

## RAPDs 和 RFLPs 分析甘蓝型杂交油菜亲本的遗传多样性

马朝芝<sup>1</sup> Sakai Takako<sup>2</sup> 傅廷栋<sup>1\*</sup> 孟金陵<sup>1</sup> 杨光圣<sup>1</sup> 涂金星<sup>1\*</sup>

(<sup>1</sup>华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室,湖北武汉 430070; <sup>2</sup>日本三菱化学植物工学研究所,日本横滨 227-0033)

**摘要** 利用 RAPD 和 RFLP 分子标记技术对甘蓝型杂交油菜亲本遗传多样性的分析结果表明:(1) 20 个亲本间具有丰富的遗传多样性,40 个引物扩增出 277 条多态性带,其中 21 条带为 10 个亲本所特有,12 个探针得到了 117 条多态性杂交带,其中 7 条带为 5 个亲本所特有;(2) 不育系与恢复系之间的遗传差异大于不育系内和恢复系内的遗传差异;(3) 依 RAPDs 与 RFLPs 估计的亲本遗传多样性存在有一定的差异,这种差异由估计时所用多态性带的数目不同而引起;(4) NJT 聚类方法将 20 份亲本分为 3 组:不育系组、恢复系组和混合组。杂交种“秦油 2 号”和“华杂 3 号”的双亲都被聚在不同的组内。本文还对 RAPD 和 RFLP 两种分子标记技术估计遗传多样性的适用性和辅助选育杂交种等方面作了讨论。

**关键词** 甘蓝型油菜;杂交种;遗传多样性;RAPD;RFLP

中图分类号: S565 文献标识码: A

## Genetic Diversity of Parents for Hybrid Breeding in *Brassica napus* L. Detected by RAPDs and RFLPs

MA Chao-Zhi<sup>1</sup> Sakai Takako<sup>2</sup> FU Ting-Dong<sup>1\*</sup> MENG Jir-Ling<sup>1</sup> YANG Guang-Sheng<sup>1</sup> TU Jir-Xing<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> National Key Lab of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070, China; <sup>2</sup> Plantech Research Institute, 1000 Kamoshida, Aoba-ku, Yokohama, 227-0033, Japan)

**Abstract** The genetic diversity of parents for hybrid breeding in *Brassica napus* L. were studied by RAPDs and RFLPs. The results showed that: (1) Large genetic variance was observed among 20 parents. Forty primers amplified 277 polymorphic bands, 21 of which were parent-specific. Twelve probes produced 117 polymorphic hybridized bands and 7 bands were parent-specific. (2) The genetic diversity among cytoplasm male sterile (CMS) lines and restorers was larger than that between male sterile lines or that between restorers. (3) Genetic diversity evaluated by RAPDs was different from that by RFLPs. The different polymorphic bands used to evaluate genetic diversity caused this difference. (4) Twenty parents were divided into three groups by NJT cluster analysis. One was the CMS group and another was restorer group. The last group was the mixture of CMS and restorer lines. Two parents of either the elite hybrid “Qinyou 2” or “Huaza 3” were clustered into different groups. The suitability of RAPDs and RFLPs in genetic diversity and their assistance to hybrids breeding were discussed.

**Key words** *Brassica napus* L.; Hybrid; Genetic diversity; RAPD; RFLP

我国油菜杂交种的种植面积已超过总面积的 30%, 杂交种比常规品种增产 10%~20%, 选育双低(低芥酸、低硫苷)油菜以提高油的营养品质和菜籽饼的饲用价值, 以及利用杂种优势选育高产品种, 已成为我国油菜育种的两个主要方向<sup>[1]</sup>。了解杂交种亲本间的遗传关系, 可为杂种优势育种提供重要的

参考。

用于油菜遗传多样性研究的主要方法为 RAPD 和 RFLP 标记技术。Demeke 等<sup>[3]</sup>用 RAPD 对芸薹属群体、种甚至属间的分类, Mailer 等<sup>[4]</sup>用 RAPD 对品种的鉴定, Diers 和 Osborn<sup>[5]</sup>用 RFLP 技术对来自于世界范围的 61 个甘蓝型油菜品种遗传多样性的分

\*基金项目: 国家高技术发展计划(101-02-03-01)。

作者简介: 马朝芝(1968-), 女, 湖北公安人, 副教授, 博士, 从事油菜杂种优势和分子生物学研究。E-mail: czma@public.wh.hb.cn。

\*通讯作者: 傅廷栋, Tel: 027-87287007; Fax: 027-87287209

Received (收稿日期): 2002-05-27, Accepted (接受日期): 2003-02-13.

析,以及 Mailer 和 May<sup>[6]</sup>用 RAPD 对甘蓝型油菜品种群体和个体间异质性的研究等表明:RAPD 和 RFLP 标记技术适合分析甘蓝型油菜的遗传多样性。同时利用 RFLPs 和 RAPDs 技术,Thorman 等<sup>[7]</sup>分析了十字花科种内和种间的遗传关系,Dos Santos 等<sup>[8]</sup>检测了埃塞俄比亚芥的遗传多样性。

利用 RFLPs<sup>[9]</sup>和 RAPDs<sup>[10]</sup>技术对我国甘蓝型油菜遗传多样性已有研究,但关于杂交种亲本的遗传多样性,未见报道。本研究所用材料包括了 Po1 CMS 系统第一个三系配套杂交种的亲本“湘矮 A”和“花叶恢”,第一个大面积种植的杂交油菜“秦油 2 号”的母本“陕 2A”和父本“垦 C”,以及第一个双低三系杂交种“华杂 3 号”的亲本“1141A”和“恢 5200”,目的在于:(1)比较 RFLPs 和 RAPDs 估计甘蓝型油菜遗传多样性的差异;(2)利用 RAPD 和 RFLP 技术分析甘蓝型油菜杂交种亲本的遗传多样性,为杂种优势育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选用了 8 个甘蓝型油菜细胞质雄性不育系和 12 个恢复系(列于表 1)。其中,不育系“98506-2A”与 2 个恢复系“P258-1”和“P005-8”由张书芬研究员

(河南省农业科学院)提供,其余由华中农业大学收集。

### 1.2 RAPD 和 RFLP

**总 DNA 提取:**每份材料取 10~15 粒种子,置于放有滤纸的湿润的培养皿内,密封,放置在培养室(25 左右)。发芽后,移入小培养钵,放入生长箱(25/15)。待 3~5 片真叶时,每份材料取样,5 株单株混合,贮存于 -70 冰箱备用。连续取样 3 次。总 DNA 抽提采用 CTAB 法<sup>[11]</sup>。DNA 质量用 1.4%的琼脂糖凝胶检测,DNA 浓度用紫外分光光度计和 0.8%的琼脂糖凝胶检测。

**RAPD:**用于扩增反应的引物为 10 碱基的寡核苷酸片段,由加拿大哥伦比亚大学提供。反应混合物成分为:1 × PCR 反应缓冲液 II(Perkin Elmer, USA), 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1 mmol/L dNTPs, 0.625 μmol/L 引物,0.6 U Taq 酶(Perkin Elmer, NJ, USA)和 10~15 ng 总 DNA。加 ddH<sub>2</sub>O 至终体积为 20 μL。扩增反应在 PTC-100(MJ research Inc. Mass. USA)扩增仪上进行。热循环程序为:94 30 s,36 30 s 和 72 120 s,2 循环;94 20 s,36 30 s,45 30 s 和 72 90 s,20 循环;94 20 s,36 30 s,45 30 s 和 72 120 s,19 循环;72 7 min 终止反应;4 保存备用。扩增产物用 1.5%的琼脂糖(Sigma type D)电泳分离,0.5 μg/μL 的溴化乙锭溶液染色,紫色灯下

表 1 本研究所用材料及其特性、材料特异性扩增/杂交带数

Table 1 Characteristic of the accessions used in the study

编号 Code	材料名称 Accession name	来源 Original	芥酸含量 <sup>1)</sup> Erucic acid	硫苷含量 <sup>1)</sup> Glucosinolates	特异带 Special bands	
					RAPD	RFLP
1	渭南 74 Weinan 74	陕西省农垦中心	high	high	0	0
2	M734	陕西省农垦中心	high	high	1	2
3	宜春 186 Yichun 186	江西宜春地区农科所	high	high	0	0
4	垦 C Ken C	陕西省农垦中心	high	high	2	1
5	花叶恢 Huayehui	湖南省农科院	high	high	1	2
6	恢 6178 Hui 6178	华中农业大学	low	low	0	1
7	恢 5148 Hui 5148	华中农业大学	low	low	0	0
8	97A	华中农业大学	low	low	0	0
9	陕 2A Shan 2A	陕西省农垦中心	high	high	3	0
10	湘矮 A Xiang A	湖南省农科院	high	high	7	0
11	恢 5200 Hui 5200	华中农业大学	low	low	2	0
12	恢 10 Hui 10	华中农业大学	low	high	0	0
13	S75-1	陕西省农垦中心	high	high	0	0
14	P258-1	河南省农科院	low	high	0	0
15	P005-8	河南省农科院	low	low	1	1
16	1141A	华中农业大学	low	low	2	0
17	245A	华中农业大学	low	low	0	0
18	宁 2A Ning 2A	江苏省农科院	high	high	1	0
19	6223A	陕西省农垦中心	high	high	0	0
20	98506-2A	河南省农科院	low	low	1	0

注:<sup>1)</sup>芥酸含量和硫苷含量的单位分别为 % ,μmol/g 干种子;Low 表示芥酸含量低于 2%或硫苷含量低于 30 μmol/g 干种子。

Notes:<sup>1)</sup>The unit of erucic acid content and glucosinolates content is represented by % ,μmol/g dried seed, respectively. Low indicate less than 2% erucic acid in seed oil or less than 30 μmol/g dried seed in glucosinolates.

(256 nm) 观察。结果分别由 Up-880 和 Image Saver AE6905C (ATTO Corporation Tokyo, Japan) 打印和贮存。

**RFLP:** 采用非放射性的荧光标记方法。总 DNA 酶切: DNA 15  $\mu$ g, 10  $\times$  Buffer 5  $\mu$ L (Takara, Japan), 内切酶 5  $\mu$ L (20 U/ $\mu$ L), 总体积为 50  $\mu$ L。37 保温消化。完全消化的总 DNA 用无水乙醇再次沉淀, TE 溶解。溶解的 DNA 经 0.8% 琼脂糖凝胶, 于 1  $\times$  TBE 缓冲液中电泳 10 h 以上。电压差为 3 V/cm。电泳完毕, 用 Vacugene (LKB) 转移方法, 通过 20  $\times$  SSC 溶液将胶上 DNA 转移到尼龙膜 (Amersham Hybond N<sup>+</sup>) 上; 尼龙膜用 2  $\times$  SSC 漂洗, 80 烘箱干燥 1 h 左右, 260 nm 紫外灯下固定 2~3 min。探针标记、预杂交、杂交以及信号的检测均依照供应商 (Amersham) 的使用指南。

### 1.3 数据分析

依扩增/杂交产物的有无, 结果记为 1 或 0。1 表示有扩增/杂交产物, 0 表示缺失。只有多态性带才进入数据分析。依 Dice 指数<sup>[12]</sup> 估计材料间的遗传相似系数 (Genetic similarity, GS)。遗传非相似系数 (Genetic dissimilarity, GD) 由公式  $GD = 1 - GS$  推导。用 NJT (Neighbor-Joining Tree) 方法<sup>[13]</sup> 对 RAPDs 和 RFLPs 资料作聚类分析, 并用 Bootstrap 分析方

法<sup>[14]</sup> 对聚类图作显著性检测, 即以一定容量随机产生 1000 个 Bootstrap 树状图, 统计每个节点 (node) 出现的百分率, 频率达 50% 以上的节点被认为是可信的。为比较依 RAPDs 和 RFLPs 得到的遗传相似系数的估计变异, 以样本容量  $n$  ( $n = 3, 12, 20, 50, 100$ ) 独立地分别从 RAPDs 和 RFLPs 随机作出 200 个 Bootstrap 样本, 计算每个样本各成对比较的遗传相似系数, 估计所有的遗传相似系数的方差, 除以 Bootstrap 样本的平均值得到变异系数 (CV)。变异系数和样本大小作自然对数转换, 转换后的变异系数和样本大小成直线关系<sup>[15]</sup>。NJ 聚类图用 MS-DOS, 相关分析用 SAS 程序, 其余的用 MS-EXCEL 完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 分子标记的多态性

为了有效地寻找多态性, 我们用 4 个模板对 600 多个引物进行了筛选。有的引物无扩增产物, 有的扩增产物强弱差异很大, 有的扩增出很好的带型但没有多态性带。40 个引物扩增的带型好, 多态性带多, 用于进一步的扩增反应。表 2 列出了它们的名称、序列和扩增出的多态性带数目。共得到了 277 条多态性扩增带, 每个引物扩增出 2~12 条, 平均 7 条多态性带。图 1 是一例 RAPD 扩增反应的产物模式。

表 2 本研究所用引物名称、序列和得到的多态性带数目

Table 2 Name and sequence of primers used in the study and their amplified polymorphic bands scored

引物 Primer	序列 Sequence (5 - 3)	多态性带 Number of scored bands	引物 Primer	序列 Sequence (5 - 3)	多态性带 Number of scored bands
UBC012	CCTGGGTCGA	7	UBC415	GITCCAGCAG	3
UBC018	GGGCCGTTA	7	UBC419	TACGTGCCCG	9
UBC019	GCCCGGTTA	8	UBC428	GGCTCCGGTA	8
UBC028	CCGGCCCTTAA	4	UBC508	CGGGCCGGAA	8
UBC029	CCGGCCCTTAC	5	UBC516	ACGCCCGACG	10
UBC030	CCGGCCCTTAG	6	UBC519	ACCGGACACT	9
UBC074	GAGCACCTGA	9	UBC523	ACAGGCAGAC	7
UBC076	GAGCACCACT	7	UBC566	CCACATCCGA	6
UBC079	GAGCTCGTGT	3	UBC570	GGCCGCTAAT	8
UBC184	CAAACGGCAC	6	UBC572	TTCGACCATC	2
UBC190	AGAAITCCGCC	6	UBC610	TTTGCCGCC	11
UBC218	CTCAGCCCAAG	4	UBC623	TCCGGGACTG	8
UBC244	CAGCCAACCG	4	UBC640	CGTGGGGCCT	6
UBC268	AGGCCGCTTA	11	UBC660	AGACCCGAC	7
UBC292	AAACA GCCCG	4	UBC669	GTTACACCAC	4
UBC305	GCTGGTACCC	12	UBC675	ACCGGTGGAG	12
UBC322	GCCCTACTA	8	UBC676	GCTAACGICC	3
UBC327	ATACGCGGTC	5	UBC680	AATGAGAGCC	9
UBC329	GCGAACCTCC	6	UBC682	CTCCGACGGT	11
UBC367	ACCTTTGGCT	9	UBC683	TATTACCCG	5



图1 随机引物“UBC682”的扩增模式  
(编号1~20:同表1, M为 /HindIII)

Fig. 1 Amplified pattern with primer“UBC682”

(No. 1~No. 20 is same as assigned in Table 1 and M is /HindIII)

同样,用2种DNA对探针作了选择,从50个拟南芥cDNA探针中筛选出11个。用这11个探针和1个种子储藏蛋白的cDNA探针(“Napin”)与20种基因型作杂交,得到了117条多态性杂交带,最少的为1条,最多的为20条。图2为探针“PA160”的杂交结果。

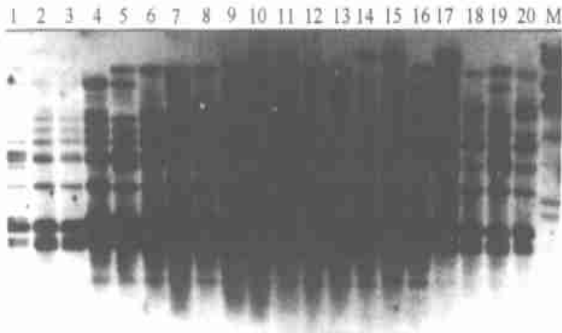


图2 探针“PA160”的Southern blotting杂交结果  
(编号1-20:同表1, M为 /Hin dIII)

Fig. 2 Result of Southern blotting hybridization with probe“PA160”

(No. 1~No. 20 is same as assigned in table 1)

RAPD检测到了10个材料特有的21条带, RFLPs检测到了5个材料的7条特有带,其中的4个材料也有特异的RAPD扩增带(表1)。有的材料含有多条特异带如“湘矮A”,而有的没有如“97A”和“1141A”。这些特异带不足以鉴别本研究所使用的20份材料。

2.2 遗传非相似系数(Genetic dissimilarity, GD)

依RAPDs估计的遗传非相似系数的平均值为36.41%,变动范围为16.26%~58.51%;依RFLPs估计的遗传非相似系数的平均值为35.33%,变动

范围为14.81%~67.62%(表3),表明亲本间的遗传差异大。

不育系与恢复系之间的遗传差异大于不育系内和恢复系内的遗传差异。表现在:(1)由RAPDs估计的不育系与恢复系之间的平均GD为39.17%,大于不育系的平均GD(33.49%)和恢复系的平均GD(33.66%),达到极显著水平;由RFLPs估计的不育系与恢复系之间的平均GD为37.03%,也大于不育系的平均GD(29.03%)(达极显著水平)和恢复系的平均GD(35.52%);(2)RAPDs估计得到的2个最小GD在两恢复系“垦C”与“渭南74”、两不育系“6223A”与“陕2A”之间,最大的2个在不育系“陕2A”与恢复系“恢5200”、不育系“6223A”与恢复系“恢5200”之间;RFLPs估计得到的2个最小GD也在两不育系(“6223A”与“1141A”)、两恢复系(“恢5200”与“恢5148”)之间,最大的2个在不育系与恢复系(“97A”与“花叶恢”、“1141A”与“花叶恢”)之间。

对依RAPDs和RFLPs估计的遗传非相似系数进行了相关分析,得到相关系数 $r = 0.327$ ,达极显著水平(图3)。说明RAPDs和RFLPs估计本实验的20个亲本遗传非相似系数时,趋势一致。

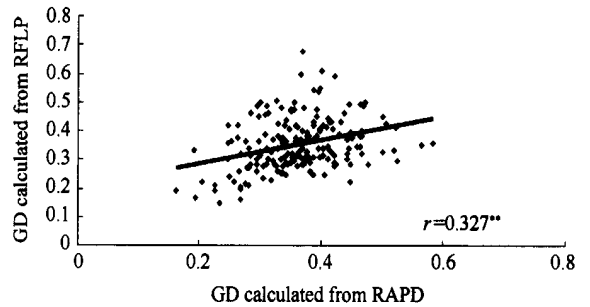


图3 两类标记RAPDs和RFLPs得到的遗传非相似系数的相关分析

Fig. 3 Correlation between genetic dissimilarities based on RAPDs and RFLPs

2.3 RAPDs和RFLPs的抽样误差

依RAPDs和RFLPs估计的遗传非相似系数虽达极显著水平的相关,但相关系数很小( $r = 0.327$ ),说明RAPDs和RFLPs估计遗传多样性时有差异。可能因估计时所用的多态性带数目不同所引起。我们比较了相同容量的200个分别依RAPDs和RFLPs的Bootstrap样本的抽样变异。图4描述的是样本容量与变异系数的直线回归关系。图4显示:

表3 RAPDs 和 RFLPs 检测的平均、最大、最小遗传非相似系数(%)

Table 3 Average, maximum and minimum of genetic dissimilarity based on RAPDs and RFLPs

	RAPD			RFLP		
	Ave	Max	Min	Ave	Max	Min
不育系内 Within CMS lines	33.49	52.30	16.30	29.03	44.87	14.81
恢复系内 Within restorers	33.66	44.77	19.03	35.52	53.4	15.78
不育系与恢复系间 Among CMS lines and restores	39.17	58.51	22.68	37.03	67.62	20.97
全部材料 Total accessions	36.41	58.51	16.26	35.33	67.62	14.81

(1) 变异系数随着估计所用多态性带数目的增加而显著下降,说明估计遗传多样性时,所用多态性带数目越多,结果越精确。(2) RAPDs 分析得到的回归直线与 RFLPs 的回归直线几乎完全重合。这说明在估计遗传多样性时,RAPDs 和 RFLPs 每条多态性带提供的信息量相同,RAPDs 没有比 RFLPs 提供更多的或不同类型的信息,它们估计遗传多样性差异的原因,是估计遗传多样性时所用的 RAPDs 和 RFLPs 数目不同(RAPDs 为 277,RFLPs 为 117)而引起的。因此将 RAPDs 和 RFLPs 合并,能更精确地估计亲本间的遗传关系。

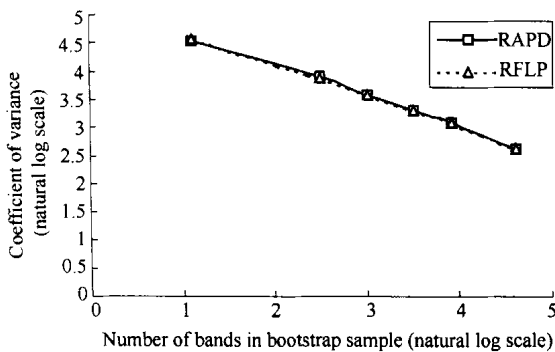


图4 RAPDs 和 RFLPs 的 bootstrap 样本容量与变异系数的直线回归关系

Fig. 4 Linear regressions of coefficients of variance on bootstrap sample size for RAPD and RFLP molecular markers

## 2.4 聚类分析

用 NJT(Neighbor-Joining Tree) 方法对 20 份材料作了聚类分析。20 份材料在图 5 上形成 3 组:不育系组、恢复系组和混合组。6 个不育系(“97A”、“1141A”、“陕 2A”、“6223A”、“宁 2A”和“245A”)在不育系组,另外还包括 1 个恢复系“S75-1”。6 个不育系各节点出现的次数(在 1000 次中)都超过 500,说明它们之间存在着显著相近的遗传关系。恢复系组的材料全部为恢复系(“渭南 74”、“M734”、“垦 C”、“花叶恢”、“P258-1”和“宜春 186”),其中,“渭南 74”、“M734”和“垦 C”由陕西省农垦中心在同一来源

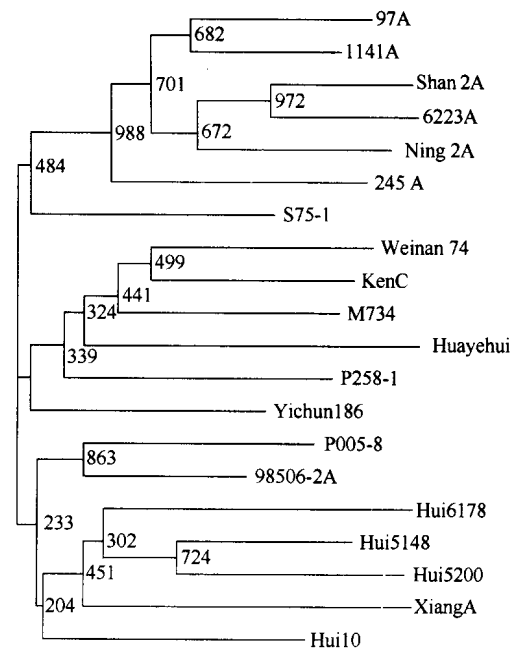


图5 依 RAPDs 和 RFLPs 的 NJT 聚类图

(节点的数字表示在 1000 个 bootstrap 样本中出现的次数)  
Fig. 5 Dendrogram by NJT method based on RAPDs and RFLPs  
(Numbers at the nodes indicate times of the node appearing in 1000 bootstrap samples)

的欧洲冬油菜中经系统选育得到。混合组中的恢复系“恢 10”为低芥酸材料,其他的(“恢 5148”、“恢 5200”、“恢 6178”、“P005-8”)都为双低(低芥酸、低硫苷)材料。“恢 5148”、“恢 5200”、“恢 6178”由华中农业大学选育,遗传背景相似,“P005-8”选自 P01 CMS 的保持系与澳大利亚春油菜“Marnoo”的杂交后代。2 个不育系(“湘矮 A”和“98506-2A”)都不是亚洲血统,“湘矮 A”的保持系来源于非洲油菜,而“98506-2A”的保持系来自于德国的双低油菜。

第一个 P01 CMS 系统的三系配套杂交种的双亲(“湘矮 A”和“花叶恢”),第一个大面积种植的杂交种“秦油 2 号”的双亲(“陕 2A”和父本“垦 C”),以及第一个双低 P01 CMS 三系杂交种“华杂 3 号”的两亲本“1141A”和“恢 5200”,都不在同一组内。

### 3 讨论和结论

#### 3.1 分子标记的多态性

RAPDs 和 RFLPs 在本研究所用 20 份材料间表现出了丰富的遗传多态性:40 个引物平均扩增出 7 条多态性带,12 个探针平均得到约 10 条多态性杂交带。一方面是因为材料本身具有很大的差异。我们从育种时间和空间两方面考虑,选择了 20 世纪 70 年代育成的第一个 P<sub>0</sub>l CMS 三系配套杂交种的亲本,80 年代育成的第一个大面积种植的杂交油菜“秦油 2 号”的父母本,以及 90 年代育成的第一个双低杂交种“华杂 3 号”的亲本。另一方面是因为我们对引物进行了筛选。为了有效地选择到多态性标记,我们从 600 多份随机引物中仅挑选到 40 个,从 50 个杂交探针中仅选择 11 个做进一步的扩增或杂交实验。

#### 3.2 比较 RAPDs 与 RFLPs 估计遗传多样性的差异

RAPDs 与 RFLPs 是估计遗传多样性的主要分子标记技术。它们各有优缺点,RFLPs 的结果可靠,但操作复杂,技术性要求很高,费时,且所需的 DNA 量大;RAPDs 具有简单、快速、低成本和所需的 DNA 量少等优点,但重复性差。RAPDs 技术的重复性和同质性一直受到重视。通过将扩增带转换成探针作杂交,Thormann 等<sup>[7]</sup>观察到了具有相同迁移率的扩增带在种间不同质,而在种内同质,只是程度不同,认为估计种内的遗传差异 RAPDs 与 RFLPs 的结果相似,而估计种间的遗传差异 RAPDs 不如 RFLPs 有效。Rieseberg 等<sup>[16]</sup>得到 91% 的扩增带是同质的结果,并认为迁移率可以很好地代表分子量大小。Perez 等<sup>[17]</sup>观察到排除弱带和带型稀有的材料可提高 RAPDs 的重复性,因此认为 RAPDs 用于估计差异较大的材料间的遗传多样性很可靠。

本研究依 RAPDs 与 RFLPs 估计 20 个亲本的遗传多样性存在有一定的差异,Bootstrap 分析的结果表明差异是由抽样误差而非两标记本身的差异引起。这一结果与 Spooner 等<sup>[15]</sup>、Paran 等<sup>[18]</sup>和 Degani 等<sup>[19]</sup>得到的结果一致,同时能被 RAPDs 与 RFLPs 所估计的遗传非相似系数和得到的品种特异性带所进一步验证。它们的平均 GD 很相似,分别为 36.42% 和 35.33%,且最大的 GD 都存在于不育系与恢复系间,最小的 GD 在不育系或恢复系内。有 RFLP 特异的杂交带的品种也有特异 RAPD 扩增带(“恢 6178”例外)。

估计遗传多样性时,所用多态性标记越多会越精确,但同时会增加劳力和费用。在本研究中,RAPDs 与 RFLPs 分别需 200 条多态性带,CV 才能达到 10%。显然,RAPDs 较 RFLPs 更容易得到 200 个多态性标记。从技术的难易、成本的高低和速度的快慢等多方面而言,无疑 RAPDs 更适合于分析亲本的遗传多样性,为育种特别是杂种优势利用提供有价值的参考。

#### 3.3 分子标记技术对不育系和恢复系的辅助选育

依 RAPDs 和 RFLPs 的结果显示不育系与恢复系间的遗传差异大于不育系内或恢复系内的遗传差异。第一个大面积种植的杂交种“秦油 2 号”的双亲(“陕 2A”和父本“垦 C”)和第一个双低 P<sub>0</sub>l CMS 三系杂交种“华杂 3 号”的双亲亲本“1141A”和“恢 5200”,都不在同一组内。这个结果与育种实践是一致的,如不育系“陕 2A”的保持系是日本油菜,恢复系“垦 C”来源于意大利油菜,杂交种“秦油 2 号”实际上由亚洲品种与欧洲品种杂交得到。

甘蓝型油菜起源于欧洲地中海沿岸,19 世纪 70~80 年代才传入亚洲。在亚洲最早栽培甘蓝型油菜的是日本。20 世纪 30~40 年代甘蓝型油菜由日本和欧洲引入中国,中国成为亚洲推广面积最大的国家。长期的定向选择和引入白菜型油菜种质,使得亚洲甘蓝型油菜品种,在遗传上不同于欧洲品种,许多研究者利用分子标记技术也验证了这一点<sup>[5,9,10]</sup>。但随着对双低品质性状的引进和选择,亚洲甘蓝型油菜的遗传背景变得较复杂,或多或少带有供体亲本如欧洲油菜的遗传背景。为了获得强优势的杂交种,可借助分子标记技术在选育保持系时尽量保存亚洲血统,在选育恢复系时尽量保存欧洲品种的血统。

本研究得到了某些材料特有的 RAPDs 和 RFLPs,它们将有助于开发出杂交种亲本特有的分子标记指纹图谱,用于品种的审定和保护。

#### 3.4 结论

RAPDs 和 RFLPs 估计遗传多样性时存在有差异,是由估计遗传多样性时所用的数目不同(RAPDs 为 277,RFLPs 为 117),而非两标记本身特性不同而引起;亲本之间存在丰富的遗传多样性,不育系与恢复系之间的遗传差异较大;依分子标记得到的亲本间的遗传关系,可为育种特别是杂种优势利用提供重要的参考。

致谢 陕西省杂交油菜研究中心的李殿荣研究员提供了该所育成品种(系)的系谱来源,河南省农业

科学研究所的张书芬研究员提供了不育系“98506-2A”和两恢复系“P258-1”和“P005-8”的种子和系谱资料,在此深表感谢。

## References

- [1] Fu T-D (傅廷栋). Breeding and Utilization of Rapeseed Hybrid(油菜杂种优势的育种和利用). Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1999 (in Chinese)
- [2] Wu J-F (吴景锋). Engineering Techniques on Crop Genetics and Breeding(作物遗传育种工程技术). Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2000 (in Chinese)
- [3] Demeke T, Adams R P, Chibbar R. Potential taxonomic use of random amplified polymorphic DNA (RAPD): a case study in *Brassica*. *Theor Appl Genet*, 1992, 84: 990—994
- [4] Mailer R J, Scarth R, Fristensky B. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 697—704
- [5] Diers B W, Osborn T C. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* germplasm based on restriction fragment length polymorphisms. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 662—668
- [6] Mailer R J, May C E. Heterogeneity of random amplified polymorphic DNA sequences in individual seedlings and bulked samples of four cultivars of *Brassica napus*. *Plant Breeding*, 1999, 118: 465—470
- [7] Thormann C E, Ferreira M E, Camargo L E A, Tivang J G, Osborn T C. Comparison of RFLP and RAPD markers to estimating genetic relationships within and among cruciferous species. *Theor Appl Genet*, 1994, 88: 973—980
- [8] Dos Santos J B, Nienhuis J, Skroch P, Tivang J, Slocum M K. Comparison of RAPD and RFLP genetic markers in determining genetic similarity among *Brassica oleracea* L. genotype. *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 909—915
- [9] Meng J-L (孟金陵), Lydiate D, Sharpe A, Bowman C, Tian Z-H (田志宏), Qian X-Z (钱秀珍). Analysis of genetic diversity by RFLP markers. *Acta Genetica Sinica* (遗传学报), 1996, 23(4): 293—306
- [10] Wu N-F (伍宁丰), Li R-G (李汝刚), Wu X-M (伍晓明), Zhu L (朱莉), Fan Y-L (范云六), Qian X-Z (钱秀珍). Genetic diversity of Chinese *Brassica napus* detected by RAPD markers. *Diversity of Living Life* (生物多样性), 1997, 5(4): 246—250
- [11] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Forcus*, 1990, 12: 13—15
- [12] Dice L R. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology*, 1945, 26: 297—302
- [13] Saitou N, Nei M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol*, 1987, 4(4): 406—425
- [14] Efron B, Tibshirani R. Bootstrap methods for standard errors, confidence intervals, and other measures of statistical accuracy. *Stat Sci*, 1986, 1: 54—77
- [15] Spooner D M, Tivang J, Nienhuis J J, Miller J T, Douches D S, Contreras M A. Comparison of four molecular markers in measuring relationships among the wild potato relatives *Solanum* section *Euberosum* (subgenus *Potatoe*). *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 532—540
- [16] Rieseberg L M. Homology among RAPD fragments in interspecific comparisons. *Molecular Ecology*, 1996, 5: 99—105
- [17] Perez T, Albornoz J, Dominguez A. An evaluation of RAPD fragment reproducibility and nature. *Molecular Ecology*, 1998, 7: 1347—1357
- [18] Paran I, Aftergoot E, Shiffriss C. Variation in *Capsicum annuum* revealed by RAPD and AFLP markers. *Euphytica*, 1998, 99: 167—173
- [19] Degani C, Rowland L J, Saunders J A, Saunders J A, Hkanson S C, Ogden EL, Olarr Gldirs A H, Galletta GJ. A comparison of genetic relationship measures in strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) based on AFLPs, RAPDs, and pedigree data. *Euphytica*, 2001, 117: 1—12
- [20] Lefort-Buson M, Dattee Y, Guillot-Lemoine B. Heterosis and genetic distance in rapeseed (*Brassica napus* L.): use of kinship coefficient. *Genome*, 1987, 29: 11—18
- [21] Srivastava K, Rai B. Expression of heterosis for yield and its attributes in rapeseed (*Brassica napus*). *Indian Journal of Agriculture Sciences*, 1993, 63(4): 243—245

## 欢迎订阅 2004 年《作物杂志》

《作物杂志》是中国作物学会和中国农科院作物所主办的农业科学技术类期刊。主要刊登农作物科研成果、科技论文、农业技术推广等方面的文章。辟有专题综述、研究简报、品种与种子生产、植物保护、土壤肥料、国外农业、果蔬园艺、栽培技术、种植制度、品种信息等栏目。《作物杂志》的读者群为农业科研单位人员、农业院校师生、各级农技推广人员、各级种子公司、农民及与农业有关单位的工作人员。《作物杂志》为双月刊, 56 页, 大 16 开, 彩色四封。定价 3.00 元/期, 全年定价 18 元。一次订购 20 本以上, 享受优惠价。全国各地邮局均可订阅, 也可直接汇款至本刊编辑部邮购。

本刊利用封 1 - 4 为农业科研成果、先进科学技术和产品做彩色图片宣传已有数年, 效果甚佳, 价格优惠。欲刊者请寄彩色照片, 照片要清晰, 注释文字要简练、重点突出。来稿采用后, 编辑部可协助客户增印彩色单页, 增印 5000 份以内只收纸张费。

地址: 北京中关村南大街 12 号中国农科院内 邮编: 100081 电话: 010 - 68918790

网址: <http://zwzz.chinajournal.net.cn> 邮发代号: 82-220

电子信箱: [zwzz304@mail.caas.net.cn](mailto:zwzz304@mail.caas.net.cn) [zwzz@chinajournal.net.cn](mailto:zwzz@chinajournal.net.cn)