

白菜类蔬菜亲缘关系的 AFLP 分析

孙德岭¹ 赵前程² 宋文芹¹ 陈瑞阳¹

(¹南开大学生命科学学院, 天津 300192; ²天津市蔬菜研究所, 天津 300384)

摘要: 利用 AFLP 分子标记技术对白菜类蔬菜间的亲缘关系进行了研究。使用 10 对选择性引物组合, 扩增出 4 173 条扩增带, 并对其进行聚类分析。结果表明: 芜菁与结球白菜和不结球白菜亲缘关系远; 而结球白菜与鸡冠菜和毛白菜亲缘关系较近, 与其它不结球白菜亲缘关系较远。从分子水平上分析了薹菜、菜薹、柴乌、箭杆白、马耳朵白等不结球白菜类蔬菜之间的亲缘关系。

关键词: 白菜类; AFLP; 亲缘关系

中图分类号: S 634 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 04-0331-05

白菜类蔬菜包括不结球白菜、结球白菜和芜菁 3 个亚种类型, 因其品种类型丰富、亲缘关系复杂, 早期植物分类学家对其定名后, 国内外许多学者又根据形态特征、生理性状、杂交关系、染色体组成及地理分布等特性, 对其进行过多方面的研究和论证^[1~5], 但在分类和起源上仍说法不一, 存有争议^[6]。本研究采用 AFLP 分子标记技术, 从分子水平上分析了白菜类各品种间的亲缘关系, 为研究白菜类蔬菜起源、演化及分类提供理论依据。

1 材料与方法

供试材料由天津市蔬菜研究所及中国农业科学院蔬菜花卉研究所资源库提供 (表 1)。

1.1 DNA 提取

取叶片在液氮冷冻条件下用研钵研碎。DNA 的提取参照 Murray 的 CTAB 法^[7]。提取到的 DNA 经 0.7 % 琼脂糖凝胶电泳与已知浓度的 Lambda DNA 进行对比, 对提取的总 DNA 进行检测。

1.2 AFLP 分析

参照 Vos 等^[8]的方法, AFLP 试剂盒购自 GIBCO-BRL 公司。每个样品总 DNA 250 ng, 经限制内切酶 EcoR 和 Mse 消化后, 在消化片段末端加上人工接头。共用了 10 个 EcoR 引物 (E₁: E+ACC, E₂: E+AAC, E₃: E+ACA, E₄: E+ACC, E₅: E+ACT, E₆: E+AGC, E₇: E+AAC, E₈: E+AAC, E₉: E+ACA, E₁₀: AGC) 和 10 个 Mse 引物 (M₁: M+CTC, M₂: M+CTT, M₃: M+CTG, M₄: M+CTG, M₅: M+CAC, M₆: M+CTC, M₇: M+CAG, M₈: M+CTC, M₉: M+CTT, M₁₀: M+CAA), 其中 E 和 M 分别表示 EcoR 引物和 Mse 引物共同序列, E 表示的共同序列为 5'-GACTGCGTACCAATTC-3', M 表示的共同序列为 5'-GATGAGTCCTCACTAA-3', E 与 M 后的 3 个碱基为选择性碱基, 分别接在 E 和 M

收稿日期: 2000-11-24; 修回日期: 2001-04-06

的 3 端。

电泳结束后，将两块玻璃小心分开，把凝胶放入 10 % 的乙酸中固定，直至前沿颜色褪尽，然后用双蒸水洗涤 3 次，每次 2 min，沥干水后转至染色液（2 g 硝酸银，3 mL 37 % 甲醛，溶于 2 L 双蒸水）中染色 30 min，再用双蒸水洗涤 5 ~ 6 s。转至显影液（60 g 碳酸钠，3 mL 37 % 甲醛，400 μL 10 % 硫代硫酸钠溶于 2 L 双蒸水中）显色，至电泳条带清晰，加入等体积 10 % 乙酸定影。将凝胶用双蒸水洗涤后，自然干燥。

1.3 数据处理和分析

选择清晰可辨的电泳带，以 1 和 0 记录多态片段的有和无，以获得矩阵。将矩阵用 NTSYS 软件（1.8 版）分析聚类，根据遗传相似性系数用 UPGRM 方法在微机上完成聚类分析图。

以上述矩阵作原始数据，利用 C 语言进行编程，完成对白菜类各品种扩增总带数及特异性带数的统计计算。

表 1 供试品种
Table 1 The varieties used in the experiment

代号 No.	品 种 Variety	拉 丁 学 名 Scientific name	来 源 Source
1	长形芜菁 Changxing wujing	<i>Brassica campestris</i> L. ssp. <i>rapifera</i> Matzg	贵州兴仁县 Xingren Guizhou
2	圆形芜菁 Yuanxing wujing	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>rapifera</i> Matzg	安徽怀远县 Huaiyuan Anhui
3	平邑薹菜 Pingyi taicai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>tai-tsai</i> Hort	山东平邑县 Pingyi Shandong
4	勺子头薹菜 Shaozitou taicai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>tai-tsai</i> Hort	山东滕县 Tengxian Shandong
5	柴 乌 Chaiwu	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino	安徽合肥市 Hefei Anhui
6	乌塌菜 Wutacai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>rosularis</i> Tsen et Lee.	江苏南京 Nanjing Jiangsu
7	四月慢 Siyueman	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino	天津市蔬菜所 Tianjin Vegetable Research Institute
8	明港箭杆白 Minggang jiangnanbai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino	河南新乡 Xinxian Henan
9	南通鸡冠菜 Nantong jiguancai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino	江苏南通市 Nantong Jiangsu
10	毛白菜 Maobaicai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino	四川平武县 Pingwu Sichuan
11	马耳朵白 Ma 'erduobai	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino	安徽广德县 Guangde Anhui
12	四九菜心 Sijiu caixin	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>parachinensis</i> Tsen et Lee	云南 Yunnan
13	双选菜心 Shuangxuan caixin	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>chinensis</i> Makino var. <i>parachinensis</i> Tsen et Lee	云南 Yunnan
14	丰抗 70 Fengkang 70	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i> Olsson	山东 Shandong
15	太原二青 Taiyuan erqing	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i> Olsson	山西 Shanxi
16	秋绿 75 Qiul ü75	<i>B. campestris</i> L. ssp. <i>pekinensis</i> Olsson	天津 Tianjin

2 结果与分析

2.1 扩增结果

本试验中选择了 10 个引物组合进行 AFLP 技术分析，获得了较好的扩增结果（图 1），10 对引物组合扩增出 629 个遗传位点，16 个品种共获得 4 173 条扩增带。各品种扩增带分布均匀，最多的是 324 条带，最少的 204 条带（表 2）。



2.2 聚类分析

用 NTSYS 软件 (1.8 版) 计算出遗传相似性系数, 以 16 个样品间的相似性系数构成矩阵, 按 UPGMA 法进行聚类分析构建聚类图 (图 2)。在聚类图中, 当遗传相似性水平取 0.62 时, 可将 16 个品种分为两大类群。第一类群包括 1 号、2 号两个芜菁品种; 余下 14 个品种组成了第二大类群, 此类群还可进一步分成 5 个亚群, 其中结球白菜 14 号 (丰抗 70)、15 号 (太原二青)、16 号 (秋绿 75) 成为一个亚群; 不结球白菜中 9 号 (鸡冠菜)、10 号 (毛白菜) 聚为一个亚群; 两个薹菜品种 3 号 (平邑薹菜)、4 号 (勺子头薹菜) 在一个亚群; 两个菜薹品种 13 号 (双选菜心) 和 12 号 (四九菜心) 聚类后又与 8 号 (箭杆白)、11 号 (马耳朵白) 聚类后组成一个亚群; 5 号 (柴乌)、6 号 (乌塌菜)、7 号 (四月慢) 在一个亚群。

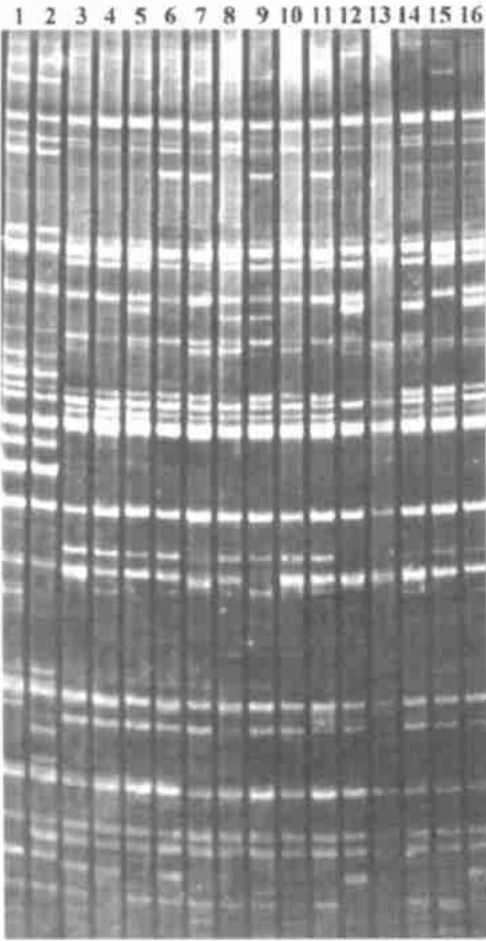


图 1 白菜类蔬菜 16 个样品的 AFLP 选择性扩增结果
样品代号名称见表 1

Fig. 1 The AFLP selective amplification result of 16 samples from Chinese cabbage
Sample numbers see Table 1

表 2 白菜类各品种 AFLP 特异带和扩增总带数

Table 2 Specific and Total AFLP Bands of Chinese cabbage varieties

代号 No.	特异带 Specific bands	扩增总带数 Total bands
1	7	267
2	40	324
3	6	291
4	2	263
5	3	270
6	2	255
7	5	267
8	4	282
9	3	260
10	1	225
11	3	291
12	2	257
13	0	251
14	0	204
15	6	254
16	2	212

注：样品代号名称见表 1
Note: Sample numbers see Table 1

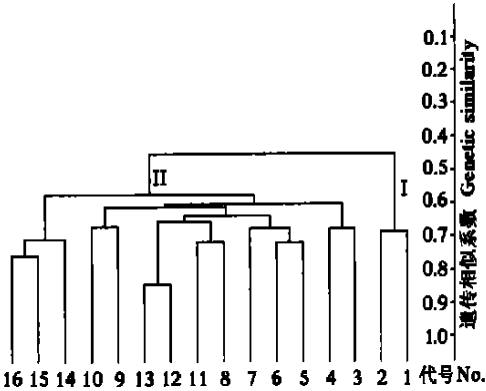


图 2 白菜类蔬菜 AFLP 标记聚类分析图
样品代号名称见表 1

Fig. 2 Clustering figure of AFLP of Chinese cabbage
Sample numbers see Table 1

3 讨论

3.1 AFLP 技术用于白菜类蔬菜亲缘关系鉴定的可行性

本试验采用 10 对 AFLP 引物组合获得 4 173 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来源不同的芜菁、薹菜、菜薹品种各自首先聚类, 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

在聚类图 (图 2) 中取遗传相似水平为 0.62 时, 供试的白菜类各品种分为两大类群。第一大类群为芜菁亚种, 从亲缘关系上看, 它与其它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。不结球白菜亚种包括: 四月慢、乌塌菜、四九菜心、双选菜心、平邑薹菜、柴乌、马耳朵白、南通鸡冠菜等品种。而 3 个结球白菜品种 (丰抗 70、太原二青、秋绿 75) 在第二类群的最外侧组成一个独立亚群, 表明它与其它不结球白菜亲缘关系也较远, 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。而两个薹菜品种被聚在不结球白菜类中。谭其猛^[4]认为中国白菜的野生类型可能较近于今日的薹菜, 也就是说在白菜类中, 薹菜较为原始。从本研究上看薹菜虽然聚在不结球白菜类中, 但与其它不结球白菜亲缘关系较远。毛白菜、鸡冠菜为独立的亚群, 与其它不结球白菜亲缘关系也较远。蓝永珍等^[9]对南通鸡冠菜花粉形态进行了研究, 提出将南通鸡冠菜作为一个独立的种。从形态上看毛白菜、鸡冠菜叶缘锯齿深, 叶脉明显, 叶面凹凸不平, 有毛, 与苗期结球白菜较相似, 这说明与其它不结球白菜相比, 毛白菜、鸡冠菜与结球白菜之间亲缘关系似乎更近些。

在聚类图中两个菜薹品种四九菜心和双选菜心与马耳朵白及箭杆白亲缘关系较近。曹家树 (1992 年) 报道马耳朵白的染色体组 G—带也表现出与菜薹的共同之处。通过基因组 DNA 分析还发现马耳朵白与箭杆白之间亲缘关系很近, 两个品种叶片无毛, 叶柄半圆形, 叶柄较长, 短无翼, 外部形态很相似。乌塌菜、柴乌、四月慢被聚为一个亚群, 从聚类图分析乌塌菜与柴乌的亲缘关系反而比四月慢近。曹家树等^[6]认为乌塌菜和柴乌合为一个独立的分支类群且进化程度比较高。本研究通过基因组 DNA 分析也发现乌塌菜和柴乌亲缘关系很近。

参考文献:

- 1 曹寿椿, 李式军. 白菜地方品种的初步研究. 南京农学院学报, 1980, (2): 1~7
- 2 林维申. 中国白菜分类的探讨. 园艺学报, 1980, 7 (2): 21~26
- 3 谭俊杰. 试论芥 (芸薹) 属蔬菜的起源与分类. 河北农业大学学报, 1980, 4 (1): 104~114
- 4 谭其猛. 试论大白菜品种的起源、分布和演化. 中国农业科学, 1979, (4): 68~75
- 5 曹家树, 曹寿椿. 大白菜起源的杂交验证初报. 园艺学报, 1995, 22: 93~94
- 6 曹家树, 曹寿椿. 中国白菜各类群的分支分析和演化关系研究. 园艺学报, 1997, 24 (1): 35~42
- 7 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high weight plant DNA. Nucl. Acids Res., 1980, 8 (19): 4331~4235
- 8 Vos P, Hoger R, Bleeker M. AFLP: a new technique for DNA finger printing. Nucl. Acids Res., 1995, 23: 4407~4414
- 9 蓝永珍, 周太炎, 钱伟珍. 中国芸薹属植物花粉形态的研究. 植物分类学报, 1989, 27 (5): 386~394

Relationships Analysis of Chinese Cabbage Species by AFLP

Sun Deling¹, Zhao Qiancheng², Song Wenqin¹, and Chen Ruiyang¹

(¹ Department of Biology, Nankai University, Tianjin 300192; ² Tianjin Vegetable Research Institute, Tianjin 300384)

Abstract: Genome relationships of Chinese Cabbage species were studied by molecular marker technology AFLP. 4173 bands were detected with 10 pairs of primers. Clustering analysis showed that it is distant between turnip and Chinese Cabbage; Jiguancai (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) and Maobaicai (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) are close to head Chinese Cabbage (*B. campestris* L. ssp. *pekinensis* Olsson) which is distant to other non-head Chinese Cabbage varieties. The relationship among non-head Chinese Cabbage (*B. campestris* L. ssp. *chinensis* Makino) varieties including Taicai, Caixin, Chaiwu, Jiangnanbai and Ma 'erduobai was analyzed on molecular level in this paper, which provides some information of origins and evolution of Chinese Cabbage.

Key words: Chinese Cabbage; AFLP; Relationship

耐热大白菜新品种 ‘夏白 45’

李化银 王立华 杨衔美 柳明山

(山东省农业科学院大白菜良种服务中心, 济南 250100)

Heat Tolerant Chinese Cabbage ‘Xiabai 45’

Li Huayin, Wang Lihua, Yang Xianmei, and Liu Mingshan

(Center of Chinese Cabbage, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100)

‘夏白 45’为早熟、耐热大白菜一代杂种。作者 1995 年引进了两个亲本材料并经亲本繁育, 田间试验鉴定, 亲本母株选择及配合力测定, 1997 年进行自然制种, 同年夏季进行品种比较试验, 1998~1999 年参加山东省夏白菜区域试验, 2000 年参加全省夏白菜生产试验, 比对照 ‘鲁白 13’ 增产 16.87%, 2001 年 5 月通过山东省农作物品种审定委员会审定。

品种特征特性

该品种早熟, 耐热, 生长期 45~53 d, 耐 38℃ 高温, 产量可达 45 t/hm²。外叶绿色, 白帮, 叠抱, 头球形, 单球质量约 1 kg, 净菜率 66.7%, 软叶率 59.7%。包心后充心快, 风味品质较好。田间综合抗病能力强, 品比试验中表现为抗病毒病、霜霉病和软腐病, 病情指数分别为 1.15、17.38、22.52。

栽培技术要点

1. 施足底肥, 起垄栽培。基施优质圈肥 45 t/hm², 磷酸二铵 0.6 t/hm², 垄高 15~20 cm, 垄距 50~55 cm。2. 适期播种, 合理密植。山东内陆地区适宜 6 月份播种, 长江流域和黄淮海地区可夏季种植, 但要根据当地气候特点确定适宜播期。适宜密度为 49 500 株/hm², 行株距 50~55 cm × 37~40 cm。3. 加强管理, 及时收获。水肥宜早攻, 注意防治虫害。包心紧实后要及早收获, 收获过迟易造成裂球, 影响其品质和商品性。