

大白菜叶色相关性状的 QTL 定位与分析

徐东辉^{1,2}, 孙日飞¹, 张延国¹, 原玉香^{1,2,3}, 康俊根⁴, 武 剑¹, 张 慧^{1,2},
宋晓飞⁵, 李晓楠^{1,2}, 宋一沫⁶, 王晓武^{1*}

(¹ 中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081; ² 中国农业科学院研究生院, 北京 100081; ³ 河南农业科学院生物技术研究所, 郑州 450002; ⁴ 山西省农业科学院蔬菜研究所, 太原 030031; ⁵ 河北农业大学园艺学院, 河北保定 071001; ⁶ 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

摘 要: 应用已构建了 AFLP遗传图谱的大白菜 DH群体, 采用多模型 QTL作图的方法, 通过色差计法、叶色素测定法和人为目测法 3种方法 7个指标对叶色相关性状进行 QTL定位和分析。结果表明, 在 7个连锁群上共检测到 18个 QTL, 其中色差计法检测到 9个 QTL, 叶色素测定法检测到 8个 QTL, 人为目测法仅检测到 1个 QTL。另外, 估算了单个 QTL的贡献率和加性效应, 发现各 QTL的加性效应各不相同, 各位点的贡献率在 5.5% ~ 15.6%之间。

关键词: 大白菜; 叶色; 数量性状位点 (QTL); 连锁群

中图分类号: S 634.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 01-0099-06

Mapping and Analysis of QTL Related to Leaf Color in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

XU Dong-hui^{1,2}, SUN Ri-fei¹, ZHANG Yan-guo¹, YUAN Yu-xiang^{1,2,3}, KANG Jun-gen⁴, WU Jian¹,
ZHANG Hui^{1,2}, SONG Xiao-fei⁵, LI Xiao-nan^{1,2}, SONG Yi-mo⁶, and WANG Xiao-wu^{1*}

(¹ Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ² The Graduate School of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³ Institute of Biotechnology, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China; ⁴ Institute of Vegetables, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China; ⁵ College of Horticulture, Hebei Agricultural University, Baoding, Hebei 071001, China; ⁶ College of Life sciences, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: A Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) double-haploid (DH) population with a reported AFLP genetic map was employed to map quantitative trait loci (QTL) related to leaf color by using MAPQTL 4.0 package. Tristimulus colorimeter, leafy pigment determination and ocular measurement were used to measure the traits related to leaf color. A total of 18 QTL were detected on 7 linkage groups, 9, 8 and 1 QTL were detected by 3 methods, respectively. These QTL individually explained 5.5% to 15.6% of the phenotypic variation, and there were unequal gene effects on the traits related to leaf color. These mapped QTL could be used to develop a marker assisted selection program for leaf color in *Brassica rapa* vegetable varieties.

Key words: Chinese cabbage; Leaf color; QTL; Linkage group

大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 育种的目标性状不少表现为数量性状遗传的特点, 即受多个数量性状位点 (QTL) 和环境因子的共同作用。传统的育种手段多依靠育种者的经验, 因此选择周期较长, 选择效率低。分子标记技术可使育种者更加清楚地了解某些性状的遗传基础,

收稿日期: 2006 - 06 - 05; 修回日期: 2006 - 10 - 11

基金项目: 中—荷战略科学联盟项目 (‘973’国际合作计划, 2004CB720); 中—荷联合园艺作物基因组技术实验室项目 (2001CB711102); 农业部蔬菜遗传与生理重点开放实验室项目

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: wangxw@mail.caas.net.cn)

进而提高育种效率和育种过程中的预见性,成为数量性状研究的有利工具。

目前,白菜类作物 QTL 定位的研究已经广泛开展,尤其在形态学 (Song et al, 1995; Nozaki et al, 1997; 卢钢等, 2002; 于拴仓等, 2003a, 2004)、抗病性 (Matsunomoto et al, 1998; Kole et al, 2002)、抗逆性 (于拴仓等, 2003b) 和抽薹开花 (Teutonico et al, 1995; Axelsson et al, 2001; Zhang et al, 2006) 等性状上做了很多工作,但在品质育种相关的 QTL 定位方面的研究却较少,仅在白菜型油菜的脂肪酸组成上有报道 (Tanhuanaää et al, 1996)。

对于白菜类蔬菜,叶色与光合效率密切相关。同时,不同的消费习惯和用途对叶色的要求不同,因此有必要对叶色相关性状进行遗传学研究。

本研究针对大白菜叶色相关性状进行 QTL 定位和分析,为今后开展叶色及相关性状的育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 大白菜 DH 群体及图谱

用于构建遗传图谱的群体是对不同大白菜 DH 系杂交 (Y177-2, Y195-93) 的 F₂ 进行游离小孢子培养获得的 DH 群体,共 183 个株系。Y177-12 为来源于日本大白菜品种 Y177 经小孢子培养产生的纯系, Y195-93 为来源于国内大白菜品种 Y195 经小孢子培养产生的纯系。两个亲本叶片颜色差异较大。用该群体构建的分子遗传图谱包括 10 个连锁群, 186 个 AFLP 标记, 遗传图谱总长 887.8 cM, 标记间平均距离 4.47 cM。该图谱已由 Zhang 等 (2006) 报道。

1.2 叶色性状的考察

DH 群体及亲本在中国农业科学院蔬菜花卉研究所实验田种植,每个 DH 株系 3 株,常规栽培管理。在莲座期应用 3 种方法进行叶色相关性状的考察和测定。

叶色测量:选择健康完整的外叶,应用 CR-400 型色差计 (Minolta, Japan) 测量其中部偏离叶脉处的叶色,每个单株测量 3 个点,3 次重复,取平均值。色差计可以从 L* (从黑到白, 0~100), a* (从绿到红, -A~+A), b* (从蓝到黄, -B~+B) 3 个方向三维立体分别评价。

色素测定:应用 UV-1601 型紫外分光光度计分别在 663、645 和 470 nm 测定叶绿素 a (Chl. a)、叶绿素 b (Chl. b) 和类胡萝卜素 (Car.) 的含量。叶片选择和取样位置选择与仪器测量一致,每个单株取样 1 次,3 次重复,测定结果取平均值。色素提取参照改良的 Amon 方法 (杨振德, 1996)。

人为目测:由视觉正常的 3 人分别独立进行观察,将叶色按绿色深浅分为 5 级。即:1 黄绿, 3 浅绿, 5 绿, 7 灰绿, 9 深绿。然后综合 3 人结果进行统计分析。

1.3 数据统计分析

采用 SPSS12.0 软件对叶色相关性状指标值进行统计分析,获得柱形分布图。

使用 MAPQTL 4.0 分析软件进行叶色相关性状的 QTL 分析。首先使用区间作图法 (Interval mapping, M) 找到确定的 QTL 和与其紧密连锁的标记,然后根据模拟计算表确定不同连锁群的 LOD 阈值 (Van et al, 1999),使用自动选择的协同因子 (Automatic cofactor selection) 对与 M 检测到的 QTL 紧密连锁的标记进行选择,在 $P < 0.05$ 水平上显著的标记作为协同因子用于多模型 QTL 作图 (MQM) 的检测。利用置换测验 (Permutation Test) 做 1 000 次重复,估算各连锁群上在 $\alpha = 0.05$ 水平上的 LOD 阈值 (Churchill & Doerge, 1994)。M 和 MQM 都以 5 cM 的步长扫描整个基因组。以连锁群上 LOD 值最高的位置作为 QTL 的位置。

2 结果与分析

2.1 叶色相关性状指标值及其遗传变异

由表 1 可知，各性状在双亲间差异较明显，因而用此双亲构建群体有可能获得控制叶球相关性状的 QTL。由图 1 可见，评价叶色的 7 个指标在群体中表现明显的分离，且均有一定数量的超亲遗传类型存在，表现为数量性状遗传的特点。

表 1 各指标的亲本值及在分离群体中的分布

Table 1 Parents values and distribution in DH population for traits

性状 Traits	亲本 Parents		DH	
	P ₁ (Y177-12)	P ₂ (Y195-93)	平均 Mean	SD
L*	45.181	48.139	46.211	1.473
a*	-13.089	-14.433	-13.360	1.024
b*	19.648	23.076	20.481	2.333
Chl. a	0.480	0.425	0.474	0.083
Chl. b	0.201	0.174	0.194	0.031
Car.	0.494	0.568	0.499	0.082
目测 Ocular measurement	7	3	4.699	2.062

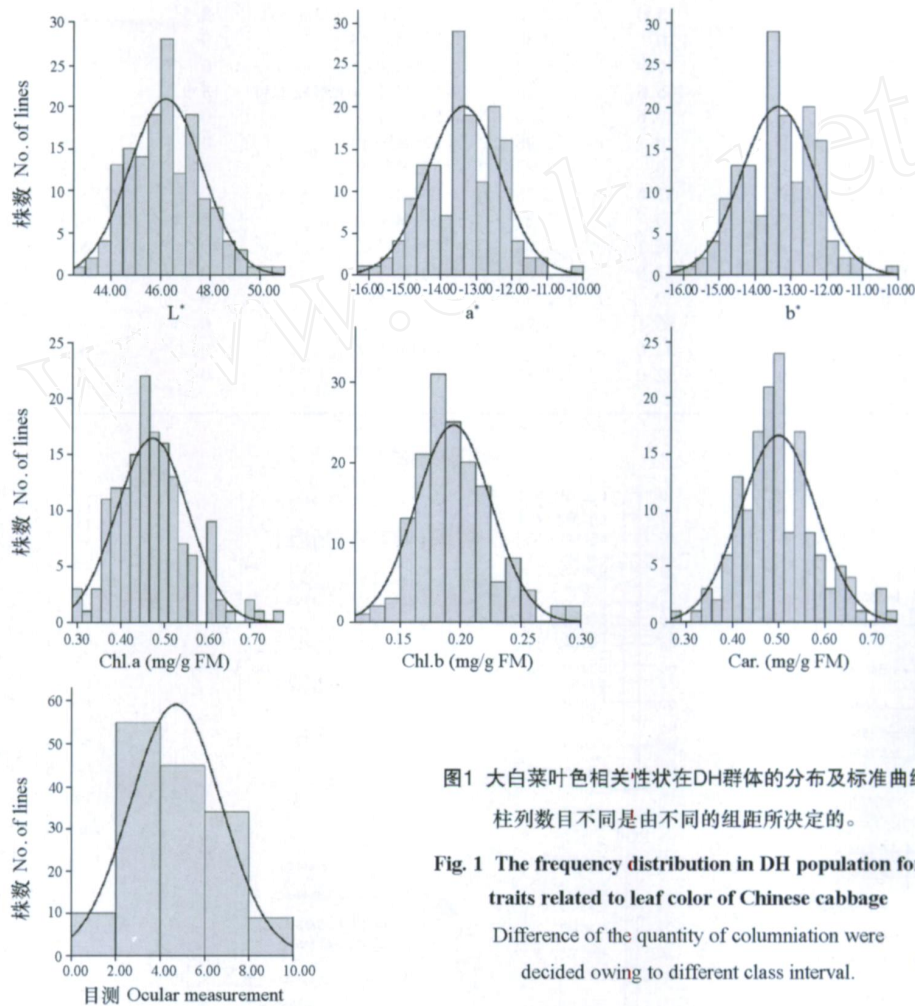


图1 大白菜叶色相关性状在DH群体的分布及标准曲线
柱列数目不同是由不同的组距所决定的。

Fig. 1 The frequency distribution in DH population for 7 traits related to leaf color of Chinese cabbage
Difference of the quantity of columniation were decided owing to different class interval.

2.2 叶色相关性状的 QTL 定位与分析

通过对大白菜 DH 群体与叶色相关性状 7 个指标的 QTL 分析，利用多 QTL 模型作图法，共发现了控制 7 个指标的 18 个 QTL（表 2），这些 QTL 共分布于 7 个连锁群上（图 2）。

通过色差计测量发现，控制 L* 值的 QTL 有 3 个，命名为 L* -1、L* -2 和 L* -3，分别位于 LG2、LG5 和 LG6，贡献率为 8.3% ~ 15.6%。其中 L* -1 贡献率最高，为 15.6%，为减效位点，效应值为 -0.589。L* -2 和 L* -3 为增效位点，效应值分别为 0.483 和 0.754。控制 a* 值的 QTL 有 2 个，命名为 a* -1 和 a* -2，分别位于 LG2 和 LG9，贡献率分别为 8.0% 和 6.5%。其中 a* -1 为增效位点，效应

值为 0.287, a^* -2为减效位点, 效应值为 - 0.328。控制 b^* 值的 QTL 有 4个, 命名为 b^* -1、 b^* -2、 b^* -3和 b^* -4, 分别位于 LG2、LG5、LG7和 LG9, 贡献率为 7.0% ~ 13.2%。其中 b^* -1贡献率最高, 为 13.2%, b^* -3贡献率最低, 且这两个 QTL 均为减效位点, 效应值分别为 - 0.847和 - 0.732。 b^* -2和 b^* -4为增效位点, 效应值分别为 0.627和 0.781。

表 2 检测到叶色相关性状的 QTL

Table 2 QTL detected by MQM with MAPQTL 4.0

性状 Traits	QTL	连锁群 LG	图谱位置 Position (cM)	LOD	侧翼标记 Flanking loci	间距 Interval (cM)	贡献率 Exp1 (%)	加性效应 Add
L^*	L^* -1	2	0	7.43	E35M56-1	0	15.6	- 0.589
	L^* -2	5	114.0	3.22	E38M51-10	0	8.3	0.438
	L^* -3	6	23.9	2.15	E33M54-2--E33M50-3	14.2	9.1	0.754
a^*	a^* -1	2	5.0	2.60	E35M56-1--E33M48-3	8.5	8.0	0.287
	a^* -2	9	0	2.38	E36M50-14	0	6.5	- 0.328
b^*	b^* -1	2	0	5.32	E35M56-1	0	13.2	- 0.847
	b^* -2	5	106.6	2.25	E38M51-9--E38M51-11	13.9	7.2	0.627
	b^* -3	7	17.6	2.70	E38M51-6	0	7.0	- 0.723
	b^* -4	9	0	2.98	E36M50-14	0	7.9	0.781
Chl. a	Chl. a-1	2	0	2.82	E35M56-1	0	8.2	0.032
	Chl. a-2	10	32.0	2.78	E33M49-9	0	8.0	0.026
Chl. b	Chl. b-1	2	0	3.21	E35M56-1	0	9.3	0.013
	Chl. b-2	8	86.1	3.02	E36M47-2	0	8.7	- 0.013
	Chl. b-3	10	32.0	3.09	E33M49-9	0	8.8	0.010
Car.	Car.-1	2	0	2.53	E35M56-1	0	7.3	0.022
	Car.-2	8	86.1	3.26	E36M47-2	0	9.3	- 0.036
	Car.-3	10	32.0	1.89	E33M49-9	0	5.5	0.021
目测 Ocular meacurement	Eo	10	32.0	2.87	E33M49-9	0	7.9	0.695

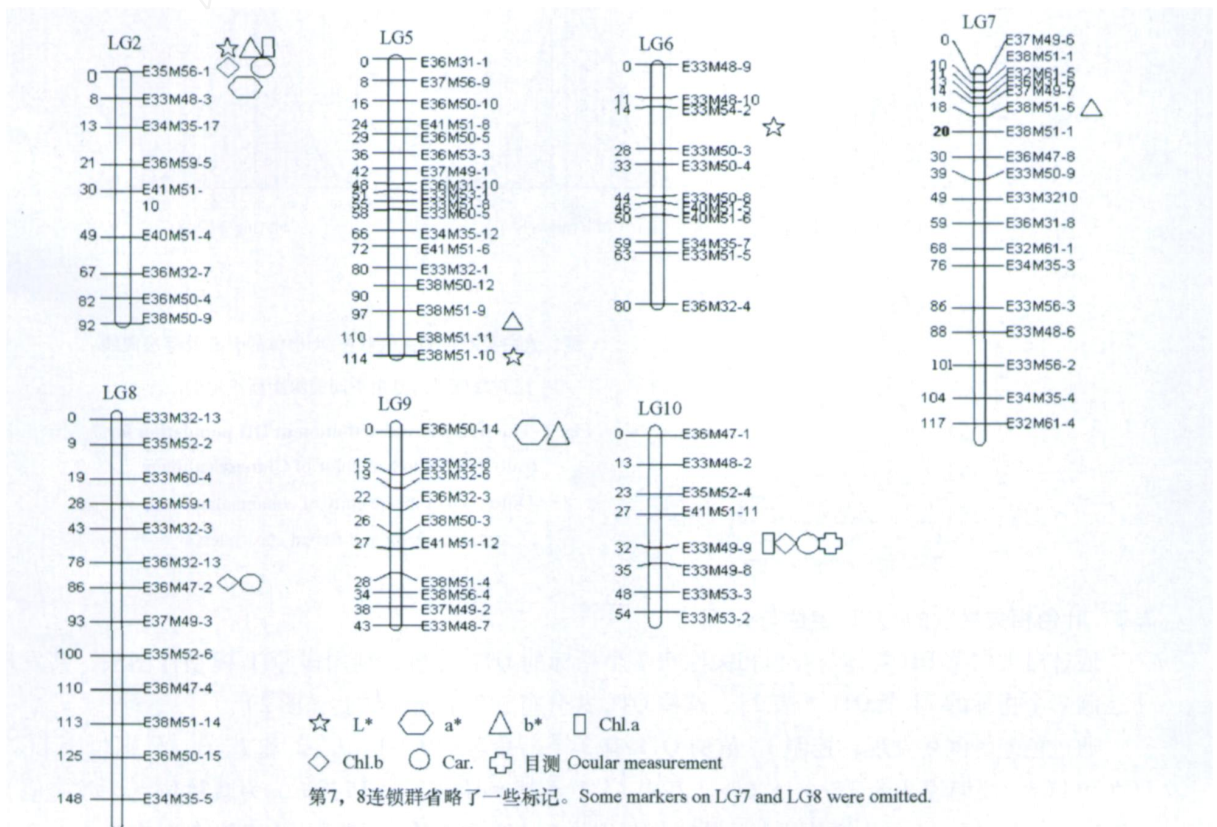


图 2 叶色相关性状的 QTL 在各连锁群上的分布

Fig. 2 QTL likelihood maps for leaf color in linkage groups

通过叶色素测定发现, 控制叶绿素 a 的 QTL 有 2 个, 命名为 *Chl. a-1* 和 *Chl. a-2*, 分别位于 LG2 和 LG10, 贡献率分别为 8.2% 和 8.0%, 且这两个 QTL 均为增效位点, 但效应值很低, 分别为 0.032 和 0.026。控制叶绿素 b 的 QTL 有 3 个, 命名为 *Chl. b-1*、*Chl. b-2* 和 *Chl. b-3*, 分别位于 LG2、LG8 和 LG10, 贡献率为 8.7% ~ 9.3%。其中 *Chl. b-2* 为减效位点, *Chl. b-1* 和 *Chl. b-3* 为增效位点, 并且效应值都很低。控制胡萝卜素的 QTL 有 3 个, 命名为 *Car. -1*、*Car. -2* 和 *Car. -3*, 分别位于 LG2、LG8 和 LG10, 贡献率为 5.5% ~ 9.3%。其中 *Car. -2* 为减效位点, *Car. -1* 和 *Car. -3* 为增效位点, 效应值也都很低。

通过人为目测仅发现 1 个 QTL, 命名为 *Eo*, 位于 LG10, 贡献率为 7.9%, 为增效位点, 效应值为 0.695。

在 7 个指标的 18 个 QTL 中, 位于 LG2 上的 6 个 QTL 除了 *a⁺-1* 外, 其余 5 个 QTL 均位于 LG2 的相同位置, 并与标记 E35M56-1 紧密连锁, 而且 *a⁺-1* 的侧翼标记为 E35M56-1 和 E33M48-3。位于 LG8 上的 *Chl. b-2* 和 *Car. -2* 两个 QTL 的位置也相同, 并与标记 E36M47-2 紧密连锁。位于 LG9 上的 *a⁺-2* 和 *b⁺-4* 的位置也相同, 并与 E36M50-14 紧密连锁。位于 LG10 上的 4 个 QTL 位置相同, 并与标记 E33M49-9 紧密连锁。因此, 可以利用其紧密连锁的单标记进行辅助选择。

3 讨论

3.1 大白菜 DH 群体的构建

利用不同大白菜 DH 系杂交 (Y177-2 × Y195-93) 的 F₂ 进行游离小孢子培养获得的 DH 群体, 主要在于利用叶色差异显著的两个大白菜亲本, 从而形成 DH 群体叶色相关性状的多态性, 在 DH 群体各单株间形成叶色相关性状的差异, 可以利用此群体进行叶色相关性状的 QTL 分析。

3.2 不同方法评价叶色相关性状的优势和适用环境

色差计是对颜色进行测定的精密仪器, 它将颜色进行数值化表示, 并将构成叶片色泽的因素进行区分, 可以说是对叶色构成因素的综合评价。应用色差计测量颜色在农业和食品加工业上已有报道 (Larrauri et al., 1998; Lentheric et al., 1999; Ana et al., 2003), 但尚未见其用于测量芸薹属蔬菜叶色的报道。本研究利用色差计共检测到 9 个 QTL, 是 3 种方法中检测 QTL 最多的。

应用紫外分光光度计测定代谢产物可对构成颜色的物质进行测定, 步骤比较繁琐。本研究测定了 3 种主要叶色素的含量并检测到 8 个 QTL, 分布在 3 个连锁群。并且 3 种叶色素在相同连锁群上的位置相同, 相同的标记紧密连锁, 这可能与 3 种叶色素的生物合成途径有关。相同的 QTL 可能是控制叶色素合成前体物质的位点, 也可能是合成途径中某一基因的位点。

人为目测的方法是直接利用叶片颜色差异对人视觉的刺激反映进行评判、分级, 这种方法受环境的影响较大, 具有较大的主观性。但通过多人评定排除环境饰变也可具有较高的准确性, 本研究虽然只在 LG10 上检测到一个 QTL, 但这个 QTL 却与 3 种叶色素位于同一位置。说明人的视觉对叶片颜色的反映与叶色素的刺激有很大关系, 人为目测虽然没有仪器检测精确, 但也有较高准确性, 并且易于操作, 是可以用于叶色相关性状初步选择的方法。

另外, 目测法与色度计法没有检测到共同的 QTL, 主要是因为利用色度计对颜色差异的评判与人视觉对绿色差异的评判是两种不同水平的评判, 二者具有一定差距。

3.3 叶色相关性状的 QTL 分析

在白菜类蔬菜中, 关于叶色遗传方面尚未见相关的报道。本研究对叶色相关性状进行遗传分析, 结果表明叶色性状是由多基因控制的数量性状, 其性状的表现除了受叶色素组成和相对含量的影响外, 还与许多代谢途径相关, 并且环境因素的作用也不可忽视。

通过分析发现, 叶色相关性状的 QTL 在连锁群上的分布是不均匀的, 如在 LG2 上分布了 6 个 QTL, LG10 上 4 个, LG5 上 2 个, LG9 上 2 个, LG8 上 2 个, 其它连锁群上很少或没有分布。同时,

不同指标的一些 QTL 出现在同一连锁群的相同位置, 如位于 LG2 上的 5 个 QTL, 并与标记 E35M56-1 紧密连锁, 在第 8、9 和 10 连锁群上也存在相同的现象。这些 QTL 的聚集和紧密连锁现象说明影响叶片颜色的各个因素是相关的, 在控制性状表现上存在明显的基因间互作, 基因位点的相关最终表现为性状的相关。这种现象在芸薹属及其它作物的基因定位中经常出现, 这种情况对于品种改良中连锁累赘不良性状的排除带来诸多困难。但通过分析每个 QTL 的效应和方向, 采用标记辅助选择将有利基因聚合, 获得返祖或超亲新组合, 这也展示了分析利用 QTL 的巨大潜力。

References

- Ana CM, Amando F, Amarilis de Varennes, Maria IV. 2003. SPAD meter versus tristimulus colorimeter to estimate chlorophyll content and leaf color in sweet pepper. *Communications in Soil Science and Plant Analysis*, 34: 2461 - 2470.
- Axelsson T, Shavorskaya O, Lagercrantz U. 2001. Multiple flowering time QTL within several *B. brassica* species could be the result of duplicated copies of one ancestral gene. *Genome*, 44: 856 - 864.
- Churchill GA, Doerge RW. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics*, 138, 963 - 971.
- Kole C, Williams PH, Rinimer SR, Osborn TC. 2002. Linkage mapping of genes controlling resistance to white rust (*Albugo candida*) in *B. brassica rapa* (syn. *campestris*) and comparative mapping to *B. brassica napus* and *Arabidopsis thaliana*. *Genome*, 45: 22 - 27.
- Larrauri JA, Sánchez-Moreno C, Saura-Calixto F. 1998. Effect of temperature on the free radical scavenging capacity of extracts from red and white grape pomace peels. *J. Agric. Food Chem.*, 46 (7): 2694 - 2697.
- Lentheric I, Pinto E, Vendrell M, Larrigaudière C. 1999. Harvest date affects the antioxidative systems in pear fruits. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 74 (6): 791 - 795.
- Lu Gang, Cao Jia-shu, Chen Hang, Xiang Xun. 2002. QTLs mapping of some horticultural traits of Chinese cabbage. *Scientia Agricultura Sinica*, 35 (8): 969 - 974. (in Chinese)
- 卢钢, 曹家树, 陈杭, 向鑫. 2002. 白菜几个重要园艺性状的 QTLs 分析. *中国农业科学*, 35 (8): 969 - 974.
- Matsunomoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M. 1998. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*B. brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica*, 104: 2, 79 - 86.
- Nozaki T, Kumazaki A, Koba T, Ishikawa K, Ikehashi H. 1997. Linkage analysis among loci for RAPDs isozyme and some agronomic traits in *B. brassica campestris* L. *Euphytica*, 95: 115 - 123.
- Song KM, Slocum MK, Osborn TC. 1995. Molecular marker analysis of genes encoding morphological variation in *B. brassica rapa* (syn. *campestris*). *Theor. Appl. Genet.*, 90: 1 - 10.
- Tanhuanpää P K, Vilkké J P, Vikki H J. 1996. Mapping a QTL for oleic acid concentration in spring turnip rape (*B. brassica rapa* ssp. *oleifera*). *Theor. Appl. Genet.*, 92: 952 - 956.
- Teutonico RA, Osborn TC. 1995. Mapping loci controlling vernalization requirement in *B. brassica rapa*. *Theor. Appl. Genet.*, 91: 1279 - 1283.
- van Ooijen JW. 1999. LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. *Heredity*, 83: 613 - 624.
- Yang Zhen-de. 1996. Studies on the determination of chlorophyll content by spectrophotometric method. *Journal of Guangxi Agricultural University*, 15 (2): 145 - 150. (in Chinese)
- 杨振德. 1996. 分光光度法测定叶绿素含量的探讨. *广西农业大学学报*, 15 (2): 145 - 150.
- Yu Shuan-cang, Wang Yong-jian, Zheng Xiao-ying. 2003a. Mapping and analysis QTL controlling some morphological traits in Chinese cabbage (*B. brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Acta Genetica Sinica*, 30 (12): 1153 - 1160. (in Chinese)
- 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 2003a. 大白菜部分形态性状的 QTL 定位与分析. *遗传学报*, 30 (12): 1153 - 1160.
- Yu Shuan-cang, Wang Yong-jian, Zheng Xiao-ying. 2003b. Mapping and analysis QTL controlling heat tolerance in *B. brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 417 - 420. (in Chinese)
- 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 2003b. 大白菜耐热性 QTL 定位与分析. *园艺学报*, 30 (4): 417 - 420.
- Yu Shuan-cang, Wang Yong-jian, Zheng Xiao-ying. 2004. Mapping and analysis QTL controlling agronomic traits related to head in *B. brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*. *Scientia Agricultura Sinica*, 37 (1): 106 - 111. (in Chinese)
- 于拴仓, 王永健, 郑晓鹰. 2004. 大白菜叶球相关性状的 QTL 定位与分析. *中国农业科学*, 37 (1): 106 - 111.
- Zhang Xiao-wei, Wu Jian, Zhao Jian-jun, Song Xiao-fei, Li Ying, Zhang Yan-guo, Xu Dong-hui, Sun Ri-fei, Yuan Yu-xiang, Xie Cong-hua, Wang Xiao-wu. 2006. Identification of QTL related to bolting in *B. brassica rapa* ssp. *pekinensis* (syn. *B. brassica campestris* ssp. *pekinensis*). *Agricultural Sciences in China*, 5 (4): 265 - 271.