

# 与辣椒抗根结线虫基因 *Me1* 紧密连锁的 EST-SSR 标记开发

张宇<sup>1,2</sup> 张晓芬<sup>1</sup> 陈斌<sup>1</sup> 耿三省<sup>1</sup> 李焕秀<sup>2</sup>

(1. 北京市农林科学院蔬菜研究中心,北京 100097; 2. 四川农业大学园艺学院,四川 雅安 625014)

**摘要:**以含抗根结线虫病基因 *Me1* 的 PM217 与感线虫品种茄门,及其  $F_1$ 、 $F_2$  作为试验材料,采用南方根结线虫 (*Meloidogyne* spp.) 人工接种鉴定,根据鉴定结果,利用分离群体分组分析法 (bulked segregant analysis, BSA) 建立抗感池,共筛选到 3 对 (118、141 及 211) 多态性 EST-SSR 引物在抗感池间存在差异。利用 Joinmap3.0 软件,结合抗病性鉴定,对  $F_2$  群体进行 SSR 分析,研究 3 个 EST-SSR 标记位点与根结线虫抗性基因 *Me1* 的连锁关系,结果表明,EST-SSR 标记 141、118 及 211 与 *Me1* 的遗传距离分别为 6.984、18.684 和 29.310cM。本研究得到的与辣椒抗根结线虫显性单基因 *Me1* 紧密连锁的 EST-SSR 标记,为 *Me1* 基因的标记辅助选择提供了参考。

**关键词:**辣椒;根结线虫;*Me1* 基因;EST-SSR

## DEVELOPMENT OF EST-SSR MARKERS LINKED TO *ME1*, A NEMATODES RESISTANCE GENE IN PEPPER

ZHANG Yu<sup>1,2</sup> ZHANG Xiao-fen<sup>1</sup> CHEN Bin<sup>1</sup> GENG San-sheng<sup>1</sup> LI Huan-xiu<sup>2</sup>

(1. Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100097;

2. Horticulture College, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014)

**Abstract:** In this study, we investigated the resistance to *Meloidogyne* spp with artificial inoculation systems among  $F_2$  lines derived from susceptible variety Qiemeng and resistant variety PM217 carried nematodes resistance gene *Me1*, with artificial *Meloidogyne* spp. inoculation systems. Based on the phenotype, we constructed a resistance bulk and a susceptible bulks to screen out the linkage markers. Using EST-SSR technology, the combination primers 118, 141 and 211 were shown to be linked to *Me1*. Furthermore, with expanding population, the three markers were mapped to the locus with genetic distances of 6.984, 18.684 and 29.310cM, respectively using Joinmap3.0 software. Identification of EST-SSR molecular markers linked to the dominant resistant gene *Me1* laid laying the foundation for resistance breeding.

**Key words:** pepper; root-knot nematode; *Me1*; EST-SSR

根结线虫是辣椒的主要病虫害之一,其危害日趋严重。我国对辣椒抗根结线虫的研究起步较晚,在病原学、病理学以及分子生物学等方面都还处于起步阶段。在国外,辣椒抗根结线虫育种研究始于 20 世纪中叶,Maxtin 于 1948 年首次报道了辣椒品种对根结线虫

的抗性,标志着辣椒抗根结线虫育种的开始<sup>[1]</sup>。现有研究表明,辣椒属中存在多个抗线虫病基因,这些基因的来源、抗谱范围、对温度的稳定性和抗病机制各不相同。Hare 等<sup>[2]</sup>将他发现的第一个抗线虫基因命名为 N。Hendy 等<sup>[3]</sup>通过 DH 群体,在 PM217 和

收稿日期:2010-11-08 接受日期:2011-01-05

基金项目:国家“863”项目(2006AA100108),国家科技支撑计划(2009BADB8B01),北京市科技计划(D08070500690803),北京市常规育种财政专项

作者简介:张宇(1985-),女,四川德阳人,硕士研究生,研究方向为蔬菜生物技术与遗传育种。E-mail:zhangyu\_black@gmail.com

通讯作者:耿三省(1966-),男,河南新乡人,研究员,研究方向为甜辣椒遗传育种。Tel:010-51503007; E-mail:gengsansheng@nervc.org

PM687 中共发现了 5 个抗病显性基因 ( $Me1 \sim Me5$ ), Caporalino 等<sup>[4]</sup>已将它们定位在辣椒的 P9 染色体, Di Vito 等<sup>[5]</sup>在几个野生辣椒材料中也发现了数个抗根结线虫病基因,但没有命名。

培育抗性品种是防治根结线虫最有效的方法,但常规育种周期长,而利用分子标记辅助育种则大大提高了育种速度。EST-SSR 作为一种新型分子标记,来自表达基因,除具备传统基因组来源的 SSR 标记所有优势外,还可能与基因功能具有直接或间接关系,从而强化了 SSR 标记在遗传研究中的应用。EST-SSR 标记已在众多植物种类中得到了证实和应用<sup>[6,7]</sup>,辣椒 EST-SSR 标记也有一些被开发<sup>[8,9]</sup>。EST-SSR 标记来源于基因组编码序列将更有利于连锁基因的研究<sup>[10]</sup>,因此加快与根结线虫基因紧密连锁的 EST-SSR 标记的开发和利用,有利于推进我国抗根结线虫病辣椒的育种进程。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料准备

试验以含有南方根结线虫抗性基因  $Me1$  的辣椒 PM217 和高感线虫的甜椒茄门为双亲,构建  $F_1$ 、 $F_2$  群体。种子经浸种催芽,待露白后播于育苗盘中,以灭菌营养土为栽培基质。待幼苗长至 4~5 片真叶时,移栽到 11cm × 11cm 营养钵中,每钵 1 株,以灭菌的细砂草炭混合土 (V:V = 2:1) 为培养基质,置于植物培养箱中培养。培养箱控制条件为:白天 (25 ± 0.5) °C,夜间温 (20 ± 0.5) °C,湿度 60% ~ 70%,光照 16h,黑暗 8h。

### 1.2 南方根结线虫卵悬浮液制备

从南方根结线虫发病严重的北京密云县收集感病明显、长有大量根瘤的黄瓜病根,制备南方根结线虫卵悬浮液<sup>[11,12]</sup>。在 Wild Makroskop M410 立体解剖镜下计数虫卵,将溶液稀释至 1000 卵/ml,4 °C 保存备用,24h 内进行接种处理。

### 1.3 苗期人工接种

幼苗移栽 10d 后进行人工接种,每钵接种 2000 卵。接种前,先将营养钵浇透水;接种时,在幼苗根际土壤对扎 2 个孔,约 1~2cm 深,将线虫卵悬浮液均匀注入,每钵 2ml。接种后,植物培养箱内条件调整为:温度 (22 ± 0.5) °C,湿度 60% ~ 70%,光照不变。每 7d 浇水 1 次,保证根系水分不能过多<sup>[11,12]</sup>。

### 1.4 抗性鉴定

人工接种 8 周后,将植株根部土壤轻轻掰开,小心取出根,清洗干净,调查根结数,每份材料根结数计数

3 次,统计结果取其平均值。分级标准以及病级指数<sup>[13,14]</sup>为:1 级:植株根部没有根瘤形成;2 级:根部形成 1~3 个根瘤;3 级:根部形成 4~12 个根瘤;4 级:根部形成 13~25 个根瘤;5 级:根部形成 26~38 个根瘤;6 级:根部形成 39~50 个根瘤;7 级:根部形成 51~65 个根瘤;8 级:根部形成 66~80 个根瘤;9 级:根部形成 81 个以上根瘤。

根结指数 (GI) =  $\Sigma$ (病级 × 各级植株数) / 总植株数。高抗 (HR):  $1 \leq GI \leq 2.9$ ; 中抗 (MR):  $3.0 < GI \leq 4.0$ ; 抗病 (R):  $4.1 < GI \leq 4.9$ ; 感病 (S):  $5.0 < GI \leq 6.9$ ; 高感 (HS):  $7.0 < GI \leq 9.0$ 。

### 1.5 模板 DNA 的提取

采用 TIANGEN 新型植物基因组 DNA 提取试剂盒提取基因组 DNA, DNA 检测在 DYCP-31DN 型水平电泳槽上进行,凝胶成像系统成像分析,紫外分光光度计测定 DNA 原液浓度, -20 °C 保存。

### 1.6 BSA 分池

依据 BSA 原则<sup>[15]</sup>,选取 10 株对根结线虫高抗和 10 株对根结线虫高感的  $F_2$  单株,分别以等量 DNA 混合建立抗病池  $B_R$  和感病池  $B_S$ 。

### 1.7 引物筛选

以双亲 DNA 为模板,对 357 对 EST-SSR 引物进行多态性引物筛选。再以抗病池  $B_R$  和感病池  $B_S$  为模板,利用在亲本间表现稳定的多态性引物进行多态性分析,最后挑选在池中稳定性好且易于识别差异的引物,对  $F_2$  代群体进行分子标记分析,以检测 SSR 标记与抗病基因的连锁程度。EST-SSR 扩增反应体系 (12.5  $\mu$ l) 为: 1 × PCR buffer, 20ng 模板 DNA, 1.0mmol/L  $MgCl_2$ , 100  $\mu$ mol/L dNTPs, 上下游引物各 160nmol/L, 0.5U *Taq* 酶。PCR 反应在东胜龙 EDC-810 型 PCR 扩增仪上进行,反应程序为: 94 °C 预变性 4min; 94 °C 变性 30s, 48 °C ~ 60 °C 复性 1min, 72 °C 延伸 1min, 35 个循环; 72 °C 再延伸 5min。

### 1.8 电泳检测

8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测 PCR 扩增产物,扩增产物中加入 2  $\mu$ l 6 × Loading buffer, 上样 6  $\mu$ l, 恒压 160V, 电泳 2h, 硝酸银染色, 统计分析扩增产物的多态性。

### 1.9 带型统计与连锁分析

与母本带型相同者记为“a”, 与父本带型相同者记为“b”, 杂合带型记为“h”, 模糊不清或者丢失的带记为“-”。用 JoinMap3.0 软件进行  $Me1$  基因与 EST-SSR 标记位点间的连锁分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 辣椒抗根结线虫接种鉴定结果

由于接种后部分植株死亡,故 PM217、茄门、 $F_1$  代及  $F_2$  代最终的鉴定植株数分别为 16、19、12、271 株(表 1)。参照根结指数及分级标准,分析得到各材料的根结指数(GI):抗病亲本 PM217 及  $F_1$  代均为 1,属于高抗

(见图版 1 及图版 3);感病亲本茄门为 8.6,为高感(见图版 2); $F_2$  群体平均为 3.6,为中抗。从表 1 可以看出,高感品种茄门死亡率最高,为 20.83%, $F_2$  群体死亡率为 4.91%,而抗性亲本 PM217 与  $F_1$  代均没有死亡株;其中在  $F_2$  群体中,表现抗病的有 197 株(见图版 4),感病有 74 株(见图版 5),抗感比为 2.7:1,  $\chi^2_{0.05,1} = 0.65 < 3.84$ ,符合单显性基因 3:1 的理论分离比例。

表 1 辣椒抗根结线虫接种鉴定结果分析

Table 1 The result of the Nematode resistance identified in capsicum

指标 index	材料 material			
	PM217	茄门 Qiemen	$F_1$	$F_2$
接种数 No. of inoculated plants	16	24	12	284
鉴定数 No. of identified plants	16	19	12	271
死亡数(率) death number (rate)	0	5(20.83%)	0	14(4.91%)
根结指数(GI) gall index	1	8.6	1	3.6
≤4 级(抗) ≤grade four(resistance)	16	0	12	197
高抗 high resistance(HR)	100%	0	100%	72.69%
≥5 级(感) ≥grade five(susceptible)	0	19	0	74
高感 high susceptible(HS)	0	100%	0	27.31%

### 2.2 基因组 DNA 提取与检测

取 4 $\mu$ l DNA 原液经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 1),结果显示,该试剂盒提取的 DNA 溶液,RNA

去除较好,基因组 DNA 比较完整,可用于 SSR 分析试验。用紫外分光光度计测定 DNA 原液浓度,统一稀释为 25ng/ $\mu$ l,分装后 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。



图 1 部分  $F_2$  辣椒单株 DNA 提取结果

Fig. 1 Parts genomic DNA of  $F_2$  plants

### 2.3 亲本与抗感池间多态性引物筛选

从设计的 357 对 EST-SSR 引物中最终筛选出 75 对在双亲间表现多态性的引物。根据抗性鉴定结果,以抗感池为模板,对在亲本间表现多态性的引物进一

步进行筛选,筛选到 118、141、211 等 3 对 EST-SSR 引物能在抗感池中扩增出与亲本相同且稳定的多态性条带(表 2、图 2)。

表 2 辣椒  $F_2$  群体抗感池间多态性引物筛选结果

Table 2 Polymorphic primers showed between resistance pool and susceptible pool of the  $F_2$  segregation population

编号 code	上游引物 (5'→3') forward primer(5'→3')	下游引物 (5'→3') reverse primer(5'→3')	PM217/ $B_R$ (bp)	茄门/ $B_S$ (bp)	$F_1$
118	CCACAACGAATGGCAAAC	TCATGGGAGAATGGCTCA	≈178	≈181	杂合带 hybrid band
141	GACGCCGAGGACTATGAT	GATACTCCGTGCCAGAT	≈240	≈245	杂合带 hybrid band
211	AGAGTTATGGGAAGATTG	AACCGAAGTTCGTAGAAG	≈245	≈249	杂合带 hybrid band

### 2.4 与辣椒抗根结线虫 *Me1* 基因连锁的 EST-SSR 标记筛选

2.4.1  $F_2$  群体中 EST-SSR 标记分布 利用筛选到的 3 对引物 118、141 及 211 分别对  $F_2$  代群体进行 EST-

SSR 分析,重复 3 次后,3 对引物的扩增结果均稳定,且条带差异明显(图 3)。运用 Joinmap3.0 软件分析 3 个 EST-SSR 标记在  $F_2$  代群体中的分布情况(表 3)。

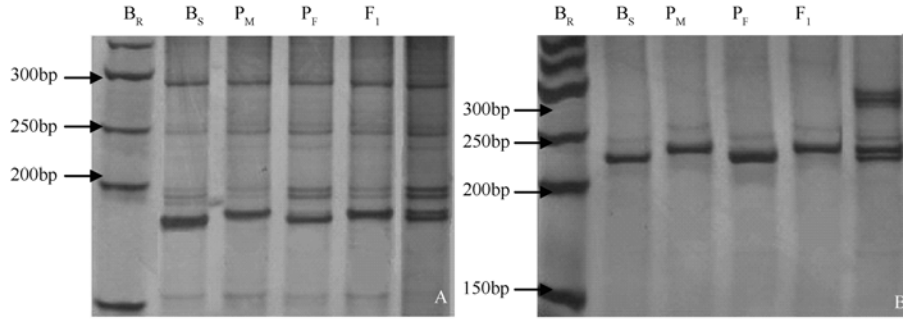


图 2 多态性引物 118(A)、141(B)在亲本及 F<sub>1</sub>、抗感池 DNA 的扩增结果

Fig. 2 Amplified in P<sub>M</sub>, P<sub>F</sub>, F<sub>1</sub>, B<sub>R</sub>, B<sub>S</sub> using polymorphic primers 118(A), 141(B)

P<sub>F</sub>:母本 PM217; P<sub>M</sub>:父本茄门; F<sub>1</sub>:PM217 × 茄门; B<sub>R</sub>:抗池; B<sub>S</sub>:感池

P<sub>F</sub>: female parent PM217; P<sub>M</sub>: male parent Qiemen; F<sub>1</sub>: PM217 × Qiemen; B<sub>R</sub>: resistance pool; B<sub>S</sub>: susceptible pool

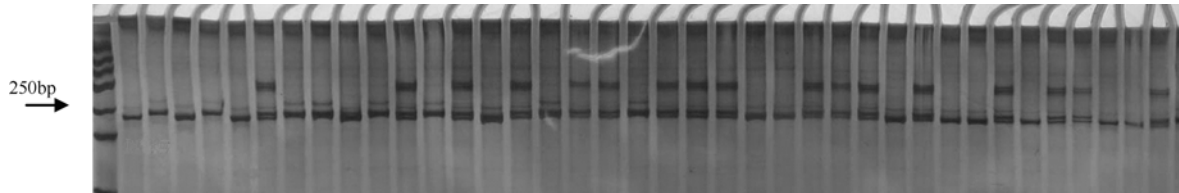


图 3 引物 141 对父母本及 F<sub>2</sub> 群体部分单株 DNA 的扩增结果

Fig. 4 PCR amplification with primer 141 in parents and F<sub>2</sub> individuals

表 3 根结线虫抗性基因 *Me1* 与 EST-SSR 标记上 F<sub>2</sub> 群体的基因型分析

Table 3 Genetic analysis of EST-SSR markers and *Me1* on F<sub>2</sub> population

位点 locus	标记分布 marker distribution						$\chi^2$ 测验 $\chi^2$ -text	自由度 df	显著性 significant	分类 classes
	a	h	b	c	d	-				
<i>Me1</i>	0	0	74	0	197	0	0.65	1	**	[b;d]
118	75	121	67	0	0	8	2.2	2	*	[a;h;b]
141	76	118	71	0	0	6	3.4	2	*	[a;h;b]
211	61	111	82	0	0	17	7.5	2	**	[a;h;b]

\*, \*\*分别表示  $P < 0.05$  和  $P < 0.01$  ( $\chi^2_{0.05,1} = 3.84, \chi^2_{0.01,1} = 6.63; \chi^2_{0.05,2} = 5.99, \chi^2_{0.01,2} = 9.21$ )。a: 与母本(抗)同型的等位基因; c: 与母本不同型的等位基因; b: 与父本(感)同型的等位基因; d: 与父本不同型的等位基因; h: 杂合基因型。

\*, \*\*show  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  ( $\chi^2_{0.05,1} = 3.84, \chi^2_{0.01,1} = 6.63, \chi^2_{0.05,2} = 5.99, \chi^2_{0.01,2} = 9.21$ ), respectively. a: as homozygous for the allele from the female parent(R); c: not a homozygote for allele a; b: as homozygous for allele from the male parent(S); d: not a homozygote for allele b; h: as heterozygote genotype.

2.4.2 *Me1* 基因与 EST-SSR 标记的连锁分析 利用 Joinmap3.0 软件分析 3 个 EST-SSR 位点(141、118、211)与 *Me1* 的连锁情况。结果显示,EST-SSR 位点 141 与根结线虫抗性基因 *Me1* 紧密连锁,其重组率  $rec = 6.94\%$ ,遗传距离为 6.984cM(图 4);位点 118 与 *Me1* 的重组率  $rec = 17.86\%$ ,遗传距离为 18.684cM;位点 211 与 *Me1* 重组率  $rec = 26.36\%$ ,遗传距离为 29.310cM。其中 EST-SSR 标记 141 与 118 分别位于 *Me1* 的两侧。EST-SSR 标记 211 与 *Me1* 间虽然遗传距离较大,约为 30cM,但也可能与 *Me1* 存在连锁关系。

### 3 讨论

辣椒对根结线虫的抗性多为显性单基因控制。国内外针对辣椒根结线虫抗性分子标记研究并不多。Caporalino 等<sup>[4,16,17]</sup>将多个 *Me* 基因定位在同一连锁群 P9 染色体上,并用 RAPD、AFLP 构建了 *Me* 基因的遗传图谱,分别获得了与 *Me1*、*Me3*、*Me4* 紧密连锁的分子标记。Wang 等<sup>[18]</sup>采用 BSA-AFLP 分析,筛选到与根结线虫抗性基因 N 基因紧密连锁的 AFLP 标记,并进



图4 与 *Me1* 基因连锁的 EST-SSR 标记位点

Fig. 4 EST-SSR markers linked to *Me1* gene

一步将该标记转化为 SCAR 标记。

SSR 分子标记稳定可靠、操作简单。EST-SSR 是基于 EST 序列开发的 SSR 标记,与基因组 SSR 相比,其来源于基因组编码序列,更有利于连锁基因的研究工作,能对决定重要表型性状的等位基因进行直接鉴定。如果发现与有益性状连锁的 EST-SSR 标记,那么这一标记很可能是该性状的直接影响因子。本研究得出的 3 个 EST-SSR 标记 141、118、211,与 *Me1* 基因的遗传距离分别为 6.9cM、18.7cM、29.3cM,其中 141 与 118 分别位于 *Me1* 基因的两侧,且 141 与 *Me1* 基因紧密连锁。推断标记 141、118 与 *Me1* 基因都属于一个连锁群,而标记 211 由于与 *Me1* 基因的遗传距离较大,是否能定位在 P9 连锁群,有待进一步的试验分析。

EST-SSR 与传统分子标记相比有一个显著特征就是其等位基因的变异可能会使基因的功能发生改变,这一特征也使得 EST-SSR 在功能标记的开发、种质功能多样性的评价及功能遗传图谱的绘制等应用上更有价值。当前,抗性遗传育种是辣椒遗传育种工作的重点,因此积极开发与辣椒不同抗病基因紧密连锁的 EST-SSR 标记,必将有效地推动辣椒遗传育种研究的发展。

本研究得到的 EST-SSR 标记稳定,可用于辣椒对根结线虫抗性的初步筛选鉴定,为分子标记辅助选择抗根结线虫材料提供参考。

#### 参考文献:

[ 1 ] Martin J A. Breeding of pungent peppers [J]. South Carolina Agr Expt Sta Annu Rpt, 1948, 60:64 - 67  
[ 2 ] Hare W W. Inheritance of resistance to root-knot nematodes in pepper [J]. Phytopathology, 1957, 47:455 - 459  
[ 3 ] Hendy H, Pochard E, Dalmaso A. Transmission hereditaire de laresistance aux nematodes *Meloidogyne* Chitwood (Tylenchida)

portee par 2 lignees de *Capsicum annuum* L.; etude de descendance homozygotes issues d'androgenese [J]. Agronomic, 1985, 5(2):93 - 100

[ 4 ] Djian Caporalino C, Pijarowski L, Januel A, et al. Root-knot nematode (*Meloidogyne* spp.) *Me* resistance genes in pepper (*Capsicum annuum* L.) are clustered on the P9 chromosome [J]. Theor Appl Genet, 2007, 114:473 - 486  
[ 5 ] Di Vito M, Zaccheo G, Catalano F. Effect of temperature stability of resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) Proceedings of the IX<sup>th</sup> EUCARPIA meeting on genetics and breeding on *Capsicum* and eggplant, 1995 [C]. Budapest, EUCARPIA, 1995: 230 - 232  
[ 6 ] 忻雅, 崔海瑞. 植物表达序列标签 (EST) 标记及其应用研究进展 [J]. 生物学通报, 2004, 39(8):46  
[ 7 ] 李小白, 崔海瑞, 张明龙. EST 分子标记开发及在比较基因组学中的应用 [J]. 生物多样性, 2006, 14(6):541 - 547  
[ 8 ] Huang S W, Zhang B X, Milbourne D, et al. Development of pepper SSR marker from sequence database [J]. Euphytica, 2000, 117(2):163 - 167  
[ 9 ] 李晶晶, 王述彬, 刘金兵, 潘宝贵, 阵劲枫. 辣椒 EST-SSR 标记的开发 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(6):1219 - 1222  
[ 10 ] 谢皓, 陈学珍, 杨柳, 王建立. EST-SSR 标记的发展和在植物遗传研究中的应用 [J]. 北京农学院学报, 2005, 20(4):73 - 76  
[ 11 ] 刘维志. 病原植物线虫学 [M]. 中国农业出版社, 2000:372 - 425  
[ 12 ] C Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Januel A, et al. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heatstable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 496 - 502  
[ 13 ] Thies J A, Mueller J D, et al. Use of a resistant pepper as a rotational crop to manage southern root-knot nematode [J]. Hort Science, 1998, 33:716 - 718  
[ 14 ] Thies J A, Fery R L. Characterization of resistance conferred by the *N* gene to *Meloidogyne arenaria* races 1 and 2, *M. hapla*, and *M. javanica* in two sets of isogenic lines of *Capsicum annuum* L [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2000, 125: 71 - 75  
[ 15 ] Michelmore R W, Paran, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid Method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations (random amplified polymorphic DNA/restriction fragment length polymorphism) [J]. Genetics Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(11):9828 - 9832  
[ 16 ] Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Fazari A, et al. High-resolution genetic mapping of the pepper (*Capsicum annuum* L.) resistance loci *Me3* and *Me4* conferring heat-stable resistance to root-knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 592 - 600  
[ 17 ] C Djian-Caporalino C, Pijarowski L, Januel A, et al. Spectrum of resistance to root-knot nematodes and inheritance of heatstable resistance in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1999, 99: 496 - 502  
[ 18 ] Wang L H, Gu X H, Hua M Y, et al. A SCAR marker linked to the *N* gene for resistance to root knot nematodes (*Meloidogyne* spp.) in pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. Scientia Horticulturae, 2009, 122(2):318 - 322

(责任编辑 王媛媛)



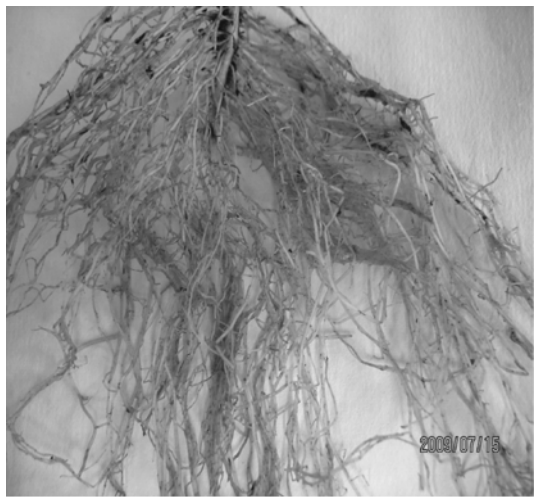
图版1 母本 PM217(抗病)  
Chart 1 Mother PM217(Resistance)



图版2 父本茄门(感病)  
Chart 2 Father Qiemen (Suscept)



图版3 F<sub>1</sub>  
Chart 3 F<sub>1</sub> (PM217 × Qiemen)



图版4 F<sub>2</sub>(抗病)  
Chart 4 The resistant plant of F<sub>2</sub> population



图版5 F<sub>2</sub>(感病)  
Chart 5 The susceptible plant of F<sub>2</sub> population