

芸薹种 (*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜遗传多样性的 RAPD 初步分析

陈云鹏¹ 曹家树² 缪颖³

¹ 上海农学院植物科学系, 上海 201101; ² 浙江大学园艺系, 杭州 310029;

³ 厦门大学生物学系, 厦门 361005)

摘要 本文对芸薹种 (*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜基因组 DNA 进行了 RAPD 初步分析, 并就 RAPD-PCR 反应条件的优化进行了探讨。结果表明: 各个亚种或变种的品种之间存在着丰富的遗传多样性。

关键词 芸薹类; 遗传多样性; RAPD

中图分类号 S634

A PRELIMINARY RAPD ANALYSIS OF THE GENETIC POLYMORPHISMS IN VEGETABLE CROPS OF *Brassica campestris* ($2n=20$)

Chen Yunpeng¹ Cao Jiashu² Miao Ying³

¹Dept. of Plant Science, Shanghai Agricultural College, Shanghai 201101; ²Dept. of Horticulture,

Zhejiang University, Hangzhou 310029; ³Dept. of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract In this paper some studies on the genetic polymorphisms in vegetable crops of *Brassica campestris* ($2n=20$) by RAPD were conducted, meanwhile some discussions about the modification of RAPD-PCR were given. The study results indicated there were abundant genetic polymorphisms among the cultivars in different subspecies and varieties.

Key words *Brassica campestris* ($2n=20$); Genetic polymorphisms; Random Amplified Polymorphic DNA

1990年, Williams等提出的随机扩增多态性DNA(Random amplified polymorphic DNA, RAPD)分子标记技术,为分析物种间的系谱关系、研究系统发育、理顺分类地位提供了全新的方法^[1]。1991年,Quirós等将RAPD技术首次成功应用于*Brassica*属系统研究,得到了A基因组所特有的分子标记^[9]。此后,RAPD技术广泛应用于大豆^[1]、葡萄^[2]、水稻^[3]、兰花^[7]等多种植物的遗传多样性分析上,效果理想。芸薹种(*Brassica campestris*, $2n=20$)蔬菜的分类

1999-04-02收稿;1999-05-12收到修改稿

一直是颇有争议的问题,国内植物学家和园艺学家观点截然不同。以周太炎(1987)为代表的植物学家倾向于将 $n=10$ 的蔬菜各类群划分为独立的种,园艺界则确认所有 $n=10$ 的蔬菜归属于同一个种 *Brassica campestris*,但对于芸薹种内亚种、变种具体划分上有不同意见。关于中国白菜类的分类问题,李家文、曹寿椿两人作了大量工作。李家文将大白菜划为四个变种,曹寿椿将白菜划为六个变种的处理成为代表性的意见,为多数学者所赞同。但两人在对个别变种的处理上仍有不尽令人满意的地方。目前,芸薹种 (*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜的分类争议主要表现在:(1)白菜、大白菜是否可以并为一个亚种或变种;(2)日本水菜分类地位及其与分蘖菜之间的演化关系,还没有人做系统研究;(3)白菜亚种以下变种、亚变种的划分还有不同意见^[4,6]。本研究旨在应用这一技术对芸薹种 (*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜进行遗传多样性分析,以揭示品种及类群之间的亲缘关系,并寻找各类群的 DNA 特征谱带,为杂交育种中进行血缘遗传控制与分子标记辅助选择、杂种优势预测与亲本选配提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料

实验选取 17 份材料,包括 7 份大白菜(*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* Olsson) 品种、1 份分蘖菜 (*B.c.L.ssp.chinensis* var. *multiceps* Hort.) 品种、2 份芜菁 (*B.c.L.ssp.rapifera* Matzg) 品种、3 份塌菜 (*B.c.L.ssp.chinensis* var. *rosularis* Tsen et Lee) 品种、2 份紫菜苔 (*B.c.L.ssp.chinensis* var. *tsai-tai* Hort.) 品种和 2 份薹菜 (*B.c.L.ssp.chinensis* var. *tai-tai* Hort.) 品种。这些材料都经过多代自交纯化,种子保存在浙江大学园艺系细胞与分子生物学实验室。

1.2 基因组 DNA 的提取

DNA 的提取按照曹家树等(1995)发表的方法进行^[5]。各样品编号同电泳泳道号,注明在括号中。

1.3 基因组 DNA 的检测

1.3.1 浓度测定 吸取约 800 μ l TE(pH8.0)溶液作空白对照校零点,然后取各样品 DNA 提取液 800 μ l 在紫外分光光度计(Shimadzu UV-210A,日本)上测定 OD₂₆₀ 和 OD₂₈₀ 值。

1.3.2 纯度检测 本实验共用 3 种方法检测模板 DNA 提取质量。

①根据 230nm、260nm、280nm 和 325nm 的吸收值,可以估计核酸的纯度。

②对所有 DNA 样品均进行了 225nm~330nm 宽幅扫描(Shimadzu UV-210A,日本)。

③取 10 μ l 模板 DNA 原液,制备 0.7%琼脂糖凝胶,在中号水平电泳槽(DYY-III33A)上 45V,稳压电泳 2hr,紫外灯下观察照相。

1.4 RAPD-PCR

1.4.1 引物 购自上海 Sangon 公司,为十聚体寡核苷酸随机引物。本实验共选用 70 种引物。

1.4.2 PCR 体系 PCR 所需试剂均购自上海 Sangon 公司。反应体系如表 1 所示。

1.4.3 PCR 扩增程序 PCR 在美国 PERKIN-ELMER 公司生产的 PE-2400 型基因扩增

仪上进行, 反应参数为: 94℃预变性 4min; 94℃变性 15s, 42℃复性 30s, 72℃延伸 75s, 45个循环; 最后在 72℃下延伸 7min, 反应产物在 4℃下保存。

2 结果与分析

2.1 DNA 的浓度与纯度

徐州薹菜 DNA 产率很高, 单位鲜重的 DNA 产率为 402 $\mu\text{g/g}$, 其它供试材料的 DNA 产率在 20~160 $\mu\text{g/g}$ 之间。①芜菁耐病(日本品种, 编号 9)

OD₂₆₀/OD₂₈₀比值为 1.25 偏低, 其余 16 份 DNA 材料均在 1.8~2.0 之间, 表明 DNA 纯度较高。②宽幅扫描结果表明所有供试样品呈典型的 DNA 光吸收曲线。③凝胶电泳检测表明 DNA 大小在 20Kb 以上, 结构完整, 带型整齐一致, 基本上无降解。我们事先采用 S200 引物对所有样品进行了 RAPD-PCR 初步分析, 结果扩增带型明晰, 多态性丰富。样品中存在少量的蛋白质不会影响 PCR 中 DNA 聚合酶的活性, 在电泳时会滞留在加样孔中, 对于较小的 DNA 扩增片段(通常在 2~3Kb)不会产生阻滞。3 种纯度检测方法相比较, 以琼脂糖凝胶电泳检测效果最好, 紫外分光比色法其次, 宽幅扫描效果相对较差。

2.2 芸薹种(*Brassica campestris*, 2n =20)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, 这种差异条带可作为该亚种或品种的特殊标记。引物 S₁₈扩增的结果显示在芜菁、大白菜、塌菜、紫菜苔和薹菜等亚种(或变种)的各品种之间, 存在着不同程度的遗传差异(图 1)。日本芜菁品种耐病(编号 9)具有一条扩增带 S₁₈-1510, 区别于中国芜菁品种气死孩(编号 10)。常州乌塌菜(编号 13)具有扩增带 S₁₈-1350, 区别于小八叶(编号 11)和黄心乌(编号 12)这两个塌菜品种。徐州薹菜(编号 16)具有扩增带 S₁₈-1350, 花叶薹菜(编号 17)具有扩增带 S₁₈-1850, 2 个薹菜品种可以依据这两条带加以鉴别。曲阳青麻叶(编号 4)、白帮河头(编号 5)、青核头(编号 6)和天津青麻叶(编号 7)等 4 个北方大白菜品种都有扩增带 S₁₈-1350, 而翻心白(编号 1)、杭州黄芽菜(编号 2)和早皇白(编号 3)等 3 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本实验中的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 3)具有一条特征带 S₁₈-1480, 特异于其他 6 个大白菜品种。引物 S₁₈是从 70 个引物中筛选出的, 扩增效率很高, 扩增结果具有可重复性, 检测结果可靠。

3 讨论

3.1 RAPD-PCR 条件的优化

漆小泉等(1995)对大白菜和紫菜苔自交系染色体组 DNA 进行了 RAPD 分析, 并就适

表 1 PCR 体系(总体积 25 μL)

Table 1 PCR components (the final volume per tube 25 μL)

	加样体积(μL)	反应终浓度
ddH ₂ O(无菌)	10.83	
MgCl ₂ (2mM)	3.33	2.0mM
dNTPs(2mM)	2.5	0.2mM
10 \times PCR buffer	2.5	1 \times PCR buffer
Taq Polymerase (5U/ μL)	0.24	1.2U/25 μL
Primer (15ng/ μL)	1.6	24ng/25 μL
TemplateDNA (12.5ng/ μL)	4.0	50ng/25 μL

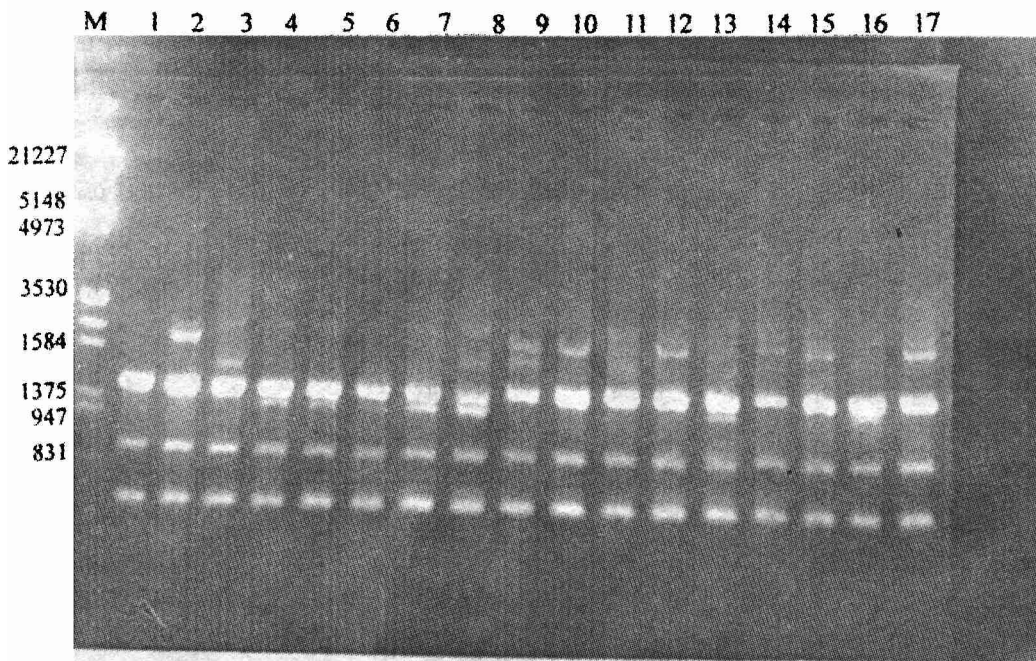


图 1 引物 S18 在芸薹种 (*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜中扩增的 RAPD 谱带图

Fig. 1 RAPD products from different vegetable cultivars of *Brassica campestris* ($2n=20$) using primer S18

注：分子量标准物为 λ DNA / *EcoR* I + *Hind* III 加样孔 1~3 为南方大白菜，4~7 为北方大白菜，8 为分蘖菜，9~10 为芜菁，11~13 为塌菜，14~15 为紫菜苔，16~17 为薹菜。根据带 S₁₈-1480 可以将早皇白 (3) 与其他 6 个大白菜品种区分开。3 个南方大白菜品种缺少扩增带 S₁₈-1350，4 个北方大白菜品种则都有 S₁₈-1350 这条带。

宜的扩增条件进行了探讨。他认为采用 35℃ 的复性温度比较合适，过高或过低的复性温度都不利于 DNA 片段的扩增^[8]。我们采用 37℃ 的复性温度对芸薹类 ($2n=20$) 蔬菜基因组 DNA 进行的多次扩增实验表明，在 37℃ 时扩增出较多的条带，但基本带和多态带产量均较低，多为弱带，无法进行统计分析。将复性温度提高到 42℃，可以有效地防止非特异性扩增，提高多态带的产量，并且带型稳定。本实验证明对于整个芸薹类 ($2n=20$) 蔬菜来说，42℃ 复性温度更合适。

模板 DNA 浓度直接影响扩增的重复性和特异性。过量的模板导致错配率增加，从而非特异性增大。模板量太少，扩增高分子量、低拷贝数的 PCR 产物，则重复性不佳。而且，常常造成 PCR 产物的量不足以检测。漆小泉等 (1995) 运用 15ng 的基因组 DNA，没能检测出扩增的 DNA 片段。增加到 50ng，出现效果较好的扩增带^[8]。本实验发现在 50~100ng 之间，模板 DNA 都能扩增，但效果也以 50ng 为好。

Mg²⁺ 浓度对扩增结果影响也较大。陈洪等 (1995) 认为，使用较高浓度的 Mg²⁺ 扩增体系，虽然能扩增较多的片段，但会增加 RAPD 多态性扩增的不稳定程度，往往会给多态性片段的识别造成不便^[3]。我们发现，若完全不加入 Mg²⁺，则不能扩增。或者，即使个别品种能够扩增出 1~2 条带，也是弱带。原因可能是 10× PCR 缓冲液中本身含有少量的 Mg²⁺，

可以部分激活 Taq DNA 聚合酶的活性。若提高 Mg^{2+} 浓度, 则产率明显增加。本实验表明, 采用 $2mmol/L$ 的 Mg^{2+} 浓度比较合适。

必须强调的是, RAPD-PCR 操作应一次性完成, 中途不能停顿。我们在实验过程中发现, PCR 反应体系配制好后, 若置于室温或 $4^{\circ}C$ 下过久, 扩增效果就不好。表现为条带模糊不清, 基本带都很弱。有的样品甚至完全不能扩增。所以, 在 RAPD-PCR 操作中, 除了要求加样精确迅速外, 更强调实验的一次性完成。

3.2 RAPD-PCR 技术用于芸薹种(*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜遗传多样性研究的可行性

RAPD-PCR 技术用于芸薹种(*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜遗传多样性的研究还是近几年的事情。Quirios 等对芸薹属 *Brassica* 的研究成为这一技术在系统学研究中成功的范例^[9]。此后, RAPD-PCR 技术作为研究植物遗传多样性的一种新方法, 在生物种内及种间都进行了尝试, Ren J P 等(1995)报道了有关芸薹种(*Brassica campestris*, $2n=20$) 内的 RAPD 分析及其遗传多样性研究^[10]。我们研究证实不同自交系间扩增的 DNA 谱带差异显著, 而从同一自交系的不同单株抽提的染色体组 DNA 扩增较一致的 DNA 谱带。这表明 RAPD 也可以象 RFLP 一样, 用于芸薹种(*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜基因组 DNA 遗传多样性的分析。

3.3 基于 RAPD 标记的芸薹种(*Brassica campestris*, $2n=20$) 蔬菜亲缘关系的分析

我们在田间观察中发现南方大白菜叶面严重皱缩, 而北方大白菜叶面相对光滑, 皱缩不很明显。本实验结果证明, 南方大白菜与北方大白菜存在着这种遗传上的差异。由于栽培技术的改进和长期的人工选育, 大白菜对环境的适应性大大增强, 某些品种的地域性已经不明显, 南北都能够种植, 这构成了南方大白菜和北方大白菜之间的过渡类型, 如早皇白(编号 3)。两个紫菜薹品种(编号 14、15)和常州乌塌菜(编号 13)都是从白菜型油菜(薹心菜)演化而来, 两者分化都较早, 亲缘关系较为亲密。至于检测出的特征带所代表的植物学性状以及它与非特征带之间的相关性问题的研究还有待于进一步研究。

致谢: 本研究得到了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, 在此一并致谢!

参 考 文 献

- 1 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. 大豆科学, 1994, 13(2): 152~156
- 2 张立平. 葡萄属植物基因组 DNA 的多态性分析及其演化分类研究(博士学位论文). 浙江农业大学. 1996
- 3 陈洪, 朱立煌, 徐吉臣, 等. RAPD 标记构建水稻分子连锁图. 植物学报. 1995, 37(9): 677~684
- 4 林维申, 中国白菜分类的探讨. 园艺学报, 1980, 7(2): 21~28
- 5 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. 园艺学报, 1995, 22(1): 47~52

(下转第 110 页)

50TCID₅₀、25TCID₅₀0 μ l/孔检测结果一致,为节省病毒抗原,我们确定 50TCID₅₀50 μ l/孔为最佳接种浓度,且这两种方法不需抗原的提纯(很多国产的 ELISA 试剂盒的非特异性较高原因之一可能与抗原提纯不当有关),因此我们选用 50TCID₅₀50 μ l/孔作为正式试验的病毒接种浓度,这对规范检测方法具有重要的参考价值。

参 考 文 献

- 1 Benfield.D.A., Nelson.E., Collins.J.E et al.Characterization of swine infertility and respiratory syndrome(SIRS)virus (isolate ATCC VR-2332).J.Vet.Diagn. Invest. 1992, 4 :127 ~ 133
- 2 郭宝清,陈章水,刘文兴,等.从疑似 PRRS 流产胎儿分离猪生殖和呼吸道综合征病毒(PRRSV)的研究.中国畜禽传染病,1996,(2):1~5
- 3 严亚贤,孙建和,吴祖立,等.仔猪生殖和呼吸道综合征的诊断与防治初探.中国畜禽传染病,1998,20(增刊):218~219
- 4 Yoon.I.J., Joo.H.S., Christianson.W.T, et al.An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera.J.Vet. Diage. Invest. 1992, 4 :144~147
- 5 孙颖杰,孙延峰,潘凤城,等.猪生殖和呼吸道综合征间接免疫荧光抗体试验诊断技术的研究.中国兽医科技,1997,27(3):3~4
- 6 王刚,张鹤晓,甘孟侯,等.IPM A 检测猪生殖和呼吸道综合征病毒抗体的研究.中国兽医杂志,1996,22(12):3~5
- 7 Cho H J, Entz S C, Magar R et al. Performance of ELISA antigens prepared from 8 isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with homologous and heterologous antisera. J. V et. Res. 1997, 61(4) :299~304

(上接第 89 页)

- 6 曹家树,曹寿椿,缪颖,等.中国白菜各类群的分支分析和演化关系研究.园艺学报,1997,24(1):35~42
- 7 梁红健,刘敏,钟志宇,等.中国部分兰花品种 RAPD 分析.园艺学报,1996,23(4):365~370
- 8 漆小泉,朱德蔚,沈镒,等.大白菜和紫菜苔自交系染色体组 DNA 的 RAPD 分析.园艺学报,1995,22(3):256~262
- 9 Quirios C F, Hu J, This P, Chevre A M, Delsny M. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by PCR in Brassica. Theor. Appl. Genet. 1991, 82(5) :627~632
- 10 Ren J P, James R, McFerison J R, Rugang Li, Stephen Kresovich, Warren F, Lamboy. Identities and relationships among Chinese vegetable brassica as determined by random amplified polymorphic DNA markers. J. AMER. SOC. HORT. SCI. 1995, 120(3) :548~555
- 11 Williams J G K, Kubelik A R, Kenneth J L, Rafalski J A, Tingey S V. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research. 1990 18(22) :6531~6535