

# SRAP和 SSR标记构建的 甘蓝型油菜品种指纹图谱比较

文雁成<sup>1,2</sup>, 王汉中<sup>1\*</sup>, 沈金雄<sup>1</sup>, 刘贵华<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院油料作物研究所, 湖北 武汉 430062; 2. 河南省农业科学院棉花油料作物研究所, 河南 郑州 450002)

**摘要:**利用 SRAP(sequence - related amplified polymorphism)和 SSR标记构建了甘蓝型油菜品种指纹图谱,并对两种标记方法进行了比较。结果表明:(1)每对 SRAP引物扩增出 20.36个条带,其中 4.44个是清晰、易于辨认的多态性带;每对 SSR引物扩增出 3.88个条带,均为多态性条带。(2)采用 25对 SRAP和 SSR引物分别构建 40个和 75个品种的特异指纹图谱,SRAP指纹中具有特异图谱的比例(82.5%和 50.7%)高于 SSR指纹图谱的结果(60.0%和 44.4%)。品种数越多具有特异指纹的品种越少。(3)运用引物组合法构建品种指纹图谱,大大地提高了指纹图谱的特异性。25对 SSR引物组合扩增 97个多态性谱带,两个不同的品种具有相同谱带的概率只有  $6.3108 \times 10^{-30}$ 。组合指纹图谱比组合数码图谱更直观。与 SRAP标记相比,SSR标记以其扩增谱带少、易于识别和统计而更适合用于引物组合法构建品种指纹图谱。

**关键词:**甘蓝型油菜;品种;指纹图谱;SRAP标记;SSR标记

**中图分类号:**S565.403 **文献标志码:**A

**文章编号:**1007—9084(2006)03—0233—07

用于油菜品种真实性鉴定的方法包括农艺性状鉴定、同功酶、蛋白质电泳图谱鉴定和 DNA 指纹图谱鉴定<sup>[1]</sup>。其中农艺性状鉴定受季节和环境条件的影响,可靠性较差,鉴定周期长。同功酶和蛋白质是基因表达的产物,遗传多态性位点少,难以有效鉴别遗传关系较密切的品种<sup>[2]</sup>。DNA 指纹技术不受取材部位、取材时间和环境影响,大大地提高了鉴定的精度,缩短鉴定时间,是一种最为科学有效的鉴定品种真实性的方法。指纹图谱在作物品种鉴定、品种注册、良种质量监测以及知识产权保护等方面具有重要作用。

用来构建品种指纹图谱的 DNA 分子标记方法有 RFLP、RAPD、AFLP 和 SSR 等。其中 RFLP 标记需要高质量和足够数量的 DNA。RAPD 标记受环境影响较大,稳定性较差。AFLP 标记操作复杂、成本较高<sup>[3]</sup>。SSR 标记作用于整个基因组,它对 DNA 的质量和数量要求不高,操作简单,多态性较好,成为构建品种指纹图谱的常用手段。Sabhyata 等<sup>[4]</sup>运用 SSR 标记对印度芥菜型油菜进行了指纹图谱分析,得到了芥菜型油菜的特异指纹图谱。刘平武等<sup>[5]</sup>和雷天刚等<sup>[6]</sup>分别运用 SSR 标记构建了双低甘蓝

型油菜杂交种亲本和黄籽品种的指纹图谱。SSR 标记也存在一定的局限性,它的引物开发较为费力费时,可用的引物有限。Li 等<sup>[7]</sup>开发出一种新的基于 PCR 的分子标记技术 SRAP(sequence - related amplified polymorphism)。SRAP 标记引物设计和操作简单,多态性好,它作用于外显子部分,与表型直接相关,具备传统分子标记的优点。Li 等<sup>[8]</sup>用该标记对甘蓝进行 DNA 扩增,获得的 45%片段与 Genbank 数据库中的已知基因相同。用 SRAP 标记构建的甘蓝连锁图谱与 AFLP 构建的连锁图谱无差别,用该标记方法还成功地对甘蓝中硫代葡萄糖甙脱饱和基因 BoGLS - ALK 进行了标记。Li 等<sup>[8]</sup>还用该方法对甘蓝与拟南芥的基因组进行了基因比对,发现在 190 个多态性 cDNA 条带中,有 169 个序列是相似的,二者在常染色质区的基因具有广泛的共线性关系。Ahmad 等<sup>[9]</sup>用 SSR 和 SRAP 标记对桃品种的遗传多样性进行了分析,发现 SRAP 标记能与 SSR 标记一样将遗传关系很近的桃品种区分开来,而且 SRAP 标记比 SSR 标记更有效、快捷、成本低。Budak 等<sup>[10]</sup>用 SRAP 标记对野牛草和草坪草的遗传多样性进行了分析,用 34 个 SRAP 引物组合将 53

收稿日期:2005—12—22

基金项目:国家 863 项目(2003AA207150)

作者简介:文雁成(1965—),男,博士研究生,副研究员,从事油菜遗传育种研究。

\*通讯作者,TEL:027-86811834, email: wanghz@oilcrops.cn

个野牛草种质分成了 8 个类别,认为 SRAP 标记能够有效地分析野牛草和草坪草遗传多样性、历史演化等。Ferriol 等<sup>[11]</sup>用 SRAP 标记和 AFLP 标记对西葫芦和笋瓜的遗传多样性进行了分析,认为 SRAP 标记结果与 AFLP 结果一致,而且 SRAP 标记比 AFLP 标记所提供的信息更接近于农艺性状的差异和历史演变的结果。目前,尚无 SRAP 标记用于油菜品种指纹图谱的构建。本文将 SSR 和 SRAP 这两种简单、高效、低成本的 DNA 分子标记用于甘蓝型油菜

指纹图谱的构建,并对它们进行比较,为我国油菜品种指纹图库的构建提供参考。

1 材料和方法

1.1 供试材料

选用 75 个建国以来我国育成的有代表性的甘蓝型油菜品种,它们来自全国油菜科研、教学和育种单位,主要来自中国农业科学院油料作物所种质资源中期库(表 1)。

表 1 供试的油菜品种  
Table 1 B. napus cultivars used in this study

编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar	编号 Code	品种 Cultivar
1	苏油 158 Suyou 158	26	中油 821 Zhongyou 821	51	中双 8 号 Zhongshuang 8
2	苏油 1 号 Suyou 1	27	中双 4 号 Zhongshuang 4	52	丰收 4 号 Fengshou 4
3	华双 3 号 Huashuang 3	28	中双 3 号 Zhongshuang 3	53	青油 2 号 Qingyou 2
4	陇油 2 号 Longyou 2	29	中双 9 号 Zhongshuang 9	54	浙油 8 号 Zheyou 8
5	青油 14 号 Qingyou 14	30	沪油 2 号 Huiyou 2	55	宁油 8 号 Ningyou 8
6	沪油 12 号 Huiyou 12	31	新华 2 号 Xinhua 2	56	湘油 10 号 Xiangyou 10
7	沪油 14 号 Huiyou 14	32	甘油 1 号 Ganyou 1	57	红油 2 号 Hongyou 2
8	沪油 15 号 Huiyou 15	33	华油 8 号 Huayou 8	58	万油 17 号 Wanyou 17
9	沪油 16 号 Huiyou 16	34	湘油 3 号 Xiangyou 3	59	早熟胜利 Early Shenli
10	沪油 17 号 Huiyou 17	35	宜油 4 号 Yiyou 4	60	川油 11 Chuanyou 11
11	川油 17 Chuanyou 17	36	云油 6 号 Yunyou 6	61	黔油 8 号 Qianyou 8
12	川油 18 Chuanyou 18	37	沪油 9 号 Huiyou 9	62	陇油 1 号 Longyou 1
13	川油 20 Chuanyou 20	38	当油早 1 号 Dangyouzao 1	63	黔油 12 号 Qianyou 12
14	浙双 6 号 Zheshuang 6	39	早丰 4 号 Zao feng 4	64	黔油 14 号 Qianyou 14
15	浙双 72 Zheshuang 72	40	陕油 3 号 Shanyou 3	65	黔油 18 号 Qianyou 18
16	高油 605 Gaoyou 605	41	安康胜利油菜 Ankang Shengli	66	浙油 7 号 Zheyou 7
17	中双 5 号 Zhongshuang 5	42	秦油 3 号 Qingyou 3	67	武九油菜 Wujiu Rapeseed
18	中双 6 号 Zhongshuang 6	43	甘油 5 号 Ganyou 5	68	淮油 6 号 Huaiyou 6
19	中双 7 号 Zhongshuang 7	44	华黄 1 号 Huahuang 1	69	跃进油菜 Yuejin
20	中双 10 号 Zhongshuang 10	45	赣油 1 号 Ganyou 1	70	福油 1 号 Fuyou 1
21	湘油 15 号 Xiangyou 15	46	云油 8 号 Yunyou 8	71	华双 4 号 Huashuang 4
22	豫油 1 号 Yuyou 1	47	皖油早 Wanyouzao	72	华双 5 号 Huashuang 5
23	豫油 2 号 Yuyou 2	48	早丰 5 号 Zao feng 5	73	宁油 14 Ningyou 14
24	宁油 12 号 Ningyou 12	49	玉油 1 号 Yuyou 1	74	中油低芥 1 号 Zhong you 1
25	宁油 10 号 Ningyou 10	50	黔油双低 2 号 Qianyou double low 2	75	青杂 1 号 Qingza 1

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 供试材料播种于大田,苗期取 10 个单株的幼嫩叶片混合,按李佳等<sup>[12]</sup>修改后的 SDS 法提取叶片总 DNA。样品经纯化后取少许 DNA 母液稀释到 50ng/μL 的工作浓度, - 20 保存。

1.2.2 SSR 标记 160 对 SSR 引物来自 <http://www.ukcrop.net/B.rassica> DB,由上海生工合成。选用具有代表性的 4 种甘蓝型油菜品种进行引物筛选,用多态性好、条带清晰稳定的 25 对引物检测 75 个品种(系)的多态性。PCR 反应体系参照陆光远等<sup>[13]</sup>方法进行,扩增产物 4 保存。

1.2.3 SRAP 标记 按照 Li 等<sup>[8]</sup>提出的原则设计引物,由上海生工合成。本研究中所用的引物组合见表 2。选用 4 个有代表性的品种对 SRAP 引物组合进行多态性筛选,用 25 对多态性好、条带清晰稳定的引物组合检测 75 个品种(系)的多态性。PCR 反应体系为:总反应体积为 10μL,带 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 的 1×反应缓冲液,2mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTPs 2 000μmol/L, Taq 酶 0.5U (购自 MB I 公司),模板 DNA 50ng,正向和反向引物各 50ng,不足部分 ddH<sub>2</sub>O 补足。PCR 反应于 Gene Amp 9700 扩增仪上进行。热循环程序为:95 变性 1min; 94 1min, 35 1min, 72 1min, 5 个循环; 94 1min, 50 1min, 72 1min, 共

35个循环; 72 延伸 7min,扩增产物 4 保存。

表 2 SRAP标记的正向引物、反向引物的序列 (5'-3')及引物对组合

Table 2 Sequences (5'-3') of SRAP forward and reverse primers and primer combinations

正向引物 Forward primer	正向引物 Forward primer	反向引物 Reverse primer	引物组合 Primer combination
Me1 TGA GTCCAAACCGGA TA	Me13AGCGA GCAA GCCGGTGG	Em1 GACTGCGTACGAA TTA TT	Em1 - Me7, Em1 - Me9
Me2TGA GTCCAAACCGGA GC	Me14GA GCGTGCGAACCGGA TG	Em2GACTGCGTACGAA TTTGC	Em1 - Me10, Em1 - Me12
Me3TGA GTCCAAACCGGA TG	Me15CAAA TGTGAACCGGA TA	Em3GACTGCGTACGAA TTGAC	Em1 - Me1, Em1 - Me15
Me4TGA GTCCAAACCGGA CA	Me16GA GTA TCAACCCGGA TT	Em4GACTGCGTACGAA TTTGA	Em1 - Me18, Em2 - Me6
Me5TGA GTCCAAACCGGA T	Me17GTACA TA GAACCGGA GT	Em5GACTGCGTACGAA TTAAC	Em2 - Me22, Em2 - Me23
Me6TGA GTCCAAACCGGGCT	Me18TACGACGAA TCCGGACT	Em6GACTGCGTACGAA TTGCA	Em3 - Me4, Em3 - Me6
Me7TGA GTCCAAACCGGTAA	Me19CACA GTCA TGCCGGAAT	Em7GACTGCGTACGAA TTA TG	Em3 - Me7, Em3 - Me14
Me8TGA GTCCAAACCGGTGC	Me20GACCA GTAAACCGGA TG	Em8GACTGCGTACGAA TTCTG	Em4 - Me4, Em4 - Me9
Me9TTCAGGGTGGCCGGA TG	Me21CAGGACTAAACCGGA TA	Em9AGGCGGTGTGICAA TTGAC	Em4 - Me1, Em4 - Me15
Me10TGGGGACAACCCGGCT	Me22ATCA GTCGGACCGGA TT	Em10TGTTGGTCCGCAAA TTTAG	Em5 - Me5, Em5 - Me13
Me11CTGGCGAACTCCGGATG	Me23GA TTGCA TCACCGGA TG		Em5 - Me16, Em6 - Me1
Me12GGTGAACGCTCCGGAAG	Me24CTTACTTA GACCGGA GT		Em6 - Me12, Em8 - Me17
			Em10 - Me19

1.2.4 电泳分析检测 扩增产物用变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (6%, 7mol/L 尿素)分离, 1 500V 电泳 80min左右, 固定、银染、显影、定影等参照陆光远等<sup>[14]</sup>的方法。对扩增结果进行统计, 有带记为 1, 无带记为 0, 并对谱带进行拍照。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记和 SRAP标记的多态性

由表 3 可以看出, 25对 SSR 引物共扩增出 97 个条带, 全为多态性带, 多态性比率为 100%。每对引物平均产生 3.88 个多态性条带。而 25个 SRAP 引物组合产生出 509个条带, 其中 123个是多态性条带, 多态性比率为 21.81%。每个 SRAP引物组合产生 20.36个条带, 其中 4.44个条带具有多态性。因此 SRAP标记单个引物对组合所产生的多态性条带数比 SSR 标记一对引物所得到的带数多。

2.2 特征谱带分析

2.2.1 SSR 标记的指纹图谱 用筛选出的 25对 SSR 引物进行分析, 得到如图 1所示的指纹图谱, 其中箭头所指为特异指纹图谱。用 25对 SSR 引物对 40个品种进行检测, 24个品种有特征谱带, 占被测品种的 60%。其中华双 3号、川油 17、新华 2号和

早丰 4号在 3对引物中有特征谱带, 浙双 72和中双 5号在 2对引物中有特征谱带。两其它 18个品种只有一对特征引物。剩下的 16个品种没有特征引物, 即仅凭一对 SSR 引物无法将这些品种与其它品种区分开 (表 4)。将分析的品种范围扩大到 75个品种时, 原来 40个品种中 24个有特征引物的品种中, 有 11个品种失去特征谱带, 占原来有特征谱带品种的 45.8%。同时又增加 20个具有特征谱带的品种, 占总品种数的 44.4% (表 4)。因此, 随着分析群体的扩大, 具有特征引物的品种比率下降, 而且不同群体中具有特征谱带的品种不同。

2.2.2 SRAP标记的指纹图谱 用筛选出的 25对 SRAP引物进行分析, 可以得到如图 2所示的指纹图谱, 其中箭头所指为特异指纹图谱。为便于识别和统计, 该图只取 SRAP标记图谱中差异大、带谱清晰的部分。当用 25对引物对 40个品种进行分析时, 有 33个品种有特征谱带, 其比例高达 82.5%, 远远高于 SSR 引物的扩增结果。当分析的品种范围扩大到 75个品种时, 原来有特征谱带的 33个品种中有 16个失去特征谱带, 占 48.5%。但又增加 21个具有特征谱带的品种, 即有特征谱带的品种有 38个, 占总品种数的 50.7%左右 (表 4), SRAP标记

表 3 SSR 和 SRAP标记产生的带型分析

Table 3 Band patterns analysis of SSRs and SRAPs

标记 Marker	引物对数 Na of primer pairs	总带数 Total na of bands	多态性带数 Na of polymorphic bands	多态性比率/% Ratio of polymorphic bands	每个引物产生带数 Na of bands per assay unit	单个引物对产生的多态性带数 Na of polymorphic bands per assay unit
SSR	25	97	97	100	3.88	3.88
SRAP	25	509	111	21.81	20.36	4.44

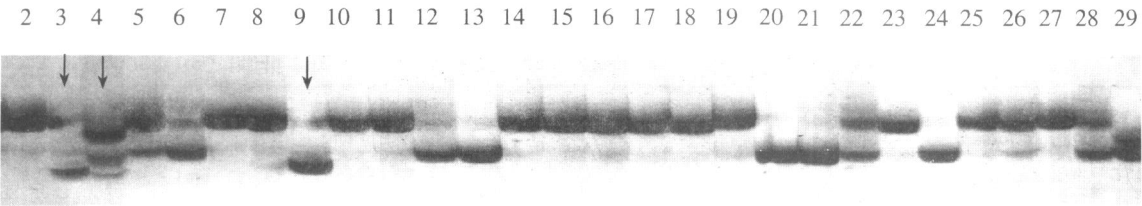


图 1 引物 P140扩增的部分品种 SSR 指纹图谱

Fig 1 SSR fingerprints of *B. napus* accessions generated by primer P140

注:品种代码见表 1,箭头所指为特异指纹

Note: The accession codes are the same as shown in table 1. The bands marked with arrows are specific fingerprints

表 4 40个和 75个品种中分别具有特征带的品种数

Table 4 No. of cultivars with distinct bands detected with SRAP and SSR markers in 40 and 75 cultivars				
品种数量 Cultivar range	SSR		SRAP	
	具有特征带的品种数	具有特征带的品种比例 / %	具有特征带的品种数	具有特征带的品种比例 / %
	No. of cultivars with distinct bands	Ratio of cultivars with distinct bands	No. of cultivars with distinct bands	Ratio of cultivars with distinct bands
40	24	60.0	33	82.5
75	35	44.4	38	50.7

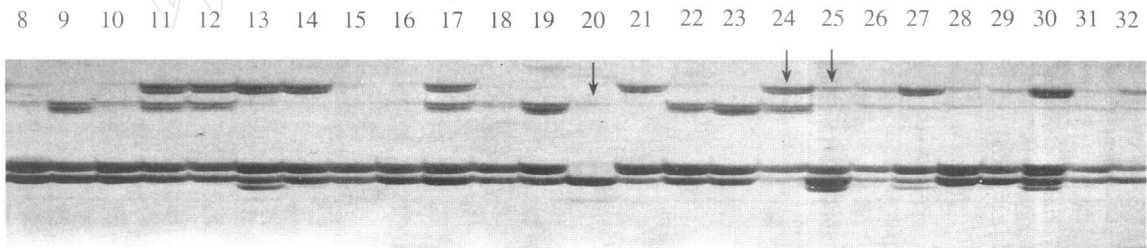


图 2 引物 Me5 - Em13扩增的部分品种 SRAP图谱

Fig 2 SRAP fingerprints of *B. napus* accessions generated by primer combination Me5 - Em13

注:品种代码见表 1,箭头所指为特异指纹

Note: The accession codes are the same as shown in table 1. The bands marked with arrows are specific fingerprints

分析的结果与 SSR 分析的结果一致,即当鉴定的品种范围扩大时,具有特征谱带的品种的比例下降,原来具有特征谱带的品种可能丧失特征谱带。SRAP标记的品种中具有特征谱带的品种比例高于 SSR 标记的结果,SRAP 标记的分辨效率更高。因此,SRAP 标记更适合于运用特征引物法鉴别品种,但这些特征引物都需要从大量引物中筛选才能得到。

2.3 引物组合法

2.3.1 标记方法的选择 根据研究的结果,25对 SRAP 标记引物组合产生 509 个扩增谱带,其中 111 个谱带为多态性谱带。从如此多的扩增带中识别和统计 111 个多态性带,有一定的难度。而 25 对 SSR 引物组合虽然只扩增出 97 个谱带,且均为多态性带,因此识别和统计都较为容易。SRAP 标记引物组合构建的指纹图谱过于复杂,而 SSR 标记引物组

合构建的指纹图谱则简洁得多。因此,SSR 标记更适合用于引物组合法构建品种指纹图谱。

2.3.2 SSR 标记引物组合法构建的指纹数码图谱

用 25 对多态性好的 SSR 引物对 75 个品种进行扩增,品种的指纹图谱用“0”和“1”表示,即为该品种的数码图谱。先用每对多态性好的引物分别对所有品种进行扩增,再将每对引物的每个品种的数码图谱组合到一起,即构成每一个品种的组合数码图谱。如用 SSR 引物 P072 和 P078 扩增品种苏油 158,分别得到的数码图谱为 00111 和 01100,二者组合到一起得到组合数码图谱为 0011101100。25 对 SSR 引物扩增结果组合在一起,可得到由 97 个由“0”和“1”组成的数码图谱,这些组合数码图谱即构成了 75 个品种的组合数码图谱数据库。

2.3.3 引物组合法构建的图谱的分辨率 采用 SSR 引物 P072 和 P078 构成的引物组合鉴别品种苏

油 158 和陇油 2 号的数码图谱为 0011101100 和 1100010000,其相应的图谱为这两个品种的指纹图谱,这两个品种中具有多态性的谱带只有 8 个,因此这两个品种的图谱完全相同的概率为  $(1/2)^8$  即  $3.9063 \times 10^{-3}$ 。本研究中平均每对 SSR 引物组合分别可产生 4.96 个多态性谱带,因此只用两对引物进行组合即可产生约 10 个多态性谱带,因此扩增的品种指纹图谱的辨别率可达  $10^{-4}$ ,多数品种可通过这种引物组合进行鉴别。但在实际应用时,具体到不同的引物组合和品种扩增出的多态性谱带数量不同,不同的引物组合的鉴别效率也不相同。在本研究中用 25 对 SSR 引物 (P011、P021、P037、P038、P052、P067、P068、P069、P072、P078、P083、P100、P117、P120、P122、P125、P140、P146、P150、P157、P164、P170、P194、P195、P200)组成的引物组合对有代表性的甘蓝型油菜品种的指纹图谱进行了构建,共产生 97 个多态性谱带,其分辨率达到  $(1/2)^{97}$ ,即  $6.3108 \times 10^{-30}$ ,在这种图谱中很难有两个品种的

DNA 图谱相同。

2.3.4 组合指纹图谱的构建 虽然组合数码图谱能够很好地区分不同品种,但需要用一套引物中的每一对引物分别扩增全套品种,工作量大,不易操作,得到的数码图谱不直观,难于比较。本研究采用一套组合引物扩增单个或少数几个品种,得到单个品种组合指纹图谱,直接比较组合指纹图谱就可以鉴别品种,无需通过繁琐的实验建立组合数码图谱再对比数码来鉴别品种。图 3 为运用该方法构建的豫油 2 号、中油 821 和中双 9 号的组合指纹图谱。中双 9 号的系谱是 [(中油 821  $\times$  双低品系 84004)  $\times$  中双 4 号变异株],而中双 4 号又是 (中油 821 变异  $\times$  中双 2 号),因此中双 9 号具有中油 821 的血统,所以二者的指纹图谱相似,但在二者的指纹图谱中也有明显不同的谱带,图中箭头所指为中油 821 和中双 9 号的不同之处。豫油 2 号的系谱是 (7818  $\times$  Mamoo)  $\times$  Qva,与中油 821 和中双 9 号的亲本不同,其指纹图谱也有明显差异。

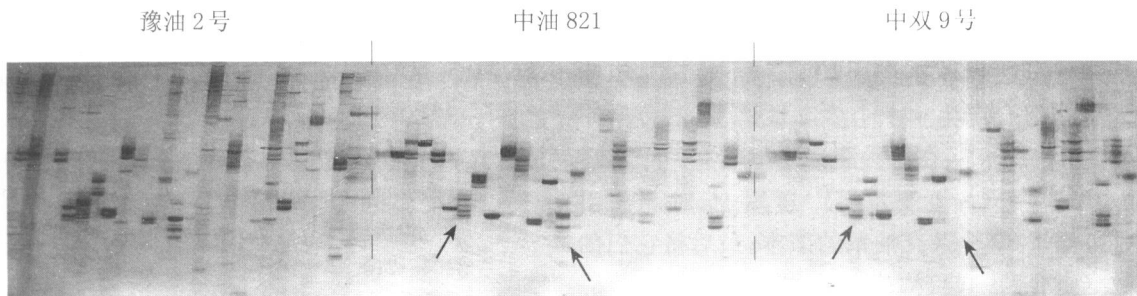


图 3 25 个 SSR 引物组成的引物组合扩增的品种指纹图谱

Fig 3 Fingerprints of three *B. napus* cultivars generated by SSR primer combination with 25 primers

注:箭头显示中油 821 和中双 9 号的指纹中的不同之处

Note: The arrows pointed the differences between Zhongyou 821 and Zhongshuang Na 9 in the fingerprints

### 3 讨论

用于制作品种指纹的 DNA 分子标记应具有多态性高、重复性和稳定性好、带型清晰、操作简单、成本低等特点。本研究结果表明,符合这些要求的 DNA 分子标记以 SSR 标记和 SRAP 标记最为理想。由于 SRAP 标记的引物设计只需要遵循一定的原则,不需要专门开发,数量无限,成本低,扩增谱带多,揭示的是外显子部分,因而更具应用价值。而 SSR 标记则需要花费人力物力进行开发,数量有限。当用特异谱带构建品种指纹图谱时,SRAP 标记比 SSR 标记有优势。SRAP 标记的扩增谱带过多,尤其是用多个引物组合来构建品种指纹图谱时,指纹的识别和鉴定更为困难。而 SSR 标记揭示的是全基

因组的 DNA 差异,扩增谱带少,其谱带的多态性达到 100%,谱带清晰,易于辨别统计。因此 SSR 标记比 SRAP 标记更适合以引物组合法构建品种指纹图谱。

本研究结果表明特征引物法的应用有其局限性。一是特征谱带和特征引物是针对特定数量品种而言的,当品种群量改变时,某一品种的特征引物和特征谱带就会丧失,因而其实用性较差。二是特征引物只能区分少数遗传基础差异较大的品种,对于遗传基础较近的品种,该方法难以鉴别。三是该方法要对引物进行大量筛选,才能确定某一品种的特征引物和特征指纹,工作量大、成本高。因此特异引物法只能用于少数品种的鉴定,不能用于多个品种

鉴定和指纹图谱库的构建。沈金雄等<sup>[15]</sup>成功地运用 2 对 SSR 引物构建特征指纹图谱鉴定油菜自交不亲和杂交种纯度。段院生等<sup>[16]</sup>运用 2 个 RAPD 引物构建特征指纹鉴定油菜杂交种 H9909 的纯度。这些研究中所指的纯度仅仅是用杂交种与父母本的指纹图谱进行比较,检查杂交种中是否混有父母本的种子。如果杂交种中混有父母本以外的油菜种子,运用该方法就不一定能够检测出来。因为随着检测品种范围的扩大,具有该杂交种特征谱带的品种数量会大大增加。雷天刚等<sup>[6]</sup>从 100 对 SSR 引物中筛选出 2 对多态性高的引物构建了 19 个黄籽品种中的 5 个品种的特异指纹图谱,有 14 个品种无法与其它品种区分开。段院生等<sup>[17]</sup>运用 9 个 RAPD 引物构建特征指纹将 39 个油菜杂交种亲本中的 27 个区分开来,仍有 12 个亲本无法区分。

引物组合法克服了特征引物法的缺点,可以将亲缘关系很近的品种区分开来,而且不需要对引物进行大量筛选,大大地提高了鉴别效率,适合于品种指纹图谱库的构建和多个品种指纹图谱的鉴定。本研究采用 2 对引物组合产生 8 个多态性谱带组合,其分辨率就可达到  $3.9063 \times 10^{-3}$ 。25 对 SSR 引物组成的引物组合产生 124 个多态性谱带,其分辨率达到  $6.3108 \times 10^{-30}$ ,在这种图谱中很难有两个品种的 DNA 图谱相同。刘平武等<sup>[5]</sup>运用 16 对 SSR 引物分别扩增了 39 个杂交油菜的亲本,最后将它们的指纹数据组合到一起,构建了这些品种的组合数码图谱,但没有得到真正意义上的引物组合指纹图谱。郭景伦等<sup>[18]</sup>首次提出了引物组合法指纹鉴定品种的方法,仍然是分别用各个引物分别扩增所有品种,再将各个引物扩增的谱带数码在后期组合到一起,形成组合数码指纹。本研究首次将一个组合的引物同时扩增不同品种,得到的是含有全套指纹的引物组合指纹图谱,通过直接观察对比组合指纹图谱就可以辨别不同的品种,更为直观,鉴定效率更高。为了便于各个实验室的指纹图谱的比较,需要对引物组合进行标准化,即选用多态性好、带型清晰、易于识别统计的引物组成核心引物组合,以此来构建品种指纹图谱库<sup>[19]</sup>。构建油菜品种指纹图谱的核心引物组合尚未确定,待进一步研究。

#### 参考文献:

- [1] 李晓辉, 李新海, 张世煌. 植物新品种保护与 DUS 测试技术 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (11): 1419—1422
- [2] 刘 华, 王宇生, 张 辉, 等. 中国小麦种质资源醇溶蛋白指纹图谱数据库的初步构建和应用 [J]. 作物学报, 1999, 25 (6): 674—682
- [3] 方宣钧, 吴为人, 唐纪康. 作物 DNA 标记辅助育种 [M]. 北京: 科学出版社, 2002 1—9.
- [4] Sabhyata B, Sandip D, Ajay J Malathil, et al. DNA fingerprinting of Brassica juncea cultivars using microsatellite probes [J]. Electrophoresis, 1995, 6 (9): 1750—1754.
- [5] 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.
- [6] 雷天刚, 张学昆, 陆 合, 等. 甘蓝型油菜黄籽品种 SSR 指纹图谱的构建 [J]. 西南农业大学学报, 2005, 27 (3): 361—364.
- [7] Li G, Quiros C F. Sequence - related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 455—461.
- [8] Li G, Gao M, Yang B, et al. Gene for gene alignment between the Brassica and Arabidopsis genomes by direct transcriptome mapping [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 168—180.
- [9] Ahmad R, Potter D, Stephen M Southwick. Genotyping of peach and nectarine cultivars with SSR and SRAP molecular markers [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2004, 129 (2): 204—210.
- [10] Budak H, Sheaman R C, Ganssoin R E, et al. Application of sequence - related amplified polymorphism marker for characterization of turfgrass species [J]. Hortscience, 2004, 39 (5): 955—958.
- [11] Ferriol M, Pico B, Nuez F. Genetic diversity of a germplasm collection of *cucurbita pepo* using SRAP and AFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107: 271—282.
- [12] 李 佳, 沈斌章, 韩继祥. 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): 51—62.
- [13] 陆光远, 杨光圣, 傅廷栋. 一个简便的适合于分析油菜中 SSR 位点的检测体系 [J]. 中国油料作物学报, 2003, 25 (3): 79—81.
- [14] 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.
- [15] 沈金雄, 陆光远, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜自交不亲和和杂种纯度鉴定 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26 (4): 12—15.
- [16] 段院生, 刘平武, 杨光圣. 甘蓝型油菜杂交种亲本指

- 纹图谱分析 [J]. 中国油料作物学报, 2002, 24 (2): 74—78.
- [17] 段院生, 刘平武, 杨光圣. 用 RAPD 标记鉴定甘蓝型油菜杂交种 H9909 的纯度 [J]. 华中农业大学学报, 2002, 21 (4): 301—305.
- [18] 郭景伦, 赵久然, 孔艳芳, 等. 引物组合法在利用 DNA 指纹鉴定玉米自交系真伪中的应用研究 [J]. 华北农学报, 2000, 15 (2): 27—31.
- [19] 赵久然, 王凤格, 郭景伦, 等. 中国玉米新 DNA 指纹库建立系列研究——适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的 SSR 核心引物的确定 [J]. 玉米科学, 2003, 11 (2): 3—5, 8.

### Comparison of cultivar fingerprints constructed with SRAP and SSR markers in *Brassica napus* L.

WEN Yan - cheng<sup>1,2</sup>, WANG Han - zhong<sup>1</sup>, SHEN Jin - xiong<sup>1</sup>, LIU Gui - hua<sup>1</sup>

(1. *Oil Crops Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430062, China;*

2. *Cotton and Oil Crops Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002, China)*

**Abstract:** Fingerprints of cultivars were constructed with SRAP (sequence - related amplified polymorphism) and SSR markers in *Brassica napus* L. Comparison between these two marker systems was carried out. Three conclusions can be drawn from this study. (1) Every primer combination of SRAP generated 20.36 bands in average, in which there were 4.44 polymorphic bands. Every primer pair of SSR generated 3.88 bands in average, which were all polymorphic. (2) Fingerprints of forty cultivars and seventy - five cultivars were constructed with 25 SRAP primer pairs and SSR primer pairs, respectively. The ratios of distinct fingerprints (82.5% and 50.7%) revealed by SRAP markers in 40 and 75 cultivars were higher than those (60.0% and 44.4%) revealed by SSR markers. The cultivars with distinct fingerprints in different populations varied. The larger the population, the less number of cultivars with distinct fingerprints. (3) The fingerprints constructed with primer combinations were much more distinct than those constructed with individual primers. The primer combination of 25 SSR primers could generate 97 polymorphic bands. In the fingerprints constructed with SSR primer combination, the probability that two different cultivars shared the same fingerprints was only  $6.3108 \times 10^{-30}$ . Combined fingerprints were more visible than combined digital fingerprints. Compared with SRAP markers, SSR markers detected less bands and the bands were easier to be identified and analyzed. Therefore, SSR markers are more suitable for constructing cultivar combined fingerprints than SRAP markers.

**Key words:** *Brassica napus* L.; Cultivar; Fingerprint; SRAP marker; SSR