

芸薹属作物分子标记研究

陈书霞¹, 王晓武², 程智慧¹, 房玉林¹

(1 西北农林科技大学 园艺系, 陕西 杨陵 712100;

2 中国农科院 蔬菜花卉研究所, 北京 100086)

S635.03

~~6944~~~~678~~ S188

[摘要] 通过对已有资料的分析, 从芸薹属作物分子连锁图现状, 芸薹属作物比较作图研究以及重要农艺性状的分子标记等方面, 概述了芸薹属作物分子标记的研究进展, 并对今后的研究方向提出了建议。

[关键词] 芸薹属作物; 分子标记; 分子连锁图; 基因定位; 育种

[中图分类号] S635.4 [文献标识码] A

1 芸薹属作物分子连锁图现状

芸薹属有许多重要的栽培种, 包括3个二倍体, 如 *B. oleracea* ($2n=2x=18$ genome CC), *B. campestris* ($2n=2x=20$ genome AA), *B. nigra* ($2n=2x=16$ genome C); 3个多倍体, 如 *B. napus* ($2n=2x=38$ genome AACCC), *B. carinata* ($2n=4x=16$ genome BC), *B. juncea* ($2n=4x=36$ genome AABB), 其中 *B. oleracea* 又包含许多变种。所以芸薹属遗传信息十分丰富, 是研究遗传学的理想材料。遗憾的是由于一直缺乏一套行之有效的形态学或生理遗传学标记, 在芸薹属中一直未进行系统化的遗传学分析, 以及基因所控制的农艺性状作图研究^[1], 但确定了一些同工酶位点作为标记^[2~7]。

近年来, DNA 标记系统的迅速发展大大促进了蔬菜作物尤其是芸薹属作物遗传学育种的研究。Slocum 等^[8]用 RFLP 标记建立了 *B. oleracea* 的连锁图, 图中含标记数目 258 个, 覆盖基因组长度 820 cM (图距单位, Centi-morgan)。在此之后, 芸薹属作物分子连锁图的绘制得到迅速地发展 (表 1), Chyi 等^[9]用 *B. rapa* 的 F_2 群体构建 RFLP 标记连锁图, 含有标记数目 360 个, 覆盖基因组长度达 1 876 cM, 是芸薹属已构建的连锁图中所含标记数目最多的 1 个。总体看来, 芸薹属遗传图谱绘制中, 甘蓝图谱涉及 200 多个标记, *B. rapa* 连锁图共涉及 300~400 个标记, 黑芥图谱约有 100 个标记, 甘蓝型油菜涉及约 300 个标记, 这些标记中, RFLP 标记偏多, 其他类型标记偏少。尽管已经在利用附加系或代换系把已经发现的连锁群定位于各自的染色体上, 但这方面的努力还不够。

2 芸薹属作物的比较作图

通过芸薹属作物间的比较作图发现, 芸薹属作物各种类之间染色体呈现重排现象。在不同的芸薹属二倍体作物中染色体倒位与易位有所不同, 但不同种类在较大区段染色体

[收稿日期] 1999-04-22

[作者简介] 陈书霞 (1971-), 女, 硕士。

上基因的排列位置一致,甚至四倍体和二倍体的芸薹属作物的基因组也显示了相当大的一致性^[8,10,11]。Lydiate 等^[12]据 *B. napus* 的 RFLP 连锁图表明,栽培芸薹属作物和同一种野生种的基因组排列位置一致,这说明芸薹属作物染色体呈现较高的保守性。这种关系的发现不仅在起源演化研究上具有重要意义,而且在分子标记育种及基因克隆方面也有重要作用。据研究,作为植物生化、生理、分类及分子遗传学的模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)和芸薹属是亲缘关系较近的物种,Kowalski 等^[13]通过比较作图表明,覆盖拟南芥基因组 24.6% 的 11 个保守区域,在 *B. oleracea* 基因组中覆盖了 29.9% 的区域。这些表明,随着研究的深入 2 种近缘作物之间转移遗传信息一定会成为可能,而且还能为共线性的假设提供有力的证据^[5]。

表 1 芸薹属已构建的分子连锁图

种名	作图群体	标记类型	标记数目/个	图距/cM	连锁群主要指定	未指定	参考文献	
<i>B. oleracea</i>	F ₂	RFLP	258	820	9	0	Slocum et al. 1990	
	F ₂	RFLP	201	1 112	9	4	Landry et al. 1992	
	F ₂	RFLP, isozyme	108	747	9	2	Kianian et al. 1992	
	F ₂	RFLP	150	1 023	9	3	刘忠松等. 1997	
	F ₂	RFLP, RAPD	159	921	9	2	Camargo et al. 1997	
	DH	RFLP	303	875	9	0	Bohuon et al. 1996	
	DH	RFLP, AFLP	92	615	12		Voorrips et al. 1997	
	F ₂	RFLP	112	1 002	9		Camargo et al. 1995	
	F ₂	RFLP, RAPD	310	1 606	9	4	Cheung et al. 1997	
<i>B. rapa</i>	F ₂	RFLP	360	1 876	10	0	Chyi et al. 1992	
	F ₃ 家系	RFLP	139	1 785	10	1	Teutonico et al. 1994	
	F ₂	RFLP	220	1 593	10	0	Song et al. 1995	
	F ₂	RFLP, RAPD	168	519	10	0	Thanhuanpaa et al.	
	RIL	RFLP	144	890	10	2	Kole et al. 1996	
	F ₂	RFLP	280	1 805	10	0	Song et al. 1991	
<i>B. nigra</i>	BC ₁	RFLP	288	855	8	0	Lagercrantz et al. 1995	
<i>B. nigra</i>	F ₂	RFLP, RAPD	124	667	8	3	Truco et al. 1994	
	DH	RFLP	132	1 016	22	6	Ferreira et al. 1994	
	BC ₁	RFLP	323	2 602	19	5	刘忠松等. 1997	
	DH	RFLP, RAPD	207	1 441	19	2	Uzunova et al. 1995	
	DH	RFLP, RAPD	254	1 765	19		Foisset et al. 1996	
	DH	RFLP, RAPD	250	1 500	19	4	刘忠松等. 1997	
			RFLP	354	2 264	19	11	Cheung et al. 1997
	DH	RFLP	277	2 264	19	6	Sharp et al. 1997	
			RFLP, RAPD, STS	274+6+2	2 125	19	10	Cheung et al. 1995
	BC ₁ , DH	RFLP	158	1 204.5	19		Howell et al. 1996	
	F ₂	RFLP	137	1 413	19	17	Landry et al. 1992	
<i>B. juncea</i>	DH	RFLP	343	2 073	18	5	Cheung et al. 1996	

在芸薹属甚至十字花科植物中,对控制开花的基因是研究得比较多的。利用在 *A. thaliana* 中定位的控制开花时间的基因 CO(已被克隆)邻近 1.5 mb(百万碱基对)区域的 RFLP 探针, Lagercrantz 等^[14]发现 *B. nigra* 的 LG₂, LG₅, LG₈ 3 个连锁群都存在对应的共线性区域,其中 LG₂ 和 LG₈ 2 个连锁群对应区域存在控制开花时间的 QTL 位点,分别

控制总变异的 53% 和 12%。Osborn 等^[15]认为, *Brassicas* 控制开花时间的 QTL 在种内和种间都处于同源染色体的相似区域。而且此种关系已在玉米和高粱 (*Sorghum*) 中发现^[16]。事实证明, *Brassica* 的一些重复区段显示了和 *Arabidopsis thaliana* 第 5 染色体的末端区域的相似性^[17]。这种染色体组之间保守性和共线性关系表明, 可以利用模式植物 *A. thaliana* 已构建的分子标记图谱和物理图谱信息研究 *Brassica* 的染色体组, 进行 *Brassica* 染色体组的染色体步移。

在芸薹属内部, 通过比较作图发现, *B. oleracea* 的连锁图有 8 条在 *B. napus* 的连锁图中处于保守位置。这些保守区段的存在反应了 A 和 C 基因组的同源性。Lagercrantz 等^[14]比较分属 A, B, C 3 个不同基因组的 3 种植物 *B. rapa* ($n=10$), *B. nigra* ($n=8$) 和 *B. oleracea* ($n=9$) 的 RFLP 图谱发现, 2 个不同染色体组的不同片段之间具有非常明显的共线性关系。通过比较以后, Cheung 等^[18]指出, 除了 *B. napus* 的连锁群有 1 个附加位点出现外, 在 *B. oleracea* 中 S-位点的连锁群和 *B. napus* 的连锁群有相当程度的同源性。

3 芸薹属作物重要农艺性状的分子标记及基因定位

由于分子标记的发展, 目前人们已有可能将复杂的数量性状进行分解, 象研究质量性状一样对控制数量性状的多个基因分别进行研究, 从而使数量遗传研究取得了突破性的进展。目前, 对芸薹属的各种数量性状的分子标记已经广泛开展。Camargo 等^[19]通过甘蓝品种“BI-16”和抗病青花菜“OSUCR-7”杂交的 F_2 家系, 找到了与甘蓝抗 *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* 有关的若干个数量基因座位。有关苗期抗性的 QTL 分别位于 LG_1 , LG_2 , LG_9 和 LG_3 , 而成株期抗性的 QTL 分别位于 LG_1 和 LG_9 , 和苗期的 2 个位点相同。Voorrips 等^[20]通过甘蓝的 DH 群体来定位抗 clubroot 的有关基因, 发现了 pb-3, pb-4 2 个主效基因座位和 2 个微效基因座位, pb-3 和 pb-4 分别定位于 LG_3 和 LG_4 上。Benoit 等^[21]通过 RFLP 标记构建 *Brassica oleracea* 的连锁图发现, 有 2 个与甘蓝根肿病 2 号生理小种抗性基因连锁的标记, 2 个标记分别定位于 LG_6 和 LG_1 上。Kennard 等^[22]对一个甘蓝和青花菜的 F_2 群体的农艺性状分析表明, 茎部性状集中分布在 3c, 8c; 叶片性状集中分布于 4c, 5c。他们还发现, 一些控制同一性状的不同 QTL 位点分布与不同连锁群重复的 RFLP 标记分布具有平行关系。

利用连锁图, 人们可以进行重要基因及所感兴趣的基因定位, 包括主效基因和 QTL。Ferreira^[16]通过 132 个 RFLP 位点的连锁图, 表明 *B. napus* 有关春化要求的基因和 7 个位点连锁, 定位于第 9 个连锁群。确定了有关春化要求的主效基因 Wg6b10。Nozaki 等^[1]关于 *B. campestris* 的抽薹时间做了一些分析, 表明抽薹时间与 2 个同工酶标记紧密连锁, 还有 6 个 RAPD 标记和该性状连锁, 主效基因位点分布在第 8 和第 9 连锁群上。这些重要性状的分子标记为芸薹属作物育种提供了有力的帮助。其他一些重要性状也已得到明确标记, 如甘蓝的黑腐病抗性^[19]、根肿病抗性^[20]、油菜^[21]的 CMS 恢复基因、硫苷含量、白腐病抗性等。大量分子标记的产生, 为育种提供了明确的指导。

通过与重要性状紧密连锁的标记, 可对所需要的性状进行早期、间接、准确地选择, 即所谓的分子标记辅助育种 (MAS)。王晓武^[23]利用 BSA 分析法获得了 1 个与甘蓝显性雄性不育基因 MS 连锁的 ERPAD 标记, 在辅助 2 个甘蓝自交系回交一代及 2 个青花菜自

交系回交一代的MS基因转育中预测的准确性超过90%。

4 问题与展望

纵观芸薹属分子连锁图,所用的RFLP标记较多,而其他类型的标记则相对较少,尤其是AFLP和SSR标记,而且所用的群体多为F₂分离群体。*B. napus*中用DH群体构建了一些永久图谱,但缺点是不够完整。总体来说,芸薹属作物在连锁图绘制上,亟待解决的问题是:要增加标记的数目,增加图谱的饱和度,同时要积极创造条件构建DH群体。除此之外,要把RFLP标记转换为以PCR为基础,易于操作、容易为人们所掌握的技术,还要通过深入地研究比较作图,达到芸薹属作物的遗传信息及探针共享,这样就可对整个芸薹属作物进行更深入地研究,使连锁图在育种中发挥更大作用。

总之,通过数量性状基因位点作图,一些数量基因已被绘制在连锁图上,而且也找到了与其紧密连锁的分子标记。如果人们把其与建立YAC(Yeast artificial chromosome)库或BAC(Bacterial artificial chromosome)库结合起来,则可以进行目标基因图谱克隆。目前番茄的多个抗病基因已被克隆^[24]。相信通过分子标记技术和高密度的基因图谱,人们会尽快明了数量性状的机理,为育种打下良好基础。

[参考文献]

- [1] Nozaki T, Kumazaki A, Koba T, et al. Linkage analysis among loci for RAPD, isozymes and some agronomic traits in *Brassica campestris* L. [J]. Eupugtica, 1997, 95: 115-123.
- [2] Chen B Y, Heneen W K, Simonsen V. Genetics of isozyme loci in *Brassica campestris* L. and in the progeny of a trigonemic hybrid between *B. napus* L. and *B. campestris* L. [J]. Genome, 1990, 33: 433-440.
- [3] Chen B Y, Heneen W K, Simonsen. Comparative and genetic studies of isozymes in esynthesized and cultivated *Brassica napus* L., *B. campestris* L. and *B. alboglabra*[J]. Bailey Theor Appl Genet, 1998, 77: 637-679.
- [4] Chevre A M, This P, Eber F, et al. Characterization of disomic additionlines *Brassica napus*[J]. Theor Appl Genet, 1991, 81: 43-49.
- [5] Furuya Y, Ikehashi H. Identification of acid phosphatase and esterase isozyme loci in *Brassica campestris*[J]. Japan J Breed, 1991, 41: 61-71.
- [6] Gotoh S, Ikehashi H. Survey of isozyme genes by polyacrylamide gel electrophoresis in cauliflower, broccoli and cabbage (*Brassica oleracea*)[J]. Japan J Breed, 1992, 42: 23-32.
- [7] Nozaki T, Anji T, Takahashi, et al. Analysis of isozyme loci and their likages in *Brassica campestris* L. [J]. Breed Sci, 1995, 45: 57-64.
- [8] Slocum M K, Figdore S S, Kennard W C, et al. Linkage arrangement of restriction length polymorphism loci in *Brassica oleracea*[J]. Theor Appl Genet, 1990, 80: 57-64.
- [9] Chyi Y S, Hoenecke M E, Sernyk J L. A genetic map of restriction fragment length polymorismloci for *Brassica rapa* (syn. *campestris*)[J]. Genome, 1992, 25(5): 746-757.
- [10] Mindrinos M, Katagiri F, Yu G L, et al. The a thanliana disease-resistant gene RPS2 encodes a protein repeats [J]. Cell, 1994, 78: 1089-1099.
- [11] Slocum M K. Analyzing the genomic structure of *Brassica* species and sub-species using RFLP analysis[A]. Development and application of molecular markers to problems in plant genetics [C]. Cold Spring Harbor Laborayory Press, Cold Spring Harbor, N Y, 1989. 73-80.
- [12] Lydiate D, Sharpe A, Lagercrantz U, et al. Mapping the *Brassica* genome[J]. Outlook Agric, 1993, 22: 85-92.

- [13] Kowalski S P, Lan T H, Feldmann K A, et al. Comparative mapping of *Arabidopsis thaliana* and *Brassica oleracea* chromosomes reveals islands of conserved [J]. *Organization Genetics*, 1994, 138: 499—510.
- [14] Lagercrantz U L F, Joanna P, Coupland G, et al. Comparative mapping in *Arabidopsis* and *Brassica*, fine scale genome collinearity and congruence of genes controlling flowering time [J]. *The Plant Journal*, 1996, 9(1): 13—20.
- [15] Osborn T C, Kole C, Parkin I A P, et al. Comparison of flowering time genes in *Brassica rapa*, *B. napus* and *Arabidopsis thaliana* [J]. *Genetics*, 1997, 156: 1123—1129.
- [16] Ferreira M E, Satagoban J, Yandell B S, et al. Mapping loci controlling vernalization requirement and flowering time in *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 90: 727—732.
- [17] Lin Y R, Schertz K F, Paterson A T. Comparative analysis of QTLs affecting plant height and maturity across the poaceae, in reference to an interspecific sorghum population [J]. *Genetics*, 1995, 141: 391—411.
- [18] Cheung W Y, Champagne G, Hubert N, et al. Conservation of s-locus for self-incompatibility in *Brassica napus* L. and *Brassica oleracea* L. [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 73—82.
- [19] Camargo L E A, Williams P H, Osborn T C. Mapping of quantitative trait loci controlling resistance of *Brassica oleracea* to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* [J]. *Phytopathology*, 1995, 85(10): 1296—1300.
- [20] 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 [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 75—82.
- [21] Benoit S, Landry, Stexen E, et al. A genetic map for *Brassica oleracea* based on RFLP markers detected with expressed DNA sequences and mapping of resistance genes to race 2 of *Plasmodiophora brassicae* (woronin) [J]. *Genome*, 1992, 35: 380—384.
- [22] Kennard W C, Slocum M K, Figdore, et al. Genetic analysis of morphological variation in *Brassica oleracea* using molecular markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 721—732.
- [23] 王晓武. 甘蓝显性雄性不育基因的分子标记及延长随机引物扩增 DNA 标记的建立 [D]. 北京: 中国农科院蔬菜花卉所资料室, 1998. 23—25.
- [24] Bohuon E J R, Ramsay L D, Craft J A, et al. The association of flowering time QTL with duplicated regions and candidate loci in *Brassica oleracea* [J]. *Genetics*, 1998, 150(1): 393—401.

Studies on molecular markers of *Brassica* crops

CHEN Shu-xia¹, WANG Xiao-wu², CHENG Zhi-hui¹, FANG Yu-lin¹

(1 Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Institute of Vegetable Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100086, China)

Abstract: Advances in studies of molecular markers of *Brassica* crops were summarized from the following aspects: the state of molecular mapping, the study of comparative mapping and the molecular marker of important traits. Suggestions on the forthcoming studies were also made in the present paper.

Key words: *Brassica* crops; molecular marker; molecular linkage map; Gene mapping