

同名甘蓝型油菜品种比较分析

赖运平¹, 张浙峰¹, 王丽容¹, 何巧林¹, 张新明², 堵苑苑², 余毅^{1*}

(1. 四川省农业科学院作物研究所/农业部植物新品种测试(成都)分中心, 四川 成都, 610066;

2. 农业部科技发展中心, 北京, 100125)

摘要:为评价不同来源同名甘蓝型油菜品种的异同性,以42个同名甘蓝型油菜品种(共91份)为研究对象,采用同名品种两两相邻种植方法,分成56组,调查参试品种的29个DUS[特异性(distinctness)、一致性(uniformity)和稳定性(stability)]测试性状,并采用43个SSR标记,对参试品种进行指纹分析,进而比较同名甘蓝型油菜品种基于DUS测试性状和SSR标记的异同性。结果表明,39.3%(22组)的不同来源同名品种无论是表型还是SSR标记都存在较大差异;26.8%(15组)的同名品种间表型和SSR指纹极为相似,亲缘系数表明,该类品种亲缘关系密切;只有33.9%(19组)的同名品种综合表现为无明显差异。由此可知,不同来源的甘蓝型油菜品种中,同名异种现象比较普遍,建议相关主管部门加强对同名品种的管理。

关键词:DUS测试;简单重复系列;甘蓝型油菜;同名异种;遗传距离

中图分类号:S565.403 文献标识码:A 文章编号:1007-9084(2013)04-0364-08

Comparison and analysis of homonymous *Brassica napus* L. varieties

LAI Yun-ping¹, ZHANG Zhe-feng¹, WANG Li-rong¹,

HE Qiao-lin¹, ZHANG Xin-ming², DU Yuan-yuan², YU Yi^{1*}

(1. Crop Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences/Chengdu Station for the Testing Center of New Varieties of Plants, Ministry of Agriculture, Chengdu 610066, China;

2. Development Center of Science and Technology of Ministry of Agriculture, Beijing 100125, China)

Abstract: To assess the distinctness of homonymous *Brassica napus* L. varieties from different resources, 91 materials of 42 varieties were employed in this study. 29 characteristics used in DUS (distinctness, uniformity, stability) testing were examined by field trial in which homonymous varieties were grown side by side. At the same time, 43 SSR markers developed by our previous research were applied for fingerprint analysis. We evaluated the distinctness of homonymous varieties by characteristics used in DUS testing and SSR markers. Results showed that in total 56 pairs, 39.3 percent (22 pairs) of homonymous varieties were greatly distinct from each other not only on morphological traits but also on SSR markers. 26.8 percent (15 pairs) of tested homonymous varieties were extremely similar and Kinship coefficient analysis revealed that these varieties have a very close relationship. The percentage of accession without significance difference was only 33.9 (19 pairs). These results suggested that it is a common phenomenon that homonymous varieties from different resources are actually homonyms. Therefore, it is suggested for department of varieties collection management to supervise homonymous varieties closely.

Key words: DUS test; Simple sequence repeat (SSR); *Brassica napus* L.; Homonyms; Genetic distance

中国于1997年颁布《中华人民共和国植物新品种保护条例》,建立了植物新品种保护制度,并于1999年加入国际植物新品种保护联盟(UPOV),成

为UPOV的第39个成员国。中国的植物新品种保护经过近15年的成长与发展,取得了显著的成绩,申请量和授权量逐年增长(www.cnppv.cn)。甘蓝

型油菜作为中国的重要油料经济作物,申请量的增长尤为显著。在公布的 80 种保护名录植物种类中,甘蓝型油菜的申请量位居第六。

为了构建甘蓝型油菜已知品种库,为近似品种筛选提供技术支持,我们从不同渠道收集了大量甘蓝型油菜品种,包括部分同名品种,如宁杂 11 号 3 份、中油杂 6 号 2 份和中油杂 7 号 2 份等。未经鉴别的同名品种不仅为品种库的构建工作带来麻烦,而且为近似品种的筛选带来困扰,因此,对其进行比较分析,对提高建库效率从而增加近似品种筛选的准确性有重要的现实意义。

DUS 测试性状是用于品种特异性 (distinctness)、一致性 (uniformity) 和稳定性 (stability) (简称 DUS) 审查的性状,某个性状只要满足 UPOV 规定的要求,都能作为 DUS 测试性状^[1]。形态性状具有简单、直观特点,是进行作物种质资源鉴定和育种材料选择的主要指标^[2,3],实践证明,形态性状用于品种鉴定具有可行性和可靠性^[4~7],因此,在 UPOV 的现有保护体系下,DUS 测试性状多数为形态性状。中国的《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 甘蓝型油菜》(NY/T 2239 - 2012) (以下简称甘蓝型油菜测试指南) 中的 29 个必测性状,均为形态性状。目前,中国的甘蓝型油菜 DUS 测试主要依据这 29 个形态性状进行。

DUS 测试中对形态性状的调查一般需要进行两个周期的田间种植,耗时较长,部分育种者和申请者呼吁采用更为快捷、简便的方法获得测试结果,因此,UPOV 的生化与分子技术工作组 (BMT) 已将品种快速 DUS 测试的研究提上了议事日程^[8]。分子标记尤其是微卫星标记因具有丰富的多态性、稳定性及低成本特性,被广泛用于品种鉴定^[5,9],并取得了显著的进展,UPOV 也为此制定了相应的技术文件^[8],为分子标记技术应用于 DUS 测试提供规范性指导。按照 UPOV 的总体原则,我们已筛选了一套甘蓝型油菜 SSR 引物,该套引物覆盖甘蓝型油菜的 19 个连锁群,具有较高的多态性,并在筛选近似品种中得到了较好应用^[10]。

然而,多数学者认为,SSR 标记不能完全取代传统的田间种植试验,若结合上述两种方法,将有助于提高鉴定的效率和准确性^[11~13]。本研究以不同来源的 42 个同名甘蓝型油菜品种 (共 91 份) 为研究对象,通过同名品种两两相邻种植方法,按照甘蓝型油菜测试指南调查参试品种的形态性状,并采用 SSR 标记技术,对参试品种进行指纹分析,比较同名甘蓝型油菜品种基于 DUS 测试性状和 SSR 标记的

异同性,并综合两种方法分析结果,对同名品种的差异性进行评价,目的在于探讨同名甘蓝型油菜品种的异同,为相关主管部门加强品种的管理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

同名甘蓝型油菜品种 42 个,共 91 份,同名品种两两比较,分成 56 组,全部为杂交种,品种名称采用编号表示,具体编号和来源见表 1。

1.2 田间种植试验及 DUS 测试性状调查

田间种植试验在农业部植物新品种测试 (成都) 分中心郫县试验站进行。为减小环境误差,同名品种两两相邻种植,2 次重复,另外,种植 DUS 测试标准品种一套,用于确定参试品种的代码。行距 40cm,株距 30cm,穴播。按照我国甘蓝型油菜测试指南要求,调查“子叶:长度”、“子叶:宽度”、“植株:幼苗生长习性”、“叶:颜色”、“叶:裂片”、“叶:裂片数目”、“叶:叶缘齿状”、“叶:长度”、“叶:宽度”、“叶:叶柄长度”、“叶:刺毛”、“叶:顶端裂片形状”、“叶:卷曲程度”、“开花期”、“花粉量”、“植株:主茎蜡粉”、“植株:主茎花青甙显色”、“花:花瓣”、“花:花瓣形态”、“花:花瓣颜色”、“花:花瓣长度”、“花:花瓣宽度”、“植株:总长度”、“角果:果身长度”、“角果:果喙长度”、“角果:果柄长度”、“角果:姿态”、“籽粒:千粒重”、“籽粒:颜色”等 29 个性状,质量性状和假质量性状采用相应代码表示,数量性状采集 40 个数据,用测量值或代码表示。

1.3 SSR 标记分析

每份品种取 50 个典型植株幼嫩叶片等量混合,按照 CTAB 法提取基因组 DNA^[14]。采用本课题组筛选的 SSR 引物 (43 对) 对参试品种进行分析^[10]。

PCR 反应体系总体积 10 μ L,含 10 \times buffer 1.0 μ L、2.5mmol \cdot L⁻¹ dNTP 0.6 μ L、10 μ mol \cdot L⁻¹ 引物 0.25 μ L、5U \cdot μ L⁻¹ Taq DNA 聚合酶 0.1 μ L、25mmol \cdot L⁻¹ MgCl₂ 1.5 μ L、10ng \cdot μ L⁻¹ 模板 DNA 2.0 μ L 和 ddH₂O 5.45 μ L。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,1 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 40s,65 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,每循环降 1 $^{\circ}$ C,共 10 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 40s,55 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45s,共 30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5min,4 $^{\circ}$ C 保存。

在 96 孔 PCR 板中,分别加入 1 μ L PCR 产物、9 μ L 的甲酰胺和 0.12 μ L 的 SIZ500 内标,3 000r/min 离心 1min。在 PCR 仪中 95 $^{\circ}$ C 变性 5min,4 $^{\circ}$ C 冷却 10min。然后在 ABI 3730xl DNA 分析仪上完成荧光检测,Genemapper IDv3.2 软件分析等位变异大小。

1.4 数据处理与分析

1.4.1 数量性状测量值转换成代码 采用 DUST (2012) 软件去除异常值, 求出所有参试品种的平均值, 参考甘蓝型油菜测试指南中的分级标准, 将测量值转换成代码。

1.4.2 DUS 测试性状差异的赋值 对于质量性状, 根据代码的差值进行赋值, 如 A 品种的代码为 2, B 品种的代码为 1, 该性状的差异值为 $2 - 1$ 等于 1。

对于“目测”的数量性状, 为真实体现品种间的差异及程度, 相同代码间和相邻代码间赋值为 0, 隔一个代码赋值为 1, 隔两个代码赋值为 2, 以此类推, 如 A 品种代码为 3, B 品种代码为 1, 赋值为 1。

对于假质量性状, 不连续表达状态间的赋值按照质量性状进行, 连续表达状态间的赋值按照“目测”数量性状进行。

对于“测量”的数量性状, 首先对测量值进行方差分析, 若品种间在该性状上差异不显著 ($p < 0.01$), 即使代码有差异, 差异值仍为 0; 若存在显著差异 ($p < 0.01$), 按代码差异进行赋值。

将 DUS 测试性状差异赋值累加获得品种间的形态差异值。

1.4.3 SSR 标记的多态性分析 将等位变异大小转换成 AA、BB 和 AB 等形式表示的基因型, 采用 Popgene1.31 软件计算各 SSR 位点的等位变异数、多态性信息含量 (polymorphism information content, PIC) 和 Shannon 信息指数 (SII)。

1.4.4 亲缘关系、遗传距离计算和聚类分析 采用基因型数据和 TASSEL 2.1 软件计算品种间的亲缘系数。将基因型数据转换成 0 和 1 数据矩阵, 采用 NTSYS-pc 2.0 软件的 Qualitative data 和 SHAN 程序计算遗传相似系数 (GS), Tree plot 程序生成聚类图。遗传相似系数采用简单配对 (simple matching, SM) 方法计算, 遗传距离 (GD) = $1 - GS$, 聚类分析采用非加权类平均法 (unweighted pair-group method with arithmetic means, UPGMA)。

1.4.5 形态差异和遗传距离的相关性 采用 SPSS 17.0 软件对形态差异值和遗传距离进行相关性分析, 并建立散点图。

2 结果与分析

2.1 基于形态性状的同名品种比较分析

从图 1 可以看出, 不同来源同名品种间的形态差异程度各不相同, 差异性性状数从 0 至 9 个不等。19 组同名品种在 29 个 DUS 测试性状上无明显差异, 占材料总组数的 33.9%。总体表现非常相似

(仅存在一个性状差异)的品种共 10 组 (17.9%)。差异最大的品种是 V38-1 和 V38-2, 有明显差异的性状多达 9 个, V38-1 的叶片颜色、叶缘齿状、叶顶端裂片形状、主茎花青甙显色、角果姿态分别表现为中等绿色、弱、近椭圆形、无或极弱、上举, 而 V38-2 分别表现为深绿色、中、近圆形、强、水平, 前者与后者相比, 花瓣长度长 2.7mm, 果身长度短 8.8mm, 果喙长度短 4.3mm, 果柄长度短 5.3mm。另外, 有 6 组品种的差异性状数也多达 6 个或 7 个, 形态性状差异表现极其明显 (图 2)。

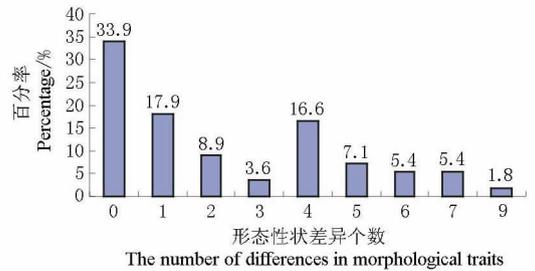
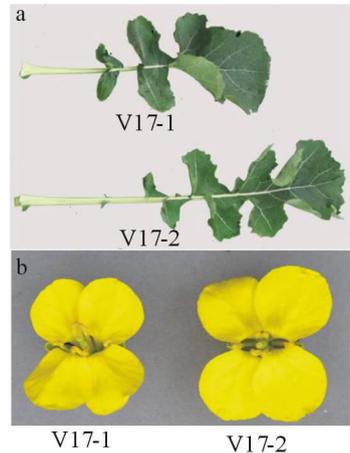


图 1 同名品种的形态性状差异数分布图

Fig. 1 Distribution of the number of differences in morphological traits between homonymous cultivars



注: a: 品种间的“叶: 长度”和“叶: 叶柄长度”存在明显差异; b: 品种间的“花: 花瓣长度”和“花: 花瓣宽度”存在明显差异
Note: a: Distinctness of “leaf: length” and “leaf: length of petiole”; b: Distinctness of “flower: length of petals” and “flower: width of petals”

图 2 品种 V17-1 和 V17-2 的叶和花对比照片

Fig. 2 Leaves and flowers of cultivar V17-1 and V17-2

为了更确切反应品种间的形态差异程度, 按照 1.4.2 方法对各形态性状的差异进行赋值, 最后计算品种间的差异权重。同名品种间的形态差异值见表 1。从表 1 可以看出, 形态差异值为 0 的同名品种有 19 组, 多数品种的形态差异值分布在 1 和 7 之间, 差异值最大的是 V34-1 和 V34-3, 与差异性性状数比较结果不一致, 原因是 V34-1 与 V34-3 的花瓣宽度和果身长度差异太大, 前者的代码分别为 9 和 4, 后者的代码分别是 3 和 9。

甘蓝型油菜测试指南中的 29 个必测性状,2 个为质量性状,6 个为假质量性状,21 个为数量性状。我们对差异性性状的类型及对应的品种组数进行了统

计,发现同名品种在 2 个质量性状上均无差异,21 组品种在假质量性状上有不同程度的差异,数量性

表 1 同名品种间的遗传相似系数、遗传距离、亲缘系数和形态差异值
Table 1 Genetic similarity coefficient, genetic distance, kinship coefficient and morphological differences between homonymous varieties

序号 Code	品种号 Accession	来源 Source	GS	GD	K	MD	序号 Code	品种号 Accession	来源 Source	GS	GD	K	MD
1	V1-1	B1	0.994 9	0.005 1	1.944 0	0	21	V21-1	B1	0.964 1	0.035 9	1.719 8	2
	V1-2	B2						V21-2	B2				
2	V2-1	B1	0.994 9	0.005 1	1.944 0	1	22	V22-1	B1	0.928 2	0.071 8	1.383 6	5
	V2-2	B1						V22-2	B2				
3	V3-1	B1	0.984 6	0.015 4	1.944 0	0	23	V23-1	B1	0.984 6	0.015 4	1.887 9	1
	V3-2	B2						V23-2	B2				
4	V4-1	B1	0.943 6	0.056 4	1.551 7	0	24	V24-1	B1	0.938 5	0.061 5	1.607 7	3
	V4-2	B2						V24-2	B2				
5	V5-1	B1	0.994 8	0.005 2	1.887 9	1	25	V25-1	B1	0.994 6	0.005 4	1.944 0	0
	V5-2	B2						V25-2	B2				
6	V6-1	B1	0.907 7	0.092 3	1.271 5	2	26	V26-1	B1	0.851 3	0.148 7	0.879 2	7
	V6-2	B2						V26-2	B2				
7	V7-1	B1	0.876 9	0.123 1	0.991 3	4		V26-1	B1	0.890 1	0.109 9	1.159 4	4
	V7-2	B2						V26-3	B3				
	V7-1	B1	0.876 9	0.123 1	1.159 4	4		V26-2	B2	0.931 9	0.068 1	1.551 7	1
	V7-3	B3						V26-3	B3				
	V7-2	B2	0.928 2	0.071 8	1.383 6	0	27	V27-1	B1	0.815 4	0.184 6	0.711 1	7
	V7-3	B3						V27-2	B2				
8	V8-1	B1	0.882 1	0.117 9	1.215 5	4	28	V28-1	B1	0.948 7	0.051 3	1.551 7	0
	V8-2	B2						V28-2	B2				
9	V9-1	B1	0.887 2	0.112 8	1.215 5	7	29	V29-1	B1	0.800 0	0.200 0	0.823 2	8
	V9-2	B2						V29-2	B2				
10	V10-1	B1	0.861 5	0.138 5	1.103 4	3	30	V30-1	B1	0.917 9	0.082 1	1.383 6	5
	V10-2	B2						V30-2	B2				
11	V11-1	B1	0.841 0	0.159 0	0.879 2	5	31	V31-1	B1	0.968 8	0.031 2	1.663 8	1
	V11-2	B2						V31-2	B2				
12	V12-1	B1	0.989 8	0.010 2	1.887 9	0	32	V32-1	B1	0.865 9	0.134 1	0.767 2	3
	V12-2	B2						V32-2	B2				
13	V13-1	B1	0.815 4	0.184 6	0.655 1	5	33	V33-1	B1	0.964 1	0.035 9	1.831 9	0
	V13-2	B2						V33-2	B2				
14	V14-1	B1	0.805 1	0.194 9	0.879 2	12	34	V34-1	B1	0.871 8	0.128 2	0.935 3	12
	V14-2	B2						V34-2	B2				
15	V15-1	B1	0.989 7	0.010 3	1.887 9	0		V34-1	B1	0.882 1	0.117 9	1.047 3	18
	V15-2	B2						V34-3	B3				
	V15-1	B1	0.989 7	0.010 3	1.887 9	0		V34-2	B2	0.969 2	0.030 8	1.719 8	2
	V15-3	B3						V34-3	B3				
	V15-2	B2	1.000 0	0.000 0	2.000 0	0	35	V35-1	B1	0.836 1	0.163 9	0.823 2	7
	V15-3	B3						V35-2	B2				
16	V16-1	B1	0.974 4	0.025 6	1.775 8	2	36	V36-1	B1	0.785 7	0.214 3	0.767 2	8
	V16-2	B2						V36-2	B2				
17	V17-1	B1	0.854 8	0.145 2	1.159 4	9	37	V37-1	B1	0.866 7	0.133 3	1.159 4	2
	V17-2	B2						V37-2	B2				
	V17-1	B1	0.876 3	0.123 7	1.327 5	9	38	V38-1	B1	0.835 9	0.164 1	1.103 4	13
	V17-3	B3						V38-2	B2				
	V17-2	B2	0.946 2	0.053 8	1.607 7	0	39	V39-1	B1	0.989 7	0.010 3	1.887 9	0
	V17-3	B3						V39-2	B2				
18	V18-1	B1	0.953 8	0.046 2	1.663 8	0		V39-1	B1	0.989 7	0.010 3	1.944 0	2
	V18-2	B2						V39-3	B3				
	V18-1	B1	0.964 1	0.035 9	1.607 7	0		V39-2	B2	0.979 3	0.020 7	1.831 9	1
	V18-3	B3						V39-3	B3				
	V18-2	B2	0.938 5	0.061 5	1.495 7	0	40	V40-1	B1	0.805 1	0.194 9	0.767 2	5
	V18-3	B3						V40-2	B2				
19	V19-1	B1	0.974 4	0.025 6	1.831 9	0	41	V41-1	B1	0.989 7	0.010 3	1.887 9	1
	V19-2	B2						V41-2	B2				
20	V20-1	B1	0.953 8	0.046 2	1.607 7	0	42	V42-1	B1	0.938 5	0.061 5	1.383 6	0
	V20-2	B2						V42-2	B2				

注:GS:遗传相似系数;GD:遗传距离;K:亲缘系数;MD:形态差异值;B1~B3:育种者1~3

Note:GS:genetic similarity coefficient; GD:genetic distance; K:kinship coefficient; MD:morphological differences; B1 to B3;Breeder 1 to Breeder 3

状差异显著的品种数最多(41组)。在10组仅一个性状差异的品种中,除V41-1和V41-2在假质量性状(叶片颜色)上有差异外(深绿色和中等绿色,位于该性状表达状态的连续变化区间),其它品种的差异均体现在数量性状上。上述结果反映了数量性状对品种特异性鉴定的重要性,这与DUS测试实践相吻合,因为在进行DUS田间种植试验时,质量性状存在差异的品种往往在近似品种筛选时已被排除。

2.2 基于SSR标记的同名品种比较结果

2.2.1 SSR标记的多态性 采用43个SSR标记对91份品种进行分析,结果表明,所有标记位点都具有多态性,各标记的等位变异数、PIC值和Shannon信息指数见表2。在91份参试品种中,43个SSR标记共检测到195个等位变异,平均每个位点检测到4.2个,位于第5连锁群的Ra3H10标记、第9连锁

群的CB10029标记和第18连锁群的CB10028标记等位变异数最多,均为9个。在91份品种中,43个标记的Shannon信息指数变幅为0.1056~1.8314,平均值为0.8609,PIC值变幅为0.0430~0.8174,平均值为0.4709,BRAS021的PIC值最低,CB10587的PIC值最高。

PIC值反映的是等位变异的分布频率,体现某个标记的多态性水平和区分品种的能力。根据Botstein等^[15]的界定方法:若PIC大于0.5,该位点为高度多态性位点;若PIC介于0.25和0.5之间时为中度多态性位点;PIC小于0.25时为低度多态性位点。本研究43个SSR标记中,高度多态性位点占40.4%,中度多态性位点占46.8%,表明本研究所用标记具有丰富的多态性,用来分析参试品种的亲缘关系和辅助区分品种切实可行。

表2 43个SSR标记在91份甘蓝型油菜品种中的多态性信息
Table 2 Polymorphism information of 43 SSR markers for 91 cultivars

序号 Code	标记 Marker	Chrom.	Alle.	SII	PIC	序号 Code	标记 Marker	Chrom.	Alle.	SII	PIC
1	BRAS084	1	4	0.949 2	0.531 0	25	CB10587	11	8	1.831 4	0.817 4
2	Ra2E04	1	2	0.625 9	0.434 2	26	CB10369	11	4	1.076 8	0.605 0
3	CB10597	1	3	0.722 0	0.444 1	27	CB10277	11	2	0.533 5	0.349 1
4	CB10355	2	6	1.019 6	0.474 8	28	OLI1H09	12	5	1.061 8	0.592 4
5	CB10172	2	3	0.855 8	0.510 6	29	OLI3G05	12	2	0.630 0	0.438 2
6	OLI1B05	3	5	0.837 9	0.425 1	30	CB10003	13	2	0.410 1	0.244 9
7	CB10036	3	4	0.993 8	0.550 1	31	CB10057a	13	3	0.875 3	0.524 2
8	BRAS029	3	2	0.687 1	0.494 0		CB10057b	3	2	0.310 3	0.169 4
9	CB10347	4	5	0.871 9	0.427 8	32	CB10427	13	5	0.852 4	0.440 5
10	BRAS021	4	2	0.105 6	0.043 0		CN48a	14	5	0.495 4	0.212 7
11	RA3H10	5	9	1.158 1	0.512 3	33	CN48b	UN	2	0.543 3	0.357 8
12	MR014	5	7	1.749 1	0.806 9	34	CB10320	14	2	0.587 9	0.398 5
13	CN57	6	4	0.993 7	0.575 6	35	OLI0C01	14	3	0.490 9	0.259 3
14	CB10330	6	3	0.756 1	0.494 6	36	MR097	15	8	1.431 1	0.710 7
15	CB10204	6	3	0.285 0	0.125 1		Na12A02a	16	4	0.445 0	0.202 1
16	BRAS023	7	4	0.810 7	0.438 7	37	Na12A02b	7	6	1.375 4	0.695 3
17	CB10343	7	3	0.732 7	0.424 4	38	CB10299	17	4	0.859 9	0.495 5
18	CB10364	8	7	1.382 3	0.680 5	39	CB10534	17	2	0.593 2	0.403 4
19	CB10026	8	2	0.673 5	0.480 4	40	CB10217	17	2	0.271 2	0.142 0
20	CB10029	9	9	1.373 1	0.662 6	41	CB10028	18	9	1.546 5	0.724 9
21	Na10D09	9	3	0.867 6	0.533 2	42	OLI3C03	19	3	1.036 2	0.628 1
22	Na10A08a	9	2	0.691 6	0.498 5	43	CB10413	19	2	0.637 8	0.445 7
	Na10A08b	15	4	0.722 4	0.369 6						
23	Na10D07	10	6	1.221 0	0.630 3						
24	Ra3D04	10	8	1.479 1	0.707 8						
							总计 Total	195			
							平均 Average	4.2	0.860 9	0.470 9	

注:Chrom.染色体;Alle.等位变异数;SII shannon 信息指数;PIC 多态性信息含量;UN 未知

Note: Alle.: No. of alleles; SII: shannon's information index; PIC: polymorphism information content; UN: unknown

2.2.2 同名品种间的遗传相似系数、聚类分析和亲缘关系 由图3可知,不同来源同名品种间的遗传相似系数存在不同程度差异,仅V15-2和V15-3的遗传相似系数为1,即两者的SSR指纹无差异,遗传相似系数最小的是V36-1和V36-2,为0.7857

(表1)。在56组品种中,遗传相似系数大于0.90的品种所占比率较大(60.71%),而在遗传相似系数大于0.90的品种中,相似系数大于0.95的品种占61.76%,表明这些同名品种的SSR指纹非常接近,具有较近的亲缘关系。

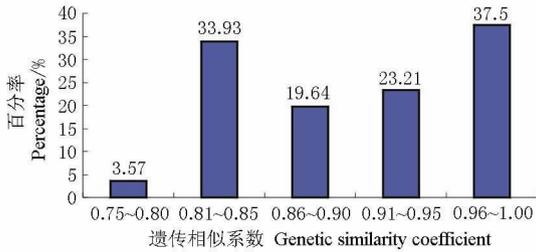


图3 同名品种遗传相似系数分布图

Fig.3 Distribution of genetic similarity coefficient between homonymous cultivars

聚类分析表明(图4),共7组同名品种未聚在一起,分别是V13-1和V13-2、V27-1和V27-2、V29-1和V29-2、V35-1和V35-2、V36-1和V36-2、V38-1和V38-2以及V40-1和V40-2,其遗传相似系数表明,7组品种的遗传相似系数最大为0.83。尽管V14-1和V14-2的遗传相似

系数为0.805 1,低于0.83,但仍然优先聚在一起,原因是其它89份品种与两份V14的遗传相似系数小。在其余49组品种中,尽管品种间的遗传相似系数差异各不相同,但同名品种均优先聚在一起,这一现象可能是本研究所用品种数量较少且不同名品种间差异较大导致的。

亲缘关系分析表明,56组同名品种的亲缘系数变幅较大,亲缘系数最大的是V15-2和V15-3(2.000),表明两者的亲缘关系完全一致,与遗传相似系数分析结果一致。亲缘系数最小的是V13-1和V13-2(0.655),两者的遗传相似系数为0.816,两种方法分析结果也基本一致。相关性分析表明,遗传相似系数与亲缘系数存在极显著正相关,相关系数为0.891($p < 0.001$),说明遗传相似系数越大,亲缘关系越近。

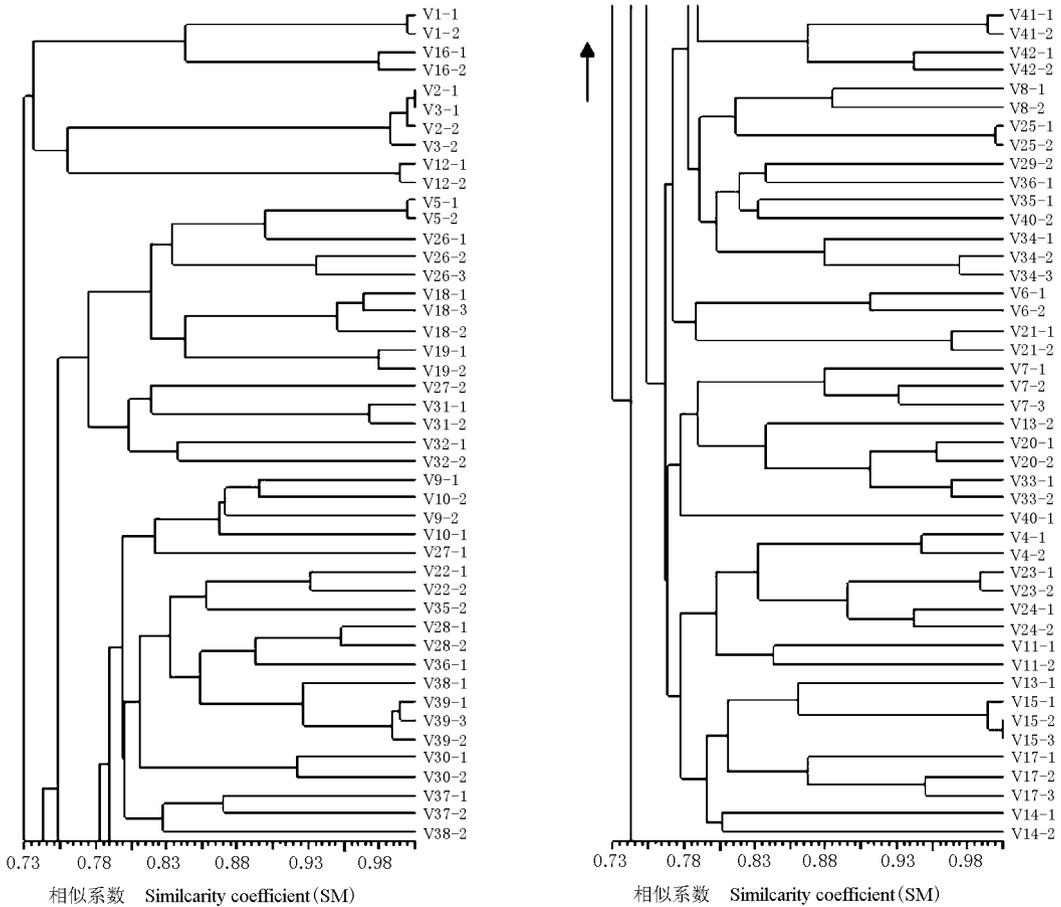


图4 基于43个SSR标记的91份甘蓝型油菜品种聚类

Fig.4 Dendrogram of 91 *Brassica napus* varieties based on 43 SSR markers

2.3 形态性状和SSR标记分析结果的比较

以SSR标记计算的遗传距离为横坐标,DUS测试性状计算的形态差异值为纵坐标,建立散点图(图5)。从图5可以看出,表型差异值较大时,遗传距离也较大。相关性分析表明,两者存在极显著正

相关,相关系数为0.732($p < 0.001$)。

若以形态差异值1和遗传距离0.1为阈值,可将品种划分成4种类型:类型1为形态差异大且遗传距离大的品种,共22对,占39.3%,对于此类品种,两种方法检测结果一致;类型2为形态差异小且

遗传距离小的品种,共 19 对,占 33.9%,对于此类品种,两种方法检测结果也一致;类型 3 为形态差异较大,但遗传距离小的品种,共 15 对,占 26.8%;类型 4 为形态差异小,而遗传距离较大的品种,品种对数为 0。对于类型 3 和类型 4 品种,两种方法的检测结果不尽一致,可进行多年田间种植试验并结合其它鉴别手段予以判断。

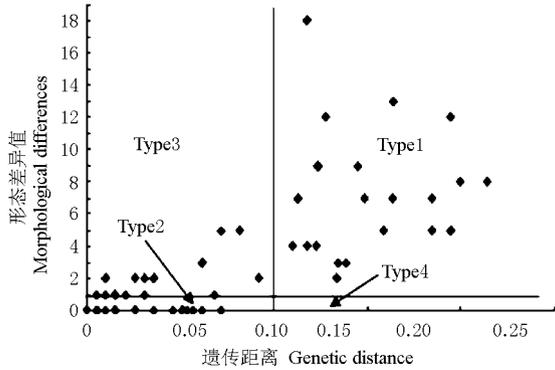


图 5 56 组同名品种的分子距离和形态差异比较

Fig. 5 Comparison between morphological differences and molecular distance of 56 pair homonymous cultivars

3 讨论

部分同名品种的表型存在不同程度的差异,且差异多体现在数量性状,这一结果与前人研究结论一致^[16-18]。数量性状往往受多基因控制,是基因和环境互作的结果,因此,安排试验时,应尽可能消除环境的误差。本研究将同名品种两两相邻种植,试验结果表明,单一品种各数量性状的变异系数变幅为 0.032 8~0.225 6,说明有效控制了环境对试验结果的影响。

UPOV 植物新品种特异性、一致性和稳定性审查总则^[1]规定,申请品种必须“明显”区别于所有已知品种,才视为具备特异性,这需要测试机构规定“明显差异”的最小阈值。对于采用“测量”的数量性状,通常在 1% 的概率水平判定其是否具有明显差异,而对于 SSR 标记性状,品种间的最小遗传距离尚在研究阶段。UPOV 规定,不管采用何种方法,不能损害现有保护体系下的保护力度,因此,SSR 标记鉴定结果需与现有保护体系鉴定结果统一。然而,研究者对基于 SSR 标记的遗传距离与形态差异的相关性还存在较大的分歧^[13],不同物种的研究结果不一致^[19,20],即使同一物种,所用 SSR 标记数量不同也可能对结果产生影响^[11]。此外,本研究发现,遗传距离和形态差异虽存在极显著正相关,但两种方法的鉴定结果仍不能等同,因此,结合两种方法,有助于提高鉴定结果的准确性^[21]。

结合形态性状差异和分子标记距离,品种可分为 4 种类型(图 5)。当固定形态差异值时,分子标记距离阈值的设定,对品种的划分有一定影响,分子标记距离阈值越小,划入 1 类和 4 类的品种比例越大,分子标记距离阈值越大,划入 2 类和 3 类的品种比例越大^[22]。在水稻^[21]和玉米^[23]上,研究者建议以遗传距离 0.05 作为阈值,在甘蓝型油菜上,陆光远等建议以遗传距离 0.1 作为阈值^[24],这些阈值是不同研究者根据不同作物提出的,目前国际上尚无统一标准。本研究发现,将分子标记距离阈值设为 0.1 时,划为类型 2 和类型 4 的品种比例最少,结合前人研究结果和甘蓝型油菜常异花授粉的繁殖特点,本研究暂将遗传距离阈值定为 0.1。

以分子标记距离 0.1、形态差异 1 为阈值,22 组同名品种被划分到第 1 类,此类品种的形态差异值较大,田间表现差异明显,分子标记距离也较大,被判定为同名异种。同名异种现象可能主要由以下两种原因造成:其一,品种更换,部分品种存在以次充好,以假乱真现象;其二,标签错误,在种子分存时,因工作失误导致标签错误。

被划入类型 2 的 19 组品种中,其 DUS 测试性状无明显差异,但遗传距离存在微小的差异(介于 0 和 0.071 8 之间),此现象在其它作物中也普遍存在^[16,17,20,25-27],而甘蓝型油菜尤为明显^[11,22],可能是由于品种的剩余遗传效应导致^[27],也可能是由于本研究所用 SSR 标记位于非功能基因内,且未与调查性状连锁,个别 SSR 位点的微小差异未反映在表型上。

划入类型 3 的 15 组同名品种中,其形态性状存在较小的差异,这些同名品种的表型较相似,遗传相似系数较大,且亲缘关系较近(表 1),暂判定为近似品种。导致此现象的可能原因较多,例如:姊妹系和/或由不同批次的同一亲本组合繁衍而来;在不同生态区的长期自然选择中,发生了适应性变异^[27]等。对于此类品种的判定,可以结合其他技术手段,如进行多年田间种植试验、同工酶标记分析、EST 标记分析或测序等。

同名异种现象由来已久,是各个作物的共性问题。如闫哲等采用形态性状和 SSR 标记,对 19 份不同来源大豆同名品种“满仓金”进行分析,结果表明,19 份“满仓金”之间都存在较大差异,无遗传一致性^[16];应杰政等发现,43.9% 的不同来源主栽水稻同名品种有差异^[25],在部分物种的地方品种中,同名异种现象更为突出^[17,18,28,29]。本研究采用综合 DUS 测试性状和 SSR 标记两种手段,对不同来源的

42 个(91 份)甘蓝型油菜同名品种进行了分析,结果表明,39.3%的同名品种无论在 DUS 测试性状还是在 SSR 标记上都存在较大差异。由此可见,甘蓝型油菜同名异种已成为比较普遍的现象,建议相关主管部门加强对同名品种的管理。

参考文献:

- [1] UPOV. General introduction to the examination of distinctness, uniformity and stability and the development of harmonized descriptions of new varieties of plants[S]. Geneva, 2002, TG/1/3.
- [2] 陈碧云,许 鲲,高桂珍,等. 中国白菜型油菜种质表型多样性分析[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(1): 25-32.
- [3] 胡标林,万 勇,李 霞,等. 水稻核心种质表型性状遗传多样性分析及综合评价[J]. 作物学报, 2012, 38(5): 829-839.
- [4] Furones - Pérez P, Fernández - López J. Usefulness of 13 morphological and phenological characteristics of sweet chestnut (*Castanea sativa* Mill.) for use in the DUS test [J]. Euphytica, 2009, 167: 1-21.
- [5] Reid A, Hof L, Felix G, et al. Construction of an integrated microsatellite and key morphological characteristic database of potato varieties on the EU common catalogue [J]. Euphytica, 2011, 182(2): 239-249.
- [6] Begum T, Kumar D. Usefulness of morphological characteristics for DUS testing of jute (*Corchorus olitorius* L. and *C. capsularis* L.) [J]. Spanish Journal of Agricultural Research, 2011, 9(2): 473-483.
- [7] Liu L J, Liu Z C, Chen H R, et al. SRAP markers and morphological traits could be used in test of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of lettuce (*Lactuca sativa*) varieties [J]. Journal of Agricultural Science, 2012, 4(3): 227-236.
- [8] UPOV. Guidelines for DNA - profiling: Molecular marker selection and database construction[S]. BMT Guidelines (proj. 17), Geneva, 2010, Draft.
- [9] Smulders M J M, Esselink G D, Everaert I, et al. Characterisation of sugar beet (*Beta vulgaris* L. ssp. *vulgaris*) varieties using microsatellite markers [J]. BMC Genetics, 2010, 11: 41.
- [10] 赖运平,张浙峰,王丽容,等. 利用 SSR 标记筛选 DUS 测试中的甘蓝型油菜近似品种[J]. 分子植物育种, 2013, 10(2): 2375-2386.
- [11] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, et al. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106: 1091-1101.
- [12] Bonow S, Von Pinho E V R, Vieira M G C, et al. Microsatellite markers in and around rice genes: applications in variety identification and DUS testing [J]. Crop Sci, 2009, 49(3): 880-886.
- [13] Kozak M, Bocianowski J, Liersch A, et al. Genetic divergence is not the same as phenotypic divergence [J]. Mol Breeding, 2011, 28: 277-280.
- [14] Doyle J J, Doyle J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue [J]. Phytochem Butt, 1987, 19: 11-15.
- [15] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms [J]. American Journal of Human Genetics, 1980, 32(3): 314-331.
- [16] 阎 哲,常汝镇,关荣霞,等. 不同来源大豆同名品种“满仓金”表现型及 SSR 标记的异同性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(2): 128-133.
- [17] 祈旭升,王晓娟. 甘肃省同名不同来源地方小麦品种的形态学鉴定 [J]. 作物杂志, 2008(3): 24-27.
- [18] 谢 炜,郭青云,郭小敏,等. 同名小麦地方品种小红芒和小红芒麦形态学和 HMW - GS 组成的演变分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 381-388.
- [19] Kwon Y S, Lee J M, Yi G B, et al. Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness, uniformity, and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annuum* L.) varieties [J]. Molecules and Cells, 2005, 19(3): 428-435.
- [20] Gunjaca J, Buhinicek I, Jukic M, et al. Discriminating maize inbred lines using molecular and DUS data [J]. Euphytica, 2008, 161: 165-172.
- [21] 庄杰云,施勇烽,应杰政,等. 中国主栽水稻品种微卫星标记数据库的初步构建 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(5): 460-468.
- [22] UPOV. Possible use molecular markers in the examination of distinctness, uniformity and stability (DUS) [S]. BMT/DUS, Geneva, 2010, Draft 3.
- [23] 赵久然,王风格. 玉米品种 DNA 指纹鉴定技术研究与应用 [M]. 北京:中国农业科学技术出版社, 2009. 98-99.
- [24] 陆光远,伍晓明,张冬晓,等. SSR 标记分析国家油菜区试品种的特异性和一致性 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 32-42.
- [25] 应杰政,施勇烽,庄杰云,等. 应用微卫星标记评估我国水稻主栽品种的一致性 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(4): 367-371.