

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01271

与大白菜霜霉病抗性主效 QTL 连锁的分子标记开发

李慧^{1,2}, 于拴仓², 张凤兰², 余阳俊², 赵岫云², 张德双², 赵湘²

1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037;
2. 北京农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097

摘要: 霜霉病是危害大白菜的三大病害之一, 该病的发生会严重影响大白菜的产量及品质, 因而研究与霜霉病抗性QTL紧密连锁的分子标记对大白菜抗病新品种培育具有重要意义。该研究在前期工作的基础上, 选用高感霜霉病株系 91-112、高抗霜霉病株系 T12-19 以及由二者为双亲构建的DH群体为实验材料, 针对大白菜霜霉病抗性主效QTL—*BrDW*所在的标记区间, 利用已有的大白菜基因组信息发展与抗性QTL紧密连锁的分子标记, 通过Blast和IMap分析, 将与*BrDW*连锁的RAPD标记K14-1030定位于大白菜KBrB058M10上(位于Contig214上), 根据KBrB058M10附近的BAC及BAC-end序列设计引物, 结合限制性内切酶酶切及HRM分析方法, 筛选得到5个与*BrDW*连锁的分子标记, 包括1个Indel标记Brb062-Indel₂₃₀, 3个CAPS标记Brb094-Dra I₇₈₇、Brb094-Aat II₆₆₆和Brb043-Bgl II₇₁₅, 1个SNP标记Brh019-SNP₁₃₇; 同时, 通过筛选与目标区域具有同源性的Unigene序列得到了1个与*BrDW*紧密连锁的SSR标记bru1209。标记Brb062-Indel₂₃₀、Brb094-Dra I₇₈₇、Brb094-Aat II₆₆₆、Brb043-Bgl II₇₁₅、Brh019-SNP₁₃₇和bru1209与RAPD标记K14-1030之间的遗传距离分别为4.3 cM、1.7 cM、5.9 cM、5.9 cM、4.6 cM和0.8 cM, 在对DH群体中的抗性株系选择上准确率分别为69.7%、70.9%、72.4%、72.4%、58.3%和74.2%, 可应用于分子标记辅助选择, 为霜霉病抗性分子育种奠定了良好基础。

关键词: 大白菜(*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*); 霜霉病; BAC序列; 分子标记

Development of molecular markers linked to the resistant QTL for downy mildew in *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*

LI Hui^{1,2}, YU Shuan-Cang², ZHANG Feng-Lan², YU Yang-Jun², ZHAO Xiu-Yun², ZHANG De-Shuang², ZHAO Xiang²

1. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China;
2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Science (BAAFS), Beijing 100097, China

Abstract: Downy mildew, caused by the oomycete *Hyaloperonospora parasitica* Constant. (Pers. ex Fr.), is one of the most severe diseases in Chinese cabbage, leading to reduction of yield and quality of the harvested products. Therefore, identifying molecular markers linked to the major QTL for downy mildew resistance will be helpful in breeding resistant varieties of Chinese cabbage. Here, one highly susceptible line 91-112, one highly resistant line T12-19, and the derived DH

收稿日期: 2010-12-30; 修回日期: 2011-02-16

基金项目: 北京市自然科学基金项目(编号: 6102011), 北京市农林科学院青年科研基金项目(编号: QNJJ201001), 国家科技支撑计划项目(编号: 2009BADB8B00-03)和现代农业产业技术体系建设专项资金资助

作者简介: 李慧, 硕士, 专业方向: 遗传学。E-mail: lihui314220@126.com

通讯作者: 张凤兰, 博士, 研究员, 研究方向: 蔬菜遗传育种与分子生物学。E-mail: zhangfenglan@nercv.org

网络出版时间: 2011-8-5 10:51:57

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110805.1051.002.html>

population were employed to develop linked molecular markers for the major QTL, *BrDW*, for downy mildew. With BLAST and IMap analysis, the RAPD marker K14-1030 linked to *BrDW* was anchored on KBrB058M10 (on Contig214). On the basis of the BAC and BAC-end sequences around KBrB058M10, a set of PCR primers were designed, and the methods of restriction analysis and HRM analysis were used to develop molecular makers. Finally, five polymorphism markers were developed, containing one Indel marker named Brb062-Indel₂₃₀, three CAPS markers named Brb094-Dra I₇₈₇, Brb094-Aat II₆₆₆ and Brb043-Bgl II₇₁₅, and one SNP marker named Brh019-SNP₁₃₇. In addition, one SSR marker from Unigene sequence homologous with KBrB058M10 (known as bru1209) was developed. The map distances between the six markers and RAPD marker K14-1030 were 4.3 cM, 1.7 cM, 5.9 cM, 5.9 cM, 4.6 cM, and 0.8 cM, respectively. The percentage of accuracy in selecting for downy mildew-resistant lines from the DH population were 69.7%, 70.9%, 72.4%, 72.4%, 58.3%, and 74.2%. These markers could be used in marker assisted selection to improve downy mildew resistance in Chinese cabbage.

Keywords: Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*); downy mildew; BAC sequence; molecular marker

霜霉病是大白菜的三大病害(病毒病、霜霉病和软腐病)之一,大白菜从苗期到结球期、从种株生长前期到开花结荚期的整个生育期均可发病。流行年份大白菜发病率可达 80%~90%,减产 30%~50%,使品质和产量造成严重损失。传统生产中通常使用杀菌剂进行霜霉病防治,不仅增加生产成本,造成环境污染,还可能引起病原菌生理小种的变异及产生抗药性,因此选育抗病品种成为最有效途径。

近年来关于霜霉病抗性及其相关分子标记研究已有大量报道,在芸薹属作物中的研究主要集中在甘蓝类蔬菜作物上。研究表明,芸薹属作物对霜霉病的抗性主要是由单一主效基因控制,并在这些作物中都发现了主效抗性基因^[1-3]。在分子标记方面,冷月强等^[4]研究获得了与不结球白菜霜霉病抗性基因紧密连锁的RAPD标记AY121238,与抗性基因的遗传距离为 6.7 cM; Farinhó等^[5,6]鉴定出了与青花菜抗霜霉病基因 Pp 5 2 3 紧密连锁的分子标记 OPK17-980 和 AT.CTA-133/134,进而将其转化为稳定的SCAR和CAPS标记,分别距离抗性基因 3.1 cM 与 3.6 cM; Giovannelli等^[7]研究得到与花椰菜霜霉病抗性基因紧密连锁的两个SCAR标记UBC359₆₂₀和 OPM16₇₅₀,分别距离抗性基因 6.7 cM和 3.3 cM。在大白菜中,Yu等^[8]研究表明,大白菜苗期霜霉病抗性具有数量性状的遗传特征,存在一对显性主效基因,并在一张高密度遗传图谱上定位了一个控制霜霉病苗期抗性的主效QTL——*BrDW*,并将其定位于A8 染色体上的同工酶标记PGM与RAPD标记

K14-1030 之间;虞慧芳等^[9]发展了一个与大白菜霜霉病抗性基因紧密连锁的分子标记RPP13MK,距离抗性基因遗传距离为 5.6 cM。开发与大白菜苗期霜霉病抗性基因连锁的分子标记,可以为早期抗病性选择提供依据,使选育抗病品种的过程变得更加简单、便捷。

在开发分子标记的过程中涉及到多种方法,利用已知BAC序列开发分子标记的研究已得到广泛应用,例如在大豆^[10]和玫瑰^[11]等植物中均有报道。大白菜基因组测序的迅猛发展提供了海量的基因组序列信息,为基因的精细定位和寻找紧密连锁分子标记奠定了良好基础。本研究在实验室已有工作的基础上,通过连锁标记的“电子信息杂交”确定*BrDW*在基因组上的位置,再通过该区域的BAC及BAC-end序列设计引物,开发与霜霉病抗性主效QTL紧密连锁的分子标记,从而为分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

以自交 9 代的高感霜霉病大白菜普通白心株系 91-112、高抗霜霉病DH系T12-19、F₁以及对F₁进行游离小孢子培养获得的DH群体为实验材料;91-112、T12-19、F₁和DH群体的 80 个株系种植于苗盘中,于两叶一心期进行霜霉病苗期接种鉴定^[9],并取幼苗真叶备用。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

采用基因组DNA提取试剂盒(全式金生物技术有限公司)提取 91-112、T12-19、F₁及 80 个DH株系基因组DNA, 具体步骤参照试剂盒说明书。

1.2.2 与抗性 QTL 紧密连锁的分子标记的开发

引物设计: 将大白菜苗期霜霉病抗性主效 QTL 附近的 RAPD 标记 K14-1030 序列在 <http://www.brassica-rapa.org/BRGP/index.jsp> 上进行电子杂交, 发现与 Contig214 上的 KBrB058M10 的部分序列一致性达 95%。根据 Contig214 上 KBrB058M10 附近的 BAC 及 BAC-end 序列使用 Primer Premier 5.0 设计引物(上海生工生物工程技术有限公司合成), 用以开发特异标记。

条带回收、克隆及测序: 利用设计引物在 91-112 和 T12-19 中进行 PCR 扩增, 利用 Biomed 公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收在 91-112 和 T12-19 中特异扩增的条带; 然后与 pEASY-T 载体(全式金生物技术有限公司)连接, 经蓝白斑筛选, 菌液 PCR 检测后, 阳性克隆由金维智生物科技有限公司测序。

序列分析及特异性引物设计: 根据测序结果, 分析 91-112 和 T12-19 扩增产物的序列差异, 并利用 Primer Premier 5.0 设计出特异扩增引物。对于在 91-112 和 T12-19 间存在单碱基差异的序列, 利用 HRM 分析试剂盒(Roche 公司产品), 在 Roche Lightcycler 480 上进行 SNP 分型; 对于在 91-112 和 T12-19 间存在酶切位点差异的序列, PCR 扩增后, 利用相应的限制性内切酶(Fermentas 公司产品)进行酶切获得差异片段, 从而开发 CAPS 标记; 对于 PCR 扩增产物在双亲间有明显差异的序列, 直接开发 Indel 标记。

SSR 标记的开发: 将已知的一些 Unigene 序列与大白菜基因组信息进行 BLAST 比对, 发现 Bru01209 位于 *BrDW* 所在区域, 并根据 Bru01209 的序列设计了一对 SSR 引物, 序列为: 5'-AGCTCTGAAAGGAGAAGTGT-3', 5'-AGCCATTATTGTTTTCAGAGA-3'。

1.2.3 遗传作图及 QTL 分析

将本研究开发的分子标记在DH群体中分析, 利

用Joinmap 4.0 软件将其定位于本实验室构建的高密度分子遗传图谱上^[8], 并利用MapQTL5.0 软件的区间作图模式进行霜霉病抗性QTL扫描分析。

2 结果与分析

2.1 标记开发

根据 Contig214 上 KBrB058M10 附近的 BAC 及 BAC-end 序列设计了 41 对引物, 其中有 37 对在 91-112 和 T12-19 中获得了清晰扩增条带; 扩增产物经克隆和测序发现, 5 对引物的扩增产物在 91-112 和 T12-19 之间存在序列差异。

2.1.1 Indel 标记的开发

来源于KBrB062C24 末端序列的一对引物扩增产生了约 660 bp的DNA片段, 91-112 和T12-19 之间存在 8 个碱基差异, 91-112 相对T12-19 缺失 8 个碱基(图 1A)。为了进一步提高扩增特异性和扩增效率, 重新设计了包含缺失位点的短片段特异扩增引物, 其产物大小为 222/230 bp(表 1)。经PCR扩增及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测, 该引物在 91-112 和T12-19 之间产生了明显的差异带型, 从而发展了一个有效的 Indel标记, 命名为Brb062-Indel₂₃₀。

2.1.2 CAPS 标记的开发

来源于KBrB094K14F和KBrB094K14R的 2 对引物及KBrB043F13 的 1 对引物(表 1), 在 91-112 和 T12-19 中扩增后, 其产物经测序并比对后发现, 二者序列之间存在酶切位点差异, 可以区分二者的内切酶分别为 *Dra* I、*Aat* II 和 *Bgl* II。*Dra* I 的酶切位点为 TTT/AAA, 而 T12-19 序列为 TTTATTTTAA, 无此酶切位点(图 1B)。经酶切及琼脂糖凝胶电泳, 91-112 和 T12-19 之间存在明显带型差异, 91-112 扩增片段可被 *Dra* I 有效酶切为 135 bp 与 652 bp 的两个片段, 而 T12-19 没有带型变化(图 2A、B); *Aat* II 酶切位点为 G/ACGTC, 在 T12-19 序列中具有酶切位点, 而 91-112 序列中发生了单碱基突变, 不具有此酶切位点(图 1C)。因此, 91-112 扩增片段经酶切后没有变化, 而 T12-19 扩增片段被酶切为 132 bp 与 534 bp 的两个片段(图 2C、D); *Bgl* II 酶切位点为 A/GATCT, 在 91-112 中具有酶切位点, 而 T12-19 中 ATCT 4 个碱基的缺失导致其不具备此酶切位点(图 1D), 91-112 扩

增片段被酶切为 120 bp 与 595 bp 两个片段, T12-19 扩增片段没有带型变化(图 2E、F)。从而获得 3 个有效的 CAPS 标记, 分别命名为 Brb094- Dra I₇₈₇、Brb094-Aat II₆₆₆ 和 Brb043-Bgl II₇₁₅。

2.1.3 SNP 标记的开发

来源于 KBrH019G24 的 1 对引物(产物大小为 197 bp, 表 1), 通过在 91-112 和 T12-19 中扩增及其产物的序列分析发现, 二者存在单碱基差异。为了提高 HRM 检测效率及检测的准确性, 通过设计新的引物, 使得扩增片段为 137 bp, 经 HRM 分析, 91-112 和 T12-19 之间分型清晰(图 3), 从而得到 1 个有效的 SNP 标记, 命名为 Brh019-SNP₁₃₇。

2.1.4 SSR 标记的开发

根据含有 7 次 GA 重复的 BRU01209 序列设计了一对 SSR 引物, 在 91-112 和 T12-19 中进行 PCR 扩增, 琼脂糖凝胶电泳分析发现二者存在片段大小差异(图 4), 从而得到 1 个有效的 SSR 标记, 命名为

bru1209。

2.2 分子标记的遗传作图

将发展的 6 个分子标记在 DH 群体中进行分析。利用 Joinmap 4.0 软件进行遗传作图。结果表明, 6 个标记均被定位于 A8 连锁群上, Brb094-Dra I₇₈₇ 位于同工酶标记 PGM 和 RAPD 标记 K14-1030 之间, 而其余 5 个标记位于两个标记所界定区域的两侧, Brb062-Indel₂₃₀、Brb094-Dra I₇₈₇、Brb094-Aat II₆₆₆、Brb043-Bgl II₇₁₅、Brh019-SNP₁₃₇ 和 bru1209 与 RAPD 标记 K14-1030 之间的距离分别为 4.3 cM、1.7 cM、5.9 cM、5.9 cM、4.6 cM 和 0.8 cM (图 5)。

2.3 QTL 及分子标记的验证分析

利用 MapQTL5.0 软件的区间作图模式进行霜

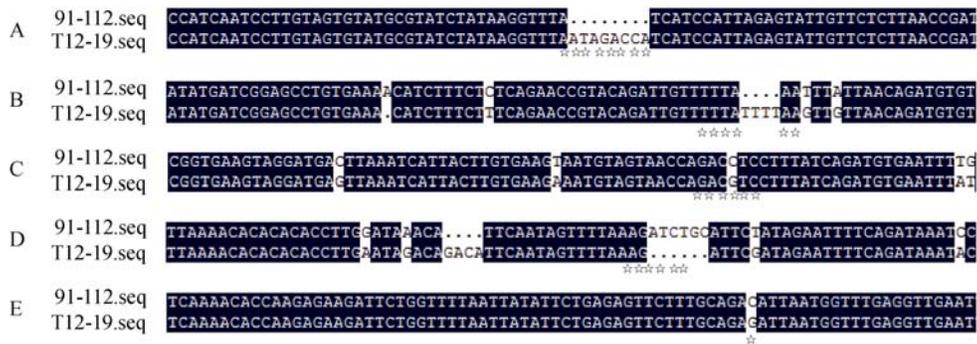


图 1 引物在 91-112 和 T12-19 中扩增序列部分比对结果

A : Brb062-Indel₂₃₀ 引物在 91-112 和 T12-19 之间扩增产物序列比对结果。☆ : 91-112 相对于 T12-19 缺失的 8 bp 碱基; B、C 和 D : Brb094-Dra I₇₈₇、Brb094-Aat II₆₆₆ 和 Brb043-Bgl II₇₁₅ 引物于 91-112 和 T12-19 间扩增产物序列比对差异结果。☆ : 酶切位点所含碱基; E : Brh019-SNP₁₃₇ 引物在 91-112 和 T12-19 之间扩增产物序列比对差异结果。☆ : 单碱基差异位置(G/C 差异)。

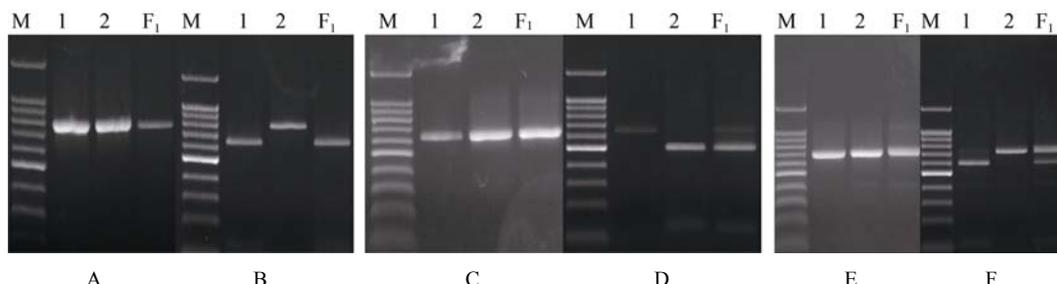


图 2 3 对 CAPS 引物在 91-112 和 T12-19 中的扩增条带及其 PCR 产物酶切后的电泳图谱

A : Brb094-Dra I₇₈₇ 引物扩增结果, B : Dra I 内切酶酶切后结果; C : Brb094-Aat II₆₆₆ 引物扩增结果, D : Aat II 内切酶酶切后结果; E :

Brb043-Bgl II₇₁₅引物扩增结果, F: Bgl II 内切酶酶切后结果。M: 100 bp DNA ladder; 1: 引物在 91-112 中的扩增条带; 2: 引物在 T12-19 中的扩增条带; F₁: 引物在 91-112×T12-19 子一代中的扩增条带。

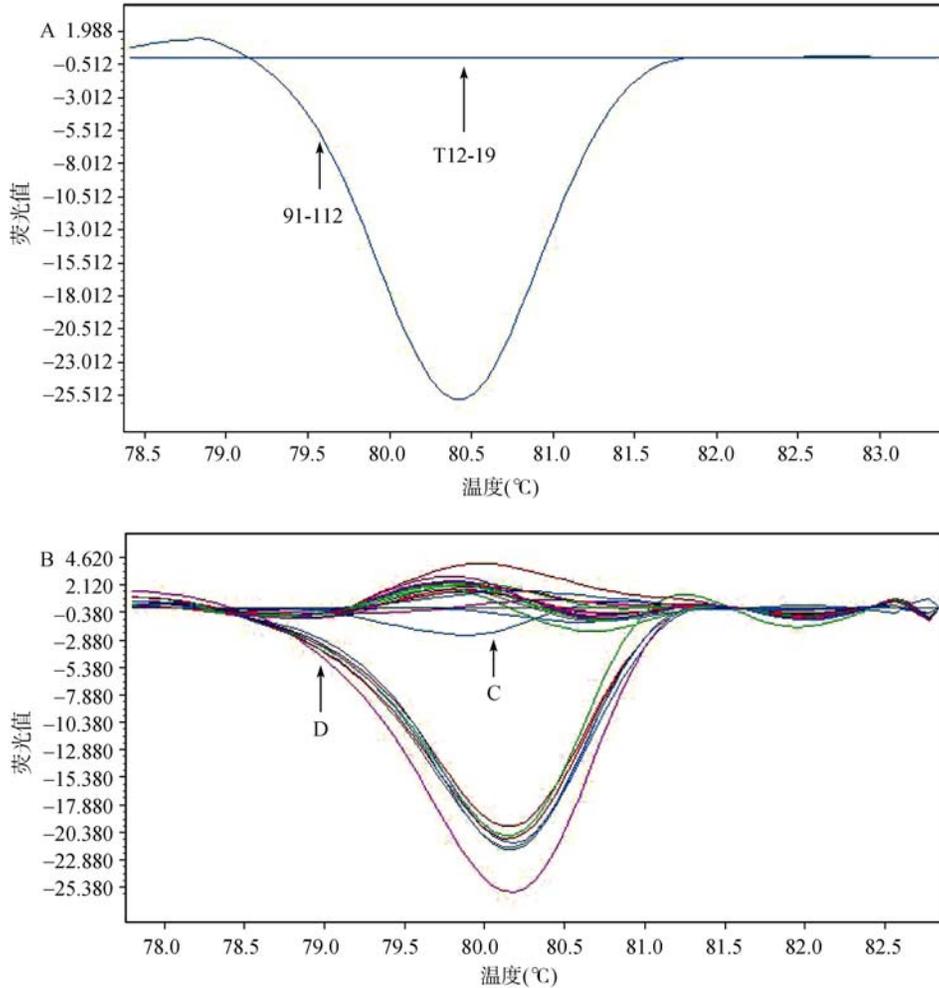


图 3 Brh019-SNP₁₃₇在 91-112 和 T12-19 及部分 DH 系中的 HRM 分析结果

A: Brh019-SNP₁₃₇在 91-112 和 T12-19 中的融解曲线; B: Brh019-SNP₁₃₇在 91-112、T12-19 及部分 DH 系(DH1-20)中的融解曲线。其中 C 表示 T12-19、DH2、3、4、7、8、12、14、15 的融解曲线, D 表示 91-112、DH1、5、6、9、10、11、13、16、17、18、19、20 的融解曲线。

表 1 BAC 名称及新开发的分子标记

BAC 名称	标记类型	标记名称	引物序列(5'→3')	片段大小 91-112/T12-19
KBrB062C24	Indel	Brb062-Indel ₂₃₀	TTTCCAAGGTCTGAGTTCAGATCCAAGCCGGATAAG	222/230 bp
KBrB094K14F	CAPS	Brb094-Dra I ₇₈₇	CACCGTCTATGCTATCCTTGTGCTTGTGGCACGAATGGG	787/790 bp
KBrB094K14R	CAPS	Brb094-Aat II ₆₆₆	CTGCCTTTGTGCTCTATCACATTCCCATTACTCATAAC	663/666 bp
KBrB043F13	CAPS	Brb043-Bgl II ₇₁₅	CTGCCTTGAGGTTACTTTGATACTGTTTCGTTTCGC	715/713 bp
KBrH019G24	SNP	Brh019-SNP ₁₃₇	CGCAGCGCAAAGAAGATAGGTGAAAACAGCGCCTGAAA	137 bp



图 4 bru1209 在 91-112 和 T12-19 及部分 DH 系中的扩增结果

M : DNA Marker ; a : bru1209 在 91-112 中的扩增条带; b : bru1209 在 T12-19 中的扩增条带; F₁ : bru1209 在 91-112×T12-19 子一代中的扩增条带; 1~14 : bru1209 在 DH1-DH14 中的扩增条带。

霉病抗性 QTL 扫描, 发现 *BrDW* 的高峰位于 A8 连锁群的 46 cM, 其 *LOD* 值为 26, 该位点可以解释的霜霉病抗性变异为 71.5%, 新发展的 6 个分子标记位点可以解释的霜霉病抗性变异分别为 57.5%、63.2%、46.4%、47.3%、47.6% 和 43.4%。

根据分子标记在 DH 群体中的分析结果表明, 本文中新发展 6 个分子标记对抗性株系的选择均具有较高的准确性。Brb062-Indel₂₃₀、Brb094-Dra I₇₈₇、Brb094-Aat II₆₆₆、Brb043-Bgl II₇₁₅、Brh019-SNP₁₃₇ 和 bru1209 选择的抗性株系平均病情指数分别为 23.1、22.3、22.4、22.4、22.4 和 21.5, 对抗性株系选择的准确率分别为 69.7%、70.9%、72.4%、72.4%、58.3% 和 74.2% (表 2)。

3 讨论

霜霉病对多种十字花科作物危害严重, 研究与抗性基因或 QTL 紧密连锁的分子标记在分子标记辅助育种方面就显得尤为重要。本研究根据 KBrB058M10 附近的 BAC、BAC-end 及相关 Unigene 序列设计特异性引物, 很好的利用了大白菜基因组已知的信息, 有针对性地发展了与目标区域紧密连锁的分子标记。同时, 本文开发的 4 类分子标记均为共显性标记, 可以清楚地区分纯合与杂合植株。因此, 在抗性种质资源鉴定、多样性分析及早期抗病性鉴定方面也有很强的实用性, 与之前获得的目标区域内的同工酶标记和 RAPD 标记相比, 在大规模育种材料后代选择中具有更为突出的实用性和经济性。

3.1 BAC 及 BAC-end 序列在发展分子标记中的应用

BAC 序列可用于真核生物重要基因及全基因组物理作图、重要性状基因的图位克隆、基因结构及功能分析等多个方面的研究, 特别是为目标基因的精细定位及图位克隆奠定了坚实的基础, 如 Kleinhofs 研究小组以水稻为图位克隆中介, 克隆了大麦感锈病抗性基因 *Rpg1* 和 *rpg4*^[12]; Quint 等^[13] 利用甘蔗花叶病毒抗性基因序列在玉米 BAC 文库中筛选同源序列, 进行了抗性基因的定位和克隆研究。这些研究主要利用了不同作物之间遗传的同线性开发分子标记, 而本研究则是利用大白菜自身已知的基因组序列进行标记开发, 相比之下, 成功开发分子标记的几率将大为增加。本研究利用与目标基因紧密连锁的 RAPD 标记 K14-1030 的序列进行电子杂交, 将目标区域定位于 KBrB058M10 附近的 BAC 序列上, 根据 Contig214 上 KBrB058M10 附近的 BAC 序列设计了 41 对引物, 引物的扩增效率高达 90%, 仅有 4 对引物无扩增或无清晰扩增条带, 可能是由于不同品种间碱基序列的变异, 使得引物与模板不能有效匹配; 其他 37 对引物均在 91-112 和 T12-19 中产生清晰的特异扩增条带, 测序后发现, 大部分引物扩增的序列在 91-112 和 T12-19 之间无碱基差异, 这表明不同品种之间在遗传上存在较高的保守性。其中 5 对引物扩增序列在 91-112 和 T12-19 存在差异, 对差异序列分析发现, 部分位点间差异属于限制性内切酶酶切位点区域, 部分差异属于单碱基突变差异, 部分表现出插入缺失突变差异。根据差异序列设计

表 2 6 个分子标记在 DH 群体中的验证

分子标记	带型	株系数	平均病情指数(ID)	表型为抗性株系数	选择准确率(%)
Brb062-Indel ₂₃₀	b	47	72.5	2	69.7
	a	33	23.1	23	
Brb094-Dra I ₇₈₇	b	49	73.5	3	70.9
	a	31	22.3	22	
Brb094-Aat II ₆₆₆	b	51	73.5	4	72.4
	a	29	22.4	21	
Brb043-Bgl II ₇₁₅	b	51	73.6	4	72.4
	a	29	22.4	21	
Brh019-SNP ₁₃₇	b	44	73.6	4	58.3
	a	36	22.4	21	
bru1209	b	49	72.4	2	

注: a: 与抗性亲本 T12-19 的带型相同; b: 与感性亲本 91-112 的带型相同。

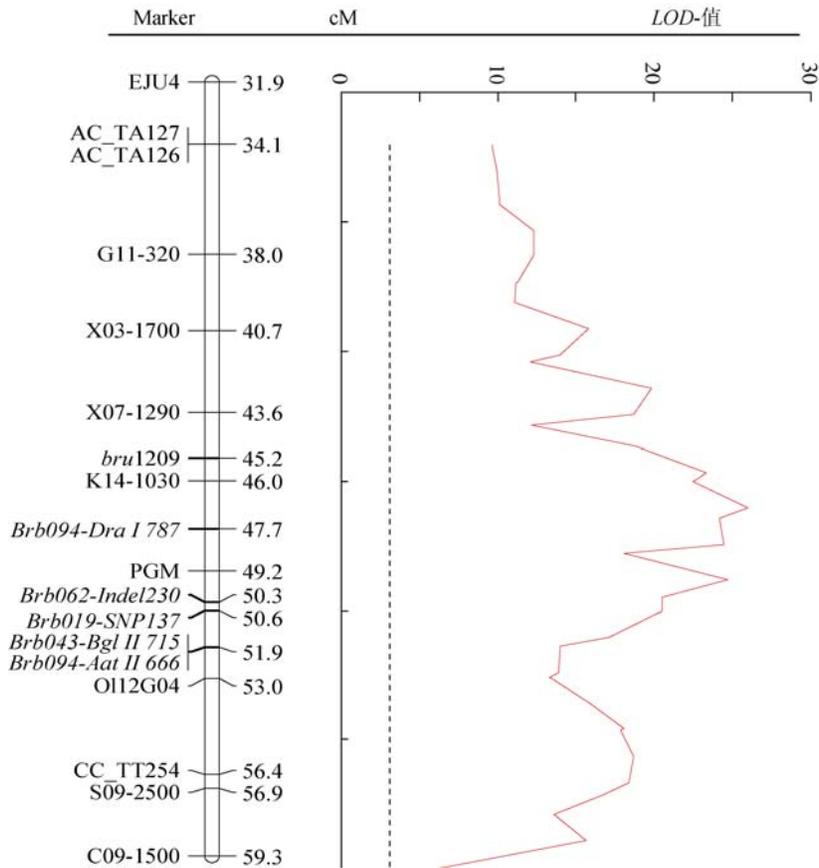


图 5 新开发的分子标记在图谱上的位置及霜霉病抗性主效 QTL-*BrDW* 定位分析

特异引物进行特异分子标记的开发, 不仅可以最大限度利用大白菜基因组已知信息, 而且能最大程度的简化分子标记开发的过程。

3.2 几种分子标记的特点及应用

随着分子生物学技术的不断发展, 开发分析速度更快、成本更低、信息量更大的分子标记成为一种必然。而分子标记技术与 DNA 提取程序化、电泳胶片分析自动化、信息(数据)处理计算机化的结合, 必将加速遗传图谱的构建、基因的定位及克隆、物种亲缘关系鉴别及分子标记辅助育种方面的研究。本文通过设计引物进行 PCR, 并结合 HRM 分析、限制性内切酶分析及电泳片段大小分析发展了 SNP、CAPS、Indel 及 SSR 标记。SNP 标记对引物设计和检测方法都有着较高的要求, 但 SNP 标记多态性丰富, 同时具有高度稳定性的优点, 因此, 成为基因定位与克隆方面必不可少的标记。SNP 标记的开发

和应用在多种作物中都有研究报道, 例如在大麦^[14]、辣椒^[15]和大豆^[16]中。本研究中原始扩增产物大小为 197 bp, 为了提高 HRM 检测的效率及检测的准确性, 通过设计新的引物, 使得扩增产物大小为 137 bp, 试验证明 91-112 和 T12-19 之间的融解曲线差异较 197 bp 片段的差异更加明显, 在 DH 群体中检测时能更好地区分单碱基差异, 这表明设计 SNP 引物的过程中考虑扩增片段大小是影响试验结果的重要因素之一^[17]; CAPS 标记技术由于具有操作简单、成本低等优点, 是检测 DNA 多态性的首选技术。CAPS 标记的开发及相关辅助育种应用在多种作物中也有报道, 例如在甘蓝型油菜^[6]、水稻^[18]和番茄^[19]中, 束永俊等^[20]还进行了大豆 CAPS 标记快速开发方法的建立与优化的研究。本文中通过对 91-112 与 T12-19 之间的序列比对分析筛选适合的内切酶开发 CAPS 标记, 是一种简便可行的方法, 并且具有很高的准确性。Indel 标记是各类标记中最为经济的一类标记^[21], 只需

PCR结合简单的凝胶电泳即可进行检测。Indel标记的开发及辅助育种也已应用到多种作物中,如水稻^[22]和小麦^[23]。本研究的标记Brb062-Indel₂₃₀,在91-112与T12-19之间相差8个碱基,只需设计包含差异片段的特异扩增引物,再通过PCR和电泳就可以区分两份材料,对大量样本进行检测也颇为简便。

本研究开发的6个特异性PCR标记与RAPD标记K14-1030之间的遗传距离分别为4.3 cM、1.7 cM、5.9 cM、5.9 cM、4.6 cM和0.8 cM,可以解释的霜霉病抗性变异分别为57.5%、63.2%、46.4%、47.3%、47.6%和43.4%。这些标记在对抗性株系的选择上准确率较高,因此,本文发展的6个分子标记在幼苗期即可对植株进行基因型选择,从而减少后期培育及鉴定等过程,大大缩短育种时间,为大白菜霜霉病抗性分子标记辅助育种提供理论依据。目前,大白菜全基因组测序工作已经完成,为抗病基因的挖掘研究提供了大量的生物信息,基于此项研究的结果可以进一步开发更加紧密连锁的分子标记,或者直接获得抗病基因的候选基因,为最终克隆抗病基因和建立标记辅助育种技术体系奠定了良好基础。

参考文献(References):

- [1] Mahajan V, Gill HS, More TA. Inheritance of downy mildew resistance in Indian cauliflower (group III). *Euphytica*, 1995, 86(1): 1-3. [DOI](#)
- [2] Farnham MW, Wang M, Thomas CE. A single dominant gene for downy mildew resistance in broccoli. *Euphytica*, 2002, 128(3): 405-407. [DOI](#)
- [3] Coelho PS, Monteiro AA. Inheritance of downy mildew resistance in mature broccoli plants. *Euphytica*, 2003, 131(1): 65-69. [DOI](#)
- [4] 冷月强, 侯喜林, 史公军. 白菜抗霜霉病基因的RAPD标记. *园艺学报*, 2007, 34(3): 763-766. [DOI](#)
- [5] Farinhó M, Coelho P, Carlier J, Svetleva D, Monteiro A, Leitão J. Mapping of a locus for adult plant resistance to downy mildew in broccoli (*Brassica oleracea* convar. *italica*). *Theor Appl Genet*, 2004, 109(7): 1392-1398. [DOI](#)
- [6] Farinhó M, Coelho P, Monteiro A, Leitão J. SCAR and CAPS markers flanking the *Brassica oleracea* L. Pp523 downy mildew resistance locus demarcate a genomic region syntenic to the top arm end of *Arabidopsis thaliana* L. chromosome 1. *Euphytica*, 2007, 157(1-2): 215-221. [DOI](#)
- [7] Giovannelli JL, Farnham MW, Wang M, Strand AE. Development of sequence characterized amplified region markers linked to downy mildew resistance in broccoli. *J Am Soc Horticult Sci*, 2002, 127(4): 597-601. [DOI](#)
- [8] Yu SC, Zhang FL, Yu RB, Zou YM, Qi JN, Zhao XY, Yu YJ, Zhang DS, Li L. Genetic mapping and localization of a major QTL for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Mol Breed*, 2009, 23(4): 573-590. [DOI](#)
- [9] 虞慧芳, 钟新民, 李必元, 顾宏辉. 与大白菜抗霜霉病基因连锁的分子标记研究. *中国农学通报*, 2010, 26(15): 66-70. [DOI](#)
- [10] Marek LF, Shoemaker RC. BAC contig development by fingerprint analysis in soybean. *Genome*, 1997, 40(4): 420-427. [DOI](#)
- [11] Biber A, Kaufmann H, Linde M, Spiller M, Terefe D, Debener T. Molecular markers from a BAC contig spanning the Rdr1 locus: a tool for marker-assisted selection in roses. *Theor Appl Genet*, 2010, 120(4): 765-773. [DOI](#)
- [12] Kilian A, Chen J, Han F, Steffenson B, Kleinhofs A. Towards map-based cloning of the barley stem rust resistance genes Rpg1 and rpg4 using rice as an intergenomic cloning vehicle. *Plant Mol Biol*, 1997, 35(1-2): 187-195. [DOI](#)
- [13] Quint M, DuBle CM, Melchinger AE, Lübberstedt T. Identification of genetically linked RGAs by BAC screening in maize and implications for gene cloning, mapping and MAS. *Theor Appl Genet*, 2003, 106(7): 1171-1177. [DOI](#)
- [14] Lehmsiek A, Sutherland MW, McNamara RB. The use of high resolution melting (HRM) to map single nucleotide polymorphism markers linked to a covered smut resistance gene in barley. *Theor Appl Genet*, 2008, 117(5): 721-728. [DOI](#)
- [15] Yang HB, Liu WY, Kang WH, Jahn M, Kang BC. Development of SNP markers linked to the L locus in *Capsicum* spp. by a comparative genetic analysis. *Mol Breed*, 2009, 24(4): 433-446. [DOI](#)
- [16] Van KJ, Hwang EY, Kim MY, Kim YH, Cho YI, Cregan PB, Lee SH. Discovery of single nucleotide polymorphisms in soybean using primers designed from ESTs. *Euphytica*, 2004, 139(2): 147-157. [DOI](#)
- [17] Mackay JF, Wright CD, Bonfiglioli RG. A new approach to varietal identification in plants by microsatellite high resolution melting analysis: application to the verification of grapevine and olive cultivars. *Plant Methods*, 2008, 4(1): 8. [DOI](#)
- [18] 刘之熙, 刘云开, 詹庆才. 水稻孕穗期耐冷基因的CAPS标记辅助选择. *湖南农业大学学报 (自然科学版)*, 2008, 34(2): 127-131. [DOI](#)
- [19] 朱莎, 宋燕, 刘磊, Atanassova B, 徐和金, 周国龙, 李君明. 番茄ps-2基因的SSR及CAPS标记开发. *园艺学报*, 2010, 37(2): 235-240. [DOI](#)
- [20] 束永俊, 李勇, 朱振雷, 朱延明. 大豆CAPS标记快速开发方法的建立与优化. *东北农业大学学报*, 2009, 40(12): 62-65. [DOI](#)
- [21] 潘存红, 王子斌, 马玉银, 殷跃军, 张亚芳, 左示敏, 陈宗祥, 潘学彪. InDel和SNP标记在水稻图位克隆中的应用

- 用. 中国水稻科学, 2007, 21(5): 447–453. [DOI](#)
- [22] Hayashi K, Yoshida H, Ashikawa I. Development of PCR-based allele-specific and InDel marker sets for nine rice blast resistance genes. *Theor Appl Genet*, 2006, 113(2): 251–260. [DOI](#)
- [23] Harsh R, Rosy R, Rachel W, Peter M. Repetitive indel markers within the *ALMT1* gene conditioning aluminium tolerance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed*, 2006, 18(2): 171–183. [DOI](#)