

大白菜耐热性分子标记的研究

郑晓鹰,王永建,宋顺华,李丽,于栓仓

(北京市农林科学院蔬菜研究中心,北京 100089)

摘要:采用单粒传的方法从大白菜耐热品种 177 和热敏感品种 276 杂交后代获得遗传性稳定的重组近交系群体,以此为材料用同工酶以及 RAPD 和 AFLP 分子标记技术鉴定了与大白菜耐热性数量性状相关的遗传标记,单因子方差分析和多元线性回归分析的结果表明,有 9 个与耐热性 QTL 紧密连锁的分子标记,包括 5 个 AFLP 标记,3 个 RAPD 标记和 1 个 PGM 同工酶标记,这些标记对耐热性遗传的贡献率为 46.7%。9 个标记中有 5 个分布在同一连锁群上,其他 4 个标记与任何一个标记无连锁关系,表明上述 9 个标记分布在大白菜的 5 个连锁群上。

关键词:大白菜;耐热性;AFLP;RAPD;同工酶;分子标记

Identification of Heat Tolerance Linked Molecular Markers of Chinese Cabbage *Brassica campestris* ssp. *pekinensis*

ZHENG Xiaoying, WANG Yongjian, SONG Shunhua, LI Li, YU Shuancang

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089)

Abstract: Genetic stable colony of recombination inbred line population was derived from a cross between a heat tolerance line 177 with a heat sensitive line 276 of Chinese cabbage (*Brassica campestris* ssp. *pekinensis*) by single seed generation. The colony was analyzed using isozyme, RAPD and AFLP techniques to determine molecular markers that linked with heat tolerance quantitative trait loci (QTL) of Chinese cabbage. The results of variance analysis of single factor and multiple linear regression analysis indicate that there are 9 molecular markers closely linked with heat tolerance QTL, they are 5 AFLP markers, 3 RAPD markers and 1 PGM isozyme marker. Total genetic contribution rate of these makers for heat tolerance is 46.7%. Five of the nine markers distribute in one linkage group and other 4 markers have no any relation with the markers in the group. The 9 heat tolerance linkage markers distribute in 5 independent locations of gene group in Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; Heat tolerance; AFLP; RAPD; Isozyme; Molecular marker

研究和不断改进大白菜耐热性的鉴定评价方法已成为重要的应用基础研究课题。目前,台湾亚蔬中心和北京蔬菜研究中心的研究人员已相继提出了以结球性能和苗期热害指数为指标分析耐热性的鉴定方法^[1,2]。

现有的研究表明,大白菜耐热性是遗传力很高($H_n = 68\%$)的数量性状,可能由少数基因控制^[3]。在前期研究中,我们已发现磷酸变位酶(PGM2)同工酶中有与耐热性相关的位点^[4]。

RAPD 和 AFLP 同是通过聚合酶链式反应(PCR)对模板 DNA 进行随机或选择扩增,根据扩增的某一 DNA 片段的有无,比较和鉴别不同基因组 DNA 的差异。RAPD 可以鉴别的 DNA 片段在 300bp 以上,而 AFLP 可以鉴别 30~300bp 的 DNA 片段,具有更强的鉴别植物多态性和分子标记的能力。结合一系列 RAPD 引物和 AFLP 引物组合的使用,可以使检测区域覆盖大部分基因组。目前,这些技术已用于鉴别大菜品种多态性,并已在很多种作物的基因连锁标记

收稿日期:2001-04-27

基金项目:北京市重点试验室种质改良项目

作者简介:郑晓鹰(1951-),女,北京人,研究员,主要从事蔬菜种质资源、种子检验、品种多样性生化和分子标记技术研究。Tel:010-88439634;

Fax:010-88446286;E-mail:xiaoying@public.east.net.cn

的鉴别中使用^[5-7]。

本研究以重组近交系(RIL)群体为材料,进行了供试 RIL 的苗期耐热性鉴定,并分别对 S₄ 各株系进行了同工酶、RAPD 和 AFLP 检测,对获得的多态性资料,用多元线性回归方式计算并确定与大白菜耐热性状连锁的分子标记,以及这些标记之间的相互关系和在染色体上的分布。

1 材料与方 法

1.1 供试材料

选用耐热的品种 177(P1)和热敏感品种 276(P2)为亲本进行杂交,从 F₂ 群体中随机选取植株自交,其后按“单粒传”法获得 105 个重组近交系(RIL S₄),构成 RIL 群体作为本项研究的试验材料。将上述群体和双亲在温室内播种育苗。育苗钵直径为 8cm,培养土经高压灭菌。温室内温度为 30℃/20℃(日/夜)。育苗期间按常规管理。幼苗长至 4 片真叶左右时,取样进行耐热性鉴定及其后同工酶、RAPD、AFLP 检测。

1.2 耐热性鉴定

试验采用随机区组设计,从各系和双亲中选取 30 株生长相对一致的幼苗,等量分成 3 组分别置于 3 个生长箱(CPH-1-CT NK 系统生长箱)内进行高温处理。各生长箱内(区组)随机排列。处理温度严格控制在 32±0.5℃范围内,光强为 180μmol/(m²·s),光周期为 14h/10h(光/暗),相对湿度为 80%~90%。

高温处理 7~10d 后,参照吴国胜等的方法^[3],对各系和亲本逐株进行耐热性鉴定并按下列公式计算各株系和双亲的热害指数。

$$\text{热害指数} = \frac{\sum \text{各株级数}}{\text{最高级数} \times \text{总株数}} \times 100\%$$

1.3 同工酶、RAPD、AFLP 检测

完成耐热性鉴定后,对各株系和双亲进行同工酶、RAPD 和 AFLP 测定,寻找与耐热性连锁的分子标记。

1.3.1 同工酶分析方法 大白菜幼苗提取同工酶依据 Wendel^[8]的方法。PGM 同工酶分析用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳,电泳仪为 BIO RAD200/500,分离胶浓度为 7%,浓缩胶浓度为 3.5%,Tris-甘氨酸电泳缓冲液 pH 8.3。每个样品加入 15μl 提取液。电泳在恒压 150V 下进行 30 min,然后转入 300V 进行 3 h。电泳后,胶片放入 PGM 染色液(1-磷酸葡

萄糖 0.15%, MgCl₂ 6H₂O 1 mol/L, NADP 0.015%, MTT 0.02%, PMS 0.004%, 6-磷酸葡萄糖脱氢酶 40 u,溶于 pH 7.5 的 0.1 mol/L Tris-HCl 液中),在 30℃ 黑暗条件下染色 1 h。

1.3.2 RAPD 和 AFLP 分析方法 RAPD 和 AFLP 的 DNA 提取:从大白菜幼苗提取 DNA 用 CTAB 方法,依据 Murry^[9]的方法,稍做修改。

RAPD 分析:扩增反应总体积为 20μl,其中 MgCl₂ 的终浓度为 2.5 mmol/L, dNTP 为 0.2 mmol/L,引物为 0.4 μmol/L,模板 DNA 为 20ng。扩增反应在 PCT-200 PCR(MJ Research, 美国)扩增仪上进行,扩增程序为:94℃ 变性 1 min, 36℃ 退火 10s, 72℃ 延伸 20s, 2 个循环;94℃ 变性 10s, 36℃ 退火 15s, 72℃ 延伸 70s, 38 个循环,再在 72℃ 下保持 4 min。扩增产物用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析,以 λDNA-EcoR I/Hind III 分子量标准片段作对照,计算各扩增片段的大小。凝胶用溴化乙锭染色,用 Gel Doc 1000 凝胶成像仪(Bio-Rad, 美国)分析电泳结果,并照像。

AFLP 分析:AFLP 的操作程序参照 Keygene 的方法,DNA 酶切步骤和选择扩增浓度有少许修改。试剂使用的是 AFLP™ 分析系统试剂盒(Gibco), 25μl 的反应体系中包括:2.5U EcoR I (B.M.), 2.5U Mse I (Gibco), 2.5μl 10× One-Phor All Buffer Plus (Pharmacia), 250ng DNA 和 H₂O。基因组 DNA 由 EcoR I 和 Mse I 在 37℃ 酶切过夜,然后在 70℃ 停止反应并维持 15 min。DNA 片段由试剂盒中的 EcoR I and Mse I 接头连接。连接产物稀释 10 倍的 DNA 片段进行预扩增:94℃ 0.5 min, 56℃ 1 min, 72℃ 1 min, 94℃ 0.5 min, 56℃ 1 min, 72℃ 10 min 20 个循环。预扩增产物稀释 10 倍后进行选择扩增,加入选择的 EcoR I + 3 和 Mse I + 3 引物,PCR 扩增程序为:94℃ 1 min, 65℃ 1 min, 72℃ 1.5 min, 94℃ 1 min 1 个循环,然后,退火温度为每一个循环降低 1℃ 共 20 个循环。反应物继续在 94℃ 1 min, 56℃ 1.5 min, 72℃ 10 min 扩增 24 个循环。样品加入点样缓冲液,95℃ 变性 5 min,在 4% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,100 W 恒功率电泳 2 h。凝胶用 DNA 银染体系染色。

1.4 数据分析

应用 SYSTAT 统计软件中的 GLM 程序,以各标记为因子进行与耐热性相关性的单因子方差分析,以求得耐热性连锁的标记座位,显著水准 P < 0.05。用多元线性回归求各相关标记对耐热性状的贡献率以及所有连锁标记的总体贡献率。

用 Mapmaker 软件分析各标记座位间的连锁关

系及在连锁群上可能的分布情况。

2 结果与分析

2.1 耐热性表型及其变异

耐热亲本 177 和热敏感亲本 276 分别表现出稳定的耐热性和热敏感性。RIL 群体表现出显著分离,且 105 个近交系植株热害指数直方形图接近振幅常态分布理论所配合的常态曲线,表明群体耐热性表型分布基本没有偏离常态分布,适于作遗传分析(图 1)。

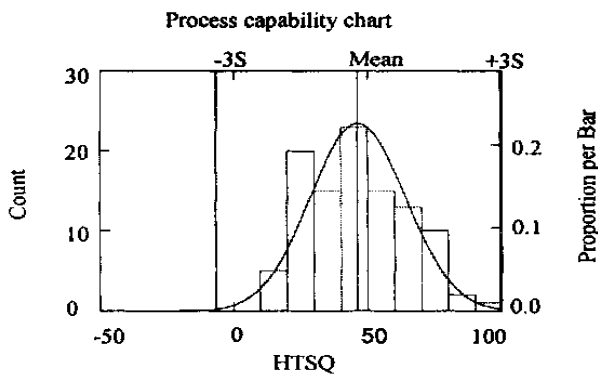


图 1 RIL 群体热害指数(HTSQ)分布与所配合的常态曲线图

Fig.1 Distribution and its normal curve of heat damage index (HTSQ) of RIL colony

2.2 重组近交系群体的同工酶(PGM)、RAPD 和 AFLP 检测

白菜幼苗的 PGM 同工酶中 PGM2-2 位点在耐热和热敏感亲本之间存在显著差异, χ^2 测定结果表明 F_2 群体中的分离比例符合 $1 \diamond 2 \diamond 1^{[4]}$ 。RIL (S_4) 群体各株系 PGM2-2 位点出现明显的分离(图 2)。

在用双亲和耐热、热敏两池进行 RAPD、AFLP 引物筛选后,从 400 个 RAPD 引物中筛选出 4 个其扩增条带在两池之间有差异的引物,S-234,S-230,S-262 和 S-279。从 16 个 AFLP 引物组合中筛选出 4 个在两池和两个亲本之间有差异的引物组,即 ACC/CTG,ACC/CAT,AGG/CAG 和 AAC/CTC。用上述 4 个 RAPD 引物和 4 个 AFLP 引物组对 RIL 群体检测的结果表明,各供试株系间相关条带存在明显的分离(图 2)。

2.3 与耐热性 QTLs 紧密连锁的分子标记的检测

为了在重组近交系 S_4 分离群体中,建立以每种检测方式得到的遗传标记与耐热数量性状之间相互关联关系,以标记为基础,根据标记基因型的种类将

分离群体分成两个亚群体:组 0 和组 1,采用多元回归分析法比较不同标记基因型群体间数量性状的差异,以寻找耐热性状与 1 个或多个标记之间的相关。从表 1 可以看出,PGM2-2 标记与耐热性显著相关,贡献率为 8.6%。RAPD 的 4 个标记中有 3 个标记 S234-620,S230-700 和 S262-950 与耐热性显著相关,贡献率分别是:16.9%,5.6%和 3.7%。AFLP 的 5 个标记 ACC/CTG165,ACC/CAT105,ACC/CAT190,AGG/CAG180,AAC/CTC220 都与耐热性显著相关,贡献率分别是:22.3%,18.5%,16.8%,4.3%和 13.1%。用多元回归方法分析 9 个与耐热性显著相关的标记的综合贡献率为 46.7%。

2.4 与耐热性连锁的分子标记在大白菜基因组的分布

根据标记的基因型,用 Mapmaker 作图软件分析标记的分布和相互间的关系的结果表明,以似然比对数(LOD)3.0 以上,两标记间最大相互距离 30cM 为标准,9 个标记中有 5 个在同一连锁群上,它们分别为 RAPD 标记 S234-620、S230-700、S262-950 和 AFLP 标记 ACC/CAT105 和 ACC/CAT190,标记之间最佳排列方式为:S230-700,ACC/CAT105,ACC/CAT190,S234-620,S262-950,它们之间的相互距离如下图(图 3),连锁群全长为 67.0cM。另外 4 个标记 PGM2、ACC/CTG165、AGG/CAG180 和 AAC/CTC220 不与任何标记连锁,表明上述 9 个标记分布在大白菜的 5 个连锁群上。

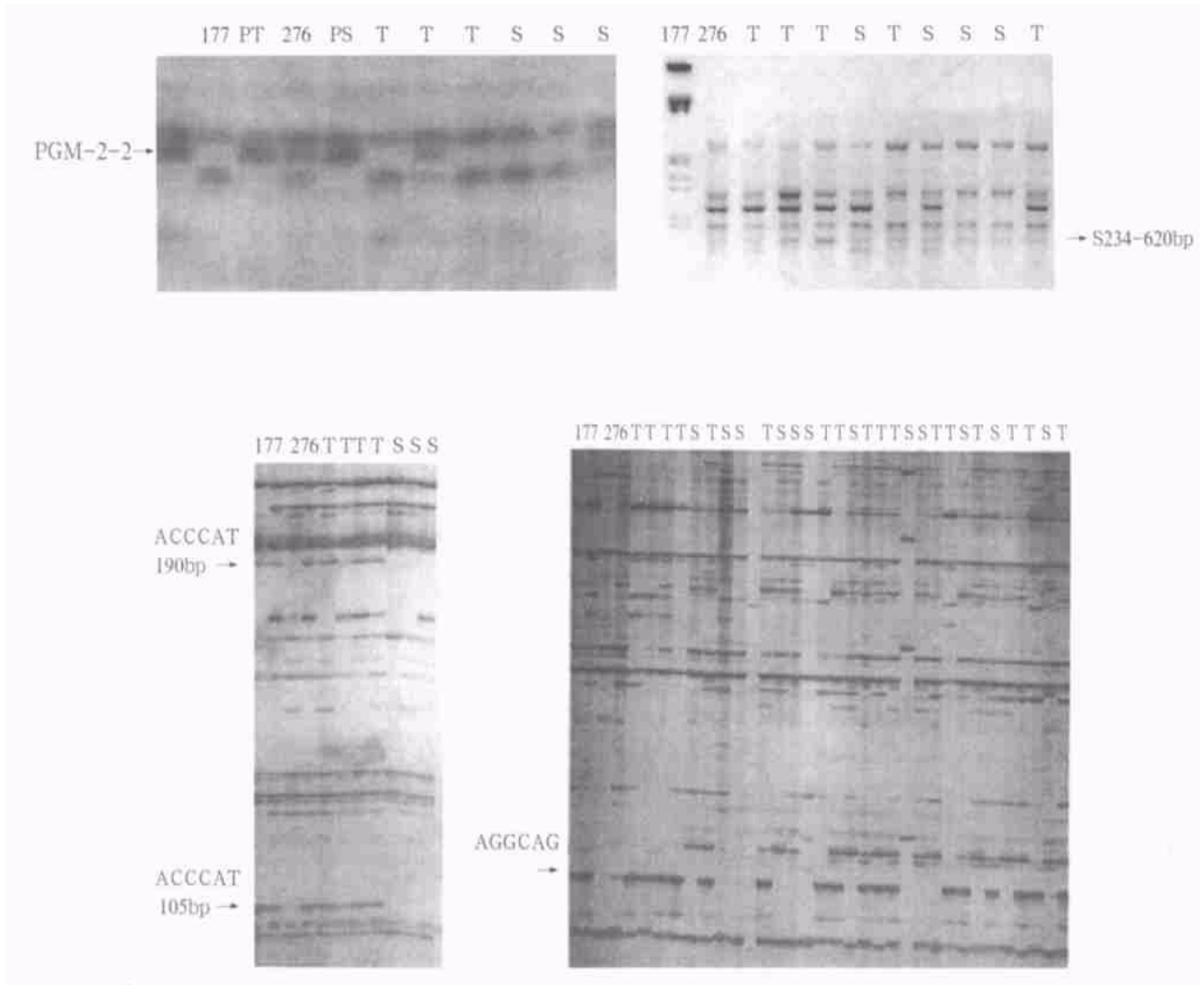
2.5 耐热性 QTL 互作关系分析

用双因子方差分析方式分别分析了在 4 个独立座位上的标记 PGM2、ACC/CTG165、AGG/CAG180 和 AAC/CTC220 与在连锁群上的 5 个标记之间的互作关系,结果证明,在所测试的上述标记之间不存在明显的互作。

3 讨论

经典的遗传学研究表明,耐热性是遗传力很高由少数基因控制的性状^[3]。本研究找到分布在 5 个独立座位上的 9 个分子标记,其中分布在同一连锁群上的 5 个与耐热性连锁的标记和另一个单独连锁群上的 ACC/CTG165 标记,对大白菜耐热性都有相对较高的贡献率,9 个标记对耐热性的总贡献率已达到 46.7%,进一步从分子数量遗传学的角度获得证据,支持这一研究结论。

Michelmore (1991)^[11]发展了一种分离体混合



177 :耐热亲本 ,PT:耐热池 ,276 :热敏亲本 ,PS:热敏池 ,T:RIL(S₄) 耐热单株 ,S:RIL(S₄) 热敏单株
 177 ,PT,T:heat tolerance parent , pool and RIL(S₄) line ;
 276 ,PS,S:heat sensitive parent ,pool and RIL(S₄) line

图 2 同工酶 PGM 、RAPD 和 AFLP 与大白菜耐热性相关的标记

Fig . 2 PGM, RAPD and AFLP markers relative with heat tolerance in Chinese cabbage

表 1 多元回归分析检测与耐热性状连锁的标记

Table 1 Detecting of heat tolerance linked markers using multiple linear regression analysis

标记 Markers	平方和 Sum of squares	自由度 df	均值平方 Mean square	F 值 F ratio	显著性误差 P	贡献率 Contribution rate (%)
PGM 2-2	28543 .9	100	285 .4	9 .3	0 .003	8 .6
RAPD S234-620	26719 .9	102	261 .9	20 .6	0 .000	16 .9
S230-700	30341 .2	102	297 .4	6 .0	0 .016	5 .6
S262-950	30939 .9	102	303 .3	3 .9	0 .050	3 .7
AFLP ACC/ CTG-165	24969 .4	98	254 .7	28 .1	0 .000	22 .2
ACC/ CAT-105	26182 .3	99	264 .4	22 .5	0 .000	18 .5
ACC/ CAT-190	26725 .3	99	269 .9	20 .0	0 .000	16 .8
AGG/ CAG-180	29974 .5	98	305 .8	4 .4	0 .038	4 .3
AAC/ CTC-220	26822 .0	97	276 .5	14 .5	0 .000	13 .1

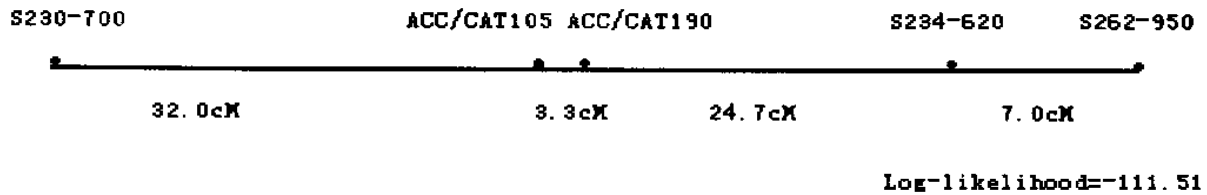


图3 连锁群上5个耐热标记的分布图

Fig. 3 Distribution of the 5 heat tolerance markers on linkage group

分析或群体分析法 (Bulked segregate analysis), 用于快速鉴别与特定基因或染色体区域连锁的标记。我们采用了这一方法从 RIL 群体中选取最为耐热的株系和热敏感株系, 产生两个混合的 DNA 样品池。两池在所选择的区域在遗传上是相异的, 而在其他区域则可能是杂和的。通过 RAPD 和 AFLP 分析在两池寻找到了有差异的分子标记。最后通过分离群体的分析进行验证, 确定了与耐热性 QTLs 紧密连锁的分子标记。实践证明, 这一方法的应用大大缩小了用 RIL 群体检测的引物范围, 有效地减少了工作量。

亲本的选择直接影响到构建连锁图谱的难易程度及所建图谱的适用范围。一般选择亲缘关系远而稳定性强的品种或材料作为分离群体的亲本。然而亲本间的差异过大, 杂种染色体之间的配对和重组受到抑制, 导致连锁座位间的重组率偏低, 降低了所建图谱的可信度和利用范围, 严重的会降低杂种后代的结实率, 甚至导致不育, 影响分离群体的构建。因此, 在选择亲本时, 既要注意亲本间的差异性, 也要考虑差异过大可能导致的上述不利影响。亲本间的亲缘关系究竟以多远为宜, 因物种而异。一般而言异交作物多态性高, 自交作物的多态性低。大白菜是异交作物, 以往 RAPD、AFLP 分析的结果表明, 其遗传多样性十分丰富。本项研究所选用的两个亲本材料分属两个生态型, 且两者在重要植物学性状上存在众多差异, 由此所得的 RIL 群体是一个很好的作图群体。

RIL 群体的获得虽然费时费工, 但与 F_2 分离群体相比有多方面的优点, 该群体可以重复进行检验, 特别适合于抗性分析和数量性状的分析。RIL 在达到纯合前已经历了多轮的减数分裂, 因而连锁基因间具有更大的重组机会。对于紧密连锁的标记, RIL 群体中所观察的重组体的数量是一次减数分裂所产生群体的两倍。在作图的初级阶段, 这种扩张性重

组使得难以检测到基因之间的连锁。但一旦建立了基本的连锁关系之后, 这种扩张重组使得更容易检测到基因座位之间的不等位, 而且可以更精确地估计图距。本项研究已经建立了标记与耐热相关基因的连锁关系, 下一步我们将利用已得到的作图群体, 深入进行大白菜耐热性 QTL 和其他重要性状的定位研究。

References :

- [1] Wu G S, et al. Studies on mode of high temperature injury and screening method for heat tolerance cabbage. *Acta Agriculturae Borealis Sinica*, 1995, 10(1) : 111 - 115. (in Chinese)
吴国胜, 等. 大白菜热害发生规律及耐热性筛选方法的研究. *华北农学报*, 1995, 10(1) : 111 - 115.
- [2] Zee S Y, et al. Electrophoretic analysis of seed proteins of heat-tolerant and heat-sensitive cultivars of Chinese cabbage. *Hort. Science*, 1978, 13(5) : 547 - 548.
- [3] Wu G S, et al. The inheritance of high temperature tolerance in Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 1997, 24(2) : 141 - 144. (in Chinese)
吴国胜, 等. 大白菜耐热性遗传效应研究. *园艺学报*, 1997, 24(2) : 141 - 144.
- [4] Zheng X Y, et al. Study on relationship between heat tolerance and phosphoglucosylase loci of Chinese cabbage. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(3) : 252 - 257. (in Chinese)
郑晓鹰, 等. 磷酸变位酶遗传表现与结球白菜耐热性的关系. *园艺学报*, 1998, 25(3) : 252 - 257.
- [5] Goldman I L, et al. Molecular markers associated with maize kernel oil concentration in an illinois high protein x illinois low protein cross. *Crop Sci.* 1994, 34 : 908 - 915.
- [6] Hu J, et al. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD marks. *Plant Cell Reports*, 1991, 10 : 505 - 511.
- [7] Lin J, et al. Identification of molecular markers in soybean comparing RFLP, RAPD and AFLP DNA mapping techniques. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1996, 14(2) : 156 - 169.
- [8] Wendel J F, et al. Genetic control of isozyme variation in *Camellia japonica* L. *J. Hered.* 1982, 73 : 197 - 204.
- [9] Murray M, et al. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.* 1980, 8 : 4321 - 4325.
- [10] Williams J G K, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 1990, 18 : 6531 - 6535.
- [11] Michelmore R W, et al. Identification of markers linked to disease resistance gene by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions using segregating populations. *Proc. Natl. Sci. USA*, 1991, 88 : 9828 - 9832.