

国内外甘蓝型油菜种质 SSR 标记遗传多样性分析

王凯华, 张文英, 王会, 张雄

(长江大学长江中游湿地农业教育部工程研究中心, 湖北荆州 434025)

摘要:用 SSR 分子标记对国内外 48 份甘蓝型油菜品种进行遗传多样性分析, 结果表明: 筛选出的 45 对引物共扩增出 326 个位点, 多态位点 281 个, 多态性比率为 86.2%; 平均每对引物扩增的条带数和多态性条带数分别为 7.2 和 6.2。多态性信息含量(PIC)在 0.374~0.856, 平均为 0.699。遗传相似系数在 0.48~0.79 之间, 参试材料差异较大; 以 0.51 为阈值将 48 份参试材料划分为冬性、半冬性和春性 3 大类群, 3 大类群间相对独立又有一定程度的渗透, 说明材料之间存在不同程度的亲缘关系。主成分分析与聚类分析结果一致。说明 SSR 标记能够较全面地反应种质材料的遗传多样性, 能够为种质的保存提供帮助, 同时可以用来分析育种材料的遗传多样性, 对育种工作有重要的参考意义。

关键词:甘蓝型油菜; SSR 标记; 遗传多样性

中图分类号: S565.403

文献标志码: A

论文编号: 2011-1258

Genetic Diversity Analysis of Domestic and Foreign Rapeseed (*Brassica napus* L.) by SSR Markers

Wang Kaihua, Zhang Wenying, Wang Hui, Zhang Xiong

(Engineering Research Center of Wetland Agriculture in the Central Yangtze of Ministry of Education,

Yangtze University, Jingzhou Hubei 434025)

Abstract: The genetic diversity of 48 rapeseed (*Brassica napus* L.), which were from domestic and foreign, was analyzed by SSR markers. The results showed that 45 pairs of primers performed 326 allele loci, and the percentage of polymorphism locus was 86.2% with 281 loci was detected. The average number of allele and polymorphism loci per primer was 7.2 and 6.2, respectively. The range of PIC per primer was 0.374–0.856, with the average of 0.699. Difference among the accessions was large with the genetic similarity range 0.48–0.79. To set 0.51 as the threshold, all 48 accessions were divided into 3 groups, as winter group, weak-winter group and spring group. The groups were independent, but still had degree of mutual inter-penetration. That was to say the accessions might have some genetic relationship. The result of PCA and cluster analysis was consistent. It concluded that SSR could reveal the genetic diversity of germplasm, provide help for preservation of germplasm, and analyze genetic diversity of breeding material. It had important reference for breeding.

Key words: rapeseed (*Brassica napus* L.); SSR marker; genetic diversity

0 引言

油菜是中国乃至全球范围内重要广泛种植的重要油料作物。其中以甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)种植面积最大, 分布范围最广, 也是中国最主要的油菜栽培类型^[1-4]。目前, 虽然油菜育种中强调双低, 但提高产

量仍然是中国油菜育种的首要目标, 杂种优势的利用将继续在油菜的育种中占主要地位。因此, 选择优良的杂交亲本在油菜的杂种优势育种中具有重要的意义。为避免在选配杂交亲本时, 因遗传基础狭窄影响制约选配效率, 对油菜资源的遗传多样性进行分析显

基金项目:湖北省教育厅科学技术研究计划优秀中青年人才项目(Q20101318)。

第一作者简介:王凯华, 男, 1985 年出生, 河南虞城人, 在读硕士, 油菜遗传育种方向。通信地址: 434025 湖北省荆州市长江大学西校区农学院, Tel: 0716-8066652, E-mail: wkhxf@gmail.com。

通讯作者:张文英, 男, 1972 年出生, 湖北天门人, 副教授, 博士, 研究方向为作物分子育种及数量遗传学, 通信地址: 434025 湖北省荆州市长江大学西校区农学院, Tel: 0716-8066652, E-mail: wyzhang2006@gmail.com。

收稿日期:2011-04-28, **修回日期:**2011-06-27。

得十分必要。

在分子标记技术广泛应用之前,对遗传多样性的研究主要从形态学水平、细胞学水平及生理生化水平等几个方面进行^[5]。20世纪80年代以来,随着分子标记技术的发展,为研究遗传多样性提供了新的技术平台^[6],使得在基因组水平上对生物进行分析成为可能。伍宁丰等^[7]用 RAPD 标记分析中国甘蓝型油菜的遗传多样性;马朝芝等^[8]用 ISSR 标记比较中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性;文雁成等^[9]用 SRAP 标记分析中国甘蓝型油菜的多样性和遗传基础。与其他几种分子标记相比,SSR 标记具有共显性、重复性强、多态性高、多态位点丰富等优点,在植物的遗传多样性研究方面等到了很好的应用。国外从20世纪90年代就曾将 SSR 标记应用到油菜的遗传多样性研究,中国最近几年才逐步将 SSR 标记应用于油菜资源的多样性分析、图谱构建、品种鉴定等方面。旦巴等^[10]用 SSR 标记对西藏野生芥菜型油菜起源中心的油菜种质资源进行

了分析,并将收集的材料划分为三大类群;汤天泽等^[11]用 SSR 标记对杂交油菜进行了纯度鉴定,并与形态学鉴定结果比较,发现 SSR 标记鉴定结果与形态学鉴定存在明显的差异;付杰^[12]利用以发表和新设计 SSR 标记构建了甘蓝型油菜的高密度遗传图谱,结果显示与已构建的拟南芥和白菜的连锁图有高度的共线性。然而,利用 SSR 标记分析不同生态区域来源的甘蓝型油菜的遗传多样性鲜见报道,本研究以来自不同国家和地区 48 份材料为实验材料,用 SSR 标记分析其遗传多样性,以期对遗传研究和育种应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验时间与地点

田间试验于2009年9月—2010年5月在长江大学农学院农学试验基地(荆州)进行。

1.2 试验材料

本研究所采用的甘蓝型油菜品种共48个。其中包括23份国内品种(系)和25份国外材料(表1),国外

表1 研究所用材料信息

材料编号	材料名称	选育地	材料编号	材料名称	选育地
C1	中双7号	中国湖北	C25	Lira donna	美国
C2	中双10号	中国湖北	C26	MR 1	韩国
C3	中油821	中国湖北	C27	France 1	法国
C4	中R884	中国湖北	C28	Legend	美国
C5	华油10号	中国湖北	C29	Shang-you	中国陕西
C6	宁油16号	中国江苏	C30	Fora	瑞典
C7	宁油14号	中国江苏	C31	Cobra	德国
C8	宁油7号	中国江苏	C32	Brink	瑞典
C9	红油3号	中国江苏	C33	Andor	加拿大
C10	浙双72	中国浙江	C34	Cuba 12	古巴
C11	富油1号	中国四川	C35	Astor	德国
C12	华双4号	中国湖北	C36	Belarus1	白俄罗斯
C13	湘油15	中国湖南	C37	Diana	德国
C14	川油18	中国四川	C38	Arvor	法国
C15	陇油2号	中国甘肃	C39	Janetzki	澳大利亚
C16	苏油3号	中国江苏	C40	Taisetsu	日本
C17	沪油9号	中国上海	C41	Indonesia 1	印度尼西亚
C18	加油3号	中国	C42	Abukuma	日本
C19	青油2号	中国上海	C43	Romania 1	罗马尼亚
C20	杂97-11	不详	C44	Altex	加拿大
C21	绿油X号	不详	C45	Morocco 1	摩洛哥
C22	Westar	德国	C46	Pakistan 1	巴基斯坦
C23	Tapidor	德国	C47	Promin	前苏联
C24	Barkant	荷兰	C48	Niko	德国

材料征集自德国 IPK 种质库 (Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research) 和从美国农业部国家植物种质资源库 (National Plant Germplasm System, USDA, USA)。

1.3 试验方法

1.3.1 DNA 提取 在油菜 5 叶期, 每份材料选 3 个生长表现正常的单株, 每株取 1 片幼嫩叶片, 液氮中混合研磨。参照 Murray 和 Thompson 的 CTAB 法^[13] 提取 DNA。0.8% 琼脂糖电泳检测 DNA 纯度和完整性, 并用紫外分光光度仪检测 DNA 浓度。最终稀释至 20 ng/L, -20℃ 保存备用。

1.3.2 PCR 扩增 参考国内外已发表的文献资料, 从中选取分布在油菜全基因组上多态性丰富的 80 对 SSR 引物^[14-16], 由武汉鼎国生物公司合成, 选择多态性丰富的 45 对引物, 建立并优化反应体系。PCR 反应体系 10 μL: 20 ng/L 模板 DNA 2 μL, 10 μmol/L 正、反引物各 0.5 μL, 10 μmol/L dNTP 0.2 μL, 10×PCR Buffer 1 μL, 2.5 U/μL Taq 酶 0.15 μL, ddH₂O 5.65 μL。PCR 反应在 BIO-RAD 扩增仪上进行。反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 40 s, 各引物退火 50~65℃, 72℃ 延伸 40 s, 反应 33 个循环; 72℃ 延伸 10 min, 4℃ 保存。

1.3.3 扩增产物检测 扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。电泳结束后, 用 1.5 g/L 的 AgNO₃ 溶液银染 15 min; ddH₂O 漂洗; 最后用 20 g/L NaOH 溶液显影。观片灯上读带, 拍照保存。

1.3.4 数据分析 对 SSR 扩增产物, 有带记为“1”, 无带记为“0”, 缺失记为“9”, 建立原始数据矩阵。用简单配对参数 (simple matching coefficient, SM) 估计基因频率, 根据 $G_s = m / (m + n)$ 计算遗传相似系数, 其中 m 为基因型间共有的带数, n 为差异的带数。利用 UPGMA

(unweighed pair group method arithmetic average) 进行聚类分析, 绘制树状聚类图 (dendrogram) 及主成分分析图。所有数据均在 NTsys-pc2.1 中处理。

2 结果分析

2.1 SSR 标记在参试材料间的多态性分析

所选用的 80 对 SSR 引物对参试的 48 份遗传材料扩增, 从中筛选得到多态位点丰富清晰的 45 对引物, 占所选用引物的 56.25%。筛选得到的 45 对 SSR 引物在 48 份参试材料间共检测到 326 个等位位点, 其中多态性位点 281 个, 多态性比率为 86.2%, 每对引物约 3~8 个多态性位点, 平均每对引物为 6.2 个多态性位点。

其中 45 对 SSR 标记, 在 48 份材料间多态信息丰富, 且每对标记所揭示的多态信息量又有明显的差别, 图 1 为其中 1 对引物 BnGMS175a 的凝胶电泳图。标记间的 PIC 值在 0.374~0.856 之间, 以标记 BnGMS181 的值最小 (0.374), 标记 BnGMS79 的值最大 (0.856)。只有 5 对标记的 PIC 值低于 0.5, 其余标记的 PIC 值均大于 0.5, 且标记所揭示的基因型数在 9~28 之间。由此说明研究材料的基因型丰富, 材料间的遗传多样性较高; 同时也表明所选用的 SSR 标记能够对遗传材料进行多样性分析。

2.2 聚类分析

利用 45 对 SSR 引物扩增出的 281 个等位变异, 计算 48 份遗传材料间的遗传相似系数 (0.48~0.79), 根据 UPGMA 方法聚类, 以 0.51 为阈值, 将 48 份材料分为 3 大类群 (图 2)。其中第 1 大类包括 20 份材料, 为半冬性类群; 第 2 大类包括 19 份材料, 为冬性类群; 第 3 大类包括 9 份材料, 为春性类群。

从聚类结果可以看出: 系谱或亲缘关系较近的材料聚在一起。例如 ‘中双 7 号’ (编号为 c1) 是 ‘中油 821’

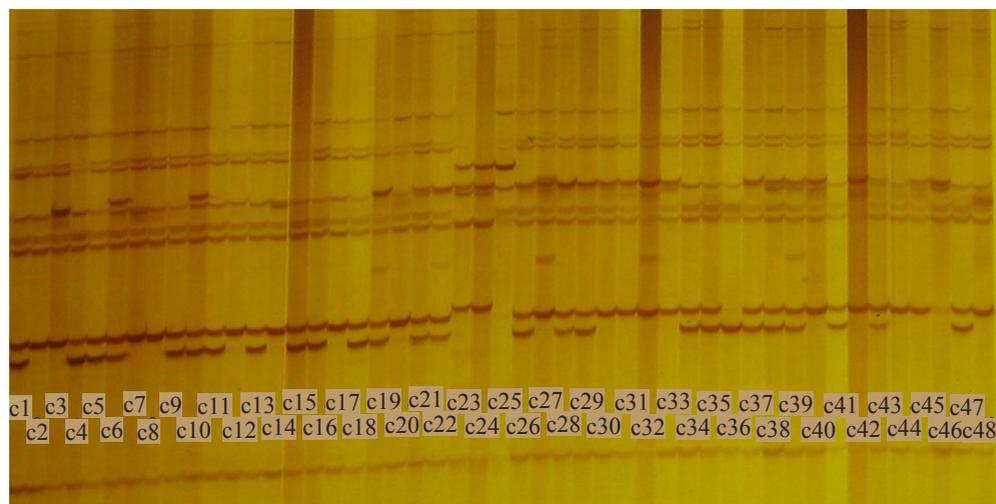


图 1 引物 BnGMS175a 电泳图 (编号同表 1)

(编号为 c3) 的三交后代选育而来, 二者的遗传相似性很近; ‘中双 7 号’ (编号 c1) 是 ‘中双 10 号’ 的亲本之一, 二者遗传相似性较近。同时, 相同生态类型的材料聚在一起。例如, 在长江中下游流域种植的半冬性油菜品种 ‘浙双 72’ (编号 c10) 与 ‘湘油 15’ (编号 c13) 聚在一起, 来自欧洲的冬性油菜品种 Tapidor (编号 c23) 与 Diana (编号 c37) 聚在一起。但是聚类也有例外, ‘华油 10’ 为半冬性油菜品种, 但是并未聚在第 1 大类。综合比较之, 第 1 大类的遗传多样性较丰富, 可能是因为由于此类品种选择较多, 致使聚类结果出现偏差。

2.3 主成分分析

对研究材料的原始矩阵进行主成分分析, 前 3 个主成分分别所能解释的总变异为 20.8%、10.2% 和 6.6%。根据主成分大致将材料分为 3 大类 (图 3)。其

中第 1 类 (位于图的右上角) 包括 16 份材料, 全部为半冬性品种类型; 第 2 类 (位于图的左下角) 包括 24 份材料, 大部分为冬性品种类型, 但是也有 4 份半冬性品种 (系) 被划分到此类群中, 可能的原因是该 4 类品种 (系) 的亲本来源可能含有冬性品种类型; 第 3 类 (位于图的左上角) 包括 8 份材料, 全部为春性品种类型。主成分分析的结果与聚类分析的结果一致, 说明 SSR 标记能够很好的区分甘蓝型油菜品种的差异, 能够用来做甘蓝型油菜的遗传多样性分析。

3 结论与讨论

本研究从所初选的 80 对 SSR 引物中筛选得到 45 对多态丰富稳定的引物进行参试材料的遗传分析。45 对引物共扩增出 326 个位点, 多态位点 281 个, 多态性比率为 86.2%; 平均每对引物扩增的条带数和多态性条带数分别为 7.2 和 6.2。标记位点的多态性信息含量

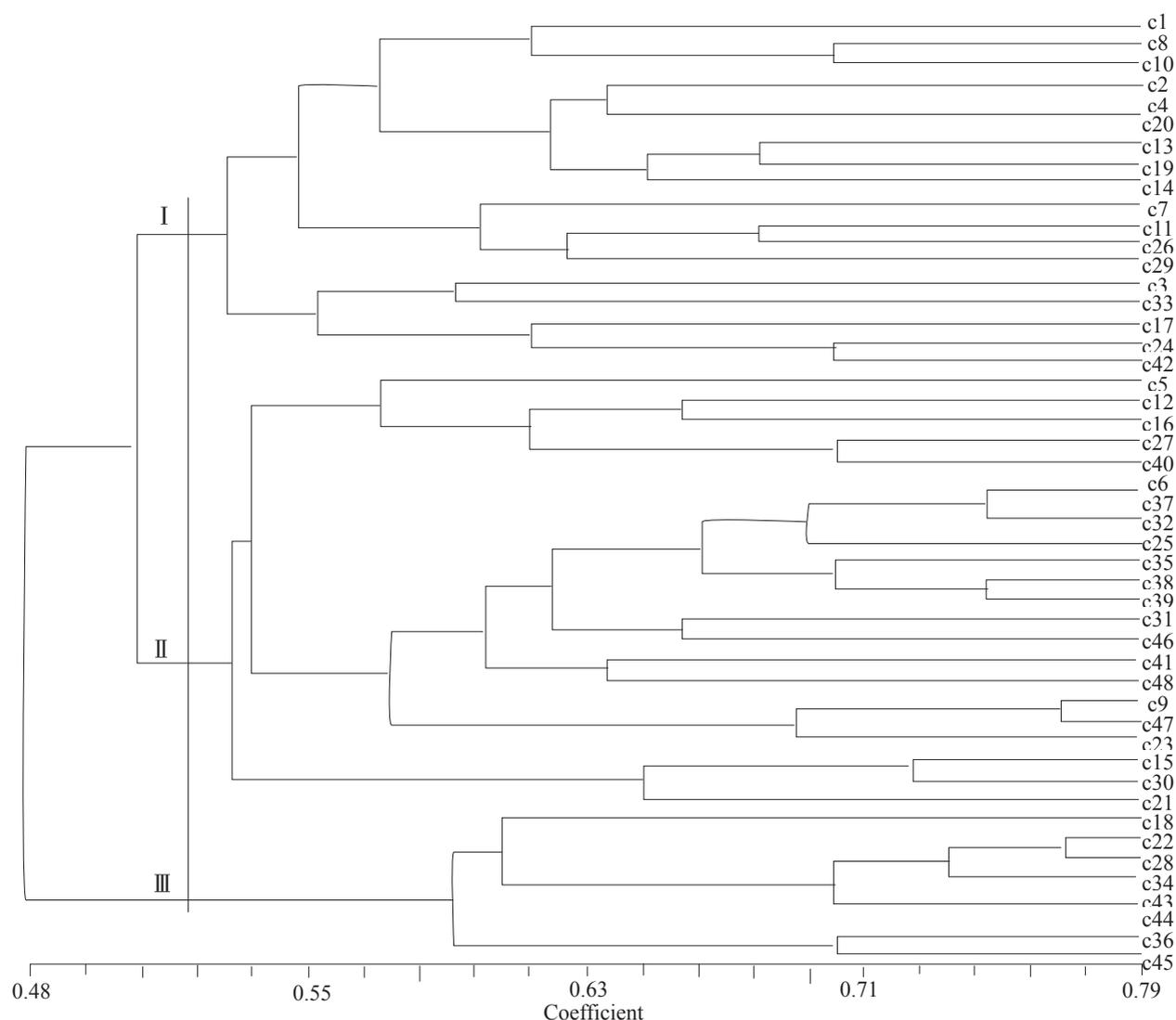


图 2 48 份甘蓝型油菜品种 (系) 的聚类分析

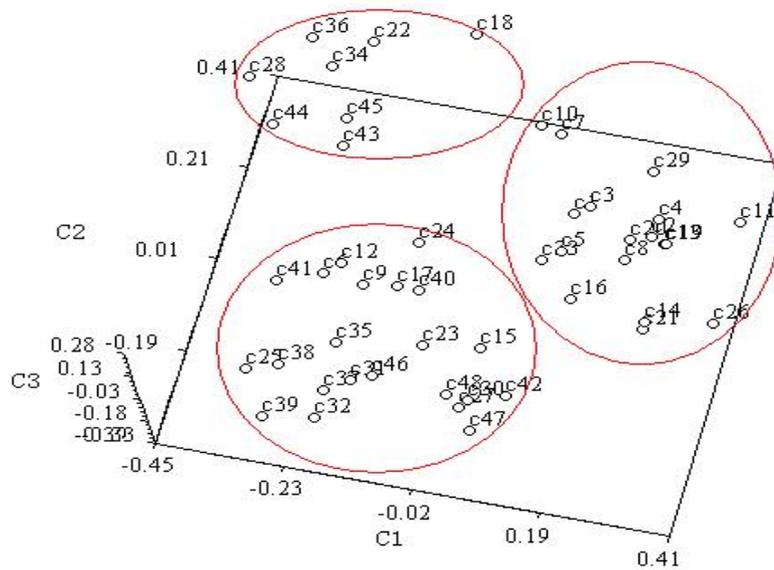


图3 48份甘蓝型油菜品种(系)的主成分分析

(PIC)在0.374~0.856,说明筛选的标记在所研究的材料间有丰富的多样性,能够准确地反应材料间的遗传差异。其中,在某些材料的扩增结果中,发现一些特异性的条带,这些特异性条带是否与某些特异性状相关,还有待进一步研究。

48份甘蓝型油菜间的相似系数在0.48~0.79之间,按UPGMA方法聚类,将材料分为春性、半冬性和冬性3大类群,与马朝芝等^[8]用ISSR分析中国和瑞典甘蓝型油菜的多样性结果一致。而主成分分析也能够将参试材料区分开,结果与聚类分析较一致,将材料划分为3大类群。而分析结果也显示较好的区域性分布规律,48份参试材料按照不同的来源,分别被划分在中国长江流域的半冬性甘蓝型油菜产区,北欧地区的冬油菜产区及北美加拿大春油菜产区。

前人的研究仅对材料的生态类型进行了区分,未考虑不同材料的种植区划,本研究利用SSR标记对来自不同国家和地区的48份甘蓝型油菜进行遗传多样性分析,在对材料生态类型划分的基础上,又将不同生态类型的品种(系)划分到相应的油菜产区。但是,由于材料收集的限制,征集的材料不能完全反映各个产区的特征,只有收集足够的材料才能较准确地掌握各个产区的资源特征。利用SSR分子标记能很好地区分不同类型的甘蓝型油菜品种,在甘蓝型油菜品种的遗传鉴定上用十分广阔的应用前景。对不同类型的油菜品种进行多样性分析,可以很好地了解品种间的亲

缘关系及遗传基础的亲疏,从而为油菜杂交育种的亲本选配提供依据。

参考文献

- [1] 沈金雄,傅廷栋,杨光圣.甘蓝型油菜SSR, ISSR标记的遗传多样性及其与杂种表现的关系[J].中国农业科学,2004,37(4): 477-483.
- [2] 董云,庞进平,王毅,等.分子标记技术在中国甘蓝型油菜资源遗传多样性研究中的进展[J].安徽农业科学,2009,37(18):8373-8374.
- [3] 胡胜武,赵惠贤,于澄宇,等.用RAPD标记分析中国和捷克甘蓝型油菜的遗传多样性[J].中国油料作物学报,2001,23(1):1-6.
- [4] Liu R H, Meng J L. RFLP and AFLP analysis of inter- and intraspecific variation of *Brassica rapa* and *B. napus* shows that *B. rapa* is an important genetic resource for *B. napus* improvement [J]. Acta Genetic Sinica, 2006, 33(9): 814-823.
- [5] 时明芝,宋会兴.植物遗传多样性研究方法概述[J].世界林业研究,2005,18(5):27-31.
- [6] 邱芳,伏健民,金德敏,等.遗传多样性的分子检测[J].生物多样性,1998, 6(2): 143-150.
- [7] 伍宁丰,李汝刚,伍晓明,等.中国甘蓝型油菜遗传多样性的RAPD分子标记[J].生物多样性,1997,5(4):246-250.
- [8] 马朝芝,傅廷栋,Stine Tuevesson.用ISSR标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J].中国农业科学,2003,36(11): 1403-1408.
- [9] 文雁成,王汉中,沈金雄,等.用SRAP标记分析中国甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础[J].中国农业科学,2006,39(2): 246-256.
- [10] 旦巴,旦增桑布,孟霞,等.西藏野生芥菜类型油菜种质资源的SSR标记分析[J].安徽农业科学,2009,37(31):15609-15613.

-
- [11] 汤天泽,肖小余,税红霞.SSR 标记与形态学方法鉴定杂交油菜纯度的比较研究[J].分子植物育种,2008,6(2):377-380.
- [12] 付杰.SSR 标记的开发及甘蓝型油菜遗传连锁图谱的构建[D].武汉:华中农业大学,2008:16-38.
- [13] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8(19):4321-4325.
- [14] Lowe A J, Moule C, Trick M, et al. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in Brassica crop species[J]. Theor Appl Genet, 2004, 108(6):1103-1112.
- [15] Cheng X, Xu J, Xia S, et al. Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus*[J]. Theor Appl Genet, 2009, 18(6):1121-1131.
- [16] Piquemal J, Cinquin E, Couton F, et al. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2005, 111(8):1514-1523.