

SSR 标记对不同黄子甘蓝型油菜亲本材料的遗传分析

刘晓兰^{1,2}, 曲存民^{1,2}, 谢景梅^{1,2}, 卢坤^{1,2}, 王敏^{1,2}, 王瑞^{1,2}, 徐新福^{1,2}, 谌利^{1,2}, 李加纳^{1,2}

(¹西南大学农学与生物科技学院, 重庆北碚 400716; ²南方山地农业教育部工程研究中心, 重庆北碚 400716)

摘要: 杂交育种中, 亲本选配是育种成败的关键。本研究以重庆市油菜工程技术研究中心提供的 180 份甘蓝型黄子油菜亲本种质为材料, 应用分布于不同连锁群的 60 对 SSR 标记进行了分析, 共检测出 308 个标记位点, 每对引物在不同亲本材料之间的等位基因数在 1~11 个之间, 平均位点为 5.1 个。其中多态性位点 207 个, 多态率达 67.2%。对 SSR 扩增结果进行 UPGMA 分析, 在遗传距离 0.566 处, 180 个品种(系)分为 3 个类群, 聚类结果与种质来源比较一致, 本研究为甘蓝型油菜黄子杂交育种和优势组合的选配提供了理论依据。

关键词: 甘蓝型油菜; 亲本骨干系; SSR 标记; 核心种质; 遗传多样性

Genetic Diversity of Yellow-seeded Parental Lines of *Brassica napus* Using SSR Markers

LIU Xiao-lan^{1,2}, QU Cun-min^{1,2}, XIE Jing-mei^{1,2}, LU Kun^{1,2},

WANG Min^{1,2}, WANG Rui^{1,2}, XU Xin-fu^{1,2}, CHEN Li^{1,2}, LI Jia-na^{1,2}

(¹College of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400716;

²Engineering Research Center of South Upland, Agriculture of Ministry of Education, Chongqing 400716)

Abstract: Selection of suitable parents is one of the key works in hybridization of *Brassica napus* L. The genetic diversity of 180 parental germplasm lines of yellow-seeded *B. napus* provided by the Chongqing Rapeseed Engineering Research Center of Southwest University was analyzed. Three hundred and eight alleles were detected via 60 SSR primer pairs, which were selected from different linked groups in *B. napus*. Among them, 207 polymorphic bands were obtained, accounting for 67.2% of the total bands observed. The UPGMA cluster analysis based on SSR data showed that these parental lines could be classified into three groups at the threshold of 0.566, which agrees with the pedigree analysis. This could also provide the theoretical basis for the hybridization and breeding of yellow-seeded *B. napus*.

Key words: *Brassica napus* L.; Parental lines; SSR marker; Core collection; Genetic diversity

甘蓝型油菜属于十字花科芸薹属, 是我国主要的油料作物和最重要的栽培类型, 种质资源非常丰富。与其他作物一样, 种质资源的创新与利用是油菜育种工作的重要组成部分, 随着 DNA 分子标记方法的建立, 从分子水平上揭示品种之间的遗传变异成为当今作物育种家们研究的重

点。目前分子标记技术 RAPD、RFLP、AFLP 和 SSR 等在作物遗传多样性研究中得到了较广泛的应用, 其中 SSR 标记具有多态性高、共显性遗传、稳定性高、标记覆盖整个基因组且分布均匀、DNA 样本用量和质量要求不高等优点^[1-2], 已有不少研究学者将 SSR 分子标记技术广泛用于小

收稿日期: 2011-09-29 修回日期: 2012-01-10

基金项目: 国家自然科学基金(31071450); 农业部油菜现代产业技术体系(CARS-43); 重庆市重点项目(CSTC 2010AA1014); 西南大学研究生创新基金(ky2009007); 西南大学博士基金(SWU110015)

作者简介: 刘晓兰, 硕士研究生, 研究方向为油菜遗传育种。E-mail: liuxiaolan0825@126.com

通讯作者: 李加纳, 教授, 研究方向为油菜遗传育种。E-mail: ljn1950@swu.edu.cn

麦^[3-4]、大豆^[5]、水稻^[6]及玉米^[7]等主要作物的遗传多样性研究中。Poulsen 等^[8]和 Hasan 等^[9]分别对甘蓝型油菜遗传多样性进行了 SSR 分子标记,张书芬等^[10]研究发现 SSR 标记是研究油菜遗传多样性比较有效的标记方法。段院生等^[11]研究证明用 SSR 标记能很好的检测不同种质资源的特异性,能够有效地指导种质资源的有效利用。目前,研究结果一致表明,在相同的背景下,甘蓝型黄子油菜较黑子具有高含油量、高蛋白质含量和低色素等一系列优点^[12-13],但由于自然界中不存在天然的甘蓝型黄子材料,因此对于甘蓝型油菜黄子遗传资源多样性的研究相对较少,在白菜型油菜中有过相关报道^[14]。本研究以重庆市油菜工程技术研究中心提供的 180 份甘蓝型黄子油菜亲本种质为材料,应用在油菜

表 1 供试材料的编号和系谱

Table 1 Codes and pedigrees of the *Brassica napus* lines

编号 Code	系谱 Pedigree	编号 Code	系谱 Pedigree	编号 Code	系谱 Pedigree
1	GH16/SC94005	31	中双 9 号 ² /06R8	64	R69-4
2	SC94005/GH16	32	中双 9 号 ² /06R8	65	R70-4
3	SC94005/GH16	33	中双 9 号/GH01/3529-5	66	中双 9 号/板
4	GH01/851	34	GH03/GH01//07Y605	67	中双 9 号/板
5	GH01/851	35	GH01/品 93-496//GH01/99A227	68	中双 9 号/板
6	GH06	36	GH01/品 93-496//GH01/99A227	69	GH16/SC94005
7	GH01/3529-5	37	07H55/X3	70	GH01/851
8	GH01/3529-5	38	07H67/X26	71	GH01/851
9	GH01/3529-5	39	07R24/X13	72	GH16/SC94005//94005
10	GH16/SC94005	40	04SH32/04P17(06M121)	73	GH06/Q2, Giessen 大学组合
11	SC94005/GH16	41	07R24/X6	74	GH06/Q2, Giessen 大学组合
12	GH01/(品 901871/中双 1 号)	42	06P422/P71	75	Q2/GH06
13	GH01/(品 901871/中双 1 号)	43	GH16/SC94005	76	NPZSR33/07/GH06
14	GH01/3529-5	44	SC94005/GH16	77	(GH01/851)//中双 9 号
15	[(D57/0)/85-64]/84-24016	45	GH01/品 93-496	78	(GH01/851)//中双 9 号
16	[(D57/0)/85-64]/84-24016	46	GH01/品 93-496	79	GH21//07 Y608
17	[(D57/0)/85-64]/84-24016	47	06P10/K120	80	GH21/94005//07Y618
18	[(D57/0)/85-64]/84-24016	48	06P415/P23	81	H15/T77
19	GH01/(品 901871/中双 1 号)	49	(GH01/851)//中双 9 号	82	H15/T77
20	GH05/GH02	50	07R24/Y566-1	83	GH01/品 93-496//GH01/99A227
21	品 93-496/[GH01/(品 901871/中双 1 号)]	51	R68/R51	84	06S55/H63-2
22	(埃斯佩德/74-317)/品 93-496/(GH01/99A227)	52	04SH32/04P17(06M120)	85	Sophia//GH16/川油 18
23	[GH01/(品 901871/中双 1 号)]/(GH01/851)	53	04SH32/04P17(06M120)	86	Sophia//GH16/川油 18
24	GH01/99A220//06P31	54	H55/X3	87	Sophia//GH16/川油 18
25	GH01/99A220//06P31	55	06E106/E191	88	Sophia//中双 9 号/06P428
26	中双 9 号/06E120	56	06P420/P71	89	L121/L307
27	中双 9 号/06E120	57	06P421/P71	90	Y520/L120
28	06P121/中双 9 号	58	06P422/P71	91	Y539/L121
29	06P121/中双 9 号	59	06P415/P23	92	GH01/(品 901871/中双 1 号)//GH16/SC94005
30	06S55	60	05E258-1(5)	93	06E231-4//GH16/SC94005
		61	07L33-1/L34-1	94	06E231-4//GH16/SC94005
		62	07R65-4	95	06S55/H63-2
		63	R69-3		

中重复性和多态性比较好的 60 对 SSR 标记进行了分析,利用 SSR 标记在甘蓝型黄子油菜遗传多样性研究中的差异,可以明确其亲本种质材料间的背景差异,划分育种亲本的杂种优势群,为甘蓝型黄子油菜杂交种的选配提供基础资料及为今后杂交育种和优势组合的选配提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为 180 份甘蓝型黄子油菜,这些材料均由西南大学重庆市油菜工程技术研究中心提供,是该中心经过多年培育的可供育种利用的亲本品系,详见表 1,利用这些品系配制出的高产优质杂交油菜品种已在全国冬油菜产区广泛种植。

续表

编号 Code	系谱 Pedigree	编号 Code	系谱 Pedigree	编号 Code	系谱 Pedigree
96	06S55/H63-2	127	[(D57/O)/85-64]/84-24016	153	GH01/3529-5
97	07H40-1	128	宁油 10 号	154	GH01/3529-5
98	07H89-3	129	GH05/GH02	155	GH16/SC94005
99	07R64-4	130	GH01/(品 901871/中双 1 号)	156	GH16/SC94005
100	R66-4	131	GH16/混合粉	157	SC94005/GH16
101	R67-2	132	品 93-496/[GH01/(品 901871/中双 1 号)]	158	SC94005/GH16
102	R69-3			159	SC94005/GH16
103	R69-4	133	[GH01/(品 901871/中双 1 号)]/(GH01/851)	160	[(D57/O)/85-64]/84-24016
104	R70-1			161	[(D57/O)/85-64]/84-24016
105	R72-2	134	(GH01/99A227)/(GH01/851)	162	GH16/SC94005//K127
106	04SH254/04P35(06M58)	135	[GH01/(品 901871/中双 1 号)]/(GH01/99A227)	163	06P243/中双 9 号
107	04SH32/04P17(06M121)			164	GH16/SC94005
108	04SH32/04P17(06M121)	136	GH01/3529-5	165	GH16/SC94005
109	05E26-2(4)	137	GH01/3529-5	166	GH16/SC94005
110	05E258-1(5)	138	GH01/3529-5	167	GH01/(品 901871/中双 1 号)
111	05E258-1(5)	139	GH01/3529-5	168	GH06
112	GH01/(品 901871/中双 1 号)	140	GH01/3529-5	169	(GH01/远杂 1 号)/GH01/02P208
113	GH01/(品 901871/中双 2 号)	141	SC94005/GH16	170	(GH01/远杂 1 号)/GH01/02P208
114	GH01/(品 901871/中双 3 号)	142	SC94005/GH16	171	(GH01/99A227)/(GH16/川油 18)
115	GH01/(品 901871/中双 4 号)	143	SC94005/GH16	172	(GH01/99A227)/(GH16/川油 18)
116	GH01/(品 901871/中双 5 号)	144	SC94005/GH16	173	(GH01/99A227)/(GH16/川油 18)
117	GH01/(品 901871/中双 6 号)	145	SC94005/GH16	174	(GH01/99A227)/(GH16/川油 18)
118	GH01/(品 901871/中双 7 号)	146	SC94005/GH01	175	(GH01/851)/(III-227/中双 1 号)
119	GH01/(品 901871/中双 8 号)	147	SC94005/GH01	176	(GH01/851)/(III-227/中双 1 号)
120	GH01/(品 901871/中双 9 号)	148	SC94005/GH16	177	(GH01/851)/[(7018/甘蓝)/(中油 821/D2)]
121	GH01/3529-5	149	SC94005/GH16	178	(GH01/851)/[(7018/甘蓝)/(中油 821/D2)]
122	GH01/3529-6	150	(GH01/3529-5)/(埃斯佩德/74-317)	179	Andor/(Altex/96V44) F8 F5
123	GH01/3529-7			180	渝黄 2 号(垫江)
124	GH01/3529-8	151	品 93-496/[GH01/(品 901871/中双 1 号)]		
125	GH01/3529-9				
126	[(D57/O)/85-64]/84-24016	152	品 93-496/[GH01/(品 901871/中双 1 号)]		

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验和种质特性分析 于 2010 年 9 月 22 日在重庆市北碚西南大学歇马试验基地播种,10 月 25 日移栽,种植密度 90000 株/hm²,单株种植,每份材料 20 株,2 次重复,成熟后分小区收获种子,混合取样在 FOSS 公司的 TR-3700 近红外分析仪上检测硫苷、芥酸、含油量、蛋白质和油酸等主要品质指标。

1.2.2 DNA 的提取 苗期在田间取幼嫩叶片组织,用液氮研磨,按照 Doyle 等^[15]的 CTAB 方法稍作改良,快速从叶片中提取基因组 DNA,溶解在 TE 溶液中,保存于 -20℃ 备用。

1.2.3 SSR 标记分析 SSR 引物序列分别来自 *BrassicaDB*(<http://www.ukcrop.net>) 公布的引物序列;Piquemal 等^[16]发表的引物序列;日本蔬菜茶叶研究所 Satoru Matsumoto 教授提供的引物序列;Os-

born 试验室公开的引物序列;加拿大 NAFF 公开的引物序列。*BrassicaDB* 和 Piquemal 引物由上海生物工程有限公司合成,日本蔬菜茶叶研究所、加拿大 NAFF 和 Osborn 试验室引物由上海英俊生物公司合成。PCR 反应的总体积为 10μl,每个反应的 DNA 模板为 25ng,1.2μl 10×PCR 反应 buffer(含 15 mmol/L MgCl₂),0.5μl 前后引物,0.2μl dNTP 和 0.5U Taq 酶,加 ddH₂O 至总体积 10μl。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 45s,55℃ 退火 45s,72℃ 延伸 1min,循环 35 次,最后延伸 10min,产物于 4℃ 保存。扩增产物经 DYCZ-30 电泳槽和 DYY-6C 型稳压稳流电泳仪上的 10% 聚丙烯酰胺凝胶检测,恒定电压 350V,电泳 35min,银染观察并照相。

1.3 数据统计分析

1.3.1 SSR 标记数据整理与分析 分别统计各

材料 SSR 的扩增条带(有带赋值为 1,无带赋值为 0,条带模糊不清记为 2),遗传相似系数用 Nei 等^[17]的计算方法,按公式 $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$,其中 N_{ij} 为 2 份材料共有的带数, N_i 和 N_j 分别为第 i 和第 j 材料各自的带数。采用 Jaccard's 相似系数,使用 NTSYS-pc2.20q 数据分析软件计算遗传相似系数和遗传距离,非加权组平均法(UPGMA)聚类分析。

1.3.2 种质特性分析 对 180 份种质材料的 5 个主要品质性状硫苷、含油量、芥酸、蛋白质和油酸进行测定,采用 SPSS 13.0 和 Excel 2003 软件进行相关数据分析。

表 2 SSR 引物的序列及其扩增多态性

Table 2 The sequences of primers used in the experiments and numbers of polymorphic bands amplified

引物 Primers	前引物序列 5'-3' Forward sequence	后引物序列 5'-3' Reverse sequences	谱带 总数 Total bands	多态性 条带数 Polymorphic bands	连锁群 Linkage group	多态性比率 (%) Polym- orphic rate
BRAS051	GGCTACAAAATGTTTGATAAGCTCT	ACCTGAAAGAGAGGCTACACAT	7	6	3,13	85.71
BRAS068	TTCAAAGGATAAGGCCATCG	TCTTCTTCTTTTGTGCTTCCG	4	2	13	50.00
BRAS072	GAATAGCCTCGCAGAAGTAGC	CGACGGCGATAAAACGAA	6	6	5	100.00
BRMS-050	CACCGTCGGAGTCTGAAT	GAGCCGTAAACCNCTAGTGTG	5	5	3,19	100.00
BRMS071	GCCATCTACACATTTATCCC	CACTAACCTTCTGTACTCCGT	4	4	3	100.00
BRMS075	AACAACCAAAACATAGTCCC	GTTGACTTTGACCTTGACTT	3	2	1	66.67
BRMS093	CGGCAATAATGGACCACTGG	CGGCTTTCACGCAGACTTCG	5	3	3,4,8,13	60.00
BRMS098	TTGATCCGAAATTTCTCTGG	AGGCAAGCAATAGATAAAGG	7	4	1,5,4	57.14
BRMS106	CTGCGCTGCATCTTACTC	TGAAGAGCAATGCAATCTT	4	4	3	100.00
BRMS129	ATGATGCCTAGCATGTCC	AAGCTAAAGCGAAAGAAGC	6	3	7	50.00
BRMS166	TGAAGAAGCTGGGACAAG	CAATGCAATACAGCACCA	4	2	5,2,13	50.00
BRMS175	CGATACTTGGAGCGTGTG	CTGGTGTCTTAACCACGC	7	2	1	28.57
BRMS184	GAGACGATGCAAAGATCG	TGCAGACACATTGGAACA	3	2	6	66.67
BRMS232	CATTCACAGGACCAGAGC	CAAAGCCAAGACAACCAT	4	4	2,1,5	100.00
BRMS240	CCGTGAGAAGTCATTTGG	AATCATTTTTGCGATGACAGAA	4	4	5	100.00
BRMS244	AAAGGACAAAAGAGGAAGGCC	TTGAAATCAAATGAGACTGACG	6	3	10	50.00
BRMS246	AACTTTGCTTCCACTGATTTTT	TTGCTTAACGCTAAATCCATAT	3	2	8	66.67
BRMS261	GATTGTTTGTCTTAAGTGTGG	TAGGATGTGACTTGCTCTTTC	4	1	6	25.00
BRMS309	CATAACACTTTCTAATCTCGCA	TTGTATTCCTGCTGTATTTCTTT	7	5	6	71.43
BRMS32	TGTCCTGTTTTCTGTGCTGG	GCCAACGCTAGTTTTGCTTC	11	7	2,3,9,18	63.64
BRMS342	ATCCCCAAACTACCCTCACC	AGGATGAGCAAAGGAAAGCA	3	2	3,4,8,13	66.67
CB10022	CCAAACGCTTTTCTTTCTGC	CCAATGACGCTCCAAGATTT	6	5	9	83.33
CB10065	CGATCTGAGCGTTGTTGCTA	GCGCGACTCAAAGAAGAAGT	4	2	6	50.00
CB10092	CCAAAGCAGGACAATCTCATC	CCGGCTCTTGTTTTATGGTT	5	3	18	60.00
CB10255	GCGATCTCCTCAGGCATAGT	CCACGCAAGCTGAAACATAA	3	2	9,18	66.67
CB10258	GAAGATTGAGCTCTTTCCG	CGTTTCAGAATCATATTGTATTTGCT	5	5	1,11	100.00
CB10278	CGTGGGCCAAGCTTAGATTA	CGTTCAAGAAGACACAGATCAAA	4	1	7	25.00
CB10302	CACCGAACAAAAGTGGGGT	CGTTTCACTGCGTTCTACCA	3	1	4,12	33.33
CB10364	AGGACCCGACTTTCCTTGTT	ACCAAACCTCGGCTACAAAT	11	9	8	81.82
CB10369	CTGATGAGGTGACCCAGTGT	GGCTTGAGTAAAGGCACCTG	6	3	1,11	50.00
CB10628	AAATTGCAAAATGCAAACGG	CCAATCTGGAACAATAGAAGATG	4	2	2,1	50.00
CN52	CAAGCAGTTTAAGAACCGC	ATAATTGCATTTTGTCTCCGC	4	3	5	75.00
CN57	CAAAGCGAGAAAGTGCAGTTGAGAG	TCCACGAAACTACTGCAGATTGAAA	3	3	6	100.00
enu_ssr008	GTTTCACATATTTTCTCTGTTTATT	ACCTTAAATGTTAAGTAAAGCTAAAC	4	2	1	50.00

2 结果与分析

2.1 供试材料的等位基因和遗传多样性分析

本研究中 60 对 SSR 引物均能在 180 份材料的基因组 DNA 中产生明显的扩增差异谱带,共检测出 308 个等位基因的标记位点,每对 SSR 引物所产生的等位基因数为 1~11 个,其中多态性位点 207 个,多态性比率为 67.2%。平均每对引物获得 3.45 个多态性位点,其多态性比率为 20%~100%,平均为 66.75%,不同引物进行 SSR 扩增出的位点数、多态性位点数和多态率及所在的连锁群见表 2。

续表

引物 Primers	前引物序列 5'-3' Forward sequence	后引物序列 5'-3' Reverse sequences	谱带 总数 Total bands	多态性 条带数 Polymorphic bands	连锁群 Linkage group	多态性比率 (%) Polym- orphic rate
EJU5	TCCAAGTAGACCGAATCAAGAGAGT	ATAAATCGAACCTGAAACCATGTCT	8	7	6	87.50
ENA19	TGCTTGAGACGCTGCCACTTTGTTC	CATTCCTCCCACCACCTTCACATC	4	1	6	25.00
ENA21	ACCAAACGACGCAAACAAACAAATA	TGACTTCGGAACGTGCAATAGAGAT	6	5	9	83.33
ENA6	TGAGGTTAGACATGGCGCTGCTTGC	TTTGATCATTGTGGTCGCGAGTTCCG	7	5	7	71.43
ES-h09-1	AAGTCACTACTTCCATTGAGGAACC	GATGATTGGTGGTTTGGGTTT	6	5	6	83.33
FIT0 040	GTGATACTGAAAGGGAGAGAGTGAG	AATCCTCATGAGCAAATCAACTAAC	3	3	2, 10	100.00
FIT0 078	AGAACAATCTAACCAAAAAGACTCG	AAACAAAATAGGTCCGAAGAATTT	2	1	4, 12	50.00
MR119	AAAAACAATACGACTGATTGAACCAT	CAAATCATAGTCGAAACTAGCTAAAA	6	5	5	83.33
Ni4-D09	CAAGACTATTTGTGTGGTTGACTC	AAATAACGAACGGAGAGAGAGAGAG	4	2	9	50.00
niab_ssr022	GTAGACTACTTTGCGAGGCAAGGAT	AGGATTCTTTACTCTCTGCAGCTTT	6	6	19	100.00
niab_ssr091	ACATGTGCTTTFATGAGAGAGAGAGA	TCTTTGTCACATTAATCCTTCCACT	2	1	1, 11	50.00
niab_ssr112	CACCTGTCATGTCTTCTTCTGG	TTGCTTTTGTFTTCTTCTCATTCG	6	4	11	66.67
OH10-C05	CAAGAGCAAGTTTGAAACAAACGAT	CATCAGTTCTTGATATGCTAGGTGA	3	2	2	66.67
Ra2-A01	AACTTAACCGAAACCGAGATAGGTG	AATCTCGAAATTCATCGACTTCCTC	5	3	7	60.00
SA63	CAACCAAAACGGGCAATATAGTTA	TGTTTTCAAATAATCTCCCGTCTAA	7	4	1	57.14
sN0464	GTTGCTGGGCTTGCAGTTAT	GAGCGTACCAGCAACCTCTC	4	3	4, 12	75.00
sN11516	ATCTCATGGTTGGTTCACCG	ATTTCCAAAACACACACGCA	7	7	4, 14	100.00
sN11722	GGCACCTACATGGAGGATTC	TGTTGGTTCGAGCTGTTTCAG	5	1	3	20.00
sNRD03	AAGTTACCAAGGAGAGGACAG	AAAGGGACGCTACAAGTCA	5	3	5, 9, 18	60.00
sORF73	GAGTGTTTGGAGCAGATGA	GGAGACTTTGCCTTTGTGT	10	5	5, 14	50.00
sR12777	CTCGTCTTCTCACCTACAAC	CTGACATCTTCTCACCCAC	5	4	9, 19	80.00
sR6293	CTCTCGTCTCGGAGGATCTAAA	GTGAGACTGGTTGCTGACTGAG	3	2	2, 12	66.67
sR7223	TGTTTCTGCTATTGCTGTCA	GAAGTTTGTGAGCCAGGAAA	7	3	7	42.86
sR9222	TCACGAGACTACCCTTGGAG	GCAACAGTCTTTTCTTGGT	6	3	5, 9, 18	50.00
sR9447	AAATTCGAAAATGCAAACGG	CCAATCTTGAACAATAGAAGATG	7	3	9	42.86
sS2331B	AGCCGTGTAGCACCAGAACT	CGTGTACTGTGCCATCTTT	5	5	18	100.00
总计 Total			308	207		66.75
平均 Mean			5.13	3.45		66.75

2.2 SSR 标记结果的聚类分析

以 SSR 分子标记在 180 个材料间的多态性数据,采用类平均法(UPGMA)对供试材料进行聚类分析,结果表明,180 份甘蓝型油菜黄子材料的相似系数为 0.56~1.00,在阈值为 0.566 时,将 180 份材料分为 3 个类群,其中第Ⅲ类群仅包含 1 个亲本材料,其他 179 份材料分别划分为 2 个类群(图 1)。

第Ⅰ类群共包括 97 份材料,在阈值为 0.687 时,此类群又可分为 5 个亚类(图 1-A, B, C, D 和 E),A 亚类包括 19 份材料,这些材料遗传背景来源相对比较单一,蛋白质含量较高而含油量较低,均值分别为 28.11% 和 36.89%(表 3);B 亚类仅包括 3 份材料,并且具有相同的遗传背景来源(Sophia//GH16/川油 18,表 3),且含油量较高而蛋白质含量较低,均值分别为 42.19% 和 24.06%;C 类群中共有 32 份材料,其中包括 2

个正在生产上推广品种宁油 10 号、渝黄 2 号(黄子亲本与 GH16 有关)的自交后代,21 份材料具有来自 GH16 遗传背景,其余则具有 GH01 的遗传背景;D 类群中仅包括 2 份材料,遗传背景来源不同,但亲缘关系较近,并且具有高蛋白低含油量的特点,均值分别为 30.04% 和 35.37%(表 3);E 类群中包括 41 份材料,这些材料中大部分具有相同或相近的遗传背景来源,即来自 GH01 和品 901871,但是在此亚类中各材料硫苷含量相对较高,均值为 80.02 $\mu\text{mol/g}$ (表 3)。

第Ⅱ类共包含 82 份材料,这些来源比较广泛,包括了本研究组以前引进不同地区或国家的双低材料转育的后代材料,从图 1 也可以看出在此类群中亲本材料内部遗传多样性程度较为丰富,在杂交组合选育后容易产生杂种优势。在阈值为 0.653 时,此类群又可分为 9 个亚类。第Ⅱ亚类所包含的材料最多,共有 43 份材料,占到材料数

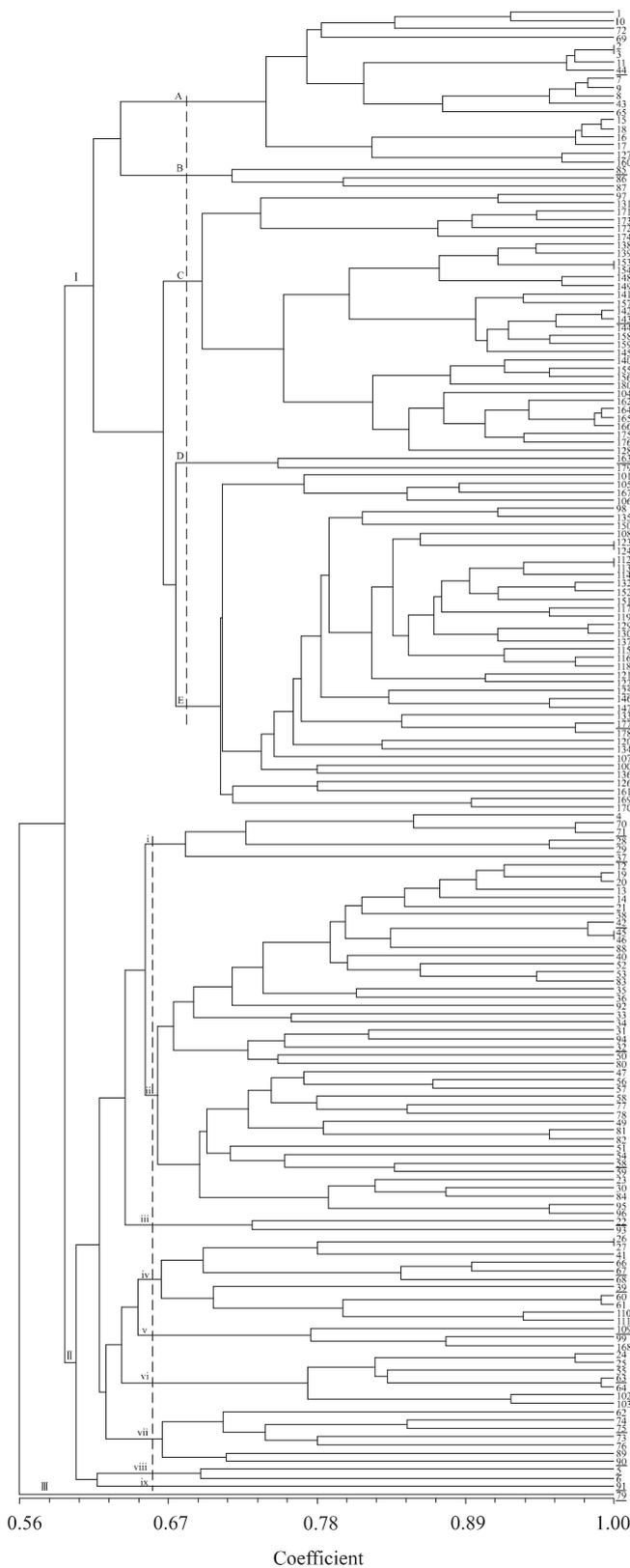


图1 180个甘蓝型油菜的不同黄子亲本材料的UPGMA聚类图
 Fig.1 The UPGMA phylogenetic tree of 180 tested yellow-seeded parental lines of *Brassica napus*

的52.44% ,并且来源也较广泛;其他8个亚类材料数都相对较少 ,其中第 i、iii、vii和viii亚类分别包括6、2、7和2份材料 ,尽管这几个亚类在5个品质性状上差异不明显 ,但是遗传背景差异却比较大;第iv和vi亚类分别包括11份和7份材料 ,这些材料含油量较高 ,均值分别达到41.52%和43.52%;第v亚类包括3份材料 ,为双高材料 ,硫苷和芥酸含量的均值分别为121.49 $\mu\text{mol/g}$ 和40.22%(表3);第ix亚类仅包括1份高油酸材料 ,油酸含量达到78.94%(表3)。

表3和图1的聚类分析结果显示大部分具有相同或相似遗传背景来源的甘蓝型黄子亲本材料聚类在一起 ,说明聚类结果与系谱来源有较好的一致性 ,同时进一步证明了SSR标记技术可以明确其亲本材料间的背景差异。

3 讨论

植物种质资源是新品种选育的重要物质基础 ,各国育种单位都非常重视遗传资源的收集与利用。但对于众多的种质资源如何进行研究与利用是各个育种单位面临的主要问题。我国作为油菜最大的生产国之一 ,选育和推广了大量的油菜新品种 ,因此对于新品种遗传多样性分析也显得尤为重要。本研究利用分布于甘蓝型油菜不同连锁群且重复性和多态性比较好的60对SSR标记分析了180份黄子甘蓝型油菜亲本材料的遗传变异 ,结果表明 ,收集的甘蓝型黄子油菜在基因组水平上有着十分明显的遗传变异 ,体现出较为丰富的遗传多样性;SSR标记的多态性较多且稳定 ,是一种可靠快速简便的分析方法^[10] ,能够较好地体现原种质资源群体的遗传结构。

理想的分类结果 ,应该是类内个体间有一定的共性 ,类间有较明显的差别。在本试验中 ,聚类分析结果与系谱来源有较好的一致性 ,与地理来源、品种选育及时期等有较好的吻合性。如在第I类群中的A、B和D亚类中含油量与蛋白质含量呈现明显的负相关关系。同样 ,在第II类群中的第iv和vi亚类也是含油量较高 ,而蛋白质含量较低 ,含油量与蛋白质含量呈负相关 ,这两个类群遗传距离比较远 ,因而在育种工作中可以从两个类群中选择高含油量材料和高蛋白质含量材料测配组合 ,容易产生高油高蛋白的杂种后代。第II个类群的结果表明参试的种质资源不仅系谱来源比较广泛 ,遗传多样性也比较丰富。如

表 3 各类材料编号及主要性状

Table 3 Codes and main traits of subclusters

类群 Cluster	亚类 Subcluster	类内材料编号 Codes of subcluster	主要性状平均值 The average of main traits			
			硫苷($\mu\text{mol/g}$) Glucosinolate	含油量(%) Oil content	芥酸(%) Erucic acid	蛋白质(%) Protein
I	A	1 ,10 ,72 ,69 ,2 ,3 ,11 ,...160	34.20	36.89	0.16	28.11
	B	85 ,86 ,87	26.73	42.19	0.26	24.06
	C	97 ,131 ,171 ,173 ,...128	46.71	38.40	0.61	26.50
	D	163 ,179	36.81	35.37	0.63	30.04
	E	101 ,105 ,167 ,106...170	80.02	36.30	4.02	27.64
II	i	4 ,70 ,71 ,28 ,29 ,37	44.82	39.69	0.37	25.99
	ii	12 ,19 ,20 ,13 ,14 ,21 ,...96	46.86	38.93	0.40	27.34
	iii	22 ,93	59.44	39.34	0.49	27.04
	iv	26 ,27 ,41 ,66 ,67 ,68 ,...111	63.04	41.52	7.05	26.41
	v	109 ,99 ,168	121.49	39.10	40.22	28.94
	vi	24 ,25 ,55 ,63 ,64 ,102 ,103	37.48	43.52	6.78	26.78
	vii	62 ,74 ,75 ,73 ,76 ,89 ,90	92.81	38.84	1.86	27.08
	viii	5 ,6	33.00	38.32	1.15	26.94
	ix	91	36.23	36.81	0.37	25.09
III		79	36.89	39.79	0.34	26.91

双高材料(高硫苷和高芥酸)和极少的高油酸材料分别被划分为一类,在此基础上,可以筛选不同的易于产生杂种优势的亲本供今后育种选用。材料6和168是同一亲本材料的后代,材料6为研究单位保留的原原种,材料168为种子公司繁育多代的亲本,它们表现出较大的遗传差异,由此说明常异花授粉作物亲本的遗传保纯是非常重要的工作。

另外,甘蓝型油菜具有较强的杂种优势^[18-19],双亲的遗传差异越大,杂交种的杂种优势越强,可以根据供试亲本材料间的遗传差异对杂种亲本进行早期筛选并预测后代的杂种优势,因此,本研究结果对于甘蓝型油菜黄子新品种的选育及杂种优势利用都具有重要的意义。

参考文献

- [1] 朱四元,陈金湘,刘爱玉,等.利用SSR标记对不同抗虫棉品种的遗传多样性分析[J].湖南农业大学学报:自然科学版,2006,32(5):469-472
- [2] 沈志军,马瑞娟,俞明亮,等.无锡水蜜桃种群遗传多样性及与其他群体亲缘关系的SSR分析[J].植物遗传资源学报,2009,10(3):367-372
- [3] Prasad M, Varshney R K, Roy J K, et al. The use of microsatellites for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity in wheat [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 584-592
- [4] Plaschke J, Ganai M W, Röder M S. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers [J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 1001-1007
- [5] Maughan P J, Saghai Maroof M A, Buss C R. Microsatellite and amplified sequence length polymorphisms in cultivated and wild soybean [J]. Genome, 1995, 38: 715-723
- [6] Zhu Z F, Sun C Q, Li Z C, et al. Study on the classification of rice varieties with SSR molecular markers [J]. J Agric Biotech, 2001, 9: 58-61
- [7] Taramino G, Tingey S. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize [J]. Genome, 1996, 39: 277-287
- [8] Poulsen G B, Kahl G, Weising K. Abundance and polymorphisms of simple repetitive DNA sequence in *Brassica napus* L. [J]. Theor Appl Genet, 1993, 85: 994-1000
- [9] Hasan M, Seyis F, Badani A G, et al. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers [J]. Genet Resour Crop Evol, 2006, 53: 793-802
- [10] 张书芬,傅廷栋,马朝芝,等.3种分子标记分析油菜品种间的多态性效率比较[J].中国油料作物学报,2005,27(2):19-23
- [11] 段院生,刘平武,杨光圣.甘蓝型油菜杂种亲本指纹图谱分析[J].中国油料作物学报,2002,24(2):5-9
- [12] Theander O, Aman P, Miksche G E, et al. Carbohydrate polyphenols and lignin in seed hulls of different colours from turnip rapeseed. [J] J Agri Food Chem, 1977, 25: 270-273
- [13] Rahman M, Joersbo M, Poulsen M. Development of yellow-seeded *Brassica napus* of double low quality [J]. Plant Breed, 2001, 120: 473-478
- [14] 何余堂,涂金星,傅廷栋,等.陕西省白菜型油菜核心种质的初步构建[J].中国油料作物学报,2002,24(1):6-9
- [15] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13-15
- [16] Piquemal J, Cinquin E, Couton F, et al. Construction of an oil-seed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1514-1523
- [17] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273
- [18] Sernyk B R, Steffanson J L. Heterosis in summer rape (*Brassica napus* L.) [J]. Can J Plant Sci, 1982, 63: 407-413
- [19] Grant I, Beversdorf W D. Heterosis and combining ability estimates in spring planted oilseed rape (*Brassica napus* L.) [J]. Can J Genet Cytol, 1985, 27: 472-478