

白菜类蔬菜种质资源亲缘关系的 RAPD 分析

林建丽^{1,2}, 朱正歌², 王建成³, 高建伟¹

(1. 山东省农业科学院 蔬菜研究所, 国家蔬菜改良中心, 山东分中心/ 山东省设施蔬菜生物学

重点实验室, 山东 济南 250100; 2. 河北师范大学 生命科学学院, 河北 石家庄 050016;

3. 山东省农业科学院 作物研究所, 山东 济南 250100)

摘要: 利用 200 个随机引物对 21 份白菜类蔬菜种质资源材料的基因组 DNA 进行了扩增, 研究了它们的亲缘关系。结果表明, 有 22 个随机引物可得到稳定的 RAPD 谱带, 扩增带总数为 135 条, 其中多态性带为 125 条, 多态性比例为 92.6%。系统聚类分析结果显示, 在遗传距离(D) = 0.25 处, 可将供试材料分为 2 类 10 组, 其中第 1 类包括 5 个甘蓝品种, 另外还包括芜菁; 而第 2 类包括白菜和芥菜 2 个亚类。这表明芜菁和白菜的亲缘关系较远。芜菁和散白菜的杂交后代与芜菁和其他白菜的杂交后代形态相似, 不能从形态学上为李家文的“杂交起源”假说提供佐证。推测白菜可能起源于野生小白菜的原始类型, 在向北方传播的过程中相互杂交, 经过长期的自然环境选择, 优胜劣汰逐渐演化才终于出现了结球结实的大白菜。

关键词: 白菜类蔬菜; RAPD; 种质资源; 聚类分析

中图分类号: S634.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)增刊-0183-07

Relative Analysis of Cabbage Germplasm Resources by RAPD

LIN Jian-li^{1,2}, ZHU Zheng-ge², WANG Jian-cheng³, GAO Jian-wei¹

(1. Institute of Vegetable Research, Shandong Academy of Agriculture Sciences, Shandong Branch of National Vegetable Improvement Center, Shandong Key Laboratory of Green Vegetable Biology, Jinan 250100, China;

2. College of Life Sciences, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China;

3. Institute of Crop Researches, Shandong Academy of Agriculture Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: The relationship of 21 accessions of cabbage vegetable was analyzed by RAPD (randomly amplified polymorphic DNA) with 200 random primers. The results showed that 22 primers produced amplified products, of which 135 bands were distinct and 125 were polymorphic. The percentage of polymorphic bands was 92.6%. All accessions were clustered into 2 groups and 10 subgroups at the genetic distance of 0.25 based on the RAPD data. Five cabbage varieties and Turnip were clustered into the first group. The second group included two subgroups composed of cabbage and mustard respectively. This indicated that the relationship of turnip and cabbage was distant. The morphologic characteristics of the hybrid offspring between turnip and the loose-leaved Chinese cabbage were similar to that between turnip and other Chinese cabbage. So it did not confirm Li Jiawen's "hybridization origin" hypothesis from the morphologic evidence. We speculated that Chinese cabbage originated from the wild types of non-heading cabbage. That is, in the process of spreading from the south to the north of China, different types of non-heading cabbage hybrid each other, and, after long term natural selection, the strong-balled Chinese cabbage arose.

Key words: Cabbage vegetable; RAPD; Germplasm resources; Clustering analysis

白菜类蔬菜在植物学分类上属于十字花科 (*Crucifera*) 芸薹属 (*Brassica*) 植物, 包括白菜 (*B. campestris* L.)、甘蓝 (*B. oleracea* L.)、芥菜 (*B. juncea* Coss) 3 个不同种。这 3 个种的基本染色体组分别是

收稿日期: 2008-9-17

基金项目: 国家科技基础条件平台建设项目 (2005DKA21001-38); 山东省农业科学院高技术自主创新基金 (2007YCX003)

作者简介: 林建丽 (1981-), 女, 河北邯郸人, 硕士, 主要从事大白菜方面的研究。

通讯作者: 高建伟 (1967-), 男, 山东汶上人, 博士, 研究员, 主要从事蔬菜育种与分子生物学研究。

白菜(AA, n= 10)、甘蓝(CC, n= 9)和芥菜(AABB, n = 18)^[1]。白菜类蔬菜种质资源丰富, 分布广泛, 亲缘关系复杂, 国内外许多学者对其进行了多方面的研究^[2- 4], 对白菜类蔬菜的遗传多样性和分类一直存在争议^[5]。

分子标记技术是研究植物遗传多样性的有利工具, 随机扩增的多态性 DNA (Randomly amplified polymorphic DNA, RAPD) 是 1990 年由 Williams^[9] 和 Welsh 领导的两个小组几乎同时发展起来的利用随机引物寻找多态性 DNA 片段 DNA 分子标记技术。RAPD 以其方便、快速提供 DNA 多态性的丰富信息, 为研究种及种内不同群体的遗传多样性提供了有力的手段。人们先后对芸薹属及其相近类群、不同地域来源的番茄、葱、不同的甘蓝基因型变种、大白菜和紫菜苔两个近缘种以及芹菜、芥菜、黄瓜等不同品种^[6- 8] 之间的遗传亲缘关系进行了深入研究, 研究

结论大多与经典的分类结果一致。本研究试图应用 RAPD 分子标记技术, 对大白菜、小白菜、芜菁、甘蓝材料进行了遗传多样性分析, 为明确白菜类蔬菜的亲缘关系和分类提供了新的试验证据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验中所使用的 21 份白菜种质资源材料见表 1, 其中 1 份皱叶甘蓝由罗马尼亚引进, 5 份来自山东省农科院蔬菜所蔬菜种质资源库(简称山东种子库) , 8 份从国家种子库购买, 2 份由山东省农业科学院蔬菜研究所张焕家研究员和赵智中博士提供, 5 份从市场上购买。从市场上购买的 5 份资源材料是目前生产上广泛栽培的白菜品种, 用于以丰富试验材料的来源和类型。

表 1 供试材料及来源

Tab.1 Materials and their origins

序号 No.	来源 Source	品种名 Accession name	学名 Scientific name
1	赵智中博士提供	十月红菜苔	<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>tai-tai</i> Hort
2	国家种子库(V02A1115)	冠县小包头	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
3	山东种子库(0519)	天津李楼中纹	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
4	张焕家教授提供	油菜	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino
5	市售	雪里红	<i>B. juncea</i> var. <i>multiceps</i> Tsen et Lee
6	山东种子库(0297)	北京翻心黄	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
7	市售	乌塌菜	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>rasularis</i> Tsen et Lee.
8	国家种子库(V02A0190)	保定青麻叶	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
9	市售	越冬 2 号甘蓝	<i>B. oleracea</i>
10	国家种子库(V04B0018)	苤蓝	<i>B. oleracea</i> var. <i>gongylodes</i> L.
11	市售	紫缨光头芥菜	<i>B. juncea</i> var. <i>juncea</i>
12	山东种子库(0513)	河南安阳二包头	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
13	山东种子库(0159)	山东掖县猪咀	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
14	市售	花椰菜	<i>B. oleracea</i> var. <i>botrytis</i> L.
15	山东种子库(0143)	山东福山二包头	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i>
16	罗马尼亚引入	皱叶甘蓝	<i>B. oleracea</i>
17	国家种子库(V04E0019)	灰叶芥蓝	<i>B. oleracea</i> var. <i>alboglabra</i>
18	国家种子库(V02B0002)	绿边菊花心	<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino
19	国家种子库(V02B0130)	散白菜	<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino
20	国家种子库(V02B0415)	苏州青	<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino
21	国家种子库(V01C0005)	芜菁	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>rapifera</i> Matzg

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 在田间品种形态鉴定的基础上, 每份材料选取嫩叶, 提取基因组 DNA。首先利用 DNA 提取缓冲液(10 mL 1 mol/L Tris pH= 8. 0, 10 mL 0. 5 mol/L EDTA pH= 8. 0, 20 mL 10% SDS, NaCl 8. 2 g), 氯仿/ 异戊醇抽提后, 用无水乙醇沉淀, 用 ddH₂O 充分溶解, 而后在- 20℃下保存备用。利用 1% 的琼脂糖胶电泳和紫外分光光度计检测 DNA 的纯度和浓度。

1.2.2 RAPD 分析 本试验所使用的 200 个随机引物, 其中 100 个购置于上海申能博彩公司(编号为 G5225~ G5779); 100 个购置于上海生工公司(编号为 S161~ S260)。Taq 酶购置于山东宝莱科技发展有限公司。PCR 扩增反应总体积为 25 μL: ddH₂O 14 μL; 缓冲液(10 ×, 含 MgCl₂) 2. 5 μL; dNTP 2 μL (2. 5 mmol/L); Taq 酶 0. 5 μL (2. 5 U/μL); 引物 1 μL (10 μmol/L); DNA 5 μL(DNA 稀释 50 倍)。扩增程序: 94℃变性 3 min 后, 94℃变性 60 s, 36℃退火 60 s ,

72℃延伸 60 s, 45 个循环, 最后 72℃延伸 10 min, 4℃保存。扩增结束后, 加入 2.5 μL 上样缓冲液, 混匀后取 25 μL 上样电泳。1.5% 琼脂糖凝胶在 DYCZ-31DN 型水平电泳槽中电泳, 电压为 150 V。Marker 为 DL2000 plus(分子量范围为 100~ 5 000 bp)。电泳结束后, 在凝胶成像仪下观察并照相。

1.2.3 数据处理 对分子量在 100~ 5 000 bp 之间的谱带进行统计。将电泳图谱上清晰且可重复出现的条带记为“1”, 同一位置没有出现的带记为“0”, 从而生成由“1”和“0”组成的原始矩阵。根据数据矩阵计算不同材料间相似系数和 jaccard 遗传距离, 并进行聚类分析。所有数据处理均在 Matlab 环境下编程实现。

1.2.4 芜菁与白菜类蔬菜的杂交 2007 年 2 月, 以芜菁材料为母本, 分别用天津青麻叶、山东掖县猪咀、油菜、河南安阳二包头、山东福山二包头、冠 291、散白菜、皱叶甘蓝为父本进行杂交, 杂交工作在温室进行。将获得的杂种 F₁ 种子于 2007 年月种植于大田, 生长期观察形态学性状, 并用 Nikon coolPIX 4500 相机摄像。

2 结果与分析

2.1 引物筛选和扩增产物的多态性

在本试验所使用的 200 个随机引物中, 有的随

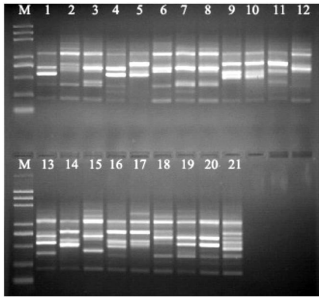
机引物对 21 份白菜种质 DNA 不能扩增出任何谱带, 有的随机引物扩增出的谱带较弱且仅能对部分白菜品种进行扩增, 这可能与白菜品种基因组间有较高的异质性所致。我们从 200 个随机引物中筛选出 22 个多态性高、重复性好的随机引物(表 2), 它们是 A15, A20, B10, D13, D19, E2, E3, E4, E6, E9, S175, S183, S188, S193, S194, S197, S206, S211, S229, S232, S251, S257。用这 22 个随机引物对 21 个白菜品种基因组 DNA 进行扩增, 共得到了 22 张指纹图谱(图 1~ 4 只显示了其中的 4 个随机引物扩增的谱带)。

22 个随机引物在 21 份种质中共扩增出 135 条带, 其中 125 条为多态性带, 多态性带百分比为 92.6%, 平均每个引物产生 6.1 条带和 5.7 条多态性带。使用不同引物, 扩增出的总带数和多态性带数的差异较大, 产生的带数最多的引物是 D19, E6, S188, S211, S251, 扩增出了 8 条带; 产生带数最少的引物是 A15, B10, E9, 仅有 4 条带。产生多态性带最高的引物是 A15, B10, E2, E9, S175, S188, S193, S194, S211, S219, S251, S257, 达到 100%。多态性最低的引物是 D13, E3, E4, S183, S197, 仅为 80%(表 2)。引物 A20, B10, E2, E9 对 21 份白菜种质扩增的 RAPD 带型如图 1~ 4。

表 2 22 个引物对 21 份白菜种质 DNA 扩增的带数

Tab. 2 The numbers of the total and polymorphic bands generated from 21 cabbage accessions using PCR with 22 RAPD primers

引物 Primer	序列 Sequence	多态性带数 Number of polymorphic bands	总带数 Total band number	多态性比率/% Percentage of polymorphic bands
A15	ttcgaaccc	4	4	100.0
A20	gttgcgacc	5	6	83.3
B10	ctgctgggac	4	4	100.0
D13	gggggacga	4	5	80.0
D19	ctggggactt	7	8	87.5
E2	ggtgcgggaa	7	7	100.0
E3	ccagatgcac	4	5	80.0
E4	gtgacatgcc	4	5	80.0
E6	aagaccctc	7	8	87.5
E9	cttcaccga	4	4	100.0
S175	tcatccgagg	5	5	100.0
S183	cagaggccc	4	5	80.0
S188	ttcagggtgg	8	8	100.0
S193	gtcgttcttg	7	7	100.0
S194	aaagggtccc	7	7	100.0
S197	tggggaccac	4	5	80.0
S206	caagggcaga	5	6	83.3
S211	ttcccgcga	8	8	100.0
S229	tgtaccgtc	6	6	100.0
S232	accccccact	6	7	85.7
S251	agaccagag	8	8	100.0
S257	acctggggag	7	7	100.0
Total		125	135	92.6
Average		5.7	6.1	92.6



M. DNA marker DL2000 plus; 1~ 21. 白菜类蔬菜品种(1. 十月红 菜苔; 2. 冠县小包头;3. 天津李楼中纹; 4. 油菜; 5 雪里红; 6. 北京翻心黄; 7. 乌塌菜; 8. 保定青麻叶; 9. 越冬 2 号 甘蓝; 10. 苕蓝; 11. 紫缨光头芥 菜; 12. 河南安阳二包头; 13. 山东掖县猪咀; 14. 花椰 菜; 15. 山东福山 二包头; 16. 皱叶甘蓝; 17. 灰叶芥 蓝; 18. 绿边菊花心; 19. 散白菜; 20. 苏州青; 21. 茺菁), 下同。

M. DNA marker DL2000 plus; 1– 21. Cabbage accessions(1. Shiyuehong- caitai; 2. Guanxianxiaobaotou; 3. Tianjinglilouzhongwen; 4. Youcai; 5. Xueli- hong; 6. Beijingfanxinhuang; 7. Wutacai; 8. Baodingqingmaye; 9. No. 2 Yue- dongganlan; 10. Pielan; 11. Ziyingguangtoujiecai; 12. Henananyang erbaotou; 13. Shandongyexianzhuzhui; 14. Cauliflower; 15. Shandongfushanerbaotou; 16. Zhouyegalan; 17. Huiyejielan; 18. Lubianjuhuaxin; 19. Sanbaicai; 20. Suzhouqing; 21. Tumip, The same as followed.

图 1 引物 A20 对 21 个白菜品种基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.1 The PCR result by the primer A20 generated from 21 cabbage accessions

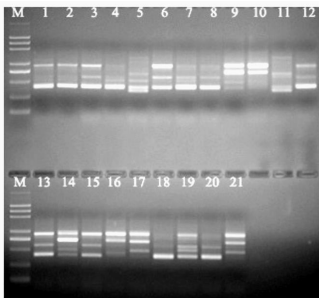


图 2 引物 B10 对 21 个白菜品种基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.2 The PCR result by the primer B10 generated from 21 cabbage accessions

表 3 白菜类蔬菜 RAPD 遗传距离矩阵和相似系数矩阵(上三角为遗传距离矩阵, 下三角为相似系数矩阵)

Tab.3 Matrix of genetic distance and similarity- index based on RAPD results in cabbage vegetables (Upper triangular part is matrix of genetic distance, lower triangular part is matrix of similarity- index)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1		0.250 0	0.364 6	0.304 3	0.515 5	0.279 6	0.296 7	0.322 9	0.663 6	0.672 6	0.520 0
2	0.646 2		0.244 4	0.311 8	0.550 0	0.230 8	0.375 0	0.276 6	0.654 5	0.639 6	0.524 8
3	0.468 1	0.665 9		0.372 3	0.604 0	0.274 7	0.383 0	0.224 7	0.690 9	0.663 6	0.578 4
4	0.576 3	0.560 9	0.472 2		0.600 0	0.408 2	0.322 2	0.398 0	0.675 9	0.672 7	0.545 5
5	0.274 0	0.199 9	0.104 8	0.118 7		0.601 9	0.637 3	0.578 4	0.715 7	0.723 8	0.390 2
6	0.601 1	0.677 0	0.620 4	0.394 0	0.092 8		0.368 4	0.268 8	0.675 7	0.672 6	0.534 7
7	0.593 3	0.456 4	0.458 4	0.564 3	0.043 1	0.471 9		0.304 3	0.709 1	0.681 8	0.570 0
8	0.523 1	0.598 8	0.696 4	0.408 5	0.139 3	0.615 5	0.578 2		0.678 6	0.663 7	0.553 4
9	- 0.082 0	- 0.067 0	- 0.126 0	- 0.081 0	- 0.082 0	- 0.112 0	- 0.156 0	- 0.127 0		0.173 3	0.689 3
10	- 0.135 0	- 0.061 0	- 0.088 0	- 0.102 0	- 0.124 0	- 0.135 0	- 0.116 0	- 0.121 0	0.808 3		0.685 7
11	0.232 3	0.217 7	0.126 1	0.200 7	0.527 0	0.202 1	0.155 7	0.157 3	- 0.052 0	- 0.067 0	

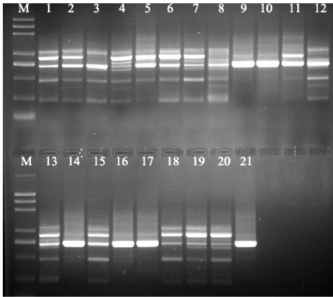


图 3 引物 E4 对 21 个白菜品种基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.3 The PCR result by the primer E4 generated from 21 cabbage accessions

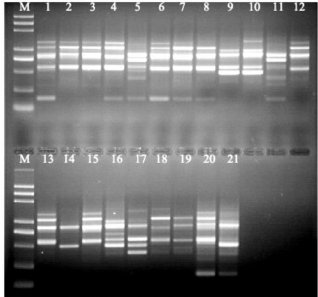


图 4 引物 E6 对 21 个白菜品种基因组 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig.4 The PCR result by the primer E6 generated from 21 cabbage accessions

2.2 相似系数和遗传距离

从表 3 可知, 芸薹属植物间遗传距离变幅较大, 在 0.173 3~ 0.735 3 之间, 说明品种之间遗传背景较复杂, 具有较高的遗传多态性。其中越冬 2 号甘蓝和苕蓝的相似系数最大(0.808 3), 遗传距离最小(0.173 3), 说明它们的亲缘关系最近; 另外, 山东掖县猪咀和冠县小包头的相似系数也较大为 0.699 9, 遗传距离(0.227 3), 说明它们的亲缘关系也比较近。紫缨光头芥菜和灰叶介蓝的遗传距离最大(0.735 3), 相似系数(- 0.111), 表明它们的亲缘关系较远。

续表:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
12	0.556 4	0.662 9	0.636 0	0.470 6	- 0.014 0	0.525 8	0.457 2	0.601 5	- 0.066 0	- 0.119 0	0.096 4
13	0.623 6	0.699 9	0.699 3	0.444 1	0.132 7	0.563 0	0.430 0	0.578 2	- 0.096 0	- 0.146 0	0.125 9
14	- 0.035 0	- 0.049 0	- 0.054 0	- 0.040 0	- 0.057 0	- 0.095 0	- 0.027 0	- 0.049 0	0.557 4	0.666 4	0.008 2
15	0.697 9	0.682 8	0.623 0	0.518 3	0.178 6	0.606 7	0.594 4	0.682 8	- 0.141 0	- 0.102 0	0.260 4
16	- 0.178 0	- 0.133 0	- 0.041 0	- 0.085 0	- 0.169 0	- 0.178 0	- 0.129 0	- 0.103 0	0.674 4	0.718 4	- 0.111 0
17	- 0.095 0	- 0.049 0	0.006 2	- 0.100 0	- 0.057 0	- 0.095 0	- 0.087 0	0.012 2	0.557 4	0.666 4	- 0.111 0
18	0.664 7	0.557 2	0.530 5	0.516 7	0.180 9	0.542 6	0.623 8	0.587 8	- 0.171 0	- 0.163 0	0.111 3
19	0.549 7	0.595 5	0.504 9	0.460 3	0.087 0	0.489 2	0.416 0	0.474 0	- 0.051 0	- 0.041 0	0.081 1
20	0.603 7	0.587 8	0.409 3	0.637 6	0.120 8	0.481 6	0.563 4	0.495 9	- 0.111 0	- 0.103 0	0.081 3
21	0.214 5	0.260 1	0.228 8	0.094 3	0.097 6	0.274 8	0.139 2	0.199 6	0.467 0	0.392 1	0.125 8

	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	0.308 5	0.277 8	0.669 8	0.227 3	0.693 0	0.694 4	0.244 4	0.326 1	0.282 6	0.524 8
2	0.241 8	0.227 3	0.672 9	0.236 0	0.672 6	0.672 9	0.308 5	0.296 7	0.290 3	0.500 0
3	0.266 7	0.232 6	0.685 7	0.280 9	0.648 1	0.660 2	0.333 3	0.358 7	0.402 1	0.525 3
4	0.368 4	0.393 6	0.682 7	0.347 8	0.669 7	0.707 5	0.344 1	0.387 1	0.269 7	0.592 2
5	0.650 9	0.596 0	0.724 5	0.571 4	0.745 3	0.724 5	0.565 7	0.620 0	0.594 1	0.628 9
6	0.326 3	0.315 2	0.694 4	0.285 7	0.693 0	0.694 4	0.319 1	0.361 7	0.354 2	0.494 9
7	0.378 9	0.404 3	0.679 6	0.303 4	0.690 9	0.704 8	0.280 9	0.414 9	0.318 7	0.574 3
8	0.279 6	0.304 3	0.672 9	0.236 0	0.660 7	0.647 6	0.290 3	0.368 4	0.343 8	0.529 4
9	0.660 6	0.685 2	0.379 7	0.700 0	0.278 5	0.379 7	0.705 4	0.669 8	0.681 8	0.418 6
10	0.669 6	0.693 7	0.298 7	0.672 7	0.240 5	0.298 7	0.690 3	0.654 2	0.666 7	0.455 6
11	0.586 5	0.584 2	0.683 7	0.515 5	0.707 5	0.735 3	0.582 5	0.607 8	0.596 2	0.602 0
12		0.269 7	0.679 2	0.333 3	0.642 2	0.691 6	0.311 8	0.337 0	0.329 8	0.534 7
13	0.638 8		0.704 8	0.244 2	0.702 7	0.717 0	0.318 7	0.287 4	0.354 8	0.560 0
14	- 0.051 0	- 0.087 0		0.707 5	0.311 7	0.305 6	0.676 2	0.689 3	0.676 2	0.452 4
15	0.531 2	0.684 6	- 0.100 0		0.705 4	0.707 5	0.269 7	0.295 5	0.326 1	0.578 4
16	- 0.041 0	- 0.159 0	0.649 8	- 0.175 0		0.243 2	0.699 1	0.700 0	0.710 5	0.500 0
17	- 0.081 0	- 0.116 0	0.671 0	- 0.100 0	0.739 1		0.724 8	0.689 3	0.700 9	0.539 3
18	0.558 7	0.563 4	- 0.038 0	0.637 6	- 0.176 0	- 0.158 0		0.272 7	0.266 7	0.530 0
19	0.534 6	0.625 7	- 0.043 0	0.610 4	- 0.144 0	- 0.043 0	0.640 2		0.272 7	0.525 8
20	0.528 3	0.503 0	- 0.038 0	0.546 9	- 0.206 0	- 0.098 0	0.635 6	0.640 2		0.530 0
21	0.199 2	0.169 0	0.441 3	0.124 1	0.318 2	0.292 5	0.214 0	0.243 5	0.214 0	

2.3 白菜类蔬菜的聚类分析

从聚类图(图 5)可以看出, 21 个白菜品种在遗传距离 D= 0.25 处被划分为 2 类 10 组, 各类、组所包含的材料有:

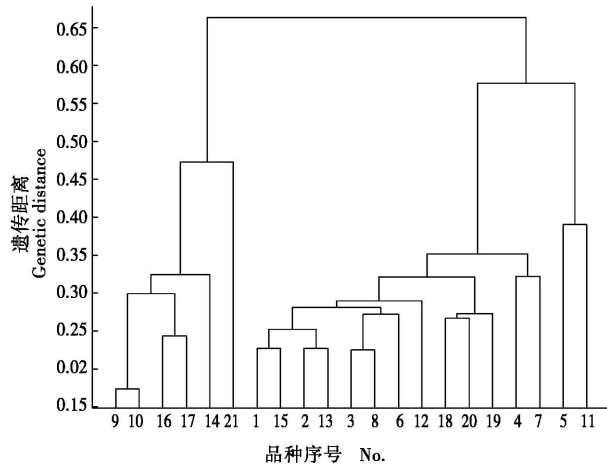


图 5 依据 RAPD 标记的白菜类种质聚类图

Fig.5 Cluster analysis of 21 cabbage accessions based on RAPD

第Ⅰ类——第 1 组: 越冬 2 号甘蓝、苤蓝、皱叶甘蓝、灰叶介蓝; 第 2 组: 花椰菜; 第 3 组: 芜菁。

第Ⅱ类——第 1 组: 十月红菜苔、山东福山二包头、冠县小包头、山东掖县猪咀、天津李楼中纹、保定青麻叶; 第 2 组: 北京翻心黄; 第 3 组: 河南安阳二包头; 第 4 组: 绿边菊花心、苏州青; 第 5 组: 散白菜; 第 6 组: 油菜、乌塌菜; 第 7 组: 雪里红、紫缨光头芥菜。

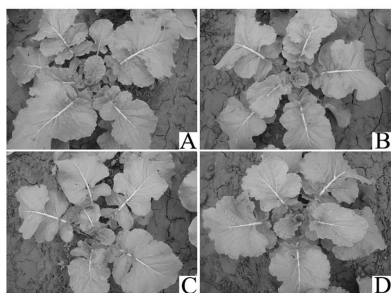
在聚类图(图 5)取遗传距离为 0.25 时, 可将供试的白菜类各品种分为两大类群。第一大类群为甘蓝, 从亲缘关系上看, 它与其他白菜类蔬菜亲缘关系远。第二大类群为结球白菜亚种和不结球白菜亚种以及芥菜。不结球白菜亚种包括: 苏州青、乌塌菜、油菜、散白菜、绿边菊花心。而 7 个结球白菜品种(冠县小包头、山东掖县猪咀、山东福山二包头、天津李楼中纹、河南安阳二包头、保定青麻叶、北京翻心黄)在第二类群组成一个独立亚群, 孙德岭等^[10]认为这可能与结球白菜进化程度较高有关, 其亲缘关系介于芜菁和不结球白菜之间。

越冬 2 号甘蓝和十月红菜苔与其他种质在形态性状上存在较大的差异, 聚类分析中这两份种质也各自被单独聚为一类。冠县小包头和山东掖县猪咀等 7 份种质, 主要为结球白菜品种, 被聚在了一起,

在一定程度上说明了 RAPD 标记与形态标记分类的一致性。但是, RAPD 标记的聚类与形态特征的表现不一致或不完全一致在大麦^[11]和红花^[12]等作物中也有报道。如第 II 类第 1 组的十月红菜苔, 第 7 组的雪里红, 紫缨光头芥菜和其他组也存在形态上的差异。这可能是因为形态性状的表现是某些功能基因在内、外环境的共同作用下表达的结果, 而 DNA 结构的差异不一定都能在形态上表现出来, 而且即便能够表现, 其表现的形式也可能是多种多样的。

2.4 芜菁与白菜类蔬菜的杂交及杂交后代形态学观察

芜菁与白菜类蔬菜的杂交结实率均为 100%, 表明芜菁与白菜类蔬菜之间不存在生殖障碍。另外, 本试验获得的芜菁与天津青麻叶、山东掖县猪咀、油菜、河南安阳二包头、山东福山二包头、冠 291、散白菜、皱叶甘蓝等不同白菜类蔬菜的杂种 F₁ 在叶部形态上与芜菁更为相似(图 6, 7)。

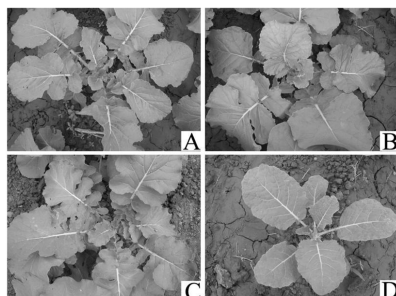


A. 芜菁 × 天津青麻叶; B. 芜菁 × 山东掖县猪咀;
C. 芜菁 × 油菜; D. 芜菁 × 河南安阳二包头。

A. Turnip × Tianjinqingmaye; B. Turnip × Shandongyexianzhuzui;
C. Turnip × Youcai; D. Turnip × Henananyang Erbaotou.

图 6 芜菁和天津青麻叶、山东掖县猪咀、油菜、河南安阳二包头杂交后代的形态图

Fig. 6 The hybrid descendant of Turnip and Tianjinqingmaye, Shandongyexianzhuzui, Youcai, Henananyangerbaotou



A. 芜菁 × 山东福山二包头; B. 芜菁 × 冠 291;
C. 芜菁 × 散白菜; D. 芜菁 × 皱叶甘蓝。

A. Turnip × Shandongfushan Erbaotou; B. Turnip × Guan291;
C. Turnip × Sanbaicai; D. Turnip × Zhouyeganlan.

图 7 芜菁和山东福山二包头、冠 291、散白菜、皱叶甘蓝杂交后代的形态图

Fig. 7 The hybrid descendant of Turnip and Shandongfushan erbaotou, Guan291, Sanbaicai, Zhouyeganlan

3 讨论

3.1 RAPD 技术在白菜类蔬菜栽培品种亲缘关系分析中应用的可行性

植物种间和种内的遗传鉴定以及亲缘关系分析的传统方法多采用系谱法、地理分布、形态特征及生化分析等方法。虽然这些分析方法对阐明植物亲缘关系起了很大作用, 但也有一定的局限性。而运用 RAPD 技术, 用一系列不同的随机引物对目的基因组 DNA 进行扩增时, 多态性较丰富。这种扩增产物的多态性反映了被测材料的遗传多样性, 进一步通过相关分析和聚类分析等数量遗传分析手段, 可对不同亲缘关系物种间的分类等进行研究。利用 RAPD 标记所进行的芸薹属的多态性分析和聚类划分, 在芥菜型油菜、白菜型油菜和芥菜上做了大量的研究并取得了较好的效果^[13,14]。本试验采用 22 对 RAPD 引物组合获得 135 条扩增带。扩增带清晰、丰富、多态性强, 通过聚类分析明显地把甘蓝、大白菜、芥菜品种各自首先聚类, 表明本试验技术和结果的可靠性。

3.2 白菜类蔬菜基因组 DNA 之间的亲缘关系

李家文^[15]认为大白菜可能是小白菜和芜菁通过自然杂交产生的杂种, 提出了“杂交起源”假说。他提出江苏北部有散叶大白菜的一些品种, 推测可能是北方的芜菁和南方的小白菜在江苏北部汇合在一起, 自然杂交而成为最原始的散叶大白菜。并且曾把芜菁和小白菜杂交, 结果杂种一代似大白菜叶子, 叶柄宽有叶翼, 有毛。谭其猛^[16]根据形态特征、生理性状、杂交关系、染色体组成、个体发育等特性, 并通过与甘蓝 (*B. oleracea* L.) 演化类比的方法, 提出大白菜是普通白菜在向北方传播的过程中分化产生的, 即分化起源说。

本试验通过 RAPD 聚类分析发现甘蓝和芜菁聚在一类, 和白菜的亲缘关系较远, 并不能为“杂交起源”假说提供佐证。通过芜菁和天津青麻叶、山东掖县猪咀、油菜、河南安阳二包头、山东福山二包头、冠 291、散白菜、皱叶甘蓝杂交, 杂交后代都和芜菁的形态极其相似, 所以这并不能从杂交后代的形态上说明白菜是由芜菁和小白菜杂交演化而来的。

利用分子标记技术对白菜类蔬菜的亲缘关系和分类做过的一些研究中, 所用的材料比较少, 不能充分的说明问题。Song^[17]等通过 RFLP 分析, 将 *Brassica rapa* 的栽培种分为 2 个组: 一组为芜菁和产油类型, 主要分布在欧洲、中亚和印度; 另一组为叶菜类型, 主要分布在东亚。他的研究验证了白菜类蔬菜

与芜菁的亲缘关系较远。本研究结果将芜菁和白菜类蔬菜聚为2类,说明它们的亲缘关系较远,而大白菜与小白菜的亲缘关系较近,同聚为一类,并且大白菜在所有白菜类蔬菜中单独聚为一类,此类还包括十月红菜苔。基于本试验结果和其他学者的有关工作,“分化起源”假说更具有说服力,郭晶心等^[18]的试验结果也验证了此结论,因此,可将芜菁和白菜作为 *Brassica rapa* 2个不同的亚种,大白菜则为白菜亚种中的一个特殊的变种。笔者认为谭其猛的分化学说可能更适合大白菜的起源,即白菜可能起源于野生小白菜的原始类型,在向北方传播的过程中相互杂交,经过长期的自然环境选择,优胜劣汰逐渐演化才终于出现了结球结实的大白菜。

3.3 白菜类蔬菜的遗传多样性

3.3.1 大白菜的遗传多样性 对于大白菜的聚类,结球白菜明显的聚为一类,十月红菜苔是个例外,可能是因为十月红菜苔是市售的,育种家根据育种的需要,经过了不同程度的改造和创新,综合了不同地区材料的优良特性,遗传背景已经变得十分的复杂。

3.3.2 小白菜的遗传多样性 小白菜在我国栽培历史悠久,形态差异很大,不同学者依据不同的生物学特性对其进行了分类。曹寿椿和李式军^[2]以小白菜的主要生物学性状、栽培特点、形态特征为分类标准,提出了它的综合性园艺学分类,将其分为:普通白菜、塌棵菜、菜薹、薹菜、分蘖菜、白菜型油菜6类。本试验结果表明小白菜各类型在DNA水平上的差异与其形态学差异并不存在完全对应的关系,很难进入更深入的分类。本试验结果还表明,小白菜各类型间的相似程度较大白菜各类型间的相似程度较低,说明其经历了较长的演化时间,即小白菜在大白菜中是起源较早的。

种质资源遗传亲缘关系研究是蔬菜育种工作的重要组成部分,它可以为亲本选配提供依据,并有效地预测杂种优势。同时一些原始品种或野生品种以及一些异源品种中存在的某些优良性状对蔬菜品种的改良有着巨大的潜力,因此确定不同品种间的亲缘关系及其在进化上的地位,并有选择的利用它们来改良蔬菜作物具有重要意义。用聚类分析中亲缘关系较远而且抗性差异较大的材料作杂交亲本,既利于拓宽遗传基础,在育成品种中积累抗性基因,又有利于形成分子标记多态性水平较高的分离群体,以便构建分子标记框架图谱,定位抗性基因,为芸薹

植物抗病育种提供分子水平的理论依据。

参考文献:

- [1] 山东农业大学. 蔬菜栽培学各论[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [2] 曹寿椿, 李式军. 白菜地方品种的初步研究[J]. 南京农学院学报, 1982(2): 1-7.
- [3] 谭其猛. 试论大白菜品种的起源、分布和演化[J]. 中国农业科学, 1979(4): 68-75.
- [4] 曹家树, 曹寿椿. 大白菜起源的杂交验证初报[J]. 园艺学报, 1995, 22: 93-94.
- [5] 周太炎. 中国植物志 33卷[M]. 北京: 科学出版社, 1987.
- [6] 曹家树, 曹寿椿, 亦清明. 白菜及其相邻类群基因组DNA和RAPD分析[J]. 园艺学报, 1995, 22(1): 47-52.
- [7] 漆小泉, 朱德蔚, 沈 锦, 等. 大白菜和紫菜苔自交系染色体组DNA的RAPD分析[J]. 园艺学报, 1995, 22(3): 256-262.
- [8] 张海英, 王永健, 许勇等. 黄瓜种质资源遗传亲缘关系的RAPD分析[J]. 园艺学报, 1998(4): 345-350.
- [9] Williams, J G K, Kubelik A R. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531-6535.
- [10] 孙德岭, 赵前程, 宋文芹, 等. 白菜类蔬菜亲缘关系的AFLP分析[J]. 园艺学报, 2001, 28(40): 331-335.
- [11] Schut J W, Qi X Q, Stem P. Association between relationship measures based on AFLP markers, pedigree data and morphological traits in barley[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 1161-1168.
- [12] 张宗文. 红花品种的形态、同工酶和分子遗传多样性及分类研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2000.
- [13] 安贤惠, 陈宝元, 傅廷栋等. 利用RAPD技术研究中国芥菜型油菜遗传多样性[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(6): 524-527.
- [14] 何余堂, 涂金星. 中国白菜型油菜种质资源的遗传多样性研究[J]. 作物学报, 2002, 24(5): 12-16.
- [15] 李家文. 大白菜选种的一些问题, 黑龙江园艺试验站. 1972.
- [16] 谭其猛. 试论大白菜品种的起源分布和演化[J]. 中国农业科学, 1979, 4: 68-75.
- [17] Song K M, Slocum M K, Osborn T C, et al. A linkage map of *Brassica rapa* (syn. *Campestris*) based on restriction fragment length polymorphism loci[J]. Theor Appl Genet, 1991, 82: 296-304.
- [18] 郭晶心, 周乃元, 马荣才, 等. 白菜类蔬菜遗传多样性的AFLP分子标记研究[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(2): 138-143.