

# 大白菜种质资源遗传多样性及纯度检测的研究

张 勇,张耀伟,崔崇士

(东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030)

**摘 要:** 本试验应用 RAPD 方法对 60 份大白菜品种资源进行了遗传多样性的研究,采用 NTSYS 软件按 UPGMA 方法进行聚类分析,试验结果为以后的亲本选配提供了理论的依据;同时对同一自交系不同单株间进行了纯度检测,表明所选用的纯度已经基本趋于稳定的状态。

**关键词:** 大白菜; 种质资源; 遗传多样性

**中图分类号:** S634.102.4 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2006)06-0001-03

种质资源遗传多样性分析,是种质资源研究工作重要组成部分,它可以为杂交亲本选择、选配提供依据,并有效地预测杂种优势,鉴定品种间遗传多样性与品种演化关系等<sup>[1]</sup>。RAPD 技术从 DNA 分子水平反映基因组的多态性,更能准确揭示个体间的差异程度,判断品种间亲缘关系的远近,通过品种之间的遗传距离,进行系谱分析和分类的研究。

RAPD 用于大白菜遗传多样性的研究很多,黄宝勇,曲士松等<sup>[2]</sup> 对大白菜 11 个地方种质材料进行遗传多样性分析,结果表明,当遗传距离为 0.18 时,11 份材料可分为二个生态类群,第一类群属于直筒类型,第二类群在 0.15 时,又分为二个类群,矮桩类型和直筒与矮桩的过渡类型。同时表明,应用 RAPD 选择特定引物在大白菜不同品种间进行遗传多样性、亲缘关系及品种鉴定等研究是可行的。本试验目的是应用 RAPD 方法对 60 份大白菜试材进行遗传多样性及亲缘关系的分析,以期为大白菜育种工作提供的理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

试验用 60 份大白菜品种资源由东北农业大学大白菜育种研究室提供,其中部分是同一品种不同单株(见表 1)。

表 1 用于抗性分析的大白菜资源

编号	品种或品系	编号	品种或品系	编号	品种或品系	编号	品种或品系
1	A17-4-1	16	A29-2-2-5	31	A103-3	46	A19-2
2	A17-4-2	17	A23-1	32	A49	47	A105-3
3	A17-4-3	18	A23-2	33	A48-2	48	A42-1
4	A17-4-4	19	A23-3	34	A46-1	49	A155
5	A17-4-5	20	A23-4	35	A42-2	50	A102
6	A17-4-6	21	A23-5	36	A16	51	CMS90-413
7	A53-1-1	22	CMS17-4-1	37	A105-1	52	A68
8	A53-1-2	23	CMS17-4-2	38	A9-1	53	A33-2
9	A53-1-3	24	T19-4-1	39	A107	54	A8-2-2
10	A53-1-4	25	T19-4-2	40	A52	55	A27-1
11	A53-1-5	26	T19-4-3	41	A156	56	A23-2
12	A25-1	27	T19-4-4	42	A58-1	57	A8-1-1
13	A25-2	28	CMS19-4-1	43	A67	58	A11-20
14	A29-2-2-3	29	CMS56	44	A90431	59	A11-20
15	A29-2-2-4	30	A56-1	45	A54-1	60	A19-2-2

### 1.2 试验方法

\* 基金项目: 国家“863”技术项目部分研究内容,项目编号: 2003AA207120  
收稿日期: 2006-06-20

1.2.1 基因组 DNA 的提取 为提高 DNA 的质量和减少对试验的影响,采用改良的 CTAB 法提取<sup>[3]</sup>。

1.2.2 RAPD 扩增体系的优化 对 PCR 反应条件进行了优化,对模板、引物、TaqE、Mg<sup>2+</sup>、dNTP 和循环次数分别做了浓度梯度试验<sup>[4]</sup>。最终确定的 RAPD 反应体系为 25  $\mu$ L,反应液组成为:模板 40 ng,引物 0.30  $\mu$ mol/L, TaqE 1.5  $\mu$ , Mg<sup>2+</sup> 2.0 mmol/L, dNTP 0.16 mmol/L; PCR 反应扩增程序:94  $^{\circ}$ C 预变性 7 min, 94  $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36  $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s, 35 个循环; 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。应用美国 PE 公司生产的 PE-480 型扩增仪,扩增产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶上电泳分离,溴化乙锭染色后,在紫外凝胶成像系统中观察并拍照。

1.2.3 引物筛选 筛选了 160 条上海生物工程公司的随机引物,首先用 1、15、30 号 3 个大白菜品种混合的 DNA 进行引物的筛选工作, RAPD 扩增反应均重复 3 次,取可重复和清晰的条带进行记录分析,然后利用筛选出的多态性好的引物进行 60 份大白菜材料遗传多样性分析。

1.2.4 统计方法 扩增结果有带记为 1,无带记为 0。用 NTSYS- $\mu$ c 软件以不加权重对算术均法(UPGMA)进行聚类分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物的筛选 筛选出引物见表 2。

表 2 RAPD 扩增所用的引物序列

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
S4	GGACTGGAGT	S142	GGTCCGGGAA	S331	CTCAGTCGCA
S21	CAGGCCCTTC	S175	TCATCCGAGG	S394	GTGACAGGCT
S37	GACCGCTTGT	S187	TCCGATGCTG	S410	TCTGGCGCAC
S60	ACCCGGTCAC	S189	TCTGTGTCCC	S413	GCTGCTCAAG
S66	GAACGGACTC	S192	CTGGGTGAGT	S434	TGCTGCGGCT
S69	CTCACCGTCC	S263	GTCCGGAGTG	S473	GGAGTGCCTC
S83	GA GCCCTCCA	S268	GACTGCCCTCT	S498	AGGCTGCGTG
SI05	AGTCGTCCCC	S279	CAAAAGCGCTC		
SI12	ACGGCCATGT	S302	TTCCGCCACC		

用以上筛选出的 25 条引物对 60 份大白菜品种资源进行 PCR 扩增,共扩增出 231 条带,多态带总数为 192 条,占总带数的 83.11%,平均每个引物扩增出 9.24 条,有多态的条带在 4~12 之间,每个引物平均扩增出多态性条带数为 7.68 条带。所用引物见表 3。

2.2 扩增结果

本文给出了引物 S410 扩增的照片(见图 1)。图 1 的编号与表 1 的编号是对应的。

表 3 25 个引物对 60 份大白菜材料扩增的多态性片断统计

引物	扩增带数	多态性带数	多态性比率(%)	引物	扩增带数	多态性带数	多态性比率(%)
S4	8	6	75.00	S21	9	8	77.77
S37	10	8	80.00	S60	8	5	62.50
S66	11	8	72.72	S69	12	9	75.00
S83	11	10	90.91	S105	9	8	88.89
S112	12	11	91.67	S142	10	9	90.00
S175	9	8	88.88	S187	13	11	84.60
S189	11	9	81.81	S192	6	4	66.67
S263	9	8	88.88	S268	7	6	85.71
S279	8	6	75.00	S302	10	9	90.00
S331	6	5	83.30	S394	10	8	80.00
S410	8	7	87.50	S413	9	7	77.77
S434	7	6	85.7	S473	8	7	87.5
S498	10	9	90.00				

2.3 大白菜品种资源遗传多样性分析

从图 2 中可以看出: (1) 同一高代自交系不同单株亲缘关系都很近, A17~4 的不同单株(1~6)遗传相似系数为 0.947~0.684, 单株 A17-4-4 与其它单株的亲缘关系较远, 遗传相似系数为 0.684, 说明其纯度还不是很高; A53 的不同单株(7~11), 遗传相似系数在 0.737~1 之间, A25 的不同单株(12、13)的遗传相似系数是 0.842, A29-2-2 的不同单株(14~16)的遗传相似系数是 0.789, A23-1 的不同单株(17~21)的遗传相似系数在 0.772~0.947 之间, CMS17-4 的不同单株(22、23)遗传相似系数是 0.947, T19-4 的不同单株(24~27)的遗传相似系数在 0.684~0.947 之间, 单株 T19-4-4 与其它单株最小的遗传相似系数最小的为 0.684, 也说明其纯度不是很高; 其它的同一高代自交系不同单株之间进行了遗传多样性分析, 遗传相似系数都较大, 遗传相似系数

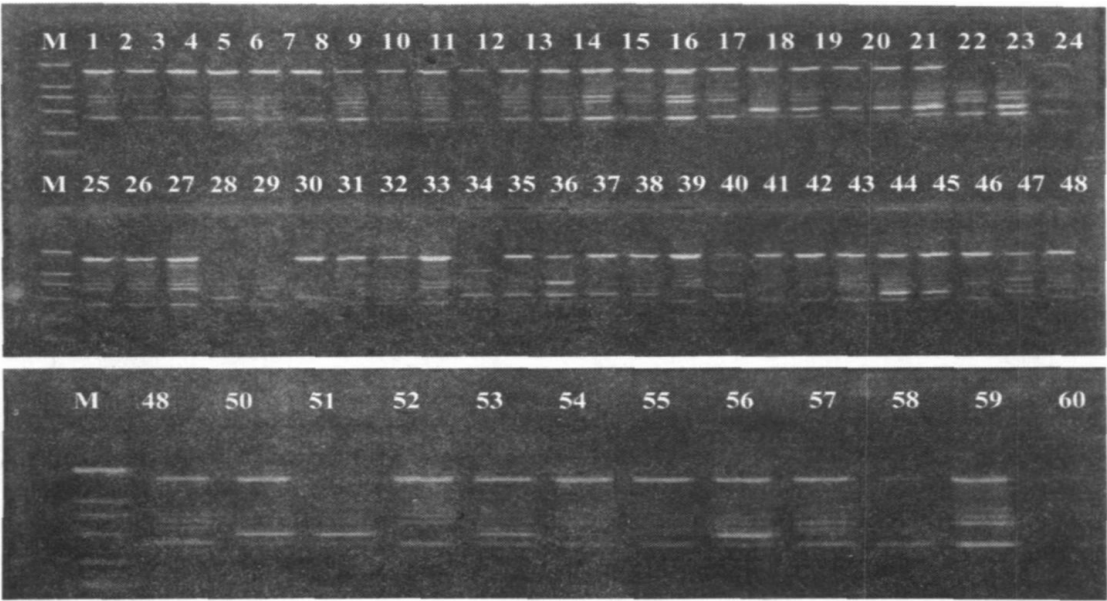


图 1 RAPD 引物 S410 扩增的产物(1~60 份资源)(Marker DL2000)

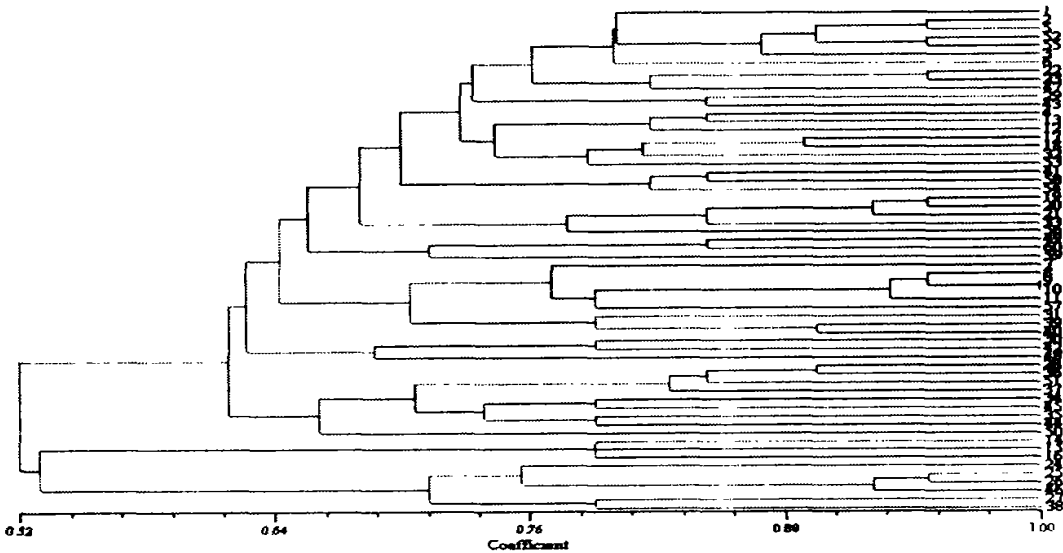


图 2 基于 RAPD 数据的 60 份大白菜种质资源的 UPGMA 聚类图

都在 0.737~1 之间,表明所选用的其纯度已经趋于稳定的状态。(2)CMS17-4(22、23)是 A17-4 的不同单株(1~6)的保持系,它们之间的亲缘关系很近,遗传相似系数在 0.684~0.842 之间,多数的遗传相似系数在 0.737~0.842,表明所选用的保持系已经基本具有高代自交系的特点,能够作为保持系而应用。(3)60 份大白菜自交系的亲缘关系为以后的杂交育种提供了理论依据,可以根据需要选用不同亲缘关系的高代自交系作为亲本进行杂交,从而创造新的种质资源。

### 3 讨论

传统的对自交系和杂交种的室内鉴定工作主要是利用蛋白质及同工酶电泳的方法,这些方法的检测也都是基因表达的最终产物,并且可供测定的蛋白质及同工酶很有限,对于一些亲缘关系比较近的材料很难用这些方法区分开。应用分子标记技术很容易解决这些问题,郭景伦(1999)等应用 RAPD 技术分析了玉米 46 个自交系,通过几个引物的组合就将 46 个玉米自交系全部区分开<sup>[3]</sup>。本试验也应用 RAPD 技术分析

了同一高代自交系不同单株的纯度,其纯度都很高,表明应用 RAPD 技术选择特定引物分析同一高代自交系的不同单株的纯度研究是可行的。同时还对其它高代自交系之间进行了亲缘关系的分析,为杂交亲本选择提供了理论依据,这样就可以减少育种工作的盲目性,为品种改良及种质交流奠定基础。

#### 参考文献:

- [1] Lowe AJ. A standard molecular genetic technique used in identify of germplasm resource; random amplified polymorphic DNA[J]. Plant Genetic Resources Newsletter, 1996, 107: 50-54.
- [2] 黄宝勇, 曲士松. 大白菜地方种质种内遗传关系的 RAPD 分析[J]. 山东农业大学学报, 2002, 33(2): 154-157.
- [3] 王关林. 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 2002, 743-744.
- [4] 史公军, 侯喜林. 不结球白菜 RAPD 反应体系的优化[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(1): 1-5.
- [5] 郭景伦. 玉米单粒种子 DNA 提取方法及在玉米种质鉴定中的应用研究[J]. 种子, 1999, 2(101): 37-38.

## The Analysis of the Genetic Diversity and the Checkage of Purity in Chinese Cabbage

ZHANG Yong, ZHANG Yao—wei, CUI Chong—shi

**Abstract:** This paper used RAPD way, to research the genetic diversity of 60 varieties in Chinese cabbage and used UPGMA to analyze that could be supplied the foundation of the matched parents. Analyzed the genetic diversity of the different plant in the same varieties the results indicated that the purity was stable.

**Keywords:** Chinesecabbage; Germplasm resources; Genetic diversity

果农的挚友 致富的向导

### 欢迎订阅《果树实用技术与信息》

《果树实用技术与信息》是由中华人民共和国农业部主管,中国农业科学院主办的果树类月刊。集科学性、实用性、时效性于一体。为满足广大读者的要求,适应我国果树生产和发展的需要,2007 年全新扩版,由 32 开本改为 16 开本。扩版后将丰富原有栏目,新增产销动态、市场行情、果园综合开发、知识角等栏目,全方位报导我国果树生产和发展的最新动态、新技术、新成果、新品种、新农药等。内容将更加丰富、实用、及时;同时提高装帧印刷质量,内文采用双胶纸印刷,提质不提价。欢迎踊跃订阅、欢迎惠登广告,欢迎投稿。

主要栏目:专家论坛、果业动态、果树栽培技术、果树医院、果农顾问、果品贮藏与加工、优新品种、新农药、产销动态、市场行情、果园综合开发、知识角等。

及时 实用 专业 权威

国内发行,邮发代号:8-220,每册定价 3.8 元,全年 45.6 元,读者可到当地邮局(所)订阅,也可向本刊编辑部订。

地址:辽宁省兴城市中国农业科学院果树研究所《果树实用技术与信息》编辑部

邮编:125100

电话:0429-5126953

邮箱: gssyjs2007@sohu.com