 依据相似系数进行的聚类分析表明这些菜薹品种可分为 4 大类, 并发现 RAPD 技术对菜薹种质资源进行分类的结果与传统分类方法有一致性但也存在较大的差异, 表明田间分类鉴定受不明确因素影响存在较大的误差。另外, 张金艳等 (2010) 利用 RAPD 技术分析了空间诱变处理后的菜薹变异株系的变化, 发现不同诱变材料的后代在 DNA 水平上与对照存在差异, 并归纳得出了突变株系基因发生了点突变或染色体互换、缺失等。菜薹中的 ISSR 标记体系建立于 2007 年, 孙雪梅等 (2007) 运用该体系分析了菜薹品种的遗传多样性, 结果发现 12 条 ISSR 引物在 27 个菜薹品种中扩增出 103 个扩增产物, 其中 68 个具有多态性; 利用多态性分析这些菜薹品种间的遗传距离, 发现其遗传多样性低, 遗传距离在 0.029 ~ 0.344 之间。进一步分析得出, ISSR 比 RAPD 更适合于研究菜薹的遗传多样性 (孙雪梅 等, 2010)。此外, 陈兆贵和王愈 (2010) 选择 4 个条带清晰的 ISSR 引物对 6 个菜薹品种进行扩增, 共检测出多态性条带 22 条, 并利用这些多态性对 6 个菜薹品种进行了遗传多样性分析, 结果显示品种间的遗传相似性系数为 0.19 ~ 0.77 之间, 表明 ISSR 标记能有效揭示菜薹材料间遗传差异且适用于品种及种子纯度鉴定。

最早运用 AFLP 标记技术分析菜薹材料的是诸丽婷 (2002) 的报道, 供试的 4 个菜薹品种分别为 ‘香港菜心’、‘油青菜心’、‘迟心 29 号’ 和 ‘四九菜心’; 遗传多样性分析结果表明 ‘香港菜心’ 和 ‘四九菜心’ 的遗传相似度较高, ‘油青菜心’ 和 ‘迟心 29 号’ 遗传背景差异较小; 另外还表明在芸薹属蔬菜中红菜薹、乌塌菜和菜薹可以归为一组, 但红菜薹与乌塌菜的遗传相似性高于菜薹。2005 年 Zhao 等 (2005) 利用 AFLP 标记分析了芸薹属蔬菜的遗传多样性, 发现 2 个国外的菜薹品

种与白菜的遗传相似程度较高, 8 个国内的菜薹品种与绝大多数白菜, 1 个薹菜和 1 个茺菁归为 1 类, 表明白菜和菜薹具有密切的亲缘关系。随后多年未见到利用 AFLP 标记在菜薹中开展研究和应用的报道, 直到 2011 年底才见到 Shi 等 (2011) 利用 AFLP 标记分析 30 个菜薹材料 (包括 16 个菜薹品种和 14 个育种中间材料或品系) 的遗传多样性的报道, 供试材料的遗传距离为 0.026 ~ 0.275, 遗传相似系数为 0.76 ~ 0.943, 表明供试材料间的遗传距离小, 遗传相似系数相似程度较高, 说明菜薹材料的遗传背景十分狭窄。这一研究所得的结果与谭雪等 (2009) 与陈兆贵和王愈 (2010) 利用 RAPD 和 ISSR 分析所得的结果基本一致, 只是遗传距离更小, 遗传相似性更高, 这或许与试验过程中大量使用来源于同一杂交组合的菜薹材料相关。另外, 该研究指出 AFLP 标记能较好地分辨出各菜薹品种和品系材料。

近年来 SRAP 标记已应用于菜薹的研究工作中。乔燕春等 (2011) 以 30 份菜薹及其近缘种 (包括红菜薹、芥菜等) 作为试验材料, 利用 SRAP 标记和表型性状进行了多样性研究, 结果显示: 2 种方法材料间的遗传相似系数和变异系数分别为 0.79 ~ 1.0 和 0.169 ~ 0.584; 根据 SRAP 多态性数据的聚类分析, 可较好地将菜薹与其种近缘材料芥菜、红菜薹和增城高脚菜薹分开; 但从其遗传相似性系数来看, 所用的材料间遗传背景相似度较高。李桂花等 (2012) 也利用 SRAP 标记对 5 份紫红菜薹、2 份白菜薹、1 份增城菜薹和 36 份普通菜薹共计 44 份材料的遗传多样性进行了分析, 结果显示材料间的遗传相似系数为 0.509 ~ 0.9, 聚类分析结果显示红菜薹与其他菜薹各归一大类; 在其他菜薹的大类中, 有 2 个迟熟菜薹品种与白菜薹合组成一个亚类, 推测这 2 个迟熟菜薹品种是从白菜薹变种形成的菜薹品种; 根据 SRAP 多态性的聚类分析与基于表型特征分类结果基本一致, 作者提出 SRAP 标记评价菜薹种质资源的遗传多样性是可行的。

郭培国等 (2011) 已建立起菜薹的 MFLP 荧光标记体系, 并分析了 47 份来自于不同区域的菜薹地方品种的遗传多样性, 表明菜薹种质材料间的遗传相似系数在 0.75 ~ 0.98 之间, 在一定程度上印证了目前我国菜薹种质资源的匮乏; 聚类分析结果表明, 菜薹的分类与传统的早熟、中熟和晚熟类型不尽一致, 与依据叶色等表型性状分类也有差异, 亦未体现出地域性差异对聚类结果有明显的影响。

3 品种 (系) 指纹图谱的构建及杂种纯度鉴定

随着种子产业的快速发展, 存在着一些品种血缘关系相近、形态特征相似的情况。分子标记技术具有高效、准确判断作物品种或材料间基因组 DNA 上存在多态性的能力, 不受环境气候等因素的影响, 能快速准确简便地判断品种间存在的差异, 在植物种子或幼苗阶段就可鉴定出品种纯度。因此, 运用分子标记建立作物品种或材料的指纹图谱, 在品种特性和纯度评价及鉴定中扮演着越来越重要的角色。菜薹品种指纹图谱构建和品种鉴定研究工作较少。冒维维等 (2010) 利用 ISSR 和 SRAP 两种分子标记技术, 对两个菜薹材料及其杂种 F_1 进行分析, 发现有 5 个 ISSR 引物和 3 对 SRAP 引物可以扩增出双亲的特征带, 并建立了由 ISSR 和 SRAP 两种标记组成的鉴定该杂交组合的分子指纹图谱, 能够有效地区分双亲及其杂种 F_1 。在此基础上, 将图形指纹图谱转化为数字指纹, 可应用于菜薹种子纯度鉴定及种质材料管理。

4 遗传图谱构建、QTL 定位与目标性状连锁标记分析

自 20 世纪 80 年代初 Botstein 等 (1980) 首次利用 RFLP 标记构建遗传连锁图谱以来, 遗传图谱的构建及 QTL 定位在蔬菜作物中得到了飞速发展。但与其他蔬菜作物如黄瓜、番茄相比, 菜薹这方面的工作落后了许多, 直到 2009 年才见到冒维维等 (2009a) 利用早抽薹品种 CT07 和晚抽薹品

种 T0601 为亲本构建 F₂ 分离群体, 采用分离群体分组法 (bulk segregant analysis, BSA), 运用 ISSR 和 SRAP 标记技术分析早抽薹池与晚抽薹池的 DNA 多态性, 发现 2 个 ISSR 标记和 2 个 SRAP 标记与早抽薹性连锁; 运用 JoinMap 构建一个具有 4 个标记组成的遗传连锁图, 该连锁图长度为 98 cM, 其中一个 SRAP 标记被认为与菜薹早抽薹基因连锁最为紧密, 遗传距离为 16.8 cM。与此同时, 冒维维等 (2009b) 利用 ISSR 标记分析菜薹的雄性不育系 ‘0601’ 及保持系, 发现 100 个 ISSR 引物中有 1 个 ISSR 引物在雄性不育系和保持系之间扩增出具有差异的条带; 该条带与菜薹的雄性不育紧密连锁, 大小为 462 bp, 根据其序列将之转换成稳定的 STS 标记; 进一步分析表明该标记很可能属于核基因组, 推测该菜薹雄性不育系 ‘0601’ 是细胞核控制的雄性不育。另外, 史卫东等 (2011) 利用菜薹抗小菜蛾品系 Caixin65 和感小菜蛾品系 Caixin69 的杂交 F₂ 分离群体, 采用 BSA 分析了菜薹对小菜蛾的抗性遗传; 在该研究中, 使用了 3 个依据芸薹属其它植物 EST (expressed sequence tag) 序列中存在的重复序列而设计的 SSR 引物组合, 在菜薹中扩增出 7 个多态性条带, 并以此多态性构建出 3 个遗传连锁群; 3 个连锁图总长为 149.1 cM, 其中最大的连锁群 47.2 cM, 最小的连锁群为 22.7 cM; 7 个标记间最大间距为 37.9 cM, 最小为 9.3 cM, 平均间距为 24.85 cM。

5 问题与展望

5.1 扩大分子标记的使用类型

SSR 标记具有操作简便、稳定性和重现性好、共显性、序列特异性强的特性, 适合于遗传连锁图谱的构建、QTL 定位、关联分析和分子标记辅助选择育种 (McGregor et al., 2000)。但菜薹中还未见有大量可供研究和应用的 SSR 标记。一般讲来, 开发 SSR 标记需检测出简单重复序列及其两侧的核苷酸序列作为设计 PCR 扩增的引物 (Moore et al., 1991)。对于基因组信息研究尚未完成的物种, 开发 SSR 引物的常规途径主要有 2 个: 一是构建基因组文库, 利用简单重复序列作为探针与小片段基因组文库进行杂交, 之后对阳性克隆进行序列分析, 再根据简单重复序列位点两翼的序列来设计引物; 利用该方法已成功地从芸薹属大白菜中开发出 343 个 SSR 标记 (Suwabe et al., 2002, 2004)。二是通过筛选已知的 DNA/EST 序列数据库, 借助于计算机软件进行引物设计; 利用此技术已在多种作物上开发出了系列 SSR 引物组合, 例如根据 182、703 个 ESTs 序列, 利用计算机软件设计了 707 个用于分析大白菜和白菜型油菜的 SSR 引物组合 (Ramchiary et al., 2011)。但对于既无大量 EST 信息又无各染色体基因组文库的菜薹来讲, 开发 SSR 标记存在着挑战。Yang 等 (2001) 结合 AFLP 和简单重复序列锚定引物双重技术的原理, 开发出多态性丰富、重复性和稳定性好且有 20% 左右标记为共显性等优点的 MFLP 技术; 该技术在运用 MFLP 技术开展遗传分析的同时, 还可开发出具有多态性的 SSR 标记 (Yang et al., 2001; Lin et al., 2009), 在研究和应用中已成功转换多个与目标性状密切相关的 SSR 标记, 且已应用到分子标记辅助育种工作之中 (Lin et al., 2009; Sadeghzadeh et al., 2010)。郭培国等 (2011) 建立了菜薹的 MFLP 标记体系, 发现其多态性丰富, 稳定性好, 并已开展将具多态性片段转换成 SSR 标记的工作。因此, 在菜薹研究中可以考虑选用 MFLP 标记。另外, 史卫东等 (2011) 根据芸薹属其他植物的 EST 序列中存在的重复序列设计出 17 对 EST-SSR 引物, 发现其中 3 对引物组合在菜薹中扩增出的产物具有较丰富的多态性, 并且用于菜薹材料的基因分型; 尽管这 3 对引物扩增出来的产物未见有共显性条带, 是否属于 SSR 标记有待进一步确定; 但一些研究表明, 芸薹属植物间的 SSR 具有一定的通用性 (Suwabe et al., 2002; 崔秀敏 等, 2005; Ramchiary et al., 2011)。因此, 依据大白菜和油菜等芸薹属植物 EST 或基因组序列设计的 SSR 引物可考虑用于菜薹。

此外,近年来在玉米、水稻等作物上大量使用的 SNP 标记亦未见在菜薹中使用;但一般讲来,SNP 标记的开发主要是通过比对某物种中两种或多种材料的 EST 或基因组序列的位点差异获得的 (Rostoks et al., 2005),而现阶段菜薹的基因组和 EST 序列信息的研究均未展开;因此,菜薹 SNP 标记的开发与应用研究需考虑作为下一阶段的主要目标。

5.2 加强种质的分子评价

尽管分子标记技术已初步应用到菜薹种质材料分析工作中,并得出菜薹的种质材料遗传背景较狭窄、遗传多样性程度较低的结果;但开展遗传多样性分析的种质材料数量较少,导致目前虽然拥有大量的种质资源,但存在有效利用率较低的情况。因此评价所有种质资源的遗传多样性并分析其遗传距离和遗传结构等,有利于挖掘尚未充分估算的种质资源,了解种质资源冗余与遗传狭窄性情况。此外,在菜薹育种中,由于对产量和其他单个目标性状筛选,选育的新品种越来越多来自于业已推广的品种,造成一批遗传多样性丰富,但产量或品质或抗逆性较低的种质在育种中被逐步淘汰,因此需通过对种质资源材料的分子评价,精确筛选不同基因重组产生的稀有基因型,鉴别与发现具有优良遗传变异的种质材料。在种质资源材料保存管理和使用方面,需考虑开展使用不同类型标记技术对种质材料进行评价,建立起具有丰富遗传背景的菜薹核心种质资源库,达到用最少的样本最大限度地代表基础种质的多样性。在此基础上,完善包括地理、表型、基因型信息的种质材料数据库,为种质的保存、利用和开发做好铺垫。

5.3 开展菜薹的遗传连锁图谱构建和 QTL 定位

近年来,随着分子标记的发展,遗传连锁图谱的构建、基因定位已成为作物遗传和分子标记辅助育种研究和应用的重要部分 (Peters et al., 2003)。尽管菜薹的研究在此领域取得了一些成绩,如初步发现了几个与某些性状连锁的分子标记;但总体讲来,还未见有构建菜薹遗传连锁图谱的报道,几个定位研究中的分子标记与相关性状的遗传距离较远,且分子标记数量较少,离分子标记辅助育种的应用还存在一定差距。因此,利用分子标记建立菜薹的遗传连锁图谱,尤其是高密度的遗传连锁图谱是菜薹研究中的当务之急;同时,亟需对优质、高产和抗逆等相关的重要表型性状开展多年、多点调查,获得大量表型性状数据;在此基础上对重要表型性状的 QTL/基因进行定位,确定出与 QTL/基因紧密连锁的分子标记,以供育种工作者利用分子标记对相关表型性状进行选择,减少品种选育工作的强度和时间的增加,提高选择的准确性。同时还需考虑建立菜薹优质、高产、多抗、高效等多性状同步改良的技术平台,实现高效分子聚合育种,进一步整体提升菜薹育种的选择效率。

References

- Bai G, Shaner G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to fusarium head blight. *Annual Review of Phytopathology*, 42: 135 - 161.
- Bai Pan, Li Rong-hua, Guo Pei-guo, Ning Zheng-xiang, Xia Yan-shi, He Qi-fang. 2012. Analysis of genetic diversity among barleys came from 19 Asian countries using fluorescent SSR markers. *Journal of Triticeae Crops*, 32 (2): 215 - 222. (in Chinese)
- 白 盼, 李荣华, 郭培国, 宁正祥, 夏岩石, 何其芳. 2012. 19 个亚洲国家大麦种质材料的遗传多样性分析. *麦类作物学报*, 32 (2): 215 - 222.
- Behera T K, Gaikward A B, Singh A K, Staub J E. 2008. Relative efficiency of DNA markers (RAPD, ISSR and AFLP) in detecting genetic diversity of bitter melon (*Momordica charantia* L.). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 88: 733 - 737.
- Botstein D, White R L, Skolnick M, Davis R W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32 (3): 314 - 331.
- Bretting P K, Widrechner M P. 1995. Genetic markers and plant genetic resource management. *Plant Breeding Reviews*, 13: 11 - 86.
- Cao Li-hua, Zong Xian-zhao, Meng Hao-guang. 2008. The microsatellite-anchored fragment length polymorphism and its application. *Journal of*

- Triticeae Crops, 28 (6): 1107 - 1112. (in Chinese)
- 曹丽华, 宗现昭, 孟颢光. 2008. MFLP 分子标记技术及其应用. 麦类作物学报, 28 (6): 1107 - 1112.
- Chen Zhao-gui, Wang Yu. 2010. Preliminary study on identification flowering Chinese cabbage varieties by ISSR molecular markers. Seed, 29 (3): 29 - 32. (in Chinese)
- 陈兆贵, 王 愈. 2010. 菜心 ISSR 分子标记技术初步研究. 种子, 29 (3): 29 - 32.
- Chu Li-ting. 2002. Studies on genetic polymorphisms with AFLP and taxonomy in *Brassica campestris* (2n = 20) [M. D. Dissertation]. Hangzhou: Zhejiang University. (in Chinese)
- 诸丽婷. 2002. 芸薹类蔬菜 (2n = 20) 遗传多样性的 AFLP 分析及其分类研究[硕士论文]. 杭州: 浙江大学.
- Cui Xiu-min, Hou Xi-li, Dong Yu-xiu. 2005. Development of SSR primers of non-heading Chinese cabbage and transferability among closely related species. Science and Technology Review, 23 (11): 20 - 23. (in Chinese)
- 崔秀敏, 侯喜林, 董玉秀. 2005. 不结球白菜 SSR 引物的高效开发及其通用性研究. 科技导报, 23 (11): 20 - 23.
- Fan Z, Robbins M D, Staub J E. 2006. Population development by phenotypic selection with subsequent marker-assisted selection for line extraction in cucumber (*Cucumis sativus* L.). Theoretical and Applied Genetics, 112 (5): 843 - 855.
- Fang D Q, Krueger R R, Roose M L. 1998. Phylogenetic relationships among selected citrus germplasm accessions revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) markers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 123: 612 - 617.
- Guo P, Bai G, Li R, Shaner G, Baum M. 2006. Resistance gene analogs associated with FHB resistance in wheat. Euphytica, 151: 251 - 261.
- Guo P, Bai G, Shaner G E. 2003. AFLP and STS tagging of a major QTL for Fusarium head blight resistance in wheat. Theoretical and Applied Genetics, 106: 1011 - 1017.
- Guo Pei-guo, Li Rong-hua, Zhang Hua, Huang Hong-di, Zheng Yan-song, Xia Yan-shi. 2011. Establishment of the fluorescent technique for microsatellite-anchored fragment length polymorphism (MFLP) in flowering Chinese cabbage. Acta Horticulturae Sinica, 38 (Supplement): 2541. (in Chinese)
- 郭培国, 李荣华, 张 华, 黄红弟, 郑岩松, 夏岩石. 2011. 菜薹荧光微卫星锚定片段长度多态性 (MFLP) 技术体系的建立. 园艺学报, 38 (增刊): 2541.
- He Qi-fang, Li Rong-hua, Guo Pei-guo, Ning Zheng-xiang, Qiu Miao-wen, Zhao Wei-cai, Chen Jun-biao, Xia Yan-shi, Bai Pan. 2012. Genetic diversity analysis of tobacco germplasm by using fluorescent MFLP technique. Chinese Tobacco Science, 33 (1): 12 - 18. (in Chinese)
- 何其芳, 李荣华, 郭培国, 宁正祥, 邱妙文, 赵伟才, 陈俊标, 夏岩石, 白 盼. 2012. 利用荧光 MFLP 标记技术分析烟草种质的遗传多样性. 中国烟草科学, 33 (1): 12 - 18.
- Holden J H W. 1984. The second ten years//Holden J H W, Williams J T. Crop genetic resources: Conservation and evaluation. London: George Allen and Unwin Ltd: 177 - 185.
- Jones C J, Edwards K J, Castaglione S, Winfield M O, Sala F, Van de Wiel C, Bredemeijer G, Vosman B, Matthes M, Daly A, Brettschneider R, Bettini P, Buiatti M, Maestri E, Malcevski A, Marmioli N, Aert R, Volckaert G, Rueda J, Linacero R, Vazquez A, Karp A. 1997. Reproducibility testing of RAPD, AFLP and SSR markers in plants by a network of European laboratories. Molecular Breeding, 3: 381 - 390.
- Kuginuki Y, Ajisaka H, Yui M, Yoshikawa H, Hida K, Hirai M. 1997. RAPD markers linked to a clubroot-resistance locus in *Brassica rapa* L. Euphytica, 98: 149 - 154.
- Li G, Quiros C F. 2001. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theoretical and Applied Genetics, 103: 455 - 461.
- Li Guang-guang, Zhang Hua, Huang Hong-di, Qiao Yan-chun, Zheng Yan-song. 2011. Research progress on flowering Chinese cabbage breeding in Guangdong Province. China Vegetables, (20): 9 - 14. (in Chinese)
- 李光光, 张 华, 黄红弟, 乔燕春, 郑岩松. 2011. 广东省菜薹 (菜心) 育种研究进展. 中国蔬菜, (20): 9 - 14.
- Li Gui-hua, Chen Han-cai, Zhang Yan, Wen Yi-min, Chen Qiong-xian, Zhang Gui-quan. 2012. Genetic diversity of *Brassica parachinensis* germplasm revealed by SRAP analysis. Chinese Agricultural Science Bulletin, 28 (4): 110 - 114. (in Chinese)
- 李桂花, 陈汉才, 张 艳, 温艺敏, 陈琼贤, 张桂权. 2012. 菜心种质资源遗传多样性的 SRAP 分析. 中国农学通报, 28 (4): 110 - 114.
- Lin R, Renshaw D, Luckett D, Clements J, Yan G, Adhikari K, Buirchell B, Sweetingham M, Yang H. 2009. Development of a sequence-specific PCR marker linked to the gene "pauper" conferring low alkaloids in white lupin (*Lupinus albus* L.) for marker assisted selection. Molecular

- Breeding, 23: 153 - 161.
- Liu Li-juan, Liu Zao-chang, Chen Hai-rong, Luo Li-jun. 2009. SRAP marker technique and its application in genetic diversity analyses of vegetable crops. Chinese Agricultural Science Bulletin, 25 (21): 43 - 48. (in Chinese)
- 刘丽娟, 刘灶长, 陈海荣, 罗利军. 2009. SRAP 标记技术及其在蔬菜作物遗传多样性分析中的应用. 中国农学通报, 25 (21): 43 - 48.
- Mao Wei-wei, Gao Hong-sheng, Bo Tian-yue, Ma Jin-jun, Chen Xue-hao, Jia Zhi-ming, Wang Yong-li. 2009a. Identification of the specific ISSR marker linked to male sterility gene of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee. Molecular Plant Breeding, 7 (1): 40 - 44. (in Chinese)
- 冒维维, 高红胜, 薄天岳, 马金骏, 陈学好, 贾志明, 王永莉. 2009a. 菜薹雄性不育相关基因的 ISSR 分子标记筛选. 分子植物育种, 7 (1): 40 - 44.
- Mao Wei-wei, Gao Hong-sheng, Bo Tian-yue, Ma Jin-jun, Xu Dong-jin, Chen Xue-hao, Jia Zhi-ming, Wang Yong-li. 2009b. Analysis of bolting trait of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee by ISSR and SRAP makers. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 25 (4): 829 - 833. (in Chinese)
- 冒维维, 高红胜, 薄天岳, 马金骏, 徐东进, 陈学好, 贾志明, 王永莉. 2009b. 菜薹抽薹性状的 ISSR 和 SRAP 分析. 江苏农业学报, 25 (4): 829 - 833.
- Mao Wei-wei, Sun Jing-dong, Chen Xue-hao. 2010. Establishment of fingerprint for a hybrid of *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* by ISSR and SRAP markers. Journal of Changjiang Vegetable, (20): 18 - 20. (in Chinese)
- 冒维维, 孙敬东, 陈学好. 2010. 菜薹杂交种 ISSR 和 SRAP 的指纹图谱构建. 长江蔬菜, (20): 18 - 20.
- McCouch S R, Doerge R W. 1995. QTL mapping in rice. Trends in Genetics, 11 (12): 482 - 487.
- McGregor C E, Lambert C A, Greyling M M, Louw J H, Warnich L. 2000. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm. Euphytica, 113 (2): 135 - 144.
- Moore S S, Sargeant L L, King T J, Mattick J S, Georges M, Hetzel D J. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. Genomics, 10 (3): 654 - 660.
- Peters J L, Cnudde F, Gerats T. 2003. Forward genetics and map-based cloning approaches. Trends in Plant Science, 8 (10): 484 - 491.
- 乔燕春, 李光光, 黄红弟, 李兆龙, 张 华, 郑岩松, 刘自珠. 2011. 菜薹种质资源 SRAP 分析及表型多样性研究. 园艺学报, 38 (增刊): 2544.
- Ramchiary N, Lim Y P. 2011. Genetics of *Brassica rapa* L.//Schmidt R, Bancroft I. Genetics and genomics of the Brassicaceae, plant genetics and genomics: Crops and models 9. New York: Springer: 215 - 260.
- Ramchiary N, Nguyen V D, Li X, Hong C P, Dhandapani V, Choi S R, Yu G, Piao Z Y, Lim Y P. 2011. Genic microsatellite markers in *Brassica rapa*: Development, characterization, mapping, and their utility in other cultivated and wild *Brassica* relatives. DNA Research, 18 (5): 305 - 320.
- Rostoks N, Mudie S, Cardle L, Russell J, Ramsay L, Booth A, Close T, Marshall D, Waugh R. 2005. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. Molecular Genetics and Genomics, 274: 515 - 527.
- Sadeghzadeh B, Rengel Z, Li C, Yang H. 2010. Molecular marker linked to a chromosome region regulating seed Zn accumulation in barley. Molecular Breeding, 25: 167 - 177.
- Sarwat M. 2012. ISSR: A reliable and cost-effective technique for detection of DNA polymorphism. Methods in Molecular Biology, 862: 103 - 121.
- Shi W, Huang R, Zhou S, Xiong F. 2011. Genetic diversity of 30 Cai-xins (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) evaluated based on AFLP molecular data. Molecular Plant Breeding, 2 (7): 41 - 47.
- Shi Wei-dong, Zhou Jian-hui, Xian Zhen-hua, Liang Yu-zhe. 2011. Inheritance analysis and SSR marker of the resistance gene for diamondback moth in Caixin (*Brassica rapa* var. *parachinensis*). Molecular Plant Breeding: Online, 9: 1637 - 1641. (in Chinese)
- 史卫东, 周建辉, 贤振华, 梁育喆. 2011. 菜心小菜蛾抗性基因遗传分析及 SSR 标记. 分子植物育种: 网络版, 9: 1637 - 1641.
- Sun Xue-mei, Qiao Ai-min, Sun Min, Gui Teng-qin. 2007. Optimization of an ISSR-PCR reaction system in flowering Chinese cabbage. Journal of Southwest University: Natural Science Edition, 29 (10): 129 - 133. (in Chinese)
- 孙雪梅, 乔爱民, 孙 敏, 桂腾琴. 2007. 菜心 ISSR-PCR 反应体系的优化. 西南大学学报: 自然科学版, 29 (10): 129 - 133.
- Sun Xue-mei, Qiao Ai-min, Sun Min, Gui Teng-qin, Yin Cai-xia. 2010. ISSR analysis of genetic diversity of 27 flowering Chinese cabbage. Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition, 35 (1): 119 - 123. (in Chinese)
- 孙雪梅, 乔爱民, 孙 敏, 桂腾琴, 尹彩霞. 2010. 27 个菜心品种遗传多样性的 ISSR 分析. 西南师范大学学报: 自然科学版, 35 (1):

119 - 123.

- Sun Z, Wang Z, Tu J, Zhang J, Yu F, McVetty PB, Li G. 2007. An ultradense genetic recombination map for *Brassica napus*, consisting of 13551 SRAP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114 (8): 1305 - 1317.
- Suwabe K, Iketani H, Nunome T, Kage T, Hirai M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1092 - 1098.
- Suwabe K, Iketani H, Nunome T, Ohyama A, Hirai M, Fukuoka H. 2004. Characterization of microsatellites in *Brassica rapa* genome and their potential utilization for comparative genomics in Cruciferae. *Breeding Science*, 54: 85 - 90.
- Tan Xue, Zhang Ji-dong, Qiao Ai-min, Li Lian-fang, Zheng Shao-wei. 2009. Germplasm classification of flowering Chinese cabbage with RAPD. *Guangdong Agricultural Science*, (10): 154 - 157. (in Chinese)
- 谭 雪, 张继栋, 乔爱民, 李莲芳, 郑少薇. 2009. 应用 RAPD 技术对菜心种质资源分类研究初报. *广东农业科学*, (10): 154 - 157.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23 (21): 4407 - 4414.
- Wang Li-ming, Jiao Shao-jie, Jiang Yan-xi, Yan Hong-dong, Su De-feng, Sun Guang-quan. 2011. Establishment of molecular identity in 142 sweet sorghum varieties. *Acta Agronomica Sinica*, 37 (11): 1975 - 1983. (in Chinese)
- 王黎明, 焦少杰, 姜艳喜, 严洪冬, 苏德峰, 孙广全. 2011. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建. *作物学报*, 37 (11): 1975 - 1983.
- Wang Li, Qiao Ai-min, Sun Yi-ming, Sun Min. 2006. Extraction of genomic DNA from flowering Chinese cabbage and optimization of RAPD reaction system. *Journal of Southwest China Normal University: Natural Science Edition*, 31 (2): 124 - 128. (in Chinese)
- 王 丽, 乔爱民, 孙一铭, 孙 敏. 2006. 菜心基因组 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化. *西南师范大学学报: 自然科学版*, 31 (2): 124 - 128.
- William J G, Kubelid A R, Livak K J, Rafalski J A, Tingey S V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 18 (22): 6531 - 6535.
- Xia Y, Ning Z, Bai G, Li R, Yan G, Siddique K H M, Baum M, Guo P. 2012. Allelic variations of a light harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene (*Lhcb1*) associated with agronomic traits in barley. *PLoS ONE*, 7 (5): e37573.
- Xu Yan, Wang Yue-jin, Zhou Peng, Zhang Jian-xia. 2003. Identification of molecular genetic markers tightly linked to white rot resistant genes in Chinese wild grape. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (1): 6 - 10. (in Chinese)
- 徐 炎, 王跃进, 周 鹏, 张剑侠. 2003. 中国野生葡萄果实抗白腐病基因的分子标记. *园艺学报*, 30 (1): 6 - 10.
- Yang H, Sweetingham W, Cowling W A, Smith P M C. 2001. DNA fingerprinting based on microsatellite-anchored fragment length polymorphisms, and isolation of sequence-specific PCR markers in lupin (*Lupinus angustifolius* L.). *Molecular Breeding*, 7: 203 - 209.
- Zhang Hua, Liu Zi-zhu. 2010. Marketing requirements of flowering Chinese cabbage and the current situation in flowering Chinese cabbage breeding. *China Vegetables*, (3): 10 - 12. (in Chinese)
- 张 华, 刘自珠. 2010. 菜薹 (菜心) 的市场需求与育种现状. *中国蔬菜*, (3): 10 - 12.
- Zhang Gui-hua, Du Sheng-li, Wang Ming, Ma De-hua. 2004. AFLP markers of cucumber powdery mildew resistance related gene. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (2): 189 - 192. (in Chinese)
- 张桂华, 杜胜利, 王 鸣, 马德华. 2004. 与黄瓜抗白粉病基因连锁的 AFLP 标记的获得. *园艺学报*, 31 (2): 189 - 192.
- Zhang Jin-yan, Zhang Ji-dong, Huang Hong-di, Zhang Hua, Yin Cai-xia, Qiao Ai-ming, Zheng Yan-song. 2010. RAPD analysis for space-induced mutant lines of *Brassica parachinensis* Bailey. *Guangdong Agricultural Science*, (1): 35 - 37. (in Chinese)
- 张金艳, 张继栋, 黄红弟, 张 华, 尹彩霞, 乔爱民, 郑岩松. 2010. 空间诱变处理后菜心变异株系的 RAPD 分析. *广东农业科学*, (1): 35 - 37.
- Zhao J, Wang X, Deng B, Lou P, Wu J, Sun R, Xu Z, Vromans J, Koornneef M, Bonnema G. 2005. Genetic relationships within *Brassica rapa* as inferred from AFLP fingerprints. *Theoretical and Applied Genetics*, 110 (7): 1301 - 1314.
- Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. 1994. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR) -anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 20: 176 - 183.