

青花菜自交系的遗传多样性及花球营养成分

张志仙, 朱长志, 何道根

(台州市农业科学研究院, 浙江 临海 317000)

摘要: 采用 ISSR 分子标记技术, 对 10 份多年自交纯化、整齐度较高的青花菜自交系材料(N237、N244、N256、N279、N318、N364、N437、N614、N622、N628)进行遗传多样性及亲缘关系分析, 并对自交系花球的营养成分含量进行测定。结果表明: 各自交系之间的遗传相似系数为 0.557 9~0.852 6, 平均相似系数为 0.703 2; 10 份自交系材料聚为两大类(A、B 类), 其中, A 类分为 4 个亚类; 根据花球的维生素 C、可溶性蛋白质含量等的测定结果, 从 10 份自交系材料中筛选出了 1 份维生素 C 含量高的材料(N256)和 3 份综合表现较好的材料(N237、N279 和 N628)。

关键词: 青花菜; 自交系; 遗传多样性; 营养成分

中图分类号: S635.9

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2014)01-0023-05

Analysis of genetic diversity and curd nutrients on broccoli inbred lines

ZHANG Zhi-xian, ZHU Chang-zhi, HE Dao-gen

(Taizhou Academy of Agricultural Sciences, Linhai, Zhejiang 317000, China)

Abstract: Ten broccoli inbred lines (N237, N244, N256, N279, N318, N364, N437, N614, N622, N628) which are highly homozygous and uniform were used for genetic diversity and genetic relationship analysis based on inter simple sequence repeat (ISSR) molecular markers. Meanwhile, six nutrients of curds in these materials were also tested. Results showed that the overall similarity values among ten inbred lines ranged from 0.557 9 to 0.852 6 with an average of 0.703 2. From the cluster analysis result, ten broccoli inbred lines were divided into two clades (A and B). And clade A was further separated into four sub-clades. One inbred line which was rich in vitamin C (N256) and three inbred lines which had good multiple characters (N237, N279 and N628) were screened.

Key words: broccoli; inbred lines; cluster analysis; nutrients

目前,在青花菜(*Brassica oleracea* L. var *italica*) 遗传育种工作中,对自交系的鉴定与识别仍以传统育种手段为主^[1-2]。依据表型和经验来筛选自交系易受到环境或者经验不足影响而淘汰一些优异的种质资源。将分子标记手段用于青花菜的遗传研究已有报道^[3-5]。这些研究在青花菜品种的指纹图谱及品种多样性评价方面具有重要作用^[6],但大部分是对市场已有青花菜品种进行鉴别或对品种之间

的遗传多样性进行分析^[7-12],对青花菜自交系遗传多样性的研究尚少。笔者以 10 份经多年自交纯化、整齐度较高的青花菜自交系为材料,采用 ISSR(inter simple sequence repeats)分子标记手段对这些材料的遗传多样性和亲缘关系进行分析,同时对自交系花球的营养成分含量进行测定,旨在筛选出营养含量高的特殊材料和综合品质较好的自交系材料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 10 份经多年自交纯化、整齐度较高的青花菜自交系(表 1),均来自台州。2011 年 9

月 13 日在浙江省台州市农业科学院实验农场播种育苗,1 个月后定植于大棚,常规栽培管理。于全生育期观察植株长势、营养器官形态等特征,去除异株,以保证每份自交系材料的纯度。

表1 青花菜自交系的植物学性状

Table 1 Description of botanical traits of ten broccoli inbred lines

材料 代数	下胚轴颜色	植株性状	结球日期	花球性状
N237	F ₇	绿 植株半直立,叶型椭圆,叶色绿,叶缘波状叶裂深,叶面蜡粉少	2012-02-01	花球中圆,紧实度一般,球色深绿,蕾粒粗
N244	F ₇	绿 植株半直立,叶型披针形,叶色深绿,叶缘波状叶裂深,叶面蜡粉少	2012-01-15	花球高圆,紧实,球色深绿,蕾粒粗
N256	F ₇	紫 植株半直立,叶型长椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉少	2012-01-07	花球中圆,紧实度一般,球色绿,蕾粒细
N279	F ₈	绿 植株平坦,叶型长椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉少	2012-01-24	花球高圆,紧实,球色绿,蕾粒细
N318	F ₉	紫 植株平坦,叶型椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉中等	2012-01-18	花球高圆,紧实度好,球色绿,蕾粒粗
N364	F ₄	紫 植株平坦,叶型长椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉少	2012-02-12	花球高圆,紧实度较好,球色发紫,蕾粒粗
N437	F ₉	绿 植株直立,叶型长椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉中等	2012-02-05	花球高圆,紧实,球色绿,蕾粒细
N614	F ₇	绿 植株半直立,叶型长椭圆,叶色深绿,叶缘波状叶裂浅,叶面蜡粉多	2012-01-21	花球高圆,紧实,球色绿,蕾粒粗
N622	F ₇	绿 植株直立,叶型椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉多	2012-01-26	花球高圆,紧实,颜色深绿,蕾粒细
N628	F ₇	绿 植株平坦,叶型椭圆,叶色深绿,叶缘波状无叶裂,叶面蜡粉中等	2012-01-25	花球高圆,紧实,球色绿,蕾粒细

1.2 青花菜自交系的遗传多样性和亲缘关系分析

1.2.1 DNA 提取

采用 CTAB 法^[13]提取植株幼嫩叶片总 DNA。提取的 DNA 用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,超微量分光光度计(Quawell, 美国)测定其浓度和质量, -20 °C 保存,备用。

1.2.2 ISSR-PCR 扩增

ISSR 引物来源于哥伦比亚大学公布的 100 条序列,去除退火温度低于 48 °C 或高于 60 °C 的引物,共 76 条,由北京鼎国昌盛生物技术公司合成。

ISSR-PCR 反应体系为 20 μL,包括 2 μL 10 倍 PCR 缓冲液,25 mmol/L Mg²⁺ 0.8 μL,20 ng/μL 模板 DNA 1 μL,10 μmol/L 引物 1 μL,10 mmol/L dNTPs 0.4 μL 和 5 U/μL Taqase(上海生工生物技术有限公司) 0.2 μL。PCR 扩增程序:94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 30 s, T_m 退火 30 s;72 °C 延伸 120 s,35 个循环;72 °C 保温 10 min;4 °C 保存。

PCR 扩增产物在 2% 琼脂糖凝胶上电泳分离,保持电泳仪电压 120 V,电泳 45 min。用凝胶成像系统观察结果并拍照,检测 PCR 结果。

1.2.3 数据统计与分析

用人工记带方式记录电泳图中清晰且能重复扩增出的条带,在相同的迁移位置上,将有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,将数据输入 Excel 2003 表格中,构建(0,1)原始矩阵。

采用 NTSYS-pc 2.10 软件 Qualitative data 程序进行相似性系数计算,用 UPGMA 法(非加权平均法)生成聚类分析图。

1.3 花球营养成份含量的测定

1.3.1 测定指标及方法

于花球采收期挑选生长健康、花球成熟度一致的植株,取花球中部的小花枝洗净,105 °C 杀青 2 h,70 °C 烘干至恒重,用失重法测定其含水量。花球可溶性固形物含量用手持式折光仪测定;叶绿素含量用 80% 丙酮提取,分光光度法测定;可溶性蛋白质含量采用 Bradford 法测定;维生素 C 含量采用碘量法测定;可溶性还原糖含量采用 2,5-二硝基水杨酸法测定。所有测定均进行 3 次重复,结果取其平均值。

1.3.2 数据统计与分析

用 Excel 2003 进行数据统计,用 DPS 7.05 进行差异显著性分析。

2 结果与分析

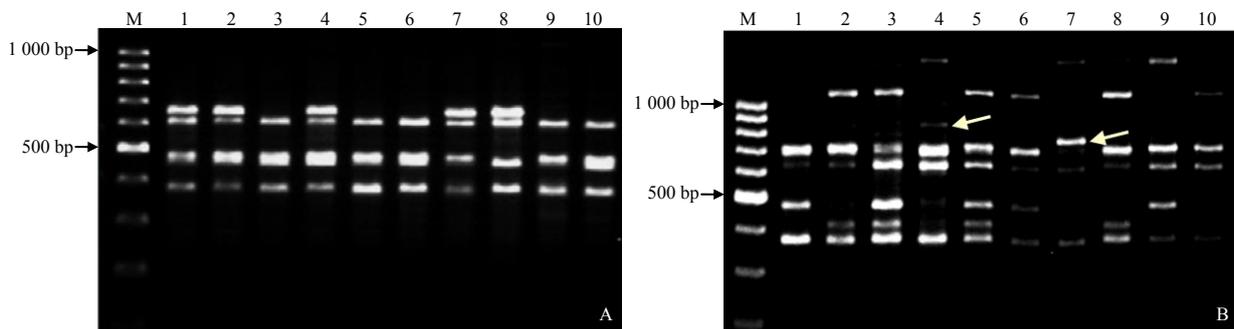
2.1 青花菜自交系的遗传多样性

以 10 份青花菜自交系为材料,从 76 条 ISSR 引物中共筛选出 15 条可扩增出清晰条带且重复性好的引物(表 2)用于青花菜自交系遗传多样性分析。15 条引物共扩增出 95 条带,其中多态性条带 75 条,多态性比例为 78.95%。单条引物扩增的条带为 2 ~ 12 条,平均 6.3 条,扩增产物长度为 200~1500 bp,

其中以 400~900 bp 的条带居多(图 1)。结果表明,从 10 个青花菜自交系的 7 份材料中扩增出 11 个材料特征带,其中,N614 在引物 UBC808 扩增图谱的 420 bp 处、N437 在 UBC880 的 900 bp 处、N364 在 UBC807 的 850 bp 处、N237 在 UBC810 的 900 bp 处、N622 在 UBC810 的 300 bp 处分别存在 1 条材料特征性带。N279 在 UBC889 的 650 bp 处(图 1-B)、在 UBC817 的 600 bp 和 330 bp 处存在材料特征性条带。N318 在 UBC810 的 500 bp 处、在 UBC888 的 650 bp 处和在 UBC889 的 800 bp(图 1-B)处存在 3 条特征性条带。

表2 用于青花菜自交系遗传多样性分析的ISSR引物
Table 2 Primers used for ISSR analysis of the ten broccoli inbred lines

编号	引物序列(5'-3')	产物数/条	产物大小/bp
UBC807	AGA GAG AGA GAG AGA GT	6	300 ~ 1 100
UBC808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	8	270 ~ 900
UBC810	GAG AGA GAG AGA GAG AT	7	200 ~ 950
UBC811	GAG AGA GAG AGA GAG AC	9	400 ~ 1 500
UBC812	GAG AGA GAG AGA GAG AA	12	250 ~ 1 100
UBC816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	4	400 ~ 700
UBC817	CAC ACA CAC ACA CAC AA	10	300 ~ 900
UBC823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	7	300 ~ 1 500
UBC836	AGA GAG AGA GAG AGA GYA	3	350 ~ 1 500
UBC840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	7	250 ~ 700
UBC856	ACA CAC ACA CAC ACA CYA	2	500 ~ 700
UBC878	GGA TGG ATG GAT GGA T	2	500 ~ 900
UBC880	GGA GAG GAG AGG AGA	5	300 ~ 900
UBC889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	9	350 ~ 1 500
UBC888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	4	300 ~ 900



M, 100 bp 梯度 DNA; 1,2,3,...,10 分别代表青花菜自交系 N237、N244、N256、N318、N622、N628、N279、N364、N437 和 N614。B 图中箭头分别表示区分 N318 和 N279 的材料特征性带。

图1 引物UBC816(A)和UBC889 (B)的ISSR电泳结果

Fig.1 Electrophoretograms of amplified by primers UBC816 (A) and UBC889 (B)

2.2 青花菜自交系的聚类分析结果

以 10 份自交系材料在 95 个位点的扩增条带数据组成(0, 1)原始矩阵,用 NTSYS 软件进行遗传

相似性分析的结果(图 2)显示,各自交系之间的遗传相似系数为 0.557 9 ~ 0.852 6,平均相似系数为 0.703 2,其中材料 N244 和 N256 的相似系数最

大,为0.8526,材料N437和N244的相似系数最小,仅为0.5579。

采用UPGMA聚类法,以相似系数0.63为临界值,10份青花菜自交系可聚为2类(A和B):A类包含N237、N364等8个自交系,这8个成员又可以分为4个亚类(相似系数临界值为0.76),其中N237、N364、N244、N256为第1亚类,N622和N628为第2亚类,N614和N279分别组成第3、4亚类;B类包括自交系材料N318和N437。

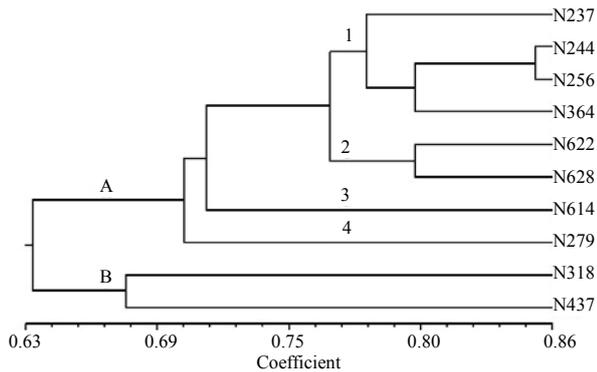


图2 青花菜自交系的聚类分析结果

Fig. 2 Dendrogram of cluster analysis for ten broccoli inbred lines

2.3 花球的营养成分含量

对青花菜自交系花球6项营养成分含量的分析结果显示,6项营养成分含量的变异系数有明显差异。其中,维生素C含量的变异系数最大,达

55.43%,其余由大到小依次为总叶绿素含量(40.01%)、可溶性蛋白质含量(33.21%)、可溶性还原糖含量(29.17%)和可溶性固形物含量(11.63%),含水量的变异系数最小,仅为1.02%。

表3结果显示,各自交系材料花球叶绿素含量间的差异有的达极显著水平,其中,材料N237、N244和N318的花球叶绿素a含量、叶绿素b含量和总叶绿素含量均高于其他材料。N364和N437的花球总叶绿素含量最低,仅为N237的36%。青花菜各自交系花球含水量保持在86.51%~88.81%,N256和N364的花球含水量最高,分别为88.62%和88.81%。青花菜自交系间花球维生素C含量的差异有的达极显著水平。N256、N244和N237的花球维生素C含量明显高于其他自交系,其中N256和N244的维生素C含量分别达1.87、1.53 mg/g,分别是N622的7.19倍和5.88倍。青花菜自交系花球中的可溶性蛋白质含量最高可达29.28 mg/g(N622),最低仅为5.39 mg/g(N256)。花球可溶性还原糖含量在各自交系间的差异有的达极显著水平。N437花球的可溶性还原糖含量最高,达到30.48 mg/g,N256的含量最低,仅为11.23 mg/g。可溶性固形物含量最高的前3个自交系材料为N614、N244和N318,含量最低的为N364和N437。

表3 花球的含水量、叶绿素、维生素C、可溶性蛋白质、可溶性还原糖和可溶性固形物含量

Table 3 Content of water, chlorophyll, vitamin C, soluble proteins, soluble reducing sugars and soluble solids in the curds of broccoli inbred lines

材料	含水量/%	叶绿素含量/(mg·g ⁻¹)			维生素C含量/(mg·g ⁻¹)	可溶性蛋白质含量/(mg·g ⁻¹)	可溶性还原糖含量/(mg·g ⁻¹)	可溶性固形物含量/%
		叶绿素a	叶绿素b	总叶绿素				
N237	86.51B	0.60A	0.19A	0.80A	1.31BC	19.80BC	17.82C	9.0B
N244	86.99B	0.50B	0.16B	0.66B	1.53B	20.46BC	12.65F	9.1AB
N256	88.62A	0.23FG	0.08E	0.30EF	1.87A	5.39D	11.23G	8.0C
N279	86.78B	0.38C	0.13C	0.51C	1.25C	16.93C	17.19CD	8.1C
N318	87.96AB	0.48B	0.16B	0.64B	0.90D	19.36BC	15.57E	9.1AB
N364	88.81A	0.22GH	0.08E	0.29EF	0.63DE	22.90B	19.56B	6.6D
N437	86.53B	0.21H	0.08DE	0.29F	0.42EF	27.51A	30.48A	6.8D
N614	86.92B	0.31D	0.10D	0.40D	0.49EF	21.39BC	20.01B	9.3A
N622	86.35B	0.28E	0.10D	0.38D	0.26F	29.28A	16.44DE	7.9C
N628	87.04B	0.24F	0.08DE	0.32E	0.83D	29.27A	20.66B	8.0C

3 结论与讨论

以10份青花菜自交系为材料,通过15条ISSR引物扩增获得95条带,多态性比例为78.95%,其中N364、N614等7份自交系扩增得到了11条特征性带,表明ISSR技术可以从分子水平上揭示各

个自交系的基因组差异。与此前对青花菜的遗传多样性研究结果^[4,9]相比,本试验中每条引物扩增出的条带数及总条带数均偏少,这主要是因为此前的研究主要以青花菜杂交品种为试验材料。这些材料结合了父本和母本双方的基因多态性,而本试验中

使用的自交系材料经过多代自交后已基本纯合,基因多态性较弱。

在植物亲缘关系研究中,相似系数越大,材料间的亲缘关系也越接近。本研究中各自交系之间的相似系数为 0.557 9~0.852 6,表明青花菜自交系的遗传基础狭窄,这与 Lu 等的推论^[9]一致。通过 UPGMA 法聚类分析,10 个青花菜自交系聚为 2 类(A、B 类):A 类中,N244 与 N364、N244 与 N256 的遗传相似性最高,相似系数分别达 0.842 1 和 0.852 6,说明这些材料极可能具有相同的遗传背景;B 类包括自交系 N318 和 N437,相似系数仅为 0.673 7,遗传多样性较为丰富。

杂种优势形成的先决条件是父本和母本之间存在差异,即基因型差异和基因多态性。在杂交组配中,两亲本的相似性低,得到强杂交优势组合的可能性越大,反之亦然,因此,通过对自交系材料的遗传多样性及亲缘关系研究,再结合田间表现,能够更准确地对杂种优势进行预测,减少杂交亲本选配上的盲目性,增加目的性。通过常规选育方法并结合分子生物学手段来创造特异的种质资源,一直是植物学家和育种学家研究的重点之一^[14-16]。本试验中对青花菜自交系花球的营养成分含量分析结果表明,除含水量外,其余 5 种物质在各自交系之间的变异程度均大于 10%,说明各材料的营养成分含量之间存在明显差异;材料 N256 的维生素 C 含量最高,达 1.87 mg/g,极显著高于其他 9 份自交系材料,而 N628、N279 和 N237 各项综合指标的测定结果均较理想。这些材料对选配高营养青花菜品种具有重要的利用价值。

参考文献:

[1] 唐征,张小玲,刘庆,等.不同播期对3个青花菜自交系农艺性状的影响[J].长江蔬菜,2010(10):31-33.
 [2] 陈晨,董树亭,刘鹏,等.种植密度对玉米自交系产量和灌浆特性的影响[J].玉米科学,2012,20(6):107-111.
 [3] Louarn S,Torp A M,Holme I B,et al.Database derived microsatellite markers (SSRs) for cultivar differentiation in *Brassica oleracea*[J].Genetic Resources and Crop Evolution,2007,54(8):1717-1725.

[4] 李昕珈,吴明根,潘刚.8个青花菜栽培品种的 ISSR 和 SSR 的遗传多样性分析[J].长江大学学报:农学卷,2010,7(1):53-55.
 [5] Jing Z,Tang Z,Zhang X,et al.Mature and origin as a marker of genetic diversity in early-mid broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) based on SRAP analysis[J].African Journal of Agricultural Research,2011,6(2):296-299.
 [6] 赵振卿,虞慧芳,张晓辉,等.花椰菜与青花菜 DNA 标记研究进展[J].浙江农业学报,2010,22(2):258-262.
 [7] Zietkiewicz E,Rafalski A,Labuda D.Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J].Genomics,1994,20(2):176-183.
 [8] 王建波.ISSR 分子标记及其在植物遗传学研究中的应用[J].遗传,2002,24(5):613-616.
 [9] Lu X,Liu L,Gong Y,et al.Cultivar identification and genetic diversity analysis of broccoli and its related species with RAPD and ISSR markers[J].Scientia Horticulturae,2009,122(4):645-648.
 [10] 孙勃,许映君,徐铁锋,等.青花菜不同器官生物活性物质和营养成分的研究[J].园艺学报,2010,37(1):59-64.
 [11] Fernández-León M F,Fernández-León A M,Lozano M,et al.Identification,quantification and comparison of the principal bioactive compounds and external quality parameters of two broccoli cultivars[J].Journal of Functional Foods,2012,4(2):465-473.
 [12] Wang J,Gu H,Yu H,et al.Genotypic variation of glucosinolates in broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) florets from China [J].Food Chemistry,2012,133(3):735-741.
 [13] 曹家树,曹寿椿.白菜及其相邻类群基因组 DNA 的 RAPD 分析[J].园艺学报,1995,22(1):47-52.
 [14] Sodhi Y S,Mukhopadhyay A,Arumugam N,et al.Genetic analysis of total glucosinolate in crosses involving a high glucosinolate Indian variety and a low glucosinolate line of *Brassica juncea*[J].Plant Breeding,2002,121(6):508-511.
 [15] Paine J A,Shipton C A,Chaggar S,et al.Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content [J].Nature Biotechnology,2005,23(4):482-487.
 [16] 于文杰,李子靖,蔡柏岩.硫素对不同大豆品种异黄酮含量的影响[J].农学学报,2013,3(1):10-14.

责任编辑:王赛群

英文编辑:王 库