

甘蓝型油菜千粒重性状的 QTL 初步定位研究

朱恒星^{1,2}, 闫晓红², 方小平², 姜成红², 刘 蒙², 袁亚宾², 杨 洁², 梁国鲁¹, 魏文辉²

(¹ 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715; ² 中国农业科学院油料作物研究所/农业部
油料作物生物学与遗传育种重点实验室, 武汉 430062)

摘要: 千粒重是油菜重要的产量相关性状之一, 构建油菜遗传连锁图谱是研究其产量性状基因的前提。本研究利用小孢子培养技术, 选育出了甘蓝型油菜大粒品系(G-42)和小粒品系(7-9)的纯合 DH 系 DH-G-42 和 DH-7-9, 其千粒重分别为 6.24 g 和 2.42 g, 二者比值达 2.58。以 DH-G-42 为母本、DH-7-9 为父本, 构建了含 190 个单株的 F₂ 遗传作图群体, 利用 SSR 和 SRAP 标记技术绘制遗传连锁图谱, 该图谱共包含 20 个连锁群, 涉及 128 个 SSR 标记和 100 个 SRAP 标记, 图谱总长 1546.6cM, 标记间平均图距为 6.78cM。本研究共检测到 3 个与千粒重性状相关的 QTL, 分别位于 A9 和 C1 连锁群, 其中 *qSW-A9-1* 和 *qSW-A9-2* 贡献率分别达到 10.98% 和 27.45%, 均可视为控制粒重的主效 QTL。本研究为后续进行油菜千粒重性状 QTL 的精细定位分析、分子标记辅助选择育种及新基因的克隆等奠定了基础。

关键词: 甘蓝型油菜; 千粒重性状; 遗传图谱; QTL 定位

Preliminary QTL Mapping for 1000-seed Weight Trait in *Brassica napus*

ZHU Heng-xing^{1,2}, YAN Xiao-hong², FANG Xiao-ping², JIANG Cheng-hong²,
LIU Meng², YUAN Ya-bin², YANG Jie², LIANG Guo-lu¹, WEI Wen-hui²

(¹ Horticulture and Landscape College, Southwest University, Chongqing 400715; ² Institute of Oil Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Oil Crops, Ministry of Agriculture, Wuhan 430062)

Abstract: 1000-seed weight of *Brassica napus* is one of most important yield traits. Construction of the genetic linkage map will provide the basis for research on the genetic base of quantitative trait in *Brassica napus*. By micro-spore culture technology, we screened the pure lines DH-G-42 with large seed and DH-7-9 with small seed, their 1000-seed weights were 6.24 g and 2.42 g, respectively, and the ratio of 1000-seed weight for two lines is 2.58. A genetic linkage map with F₂ population including 190 individuals derived from a cross of DH-G-42 × DH-7-9 were established by SSR and SRAP markers. The map consisted of twenty linkage groups anchored 128 SSR and 100 SRAP markers and covered 1546.6cM with an average marker interval of 6.78cM. QTLs located in A9 and C1 linkage group were identified to be significant for the 1000-seed weight trait. The *qSW-A9-1* and *qSW-A9-2* explained 10.98% and 27.45% of the phenotypic variation, which could be considered as main effect QTL for the 1000-seed weight trait. Our study will be beneficial to the fine QTL mapping, the marker-assisted breeding and the novel genes cloning in *Brassica napus*.

Key words: *Brassica napus*; 1000-seed weight trait; Genetic map; QTL mapping

甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 高产育种一直是油菜的主要育种目标。油菜千粒重等产量相关性状虽然受数量性状基因控制, 但其遗传率较高, 因

此, 成为育种工作者关注的性状。遗传连锁图是指以遗传标记间重组频率为基础的一条染色体或基因内位点的相对位置线性排列图, 遗传连锁图谱的构

收稿日期: 2012-01-20 修回日期: 2012-04-17

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671312); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(1610172008004)

作者简介: 朱恒星, 博士研究生, 主要从事植物遗传学研究。E-mail: 17249643@qq.com

通讯作者: 梁国鲁, 研究员, 博士生导师, 主要从事植物细胞生物学研究。E-mail: lianggl@swu.edu.cn

魏文辉, 副研究员, 硕士生导师, 主要从事油料作物遗传学与分子生物学研究。E-mail: whwei@oilcrops.cn

建和 QTL 的初步定位是后续相关数量型基因精细定位与基因克隆研究的基础。Fan 等^[1]分别以春油菜纯系和冬油菜纯系为亲本进行千粒重 QTL (quantitative trait loci) 作图。Shi 等^[2]分别以 Tapior 和 Ningyou7 为亲本进行油菜产量性状的 QTL 分析。Quijada 等^[3]以 3 个春油菜种质为亲本材料对构建的两个群体进行产量性状的 QTL 定位研究。易斌等^[4]利用中油 821 和保 604 为亲本材料进行油菜产量及产量构成因子的 QTL 分析。张书芬等^[5]以双低油菜细胞质雄性不育保持系 1141B 和双高恢复系垦 C1 为亲本材料,对甘蓝型油菜产量及其构成因子进行了 QTL 定位与分析。这些研究结果为进一步了解油菜产量及产量相关性状的分子机制奠定了基础,但是上述研究中作图亲本的粒重差异并不显著。

研究粒重遗传的一个关键是要得到遗传差异大、粒重差异大的亲本,只有通过特异创建的材料,研究粒重的目的才容易实现。因此,本研究利用小孢子培养技术快速获得油菜大粒品系(G-42)和小粒品系(7-9)的纯合 DH (doubled haploid) 系材料,以公开发表的 SSR 标记作为锚定标记,构建了一张包含 SSR 和 SRAP 两种类型标记的甘蓝型油菜遗传连锁图谱,并对油菜千粒重相关 QTL 进行初步定位研究。主效千粒重性状 QTL 的获得可为后续进行油菜千粒重 QTL 精细定位分析、分子标记辅助育种及相应基因的克隆奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

将甘蓝型油菜大粒品系 G-42 及小粒品系 7-9 种植于中国农业科学院油料作物研究所武汉市武昌区试验田,分别从两个品系中取单株的花蕾进行游离小孢子培养。将诱导出的再生植株用秋水仙素浸根处理后,加倍染色体。种植后于开花前取叶组织进行倍性鉴定,确定为 DH 植株的大粒品系命名为 DH-G-42、小粒品系命名为 DH-7-9。对两个 DH 系的千粒重等产量相关性状的数据进行统计分析。以 DH-G-42 为母本、DH-7-9 为父本进行杂交,得到 F_1 ,将 F_1 单株套袋自交获得的种子种植于中国农业科学院油料作物研究所武汉市武昌区试验田,获得 190 个单株的 F_2 群体。将 $F_{2:3}$ 家系种植于青海省西宁市青海大学油菜繁育中心试验田,成熟后统计千粒重(1000-seed weight, SW) 性状。

1.2 小孢子培养、再生植株加倍及倍性检测

花蕾的采集时期及选择、小孢子的游离、小孢子胚状体的诱导、胚培养和生根及炼苗后加倍处理方法,参照介智靖等^[6]的方法。采用流式细胞仪(Cell Lab Quanta SC)检测成活植株的染色体倍性,操作步骤参考 Dolezel 等^[7]的方法。

1.3 产量相关性状数据统计

油菜角果正常成熟后,统计各株(品)系的千粒重、单株角果数、每角粒数、株高和一次有效分枝数等产量相关性状数据。

1.4 DNA 提取和多态性分子标记

采用 CTAB 法^[8]提取油菜叶片基因组 DNA,经 1% 琼脂糖电泳和紫外分光光度计检测 DNA 浓度和纯度, -20℃ 保存备用。所有 PCR 反应所需要的 *Taq* 酶、dNTPs、PCR Buffer(含 Mg^{2+} 20mmol/L) 购自武汉中鑫博尔生物工程有限公司。SSR 和 SRAP 引物均由上海英骏生物公司合成。

1.4.1 SSR 分子标记 Na-、Ol-、Ra-及 Ni-引物按照 BrassicaDB(<http://www.ukcrop.net>) 公布的引物序列合成; CB-、BRAS-和 MR-引物按照 Piquemal 等^[9]发表的引物序列合成; BnGMS-引物按照 Cheng 等^[10]发表的引物序列合成。SSR 引物共有 676 对。SSR 标记的操作方法主要参照陆光远等^[11]方法。

1.4.2 SRAP 标记 参照 Li 等^[12]的 SRAP 引物设计。操作方法主要参照文雁成等^[13]的方法。

1.4.3 电泳分析检测 扩增产物用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,固定、银染、显影和定影等步骤参照陆光远等^[14]的方法。

1.4.4 数据记载及遗传连锁图谱构建 作图群体各株系中共显性带型与母本相同的记为“a”,与父本相同的记为“b”;显性带型与母本不同的记为“c”,与父本不同的记为“d”;带型不清或者缺失者记为“-”。如果 1 对引物同时检测到多个位点,在引物编号后加“-1、-2、-3”等。运用 JoinMap 3.0 软件构建遗传图谱,先用 New project 命令创建一个新的文件夹,用 Load data 命令导入标记数据,再用命令 Individual genot freq 排除数据缺失过多的单株,用 Locus genot freq 命令分析标记的偏分离情况,然后用 Group 命令进行分组,最后用 Map 命令构建连锁图谱。

1.4.5 CIM 法 QTL 定位分析 利用复合区间作图法(CIM)进行定位,定位所用软件为 QTL Cartographer 2.5。CIM 定位模型与黄杰恒等^[15]的设置相同。选择“Standard model (model 6)”,回归方式选择“backward regression method”,控制标记数目 5

个;扫描步移速率为 1.0cM;定义 QTL 的 LOD 阈值由 1000 次的“排列(permutation)”在 $P=0.01$ 水平上确定,其他所有详细参数选项使用默认设置。

QTL 命名参照 McCouch 等^[16]的规则:斜写的小写字母“*q*”加上性状的名字,后面跟一个字母数字组合表示连锁群的序号,最后一个数字表示 QTL 的序号。如 *qSW-A9-1* 表示千粒重位于 A9 连锁群上第 1 个 QTL。

2 结果与分析

2.1 亲本及 $F_{2:3}$ 产量性状分析

取 G-42 和 7-9 品系的游离小孢子进行培养,胚状体在培养基中生长良好(图 1-A)。将培养基中已经生根的幼苗移出室外,炼苗后用 0.3% 的秋水仙碱进行浸根,加倍染色体。存活的植株采用流式细胞仪鉴定倍性。G-42 与 7-9 加倍处理后,成活的双、单倍体植株分别为 62 株和 33 株。DH-G-42 或 DH-7-9 单

株,在田间表现整齐度良好。考种 DH-G-42 和 DH-7-9 株系各 20 株,考种 G-42 和 7-9 株系各 30 株,得到单株角果数、千粒重、每角粒数、株高、一次有效分枝数等性状数据(表 1)。DH-G-42 单株的千粒重较 G-42 平均值增加 4.9%,达极显著;每角果粒数增加 9.7%,表现为显著。DH-G-42 和 G-42 品系的其余产量相关性状,如株高、一次有效分枝数和单株角果数,差异不明显。DH-7-9 单株的千粒重较 7-9 平均值降低 4.7%,极显著。DH-7-9 和 7-9 其余产量相关性状差异不明显。大粒品系 G-42 与小粒品系 7-9 的千粒重平均值为 5.95 g 和 2.54g,比值为 2.34。DH-G-42 和 DH-7-9 千粒重分别为 6.24 g 和 2.42 g,比值提高到 2.58,由于纯化致使千粒重差异度增加(图 1-B)。用 DPS 统计软件对 $F_{2:3}$ 家系千粒重性状进行分析,频率分布如图 2 所示。千粒重性状表现基本符合正态分布,表明其后代分离不是由单个主效基因控制,而是由多基因控制的数量性状。

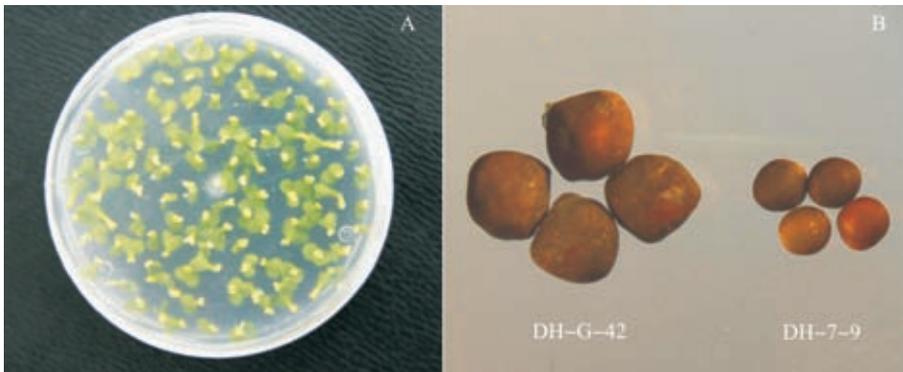


图 1 油菜胚状体生长情况和 DH 系成熟种子

Fig.1 Embryoid and mature seeds of DH lines

A: 油菜胚状体生长情况; B: DH-G-42 和 DH-7-9 的成熟种子

A: the growth situation of embryo from oilseed rape; B: mature seeds of lines DH-G-42 and DH-7-9

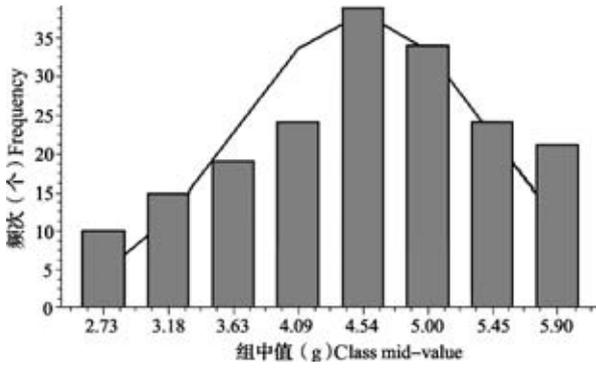
表 1 亲本间部分产量性状差异及 $F_{2:3}$ 群体平均值

Table 1 Yield-related traits difference between two parents and the meanvalue in $F_{2:3}$ population

品系 Lines	单株角果数 No. of siliques per plant	每角粒数 No. of seeds per silique	株高(cm) Plant height	一次有效分枝数 No. of first branches	千粒重(g) 1000-seed weight
G-42	106.77 ± 3.71	24.60 ± 0.51 a	150.38 ± 5.25	7.43 ± 0.36	5.95 ± 0.07A(2.34*)
DH-G-42	113.42 ± 2.68	27.10 ± 0.45 b	157.46 ± 5.12	7.08 ± 0.32	6.24 ± 0.05 B(2.58**)
7-9	230.83 ± 8.38	20.13 ± 0.38	91.55 ± 3.76	13.80 ± 0.76	2.54 ± 0.017a
DH-7-9	241.29 ± 6.33	19.47 ± 0.41	94.21 ± 2.98	14.21 ± 0.76	2.42 ± 0.015b
Mean($F_{2:3}$)	172.36 ± 45.98	22.72 ± 1.77	129.34 ± 22.34	9.93 ± 2.65	4.53 ± 0.87

不同大、小写字母分别表示在 0.01、0.05 水平上存在差异; * 表示 G-42 与 7-9 的千粒重比值; ** 表示 DH-G-42 与 DH-7-9 的千粒重比值

Different lowercase and capital mean significance at 0.01, 0.05 level; * ratio of 1000-seed weight for G-42 and 7-9; ** ratio of 1000-seed weight for DH-G-42 and DH-7-9

图2 $F_{2,3}$ 家系千粒重频率分布Fig. 2 Frequency distribution of 1000-seed weight in $F_{2,3}$ population

2.3 分子标记多态性

利用 DH 系亲本筛选 676 对 SSR 引物,其中 152 对引物产生的扩增产物多态性明显,所占比率为 22.49%。用筛选得到的 SSR 引物对双亲及其 F_2 群体中 190 个单株进行分析,134 对引物在 F_2 群体中能重复检出多态性且带型清晰,平均每对引物扩增出 1.13 条多态性带。其中 119 对引物检测到 1 个位点,7 对引物检测到 2 个位点,5 对引物检测到 3 个位点,3 对引物检测到 4 个位点。这些引物共产生 160 个标记,其中共显性标记 83 个,显性标记 77 个。

从 279 对 SRAP 引物组合中筛选出 61 对条带清晰、多态性高的引物组合,对双亲及其 F_2 群体中 190 个单株进行 SRAP 分析,共产生 143 个清晰度好

的多态性标记位点,平均每对引物扩增出 2.34 条多态性带。

2.4 遗传图谱构建和千粒重 QTL 定位

利用 JoinMap 3.0 软件对 303 个多态性标记 (160 个 SSR 标记和 143 个 SRAP 标记) 进行连锁遗传分析。在 $LOD \geq 3.0$ 的条件下,共有 228 个标记 (128 个 SSR 标记和 100 个 SRAP 标记) 进入连锁群,其余 75 个标记未能归入连锁群。所构建的分子遗传图谱涉及 20 个连锁群,总长 1546.6cM,连锁群长度介于 23.78 ~ 130.32cM,标记间的平均距离为 6.78cM (表 2,图 3)。综合利用 Piquemal 等^[9]、Lowe 等^[17]、Cheng 等^[10]、Fan 等^[11] 以及 Qiu 等^[18] 提供的油菜图谱中 SSR 标记的信息,连锁群也根据标准图谱进行了命名 (表 3,图 3)。初步对应结果表明,该图谱中的绝大部分连锁群可与公认的图谱对应。仅多出了 1 条包含 13 个标记、长度为 90.15cM 的连锁群,命名为 LG20。

在植物遗传作图中普遍存在偏分离标记。在本研究统计的 303 个标记中,有 63 个标记表现偏分离,频率为 20.8%。其中,32 个偏分离不严重的标记可被整合到图谱中 (标记名称后用“*”表示,图 3)。在这 32 个偏分离标记中,13 个 (40.6%,用“* a”表示) 偏向母本 DH-G-42,15 个 (46.9%,用“* b”表示) 偏向父本 DH-7-9,4 个 (12.5%,用“* h”表示) 偏向杂合体。

表 2 图谱中各连锁群的图距及标记分布

Table 2 Genetic distance of linkage groups and distribution of markers on the map

连锁群 Linkage group	标记数目 No. of markers			连锁群长度 (cM) Length of linkage group	标记平均距离 (cM/标记) Average distance (cM/marker)
	SSR	SRAP	总数 Total		
A1	2	2	4	56.01	14.00
A2	2	0	2	23.78	11.89
A3	3	9	12	72.76	6.06
A4	6	6	12	125.31	10.44
A5	5	8	13	63.37	4.87
A6	8	8	16	70.01	4.38
A7	5	3	8	78.94	9.87
A8	2	4	6	63.9	10.65
A9	14	8	22	119.12	5.41
A10	7	0	7	34.94	4.99
C1	14	15	29	95.3	3.29
C2	5	1	6	51.9	8.65
C3	14	4	18	79.83	4.44
C4	5	5	10	49.34	4.93
C5	11	7	18	130.32	7.24
C6	4	2	6	92.07	15.35
C7	5	7	12	128.82	10.74
C8	8	3	11	91.78	8.34
C9	3	0	3	28.95	9.65
LG20	5	8	13	90.15	6.93
总计 Total	128	100	228	1546.6	

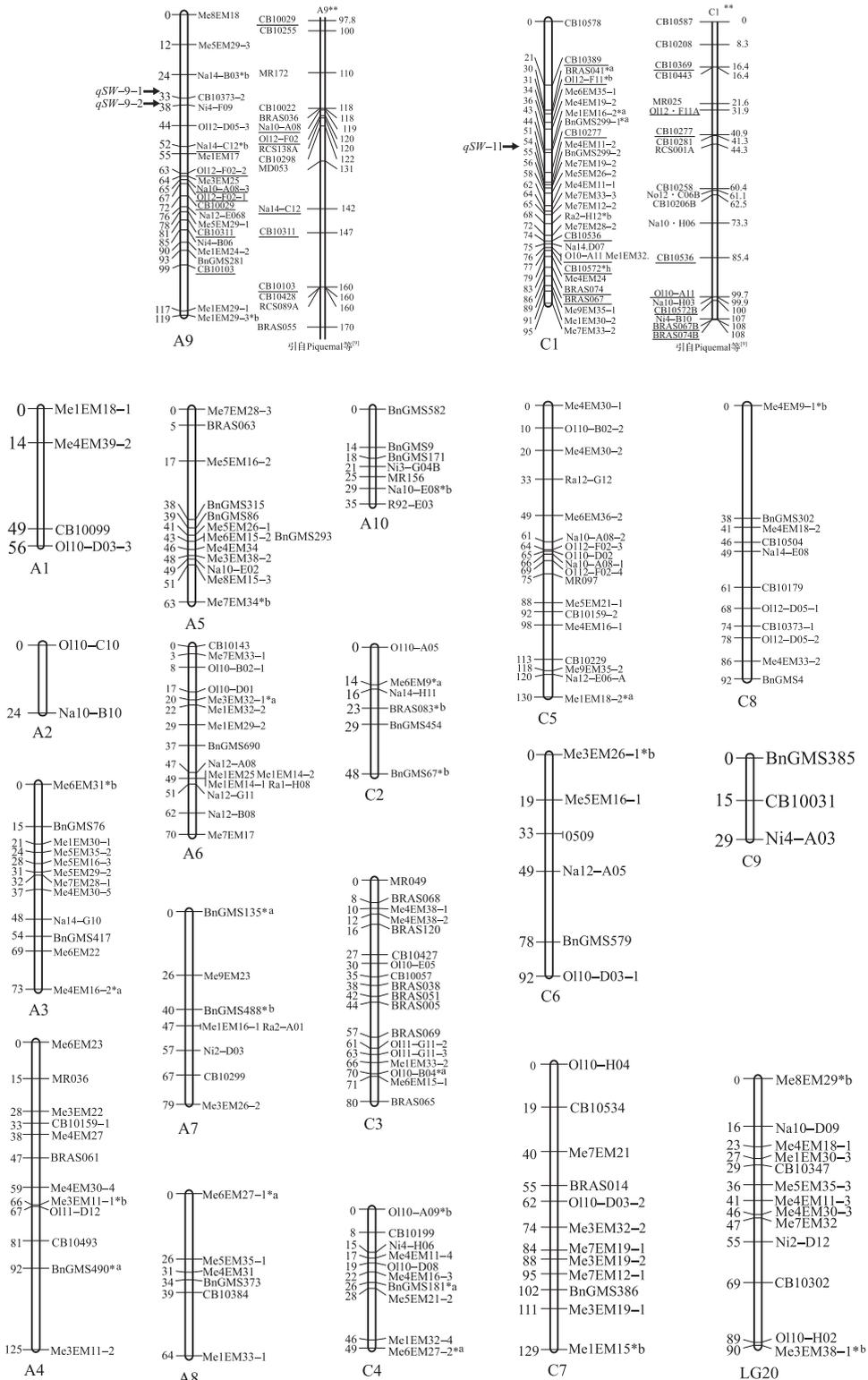


图 3 甘蓝型油菜分子标记遗传连锁图

Fig. 3 The molecular marker linkage map of *B. napus*

*: 偏分离标记; *a: 偏母本的标记; *b: 偏父本的标记; *h: 偏杂合的标记; 箭头所示位置为检测到的千粒重 QTL;

** : 本研究构建的遗传图谱与公共图谱^[9]的对比结果; 下划线标注的 SSR 标记为共有标记

* : Distorted markers; * a: Markers deviated toward female parent; * b: Markers deviated toward male parent; * h: Markers distorted toward heterozygote; Arrows denote the linkage location of QTLs for 1000-seed weight trait; ** : The results of our genetic linkage map compared with international published map. The SSR markers with underline are common marker

表 3 本研究所用 SSR 标记数目及其在其他图谱中的分布

Table 3 Number of aligned SSR markers and distribution of these markers in other maps

连锁群 Linkage group	SSR 标记数 No. of markers	在其他图谱中的分布 Distribution of aligned markers in other map						
		Piquemal et al ^[9]		Cheng et al ^[10]		Lowe et al ^[17]	Fan et al ^[11]	Qiu et al ^[18]
A1	2	CB10099	OH10-D03	CB10099	-	-	-	-
A2	2	-	-	Na10-B10	-	OH10-C10	Na10-B10	-
A3	3	-	-	BnGMS76	-	Na14-G10	-	-
		-	-	BnGMS417	-	BnGMS417	-	-
A4	4	CB10493	MR036	-	-	-	-	-
		BRAS061	CB10159	-	-	-	-	-
A5	4	BRAS063	-	BnGMS86	Na10-E02	Na10-E02	Na10-E02	Na10-E02
		-	-	BnGMS293	-	-	-	-
		-	-	BRAS063	-	-	-	-
A6	6	OH10-D01	-	BnGMS690	Na12-A08	-	Na12-B08	-
		OH10-B02	CB10143	OH10-D01	OH10-B02	-	OH10-D01	-
A7	2	-	-	BnGMS488	Ra2-A01	-	-	-
A8	2	CB10364	-	BnGMS373	-	-	-	-
A9	7	Na14-C12	CB10311	OH12-F02	Na14-C12	-	OH12-F02	OH12-F02
		OH12-F02	CB10029	Na10-A08	OH12-F02	-	Na10-A08	Na10-A08
		Na10-A08	CB10103	BnGMS281	-	-	-	-
A10	4	MR156	-	BnGMS171	Na10-E08	Ra2-E03	-	Ra2-E03
C1	9	CB10369	OH12-F11	CB10277	-	Ra2-H12	-	-
		OH10-A11	CB10572	CB10536	-	-	-	-
		BRAS074	BRAS067	Na14-H11	-	-	-	-
C2	4	-	-	BnGMS454	BnGMS67	BRAS083	-	-
C3	12	MR049	CB10427	CB10057	OH11-G11	OH10-E05	OH11-G11	OH11-G11
		BRAS038	BRAS005	BRAS051	-	OH11-G11	-	-
		BRAS069	BRAS065	BRAS068	BRAS120	-	-	-
C4	2	OH10-D08	OH10-A09	-	-	-	-	-
C5	7	OH12-F02	MR097	Ra12-G12	OH12-F02	MR097	OH10-B02	-
		Na10-A08	CB10229	-	Na12-E06A	-	-	-
C6	3	-	-	BnGMS579	Na12-A05	-	OH10-D03	Na12-A05
C7	4	CB10534	BRAS014	BnGMS386	OH10-H04	-	-	-
C8	6	OH12-D05	CB10373	BnGMS4	-	CB10504	-	-
		CB10179	CB10504	BnGMS302	-	-	-	-
C9	1	-	-	BnGMS385	-	-	-	-

通过 QTL Cartographer 2.5 复合区间作图法进行 QTL 分析,共检测到 3 个 QTL 与油菜千粒重性状相关,位于 A9 和 C1 两个染色体上(表 4),分别命名为 *qSW-A9-1*、*qSW-A9-2*、*qSW-C1*。*qSW-A9-1* 位于油菜的 A9 染色体 Na14-B03 ~ CB10373-2 标记区间,贡献率为 10.98%; *qSW-A9-2* 位于油菜的 A9 染色体 CB10373-2 ~ Ni4-F09 标记区间,贡献率为 27.45%,距表 4 油菜千粒重性状 QTL 分析

Table 4 QTL analysis of 1000-seed weight trait in oilseed rape

QTL	连锁群 Linkage group	位置(cM) Position	标记区间 Maker flanking	距两侧标记距离 (cM) Distance		置信区间(cM) Confidence interval	LOD	贡献率 (%) R ²	加性效应 Additive effect
<i>qSW-A9-1</i>	A9	29.91	Na14-B03 ~ CB10373-2	6	3.46	23.8 ~ 33.4	3.6087	10.98	0.4557
<i>qSW-A9-2</i>	A9	35.41	CB10373-2 ~ Ni4-F09	2.04	0.12	33.4 ~ 43.5	4.1490	27.45	1.0379
<i>qSW-C1</i>	C1	54.11	Me4EM11-2 ~ BnGMS299-2	0.03	0.99	43.9 ~ 61.5	2.7885	3.50	0.3857

离 Ni4-F09 标记仅 0.12cM; *qSW-C1* 的贡献率较小(3.5%),位于油菜的 C1 染色体 Me4EM11-2 ~ BnGMS299-2 标记区间,该区间范围约 1cM 左右。位于 A9 染色体上的两个 QTL, *qSW-A9-1* 和 *qSW-A9-2*,合计贡献率达到 38.43%,均可视为控制粒重的主效 QTL。两个 QTL 相距仅 5.5cM,均位于标记 CB 1037-2 附近。3 个千粒重 QTL 的增效基因均来自于高粒重母本 G-42。

3 讨论

本研究中, G-42 和 7-9 品系虽然粒重差异较大,但需纯化后,才能用于后续研究。传统方法采用多代自交纯化,即使每年种植 2 代,也需要 3 年以上才能够完成。采用游离小孢子加倍的方法,诱导出 DH-G-42 和 DH-7-9 植株,仅需 1 年半左右的时间。因而大大提高了效率,加快了后续 QTL 作图和分子标记辅助育种研究的进程。

遗传连锁图谱的构建在数量性状基因定位、图位克隆和分子标记辅助选择育种等研究中发挥了十分重要的作用。图谱构建所选用的分子标记的类型是获得高质量遗传图谱的关键之一^[19]。SSR 标记具有共显性遗传、可靠性高等优点^[20],能够作为锚定标记与其他研究者发表的油菜遗传图谱进行比对,被广泛应用于遗传作图和分子标记辅助育种等研究领域。SRAP 标记是通过独特的引物设计,可扩增基因组中分布较均匀的 ORFs(open reading frames)片段^[21],具有简便、稳定、作图效率较高等特点^[22]。选用扩增基因组不同区域的 SSR 和 SRAP 分子标记,能够很好地揭示油菜品种间遗传多样性的差异^[23],有助于提高遗传图谱的覆盖率和标记分布的均匀度。

衡量遗传图谱质量的两个重要标准是图谱覆盖率与标记分布的均匀程度。Lombard 等^[24]估计油菜的基因组长度为 2127~2480cM。从理论上推算,构建甘蓝型油菜平均图距为 5cM 的图谱需要 500 个标记。本研究构建的油菜图谱总长为 1546.6cM,略高于易斌等^[4](1413cM, 251 个标记)的研究结果,低于李媛媛等^[25](1979.74cM, 398 个标记)的研究结果。本图谱上分子标记的分布不太均匀,在 N1、N2 等 8 个连锁群上出现大于 20cM 的间隙,同时在 N6 上存在标记密集区。本图谱连锁的标记有 228 个,标记位点数较少可能是造成图谱覆盖率偏低的主要原因。此外,利用 JoinMap 软件构建的图谱长度可能比用 OUTMAP 和 Mapmaker 软件构建的图谱长度小^[26-27]。与国际公认的图谱进行初步比较的结果表明,本图谱包含了油菜的全部 19 条染色体。但是由于缺乏部分连接标记而导致图谱中多出了 1 个连锁群 LG20。

偏分离现象普遍存在于植物中,被认为是生物进化的推动力之一^[28],关于偏分离标记产生的原因也有不少报道。Knox 等^[29]认为环境因素、非同源重组、基因转换和转座因子等可能是引起偏分离的重要因素。Lyttle^[30]认为偏分离现象与配子体或孢

子体的选择有关。在本研究统计的 303 个标记中,有 63 个标记表现偏分离,频率为 20.8%。其中,32 个偏分离不严重的标记可被整合到图谱中。在这 32 个偏分离标记中,13 个(40.6%)偏向母本 DH-G-42,15 个(46.9%)偏向父本 DH-7-9,4 个(12.5%)偏向杂合体。

千粒重是油菜产量性状重要构成因子之一^[2],油菜含油量、蛋白质含量、种子萌发率和成活率也与千粒重相关^[31]。随着油菜千粒重性状的研究逐渐得到重视,越来越多的研究者通过 QTL 作图的方法寻找控制千粒重性状的 QTL 位点。Fan 等^[1]构建的用于定位油菜千粒重的图谱中,大粒亲本的千粒重分别为 3.04g、2.69g 和 4.26 g,对应的小粒亲本千粒重分别为 2.11g、2.38g 和 2.68 g。定位了两个与粒重有关的主效 QTL, *TSWA7a* 和 *TSWA7b*,在不同环境中共计解释了表型变异的 27.6%~37.9%。Shi 等^[2]研究所用的群体亲本 Tapidor 的千粒重在 2.60~2.86 g 之间,亲本 Ningyou7 的千粒重在 3.09~3.51 g 之间。构建的两个群体在 10 个环境中共检测到 159 个与粒重相关的 QTL,但是只有 4 个是主效 QTL,其中 *qSW.A7-2* 在 4 个环境中都被检测到。Quijada 等^[3]研究使用的群体大粒亲本千粒重分别为 2.92g 和 2.88 g,对应的小粒亲本千粒重为 2.48 g 和 2.56 g。在 4 个群体两年两点的实验中,检测到 3 个共同的与粒重相关的 QTL,分别位于 N7、N17 和 N19。易斌等^[4]所用的群体亲本分别为中油 821 和保 604,其千粒重分别为 3.23 g 和 3.05 g,检测到 1 个与粒重相关的 QTL,位于 N9 连锁群,贡献率为 7.64%。张书芬等^[5]所用的群体亲本千粒重分别为 2.57 g 和 2.97 g,共计检测到 9 个与粒重相关的 QTL,分布于 N1、N4 和 N6 连锁群,两个效应很大的千粒重 QTL, *sw2* 和 *sw6*,贡献率分别为 60.26% 和 73.34%。前人用于研究千粒重性状 QTL 的亲本材料中,大粒亲本与小粒亲本千粒重的比值在 1.05~1.6 之间,千粒重性状差异不极端。

本研究利用游离小孢子加倍技术获得的 DH-G-42 和 DH-7-9 千粒重分别为 6.24 g 和 2.42 g,比值达到 2.58。高纯合 DH-G-42 的千粒重较 G-42 品系平均值增加 4.9%,DH-7-9 的千粒重较 7-9 品系平均值降低 4.7%,均在 0.01 水平上差异极显著(表 1)。研究材料越纯且千粒重相差越大,越可能有利于后续开展千粒重性状 QTL 的定位分析和分子机制研究。在本研究中,共计检测到 3 个 QTL 与油菜千粒重性状相关(表 4),其中 *qSW-A9-1* 和 *qSW-A9-2* 都位于 A9 连锁群的 CB10373-2 标记附近,合计贡

献率达到 38.4%。 $qSW-A9-1$ 和 $qSW-A9-2$ 贡献率分别达到 10.98% 和 27.45%，均可视为控制粒重的主效 QTL，其中 $qSW-A9-2$ 距离 Ni4-F09 标记仅 0.12cM。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 的近等基因系进行精细定位；再结合生物信息学知识图位克隆靶基因。本研究得到的千粒重 QTL 附近的 SSR 标记，可以用于下一步采用分子标记辅助手段构建近等基因系。千粒重 QTL 的初步定位结果有利于后续通过精细定位和图位克隆最终获得控制千粒重性状的目的基因，同时研究基因之间的相互关系和作用机理。

参考文献

- [1] Fan C C, Cai G Q, Qin J, et al. Mapping of quantitative trait loci and development of allele-specific markers for seed weight in *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Genet*, 2010, 121: 1289-1301
- [2] Shi J Q, Li R Y, Qiu D, et al. Unraveling the complex trait of crop yield with quantitative trait loci mapping in *Brassica napus* [J]. *Genetics*, 2009, 182: 851-861
- [3] Quijada P A, Udall J A, Lambert B, et al. Quantitative trait analysis of seed yield and other complex traits in hybrid spring oilseed rape (*Brassica napus* L.): 1. Identification of genomic regions from winter germplasm [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 549-561
- [4] 易斌, 陈伟, 马朝芝, 等. 甘蓝型油菜产量及相关性状的 QTL 分析 [J]. *作物学报*, 2006, 32(5): 676-682
- [5] 张书芬, 傅廷栋, 朱家成, 等. 甘蓝型油菜产量及其构成因素的 QTL 定位与分析 [J]. *作物学报*, 2006, 32(8): 1135-1142
- [6] 介智靖, 闫晓红, 方小平, 等. 甘蓝型油菜 DH 植株创建及其倍性的流式鉴定 [J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(3): 349-353
- [7] Dolezel J, Lysák M A, Houwe I V D, et al. Use of flow cytometry for rapid ploidy determination in *Musa* species [J]. *Info Musa*, 1997, 6(1): 6-9
- [8] Haymes K M. Mini-prep method suitable for a plant breeding program [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1996, 14: 280-284
- [9] Piquemal J, Cinquin E, Couton F, et al. Construction of an oilseed (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1514-1523
- [10] Cheng X M, Xu J S, Xia S, et al. Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus* [J]. *Theor Appl Genet*, 2009, 118: 1121-1131
- [11] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 一个简便的适合于分析油菜中 SSR 位点的检测体系 [J]. *中国油料作物学报*, 2003, 25(3): 79-81
- [12] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455-461
- [13] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 等. 用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础 [J]. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 246-256
- [14] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用于油菜研究的简便银染 AFLP 标记技术的构建 [J]. *华中农业大学学报*, 2001, 20: 413-415
- [15] 黄杰恒, 徐新福, 曲存民, 等. 甘蓝型油菜种胚叶绿素含量的 QTL 定位 [J]. *植物遗传资源学报*, 2010, 11(6): 766-771
- [16] McCouch S R, Cho Y G, Yano M, et al. Report on QTL nomenclature [J]. *Rice Genet Newsl*, 1997, 14: 11-13
- [17] Lowe A J, Moule C, Trick M, et al. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1103-1112
- [18] Qiu D, Morgan C, Shi J, et al. A comparative linkage map of oilseed rape and its use for QTL analysis of seed oil and erucic acid content [J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 114: 67-80
- [19] Castiglioni P, Ajmone P, van Wijk R, et al. AFLP markers in a molecular linkage map of maize: codominant scoring and linkage group distribution [J]. *Theor Appl Genet*, 1999, 99: 425-431
- [20] Bell C J, Ecker J R. Assignment of 30 microsatellite loci to the linkage map of *Arabidopsis* [J]. *Genomics*, 1994, 19(1): 137-144
- [21] Li G, Quiros C F. Analysis, Expression and molecular characterization of BoGSL-ELONG, a major gene involved in the *Aliphatic Glucosinolate* pathway of *Brassic* species [J]. *Genetics*, 2002, 162: 1937-1943
- [22] 陈晖, 陈美霞, 陶爱芬, 等. 长果种黄麻 SRAP 标记遗传连锁图谱的构建及 3 个质量性状基因定位 [J]. *中国农业科学*, 2011, 44(12): 2422-2430
- [23] 谭祖猛, 李云昌, 胡琼, 等. SSR 和 SRAP 标记研究油菜杂交种骨干亲本的遗传多样性 [J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(5): 882-890
- [24] Lombard V, Delourme R. A consensus linkage map for rapeseed (*Brassica napus* L.): construction and integration of three individual maps from DH populations [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 491-507
- [25] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱 [J]. *中国农业科学*, 2007, 40(6): 1118-1126
- [26] Sewell M M, Sherman B K, Neale D B. A consensus map for loblolly (*Pinustaeda* L.): I. Construction and intergration of individual linkage maps from two outbred three-generation pedigree [J]. *Genetics*, 1999, 151: 321-330
- [27] Butcher P A, Williams E R, Whitaker D, et al. Improving linkage analysis in outcrossed forest trees: An example from *Acacia mangium* [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 104: 1185-1191
- [28] Foisset N, Delourme R, Barret P, et al. Molecular mapping analysis of *Brassica napus* using isozyme, RAPD and RFLP markers on double haploid progeny [J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 1017-1025
- [29] Knox M R, Ellis T H N. Excess heterozygosity contributes to genetic map expansion in pea recombinant inbred populations [J]. *Genetics*, 2002, 162: 861-873
- [30] Lyttle T W. Segregation distorters [J]. *Annu Rev Genet*, 1991, 25: 511-557
- [31] Adamskia N M, Anastasioub E, Erikssona S, et al. Local maternal control of seed size by KLUH/CYP78A5-dependent growth signaling [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 20115-20120