

西藏野生油菜遗传多样性分析

旦巴¹,傅廷栋²,孟霞¹,黄镇²,万正杰²,王建林¹,次仁旦达³,马朝芝^{2*}

(1. 西藏大学农牧学院作物分子育种实验室, 西藏 林芝 860000; 2. 华中农业大学作物遗传改良
国家重点实验室, 湖北 武汉 430070; 3 西藏日喀则地区萨嘎县旦嘎乡完全小学 857000)

摘要:利用 10 对 AFLP 引物及 13 对 SSR 引物, 分析了 43 份来自西藏地区部分野生类型油菜种质的遗传多样性。10 对 AFLP 引物共得到 276 条清晰的谱带, 其中多态性带 214 条, 多态性位点比率为 77.5%, 平均每对 AFLP 引物得到 21.4 条多态性带。13 对 SSR 引物共扩增出 57 条带, 其中多态性带 51 条, 多态性位点比率为 89.5%, 说明西藏野生油菜遗传多样性丰富。通过对西藏野生类型油菜资源的遗传距离以及聚类分析, 可将西藏野生类油菜分为两大类群, 分别为白菜型和芥菜型野生油菜种质资源; 两种分子标记适合揭示西藏野生油菜的遗传多样性。

关键词: AFLP; SSR; 西藏; 野生类油菜; 遗传多样性

中图分类号: S565.403 **文献标识码:** A **文章编号:** 1007-9084(2009)02-0109-05

Genetic diversity of Tibetan wild rapeseeds detected by AFLPs and SSRs

DAN Ba¹, FU Ting-dong², MENG Xia¹, HUANG Zhen², WAN Zheng-jie²,
WANG Jian-lin¹, Crendenda³, MA Chao-zhi^{2*}

(1. Tibet Plateau Crops Molecular Breeding Lab of Tibet Agriculture and Husbandry College, Linzhi 860000, China;
2. National Key Lab for Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China;
3. Primary School Danga Town Saga County Rikaze of region of Tibet 857000, China)

Abstract: 10 AFLP and 13 SSR primer combinations were used to amplify the 43 wild type rapeseed materials from Tibet. A total of 276 clear bands were produced by 10 AFLP pairs of primers, of which 214 bands were polymorphism with an average of 21.4 polymorphic bands per AFLP primer pair, and the polymorphic ratio was 77.5%. Meanwhile, 13 SSR primer pairs amplified 57 bands, with 51 polymorphisms, and the polymorphic ratio was 89.5%. Genetic distance based on AFLP and SSR showed that Tibetan wild type rapeseed germplasm has high genetic diversity. Clustering of most of 43 accessions were coincided with *B. campestris* or *B. juncea*, indicating that AFLPs and SSRs are fit for detecting the genetic diversity of Tibet wild rapeseed germplasm. All the results are beneficial for further identification and classification of the rich genetic resources of wild type rapeseed, and for breeding fine new varieties of rapeseed.

Key words: AFLP; SSR; Tibet; Wild type; Rape seeds Geno-diversity

西藏由于其独特的地质史, 特殊的地理概貌, 形成千差万别的生态环境, 从而孕育了丰富的油菜种质资源。西藏油菜具有耐寒、耐旱、耐瘠薄、含油量高^[1]等特点, 且保存有很多地方品种及处于原始生长状态的野生和半野生油菜。西藏的野生类型油菜阿达托启、雄菜、康布罗马等的芥酸含量幅度为

6.73% ~ 23.26%, 其中阿达托启最低, 芥酸含量仅有 6.73%, 是低芥酸油菜育种极珍贵的种质资源。当前, 发展油菜生产是西藏调整种植业结构的重要内容之一, 同时也是增加农民收入、满足居民食用植物油消费与饲用蛋白需求的重要途径, 因此很有必要对西藏野生油菜种质资源进行抢救性的收集和系

收稿日期: 2008-09-20
基金项目: 国家自然科学基金项目(30360055); 油菜现代产业技术体系建设项目(nycyt-00501)
作者简介: 旦巴(1971-), 男, 藏族, 西藏日喀则人, 讲师, 学士, 主要从事油菜遗传研究
*通讯作者: 马朝芝(1968-), 女, 湖北公安人, 副教授, 博士, 研究方向为油菜遗传育种, Tel: 027-87281733; E-mail: yuanbeauty@mail.hzau.edu.cn

统深入的研究,来拓展西藏栽培种油菜的遗传基础。以往对西藏油菜的研究主要集中在产量^[2]、品质^[3]、生育期^[4,5]、表型性状^[6,7]和利用^[1,8,9]等方面,利用分子标记技术研究西藏油菜,尤其是野生油菜遗传变异的研究尚未见报道。本项研究通过利用 AFLP(amplified fragment length polymorphism) 和 SSR(simple sequence repeats) 两种分子标记技术对西藏野生类型油菜种质资源进行多态性标记分析,以明确西藏野生类型油菜种质资源的分布情况及遗传多样性,进而探讨野生类型油菜之间、野生类型油菜同栽培种之间的亲缘关系,以及在新品种选育中的利用价值。

1 材料与方法

1.1 植物材料

野生类型油菜是由课题组从西藏藏中野生白菜型和野生芥菜型油菜地理分布中心区(桑日、林周、墨竹工卡、乃东、琼结、扎囊一带)和藏东三江流域野生白菜型油菜分布区(以昌都、洛隆、类乌齐、江达等)的偏远山村采集得到,并选用未经栽培驯化、同栽培油菜具有明显差异的材料,在林芝进行隔离繁殖,然后在武汉秋播。材料名称和来源等详见表1。

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 待幼苗长出3~4片真叶时取样。从每份自交系材料中随机选取5株,每株上取1~2片心叶,分装在5个1.5mL的离心管中。参照小样CTAB法提取基因组总DNA,提取DNA后,再把每份材料的5管DNA溶液混合在1个离心管中。用紫外分光光度计测定DNA浓度,稀释标定到50ng/ μ L。

1.2.2 PCR 分析

1.2.2.1 AFLP 分析

AFLP的分析参照Vos^[10]、陆光远^[11]等的描述方法进行。用于选择性扩增的P引物、MG引物,预扩增引物P0、MG,及对应的Pst I接头、Mse I接头均由上海Sangon合成。接头序列为:

MseI:左接头5'-GACGATGAGTCCTGAG-3'

右接头:3'-TACTCAGGACTCAT-5'

PstI:左接头5'-CTCGTAGACTGCGTACATG-CA-3'

右接头:3'-CATCTGACGCATGT-5'。

从45对引物组合中筛选多态性较高的10对扩增亲本总DNA。这些引物组合为:P₀₇/MG₀₃, P₀₉/MG₀₈, P₀₉/MG₁₆, P₁₁/MG₀₁ ~ MG₀₄, P₁₁/MG₁₂, P₁₅/MG₀₁, P₁₅/MG₁₆。

1.2.2.2 SSR 分析

PCR反应总体积为10 μ L:其中含50ng/ μ L样品DNA 3 μ L, 10mmol/L dNTP_s 0.2 μ L, 5U/ μ L TaqDNA聚合酶 0.1 μ L, 25mmol/L mg²⁺ 0.8 μ L, 50ng/ μ L引物 0.5 μ L, ddH₂O 4.4 μ L, 10 \times Buffer with (NH₄)₂SO₄ 1 μ L。PCR反应在PTC-225型基因扩增仪上进行。PCR循环参数为:94℃变性(2min);94℃变性(1min)-60℃复性(30s)-72℃延伸(45s);此后每个循环的退火温度降低0.5℃,共计9个循环;94℃变性(1min)-55℃复性(30s)-72℃延伸45s,29个循环;72℃(10 min),然后4℃保存。扩增产物的电泳分离和检测与AFLP分析方法相同。从分子标记连锁图上选择114对SSR标记^[12],筛选到多态性较高的13对SSR引物,扩增供试材料的DNA。

1.3 数据分析

每个样品按扩增条带的有无分别记为1和0,只记载清晰易辨的扩增带,统计每对引物扩增出的总带数,将10对AFLP引物和13对SSR引物所产生的扩增带数据输入到数据矩阵,在NTSYSpc version2.1统计分析软件系统中,按Nei和Li的方法计算AFLP扩增片段的遗传相似系数(GS)和遗传距离(GD),根据遗传相似系数(GS)按非加权配对法(UPGMA)进行SAHN聚类分析^[13,14]。

2 结果与分析

2.1 AFLP 引物扩增效果

10对AFLP引物组合对43份来自西藏地区部分野生类型油菜种质基因组DNA进行片段长度多态性扩增,共扩增出276条清晰可辨条带(片段大小在100bp至500bp之间)(图1),其中214条具有多态性,多态性位点比率为77.5%,平均每对AFLP引物得到21.4条多态性带。引物P₀₇/MG₈扩增出的36条带均属多态性。

2.2 SSR 引物扩增效果

13对SSR引物,共扩增出57条清晰可辨的条带(图2),多态性带51条,占89.5%,平均每对SSR引物检测出3.8条带,多态性带3.4条,说明参试材料间具有较大的差异,遗传多样性十分丰富。

2.3 聚类分析结果

AFLP检测到43份材料间的相似系数为0.23~0.97,平均为0.60。在0.36处可将参试材料聚为两大类群,野生白菜型-4(37)等19个材料聚为第一类,堆龙油菜(5)等24个材料聚为第二类。第一类在相似系数0.81处可进一步分为两个亚群,第

表 1 供试材料的来源和类型
Table 1 Origin and type of selected materials

编号 No.	材料 Material	类型 Type	来源 Origin	编号 No.	材料 Material	类型 Type	来源 Origin
1	米噶 Miga	<i>B. campestris</i> L.	山南桑日 Shannan sangr	23	芥菜型油菜-7 <i>B. juncea</i> L. 7	<i>B. juncea</i> L.	贡噶县昌果乡昌果村 Changguo village of Changguo township in Gongga County
2	本地种 Native population	unidentified	拉萨堆龙 Lhasa duilong	24	野生芥菜型-2 Wild. <i>B. juncea</i> L. . 2	Wild <i>B. juncea</i> L.	朗县拉多乡1村 No. 1 village of Laduo township in Lang County
3	江罗 Jiangluo	<i>B. campestris</i> L.	日喀则拉孜县 Rikaze lazi County	25	野生芥菜型-3 Wild. <i>B. juncea</i> L. 3	Wild <i>B. juncea</i> L.	堆龙德庆乡扎西岗村 Zhaxigang village of Duilongdeqing Country
4	琼吉 Qiongji	unidentified	拉萨林周 Lhasa linzhou	26	野生芥菜型-4 Wild. <i>B. juncea</i> L. 4	<i>B. juncea</i> L.	堆龙德庆乡扎西岗村 Zhaxigang village of Duilongdeqing Country
5	堆龙油菜 Duilong rapeseed	<i>B. juncea</i> L.	堆龙 Duilong	27	芥菜型油菜-8 <i>B. juncea</i> L. 8	Wild <i>B. juncea</i> L.	康马县南尼乡南尼村 Nanni village of Nanni township in Kangma County
6	白钦 Baiqin	<i>B. campestris</i> L.	日喀则拉孜县 Rikaze lazi County	28	绿茎秆芥菜型 green stalk <i>B. juncea</i> L.	Wild <i>B. juncea</i> L.	日喀则市尼日乡扎西岗村 Zhaxigang village of Niri township in Rikaze City
7	拉萨农家油菜 Lhasa domestic population	<i>B. campestris</i> L.	拉萨 Lhasa	29	野生芥菜型-5 Wild. <i>B. juncea</i> L. 5	Wild <i>B. juncea</i> L.	白朗县罗噶乡加噶村 Jiaga village of Luoga township in Bailang County
8	吉泽-1 Jize1	Wild <i>B. juncea</i> L.	谢通门 Xietongmen County	30	野生芥菜型-6 Wild. <i>B. juncea</i> L. 6	Wild <i>B. juncea</i> L.	康马县少岗村 Shaogang village of Kangma County
9	仁布油菜 Renbu rapeseed	<i>B. campestris</i> L.	仁布县 Renbu County	31	上生(先)分枝 野生芥菜 Up-grown ramification wild rapeseed	Wild <i>B. juncea</i> L.	林周县布堆乡 Budui township of Linzhou County
10	多钦 Duoqin	<i>B. campestris</i> L.	山南曲松 Shannan qusong County	32	野生芥菜型-7 Wild. <i>B. juncea</i> L. 7	Wild <i>B. juncea</i> L.	工布江达县松多镇罗玛林村 Luomalin village of Songduo township in Gongbujiangda County
11	吉泽-2 Jize2	<i>B. juncea</i> L.	山南曲松 Shannan qusong County	33	野生白菜型-1 Wild <i>B. campestris</i> L. 1	Wild <i>B. campestris</i> L.	贡嘎县贡嘎村 Gongga village of Gongga County
12	扎囊野油菜 Zhanang Wild rapeseed	Wild <i>B. campestris</i> L.	山南扎囊 Shannan zhanang County	34	小花瓣油菜 Small petal Rape	unidentified	琼结县 Qiongjie County
13	黄花芥菜型 Yellow flower <i>B. juncea</i> L.	<i>B. juncea</i> L.	谢通门龙玛乡龙玛村 longma village of Xietongmen County	35	野生白菜型-2 Wild <i>B. campestris</i> L. 2	<i>B. campestris</i> L.	乃东县昌珠村 Changzhu village of Naidong County
14	芥菜型油菜-1 <i>B. juncea</i> L. 1	<i>B. juncea</i> L.	左贡县田妥镇 Tiansui township of zuogong County	36	野生白菜型-3 Wild <i>B. campestris</i> L. 3	<i>B. campestris</i> L.	昌都县 Changdou County
15	野生芥菜型-1 Wild. <i>B. juncea</i> L. 1	<i>B. juncea</i> L.	朗县拉龙乡一村 No. 1 village of lalong township of lang County	37	野生白菜型-4 Wild <i>B. campestris</i> L. 4	<i>B. campestris</i> L.	类乌齐几多乡 Jiduo township of Leiwuqi
16	芥菜型油菜-2 <i>B. juncea</i> L. 2	<i>B. juncea</i> L.	拉孜县杰孜村 jiezi village of Lazi County	38	野生白菜型-5 Wild <i>B. campestris</i> L. 5	Wild <i>B. campestris</i> L.	扎囊县德汝村 Deru village of Zhanang County
17	芥菜型油菜-3 <i>B. juncea</i> L. 3	<i>B. juncea</i> L.	乃东县昌珠村 Changzhu village of naidong County	39	野生白菜型-6 Wild <i>B. campestris</i> L. 6	Wild <i>B. campestris</i> L.	扎囊县德汝村 Deru village of Zhanang County
18	芥菜型油菜-4 <i>B. juncea</i> L. 4	<i>B. juncea</i> L.	曲水县仓木拉乡6村 No. 6 village of cangmula country of Qushui County	40	白菜型油菜-1 <i>B. campestris</i> L. 1	<i>B. campestris</i> L.	左贡县田妥镇 Tiansui township of Zuogong County
19	芥菜型油菜-5 <i>B. juncea</i> L. 5	<i>B. juncea</i> L.	日喀则市尼日乡扎西岗村 Zhaxigang village of niri township in Rrikaze City	41	白菜型(容纳) <i>B. campestris</i> L.	<i>B. campestris</i> L.	洛隆县托镇 Luolongzi Country
20	下生分枝野生油菜 Lower grow ramification wild rapeseed	unidentified	林周县布堆乡纳热村 Nare village of Budui township in Linzhou County	42	白菜型油菜-2 <i>B. campestris</i> L. 2	<i>B. campestris</i> L.	当雄羊八井拉多乡 Laduo township of Dangxiong Yangbajing
21	芥菜型油菜-6 <i>B. juncea</i> L. 6	<i>B. juncea</i> L.	桑日县央乡 Jiayang township of Sangri County	43	白菜型油菜-3 <i>B. campestris</i> L. 3	<i>B. campestris</i> L.	昌都 Changdou
22	绿色茎秆芥菜型 Green stalk <i>B. juncea</i> L.	Wild <i>B. juncea</i> L.	桑日县桑日镇 Sangri township of Sangri County				

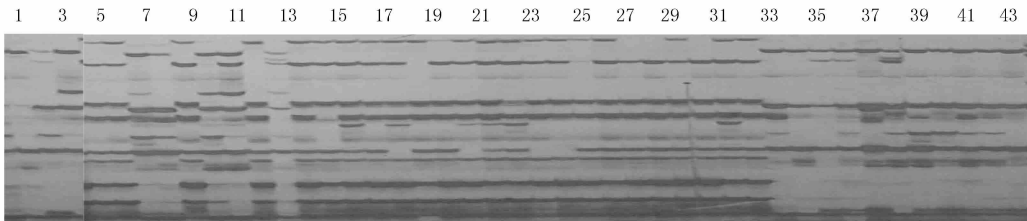
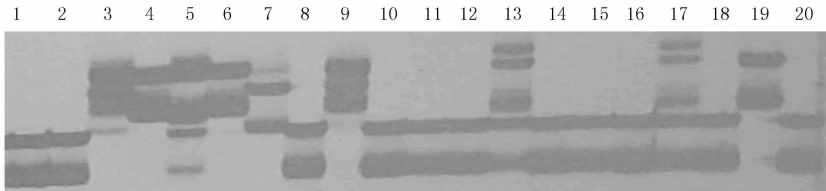


图1 AFLP 引物 P₁₅/MG₁₆ 在 43 份供试材料中的扩增图

Fig. 1 Amplified patterns of 43 materials with AFLP primer P₁₅/MG₁₆



注:图中9、17 分别为扎囊野生油菜和下生分枝野生油菜

Note: Line 9,17 were Zhanang wild rapeseed and lower grow ramification wild rapeseed

图2 SSR 引物 SSR527 对部分野生型油菜的扩增结果

Fig. 2 Amplification result of some wide-type rapeseed by primer SSR527

表2 AFLP 和 SSR 标记产生的带型分析

Table 2 Analysis of band patterns produced by AFLP and SSR

标记 Marker type	引物对数 No. of Primer pairs	总带数 Total No. of bands	多态性带数 No. of polymorphic bands	多态性比率/% Ratio of polymorphic bands	每个引物产生的带数 No. of bands per assay unit
AFLP	10	276	214	77.5	27.6
SSR	13	57	51	89.5	4.38

一亚类包括江罗等 18 份参试材料,此亚类中,(1)米嘎等地方材料在不同水平上聚为一小类;第二亚类仅包括(37)野生白菜型-4 一个材料;第二类在 0.85 处分为两个亚类,第一亚类包括(13)黄花芥菜型等 5 份材料,第二亚类包括(4)琼吉等 19 份材料,此亚类中,19 份材料也在不同水平上聚为一小类(图 3)。

根据 SSR 的扩增结果得到 43 份材料间的相似系数为 0.49~1.0,平均为 0.79。参试材料在遗传距离 0.62 处被明显地区分为两类,第一大类群包括扎囊野油菜等 19 份白菜型野生油菜材料,另外 24 份材料聚为第二大类。第一大类群又可分为两个亚群,第一亚群仅(1)米嘎一个材料,其余材料聚集在第二亚群中,第二亚群在不同水平上聚为一小类;第二大类群包括(13)黄花芥菜型等 24 份,在 0.89 处可分为四个亚群,第一亚群包括来自堆龙德庆乡扎西岗村(25)野生芥菜型油菜-3 和(26)野生芥菜型油菜-4 等共计 19 个材料,第二亚群包括(16)芥菜型油菜-2、(20)下生分枝野生油菜、(22)绿色茎秆芥菜型三个材料,第三亚群和第四亚群都仅有一个材料,分别为(19)芥菜型油菜-5 和(29)野生芥菜型-5(图 4)。

AFLP 和 SSR 两种分子标记所构建的聚类图都将本研究的 43 份材料分为两大类,每一类包含相同

的材料,如第一类包括米嘎(1)等 17 份白菜型油菜和本地种(2)、小花瓣油菜(34)两份类型未知的材料,第二类包括 24 份材料,除了琼吉(4)和下生分枝野生油菜(20)类型未知外,其余的 22 份材料全部为芥菜型油菜。在亚类的划分上,两种标记存在一定的差异,如在 SSR 聚类结果中,(25)野生芥菜型-3 和(26)野生芥菜型-4 之间的遗传相似性系数达到 0.98,表现很高的亲缘关系;(14)芥菜型油菜-1 同(12)扎囊野油菜之间的遗传相似性系数最低,为 0.49;(1)米嘎仅一个材料为一个亚群。AFLP 聚类结果中,(25)野生芥菜型-3 和(26)野生芥菜型-4 之间的遗传相似性系数为 0.85,两材料并未聚在一起;(20)下生分枝野生油菜与(12)扎囊野油菜之间的遗传相似系数最低,为 0.25;(37)野生白菜型油菜-4 单独聚为一个亚类。

3 讨论

分子标记技术是 20 世纪 80 年代发展起来的,应用于作物育种研究已有 20 余年时间。迄今为止,分子标记技术已被成功地用于研究植物材料的遗传多样性等^[15]。但是,利用分子标记技术研究涉及西藏油菜的文献及报道很少。本文利用 AFLP 及 SSR 分子标记技术,对西藏野生类型油菜资源的遗传距离以及聚类分析表明,西藏各地方的野生类型油菜

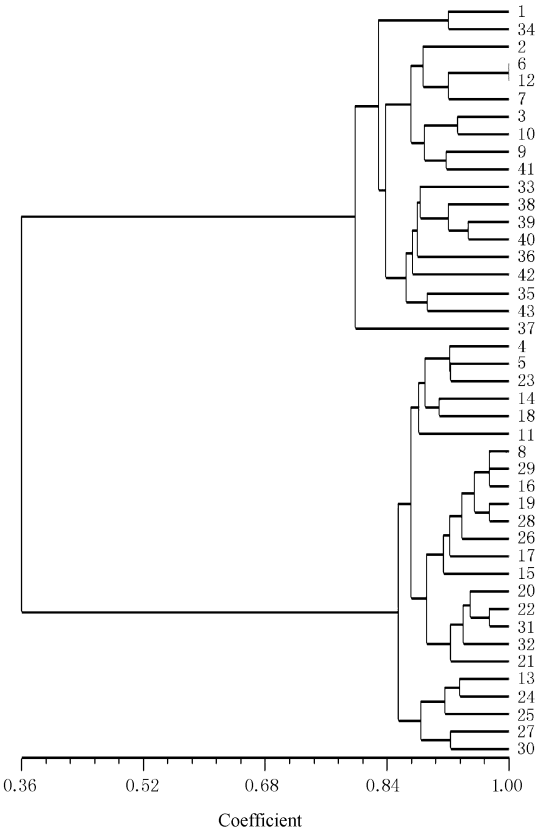


图3 43份供试材料 AFLP 分析聚类图
Fig.3 Dendrogram of 43 material based on AFLPs

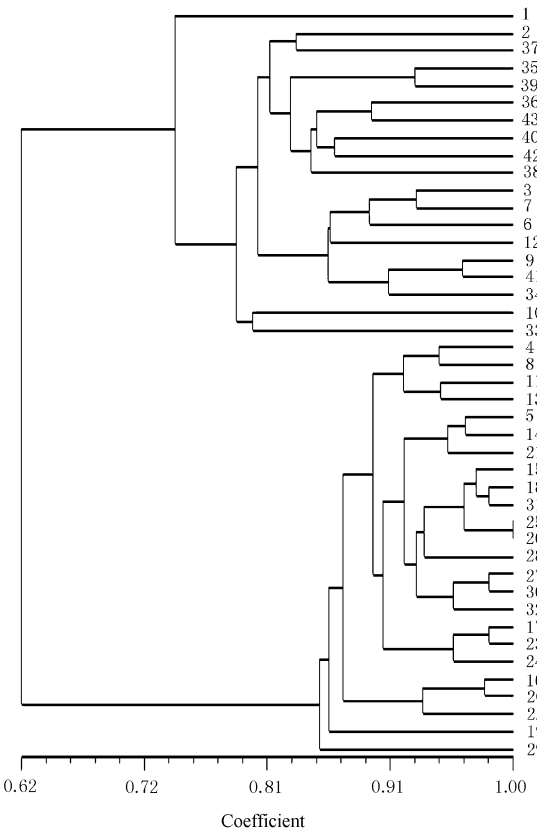


图4 43份供试材料 SSR 分析聚类图
Fig4. Dendrogram of 43 material based on SSRs

都聚集到相应的白菜型及芥菜型油菜中,两种分子标记都能有效地揭示西藏野生油菜的遗传多样性。

AFLP 及 SSR 结果分析表明,西藏野生类型油菜种质资源的遗传多样性非常丰富,这同以往研究栽培型油菜遗传多样性^[16]以及栾运芳等表型性状的观察结果相一致。据栾运芳等种植观察,西藏野生白菜型油菜和芥菜型油菜的茎秆色泽、茎秆上的刺毛变化非常丰富^[7],表现很高的遗传多样性。西藏特殊的地理环境和自然条件是油菜品种的遗传多样化的主要原因。在研究过程中,发现一些特殊的种质资源,如扎囊野油菜、下生分枝野生油菜、芥菜型油菜-1 等野生类油菜在每对 AFLP 引物及 SSR 引物中扩增得到的带型及表型性状上同其它油菜类型存在较大差异,同其它油菜材料之间的遗传距离也较远,说明这几份材料可能比较特别,具有潜在的利用价值。本地种(2)及琼吉(4)这两个供试材料在形态上似白菜型油菜,但分别聚在白菜类野生油菜和芥菜类野生油菜中,两种分子标记聚类分析结果完全一致;类型不清的材料下生分枝野生油菜及小花瓣油菜分别属芥菜类油菜和白菜类油菜。这些分类未知材料形态与分子标记分类上的差异可能预示着它们有特殊的利用价值。

两种标记聚类结果都显示,芥菜型野生油菜之间的遗传相似系数相对于白菜型野生油菜要高些,造成这一现象的原因,可能是由于:(1)西藏属高寒地区,各地方以种植白菜型油菜为主,白菜类型油菜广泛地分布在西藏各地方;(2)白菜型油菜属典型的异花授粉植物,有利于遗传变异的产生和保持。

西藏相对于祖国内地,油菜基础及应用基础研究相对滞后,油菜育种工作也局限于常规方法。长期以来,培育和推广适应西藏本地的高产、优质新品种甚少,生产中普遍以种植农家品种为主。特别是寻找与高产、优质、抗病虫等有关的目标性状的聚合种质较难,新品种选育进程很慢,而且西藏各个地区的气候条件、海拔高低等相差甚大,对于一些新品种在西藏大面积推广带来一定的困难。分子标记方法已成为把野生种质的有利基因转入栽培种的一种有效的检测手段^[17],必须不断搜集和挖掘西藏优良的野生类型油菜种植资源,以应用于优异种质资源创新,来不断发展油菜生产和适应西藏经济发展需求。本研究揭示出西藏野生类型油菜种质资源材料具有丰富的遗传多样性,充分利用西藏当地油菜丰富遗传