

大白菜中与芜菁花叶病毒(TuMV)感病基因连锁的 AFLP 标记

韩和平, 孙日飞, 张淑江, 李 菲, 章世蕃, 钮心恪

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: TuMV 是大白菜病毒病的主要病原物之一, 所以抗 TuMV 病毒病成为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。以抗病自交系 Brp0058 和感病自交系 Brp0181 杂交后代的 F₂ 分离群体为试材, 采用分离群体分组分析法(BSA), 筛选到 2 个与 TuMV 感病基因紧密连锁的 AFLP 分子标记, 利用 MAPMAKER/EXP (Version 3.0) 作图软件统计, 其遗传距离分别为 7.5 和 8.4 cM。

关键词: 大白菜; TuMV; 感病基因; AFLP 标记; BSA

AFLP Markers Linked to TuMV-resistance Gene in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

HAN He-ping, SUN Ri-fei, ZHANG Shu-jiang, LI Fei, ZHANG Shi-fan, NIU Xin-ke

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

Abstract: Several strains of turnip mosaic virus (TuMV) causes the most important virus disease in Chinese cabbage. In China, Chinese cabbage is infected by a mixture of strains. Cultivars with resistance to TuMV are major objectives in cabbag breeding. Screening the molecular marker linked to the TuMV-resistance gene for molecular assisted selection is the major method to improve breeding efficiency. In this study, AFLP technique and the method of bulked segregant analysis were used to study the progeny of Brp0058 × Brp0181, and two DNA molecular markers linked to TuMV-resistance gene with a recombination frequency 7.5 and 8.4 cM were identified.

Key words: Chinese cabbage; Susceptible gene; TuMV; AFLP marker; BSA

大白菜(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)原产我国, 是我国最重要的蔬菜作物之一, 其面积和产量占全国蔬菜作物的 1/4, 20 世纪 50 年代以来由于病毒病的普遍流行, 使白菜的生产受到巨大的损失, 而 TuMV 是白菜病毒病的主要病原物, 占病毒分离物的 71.9%。在我国, 大白菜被 TuMV 病毒的不同株系混合感染, 其中 TuMV-C₄ 为主要株系, 占分离物的 45.2%, 而 TuMV-C₅ 的致病性最强。目前抗 TuMV 病毒病成为白菜抗病育种的主要目标。20 世纪 70 年代以来, 全国已经陆续筛选出一批抗 TuMV 的优良的种质材料^[1]。但田间接种鉴定程序仍比较繁琐。随着分子生物学的不断发展, 分子标记技术在抗病育种中得到广泛应用, 目前已经找到 2 个与 TuMV 抗

性基因紧密连锁的 RAPD 标记 OPV18₁₄₀₀ 和 OPV18₈₂₀, 但是由于 RAPD 标记技术稳定性差, 使大白菜 TuMV 分子标记辅助育种受到了一定限制^[2]。

AFLP(amplified fragment length polymorphism)是由荷兰科学家 Zebau 和 Vos 创建并不断发展起来的一种新型 DNA 分子标记技术, 它结合了 RFLP 和 RAPD 的优点, 既具有前者的可靠性, 又具有后者的方便性, 自问世以来, 很快在多种蔬菜作物重要性状的标记, 遗传图谱的构建等方面得到广泛应用^[3~9], 但目前关于大白菜 TuMV 病毒病相关基因 AFLP 标记还未见报道, 本试验试图采用 BSA (bulked segregant analysis) 方法, 筛选与大白菜抗 TuMV 基因紧密连锁的 AFLP 标记, 以便更好的利用分子标记辅助

收稿日期: 2003-06-06

基金项目: 国家高技术研究发展计划资助项目。(2003AA207120)

作者简介: 韩和平(1971-), 男, 山西晋中人, 博士研究生。主要从事蔬菜遗传育种和植物抗盐机理的研究。Tel: 010-62591431-6241; E-mail: hepinghan@hotmail.com。孙日飞为通讯作者, Tel: 010-68919511; E-mail: rifei.sun@caas.net.cn

育种的方法, 加速大白菜的抗病育种进程。

1 材料与方 法

1.1 材 料

Brp0058是经过多代自交选育的大白菜自交系, 经田间接种鉴定对TuMV表现优良的抗性, 本试验用抗病材料Brp0058和感病材料Brp0181杂交后代构建 F_2 分离群体, 对 F_2 的各个单株接种TuMV- C_5 株系进行田间鉴定, 并选取极端抗病和极端感病的单株提取DNA, 用于构建抗病池和感病池。所有生物材料均由中国农业科学院蔬菜花卉所白菜组提供。

1.2 方 法

1.2.1 抗病性的鉴定 抗病材料Brp058和感病材料Brp181杂交后代构建 F_2 分离群体, 所有的种子放在铺有湿润的滤纸的培养皿内, 于25℃催芽24 h。然后将催芽的种子播种于塑料营养钵中置于温室中培养, 白天保持20℃, 夜晚保持15℃。本试验采用TuMV- C_5 株系对 F_2 的各个单株进行摩擦接种, 具体方法为大白菜的三叶期在植株的第2和第3片叶子的表面撒上600目的金刚砂, 用纱布蘸取TuMV悬浮液进行摩擦接种, 接种后立即用蒸馏水冲洗叶面。在第1次接种1周后, 在第4片叶面用同样的方法接种, 并将所有接种的叶片作好标记。在20~30℃的温室中培养15~20 d, 然后采用酶联检测的方法对所有单株进行TuMV抗性鉴定。结果表明, 其抗性受单基因隐性控制。

1.2.2 DNA的提取和检测 采集幼嫩的叶片用自来水冲洗干净备用。DNA的提取采用PHYTOPure plant DNA extraction kit, 具体步骤参照操作手册。用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳法检测DNA的纯度和含量。

1.2.3 抗感池的构建 由于AFLP的多态性很高, 为了减少单株鉴定的工作量, 笔者采用不同建池单株分别构建3对抗感池, 用于AFLP引物的筛选。试验表明, 不同单株的DNA经过酶切、连接和预扩之后, 其DNA的浓度已趋于一致, 所以本试验采用极端抗病和极端感病单株DNA的预扩产物来构建抗感池。

1.2.4 AFLP分析

(1) 基因组DNA的酶切和连接 基因组DNA的双酶切和接头的连接采用一步完成, 其反应体系为11 μ l, 包括: 10 \times T4连接酶缓冲液 1.1 μ l; 0.5 mol·L⁻¹ NaCl 1.1 μ l; 10 \times ATP 1.1 μ l; BSA(1 mg·ml⁻¹) 0.5 μ l; MseI和EcoRI接头各1.0 μ l; MseI

(20 U· μ l⁻¹) 0.4 μ l; EcoRI(20 U· μ l⁻¹) 0.2 μ l; T4连接酶 0.5 μ l; 基因组DNA 4.1 μ l; 37℃反应2 h。70℃变性10 min。

(2) 预扩增: 将酶切连接产物稀释20倍, 采用PE公司的AFLP plant mapping kit, 按如下体系预扩增: DNA模板 4.0 μ l; 预扩增引物 1.0 μ l; core mix 15 μ l; 总体积 20 μ l。扩增程序: 94℃ 变性 2 min, 94℃ 1 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 20次循环, 60℃ 30 min, 4℃ 保存。

(3) 选择性扩增: 扩增体系如下: 10 \times PCR 缓冲液 2.0 μ l; MgCl₂ 2.4 μ l; dNTP 0.8 μ l; Taq酶 1 U; EcoRI和MseI引物各1 μ l; 模板DNA 6 μ l; 加超纯水至20 μ l。扩增程序为: 94℃ 变性 2 min, 94℃ 30 s, 65℃ 30 s, 72℃ 2 min, 10次循环, 每次循环退火温度降低1℃, 94℃ 30 s, 56℃ 30 s, 72℃ 2 min, 30个循环, 72℃ 延伸 5 min。

(4) 银染程序: 参照参考文献[4]。

1.2.5 AFLP选择性扩增体系的优化 由于Mg²⁺和dNTP的浓度对PCR扩增结果影响较大, 本试验将Mg²⁺设1.5、2.0、2.5、3.0和3.5 mmol·L⁻¹等5个浓度, dNTP设200、400、600和800 nmol·L⁻¹等4个浓度, 共组成20个不同处理对扩增体系进行了优化。

1.2.6 TuMV感病基因AFLP标记的筛选 用不同的单株分别构建3对抗感池, 采用含2个选择性碱基的8个EcoRI引物AA、AC、AG、AT、TA、TC、TG、TT和含有3个选择性碱基的16个MseI引物CAA、CAC、CAG、CAT、CTA、CTC、CTG、CTT、GAA、GAC、GAG、GAT、GTA、GTC、GTG、GTT组成128对引物, 进行引物筛选, 然后对筛选的标记进行单株鉴定。并重复3次。

2 结果与分析

2.1 AFLP选择性扩增条件的优化

AFLP技术的操作过程中, 选择性扩增是最重要的步骤, 而影响选择性扩增的关键是Mg²⁺和dNTP的浓度。不同的PCR反应中Mg²⁺和dNTP的最适浓度不同, 本试验Mg²⁺设1.5、2.0、2.5、3.0和3.5 mmol·L⁻¹等5个浓度, dNTP设200、400、600和800 nmol·L⁻¹等4个浓度, 共组成20个处理(表1), 结果表明, 同其它作物相比白菜基因组DNA的PCR反应中需要较高浓度的Mg²⁺和dNTP, 在Mg²⁺浓度高于2.5 mmol·L⁻¹, dNTP浓度高于400 nmol·L⁻¹时条带比较清晰, 而Mg²⁺浓度为2.5 mmol·L⁻¹, dNTP浓度400 nmol·L⁻¹时所扩增的条带最清晰稳定。浓度过高则泳道背景加深, 表明非特异性扩增增加(图1)。

表1 不同 Mg^{2+} 和 dNTP 的浓度对 PCR 扩增结果影响Table 1 The effect of different Mg^{2+} and dNTP on PCR amplification result

处理 Treatment	Mg^{2+} ($mmol \cdot L^{-1}$)	dNTP ($nmol \cdot L^{-1}$)	处理 Treatment	Mg^{2+} ($mmol \cdot L^{-1}$)	dNTP ($nmol \cdot L^{-1}$)
1	1.5	200	11	2.5	600
2	1.5	400	12	2.5	800
3	1.5	600	13	3.0	200
4	1.5	800	14	3.0	400
5	2.0	200	15	3.0	600
6	2.0	400	16	3.0	800
7	2.0	600	17	3.5	200
8	2.0	800	18	3.5	400
9	2.5	200	19	3.5	600
10	2.5	400	20	3.5	800

2.2 抗 TuMV 病毒病基因 AFLP 标记的筛选

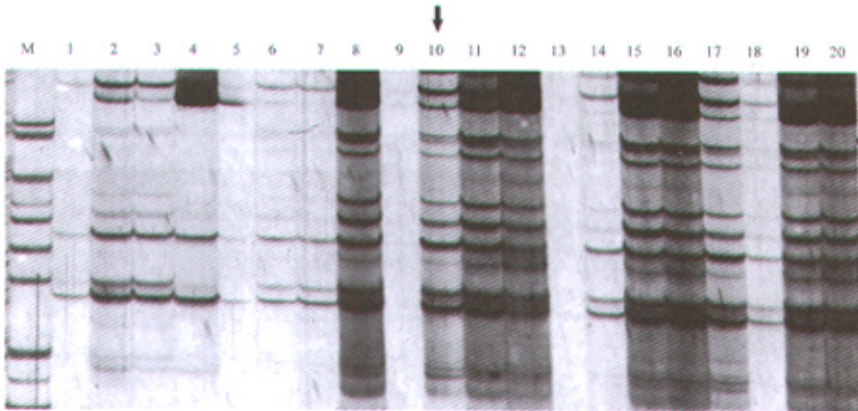
本试验用极端抗病和极端感病的不同 F_2 单株构建 3 对抗感池, 以 8 个 EcoRI 引物, 16 个 MseI 引物共组成 128 对引物组合, 对抗 TuMV 病毒病基因的 AFLP 标记进行了筛选, 结果以 EcoRI-AG/MseI-

GAC 和 EcoRI-AG/MseI-CAC 2 对引物组合分别筛选出 150 bp 的 2 个标记 CAG150 和 CAC150, 并且对所有 116 个 F_2 单株进行鉴定, 并重复 3 次, 结果稳定, 利用 MAPMAKER/EXP (Version 3.0) 作图软件统计, 其遗传距离分别为 7.5 和 8.4 cM (表 2, 图 2、3、4)。

表2 大白菜 TuMV 感病基因 AFLP 标记的筛选结果

Table 2 The screening result of AFLP marker link to TuMV susceptible gene in Chinese cabbage

标记 Marker	总株数 Total number of plant	未交换株数 Number of unexchange plant	交换株数 Number of exchange plant	交换率 Exchange frequency (%)	遗传图距 Map distance (cM)
CAG ₁₅₀	116	108	8	6.90	7.5
CAC ₁₅₀	116	107	9	7.76	8.4



箭头所指 (泳道 10) 为最优化的反应体系

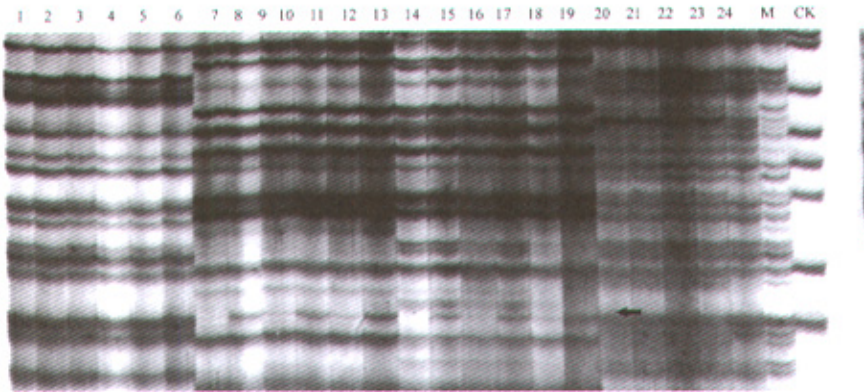
Arrow indicates (line 10) the most suitable PCR system

图1 不同 Mg^{2+} 和 dNTP 的浓度对 PCR 扩增结果影响Fig.1 The effect of different concentration Mg^{2+} and dNTP on PCR amplification result

3 讨论

3.1 白菜 TuMV 的抗性遗传规律受所选材料, 接种病毒株系等因素的影响很大。试验证明, 抗病材料

Brp0058 在接种 TuMV-C5 株系后, 其对 TuMV 的抗性受单基因隐性控制, 因此只有在纯合隐性基因的情况下才表现为抗性, 如果选用的标记与抗性基因相连锁, 则感病的杂合基因型中也会出现该标记, 无法

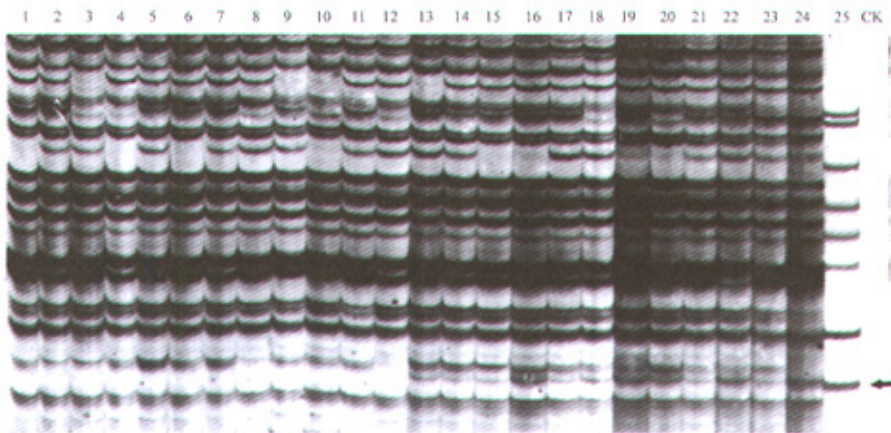


箭头所指为感病池中的差异目标条带;7、9、11: 为引物 EcoRI-AG/MseI-CAC 在抗病池中的扩增结果;8、10、12: 为引物 EcoRI-AG/MseI-CAC 在感病池中的扩增结果; 13、15、17: 为引物 EcoRI-AG/MseI-GAC 在抗病池中的扩增结果;14、16、18: 为引物 EcoRI-AG/MseI-GAC 在感病池中的扩增结果

Arrow indicates the special band in susceptible bulk; 7,9,11: amplification result in resistance bulk with EcoRI-AG/MseI-CAC;8,10,12: Amplification result in resistance bulk with EcoRI-AG/MseI-CAC; 13,15,17: Amplification result in resistance bulk with EcoRI-AG/MseI-GAC; 14,16,18: Amplification result in susceptible bulk with EcoRI-AG/MseI-GAC

图2 引物筛选

Fig.2 The screening result of primer combinations



箭头所指为感病单株中的目标条带;1~12: 抗病单株;13~24: 感病单株;M: 标记;CK: 对照

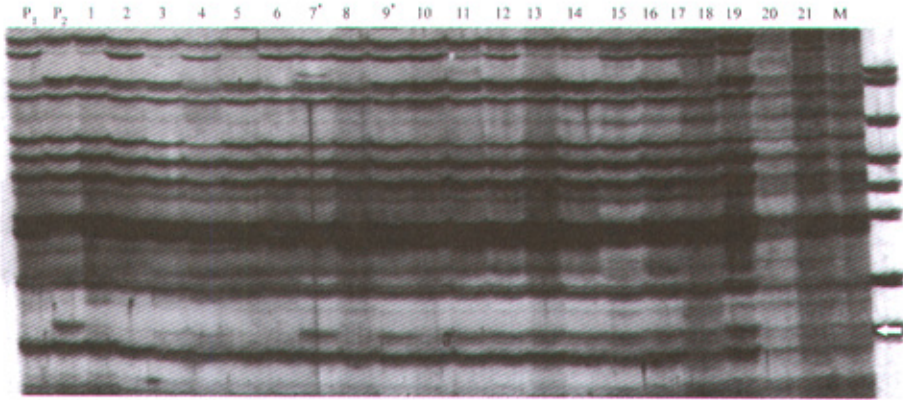
Arrow indicates the special band in susceptible plant; 1-12: Resistance plant; 13-24: Susceptible plant; M: Marker; CK: Control

图3 引物组合 EcoRI-AG/MseI-GAC 的单株鉴定结果

Fig.3 The amplification result in F_2 population with the primer combination EcoRI-AG/MseI-GAC

用于白菜的分子标记辅助育种,所以笔者选用与感病基因相连锁的标记,这样如果样品中没有该标记则其基因型一定为纯合隐性,表现为抗性,这种基因型才是抗性育种中需要保留的株系。但由于本

试验所筛选的标记是与感性基因相连锁,所以如果利用染色体步移的方法进行基因的定位克隆,所分离的基因为感性基因,没有实际应用价值,但对白菜 TuMV 的分子标记抗病育种选择以及揭示病毒-寄主



箭头所指为感病单株中的目标条带; 1~10: 抗病单株; 11~18: 感病单株; 7*、9*: 发生交换的单株; P₁: 抗病亲本; P₂: 感病亲本; M: 标记

Arrow indicates the special band in the susceptible plants; 1-10: Susceptible plant; 11-18: resistance plant; 7*, 9*: exchanged plant; P₁: Susceptible parent; P₂: Resistance plant; M: Marker

图4 引物组合 EcoRI-AG/MseI-CAC 的单株鉴定结果

Fig. 4 The amplification result in F₂ population with the primer combination EcoRI-AG/MseI-CAC

之间的互作机制仍有重要的现实意义。

3.2 AFLP 技术是目前一种比较先进的 DNA 分子指纹技术。和 RAPD 相比, 它具有 16~20 个碱基的引物, 稳定性更好; 和 RFLP 相比, 它采用 PCR 技术, 需要的 DNA 的量很少; 和 SSR 相比, 它不需要基因组 DNA 的任何序列。因此, 自问世以来, 在重要性状的标记、遗传图谱的构建上得到了广泛的应用^[10~17], 并且随着检测手段的不断提高, 利用银染技术也可得到相当清晰的扩增条带。但 AFLP 本身也存在一定的局限性, 它的过程比较繁琐, 包括基因组 DNA 的酶切和接头的连接, 预扩增以及选择性扩增, 而且对基因组 DNA 的纯度要求比较高, 给实际应用带来一定的困难。因此有必要将其克隆测序, 并进一步转换为稳定性好、易操作的 SCAR 标记。

3.3 在构建抗感池时所选用单株的 DNA 浓度必须一致,才能避免将个别单株之间的差异作为所要筛选的目的标记而产生假阳性。试验证明, 尽管不同单株之间的 DNA 浓度存在一定的差异, 但经过酶切连接和预扩增之后, 其 DNA 浓度已基本趋于一致, 因此本试验用等量的预扩增产物构建的抗感池可明显的避免上述假阳性的产生。

3.4 为了证明某对抗感池中是否存在相应的标记,一般要筛选 100~200 对引物。由于 AFLP 多态性高, 容易产生假阳性, 从而增加单株鉴定的工作量。因此本试验在采用 BSA 法构建抗感池时, 利用不同单

株同时建立 3 对抗感池, 有效的避免了假阳性的产生, 同时减少了单株鉴定的工作量, 大大提高了试验速度。

3.5 稳定性是衡量一种分子标记技术的重要指标。由于白菜叶片中含有较多的多糖和酚类物质, 以及在 DNA 提取过程中 CTAB、苯酚、异丙醇等化学物质的影响, 使白菜基因组 DNA 的纯度下降容易造成随后的 DNA 双酶切不彻底, 从而影响 AFLP 结果的稳定性。因此, 在进行 AFLP 实验操作中应当设法提高基因组 DNA 的纯度, 同时在不同重复之间要严格保持反应体系和扩增条件的一致性, 以保证 AFLP 的稳定性。

References

- [1] 李树德. 中国主要蔬菜抗病育种进展. 北京: 科学出版社, 1995: 26-29.
Li S D. *Advances in Main Vegetable Crop Breeding For Diseases Resistance in China*. Beijing: Science Press, 1995: 26-29. (in Chinese)
- [2] 闫瑾琦. 大白菜抗芜菁花叶病毒病基因的 RAPD 分子标记的研究. 硕士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2000.
Yan J Q. RAPD (random amplified polymorphic DNA) markers linked to Turnip mosaic virus-resistance gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. pekinensis). Beijing: The Papers of Master Degree of Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2000. (in Chinese)
- [3] Vos P, Hoger R, Bleeker M. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 1995, 23: 4 407-4 414.

- [4] 孙德岭, 赵前程, 宋文芹, 陈瑞阳. 白菜类蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析. 园艺学报, 2001, 28(4): 331-334.
Sun D L, Zhao Q C, Song W Q, Chen R Y. Relationships analysis of Chinese cabbage species by AFLP. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(4): 331-334. (in Chinese)
- [5] 田清震, 盖钧镒, 喻德跃, 吕慧能, 贾继增. 我国野生大豆与栽培大豆 AFLP 指纹图谱研究. 中国农业科学, 2001, 34(5): 480-485.
Tian Q Z, Gai J Y, Yu D Y, Lu H N, Jia J Z. AFLP fingerprint analysis of *G. soja* and *G. max* in China. *Agricultural Sciences in China*, 2001, 34(5): 480-485. (in Chinese)
- [6] 郑晓鹰, 王永建, 宋顺华, 李 丽, 于栓仓. 大白菜耐热性分子标记的研究. 中国农业科学, 2002, 35(3): 309-313.
Zheng X Y, Wang Y J, Song S H, Li L, Yu S C. Identification of heat tolerance linked molecular markers of Chinese cabbage *Bssica campestris* ssp. *pekinenses*. *Agricultural Sciences in China*, 2002, 35(3): 309-313. (in Chinese)
- [7] 陈 亮, 梁春阳, 孙传清, 金德敏, 江延波, 王 斌, 王象坤. AFLP 和 RFLP 标记检测水稻亲本遗传多样性比较研究. 中国农业科学, 2002, 35(6): 589-564.
Chen L, Liang C Y, Sun C Q, Jin D M, Jiang Y B, Wang B, Wang X K. Comparison between AFLP and RFLP markers in detecting the diversity of rice (*Oryza sativa* L.) *Agricultural Sciences in China*, 2002, 35(6): 589-564. (in Chinese)
- [8] Parsons Y M, Shaw K L. Mapping unexplored genomes: a genetic linkage map of the Hawaiian cricket *laupala*. *Genetics*, 2002, 162: 1 275-1 282.
- [9] Theo van der Lee, Andrea Robold, Antonino Testa, John W van't Klooster, Francine Govers. Mapping of avirulence genes in *phytophthora infestans* with amplified fragment length polymorphism markers selected by bulked segregant analysis. *Genetics*, 2001, 157: 949-956.
- [10] Luis F Cabrita, Uygun Aksoy, Serra Hepaksoy, Jose M Leitao. Suitability of isozyme, RAPD and AFLP markers to assess genetic differences and relatedness among fig (*Ficus carica* L.) clones. *Scientia Horticulturae*, 2001, 87: 261-273.
- [11] Liu J, Liu G S, Chao C H J. Comparison of genetic diversity of the germplasm resources of confectionary sunflower (*Helianthus annuus*) in China based on RAPDs and AFLPs. *Acta Botanica Sinica*, 2003, 45(3): 352-358.
- [12] Kazusato Ohshima, Yuka Yamaguchi, Ryo Hirota, Tamaki Hamamoto, Kenta Tomimura, Zhongyang Tan, Teruo Sano, Fumio Azuhata, John A Walsh, John Fletcher, Jishuang Chen, Abed Gera, Adrian Gibbs. Molecular evolution of Turnip mosaic virus: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 2002, 83: 1 511-1 521.
- [13] James A Saunders, Monica J Pedroni, Lindsay D J Penrose, Anthony J Fist. AFLP analysis of opium poppy. *Crop Science*, 2001, 41: 1 596-1 601.
- [14] Wim J M Koopman, Martin J Zevenbergen, Ronald G Van den Berg. Species relationships in *Lactuca* S L (lactuceae, asteraceae) inferred from AFLP fingerprints. *American Journal of Botany*, 2001, 88(10): 1 881-1 887.
- [15] Angus Mellish, Bruce Coulman, Yasas Ferdinandez. Genetic relationship among selected crested wheatgrass cultivars and species determined on the basis of AFLP marker. *Crop Science*, 2002, 42: 1 662-1 668.
- [16] Janny L Peters, Hans Constandt, Pia Neyt, Gerda Cnops, Jan Zethof, Marc Zebeau, Tom Gerats. A physical amplified fragment-length polymorphism map of *arabidopsis*. *Plant Physiology*, 2001, 127: 1 579-1 589.
- [17] Caro Wong, Ruth Kiew, George Argent, Ohn Set, Sing Kong Lee, Yik Yuen Gan. Assessment of the validity of the sections in *Musa* (Musaceae) using AFLP. *Annals of Botany*, 2002, 90: 231-238.