

甘蓝型油菜隐性核三系临保系遗传多样性分析

陈 雪, 王 瑞, 张胜森, 郭青青, 李加纳

西南大学 农学与生物科技学院, 重庆 400715

摘要: 利用油菜 50K SNP 芯片对 39 份甘蓝型油菜临保系进行遗传多样性分析, 绘制 SNP 标记染色体密度图。结果表明: SNP 标记并非均匀分布在每条染色体上, 甚至有些区段的 SNP 标记空缺; 通过 MEGA5 和 SNPhylo 分别绘制出聚类分析图和遗传进化树, 其分类结果趋于一致, 但遗传进化树展示聚类结果更为直观。使用 MEGA5 聚类分析, 设置阈值为 0.3, 可将临保系材料分为 4 个类群, 聚类结果和花色及品质的考察结果基本一致。

关 键 词: 甘蓝型油菜; SNP 芯片; 临保系

中图分类号: S565

文献标志码: A

文章编号: 1673-9868(2021)08-0036-06

甘蓝型油菜是我国重要的油菜作物^[1], 存在明显的杂种优势。杂种优势利用的途径包括化学杀雄^[2]、波里马不育^[3]、萝卜质不育^[4]、显性核不育^[5]、自交不亲和性^[6]、细胞质+细胞核双重不育^[7-8]和隐性核不育^[9-10]等, 隐性核不育因其恢复源广泛且配组自由成为杂种优势利用的主要途径。但隐性核不育存在需与临保系搭配使用这一问题, 让其利用受到很大限制。

遗传多样性分析是种质资源评价和杂种优势利用的基础。随着高通量测序技术和功能基因组学的发展, SNP 芯片为作物种质资源的遗传多样性分析提供了新的技术手段, 目前已有甘蓝型油菜 SNP 芯片应用于聚类分析和基因定位研究^[11-12]。本文以西南大学油菜生物学团队选育出的 39 份甘蓝型油菜隐性核三系临保系为材料, 通过武汉双绿源创芯科技研究院有限公司提供的油菜 50K SNP 芯片分析评价其遗传多样性, 为临保系配制隐性核不育提供准确的遗传背景指导。

1 材料与方法

1.1 材 料

试验材料 39 份, 为西南大学油菜生物学选育的甘蓝型油菜隐性核三系临保系。

1.2 方 法

1.2.1 播种与取样

2018 年 10 月初将材料播种于重庆市北碚区西南大学歇马油菜基地试验田, 于苗期摘取每份临保系材料生长大小一致的 3 个单株的幼嫩叶置于 2 mL 离心管中, -20 °C 冰箱保存。

1.2.2 DNA 提取

用 CTAB 法^[13]提取 DNA, 用 1.0% 琼脂糖电泳检查 DNA 的质量, 用 Nanodrop 核酸蛋白质分析仪检测 DNA 的浓度, 并将 DNA 浓度稀释成 50 ng/L, -20 °C 保存备用。

1.2.3 SNP 芯片分析

使用油菜 50K 高通量芯片对 39 份临保系的每份材料进行 DNA 光学扫描, 通过光学设备扫描“红”或

“绿”和“有”或“无”来区分一个 SNP 位点. 此 SNP 芯片检测通量大, 几十个位点可以通过 1 次检测完成, 并且具有高达 99.9% 以上的检测准确性.

1.2.4 数据统计与分析

在 R3.5.0 环境下使用 CMplot 包(<https://github.com/YinLiLin/R-CMplot>)对临保系所有 SNP 位点统计各染色体 SNP 密度; 基于 neighbor-joining 算法使用 MEGA5^[14] 软件对 39 个临保系 SNP 标记数据进行聚类分析; Lee 等^[15] 在 2014 年开发出 SNPhylo 流程(<http://chibba.pgml.uga.edu/snphylo/>), BASH 命令行一步执行生成遗传进化树. 39 个临保系 SNP 标记数据文件通过选择参数提取具有代表性的 SNP 位点, MUSCLE 多重比较, DANML 制作最大似然树得到进化树图像.

2 结果与分析

2.1 表型观察与统计

39 份甘蓝型油菜临保系在品质、角果长度、种子颜色、花瓣颜色、抗倒、株型和生育期等方面不尽一致, 其简易表型观察如表 1. RW01-RW21 品质为低芥酸低硫苷, 花瓣颜色为典型黄色. RW22-RW39 材料中, RW22 为低芥酸高硫苷, RW37 为高芥酸高硫苷, 其余品质都为高芥酸低硫苷, 而花瓣色泽为白花、粉白色、粉桃色、桃红色不等. 这些临保系的隐性上位基因和隐性不育基因处于隐性纯合状态, 其他遗传背景通过各种育种手段和技术发生了重组和交换.

表 1 39 份甘蓝型油菜隐性核三系临保系简易表型观察

代号	芥酸/%	硫苷/%	角果长度	种子颜色	花瓣颜色	其 他
RW01	0	27.23	长	黑籽	黄花	抗倒、株型性状优异
RW02	0	34.42	短	黄籽	黄花	抗倒、株型性状优异
RW03	0	42.77	极短	黄籽	黄花	抗倒、株型性状优异
RW04	0	47.48	中	黄籽	黄花	晚熟、抗倒、秆硬
RW05	0	39.86	中	黄籽	黄花	易倒伏
RW06	0	30.37	中	黄籽	黄花	易倒伏
RW07	0	29.56	中	黄籽	黄花	易倒伏
RW08	0	25.11	中	黄籽	黄花	易倒伏
RW09	0	40.35	中	黄籽	黄花	抗倒
RW10	0	31.30	中	黄籽	黄花	抗倒
RW11	0	29.08	中	黄籽	黄花	抗倒、株型性状优异
RW12	0	30.56	中	黄籽	黄花	抗倒、株型性状优异
RW13	0	32.37	极短	黄籽	黄花	抗倒
RW14	0	32.27	中	黑籽	黄花	抗倒、株型性状优异
RW15	0	39.37	长	黑籽	黄花	高大、抗倒、分支部位高
RW16	0	32.28	长	褐籽	黄花	高大、抗倒、茎秆粗壮
RW17	0	38.37	长	褐籽	黄花	高大、抗倒、茎秆粗壮
RW18	0	29.86	中	青黄籽	黄花	抗倒
RW19	0	34.65	中	黄籽	黄花	抗倒
RW20	0	31.40	中	黄籽	黄花	抗倒
RW21	0	42.78	长	黑籽	黄花	抗倒
RW22	0	115.00	中	黑籽	粉花	抗倒
RW23	21.26	32.27	短	褐籽	白花	植株矮弱小
RW24	19.61	58.51	中	青黄籽	粉白色花	抗倒、株型性状优异

续表 1

代号	芥酸/%	硫苷/%	角果长度	种子颜色	花瓣颜色	其 他
RW25	42.06	27.63	中	黑籽	粉桃色花	抗倒、株型性状优异
RW26	18.06	54.73	中	黑籽	白花	分枝多、株型好
RW27	21.31	90.22	长	红黑籽	白花	抗倒、株型性状优异
RW28	42.31	37.46	中	褐籽	白花	叶片极大，开花晚
RW29	19.66	55.64	中	黑籽	白花	抗倒、株型性状优异
RW30	40.72	43.43	中	红黑籽	桃红色花	开花早
RW31	30.16	46.88	中	黄籽	桔红色花	分枝角度小、秆硬抗倒
RW32	19.38	31.33	长	黄籽	粉白色花	抗倒、株型性状优异
RW33	17.22	87.24	中	红籽	粉白色花	抗倒、株型性状优异
RW34	15.43	21.70	中	红黑籽	粉桃色花	植株矮、叶片大、开花晚
RW35	38.69	95.23	长	黑籽	粉桃色花	叶片大、叶片多
RW36	18.38	25.09	中	红黑籽	粉桃色花	叶片大、叶片多、开花晚
RW37	21.54	119.62	中	青黄籽	粉白色花	抗倒、株型性状优异
RW38	18.98	79.91	中	红黑籽	白花	抗倒、株型性状优异
RW39	21.78	85.37	中	红黑籽	白花	开花早

2.2 SNP 密度分布

利用武汉双绿源创芯科技研究院有限公司的油菜 50K SNP 芯片对 39 份临保系材料进行基因型鉴定，共鉴定出 25 401 个高质量的 SNP 标记，使用 CMplot R 包绘制 19 条染色体 SNP 密度分布图(图 1)。结果显示，SNP 标记并非在染色体上均匀分布，染色体 Chr11 和 Chr14 出现 SNP 标记数大于 113 个/Mb，而几乎每条染色体都存在 SNP 标记空缺的现象。



图 1 SNP 密度分布图

2.3 MEGA5 分析 39 份临保系遗传多样性

利用生物学软件 MEGA5 和 SNP 标记数据文件，基于 neighbor-joining 算法对 39 份临保系进行聚类分析(图 2)。在 0.3 阈值下，39 份材料可聚成 A,B,C,D 4 个大类，A 类群只包括 RW22，为黑籽粉花临保系；B 类群体包括 19 份材料，除 RW03,RW13 两个角果极短的黄籽黄花材料外，其余为高芥酸、非黄花临保系；C 类群体包括 10 份材料，为低芥酸低硫苷、黄籽黄花临保系；D 类群体包括 9 份材料，为低芥酸、抗倒伏黄花临保系。因此，聚类分析可用于区别花色和品质性状，也可应用于甘蓝型油菜临保系遗传背景和性状之间的比较和评价。

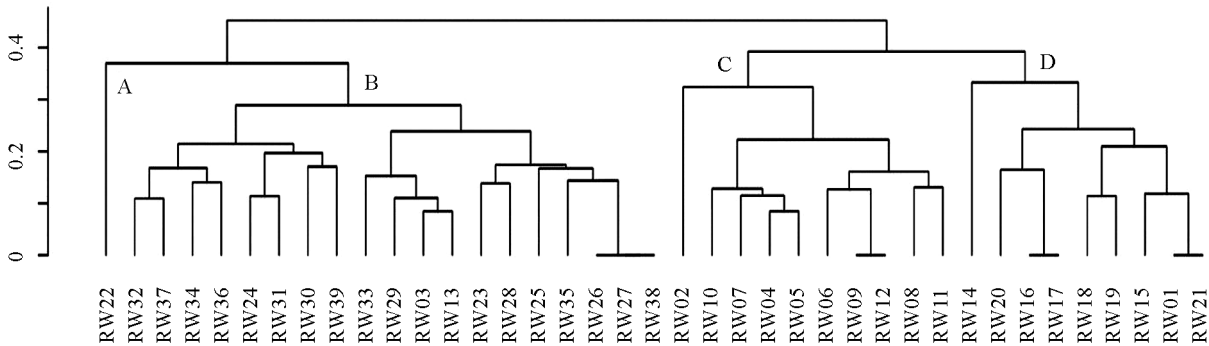


图 2 39 份甘蓝型油菜临保系聚类图

2.4 SNPhylo 分析 39 份临保系遗传多样性

利用生物学软件 SNPhylo 分析 SNP 位点数据,构建 39 份临保系材料的遗传进化树(图 3)。进化树显示出 5 个主干分支,RW03,RW13 和 RW22 分布在中心节点附近。低芥酸低硫苷和黄花临保系分布在两个主干分支上,一个分支上有 RW01,RW15,RW20,RW14,RW18,RW19,RW17 等,另一个主干分支上有 RW02,RW07,RW10,RW06 等。同一主干分支的临保系遗传背景最为接近,其分布距离反映出临保系之间的遗传距离。而高芥酸非黄花临保系分布在另外 2 个分支上。RW28,RW23,RW35,RW26,RW27,R38,RW25 在同一分支上分散。RW31,RW24,RW30 和 RW32,RW37 以及 RW34,RW39,RW36 分别处于同一个主干分支下的 3 个次生分支上。此外,还有一主干分支上分布着 RW29 和 RW33。遗传进化树可区分品质性状和花瓣颜色性状,但对种子颜色、抗倒等其他性状不能区分。与聚类分析结果一致,但遗传进化树与聚类图相比较更为形象直观,材料的遗传亲缘关系反映尤为充分。

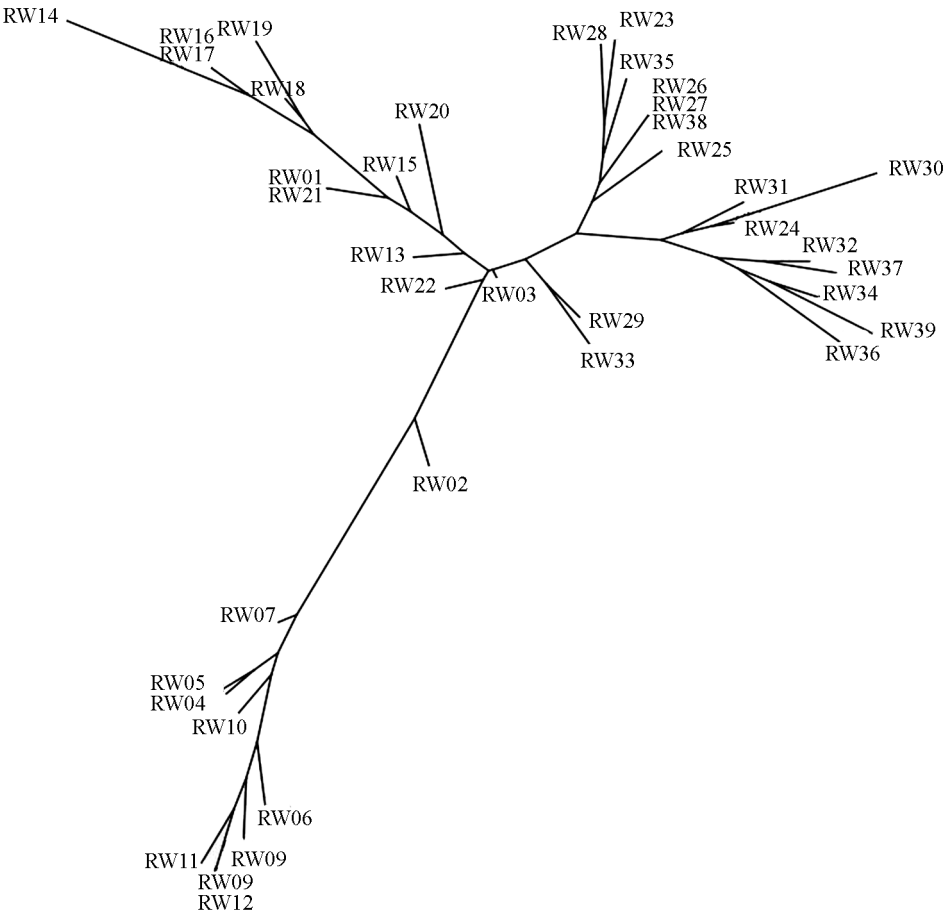


图 3 39 个甘蓝型油菜临保系遗传进化树

3 讨论和结论

利用 SSR, AFLP, SNP, SCAR 等各种标记方法, 甘蓝型油菜遗传多样性分析已在黄籽油菜^[16]、隐性核不育^[17]、杂交亲本评价、油菜区试指纹图谱^[18]等方面做了很多研究工作, 甘蓝型油菜隐性核三系临保系在选育策略^[19-20]、分子标记^[21-22]、专利和应用^[23]等方面也取得了多项成果, 但利用 SNP 芯片分析甘蓝型油菜隐性核三系临保系遗传多样性还未有文献报道。本研究利用 50K 油菜芯片 SNP 对 39 份甘蓝型油菜临保系材料进行遗传分析, 结果表明临保系材料间具有较好的遗传多样性。根据 SNP 数据绘制染色体 SNP 密度分布图, SNP 标记基本覆盖了整个染色体组, 但并非均匀分布, 甚至每条染色体都出现 SNP 标记空缺现象, 表明武汉双绿源创芯科技研究院有限公司开发的油菜 50K SNP 芯片设计不够完善, 也说明临保系材料数量太少, 遗传变异类型不够丰富。

对 39 份临保系材料的聚类结果表明, 表型为粉白色、抗倒伏、株型性状优异的临保系材料 RW32 和 RW37 优先聚集到一起; 表型为粉桃色、叶片大、花期晚的临保系材料 RW34, RW36 也优先聚集到一起, 这充分说明 SNP 芯片揭示的遗传多样性和性状基本一致, 可以充分反映材料之间的遗传差异。在该研究中, 临保系 RW22 单独聚为一类, 与其他材料具有明显的遗传特异性, 而在表型上该材料确实具有黑籽、粉花等非常特殊的农艺性状, 需要对该特异种质资源加以保存和利用。由此可见, SNP 聚类结果能较好地反映材料间的亲缘关系, 可为种质资源的利用提供参考。

参考文献:

- [1] 许代香, 贾乐东, 王 瑞, 等. 甘蓝型油菜显性核不育系 D3A 的细胞学研究 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2020, 42(1): 16-21.
- [2] 王彦明, 叶朝红, 付云龙, 等. 化学杀雄剂在油菜制种中的应用回顾与展望 [J]. 种子科技, 2019, 37(16): 12-13.
- [3] 王俊霞, 杨光圣, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜 PolCMS 育性恢复基因的 RAPD 标记 [J]. 作物学报, 2000, 26(5): 575-578.
- [4] 王同华, 陈卫江, 李 莓, 等. 甘蓝型油菜萝卜细胞质雄性不育杂种优势利用研究进展 [J]. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2777-2783.
- [5] 李树林, 钱玉秀, 吴志华. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传验证 [J]. 上海农业学报, 1986(2): 1-8.
- [6] 安彩泰, 李学才, 孙万泉. 甘蓝型油菜自交不亲和系 1010 及其在杂种优势育种中的利用研究 [J]. 甘肃农业大学学报, 1990, 25(1): 51-56.
- [7] 张瑞茂, 陈大伦, 李 敏, 等. 甘蓝型油菜双隐性基因细胞核+广恢型细胞质双重雄性不育系 ZCL801A 的选育 [J]. 种子, 2004, 23(10): 71-74.
- [8] 唐章林, 李加纳, 谌 利, 等. 甘蓝型油菜细胞核+细胞质双重不育系选育及研究 [J]. 西南农业学报, 2002, 15(1): 1-4.
- [9] 侯国佐, 王 华, 张瑞茂. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育材料 117A 的遗传研究 [J]. 中国油料, 1990(2): 7-11.
- [10] 陈凤祥, 胡宝成, 李 成, 等. 甘蓝型油菜细胞核雄性不育性的遗传研究: I. 隐性核不育系 9012A 的遗传 [J]. 作物学报, 1998, 24(4): 431-438.
- [11] 俎 峰, 赵凯琴, 张云云, 等. 利用 SNP 芯片构建甘蓝型油菜高密度遗传连锁图谱及含油量性状 QTL 分析 [J]. 西南农业学报, 2019, 32(10): 2279-2284.
- [12] 桑世飞, 王 会, 梅德圣, 等. 利用全基因组 SNP 芯片分析油菜遗传距离与杂种优势的关系 [J]. 中国农业科学, 2015, 48(12): 2469-2478.
- [13] 阎星颖. 甘蓝型油菜油脂 QTL 定位及油酸脱氢酶 FAD2 基因的克隆和分子进化 [D]. 重庆: 西南大学, 2012.
- [14] KUMAR SUDHIR, STECHER GLEN, TAMURA KOICHIRO. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets [J]. Molecular Biology and Evolution, 2016, 33(7): 1870-1874.
- [15] TAE HO LEE, HUI GUO, XIYIN WANG, et al. SNPhylo: a Pipeline to Construct a Phylogenetic Tree from Huge SNP Data [J]. BioMed Central, 2014, 15(1): 162.
- [16] 雷天刚, 张学昆, 李加纳, 等. 甘蓝型黄籽油菜 SSR 标记遗传多样性 [J]. 中国油料作物学报, 2005, 27(1): 41-45.
- [17] 李德文, 王 瑞, 魏忠芬, 等. 甘蓝型油菜隐性核不育种质的 SSR 遗传多样性分析 [J]. 西南农业学报, 2013, 26(2):

415-422.

[18] 赵仁欣, 李森业, 郭瑞星, 等. 利用 SNP 芯片构建我国冬油菜参试品种 DNA 指纹图谱 [J]. 作物学报, 2018, 44(7): 956-965.

[19] 吴新杰, 陈凤祥, 胡宝成, 等. 甘蓝型油菜隐性上位互作核不育同型临时保系选育新策略 [J]. 中国油料作物学报, 2016, 38(6): 737-741.

[20] 王 瑞, 李加纳, 唐章林, 等. 甘蓝型油菜显性纯合两用系和临时保持系同源化策略 [J]. 西南大学学报(自然科学版), 2009, 31 (8): 52-56.

[21] 任梦阳, 倪西源, 王 灏, 等. 甘蓝型油菜隐性核不育系 20118A 的育性遗传及分子标记辅助选择 [J]. 作物学报, 2012, 38(11): 2015-2023.

[22] 俎 峰, 夏胜前, 顿小玲, 等. 基于分子标记的油菜隐性核不育 7-7365AB 遗传模式探究 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(15): 3067-3075.

[23] 王伟荣, 杨立勇, 李延莉, 等. 甘蓝型双低隐性核不育杂交种‘沪油杂 8 号’的选育 [J]. 上海农业学报, 2013, 29(6): 1-3.

Genetic Diversity Analysis of 39 GMS Temporary
Maintainer Lines of Rapeseed (*Brassica napus*)

CHEN Xue, WANG Rui, ZHANG Sheng-sen,
GUO Qing-qing, LI Jia-na

School of Agronomy and Biotechnology, Southwest University, Chongqing 400715, China

Abstract: The genetic diversity of 39 temporary maintainer lines of rapeseed (*Brassica napus* L.) was analyzed by using 50K SNP microarray, and a chromosome density map of SNP markers was plotted. The results showed that SNP markers were not evenly distributed on every chromosome, and some SNP markers were absent in some regions of the chromosome. A cluster analysis diagram and a genetic evolutionary tree were drawn with MEGA5 and Snphyl, respectively, and their classification results tended to be consistent with each other, but the genetic evolutionary tree gave a more visual representation of the clustering results. MEGA5 analysis, with the threshold set at 0.3, clustered the temporary maintainers into 4 groups, and the results were basically consistent with the inspection results of color and quality.

Key words: *Brassica napus* L. ; SNP chip; temporary maintainer

责任编辑 周仁惠