

# 甘蓝型黄籽油菜分子标记辅助选择的效果分析

刘志文<sup>1,2</sup>, 王 英<sup>1</sup>, 刘雪平<sup>2</sup>, 傅廷栋<sup>2</sup>, 薛永常<sup>1</sup>, 涂金星<sup>2</sup>, 马朝芝<sup>2</sup>

(1. 大连轻工业学院 生物与食品工程学院, 辽宁 大连 116034;

2. 华中农业大学 作物遗传改良国家重点实验室, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**应用分子标记辅助选择的方法,将黄籽性状导入到波里马恢复系中,利用杂种优势,将是提高油菜产量的理想途径。分析了分子标记辅助选择甘蓝型黄籽油菜的前景和背景选择的效果,结果表明,在背景选择中,7种不同RAPD引物数目组合方式的选择结果基本一致;应用少数连锁群上的标记可以获得与全基因组相似的选择结果。在前景选择中,随着世代的增加,每一个标记的选择准确率在降低;双侧标记的选择准确率比单侧的标记高,此外,多个单侧标记未能提高选择准确率。据此,提出了作物前景和背景选择过程中的一些改进策略。

**关键词:**甘蓝型黄籽油菜;分子标记;前景选择;背景选择

**中图分类号:**S634.301 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2006)02-0057-05

## The Effects Analysis of Molecular Marker-assisted Selection in Yellow-seeded *Brassica napus*

LIU Zhi-wen<sup>1,2</sup>, WANG Ying<sup>1</sup>, LIU Xue-ping<sup>2</sup>, FU Ting-dong<sup>2</sup>,

XUE Yong-chang<sup>1</sup>, TU Jin-xing<sup>2</sup>, MA Chao-zhi<sup>2</sup>

(1. College of Bio & Food Technology, Dalian Institute of Light Industry, Dalian 116034, China;

2. National Key Lab of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstract:** To transfer the yellow-seeded gene into Pol cms restorer lines and utilize heterosis using molecular marker-assisted selection (MAS) would be an ideal approach to increase the rapeseed oil yield. This paper analyzed the effects of the back and foreground selection in yellow-seeded *Brassica napus*, the results showed that the selection results of 7 different RAPD primer combinations are identical and selection by a limited linkage groups can get the whole genome similar effect in background selection. During foreground selection program, it demonstrated that the selection efficiency of each marker would decrease with generation and the unilateral markers can't increase the efficiency with number, moreover, flanked markers can attain higher efficiency than unilateral markers. As a result, we proposed some improved strategies for back and foreground selection in crop MAS.

**Key words:** Yellow-seeded *Brassica napus*; Molecular marker; Background selection; Foreground selection

甘蓝型黄籽油菜具有种皮薄、含油量和蛋白质含量高等一系列优点<sup>[1,2]</sup>,因此,选育甘蓝型黄籽油菜成为提高种子含油量的一个重要途径,成了当前油菜育种的主要目标之一。以前黄籽油菜育种进展缓慢,除了因为黄籽遗传复杂、多基因遗传模式、多为隐性遗传、表达受环境影响较大外,另外一个重要原因是缺少优良和稳定的甘蓝型黄籽资源。No.2127-17是一个优良黄籽基因资源(单基因控制,

部分显性),利用潜力大,特别是在将其与杂种优势利用结合起来将更具特色<sup>[3]</sup>。传统育种方法通过表现型间接对基因型进行选择,受到许多条件限制,如基因表达的时空性、环境条件影响、其他非目标基因的互作等,使得选育甘蓝型黄籽品种费时、费力、耗钱,易受到环境影响,效率较低。而分子标记辅助选择(MAS)可在任何生长期进行,不受环境条件影响,可排除非等位基因相互作用而造成的干扰,具有快

收稿日期:2005-09-28

基金项目:国家“973”项目(2001CB108);辽宁省教育厅项目(05L075)

作者简介:刘志文(1972-),男,湖北罗田人,博士,副教授,主要从事甘蓝型黄籽油菜的育种和分子生物学研究工作;傅廷栋为通讯作者。

速、经济、效率高、准确性强等优点,它包括对目标基因的跟踪即前景选择和对遗传背景的选择。背景选择可加快遗传背景恢复速度,缩短育种年限和减轻连锁累赘的作用。MAS 在水稻,玉米,小麦、棉花等作物中均有成功报道<sup>[4~10]</sup>,但在油菜中应用并不多<sup>[11]</sup>。

此前我们筛选到了大量甘蓝型黄籽油菜多态性标记,鉴定和发展了一批与黄籽油菜 No.2127-17 的黄籽基因连锁的 PCR 标记<sup>[4]</sup>,因此,可以以其为基因供体进行黄籽 MAS 选育,将黄籽基因回交转到波里马恢复系中。本研究主要分析了甘蓝型黄籽油菜 MAS 的效果,据此提出一些改进对策,以期降低 MAS 的应用成本。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

供体亲本为人工合成甘蓝型黄籽品系 No.2127-17,由陈宝元教授提供。轮回亲本是黑子品种恢 5148-2,为华中农业大学油菜研究室选育的优良波里马恢复系。恢 5148-2 × No.2127-17 经小孢子培养而来的 DH 系,以及用恢 5148-2 回交的 2 个回交和 1 个自交群体。

### 1.2 DNA 抽提

苗期提取亲本恢 5148-2, No.2127-17 及 DH 系的总 DNA,提取及纯化参照李佳等<sup>[12]</sup>的大量 SDS 法,并略作修改,总 DNA 质量用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测,总 DNA 浓度用紫外分光光度计(Pharmacia Biotech, GeneQuant II)测量。将各样品的 DNA 浓度用灭菌双蒸水(ddH<sub>2</sub>O)调整到 25 ng/μL, -20℃ 保存备用。

回交和自交世代中的各单株 DNA 用小量法提取,具体的过程是:在苗期取 0.1~0.2 g 油菜幼嫩干净叶片于 1.5 mL 离心管中,加 0.5 mL Extraction buffer,捣成匀浆,再用 0.5 mL Extraction buffer 冲洗并混匀;55~60℃ 水浴 45 min,并不时轻轻摇动;冷却至室温,13 000 r/min 离心 10 min,取上清液,加 3~5 μL 10 ng/μL RNase,37℃ 水浴 3~5 h;加等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)充分混匀,13 000 r/min 离心 10 min 取上清液,重复此步骤 1 次;转移上清液,用约 2 倍体积无水乙醇(或异丙醇),-20℃ 过夜析出 DNA;用枪头轻轻挑起或 10 000 r/min 离心 3 min 沉淀 DNA,70% 乙醇(含 5 mmol/L NH<sub>4</sub>AC)浸泡 5 h;除去乙醇,彻底干燥 DNA,加 300 μL ddH<sub>2</sub>O/TE

buffer 溶解 DNA, -20℃ 保存备用。PCR 扩增时,取 1~1.5 μL 直接用作 DNA 模板。

### 1.3 RAPD 分析

反应体系如下:1 × PCR buffer, 1.35 mmol/L Mg-Cl<sub>2</sub>, 0.08 mmol/L dNTPs, 1.0 U Taq polymerase(四者均为 MBI Fermentas, Lithuania, 下同), 0.45 μmol/L 10-mer RAPD Primer(上海生物工程有限公司), 50 ng DNA 模板,加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积 20 μL。热循环参数为:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 40℃ 45 s, 72℃ 60 s, 38 cycles; 72℃ 10 min, 4℃ 保存。反应于 PTC-225 扩增仪(MJ Research, USA)上进行。扩增产物在 1 × TAE 缓冲液、1.2% 琼脂糖凝胶(含 EB)上电泳分离,电泳完毕,于凝胶成像系统(UVP)拍照保存,记录多态性结果。

### 1.4 SCAR 和 CAPS 分析

SCAR-PCR 反应体系:1 × PCR buffer, 1.35 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.08 mmol/L dNTPs, 1.0 U Taq polymerase, 50 ng DNA, 0.45 μmol/L 正反向引物(Forward, Reverse), ddH<sub>2</sub>O 补充至终体积 20 μL。热循环参数为:94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 64℃ 45 s, 72℃ 60 s, 38 cycles; 72℃ 10 min, 1 cycle; 4℃ 保存,反应在 PTC-225 PCR 仪上完成。

CAPS 酶切分析体系为:10 μL SCAR-PCR products, 1.5 μL 10 × digested buffer, 1.5 U Restrict enzyme(MBI Fermentas, Lithuania), ddH<sub>2</sub>O 补充至终体积 15 μL, 37℃ 酶切 3~6 h。SCAR 和 CAPS 的电泳分析同 RAPD 分析。

### 1.5 数据统计和分析

每个单株根据带型有无分别赋值为 1 和 0。按 Nei 和 Li<sup>[13]</sup>的方法计算各材料与恢 5148-2 的相似系数和遗传距离:遗传相似系  $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$ , 其中  $N_i$ 、 $N_j$  分别为材料  $i$  与材料  $j$  中扩增片段数目,  $N_{ij}$  是为材料  $i$  和材料  $j$  共有扩增片段数目。遗传距离  $GD = -\ln(GS)$ 。相似性分析采用 UPGMA(Unweighted pair group with arithmetic average, 算术平均数非加权类平均法)方法进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 背景选择分析

2.1.1 全部 RAPD 引物的选择结果 油菜成熟后,收获各 DH 系,室内进行种皮颜色分析,结合品质分析,从中选出 12 个黄色级别在 1 级、种子饱满、粒大、品质较好的 DH 系,进行遗传背景与恢 5148-2 的

相似性分析。

本试验设计为定位和育种同步进行,背景选择中的分子标记筛选与此前黄籽基因定位同时进行。在 240 条 RAPD 多态性引物中,选用多态性最好的 142 条,对双亲和上述 12 个 DH 系进行 PCR 分析,结果显示,共扩增出 830 条带,多态性带 314 条,平均每引物扩增 2.2 条多态带(图 1)。以这 314 条多态带为数据计算遗传距离,进行聚类分析,筛选出 2 个与恢 5148-2 遗传距离最小的 DH 系 DH21 和 DH146(表 1),田间观察发现这 2 个 DH 系表现与恢 5148-2 最相似,与背景选择结果相一致。

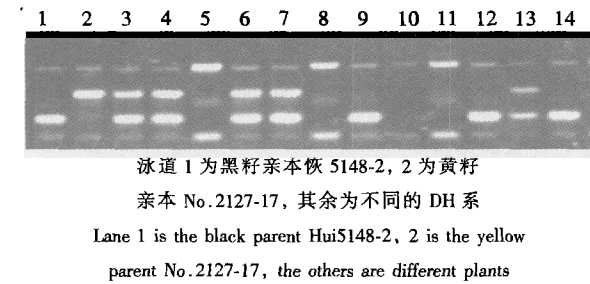


图 1 引物 S86 在 DH 群体中的背景选择效果

Fig. 1 The results of S86 screening in the DH lines

2.1.2 不同引物数目和组合方式的选择效果分析

对这 142 条引物进行不同方式的组合,分别设置方法 1,2,3,4,5:全部 142 条引物、142 条中随机选择 30,60, 90,120 条引物。刘雪平等<sup>[14]</sup>以 No.2127-17

为亲本之一的 DH 群体构建了一张包含有 97 个 RAPD 标记的 19 个连锁群的遗传图谱,每一连锁群上有 1~16 个 RAPD 标记(LG11 除外),有 5 个主连锁群,与本试验相同的引物共有 43 条,并分别分布在 18 个连锁群上,据此结果我们又分别设置方法 6,7:18 个连锁群上,每一连锁群选择 1~2 条引物共 30 条引物;5 个主连锁群上,所有共有的 22 条引物组合在一起。

7 种方法分别扩增 314,69,115,200,254,66,43 条多态性带,以上述 7 组数据进行聚类分析,计算遗传距离。从表 1 结果可以看出,7 种不同引物数目的组合方式的选择结果基本一致,处在前列(前 5 位)材料基本上每种方法均准确选出,只是排列顺序略有不同;方法 6 和 7 的结果表明,少数连锁群(5 个)上的标记可以获得与全基因组相似的选择结果。这给我们一个启示:背景选择的准确性并不取决于标记的多少,少的标记同样也可以获得较好的选择结果,而且没有必要追求均匀分布于整个基因组的标记进行背景选择,这样可以采用逐步选择法,即随机选取部分引物对初始群体进行初选,淘汰与轮回亲本距离较远的部分材料,再增加不同引物,对剩下材料进一步分析,选出最佳单株,这样可大大减少工作量,节约成本。

表 1 不同的引物组合选择方法的结果比较

Tab.1 Comparison of the selection results by different primer combinations														
排列顺序 Order	方法 1		方法 2		方法 3		方法 4		方法 5		方法 6		方法 7	
	Method 1		Method 2		Method 3		Method 4		Method 5		Method 6		Method 7	
	ID	GD	ID	GD	ID	GD	ID	GD	ID	GD	ID	GD	ID	GD
1	146	0.4329	146	0.3463	146	0.3629	146	0.4533	146	0.3652	146	0.3441	21	0.3483
2	21	0.5022	21	0.4447	21	0.4353	21	0.5008	21	0.4722	21	0.4055	146	0.4463
3	95	0.5284	95	0.4574	95	0.4875	95	0.5021	95	0.5341	95	0.4726	95	0.4906
4	104	0.5667	104	0.5108	104	0.5131	104	0.5705	144	0.5708	104	0.5147	104	0.5046
5	144	0.6169	137	0.5232	137	0.5242	144	0.6165	104	0.5738	137	0.5408	118	0.5261
6	137	0.6294	144	0.5853	118	0.5459	118	0.6311	24	0.6125	90	0.5596	144	0.5306
7	85	0.6424	24	0.6806	24	0.6113	45	0.6710	85	0.6206	144	0.6549	24	0.6721
8	118	0.6444	160	0.6806	90	0.6267	137	0.6835	137	0.6266	118	0.6931	137	0.7156
9	45	0.6643	118	0.6817	144	0.6267	85	0.7156	118	0.6427	160	0.6931	45	0.7340
10	90	0.6696	85	0.7777	45	0.7082	90	0.7211	45	0.6470	85	0.7363	160	0.7802
11	24	0.6747	45	0.8044	160	0.7087	24	0.7489	90	0.6671	45	0.7911	85	0.8210
12	160	0.8535	90	0.8650	85	0.7163	160	0.8085	160	0.8435	24	0.8247	90	0.8544
13	706	1.0704	706	0.9985	706	1.1314	706	0.9892	706	1.1553	706	0.9719	706	1.1896

注:ID 单株;GD 遗传距离;表中数值均为各个材料与恢 5148-2 之间的遗传距离

Note:ID Individual;GD Genetics distance;The values listed in table are the genetics distances between the different individuals and the Hui5148-2

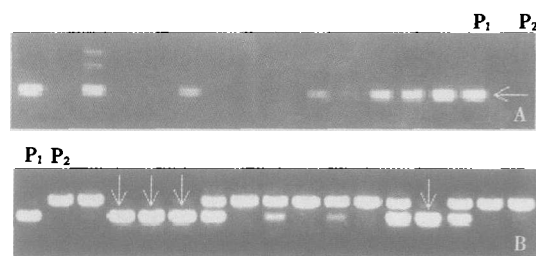
2.2 前景选择分析比较

本试验所用的前景选择(黄籽基因的跟踪)分子标记分别为 RAPD 标记 S1129, S1130, SCAR 标记 SCS1130, CAPS 标记 SCA1,其中 SCS1130 是由 S1130

发展而来, S1129, S1130 和 SCS1130 与 SCA1 分别处于黄籽基因的两侧,遗传图距列于表 2。

根据田间表型的鉴定结果,4 个标记在不同世代中的选择结果(图 2 和表 2)表明,随着世代的增

加,每一个标记的选择准确率在降低。以 SCA1 为例,在 3 个世代中的错选率分别为 5.10%,5.83% 和 6.12%。在 2 个回交世代中,同侧标记 S1129,S1130 和 SCS1130 的同时应用并未提高选择的正确率,并且以遗传图距最小的 SCS1130 的准确率最高,错选率分别为 4.25% 和 5.83%,表明标记与目标基因的遗传图距越小,其选择的准确率越高。当在  $BC_1F_1$ ,  $BC_2F_1$  中使用双侧标记 SCS1130 和 SCA1 时,分别仅有 2 和 1 株错选,错选率分别降到了 0.57% 和 0.45%,表明双侧标记的选择准确率明显高于单侧标记。由 RAPD 标记发展而来的 SCAR 标记 SCS1130 的准确率高原标记 S1130,表明 SCAR 标记的选择效果会更好。此外,共显性的 SCA1 标记能较好的区分各个世代的后代纯合与否(图 2)。



P<sub>1</sub> 为 No.2127-17, P<sub>2</sub> 为恢 5148-2, 其余为不同的单株,  
箭头所示为黄籽单株的特异带(A)和纯合黄籽单株(B)  
P<sub>1</sub> is No.2127-17, P<sub>2</sub> is Hui5148-2, the others are different plants,  
the arrows indicate the yellow-specific polymorphic fragment  
(A) and the homozygous plants (B)

图 2 SCS1130 在  $BC_2F_1$  群体(A)和 SCA1 在  $BC_2F_2$  群体(B)中的部分单株前景选择的效果

Fig.2 Amplification patterns generated by SCS1130 in the partial  $BC_2F_1$  individuals (A) and SCA1 in  $BC_2F_2$  individuals (B) respectively

表 2 各标记对各世代的选择准确性比较

Tab.2 The accuracy comparison of the markers in different generations

世代 Generation	标记 Markers		纯合黄籽单株 Homo-YY		杂合黄籽单株 Hetero-Yy			纯合黑子单株 Homo-yy			错选率 (%)	双交换 (%)
	名称 Name	遗传图距(cM) Map distance	+	-	-	+	-	+	-	+	Misclassi- fication	Double cross
BC <sub>1</sub> F <sub>1</sub>	S1129	4.7			8	161		14	170		6.23	
	S1130	3.9			8	161		9	175		4.82	
	SCS1130	3.2			6	163		9	175		4.25	0.57
	SCA1	3.9				161	8	2	174	8	5.10	
BC <sub>2</sub> F <sub>1</sub>	S1129	4.7			6	99		10	108		7.17	
	S1130	3.9			5	100		9	109		6.27	
	SCS1130	3.2			5	100		8	110		5.83	0.45
	SCA1	3.9				98	7	1	112	5	5.83	
BC <sub>2</sub> F <sub>2</sub>	SCA1	3.9	9	0		22	1		15	2	6.12	

注: + / - ,特异带的有无 Note: Presence/absence of the specific fragment

### 3 讨论

利用 MAS,将分子标记技术与回交育种相结合,可以快速地将与分子标记连锁基因转移到另一个品种中,改良某个特定性状,提高育种效率和缩短年限。MAS 中前景选择的准确性主要取决于标记与目标基因的连锁强度,标记与基因连锁得愈紧密,依据标记进行选择的可可靠性就愈高。因此在实际应用中,优先考虑选择 2 个位于基因两侧最近分子标记,这样不仅可以提高准确率,而且可以增加中选个体与受体亲本遗传背景同质性,即使标记遗传图距较大也会比单侧选择有效。在没有双侧标记时,用一个最近的标记即可,多个标记使用对提高准确性并没有起作用,反而增加成本。本研究 and 潘海军

等<sup>[15]</sup>结果清楚地表明这一点。

背景选择的对象是作物的整个基因组,因此应有一张完整的分子标记连锁图,知道每条染色体的组成及标记在染色体上的分布和覆盖程度。在油菜中,尚未有覆盖整个基因组并与染色体对应的遗传图谱,很难做到像水稻那样,在每一条染色体上选取均匀分布的少数标记进行背景选择。段红梅等<sup>[16]</sup>对大豆 MAS 效果分析表明,不同组合方式的 20 条 SSR 引物与全部 51 条引物选出各株系的遗传背景回复率数值不同,排序有差别,但是选择到相同株系比例较高,同时发现随着引物增加,遗传背景回复率的相关程度也在增加,用 40 条引物几乎可得到 51 条相同选择效果。夏军红等<sup>[6]</sup>对玉米研究表明,绝大多数染色体与基因组遗传背景回复率的偏相关达

显著水平,对有限数目染色体(一条或多条)进行背景选择可以达到对整个基因组选择类似结果,并比较 AFLP 和 SSR 两种标记背景选择的相关性,发现达显著水平,结果具有同一性。因此背景选择时,尽可能地优先选用均匀分布在连锁群或者染色体上的标记,每一轮采用逐步选择法,用少数引物淘汰部分初始群体中不符合的材料,再对遗传背景回复率较高剩余材料增加标记进一步精确分析,下一个世代对已恢复为轮回亲本的位点可不再选择,最终仍可选到最佳株系,大大减少工作量,提高选择效率,节约成本。此外,对不同世代的背景选择只需选用一种标记类型进行即可。在甘蓝型黄籽油菜 MAS 中,BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 仅随机选用 RAPD 标记,在 BC<sub>2</sub>F<sub>1</sub> 则换成 AFLP,取得了较好育种结果,也证明了上述的结论。

#### 参考文献:

- [1] Jansson R. Breeding of improved oil and meal quality in rape (*Brassica napus*) and turnip rape (*Brassica campestris*) [J]. *Hereditas*, 1977, 85: 205 - 218.
- [2] 刘后利. 甘蓝型黄籽油菜的遗传研究 [J]. *作物学报*, 1992, 18 (4): 241 - 249.
- [3] Liu Z W, Fu T D, Tu J X, *et al.* Inheritance of seed colour and identification of RAPD and AFLP markers linked to the seed colour gene in rapeseed (*Brassica napus* L.) [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 110(2): 303 - 310.
- [4] Singh J, Sidhu S, Huang N, *et al.* Pyramiding three bacterial blight resistance genes (*xa5*, *xa13*, *Xa21*) using marker-assisted selection [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 102: 1011 - 1015.
- [5] Zhou P, Tan Y, He Y, *et al.* Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice by molecular marker-assisted selection [J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 326 - 331.
- [6] 夏军红, 郑用琰. 玉米恢复系的分子标记辅助回交选育与效益分析 [J]. *作物学报*, 2002, 28 (30): 339 - 344.
- [7] 梁荣奇, 张义荣, 姚大年, 等. 小麦淀粉品质改良的综合标记辅助选择体系的建立 [J]. *中国农业科学*, 2002, 35 (3): 245 - 249.
- [8] Dholakia B B, Ammiraju S S, Lagu M D, *et al.* Molecular marker analysis of kernel size and shape in bread wheat [J]. *Plant Breeding*, 2003, 122 (5): 392 - 397.
- [9] Zhou W C, Kolb F L, Bai G H, *et al.* Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat [J]. *Plant Breeding*, 2003, 122 (1): 40 - 44.
- [10] 柳李旺, 朱协飞, 郭旺珍, 等. 分子标记辅助选择聚合棉花 *Rf1* 育性恢复基因和抗虫 *Bt* 基因 [J]. *分子植物育种*, 2003, 1 (1): 48 - 52.
- [11] Hansen M, Hallden C, Nilsson N O, *et al.* Marker-assisted selection of restored male-fertile *Brassica napus* plants using a set of dominant RAPD markers [J]. *Molecular Breeding*, 1997, 3: 449 - 456.
- [12] 李 佳, 沈斌章, 韩继祥, 等. 一种有效提取油菜叶片总 DNA 的方法 [J]. *华中农业大学学报*, 1994, 13(5): 521 - 523.
- [13] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76(1): 269 - 573.
- [14] Liu X P, Tu J X, Liu Z W, *et al.* Construction a linkage map with molecular makers and using it to analyze QTL for erucic acids in *Brassica napus* [J]. *Acta Agro Sinica*, 2005, 31(3): 275 - 282.
- [15] 段红梅, 王文秀, 常汝镇. 大豆 SSR 标记辅助遗传背景选择的效果分析 [J]. *植物遗传资源学报*, 2003, 4 (1): 36 - 42.
- [16] 潘海军, 王春连, 赵开军, 等. 水稻抗白叶枯病基因 *Xa23* 的 PCR 分子标记定位及辅助选择 [J]. *作物学报*, 2003, 29(4): 501 - 504.