

控制白菜叶片紫色的 *pur* 基因初步定位

刘瑾^{1,2}, 汪维红², 张德双², 于拴仓², 张凤兰², 赵岫云^{1,2},
余阳俊², 徐家炳², 卢桂香²

(1. 北京农学院 植物科学技术学院 北京 102206; 2. 北京市农林科学院 蔬菜研究中心 农业部
华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室 北京 100097)

摘要: 为了定位控制白菜叶片紫色的 *pur* 基因, 选用大白菜自交系 09-680 和紫色小白菜 09N-742 进行杂交构建了一个由 307 个单株组成的 F₂ 群体, 采用群体分离分析法(Bulked segregant analysis, BSA) 构建紫色和绿色池, 对分布在白菜基因组 10 个连锁群上的 125 个 InDel 标记和 100 个 SSR 标记进行多态筛选, 其中位于 A3 连锁群末端的 2 个 In-Del 标记 BrID10999 和 BrID10399 与紫色性状表现连锁。连锁分析发现 2 个标记与 *pur* 基因的遗传距离分别为 7.3, 5.7 cM, 位于 *pur* 基因的同侧。在此基础上, 根据这些标记所在区域的 BAC 序列设计了 23 对 SSR 引物, 其中来源于 KBrH005P10 的 SSR 标记 BVRCP10-6 位于 *pur* 基因的另一侧, 距离 *pur* 基因仅 1.9 cM。这些标记可有效用于白菜紫色性状的分子标记辅助育种, 也为进一步精细定位和克隆 *pur* 基因奠定了基础。

关键词: 大白菜; 叶片颜色; *pur*; 基因定位

中图分类号: S634.03 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)01-0049-05

Primary Mapping of *pur* a Gene Controlling Purple Leaf Color in *Brassica rapa*

LIU Jin^{1,2}, WANG Wei-hong², ZHANG De-shuang², YU Shuan-cang², ZHANG Feng-lan²,
ZHAO Xiu-yun², YU Yang-jun², XU Jia-bing², LU Gui-xiang²

(1. Plant Science and Technology College, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China;
2. Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key
Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops(North China), Ministry of
Agriculture, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to map the *pur* gene controlling purple leaf color in *Brassica rapa*, a F₂ population including 307 individuals was constructed by crossed Chinese Cabbage inbred line 09-680(green leaf) with non-heading Chinese Cabbage inbred line 09N-742(purple leaf). A bulk segregant analysis(BSA) technology was conducted by screening 125 PCR-based insertion/deletion(InDel) markers and 100 simple sequence repeats(SSR) markers distributed on 10 linkage groups to screen the polymorphism between the purple and green leaf pools. Of these, two In-Del markers BrID10999 and BrID10399 were found to be linked to the *pur* gene. By linkage analysis, two markers were located at the end of A3 at the same side of *pur* gene at distances of 7.3, 5.7 cM, respectively. In order to obtain tightly linked markers on both sides of *pur* gene, 23 SSR primers derived from three bacterial artificial chromosome(BAC) clones were selected, of which one SSR marker BVRCP10-6 from KBrH005P10 was identified as closely linked to *pur* gene at a genetic distance of 1.9 cM, at the other side of the *pur* gene. These markers could be very helpful for marker-assisted selection(MAS) in purple Chinese cabbage hybrid breeding programs as well as for fine mapping and cloning this gene.

Key words: *Brassica rapa* L.; Leaf color; *pur*; Gene mapping

收稿日期: 2012-11-16

基金项目: 科技部“973”项目(2012CB113906); 北京市科技项目(D111100001311002); 国家科技支撑计划(2012BAD02B01); 北京市自然科学基金项目(6092009); 大宗蔬菜产业技术体系(CARS-25-A-11); 北京市留学人员科技活动择优资助项目(优秀类)

作者简介: 刘瑾(1986-), 女, 山西吕梁人, 在读硕士, 主要从事蔬菜分子育种研究。

通讯作者: 张凤兰(1964-), 女, 山东莱阳人, 研究员, 博士, 主要从事蔬菜分子育种研究。

白菜紫色品种的紫红色是由花青素类物质所致^[1]。花青素又称花色素,是一类广泛存在于植物中的水溶性天然色素,属黄酮类化合物^[2]。最早且最丰富的花青素是从葡萄酒渣中提取的葡萄皮红,它于 1879 年在意大利上市^[3]。花青素是迄今为止所发现的最强效的自由基清除剂,具有抗氧化衰老、抗突变、抗癌与抗动脉硬化功能;此外,花青素还是一种安全、无毒的天然食用色素,在食品、化妆、医药等方面有着巨大的应用潜力。同时大白菜球色育种(黄色、桔红色和紫色等叶色品种的选育)是品质育种的重要内容之一,不仅丰富了大白菜品种的多样性,而且满足了人们对大白菜品质的多种要求^[4]。大白菜球色可以作为指示性状,用以在早期辅助选择所需要的材料,以减少工作量,并借助分子标记技术研究,极大地提高育种效率。因此,培育色彩多样、富含花青素的蔬菜新品种已成为品质育种的主要内容。

在芸薹属作物中,紫甘蓝作为一种富含花青素的特色蔬菜,早在 20 世纪 90 年代就进入我国蔬菜市场,并受到消费者的青睐。Yuan 等^[5]采用 HPLC 检测了 4 个普通甘蓝品种和 4 个紫甘蓝品种的总花青素含量。研究发现 4 个普通甘蓝品种中几乎检测不到花青素,而 4 个紫甘蓝品种花青素含量(以鲜质量计)高达 1.60 mg/g。2006 年,国外推出了应用细胞质 Ogu CMS 不育系育成的紫色小白菜杂交一代品种紫罗兰,不久便被引入中国市场,成为蔬菜市场的新宠。近年来,培育紫色大白菜品种成为大白菜品质育种的主要研究内容之一。2007 年国内首次报道了将紫罗兰紫色基因导入大白菜中^[6],其后通过杂交,获得了紫罗兰和大白菜的杂种,但由于紫罗兰为细胞质不育材料,并且紫色性状表现出数量性状的遗传特征^[7-8],这都给紫色性状的转育带来困难;此外,孙日飞等^[1]、张明科等^[9]和 Hayashi 等^[10]分别尝试将紫芥菜、紫菜薹和紫红色芜菁等的紫色性状导入到大白菜中。然而,由于植株形态和食用器官等方面的差异,要获得紫色大白菜新种质,后代选择难度较大。

研究白菜紫色叶片形成的分子机理,定位并克隆控制紫色形成的基因对于紫色大白菜分子育种具有重要意义。张明科等^[9]研究表明,来源于紫菜薹的紫色为数量性状,是受一对主基因控制的不完全显性遗传,并呈现出剂量效应,可能还受到微效基因和环境条件的共同影响。在此基础上,将控制紫色性状的主基因定位于白菜 A9 连锁群上,并获得了其双侧 RAPD 标记,遗传距离分别为 13.73,18.65 cM。

Hayashi 等^[10]将控制芜菁紫红色的基因命名为 *Anp*, 将其定位到 A7 连锁群上,与 SSR 标记 BRMS-036 和 CAPS 标记 OPU10C 表现连锁,遗传距离分别为 2.4 cM。尽管如此,这些标记与目标性状的遗传距离还相对较远,要克隆控制紫色的基因,并阐明紫色形成的分子机理还需要大量的研究工作。

张德双等^[11]引进了一份可育的紫色小白菜,其叶片中花青素含量(以鲜质量计)高达 2.42 mg/g(未发表),遗传分析表明,紫色受一对显性主效基因控制,该材料是创制紫色大白菜新种质的理想材料。本研究将在此基础上,利用 F_2 分离群体结合 BSA 定位控制白菜叶片紫色的 *pur* 基因,并开发与紫色性状连锁的共显性分子标记,为紫色大白菜分子标记辅助育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

母本为普通大白菜高代自交系 09-680,外叶绿色;父本为紫色小白菜自交系 09N-742,叶片深紫色,均来源于北京市农林科学院蔬菜研究中心。双亲杂交后得到 F_1 ,进一步自交获得 F_2 群体。用 307 个单株组成的 F_2 群体进行紫色性状的遗传定位和分子标记的开发。从中选取了 121 个单株用于验证标记的可靠性,其中的 74 个紫色单株继续自交获得 F_3 家系,推断其 F_2 的基因型。

1.2 表型调查

试验在北京市农林科学院蔬菜研究中心空调温室进行。2010 年 8 月种植母本(09-680)、父本(09N-742)、 F_1 (09-680 × 09N-742)和 307 个单株组成的 F_2 分离群体于 50 孔育苗穴盘中,于 2~3 叶期调查叶色。同年将 74 个紫色单株移栽到直径 20 cm 的营养钵,在空调温室自交授粉获得 F_3 种子。2011 年 4 月将 F_3 家系播种在 50 孔育苗穴盘中,每家系播 40 粒种子,于 2~3 叶期调查叶色,用以鉴定 F_2 各单株的基因型。

1.3 基因组 DNA 提取及紫色、绿色池的构建

取母本、父本、 F_1 和 F_2 分离群体的叶片用液氮速冻,于 -80℃ 冰箱冻存,以备 DNA 提取。采用 CTAB 法提取总 DNA。紫外分光光度计测定 DNA 浓度和纯度,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量,将模板 DNA 浓度调整到工作液浓度 30 ng/μL。根据 307 个 F_2 单株的调查结果,随机选取表现紫色和绿色单株各 11 株,将 DNA 等量混合组成紫色池和绿色池。

1.4 标记分析及 *pur* 基因的定位

所用引物为 125 个 InDel 标记^[12]和 100 个 SSR

标记^[13-14]。此外,根据与紫色性状连锁标记 BrID10399 所在区域的 BAC 序列设计了 23 对 SSR 引物,引物设计用 Primer 3.0 软件。PCR 反应体系为 12.5 μ L 其中包含:1 \times PCR 缓冲液 0.25 mmol/L dNTPs 1.0 μ mol/L 上下游引物 30 ng 模板 DNA, 1 U *Taq*。PCR 扩增采用 Touchdown 程序。热循环程序为:94 $^{\circ}$ C 变性 3 min 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min 62 $^{\circ}$ C 复性 1 min (每个循环降低 0.8 $^{\circ}$ C) 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 12 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min 50 $^{\circ}$ C 复性 1 min 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 23 个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 8 min。扩增产物用 3% 超高分辨率琼脂糖凝胶电泳或 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。所有引物均由上海生工生物工程公司合成。

1.5 连锁分析

对双池间表现多态的标记检测其在 F_2 群体 307 个单株的带型。与 09N-742 条带相同的记作 b, 与 09-680 条带相同的记作 a,同时含有 2 个条带的记作 h。根据各单株标记的带型结果,结合单株叶片颜色表型鉴定结果,利用 JoinMap 3.0 软件进行连锁分析^[15],按 Kosambi 函数计算遗传距离^[16],利

用 Mapchart 绘制连锁图谱^[17]。

1.6 标记的可靠性验证

对 121 个 F_2 单株自交获得的 F_3 家系,通过 F_3 家系的叶色分离情况推断其 F_2 的基因型 纯合紫色记为 PP 杂合紫色记为 Pp 绿色记为 pp。用获得的 3 个标记对这 121 个单株进行可靠性验证,与 09N-742 条带相同的记作 P,与 09-680 条带相同的记作 G,同时含有 2 个条带的记作 H。通过带型和表型的比对,计算标记选择的吻合率。

2 结果与分析

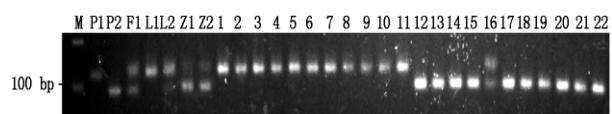
2.1 亲本间和两池间多态性引物的筛选

在 125 对 InDel 标记和 100 对 SSR 标记中,86 个在双亲间表现出了多态性,多态性比例为 38.2%。进一步在紫色池和绿色池之间筛选发现,仅有 2 个 InDel 标记在两池间表现出了差异,分别为 BrID10999 和 BrID10399(表 1)。打开双池进行 PCR 扩增 2 个标记在紫色单株和绿色单株间表现差异(图 1),初步推断 2 个标记与叶片紫色 *pur* 基因连锁。

表 1 A3 连锁群上与 *pur* 基因连锁标记的引物序列

Tab.1 Sequences of markers linked to *pur* gene on A3

标记 Markers	类型 Type	来源 Source	上游引物(5'-3') Forward primer sequences (5'-3')	下游引物(5'-3') Reverse primer sequences (5'-3')	产物大小/bp
BrID10999	InDel	Wang <i>et al</i> 2011	CGAAGTTGGTTCGTATGTG	TTTGGAGGTCTACCAAATG	121
BrID10399	InDel	Wang <i>et al</i> 2011	GTGCATCAGTGAGGGTATCT	ACACAGACGTGGTTAGTGTG	86
BVRCP10-6	SSR	KBrH005P10	CATACCAACGTGCTTTGAAGA	TCAATTGGTGCTCAGACGAA	226



M. 50 bp DNA Marker; P1. 大白菜 09-680; P2. 紫色小白菜 09N-742; L1 L2. 绿色池; Z1 Z2. 紫色池; 1~11. 绿色单株; 12~22. 紫色单株。
M. 50 bp DNA Marker; P1. Chinese cabbage inbred line 09-680 with green leaves; P2. Non-heading Chinese cabbage inbred line 09N-742 with purple leaf; L1 L2. Green pools; Z1 Z2. Purple pools; 1~11. Green individuals; 12~22. Purple individuals.

图 1 引物 BrID10399 扩增图

Fig.1 The PCR amplification pattern with primer BrID10399

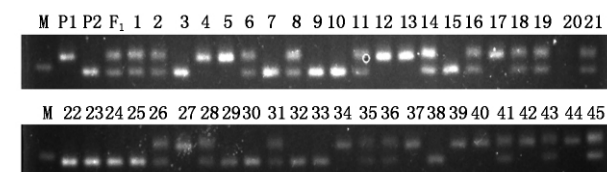
2.2 与 *pur* 基因紧密连锁的 SSR 标记开发

选取 A3 连锁群上 BrID10399 所在区域的 3 个 BAC 克隆(登录号: KBrB065L05、KBrH006L17 和 KBrH005P10),用 Primer 3.0 设计了 23 对 SSR 特异引物,其中来源于 KBrH005P10 的共显性标记 BVRCP10-6 在双亲间扩增出了多态性(表 1),经 F_2 群体验证,重组率仅为 1.9%(图 2)。

2.3 连锁分析

将以上 3 个标记在群体中分析,并利用 Joinmap 3.0 软件进行定位,构建了一张包含 *pur* 基因、1 个

SSR 和 2 个 InDel 标记的部分连锁图,该图谱覆盖基因组长度 9.2 cM,标记间平均距离为 3.1 cM(图 3)。标记 BrID10999 和 BrID10399 位于 *pur* 基因的一侧,与 *pur* 基因的遗传距离分别为 7.3 5.7 cM,根据 2 个标记在基因组中的位置^[13],推断 *pur* 基因位于 A3 连锁群的末端。BVRCP10³ 位于 *pur* 基因的另一侧,遗传距离仅为 1.9 cM。



M. 50 bp DNA Marker; P1. 大白菜 09-680; P2. 紫色小白菜 09N-742; 1~45. F_2 单株。

M. 50 bp DNA Marker; P1. Chinese cabbage inbred line 09-680 with green leaves; P2. Non-heading Chinese Cabbage inbred line 09N-742 with purple leaf; 1~45. F_2 individuals.

图 2 引物 BrID10399 在部分 F_2 群体中的扩增图

Fig.2 The PCR amplification pattern with primer BrID10399 in F_2 population

2.4 标记的可靠性分析

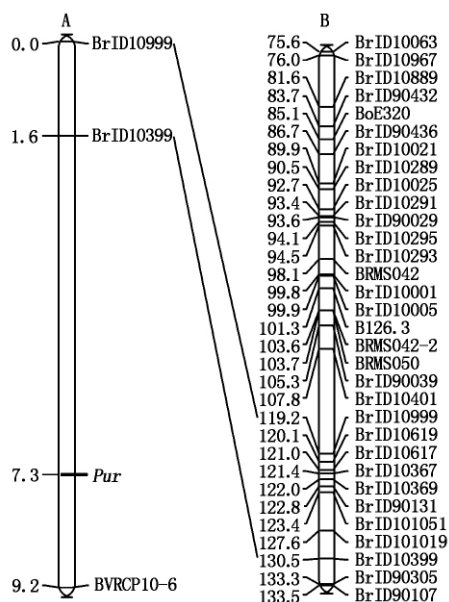
本研究获得了 3 个与大白菜叶片紫色 *pur* 基因紧密连锁的分子标记 BrID10999、BrID10399 和 BVRCP10-6 3 个标记全部为共显性标记。经由 121 个单株组成的 F_3 家系验证后 3 个标记的重组率分

别为 9.9%、20.7%、2.5%；吻合率分别达到了 90.1%、89.3%、97.5% (表 2), 这为下一步进行分子标记辅助育种及其克隆基因奠定了坚实的基础, 加快了紫色大白菜品种的选育及 *pur* 基因的研究利用进程。

表 2 BrID10999、BrID10399 和 BVRCP10-6 在 F_3 家系中的分离

Tab. 2 Segregation of marker BrID10999, BrID10399 and BVRCP10-6 in the F_3 pedigree

标记名称 Marker name	F_2 植株基因型 Genotypes of F_2 plants	植株数 No. plants	带型 Band pattern			重组率 / % Recombination frequency	吻合率 / % Accuracy
			P	H	G		
BrID10999	PP	22	19	—	—	9.9	90.1
	Pp	52	—	50	—		
	pp	47	—	—	40		
BrID10399	PP	22	19	—	—	20.7	89.3
	Pp	52	—	51	—		
	pp	47	—	—	38		
BVRCP10-6	PP	22	22	—	—	2.5	97.5
	Pp	52	—	49	—		
	pp	47	—	—	47		



A. 用 3 个标记构建的位于 A3 上的部分连锁图;

B. 已发表的大白菜 A03 部分连锁图^[12]。

A. Partial genetic linkage map using three markers on A3;

B. Partial linkage map A03 of the published genetic map of Chinese cabbage.

图 3 *pur* 基因在遗传图谱上的定位及其与参考图谱的比较
Fig. 3 Mapping of the *pur* gene and comparison with the reference map on Chinese cabbage A03 chromosome

3 讨论

目前, 白菜紫色性状主要来源于芥菜、紫菜薹、芜菁和紫色小白菜。来源于紫菜薹和芜菁的基因分别定位到了 A9 和 A7 连锁群上, 而来源于芥菜的紫色基因及分子标记的研究还未见报道。在小白菜中, 郝有健等^[7]以紫罗兰为研究对象, 定位了 3 个

与紫色性状相关的 QTL, 但是并未将其定位到特定的连锁群上。本研究利用一份国外引进的紫色小白菜, 采用 F_2 分离群体结合 BSA 定位了控制叶片紫色的 *pur* 基因, 并开发了与其紧密连锁的分子标记。通过标记与性状的连锁分析, 构建了一张包含 *pur* 基因和 3 个分子标记的分子连锁图谱。利用 2 个锚定标记 BrID10999 和 BrID10399 与 Wang^[18] 所构建的参考图谱进行比对, 发现 2 个标记在该图谱上的位置与参考图谱 A3 连锁群上各个标记的位置具有很好的共线性, 从而证实了 *pur* 基因位于 A3 连锁群的末端。由此可见, 本研究定位了一个控制白菜叶片紫色的新基因。由于 *pur* 基因属主效基因位点, 回交转育较为容易, 是紫色大白菜创制的理想基因源。

因具有很高的营养价值, 消费者对色彩丰富的大白菜新品种越来越青睐, 尤其是富含花青素的新品种。前期已展开了紫色大白菜和紫色小白菜的选育工作, 但是常规育种很难分辨出纯合与杂合植株。本研究基于 BSA 法及基因组序列发展了与 *pur* 基因紧密连锁的 3 个共显性分子标记, 这些标记与 *pur* 基因的遗传距离分别为 7.3、5.7、1.9 cM, 用 121 个单株构成的 F_3 家系进行了验证, 研究表明, 在群体中选择的准确性分别达到 90.1%、89.3%、97.5%。如果用 *pur* 基因双侧标记 BrID10399 和 BVRCP10-6 同时进行标记辅助选择, 其准确度可提高到 100%。可见, 这些标记可用于白菜紫色性状的标记辅助选择, 为紫色大白菜新种质的分子改良奠定了良好基础。然而, 标记与基因之间还存在较大的距离, 标记

辅助选择中仍将存在较多的重组事件,还远未达到能在分子水平上进行分离 *pur* 基因的程度。

2003 年,以韩国和英国为核心联合发起了多国芸薹属基因组计划(MBGP),并启动了白菜基因组“测序计划”,针对大白菜 Chifu401-42 实施了 BAC-by-BAC 的测序^[19],大量的序列信息发表在互联网 <http://brassica-rapa.org/>。在各国芸薹属基因组计划的研究基础上,2008 年初,中国农科院蔬菜花卉所领衔发起了白菜全基因组测序项目,采用新一代测序技术和全基因组鸟枪法测序策略,在短短的 2 年多时间内就获得了白菜 Chifu401-42 的全基因组的精细图,其研究成果于 2011 年 8 月 29 日在线发表在国际权威学术期刊《自然—遗传学(Nature Genetics)》^[13]。继此,中国农业科学院蔬菜花卉研究所组建了白菜重测序联盟,发起了大规模白菜重测序计划。这些计划的实施提供了大量基因组变异信息,为大规模开发 SNP 和 InDel 标记奠定了良好基础,并将极大提高基因精细定位的效率。基于此项研究结果,可进一步利用基因组序列变异信息,开发更加紧密连锁的分子标记,精细定位 *pur* 基因,为最终克隆该基因和建立白菜高品质分子育种技术体系奠定良好基础。

参考文献:

- [1] 孙日飞,张淑江,章时蕃,等. 紫红色大白菜种质的创新研究[J]. 园艺学报 2006 33(5): 1032.
- [2] Anna R, Renato C N, Daniela V *et al.* Modification of glass transition temperature through carbohydrates addition and anthocyanin and soluble phenol stability of frozen blueberry juices[J]. Food Eng 2003 56(2-3): 229-231.
- [3] Almeida J R, D'amico E, Preuss A *et al.* Characterization of majorenzymes and genes involved in flavonoid and proanthocyanidin biosynthesis during fruit development in strawberry(*Fragaria ananassa*) [J]. Arch Biochem Biophys 2007 465(1): 61-71.
- [4] 张德双,张凤兰,余阳俊,等. 紫色大白菜育种思路初探[J]. 长江蔬菜 2008 11b: 14-17.
- [5] Yuan Y X, Chiu L W, Li L. Transcriptional regulation of anthocyanin biosynthesis in red cabbage [J]. Planta, 2009 230: 1141-1153.
- [6] 张德双,张凤兰,余阳俊,等. 紫色大白菜育种材料的创造[J]. 长江蔬菜 2007 11: 52-53.
- [7] 郁有健,张耀伟,张德双. 大白菜紫色性状的 SRAP 连锁标记的筛选[J]. 分子植物育种 2009 7(3): 573-578.
- [8] 张德双,陈斌,张凤兰,等. 一种紫色大白菜细胞质不育系的分子鉴定[J]. 华北农学报 2009 24(3): 174-178.
- [9] 张明科,张鲁刚,巩振辉,等. 白菜紫色性状 RAPD 连锁标记的筛选与染色体定位研究[J]. 西北植物学报, 2008 28(5): 901-906.
- [10] Hayashi K, Matsumoto S, Tsukazaki H *et al.* Mapping of a novel locus regulating anthocyanin pigmentation in *Brassica rapa* [J]. Breeding Science 2010 60: 76-80.
- [11] 张德双,张凤兰,赵岫云,等. 大白菜(大白菜×紫色小白菜)叶片紫色性状的遗传分析[J]. 中国蔬菜, 2011 2: 36-38.
- [12] Wang X, Wang H Z, Wang J *et al.* The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa* [J]. Nature Genetics 2011 43: 1035-1039.
- [13] Suwabe K, Iketani H, Nunome T *et al.* Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. [J]. Theor Appl Genet 2002 104: 1092-1098.
- [14] Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H *et al.* SSR-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: the genetic origin of clubroot resistance [J]. Genetics 2006 173: 309-319.
- [15] Van Ooijen J W, Voorrips R E. JoinMap_3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps [Z]. Plant Research International, Wageningen, the Netherlands, 2001.
- [16] Kosambi D D. The estimation of map distances from recombination values [J]. Ann Eugen, 1944, 12: 172-175.
- [17] Voorrips R E. MapChart software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs [J]. J Hered 2002, 93: 77-78.
- [18] Wang Y, Sun S L, Liu B *et al.* A sequence-based genetic linkage map as a reference for *Brassica rapa* pseudochromosome assembly [J]. BMC Genomics 2011 12: 239.
- [19] Yang T J, Kim J S, Lim K B *et al.* The Korea Brassica Genome Project: A glimpse of the *Brassica* genome based on comparative genome analysis with *Arabidopsis* [J]. Comparative and Functional Genomics 2005 6: 138-146.