

网络出版日期:2017-06-05

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20170605.1715.016.html>

甘蓝型油菜 EMS 突变后代材料的分子遗传多样性分析

袁润勤^{1,2}, 曲高平^{1,2}, 郭媛^{1,2}, 胡胜武^{1,2}

(1. 旱区作物逆境生物学国家重点实验室, 陕西杨凌 712100; 2. 西北农林科技大学 农学院, 陕西杨凌 712100)

摘 要 旨在利用 SSR 和 SRAP 标记从分子水平上分析甘蓝型油菜 EMS 突变后代材料的遗传差异。选取 138 个‘中双 9 号’油菜的 EMS 突变 M_3 株系(以‘中双 9 号’为参照), 这些材料的叶、花、角果等存在丰富的形态学变异, 选用 24 对扩增条带清晰、多态性高的 SRAP 引物和 20 对 SSR 引物对参试的 139 个材料进行分析。结果显示, 24 对 SRAP 引物共检测到 360 个位点, 其中 102 个为多态性位点, 平均多态性比率为 28.33%, 平均多态性信息含量 PIC 为 0.60; 20 对 SSR 引物共检测到 196 个位点, 其中 91 个为多态性位点, 平均多态性比率为 46.43%, PIC 为 0.59。参试材料之间的遗传相似系数为 0.62~0.91, 聚类分析和群体结构分析结果显示, 参试 EMS 突变 M_3 株系没有完全按表型突变聚在一起。研究表明, EMS 诱导‘中双 9 号’产生了分子水平上可检测的突变且诱变后代材料之间存在广泛的遗传差异。

关键词 甘蓝型油菜; EMS 突变后代材料; 遗传多样性; SSR 标记; SRAP 标记

中图分类号 S565.4

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2017)06-0855-10

甲基磺酸乙酯 (Ethyl methyl sulfonate, EMS) 是作物诱变育种中利用最广泛、效果最好的一种化学诱变剂^[1]。迄今为止, 通过化学诱变育成 406 个作物品种, 其中 EMS 诱变育成的品种有 116 个, 占化学诱变育成品种的 28.6% (<http://mvgs.iaea.org/>)。甘蓝型油菜是一个比较年轻的物种, 近代油菜品质育种(低芥酸、低硫甾)使其经历了 2 次瓶颈, 导致其遗传基础进一步狭窄^[2]。通过 EMS 等诱变处理, 是创造油菜新变异、丰富油菜资源的一条重要途径。前人以不同油菜品种为基础材料, 通过 EMS 诱变创建了几个油菜突变体库^[3-6], 并对突变材料的形态特征、植物学性状及品质等进行了鉴定分析, 这些突变体的获得拓宽了油菜遗传变异。

分子标记具有稳定性强、不受环境条件的影响、没有组织或器官的特异性、不受个体发育阶段的影响等特点, 广泛应用于作物遗传育种研究。目前, 利用 SSR 分子标记对玉米^[7-8]、小麦^[9]、大豆^[10]等作物 EMS 突变后代材料进行了检测, 发现不同诱变系间存在一定的遗传变异, 且这些变

异与品质性状、农艺性状相关。这些研究结果为突变体的利用提供了参考依据。然而, 目前还未见对油菜 EMS 突变体后代的分子遗传多样性研究的报道。

西北农林科技大学油菜研究中心生物技术育种课题组利用体积分数为 1.0% 的 EMS 溶液处理‘中双 9 号’油菜干种子, 创建了包括子叶、叶片、花器、株型、角果等多器官变异类型的突变体库^[6]。本研究从该突变体库 M_2 代 2 558 个株系中选择 138 个不同变异类型材料, 种成 M_3 株系, 利用 SSR 和 SRAP 标记对这 138 个 M_3 代株系和基础材料‘中双 9 号’(对照)进行遗传多样性评价, 为这些材料在油菜遗传育种中的利用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

利用体积分数为 1.0% EMS 溶液处理甘蓝型油菜‘中双 9 号’干种子, 得到一个变异类型比较丰富的突变体库。从该突变体库 M_2 代 2 558 个株系中选择 138 个不同变异类型材料, 种成 M_3

收稿日期: 2016-05-06 修回日期: 2016-07-06

基金项目: 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-13)。

第一作者: 袁润勤, 女, 硕士研究生, 从事油菜遗传育种研究。E-mail: 15091184922@163.com

通信作者: 胡胜武, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 从事油菜遗传育种研究。E-mail: swhu83251@nwsuaf.edu.cn

株系。这些材料表现出较为广泛的变异,包括 25 个不育材料,13 个花色突变材料,5 个花闭合材料,3 个无雌蕊突变材料,9 个花瓣突变材料,6 个其他花变异;3 个叶片内卷材料,22 个叶色突变材料;15 个角果突变材料;17 个种子突变材料;5 个株型突变材料;还有 15 个其他类型突变材料(表 1)。以基础材料‘中双 9 号’油菜为对照,进行观察和分析。

表 1 突变材料及其典型特征

Table 1 The characteristics of rapeseed mutants

编号 Code	表型 Phenotype	突变类型 Mutation type	编号 Code	表型 Phenotype	突变类型 Mutation type	编号 Code	表型 Phenotype	突变类型 Mutation type
1	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	50	花闭合 Closed flower	花突变 Flower mutation	98	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation
3	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	51	花闭合 Closed flower	花突变 Flower mutation	99	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation
4	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	52	花闭合 Closed flower	花突变 Flower mutation	100	褐籽 Brown seed	种子突变 Seed mutation
5	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	53	花闭合 Closed flower	花突变 Flower mutation	101	褐籽,角果紫 Brown seed, purple silique	种子突变 Seed mutation
6	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	54	花闭合 Closed flower	花突变 Flower mutation	102	角果直立 Erect silique	角果突变 Silique mutation
7	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	55	无雌蕊 No gynoecium	花突变 Flower mutation	103	角果粗短 Dumpy silique	角果突变 Silique mutation
8	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	56	无雌蕊 No gynoecium	花突变 Flower mutation	104	长角 Long silique	角果突变 Silique mutation
9		其他类型 Other type	57	无雌蕊 No gynoecium	花突变 Flower mutation	105	角果细长 Gracile silique	角果突变 Silique mutation
10		其他类型 Other type	58	多花瓣 Multiple petals	花突变 Flower mutation	106	密角 Dense silique	角果突变 Silique mutation
11		其他类型 Other type	59	大花瓣 Large petals	花突变 Flower mutation	107	密角 Dense silique	角果突变 Silique mutation
12		其他类型 Other type	60	大花瓣 Large petals	花突变 Flower mutation	108	密角 Dense silique	角果突变 Silique mutation
13		其他类型 Other type	61	花皱缩 Wrinkled petals	花突变 Flower mutation	109	密角 Dense silique	角果突变 Silique mutation
15	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	62	花皱缩 Wrinkled petals	花突变 Flower mutation	110	密角 Dense silique	角果突变 Silique mutation
16	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	63	小花瓣 Small petals	花突变 Flower mutation	111	角果黄 Yellow silique	角果突变 Silique mutation
17	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	64	小花瓣 Small petals	花突变 Flower mutation	112	角果紫 Purple silique	角果突变 Silique mutation
18	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	65	花瓣细长 Elongated petals	花突变 Flower mutation	113	大花 Big flower	花突变 Flower mutation
19	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	66	花瓣外卷 Revolute petals	花突变 Flower mutation	114	大粒 Large seed	种子突变 Seed mutation
20	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	67	轮状花序 Round inflorescence	花突变 Flower mutation	115	大粒 Large seed	种子突变 Seed mutation
21	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	68	边缘紫化 Purple of leaf edge	叶突变 Leaf mutation	116	大粒 Large seed	种子突变 Seed mutation
22	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	69	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	117	暴粒 Convex siliques	角果突变 Silique mutation
23	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	70	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	118	株型紧凑 Compact	株型突变 Plant mutation
24	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	71	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	119	花蕾紫化 Purple bud	花突变 Flower mutation
25	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	72	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	120	紫株 Purple plant	株型突变 Plant mutation

(续表 1 Continued table 1)

编号 Code	表型 Phenotype	突变类型 Mutation type	编号 Code	表型 Phenotype	突变类型 Mutation type	编号 Code	表型 Phenotype	突变类型 Mutation type
26	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	73	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	121	紫株 Purple plant	株型突变 Plant mutation
27	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	74	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	122	褐籽 Brown seed	种子突变 Seed mutation
28	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	75	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	123	角果紫 Purple silique	角果突变 Silique mutation
29	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	76	黄化-白化 Etiolated-albinistic leaf	叶突变 Leaf mutation	124	角果紫 Purple silique	角果突变 Silique mutation
30	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	78	边缘黄化 Etiolated of leaf edge	叶突变 Leaf mutation	125	角果紫 Purple silique	角果突变 Silique mutation
31	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	79	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	127	紫株 Purple plant	株型突变 Plant mutation
32	不育 Sterility	花突变 Flower mutation	80	浅绿 Light green leaf	叶突变 Leaf mutation	128	柱头外露 Stigma showing	花突变 Flower mutation
33	叶片内卷 Involute leaf	叶突变 Flower mutation	81	边缘黄化 Etiolated of leaf edge	叶突变 Leaf mutation	129	墨绿叶 Blackish green leaf	叶突变 Leaf mutation
34	叶片内卷 Involute leaf	叶突变 Flower mutation	82	不完全黄化 Not completely etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	130	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation
35	叶片内卷 Involute leaf	叶突变 Flower mutation	83	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	131	花枝异化 Spray alienation	花突变 Flower mutation
36	花色浅 Flower with light color	花突变 Flower mutation	84	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	132	丛生 Caespitose branches	株型突变 Plant mutation
37	花色浅 Flower with light color	花突变 Flower mutation	85	不完全黄化 Not completely etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	133		其他类型 Other type
38	花色浅 Flower with light color	花突变 Flower mutation	86	浅绿 Light green leaf	叶突变 Leaf mutation	134		其他类型 Other type
39	花色浅 Flower with light color	花突变 Flower mutation	87	叶片黄化 Etiolated leaf	叶突变 Leaf mutation	135		其他类型 Other type
40	花色浅 Flower with light color	花突变 Flower mutation	88	边缘黄化 Etiolated of leaf edge	叶突变 Leaf mutation	136		其他类型 Other type
41	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	89	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation	137		其他类型 Other type
42	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	90	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation	138		其他类型 Other type
43	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	91	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation	139		其他类型 Other type
44	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	92	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation	140		其他类型 Other type
45	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	93	黄籽,角果粗短 Yellow seed, dumpy silique	种子突变 Seed mutation	141		其他类型 Other type
46	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	94	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation	142		其他类型 Other type
47	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	95	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation	143	中双 9 号 Zhongshuang No. 9	突变基础材料 Wild type
48	花色白 White flower	花突变 Flower mutation	96	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation			
49	多花丛生 Two flowers with one stalk	花突变 Flower mutation	97	黄籽 Yellow seed	种子突变 Seed mutation			

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 从每个 M₃ 株系中随机选取 5 个单株,每个单株取等量嫩叶混合,按照 Murray 等^[11]报道的改良 CTAB 法提取总基因组 DNA。

1.2.2 SRAP-PCR SRAP 引物参照 Li 等^[12],由上海生工生物工程技术有限公司合成,34

条上游引物和 19 条下游引物随机组合成 646 对引物组合,从中筛选出扩增条带丰富、清晰、稳定的 24 对引物组合用于对所有参试材料的扩增分析。PCR 及产物检测:PCR 反应体系为 10 μL,其中模板 DNA(50 ng/μL)2 μL、ddH₂O 2.4 μL、SRAP 正反向引物各 0.3 μL、2× Es Taq DNA Polymerase(康为世纪生产)5 μL。PCR 扩增程

序为:94 ℃预变性 1 min;94 ℃变性 1 min,35 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,5 个循环;94 ℃变性 1 min,50 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,35 个循环;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存。PCR 扩增产物用 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.3 SSR-PCR 从 380 对引物中筛选出 20 对扩增条带清晰、稳定的多态性引物并用于对所有参试材料的扩增分析。PCR 及产物检测:PCR 反应体系为 10 μ L,其中模板 DNA (50 ng/ μ L) 2 μ L、ddH₂O 2.4 μ L、SSR 正反向引物各 0.3 μ L、2 $\times$ Es Taq DNA Polymerase(康为世纪生产) 5 μ L。PCR 扩增程序为:95 ℃预变性 4 min;94 ℃变性 1 min,60 ℃退火 1 min,72 ℃延伸 1 min,10 个循环,每个循环退火温度下降 0.5 ℃;94 ℃变性 30 s,55 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 60 s,36 个循环;72 ℃延伸 4 min。PCR 扩增产物用 80 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测。

1.2.4 数据收集与分析 统计电泳图谱上有差异且易识别的多态性条带,在相同迁移率的位置上,有带记为“1”,无带记为“0”,组成“1”和“0”的原始数据矩阵。多态性信息含量(PIC)按 $PIC = 1 - \sum_{j=1}^n P_{ij}^2$ 计算,其中 P_{ij} 表示第 i 位点的第 j 种基因型频率。

根据 0、1 矩阵,利用 NTSYSpc 2.0 软件^[13]中的子程序 SHAN 程序和 UPGMA 方法进行聚类分析,对 139 个材料构建聚类图;采用 NTsyspc 2.0 软件的 Dice 计算参试材料的遗传相似系数(GS),遗传距离(GD) = 1 - GS。利用 Structure 2.3.4^[14]软件进行群体结构分析。

2 结果与分析

2.1 参试材料的 SRAP 和 SSR 分析

从 646 个 SRAP 引物组合中筛选出多态性高、条带清晰、重复性好的 24 对引物对参试的 138 个 M₃ 株系及‘中双 9 号’(对照)进行分析。结果共扩增出 360 个条带,其中多态性条带 102 个,平均每对引物组合检测到 4.25 个多态性条带,平均多态性比率为 28.33%。在选用的 24 对引物组合中,引物组合 Em15+Me11 扩增的多态性条带数最多(10),引物组合 Em11+Me21 为单态位点,各对引物可扩增出 1~10 个多态性位点。SRAP 引物组合 PIC 为 0.17(Em14+Me23)~0.85(Em15+Me11),平均为 0.60(表 2)。

从 380 对 SSR 引物中筛选出 20 对扩增结果稳定的多态性引物,用于 138 个 M₃ 株系及‘中双 9 号’(对照)遗传多样性分析。结果共扩增得到 196 个位点,其中多态性位点 91 个,平均 4.55 个,平均多态性比率为 46.43%。选用的 20 对引物可扩增出 2~8 个多态性位点,其中引物 CB10028 扩增到 8 个,引物 Ni4-C06 和引物 Na14-D07 仅扩增出 2 个多态性位点。SSR 引物组合 PIC 为 0.21(Ni4-D09)~0.80(CB10028),平均为 0.59(表 3)。

2.2 聚类分析

基于 SRAP 和 SSR 标记数据,139 个材料两两组合共得到 9 591 个遗传相似系数,138 个诱变材料与基础材料‘中双 9 号’的遗传相似系数为 0.50~0.82,平均为 0.70。将遗传相似系数转化为遗传距离,以 0.02 为组距进行次数分布分析,139 个试验材料间的遗传距离为 0.09~0.52,平均为 0.29,其中 No.33 和 No.20, No.108 和 No.20 遗传距离最大,为 0.52;No.46 和 No.40, No.41 和 No.46, No.63 和 No.85, No.80 和 No.85, No.121 和 No.130, No.130 和 No.131 间的遗传距离最小,为 0.09。84%的遗传距离数据集中分布在 0.21~0.37,遗传距离小于 0.21 有 699 个(7.3%),遗传距离大于 0.37 有 840 个(8.7%)。97% 的遗传距离分布在 0.17~0.42(图 1)。

根据 SRAP 和 SSR 标记数据,利用 UPGMA 方法构建聚类图(图 2)。结果 139 个材料被分为 5 类(Cluster I-V):Cluster I 由 44 个材料组成,其中 25 个花突变材料,12 个叶突变材料,5 个种子突变材料,1 个角果突变材料和基础材料‘中双 9 号’;44 个材料间的遗传相似系数为 0.74~0.91。Cluster II 由 32 个材料组成,其中 4 个花突变材料,2 个叶突变,8 个种子突变材料,9 个角果突变材料,3 个株型突变材料,6 个其他类型突变材料;32 个材料间的遗传相似系数为 0.73~0.91。Cluster III 由 8 个材料组成,其中 3 个花突变材料,1 个叶突变材料,2 个种子突变材料,1 个角果突变材料,1 个其他类型材料;8 个突变材料的遗传相似系数为 0.73~0.85。Cluster IV 由 40 个突变材料组成,其中 21 个花突变材料,7 个叶突变材料,2 个种子突变材料,1 个角果突变材料,2 个株型突变材料,7 个其他类型材料;40 个突变材料间的遗传相似系数为 0.67~0.88。Cluster V 包括 15 个突变材料,其中 8 个花突变材料,3

个叶突变材料,3 个角果突变材料,1 个其他类型突变材料;这 15 个突变材料的遗传相似系数为 0.62~0.75。所有供试的 138 个突变材料没有按

照叶突变、花突变、角果突变、种子突变、株型突变和其他突变类型聚类。

表 2 SRAP 引物组合及扩增结果

Table 2 The SRAP primer combinations and their amplified results

编号 Code	SRAP 引物组合 SRAP primers	正//反引物序列(5'→3') Forward // Revere primer sequence (5'→3')	总条带数 Amplified bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率/% Polymorphism	PIC
1	Em1+Me22	GACTGCGTACGAATTATT// GGTGAACGCTCCGGAAG	14	3	21.43	0.58
2	Em1+Me27	GACTGCGTACGAATTATT// GTACATAGAACCGGAGT	12	3	25.00	0.50
3	Em1+Me31	GACTGCGTACGAATTATT// CAGGACTAAACCGGATA	22	3	13.64	0.59
4	Em1+Me26	GACTGCGTACGAATTATT// GAGTATCAACCCGGATT	14	3	21.43	0.51
5	Em2+Me5	GACTGCGTACGAATTGTC// TGAGTCCAAACCGGAT	11	3	27.27	0.23
6	Em3+Me22	GACTGCGTACGAATTGAC// GGTGAACGCTCCGGAAG	17	5	29.41	0.76
7	Em5+Me4	GACTGCGTACGAATTAAC// TGAGTCCAAACCGGACA	12	4	33.33	0.69
8	Em5+Me31	GACTGCGTACGAATTAAC// CAGGACTAAACCGGATA	17	6	35.29	0.76
9	EM5+Me30	GACTGCGTACGAATTAAC// GACCAGTAAACCGGATG	17	5	29.41	0.68
10	Em6+Me22	GACTGCGTACGAATTGCA// GGTGAACGCTCCGGAAG	16	6	37.50	0.77
11	Em7+Me18	GACTGCGTACGAATTATG// TGAGTCCAAACCGGAAG	14	3	21.43	0.40
12	Em8+Me19	GACTGCGTACGAATTCTG// TTCAGGGTGGCCGGATG	16	2	12.50	0.33
13	Em8+Me21	GACTGCGTACGAATTCTG// CTGGCGAACTCCGGATG	15	4	26.67	0.55
14	Em10+Me22	GACTGCGTACGAATTCAC// GGTGAACGCTCCGGAAG	9	5	55.56	0.61
15	Em10+Me25	GACTGCGTACGAATTCAC// CAAATGTGAACCGGATA	19	5	26.32	0.71
16	Em11+Me14	GACTGCGTACGAATTCAG// TGAGTCCAAACCGGAGG	13	5	38.46	0.63
17	Em11+Me21	GACTGCGTACGAATTCAG// CTGGCGAACTCCGGATG	12	1	8.33	单态位点 Monomorphic loci
18	Em13+Me33	GACTGCGTACGAATTCTA// GATTGCATCACC GGATG	11	5	45.45	0.71
19	Em14+Me14	GACTGCGTACGAATTCTC// TGAGTCCAAACCGGAGG	12	3	25.00	0.53
20	Em14+Me23	GACTGCGTACGAATTCTC// AGCGAGCAAGCCGGTGG	14	2	14.29	0.17
21	Em14+Me29	GACTGCGTACGAATTCTC// ACAGTCATGCCGGAAT	22	6	27.27	0.79
22	Em15+Me4	GACTGCGTACGAATTCTT// TGAGTCCAAACCGGACA	17	5	29.41	0.69
23	Em15+Me6	GACTGCGTACGAATTCTT// TGAGTCCAAACCGGGCT	16	5	31.25	0.70
24	Em15+Me11	GACTGCGTACGAATTCTT// TGAGTCCAAACCGGAAG	18	10	55.56	0.85
合计 Total			360	102		13.72
平均 Average			15	4.25		0.60

2.3 群体遗传结构分析

根据 SRAP 和 SSR 扩增结果,利用 STRU-
CURE 2.2 软件对 139 个材料进行群体结构分
析。根据不同 k 值所对应的 LnP(D)值,发现 k=
5 时出现拐点,因此将 139 个材料分为 5 个组

(G I ~GV,图 3)。G I 包括 44 个突变材料,其
中 23 个花突变材料,13 个叶突变材料,5 个种子
突变材料,1 个角果突变材料,1 个株型突变材料,
和基础材料‘中双 9 号’;包括聚类分析 Cluster
I 中 38 个突变材料和基础材料‘中双 9 号’,

表 3 SSR 引物信息、扩增带数、多态性带数和 PIC
Table 3 The PIC, total and polymorphic fragments per SSR primer

编号 Code	SRAP 引物组合 SRAP primers	正//反引物序列(5'→3') Forward // Revere primer sequence (5'→3')	总条带数 Amplified bands	多态性条带数 Polymorphic bands	多态性比率/% Polymorphism	PIC
1	CB10369	CATTACAGGACCAGAGC // CAAAGCCAAGACAACCAT	9	6	66.67	0.67
2	BRAS120	AAAAATAAATACAGCGAACC // ACCTTTAGCAGCTAATCATC	6	3	50.00	0.55
3	CB10028	CTGCACATTTGAAAATTGGTC// AAATCAACGCTTACCCACT	12	8	66.67	0.80
4	MR049	AATGGGAAGCTCGTCGAA // AATTATGCCAACATCCTACGG	10	5	50.00	0.76
5	0111-G11	GTTGCGGCGAAACAGAGAAG// GAGTAGGCGATCAAACCGAG	13	5	38.46	0.76
6	CB10364	GAGACGATGCAAAGATCG// TGCAGACACATTCTGAACA	11	3	27.27	0.56
7	CB10373	CGGTCAGATTCCAACAGA // GCCATCTCAGAGACGACA	9	6	66.67	0.56
8	Ni4-C11	ATAAGGCCGATGTTTCCTCC// CACAGTTGCTTTGGATCTCG	7	3	42.86	0.54
9	Ni4-C06	CAGAGGCGAAAACGAGAGAG // TTTATAGACTTCCCGTGGGC	8	2	25.00	0.34
10	BRAS004	GTTCATTTGACGGCAACTCTC// CGCCAACGAAGCAGGTC	8	3	37.50	0.54
11	Ra2-A05	GCTAGTTTACGCGGCGG// AAACGACATCGGCAAAGAAG	7	6	85.71	0.35
12	Na12-D09	ACTGAAACTTACTAAAAGAGAGA// TCTAGAAACACCAGCAGTGGC	18	6	33.33	0.76
13	0111-H02	TCTTCAGGGTTTCCAACGAC // AGGCTCCTTCATTTGATCCC	12	6	50.00	0.70
14	0113-G05	GTGTGCAGGAAACGATGTTC // GGGAGTTTGAAGAGAAAAGCG	10	6	60.00	0.70
15	BRAS061	GCAGCCTTCAACTCCCATAGA// TGGGTTTCGAGCAGGGTTC	6	3	50.00	0.55
16	Na14-F11	CTATGGTTCATCTTTCGCCG // CATGCTCCAACCACAGTTTG	11	6	54.55	0.75
17	Na14-D07	GCATAACGTCAGCGTCAAAC // CTGCGGGACACATAAATTG	5	2	40.00	0.37
18	0113-D02	TTCTCCACACCAAGCAACAC // TACAGGCTTGGTCGTTTCC	11	4	36.36	0.66
19	Ni4-D09	AAAGGACAAAGAGGAAGGGC // TTGAAATCAAATGAGAGTGACG	15	5	33.33	0.21
20	0112-E03	CTTGAAGAGCTCCGACACC // GACGGCTAACAGTGGTGAC	8	3	37.50	0.73
合计 Total			196	91		11.87
平均 Average			9.80	4.55		0.59

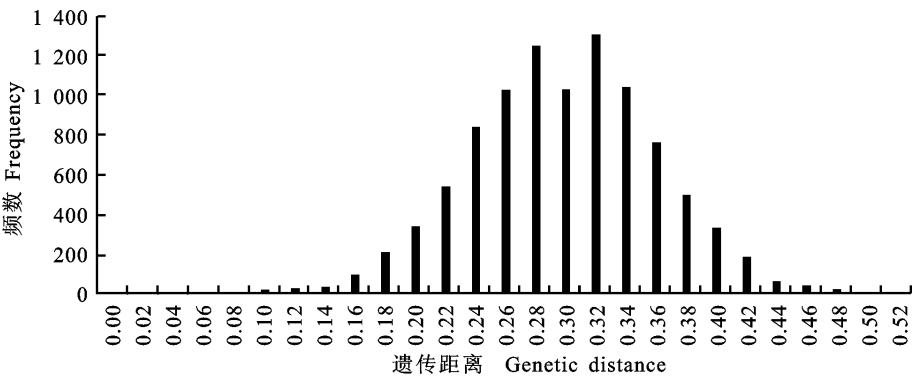


图 1 试验材料间遗传距离次数分布直方图
Fig. 1 The frequency distribution of genetic distance between experimental materials

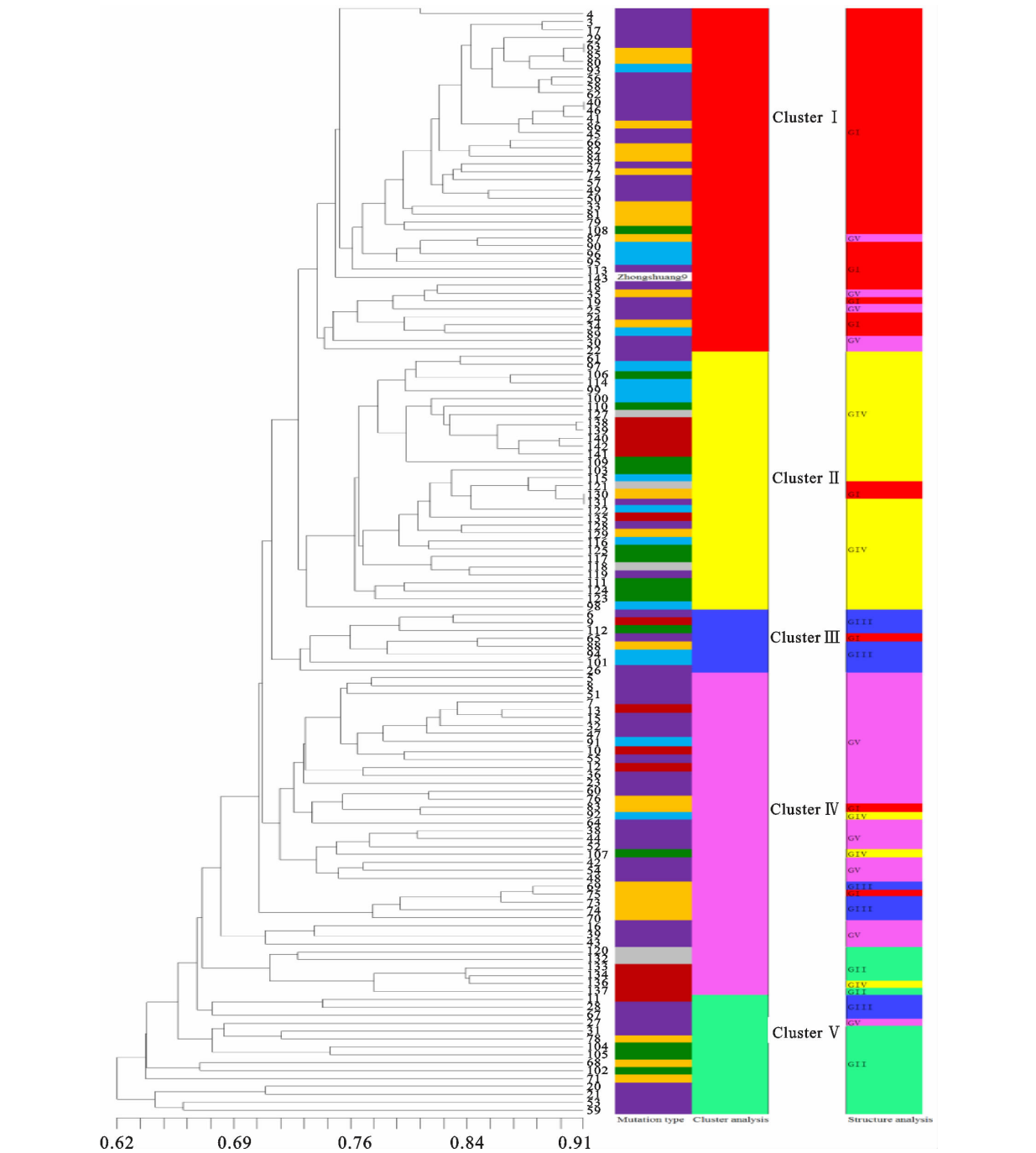


图 2 基于 SRAP 和 SSR 分子标记构建的 139 份试验材料的聚类图

Fig. 2 Dendrogram of 139 materials generated by SSR and SRAP molecular markers

Cluster II 中 2 个突变材料, Cluster III 中 1 个突变材料, Cluster IV 中 2 个突变材料。G II 包括 16 个突变材料, 其中 5 个花突变材料, 3 个叶突变材料, 3 个角果突变材料, 2 个株型突变材料, 3 个其他类型突变材料; 包括聚类分析 Cluster IV 中 5 个突变材料, Cluster V 中 11 个突变材料。G III 包括 14 个材料, 其中 4 个花突变材料, 5 个叶突变材料, 2 个种子突变材料, 1 角果突变材料, 2 个其他类型突变材料; 包括聚类分析 Cluster III 中的 7 个突变材料, Cluster IV 中的 4 个材料, Clus-

ter V 中的 3 个突变材料。G IV 包括 33 个材料,其中 4 个花突变材料,1 个叶突变材料,9 个种子突变材料,10 个角果突变材料,2 个株型突变材料,7 个其他类型的突变材料;包括聚类分析 Cluster II 中的 30 个突变材料,Cluster IV 中的 3 个突变材料。G V 包含 32 个突变材料,包括 25 个花突变材料,3 个叶突变材料,1 个种子突变材

料,3 个其他类型突变材料;包括聚类分析 Cluster I 中的 5 个突变材料,Cluster IV 中的 26 个突变材料,Cluster V 中的 1 个突变材料。总体来看,群体结构分析结果与聚类分析结果基本一致,但供试的突变材料还是没有按照叶突变、花突变、角果突变、种子突变、株型突变和其他突变类型聚类。

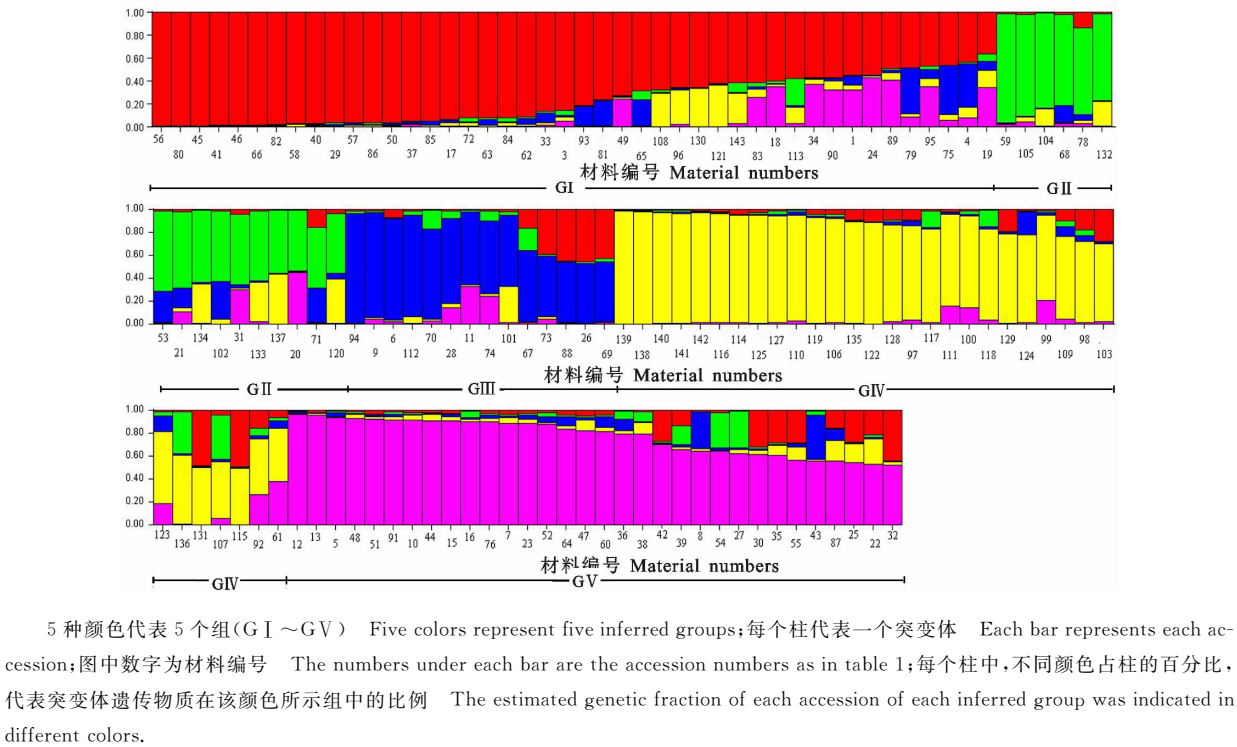


图 3 SSR 和 SRAP 标记构建的 139 份试验材料的群体结构图($k=5$)
Fig. 3 Population structure of the 139 materials by SSR and SRAP molecular markers($k=5$)

3 讨论

与芸薹属其他物种相比,甘蓝型油菜遗传背景狭窄、遗传基础单一^[15]。因此,利用理化诱变创造油菜新变异,拓宽其遗传基础,对丰富现有油菜资源具有非常重要的意义。本课题组利用体积分数为 0.1% EMS 溶液处理‘中双 9 号’油菜干种子,构建甘蓝型油菜 EMS 突变体库^[6],创造了新的种质资源,分析这些新种质的分子遗传多样性对其在油菜育种中的合理利用具有指导意义。

本研究利用 SRAP 和 SSR 标记分析结果表明,138 个 EMS 诱变 M_3 株系与基础材料‘中双 9 号’的遗传相似系数为 0.50~0.82,平均为 0.70。Girija 等^[16]分别用 EMS、 γ 射线、EMS- γ 射线诱导豇豆品种‘CO7’,用 RAPD 标记分析 M_6 代遗传差异,结果显示诱变材料与基础材料的遗传相

似系数为 0.58~0.71,平均为 0.66。李红英等^[17]用 SSR 标记分析玉米自交系 AS-9 经化学诱变获得的诱变系 M_1 和 M_4 的遗传差异,研究表明诱变系 M_1 和 M_4 与基础材料的遗传相似系数分别为 0.32~0.41、0.38~0.48,平均值分别为 0.36、0.43。石海春等^[7]用 EMS-石蜡诱变玉米自交系 K305 和 R08,并用 SSR 标记分析 9 个 K305 诱变系和 10 个 R08 诱变系的遗传差异,结果显示,K305 诱变系与 K305 的遗传相似系数为 0.79~0.92,平均为 0.86,R08 诱变系与 R08 的遗传相似系数为 0.71~0.88,平均为 0.81。张娜等^[18]用 EMS 处理燕麦品种‘白燕 2 号’,并分析 M_2 突变体的遗传多样性,结果显示突变体间的遗传相似系数为 0.67~0.97。上述结果表明,EMS 诱变不同作物产生了分子水平上可检测到的变异,但变异范围因作物及诱变处理不同而异。

基于 SRAP 和 SSR 标记结果对 139 个参试材料进行聚类分析和遗传结构分析,结果显示 138 个突变体并没有按照突变表型而明显地聚在一起。一方面,不同基因突变可能导致同样的表型,例如前人在拟南芥中发现并报道了多种雄性不育,研究发现它们受控于不同的基因^[19-23];另一方面,笔者在对突变体进行表型观察记载时,主要选取最明显直观的表型变异,但突变体间还存在其他变异,只是认为其应用价值不大或忽略记载。因此,导致 EMS 突变后代没按花、叶、种子、角果、株型突变等聚在一起。建议选择与基础材料遗传相似系数较小的突变材料进行深入研究,可望为油菜遗传改良提供变异更加丰富的材料。

参考文献 Reference:

[1] 刘翔. EMS 诱变技术在植物育种中的研究进展[J]. 激光生物学报, 2014(3): 197-201.
LIU X. Progresses on EMS mutagenesis in plant breeding [J]. *Actalaser Biology Sinica*, 2014(3): 197-201 (in Chinese with English abstract).

[2] BUS A, KORBER N, SNOWDON R J, *et al.* Patterns of molecular variation in a species-wide germplasm set of *Brassica napus* [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2011, 123(8): 1413-1423.

[3] 孙加焱, 涂进东, 范叔味, 等. 甘蓝型油菜理化诱变和突变体库的构建[J]. 遗传, 2007, 29(4): 475-482.
SUN J Y, TU J D, FAN SH W, *et al.* The screening of mutants induced by physical and chemical factors and construction of mutant population for *Brassica napus* L. [J] *Hereditas*, 2007, 29(4): 475-482 (in Chinese with English abstract).

[4] 汪念. 甘蓝型油菜 EMS 突变体库的构建及 TILLING、EcoTILLING 技术的应用研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2009.
WANG N. Constructing an EMS mutant population and applying TILLING, EcoTILLING technology in *Brassica napus* [D]. Wuhan: Huazhong Agriculture University, 2009 (in Chinese with English abstract).

[5] 石从广, 孟华兵, 姜宇晓, 等. 甘蓝型油菜 EMS 诱变二代农艺与籽粒品质性状的变异与 TILLING 库的构建[J]. 核农学报, 2010, 24(6): 1132-1140.
SHI C G, MENG H B, JIANG Y X, *et al.* Phenotypic variation of agronomic and grain quality traits in an EMS-induced M₂ population and the construction of the DNA pool for TILLING analysis [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2010, 24(6): 1132-1140 (in Chinese with English abstract).

[6] 曲高平, 孙妍妍, 庞红喜, 等. 甘蓝型油菜 EMS 突变体库构建及抗除草剂突变体筛选[J]. 中国油料作物学报, 2014, 36(1): 25-31.
QU G P, SUN Y Y, PENG H X, *et al.* EMS mutagenesis and ALS-inhibitor herbicide-resistant mutants of *Brassica napus* L. [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2014, 36(1): 25-31 (in Chinese with English abstract).

[7] 石海春, 谭义川, 夏伟, 等. 19 份玉米 EMS 诱变系的遗传差异评价[J]. 华北农学报, 2016, 31(1): 110-116.
SHI H CH, TAN Y CH, XIA W, *et al.* Evaluation on genetic differences of 19 maize mutant lines induced by EMS [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2016, 31(1): 110-116 (in Chinese with English abstract).

[8] 覃鸿妮, 蔡一林, 杨春蓉, 等. 玉米诱变系的 SSR 遗传变异分析[J]. 核农学报, 2008(6): 750-755, 765.
QIN H N, CAI Y L, YANG CH R, *et al.* Genetic variation of maize (*Zea mays* L.) mutants based on SSR analysis [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2008(6): 750-755, 765 (in Chinese with English abstract).

[9] 王长里. EMS 诱导小麦 M₂ 代突变的鉴定[D]. 河北保定: 河北农业大学, 2008.
WANG CH L. Identification of wheat M₂ mutations induced by EMS [D]. Baoding Hebei: Agricultural University of Hebei, 2008 (in Chinese with English abstract).

[10] 谢圣男, 王宏光, 杨振, 等. 大豆绥农 14 突变体库构建及株高性状分析[J]. 核农学报, 2013, 27(3): 307-313.
XIE SH N, WANG H G, YANG ZH, *et al.* Construction of Suinong 14 mutant library and analysis of soybean height mutant [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2013, 27(3): 307-313 (in Chinese with English abstract).

[11] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.

[12] 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]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, 103(2): 455-461.

[13] ROHLF F J. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 2.0 User Guide [M]. Exeter Software Setauket, New York, 1998.

[14] PRITCHARD J K, STEPHENS M, DONNELLY P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 7(4): 574-578.

[15] 伍晓明, 许颢, 王汉中, 等. 甘蓝型油菜与新疆野生油菜属间杂种的获得与分子鉴定[J]. 中国油料作物学报, 2002, 24(4): 5-9.
WU X M, XU K, WANG H ZH, *et al.* Obtained and molecular identification of interspecific hybrids between *Brassica* and Xinjiang wild rape [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2002, 24(4): 5-9 (in Chinese).

[16] GIRIJA M, GNANAMURTHY S, DHANAVEL D. Genetic diversity analysis of cowpea mutant (*Vigna unguiculata* L. Walp) as revealed by RAPD marker [J]. *International Journal of Advanced Research*, 2013, 1(4): 139-147.

[17] 李红英, 卢存福, 兰小中, 等. 玉米自交系 AS-9 化学诱变后代 SSR 遗传变异分析[J]. 华北农学报, 2013, 28(3): 92-101.
LI H Y, LU C F, LAN X ZH, *et al.* Genetic variation analysis in maize mutants from AS-9 inbred line based on SSR

- marker [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2013, 28(3):92-101 (in Chinese with English abstract).
- [18] 张娜,杨希文,任长忠,等. 白燕2号EMS突变体的形态鉴定与遗传变异分析[J]. 麦类作物学报, 2011, 31(3): 421-426.
- ZHANG N, YANG X W, REN CH ZH, *et al.* Morphological identification and genetic variation analysis of EMS mutants from Hexaploid Oat (*Avena sativa*) cultivar Baiyan2 [J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2011, 31(3): 421-426 (in Chinese with English abstract).
- [19] AARTS M G, DIRKSE W G, STIEKEMA W J, *et al.* Transposon tagging of a male sterility gene in *Arabidopsis* [J]. *Nature*, 1993, 363(6431): 715-717.
- [20] SANDERS P M, WETERINGS B K. Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants [J]. *Sexual Plant Reproduction*, 1998, 11(6): 297-322.
- [21] WILSON Z A, MORROLL S J, SWARUP R, *et al.* The *Arabidopsis* MALE STERILITY1 (*MS1*) gene is a transcriptional regulator of male gametogenesis, with homology to the PHD-finger family of transcription factors[J]. *Plant Journal*, 2001, 28(1): 27-39.
- [22] STEINER-LANGE S, UNTE U S, ECKSTEIN L, *et al.* Disruption of *Arabidopsis thaliana* MYB26 results in male sterility due to non-dehiscent anthers. [J]. *Plant Journal*, 2003, 34(4): 519-528.
- [23] ARIIZUMI T, HATAKEYAMA K, HINATA K R, *et al.* Disruption of the novel plant protein NEF1 affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen, resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 2004, 39(2): 170-181.

Molecular Genetic Diversity in EMS-induced Mutant Progenies in *Brassica napus* L.

YUAN Runqin^{1,2}, QU Gaoping^{1,2}, GUO Yuan^{1,2} and HU Shengwu^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Crop Stress Biology in Arid Areas, Yangling Shaanxi 712100, China;
2. College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract This study was designed to analyze genetic diversity of EMS-induced mutant progenies in *Brassica napus* L. using simple sequence repeat (SSR) and sequence-related amplified polymorphism (SRAP) molecular markers. The selected 138 M₃ mutant strains of *B. napus* cv. ‘Zhongshuang No. 9’ which served as the control, with abundant morphological variation in leaf, flower and silique organs, was analyzed by 24 SRAP and 20 SSR primer pairs. A total of 360 amplified fragments including 102 polymorphic fragments were detected by 24 SRAP primer combinations, with an average 28.33% of polymorphic fragment percentage and 0.60 of polymorphism information content (PIC) value; whereas, 196 amplified fragments containing 91 polymorphic fragments were detected by 20 SSR primer pairs, with an average 46.43% of polymorphic fragment percentage and 0.59 of PIC value. The genetic similarity coefficient between 139 experimental materials varied from 0.62 to 0.91. The cluster and population structure analysis exhibited that experimental materials are not exactly classified depending on phenotype mutation. In general, EMS-induced mutations in ‘Zhongshuang No. 9’ can be detected at the molecular level and there are extensive genetic differences among the mutant progenies.

Key words *Brassica napus* L.; EMS-induced mutant; Genetic diversity; SSR marker; SRAP marker

Received 2016-05-06 **Returned** 2016-07-06

Foundation item Earmarked Found for China Agriculture Research System(No. CARS-13).

First author YUAN Runqin, female, master student. Research area: rapeseed genetics and breeding. E-mail: 15091184922@163.com

Corresponding author HU Shengwu, male, Ph. D, professor, doctoral supervisor. Research area: rapeseed genetics and breeding. E-mail: swhu83251@nwsuaf.edu.cn