

大白菜品种鉴定的 SSR 核心引物筛选及其应用

隋光磊, 于拴仓, 杨金雪, 汪维红, 苏同兵, 张凤兰*, 余阳俊, 张德双, 赵岫云

(北京市农林科学院蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097)

摘要: 为筛选出一套大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 简单重复序列 (Simple sequence repeat, SSR) 的核心引物, 以 54 份大白菜骨干自交系为材料, 从已发表的 2 129 对白菜 SSR 引物中, 初步筛选出分布于白菜整个基因组、具有唯一扩增位点、扩增稳定性及重复性好的多态性 SSR 引物 51 对。进一步根据引物的多态性信息量 (*PIC*)、等位基因数量、位点的物理位置和主成分分析 (PCA) 等分析结果, 确定了一套包含 28 对 SSR 引物的核心引物组合。比较核心引物组合、51 对多态性 SSR 引物和 123 个标记 (72 个 SNP 标记与 51 对多态性 SSR 引物) 对 54 份大白菜骨干自交系的聚类分析结果, 三者具有较高的一致性; 该套引物可将 262 份大白菜高代自交系区分开, 具有较好的鉴别能力。利用这套核心引物构建了 242 份大白菜品种的指纹图谱。该研究获得的 28 对 SSR 引物可以用于大白菜的遗传多样性分析和品种核酸指纹库构建等研究, 可为大白菜新品种的特异性、一致性、稳定性检测体系的建立和新品种保护提供技术支持。

关键词: 大白菜; SSR; 核心引物; 品种鉴定

中图分类号: S 634.1

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 10-2021-14

Validation of a Core Set of Microsatellite Markers and Its Application for Varieties Identification in Chinese Cabbage

SUI Guang-lei, YU Shuan-cang, YANG Jin-xue, WANG Wei-hong, SU Tong-bing, ZHANG Feng-lan*, YU Yang-jun, ZHANG De-shuang, and ZHAO Xiu-yun

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, Beijing 100097, China)

Abstract: To screen a core set of SSR primers for varieties identification in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*), 54 elite inbred lines were applied and 51 highly informative SSR markers that were equally distributed in the whole genome and had unique amplification loci, good stability and repeatability, were selected from the 2 129 mapped SSR as the candidate markers. According to results of Polymorphism Information Content (*PIC*), allele number, physical locations of loci and Principal Component Analysis (PCA) etc., a core set of 28 SSR primers were further confirmed. Meanwhile, the dendrograms of 54 elite inbred lines based on 28 core primer combinations, 51 candidate

收稿日期: 2014-06-15; **修回日期:** 2014-09-25

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2012BAD50G01, 2012BAD02B01); 国家‘863’计划项目 (2012AA020103, 2012AA100101); 国家‘973’项目 (2012CB113906); 国家现代农业产业技术体系建设专项资金项目 (CARS-25-A-11)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: zhangfenglan@nrcv.org)

SSR primers and 123 markers (72 SNP and 51 polymorphic SSR primers) were highly consistent. Moreover, The utility of this core set SSRs was demonstrated in 262 inbred lines, which could be placed into three clusters that were largely consistent with previous classification. Finally, SSR fingerprint of 242 Chinese cabbage varieties were constructed using this core primer combinations. This core set of SSR markers should be very useful for genetic variation analysis and DNA fingerprinting of varieties, and would provide technical support for detecting of distinctness, uniformity and stability of new variety in Chinese cabbage.

Key words: Chinese cabbage; SSR; core primer; variety identification

近年来,随着大白菜 (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*) 育种的发展,其品种数量急剧增多,如何快速准确地进行品种的真实性鉴定对白菜种业的可持续发展具有重要意义。与田间小区种植鉴定方法相比,DNA 指纹图谱技术具有高效、准确、不受环境条件影响、试验操作简单和周期短等优势。

国际植物新品种保护联盟(International Union for the Protection of New Varieties of Plants, UPOV)在其生物化学和分子技术测试指南中已将构建 DNA 指纹数据库的标记确定为 SSR 和 SNP (UPOV, 2007)。第 2 代分子标记技术 SSR (Simple sequence repeat) 已经广泛应用于大白菜 (Suwabe et al., 2006)、白菜 (王笑一 等, 2008)、甘蓝 (Wang et al., 2012)、黄瓜 (Miao et al., 2011)、西瓜 (Zhang et al., 2012) 和番茄 (Geethanjali et al., 2010) 等蔬菜作物的基因定位和 QTL 分析、DNA 指纹和品种鉴定、遗传多样性分析和分子标记辅助育种等。

目前大白菜新品种 DUS (distinctness, uniformity, stability) 测试仍主要依据形态指标,没有很好地与分子标记相结合来提高品种鉴定效率。目前利用 SSR 标记进行大白菜品种鉴定的报道还不多见 (石磊 等, 2007; 李丽和郑晓鹰, 2009; 张婉 等, 2013)。随着白菜基因组测序完成,使得规模化开发 SSR 标记成为可能,定位于白菜分子遗传图谱上的 SSR 标记已超过 2 000 个。本研究中充分利用这些信息,筛选并确定一套具有普遍代表性的 SSR 引物组合,为大白菜的遗传多样性分析和品种核酸指纹库构建等研究提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 材料

用于核心引物筛选的 262 份大白菜材料由 54 份骨干自交系和 208 份高代自交系组成 (表 1)。其中 14 份是春大白菜,43 份是夏大白菜,205 份是秋大白菜。3 类大白菜分别以 C、X 和 Q 字母开头命名,所有供试材料均由北京市农林科学院蔬菜研究中心白菜组提供。

表 1 用于 SSR 核心引物筛选的 262 份大白菜自交系

Table 1 Two hundred and sixty-two Chinese cabbage inbred lines for screening of core SSR primer pairs

编号 ^a Code ^a	特性 ^b Characteristics ^b	来源 Origin	备注 ^c Note ^c	编号 ^a Code ^a	特性 ^b Characteristics ^b	来源 Origin	备注 ^c Note ^c
X3-1-1	VEM; F	广东 Guangdong	E	Q3-315-1	LM; F	山东 Shandong	G
X3-10-1	VEM; F	福建 Fujian	G	Q3-316-1	LM; F	山东 Shandong	G
X3-11-3	VEM; F	广东 Guangdong	E	Q3-317-2	LM; F	山东 Shandong	G
X3-13-1	VEM; F	广东 Guangdong	G, P	Q3-318-1	LM; F	山东 Shandong	G
X3-14-1	VEM; F	福建 Fujian	E	Q3-322-1	LM; F	河南 Henan	G
X3-17-1	VEM; F	福建 Fujian	G	Q3-331-2	LM; F	北京 Beijing	G
X3-19-1	VEM; F	中国台湾 Taiwan, China	G	Q3-332-1	LM; F	北京 Beijing	G
X3-20-2	EM; F	泰国 Thailand	G	Q3-334-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-20-6	EM; F	山东 Shandong	G	Q3-335-1	LM; F	北京 Beijing	E

续表 1

编号 ^a Code ^a	特性 ^b Characteristics ^b	来源 Origin	备注 ^c Note ^c	编号 ^a Code ^a	特性 ^b Characteristics ^b	来源 Origin	备注 ^c Note ^c
Q3-22-1	VEM; F	山东 Shandong	G	Q3-336-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-25-1	EM; F	北京 Beijing	G	Q3-339-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-26-4	EM; F	山东 Shandong	G	Q3-344-1	LM; F	北京 Beijing	G
X3-28-2	EM; F	中国台湾 Taiwan, China	G	Q3-344-7	LM; F	北京 Beijing	E
Q3-33-1	MM; F	河南 Henan	G	Q3-345-1	MM; F	北京 Beijing	G
Q3-38-2	EM; F	河南 Henan	G	Q3-346-1	LM; F	北京 Beijing	E
X3-40-1	EM; F	广东 Guangdong	E	Q3-347-1	LM; F	北京 Beijing	E
X3-44-1	EM; F	福建 Fujian	E	Q3-349-1	LM; F	北京 Beijing	E
X3-44-5	EM; CL	福建 Fujian	G	Q3-350-1	MM; F	北京 Beijing	G
Q3-55-1	EM; F	山东 Shandong	G	Q3-357-4	MM; CL	山东 Shandong	G
X3-57-2	EM; F	广东 Guangdong	E	Q3-360-1	MM; F	山东 Shandong	G
X3-57-4	EM; F	广东 Guangdong	G	Q3-364-1	LM; F	北京 Beijing	E
X3-57-8	EM; S	广东 Guangdong	G	Q3-366-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-60-1	EM; S	北京 Beijing	G	Q3-367-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-61-5	EM; F	北京 Beijing	G	Q3-368-2	LM; F	北京 Beijing	E
Q3-64-1	EM; S	北京 Beijing	G	Q3-369-1	MM; F	山东 Shandong	G
Q3-65-1	EM; S	天津 Tianjin	E	Q3-373-1	LM; F	内蒙古 Inner Mongolia	G
Q3-67-1	EM; C	山西 Shanxi	G	Q3-376-2	LM; F	内蒙古 Inner Mongolia	G
Q3-68-1	EMM; CL	云南 Yunnan	G	Q3-378-4	LM; F	内蒙古 Inner Mongolia	G
Q3-70-1	EM; F	广东 Guangdong	G	Q3-382-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-71-1	MM; CL	北京 Beijing	G	Q3-383-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-71-4	EM; C	北京 Beijing	G	Q3-385-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-76-1	EM; C	北京 Beijing	G	Q3-386-2	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-79-1	EM; CL	山东 Shandong	G	Q3-394-1	LM; F	山东 Shandong	G
Q3-80-1	MM; F	北京 Beijing	G	Q3-397-1	LM; F	山东 Shandong	G
C3-85-1	EM; F	韩国 Korea	E	Q3-398-1	LM; F	山东 Shandong	G
C3-86-1	EM; CL	韩国 Korea	E	Q3-403-1	LM; F	山东 Shandong	G
Q3-87-2	EM; F	山东 Shandong	G	Q3-406-1	LM; C	吉林 Jilin	G
Q3-88-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-407-2	LM; C	吉林 Jilin	G
Q3-89-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-410-1	EM; C	天津 Tianjin	E
Q3-93-1	MM; CL	北京 Beijing	G	Q3-411-1	EM; C	天津 Tianjin	G
Q3-95-1	LM; CL	北京 Beijing	G	Q3-412-2	EM; C	天津 Tianjin	G
Q3-95-5	LM; F	北京 Beijing	G	Q3-413-4	EM; C	天津 Tianjin	E
Q3-95-13	LM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-414-1	EM; C	天津 Tianjin	E
Q3-96-8	MM; F	辽宁 Liaoning	G	Q3-415-1	EM; C	天津 Tianjin	E
Q3-103-1	LM; CL	辽宁 Liaoning	G	Q3-420-1	MM; C	天津 Tianjin	E
Q3-105-1	MM; CL	辽宁 Liaoning	G	Q3-421-1	MM; C	河北 Hebei	E
Q3-108-1	EM; F	山东 Shandong	G	Q3-426-1	LM; F	北京 Beijing	G
Q3-113-1	EM; CL	山东 Shandong	G	Q3-427-1	LM; S	北京 Beijing	G
Q3-115-1	EM; CL	山东 Shandong	G	Q3-428-1	LM; S	河北 Hebei	G
Q3-122-1	EM; CL	山东 Shandong	G	Q3-429-4	EMM; S	河北 Hebei	G
Q3-124-1	MM; CL	山东 Shandong	G	Q3-431-1	EMM; C	吉林 Jilin	G
Q3-125-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-433-1	LM; C	吉林 Jilin	G
Q3-127-1	MM; CL	山东 Shandong	G	Q3-434-1	EM; C	天津 Tianjin	E
Q3-131-1	LM; F	山东 Shandong	G	Q3-435-1	EM; C	天津 Tianjin	E
Q3-134-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-436-1	EM; S	天津 Tianjin	G
Q3-134-3	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-438-1	EM; S	天津 Tianjin	E
Q3-143-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-441-1	LM; S	天津 Tianjin	G
Q3-146-3	LM; F	山东 Shandong	G	Q3-442-1	MM; S	天津 Tianjin	G
Q3-149-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-446-1	MM; S	天津 Tianjin	G
Q3-150-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-448-1	MM; S	天津 Tianjin	G
Q3-151-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-449-1	MM; S	天津 Tianjin	G
Q3-152-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-450-1	MM; S	天津 Tianjin	G
Q3-153-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-451-1	MM; S	天津 Tianjin	G
Q3-154-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-452-1	LM; S	天津 Tianjin	G
Q3-155-1	MM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-458-2	LM; S	天津 Tianjin	G
Q3-156-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-459-3	LM; S	河北 Hebei	G
Q3-156-9	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-461-1	MM; S	陕西 Shaanxi	G
Q3-159-3	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-462-1	LM; S	江苏 Jiangsu	G
Q3-165-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-464-1	MM; S	陕西 Shaanxi	G
Q3-166-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-467-1	LM; S	山西 Shanxi	G
Q3-169-1	LM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-468-1	LM; S	山西 Shanxi	G
Q3-169-4	LM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	Q3-469-2	MM; S	山西 Shanxi	G
Q3-171-1	LM; CL	辽宁 Liaoning	G	Q3-471-1	MM; S	吉林 Jilin	G

续表 1

编号 ^a	特性 ^b	来源	备注 ^c	编号 ^a	特性 ^b	来源	备注 ^c
Code ^a	Characteristics ^b	Origin	Note ^c	Code ^a	Characteristics ^b	Origin	Note ^c
Q3-172-1	MM; CL	山东 Shandong	G	Q3-473-1	MM; C	山西 Shanxi	G
Q3-173-3	MM; F	山东 Shandong	G	Q3-474-1	MM; S	辽宁 Liaoning	G
Q3-173-5	MM; CL	山东 Shandong	G	Q3-478-4	MM; S	河北 Hebei	G
Q3-174-1	EM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	Q6-1-4	EM; S	天津 Tianjin	E
Q3-175-2	MM ; CL	山东 Shandong	G	Q6-8-1	EM; CL	山东 Shandong	G
Q3-179-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q6-13-1	EM; C	北京 Beijing	G
Q3-180-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q6-20-4	EM; F	北京 Beijing	G
Q3-180-4	EM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q6-21-4	EM; F	浙江 Zhejiang	G
Q3-180-7	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	X6-22-6	EM; F	日本 Japan	G, P
Q3-181-1	MM; CL	江苏 Jiangsu	G	Q6-27-2	EM; C	山东 Shandong	G
Q3-186-3	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q6-32-1	EM; F	北京 Beijing	G
Q3-187-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	Q6-33-3	EM; F	北京 Beijing	G
Q3-188-3	MM; F	山东 Shandong	G	X6-34-4	EM; F	山东 Shandong	G
Q3-188-4	MM; CL	山东 Shandong	G	Q6-35-1	EM; F	浙江 Zhejiang	G
C3-190-1	EM; CL	韩国 Korea	E	Q6-46-1	EM; F	浙江 Zhejiang	G
Q3-192-1	MM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	X6-51-3	EM; F	福建 Fujian	G
Q3-193-1	MM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G	X6-52-6	EM; F	云南 Yunnan	G
C3-198-1	LM; CL	韩国 Korea	E	X6-55-4	EM; F	日本 Japan	G
C3-201-1	MM; CL	韩国 Korea	E	X6-56-1	EM; F	广东 Guangdong	G
Q3-202-1	MM; CL	山东 Shandong	G	X6-59-2	EM; F	广东 Guangdong	E
C3-209-1	MM; F	韩国 Korea	E	Q6-60-1	EM; CL	山东 Shandong	G
C3-212-4	MM; CL	韩国 Korea	E	X6-65-2	EM; F	广东 Guangdong	E
Q3-213-1	MM; CL	山东 Shandong	G	X6-66-1	EM; C	广东 Guangdong	G
Q3-213-5	MM; F	山东 Shandong	G	X6-68-3	EM; F	广东 Guangdong	E
C3-214-1	MM; F	韩国 Korea	E	X6-69-2	EM; F	广东 Guangdong	G
Q3-216-1	LM; S	北京 Beijing	G	X6-70-9	EM; F	广东 Guangdong	E
Q3-217-1	LM; S	北京 Beijing	G	X6-71-4	EM; F	福建 Fujian	E
Q3-218-2	MM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	X6-75-3	EM; F	福建 Fujian	E
Q3-222-1	LM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	X6-82-4	EM; F	福建 Fujian	E
Q3-222-4	LM; F	黑龙江 Heilongjiang	G	X6-84-4	EM; CL	福建 Fujian	G
C3-224-1	EM; F	日本 Japan Japan	E	X6-86-5	EM; F	福建 Fujian	G
C3-227-4	EM; F	韩国 Korea	E	Q6-87-1	EM; F	中国台湾 Taiwan, China	G
C3-230-2	MM; CL	韩国 Korea	E	Q6-90-7	EM; F	中国台湾 Taiwan, China	E
C3-243-1	MM; CL	日本 Japan	E	X6-92-2	EM; F	广东 Guangdong	G
C3-245-1	MM; CL	日本 Japan	E	X6-93-6	EM; F	广东 Guangdong	G
C3-246-2	MM; CL	韩国 Korea	G	Q6-94-3	EM; F	河南 Henan	G
Q3-249-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q6-95-2	EM; F	河南 Henan	G
Q3-253-2	LM; CL	山东 Shandong	G	Q6-96-3	EM; CL	陕西 Shaanxi	G
Q3-258-1	MM; CL	山东 Shandong	G	Q6-97-5	EM; F	陕西 Shaanxi	E
Q3-261-2	MM; CL	云南 Yunnan	G	X6-98-1	EM; F	广东 Guangdong	E
Q3-264-5	LM; CL	云南 Yunnan	G	X6-104-3	EM; F	广东 Guangdong	E
Q3-265-1	LM; F	河南 Henan	G	X6-105-5	EM; F	广东 Guangdong	E
Q3-269-1	MM; F	河南 Henan	G	Q6-110-3	EM; F	北京 Beijing	G
Q3-270-1	LM; F	河南 Henan	G	X6-111-9	EM; F	广东 Guangdong	E
Q3-271-2	LM; F	河南 Henan	G	X6-112-1	EM; F	福建 Fujian	E
Q3-275-1	MM; F	山东 Shandong	G	X6-113-6	EM; L	广西 Guangxi	G
Q3-278-2	MM; F	山东 Shandong	G	X6-114-2	EM; L	广西 Guangxi	G
Q3-279-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q10-1084	LM; F	北京 Beijing	G, P
Q3-282-3	MM; F	河南 Henan	G	Q10-1085	LM; CL	山东 Shandong	G, P
Q3-283-1	LM; F	河南 Henan	G	Q09-972	EM; S	天津 Tianjin	E
Q3-284-1	MM; F	福建 Fujian	G	Q09-1014	LM; S	天津 Tianjin	G, P
Q3-287-1	MM; F	山东 Shandong	G	Q04-622	EM; S	北京 Beijing	G, P
Q3-288-1	EMM; F	陕西 Shaanxi	G	Q09-1070	LM; CL	黑龙江 Heilongjiang	G, P
Q3-291-1	LM; F	山西 Shanxi	G	Q04-825	LM; CL	山东 Shandong	G, P
Q3-292-1	MM; F	河南 Henan	G	C10-73	EM; CL	日本 Japan	G, P
Q3-295-1	MM; F	陕西 Shaanxi	G	Q03-282	EM; F	广东 Guangdong	G, P
Q3-312-1	LM; CL	山东 Shandong	G	Q05-302	EM; F	浙江 Zhejiang	G, P
Q3-313-1	LM; F	山东 Shandong	G	Q97-321	EM; F	北京 Beijing	G, P

注: ^aC、X 和 Q 分别代表春、夏和秋大白菜。^bVEM、EM、EMM、MM 和 LM 分别表示极早熟、早熟、早中熟、中熟和晚熟类型, F、C、CL、S 和 L 分别表示叠抱、舒心、合抱、拧抱和散叶类型。^cE、G 和 P 分别代表骨干自交系、高代自交系和用于引物筛选。

Note: ^aC, X and Q indicate spring, summer and autumn Chinese cabbage respectively. ^bVEM, EM, EMM, MM and LM indicate very early maturing, early maturing, early middle maturing, middle maturing and late maturing respectively; F, C, CL, S and L indicate folding, comfortable, closing, screwing and leaf types respectively. ^cE, G and P indicate elite inbred lines, high generation inbred lines and screening SSR primers respectively.

另外, 来源于天津科润蔬菜研究所、中国种子集团有限公司和北京市农林科学院蔬菜研究中心等 45 家单位的 242 份大白菜品种用于 DNA 指纹库构建 (表 2)。

表 2 用于构建指纹库的 242 份大白菜杂交品种

Table 2 Two hundred and forty-two Chinese cabbage hybrids for fingerprinting

编号 Code	品种名称 Name of cultivar	编号 Code	品种名称 Name of cultivar	编号 Code	品种名称 Name of cultivar
1	耐抽薹春绿 1 号 Bolting Resistant Chunlü 1	82	12 娃 1 12 Wa 1	163	艳春 Yanchun
2	津秀 1 号 Jinxiu 1	83	12 娃 2 12 Wa 2	164	仲伯黄心 1 号 Zhongbo Huangxin 1
3	津秀 2 号 Jinxiu 2	84	12 娃 3 12 Wa 3	165	仲伯黄心 2 号 Zhongbo Huangxin 2
4	珍亮 Zhenliang	85	北京桔红心 Beijing Juhongxin	166	仲伯黄心 3 号 Zhongbo Huangxin 3
5	秋绿 60 Qiulü 60	86	京秋 3 号 Jingqiu 3	167	仲伯黄心 4 号 Zhongbo Huangxin 4
6	珍绿 80 Zhenlü 80	87	京秋 4 号 Jingqiu 4	168	酷夏 Kuxia
7	优秀 Youxiu	88	北京新 3 号 Beijing Xin 3	169	盛夏 Shengxia
8	速生快绿 Susheng Kuailü	89	CR - 金鸣 CR-jinming	170	CR - 春福 CR-chunfu
9	W-01	90	春鹤 Chunhe	171	春白菜 1 号 Chunbaicai 1
10	希望 Xiwang	91	春辉 Chunhui	172	春白菜 2 号 Chunbaicai 2
11	中白 1 号 Zhongbai 1	92	碧春 Bichun	173	春白菜 4 号 Chunbaicai 4
12	中白 2 号 Zhongbai 2	93	金冠春 Jinguanchun	174	春白菜 5 号 Chunbaicai 5
13	中白 3 号 Zhongbai 3	94	W1306	175	春白菜 6 号 Chunbaicai 6
14	中白 4 号 Zhongbai 4	95	W1307	176	大奖 Dajiang
15	中白 5 号 Zhongbai 5	96	W1308	177	春上 Chunshang
16	中白 6 号 Zhongbai 6	97	W1309	178	迎春 Yingchun
17	中白 7 号 Zhongbai 7	98	B1301	179	金天喜 Jintianxi
18	中白 8 号 Zhongbai 8	99	B1302	180	金宝黄 Jinbaohuang
19	中白 9 号 Zhongbai 9	100	B1303	181	春秋美冠 Chunqiu Meiguan
20	中白 10 号 Zhongbai 10	101	B1304	182	特 1X10020 Te1X10020
21	中白 11 号 Zhongbai 11	102	B1305	183	特 1X10040 Te1X10040
22	中白 12 号 Zhongbai 12	103	B1306	184	特 1X10070 Te1X10070
23	中白 13 号 Zhongbai 13	104	B1307	185	新 - 13 Xin-13
24	中白 14 号 Zhongbai 14	105	B1308	186	CR 春秀 CR Chunxiu
25	中白 15 号 Zhongbai 15	106	B1309	187	锦黄春 Jinhuangchun
26	SCH101	107	B1310	188	强盛 Qiangsheng
27	SCH102	108	B1311	189	豫早 09-1 Yuzao 09-1
28	CC51	109	B1312	190	豫 11-1 Yu 11-1
29	迷你黄 Minihuang	110	W1301	191	豫 0701 Yu 0701
30	中娃 2 号 Zhongwa 2	111	W1302	192	豫 10-01 Yu 10-01
31	中娃 3 号 Zhongwa 3	112	W1303	193	胜春黄 Shengchunhuang
32	中娃 4 号 Zhongwa 4	113	W1304	194	金福娃 Jinfuwa
33	金星 Jinxing	114	玲珑黄 009 Linglonghuang 009	195	金福娃二号 Jinfuwa 2
34	东星 10B-2 Dongxing 10B-2	115	玲珑黄 012 Linglonghuang 012	196	夏白 45 Xiabai 45
35	春菊 Chunju	116	玲珑黄 515 Linglonghuang 515	197	石育将军 Shiyujiangjun
36	京春 99 Jingchun 99	117	玲珑黄 538 Linglonghuang 538	198	石育秋宝 Shiyuqiubao
37	京春白 Jingchunbai	118	超越 50 Chaoyue 50	199	金童 Jintong
38	京春白 2 号 Jingchunbai 2	119	夏秋早 Xiaqiuza	200	石育 78 Shiyu 78
39	改良京春绿 Improved Jingchunlü	120	CR119	201	石丰 88 Shifeng 88
40	京春黄 Jingchunhuang	121	泰能 - 舒根 Taineng-shugen	202	石绿 85 Shilü 85
41	10S-1	122	优早 45 Youzao 45	203	香港日昇超夏阳
42	10S-2	123	热王 A1 Rewang A1		Hong Kong Risheng Chaoxiayang
43	11S-1	124	热王 A2 Rewang A2	204	新西兰秋冬春结球白菜
44	11S-2	125	春喜 04-66 Chunxi 04-66		N.Z. Qiudongchun Chinese Cabbage
45	12S-3	126	优早 55 Youzao 55	205	CR 金将军 CR Jinjiangjun
46	12S-4	127	日本春皇白 Japan Chunhuangbai	206	DY1036
47	11CR-1	128	春优王 Chunyouwang	207	秋杂 65 Qiuza 65
48	12CR-1	129	福禧宝珠 Fuxi Baozhu	208	新白二青 Xinbai Erqing
49	京秋 56 号 Jingqiu 56	130	高抗王 AC-2 Gaokangwang AC-2	209	春悦 Chunyue
50	京秋新 56 号 Jingqiuxin 56	131	高抗王 AC-3 Gaokangwang AC-3	210	金晖 Jinhui
51	京翠 55 号 Jingcui 55	132	高抗王 AC-1 Gaokangwang AC-1	211	中白 61 Zhongbai 61
52	北京小杂 60 号 Beijing Xiaozha 60	133	万能春秋 78 Wanneng Chunqiu 78	212	中白 62 Zhongbai 62
53	北京小杂 61 号 Beijing Xiaozha 61	134	春秋 75 Chunqiu 75	213	绿健 85 Lujian 85
54	京秋 65 号 Jingqiu 65	135	皇帝 Huangdi	214	秋帅 (80-2) Qiushuai (80-2)
55	11-2	136	美春 Meichun	215	沈阳新三号 Shenyang Xin 3
		137	美绿 Meilü	216	汉城金币 2 号 Hancheng Jinbi 2

续表 2

编号 Code	品种名称 Name of cultivar	编号 Code	品种名称 Name of cultivar	编号 Code	品种名称 Name of cultivar
56	小杂 56 号 Xiaoza 56	138	辰瑞 1 号 Chenrui 1	217	汉城金币 3 号 Hancheng Jinbi 3
57	京翠 60 号 Jingcui 60	139	正版 203 Zhengban 203	218	小黄龙 Xiaohuanglong
58	08-10	140	板扎超夏日 555	219	BN-101
59	北京 68 号 Beijing 68		Banzha Chaoxiari 555	220	金娃 Jinwa
60	北京大牛心 Beijing Daniuxin	141	板扎夏大将 Banzha Xiadajiang	221	WA-9
61	北京改良 67 号	142	板扎 323 鸡窝白 Banzha 323 Jiwo bai	222	世诚 701 Shicheng 701
	Beijing Improvement 67	143	云鸿夏葵 Yunhong Xiali	223	世诚 702 Shicheng 702
62	京秋 70 号 Jingqiu 70	144	板扎金黄白 Banzha Jinhuangbai	224	世诚 703 Shicheng 703
63	京秋 75 号 Jingqiu 75	145	昊雄春白菜 Haoxiong Chunbaicai	225	快菜 50 Kuaicai 50
64	京秋 76 号 Jingqiu 76	146	皇童 Huangtong	226	多抗 4 号 Duokang 4
65	北京桔红心 2 号 Beijing Juhongxin 2	147	抗病 50 Kangbing 50	227	日本快菜 26 Japan Kuaicai 26
66	京秋黄心 70 号 Jingqiu Huangxin 70	148	好运来 Haoyunlai	228	特快 20 Tekuai 20
67	京翠 70 号 Jingcui 70	149	夏喜 Xiayi	229	极快 22 Jikuai 22
68	09-19	150	金科 Jinke	230	日本热王 50 Japan Rewang 50
69	京秋娃娃菜 Jingqiu Wawacai	151	金丰 Jinfeng	231	夏阳宝珠 Xiayang Baozhu
70	京春娃 2 号 Jingchunwa 2	152	CR 新金丰 CR Xinjinfeng	232	CR 冷夏黄 CR Lengxiahuang
71	京研快菜 Jingyan Kuaicai	153	亚春娃娃菜 Yachun Wawacai	233	豫早一号 Yuzao 1
72	京研快菜 2 号 Jingyan Kuaicai 2	154	夏美娃娃菜 Xiamei Wawacai	234	金盛 Jinsheng
73	京研快菜 3 号 Jingyan Kuaicai 3	155	春秋王 Chunqiuwang	235	世纪皇妃 Shiji Huangfei
74	京研快菜 4 号 Jingyan Kuaicai 4	156	春胜 Chunsheng	236	强者 Qiangzhe
75	京研快菜 5 号 Jingyan Kuaicai 5	157	冠春 Ganchun	237	A04788
76	四季快菜 1 号 Siji Kuaicai 1	158	金富贵 Jinfugui	238	九千娃娃菜 1 号 Jiuqian Wawacai 1
77	四季快菜 2 号 Siji Kuaicai 2	159	富贵 Fugui	239	贝蒂 Beidi
78	10.5-44	160	金金 Jinjin	240	极早三十日 Jizao 30 Day
79	10 娃 4 10 Wa 4	161	福娃 Fuwa	241	武蔬快菜 Wushu Kuaicai
80	11 娃 3 11 Wa 3	162	春秋抗病 50 天	242	郑白 886 快菜
81	11 娃 5 11 Wa 5		Chunqiu Kangbing 50 Day		Zhengbai 886 Kuaicai

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 提取

262 份自交系和 242 个品种均各取 5 个单株的幼嫩叶片等量混匀, 经冷冻干燥后储存于超低温保存柜备用。采用 CTAB 法提取基因组 DNA。提取的 DNA 溶于 200 μL 无菌水中, 利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 将 DNA 稀释到 10 $\text{ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.2.2 SSR 引物来源及基因组定位

用于核心引物筛选的 2 129 对 SSR 引物主要来源于文献 (Lowe et al., 2002, 2004; Suwabe et al., 2002, 2006; 葛佳 等, 2005; Piquemal et al., 2005; Choi et al., 2007; Ling et al., 2007; Kim et al., 2009; Yu et al., 2009; Wang et al., 2011) 和本课题组利用白菜 EST 和 unigene 序列设计。通过在 Brassica Database (<http://brassicadb.org/brad/index.php>) 上 Blast 分析进行基因组定位 (Ramu et al., 2010), SSR 位点定位于某一特定连锁群必须满足 3 个基本条件: ①上、下游引物序列定位于参考基因组同一条连锁群; ②与其互补的基因组序列为正、负双链; ③扩增的基因组片段大小在 50 ~ 500 bp 之间。最后将定位于白菜特定连锁群的 544 对 SSR 引物用于本研究。

1.2.3 SSR 扩增

PCR 反应体系为 20 μL , 其中包括: 10 \times PCR Buffer 2.0 μL ; dNTP 0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$; SSR 引物 0.5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$; Taq 聚合酶 1.25 U (TaKaRa); DNA 模板 20 ng。采用 Touchdown 程序: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 62 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s (每个循环降低 1 $^{\circ}\text{C}$), 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 10 个循环; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s, 52 $^{\circ}\text{C}$ 复性 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 45 s, 共 23 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 6 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。引物由上海生物工程技术有限公司合成。

1.2.4 电泳检测

通过 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 进行 PCR 产物分离, 用 0.1% 硝酸银染色 5 min, 1.5%

氢氧化钠和 1%甲醛进行显影。

选择清晰易辨的多态性带型进行统计,在相同迁移率位置,有条带记为“1”,无条带记为“0”,缺失记为“?”。利用 Powermarker 软件计算每对引物的 *PIC* 值、等位基因数量及样品间的遗传距离, Tassel 4.0 软件进行多态性 SSR 引物的主成分分析, Mega 4.0 软件的 UPGMA (类平均法) 进行聚类分析, GGT 2.0 软件生成品种的基因分型图。

1.2.5 SNP 位点设计

SNP 位点来源于 10 份大白菜重测序数据的 SNP 信息。引物设计采用 Beckman 相应 Autoprimer 设计平台完成。PCR 扩增、Cleanp、延伸及杂交按照 SNP stream 标准流程进行。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的多态性筛选

挑选 12 份遗传背景较远的高代自交系用于 544 对 SSR 引物的多态性筛选,获得 51 个扩增带型清晰、等位基因间片段差异明显、等位基因数 ≥ 2 的引物位点,占筛选数的 9.4%。这些多态性位点分布于白菜整个基因组。利用 51 对多态性引物对 54 份骨干自交系进行 SSR 扩增,均得到清晰稳定的单一带型,共检测出 195 个等位基因。

2.2 主成分分析

通过 Tassel4.0 软件对 51 对多态性引物进行主成分分析 (PCA),分析显示:当主成分个数为 27 个时,多态性引物的累积贡献率可达到 85%,从每个主成分中选出贡献最大的引物对,即具有最大特征向量值的引物对,结果获得 22 对最具代表性的 SSR 引物。综合考虑引物的扩增效果、多态性稳定性及重复性、等位基因数量、位点的物理位置、*PIC* 值和主成分分析结果等指标,确定了一套含 28 对 SSR 引物的核心引物组合 (表 3)。

表 3 28 对 SSR 核心引物信息
Table 3 Information of 28 SSR core primers

连锁群 Linkage group	引物名称 Name of primer	引物来源 Reference	序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	多态性 信息量 <i>PIC</i>	等位基 因数 Number of alleles	物理位 置/Mb Physical location	片段大小 (bp) /参照样品 Fragment size (bp) /referential sample
A1	CB10081	Piquemal et al., 2005	F: GGCTTTAGCACTGTGATCCT R: TTGGGAGAGAAAACATACG	0.46	4	0.3	211/Q6-8-1; 209/Q6-87-1; 201/Q3-345-1; 199/X6-55-4
	NA14G06	Lowe et al., 2002	F: AAACGGCTTGCAATTGTCTC R: GGCTTGCTTGATCCAGTCTC	0.22	3	9.4	196/Q04-622; 191/Q6-87-1; 181/Q10-1085
	BRAS067	Suwabe et al., 2002	F: AATTAAACCTCATTTTCTTC R: ACCTCCATTGTGTCTGAT	0.56	5	26.0	161/Q3-407-2; 151/Q09-1070; 142/Q6-8-1; 131/Q3-458-2; 127/Q09-972
A2	OL11H09	Lowe et al., 2002	F: CCCTTTTCCCCTTCTATTGG R: GTGCGACTTGGAAATTCTCC	0.44	5	0.1	175/Q3-124-1; 173/Q3-38-2; 169/Q6-110-3; 166/Q3-386-2; 165/X6-111-9
	CX271723	Beijing Vegetable Research Center [*] ; Yu et al., 2009	F: GAAGAAGTGGCGCTTCAA R: CTTAGCAGAGCAACCATC	0.49	3	6.5	183/X6-84-4; 180/Q6-46-1; 168/X6-114-2
	BC48	葛佳 等, 2005	F: CTGGTGATGGAGACGCTATTA R: ACTGTCCCAAACCGCCTCTC	0.44	3	19.8	218/Q10-1085; 208/Q09-972; 206/X6-22-6
A3	BRMS-043	Suwabe et al., 2002	F: GCGATGTTTTTTCTTCAGTGTC R: TTAATCCCTACCCACAATTTC	0.63	4	7.9	348/Q6-8-1; 322/X6-111-9; 307/X6-93-6; 289/Q3-315-1
	BRU05680	Beijing Vegetable Research Center [*]	F: CATGTCGCTTCTTTGCTG R: CTTTTGCTTGAGCTTTGTGT	0.45	6	16.0	201/Q3-458-2; 191/Q3-369-1; 189/Q3-95-13; 177/Q3-312-1; 169/C3-209-1; 165/Q6-46-1

续表 3

连锁群 Linkage group	引物名称 Name of primer	引物来源 Reference	序列 (5' - 3') Primer sequence (5' - 3')	多态性 信息量 <i>PIC</i>	等位基 因数 Number of alleles	物理位 置/Mb Physical location	片段大小 (bp) /参照样品 Fragment size (bp) /referential sample
A4	cnu_m316a	Kim et al., 2009	F: TCAAGCATGTCCTTAAACTCTGA R: GCGTTCACGTTTCCCATATC	0.63	4	22.6	231/X6-52-6; 216/Q6-32-1; 211/X6-56-1; 207/Q6-46-1
	BRU03245	Beijing Vegetable Research Center*	F: CCAGATCTCACAATTTCATTC R: TCTTAACGTGTCGCTGAAC	0.49	3	9.0	165/X6-71-4; 161/Q6-87-1; 157/X6-52-6
	BC65	葛佳 等, 2005	F: CTTCCAGTAGCCATTGTTGA R: ATCGGGTTTATACTCTGAA	0.59	5	17.9	179/Q3-403-1; 172/Q3-265-1; 170/Q3-344-1; 167/Q6-32-1; 165/Q04-622
A5	BRMS-034	Suwabe et al., 2002	F: GATCAAATAACGAACGGAGAGA R: GAGCCAAGAAAGGACCTAAGAT	0.65	5	1.8	154/Q3-156-1; 138/Q6-21-4; 136/Q3-442-1; 131/X6-66-1; 129/X6-56-1
A6	ENA4	Choi et al., 2007	F: ACTTCTCTTTATTCCTTCCCA R: GAGGGTGGTTGGTTTCAT	0.5	4	7.6	178/X6-84-4; 151/Q04-825; 148/Q6-87-1; 142/C10-73
	CX272976	Beijing Vegetable Research Center*	F: CAACTCTAACGAACGAGAGC R: CATGTATTCTGCGTGAAGTG	0.47	3	25.2	264/Q6-46-1; 255/X6-113-6; 249/Q6-35-1
	BRU04917	Beijing Vegetable Research Center*	F: TTCTGAATCACACTTCCTTG R: TTCAACATCTTCCATCAAAGT	0.49	3	0.1	170/X6-75-3; 166/Q6-32-1; 163/X6-111-9
	cnu_m149a	Kim et al., 2009	F: GGAAGCCTCTGTGCGAAAAA R: TGCCGACGATTTGATAGAGGA	0.57	4	8.2	190/Q6-110-3; 187/Q6-33-3; 179/Q6-87-1; 164/Q6-20-4
	EJU5	Choi et al., 2007	F: GGCACGTACATGGAGGATTC R: TGTTGGTCGAGCTGTTTCAG	0.52	5	22.7	183/Q6-21-4; 175/X6-69-2; 173/Q6-87-1; 160/X6-114-2; 154/Q6-20-4
A7	CX272719	Beijing Vegetable Research Center*	F: GGCATAATCACCATTAAACCCG R: AGACCAGAGTGCTTGTAGGA	0.34	2	0.7	338/Q6-65-2; 285/X6-66-1
A8	cnu_m295a	Kim et al., 2009	F: GCTGCCTAATAGGGTGCTTG R: AGAGCGCATTCAGTCTGGT	0.59	5	16.5	210/Q3-312-1; 207/Q6-27-2; 204/Q3-449-1; 202/X6-34-4; 199/X6-52-6
	BRU00756	Beijing Vegetable Research Center*	F: AGAGTACCTCTCTGGCAAGTC R: AGACAGAAGGGTTTTGTTTT	0.56	3	21.1	175/Q03-282; 173/Q10-1085; 167/Q3-378-4
	cnu_m090a	Kim et al., 2009	F: GCAAAGATCGGCGAAGAAGA R: TGCAGACACATTCGAACAACA	0.63	4	6.2	229/Q3-166-1; 207/X6-111-9; 201/X6-52-6; 193/Q6-20-4
	CX273016	Beijing Vegetable Research Center*	F: AGAGAGATCGAGATCCACAA R: GGCGAGAAAGTTAGTTGCTA	0.54	3	18.6	158/Q6-20-4; 144/X6-59-2; 134/X6-52-6
	EJU3	Choi et al., 2007	F: CCTCTTTTAATTCAAACAAGAAAT CA R: TTCGGACAATGGCAGTGATA	0.63	5	20.7	291/Q3-450-1; 281/X6-52-6; 272/X6-22-6; 269/Q3-442-1; 265/Q6-20-4
A9	PBCGSSR- BR10	Ling et al., 2007	F: CATCAACCAAGCAATGAAA R: TTGGAAGGTCAAGAAGGT	0.37	4	24.6	250/Q6-60-1; 242/X6-114-2; 213/X6-112-1; 203/X6-113-6
	EJU2	Choi et al., 2007	F: TTCACATCTTCTTCATCTTC R: TTGCTATTCTGTTCTCAGTCTC	0.22	4	29.6	130/Q6-21-4; 129/X6-52-6; 128/Q6-65-2; 124/X6-70-9
	ENA27	Choi et al., 2007	F: AAAGGACAAAGAGGAAGGGC R: TTGAAATCAATGAGAGTGACG	0.55	5	32.9	240/Q3-403-1; 238/Q03-282; 234/Q04-825; 182/Q3-383-1; 172/Q09-972
A10	BRU03208	Beijing Vegetable Research Center*	F: TCTTTCTTCTCTCCGTCGT R: AAGGGGAATTGAGTAAAGCTA	0.56	4	10.2	167/Q6-87-1; 160/Q6-20-4; 154/Q6-27-2; 147/X6-51-3
	BRU02939	Beijing Vegetable Research Center*	F: CCAAGATGATGCAGATACATT R: TGATCTTAATGCCCTTTTGA	0.43	4	13.7	167/Q6-35-1; 164/Q6-46-1; 160/C3-201-1; 157/X6-113-6

* Beijing Vegetable Research Center: 北京蔬菜研究中心。

2.3 核心引物的代表性分析

28 对 SSR 核心引物 (表 3) 较均匀分布于白菜基因组 10 个连锁群, 每个连锁群含有 2~3 个点。引物的 *PIC* 值大小在 0.65~0.22 之间, 平均为 0.5; 获得等位基因 112 个, 平均每个引物 4 个。

以 54 份骨干自交系为试材, 分别用 28 对 SSR 核心引物 (图 1, a)、51 对多态性 SSR 引物 (图 1, b) 以及 72 个 SNP 标记与 51 对多态性 SSR 引物组成的 123 个标记 (图 1, c) 的基因型数据进行聚类分析, 详细比较聚类结果的异同。当遗传距离为 0.45 时, 28 对 SSR 核心引物 (图 1, a) 和 51 对多态性 SSR 引物 (图 1, b) 聚类结果完全一致, 均可划分成 3 大类。第 1 大类 (红色) 包括

21 份自交系, 均属于叠抱类型的夏大白菜, 来源于广东、中国台湾和泰国。第 2 大类 (绿色) 包括 20 份自交系, 均属于秋大白菜, 主要来源于北京、天津和河北等地。该类又可分成两个亚类, 第 1 亚类包括 8 份自交系, 如 Q3-334-1、Q3-349-1 和 Q3-346-1 等均为晚熟、叠抱类型; 第 2 亚类包括 12 份自交系, 如 Q3-410-1、Q3-413-4、Q3-65-1 和 Q6-1-4 等均为早熟、拧抱类型。第 3 大类 (粉色) 包括 13 份自交系, 均属于合抱类型的春大白菜, 来源于韩国、日本和山东芝罘。当遗传距离为 0.33 时, 由 72 个 SNP 标记与 51 对多态性 SSR 引物组成的 123 个标记 (图 1, c) 的聚类结果可划分成 4 大类, 其中的两个大类 (红色和粉色) 与图 1, a 和 b 中第 1 大类和第 3 大类一致, 另外的两个大类 (绿色) 分别对应于图 1, a 和 b 中第 2 大类的两个亚类。因此 3 个聚类结果基本一致, 表明筛选获得的 28 对 SSR 引物具有一定的代表性。

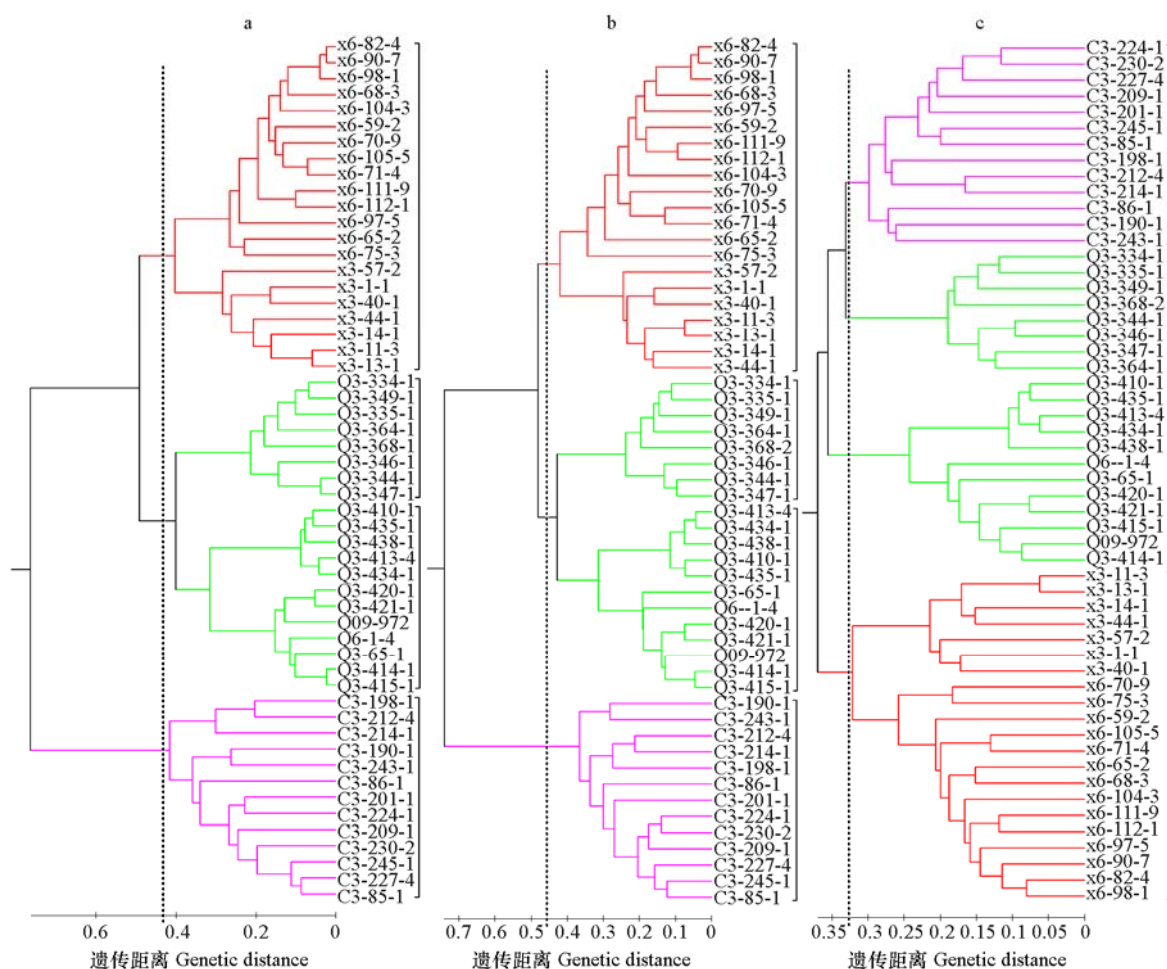


图 1 3 组标记对 54 个骨干自交系的聚类图比较

a: 28 对 SSR 核心引物分析结果聚类图; b: 51 对多态性 SSR 引物分析结果聚类图;

c: 72 个 SNP 标记和 51 对多态性 SSR 引物分析结果聚类图。

Fig. 1 Three dendrograms of 54 elite lines by different marker combinations

a: Dendrogram by 28 core SSR markers; b: Dendrogram by 51 polymorphic SSR markers;

c: Dendrogram by 72 SNP markers and 51 polymorphic SSR markers.

2.4 核心引物的有效性验证

利用核心引物组合对 262 份大白菜自交系 (54 份骨干自交系和 208 份高代自交系) 的基因分型数据进行聚类, 结果显示核心引物组合能够将 262 份自交系完全区分开 (图 2)。其中遗传距离最近的是 Q3-450-1 与 Q3-451-1, 为 0.036, 只存在 1 个 SSR 差异位点; 此外, Q3-471-1、Q3-467-1 和

Q3-464-1 三者之间也只存在 1 个 SSR 差异位点,其中 Q3-471-1 与 Q3-467-1 和 Q3-471-1 与 Q3-464-1 的遗传距离均为 0.038, Q3-467-1 与 Q3-464-1 的遗传距离为 0.039。其次, Q6-90-7 与 X6-82-4、X3-19-1 与 X3-17-1 和 Q3-173-3 与 Q3-173-5 等两两之间存在两个 SSR 差异位点,遗传距离均大于等于 0.046。说明 28 对 SSR 核心引物具有一定的鉴别力和有效性,可用于大白菜品种的真实性鉴定。



图 2 28 对核心引物对 262 份自交系的聚类图

Fig. 2 Dendrogram by 28 core primers for 262 inbred lines

2.5 核心引物的应用

为了方便查询 242 个品种的 DNA 指纹,将数据记录的 0-1 格式转变成基因型格式,并生成了基因分型图(图 3),使得每份品种都显示出特有的指纹,从指纹图谱也可看出品种间都至少具有 1 个 SSR 位点的差异,如 W1308 (96) 与玲珑黄 012 (115)、春白菜 4 号 (173) 与迎春 (178)、B1301 (98) 与春上 (177) 和贝蒂 (239) 与金福娃 (194) 两两之间只具有 1 个 SSR 位点的差异。

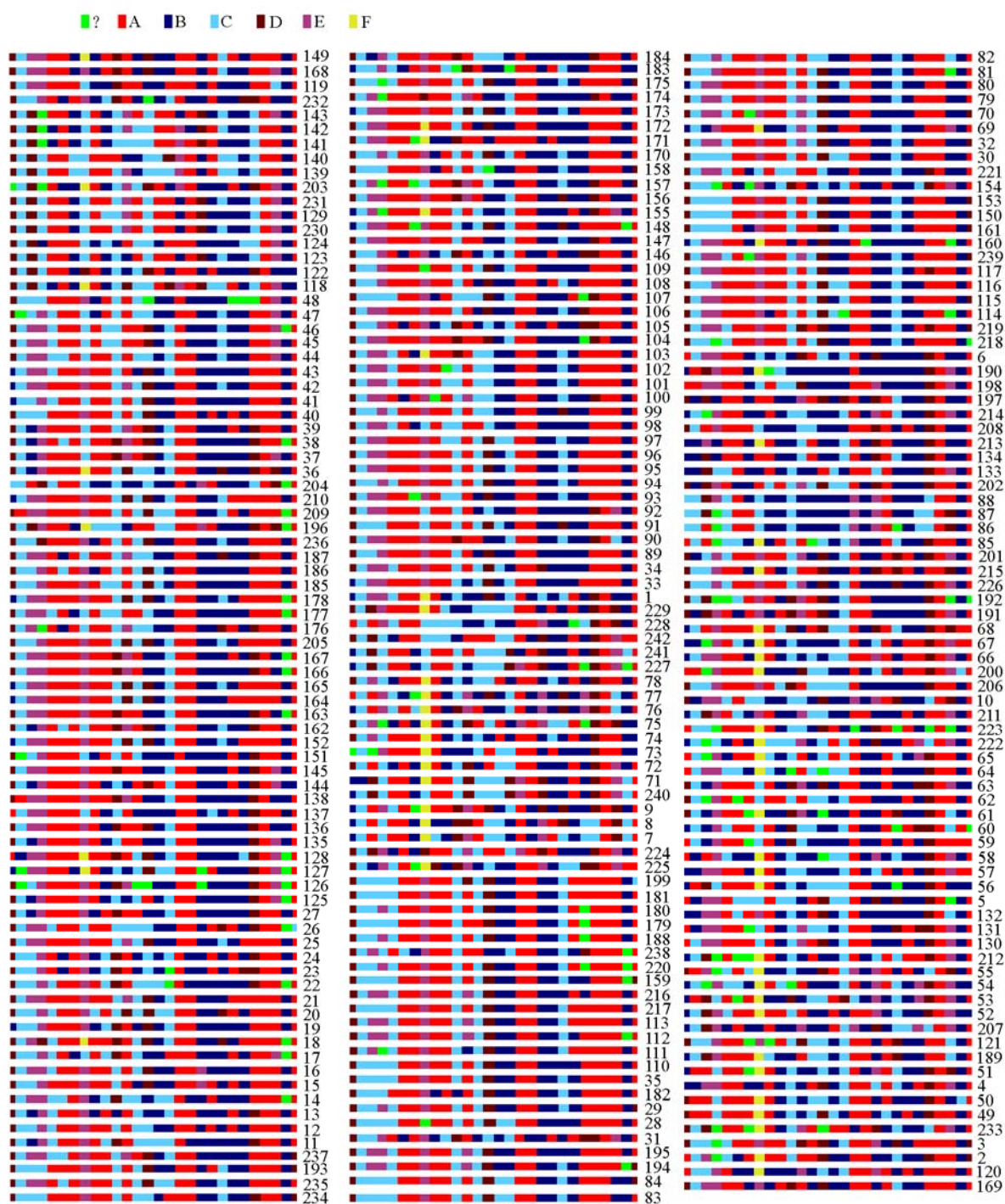


图 3 242 份品种的基因分型图

242 份材料详见表 2。“?”表示该位点的等位基因缺失，A~F 表示 6 个等位基因。

引物从左到右依次为 CB10081、NA14G06、BRAS067、OL11H09、CX271723、BC48、BRMS-043、BRU05680、cnu_m316a、BRU03245、BC65、BRMS-034、ENA4、CX272976、BRU04917、cnu_m149a、EJU5、CX272719、cnu_m295a、BRU00756、cnu_m090a、CX273016、EJU3、PBCGSSRBR10、EJU2、ENA27、BRU03208 和 BRU02939。

Fig. 3 Graphical genotypes of 242 varieties

Two hundred and forty-two Chinese cabbage hybrids see Table 2. “?” indicates missing data. A to F indicate alleles of each marker. The primers from left to right represent CB10081, NA14G06, BRAS067, OL11H09, CX271723, BC48, BRMS-043, BRU05680, cnu_m316a, BRU03245, BC65, BRMS-034, ENA4, CX272976, BRU04917, cnu_m149a, EJU5, CX272719, cnu_m295a, BRU00756, cnu_m090a, CX273016, EJU3, PBCGSSRBR10, EJU2, ENA27, BRU03208 and BRU02939.

利用核心引物组合构建了 242 份大白菜杂交品种的 DNA 指纹图谱, 部分品种电泳图谱见图 4。

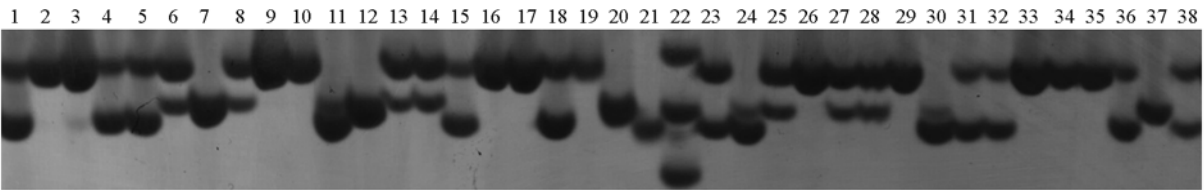


图 4 引物 BC48 扩增部分品种电泳图

1~18 分别为艳春、仲伯黄心 1 号、仲伯黄心 2 号、仲伯黄心 3 号、仲伯黄心 4 号、CR 金将军、大奖、春上、迎春、新-13、CR 春秀、锦黄春、强者、夏白 45、春悦、金晖、新西兰秋冬春结球白菜和京春 99; 19~21 分别为参照自交系 10-1085、09-972、6-22-6; 22 为分子量标准; 23~38 分别为京春白、京春白 2 号、改良京春绿、京春黄、10S-1、10S-2、11S-1、11S-2、12S-3、12S-4、11CR-1、12CR-1、金福娃、金福娃二号、中娃 3 号和 CC51。

Fig. 4 Electrophoresis result of some varieties using primer BC48

1~18 indicate Yanchun, Zhongbo Huangxin 1, Zhongbo Huangxin 2, Zhongbo Huangxin 3, Zhongbo Huangxin 4, CR Jinjiangjun, Dajiang, Chunshang, Yingchun, Xin-13, CR Chunxiu, Jinhuangchun, Qiangzhe, Xiabai 45, Chunyue, Jinhui, N.Z. Qiudongchun Chinese Cabbage and Jingchun 99 respectively; 19~21 indicate reference 10-1085, 09-972 and 6-22-6 respectively; 22 indicates DNA ladder; 23~38 indicate Jingchunbai, Jingchunbai 2, Improved Jingchunlu, Jingchunhuang, 10S-1, 10S-2, 11S-1, 11S-2, 12S-3, 12S-4, 11CR-1, 12CR-1, Jinfuwa, Jinfuwa 2, Zhongwa 3 and CC51 respectively.

3 讨论

随着 SSR 标记技术的快速发展, 中国农业部也应用该方法公布了一系列主要农作物品种鉴定的行业标准, 如: NY/T1432-2007《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》、NY/T1433-2007《水稻品种鉴定 DNA 指纹方法》等, 这些标准是根据最终筛选的 SSR 核心引物建立了品种真实性判定标准, 核心引物的选定极其重要。因此怎样设计试验才能挑选出代表性强和适用性广的核心引物是品种鉴定的关键。

对于本研究来说, 首先重视了试验材料的选取。经过本实验室 40 多年的广泛收集, 现有种质资源的数量达 2 000 余份, 本研究从中挑选出 262 份具有代表性的大白菜高代自交系作为试验材料, 其中 54 份为核心育种材料, 用于筛选极具特异性的核心引物; 另外的 208 份由姊妹系和遗传背景较远的家系组成, 用于检验核心引物的鉴别力。

其次, 衡量考虑了多个筛选条件。Wei 等 (2012) 从 36 个公开发表的芸薹属 A、B 和 C 基因组的遗传连锁图谱中, 每个连锁群挑选出 10 对不同的核心引物, 筛选的 4 个条件如下: ①引物在多个作图群体中存在一致的多态性位点; ②近似一致的退火温度; ③每个连锁群的引物位点分布均匀; ④引物扩增带型清晰且差异明显。Zhang 等 (2012) 挑选的 23 对西瓜 SSR 核心引物是基于 5 个条件: ①SSR 引物和 SNP 标记分别对 17 份重测序材料聚类的结果要一致; ②PIC 值大于 0.45; ③SSR 引物分布于整个基因组且每个连锁群至少存在一对引物; ④PCR 产物带型清晰且容易扩增; ⑤每对 SSR 引物具有单一的扩增位点。本研究中综合考虑了 Wei 等 (2012) 和 Zhang 等 (2012) 的筛选标准, 最终确定了一套含 28 对 SSR 引物的核心引物, 其中有 4 对 (CX271723、BRMS-034、EJU3 和 BRU02939) 与张婉等 (2013) 挑选的 20 对白菜 SSR 核心引物中的相同。

另外, 本研究中用生产上推广的大白菜品种进一步检验了核心引物组合的适用性。利用 28 对 SSR 核心引物获得了 242 份不同来源的大白菜一代杂种的 DNA 特征指纹, 初步建立了大白菜品种的 DNA 指纹库。通过指纹库的数据显示, 绝大部分品种间都存在两个或两个以上的 SSR 差异位点, 只有极少数品种间存在 1 个 SSR 差异位点。这些只有 1 个 SSR 差异位点的品种, 其两两之间的表型很相似, 如 ‘W1308’ 与 ‘玲珑黄 012’ 的叶色都为深绿色; ‘春白菜 4 号’ 与 ‘迎春’ 的叶球形状都为合抱; ‘B1301’ 与 ‘春上’ 的抗病性都很强, 外叶也都为深绿色; ‘贝蒂’ 与 ‘金福娃’ 的心叶都为浅黄色。因此, 为了提高品种真伪识别的可信度, 也参照玉米和水稻品种鉴定的行业标准,

认为品种间至少要存在 2 个位点的差异, 才能判断两个品种为不同的品种。不过要想更准确地鉴别品种, 仍需搜集国内大面积种植以及已审定或鉴定的大白菜品种, 来扩充和丰富 DNA 指纹库的数据量, 为大白菜品种真实性的判定、维护育种者权益及种业的健康发展服务。

References

- Choi S R, Teakle G R, Plaha P, Kim J H, Charlotte J A, Beynon E, Piao Z Y, Soengas P, Han T H, King G J, Barker G C, Hand P, Lydiat D J, Batley J, Edwards D, Koo D H, Bang W J, Park B S, Lim Y P. 2007. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project. *Theor Appl Genet*, 111: 777 – 792.
- Ge Jia, Xie Hua, Cui Chong-shi, Hong Jian-ming, Ma Rong-cai. 2005. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) derived SSR markers in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 13 (4): 423 – 428. (in Chinese)
- 葛佳, 谢华, 崔崇士, 洪剑明, 马荣才. 2005. 大白菜表达序列标签 SSR 标记分析. *农业生物技术学报*, 13 (4): 423 – 428.
- Geethanjali S, Chen K Y, Pastrana D V, Wang J F. 2010. Development and characterization of tomato SSR markers from genomic sequences of anchored BAC clones on chromosome 6. *Euphytica*, 173: 85 – 97.
- Kim H R, Choi S R, Bae J, Hong C P, Lee S Y, Hossain M J, Nguyen D V, Jin M, Park B S, Bang J W, Bancroft I, Lim Y P. 2009. Sequenced BAC anchored reference genetic map that reconciles the ten individual chromosomes of *Brassica rapa*. *BMC Genomics*, 10: 432.
- Li Li, Zheng Xiao-ying. 2009. 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. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (11): 1627 – 1634. (in Chinese)
- 李丽, 郑晓鹰. 2009. 用于白菜和大白菜品种鉴定的 EST-SSR 复合标记的建立. *园艺学报*, 36 (11): 1627 – 1634.
- Ling A E, Kaur J, Burgess B, Hand M, Hopkins C J, Li X, Love C G, Vardy M, Walkiewicz M, Spangenberg G, Edwards D, Batley J. 2007. Characterization of simple sequence repeat markers derived in silico from *Brassica rapa* bacterial artificial chromosome sequences and their application in *Brassica napus*. *Mol Ecol Notes*, 273 – 277.
- Lowe A J, Moule C, Trick M, Edwards K J. 2004. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species. *Theor Appl Genet*, 108: 1103 – 1112.
- Lowe A J, Jones A E, Raybould A F, Trick M, Moule C L, Edwards K J. 2002. Transferability and genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle. *Mol Ecol Notes*, 2: 7 – 11.
- Miao H, Zhang S P, Wang X W, Zhang Z H, Li M, Mu S Q, Cheng Z C, Zhang R W, Huang S W, Xie B Y, Fang Z Y, Zhang Z X, Weng Y Y, Gu X F. 2011. A linkage map of cultivated cucumber (*Cucumis sativus* L.) with 248 microsatellite marker loci and seven genes for horticulturally important traits. *Euphytica*, 182: 167 – 176.
- 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 (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers. *Theor Appl Genet*, 111: 1514 – 1523.
- Ramu P, Deshpande S P, Senthilvel S, Jayashree B, Billot C, Deu M, Reddy L A, Hash C T. 2010. In silico mapping of important genes and markers available in the public domain for efficient sorghum breeding. *Mol Breeding*, 26: 409 – 418.
- Shi Lei, Li Li, Zheng Xiao-ying. 2007. Optimization of SSR-PCR system for identification in Chinese cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). *Molecular Plant Breeding*, 5 (1): 110 – 116. (in Chinese)
- 石磊, 李丽, 郑晓鹰. 2007. 大白菜 SSR 检测体系的优化. *分子植物育种*, 5 (1): 110 – 116.
- Suwabe K, Iketani H, Nunome T, Kage T, Hirai M. 2002. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. *Theor Appl Genet*, 104: 1092 – 1098.
- Suwabe K, Tsukazaki H, Iketani H, Hatakeyama K, Kondo M, Fujimura M, Nunome T, Fukuoka H, Hirai M, Matsumoto S. 2006. SSR-based comparative genomics between *Brassica rapa* and *Arabidopsis thaliana*: The genetic origin of clubroot resistance. *Genetics*, 173: 309 – 319.
- UPOV (Union for the Protection of New Varieties of Plants). 2007. Guidelines for DNA-profiling: Molecular marker selection and database construction//BMT Guidelines (proj.9). Geneva: UPOV, 3 – 4.
- Wang W X, Huang S M, Liu Y M, Fang Z Y, Yang L M, Hua W, Yuan S X, Liu S Y, Sun J F, Zhuang M, Zhang Y Y, Zeng A S. 2012. Construction and analysis of a high-density genetic linkage map in cabbage (*Brassica oleracea* L. var. *capitata*). *BMC Genomics*, 13: 523.
- Wang Xiao-yi, Yu Shuan-cang, Zhang Feng-lan, Yu Yang-jun, Zhao Xiu-yun, Zhang De-shuang. 2008. SSR fingerprinting and genetic distinctness of pak-choi (*Brassica rapa* L. ssp. *chinensis* Makino). *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 23 (5): 97 – 103. (in Chinese)

- 王笑一, 于拴仓, 张凤兰, 余阳俊, 赵岫云, 张德双. 2008. 小白菜品种的 SSR 指纹图谱及遗传特异性分析. 华北农学报, 23 (5): 97 - 103.
- Wang Y, Sun S L, Liu B, Wang H, Deng J, Liao Y C, Wang Q, Cheng F, Wang X W, Wu J. 2011. A sequence-based genetic linkage map as a reference for *Brassica rapa* pseudo chromosome assembly. BMC Genomics, 12: 239.
- Wei L Y, Zhao C X, Li J N, Li J N, Qian W, Fu D H. 2012. Screening of core simple sequence repeat primer pairs and establishment of a multiplex polymerase chain reaction system for *Brassica* genomes A and C. Plant Breeding, 131: 457 - 459.
- Yu S C, Zhang F L, Yu R B, Zou Y M, Qi J N, Zhao X Y, Yu Y J, Zhang D S, Li L. 2009. Genetic mapping and localization of a major QTL for seedling resistance to downy mildew in Chinese cabbage (*Brassica rapa* ssp. *pekinensis*). Mol Breeding, 23: 573 - 590.
- Zhang H Y, Wang H, Guo S G, Ren Y, Gong G Y, Weng Y Q, Xu Y. 2012. Identification and validation of a core set of microsatellite markers for genetic diversity analysis in watermelon, *Citrullus lanatus* Thunb. Matsum. & Nakai. Euphytica, 186: 329 - 342.
- Zhang Wan, Cui Ji-zhe, Yu Shuan-cang, Li Li. 2013. Construction of SSR fingerprint database of Chinese cabbage varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*). Molecular Plant Breeding, 11 (6): 843 - 857. (in Chinese)
- 张 婉, 崔继哲, 于拴仓, 李 丽. 2013. 白菜品种的 SSR 指纹图谱数据库的构建. 分子植物育种, 11 (6) : 843 - 857.

“中国园艺学会 2015 年学术年会”征文通知

“中国园艺学会 2015 年学术年会”即日起征集: ①研究论文摘要, ②有关园艺学进展的综述。经审查合格的摘要将收入《园艺学报》2015 年增刊, 综述将收入 2015 年正刊 (刊期待定), 均于会前出版。

征文内容: 有关果树、蔬菜、西瓜甜瓜、观赏园艺植物及其它园艺植物的种质资源、遗传育种、生物技术、栽培技术与生理、采后技术与生理等方面未曾发表过的研究论文摘要和文献综述。

投稿要求: 摘要稿件需将电子文件发送至本刊电子邮箱 (ivfyxb@caas.cn), 综述稿件需登录本刊网站 (<http://www.ahs.ac.cn>) 在线投稿, 同时均需将纸质稿件一式两份寄送到: 北京中关村南大街 12 号《园艺学报》编辑部 (邮编 100081), 并请交纳审理费 320 元 (邮局汇款地址: 北京中关村南大街 12 号中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 邮编 100081, 收款人《园艺学报》编辑部)。对于录用的稿件, 将及时通知参会作者, 未录用的稿件恕不退回。联系电话: 010-62192388。

综述写作要求与《园艺学报》正刊相同。

摘要写作要求:

每篇限 A4 纸 1 页 (单倍行距, 标准字间距), 不写英文和参考文献, 不用图表。

题目 (黑体, 2 号字)

作者姓名 (仿宋, 4 号字)

(作者单位, 城市名 邮编) (宋体, 小 5 号字)

内容包括目的与意义, 材料与方法, 研究结果 (宋体, 5 号字)

关键词:

中图分类号: (由编辑部填写) 文献标志码: A 文章编号: 0513-353X

基金项目:

E-mail:

Tel:

中国园艺学会
2014 年 10 月 20 日