

利用 RAPD 技术鉴定大白菜主栽品种 及品种间遗传多样性分析

宋顺华, 郑晓鹰

(北京市蔬菜研究中心, 北京 100089)

摘要: 采用随机引物扩增多态 DNA (RAPD) 技术分析了 21 个大白菜主栽品种。用 13 个引物共扩增出 87 个清晰可重复的 DNA 片段, 其中 39 条带具有多态性, 多态性条带的频率为 44.8%。OPE01 是多态性频率最高的引物, 它可区分 15 个大白菜品种, 再与引物 OPH03 和 OPH12 配合, 即可将 21 个大白菜品种区别开。

关键词: 大白菜; 主栽品种; RAPD 标记

中图分类号: S634.103.7 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2000)03-0001-05

生化标记的研究和应用作为一种有效的手段, 已广泛地应用在许多蔬菜杂交种的品种纯度鉴定和品种鉴别上, 如用同功酶和蛋白质电泳鉴定大白菜^[1~3]、甜椒^[4]、甘蓝^[2]等杂交品种的纯度; 用同功酶和种子水溶蛋白图谱的多样性位点分析大白菜品种的多样性, 并鉴别其品种^[5]。随着生化技术的发展, DNA 分析技术与电泳技术比较, 能更有效地鉴别不同的基因型, 在园艺品种分类鉴定、种子纯度测定等方面已越来越成为更理想的方法, 其中, RAPD 技术由于具备成本低, 分析速度快, 只需少量的 DNA, 就能产生丰富的 DNA 多态性, 操作简便等优点而得到广泛的应用。本研究选取了 21 个大白菜主栽杂交品种, 其目的是采用 RAPD 分析技术, 进行品种鉴别, 建立一套高效、准确的室内鉴定技术, 为品种的真伪鉴别提供一种可靠的方法。

1 材料和方法

1.1 材料

21 个全国大白菜主栽杂交品种的种子, 均由北京蔬菜研究中心种检室收集(表 1)。筛选引物的材料为白杨, P₈-41 号, 379 号。每品种选取大约 100 粒高纯度的种子, 播于试验盒内, 放置在 25℃ 的恒温培养箱中培养 5 d, 随机采集一定量的种苗用于提取 DNA。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取方法 采用 CTAB 法提取 DNA, 然后用分光光度计在 260 nm 的波长下测量 DNA 的含量。DNA 样品在 -20℃ 的冰柜中保存。

1.2.2 引物的筛选 采用 OPERON 公司的随机引物, 从 OPE1-20, OPF1-20, OPG1-20,

收稿日期: 1999-05-25

作者简介: 宋顺华(1963-), 女, 副研究员, 大学本科, 主要从事蔬菜种子质量检验方面的研究工作。

OPH1– 20 共 80 个引物中筛选适合本研究的最佳引物。

表 1 试验材料及编号

编号	品 种	品 种 来 源	编号	品 种	品 种 来 源
A	北京 55 号	北京蔬菜中心大白菜组	L	鲁白八号	山东莱州西电镇种子子公司
B	北京 56 号	北京蔬菜中心大白菜组	M	山东二号	山东农科院蔬菜研究所
C	北京 60 号	北京蔬菜中心大白菜组	N	山东四号	山东农科院蔬菜研究所
D	北京 65 号	北京蔬菜中心大白菜组	O	山东六号	山东农科院蔬菜研究所
E	新一号	北京蔬菜中心大白菜组	P	北京 61 号	北京蔬菜中心大白菜组
F	新二号	北京蔬菜中心大白菜组	Q	北京 106 号	北京蔬菜中心大白菜组
G	新三号	北京蔬菜中心大白菜组	R	北京 75 号	北京蔬菜中心大白菜组
H	早熟五号	浙江农科院园艺研究所	S	北京 80 号	北京蔬菜中心大白菜组
I	晋菜三号	山西农科院蔬菜研究所	T	北京 66 号	北京蔬菜中心大白菜组
J	鲁白二号	山东农科院蔬菜研究所	U	北京 67 号	北京蔬菜中心大白菜组
K	鲁白六号	山东农科院蔬菜研究所			

1. 2. 3 RAPD 扩增反应 反应体系: 扩增反应总体积为 25 μL, 其中 Tris– HCl(pH8. 0) 的终浓度为 10 mol/ L, MgCl 为 3 mol/ L, dNDP 为 0. 2 mol/ L, 引物为 0. 3 mol/ L, 模板为 20 ng, Tag DNA 聚合酶为 1. 2 个单位(购自泰克金生物制品公司) 。

反应程序: 扩增反应在 Idaho 1605 气浴式毛细管 PCR 扩增仪上进行。94 ℃变性 1 min, 36 ℃复性 10 s, 72 ℃延伸 20 s, 2 个循环; 94 ℃变性 10 s, 36 ℃复性 15 s, 72 ℃延伸 70 s, 38 个循环。最后在 72 ℃下保持 5 min, 立即将扩增产物放入 4 ℃下至少 4 min。

扩增产物的检测: 将扩增产物与 4 μL 加样缓冲液(40% 蔗糖, 0. 25% 溴酚兰) 混匀, 点入含 0. 5 μg/ mL 溴化乙锭的 1. 4% 琼脂糖凝胶中, 使用 0. 5×TBE 缓冲液, 在 60V 电压下电泳 3 ~ 4 h, 停止电泳后取出凝胶, 在紫外光下观察并照相。

扩增 DNA 条带的命名: 不同引物扩增出的 DNA 条带, 按其分子量的大小进行命名, 例如 OPF12– 800 表示引物 OPF12 扩增出的长度约为 800 bp 大小的 DNA 片段。

1. 2. 4 结果的观察 用 λDNA/Hind III+ EcoRI 双酶切 DNA 标准分子量作对照, 比较反应条带(可重复的条带) 在胶上的对应位置, 出现清晰可见的带记作“1”, 无条带出现或太弱记作“0”, 得到原始数据表, 以此来判断结果。

2 结果与分析

2. 1 PCR 扩增条件的优化

参照邹喻苹等的反应程序及反应体系, 通过反复试验比较, 认为 25 μL 反应体积的扩增结果比较稳定, 10 s 的变性时间、36 ℃退火温度比较适宜于 25 μL 以上的反应体积, Mg 离子浓度不宜太低, 扩增效果最好的浓度为 3 mol/ L, 模板 DNA 用量以 10~ 20 ng 较合适, 太高时, 有可能含有更多的杂质而影响 PCR 扩增反应结果。

2. 2 引物筛选结果

从大白菜种质资源中挑选出白杨(耐热)、P₈(不耐热)、41 号(早熟)、379 号(晚熟) 4 个性

状差异较大的品系筛选引物。在筛选引物的过程中发现, 白杨与 P₈ 之间的差异较小, 而 41 号与 379 号之间的差异比较大, 最后选取扩增带型在 4 个材料之间均有差异和在 41 号和 379 号之间有差异的引物作为扩增试验材料, 从而选出了 31 个有多态性的引物, 其多态百分率为 38. 8%, 其中 13 个引物扩增效果好, 用于结果的统计分析(表 2)。

表 2 13 个随机引物扩增带统计结果

引物	总条带数	具多态性条带数	多态性频率(%)	引物序列(5' - 3')
OPE01	11	10	90. 9	CCCAAGGTCC
OPE12	8	1	12. 5	TTATCGCCC
OPE17	9	3	33. 3	CTACTGCCGT
OPE20	5	1	20. 0	AACGGTGACC
OPF07	8	5	62. 5	CCGATATCCC
OPF12	4	2	50. 0	ACGGTACCAG
OPF16	6	1	16. 7	GGAGTACTGG
OPF20	4	1	25. 0	GGTCTAGAGG
OPG04	3	1	33. 3	AGCGTGTCTG
OPG12	4	2	50. 0	CAGCTCACGA
OPG15	11	5	45. 5	ACTGGGACTC
OPH03	6	4	66. 7	AGACGTCCAC
OPH12	8	3	37. 5	ACGCGCATGT
合 计	87	39	44. 8	

2. 3 大白菜品种的 RAPD 扩增结果

按照以上所建立的反应体系和扩增条件, 用 13 个引物分别扩增 21 个大白菜品种, 结果共产生 87 条带, 平均每个引物产生 7 条带, 最多产生 11 条带(OPE01 和 OPG15), 最少为 3 条带(OPG04), 其中 39 条带具有多态性, 48 条带在所有品种间是一致的, 多态性频率为 44. 8%。扩增出的 DNA 片断大小一般为 450~ 2 800 bp。引物 OPE01 的多态性频率最高, 达 90. 1%, 引物 OPE12 产生 8 条扩增带, 只有 1 条带具有多态性, 多态性频率最低, 仅为 12. 5%(表 2)。引物 OPF12 和 OPE01 扩增出的带型如图 1 所示。

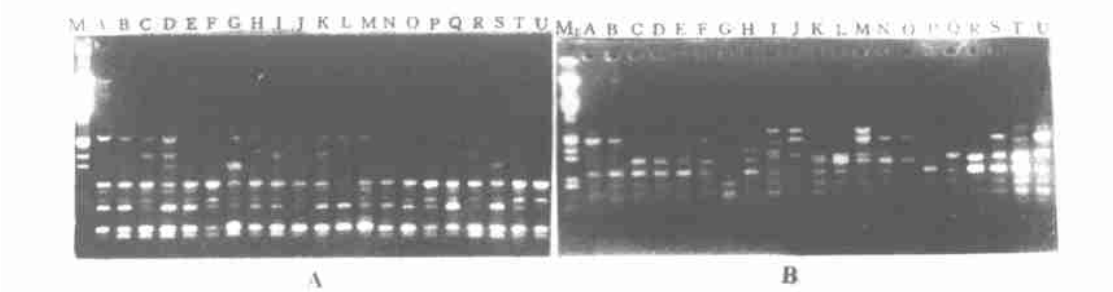


图 1 引物 OPF12(A) 和 OPE01(B) 的扩增带型

大白菜是原产于我国的蔬菜, RAPD 分析结果表明, 其丰富的种质资源可提供广泛的育种试材, 因而使得大白菜品种具有丰富的遗传多样性。

2. 4 品种的特异性条带及鉴定

品种特有的遗传标记可作为重要的分子性状用于作物品种鉴定。本试验在 13 个引物中, 大多数是产生几种类型, 可将大白菜品种分成几组或几个类型。不同品种独有的 RAPD 标记较少, 本试验只有 OPE01- 1600 为早熟 5 号独有的标记。另外还有 4 个标记为某个品种特异性缺少, 而其他品种共同存在, 即北京 60 号缺少 OPH03- 1650, 北京 65 号缺少 OPH12- 1375, 北京 66 号缺少 OPF07- 600, 北京 80 号缺少 OPF07- 600。引物 OPE01 是产生条带最多、多态性频率最高的引物, 比较各品种在其中条带的差异, 它能从 21 个品种中区别出 15 个品种, 再与引物 OPH03 和 OPH12 配合, 3 个引物即可将这些大白菜品种区别开(表 3)。

表 3 3 个引物具有多态性的 RAPD 标记

标 记 名 称	品 种																				
	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U
OPE01- 2800	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
OPE01- 2500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01- 1900	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1
OPE01- 1800	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
OPE01- 1600	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
OPE01- 1500	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
OPE01- 1380	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1
OPE01- 1300	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0
OPE01- 1050	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1
OPE01- 850	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
OPH03- 1750	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	1	0
OPH03- 1650	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPH03- 650	0	0	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPH03- 500	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
OPH12- 1375	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
OPH12- 900	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	1
OPH12- 450	1	0	1	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0

注:“0”表示缺少此标记或此标记太弱;“1”表示出现此标记。

用同功酶电泳检测技术鉴定蔬菜 F₁ 杂交种纯度以及与双亲之间的遗传关系对大多数品种比较有效, 由于蛋白质只是遗传基因的表达形式, 因此同功酶检测技术与种子的活力及种苗的苗龄密切相关, 而且对鉴别不同品种之间的差别还有一定的局限性。理论上, RAPD 分析能检测出任何一个变异, 在进行品种鉴别和纯度分析等研究时, 其效率及准确性可以弥补同功酶分析的不足。

总之, 通过对 21 个大白菜品种的 RAPD 分析, 建立了可鉴别本研究所用试材的 RAPD 图谱, 为利用 DNA 指纹鉴别大白菜品种打下了一定的基础, 也进一步说明了 RAPD 作为遗传标记的可行性, 以及在品种鉴定上的高效性和可靠性, 对新品种的登记和利用起到了重要作用。

参考文献:

- [1] 郑晓鹰, 刘 岩. 用过氧化物酶及酯酶同工酶鉴定大白菜杂交种纯度[J]. 园艺学报, 1994, 21(1): 59–64.
- [2] 漆小泉, 赵建春, 沈 颖. 甘蓝与大白菜一代杂种及双亲幼苗两种同工酶分析[J]. 中国蔬菜, 1993, (4): 6– 10.
- [3] Chen B Y, Henecn W K. Genetics of isozyme loci in *Brassica campestris* L and in the progeny of a trigonemic hybrid between *B Napus* L and *B Campestris* L[J]. *Genome*, 1989, 433– 440.
- [4] 郑晓鹰, 黄为平. 同工酶和蛋白电泳技术检测甜椒种子杂交种纯度的研究[J]. 华北农学报, 1996, 11(4): 119– 122.
- [5] 郑晓鹰, 李 丽, 李秀清. 大白菜品种同工酶及水溶蛋白的遗传多样性分析[J]. 园艺学报, 1997, 24(3): 244– 248.

Identification of Main Chinese Cabbage Cultivars with Random Amplified Polymorphic DNA Markers

SONG Shun hua, ZHENG Xiao ying

(Beijing Vegetable Research Centre, Beijing 100089, China)

Abstract: Twenty-one Chinese cabbage cultivars were analyzed with Random amplified polymorphic DNA(RAPD) . Using 13 arbitrary 10-mer primers, we scored a total of 87 clear and repeatable different fragments for their presence/ absence. 39 bands (44. 8%) were polymorphic. Primer OPE-01 had the highest ratio of polymorphic, with which 15 Chinese cabbage cultivars could be distinguished. Primer OPE-01 combined with primer OPH-03 and primer OPH-12 could distinguish all of the Chinese cabbage cultivars.

Key words: Chinese cabbage; Main cultivars; RAPD markers