

青花菜遗传育种与生物技术应用研究进展

秦耀国, 雷建军, 曹必好

(华南农业大学, 广州 510642)

摘要: 青花菜在欧美深受欢迎, 在国内, 引进栽培初期作为一种特菜仅少量栽培, 后来栽培面积逐步扩大, 但种子多依赖进口, 价格昂贵, 20 世纪 80 年代初我国利用引入的青花菜材料开始选育种工作, 育出了几个品种, 取得了一定进展, 生物技术在青花菜育种上也得到广泛应用。从起源、资源评价、主要性状遗传规律、新品种选育、组织培养、基因工程育种和分子标记等进行了综述。

关键词: 青花菜; 遗传育种; 生物技术

中图分类号: S635.303.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2004)02-0011-03

青花菜(*Brassica oleracea* L. var. *italica* Planch)又名西兰花、绿菜花、茎椰菜、木立花椰菜、意大利芥蓝等, 是十字花科芸薹属甘蓝种中以绿色花球为产品的一、二年生草本植物。营养价值较高, 含有丰富的维生素 A 和维生素 C, 以及含量可观的维生素 B1、B2、B5、钙和铁等物质, 并含抗癌物质, 受到消费者的青睐。青花菜栽培历史较短, 但发展很快, 在我国已成为一些地区出口创汇的重要优质蔬菜种类之一。同时, 美国、日本等国家育成的杂种一代品种在国内外市场上畅销, 我国也育出一批品种。除常规育种外, 生物技术在青花菜育种上也得到了广泛应用, 现就相关研究进展作一综述。

1 起源及栽培分布

青花菜由甘蓝演化而来, 是由野生甘蓝演化为花椰菜过程中的一个变种, 演化中心在地中海东部沿岸地区, 文献记载原产意大利。据米歇尔《园艺学辞典》记载, 1660 年有嫩茎花菜和意大利笋菜等名称, 与花椰菜名称相混淆。由于形态相似, 林奈将青花菜归入花椰菜中, 1829 年 Switces 才将其从花椰菜中分出。除欧洲作为起源地广泛栽培外, 19 世纪初传入美国, 后传到日本, 19 世纪末或 20 世纪初传入我国, 栽培地区还遍及亚洲其它地区、非洲和大洋洲。青花菜栽培历史虽短, 但栽培面积逐步扩大, 在美国已经远远超过花椰菜, 并且居五大速冻蔬菜之首。目前我国, 台湾省栽培较为普遍, 广东、云南、福建、北京、上海、浙江、山东等省市也均有栽培。

2 种质资源评价

青花菜野生种主要分布于地中海沿岸, 在欧洲和北美通过人工选择已形成了适应当地消费和具地方特色的品种。已做的种质资源评价工作包括对产量、抗病性、地区和季节适应性、植株形态表现等方面的比较与鉴定。青花菜主要病害有

黑腐病、霜霉病、病毒病等, 对生产危害较大, 进行抗病性鉴定以筛选抗病材料研究较多。Thomas 对 240 份青花菜和花椰菜材料进行了由霜霉菌 2 号小种引起的霜霉病抗性鉴定, 2 片叶展平期接种病原孢子, 表明无高抗材料, 青花菜材料表现中抗或感病^[1]; 但在鉴定时期上, Dickson 等认为在实验室的筛选试验中, 霜霉病抗性取决于植株年龄, 苗期抗病性似乎与成株期(8 片叶以上)抗病性无相关性, 同时还受不同分离菌来源的影响, 指出在特定地区选择表现高抗的成熟株比较有效^[2]。Canaday 对细菌性软腐病抗性鉴定表明不同基因型敏感性不同, 品种“Green Defender”和“Shogun”在 4 年试验中一直表现高抗, “Green Valiant”具轻度抗性, 发病率和严重度与从移栽到收获的天数成负相关^[3]。刘玉梅等对从国外引入的 80 余份种质资源经选择形成的自交系进行了苗期多抗性人工接种和田间鉴定相结合的方法, 筛选出一份抗 TuMV 兼抗黑腐病的抗源材料和一份抗 TuMV 耐黑腐病的抗源材料, 并与其它自交系杂交, 初步选出两个优良的杂交组合, 田间表现抗病病毒兼抗黑腐病, 且其它经济性状优良^[4], 为选育抗病优良品种用于生产奠定了基础。

3 主要性状遗传规律研究

3.1 形态性状遗传

严继勇等探讨了青花菜 10 个性状在自交后代中的遗传稳定性, 表明花期亲和指数、系内株高、分枝数、花蕾粗细、球茎髓部空度、花瓣颜色等性状在自交 3~4 代后趋于稳定或一致, 花球成熟期尚难稳定, 球径与球高比值在世代间变化不大; 花球大小、蕾期亲和指数和生长势表现明显的自交衰退^[5]。Baggett 等分析了节间长度遗传及其与花球伸出和花球大小的关系, 表明节间长度主要以加性效应遗传, 选择高的花球伸出即节间长的单株会导致小花球和减产^[6]。Khattra 等对产量与产量构成性状进行了相关和通径分析, 调查的多数性状与产量成正相关, 但总矿物质与产量成显著负相关; 通径分析显示主花球重对产量最直接正相关, 其次为单株侧花球产量、主花球直径、单株侧花球数^[7]。Pritam 研究了产量与产量构成性状的遗传变异性, 表明表型和基因型变异系数高的性状有叶面积、嫩茎数、植株重、顶花球重、花球紧实度、产量和平均嫩茎重; 高遗传率和遗传进度的性状有产量、顶花球重、叶和花球的高度、球形指数、嫩茎数、平均嫩茎重、植株重



第一作者简介: 秦耀国, 1979 年生, 现就读于华南农业大学园艺学院, 2001 级在读硕士, 蔬菜专业, 从事蔬菜育种与生物技术方向的研究, 参加导师课题“花椰菜亲本快速纯化、抗虫基因转化及新品种选育研究”、“彩色甜椒杂交一代新组合的选育研

究”等多项。

收稿日期: 2003-10-28

和叶面积,表明这些性状加性基因起作用,可通过选择进行改良;花球紧实度遗传率中等和遗传进度高表明加性和非加性基因起作用;高遗传率和低遗传进度的商品成熟期与中等遗传率和低遗传进度的茎直径以及收获指数以非加性效应遗传^[8]。

3.2 抗病性遗传

Jensen 等利用 6 个 DH(双单倍体)株系采用半双列杂交分析了青花菜子叶期霜霉病局部抗性遗传,表明基因加性效应分别占孢子形成得分和孢子生成量变异的 45.8% 和 31.8%,通过轮回早期选择局部抗性植株对获得子叶期抗病性有效^[9]。Wang 等(2001)对真叶期霜霉病抗性遗传进行了研究,利用从抗霜霉病品种“Everest”获得的同样在 3~4 叶期表现高抗性的 DH 系与感病品系杂交得到 F₁、F₂ 和 BC 群体,3 到 4 叶期接种鉴定,表明霜霉病抗性是由两个显性基因互补作用决定的,说明通过抗病品系杂交选育 F₁ 品种可以用来防治霜霉病^[10]。

3.3 耐热遗传

Dickson 等用耐热株系间杂交,杂交种耐热性好于两个亲本,表明耐热性受控于基因加性效应^[11]。

3.4 抗冻性遗传

严继勇等在不同低温条件下,测定了青花菜 5 个亲本及 20 个组合离体幼叶的细胞膜伤害率,以得出的低温致死温度为抗冻指标,分析了其抗冻性遗传,表明青花菜的抗冻性呈数量性状遗传方式,符合加性——显性模型,以加性效应为主,显性效应也有一定作用^[12]。

4 杂种优势利用研究

4.1 自交不亲和系选育和利用

青花菜具有广泛的自交不亲和性,由具有多个复等位基因的单基因位点 S 位点控制,属孢子体不亲和类型。目前从日本、美国、荷兰、韩国等进口的品种和国内一些科研单位育出的品种多为利用自交不亲和系选育配成的杂种一代品种。自交不亲和系选育的步骤一般是对引入的材料(F₁)进行单株选择,连续自交,逐代选育花期亲和指数低、蕾期亲和指数高的株系,同时注意对一些主要经济性状的选择。我国最早于 20 世纪 80 年代初由中国农科院蔬菜花卉研究所开展了青花菜自交不亲和系的选育,同时进行了杂交组合试配鉴定,选育出“中青一号”和“中青二号”品种,随后报道的“上海一号”、“上海二号”、“碧杉”、“碧松”、“绿宝”、“绿莲”等杂种一代品种的选育均是利用相同的方法育出的,为改变我国种子依赖进口和推动进口种子国产化战略以及促进青花菜栽培生产起了重要作用。

4.2 雄性不育系选育的研究

Yu(刘玉梅)等选育出了蜜腺和雌蕊正常、雄蕊退化和花粉败育的细胞核雄性不育系,杂交分离试验表明不育性符合两对隐性核基因控制遗传模式,利用此不育系配制的杂交组合产量明显高于“中青一号”、“中青二号”和“里绿”品种,说明有极大的应用潜力。林荔仙等利用从美国引进的青花菜细胞质雄性不育材料为不育源,通过杂交和连续回交方法选育出不育性稳定,经济性状良好的一批青花菜胞质雄性不育系,并已初步育出新品种“绿宝 2 号”。

在缺乏天然的雄性不育材料时,利用异源胞质雄性不育

通过核置换和原生质体融合是选育青花菜雄性不育系的一条有效途径。Pearson 通过杂交获得了具有黑芥胞质的青花菜雄性不育系,但缺少蜜腺。Dixon 等对该不育性改良使蜜腺恢复到中等大小,有功能。Yerrow 等利用原生质体融合,将 Poiima 油菜 CMS 转入青花菜品种“Green Comet”中,获得了具有青花菜核基因组及 Polima 线粒体和叶绿体的杂种,植株形态上与“Green Comet”相似,可育度低。林碧英等和朱玉英等通过杂交和连续回交的核置换方法分别育出了具有花椰菜不育胞质和萝卜 Ogura 不育胞质的青花菜异源胞质雄性不育系,不育系不育性稳定,不育株率和不育度达 100%,可以用来配制一代杂种。

5 生物技术在青花菜育种上的应用

5.1 组织培养的研究

5.1.1 器官培养 用叶片、子叶、下胚轴、花蕾和花梗等外植体离体培养可以实现无性繁殖、离体保存和作为受体进行遗传转化的研究。Anderson 等、Johnson 等分别报道了利用花蕾和茎、叶、叶肋分化再生植株进行离体繁殖的研究。国内最早由钟仲贤和李曙轩等进行了花蕾、花器官和叶片、中肋、花序柄外植体的组织培养,在基本培养基 MS 或 B₅ 附加一定量的生长素和细胞分裂素配比的条件下取得了不错效果。王怀名用花蕾、子叶、子叶节、胚根和下胚轴离体培养,试管苗获得了较高的移栽成活率。Christey 等探讨了以花梗为外植体获得高频率再生不定芽的潜力,在 LS 附加 BA 1 mg/L(毫克/升)的培养基上,供试的 6 个青花菜品种中,“GreenComet”再生率高达 98%,平均每个外植体分化 9 个不定芽,其它品种分化率在 41%~94%之间,说明花梗可作为离体快繁的材料。子叶和下胚轴取材方便,常作为遗传转化的受体,但影响再生的一大问题是玻璃苗发生严重,胡开林等试验表明提高培养基中琼脂浓度至 11 g/L~14 g/L(克/升),增加培养基的渗透势及采用透气性较好的棉塞和牛皮纸封口时,能基本克服玻璃苗的发生。

5.1.2 花药、花粉(小孢子)培养 利用花药、花粉培养获得 DH 纯合株系用来纯化亲本在青花菜育种上得到应用。进行的工作主要是围绕对小孢子胚状体发生的一些影响因素来提高胚状体诱导率以及对倍性鉴定的研究。Keller 等报道了通过高温预处理花药培养获得单倍体,利用不育性表型推断 53%的再生植株是单倍体。Takahata 等利用游离小孢子培养获得了单倍体植株,研究了预处理、温育时间、花蕾大小和不同培养方式对小孢子出胚率的影响,其中青花菜品系“B31-18”用 4 mm~5 mm(毫米)大小花蕾游离的小孢子胚状体诱导率最高(0.54%),再生植株 80%以上是单倍体。国内王怀名等培养花药诱导胚状体得到再生单倍体植株,但花粉培养仅得到胚性细胞。张德双等游离小孢子培养再生植株,表明受不同基因型的影响很大,在培养基中加入活性炭可提高出胚率,双核期小孢子比例对游离小孢子培养也有影响。此外,培养密度、紫外线、甲基硫酸乙酯、NMU(亚硝基甲基脲)、AgNO₃ 等对胚状体诱导的影响也有研究。再生植株往往是具不同染色体倍性的混合群体,Farnham 等和 Wang 等采用 DNA 流式细胞仪鉴定了花药和小孢子培养再生植株的倍性,都表明二倍体植株居多,单倍体占少数。

5.1.3 原生质体培养与融合 Robertson 等首先报道了利用

叶片游离原生质体的研究,表明从下胚轴再生植株的叶片比由种子生成植株的叶片游离原生质体的全能性要高,在培养基 B 上,前者原生质体分裂频率高于 70%,1% 的原生质体能形成愈伤组织,77% 的愈伤组织再生芽,而后者原生质体分裂频率仅为 15%~22%,极少数愈伤组织出芽。Kao 等培养叶片和下胚轴的原生质体获得高效再生,从原生质体到生成植株需要 8~11 周。钟仲贤等将下胚轴游离的原生质体采用琼脂糖小块培养,分裂频率为 35%,植板率为 5%,分化率达 20%。

在融合方面,Yerrow 等利用原生质体融合将 Polima 油菜 CMS 性状成功转入到青花菜品种中。Christey 用含黑芥 CMS 的青花菜叶肉原生质体与抗除草剂阿特拉津的芜菁下胚轴原生质体融合获得了 4 株既表现 CMS 又抗阿特拉津的表型与青花菜相似的植株;Conner 等利用此特性不育株系作母本,把阿特拉津抗性作为遗传标记进行杂种种子生产以提高制种效率。Zhou 等在油菜与青花菜原生质体融合后的再生植株中得到了抗黑腐病植株。抗病植株与青花菜回交 2~4 代或自交 1~2 代后,进行了抗病性鉴定,RAPD 分析找到 5 个与抗病基因连锁的标记,它们都属于同一连锁群。

5.1.4 突变体筛选 Qin 等研究了花梗预培养天数和 γ 射线辐射剂量对愈伤组织形成、器官分化和再生植株变异的影响,用 5kR 的 γ 射线辐照预培养 7 d(天)的花梗效果较好,得到的再生植株总变异率 10.19%,其中有利变异如早熟和无侧枝类型的变异率分别为 3.75% 和 1.85%。Dunemann 等用 NMU 处理青花菜花序外植体,通过离体培养再生的植株出现了形态和育性上的变异,发现了一株雌蕊正常但雄性不育的植株,经鉴定不育性符合单基因显性遗传,讨论了着手利用此雄性不育开展杂种优势育种。

5.2 基因工程育种

常规育种往往受到基因资源的限制,利用基因工程手段将其它物种的有用基因转入并实现表达从而创新种质,具有目的性强、育种效率高等优点。外源基因转化青花菜的研究已有一些报道,并取得了较大进展,详细报道见下表:

目的基因	转化受体	转化方法	文献
Bt 基因	子叶柄、下胚轴、 子叶、花梗	根癌农杆菌介导	Metz 等(1995)尤进钦 等(1996)Cao 等(1999, 2001)
S-腺苷甲硫氨酸水解酶基因	——(原文未给出)	根癌农杆菌介导	Wagoner 等(1992)
ACC 氧化酶反义基因	叶片、子叶	发根农杆菌介导	Henzi 等(1998)
ACC 解氨酶基因	下胚轴	根癌农杆菌介导	李贤等(2001)
ipt(异戊烯转移酶)基因	子叶柄、下胚轴、花梗	根癌农杆菌介导	Chen 等(2001)
SLG(S 位点糖蛋白)反义基因	——	农杆菌介导	Toriyama 等(1991)
几丁质酶基因	子叶柄	根癌农杆菌介导	Mora 等(2001)
铜结合蛋白基因	子叶、下胚轴	根癌农杆菌介导	陈淑惠等(1998)

青花菜转 Bt 抗虫基因和延迟熟基因的研究较多,对转 Bt 基因植株的抗虫性鉴定表明转基因植株对主要害虫小菜蛾、菜青虫和粉纹夜蛾具有抗性,最高致死率达 100%。Henzi 等获得了转 ACC 氧化酶反义基因的青花菜,通过测定,花蕾乙烯的合成明显减少,具有延迟成熟的特性。在转化方法上多为根癌农杆菌介导,也有发根农杆菌介导和基因枪法的报道,但转入的多是报告基因。

5.3 分子标记研究

已用于青花菜的品种鉴定、遗传变异性和亲缘关系分析等方面的研究。Hu 等用 4 个 10 bp 随机引物对 14 个青花菜和 12 个花椰菜品种进行了 RAPD 检测,表明用其中两个引物足以区分 14 个青花菜品种,用三个引物可以区分 12 个花椰菜品种,说明 RAPD 标记提供了一条快速可靠鉴别青花菜和花椰菜品种的方法。杨尧文等利用 RAPD 对花椰菜和青花菜 F₁ 品种及亲本的遗传变异进行了研究,9 个引物产生了 93 个 DNA 条带,有 17 个为花椰菜和青花菜所共有,3 个为青花菜所有,8 个为单一样本所特有,其它 65 个为多型性条带可以分辨不同的样本,由 RAPD 标记求出的样本之间相似系数与建立的亲缘关系图可以反映 F₁ 品种和其亲本之间的关系及不同样本遗传上的差异性。孙德岭等应用 AFLP 技术对花椰菜、青花菜、紫花菜和黄花菜自交系的遗传亲缘关系研究表明青花菜和紫花菜关系较近,与传统分类学相一致。

参考文献:

[1] Thomas C E, Jourdain E L. Evaluation of broccoli and cauliflower germplasm for resistance to race 2 of *Peronospora parasitica*. HortScience, 1990, 11: 1429~1431.

[2] Dickson M H, Petzoldt R. Plant age and isolate source affect expression of downy mildew resistance in broccoli. HortScience, 1993, 7: 730~731.

[3] Canaday C H, Wyatt J E, Mullins J A. Resistance in broccoli to bacterial soft rot caused by *Pseudomonas maminalis* and fluorescent *Pseudomonas* species. Plant—Disease, 1991, 7: 715~720.

[4] 刘玉梅, 孙培田, 方智远, 等. 青花菜抗源材料的筛选和利用[J]. 中国蔬菜, 1996(6): 23~26.

[5] 严继勇. 青花菜主要性状在自交后代中的遗传稳定性[J]. 中国蔬菜, 1999(6): 9~11.

[6] Baggett J R, Kean D, Kasimor K. Inheritance of internode length and its relation to head exertion and head size in broccoli. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1995, 2: 292~296.

[7] Khattri A S, Gurmail Singh, Thakur J C, et al. Genotypic and phenotypic correlations and path analysis studies in sprouting broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica* L.). Journal of Research, Punjab Agricultural University, 2001, 3~4: 195~201.

[8] Pritam—Kalia, Shakuntla, Kalia P. Genetic variability for horticultural characters in green sprouting broccoli. Indian Journal of Horticulture, 2002, 1: 67~70.

[9] Jensen B D, Vaerbak S, Munk L. Characterization and inheritance of partial resistance to downy mildew, *Peronospora parasitica*, in breeding material of broccoli, *Brassica oleracea* conv. *botrytis* var. *italica*. Plant Breeding, 1999, 6: 549~554.

[10] Wang M, Farnham M W, Thomas C E. Inheritance of true leaf stage downy mildew resistance in broccoli. J. Am. Soc. Hortic. Sci., 2001, 6: 727~729.

[11] Dickson M H, Kuo C G. Breeding for heat tolerance in green beans and broccoli. Adaptation of food crops to temperature and water stress: proceedings of an international symposium, Taiwan, 13~18 August 1992. 1993, 296~302.

[12] 严继勇, 李式军, 徐鹤林. 青花菜抗冻性的遗传分析. 南京农业大学学报, 1995, 18(1): 21~25.