

# 与大白菜橘红心基因紧密连锁的 SCAR 标记

王国臣<sup>1,2</sup>, 张凤兰<sup>1\*</sup>, 余阳俊<sup>1</sup>, 张德双<sup>1</sup>, 赵岫云<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100097; <sup>2</sup>首都师范大学生命科学学院, 北京 100037)

**摘 要:** 利用游离小孢子培养获得的 DH 系群体和 BSA 法对与大白菜橘红心基因紧密连锁的分子标记进行了研究, 筛选到与橘红心球色基因 *or* 连锁的 RAPD 标记 S1338<sub>656</sub> 和 AFLP 标记 P67M54<sub>172</sub>, 其遗传距离分别为 8 cM 和 13 cM, 并将其成功转化成 SCAR 标记 SCOR<sub>204</sub> 和 SCOR<sub>127</sub>。对标记的通用性在 110 个大白菜自交不亲和系育种材料中进行了验证, 与田间鉴定结果的吻合率分别为 90% 和 89.1%。SCAR 标记的获得为大白菜橘红心性状的分子标记辅助选择与基因的图位克隆奠定了基础。

**关键词:** 大白菜; 球叶色; BSA; SCAR; 标记辅助选择

中图分类号: S 634.3 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 01-0217-04

## Identification of SCAR Markers Linked to Orange Head Leaf Gene in Chinese Cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)

WANG Guo-chen<sup>1,2</sup>, ZHANG Feng-lan<sup>1\*</sup>, YU Yang-jun<sup>1</sup>, ZHANG De-shuang<sup>1</sup>, and ZHAO Xiu-yun<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> National Engineering Research Center for Vegetables, Beijing 100097, China; <sup>2</sup> College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

**Abstract:** Bulk segregant analysis was employed to identify molecular markers linked to orange head leaf gene (*or*) trait based on RAPD and AFLP in Chinese cabbage with a doubled haploid (DH) population derived from the F<sub>1</sub> between the two parents 91-112 (white head leaf) and T12-19 (orange head leaf) via microspore culture. One RAPD marker S1338<sub>656</sub> and one AFLP marker P67M54<sub>172</sub> were identified to be linked to *or* gene with the distance of 8 cM and 13 cM respectively. These two markers were successfully transformed into SCAR markers SCOR<sub>204</sub> and SCOR<sub>127</sub>. The accuracy of 90% and 89.1% were obtained when 110 different incompatibility breeding lines of Chinese cabbage were used to be investigated with two SCAR markers, indicating that these two SCAR makers could be used in marker-assisted-selection in orange head leaf breeding programs and positional cloning of *or* gene in Chinese cabbage.

**Key words:** Chinese cabbage; *Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*; Orange head leaf gene (*or*); BSA; SCAR; Marker-assisted selection

橘红心大白菜比普通大白菜含有较高的维生素 C、胡萝卜素及矿质元素 (徐家炳, 1998), 因此球色育种受到育种家的重视, 但对球色性状的检测必须在结球末期剖球进行, 田间选择费时费力。为建立大白菜橘红心性状分子标记辅助育种技术体系和进行 *or* 基因的图位克隆, 作者在以前工作的基础上, 以 DH 群体为材料, 结合 BSA 法, 利用 RAPD 和 AFLP 标记技术获得在 *or* 基因两侧与橘红心性状紧密连锁的标记, 并将其转化成 SCAR 标记。同时, 验证了连锁标记在不同大白菜材料中的通用性和用于标记辅助选择的可行性。

收稿日期: 2006 - 05 - 25; 修回日期: 2006 - 08 - 14

基金项目: 北京市自然科学基金项目 (5062007); 国家自然科学基金项目 (30671422); 国家 '863' 项目 (2006AA10Z1C9, 2006AA100108)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangfenglan@nerv.com)

## 1 材料与方法

以大白菜橘红心株系 T12-19和普通白心株系 91-112以及杂交  $F_1$  进行游离小孢子培养得到的 100 个 DH 株系 (张凤兰和赵岫云, 2003) 为试材, 随机选取 10 个白心株系和 10 个橘红心株系, 将其 DNA 分别等量混合, 构建白心池和橘红心池。选用 300 个 RAPD 随机引物和 16 条 Pst (P+3) 引物和 16 条 Mse (M+3) 引物组成 256 对 AFLP 引物组合在两池间筛选多态性引物, 在 DH 群体中验证多态标记与橘红心性状的连锁关系, 采用 JoinMap3.0 软件根据 DH 群体球色田间调查记录, 计算标记与橘红心 *or* 基因的连锁距离, 并将获得的连锁标记转化成 SCAR 标记。随机选择 67 个白心自交不亲和系材料和 43 个橘红心自交不亲和系材料验证标记鉴定与田间鉴定的吻合率, 了解连锁分子标记在不同大白菜材料中的通用性。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 与橘红心连锁 RAPD 标记的筛选

筛选的 300 条随机引物中有 280 条可扩增到清晰的条带, 双亲间稳定表现多态的引物 45 条, 多态率为 15%。利用有差异的 45 条引物对两个池的 DNA 进行扩增, 发现 7 条引物在两池间有差异谱带, 但在打开池进行单株确证时, 6 条引物扩增的标记并不与橘红心球色基因连锁, 只有引物 S1338 (5'-GTGTGCGAGTG-3') 产生的分子量为 656 bp 的条带 S1338<sub>656</sub> 在橘红心池的各单株中都存在, 而在白心池的单株中不存在, 重复 1 次, 结果一致 (图 1), 初步确定了 S1338<sub>656</sub> 与橘红心球色基因存在连锁关系。



图 1 引物 S1338 在两亲本、 $F_1$  及池中各 DH 单株 DNA 扩增结果

M: 分子量标准 (100 bp DNA ladder); P<sub>1</sub>: T12-19; P<sub>2</sub>: 91-112;

F<sub>1</sub>: T12-19 × 91-112; 1~10: 橘红心池中各单株; 11~20: 白心池中各单株。

Fig 1 The amplification of primer S1338 in two parents, two pools and every individual of two pools

M: 100 bp DNA ladder; P<sub>1</sub>: T12-19; P<sub>2</sub>: 91-112; F<sub>1</sub>: T12-19 × 91-112; 1 - 10: Individual plants of orange pool;

11 - 20: Individual plants of white pool

### 2.2 与橘红心连锁的 AFLP 标记的筛选

采用 (P+3) / (M+3) 的选择性引物组合, 以 16 条 Pst (P+3) 引物和 16 条 Mse (M+3) 引物组成 256 对引物组合, 对 91-112, T12-19, 白心池, 橘红心池进行多态引物组合的筛选, 获得 22 对引物组合在双亲及两池间表现多态。利用这 22 对引物在两池各单株中进行 AFLP 再扩增, 只获得 1 条特异片段 P67M54<sub>172</sub>, 在橘红心池 10 个单株中有 1 株未扩增出 P67M54<sub>172</sub>, 在白心池 10 个单株中有 1 株扩增出 P67M54<sub>172</sub> (图 2), 标记 P67M54<sub>172</sub> 可能与橘红心基因连锁。

### 2.3 所得 RAPD 与 AFLP 标记在 DH 群体中的分离及与橘红心 *or* 基因的连锁关系分析

对 DH 群体各株系 DNA 用引物 S1338 进行 PCR 扩增 (表 1), 59 个橘红心株系中有 5 个未扩出 S1338<sub>656</sub> 条带, 41 个白心株系中有 3 个扩增到 S1338<sub>656</sub>, 即 100 个株系中有 8 株交换株, 重组率为 8%, 与田间球色鉴定的吻合率为 92%。

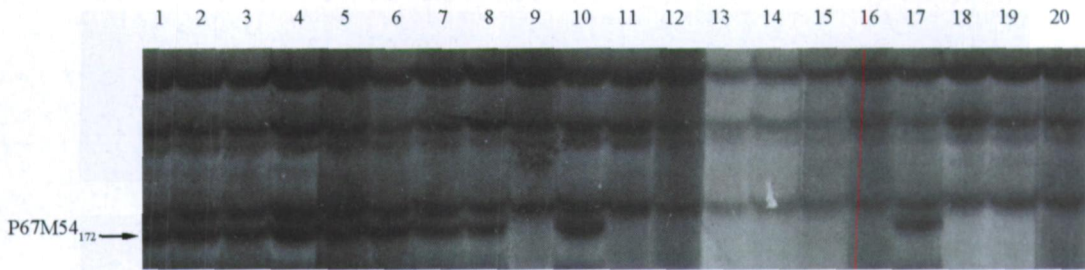


图 2 AFLP引物对 P67M54在橘红心池和白心池中各单株的扩增结果

1~10: 橘红心池中各单株; 11~20: 白心池中各单株。

Fig 2 The amplification of AFLP primer P67M54 in every individual of two pools

Lane 1 - 10: Individual plant of orange pool; Lane 11 - 20: Individual plants of white pool

对 DH群体各株系 DNA 用 AFLP引物对 P67M54进行扩增, 59个橘红心株系中有 4个未扩出 P67M54<sub>172</sub>条带, 41个白心株系中有 6个扩增到 P67M54<sub>172</sub>, 即 100个株系中有 10个交换株, 重组率为 10%, 与田间球色鉴定的吻合率为 90% (表 1)。

表 1 S1338<sub>656</sub>和 P67M54<sub>172</sub>标记在 DH群体中的扩增结果

Table 1 Amplification of S1338<sub>656</sub> and P67M54<sub>172</sub> markers in DH population

标记	球色	株系数	有标记株系	无标记株系	重组率
Marker	Head colour	Number of lines	Number of lines with marker	Number of lines without marker	Recombinant frequency(%)
S1338 <sub>656</sub>	橘红心 Orange	59	54	5	8
	白心 White	41	3	38	
P67M54 <sub>172</sub>	橘红心 Orange	59	55	4	10
	白心 White	41	6	35	

对标记 S1338<sub>656</sub>和 P67M54<sub>172</sub>与橘红心基因的连锁关系进行分析的结果表明, 这两个标记都与橘红心 *or*基因存在连锁关系, 且位于 *or*基因两侧, 其连锁距离分别为 8 cM 和 13 cM (图 3)。标记 OPB01-850是曾研究已经找到的标记 (刘秀村 等, 2003), 利用 JoinMap 3.0软件分析其与 *or*的连锁距离为 6 cM, 大于用 Mapmaker 3.0软件计算的 3.8 cM 的连锁距离。这说明 JoinMap 3.0软件和 Mapmaker 3.0软件的计算结果存在一定的差异。

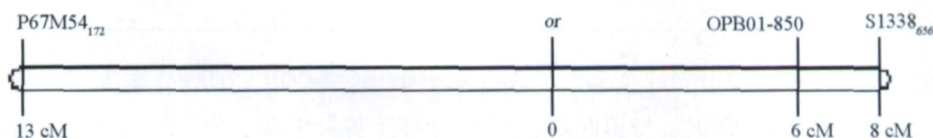


图 3 标记 S1338<sub>656</sub>, P67M54<sub>172</sub>和 OPB01-850与橘红心基因 *or*的连锁图

Fig 3 Linkage map of S1338<sub>656</sub>, P67M54<sub>172</sub>, OPB01-850 and the orange head leaf gene *or*

## 2.4 SCAR引物转化

将连锁 RAPD 标记 S1338<sub>656</sub>进行克隆测序, 根据测序结果设计 SCAR 引物, 引物 SCAR1 (上游引物序列为 5'-ATACGACGGTGAAGTGAAG-3', 下游引物序列为 5'-ACTACACCAATTGTGTGTCGG-3') 在 56 退火条件下可获得较好的扩增结果, PCR 产物大小为 204 bp, 与标记 S1338<sub>656</sub>的扩增结果完全一致, 表现共分离, 命名为 SCOR<sub>204</sub> (图 4)。

将连锁 AFLP标记 P67M54<sub>172</sub>进行克隆测序。根据测序结果设计 SCAR 引物, 引物 SCAR2 (上游引物序列为 5'-GAGTCGCTACTGGTGAAC-3', 下游引物序列 5'-AAAGAAATTATGACGCA TGA-3') 在 56 退火条件下获得较好的扩增结果, PCR 产物大小为 127 bp, 与其相对应的 AFLP标记 P67M54<sub>172</sub>的扩增结果完全一致, 表现共分离, 命名为 SCOR<sub>127</sub> (图 4)。

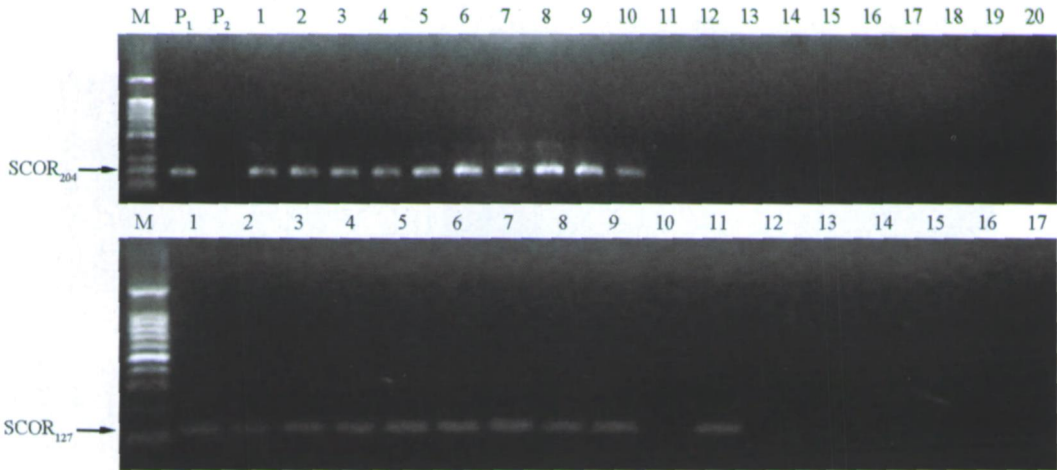


图 4 引物 SCAR1 (上) 和引物 SCAR2 (下) 对两亲本和两池中各单株扩增结果

M: 分子量标准 (100 bp DNA ladder); P<sub>1</sub>: T12-19; P<sub>2</sub>: 91-112;  
1 ~ 10: 橘红心池中各单株; 11 ~ 20: 白心池中各单株。

Fig 4 The amplification of primer SCAR1 (up) and SCAR2 (down) in two parents and every individual of two pools

M: 100 bp DNA ladder; P<sub>1</sub>: T12-19; P<sub>2</sub>: 91-112;  
Lane 1 - 10: Individual of orange pool; Lane 11 - 20: Individual of white pool

2.5 SCAR标记在不同的大白菜自交不亲和系中的验证

对 110 个不同的大白菜自交不亲和系用两对 SCAR 引物进行扩增，结果见表 2。SCAR1 引物对的扩增结果，43 个橘红心自交不亲和系材料中有 38 个扩增到 SCOR<sub>204</sub>，67 个白心自交不亲和系材料中有 6 个扩增到此条带，因此其标记鉴定与田间鉴定的吻合率为 90%。SCAR2 引物对在 110 个大白菜自交不亲和系材料的扩增结果，与田间鉴定的吻合率为 89.1%。

表 2 SCAR 标记 SCOR<sub>204</sub> 和 SCOR<sub>127</sub> 在 110 个不同的大白菜自交不亲和系中分离结果  
Table 2 The amplification of SCAR markers in 110 different incompatibility lines of Chinese cabbage

SCAR 标记	球色	株系数	有标记株系	无标记株系	吻合率
SCAR markers	Head colour	Number of lines	Number of lines with marker	Number of lines without marker	Inosculate (%)
SCOR <sub>204</sub>	橘红心 Orange	43	38	5	90
	白心 White	67	6	61	
SCOR <sub>127</sub>	橘红心 Orange	43	37	6	89.1
	白心 White	67	6	61	

在 DH 群体中 SCOR<sub>204</sub> 与田间球色鉴定的吻合率为 92%，SCOR<sub>127</sub> 的吻合率为 90%；在 110 个不同的大白菜自交不亲和系中 SCOR<sub>204</sub> 与田间球色鉴定的吻合率为 90%，SCOR<sub>127</sub> 的吻合率为 89.1%。说明本研究获得的两个 SCAR 标记在不同的大白菜材料中进行标记辅助选择具有通用性，可以大范围的大白菜材料中用于橘红心性状的标记辅助育种，从而提高球色育种的选择效率，加快育种进程。

References

Liu Xiu-cun, Zhang Feng-lan, Zhang De-shuang, Yang Jian-ping, Wang Mei, Xu Jia-bing 2003. Identification of a RAPD marker linked to orange-red internal head gene in Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 18 (4): 51 - 54. (in Chinese)  
刘秀村, 张凤兰, 张德双, 杨建平, 王 美, 徐家炳. 2003 与白菜桔红心基因连锁的 RAPD 标记. *华北农学报*, 18 (4): 51 - 54  
Xu Jia-bing 1998. A new Chinese cabbage hybrid Beijing orange (97-8). *China Vegetables*, (4): 31. (in Chinese)  
徐家炳. 1998 北京桔红心 (97-8) 大白菜新品系. *中国蔬菜*, (4): 31.  
Zhang Feng-lan, Zhao Xiu-yun 2003. Establishing double haploid population with microspore culture for genetic mapping in Chinese cabbage. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 18 (4): 74 - 77. (in Chinese)  
张凤兰, 赵岫云. 2003 用小孢子培养创建大白菜双单倍体作图群体. *华北农学报*, 18 (4): 74 - 77.