

SSR 标记分析国家油菜区试品种的特异性和一致性

陆光远¹, 伍晓明¹, 张冬晓², 刘凤兰¹, 陈碧云¹, 高桂珍¹, 许 鲲¹

(¹中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; ²农业部全国农业技术推广服务中心, 北京 100026)

摘要: 【目的】分析中国油菜区试品种的特异性、一致性和稳定性, 为新品种审定和品种权保护提供科学依据。【方法】以近年参加中国冬油菜区域试验的 89 个品种为试验材料, 利用筛选确定的 15 对较好的 SSR 引物开展品种的特异性和一致性分析。【结果】共获得 42 个多态性标记。遗传聚类、主成份、分配试验和 AMOVA 分析结果表明: 42 个标记能够将 89 个品种完全区分开; 同一个育种单位选育的品种其遗传基础相近, 而不同地区或育种单位选育的品种其遗传背景相差较大, 揭示的遗传结构与品种系谱来源相吻合; 以遗传距离 0.1 为划分标准, 75% 的供试品种具备特异性; 分配试验中, 大部分单株都能正确的分配回到原来的品种, 少数品种的单株正确分配率较低, 品种一致性差; 品种在供种年份间差异不显著, 其一致性较好, 而在同一年份的品种间差异极显著, 其特异性较高。【结论】除少数品种外, 大部分品种都具有很高的特异性和一致性; SSR 标记是适合于开展油菜品种 DUS 测试的鉴定技术。

关键词: 油菜; 区域试验; SSR 标记; DUS 测试

SSR-based Evaluation of Distinctness and Uniformity of Rapeseed (*Brassica napus* L.) Varieties under Chinese National Official Field Tests

LU Guang-yuan¹, WU Xiao-ming¹, ZHANG Dong-xiao², LIU Feng-lan¹, CHEN Bi-yun¹, GAO Gui-zhen¹, XU Kun¹

(¹Oil Crops Research Institute, CAAS, Wuhan 430062; ²National Service and Extension Center for Agricultural Technology, Beijing 100026)

Abstract: 【Objective】 Analysis was carried out to evaluate distinctness, uniformity and stability of new varieties to be registered. 【Method】 In this study, 89 varieties under Chinese national official field test were fingerprinted by 42 polymorphic markers generating from 15 highly informative SSR primers. 【Result】 The genetic clustering, principal component analysis, assignment test and AMOVA (analysis of molecular variance) results showed that: Fourty-two polymorphic markers are sufficient to completely separate all 89 varieties. Most of the similar varieties were bred by the same breeders and the most distinct ones came from different province or breeders, which was in accordance with the pedigree information. Seventy-five percent of the tested varieties are distinct using a genetic distance threshold of 0.1. In the assignment test, most of the varieties could be correctly placed back to the respective source variety, yet the other had a low correct individual assignment percentage, a sign of poor uniformity. The genetic variation between seed delivery was not significant, indicating a good stability of variety, and genetic variation among varieties within seed delivery is significant, meaning a good distinctness. 【Conclusion】 Overall, the results showed that most of the tested rapeseed varieties have the characteristics of distinctness, uniformity and stability (DUS), and SSR technique is suitable for DUS testing.

Key words: Rapeseed (*Brassica napus* L.); Official field test; SSR marker; DUS testing

0 引言

【研究意义】油菜是中国十分重要的油料经济作

物, 同时也是潜在的能源作物^[1]。由于油菜的经济价值较高, 目前新品种的选育和推广呈快速增长的趋势, 每年申请参加国家或地方审定的油菜新品种多达几十

收稿日期: 2006-12-14; 接受日期: 2007-02-05

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (2006AA10Z1E4), 国家科技支撑项目 (2006BAD13B05), 院长基金项目 (2007-13), 农业部油料作物遗传改良重点开放实验室课题 (200709)

作者简介: 陆光远 (1974-), 男, 广西贵港人, 副研究员, 博士, 研究方向为油菜品种资源和生物技术研究。通讯作者伍晓明 (1963-), 男, 湖北武汉人, 研究员, 研究方向为油菜种质资源学。Tel: 027-86812906; E-mail: wuxm@oilcrops.cn

个。油菜新品种必须具备特异性、一致性和稳定性(即 DUS),这是新品种审定的前提,也是保护育种家合法权益、打击假冒伪劣种子、依法维护农民利益的基础。【前人研究进展】目前,中国及国际上通行的油菜品种 DUS 测试标准主要是建立在部分生物学性状(包括农艺性状、品质性状和抗逆性状等)的基础上的,鉴定结果容易受环境因素的影响,而且周期较长。随着油菜遗传育种材料遗传基础的日益狭窄,以及选育品种数目的增多,品种间的差异越来越小,单纯依靠传统的生物学性状已经难以将它们准确区分鉴别。DNA 分子标记的出现和快速发展,为油菜品种的准确鉴定提供了一种的高新技术手段。SSR 标记就是一种非常适合于开展油菜品种鉴定的新技术,其依据是 SSR 座位在同一物种内十分保守,但核心序列的重复次数在不同品种间差异较大,造成了丰富的多态性。SSR 标记的优点是:(1)数量丰富,共显性遗传,信息含量高;(2)分析方法简单快速,成本低廉;(3)每个位点由引物序列决定,结果重现性好,便于实验室间交流^[2]。SSR 标记的高分辨力特性及遗传方式使其成为品种 DNA 指纹分析较理想的技术,并且已经开始应用于油菜^[3]、小麦^[4]、水稻^[5]、番茄^[6]、玉米^[7]、马铃薯^[8]和大豆^[9]等作物的品种鉴定和遗传多样性研究中。【本研究切入点】对于利用分子标记技术进行油菜品种的特异性和一致性鉴定研究,国外已开始探索^[10,11],而国内尚未开始。【拟解决的关键问题】本文采用 SSR 标记技术对近年参加全国区试的油菜品种进行品种特异性和一致性分析,以期对油菜新品种的审定和保护提供科学依据。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

供试材料为 2004~2005 年度参加国家冬油菜区域试验的 89 个品种,由农业部全国农业技术推广服务中心提供,其中的 17 个品种还参加了 2005~2006 年度的区域试验(表 1)。

1.2 DNA 提取

油菜种子在室内发芽,以避免田间自生苗的污染。发芽 7 d 后,每个品种混合采集 30 株幼苗提取总 DNA 用于品种特异性分析,同时单独提取 30 个单株的 DNA 用于品种一致性分析。DNA 提取按照改进的 SDS 法进行^[12]。

1.3 SSR 分析

SSR 分析按照笔者优化的体系进行,银染法显带^[12]。

所有胶板均拍照存档。

1.4 数据统计

1.4.1 SSR 标记的多态性及鉴别力

对于 SSR 带型,在相同迁移率的位置上,有带记录为“1”,无带记录为“0”。

引物的鉴别能力可用 PIC 值和 DP 值表示。PIC 计算公式为: $PIC=1-\sum f_i^2$,其中 f_i 为 i 位点的基因频率^[13]。DP (即鉴别力, discrimination power) 是指一对引物所能区分的最大品种数目^[10]。

1.4.2 品种的遗传多样性水平

任意两个品种 A 和 B 间的遗传距离(GD)按 Nei 和 Li 报道的方法计算: $GD=1-2X_{12}/(X_1+X_2)$, 式中的 X_1 为 A 品种的总带数, X_2 为品种 B 的总带数, X_{12} 为两者共同带型的数目^[14]。

品种内的遗传变异程度用 Nei 基因多样性指数和 Shannon 信息指数衡量,在软件 Popgene^[15]上求算。

1.4.3 品种的遗传结构

89 个品种的遗传聚类分析(UPGMA 法)在程序包 PHYLIP^[16]上进行,其可靠性用 Bootstrap 法检验(1 000 次重复,每次替换 35% 的分子标记数据)。

品种的主成份分析(principal component analysis)和分配试验(assignment test)分别在软件 NTSYS-pc^[17]和 GeneClass^[18]上进行。

1.4.4 品种分子标记数据的方差分析

对于有重复的 17 个品种(连续参加了两个年度的区域试验),可以进行分子方差分析(Analysis of Molecular Variance, AMOVA)以了解各种遗传变异(年度间、年度内品种间)的大小及其显著性。数据处理在软件 Arlequin^[19]上进行。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性和鉴别力

利用 5 个形态差异较大的品种对 96 对 SSR 引物进行了筛选,确定其中的 15 对扩增带纹清晰、多态性丰富的引物用于本研究。部分引物的扩增结果见图 1。15 对引物在 89 份品种中检测到的多态性标记从 1 个到 6 个不等,总共 42 个,平均每对引物 2.8 个(表 2)。引物的 PIC 值变幅为 0.17~0.95,平均值为 0.58,说明这些引物总体上具有较好的鉴别能力。引物 P005 的 PIC 值最高(0.95), OI08B11 最低(0.17)。尽管 OI08B11 的 PIC 值较低,但由于揭示的带型十分特异,所以也予以入选。

从引物的鉴别力(DP)来看,DP 值较高的引物有 P017、P014 和 Na10A02 等,采用这种高鉴别力的引物有可能用最少的引物数目将所有的品种区分开。

表 1 油菜区试品种的名称及选育单位

Table 1 Name and breeder of rapeseed cultivars used in this study

代号 Code ¹⁾	品种名称 Accession	品种类型 Type ²⁾	选育单位 Plant breeder ³⁾
01	皖油 24 Wanyou24	CMS Hybrid	安徽滁州市农科所 Anhui Chuzhou AI
02	ZC001	CMS Hybrid	安徽国瑞农业科技公司 Anhui Guorui SC
03	皖油 14 Wanyou14	CMS Hybrid	安徽农科院 Anhui AAS
04	皖核杂 5 号 Wanheza 5	GMS Hybrid	安徽农科院 Anhui AAS
05	皖核杂 6 号 Wanheza 5	GMS Hybrid	安徽农科院 Anhui AAS
06	皖核杂 8 号 Wanheza 8	GMS Hybrid	安徽农科院 Anhui AAS
07	皖核杂 4 号 Wanheza 4	GMS Hybrid	安徽农科院 Anhui AAS
08	H243	CMS Hybrid	安徽农科院 Anhui AAS
09	H2456860	CMS Hybrid	北京中农种业公司 Beijing Zhongnong SC
10	中农油 1 号 Zhongnongyou 1	CMS Hybrid	北京中农种业公司 Beijing Zhongnong SC
11	杂 0203 Za0203	CMS Hybrid	成都市第二农科所 Chengdu 2th AI
12*	杂 2015 Za2015	CMS Hybrid	成都市第二农科所 Chengdu 2th AI
13*	成油 1 号	CMS Hybrid	成县种子分公司 Chengxian SC
14	黔杂 zw99004 Qianza99004	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
15	黔油 18 Qianyou18	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
16	油研 727 Youyan727	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
17	油研 7 号 Youyan 7	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
18	HY001	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
19*	HY002	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
20	油 87HO You87HO	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
21	油 0310 You0310	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
22	油研 278 Youyan278	CMS Hybrid	贵州农科院 Guizhou AAS
23	贵杂 5 号 Guiza 5	GMS Hybrid	贵州种子管理站 Guizhou Seed Station
24	创优 26 Chuangyou26	CMS Hybrid	河南 信阳 Xinyang, Henan
25*	杂双 3 号 Zashuang 3	CMS Hybrid	河南农科院 Henan AAS
26	EYZ9-4	CMS Hybrid	湖北优质油菜良种繁殖中心 Hubei CPC
27	杂 753 Za753	GMS Hybrid	湖南农业大学 Hunan Agri. Univ.
28	杂 743 Za743	CMS Hybrid	湖南农业大学 Hunan Agri. Univ.
29	杂 631 Za631	CMS Hybrid	湖南农业大学 Hunan Agri. Univ.
30	杂 125 Za125	CMS Hybrid	湖南农科院 Hunan AAS
31	2011	GMS Hybrid	湖南农科院 Hunan AAS
32*	H04-4-7	CMS Hybrid	湖南亚华种业公司 Hunan Yahua SC
33	中油杂 6 号 Zhongyouza 6	CMS Hybrid	湖南亚华种业公司 Hunan Yahua SC
34	K28	CMS Hybrid	湖南亚华种业公司 Hunan Yahua SC
35	丰油 701 Fengyou701	CMS Hybrid	湖南农科院 Hunan AAS
36	H0202	CMS Hybrid	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
37*	H0201	CMS Hybrid	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
38	H4270	CMS Hybrid	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
39	H0301	CMS Hybrid	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
40	H0203	CMS Hybrid	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
41	04-P-27	CMS Hybrid	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
42	21933	OP	华中农业大学 Huazhong Agri. Univ.
43	H3531	CMS Hybrid	江苏大绿种苗公司 Jiangsu Dalu SC
44	H336	CMS Hybrid	江苏淮安市农科所 Jiangsu Huai'an AI

续表 1 Continue table 1

45*	扬鉴 8 Yangjian8	OP	江苏里下河地区农科所 Jiangsu Lixiahe AI
46*	HY8	GMS Hybrid	江苏农科院 Jiangsu AAS
47	99-1055	OP	江苏农科院 Jiangsu AAS
48	赣油杂 1 号 Ganyouza 1	CMS Hybrid	江西农科院 Jiangxi AAS
49*	H9945	CMS Hybrid	荆楚种业公司 Jingchu SC
50	绵杂 99-67 Mianza99-67	CMS Hybrid	绵阳市农科所 Sichuan Mianyang AI
51	绵杂 99-13 Mianza99-13	CMS Hybrid	绵阳市农科所 Sichuan Mianyang AI
52	优 88 You88	OP	南京绿江种苗开发中心 Nanjing Lumiao SC
53	杂-64 Za-64	CMS Hybrid	秦丰农业杂交油菜公司 Shanxi Qinfeng SC
54	万油杂 1 号 Wanyouza 1	CMS Hybrid	湖北三峡农科所 Hubei Sanxia AI
55	陕油杂 1 号 Shanyouza 1	CMS Hybrid	陕西神禾农业公司 Shanxi Shenhe SC
56	杂-49 Za-49	CMS Hybrid	陕西省秦丰公司 Shanxi Qinfeng SC
57*	驰丰 1 号 Chifeng 1	CMS Hybrid	陕西省三原县种子分公司 Shanxi Sanyuan SC
58*	秦杂油 1 号 Qinzaoyou 1	CMS Hybrid	陕西杂交油菜研究中心 Shanxi HRRC
59	秦优 7 号 Qinyou 7	CMS Hybrid	陕西杂交油菜研究中心 Shanxi HRRC
60*	沪油 17 huyou17	OP	上海农科院 Shanghai AAS
61	沪油杂 1 号 Huyouza 1	CMS Hybrid	上海农科院 Shanghai AAS
62	96185	CMS Hybrid	四川大学 Sichuan University
63*	03 杂-1 03Za-1	CMS Hybrid	四川农科院 Sichuan AAS
64	德油 6 号 Deyou 6	CMS Hybrid	四川德农正成公司 Sichuan DNZC SC
65	99 杂 06 99Za06	GMS Hybrid	四川绿丹种业公司 Sichuan Ludan SC
66	2069A×12C	CMS Hybrid	绵阳市生物所 Mianyang Biological Institute
67	01 杂 796 01Za796	CMS Hybrid	四川南充市农科所 Sichuan Nanchong AI
68	03 杂 715 03Za715	CMS Hybrid	四川南充市农科所 Sichuan Nanchong AI
69	H9941	CMS Hybrid	武汉佳禾种业公司 Wuhan Shenhe SC
70	99-6	CMS Hybrid	武汉中农油公司 Wuhan Zhongnongyou SC
71	秦研 211 Qinyan211	CMS Hybrid	西北农林大学 North-West A&f Univ.
72	2004 杂 V1 2004ZaV1	CMS Hybrid	西南农业大学 South-West Agri. Univ.
73	2002V07	CHA Hybrid	西南农业大学 South-West Agri. Univ.
74	秦油 8 号 Qinyou 8	CMS Hybrid	咸阳市农科所 Shanxi Xianyang AI
75	2000-5	CMS Hybrid	咸阳市农科所 Shanxi Xianyang AI
76*	4026	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
77	希望 98 Xiwang98	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
78*	中油杂 2 号 Zhongyouza 2	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
79	96-8	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
80	4028	GMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
81	中双 9 号 Zhongshuang 9	OP	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
82	99-8	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
83	4029	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
84	98-8	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
85*	浙油 18 Zheyou18	OP	浙江农科院 Zhejiang AAS
86*	希望 568 Xiwang568	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
87	96(D)-8	CMS Hybrid	中国农科院油料所 OCRI,CAAS
88	华油 2008 Huayou2008	CMS Hybrid	中国种业集团公司 China SC
89	华油 2000 Huayou2000	CMS Hybrid	中国种业集团公司 China SC

¹⁾*连续参加两年区试 subjected to two consecutive years of field test

²⁾CMS Hybrid 细胞质不育杂种; GMS Hybrid 细胞核不育杂种; CHA Hybrid 化学杀雄杂种; OP 常规种

³⁾AI: Agricultural Institute; SC: Seed Company; HRRC: Hybrid Rapeseed Research Center; AAS: Academy of Agricultural Science; OCRI, CAAS: Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Science; CPC: Canola Propagating Center

表 2 不同 SSR 引物的扩增结果

Table 2 Amplification results of different SSR primers

引物 Primer	标记数目 No. of markers	多态性信息量 <i>PI</i> C	鉴别力 <i>DP</i>
P004 ¹⁾	5	0.67	7
P005 ¹⁾	1	0.95	2
P011 ¹⁾	1	0.58	2
P014 ¹⁾	4	0.73	12
P016 ¹⁾	2	0.26	3
P017 ¹⁾	5	0.74	13
P022 ¹⁾	4	0.45	6
P023 ¹⁾	3	0.67	5
P029 ¹⁾	2	0.30	4
P031 ¹⁾	1	0.28	2
P042 ¹⁾	2	0.76	4
P078 ¹⁾	2	0.87	4
P083 ¹⁾	2	0.50	3
Na10A02 ²⁾	6	0.80	9
O108B11 ²⁾	2	0.17	3
合计 Total	42		
平均 Mean	2.8	0.58	5.3

¹⁾ 引物序列未公布 Unpublished primer sequences

²⁾ 来源于公共数据库 (<http://ukcrop.net/perl/ace/search/BrassicaDB>) From public domain

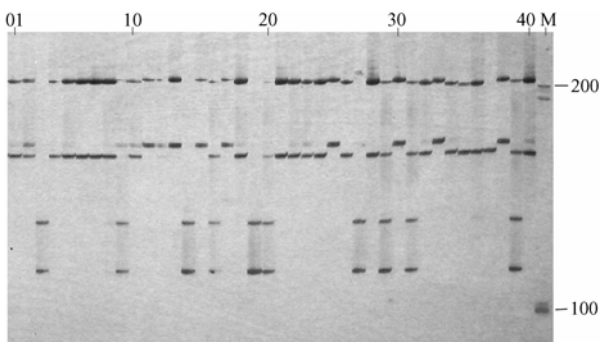


图 1 SSR 引物 Na10A02 在部分品种中的扩增情况 (品种代号见表 1, M 为 100 bp 标准分子量)

Fig. 1 DNA fingerprinting of 40 cultivars detected by SSR primer Na10A02 (the code for accessions was shown in Table 1. M, 100 bp DNA ladder)

2.2 品种的特异性分析

利用 15 对引物在 89 个品种中检测到的 42 个 SSR 标记计算了品种间的遗传距离, 并进行遗传聚类分析。

聚类结果表明: (1) 同一地区或同一育种单位提供的品种其遗传基础相近, 往往首先聚类在一起, 且得到较高 Bootstrap 值的支持, 比如华中农业大学提供的 H0201、H0203 和 H4270, 四川绵阳市农科所育成的绵杂 99-67 和绵杂 99-13, 中国农业科学院油料作物研究所提供的希望 98、96-8、99-8 和希望 568, 以及陕西省提供的杂-49、秦杂油 1 号和秦优 7 号等; (2) 不同单位选育的品种其遗传背景差异较大, 往往被分配到不同的类群中, 其中 4028 最为特别, 自成一类, 具有很高的特异性 (图 2)。

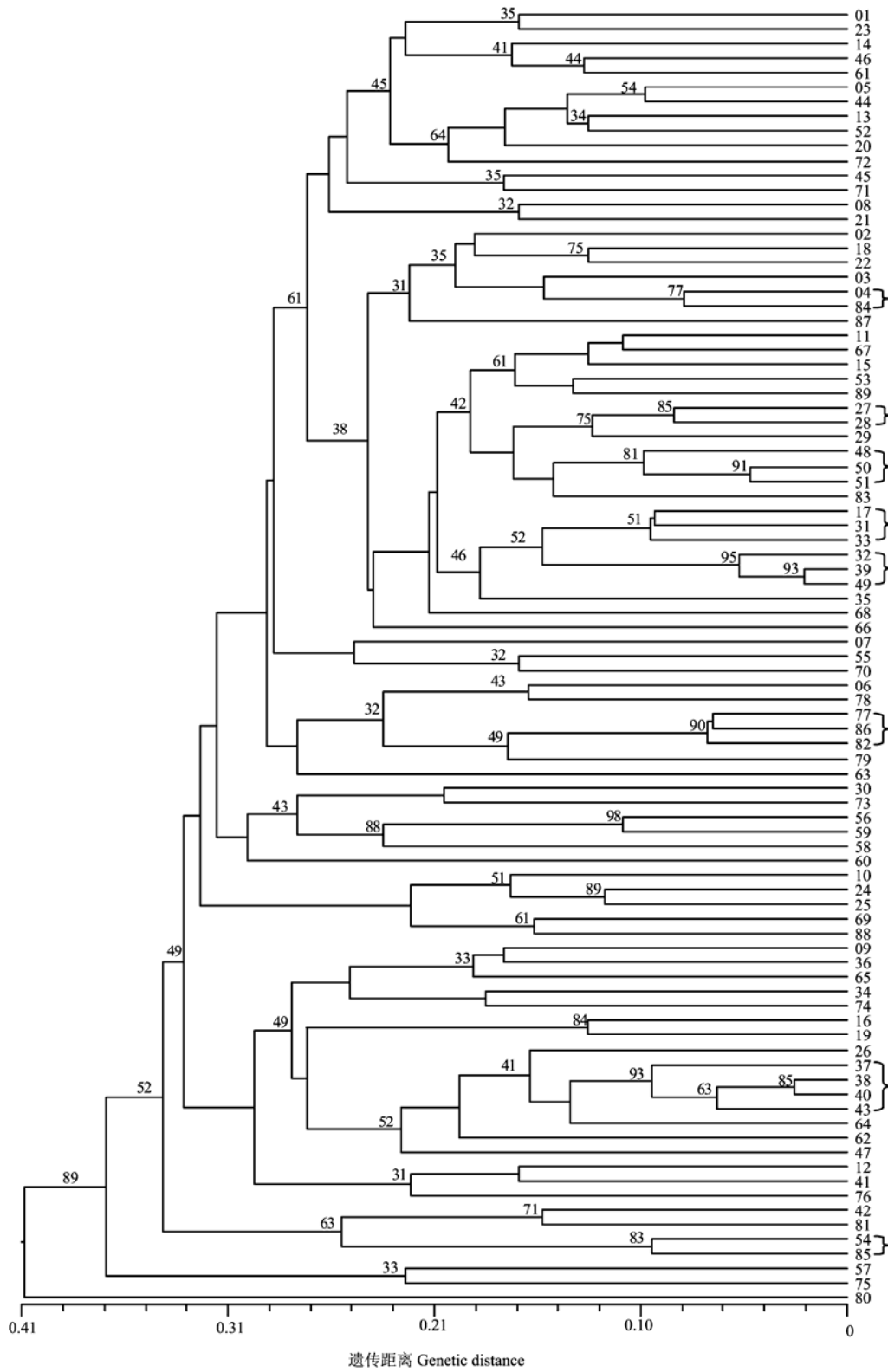
主成份分析结果也表明 89 份品种具有一定的特异性。前两个主成份能解释的总变异为 72.7%, 在二维座标图上所有品种都被划分到不同的区域, 仅有少数品种相互靠近, 如 HY8 和 2069A×12C, H3531 和 98-8, 以及黔油 18 和贵杂 5 号等 (图 3)。

笔者计算了 89 个品种相互间的遗传距离, 并将任意一个品种与其余 88 个品种的遗传距离的平均值、最大值和最小值归纳整理, 结果列于表 3。可以看出, 品种间遗传距离平均值的变幅为 0.237~0.429, 最大值的变幅为 0.385~0.667 (表 3), 说明区试品种总体上具有一定的特异性, 部分品种具有较高的特异性。再从最小值看, 如果分别以遗传距离阈值 $T = 0.25$ 、0.20、0.15、0.10 和 0.05 为确定品种具有特异性的标准, 那么具有特异性品种的比例分别为 1%、4%、39%、75%和 92% (表 4)。由此可见, 随着 T 值的降低, 符合特异性标准的品种比例迅速增加。在本研究中, $T = 0.10$ 的划分效果较合适, 有 67 个品种 (75%) 具有特异性, 22 个品种不具备特异性。不具备特异性的品种大多数来源于同一育种单位, 而且优先聚类在一起 (图 2)。

2.3 品种的一致性

以 DH 系为参照, 选取 4 个有代表性的品种进行一致性分析, 每份材料检测 30 个单株。首先以 Nei 基因多样性指数和 Shannon 多样性指数为指标, 评价各个品种的一致性程度。在 5 份材料中, 品种内遗传多样性程度最低的是 DH 系, 即 DH 系的一致性最好, 与预期结果相符, 说明 SSR 分析的结果是可靠的。中油杂 2 号和 2002V07 的多样性指数也较低, 其品种一致性较好, 而 99 杂 06 和沪油 17 的多样性指数最高, 其品种一致性最差 (表 5)。

其次, 采用分配试验进一步评价这些品种的一致性。分配试验是评价品种一致性的常用统计方法, 其步骤是首先计算每个被分配单株相对于 5 个目标品种



节点处为 Bootstrap 值 (仅标出大于 30% 的值) 无特异性的品种用大括号注明

Nei genetic distance with indication of Bootstrap values of 1 000 datasets (only value above 30% listed). Varieties with low distinctiveness are marked with bracket

图 2 89 个油菜品种的 UPGMA 聚类图

Fig. 2 UPGMA clustering of the 89 varieties

表 3 品种间的 Nei 氏遗传距离

Table 3 Distinctiveness over varieties expressed as the min, max and mean standard Nei genetic distance by pairwise comparison

品种代号 Code	遗传距离 Genetic distance			品种代号 Code	遗传距离 Genetic distance		
	平均值 Mean	最大值 Max	最小值 Min		平均值 Mean	最大值 Max	最小值 Min
01	0.304	0.450	0.163	46	0.287	0.444	0.130
02	0.308	0.512	0.128	47	0.382	0.610	0.158
03	0.301	0.529	0.135	48	0.269	0.421	0.073
04	0.265	0.474	0.081	49	0.269	0.395	0.021
05	0.239	0.444	0.100	50	0.254	0.389	0.048
06	0.287	0.455	0.158	51	0.265	0.412	0.048
07	0.328	0.515	0.189	52	0.259	0.514	0.122
08	0.294	0.500	0.143	53	0.237	0.385	0.111
09	0.351	0.500	0.171	54	0.301	0.471	0.097
10	0.365	0.610	0.143	55	0.311	0.500	0.163
11	0.252	0.421	0.111	56	0.318	0.581	0.111
12	0.314	0.500	0.163	57	0.383	0.667	0.182
13	0.290	0.529	0.105	58	0.327	0.538	0.174
14	0.305	0.436	0.163	59	0.311	0.524	0.111
15	0.266	0.415	0.100	60	0.387	0.667	0.222
16	0.331	0.487	0.128	61	0.266	0.500	0.130
17	0.251	0.429	0.095	62	0.330	0.487	0.176
18	0.288	0.474	0.105	63	0.334	0.486	0.188
19	0.335	0.488	0.128	64	0.282	0.442	0.128
20	0.294	0.538	0.116	65	0.323	0.450	0.171
21	0.294	0.487	0.163	66	0.290	0.429	0.136
22	0.245	0.415	0.100	67	0.308	0.500	0.111
23	0.263	0.405	0.143	68	0.281	0.436	0.150
24	0.300	0.500	0.120	69	0.347	0.514	0.156
25	0.297	0.524	0.120	70	0.301	0.543	0.158
26	0.315	0.487	0.135	71	0.280	0.474	0.150
27	0.247	0.429	0.086	72	0.304	0.474	0.150
28	0.278	0.444	0.086	73	0.336	0.538	0.200
29	0.273	0.500	0.118	74	0.343	0.486	0.171
30	0.286	0.514	0.158	75	0.353	0.568	0.220
31	0.251	0.421	0.095	76	0.364	0.514	0.171
32	0.258	0.421	0.043	77	0.318	0.563	0.067
33	0.260	0.415	0.095	78	0.275	0.459	0.143
34	0.364	0.550	0.171	79	0.311	0.484	0.161
35	0.316	0.487	0.128	80	0.409	0.563	0.257
36	0.317	0.476	0.171	81	0.360	0.588	0.152
37	0.260	0.429	0.073	82	0.322	0.533	0.067
38	0.261	0.436	0.026	83	0.281	0.459	0.116
39	0.260	0.395	0.021	84	0.258	0.487	0.081
40	0.268	0.450	0.026	85	0.357	0.526	0.097
41	0.333	0.526	0.163	86	0.331	0.533	0.067
42	0.338	0.543	0.152	87	0.322	0.550	0.171
43	0.254	0.429	0.053	88	0.342	0.524	0.156
44	0.259	0.556	0.100	89	0.255	0.429	0.100
45	0.332	0.526	0.171				

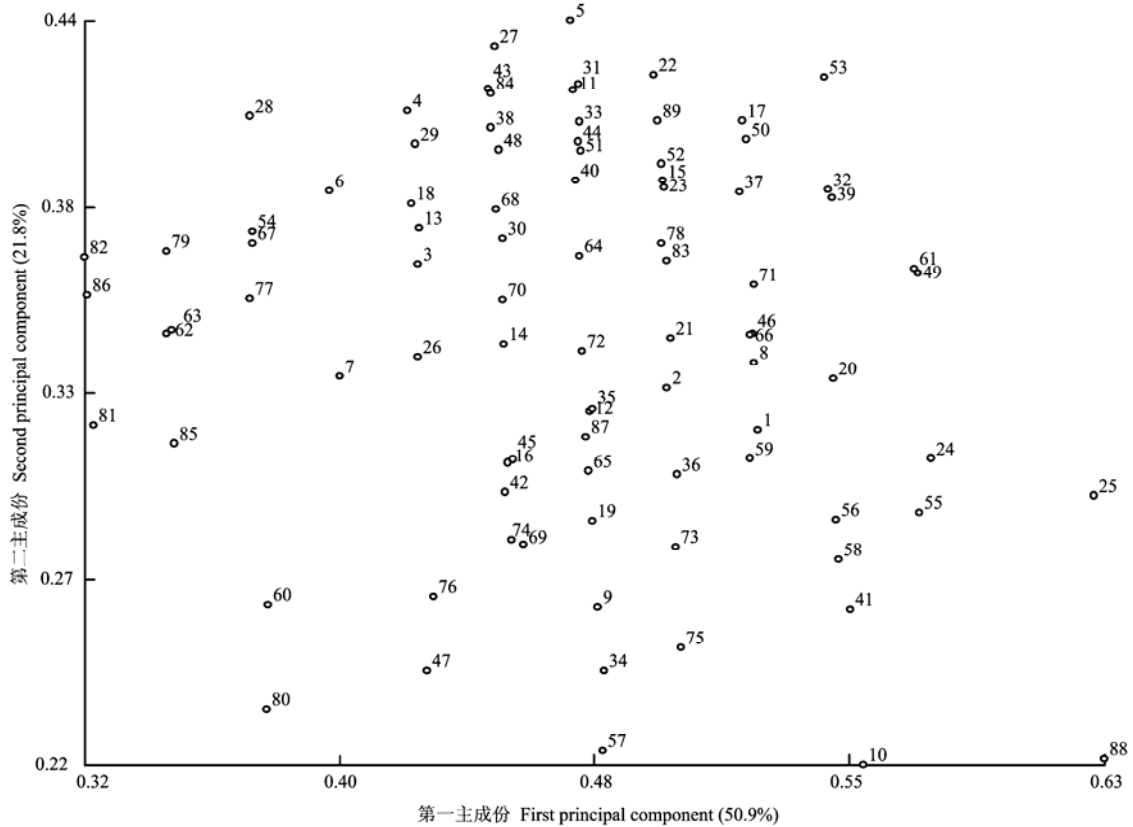


图 3 89 个油菜品种的主成份分析

Fig. 3 Genetic structure of 89 rapeseed varieties revealed by principal components analysis

表 4 89 个品种的特异性划分

Table 4 Distinctness classification of 89 varieties

遗传距离阈值 Threshold of genetic distance (<i>T</i>)	特异性品种数 No. of varieties with distinctness	百分比 Percentage of total varieties (%)
0.25	1	1%
0.20	4	4%
0.15	35	39%
0.10	67	75%
0.05	82	92%

的期望基因型频率，然后将其一一分配到期望基因型频率最高的目标品种中去。分配试验结果表明，在 150 个单株（30×5）中，84.7%的单株（127 株）被正确的分配回到原来的品种中（频率低于 0.5 的单株不分配，见表 6）。单株正确分配率最高的材料是 DH 系和中油杂 2 号，达 100%；其次是 2002V07，为 87%；其它品种较低，仅有 67%~70%（表 6）。以上结果也说明 DH 系和中油杂 2 号的一致性最好，2002V07 的一致性次之，99 杂 06 和沪油 17 的一致性最差。

表 5 品种内的遗传变异

Table 5 Genotype diversity within varieties for 15 SSR markers based on the analysis of 30 individuals from each of the test array

品种 Variety	Nei 基因多样性 Nei gene diversity	Shannon 信息指数 Shannon information index
DH	0.0232	0.0329
中油杂 2 号 Zhongyouza 2	0.0801	0.1241
2002V07	0.1555	0.2294
沪油 17 Huyou 17	0.2382	0.3554
99 杂 06 99Za06	0.2512	0.3697

有 17 个品种连续参加了 2004~2005 年度和 2005~2006 年度的国家区试，可以将这些不同年份提供的种子看作是品种的两个重复。对这些品种进行比较分析可以了解品种在不同供种年份间的变异情况。首先，计算了每个品种在两个年份间的遗传距离，遗传距离越小越好。根据上面的结果，仍以遗传距离阈值 $T=0.10$ 为标准，低于此值的品种有 12 个，说明其

表 6 品种单株分配试验结果 (表中数据为分配到各品种中的单株数)

Table 6 Results of assignment test (Values are the number of plants from each variety assigned to each variety)

目标品种 Source variety	待分配品种 Assigned variety				
	DH	中油杂 2 号 Zhongyouza 2	2002V07	99 杂 06 99Za06	沪油 17 Huyou 17
DH	30	0	0	0	0
中油杂 2 号 Zhongyouza 2	0	30	0	0	0
2002V07	0	0	26	0	2
99 杂 06 99Za06	0	0	0	20	6
沪油 17 Huyou 17	0	0	0	10	21
其它 Other($P < 0.5$)	0	0	4	0	1

一致性较好; 高于此值的品种有 5 个, 表明其一致性较差 (表 7)。

表 7 品种不同年份间的遗传距离

Table 7 Genetic distance of two different year delivery

品种 Variety	遗传距离 Genetic distance
H0201	0
绵杂 99-67 Mianza 99-67	0
HY002	0
秦研 211 Qinyan 211	0
华油 2008 Huayou 2008	0
4026	0.0588
H0203	0.0588
H04-4-7	0.0667
油 87HO You87 HO	0.0667
沪油 17 Huyou 17	0.0769
2000-5	0.0981
2011	0.0998
EYZ9-4	0.1667
03 杂-1 03Za-1	0.2308
浙油 18 Zheyou 18	0.2308
希望 568 Xiwang568	0.2500
杂 2015 Za 2015	0.2727

其次, 按供种年份将种子样品分为两组, 每组 17 个品种, 进行 AMOVA 分析。结果表明, 由供种年份间带来的遗传变异仅占 3.4%, 且未达显著水平, 说明这些品种总体上在不同年份间的一致性较好; 由年份内品种间引起的遗传变异占总变异的 96.6%, 且达到极显著水平, 说明这些品种之间差异较大, 总体上具有较高的特异性 (表 8)。

表 8 品种分子标记数据的方差分析结果

Table 8 Analysis of molecular variance (AMOVA) of 34 accessions with different year delivery

变异来源 Source of variation	自由度 df	变异组成 Variance components	变异比例 % of variation
年份间 Among seed delivery	1	0.0850	3.56
年份内品种间 Within seed deliveries	32	2.3010*	96.44
总计 Total	33	2.3860	

* 显著水平为 $P = 0.001$ Significant at $P = 0.001$

3 讨论

Smith 和 Chin^[2]认为, 最理想的品种鉴定技术应该是具有较好的可操作性、精确性、可靠性和高度的自动化。Heckenberger 等^[20]在 127 份玉米材料中分析了 100 对 SSR 引物后认为, SSR 标记就是最接近于理想化的品种鉴定技术, 其优点是鉴别力高, 不受环境影响, 分析结果在实验室间具有可比性, 遗传距离与系谱来源相吻合, 基因组覆盖率高, 引物信息广泛共享, 操作高度自动化, 成本低廉。在本研究中, 笔者仅利用 15 对 SSR 引物就可以对 89 个区试油菜品种进行精确的特异性和一致性鉴定, 鉴定结果与系谱分析和田间数据相吻合, 表明 SSR 引物也适合于开展油菜品种的 DUS 测试分析。Tommasini 等对 SSR 标记分析方法做了改进, 建立了复合 PCR (multiplex PCR) 反应体系和荧光标记半自动化检测技术, 极大的提高了工作效率^[11]。

在 DUS 测试中, 最为关键的是品种特异性的测定。在传统的 DUS 测试体系中, 品种间只要有一个明显不同的性状即视为具备特异性。在以分子标记为基础的测试体系中, 通常是将分子标记数据转换为遗传

距离, 然后根据遗传距离的大小来判断品种是否具有特异性的。国际上, 已经提出的用于划分品种特异性的遗传距离临界值有 0.25^[21]、0.20^[22]和 0.10^[23]等, 这些标准都是不同的研究者根据不同的作物、不同的分子标记类型提出的, 由于任何一个标准都无法适用于所有的作物, 因而国际上尚无法确定一个统一的标准。经综合比较分析, 本研究认为采用遗传距离阈值 $T=0.10$ 作为油菜品种特异性的划分标准较为合适。采用此标准, 初步鉴定出 22 个特异性较低(或无特异性)的品种(表 3), 它们大多数来源于相同的育种单位(表 1), 具有较为相似的遗传背景(图 2), 可能是由于育种者使用了相同或相近的核心亲本, 采用了类似的育种程序选育而造成的。尽管如此, 有关油菜品种特异性的遗传距离标准问题仍然值得进一步探讨。由于遗传距离与品种类型(杂交种、常规种、掺和种等)、标记方法(RFLP、SSR、AFLP 等)、引物数目和统计方法(Nei 距离欧氏距离、Dice 距离、Jaccard 距离等)等诸多因素有关, 因此在确定遗传距离标准时应慎重对待, 全面考虑。如果标准定得太高, 大部分品种被视为“无特异性”, 这会挫伤育种家的积极性, 阻碍新品种的选育; 反之, 标准太低则会发生品种剽窃现象, 无法保障育种家的正当权益。今后应该加大 SSR 引物筛选数目, 确定一套适合于油菜品种 DUS 测试的标准引物, 建立规范的技术操作规程, 确定一个为各方都能接受的遗传距离标准, 以利于保护育种家的权益和促进新品种的选育。目前在莴苣中已有类似的技术规范, 由国际种子联盟(International Seed Federation, ISF)颁布实施^[24]。

4 结论

本研究运用 SSR 标记技术对中国新近育种的油菜品种进行了品种特异性和一致性分析。研究表明, 利用少数骨干引物可以将所有的品种区分开分子标记数据揭示的品种亲缘关系与真实系谱来源信息相吻合, 即同一育种单位选育的品种其遗传基础相近, 而不同地区或育种单位选育的品种其遗传背景相差较大, 表明 SSR 标记用于品种 DUS 测试是可靠的。在测试的 89 个区试品种中, 大部分(75%)品种都具有较好的特异性和一致性。为了使 SSR 标记在中国油菜品种 DUS 测试中得到广泛应用, 应尽快建立相关的技术标准, 包括规范化的实验操作程序和品种特异性、一致性和稳定性的划分标准。

References

- [1] 王汉中. 中国油菜产业发展的中长期战略. 中国油料作物学报, 2004, 26: 98-101.
Wang H Z. Long and medium term strategy for rapeseed development in China. *Chinese Journal of Oil Crops Sciences*, 2004, 26: 98-101. (in Chinese)
- [2] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, Smith O S, Wall S J, Senior M L, Mitchenll S E, Kresovich S, Ziegler J. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics*, 1997, 95: 163-173.
- [3] Plieske J, Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I. development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 102: 689-694.
- [4] 李伟, 郑有良, 魏育明, 颜泽洪, 兰秀锦. 小麦新品种川农 16 的分子鉴定. 麦类作物学报, 2004, 24: 6-10.
Li W, Zheng Y L, Wei Y M, Yan Z H, Lan X J. Molecular identification of new wheat cultivar Chuannong 16. *Journal of Triticeae Crops*, 2004, 24: 6-10. (in Chinese)
- [5] 李莉, 杨剑波, Machill D J, Colowit P M. 水稻 SSR 不同检测和分析方法的比较研究. 中国水稻科学, 2000, 14: 185-188.
Li L, Yang J B, Machill D J, Colowit P M. Comparison of different detection methods for rice SSR analysis. *Chinese Journal of Rice Sciences*, 2000, 14: 185-188. (in Chinese)
- [6] 栾雨时, 安利佳, 黄百渠, 张文俊, 何孟元. 用 SSR 探针进行番茄品种的 DNA 指纹分析. 园艺学报, 1999, 26: 51-53.
Luan Y S, An L J, Huang B Q, Zhang W J, He M Y. Using simple sequence repeat probe for DNA fingerprints in tomato cultivars. *Acta Horticulturae Sinica*, 1999, 26: 51-53.
- [7] 王风格, 赵久然, 郭景伦, 余花娣, 陈刚. 比较三种 DNA 指纹分析方法在玉米品种纯度及真伪鉴定中的应用. 分子植物育种, 2003, 1: 655-661.
Wang F G, Zhao J R, Guo J L, She H D, Chen G. Comparison of three DNA fingerprint analyzing methods for maize cultivars' identification. *Molecular Plant Breeding*, 2003, 1: 655-661. (in Chinese)
- [8] Provan J, Powell W, Waugh R. Microsatellite analysis of relationships within cultivated potato (*Solanum tuberosum*). *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 1078-1084.
- [9] 崔艳华, 邱丽娟, 常汝镇, 吕文河. 利用 SSR 分子标记检测黄淮海大豆初选核心样本的代表性. 植物遗传资源学报, 2003, 4: 9-15.
Cui Y H, Qiu L J, Chang R Z, Lü W H. Examination of representiveness of the primary core collection in Huanghuai summer

- sowing soybean (*Glycine max*) using SSR. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2003, 4: 9-15. (in Chinese)
- [10] Lombard V, Baril C P, Dubreuil P, Blouet F, Zhang D. Genetic relationships and fingerprinting of rapeseed cultivars by AFLP: consequences for varietal registration. *Crop Science*, 2000, 40: 1417-1425.
- [11] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, Cooke R J, Donini P, Lee D, Law J R, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards K J. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 106: 1091-1101.
- [12] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 一个简便的适合于分析油菜中 SSR 位点的检测体系. *中国油料作物学报*, 2003, 25: 79-81.
Lu G Y, Yang G S, Fu T D. An effective SSR detection system in rapeseed. *Chinese Journal of Oil Crops Sciences*, 2003, 25: 79-81. (in Chinese)
- [13] Nei M. Analysis of gene diversity in subdivided populations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1973, 70: 3321-3323.
- [14] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 1979, 76: 5269-5273.
- [15] Yeh F C, Yang R C, Boyle T B J. *POPGENE, The User Friendly Shareware for Population Genetics Data Analysis*. Molecular biology and biotechnology center, University of Alberta, Canada, 1997.
- [16] Felsenstein J. *PHYLIP (Phylogeny Inference Package) Version 3.5c*. Distributed by the author, department of genetics, University of Washington, Seattle, Washington.
- [17] Rohlf F J. NTSYS-PC 2.1. *Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*. Exeter software, Setauket, NY, 1997.
- [18] Piry S, Alapetite A, Cornuet J M, Paetkau D, Baudouin L, Estoup A. GeneClass2: A software for genetic assignment and first-generation migrant detection. *Journal of Heredity*, 2004, 95: 536-539.
- [19] Schneider S, Roessli D, Excoffier L. *Arlequin: a Software for Population Genetics Data Analysis*. Ver 2.000. Genetics and Biometry Lab, Department of Anthropology, University of Geneva, 2000.
- [20] Heckenberger M, van der Voort J R, Melchinger A E, Peleman J, Bohn M. Variation of DNA fingerprints among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties: II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data. *Molecular Breeding*, 2003, 12: 97-106.
- [21] Smith J S C, Smith O S. The description and assessment of distances between inbred lines of maize: II. The utility of morphological, biochemical, and genetic descriptors and a scheme for testing of distinctiveness between inbred lines. *Maydica*, 1989, 34: 151-161.
- [22] ASSINSEL. 2000. *DUS Testing: Phenotype vs. Genotype*. Position Paper adopted at the Rome Congress in May 2000.
- [23] Troyer A F, Rocheford T R. Germplasm ownership: related corn inbreds. *Crop Science*, 2002, 42: 3-11.
- [24] ISF. 2004. *Technical Protocol for Implementation of the ISF Guidelines for the Handling of a Dispute on EDV in Lettuce* (Adopted by ISF Vegetable and Ornamental Section, May 2004).

(责任编辑 于 竞)