

文章编号:1673-1689(2009)03-0377-08

油菜杂种及亲本指纹图谱构建和杂种纯度鉴定

王通强, 马晓峰, 吴有祥

(贵州大学农学院, 贵阳 550025)

摘要: 利用 SSR 分子标记技术对 43 份贵杂系列甘蓝型杂交油菜品种(组合)及亲本材料进行研究, 筛选出了一批在贵杂系列亲本和杂种上具有较高多态性的 SSR 引物, 构建了贵杂系列油菜亲本及杂交组合的指纹图谱。通过对 24 份甘蓝型油菜的 SSR 分析, 从 100 对 SSR 引物中筛选到 21 对多态性很强且极易识别的引物, 从中筛选出 4 对核心引物 (Na12C06、Na10B04b、0110A05、Na10D03), 构建了贵杂系列常用油菜亲本的指纹图谱; 对这些亲本组配的 19 个杂交组合进行 SSR 分析, 从 100 对引物中筛选到 22 对适合油菜杂交种的多态性引物, 从中选取 4 对核心引物 (Na12C06、Na10D03、Na10E02c、0110A05), 构建了贵杂系列常用油菜杂交组合的指纹图谱; 利用核心引物组合扩增的方法, 可以鉴定油菜杂交组合及其亲本的真实性和纯度。

关键词: 甘蓝型油菜; SSR 标记; DNA 指纹图谱; 种子纯度鉴定

中图分类号: S 603.7

文献标识码: A

Fingerprints Construction of Hybrid Parents in Brassica napus of the series of Guiza and Its Utilization in Hybrid Purity Test

WANG Tong-qiang, MA Xiao-feng, WU You-xiang

(Agricultural college, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: In the study, morphology method and the SSR marker method were used to analyze 43 brassica napus materials including Guiza series hybrid and their parents etc. Differences between the two methods were discussed. High multi-state property SSR primer were selected used in building DNA fingerprinting database of Guiza series hybrid and their parents. The main results were as follows. 24 brassica napus inbred lines were analyzed by using SSR. Twenty-one pairs out of one hundred pairs of SSR primers were selected to give polymorphic, stable and repeated amplification profiles. Four primers including Na12C06, Na10B04b, 0110A05, Na10D03 were selected to build DNA fingerprinting database of all 24 inbred lines. DNA fingerprint map of 19 brassica napus hybrids were built with 21 pairs SSR primes. These primers also gave polymorphic, stable and repeated amplification profiles. Four primers including Na12C06, Na10D03, Na10E02c, 0110A05 were selected to build the DNA fingerprinting database of all 19 brassica napus hybrids. Using primer-in-group method can expand the core primers quickly to identify the purity and reality of brassica hybrids.

Key words: Brassica napus, SSR, DNA fingerprinting database, purity identification of seed

收稿日期: 2007-09-06

基金项目: 贵州省“十一五”科技攻关重大项目(GZ115-03-04-03).

作者简介: 王通强(1958-), 男, 贵州思南人, 研究员, 贵州省省管专家和青年优秀科技人才, 主要从事油菜遗传育种研究。Email: agr. tqwang@gzu. edu. cn

作物品种和育种材料的基础不同,其形态和内部结构上常存在许多稳定的遗传差异^[1-5]。商业化育种的推进,伴随着种质资源利用的受限,引起种质基础较窄,致使品种间种子形态差异也较难区分^[6]。虽然传统的田间形态学鉴定仍是目前最为普遍使用的品种真实性和种子纯度鉴定方法,但由于其受环境和基因显隐性等的影响颇大,人们对其可靠性已产生了置疑^[7]。特别在种子贸易仲裁检验中,对不发芽的种子和形态相近的材料,仅靠传统鉴定的方法是很难提供可靠证据的。随着生化技术及生物技术的发展及其在作物育种中应用的不断深入,利用遗传决定的蛋白质组分不受环境影响和其在组分上的差异性,可以反映出基因型的不同的原理,科学家们提出了采用生化标记技术和分子标记技术进行农作物品种的遗传和真实性鉴定^[8-12]。特别是分子标记技术现已广泛用于遗传育种领域,先后建立了 DNA 重组、限制酶消化、Southern 转移、分子杂交、DNA 快速序列分析、PCR 系列分子生物学技术;可更加方便地检测 DNA 序列的多态性和直接检测基因组的遗传变异,可避免用形态或生化标记检测遗传变异所固有的许多问题和偏差^[13-16]。

本研究力图应用 SSR 分子标记方法构建贵杂系列甘蓝型杂交油菜品种及其亲本指纹图谱,进而开展杂种纯度鉴定技术研究,以为油菜育种及良种的安全使用提供科学参考。

表 1 供试亲本及其杂交组合

Tab. 1 The names of inbred and or group names of hybrids investigate

亲本材料				杂交组合			
编号	名称	编号	名称	编号	名称	编号	名称
1	贵 7-5	13	1515	1	贵杂 4 号	13	Y1×1515
2	贵油 5 号	14	1540	2	贵杂 2 号	14	Y1×1540
3	贵 7-4-8	15	1559	3	贵杂 5 号	15	Y1×1559
4	wp3	16	1564	4	贵×w3	16	Y1×1564
5	wp6	17	1589	5	贵×w6	17	Y1×1589
6	wp15	18	1599	6	贵×w15	18	Y1×1599
7	wp52	19	1603	7	贵×w52	19	Y1×1603
8	wp82	20	201A	8	贵×w82		
9	wp103	21	S _{A6} A	9	贵×w103		
10	wp114	22	203A	10	贵×w114		
11	wp117	23	贵油 4AB	11	贵×w117		
12	1501	24	Y1	12	Y1×1501		

注:贵 7-5、贵油 5 号、贵 7-4-8、wp3~wp117 为黑籽油菜亲本材料,1501~1603 为黄籽油菜亲本材料,201A、S_{A6}A、203A、贵油 4AB、Y1 为不育系材料。贵×w3~贵×w117 为贵油 4AB 和 wp3~wp117 不同的杂交组合,Y1×1501~Y1×1603 为 Y1 和 1501~1603 不同的杂交组合。

1.2.3 数据处理 重复 3 次,选择重复性好,清晰万方数据

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用贵州大学近年选育的贵杂系列等杂交种及其亲本为实验材料(见表 1)。材料由贵州大学油料作物研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 选取亲本叶片,-85℃保存。参照 Haymes 的简易 CTAB 法提取叶片总 DNA^[7],然后进行 DNA 纯化,检测浓度及质量后于-20℃保存备用。

1.2.2 SSR 分析 先用亲本进行 SSR 引物(来自 <http://www.ukcrop.net>)预选,然后选用可以特异区分两亲本的引物进行 F1 纯度鉴定。PCR 反应体系如下:1×扩增缓冲液,2 mmol/L MgCl₂,0.2 mmol/L dNTPs,0.5 U Taq 酶,2.5 mmol/L 引物(上海生物工程公司合成),50 ng 模板 DNA,加 ddH₂O 至终体积 10 μL。反应于 PCR 仪上进行。热循环程序为:95℃(5 min),1 个循环;94℃(1 min),60℃(30 s,每循环降 0.5℃),72℃(45 s),10 个循环;94℃(1 min),55℃(30 s),72℃(45 s),30 个循环;4℃保存。扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。银染显影参照陆光远等^[8]描述的方法进行。

可辨的照片进行谱带统计,建立 SSR 的 0-1 数据

库。每个样品的电泳条带按有或无记录,有带赋值为 1,否则为 0。

2 结果与分析

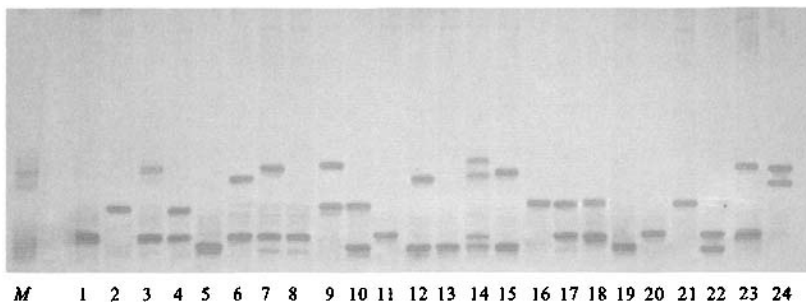
2.1 油菜亲本的多态性引物筛选

对 24 份油菜亲本的 SSR 分析结果,从 100 对

SSR 引物中筛选到 21 对多态性很强且极易识别的引物(见表 2)。21 对引物共扩增出 92 条具有遗传多态性的条带,平均每个位点监测到的等位基因数为 4.38 个,变化范围为 4~6 个。部分引物的扩增结果见图 1、图 2。

表 2 油菜亲本材料中 SSR 检测的等位基因
Tab. 2 The alleles detected by SSR in brassica inbred lines

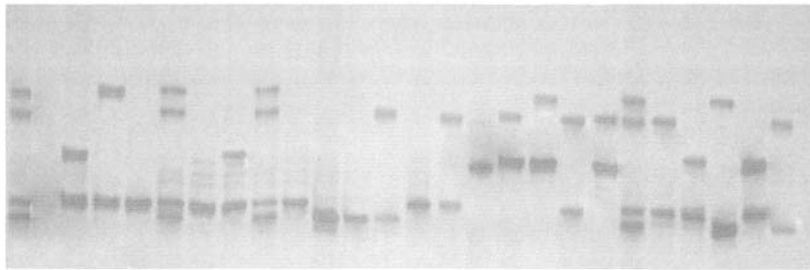
引物名称	等位基因数	染色体中位置	引物序列	
			Forward primer	Reverse primer
Na10B04b	4	1	GCGTCGAGAGATCGAGAG	CTCACCGTCACTGCTTCATC
Na12C06	6	1	AACGGATGAAGAACACATTGC	TAGGGCCTGTTATTCGATGG
Ol10A05	4	2	TGTAATAACCCGACCCATCC	CTCTCTCGCTCTCTCGATCC
Na10D03	5	3	ATGATTTGCCTTGAATGCC	GATGAAACAATAACCTGAGACACAC
Na14G02	5	3	TTCCCTTTATTGAGCAAGCTG	TCCCGGTCGCTAAGATATTG
Ol11H02a	5	4	TCTTCAGGGTTTCCAACGAC	AGGCTCCTTCATTTGATCCC
Na10E02c	4	5	TCGCGCATGTAATCAAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATAc
Na10E02b	4	6	TCGCGCATGTAATCAAAAATC	TGTGACGCATCCGATCATAc
Ra2A05b	4	7	GCTAGTTTACGCGGCGG	AAACGACATCGGCAAAGAAG
Ra2E12	5	8	TGTCAGTGTGTCCACTTCGC	AAGAGAAACCCAATAAAGTAGAACC
Ra2A10b	4	9	CCAGTGTGTGTGTGTGTG	TTTAACAGATAGCGCAGTGGTC
Ra2A11	4	9	GACCTATTTAATATGCTGTTTTACG	ACCTCACCGGAGAGAAATCC
Ra2E07	4	10	ATTGCTGAGATTGGCTCAGG	CCTACACTTGCGATCTTCACC
Na12C08	4	11	GCAAACGATTTGTTTACCCG	CGTGTAGGGTGATCTAGATGGG
Ol09A06a	4	12	TGTGTGAAAGCTTGAAACAG	TAGGATTTTTTTGTTCCACCG
Ni4C06a	4	13	CAGAGGCGAAAACGAGAGAG	TTTATAGACTTCCCGTGGGC
Na10B04a	5	14	GCGTCGAGAGAGATCGAGAG	CTCACCGTCACTGCTTCATC
Na10G06d	4	15	TGAGAAGGGGAACAGTCGAG	TGTGTTGTTTTGGCTTTTGG
Na12F03	4	17	GGCGACATAGATTTGAACCG	TCCACTTTCTCTCTCTCCCC
Ol12G04b	4	18	CGAACATCTTAGGCCGAATC	GGTTAACCTGCGGGATATTG
Ra2F11d	5	19	TGAAACTAGGGTTTCCAGCC	CTTCACCATGGTTTTGTCCC
平均	4.38			



M 为相对分子质量标记,1-24 号亲本材料名称与表 1 中的 1-24 一致

图 1 引物 Na10D03 对 24 个杂交种亲本的扩增结果

Fig. 1 Amplified results of 24 inbred lines with primer Na10D03



M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24

M为相对分子质量标记,1-24号亲本材料名称与表1中的1-24一致

图2 引物 OI11H02a 对 24 个杂交种亲本的扩增结果

Fig.2 Amplified results of 24 inbred lines with primer OI11H02a

2.2 亲本 DNA 指纹图谱构建

从筛选出的 21 对遗传多样性很强的引物中,选取 4 对核心引物 (Na12C06、Na10B04b、OI10A05、Na10D03),利用它们的指纹组合,构建了贵杂系列常用油菜亲本的指纹图谱,可区分开所有不同供试亲本材料(见表 3)。其中 Na12C06 的扩增指纹能将 3、4、7、8、9、11、13、19、22、23 等材料区分开来,且与其他材料的带型不同;Na12C06 与

Na10B04b 的扩增指纹组合在一起能将 2、5、6、10、15、17、18、20、21、24 等材料区分开来,且与其他亲本材料的带型不同;Na12C06、OI10A05 与 Na10B04b 的扩增指纹组合在一起就能将 12、14 等亲本材料区分开来,且与其他材料的带型不同。Na12C06、OI10A05、Na10B04b 与 Na10D03 的扩增指纹组合在一起就能将 1、16 等亲本区分开来,且与其他亲本的带型不同^[17-18]。

表 3 24 份供试油菜亲本的 SSR 指纹

Tab.3 SSR fingerprints of 24 brassica napus inbred lines investigated

亲本 编号	Na10B04b				Na12C06						OI10A05				Na10D03					OI11H02a					Na10E02c				
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	
1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	
2	0	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	0	1	
3	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	
4	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	0	0	
5	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	
6	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	
7	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	0	
8	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	
9	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	
10	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	
11	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	
12	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0
13	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	0	
14	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	
15	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	
16	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	0	
17	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	
18	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	1	0	
19	1	1	0	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	0	
20	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	1	
21	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0		
22	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	
23	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	
24	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1	0	0	1	

2.3 油菜杂交组合的多态性引物筛选

选取随机分布于甘蓝型油菜全部 19 条染色体上的 100 对 SSR 引物,对 19 个油菜杂交组合进行了筛选,其中有 22 对扩增谱带很清晰,且极易识别的引物在这 19 个供试材料中显示稳定的多态性,占检测引物的 22%。这些多态性较好的引物共检测到 98 条多态性片段,一般片段大小在 76~280 bp 之间,平均每个位点的等位基因数为 4.45 个,变化范围 4~6 个。部分引物的扩增结果见图 3、图 4。

2.4 油菜杂交组合 DNA 指纹图谱的构建

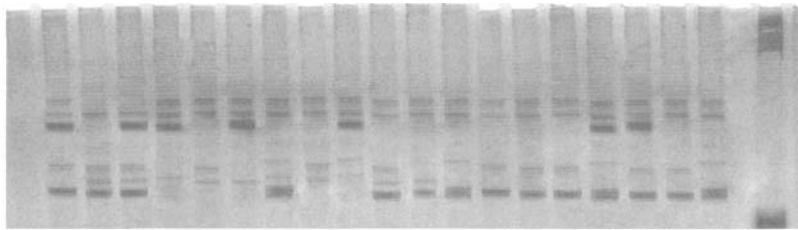
从筛选出的 22 对遗传多样性很强的引物中,选取 4 对核心引物 (Na12C06、Na10D03、Na10E02c、Ol10A05),利用它们的指纹组合,构建了贵杂系列常用油菜杂交组合的指纹图谱,区分开了所有不同供试杂交组合(见表 4)。其中 Na12C06 的扩增指纹能将 2、3、9、11、19 等杂交组合区分开来,且与其他杂交组合的带型不同;Na12C06 与 Na10D03 的扩增指纹组合就能进而将 1、4、6、7、10、14、16、17、18 等杂交组合区分开来,且与其他杂交组合的带型不同;Na12C06、Na10D03 与 Na10E02c 的扩增指纹组合就能进而将 5、8、12 等杂交组合区分开来,且与其他杂交组合的带型不同;Na12C06、Na10D03、Na10E02c 与 Ol10A05 的扩增指纹组合就能进而将 13、15 等杂交组合区分开来,且与其他杂交组合的带型不同^[19]。

2.5 杂交油菜组合纯度鉴定的引物筛选

在本研究中,由表 5 看出,像 Na10B04b、Na12C06、Ol10A05、Ni4C06a、Na10B04a 等引物在杂交组合贵杂 4 号中产生双亲互补带型,它们适用于油菜杂交组合的纯度检测。本试验中杂交种中产生双亲互补带型的特异性引物列于表 5。部分引物扩增结果见图 3-5。

2.6 利用 SSR 标记技术进行杂交组合纯度的准确性判别

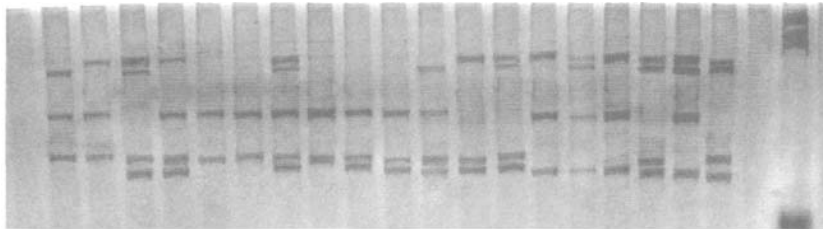
分别在贵杂 4 号和贵×w103 两份样品中人为掺入相应的亲本种子,为防止原样本本身含有杂种子,本实验中对原样本种子和掺入的种子进行了单粒编号。图 5 是在贵杂 4 号种子中人为掺入 2 粒父本贵 7-5 和 2 粒母本 201A 后,用引物 Na12C06 进行扩增的结果。从中明显可以看出 SSR,标准的贵杂 4 号(F1)具有母本、父本的谱带,形成双亲杂种互补带型,而 1 号、2 号及 3 号、4 号种子仅有单亲谱带,不能形成双亲互补带型。因 1 号和 2 号为掺入的父本种子,3 号和 4 号为掺入的母本种子,与事先设计相符。在贵×w103 的杂种中人为掺入父本 wp103 和母本贵油 4AB 后的行扩增的结果,除组合间带型差异外,掺入亲本种子表现类同。由此看出,SSR 标记的方法能有效、准确地把杂交组合中混杂的种子鉴别出来,对于区别混杂其中的其他杂交组合的种子也是有效的^[20-21]。



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M
M 为相对分子质量标记,1-19 号杂交种名称与表 1 中的 1-19 号一致

图 3 引物 Na12C06 对 19 个杂交种的扩增结果

Fig. 3 Amplified results of 19 hybrids with primer Na12C06

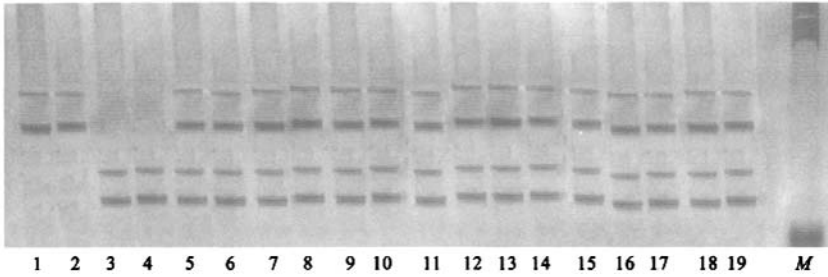


1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 M

M 为相对分子质量标记,1-19 号杂交种名称与表 1 中的 1-19 号一致

图 4 引物 Ol11H02a 对 19 个杂交种的扩增结果

Fig. 4 Amplified results of 19 hybrids with primer Ol11H02a



M为Marker, 1,2号为父本201A的标准样品,3,4号为母本贵7-5的标准样品,5-19号为掺杂样品。

图5 引物Na12C06对贵杂4号人为掺杂母本(201A)和父本(贵7-5)种子的纯度鉴定结果

Fig. 5 Purity identification of the adulterated female(201A) and male(gui7-5) of guiza 4hao by primer Na12C06

表4 19份供试油菜杂交组合的SSR指纹

Tab. 4 SSR fingerprints of 19 brassica napus hybrids investigated

亲本 编号	Na10B04b				Na12C06						Ol10A05				Na10D03					Ol11H02a					Na10E02c				
	1	2	3	4	1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	
1	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	
2	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
3	1	0	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	
4	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
5	1	0	1	1	0	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	1	
6	1	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1
7	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1
8	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	
9	1	0	1	1	0	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	
10	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	
11	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	
12	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1	
13	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	
14	1	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	
15	1	1	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	
16	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1
17	0	1	0	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
18	0	1	0	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	
19	1	1	0	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	1	

表5 纯度鉴定的引物筛选

Tab. 5 Primers selection about purity identification

材料	引物	材料	引物
贵杂4号	Na10B04b、Na12C06、Ol10A05、Ni4C06a、Na10B04a	贵×w17	Ol12G04b、Ra2F11d、Ra2E01c
贵杂2号	Ol11H02a、Na10E02c、Na10E02b、Ra2A05b、Ra2E12	Y1×1501	Na12C08、Ol09A06a、Ni4C06a、Na10B04a、Na10G06d
贵杂5号	Na14G02、Ol11H02a、Na10E02c、Na10E02b	Y1×1515	Na10E02c、Na10E02b、Ra2A05b、Ra2E12、Ra2A10b
贵×w3	Na12C08、Ol09A06a、Ni4C06a	Y1×1540	Na14G02、Ol11H02a、Na10E02c、Na10E02b
贵×w6	Ol10A05、Na10D03、Na14G02、Ol11H02a、Na10E02c、Ra2E01c	Y1×1559	Na10B04b、Na12C06、Ol10A05
贵×w15	Na10E02c、Na10E02b、Ra2A05b、Ra2E12	Y1×1564	Ol10A05、Na10D03、Na14G02、Ol11H02a、Na10E02c、Na10E02b
贵×w52	Ol10A05、Na10D03、Na14G02、Ol11H02a	Y1×1589	Ra2A11、Ra2E07、Na12C08、Ol09A06a
贵×w82	Na10B04b、Ra2E07、Na12C08、Ol09A06a、Ni4C06a、Na10B04a	Y1×1599	Ni4C06a、Na10B04a、Na10G06d、Na12F03
贵×w103	Na10D03、Na14G02、Ol11H02a	Y1×1603	Ol11H02a、Na10E02c、Na10E02b
贵×w114	Na10B04a、Na10G06d、Na12F03		

3 结 语

1) 本研究中随机选取分布于油菜全部 19 条染色体上的 100 对 SSR 引物,对 24 份油菜亲本和 19 个油菜杂交组合进行了筛选,筛选到 21 对谱带清晰、多态性很强的引物。亲本的 22 对引物共扩增出 92 条具有遗传多态性的条带,平均每个位点检测到的等位基因数为 4.38 个,变化范围 4~6 个;杂交组合的 22 对引物共扩增出 98 条具有遗传多态性的条带,平均每个位点检测到的等位基因数为 4.45 个,变化范围 4~6 个。结果表明,作者所筛选到的多态性引物在贵杂系列油菜亲本、杂交种间存在着一定的遗传多态性,用于亲本真实性的分子标记鉴定是有效的。

2) 本研究中用 SSR 标记构建了 24 份甘蓝型油菜杂交种亲本及其组配的 19 个杂交种的 DNA 指纹图谱。从指纹图谱筛选中发现:本研究所涉及

的引物均不能单独区分所有的 24 份甘蓝型油菜杂交种亲本或 19 个杂交种,多个多态性引物组合在一起能分别区分所有的 24 份甘蓝型油菜杂交种亲本和 19 个杂交种。

3) 研究中对 19 份杂交组合均筛选出了相应的可应用于纯度检测的引物。可以区别出在杂交组合材料中人为掺入的相应的亲本种子。验证了利用 SSR 标记技术进行杂交组合纯度鉴定的准确性与可行性。

4) 从研究的结果可知,利用引物组合,将几对核心引物组合起来进行扩增,可以用来鉴定甘蓝型油菜杂交组合及其亲本的真实性和纯度。特别是在检测杂交种纯度时,采用引物组合的方法会更为有效。在纯度鉴定时,极易找到具有杂种双亲互补带型的引物,然后利用该引物对杂种种籽进行单粒扩增,根据其带型表现结果,测算 F1 双亲互补带单粒种子占被测数的百分率,即为种子纯度。

参考文献(References):

- [1] 马朝芝, Sakai Takako, 傅廷栋, 等. RAPDS 和 RFLPS 分析甘蓝型杂交油菜亲本的遗传多样性[J]. 作物学报, 2003, 29(5): 701-707.
MA Chao-zhi, Sakai Takako, FU Ting-dong, et al. Genetic diversity of parents for hybrid breeding in *Brassica napus* L. Detected by RAPDs and RELPs[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2003, 29(5): 701-707. (in Chinese)
- [2] 马朝芝, 傅廷栋, Stine Tuevesson, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1403-1408.
MA Chao-zhi, FU Ting-dong, Stine Tuevesson, et al. Genetic diversity of Chinese and Swedish rapeseed (*Brassica napus* L.) Analysed by inter-simple sequence repeats (ISSRs)[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2003, 36(11): 1403-1408. (in Chinese)
- [3] 马朝芝. 甘蓝型油菜遗传多样性和杂种优势的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.
- [4] 王令强. 中国西部芥兰型油菜遗传多样性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2001.
- [5] 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 一个与甘蓝显性雄性核不育基因连锁的 RAPD 标记[J]. 园艺学报, 1998, 25(2): 197-198.
WANG Xiao-wu, FANG Zhi-yuan, SUN Pei-tian, et al. A RAPD marker linked to dominant genic male sterile gene in Cabbage (*Brassica oleracea*) [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 1998, 25(2): 197-198. (in Chinese)
- [6] 王晓武, 方智远, 孙培田, 等. 一个用于甘蓝显性雄性核不育基因转育辅助选择的 SCAR 标记[J]. 园艺学报, 2000, 27(2): 143-144.
WANG Xiao-wu, FANG Zhi-yuan, SUN Pei-tian, et al. A SCAR marker used to assisted selection of cabbage (*Brassica oleracea*) dominant male sterility [J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2000, 27(2): 143-144. (in Chinese)
- [7] Forster J, Knaak C, Frauen M, et al. Microsatellites for analysing rapeseed genotypes [C] // Wratten N, Salisbury P A. Inter Rapeseed Congress Abstract Book. Canberra: [s. n.], 1999: 175.
- [8] 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[J]. 华中农业大学学报, 2001, 20(5): 413-415.
LU Guang-yuan, YANG Guang-sheng, FU Ting-dong. Silver-stained AFLP-A novel assay for DNA fingerprinting in *Brassica napus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2001, 20(5): 413-415. (in Chinese)
- [9] 龙艳, 牛应泽. 我国油菜品质育种研究的进展与展望[J]. 四川农业大学学报, 2002, 20(4): 372-376.
LONG Yan, NIU Ying-ze. Progress and prospect of research for quality breeding of rapeseed in China [J]. *Journal of Sichuan Agricultural University*, 2002, 20(4): 372-376. (in Chinese)
- [10] 伍宁丰, 李汝刚, 伍晓明, 等. 中国甘蓝型油菜遗传多样性的 RAPD 分子标记[J]. 生物多样性, 1997, 5(4): 246-250.
万方数据

- WU Ning-feng, LI Ru-gang, WU Xiao-ming. RAPD molecular markers and genetic diversity among 40 cultivars of *brassica napus* in China[J]. *Chinese Biodiversity*, 1997, 5(4): 246-250. (in Chinese)
- [11] 刘春林, 官春云, 李拘, 等. 油菜分子标记图谱构建及抗菌核病性状的 QTL 定位[J]. *遗传学报*, 2000, 27: 918-924.
LIU Chun-lin, GUAN Chun-yun, LI Ju, et al. Construction of molecular markers linkage map and QTL mapping for sclerotinia sclerotiorum resistance in rapeseed[J]. *Journal of Genetics*, 2000, 27: 918-924. (in Chinese)
- [12] 刘后利. 油菜遗传育种学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000.
- [13] 刘平武, 周国岭, 杨光圣, 等. 双低甘蓝型油菜杂交种亲本指纹图谱构建和杂交种纯度鉴定[J]. *作物学报*, 2005, 31(5): 640-646.
LIU Ping-wu, ZHOU Guo-ling, YANG Guang-sheng. Fingerprints construction of hybrid parents in *B. rassaica napus* and its utilization in hybrid purity test[J]. *Acta Agronomica Sinica*, 2005, 31(5): 640-646. (in Chinese)
- [14] 李爱民, 张永泰, 惠飞虎. 未来油菜品质改良趋势[J]. *中国种业*, 2002(1): 26-27.
LI Ai-ming, ZHANG Yong-tai, HUI Fei-hu. Trend of rapeseed quality improvement[J]. *China Seed Industry*, 2002(1): 26-27. (in Chinese)
- [15] 李佳, 沈斌章, 韩继祥, 等. 一种有效提取油菜叶片总 DNA 的方法[J]. *华中农业大学学报*, 1994, 13(5): 521-523.
LI Jia, SHEN Bing-zhang, HAN Ji-xiang, et al. A effective procedure for extracting total DNA in rape[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1994, 13(5): 521-523. (in Chinese)
- [16] 肖复明, 熊彩云, 刘江毅. 分子标记技术与物种多样性保护[J]. *江西林业科技*, 2002(1): 25-28.
XIAO Fu-ming, XIONG Cai-yun, LIU Jiang-yi. Molecular marker technique and species diversity conservation[J]. *Jiangxi forestry Science and Technology*, 2002(1): 25-28. (in Chinese)
- [17] 张冬晓. 我国油菜生产的发展与展望[J]. *中国油料作物学报*, 2001, 23(4): 79-81.
ZHANG Dong-xiao. The development and prospect on rapeseed produce in China[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2001, 23(4): 79-81. (in Chinese)
- [18] 张鲁刚, 王鸣, 陈杭, 等. 中国白菜 RAPD 分子遗传图谱的构建[J]. *植物学报*, 2000, 42(5): 485-489.
ZHANG Lu-gang, WANG Ming, CHENG Hang, et al. Construction of RAPD markers linkage map in Chinese cabbage[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(5): 485-489. (in Chinese)
- [19] 余四斌, 徐才国. 用 RAPD 技术鉴定水稻种子纯度初探[J]. *种子*, 1996(5): 56-57.
YU Shi-bing, XU Cai-guo. Using RAPD molecular marker technique to identify seed purity[J]. *Seed*, 1996(5): 56-57. (in Chinese)
- [20] 中国农学会遗传资源学会. 中国作物遗传资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1994: 517-546.
- [21] 方宣灼, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2000.

(责任编辑: 秦和平, 李春丽)