

doi:10.7668/hbxb.2014.06.001

一个新的白菜苗期 TuMV-C4 抗性主效 QTL 定位及连锁分子标记开发

田希辉^{1,2}, 于拴仓², 苏同兵², 张凤兰², 余阳俊², 张德双², 赵岫云², 汪维红²

(1. 北京农学院 植物科学技术学院, 北京 102206; 2. 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097)

摘要:为寻找与 TuMV 抗性基因紧密连锁的分子标记, 选用高抗病毒病大白菜自交系 91-112 和高感病毒病自交系 T12-19 以及由二者为双亲构建的包含 100 个株系的 DH 群体为材料, 通过 SSR 和 InDel 标记的遗传分析, 在 A09 上定位了一个新的与大白菜苗期 TuMV-C4 抗性相关的主效 QTL 位点 *BrTuA09*。在此基础上, 针对该 QTL 位点所在的标记区间, 根据作图群体双亲的重测序结果, 设计合成 27 对引物, 其中 11 个 InDel 在双亲间具有多态性, 且条带单一、扩增稳定; 连锁分析发现, 11 个 InDel 标记均被定位在 A09 连锁群上 *BrTuA09* 的置信区间。利用 BC₁ 群体进行标记验证发现, 这些标记对高抗单株选择的准确率均达到 78% 以上, 可应用于分子标记辅助选择, 为大白菜 TuMV 抗病分子育种奠定了良好的基础。

关键词:大白菜; QTL; TuMV; 分子标记

中图分类号:Q78; S634.3 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2014)06-0001-05

Development of Molecular Markers Linked to a Novel QTL for TuMV-C4 Resistance in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*

TIAN Xi-hui^{1,2}, YU Shuan-cang², SU Tong-bing², ZHANG Feng-lan²,
YU Yang-jun², ZHANG De-shuang², ZHAO Xiu-yun², WANG Wei-hong²

(1. Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China; 2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China) Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China)

Abstract: Our research constructed a molecular genetic map with a line 91-112 (highly resistant to TuMV-C4), a highly susceptible line T12-19 and the DH population derived from microspore culture of F₁ (91-112 × T12-19). A total of 45 markers were mapped to the A09 chromosome, and a new QTL-*BrTuA09* controlling TuMV-C4 resistance was identified. On this basis, 27 pairs of primers were designed by screening the InDel loci on A09 chromosome of Chinese cabbage based on genome re-sequencing. The results showed that distinct PCR amplification products were obtained from the InDel markers. Among these markers, 11 InDel were polymorphic on the tested parent materials, and mapped to the A09 chromosome. By linkage analysis, these markers were tightly linked to the QTL-*BrTuA09*. The studies showed that these markers can be applied in marker-assisted selection in Chinese cabbage hybrid breeding programs and improve the resistance to TuMV-C4.

Key words: Chinese cabbage; QTL; TuMV; Molecular markers

病毒病是影响大白菜产量和品质的三大病害 (病毒病、霜霉病和软腐病) 之一, 平均每年可造成 5% ~ 10% 的产量损失, 流行年份发病率可达 80%, 甚至绝收^[1]。目前, 尚无有效药剂及控制技术, 因

收稿日期: 2014-10-17

基金项目: 科技部科技支撑项目 (2012BAD50G01; 2012BAD02B01); 科技部“863”项目 (2012AA020103; 2012AA100103); 国家大宗蔬菜产业技术体系 (CARS-25-A-11)

作者简介: 田希辉 (1988-), 男, 山东泰安人, 在读硕士, 主要从事蔬菜分子育种研究。

通讯作者: 张凤兰 (1964-), 女, 山东莱西人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种和分子生物学研究。

此,培育抗病品种成为最有效的防治措施。研究证明,TuMV 是大白菜病毒病的主要病原^[2],所以抗 TuMV 成为大白菜抗病育种的主要目标。寻找与抗性基因紧密连锁的分子标记,进行分子标记辅助育种,是提高白菜抗病育种效率的有效手段。

目前,关于大白菜病毒病抗性的研究已有大量报道。在遗传规律研究方面,尽管报道较多,但由于病原、试验材料、接种压力及试验环境等差异,研究结果不尽相同^[3-6]。近几年,国内研究大都表明大白菜对 TuMV 的抗性属“加性-显性”遗传模型^[7-9]。在 QTL 定位分析上也有较多发现,国外 Rusholme^[10-11]以 DH 群体为材料定位到 2 个 QTL,位于 A6 连锁群的 *TuRB01b* 和位于 R4 连锁群的 *retr01*; Fujiwara^[12]将相关基因 *Rnt1* 定位在 A6 连锁群上^[12];近期 Jin^[13]在 A6 连锁群上定位了一个抗 TuMV-C4 的 QTL-*TuRB07*,并获得候选基因。国内屈淑平^[14]在大白菜上检测到 4 个抗 TuMV-C3 的 QTL 位点;韩和平^[15]发现了一个与 TuMV-C5 抗性相关的显性标记;张俊华等^[16]报道了 4 个抗 TuMV-C3 的 QTL;张晓伟等^[17]发现 3 个抗 TuMV-C4 的 QTL 位点;Zhang^[18]通过研究,在一个包含 376 个分子标记的遗传图谱上,发现了 4 个与大白菜抗 TuMV-C4 相关的 QTL。

本研究以包含 100 个株系的 DH 群体为试验材料,通过构建高密度分子遗传图谱对大白菜 TuMV-C4 的苗期抗性进行 QTL 分析,并进一步开发与之紧密连锁的分子标记,为早期抗病性分子标记辅助选择提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

父本 91-112 为连续自交 9 代的大白菜高代自交系,高抗 TuMV-C4;母本 T12-19 是双单倍体株系,高感 TuMV-C4。通过对 T12-19 × 91-112 的 F_1 进行小孢子培养,得到包括 100 个双单倍体株系的群体,以此为材料,对大白菜 TuMV 抗性进行 QTL 分析。以感病亲本 T12-19 与 F_1 回交获得 188 个单株的 BC_1 群体为材料,验证分子标记对 TuMV 抗性选择的有效性。

1.2 试验方法

1.2.1 苗期 TuMV 抗性鉴定 DH 群体及 BC_1 群体播种于 50 孔育苗盘中,于 2 片真叶完全展开时接种 TuMV-C4,分别对 DH 及分离群体的各单株及双亲进行苗期人工接种鉴定。试验采用完全随机区组设计,3 次重复,每重复 10 株。幼苗接种 28 d 后进

行病情调查,记录全株病情。根据全国主要蔬菜抗病育种攻关组制定的抗病性分级标准,按发病症状的轻重分为 0,1,3,5,7,9 共 6 个病级(0 级无症状;1 级心叶轻微花叶;3 级心叶及中部花叶;5 级严重花叶,少数叶片皱缩,植株矮化;7 级严重花叶,全部叶片皱缩畸形,植株矮化;9 级叶片枯死,植株濒临死亡),对所有单株的病级进行了调查和记载,并计算各 DH 系的病情指数 DI(Disease index)。

1.2.2 基因组 DNA 的提取 采用改良的 CTAB 法提取叶片总 DNA,用分光光度计检测 DNA 的浓度及纯度,并将模板 DNA 浓度调整到工作液浓度 50 ng/ μ L,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。

1.2.3 QTL 分析 采用 SSR 和 InDel 标记的谱带分析结果和 Join map 3.0 软件构建遗传图谱^[19],按 Kosambi 函数计算遗传距离^[20-21]。利用 Map QTL 5.0 软件的复合区间作图法进行 QTL 位点确定。以 3 次重复的病情指数平均值为表型数据进行 QTL 分析。首先利用置换测验做 1 000 次重复,估算基因组范围内 $\alpha = 0.05$ 水平上的 LOD 阈值。利用区间作图法(IM)进行 QTL 分析,在每一条染色体上每隔 1 cM 对 QTL 存在的可能性扫描 1 次。对于 IM 分析检测到的 QTL,将最高 LOD 值所在位置的标记或与其紧密连锁的标记作为协同因子,进行多座位 QTL 模型(MQM)检测。以连锁群上 LOD 值最高的位置作为 QTL 的位置。

1.2.4 分子标记的开发 在作图群体双亲基因组重测序预测得到的 InDel 位点中,于目标 QTL 所在区间,筛选插入/缺失碱基数为 5 ~ 100 bp 的 InDel 位点。引物设计使用 Primer 3.0。PCR 反应体系为 12.5 μ L,其中包含:10 × PCR 缓冲液,0.25 mmol/L dNTPs,1.0 μ mol/L 上下游引物,50 ng 模板 DNA,1 U *Taq* PCR。扩增采用程序为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,55 °C 退火 35 s,72 °C 延伸 50 s,35 个循环;再 72 °C 延伸 5 min,4 °C 保存。试验中的引物均由上海生工生物工程公司合成。PCR 产物用 3% 高分辨率琼脂糖凝胶电泳或 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.5 标记的可靠性验证 根据 BC_1 群体的表型调查结果判定单株的抗感:发病症状 3 级及以下的记为抗病单株(R),5 级及以上的记为感病单株(S)。用新开发的 11 对标记在此 BC_1 群体上进行可靠性验证,与抗病亲本 91-112 带型相同的记为 a,与感病亲本 T12-19 带型相同的记为 b,同时含有 2 条带型的记为 ab。通过带型和表型的比对,计算标记选择的准确性,计算公式:选择准确率 = $R(ab) +$

$S(b) / (R + S)$

2 结果与分析

2.1 大白菜抗 TuMV-C4 的 QTL 分析

以来源于 T12-19 × 91-112 的 100 个株系组成的 DH 群体为作图群体进行了分子遗传图谱的构建研究。整合 136 个 SSR 标记、86 个 InDel 标记、231 个 AFLP 标记、138 个 RAPD 标记及 13 个同工酶标记,最终构建了一张由 10 个连锁群组成,包含了 604 个标记的大白菜高密度分子遗传图谱。该图谱覆盖基因组长度 1 049.4 cM,标记间平均图距 1.7 cM,该图谱可用于 QTL 分析。

利用复合区间作图法进行抗 TuMV-C4 的 QTL 分析,在 A09 上检测到一个主效 QTL 位点(图 1-A),暂命名为 *BrTuA09*,该位点位于标记 Fito518 与标记 MR172 之间,其 LOD 值为 18.6,加性效应为 16.2,可解释的表型变异达 62.0%。

2.2 亲本间多态性引物的筛选

根据作图群体双亲基因组重测序预测得到的 InDel 位点,在 A09 连锁群的主效 QTL 位点设计合成了 27 对 InDel 引物,其中 26 对引物均获得扩增产

物,11 对引物(表 1)在双亲间表现出多态性(图 2)。

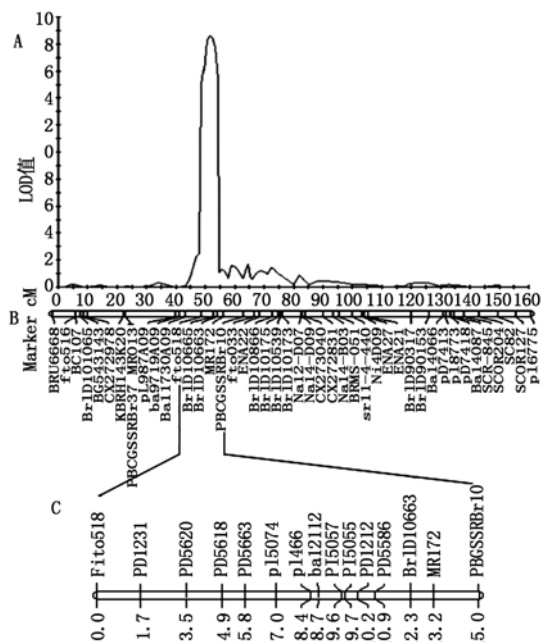


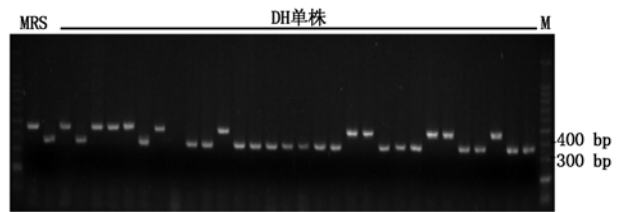
图 1 连锁图谱 (B) 及 TuMV-C4 抗性 QTL 分布 (A) 和新开发的分子标记在图谱上的位置 (C)

Fig.1 Linkage map (B) and distribution of QTLs for traits related to TuMV-C4 resistance (A) and Location of new developed markers (C)

表 1 新开发的标记信息

Tab.1 Information of newly developed markers

| 标记名称 Marker ID | 上游引物(5′-3′) Forward primer | 下游引物(5′-3′) Reverse primer | 产物大小/bp PCR product |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------|
| p1466 | CACGAGGCTATACTGAAACA | CTCTGGGATAAACACCAACT | 229 |
| p15074 | TATCAAGATGCTGAAGGAAAG | ACAACAATAAAACAGAGGGAT | 316 |
| ba12112 | CACCTCGTGTCCTAATACCTTT | GATGCCTATCATCCAGTCTCC | 627 |
| PI5057 | TTCCGCGAGAAAGAACTGT | CCACCTCATTTGAAGCAACC | 183 |
| PD5663 | TGCTTGTTTACTACTGTTTTTCG | ATCTGCGTAGGTTTCGTTTAGG | 316 |
| PD1231 | TTTCATCTCCAGGGACCCAC | AGATTGGCGAGGGTTGAGAA | 312 |
| PD5620 | ATCCGACACGAAAACCAAAA | AATGAGGGGAGATTGTTGT | 203 |
| PD5618 | CAATGTCATCGTATGGGCACT | AGGTGGTTCGAGGCATAACAC | 177 |
| PI5055 | CACGTTTGACGGTTGAAGAG | TCCGTTGTTGAGGTGCAATA | 254 |
| PD1212 | CCTTGCTAAGTAAGCGACAC | CATCCTATTGAGAACCCAGAA | 353 |
| PD5586 | GTCCCAACAGAAAGCGACTC | AGGCTCACGAGGAGGAGAAT | 271 |



M. 100 bp Marker; R. 抗病亲本 91-112; S. 感病亲本 T12-19。
M. 100 bp Marker; R. Highly resistant line 91-112;
S. Highly susceptible line T12-19.

图 2 标记 PD1231 在双亲和 DH 单株中的扩增图谱
Fig.2 The PCR amplification products with primer PD1231 in parents and DH lines

2.3 分子标记的遗传作图

将开发的 11 个分子标记在 DH 群体中进行分析。利用 Join map 4.0 软件进行遗传作图。结果表明,11 个标记均被定位于 A09 连锁群上,这些标记均位于 *BrTuA09* 的置信区间(图 1-B,C)。

2.4 连锁标记的可靠性分析

根据分子标记在 BC_1 群体中的分析结果,本研究新开发的 11 个分子标记对抗性株系的选择均具有较高的准确性。各标记对抗性株系选择的准确率最低为 78.5%,最高为 82.4%(表 2)。这为下一步进行分子标记辅助育种以及基因克隆奠定了良好的基础。

表 2 新标记在 BC₁ 群体中的验证Tab. 2 Test of new markers in BC₁ population

| 标记名称 Marker ID | 植株表型 Plant phenotype | 株数 No. of plants | 带型 Genotype | | 选择准确率/% Accuracy rate |
|-------------------|-------------------------|---------------------|-------------|----|--------------------------|
| | | | b | ab | |
| PD5586 | R | 90 | 15 | 75 | 79.4 |
| | S | 85 | 64 | 21 | |
| PD5663 | R | 94 | 10 | 84 | 82.4 |
| | S | 93 | 70 | 23 | |
| PD5618 | R | 91 | 10 | 81 | 82.0 |
| | S | 87 | 65 | 22 | |
| PI5057 | R | 93 | 15 | 78 | 80.6 |
| | S | 93 | 72 | 21 | |
| ba12112 | R | 93 | 13 | 80 | 80.6 |
| | S | 87 | 65 | 22 | |
| pl466 | R | 94 | 14 | 80 | 80.1 |
| | S | 77 | 57 | 20 | |
| PD5620 | R | 94 | 11 | 83 | 82.3 |
| | S | 92 | 70 | 22 | |
| pl5074 | R | 86 | 10 | 76 | 81.7 |
| | S | 89 | 67 | 22 | |
| PI5055 | R | 90 | 16 | 74 | 79.6 |
| | S | 91 | 70 | 21 | |
| PD1212 | R | 91 | 16 | 75 | 78.5 |
| | S | 86 | 64 | 22 | |
| PD1231 | R | 92 | 13 | 79 | 80.2 |

注:a. 与抗病亲本 91-112 的带型相同;b. 与感病亲本 T12-19 的带型相同。

Note:a. The same with resistant line 91-112;b. The same with susceptible line T12-19.

3 讨论

病毒病对多种芸薹属作物危害严重,挖掘与抗性基因或 QTL 连锁的分子标记在加速分子标记辅助育种方面极为重要。到目前为止,在芸薹属作物上,人们已经利用分子标记技术在连锁图谱上定位了 11 个与 TuMV 抗性相关的基因,其中在白菜上定位的 6 个基因分别为 *TuRB01b* (位于 A6 连锁群)^[10]、*ConTR01* (R8) 和 *retr01* (位于 R4 连锁群)^[11]、*Rnt1* (位于 A6 连锁群)^[12]、*retr02* (位于 A4 连锁群)^[22] 和 *TuRB07* (位于 A6 连锁群)^[13]。在 QTL 分析上,大部分研究所应用的连锁图谱没有和参考图谱建立对应关系,所获得的 QTL 也无法被定位于特定染色体^[10-12],这些基因或 QTL 主要集中在 A04 和 A06 上。本研究获得的 TuMV-C4 抗性 QTL-*BrTuA09* 被定位于 A09 连锁群上,明显不同于以往的报道,是一个新的抗病主效 QTL 位点。

针对 *BrTuA09* 所在的置信区间,根据重测序信息新开发了 11 个 InDel 标记,这些标记对抗性株系选择的准确率约 80%,与 *BrTuA09* 紧密连锁,因此,本研究开发的 11 个标记能在苗期对植株的基因型进行规模化筛选,大大减少了后期培育及鉴定的难

度,将有效缩短育种时间。同时,该研究也为精细定位并图位克隆该抗病基因奠定了良好的基础。

参考文献:

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展[M]. 北京:科学出版社,1995:26-29.
- [2] 冯兰香,徐玲,刘佳,等. 北京地区大白菜芜菁花叶病毒株系的鉴定[J]. 中国蔬菜,1988(4):23-25.
- [3] 谭其猛. 蔬菜育种[M]. 北京:农业出版社,1980.
- [4] 钮心恪. 大白菜抗霜霉病、病毒病原始材料的筛选及抗性遗传的研究[J]. 中国蔬菜,1984(4):28-32.
- [5] Leung H I, Williams P H. Cytoplasmic male sterile *Brassica campestris* breeding lines with resistance to clubroot, turnip mosaic, and downy mildew[J]. Hort Science, 1983,18(5):774-775.
- [6] Yoon J Y, Green S K, Opena R T. Inheritance of resistance to turnip mosaic virus in Chinese cabbage[J]. Euphytica,1993,69(1/2):103-108.
- [7] 鹿英杰,康永春,李光池,等. 大白菜对芜菁花叶病毒抗性遗传规律的研究[J]. 黑龙江农业科学,1988(6):27-31.
- [8] 潘春清. 大白菜 AFLP 遗传图谱构建及抗 TuMV-C3 的 QTL 分析[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2007.

- [9] 李巧云, 张晓亮, 张志刚, 等. 大白菜分子遗传图谱构建研究进展[J]. 生物技术通报, 2012(6): 18–24.
- [10] Rusholme R L. The genetic control of resistance to turnip mosaic virus (TuMV) in *Brassica* [D]. Norwich: University of East Anglia (PhD Thesis), 2000.
- [11] Rusholme R L, Higgins E E, Walsh J A, *et al.* Genetic control of broad-spectrum resistance to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* (Chinese cabbage) [J]. Journal of General Virology, 2007, 88(11): 3177–3186.
- [12] Fujiwara A, Inukai T, Kim B M, *et al.* Combinations of a host resistance gene and the CI gene of turnip mosaic virus differentially regulate symptom expression in *Brassica rapa* cultivars [J]. Archives of Virology, 2011, 156(9): 1575–1581.
- [13] Jin M A, Lee S S, Ke L, *et al.* Identification and mapping of a novel dominant resistance gene, TuRB07 to turnip mosaic virus in *Brassica rapa* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2014, 127(2): 509–519.
- [14] 屈淑平, 张 彤, 张俊华, 等. 大白菜抗 TuMV-C3 的 QTL 分析[J]. 东北农业大学学报, 2009, 40(11): 33–37.
- [15] 韩和平, 孙日飞, 张淑江, 等. 大白菜中与芜菁花叶病毒(TuMV)感病基因连锁的 AFLP 标记[J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 539–544.
- [16] 张俊华, 屈淑平, 崔崇士. 大白菜抗芜菁花叶病毒的 QTL 分析[J]. 植物病理学报, 2008, 38(2): 178–184.
- [17] 张晓伟, 原玉香, 王晓武, 等. 大白菜 DH 群体 TuMV 抗性的 QTL 定位与分析[J]. 园艺学报, 2009, 36(5): 731–736.
- [18] Zhang F L, Wang M, Liu X C, *et al.* Quantitative trait loci analysis for resistance against Turnip mosaic virus based on a doubled-haploid population in Chinese cabbage [J]. Plant Breeding, 2008, 127(1): 82–86.
- [19] Ooijen J W, Voorrips R E. JoinMap: version 3.0 software for the calculation of genetic linkage maps [M]. Wageningen: Wageningen University and Research Center, 2001.
- [20] Yu S C, Zhang F L, Zhao X, *et al.* An improved *Brassica rapa* genetic linkage map and locus-specific variations in a doubled haploid population [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2013, 31(3): 558–568.
- [21] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. Annals of Eugenics, 1943, 12(1): 172–175.
- [22] Qian W, Zhang S J, Zhang S F, *et al.* Mapping and candidate-gene screening of the novel Turnip mosaic virus resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2013, 126(1): 179–188.