

用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性

马朝芝¹, 傅廷栋¹, Stine Tuevesson², Bo Gertsson²

(¹ 华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070; ² Svalof Weibull AB, S-26881 Svalov, 瑞典)

摘要: 利用 ISSR(inter-simple sequence repeats)技术比较了 24 份中国半冬性、瑞典冬性和瑞典春性油菜的遗传多样性。20 个引物扩增出了 125 条多态性带。UPGMA 聚类分析将 24 份材料分为 3 组。第一组为 6 份瑞典冬性和 8 份中国半冬性材料, 第二组为 2 个中国半冬性材料湘油 15 号和保 81, 第三组为 8 份瑞典春性材料。主成分分析结果与聚类分析结果相似, 表明研究所用中国半冬性、瑞典冬性和瑞典春性 3 类材料彼此间区分明显, 中国半冬性油菜与瑞典冬性油菜的遗传关系比与瑞典春性油菜的关系近。结果显示, ISSR 技术是估计油菜种质资源遗传多样性的有效手段。

关键词: 甘蓝型油菜; 遗传多样性; ISSR

S635 A

Genetic Diversity of Chinese and Swedish Rapeseed (*Brassica napus* L.) Analysed by Inter-simple Sequence Repeats (ISSRs)

MA Chao-zhi¹, FU Ting-dong¹, Stine Tuevesson², Bo Gertsson²

(¹ National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan, China 430070;

² Svalof Weibull AB, S-26881 Svalov, Sweden)

Abstract: Genetic diversity of 24 Chinese weak-winter, Swedish winter and spring *B. napus* accessions by inter-simple sequence repeats (ISSRs) was compared. By cluster analysis (UPGMA) based on 125 polymorphism bands amplified with 20 primers, all 24 accessions were divided into three groups. Six Swedish winter lines and eight Chinese weak-winter lines were in the group I and two Chinese weak-winter lines 'Xiangyou15' and 'Bao811' were in the group II. The third group were eight Swedish spring lines. Principal co-ordinates analysis (PCO) showed similar groupings to cluster analysis. Results from cluster analysis and PCO analysis showed very clearly that Chinese weak-winter, Swedish spring and winter accessions were distinguished from each other and Chinese weak-winter accessions in this study were genetically closer to Swedish winter accessions than to Swedish spring accessions, and that Chinese weak-winter accessions had larger diversity than Swedish spring or winter accessions. As this study indicated above, ISSR is a suitable and effective tool to evaluate genetic diversity among rapeseed germplasms.

Key words: *Brassica napus* L.; Genetic diversity; Inter-simple sequence repeats (ISSRs)

油菜具有强的杂种优势^[1,2]。双亲的遗传差异越大, 杂交种的杂种优势越强^[3]。因此, 可根据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。

中国的油菜栽培面积和总产约占世界的1/3^[4]。

瑞典也有一定的油菜生产面积, 其选育的油菜在加拿大、德国等国家种植广泛。瑞典的油菜春性或冬性较强, 需满足一定的长日照或低温才能正常进行花芽分化, 而中国油菜对光照或温度不很敏感。到目前为止, 尚未见中国油菜和瑞典油菜遗传多样性

收稿日期: 2002-06-03

基金项目: 欧盟资助项目(IC18-CT97-0172)

作者简介: 马朝芝(1968-), 女, 湖北公安人, 副教授, 博士, 主要从事油菜杂种优势和分子生物学的研究。E-mail: czma@public.wh.hb.cn。傅廷栋为通讯作者, Tel: 027-87287007; Fax: 027-87287209

比较的研究报道。

DNA 分子标记技术是估计遗传多样性的理想工具。用于油菜遗传多样性研究的标记类型有 RFLP^[5-7]、RAPD^[8,9]、SSR^[10]和 ISSR^[11]。RFLP 技术的突出优点是稳定,但费时、成本高,并且技术性要求高;RAPD 技术简单、快速、操作方便,DNA 用量少,但稳定性和重复性存在问题;SSRs 标记位点特异性强,但引物序列的设计费时、成本高,每反应检测到的位点数少。ISSR 是最近发展起来的标记技术,它克服了 RFLP 和 RAPD 的限制^[12,13]。

笔者运用 ISSR 分子标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性,以期分子标记技术在油菜杂种优势育种上的应用提供参考。

1 材料与 方法

1.1 材料

实验材料为 24 份甘蓝型油菜,包括 10 份中国半冬性(其中 1 份为自交不亲和系),8 份瑞典春性和 6 份瑞典冬性材料(表 1)。

表 1 研究所用材料名称、来源和特性

Table 1 List of materials used in the study

代号 Code	品种/系 Cultivar/line ¹⁾	来源 Sources ²⁾	类型 Type	指定名 Assigned name
1	99-420395	中国湖北 Hubei, China	半冬性 Weak-Winter	C1
2	Sponsor	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S1
3	SI1300 ¹⁾	中国湖北 Hubei, China	半冬性 Weak-Winter	C2
4	Pastell	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	冬性 Winter	W1
5	Kvintett	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	冬性 Winter	W2
6	SW0754	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	冬性 Winter	W3
7	SW0756	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	冬性 Winter	W4
8	SW0742	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	冬性 Winter	W5
9	Banjo	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	冬性 Winter	W6
10	Maskot	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S2
11	Senator	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S3
12	Estrade	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S4
13	Canyon	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S5
14	Puma	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S6
15	SW9522170	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S7
16	SW9623628	瑞典 Svalof Weibull, Sweden	春性 Spring	S8
17	上海 9715 Shanghai9715	中国上海 Shanghai, China	半冬性 Weak-Winter	C3
18	沪油 12 Huyou12	中国上海 Shanghai, China	半冬性 Weak-Winter	C4
19	沪油 14 Huyou14	中国上海 Shanghai, China	半冬性 Weak-Winter	C5
20	湘油 15 Xiangyou15	中国湖南 Hunan, China	半冬性 Weak-Winter	C6
21	保 81 Bao81	中国湖北 Hubei, China	半冬性 Weak-Winter	C7
22	周 668 Zhou668	中国湖北 Hubei, China	半冬性 Weak-Winter	C8
23	89008	中国湖北 Hubei, China	半冬性 Weak-Winter	C9
24	华双 3 号 Huashuang3	中国湖北 Hubei, China	半冬性 Weak-Winter	C10

¹⁾ 自交不亲和系; ²⁾ 选育地

¹⁾ A self-incompatible line; ²⁾ Place where come from

1.2 DNA 提取和 ISSR 分析

用打孔器取苗龄 14 d 的叶片(约 20 mm²),放入 96 孔板,保存在 -70℃ 冰箱备用。DNA 提取依照 Cheung 的程序^[14]。扩增反应混合物成分为:1 μl DNA(约 50ng),2.5 μl 10× 缓冲液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl pH 8.0,500 mmol·L⁻¹ KCl,20 mmol·L⁻¹ Mg-Cl₂和 0.2% Gelatin),0.2 μl d'NTPs(100 mmol·L⁻¹),0.33 μl primer(15 mmol·L⁻¹),0.1 μl Taq 聚合酶(5 U·ml⁻¹,Sigma),加水至终体积为 25 μl。所用 20 个引物来自于加拿大哥伦比亚大学。

扩增反应程序为 94℃ 预变性 1 min;94℃ 1 min,55℃ 2 min,72℃ 0.5 min,扩增 30 循环;最后

72℃ 延伸 5 min^[11]。反应在 PTC-225 型 PCR 仪(MJ Research)上进行。扩增产物在变性聚丙烯酰胺胶 precast Clean Gel 48 s(Pharmacia LKB Biotechnology)上分离,银染检测^[11]。

1.3 数据分析

扩增结果记为出现“1”或缺失“0”,只统计多态性扩增带。数据分析用软件 POPGENE VERSION 1.31(Francis C Y and Rong-cai Y,http://www.ualberta.ca/~fyeh/)完成。相似矩阵和遗传距离(genetic distance,GD)依 Nei 的方法^[15],聚类方法为 UPGMA。相似矩阵用于做主成分分析,依引起变异最大的主成分(第一主成分)和其次的主成分(第二主成分)

做出材料的分布图。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

24 份材料间检测到了丰富的遗传多样性(图 1)。20 个引物(表 2)扩增出了 125 条多态性带,每条引物扩增出 1~12 条,平均为 6.26 条多态性带。

依据 125 条多态性扩增带,得到了材料间的遗传距离(GD)矩阵。表 3 列出了一些材料间 GD 的最大值、最小值和平均值等。10 份中国油菜的平均 GD 为 0.387,显著地高于 6 份瑞典冬性材料(0.246)和 8 份瑞典春性油菜(0.281)。表明笔者所用中国油菜有较瑞典冬性或瑞典春性更丰富的遗传多样性。

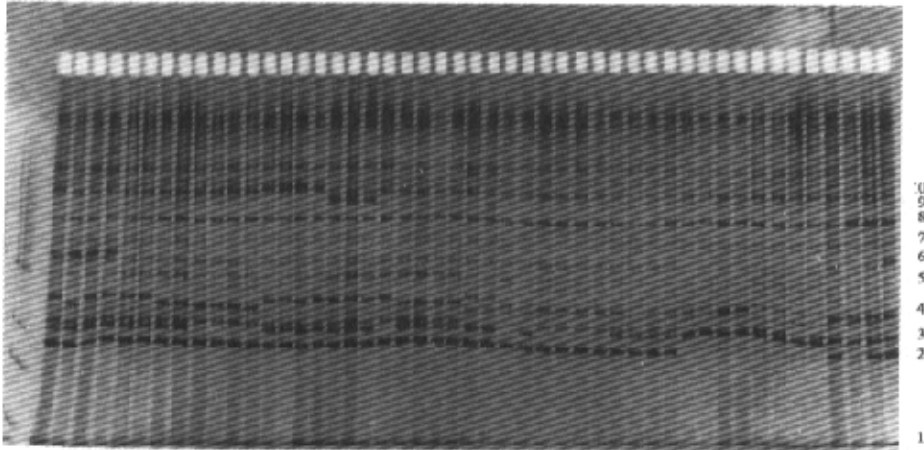


图 1 引物 UBC 841 扩增的 ISSR 图谱(两侧为 100bp 的标准分子量)

Fig.1 PCR-amplified inter-simple sequence repeat patterns with primer UBC 841 (Lanes on two sides are 100 bp ladder markers)

表 2 引物名称、序列和扩增出的多态性带数目

Table 2 Primers, their sequence and the polymorphic bands scored

引物 Primer	序列 ¹⁾ Sequence	多态性扩增带数目 Number of polymorphic bands among				分子量范围 Size range (bp)
		合计 Total	春性 Spring	冬性 Winter	半冬性 Weak-winter	
807	ACA GAG AGA GAG AGA GT	7	6	6	7	400~1 300
808	AGA GAG AGA GAG AGA GC	6	5	5	6	310~1 100
814	CTC TCT CTC TCT CTC TA	3	3	0	3	480~1 600
816	CAC ACA CAC ACA CAC AT	12	10	7	9	420~1 700
823	TCT CTC TCT CTC TCT CC	5	4	4	5	650~1 300
825	ACA CAC AGA CAC ACA CT	2	2	2	2	850~1 050
834	ACA GAG AGA GAG AGA GYT	12	9	11	12	190~1 200
835	AGA CAG AGA GAG AGA GYC	10	9	9	10	260~1 600
840	GAG AGA GAG AGA GAG AYT	8	8	4	8	200~900
841	CAG AGA GAG AGA GAG AYC	7	7	7	7	280~1 100
847	CAC ACA CAC ACA CAC ARC	2	2	2	2	740~770
866	CTC CTC CTC CTC CTC CTC	3	2	3	3	650~1 500
880	GGA GAG CAG ACC AGA	1	0	1	0	400
884	HBH AGA GAC ACA CAC AC	5	5	2	5	280~1 100
885	BHB GAG AGA GAG AGA GA	2	1	2	1	280~400
887	DVD TCT CTC TCT CTC TC	7	4	4	6	370~1 100
888	BDB CAC ACA CAC ACA CA	7	7	6	6	440~1100
889	DBD ACA CAC ACA CAC AC	6	6	5	6	450~830
890	VHV GTC TGT GTG TGT GT	11	8	8	8	380~910
891	HVH TCT CTC TGT GTC TC	9	6	5	6	470~1 000
合计 Total		125	104	93	112	

¹⁾ Single letter abbreviations for mixed base positions: N = (A, C, C, T), R = (A, G), Y = (C, T), B = (C, G, T) (I.e. not A), D = (A, G, T) (I.e. not C), H = (A, C, T) (I.e. not G), V = (A, C, G) (I.e. not T)

表 3 一些材料间遗传距离的最大值、最小值和平均值

Table 3 Max, Min and average genetic distance of some pairwises

材料间遗传距离 Pairwise ¹⁾	S + C	S + W	W + C	S + S	W + W	C + C
最大值 Max	0.831	0.654	0.693	0.425	0.428	0.546
最小值 Min	0.380	0.375	0.242	0.130	0.088	0.164
误差 Var	0.010	0.005	0.008	0.007	0.007	0.007
平均 Average	0.552	0.504	0.421	0.281	0.246	0.387
n ²⁾	80	48	60	28	15	45

¹⁾ S:瑞典春性材料; C:中国半冬性材料; W:瑞典冬性材料。 ²⁾ GD 的数目

¹⁾ S:Swedish spring accessions; C:Chinese weak-winter accessions; W:Swedish winter accessions. ²⁾The number of pairwises

中国材料与瑞典春性材料间的平均 GD 最大, 大于瑞典冬性材料与瑞典春性材料间的平均 GD。显示中国材料与瑞典春性材料间的遗传关系较瑞典冬性材料远。

2.2 材料的分组

UPGMA 聚类分析将 24 份材料分为 3 组(图 2): 第一组包括 6 份瑞典冬性材料和除湘油 15 号和保 81 之外的中国材料; 湘油 15 号和保 81 为第二组; 聚在第三组的 8 份材料全部为瑞典春性材料。结果表

明, 中国半冬性、瑞典春性和瑞典冬性彼此间区别明显, 中国材料的遗传多样性丰富, 中国材料与瑞典冬性油菜的遗传关系较春性油菜近。

利用相似矩阵, 进行了主成分分析。图 3 是第一主成分和第二主成分的散点图。第一主成分和第二主成分分别解释总变异的 18.9% 和 11.0%。主成分分析结果与聚类分析的相似: 8 份瑞典春油菜为 1 组, 它们在图 3 的分布区域明显地不同于瑞典冬性油菜和中国半冬性油菜, 6 份瑞典冬性油菜彼

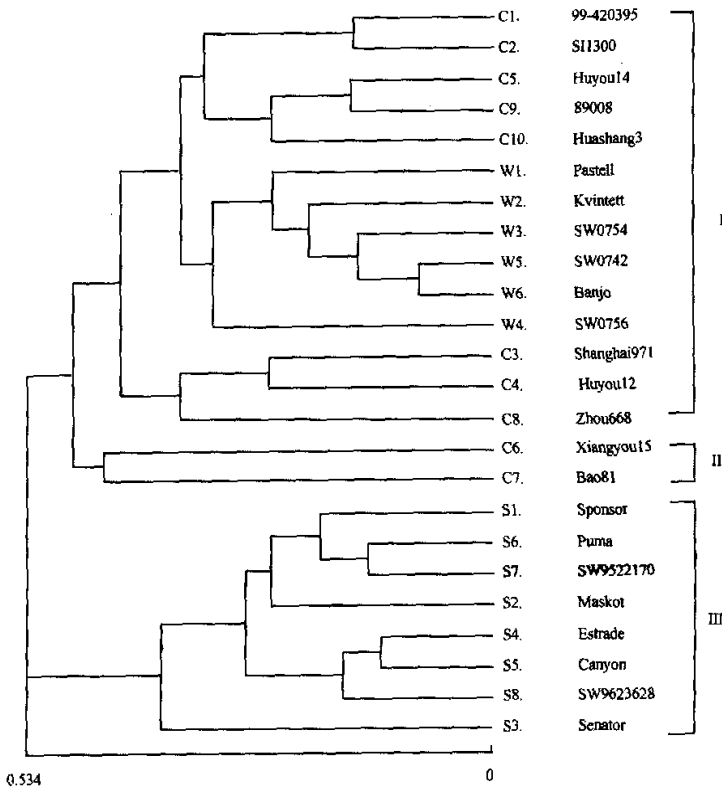
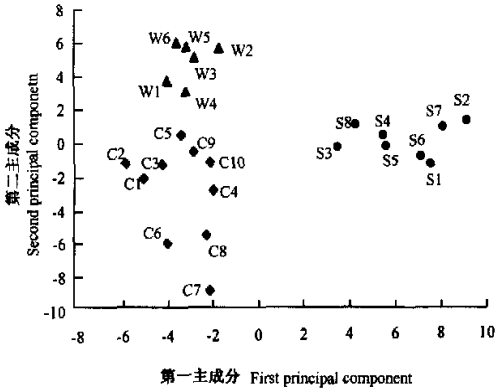


图 2 24 份甘蓝型油菜的 UPGMA 聚类图

Fig.2 Dendrogram for 24 accessions based on ISSR data using UPGMA (unweighted pair-group method with an arithmetic average) method

此在一起,邻近中国半冬性油菜,中国半冬性油菜较松散地分布在一个区域。主成分分析的结果也清楚地表明,笔者研究所用中国半冬性材料具有较瑞典春性、瑞典冬性油菜丰富的遗传多样性,中国半冬性油菜与瑞典冬性油菜的遗传关系较近。



第一主成分和第二主成分分别解释总变异的 18.9% 和 11.0%

The first and second coordinate axes represents 18.9% and 11.0% of the total variation, respectively

▲ 瑞典冬性材料 Swedish winter accessions (W); ● 瑞典春性材料 Swedish spring accessions (S); ◆ 中国半冬性材料 Chinese weak-winter accessions (C)

图 3 24 份甘蓝型油菜依第一主成分和第二主成分的散点

Fig.3 Scatter of 24 accessions by principal co-ordinates analysis (PCO) based on ISSR data

3 讨论

ISSR 引物与基因组简单重复(1~4 核苷酸串联重复)序列互补,包含有短的寡核苷酸锚定序列,保证引物与基因组重复序列的 3'或 5'端结合。因简单重复序列区域在真核基因组内分布很广,且在长度上多态性很高,所以 ISSR 引物能找到大量的多态性位点。Charters^[11]等仅用 2 个引物就得到了在 20 个甘蓝型油菜品种间存在多态性的扩增带 56 条,这 56 条带可区分被研究的 20 个品种。Huang 和 Sun^[16]的研究结果为 15 个引物扩增出 2 071 条 ISSR 片段,其中 62.2% 的片段在甘薯 40 份材料间具有多态性。笔者也检测到 ISSR 丰富的多态性。20 个引物在 24 份材料间扩增出 125 条多态性带,平均为 6.25,其中引物 UBC 816 和 UBC 834 都得到了 12 条多态性扩增带。ISSR 技术能检测出丰富的遗传多态性。

聚类分析和主成分分析的结果都显示瑞典春性甘蓝型油菜与冬性油菜在遗传背景上有明显差距。

其它很多研究^[6,7,10,11]报道过相似的结果,即春性甘蓝型油菜与冬性甘蓝型油菜区别明显。笔者研究中所用春性或冬性材料都是在各自独立的遗传背景下选育得到的,没有尝试过春性与冬性油菜间的杂交以扩大各自种质的遗传变异,因此,它们能保持春、冬性甘蓝型油菜间的遗传差异。Banjo 为 F_1 代,SW0742 是它的恢复系,Banjo 与其恢复系 SW0742 间具有最小的 CD(0.088)。中国半冬性材料 99-420395 是由自交不亲和系 SII300 得到的一个 F_1 杂种,它与 SII300 相聚最近。以上的结果表明聚类分析的结果与系谱关系一致,ISSR 技术可用来揭示油菜的遗传多样性。

了解材料间遗传多样性,有助于选择亲本配制优良杂交种。半冬性、冬性和春性 3 类材料间的遗传多样性大于 3 类材料内的遗传多样性,由此可见,这 3 类材料间的杂交可以扩大各自基因库的遗传差异,同时半冬性、冬性和春性材料间得到的杂交种可能会有强的杂种优势和种子产量潜力。中国半冬性材料间的遗传多样性很丰富,大于瑞典冬性或春性材料的遗传多样性。中国材料间丰富的遗传多样性可能是中国杂交油菜有较强的优势,并得到广泛种植的原因之一。

ISSR 是估计油菜种质资源遗传多样性的一个适合的、有效的手段,中国半冬性,瑞典春性和瑞典冬性材料间杂交得到的 F_1 可能具有较高的杂种优势和种子产量潜力。

References

- [1] Sernyk B R, Steffanson J L. Heterosis in summer rape (*Brassica napus* L.). *Canadian Journal of Plant Science*, 1982, 63:407-413.
- [2] Grant I, Beversdorf W D. Heterosis and combining ability estimates in spring planted oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1985, 27: 472-478.
- [3] 吴景镛. 作物遗传育种工程. 郑州:河南科学技术出版社,2000.
Wu J F. *Engineering Techniques on Crop Genetics and Breeding*. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2000. (in Chinese)
- [4] 傅廷栋主编. 杂交油菜的育种与利用. 武汉:湖北科学技术出版社,1999.
Fu T D. *Breeding and Utilization of Rapeseed Hybrid*. Wuhan: Hubei Science and Technology Press, 1999. (in Chinese)
- [5] Thormann C E, Ferreira M E, Camargo L E A, Tivang J C, Osborn T C. Comparison of genetic relationship estimates within and among cruciferous species based on RFLP and RAPD markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 88: 973-980.
- [6] Diers B W, McVetty P B E, Osborn T C. Relationship between het-

- erous and genetic distance based on restriction fragment length polymorphism markers in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Crop Science*, 1996, 36: 79 - 83.
- [7] 孟金陵, Sharpe A, Bowman C, 田志宏, 傅廷栋, 钱秀珍, Lydi-ate 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, Lydi-ate D. Analysis of genetic diversity by RFLP markers. *Acta Genetica Sinica*, 1996, 23(4): 293 - 306. (in Chinese)
- [8] Mailer R J, Scarth R, Fristensky B. Discrimination among cultivars of rapeseed (*Brassica napus* L.) using DNA polymorphisms amplified from arbitrary primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 87: 697 - 704.
- [9] 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 N 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)
- [10] 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.
- [11] Charters Y M, Robertson A, Wilkinson M J, Ramsey C. PCR analysis of oilseed rape cultivars (*Brassica napus* L ssp. *oleifera*) using 5'-anchored simple sequence repeat (SSR) primers. *Theoretical and Applied Genetics*, 1996, 92: 442 - 447.
- [12] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics*, 1994, 20: 176 - 183.
- [13] Gupta M, Chyi Y S, Romero-Severson J, Owen J L. Amplification of DNA markers from evolutionarily diverse genomes using single primers of simple-sequence repeats. *Theoretical and Applied Genetics*, 1994, 89: 998 - 1 006.
- [14] Cheung W Y, Hubert N, Landry B S. A simple and rapid DNA micro-extraction method for plant, animal, and insect suitable for RAPD and other PCR analysis. *PCR Methods and Application*, 1993, 3: 69 - 70.
- [15] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 1978, 89: 583 - 590.
- [16] Huang J C, Sun M. Genetic diversity and relationships of sweetpotato and its wild relatives in *Ipomoea series Batatas* (Convolvaceae) as revealed by inter-simple sequence repeat (ISSR) and restriction analysis of chloroplast DNA. *Theoretical and Applied Genetics*, 2000, 100: 1 050 - 1 060.

(责任编辑 孙雷心)