

用于白菜和大白菜品种鉴定的 EST-SSR 复合标记的建立

李 丽, 郑晓鹰*

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100097)

摘 要: 为了有效和全面鉴定白菜和大白菜品种, 研制了由 3 个引物对组成的 6 套 EST-SSR 复合标记组合, 并形成了多重 SSR 的最佳实用试验条件。经由这 6 套标记组合完全鉴别了 43 个白菜和大白菜品种差异的检测, 并在 3 个大白菜杂交种个体之间的表现一致, 比较了单引物标记与复合标记的鉴定效率, 验证了这套技术和组合可以表达白菜和大白菜品种间多态性、品种内一致性及稳定性和重复性, 确认其可以高效准确和全面地鉴别白菜和大白菜品种的真实性和杂交种纯度。

关键词: 白菜; 大白菜; EST-SSR 复合标记; 品种鉴定

中图分类号: S 634.1; S 634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2009) 11-1627-08

The Development of Multiplex EST-SSR Markers to Identification Chinese Cabbage [*Brassica campestris* L. *chinensis* (L.) Makino and *Brassica campestris* L. *pekinensis* (Lour.) Olsson] Cultivars

L ILi and ZHENG Xiao-ying*

(Beijing Vegetable Research Center of Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: In order to identify Chinese cabbage [*Brassica campestris* L. *chinensis* (L.) Makino] and [*Brassica campestris* L. *pekinensis* (Lour.) Olsson] cultivars, six multiplex EST-SSR sets made up of three pairs of primers in each set were developed and optimized PCR condition for each multiplex SSRs amplifying. These six multiplex EST-SSR markers may distinguish the forty-three Chinese cabbage cultivars completely and test the uniformity within the individuals of three Chinese cabbage hybrids. Efficiency from single primer pair and multiplex primer sets were compared. They were measured the extent of diversity between the forty-three Chinese cabbage cultivars, uniformity within cultivars and stabilities, repetition. According to the cultivar and the locus examined. These results validated that the six multiplex EST-SSR markers could be used to identification Chinese cabbage cultivars and test the purity of hybrids.

Key words: Chinese cabbage; multiplex EST-SSR; cultivars identification

白菜和大白菜是原产于我国并广受欢迎的蔬菜, 其栽培面积积极广, 可在全国各种气候条件下栽培。品种的差异直接影响这类蔬菜的生产和使用性能, 因此品种鉴别尤为重要。对于商用种子的品种鉴别, 新品种登记测试以及资源种质遗传多样性分析, 都非常需要发展一种高效、快速、准确和经济实用的品种鉴别方式。

经典的鉴定方法是形态标记的田间检测 (孟淑春 等, 2005), 上世纪自 90 年代以来分子标记作为一种植物基因组特征分析手段, 是继形态标记, 细胞标记和生化标记之后发展起来的一种新的较为理想的基因标记形式, 具有许多优势, 是基于 DNA 水平多态性的遗传标记。众所周知, 目前已使用

收稿日期: 2009 - 06 - 25; 修回日期: 2009 - 09 - 14

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30571134)

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhengxiaoying@nercv.org)

的分子标记技术有十多种 (郭晶心 等, 2002; Li et al, 2004; 张书芬 等, 2006; 忻雅 等, 2007), SSR技术多态性和重复性较好, 但是一次试验得到的位点较少。Tommasini 等 (2002) 发展了多重SSR分析技术, 并有效地鉴定了油菜品种。

本研究在分子标记最新研究成果的基础上, 发展 EST-SSR 多重标记组合及其检测技术, 扩大 SSR 标记的多态信息量, 弥补其位点少的缺陷, 一次扩增反应可以得到多个多态标记。并在确认品种间多态性和品种内一致性以及重复性和实用性检测验证的基础上, 建立了一套用于白菜和大白菜种子真伪鉴定和纯度检测、种质资源分析的经济实用的鉴定技术。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用白菜 [*B. rassaica campestris* L. *chinensis* (L.) Makino] 和大白菜 [*B. rassaica campestris* L. *pekinensis* (Lour.) Olsón] 种子来自北京市农林科学院蔬菜研究中心白菜育种组和种质资源库, 使用的品种见表 1。试验于 2006 年底至 2008 年初在北京市农林科学院蔬菜研究中心种子技术分子检测实验室进行。

表 1 品种名称及编号

Table 1 Cultivar name and number

样品号 No	品种名称 Cultivar	种类 Sort	样品号 No	品种名称 Cultivar	种类 Sort
1	春油 1号 Chunyou 1	白菜 Pakchoi	23	北京桔红心 Beijing Juhongxin	大白菜 Chin cab
2	紫冠 1号 Ziguan 1	白菜 Pakchoi	24	桔红 2号 Juhong 2	大白菜 Chin cab
3	天津绿 Tianjinl ü	白菜 Pakchoi	25	京夏 1号 Jingxia 1	大白菜 Chin cab
4	京绿 7号 Jingl ü7	白菜 Pakchoi	26	京研快菜 Jingyan Kuaicai	大白菜 Chin cab
5	京绿 2号 Jingl ü2	白菜 Pakchoi	27	京翠 70 Jingcui 70	大白菜 Chin cab
6	国夏 1号 Guoxia 1	白菜 Pakchoi	28	北京大牛心 Beijing Daniuxin	大白菜 Chin cab
7	京冠 1号 Jingguan 1	白菜 Pakchoi	29	快菜 1号 Kuaicai 1	大白菜 Chin cab
8	黑叶 2号 Heiye 2	白菜 Pakchoi	30	夏胜 Xiasheng	大白菜 Chin cab
9	京冠 2号 Jingguan 2	白菜 Pakchoi	31	二包头 Erbaotou	大白菜 Chin cab
10	京绿乌塌菜 Jingl üwutacai	白菜 Pakchoi	32	夏优三号 Xiayou 3	大白菜 Chin cab
11	奶白 1号 Naibai 1	白菜 Pakchoi	33	贮藏用白菜 Zhucang Baicai	大白菜 Chin cab
12	斗白 1号 Doubai 1	白菜 Pakchoi	34	大核桃纹 Dahetaowen	大白菜 Chin cab
13	胶研金秋 Jiaoyan Jinjiu	大白菜 Chin cab	35	青和 1号 Qinghe 1	大白菜 Chin cab
14	京春娃娃菜 2号 Jingchunwacai 2	大白菜 Chin cab	36	春早黄心 Chunzao Huangxin	大白菜 Chin cab
15	改良京春绿 Gailiang Jingchunl ü	大白菜 Chin cab	37	河北青麻叶 Hebei Qingmaye	大白菜 Chin cab
16	改良京春白 Gailiang Jingchunbai	大白菜 Chin cab	38	矮五头 Aiwutou	大白菜 Chin cab
17	青杂中丰 Qingzazhongfeng	大白菜 Chin cab	39	大青梢 Daqingshao	大白菜 Chin cab
18	黄芽菜 Huangyacai	大白菜 Chin cab	40	内蒙八叶齐 Neimeng Bayeqi	大白菜 Chin cab
19	秋月 Qiuyue	大白菜 Chin cab	41	东京五号 Dongjing 5	大白菜 Chin cab
20	北京小杂 60 Beijing Xiaoza 60	大白菜 Chin cab	42	怡兴黄蕊 Yixing Huangrui	大白菜 Chin cab
21	京秋 65 Jingqiu 65	大白菜 Chin cab	43	早熟 5号 Zaoshu 5	大白菜 Chin cab
22	京翠 1号 Jingcui 1	大白菜 Chin cab			

1.2 DNA的制备

取苗龄 30~40 d 的幼苗幼嫩真叶 50~60 mg 放入 1.5 mL 离心管, 加 400 µL SDS-DNA 提取液 (Tris-HCl pH 7.5, 200 mmol · L⁻¹; NaCl 250 mmol · L⁻¹; EDTA 2.5 mmol · L⁻¹; SDS 0.5%)。玻璃棒研磨混匀后置 65 °C 水浴 15 min, 中间振摇混匀 3 次, 加 5 mol · L⁻¹ KAc 200 µL, 混匀后置冰浴 10 min, 13 000 r · min⁻¹ 离心 30 min, 取上清液用等体积预冷 (-20 °C) 的异丙醇沉淀 DNA, 沉淀物用

70%乙醇洗涤 2~3 次后溶于 60~80 μL 消毒双蒸水中过夜，参照 Dorokhov 和 Klocke (1997) 的方法提取 DNA。其 OD₂₆₀/OD₂₃₀ 比值在 1.9~2.0 左右，OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值在 1.8~2.0 之间，用 1.0% Agrose 凝胶电泳检测提取的 DNA 为一条清晰的带，表明提取的 DNA 分子没有断裂和降解，是一条完整的双链分子，纯度符合 PCR 扩增的要求。

1.3 EST-SSR 引物设计和筛选

利用澳大利亚植物生物技术中心在网上公布的 SSR 引物设计软件 (PBC Public SSR Primer Discovery) 对美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 发布的十字花科芸薹属 EST 信息库进行搜索，形成 242 对 SSR 引物序列。以白菜和大白菜的 4 个自交系 (P8, P14, P40, P41 为 4 个大白菜自交系)，和 7 个地方品种 (1、15、18、23、28、37、43 见表 1) 从 EST-SSR 引物群筛选出 120 个多态引物。

1.4 PCR 反应

PCR 反应体系为：总反应体积为 20 μL，其中包括 10 mmol·L⁻¹ dNTP 0.4 μL，PCR 反应缓冲液 (含 15 mmol·L⁻¹ Mg²⁺) 2 μL，25 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 0.4 μL，5 U·μL⁻¹ 10 Taq 酶 0.5 μL (购自北京泽星生物科技有限公司)，模板 DNA 20~200 ng·μL⁻¹ 2 μL，引物取量见表 2。PCR 反应在选定的多态性引物组中选择具有可相容的基因片段大小范围，PCR 扩增条件相近的 SSR 引物在 PE9700 扩增仪 (PE Biosystems) 同一个扩增程序上扩增，温度从 68 至 58 逐级降低，每完成扩增的两个循环，温度降低 1，直到降到 58。采用 Szewc-McFadden 等 (1996) 提出的 TD-PCR 并略有修改：72 3 min，94 2 min 后进行 20 个迫降循环：94 1 min，68 1 min，72 45 s (-1/2 循环)；再进行 20 个循环：94 1 min，58 1 min，72 45 s，于 72 10 min 后于 4 保存。PCR 扩增产物于 -20 冰箱保存。

表 2 6 组复合标记所用引物的碱基序列及其引物用量

Table 2 The primer sequences and PCR reagent concentration for the six EST-SSR sets

引物组合	引物序列	用量 /μL	引物组合	引物序列	用量 /μL
MPS	Primer sequence (5'-3')	Dosage	MPS	Primer sequence (5'-3')	Dosage
I	GTGA TAGCA GTGGTGGAA GT*	3.0	IV	GCTTGACGA ICTGTAA CCAT	1.3
	GA TAA TA TCA GCCGACGA AG			GAGAGCTGCTCA TTCA TTTC	
	GA TCTCA TC GACCCGTACTA	1.6		CAAGTCTCCTTCAAA TCTCG	1.6
	CAGAGA TACTGCA GAGGAGG			AGTCTCCGCTCTCTTCTTCT	
	TTCCGTCCTTCCCTAAACA	0.9		GAA GAA GTGGCGCTTCAA	2.6
	GAACACTACTGCCCA GA GAACAC			CTTAGCA GAGA GCAACCA TC	
	GTTGACTGTGGA TGA TGTGA	1.0	V	CGGAA GATTGA GAAACACAG	1.2
	TTTCTCTCTCGGTCTCGT			GACTTTCA GCTGTAGGGTTG	
	GAGTTTCGA GGA GTTTCA GA	1.8		CCCACTCAACACACACTAGA	2.5
	CTTCAAA GTAGA GAGAA GCCC			CTCCTTTCA GAGTGACCAAG	
	CTTCTTACGA TGGA TTGA GC	1.6		AACAGCTTTTCTCTCTCA TGGTTG	1.8
	CCTCTTTCAA GAACTTAGCG			AGCATTA CACA GAGACG	
	AGAGA GA TCGA GATCCACAA	1.5	VI	ACATGACACACTCTCTGCAA	2.0
	GGCGA GAAAGTTAGTTGCTA			GAGGAGA GCA GACTAACAG	
	GACTCTGTCA TCA TCGTCTT	1.0		AACTGGTA GAGCA GAAACCA	1.3
	ACACGACA GAACACAA GTGA			ATCAGGA GAAACGTGTGTGT	
	CAGATCTCA TCTTCTTCTTCTTGG	2.0		GATCACAACTCAACCAGC	2.2
	GAAAGGAGCCAGA TCTTCTT			CTGTGTCTTCTTTGGCTTC	

*所有正向引物和反向引物的用量均为 20 μL 扩增体系中的用量，所用引物的浓度均为 10 pmol·L⁻¹，表中所列为引物的体积。
* The dosage in 20 μL PCR system of forward primers is same as that of reverse primers, the concentration of primers solution is 10 pmol·L⁻¹, the dosage in the table is the volume of each primer solution

1.5 电泳分析检测

扩增产物在含有 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 溴化乙锭的超高分辨率的琼脂糖凝胶 (美国 Amresco 公司) 上电泳, 凝胶浓度为 3%。电泳仪采用北京六一厂生产的 DYY- 型电泳仪, 在 $5 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$ 的电压下, 进行 2.5 h。使用 Alpha Innotech 公司 Multimage™ 凝胶成像仪进行凝胶扫描成像。

2 结果与分析

2.1 EST-SSR多态标记引物的筛选以及复合 SSR引物组合的形成

利用白菜和大白菜的 11 个品种, 从 242 对引物中筛选出了 120 对多态性 SSR 引物。图 1 为筛选过程中的电泳图片。在筛选的 120 对引物中, 选择其中 20 对扩增带型好、品种间带型差异明显、多态性丰富的引物形成多重引物组。每个引物组选择了具有可相容的基因片段大小, 且扩增条件相近的 3 个 SSR 引物 (图 2), 在同一个反应条件和扩增程序上扩增, 选用 Touchdown 程序, 温度从 $68 \sim 58$ 逐级降低, 每完成两个循环, 温度降低 1°C , 这个过程促使扩增得到的大小不等的产物片段可以在模板相对应的区域适当配对, 得到了多重 SSR-PCR 扩增反应的适宜条件。扩增反应中所用的每一组复合引物的量都不一样, 其它试剂的用量也有相应的增加。经过大量的筛选和多次重复性的验证, 最终确定了将 3 对引物组合在一起的适宜条件, 成功获得 6 组鉴定白菜和大白菜品种的多态性 EST-SSR 复合标记组合 (表 2)。

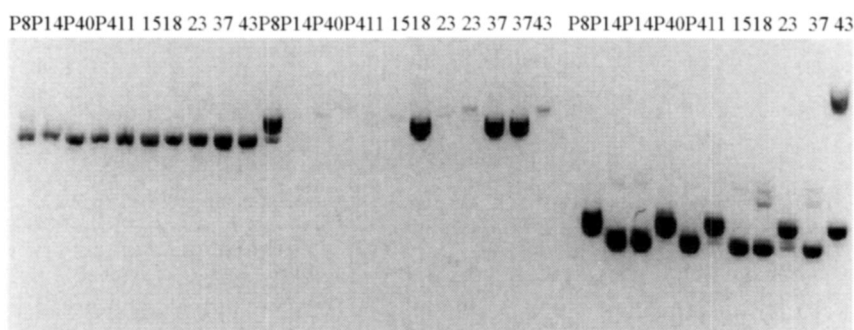


图 1 利用 11 个白菜和大白菜品种筛选 EST-SSR 多态性引物

Fig. 1 Applying 11 Chinese cabbage samples screened polymorphic primers

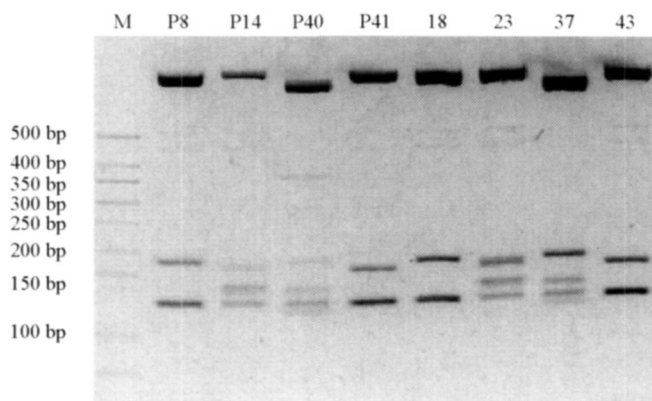


图 2 用 3 对 EST-SSR 引物组合成的复合标记扩增 8 个白菜和大白菜品种的电泳图

Fig. 2 Amplification of multiplex EST-SSR composing of 3 primer pairs screen 8 Chinese cabbage cultivars

2.2 复合 EST-SSR引物组合鉴定白菜和大白菜品种的多态性分析

为了确定复合 EST-SSR 标记组合在白菜和大白菜品种鉴定中应用的效果, 选择了有代表性的 43 个白菜和大白菜品种, 对上述试验得到的 6 组复合 EST-SSR 标记组合的多态性及应用于实际检测的可行性进行了确定性试验验证。结果表明, 平均每个引物组合产生近 24 条带, 有效多态性带 17 条。6 套引物组合共产生 131 条带, 有效多态性带 100 条。每套复合引物组合产生的有效多态性带的比例为 69.0% ~ 84.6%, 平均为 76.3% (表 3)。图 3 和图 4 是用复合 EST-SSR 引物组合 1 和 2 分析 43 个白菜和大白菜品种的鉴定结果, 有效扩增的条带的区域为 100 ~ 700 bp, 扩增带清晰、稳定, 多态性条带的大小范围也属这一区域。

表 3 复合 EST-SSR 引物组合鉴定白菜和大白菜品种的多态性分析

Table 3 Polymorphic analysis of multiplex EST-SSR set for cultivars identification of Chinese cabbage

多重引物组合 Multiplex primer sets (MPS)	总条带数 Total bands (T)	多态性条带数 Polymorphic bands (P)	多态率 / % Polymorphic efficiency (P/T)	多态信息量 / % Polymorphism information content (PIC)
MPS 1	26	22	84.6	47.6
MPS 2	24	18	75.0	38.2
MPS 3	9	7	77.8	58.7
MPS 4	16	13	81.3	67.0
MPS 5	27	20	74.1	74.0
MPS 6	29	20	69.0	76.8
合计 Total	131	100	76.3	60.4

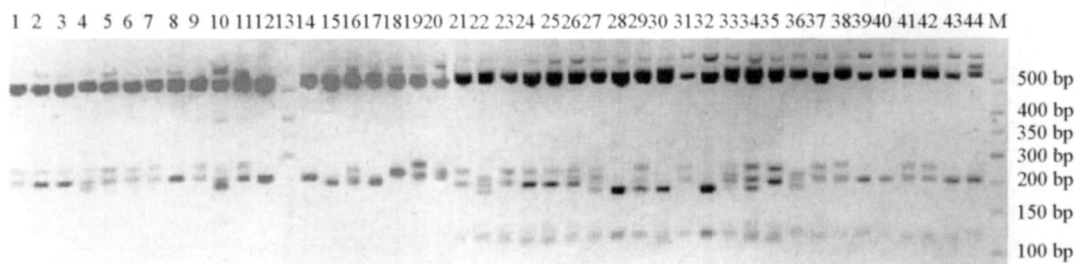


图 3 复合 EST-SSR 组合 1 鉴定 43 个白菜和大白菜品种的 DNA 扩增结果

Fig. 3 Amplification of multiplex EST-SSR set 1 screened
43 Chinese cabbage cultivars

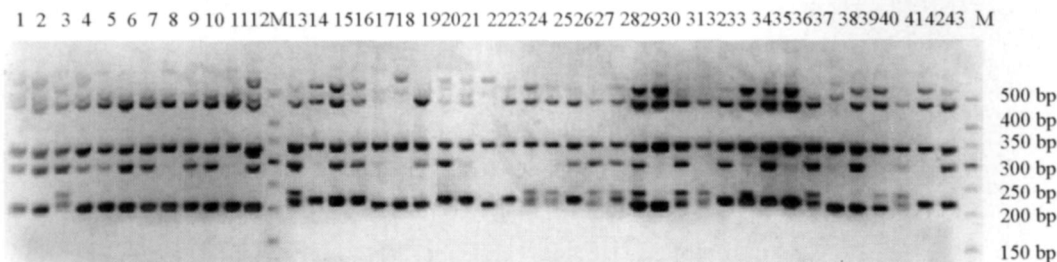


图 4 复合 EST-SSR 组合 2 鉴定 43 个白菜和大白菜品种的 DNA 扩增结果

Fig. 4 Amplification of multiplex EST-SSR set 2 screened
43 Chinese cabbage cultivars

态位点为 2 个, 如果只用一对引物来鉴定, 只能将 3 个品种区别开来。但 3 对引物组合的复合标记就有 6 个多态位点, 多态位点为 6 的组合数是 82, 所以其复合标记能将 82 个品种鉴别开来, 复合标记极大地提高了 EST-SSR 标记鉴定品种的效率。

References

- Dorokhov D B, Klocke E. 1997. A rapid and economic technique for RAPD analysis of plant genomes. *Russ J Genet*, 33: 443 - 450.
- Guo Jing-xin, Zhou Nai-yuan, Ma Rong-cai, Cao Ming-qing. 2002. Genetic diversity in *B. napus* revealed by AFLP molecular markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 10 (2): 138 - 143. (in Chinese)
- 郭晶心, 周乃元, 马荣才, 曹鸣庆. 2002. 白菜类蔬菜遗传多样性的 AFLP 分子标记研究. *农业生物技术学报*, 10 (2): 138 - 143.
- Li Li, Zheng Xiao-ying, Klocke E. 2003. Identification of hybrid purity of tomato (*Lycopersicon esculentum*) using RAPD markers. *Guohua*, 23 (2): 149 - 154.
- Li Li, Zheng Xiao-ying, Klocke E. 2004. Variation in some *Lycopersicon esculentum* and *Capsicum annuum* cultivars revealed by RAPD and AFLP markers. *Guangxi Sciences*, 11 (3): 249 - 257.
- Li Xiao-bai, Zhang Ming-long, Cui Hai-rui. 2007. Analysis of SSR information in EST resource of oilseed rape. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 29 (1): 20 - 25. (in Chinese)
- 李小白, 张明龙, 崔海瑞. 2007. 油菜 EST 资源的 SSR 信息分析. *中国油料作物学报*, 29 (1): 20 - 25.
- Meng Shu-chun, Zheng Xiao-ying, Liu Yu-mei, He Wei-ming, Liu Pang-yuan. 2005. Diversity analysis of morphological traits in Chinese cabbage germplasm resources. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 20 (4): 57 - 61. (in Chinese)
- 孟淑春, 郑晓鹰, 刘玉梅, 何伟明, 刘庞源. 2005. 大白菜种质资源形态形状的多样性分析. *华北农学报*, 20 (4): 57 - 61.
- Szewc-McFadden A K, Kresovich S, Bliet SM, Mitchell S E, McFerson J R. 1996. Identification of polymorphic conserved simple sequence repeats (SSRs) in cultivated *B. napus* species. *Theor Appl Genet*, 93 (4): 534 - 538.
- Tommasini L, Batley J, Arnold GM, Cooke R J, Donini P, Lee D, Law J R, Lowe C, Moule C, Trick M, Edwards K J. 2002. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*B. napus* L.) varieties. *Theor Appl Genet*, 106: 1091 - 1101.
- Xin Ya, Cui Hai-rui, Yong Pyo-lin, Cui Shui-lian. 2005. Development of EST (Expressed Sequence Tags) marker in Chinese Cabbage and its transferability to rapeseed. *Hereditas*, 27 (3): 410 - 416. (in Chinese)
- 忻雅, 崔海瑞, 林荣杓, 崔水莲. 2005. 白菜的 EST 标记及其对油菜的通用性. *遗传*, 27 (3): 410 - 416.
- Xin Ya, Cui Hai-rui, Lu Mei-zhen, Yao Yan-ling, Jin Ji-qiang, Yong Pyo-lin, Cui Shui-lian. 2006. Data mining for SSRs in ESTs and EST-SSR marker development in Chinese Cabbage. *Acta Horticulture Sinica*, 33 (3): 549 - 554. (in Chinese)
- 忻雅, 崔海瑞, 卢美贞, 姚艳玲, 金基强, 林荣杓, 崔水莲. 2006. 白菜 EST-SSR 信息分析与标记的建立. *园艺学报*, 33 (3): 549 - 554.
- Xin Ya, Cui Hai-rui, Zhang Fan, Yong Pyo-lin. 2007. Application in analysis Chinese cabbage germplasm resource by EST-SSR markers. *Zhejiang Agricultural Sciences*, 6: 628 - 629. (in Chinese)
- 忻雅, 崔海瑞, 张帆, 林荣杓. 2007. EST-SSR 标记在白菜种质资源分析中的应用. *浙江农业科学*, 6: 628 - 629.
- Yang Su-li, Ming Jun, Liu Chun, Mu Ding, Li Ming-yang. 2008. Data mining for simple sequence repeats marker development in expressed sequence tags from *Lilium* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 35 (7): 1069 - 1074. (in Chinese)
- 杨素丽, 明军, 刘春, 穆鼎, 李名扬. 2008. 基于 EST 信息的百合 SSR 标记的建立. *园艺学报*, 35 (7): 1069 - 1074.
- Zhang Shu-fen, Fu Ting-dong, Li Yuan-yuan, Zhu Jia-cheng, Wang Jian-ping, Ma Chao-zhi. 2006. Polymorphism analysis by sequence-related amplified polymorphism markers in *B. napus* L. *Acta Agriculture Boreali-Sinica*, 21 (1): 50 - 54. (in Chinese)
- 张书芬, 傅廷栋, 李媛媛, 朱家成, 王建平, 马朝芝. 2006. SRAP 标记分析甘蓝型油菜多态性. *华北农学报*, 21 (1): 50 - 54.