

利用 DH 群体构建大白菜分子遗传图谱

刘俊峰¹, 张 斌², 李 梅², 刘 莉³, 闻凤英²

(1. 天津师范大学 生命科学学院, 天津 300387; 2. 天津科润蔬菜研究所, 天津 300384;
3. 天津大学 环境科学与工程学院, 天津 300072)

摘要:构建大白菜分子遗传图谱,为大白菜干烧心 QTL 定位和分析奠定基础。以大白菜感病品种 B120 和大白菜抗病品种黑 227 为亲本建立的 DH 系为作图群体,基于所筛选出的 74 对 InDel 标记和 37 对 SSR 标记构建分子遗传图谱。利用 JoinMap 4.0 软件,初步构建了一张覆盖基因组长度为 1 004.7 cM、平均图距为 9.30 cM 的大白菜遗传连锁图,该图谱包含 12 个连锁群、108 个标记位点。该图谱能有效地用于大白菜干烧心 QTL 定位。

关键词:大白菜;干烧心病;DH 群体;遗传图谱

中图分类号:S634.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2015)02-0156-05

doi:10.7668/hbxb.2015.02.028

Constructing Genetic Linkage Map of Chinese Cabbage with Double Haploid (DH) Population

LIU Jun-feng¹, ZHANG Bin², LI Mei², LIU Li³, WEN Feng-ying²

(1. College of Life Sciences, Tianjin Normal University, Tianjin 300387, China; 2. Tianjin Kernel Vegetable Research Institute, Tianjin 300384, China; 3. School of Environmental Science and Engineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: A molecular genetic map of Chinese cabbage was constructed, whose aim that the location and analysis of QTL of tipburn in Chinese. The map was constructed based on 74 InDels markers and 37 SSRs markers using DNA samples extracted from a doubled haploid population obtained through microspore culture from the F₁ between two homozygous parents: B120 and Black 227. By using JoinMap 4.0 software analysis, the map consisted 12 linkage groups, included 108 genetic markers and covered 1 004.7 cM with an average distance of 9.30 cM. The map would be used effectively to QTL location of tipburn in Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; Tipburn; DH population; Genetic linkage map

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *Pekinensis*)是十字花科芸薹属植物,栽培历史悠久,资源丰富,是我国蔬菜栽培中种植面积最大、分布最广的蔬菜作物之一。大白菜干烧心病是近年来继三大病害之后危害较严重的一种病害,其发生较为普遍,在全国各大城市近郊尤为严重,一般发病率在 30%~50%,严重的达 80%~90%,并有逐年发展的趋势^[1]。此病是由缺钙引起的生理性病害^[2],很多学者对干烧心病的表现症状^[3]、发病机理^[4]进行了大量研究,分子方面的研究包括孙秀峰^[5]利用 F₂ 群体构建一张含 105 个标记位点,11 个连锁群,覆盖 669.7 cM 的

大白菜 AFLP 分子遗传图谱,并检测到 4 个与抗干烧心病有关的 QTL 位点;李坤等^[6]以 F₂ 群体作为材料,利用双亲 DNA 构建大白菜感病池和抗病池对 104 对 SSR 和 320 对 SRAP 引物进行筛选,获得 2 个与大白菜干烧边性状相关的 QTLs;黄萍等^[7]以 F₂ 群体作为研究材料,对大白菜干烧心病进行分子标记研究,获得了 1 个与大白菜干烧心病基因相关的 AFLP 标记。

利用分子标记构建大白菜遗传连锁图谱,选取 F₂ 群体作为研究群体使用有一定缺陷,因为它属于临时性群体,只能使用一个有性世代,难以长期保

收稿日期:2014-12-17

基金项目:“十二五”国家科技支撑计划项目(2012BAD02B01);天津市种业重大科技专项(12ZCDZNC03500)

作者简介:刘俊峰(1990-),男,天津人,硕士,主要从事蔬菜分子育种研究。

通讯作者:张 斌(1965-),男,辽宁本溪人,研究员,博士,主要从事蔬菜种质资源及蔬菜育种研究。

持,相比之下,DH 群体由于遗传上纯合性,可永久继代保存,适用进行持续研究;选取 AFLP、SRAP、SSR 等分子标记在一定程度上有其不足之处,如重复性不好、技术难度大、覆盖基因组程度不高等。InDel 标记是一种基于基因组序列开发的标记,其多态性好、在染色体上均匀分布、覆盖率较高,可以大大增加白菜类作物的特异性分子标记数量。本研究主要以 InDel 标记作为构建图谱的主要标记,以大白菜感病品种 B120 和大白菜抗病品种黑 227 的杂种 F_1 进行游离小孢子培养,获得了 99 个 DH 株系为作图群体,结合少量 SSR 标记,构建大白菜分子连锁图谱。

1 材料和方法

1.1 试验材料

天津科润蔬菜研究所提供的抗干烧心病青麻叶高代自交系黑 227 和易感干烧心病高代自交系 B120 及 B120 \times 黑 227 的杂交 F_1 经过游离小孢子培养获得的 DH 群体为材料。

SSR 和 InDel 标记引物来源:415 个 InDel 和 92 个 SSR 引物标记来自文献[8];144 个 SSR 引物标记来自大白菜基因组;共 651 个。引物均由南京金斯瑞有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取和检测 利用 CTAB 法,提取基因组 DNA。用 1% 琼脂糖电泳检测提取基因组 DNA 完整性和纯度。

1.2.2 InDel 和 SSR 分析 均采用 20 μ L 的反应体系,其中 2 μ L 10 \times PCR Buffer、2 μ L dNTPs (2.5 mmol/L)、1 μ L Forward primer (10 μ mol/L)、1 μ L Reverse primer (10 μ mol/L)、0.2 μ L *Taq* 酶 (2.5 U/ μ L)、2 μ L DNA (50 ng/ μ L) 和 11.8 μ L ddH₂O。PCR 扩增程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 保存。

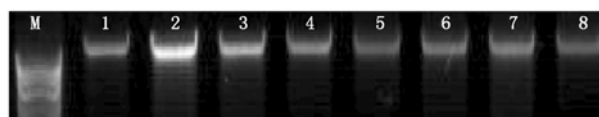
1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳 选用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。对跑过电泳的胶板快速银染。

1.2.4 数据整理与连锁分析 根据亲本的带型来确定多态性条带,与感病亲本带型相同的记为“1”,与抗病亲本带型相同的记为“0”,由于其他原因造成的条带不清或缺失的赋值“-”。运用 JoinMap 4.0 软件构建分子遗传图谱,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 命令构建分子遗传图谱,采用 Kosambi 函数计算图距。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量和浓度的检测结果

琼脂糖电泳的检测结果表明,基因组 DNA 条带完整、清晰、无明显的拖尾弥散现象,无 RNA 和多糖污染,满足 InDel 和 SSR 标记扩增对 DNA 模板的要求(图 1)。



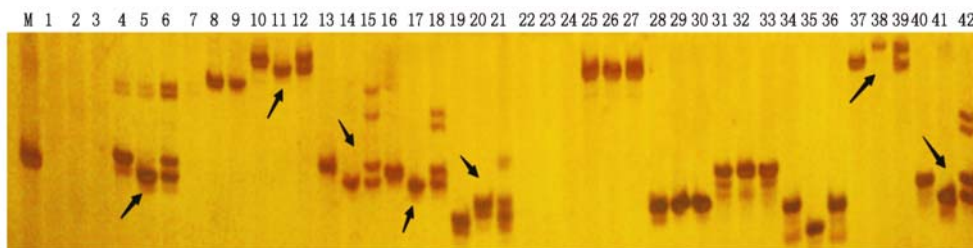
M. Marker; 1 ~ 8. DH 群体不同株系。
M. Marker; 1 ~ 8. Different strains of DH lines.

图 1 基因组 DNA 的琼脂糖电泳检测结果

Fig. 1 The detection of genomic DNA from agarose gel

2.2 分子标记的多态性

本研究利用抗感亲本和其 F_1 对 415 对 InDel 标记和 236 对 SSR 标记进行筛选,结果如图 2,得到了 74 对 InDel 引物和 37 对 SSR 引物,在作图群体的双亲间表现多态、条带清晰、重复性好。再用筛选得到的多态性引物对 99 个 DH 株系进行 PCR 扩增。图 3 为 InDel 引物在双亲、 F_1 及 DH 株系中检测的电泳图,图 4 为 SSR 引物在双亲、 F_1 及 DH 株系中检测的电泳图。



箭头所指为多态性引物扩增条带。
The arrows indicate the polymorphic bands.

图 2 多态性引物的筛选

Fig. 2 Screening of polymorphic primers



P1. B120; P2. 黑 227; F₁. B120 × 黑 227; M. Marker; 1 ~ 48. DH 群体不同株系。图 4 同。

P1. B120; P2. Black 227; F₁. B120 × Black 227; M. Marker; 1 ~ 48. Different strains of DH lines. The same as Fig. 4.

图 3 InDel 引物 BrID10715 在 DH 系中的检测结果

Fig. 3 InDel primer BrID10715 test results in DH lines

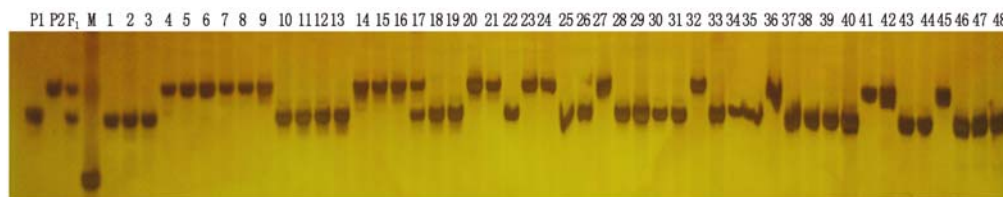


图 4 SSR 引物 BRMS042 在 DH 系中的检测结果

Fig. 4 SSR primer BRMS042 test results in DH lines

2.3 遗传图谱的构建

使用 JoinMap 4.0 软件构建遗传图谱,在 $LOD \geq 4.0$ 的条件下,对 111 对多态性引物进行连锁分析后,将 111 个标记中的 108 个标记位点定位在 12 个连锁群上,覆盖基因组总长度为 1 004.7 cM,平均图距为 9.30 cM,连锁群上有 38.0% 的标记出现偏分离(表 1、图 5),每个连锁群上的标记数为 2 ~ 17 个,平均图距为 1.53 ~ 15.03 cM,连锁群长度为 4.6 ~ 240.6 cM。本研究所筛选的引物来自大白菜参考图谱,使用国际上最新提出的 A 基因组命名法(http://www.brassica.info/brassica_info/linkage_groups_assignments.php)将其命名为 A01 ~ A10。由于构建图谱上的分子标记在连锁群上分布不均匀,与大白菜参

考图谱对比发现,在 A01、A02 和 A10 这 3 个连锁群上出现了断裂,各自分成了 2 个片段,以及没有出现 A08 连锁群。对每条连锁群分析发现,在 A01(1)、A02(1)、A03、A04、A05、A06 和 A07 连锁群上均出现间隔大于 20 cM 的间隙,其中 A02(1)、A03、A05 和 A06 连锁群表现最不饱和。标记数最多的连锁群为 A09 连锁群,包括 17 个标记,标记最少的连锁群为 A01(2)连锁群,只有 2 个标记。在连锁群上出现不同程度的标记密集区,其中 A10(1)在 22.2 ~ 28.5 cM 区段,分布一个标记密集区,包括 6 个分子标记,平均图距 1.05 cM。其中 A03 连锁群平均间距最大,间距为 15.03 cM, A10(2)连锁群平均间距最小,间距只有 1.53 cM。

表 1 遗传连锁图谱上分子标记的分布

Tab. 1 Distribution of molecular on genetic linkage map

连锁群 Linkage group	LOD 值 LOD score	长度/cM Length	标记数 No. of markers	平均图距/cM Average distance	偏分离标记数 No. of distorted markers
A01(1)	8.0	43.1	5	8.62	4
A01(2)	4.0	13.7	2	6.85	0
A02(1)	4.0	80.1	8	10.01	6
A02(2)	6.0	11.8	4	2.95	0
A03	5.0	240.6	16	15.03	1
A04	7.0	47.7	6	7.95	1
A05	4.0	113.6	10	11.36	0
A06	4.0	171.2	15	11.41	11
A07	8.0	81.6	14	5.83	9
A09	6.0	168.2	17	9.89	9
A10(1)	6.0	28.5	8	3.56	0
A10(2)	5.0	4.6	3	1.53	0
总计 Total	—	1 004.7	108	—	41

2.4 分子标记的分离分析

在 $P < 0.05$ 水平上的卡方检测结果表明,108 个分子标记(34 个 SSR 标记,74 个 InDel 标记)中,有 41 个分子标记(19 个 SSR 标记,22 个 InDel 标

记)发生了偏分离,偏分离比为 38.0%。SSR 标记偏分离比为 17.6%,其中有 10 个 SSR 标记偏向 B120,9 个 SSR 标记偏向黑 227; InDel 标记偏分离比为 20.4%,其中 12 个 InDel 标记偏向 B120,10 个

InDel 标记偏向黑 227(表 2)。

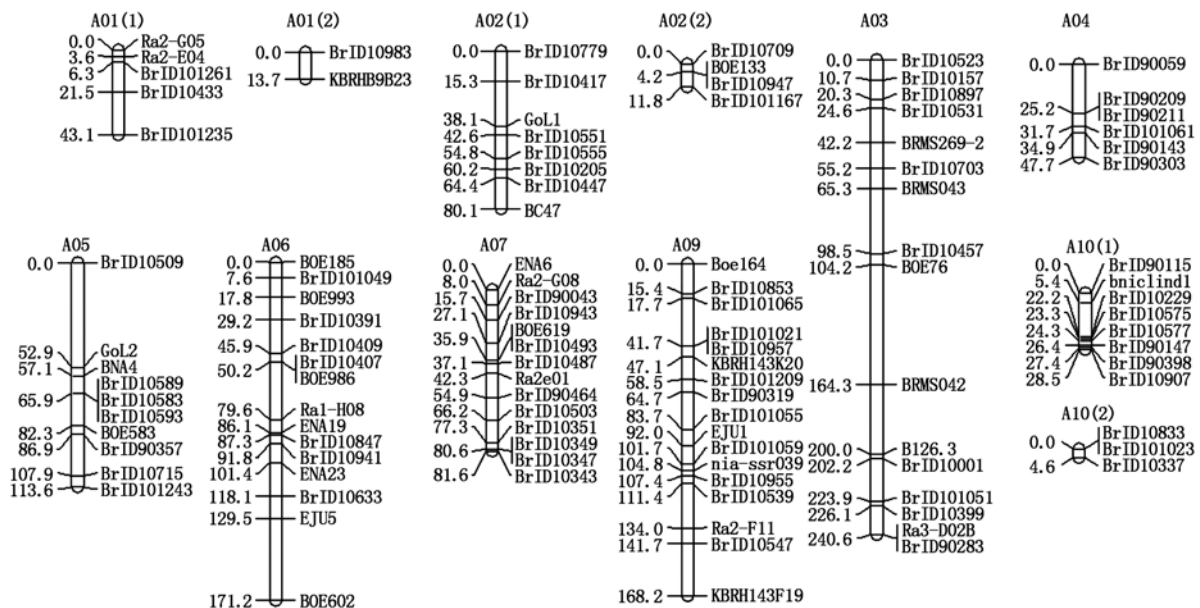


图 5 大白菜 InDel 和 SSR 分子遗传图谱

Fig. 5 InDel and SSR molecular genetic map of Chinese cabbage

表 2 SSR 和 InDel 标记偏离分离情况

Tab. 2 The distorted conditions of SSR and InDel makers

分子标记 Molecular marker	多态性标记数 No. of makers polymorphism	偏 B120 标记数 No. of markers distorted to B120	偏黑 227 标记数 No. of markers distorted to Black 227	偏离分离标记数 No. of distorted markers
SSR	34	10	9	19
InDel	74	12	10	22
总计 Total	108	22	19	41

3 讨论

3.1 关于大白菜分子遗传图谱

本研究利用大白菜感抗干烧心病 DH 群体构建分子遗传,覆盖基因组长度为 1 004.7 cM,与原玉香等^[9](1 272 cM)、Suwabe 等^[10](1 005.5 cM)、Choi 等^[11](1 182 cM)、Novakova 等^[12](1 138.1 cM)构建的大白菜图谱覆盖基因组长度有一定差异,这主要与选取作图群体双亲间遗传差异的大小有关。当两亲本间的遗传距离较大,染色体上差异位点多,且分布均匀时,构建出来的分子遗传图谱越长,与物种实际的基因组越接近;但若两亲本之间差异非常大时,在染色体发生重组及配对时会受到强烈的抑制,造成染色体上连锁座位间重组率降低,影响分离群体的构建。

染色体在分子水平上的表现就是连锁群,物种染色体数目应该与遗传图谱中的连锁群数目一样,但由于分子标记在染色体上随机分布及染色体之间存在不同交换值,导致构建出遗传图谱中的连锁群会出现较大间隙或小片段连锁群。大白菜有 10 条染色体,然而本研究构建出的遗传连锁图谱有 12 个

连锁群,说明有 2 条染色体上的分子标记缺失及频繁发生交换,如 Ajisaka 等^[13](16 个)、于拴仓等^[14](17 个)、孙秀峰等^[5](11 个)研究中都存在此问题。本研究所用的分子标记来自大白菜参考图谱,通过与大白菜参考图谱对比发现,在 A01、A02 和 A10 这 3 个连锁群上各自断裂形成了 2 个片段,以及没有出现 A08 连锁群,原因可能与本研究选取亲本之间的多态性较低有关,导致筛选出的多态性引物较少,构建出的遗传图谱的间隙较大、密度较低,出现小片段连锁群,构建出的连锁群与实际染色体数目不符。

3.2 关于 InDel 标记

InDel 标记是基于基因组序列信息而开发的新型分子标记技术,其变异在基因组中分布广泛,具有丰富多态性、标记带型简单、位点单一稳定等特点,是高分辨遗传图谱构建和关联研究的最佳候选标记^[15]。在白菜类作物中,DNA 序列水平上的多态位点变异颇为频繁,对比其他分子标记类型,其中 SNPs 和 InDels 是基因组序列中分布最为广泛的多态性变异。Park 等^[16]对中国大白菜栽培品种 Chifu-401-42 和 557 个 BAC 序列上的 1 398 个 STS 进行重测序分析表明,白菜中 SNP 和 InDel 频率分别为

15.3, 4.83 kb。该研究还发现,在白菜类作物 28 222 个序列变异中, InDel 变异频率几乎为总变异的 24%。由于 InDel 标记具有多态性比例高、检测方便、经济高效等优点,因此,成为构建分子遗传图谱的新型分子标记,但在白菜作物中公开发表的 InDel 标记数量很少,用 InDel 标记来构建分子遗传图谱的研究并不多见。本研究从 415 对 InDel 引物中筛选得到 74 对多态性 InDel 引物,遍及每一个连锁群,但是 InDel 标记在每个连锁群上分布不均匀,在 A09 连锁群上出现最多, A01 (2) 连锁群上出现最少,可能与每条染色体上开发出的 InDel 标记数量不同及亲本间多态性较低有关。

3.3 关于 DH 群体和分子标记偏分离

DH 群体,是由单倍体加倍获得的双单倍体,其遗传结构反映了子一代配子中的分离和重组,在育种研究中可以直接应用,能极大地缩短育种周期,作为永久性作图群体长期稳定使用。本研究的大白菜 DH 群体是通过培养游离小孢子产生的,建立所需时间短、较容易。作图群体的数量越多,构建出的分子遗传图谱精度越高,产生的偏分离标记数也就越低。本研究所使用的 DH 群体为 99 个,与张晓芬等^[17] 59 个,赵湘^[18] 80 个,张立阳等^[19] 100 个相比,能达到构建精度较高分子遗传图谱的要求,这就为下一步的干烧心病 QTL 定位奠定了基础。

本研究构建图谱的 108 个分子标记中,在 $P < 0.05$ 时,有 41 个表现偏分离,偏分离比为 38.0%,高于 Song 等^[20] 的 3.0%、Chyi 等^[21] 的 24.0%、Matsunomoto 等^[22] 的 19.0%、于拴仓等^[14] 的 13.9% 及王美等^[23] 的 15.0%,与张立阳等^[19] 的 45% 相差不大,这可能与选取的 DH 群体为作图群体有关。DH 群体的获得受遗传因素影响比较大,配子体或孢子体不同发育阶段对基因型产生选择效应,从而使 DH 群体遗传结构的完整性发生改变,导致偏分离现象的发生。

参考文献:

- [1] 张鹤,赵熙,刘莉. 大白菜干烧心病的研究进展[J]. 天津农业科学, 2009, 15(6): 47-48.
- [2] Aloni B, Pashkar T, Libl R, et al. The possible involvement of gibberellins and Calcium in tipburn of Chinese cabbage study of intact plants and detached leaves[J]. Plant Growth Regulation, 1984, 4(1): 311.
- [3] 王淑芬,张仪,沈征言. 大白菜干烧心病的形态结构及生理生化变化[J]. 园艺学报, 1996, 23(1): 37-44.
- [4] 赵素娥,邢金铭,李得众. 大白菜“干心”病的发生与缺钙的关系[J]. 园艺学报, 1982, 9(1): 33-40.
- [5] 孙秀峰. 大白菜 AFLP 分子遗传图谱的构建及干烧心病性状的 QTL 定位[D]. 泰安: 山东农业大学, 2005.
- [6] 李坤,史庆馨,张耀伟. 与大白菜干烧边性状相关的 SSR 和 SRAP 标记分析[J]. 中国瓜菜, 2010, 23(4): 6-11.
- [7] 黄萍,王五宏,李必元,等. 大白菜干烧心病基因 AFLP 分子标记的研究[J]. 浙江农业科学, 2011(5): 991-994.
- [8] 王艳. 白菜参考遗传图谱的构建[D]. 北京: 中国农业科学院, 2011.
- [9] 原玉香,张晓伟,孙日飞,等. 大白菜遗传图谱的构建及与染色体关联分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(3): 80-86.
- [10] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, et al. Simple sequence repeat-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The genetic origin of clubroot resistance[J]. Genetics, 2006(173): 309-319.
- [11] Choi S R, Teakle G R, Plaha P, et al. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007(115): 777-792.
- [12] Novakova B, Salava J, Lydiate D. Construction of a genetic linkage map for *Brassica campestris* L. [J]. Genetika Slechteni, 1996(32): 249-256.
- [13] Ajisaka H, Kuginuki Y, Hida K, et al. A Linkage map of DNA markers in *Brassica campestris* [J]. Breed ScL, 1995, 45(Suppl): 195-199.
- [14] 于拴仓,王永健,郑晓鹰. 大白菜分子遗传图谱的构建与分析[J]. 中国农业科学, 2003, 36(2): 190-195.
- [15] Rafalski A. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics[J]. Current Opinion in Plant Biology, 2002, 5(2): 94-100.
- [16] Park S, Yu H J, Mun J H, et al. Genome-wide discovery of DNA polymorphism in *Brassica rapa* [J]. Molecular Genetics and Genomics, 2010(283): 135-145.
- [17] 张晓芬,王晓武,娄平,等. 利用大白菜 DH 群体构建 AFLP 遗传连锁图谱[J]. 园艺学报, 2005, 32(3): 443-448.
- [18] 赵湘. 利用 SSR 和 InDel 标记构建白菜×芜菁分子遗传图谱[D]. 扬州: 扬州大学, 2011.
- [19] 张立阳,张凤兰,王美,等. 大白菜永久高密度分子遗传图谱的构建[J]. 园艺学报, 2005, 32(2): 249-255.
- [20] Song K M, Suzuki J Y, Slocum M K, et al. A linkage map of *Brassicarapa* (syn. *campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1991(82): 296-304.
- [21] Chyi Y S, Hoenecke M E, Sernyk J L. A genetic linkage map of restriction fragment length polymorphism loci for *Brassica rapa* (syn. *campestris*) [J]. Genome, 1992(35): 746-757.
- [22] Matsunomoto E, Yasui C, Ohi M, et al. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Euphytica, 1998(104): 79-86.
- [23] 王美,张凤兰,孟祥栋,等. 中国白菜 AFLP 分子遗传图谱的构建[J]. 华北农学报, 2004, 19(1): 28-33.