

中国甘蓝型油菜遗传多样性的 RAPD 分子标记*

伍宁丰¹ 李汝刚¹ 伍晓明² 朱莉¹ 范云六¹ 钱秀珍²

1 (中国农业科学院生物技术研究中心, 北京 100081)

2 (中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062)

摘要 本文利用 RAPD 方法和统计学分析,对我国 7 省市和国外引进的总计 40 份甘蓝型油菜品种的遗传多样性进行了研究。结果表明,40 个品种的甘蓝型油菜存在着广泛的遗传变异,根据 RAPD 指纹图谱,通过在 DNA 分子水平上的聚类分析可以将它们分为 3 大类群,反映出这些品种之间的亲缘关系,并对如何引进甘蓝型油菜资源进行了初浅的讨论。

关键词 甘蓝型油菜, RAPD, 遗传多样性

RAPD molecular markers and genetic diversity among 40 cultivars of *Brassica napus* in China/ Wu Ningfeng¹, Li Rugang¹, Wu Xiaoming², Zhu Li¹, Fan Yunliu¹, Qian Xiuzhen² // CHINESE BIODIVERSITY. —1997, 5(4): 246 ~ 250

The genetic diversity and the relationship among 40 cultivars of *Brassica napus* from seven Provinces of China and other countries *Brassica napus* was analyzed by RAPD technique and statistical methods. Cluster analysis showed that the extensive genetic variation existed among 40 cultivars of *B. napus*. The 40 cultivars were divided into three groups at DNA level. This result has significance for the genetic breeding of *Brassica napus*.

Key words *Brassica napus*, RAPD, genetic diversity

Author's address 1) Biotechnology Research Center, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081

2) Institute of Oil Crop, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062

甘蓝型油菜是我国栽培的 3 大油菜之一,也是我国长江流域的主要油菜栽培种^[1]。虽然我国不是甘蓝型油菜的起源地,但本世纪以来,尤其 40、50 年代以来,从加拿大、欧洲及日本等国引进了许多品种。这些品种在形态特征、品质、抗性、生态特点和繁育特性方面各具特色,明确各品种之间的相互关系,将为利用杂交优势,提高油菜的品质、产量及适应性提供理论基础。同时通过研究这些品种的遗传变异,为进一步从国外引进资源提供依据。

80 年代以前,研究品种之间的遗传差异都是根据作物的形态特征、同工酶酶谱等进行的。例如, Coulthart M.^[2] 等就利用蛋白质和同工酶模式鉴定了芸苔属的种间关系。众所周知,品种之间可区别的形态特征较少,而同功酶谱带多态性小,因而不适应于研究品种之间的相互关系。进入 80 年代以后,分子生物学迅猛发展,使人们可以在基因组水平上对生物进行指纹分析。其中 RAPD 技术是在 PCR 基础上发展起来的研究生物基因组差异的新的分子标记技术,由于它具有操作简单方便、DNA 用量少、无需放射性同位素标记等等优点,现已被广泛应用于研究植物资源的遗传多样性^[3-5]。

收稿日期:1996-07-09;接受日期:1996-10-24

* 本研究项目为国家劳动人事部留学回国人员择优资助项目。中国农科院品种资源研究所计算机室副研究员曹永生同志协助聚类分析,特此致谢

1 材料和方法

1.1 植物材料 本实验所选用的 40 个甘蓝型油菜品种来自我国及世界各地,均由中国农科院油料作物研究所资源室保存,见表 1。从每一个品种内,随机取 5 个植株,每株叶片 4~5 片。在 4℃ 下运至北京,冷冻干燥,保存在 -20℃ 冰箱中,待用。

表 1 实验用的 40 个甘蓝型油菜品种

Table 1 The 40 cultivars of *Brassica napus* used in the experiments

序号 Order No.	编号* Cultivar	品种名称 Cultivar	来源 Origin	系谱 ⁽⁹⁾ Pedigree
1		Norin 3	日本	Wase-chosen 系选
2		Norin 30	日本	Norin 16 × Isobe-zairai
3	1348	Oro	加拿大	
4	3307	Ledos	西德	
5		Norin 5	日本	Yokkaichi-kurodane 系选
6		Norin 31	日本	Norin 17 × Isuzu
7	1248	湘油 2 号	湖南	胜利油菜 → 黔油二号 × 云油七号
8	1249	湘油 3 号	湖南	胜利油菜 → 182 系选
9	1250	湘油 4 号	湖南	胜利油菜 → 71-39 → 217 系选
10	1251	湘油 5 号	湖南	胜利油菜 → 慈油一号 → 1074 × 306
11	1252	邵胜 3 号	湖南	胜利油菜系选
12	1254	71-39	湖南	胜利油菜 → 东胜 14 系选
13	1255	慈油 1 号	湖南	胜利油菜系选
14	1256	慈油 2 号	湖南	胜利油菜 → 322 系选
15	1257	辰油 2 号	湖南	胜利油菜 → 辰油一号 × 川油二号
16	1258	潭油 3 号	湖南	胜利油菜 → 矮架早 →
17	4678	III-227	四川	
18	5142	28621	西德	
19	5141	28620	西德	
20	5133	28670	西德	
21	5132	28669	西德	
22	5131	28663	西德	
23	5117	1655	西德	
24	2789	中油 821	湖北	苏早 3 × [(白油 1/云油 7) × (甘油 3/甘油 1)] × 71-5]
25	2781	B104	河南	
26	2787	甘油 5 号	湖北	胜利油菜 → 318 → 辐射处理系选
27	4545	230	陕西	
28	5199	Ramon - 3	荷兰	
29	4767	定油一号	贵州	
30	5168	Lirawell	西德	
31	5167	Kait	西德	
32	5165	Callypso	西德	
33	5218	celebra	加拿大	
34	5208	korall	瑞典	
35	4479	密角多头油菜	上海	
36		三子叶油菜	湖北	
37		复果油菜	湖北	中油 821 突变体
38		中双 1 号	湖北	Oro × 上海 2413 → (81008 × 甘油五号) × 澳双低 PB52
39		甘油 1 号	湖北	胜利油菜 → 363 → 系选
40		Norin 6	日本	

*《中国油菜品种资源目录》总编号

Number of cultivar in 《Catalog of Oilseed Brassica Cultivars in China》

1.2 基因组 DNA 的提取 参考 Colosi 和 Schaal^[6]的方法,取 0.06~0.1g 冻干的叶片放到 1.5 ml 离心管中,用直径 4 mm 的钢珠,在液氮冷冻条件下打碎组织。DNA 的提取参考 Hillis^[7]的方法,用 CTAB 缓冲液提取。提取好的 DNA 溶于 100 μ l 的 TE 缓冲液中。用 DU-70 分光光度计确定 DNA 的浓度。

1.3 DNA 扩增 将每个品种的 5 个个体基因组 DNA 等量混合,稀释至 5 ng/ μ l,进行 PCR 反应。PCR 反应所用扩增仪型号为 PTC-100(MJ Research Inc, USA)。反应液总体积为 25 μ l,含 10 mmol/L Tris-Hcl (pH8.3), 2.5 mmol/L MgCl₂, 0.2 mol/L dNTP (B.M 公司进口分装), 0.64 μ mol/l 引物 DNA (加拿大哥伦比亚大学生物技术实验室), 0.625 单位 TaqDNA 聚合酶(北京农业大学中心实验室)及 25 ng 的模板 DNA。反应程序为:94 1 min, 38 5 min, 以 0.2 /sec 上升至 72, 72 3 min, 45 个循环。

1.4 电泳分析 DNA 扩增产物在 1 \times TAE 缓冲液中用 1.5% 琼脂糖胶分离,溴化乙锭染色,标准 DNA 分子量用 PCR Marker (华美生物工程公司)。

1.5 聚类分析 根据离差平方和,用 Wards 聚类方法进行聚类。

2 结果

2.1 RAPD 引物的筛选 为得到可靠的 RAPD 结果,从 40 个品种中选择 2 个地理差异较大的样品(Norin3 和湘油 3 号)DNA 作模板,对寡核苷酸引物进行筛选。选择那些所产生的 DNA 条带清晰、两个样品之间有较高多态性的引物,共选择了 21 个引物用于所有基因组 DNA 样品的扩增。本实验所选用的适宜的寡核苷酸引物见表 2。

2.2 PCR 扩增结果 在扩增了甘蓝型油菜基因组 DNA 的实验中,21 个 DNA 引物产生了

表 2 实验用寡核苷酸引物序列

Table 2 Oligonucleotide primers used in the test

序号	序列(5~3)	序号	序列(5~3)	序号	序列(5~3)
1	AGG ACG TGC C	8	CGA CAG TCC C	15	CCT CCT TGA C
2	CAG CGA ACT A	9	CGC CCC CAG T	16	CCG CGA GCA C
3	CTC AGC CCA G	10	TCC ACC GA G C	17	AGC TGA AGA G
4	GTC GAT GTC G	11	CCG GGC AAG C	18	TCG TGT TGC T
5	CCA CCC AGA G	12	GGT TCC AGC T	19	CGC GTT CCT G
6	CGG TGA CAT C	13	CGG CCA CCG T	20	TGT CAG CGG T
7	CGC GTG CCA G	14	GGG CGC CTA G	21	GGC TAG GGC G

表 3 甘蓝型油菜的 3 大类群

Table 3 Three groups of *Brassica napus*

类群 Group	品种 Cultivars	来源 Origin
1	辰油 2 号、慈油 2 号、慈油 1 号、III = - 227、邵胜 3 号、湘油 5 号、Oro、Norin 5、Norin 31、Norin 30、Norin 3	湖南(5/11)、日本(4/11)、加拿大(1/11)、四川(1/11)
2	密角多头油菜、Korall、Celebra、Ramon-3、定油一号、Callypso、Kait、Lirawell、230、28669、28670、1655、28663、28620、28621、Ledis	德国(10/16)、陕西(1/16)、荷兰(1/16)、贵州(1/16)、瑞典(1/16)、加拿大(1/16)、上海(1/16)
3	Norin 6、三子叶油菜、甘油 1 号、中双 1 号、复果油菜、B104、甘油 5 号、中油 821、潭油 3 号、71-39、湘油 3 号、湘油 4 号、湘油 2 号	湖北(6/13)、湖南(5/13)、日本(1/13)、河南(1/13)

180 条带,平均每个引物产生 8.5 条 DNA 带,DNA 片段的长度大约在 200 ~ 1600 碱基之间。其中有 113 条带有多态性,占 63%。图 1 显示出引物 21(GGC TAG GGC G)扩增的结果。

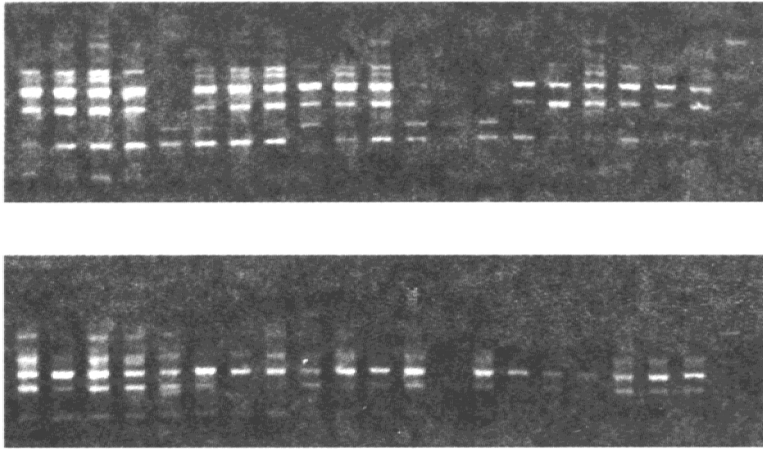


图 1 引物 21 扩增甘蓝型油菜基因组 DNA 的图谱

Fig. 1 The genomic DNA pattern of *Brassica napus* amplified with primer 21

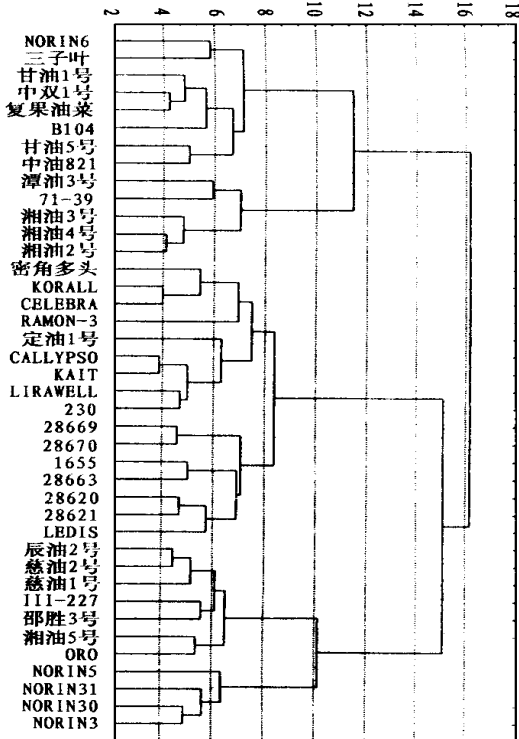


图 2 40 个甘蓝型油菜品种的相互关系

Fig. 2 The relationship among 40 accessions of *Brassica napus* as determined by Ward's cluster method from RAPD data

2.3 聚类分析 我们利用离差平方和的方法做聚类分析,图 2 表明甘蓝型油菜存在着广泛的遗传差异。依据它们的遗传距离,从分子水平着眼可将其分为 3 大类群(表 3)。

3 讨论

甘蓝型油菜起源于欧洲地中海沿岸,然后先传入日本、朝鲜等国,30、40 年代由日本和英国传入我国^[10]。解放初期甘蓝型油菜品种胜利油菜开始在我国广泛推广,目前我国广泛种植的甘蓝型油菜有 97% 是由胜利油菜系选或杂交得到的^[9]。我们的 RAPD 聚类分析结果显示了品种的亲缘关系,从 3 大类群看,第一大类群为日本引进的 Norin 和胜利油菜亲缘群;第二大类群主要为欧洲和加拿大引进的;第三大类群中一部分为胜利油菜亲缘群,一部分为国外引进种而后杂交得到。亲缘关系近的那些品种聚集在一起,如从西德引进的 Ledis、28620、28621、28663、1655、28670、28669 聚集在一起,由胜利油菜系选得到

的湘油 2 号、湘油 3 号、湘油 4 号和 71-39、潭油 3 号聚集在一起。我们还发现,同是胜利油菜系选的邵胜 3 号和 71-39 并没有聚在一起,被分到两个组中,在分子水平上有很大的遗传差异,可能与不同选择方向下选育有关。本项研究明确了 40 个甘蓝型油菜品种之间的相互关

系,国外引进的品种与国内品种之间存在着一定的遗传距离。因此,该研究可为进一步引进国外油菜品种及扩大我国的遗传资源提供依据。由于 RAPD 的指纹图谱结果可区别不同来源的品种,因而可用于品种认定。同时,为油菜的遗传育种及杂种优势利用提供了依据。

参 考 文 献

- 1 刘后利主编. 油菜的遗传和育种. 上海科学技术出版社,1985
- 2 Coulthart M, K E Denford. Isozyme studies in *Brassica* I. Electrophoretic techniques for leaf enzymes and comparison of *B. napus*, *B. cdmpestris* and *B. oleracea* using phosphoglucomutase. *Can. J. Plant Sci.*, 1982, **62**:621 ~ 63
- 3 Jianping R, James R McFerson et al. Identites and relationships among Chinese vegetable *Brassica* as determined by random amplified polymorphic DNA markers. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 1995, **120**(3):548 ~ 555
- 4 Mazzucato A, G Barcaccia et al. Random amplified polymorphic DNA and genetic diversity in Indian *Musa* germplasm. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 1995, **42**(2):107 ~ 118
- 5 Link W, C Dixkens et al. Genetic diversity in European and Mediterranean faba bean germplasm revealed by RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, **90**(1):27 ~ 32
- 6 Colosi J C, B A Schaal. Tissue grinding with ball bearing and vortex mixer for DNA extraction. *Nucleic Acids Research*, 1993, **21**:1051 ~ 1052
- 7 Hillis D M et al. Nucleic acids III. Sequencing. In: Hillis D M, C Mortiz (eds), *Molecular systematics*, Sunderland, 1990, 318 ~ 370
- 8 钱秀珍. 我国甘蓝型油菜品种(系)的系谱初析. 中国油料, 1985, (2):11 ~ 14
- 9 刘后利. 几种芸苔属油菜的起源和进化. 作物学报, 1984, **10**(1):10 ~ 18