



## 研究报告 Article Report

### ‘甬榨 1 号’、‘甬榨 2 号’和‘甬榨 3 号’ SSR 指纹图谱的构建

宋慧<sup>✉</sup>, 孟秋峰<sup>✉</sup>, 张香琴<sup>✉</sup>, 王毓洪<sup>✉</sup>

宁波市农业科学研究院蔬菜研究所, 宁波, 315040

✉ 通讯作者: songhui\_nj@yahoo.com.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 14 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0014

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

宋慧等, 2013, ‘甬榨 1 号’、‘甬榨 2 号’和‘甬榨 3 号’ SSR 指纹图谱的构建, 分子植物育种(online), 11(14): 1094-1097 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0014)

引用格式(英文):

Song et al., 2013, Construction of SSR Fingerprinting of ‘Yongzha No.1’, ‘Yongzha No.2’, and ‘Yongzha No.3’ Mustard Tuber Varieties, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(14): 1094-1097 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0014)

**摘要** 以市售同类型榨菜品种‘鲜榨 1 号’和‘余姚缩头种’为对照, 对甬榨系列榨菜品种‘甬榨 1 号’、‘甬榨 2 号’和‘甬榨 3 号’进行分子指纹图谱构建。从 90 对 SSR 中共筛选到 6 个多态性引物(引物编号为 S8005/8006、S8021/8022、S8051/8052、S8071/8072、S8125/8126 和 S8159/8160), 在 5 份供试材料中稳定扩增出 6 个多态性位点, 揭示多态性比例为 6.67%。组合 6 个 SSR 多态性位点, 构建‘甬榨 1 号’、‘甬榨 2 号’和‘甬榨 3 号’, 及对照‘鲜榨 1 号’和‘余姚缩头种’的指纹图谱分别是 1-0-1-1-0-1、0-1-1-1-0-0、0-1-1-0-1-0、1-0-0-1-0-0 和 0-1-1-0-0-0。三个榨菜新品种可以通过各自指纹图谱进行区分, 并能有效鉴别新品种与对照, 图谱出现概率为 1/4851495000, 最终起到鉴定和保护品种的作用。

**关键词** 甬榨; 榨菜; 指纹图谱

### Construction of SSR Fingerprinting of ‘Yongzha No.1’, ‘Yongzha No.2’, and ‘Yongzha No.3’ Mustard Tuber Varieties

Song Hui<sup>✉</sup>, Meng Qiufeng<sup>✉</sup>, Zhang Xiangqin<sup>✉</sup>, Wang Yuhong<sup>✉</sup>

Institute of Vegetable, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo, 315040, P.R. China

✉ Corresponding author, songhui\_nj@yahoo.com.cn; ✉ Authors

**Abstract** The fingerprinting of a series of Yongzha mustard tuber varieties, including ‘Yongzha No.1’, ‘Yongzha No.2’, and ‘Yongzha No.3’, were established using SSR molecular markers, compared with the similar type of mustard tuber cultivars ‘Xianzha No.1’ and ‘Yuyao suotouzhong’. Six SSR markers (S8005/8006, S8021/8022, S8051/8052, S8071/8072, S8125/8126 and S8159/8160) were identified from 90 mustard tuber SSR primers, which generated six polymorphic loci. These SSR markers showed that the polymorphism ratio of mustard tuber varieties tested were 6.67%. The fingerprinting of ‘Yongzha No.1’, ‘Yongzha No.2’, ‘Yongzha No.3’, ‘Xianzha No.1’ and ‘Yuyao suotouzhong’ established by the six polymorphism loci were 1-0-1-1-0-1, 0-1-1-1-0-0, 0-1-1-0-1-0, 1-0-0-1-0-0 and 0-1-1-0-0-0. Three new mustard tuber cultivars and two checks could be identified each other by the fingerprinting results with high resolution (1/4851495000).

**Keywords** Yongzha; Mustard tuber; Fingerprinting

## 研究背景

茎瘤芥(*Brassica juncea* var *tumida* Tsen et Lee)

收稿日期: 2013 年 01 月 18 日

接受日期: 2013 年 03 月 10 日

发表日期: 2013 年 05 月 27 日

基金项目: 本研究由国家农业成果转化资金项目(2011GB2C220003)、国家自然科学基金(31000907)、宁波市国际合作项目(2010D10011)和宁波市农业重大攻关项目(2010C10012, 2012C10034)共同资助

作为传统加工蔬菜, 产量高, 质量好, 市场竞争力强, 成为中国重要的特色农产品。甬榨系列是由宁波市农科院自主选育的榨菜新品种, 包括‘甬榨 1 号’(王毓洪等, 2009) (采收期早, 适合水稻冬闲田种植)、‘甬榨 2 号’(孟秋峰等, 2010) (生长势强, 产量高)和‘甬榨 3 号’(杂交种, 抗病性强)等。在新品种的推广种植过程中, 准确快速地鉴定品种真实性, 是确保育种者和种植者利益的重要手段。鉴定榨菜品



种真实性的常规方法主要是利用苗期或成株期形态学指标进行,周期长且准确性差,特别是鉴定表型相似的榨菜材料,形态指标难以奏效(汪炳良,2006,中国三峡出版社,pp.6-7)。近年来,以DNA为基础的分子标记技术迅速发展,通过该技术构建作物品种DNA指纹图谱,能够快速准确地鉴定品种,为作物育种和种子管理提供了极大的便利(马琳等,2010)。目前该技术已广泛应用于水稻(从夕汉等,2010)、白菜(王笑一等,2008)和甜瓜(王美荣等,2010)等作物,有关榨菜品种指纹图谱构建与利用的研究未见报道。为此,本研究拟利用SSR分子标记,构建‘甬榨1号’、‘甬榨2号’和‘甬榨3号’指纹图谱,为保护育种者知识产权提供新途径。

## 1 结果与分析

### 1.1 SSR 多态性引物的筛选与供试榨菜材料的多态性分析

在90对SSR中,共筛选到6对SSR引物

S8005/8006、S8021/8022、S8051/8052、S8071/8072、S8125/8126和S8159/8160,在5份榨菜材料中稳定扩增出6个差异位点,揭示供试材料的多态性比例为6.67%(图1)。

### 1.2 榨菜品种指纹图谱的构建

组合6个SSR多态性位点,构建供试榨菜品种的指纹图谱,结果见表1。其中‘甬榨1号’、‘甬榨2号’和‘甬榨3号’的指纹图谱分别是1-0-1-1-0-1、0-1-1-1-0-0和0-1-1-0-1-0,三个甬榨系列新品种可以通过各自指纹图谱进行区分,并与市售同类型对照‘鲜榨1号’(1-0-0-1-0-0)和‘余姚缩头种’(0-1-1-0-0-0)鉴别开。根据图谱出现概率公式计算结果,图谱出现概率为 $1/4851495000$ ,出错概率十分微小,表明利用SSR技术构建指纹图谱鉴别和保护甬榨系列新品种是有效可行的。

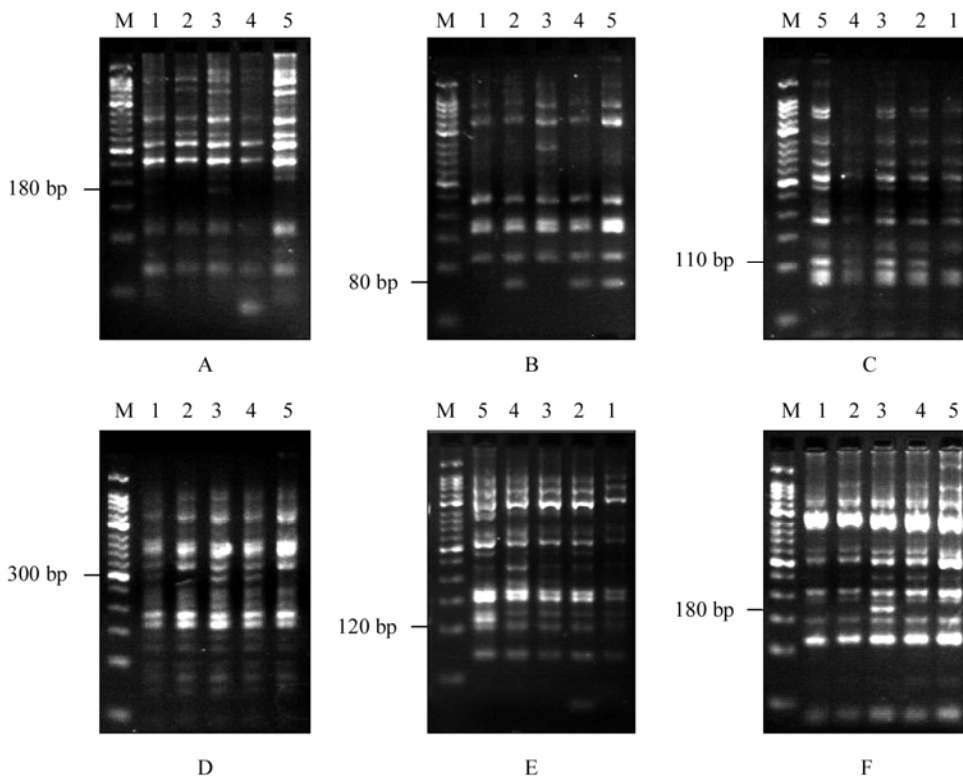


图1 SSR引物在‘甬榨1号’、‘甬榨2号’、‘甬榨3号’,及对照材料‘鲜榨1号’和‘余姚缩头种’中的扩增

注: M: 50 bp DNA ladder marker; 1:‘鲜榨1号’; 2:‘余姚缩头种’; 3:‘甬榨1号’; 4:‘甬榨2号’; 5:‘甬榨3号’; 黑色箭头: 引物在1~5中的差异位点; A: S8005/8006; B: S8021/8022; C: S8051/8052; D: S8071/8072; E: S8125/8126; F: S8159/8160

Figure 1 SSR amplification of ‘Yongzha No.1’, ‘Yongzha No.2’, ‘Yongzha No.3’, ‘Xianzha No.1’ and ‘Yuyao suotouzhong’

Note: M: 50 bp DNA ladder marker; 1: ‘Xianzha No.1’; 2: ‘Yuyao suotouzhong’; 3: ‘Yongzha No.1’; 4: ‘Yongzha No.2’; 5: ‘Yongzha No.3’; Black arrow: Polymorphic fragments of 1~5; A: S8005/8006; B: S8021/8022; C: S8051/8052; D: S8071/8072; E: S8125/8126; F: S8159/8160

表 1 供试榨菜品种编号、名称和 SSR 指纹图谱

Table 1 Code, name, and SSR fingerprinting of mustard tuber varieties

编号 Code	位点(等位/差异) Loci (Allelic/Polymorphic)	引物名称及差异片段 Primer name and polymorphic size	鲜榨 1 号 Xianzha No.1	余姚缩头种 Yuyao suotouzhong	甬榨 1 号 Yongzha No.1	甬榨 2 号 Yongzha No.2	甬榨 3 号 Yongzha No.3
1	9/1	S8005/8006-180 bp	1	0	1	0	0
2	5/1	S8021/8022-80 bp	0	1	0	1	1
3	10/1	S8051/8052-110 bp	0	1	1	1	1
4	11/1	S8071/8072-300 bp	1	0	1	1	0
5	10/1	S8125/8126-120 bp	0	0	0	0	1
6	8/1	S8159/8160-180 bp	0	0	1	0	0

## 2 讨论

SSR 分子标记多态性丰富, 扩增稳定, 是国际植物新品种保护联盟(UPOV)规定使用的分子标记类型之一(滕海涛等, 2009)。但是 SSR 标记具有种属特异性, 开发成本高, 目前有关榨菜 SSR 的开发利用报道较少。本研究参照文献报道, 合成 90 对榨菜 SSR 引物, 揭示供试材料的多态性比例为 6.67%。这个多态性结果, 远远低于付杰(2005)和陈发波(2010)利用相同 SSR 标记, 分析 29 份中国芥菜和 220 份茎瘤芥种质遗传多样性时, 获得的 82.1%和 85.0%的多态性研究结果。这主要是由于, 本研究所选试材为仅凭外观不易区分的市售同类型榨菜品种, 材料之间的相似程度高, 多态性降低。付杰(2005)和陈发波(2010)研究中的供试材料多源于芥菜起源中心或近源植物, 材料之间差异明显, 多态性比例高。同样的, 这也与水稻(从夕汉等, 2010)和甜瓜(王美荣等, 2010)等作物构建指纹图谱时, 得到的低多态性比例(2.92%和 3.28%)的结论是一致的。

甬榨系列是我院自主选育的榨菜新品种, 本研究最终利用 6 对榨菜 SSR 引物组合, 构建了供试榨菜品种特有的分子指纹图谱, 能够逐一区分甬榨 1 号、甬榨 2 号和甬榨 3 号及其市售同类型对照品种‘鲜榨 1 号’和‘余姚缩头种’, 图谱出现概率小, 为榨菜新品种真实性检验提供了新方法。同时, 随着榨菜品种日益丰富, 品种间表型差异越来越小, 不断筛选新的分子标记, 以补充和扩展现有指纹图谱, 是增强该技术鉴定和保护力度的重要措施。

## 3 材料与方

### 3.1 榨菜材料

供试材料包括‘甬榨 1 号’、‘甬榨 2 号’和‘甬榨 3

号’, 以市售同类型品种‘鲜榨 1 号’和‘余姚缩头种’作为对照。上述各材料外观相似, 不易区分。

### 3.2 试验方法

植株长至三叶一心时, 10 个单株混合采集嫩叶 1 g, -80℃ 保存。利用 CTAB 法(Murray and Thompson, 1980), 提取新鲜叶片总基因组 DNA。参照文献报道, 合成 90 对榨菜 SSR 引物(陈发波, 2010; 付杰, 2005)。PCR 反应体系为 15 μL, 包括 1.25 mmol/L Dntp (3.24 μL), 10×buffer (1.5 μL), 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> (2.43 μL), 5 mmol/L 引物(1.35 μL), 10 ng/μL DNA (5 μL), 1 U Taq (0.05 μL)。PCR 扩增程序为: 预变性 94℃(4 min); 变性 93℃ (15 s), 退火 37℃ (1 min 30 s), 延伸 72℃ (2 min) (40 个循环); 延伸 72℃(6 min)。扩增产物在 2.5%的 MS-6 高分辨率琼脂糖凝胶上电泳检测。

### 3.3 数据分析

观察统计差异引物产生的等位位点数目和差异位点数目, 通过公式  $2/n(n+1)$  ( $n$  表示等位基因的数目), 计算图谱出现概率。同时, 对差异位点进行数字化处理, 即“1”表示该差异位点有扩增, “0”表示该差异位点无扩增, 构成供试材料指纹图谱。

### 作者贡献

宋慧、张香琴和孟秋峰是本研究的试验设计和实验研究的执行人; 宋慧完成数据分析和论文实验设计和论文写作与修改; 孟秋峰和王毓洪参与试验研究和结果分析。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由国家农业成果转化资金项目(2011GB2C220003)、国家自然科学基金(31000907)、宁波市国际合作项目(2010D10011)和宁波市农业重大攻关项目



(2010C10012, 2012C10034)共同资助。

## 参考文献

- Chen F.B., 2010, Analysis on genetic diversity, heterosis, combining ability and origin of tuber mustard (*Brassica juncea var tumida Tsen et Lee*) germplasm, Dissertation for Ph.D., College of Agronomy, Sichuan Agricultural University, Supervisor: Yang K.C., pp.77-78 (陈发波, 2010, 茎瘤芥(*Brassica juncea var tumida Tsen et Lee*)种质资源遗传多样性与育种潜势分析及起源进化探讨, 博士学位论文, 四川农业大学农学院, 导师: 杨克诚, pp.77-78)
- Cong X.H., Li L., Teng B., Liu H.Z., Ni D.H., Lu X.Z., Song F.S., and Yang J.B., 2010, Establishment of SSR fingerprint map and analysis of genetic similarity among 56 backbone parental lines in hybrid rice, (*Journal of Biology*), 27(1): 87-91 (从夕汉, 李莉, 滕斌, 刘海珍, 倪大虎, 陆徐忠, 宋丰顺, 杨剑波, 2010, 56个杂交水稻骨干亲本 SSR 指纹图谱的构建及遗传相似性分析, *生物学杂志*, 27(1): 87-91)
- Fu J., 2005, Genetic diversity and phylogenetic relationship among Chinese mustard as revealed by RAPD and microsatellite markers, Thesis for M.S., Zhejiang University, Supervisor: Zhang M.F., pp.32 (付杰, 2005, 中国芥菜遗传多样性与亲缘关系研究, 硕士学位论文, 浙江大学导师: 张明方, pp.32)
- Ma L., Yu X.Q., and Zhao F.S., 2010, Establishment of SSR fingerprint map of local rice varieties 'He' in Guizhou, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Science)*, 23(1): 5-10 (马琳, 余显权, 赵福胜, 2010, 贵州地方水稻品种“禾”的 SSR 指纹图谱构建, *西南农业学报*, 23(1): 5-10)
- Meng Q.F., Wang B.L., Wang Y.H., Huangfu W.G., and Huang Y.P., 2010, A new spring tuber mustard cultivar 'yongzha 2', *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 37(8): 1371-1372 (孟秋峰, 汪炳良, 王毓洪, 皇甫伟国, 黄芸萍, 2010, 春茎芥菜新品种‘甬榨2号’, *园艺学报*, 37(8): 1371-1372)
- Murray M.G. and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.*, 8(19): 4321-4325  
<http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321>  
PMid:7433111 PMCID:324241
- Teng H.T., Lv B., Zhao J.R., Xu Y., Wang F.G., Du Y.Y., Yang K., Tang H., and Li X.Y., 2009, DNA fingerprint profile involved in plant variety protection practice, *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, (1):1-6 (滕海涛, 吕波, 赵久然, 徐岩, 王风格, 堵苑苑, 杨坤, 唐浩, 李祥羽, 2009, 利用 DNA 指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性, *生物技术通报*, (1): 1-6)
- Wang M.R., Xu Y., Zhan Y.L., Guo S.G., Ren Y., Kong G.Y., and Zhang H.Y., 2010, Construction of fingerprinting with SSR for varieties of *Cucumis melo ssp. melo*, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 26(20):47-51 (王美荣, 许勇, 詹永乐, 郭绍贵, 任毅, 宫国义, 张海英, 2010, 厚皮甜瓜品种组合 SSR 指纹图谱构建, *中国农学通报*, 26(20): 47-51)
- Wang X.Y., Yu S.C., Zhang F.L., Yu Y.J., Zhao X.Y., and Zhang D.S., 2008, SSR Fingerprinting and genetic distinctness of pak-choi (*Brassica rapa L. ssp. Chinesis Makino*), *Huabeinong Xuebao (Acta Agruculturae Boreali-Sinica)*, 23(5): 97-103 (王笑一, 于栓仓, 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.H., Meng Q.F., Huangfu W.G., and Huang Y.P., 2009, A new spring tuber mustard cultivar 'yongzha 1', *Yuanyi Xuebao (Acta Horticulturae Sinica)*, 36(5): 774 (王毓洪, 孟秋峰, 皇甫伟国, 黄芸萍, 2009, 春茎芥菜新品种‘甬榨1号’, *园艺学报*, 36(5): 774)