

甘蓝型油菜硫苷性状的 RAPD 连锁标记研究

宋志荣^{1,2}, 官春云^{1*}

(1.湖南农业大学 油料作物研究所, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省农业技术推广总站, 湖南 长沙 410005)

摘 要: 选择硫苷性状差异大, 而其他品质性状和农艺性状相近的油菜品系 967H 和 967L 为亲本, 用 RAPD 引物对亲本、F₁、F₂ 植株进行分子标记, 寻找与硫苷性状相连锁的标记。结果表明, 从 482 个 RAPD 引物筛选出 6 个在 2 个亲本之间表现多态性的引物, 从这 6 个引物中筛选出 1 个在高硫苷基因池和低硫苷基因池之间有稳定差异的引物 S268, 用 S268 对 F₂ 群体单株进行检验, 群体单株只显示 3 种带型标记, 与低硫苷性状连锁的标记 S268 对低硫苷性状的贡献率为 29.51%。

关 键 词: 甘蓝型油菜; 硫苷性状; RAPD 分子标记

中图分类号: S565.403.53 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0254-04

Interlocking RAPD marks of glucosinolate trait in *Brassica napus*

SONG Zhi-rong^{1,2}, GUAN Chun-yun^{1*}

(1.Oilseed Crops Institute, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Agricultural Technology and Extension Office, Agricultural Department of Hunan, Changsha 410005, China)

Abstract: In order to find interlocking RAPD marks for the glucosinolate trait in *Brassica napus*, 967H and 967L were used as materials, which kept similar characteristics in quality and other agronomic traits except for the glucosinolate trait, to study RAPD marks of the parents and their F₁ and F₂ plants. The results showed that 6 RAPD primers from 482 RAPD primers were detected polymorphism between parents, and one RAPD primer(S268) from the 6 RAPD primers was detected polymorphism between two parents and two DNA bulks. The primer S268 could only display three kinds of different marks. Variant analysis with a single mark indicated that the low glucosinolate traits of 29.51% were contributed by the S268 mark.

Key words: *Brassica napus* L.; glucosinolate trait; RAPD tags

硫苷含量是衡量油菜籽粒品质性状的重要指标。硫苷及其水解产物对增强油菜抗性, 特别是在防御昆虫侵犯和食植昆虫的寄主定位以及细菌和真菌等方面发挥重要作用^[1-5]。不少学者开展了硫苷性状的遗传研究^[6]。由于 RAPD 技术具有效率高、样本量少、特异性强、检测容易、引物通用、不需要设计引物、成本低廉等优点, 目前被广泛应用于油菜育性^[7]、抗病性^[8]、品质性状^[9-10]和植

物学性状^[11]的基因定位和辅助育种^[12]等研究。笔者以硫苷性状差异较大、而其他农艺性状和品质性状相近的 967H、967L 油菜品系及其杂交后代为材料, 对亲本、F₁、F₂ 植株进行 RAPD 分子标记, 寻找与硫苷性状连锁的 RAPD 标记, 分析其对硫苷性状的贡献率, 以期为低硫苷性状基因的进一步定位、克隆奠定基础, 并为合理利用硫苷性状提供参考。

收稿日期: 2009-07-06

基金项目: 国家“948”计划项目(2006-G04)

作者简介: 宋志荣(1974—), 男, 湖南邵东人, 博士, 高级农艺师; *通讯作者, guancy2000@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 材料

供试油菜品系 967H、967L，系从品种湘农油 571 中分离并经过连续 6 代自交后得到，硫苷性状差异较大，主要农艺性状和其他品质性状相似，性状稳定，由湖南农业大学油料作物研究所提供。967H 硫苷含量为 107.48 $\mu\text{mol/g}$ ，967L 为 34.40 $\mu\text{mol/g}$ 。

1.2 方法

田间试验在湖南农业大学油菜试验基地进行。2005 年 9 月 27 日播种，行距 40 cm，株距 18 cm，2006 年 3—4 月进行杂交，5 月获得正反交 F_1 代种子。2006 年 9 月 28 日种植正反交 F_1 代种子各 100 株，选择亲本、 F_1 代植株各 10 株进行花期套袋自交，2007 年 5 月获得 F_2 代种子。2007 年 9 月，在湖南农业大学种植亲本、 F_1 种植各 4 行， F_2 20 行，每行 10 株，继续对亲本进行杂交，对 F_1 、 F_2 进行套袋自交，2008 年 5 月获得亲本、 F_1 、 F_2 、 F_3 等世代种子。

参考文献[13]的方法，构建 F_2 群体的高硫苷基因池和低硫苷基因池。采用 CTAB 法提取油菜总 DNA。RAPD 反应体系(总体积为 20 μL)为：10 \times Buffer (含 Mg^{2+}) 2.0 μL ，2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μL ，2.5 U/ μL Taq 酶 0.6 μL ，10 ng/ μL 引物 1.0 μL ，40 ng/ μL DNA 2.0 μL 和 ddH₂O 13.9 μL 。PCR 扩增程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 2 min 后，以 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s，37 $^{\circ}\text{C}$ 1.0 min，72 $^{\circ}\text{C}$ 1.5 min，进行 40 个循环，再 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物在琼脂糖凝胶中进行电泳，用 Gel DOC1000 凝胶分析仪进行观察、分析和照相。

随机扩增多态性 DNA 引物由上海生工生物工程有限公司设计并合成，从中随机选择 482 个引物用于 PCR 扩增。

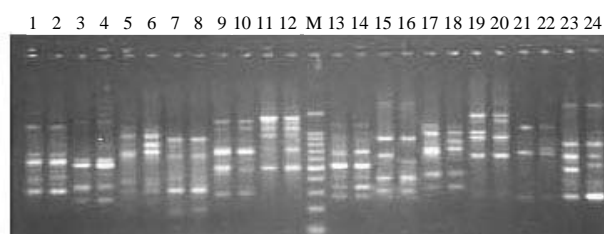
硫苷含量的测定按文献[14]方法进行。所有统计分析均采用唐启义的 DPS 统计软件进行。

2 结果与分析

2.1 RAPD 标记差异性引物的筛选

用 482 条随机引物对 967H 和 967L 基因组进行

PCR 扩增，扩增产物检测发现，有 52 个引物不能扩增出任何带型，占 10.79%，有部分引物扩增出的谱带较弱，有 6 个引物能够在亲本之间扩增出稳定清晰的差异带(图 1)，占 1.24%。

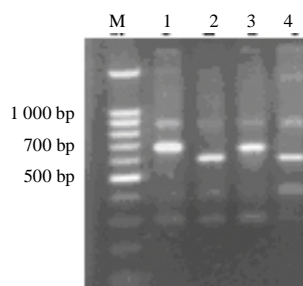


M 100 bp marker; 1、2 引物 S1200; 3、4 引物 S1479; 5、6 引物 S432; 7、8 引物 S1233; 9、10 引物 S280; 11、12 引物 S216; 13、14 引物 S29; 15、16 引物 S268; 17、18 引物 S432; 19、20 引物 S61; 21、22 引物 S131; 23、24 引物 S212。

图 1 亲本间 RAPD 引物的筛选

Fig. 1 The selection of RAPD primers between 967H and 967L

利用 BSA 法，在 F_2 群体中选用 20 株高硫苷单株和 20 株低硫苷单株的 DNA，用上述 6 个引物进行进一步筛选，筛选出 1 对在高硫苷基因池、低硫苷基因池之间表现多态性的 RAPD 引物 S268(图 2)。



M 100 bp marker; 1 高硫苷亲本; 2 低硫苷亲本; 3 高硫苷基因池; 4 低硫苷基因池。

图 2 S268 引物在亲本、 F_1 、高、低硫苷基因池间 RAPD 扩增产物电泳结果

Fig. 2 Electrophoresis pattern of RAPD amplification in tall, low glucosinolates parents and DNA bulks used primer S268

2.2 RAPD 标记的 F_2 群体检测

用筛选出的引物 S268 对 F_2 群体进行扩增，结果共有 3 种带型，即高硫苷亲本带型、低硫苷亲本带型和杂合带型(F_1 相同的带型)(图 3)。对 F_2 群体植株 RAPD 扩增植株的结果进行统计，与高硫苷亲本相同的带型记为 A，与低硫苷亲本相同的带型记为 B，与 F_1 相同的带型记为 H。S268 引物在 F_2 群体中的扩增带型的统计结果如表 1。

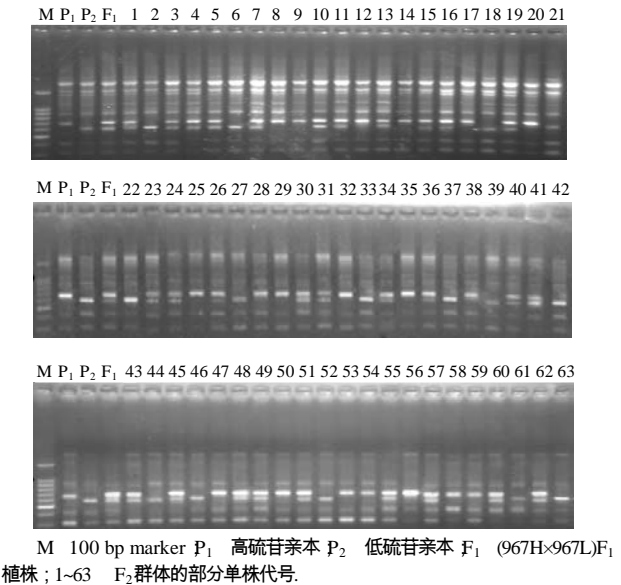


图 3 引物S268 在亲本、F₁及F₂群体中的RAPD带型

Fig. 3 RAPD patterns generated by primer S268 in two parental lines and their F₁ and F₂ population

2.3 RAPD 标记的连锁关系

对 967H、967L、高硫苷基因池、低硫苷基因池和F₁的RAPD标记进行分析,发现 967H与高硫苷基因池具有相似的带型,967L与低硫苷基因池具有相似的带型,而F₁包括了 967H和 967L的特征带型.本研究检测到的S268 标记是低硫苷亲本的一个特异标记.为研究S268 标记与硫苷性状的连锁关系,对表 1 中F₂群体检测结果进行单因素方差分析(表 2),结果表明,标记S268 与低硫苷性状的连锁相关性达极显著水平($F=23.797$, $P<0.001$),单标记观察到的QTL对该群体矮生性的贡献率为 29.51% .

表 1 RAPD引物S268 在亲本、F₁和F₂单株的分布

Table 1 The distribution of RAPD patterns generated by primer S268 in two parental lines and their F₁ and F₂ population

株号	世代	硫苷	带型	株号	世代	硫苷	带型	株号	世代	硫苷	带型	株号	世代	硫苷	带型
967H	P ₁	106.684	A	31	F ₂	88.439	H	64	F ₂	84.509	H	97	F ₂	72.353	H
967L	P ₂	34.397	B	32	F ₂	111.462	A	65	F ₂	49.578	B	98	F ₂	122.301	A
F ₁	F ₁	91.633	H	33	F ₂	53.109	B	66	F ₂	73.260	H	99	F ₂	62.964	H
1	F ₂	90.488	H	34	F ₂	83.564	H	67	F ₂	84.965	A	100	F ₂	97.540	H
2	F ₂	44.240	B	35	F ₂	104.124	A	68	F ₂	65.870	B	101	F ₂	79.030	A
3	F ₂	84.642	H	36	F ₂	88.198	H	69	F ₂	94.300	H	102	F ₂	98.986	A
4	F ₂	69.669	H	37	F ₂	70.005	B	70	F ₂	88.813	A	103	F ₂	73.351	A
5	F ₂	76.874	H	38	F ₂	58.124	A	71	F ₂	71.785	H	104	F ₂	122.369	A
6	F ₂	51.866	B	39	F ₂	68.673	B	72	F ₂	105.160	A	105	F ₂	62.604	H
7	F ₂	46.591	H	40	F ₂	80.028	H	73	F ₂	89.999	H	106	F ₂	77.318	B
8	F ₂	93.727	A	41	F ₂	52.055	H	74	F ₂	93.221	A	107	F ₂	76.393	H
9	F ₂	81.132	A	42	F ₂	66.398	B	75	F ₂	64.510	H	108	F ₂	70.117	A
10	F ₂	72.236	H	43	F ₂	65.794	H	76	F ₂	83.899	A	109	F ₂	62.254	B
11	F ₂	81.557	H	44	F ₂	73.96	B	77	F ₂	76.826	H	110	F ₂	62.409	H
12	F ₂	81.549	A	45	F ₂	79.337	H	78	F ₂	97.139	H	111	F ₂	71.786	B
13	F ₂	84.389	H	46	F ₂	56.400	B	79	F ₂	76.355	B	112	F ₂	75.762	H
14	F ₂	122.387	A	47	F ₂	96.482	A	80	F ₂	70.757	H	113	F ₂	91.854	H
15	F ₂	62.264	H	48	F ₂	100.720	H	81	F ₂	87.295	H	114	F ₂	69.027	B
16	F ₂	77.687	H	49	F ₂	84.159	H	82	F ₂	101.596	H	115	F ₂	83.910	A
17	F ₂	132.912	A	50	F ₂	116.796	A	83	F ₂	103.951	A	116	F ₂	57.876	H
18	F ₂	89.196	B	51	F ₂	55.084	H	84	F ₂	47.464	B	117	F ₂	82.458	H
19	F ₂	69.719	H	52	F ₂	90.839	B	85	F ₂	87.302	B	118	F ₂	72.583	A
20	F ₂	67.116	A	53	F ₂	100.560	A	86	F ₂	43.211	B	119	F ₂	73.549	A
21	F ₂	52.573	B	54	F ₂	90.200	A	87	F ₂	77.275	B	120	F ₂	76.276	H
22	F ₂	46.398	B	55	F ₂	100.713	H	88	F ₂	87.282	A	121	F ₂	78.291	H
23	F ₂	87.564	H	56	F ₂	74.253	A	89	F ₂	90.213	H	122	F ₂	55.760	B
24	F ₂	78.789	H	57	F ₂	92.015	H	90	F ₂	48.147	H	123	F ₂	75.010	A
25	F ₂	127.538	A	58	F ₂	98.955	A	91	F ₂	66.377	A	124	F ₂	73.776	H
26	F ₂	83.658	H	59	F ₂	74.348	A	92	F ₂	84.002	H	125	F ₂	31.047	B
27	F ₂	36.827	B	60	F ₂	90.495	H	93	F ₂	68.614	A	126	F ₂	66.404	H
28	F ₂	84.555	A	61	F ₂	99.177	B	94	F ₂	84.674	H				
29	F ₂	84.073	A	62	F ₂	97.362	H	95	F ₂	38.336	B				
30	F ₂	69.435	H	63	F ₂	51.329	B	96	F ₂	61.216	H				

硫苷含量单位为 $\mu\text{mol/g}$.

表 2 RAPD 标记 S268 在 F₂ 群体硫苷含量方差分析
Table 2 Variance analysis of the glucosinolate content in F₂ population of the cross from 967H and 967L under RAPD mark S268

变异来源	SS	DF	MS	F	P	贡献率/%	
基因型间	2	13	548.28	6 774.14	25.75	0.00	29.51
误差	123	32	358.56	263.08			
总变异	125	45	906.84				

3 小 结

由于油菜硫苷性状是受多基因控制的数量性状^[15]，并且栽培技术和环境因素等对植株籽粒硫苷含量有较大影响^[16-17]，因此，采用传统经典方法研究硫苷的遗传特性十分困难。本研究用 482 个 RAPD 引物对 967H 和 967L 进行检测，在 2 个亲本间存在多态性的引物仅占 1.24%。利用 BSA 法从 F₂ 分离群体中选取数量相等的高硫苷单株和低硫苷单株，产生 2 个混合 DNA 池，两池除了在所选择的目基因及其附近的区域存在差异之外，其他区域基本相同，类似于近等基因系(NIL)，仅有 1 个 RAPD 引物 S268 能够在高硫苷基因池、低硫苷基因池中扩增出差异常带。该引物的带型清晰、稳定、重复性好，与油菜低硫苷性状连锁的标记 S268 的贡献率为 29.51%，印证了硫苷性状是受多基因控制的数量性状。本试验用 RAPD 标记寻找与油菜硫苷性状相连锁的标记，特征带型分布在约 600 bp，可以用琼脂糖进行检测出来，带型较少，但是主要带型较清晰，可以不必通过检测程序相对复杂的聚丙烯酰胺进行检测。

参考文献:

[1] 宋志荣, 官春云. 甘蓝型油菜硫苷特性与对菌核病抗性关系[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2008, 34(4): 462-465.

[2] Bhardwaj H L, Hamama A A. Accumulation of glucosinolate, oil, and erucic acid in developing *Brassica* seeds[J]. Industrial Crops and Products, 2003, 17(1): 47-51.

[3] Kliebenstein D, Pedersen D, Barker B, et al. Chemical defenses of crucifers: Elicitation and metabolism of phytoalexins and indole-3-acetonitrile in brown mustard and turnip[J]. Phytochemistry, 2002, 59: 611-625.

[4] Wittstock U, Agerbirk N, Stauber E J, et al. Successful herbivore attack due to metabolic diversion of a plant chemical defense[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101:

4859-4864.

[5] Buskov S, Serra B, Rosa E, et al. Effects of intact glucosinolates and products produced from glucosinolates in myrosinase-catalyzed hydrolysis on the potato cyst nematode(*Globodera rostochiensis* Wol1)[J]. J Agric Food Chem, 2002, 50: 690-695.

[6] 牟同敏, 刘后利. 甘蓝型油菜种子中硫代葡萄糖苷总量的遗传分析[J]. 作物学报, 1990, 16(2): 97-105.

[7] 缪颖, 陈林蛟. 应用 Bulk-DNA 寻找白菜型油菜核雄性不育基因的 RAPD 标记[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2000, 39(5): 682-685.

[8] Prabhu K C, Somers D J, Rakow C, et al. Molecular markers linked to white rust resistance in mustard *Brassica juncea*[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 865-870.

[9] Hu J, Li G, Stress D, et al. SCAR and RAPD markers associated with 18-carbon fatty acids in rapeseed, *Brassica napus*[J]. Plant Breeding, 1999, 118: 145-150.

[10] Somers D J, Friesen K R D, Rakow C. Identification of molecular markers associated with linolenic acid content in *Brassica napus*[J]. Theor Appl Genet, 1998, 96: 897-903.

[11] Monkolporn O, Pang E C K, Kadkol G P. Molecular markers linked to shatter resistance genes in *Brassica campestris* L.(syn. *Rapa. L.*)[C]//Wratten N. Saliabury P A 10th Inter Rapeseed Congress Abstract. Canberra, 1999: 363.

[12] 郑卓, 李健, 李桐, 等. 新疆野生油菜与甘蓝型油菜属间杂交亲和性及杂种分子鉴定[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 32(5): 465-468.

[13] Michelmores R W, Kesseli R V, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating population[J]. Proc Nati Acad Sci USA, 1991, 88: 9828-9832.

[14] 刘恒烈, 战广琴, 曹流俭. 油菜籽中硫苷总量的测定方法——内源酶法[J]. 中国油料, 1994, 16(4): 46-49.

[15] Bennett R N, Mellon F A, Botting N P, et al. Identification of the major glucosinolate (4-mercaptobutyl glucosinolate) in leaves of *Eruca sativa* L.(Salad rocket)[J]. Phytochemistry, 2002, 61: 25-30.

[16] 张勤争, 吴海福, 郎献华, 等. 油菜籽硫代葡萄糖苷含量影响因子的研究[J]. 浙江农业学报, 1990, 2(1): 30-34.

[17] 张耀文, 李殿荣. 油菜硫营养及其与品质的关系[J]. 土壤肥料, 2002(5): 3-7.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 胡东平