



主要大白菜品种及种质资源在 *eIF(iso)4E.a* 和 *eIF(iso)4E.c* 位点的基因型精准鉴定

刘栓桃¹ 张志刚¹ 王立华¹ 王荣花¹ 李巧云¹ 陈伟¹ 赵智中^{1*} 张全芳² 梁水美² 王淑芬¹

¹ 山东省农业科学院 蔬菜花卉研究所/山东省设施蔬菜生物学重点实验室/国家蔬菜改良中心山东分中心, 济南 250100; ² 山东省农业科学院 生物技术研究中心, 济南 250100

* 通讯作者, zhaozhizhong454@163.com

摘要 由芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)引起的病毒病是大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)主要病害之一。大白菜中野生型 *eIF(iso)4E.a* (A)和 *eIF(iso)4E.c* (C)共同介导病毒的早期侵染, 单个或两个基因发生功能缺失突变将使病毒难以侵染植株, 大白菜表现为抗病毒表型。前人已筛选出 *eIF(iso)4E.a* 的可变剪切突变(a^1)和假基因突变(a^2)、*eIF(iso)4E.c* 的移码突变(c^1)和转座子插入突变(c^2)。本研究对3种 *eIF(iso)4E.a* 等位基因序列进行了重新分析和评估, 优化了检测标记, 结合本课题组已经获得的鉴定 *eIF(iso)4E.c* 等位突变的标记, 对中国市场销售的38个大白菜品种和本课题组创制的96份叠抱类大白菜种质资源进行了筛查。结果表明, A、 a^1 和 a^2 基因型在市售大白菜杂交种和叠抱类种质资源中的检出频率分别是36.8%、40.8%、22.4%和26.1%、28.1%、45.8%。 a^1 和 a^2 两种突变等位基因的检出频率总体达71.3%。相比之下, 在 *eIF(iso)4E.c* 位点, 供试的134份材料中仅有1份种质是 c^1c^1 基因型、13份种质是 c^2c^2 基因型, 两种突变等位基因所占的比例仅为10.4%。本研究结果为利用抗病毒功能基因进行种质鉴定和新品种培育提供了可选的标记, 对已有品种的推广提供了抗病毒分子证据。

关键词 大白菜, 主栽品种, 种质资源, *eIF(iso)4E.a* 和 *eIF(iso)4E.c* 位点, 等位变异

中图分类号 S643.1 **文献标识码** A

Precise Genotyping of *eIF(iso)4E.a* and *eIF(iso)4E.c* in Main Chinese Cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) Cultivars and Germplasms

LIU Shuan-Tao¹ ZHANG Zhi-Gang¹ WANG Li-Hua¹ WANG Rong-Hua¹ LI Qiao-Yun¹ CHEN Wei¹
ZHAO Zhi-Zhong^{1*} ZHANG Quan-Fang² LIANG Shui-Mei² WANG Shu-Fen¹

¹ Vegetable and Flower Institute of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Shandong Branch of National Center for Vegetables Improvement, Shandong Key Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetables, Ji'nan 250100, China; ² Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100, China

* Corresponding author, zhaozhizhong454@163.com

Abstract Virus disease caused by *Turnip mosaic virus* (TuMV) is one of the most serious problems during Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) cultivation. Initial infection of TuMV in Chinese cabbage has been demonstrated to be related to wild type *BraA.eIF(iso)4E.a* (A) and *BraA.eIF(iso)4E.c* (C). Loss-of-function mutation in one or two genes hinders TuMV infection and results in virus-resistant phenotype in Chinese cabbage. Two kind of allelic variations, miss splicing mutation (a^1) and pseudogene mutation (a^2) in *eIF*

基金项目: 山东省自然科学基金(No. ZR2015YL073)、山东省重点研发计划(No. GG201703090051)和山东省农业科学院创新工程(No. CXGC2016A11)

收稿日期: 2017-11-30 接受日期: 2018-01-05

(*iso*)4E.a, frame-shift mutation (c^1) and transposon-insertion mutation (c^2). in *eIF(iso)4E.c*, has been identified respectively from Chinese cabbage. In this study, the differences among three kinds of *eIF(iso)4E.a* genotype were compared again. Simple and convenient markers were developed. The precise genotyping of *eIF(iso)4E.a* and *eIF(iso)4E.c* was detected among 38 hybrids bought from seed market and 96 germplasms created by our breeding team. The results showed that the allele frequencies for *A*, a^1 and a^2 were 36.8%, 40.8%, 22.4% among hybrids and 26.1%, 28.1%, 45.8% among germplasms respectively. Total genotype frequency for two mutant alleles of a^1 and a^2 was 70.1%. Comparatively, only one germplasm carried c^1c^1 genotype and 13 germplasms carried c^2c^2 genotype. The total genotype frequency for c^1 and c^2 was only 10.4%. The results provide molecular markers for utilizing the genes in germplasms detection and new varieties breeding. They also provide molecular evidence for continuing expanding of those virus-resistance hybrids.

Keywords Chines cabbage, Main hybrids, Germplasms, *eIF(iso)4E.a* and *eIF(iso)4E.c*, Allele variations

大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)是十字花科重要的蔬菜作物,原产于中国,是我国乃至东亚最主要的蔬菜作物之一。病毒病、霜霉病和软腐病等是大白菜生产中主要的影响因素,培育抗病毒大白菜新品种是应对病毒病危害的首选途径(Suh et al., 1995; Walsh, Jenner, 2002; 王雪等, 2005)。我国大白菜病毒病的病原主要包括芜菁花叶病毒(*Turnip mosaic virus*, TuMV)、黄瓜花叶病毒(*Cucumber mosaic virus*, CMV)和少数其他病毒(苗立强等, 2008),其中危害最严重的是TuMV。TuMV属于马铃薯Y病毒属(*Potyvirus*) (赵建平等, 2004),是正链RNA病毒,其基因组具有与真核生物mRNA类似的结构。研究表明,真核生物翻译起始因子4E(eukaryotic translation initiation factor 4E, eIF4E)及其异构体参与这类病毒与植物的互作,从而影响病毒在寄主体内的复制和系统侵染。利用酵母双杂交系统和体外实验证明,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) eIF4E和eIF(iso)4E可以同TuMV的VPg蛋白(viral genome-linked protein)相互作用(Wittmann et al., 1997; Léonard et al., 2000),而烟草(*Nicotiana tabacum*)eIF4E则可以与烟草蚀刻病毒(*Tobacco etch virus*, TEV)的NIa蛋白(nuclear inclusion-a protein)相互作用(Schaad et al., 2000)。这种相互作用的关键氨基酸与真核生物自身mRNA翻译所需的关键氨基酸位点不同,所以eIF4E及eIF(iso)4E的一些氨基酸突变不影响植物自身的生长发育却导致病毒与寄主不能发生互作,从而使寄主表现出抵抗病毒侵染的特性。在生菜(*Lactuca sativa*)、辣椒(*Capsicum annuum*)、甜瓜(*Cucumis melo*)等重要蔬菜作物中已经发现了不少这样的突变体资源(Nicaise et al., 2003; Ruffel et al., 2002; Nieto et al., 2006),这些

资源作为重要的抗病毒抗源材料,至今在生产上发挥着不可替代的作用。

研究表明,大白菜中与病毒侵染直接相关的基因是*eIF(iso)4E*(Jenner et al., 2010; Qian et al., 2013; Nellist et al., 2014; 李国亮, 2016),最初是从一种对病毒非常敏感的大白菜近缘亚种R-o-18 (yellow sarson, *Brassica rapa* ssp. *trilocularis*)中分离出来的,有3个拷贝,分别命名为*BraAeIF(iso)4E.a*、*b*和*c* (Jenner et al., 2010),其中与TuMV侵染直接相关的是*eIF(iso)4E.a*和*eIF(iso)4E.c*(Nellist et al., 2014; 李国亮, 2016)。目前筛选出*eIF(iso)4E.a*和*eIF(iso)4E.c*突变的等位基因型各两个(Qian et al., 2013; Nellist et al., 2014; Liu et al., 2017a 和 2017b),*eIF(iso)4E.a*位点突变的有可变剪切突变型*eIF(iso)4E.a¹* (Qian et al., 2013; Nellist et al., 2014)和假基因突变型*eIF(iso)4E.a²* (Kim et al., 2013; Liu et al., 2017a),*eIF(iso)4E.c*位点的突变是编码区碱基缺失导致的移码突变类型*eIF(iso)4E.c¹* (Liu et al., 2017a)和转座子插入突变型*eIF(iso)4E.c²*(Liu et al., 2017b)。Liu等(2017a; 2017b)开发了鉴别*eIF(iso)4E.a²*、*eIF(iso)4E.c¹*和*eIF(iso)4E.c²*的功能标记,李国亮等(2016)开发了鉴定*eIF(iso)4E.a¹*的竞争性等位基因特异性PCR(kompetitive allele specific PCR, KASP)标记。本研究在优化标记检测体系的基础上,对中国市场销售的正规大白菜品种以及本课题组创制的大白菜种质资源在*eIF(iso)4E.a*和*eIF(iso)4E.c*两个位点的基因型进行了筛查,旨在掌握我国大白菜主推品种以及本课题组大白菜资源在上述两个位点的基因型状况和突变体资源的利用情况,以期为主推品种的抗病毒特性,以及合理选择具有突变位点的种质材料培育抗病毒大白菜新品种提供分子证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

供试大白菜(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*)分两部分,一部分是中国市场认可度较高并广泛销售的F₁品种,另一部分为本课题组近十年创制的叠抱类大白菜种质资源。F₁品种都是经国家或地方正式审定,或从日、韩等国家进口的大白菜品种,种子从市场购得,有直筒、叠抱、合抱3种类型。品种名称、育成(或经销)单位及主要特征见表1。大白菜种质资源为山东省农业科学院蔬菜花卉研究所大白菜课题组自行创制的育种材料,都是6~10代的自交系,共计96份,详见表2。

1.2 基因组DNA提取

DNA提取参照刘栓桃等(2014b)的方法,取大白菜幼嫩的叶片约2 cm²、置于2 mL离心管中,加入800 μL预冷的提取液(100 mmol/L Tris, 1 mol/L KCl, 10 mmol/L 乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA), pH 8.0),再放2~3粒研磨珠,于自动研磨仪(Precellys 24, 法国)上研磨,然后65 °C温浴30~60 min。温浴结束后冷却至室温,10 000 r/min离心5 min,取上清加入等体积氯仿混匀,12 000 r/min离心10 min;再次取上清加入等体积异丙醇使DNA沉淀,12 000 r/min离心10 min,沉淀用75%乙醇洗涤,室温干燥5~10 min后用TE缓冲液于4 °C冰箱溶解过夜,-20 °C保存备用。

1.3 *eIF(iso)4E.a*及*eIF(iso)4E.c*各位点的鉴定

本研究对野生型*eIF(iso)4E.a*(A)与两个突变体*eIF(iso)4E.a*¹(a¹)和*eIF(iso)4E.a*²(a²)序列(Qian et al., 2013; 刘栓桃等, 2014a)重新进行分析,进一步优化了检测体系,在基因上游的第一外显子和内含子之间设计了两对引物:

PaF1: 5'-CCCTTCGCAAAGCCTATACCT-3',

PaR1: 5'-TTCAGCATTCGGCGwCAGTT-3';

PaF2: 5'-GAGTGCGATGGCGACAGAGGAT-3',

PaR2: 5'-TCCACTTTCGCCATTAGCACAC-3'。

首先用PaF1/PaR1扩增并检测,3种基因型预测的检测产物分别是A157、a¹158和a²167。由于A/a¹仅仅相差1个碱基,二者在6%非变性聚丙烯酰胺凝胶上难以区分。对于含有A/a¹扩增条带的模板

再用PaF2/PaR2进行高保真酶扩增和PCR产物直接测序。

*eIF(iso)4E.c*各位点的鉴别则参照Liu等(2017a; 2017b)的方法,即*eIF(iso)4E.c*¹位点鉴别采用巢式PCR扩增法(Liu et al., 2017a),*c*²的鉴别采用La Taq介导的PCR扩增结合琼脂糖凝胶法(Liu et al., 2017b)。

本研究普通PCR扩增采用含染料的2×Taq PCR Mastermix(天根,北京,货号:KT201-01)进行,在20 μL反应体系中包含2×Taq PCR Mastermix 10 μL,10 μmol/L的正、反向引物各1 μL,50 μg/L的DNA模板1 μL,灭菌水7 μL。PCR反应条件为:94 °C预变性5 min、94 °C变性30 s、59 °C退火30 s、72 °C延伸10 s(小于200 bp的产物)或5 min(大于3 kb的产物),循环35次。高保真酶扩增采用全式金(北京)的TransStart FastPfu DNA Polymerase(AP221-01)并按说明书操作,扩增条件:95 °C、3 min,95 °C、30 s,57.5 °C、20 s,72 °C、30 s,35个循环,72 °C后延伸5 min。PCR扩增在BioRad T 100梯度PCR仪上进行,小于200 bp的扩增产物用6%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、银染检测,数码相机拍照;大于300 bp的扩增产物用1%的琼脂糖凝胶电泳、EB染色、自动凝胶成像系统捕捉图像。需要测序的PCR产物在华大基因有限公司进行。根据扩增结果的条带大小或测序结果,统计各模板对应等位基因的基因型。某种基因型的频率=某种基因型在供试材料中出现的次数/所有检测材料的基因型数量总和×100%。

2 结果与分析

2.1 *eIF(iso)4E.a*位点的基因型状况

大白菜*eIF(iso)4E.a*的3种等位基因的序列在3'端的序列差异如图1所示,可变剪切突变a¹,与野生型A相比在第一外显子和第一内含子之间仅有一个碱基的插入/缺失差异;假基因突变体a²与野生型A和突变体a¹相比,在第一内含子中有10 bp的插入。PaF1/PaR1对部分品种和部分种质资源的鉴定结果如图2所示,其中含有大片段的模板可以确定为a²a²,含有小片段的模板可能是纯合AA或a¹a¹也可能是杂合型Aa¹,关于这3种基因型的测序结果如图3所示。采用上述手段对38个品种以及

表 1 供试品种信息

Table 1 Detailed information about test hybrids

序号 No.	名称 Name	抱合类型 Heading type	育成或销售单位 Institute/Company which produced the hybrid
1	北京新三号 BeiJing New No.3	合抱 Inward-curling type with-out overlap	北京京研益农种业科技有限公司 JingyanYinong (Beijing) Seed Sci-Tech Co., Ltd.
2	山东六号 ShanDong No.6	叠抱 Overlapping type	山东省农业科学院蔬菜花卉研究所(VFI-SAAS) Vegetable and Flower Institute of Shandong Academy of Agricultural Sciences
3	山东七号 ShanDong No.7	叠抱 Overlapping type	山东省鲁蔬种业有限责任公司 Shandong LuShu Seed Co., Ltd.
4	牛牌 19 NiuBrand No.19	叠抱 Overlapping type	VFI-SAAS
5	牛早秋 1 号 NiuZaoQiu No.1	叠抱 Overlapping type	VFI-SAAS
6	攻关二号 GongGuan No.2	叠抱 Overlapping type	VFI-SAAS
7	高抗二号 GaoKang No.2	叠抱 Overlapping type	VFI-SAAS
8	鲁白一号 LuBai No.1	叠抱 Overlapping type	VFI-SAAS
9	鲁白六号 LuBai No.6	叠抱 Overlapping type	VFI-SAAS
10	春秋王 ChunQiuWang	合抱 Inward-curling type with-out overlap	山东省微山县华兴种苗研究所 HuaXing Seed Institute Weishan county Shandong province
11	改良青杂三号 Improved QingZa No.3	叠抱 Overlapping type	青岛国际种苗有限公司 Qingdao International Seed Co., Ltd.
12	丰抗 60 FengKang 60	叠抱 Overlapping type	山东登海种业股份有限公司西由种子分公司(SD-DHS-XY) Shandong Denghai Seeds Co., Ltd. XiYou Seed Branch Company
13	丰抗 70 FengKang 70	叠抱 Overlapping type	SDDHS-XY
14	丰抗 78 FengKang 78	叠抱 Overlapping type	SDDHS-XY
15	天津青麻叶 TianJinQingMaYe	直筒 Cylinder Type	天津神农种业有限公司(SNS-TJ) Tianjin Shennong Seed Co., Ltd.
16	津育 75F1 JinYu 75F1	直筒 Cylinder Type	SNS-TJ
17	津育 60F1 JinYu 60F1	直筒 Cylinder Type	SNS-TJ
18	天白 75 TianBai 75	直筒 Cylinder Type	天津科润农业科技股份有限公司 Tianjin Kerun Agriculture Sci-Tech Co., Ltd.
19	中白 76 ZhongBai 76	直筒 Cylinder Type	VFI-SAAS
20	中白 62 ZhongBai 62	直筒 Cylinder Type	VFI-SAAS
21	改良太原二青 Improved TaiYuanErQing	直筒 Cylinder Type	山西省农业科学院园艺研究所(GRI-SAAS) Gardening Research Institute of Shanxi Academy of Agriculture Sciences
22	晋菜三号 JinCai No.3	直筒 Cylinder Type	GRI-SAAS
23	太原二青 TaiYuanErQing	直筒 Cylinder Type	GRI-SAAS
24	优选小杂 56 YouXuanXiaoZa 56	直筒 Cylinder Type	郑州郑研种苗科技有限公司 Zhengzhou Zhengyan Seed Technology Co., Ltd.
25	小义和秋 XiaoYiHeQiu	合抱 Inward-curling type with-out overlap	青岛和丰种业有限公司 Qingdao Hefeng Seed Co., Ltd.
26	精品贵龙五号 JingPingGuiLong No.5	叠抱 Overlapping type	青岛贵龙种苗有限公司 Qingdao Guilong Seed Co., Ltd.

27 强势 QiangShi	合抱 Inward-curling type with-out overlap	韩国汉城种苗公司 Seoul (Korea) Seed Co., Ltd.
28 韩春 HanChun	合抱 Inward-curling type with-out overlap	原产地韩国/沈阳新东方种业有限公司销售 Produced in Korea/Sold by Shenyang New East Seed Co., Ltd.
29 秋黄 70 QiuHuang 70	合抱 Inward-curling type with-out overlap	韩国 BIOTONG 种苗株式会社 BIOTONG (Korea) Seed Co., Ltd.
30 黄芯早 45 HuangXinZao 45	合抱 Inward-curling type with-out overlap	原产地韩国/广东省良种引进服务公司 Produced in Korea/Sold by Guangdong Provincial Improved Variety Introduce Service Co.
31 春月黄 娃娃菜 ChunYueHuang miniChinse Cabbage	合抱 Inward-curling type with-out overlap	东部韩农种苗科技(北京)有限公司 Dongbu Hannong (Beijing) seed Co., Ltd.
32 菊锦 JuJin	合抱 Inward-curling type with-out overlap	日本东北种苗株式会社生产/福建农播王种苗有限公司销售 Produced in Japanese Tohoku Seed Co., Ltd./Sold by Fujian Nobowang Co., Ltd.
33 金锦 JinJin	合抱 Inward-curling type with-out overlap	日本东北种苗株式会社生产/福建农播王种苗有限公司销售 Produced in Japanese Tohoku Seed Co., Ltd./ Sold by Fujian Nobowang Co., Ltd.
34 特选日本绍菜 Carefully Selected Japanese ShaoCai	直筒 Cylinder Type	原产地日本/广东省良种引进服务公司 Produced in Japanese and Sold by Guangdong Provincial Improved Variety Introduce Service Co.
35 秦白二号 QinBai No.2	叠抱 Overlapping type	杨凌农业高科技发展股份有限公司 Yangling Agriculture High-Tech Developing Co., Ltd.
36 德高 16 DeGao No.16	叠抱 Overlapping type	山东德州市德高蔬菜种苗研究所 Shandong Degao Vegetable Seed Institute
37 德高 CR117 DeGao CR117	合抱 Inward-curling type with-out overlap	山东德州市德高蔬菜种苗研究所 Shandong Degao Vegetable Seed Institute
38 早熟 5号 ZaoShu No.5	叠抱 Overlapping type	浙江省农业科学院 Zhejiang Academy of Agriculture Sciences

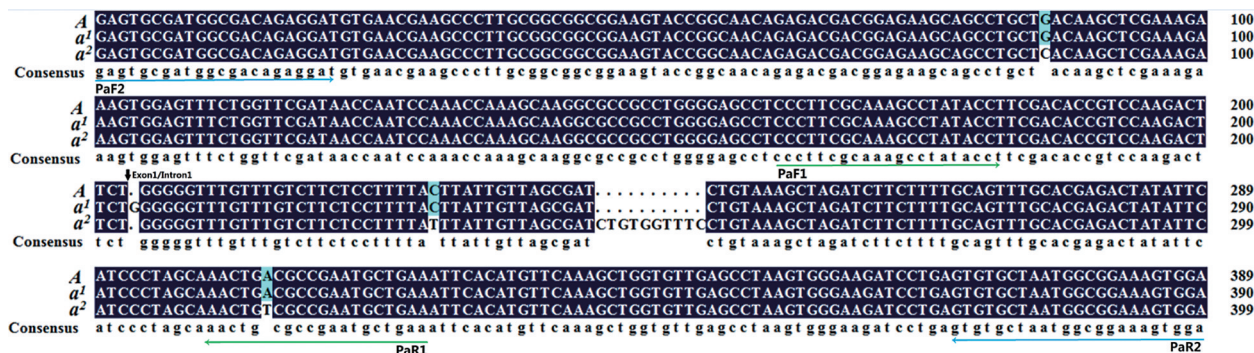


图 1 *eIF(iso)4E.a* 三种等位基因的序列在 3'-端的序列比对

Figure 1 The alignment result at 3'-terminus of three kind of *eIF(iso)4E.a* allele

A: 野生型; *a*¹: 可变剪切突变类型; *a*²: 假基因突变类型; 有下划线的区域表示引物所在位置, 引物的名称在下划线下方; 箭头所指的位置是第一外显子/第一内含子交界处; 黑色阴影表示 3 种基因型序列完全相同, 蓝色阴影表示两种基因型之间序列相同
A: Wild type; *a*¹: Splicing mutation; *a*²: Pseudogene mutation; Regions with underlings mean the sites of primers designed, and the names of primers given below the underlings; The arrows point the junction site of exon 1/intron 1; The black shadow regions mean complete identity among three kind of allele sequences, and the blue ones mean sequence identity existed in two of the alleles

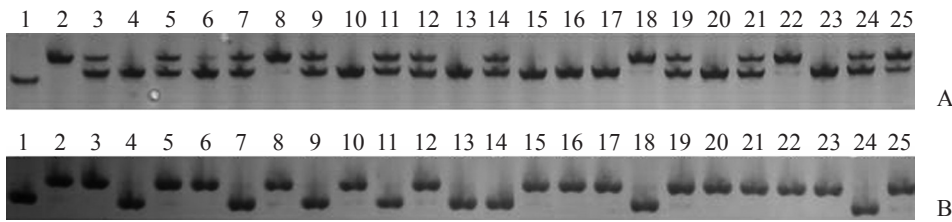


图2 引物组合 PaF1/PaR1 在部分大白菜品种及资源中的鉴定结果

Figure 2 Genotyping results in partial hybrids and germplasms by primer pair PaF1/PaR1

A. 部分品种的鉴定结果。B. 部分资源的鉴定结果。A、B中泳道1和2分别代表标准的野生型AA和突变体， a^2a^2 为对照，泳道3~25分别是不同品种(A: 依次对应表1中的29, 32, 36, 23, 25, 6, 26, 31, 14, 33, 10, 1, 30, 21, 19, 24, 4, 34, 37, 8, 22, 7, 2)和资源(B: 依次对应表2中的序号3~25)

A. Results of partial hybrids. B. Results of partial germplasms. Lane 1 and 2 both in A and B referred to wild type AA and mutant a^2a^2 control, lane 3~25 refers to the No. of different hybrids (A: The details reference to 29, 32, 36, 23, 25, 6, 26, 31, 14, 33, 10, 1, 30, 21, 19, 24, 4, 34, 37, 8, 22, 7, 2 in Table 1) and germplasms (B: The details reference to 3~25 in Table 2)

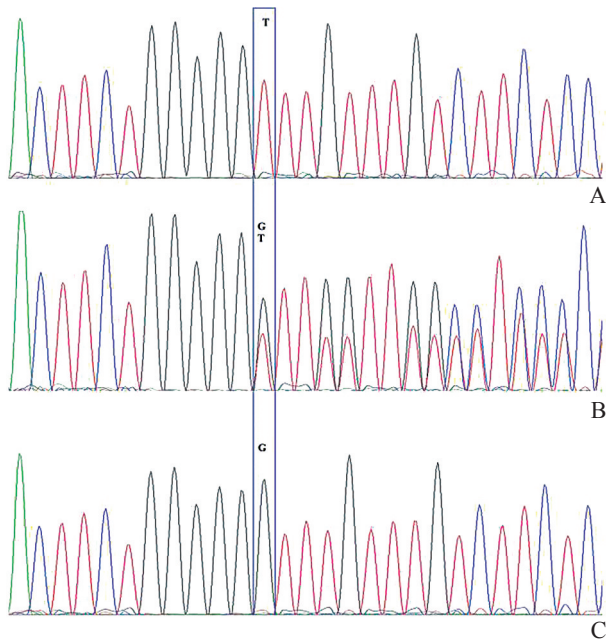


图3 AA、 Aa^1 和 a^1a^1 基因型测序峰图

Figure 3 Sequencing peak figure of AA, Aa^1 and a^1a^1

A. AA 基因型。B. Aa^1 基因型。C. a^1a^1 基因型

A. AA genotype. B. Aa^1 genotype. C. a^1a^1 genotype

96份核心资源在 *eIF(iso)4E.a* 位点的鉴定结果如表2和表3所示。从表中数据可知，杂交种中A、 a^1 和 a^2 基因型的频率分别是36.8%、40.8%和22.4%，在种质资源中3种基因型的频率则分别是26.1%、28.1%和45.8%。 a^1 和 a^2 突变位点在杂交种中的频率为63.2%、在种质资源中的频率为73.9%，在供试材料中的总频率为71.3%。另外，种质资源中有4份在该位点仍是杂合型，分别是第39和55号为 Aa^2 ，第41和42号为 a^1a^2 ，这4份资源需要继续自交纯化，其余均为纯合型。

2.2 *eIF(iso)4E.c* 位点的基因型精准鉴定

对杂交种的巢式PCR及LA Taq扩增结果表明，所有38个品种在 *eIF(iso)4E.c* 位点均为野生型。种质资源的巢式PCR检测结果仅发现一份材料在 *eIF(iso)4E.c* 位点是碱基缺失突变体(图4)，该材料编号为2015-359-1，是He102的转育后代。另有13份核心资源的巢式PCR扩增没有任何条带，这些材料经LA Taq扩增后，都得到了5 kb左右的条带(图5)，表明这些材料在 *eIF(iso)4E.c* 位点发生了转座子插入突变，其基因型属于 *eIF(iso)4E.c^2*，该基因型在种质资源中的出现频率为13.5%。在这13份 *eIF(iso)4E.c^2* 纯合基因型中，有9份(3, 6, 10, 35, 37, 48, 49, 51, 86)转育自826，另有2份(25, 26)是DaQinBai(Liu et al., 2017b)的转育后代，其余2份(21和32)是新鉴别出的材料。 c^1 和 c^2 突变基因型的总体检出频率仅为10.4%。

3 讨论

本研究基于大白菜中已经明确抗病毒功能的 *eIF(iso)4E.a* 和 *eIF(iso)4E.c* 基因内部序列多态性而开发了区分不同等位基因类型的分子标记，属于典型的功能性分子标记。采用功能性分子标记对供试材料的鉴定更为精准，可以明确供试品种或种质材料在检测位点的等位基因状态，进而根据等位基因的功能掌握种质材料的抗病毒表型，为种质材料的进一步利用和品种的推广提供抗病毒分子证据，相关研究在大白菜中比较少见。本研究在对 *eIF(iso)4E.a* 的3种等位变异(图1)进行精准鉴定时，采

表2 供试叠抱类大白菜种质资源

Table 2 Information of Tested Germplasm

序号	种质编号	序号	种质编号	序号	种质编号	序号	种质编号
Order No.	Germ No.	Order No.	Germ No.	Order No.	Germ No.	Order No.	Germ No.
1	2017-YM4	25	2012-YZ6	49	2015-ZC52-1	73	2013-278-3
2	2017-YM5	26	2015-361-1	50	2016-72-1	74	2017-YM56
3	2017-YM6	27	2015-378-2	51	2016-126-1	75	2017-YM57
4	2017-YM7	28	2015-354-1	52	2016-153-1	76	2017-YM59
5	2017-YM8	29	2015-355-1	53	2016-165-2	77	2016-XC22-2
6	2015-YZ6	30	2015-389-2	54	2016-256-2	78	2016-XC22-3
7	2017-YM63	31	2016-291-2	55	2016-261-1	79	2016-XC23-1
8	2017-YM64	32	B76-294	56	2016-331-2	80	2016-XC26-1
9	2017-M4	33	07-273-1	57	2016-DB1-11	81	2016-XC26-2
10	2017-F4	34	07-274-1	58	2016-DB14-3	82	2016-129-2
11	2017-M1	35	2013-38-1	59	BCZY4	83	2016-133-3
12	2017-F1	36	2016-ZC16-1	60	09-552-3	84	2016-138-1
13	2017-YZ8	37	2016-ZC30-1	61	07-48	85	2016-139-1
14	2017-YZ9	38	2017-YM58	62	BCZY3	86	2016-142-1
15	2012-YZ1	39	2016-XC29-1	63	2016-156-1	87	2016-150-2
16	2012-YZ2	40	09-574-1	64	2017-YM15	88	2016-161-2
17	2017-YM61	41	2016-XC32-1	65	2016-332-2	89	2016-171-3
18	2015-369-3	42	2016-XC32-2	66	2016-315-2	90	2016-175-2
19	2015-363-1	43	2012-DB6-2-2-1	67	2015-189-1	91	2016-185-3
20	2017-M2	44	2013-381-2	68	2015-378-1	92	2016-186-2
21	2017-DB1	45	2013-382-1	69	2015-395-1	93	2016-189-1
22	Zao 219	46	2014-DB5-31-1	70	2015-38	94	2011-ZC39-4
23	2015-359-1	47	2015-ZC59-2	71	2012-178-2	95	2014-249-1
24	2017-YM20	48	2013-36-1	72	2013-276-2	96	2014-251-1

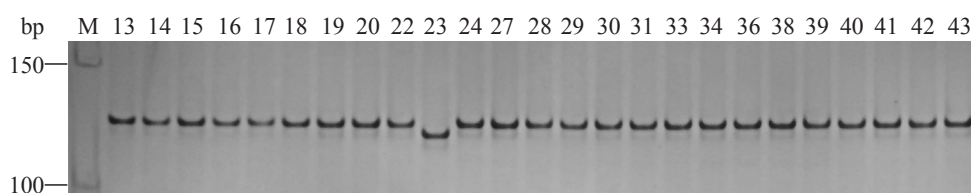


图4 部分资源在*eIF(iso)4E.c*位点的巢式PCR扩增结果

Figure 4 Results detected by Nest PCR in some germplasm

图中数字为种质资源的序号(资源信息详见表2); M: DNA分子量标准 50 bp ladder

Numbers in figure means the order No. of germplasm (the details reference to Table 2); M: 50 bp DNA ladder

用了两对引物相结合的方法分别进行PCR扩增,即首先用PaF1/PaR1准确地将 a^2a^2 筛选出来(图2),然后再用PaF2/PaR2鉴定剩余材料的基因型(图3),用该方法对未知大白菜品种或种质*eIF(iso)4E.a*的基因型可以实现精准鉴定。李国亮(2016)成功地将可变剪切突变转化成了KASP标记,但采用该KASP标记技术只能将含有 a^1 基因型的材料识别

出来,并不能区分未知材料中的AA、 Aa^2 或 a^2a^2 ,因为上述3种基因型在检测位点完全相同,由此可见该KASP标记仅适合已知AA或 a^2a^2 与 a^1a^1 为双亲而衍生的群体后代的鉴定。由此可见,要准确鉴定未知供试材料中复杂的等位变异类型,有必要采用多种检测手段相结合的策略。本研究对*eIF(iso)4E.c*的鉴定也采用了多次PCR扩增的方法,同样支持

表3 主栽大白菜品种在 *eIF(iso)4E.a* 位点的基因型
 Table 3 Genotyping results on allele of *eIF(iso)4E.a* in hybrids

品种名称 Hybrid name	基因型 Genotyping	品种名称 Hybrid name	基因型 Genotyping	品种名称 Hybrid name	基因型 Genotyping
北京新三号 BeiJing New No.3	a^1a^2	丰抗 78 FengKang 78	a^1a^2	强势 QiangShi	AA
山东六号 ShanDong No.6	a^1a^2	天津青麻叶 TianJinQingMaYe	Aa^1	韩春 HanChun	AA
山东七号 ShanDong No.7	a^1a^2	津育 75F1 JinYu 75F1	a^1a^1	秋黄 70 QiuHuang 70	Aa^2
牛牌 19 NiuBrand No.19	Aa^2	津育 60F1 JinYu 60F1	a^1a^1	黄芯早 45 HuangXinZao 45	AA
牛早秋 1 号 NiuZaoQiu No.1	a^2a^2	天白 75 TianBai 75	a^2a^2	春月黄 娃娃菜 ChunYueHuang mini Chinse Cabbage	AA
攻关二号 GongGuan No.2	a^2a^2	中白 76 ZhongBai 76	a^1a^1	菊锦 JuJin	AA
高抗二号 GaoKang No.2	a^1a^2	中白 62 ZhongBai 62	a^1a^1	金锦 JinJin	Aa^2
鲁白一号 LuBai No.1	a^2a^2	改良太原二青 Improved TaiYuanErQing	Aa^1	特选日本绍菜 Carefully Selected Japanese ShaoCai	AA
鲁白六号 LuBai No.6	Aa^2	晋菜三号 JinCai No.3	Aa^1	秦白二号 QinBai No.2	Aa^2
春秋王 ChunQiuWang	Aa^1	太原二青 TaiYuanErQing	AA	德高 16 DeGao No.16	Aa^2
改良青杂三号 Improved QingZa No.3	Aa^2	优选小杂 56 YouXuanXiaoZa 56	a^2a^2	德高 CR117 DeGao CR117	Aa^2
丰抗 60 FengKang 60	a^2a^2	小义和秋 XiaoYiHeQiu	Aa^2	早熟 5 号 ZaoShu No.5	a^2a^2
丰抗 70 FengKang 70	a^2a^2	精品贵龙五号 JingPingGuiLong No.5	Aa^2		

A: 野生型; a^1 : 可变剪切突变类型; a^2 : 假基因突变类型
 A: Wild type; a^1 : Splicing mutation; a^2 : Pseudogene mutation

上述观点。

BraAeIF(iso)4E.a 和 *BraAeIF(iso)4E.c* 的功能缺失突变可以使大白菜具有抗病毒特性, 本研究鉴定结果表明, 在大白菜主栽品种中, *eIF(iso)4E.a* 位点中与抗病毒相关的突变基因型(*eIF(iso)4E.a*¹ 和 *eIF(iso)4E.a*²) 出现的频率大约占 2/3(40.8%+22.4%), 其中有 17 个品种的双亲同时具备突变基因型(基因型为 a^1a^1 , a^1a^2 或 a^2a^2), 有 14 个品种的双亲之一是突变型(即基因型为 Aa^1 或 Aa^2), 上述 31 个品种中有 30 个品种是中国各育种单位选育的品种, 占供试中国品种的 97%(表 1 和表 3)。由此可见中国的育种材料中, 大部分材料携带 *eIF(iso)4E.a*¹ 或 *eIF(iso)4E.a*² 位

点。另外, 有 7 个品种的双亲均为野生型, 其中 6 个是日韩品种, 分别为强势、韩春、春月黄娃娃菜、菊锦、黄芯早 45 和日本绍菜(表 1 和表 3), 据多年生产实践调研结果显示, 日韩品种大多不抗病毒病, 本研究结果对这一实践观察提供了有力的分子证据。由于日韩品种主要作为春白菜栽培, 而春季蚜虫等传播病毒的媒介较少, 导致病毒病发病相对较轻, 故此日韩品种能够占据我国白菜生产的一席之地。值得关注的是金锦(Aa^2)与太原二青(AA), 前者是日本选育的品种, 比菊锦晚几年被引进中国市场, 从检测结果可以发现其亲本中已经有 a^2 突变型, 可见日本大白菜育种在抗病毒育种方面在改

表 4 核心资源 *eIF(iso)4E.a* 位点的基因型

Table 4 Genotyping results on allele of *eIF(iso)4E.a* in germplasms

序号	基因型	序号	基因型	序号	基因型	序号	基因型
Order No.	Genotyping	Order No.	Genotyping	Order No.	Genotyping	Order No.	Genotyping
1	AA	25	a^2a^2	49	a^2a^2	73	a^2a^2
2	a^2a^2	26	a^2a^2	50	a^2a^2	74	AA
3	a^2a^2	27	a^1a^1	51	a^2a^2	75	AA
4	AA	28	a^2a^2	52	a^1a^1	76	AA
5	a^2a^2	29	a^2a^2	53	a^1a^1	77	AA
6	a^2a^2	30	a^2a^2	54	a^2a^2	78	AA
7	AA	31	a^2a^2	55	Aa^2	79	AA
8	a^2a^2	32	a^1a^1	56	a^2a^2	80	AA
9	a^1a^1	33	AA	57	a^2a^2	81	AA
10	a^2a^2	34	AA	58	a^2a^2	82	AA
11	a^1a^1	35	a^2a^2	59	a^1a^1	83	a^1a^1
12	a^2a^2	36	a^2a^2	60	AA	84	AA
13	a^1a^1	37	a^2a^2	61	a^1a^1	85	a^1a^1
14	a^1a^1	38	a^2a^2	62	a^1a^1	86	a^1a^1
15	a^2a^2	39	Aa^2	63	a^1a^1	87	a^1a^1
16	a^2a^2	40	a^2a^2	64	AA	88	a^1a^1
17	a^2a^2	41	a^1a^2	65	AA	89	a^1a^1
18	a^1a^1	42	a^1a^2	66	AA	90	AA
19	a^2a^2	43	a^2a^2	67	a^1a^1	91	a^1a^1
20	a^2a^2	44	a^2a^2	68	a^1a^1	92	a^1a^1
21	a^2a^2	45	a^2a^2	69	a^1a^1	93	AA
22	a^2a^2	46	a^2a^2	70	AA	94	a^2a^2
23	a^2a^2	47	a^2a^2	71	AA	95	a^1a^1
24	AA	48	a^2a^2	72	a^1a^1	96	a^2a^2

A: 野生型; a^1 : 可变剪切突变类型; a^2 : 假基因突变类型

A: Wild type; a^1 : Splicing mutation; a^2 : Pseudogene mutation

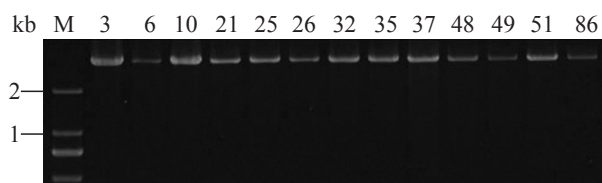


图 5 *eIF(iso)4E.c^2* 位点的 LA Taq 扩增结果

Figure 5 Results detected by LA Taq in some germplasms

图中数字为种质资源序号(种质资源信息详见表 2), M: DNA 分子量标准 DL2000

Numbers in figure mean the order No. of germplasms (the details reference to Table 2)

进。另一个比较典型的品种是作为秋白菜栽培的太原二青(AA), 其双亲均为野生型, 但根据生产实践调研的信息, 该品种抗病毒性状比较好, 推测其

双亲应该携带了其他抗病毒基因, 也说明不同类型的大白菜品种抗病机理存在差异, 这有待进一步验证。本课题组创制的种质材料中, 73.9%携带 a^1 或 a^2 基因型, 虽然本研究没有对供试材料的抗病毒特性进行接种鉴定, 但据田间表型选择观察, 大部分材料具有抗病毒表型。

与 *eIF(iso)4E.a* 突变型被广泛选择形成鲜明对比的是, *eIF(iso)4E.c* 突变型位点出现的总体频率仅为 10.4%, 其中 *eIF(iso)4E.c^1* 的出现频率仅为 0.7% (1/(38+96))。早期研究表明, 位于不同染色体上的 *eIF(iso)4E.a* 和 *eIF(iso)4E.c* 共同参与病毒侵染, 其中 *eIF(iso)4E.a* 的突变具有隐性上位性遗传效应 (Rusholme et al., 2007; Nellist et al., 2014)。另外, 植物病毒可以选择性地利用寄主因子实现其系统

侵染(Duprat et al., 2002), 据李国亮(2016)的研究表明, 不同 TuMV 株系的 Vpg 蛋白与不同拷贝的 *eIF(iso)4E* 蛋白互作, TuMV-C4 Vpg 可以同 *eIF(iso)4E.a* 互作, 但不能同 *eIF(iso)4E.c* 互作; 相反, TuMV CDN1-Vpg 可以同 *eIF(iso)4E.c* 互作, 但不能同 *eIF(iso)4E.a*。这其中既有 *eIF(iso)4E.a* 与 *eIF(iso)4E.c* 的差异, 也有 TuMV C4-Vpg 与 TuMV CDN1-Vpg 的差异, 最终导致不同的病毒倾向于选择不同的寄主因子。由于我国北方大白菜病毒病的病原主要是 TuMV-C4 株系(冯兰香等, 1988), 根据李国亮(2016)的结果, 大白菜对 TuMV-C4 抗性主要受 *eIF(iso)4E.a* 单基因隐性突变控制, 这也可能是导致 *eIF(iso)4E.a*¹、*eIF(iso)4E.a*² 基因型被广泛选择的原因之一。但是, 大白菜抗病毒的分子机制十分复杂, 远非这两个基因所能阐释清楚的。如在本课题组的研究中发现(Li et al., 2015; Liu et al., 2017a), 具有 *a*¹*a*¹*CC* 基因型的大白菜自交系 8407 高抗 TuMV-C4 株系、*a*²*a*²*CC* 基因型自交系冠 291 (Guan 291) 却对 TuMV-C4 十分敏感, 但同样具有 *a*²*a*²*CC* 基因型的 He304、05-46 等多个自交系却表现出高抗 TuMV-C4 (Liu et al., 2017a)。

可见 TuMV 系统侵染大白菜具有复杂的机制, 不排除在这些基因之外还存在其他抗病毒基因与其连锁。只有在全面了解和掌握其分子机制的基础上, 针对不同功能基因的抗病毒等位变异开发相应的分子标记, 才能充分利用分子标记辅助选择手段创制和培育广谱抗病毒大白菜新种质和新品种。

4 结论

本研究对中国市场销售的主要大白菜品种和本课题组创制的优异大白菜种质资源进行了抗病毒功能基因 *eIF(iso)4E.a* 和 *eIF(iso)4E.c* 的精准鉴定, 结果表明: 分别有 97% 和 62% 的中国自主培育的大白菜杂交种和本课题自主创制的叠抱类大白菜种质材料携带抗病毒等位基因 *eIF(iso)4E.a*¹ 或 *eIF(iso)4E.a*²。市售大白菜杂交种在 *eIF(iso)4E.c* 位点均为野生型, 只有本课题组拥有 *eIF(iso)4E.c*¹ 或 *eIF(iso)4E.c*² 突变位点的种质材料, 突变位点频率仅为 10%。作为春白菜栽培的日、韩品种在 *eIF(iso)4E.a* 和 *eIF(iso)4E.c* 位点普遍为野生型。本研究结果为利用抗病毒功能基因进行种质鉴定和新品种培育提供了分子证据和可选的标记。

参考文献

- 冯兰香, 徐玲, 刘佳, 等. 1988. 北京地区大白菜芜菁花叶病毒株系的鉴定[J]. 中国蔬菜, 4: 11-13. (Feng L X, Xu L, Liu J, et al. 1988. Identification on TuMV strains isolated from Beijing area[J]. China Vegetable, 4: 11-13.)
- 李国亮. 2016. 白菜 *eIF(iso)4E* 基因对 TuMV 的抗性机制研究[D]. 博士学位论文, 中国农业科学院, 导师: 孙日飞, pp. 26-32. (Li G L. 2016. Investigation of interaction mechanism of the *eIF(iso)4E* gene to TuMV in *Brassica rapa* L. [D]. Thesis for Ph.D., Chinese Academy of Agricultural Sciences. Supervisor: Sun R F, pp. 26-32.)
- 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 等. 2014a. 大白菜 *eIF(iso)4E.a* 假基因突变体的鉴别及相关检测标记的开发[J]. 中国农学通报, 30(4): 101-107. (Liu S T, Zhang Z G, Li Q Y, et al. 2014a. Characterization of mutation at locus *eIF(iso)4E.a* and development of related markers in Chinese cabbage[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 30(4): 101-107.)
- 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 等. 2014b. 光敏色素 B 基因(*PHYB*) 启动子突变及与大白菜开花时间的关联分析[J]. 农业生物技术学报, 22(7): 853-861. (Liu S T, Zhang Z G, Li Q Y, et al. 2014b. Association analysis between phytochrome B gene (*PHYB*) promoter mutations and flowering time in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp *pekinensis*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 22(7): 853-861.)
- 苗立强, 张耀伟, 崔崇士. 2008. 我国白菜抗病育种研究进展[J]. 东北农业大学学报, 37(4): 529-533. (Miao L Q, Zhang Y W, Cui Z S. 2008. The progress of study on Chinese cabbage breeding for diseases resistance in China[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 37(4): 529-533.)
- 王雪, 刘玉梅, 李汉霞, 等. 2005. 芸薹属作物抗芜菁花叶病毒育种研究进展[J]. 园艺学报, 32(5): 939-946. (Wang X, Liu Y M, Li H X, et al. 2005. Advance in research on TuMV-resistance breeding of *Brassica* crops[J]. Acta Horticulturae Sinica, 32(5): 939-946.)
- 赵建平, 周钊美, 陈集双, 等. 2004. 芜菁花叶病毒(TuMV)特性的研究进展[J]. 微生物学通报, 31(6): 100-104. (Zhao J P, Zhou C M, Chen J S, et al. 2004. Recent advances in Turnip mosaic virus[J]. Microbiology China, 31(6): 100-104.)
- Duprat A, Caranta C, Revers F, et al. 2002. The *Arabidopsis* eukaryotic initiation factor (iso)4E is dispensable for plant growth but required for susceptibility to potyviruses[J]. Plant Journal, 32(6): 927-934.

- Jenner C E, Nellist C F, Barker G C, et al. 2010. Turnip mosaic virus (TuMV) is able to use alleles of both *eIF4E* and *eIF(iso)4E* from multiple loci of the diploid *Brassica rapa*[J]. *Molecular Plant Microbe Interact*, 23(11): 1498-1505.
- Kim J, Kang W, Yang H, et al. 2013. Identification of a broad-spectrum recessive gene in *Brassica rapa* and molecular analysis of the *eIF4E* gene family to develop molecular markers[J]. *Molecular Breeding*, 32(2): 385-398.
- Léonard S, Plante D, Wittmann S, et al. 2000. Complex formation between potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity[J]. *Journal Virology*, 74(17): 7730-7737.
- Li Q Y, Zhang X L, Zeng Q, et al. 2015. Identification and mapping of a novel Turnip mosaic virus resistance gene *TuRBCS01* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.) [J]. *Plant Breeding*, 134(2): 221-225.
- Liu S T, Li Q Y, Zhang Z G, et al., 2017a. Characterization of a double mutation of *eIF(iso)4E.a* and *eIF(iso)4E.c* with a diverse genetic background and TuMV resistance in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.)[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(10): 1575-1587.
- Liu S T, Zhang Z G, Wang L H, et al. 2017b. Characterization of an active hAT superfamily transposon insertion mutation in *eIF(iso)4E.c* of Chinese cabbage[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 25(11): 1791-1798.
- Nellist C F, Qian W, Jenner C E, et al. 2014. Multiple copies of eukaryotic translation initiation factors in *Brassica rapa* facilitate redundancy, enabling diversification through variation in splicing and broad-spectrum virus resistance[J]. *Plant Journal*, 77(2): 261-268.
- Nicaise V, German-Retana S, Sanjuán R, et al. 2003. The eukaryotic translation initiation factor 4E controls lettuce susceptibility to the *Potyvirus lettuce mosaic virus*[J]. *Plant Physiology*, 132(3): 1272-1282.
- Nieto C, Morales M, Orjeda G, et al. 2006. An eIF4E allele confers resistance to an uncapped and non-polyadenylated RNA virus in melon[J]. *Plant Journal*, 48(3): 452-462.
- Qian W, Zhang S, Zhang S, et al. 2013. Mapping and candidate-gene screening of the novel Turnip mosaic virus resistance gene *retr02* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L.)[J]. *Theoretical & Applied Genetics*, 126(1): 179-188.
- Ruffel S, Dussault M H, Palloix A, et al. 2002. A natural recessive resistance gene against potato virus Y in pepper corresponds to the eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) [J]. *Plant Journal*, 32(6): 1067-1075.
- Rusholme R L, Higgins E E, Walsh J A, et al. 2007. Genetic control of broad-spectrum resistance to Turnip mosaic virus in *Brassica rapa*(Chinese cabbage) [J]. *Journal of General Virology*, 88(Pt 11): 3177-3186.
- Schaad M C, Anderberg R J, Carrington J C. 2000. Strain-specific interaction of the Tobacco etch virus Nia protein with the translation initiation factor eIF4E in the yeast two-hybrid system[J]. *Virology*, 273(2): 300-306.
- Suh S K, Green S K, Park H G. 1995. Genetics of resistance to five strains of Turnip mosaic virus in Chinese cabbage [J]. *Euphytica*, 81(1): 71-77.
- Walsh J A, Jenner C E. 2002. Turnip mosaic virus and the quest for durable resistance[J]. *Molecular Plant Pathology*, 3(5): 289-300.
- Wittmann S, Chatel H, Fortin M G, et al. 1997. Interaction of the viral protein genome linked of Turnip mosaic potyvirus with the translational eukaryotic initiation factor (iso) 4E of *Arabidopsis thaliana* using the yeast two-hybrid system[J]. *Virology*, 234(1): 84-92.

(责任编辑 侯小锋)