

大白菜高通量 SSR 标记鉴定体系的建立和应用

张 晗, 王东建, 孙加梅, 郑永胜, 姚凤霞, 许金芳, 宋国安, 段丽丽, 李 华, 王雪梅, 李汝玉
(山东省农业科学院作物研究所, 济南 250100)

摘要: 大白菜是重要的蔬菜作物, 准确鉴定大白菜品种对于大白菜种质资源管理、新品种测试、种子质量检测等具有重要意义。本研究从已定位到大白菜 10 个连锁群的 205 个 SSR 标记中, 筛选出 30 个在连锁群上分布均匀、PCR 扩增稳定、带型简单的标记, 用于大白菜品种 DNA 指纹鉴定。对入选的引物用 4 种荧光染料进行了标记, 利用基于毛细管电泳荧光检测的 DNA 分析仪对 SSR 扩增产物进行检测。通过比较分析 2 种不同型号的 3 台 DNA 分析仪的扩增片段检测数据, 明确了不同 DNA 分析仪的检测数据间一般存在明显的系统误差。系统误差的大小取决于引物, 一般在 1~4 bp 之间。使用扩增产物的片段长度对各 SSR 位点的不同等位变异进行命名。通过使用一组参照品种, 消除了不同批次、不同 DNA 分析仪型号间的系统误差, 保证了检测数据的可重复性和可再现性。在此基础上, 对 184 份大白菜品种进行了 DNA 分子数据采集。

关键词: 大白菜; SSR; 品种鉴定; DNA 指纹

Development and Application of a High-throughput Chinese Cabbage DNA Profiling System Based on SSR Markers

ZHANG Han, WANG Dong-jian, SUN Jia-mei, ZHENG Yong-sheng, YAO Feng-xia, XU Jin-fang,
SONG Guo-an, DUAN Li-li, LI Hua, WANG Xue-mei, LI Ru-yu
(Crop Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100)

Abstract: Chinese cabbage is one of the most important vegetables in the world. Identifying and distinguishing Chinese cabbage varieties is critical for management of genetic resources, new variety testing, and seed quality supervision. In this study, we screened from 205 mapped SSR markers for those that amplified stably in PCR reaction and were easily scored and relatively evenly distributed on the ten linkage groups of Chinese cabbage. 30 makers were selected for Chinese cabbage identification and were labeled with four fluorescent dyes and allele sizing were conducted using DNA analyzers based on capillary electrophoresis and fluorescent detection. Allele sizes of same groups of samples determined using three DNA analyzers of two models were compared and analyzed. And it was found that systematic errors often occurred among DNA analyzers. Values of the systematic errors depended on the markers and varied between 1 and 4 bp. Alleles of the SSR loci were named according to the length of the amplified DNA fragment determined by an ABI 3730 XL analyzer. It was proved that systematic errors could be removed by using a group of reference varieties so that repeatability and reproducibility could be ensured for results from different laboratories. Molecular data of 184 Chinese cabbage varieties were collected based on the SSR marker detection system.

Key words: Chinese cabbage; SSRs; variety identification; DNA profiling

大白菜属十字花科芸薹属白菜种的大白菜亚种 (*Brassica rapa* ssp. *Pekinensis*), 是东亚地区最重要的蔬菜作物之一, 在世界其他地区也有栽培^[1]。在大

白菜长期驯化栽培过程中, 形成了丰富的种质资源。而随着现代育种工作的开展, 大白菜品种数量不断增加。准确鉴定大白菜品种对大白菜种质资源管

收稿日期: 2013-09-16 修回日期: 2013-10-15 网络出版日期: 2014-06-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20140609.1432.028.html>

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(200903008)

第一作者研究方向为分子生物学和植物新品种测试。E-mail: peony-han@163.com; 王东建为共同第一作者

通信作者: 李汝玉, 研究方向为分子生物学和植物新品种保护。E-mail: li_ruyu@sina.com

理、新品种测试、种子质量监测具有重要意义。传统的田间种植品种鉴定方法根据表型性状进行品种区分鉴别,不仅鉴定周期长,而且表型性状易受环境因素影响,仅靠表型性状鉴别品种有较大的难度^[2]。

DNA 指纹鉴定可直接检测种质材料间 DNA 水平上的差异,不受环境条件影响,具有快速准确的特点,广泛应用于种质资源管理、品种鉴定、新品种测试和品种权保护、种子纯度检测等领域^[2-13]。SSR 分子标记在基因组中分布广泛、多态性水平高、呈共显性遗传、分析简便,是当前 DNA 指纹鉴定中应用最广泛的分子标记^[14]。近几年,随着白菜基因组测序的开展,大规模开发大白菜 SSR 标记成为可能,已有一大批 SSR 标记定位到大白菜连锁图谱上^[15-16]。

利用 SSR 标记进行白菜品种指纹鉴定的研究报道不多。石磊等^[17]对大白菜 SSR 检测体系进行了优化。王笑一等^[7]利用 5 对 SSR 引物建立了 80 份小白菜品种的指纹图谱。李莉等^[9]利用芸薹属植物数据库中的 EST 序列,开发并筛选出由 3 个引物对组成的 6 套 EST-SSR 复合标记组合,优化了相应的多重 PCR 试验条件,用于白菜和大白菜品种鉴定。李丽等^[8]进一步利用 EST-SSR 标记建立了 168 份大白菜核心种质的指纹模式图。国际植物新品种保护联盟(UPOV)^[14]提出适用于 DNA 指纹数据采集的分子标记技术应满足以下条件:(1)在不同试验室间应有良好的可再现性和重复性;(2)分辨率高;(3)DNA 指纹数据适合构建数据库;(4)分子标记在基因组中的分布已知。

本研究从已定位到大白菜 10 个连锁群的 SSR 引物中,筛选出一批连锁群上分布均匀、PCR 扩增稳定、带型简单的 SSR 引物,利用基于毛细管荧光检测的 DNA 分析仪对 SSR 扩增产物进行检测,使用扩增产物的片段长度对各 SSR 位点的不同等位变异进行命名,通过使用一组参照品种,消除不同批次、不同 DNA 分析仪间可能存在的系统误差,保证了检测数据的可重复性和可再现性。在此基础上,对一批大白菜品种进行了 DNA 分子数据采集。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验材料共 243 份(表 1),其中大白菜自交系 40 份(代号 1~40),从山东省农业科学院蔬菜研究所提供的 157 份自交系中筛选获得。农业部植物新品种测试中心提供的大白菜品种 43 份(代号

c403~c445,主要是获得品种权保护的品种)。近年育成的大白菜品种 160 份,其中 50 份(代号 c301~c350)由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供,其余 110 份(c84~143、c351~c400)来自市场收集。

1.2 DNA 提取

每个品种取 30 株幼苗的幼嫩组织或 30 株成株的叶片混合,在液氮中磨碎,采用 CTAB 法提取基因组 DNA。提取的 DNA 加适量 TE 溶液溶解,利用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.3 SSR 引物

已定位到白菜 10 个连锁群上的 205 个 SSR 位点的引物^[16]。其中 5 对引物来自 A. J. Lowe 等^[18], 9 对引物来自 S. Choi 等^[15], 191 对引物来自 H. Kim 等^[16]。对筛选出的引物分别利用 6-FAM、HEX、ROX 和 TAMRA 等 4 种荧光染料中的一种对 SSR 位点前引物 5' 末端进行标记。引物的合成和标记均由上海生工生物工程技术有限公司完成。

1.4 PCR 反应

PCR 反应体系和热循环程序参考于仁波等^[19]的方法。采用的反应体系如下:12.5 μL 的反应体积,含每种 dNTP 0.25 mmol/L,正向引物、反向引物各 0.4 $\mu\text{mol/L}$,Taq DNA 聚合酶 1.0 U,1 \times PCR 缓冲液(Tris-Hcl zommmol/L, kcl zommmol/L, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10 mmol/L)(不含 Mg^{2+}), MgCl_2 1.5 mmol/L,样品 DNA 10~40 ng。PCR 反应程序为:94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 45 s,65 $^\circ\text{C}$ 退火 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,每循环降 1 $^\circ\text{C}$,共 15 个循环;94 $^\circ\text{C}$ 变性 45 s,50 $^\circ\text{C}$ 退火 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 45 s,共 30 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.5 扩增产物检测

1.5.1 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 PCR 扩增产物中加入 10 μL 加样缓冲液(98% 甲酰胺,pH 8.0,10 mmol/L EDTA,0.25% 溴酚蓝,0.25% 二甲苯青),95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min,冰水上冷却,在 4.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳上电泳 1~1.5 h(60 W 恒功率),银染检测扩增产物。

1.5.2 DNA 分析仪片段分析 将 6-FAM 和 HEX 荧光标记的 PCR 产物用超纯水稀释 30 倍,TAMRA 和 ROX 荧光标记的 PCR 产物稀释 10 倍。分别取等体积的上述 4 种稀释后溶液混合,吸取 1 μL 加入到深孔板孔中。板中各孔另分别加入 0.1 μL LIZ500 分子量内标和 8.9 μL 去离子甲酰胺。将样品 95 $^\circ\text{C}$ 变性 5 min,置于碎冰上,冷却 10 min,放置

表 1 本研究中的大白菜自交系和杂交种

Table 1 Inbred lines and hybrids used in this study

| 代号 ID | 品种 Variety | 代号 ID | 品种 Variety | 代号 ID | 品种 Variety | 代号 ID | 品种 Variety | 代号 ID | 品种 Variety | 代号 ID | 品种 Variety |
|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|----------|---------------|
| 1 | W4-1 | C85 | 改良青杂三号 | C126 | 双抗霸王 | C324 | 春绿 1 号 | C365 | 潍白九号 | C408 | 莱白 38 |
| 2 | W13-8 | C86 | 义和秋 | C127 | 翠绿金刚 | C325 | 龙园红 1 号 | C366 | 四季红运 | C409 | 豫新 1 号 |
| 3 | W28-8 | C87 | 高抗二号 | C128 | 秋玉 78 | C326 | 科萌 45 | C367 | 沂丰桔红心 | C410 | 豫新 1 号 |
| 4 | 695-7 | C88 | 87-114 | C129 | 大白菜 | C327 | 京秋 65 | C368 | 潍白七号 | C411 | 豫新 2 号 |
| 5 | 267-1 | C89 | 胶州大白菜 | C130 | 传祺 | C328 | 京夏王 | C369 | 南阜秋宝大白菜 | C412 | 豫新 3 号 |
| 6 | 金贝-2 | C90 | 北辰清抗 | C131 | 秋珍白三号 | C329 | 科萌夏秋王 | C370 | 西由铁根 | C413 | 春丰 007 |
| 7 | 229-1 | C91 | 城春白菜 | C132 | 早熟 5 号 | C330 | 豫早 1 号 | C371 | 潍白 69 | C414 | 西白 9 号 |
| 8 | W3 | C92 | 秋真白十一号 | C133 | 悦喜 60 白菜 | C331 | 豫新 55 | C372 | 潍白二号 | C415 | 西白 5 号 |
| 9 | 福山包头 | C93 | 秋霸 | C134 | 青研早六号 | C332 | 豫新 60 | 373 | 潍白秋玉 | C416 | 西春白 3 号 |
| 10 | 西 388-1 | C94 | 87-114 | C135 | 青研早九号 | C333 | 东农 907 | C374 | 高抗黄冠 | C417 | 中白 78 号 |
| 11 | 玉青 | C95 | 太空八号 | C136 | 早熟五号 | C334 | 绿星 58 | C375 | 秋抗 2 号 | C418 | 西白 10 号 |
| 12 | Z61-2-3 | C96 | 秋美 | C137 | 喜诺春 | C335 | 东农 905 | C376 | 金来秋白 6 号 | C419 | 莱白一号 |
| 13 | 734-11 | C97 | 真不坏 | C138 | 夏秋 55 | C336 | 中白 61 | C377 | 神狮 70 | C420 | 天正超白二号 |
| 14 | 玲珑-2 | C98 | 改良青杂三号 | C139 | 天正秋白 19 号 | C337 | 绿星 70 | C378 | 晋菜三号 | C421 | 豫新 1 号 |
| 15 | 224-3 | C99 | 中白 76 | C140 | 小杂 56 | C338 | 龙白 7 号 | C379 | 胸阳 78 | C422 | 辽白十号 |
| 16 | 726-2 | C100 | 太空一号 | C141 | 贵龙五号 | C339 | 福田 80 | C380 | 北京新优 3 号 | C423 | 莱 6014 |
| 17 | 南路 1 号 | C101 | 保丰收 | C142 | 青研一号 | C340 | 北京大牛心 | C381 | 金来秋白一号 | C424 | 金华元 19 号 |
| 18 | 659 | C102 | 京益三号 | C143 | 夏优三号 | C341 | 晋白二号 | C382 | 津双 75 | C425 | 天正品优一号 |
| 19 | 126-5 | C103 | 金秋状元大白菜 | C301 | 晋菜二号 | C342 | 豫新 4 号 | C383 | 丰抗 798 | C426 | 金冠 2 号 |
| 20 | 127-1 | C104 | 华夏极品 | C302 | 辽白 12 | C343 | 豫新 6 号 | C384 | 金秋白 78 | C427 | 冠春 |
| 21 | 128-1 | C105 | 精品油绿三 | C303 | 辽白八号 | C344 | 中白 83 | C385 | 鲁白十五号 | C428 | 新早 58 |
| 22 | W34-2 | C106 | 鲁熟 3 号 | C304 | 绿星大棵菜 | C345 | 新二包头 | C386 | 胶白七号 | C429 | 秋玉 78 |
| 23 | W48-3 | C107 | 保时捷白菜 | C305 | 青绿王 | C346 | 精选中白 81 | C387 | 中农新三号 | C430 | 青研四号 |
| 24 | W38-1 | C108 | 领域大白菜 | C306 | 晋菜三号 | C347 | 福尔斯 | C388 | 金来秋白 2 号 | C431 | 丰南 F115-93 |
| 25 | W40-1 | C109 | 抗病将军 | C307 | 新育三号 | C348 | 福尔青 | C389 | 潍白八号 | C432 | 天正春白二号 |
| 26 | W37-1 | C110 | 大江 78 | C308 | 科萌 80 | C349 | 福尔乐 | C390 | 胸阳新三号 | C433 | 热抗 7 号 |
| 27 | W33-2 | C111 | 新北京三号 | C309 | 科萌 90 | C350 | 福尔美 | C391 | 丰抗 80 | C434 | 沈白 GMS01 |
| 28 | W32-5 | C112 | 北京优抗王 | C310 | 新绿 85 | C351 | 热抗白 50 | C392 | 山东四号 | C435 | 中白 62 号 |
| 29 | 141-3 | C113 | 北京抗病三号 | C311 | 新青 | C352 | 新夏阳大白菜 | C393 | 金来新 78 | C436 | 四季翠 |
| 30 | 129-1 | C114 | 金秋 66 | C312 | 科萌新青二号 | C353 | 日本夏抗 555 | C394 | 精品京育 80 | C437 | 秋早 9 号 |
| 31 | 132-1 | C115 | 秦白二号 | C313 | 新绿 2 号 | C354 | 南阜夏秋王大白菜 | C395 | 胶白秋丰 | C438 | 青研春白一号 |
| 32 | W46-6 | C116 | 秋真白六号 | C314 | 中白 76 | C355 | 夏优 168 | C396 | 德高 1 号 | C439 | 浙白 6 号 |
| 33 | 玉青 2 | C117 | 金刚矮大头 | C315 | 津秋 78 | C356 | 金来秋白五号 | C397 | 大青麻叶 | C440 | 秋早 60 |
| 34 | 黄心娃 | C118 | 秦白二号 | C316 | 科萌 75 | C357 | 夏阳 50 | C398 | 潍白四号 | C441 | 郑白 75 |
| 35 | W43-5 | C119 | 义和景品 | C317 | 京翠 70 | C358 | 盛夏 50 | C399 | 丰抗 90 | C442 | 西由铁根 |
| 36 | 145-2 | C120 | 鲁白二号 | C318 | 科萌 60 | C359 | 德高 16 | C400 | 太原二青 | C443 | 珍珠 6 号 |
| 37 | 津绿 2 | C121 | 义和四号 | C319 | 秋绿 60 | C360 | 北京小杂 56 | C403 | 新三号 | C444 | 黔白 4 号 |
| 38 | 144-4 | C122 | 铁将军 | C320 | 京秋 56 | C361 | 秋绿 | C404 | 西白 3 号 | C445 | 天正橘红 62 |
| 39 | 城阳青 | C123 | 高产状元 | C321 | 津白 56 | C362 | 橘红心白菜 | C405 | 西白 4 号 | | |
| 40 | 津绿 3 | C124 | 桔红心白菜 | C322 | 秋绿 55 | C363 | 胶白十号 | C406 | 鲁白 16 号 | | |
| C84 | 胶研 5869 | C125 | 悦喜 70 白菜 | C323 | 津白 45 | C364 | 潍白六号 | C407 | 新乡小包 23 | | |

到 DNA 分析仪上。上机、分析程序设置、电泳等按仪器厂家推荐使用方法进行。使用 GeneMapper 3.2 软件分析扩增片段峰型,读取片段数据。

除使用一台 ABI 3730 XL 对全部样品进行了分析外,为确定 DNA 分析仪间的系统误差,还使用了一台 ABI 3130 XL DNA 分析仪对部分样品的 SSR 扩增产物进行了重复检测,另委托中国农业科学院作物科学研究所使用另一台 ABI 3730 XL 分析仪进

行了同型号不同 DNA 分析仪的重复分析。

1.6 数据分析

应用 PowerMarker 3.25 软件^[20],计算了 SSR 位点的多态性信息量(PIC)。

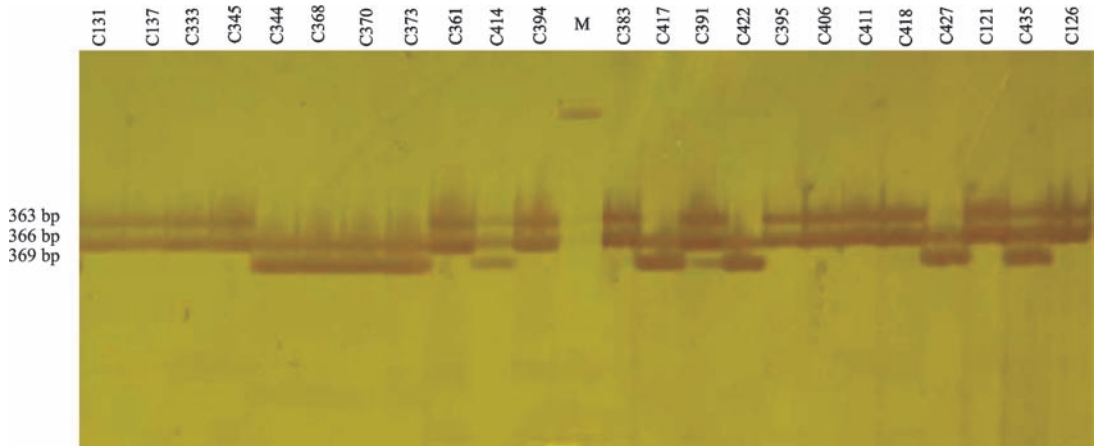
2 结果与分析

2.1 引物筛选

利用 205 对引物对 8 份自交系(代号 1~8)进行

扩增,对扩增产物采用 4.5% 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离及银染检测。73 对引物的扩增产物符合带型简单、多态性、扩增稳定、扩增片段长度在 100 ~ 400 bp 之间的条件。将上述 73 对引物对 48 份杂交种(代号

c351 ~ c398) 进行扩增,对扩增产物进行测序凝胶电泳分离和银染检测,重点对引物的多态性水平进行评价,选择了 51 对引物。图 1 为引物 nia-m035a 对一组大白菜杂交种扩增产物的电泳检测结果。



泳道 M 为 DNA 分子量标准 PBR322/MSP I

Lane M was loaded with PBR322/MSP I

图 1 引物 nia_m035a 在一组大白菜杂交种中检测到的扩增产物多态性

Fig. 1 Band patterns detected in a group of Chinese cabbage hybrids with amplification at locus nia_m035a

利用上述 51 对引物对 157 份大白菜自交系进行扩增,记录每份自交系每个引物位点上的等位变异。针对每个等位变异,选择一份相应自交系。本着使用最少的自交系数量代表最多的等位变异的原则,共选择了 40 份材料(代号 1 ~ 40),代表了 157 份自交系中 51 个引物位点上全部的等位变异。

将 51 对引物中的每一对引物利用 6-FAM、HEX、ROX 和 TAMRA 等 4 种荧光染料中的一种进行了标记。利用 51 对荧光标记引物对上述 40 份自交系和 56 份杂交种(代号 c301 ~ c356) 进行扩增,扩增产物利用 ABI 3730 XL 型 DNA 分析仪进行扩增产物片段

分析。分析每对引物扩增产物的峰型、主峰位置、片段长度数据规律性、杂合位点峰型组成,选择峰型简单、主峰位置在不同大小的扩增片段间保持稳定、片段长度的变化规律与重复单位组成(二碱基或三碱基重复单位)相符、杂合位点的峰型组成易于判读的引物。51 对引物中有 45 对引物符合以上标准。图 2 为一对引物扩增产物的测序仪峰图。

根据入选的 45 对引物位点在连锁群上的位置^[16],选择了在 10 个连锁群上分布相对均匀的 30 个位点的引物。每个连锁群上至少有 2 个标记。入选的 30 对引物的信息见表 2。

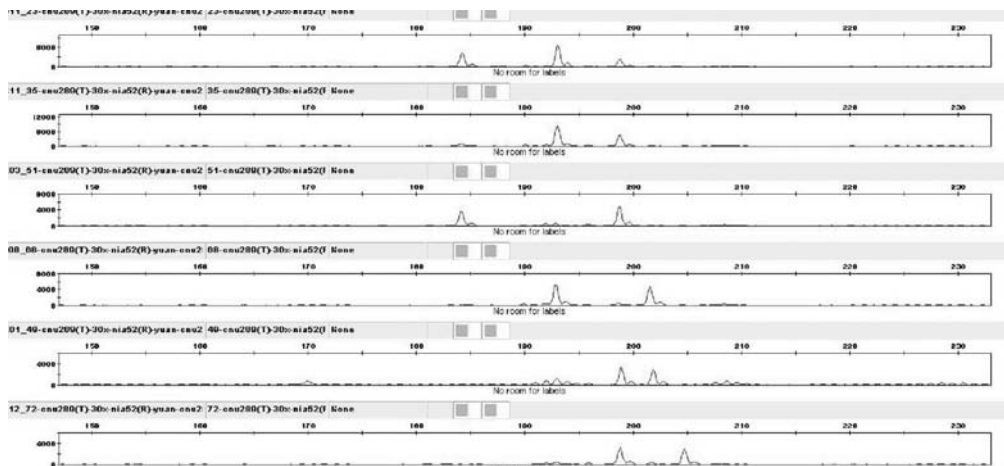


图 2 DNA 分析仪检测到的 cnu-m90a 位点大白菜杂交种的等位变异

Fig. 2 Alleles of six Chinese cabbage varieties at locus cnu_m90a detected with DNA analyzer

表 2 用于大白菜指纹鉴定的 30 个 SSR 标记信息
Table 2 Details of 30 SSR markers selected for Chinese cabbage DNA profiling

| 标记 Marker | 连锁群 Linkage group | 荧光 Fluore- scent dye | PIC | 等位变异(参照品种) Allele (reference variety) | 标记 Marker | 连锁群 Linkage group | 荧光 Fluore- scent dye | PIC | 等位变异(参照品种) Allele (reference variety) |
|--------------|-------------------------|----------------------------|--------|--|--------------|-------------------------|----------------------------|--------|---|
| enu_m139a | A1 | HEX | 0.7885 | 157(W3),161(W13-8),163(W33-2),165(229-1),167(W37-1),174(726-2) | enu_m050a | A6 | ROX | 0.5092 | 146(金贝-2, Jinbei-2), 153(新二包头 Xin' erbaotou), 157(119-1), 159(W38-1), 161(玉青 2 Yuqing 2), 165(津绿 2 Jinlü 2), 173(京夏王 Jingxiawang) |
| nia_m086a | A1 | ROX | 0.3689 | 257(W13-8), 259(W3) | enu_m149a | A6 | HEX | 0.5819 | 157(W13-8), 171(福山包头 Fushanbaotou), 173(W34-2), 177(W28-8), 181(豫新 60 Yuxin 60) |
| nia_m098a | A1 | TAMRA | 0.7293 | 238(金贝-2, Jinbei-2), 250(695-7), 252(734-11), 254(福尔青 Fuering), 258(W3), 260(229-1), 262(中白 83 Zhongbai 83), 264(绿星大棵菜 LÜxingdakecai), 266(W33-2), 268(黄心娃 Huangxinwa), 270(精选中白 81 Jingxuan Zhongbai 81), 272(精选中白 81 Jingxuan Zhongbai 81) | nia_m037a | A6 | 6-FAM | 0.6913 | 297(267-1), 305(南路 1 号 Nanlu 1), 309(W28-8), 311(W13-8), 313(141-3), 315(青绿王 Qinglüwang) |
| nia_m138a | A1 | ROX | 0.7227 | 247(北京大牛心 Beijing Daniuxin), 249(W46-6), 251(金贝-2, Jinbei-2), 253(267-1), 255(津绿 Jinlü), 257(津绿 3 Jinlü 3), 259(西 388-1 X388-1), 261(229-1), 263(W28-8) | nia_m049a | A6 | ROX | 0.7764 | 314(西 388-1 X388-1), 328(267-1), 330(Z61-2-3), 32(726-2), 334(玉青 Yuqing), 338(W28-8), 345(W13-8) |
| enu_m046a | A2 | TAMRA | 0.6791 | 161(玉青 Yuqing), 173(W13-8), 181(267-1), 183(中白 61 Zhongbai 61), 185(W3), 187(229-1) | enu_m182a | A7 | 6-FAM | 0.7941 | 271(W13-8), 274(W3), 277(229-1), 280(黄心娃 Huangxinwa), 283(W28-8), 286(福山包头 Fushan Baotou) |
| nia_m121a | A2 | HEX | 0.6931 | 281(726-2), 284(W28-8), 290(267-1), 296(W13-8) | enu_m295a | A7 | TAMRA | 0.5974 | 192(W13-8), 194(W3), 196(秋绿 55 Qiulü 55), 200(Z61-2-3) |
| enu_m073a | A3 | ROX | 0.7365 | 292(695-7), 294(267-1), 296(西 388-1 X388-1), 298(南路 1 号 Nanlu 1), 305(127-1) | enu_m090a | A8 | 6-FAM | 0.5939 | 184(W13-8), 193(W3), 199(W28-8), 202(玉青 2 Yuqing 2) |
| enu_m288a | A3 | HEX | 0.6073 | 145(W28-8), 147(W13-8), 149(玉青 Yuqing), 151(C76), 153(W3) | enu_m537a | A8 | ROX | 0.7535 | 187(W28-8), 189(W46-6), 191(W4-1), 193(晋白二号 Jinbai 2), 195(267-1), 197(西 388-1 X388-1), 199(W34-2), 201(龙园红 1 号 Longyuanhong 1), 203(W13-8) |
| enu_m316a | A3 | ROX | 0.6849 | 200(W13-8), 203(南路 1 号 Nanlu 1), 211(267-1), 219(W3) | enu_m016a | A9 | TAMRA | 0.7225 | 166(726-2), 168(W28-8), 170(W13-8), 172(福山包头 Fushan Baotou), 174(267-1) |
| enu_m327a | A3 | 6-FAM | 0.7929 | 193(W32-5), 205(W28-8), 209(W13-8), 211(267-1), 213(津秋 78 Jinqiu 78), 215(科萌新青 2 号 Kemeng Xinqing 2), 217(Z61-2-3) | enu_m530a | A9 | HEX | 0.5987 | 283(津绿 2 Jinlü 2), 285(W13-8), 287(W28-8), 291(金贝-2, Jinbei-2) |
| nia_m101a | A3 | 6-FAM | 0.3912 | 270(W13-8), 279(W3) | enu_m534a | A9 | HEX | 0.5727 | 201(金贝-2, Jinbei-2), 204(南路 1 号 Nanlu 1), 207(W13-8) |
| enu_m252a | A4 | TAMRA | 0.5652 | 238(W32-5), 241(W3), 251(W13-8), 254(W28-8) | nia_m022a | A9 | 6-FAM | 0.5909 | 309(659), 316(Z61-2-3), 318(734-11), 325(W13-8) |
| Na10-D09 | A4 | HEX | 0.3899 | 276(W28-8), 282(豫早 1 号 Yuzao 1), 284(玉青 Yuqing), 290(W32-5) | nia_m038a | A9 | ROX | 0.6768 | 321(W13-8), 324(734-11), 333(229-1), 336(W33-2), 342(福尔青 Fu'erqing) |
| enu_m289a | A5 | TAMRA | 0.7957 | 150(津绿 2 Jinlü 2), 178(W37-1), 180(W28-8), 186(W32-5), 188(267-1), 190(玉青 Yuqing), 192(127-1), 194(福山包头 Fushan Baotou) | ENA2 | A10 | TAMRA | 0.6851 | 274(W13-8), 277(W37-1), 280(福山包头 Fushan Baotou), 283(229-1) |
| enu_m442a | A5 | ROX | 0.5427 | 270(W28-8), 280(京秋 56 Jingqiu 56), 282(141-3), 288(229-1) | nia_m035a | A10 | HEX | 0.4926 | 363(金贝-2, Jinbei-2), 366(福山包头 Fushan Baotou), 369(W13-8) |

2.2 等位变异命名和参照品种的确

本研究表明,使用 DNA 分析仪进行片段分析时,同一批次样品相等等位变异间的检测数据误差不得超过 0.40 bp,多在 0.3 bp 以内,远小于同一位点 2 个等位变异之间 2 bp 或 3bp 的最小差异(二核苷

酸或三核苷酸类型重复单位),可以容易区分不同等位变异。同一组样品利用同一型号 DNA 分析仪重复分析,重复间差异一般在 0.3 bp 之内。表 3 为 2 对引物在一组自交系中扩增产物重复分析的结果。2 次重复间存在明显的系统误差,但差值较小。

表 3 2 对引物 DNA 分析仪重复分析结果

Table 3 Allele sizes of two replications for two primer pairs determined using DNA analyzer

| 样品编号 Sample No. | cnu139(H) | | | cnu252(T) | | |
|--------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|-----------------------|-----------------------|------------------|
| | 重复 1 Replication 1 | 重复 2 Replication 2 | 差值 Difference | 重复 1 Replication 1 | 重复 2 Replication 2 | 差值 Difference |
| 2 | 161.38 | 161.21 | 0.17 | 251.29 | 251.27 | 0.02 |
| 3 | 163.17 | 163.05 | 0.12 | 254.12 | 254.23 | -0.11 |
| 5 | 165.34 | 165.28 | 0.06 | 251.21 | 251.30 | -0.09 |
| 6 | 165.46 | 165.31 | 0.15 | 254.19 | 254.32 | -0.13 |
| 7 | 165.44 | 165.19 | 0.25 | 251.11 | 251.37 | -0.26 |
| 9 | 165.49 | 165.31 | 0.18 | 251.24 | 251.29 | -0.05 |
| 10 | 163.14 | 163.03 | 0.11 | 251.29 | 251.37 | -0.08 |
| 11 | 163.24 | 163.02 | 0.22 | 240.98 | 241.19 | -0.21 |
| 13 | 162.97 | 163.05 | -0.08 | 240.81 | 241.01 | -0.30 |
| 15 | 163.09 | 162.85 | 0.24 | 251.14 | 251.28 | -0.14 |
| 16 | 174.34 | 174.25 | 0.09 | 240.85 | 240.94 | -0.19 |
| 18 | 163.17 | 162.93 | 0.14 | 251.20 | 251.32 | -0.20 |
| 19 | 163.07 | 163.07 | 0.00 | 251.11 | 251.30 | -0.19 |
| 20 | 163.17 | 163.06 | 0.11 | 251.08 | 251.27 | -0.19 |
| 21 | 163.27 | 163.15 | 0.12 | 251.20 | 251.29 | -0.09 |
| 22 | 163.16 | 163.05 | 0.11 | 240.98 | 241.00 | -0.02 |
| 23 | 163.07 | 162.96 | 0.11 | 240.91 | 241.05 | -0.14 |
| 25 | 163.10 | 162.86 | 0.15 | 240.73 | 240.92 | -0.19 |
| 26 | 167.28 | 167.07 | 0.21 | 240.78 | 241.00 | -0.22 |
| 27 | 163.09 | 163.08 | 0.01 | 238.01 | 238.19 | -0.18 |
| 28 | 163.09 | 162.98 | 0.11 | 237.98 | 238.11 | -0.13 |
| 29 | 174.38 | 174.25 | 0.14 | 240.91 | 241.01 | -0.20 |
| 30 | 163.05 | 162.94 | 0.11 | 251.20 | 251.24 | -0.04 |

H,T 分别代表 HEX 和 TAMRA

H and T denote HEX and TAMRA, respectively

同一型号不同 DNA 分析仪或不同型号的 DNA 分析仪对同一批样品检测数据间一般存在明显的差异,所有样品间都表现出相同的趋势。表 4 所示为 2 种不同型号的 3 台 DNA 分析仪对同一组样品的分析结果,引物为 cnu_m90a。根据标记 SSR 重复单位的组成对等位变异大小的原始数据进行修正。例如,cnu_m90a 标记不同扩增片段的大小原始数据分别为 184.28 bp、192.96 bp、198.71 bp 和 201.62 bp,其重复单位由 3 个碱基

组成,则该位点 4 个等位变异修正后分别为 184 bp、193 bp、199 bp 和 202 bp。利用修正后的等位变异大小计算出的不同 DNA 分析仪数据间差值的大小对每个样品都是相同的(表 4),因此该差值应视为系统误差。

对于 2 台同型号或不同型号 DNA 分析仪,系统误差的大小因引物而不同,大小在 0~4 bp 之间。表 5 列出了本研究中不同 DNA 分析仪间系统误差在 30 对引物中的分布。

表 4 两种不同型号的 3 台 DNA 分析仪对同一组自交系的分析结果

Table 4 Allele sizes of the same group of inbred lines determined using three DNA analyzers of two models

| 自交系 Inbred lines | 原始数据 Raw measurement | | | 修正值 Adjusted value | | | 原始数据差值 Difference of raw measurements | | | 系统误差 System error | | |
|---------------------|-------------------------|--------|--------|-----------------------|-----|-----|--|---------|---------|----------------------|---------|---------|
| | (1) | (2) | (0) | (1) | (2) | (0) | (1)-(2) | (1)-(0) | (2)-(0) | (1)-(2) | (1)-(0) | (2)-(0) |
| | 1 | 184.28 | 183.94 | 181.63 | 184 | 184 | 182 | 0.34 | 2.65 | 2.31 | 0 | 2 |
| 2 | 184.05 | 183.84 | 181.58 | 184 | 184 | 182 | 0.21 | 2.47 | 2.26 | 0 | 2 | 2 |
| 3 | 198.61 | 198.82 | 196.25 | 199 | 199 | 197 | -0.21 | 2.36 | 2.57 | 0 | 2 | 2 |
| 5 | 184.05 | 183.89 | 181.62 | 184 | 184 | 182 | 0.16 | 2.43 | 2.27 | 0 | 2 | 2 |
| 6 | 192.96 | 192.99 | 190.57 | 193 | 193 | 191 | -0.03 | 2.39 | 2.42 | 0 | 2 | 2 |
| 7 | 184.23 | 183.94 | 181.60 | 184 | 184 | 182 | 0.29 | 2.63 | 2.34 | 0 | 2 | 2 |
| 8 | 193.00 | 193.06 | 190.59 | 193 | 193 | 191 | -0.06 | 2.41 | 2.47 | 0 | 2 | 2 |
| 9 | 184.23 | 184.06 | 181.65 | 184 | 184 | 182 | 0.17 | 2.58 | 2.41 | 0 | 2 | 2 |
| 11 | 198.71 | 198.81 | 196.37 | 199 | 199 | 197 | -0.10 | 2.34 | 2.44 | 0 | 2 | 2 |
| 12 | 192.95 | 192.89 | 190.43 | 193 | 193 | 191 | 0.06 | 2.52 | 2.46 | 0 | 2 | 2 |
| 13 | 198.60 | 198.90 | 196.38 | 199 | 199 | 197 | -0.30 | 2.22 | 2.52 | 0 | 2 | 2 |
| 14 | 192.70 | 192.89 | 190.51 | 193 | 193 | 191 | -0.19 | 2.19 | 2.38 | 0 | 2 | 2 |
| 16 | 184.04 | 183.85 | 181.65 | 184 | 184 | 182 | 0.19 | 2.39 | 2.20 | 0 | 2 | 2 |
| 17 | 198.70 | 198.93 | 196.42 | 199 | 199 | 197 | -0.23 | 2.28 | 2.51 | 0 | 2 | 2 |
| 18 | 193.00 | 192.91 | 190.52 | 193 | 193 | 191 | 0.09 | 2.48 | 2.39 | 0 | 2 | 2 |
| 20 | 184.05 | 183.82 | 181.58 | 184 | 184 | 182 | 0.23 | 2.47 | 2.24 | 0 | 2 | 2 |
| 21 | 184.13 | 183.79 | 181.62 | 184 | 184 | 182 | 0.34 | 2.51 | 2.17 | 0 | 2 | 2 |
| 22 | 198.61 | 198.81 | 196.38 | 199 | 199 | 197 | -0.20 | 2.23 | 2.43 | 0 | 2 | 2 |
| 25 | 192.84 | 192.82 | 190.61 | 193 | 193 | 191 | 0.02 | 2.23 | 2.21 | 0 | 2 | 2 |
| 26 | 198.60 | 198.91 | 196.38 | 199 | 199 | 197 | -0.31 | 2.22 | 2.53 | 0 | 2 | 2 |
| 27 | 198.70 | 198.91 | 196.34 | 199 | 199 | 197 | -0.21 | 2.36 | 2.57 | 0 | 2 | 2 |
| 29 | 198.70 | 199.02 | 196.43 | 199 | 199 | 197 | -0.32 | 2.27 | 2.59 | 0 | 2 | 2 |
| 30 | 183.95 | 183.74 | 181.60 | 184 | 184 | 182 | 0.21 | 2.35 | 2.14 | 0 | 2 | 2 |
| 31 | 193.07 | 192.86 | 190.52 | 193 | 193 | 191 | 0.21 | 2.55 | 2.34 | 0 | 2 | 2 |
| 33 | 201.62 | 201.92 | 199.25 | 202 | 202 | 200 | -0.30 | 2.37 | 2.67 | 0 | 2 | 2 |
| 34 | 192.86 | 192.87 | 190.52 | 193 | 193 | 191 | -0.01 | 2.34 | 2.35 | 0 | 2 | 2 |
| 37 | 192.79 | 192.84 | 190.49 | 193 | 193 | 191 | -0.05 | 2.30 | 2.35 | 0 | 2 | 2 |
| 39 | 192.91 | 192.94 | 190.63 | 193 | 193 | 191 | -0.03 | 2.28 | 2.31 | 0 | 2 | 2 |
| 40 | 198.70 | 199.00 | 196.49 | 199 | 199 | 197 | -0.30 | 2.21 | 2.51 | 0 | 2 | 2 |

(0)、(1)、(2)分别代表 3130(0)、3730xl(1)和 3730XL(2);3130(0)、3730xl(1)和 3730XL(2)分别代表 3 台 DNA 分析仪,下同

(0),(1),and(2)represent the 3130(0),3730xl(1),and 3730XL(2),3130(0),3730xl(1),and 3730XL(2) represent the 3 ABI 3730XL DNA analyzers used in this study. The same as below

为消除同一 DNA 分析仪不同批次样品间或不同 DNA 分析仪(同型号或不同型号)检测数据间的系统误差,根据 30 对荧光引物对 40 份自交系的扩增片段在 3730 XL DNA 分析仪上的分析结果,对 30 个 SSR 位点的等位变异进行了命名,并确定了相应的参照品种。根据 3730XL 型 DNA 分析仪的分析结果,结合 SSR 标记的重复单位组成,对每个等位变异的检测值进行了取整。

在此基础上,对每个引物位点的每个等位变异进行了命名。每个等位变异的命名由“标记名称”和“扩增片段长度”组成,中间由短线连接。例如“cnu_m139a-157”。表 2 列出了 30 个 SSR 位点各等位变异的大小和相应的参照品种。为便于参照品种的繁殖、保存和使用,尽可能用最少数量的参照品种代表尽可能多的等位变异。对于缺少相应自交系的等位变异,选用了杂交种作为参照品种。

表 5 不同 DNA 分析仪间系统误差在 30 对引物中的分布

Table 5 Distribution of system error between DNA analyzers for 30 primer pairs

| 系统误差(bp) System error | 引物数量 No. of primer pairs | | |
|--------------------------|--------------------------|-------------|-------------|
| | (1)与(2) | (1)与(0) | (2)与(0) |
| | (1) and (2) | (1) and (0) | (2) and (0) |
| -1 | 0 | 0 | 1 |
| 0 | 12 | 0 | 5 |
| 1 | 13 | 5 | 10 |
| 2 | 3 | 16 | 12 |
| 3 | 2 | 8 | 2 |
| 4 | 0 | 1 | 0 |
| 合计 Total | 30 | 30 | 30 |

在进行样品等位变异检测时,同时加入几份参照品种。通过计算参照品种本批次分析值修正后与

表 1 中所列等位变异标准值的差值,确定本批次样品分析值系统误差的大小。从本批次样品修正值中减去该系统误差,即可得到校正后的等位变异数据。通过这种方式,保证了 DNA 数据的可重复性和再现性。

2.3 DNA 指纹数据采集

根据上述方法对 184 份大白菜品种进行了 DNA 指纹数据采集。在基因型记录时,纯合位点的

基因型记录为 X/X,杂合位点的基因型记录为 X/Y,其中 X、Y 为该位点上 2 个不同的等位变异片段大小,小片段在前,大片段在后。无效等位变异记录为 0/0。表 6 列出了农业部植物新品种测试中心保存的 41 份大白菜品种的 DNA 指纹数据。限于篇幅,仅列出了 30 个 SSR 位点中 12 个位点的数据。每一品种的数据均来自平行分析的 2 个样品。

表 6 41 份大白菜品种 12 个位点的 DNA 指纹数据

Table 6 DNA profiles of 41 Chinese cabbage varieties

| 代号 ID | cnu139 | nia121 | cnu327 | nia101 | Na10-D09 | cnu50 | nia49 | cnu295 | cnu90 | nia22 | nia38 | nia35 |
|-------|---------|---------|---------|---------|----------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|---------|
| c403 | 157/161 | 281/284 | 193/209 | 270/270 | 284/284 | 156/156 | 328/330 | 192/192 | 184/199 | 309/325 | 336/342 | 363/369 |
| c404 | 161/174 | 281/296 | 209/209 | 270/279 | 284/284 | 146/146 | 328/346 | 192/200 | 184/199 | 325/325 | 321/336 | 369/369 |
| c405 | 161/167 | 287/296 | 215/217 | 270/279 | 276/276 | 146/165 | 330/330 | 192/192 | 193/193 | 316/316 | 336/336 | 363/363 |
| c406 | 161/163 | 281/296 | 209/209 | 270/270 | 284/284 | 146/146 | 312/346 | 192/200 | 184/199 | 325/325 | 321/336 | 366/369 |
| c407 | 163/174 | 290/296 | 209/209 | 270/270 | 284/284 | 146/146 | 328/338 | 192/194 | 193/199 | 309/325 | 321/333 | 366/369 |
| c408 | 157/174 | 281/281 | 205/205 | 270/270 | 282/284 | 152/152 | 328/338 | 192/194 | 184/199 | 316/318 | 324/336 | 363/363 |
| c409 | 157/174 | 281/284 | 193/193 | 270/279 | 284/284 | 146/146 | 312/338 | 194/194 | 193/199 | 316/325 | 321/336 | 363/363 |
| c410 | 157/163 | 284/284 | 193/193 | 270/279 | 284/284 | 146/156 | 312/328 | 194/194 | 193/199 | 325/325 | 321/336 | 363/369 |
| c411 | 163/163 | 281/296 | 193/215 | 270/270 | 276/276 | 156/158 | 312/328 | 194/194 | 193/199 | 318/325 | 342/342 | 366/369 |
| c412 | 161/174 | 284/284 | 209/209 | 270/270 | 284/284 | 146/152 | 312/328 | 194/194 | 193/193 | 309/325 | 321/324 | 369/369 |
| c414 | 167/174 | 284/290 | 217/217 | 270/279 | 284/284 | 165/165 | 328/334 | 192/194 | 199/199 | 316/318 | 321/321 | 363/366 |
| c415 | 161/161 | 296/296 | 225/233 | 270/279 | 276/284 | 146/146 | 330/346 | 192/192 | 184/199 | 316/325 | 321/336 | 363/369 |
| c416 | 157/174 | 281/290 | 217/217 | 270/279 | 276/284 | 156/158 | 328/332 | 200/200 | 184/199 | 325/325 | 336/342 | 363/369 |
| c417 | 161/165 | 290/296 | 209/217 | 279/279 | 276/284 | 146/146 | 328/330 | 192/200 | 199/199 | 316/325 | 336/336 | 363/366 |
| c418 | 157/174 | 281/284 | 193/193 | 270/279 | 284/284 | 146/146 | 312/312 | 192/194 | 193/193 | 318/325 | 321/333 | 366/369 |
| c419 | 167/174 | 281/281 | 241/241 | 270/279 | 276/284 | 146/146 | 338/338 | 192/192 | 193/199 | 316/325 | 324/336 | 363/369 |
| c420 | 165/167 | 281/290 | 209/209 | 270/279 | 284/284 | 146/146 | 312/330 | 200/200 | 193/199 | 325/325 | 324/336 | 363/369 |
| c421 | 157/163 | 284/284 | 193/193 | 270/279 | 282/284 | 146/156 | 328/338 | 194/194 | 193/199 | 318/325 | 321/336 | 363/369 |
| c422 | 157/157 | 281/296 | 193/209 | 270/279 | 284/284 | 156/165 | 328/328 | 192/200 | 184/193 | 309/325 | 321/336 | 363/366 |
| c423 | 165/165 | 290/290 | 209/209 | 270/279 | 276/276 | 146/146 | 338/338 | 200/200 | 199/199 | 325/325 | 324/324 | 363/363 |
| c424 | 157/163 | 281/284 | 193/209 | 270/279 | 276/276 | 146/146 | 312/338 | 194/200 | 193/193 | 316/325 | 321/324 | 363/369 |
| c425 | 161/167 | 281/281 | 241/241 | 270/279 | 276/284 | 146/146 | 328/330 | 192/194 | 193/193 | 309/325 | 321/324 | 363/363 |
| c426 | 157/157 | 296/296 | 213/213 | 274/274 | 284/284 | 146/146 | 330/338 | 200/200 | 184/199 | 309/325 | 321/324 | 363/363 |
| c427 | 157/161 | 284/290 | 213/215 | 270/279 | 284/284 | 158/158 | 312/312 | 192/200 | 184/184 | 325/325 | 324/324 | 363/366 |
| c428 | 157/174 | 281/284 | 193/193 | 270/270 | 284/284 | 146/156 | 312/338 | 192/194 | 193/199 | 316/318 | 324/336 | 363/369 |
| c429 | 157/161 | 281/281 | 193/213 | 270/279 | 284/284 | 146/146 | 328/332 | 192/196 | 193/193 | 309/325 | 321/324 | 363/363 |
| c430 | 161/161 | 284/284 | 211/213 | 279/279 | 284/284 | 156/158 | 312/334 | 192/194 | 193/199 | 318/318 | 321/324 | 369/369 |
| c431 | 161/161 | 281/281 | 213/213 | 270/270 | 284/284 | 146/146 | 332/332 | 196/196 | 201/201 | 325/325 | 324/324 | 363/369 |
| c432 | 161/167 | 281/290 | 193/209 | 270/270 | 284/284 | 156/156 | 330/332 | 192/200 | 184/199 | 316/325 | 321/324 | 363/369 |
| c433 | 157/161 | 284/296 | 217/217 | 279/279 | 276/276 | 146/146 | 330/330 | 200/200 | 193/199 | 316/325 | 324/336 | 363/363 |
| c434 | 174/174 | 284/290 | 217/217 | 279/279 | 284/284 | 165/165 | 328/334 | 192/192 | 199/199 | 316/316 | 321/321 | 363/363 |
| c435 | 161/163 | 281/284 | 209/209 | 270/270 | 284/284 | 165/165 | 328/328 | 192/196 | 184/193 | 309/316 | 321/321 | 363/366 |
| c436 | 157/167 | 281/284 | 205/205 | 270/279 | 276/282 | 146/156 | 312/328 | 194/194 | 184/193 | 325/325 | 321/324 | 363/369 |
| c437 | 157/161 | 284/284 | 193/193 | 270/279 | 284/284 | 158/158 | 312/330 | 194/200 | 184/199 | 318/325 | 324/336 | 363/363 |
| c438 | 165/174 | 281/290 | 205/209 | 279/279 | 276/276 | 146/146 | 330/332 | 192/200 | 193/199 | 316/325 | 333/336 | 363/363 |
| c439 | 157/161 | 281/290 | 209/215 | 279/279 | 276/284 | 146/146 | 328/328 | 194/200 | 199/199 | 318/325 | 321/324 | 363/363 |
| c441 | 167/174 | 296/296 | 209/211 | 270/270 | 284/284 | 146/146 | 312/338 | 194/194 | 184/199 | 318/325 | 321/333 | 363/369 |
| c442 | 161/161 | 281/296 | 217/217 | 270/279 | 276/284 | 146/146 | 312/330 | 192/200 | 199/199 | 316/325 | 336/336 | 363/366 |
| c443 | 157/161 | 281/284 | 193/209 | 270/270 | 284/284 | 156/165 | 328/328 | 192/192 | 184/184 | 309/325 | 336/342 | 363/369 |
| c444 | 157/167 | 284/284 | 209/209 | 279/279 | 276/284 | 146/146 | 330/338 | 192/194 | 199/205 | 318/325 | 336/342 | 363/363 |
| c445 | 163/174 | 281/290 | 209/209 | 270/279 | 276/284 | 146/146 | 312/330 | 194/194 | 184/193 | 309/325 | 336/342 | 369/369 |

3 讨论

与变性聚丙烯酰胺凝胶电泳等普通检测方法相比,DNA 分析仪用于 SSR 标记检测具有通量高、数据准确等优点,但仪器设备一次性投资大,试剂使用成本高。为降低试剂使用费用,本研究采用了 6-FAM、HEX、ROX 和 TAMRA 等 4 种用户定制荧光染料对引物进行标记。本研究使用的基于毛细管电泳荧光检测的 DNA 分析仪,为当前主流的 DNA 片段分析设备,可同时对 4 种荧光标记的 PCR 产物进行检测标记,通过合理搭配同种荧光标记的引物,可以实现对多达十几对荧光引物的 PCR 产物检测^[20],大大提高了指纹数据采集效率,降低了使用成本。

不同 SSR 等位变异之间差别的实质主要是核心序列重复次数不同引起的扩增片段长度的差异,扩增片段长度是最原始的数据。本研究中,根据 DNA 分析仪确定的不同等位变异的片段大小为等位变异命名,不同的等位变异数值代表了扩增片段的长度。采用这种记录方式获得的数据,可以根据研究的需要转化为“1”、“0”格式。同时,对于多态性丰富的 SSR 标记,采用片段长度的等位变异数据格式用于构建数据库时,占据的数据存储空间小,更适合数据的查询、比对等一系列数据库功能的实现。

本研究表明,使用毛细管电泳 DNA 分析仪进行等位变异数据分析时,相同或不同型号 DNA 分析仪存在一定的系统误差,但系统误差的大小在不同等位变异间是一致的,可以按照本研究的等位变异命名,通过使用参照品种去除,从而保证了使用不同 DNA 分析仪获得的等位变异数据的可重复性和不同试验室间检测数据的一致性。

参考文献

- [1] 朱德蔚,王德楦,李锡香. 中国作物及其野生近缘植物 蔬菜作物卷(上)[M]. 北京:中国农业出版社,2008:120-124
- [2] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, et al. The development of

- multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1091-1101
- [3] Roder M S, Wendehake K, Korzun V, et al. Construction and analysis of a microsatellite-based database of European wheat varieties[J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 106: 67-73
- [4] Bernet G P, Bramardi S, Calvache D, et al. Applicability of molecular markers in the context of protection of new varieties of cucumber[J]. *Plant Breeding*, 2003, 122: 146-152
- [5] Singh R K, Sharma R K, Singh A K, et al. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice[J]. *Euphytica*, 2004, 135: 135-143
- [6] 李根英, Susanne D, Marilyn L W, 等. 小麦指纹图谱数据库的建立及 SSR 分子标记试剂盒的研发[J]. *作物学报*, 2006, 32(12): 1771-1778
- [7] 王笑一, 于拴仓, 张凤兰, 等. 小白菜品种的 SSR 指纹图谱及遗传特异性分析[J]. *华北农学报*, 2008, 23(5): 97-103
- [8] 李丽, 何伟明, 马连平, 等. 用 EST-SSR 分子标记技术构建大白菜核心种质及其指纹图谱库[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(1): 76-88
- [9] 李丽, 郑晓鹰. 用于白菜和大白菜品种鉴定的 EST-SSR 复合标记的建立[J]. *园艺学报*, 2009, 36(11): 1627-1634
- [10] 王风格, 赵久然, 易红梅, 等. DNA 指纹技术在玉米品种权保护中的应用[J]. *玉米科学*, 2009, 17(6): 136-139
- [11] 王立新, 常利芳, 李宏博, 等. 小麦区试品系 DUS 测试的分子标记[J]. *作物学报*, 2010, 36(7): 1114-1125
- [12] 盖树鹏, 盖伟玲, 黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(3): 468-472
- [13] 顾爱侠, 赵玉靖, 鄢丽娟, 等. 二倍体大白菜与四倍体结球甘蓝杂种的获得及其 SSR 鉴定与 GISH 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(2): 144-150
- [14] UPOV. Guidelines for DNA-profiling: molecular markers selection and database construction [M]. Geneva: Office of the Union, 2010: 3-4
- [15] Choi S, Teakle G R, Plaha P, et al. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 777-792
- [16] Kim H, Choi S, Bae J, et al. Sequenced BAC anchored reference genetic map that reconciles the ten individual chromosomes of *Brassica rapa*[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 432-447
- [17] 石磊, 李丽, 郑晓鹰. 大白菜 SSR 检测体系的优化[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(1): 110-116
- [18] Lowe A J, Moule C, Trick M, et al. Efficient large-scale development of microsatellites for marker and mapping applications in *Brassica* crop species [J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108: 1103-1112
- [19] 于仁波, 于拴仓, 戚佳妮, 等. 大白菜 SSR 锚定标记分子遗传图谱的构建[J]. *园艺学报*, 2008, 35(10): 1447-1454
- [20] 赵久然, 王风格. 玉米 DNA 指纹鉴定技术研究与应用[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2009: 33-37