

## 甘蓝型油菜一个代表性核心种质的遴选

任丽平<sup>1,2</sup>, 倪西源<sup>2</sup>, 黄吉祥<sup>1,2</sup>, 雷伟侠<sup>2</sup>, 曹明富<sup>1</sup>, 赵坚义<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310021; <sup>2</sup>浙江省农业科学院作物与核技术利用研究所, 杭州 310021)

**摘要:**【目的】分析甘蓝型油菜的遗传多样性, 遴选核心种质。【方法】将来自欧洲、亚洲、加拿大、澳大利亚和中国几个不同地区的甘蓝型油菜 500 余份, 按照其品质特点、地理位置、生长习性分组并按比例取样, 建立由 87 个品种组成的预选核心种质。采用 EST-STS 标记和 SSR 标记对其进行分析, 剔除遗传冗余, 选出代表该 500 余份资源的核心种质并进行分子标记多样性评价和表型特征分析。【结果】在相同的选择背景下, EST-STS 和 SSR 标记的多态性检出率相仿 (39%~40%), 每对 EST 引物与 SSR 引物产生的多态性条带相近。聚类分析在遗传相似系数 0.65 处把 87 个品种分成中国和国外油菜两个类群, 进一步在约 0.70 处类群 I 和类群 II 又分别产生中国“双低”、中国“双高”以及欧洲冬油菜和欧洲春油菜各两个亚组。根据遗传多样性分析, 剔除遗传相似系数大于或等于 0.85 的遗传冗余, 获得 78 个品种的核心种质。【结论】EST-STS 是一种经济、有效具有功能信息的分子标记, 功效与普通 SSR 标记相仿; 遗传多样性和聚类分析结果为甘蓝型油菜 4 个组的划分提供了依据; 78 个品种组成的核心种质保留了预选核心种质的遗传多样性和结构, 可作为本研究中 500 余份品种资源的核心种质加以利用和保存。

**关键词:** 甘蓝型油菜; EST 标记; 遗传多样性; 核心种质

## Core Collection of a Representative Germplasm Population in *Brassica napus*

REN Li-ping<sup>1,2</sup>, NI Xi-yuan<sup>2</sup>, HUANG Ji-xiang<sup>1,2</sup>, LEI Wei-xia<sup>2</sup>, CAO Ming-fu<sup>1</sup>, ZHAO Jian-yi<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310021; <sup>2</sup>Institute of Crop and Nuclear Technology Application, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021)

**Abstract:** 【Objective】 Investigating the genetic diversity and selecting core collection of rapeseed. 【Method】 According to previous researches, 500 accessions from Europe, Asia, Canada, Australia and China were divided into four groups based on their qualities, geographic regions and growth habits. A primary core collection of 87 accessions was sampled from each group in same proportion. EST-STS and SSR markers were applied to measure their genetic diversities, eliminate the genetic redundancy and evaluate diversity indices of molecular markers for developing core collection. Phenotypes of individual core gene pool were analyzed and compared. 【Result】 Under the same selection background, two types of marker showed similar polymorphism rate (39%-40%), and polymorphic fragments number. Cluster analysis divided the 87 accessions into two groups ( I , II ) at similarity coefficient of 0.65, further two subgroups from each group were generated, respectively. A core collection consisted of 78 accessions was constructed after eliminating genetic redundancy above 0.85 genetic similarity coefficients. 【Conclusion】 The results indicated that EST-STS was economic, effective and functional marker with similar efficacy compared with normal SSRs. The genetic diversity and cluster analysis supported the classification of four groups in *Brassica napus*. 78 accessions retaining the most genetic diversity and structure could be utilized and preserved as core germplasm collection for 500 initial rapeseed resources.

**Key words:** *B. napus* L.; EST and SSR; Genetic diversity; Core collection

收稿日期: 2007-09-20; 接受日期: 2008-01-08

基金项目: 浙江省科技厅重大项目 (2005C12019-01); 国家高技术研究发展计划 (“863” 计划) 项目 (2006AA100106)

作者简介: 任丽平 (1981-), 女, 河南许昌人, 硕士研究生, 研究方向为油菜遗传育种和种质资源。通讯作者赵坚义 (1958-), 女, 浙江绍兴人, 研究员, 博士, 研究方向为油菜分子育种。Tel: 0571-86403406; E-mail: jianyi32000@yahoo.com.cn

## 0 引言

【研究意义】作物的遗传多样性是改良品种的基础,对作物品种资源收集、保存进而鉴定评价并实现在作物遗传改良中的科学利用是一项倍受全球重视具有重要现实意义的工作。【前人研究进展】Frankel<sup>[1]</sup>于1984年首次提出了“核心资源”的概念,在过去的20余年中,有关学者分别从各种作物的遗传多样性,核心资源构建方法、构建程序以及核心资源利用方面进行了广泛研究,使各种作物遗传多样性研究得到长足发展,核心资源构建方法逐步完善与成熟。目前对小麦、大麦、花生、芝麻、苜蓿、水稻及多年生野生大豆等作物均利用农艺性状结合分子标记构建了核心资源<sup>[2,3]</sup>。芸薹属中,何余堂<sup>[4]</sup>采用类似方法初步建立了陕西省白菜型油菜核心种质,但在甘蓝型油菜中尚未有核心种质的研究报道。遗传多样性的评价是种质资源保护、开发、利用的基础。利用农艺性状、同工酶和各种分子标记研究国内外甘蓝型油菜资源的遗传多样性前人已有众多报道<sup>[5-12]</sup>,对中国“双低”和“双高”油菜以及欧洲春油菜和冬油菜的遗传差异做了比较。结果显示中国和欧洲油菜存在显著差异,欧洲春油菜和冬油菜分属不同的类群,而中国“双低”油菜和“双高”油菜又相对独立。【本研究切入点】基于EST序列的STS(sequence tagged site)标记是一种新型DNA分子标记,与功能基因信息直接相关,对遗传多样性的研究比其它分子标记更具有优越性,因为它是对基因内部变异的一种直接评价,有可能和形态性状、生理生化特征或某个特定的环境适应性相联系。目前EST标记在挪威云杉、大豆、小麦等植物的遗传多样性研究中得到了广泛应用<sup>[13]</sup>,但尚未有EST标记用于甘蓝型油菜品种的遗传多样性分析的报导。【拟解决的关键问题】本研究从浙江省农业科学院征集的国内外500余份甘蓝型油菜品种,根据前人的研究结果按不同地理来源、选育年份、品质特点、生长特性分成若干初级库并从中选出代表性材料95份,应用EST-STS和SSR标记进行遗传分析,目的在于(1)鉴定EST-STS标记在油菜品种资源遗传分析中的应用效果;(2)确认预选核心种质4个组产生的合理性和依据;(3)较大范围内鉴定不同遗传背景下甘蓝型油菜品种的遗传多样性,为科学合理地设计育种方案提供参考;(4)筛选出浙江省农业科学院至今收集的500余份甘蓝型油菜品种的核心种质,为品种资源的科学管理和合理利用提供依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

依据前人的研究结果将500余份浙江省农业科学院收集的来自欧洲、亚洲其它国家、加拿大、澳大利亚和中国不同地区的甘蓝型油菜品种(多代自交)分成:(1)中国双低(低芥酸和低硫苷)油菜;(2)中国双高(高芥酸和高硫苷)油菜;(3)国外春油菜和(4)国外冬油菜4个组,按比例从中分别抽取来源于不同国家和省份的代表性材料各28,39,13和15份,共95份用于研究,其中8份材料因数据不全未用于分析,实际用于本研究资源87份,作为预选核心样本。以A、B、C和D4个英语大写字母加数字代表每个组中的特定品种(系),4个亚洲其它国家的品种归属于相应中国材料组,87个品种介绍详见表1。

### 1.2 试验方法

1.2.1 DNA样品的提取和田间性状考察 每一品种栽种10株,苗期选取幼嫩叶片混合取样,液氮速冻后在-70℃储存备用。总DNA提取采用略作改动的CTAB法<sup>[14]</sup>。500份材料田间试验在浙江省农业科学院试验田(浙江省杭州市)进行。所有材料随机排列,两行区,行距为0.3m,行长3m,株距为0.15m。田间记载生育期(初花期、终花期、成熟期),长势。收获前每小区取样5株,考察性状有株高、有效分枝部位、一次分枝数、主花序长度、主花序角果数、单株角果总数、角果长度、每果粒数、千粒重、单株产量等10个性状。

1.2.2 标记来源 研究所使用的SSR引物来自Brassica数据库(<http://brassica.bbsrc.ac.uk>)和Piguemal等<sup>[15]</sup>中公布的引物序列。EST标记选自Brassica序列数据库(<ftp://149.155.100.41/pub/brassica/BrassicaDB-DNA>),标记引物由浙江大学农业与生物技术研究所Brassica和Arabidopsis thaliana所共有的基因为基础设计而成,以ZAAS加数字为标记名。引物序列由上海生物工程技术服务公司合成。

1.2.3 EST和SSR分析 PCR反应体系如下:总体积10μl,样品DNA 25ng,内含0.2μl dNTPs(A、T、C、G各10mmol·L<sup>-1</sup>),上游和下游引物各0.5μmol·L<sup>-1</sup>、Taq酶0.5U和1×Buffer(含Mg<sup>2+</sup>0.1μl)。PCR扩增程序是94℃2min后进入20个循环:94℃1min,65℃30s(每个循环下降0.5℃),72℃45s;然后再进入20个循环:94℃1min,55℃30s,72℃45s;72℃8min;16℃保温。PCR扩增产物用6%聚丙烯酰胺

表 1 参试的甘蓝型油菜品种名称、来源、品质及选育年份

Table 1 Material origins, names, code number, qualities and years of release used in the study

分组 Group	编号 Code	品种(系)名称 Variety (Line) name	来源 Origin	选育年份 Year of release	品质 Quality
中国“双低”油菜 Chinese‘00’ quality (Ch-‘00’)	A1	浙双 72 Zheshuang 72	浙江 Zhejiang	2001	00
	A2	浙双 3 Zheshuang 3	浙江 Zhejiang	2001	00
	A3	浙油 18 Zheyou 18	浙江 Zhejiang	2006	00
	A4	浙双 758 Zheshuang 758	浙江 Zhejiang	1998	00
	A5	5802	浙江 Zhejiang	品系 Line	00
	A6	浙优油 2 号 Zheyouyou 2	浙江 Zhejiang	1992	00
	A7	浙油 19 Zheyou 19	浙江 Zhejiang	2007	00
	A8	24729	华中农业大学 HAU	品系 Line	00
	A9	华双 3 号 Huashuang 3	华中农业大学 HAU	1998	00
	A10	4312	华中农业大学 HAU	品系 Line	00
	A11	22108	华中农业大学 HAU	品系 Line	00
	A12	68-1	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	品系 Line	00
	A13	中 821 Zhongshuang 821	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	1993	00
	A14	中双 2 号 Zhongshuang 2	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	?	00
	A15	中双 4 号 Zhongshuang 4	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	1994	00
	A16	中双 7 号 Zhongshuang 7	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	1998	00
	A17	中双 8 号 Zhongshuang 8	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	2001	00
	A18	沪油 14 号 Huyou 14	上海 Shanghai	1996	00
	A19	沪油 15 号 Huyou 15	上海 Shanghai	1997	00
	A20	沪油 18 号 Huyou 18	上海 Shanghai	2002	00
	A21	湘油 11 号 Xiangyou 11	湖南 Hunan	1987	00
	A22	湘油 15 号 Xiangyou 15	湖南 Hunan	1997	00
	A23	苏 9303-1 Su 9303-1	江苏 Jiangsu	品系 Line	00
	A24	红油 3 号 Huyou 3	四川 Sichuan	?	00
A25	优 88 常规 You88	南京 Nanjing	品系 Line	00	
A26	H64	西南 Xinan	品系 Line	00	
中国“双高”油菜 Chinese‘+’ quality	B1	申优青 Shenyuqing	上海 Shanghai	1997	0+
	B2	美间 Meijian	西藏 Xizang	?	0+
	B3	SHORT	浙江 Zhejiang	DH 系 DH Line	?
	B4	高油 605 Gaoyou 605	浙江 Zhejiang	1998	+
	B5	九二油菜 Jiu'er youcai	浙江 Zhejiang	1968	+
	B6	79601	浙江 Zhejiang	?	+
	B7	82769	浙江 Zhejiang	?	+
	B8	480	浙江 Zhejiang	1978	+
	B9	三高油菜 Sangao	浙江 Zhejiang	1969	+
	B10	长荚油菜 Changjia	浙江 Zhejiang	品系 Line	+
	B11	宁油 5 号 Ningyou 5	江苏 Jiangsu	1972	+
	B12	淮油 6 号 Huaiyou 6	江苏 Jiangsu	1975	+
	B13	军农 1 号 Junnong 1	江苏 Jiangsu	?	+
	B14	苏 128 Su 128	江苏 Jiangsu	?	+
	B15	矮架早 Aijiazao	四川 Sichuan	1965	+
	B16	万油 5 号 Wanyou 5	四川 Sichuan	1974	+

续表 1 Continued from table 1

分组 Group	编号 Code	品种(系)名称 Variety (Line) name	来源 Origin	选育年份 Year of release	品质 Quality
	B17	丰收 4 号 Fengshou 4	四川 Sichuan	1965	+
	B18	特早 13 号 Tezao 13	四川 Sichuan	?	+
	B19	沪油 9 号 Huyou 9	上海 Shanghai	?	+
	B20	沪油 3 号 Huyou 3	上海 Shanghai	?	+
	B21	西油 2 号 Xiyou 2	贵州 Guizhou	1964	+
	B22	黔油 8 号 Qianyou 8	贵州 Guizhou	1972	+
	B23	贵 77-2 Gui 77-2	贵州 Guizhou	?	+
	B24	黔油 13 号 Qianyou 13	贵州 Guizhou	?	+
	B25	黔 326 Qian 326	贵州 Guizhou	?	+
	B26	云油 31 Yunyou 31	云南 Yunnan	1967	+
	B27	云油 6 号 Yunyou 6	云南 Yunnan	1959	+
	B28	湘油 4 号 Xiangyou 4	湖南 Hunan	1972	+
	B29	中油 821 Zhongyou 821	中国农业科学院油料作物研究所 OCRI, CAAS	2003	+
	B30	华油 9 号 Huayou 9	华中农业大学 HAU	?	+
	B31	1060(2)-4	华中农业大学 HAU	品系 Line	+
	B32	1419②-2	华中农业大学 HAU	品系 Line	+
	B33	新都 7315 Xindu 7315	江西 Jiangxi	?	+
	B34 <sup>f</sup>	农林 18 Norin 18	日本 Japan	1949	+
	B35 <sup>f</sup>	日本 3 号 Riben 3	日本 Japan	?	+
	B36 <sup>f</sup>	村崎 Cunqi	日本 Japan	?	+
	B37 <sup>f</sup>	荣山油菜 Rongshan	朝鲜 Korea	?	+
国外春油菜 Foreign spring type (F-S)	C1	Princeton	瑞典 Sweden	?	00
	C2	Westar	加拿大 Canada	1982	00
	C3	Tower	加拿大 Canada	1976	+
	C4	Wesroona	澳大利亚 Australia	1980	+
	C5	Marnoor	澳大利亚 Australia	?	00
	C6	Topas	瑞典 Sweden	1981	00
	C7	Delta	瑞典 Sweden	1988	00
	C8	Bingo	丹麦 Denmark	1990	00
	C9	Ural	德国 Germany	1998	00
	C10	Orca	德国 Germany	?	00
	C11	Topic	德国 Germany	?	00
国外冬油菜 Foreign winter type (F-W)	D1	Casino	瑞典 Sweden	1991	00
	D2	Panter	瑞典 Sweden	1967	00
	D3	Ceres	德国 Germany	1986	00
	D4	Lirjet	德国 Germany	1989	00
	D5	Express	德国 Germany	1993	00
	D6	Viking	德国 Germany	2002	00
	D7	Rasmus	德国 Germany	1999	00
	D8	Artus	德国 Germany	1997	00
	D9	Baldur	德国 Germany	2003	00
	D10	Mendel	德国 Germany	2002	00
	D11	TGGH	德国 Germany	?	00
	D12	Tapidor	法国 France	1989	00
	D13	Sollux	德国 Germany	1973	+

B34<sup>f</sup>、B35<sup>f</sup>、B36<sup>f</sup>、B37<sup>f</sup> 亚洲其它国家双高材料放在中国双高组；00：无芥酸和低硫代葡萄糖苷；+：高芥酸和高硫代葡萄糖苷；0+：低芥酸和高硫代葡萄糖苷；?：不详 HAU：华中农业大学；OCRI, CAAS：中国农业科学院油料作物研究所

B34<sup>f</sup>, B35<sup>f</sup>, B36<sup>f</sup>, B37<sup>f</sup> accessions from other Asian countries with high erucic acid and high glucosinolate were in Chinese '+' group; 00: Erucic acid free and low glucosinolate; +: High erucic acid and high glucosinolate; 0+: Erucic acid free and high glucosinolate ? : Not known; HAU: Huazhong Agricultural University; OCRI, CAAS: Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences

胺凝胶电泳, 片段长度大多 150~500 bp。电泳结束后采用银染显色和保存。

**1.2.4 数据统计分析** 根据电泳结果记录条带清晰、易识别、重复性好的 EST 和 SSR 标记条带, 有带记为“1”, 无带记为“0”。Jaccard 遗传相似系数的计算方法:  $GS_{ij} = N_{ij} / (N_{ij} + N_i + N_j)$ , 其中  $N_{ij}$  为品种  $i$  和品种  $j$  共有的条带数,  $N_i$  为  $i$  品种有而  $j$  品种缺失的条带数,  $N_j$  为  $j$  品种有而  $i$  品种缺失的条带数。根据遗传相似系数, 用 NTSYSpc2.10e 软件<sup>[16]</sup>进行聚类 and 主成分分析, 并用两维 Mantel test 检验计算聚类结果符合程度的相关系数。核心种质的分子标记遗传多样性利用样本平均 Shannon-Weaver 多样性信息指数<sup>[17]</sup> (average genetic diversity index, I) 评价。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 和 EST-STS 标记多态性分析和比较

本试验选用了 49 对和 47 对在 DH 群体 (Sollux × Gaoyou)<sup>[18]</sup> 双亲间表现差异的 EST 和 SSR 引物, 其中 19 对 EST 和 19 对 SSR 引物在所有供试的 87 个品种中扩增出清晰重复性好的差异片段, 分别占总数的 39% 和 40%, 进而用这 38 对引物来扩增 87 个代表性品种的基因组 DNA, 总共获得 218 条清晰的条带, 其中 139 条 (约 63.8%) 具有多态性, EST 引物扩增的 99 条带中 72 条具有多态性, 占 73%; SSR 引物扩增的 119 条带中 67 条有多态性, 比例为 56%。平均每对 EST 引物扩增多态性条带 3.8 条, SSR 引物为 3.5 条。引物的多态性频率 (PP) 位点间表现很大差异, 分别有 5 个 EST 和 4 个 SSR 标记的 PP 值达 100%。除此之外, 超过 80% 的 EST 标记有 5 个, SSR 标记有 1 个。每对多态性引物扩增的总条带数 (TNB)、多态性条带数 (NPB) 以及多态性频率 (PP) (表 2)。

### 2.2 预选核心种质组间和组内的遗传丰度

表 3 列出了在分子水平预选核心种质的遗传相似性分析结果, 不同组之间国外的冬油菜品种和中国的“双高”品种之间的遗传相似系数最低 (0.626), 遗传差异最大; 而中国的“双高”、“双低”品种之间和国外的冬油菜、春油菜之间遗传相似系数接近 (分别为 0.683 和 0.686)。组内品种间, 中国“双高”品种间的平均遗传相似系数最小 (0.690), 遗传多态性最为丰富, 而国外冬油菜品种间的遗传相似系数最高, 达到 0.800 左右, 品种间遗传差异最小。中国的“双低”品种和国外春油菜两大组的组内遗传相似系数接近, 在 0.710 左右。

### 2.3 聚类分析

基于分子标记分析对 87 个甘蓝型油菜品种间的遗传相似系数 (GS) 建立的原始相似矩阵和聚类矩阵的共表相关系数达显著水平 ( $r=0.62^{**}$ ), 说明聚类结果比较合理。聚类分析结果 (图 1) 显示, 这些品种的遗传背景差异较大, 极少数品种相似系数在 0.90 以上。在相似系数为 0.65 处 87 个品种被分成中国油菜品种 (包括 3 个亚洲其它国家品种) 和国外油菜品种二大组, 以 I 和 II 表示。在遗传相似系数 0.70 左右, 中国油菜品种又进一步被分成“双低”油菜和“双高”油菜两个组, 以 I-i 和 I-ii 表示。I-i 组内的 16 个品种全部是双低油菜, 浙江省农业科学院近十余年来育成的 5 个双低品种均归入该组, 另包括 4 个来自湖北 (油料作物研究所 3 个, 华中农业大学 1 个)、2 个来自上海和 2 个来自湖南的双低油菜品种 I-ii 包括了 17 个双高油菜和 4 个双低油菜, 其中 5 个是浙江 60~70 年代育成常规品种 (品系), 8 个品种来自云、贵、川长江上游地区, 2 个来自上海邻近地区。4 个双低品种“苏 128”, “特早 13”, “湘油 4 号”和“新都 7315”都是 80~90 年代双低油菜早期选育品种。其余的中国油菜品种包括 3 个日本和朝鲜品种组成 5 个小的组群, 与中国“双低”和“双高”两个组靠近, 称为混合组 I-iii, 含 9 个双低品种或品系, 其中 3 个来自华中农业大学, 2 个来自中国农业科学院油料作物研究所, 2 个源于贵州, 浙江新近育成的高油分品种浙油 19 和上海的沪油 18 位于其中, 显然这些材料的遗传背景与 I-ii 中的品种有较大的差异; 另外 10 个中国“双高”油菜和 2 个来源于日本一个来自朝鲜的品种也归在这个组群。

第二大类国外品种中, 欧洲冬油菜和春油菜又分成两个亚组: II-i 和 II-ii, 少数几个中国和亚洲其他国家品种掺杂其中。II-i 包括 13 个欧洲冬油菜, 1 个中国“双低”品系‘68-1’ (A12)、1 个低芥高硫苷品种‘申油青’ (B1) 和 1 个瑞典春油菜‘Delta’ (C7), II-ii 有 6 个国外春油菜, 2 个双高品种‘美间’ (B2, 西藏) 和‘村崎’ (B36, 日本)。

本研究还根据 87 个供试品种的熟期、品质、形态和产量及构成等 13 个表型性状进行聚类 (聚类图未给出), 结果与分子水平上的聚类趋势一致, 4 个组群仍具有相对独立的遗传组成但其划分相对较模糊, 有较多的交叉归类现象。

### 2.4 核心种质的构建

为了进一步剔除遗传冗余, 构建一个能代表 500

表 2 标记的引物序列、扩增带数、多态性带数及多态性频率

Table 2 Primer sequence, total number of amplified (TNB) and number of polymorphic bands (NPB) and percent of polymorphism (PP) per EST and SSR marker

EST 标记 EST marker	相应拟南芥基因 Corresponding <i>A. thaliana</i> locus name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	扩增 带数 TNB	多态性 带数 NPB	多态性 频率 PP	SSR 标记 SSR marker	扩增 带数 TNB	多态性 带数 NPB	多态性 频率 PP
ZAAS017	At1g15950	5'-AGAGGCTACACGGTCAAAGG-3' 5'-AAAGACGCCCGTCACAACC-3'	6	6	100.0	O110-H02	3	3	100.0
ZAAS108	At4g14880	5'-TTGGTCGTGTTGCTGCTAAG-3' 5'-CCGTGAATGCTAACCCTAACC-3'	3	3	100.0	Ra3-H09	6	6	100.0
ZAAS113	At5g47180	5'-ATACAGCGGCTGAAGGAAGA-3' 5'-TGATGAGTCCGATGAGTCCA-3'	4	4	100.0	O111-G11	6	6	100.0
ZAAS151	At1g27980	5'-TTGGCTGTGAAGTCATCTCG-3' 5'-AATCCTGGTGTGCTGATCCAAC-3'	3	3	100.0	MR228	3	3	100.0
ZAAS160	At4g00550	5'-GGCATTACTGCCACAAGGT-3' 5'-TGTACCCTTGCTCCAGACC-3'	6	6	100.0	Na12-A02	7	6	85.7
ZAAS045	At4g34430	5'-ATGGTATAGCCGTGCTTGG-3' 5'-TCCGACAACCTTCTGGATCA-3'	6	5	83.3	Ra3-H10	4	3	75.0
ZAAS068	At4g28910	5'-CAGAGGATGCATCAGAACGA-3' 5'-TTGATCTGGTTCGCTTGTA-3'	6	5	83.3	Ra2-E04	4	3	75.0
ZAAS085	At2g45960	5'-CCTATCGGATTCGCTGTGTT-3' 5'-ATGAATGGTCCAACCCAAAA-3'	5	4	80.0	Ra2-D04	7	5	71.4
ZAAS088	At5g02800	5'-ATACGATACTGTGCTCCCG-3' 5'-CGGAGGGTATTGACCTTGAA-3'	5	4	80.0	Na10-D07	6	4	66.7
ZAAS159	At1g03910	5'-GGTGCTGGTTTTGAGTCCAT-3' 5'-TGATCGTGAAGAAGCAATCG-3'	5	4	80.0	Bras023	3	2	66.7
ZAAS156	At4g26370	5'-AACCACATGAGCTTTGGAGG-3' 5'-TTGCTGTACACCAGCTTTGG-3'	4	3	75.0	MR12	6	4	66.7
ZAAS192	At1g62640	5'-GTACTTCCACTCTGATG-3' 5'-ACAAGCCTGAACAACCAC-3'	7	5	71.4	Bras-036	8	5	62.5
ZAAS164	At3g01060	5'-CCTATTGCTCCACCAAAGA-3' 5'-CATACTTGAGCCTTGGGGAA-3'	6	4	66.7	Ra2-G09	7	4	57.1
ZAAS092	At1g50010	5'-GGAGGGACTTCTTCTTGGG-3' 5'-TCGATGTAAGGTGGTGGTGA-3'	6	4	66.7	Na10-D09	6	3	50.0
ZAAS101	At5g03290	5'-TTGGTGATGCCAAACCTGTA-3' 5'-CAGCGATATCAGGTGCAGAA-3'	3	2	66.7	Na10-H03	2	1	50.0
ZAAS141	At3g29320	5'-TTTGATATTTGGGGGAAAA-3' 5'-CTGGAATGAGCAATTCAGCA-3'	6	3	50.0	Ra2-E11	6	3	50.0
ZAAS117	At3g14420	5'-TTGACCTCGAAAGATGGAC-3' 5'-ATTGCTCGGAGCCACTGGAC-3'	7	3	42.8	Ra3-D04	6	3	50.0
ZAAS023	GI507807	5'-GATGGGTGGAGACCGTGAT-3' 5'-TCTTTTGGCACATCTTTGAACT-3'	5	2	40.0	O112-F02	7	3	42.8
ZAAS012	At3g57650	5'-GGAAGCGCATTGGCTGTA-3' 5'-AAGGTCTAGGGAAGTCGTCAA-3'	6	2	33.3	O111-B05	5	2	40.0
合计 Total			99	72	74.7	合计 Total	119	67	68.9
平均 Average			5.2	3.8		平均 Average	5.2	3.5	

表 3 预选核心种质组间和组内品种间的平均遗传相似系数

Table 3 Mean genetic similarity (GS) coefficients between groups and cultivars within groups in *B. napus* L.

分库 Pools	中国“双低”油菜 Ch-'00'	中国“双高”油菜 Ch-'+'	国外春油菜 F-S	国外冬油菜 F-W
中国“双低”油菜 Ch-'00'	0.710	0.683	0.674	0.655
中国“双高”油菜 Ch-'+'		0.690	0.640	0.626
国外春油菜 F-S			0.716	0.686
国外冬油菜 F-W				0.772

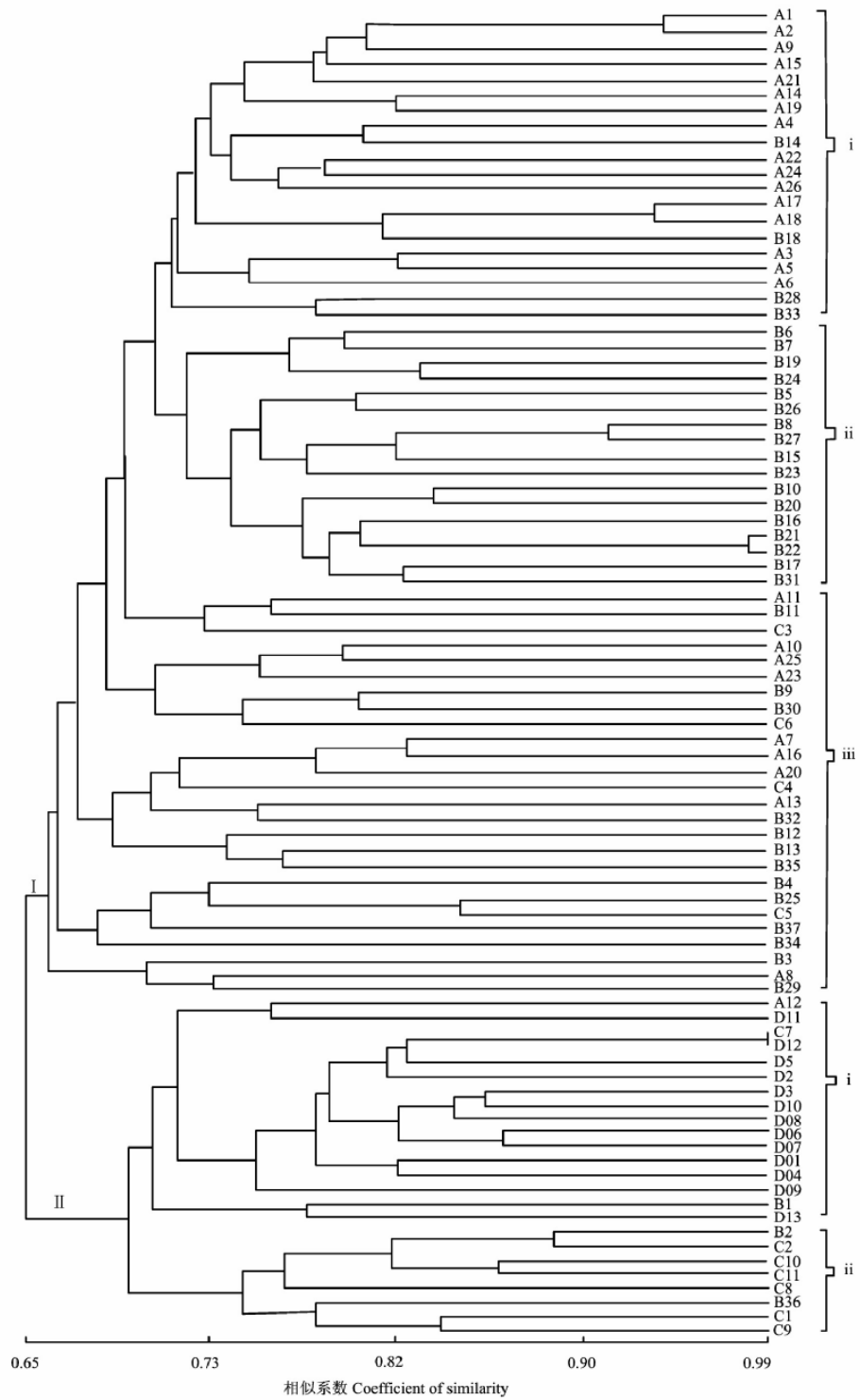


图 1 87 个甘蓝型油菜品中的 EST 和 SSR 标记聚类图 (品种代码与表 1 相同)

Fig. 1 Dendrogram of 87 oilseed rape (*B. napus* L.) accessions based on EST and SSR data (The accession codes are the same as those shown in table 1)

余份品种资源的核心种质, 根据 87 个品种的聚类结果, 依次剔除遗传相似系数 (genetic similarity, GS) 介于 0.80~0.99 的遗传材料获得 5 种子集, 分别对其进行聚类 (图未给出) 和分子标记多样性评价 (表 4)。结果表明, 分别剔除遗传相似系数大于等于 0.90 和 0.85 的遗传冗余获得的两个子集 S1 和 S2。聚类结果基本保持预选核心种质结构, 但至 S3 子集开始类群

结构发生较大改变。另一方面从 5 个子集的平均 Shannon-Weaver 多样性信息指数 (I) 来看, S2 和 S1 子集基本持平, S2 至 S3 有一个明显的转折, 而 S3 至 S5 子集又出现缓慢的回升, 说明 S2 子集已具有较小的样本容量和遗传冗余, 不宜再继续缩减, 由 78 个品种构成的 S2 子集可作为本研究 500 余份品种资源的核心种质加以利用和保存, 剔除的 9 个品种是:

表 4 5 个子集与预选核心种质的分子标记多样性信息指数 (I) 比较

Table 4 Comparison of molecular marker diversity index (I) between the initial collection and the five subsets

分组 Groups	子集 Subsets					
	87 个品种 87 cultivars	82 个品种(S1) 82 cultivars(S1) (GS≥0.90)	78 个品种(S2) 78 cultivars(S2) (GS≥0.85)	72 个品种(S3) 72 cultivars(S3) (GS≥0.83)	67 个品种(S4) 67 cultivars(S4) (GS≥0.82)	60 个品种(S5) 60 cultivars(S5) (GS≥0.81)
Ch-"00"	0.3908	0.3945	0.3945	0.3945	0.3943	0.3922
Ch-"+"	0.4101	0.4135	0.4131	0.4094	0.4139	0.4158
F-S	0.3560	0.3450	0.3305	0.3522	0.3522	0.2907
F-W	0.2975	0.2975	0.2843	0.2768	0.2733	0.2024
Total	0.4319	0.4339	0.4337	0.4328	0.4339	0.4371

A1、A16、A17、B1、B2、B21、B27、C7、D3 和 D6。

图 2 是 78 个品种组成的核心种质主成分分析结果, 可以看出这些资源所包含遗传信息的丰度、离散程度和分布规律。国外冬油菜和中国的“双高”油菜居于第一主成分轴的两侧, 表现出最大的遗传差异; 沿第二主成分轴国外的春油菜和冬油菜又相对分开, 而中国“双低”品种大多介于中国“双高”品种和欧洲

品种之间, 小部分与中国“双高”油菜相近形成一个混合区。这个结果和前人的研究报导完全一致, 同时也证明本研究中对中国甘蓝型油菜初级库的划分是基本合理的。

与 87 个品种组成的预选核心种质相比, 国外的春油菜和冬油菜组保留了剔除冗余后的全部材料; 中国“双低”组和“双高”组划分更为清晰; 混合组中的中国“双低”和中国“双高”品种聚类更为集中。样品分布的几何特征表明, 核心种质的样品分布保存了预选核心种质分布的几何形状和特征 (87 品种主成分结果未给出), 样品分布更为离散, 遗传变异得以保留。

## 2.5 核心种质的表型特征

表 5 列出了 78 个核心种质 4 个类群的生育性状、主要形态和产量构成性状的平均表型值, 以及相互间的差异显著性。国外冬油菜的特点是迟花迟熟, 主花序发达, 角果粒数多而千粒重偏低。春油菜组表现株高和分枝位均显著低于其他类型, 虽角果长度偏短但每果粒数和中国品种相似。中国“双低”和“双高”两库比较, 除生育期“双低”品种总体较“双高”品种迟熟 3~4 d, 差异达显著外, 其他性状均无明显差异。

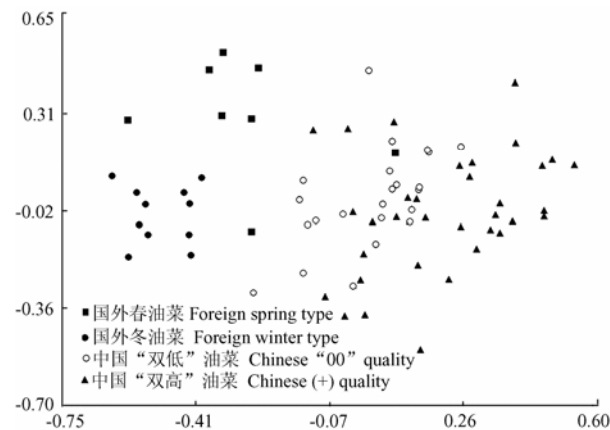


图 2 78 个甘蓝型油菜品种组成的核心种质的主成分分析图

Fig. 2 Principal component plot of core collection derived from 78 oilseed rape (*B. napus* L.) cultivars

## 3 讨论

本研究所用的 EST 标记是基于具有功能信息的甘



表 5 核心种质的主要农艺性状及差异显著性

Table 5 Major agronomic characters and their difference significance in core collections

组别 Group	初花期 DTF <sup>2)</sup>	终花期 DTE	成熟期 DTM	株高 PH	分枝位 HPB	一次分 枝数 FB	主花序 长度 LMI	主花序 角果数 SMI	单株角 果总数 SP	每果 长度 LS	每果 粒数 SS	千粒重 SW	单株 产量 YP
中国双低 CH-“00”	161b <sup>1)</sup>	193b	223b	151a	55a	7a	44b	55b	300a	5.5a	19b	3.35a	15.74a
中国双高 CH-“+”	158b	191b	219c	147a	47a	7a	48ab	54b	330a	5.2ab	19b	3.31a	15.00a
国外春油菜 F-S	160b	194b	223b	134b	32b	7a	48ab	55ab	337a	4.8	19b	2.87a	13.64a
国外冬油菜 F-W	179a	209a	228a	150a	47a	7a	52a	65a	342a	5.4a	22a	2.10b	9.61b

<sup>1)</sup> 小写英文字母表示相邻两库平均值之间在 0.05 水平上差异显著性

<sup>2)</sup> DTF: Days from sowing to flowering; DTE: Days from sowing to the end of flowering; DTM: Days from sowing to maturity; PH: Plant height, cm; HPB: Height of primary effective branch, cm; FB: Number of first branches; LMI: Length of main inflorescence, cm; SMI: Number of siliques on main inflorescence; SP: Number of siliques per plant; LS: Length per silique; SS: Number of seeds per silique; SW: 1000-seed weight, g; YP: Yield per plant, g; \* Significantly different according to LSD at 0.05 level

蓝型油菜 EST 序列而设计,与常用 PCR 基础上的 SSR 标记、AFLP 和 SRAP 标记相比,有着一定的功能基因信息,能更有效地度量和研究品种资源的基因多样性。快速增加中的芸苔属 EST 序列、BAC 文库序列等生物学信息资源为大范围开发油菜 EST 标记提供了可能。大多数 EST-STS 标记具有共显特性;且采用的是常规 PCR 技术,操作简便,结果稳定。

芸苔属 EST 标记用于遗传图谱的构建<sup>[19,20]</sup>、比较基因组学研究<sup>[21,22]</sup>和候选基因筛选<sup>[23,24]</sup>等已有众多报导。本研究对芸苔属 EST-STS 和常规 SSR 两种标记检测品种资源的遗传多态性效率进行比较,结果表明,在相同的选择背景下,SSR 和 EST 标记中选率相近(39%和 40%),且多态性检出率相仿,说明 EST-STS 是一种适用于分析品种资源遗传差异的新型分子标记。本研究中有 5 对 EST-STS 引物和 4 对 SSR 引物的多态性频率达到 100%,是非常有效的标记引物,可以作为品种鉴定、纯度控制和品种资源多样性检测的首选。

87 个品种的表型和分子水平聚类结果基本一致,分子水平聚类与表型聚类比较,同一类群的品种聚类更为集中,原因可能是田间试验受环境影响较大,又只是一年一次重复数据,可能会有一定试验误差。标记数据聚类结果显示中国油菜和国外油菜构成二大基因库,遗传相异性达 35%以上;国内“双低”品种和“双高”品种、国外冬油菜和春油菜又各成二个亚类,类间遗传相似性在 70%以上。中国“双低”品种介于国外油菜和中国“双高”油菜之间,部分中国“双低”和“双高”品种遗传背景相近,形成一个混合族群。这些结果和以往众多研究报导基本一致<sup>[5-10]</sup>。值得注意的是来自同一育种单位的品种如浙江省农业科学院

育成的 5 个双低品种,中国农业科学院油料作物研究所选育的 3 个品种,德国 NPZ 育种公司提供的双低油菜品种遗传相似性都较高,遗传基础相对狭窄,因此在今后的育种中要重视国内外、国内育种单位之间信息和材料交流,创造新的种质资源,扩大遗传背景。根据遗传聚类结果,在兼顾农艺性状、产量水平和品质特点的前提下,宜选择遗传背景差异较大的材料用作育种亲本。象中国“双低”品种资源,选择混合区内的材料配组或与“双低”组内的基因型组配可能比“双低”库内的二个品种组合更为有效;考虑到生育特性的相似性,国外春油菜可能比欧洲冬油菜更适合用于扩大遗传基础。如果研究人员对品种资源从表型特征到遗传本质进行系统分类,建立起从核心种质、预选核心种质到原始种质库信息和材料管理体系,育种中根据育种要求目标明确地搜索资源信息调用适宜材料,对提高油菜育种的技术含量加快油菜新品种的育成速度必将产生事半功倍的效果。

随着作物种质资源收集量的增加,资源的保存与管理日益困难。与此同时,由于资源收集过程中的异地、异人及异系统性,使得整个资源收集品有可能存在极大的重复性,给利用带来一定盲目性。因此用最少的资源收集品,最大限度地保存遗传基因型已成为作物品种资源工作者关注焦点。Brown<sup>[25]</sup>认为,构建核心资源的关键是材料的分组,分组方法常见的有按植物分类地位、地理分布、农业生态区等。本研究根据众多前人的研究结果将浙江省农业科学院征集保存的 500 余份甘蓝型油菜资源按国外(欧洲)冬油菜、国外春油菜、中国“双高”和中国“双低”油菜四大类型分组,进而按一定比例分别从每组中随机取样选出预选核心种质,进行遗传多样性和核心种质筛选具

有一定的理论依据, 87 个品种构成的预选核心种质的遗传冗余已经较小, 剔除遗传相似系数大于等于 0.85 的遗传冗余进入核心种质的品种所包含的遗传信息、离散程度和分布特点在图 2 中得到较好的体现, 78 个品种的遗传构成基本符合核心种质的要求, 包括了欧洲、亚洲其他国家、加拿大、澳大利亚和中国不同省份的生态类型, 基本代表了整个群体的遗传多样性和结构。

核心资源的评价是检验核心资源代表性的标准。表 4 列出的各子集与预选核心种质多样性参数的比较, 反映了该子集对预选核心种质分子标记遗传多样性的保有量。比较不同的子集发现, 随着删除冗余材料的增多, 子集的平均 Shannon-Weaver 多样性信息指数 (I) 和有效等位基因数 (A) 逐渐提高。这说明, 用分子标记数据度量个体间的遗传相似性, 通过取样剔除了一些分子标记多样性上存在冗余的材料, 等位基因频率存在极端差异的位点其稀有等位基因的频率将会被显著提高, 从而使子集具有更大的分子标记多样性。表 5 所列核心种质的主要农艺性状及差异显著性比较为育种家高效选择目标性状提供了信息。随着免耕直播等轻型栽培技术的推广和机械化收割的普及, 对油菜新品种选育将提出新的要求, 如降低株高、早熟耐迟播等。本研究结果提示我们要寻找矮秆、低分枝位基因可重点在国外春油菜品种中挖掘而早熟基因可能在中国“双高”品种中出现频率较高; 国外冬油菜品种中, 可望寻找提高角果粒数的基因和材料; 中国“双低”油菜应该作为育种主体材料。

## 4 结 论

EST-STS 标记的引物设计和实验操作过程简单, 扩增条带清晰, 结果稳定, 与常用 PCR 基础上的 SSR 标记、AFLP 和 SRAP 标记相比, 具有功能基因信息, 多态性检出率与常规 SSR 相当, 是适用于分析品种资源遗传差异的新型分子标记。在遗传相似系数 0.65 处, 87 个品种组成的预选核心种质分成 I 和 II 两个类群, 在遗传相似系数 0.70 左右处, I 分成中国“双低”(I-i) 和“双高”(I-ii); II 分成国外冬油菜(II-i) 和国外春油菜(II-ii) 各两个亚组。根据遗传多样性分析剔除相似系数大于等于 0.85 的遗传冗余, 获得 78 个品种的核心种质, 通过聚类分析和分子标记评价提出 78 个品种可作为本研究中 500 余份品种资源的核心种质加以利用和保存。核心种质的主要农艺性状分析显示国外冬油菜的特点是迟花迟熟, 主花序发达,

角果粒数多; 春油菜组表现株高和分枝位均显著低于其他类型; “双低”品种和“双高”品种除了品质外农艺性状无本质差异。

致谢: 感谢浙江大学徐海明老师在核心种质的评价、数据处理和文章修改方面给予的帮助和支持!

## References

- [1] Frankel O H. Genetic perspectives of germplasm conservation. In: Arber W, Llimensee K, Peacock W J, Starlinger P. *Genetic Manipulation: Impact on Man and Society*. Cambridge: Cambridge University Press, 1984: 161-170.
- [2] 李长涛, 宋丽丽, 孔伟丽, 洪兆龙. 植物遗传资源核心种质的构建及应用. *植物学通报*, 2005, 22: 139-145.  
Li C T, Song L L, Kong W L, Hong Z L. The construction and application of a core collection of plant genetic resources. *Chinese Bulletin of Botany*, 2005, 22: 139-145. (in Chinese)
- [3] 赵丽梅, 董英山, 刘 宝, 郝 水, 王克晶, 李向华. 中国一年生野生大豆核心资源的构建. *科学通报*, 2005, 50(10): 992-999.  
Zhao L M, Dong Y S, Liu B, Hao S, Wang K J, Li X H. Establishment of a core collection for the Chinese annual wild soybean (*Glycine soja*). *Chinese Science Bulletin*, 2005, 50(10): 992-999. (in Chinese)
- [4] 何余堂, 涂金星, 傅廷栋, 李殿荣, 陈宝元. 陕西省白菜型油菜核心种质的初步构建. *中国油料作物报*, 2002, 24(1): 6-9.  
He Y T, Tu J X, Fu T D, Li D R, Chen B Y. Preliminary development of core collection of *Brassica campestris* in Shaanxi province. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2002, 24(1): 6-9. (in Chinese)
- [5] 赵坚义, H. C. Becker. 同工酶分子标记研究中国和欧洲栽培油菜的遗传差异. *作物学报*, 1998, 24(2): 213-220.  
Zhao J Y, Becker H C. Genetic diversity of Chinese and European rapeseed (*Brassica napus* L.) analysed by isoenzyme molecular markers. *Acta Agronomica Sinica*, 1998, 24(2): 213-220. (in Chinese)
- [6] 马朝芝, 傅廷栋, Stine Tuevesson, Bo Gertsson. 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)
- [7] 文雁成, 王汉中, 沈金雄, 刘贵华, 张书芬. 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. *中国农业科学*, 2006, 39(2): 246-256.

- Wen Y C, Wang H Z, Shen J X, Liu G H, Zhang S F. Analysis of genetic diversity and genetic basis of Chinese rapeseed cultivars (*Brassica napus* L.) by sequence-related amplified polymorphism markers. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(2): 246-256. (in Chinese)
- [8] 刘仁虎, 孟金陵. RFLP 和 AFLP 分析白菜型油菜和甘蓝型油菜遗传多样性及其在油菜改良中的应用价值. *遗传学报*, 2006, 33(9): 814-823.
- 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. *Acta Genetica Sinica*, 2006, 33(9): 814-823. (in Chinese)
- [9] Hu S W, Ovesna J, Kucera L, Kucera V, Vyvadilova M. Evaluation of genetic diversity of *Brassica napus* germplasm from China and Europe assessed by RAPD markers. *Plant Soil and Environment*, 2003, 49(3): 106-113.
- [10] Hu S W, Yu C Y, Zhao H X, Sun G L, Zhao S L. Genetic diversity of *Brassica napus* L. Germplasm from China and Europe assessed by some agronomically important characters. *Euphytica*, 2007, 154: 9-16.
- [11] Qian W, Meng J, Li M, Frauen M, Sass O, Noack J, Jung C. Introgression of genomic components from Chinese *Brassica rapa* contributes to widening the genetic diversity in rapeseed (*B. napus* L.) with emphasis on the evolution of Chinese rapeseed. *Theoretical and Applied Genetics*, 2006, 113: 49-54.
- [12] Hasan M, Seyis F, Badani A G, Pons-Kuhnemann J, Friedt W, Luhs W, Snowden R J. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers. *Genetic Resources and Crop Evolution*, 2006, 53: 793-802.
- [13] 李小白, 崔海瑞, 张明龙. EST 分子标记开发及在比较基因组学中的应用. *生物多样性*, 2006, 14(6): 541-547.
- Li X B, Cui H R, Zhang M L. Molecular markers derived from EST: their development and applications in comparative genomics. *Biodiversity Science*, 2006, 53: 793-802.
- [14] Uzunova M I, Ecke W, Weissleder K, Roßbelen G. Mapping the genome of rapeseed (*Brassica napus* L.) I. Construction of an RFLP linkage map and localization of QTLs for seed glucosinolate content. *Theoretical and Applied Genetics*, 1995, 90: 194-204.
- [15] Piquemal J, Cinquin E, Couton F, Rondeau C, Seignoret E, Doucet I, Perret D, Villeger M J, Vincourt P, Blanchard P. Construction of an oilseed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111: 1514-1523.
- [16] Rohlf F J. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multi-variate analysis system. *Exeter Software*, 2001, New York, USA.
- [17] 徐海明, 胡晋, 邱英雄. 利用分子标记和数量性状基因型值构建作物核心种质库的研究. *生物数学学报*, 2005, 20(3): 351-355.
- Xu H M, Hu J, Qiu Y X. Study on constructing core collection based on plant molecular markers and quantitative traits. *Journal of Biomathematics*, 2005, 20(3): 351-355. (in Chinese)
- [18] Zhao J Y, Becker H C, Zhang D Q, Zhang Y F, Ecke W. Oil content in European×Chinese rapeseed population: QTL with additive and epistatic effects and their genotype-environment interactions. *Crop Science*, 2005, 45: 51-59.
- [19] Li Y Y, Ma C Z, Fu T D, Yang G S, Tu J X, Chen Q F, Wang T H, Zhang X G, Li C Y. Construction of a molecular functional map of rapeseed (*Brassica napus* L.) using differentially expressed genes between hybrid and its parents. *Euphytica*, 2006, 152: 25-39.
- [20] Kim J S, Chung T Y, Graham J K, Mina J, Yang T J, Jin Y M, Kim H, Park B S. A sequence-tagged linkage map of *Brassica rapa*. *Genetics*, 2006, 174: 29-39.
- [21] Carmel M O, Ian B. Comparative physical mapping of segments of the genome of *Brassica oleracea* var. alboglabra that are homoeologous to sequenced regions of chromosomes 4 and 5 of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 2000, 23(2): 233-243.
- [22] Isobel A P P, Sigrun M G, Andrew G S, Lewis L, Martin T, Thomas C O, Derek J L. Segmental structure of the *Brassica napus* genome based on comparative analysis with *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*, 2005, 171: 765-781.
- [23] Reinhold M, Kris W, Marion M, Derek L, Vipin K B, Allen G G, Isobel A P P. Complexities of chromosome landing in a highly duplicated genome: Toward map-based cloning of a gene controlling blackleg resistance in *Brassica napus*. *Genetics*, 2005, 171: 1977-1988.
- [24] Sillto D, Parkin I A, Mayerhofer R, Lydiat D J, Good A G. *Arabidopsis thaliana*: a source of candidate disease resistance gene for *Brassica napus*. *Genome*, 2000, 43(3): 452-460.
- [25] Brown A H D. Core collections: A practical approach to genetic resources management. *Genome*, 1989, 31: 818-824.