

甘蓝型油菜白花基因的RAPD标记^{*}

董育红^{1,2}, 田建华², 李殿荣², 郭蔼光¹, 孔建², 赵小萍²

(1 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省杂交油菜研究中心, 陕西 大荔 715105)

[摘要] 以甘蓝型白花油菜及其分离群体为材料,对甘蓝型油菜白花性状的遗传规律进行了研究。结果表明,白花对黄花是一对由不完全显性基因(WW)控制的不完全显性遗传性状;利用集群分离法(BSA)对该白花基因进行RAPD分析,在1200个随机引物中,获得了引物S₁₀₉₂(5-CCCAGGCTAC-3),在白花基因库和黄花基因库间扩增出多态性产物S-1092₁₂₅₀;对该分离群体及其姊妹系和其他白花油菜进行的单株验证表明,S-1092₁₂₅₀与甘蓝型油菜白花基因相连锁,遗传距离为0.84 cM。

[关键词] 甘蓝型油菜;白花;分子标记;RAPD;集群分离法

[中图分类号] Q942.6;S634.303.6

[文献标识码] A **[文章编号]** 1671-9387(2005)10-0057-05

油菜花瓣的颜色一般为黄色,但也有金黄、浅黄、桔红、乳白和纯白等不同颜色,这些花色性状有些为自然突变产生,有些则为人工种间杂交而来^[1-5]。白花作为油菜的一个重要性状,目测极易鉴别,在测定品种的异交率及其纯度、检测性状转移等方面有着广阔的应用前景。白花作为标志性状在油菜杂种优势利用体系中也能发挥重要作用,但由于花期检测偏晚以及对白花性状研究的局限,使得该性状的利用未受到足够重视。随着分子标记技术的不断发展和日益成熟,使其用于作物重要性状的早期检测和选择成为可能。对油菜白花性状基因进行分析研究,筛选到与花色性状紧密连锁的分子标记,不仅有利于提高油菜育种效率,丰富油菜分子标记位点,而且可为进一步揭示花色性状的分子遗传机理和分析定位相关基因奠定基础,还可通过分析筛选到与白花这一标志性状连锁的其他品质性状基因。例如,刘雪平等^[6]通过RAPD分子标记,找到了白花性状基因与高芥酸性状基因紧密连锁的关系,为油菜品质育种提供了一种新的选择手段。本研究运用RAPD分子标记技术,对油菜白花性状基因进行了分析,找到了与油菜白花性状基因连锁的分子标记,为进一步运用形态标记和分子标记相结合的辅助选择育种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 D11, A55, C431和E420 4个遗传稳定的甘蓝型白花油菜品系,及以D11为母本所配11个杂交组合的F₂代分离群体。11个杂交组合的代号分别为O119, O124, O139, Q335, Q354, Q356, Q454, Q498, W82, W157, Q357(编号分别为1~11),其父本均为正常的黄花油菜。以上试验材料均由陕西省杂交油菜研究中心提供。

1.1.2 试剂 1200个10碱基序列的随机引物,购自上海生工(Sangon)公司; dNTP, Taq酶和200bp DNA分子量标准,均购自华美生物工程公司。其中dNTP浓度为10 mmol/L, Taq酶浓度为5 U/μL,引物溶解后的浓度为25 μmol/L。

1.2 方法

1.2.1 群体的获得及花色性状的调查 2004-09将试验材料播种于陕西省杂交油菜研究中心育种试验田,苗期单株编号。2004-10分单株取油菜幼嫩叶片,提取基因组DNA。2005-04油菜花期对4个白花材料及11个杂交组合的F₂代植株进行花色分离调查,统计花色分离比例。

1.2.2 油菜基因组DNA的提取 参照Edwards等^[7]的方法并略作修改。具体操作如下:称取0.2g

* [收稿日期] 2005-06-23

[基金项目] 陕西省自然科学基金项目[2001SM32]

[作者简介] 董育红(1971-),男,陕西蓝田人,助理研究员,在读硕士,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: dongyuhong9919@163.com

[通讯作者] 李殿荣(1938-),男,陕西华县人,研究员,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: lidr@peoplemail.com.cn

鲜嫩油菜叶片装入1.5 mL离心管中,电钻迅速研磨成糊状,加入0.8 mL DNA提取缓冲液,轻轻旋转混匀,于65℃水浴中保温30 min,期间每10 min轻轻旋转混匀1次。加入1/4体积5 mol/L KAc (-20℃),混匀,4℃条件下放置30 min,然后在此温度下13 000 g离心10 min。吸取上清液500 μL,加入等体积平衡酚(pH 8.0),再加入等体积氯仿/异戊醇(体积比为24:1)混合液,轻轻混匀数分钟,4℃下13 000 g离心10 min。取上清液400 μL,加入1/4体积10 mol/L NH₄Ac,再加入2倍体积无水乙醇(-20℃)轻轻混匀,于-20℃静置30 min以上。4℃下10 000 g离心5 min。弃去上清液,用1 mL体积分数70%乙醇冲洗沉淀1次,在-90℃的真空条件下对DNA沉淀进行冷冻干燥。干燥后的DNA溶于500 μL 1×TE中,加入RNase,使其终浓度为100 μg/mL,于37℃水浴中保温30 min。加入等体积平衡酚(pH 8.0),再加入等体积氯仿/异戊醇(体积比为24:1)混合液,混匀数分钟,4℃下13 000 g离心10 min。吸取上清液,加入1/4体积10 mol/L NH₄Ac,再加2倍体积无水乙醇(-20℃)轻轻混匀,于-20℃条件下静置30 min以上。4℃下10 000 g离心5 min。弃去上清液,用1 mL体积分数70%乙醇冲洗DNA沉淀2遍,然后在-90℃的真空条件下冷冻干燥,-20℃保存备用。

1.2.3 近等基因库的构建 采用集群分离法(BSA),根据调查结果,在第11号组合(Q357)的F₂代3:1(白:黄)花色分离群体中,选取30个白花单株的基因组总DNA等量混合,构建白花基因库(W)的DNA样品;再选取30个黄花单株的基因组总DNA等量混合,构建黄花基因库(Y)DNA样品。

1.2.4 RAPD分析 在20 μL反应体系中含1×

PCR Buffer (10×, 2 μL), 2.0 mmol/L MgCl₂ (25 mmol/L, 1.6 μL), 0.2 mmol/L的dNTPs (10 mmol/L, 0.4 μL), 1.0 U (5 U/μL, 0.2 μL) Taq酶, 0.25 μmol/L 10碱基引物(25 μmol/L, 0.2 μL)及约30 ng的模板DNA (20 ng/μL, 1.5 μL)。PCR反应程序为:95℃ 3 min, 1个循环;94℃ 50 s, 38~50 s, 72℃ 90 s, 35个循环;最后在72℃延伸10 min。PCR扩增产物在0.5倍TBE缓冲液中用1.4 g/L琼脂糖凝胶(含1 μg/mL溴化乙锭)电泳分离,BD-RAD凝胶自动成像系统照相分析。

2 结果与分析

2.1 甘蓝型白花油菜的花色表现与遗传

遗传试验表明^[1],甘蓝型油菜的白花对黄花是由一对等位基因(Ww)控制的不完全显性遗传性状,基因型WW表现为白花,基因型Ww表现为乳白花,基因型ww表现为黄花。本试验所用的4个甘蓝型油菜品系(D11, A55, C431, E420)均为遗传稳定的白花材料,其自交后代花瓣均为白色,即基因型为WW。以D11为母本所配的11个杂交组合的F₁代植株,花瓣颜色均表现为中间类型乳白色(Ww);在F₂代,其花瓣颜色均发生了分离,其中群体较大的6个组合(O119, O124, O139, Q454, Q498, Q357)分离情况见表1。对表1中6个组合的F₂代植株白花(WW)、乳白花(Ww)和黄花(ww)的分离比进行卡方测验,均符合1:2:1的理论比例,由此可以确定甘蓝型油菜白花性状是单基因(W)控制的不完全显性遗传。中间类型乳白花(Ww)的花瓣颜色介于白花和黄花之间,但能明显区分,因其含有显性基因(W),在试验过程中将其归于白花群体,这样F₂代分离群体中白花与黄花的比例为3:1。

表1 6个杂交组合的F₂代花色分离结果统计

Table 1 Results of petal color segregation of F₂ in six crosses

杂交组合 Combina- tion	白花 White- petal	乳白花 Creamy- white- petal	黄花 Yellow- petal	总数 Total	杂交组合 Combina- tion	白花 White- petal	乳白花 Creamy- white- petal	黄花 Yellow- petal	总数 Total
O119	15	28	19	62	Q454	11	37	14	62
O124	12	35	21	68	Q498	11	32	20	63
O139	16	37	14	67	Q357	47	133	58	238

虽然白花性状符合质量性状的遗传规律,但也具有数量性状的特点。在以同一白花材料D11为母本配制的11个杂交组合中,其中间类型乳白花(Ww)的花色表现在组合之间差异较大,有的略偏向黄色,有的则偏向于白色;同组合内同为乳白花的植株,其花瓣颜色的深浅也略有差异,因此白花性状

还具有数量性状连续性的特征。

2.2 花色分离集团间多态性引物的筛选

用1 200个随机引物对白花基因库(W)和黄花基因库(Y)的DNA进行RAPD标记筛选,结果表明,不同随机引物扩增的条带数从0~9不等,多数引物可扩增出2~5条带,其核酸分子为0.2~2.0

kb, 部分引物扩增结果见图1。在所选用的引物中, 只有S₁₀₉₂ (5-CCC A GG CTAC-3) 1个引物在2个基因库间检测到多态性, 即在白花基因库中扩增出了特异DNA 片段(图1箭头所示, 从图2单株验证可知, 该特异DNA 片段约为1.25 kb), 而在黄花基因库中未扩增出相应的DNA 片段。其余引物在2个基

因库间的扩增带型基本一致。多次重复试验表明, 用引物S₁₀₉₂扩增得到的特异1.25 kb DNA 片段具有很好的重复性, 由此认为以S₁₀₉₂为引物扩增出的特异DNA 片段S-1092₁₂₅₀可能与甘蓝型油菜白花基因相连锁

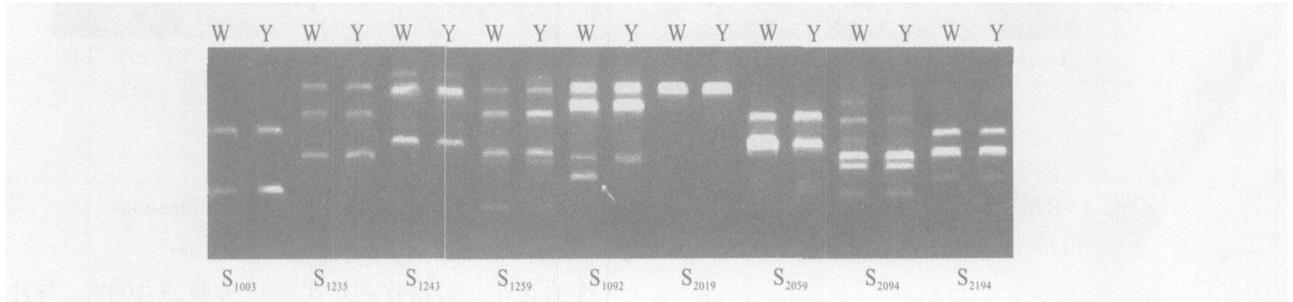


图1 不同随机引物在白花基因库(W)和黄花基因库(Y)间的扩增结果
箭头指示为白花基因片段S-1092₁₂₅₀, 下图同。

Fig 1 RAPD amplification patterns between bulk W and bulk Y using different random primers
A row indicates polymorphic band S-1092₁₂₅₀ in white-petal gene. Same as in following figures

2.3 花色分离群体各单株的RAPD 分析

2.3.1 构成混合基因库的分离群体Q 357 F₂ 代各单株的RAPD 分析 用引物S₁₀₉₂对组合Q 357 的F₂ 代分离群体中包含构成近等基因库在内的共238 个单株(白花180 株, 黄花58 株)的DNA 样品进行RAPD 分析, 部分扩增结果见图2。由图2 可知, 白花

群体中绝大部分单株均扩增出了特异片段 S-1092₁₂₅₀, 仅有1 株发生了交换, 未扩增出该特异片段, 交换率为0.556%; 黄花群体中绝大部分单株未扩增出特异片段S-1092₁₂₅₀, 仅有1 株发生了变异, 扩增出了该特异片段, 交换率为1.724%。

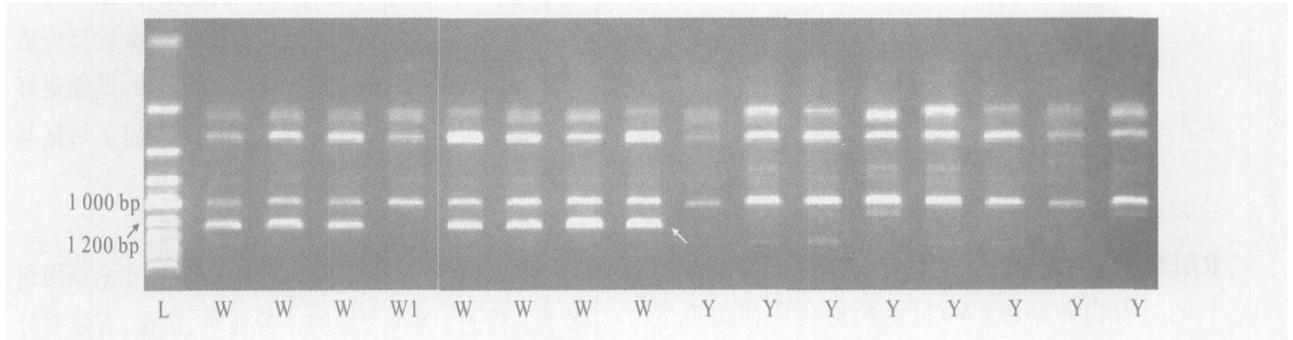


图2 以S₁₀₉₂为引物的分离群体Q 357 F₂ 代各单株的RAPD 分析图谱
L. 200 bp DNA 梯度标准; W. 白花单株; Y. 黄花单株; W1. 交换类型

Fig 2 RAPD analysis with primer S₁₀₉₂ among individual plants of F₂ in segregation population Q 357
L. 200 bp DNA ladder; W. White-petal individual plants; Y. Yellow-petal individual plants; W1. Type of exchanging

2.3.2 其余10 个组合单株的RAPD 分析 从编号为1~ 10 的每一个组合F₂ 代分离群体中, 随机抽取1 个白花单株和1 个黄花单株的DNA 样品, 用引物S₁₀₉₂进行RAPD 分析, 结果见图3。由图3 可知, 所有的白花单株均扩增出了特异片段S-1092₁₂₅₀, 而所有的黄花单株均未扩增出此带。

从以上分离群体的单株RAPD 分析结果可以

看出, 特异性片段S-1092₁₂₅₀与甘蓝型白花油菜D 11 的白花基因是紧密连锁的。

2.4 不同甘蓝型白花油菜的RAPD 分析

从D 11, A 55, C431 和E420 4 个稳定遗传的白花材料中, 分别随机抽取1 个单株DNA 样品进行RAPD 分析, 结果见图4。由图4 可见, 4 个稳定遗传的白花材料均扩增出了特异片段S-1092₁₂₅₀。

根据以上分析结果完全可以确定,用引物S₁₀₉₂扩增出来的特异片段S-1092₁₂₅₀与甘蓝型油菜白花

基因(W)是紧密连锁的。

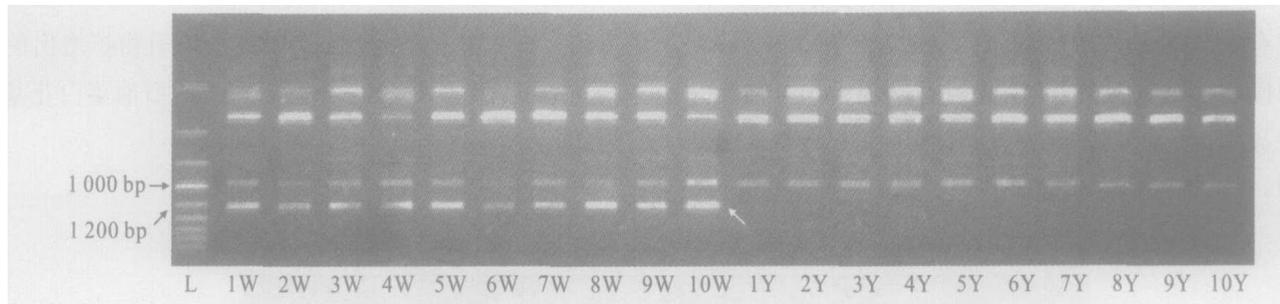


图3 以S₁₀₉₂为引物的不同组合F₂代单株的RAPD分析结果

L. 200 bp DNA 梯度标准; IW~10W. 白花单株; 1Y~10Y. 黄花单株

Fig 3 RAPD analysis with primer S₁₀₉₂ among individual plants of F₂ progeny in different combinations

L. 200 bp DNA ladder; IW~10W. White-petal individual plants; 1Y~10Y. Yellow-petal individual plants

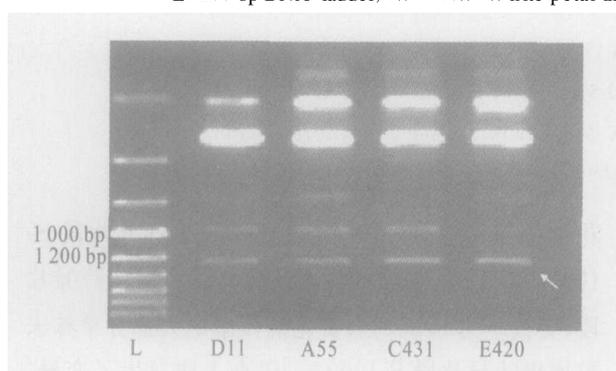


图4 以S₁₀₉₂为引物不同甘蓝型白花油菜的RAPD分析

L. 200 bp DNA 梯度标准

Fig 2 RAPD analysis with primer S₁₀₉₂

among different white-petal *Brassica napus* L.

L. 200 bp DNA ladder

2.5 RAPD 标记S-1092₁₂₅₀与甘蓝型油菜白花基因(W)位点的遗传距离

根据2.3.1对分离群体Q 357中238个单株的RAPD分析结果,可以计算出RAPD标记S-1092₁₂₅₀与白花基因(W)位点的遗传距离为0.84 cM。

3 讨论

3.1 关于所选的RAPD 标记S-1092₁₂₅₀

本试验利用RAPD—集群分离分析法(BSA)检测甘蓝型油菜白花显性基因的多态性。由于集群分离分析要求将相同表型或基因型的个体混合,这样才能将该表型或基因型有关的差别检测到,从而大大提高检出与目标基因相连锁的分子标记的可能性。试验用S₁₀₉₂从分离群体混合样品中检测出白花多态性标记S-1092₁₂₅₀,并进行重复后,再对分离群体中的个体进行验证,其结果有力证明了这种多态性的存在。根据这些结果可以推断,S-1092₁₂₅₀与甘

蓝型油菜白花基因是紧密连锁的,遗传距离为0.84 cM。

1200个随机引物中,除S₁₀₉₂外,其余引物在两集团间的扩增带型基本一致,说明构建的近等基因库很好地消除了除目标性状外的其他差异。这种差异与构成近等基因库的植株数目有关,一般情况下,若植株数目过少,由于取样的随机误差导致两库DNA出现差异的机会增加,检测到的多态性并不一定是真实的;若植株数目过多,则属于同一库的植株因在目的基因位点附近的连锁区段发生交换而使两库DNA出现差异的机会减小,检测出多态性的可能性就降低^[8]。因此,近等基因库中植株数目应适当。本试验用30个植株构建近等基因库,既能很好地消除集团间的背景差异,又准确地检出了目标基因的多态性。

3.2 RAPD 标记转换的必要性与方法

RAPD 标记是以PCR技术为基础,在全基因组水平上检测DNA变异的一种简单、快速、有效的分析方法,其灵敏度高但稳定性差。RAPD分析所用引物一般为10碱基的随机引物,其与靶序列结合的专一性差,出现非特异性扩增的机率较高。有时某一扩增产子的序列在不同遗传背景的材料间有所不同,从而使该引物在不同的材料间不能通用^[9]。另外,RAPD标记多为显性标记,不能区分显性纯合体和杂合体基因型,因此有必要将RAPD标记进行转换。转换的方法有:将PCR扩增出的特异片段作为探针进行分子杂交,转化为RFLP标记;将PCR目标片段克隆、测序,根据两端的序列设计20~24碱基的特异引物,从而转化为具有共显性效应的STS标记(sequence-tagged site)或SCAR标记(sequence characterized amplified region)。SCAR标记是单一

位点扩增标记,对反应条件不敏感,产物扩增是单一的特异性扩增,可以通过DNA 是否被扩增来判断鉴定基因型。将本试验获得的RAPD 标记转换成特异

性更强的SCAR 标记,可为甘蓝型白花油菜的进一步研究提供可靠的分子标记。

[参考文献]

- [1] 张洁夫,浦惠明,戚存扣,等. 甘蓝型油菜花色性状的遗传研究[J]. 中国油料作物学报, 2000, 22(3): 1- 4
- [2] 于澄宇,胡胜武,张春红,等. 一种花色突变雄性不育油菜的发现[J]. 遗传, 2004, 26(3): 330- 332
- [3] 牛应贵,汪良中,刘玉贞,等. 利用人工合成甘蓝型油菜创建油菜新种质[J]. 中国油料作物学报, 2003, 25(4): 11- 15
- [4] 黄邦全,刘幼琪,吴文华,等. Ogura CMS 紫菜苔×萝卜×甘蓝型油菜杂种的获得及细胞遗传学研究[J]. 遗传学报, 2002, 29(5): 467- 470
- [5] 李 莓,陈卫江,易冬莲. 甘蓝型油菜CMS 桔红花色恢复系R18 遗传研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32: 27- 30
- [6] 刘雪平,涂金星,陈宝元,等. 人工合成甘蓝型油菜中花色与芥酸含量的遗传连锁分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(4): 357- 362
- [7] Edwards K, John S C, Thom P C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Res, 1991, 19: 1349
- [8] Churchill G A, Giovannoni J J, Tanksley S. Pooled-sampling makes higher resolution mapping practical with DNA markers[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 93: 16- 20
- [9] Shi Y G, Zheng Y L, Li J S, et al. Mapping CMS-S restores gene Rf3 with RFLPs and RAPDs[J]. Acta Agronomica Sinica, 1997, 23(1): 1- 6

RAPD markers linked to white-petal gene in *B. rassica napus* L.

DONG Yu-hong^{1,2}, TIAN Jian-hua², LI Di-an-rong²,
GUO Ai-guang¹, KONG Jian², ZHAO Xiao-ping²

(1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Hybrid Rapeseed Research Center of Shaanxi Province, Dali, Shaanxi 715105, China)

Abstract: White-petal (W) rapeseed (*B. rassica napus* L.) and its segregation population were used as experiment materials to study the inheritance of its white-petal traits. The result showed that the petal color character of W vs Y (yellow-petal) was controlled by one pair incomplete dominant gene WW. Bulk segregation analysis (BSA) was employed to identify random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to the white-petal gene. A total of 1 200 arbitrary 10-mer oligonucleotide primers were screened on the DNA of W and Y bulks. Primer S₁₀₉₂ (5-CCC AGG CTA C-3) gave polymorphism between the two bulks. DNA from individual plants of the two bulks, their sister lines and the other white-petal rapeseed (*B. rassica napus* L.) were then used as template for screening with the primer S₁₀₉₂ and the 1.25 kb DNA polymorphism generated by the primer S_{1092W} were verified linking with the white-petal gene. The genetic distance was 0.84 cM between RAPD marker and white-petal gene.

Key words: *B. rassica napus* L.; white-petal; molecular marker; RAPD; BSA