

油菜种子发育早期种皮颜色的快速鉴定方法

陆赢, 刘显军, 官春云, 刘淑艳, 刘忠松*

(湖南农业大学 油料作物研究所, 湖南 长沙 410128)

摘要: 利用香草醛与原花色素生成有色物质的原理, 创建了一种简单、快捷、可靠的油菜种皮颜色鉴定方法, 在授粉后 15 d 能准确鉴定芥菜型和甘蓝型油菜种子的种皮颜色, 利于在油菜开花结束前进行黄籽性状选择。

关键词: 油菜; 种皮颜色; 香草醛染色; 快速鉴定

中图分类号: S565.4 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2011)02-0120-03

A simple and rapid procedure for identification of seed coat color at the early developmental stage of *Brassica juncea* and *Brassica napus*

LU Ying, LIU Xian-jun, GUAN Chun-yun, LIU Shu-yan, LIU Zhong-song*

(Oil Crop Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Color of seed coats from *Brassica juncea* and *B. napus* can be precisely determined as early as 15 d after pollination by staining with 0.5% vanillin-HCl solution for 5 min, which is a simple, rapid, and reliable procedure for identification. Therefore selection for seed coat color trait could be done one generation earlier than traditional rapeseed breeding, which will speed up improvement of *Brassica* yellow-seeded trait.

Key words: *Brassica*; seed coat color; vanillin staining; rapid identification

培育黄籽油菜品种是当前油菜育种的重点和热点^[1-2]。油菜种皮颜色通常要等到种子完全成熟时才能考察^[3],加之甘蓝型油菜黄籽性状表现不稳定,使得对油菜黄籽性状的选择缺乏有效方法,影响黄籽油菜育种进程。组织化学分析和基因表达分析表明,黑籽或褐籽油菜种皮中 4-二氢黄酮醇还原酶基因、花色素合成酶基因和花色素还原酶基因都表达,其内珠被最内层即内皮层积累大量原花色素(proanthocyanidins, PAs),而黄籽油菜种皮中上述基因不表达,也不积累 PAs^[4-8]。PAs 在油菜授粉 10 d 后开始形成和积累,在种子成熟过程中, PAs 被氧化后与细胞壁多糖及其他酚类和/或蛋白质形成复合物,形成黑、褐色种子^[7, 9-10]。在酸性条件下, PAs 组成成分儿茶素的 A 环化学活性较高,

其上的羟基可与香草醛发生缩合反应,生成有色产物^[11]。笔者利用香草醛在酸性条件下能将黑籽早期的种皮染成红色、黄籽不染色这一生化标记对芥菜型和甘蓝型油菜种皮颜色进行早期鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材 料

芥菜型油菜包括四川黄籽(SY)及其黑籽近等基因系(NILA、NILB)、BC₈F₂种皮颜色分离群体^[3]以及所收集的 8 个国家 38 份油菜种质资源,其中,黄籽 19 份(Y1~Y19),黑籽 19 份(B1~B19);甘蓝型油菜包括系选获得的和芥甘杂交培育的甘蓝型油菜黄籽品系^[12]以及湘油 15 号等共 12 份,其中,黄籽(Y20~Y25)和黑籽(B20~B25)各 6 份(表 1)。

收稿日期: 2010-12-14

基金项目: 国家自然科学基金项目(30971799); 国家高新技术研究发展计划项目(2006AA10A113); 教育部高等学校博士学科点专项基金项目(200805370003)

作者简介: 陆赢(1984—),男,湖南醴陵人,硕士研究生,主要从事油菜分子育种研究, lousi_ly@sohu.com; *通信作者, zslu48@sohu.com

表 1 油菜种质资源

Table 1 Accessions of *Brassica juncea* and *B.napus* used in this study

编号	种质名称	来源	编号	种质名称	来源
Y1	四川黄籽	四川	B7	山南芥 2 号	西藏
Y2	9-43	巴基斯坦	B8	山南错那油菜	西藏
Y3	巴 1	巴基斯坦	B9	江孜 301	西藏
Y4	斯拉扬卡	俄罗斯	B10	德庆大粒	西藏
Y5	和政黄芥	甘肃	B11	藏油 1 号	西藏
Y6	来凤黄籽选	湖北	B12	2900092	印度
Y7	Domo	加拿大	B13	2900089	印度
Y8	内蒙大黄芥	内蒙古	B14	2900098	印度
Y9	晋鉴 5 号	山西	B15	T6342	印度
Y10	大菜籽	山西	B16	渝丰榨菜	重庆
Y11	陕北黄籽选	陕西	B17	SL83	湖北
Y12	陕北黄芥	陕西	B18	兰市草腰子	四川
Y13	吴旗黄芥	陕西	B19	SL54	湖北
Y14	蓬菜芥菜	四川	Y20	y101	系统选育
Y15	2900121	新疆	Y21	y103	芥甘杂交选育
Y16	紫叶黄籽	湖南	Y22	y105	芥甘杂交选育
Y17	JO006	澳大利亚	Y23	y117	芥甘杂交选育
Y18	铜梁黄青油菜	重庆	Y24	y120	芥甘杂交选育
Y19	Sv9041503	瑞典	Y25	y141	系统选育
B1	113'68	德国	B20	L1293	品种间杂交选育
B2	射洪马尾松	四川	B21	L1294	品种间杂交选育
B3	藏油 9 号	西藏	B22	L1295	品种间杂交选育
B4	藏油 6 号	西藏	B23	L1296	品种间杂交选育
B5	日喀则白鉴	西藏	B24	L1298	品种间杂交选育
B6	芥油 1 号	西藏	B25	L1299	品种间杂交选育

1.2 方 法

参考文献[13]的方法, 配制 0.5% 香草醛溶液。

分别于授粉后 10、15、20、25、30、35、40、45 d, 直接剥取芥菜型油菜四川黄籽及其黑籽近等基因系 NILA 和 NILB 新鲜角果中种子的种皮, 置于载玻片上, 用 0.5% 香草醛溶液完全覆盖种皮, 常温下染色 5 min 后, 观察种皮颜色的变化, 拟确定最佳染色时间。对芥菜型油菜 BC₈F₂ 分离群体种子、芥菜型和甘蓝型油菜黄黑籽材料在最佳染色时间进行染色观察。

2 结果与分析

2.1 芥菜型油菜近等基因系种皮颜色的快速鉴定

观察结果(封 2 图 1-A、B、C)表明, 四川黄籽的种皮在授粉后 10~45 d 不能被香草醛溶液染色, 而呈黄绿色; 黑籽材料近等基因系 NILA 和 NILB 授粉后 10 d 种皮染色不明显, 但授粉后 15~45 d 种

皮均被染成特异性红色, 说明用香草醛溶液对种皮进行染色时, 可选择授粉后 15 d 进行。

2.2 芥菜型油菜分离群体种皮颜色的快速鉴定

对 BC₈F₂ 代(芥菜型油菜四川黄籽作轮回亲本与黑籽亲本紫叶芥杂交、连续回交培育)群体 1 700 株植株授粉后 15 d 种子的种皮进行香草醛溶液染色鉴定, 发现种皮被染色的植株 1 320 株, 种皮不染色的植株 380 株, 成熟时(大约授粉后 50 d)考察上述植株收获的种子的种皮颜色, 结果表明种皮染成红色的植株都结黑籽, 不染色的植株都产生黄籽, 染色观察结果与成熟后种皮颜色考察结果完全一致。

2.3 芥菜型和甘蓝型油菜黄黑籽种皮颜色的快速鉴定

为了验证方法的普遍实用性, 进一步用芥菜型油菜黄籽品种和黑籽品种授粉后 15 d 种子的种皮进行染色观察, 结果(封 2 图 1-D、E、F、G)所

有黑籽材料的种皮均被染色,而所有黄籽材料的种皮都没被染色。

为了验证香草醛溶液染色方法对甘蓝型油菜种皮颜色鉴定的实用性,选择不同来源的甘蓝型黄籽品系和黑籽品种各6个,用其授粉后15d种子的种皮进行染色观察。结果(封2图1-H、I)6个黑籽材料的种皮全被染成深红色,而6个黄籽材料的种皮不被染色,呈现为染色前的黄绿色。

3 结论与讨论

在不同品种油菜种子的不同发育时期,用0.5%香草醛-盐酸溶液对种皮染色5min,能够在授粉后15d准确鉴定芥菜型油菜和甘蓝型油菜种子的种皮颜色,说明这是一种简单、快捷、可靠的油菜种皮颜色鉴定方法。油菜从授粉到种子成熟大约需要50d^[14]。利用香草醛染色可以将油菜种皮颜色鉴定提前1个月左右,在育种时可以利用香草醛染色提早进行种皮颜色鉴定,淘汰黑籽植株,而选留黄籽基因型植株。

香草醛溶液中盐酸浓度过高会造成种皮细胞的碳化而使染色后种皮变暗红色,与香草醛溶液染色的特异性红色混淆,因此应将盐酸的浓度降低到5mol/L,并适当延长染色时间。用香草醛染色进行种皮颜色鉴定,在剥离种皮时,应尽量减少残留胚,残留胚过多会影响种皮染色的时间。剥取种皮后如果不能及时染色,可将种皮在-20℃以下低温保存,这样不会影响染色结果。种脐区域的种皮结构不同于种子的其他部分,即使是黄籽在种脐区域也会有积累色素^[14],因此,应不用种脐区域的种皮进行染色观察。

华中农业大学孟金陵教授、马朝芝教授,陕西杂交油菜研究中心李殿荣研究员,江苏省农业科学院张洁夫研究员,甘肃农业大学孙万仓教授,内蒙古农业大学张胜教授,四川省农业科学院张锦芳研究员,西藏自治区农科所尼玛卓玛研究员,新疆维吾尔自治区农业科学院陈跃华研究员,陕西省农业科学院徐爱霞研究员惠赠有关材料,特此感谢。

参考文献:

[1] Vollmann J, Rajcan I. Oil Crops, Handbook of Plant

- Breeding[K]. New York: Springer, 2009: 91-126.
- [2] Nesi N, Delourme R, Brégeon M, et al. Genetic and molecular approaches to improve nutritional value of *Brassica napus* L. seed[J]. C R Biol, 2008, 331: 763-771.
- [3] 刘显军, 袁谋志, 官春云, 等. 芥菜型油菜黄籽性状的遗传、基因定位和起源探讨[J]. 作物学报, 2009, 35: 839-847.
- [4] 严明理, 刘显军, 刘忠松, 等. 芥菜型油菜4-二氢黄酮醇还原酶基因的克隆和表达分析[J]. 作物学报, 2008, 34: 1-7.
- [5] 严明理. 芥菜型油菜黄籽形成的分子机理研究[D]. 长沙: 湖南农业大学农学院, 2007.
- [6] Akhov L, Ashe P, Tan Y F, et al. Proanthocyanidin biosynthesis in the seed coat of yellow-seeded, canola quality *Brassica napus* YN01-429 is constrained at the committed step catalyzed by dihydroflavonol 4-reductase [J]. Botany, 2009, 87: 616-625.
- [7] Marles M A S, Gruber M Y. Histochemical characterisation of unextractable seed coat pigments and quantification of extractable lignin in the *Brassicaceae* [J]. J Sci Food Agric, 2004, 84: 251-262.
- [8] 曾盈, 刘忠松, 龙桑, 等. 芥菜型油菜黄黑种皮多酚差异的紫外-可见光谱研究[J]. 作物学报, 2007, 33: 476-481.
- [9] Auger B, Marnet N, Gautier V, et al. A detailed survey of seed coat flavonoids in developing seeds of *Brassica napus* L. [J]. J Agric Food Chem, 2010, 58: 6246-6256.
- [10] Nesi N, Lucas M O, Auger B, et al. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* BAN gene is active in proanthocyanidin-accumulating cells of the *Brassica napus* seed coat [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 601-617.
- [11] Hummer W, Schreier P. Analysis of proanthocyanidins [J]. Mol Nutr Food Res, 2008, 52: 1381-1398.
- [12] Liu Z S, Guan C Y, Chen S Y, et al. Development of the novel yellow-seeded *Brassica napus* germplasm through the interspecific cross *B. juncea* × *B. napus* [C]//Fu T D, Guan C Y. Proc 12th Intl Rapeseed Cong. Beijing: Science Press, 2007: 336-339.
- [13] Debeaujon I, Leon-Kloosterziel K, Koornneef M. Influence of the testa on seed dormancy germination and longevity in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2000, 122: 403-414.
- [14] 陈玉萍, 刘后利. 甘蓝型油菜种子发育过程中种皮颜色变化[J]. 中国油料, 1995, 17(2): 1-3.

责任编辑: 杨盛强

英文编辑: 易来宾