

网络出版时间:2018-11-06 16:58

DOI:10.13207/j.cnki.jnwfufu.2019.05.002

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20181106.1657.004.html>

利用 SSR 和 SRAP 标记分析油菜骨干亲本的遗传多样性

臧 珊, 张云霄, 郭 媛, 胡胜武

(西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 **【目的】** 分析甘蓝型油菜骨干亲本的遗传多样性, 揭示参试材料的遗传差异。 **【方法】** 利用筛选到的 8 对 SSR 引物和 12 对 SRAP 引物, 对 30 份甘蓝型油菜骨干亲本材料及 1 份芥菜型油菜和 1 份白菜型油菜材料进行遗传多样性分析, 结合聚类分析、主成分分析、群体结构分析以及分子方差分析揭示参试材料之间的遗传多样性。 **【结果】** 在参试材料中, 8 对 SSR 引物共扩增出 49 条多态性条带, 多态性比率为 96.08%, 平均每对引物扩增 6.1 条, 平均多态性信息含量(PIC)为 0.43, 遗传距离均值 0.34; 12 对 SRAP 引物共扩增出 77 条多态性条带, 多态性比率为 98.72%, 平均每对引物扩增 6.4 条, PIC 为 0.59, 遗传距离均值 0.46。UPGMA 聚类分析表明, 在遗传相似系数 0.65 处, 大部分参试材料被分为两大类, 第 I 类包括 19 份材料, 其中 14 份为恢复系, 5 份为保持系; 第 II 类包括 9 份材料, 均为保持系。主成分分析、群体结构分析的结果与聚类分析结果基本一致。分子方差分析结果显示, 参试甘蓝型油菜群体内变异系数为 95.46%, 群体间变异系数仅为 4.54%。保持系与恢复系材料间差异为 2.03%。 **【结论】** 参试甘蓝型油菜骨干亲本间存在一定的遗传差异, 恢复系和保持系群体内部遗传变异大于群体间的遗传变异。

【关键词】 油菜; 骨干亲本; 遗传多样性; SSR 标记; SRAP 标记

【中图分类号】 S565.42

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2019)05-0007-08

Genetic diversity pattern of elite lines in *Brassica napus* L. based on SSR and SRAP markers

ZANG Shan, ZHANG Yunxiao, GUO Yuan, HU Shengwu

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: **【Objective】** The study revealed the genetic diversity of elite lines in *Brassica napus* L. **【Method】** Thirty elite lines of *B. napus* L., one *Brassica juncea* L. cultivar and one *Brassica campestris* L. cultivar were genotyped using 8 pairs of SSR primers and 12 pairs of SRAP primers, and their genetic diversity patterns were analyzed by combination of cluster analysis, principal component analysis, population analysis, and molecular variance analysis. **【Result】** A total of 49 polymorphic fragments were detected using 8 SSR primer pairs, and the polymorphism rate was 96.08%, with an average number of polymorphic fragments per primer pair of 6.1, the average polymorphism information content of 0.43, and the genetic distance was 0.34. A total of 77 polymorphic fragments were detected using 12 SRAP primer pairs, and the polymorphism rate was 98.72%, with an average number of polymorphic fragments per primer pair of 6.4, the average polymorphism information content of 0.59, and the genetic distance was 0.46. The unweighted pair-group method with arithmetic mean cluster analysis indicated that most accessions could be divided in-

【收稿日期】 2018-03-16

【基金项目】 西北农林科技大学唐仲英作物育种基金项目(A212021713)

【作者简介】 臧 珊(1994—), 女, 山东青岛人, 硕士, 主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: 1692834397@qq.com

【通信作者】 胡胜武(1966—), 男, 陕西柞水人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事油菜遗传育种研究。

E-mail: swhu83251@nwsuaf.edu.cn

to 2 major clusters with the coefficient cut off value of 0.65. The first cluster consisted of 19 materials, of which 14 were restorer lines and 5 were maintainer lines. The second cluster consisted of 9 materials, and all were maintainer. The results of principal component analysis and population structure analysis were similar to that of cluster analysis. Molecular variance analysis revealed that the genetic variation was 95.46% within *B. napus* restorers and maintainers and was 4.54% among them. The difference between *B. napus* maintainers and restorers was 2.03%. 【Conclusion】 There was certain genetic difference between the parent lines of tested rapeseed, and the genetic variation within the restorers and maintainers was greater than among them.

Key words: *Brassica napus* L.; elite line; genetic diversity; SSR marker; SRAP marker

油菜是我国及世界上种植面积最大的油料作物,其杂种优势显著。骨干亲本的遗传多样性分析是油菜育种的重要基础工作,深入研究亲本之间的遗传多样性,可以将亲本材料划分为不同的杂种优势群,有助于组配强优势杂交组合,从而更为有效地选育强优势油菜杂交种。

目前,用于油菜遗传多样性研究的分子标记主要有 RFLP、RAPD、SSR、SRAP 和 AFLP 等。SSR 标记也称微卫星 DNA 标记,是分布于真核生物基因组中的简单重复序列,通常以 2~6 个碱基形成的核心序列为单位多次串联重复,由于重复次数不同导致不同个体出现多态性^[1]。SSR 标记多态性好、DNA 用量少、操作简便、重复性好^[2],其揭示的是整个基因组的多样性,对于通过远缘杂交渗入的其他物种的基因片段具有较好的检测能力,因此 SSR 标记分析能较大限度地反映种质的遗传多样性^[3]。SRAP 标记是一种共显性标记^[4],具有简便、高效、共显性、重复性好、易测序、便于克隆目标片段等特点。SRAP 标记目标扩增区域是开放读码框,其分析的多样性可能与人们感兴趣的重要目标性状有关,如产量、株高等性状,因此 SRAP 标记能更好地分析遗传距离,以获得杂种优势^[5]。目前,SSR 标记和 SRAP 标记已广泛应用于作物遗传多样性分析、遗传图谱的构建、重要性状的标记以及相关基因的克隆等方面,结合 SSR 和 SRAP 标记既能从全基因组层面、又能有重点地从功能基因组层面分析育种材料的遗传多样性,对于中长期育种目标的实现有较大的意义。谭祖猛等^[6]利用 SSR 和 SRAP 标记将 49 份甘蓝型油菜杂交种亲本划分为 5 大类群。宋立红等^[7]利用 24 对 SSR 引物对我国 4 大冬油菜区的 66 份甘蓝型油菜品种及 4 份杂交组合的遗传多样性进行分析,结果表明我国冬油菜品种遗传多样性丰富,不同冬油菜区域品种的变异以区内变异为主,说明我国不同地区间材料交流频繁。Li 等^[8]

利用 RAPD、EST-SSR 标记对来源于中国、美国、加拿大和欧洲部分国家的 92 份油菜品种(系)的遗传多样性进行分析,将参试材料基于品种所属类型分为 3 大类群,且群体内的遗传变异大于群体间。Zhang 等^[9]利用 SSR 和 SRAP 标记对 65 份油菜材料(54 份白菜型油菜材料和 11 份其他类型油菜)进行遗传多样性研究,结果发现中国白菜型油菜品种与外来种之间存在较大的遗传变异,这对油菜杂交种的选育具有重要的借鉴意义。Lees 等^[10]分别利用 SRAP 标记和 GBS 技术对 79 个甘蓝型油菜的基因型进行了鉴定和分型,2 种不同方法得出了相似的结果,即将参试材料分为 12 个聚类小群。Shen 等^[11]利用 ISSR 和 SCAR 标记分析了 11 个不结球大白菜品种的遗传多样性,聚类分析结果表明 11 个材料被分为 2 大类,其中 1 份具有芳香性的大白菜品种被单独分开。目前,随着新型测序技术的不断发展,优异的基因分型技术可缩减分子标记复杂的操作流程,2 种技术结合应用更有利于种质遗传多样性的研究。本研究利用 SSR 和 SRAP 分子标记对 30 份油菜骨干亲本材料进行了遗传多样性分析,旨在揭示参试骨干亲本材料的遗传差异,为油菜杂种优势育种提供参考信息。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料共 32 份:甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)骨干亲本材料 30 份,包括 15 份恢复系和 15 份保持系材料,均为低芥酸和低硫苷材料;1 份芥菜型油菜和 1 份白菜型油菜作为参照种(表 1)。以上材料均由西北农林科技大学油菜研究中心生物技术育种课题组提供,2016 年 9 月中旬播种于陕西杨凌西北农林科技大学农学院标本区。

1.2 方法

1.2.1 油菜基因组 DNA 的提取 每份参试材料

随机选取 13~15 株,取其幼叶混合,液氮研磨至粉末状,参考 Murray 等^[12]报道的改良 CTAB 法提取基因组 DNA。用 0.8%的琼脂糖凝胶电泳和紫外

分光光度计检测 DNA 的品质及质量浓度。调整所有 DNA 样品的质量浓度为 50 ng/ μ L,4 ℃ 保存备用。

表 1 供试油菜品系名称、类型、分类群和品质

Table 1 Name, type, taxa and quality of tested rapeseed accessions

序号 No.	品种名称 Name	类型 Type	分类群 Taxa	品质 Quality
1	Q10C	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
2	S11R	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
3	S8R	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
4	QY211R	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
5	HYZ01R	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
6	9722	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
7	SH11	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
8	D1526	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
9	Z6C	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
10	Q7C	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
11	Q7C	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
12	Y6	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
13	2000-5R	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
14	Z821R	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
15	QSC	恢复系 Restorer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
16	中双 7 号 Zhong 7	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
17	中双 5 号 Zhong 5	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
18	中双 9 号 Zhong 9	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
19	中双 9 号Ⅲ Zhong 9 Ⅲ	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
20	浙油 72 ZY72	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
21	2010B1	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
22	沪油 15 HY15	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
23	New B1	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
24	2010B7	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
25	2012B1	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
26	2010B4	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
27	中双 2 号 Zhong 2	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
28	中双 4 号 Zhong 4	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
29	CZ49	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
30	浙油 18 ZY18	保持 Maintainer	甘蓝型油菜 <i>B. napus</i>	低芥酸低硫苷 Low erucic acid and low glucosinolates
31	渭源大黃芥 Weiyuandahuangjie		芥菜型油菜 <i>B. juncea</i>	高芥酸高硫苷 High erucic acid and high glucosinolates
32	天油 4 号 Tianyou No. 4		白菜型油菜 <i>B. rapa</i>	高芥酸高硫苷 High erucic acid and high glucosinolates

1.2.2 SSR 标记分析 用 36 对 SSR 引物进行预试验,从中筛选出扩增主带明亮、多态性好、扩增结果稳定的 8 对引物(表 2),用于本试验分析。PCR 反应总体系为 10 μ L,其中 50 ng/ μ L 的 DNA 模板 2 μ L,10 μ mol/L 的正、反向引物各 0.6 μ L,2 $\times$ Es Taq Master Mix 5 μ L,ddH₂O 补足 10 μ L。PCR 扩增程序:95 ℃ 1 min;94 ℃ 1 min,35 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,5 个循环;94 ℃ 1 min,50 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,34 个循环;72 ℃ 7 min;4 ℃ 保存。扩增产物通过 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显影。试验重复 2 次,记录 2 次重复中的可再现条带。

1.2.3 SRAP 标记分析 用 43 对 SRAP 引物进行预试验,从中筛选扩增主带明亮、多态性好、扩增结

果稳定的 12 对引物(表 3),用于本试验分析。PCR 反应总体系为 10 μ L,其中 50 ng/ μ L 的 DNA 模板 2 μ L,10 μ mol/L 的正、反向引物各 0.6 μ L,2 $\times$ Es Taq Master Mix 5 μ L,ddH₂O 补足 10 μ L。PCR 扩增程序:94.0 ℃ 5 min;94.0 ℃ 30 s,56 ℃ 60 s,2 ℃ 45 s,40 个循环;72 ℃ 5 min;4 ℃ 保存。扩增产物通过 8%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染显影。试验重复 2 次,记录 2 次重复中的可再现条带。

1.2.4 数据收集和统计分析 记录 SSR 及 SRAP 标记分析中结果清晰、可重复的条带,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失数据记为“9”,建立“0,1”矩阵。计算多态信息含量(Polymorphic information content,PIC): $PIC=1-\sum P_{ij}^2$,其中 P_{ij} 表示位点 i 的第

j 个等位点出现的频率。利用 NTSYS-pc2. 10 软件中 SM 法计算遗传相似系数,通过该软件中 SHAN 程序下的算术平均数的非加权成组法(UP-GMA)进行聚类分析。主成分分析(PCA)先用 Dcenter 程序计算相似系数矩阵,生成相关系数矩阵,再通过 Eigen 程序,利用相关系数矩阵计算每个样品的主成分值。运用软件 Structure (version 2. 3. 4)^[13]进行群体结构分析,应用隐性等位基因模型及混合模型,将 MCMC(Markov chain montecarlo)开始时的不作数迭代(Length of burn-in period)及不作数迭代后的 MCMC 均设为 10 000 次,群体组数 K 取 1~10^[13]。利用 ARLEQUIN 软件根据遗传距离矩阵对群体间和群体内材料进行分子方差

分析(AMOVA)^[14]。

2 结果与分析

2.1 SSR 和 SRAP 引物扩增结果

用筛选到的 8 对 SSR 引物和 12 对 SRAP 引物对参试的 32 份油菜材料进行分析,结果共扩增出 129 条条带,其中多态性带 126 条,多态性比率为 97. 67%。8 对 SSR 引物共扩增出 51 条条带,其中多态性条带 49 条(表 2),多态性比率为 96. 08%,各引物可扩增出 3~8 条多态性条带,平均 6. 1 条;12 对 SRAP 引物共扩增出 78 条条带,其中多态性条带 77 条,多态性比率为 98. 72%,各引物可扩增出 4~9 条多态性条带(表 3),平均 6. 1 条。

表 2 SSR 引物及其扩增结果
Table 2 Amplification description of SSR primers

引物名 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	多态性条带数 Number of polymorphic fragments
BrgMS90	F:AAACAGAGTGTCCTTCAAAA,R:TGGCTGCACAATAACAGATACAC	7
BrGMS202	F:ATCGCCTCAACACACAGTAAAA,R:TTAGCAAGCATTGATGAAGAGC	7
BrgMS268	F:TCACCATGTGTAAAAAGACTCGG,R:TTGGCTTATCTTCTTGGGATTG	4
BrGMS343	F:CCCAAATATCAATCTCAAAGCC,R:TCGTTTCTCATCAATCTGTTGG	8
BrGMS513	F:TCTCAGCCTTTAACTTCTCCCA,R:AACTTTGTTTCAGCTCCTGCTC	6
BrgMS629	F:GTGCTTTCTGCGTTATTTCTCA,R:TTACGACCACCAACTAGCAAAA	3
BrgMS635	F:GTGTTTCTCTTCAACGCCTTTT,R:CACAAAGAATCCCCACAGATTT	7
BrgMS654	F:TCTGCCTGCATATTCTTGTA,R:AACGGAGAAGGTTTCATTAGCAC	7

表 3 SRAP 引物及其扩增结果
Table 3 Amplification description of SRAP primers

引物名 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	多态性条带数 Number of polymorphic fragments
Em4Me8	F:TGAGTCCAAACCGGTGC,R:GACTGCGTACGAATTTGA	8
Em5Me21	F:CTGGCGAACTCCGGATG,R:GACTGCGTACGAATTAAC	6
Em5Me22	F:GGTGAACGCTCCGGAAG,R:GACTGCGTACGAATTAAC	9
Em5Me23	F:AGCGAGCAAGCCGGTGG,R:GACTGCGTACGAATTAAC	9
Em5Me24	F:GAGCGTCGAACCGGATG,R:GACTGCGTACGAATTAAC	5
Em5Me30	F:GACCAGTAAACCGGATG,R:GACTGCGTACGAATTAAC	4
Em12Me18	F:TGAGTCCAAACCGGAAG,R:GACTGCGTACGAATTCTAT	4
Em14Me20	F:TGGGGACAACCCGGCTT,R:GACTGCGTACGAATTCTC	7
Em14Me22	F:GGTGAACGCTCCGGAAG,R:GACTGCGTACGAATTCTC	6
Em15Me5	F:TGAGTCCAAACCGGGAT,R:GACTGCGTACGAATTCTT	4
Em15Me8	F:TGAGTCCAAACCGGTGC,R:GACTGCGTACGAATTCTT	8
Em17Me24	F:GAGCGTCGAACCGGATG,R:GACTGCGTACGAATTGTC	7

由表 4 可知,基于 SSR 标记的油菜材料间的 PIC 值介于 0. 22~0. 65,均值 0. 43,遗传距离介于 0. 06~0. 61,均值 0. 34;基于 SRAP 标记的油菜材

料间的 PIC 值介于 0. 47~0. 78,均值 0. 59,遗传距离介于 0. 23~0. 69,均值 0. 46。SRAP 引物揭示的平均遗传距离(0. 46)要大于 SSR 引物(0. 34)。

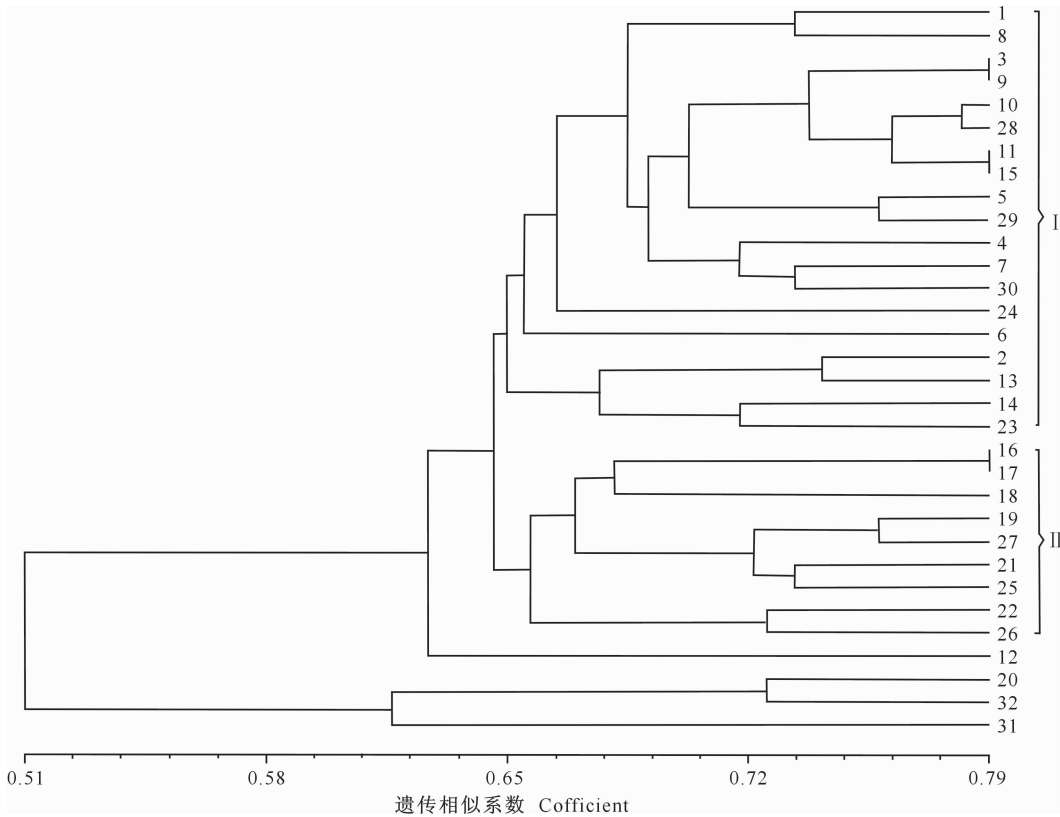
表 4 SSR 和 SRAP 引物扩增结果
Table 4 Amplification description of SSR primers and SRAP primers

标记类型 Marker types	总引物数 Total primers	多态性引物数 Polymorphic primers	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性信息含量 PIC		遗传距离 Genetic distance	
				变幅 Range	均值 Mean	变幅 Range	均值 Mean
SSR	36	8	49	0. 22~0. 65	0. 43	0. 06~0. 61	0. 34
SRAP	43	12	77	0. 47~0. 78	0. 59	0. 23~0. 69	0. 46

2.2 32 份油菜材料聚类结果

除芥菜型油菜(31 号)和白菜型油菜(32 号)外,参试 30 份甘蓝型油菜材料间的遗传相似系数为 0.51~0.79,平均值为 0.65,其中 S8R(3 号)与 Z6C(9 号)、Q7C(11 号)与 QSC(15 号)、中双 7 号(16 号)与中双 5 号(17 号)的遗传相似系数最大,均为 0.79,说明它们之间的遗传差异较小;Z6C(9 号)与浙油 72(20 号)的遗传相似系数最小,为 0.51,说明它们之间的遗传差异最大。

利用 SSR 标记和 SRAP 标记对 32 份材料进行聚类分析,结果见图 1。由图 1 可知,在遗传相似系数为 0.65 时,除 12,20,31 和 32 号材料外,其余 28 份材料被划分为 2 大类:第 I 类包括 19 份材料,其中 14 份(1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,13,14,15 号)为恢复系,5 份(23,24,28,29,30 号)为保持系;第 II 类包括 9 份(16,17,18,19,21,22,25,26,27 号)材料,均为保持系。说明参试恢复系和保持系材料间存在一定的遗传差异。



1~32 号代表的品种同表 1。下图同
Numbers 1—32 represent same accessions in Table 1. The same as the following figure

图 1 基于 SSR 和 SRAP 分子标记的 32 份参试油菜材料的聚类图

Fig. 1 Cluster dendrogram of 32 rapeseed materials constructed by SSR and SRAP molecular markers

2.3 32 份油菜材料的主成分分析

主成分分析(PCA)结果(图 2)显示,32 份材料被分为 3 大类:除 QY211R(4 号)与 Z821R(14 号)外的 13 份(1,2,3,5,6,7,8,9,10,11,12,13,15 号)恢复系材料和 4 份(24,25,29,30 号)保持系材料被划为一类;10 份(16,17,18,19,21,22,23,26,27,28 号)保持系材料和 4,14 号 2 份恢复系材料被划为一类;甘蓝型油菜浙油 72(20 号)、芥菜型油菜渭源大 黄芥(31 号)和白菜型油菜天油 4 号(32 号)被划为 另一类(图 2)。这与聚类分析结果基本一致,说明 主成分分析结果与聚类分析结果具有较好的一致

性。

2.4 32 份油菜材料的群体结构分析

根据 SSR 和 SRAP 扩增结果,利用 Structure 软件对 32 份参试材料进行群体结构分析。当 $K=3$ 时, $\ln P(D)$ 值最大,32 份参试材料被分成 G I ~ G III 三大组(图 3)。G I 组中有 14 份材料,包括 11 份恢复系材料(其中 10 份为聚类分析中第 I 类材料)和 3 份保持系材料(为聚类分析第 I 类材料); G II 组包括 20,31 和 32 号 3 份材料;G III 组有 15 份材料,包括 11 份保持系材料(其中 9 份为聚类分析 中第 II 类材料)和 4 份恢复系材料(均为聚类分析第

I 类材料)。群体结构分析能够将大多数的保持系与恢复系材料区分开。总体来说,群体结构分析、主成分分析与聚类分析结果基本一致。

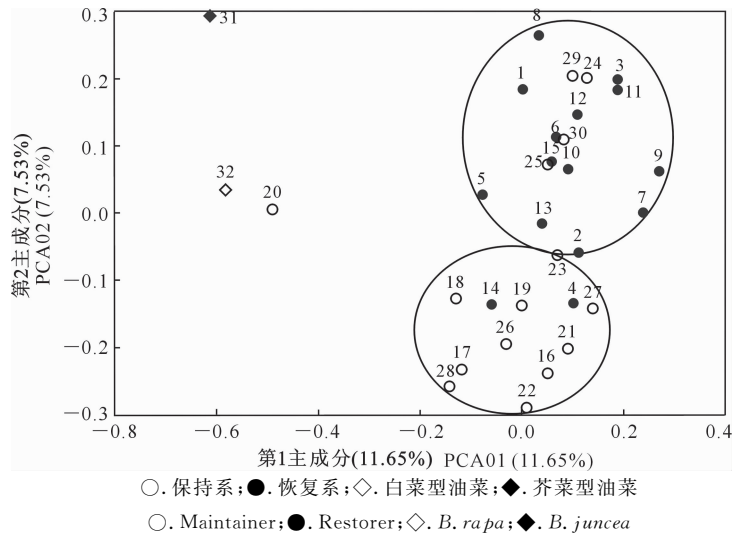
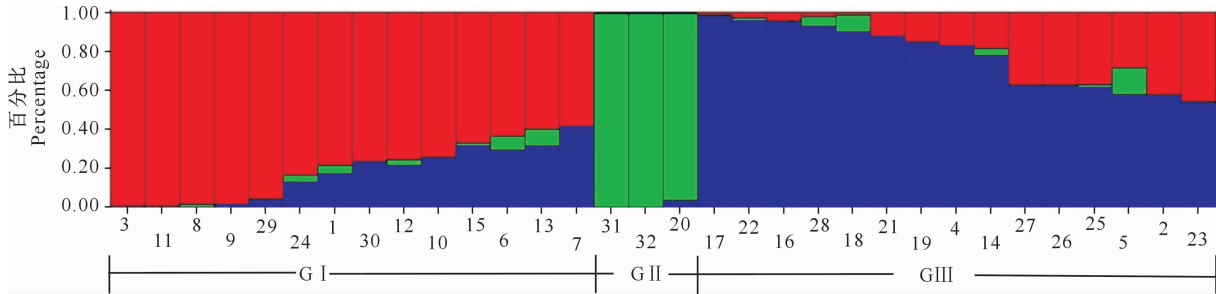


图 2 SSR 结合 SRAP 标记的油菜主成分分析结果
Fig. 2 Analysis results of main components of SRAP and SSR data



每个柱中不同颜色所占柱的百分比代表该材料分到相应组的可能性
The estimated genetic fraction of each accession of each inferred group is indicated by one color

图 3 32 份油菜材料的群体结构分析($K=3$)

Fig. 3 Population structure of the 32 rapeseed accessions suggested by structure analysis ($K=3$)

2.5 甘蓝型油菜保持系和恢复系亲本间的差异分析

利用 AMOVA 分析甘蓝型油菜保持系和恢复系之间的遗传差异,结果见表 5。由表 5 可以看出,保持系和恢复系材料群体内变异系数为 95.46%,群体间变异系数为 4.54%。不同类型甘蓝型油菜亲

本材料间的差异分析结果表明,保持系内差异(44.02%)和恢复系内差异(41.20%)大于保持系与恢复系间差异(2.03%)。总体来说,保持系和恢复系材料间存在一定的遗传差异,然而群体内差异大于群体间差异。

表 5 不同类型甘蓝型油菜亲本材料的方差分析

Table 5 Analysis of molecular variance of different Brassicanapus accessions

变异来源 Source of variation	自由度 <i>df</i>	平方和 Sum of squares	方差分量 Variance component	变异系数/% Percentage of variation
群体间 Among populations	1	36.500	1.013	4.54
群体内 Within populations	28	596.533	21.305	95.46
总计 Total	29	633.033	22.318	

3 讨 论

油菜骨干亲本的遗传多样性分析是杂种优势育

种的重要基础工作。本研究选用本课题组多年选育出的 15 份保持系和 15 份恢复系甘蓝型油菜及 1 份芥菜型油菜和 1 份白菜型油菜,利用 8 对 SSR 引物

和 12 对 SRAP 引物进行基因型分析,结果显示,参试亲本材料间存在一定的遗传差异,大部分保持系和恢复系材料被分开;参试甘蓝型油菜恢复系和保持系群体内遗传变异(95.46%)大于群体间的遗传变异(4.54%)。

前人利用多种分子标记对油菜遗传多样性进行了广泛研究。陈伦林等^[3]利用 SSR 和 SRAP 标记分析了国内外 19 个甘蓝型油菜品种的遗传多样性,认为 SSR 标记揭示的遗传距离大于 SRAP 标记,SRAP 标记的多态性信息含量多于 SSR 标记,两种标记各有优势,因此结合使用两种标记能更全面地分析品种遗传多样性。谭祖猛等^[6]分别利用 SSR 和 SRAP 标记对油菜杂交种骨干亲本的遗传多样性进行研究,认为 SRAP 标记多态性信息含量及揭示的亲本遗传距离要大于 SSR 标记,该结果与本研究结果相一致;SRAP 标记划分的类群与系谱资料更为接近,更适合用于遗传关系较近材料的遗传多样性分析。李淑娟等^[15]利用 SSR 标记对 9 份来自云南的主栽甘蓝型油菜品种进行遗传多样性及分子鉴定分析,结果表明品种间具有较高的遗传多样性,并获得了能够区分云南 9 个品种的分子标记 CB10364,为云南省甘蓝型油菜的种质资源利用与品种改良提供了条件。Su 等^[16]利用基于 KASP 技术开发的 SNP 标记结合群体结构分析、主成分分析和邻接系统发育分析,对 231 个白菜型油菜品种进行了基因型和遗传变异分析,将参试材料分为 4 个亚群,且材料间表现出遗传变异。张晓娟等^[17]利用 SSR 和 SRAP 标记对 43 份抗菌核病的油菜材料进行遗传多样性分析,聚类分析、主成分分析及群体结构分析均将参试材料分为三大类,白菜型油菜可较好地与甘蓝型油菜区分开,与本研究结果相一致,为抗菌核病油菜品种的选育奠定了基础。

谭祖猛等^[6]对油菜杂交种骨干亲本遗传多样性的研究认为,保持系之间的遗传距离相对较小,遗传变异小,恢复系遗传距离相对较大,遗传变异较大;参试恢复系和保持系群体内部遗传变异小于群体间的遗传变异。本研究 SSR 和 SRAP 2 种分子标记分析结果显示,油菜保持系与恢复系群体间存在一定的遗传差异(4.54%),然而保持系、恢复系群体内的遗传差异(95.46%)占主要部分,与谭祖猛等^[6]研究结果不同,这与参试油菜亲本材料不同有关。目前,在玉米中广泛开展了杂种优势群划分及杂优模式研究^[18],而在油菜中此类研究较少^[19-21],这可能导致油菜保持系与恢复系间遗传差异较小。因此,

在今后的育种工作中,需要加强油菜杂种优势群分群及杂种利用模式研究,定向扩大保持系与恢复系间的遗传差异,创制新的材料。本研究结果对我国油菜杂种优势育种具有一定的参考价值。

[参考文献]

- [1] Litt M, Luty J A. Hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle action gene [J]. American Journal of Human Genet, 1989, 44: 391-401.
- [2] Cheng X M, Xu J S, Xia S, et al. Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus* [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2009, 118(6): 1121-1131.
- [3] 陈伦林, 邹小云, 李书宇, 等. SSR 和 SRAP 标记揭示甘蓝型油菜遗传多样性的差异分析 [J]. 分子植物育种, 2008, 6(3): 511-516.
Chen L L, Zou X Y, Li S Y, et al. Analysis the genetic diversity of rapeseed by SSR and SRAP with emphasis on the difference of this two kinds of markers [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(3): 511-516.
- [4] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2001, 103: 455-461.
- [5] Riaz A, Li G, Quresh Z, et al. Genetic diversity of oilseed *Brassica napus* L. inbred lines based on sequence-related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance [J]. Plant Breeding, 2010, 120(5): 411-415.
- [6] 谭祖猛, 李云昌, 胡 琼, 等. SSR 和 SRAP 标记研究油菜杂交种骨干亲本的遗传多样性 [J]. 农业生物技术学报, 2009, 17(5): 882-890.
Tan Z M, Li Y C, Hu Q, et al. Genetic diversity of parental lines of rapeseed hybrids based on SSR and SRAP markers [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2009, 17(5): 882-890.
- [7] 宋立红, 智文良, 李 玮, 等. 我国近年审定的甘蓝型油菜品种的遗传多样性分析 [J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版), 2011, 39(11): 110-118.
Song L H, Zhi W L, Li W, et al. Genetic diversity of Chinese cultivars in *Brassica napus* L. revealed by SSR markers [J]. Journal of Northwest A&F University (Nat Sci Ed), 2011, 39(11): 110-118.
- [8] Li W, Jiang W, Zhao H X, et al. Genetic diversity of rapeseed accessions from different geographic locations revealed by expressed sequence tag-simple sequence repeat and random amplified polymorphic DNA markers [J]. Crop Science, 2012, 52(1): 201-210.
- [9] Zhang X J, Chen H Y, Channa S A, et al. Genetic diversity in Chinese and exotic *Brassica rapa* L. accessions revealed by SSR and SRAP markers [J]. Brazilian Journal of Botany, 2017,

- 40(4):973-982.
- [10] Lees C J, Li G, Duncan R W. Characterization of *Brassica napus* L. genotypes utilizing sequence-related amplified polymorphism and genotyping by sequencing in association with cluster analysis [J]. Molecular Breeding, 2016, 36(11):155.
- [11] Shen X L, Zhang Y M, Xue J Y, et al. Analysis of genetic diversity of *Brassica rapa* var. *chinensis* using ISSR markers and development of SCAR marker specific for Fragrant Bok Choy, a product of geographic indication [J]. Genetics & Molecular Research, 2016, 15(2):22-36.
- [12] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8(19):4321.
- [13] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. Genetics, 2000, 155:945-959.
- [14] Excoffier L, Smouse P E, Quattro J M. Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes; application to human mitochondrial DNA restriction data [J]. Genetics, 1992, 131:479-491.
- [15] 李淑娟, 刘 岱, 孙桂林, 等. 云南主栽甘蓝型油菜品种的遗传多样性分析与分子鉴定 [J]. 种子, 2014, 33(11):27-30.
- Li S J, Liu D, Sun G L, et al. Genetic diversity analysis and molecular identification of *Brassic napus* varieties mainly planting in Yunnan province [J]. Seed, 2014, 33(11):27-30.
- [16] Su T B, Li P R, Yang J J, et al. Development of cost-effective single nucleotide polymorphism marker assays for genetic diversity analysis in *Brassica rapa* [J]. Molecular Breeding, 2018, 38(4):42.
- [17] 张晓娟, 赵 辉, 张 羽, 等. SSR 结合 SRAP 标记分析油菜菌核病抗性资源遗传多样性 [J]. 华北农学报, 2016, 31(3):169-174.
- Zhang X J, Zhao H, Zhang Y, et al. Genetic diversity of sclerotinia sclerotiorum resistant *Brassica napus* based on SSR and SRAP [J]. Acta Agriculturae Boreali Sinica, 2016, 31(3):169-174.
- [18] Melchinger A E, Gumber R K, Leipert R B, et al. Prediction of testcross means and variances among F_3 progenies of F_1 crosses from testcross means and genetic distances of their parents in maize [J]. Theoretical & Applied Genetics, 1998, 96(3/4):503.
- [19] Qian W, Sass O, Meng J, et al. Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.): I. Crosses between spring and Chinese semi-winter lines [J]. Theoretical & Applied Genetics, 2007, 115(1):27-34.
- [20] Qian W, Li Q, Noack J, et al. Heterotic patterns in rapeseed (*Brassica napus* L.): II. Crosses between European winter and Chinese semi-winter lines [J]. Plant Breeding, 2009, 128(5):466-470.
- [21] Tian H Y, Channa S A, Hu S W. Heterotic grouping and the heterotic pattern among Chinese rapeseed accessions (*Brassica napus* L.) [J]. Agronomy Journal, 2015, 107(4):1321-1330.