

大白菜橘红心类胡萝卜素组分及其基因分析

李佩荣, 张淑江, 章时蕃, 李 菲, 张 慧, 刘新艳, 武 剑, 王晓武, 孙日飞*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 利用高效液相色谱法 (HPLC), 根据二极管阵列检测器和标准品的检测结果对橘红心和白心大白菜内叶类胡萝卜素组分进行鉴定; 以橘红心大白菜自交系 ‘A21530’ 和白心大白菜自交系 ‘A21445’ 为亲本构建了一个 269 单株的 F_2 分离群体, 进行橘红心基因精细定位; 根据大白菜基因组注释信息, 筛选橘红心候选基因并克隆测序分析; 基因内部开发标记, 在 F_2 群体进行候选基因验证。研究表明, 橘红色是由于前番茄红素 (7, 9, 7', 9' - 四顺式 - 番茄红素)、9 - 顺式 - β - 胡萝卜素、前链孢红素 (7, 9, 9' - 三顺式 - 链孢红素) 和其他胡萝卜素组分积累造成的。通过精细定位将橘红心基因定位于 A09 号染色体末端, 其两侧紧密连锁的标记是 SB13037 和 SB13049, 这两个标记各有一个重组单株, 与橘红色基因分别相距 0.3 和 1.1 cM, 物理距离为 98.904 kb。根据大白菜基因组注释信息, 分析定位区域的 23 个基因, 筛选出 1 个编码类胡萝卜素异构酶的基因 *CRTISO*, 基因编号 *Bra031539*。测序结果表明, *Bra031539* 的编码区有 53 个 SNP 和 6 个碱基缺失, 造成 12 个氨基酸突变和 2 个谷氨酸的缺失。根据缺失突变位点设计标记, 在 F_2 群体中进行验证, 结果表明候选基因与橘红心性状共分离。

关键词: 大白菜; 橘红心; 类胡萝卜素; 基因定位; *or* 候选基因; 类胡萝卜素异构酶

中图分类号: S 634.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 03-0469-10

Analysis of the Carotenoids Pigments and Orange Inner Leaf Gene in Chinese Cabbage (*Brassica rapa*)

LI Pei-rong, ZHANG Shu-jiang, ZHANG Shi-fan, LI Fei, ZHANG Hui, LIU Xin-yan, WU Jian, WANG Xiao-wu, and SUN Ri-fei*

(Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: High-performance liquid chromatography (HPLC), coupled with photodiode array detection and carotenoid standards was used to analyze carotenoid composition in different genotypes of Chinese cabbage. A F_2 population constructed by homozygous breeding lines white inner leaf cabbage ‘A21445’ and orange inner leaf cabbage ‘A21530’ was used for markers screening and fine mapping. The candidate *or* gene was screened and cloned according to *Brassica rapa* genome annotation information. An internal marker in the gene was developed and verified candidate gene in F_2 population. Mapping of SSR and InDel markers on 269 individuals of F_2 population, the *or* gene was located to a 1.4 cM interval with the physical distance of 98.904 kb on chromosome A09 of the *B. rapa* genome. HPLC analysis indicated that orange inner leaf of Chinese cabbage is due to the accumulation of polycycopene (7Z, 9Z, 7'Z, 9'Z-

收稿日期: 2013 - 10 - 21; **修回日期:** 2014 - 02 - 25

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (‘973’) 项目 (2012CB113900); ‘十二五’ 农村领域国家科技计划课题 (2012AA100100); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室项目

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: rifei.sun@caas.net.cn)

tetra-*cis*-lycopene), 9-*cis*- β -carotene, proneurosporene (7,9,9'-tri-*cis*-neurosporene) and other carotenoids pigments. According to *B. rapa* genome annotation information, a candidate gene *Bra031539*, designated *CRTISO*, was predicted within the mapped *or* locus. A deletion of 6 bp and 53 SNPs were found in coding sequence of the orange type, corresponding to two glutamic acids (Glu) deletion and 12 amino acids mutations. The functional marker was cosegregated with *or* loci in F₂ individuals.

Key words: Chinese cabbage; orange inner leaf; carotenoids; mapping; *or* candidate gene; *CRTISO*

大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 心叶颜色一般接近白色。橘红心大白菜是利用生物技术手段将大白菜与芜菁杂交而得到的一个新的种质资源。研究表明: 橘红心大白菜的维生素 C、胡萝卜素及矿质元素含量均高于普通大白菜 (张德双 等, 2004), 并且含有普通大白菜中没有的番茄红素 (熊玉兰, 2002; 陈鹏飞, 2008; Feng et al., 2012)。陈鹏飞等 (2011) 针对大白菜的类胡萝卜素构成特点建立了 RP-HPLC 分析方法, 共分离出 48 种类胡萝卜素。Tuan 等 (2012) 发现光照条件下生长的大白菜中类胡萝卜素总量明显高于黑暗中生长的, 且接受光照的大白菜外叶的类胡萝卜素总量是内叶和中叶的 30 倍。Lee 等 (2014) 认为橘红心大白菜内叶含有类似番茄红素的复合物, 主要是前番茄红素 (7, 9, 7', 9' - 四顺式 - 番茄红素) 和其顺式异构体。

类胡萝卜素是萜类色素物质, 在生物体内通过类异戊二烯途径合成, 呈现黄色、橙红色和红色 (Zhu et al., 2010)。在植物类胡萝卜素生物合成途径中, 几乎所有的基因都已被分离和鉴定。类胡萝卜素异构酶 *CRTISO* 能催化前番茄红素生成全反式番茄红素 (Breitenbach et al., 2001; Masamoto et al., 2001)。在植物中, 许多具有橘红色性状的突变体材料都与类胡萝卜素异构酶有关。Park 等 (2002) 在拟南芥中定位并克隆了基因 *CRTISO*, 发现类胡萝卜素异构酶缺失突变体主要积累前番茄红素和前链孢红素 (7, 9, 9' - 三顺式 - 链孢红素)。Isaacson 等 (2002) 克隆了番茄橘红色基因 *tangerine*, 并证实 *tangerine* 编码一个类胡萝卜素异构酶, *tangerine* 突变体缺失 *CRTISO* 导致番茄积累前番茄红素和 ζ -胡萝卜素, 而番茄红素含量极低。水稻突变体 'zebra' 中, 突变基因 *CRTISO* 能够导致黑暗下生长的水稻组织产生前番茄红素 (Chai et al., 2011)。Lee 等 (2014) 通过类胡萝卜素候选基因关联分析法筛选到橘红心候选基因 *BrCRTISO1* 和 *BrCRTISO2*, 并发现 *BrCRTISO1* 的编码区序列含有多处变异。

分子标记是基因图位克隆、遗传多样性分析和分子标记辅助育种的重要工具 (McCouch et al., 1997; Nagaraju et al., 2002; Liu et al., 2013)。Matsumoto 等 (1998) 开展了大白菜橘红心基因方面的研究, 将控制大白菜橘红心性状的 *oy* 基因定位于 01 号连锁群上, 与 3 个相距很近的 RFLP 标记间距离 17 ~ 19 cM。刘秀村 (2003) 以 DH 群体为试材, 得到了一个与橘红心基因连锁的 RAPD 标记, 遗传距离 3.8 cM。王国臣等 (2007) 以 DH 群体为试材, 找到了一个 RAPD 和 AFLP 标记, 遗传距离分别为 8 cM 和 13 cM。Zhang 等 (2008) 利用上述相同的 DH 群体得到了 2 个 RAPD 标记和一个 AFLP 标记。Feng 等 (2012) 通过 F₂ 分离群体获得了 5 个与 *or* 基因连锁的分子标记, *or* 基因两侧的标记 syau19 和 syau15 覆盖了 4.6 cM 的区域, 物理距离约为 671.271 kb。Zhang 等 (2013) 通过 F₂ 分离群体将橘红心基因 *Br-or* 定位在 16.7 kb 的范围内, 定位区间有 3 个基因, 克隆测序其中的 *CRTISO* 发现启动子区有插入缺失突变。

从现有报道来看, 前人已经进行了大白菜橘红心基因的精细定位, 但对于候选基因克隆和分析的报道较少, 并且到目前为止尚不能完全确定导致大白菜内叶橘红色的类胡萝卜素组分。因此, 继续开展大白菜橘红色组分和橘红心基因克隆分析具有一定的必要性。本试验中采用高效液相色谱法 (HPLC) 对不同材料内叶的类胡萝卜素组分进行鉴定; 以 F₂ 分离群体对橘红心基因进行精细定位, 并且利用大白菜基因组注释信息, 筛选候选基因, 克隆测序橘红心候选基因, 分析变异位点,

为橘红心基因功能分析和类胡萝卜素代谢通路机理研究以及大白菜性状改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以橘红心大白菜自交系‘A21530’和普通大白菜自交系‘A21445’为亲本构建了一个 269 单株的 F₂ 分离群体。将该群体种植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所北京顺义试验田, 用于大白菜橘红心基因连锁标记筛选和精细定位。在成熟期选择白心大白菜‘A21445’和橘红心大白菜‘Jihong 82’、‘A21530’、‘A14316’的内叶进行类胡萝卜素组分的测定, 每份材料 3 个重复。

本试验中的大白菜材料和用于精细定位的 SSR、InDel 引物分别来自中国农业科学院蔬菜花卉研究所大白菜课题组和分子遗传实验室。

1.2 表型调查

本试验于 2012 年 11 月在成熟期将大白菜纵剖, 观察内叶颜色, 统计表型。同时取单株叶片进行冷冻抽干, 用于 DNA 提取。

1.3 类胡萝卜素提取和鉴定方法

取成熟期大白菜内叶, 冷冻抽干并磨碎成干粉。准确称取白菜干粉样品 0.500 g, 置于研钵中, 加入石英砂后再加入适量丙酮: 石油醚 (体积比 1:1) 混合溶液 (0.1% BHT) 完全淹没试样, 用研棒充分研磨后移入砂心漏斗中真空抽滤, 滤液收集于试管中, 重复上述步骤直至将试样洗至无色。将全部滤液转移至圆底烧瓶, 在水浴温度 35 °C 的旋转蒸发仪上浓缩至近干, 再经氮气吹干。若有残留水分可加入少量无水硫酸钠吸附, 用 3.00 mL 丙酮 + 乙腈 (1+1) 溶解, 过 0.22 μm 微孔滤膜, 待测。

使用 HPLC (Waters Alliance 2695) Waters 2998 PDA 检测器, 色谱柱: C₃₀ 不锈钢柱, 250 mm × 4.6 mm, 5 μm, Empore 色谱工作站。标准样品有辣椒红素、叶黄素、玉米黄质、隐黄质和 β-胡萝卜素。对于有标样的组分, 对照标样, 利用保留时间的一致性进行鉴定。没有标样的组分, 利用 PAD 在波长 200 ~ 800 nm 范围的扫描结果, 分析物质的特征吸收峰, 对照文献资料 (Rodriguez-Amaya, 2001; Isaacson et al., 2002; Park et al., 2002; Taylor et al., 2006) 进行鉴定。既无标样、吸收峰波长又与相关文献相差较大的, 标记为未鉴定。

1.4 DNA 提取及 BSA 池的构建

2012 年冬季取 F₂ 群体 (269 株) 各单株叶片, 进行冷冻干燥。F₂ 单株叶片采用 CTAB 法提取 DNA。选取 F₂ 群体中 10 个白心单株和 10 个橘红心单株的 DNA, 采用 BSA 法构建白色 (W) 基因池和橘红色 (O) 基因池, 在建池前对用于建池单株的 DNA 浓度稀释至 50 ng · μL⁻¹, 然后等体积混合, 使所构建的白色基因池和橘红色基因池中的浓度保持相对一致。

1.5 橘红心基因连锁标记筛选及基因定位

采用中国农业科学院蔬菜花卉研究所生物技术研究室的 200 个 SSR 标记和 1 000 对 InDel 标记, 在 BSA 池间进行连锁标记的筛选及定位。利用筛选出的连锁标记检测 F₂ 群体, 利用 JoinMap4.0 软件进行连锁标记分析, 构建区域遗传连锁图, 对橘红心基因进行定位。数据统计: 橘红心亲本扩增片段记为 a 型, 白心亲本扩增片段记为 b 型, F₁ 扩增片段记为 h 型。PCR 反应体系为 15 μL, 其中包括: 10 × PCR 缓冲液, 0.25 mmol · L⁻¹ dNTPs, 1.0 μmol · L⁻¹ 上下游引物, 50 ng · μL⁻¹ 模板 DNA, 1 U Taq。PCR 循环程序为: 94 °C 变性 5 min, 94 °C 变性 40 s, 55 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 50 s, 35 个循环。PCR 扩增产物用 8% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.6 橘红心候选基因的筛选

大白菜基因组测序项目已经由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主持完成, 并且针对全基因组进行了注释分析 (BRAD, <http://brassicadb.org/brad/>)。通过对定位区域的注释基因进行分析, 辅以 TAIR 和 KEEG2 数据库信息, 寻找大白菜类胡萝卜素合成通路的相关基因。

1.7 候选基因克隆分析及验证

根据大白菜参考基因组中 *Bra031539* 基因的序列信息, 设计合适引物, 对橘红心材料 ‘A21530’ 和白心材料 ‘A21445’ 的 *Bra031539* 位点进行 PCR 扩增、回收、连接、克隆及测序。PCR 反应使用高保真 PCR 酶 KOD-Plus-Neo, 扩增 30 个循环 (94 °C 1 min, 55 °C 1 min, 68 °C 2 min)。将 PCR 产物使用 omega 胶回收试剂盒进行回收。使用全式金 TA 克隆试剂盒, 将回收到的 PCR 产物连接到质粒载体 PEASY-T1, 由中国农业科学院重大工程楼开放实验室测序分析。橘红心材料 ‘A21530’ 的 *Bra031539* 基因命名为 *or*, 白心材料 ‘A21445’ 的 *Bra031539* 基因命名为 *Or*。

根据 ‘A21530’ 和 ‘A21445’ 的 *Bra031539* 克隆序列, 利用 ClustalX2 进行比对分析, 寻找二者之间的差异位点。根据差异位点, 设计合适的引物, 扩增差异位点。开发基因内部的功能标记, 在 F₂ 分离群体上对候选基因进行验证。

2 结果与分析

2.1 大白菜内叶类胡萝卜素组分鉴定分析

如表 1 所示, 采用 HPLC 法在两种心叶大白菜内叶中共确定了 10 种类胡萝卜素组分: 紫黄质、叶黄素、玉米黄质、前番茄红素 (7, 9, 7', 9' - 四顺式 - 番茄红素)、前链孢红素 (7, 9, 9' - 三顺式 - 链孢红素)、前 ζ - 胡萝卜素、 ζ - 胡萝卜素、9 - 顺式 - β - 胡萝卜素、 β - 胡萝卜素、链孢红素。在白心大白菜内叶中, 只检测到少量的紫黄质和玉米黄质; 在橘红心大白菜中, 内叶主要积累前番茄红素, 约占类胡萝卜素总量的 75%, 除此之外还积累较多的前链孢红素、前 ζ - 胡萝卜素、9 - 顺式 - β - 胡萝卜素、 β - 胡萝卜素和少量的叶黄素、紫黄质等。

表 1 白心大白菜和橘红心大白菜内叶中类胡萝卜素组分鉴定及其相对含量
Table 1 Identification and percentage of carotenoids that accumulated in the inner leaf of Chinese cabbage

成分 Compound	保留时间/ min Retention time	光谱特征/nm Spectral characteristics		III/ II % ^b		A21445	A21530	A14316	Jihong82
		观测值 Observed	理论值 Reported	观测值 Observed	理论值 Reported				
紫黄质 Violaxanthin	6.73	416,441,469	416,440,465	97	98	73.6	0.7	0.8	0.6
叶黄素 ^a Lutein ^a	10.55						0.6	0.3	0.5
玉米黄质 ^a Zeaxanthin ^a	11.62					9.3			
前番茄红素 Prolycopene	35.74	423,442,464	424,442,464	10	10		78.6	71.2	71.5
前链孢红素 Proneurosporene	36.70	413,434,462	412,434,462	10	10		3.1	2.3	2.7
前 ζ - 胡萝卜素 Pro- ζ -carotene	37.74	380,402,427	380,404,428	107	107		3.9	3.7	4.6
ζ - 胡萝卜素 ζ -carotene	39.47	381,402,427	378,400,425	98	103		0.3	0.3	0.4
9 - 顺式 - β - 胡萝卜素	40.97	423,447,469	422,446,470	18	18		4.9	11.4	10.5
9- <i>cis</i> - β -carotene									
β - 胡萝卜素 ^a β -carotene ^a	42.03						2.3	2.9	2.1
链孢红素 Neurosporene	43.95	414,439,468	414,439,467	100	100		0.6	0.7	0.8
未鉴定 Unidentified						17.1	5.0	6.4	6.3

注: ^a 表示物质通过标样确定, 因此吸收光谱未列出; ^b III/II % 表示最大吸收波长的高度 (III) 与中间吸收波长的高度 (II) 的比值乘以 100 (Britton, 1995)。相对含量指该类胡萝卜素峰面积占该品种类胡萝卜素总峰面积的比值。

Note: ^a The compound was identified by standards, so spectral characteristics were not shown; ^b Ratio of the height of the longest-wavelength absorption peak, designated III, and that of the middle absorption peak, designated II, taking the minimum between two peaks as baseline, multiplied by 100 (Britton, 1995). Percentage of carotenoids composition is defined as percentage of the area of an individual peak against the total area of all peaks.

2.2 大白菜橘红心基因精细定位

在亲本橘红心材料‘A21530’和白心材料‘A21445’间共筛选了 200 对 SSR 引物和 1 000 对 InDel 引物,其中 227 对 InDel 引物表现出多态性。经分离群体分组分析(BSA)发现,8 个 InDel 标记(BrID10733、BrID90343、BrID11773、BrID11763、BrID11765、BrID90317、BrID11769、BrID11527)在白色基因池和橘红色基因池间表现出多态性。用 8 对多态性 InDel 标记检测 F_2 群体的 269 个单株,利用 Jionmap4.0 分析其连锁关系,发现这 8 个 InDel 标记与橘红心基因紧密连锁,位于 A09 染色体末端。

根据大白菜橘红色基因 *or* 的初定位结果,参考大白菜基因组序列分析,将该基因定位于 A09 染色体末端的 Scaffold000077 和 Scaffold000082 之间。在该区域内设计了 9 个 InDel 标记和 27 个 SSR 标记,其中 11 个标记与橘红心基因紧密连锁。加之初定位筛选到的 8 个 InDel 标记,共计 19 个。利用 Jionmap4.0 软件分析它们之间的连锁关系,构建了一个包含 19 个标记的区域遗传连锁图,将该橘红心基因定位在 A09 染色体末端,两侧紧密连锁的分子标记为 SB13037 和 SB13049。这两个标记与橘红心基因连锁距离分别为 0.3 cM 和 1.1 cM,物理距离为 98.904 kb,定位区域内有 23 个基因(图 1)。标记 SB13037、SB13049 各有一个重组单株。

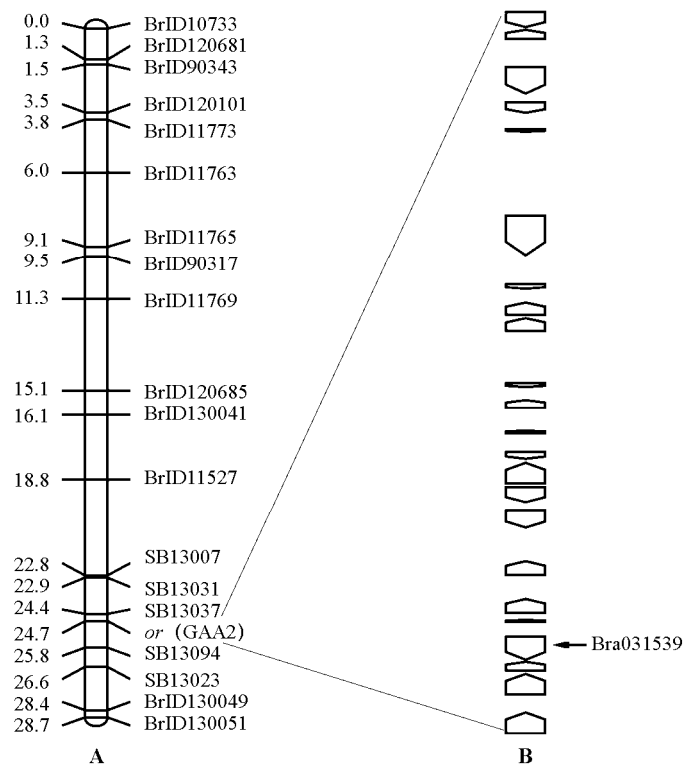


图 1 大白菜橘红心基因遗传图谱和候选基因筛选

A: 橘红心基因遗传图谱, GAA2 为功能标记。B: 紧密连锁标记 SB13037 和 SB13049 之间的注释基因, 基因的间距按物理距离等比例缩放。

Fig. 1 Genetic map and candidate gene screening of *or*

A: Genetic map of the *or* gene on A09 in Chinese cabbage, GAA2 is a functional marker. B: The annotated genes located between two closely linked markers (SB13037, SB13049). The distance between genes scaled in accordance with the physical distance.

2.3 大白菜橘红心基因筛选

根据大白菜基因组注释信息,结合 TAIR 和 KEEG2 数据库信息,对定位区域内的 23 个基因(<http://brassicadb.org/brad/searchAll.php>)比对分析发现,该区域内与拟南芥直系同源的注释基因主

要有：核糖体蛋白、信号肽酶、蛋白激酶、蛋白质水解酶、结构基因、转录因子和未知基因等（表 2）。根据以上信息，结合类胡萝卜素组分鉴定结果，筛选到一个编码类胡萝卜素异构酶的基因 *CRTISO*，基因编号 *Bra031539*，对应拟南芥同源基因 *AT1G06820*。

表 2 定位区域内的大白菜基因及拟南芥同源基因
Table 2 *Brassica rapa* genes in positional region and the homologous genes in *Arabidopsis thaliana*

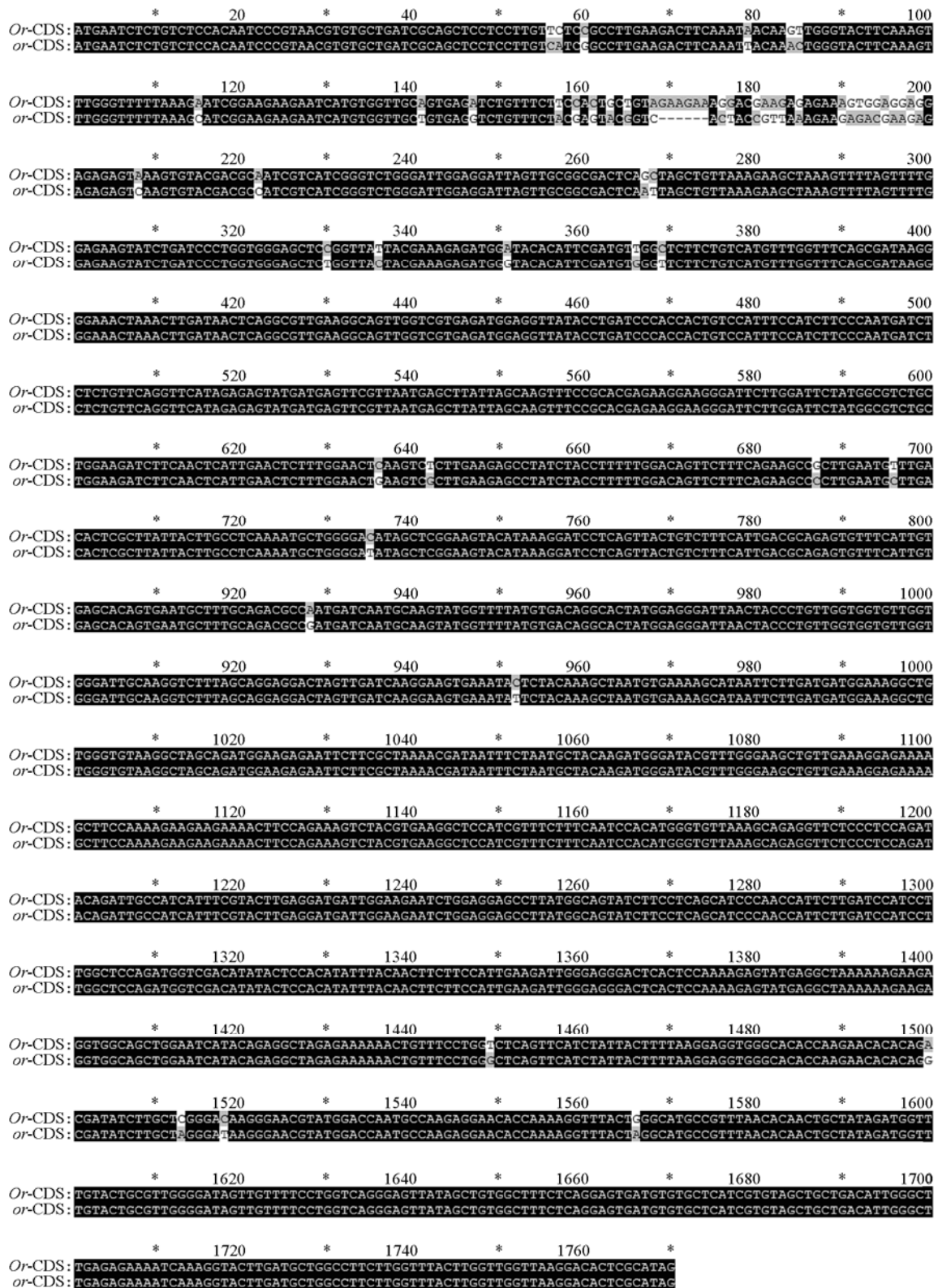
大白菜基因编号 <i>Brassica rapa</i> gene	拟南芥基因编号 <i>Arabidopsis thaliana</i> gene	基因注释信息 <i>Arabidopsis thaliana</i> annotations
<i>Bra031558</i>	<i>AT1G07220</i>	功能未知 Unknown
<i>Bra031557</i>	<i>AT1G07210</i>	30S 核糖体蛋白 30S ribosomal protein S18 family
<i>Bra031556</i>	<i>AT1G07200</i>	ATP 依赖的丝氨酸蛋白酶 ATP-dependent Clp protease
<i>Bra031555</i>	<i>AT1G07140</i>	核内小分子 GTP 结合蛋白 Ran GTPase binding
<i>Bra031554</i>	<i>AT1G07135</i>	富含甘氨酸蛋白 Glycine-rich protein
<i>Bra031553</i>	<i>AT1G07110</i>	2,6 - 二磷酸酶 ATF2KP
<i>Bra031552</i>	<i>AT1G07090</i>	下胚轴光敏基因 LSH6
<i>Bra031551</i>	<i>AT1G07080</i>	γ 干扰素可诱导的溶酶体硫酸还原酶家族蛋白 GILT family protein
<i>Bra031550</i>	<i>AT1G06990</i>	水解酶家族蛋白 Hydrolase family protein
<i>Bra031549</i>	<i>AT1G06980</i>	功能未知 Unknown protein
<i>Bra031548</i>	<i>AT1G06970</i>	钠氢通道蛋白 CHX14
<i>Bra031547</i>	<i>AT1G06923</i>	卵形家族蛋白 Ovate family protein
<i>Bra031546</i>	<i>AT1G06920</i>	拟南芥卵形家族蛋白 ATOFP4
<i>Bra031545</i>	<i>AT1G06910</i>	转录因子 Transcription factor
<i>Bra031544</i>	<i>AT1G06900</i>	金属内肽酶 Metalloendopeptidase
<i>Bra031543</i>	<i>AT1G06890</i>	核苷酸/糖转运家族蛋白 Nucleotide/sugar transporter family protein
<i>Bra031542</i>	<i>AT1G06870</i>	信号肽酶 Signal peptidase
<i>Bra031541</i>	<i>AT1G06850</i>	拟南芥亮氨酸拉链转录因子 AtbZIP52
<i>Bra031540</i>	<i>AT1G06830</i>	谷氧还蛋白家族蛋白 Glutaredoxin family protein
<i>Bra031539</i>	<i>AT1G06820</i>	类胡萝卜素异构酶 CRTISO
<i>Bra031538</i>	<i>AT1G06790</i>	核糖核酸聚合酶 RNA polymerase
<i>Bra031537</i>	<i>AT1G06780</i>	半乳糖醛酸转移酶 GAUT6
<i>Bra031536</i>	<i>AT1G06750</i>	功能未知 Unknown protein

2.4 大白菜橘红心基因克隆分析

根据大白菜参考基因组中 *Bra031539* 的序列信息（A09，37676627 ~ 37679733，3 107 bp）设计引物，克隆测序基因的 gDNA 和 cDNA 序列。结果表明：*or* 基因有 13 个外显子和 12 个内含子，基因序列全长 3 107 bp，CDS 全长 1 770 bp（图 2，A）。通过对大白菜课题组多份橘红心和白心骨干亲本材料的克隆分析表明，*or* 基因的编码区存在 53 个单核苷酸多态性（SNP）和 6 个碱基（GAAGAA）缺失突变（图 3）；并且变异主要存在于第一个外显子上，有 39 个 SNP 和 6 个碱基缺失。序列分析发现，*or* 基因的变异共造成 12 个氨基酸位点的突变和两个谷氨酸（E）的缺失（图 2，B）。



图 2 橘红心基因的结构和变异位点
A: 黑色方块表示外显子，标注了橘红心基因的突变位点；B: 氨基酸水平上的突变类型，数字代表具体的变异位点。
Fig. 2 The structure and variation locus of *or*
A: Black closed boxes represent exons. Deletions found in *CRTISO* of orange alleles are indicated; B: The variation sites in amino acid level. Numbers represent the specific location of mutation partially.

图3 *Or* 和 *or* 基因编码序列比对分析

Or-CDS: *Or* 基因的编码区序列; *or*-CDS: *or* 基因的编码区序列。

Fig. 3 The coding sequence alignment analysis of *Or* and *or* gene

Or-CDS: The coding sequence of *Or*; *or*-CDS: The coding sequence of *or*.

2.5 大白菜橘红心基因验证

基于候选基因 *or* 第一外显子上 6 个碱基的缺失变异设计引物 Bio130275/ Bio130276, 在聚丙烯酰胺凝胶上检测亲本和 F_2 群体的扩增产物。结果表明: 引物在亲本间具有多态性, 橘红心亲本 (图 4, P_1) 扩增片段 131 bp (a 型), 白心亲本 (图 4, P_2) 扩增片段 137 bp (b 型)。在 F_2 群体中, 62 份橘红心材料的扩增片段均为 a 型; 207 份白心材料中有 76 份材料扩增片段为 b 型, 131 份材料为 h 型 (杂合型), 该标记在 F_2 群体上的检验结果与表型性状共分离 (图 4)。由于与 *or* 基因紧密连锁的两个标记 (SB13037、SB13049) 各有一个重组单株, 而基于 *or* 序列开发的功能标记与橘红心性状的共分离, 从而验证了候选基因。将标记命名为 GAA2, 该标记可以用于橘红心材料的辅助选择育种。

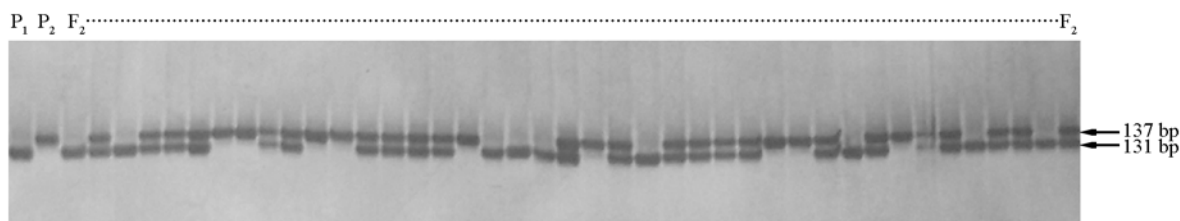


图 4 亲本和 F_2 群体验证候选基因
功能标记 GAA2 在亲本和 F_2 群体中的多态性分析。

Fig. 4 Candidate gene was verified in parents and F_2 population

The polymorphism of the P_1 plant (A21530), the P_2 plant (A21445), and the F_2 individuals by functional marker GAA2.

3 讨论

3.1 大白菜内叶类胡萝卜素

前人已经对大白菜中类胡萝卜素物质做了一定的研究 (Tuan et al., 2012), 但是关于导致大白菜内叶呈现橘红色的物质报道较少。据报道, 大白菜内叶呈现橘红色是由于番茄红素和 β -胡萝卜素的积累造成的 (熊玉兰, 2002; 陈鹏飞, 2008; Feng et al., 2012)。也有报道称前番茄红素的积累导致大白菜内叶呈现橘红色 (Lee et al., 2014)。另外, 前人测定大白菜类胡萝卜素大多采用单层硅烷 C_{18} 色谱柱, 通常 C_{18} 色谱柱能够有效分离不同种类的类胡萝卜素, 但却难以分离同分异构体, 无法对类胡萝卜素成分进行精确分析。新型的多层硅烷 C_{30} 色谱柱在分离同分异构体时具有明显的优势, 近年来被越来越广泛地用于类胡萝卜素研究 (Sander et al., 1994; Lessin et al., 1997)。

本试验中采用 HPLC 法, 使用多层硅烷 C_{30} 色谱柱在大白菜中分离鉴定了 10 种类胡萝卜素成分, 多于 Lee 等 (2014) 测定的类胡萝卜素组分。Lee 等 (2014) 在黄心和橘红心大白菜内叶中都检测到了较多的叶黄素, 而本试验中仅在橘红心材料中检测到微量的叶黄素。在本试验中明确了大白菜橘红色主要是由于内叶积累 7,9,7',9'-四顺式-番茄红素造成的, 没有检测到全反式番茄红素的存在; 除此之外, 橘红心材料还积累较多的前链孢红素 (7,9,9'-三顺式-链孢红素)、前 ζ -胡萝卜素、9-顺式- β -胡萝卜素、 β -胡萝卜素、少量的叶黄素和紫黄质等。

3.2 橘红心候选基因 *CRTISO*

CRTISO 是类胡萝卜素异构酶 (Beyer et al., 1989)。在植物中, *CRTISO* 能催化前番茄红素生成全反式番茄红素, 许多突变体材料的橘红色性状都与类胡萝卜素异构酶有关 (Isaacson et al., 2002; Park et al., 2002)。Zhang 等 (2013) 通过精细定位筛选到橘红心候选基因 *CRTISO*, 发现 *CRTISO*

的启动子区存在插入缺失突变, 但 *CRTISO* 的编码序列没有变异, 而本试验中发现的突变位点在 *or* 基因的编码区。Lee 等 (2014) 通过类胡萝卜素候选基因关联分析法筛选到橘红心候选基因 *BrCRTISO1*, 其第一个外显子有 9 个碱基的插入和 15 个碱基的缺失, 在基因的外显子和内含子上均有多处 SNP。然而, Lee 等 (2014) 没有扩增出 *BrCRTISO1* 的 3'端的序列, 因而没有获得完整的 *BrCRTISO1* 转录本。

本试验中, 克隆测序了 *or* 和 *Or* 的 CDS 全长序列, 并发现橘红心基因的变异位点存在于编码区, 但与 Lee 等 (2014) 发现的突变位点不同, 且 *or* 的 3'端序列没有差异。*or* 基因的 CDS 区有 53 个单核苷酸多态性 (SNP) 和 6 个碱基的缺失突变, 造成 12 个氨基酸位点的突变和两个谷氨酸 (E) 的缺失。分析发现, 第 19 位的疏水非极性苯丙氨酸 (F) 突变成极性亲水丝氨酸 (S), 第 39 位的天冬氨酸 (N) 变异成碱性组氨酸 (H), 第 57 位的 2 个酸性谷氨酸 (E) 缺失, 第 67 位的非极性甘氨酸 (G) 突变为碱性精氨酸 (R)。这几个氨基酸性质发生变化, 可能影响了酶的活性, 至于哪个突变位点的氨基酸为关键氨基酸还有待进一步研究和验证。有研究表明, *CRTISO* 功能丧失能使植物在黑暗中积累前番茄红素、顺式胡萝卜素和番茄红素的前体物质 (Isaacson et al., 2002; Park et al., 2002)。许多类胡萝卜素合成途径的酶都具有高度保守的核苷酸结构域, 在类胡萝卜素异构酶的 N 端具有保守的二核苷酸结合域 (Isaacson et al., 2004)。基于以上信息, 推测位于保守结构域的某些关键氨基酸极性和酸碱性发生变化, 可能导致了类胡萝卜素异构酶 *CRTISO* 活性的降低或丧失。

References

- Beyer P, Mayer M, Kleinig H. 1989. Molecular oxygen and the state of geometric isomerism of intermediates are essential in the carotene desaturation and cyclization reactions in daffodil chromoplasts. *Eur J Biochem*, 184 (1): 141 - 150.
- Breitenbach J, Vioque A, Sandmann G. 2001. Gene sl0033 from *Synechocystis* 6803 encodes a carotene isomerase involved in the biosynthesis of all-E lycopene. *Z Naturforsch C*, 56 (9 - 10): 915 - 917.
- Britton G. 1995. UV/visible spectroscopy. *ChemInform*, 26 (32): 13 - 63.
- Chai Cheng-lin, Fang Jun, Liu Yang, Tong Hong-ning, Gong Yan-qing, Wang Yi-qin, Liu Min, Wang You-ping, Qian Qian, Cheng Zhu-kuan. 2011. *ZEBRA2*, encoding a carotenoid isomerase, is involved in photoprotection in rice. *Plant Molecular Biology*, 75 (3): 211 - 221.
- Chen Peng-fei. 2008. The study of identify and accumulation mechanisms and regulation control of carotenoid on Chinese cabbage [M. D. Dissertation]. Yangzhou: Yangzhou University. (in Chinese)
- 陈鹏飞. 2008. 大白菜类胡萝卜素分离鉴定和积累机理与调控研究 [硕士论文]. 扬州: 扬州大学.
- Chen Peng-fei, Liu Shuan-tao, Zhang Zhi-gang, Li Qiao-yun, Zhao Zhi-zhong, Xue Lin-bao. 2011. Category identification of carotenoids in Chinese cabbage. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 27 (19): 137 - 143. (in Chinese)
- 陈鹏飞, 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 赵智中, 薛林宝. 2011. 大白菜的类胡萝卜素种类鉴定. *中国农学通报*, 27 (19): 137 - 143.
- Feng Hui, Li Yue-fei, Liu Zhi-yong, Liu Jing. 2012. Mapping of *or*, a gene conferring orange color on the inner leaf of the Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Molecular Breeding*, 29: 235 - 244.
- Isaacson T, Ohad I, Beyer P, Hirschberg J. 2004. Analysis in vitro of the enzyme *CRTISO* establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology*, 136 (4): 4246 - 4255.
- Isaacson T, Ronen G, Zamir D, Hirschberg J. 2002. Cloning of *tangerine* from tomato reveals a carotenoid isomerase essential for the production of β -carotene and xanthophylls in plants. *The Plant Cell Online*, 14 (2): 333 - 342.
- Lee S, Lee S C, Byun D H, Lee D Y, Park J Y, Lee J H, Lee H O, Sung S H, Yang T J. 2014. Association of molecular markers derived from the *BrCRISTO1* gene with polycarpene-enriched orange-colored leaves in *Brassica rapa*. *Theor Appl Genet*, 127 (1): 179 - 191.
- Lessin W J, Catigani G L, Schwartz S J. 1997. Quantification of cis-trans isomers of provitamin A carotenoids in fresh and processed fruits and vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45 (10): 3728 - 3732.
- Liu Bo, Wang Yan, Zhai Wen, Deng Jie, Wang Hui, Cui Yang, Cheng Feng, Wang Xiao-wu, Wu Jian. 2013. Development of InDel markers for *Brassica rapa* based on whole-genome re-sequencing. *Theoretical and Applied Genetics*, 126 (1): 231 - 239.

- Liu Xiu-cun. 2003. Identification of RAPD and SCAR markers linked to orange-red internal head gene in Chinese cabbage[M. D. Dissertation]. Tai'an: Shandong Agricultural University. (in Chinese)
- 刘秀村. 2003. 与大白菜橘红心性状连锁的 RAPD 和 SCAR 标记的探索[硕士论文]. 泰安: 山东农业大学.
- Matsumoto E, Yasui C, Ohi M, Tsukada M. 1998. Linkage analysis of RFLP markers for clubroot resistance and pigmentation in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). *Euphytica*, 104 (2): 79 - 86.
- Masamoto K, Wada H, Kaneko T, Takaichi S. 2001. Identification of a gene required for cis-to-trans carotene isomerization in carotenogenesis of the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant Cell Physiol*, 42 (12): 1398 - 1402.
- McCouch S R, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho Y G, Huang N, Ishii T, Blair M. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol Biol*, 35 (1 - 2): 89 - 99.
- Nagaraju J, Kathirvel M, Kumar R R, Siddiq E, Hasnain S E. 2002. Genetic analysis of traditional and evolved Basmati and non-Basmati rice varieties by using fluorescence-based ISSR-PCR and SSR markers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99 (9): 5836 - 5841.
- Park H, Kreunen S S, Cuttriss A J, DellaPenna D, Pogson B J. 2002. Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *The Plant Cell Online*, 14 (2): 321 - 332.
- Rodriguez-Amaya D B. 2001. A guide to carotenoid analysis in foods. Washington, DC: ILSI Press: 1 - 64.
- Sander L C, Sharpless K E, Craft N E, Wise S A. 1994. Development of engineered stationary phases for the separation of carotenoid isomers. *Analytical Chemistry*, 66 (10): 1667 - 1674.
- Taylor K L, Brackenridge A E, Vivier M A, Oberholster A. 2006. High-performance liquid chromatography profiling of the major carotenoids in *Arabidopsis thaliana* leaf tissue. *J Chromatogr A*, 1121 (1): 83 - 91.
- Tuan P A, Park N I, Park W T, Kim Y B, Kim J K, Lee J, Lee S H, Yang T J, Park S U. 2012. Carotenoids accumulation and expression of carotenogenesis genes during seedling and leaf development in Chinese cabbage (*Brassica rapa* subsp. *pekinensis*). *Plant Omics Journal*, 5 (2): 143 - 148.
- Wang Guo-chen, Zhang Feng-lan, Yu Yang-jun, Zhang De-shuang, Zhao Xiu-yun. 2007. Identification of SCAR markers linked to orange head leaf gene in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Acta Horticulturae Sinica*, 34: 217 - 220. (in Chinese)
- 王国臣, 张凤兰, 余阳俊, 张德双, 赵岫云. 2007. 与大白菜橘红心基因紧密连锁的 SCAR 标记. *园艺学报*, 34: 217 - 220.
- Xiong Yu-lan. 2002. Comparative analysis of carotenoid biosynthetic enzyme gene expression in Juhongxin and popular heading Chinese cabbage[M. D. Dissertation]. Beijing: Capital Normal University. (in Chinese)
- 熊玉兰. 2002. 橘红心白菜和普通大白菜类胡萝卜素代谢途径主要酶基因的表达分析[硕士论文]. 北京: 首都师范大学.
- Zhang De-shuang, Xu Jia-bing, Zhang Feng-lan. 2004. The primary nutrients analysis in different head color Chinese cabbage. *China Vegetables*, (3): 37. (in Chinese)
- 张德双, 徐家炳, 张凤兰. 2004. 不同球色大白菜主要营养成分分析. *中国蔬菜*, (3): 37.
- Zhang Feng-lan, Wang Guo-chen, Wang Mei, Liu Xiu-cun, Zhao Xiu-yun, Yu Yang-jun, Zhang De-shuang, Yu Shuan-cang. 2008. Identification of SCAR markers linked to *or*, a gene inducing beta-carotene accumulation in Chinese cabbage. *Euphytica*, 164 (2): 463 - 471.
- Zhang Jun-xiang, Li Hui-xia, Zhang Ming-ke, Hui Mai-xia, Wang Qi, Li Li, Zhang Lu-gang. 2013. Fine mapping and identification of candidate *Br-or* gene controlling orange head of Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Molecular Breeding*, 32 (4): 799 - 805.
- Zhu Chang-fu, Bai Chao, Sanahuja G, Yuan Da-wei, Farré G, Naqvi S, Shi Lian-xuan, Capell T, Christou P. 2010. The regulation of carotenoid pigmentation in flowers. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 504 (1): 132 - 141.