

# 白菜类作物 *BrFLC5* 与开花时间相关的 dCAPs 标记开发

张学铭, 刘 博, 胡云艳, 刘 静, 王晓武, 武 剑\*

(中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

**摘 要:** 为了揭示 *BrFLC5* 对白菜类作物抽薹开花的作用机制, 克隆了 12 份开花习性不同的白菜类作物 *BrFLC5* 基因 exon2 ~ exon4 特异序列, 分析发现在 exon3 的 Pi3 + 1 存在 G - A 变异, 并开发了 dCAPs 标记。通过对来自 10 个不同栽培种群的 93 份材料进行开花时间调查和基因型检测, 发现该基因的分子标记与开花时间表型显著相关 ( $P < 0.05$ )。因此, 用该标记可以进行抽薹开花分子标记辅助选择育种。

**关键词:** 白菜类; 抽薹开花时间; *BrFLC5*; dCAPs 标记

**中图分类号:** S 634

**文献标志码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2014) 10-2035-08

## Development of dCAPs Marker for *BrFLC5* Related with Flowering Time in *Brassica rapa*

ZHANG Xue-ming, LIU Bo, HU Yun-yan, LIU Jing, WANG Xiao-wu, and WU Jian\*

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

**Abstract:** In order to reveal the mechanism of the *BrFLC5* gene in the process of flowering time, we cloned exon2 - exon4 of *BrFLC5* in twelve *Brassica rapa* accessions with a wide range of flowering time variation. There was a single-base mutation (G - A) in the Pi3 + 1 of *BrFLC5* exon3 and subsequently a dCAPs marker for *BrFLC5* was developed in the *B. rapa*. We screened 93 accessions from ten different cultivar groups and analysed the correlation between flowering time and dCAPs marker for *BrFLC5*. The results showed that the flowering time was significantly correlated to the dCAPs of *BrFLC5* ( $P < 0.05$ ). The special marker can be easily used for marker-assisted selection (MAS) of the bolting and flowering time in breeding.

**Key words:** *Brassica rapa*; bolting and flowering time; *BrFLC5*; dCAPs marker

白菜类作物包括大白菜、白菜、菜薹、薹菜、水菜、乌塌菜、芜菁和紫菜薹等多种类型。抽薹开花是白菜类作物重要的农艺性状 (Wu et al., 2012)。在中国春季及高寒地区的秋冬白菜类作物生产中, 先期抽薹开花常常成为困扰生产的一道难题。

关于抽薹开花调控机理, 在拟南芥中已经有了详尽的研究。抽薹开花是由内源发育信号和多种环境因素共同调控的 (Srikanth & Schmid, 2011), 大约有超过 180 个基因参与了植物抽薹开花的分

收稿日期: 2014 - 05 - 19; 修回日期: 2014 - 07 - 09

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 ('973') 项目 (2012CB113900); 国家自然科学基金项目 (31272179, 30800753)

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

子机理调控过程 (Fornara et al., 2010)。特别在春化路径和自主路径中, 主要是环境因子作用于 *FLC* (*Flowering Locus C*), 调控着拟南芥的抽薹开花, 并以剂量的方式抑制开花 (Michaels & Amasino, 2001)。研究显示: 在拟南芥中, 春化路径中的抽薹开花时间是由 *FLC* 以及控制 *FLC* 表达的 *FRI* (*FRIGIDA*) 等位基因调控的 (Michaels & Amasino, 1999; Johanson et al., 2000)。 *FLC* 是编码 MADS-box 的转录调控因子, 其通过抑制 *FT* (*Flowering Locus T*) 和 *SOC1* 基因的表达, 阻止顶端分生组织从营养生长向生殖生长转换, 从而抑制拟南芥的开花 (Zachco et al., 1997; Michaels & Amasino, 1999; Jung et al., 2010)。白菜类作物中, 确定存在 4 个拷贝 *FLC* 同源基因, 并且 *FLC* 重复产生的多倍性是造成其开花时间变异的原因 (Schrantz et al., 2002), 这就给 *FLC* 基因的功能研究带来困难。近年来, 国内外学者对白菜的抽薹开花的遗传机理进行了相关研究, 结果表明抽薹开花受到极其复杂的遗传控制 (Lin et al., 2005; Kim et al., 2007; Yuan et al., 2009; Zhao et al., 2010; Wu et al., 2012)。Osborn (2004) 认为白菜中的多拷贝同源基因是以剂量的方式来调控抽薹开花。Yuan 等 (2009) 在白菜中发现 *BrFLC1* 存在一个与抽薹开花紧密连锁的变异位点, 开发 CAPs 标记, 说明 *BrFLC1* 在白菜开花机制中起着重要作用。Zhao 等 (2010) 研究发现 *BrFLC2* 是开花时间的主效 QTL, 是抽薹开花最大的候选基因。Wu 等 (2012) 发现 *BrFLC2* 存在与开花相关的缺失突变, 开发了 InDel 标记。黄细松等 (2007) 克隆了白菜和菜薹 *BrFLC3* 的编码区、启动子以及内含子序列, 发现该基因随低温处理时间的延长, 表达逐渐减弱, 说明 *BrFLC3* 基因位点可能参与决定白菜类作物广泛的开花时间变异。Schrantz 等 (2002) 检测到两个 *BrFLC5* 剪接变异体, 但是没有进一步的报道。尽管 *BrFLC5* 是否参与了抽薹开花的调控未见明确的报道, 但是前期研究显示, 95 份重测序材料中检测到 *BrFLC5* 在 mRNA 水平的表达上有差异。关于白菜 *BrFLC5* 的变异是否对白菜的开花时间产生影响也未见相关报道。

本研究中利用 12 份具有不同开花习性的白菜类作物, 对 *BrFLC5* 序列进行分析, 发现在 exon3 的 Pi3 + 1 存在 G - A 变异, 基于此变异位点开发 dCAPs 标记, 并利用 93 份白菜类作物材料验证 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记与开花时间的相关性, 为白菜类作物分子标记辅助育种提供技术和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

使用了不同开花习性的 12 份白菜类作物, 包括大白菜 4 份、白菜 2 份、黄籽沙逊油菜 2 份、芜菁 2 份、菜薹 1 份和水菜 1 份 (表 2), 这些材料用于全基因组 DNA 的提取, *BrFLC5* 的 exon2 ~ exon4 的 DNA 序列的扩增, 以及 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记开发。

*BrFLC5* 的 dCAPs 标记验证来自 10 个不同栽培群体的 93 份材料的自然群体, 包括大白菜 46 份、白菜 17 份、菜薹 9 份、芜菁 6 份、薹菜 4 份、乌塌菜 2 份、小苾菜 2 份、水菜 2 份、黄籽沙逊油菜 3 份和其他材料 2 份等, 86 份材料为双单倍体 (DH) 材料, 其他 7 份为高代自交系 (表 3)。

### 1.2 抽薹开花时间的调查

试验材料于 2012 年 9 月—2013 年 2 月种植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所玻璃温室中苗床, 白天温度保持 23 ~ 25 °C、光照 16 h (补光), 夜晚温度保持 18 ~ 20 °C、黑暗 8 h, 相对湿度保持在 40% ~ 50%; 将种子放在含有 1.5% 琼脂糖的圆底离心管中, 恒温箱 25 °C 催芽, 待露白后播种于苗盆中, 每份材料 6 个单株, 随机分布, 常规管理。

抽薹开花时间的调查参照 Osborn (2004) 和 Okazaki 等 (2007) 的方法, 略有改动。开花时间

调查标准为从播种（2012 年 9 月）到肉眼可见花蕾所需的时间，从第一份材料花蕾初现时开始，逐日观察统计，直至播种后 150 d，未开花的材料记为 150 d。每份材料取重复的平均值。

1.3 全基因组 DNA 提取、特异引物序列的设计、PCR 反应及 *Ssp* I 酶切反应

DNA 提取采用 CTAB 法（Wang et al., 2005）。

*BrFLC5* 基因的全基因组序列参考白菜基因组的序列（<http://brassicadb.org/brad/>），利用 Primer 5.0 软件设计特异引物（表 1）。*BrFLC5* exon2 ~ exon4 的 DNA 区域设计检测 *BrFLC5* 的变异位点引物为 BrFLC5F1 和 BrFLC5R1。采取巢式扩增的方法，获得 *BrFLC5* 基因特异酶切序列：先用一对外侧引物（BrFLC5F2 和 BrFLC5R2）进行第一次扩增，然后将 PCR 产物稀释 1 000 倍，并以稀释的 PCR 产物为模板，再用内侧引物（BrFLC5F 和 BrFLC5R）进行巢式扩增，获得 *BrFLC5* dCAPs 标记的特异酶切序列。对于 *BrFLC5* exon3、exon4 的 DNA 序列区域设计的 dCAPs 标记特异引物 BrFLC5F 和 BrFLC5R，正向引物 BrFLC5F（TGAGCTACTAGAACTTGTGGAAAT）序列最后一个碱基会引入一个错配 G→T。

将获得 PCR 产物进行纯化，采用 PCR 产物纯化试剂盒（Trans Biotech，全式金），具体方法见试剂盒说明书。PCR 产物纯化完以后，取 5 μL 检测，1%琼脂糖凝胶电泳检测是否有条带，其余用于克隆测序。对扩增得到的产物纯化后连接到 pEASY-T1 载体，连接产物通过热激转化受体大肠杆菌 Trans-T1 感受态细胞，通过蓝白斑筛选得到阳性克隆。将阳性克隆的菌液送至中国农业科学院作物科学研究所进行测序。测序在 ABI3730XL DNA Analyzer（Perkin-Elmer，USA）上进行，采用 DNAMAN 软件中多序列比对进行序列分析。

PCR 反应体系：50 ng DNA，10 × LA buffer 2 μL，2.5 mmol · L<sup>-1</sup> 的 dNTPs 2 μL，Primer F 和 R 各 0.5 μL，0.5 U LA polymerase[TaKaRa，宝生物工程（大连）有限公司]，ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL。热循环程序为：94 °C 预变性 5 min；94 °C 变性 30 s；55 °C 复性 40 s，72 °C 延伸 1 min，35 个循环；72 °C 延伸 10 min。取 5 μL PCR 扩增产物，加入 6 × loading buffer 后，用 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出目的片段。

*BrFLC5* 基因 dCAPs 标记的酶切反应体系：PCR 产物 5 μL，*Ssp* I 内切酶反应缓冲液 2 μL，*Ssp* I 内切酶 0.5 μL，ddH<sub>2</sub>O 补足 20 μL，37 °C 水浴 2 h，用 8.0%聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）检测。

表 1 *BrFLC5* 引物及序列  
Table 1 Primers and sequences

引物用途 Use of the primers	引物名称 Primer name	引物序列（5′-3′） Sequence of primers（5′-3′）
扩增 <i>BrFLC5</i> exon2 ~ exon4 序列的特异引物 <i>BrFLC5</i> specific primers in exon2 - exon4	BrFLC5F1	ATGCTGATGATCTCAATGCC
	BrFLC5R1	ATCTTCTAGCTCAACGAGGG
扩增 <i>BrFLC5</i> intron2 ~ intron5 序列的特异引物 <i>BrFLC5</i> specific primers in intron2 - intron5	BrFLC5F2	CTGCGTGTATCATTCTATTT
	BrFLC5R2	GTGCTATAAAATCACAAATCTA
扩增 <i>BrFLC5</i> 酶切位点 exon3、exon4 序列的特异引物 <i>BrFLC5</i> specific primers used to amplify the sequence of the restriction enzyme cutting site in exon3, exon4	BrFLC5F	TGAGCTACTAGAACTTGTGGAAAT
	BrFLC5R	GCTCAACGAGGGAATCCACGCTTA

1.4 统计学分析

方差分析（ANOVA）和相关性分析利用统计分析软件包 SPSS20.0（SPSS Inc., IBM, USA）。其中方差分析采用单因素方差分析（one-way ANOVA），以标记基因型作为自变量。开花时间表型与基因型的相关性分析采用 SPSS20.0 的皮尔逊相关系数单侧检验（one-tailed Pearson）。

将 *BrFLC5* 的两种基因型 A 和 G，分别标记为 1 和 2，各个单株对应着开花时间的天数，先用

one-way ANOVA 进行方差分析, 然后用 one-tailed Pearson 进行相关性分析, 相关显著性分析参考相关系数临界值表 (王式安, 1995)。

2 结果与分析

2.1 供试材料的抽薹开花特性

12 份材料抽薹开花时间有很大的差异, 最早的在播种后 26 d 抽薹开花, 最晚的在播种后 134 d 抽薹开花 (表 2)。抽薹开花时间 < 40 d 的材料有 2 份, 分别为 L144 和 L58; 抽薹开花时间在 55 ~ 80 d 的材料有 4 份, 分别为 HN54、金沙清江白菜、Z16 和 L143; 抽薹开花时间在 130 d 左右的材料有 6 份, 分别为华白 2、大青麻叶 939、V02B0002、L203、CGN15220 和 CGN06688。

表 2 本试验所用的 12 份白菜类作物材料  
Table 2 List of the 12 *Brassica rapa* crops accessions used in this experiment

材料编号 Accessions No.	栽培群体 Cultivar group	材料名称 Accession name	来源 Origin	开花时间/d Flowering time
1	大白菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	HN54	中国 China	79 ± 0.50
2	大白菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	Z16	中国 China	65 ± 2.50
3	大白菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	华白 2 Huabai 2	中国 China	133 ± 2.89
4	大白菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	大青麻叶 939 Daqingmaye 939	中国 China	134 ± 1.00
5	黄籽沙逊油菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>tricoloris</i>	L144	欧洲 Europe	26 ± 10.00
6	白菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	V02B0002	中国 China	125 ± 0.70
7	水菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>nipposinica</i>	L203	日本 Japan	127 ± 5.77
8	白菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	金沙清江白菜 Jinsha Qingjiang Baicai	中国 China	61 ± 8.70
9	黄籽沙逊油菜 <i>B. rapa</i> ssp. <i>tricoloris</i>	L143	印度 India	57 ± 5.85
10	芜菁 <i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i> Metzg.	CGN15220	欧洲 Europe	134 ± 3.69
11	菜薹 <i>B. rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> (L.) var. <i>utilis</i> Tsen et Lee	L58	中国 China	33 ± 0.00
12	芜菁 <i>B. rapa</i> ssp. <i>rapifera</i> Metzg.	CGN06688	欧洲 Europe	134 ± 0.00

注: 开花时间数据以平均数 ± 标准差表示。  
Note: Flowering time date were presented as means ± SD.

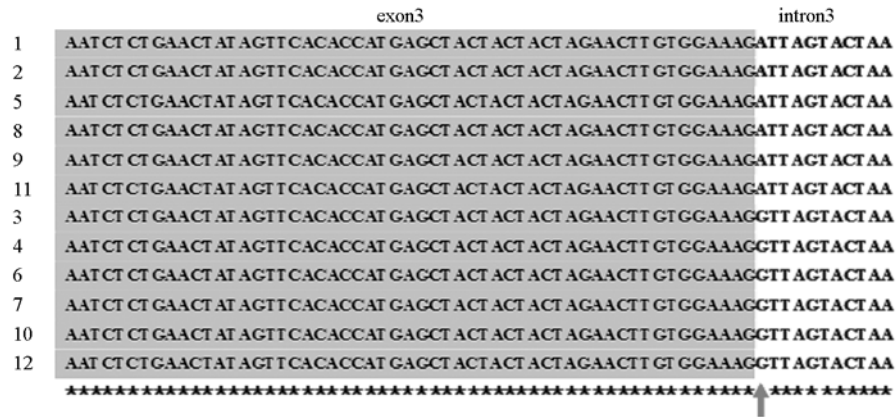
2.2 *BrFLC5* 序列变异的分析以及 dCAPs 标记的开发

利用特异引物 BrFLC5F1 和 BrFLC5R1 对 12 份材料 *BrFLC5* 的 exon2 ~ exon4 区域进行扩增, 对扩增片段进行克隆测序, 结果显示: 在 exon3 的剪切位点 Pi3 + 1 处存在 G - A 突变 (图 1)。

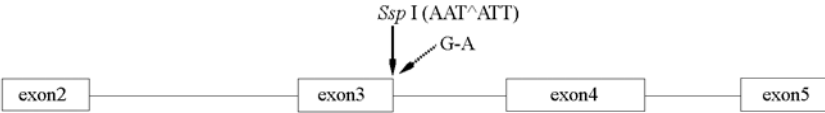
*BrFLC5* 的 exon3 的突变位点 Pi3 + 1 为 G - A 突变, 基于此位点设计扩增 *BrFLC5* 酶切位点 exon3 ~ exon4 序列的特异引物 (BrFLC5F 和 BrFLC5R), 然后利用 *Ssp* I (AAT<sup>^</sup>ATT) 对扩增产物进行酶切, 从而开发 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记 (图 2)。

白菜类作物中存在 4 个拷贝的 *FLC* (*BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* 和 *BrFLC5*) 同源基因, 并且各个 *FLC* 基因的序列相似性比较高, 采用巢式扩增的方法获得 *BrFLC5* 的特异酶切片段序列。利用 *BrFLC5* 的特异外侧引物 BrFLC5F2 和 BrFLC5R2 进行第 1 次 PCR 扩增, 得到扩增产物大小为 691 bp (图 3, A), 利用 *BrFLC5* 的特异内侧引物 BrFLC5F 和 BrFLC5R 进行巢式扩增, 获得 *BrFLC5* 的酶切片段序列大小为 169 bp (图 3, B)。

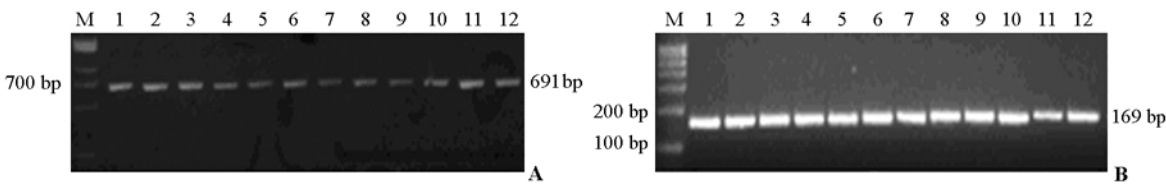
利用 *Ssp* I 内切酶, 对 *BrFLC5* 的酶切片段进行酶切, 酶切结果 (图 4): 1、2、5、8、9 和 11 号材料能够被 *Ssp* I 内切酶切开, 有两条带型 169 bp 和 145 bp, 其 *BrFLC5* 的基因型为 A; 3、4、6、7、10 和 12 号材料不能被 *Ssp* I 内切酶切开, 只有一条带型 169 bp, 其 *BrFLC5* 的基因型为 G。这一结果与 *BrFLC5* 的基因组 exon2 ~ exon4 序列突变位点的测序结果 (图 2) 一致。



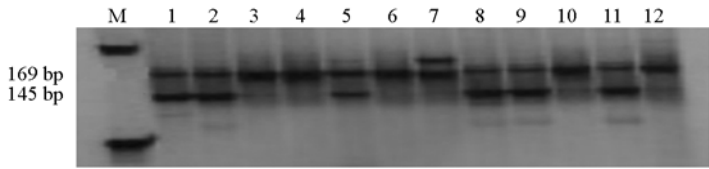
**图 1** 12 份白菜类作物 *BrFLC5* 的全基因组 exon2 ~ exon4 的测序结果  
1 ~ 12: 表 2 中的 12 份材料; 灰色部分为 exon3; 白色部分为 intron3; 箭头指示为突变位点。  
**Fig. 1** The sequenced results of the *BrFLC5* exon2 ~ exon4 in *Brassica rapa*  
1 - 12 represent accessions in Table 2; Grey parts indicate exon3; White parts indicate intron3;  
Arrow indicates the mutant sites.



**图 2** 白菜 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记的开发  
实线框代表外显子, 实线箭头代表 *Ssp* I 的酶切位点 (AAT<sup>^</sup>ATT), 虚线箭头表示 *BrFLC5* 的突变位点 (G - A)。  
**Fig. 2** Development of the dCAPs marker for *BrFLC5* in *Brassica rapa*  
Solid box indicates exon, solid arrow indicates the restriction enzyme cutting site of *Ssp* I (AAT<sup>^</sup>ATT).  
Dotted arrow indicates the mutation site of *BrFLC5* (G - A).



**图 3** *BrFLC5* 基因的第 1 次 PCR (A) 扩增和巢式扩增 (B)  
A、M: DNA marker III; B、M: DNA marker I; 1 ~ 12: 表 2 中的 12 份材料。  
**Fig.3** The first PCR (A) and nested PCR (B) amplification profile of *BrFLC5* gene in *Brassica rapa*  
A, M: DNA marker III; B, M: DNA marker I; 1 - 12: 1 - 12 accessions in Table 2.



**图 4** *BrFLC5* 巢式扩增 *Ssp* I 酶切电泳  
M: DNA marker I; 1 ~ 12: 表 2 中的 12 份材料。  
**Fig.4** Electrophoresis of the nested PCR amplification profile of *BrFLC5* by *Ssp* I enzyme  
M: DNA marker I; 1 - 12: 1 - 12 accessions in Table 2.

2.3 dCAPs 标记与开花时间的相关性分析

为了验证标记的可靠性,对 93 份白菜类作物材料进行抽薹开花时间的调查,并利用本试验开发的 dCAPs 标记检测 *BrFLC5* 基因型(表 3)。

表 3 93 份白菜类作物的 *BrFLC5* 的基因型和开花时间  
Table 3 Flowering time and genotype of 93 accessions for the *BrFLC5*

栽培种群 Cultivar group	类型 Type	基因型 Genotype	开花时间/d Flowering time	栽培种群 Cultivar group	类型 Type	基因型 Genotype	开花时间/d Flowering time
白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i>	DH	A	126 ± 0.00		DH	A	133 ± 0.00
	DH	A	145 ± 0.00		DH	G	127 ± 2.89
	DH	A	55 ± 1.00		DH	A	83 ± 8.72
	DH	A	145 ± 0.00		DH	A	79 ± 0.50
	DH	A	113 ± 1.20		DH	A	113 ± 1.50
	DH	G	125 ± 1.40		DH	A	136 ± 0.71
	DH	A	115 ± 0.58		DH	A	116 ± 3.95
	DH	A	112 ± 1.50		DH	A	132 ± 1.29
	DH	A	119 ± 2.20		DH	A	129 ± 2.00
	DH	G	116 ± 3.50		DH	A	129 ± 2.52
	DH	A	61 ± 8.70		DH	A	85 ± 1.73
	DH	A	127 ± 5.20		DH	G	121 ± 2.38
	DH	A	119 ± 0.50		DH	G	134 ± 1.00
	DH	A	145 ± 0.00		DH	A	136 ± 0.00
	DH	A	120 ± 0.50		H	G	121 ± 5.00
	DH	A	125 ± 1.55		H	G	117 ± 5.38
乌塌菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> (L.)Makino	DH	A	131 ± 1.41		H	G	109 ± 1.15
	DH	A	126 ± 0.00		H	A	91 ± 6.65
var. <i>rosularis</i> Tsen et Lee					H	A	135 ± 0.58
大白菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>pekinensis</i>	DH	A	65 ± 2.50	薹菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> Makino	DH	G	118 ± 1.00
	DH	A	107 ± 2.06	var. <i>tai-tsai</i> Hort	DH	A	145 ± 0.00
	DH	A	101 ± 5.07		DH	A	145 ± 0.00
	DH	A	134 ± 0.82	菜薹 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>chinensis</i> (L.) var. <i>utilis</i>	DH	A	110 ± 0.71
	DH	A	109 ± 5.35	Tsen et Lee	DH	A	86 ± 0.50
	DH	A	133 ± 1.16		DH	A	62 ± 1.15
	DH	A	131 ± 1.73		DH	A	92 ± 0.71
	DH	A	120 ± 4.00		DH	A	33 ± 0.00
	DH	A	136 ± 1.41		DH	A	33 ± 0.58
	DH	A	132 ± 4.92		DH	A	36 ± 0.00
	DH	G	131 ± 5.66		DH	A	74 ± 3.56
	DH	G	130 ± 4.04		DH	A	65 ± 5.35
	DH	G	112 ± 3.46	黄籽沙逊油菜	DH	A	37 ± 0.50
	DH	A	118 ± 1.41	<i>Brassica rapa</i> ssp. <i>tricoloris</i>	DH	A	63 ± 4.69
	DH	A	124 ± 3.61		H	A	57 ± 5.85
	DH	G	122 ± 3.10	小菘菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>perviridis</i>	DH	A	106 ± 7.02
	DH	A	128 ± 0.58		DH	A	117 ± 1.15
	DH	A	124 ± 5.29	水菜 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>nipposinica</i>	H	G	127 ± 5.77
	DH	A	110 ± 1.26		H	A	85 ± 10.72
	DH	A	108 ± 2.32	芜菁 <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rapifera</i> Metzg.	DH	A	92 ± 5.85
	DH	A	136 ± 2.83		DH	A	117 ± 1.26
	DH	A	132 ± 2.52		DH	G	134 ± 3.69
	DH	G	133 ± 2.89		DH	A	117 ± 3.61
	DH	A	128 ± 1.50		DH	A	112 ± 0.00
	DH	A	127 ± 3.54		DH	G	134 ± 0.00
	DH	A	132 ± 2.52	其他 Others	DH	A	37 ± 0.50
	DH	A	142 ± 0.00		DH	A	27 ± 3.70

注: 开花时间数据以平均数 ± 标准差表示。DH: 双单倍体; H: 高代自交系。  
Note: Flowering time date were presented as means ± SD. DH: Double haploid; H: High-generation inbred line.

利用 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记检测 93 份材料的基因型, A 基因型的为 74 份材料, 平均开花时间为  $(108 \pm 3.8)$  d; G 基因型的为 19 份材料, 平均开花时间为  $(122 \pm 2.5)$  d, A 基因型材料的开花时间早于 G 基因型材料的开花时间, 两者差异显著 ( $P < 0.05$ ) (表 4)。*BrFLC5* 的 dCAPs 标记基因型和开花时间表型的 one-tailed Pearson 相关分析表明, 开花时间与 *BrFLC5* 的 dCAPs 的基因型显著相关 ( $P < 0.05$ ), 其相关系数为 0.206, 大于临界值 0.205 ( $n = 90$ )。

表 4 93 份白菜类作物材料的 *BrFLC5* 基因型与开花时间的方差分析

Table 4 Variance analysis of genotype and flowering time of 93 *Brassica rapa* accessions

基因型 Genotype	材料份数 Number of lines	开花时间/d Flowering time
G	19	$122 \pm 2.5$ a
A	74	$108 \pm 3.8$ b

注: 不同字母代表在  $P < 0.05$  水平差异显著; 显著性由 one-way ANOVA 分析确定。

Note: Different letters indicate significant difference at  $P < 0.05$  level; Significance was analysed by one-way ANOVA.

### 3 讨论

本研究中通过对 12 份开花习性不同的白菜类作物 *BrFLC5* 基因的 exon2 ~ exon4 的 DNA 序列进行分析, 发现在 *BrFLC5* exon3 的 Pi3 + 1 位点存在 G - A 突变, 基于此位点的变异开发了 dCAPs 标记, 并且在 93 份白菜类作物中验证 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记与抽薹开花的相关性。对 93 份白菜类作物的 *BrFLC5* 的 dCAPs 标记与抽薹开花时间的相关性分析, 结果表明标记与抽薹开花时间是显著相关的, 此标记对白菜类作物分子标记辅助育种具有重要意义。

Schranz 等 (2002) 的研究表明 *BrFLC1*、*BrFLC2* 和 *BrFLC5* 主要控制着白菜类作物的开花时间变异性状, 并且 98% 的芸薹种作物开花时间变异是由于 *BrFLC1* (72.2%) 和 *BrFLC2* (25.4%) 的加性效应造成的。Yuan 等 (2009) 在 *B. rapa* 中研究发现 *BrFLC1* 基因中存在一个与抽薹开花紧密连锁的剪切变异, 并基于此变异开发了与开花时间显著相关的 CAPs 标记, 说明 *BrFLC1* 在白菜开花机制中起着重要作用。Zhao 等 (2010) 研究发现 *BrFLC2* 是开花时间的主效 QTL, 是抽薹开花最大的候选基因。并且 Wu 等 (2012) 研究发现 *BrFLC2* 基因至少存在 4 种不同的选择性剪切, 剪切位点的变异与抽薹开花时间紧密相关。这些研究都说明了 4 个拷贝的 *FLC* 同源基因中 *BrFLC1* 和 *BrFLC2* 在白菜类作物抽薹开花时间调控的通路中重要的作用, 而 *BrFLC5* 对白菜类作物抽薹开花时间的作用尚未见报道。本研究结果证明 *BrFLC5* 与抽薹开花时间显著相关, 但还需进一步构建近等位基因系来研究 *BrFLC5* 对于抽薹开花时间的影响。

*BrFLC5* 的 dCAPs 标记可以检测白菜类作物中 *BrFLC5* 基因的基因型, 也可以作为耐抽薹育种中的标记辅助选择的新工具, 具有非常重要的意义。

### References

- Fornara F, Montaigu A D, Coupland G. 2010. SnapShot: Control of flowering in *Arabidopsis*. Cell, 141 (3): 550, 550e1 - 2.
- Huang Xi-song, Li Jin-yu, Yu Xiao-lin, Sun Bao-juan, Cao Jia-shu. 2007. Cloning and expression analysis of vernalization-related gene *BcFLC* in *Brassica campestris*. Acta Horticulturae Sinica, 34 (10): 1169 - 1176. (in Chinese)
- 黄细松, 李晋豫, 余小林, 孙保娟, 曹家树. 2007. 白菜春化相关基因 *BcFLC* 的克隆及表达研究. 园艺学报, 34 (10): 1169 - 1176.
- Johanson U, West J, Lister C, Michaels S, Amasino R, Dean C. 2000. Molecular analysis of *FRIGIDA*, a major determinant of natural variation in *Arabidopsis* flowering time. Science, 290 (5490): 344 - 347.
- Jungen L, Llha L. 2010. Regulation and function of *SOC1*, a flowering pathway integrator. Journal of Experimental Botany, 61 (9): 2247 - 2254.
- Kim S Y, Park B S, Kwon S J, Kim J, Lim M H, Park Y D, Kim D Y, Suh S C, Jin Y M, Ahn J H, Lee Y H. 2007. Delayed flowering time

- in *Arabidopsis* and *Brassica rapa* by the over-expression of *FLOWERING LOCUS C (FLC)* homologs isolated from Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Plant Cell Rep*, 26: 327 – 336.
- Lin S, Wang J, Poon S, Su C, Wang S, Chiou T. 2005. Differential regulation of *FLOWERING LOCUS C* expression by vernalization in cabbage and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 137: 1037 – 1048.
- Michaels S D, Amasino R M. 1999. *FLOWERING LOCUS C* encodes a novel MADS domain protein that acts as a repressor of flowering. *Plant Cell*, 11: 949 – 956.
- Michaels S D, Amasino R M. 2001. Loss of *FLOWERING LOCUS C* activity eliminates the late-flowering phenotype of *FRIGIDA* and autonomous pathway mutations but not responsiveness to vernalization. *Plant Cell*, 13 (4): 935 – 941.
- Okazaki K, Sakamoto K, Kikuchi R, Saito A, Togashi E, Kuginuki Y, Matsumoto S, Hirai M. 2007. Mapping and characterization of *FLC* homologs and QTL analysis of flowering time in *Brassica oleracea*. *Theoretical and Applied Genetics*, 114: 595 – 608.
- Osborn T C. 2004. The contribution of polyploidy to variation in *Brassica* species. *Physiol Plantarum*, 121: 531 – 536.
- Schranz M E, Quijada P, Sung S B, Lukens L, Amasino R, Osborn T C. 2002. Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa*. *Genetics*, 162: 1457 – 1468.
- Srikanth A, Schmid M. 2011. Regulation of flowering time: All roads lead to Rome. *Cell Mol Life Sci*, 68: 2013 – 2037.
- Wang Shi-an. 1995. Mathematical statistics. Beijing: Beijing Institute of Technology Press: 362. (in Chinese)
- 王式安. 1995. 数理统计. 北京: 北京理工大学出版社: 362.
- Wang X W, Lou P, Bonnema G, Yang B J, He H J, Zhang Y G, Fang Z Y. 2005. Linkage mapping of a dominant male sterility gene *Ms-cd1* in *Brassica oleracea*. *Genome*, 48: 848 – 854.
- Wu J, Wei K Y, Cheng F, Li S K, Wang Q, Zhao J J, Bonnema G, Wang X W. 2012. A naturally occurring InDel variation in *BraA.FLC.b (BrFLC2)* associated with flowering time variation in *Brassica rapa*. *BMC Plant Biology*, 12: 151.
- Yuan Y X, Wu J, Sun R F, Zhang X W, Xu D H, Bonnema G, Wang X W. 2009. A naturally occurring splicing site mutation in the *Brassica rapa FLC1* gene is associated with variation in flowering time. *J Exp Bot*, 60: 1299 – 1308.
- Zachco S, Sardler H, Schwara-Sommer Z. 1997. Pollen-specific expression of DEFH125, a MADS box transcriptional factor in *Antirrhinum* with unusual features. *Plant Journal*, 11 (5): 1043 – 1050.
- Zhao J J, Kulkarni V, Liu N N, Carpio D P D, Bucher J, Bonnema G. 2010. *BrFLC2 (FLOWERING LOCUS C)* as a candidate gene for a vernalization response QTL in *Brassica rapa*. *J Exp Bot*, 61: 1817 – 1825.

## 欢迎订阅 2015 年《保鲜与加工》

《保鲜与加工》是中国科技核心期刊、中国北方优秀期刊、中国学术期刊光盘版收录期刊、美国《化学文摘》(CA) 收录期刊、英国《国际农业与生物科学研究中心》(CABI) 收录期刊。由天津市农业科学院主管, 国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津) 主办。国际标准连续出版物号: ISSN1009-6221, 国内统一连续出版物号: CN12-1330/S, 邮发代号: 6-146, 双月刊, 逢单月 10 日出版, 单价 10 元, 全年 60 元。

《保鲜与加工》杂志是我国农产品采后技术研究领域的科技核心期刊, 据中国知网的最新统计结果, 复合影响因子为 0.983。本刊主要报道农产品保鲜与加工相关领域基础理论、新技术、新工艺、新设备、新材料的研究成果及国内外相关行业的动态与信息。主要设置专家论坛、保鲜研究、加工研究、检测分析、专题论述、技术指南、行业资讯、科普沙龙、科技前沿、政策法规等栏目。适于科技人员、农业技术推广人员、相关企业管理和技术人员、大专院校师生及广大从事保鲜与加工技术研发领域的人士参阅。

欢迎在全国各地邮局(所) 或本编辑部订阅, 欢迎广大读者踊跃投稿, 并诚邀刊登各类相关广告。

通讯地址: (300384) 天津市西青区津静公路 17 公里处, 国家农产品保鲜工程技术研究中心(天津)《保鲜与加工》编辑部。电话: 022-27948711, 联系邮箱: bxyjg@163.com, 投稿平台: <http://www.bxyjg.com>。