

赵会彦,肖 麓,杜德志. 青海大黄油菜黄籽基因 SSR 标记开发和图谱构建[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):32-35.

青海大黄油菜黄籽基因 SSR 标记开发和图谱构建

赵会彦,肖 麓,杜德志

(青海大学农林科学院春油菜研究所/青海省春油菜遗传改良重点实验室/青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室,青海西宁 810016)

摘要:青海大黄油菜是青藏高原特有的一个白菜型油菜地方品种,具有黄籽的优良性状。前人研究结果表明大黄油菜黄籽性状受一对隐性基因 *Brsc1* 控制。该基因被定位于白菜型油菜的 A9 染色体上。为了筛选更多与 *Brsc1* 紧密连锁的标记,本研究根据 *Brsc1* 所在染色体区间,依据 BRAD 数据库中已公布的白菜型油菜的序列信息(<http://brassicadb.org/brad/>),设计新的 SSR 引物,同时利用同源区间内已有的 SSR 引物对目标基因进一步精细定位。以大黄油菜和褐籽油菜 09A-126 为亲本,构建 BC₁ 分离群体和 F₂ 群体,结合 BSA 法,对 SSR 引物进行检测,共筛选到 5 个与 *Brsc1* 基因紧密连锁的 SSR 标记:A-11-65、A-11-145、B-6-32、*BrID10607* 和 *KS10760*,其中 A-11-65 为共显性标记。构建了 *Brsc1* 的 SSR 标记遗传图谱和物理图谱,图谱标记密度较前人进一步增加。这些标记的获得为油菜黄籽品种分子标记辅助选择育种体系的建立和黄籽基因的克隆奠定了基础。

关键词:青海大黄油菜;黄籽基因;SSR;遗传图谱;物理图谱

中图分类号:S565.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0032-04

油菜是世界范围内广泛种植的油料作物之一,也是我国食用植物油的重要来源。油菜种皮颜色有黄色、褐色、黑色等,研究表明,在相同遗传背景下,黄籽油菜与黑、褐籽等油菜相比,具有种皮薄,皮壳率低,蛋白质和含油量高,色素含量少等优点^[1-2]。白菜型黄籽油菜为自然界存在的天然黄籽资源之一,对白菜型油菜黄籽基因进行定位,开发与黄籽基因紧密连锁的分子标记,构建黄籽基因的遗传连锁图谱和物理图谱,对黄籽油菜分子标记辅助选择育种体系的建立、黄籽基因的图位克隆以及转基因油菜品种的培育等都具有重要的意

义^[3-7]。Chen 等利用印度黄籽沙逊构建白菜-芥蓝 (*B. campestris* - *B. alboglabra*) C 染色体组异附加系,并利用该异附加系筛选出一个与黄籽基因紧密连锁的 RAPD 标记 B06-600^[8]。Rahman 等在白菜型黄籽沙逊油菜中发现 1 个与黄籽性状主效基因 (*Br1/br1*) 紧密连锁的 SRAP 标记 SA7BG29-245,并将这个标记转化为共显性 SNP(单核苷酸多态性)标记和 SCAR(序列特异性扩增区域)标记^[9]。Zhang 等利用大白菜双单倍体群体进行黄籽基因的精细定位和图位克隆,用 13 个 SRAP 标记、6 个 SCAR 标记和 4 个 SNP 标记构建了黄籽基因的遗传连锁图谱,克隆了控制种皮颜色的基因,该基因位于白菜型油菜 A6 连锁群^[10]。Kebede 等对白菜型黄籽沙逊油菜种皮颜色基因进行了 QTL 定位,共检测到 4 个 QTL 位点,其中一个主效 QTL 位点 SCA9-2 和一个微效 QTL 位点 SCA9-1 位于 A9 连锁群,其他两个微效 QTL 位点 (SCA3-1 和 SCA5-1) 分别位于 A3 和 A5 连锁群,共解释了 67% 的表型变异^[11]。Xiao 等对青海大黄油菜黄籽性状进行了遗传分析和基因定位研究,结果表明青海大黄油菜黄籽性

收稿日期:2013-05-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060196);国家“863”计划(编号:2011AA10A104);国家“973”计划(编号:2012CB723007);国家油菜产业技术体系专项(编号:CARS-13)。

作者简介:赵会彦(1989—),男,河南南阳人,硕士研究生,主要从事春油菜分子生物学研究。E-mail:13639767407@163.com。

通信作者:肖 麓,博士。E-mail:981919669@qq.com。

参考文献:

- [1] Christie J M. Phototropin blue-light receptors[J]. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 21-45.
- [2] Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, et al. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(14): 5626-5631.
- [3] Kong S G, Kinoshita T, Shimazaki K, et al. The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses[J]. Plant Journal, 2007, 51(5): 862-873.
- [4] Kong S G, Suetsugu N, Kikuchi S, et al. Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity[J]. Plant & Cell Physiology, 2013, 54(1): 80-92.
- [5] Kong S G, Suzuki T, Tamura K, et al. Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus[J]. Plant Journal, 2006, 45(6): 994-1005.
- [6] Takemiya A, Inoue S, Doi M, et al. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments[J]. Plant Cell, 2005, 17(4): 1120-1127.
- [7] Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, et al. *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(12): 6969-6974.
- [8] Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, et al. *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response[J]. Science, 2001, 291(5511): 2138-2141.
- [9] Clough S J, Bent A F. Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 1998, 16(6): 735-743.

状受一对隐性基因(*Brsc1*)控制,筛选到与*Brsc1* 紧密连锁的 10 个 AFLP 标记(*Y1* 至 *Y10*)和 3 个 SSR 标记(*CB10255*、*CB10022*、*CB10428*),将其定位于白菜型油菜 A9 染色体上,同时构建了*Brsc1* 基因所在区域的遗传连锁图谱^[12]。

综上所述可见,前人对不同的白菜型黄籽油菜品种的黄籽基因进行了定位、克隆等研究,但是对于不同油菜品种的研究结果有所不同。本研究所用青海大黄油菜是起源于青藏高原的白菜型油菜地方品种,有能够稳定遗传的黄籽性状,是一种研究白菜型油菜黄籽性状的优异种质资源^[13-14]。前人将大黄油菜黄籽基因*Brsc1* 定位于 A9 染色体上特定区段,但标记数目有限,图谱饱和度不够。本研究在前人研究的基础上,进一步扩大作图群体,结合分离体分组混合分析法(bulked segregant analysis,BSA 法),在*Brsc1* 所在染色体区段筛选新的与*Brsc1* 连锁更为紧密的 SSR 标记,增加与*Brsc1* 基因紧密连锁标记的数目,提高*Brsc1* 遗传连锁图谱的标记密度,为大黄油菜黄籽基因的克隆创造条件。同时,检测所获 SSR 标记是否为共显性标记,用于大黄油菜分子标记辅助选择育种体系的建立。

1 材料与方法

1.1 试验材料和群体构建

本研究所用亲本材料为青海大黄油菜和一个白菜型油菜褐籽品系(编号 09A-126),由青海省农林科学院春油菜研究所提供。两亲本均已连续自交或兄妹交 8 代以上,其种皮颜色性状均可稳定遗传。以大黄油菜为母本,09A-126 为父本,F₁ 代与大黄油菜回交,构建 BC₁ 群体,作为定位群体;F₁ 同时自交,获得 F₂ 群体,F₂ 中每一单株套袋自交获得 F_{2,3} 家系,用于与目标基因连锁的共显性标记的筛选。

1.2 DNA 提取和性状调查分组

油菜苗期,采用 CTAB 法提取叶片总 DNA^[15]。测定每份 DNA 溶液的浓度,稀释至 50 ng/μL,-20℃ 下保存备用。

油菜果角完全成熟后,分单株收获,晾干后考种。通过肉眼观察,考查每一单株的种皮颜色。根据考查结果,将 BC₁ 群体单株分为黄籽和褐籽两组。随机选取 12 个黄籽单株和 12 个褐籽单株,将单株 DNA 等量混合,分别构建两个黄籽基因池和两个褐籽基因池。根据 F₂ 群体中各单株的种皮颜色性状,将 F₂ 群体首先分为黄籽和褐籽两组,再根据 F_{2,3} 家系性状,将 F₂ 群体中的褐籽单株分为纯合褐籽(性状不分离)

和杂合褐籽(性状分离)两组,最终将 F₂ 群体分为黄籽、杂合褐籽和纯合褐籽 3 组。

1.3 SSR 标记开发与检测

根据前人的研究结果,*Brsc1* 被定位在白菜型油菜 A9 染色体上的一段 2.8 Mb 的区间内。从 BRAD 数据库(<http://brassicadb.org/brad/>)下载*Brsc1* 所在区间的序列信息,利用 SSRHunter 1.3 软件,进行微卫星筛选。然后利用 Primer 3 软件设计 SSR 引物(<http://frodo.wi.mit.edu/>)。同时利用 BRAD 数据库中*Brsc1* 所在区间内已有的 SSR 标记在我们的定位群体中进行多态性分析^[16-19]。SSR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。SSR 扩增反应参照梅德圣等的方法^[20]。扩增产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离检测。SSR 引物首先在 2 对基因池中进行检测,表现为多态性的引物继续在 BC₁ 分离群体的单株中进一步进行分析,若仍然表现多态性,则确定为与*Brsc1* 基因紧密连锁的标记。获得的特异 SSR 引物同时用 F₂ 群体中的单株进行检测,以确定其是否为共显性标记。

1.4 SSR 标记遗传图谱和物理图谱的构建

特异性 SSR 标记在 BC₁ 分离群体中进行重组单株的筛选,计算重组率,利用 Kosamabi 函数转换为遗传距离^[21]。利用 MAPMAKER/EXP3.0 软件,构建*Brsc1* 的 SSR 标记遗传图谱,并利用 MapDraw V2.1 作图软件进行遗传图谱和物理图谱的绘制^[22]。

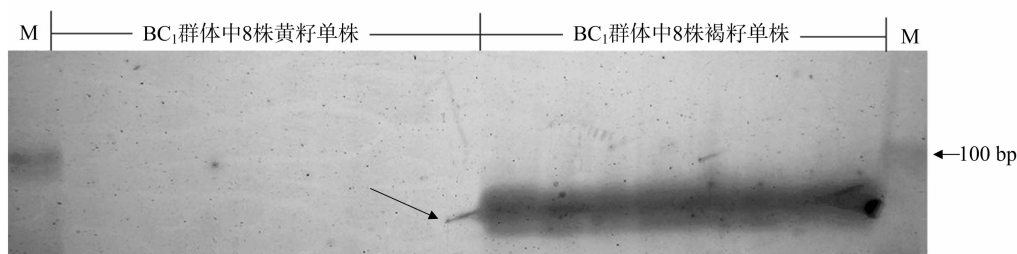
2 结果与分析

2.1 SSR 标记开发与筛选结果

前人将*Brsc1* 定位于 A9 染色体上 Y06(19.3 Mb)和 Y10(22.1 Mb)之间 2.8 Mb 的区间内。从 BRAD 数据库下载该区间部分序列,用于 SSR 引物的设计,并下载该区间已公布的 SSR 标记。用黄籽/褐籽基因池和 BC₁ 分离群体单株进行检测,共获得 5 个与*Brsc1* 紧密连锁的特异性 SSR 标记:*A-11-65*、*A-11-145*、*B-6-32*、*BrID10607* 和 *KS10760*,引物序列信息见表 1。各特异性引物扩增产物在 6% 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,条带多态性明显,带型清晰稳定,图 1 和图 2 所示分别为引物 BrID10607 和 KS10760 扩增结果。同时,5 个特异性 SSR 标记对 F₂ 群体中的单株进行扫描,结果显示,*A-11-65* 为共显性标记,能够区分黄籽、杂合褐籽和纯合褐籽单株(图 3)。

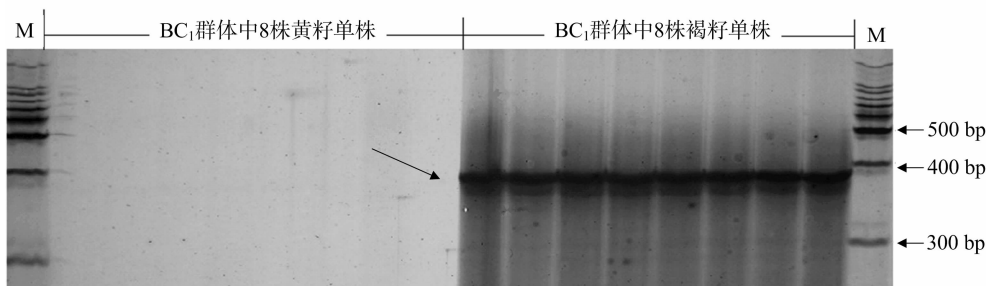
表 1 与青海大黄油菜黄籽基因*Brsc1* 紧密连锁的 SSR 标记

SSR 标记	引物名称	引物序列(5'→3')	遗传距离(cM)	物理位置(Mb)
<i>A-11-65</i>	<i>A-11-65F</i>	CCTCTGAACAAGATGTCCG	0.008 0	21.9
	<i>A-11-65R</i>	CCAGATCAGAAGCAACG		
<i>A-11-145</i>	<i>A-11-145F</i>	TCGAGCAAGAAGCCAAGC	0.007 5	21.8
	<i>A-11-145R</i>	GCGTAATCCAGTCCTACATTCC		
<i>B-6-32</i>	<i>B-6-32F</i>	AGAGCTTGTAGGTGCAGATG	0.006 3	21.2
	<i>B-6-32R</i>	GCCGTGAGACAGAGAGTATC		
<i>BrID10607</i>	<i>BrID10607F</i>	GTGTGATAAACTGAAACGG	0.006 3	21.3
	<i>BrID10607R</i>	TGAGCAGAGCACACGTCTA		
<i>KS10760</i>	<i>KS10760FA-11-145</i>	TAGCAGTGGCCTACTCCTTG	0.005 7	21.0
	<i>KS10760RB-6-32</i>	CAGCATTTGTGATGTGTCAGG		



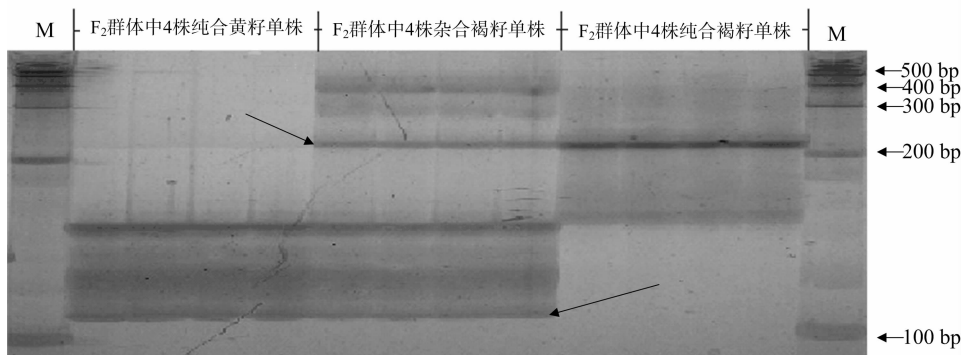
图中小箭头所示为能够区分 2 种单株的特异性条带；M—100 bp ladder DNA marker

图1 SSR引物BrID10607的PCR扩增产物在6%聚丙烯酰胺凝胶上的电泳检测结果



注同图1

图2 SSR引物KS10760的PCR扩增产物在6%聚丙烯酰胺凝胶上的电泳检测结果



图中两箭头所示即为能够区分不同基因型植株的特异性条带；M—100 bp ladder DNA marker

图3 共显性SSR引物A-11-65的PCR扩增产物在6%聚丙烯酰胺凝胶上的电泳检测结果

2.2 SSR 标记遗传连锁图谱和物理图谱的构建

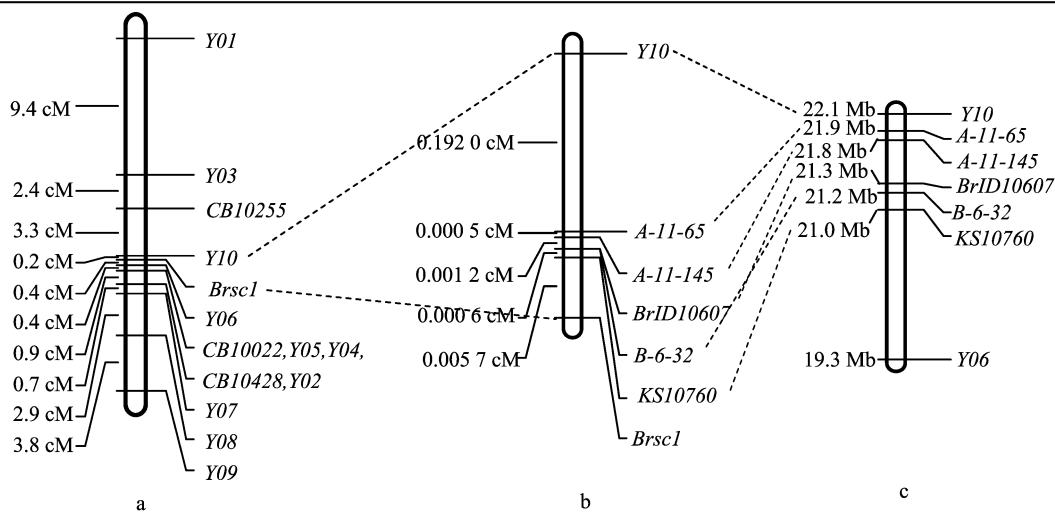
本研究所构建 BC_1 作图分离群体包含 1 740 个单株,6 个与 *Brsc1* 表现连锁的 SSR 标记在 BC_1 群体中进行重组单株的筛选,计算重组率,确定各连锁标记与 *Brsc1* 之间的遗传距离(表 1)。将 6 个 SSR 标记与前人对 *Brsc1* 的定位结果进行比较和整合,构建 *Brsc1* 的遗传连锁图谱(图 4)。各连锁 SSR 标记的物理位置见表 1,使用作图软件绘制其物理图谱(图 4)。新开发的 6 个 SSR 连锁标记位于 *Brsc1* 同侧,与 *Brsc1* 间的平均遗传距离为 0.012 2,连锁紧密。新开发的 SSR 标记覆盖染色体上 0.9 Mb 的长度,图谱标记密度进一步增加。

3 讨论

与前人所获得的分子标记相比,本研究筛选得到的 5 个与目标基因 *Brsc1* 紧密连锁的 SSR 标记与 *Brsc1* 之间的遗传距离进一步缩短,最近的标记为 *KS10760* (0.005 7 cM)。将新获得的 SSR 标记与前人研究所得 *Brsc1* 的遗传连锁图谱进行整合,图谱标记密度进一步增加。高密度的遗传图谱是实现 *Brsc1* 图位克隆的关键。新开发的 SSR 标记位于 *Brsc1* 同

侧,要实现 *Brsc1* 的克隆,在 *Brsc1* 另一侧还须开发更多与 *Brsc1* 距离更近的分子标记,将 *Brsc1* 锁定于更小的范围内。本研究所用作图分离群体较前人有所扩大,作图群体的扩大使连锁标记与目标基因之间的遗传距离测算更为准确,图谱精度进一步提高,且为连锁更紧密的分子标记的开发创造了条件。

Xiao 等所得与 *Brsc1* 紧密连锁的 SSR 标记,距离最近的为 *CB10022* (0.8 cM),本研究新开发的 SSR 标记不但与 *Brsc1* 之间遗传距离大大缩短,而且得到一个共显性标记 *A-11-65* (0.008 0 cM)。由于 SSR 标记具有操作简单,重复性好,成本较低等优点,因此被广泛应用于分子标记辅助选择育种。本研究所得到的 SSR 标记,不但与 *Brsc1* 连锁紧密,而且扩增条带清晰稳定,尤其是共显性标记的获得,能较准确地区分不同基因型的单株,因此很适用于建立白菜型黄籽油菜分子标记辅助选择育种体系。不足之处在于没有筛选到与 *Brsc1* 共分离的 SSR 标记,SSR 连锁标记的数目也不够多,为提高分子标记辅助选择的准确率,还需要开发更多与 *Brsc1* 紧密连锁的分子标记。



a: Xiao 等所构建 *Brsc1* 的遗传连锁图谱, 目标基因 *Brsc1* 位于 Y06 和 Y10 之间; b: *Brsc1* 的 SSR 标记遗传连锁图谱, 新开发的 SSR 标记位于 Y10 和 *Brsc1* 之间; c: SSR 标记的物理图谱, 新开发的 SSR 标记位于 Y10 和 Y06 之间

图4 与 *Brsc1* 连锁的 SSR 标记的遗传图谱和物理图谱

本研究利用新开发的 SSR 标记进行遗传图谱构建, 这些标记是根据目标基因所在特定区段的序列信息进行开发的。随着基因测序技术的发展, 植物基因组序列信息数据库的不断完善, 通过搜索数据库序列信息开发 SSR 引物越来越普遍。利用该方法进行目标基因的定位, 目的性强, 可快速筛选出与目标基因连锁的分子标记。但该方法需要以一定的定位结果为基础, 并且需将目标基因锁定于较小的区段内, 否则会会增加 SSR 标记开发和筛选的难度。该方法还可用于开发 SCAR、IP 标记等, 适用于目标基因的精细定位。

参考文献:

- [1] 刘后利. 油菜遗传育种学 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 215 - 225.
- [2] 高永同. 黄籽油菜的遗传和育种研究进展 [J]. 中国油料, 1984 (3): 89 - 93, 96.
- [3] 李爱民, 张永泰, 蒋金金, 等. 芸苔属主要油料作物黄籽性状分子遗传研究进展 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 407 - 412.
- [5] 闫其涛, 逯慧, 毛万霞, 等. 植物基因分离的图位克隆技术 [J]. 分子植物育种, 2005, 3(4): 585 - 590.
- [6] 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(5): 839 - 847.
- [7] 刘雪平, 涂金星, 陈宝元, 等. 甘蓝型黄籽油菜研究进展 [J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(2): 87 - 91.
- [8] Chen B Y, Jergensen R B, Cheng B F, et al. Identification and chromosomal assignment of RAPD markers linked with a gene for seed colour in a *Brassica campestris* - *alboglabra* addition line [J]. Hereditas, 1997, 126(2): 133 - 138.
- [9] Rahman M, McVetty P B, Li G. Development of SRAP, SNP and multiplexed SCAR molecular markers for the major seed coat color gene in *Brassica rapa* L. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115 (8): 1101 - 1107.
- [10] Zhang J, Lu Y, Yuan Y, et al. Map - based cloning and characterization of a gene controlling hairiness and seed coat color traits in *Brassica rapa* [J]. Plant Molecular Biology, 2009, 69(5): 553 - 563.
- [11] Kebede B, Cheema K, Greenshields D L, et al. Construction of genetic linkage map and mapping of QTL for seed color in *Brassica rapa* [J]. Genome, 2012, 55(12): 813 - 823.
- [12] Xiao L, Zhao Z, Du D, et al. Genetic characterization and fine mapping of a yellow - seeded gene in Dahuang (a *Brassica rapa* landrace) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2012, 124(5): 903 - 909.
- [13] 罗玉秀, 杜德志. 青海大黄油菜主要农艺性状研究 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(1): 136 - 139.
- [14] 罗玉秀. 青海白菜型大黄油菜优良特性的研究 [D]. 西宁: 青海农林科学院, 2007.
- [15] Doyle J J, Doyle J I. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Bull, 1987, 19: 11 - 15.
- [16] Cheng X, Xu J, Xia S, et al. Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus* [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 118(6): 1121 - 1131.
- [17] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, et al. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 106(6): 1091 - 1101.
- [18] Iniguez - Luy F L, Voort A V, Osborn T C. Development of a set of public SSR markers derived from genomic sequence of a rapid cycling *Brassica oleracea* L. genotype [J]. Theoretical and Applied Genetics Theoretische und Angewandte Genetik, 2008, 117(6): 977 - 985.
- [19] 李霞. 人工合成甘蓝型黄籽油菜粒色基因的精细定位 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
- [20] 梅德圣, 李云昌, 王汉中, 等. 甘蓝型油菜渝黄 1 号黄籽性状的 AFLP 和 SSR 标记 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(3): 6 - 9.
- [21] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. Annals of Human Genetics, 1943, 12(1): 172 - 175.
- [22] 刘仁虎, 孟金陵. MapDraw 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏 [J]. 遗传, 2003, 25(3): 317 - 321.