

白菜几个重要园艺性状的 QTLs 分析

卢 钢¹, 曹家树¹, 陈 杭², 向 珣¹

(¹ 浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; ² 国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100087)

摘要: 利用白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis*) × 芜菁 (*B. campestris* L. ssp. *rapifera* Metzg) 杂交建立的 F₂ 分离群体, 构建了含 131 个遗传标记, 覆盖 1 810.9cM 的遗传图谱。采用区间作图法对地上部主要园艺性状进行了 QTLs 分析, 发现与叶型、叶柄形状、株高等 8 个重要园艺性状连锁的 24 个 QTLs 位点, 各性状 QTL 的数目在 1~5 个之间, 各位点间存在一定的相关关系。

关键词: 白菜; 芜菁; 遗传图谱; 园艺性状; QTL

QTLs Mapping of Some Horticultural Traits of Chinese Cabbage

LU Gang¹, CAO Jia-shu¹, CHEN Hang², XIANG Xun¹

(¹ Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029;

² National Vegetable Research Center, Beijing 100089)

Abstract: A genetic linkage map comprised of 131 loci was constructed with a F₂ population derived from inter-subspecific cross between *Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* variety 'aijiaohuang' and *B. campestris* L. ssp. *rapifera* variety 'qisihai', which covered 1 810.9cM in 12 linkage groups. The interval mapping was used to determine QTLs associated with eight morphological traits in Chinese cabbage. 24 QTLs affecting eight traits of shoots were identified using Mapmaker/QTL1.1 software. The QTLs was associated with 8.9% - 86.5% of the phenotypic variation in different traits. Two QTLs were identified for leaf length and leaf number respectively; three QTLs for leaf width and plant height, four QTLs for number of leaf lobes and petiole width, five QTLs for petiole length.

Key words: Chinese cabbage; Turnip; Molecular map; QTL

白菜为芸薹属蔬菜之一,在我国蔬菜生产中占有举足轻重的地位。人们在白菜起源、种质资源研究以及遗传育种等方面积累了丰富的研究成果。但由于控制白菜产量和品质的相关性状大多为数量性状,只有通过 QTL 分析才能将多基因性状分解为若干遗传组分,利用研究单基因的方法进行分析。对芸薹属植物的许多园艺性状已进行了基因定位研究,例如叶形态、叶面绒毛、种子油酸含量、开花时间、春化基因、抗病性(根肿病、叶斑病等)等^[1-6]。但研究的芸薹种(*B. campestris* L.)材料大多是欧洲油用型白菜,对中国白菜(*B. campestris* L. ssp. *chinensis*)主要园艺性状遗传的分子基础研究尚未

见报道^[7,8]。由于缺乏可利用的白菜遗传图谱,对其性状的遗传规律、基因组的进化研究受到很大限制^[9]。

芜菁与白菜为芸薹种的不同亚种,两者在形态、生理特性上存在较大差异。芜菁中有大量抗逆性、抗病性极强的资源可供利用,例如,芜菁具有抗根肿病的特性,而在中国白菜中尚未发现高抗材料,若将抗根肿病基因转移到白菜品种上需大量的工作和时间^[10]。利用建立在分子定位基础上的分子标记进行数量性状选择,则可大大缩短这一过程。笔者利用白菜和芜菁杂交建立的 F₂ 分离群体,在构建 AFLPs 和 RAPDs 分子图谱基础上,利用 Mapmak-

收稿日期:2001-12-12

基金项目:国家自然科学基金项目(39870509)和浙江省自然科学基金项目(301288)

作者简介:卢 钢(1968-),男,浙江东阳人,副教授,博士,主要从事蔬菜分子遗传研究。曹家树为通讯联系人, Tel:0571-86971188; E-mail:

jshcao@zju.edu.cn

er/ QTLs 软件对其地上部重要农艺性状进行 QTLs 定位, 分析遗传效应, 以期阐明白菜数量性状遗传的分子基础, 为蔬菜的分子育种提供应用基础和理论依据。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

用于构建作图群体的 2 个亲本是气死孩芜菁 (QSH) 自交系 97-2 (*B. campestris* L. ssp. *rapi fera* Metzg cv. *Qisihai*), 矮脚黄白菜 (AJH) 自交系 97-24 (*B. campestris* L. ssp. *chinensis* cv. *Aijiao-huang*)。母本为矮脚黄 5 代纯合自交系, 父本为气死孩芜菁 3 代自交系。按单株采收 F_1 植株上的种子。双亲 F_1 及 F_2 群体于 1998 年 9 月 26 日播种于浙江大学实验农场, 按常规进行栽培管理。在播后 96d, 15~18 片真叶时观察统计植株株高、叶片数、叶柄长度、叶柄宽度、叶片全长等性状。

1.2 分子图谱构建

DNA 提取与 RAPD 反应程序参照参考文献 [11]。从 500 个 10 碱基随机引物中筛选出 111 个多态性的引物, 用于 F_2 群体的多态性分析。AFLP

分析试剂除 Taq 酶外 (Promega, USA) 均购自 Life Technology 公司, 参照 Vos 等^[12]方法, 从 64 对引物中筛选出 12 对引物组合, 用于 F_2 分离分析。分析所得数据经 χ^2 测验后, 利用 Mapmaker/ EXP version 3.0^[13] 构建以 Kosambi 函数转化图距表示的白菜图谱。

1.3 数据统计分析

采用 Mapmaker/ QTLI .1 (Lincoln 等) 软件, 利用区间作图法对相应性状进行数量性状位点 (QTL) 分析。LOD 值采用 3.0 为阈值, 在每一条染色体上每隔 2cM 对 QTL 存在的可能性扫描 1 次。采用该软件中的多座位 QTL 模型估算所有可能的 QTL 以及解释性状表型变异的贡献率。

2 结果与分析

2.1 亲本间叶部性状的差异以及在各群体中的变异

白菜重要性状在亲本及群体中的分布如图 1 所示。气死孩芜菁和矮脚黄白菜 2 个亲本间的农艺性状差别较大, 在 F_2 群体中各性状为连续变异, 且均有一定数量的超亲遗传类型存在, 表现为数量性状遗传的特点。

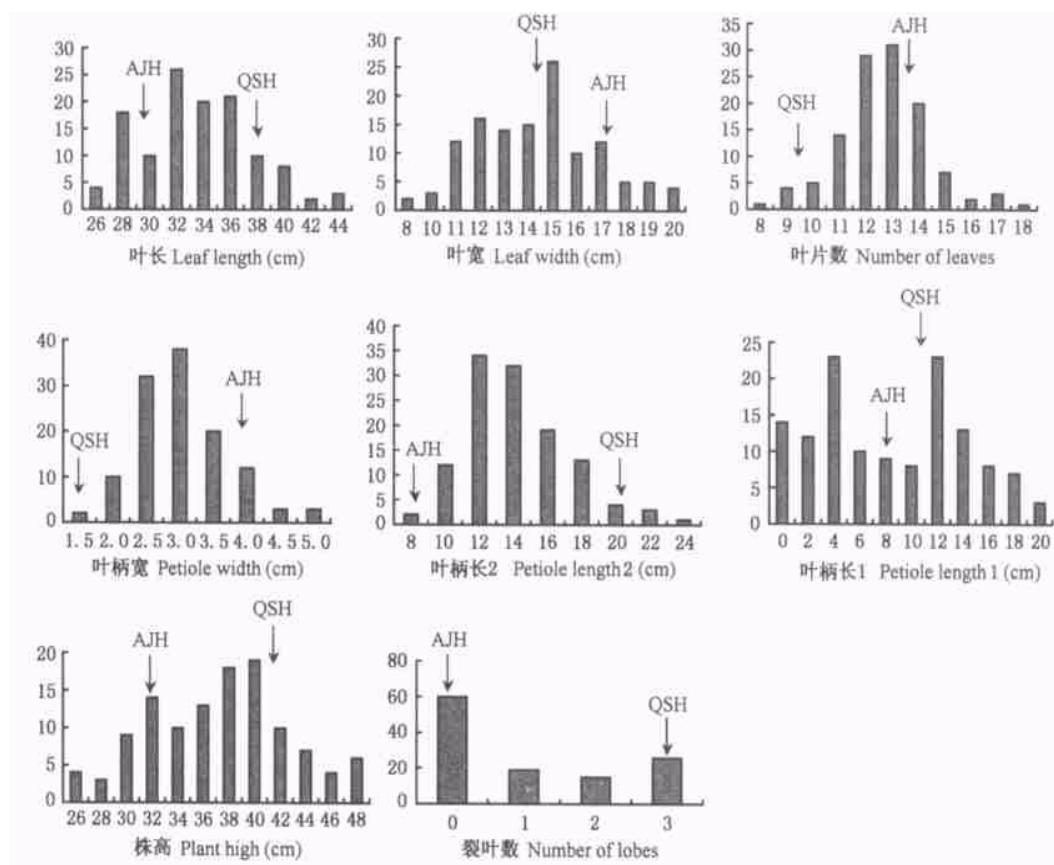


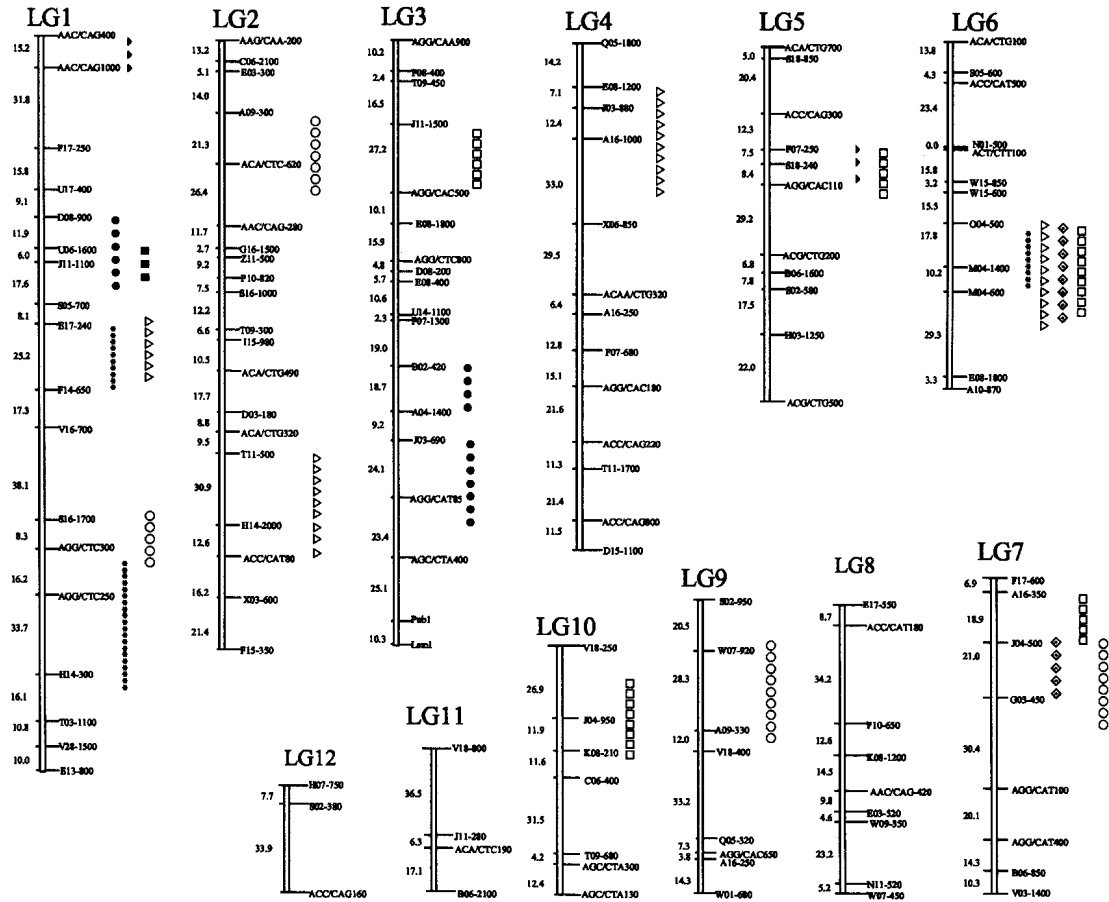
图 1 白菜 \times 芜菁 F_2 群体地上部主要农艺性状的分离

Fig. 1 The distribution of F_2 population from the cross between *B. campestris* L. ssp. *chinensis* and ssp. *rapi fera* for main agronomic characters in shoots

各数量性状的相关性分析表明(表略),各性状间存在显著相关。例如,叶全长同株高、叶宽以及茎部至真叶基部叶柄长等性状呈极显著正相关($R = 0.4650^{***} \sim 0.6371^{***}$),而裂叶数与茎部至裂叶基部叶柄长度(PL1)呈负相关($R = -0.6179^{***}$),与叶形系数呈显著正相关($R = 0.7775^{***}$)。

2.2 分子标记连锁图谱构建

利用 Mapmaker/ EXP version 3.0 构建的白菜分子图谱包括 131 个遗传标记,其中有 2 个形态位点(pub1 表示叶毛的有无;lsml 表示叶面光滑或皱缩),93 个 RAPD 位点,36 个 AFLP 位点,分布在 10 个主要连锁群及 2 个小连锁群上,图谱总长度为 1 810.9cM,标记间最大图距为 38.1cM,最小为 0cM,平均距离为 13.7cM(图 2)。



◇◇叶片全长 Leaf length ***叶宽 Leaf width ▲▲叶片数 Number of leaves ○○叶柄宽度 Petiole width △△裂叶数 Number of leaf lobes ●●株高 Plant height ■■叶柄长 1 Petiole length 1 □□叶柄长 2 Petiole length 2

图 2 白菜 × 芜菁地上部主要农艺性状基因定位

Fig.2 Distribution in linkage group of QTLs of the main agronomical characters in shoots with F₂ population derived from the cross of *B. ca mpestris* ssp. *chinensis* and *B. ca mpestris* ssp. *ra pi fera*

2.3 叶部性状的 QTLs 定位及基因效应分析

通过区间作图法对形态性状进行了 QTL 分析,控制白菜 8 个重要农艺性状的 QTLs 定位在由 12 个连锁群之中的 9 个连锁群上(表,图 2)。

控制植株株高的 3 个 QTLs 位点分别位于 LG1、LG3 上。位于 LG1 上的位点,以显性效应为主,来自父本气死孩的基因明显增加株高表现,可解释 35.9% 的性状变异。位于 LG3 上的 2 个 QTL 位

点虽然位置比较接近,但显性效应作用不同,合并分析发现为独立作用位点。

对于从茎基部到裂叶基部叶柄长度这一性状,在次数分布图上表现为较典型的双峰分布(图 1),该性状由主效基因所控制。在全基因扫描过程中,只有 LOD 阈值降至 2.0 时,在 LG1 上发现 1 个 LOD 值为 2.56,控制 19.2% 性状变异的 QTLs 位点。若叶柄长度中包括裂叶着生部位,则在 5 个连

表 白菜 × 芜菁 F₂ 群体地上部主要农艺性状 QTLs 位置与效应分析Table Locations and effects of QTLs of the main agronomical characters in shoots with F₂ population derived from the cross of *B. campestris* ssp. *chinensis* and *B. campestris* ssp. *rapifera*

性状 Traits	连锁群 Linkage group	两侧标记 Flanking marker	加性效应 Additive effect	显性效应 Dominant effects	LOD 值 LOD value	贡献率 Explained variance(%)
叶片长度	LG7	J04-500 ~ G03-45	1.97	-1.82	3.87	14.0
Leaf length	LG6	O04-500 ~ M04-1400	-1.40	6.83	2.02	28.2
叶宽	LG1	E17-240 ~ F14-650	0.02	5.21	3.61	35.8
Leaf width	LG1	AGG/CTC250 ~ H14-300	-2.83	4.63	2.08	43.1
	LG6	O04-500 ~ M04-1400	1.86	-0.43	2.66	21.5
叶片数	LG1	AAC/ CAG400 ~ AAC/ CAG1000	-0.33	3.58	2.62	23.4
No. of leaves	LG5	S18-240 ~ AGC/ CAC110	0.26	3.01	2.51	15.5
裂叶数	LG2	T11-500 ~ H14-2000	0.05	-2.42	16.27	86.5
No. of lobes	LG1	E17-240 ~ F14-650	1.01	2.39	7.04	56.0
	LG4	J03-880 ~ A16-1000	-0.01	2.39	14.7	86.4
	LG6	O04-500 ~ M04-1400	0.03	2.37	8.8	86.3
叶柄宽度	LG1	S16-1700 ~ AGG/ CTC320	-2.14	1.32	3.61	20.2
Petiole width	LG2	A09-300 ~ ACA/ CTC620	0.19	1.72	3.23	36.9
	LG7	J04-500 ~ G03-450	0.25	-0.26	2.38	8.9
	LG9	A09-330 ~ W07-920	0.14	1.27	4.26	47.3
叶柄长 1	LG1	U06-1600 ~ J11-1100	3.65	2.55	2.56	19.2
Petiole length 1						
叶柄长 2	LG3	J11-1500 ~ AGG/ CAC500	3.25	0.97	3.07	30.4
Petiole length 2	LG5	S18-240 ~ AGG/ CAC110	-0.07	1.57	2.33	30.6
	LG6	O04-500 ~ M04-1400	-2.68	6.27	3.99	43.2
	LG7	A16-350 ~ J04-500	-0.01	8.78	3.86	32.8
	LG10	V18-250 ~ J04-950	1.25	6.08	3.91	33.2
株高	LG1	J11-1100 ~ S05-700	0.23	5.84	2.55	35.9
Plant high	LG3	B02-420 ~ A04-1400	-0.03	3.99	3.22	46.0
	LG3	J03-600 ~ AGG/ CAT800	-2.11	-2.88	3.39	46.8

锁群上发现 5 个效应各不相同的 QTLs 位点。对该 5 个位点进行合并分析后发现,各基因位点间存在明显的互作关系,虽然 LOD 值上升至 8.63,但是只控制 69.2% 的性状变异。

LOD 值 ≥ 3.0 分析时,在连锁群 LG7 上发现 1 个控制叶片长度的微效基因,可解释 14% 的叶片变异。该位点表现为显性 - 加性效应,对叶长有微弱增效作用。进一步降低 LOD 值至 2.0,在 LG6 上发现另 1 显性 - 加性遗传的 QTL 位点,LOD 值为 2.02,可解释 28.2% 的性状变异。

在 LG1 上发现 2 个控制叶宽的主效 QTLs 位点,分别解释叶宽性状变异的 35.8%、43.1%,合并分析发现 2 者为独立作用的位点。另有 1 个控制叶宽的 QTL 位于 LG6 上 O₀₄₋₅₀₀ 与 M₀₄₋₁₄₀₀ 之间,中心位置距离 M₀₄₋₁₄₀₀ 仅仅 0.5cM,以加性效应为主,对叶宽有增效作用。LG6 上的该 QTLs 位点与控制叶片长度的位点处于同一区域内,而且中心位置非常接近。

控制叶柄宽度的 QTLs 分别位于 LG1、LG2、

LG7、LG9 上。LG2 上的位点位于 A₀₉₋₃₀₀ 与 ACA/CTC₆₂₀ 之间,中心位置距 A₀₉₋₃₀₀ 只有 3.0cM,可解释 36.9% 的性状变异。LG7 上的位点在 H₀₄₋₅₀₀ 与 G₀₃₋₄₅₀ 之间,距 G₀₃₋₄₅₀ 只有 1cM,效应值低,只解释 8.9% 的性状变异。

控制叶片数的 2 个 QTL 位点分别位于 LG1 与 LG5 上,都表现为加性 - 显性效应遗传,两者加性作用相反,位于 LG1 上的 QTL 位点减少叶片数,而 LG5 上的位点则有增加叶片数目效应。2 者分别控制叶片数性状变异的 23.4%、15.5%。

在 F₂ 群体中,如果按有、无裂叶分类,该性状分离则符合 1:1 的分离规律。利用“pairwise”命令分析发现控制裂叶有无的基因同 A₁₆₋₁₀₀₀、X₀₆₋₈₅₀ 紧密连锁,与 A₁₆₋₁₀₀₀ 相距 3.0cM。对其分级后的 QTL 分析表明,在 LG4 上的 J₀₃₋₈₈₀ 与 A₁₆₋₁₀₀₀ 之间存在 1 个主效基因,以显性作用为主,非常接近 A₁₆₋₁₀₀₀ 标记,可以解释 86.4% 的性状变异。同时在 LG2、LG6、LG1 上发现另外 3 个主效基因,分别解释 86.5%、86.3%、56% 的性状变异。

3 讨论

经典遗传学研究表明,农艺性状构成因素之间存在明显的相关性,主要原因是存在一因多效或者是由紧密连锁群上的位于同一染色体区间的不同座位控制所引起的。有关一因多效,最典型的莫过于 LG6 上的 O_{04-500} 与 $M_{04-1400}$ 区间。控制叶片长度的 1 个 QTL 距 O_{04-500} 标记 14.0cM,叶宽的 1 个 QTL 距其 15.0cM,叶柄长的 1 个 QTL 距其 12.0cM。另外 1 个控制叶面光滑度的 QTL 中心位置恰位于 O_{04-500} 附近(数据没列出)。这些 QTL 除叶宽外,大多表现为增加性状表现值的效应,使得 F_2 单株最终性状偏向于亲本气死孩,所以这些 QTL 位点有可能源于该亲本,表现为较强的显性效应。这些 QTL 最终可分成几个基因以及各自相关关系、互作效应等尚待进一步研究。初步研究表明,叶片长度 2 基因间存在明显的互作关系,当采用同步拟合分析时,控制叶片长度的 2 个 QTL 总效应减弱,只解释 31.7% 的性状变异率,远低于两者单独作用时解释变异的效应之和。这是否与采用单基因扫描时夸大了单个 QTL 解释的变异率有关,尚有待进一步验证。对控制叶宽的 3 个 QTLs 位点合并分析后发现,虽然 LOD 值上升到 6.12,但只解释总变异的 64.9%,表明 LG6 上的 QTL 位点与 LG1 上 2 个 QTL 位点之间可能存在明显的互作效应。

基因位点间的相关最终表现为性状相关。从前面的分析中,我们已经知道叶全长与叶柄长(PL2)、叶宽都存在显著相关,这从 QTLs 位点的分析上得到了进一步印证。这种现象在芸薹属及其它作物的基因定位中经常出现。Kennard 等^[14]在研究 *B. oleracea* 形态变化时发现,同一 QTL 位点控制着现蕾期与开花时间。Song 等^[21]在 *B. rapa* 上的研究表明,控制叶柄形态的诸多性状,例如叶柄长、宽及叶柄形态系数由同一连锁群 QTLs 所控制,同开花相关的现蕾期、开花期以及现蕾至开花的天数也由位于同一连锁群的 QTL 控制。在其它作物上,也都发现相关性状的 QTL 在染色体上位置相同或接近。例如,水稻粒长的增效 QTL 与粒宽的减效 QTL,棉花铃数的增效 QTL 和铃重的减效 QTL。这种情况对于品种改良中连锁累赘不良性状的排除带来诸多困难。

在多数情况下,各 QTL 基因型的表现符合亲本各自独立时的性状表现。例如裂叶数目,源于 QSH 的等位基因一般增加裂叶数,但是,对于一些

微效基因及极少数效应较大的 QTL 位点,从 2 个亲本而来的等位基因均可能增加或减少该性状表现值。例如源于芜菁亲本的等位基因一般增加叶柄长度,但 LG6 上的 QTL 却表现为负的加性效应(-2.68cM),效应值较大,或者可能是源于 AJH 亲本的等位基因增加叶柄长度。Song 等^[21]将这些作用称为隐蔽基因效应(cryptic gene effect),在其所观测的 20 个 *B. rapa* 形态性状中有 8 个 QTL 位点存在这种效应。他认为这些等位基因在亲本中被紧密连锁的其它基因所掩盖,发生重组后可被检测到。从图 2 还可以看出,存在着超亲分离的性状。例如叶长、叶柄宽度等性状发生隐蔽基因效应的可能性更大,这是否可以认为这种对立效应的发生是超亲分离的遗传基础,其与双亲纯合度的关系有待进一步研究。育种工作者通常对于具有较大效应的 QTL 位点感兴趣,性状选择目的是改变影响性状的等位基因频率,也就是增加目的基因的频率或减少非目标基因的频率。值得庆幸的是,在叶片长度、叶片数、株高等典型数量性状中都发现了主效基因。虽然每个 QTL 位点尚有待在大群体、高密度图谱、不同栽植环境中进一步验证以及精确定位,但利用侧链的分子标记以选择数量性状基因型已有多例成功范例^[15]。

References

- [1] Hu J, Li G, Struss D, Quiros C F. Scar and RFLP markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed. *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 1999, 118(2): 145 - 150.
- [2] Song K, Slocum M K, Osborn T C. Molecular marker analysis of genes encoding morphological variation in *Brassica rapa* (syn. *ca mpestris*). *Theor. Appl. Genet.* 1995, 90 (1) : 1 - 10.
- [3] Teutonico R A, Osborn T C. Mapping of RFLP and qualitative trait loci in *Brassica rapa* and comparison to the linkage maps of *B. napus*, *B. oleracea*, and *Arabidopsis thaliana*. *Theor. Appl. Genet.* 1994, 89: 885 - 894.
- [4] Rajcan I, Kasha K J, Kott L S, Beversdorf W D. Detection of molecular markers associated with linolenic and erucic acid levels in spring rapeseed (*Brassica napus* L.). *Euphytica*, 1999, 105 (3): 173 - 181.
- [5] Rae A M, Howell E C, Kearsey M J. More QTL for flowering time revealed by substitution lines in *Brassica oleracea*. *Heredity*, 1999, 83: 586 - 596.
- [6] Voorrips R E, Jongerius M C, Kanne H J. Mapping of two genes for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in a population of doubled haploid lines of *Brassica oleracea* by means of RFLP and AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 1997, 94: 75 - 82.

- [7] Nozaki T, Kumazaki A, Koba T, Ishikawa K, Ikehashi H. Linkage analysis among loci for RAPDs, isozymes and some agronomic traits in *Brassica campestris* L. *Euphytica*, 1997, 95 (1): 115 - 123.
- [8] Liu G S, Zhao H, Liu J, Cao M Q. Application of molecular marker in *Brassica* ssp. *Chinese Bulletin of Botany*, 1998, 2: 67 - 72. (in Chinese)
刘公社, 赵泓, 刘杰, 曹鸣庆. 分子标记技术及其在芸薹属植物研究中的应用. *植物学通报*, 1998, 2: 67 - 72.
- [9] Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica*, 1998, 104 (2): 79 - 86.
- [10] Kikuchi M, Ajisaka H, Kuginuki Y, Hirai M. Conversion of RAPD markers for a clubroot resistance gene of *Brassica rapa* into sequence-tagged sites (STSs). *Breeding Science*, 1999, 49 (2): 83 - 88.
- [11] Chen Y P, Cao J S, Miao Y. Analysis of genetic polymorphisms in vegetable crops of *Brassica campestris* by RAPD markers. *Journal of Zhejiang University (Agriculture and Life Sciences Edition)*, 2000, 26(2): 131 - 136. (in Chinese)
- 陈云鹏, 曹家树, 缪颖. 利用 RAPD 标记分析芸薹类蔬菜的遗传多样性. *浙江大学学报(农业与生命科学)*, 2000, 26 (2): 131 - 136.
- [12] Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Freijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucl. Acids Res.* 1995, 23: 4407 - 4414.
- [13] Lander E S, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daley M, Lincoln S, Newburg L. Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics*, 1987, 1: 174 - 181.
- [14] Kennard W C, Slocum M K, Figdore S S, Osborn T C. Genetic analysis of morphological variation in *Brassica oleracea* using molecular markers. *Theor. Appl. Genet.* 1994, 87: 721 - 732.
- [15] Ajisaka H, Kuginuki Y, Yui S, Enomoto S, Hirai S. Identification and mapping of a quantitative trait locus controlling extreme late bolting in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis* syn. *campestris* L.) using bulked segregate analysis - A QTL controlling extreme late bolting in Chinese cabbage. *Euphytica*, 2001, 118 (1): 75 - 81.

欢迎订阅

《中国粮油学报》是中国粮油学会主办的学术性刊物,已纳入全国食品工业类中文核心期刊,属全国重点期刊之一,并为美国《化学文摘》收录。《中国粮油学报》主要登载谷物、油脂化学方面的学术论文;报道优质粮油品质资源选育、贮藏、加工利用、以及品质检测方面的研究成果,它对指导粮油学科的发展,提高粮油资源的深度开发利用水平,具有实用价值。国内统一刊号:CN11-2864/TS,国际标准连续出版刊号:ISSN 1003-0174。双月刊,逢双月出版,胶版印刷,大16开,64页,每期定价10.00元,全年定价60.00元(含邮费)。自1996年以来,每年还出版一期英文增刊,国内订户优惠价10.00元(含邮费)。全套共计70.00元。

订阅可通过邮局或银行汇款。地址:北京市宣武区报国寺1号《中国粮油学报》编辑部,邮政编码:100053,账户:中国粮油学会,开户银行:北京市商业银行报国寺支行,账号:201050385-70;电话:010-63038765,传真:010-63049529。