

# 松花型花椰菜主要品种鉴定的分子标记分析

马二磊<sup>1</sup>, 王 燕<sup>2</sup>, 刘 莉<sup>3</sup>, 龚义勤<sup>1</sup>, 宋立君<sup>1</sup>, 柳李旺<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>南京农业大学园艺学院 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095;

<sup>2</sup>温州科技职业学院 温州市农科院蔬菜科学研究所, 温州 325014; <sup>3</sup>中国种子集团公司, 北京 100045)

**摘要:** 利用 RAPD、ISSR 和 SRAP 3 种分子标记对我国南方地区松花型花椰菜主栽品种进行鉴定, 分析了品种间的遗传多样性。3 种标记共产生 370 条扩增带, 238 条为多态性条带, 其多态率为 64.32%。其中只有 SRAP 标记的引物 mel/em1 可将 20 个品种全部鉴别。遗传相似系数分析表明, 松花型花椰菜品种之间的亲缘关系较近, 遗传背景比较狭窄。聚类分析表明品种间的亲缘关系与熟性、地理分布相关。研究表明, 分子标记能有效地应用于花椰菜品种鉴定, 且综合多种分子标记分析品种间的遗传多样性将更加准确可靠。

**关键词:** 松花型花椰菜; 品种鉴定; 分子标记

## Cultivar Identification in the Loose-curd Cauliflower with Molecular Markers

MA Er-lei<sup>1</sup>, WANG Yan<sup>2</sup>, LIU Li<sup>3</sup>, GONG Yiqin<sup>1</sup>, SONG Lijun<sup>1</sup>, LIU Liwang<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement/College of Horticulture, Nanjing Agriculture University,

Nanjing 210095; <sup>2</sup>Wenzhou Vocation College of Science & Technology, Institute of Vegetable Crops, Wenzhou Academy of

Agricultural Sciences Wenzhou 325014; <sup>3</sup>China National Seed Group Corp, Beijing 100045)

**Abstract** RAPD, ISSR and SRAP molecular markers were used for cultivar identification and genetic diversity analysis of loose-curd cauliflower cultivars in the southern China. Totally 370 bands were amplified and 238 (64.32%) were polymorphic. The SRAP primer mel/em1 could distinguish all 20 cultivars. Analysis of genetic similarity coefficient showed that loose-curd cauliflower cultivars had a near genetic relationship with the narrow genetic background. Cluster analysis showed that genetic relationship among cultivars and the geographic distribution and maturity were much related. It is indicated that cauliflower cultivar identification and genetic diversity analysis could be conducted effectively with molecular markers and the reliable result could be obtained with multiple molecular marker analysis.

**Key words** Loose-curd cauliflower; Cultivar identification; Molecular marker

花椰菜 (*Brassica oleracea* var. *botrytis* L.) 是十字花科芸薹属重要的蔬菜作物之一。松花型花椰菜花球松散, 梗青球白, 生脆可口, 味道鲜美, 植株适应性和抗逆性强。近年来松花型花椰菜已逐渐赢得我国南方地区消费者的青睐, 种植面积不断扩大<sup>[1-2]</sup>。传统品种鉴定方法主要是对植株形态进行观察, 但由于大部分花椰菜品种苗期形态相似, 要到成株才

开始表现品种特性, 所以品种鉴定往往需要较长时间, 且易受环境影响。

快速、准确、高效的分子标记技术在蔬菜作物品种鉴定上得到广泛应用, 成为分析遗传关系和遗传多样性的强有力工具<sup>[3-5]</sup>。Hu 等<sup>[6]</sup>利用 4 个随机引物产生的标记条带鉴别了 14 个青花菜和 12 个花椰菜品种。Kresovich 等<sup>[7]</sup>利用分子标记对甘蓝类

收稿日期: 2009-11-06 修回日期: 2010-04-05

基金项目: 江苏省科技支撑计划项目 (BE2008312); 江苏省农业种质资源基因库项目 [sx(2008)g09]; 温州市科技计划项目 (X2009007)

作者简介: 马二磊, 硕士, 研究方向: 蔬菜作物遗传育种

通讯作者: 柳李旺, 教授, 博导。E-mail: nauliw@njau.edu.cn

© 1994-2011 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

蔬菜进行品种鉴定及遗传多样性分析。但是对花椰菜进行品种鉴定及指纹图谱分析的研究还不多<sup>[8]</sup>,利用 RAPD、ISSR 和 SRAP 3种标记进行松花型花椰菜品种鉴定与遗传多样性分析的研究尚未见报道。本文利用分子标记对松花型花椰菜品种进行鉴定与遗传多样性评价,从 DNA 水平揭示品种的遗传变异与亲缘关系,以期为松花型花椰菜品种鉴定与品种选

育过程中优异种质的合理利用提供技术参考。

1 材料与方法

1.1 材料

选取我国南方地区广泛栽培的 20 个不同来源和熟性的松花型花椰菜品种(表 1)。

表 1 松花型花椰菜品种的特性及来源地

Table 1 The characteristics and sources of loose-curd cauliflower cultivars

编号 Code	品种 Cultivar	熟性 Maturity	单球重 (kg) Single curd weight	来源 Origin	编号 Code	品种 Cultivar	熟性 Maturity	单球重 (kg) Single curd weight	来源 Origin
1	庆松 90天	中熟	1.5~2.0	1	11	农美 50天	极早熟	1.5~1.8	5
2	庆松 100天	中晚熟	1.4~2.0	1	12	泰国 65天	早熟	1.4~2.0	6
3	秀华 90天	中熟	1.5~2.5	2	13	吉美 50日	极早熟	1.4~1.6	7
4	庆松 65天	早熟	1.3~2.0	1	14	青秀 65天	早熟	1.3~1.5	2
5	庆松 85天	中熟	1.4~2.0	1	15	秀美 60天	早熟	1.5~1.8	2
6	庆农 58日	极早熟	1.5~1.8	3	16	庆农 90日	中熟	2.2~2.4	3
7	雪松 60天	早熟	0.6~0.9	4	17	秀华 65天	早熟	1.5~2.0	2
8	庆农 85日	早中熟	2.0~2.2	3	18	好吃花菜 120天	晚熟	1.5~2.5	8
9	庆农 65日	早熟	1.6~2.0	3	19	好吃花菜 80天	中熟	1.4~2.0	8
10	庆农 60日	早熟	1.6~1.9	3	20	好吃花菜 70天	早熟	1.1~1.5	8

1 浙江神良种业; 2 台湾禾峰种子有限公司; 3 台湾庆农种苗有限公司; 4 温州神龙种苗有限公司; 5 台湾农业种苗股份有限公司; 6 台湾津源田种苗; 7 台湾田农种苗股份有限公司; 8 温州首指蔬菜种业有限公司

1.2 方法

1.2.1 田间鉴定 供试材料 2007-2008年播种于南京农业大学江浦园艺实验站,并进行田间性状鉴定。

1.2.2 基因组 DNA 的提取和纯化 选取新鲜的花椰菜叶片,采用本实验室改良的 CTAB-氯仿-异戊醇法<sup>[9]</sup>,进行基因组 DNA 的提取,紫外分光光度计测定 DNA 浓度后,保存于 -20℃冰箱中备用。

1.2.3 PCR反应体系 RAPD 扩增反应体系为 2.0mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.15mmol/L dNTPs, 0.44 μmol/L 引物, 0.75 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 扩增程序为 94℃ 2min, 94℃ 30s, 37℃ 45s, 72℃ 90s, 40个循环; 72℃ 10min 延伸; ISSR 反应体系为 2.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.156mmol/L dNTPs, 0.5 μmol/L 引物, 0.64 U Taq DNA 聚合酶 (TaKaRa), 扩增程序: 94℃ 3min, 94℃ 30s, 55℃ 1min, 72℃ 90s, 35个循环; 72℃ 10min 延伸。PCR 扩增产物在 1.2% 琼脂糖凝胶中电泳检测,紫外灯下拍照。SRAP-PCR 反应与产物检测按本实验室方法进行<sup>[10]</sup>。

1.2.4 数据处理与分析 对电泳结果进行统计,将电泳图谱上清晰且重复出现的条带作为一个位点,同一位置上出现的记为“1”,未出现的记为“0”。采

用 NTSYS-pc2 10 软件,按照非加权算术平均数聚类分析方法 (UPGMA) 对遗传相似系数进行聚类分析,计算品种间的遗传距离并构建聚类分析树状图。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

筛选引物后对供试材料进行检测(图 1)。12 个 RAPD 随机引物共产生 77 条多态性条带,多态率为 62.10%,单个引物检测到的多态性位点比率最低的是 NAURP147(37.50%),最高的为 NAURP40(77.78%)。ISSR 标记 11 个引物产生 37 条多态性带,多态率为 46.84%,单个引物检测到的多态性位点比率最低的是 NAUISR57(25.00%),最高的为 NAUISR42(77.78%)。筛选出 9 对 SRAP 引物共产生 124 条多态性带,多态率为 74.25%,单个引物检测到的多态性位点比率最低的为 odd38/en1(43.48%),最高的为 me1/en3(88.89%)。引物 me1/en3 产生 16 条多态性带,多态性最高为 88.89%。3 种标记共产生 238 条多态性带,多态率为 64.32%。表明松花型花椰菜品种间的遗传多样性较低,遗传背景比较狭窄。

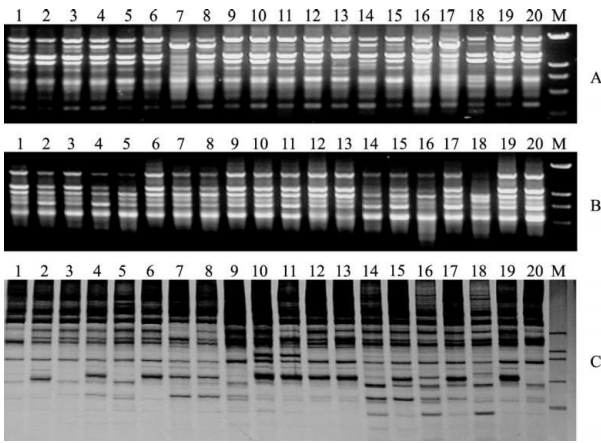


图 1 供试材料不同标记电泳图谱

Fig 1 Electrophoresis profiles amplified by different molecular markers in cauliflowers

A: RAPD, B: SSR, C: SRAP, M: DL2000 DNA ladder

## 2.2 遗传相似性分析

RAPD标记的遗传相似系数分析表明, 庆农 65日和好吃花菜 120天的遗传相似系数最低为 0.5645, 庆松 90天和庆松 100天、庆农 65日和秀华 65天的最高为 0.9516, 平均遗传相似系数为 0.8056。SSR标记的遗传相似系数分析显示, 庆农 85日和好吃花菜 120天的遗传相似系数最低为 0.6835, 庆农 65日和吉美 50日、庆农 60日和农美 50天的最高为 0.9747, 平均遗传相似系数为 0.8662。SRAP标记的遗传相似系数分析表明, 雪松 60天和好吃花菜 120天、庆农 85日和好吃花菜 120天的遗传相似系数最低为 0.5689, 庆松 90天和庆松 100天的最高为 0.9222, 平均遗传相似系数为 0.7621。

3种标记的遗传相似系数分析表明, 雪松 60天和好吃花菜 120天的遗传相似系数最低为 0.6054, 庆松 90天和庆松 100天的最高为 0.9351, 平均遗传相似系数为 0.7989。所有品种的遗传相似系数都小于 1, 同时又都能聚类在一起, 表明供试材料既有相同的遗传背景, 又存在一定差异。来源于浙江的雪松 60天与好吃花菜 120天的亲缘关系最远, 表明熟性是影响亲缘关系的重要因素。庆松 90天和庆松 100天的亲缘关系最近, 两者来源地相同、熟期相近。

## 2.3 指纹图谱分析与品种鉴别

利用多态性位点对材料进行鉴定。RAPD标记可区分的品种数最少的引物是 NAURP147 (仅 2个), 最多的引物为 NAURP154 (达到 12个), 使用引物 NAURP154 和 NAURP7 可鉴别全部品种。SSR标记可区分的品种数最多的引物为 NAU SSR42

(达到 9个), 但 ISSR 标记引物组合不能将所有品种区分开。SRAP标记可区分的品种数最少的引物是 me6/em9 (仅 5个), 引物 me1/em1 可区分品种数最多 (达到 20个), 其鉴定效率最高, 仅此引物可将材料全部鉴别 (图 1-C)。

## 2.4 聚类分析

在 3种标记综合分析的聚类图中 (图 2), 遗传相似系数为 0.68 时聚类图分为两个类群。I 类群包含 18个品种; II类群包括来源于温州的 2个中晚熟品种: 庆松 85天和好吃花菜 120天。I 类群在遗传相似系数为 0.85 时分离为 3个组。i 组包含 13个松花型花椰菜品种, 又可分成 3个亚组, 第 1亚组由品种庆松 90天、庆松 100天、秀华 90天、秀华 65天、庆松 65天构成, 除秀华 65天来源于中国台湾外, 其余品种均来源于温州, 表明其父母本遗传背景相似, 由此推测其亲本之间亲缘关系较近; 第 2亚组由庆农 58日、庆农 65日、庆农 60日、农美 50天、泰国 65天和吉美 50日组成, 均是来源于中国台湾的早熟、中熟品种; 第 3亚组仅有好吃花菜 80天和好吃花菜 70天, 来源于温州道指公司且熟期相近。ii 组包含品种雪松 60天、庆农 85日和秀美 60天, 除雪松 60天来源于温州外, 其余品种均是来自中国台湾的早熟类型。iii组仅有品种青秀 65天和庆农 90日, 均来自中国台湾, 表明同地区品种亲缘关系较近。聚类分析不能区分品种庆松 90天和庆松 100天, 表明熟期和地理区域是影响品种亲缘关系的重要因素。

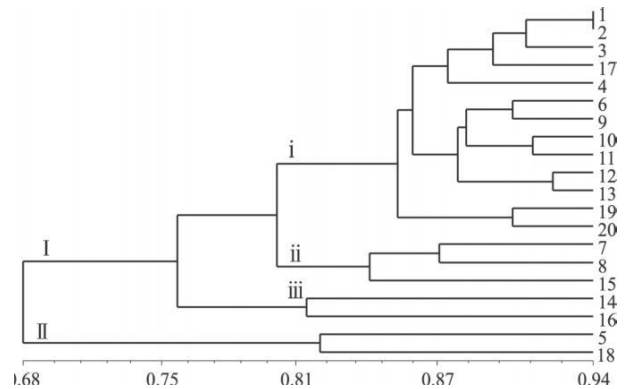


图 2 松花型花椰菜品种基于分子标记的聚类分析图

Fig 2 Dendrograms of bosc-curd cauliflower cultivars based on molecular marker analysis

## 3 讨论

所有标记均不能区分全部品种, 表明南方地区松花型花椰菜品种遗传背景比较狭窄。可能是因为

这些品种来自南方的浙江、台湾地区, 频繁引种、长期人工选育和广泛品种交流造成品种间基因交流, 降低了该地区品种遗传多样性; 或是采用了相似的亲本, 导致品种特异性降低。

成熟期是品种鉴定的重要指标, 是影响聚类分析结果的重要因素。品种熟期与遗传亲缘关系存在一定的相关性。极早熟品种与早熟品种亲缘关系较近, 中早熟与中熟品种亲缘关系较近, 极早熟、早熟品种与晚熟品种亲缘关系较远。在聚类图中材料基本上按照熟期进行分布, 表明分子标记结果与农艺性状及生物学分类有一定的相关性<sup>[10-11]</sup>。品种间亲缘关系与地理分布有一定的相关性, 如第1组第2亚组的品种均来自中国台湾; 不同地域的品种聚在一起, 如好吃花菜 120天和庆松 85天, 可能是由于育种过程中采用了相同或遗传相似性较高的亲本。

分子标记技术在一定程度上能够揭示品种之间园艺学性状的相似性及亲缘关系远近, 并且不同分子标记结果表现出一定的相似性。SRAP标记鉴定品种的效率最高, 与3种标记综合分析的结果接近, 说明SRAP技术能有效地应用于松花型花椰菜品种鉴定。SRAP标记多为共显性, 主要检测的是基因阅读框区域多态性, 常与形态学分类表现出很高的一致性<sup>[12-13]</sup>。遗传标记在基因组中分布位置不同, 在分析材料遗传多样性与品种鉴定能力方面会存在一些差异, 因此利用多种标记进行品种鉴定与遗传多样性分析结果将可能更加准确、可靠<sup>[14-15]</sup>。

#### 参考文献

- [1] 顾宏辉, 朱丹华, 杨加付, 等. 小孢子培养获得松花型花椰菜DH再生植株[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(2): 301-305

- [2] 何圣米, 寿伟林, 李必元, 等. 松花型花椰菜高山无公害栽培技术[J]. 长江蔬菜, 2005, 4: 23-24
- [3] Lopes P M, Brio J L, Ganes S, et al. RAPD and ISSR molecular markers in *O. la europaea* L.: Genetic variability and molecular cultivar identification[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2007, 54: 117-128
- [4] Mangale E, Herve Y, Hu J, et al. Determination of genetic variability by RAPD markers in cauliflower, cabbage and kale local cultivars from France[J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 1995, 42: 281-289
- [5] 黄聪勇, 李传勇, 潘爱民, 等. RAPD分析花椰菜不同品种的遗传变异[J]. 亚热带植物科学, 2001, 30(3): 1-6
- [6] Hu J G, Quins C F. Identification of broccolli and cauliflower cultivars with RAPD markers[J]. Plant Cell Rep, 1991, 10: 505-511
- [7] Kresovich S, Williams J G K, McFerson J R, et al. Characterization of genetic identities and relationships of *Brassica oleracea* L. via a random amplified polymorphic DNA assay[J]. Theor Appl Genet, 1992, 85: 190-196
- [8] Asturini I A, Plummer J A, Lancaster R A, et al. Genetic diversity of Indonesian cauliflower cultivars and their relationships with hybrid cultivars grown in Australia[J]. Sci Hort, 2006, 108: 143-150
- [9] Liu L, Guo W, Zhu X, et al. Inheritance and fine mapping of fertility restoration for cytoplasmic male sterility in *Gossypium hirsutum* L. [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 461-469
- [10] Liu G, Liu L W, Gong Y, et al. Seed genetic purity testing of F<sub>1</sub> hybrid cabbage (*Brassica oleracea* var *capitata*) with molecular analysis[J]. Seed science and technology, 2007, 35(2): 477-486
- [11] 杨华, 刘灶长, 陈海荣, 等. 上海地区芸薹属蔬菜遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(3): 264-269
- [12] Riaz A, Li G, Qureshi Z, et al. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance[J]. Plant Breeding, 2001, 120(5): 411-415
- [13] 柳李旺, 龚义勤, 黄浩, 等. 新型分子标记——SRAP与TRAP及其应用[J]. 遗传, 2004, 26(5): 777-781
- [14] Williams J G K, Kubelk A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res., 1990, 18: 6531-6535
- [15] Mattioni C, Casasoli M, Gonzalez M, et al. Comparison of ISSR and RAPD markers to characterize three Chilean *Nothofagus* species[J]. Theor Appl Genet, 2002, 104: 1064-1070

#### 欢迎 订阅

《林业资源管理》是受国家林业局森林资源管理司委托、由国家林业局调查规划设计院主办的综合性科技期刊。

《林业资源管理》是目前国内唯一一家全方位报道与森林资源和林政管理相关的政策政务、科学理论、应用技术、生产实践和国内外有关动态信息的综合性、实用性、大容量的科技期刊。大16开, 双月刊。每期12元, 全年72元。

地址: (100714)北京和平里东街18号国家林业局院内  
规划院《林业资源管理》编辑部

电话: 010-84239158 传真: 010-84239351

网址: <http://lyzy.chinajournal.net.cn>

电子邮箱: lyzy0912@sina.com

《浙江林业科技》为综合性林业科技期刊, 是全国中文核心期刊、中国科技核心期刊, 也被多家数据库收录。

《浙江林业科技》主要报道国内外有关育苗、造林、森林经营、森林保护、森林生态、林产加工、林业经济、林业机械及森林多种效益经营与开发等方面的研究新成果、新技术、新经验、新动向及新信息。双月刊, 国际标准大16开80页; 国内定价10元/册, 全年60元。

地址: (310023)杭州市留下留和路399号 浙江省林业科学研究院

电话: 0571-87798221 传真: 0571-87798206

E-mail: zljf@mail.hz.zj.cn