

# RAPD 标记构建芥蓝 × 甘蓝分子标记连锁图

陈书霞<sup>1</sup> 王晓武<sup>2</sup> 方智远<sup>2</sup> 程智慧<sup>1</sup> 孙培田<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 西北农林科技大学园艺系, 杨凌 712100; <sup>2</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘要:** 以芥蓝 C<sub>100-12</sub> × 甘蓝秋<sub>50-77</sub> 为杂交组合, 构建了 F<sub>2</sub> 作图群体, 利用 300 个随机引物对两亲本进行了 RAPD 检测, 共筛选到 150 个 RAPD 引物在亲本间表现多态, 多态引物的比率为 58.3%。共分析了 52 个引物产生的 96 个多态性 RAPD 标记在该群体中的遗传。96 个 RAPD 标记中有 94 个在 F<sub>2</sub> 群体中的分离比符合 3:1, 说明该群体适合于 QTL 分析, 共发现两对共分离的 RAPD 标记。利用该作图群体构建了甘蓝的基本遗传图谱。该图谱由 9 个主要的连锁图构成, 覆盖基因总长度约为 555.7 cM。

**关键词:** 分子标记; 连锁图; RAPD; 甘蓝

**中图分类号:** S 653 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2002) 03-0229-04

甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata*) 的遗传图谱多用 RFLP 标记构建, 目前已有 9 个连锁图问世, 其中所含标记数目最多的是 Cheung 所构建的连锁图, 共含 310 个标记, 覆盖全基因组的 1 606 cM<sup>[1]</sup>。与 RFLP 分析相比, RAPD 方法的优点在于操作程序简单、迅速、不用同位素或非同位素标记, 只需要极少量的 DNA 作模板。迄今已有多种植物是用 RAPD 标记建成的分子连锁图<sup>[2-4]</sup>。本文报道我们以芥蓝 × 甘蓝的 F<sub>2</sub> 群体为基础, 用 96 个 RAPD 标记建成的芥蓝 × 甘蓝的 RAPD 标记连锁图, 为甘蓝的分子标记连锁图提供框架。

## 1 材料与方法

### 1.1 芥蓝 × 甘蓝的 F<sub>2</sub> 群体构建

本试验所用的亲本材料由中国农业科学院蔬菜花卉研究所甘蓝组提供。以经几代自交的芥蓝 C<sub>100-12</sub> 为母本 (P<sub>1</sub>), 以高代自交纯合的甘蓝自交系秋<sub>50-77</sub> 为父本 (P<sub>2</sub>), 以其 F<sub>2</sub> 为作图群体。1995 年底在中国农业科学院蔬菜花卉研究所试验场种植 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub>, 并杂交获得 F<sub>1</sub> 种子, 亲本套袋自交留种。1996 年底在该试验场种植, 在其生长期初步调查 P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 和 F<sub>1</sub> 的抽薹时间、开花时间、株高、开展度、茎高、花色等农艺性状。1997 年底播种亲本及 F<sub>1</sub> 自交所得的 F<sub>2</sub> 种子。1998 年 3 月 25 日定植大田。P<sub>1</sub>、P<sub>2</sub> 各种植 15 株, F<sub>2</sub> 种植 120 株, 田间管理同常规苗。

### 1.2 基因组 DNA 的提取和 RAPD 扩增

分离群体按单株取样 1 g 分别提取总 DNA<sup>[5]</sup>, 两亲本及 F<sub>1</sub> 每个单株取 0.1 g 混合后提取总 DNA<sup>[5]</sup>。DNA 浓度用琼脂糖凝胶电泳法测定。根据 DNA 浓度测定值将所有样品浓度调整到 40 ng/μL。

引物选用 Operon 公司的 10 bp 寡聚核苷酸随机顺序引物 15 套共计 300 个。采用 PE 9600 型 PCR 仪。Tag 酶购自鼎国生物技术发展中心。RAPD 反应参照文献 [5] 所用程序并略有调整, 反应程序为 95 3 min, 36 30 s, 72 80 s, 92 20 s, 40 个循环。PCR 扩增完成后, 样品加入 3 μL 15% Ficol 400 加样缓冲液, 混匀, 取 8 μL 进行 4% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。聚丙烯酰胺凝胶电泳用简易银染法染色之后用数码相机拍照, 直接输入计算机。

收稿日期: 2001-08-02; 修回日期: 2001-11-26

基金项目: 农业部“蔬菜遗传与生理重点实验室”资助课题

刘玉梅、杨丽梅、庄木为作者之一。

### 1.3 连锁分析

根据 RAPD 扩增电泳结果将每个  $F_2$  单株的电泳带型按亲本类型归类, 用“ A ”代表来源于  $P_2$  的隐性纯合标记, “ C ”代表相应的显性纯合标记和杂合标记, “ B ”代表来源于  $P_1$  的隐性纯合标记, “ D ”代表相应的显性纯合标记和杂合标记, 将所有的 RAPD 标记转化为 A、B、C、D 表示的形式。设置最大遗传距离为 50.0 cM, 最小 LOD 值为 3.0。用“ group ”指令把全部标记数据分成连锁群, 用“ compare ”指令确定每个连锁群的标记排列顺序, 确定顺序后, 用“ Map ”指令进行图谱构建。

## 2 结果与分析

### 2.1 亲本的多态性分析

亲本芥蓝  $C_{100-12}$  和甘蓝秋 $_{50-17}$  各农艺性状 (除株高外) 存在显著差异 (表 1)。

共用 300 个随机引物扩增亲本, 有 257 个引物扩增出清晰可辨的带型, 谱带总数为 3 642 条, 有效引物的比例为 74%, 平均每个引物扩增的带数为 14 条。其中有 150 个引物的扩增产物在芥蓝  $C_{100-12}$  和甘蓝秋 $_{50-17}$  之间表现多态, 多态性引物的比率为 58.3%, 有 27 个引物具有 2 条甚至 3~4 条多态性带。这有利于定位出更多的多态性位点。扩增反应所产生的谱带大小在 0.15~3.5 kb 之间。本研究选用了 52 个带型清晰、多态性丰富的随机引物, 用于遗传图谱的构建。RAPD 标记为显性标记, 在  $F_1$  代中各单株和两亲本之一具有相同的带型。谱带在  $F_2$  代表现为分离。用 52 个引物对  $F_2$  代单株进行 PCR 扩增, 共得到 728 条扩增产物, 其中表现为多态性的扩增产物 96 条, 占扩增产物的 13.2%。对这些产物进行统计归类: 96 条多态性产物主要表现为 3:1 分离, 其中仅有 3 条标记呈现显著偏分离, 有一条标记呈现极显著偏分离。偏分离标记占 4.2%。

### 2.2 RAPD 连锁图谱的构建

由芥蓝  $C_{100-12}$  × 甘蓝秋 $_{50-17}$  的  $F_2$  分离群体中 RAPD 标记大部分呈 3:1 分离比可知, 该群体适合作遗传分析和构建遗传图谱。利用 Mapmaker/exp version 3.0 软件对  $F_2$  分离群体 RAPD 标记进行连锁图谱构建 (图 1)。

### 2.3 共分离 RAPD 标记的检测

在所构建的 9 个连锁群中, 有 2 对标记呈现共分离。其中呈现共分离的三个标记来自于同一引物  $L_{07-0550}$ 、 $L_{07-0560}$  和  $L_{07-0555}$ , 另一对标记来自于不同引物  $R_{08-0750}$  和  $U_{16-0570}$ 。重复扩增所得的共分离标记, 结果完全一致。说明这两对标记分别紧密连锁在同一座位上 (图 2)。

## 3 讨论

### 3.1 RAPD 标记在后代中的表现及分离

从 RAPD 标记在  $F_2$  代单株中的分离来看, 在这 96 条多态性产物中, 来自甘蓝的标记和来自芥蓝的标记各占 48 条, 其中未发现隐性标记。总体来说, 本杂交组合中 RAPD 标记以符合 3:1 分离为主。96 条多态性标记中, 来自父本的标记和来自母本的标记一样多, 说明父本、母本在该杂交组合后代中占同等重要的比重, 也说明该杂交组合中后代基因的均衡性。

### 3.2 RAPD 连锁图在应用上的问题

由于 RAPD 为显性标记而且操作相对简单, 因此可以快速而有效地找到大量的多态性标记, 从而

表 1 各性状在亲本间的差异显著性测验

性 状 Trait	自由度 Degree of freedom	平均数 Mean		Ttest
		$C_{100-12}$	秋 $_{50-17}$	
伸展度 Spread range	26	33.47	43.66	2.9039 **
株 高 Plant height	26	34.21	34	0.0613
叶 长 Leaf length	26	20.65	27.27	2.006 *
叶柄长 Petiole length	26	6.09	9.79	7.74 **
叶 宽 Leaf width	26	10.64	19.6	9.846 **
茎 高 Stem height	26	13.5	10.4	2.348 *
叶 数 Leaf number	26	9	16	6.538 **

\*表示 5% 的显著水平; \*\*表示 1% 的显著水平。

\*The significant level of 5%; \*\*The significant level of 1%.

在相对短的时间内构建基因图谱。该图谱目前只有不超过 100 个标记，只是一个框架图，其中有多区域还超过 40 cM 的较大间隙，从进行 QTL 定位的研究和提高 QTL 定位的准确性来讲，还必须结合其它的标记方法填充图谱间隙，增加图谱密度。另外由于 RAPD 标记重复性较差，要想办法改进引物等内部条件，如设计 SCAR 引物等，但 SCAR 引物费用较高，并且比较繁琐。因此我们设计用 ERAPD 的方法来进行 RAPD 稳定性的改进<sup>[5]</sup>。

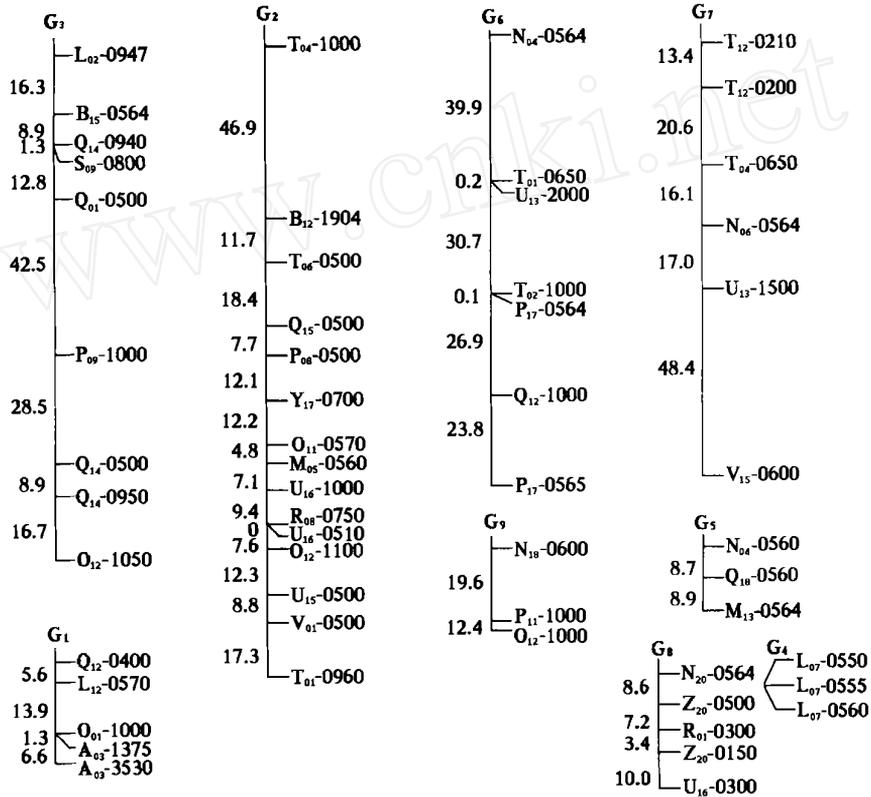


图 1 芥蓝 ×甘蓝 RAPD 标记连锁图

Fig. 1 RAPD linkage map of a cross between *B. oleracea* var. *capitata* × *B. oleracea* var. *alboglabra*

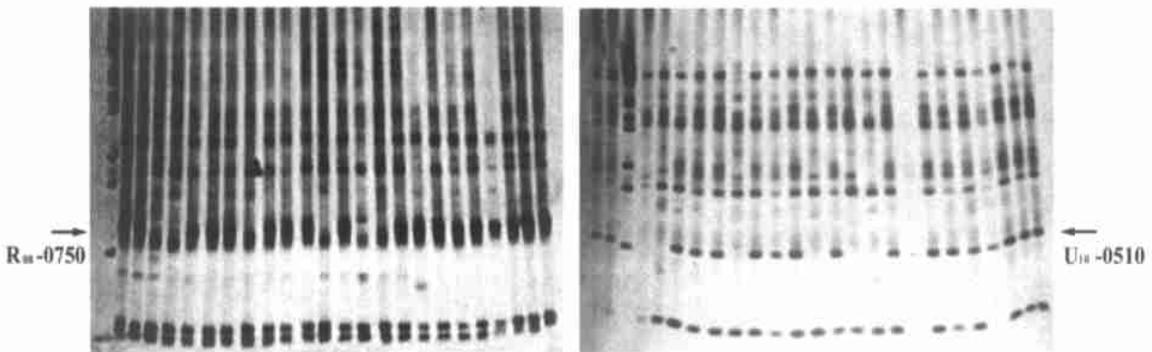


图 2 R<sub>08</sub>和 U<sub>16</sub>在 47 ~ 72 单株中产生的共分离标记

Fig. 2 Markers of cosegregation by R<sub>08</sub> and U<sub>16</sub> in 47 - 72 F<sub>2</sub> individuals

### 3.3 RAPD 标记转化为延长随机扩增 DNA (ERAPD) 标记研究

为了改进 RAPD 稳定性，本研究又利用延长随机引物扩增 DNA (Extended Random Primer Amplified DNA, ERAPD) 标记方法，把所得到的某些标记转化为了 ERAPD 标记。这种方法中，引物的延长过

程是一个逐步添加碱基和筛选引物的过程, 延长引物的设计无需额外的碱基顺序信息, 直接在随机引物的 3' 端添加一个或两个碱基。本研究进行了延长一个碱基的研究。

对于  $O_{12}$  及其延长一个碱基的引物组合, 选用  $P_1$ 、 $P_2$ 、单株 6、单株 7 做模板, 分别对随机引物  $O_{12}$  和延长碱基所组成的 10 个引物对进行扩增, 结果发现, 延长一个碱基的引物组合能扩增出比原 RAPD 引物扩增较多的带, 其中原 RAPD 扩增出 3 条特异带分别为 1 000 bp、1 050 bp、1 100 bp, 经延长一个碱基的引物对筛选发现 AG 组合即  $O_{12}$ -A +  $O_{12}$ -G 组合可以扩出 1 050 bp 和 1 100 bp 的特征带, 但 1 000 bp 的特征谱带在延长引物组合中未找到对应谱带, 且所找到的谱带都相应地得到加强。随后用 AG 组合来进行单株检测, 上述两带能够和原 RAPD 特征谱带吻合, 且稳定性得到增强。

对随机引物  $P_{17}$  及其延长一个碱基的引物组合, 选用  $P_1$ 、 $P_2$ 、单株 6、单株 7 进行扩增筛选, 结果发现原 RAPD 扩增得到 4 条分别为 200 bp、550 bp、560 bp、1 100 bp 的谱带, 其中分子量为 550 bp 和 560 bp 的特征谱带有 AG 组合扩出, 且谱带比较强, 此组合也扩出了 1 100 bp 的谱带, 但较弱。200 bp 的特征谱带在延长引物组合中未找到对应的扩增物。用前 1~46 个单株和亲本来进行单株检测, 发现  $P_{17}$ -A +  $P_{17}$ -T 能特异扩增 550 bp 和 560 bp 的特征谱带, 经反复试验都能得到相同的结果。利用 Mapmaker/exp version 3.0 软件所得到的 ERAPD 标记和  $F_2$  分离群体 RAPD 标记对进行连锁图谱构建, 发现 ERAPD 标记没有整合到图谱中去。但在随机引物  $Q_{14}$  和  $R_{13}$  及其随机引物的延长引物组合中未找到对应的特异谱带。我们将继续把其它的 RAPD 标记转换成 ERAPD 标记, 以增加图谱的实用性。

#### 参考文献:

- 1 Cheung W Y, Champague G, Hubert N, et al. Comparison of the genetic maps of *Brassica napus* and *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 569~582
- 2 Robert S R, John G K W, Kenneth A F. Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1992, 89: 1477~1481
- 3 尹佟明, 黄敏仁, 王明麻, 等. 利用 RAPD 标记和单株树大配子体构建马属松的分子标记连锁图谱. *植物学报*, 1997, 39 (7): 607~612
- 4 陈 洪, 朱立煌, 徐吉臣, 等. RAPD 标记构建水稻分子连锁图. *植物学报*, 1995, 37 (9): 677~684
- 5 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 甘蓝显性雄性不育基因的延长随机引物扩增 DNA (ERAPD) 标记. *园艺学报*, 1999, 26 (1): 23~27

## Construction of Molecular Linkage Map of *Brassica oleracea* var. *alboglabra* × *B. oleracea* var. *capitata* by RAPD analysis

Chen Shuxia<sup>1</sup>, Wang Xiaowu<sup>2</sup>, Fang Zhiyuan<sup>2</sup>, Cheng Zhihui<sup>1</sup>, and Sun Peitian<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China;

<sup>2</sup>Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

**Abstract:** The hybrids were produced by a cross between *Brassica oleracea* var. *capitata* and *B. oleracea* var. *alboglabra*. A total of 300 random primers were initially screened using two parents, of which 150 showed polymorphism between two parents. The ratio of polymorphism primers is 58.3%. 96  $F_2$  individuals were analyzed using 52 10 bp random primers to select polymorphic, stable and repeatable fragment in preliminary segregation analysis. Most (95.8%) of the segregating fragments followed the expected 3:1 Mendelian segregation; 4.2% showed significant segregation distortion. This shows that the population is suited for analysis of QTLs. There were two pairs of RAPD markers which showed cosegregation. A genetic linkage map of *B. oleracea* was constructed based on the segregation of 96 RAPD polymorphic loci in one  $F_2$  population of *B. oleracea* var. *capitata* × *B. oleracea* var. *alboglabra*. The genetic markers defined nine linkage groups, covering 555.7 recombination units.

**Key words:** Molecular linkage map; RAPD; *Brassica oleracea* var. *capitata*