

利用 BC₃F₁ 群体定位和分析甘蓝型油菜 A7-含油量 QTL

邵玉锁^{1,2}, 倪西源², 黄吉祥², 任丽平³, 赵蔚⁴, 方小燕⁴, 曹明富¹, 赵坚义²

(¹杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036; ²浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州 310021; ³河南省开封高级中学, 河南开封 475000; ⁴扬州大学生物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

摘要:【目的】通过构建 BC₃F₁ 群体对第 7 连锁群上一个影响油菜籽油分含量的主效 QTL (A7-QTL) 进行定位确认。【方法】在用 SG-DH 群体初定位基础上以欧洲品种 So1lux 为轮回亲本、目标区段含中国亲本 Gaoyou 等位基因片段的 DH 系为供体构建近等基因系。用 1 700 个 BC₃F₁ 单株基因型和其种子 (BC₃F₂) 表现型, 采用 WinQTLCartographer 2.5 和 SPSS 11.5 软件对 A7-QTL 进行精细定位以及标记和性状的关联分析。【结果】含油量 QTL 的置信区间在标记 ZAAS849s-R131 之间, 范围在 21.7 cM 左右, 其 LOD 峰值为 9.71, 距离两侧最近标记 RPSaA3 和 ZAAS839 分别为 0.9 和 2.1 cM, QTL 的加性效应值是 0.75; QTL 区段内的单标记方差分析表明: 目标区段内 4 个标记各 3 种基因型的含油量之间存在极显著差异, 标记 ZAAS839 处的差异最显著 ($P=1.2 \times 10^{-10}$); 通过比较含油量和 4 个标记之间的对应关系, 进一步推断 QTL 最可能位于标记 RPSaA3 和 ZAAS839 之间或临近。【结论】用 BC₃F₁ 群体定位的 QTL 区间与 DH 群体分析结果相重叠, 但置信区间明显缩小; 定位结果进一步确认了 A7 连锁群上存在油分 QTL 的真实性, 增加了在该区域存有参与控制油菜含油量基因的可靠性; QTL 可能存在于标记 RPSaA3 和 ZAAS839 临近区域, 两标记间距约 3 cM。

关键词: 甘蓝型油菜; 含油量; QTL-近等基因系; QTL 定位

Mapping and Analysis of an Oil Content QTL in the Linkage Group 7 Using BC₃F₁ Population of *Brassica napus*

SHAO Yu-suo^{1,2}, NI Xi-yuan², HUANG Ji-xiang², REN Li-ping³, ZHAO Wei⁴, FANG Xiao-yan⁴, CAO Ming-fu¹, ZHAO Jian-yi²

(¹Hangzhou Normal University, College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou 310036; ²Institute of Crop and Nuclear Technology Utilization, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021; ³Kaifeng Senior High School of Henan Province, Kaifeng 475000, Henan; ⁴College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, Jiangsu)

Abstract: 【Objective】 Mapping and conforming a major QTL for oil content in linkage group 7 using BC₃F₁ population in *Brassica napus* L. 【Method】 QTL-near isogenic lines (NILs) were developed by marker assistant selection on the basis of primary QTL analysis with SG-DH lines. 1700 BC₃F₁ plants, containing corresponding marker genotypes on A7 and trait phenotypes of oil content, were used for fine mapping oil QTL and association analysis between the marker genotypes and the trait (oil content) performance on A7 by software WinQTLCartographer 2.5 and SPSS11.5. 【Result】 The confidence interval of oil content QTL was located between the markers ZAAS849s and R131, which range about 21.7 cM and the peak value of LOD was 9.71. The distances between QTL and the nearest flanking markers RPSaA3 and ZAAS839 were 0.9 and 2.1 cM, respectively. The additive effect of QTL was 0.75, with Chinese allele increasing oil content. Marker-oil content association analysis (ANOVA) indicated that the oil content showed a significant difference among the three types of marker genotypes in each loci within QTL region (four markers), of which

收稿日期: 2009-03-04; 接受日期: 2009-07-24

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (“973” 计划项目) (2006CB101600)、国家高技术研究发展计划 (“863” 计划项目) (2006AA100106)、浙江省科技计划项目 (2007C22020)、国家自然科学基金面上项目 (30871543)

作者简介: 邵玉锁, 硕士。E-mail: shui0820@hotmail.com。通信作者赵坚义, 研究员。Tel: 0571-86403406; E-mail: jyzhao3@yahoo.com

the marker ZAAS839 showed the largest P value ($P=1.2\times 10^{-10}$). 【Conclusion】 QTL position identified by mapping analysis using BC₃F₁ population was overlapped with primary QTL identification using SG-DH lines, however, the confidence interval was clearly decreased. The most probable QTL position is in the region near the markers RPSaA3 and ZAAS839. The genetic distance between RPSaA3 and ZAAS839 is about 3 cM.

Key words: *Brassica napus* L.; oil content; QTL-NILs; QTL-mapping

0 引言

【研究意义】油菜籽油分含量是油菜作物最重要的经济性状之一, 由多基因控制, 易受环境影响, 遗传规律复杂。经典遗传学研究认为, 含油量主要由遗传因素决定, 受母体基因型控制; 控制含油量的基因以加性效应为主, 易受环境影响^[1-2]。但经典遗传学无法确切地解析像油菜籽含油量这种复杂性状的遗传控制机理和基因作用模式; 以普通作图群体进行 QTL (quantitative trait loci) 分析可以将控制含油量性状的众多基因定位到基因组的染色体不同位置上, 但仍无法对单个 QTL 进行有效操作和克隆; 而通过构建 QTL-近等基因系, 针对特定 QTL 区域作进一步的精细定位, 通过图位克隆有可能获得对性状起重要作用的目的基因。【前人研究进展】近年来随着分子标记技术的发展, 相应遗传图谱的构建, 越来越多与油菜含油量性状相关的 QTL 位点被相继发现。Burns 等^[3]用分子标记辅助选择构建的重组替换系检测到 13 个不同脂肪酸组分的 QTL, 其中 7 个对种子含油量有一定影响。Mahmood 等^[4]利用芥菜型油菜 DH (doubled haploid) 群体构建 RFLP 遗传图谱, 确定了 6 个与油分含量相关的 QTL。Qiu 等^[5]利用甘蓝型油菜构建的 DH 群体, 定位了 7 个含油量 QTL。Delourme 等^[6]利用 Darmorbzh 与 Yudul 获得 DH 系, 构建 SSR 遗传图谱定位了 14 个与含油量相关的 QTL, 并将定位结果与前人研究报导比较, 提出一系列在多个作图群体中都检测到的共性 QTL。Zhao 等^[7-9]利用欧洲 (Sollux) 和中国 (Gaoyou) 高含油量油菜品种杂交产生的 F₁ 构建的 DH 群体, 对甘蓝型油菜种子含油量进行多环境下的联合定位分析, 获得 8 个主效含油量 QTL, 其中定位在第 7 连锁群 (A7) 上的 QTL 效应值最大且在所有被检环境中均稳定表达。但前人的研究大多都停留在对含油量 QTL 的初步定位上, 至今未见有对相关油菜含油量 QTL 进行验证和精细定位的报道。【本研究切入点】利用分子标记辅助手段构建的近等基因系由于遗传背景高度一致, 只有目标区段存在差异, 因此可以有效地验证靶 QTL 存在的真实性^[10-11], 并用

于精细定位, 期望通过图位克隆筛选出重要候选基因^[12-14]; 同时近等基因系也适用于研究 QTL 和环境以及 QTL 和遗传背景之间的互作关系^[15-16]。【拟解决的关键问题】本研究拟在 Zhao 等^[7]含油量 QTL 初定位基础上, 选取含油量高且靶 QTL 区域含高油等位基因亲本 DNA 片段的 DH 株系, 构建 QTL-近等基因系, 发展分子标记对 A7 上的一个稳定表达的含油量 QTL 做进一步的定位, 以期验证并缩小目标 QTL 区域, 为最终图位克隆目标基因打下良好基础。

1 材料与方法

1.1 材料来源和田间试验

本研究材料来自 Zhao 等^[7]报导的 SG-DH 群体, 根据 A7 上含油量 QTL 初步定位结果, 选取含油量较高且目标区段为高油等位基因亲本 Gaoyou 的 2 个 DH 系 DH106 和 DH255 为供体亲本, 以欧洲亲本 Sollux 作为轮回亲本, 培育 A7-QTL 近等基因系。图 1 为 2 个供体 DH 株系和双亲在杭州 2001、2004、2005 和 2007 年 4 个年度的含油量平均值和标准差^[17]。从 BC₂ 代开始进行含油量表现型和标记基因型双向选择, 由

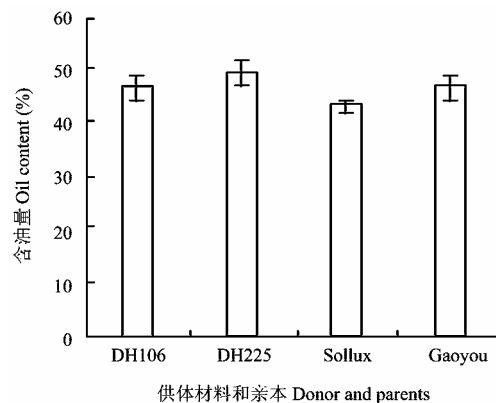


图 1 2 个供体 DH 系和双亲在杭州 4 个年度 (2001、2004、2005、2007) 含油量平均值及标准误

Fig. 1 The means and standard error of oil content for two donor DH lines, DH106 and DH255, and their parents Sollux and Gaoyou in 4 year trials in Hangzhou

BC₃ 自交得到约 4 000 个 BC₃F₁ 单株构成的群体作为本研究定位材料。

BC₃F₁ 群体于 2007—2008 年在浙江省农业科学院试验地(杭州)种植, 二行区行长 2.5 m, 行、株距为 0.33 m×0.15 m; 苗期取约 3 500 个单株的叶片, 分单株提取 DNA; 用 A7 连锁群上 QTL 区域和两侧距离最近的 10 个标记逐株进行标记检测; 花期单株套袋, 成熟时按单株收获种子, 近红外(NIRS)分析仪(德国 BRUKER 公司, 型号 VECTOR 22/N)测定收获种子(BC₃F₂)含油量, 间隔 50 个样品设置高低含油量 2 个对照控制测试误差。重复测定 3 次, 取平均值。

1.2 A7 连锁群分子标记加密

在原有 SG-A7 图谱基础上, 借助前人发表的多个甘蓝型油菜图谱标记信息, 同时在生物信息数据库的引导下针对 A7 连锁群发展基于 EST 序列位点特异性标记。自行开发的引物序列由浙江大学生物信息研究所设计, 上海生物工程技术服务公司合成。利用 Mapmaker/Exp 3.0 软件^[18], 通过“near”、“try”等命令将新的标记添加到 A7 连锁群上。

1.3 DNA 提取与 PCR 扩增

选取苗期的油菜嫩叶, 采用略作改动的 CTAB 法^[19]提取双亲及 BC₃F₁ 群体各单株的叶片总 DNA。PCR 扩增体系和反应程序参照 Zhao 等^[7]的方法, 扩增产物加 5 μL 上样缓冲液(40%蔗糖, 0.025%溴芬兰), 6%聚丙烯酰胺凝胶(19:1)电泳, 银染法染色, 电泳结果扫描保存。

1.4 统计分析

遗传背景回复率: 基于分子标记的遗传背景回复率计算公式:

$$G(g)=[L+X(g)]/(2L)=1/2+(1/2)[X(g)/L]$$

式中, G(g)指在 g 代的遗传背景回复率; X(g)指在回交 g 代表现为轮回亲本带型的分子标记数量; L 指所分析的分子标记数量^[20]。

A7-QTL 定位采用 WinQTL Cartographer 2.5 软件复合区间作图法^[21], 标记之间的关联分析用 SPSS11.5 软件处理。LOD 值的显著性通过置换分析(permutation analysis)运算 1 000 次确定。

2 结果与分析

2.1 A7-QTL 近等基因系的构建和 BC₃F₁ 群体分析

以 DH106 和 DH255 为母本, 德国亲本 Sollux 为轮回亲本连续回交, 从 BC₂ 世代开始用标记作前景分析, 首先用 QTL 区域的 3 个标记(Na12A02b、BRMS036、ZAAS12a)(表 1)从 156 株中筛选出 75 株, 回交产生 BC₃ 世代。随即对 2 个株系的 52 个 BC₃ 单株进行前景和背景选择, 前景选择包含了分布于 A7 连锁群上的 10 个标记(SUC1-2a、Na12A02b、BRMS036、ZAAS176、RPSaA3、ZAAS12a、sR7223、APOC1、BRAS023、sR0282R)(表 1), 背景选择涉及 SG 图谱的 180 个均匀分布在油菜全基因组上的分子标记, 最终在前景选择的基础上挑选遗传背景回复率较高且在其它主要含油量 QTL 区域为轮回亲本

表 1 用于 A7-QTL 定位的标记序列及其来源

Table 1 Marker sequences and their origins used for mapping of A7-QTL in this study

标记 Marker	上游引物 Forward primer	下游引物 Reverse primer	来源 Origins
APOC1	CTCGTCTCACTTCTCCC	GAATAACTCCAGGTCCAA	Li <i>et al.</i> Euphytica, 2006,152:25-29
RPSaA3	TACTGATCCACGTACCGA	CTCTGGCTTAGCCTCCTC	Li <i>et al.</i> Euphytica, 2006,152:25-29
SUC1-2a	CCGTCGCTGGTATTAGA	GCCGGAGCTGCTTGAAAA	Li <i>et al.</i> Euphytica, 2006,152:25-29
BRAS023	CCATTGCAAATCCCTTTACTC	AGATGGAATGCGATCAAAGA	Piquemal <i>et al.</i> Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(8):1514-1523
BRMS036	GGTCCATTCTTTTTGCATCTG	CATGGCAAGGGTAACAAACAT	Kim <i>et al.</i> Genetics, 2006,174(1):29-39
sR0282R	AGGAAGCCCAACAGACTTT	AATTCGATTCTCCATCGTGC	http://www.brassica.agr.gc.ca
sR7223	AGGACCCGACTTTCCTTGTT	ACCAAACCTCGGCGTACAAAT	http://www.brassica.agr.gc.ca
Na12A02b	AGCCTTGTGTCTTTCAACG	AGTGAATCGATGATCTCGCC	Lowe <i>et al.</i> Theoretical and Applied Genetics, 2004,108(6):1103-1112
EST839	AAACCGCTACGAGATCCTT	CGCTGTTTAGCCAATCTAA	浙江省农业科学院 Zhejiang Academy of Agricultural Sciences
ZAAS176	GTCAACAAGGAGAGGCTTGC	TTGGAAGCAGAAGCAATGTG	浙江省农业科学院 Zhejiang Academy of Agricultural Sciences
ZAAS12a	TCAATGGCGATGGCAGCAG	CCAGTCAACAATCCAGACAAGC	浙江省农业科学院 Zhejiang Academy of Agricultural Sciences

基因型的 BC₃ 单株 28 株, 继续回交产生 BC₄, 所有 52 个单株均套袋自交产生 BC₃F₁。根据自交单株种子含油量测定结果结合标记基因型分析, 筛选含油量近于或高于 45%, 遗传背景回复率高于 93% 的单株 6 个 (表 2), 按株系播种。其中 N46-2、N46-3、N46-7、N46-8 源于 SG-DH106; N59-2、N59-3 来自于 SG-DH255。由此构建了一个 4 000 个单株左右的 BC₃F₁ 群体, BC₃F₁ 群体的构建过程如图 2 所示。油菜开花期套袋自交约 3 500 株, 成熟时按单株收获测定种子 (BC₃F₂) 含油量。含油量大多分布在 40%—45% 之间, 占群体的 80% 以上。

2.2 A7 连锁群上分子标记的加密和 QTL 定位

在已经发表的 SG 图谱^[7]基础上, 利用发表在其它甘蓝型油菜图谱 A7 上的标记信息和本实验室开发的 EST 标记对 SG 群体双亲进行多态性筛选和 DH 群体分析, 增加 A7 连锁群上标记密度。然后选取 A7-QTL 两侧 10 个共显性分子标记 (Ra12A02b、BRMS036、ZAAS176、RPSaA3、ZAAS839、ZAAS12a、sR7223、APOC1、BRAS023、sR0282R) 对 BC₃F₁ 单株进行基因型分析, 10 个标记的相关信息见表 1。最

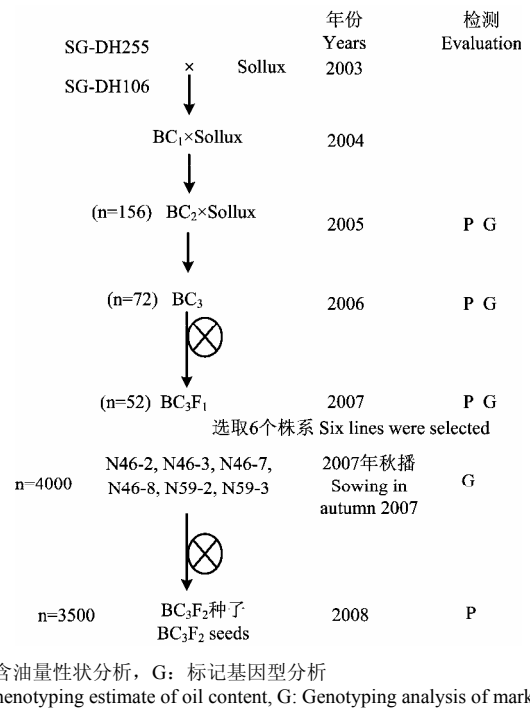


图 2 QTL-BC₃F₂ 构建过程

Fig. 2 Procedure of QTL-BC₃F₂ development

表 2 6 个中选 BC₃ 单株种子含油量 (%) 以及背景回复率 (%)

Table 2 Oil content (%) and ratio of background restoration (%) of 6 selected BC₃ plants

	BC ₃ 株系 BC ₃ line					
	N46-2	N46-3	N46-7	N46-8	N59-2	N59-3
含油量 Oil content (%)	45.0 (±1.76)	45.7 (±1.79)	47.9 (±1.78)	46.4 (±1.77)	45.8 (±1.76)	44.6 (±1.78)
背景回复率 Ratio of background restoration (%)	93.3	94	94.5	94.8	93.8	93.2

终选用 1 700 株标记基因型 (BC₃F₁) 和种子含油量数据 (BC₃F₂) 均完整的单株, 对第 7 连锁群进行 QTL 扫描, 以 LOD 值 ≥ 3.3 确定有无 QTL 的存在并检测 QTL 在连锁图上的置信区间 (图 2)。含油量 QTL 置信区域在分子标记 ZAAS849s-R131 之间, 其 LOD 峰

值为 9.71, 距离两侧最近标记 RPSaA3 和 ZAAS839 分别为 0.9 和 2.1 cM, QTL 的加性效应值是 0.75。与用 DH 群体在杭州四环境下的定位结果比较^[17], LOD 峰值、加性效应值相近, QTL 区间重叠, 但范围集中到了一个 21.7 cM 的区段内 (表 3, 图 3)。

表 3 应用 BC₃F₁ 和 DH 群体在杭州四年度的 QTL 分析结果比较

Table 3 A7-QTL for oil content with SG-BC₃F₁ and SG-DH population in 4 year trials in Hangzhou

群体 Population	年份 Years	最大 LOD 值 ¹⁾ Peak LOD score	加性效应 Additivity	置信区间 Confidence interval	位置 Position (cM)
BC ₃ F ₁	2008	9.71	0.75	ZAAS849-R131	40.3—62.0
SG-DH	2001	9.16	0.65	Na12A02b-R131	32.2—62.0
	2004	10.59	0.92	SUC1_2A-BRMS036	25.0—45.5
	2005	12.97	0.95	Na12A02b-R131	32.2—62.0
	2007	10.30	0.62	SUC1_2A-ZAAS839	25.0—51.6

¹⁾ LOD 值的显著性=3.3 Significant LOD score=3.3

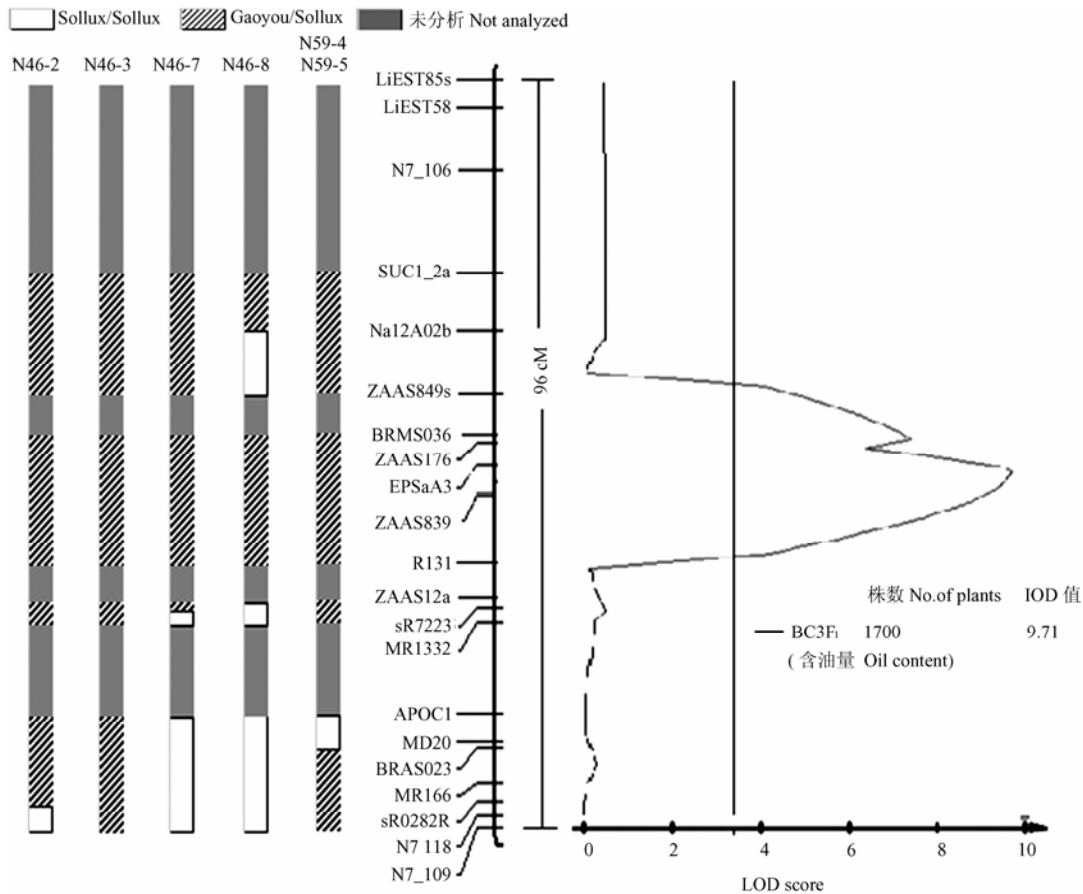


图3 6个中选 BC_3 单株(N46-2、N46-3、N46-7、N46-8、N59-2、N59-3)标记基因型及自交产生的1700株 BC_3F_1 群体定位A7-含油量QTL

Fig. 3 Genotypes of 6 selected BC_3 plants and oil QTL on A7 using BC_3F_1 population with 1 700 selfing plants

2.3 QTL 区间标记基因型和含油量关联分析

为了进一步确认第7连锁群上分子标记基因型与含油量性状间的相关程度,根据分子标记显示的带型,将 BC_3F_1 群体按单株分为轮回亲本型(Sollux/Sollux)、杂合型(Gaoyou/Sollux)和供体亲本型(Gaoyou/Gaoyou)3组,对3组含油量性状按单标记进行方差分析(表4)。结果表明:QTL区域内4个标记BRMS036、ZAAS176、RPSaA3和ZAAS839的各3种基因型含油量之间均存在极显著差异。说明这些标记可能与含油量有关或与控制含油量性状的基因紧密连锁。其中含油量在标记ZAAS839基因型间差异最显著, P 值达 1.2×10^{-10} 。进而对这4个标记各3种基因型含油量表型进行多重比较(表4),4个标记供体亲本和轮回亲本基因型含油量之间均存在极显著差异,标记ZAAS839三种基因型间差异均达显著;而位于QTL区间外二侧标记Ra12A02b($P=0.08$)、

ZAAS12a($P=0.07$)、sR7223($P=0.16$)、APOC1($P=0.13$)、BRAS023($P=0.92$)、sR0282R($P=0.94$) P 值均大于0.05,3种基因型含油量间无显著差异,说明这些标记与含油量性状不相关。在A7连锁群上,BRMS036、ZAAS176、RPSaA3和ZAAS839等4个标记间距离为7.1 cM。

为试图进一步缩小QTL区间,根据BRMS036、ZAAS176、RPSaA3和ZAAS839等4个标记基因型的不同组合选取2组共6种类型,对其种子含油量进行方差分析和多重比较(表5),首先分别选取4个标记均为轮回亲本(Sollux/Sollux)和供体亲本(Gaoyou/Gaoyou)基因型的单株(BC_3F_2 种子)各347和248株(第1组包括1、2类),以轮回亲本Sollux(37株)为对照,三类间进行含油量比较分析(表5)。结果表明目标区段为供体基因型(Gaoyou)的 BC_3F_2 种子平均含油量43.35%,较目标区段为轮回亲本

表 4 A7-QTL 区间内 4 个标记基因型和含油量表现型的比较分析

Table 4 Comparative analysis between marker genotype and oil content in 4 marker loci in A7-QTL region

分子标记基因型 Molecular marker genotype	株数 No. of plants	平均含油量(标准误) Average of oil content (%)	P 值 P value	多重比较(0.05) ¹⁾ Mul. comparison
BRMS036			1.2×10 ⁻⁶	
Gaoyou/Gaoyou	340	43.19 (±1.79)		a
Gaoyou/Sollux	736	42.93 (±1.81)		a
Sollux/Sollux	436	42.50 (±1.82)		b
ZAAS176			1.5×10 ⁻⁷	
Gaoyou/Gaoyou	321	43.06 (±1.78)		a
Gaoyou/Sollux	729	42.96 (±1.82)		a
Sollux/Sollux	436	42.44 (±1.80)		b
RPSaA3			3.0×10 ⁻⁹	
Gaoyou/Gaoyou	256	43.23 (±1.82)		a
Gaoyou/Sollux	545	42.94 (±1.79)		a
Sollux/Sollux	330	42.30 (±1.81)		b
ZAAS839			1.2×10 ⁻¹⁰	
Gaoyou/Gaoyou	331	43.25 (±1.83)		a
Gaoyou/Sollux	697	42.92 (±1.78)		b
Sollux/Sollux	383	42.32 (±1.79)		c

¹⁾ 相同英文字母表示不同标记基因型间种子含油量无显著差异, 反之差异达显著

¹⁾ Same letter means no significant difference for oil content between marker genotypes, otherwise showing a significant difference for oil content between marker genotypes

表 5 A7-QTL 区间 4 个标记基因型含油量比较分析

Table 5 Comparative analysis between marker genotype and oil content in 4 marker loci in A7-QTL region

类型 Type	标记基因型 Marker genotype				株数 No. of plants	平均含油量 Average of oil content (%)	P 值 P value	多重比较(0.05) Mul. comparison
第一组 First group	BRMS036	ZAAS176	RPSaA3	ZAAS839			3.5×10 ⁻⁸	
1	P ₂	P ₂	P ₂	P ₂	248	43.35 (±1.60)		a
2	P ₁	P ₁	P ₁	P ₁	347	42.27 (±1.69)		b
轮回亲本 Sollux (P ₁) (CK)					37	42.30 (±1.26)		b
第二组 Second group	BRMS036	ZAAS176	RPSaA3	ZAAS839			0.003	
3	P ₁	P ₁	F ₁	F ₁	48	43.36 (±1.60)		a
4	F ₁	F ₁	P ₁	P ₁	47	42.48 (±1.60)		b
5	F ₁	F ₁	P ₁	F ₁	15	42.67 (±1.79)		b
6	F ₁	F ₁	F ₁	P ₁	13	42.32 (±1.69)		b
轮回亲本 Sollux (P ₁) (CK)					37	42.30 (±1.26)		b

* P₁ 表示 Sollux/Sollux 基因型, P₂ 表示 Gaoyou/Gaoyou 基因型, F₁ 表示 Gaoyou/Sollux 基因型

* P₁: Sollux/Sollux genotype, P₂: Gaoyou/Gaoyou genotype, F₁: Gaoyou/Sollux genotype

(Sollux) (42.27%) 高出 1.08 个百分点, 两者比较 P 值达 9.6×10^{-12} , 差异极显著; 而轮回亲本 Sollux 平均含油量是 42.30%, 与目标区段为轮回亲本 (Sollux) 的 BC₃F₂ 种子平均含油量比较差异不显著。进一步根据 4 个标记 P₁ 和 F₁ 的不同组合再形成 4 种类型 (第 2 组, 3—6 类), 对其进行基因型和含油量表型的对应

分析。第 3 类 (BRMS036 和 ZAAS176 为轮回亲本基因型, RPSaA3、ZAAS839 为杂合基因型) 和其它 3 个类型 (4—6 类) 及轮回亲本间差异均达显著, 而其它 3 类之间及其与轮回亲本之间差异都不显著, 由此推断 QTL 更可能位于 RPSaA3 和 ZAAS839 之间或相邻区域。

3 讨论

近年来, 众多基因得以快速克隆的一个重要原因是大量使用了近等基因系材料和生物信息学知识, 许多基因的成功克隆都基于类似的研究策略: 首先使用常规定位群体对靶性状进行 QTL 初定位; 进而构建含靶 QTL 的近等基因系作精细定位; 再结合生物信息学知识图位克隆靶基因。Alpert 和 Tanksley^[22]首次利用近等基因系精细定位 QTL, 将控制西红柿果重 QTL 定位在一个约 150 kb 的基因组区域内, Frary 等^[23]进而克隆出了这个基因, 该基因控制心皮细胞的数目。另在拟南芥、水稻等作物上均有不少成功的报导^[13-14,24]。油菜作物在分子生物学领域的研究进展相对拟南芥、水稻等作物存在较大差距, 相关报导不多。Delourme 等^[25]利用近等基因系对抗黑茎病 QTL 做了较精确的效应评价。至今未有用多轮回交后代对油菜含油量 QTL 进行确认和精细定位的报道。

在用 SG 群体进行 QTL 定位研究中, Zhao 等^[7]和黄吉祥^[17]发现在 A7 连锁群上存在一个效应值较大而且在多环境中稳定表达的含油量 QTL。金梦阳等^[26]利用高世代自交材料研究发现在第 7 连锁群上有一个与含油量有关的 QTL; Delourme 等^[6]利用 DH 群体也在 A7 染色体上发现了含油量 QTL 位点, 只是贡献率都没有象 SG 群体中检测到的大, 但由于缺乏相同标记难以确定是否为相同基因位点。

近等基因系群体同 DH 群体相比, 在 QTL 定位和效应评价等方面更具优势。因为近等基因系背景高度相似, 只有来自供体一小片段差异, 使得靶 QTL 的遗传效应更容易突显出来; 而 DH 系由于背景是 2 个亲本的嵌合体, 背景之间存在着一定的互作, 有可能使 QTL 的位置和效应值的估算出现偏差。综合分析杭州 4 个年度的初定位结果, A7 含油量 QTL 区间在一个约 45 cM 的范围内。本研究利用 BC₃F₁ 群体定位的 QTL 位置与初定位区段基本重叠, 但区间缩小到 21.7 cM。单标记方差分析则显示, 标记 ZAAS839 基因型与性状表现型关联最紧密, 进一步通过对目标 QTL 区段内 4 个标记不同基因型组合和种子含油量的比较分析, 推测影响油菜含油量的 A7-QTL 的位置更可能存在于 RPSaA3、ZAAS839 这 2 个标记之间或临近, 标记 RPSaA3 和 ZAAS839 的图谱距离仅为 3.0 cM。本研究结果证实了先前报导的 SG-A7 连锁群上的含油量 QTL, 定位结果使 QTL 位点更加明确, QTL 区域更为集中。

对本研究 BC₃F₁ 群体和先前 DH 群体定位结果比较^[7,17], LOD 值和加性效应值均未明显提高, 从加性效应值 $\alpha=0.75$ 推算, 该 QTL 区域当 Sollux 的等位基因被 Gaoyou 纯合替代时可提高含油量约 1.5 个百分点, 略高于目标区段全为供体基因型 (43.35%) 和轮回亲本 (Sollux) 基因型 (42.27%) 平均含油量的差值 (1.08 个百分点); 又 1 700 个 BC₃F₁ 群体单株间含油量出现约 8 个百分点的差异。对上述现象笔者分析有以下几方面原因: (1) 由于本试验中所用定位群体 BC₃F₁ 含油量测定数据为单株套袋种子, 其数值可能会因小环境差异受不均等的病、虫害或倒伏等因素影响从而干扰含油量的真实表型; (2) 由于轮回亲本是德国冬油菜品种 Sollux, 在杭州条件下成熟期温度上升较快, 成熟期仍有一定差异的单株会发生不同程度的高温逼熟现象, 也会影响到真实的含油量水平;

(3) 由于本研究中所用材料只是 BC₃F₁ 世代, 除目标区段外可能仍有较多的区间与供体亲本一致, 因此单株间较大的含油量差异也可能是其它区域的供体亲本基因型直接或间接作用的结果, 在一定程度上干扰目标 QTL 的真实表达和检测结果。因此对 A7-QTL 的进一步精细定位还需要利用更高世代的回交自交群体和进一步增加 QTL 区间标记密度。后续研究中, 笔者将利用 BC₃F₂ 小区开放种子以及 BC₄F₁ 和 BC₄F₂ 群体, 同时重点在约 10—20 cM 的区域内根据油菜 BAC 序列和拟南芥基因库信息大量发展位点特异性标记, 精细定位 A7-含油量 QTL。

通过对 BC₃F₁ 单株初花期的考察, 我们发现不同株系间开花期仍存在较大差异, 但初定位结果 A7 上没有发现主效开花期 QTL, 在更高世代 QTL-近等基因系选育材料中, 有必要继续关注此性状并观察其与含油量之间的关系; 第 7 连锁群与含油量 QTL 相隔约 35 cM 区域还存在效应值方向相反的主效千粒重和效应值方向相同的角果粒数 QTL 位点。目前笔者正在同时针对 A7 上的这些主效 QTL 构建近等基因系, 试图通过精细定位和图位克隆最终获得控制这些重要性状的目的基因, 并研究基因之间的相互关系和作用机理。

4 结论

本试验以欧洲品种 Sollux 为轮回亲本, 目标区段含中国亲本 Gaoyou 高含油量等位基因片段的 SG-DH 系为供体亲本构建近等基因系, 用 1 700 株 BC₃F₁ 单株基因型和相应单株上收获的 BC₃F₂ 种子含油量对 A7 进行定位分析, 结果验证了先前报导

的 A7 连锁群上油分 QTL, QTL 位点更加明确, 区域更为集中。进一步通过对 10 个标记基因型和对应含油量的关联分析和 QTL 区间内 4 个标记不同基因型组合和含油量性状间的比较分析, 初步判断油菜第 7 连锁群上的含油量 QTL 最可能存在于 RPSaA3 和 ZAAS839 两个标记之间或相临区域, 两标记间距离为 3.0 cM。

致谢: 浙江大学徐飞博士帮助设计相关引物, 徐海明老师在项目研究过程中给予许多建议、讨论和帮助, 在此一并致谢!

References

- [1] 刘后利. 油菜的遗传与育种. 上海: 上海科学技术出版社, 1985: 128-214.
- Liu H L. *Genetics and Breeding of Brassica napus* L. Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Press, 1985: 128-214. (in Chinese)
- [2] 周伟军, 许光华, 沈惠聪. 油菜高油份育种的前景与问题探讨. 科技通报, 1995(6): 361-364.
- Zhou W J, Xu G H, Shen H C. Prospects and problems of the high-oil rapeseed breeding. *Bulletin of Science and Technology*, 1995(6): 361-364. (in Chinese)
- [3] Burns M J, Barnes S R, Bowman J G, Clarke M H E, Werner C P, Kearsley M J. QTL analysis of an intervarietal set of substitution lines in *Brassica napus*: seed oil content and fatty acid composition. *Heredity*, 2003, 90: 39-48.
- [4] Mahmood T, Rahman M H, Stringam G R, Yeh F, Good A G. Identification of quantitative trait loci (QTL) for oil and protein contents and their relationships with other seed quality traits in *Brassica juncea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 1211-1220.
- [5] Qiu D, Morgan J, Shi J, Long Y, Liu J, Li R, Zhuang X, Wang Y, Tan X, Dietrich E, Weihmann T, Everett C, Vanstraelen S, Beckett P, Fraser F, Trick M, Barnes S, Wilmer J, Schmidt R, Li J, Li D, Meng J, Bancroft I. A comparative linkage map of oilseed rape and its use for QTL analysis of seed oil and erucic acid content. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 114: 67-80.
- [6] Delourme R, Falentin C, Huteau V, Clouet V, Horvais R, Gandon B, Specel S, Hanneton L, Dheu J, Deschamps M, Margale E, Vincourt P, Renard M. Genetic control of oil content in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 1331-1345.
- [7] Zhao J Y, Becker H C, Zhang D Q, Zhang Y, Ecke W. Oil content in a European × Chinese rapeseed population: QTL with additive and epistatic effects and their genotype-environment interactions. *Crop Science*, 2005, 45: 51-59.
- [8] Zhao J, Becker H C, Zhang D Q, Zhang Y, Ecke W. Conditional QTL mapping of oil content in rapeseed with respect to protein content and traits related to plant development and grain yield. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 33-38.
- [9] Zhao J Y, Zoran D, Becker H C, Ecke W, Christian M. Mapping QTL controlling fatty acid composition in a doubled haploid rapeseed population segregating for oil content. *Molecular Breeding*, 2008, 21: 115-125.
- [10] Ioannidou D, Pinel A, Brugidou C, Albar L, Ahmadi N, Ghesquiere A, Nicole M, Fargette D. Characterization of the effects of a major QTL of the partial resistance to rice yellow mottle virus using a near-isogenic line approach. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 2003, 63: 213-221.
- [11] Wissuwa M, Ae N. Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil*, 2001, 237: 275-286.
- [12] Loudet O, Saliba-Colombani V, Camilleri C, Calange F, Gaudon V, Koprova A, North K A, Kopriva S, Daniel-Vedele F. Natural variation for sulphate content in *Arabidopsis thaliana* is highly controlled by APR2. *Nature Genetics*, 2007, 39: 896-900.
- [13] Song X J, Huang W, Shi M, Zhu M Z, Lin H X. A QTL for rice grain width and weight encodes a previously unknown RING-type E3 ubiquitin ligase. *Nature Genetics*, 2007, 39: 623-630.
- [14] Ren Z H, Gao J P, Li L G, Cai X L, Huang W, Chao D Y, Zhu M Z, Wang Z Y, Luan S, Lin H X. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter. *Nature Genetics*, 2005, 37: 1141-1146.
- [15] Steele K A, Virk D S, Kumar R, Prasad S C, Witcombe J R. Field evaluation of upland rice lines selected for QTLs controlling root traits. *Field Crops Research*, 2007, 101: 180-186.
- [16] Lecomte L, Saliba-Colombani V, Gautier A, Gomez-Jimenez M C, DuVé P, Buret M, Causse M. Fine mapping of QTL of chromosome 2 affecting the fruit architecture and composition of tomato. *Molecular Breeding*, 2004, 13: 1-14.
- [17] 黄吉祥. 甘蓝型油菜油脂功能相关分子图谱构建与含油量 QTL 定位[D]. 杭州: 杭州师范大学, 2008.
- Huang J X. Construction of a lipid related functional gene map and QTL analysis of oil content in *Brassica napus* L. [D]. Hangzhou: Hangzhou Normal University, 2008. (in Chinese)
- [18] Lincoln S, Daly M, Lander E. Constructing genetic maps with Mapmaker/Exp 3.0. Cambridge, MA, USA: Whitehead Institute

- Technical Report, 1992.
- [19] Uzunova M I, Ecke W, Weissleder K, Roebbelen G. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.) I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 194-204.
- [20] 夏军红, 郑用琰. 玉米 *Rf3* 近等基因系的分子标记辅助回交选育与效益分析. *作物学报*, 2002, 28(4): 339-344.
- Xia J H, Zheng Y L. Molecular marker-assisted backcross breeding of maize *Rf3* NIL and its efficient analysis. *Acta Agronomica Sinica*, 2002, 28(4): 339-344. (in Chinese)
- [21] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics*, 1994, 136: 1457-1468.
- [22] Alpert K B, Tanksley S D. High-resolution mapping and isolation of a yeast artificial chromosome contig containing fw2. 2: A major fruit weight quantitative trait locus in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 1996, 93(26): 15503-15507.
- [23] Frary A, Nesbitt T C, Grandillo S, Knaap E, Cong B, Liu J, Meller J, Elber R, Alpert K B, Tanksley S D. fw2. 2: A quantitative trait locus key to the evolution of tomato fruit size. *Science*, 2000, 289(5476): 85-88.
- [24] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, Yamanouchi U, Monna L, Fuse T, Baba T, Yamamoto K, Umehara Y, Nagamura Y, Sasaki T. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice is closely related to the *Arabidopsis* flowering time gene *CONSTANS*. *Plant Cell*, 2000, 12: 2473-2483.
- [25] Delourme R, Piel N, Horvais R, Pouilly N, Domin C, Vallée P, Falentin C, Manzanares-Dauleux M J, Renard M. Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 2008, 117: 1055-1067.
- [26] 金梦阳, 李加纳, 付福友, 张正圣, 张学昆, 刘列钊. 甘蓝型油菜含油量及皮壳率的QTL分析. *中国农业科学*, 2007, 40(4): 677-684.
- Jin M Y, Li J N, Fu F Y, Zhang Z S, Zhang X K, Liu L Z. QTL analysis of oil and hull content in *Brassica napus* L. *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, 40(4): 677-684. (in Chinese)

(责任编辑 郭银巧)