

## 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

文雁成<sup>1,2</sup>, 王汉中<sup>1</sup>, 沈金雄<sup>1</sup>, 刘贵华<sup>1</sup>, 张书芬<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院油料作物研究所, 武汉 430062; <sup>2</sup>河南省农业科学院棉花油料作物研究所, 郑州 450002)

**摘要:**【目的】探讨中国甘蓝型油菜遗传多样性和遗传基础。【方法】采用 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 标记对建国以来不同时期选育的 130 个品种进行分析。【结果】25 个 SRAP 引物组合共扩增到 509 个谱带、123 个多态性带; 多态性带的比例为 24%。每对引物组合的谱带数和多态性带数分别为 20.4 个和 4.9 个。在遗传距离为 0.12 处, 将 130 个甘蓝型油菜品种 (系) 分为 A、B、C、D 4 个类群, 其中 78.5% 的品种归入 C 类。C 类又可在遗传距离 0.10 处分为 I、II、III、IV、V 5 个亚群, 又有 58.5% 的品种归入 III 亚群。说明我国近 60% 的甘蓝型油菜品种遗传多样性较匮乏。遗传基础分析结果表明, 20 世纪 80 年代前育成的甘蓝型油菜品种的遗传基础最窄, 80 年代最宽, 90 年代略有下降。进入 21 世纪, 品种间的遗传基础进一步下降。差异显著性测验结果表明, 1991~2000 年间与 2000 年以后育成的品种间的平均遗传距离差异不显著, 80 年代前育成品种与 80 年代育成的品种平均遗传距离间差异达到 0.01 显著水平, 80 年代与 90 年代育成的品种间遗传距离差异达到 0.05 的显著水平。我国育成的品种间的遗传距离与引进品种间的遗传距离差异达到 0.01 的极显著水平。【结论】SRAP 标记是一种经济、有效和可靠的分子标记手段。

**关键词:** 甘蓝型油菜; SRAP; 遗传多样性; 遗传基础

## Analysis of Genetic Diversity and Genetic Basis of Chinese Rapeseed Cultivars (*Brassica napus* L.) by Sequence-Related Amplified Polymorphism Markers

WEN Yan-cheng<sup>1,2</sup>, WANG Han-zhong<sup>1</sup>, SHEN Jin-xiong<sup>1</sup>, LIU Gui-hua<sup>1</sup>, ZHANG Shu-fen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062;

<sup>2</sup>Cotton and Oil Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

**Abstract:** 【Objective】In order to investigate the Genetic diversity and genetic basis of rapeseed (*B. napus* L.) in China, 【Method】Total 130 accessions developed in different years since 1949 were analyzed using SRAP (sequence-related amplified polymorphism) markers. 【Result】A total of 509 amplified fragments and 123 polymorphic fragments were detected by applying 25 SRAP primer combinations. The polymorphic fragment percentage was 24%. The number of amplified fragments and polymorphic fragments per primer combination were 20.4 and 4.9, respectively. 130 *B. napus* accessions were divided into four groups of A, B, C and D at genetic distance of 0.12. About 78.5% of total accessions were classified into group C. Group C could also be divided into I, II, III, IV and V sub-groups at genetic distance of 0.10. About 58.5% of total accessions were classified into sub-group I, indicating the genetic diversity of 58.5% accessions of total was poor. The results demonstrated that the genetic basis of *B. napus* L. accessions released before 1980 was the narrowest while those released in 1980s reached the widest. In 1990s, the genetic distances of *B. napus* L. accessions declined again. The genetic basis of *B. napus* L. accessions narrowed further after 2000. Though the difference of mean genetic distance between accessions bred in 1990s and after 2000 did not reach a significant level, the difference in mean genetic distance in different periods was at 0.01 or 0.05 significant level. The difference in mean genetic distance between accessions bred in

收稿日期: 2005-06-10; 接受日期: 2006-01-02

基金项目: 国家“863”项目 (2003AA207150)

作者简介: 文雁成 (1965-), 男, 副研究员, 博士研究生, 研究方向为油菜遗传育种。通讯作者王汉中, 男, 研究员, Tel: 027-86811834, E-mail: wanghz@oilcrops.cn



China and introduced from abroad reached a significant level at 0.01. 【Conclusion】 All these results showed that SRAP markers were economic, effective, and reliable.

Key words: *B. napus* L.; SRAP; Genetic diversity; Genetic basis

## 0 引言

【本研究的重要意义】甘蓝型油菜是中国最重要的栽培类型,它于 20 世纪 40 年代和 50 年代分别从英国和意大利引入到中国的四川和陕西,并从中育成了分别在长江流域和黄淮流域广泛种植的甘蓝型油菜品种胜利油菜和跃进油菜<sup>[1, 2]</sup>。在随后的 20 多年中,中国育种者通过系统选择、与白菜型油菜的种间杂交,培育出了一批适应中国不同生态环境的甘蓝型油菜品种<sup>[3]</sup>。20 世纪 70 年代后期,中国从波兰引进甘蓝型低硫代葡萄糖苷品种 Bronowski,从加拿大引进甘蓝型低芥酸品种 Oro,通过杂交选育出了低芥酸、低硫代葡萄糖苷的优质油菜品种,使中国甘蓝型油菜品种的遗传基础发生了较大变化。为了培育出更高产、优质的甘蓝型油菜品种、配制强优势的油菜杂交种、避免遗传基础过于狭窄可能造成的危害,有必要对中国各个时期主要栽培的甘蓝型油菜品种的遗传多样性和遗传基础进行分析。【前人研究进展】目前常用的 DNA 分子标记有 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等,它们各有优缺点<sup>[4]</sup>。Li 等<sup>[5]</sup>于 2001 年开发出了一种新的基于 PCR 的 SRAP (sequence-related amplified polymorphism) 标记。该标记具备 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 等分子标记的优点,克服了它们的缺点,已在欧美得到应用。Li 等<sup>[5]</sup>用该标记对甘蓝进行 DNA 扩增,获得的 45%片段与 Genbank 数据库中的已知基因相同。用 SRAP 标记构建的甘蓝连锁图谱与 AFLP 构建的连锁图谱无差别,用该标记方法还成功地对甘蓝中硫代葡萄糖甙脱饱和基因 *BoGLS-ALK* 进行了标记。Li 等<sup>[6]</sup>还用该方法对甘蓝与拟南芥的基因组进行了基因比对,发现在 190 个多态性 cDNA 条带中,有 169 个序列是相似的,二者在常染色质区的基因具有广泛的共线性关系。Ahmad 等<sup>[7]</sup>用 SSR 和 SRAP 标记对桃品种的遗传多样性进行了分析,发现 SRAP 标记能与 SSR 标记一样将遗传关系很近的桃品种区分开来,而且 SRAP 标记比 SSR 标记更有效、快捷、成本低。Budak 等<sup>[8-10]</sup>用 SRAP 标记对野牛草和草坪草的遗传多样性进行了分析,用 34 个 SRAP 引物组合将 53 个野牛草种质分成了 8 个类别,认为 SRAP 标记能够有效地分析野牛草和草坪草遗传多样性、历史演化

等。Budak<sup>[10]</sup>还对 ISSR、SSR、RAPD 和 SRAP 标记进行了比较,认为 SRAP 标记多态性丰富,能够区分遗传关系很近的品种。Ferriol 等<sup>[11, 12]</sup>用 SRAP 标记和 AFLP 标记对西葫芦和笋瓜的遗传多样性进行了分析,认为 SRAP 标记结果与 AFLP 结果一致,而且 SRAP 标记比 AFLP 标记所提供的信息更接近于农艺性状的差异和历史演变的结果。林忠旭等<sup>[13, 14]</sup>用 SRAP 标记构建了棉花 SRAP 遗传连锁图,并分析了棉花的遗传多样性,认为 SRAP 标记多态性好、操作简单、重复性好。【本研究的切入点及拟解决的关键问题】目前,尚未有 SRAP 标记用于甘蓝型油菜品种的遗传多样性分析的报道,笔者拟将 SRAP 标记应用于中国建国以来各个时期主要甘蓝型油菜品种的遗传多样性分析,揭示甘蓝型油菜品种的遗传基础,为油菜品种选育、利用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本研究所用的 130 份中国各个时期的甘蓝型油菜主栽品种(系)(包括 23 份从国外引进的品种)是从全国油菜育种、教学和科研单位征集而来的,其中大部分保存于中国农业科学院油料作物研究所油菜中期种质资源库,品种(系)均为自交稳定材料(表 1)。

### 1.2 方法

1.2.1 DNA 提取及 PCR 反应 将供试材料播种于大田,苗期取 10 个单株的幼嫩叶片混合,按李佳<sup>[15]</sup>修改后的 SDS 法提取叶片总 DNA。按照 Li 等<sup>[5]</sup>提出的原则设计引物,由上海生工合成,引物及本研究中所用的引物组合见表 2。PCR 反应体系为:总反应体积为 10  $\mu\text{l}$ ,带  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  的  $1\times$  反应缓冲液,2  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , dNTPs 2000  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ , Tag 酶 0.5 U (购自 MBI 公司),模板 DNA 50 ng,正向和反向引物各 50 ng,不足部分用 dd  $\text{H}_2\text{O}$  补足。PCR 反应于 Gene Amp 9700 扩增仪上进行。热循环程序为:95 $^{\circ}\text{C}$  1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 35 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 5 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 50 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$  1 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$  延伸 7 min, 4 $^{\circ}\text{C}$  保存。

1.2.2 电泳分析检测 扩增产物用聚丙烯酰胺凝胶电泳(6%, 7  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  尿素)分离,固定、银染、显影

表 1 参试的甘蓝型油菜品种名称及来源

Table 1 Names, origins and years of release of tested *B. napus* L. accessions

编号 Code	品种(系)名称 Accession	来源 Origin	选育年份 Year released
9	苏 128 Su 128	江苏省农业科学院 Jiangsu AAS <sup>1)</sup>	不详 Unknown
10	7033	安徽省农业科学院 Anhui AAS	不详 Unknown
11	Porozanski	国外 Exotic	不详 Unknown
12	86-10	湖南省农业科学院 Hunan AAS	不详 Unknown
13	利戈勒-1 Ligora-1	国外 Exotic	不详 Unknown
14	537	不详 Unknown	不详 Unknown
15	Dong-Hae23	国外 Exotic	不详 Unknown
16	III-227	四川省 Sichuan Province	不详 Unknown
17	苏油 158 Suyou 158	江苏油力特 Jiangsu Youlite	2002
18	苏油 1 号 Suyou 1	江苏太湖 Jiangsu Taihu	1999
19	华双 3 号 Huashuang No.3	华中农业大学 HAU <sup>2)</sup>	1998
20	陇油 2 号 Nongyou No.2	甘肃省农业科学院 Gansu AAS	1984
21	青油 14 号 Qinyou No.14	青海省农业科学院 Qinghai AAS	1994
22	沪油 12 号 Huyou No.12	上海农业科学院 Shanghai AAS	1987
23	沪油 14 号 Huyou No.14	上海农业科学院 Shanghai AAS	1996
24	沪油 15 号 Huyou No.15	上海农业科学院 Shanghai AAS	1997
25	沪油 16 号 Huyou No.16	上海农业科学院 Shanghai AAS	2002
26	沪油 17 号 Huyou No.17	上海农业科学院 Shanghai AAS	不详 Unknown
27	5200	华中农业大学 HAU	不详 Unknown
28	5900	华中农业大学 HAU	不详 Unknown
29	1141B	华中农业大学 HAU	不详 Unknown
30	花叶恢 Huayehui	湖南 Hunan	不详 Unknown
31	川油 17 Chuanyou No.17	四川省农业科学院 Sichuan AAS	1992
32	川油 18 Chuanyou No.18	四川省农业科学院 Sichuan AAS	1998
33	川油 20 Chuanyou No.20	四川省农业科学院 Sichuan AAS	2000
34	浙双 6 号 Zheshuang No.6	浙江省农业科学院 Zhejiang AAS	2003
35	浙双 72 Zheshuang 72	浙江省农业科学院 Zhejiang AAS	2001
36	高油 605 Gaoyou 605	浙江大学 Zhejiang University	1998
37	中双 5 号 Zhongshuang 5	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS <sup>3)</sup>	1999
38	中双 6 号 Zhongshuang No.6	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	2000
39	中双 7 号 Zhongshuang No.7	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1998
40	中双 10 号 Zhongshuang 10	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	2003
41	湘油 15 号 Xiangyou No.15	湖南农业大学 Hunan Agricultural University	1997
42	郑 252 Zheng 252	河南省农业科学院 Henan AAS	1990
43	豫油 1 号 Yuyou No.1	河南省农业科学院 Henan AAS	1986
44	豫油 2 号 Yuyou No.2	河南省农业科学院 Henan AAS	1989
45	宁油 12 号 Ningyou 12	江苏省农业科学院 Jiangsu AAS	2003
46	宁油 10 号 Ningyou 10	江苏省农业科学院 Jiangsu AAS	1997
47	中油 821 Zhongyou 821	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
48	中双 4 号 Zhongshuang 4	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1994
49	中双 3 号 Zhongshuang 3	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1993
50	中双 9 号 Zhongshuang 9	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	2002
51	沪油 2 号 Huyou 2	上海农业科学院 Shanghai AAS	1971
52	新华 2 号 Xinhua 2	江苏太仓 Jiangsu Taicang	1970
53	甘油 1 号 Ganyou 1	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1965
54	华油 8 号 Huayou 8	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1969
55	湘油 3 号 Xiangyou 3	湖南省农业科学院 Hunan AAS	1973
56	宜油 4 号 Yiyou 4	四川宜宾 Sichuan Yibin	不详 Unknown
57	云油 6 号 Yunyou 6	云南省农业科学院 Yunnan AAS	1959
58	Oro	加拿大 Canada	1976
59	沪油 9 号 Huyou 9	上海农业科学院 Shanghai AAS	不详 Unknown
60	当油早 1 号 Dangyouzao 1	安徽当涂 Anhui Dangtu	1982
61	早丰 4 号 Zaofeng 4	陕西省农业科学院 Shanxi AAS	不详 Unknown
62	陕油 3 号 Shanyou 3	陕西省农业科学院 Shanxi AAS	1971
63	安康胜利油菜 Ankang Shenli	陕西省农业科学院 Shanxi AAS	不详 Unknown
64	秦油 3 号 Qinyou 3	陕西省农业科学院 Shanxi AAS	1980
65	甘油 5 号 Ganyou 5	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1977
66	华黄 1 号 Huahuang 1	华中农业大学 HAU	1990

续表 1 Continued Table 1

编号 Code	品种(系)名称 Accession	来源 Origin	选育年份 Year released
67	赣油 1 号 Ganyou 1	江西省农业科学院 Jiangxi AAS	1973
68	云油 8 号 Yunyou 8	云南省农业科学院 Yunnan AAS	不详 Unknown
69	皖油早 Wanyouzao	安徽省农业科学院 Anhui AAS	1965
70	早丰 5 号 Zaofeng 5	陕西省农业科学院 Shanxi AAS	不详 Unknown
71	玉油 1 号 Yuyou 1	江西省农业科学院 Jiangxi AAS	不详 Unknown
72	农林 27 号 Norin 27	日本 Japan	不详 Unknown
73	Parter	国外 Exotic	不详 Unknown
74	黔油双低 2 号 Qianyou doublelow 2	贵州省农业科学院 Guizhou AAS	1996
75	中双 8 号 Zhongshuang 8	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	2001
76	丰收 4 号 Fengshou 4	四川新都县 Sichuan Xindu County	不详 Unknown
78	浙油 8 号 Zheyou 8	浙江省农业科学院 Zhejiang AAS	不详 Unknown
79	宁油 8 号 Ningyou 8	江苏省农业科学院 Jiangsu AAS	1985
80	湘油 10 号 Xiangyou 10	湖南淮化 Hunan Huaihua	1985
81	红油 2 号 Hongyou 2	四川成都 Sichuan Chengdu	1975
82	万油 17 号 Wanyou 17	四川万县 Sichuan Wan county	1986
83	早熟胜利 Early Shenli	福建省农业科学院 Fujian AAS	不详 Unknown
85	Tower	加拿大 Canada	1976
86	川油 11 Chuanyou 11	四川省农业科学院 Sichuan AAS	不详 Unknown
87	黔油 8 号 Qianyou 8	贵州省农业科学院 Guizhou AAS	1972
88	73-1-2	贵州油料所 Guizhou Oil Crops Institute	不详 Unknown
89	陇油 1 号 Nongyou 1	甘肃省农业科学院 Gansu AAS	1988
90	060024	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
91	Pivot	国外 Exotic	不详 Unknown
92	农林 3 号 Norin 3	日本 Japan	不详 Unknown
93	黔油 12 号 Qianyou 12	贵州省农业科学院 Guizhou AAS	1999
94	黔油 14 号 Qianyou 14	贵州省农业科学院 Guizhou AAS	2002
95	黔油 18 号 Qianyou 18	贵州省农业科学院 Guizhou AAS	2003
96	Westar	加拿大 Canada	1982
97	白花 White flower	上海农业科学院 Shanghai AAS	不详 Unknown
98	乳白花 White flower	非洲 Africa	不详 Unknown
99	浙油 7 号 Zheyou 7	浙江省农业科学院 Zhejiang AAS	1979
100	武九油菜 Wujiu Rapeseed	浙江省农业科学院 Zhejiang AAS	1970
101	淮油 6 号 Huaiyou 6	江苏淮阴 Jiangsu Huaiyin	1972
102	跃进油菜 Yuejin	西北农科所 North-west Agricultural Institute	1957
103	老红甘 Laohonggan	湖南省农业科学院 Hunan AAS	不详 Unknown
104	丰油早 Fengyouzao	江西省农业科学院 Jiangxi AAS	不详 Unknown
105	福油 1 号 Fuyou 1	福建省农业科学院 Fujian AAS	1989
106	陆奥 Luao	国外 Exotic	不详 Unknown
107	农林 16 号 Norin 16	日本 Japan	不详 Unknown
108	耐寒油菜 Naihan Rapeseed	不详 Unknown	不详 Unknown
109	Ceres	国外 Exotic	不详 Unknown
110	Ligora	国外 Exotic	不详 Unknown
111	Start	国外 Exotic	不详 Unknown
112	P21	国外 Exotic	不详 Unknown
113	奥帕尔 Aopal	国外 Exotic	不详 Unknown
114	Jupiter	国外 Exotic	不详 Unknown
115	华双 4 号 Huashuang 4	华中农业大学 HAU	2003
116	21935 品系 Line 21635	华中农业大学 HAU	不详 Unknown
118	6026	华中农业大学 HAU	不详 Unknown
119	优 88 You 88	华中农业大学 HAU	不详 Unknown
121	8908A × R2	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
122	8908A	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown

续表 1 Continued Table 1

编号 Code	品种(系)名称 Accession	来源 Origin	选育年份 Year released
123	R6	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
124	6098A × R6	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
125	棚 40 Peng 40	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
126	华双 5 号 Huashuang 5	华中农业大学 HAU	2004
127	R2	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
128	8908A × R6	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
129	宁油 14 Ningyou 14	江苏省农业科学院 Jiangsu AAS	不详 Unknown
130	6098A × R2	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
131	6098A	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
133	中油低芥 1 号 Zhongyou 1	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	1986
136	D4111	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
137	D4113	中国农业科学院油料所 OCRI, CAAS	不详 Unknown
139	23576-6	不详 Unknown	不详 Unknown
140	青杂 1 号 Qinza 1	青海省农业科学院 Qinhai AAS	不详 Unknown
142	II 杂 367 IIza367	不详 Unknown	不详 Unknown
143	Bronowski	波兰 Poland	1995
148	P8	西南农业大学 South-west Agricultural University	不详 Unknown
149	SV32	西南农业大学 South-west Agricultural University	不详 Unknown
150	SH56	西南农业大学 South-west Agricultural University	不详 Unknown

<sup>1)</sup> AAS: Academy of Agricultural Sciences; <sup>2)</sup> HAU: Huazhong Agricultural University; <sup>3)</sup> OCRI, CAAS: Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences

表 2 SRAP 标记的正向引物、反向引物的序列 (5'-3')

Table 2 Sequences (5'-3') of SRAP forward and reverse primers used in this study

正向引物 Forward primer	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer
Me1 TGA GTC CAA ACC GGA TA	Me13 AGC GAG CAA GCC GGT GG	Em1 GAC TGC GTA CGA ATT ATT
Me2 TGA GTC CAA ACC GGA GC	Me14 GAG CGT CGA ACC GGA TG	Em2 GAC TGC GTA CGA ATT TGC
Me3 TGA GTC CAA ACC GGA TG	Me15 CAA ATG TGA ACC GGA TA	Em3 GAC TGC GTA CGA ATT GAC
Me4 TGA GTC CAA ACC GGA CA	Me16 GAG TAT CAA CCC GGA TT	Em4 GAC TGC GTA CGA ATT TGA
Me5 TGA GTC CAA ACC GGG AT	Me17 GTA CAT AGA ACC GGA GT	Em5 GAC TGC GTA CGA ATT AAC
Me6 TGA GTC CAA ACC GGG CT	Me18 TAC GAC GAA TCC GGA CT	Em6 GAC TGC GTA CGA ATT GCA
Me7 TGA GTC CAA ACC GGT AA	Me19 CAC AGT CAT GCC GGA AT	Em7 GAC TGC GTA CGA ATT ATG
Me8 TGA GTC CAA ACC GGT GC	Me20 GAC CAG TAA ACC GGA TG	Em8 GAC TGC GTA CGA ATT CTG
Me9 TTC AGG GTG GCC GGA TG	Me21 CAG GAC TAA ACC GGA TA	Em9 AGG CGG TTG TCA ATT GAC
Me10 TGG GGA CAA CCC GGC TT	Me22 ATC AGT CGG ACC GGA TT	Em10 TGT GGT CCG CAA ATT TAG
Me11 CTG GCG AAC TCC GGA TG	Me23 GAT TGC ATC ACC GGA TG	
Me12 GGT GAA CGC TCC GGA AG	Me24 CTT ACT TAG ACC GGA GT	

和定影等步骤参照陆光远等<sup>[16]</sup>的方法。

1.2.3 随机引物的筛选 用 4 个有代表性的品种对 240 个 SRAP 标记组合进行筛选。用多态性好、易于区分的引物组合检测供试的甘蓝型油菜品种(系)。

1.2.4 遗传多样性的 SRAP 分析 用筛选到的 25 对引物组合对各品种的 DNA 样品进行 PCR 扩增。仅统计有差异、易于识别的多态性条带, 有带记为 1, 无带记为 0。遗传相似系数(GS)及遗传距离(GD)按 Nei 和 Li 等的方法计算:  $GS=2X_{12}/(X_1+X_2)$ ,  $GD=-\ln GS$ 。其中  $X_1$ 、 $X_2$  分别为成对比较的两个品种

的扩增带数,  $X_{12}$  为这 2 个品种的共有带数。利用 Cluster 软件分析, 非加权类平均法(UPGMA)构建聚类图。组内品种间平均遗传距离  $GD_A=\sum(GDi/[n(n-1)]/2)$ ,  $n$  为组内品种数,  $i=1, \dots, n$ 。品种间平均遗传距离的差异显著性检验采用 SAS 软件分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 SRAP 标记的多态性

为了有效地寻找具有多态性的引物组合, 用 4 个具有代表性的品种对 240 个 SRAP 引物组合的多态性

进行筛选,得到 93 个扩增后带型好、品种间带型差异明显、易于识别的引物组合。最后实际用于检测的只有其中的 25 个引物组合(表 3)。每个引物组合产生 10~50 个扩增带,25 个引物组合共产生 509 个,平均每个引物组合产生 20.4 个。每个引物组合产生 2~12 个多态性带,25 个引物组合共产生 123 个多态性带,平均每个引物组合产生 4.9 个多态性带。每个引物组合产生的多态性带的比例为 12%~60%,平均为 24%。图 1 是引物组合 Em4-Me4 的 SRAP 扩增反应的产物模式。在大于 800 bp 的区域,扩增带多且密,不易辨认,故不予记录。在 100~800 bp 范围内,扩增带易于辨认记录,故多态条带多来自这一部分。小于 100 bp 的扩增带多数较弱,不易辨认,所以也不予记录。

## 2.2 聚类分析

在聚类图(图 2)中,具有共同亲缘关系的品种由于遗传距离很小首先聚类,如中双 3 号与农林 27 (GD 0.08)、沪油 15 号与沪油 16 (都有汇油 50 的血

缘, GD 0.10)、陇油 1 号与 Westar (均有 Midas 血缘, GD 0.06)、8908A、6098A、6098A×R6、8908A×R6、6098A×R2、R2 与 R6 (GD 0.08)、苏油 158 (史力丰)与苏油 1 号(均有荣选血缘, GD 0.08)、黔油 14 号与黔油 18 号(GD 0.06)、早丰 4 号与早丰 5 号(GD 0.08)、当油早 1 号与甘油 5 号 (GD 0.08)、中双 5 号与中双 6 号(含有中油 821 的血缘, GD 0.05)。这些品种间的遗传距离均在 0.05 到 0.10 之间。Dong-Hae23 和 III227 之间的遗传距离近于 0.0233,几乎是同一材料。在遗传距离 0.12 处,可将 130 份甘蓝型油菜品种分为 A、B、C、D 类,它们分别包括 3、16、102 和 5 个品种,划分到 A、B、D 3 类中的品种为 24 个,占总品种的 18.5%,其它 102 个品种归到 C 类中,占 78.5%,说明中国育成的油菜品种的遗传多样性较匮乏。A 类群为国外引进的品种和宁油 14 号;B 类群为引进品种及国内育成的甘蓝型油菜品种;C 类群包含了中国大部分甘蓝型油菜品种;D 类群为混合类群。在遗传距

表 3 SRAP 引物组合、扩增带数及多态性带数

Table 3 Total and polymorphic fragments number per SRAP primer combination

序号 Code	引物组合 Primer combination	总带数 No. of total fragments	多态性带数 No. of polymorphic fragments	多态性比率 Percentage of polymorphic fragments (%)
1	Em1-Me7	20	12	60.0
2	Em1-Me9	10	4	40.0
3	Em1-Me10	18	6	33.3
4	Em1-Me12	19	5	26.3
5	Em1-Me14	20	4	20.0
6	Em1-Me15	11	3	27.3
7	Em1-Me18	15	3	20.0
8	Em2-Me6	13	4	30.7
9	Em2-Me22	50	8	16.0
10	Em2-Me23	20	6	12.0
11	Em3-Me4	18	6	33.3
12	Em3-Me6	12	3	25.0
13	Em3-Me7	15	4	26.7
14	Em3-Me14	10	2	20.0
15	Em4-Me4	18	4	22.2
16	Em4-Me9	28	4	14.3
17	Em4-Me14	20	7	35.0
18	Em4-Me15	26	5	19.3
19	Em5-Me5	16	4	25.0
20	Em5-Me13	30	5	16.7
21	Em5-Me16	30	4	13.3
22	Em6-Me1	20	7	35.0
23	Em6-Me12	30	5	16.7
24	Em8-Me17	20	5	25.0
25	Em10-Me19	20	3	15.0
	总数 Total	509	123	-
	平均 Average	20.4	4.9	24.0

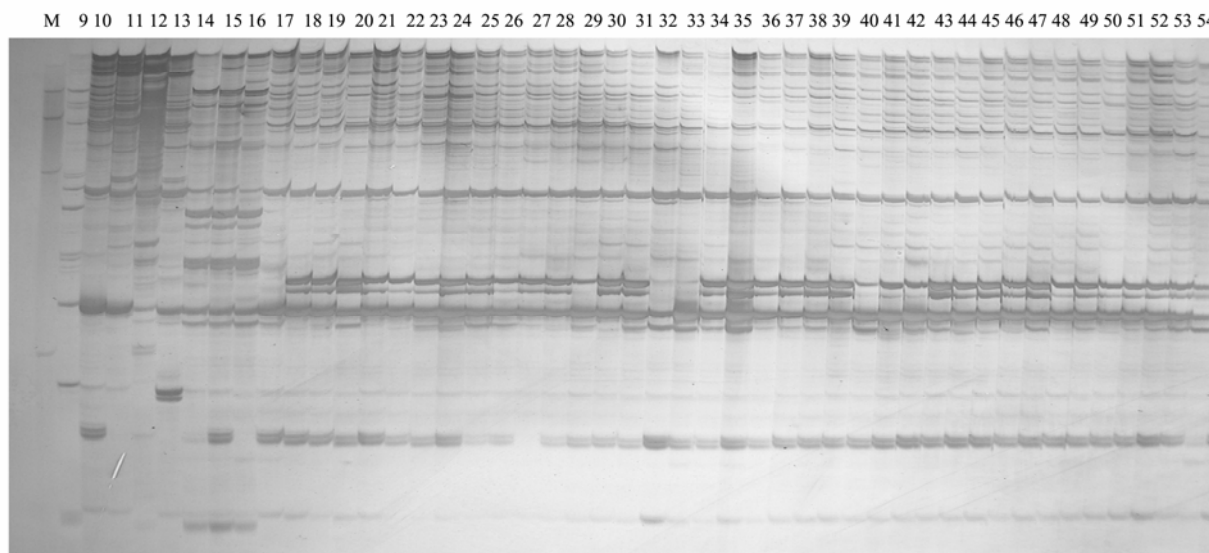


图 1 引物 Me4—Em14 扩增的 SRAP 图谱(左侧为 100 bp 的标准分子量, 品种代码见表 1)

Fig.1 SRAP fingerprint of 46 *B. napus* L. accessions generated by primer combination Me4—Em14 with a 100 bp ladder on left side (The accession codes are the same as those shown in table 1)

离 0.10 处, 又可将 C 群划分为 I、II、III、IV、V 5 个亚群。其中第 I 亚群包括 5 个品种, 它们含有 Midas 的血统; 第 II 亚群包括 17 个品种, 其中 9 个品种来自中国农业科学院油料所; 第 III 亚群包括 76 个品种, 主要为从欧洲引进的品种、含有欧洲品种血缘的品种、含有中油 821 血缘的品种以及一些其它品种。这一亚群的品种占总参试品种的 58.5%, 进一步说明中国的甘蓝型油菜品种的遗传多样性较匮乏; 第 IV 亚群包括 2 个品种 (沪油 12 号和川油 17 号); 第 V 亚群包括 3 个品种, 均为西南农业大学的品种。但是聚类结果也有例外, 如由胜利油菜系统选育或辐射诱变育成的新华 2 号、云油 6 号、安康胜利油菜、甘油 5 号、云油 8 号、早熟胜利油菜并没有聚在同一类。这可能是胜利油菜在中国引种时间较长, 在不同生态条件下发生了较大变异。8098A×R2 也没有与 8098A 和 R2 聚在同一类, 可能的原因是误差造成。从聚类结果来看, 中国育成的品种与国外 (主要是欧洲品种) 聚在同一类, 没有分开, 这与中国甘蓝型油菜从一开始就由国外引进、近来品质育种更是大量使用国外品种做优质亲本有关。

### 2.3 品种遗传基础

2.3.1 不同时期甘蓝型油菜遗传基础比较 对中国育成年限明确的 59 个品种, 按 1980 年以前、1981~1990、1991~2000 和 2000 年以后 4 个时期, 比较这 4

个时期育成的品种的遗传基础。由表 4 可以看出, 1980 年以前的品种的遗传距离的变动幅度和平均遗传距离最小, 而 1981~1990 年期间育成的品种的遗传距离的变动幅度比 1980 年前育成的品种有所上升, 而且其变动幅度和平均值为这 4 个阶段中的最大值。1991~2000 年间的品种的遗传距离 1981~1990 年的有所下降。2000 年以后的品种的遗传距离更进一步下降。差异显著性测验结果表明, 1991~2000 年间与 2000 年以后育成的品种间的平均遗传距离差异不显著, 80 年代前育成品种与 80 年代育成的品种平均遗传距离间差异达到 0.01 显著水平, 80 年代与 90 年代育成的品种间遗传距离差异达到 0.05 的显著水平。这个结果与中国甘蓝型油菜育种的实际情况相符。20 世纪 80 年代前, 育成的油菜品种较少, 大部分由胜利油菜、跃进油菜系统选育、辐射诱变或杂交选育而成, 钱秀珍对 1950~1982 年中国育成的甘蓝型油菜品种系谱分析表明含有胜利油菜血缘的品种占 97.33%<sup>[3]</sup>。而 1980 年以后, 中国在全国范围内开展油菜育种攻关, 育成的品种增多, 因此这个时期的油菜品种的遗传多样性增加。1991~2000 年, 杂种优势利用替代常规育种成为全国油菜育种的主攻方向, 选育的油菜常规品种数量减少, 致使品种间遗传距离变小。2000 年以后, 这个情况持续 (表 4)。



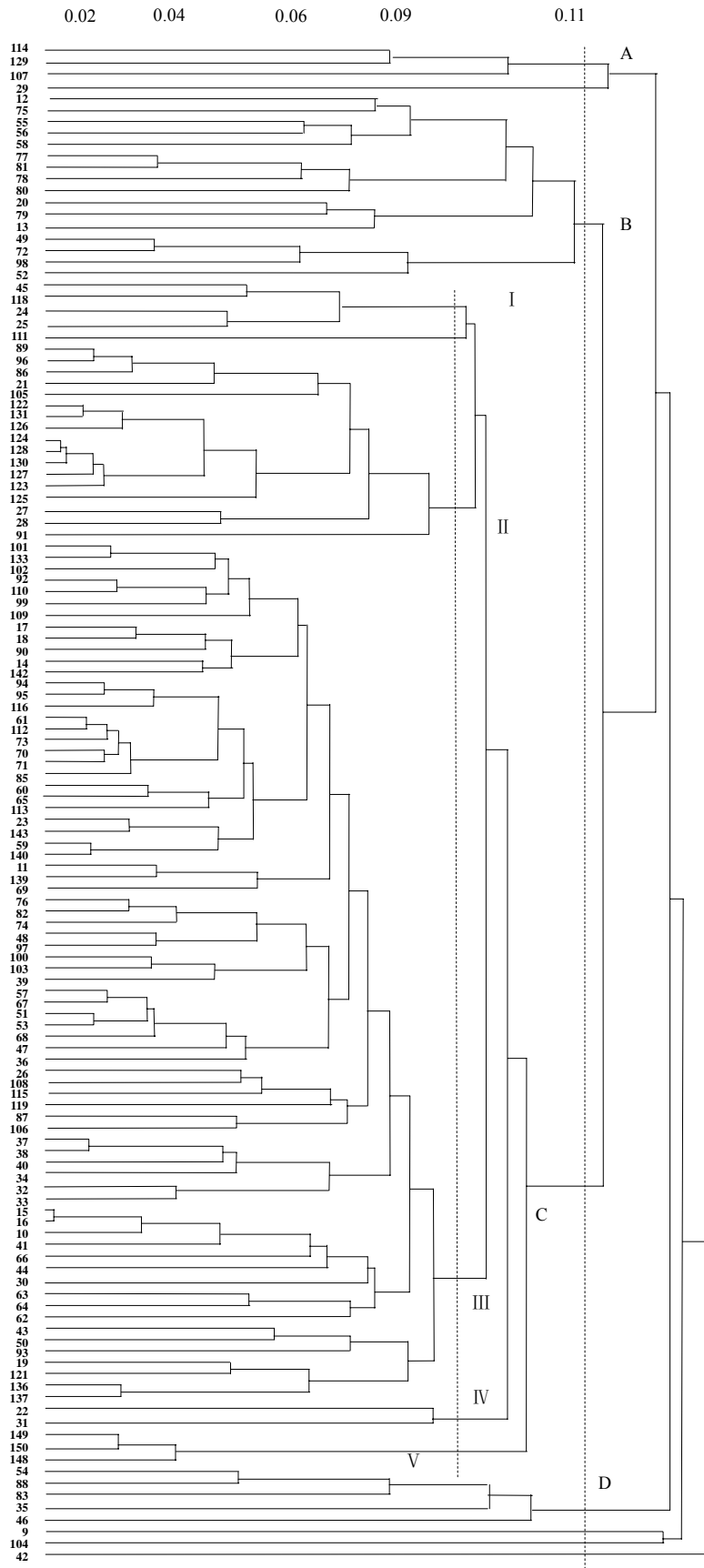


图 2 130 个甘蓝型油菜品种的 SRAP 标记聚类图 (品种代码与表 1 相同)

Fig. 2 Dendrogram of genetic relationship among 130 *B. napus* L. accessions detected by SRAP (The accession codes are the same as those shown in Table 1)

表 4 不同时期育成的甘蓝型油菜品种遗传距离

Table 4 Genetic distances of *B. napus* L. accessions bred in different time periods

年代 Period	品种数 Accession number	最小遗传距离 Minimum genetic distance	最大遗传距离 Maximum genetic distance	平均遗传距离 <sup>1)</sup> Average genetic distance
1980 年以前 Before 1980	18	0.0578	0.2530	0.1452 a
1981~1990	13	0.1001	0.3920	0.1966 c
1991~2000	18	0.0493	0.3327	0.1779 b
2000 年以后 After 2000	10	0.0606	0.2877	0.1726 b

<sup>1)</sup> 带有不同字母的平均遗传距离在 0.05 水平上差异显著

Mean genetic distances followed by different letters are significantly different according to LSD at 0.05 level

2.3.2 引进品种与国内育成品种的遗传基础 对 23 个国外引进品种和 107 个国内育成的品种进行遗传距离分析的结果表明, 国内育成品种的遗传距离变幅较大, 达到 0.0377~0.4193。国外引进品种的遗传距离的变动幅度较小, 为 0.0606~0.2917。国内育成品种

的平均遗传距离比引进品种的平均遗传距离大, 二者差异达到 0.01 的极显著水平。结果说明尽管中国的甘蓝型油菜是由国外引进的, 但经过广大育种工作者的不懈努力, 选育出了适合中国不同生态区的、具有更大变异的材料和品种 (表 5)。

表 5 引进和国内育成油菜品种遗传距离

Table 5 Genetic distances between *B. napus* L. accessions introduced and bred in China

来源 Origin	品种数 Accession number	最小遗传距离 Minimum genetic distance	最大遗传距离 Maximum genetic distance	平均遗传距离 <sup>1)</sup> Average genetic distance
引进品种 Introduced cultivars	23	0.0606	0.2917	0.1676 a
国内育成品种 Cultivars bred in China	107	0.0377	0.4193	0.1760 b

<sup>1)</sup> 带有不同字母的平均遗传距离在 0.01 水平上差异显著

Mean genetic distances followed by different letters are significantly different according to LSD at 0.01 level

### 3 讨论

SRAP 标记是在总结已有的 DNA 分子标记的优缺点的基础上开发的一种新的基于 PCR 的 DNA 分子标记技术。SRAP 标记引物设计简单, 17 bp 的正向引物、18 bp 的反向引物以及 50℃ 的退火温度保证了扩增结果的稳定性。正向引物的 CCGG 和反向引物的 AATT 的核心序列使得 SRAP 标记主要是对开放阅读框 (ORF) 进行扩增, 提高了扩增结果与表现型的相关性。由于采用 PCR 扩增, 不需要像 RFLP 标记那样要求高纯度和高浓度的 DNA 和使用放射性同位素, 不需要像 SSR 标记那样花费人力物力进行引物开发, 比 RAPD 标记稳定, 不需要像 AFLP 那样需要预扩增和连接, 但扩增结果的多态性可与 AFLP 标记相媲美。SRAP 标记的这些优点已经在甘蓝、拟南芥、桃、野牛草、草坪草、西葫芦、笋瓜和棉花的研究<sup>[5-14]</sup>上得到证实。本研究中每对引物组合的多态性带数(4.9 个)与 Budak 等<sup>[8]</sup>对野牛草品种研究的多态性带数 8 个、Ferrilo 等<sup>[11]</sup>对西葫芦种质研究的 5.8 个和林忠旭等<sup>[14]</sup>对棉花研究的 5.14 个相近。但不同研究中, 扩增带的

多态性比例差异较大, 例如 Budak 等<sup>[8]</sup>对野牛草的研究中为 95%, Ferriol 等<sup>[11,12]</sup>对西葫芦和笋瓜的研究中为 72.7%, 而本研究中仅为 24%。这可能与所研究的材料的类型有关。本研究使用的为遗传关系相近的甘蓝型油菜品种, 而 Budak<sup>[8]</sup>和 Ferriol 等<sup>[11,12]</sup>的研究中所用的材料包括不同种间的、多种倍性的、遗传关系较远的不同种质资源。

本研究在国内外首次采用 SRAP 标记对甘蓝型油菜的遗传多样性进行分析, 结果表明 SRAP 标记是一种经济、有效和可靠的分子标记技术, 与前人的结果一致。在 0.12 的遗传距离处, 将这些油菜品种分为 A、B、C、D 类, C 类中有 102 个品种, 占供试材料的 78.5%, 其它 3 个类群品种只有 24 个, 占 18.5%。C 类群在遗传距离 0.10 处, 又可分为 I、II、III、IV、V 等 5 个亚群。在第 III 亚群中, 有 76 个品种, 占供试品种的 58.5%, 说明中国育成的甘蓝型油菜的遗传多样性较匮乏, 这个结果与钱秀珍等<sup>[3]</sup>的系谱分析结果一致。中国育成的甘蓝型油菜品种与引进品种在聚类时没有明显分开, 这可能是由于本试验所用的国外品种多为中国引进、已经在生产上直接应用或作为亲本间接利

用。而在孟金陵等<sup>[17]</sup>用 RFLP 标记、伍宁丰等<sup>[18]</sup>用 RAPD 标记、马朝芝等<sup>[19]</sup>用 ISSR 标记对中国和国外甘蓝型油菜品种进行的遗传多样性分析中, 国内与国外品种被分到不同的类群中, 原因是这些研究中所用的国外品种多数为国外生产上应用、而并未引入中国的品种。本研究所选材料为各区域不同时期有重大影响的 130 个品种, 与前人研究相比, 所选材料数量更大、更全面、更具代表性。

尽管在聚类分析中中国育成的品种与国外引进的品种没有明显分开, 但这 2 类品种的平均遗传距离的差异达到 0.01 的极显著水平, 因此这 2 类品种间可能存在较强的杂种优势。根据各个时期的品种间遗传距离分析, 1980 年代以前的品种遗传基础较窄, 80 年代达到最大, 但 90 年代以后甘蓝型油菜品种的遗传基础略有下降, 2000 年后的品种进一步下降。其原因可能是在 20 世纪 80 年代前, 中国油菜品种的亲本多半来自胜利油菜和跃进油菜。随着改革开放和国际合作的开展, 中国引进了一批外国甘蓝型油菜种质, 展开了全国油菜育种攻关, 育成品种类型和数量增多。但近年来, 杂种优势利用成为油菜育种的主攻目标, 常规品种的选育受到冷落, 从而导致近年来育成的常规品种数量减少, 品种遗传基础变窄。因此, 在甘蓝型油菜育种中, 以后应在重视杂交种选育的同时, 重视常规品种的选育, 尤其是优异种质资源的创新。

#### 4 结论

本研究在国内外首次将 SRAP 这种新的 DNA 分子标记运用到甘蓝型油菜的遗传多样性和遗传基础研究上。结果表明, SRAP 标记的引物设计和实验操作过程简单, 扩增谱带清晰, 结果稳定, 每对引物扩增的谱带和多态性谱带分别达到 20.4 个和 4.9 个, 是一种吸收了 RFLP、RAPD、SSR 和 AFLP 标记的优点、而又克服了它们的一些缺点的一种新型 DNA 分子标记。在遗传距离为 0.12 处, 将 130 个甘蓝型油菜品种(系)分为 A、B、C、D 等 4 个类群, 其中 78.5% 的品种归入 C 类。C 类又可在遗传距离 0.10 处分为 I、II、III、IV、V 等 5 个亚群, 58.5% 的品种归入 III 亚群。结果说明中国近 60% 甘蓝型油菜品种遗传多样性较匮乏。中国育成的品种与引进品种聚类图上没有完全分开, 但二者品种间的遗传距离差异达到 0.01 的极显著水平。遗传基础分析结果表明 1980 年前育成的品种遗传基础最窄, 80 年代最宽, 90 年代略有下降, 2000 年后育成的品种遗传基础进一步下降。差异显著性测

验表明, 1980 年前的品种与 80 年代育成的品种遗传距离差异达到 0.01 的极显著水平, 80 年代育成的品种与 90 年代育成的品种间遗传距离差异达到 0.05 的显著水平, 90 年代育成的品种与 2000 年后育成的品种间遗传距离差异不显著。上述结果表明 SRAP 标记是一种新的有效而可靠, 简单又经济的分子标记手段。

#### References

- [1] 刘后利. 油菜的遗传和育种. 上海: 科学技术出版社, 1987: 261-288.
- Liu H L. *Rapeseed Genetics and Breeding*. Shanghai: Scientific Technology Press, 1987: 261-288. (in Chinese)
- [2] 刘后利. 几种芸薹属油菜的起源和进化. 作物学报, 1984, 10 (1): 9-18.
- Liu H L. Origin and evolution of genus *Brassica* oilseed rapes. *Acta Agronomica Sinica*, 1984, 10 (1): 9-18. (in Chinese)
- [3] 钱秀珍. 我国甘蓝型油菜品种(系)的系谱初析. 中国油料, 1985, (2): 11-14.
- Qian X Z. Pedigree analysis of *B.napus* in China. *Oil Crops of China*, 1985, (2): 11-14. (in Chinese)
- [4] 方宣钧, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种. 北京: 科学出版社, 2002: 1-9.
- Fang X J, Wu W R, Tang J L. *DNA Marker Assisted Crop Breeding*. Beijing: Sciences Press, 2002: 1-9. (in Chinese)
- [5] 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*. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103: 455-461.
- [6] Li G, Gao M, Yang B, Quiros C F. Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 168-180.
- [7] Ahmad R, Potter D, Southwick S M. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular marker. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 2004, 129 (2): 204-210.
- [8] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, Gaussoin R E, Riordan T P, Dweikat I. Molecular characterization of buffalograss germplasm using sequence-related amplified polymorphism markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 108: 328-334.
- [9] Budak H, Shearman R C, Gaussoin R E, Dweikat I. Application of sequence-related amplified polymorphism markers for characterization of turf grass species. *Hortscience*, 2004, 39: 955-958.
- [10] Budak H, Shearman R C, Parmaksiz I, Dweikat I. Comparative

- analysis of seeded and vegetative biotype buffalograsses based on phylogenetic relationship using ISSRs, SSRs, RAPDs and SRAPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 2004, 109: 280-288.
- [11] Ferriol M, Pioó B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2003, 107: 271-282.
- [12] Ferriol M, Pioó B, Nuez F. Morphological and molecular diversity of a collection of *Cucurbita maxima* landraces. *Journal of American Society for Horticultural Science*, 2004, 129 (1): 60-69.
- [13] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清. 棉花 SRAP 遗传连锁图构建. *科学通报*, 2003, 48: 1676-1679.
- Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C, He D H, Wu M Q. Construction of cotton genetic linkage maps with sequence-related amplified polymorphism. *Newsletter of Sciences*, 2003, 48: 1676-1679. (in Chinese)
- [14] 林忠旭, 张献龙, 聂以春. 新型标记 SRAP 在棉花 F<sub>2</sub> 分离群体及遗传多样性评价中的适用性分析. *遗传学报*, 2004, 31: 622-626.
- Lin Z X, Zhang X L, Nie Y C. Evaluation of application of a new molecular marker SRAP on analysis of F<sub>2</sub> segregation population and genetic diversity in cotton. *Acta Genetica Sinica*, 2004, 31: 622-626. (in Chinese)
- [15] 李 佳, 沈斌章, 韩继祥. 一种有效提取油菜叶片总 DNA 的方法. *华中农业大学学报*, 1994, 13(5): 51-62.
- Li J, Shen B Z, Han J X. An efficient method for extracting genome DNA from rapeseed leaves. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1994, 13(5): 521-523 (in Chinese).
- [16] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 应用于油菜研究的简便银染 AFLP 标记技术的构建. *华中农业大学学报*, 2001, 20: 413-415
- Lu G Y, Yang G S, Fu T D. Silver-Stained AFLP-A novel assay for DNA fingerprinting in *Brassica napus*. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20: 413-415. (in Chinese)
- [17] 孟金陵, Sharpe A, Bowman C, 田志宏, 傅廷栋, 钱秀珍, Lydite D. 用 RFLP 标记分析甘蓝型油菜的遗传多样性. *遗传学报*, 1996, 23(4): 293-306.
- Meng J L, Sharpe A, Bowman C, Tian Z H, Fu T D, Qian X Z, Lydite D. Genetic diversity of *Brassica napus* detected with RFLP markers. *Acta Genetica Sinica*, 1996, 23(4): 293-306. (in Chinese)
- [18] 伍宁丰, 李汝刚, 伍晓明, 朱 莉, 范云六, 钱秀珍. 中国甘蓝型油菜遗传多样性的 RAPD 分子标记. *生物多样性*, 1997, 5(4): 246-250.
- Wu N F, Li R G, Wu X M, Zhu L, Fan Y L, Qian X Z. RAPD molecular markers and genetic diversity among 40 cultivars of *Brassica napus* in China. *Chinese Biodiversity*, 1997, 5(4): 246-250. (in Chinese)
- [19] 马朝芝, 傅廷栋, Tuevesson S, Gertsson B. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性. *中国农业科学*, 2003, 36: 1403-1408.
- Ma C Z, Fu T D, Tuevesson S, Gertsson B. Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L.) analysed by inter-simple sequence repeats (ISSRs). *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36: 1403-1408. (in Chinese)

(责任编辑 于 竞, 孙雷心)