

油菜硫甙性状 QTL 区间的加密和整合

曾丽萍 冯 吉 龙 艳[△] 孟金陵

(华中农业大学植物科学技术学院 湖北 武汉 430070)

摘要 目的 加密油菜控制硫甙性状 QTL 区间, 并进行 QTL 整合预测候选基因。方法 利用生物信息学方法根据已知测序的白菜 BAC 序列信息设计引物, 在油菜 TN DH 群体中进行多态性扩增和定位, 并根据加密后构建的遗传连锁图重新检测 QTL, 进行 QTL 整合。结果 将根据白菜 BAC 设计的 3 对多态性标记成功定位到油菜控制硫甙性状 QTL 区间, 进行 QTL 整合后将 QTL 置信区间进一步缩小, 并判定了初步的候选基因。结论 充分利用白菜已测序的 BAC 或者基因组信息, 将能加快油菜基础研究的步伐。

关键词 油菜; 硫甙; QTL

中图分类号: Q341, Q37 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2012)01-52-04

Fine Mapping and Integration of Glucosinolate QTL in Brassica Napus

ZENG Li-ping, FENG Ji, LONG Yan[△], MENG Jin-ling

(College of plant science and technology of Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China)

ABSTRACT Objective: Adding markers to the confidence interval of glucosinolate content QTL in Brassica napus, and then to do QTL integration and candidate gene prediction. **Methods:** Designed primers according to BAC sequence of Brassica rapa, and then detected polymorphism between the two parents of TN DH population of B.napus. With the polymorphic markers genetic mapping will be done in TN DH population. Finally, QTL mapping and integregation will be done based on the new linkage map. **Results:** Three polymorphic markers were mapped to the confidence interval of seed glucosinolate content QTL, after QTL mapping and integregation were done, the confidence interval was narrow down and two candidate genes were predicted in the region. **Conclusion:** If taking full advantage of the sequenced BAC and whole genomic information, the basic research of B.napus will be speeded up.

Key words: Brassica napus; Glucosinolate; QTL

Chinese Library Classification: Q341, Q37 **Document code:** A

Article ID : 1673-6273(2012)01-52-04

前言

硫甙是芸薹科植物中一种次生代谢产物, 主要在植物的营养体中合成。在生殖生长时期, 硫甙从营养体运输到籽粒中贮存^[1]。如果使油菜植株营养体中的硫甙向籽粒转运的过程中中止, 硫甙将在营养体内大量累积。目前通过对模式植物拟南芥叶片硫甙合成的遗传规律的研究, 在一定程度上揭示了硫甙合成代谢途径^[2]。然而到目前为止, 硫甙的研究却没有完全地揭示出拟南芥硫甙合成与运输的代谢调控机制。对于多倍体作物甘蓝型油菜, 目前的研究主要是关注于油菜籽粒中的硫甙积累, 对其营养体的遗传规律还没有报道, 其代谢调控机制就更不得而知。在本实验室前期的工作中定位了硫甙的许多重要 QTL, 其中位于 A9 连锁群上存在一个主效 QTL 区间, 置信区间有 30cM。因此, 继续进行 QTL 区间的分子标记加密和候选基因分析是克隆油菜中硫甙基因的重要步骤。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用到的实验材料为利用法国的 "双低" 品种

作者简介: 曾丽萍 (1987-), 女, 硕士研究生, 主要研究方向: 油菜基因组学。电话: 027-87283189 E-mail: zlpwuhan2008@163.com

[△]通讯作者: 龙艳 E-mail: longyan@mail.hzau.edu.cn

(收稿日期: 2011-06-02 接受日期: 2011-06-28)

Tapidor 和中国的 "双高" 品种 Ningyou7 为亲本杂交获得的 F1 代经过小孢子培养得到 202 个 DH 系^[3]。

1.2 实验方法

1.2.1 QTL 区间内标记开发方法 (1) 白菜目标 BAC 的筛选 将 TNDH 遗传连锁图 A9 连锁群上硫甙 QTL 区间内的标记与韩国白菜 VCS 和 JW 两个群体遗传图谱进行比对, 找到相对应的白菜 BAC。在 NCBI 数据库中找到目标 BAC 的序列, 将这些序列作为引物设计的模板。(2) 引物的设计 利用引物设计软件 Primer5 设计引物, 引物设计的原则为 GC 含量大于 40%, 退火温度在 50-60 度之间。(3) TN DH 群体多态性筛选及群体基因型扩增 将设计的引物首先在亲本 Tapidor 和 Ningyou7 中进行多态性筛选, 将筛选出的有多态性的引物在 TN DH 群体的 188 个株系中进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系如下: DNA 模板 2.5μl, 缓冲液 1.0 μl, 镁离子 0.8μl, 正向引物 0.5μl, dNTP 为 0.2μl, Taq 为 0.2μl, H₂O 为 4.3μl, 共 10μl。通过聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后银染检测基因型。(4) 多态性标记在 TNDH 遗传图谱上的定位 利用作图软件 joinmap4 进行多态性标记的遗传定位。

1.2.2 QTL 分析和整合 QTL 定位所用数据为 TN DH 群体及其亲本在半冬性油菜产区湖北武汉 (2004 年, 2005 年, 2006 年) 以及湖北大冶 (2006 年) 共 4 个环境点进行种植的种子硫甙含量^[4]。

QTL 定位所用软件为 WinQTLCart2.5 <http://statgen.ncsu.edu/QTLcart/WQTLCart.htm>)^[5,6]。对重新加密后的分子遗传连锁图谱进行硫甬性状 QTL 定位，作图方法为复合区间作图法 CIM，以 P=0.05 为概率，分别对每个环境的表型数据用 1000 次排布测验方法^[7]来确定 LOD 值的阈值。

对于 QTL 的整合利用软件 BIOMERCATOR2.1 进行。

2 结果

2.1 基于白菜 BAC 序列设计的引物

根据实验室前期研究结果，通过比较基因组学的手段获得了甘蓝型油菜 A9 连锁群对应的已测序的白菜的 BAC 名称：KBRB011P07，KBRB022L12，KBRB068N22，KBRB036J07，KBrB051M06，KBRH125N23，根据这些 BAC 序列共设计了 32 对引物(表 1)。

表 1 定位 A9 连锁群根据 BAC 信息设计的引物序列
Table 1 Primer sequences designed by the information of BACS use for adding markers within A9

Primers	Left primers	TM	Right primers	Product-size
KBRB011P07-1	5'CGTTTGCGGGATACTTATGACT3'	60.3	5'GCTCCGAACCTCTTAAATCAA3'	383
KBRB011P07-2	5'CTTTCTTTTGCTTCCTCCTTT3'	60.2	5'GGTCTTCTTTTGCTTTTGGTG3'	362
KBRB011P07-3	5'TGGCTTTGTGTTGACCTTTATCC3'	60.3	5'ATGATGCTCACGTTCAAGAAGA3'	386
KBRB011P07-4	5'GTGAAACACAAGCTCCCATTTT3'	60.3	5'TTCTTTCCCGATATACCCCTTT3'	300
KBRB011P07-5	5'AAGGAGAGGAGGAAGAAGAGGA3'	59.9	5'AGCAAAAGCACCAAACTAGAGG3'	374
KBRB011P07-6	5'TTCCTTATTTACCCGAAGTTCG3'	59.5	5'CAAGGTTTGTACAGGGTTGAAT3'	200
KBRB022L12-1	5'CAGAAATGGAGAAGAACAATGG3'	58.6	5'TCTTTGTATGTGTGTTTCAGGC3'	341
KBRB022L12-2	5'CTTTTGGGCTTGTAGCAGACTT3'	59.9	5'GTCGCCATCTCCGTAATACTC3'	396
KBRB068N22-1	5'CATTGTGATGCTTAGATGGAGC3'	59.7	5'GTTATCAGTCCACCAGGAAACC3'	106
KBRB068N22-2	5'GGCATGGCTTCATGTGTATTTA3'	59.8	5'CCAAC TTCACCAATGTTCTCA3'	371
KBRB068N22-3	5'AGCTTCATAAACGCCTACAAA3'	60.1	5'TCATCGAACGAGAAGAAGTGAG3'	350
KBRB036J07-1	5'GTAGACGGAGTCAGAGGCTGTA3'	58.6	5'CTTCATCACCAAGACACGAACT3'	323
KBRB036J07-2	5'GGGAAAGATAAAGGCACTACCA3'	59.5	5'GGAACAGCTATGGAGGTGTGAT3'	281
KBRB036J07-3	5'ACCAAATCAATCATACAAGCCC3'	60.0	5'GGCACAAGGATAAATACGCTTC3'	232
KBRB036J07-4	5'TAGAGAGGCCAGAAAAGAGGAA3'	59.6	5'TGTGTGTGTGTGTGTGTGAATG3'	244
KBRB036J07-5	5'CAGACAACGTGGAGAAGTGAAG3'	59.9	5'ATTTACTGAAACGGACCAGACG3'	254
KBRB036J07-6	5'CTGACAATGAGGGACAAAGATG3'	59.5	5'CCAACCCCACTAAGTTTCAAC3'	354
KBRB036J07-7	5'GGCAATGTACTAGACGAAACCC3'	59.8	5'CGGAGATTCACTATAAGGTGGC3'	121
KBRB036J07-8	5'GCATATAGCCCACTTACCTC3'	59.9	5'GAGTTCGATAACGGAATAACGG3'	342
KBRB036J07-9	5'TAGGGTTTGATTGAGTCTGCT3'	60.1	5'ATCTCATAGTGGGCAAAAGAA3'	310
KBRB036J07-10	5'TCTTCATGGTCGTGTGGATAAA3'	60.3	5'CTTCTTGTTAGGAAAGCATTGACAC3'	272
KBRB036J07-11	5'TTCTTCTTTATGATCTTCCCGC3'	59.7	5'CTTACTATTGGGCCTTTCATC3'	389
KBRB036J07-12	5'AGAAACCTGCTAAGTGGGATCA3'	60.1	5'GCCGTTTATTGTATTGGTGGT3'	383
KBRB051M06-1	5'CTGACAATGACGAACAAAGATG3'	60.5	5'CCAACCCCACTGACTTCCAAC3'	336
KBRB051M06-2	5'TGTGCGTATGGGTCCTCCAATTATCA3'	61.5	5'GGCATTGAGCTTGACGGGGAGT3'	365
KBRH125N23-1	5'GACGTTGGTGTCTCCGGTAT3'	59.8	5'GTTGAAATCTTCCTCCCAAAGA3'	215
KBRH125N23-2	5'CTTTCTCACCGAATCAACCAAT3'	60.3	5'ATGGGCTCAACTTCACAGATT3'	386
KBRH125N23-3	5'GCATGTGACTACAGCCTCAATC3'	59.7	5'GACGAGAGAAAGACGAGGAGAA3'	380
KBRH125N23-4	5'GCTTCTTCTCTCCAGCTTTCT3'	60.6	5'GCTCATTCTCTTAACCGACGAC3'	343
KBRH125N23-5	5'ATATTCATACGGTCACGGGTCA3'	61.3	5'CGGGCGGGTATTTATTTATGT3'	365
KBRH125N23-6	5'TAGCGATGGTTAGGGAGATGTT3'	59.9	5'AGGTGCGTTGATAAAAGAGGAG3'	245
KBRH125N23-7	5'GCCGTTTATTTGTATTGGTGGT3'	60.0	5'AGAAACCTGCTAAGTGGGATCA3'	383

2.2 TNDH 群体多态性筛选及图谱定位

将设计的 30 对引物分别在 TN DH 两个亲本中进行了多态性筛选后,在 30 对引物中共有 14 对引物表现出多态性。分别将这 14 对引物在 TNDH 群体中进行基因型分析,并用 join-map4 软件进行定位后发现其中的 3 对多态性标记能定位到 A9 连锁群上,另外 8 对标记则同时定位到了 C9 连锁群上,剩余 3 对引物没有能定位到连锁群上。

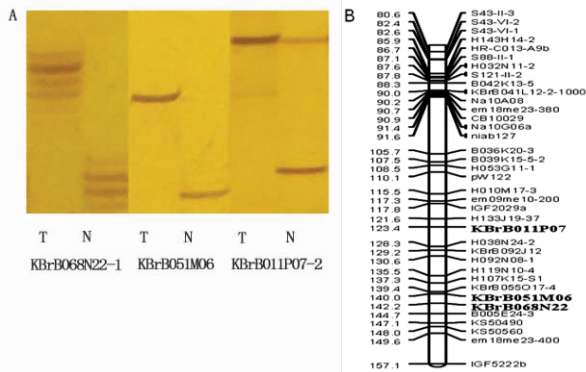


图 1 新开发定位到 A9 连锁群的标记扩增图片及图谱定位结果。加密的标记名称为 KBrB068N22-1、KBrB051M06-2 和 KBrB011P07-2。图 A 为多态性扩增图片,图 B 为加密后的 A9 连锁群。

Fig. 1 The polymorphism and distribution of new developed markers in the A9 target region. The name of the markers are: RB068N22-1, KBrB051M06-2 and KBRB011P07-2 shown by bold. A: Polymorphic markers of two parents in TN DH population; B: A9 linkage group with adding markers

2.3 加密后油菜 A9QTL 区间和白菜连锁群比对结果

将加密标记后的 A9 连锁群与韩国白菜 JW 群体和 VCS 群体的标记进行比对(图 2)。结果表明:甘蓝型油菜和白菜连锁群之间存在很好的共线性关系。同时,在油菜和白菜群体的 A9 连锁群上检测到一个控制籽粒中总硫苷含量的 QTL。这说明芸薹科作物的同源基因可能存在相同或者相似的遗传变异,也证明了在甘蓝型油菜中检测到的 QTL 的真实可靠与稳定性。

2.4 A9 连锁群硫甙 QTL 分析

在 A9 连锁群分子标记加密前,利用软件 WinQTLCart 2.5 进行 QTL 分析后,发现主要 QTL 分布在以下连锁群上: N1, N2, N3, N4, N7, N9, N12, N17 和 N19。其中 A9 连锁群上 4 个环境中分别检测到的三个 QTL 能解释表型方差在 30%以上(图 3)。为了保证检测到 QTL 的稳定与可靠性,加密标记后,利用同样的表型数据对 QTL 进行检测。如图三所示,对比加密标记前后,结果表明 QTL 所在位置基本相同,但不同环境中检测到的 QTL 的峰值位置更为集中。

在分别对 4 个环境的种子硫甙含量进行 QTL 检测时发现 QTL 的数目、位置以及效应大小会有所不同。利用 QTL 整合软件 BioMERCATOR2.1 对这 4 个环境中检测到的种子中硫甙含量的 QTL 进行整合。整合过程中使用的数据利用 QTL 的位置、置信区间、贡献率以及加性效应值。整合结果如图四所示。通过此软件整合 QTL 后, QTL 的位置与前期没有加密标记前相比较缩小了近 6 个 cM,整合后的同义 QTL 对于硫甙含量的

研究具有重要意义。将加密标记前后的硫甙 QTL 的整合图谱进行比对,白菜 A9 连锁群的标记所对应的 BAC 和 Scaffold,以及和拟南芥的比对结果表明在硫甙 QTL 区间内可能存在硫甙转运因子 MAM1 和 MAM3(图 4)。

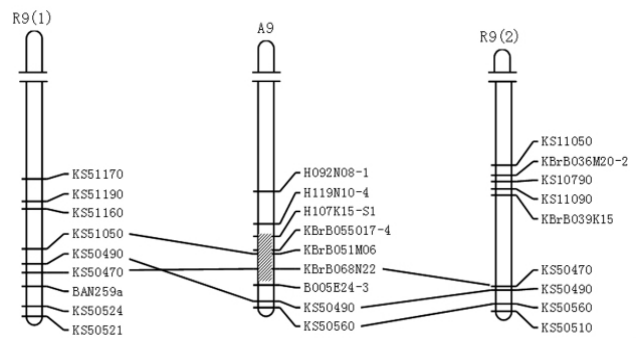


图 2 白菜与甘蓝型油菜作图群体部分 A9 连锁群的比较作图。R9(1): 韩国白菜 JW 群体相对的 A9 部分连锁群; A9: TN 群体 A9 部分连锁群; R9(2): 韩国白菜 VCS 群体 A9 部分连锁群。斜体区域表示硫苷 QTL 区间,黑色直线表示不同群体遗传连锁图间来源于相同的 BAC 开发的分子标记

Fig. 2 Comparasion between A9 linkage group of TN DH population and different mapping population of Brassica rapa. R9(1): A9 linkage group of JW population of B. rapa; A9: A9 linkage group of TN DH map; R9(2): A9 linkage group of VCS population of B. rapa. The bias region represented the position of QTL for glucosinolate content in seeds; the markers linked by black lines were the markers developed from the same BACs on the linkage maps among different populations

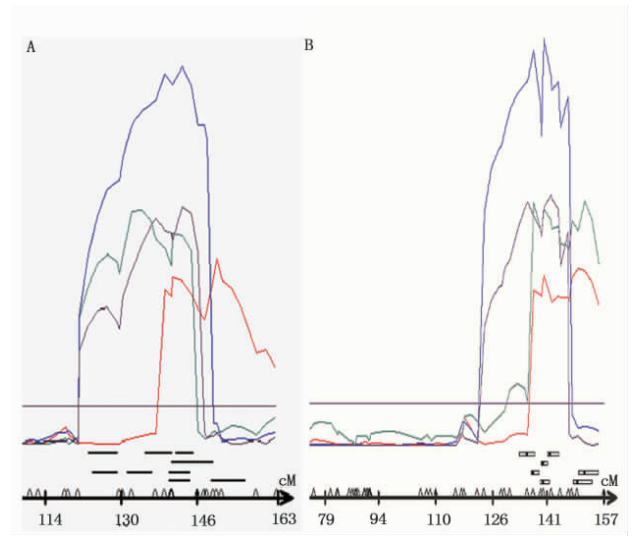


图 3 A9 连锁群 QTL 检测峰图。A: 标记加密之前 A9 连锁群硫甙性状 QTL 检测结果; B: 标记加密之后 A9 连锁群硫甙 QTL 检测结果

Fig. 3 Graph of QTL mapping result in A9 linkage group. A: Result of glucosinolate content QTL detection within A9 before adding markers; B: Result of glucosinolate content QTL detection within A9 after adding markers

3 讨论

芸薹属是十字花科的一种,而且包含了白菜、甘蓝等经济

价值较高的作物，是极为重要的一属。芸薹属包含白菜(AA，2n=20)，甘蓝(CC 2n=18)和黑芥(BB 2n=16)3个基本种以及油菜(AACC 2n=38)，芥菜型油菜(AABB 2n=36)和埃塞俄比亚芥(BBCC 2n=34)3个复合种。通过大量种间人工合成的研究结果得出结论，芸薹、黑芥和甘蓝为3个基本染色体组，这3个基本组通过相互杂交和自然加倍而形成现在的二倍体种。白菜作为油菜的二倍体亲缘种，具有和白菜相同的A基因组，因此对于A基因组的区段来说，白菜和油菜在基因区保持着高度的保守性。如Cho等(2010)通过对存在于白菜、油菜测序的BAC中含油量相关基因的比较发现白菜和油菜基因组中基因区的相似度高达99.2%^[8]。因此，白菜与油菜基因组功能的保守性和基因组间的共线性，可以加速利用白菜的生物信息学方法对油菜基因组的研究。

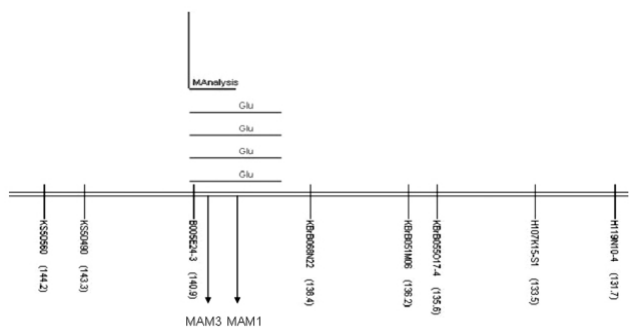


图4 加密后的A9连锁群硫甙QTL整合结果。其中灰色“└”表示整合前的QTL，红色“└”表示整合后的QTL。其中“└”的横向长度表示QTL置信区间的大小，纵向的位置和长度分别表示QTL峰值位置和QTL对籽粒总硫甙含量的贡献率大小

Fig. 4 The glucosinolate content QTLs distribution after integrated detected on A9 linkage which has been adding markers. The gray color “└” represented QTLs before integrated, The red color “└” represented QTLs after integrated. The length of the horizontal bars in “└” indicated the confidence interval of QTL, and the vertical bars indicated the peak position

作为重要的农艺性状，油菜籽粒中硫甙含量是受复杂的代谢网络调控。在调控网络中有许多关键基因起着重要的作用，要深入解析这些关键基因的作用，QTL定位、克隆起着至关重要的作用。Uzunova等(1995)在甘蓝型油菜中通过QTL的研究，得到4个控制籽粒硫甙总量的QTL，分别位于第2、9、16和18连锁群上，解释的总表型变异方差在70%以上^[9]。Zhao等(2003)检测得到5-6个控制籽粒硫甙含量的QTL，解释的总表型变异方差在70%以上^[10]。Howell等(2003)以2个回交群体为研究材料，定位出4个控制籽粒总硫甙的QTL，并且通过比较分析发现，研究中得到的4个控制籽粒总硫甙的QTL与以前的研究的结果一致，分别分布在A9、C2、C7和C9连锁群上。而后通过后续研究分析，认为检测得到的控制籽粒总硫甙QTL区域所对应的控制籽粒低硫甙的基因可能来自与原始的低硫甙资源Bronowski^[12]。

本研究在前期QTL初步定位鉴定出位于A9连锁群的主

效QTL的基础上，通过和油菜亲本种白菜遗传图谱的比较，找到可能的目的BAC，并根据测序BAC信息设计引物，将有多态性的3对引物在TN DH群体中进行遗传定位，通过对加密后的遗传图谱进行QTL定位和整合发现位于A9的QTL区间比原来缩小6个cM，还进一步通过比对初步判定出两个可能的候选基因。但目前遗传连锁图谱的分子标记大都属于随机标记，如SRAP、SSR等，在随机标记构建的图谱上发现的标记间和标记与基因间的关联是一种随机关联，仅是一种分子水平标记上的广泛的共线性，从方法学上来讲，不失为一种有益的探索。但标记水平上的共线性只能反映宏观水平上的共线性，不足以完全揭示甘蓝型油菜和白菜之间的同源性关系，更不能反映基因组内部大量微小的缺失、插入和易位等分子重排。因此，随着新一代测序技术的发展，需要进一步利用基因组序列信息来进行同源区段的比较及候选基因的寻找，并最终进行基因的克隆。

参考文献(References)

[1] Chen S, Halkier BA. Characterization of glucosinolate uptake by leaf protoplasts of Brassica napus [J]. J Biol Chem, 2000, 275: 22955-22960

[2] Grubb CD, Abel S. Glucosinolate metabolism and its control [J]. Trends Plant Sci, 2006, 11: 89-100

[3] 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

[4] Shi JQ, Li RY, 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

[5] Zeng Z B. Precision mapping of quantitative trait loci [J]. Genetics, 1994, 136: 1457-1468

[6] Wang S C, Bastern J, Zeng Z B. 2006 Windows QTL Cartographer 2.5 [P]. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)

[7] Churchill G A, Doerge R W. Empirical threshold values for quantitative trait mapping [J]. Genetics, 1994, 138: 963-971

[8] Cho K, O'Neill CM, Kwon SJ, et al. Sequence-level comparative analysis of the Brassica napus genome around two stearoyl-ACP desaturase loci [J]. The Plant Journal, 2010, 61(4): 591-599

[9] Uzunova M, Ecker W, Weissleder K, et al. Mapping the genome of rapeseed (Brassica napus L.). I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 194-204

[10] Zhao J, Meng J. Detection of loci controlling seed glucosinolate content and their association with Sclerotinia resistance in Brassica napus [J]. Plant Breeding, 2003, 122: 19-23

[11] Howell PM, Sharpe AG, Lydiate DJ. Homoeologous loci control the accumulation of seed glucosinolates in oilseed rape (Brassica napus) [J]. Genome, 2003, 46: 454-460

[12] Sharpe AG, Lydiate DJ. Mapping the mosaic of ancestral genotypes in a cultivar of oilseed rape (Brassica napus) selected via pedigree breeding[J]. Genome, 2003, 46: 461-468