

研究报告

A Letter

菜心小菜蛾抗性基因遗传分析及 SSR 标记

史卫东¹, 周建辉¹, 贤振华², 梁育喆²

1. 广西农科院蔬菜研究所, 南宁, 530007

2. 广西大学农学院, 南宁, 530005

✉ 通讯作者: shiwd@gxaas.net ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 89 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0089

收稿日期: 2011 年 06 月 20 日

接受日期: 2011 年 07 月 01 日

发表日期: 2011 年 07 月 05 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

Shi et al., 2011, Inheritance Analysis and SSR Marker of the Resistance Gene for Diamondback Moth in Caixin (*Brassica rapa* var. *parachinensis*), Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.89 pp.1637-1641 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0089) (史卫东等, 2011, 菜心小菜蛾抗性基因遗传分析及 SSR 标记, 分子植物育种(online) Vol.9 No.89 pp.1637-1641 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0089))

摘 要 本研究针对我国南方地区十字花科蔬菜虫害严重的问题, 以菜心抗小菜蛾品系 Caixin65 和感小菜蛾品系 Cxixin69 的杂交 F₂ 分离群体为材料, 进行了菜心抗小菜蛾的抗性遗传分析及 SSR 分子标记研究。结果表明, 菜心对小菜蛾抗性符合 3:1 的孟德尔一对显性基因遗传规律。根据 BSA 方法, 从 17 对 EST-SSR 引物中筛选出 3 对多态性引物扩增 F₂ 分离群体, 得到 12 个 EST-SSR 标记, 其中 7 个标记的卡方适合性测验显著, 其余 5 个不显著。将 7 个 EST-SSR 标记用 MapMaker/EXP3.0 软件处理以构建菜心分子遗传图谱, 结果分为 3 个连锁群, 编号为 LG1 至 KG3, 总长 149.1 cM, 最大的连锁群 47.2 cM, 最小的连锁群为 22.7 cM。标记间最大间距为 37.9 cM, 最小为 9.3 cM, 平均间距为 24.85 cM。本研究为菜心抗虫性鉴定及分子标记辅助抗虫育种提供了重要的理论依据。

关键词 菜心(*Brassica rapa* var. *parachinensis*); SSR; 遗传图谱

Inheritance Analysis and SSR Marker of the Resistance Gene for Diamondback Moth in Caixin (*Brassica rapa* var. *parachinensis*)

Shi Weidong¹, Zhou Jianhui¹, Xian Zhenhua², Liang Yuzhe²

1. The Institute of Vegetable Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning, 530007, P.R. China

2. Agricultural college of Guangxi University, Nanning, 530007, P.R. China

✉ Corresponding author, shiwd@gxaas.net; ✉ Authors

Abstract The Diamondback moth is a serious damage to *Brassicia* vegetables Caixin (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) in south china. In this paper the genetic anaylsis of resistance for Caixin to Diamondback moth (*Plutella xylostella*) was studied by F₂ segeration population and EST-SSR. The inheritance of resistance to Caixin Diamondback mothwere analysed with 98 progenies of the F₂ segregating population hybridized by insect-susceptible Caixin 65 and insect-resistance Caixin 69. The resistance was consistent with the Mendelian ratio 3:1 and to be judged a single dominant gene. EST-SSR marker was used to constructe the genetic map of Caixin with it based BSA method.3 of 17 EST-SSR primers were selected to screen F₂ and 12 polymorphic loci were obtained. 7 of 12 were Chi-square test significantly and used to construct map. The genetic linkage map consisted of 7 marker loci in 3 linkage groups and covered 149.1 cM with an average genetic distance of 24.85 cM between adjacent markers. The largest linkage group consisted of 3 marker loci, while the smallest one contained only 2 marker loci. Our results might have important theory for breeding.

Keywords Caixin (*Brassica rapa* var. *parachinensis*); SSR; Genetic lingkage map

研究背景

小菜蛾(Diamondback moth)属鳞翅目菜蛾科, 学名为 *Plutella xylostella*, 是一种世界性害虫。在我国南方广东、广西、海南等地发生较多。在对南宁无公害和常规菜区的植食性昆虫调查表明, 感虫和

受害严重程度的为十字花科类蔬菜, 小菜蛾在十字花科蔬菜上一年四季为害, 出现百株密度50头以上的达5月次以上(贤振华等, 2007, 中国植保导刊, 27(6): 25-27)。菜心(*Brassica rapa* var. *parachinensis*), 基因组为AA, 是食用花薹器官的白菜变种。在华南地区

栽培规模最大, 具有极其丰富的种质资源。目前已经开展了白菜抗小菜蛾种质资源鉴定研究, 对主要形态性状与抗性之间的相关性分析, 发现叶面皱度与抗性存在一定的相关性, 而其他性状与抗性关系不大(王海平等, 2005)。抗性遗传机制研究结果表明白菜对小菜蛾的抗性在不同生育期均稳定遗传, 抗性遗传符合‘加性—显性’遗传模型, 但以加性为主, 经过六世代联合分析还发现F₂群体主基因遗传率达到41.11%以上(王欣等, 2007; 陆鹏, 2010)。

EST-SSR是基于无内含子的cDNA序列的功能性分子标记, 反映的是完整表达基因的部分信息, 不但可以用来进行未知功能基因鉴定, 同时也具有优良的种间通用性。如果与传统育种手段结合, 能够提高杂交育种效率和精确性, 加速育种进程, 因而在白菜得的遗传多样性分析、种质鉴定和遗传图谱构建上得到广泛应用(析雅等, 2006; 李丽等, 2009)。鉴于菜心种质资源丰富而小菜蛾抗药性的又不断提高, 挖掘和利用菜心本身的抗虫基因资源以保证食品安全将成为菜心抗虫育种的一个重要方向。本研究前期进行了菜心抗小菜蛾种质资源鉴定, 获得了一批抗性较强的材料并配置了杂交组合。为继续挖掘和有效利用抗虫基因和白菜类蔬菜EST资源, 本研究选用经鉴定为一对显性抗虫基因控制的菜心F₂群体及亲本, 首次利用EST-SSR进行菜心抗虫性遗传连锁分析, 旨在获得抗虫种质相关的基因信息, 为将来开展抗虫基因工程研究奠定基础。

1 结果与分析

1.1 菜心抗虫性鉴定

对抗虫亲本、感虫亲本及F₂代分离群体进行苗期抗虫性离体鉴定(图1), 结果表明98株F₂代群体后代出现了明显的分离, 表现为抗虫和感虫性状, 其中感虫24株, 抗虫74株, 卡方测验符合1:3预期结果($\chi^2=0.35, P>0.05$), 符合孟德尔遗传规律, 表明本菜心对小菜蛾的抗虫性是由显性单基因控制。

1.2 菜心抗虫性的遗传连锁分析

通过BSA法, 从17对EST-SSR引物中筛选出多态性丰富的3对用于F₂分离群体的多态性分析(表1; 图2), 结果多态性比例为18%。3对引物ESTP3\ESTP-3-1, ESTP11\ESTP11-1和ESTP13\ESTP13-1扩增98株F₂代分离群体得到12个EST-SSR标记, 命名为



图1 菜心F₂分离群体部分单株的抗虫性鉴定结果
注: A: 抗虫植株; B: 感虫植株

Figure 1 The resistance identification for some F₂ individuals of Caixin

Note: A: Resistant plant; B: Sensitive plant

EST-SSR1~EST-SSR12, 平均每对引物得到4个标记。将12个标记进行卡方检验, 7个标记的卡方测验显著($\chi^2=0.31, P>0.05$), 表明F₂群体中抗、感基因型分离符合期望的分离比例3:1, 可以进行遗传连锁分析。其余5个偏分离标记卡方不显著, 偏分离比例为42%, 有3个偏向母本(60%), 1个偏向父本(20%), 1个偏向杂合体(20%)。

将7个EST-SSR标记用MapMaker/EXP3.0软件处理, 结果分为3个连锁群, 编号为LG1至KG3。总长149.1 cM, 包括7个标记, 最大的连锁群47.2 cM, 最小的为22.7 cM。标记间最大间距为37.9 cM, 最小为9.3 cM, 平均间距为24.85 cM。将各个标记的遗传距离输入MapDraw运行得到遗传连锁图(图3)。

2 讨论

抗虫性是数量性状, 但其抗性不是绝对的, 由抗虫与感虫品种杂交获得的F₂和高世代的抗性水平较高且较不稳定(张文珠等, 1999), 如在白菜对小菜蛾抗性研究中发现F₂群体主基因遗传率达到41.11%以上, 因此认为在抗虫育种中应充分利用F₂群体并进行早世代选择以提高效率(王欣等, 2007; 陆鹏, 2010)。本研究采用离体方法鉴定菜心F₂分离群体抗虫性, 发现抗虫亲本对感虫亲本的抗性是由显性单基因控制, 这是与已有的研究结果不同的(王欣, 2007; 陆鹏, 2010), 原因可能在于材料和研究方法的差异。抗性材料之间遗传背景的差异, 及同一份

表 1 EST-SSR 引物碱基序列

Table1 The EST-SSR primer sequences

编号 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')	编号 Primer code	引物序列(5'-3') Primer sequence (5'-3')
ESTP1	CAAAAACGTCGAAAATGCTT	ESTP10-1	TTTTTGCAGGTGGTCCTGG
ESTP1-1	TTTTTCTGTGGGCAGGACT	ESTP11	AAAAACAAAATGTAGAGACCCCA
ESTP2	ATCCTAAAAACATGCAATAGTAATACG	ESTP11-1	ATGTTTCCTTTAGGCCAGAGA
ESTP2-1	TTCGGAAAAAGAAAGGTTTTCA	ESTP12	GGCTTCTATCTAAACCGATGG
ESTP3	GGGGGCATACAACCTCCCAT	ESTP12-1	AAGTTCACATCCACATCCGTC
ESTP3-1	AATGATCAAAGCAAGCAACG	ESTP13	GAAAATAACTATTGACACCTTTTTCA
ESTP4	CCCCATCTCAAAAATACATTACA	ESTP13-1	AATCCACAAAGTTCTGTGCTCT
ESTP4-1	GCGAGAACAAGAATGGATTGA	ESTP14	GCTAGGAGGAGCTTGACCC
ESTP5	CTCCTTCAGTTTTCTACGGAGG	ESTP14-1	AGAGCAGCAAGAGCCACAC
ESTP5-1	ATTAACAGCTACAGAGATAGACTGGC	ESTP15	GGGGATGTTTATCCCGTTG
ESTP6	GAATAGCTTATTTCTTGGAGGCA	ESTP15-1	CTTGTCAAGATCCCCAGTAAGC
ESTP6-1	TTCGGTGGCTTAACACCAAT	ESTP16	AAGAGAATAAATCAAGAAACACAAGTC
ESTP7	TTTTAGTAGTCTTATAACGAAAAGGGG	ESTP16-1	ACTCTTTTAGAAGCTGAAGAAGCA
ESTP7-1	TGGAGTGGAGAGCTCGG	ESTP17	CCCCATCCTCAAAAATACATTACA
ESTP9	GGGATTAATCTTTTCGTTTCTTG	ESTP17-1	GCGAGAACAAGAATGGATTGA
ESTP9-1	TCCAAACCAAATCAACTCTTG	ESTP18	AACGAAACAGCCACTAGAAACA
ESTP10	AACCAGTTTATGTCATCGATTATG	ESTP18-1	CCCTCTCACAGCCCTCAG

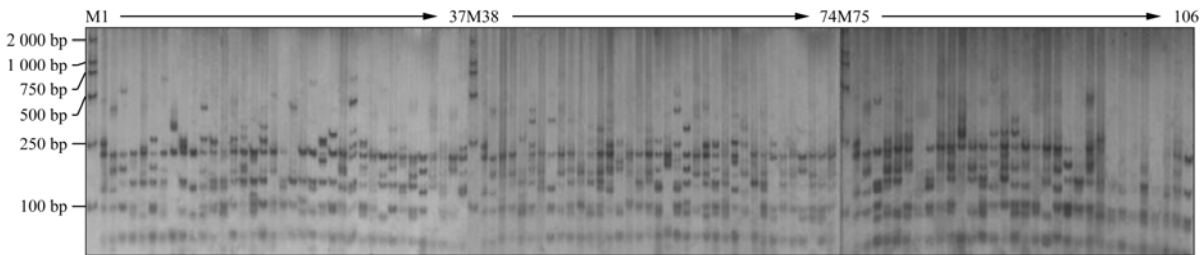


图2 EST-SSR引物ESTP013扩增抗虫、感虫菜心亲本及F₂分离群体结果

注: M: 分子量标准; 1: 38和75为感虫亲本; 2: 39和76为抗虫亲本; 3~37, 40~74, 77~106为F₂单株

Figure 2 EST-SSR patterns displayed by a primer pair ESTP013

Note: M: Molecular weight marker; 1: 38 and 75 were susceptible parents; 2: 39 and 76 were resistance parents; 3~37, 40~74, 77~106 were individuals of F₂

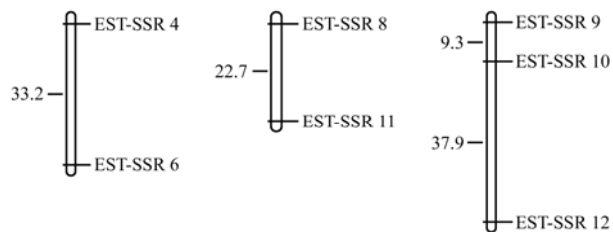


图3 菜心EST-SSR分子标记遗传连锁图

Figure 3 Caixin EST-SSR genetic linkage map

材料鉴定方法的差异都可能影响抗性鉴定结果(王海平等, 2005; 陆鹏, 2010)。在大豆抗食心虫的研究

结果也证实, 不同抗性亲本携带的抗虫基因可能是不同的, 大豆F₂代的抗虫性虽然不具有数量性状特有的中心对称分布特征, 但是选择效果比其它数量性状更有效(孙志强等, 1989)。本研究选用F₂群体研究菜心抗虫性遗传在于其构建时间短, 遗传基础丰富, 基因型随机分离, 没有自然和人为选择干扰, 误差低, 还可同时估算数量性状的其它效应值等, 能够迅速了解抗虫分离群体基本特性, 为构建永久群体奠定基础。

SSR标记是基于基因组DNA的结构性分子标记, 具有操作简单和共显性遗传等优点, 缺点是位

点少、多态信息量低、引物合成和测试耗时耗费大、不能提供基因信息等。目前利用SSR和其它分子标记构建了很多白菜类的遗传连锁图谱(原玉香等, 2009; 成妍, 2009), 国际上也建立了基于SSR标记的白菜图谱(Kim et al., 2006; Suwabe et al., 2006), 但是由于使用的作图群体和标记均不相同, 图谱之间的整合还是一个亟待解决的问题。菜心和拟南芥、白菜之间亲缘关系接近, 与利用结构性分子标记构建的白菜遗传图谱和拟南芥图谱相比(Kim et al., 2006; Suwabe et al., 2006; 成妍, 2009), 本研究首次利用ESR-SSR构建的功能性分子标记遗传图谱群体较小、标记较少、连锁群较少、长度较短和偏分离比例较大, 原因之一是选用的EST-SSR引物对数量仍不够, 二是引物设计序列为具有时空表达特性和无内含子的cDNA, 多态性远不如基于基因组的SSR引物丰富, 为此需要将ESR-SSR与其它标记相结合才能构建更精细的图谱。

在育种研究中数量性状依赖于材料本身, 应用上限制较多, 不如单显性基因运用方便。利用EST-SSR进行分子遗传连锁分析不但能够直接反映基因的功能信息, 而且可以直接克隆差异片段获得目的基因片段, 极大地提高了育种效率和水平, 本研究将EST-SSR应用于菜心抗虫性图谱构建, 为进一步开展抗虫基因定位、分离、功能验证等研究提高了可能性。

3材料与方法

3.1供试材料

供试小菜蛾为湖南农业大学提供的敏感种群, 在广西大学昆虫研究所饲养至3龄供抗虫试验使用。菜心抗虫亲本Caixin65和感虫亲本Cxixin69亲本均经过田间自然鉴定和离体鉴定, 自交多代。2010年秋将两亲本经人工去雄和杂交套袋授粉配制为F₁, 同年加代自交抗性F₁单株。2010年春将F₂群体98份及亲本2份用于菜心EST-SSR分子标记分析。

3.2菜心抗虫性鉴定

菜心两亲本及F₁、F₂群体的抗虫性鉴定采用离体方法, 抗性调查及分级标准参考王欣等(2007)。Microsoft excel 2003软件进行数据统计和卡平方适合度测验显著性。

3.3菜心基因组DNA的提取及EST-SSR反应体系建立

菜心总DNA提取采用CTAB法(Shi et al., 2011)。

EST-SSR引物设计, 下载NCBI十字花科芸薹属表达序列标签(Expressed Sequence Tag, EST) 13 747条, 利用SSR hunter搜索和查找SSR, 再根据结果的同源性和频率高低, 选择与抗性抗逆相关基因EST, 采用primer3.0 (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>)设计引物。

反应体系20 μL: 1× PCR buffer 2 μL、*Taq* DNA聚合酶(2.5 U/μL) 1 U、dNTP (2.5 mmol/L) 0.4 μL、positive primer (10 μm/μL)、reverse primer (10 μm/μL) 1 μL, DNA (50 ng/μL) 2 μL, ddH₂O 12.6 μL。反应条件参考李丽等(2009): 72°C 3 min, 94°C 2 min; 94°C 1 min, 68°C 1 min, 72°C 45 s (-1°C/2 cycles); 20 cycles; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 45 s, 72°C 10 min。聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染显色。引物、*Taq*聚合酶、dNTPs和DNA Marker均购自上海英骏生物技术有限公司。

3.4遗传连锁分析

按分离群体分组(bulk segregation analysis, BSA)分析法(Michelmore et al., 1991), 将F₂群体单株分别提取基因组总DNA, 随机选取10个抗虫单株和10个感虫单株, 分别等量混合DNA建立抗虫池和感虫池, 然后筛选在亲本抗、感池间表现多态性的EST-SSR引物对, 再利用这些多态性引物分析F₂分离群体多态性。Mapmake3.0软件计算扩增位点和目的基因的遗传距离并构建图谱, Mapdraw软件绘制连锁图谱(刘仁虎等, 2003; 盖红梅等, 2011)。

作者贡献

史卫东是本实验设计者和负责人, 预备实验, 数据分析, 论文写作与修改。梁育喆和周建辉均为实验项目的执行人; 贤振华指导抗虫性鉴定。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本实验获得了广西农业科学院基本科研业务项目(200805Z)和广西自然科学基金面上项目(2010GXNSFA-013084)的支助。

参考文献

Chen Y., Geng J.F., Zhang J.Y., Wang Q., Ban Q.Y., and Hou X.L., 2009, The construction of a genetic linkage map of

- non-heading Chinese Cabbage (*Brassica Campestris* Ssp. *Chinensis* Makino), *Yichuan Xuebao* (Journal of Genetics and Genomics), 36(8): 501-508 (成妍, 耿建峰, 张静宜, 王倩, 班青宇, 侯喜林, 2009, 不结球白菜(*Brassica Campestris* Ssp. *Chinensis* Makino)遗传连锁图谱的构建, 遗传学报, 36(8): 501-508)
- Gai et al., 2011, DataTrans1.0, A Software for Microsatellite Data Processing Based on Excel Macro, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.48 pp.1359-1365 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0048) (盖红梅等, 2011, SSR数据处理宏程序DataTrans 1.0, 分子植物育种 (online) Vol.9 No.48 pp.1359-1365(doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0048))
- Kim J.S., Chung T.Y., King G.J., Jin M., Yang T.J., Jin Y.M., Kim H.I., and Park B.S., 2006, A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*, *Genetics*, 174(1): 29-39
- Li L., He W.M., Ma L.P., Liu P.Y., Xu H.M., Xu J.B., and Zheng X.Y., 2009, Construction Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L.) core collection and its EST-SSR fingerprint database by EST-SSR molecular markers, *Jiyin Zuxue Yu Yingyong Shengwuxue* (Genomics and Applied Biology), 28(1): 76-88 (李丽, 何伟明, 马连平, 刘庞源, 徐海明, 徐家柄, 郑晓鹰, 2009, 用EST-SSR分子标记技术构建大白菜核心种质及其指纹图谱库, 基因组学与应用生物学, 28(1): 76-88)
- Liu R.H., and Meng J.L., 2003, Mapdraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data, *Yichuan* (Hereditas), 25(3): 317-321 (刘仁虎, 孟金陵, 2003, MapDraw, 在Excel中绘制遗传连锁图的宏, 遗传, 25(3): 317-321)
- Lu P., 2010, Genetic analysis and QTL mapping of the resistance to Diamondback Moth (*Plutella Xylostella* L.) in elite non-heading Chinese Cabbage (*Brassica Campestris* Ssp. *Chinensis*) germplasms, Thesis for M.S., Institute of Vegetables and Flowers, CAAS, Supervisor: Li X.X., pp.36 (陆鹏, 2010, 不结球白菜优异种质对小菜蛾抗性的遗传分析及QTL定位, 硕士学位论文, 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 导师: 李锡香, pp.36)
- Michelmore R.W., Paran I., and Vesseli R.V., 1991, Identification of markers linked to disease-resistant genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 88(21): 9828-9832
- Shi et al., 2011, Genetic Diversity of 30 Cai-xins (*Brassica rapa* var. *parachinensis*) Evaluated Based on AFLP Molecular Data, *Molecular Plant Breeding* Vol.2 No.7 (doi: 10.5376/mpb.2011.02.0007)
- Sun Z.Q., Tian P.Z., and Yue D., 1989, Study on inheritance of soybean pod borer resistance and methods for insect resistance breeding in soybean: I. insect resistance performance under artificial inoculating conditions, *soybean science*, 8(2): 177-184 (孙志强, 田佩占, 岳德荣, 1989, 大豆抗食心虫性的遗传及抗虫育种方法的研究: I.人工接虫条件下F₂代的抗虫性, 大豆科学, 8(2): 177-184)
- Suwabe K., Tsukazaki H., Iketani H., Hatakeyama K., Kondo M., Fujimura M., Nunome T., Fukuoka H., Hirai M., and Matsumoto S., 2006, Simple sequence repeat based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The genetic origin of clubroot resistance, *Genetics*, 173(1): 309-319
- Wang H.P., Li X.X., Yang F.S., Shen D., Song J.P., 2005, Identification of resistance of *Brassica Campestris* L. Ssp. *Chinensis* germplasm resources to *Plutella Xylostella*, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao* (Journal of Plant Genetic Resources), 6(2): 191-194 (王海平, 李锡香, 杨峰山, 沈楠, 宋江萍, 2005, 小白菜种质资源对小菜蛾的抗性评价, 植物遗传资源学报, 6(2): 191-194)
- Wang X., Li X.X., Wu Q.J., and Zhang Y.J., 2007, Comparison of two methods for evaluating chinese cabbage resistance to diamond back moth in vitro and under net conditions, *Zhongguo Shucai* (China Vegetables), 12: 22-24 (王欣, 李锡香, 吴青君, 徐宝云, 张友军, 2007, 白菜抗小菜蛾网室鉴定和离体鉴定方法比较, 中国蔬菜, 12: 22-24)
- Xin Y., Cui H.R., Lu M.Z., Yao Y.L., Jin J.Q., Lim Y.P., and Chui S.Y., 2006, Data mining for ssrs in ests and EST-SSR marker development in Chinese Cabbage, *Yuanyi Xuebao* (*Acta Horticulturae Sinica*), 33(3): 549-554 (忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 姚艳玲, 金基强, 林容杓, 崔水莲, 2006, 白菜EST-SSR信息分析与标记的建立, 园艺学报, 33(3): 549-554)
- Yuan Y.X., Zhang X.W., Jiang W.S., Yao Q.J., Geng J.F., Chen X., and Xu M.L., 2009, Advance on molecular breeding in Brassica vegetable, *Henan Nongye Kexue* (Henan agricultural science) 9: 155-160 (原玉香, 张晓伟, 蒋武生, 姚秋菊, 耿建峰, 陈晓, 徐明磊, 2009, 芸薹属蔬菜分子育种研究进展, 河南农业科学, 9: 155-160)
- Zhang W.Z., and Li J.W., 1999, Present state and prospects of vegetable breeding for pest resistance, *Journal of Henan Agricultural University*, 33(4): 360-363 (张文珠, 李加旺, 1999, 蔬菜抗虫育种研究现状与前景, 河南农业大学学报, 33(4): 360-363)