

技术主题

Technology Feature

EST-SSR 标记在大白菜杂交种种子纯度鉴定中的应用

赵新[✉], 王永[✉], 兰青阔[✉], 余景会[✉], 李欧静[✉], 陈锐[✉], 朱珠[✉], 郭永泽[✉]

天津市农业质量标准与检测技术研究所, 天津, 300381

✉通讯作者: wyzl2007@yahoo.com.cn; ✉作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 20 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0020

收稿日期: 2012 年 04 月 20 日

接受日期: 2012 年 04 月 27 日

发表日期: 2012 年 05 月 15 日

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。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

赵新等, 2012, EST-SSR 标记在大白菜杂交种种子纯度鉴定中的应用, 分子植物育种(online) Vol.10 No.20 pp.1145-1150 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0020)

引用格式(英文):

Zhao et al., 2012, Purity Identification of Chinese Cabbage Cultivar Using EST-SSR Marker, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.20 pp.1145-1150 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0020)

摘要 本研究利用 EST-SSR 分子标记技术, 对 10 份大白菜杂交种及其双亲之间的多态性进行了引物筛选和纯度鉴定的研究。结果表明, 通过 GeneBank 数据库上公布的大白菜 EST 序列, 合成得到 30 对引物, 其中有 7 对引物表现为稳定的共显性, 利用其中 3 对 EST-SSR 引物即可对全部 10 份大白菜杂交种进行纯度鉴定, 带型为双亲的互补带型。经田间验证试验引物稳定性良好, 且与田间形态观察结果较为吻合, 可用于大白菜杂交种种子纯度的鉴定。

关键词 大白菜; 种子; 纯度鉴定; EST-SSR 分子标记

Purity Identification of Chinese Cabbage Cultivar Using EST-SSR Marker

Zhao Xin[✉], Wang Yong[✉], Lan Qingkuo[✉], Yu Jinghui[✉], Li Oujing[✉], Chen Rui[✉], Zhu Zhu[✉], Guo Yongze[✉]

Institute of Tianjin Agriculture Quality Standard and Testing Technology, Tianjin, 300381

✉Corresponding author: wyzl2007@yahoo.com.cn; ✉ Authors

Abstract In this research, primers screening and purity identification of both parents and F1 of 10 Chinese cabbage cultivars were conducted by using EST-SSR molecular marker technique. The results showed that there were 7 pairs of EST-SSR primers presenting stable codominance among 30 pairs of screened SSR primers, which were designed from expressed sequence tags (ESTs) in GeneBank. Only using 3 pairs of them, the purity identification of the total 10 Chinese cabbage cultivars could be done. The banding patterns of hybrid seeds are complementary types of their parents, and it is similar to their field purities. This indicates that EST-SSR markers could be used for rapid and accurate identification of seed purity of Chinese cabbage cultivar.

Keywords Chinese cabbage; Seed; Purity Identification; EST-SSR Molecular Marker

研究背景

大白菜(*Brassica campestris* L. ssp *pekinensis*)为十字花科芸薹属叶用蔬菜, 起源于我国北方, 是人们生活中不可缺少的一种重要蔬菜, 栽培面积和销售量在我国居各类蔬菜之首, 可在全国各种条件气候下栽培, 因此广受农户欢迎。大白菜的品种较多, 不同品种的营养和经济价值以及适宜的栽培方式也不尽相同, 同时每种品种的种子质量直接影响农户的产量和经济效益, 而种子纯度又是种子质量的重要影响因素和评价指标, 因此保证种子的纯度对农户尤为重要。鉴定种子纯度的方法多为传统的田间形态学观察, 需要一个较长的育种过程, 而且受

各种环境条件的影响也较大, 往往时间较长而且结果可能存在偏差, 这种方法对于农户而言虽然传统, 但在时间上存在很大的不利因素, 可能因此而错过最佳的育种时机, 直接影响经济收益。因此, 开发一种快速准确的种子纯度鉴定方法已成为各类种子科研院所、质检机构以及企业和农户共同关注的问题(赵振卿等, 2011)。

近年来, 种子纯度鉴定的方法有十多种, 发展速度也较快, 从种子、幼苗形态及物理化学的常规鉴定法到蛋白质及同工酶的电泳鉴定法再到 DNA 水平的分子标记鉴定法, 鉴定周期及时间上都已大大缩短, 但相比较而言, DNA 水平的分子标记鉴定法以其信

息量大、遗传性稳定、检测速度快、操作简便等突出优点在多种鉴定方法中占据了较大优势, 并且也得到了广泛应用(李淑娟, 2003; 田雷等, 2001)。

EST-SSR 标记是分子标记鉴定方法之一, 随着 GenBank 上公布的常见物种的 EST 序列信息日渐丰富, 利用 EST 数据库开发 SSR 引物较其它分子标记方法更加便捷、信息量大、花费低、效率高, 同时也具备 SSR 标记的共显性、多态性高、实验程序简单等优点, 较适合于农户育种的需要(张晗等, 2010)。

本研究以 10 份市售大白菜杂交种及其双亲为试验材料, 通过 GenBank 数据库上公布的大白菜 EST 序列, 设计合成引物, 通过比较杂交种及双亲的特征谱带, 筛选杂交种呈现双亲共显性的互补带型的引物, 建立准确快速的 EST-SSR 标记技术鉴定大白菜杂交种种子纯度的检测方法, 为大白菜杂交种种子纯度分析提供理论基础。

1 结果与分析

1.1 大白菜叶片基因组 DNA 提取方法

利用改良 CTAB 方法提取大白菜叶片基因组 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测结果见图 1。从图中可以看出, 所提取的基因组 DNA 主带清晰, 整齐一致, 没有明显降解, 可用于下一步 PCR 扩增。

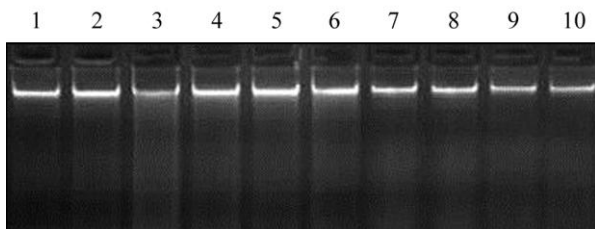


图 1 大白菜基因组 DNA 电泳图

注: 1~10: 10 份大白菜杂交种

Figure 1 Electrophoretogram of Chinese cabbage genome

Note: 1~10: 10 Chinese Cabbage hybrids

1.2 引物筛选结果

利用 EST-SSR 标记技术对天津科润蔬菜研究所提供的大白菜杂交种及其双亲进行种子纯度鉴定, 通过合成的 30 对核心引物, 比较杂交种及双亲特征谱带的差异, 筛选杂交种呈现双亲共显性的互补带型的引物, 其中 7 对引物出现杂交种带型为双亲的互补带型, 可用于大白菜杂交种种子纯度的鉴定, 仅应用其中 3 对引物即可覆盖 10 个品种的大白菜杂交种种子纯度的鉴定。引物序列见表 1, 应用 3 对引物对 10 个品种大白菜进行纯度鉴定的

图谱如图 2、图 3、图 4 所示。

1.3 利用筛选到的 3 对引物进行田间大白菜纯度鉴定

对 10 份大白菜杂交种进行田间随机取样, 每个品种的大白菜各取单株 60 株, 利用嫩叶进行 DNA 提取, 应用筛选得到的 3 对 EST-SSR 引物, 鉴定每个品种大白菜的纯度, 并与田间形态观察结果对比, 从而确定引物的适用性, 两种方法纯度鉴定结果如表 2 所示。

2 讨论

目前对于种子纯度的鉴定方法已经发展到分子水平, 分子标记技术可以直接反应 DNA 水平上的差异, 因此已成为种子纯度鉴定的主要发展趋势。DNA 分子标记技术主要包括: 扩增片段长度多态性(AFLP)、随机扩增多态性 DNA (RAPD)、限制性片段长度多态性(RFLP)、简单重复序列(SSR)等方法。其中, AFLP 虽然稳定性和重复性较高, 但技术本身对 DNA 的纯度和内切酶的质量要求严格, 在应用上收到了限制; RAPD 检测受环境条件影响较大且稳定性和重复性欠缺; RFLP 特异性强、准确性高, 但由于应用到探针标记, 价格较高, 难以普及。而 SSR 标记不受环境条件影响, 多态性高, 重复性稳定, 且价格低廉, 操作简便, 同时是共显性标记, 因此已被杂交种纯度鉴定广泛应用。

而基于近年来 GenBank 上公布的常见物种的 EST 序列信息日渐丰富, 且获取简便, 没有任何费用, 因此利用 EST 数据库开发 SSR 引物, 不仅保留了 SSR 标记的所有特点, 而且凸显了其便捷、信息量大、花费低、效率高等优势, 适合于技术的推广和普及。目前 EST-SSR 标记已经应用于水稻、葡萄、小麦、黑麦、大麦和扁桃、玉米、甘蔗等(Cho et al., 2000; Nicot et al., 2004; Thiel et al., 2003; Xu et al., 2004; Cordeiro et al., 2001; 杨春霞等, 2011)植物进行分子连锁图谱构建和遗传多样性分析。因此, EST-SSR 分子标记在蔬菜类作物和其他作物的遗传图谱构建、比较基因作图、物种亲缘关系鉴定、遗传多样性研究、品种鉴定、新基因的发掘等方面有很大的应用潜力(葛佳等, 2005)。

本研究利用 EST-SSR 分子标记技术对大白菜进行种子纯度鉴定, 以 10 份大白菜杂交种及其双亲为试验材料, 用 30 对 EST-SSR 引物进行筛选。通过筛选应用其中 3 对引物可对 10 份大白菜的全部品种进行纯度鉴定, 即在杂交种 F_1 代中均产生与

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

序号 No.	正向引物 Forward primers	反向引物 Reverse primers
1	5'-TTTGTCCCTATTGCTCAGGG-3'	5'-CCGAGAACGTCTTCTCCTTG-3'
9	5'-ACCTTCCGTCTCTGGGTCTT-3'	5'-TTTTGAACGAGGTGGAGGAC-3'
26	5'-ATAACAACAACCTGCCCGAG-3'	5'-GAAGCACAAGAACAGGGCTC-3'

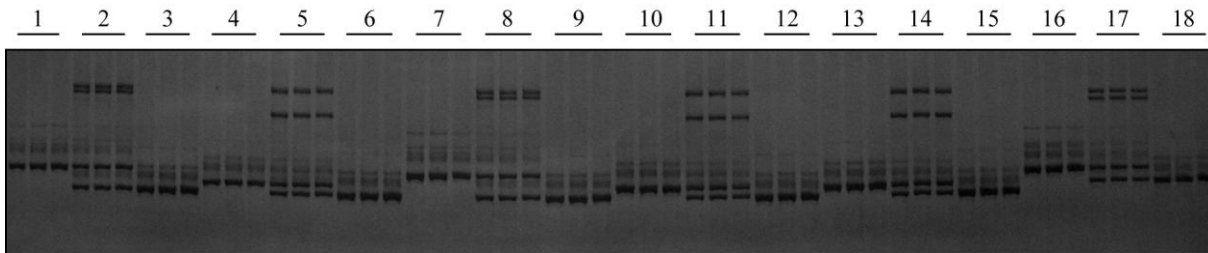


图 2 引物 1 大白菜杂交种纯度鉴定

注: 1 号, 2 号, 3 号, 5 号, 6 号, 9 号品种的大白菜杂交种种子纯度鉴定结果, 1, 2, 3 分别为 1 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 4, 5, 6 分别为 2 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 7, 8, 9 分别为 3 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 10, 11, 12 分别为 5 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 13, 14, 15 分别为 6 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 16, 17, 18 分别为 9 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本

Figure 2 Results of purity identification of Chinese cabbage hybrids by primer No.1

Note: Results of purity identification of Chinese cabbage of No.1, 2, 3, 5, 6, 9 hybrids, 1, 2, 3 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.1 hybrid respectively; 4, 5, 6 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.2 hybrid respectively; 7, 8, 9 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.3 hybrid respectively; 10, 11, 12 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.5 hybrid respectively; 13, 14, 15 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.6 hybrid respectively; 16, 17, 18 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.9 hybrid respectively

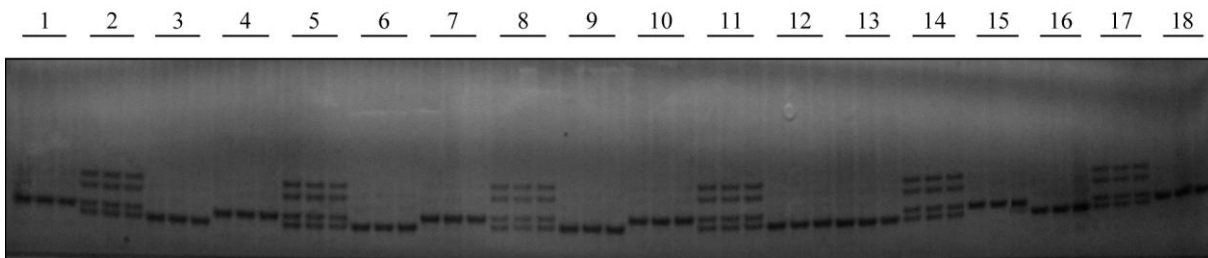


图 3 引物 9 大白菜杂交种纯度鉴定

注: 1 号, 3 号, 4 号, 5 号, 7 号, 8 号品种的大白菜杂交种种子纯度鉴定结果, 1, 2, 3 分别为 1 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 4, 5, 6 分别为 3 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 7, 8, 9 分别为 4 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 10, 11, 12 分别为 5 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 13, 14, 15 分别为 7 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 16, 17, 18 分别为 8 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本

Figure 3 Results of purity identification of Chinese cabbage hybrids by primer No.9

Note: Results of purity identification of Chinese cabbage of No.1, 3, 4, 5, 7, 8 hybrids, 1, 2, 3 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.1 hybrid respectively; 4, 5, 6 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.3 hybrid respectively; 7, 8, 9 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.4 hybrid respectively; 10, 11, 12 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.5 hybrid respectively; 13, 14, 15 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.7 hybrid respectively; 16, 17, 18 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.8 hybrid respectively

父本和母本互补的共显性带型, 并对所筛选引物进行田间验证, 验证结果为大白菜的 EST-SSR 分子标记方法与田间形态观察方法纯度鉴定结果一致, 即所建立的技术可用来鉴定大白菜杂交种的种子纯

度。并且该技术在计算 DNA 提取过程耗时的情况下, PCR 耗时 2 h, EST-SSR 分析 60~90 min, 所以本研究的检测方法在 4 h 之内即可完成种子纯度鉴定工作, 具有快速、低成本、操作方便等优势。

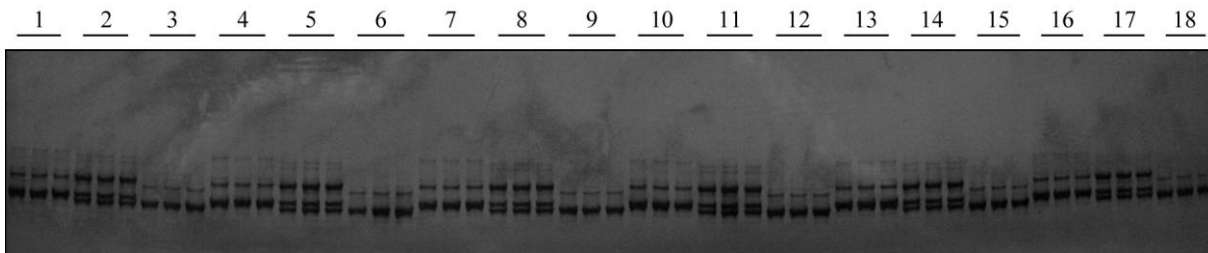


图 4 引物 26 大白菜杂交种纯度鉴定

注: 1 号, 2 号, 3 号, 5 号, 9 号, 10 号品种的大白菜杂交种种子纯度鉴定结果, 1, 2, 3 分别为 1 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 4, 5, 6 分别为 2 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 7, 8, 9 分别为 3 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 10, 11, 12 分别为 5 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 13, 14, 15 分别为 9 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本; 16, 17, 18 分别为 10 号品种大白菜的母本, 杂交种, 父本

Figure 4 Results of purity identification of Chinese Cabbage hybrids by primer No.26

Note: Results of purity identification of Chinese Cabbage of No.1, 2, 3, 5, 9, 10 hybrids, 1, 2, 3 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.1 hybrid respectively; 4, 5, 6 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.2 hybrid respectively; 7, 8, 9 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.3 hybrid respectively; 10, 11, 12 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.5 hybrid respectively; 13, 14, 15 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.9 hybrid respectively; 16, 17, 18 were maternal parent, hybrid, paternal parent of No.10 hybrid respectively

表 2 两种方法纯度鉴定结果

Table 2 Results of two methods for purity identification

杂交种编号 No. of hybrid	EST-SSR 纯度鉴定结果(%) Results of purity by EST-SSR (%)	田间纯度鉴定结果(%) Results of purity with planting (%)
1	100	100
2	98.33	98.33
3	96.67	98.33
4	96.67	98.33
5	100	100
6	100	100
7	93.33	96.67
8	93.33	96.67
9	93.33	96.67
10	96.67	98.33

3 试验材料与方法

3.1 试验材料

以 10 份市售大白菜杂交种及其双亲为试验材料, 由天津科润蔬菜研究所提供, 10 份大白菜杂交种品种名称见表 3。

3.2 试验方法

3.2.1 EST-SSR 引物设计与合成

通过 GenBank 上公布的大白菜 EST 序列信息, 应用 CMD SSR Server (http://www.cottonmarker.org/cgi-bin/cmd_ssr)在线设计软件, 共设计了 30 对核心引物, 引物由上海生工合成。

3.2.2 DNA 提取

利用改良 CTAB 法提取大白菜叶片基因组

DNA (王永等, 2008)。将获得的植物组 DNA 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

3.2.3 引物筛选

以大白菜杂交种及其父本和母本的基因组 DNA 为模板, 分别对 30 对 EST-SSR 引物进行扩增, 扩增产物用 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离、染色, 筛选杂交种带型为父母本互补的引物。

3.2.4 PCR 扩增体系及程序

PCR 扩增反应的总体积为 10 μ L, 扩增反应体系为: 2 \times GoTaq[®] Master Mixes 5 μ L, 上游和下游引物 10 μ mol/L 各 0.25 μ L, 供试品种大白菜基因组 DNA 模板, 浓度 50 ng/ μ L, 1 μ L, 双蒸水补足 10 μ L; PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 35 个扩增循环

表 3 品种名称及编号

Table 3 Cultivars and No. of hybrid

杂交种编号 No. of hybrid	品种名称 Cultivars	杂交种编号 No. of hybrid	品种名称 Cultivars
1	秋绿 75 Qiulv75	6	津白 45 Jinbai45
2	津秋 78 Jinqiu78	7	秋绿 55 Qiulv55
3	秋绿 60 Qiulv60	8	津夏 3 号 Jinxia3
4	耐抽薹型春绿 1 号 Naichoutaixingchunlv1	9	津秀 3 号 Jinxiu3
5	津白 56 Jinbai56	10	珍绿 6 号 Zhenlv6

(94°C 1 min, 53.5°C 45 s, 72°C 45 s); 72°C 延伸 7 min, 4°C 保存。

3.2.5 田间试验验证

对 10 份大白菜杂交种进行田间随机取样, 每个品种的大白菜取单株 60 株, 用筛选出的 3 对 EST-SSR 引物进行纯度鉴定, 鉴定结果与田间形态观察结果对比, 确定所筛选引物的适用性。

作者贡献

赵新、王永和兰青阔是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 朱珠和陈锐完成数据分析; 余景会和李欧静参与实验设计, 试验结果分析; 赵新指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改; 王永是项目的构思者和负责人, 郭永泽是项目的构思者。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由天津市科技支撑项目(10ZCGYNC00400)和天津市应用基础及前沿技术研究计划(10JCYBJC09300)共同资助。作者对天津科润蔬菜研究所在本实验过程中提供的试验材料表示感谢。感谢匿名的同行评审人的评审建议和修改建议。

参考文献

Zhao Z.Q., Sheng X.G., Yu H.F., Wang J.S., Zhang X.H., and Gu H.H., 2011, Hybrid purity identification of a new cauliflower cultivar zhe 801 by SSR marker, *Changjiang Shucai (Journal of Changjiang Vegetables)*, 18: 18-20 (赵振卿, 盛小光, 虞慧芳, 王建升, 张晓辉, 顾宏辉, 2011, 花椰菜新品种浙 801 杂交种纯度的 SSR 鉴定, *长江蔬菜*, 18: 18-20)

Li S.J., 2003, Summariy of identification method on seed purity, *Qinghai Daxue Xuebao (Journal of Qinghai University)*, 21(1): 16-19 (李淑娟, 2003, 种子纯度鉴定方法概述, *青海大学学报*, 21(1):16-19)

Tian L., Cao M.Q., Wang H., Guo J.X., Zhou N.Y., Sun J., and Jia X.H., 2001, Application of AFLP in the identification of Cabbage seed genuineness and purity *Shengwu Jishu Tongbao (Biotechnology Bulletin)*, 3: 38-40 (田雷, 曹鸣庆, 王辉, 郭晶心, 周乃元, 孙江, 贾希海, 2001, AFLP 标记技术在鉴定甘蓝种子真实性及品种纯度中的应用, *生物技术通报*, 3: 38-40)

Zhang H., Yao F.X., Liu Y.J., Wang D.J., Xu J.F., and Li Y.Y., 2010, Genetic diversity among major winter wheat cultivars in Huanghuaihai Area of China revealed by EST-SSR, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 8(2): 297-302 (张晗, 姚凤霞, 刘永杰, 王东建, 许金芳, 李汝玉, 2010, 黄淮海地区主要冬小麦品种的 EST-SSR 遗传多样性分析, *分子植物育种*, 8(2): 297-302)

Cordeiro G.M., Casu R., McIntyre C.L., Manners J.M., and Henry R.J., 2001, Microsatellite markers from sugarcane (*Saccharum* spp.) ESTs cross transferable to erianthus and sorghum, *Plant Sciences*, 160(6): 1115-1123 [http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452\(01\)00365-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0168-9452(01)00365-X)

Cho Y.G., Ishii T., Temnykh S., Chen X., Lipovich L., McCouch S.R., Park W.D., Ayres N., and Cartinhour S., 2000, Diversity of microsatellites derived from genomic libraries and GenBank sequences in rice (*Oryza sativa* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 100(5): 713-722 <http://dx.doi.org/10.1007/s001220051343>

Nicot N., Chiquet V., Gandon B., Amilhat L., Legeai F., Leroy P., Bernard M., and Sourdille P., 2004, Study of simple sequence repeat (SSR) markers from wheat expressed sequence tags (ESTs), *Theor. Appl. Genet.*, 109(4): 800-805 <http://dx.doi.org/10.1007/s00122-004-1685-x> PMID:15146317

Thiel T., Michalek W., Varshney R.K., and Graner A., 2003, Exploiting EST databases for the development and

- characterization of gene-derived SSR-markers in barley (*Hordeum vulgare* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 106(3): 412-422
- Xu Y., Ma R.C., Xie H., Liu J.T., Cao M.Q., 2004, Development of SSR markers for the phylogenetic analysis of almond trees from China and the Mediterranean region, *Genome*, 47(6): 1091-1104 <http://dx.doi.org/10.1139/g04-058> PMID:15644967
- Yang C.X., Wen Q., Ye J.S., and Zhu P.L., 2011, Development of EST-SSR markers in (*Citrus aurantium* L.), *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 9(1): 123-127 (杨春霞, 温强, 叶金山, 朱培林, 2011, 枳壳 EST-SSR 标记的开发, *分子植物育种*, 9(1): 123-127)
- Ge J., Xie H., Cui C.S., Hong J.M., Ma R.C., 2005, Analysis of expressed sequence tags (ESTs) derived SSR markers in Chinese Cabbage (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis*), *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 13(4): 423-428 (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)
- Wang Y., Lan Q.K., Zhang L., Zhao X., Zhu Z., and Cheng Y., 2008, Comparison on effect of improved chelex-100 method and CTAB method for transgenic roundup ready Soybean detection, *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 27(5): 898-901 (王永, 兰青阔, 张莉, 赵新, 朱珠, 程奕, 2008, 改良 Chelex-100 法和 CTAB 法用于转基因抗草甘膦大豆检测效果的比较, *大豆科学*, 27(5): 898-901)