

# 结球甘蓝相对于大白菜的连锁群特异 SSR 标记建立

顾爱侠, 王彦华, 轩淑欣, 陈雪平, 申书兴\*

(河北农业大学园艺学院, 河北保定 071000)

**摘要:** 选用位于甘蓝 9 个连锁群的 91 对 SSR 引物, 对 8 个结球甘蓝品种和 7 个大白菜品种进行 PCR 扩增, 筛选出 25 对结球甘蓝相对大白菜的特异 SSR 引物, 涉及甘蓝的 9 个连锁群, 其中位于 O1 连锁群 3 对, O2 连锁群 4 对, O3 连锁群 2 对, O4 连锁群 3 对, O5 连锁群 2 对, O6 连锁群 2 对, O7 连锁群 4 对, O8 连锁群 2 对, O9 连锁群 3 对。为利用 SSR 标记鉴定大白菜—结球甘蓝异附加系中附加的结球甘蓝染色体奠定了基础。

**关键词:** 大白菜; 结球甘蓝; SSR; 连锁群特异标记

**中图分类号:** S 635.1; S 634.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 08-1221-06

## Establishment of Specific SSR from Different Linkage Groups of Cabbage Compared with Chinese Cabbage

GU Ai-xia, WANG Yan-hua, XUAN Shu-xin, CHEN Xue-ping, and SHEN Shu-xing\*

(College of Horticulture, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071001, China)

**Abstract:** Ninety-one primers from 9 cabbage linkage groups were amplified on 8 cabbage cultivars and 7 Chinese cabbage cultivars, 25 of them were specific on cabbage compared with Chinese cabbage. These primers assigned 9 linkage groups of cabbage, 3 of them were assigned linkage group O1, 4 of them were assigned linkage group O2, 2 of them were assigned linkage group O3, 3 of them were assigned linkage group O4, 2 of them were assigned linkage group O5, 2 of them were assigned linkage group O6, 4 of them were assigned linkage group O7, 2 of them were assigned linkage group O8, and 3 of them were assigned linkage group O9. It laid a foundation to further identify the introduced chromosome of cabbage in Chinese cabbage alien addition lines.

**Key words:** Chinese cabbage; cabbage; SSR; linkage group-specific marker

异附加系是利用外源基因进行基因组研究和品种改良的重要材料, 被广泛用来转导近缘种或野生种中各种有用性状 (Peterka et al, 2004)。创建大白菜—结球甘蓝异附加系, 不仅能够将结球甘蓝优良基因向大白菜基因组转移, 也能够将这些基因定位并确定其遗传模式, 为研究大白菜与结球甘蓝亲缘关系, 解剖结球甘蓝基因组提供新的途径。但由于芸薹属染色体小, 形态相近, 使得在大白菜背景下区分结球甘蓝染色体的细胞学研究十分困难 (Snowdon, 2007)。Cheng 等 (1995) 采用核型分析鉴定出了 4 号芸薹—芥蓝单体异附加系, 但同时也阐明了在芸薹背景下区分芥蓝的 2 号和 3 号, 5 号和 6 号染色体是非常困难的。

GISH 是鉴定异染色体系常用高效的方法, 魏文辉等 (2006) 利用 GISH 分析获得了白芥与甘蓝单体异附加系, 但 GISH 不能区分芸薹属 A、C 基因组染色体 (Snowdon et al, 1997; 李宗芸 等,

收稿日期: 2009 - 03 - 24; 修回日期: 2009 - 06 - 23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30871713); 河北省自然科学基金项目 (C2005000222); 河北农业大学将帅计划项目

\* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: shensx@hebau.edu.cn)

2003)。Hasterok等(2005)采用荧光原位杂交(FISH)技术,以5S rDNA、25S rDNA为探针,也仅鉴定出了5、8、9号芸薹—芥蓝单体异附加系。目前尚未见精确区分大白菜(AA)与结球甘蓝(CC)每条染色体的方法。

在芸薹属中,RFLP和RAPD被广泛应用于系统发育和遗传图谱研究,但RAPD为显性标记,稳定性较差,RFLP多态性较低,且操作复杂。SSR(simple sequence repeats)几乎遍布所有真核生物基因组(Dib et al, 1996; Dietrich et al, 1996),在染色体除着丝粒及端粒区域外,其他区域均广泛分布有SSR位点,具有多态性高(Weber & May, 1989; Hancock, 1995)、稳定性强、操作简便、DNA用量少、表现为共显性的孟德尔遗传(Morgante & Olivieri, 1993; Thomas & Scott, 1993)等特点,近些年广泛用于植物遗传图谱构建,系统发育关系分析,种质资源分类鉴定,杂种鉴定,分子标记辅助育种选择(Gupta & Varshney, 2000; Suwabe et al, 2002; Piquemal et al, 2005; 殷兆晴等, 2006)等诸多方面。

本研究中利用91对甘蓝SSR引物,筛选并建立结球甘蓝每个连锁群相对于大白菜的特异引物,为大白菜—结球甘蓝异附加系的鉴定开辟新途径。

## 1 材料与方法

试材为结球甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L.):春季早熟品种‘中甘11’、‘8312’和‘极早甘蓝’,春季中熟品种‘京丰一号’,春秋兼用早熟品种‘中甘17’和‘中甘18’,秋季中熟品种‘中甘19’,秋季晚熟品种‘晚丰甘蓝’;大白菜[*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour) Olsson]抗抽薹炮弹型品种‘强丰春白菜’和‘高抗王’,中晚熟直筒合抱品种‘多抗75’,极早熟叠抱品种‘超级夏阳’和‘早熟五号’,早熟高桩直筒品种‘秋绿55’,中熟矮桩叠抱品种‘新乡小包23’。

以上品种均为生产商用品种。于2008年3月在河北农业大学细胞生物实验室内播种于穴盘,2~3片时剪取真叶,CTAB法提取基因组DNA。

引物来源于 <http://brassica.info>,共选取了分布于甘蓝9个连锁群的91对SSR引物(表1),引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

每个反应体系为20 μL,含模板DNA 50 ng, 1.5 mmol·L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 1×buffer, 200 μmol·L<sup>-1</sup> dNTP, 1U *Taq*酶,正反向引物各0.2 μmol·L<sup>-1</sup>。

PCR扩增程序为94 预变性2 min; 94 变性1 min, 55~60 复性30 s, 72 延伸45 s, 35个循环; 72 延伸5 min, 4 保存。

扩增产物在6%变性聚丙烯酰胺凝胶中电泳分离,采用银染法检测,并照相。

## 2 结果与分析

### 2.1 大白菜、结球甘蓝多态性

在选用的91对SSR引物中,对于大白菜,每个SSR引物位点检测到的等位基因数为0~4个,检测到2个等位基因的频率最高,为45%;检测到3个和4个等位基因频率均为17%;1个等位基因频率为11%;10%的引物在大白菜上没有扩增产物。

在结球甘蓝中,每个SSR引物位点检测到的等位基因数为1~6个,检测到2个等位基因的频率最高,为40%;检测到1个等位基因的频率为5%;3个等位基因的频率为17%;4个等位基因的频率为20%;5个和6个等位基因的频率分别为13%和5%。

2.2 多态性引物在连锁群上的分布

筛选结球甘蓝每个染色体相对于大白菜具有差异引物的标准是：在结球甘蓝上有扩增产物而在大白菜上没有扩增产物的引物；或是两者都有扩增产物，但扩增产物大小存在差异的引物。

在选用的 91对 SSR 引物中，25对能够在结球甘蓝、大白菜扩增出清晰有差异的片段，片段长度在 40 ~ 430 bp，其中 7对引物在结球甘蓝品种上有扩增产物，而大白菜品种上没有扩增产物。

这 25对引物涉及了甘蓝的 9个连锁群（表 1），其中 O1连锁群 3对（图 1，A ~ C），O2连锁群 4对（图 1，D ~ G），O3连锁群 2对（图 1，H、I），O4连锁群 3对（图 1，J ~ L），O5连锁群 2对（图 1，M、N），O6连锁群 2对（图 1，O、P），O7连锁群 4对（图 1，Q ~ T），O8连锁群 2对（图 1，U、V），O9连锁群 3对（图 1，W ~ Y）。

表 1 甘蓝连锁群特异引物  
Table 1 Linkage group-specific primers of cabbage

连锁群 Linkage group	SSR 引物 SSR primers	特异 SSR 引物 Specific SSR primers	特异引物扩增产物的 片段大小 /bp Size range of products from specific primers	特异引物重复类型 Repeat type of specific primer
O1	Na10H03, Na10H06, Na12C08, Na12H04, nga248, N4B10, O110A11, O110F11	Na10H03	90 ~ 128	(GGC) <sub>6</sub>
		N4B10	165 ~ 185	(CT) <sub>20</sub>
		Na12C08	140 ~ 404	(CT) <sub>50</sub>
O2	Na12C03, Na12H09, N12C12, O109A03a, O109A06a, O113E08b, O113G05, sORA26, sORA43	O113G05	100 ~ 130	(CCG) <sub>5</sub>
		sORA43	100 ~ 198	(GGC) <sub>7</sub>
		Na12C03	123 ~ 250	(GA) <sub>30</sub>
		Na12H09	108 ~ 162	(GA) <sub>24</sub>
O3	BN12A, CALSSR, Na10E02d, Na10G10, Na12F12, Na14E02, N4G04, O110A05a, O110B04, O111B05, O111G11, O113A10, O113C12b, O113H09, Ra2E11b	O111G11	100 ~ 163	(CCG) <sub>5</sub>
		BN12A	147 ~ 350	(GA) <sub>11</sub> (AAG) <sub>4</sub>
O4	Na10B04a, Na10F06, Na12E05, Na14E08, Na14E11, N12D08b, N4F08, O110A09, O110F12, O110G08a, O111H02b, O111H08, O112B05a, O112F07, O113D02Aa	Na12E05	110 ~ 165	(CA) <sub>10</sub>
		O110F12	95 ~ 130	(CT) <sub>64</sub>
		O111H08	76 ~ 160	(AG) <sub>24</sub>
O5	Na10D11, Na10A08A, Na10B08, Na10G08A, Na12D10, Na12E06Ab, N12F02b, N4C11, O110G09, O112F02a, Ra2A04b, sORA21b	Na10D11	123 ~ 220	(GA) <sub>27</sub>
		Ra2A04b	40 ~ 67	(GA) <sub>58</sub>
O6	Ap1a5pr, ca72, MB4, Na10C06, Na12A02b, Na14F11, nga111, N12A11, O110H07b, O110F09, Ra2A05	Ap1a5pr	187 ~ 217	4/
		Na14F11	137 ~ 430	(GT) <sub>7</sub>
O7	BN72a, Na12F03, O110B01, O110H04, O111C02, Ra3C04a	O110B01	116 ~ 201	(GA) <sub>20</sub>
		BN72a	140 ~ 309	(TAA) <sub>5</sub> (GA) <sub>9</sub>
		Na12F03	147 ~ 309	(GA) <sub>35</sub>
		O110H04	120 ~ 201	(CT) <sub>29</sub>
O8	N12F11A, N4D09, O112D05, O112G04b	O112D05	103 ~ 140	(CT) <sub>32</sub>
		O112G04b	90 ~ 135	(TC) <sub>24</sub>
O9	BN83b1, N12B01, O110D08, O111B03a, O111H06, O112A04, O112D09, O113C03, Ra1F03, Ra2E01c, Ra2E03b	O112D09	95 ~ 135	(CGG) <sub>4</sub>
		Ra1F03	97 ~ 145	(TCCV GCC) <sub>18</sub>
		O112A04	95 ~ 160	(CT) <sub>17</sub>

注：“4/”表示尚不清楚。  
Note：“4/” represented unknown

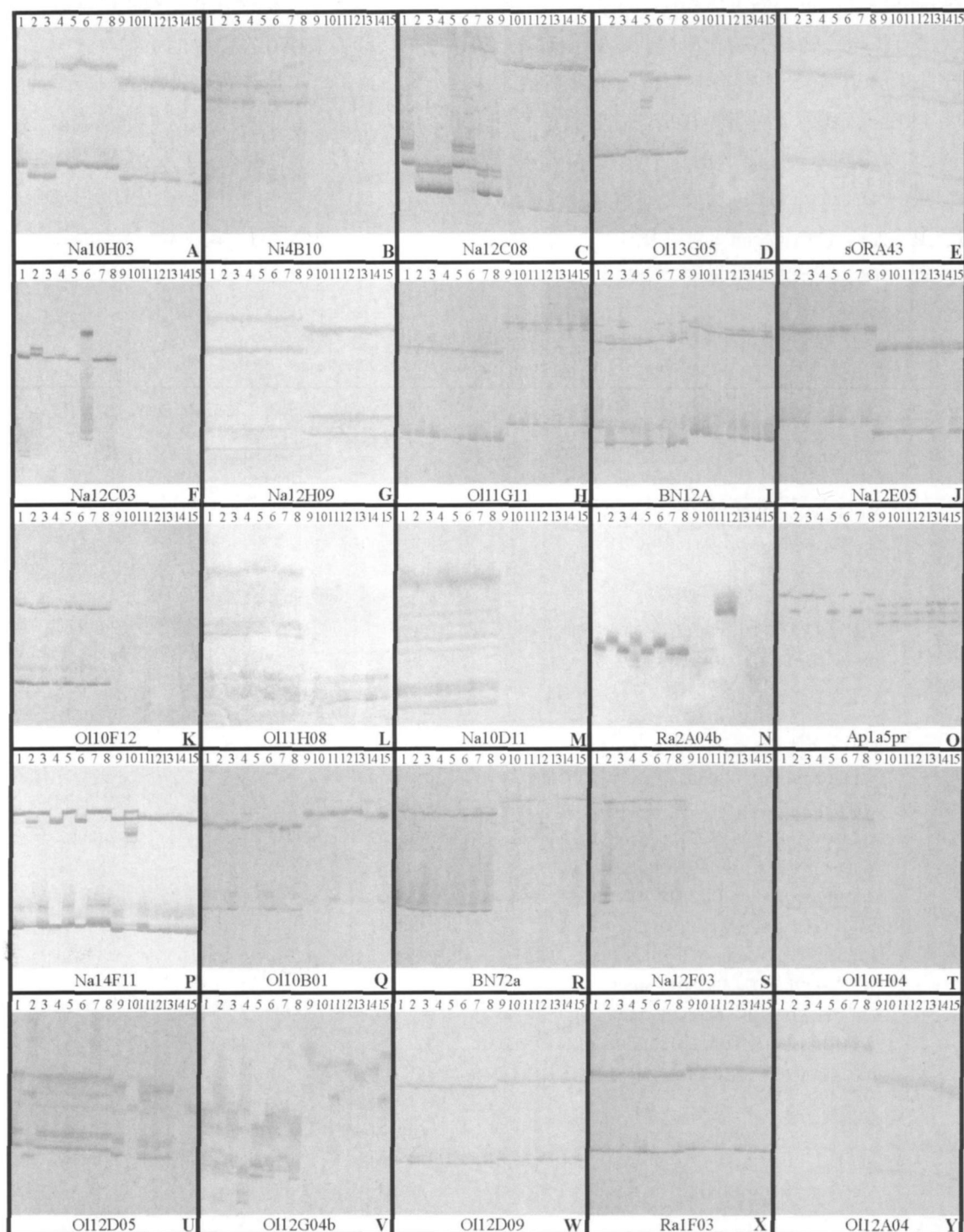


图 1 连锁群特异引物在结球甘蓝品种和大白菜品种中的扩增结果

1: 极早甘蓝; 2: 晚丰甘蓝; 3: 中甘 17; 4: 京丰一号; 5: 中甘 18; 6: 中甘 11; 7: 中甘 19; 8: 8312; 9: 秋绿 55; 10: 超级夏阳; 11: 新乡小包 23; 12: 多抗 75; 13: 早熟五号; 14: 高抗王; 15: 强丰春白菜。

Fig. 1 Amplification results of linkage group-specific primers on varieties of Chinese cabbage and cabbage

1: Jizao cabbage; 2: Wanfeng cabbage; 3: Zhonggan 17; 4: Jingfeng 1; 5: Zhonggan 18; 6: Zhonggan 11; 7: Zhonggan 19; 8: 8312; 9: Qiulü55; 10: Chaoji Xiayang; 11: Xinxiang Xiaobao 23; 12: Duokang 75; 13: Zaoshu 5; 14: Gaokangwang; 15: Qiangfeng Spring Chinese cabbage

### 3 讨论

本研究选用 91 对 SSR 引物检测结球甘蓝与大白菜间的多态性, 结果显示 27.5% (25 对) 引物在结球甘蓝和大白菜种间表现多态性, 分析多态性比率偏低的原因是大白菜 A 基因组与结球甘蓝 C 基因组具有较强同源性所致。McGrath 和 Quiros (1990) 通过芸薹和甘蓝的分子连锁图谱比较研究, 发现被保留的连锁重排的许多区域, 也发现两者在碱基序列和基因拷贝数上存在很高的相似性。Song 和 Osborn (1992) 通过芸薹和甘蓝线粒体和叶绿体 RFLP 图谱比较发现, 两者的酶切图谱变化很小, 说明芸薹和甘蓝间具有较强的亲缘关系。

前人研究表明, 甘蓝型油菜 (SzeWC-McFadden et al, 1996; Uzunova & Ecker, 1999)、水稻 (Wu & Tanksley, 1993)、苹果 (Guilford et al, 1997)、大麦 (Struss & Plieske, 1998) 基因组中含有高频率的 GA 重复序列, 小麦中重复序列数量与等位基因数量存在较弱的相关关系 (Plaschke et al, 1995), 而大麦中存在很强的相关关系 (Saghai et al, 1994)。本研究发现, 大白菜与结球甘蓝基因组中含有高频率的 GA 与 CT 重复序列, 重复序列数与等位基因数量不存在相关关系。SzeWC-McFadden 等 (1996) 与 Plieske 和 Struss (2001) 在研究甘蓝型油菜时也发现有高频率的 GA 重复, 且重复数量与等位基因数量不存在相关关系。

本研究建立了甘蓝连锁群相对于大白菜特异的 SSR 引物, 不仅可用于大白菜与结球甘蓝杂交种的鉴定, 还可以用于异附加系等的鉴定, 并能够确定附加的外源连锁群。许多学者在芸薹—芥蓝 (Chen et al, 1992), 甘蓝型油菜—黑芥 (Quiros et al, 1991), 芸薹—甘蓝 (Quiros et al, 1987; Mitchell et al, 1990) 单体异附加系鉴定研究上借助酶、RFLP、RAPD 技术, 筛选单体异附加系的特异标记, 但这种标记是种间范围内的, 不能作为某连锁群或染色体的特异标记, 使得鉴定的异附加系在各实验室之间交流性差。利用本研究中建立的甘蓝连锁群相对于大白菜的特异 SSR 标记鉴定大白菜/结球甘蓝异附加系, 能够确定附加的外源染色体的连锁群, 增强了异附加系在不同实验室间的相互交流性, 且可结合对附加染色体的鉴定, 最终建立甘蓝连锁群与染色体的对应关系。结球甘蓝相对于大白菜特异 SSR 引物的建立, 也为异代换系和易位系的鉴定奠定了基础。

### References

- Chen B Y, Simonsen V, Lann G, Herrera C, Heneen W K. 1992. A *B. rassaica campestris-alboglabra* addition line and its use for gene mapping, intergenomic gene transfer and generation of trisomics. *Theoretical and Applied Genetics*, 84: 592 - 599.
- Cheng B F, Heneen W K, Chen B Y. 1995. Mitotic karyotypes of *B. rassaica campestris* and *B. rassaica alboglabra* and identification of the *B. alboglabra* chromosome in an addition line. *Genome*, 38: 313 - 319.
- Dib C, Faure S, Fizames C, Samson D, Drouot N, Vignal A. 1996. A comprehensive genetic map of human genome based on 5 264 microsatellites. *Nature*, 380: 152 - 154.
- Dietrich W F, Miller J, Steen R, Merchant M A, Darnon-Boles D, Husain Z. 1996. A comprehensive genetic map of the mouse genome. *Nature*, 380: 149 - 152.
- Guilford P, Prakash S, Zhu J M, Rikkerink E, Gardiner S, Bassett H, Forster R. 1997. Microsatellites in *Malus domestica* (apple): Abundance, polymorphism and cultivar identification. *Theoretical and Applied Genetics*, 94: 249 - 254.
- Gupta P K, Varshney R K. 2000. The development and use of microsatellite markers for genetic analysis and plant breeding with emphasis on bread wheat. *Euphytica*, 113: 163 - 185.
- Hancock J M. 1995. The contribution of slippage-like processes to genome evolution. *Journal of Molecular Evolution*, 41: 1038 - 1047.
- Hasterok R, Wolny E, Kulak S, Zdziewiecz A, Maluszynska J, Heneen W K. 2005. Molecular cytogenetic analysis of *B. rassaica napu-B. rassaica oleracea* var. *alboglabra* monosomic addition lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 196 - 205.
- Li Zong-yun, Wu Xiao-ming, Wang Xiu-qin, Song Yun-chun. 2003. Genomic in situ hybridization (GISH) analysis of *B. oleracea* and 5 related *B. rassaica* species. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 25 (4): 16 - 19. (in Chinese)

- 李宗芸, 伍晓明, 王秀琴, 宋运淳. 2003. 结球甘蓝与芸薹属 5 个近缘物种的基因组原位杂交分析. 中国油料作物学报, 25 (4): 16 - 19.
- McGrath J M, Quiros C F. 1990. Generation of alien chromosome addition lines from Synthetic *B rassic a napus*, morphology, cytology fertility, and chromosome transmission. *Genome*, 33: 374 - 383.
- Mitchell McGrath J, Quiros C F, Harada J J, Landry B S. 1990. Identification of *B rassic a oleracea* monosomic alien chromosome addition lines with molecular markers reveals extensive gene duplication. *Molecular Genetics and Genomics*, 223: 198 - 204.
- Morgante M, Olivieri A M. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant Journal*, 3: 175 - 182.
- Peterka H, Budahn H, Schrader O, Ahne R, Sch üze W. 2004. Transfer of resistance against the beet cyst nematode from radish (*Raphanus sativus*) to rape (*B rassic a napus*) by monosomic chromosome addition. *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 30 - 41.
- Piquemal J, Cinquin E, Couton F, Rondeau C, Seignoret E, Doucet I, Perret D, Villeger M J, Vincourt P, Blanchard P. 2005. Construction of an oilseed rape (*B rassic a napus* L. ) genetic map with SSR markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 111: 1514 - 1523.
- Plaschke J, Ganal M W, Röder M S. 1995. Detection of genetic diversity in closely related bread wheat using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1001 - 1007.
- Plieske J, Struss D. 2001. Microsatellite markers for genome analysis in *B rassic a* . development in *B rassic a napus* and abundance in *B rassic aceae species*. *Theoretical and Applied Genetics*, 102: 689 - 694.
- Quiros C F, Hu J, This P, Chevre A M, Delseny M. 1991. Development and chromosomal localization of genome-specific markers by polymerase chain reaction in *B rassic a*. *Theoretical and Applied Genetics*, 82: 627 - 632.
- Quiros C F, Ochoa O, Kianian S F, Douches D. 1987. Analysis of the *B rassic a oleracea* genome by the generation of *B. campestris-oleracea* chromosome addition lines: Characterization by isozymes and rDNA genes. *Theoretical and Applied Genetics*, 74: 758 - 766.
- Saghai Maroof M A, Biyashev R M, Yang G P, Zhang Q, Allard R W. 1994. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: Species diversity, chromosomal locations, and population dynamics. *The Proceedings of National Academy of Sciences*, 91: 5466 - 5470.
- Snowdon R J. 2007. Cytogenetics and genome analysis in *B rassic a* crops. *Chromosome Research*, 15: 85 - 95.
- Snowdon R J, Köhler W, Friedt W, Köhler A. 1997. Genomic in situ hybridization in *B rassic a amphidiploids* and interspecific hybrids. *Theoretical and Applied Genetics*, 95: 1320 - 1324.
- Song K M, Osborn T C. 1992. Polyphyletic origins of *B rassic a napus*: New evidence based on organelle and nuclear RFLP analysis. *Genome*, 35: 992 - 1001.
- Struss D, Plieske J. 1998. The use of microsatellite marker for detection of genetic diversity in barley populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 97: 308 - 315.
- Suwabe K, Iketani H, Nunome T, Kage T, Hirai M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *B rassic a rapa* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1092 - 1098.
- Szewc McFadden A K, Kresovich S, Bliet S M, Mitchell S E, McFerson J R. 1996. Identification of polymorphic, conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *B rassic a species*. *Theoretical and Applied Genetics*, 93: 534 - 538.
- Thomas M R, Scott N S. 1993. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analyzed as sequence-tagged sites (STSs). *Theoretical and Applied Genetics*, 86: 985 - 990.
- Uzunova M I, Ecke W. 1999. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in oilseed rape (*B rassic a napus* L. ). *Plant Breed*, 118: 323 - 326.
- Weber J L, May P E. 1989. Abundant class of human DNA polymorphisms which can be typed using the polymerase chain reaction. *American Journal of Human Genetics*, 44: 388 - 396.
- Wei Wen-hui, Zhang Su-feng, Li Jun, Wang Li-jun, Chen Bo, Fang Xiao-ping, Wang Zhuan, Luo Li-xia. 2006. GISH analysis of  $F_1$  and monosomic alien addition line from  $BC_1$  between *Sinapis alba* L. and *B rassic a oleracea* var *albobolana*. *Science Bulletin*, 51 (21): 2490 - 2494. (in Chinese)
- 魏文辉, 张苏锋, 李 均, 王力军, 陈 波, 方小平, 王 转, 罗莉霞. 2006. 白芥 × 甘蓝  $F_1$  代及  $BC_1$  代单体异附加系的 GISH 分析. *科学通报*, 51 (21): 2490 - 2494.
- Wu K S, Tanksley S D. 1993. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Molecular Genetics and Genomics*, 241: 225 - 235.
- Yin Zhao-qing, Wang Yu-ping, Zhou Li-jun, Xiao Xiao-yu, Li Shi-gui. 2006. Identification and purity test of hybrid rice with SSR molecular markers and its application research. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 19: 1000 - 1004. (in Chinese)
- 殷兆晴, 王玉平, 周黎军, 肖小余, 李仕贵. 2006. 杂交稻种子纯度的 SSR 分子检测及应用研究. *西南农业学报*, 19: 1000 - 1004.