

油菜与诸葛菜的几种分子标记比较研究

吴沿友¹, 王宝利¹, Paul W. J. Taylor²

(1. 中国科学院地球化学研究所环境化学国家重点实验室, 贵州 贵阳 550002;

2. Department of Crop Production, Joint Centre for Crop Improvement, The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia)

摘要:利用分子标记(随机引物、简单重复序列、微卫星 DNA 重复序列、rDNA - ITS)比较研究了白菜型油菜与诸葛菜的亲缘关系。RAPD 分析表明,诸葛菜与白菜型油菜 PCR 产物相似性只有 10% 左右;简单重复序列(SSRs)标记中引物 B. n. 12A 的 PCR 产物表明诸葛菜与白菜型油菜有明显差异,诸葛菜没有扩增产物,白菜型油菜具有明显的扩增产物;引物 ITS₄ - ITS₅ 的 PCR 产物也有明显的差异。这些结果说明白菜型油菜与诸葛菜的亲缘关系不是很近。结合其他学者的工作,讨论了甘蓝型油菜、芥菜型油菜与诸葛菜的亲缘关系。

关键词:白菜型油菜;诸葛菜;分子标记;细胞融合—染色体组分割

中图分类号:S565.403.53.

文献标识码:A

文章编号:1007—9084(2002)02—0022—04

诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*)是十字花科诸葛菜属的一种野生植物,具有许多优良的遗传性状、经济性状和喀斯特适生性^[1-3]。油菜与诸葛菜的远缘杂种已获得了近 10 个^[4-8]。白菜型油菜、芥菜型油菜、甘蓝型油菜、埃塞俄比亚芥、芥蓝等都能与诸葛菜形成杂种,很多杂种 F₁ 表现可育^[4,5,7,8]。尽管诸葛菜与油菜的杂交亲和性较高,但并非亲缘关系较近。从大量的细胞遗传学研究来看,油菜与诸葛菜远缘杂种 F₁ 的 PMC 中同源配对的染色体很少,这使得诸葛菜与不同类型油菜的亲缘关系扑朔迷离。为了进一步验证油菜与诸葛菜的亲缘关系,

本试验研究了不同的分子标记在油菜与诸葛菜的总 DNA 之间的表现,为判明油菜与诸葛菜的亲缘关系以及十字花科植物的起源进化提供一些信息和数据。

1 材料和方法

供试材料为诸葛菜(*Orychophragmus violaceus*)和白菜型油菜(*Brassica campestris*)川油 8 号种子,萌发后 10d 取幼苗提取的 DNA。以 CTAB 法提取 DNA 并纯化。RAPD 分析参考 Taylor 等^[9]的方法。9 个随机引物(表 1)来自于 Life Technologies Co.

表 1 用于分子标记的引物序列

Table 1 Primer sequences using molecular markers

引物名称 Primer	引物序列 Sequence	引物名称 Primer	引物序列 Sequence
BA9	5'GGAAGTCCAC	B. n. 12A	5'CCCCTTCTAGGCTTCTGGCA 5'GAGGAACTGAGACGGCGGAAATCA
BA10	5'GGACGTTGAG	B. n. 9A	5'GAGCCCATCCCTAGCAAACAAG 5'CGTGGAAGCAAGTGAGATGAT
BA20	5'GAGCGTACC	MR33	5'AAAAATAAAGAAGTTTGGAAAGG 5'CCAACACACCTTTTACTCTT
BB5	5'GGGCCGAACA	MR167	5'TATGTACACATTCTCTATTTTC 5'CAITCGTCTCCACCTTCT
BB6	5'CTGAAGCTCC	MR176	5'GATTGAACACCCCTAGTGAG 5'TATCAAAAACCCCAAGATTG
BB7	5'GAAGCTGGG	MR181	5'AGATTTGCATGTGGTTTGAC 5'ATTGCTTANTGATGTTGGGAA
BB8	5'TCCTCGAAGC	ITS ₄ - ITS ₅	5'TGGGAAAGTCTTGTGTGCA 5'ATTAGTCTGGTATGATCGC
BB14	5'GTGGGACCTG	BB15	5'AAGTGCCCTG

收稿日期:2001—08—29

基金项目:中国科学院与澳大利亚科学院合作项目

作者简介:吴沿友(1966—),男,博士(博士后),研究员,主要从事油菜遗传育种和喀斯特生态研究。

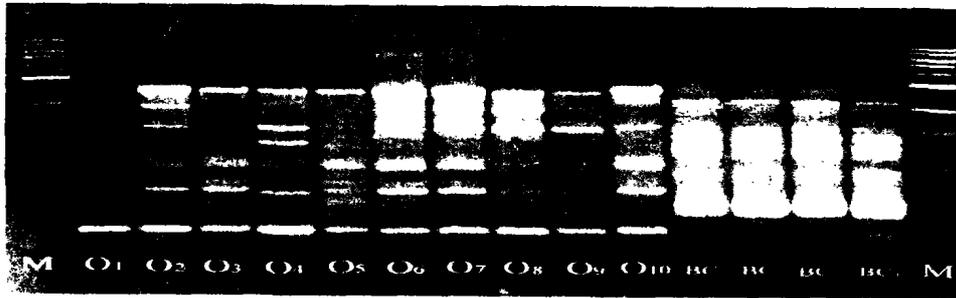
SSR(简单序列重复)的扩增和多态型分析参考 Sze-we - McFadden 等^[10]的方法,所用引物 B. n. 12A 和 B. n. 9A 来自 Life Technologies Co. 微卫星 DNA 多态分析参考 Uzunova 和 Ecke^[11]的方法,所用引物 MR33、MR167、MR176 和 MR181 来自 Life Technologies Co. 核糖体 DNA - ITS 区域扩增多态性分析参考 Sherriff 等^[12]的方法,所用引物 ITS₄ - ITS₅ 来自 Life Technologies Co.

2 结果与分析

从 9 个引物的 RAPD 图谱可以看出,白菜型油菜与诸葛菜相同的谱带不多,只有 10% 左右。诸葛

菜的不同植株之间呈现出较广泛的多态性,但任何一株与白菜型油菜的谱带相似性都较少。图 1 和图 2 是其中 2 个引物反应产生的结果。

2 个 SSRs 引物的 PCR 结果如图 3,以 B. n. 12A 为引物,白菜型油菜有 1 个片段被扩增,诸葛菜没有片段被扩增。以 B. n. 9A 为引物,诸葛菜和白菜型油菜都没有片段被扩增。3 种微卫星 DNA 多态性位点在白菜型油菜和诸葛菜上都未发现。核糖体 DNA 多态性分析表明,引物为 ITS₄ - ITS₅ 的扩增,诸葛菜未显示多态性而白菜型油菜显示出多态性(图 4)。白菜型油菜有 4 个位点被扩增,而诸葛菜只有 1 个位点被扩增。



M: Marker (1kb); O₁₋₁₀: 诸葛菜 1~10 号植株; BC₁₋₄: 白菜型油菜 1~4 号植株; 下图相同

O₁₋₁₀ representing No. of samples of *O. violaceus*; BC₁₋₄ representing No. of samples of *B. chinensis*; the same as below

图 1 随机引物 BB7 的 PCR 多态性谱带

Fig. 1 Polymorphism patterns of PCR using RAPD primer BB7

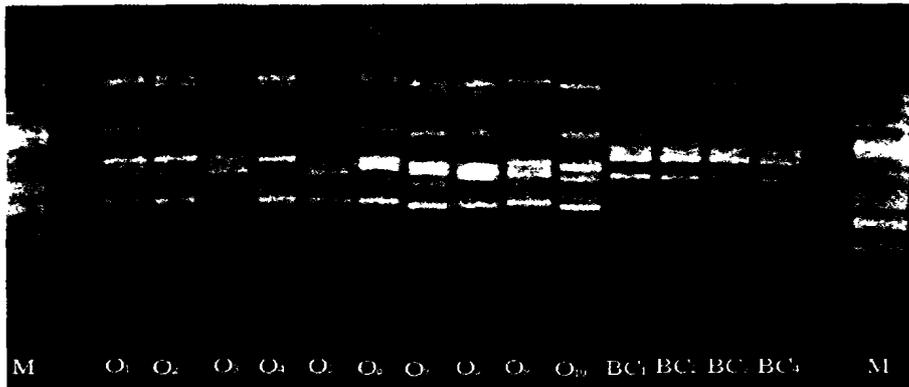


图 2 随机引物 BB6 的 PCR 多态性谱带

Fig. 2 Polymorphism patterns of PCR using RAPD primer BB6

本试验几种分子标记的 PCR 反应结果显示,白菜型油菜与诸葛菜的遗传结构差异显著,由此可以看出诸葛菜与白菜型油菜的亲缘关系并非很近。

3 讨论

本实验选择的引物对芸薹属植物是有效的,引物 B. n. 12A 和 B. n. 9A 对 *B. napus*、*B. oleracea* 和

B. rapa 都有作用^[10,13],这些引物是专为芸薹属植物设计的具有种属特异性的 SSR 引物,引物 B. n. 12A 对白菜型油菜也有效,说明引物 B. n. 12A 更具种属特异性,可以作为判断是否与芸薹属植物具有亲缘关系的重要标志之一。引物 MR33、MR167、MR176 和 MR181 对甘蓝型油菜很有效,其中 MR181 对芥菜型油菜(*Brassica juncea*)有效^[12]。本研究中我们

组的不相容性。染色体组的不相容性,一方面与细胞周期有关系^[17],另一方面就是亲缘关系不是很近。

参考文献:

- [1] 罗鹏. 植物遗传资源诸葛菜研究[M]. 成都: 四川大学出版社, 1995.
- [2] 吴沿友. 喀斯特适生植物诸葛菜综合研究[M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 1997.
- [3] 吴沿友, 蒋九余, 帅世文, 等. 诸葛菜的喀斯特适生性的无机营养机制探讨[J]. 中国油料, 1997, 19(1): 47—49.
- [4] 吴沿友, 罗鹏. 芥菜型油菜与诸葛菜属间杂种 F₁ 的可育性研究[J]. 种子, 1995(2): 24—26.
- [5] Li Z, Wu J G, Liu Y, et al. Production and cytogenetics of the intergeneric hybrids *Brassica juncea* × *Orychophragmus violaceus* and *B. carinata* × *O. violaceus* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 96(2): 251—265.
- [6] Luo P, Yin J M, Wu Y Y, et al. Studies on chromosome behaviour in intergeneric hybrids of some cruciferous plants[J]. Cruciferae Newsletter, 2000, 22: 17—18.
- [7] Luo P, Li Z Y, Wu Y Y. Intergeneric hybridization between *Brassica napus* and *Orychophragmus violaceus* [J]. Chinese Journal of Botany, 1994, 6(1): 86—88.
- [8] Wu Y Y, Jiang J Y, Luo P. Production of intergeneric hybrids between *Brassica chinensis* and *Orychophragmus violaceus* via embryo rescue[J]. Cruciferae Newsletter, 1996, 18: 18—19.
- [9] Taylor P W J, Geijskes J R, Ko H L, et al. Sensitivity of random amplified polymorphic DNA analysis to detect genetic change in sugarcane during tissue culture[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 1168—1173.
- [10] Szewe - McFadden A K, Kresovich S, Blied S M, et al. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *Brassica* species [J]. Theor Appl Genet, 1995, 93: 534—538.
- [11] Uzunova M I, Ecke W. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. Plant Breeding, 1999, 118: 323—326.
- [12] Sherriff C, Wheelan M J, Arnold G M, et al. Ribosomal DNA sequence analysis reveals new species groupings in the genus *colletotrichum* [J]. Experimental Mycology, 1994, 18: 121—138.
- [13] Kresovich S, Szewe - McFadden A K, Blied S M, et al. Abundance and characterization of simple - sequence repeats (SSRs) isolated from a size - fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed) [J]. Theor Appl Genet, 1995, 93: 534—538.
- [14] 吴沿友, 蒋九余, 罗鹏, 等. 染色体组分割的甘蓝型油菜单倍体的形成途径[J]. 西北植物学报, 1998, 18(2): 237—240.
- [15] 吴沿友, 周介雄. 遗传学基本定律的扩展及育种中的应用[J]. 种子, 1997(3): 64.
- [16] 吴沿友. 遗传定律的统一及拓展[J]. 遗传, 1998, 20(增刊): 141.
- [17] Wu Y Y, Luo P. Genetic laws from gene to chromosome and from chromosome to chromosome set [J]. Cruciferae Newsletter, 1999(21): 51—52.

Comparison study on several molecular markers between rapeseed and *Orychophragmus violaceus*

WU Yan - you¹, WANG Bao - li¹, Paul W. J. Taylor²

(1. The State Key Laboratory of Environmental Geochemistry, Institute of Geochemistry,

The Chinese Academy of Sciences, Guiyang 550002, China;

2. Department of Crop Production, Joint Centre for Crop Improvement,

The University of Melbourne, Parkville, Victoria 3010, Australia)

Abstract: Relative relationships between rapeseed and *O. violaceus* were studied by using molecular markers (random primers, simple sequence repeat, microsatellites DNA sequence repeat, ribosome DNA - ITS region). Through RAPD analysis, about 10% of similarity for PCR products between *B. campestris* and *O. violaceus* were found. Primer pair of B. n. 12A in simple sequence repeats produced some different outcome, *O. violaceus* without amplified products and *B. campestris* with one band. The difference from PCR products of primer pair ITS₄ - IT₅ between *B. campestris* and *O. violaceus* were found, *O. violaceus* with 1 band and *B. campestris* with 4 bands. Those results showed that relative relationships between *B. campestris* and *O. violaceus* couldn't near. Combined with other scholar works, relative relationships among *B. napus*, *B. juncea* and *O. violaceus* were discussed.

Key words: *Brassica campestris*; *Orychophragmus violaceus*; Molecular markers; Cell mixis - chromosomes set fractionation