

# 十字花科蔬菜基因组含量的测定与分析

李 蔚, 刘莉莎, 李 仁, 郭仰东  
(中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193)

**摘要:** 以我国 14 种重要十字花科蔬菜为材料, 利用流式细胞术测定基因组含量。其中青苤蓝、乌塌菜、雪里蕻、芥蓝的基因组含量属首次报道。本试验数据与国外文献提供的相关数据对比, 发现青萝卜、结球甘蓝、青花菜和根用芥菜的基因组含量与已报道数值基本吻合, 而大白菜、花椰菜的基因组含量值与报道数据存在差异。造成同一物种基因组含量值差异的原因可能是品种的不同, 也可能与生长环境或测定时参考标准选用等因素不同有关。

**关键词:** 十字花科蔬菜; 流式细胞术; 基因组含量; 遗传变异

## Analysis of Genome Contents in Some Cruciferous Vegetables

LI Wei, LIU Lisha, LI Ren, GUO Yang-dong

(College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193)

**Abstract** The genome contents of 14 major cruciferous vegetables were measured. The genome contents of green kohlrabi (*Brassica oleracea* L. var. *caulorapa* D. C.), savoy (*Brassica chinensis* var. *rosularis* Tsen et Lee), leaf mustard (*Brassica juncea* var. *multiceps* Tsen et Lee) and Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) were firstly reported in the current study. Comparing the relevant data and numerical of foreign literature provided, the genome contents of the green radish (*Raphanus sativus* Bailey), cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*), broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) and root mustard (*Brassica juncea* Coss) were basically consistent with the reported values. The genome contents of the heading Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. var. *cephalata* Tsen et Lee) and cauliflower (*Brassica oleracea* L. var. *botrytis* L.) were some different from the reported data. The reasons which cause the variation in genome content of the same species were possibly the difference of breed, the diverse growing environment or the inconsistent reference standard.

**Key words** Cruciferous vegetables; Flow cytometry; Genome content; Genome variation

十字花科蔬菜是我国种植最广泛、食用最普遍的蔬菜种类, 包括白菜类、甘蓝类、芥菜类和萝卜等蔬菜作物<sup>[1]</sup>。其产量高、管理技术简单、易于栽培、供应期长, 对中国蔬菜供应起着重要作用。除此之外, 有报道从十字花科蔬菜中提取的化学预防剂在癌症发生的启动和促进阶段都有抑制作用<sup>[2]</sup>。鉴于十字花科蔬菜的重要性, 有必要对不同染色体组的十字花科蔬菜开展基因组含量研究。

基因组是生物体维持生存所需的全套基因。可以认为, 它反映了生物种全部的、特定的遗传信息,

从根本上决定了遗传物质的传递。基因组含量又称 C 值, 指一个物种单倍体核的 DNA 含量。同一物种的基因组含量是相当稳定的, 是各个物种固有的特征参数<sup>[3]</sup>。越来越多的研究发现基因组含量和生物的很多生理参数存在关系。

以目前的研究成果来看, 有关基因组含量的测定多集中在动物和微生物方面<sup>[4-5]</sup>, 有关植物的相关研究比较少, 全世界只有约 1% 的植物已知其基因组含量, 其中绝大多数为国外的品种资源<sup>[6]</sup>。国内关于植物基因组含量的文章也只有寥寥几

收稿日期: 2010-07-27 修回日期: 2010-09-03

基金项目: 国家“973”计划项目 (2009CB119000); 公益性行业科研专项 (201003037); 北京市大学生科学研究与创业行动计划

作者简介: 李蔚, 硕士研究生。Email: weinyw@yahoo.com.cn

通讯作者: 郭仰东, 教授, 博士生导师, 主要从事蔬菜生物技术研究。Email: yagu@cau.edu.cn

篇<sup>[7-11]</sup>。国外文献提供的相关数据虽然有些借鉴意义,但不能准确反映及代表我国蔬菜品种基因组的含量,而且有资料报道,基因组含量与物种分类、进化都有一定关系<sup>[4]</sup>。所以测定我国十字花科蔬菜基因组含量并与国外数据进行对比分析十分必要,可为今后国内蔬菜细胞生物学、物种进化、分类学、遗传学、分子生物学等相关研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用我国 14 种重要十字花科蔬菜,分别是结球甘蓝品种精选中甘 11 号,花椰菜品种赛雪,大白菜品种京研早熟北京新 3 号,青花菜品种青森,樱桃萝卜品种鲜红,青萝卜品种沈春,心里美萝卜品种嘉禾满堂红,白萝卜品种春宝 2 号,青苕蓝品种金丰地,乌塌菜品种青丰,芥菜品种日本光头,雪里蕻品种精选九头鸟,芥蓝品种香港白花,不结球小白菜品种嘉禾北极。材料均购买于中国农业科学院。公鸡全血用于对仪器的校正,来自美国 BD 公司。

### 1.2 方法

**1.2.1 鸡血参照标准制备** 本试验采用流式细胞术(flow cytometry, FCM)测定基因组含量<sup>[12]</sup>。测定样品时,国际上一般采用鸡红细胞核 DNA 含量( $2C = 2.35pg$ )作为参照标准<sup>[13]</sup>。所以先以公鸡的红血细胞作为外部标准对仪器进行校正,然后再作为内部标准,测定蔬菜品种基因组含量。本试验所用流式细胞仪(FACSCalibur美国 BD 公司生产)由北京市农林科学院蔬菜研究中心提供。

取 5 $\mu$ l 鸡血红细胞,加 0.5ml 裂解液,1000r/min 的条件下离心 5min 弃上清,加入 200 $\mu$ l PI 染料,低温(4 $^{\circ}$ C)染色 2h。

**1.2.2 蔬菜样品的制备** 将上述各十字花科蔬菜种于 9 cm  $\times$  9 cm 的营养钵,置于中国农业大学科学院日光温室中生长,常规栽培管理。当各种蔬菜有 3~4 片真叶展开时,取各物种幼叶,用清水清洗,每一物种取 1 cm  $\times$  1 cm 洗净的新叶置于塑料培养皿中,加入 0.5ml 裂解液,用双面刀将叶片切碎。将切好的样品经 350 目尼龙筛网过滤到离心管中,对所得滤液在 1000r/min 的条件下离心 5min 弃上清,在准备用流式细胞仪检测样品时,再向样品中加入 200 $\mu$ l PI 染料,测试前置于低温(4 $^{\circ}$ C)染色 2h。

**1.2.3 DNA 含量测定** 在检测样品之前,开启系统预热 5min,根据样品优化仪器检测条件,如进样

速度、FSC/SSC 探测器电压及 FSC 阈值,先以鸡血为外部标准,对仪器进行校正,然后再作为内部标准,测定结球甘蓝的基因组含量(在国外相关资料中结球甘蓝的 2C 值处于十字花科蔬菜基因组含量的中间位置),公式为:

$$\text{结球甘蓝细胞核 DNA 绝对含量 (pg)} = \frac{\text{结球甘蓝细胞核 DNA 相对含量}}{\text{鸡血红细胞细胞核 DNA 相对含量}} \times 2.35$$

重复 3 次,取平均值为结球甘蓝的核 DNA 含量。然后以结球甘蓝为标准,测定其他蔬菜品种基因组含量。每一物种的相对 DNA 含量与其对应的标准 DNA 含量比较,换算出各种蔬菜的细胞核 DNA 绝对含量,其公式为:

$$\text{样品细胞核 DNA 绝对含量 (pg)} = \frac{\text{样品细胞核 DNA 相对含量}}{\text{同组结球甘蓝细胞核 DNA 相对含量}} \times 1.26$$

每个样品取 3 次重复,平均值为该品种蔬菜的核 DNA 含量。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因组含量测定结果

计算机采集所测量到的各种信号进行计算处理,根据 CellQuest 软件分析得到结果。测定结果中鸡血、结球甘蓝、大白菜的标准细胞流式图分别为图 1 图 2 图 3。

根据公式,得到各种蔬菜基因组含量。如表 1。

在所测定的 14 种蔬菜作物中,青苕蓝、乌塌菜、雪里蕻、芥蓝的基因组含量是国内外首次报道。

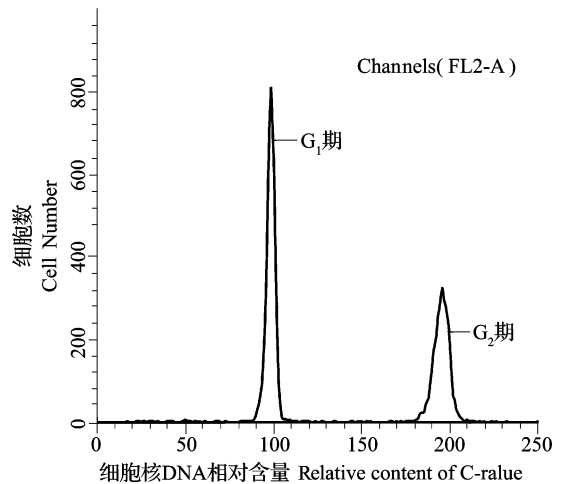


图 1 鸡血 DNA 含量的确定

Fig 1 Determination of the C-value of chicken erythrocytes

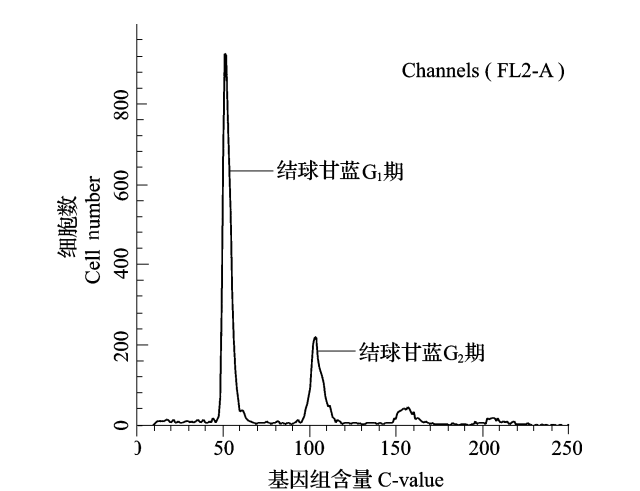


图 2 以鸡血为对照, 结球甘蓝的基因组含量

Fig 2 Controlled by chicken C-value the C-value of cabbage

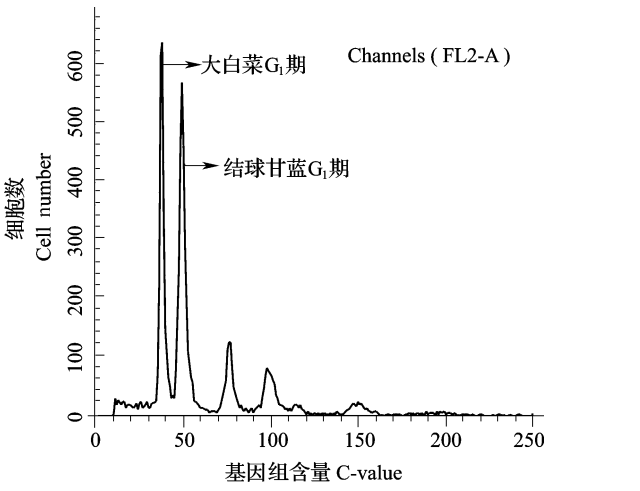


图 3 以结球甘蓝为对照, 大白菜基因组含量

Fig 3 Controlled by cabbage C-value the C-value of the heading Chinese cabbage

表 1 14种十字花科蔬菜基因组含量及与国外相关数据对比

Table 1 Result of the C-value measurement for 14 major cruciferous vegetables and some of our genome contents comparison with foreign data

材料 Material	平均 DNA 含量 Mean value (pg/2C)	标准差 SD	国外相关数据 <sup>[6]</sup> Foreign related data (pg/2C)
结球甘蓝 Cabbage ( <i>Brassica oleracea</i> L. var <i>capitata</i> )	1.26	0.006	1.3
青苤蓝* Greer kohrabi ( <i>Brassica oleracea</i> L. var <i>caulorapa</i> D. C.)	1.44	0.010	—
花椰菜 Cauliflower ( <i>Brassica oleracea</i> L. var <i>botrytis</i> L.)	1.26	0	1.4
青花菜 Broccoli ( <i>Brassica oleracea</i> L. var <i>italica</i> )	1.26	0.006	1.3
芥蓝* Chinese kale ( <i>Brassica alboglabra</i> Bailey)	1.26	0.020	—
根用芥菜 Root mustard ( <i>Brassica juncea</i> Coss)	2.31	0.015	2.3
雪里蕻* Leaf mustard ( <i>Brassica juncea</i> var <i>multiceps</i> Tsen et Lee)	2.01	0.006	—
大白菜 (结球) Heading Chinese cabbage ( <i>Brassica campestris</i> L. var <i>cephalata</i> Tsen et Lee)	0.96	0.012	1.1
乌塌菜* Savoy ( <i>Brassica chinensis</i> var <i>rosularis</i> Tsen et Lee)	0.98	0.006	—
不结球小白菜 Pakchoi ( <i>Brassica campestris</i> ssp <i>chinensis</i> var <i>communis</i> Tsen et Lee)	1.02	0.021	—
白萝卜 White radish ( <i>Raphanus sativus</i> Bailey)	1.26	0	—
青萝卜 Green radish ( <i>Raphanus sativus</i> Bailey)	1.07	0.010	1.1
心里美萝卜 Red radish ( <i>Raphanus sativus</i> Bailey)	1.03	0.021	—
樱桃萝卜 Cherry radish ( <i>Raphanus sativus</i> Bailey)	1.26	0.015	—

\* : 国内外首次报道的物种; 由于所测样品均为 2 倍体物种, 所以用 2C 值表示基因组含量

\* : The first reported data

2.2 基因组含量与物种亲缘关系的相关性

所测十字花科蔬菜的 C 值在 0.48~1.51 之间。根据有关资料, 茄科蔬菜的 C 值多集中在 0.90~2.00 之间, 而百合科蔬菜的 C 值则平均为 16.26<sup>[6]</sup>。可见, 不同科的蔬菜基因组含量范围有所不同。

结球甘蓝、青苤蓝、花椰菜、青花菜及芥蓝属

于芸薹属甘蓝种下的亚种或变种<sup>[14]</sup>, 其基因组含量基本相同, 除青苤蓝外, 其 2C 值均为 1.26。根用芥菜、雪里蕻属于芸薹属芥菜种的变种<sup>[14]</sup>, 其基因组含量与甘蓝种蔬菜差距较大。大白菜、乌塌菜、不结球小白菜属于芸薹属芸薹种的不同变种或亚种<sup>[14]</sup>, 根据结果可看出该种蔬菜作物基因组含量均较小。白萝卜、青萝卜、心里美萝卜、樱桃

萝卜同属萝卜属萝卜种的不同亚种或变种,它们之间的基因组含量也相近但不完全相同。所以十字花科蔬菜基因组含量在不同属、不同种间差异较大,而亲缘关系近的同种蔬菜之间基因组含量也相近但稍有差异,这与 Price等<sup>[15]</sup>认为的在一个种内不同亚种或品种间核 DNA 值亦有不一致的情况是一致的。这为蔬菜的物种亲缘远近关系的研究开辟了新的思路。

### 2.3 基因组含量与物种进化的关系

有学者认为,物种的进化包括了 DNA 含量的增加与减少,强调指出物种进化与 DNA 含量的关系是复杂的<sup>[4]</sup>。此外,也有资料明确表示,在相近物种中,进化的物种基因组出现压缩是自然界常观察到的现象<sup>[5]</sup>。C 值大小与染色体体积呈正相关。C 值小,染色体体积小,所以细胞核与细胞体积小,细胞最短增殖时间也就相应变短,分生组织生长速率越快,幼苗生长速率快,竞争能力强,世代时间有可能变短,呈现不同的生活周期类型的可能性加大,生态适应性越大,植物的入侵性也就越强<sup>[16]</sup>。也有资料表明,通过比较濒危植物和其非濒危的近亲之间的基因组大小的关系发现,基因组越大的物种,其濒危程度越高<sup>[17]</sup>。由此可以推测,十字花科蔬菜中 C 值小的物种生态适应性强,如大白菜被其他植物入侵的可能性相对较小,这可能是大白菜可以全世界广泛、长久种植的原因之一。

## 3 讨论

### 3.1 影响基因组含量的因素

通过文献查阅,得到国外一些相关蔬菜的基因组含量,将其与本次试验所得到的结果对比,可知,结球甘蓝、根用芥菜、青花菜、青萝卜的基因组含量与已报道数值基本一致,而大白菜、花椰菜和已知数据还是有一些差异的。分析其原因可能由于本次试验的各种蔬菜品种是华北地区主栽品种,与国外的品种存在着一定差异。而且国际上经常在测定样品时只用鸡血作为参照标准。Johnston等<sup>[18]</sup>建议在检测植物 DNA 含量时最好选用植物材料作为参照,同时建议作为参照标准材料的 DNA 含量应该与所检测的目标样品的 DNA 含量相近,但又不至于完全相等,可以被流式细胞仪检测到二者的差异。所以本试验选用结球甘蓝作为内参,在相关资料中,其 DNA 含量处于十字花科蔬菜基因组含量中间位置。此外,有资料表明,在特定的条件下,基因组含量会被某种特定的选择力所影响,植物基因组含量在近

缘种之间存在显著差异被认为是由于纬度、海拔高度、温度、气候或者地区差异所造成的<sup>[19]</sup>。中国地域辽阔,气候类型复杂,由此而形成的不同生态环境中,经过长期的自然和人工选择,产生了极其丰富的作物遗传资源。

### 3.2 基因组含量与基因组大小的关系

Bennet等<sup>[20]</sup>报道,可以根据  $1\text{pg DNA} = 0.965 \times 10^9 \text{ bp}$  计算出基因组大小。所以,可以根据本次试验的数据得到各蔬菜品种的基因组大小,并与国外数据进行对比分析,为蔬菜的进化、遗传学、分子生物学等研究做科学资料的积累。

### 参考文献

- [1] 刘公社,赵泓,刘杰,等.分子标记技术及其在芸薹属植物研究中的应用[J].植物学通报,1998(2):67-72
- [2] 孙静,黄建.十字花科蔬菜的防癌作用[M].国外医学卫生学分册,2003 30(1):19-24
- [3] 杨勇,陈克成,孙天恩.对几种百合科植物基因组大小的评价[J].武汉植物学研究,1996 14(3):199-203
- [4] 杜波,王丁.长江江豚基因组大小测定[J].动物学报,2006 52(4):73-77
- [5] 王如平,刘伟,曹祥荣.毛冠鹿基因组大小的研究[J].扬州大学学报:农业与生命科学版,2008,29(4):23-25
- [6] Bennett Leih Nuclear DNA Amounts in Angiosperms[J]. Ann Bot London 1995 76:113-176
- [7] 李赞,石荫坪,束怀瑞,等.利用流式细胞光度术鉴定苹果倍性的研究[J].西北植物学报,1998 18(4):499-504
- [8] 张俊娥,刘继红,邓秀新.采用倍性分析仪鉴定柑橘愈伤组织的遗传变异[J].遗传学报,2003 30(2):169-174
- [9] 桂毅杰,王晟.毛竹基因组大小和序列构成的比较分析[J].中国科学 C 辑:生命科学,2007,37(4):488-492
- [10] 张振超,张蜀宁.四倍体不结球白菜的诱导及染色体倍性鉴定[J].西北植物学报,2007 27(1):28-32
- [11] 焦旭雯,赵树进.流式细胞术在高等植物研究中的应用[J].热带亚热带植物学报,2006 14(4):354-358
- [12] 杜立颖,冯仁青.流式细胞术[M].北京:北京大学出版社,2008
- [13] 刘江惠,左连富,刘亮,等.流式细胞仪专用鸡红细胞的制备方法[J].河北医科大学学报,2008 29(6):873-875
- [14] 周荣,任吉君,王艳.POD、PPO 指纹图谱在芸薹属蔬菜分类上的研究[J].中山大学学报:自然科学版,2010 49(4):106-110
- [15] Price H J Chambers K L, Bachmann K. Geographical and ecological distribution of genomic DNA content variation in *Microseris douglasii* (Asteraceae) [J]. Bot Gaz 1981 142(3):415-426
- [16] 郭水良,陈国奇. DNA C 值与被子植物入侵性关系的数据统计分析[J].生态学报,2008 28(8):3698-3705
- [17] Vinogradov A E. Selfish DNA is maladaptive evidence from the plant Red List [J]. Trends Genet 2003, 19:609-614
- [18] Johnston J S Bennett M D, Rayburn A L, et al Reference standards for determination of DNA content of plant nuclei [J]. Am J Bot 1999, 86(5):609-613
- [19] Charles A K, David D A. Variation in nuclear DNA content across environmental gradients: a quantile regression analysis [J]. Ecol Lett 2002, 5:66-76
- [20] Bennet M D, Smith J B, Heslop-Harrison J S. Nuclear DNA amounts in angiosperms [J]. Phil Trans R Soc Lond B, 1982 216:179-199