

# 花椰菜的分子遗传与育种研究进展概述

张 凯,徐艳辉

(辽宁省农业科学院园艺所,辽宁 沈阳 110161)

中图分类号:S635.301

文献标识码:B

花椰菜(*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)起源于地中海至北海沿岸,起初由野生甘蓝进化而来,由于生长习性的演变和阶段性的变异,经不同环境条件和不同目标的选择和培育而形成的变种,因此是生物学研究的很好的试材;加之营养丰富,适应性广,在我国分布地区很广,因而也成为育种者和消费者都十分喜爱的蔬菜。

作物育种要对表现型进行评价,然后通过筛选,重新组合,以集中优良基因,获得目的产品。近年来,花椰菜育种的最重要的进展就是采用  $F_1$  杂种作为提高早熟性,一致性和品质的手段。有关花椰菜的遗传学对育种者来说是十分重要的。

通过人工选择的遗传改良的成效取决于人们正确估价表现型,剔除环境效应、利用遗传效应的能力。对那些由加性遗传效应控制的性状进行表现型选择,可产生显著的选择效应。与重要的经济性状相关测定遗传标记已成为一些工作者的工具。分子辅助育种将缩短快速筛选期望性状的时间,提高选择效率,利于早期选择,并可减少作物群体的种植规模。

## 1 花椰菜遗传性状的研究

### 1.1 主要数量性状的研究

花椰菜育种时重要的经济性状多是数量性状。这些由基因控制的数量性状的研究常常受环境因素的影响。通常用基因的加性效应或显性互作来解释。

花椰菜是二年生作物,首先进行营养生长,只有前期经过低温(春化)阶段才能开花。花椰菜的早花球相对晚花球为显性。

花球质量与受遗传控制的苞片和紫花有关。这两个性状在田间实验条件下很难进行评价,并且在使用组织培养的手段进行选择时,其效应往往变得更加明显。此外还有结球松散、毛花球。一般来说有关花球质量优良的基因多是部分显性并且受多基因控制。

魏乃荣用白峰、雪山等 12 个花椰菜品种(品系)为试

材,应用方差-协方差分析法,对其 11 个数量性状(株高、株幅、单株叶片数、叶柄长度、单株生物学产量、单株花球重、花球直径、花球高度、花球厚实度、显花球期和成熟)的遗传力、遗传变异系数、遗传进度及性状间的表现型相关和遗传相关系数,发现表现型相关和遗传相关的方向一致,遗传相关大于表现型相关,单株花球重和成熟期和花球厚实度三个性状呈极显著的正相关<sup>[1]</sup>。

李素文等采用  $6 \times 6$  双列杂交法研究了花椰菜 10 个经济性状的配合力,发现现球期、成熟期、株高、株展、单株生物学产量、叶片数量等性状在相当程度上受非加性基因控制;单株经济产量和与花球质量有关的花球直径(球径)、花球纵径、紧实度等性状则受加性基因效应影响大。亲本的一般配合力与其组合的特殊配合力间无必然联系,彼此独立,而且均与  $F_1$  表现呈正相关关系。特殊配合力与  $F_1$  关系更为密切<sup>[2]</sup>。

### 1.2 花椰菜的形态学

芸薹属植物具有不同的营养贮藏器官,这也是鉴定它们形态的依据。花椰菜的花球贮存有糖、蛋白质等营养物质,在结构上它由众多短缩的分枝组成,其表面为无数裸露的顶端分生组织,是育种的目标也是栽培收获的对象。

花球的大小和形状受基因控制,呈现出不同程度的变异。花球的形成受主基因的控制(见后),有的基因是显性,有的则是隐性<sup>[3]</sup>。同时也有关于花球形成是多基因遗传的证据。青花菜和花椰菜的杂交在  $F_2$  代并符合孟德尔分离比例。认为修饰基因在花球形成上起相当重要的作用,也可能是花球的大小和形状变异如此丰富的原因<sup>[4]</sup>。

花椰菜花球的颜色通常是白色的,当暴露于阳光下,不同光照强度不同品种逐渐变为乳白色、淡黄色直至黄褐色。生产上为获得白色花球,多是用束住外叶,遮盖或培育叶片能遮盖花球的品种。色素分散在顶端分生组织的有色花球也有发生。有几个影响花球的颜色基因已

经确定。一种是一个白色基因对黄色是显性;Crisp等发现一个基因对白色是部分显性,对矮化、桔黄色花球表现双隐性<sup>[5]</sup>;Crisp & Angell用遗传上一致的白色花球品种和绿色品种杂交,从杂交后代遗传表现提出一种模型:(*Wi wi*)基因控制白色对黄色是显性,非独立共显性基因(*gr1 gr2*)表现为绿色<sup>[6]</sup>。Dickson & Lee报道了在引于埃及的品种PI 183214,即便完全暴露于阳光下,花球也是纯白色的。并认为是由2或3对显性基因控制的<sup>[7]</sup>。Singh等报道了由两对基因控制的可以遮盖住花球的叶片,以防止阳光照射引起花球变色<sup>[8]</sup>。

### 1.3 雄性不育性

雄性不育在植物中是一种十分普遍的现象。对雄性不育进行研究,在理论上可以丰富花粉发育、细胞质遗传和核质互作等知识,在实践上可以作为一种遗传工具,减少人工去雄的麻烦,在作物杂种优势利用、群体改良中有重要的应用价值。雄性不育类型有不同的败育表现,根据败育发生的早晚,可以分为:(1)雄蕊退化或变形型;(2)花药异常型;(3)孢子囊退化型;(4)小孢子退化型;(5)花粉功能缺陷型。

Ruffio-Chable报道了含有单基因显性雄性不育基因的秋种类型花椰菜和一个冬种类型花椰菜表现型,遗传以及在F<sub>1</sub>杂交种配制的利用。连续5年,秋种类型花椰菜回交后代中雄性不育株占1/2,而在冬种类型花椰菜回交后代中雄性不育株所占较小。同时,也研究了温度对雄性不育株的影响,在较低温度下,一些雄性不育株表现为部分可育;在较高温度下雄性不育株依然表现为不育。分析表明:秋种类型花椰菜回交和自交后代分离比例符合单基因显性遗传;而冬种类型花椰菜回交后代包括大量可育株表现型可能受环境条件和/或遗传背景的影响<sup>[9]</sup>。

何承坤等以Ogura不育胞质为供体,不同生育期花椰菜品种为受体,通过回交获得花椰菜异源细胞质雄性不育材料。该材料每世代均具有雄性不育特性,雄蕊主要呈戟形,少量呈瓣状、羽毛状、丝状及雄蕊心皮化,极少数花药具花粉粒,花粉粒开裂。回交转育克服了不育胞质供体存在雌蕊功能障碍、闭蕾、败蕾、柱头外露以及蜜腺缺失等缺陷<sup>[10]</sup>。

姜平等用具有Ogura胞质雄性不育基因的花椰菜雄性不育材料为母本,不同的花椰菜品种为副本,连续6代回交选育,育成异源胞质雄性不育系C50-2及相应保持系5011-2<sup>[11]</sup>。黄庆榴以花椰菜雄性不育两用系(84414-5)的不育与可育种子、土壤栽培苗和组织培养材料(叶片、花球等)为试材,对其蛋白质组分进行比较研究。结果表明,花椰菜雄性不育两用系不育株幼苗、嫩叶、花球等的蛋白质组分与可育株存在着一定的差异,表现为不育的多于可育的趋势,除蛋白质组分外,还观察到萌发7d的

幼苗中苹果酸脱氢酶同工酶不育株与可育株亦有不同,不育株的聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱的阳极端比可育的少一条谱带。认为利用幼苗或植株叶片蛋白质组分的差异可以作为早期鉴别花椰菜雄性不育两用系不育株的生理生化指标<sup>[12]</sup>。

## 2 分子水平上的研究及转基因工程

### 2.1 遗传变异性的研究

杨尧文用12个不同花椰菜及青花菜品种(包括7个亲本及5个F#-[1]的商业品种)为材料,并以黄花芥蓝为对照,进行随机增殖DNA片段的分析。由9个寡核苷酸链所产生的95个DNA条带(RAPD markers),有2个为黄花芥蓝所特有,17个为花椰菜及青花菜所共有,3个为青花菜所有,8个为单一样本所有,其它65个为多型性条带,可以用来分辨不同的样本。利用Jaccard方法所求出不同样本之间的相似度及UPGMA方法所建立出来的亲缘关系图,显示青花菜和花椰菜可分为两群,其F#-[1]品种和其亲本之间的关系也可以由此结果显现出来。而不同样本之间的遗传变异虽然也和样本之间形态上差异有正相关关系,但由于不同样本遗传上的差异性,有些也非完全可以由形态上差异可分别的出来<sup>[13]</sup>。

赵前程等利用AFLP技术对花椰菜、青花菜、紫花菜、黄花菜自交系的遗传亲缘关系进行了研究。使用8对选择性引物组合,扩增出4901条电泳带,并对其聚类分析,根据UPGMA方法构建聚类树状图。结果表明:花椰菜、青花菜、紫花菜、黄花菜明显分为四大类群;青花菜与紫花菜亲缘关系较近,花椰菜与其它花菜亲缘关系较远,黄花菜居中<sup>[14]</sup>。

### 2.2 花球形成的分子遗传学研究

长期以来,人们通过生理学、解剖学和遗传学等方法研究花球的形态发生,试图了解花球分化和发育的生理机制。Bowman等首先在拟南芥中发现了花球突变体*cauliflower*,随后Kempin等分离出与花球发生有关的CAL基因。李小方等从花椰菜中分离出4种花球类型的纯合株系:光滑型花球 *curd-s*、毛状物花球 *curd-h*、颗粒状花球 *curd-c* 和刺状物花球 *curd-t*。用PCR方法分别扩增各株系的BobCAL基因并分析其中的部分序列,发现4种株系的CAL基因在第5个外显子中都有AAG向TAG的终止突变,而且该终止密码子上游638bp的DNA序列完全一致,说明花蕾、茎生叶等花球附生物形态发生不是BobCAL的单一调节作用。花椰菜与结球甘蓝(*B. oleracea* var. *capitata*)和青花菜(*B. oleracea* var. *italica*)杂交后其F<sub>1</sub>代植株都失去了原有花球的形态特征,表现出花序的多态性,从而显示了不同变种CAL相互作用的形态学差异。为了解CAL基因的生物功能,研究花球形态发生的机制提供了分子和遗传证据<sup>[15]</sup>。

### 2.3 花色的研究

陈瑞阳等利用 Smart cDNA-AFLP (Amplified fragment length polymorphic) 银染技术对花椰菜黄花 (A0-3) 和白花 (A1-3) 一对近等基因系的 mRNA 进行了分析。用 8 对选择性引物对这两个品系的 cDNA 进行了扩增。其中 2 对引物的 3 条带在 2 个表达基因文库之间存在多态性, 其中一条与白花品系共分离; 另两条与黄花品系共分离。将与白花共分离的谱带 W260 和与黄花共分离的谱带 Y310 分离、扩增、克隆, 并用 Northern blot 杂交初步证明了它们分别为白花品系和黄花品系特有的。W260 经测序后, 通过 Genbank 进行同源性检测, 发现它与矮牵牛胞质雄性不育株系 3688 的  $F_1$ -ATPase 的部分有 92% 的同源性<sup>[16]</sup>。

### 2.4 抗病性研究

张峰利用 AFLP-银染法在一对花椰菜抗、感黑腐病的近等基因系中筛选到 4 个与抗黑腐病性状、一个与感黑腐病性状连锁的 DNA 分子标记, 对其中一个 400 bp 的抗病标记进行 Southern 杂交检测, 结果表明该标记在抗病品系中存在明显的杂交信号, 而在感病品系中无杂交信号。该标记测序后, 通过 Genbank 进行同源性检测, 发现其与拟南芥菜 BAC 克隆 F7N22 部分序列有 75% 的同源性。该 BAC 克隆位于拟南芥菜 5 号染色体的黑腐病抗性基因 (*rx2*) 附近, 这意味着该标记可能与甘蓝黑腐病抗性基因紧密连锁<sup>[17]</sup>。

毛英伟用天津市农业科学院蔬菜研究所经过数十代杂交培育出的抗黑腐病近等位基因系 C712 和 C731 作为材料, 创造性地将近年发展起来的较为先进的三项技术: ①磁珠分离真核生物 mRNA 技术; ②SMART-PCR cDNA 合成技术; ③AFLP-银染法创造性地融合在一起, 发展了一项先进的 mRNA 差异显示技术。运用该技术, 研究了花椰菜 C712 抗黑腐病系在黑腐病菌侵染和非侵染条件下基因表达的情况, 筛选了 20 对引物组合, 获得了 100 多条差异表达的 cDNA 片段, 并将其中的 15 条特异带挖出重新扩增, 13 条差异 cDNA 获得克隆<sup>[18]</sup>。

许建平从杭州市郊区及本校附近菜园地表现严重花叶症状的花椰菜上分离到一种线状病毒, 接种 6 科 31 种鉴别寄主, 能侵染 5 科 22 种植物。病组织超薄切片可见风轮状内含体和片层聚集状内含体。感病的芥菜叶片, 用 0.5 mol/L 磷酸钾缓冲液 (pH7.5) 匀浆后汁液加 4% PEG-8 沉淀 3 h, 5%~40% 甘油梯度离心纯化病毒, 可获得较高的产量。提纯的病毒均为一弯曲的线状颗粒, 长度 740 nm 左右。病毒提纯液于 264 nm 处有一吸收峰, 为典型的核蛋白紫外吸收。TuMV-H 分离株抗血清包被的铜网能大量吸附病毒颗粒。用特异的 PCR 引物扩增其外壳蛋白基因, 可得 -0.9Kb 的片段<sup>[19]</sup>。

### 2.5 抗虫基因的导入

华学军利用土壤根瘤农杆菌的介导, 将 *B. t. aizawai*-

29 $\delta$ -内毒素基因, 导入花椰菜栽培品种中, 使该基因在花椰菜愈伤组织中整合并表达。花椰菜品种是瑞士雪球, 种在 MS 基本培养基中, 加光照培养, 在 14 d 苗龄时将无菌苗的下胚轴和子叶柄接种工程菌株 A63 和 B63, 菌液中浸泡时间为 30 s。工程菌株 A63 和 B63 是将带有杀虫蛋白基因的质粒 pGYCK63, 转入农杆菌 A281 和 B6S3 获得的。采用组织化学法检测 GUS 基因, 以鉴别质粒的转化并进行筛选。凡已转化的愈伤组织细胞, 在显微镜下呈很强的蓝色, 没转化的愈伤组织则不出现任何蓝色。愈伤组织经提纯, 经 Dot blot 和 Southern blot 测定, 证明 Bt 杀虫晶体蛋白基因已经整合在花椰菜细胞的基因组中<sup>[20]</sup>。

游建南采用 Ti 质粒 pKSB 带有 Bt 杀虫蛋白基因、NPTII 选择标记基因及 GUS 基因, 通过根瘤农杆菌 LBA4044 菌株的介导, 将 Bt 杀虫基因导入花椰菜品种中。试验以花椰菜下胚轴为外植体, 将下胚轴切段置于分化培养基 (MS + 6-BA 1.0~2.0 mg/L + NAA 0~0.5 mg/L) 上, 对影响转化的种种因素进行了试验。得到了转化的愈伤组织及再生植株, 用组织化学法检测 GUS 活性, 观察到愈伤组织内的转化细胞呈阳性蓝色反应<sup>[21]</sup>。

徐淑平等以花椰菜“杂交 75 d”父、母本的种子萌发的无菌苗下胚轴切段为受体材料, 用根瘤农杆菌介导的遗传转化法将 *B. t.* 基因和豇豆胰蛋白酶抑制基因 (*CpTI*) 导入花椰菜的下胚轴切断细胞, 获得了转基因花椰菜小植株。小植株移至大田能正常生长、开花、结籽。PCR 和 Southern blot 分析表明 *B. t.* 和 *CpTI* 基因已整合在植物基因组中<sup>[22]</sup>。

### 2.6 自交不亲和性的 RAPD 分析

目前, 花椰菜自交不亲和系的利用是  $F_1$  代杂种利用的最有效手段。表现型的整齐一致通过杂种一代而获得。自交不亲和性在十字花科作物中普遍存在。近年来, 自交不亲和性的研究已成为一个热点。

自交不亲和性是指抑制植物自身花粉的萌发或花粉管的生长, 是植物在长期进化过程中形成的在受精前选择有利花粉的策略。芸苔属 SI 受控于一个具有多等位基因的单一遗传位点 S, 它的花粉表型由产生花粉的植株即孢子体基因型决定, 因此称为孢子体 SI (Sporophytic SI, SSI)。现在已发现了 50 个 S 基因。

黄聪丽应用随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析方法, 分别对 3 组花椰菜自交不亲和系和自交系的基因组 DNA 进行差异分析。筛选出 20 个 10 bp 随机引物进行 RAPD 反应, 扩增片段分子量在 0.3~3 kb 之间, 其中分别有 3、2、3 个引物在各组中扩增出差异片段 5、4、5 条。结果表明, 花椰菜自交不亲和系与自交系 DNA 之间存在明显差异, 扩增出的差异片段与花椰菜自交不亲和性相关<sup>[23]</sup>。

关于花椰菜的基本遗传学内容相对于茄果类、瓜类、

辣椒等少得多;但由于它容易获得纯合基因型,且对于诸如自交不亲和系,花球的形成的遗传学研究是相当好的材料。

在任何育种过程中,最耗时费力的阶段就是评价表现型了。最新发展起来的分子标记的技术将会在育种过程中改变这种状况。尽管它不能直接选育某些数量形状或把由基因编码的DNA序列介入到新的品种中,但这些技术可用来研究植物发育的基本机制。有关花椰菜育种性状的遗传学知识将成为育种者在应用他们的育种材料时最有价值的信息。

分子生物学和遗传学的进展,已使人们可以在分子和细胞水平上研究十分复杂的生命现象。分子标记和相关技术在育种上的应用就是可以洞悉控制农艺性状的遗传机制。这些信息的获得可以应用到常规育种上。随着这些技术的改进,分子标记及其相关技术可以做到快速筛选育种群体,加快整个选择程序。

#### 参考文献:

- [1] 魏乃荣. 花椰菜主要性状遗传参数的初步研究[J]. 华北农学报, 1992, 7(1): 83~88.
- [2] 李素文, 孙德岭, 张宝珍, 等. 花椰菜主要经济性状的配合力分析[J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 104~108.
- [3] Crisp, P., The use of an evolutionary scheme for cauliflowers in the screening of genetic resources[J]. Euphytica, 1982, 31: 725~734.
- [4] Gray, A.R. Majoring in minor Brassicas[A]. In: Science for Growers[C]. Ed. J. Hardcastle. Agricultural and Food Research Council, Swindon. 1988. 2~3.
- [5] Crisp, P., D.G.A. Walkey, E. Bellman & E. Roberts. A mutation affecting curd colour in cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.)[J]. Euphytica, 1975, 24: 173~176.
- [6] Crisp, P., S.M. Angell. Genetic control of green curd colour in cauliflower[J]. Annals of Applied Biology, 1985, 107: 601~603.
- [7] Dickson, M.H. & C.Y. Lee. Persistent white curd and other curd characters of cauliflower. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1980, 105: 533~535.
- [8] Singh, A.K., J. Singh, S.S. Saini. Inheritance of curd quality in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.)[J]. Horticultural Research, 1978, 18: 1~6.
- [9] Ruffio-Chable, V., H. Bellis, Y. Herve. A dominant gene for male sterility in cauliflower (*Brassica oleracea* var. *botrytis*): phenotype expression, inheritance, and use in F<sub>1</sub> hybrid production[J]. Euphytica, 1993, 67: 9~17.
- [10] 何承坤, 郭素枝, 张智钊, 等. 花椰菜异源细胞质雄性不育材料的初步研究[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 125~127.
- [11] 姜平, 朱朝辉, 郑益嫩. 花椰菜异源胞质雄性不育系 C50-2 选育的研究[J]. 福建农业学报, 2001, 16(3): 9~41.
- [12] 黄庆榴. 花椰菜雄性不育两用系不育与可育幼苗和叶片蛋白质组分的比较[J]. 上海农业学报, 1992, 8(3): 20~23.
- [13] 杨尧文. 利用逢机增殖DNA片段对花椰菜和青花菜 F<sub>1</sub>-[1]品种及亲本遗传变异性的研究[J]. 中国园艺(台湾省), 1997.
- [14] 赵前程, 宋文芹, 陈瑞阳. 花椰菜类蔬菜自交系基因组间亲缘关系的 AFLP 分析[J]. 园艺学报, 2002, 29(1): 72~74.
- [15] 李小方, 薛万新, 孙玉东, 等. 芸薹属植物 CAL 基因的结构特征与花球的形态遗传[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 712~718.
- [16] 李凌, 宋文芹, 毛英伟, 等. 用 cDNA-AFLP 银染技术研究与花椰菜花色相关的基因[J]. 南开大学学报(自然科学版), 2000, 33(4): 33~36.
- [17] 张峰, 宋文芹, 李凌, 等. 花椰菜甘蓝黑腐病近等基因系 AFLP 银染性状连锁分子标记[J]. 南开大学学报(自然科学版), 1999, 32(3): 177~181.
- [18] 毛英伟. 花椰菜抗黑腐病差异表达 cDNA 片段的克隆[D]. 天津: 南开大学, 1995.
- [19] 许建平. 侵染花椰菜的芜菁花叶病毒及 RT-PCR 扩增外壳蛋白基因研究[J]. 植物病理学报, 1998, 28(2): 151~157.
- [20] 华学军. 苏芸金杆菌杀虫基因在花椰菜愈伤组织的整合与表达[J]. 中国农业科学, 1992, 25(4): 82~87.
- [21] 蔡荣旗, 孙德岭, 赵前程, 等. 根癌农杆菌介导 Bt 杀虫基因对花椰菜的转化初报[J]. 天津农业科学, 2000, 6(4): 9~12.
- [22] 徐淑平, 卫志明, 黄建秋, 等. 根癌农杆菌介导 B. t. 基因和 CpTI 基因对花椰菜的转化[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2002, 28(3): 193~199.
- [23] 黄聪丽, 李传勇, 潘爱民, 等. 花椰菜自交不亲和性的 RAPD 分析[J]. 福建农业学报, 2001, 16(4): 58~61.