

与大白菜质地品质连锁的 RAPD 标记

吴春燕^{1,2}, 宋廷宇¹, 何启伟³, 邓永林⁴, 王翠花³, 徐文玲³

(1. 吉林农业大学 园艺学院, 吉林 长春 130118; 2. 山东农业大学 园艺学院, 山东 泰安 271018;

3. 山东省农业科学院 蔬菜研究所, 山东 济南 250100; 4. 山东登海种业股份有限公司西由种子分公司, 山东 莱州 261418)

摘要:利用 F_2 分离世代和 BSA 法对与大白菜易嚼烂程度连锁的分子标记进行了研究, 筛选到了与大白菜易嚼烂程度连锁的 RAPD 标记 OPA06₁₄₀₀, 其遗传距离为 24.8 cM。

关键词:大白菜; 质地品质; BSA; RAPD

中图分类号:S 634.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0148-03

大白菜的品质包括商品品质、营养品质及风味品质。在风味品质中, 风味和质地是关键指标, 其它指标是通过风味、质地对感官产生影响^[1-2]。质地是一个综合复杂的物理属性, 不仅取决于视觉, 还包括口感在内的触觉以及取决于这些感觉的综合反应^[3]。如大白菜的甜味、鲜味、易煮烂/易嚼烂程度等。目前, 对于大白菜质地品质已进行了一些研究^[4-5], 但对于大白菜的易煮烂/易嚼烂程度, 到目前为止尚未进行深入探讨, 而易煮烂/易嚼烂程度又是大白菜质地品质的一个重要指标, 也是消费者和育种学家非常关注的问题。

易煮烂/易嚼烂程度的评价要在大白菜采收适期进行, 田间选择费时费力。随着分子标记技术的不断发展, 用与目标基因紧密连锁的分子标记对杂交后代进行鉴定能极大地缩短培育新品种的时间, 提高选择效率。目前在大白菜根瘤病^[6]、TuMV 感病基因^[7]、根肿病^[8]、桔红心^[9]、雄性不育性^[10]、晚抽薹^[11]、春化时间^[12]等方面进行了 DNA 分子标记的研究, 而对于与大白菜易煮烂/易嚼烂程度连锁的 RAPD 研究, 国内外未见报道。

现采用 F_2 分离世代, 结合 BSA 法, 利用 RAPD 技术获得了与大白菜易嚼烂程度连锁的标记, 为大白菜风味品质评价体系及优质育种提供了科学依据。

1 材料与试验方法

1.1 供试材料

试验用于分子标记研究的群体为 F_2 分离世代, 母本为‘花 273’, 父本为‘114 福山’, 由登海种业集团西由种子分公司提供。2006 年春季配制 F_1 组合, 2007 年春季自交得到 F_2 代种子, 2007 年秋季将所选群体种植于田

间, 定株编号。在幼苗期每株选取嫩叶, 液氮速冻后置于 -80°C 超低温冰箱中保存, 用于分子标记研究。

1.2 试验方法

对 F_2 群体的易煮烂/易嚼烂程度评价采用生食易嚼烂程度的品尝结果。聘请 7~10 位身体健康、有经验的评审员, 在田间对 F_2 群体逐株进行生食品尝, 结果采取打分制, 最后取每 1 单株的平均值。从 F_2 分离群体中选取极端易嚼烂和极端不易嚼烂程度的植株各 8 株, 取其 DNA 样品进行同等浓度混合, 分别建立易嚼烂基因池和不易嚼烂基因池。随机选取 273 条引物, 在两池间筛选多态性引物, 利用筛选的引物在 F_2 群体中验证多态性标记与质地品质性状的连锁关系。

1.3 RAPD 反应条件

扩增反应 25 μL 体系中, 模板 DNA 用量为 60 ng; Mg^{2+} 浓度为 1.5 mmol/L; dNTP 浓度为 200 $\mu\text{mol/L}$; 引物浓度为 0.4 $\mu\text{mol/L}$; Taq 酶用量为 1.0 U。PCR 扩增程序为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 变性 20 s, 36°C 复性 1 min, 72°C 延伸 1 min, 45 个循环; 72°C 延伸 10 min。

2 结果与分析

2.1 大白菜基因组 DNA 的质量及产率

采用 CTAB 法, 提取大白菜基因组 DNA, 部分 DNA 电泳见图 1。由图 1 可知, 每一样品在电泳时均形成明显的 1 条整齐带, 且条带清晰, 无明显降解, 与分子量标准对照, DNA 片断大小在 23 kb 以上。适合 RAPD 分析。

2.2 RAPD 引物的筛选

引物筛选应用琼脂糖凝胶电泳, 在 273 条随机引物中, 共有 264 个引物获得了扩增产物, 出现的谱带总数为 1 621 条, 平均每个引物扩增的谱带数为 6.14 条(图 2)。其中, 在 2 个基因池间具有多态性高、条带清晰的引物 14 个(表 1)。

该试验筛选的 14 条多态性引物, 共扩增出 83 条谱

第一作者简介: 吴春燕(1978-), 女, 吉林永吉人, 博士, 讲师, 现主要研究方向为蔬菜种质资源创新与利用。E-mail: cywu315@163.com。

通讯作者: 何启伟(1940-), 男, 研究员, 主要研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail: hqw1215@sohu.com。

收稿日期: 2010-06-20

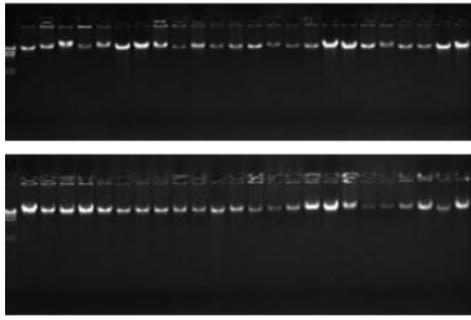


图 1 大白菜基因组 DNA 的电泳结果

注: M: DNA 分子量标记 λ DNA/HindIII Marker

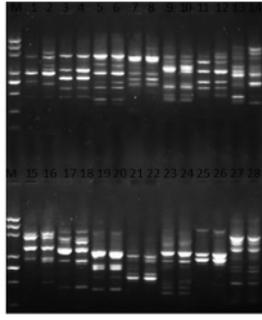


图 2 RAPD 多态性引物的筛选

注: M: DNA 分子量标准, D2000plus DNA ladder, 奇数泳道为易嚼烂基因池, 偶数泳道为不易嚼烂基因池, 同图 3。

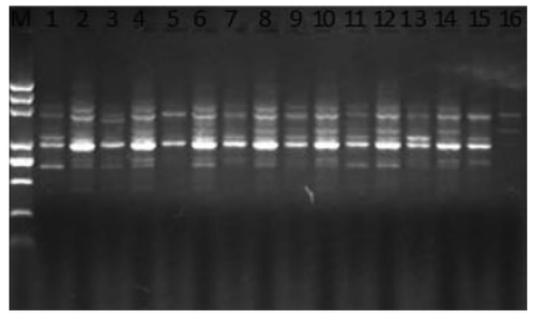


图 3 引物 OPA-06 在不同基因池间扩增结果

带, 平均每个引物产生 5.9 条带, 最多的有 8 条带, 最少的有 4 条带。扩增片段大小集中在 200~2 000 bp, 产生多态性条带 24 条, 平均每个引物有 1.7 条多态性带。

表 1 在 RAPD 分析中获得的多态性引物

生工编号	Operon 编号	序列(5'-3')
S26	OPA-06	GGTCCCTGAC
S28	OPA-08	GTGACGTAGG
S83	OPG-03	GAGCCCTCCA
S86	OPG-06	GTGCCTAACC
S94	OPG-14	GGATGAGACC
S355	OPJ-15	TGTAGCAGGG
S369	OPK-09	CCCTACCGAC
S407	OPM-07	CCGTGACTCA
S445	OPO-05	CCCAGTCACT
S453	OPO-13	GTCAGAGTCC
S462	OPP-02	TCGGCACGCA
S1087	OPAL-07	CCGTCCATCC
S1117	-	GCTAACGTCC
S1126	OPAN-06	GGAACCCGT

将上述表现多态性的 14 个引物, 经过重复验证后。结果表明, 只有引物 OPA-06 在不同易嚼烂基因池中能产生稳定的扩增差异带(图 3), 其中不易嚼烂基因池在 1 400 bp 处, 可以稳定的扩增出 1 条特异性带, 条带较弱, 而易嚼烂基因池中并没有此带。由此推断, RAPD 标记 OPA06-1400 与大白菜易嚼烂基因存在一定的连锁关系。

2.3 单株检测与遗传距离的确定

从 F₂ 群体中选取极端易嚼烂和不易嚼烂植株各 24 株,

品尝结果见表 2。用筛选到的引物 OPA-06, 对选取的 F₂ 分离世代的单株共 48 株进行 PCR 扩增, 观察目标谱带的出现情况。

表 2 参与验证植株易嚼烂程度的品尝结果

易嚼烂基因池		不易嚼烂基因池	
F ₂ 单株	品尝结果	F ₂ 单株	品尝结果
1	6.50	13	6.67
2	7.50	14	6.67
3	7.17	15	6.67
4	6.50	16	6.67
5	6.83	17	6.83
6	6.67	18	6.83
7	7.83	19	6.67
8	8.00	20	6.67
9	6.83	21	6.83
10	6.50	22	6.83
11	8.33	23	6.67
12	7.50	24	6.83

注: 表内数据为平均值。

由图 4 可知, OPA06-1400 特异谱带在易嚼烂的单株中有 18 株未出现, 6 株出现。在不易嚼烂的单株中, 有 19 株出现, 5 株未出现, 重组率为 22.9%。图距的估算通常采用作图函数将重组率转换为图距, 常用的作图函数是 Kosambi 作图函数, 该函数假定 $C=2r$, 即存在正干扰: $X=(1/4)\ln[(1+2r)/(1-2r)]$ 。

由此可以推算出 OPA06-1400 与易嚼烂基因的遗传连锁距离为 24.8 cM。

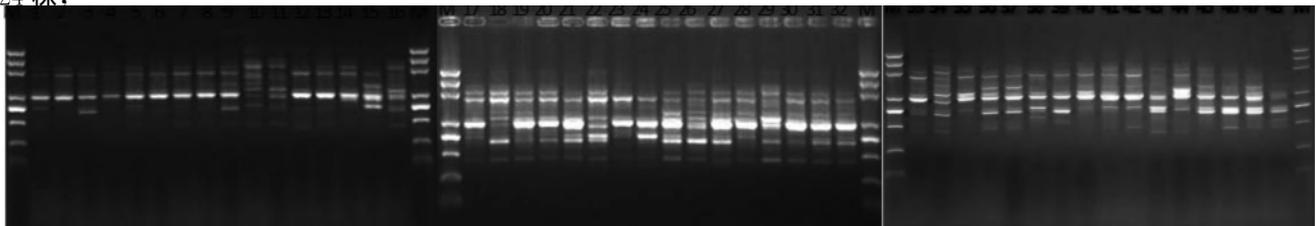


图 4 引物 OPA-06 在 F₂ 单株中的扩增结果

注: M: DNA 分子量标准, D2000plus DNA ladder, 1~24 为易嚼烂单株, 25~48 为不易嚼烂单株。

3 讨论

选择是育种中最重要的环节之一,传统的选择依据是表现型而非基因型。表现型选择对质量性状一般是有效的,而许多重要的农艺性状属数量性状,且易受环境的影响,选择效率低。分子标记辅助选择^[13]为实现对基因型的直接选择提供了可能,通过检测与目标基因紧密连锁的分子标记,就能获得目标基因的基因型。所以,应用与白菜易煮烂基因连锁的分子标记进行选择,能够提高选择效率,加速育种进程,在苗期即可进行鉴定。同时,可以消除病虫害或环境条件等的影响。该试验应用 BSA 方法,对与白菜易煮烂基因连锁的标记进行了分析。结果表明,OPA06-1400 与易煮烂基因的遗传连锁距离为 24.8 cM。遗传距离较大,可能原因:一是与所选用的引物有关。试验一共选用了 273 条随机引物,数量较多。但仅有 1 条引物与目标性状连锁,有效引物较少。因此,可以通过选用更多引物继续进行筛选,找到与易煮烂基因遗传距离更近的标记。二是与选用的 F₂ 检测单株的数量有关。研究对白菜质地品质进行评价时,采用生食对白菜易嚼烂程度进行评分的方法。为了准确找到与目标性状连锁的标记,在 179 株 F₂ 群体中,选用的是极端易煮烂和极端不易煮烂单株各 24 株,进行单株检测。因为所用单株数量较少,所以每一单株的检测结果对遗传距离的影响相对较大。如果在适当范围内,扩大检测单株数量,使每一单株检测结果对遗传距离的影响变小,就有可能缩小遗传距离。

1990 年以 WELSH 等^[14]和 WILLIAMS 等^[15]为首的 2 个研究小组同时建立了 RAPD 分子标记技术。由于 RAPD 分子标记技术检测基因组 DNA 多态性具有快速、简便、高效等优点,已广泛应用于蔬菜的遗传图谱构建^[16]、基因定位^[17]、品种鉴定^[18]、分子标记辅助选择^[19]、亲缘关系与遗传多样性^[20]等各个领域。它的缺点是:对外界环境过度敏感,实验操作的可重复性差,反应条件的任何微小变化都会引起条带数目和强度的改变;显性遗传,极少数为共显性遗传,不能鉴别杂合子和纯合子。RAPD 标记虽检测方便,但稳定性和重复性差,所以应通过克隆测序转化为 SCAR 标记,以提高检测的稳定性和实用性。

参考文献

- [1] 刘宜生. 中国大白菜[M]. 北京:中国农业出版社,1998:8.
- [2] 张德双,金同铭,徐家炳,等. 几种主要营养成分在大白菜不同叶片及部位中的分布规律[J]. 华北农学报,2000,15(1):108-111.
- [3] 屈淑萍. 大白菜品质性状综合评价及配合力研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2000.
- [4] 曲淑平,张耀伟,崔崇士. 大白菜综合风味品质的鉴定及其相关性状研究[J]. 东北农业大学学报,2004,35(2):129-134.
- [5] 苗如意,岳青,沈征言,等. 大白菜组织结构感官品质与评定指标的关系[J]. 园艺学报,1996,23(4):355-358.
- [6] Piao Zhong-yun. Molecular map of clubroot resistance gene in Chinese cabbage(*Brassica Rapa* SSP. *pekinensis*) [J]. Plant & Genomes XI conference,2002.
- [7] 韩和平,孙日飞,张淑江,等. 大白菜中与芜青花叶病毒(TuMV)感病基因连锁的 AFLP 标记[J]. 中国农业科学,2004,37(4):539-544.
- [8] Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, et al. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage(*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*) [J]. Euphytica,1998,104:79-86.
- [9] 刘秀村,张凤兰,张德双,等. 与白菜桔红心基因连锁的 RAPD 标记[J]. 华北农学报,2003,18(4):51-54.
- [10] Miao Ying, Felix Dreyer, Daguang Cai, et al. Molecular markers for genetic male sterility in Chinese cabbage [J]. Euphytica,2003,132:227-234.
- [11] Hidetoshi A, Kuginuki Y Y, Susumu Y, et al. Identification and mapping of a quantitative trait locus controlling extreme late bolting in Chinese cabbage using bulked segregant analysis [J]. Euphytica,2001,118:75-81.
- [12] Teutonico R A, Osborn T C. Mapping loci controlling vernalization requirement in *Brassica rapa* [J]. Theor Appl Genet,1995,91(8):1279-1283.
- [13] Tanksley S D, Young N D, Paterson A H, et al. RFLP mapping in plant breeding:new tools for an old science [J]. Biotechnology,1989(7):257-264.
- [14] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers [J]. Nucl. Acids Res,1990(18):7213-7218.
- [15] Williams J C S, Knbelik A R. I, Ivak K T, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. Nucl. Acids Res,1990(18):6531-6535.
- [16] 张鲁刚,王鸣,陈航,等. 中国白菜 RAPD 分子遗传图谱的构建[J]. 植物学报,2000,42(5):485-489.
- [17] Tanhuanua P K. Association of a RAPD marker with linoleic acid concentration in the seed oil of rapeseed [J]. Genome,1995,58(2):414-416.
- [18] Hu J, Quiros C. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers [J]. Plant Cell Rep,1991,10(10):505-511.
- [19] 王晓武,方智远,孙培田,等. 利用分子标记 EP11900 辅助甘蓝显性雄性不育基因转育[J]. 中国蔬菜,1998(6):11-14.
- [20] Mailer R T, Scarth R, Fristensky B. Discrimination among cultivars of rapeseed(*Brassica napus* L.) using DNA polymorphism amplified from arbitrary primers [J]. Theor Appl Genet,1994(87):697-704.

(该文作者还有牟晋华,单位:山东省农业科学院。)

Identification RAPD Markers Linked to Texture Quality of Chinese Cabbage

WU Chun-yan^{1,2}, SONG Ting-yu¹, HE Qi-wei³, DENG Yong-lin⁴, WANG Cui-hua³, XU Wen-ling³, MU Jin-hua³

(1. College of Horticulture, Jiling Agricultural University, Changchun, Jilin 130118; 2. Department of Horticultural Sciences and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018; 3. Vegetable Institute of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, Shandong 250100; 4. Denghai Seed Corporation Limited(Xiyou), Laizhou, Shandong 261418)

Abstract: Using F₂ segregating generations and BSA method, the molecular markers linked to chewy degree of Chinese cabbage were studied. The OPA06-1 400 was identified to be linked with chewy degree gene of Chinese cabbage. The genetic distance between the chewy degree gene and the RAPD marker was 24.8 cM.

Key words: Chinese cabbage; texture quality; BSA; RAPD