

大白菜—结球甘蓝 1 号二体异附加系分子 标记鉴定及其自交后代的性状分析

顾爱侠, 许愿超, 冯大领, 刘立平, 赵建军, 王彦华, 申书兴

(河北农业大学园艺学院/河北省蔬菜种质资源创新与利用重点实验室, 保定 071001)

摘要: 利用与抗霜霉病、抗芜菁花叶病毒基因连锁的 SCAR 标记和能够区分大白菜和结球甘蓝 *FLCs* 基因的特异引物对大白菜—结球甘蓝 1 号二体异附加系 (AC_1d) 及其亲本进行分析, 结果表明: AC_1d 及其双亲中均含有与抗霜霉病基因连锁的标记; AC_1d 和亲本结球甘蓝中含有与抗芜菁花叶病毒基因连锁的标记, 亲本大白菜中无该标记; AC_1d 除具有 4 个大白菜 *BrFLCs* 基因外, 同时还添加了结球甘蓝 *BoFLC3* 基因。 AC_1d 自交后代的株高、株展、球高、维生素 C 含量、可溶性蛋白质及其 7 种硫苷组分含量超出了亲本大白菜和结球甘蓝; 叶形指数、可溶性糖含量和对小菜蛾的抗性超出了亲本大白菜。为利用 AC_1d 后代选育携带有目标性状的易位系提供了依据。

关键词: 大白菜; 结球甘蓝; 二体异附加系; 抗病性; 表型; 品质

Identification of Molecular Markers on Chinese Cabbage-Cabbage Disomic Alien Addition Line 1 and Morphological and Qualitative Traits of Its Selfed Progenies

GU Ai-xia, XU Yuan-chao, FENG Da-ling, LIU Li-ping, ZHAO Jian-jun, WANG Yan-hua, SHEN Shu-xing

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei,

Key Laboratory of Vegetable Germplasm and Utilization of Hebei, Baoding 071001)

Abstract: Chinese cabbage-cabbage disomic alien addition line 1 (AC_1d) and its parents were analysed by the markers linked to downy mildew and TuMV resistance from cabbage and specific four pairs of primers for *BrFLCs* and *BoFLCs*. The results indicated that marker linked to downy mildew resistance could be amplified on AC_1d and its parents Chinese cabbage and cabbage, and the marker linked to TuMV resistance could be amplified on AC_1d and parent cabbage, but it could not be amplified on Chinese cabbage. Besides the 4 *BrFLCs* genes, *BoFLC3* was also existing in AC_1d . The values of plant length, plant width, head length, vitamin C, soluble protein and seven components of glucosinolate in selfed progenies of AC_1d showed a wide range of variation beyond corresponding values of parents Chinese cabbage and cabbage; the values of leaf index, soluble sugar and resistance to diamondback moth in selfed progenies of AC_1d also showed an extensive range beyond that of one parent Chinese cabbage. These results will offer an opportunity to screen translocation lines meeting the breeding aims.

Key words: Chinese cabbage; cabbage; disomic alien addition line; disease resistance; phenotype; quality

二体异附加系是在完整受体染色体组的背景下, 添加了供体 1 对染色体的植物新系统, 是研究物

收稿日期: 2015-02-27

修回日期: 2015-03-25

网络出版日期: 2015-06-10

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20150610.1605.007.html>

基金项目: 国家自然科学基金 (31101552, 31171964, 31171976); 河北省自然科学基金 (C2014204093); 高等学校博士学科点专项科研基金 (20101302120006); “十二五”农村领域国家科技计划课题 (2012AA100102-5); 农业部农业科研杰出人才培养计划; 河北省高等学校科学技术研究项目 (Z2010149)

第一作者研究方向蔬菜遗传育种。E-mail: aixiagu@126.com

通信作者: 申书兴, 研究方向蔬菜遗传育种。E-mail: shensx@hebau.edu.cn

种起源和进化、染色体组之间亲缘关系、基因互作以及染色体组文库构建的重要遗传材料,而且还是引进近缘种或野生种优良性状,培育异代换系和易位系的桥梁材料^[1-3]。本研究在获得了添加了 1 对结球甘蓝 (*B. oleracea* var. *capitata*, CC) 1 号染色体的大白菜 (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*, AA) 二体异附加系的基础上^[4],利用与抗霜霉病、抗芜菁花叶病毒基因连锁的标记对其进行鉴定,并对其开花时间关键基因 *FLCs* 的来源与组成进行鉴定,同时对该二体异附加系自交后代的表型、维生素 C 等营养品质、硫代葡萄糖苷 (Glucosinolate, 简称硫苷) 含量以及对小菜蛾的抗性等进行测定,分析结球甘蓝染色体的添加对大白菜特性的影响,为利用该二体异附加系创建携带有目的基因或性状的易位系提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

大白菜—结球甘蓝 1 号二体异附加系 AC₁d 自交后代,及其亲本大白菜、结球甘蓝。

1.2 AC₁d 抗病基因连锁的 SCAR 标记分析

引物来自 M. Farinhó 等^[5]的抗霜霉病基因连锁 SCAR 标记,上游引物 5'-CCGGAACAAGTGGACCG-GAAAT-3',下游引物 5'-GGACACCACTCATCAG-TAG-3';高金萍等^[6]的抗芜菁花叶病毒基因连锁 SCAR 标记,上游引物 5'-GTGCGCTGGATCACTC-3',下游引物 3'-GGAACTGGTGGTCAGAG-5'。PCR 反应程序:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 45 s,60℃ 退火 35 s,72℃ 延伸 50 s,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。扩增产物在 1.0% 琼脂糖凝胶中进行电泳,凝胶成像分析系统进行拍照及分析。

1.3 AC₁d 中 *FLCs* 基因组成鉴定

利用顾爱侠等^[7-8]设计的能够区分大白菜 *BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3*、*BrFLC5* 与结球甘蓝 *BoFLC1*、*BoFLC2*、*BoFLC3* 和 *BoFLC5* 共计 8 个基因的 4 对特异引物,对 AC₁d 中的 *FLCs* 基因组成进行鉴定。

1.4 营养时期性状

种植 AC₁d 的自交种,用于预测及评价利用 AC₁d 创制携带有结球甘蓝性状大白菜新种质的可行性。随机选取自交群体中的 30 株,参考大白菜 DUS 测定标准,在商品菜成熟期进行营养性状观测,包括株高、株展、叶片颜色、叶表面茸毛、叶缘锯齿、叶面褶皱、中肋形状与颜色、叶球形状、叶球大小等,并进行

品质分析。采用硫酸—蒽酮比色法测定可溶性糖含量;考马斯亮蓝-G250 法测定可溶性蛋白含量;2,6-二氯酚靛酚滴定法测定维生素 C 含量;比色法测定纤维素含量。

1.5 硫代葡萄糖苷组分及含量测定

硫苷组分及含量测定参照何洪巨等^[9]的方法。

1.6 小菜蛾抗性鉴定

供试小菜蛾卵购于河南省济源白云实业有限公司,卵孵化后饲养 5 d 至 2 龄。随机选取自交群体中的 30 株,从每份材料单株上取新鲜的叶片,从软叶部分取直径为 6 cm × 6 cm 的圆片,3 次重复。每个圆片放入预先加有 2 层湿润滤纸的培养皿中。每皿中分别接种 2 龄幼虫 10 头。接虫后放置于 25℃、光周期为 16 h/8 h (白天/夜晚) 的培养箱中。第 3 天调查叶片受害情况,按取食面积进行抗性分级^[10-11]:叶片无取食为 0 级,取食面积 ≤ 25% 为 1 级,25% < 取食面积 ≤ 50% 为 3 级,50% < 取食面积 ≤ 75% 为 5 级,取食面积 > 75% 但叶肉未食尽为 7 级,取食只剩叶脉为 9 级。

2 结果与分析

2.1 AC₁d 及其亲本抗病连锁 SCAR 标记分析

甘蓝抗霜霉病基因连锁的 SCAR 标记,在 AC₁d 及其亲本中的扩增结果表明:AC₁d 及其亲本大白菜、结球甘蓝均扩增出与预期片段大小一致 (443 bp) 的扩增产物 (图 1 A),即 AC₁d 及其亲本大白菜及结球甘蓝中含有该抗霜霉病基因连锁标记。甘蓝抗芜菁花叶病毒基因连锁的 SCAR 标记,在 AC₁d 及其亲本中的扩增结果表明:AC₁d 与结球甘蓝中扩增出与抗芜菁花叶病毒基因连锁标记一致的产物 (433 bp),亲本大白菜没有扩增出相应的产物 (图 1 B),即 AC₁d 中添加了来自结球甘蓝的与抗芜菁花叶病毒基因连锁的标记。

2.2 AC₁d 中 *FLCs* 基因组成鉴定

利用能够区分大白菜和结球甘蓝 8 个 *FLCs* 基因的 4 对特异引物,对 AC₁d 的 *FLCs* 基因来源、组成进行鉴定,结果表明,AC₁d 除扩增出大白菜 *BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3* 和 *BrFLC5* 这 4 个基因外,同时还扩增出结球甘蓝 *BoFLC3* 基因相应产物 (图 2),即 AC₁d 中添加了结球甘蓝 *BoFLC3* 基因。为进一步开展 *BoFLC3* 在大白菜中的遗传表达,筛选添加 *BoFLC3* 基因的大白菜—结球易位系等提供了特色材料。

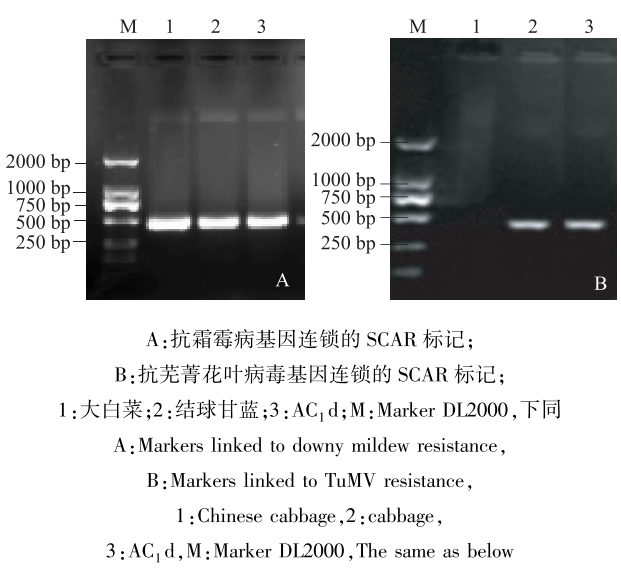


图1 AC₁d 及其亲本的抗霜霉病和抗芜菁花叶病毒基因连锁的 SCAR 标记鉴定

Fig.1 Identification of SCAR marker linked to downy mildew resistance and TuMV resistance genes from cabbage in AC₁d and its parents

2.3 AC₁d 自交后代营养生长时期表型

对 AC₁d 的 30 株自交后代营养生长成熟时期性状进行观测,结果表明:叶中肋颜色在自交后代群

体中无分离,与亲本大白菜 85-1 表现一致,为白色;叶中肋形状在自交后代中分离,表现平、中、鼓 3 种类型;叶球形状表现为不结球、球形、头球形和筒形 4 种类型;叶片颜色、叶表面茸毛、叶缘锯齿、叶面褶皱程度接近于亲本大白菜,分别表现为浅绿、少、钝锯、稍皱;同时对株高、株展、叶形指数、叶球高和宽(表 1)进行了测量,除叶形指数外,其他 4 个性状的分离超出了亲本大白菜和结球甘蓝值的范围。这为进一步利用 AC₁d 自交后代,定向选育不同类型大白菜—结球甘蓝易位系等提供参考,同时为开展表型性状的遗传分析提供材料。

2.4 AC₁d 自交后代营养生长时期品质

通过 AC₁d 自交后代营养生长成熟时期的品质分析表明(表 1),亲本大白菜与结球甘蓝具有相近的粗纤维含量,结球甘蓝维生素 C、蛋白质、可溶性糖含量高于大白菜,其中维生素 C 含量接近于大白菜的 2 倍。AC₁d 自交后代中维生素 C、蛋白质含量的分离范围超出双亲值范围,粗纤维、可溶性糖含量值在自交后代中分离范围未超出双亲值,但可溶性糖含量在部分自交后代中较亲本大白菜有明显提高。这为进一步利用 AC₁d 自交后代,选育高维生素 C、蛋白质、可溶性糖含量的大白菜提供依据和材料。

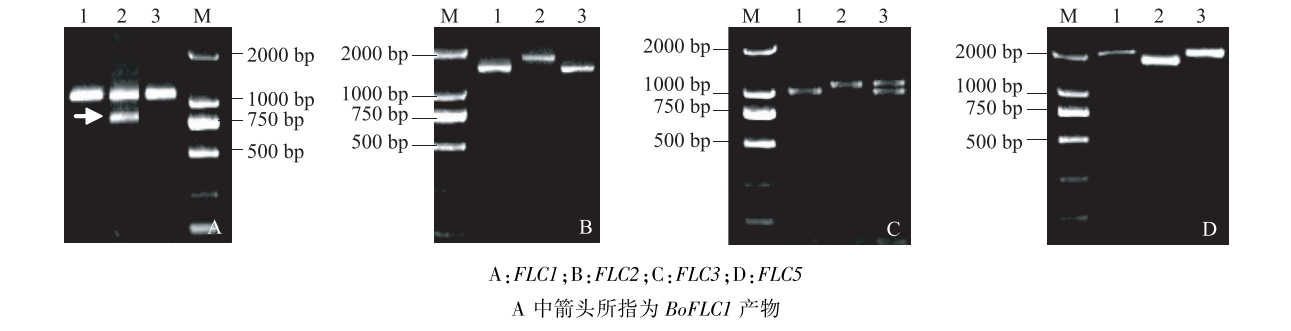


图2 FLCs 特异引物在 AC₁d 及其亲本中的扩增结果

Fig.2 Amplification of specific primer for FLCs in AC₁d and its parents

表 1 AC₁d 自交后代及其亲本部分营养时期性状及品质

材料		株高	开展度	叶形指数	球高 (cm)	球宽 (cm)	粗纤维	维生素 C	蛋白质	可溶性糖
Materials		(cm)	(cm)	Leaf index	Head length	Head width	(g/100 g FW)	(mg/100 g FW)	(mg/g)	(mg/g FW)
		Plant height	Plant width				Crude fiber	Vc	Soluble protein	Soluble sugar
大白菜	均值 Mean	42.67	73.00	1.44	19.00	36.67	0.69	32.11	1.89	39.43
结球甘蓝	均值 Mean	25.67	47.67	0.98	15.67	19.67	0.63	60.04	2.09	48.22
AC ₁ d	最小值 Min.	13.00	24.00	1.14	—	—	0.21	14.67	0.84	21.00
自交后代	最大值 Max.	45.00	81.00	1.88	23.00	37.00	0.68	65.30	2.38	46.01
	均值 Mean	30.64	52.91	1.39	12.27	18.64	0.53	38.01	1.62	39.47

— 代表未结球
— represents no heading

大白菜和 AC₁d 自交后代中检测到 8 种硫苷(表 2),其中 3 种脂肪族硫苷分别为 2-羟基-3-丁烯基硫苷(PRO, progoitrin)、3-丁烯基硫苷(NAP, gluconapin)和 4-戊烯基硫苷(GBN, glucobrassicin);4 种吲哚族硫苷分别为 3-吲哚基甲基硫苷(GBC, glucobrassicin)、4-甲氧基-3-吲哚基硫苷(4ME, 4-methoxyglucobrassicin)、1-甲氧基-3-吲哚基甲基硫苷(NEO, neoglucobrassicin)和 4-羟基-3-吲哚基甲基硫苷(4OH, 4-hydroxyglucobrassicin);1 种

芳香族硫苷为苯乙基硫苷(NAS, gluconasturtin)。亲本结球甘蓝中检测到脂肪族和吲哚族中的 8 种硫苷(表 2),未检测到芳香族硫苷,相对于亲本大白菜特有的是黑芥子苷(SIN, sinigrin),AC₁d 自交后代中也未检测到该成分。研究表明吲哚族硫苷降解产物有益人体健康^[12-15],在 AC₁d 自交后代中 GBC、4ME、NEO 最大值分别为 3.10、3.06、1.11,较亲本大白菜有显著提高,为进一步选育含有高有益硫苷含量的大白菜提供了可能。

表 2 AC₁d 自交后代及其亲本硫苷组成与含量

Table 2 Composition and concentration of glucosinolates in selfed progenies of AC₁d and its parents

材料 Materials		脂肪族 Aliphati				吲哚族 Indoyl				芳香族 Aromatic
		PRO	NAP	GBN	SIN	4OH	GBC	4ME	NEO	NAS
大白菜	均值 Mean	1.42	0.09	0.61	0	0.29	1.23	1.01	0.19	0.53
结球甘蓝	均值 Mean	0.41	0.02	0.25	3.11	0.08	1.89	0.54	0.08	0
AC ₁ d	最大值 Max.	2.32	1.50	4.37	0	0.21	3.10	3.06	1.11	1.27
自交后代	最小值 Min.	0.80	0.01	0.39	0	0.03	0.24	0.42	0.12	0.04
	均值 Mean	1.41	0.75	2.34	0	0.18	1.26	1.50	0.55	0.52

2.5 AC₁d 自交后代对小菜蛾抗性的离体鉴定

AC₁d 亲本大白菜对小菜蛾的抗性为 3 级,亲本结球甘蓝的抗性为 1 级;AC₁d 的 30 株自交后代中,9 株表现 1 级抗性,12 株表现 3 级抗性,9 株表现为 5 级抗性。在抗性为 5 级的材料鉴定过程中,小菜蛾死亡虫数较少,为 0~2 头,且幼虫化蛹数量多。而在抗性为 1 级的材料鉴定过程中小菜蛾死亡数量增加,且幼虫化蛹数量很少,说明 1 级抗性材料对小菜蛾幼虫取食后的生长产生了抑制。AC₁d 自交后代中出现了较亲本大白菜对小菜蛾抗性增强和降低的材料,这为丰富大白菜种质,以及开展小菜蛾抗性研究提供材料。

3 讨论

AC₁d 自交后代的性状及品质等特性的变化范围超出亲本大白菜或双亲值,这可能是由于外源甘蓝基因添加后造成的基因组成、基因剂量和基因互作等效应引起的。J. Li 等^[16]研究表明,基因的复制或基因剂量的变化可能导致生物系统中基因功能的冗余,并为特定数量性状变异提供潜在基础。

利用能够区分大白菜 *BrFLC1*、*BrFLC2*、*BrFLC3*、*BrFLC5* 与结球甘蓝 *BoFLC1*、*BoFLC2*、*BoFLC3*、*BoFLC5* 共计 8 个基因的 4 对特异引物,对大白菜—结球甘蓝异附加系中的 *FLCs* 基因组成进行鉴定,*BoFLC3* 在 2 号单体异附加系^[7]和 AC₁d 中均

被检测到,说明在异附加系的合成过程中,如大白菜—结球甘蓝种间杂交种(AAC, 2n = 29)阶段,某些位点发生了染色体重组,重组可能发生在大白菜与结球甘蓝染色体间,也有可能发生在结球甘蓝染色体间;同时 *BoFLC3* 所在区段非同源染色体间的部分同源性可能较强,易于发生染色体重组。

本研究中的 AC₁d 自交后代中未检测到含有 SIN 的个体外,许多研究表明在白菜中均未检测到 SIN^[17-19],或即便是在某些品种中检测到 SIN 但含量也很低^[20-21]。在测定其他大白菜—结球甘蓝异附加系及其后代硫苷含量时,均未检测到亲本结球甘蓝相对于亲本大白菜特有的这种硫苷组分,分析原因可能是,结球甘蓝中合成该物质的基因与大白菜的同源性低,很难通过杂交、回交途径转入到大白菜中,或大白菜中具备该物质的快速降解途径。

参考文献

[1] Geleta M, Heneen W K, Stoute A I, et al. Assigning *Brassica* microsatellite markers to the nine C-genome chromosomes using *Brassica rapa* var. *trilocularis*-*B. oleracea* var. *alboglabra* monosomic alien addition lines[J]. Theor Appl Genet, 2012, 125: 455-466

[2] Heneen W K, Geleta M, Brismar K, et al. Seed colour loci, homoeology and linkage groups of the C genome chromosomes revealed in *Brassica rapa*-*B. oleracea* monosomic alien addition lines[J]. Ann Bot, 2012, 109: 1227-1242

[3] 吴金华, 王长有, 王秋英, 等. 小麦-黑麦二体异附加系分子细胞遗传学鉴定[J]. 西北植物学报, 2008, 28(1): 59-64