

## 芸薹类蔬菜基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析

陈云鹏<sup>1</sup>, 曹家树<sup>1</sup>, 缪颖<sup>2</sup>, 叶纨芝<sup>1</sup>

(1. 浙江大学园艺系, 浙江杭州 310029; 2. 厦门大学生物系, 福建厦门 361005)

**摘要:** 采用随机引物扩增多态性 DNA (RAPD) 技术, 对芸薹类 ( $2n=20$ ) 蔬菜作物的 33 个品种进行了遗传多样性检测。从 70 个引物中筛选出 37 个引物, 共扩增出 353 带。其中, 多态带有 260 条, 扩增片段长度大多数集中在 0.9~1.6 kb 之间。不同引物的检测效率相差很大。运用 5 个引物扩增的 10 条 RAPD 特征带, 可以作为一组 DNA 指纹, 区分所有供试 7 个大白菜品种。

**关键词:** 芸薹类; 遗传多样性; RAPD

中图分类号: S634; Q943.2 文献标识码: A

CHEN Yun-peng<sup>1</sup>, CAO Jia-shu<sup>1</sup>, MIAO Ying<sup>2</sup>, YE Wan-zhi<sup>1</sup> (1. Dept. of Horticulture, Zhejiang Univ., Hangzhou 310029, China; 2. Dept. of Biology, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China)

**Analysis of genetic polymorphisms in vegetable crops of *Brassica campestris* by RAPD markers.** Journal of Zhejiang University (Agric. & Life Sci.), 2000, 26(2): 131-136

**Abstract** The genetic polymorphisms in vegetable crops of *Brassica campestris* was investigated using random amplified polymorphic DNA markers (RAPDs), the detected materials included thirty-three cultivars. Thirty-seven primers selected from seventy primers amplified 353 RAPD fragments and 260 bands of them showed polymorphisms. The length of most amplified fragments ranged from 0.9 to 1.6 kb. Different primers exhibited different detective efficiency. There were ten RAPD characteristic markers, which were detected as a group of DNA fingerprints to identify all the seven cultivars of heading type Chinese cabbage.

**Key words** *Brassica campestris* L. (Syn. *B. rapa* L.); genetic polymorphism; random amplified polymorphic DNA

芸薹类蔬菜包括芸薹 (*Brassica campestris* L. var. *olerifera* DC.)、芜菁 (*B. campestris* L. ssp. *rapifera* Matzg.)、白菜 (*B. campestris* L. ssp. *chinensis* Makino.)、大白菜 (*B. campestris* L. ssp. *pekinensis* Olsson.)、日本水菜 (*B. campestris* L. ssp. *japonica* (Sieb) Hort.) 等, 它

们分布地区广, 品种类型丰富, 在蔬菜生产上占有极其重要的地位。RAPD 技术具有简便迅速、成本低、DNA 多态性检测率高、无需同位素标记等优点, 目前广泛应用于物种鉴定<sup>[1-3]</sup>、遗传多样性分析<sup>[4-7]</sup> 和外源 DNA 的快速鉴定<sup>[8]</sup> 等。应用 RAPD 技术研究芸薹类蔬菜的遗传多样性有零星的报道<sup>[9]</sup>。本研究试图在前人的研究基础上, 采用更多更全面的代表种类 (品种), 估测类群间的遗传差异。

收稿日期: 1999-06-07

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目 (395064)

作者简介: 陈云鹏 (1972-), 男, 湖北黄梅县人, 硕士, 从事蔬菜遗传育种研究, 现在上海交通大学农学院植物科学系工作。

# 1 材料与方 法

## 1.1 实验材料

选取 33 份材料(表 1),包括普通白菜、南方白菜型油菜、大白菜、分蘖菜、茼蒿、塌菜、紫菜薹和薹菜等类群的代表品种。其中,大白菜包括南方类型三个品种(编号 17~19)和北方类型四个品种(编号 20~23)。每一份材料都经过 3~6 代自交纯化和鉴定筛选,1996 年 9 月 18 日露地播种于原浙江农业大学园艺系蔬菜实验基地,栽培管理条件同大田。

表 1 实验材料(品种)

Table 1 Cultivars in *Brassica campestris* L. used in the experiments

品种编号	品种名	所属类群	品种编号	品种名	所属类群
1	矮脚黄	A	18	杭州黄芽菜	C
2	大花叶腌菜	A	19	早皇白	C
3	早油冬	A	20	曲阳青麻叶	C
4	临安花叶	A	21	白帮河头	C
5	赣榆鸡冠菜	A	22	青核头	C
6	三月慢	A	23	天津青麻叶	C
7	如皋毛菜	D	24	马耳头	D
8	绿叶镶边	A	25	耐病(日本)	E
9	东台百合头	A	26	气死孩	E
10	亮白叶	A	27	小八叶	F
11	上海四月慢	A	28	黄心乌	F
12	雪克青	A	29	常州乌塌菜	F
13	常州短白梗	A	30	大股子	G
14	崇明菜籽	B	31	洪山菜薹	G
15	浠水白	B	32	徐州薹菜	H
16	泰县油菜	B	33	花叶薹菜	H
17	翻心白	C			

注: A—普通白菜; B—南方白菜型油菜; C—大白菜; D—分蘖菜; E—茼蒿; F—塌菜; G—紫菜苔; H—薹菜。

## 1.2 DNA 提取

1996 年 10 月 29 日和 1997 年 1 月 31 日各取样一次,分别为幼苗期和莲座期时幼嫩心叶。各品种随机选取健壮无病植株约 20 株,每株剪取 1~2 片幼嫩舒展的心叶,分品种混合后取样。按曹家树等的方法提取各试样的总基因组 DNA,测定其浓度后备用<sup>[9]</sup>。

## 1.3 AP-PCR

实验共选用 70 个十聚体寡核苷酸随机引物,依据扩增结果,按照清晰度、可重复性、多态

性三个原则,进行统计分析。扩增反应体积为 25 $\mu$  L,其中 10 $\times$  buffer 2.5 $\mu$  L, MgCl<sub>2</sub> 2 mmol/L, dNTP 200 $\mu$  mol/L, TaqDNA 聚合酶 1.2 U, 模板 DNA 50 ng,引物 24 ng, PCR 所需引物和试剂均购自上海 Sangon 公司。PE-2400 型 PCR 仪,反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 42 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 75 s, 45 个循环;最后在 72 $^{\circ}$ C 下延伸 7 min,反应产物在 4 $^{\circ}$ C 下保存。

PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上,90 V 稳压电泳 1.5 h,每个多态 DNA 片段视为一个分子标记,每两个样品间标记进行成对比较。所有材料在同一位点 RAPD 谱带存在时赋值 1,不存在时赋值 0。按照 Nei-Li (1979)公式  $S = 2N_{ab} / (N_a + N_b + 2N_{ab})$  计算出样品间的相似系数,输入计算机,运用 DPS (Data Processing System) 软件生成聚类图。

# 2 结果与分析

## 2.1 不同引物对芸薹类蔬菜的扩增效率

70 个引物的 PCR 扩增,共产生 353 条带,平均每个引物扩增出 9.5 条带。其中,单态带

表 2 芸薹类蔬菜基因组 DNA 37 个引物扩增效率

Table 2 The amplified efficiency of 37 primers in the vegetable genomic DNA of *Brassica campestris* L.

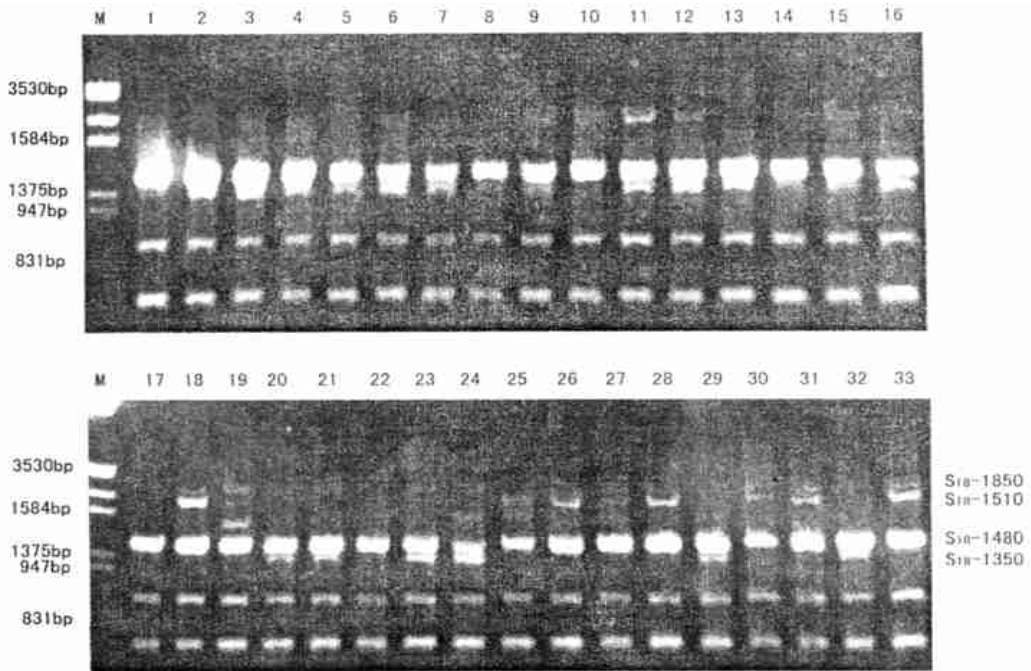
引物	单态带	多态带	总计	引物	单态带	多态带	总计
S10	1	8	9	S36	0	13	13
S15	0	8	8	S37	0	10	10
S16	1	7	8	S38	0	14	14
S17	3	7	10	S39	1	8	9
S18	2	4	6	S40	1	10	11
S19	0	9	9	S42	0	10	10
S20	0	9	9	S43	4	7	11
S21	2	4	6	S46	1	7	8
S22	4	5	9	S47	2	11	13
S23	6	6	12	S49	5	4	9
S24	4	6	10	S50	6	5	11
S25	5	5	10	S51	7	2	9
S26	2	7	9	S52	5	5	10
S27	2	6	8	S54	5	4	9
S28	0	7	7	S55	3	4	7
S31	2	6	8	S60	7	4	11
S33	4	6	10	S62	7	2	9
S34	0	12	12	S64	3	3	6
S35	0	12	12				

93 条,平均每个引物扩增出 2.5 条单态带,多态带 260 条,平均每个引物扩增出 7 条多态带. 70 个引物与 37 个引物单态带/多态带比值大致相同. 但是,后者扩增产率更高,能够检测出更多的 DNA 位点. 另外,此 37 个引物间的检测效率相差很大,有的可以区别所有的 33 个品种(全为多态带),有的只能揭示出某些品种的特征带(表 2). 引物扩增产物多数集中在 0.6~2.0 kb 之间,尤以 0.9~1.6 kb 的片段最多.

## 2.2 芸薹类蔬菜基因组 DNA 的遗传多态性

在不同引物的扩增产物中,仅个别亚种或品种在某一片段长度处有条带出现,可作为该亚种或品种的特殊标记. 引物 S18 揭示芜菁、大白菜、塌菜、紫菜苔和薹菜等亚种(或变种)的遗传差异(图 1). 日本芜菁品种耐病(编号 25)具

有一条扩增带 S<sub>18</sub>-1510,区别于中国芜菁品种气死孩(编号 26). 常州乌塌菜(编号 29)具有扩增带 S<sub>18</sub>-1350,区别于小八叶(编号 27)和黄心乌(编号 28)两个塌菜品种. 徐州薹菜(编号 32)具有扩增带 S<sub>18</sub>-1350,花叶薹菜(编号 33)具有扩增带 S<sub>18</sub>-1850,两个薹菜品种可以依据这两条带加以鉴别. 曲阳青麻叶(编号 20)、白帮河头(编号 21)、青核头(编号 22)和天津青麻叶(编号 23)等四个北方大白菜品种都有扩增带 S<sub>18</sub>-1350,而翻心白(编号 17)、杭州黄芽菜(编号 18)和早皇白(编号 19)等三个南方大白菜品种都没有这条带. 因此,也可以根据这条带将供试南方大白菜品种和北方大白菜品种区分开. 另外,早皇白(编号 19)具有一条特征带 S<sub>18</sub>-1480,区别于其它六个大白菜品种.



分子量标准物为(DNA/EcoR + HindIII). 加样孔序号 1~6, 8~13 为普通白菜, 14~16 为南方白菜型油菜, 17~19 为南方大白菜, 20~23 为北方大白菜, 7, 24 为分蘖菜, 25~26 为芜菁, 27~29 为塌菜, 30~31 为紫菜薹, 32~33 为薹菜品种. 根据带 S<sub>18</sub>-1480 可以将早皇白(19)与其它 6 个大白菜品种区分开. 四个北方大白菜品种(20~23)都有扩增带 S<sub>18</sub>-1350, 三个南方大白菜品种(17~19)缺少这条带. 供试品种之间显示了丰富的遗传多样性.

图 1 引物 S18 在芸薹类蔬菜基因组中扩增的 RAPD 谱带图

Fig. 1 The genomic DNA pattern of *Brassica campestris* L amplified with primer S18

## 2.3 大白菜品种的 RAPD 分子标记特征带

利用本实验筛选到的 S18, S21, S22, S31 和 S51 五个引物扩增出的 10 条特征带, 可将供

试的 7 个大白菜品种区分为四种类型(表 3), 即: 翻心白(17)和杭州黄芽菜(18); 曲阳青麻叶(20)和白帮河头(21); 青核头(22)和天津青麻

表 3 供试大白菜品种 RAPD分子标记特征带

Table 3 The characteristic bands of RAPD markers in the sampled cultivars of heading type Chinese cabbage

AP-PCR片段	供试大白菜品种						
	翻 心 白 (17)	杭 州 黄 芽 菜 (18)	早 皇 白 (19)	曲 阳 青 麻 叶 (20)	白 帮 河 头 (21)	青 核 头 (22)	天 津 青 麻 叶 (23)
S <sub>8</sub> -1350	0	0	0	1	1	1	1
S <sub>8</sub> -1480	0	0	1	0	0	0	0
S <sub>21</sub> -1340	0	1	1	0	0	1	1
S <sub>21</sub> -1400	0	0	0	1	0	0	1
S <sub>22</sub> -1350	0	1	0	0	0	0	0
S <sub>22</sub> -1620	0	1	1	0	0	0	0
S <sub>31</sub> -1410	0	0	1	1	1	0	1
S <sub>31</sub> -1490	1	1	1	1	1	0	1
S <sub>31</sub> -1880	1	1	1	0	0	0	0
S <sub>31</sub> -3550	0	0	0	1	1	1	1

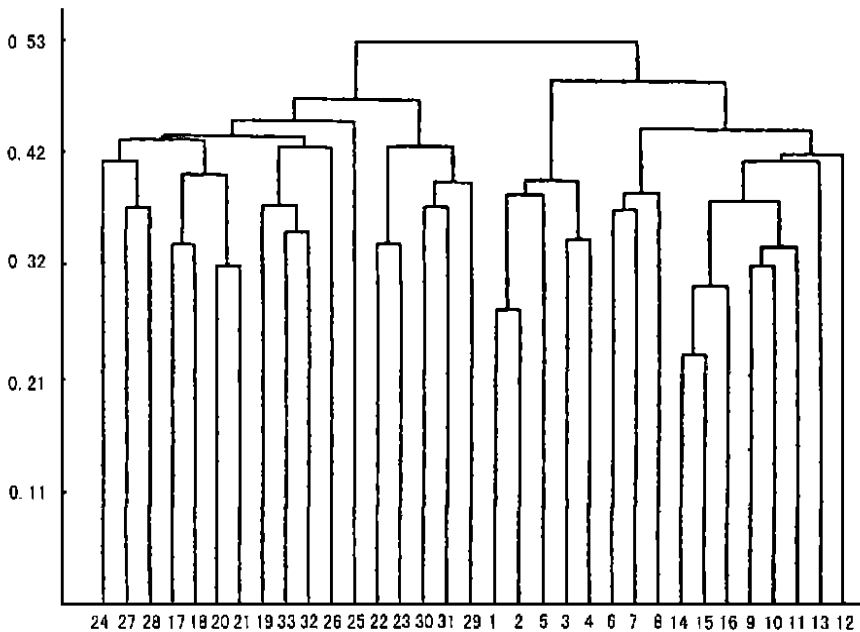
注:表中 1代表该品种稳定存在的 RAPD 标记,0代表该品种总不存在的 RAPD 标记. 供试大白菜品种编号同表 1.

叶(23);早皇白(19)具有一条其它 6 个大白菜品种都没有的特异带 S<sub>8</sub>-1480,并且其带型表

现为其它三类的中间类型. 因此,将早皇白(19)单独作为一类. 各类之间特征带差别明显,但是同类差异较小. 根据每个品种的这 10 条 RAPD 分子标记带,可以进行品种鉴别和分类. S<sub>8</sub>-1350 与 S<sub>31</sub>-3550 在 7 个大白菜品种的 RAPD 标记中有同源性,翻心白(17)、杭州黄芽菜(18)和早皇白(19)都缺少带 S<sub>8</sub>-1350 和 S<sub>31</sub>-3550,而曲阳青麻叶(20)、白帮河头(21)、青核头(22)和天津青麻叶(23)四个大白菜品种则都具有这两条带.

2.4 基于 RAPD 的亚种及品种间亲缘关系的聚类分析

选用 37 个引物采用 DPS(Data Processing System)数据处理系统进行最短距离法聚类,得到芸薹类蔬菜在不同聚类水平上并类的树状图(图 2). 参考前人有关研究结论,并结合实际田间观察结果,我们认为取阈值为 0.43 比较合理. 将 33 个品种分成 8 个类群(表 4).



图中横坐标数字表示样品编号(见表 1),纵坐标表示截距,最短距离法聚类. 1~ 6, 8~ 13 为普通白菜; 14~ 16 为南方白菜型油菜; 17~ 23 为大白菜; 7, 24 为分蘖菜; 25~ 26 为芜菁品种, 27~ 29 为塌菜品种, 30~ 31 为紫菜薹品种, 32~ 33 为薹菜品种.

图 2 根据 37 个引物 353 个 RAPD 标记构建的 33 个芸薹类蔬菜品种的聚类图

Fig. 2 The dendrogram of 33 vegetable cultivars in *Brassica campestris* L. based on 353 RAPD markers amplified with 37 primers

表 4 芸薹类蔬菜 33 个品种的 37 个引物 353 个 RAPD 片段的聚类结果

Table 4 The clustering result of *Brassica campestris* L. based on 353 RAPD markers amplified with 37 primers

类群	材料数目	材料名称
I	1	马耳头
II	5	翻心白,杭州黄芽菜,曲阳青麻叶*,白帮河头*,早皇白
III	2	青核头,天津青麻叶
IV	2	花叶薹菜,徐州薹菜
V	2	小八叶,黄心乌
VI	2	耐病,气死孩
VII	3	大股子,洪山菜薹,常州乌塌菜*
VIII	16	(矮脚黄,大花叶腌菜,赣榆鸡冠菜,早油冬,临安花叶),(三月慢,如皋毛菜,绿叶镶边),(崇明菜籽,浠水白,泰县油菜),(东台百合头,亮白叶,上海四月慢),(雪克青,常州短白梗)

注: \* 表示该品种归类结果与传统形态学分类不一致。

由图 2 可以看到, 33 个品种之间遗传距离变动幅度不大, 在 0.25~0.37 之间, 这表明芸薹类蔬菜各个类群之间的亲缘关系十分密切。崇明菜籽 (14) 和浠水白 (15) 之间的遗传距离最小 (0.25), 三月慢 (6) 和如皋毛菜 (7) 之间的遗传距离最大 (0.37)。我们在田间性状观察中证实, 崇明菜籽 (14) 和浠水白 (15) 每轮叶数 5~6 片, 叶形长卵圆, 叶色深绿, 叶面光滑有茸毛, 叶梗青色, 这些表型性状相同。所不同的是, 崇明菜籽 (14) 叶缘全缘, 而浠水白 (15) 叶缘锯齿状缺刻。另外, 前者叶梗半圆形, 后者叶梗扁平。三月慢 (6) 和如皋毛菜 (7) 相比, 除了叶柄都是青梗, 其余主要田间性状表型差异非常明显。

### 3 讨 论

#### 3.1 芸薹类蔬菜的遗传多样性检测效率

对原产于中国的芸薹属蔬菜进行了 RAPD 分析<sup>[10]</sup>。实验选取 5 个含 20 个碱基的随机引物, 获得 112 条特异带, 平均每个引物产生 20 条以上的 RAPD 带。我们采用 37 个引物产生的 353 个 RAPD 带, 可以检测出亚种、变种和品种之间的差异。每个引物平均产生 9.5 条带, 低于任建平等同类研究结果。Thomann 等<sup>[10]</sup>推测由总基因组 DNA 得到的 RAPD 片段中, 代表线粒体和叶绿体基因组差异的片段数很可能不超过 5%。根据这一推测, 本实验中所得到

的 353 条 RAPD 带中, 应至少有 335 条 RAPD 带来自核 DNA 的扩增。在 260 条 RAPD 多态带中, 大约有 247 条多态带反映了类群间的遗传差异。其中, 引物 S18, S21, S22, S31 和 S51 扩增出的 10 条 RAPD 带 (表 3) 可以作为一组 DNA 指纹, 清楚地反映出七个大白菜品种最终聚类格局。所以, 37 个引物检测出的信息量是非常丰富的。

#### 3.2 RAPD 用于芸薹类蔬菜分类的可行性

由表 4 可以看到, RAPD 聚类结果与传统形态学的分类结果基本一致。在第 VIII 组中, 13 个普通白菜品种和 3 个南方白菜型油菜品种聚类到一起, 其组内又可以分为五大类。在这五类中, 崇明菜籽、浠水白、泰县油菜为南方型油菜, 分化较早。其余四类大多是华东地区品种群。普通白菜和芜菁杂交后经过不同目的的人工选择, 形成了多种多样的栽培类型和品种。其变种内存在着叶翼下延的品种 (如绿叶镶边), 也有分蘖性强的品种 (东台百合头、如皋毛菜)。7 个大白菜品种在比较高的聚类水平上 (0.44) 与中国芜菁品种耐病 (25) 聚类水平更高 (0.46)。加茂 (1930) 认为日本芜菁可能来源于中国。由此看来, 中国芜菁在传播至日本的过程中, 在日本的生态环境下积累了一定的变异, 因此, 它的植物学性状表现明显不同于中国芜菁。从更高的聚类水平上看 (0.48), 四个北方大白菜品种都是聚类在芜菁和塌菜之间, 但在聚类水平 0.43 上, 四个北方大白菜品种聚为两类, 一类是曲阳青麻叶 (20) 和白帮河头 (21) 这两个北方品种与翻心白 (17)、杭州黄芽菜 (18) 以及早皇白 (19) 三个品种聚成一组, 另外一类是青核头 (22) 和天津青麻叶 (23) 聚成一组。

大股子 (30) 和洪山菜薹 (31) 这两个紫菜薹品种和常州乌塌菜 (29) 都是从白菜型油菜 (薹心菜) 演化而来, 两者分化都较早, 遗传关系较为亲密, 聚类水平比较低 (0.38)。中国白菜各个变种以芜菁为中心, 分别聚类在其两端。大白菜可能受芜菁和塌菜的遗传影响比较大, 因此, 它与芜菁和塌菜的聚类水平比较低。普通白菜受芜菁的影响相对来说较小, 因此, 它与紫菜薹、塌菜、分蘖菜和芜菁的聚类水平比较高。

常州乌塌菜 (29)叶面光滑,叶形扁圆,而小八叶 (27)和黄心乌 (28)叶面皱缩,圆或近圆形叶,另外,在叶色、叶柄形状、叶柄颜色上前者与后两者均存在着不同程度的差异.虽然,传统分类学依据其株型将三者归为塌菜一类,但这种植物学性状上的差异,如果是遗传差异的表现,可以通过 RAPD-PCR 技术高效率地检测出来.我们认为,塌菜具有地域性生态型特征,某些品种如常州乌塌菜 (29)与紫菜薹、分蘖菜等可能有着活跃的地域性基因交流,因此其遗传基础丰富,与小八叶 (27)和黄心乌 (28)难以聚为一类.这在育种上可以广泛地利用来进行种内、甚至种间的杂交.如皋毛菜 (7)掌状花叶、锯状缺刻,叶柄半圆形,马耳头 (24)叶片长披针形,皱缩内翻,叶柄圆形,两者也存在着显著差别,同样地在聚类图上得到反映,马耳头 (24)单独归为一类,而如皋毛菜 (7)则归入普通白菜一类.

由表 4 可知,芸薹类蔬菜基因组 DNA 遗传多样性与其植物学性状的多样性是紧密联系的,RAPD 分析印证了传统形态学分类框架的正确性,并对其作了更进一步的补充完善.由于蛋白质的表达受外界环境(包括人工选择和栽培措施)的影响,其相对表达程度在不同品种、不同地域环境下会有所不同.因此,根据主要植物学性状或主要农艺性状作出的分类,有时会掩盖品种间的遗传差异.这种差异在 DNA 水平上可能较大,但表现在农艺性状上却并不明显,因而部分品种的分类处理两种方法可能不同.采用 RAPD 分析可以避免人的主观性及外界环境的矫饰作用,揭示更为客观细微的遗传信息,对传统的形态学分类加以补充细化.理论上,采用的引物越多,其揭示的信息量越丰富,分类结果越详尽可靠.本实验采用 70 个引物完全能够揭示芸薹类蔬菜主要类群代表品种间的遗传差异,至于找到的 RAPD 分子标记特征带与植物学性状的对应关系以及特征带间的相关性、同源性问题,则有待于今后更深入的研究.

致谢:实验过程中得到浙江大学园艺系细胞与分子生物学实验室卢钢、张明等同志的热情帮助,在此深表感谢!

#### 参考文献:

- [1] Hu J G, Quries C F. Identification of broccoli and cauliflower cultivars with RAPD markers [J]. *Plant Cell Rep*, 1991, 10: 505-511.
- [2] Mailer R J, Scarth R, Fristensky B. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers [J]. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 697-704.
- [3] 詹才新,朱宝兰,杨秀美. RAPD 技术在金针菇菌株鉴别的应用 [J]. *华中农业大学学报*, 1995, 14(3): 253-257.
- [4] 裴颜龙,邹喻苹,尹 蓁,等. 矮牡丹与紫斑牡丹 RAPD 分析初报 [J]. *植物分类学报*, 1995, 33(4): 350-356.
- [5] Brauner S, Crawford D J, Stuessy T F. Ribosomal DNA and RAPD variation in the rare plant family Lactoridaceae [J]. *Amer J Bot*, 1992, 79: 1436-1439.
- [6] Mosseler A, Egger K N, Hughes G A. Low levels of genetic diversity in red pine confirmed by random amplified polymorphic DNA marker [J]. *Can J For Res*, 1992, 22: 1332-1337.
- [7] Koller B, Lehmann A, Medermott J M, Gessler C. Identification of apple cultivar using RAPD markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 901-904.
- [8] 李希臣,雷勃钧,卢翟华,等. 早熟大豆外源 DNA 导入的 RAPD 分子验证 [J]. *大豆科学*, 1994, 13(2): 152-156.
- [9] 曹家树,曹寿椿,易清明. 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.
- [10] Ren J P, James R, McFerson J R, et al. Identities and relationships among Chinese vegetable brassica as determined by random amplified polymorphic DNA markers [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1995, 120(3): 548-555.
- [11] Soltis P S, Soltis D E. Genetics variation in endemic and widespread plant species: examples from saxifragaceae and polystichum (Dryopteridaceae) [J]. *Aliso*, 1991, 13: 215-223.

(责任编辑 杜玲玲)