

基于RAPD标记的芥蓝种质资源遗传多样性分析

陈文文,刘厚诚,陈日远,宋世威,孙光闻
(华南农业大学园艺学院,广州 510642)

摘要:调查了44份芥蓝种质的植物学性状,并利用RAPD分子标记分析了其遗传多样性。结果从150条随机引物中筛选出20个引物,20个引物共扩增出177条谱带,其中多态谱带105条,平均每个引物扩增出8.9条谱带和5.3条多态性谱,多态性比率为59.32%。基于RAPD标记,利用NTSYS-pc2.11构建了聚类树状图谱,遗传距离为0.70时,44份芥蓝资源可聚成6大类群。芥蓝种质存在着一定的遗传多样性,但原产华南而且主要产区也在华南,遗传多样性要小于芸薹属其他蔬菜。

关键词:芥蓝;种质资源;RAPD;遗传多样性

中图分类号:S635.9

文献标志码:A

论文编号:2010-1885

Genetic Diversity Analysis of Chinese Kale Germplasm Resources by RAPD Markers

Chen Wenwen, Liu Houcheng, Chen Riyuan, Song Shiwei, Sun Guangwen
(College of Horticulture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642)

Abstract: The morphological characteristics of 44 Chinese kale accessions were investigated and the DNA polymorphism was analyzed by randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) marker. 20 primers selected from 150 primers amplified a total of 177 bands, of which 105 were polymorphic, with an average of 8.9 bands and 5.3 polymorphic fragments per primer. The polymorphic percentage was 59.32%. The dendrogram based on RAPD data was constructed by NTSYS-pc2.11. Cluster analysis showed that 44 Chinese kale accessions could be divided into six groups at the level of $D=0.70$. Because Chinese kale was from south China and the main area was in south China, the genetic diversity of Chinese kale was smaller than other *Brassica* vegetables.

Key words: Chinese kale; germplasm resources; RAPD; genetic diversity

0 引言

芥蓝 (*Brassica alboglabra* Bailey) 为十字花科 (Cruciferous) 芸薹属 (*Brassica*) 1、2 年生草本植物, 原产于中国华南地区, 以肥嫩花薹和嫩叶供食用^[1-4]。芥蓝肉质脆嫩清甜、营养丰富、抗癌物质含量高^[5], 一直深受粤港澳人青睐, 同时也出口日本、东南亚和其他一些国家, 是中国著名特产蔬菜之一。国内外关于芥蓝种质资源多样性的报道极少, 有芥蓝种质资源的形态学性状多样性分析^[6]和营养成分评价^[7]。芥蓝分子标记方面, 以 λ TriplEx2TM 为载体构建了芥蓝的 cDNA 文库^[8]; 以芥蓝 C100-12 \times 甘蓝秋 50-Y7 为杂交组合构建

了 F2 作图群体, 获得 96 个 RAPD 标记和发现 2 对共分离的 RAPD 标记, 并利用该作图群体构建了甘蓝的基本遗传图谱^[9]; 获得了控制抽薹期、开花期、株高等 19 个农艺学性状的 QTL 定位^[10]; 利用芥蓝 \times 青花菜 DH 群体构建了含 337 个 AFLP 标记的遗传连锁图谱^[11]。采用 RAPD 技术对芸薹类蔬菜作物品种^[12]、甘蓝类蔬菜^[13]、甘蓝型油菜^[14-15]、白菜类蔬菜^[16]、不结球白菜^[17]、芥菜^[18]进行了遗传多样性检测。本研究调查了 44 份芥蓝种质的植物学性状, 再采用 RAPD 分子标记进行遗传多样性分析, 旨在 DNA 水平上对芥蓝分类和进一步的种质资源利用提供理论依据和参考。

基金项目: 国家科技部星火计划项目“蔬菜高效可持续生产技术体系建立与示范推广”(2008GA781001); 广东省产学研重大项目“外向型设施蔬菜周年生产与产业化示范”(cgzhzd0809)。

第一作者简介: 陈文文, 女, 1982 年出生, 硕士, 研究方向: 蔬菜栽培生理。通信地址: 510642 广州市五山路 483 号 华南农业新园艺学院, Tel: 020-85280464, E-mail: chenww2001@163.com。

通讯作者: 刘厚诚, 男, 1968 年出生, 教授, 博士, 研究方向: 蔬菜栽培生理。Tel: 020-85280464, E-mail: liuhch@scau.edu.cn。

收稿日期: 2010-06-22, **修回日期:** 2010-09-03。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验所用的芥蓝材料为44份(表1),分别是来自广东芥蓝主要产区的农家品种和各地的商品品种。

1.2 方法

1.2.1 植物学性状调查 在商品成熟期进行植株植物学性状调查,在每份种质中取5株具有代表性植株调查。调查的性状有株高、薹高、薹粗、熟性、菜薹颜色等。质量性状采用观察法,数量性状则用测量法。株

高、薹高用卷尺测量;薹粗用游标卡尺测量。

1.2.2 基因组DNA的提取与检测 将供试材料播于穴盘中,待幼苗长至5~6片真叶时,每份材料随机取上部幼嫩叶片3~4片用于植株总DNA提取。植株总DNA的提取参照改良的CTAB法。取100~200 ng DNA样品,以 λ DNA/*Hind*III为标准,在0.8%琼脂糖凝胶中电泳检测DNA。电泳电压为120 V。电泳结束后,在凝胶成像系统下照相,分析检测DNA的浓度与质量。最后将DNA统一稀释到25 ng/ μ L。

表1 芥蓝种质资源及来源

编号	材料	来源	编号	材料	来源
v1	中花芥蓝(澄海)	广东澄海	v23	粗条芥蓝	广东澄海
v2	中迟芥蓝	广东汕头	v24	中花芥蓝(潮州)	广东揭东
v3	桃山中花(白花)	广东揭东	v25	薄叶赤叶	广东潮州
v4	曲溪格兰筷	广东揭东	v26	晚熟龟老种	广东潮州
v5	铁种芥蓝	广东揭东	v27	中熟龟老种	广东潮州
v6	省种芥蓝	广东揭东	v28	早花芥蓝	广东潮州
v7	曲溪圆叶	广东揭东	v29	皱叶芥蓝	广东潮州
v8	本地铁种	广东揭东	v30	乌叶格蓝(晚熟)	广东潮州
v9	桃山中花(黄花)	广东揭东	v31	华格蓝(中迟熟)	广东揭东
v10	快格兰筷	广东潮州	v32	澄海香菇种	广东澄海
v11	选种格兰筷	广东揭东	v33	新会芥蓝	广东潮州
v12	中熟黄花芥蓝筷	广东揭东	v34	早格蓝	广东潮州
v13	中熟白花芥蓝筷	广东揭东	v35	香港尖叶中花	广东揭阳伟达种业商行
v14	香菇芥蓝	广东揭东	v36	中花粗心芥蓝	广州爱普农农业科技司
v15	孤老种(小叶)	广东潮州	v37	中花芥蓝(广州)	广州市农业科学研究所
v16	孤老种(大叶)	广东潮州	v38	中花芥蓝(阳春)	阳春市种子子公司
v17	新会种(矮丛)	广东潮州	v39	优质中花芥蓝	广州兴田种子有限公司
v18	新会种(春播)	广东潮州	v40	澳洲粗条甜脆芥蓝	青岛贵龙种苗有限公司
v19	小香菇	广东汕头	v41	耐热粗条芥蓝	广州蔬菜科学研究所
v20	老种香菇	广东澄海	v42	尖叶夏芥蓝	华南农业大学园艺开发司
v21	矮脚香菇	广东澄海	v43	新加坡芥蓝王	广州亚蔬园艺种苗公司
v22	红脚芥蓝	广东普宁	v44	广州中迟花芥蓝	广州市张水江菜种店

1.2.3 引物筛选 从样本中选取2个具有代表性、表型差异较大的品种进行引物的筛选,每条引物设2次重复。从中选取多态性好、重复性好、稳定性高的引物用于所有供试材料的RAPD-PCR扩增。

1.2.4 RAPD-PCR扩增与检测 芥蓝的PCR最佳反应体系^[9]为:反应体系总体积为25 μ L,其中包括:25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、2.5 mmol/L dNTPs 2.0 μ L、5 U/ μ L Taq 酶 0.25 μ L、5 μ mol/L 引物 1.2 μ L、模板DNA 5 μ L、灭菌双蒸水。

扩增反应在Biometra公司生产的Tlthermocycler PCR仪上进行。最佳反应程序为:94 $^{\circ}$ C预变性5 min;94 $^{\circ}$ C变性1 min,36 $^{\circ}$ C退火1 min,72 $^{\circ}$ C延伸2 min,40个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min,15 $^{\circ}$ C保存。扩增完毕后,在每个扩增产物中加入3 μ L加样缓冲液,取20 μ L点样于2%浓度的琼脂糖凝胶点样孔中,电泳缓冲液为0.5 \times TBE,140 V恒压下电泳150 min,然后在紫外凝胶成像系统中观察并照相记录,分析电泳结果。

1.2.5 数据分析 统计扩增的条带数,同一引物扩增产

物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。RAPD扩增产物以0、1记录电泳谱带建立0、1矩阵,在相同迁移位置上有带记为1,无带记为0。用NTSYS-pc2.11软件进行聚类分析,采用非加权配对算术平均法(UPGMA)。

2 结果与分析

2.1 芥蓝种质的植物学性状

44份芥蓝种质资源的植物学性状见表2。其中,早熟种和极早熟种有30份,晚熟种只有3份。绝大部分芥蓝种质的菜薹颜色为绿色,但红脚芥蓝为紫色。

表2 芥蓝种质资源的植物学性状

编号	品种名	株高/cm	薹高/cm	薹粗/mm	熟性	菜薹颜色	花色	菇叶
v1	中花芥蓝(澄海)	16.60±1.46	9.12±1.22	15.00±0.32	中	绿色	白色	无
v2	中迟芥蓝	16.64±0.75	10.04±0.85	12.54±0.67	早	绿色	白色	无
v3	桃山中花(白花)	20.96±3.04	11.96±2.48	13.85±1.27	中	绿色	白色	无
v4	曲溪格兰簇	21.72±1.03	13.76±1.39	12.26±1.06	极早	绿色	白色	无
v5	铁种芥蓝	13.30±0.00	6.50±0.00	13.96±0.00	晚	绿色	白色	无
v6	省种芥蓝	23.64±2.20	13.88±1.83	19.11±1.63	中	绿色	白色	无
v7	曲溪圆叶	22.68±2.56	12.86±2.01	17.20±1.22	中	绿色	白色	无
v8	本地铁种	20.12±0.47	12.20±0.68	22.28±0.36	晚	绿色	白色	无
v9	桃山中花(黄花)	24.38±3.13	14.96±2.37	12.56±1.11	早	绿色	黄色	无
v10	快格兰簇	23.08±3.70	15.14±3.12	13.16±0.40	早	绿色	白色	无
v11	选种格兰簇	19.68±1.00	11.16±0.65	19.72±0.70	晚	绿色	白色	无
v12	中熟黄花芥蓝簇	18.84±1.85	11.82±1.39	14.18±0.83	早	绿色	黄色	无
v13	中熟白花芥蓝簇	21.00±2.45	13.82±2.22	15.41±0.92	早	绿色	白色	无
v14	香菇芥蓝	27.48±2.46	17.04±1.93	17.43±1.04	早	绿色	白色	无
v15	孤老种(小叶)	21.04±1.45	15.50±1.33	11.89±0.97	极早	绿色	白色	无
v16	孤老种(大叶)	21.76±1.51	15.14±0.94	12.71±0.97	极早	绿色	白色	无
v17	新会种(矮丛)	22.34±2.73	15.22±2.49	12.85±1.56	早	绿色	白色	无
v18	新会种(春播)	25.34±1.97	18.88±1.74	14.02±0.69	极早	绿色	白色	无
v19	小香菇	25.24±2.32	15.52±2.32	23.26±1.12	中	绿色	白色	有
v20	老种香菇	26.54±2.72	16.96±1.92	22.02±2.20	中	绿色	白色	有
v21	矮脚香菇	27.08±2.56	17.44±2.76	23.63±2.81	中	绿色	白色	有
v22	红脚芥蓝	29.42±0.66	19.28±1.76	12.78±0.36	中	紫色	黄色	无
v23	粗条芥蓝	29.42±1.46	17.50±0.79	24.33±0.82	早	绿色	白色	无
v24	中花芥蓝(潮州)	20.50±1.53	14.50±0.57	14.97±1.09	极早	绿色	白色	无
v25	薄叶赤叶	21.78±1.44	14.26±1.45	14.24±0.58	极早	绿色	白色	无
v26	晚熟龟老种	13.88±1.37	7.36±0.89	15.94±0.71	早	绿色	白色	无
v27	中熟龟老种	21.16±1.81	14.00±0.86	14.09±1.20	极早	绿色	白色	无
v28	早花芥蓝	25.06±1.97	14.58±1.08	15.26±1.02	极早	绿色	白色	无
v29	皱叶芥蓝	22.24±1.13	12.88±0.89	14.47±0.99	极早	绿色	白色	无
v30	乌叶格蓝(晚熟)	20.60±1.35	12.32±1.25	18.57±1.07	早	绿色	白色	无
v31	华格蓝(中迟熟)	21.64±1.19	14.14±1.31	10.67±1.23	极早	绿色	白色	无
v32	澄海香菇种	24.02±1.82	15.20±1.49	22.95±1.48	中	绿色	白色	有
v34	新会芥蓝	24.68±2.26	15.36±1.82	18.97±0.84	中	绿色	白色	无
v35	早格蓝	20.38±2.74	11.88±2.50	15.37±0.64	早	绿色	白色	无
v36	香港尖叶中花	26.30±2.90	16.14±2.46	21.04±0.52	极早	绿色	白色	无
v37	中花粗心芥蓝	23.62±0.95	17.16±1.15	12.81±0.64	极早	绿色	白色	无

续表2

编号	品种名	株高/cm	薹高/cm	薹粗/mm	熟性	菜薹颜色	花色	菇叶
v38	中花芥蓝(广州)	26.72±1.64	16.66±1.59	11.76±1.03	极早	绿色	白色	无
v39	中花芥蓝(阳春)	17.24±1.15	9.24±0.65	14.11±0.45	极早	绿色	白色	无
v40	优质中花芥蓝	25.78±2.05	16.96±2.02	20.17±0.92	极早	绿色	白色	无
v41	澳洲粗条甜脆芥蓝	24.66±3.15	14.52±2.68	25.37±0.59	早	绿色	白色	无
v42	耐热粗条芥蓝	28.64±3.21	16.06±2.26	13.14±0.38	极早	绿色	白色	无
v43	尖叶夏芥蓝	32.44±1.08	21.12±1.78	16.79±0.56	早	绿色	白色	无
v44	新加坡芥蓝王	21.20±0.46	11.60±0.28	17.76±1.54	早	绿色	白色	无

绝大部分芥蓝种质花的颜色为白色,但有3份种质为黄色。4份种质的叶片长有小叶(菇叶),其他种质则没有。

2.2 RAPD 扩增多态性

从150条购自Operoa公司的引物中成功筛选出20条多态性高、稳定性好、条带清晰的随机引物,用于所有供试材料的RAPD分析,并得到稳定的多态性谱带(表3)。20条引物共扩增出177条谱带,其中多态性谱带105条,平均每个引物扩增出8.9条谱带和5.3条

多态性谱带,多态性比率为59.32%。所用的20条引物中每条引物扩增出的条带数在4~13条之间。扩增条带数最少的引物为AT18,扩增出4条谱带;扩增条带数最多的引物为AW06,扩增出13条谱带。每条引物扩增出的多态性谱带为3~9条,引物的多态性比率为36.4%~80.0%。

2.3 RAPD 聚类分析

基于RAPD标记,将20条引物的扩增结果转化成0、1矩阵,利用NTSYS-pc2.11构建了树状聚类图谱

表3 RAPD 随机引物及其扩增结果

引物名称	引物序列(5'-3')	共扩增条带/条	多态性条带/条	多态率%
AS03	ACGGTCCAC	10	6	60.0
AS15	CTGCAATGGG	9	5	55.6
AS16	AACCCTTCCC	9	4	44.4
AT03	GACTGGGAGG	7	5	71.2
AT11	CCAGATCTCC	8	5	62.5
AT18	CCAGCTGTGA	4	3	75.0
AU05	GAGCTACCGT	9	7	77.8
AU10	GGCGTATGGT	9	6	66.7
AU16	TCTTAGGCGG	11	5	45.4
AV06	CCCGAGATCC	7	5	71.2
AV15	GGCAGCAGGT	6	4	66.7
AW02	TCGCAGGTTT	11	4	36.4
AW06	TTTGGGCCCC	13	7	53.8
AX11	TGATTGCGGG	12	9	75.0
AX14	CACGGGCTTG	5	4	80.0
AX20	ACACTCGGCA	12	9	75.0
AY07	GACCGTCTGT	7	3	42.9
AZ03	GGCTGTGTGG	11	5	45.5
AZ04	CCAGCCTCAG	10	6	60.0
AZ18	CCGACGTTGA	7	3	42.9
总数		177	105	59.32
平均数		8.9	5.3	59.32

(图1)。从图1中可以看出,44份芥蓝材料之间的相似系数介于0.60~1.00之间,在相似系数0.70处分为6类。

第1类均为粗薹芥蓝:包括粗条芥蓝(v23)、中花粗心芥蓝(v36)、澳洲粗条甜脆芥蓝(v40)、耐热粗条芥蓝(v41)。第2类为长有菇叶的品种:包括小香菇(v19)、老种香菇(v20)、矮脚香菇(v21)、澄海香菇种(v32)4个香菇种芥蓝,植物学性状调查也显示只有这4个品种长有菇叶(表2);小香菇、老种香菇和矮脚香菇3个品种相似系数接近为1,有可能为来自同一亲本的后代。第3类为黄花品种:包括桃山中花(v9)、中熟黄花芥蓝簇(v12)、红脚芥蓝(v22)。这3个品种的花色为黄色(表2),而其余品种的花色为白色。其中桃山中花与中熟黄花芥蓝簇又聚为一类,而红脚芥蓝单独为一类,这是因为前两者菜薹薹茎为绿色,而后者为红色。第4类均来自新会:包括新会种-春播(v18)、新

会芥蓝(v33)。第5类为3个叶用品种:包括桃山中花(v3)、铁种芥蓝(v5)、本地铁种(v8)。第6类包括剩余的28个芥蓝品种。

第6类在相似系数0.74处又进一步分为7亚类。第1亚类包括中花芥蓝-澄海(v1)、中迟芥蓝(v2)。2个品种的长势比较弱;第2亚类包括皱叶芥蓝(v29),唯一的皱叶品种;第3亚类包括香港尖叶中花(v35);第4亚类包括曲溪格蓝簇(v4)、快格蓝簇(v10)、早格蓝(v34)、省种芥蓝(v6)、曲溪圆叶(v7)、华格蓝(v31)、中熟白花芥蓝簇(v13)、香菇芥蓝(v14)、乌叶格蓝(v30)、选种格蓝簇(v11);第5亚类包括中花芥蓝-潮州(v24)、薄叶赤叶(v25)、中花芥蓝-广州(v37)、中花芥蓝-阳春(v38)、尖叶夏芥蓝(v42)、优质中花芥蓝(v39),此类均为极早熟品种(表2);第6亚类包括新加坡芥蓝王(v43)、广州中迟花芥蓝(v44),2个品种长势较旺,侧芽萌发力较强;第7亚类包括小叶孤老种

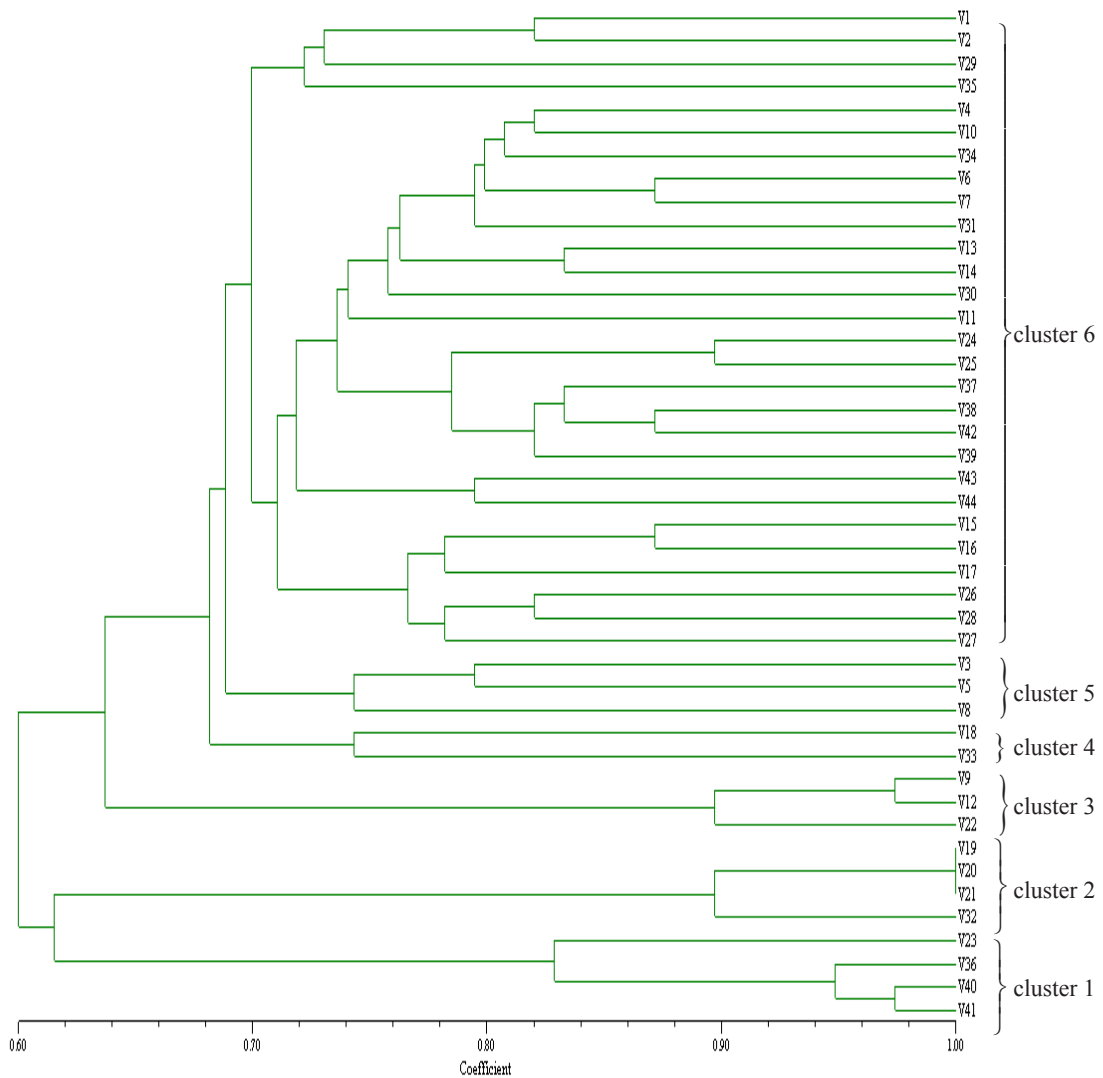


图1 基于RAPD标记的44份芥蓝种质的UPGMA聚类图

(v15)、大叶孤老种(v16)、新会种(v17)、晚熟龟老种(v26)、中熟龟老种(v27)、早花芥蓝(v28)。

3 结论与讨论

本研究利用 RAPD 分子标记进行芥蓝种质资源遗传多样性分析,从 150 条随机引物中筛选出 20 个引物,将 44 份芥蓝材料划分为 6 大类群。在分子水平上的分类结果与品种特性在很大程度上还是一致的:第 1 类的 4 个芥蓝品种均为粗薹芥蓝,第 2 类则为 4 个菇叶品种,第 3 类为 3 个黄花品种,第 5 类为 3 个叶用品种,第 1 亚类和第 6 亚类则根据长势的强弱分为一类。但是,芥蓝品种并没有按照它们的熟性分为相应的类群,这可能是由于人们在实际的栽培中,常常根据地区和生产上的需要来确定品种的成熟期,缺少一个统一界定的标准。以成熟期来作为多样性分类的依据,会有一定的局限性和不可靠性。本研究采用 RAPD 技术在 DNA 水平上对芥蓝分类,有别于成熟期和植株性状分类,可为芥蓝种质资源的进一步利用提供理论依据和参考。

20 个引物在 44 份芥蓝种质中的多态性比率为 59.32%,说明芥蓝种质之间存在着一定的遗传多样性。芥蓝种质资源 RAPD 多态性比率相对较低,可能与供试材料的来源有关,芥蓝原产于华南地区,主要生产地区也在华南地区,大部分材料来自广东,它们的地域差异相对较小。

参考文献

- [1] 关佩聪主编.广州蔬菜品种志[M].广州:广东科技出版社,1994:24-28.
- [2] 刘海涛,关佩聪.黄花芥蓝与白花芥蓝的分类学关系[J].华南农业大学学报,1997,18(2):13-16.
- [3] 刘海涛,关佩聪.芥蓝的分类学研究[J].华南农业大学学报,1998,19(4):82-86.
- [4] 张平真.关于芥蓝起源的研究[J].中国蔬菜,2009(14):62-65.
- [5] 陈新娟,朱祝军,杨静,等.芥蓝叶和薹的硫代葡萄糖苷组分及含量[J].园艺学报,2006,33(4):741-744.
- [6] 张静,张鲁刚.芥蓝种质资源的多样性和聚类分析[J].西北农业学报,2008,17(4):285-289.
- [7] 张静,张鲁刚,张玉.芥蓝种质资源营养成分及商品性评价[J].中国蔬菜,2009(16):41-44.
- [8] 王劲,袁旭,李旭峰.芥蓝 cDNA 文库的构建及文库质量检测[J].四川大学学报(增刊),2000,37:76-79.
- [9] 陈书霞,王晓武,方智远,等.RAPD 标记构建芥蓝×甘蓝分子标记连锁图[J].园艺学报,2002,29(3):229-232.
- [10] 陈书霞,王晓武,方智远,等.芥蓝×甘蓝的 F₂ 群体抽薹期性状 QTLs 的 RAPD 标记[J].园艺学报,2003,30(4):421-426.
- [11] 王晓武,姜平,何杭军,等.利用芥蓝×青花菜 DH 群体构建 AFLP 连锁图谱[J].园艺学报,2005,32(1):30-34.
- [12] 陈云鹏,曹家树,缪颖,等.芸薹类蔬菜基因组 DNA 遗传多样性的 RAPD 分析[J].浙江大学学报,2000,26(2):131-136.
- [13] 田源,王超.甘蓝类蔬菜亲缘关系的 RAPD 初步分析[J].中国蔬菜,2008(1):20-21.
- [14] 伍宁丰,李汝刚,伍晓明,等.中国甘蓝型油菜遗传多样性的 RAPD 分子标记.生物多样性,1997,5(4):246-250.
- [15] 董媛媛,俞咪娜,李小白,等.EST-SSR 和 RAPD 标记检测油菜 (*Brassica napus*) 遗传多样性[J].核农学报,2008,22(5):611-616.
- [16] 林建丽,朱正歌,王建成,等.白菜类蔬菜种质资源亲缘关系的 RAPD 分析[J].华北农学报(增刊),2008,23:183-189.
- [17] 韩建明,侯喜林,徐海明,等.不结球白菜种质资源遗传多样性 RAPD 分析[J].南京农业大学学报,2008,31(3):31-36.
- [18] 宋明,刘婷,汤青林,等.芥菜种质资源的 RAPD 和 ISSR 分析[J].园艺学报,2009,36(6):835-842.
- [19] 陈文文,刘厚诚,陈日远,等.芥蓝 RAPD 反应体系的建立[J].中国农学通报,2010,26(6):22-25.