

基于 InDels 标记的大白菜育种材料的亲缘关系鉴定

刘栓桃¹, 张志刚¹, 司立英², 王荣花¹, 李巧云¹, 王立华¹,
赵智中¹, 梁水美³, 张全芳³, 步 迅³

(¹ 国家蔬菜改良中心山东分中心/山东省农业科学院蔬菜花卉研究所/山东省设施蔬菜生物学重点实验室, 济南 250100;

² 山东省聊城市东昌府区农业局, 聊城 252000; ³ 山东省农业科学院生物技术研究中心, 济南 250100)

摘要: 采用 86 对 InDels 引物对 105 份大白菜育种材料进行了鉴定, 共得到 189 个多态性位点。每对引物所能检测到的等位基因为 2~4 个, 其中 82.6% 的引物仅能检测到 2 个等位基因位点; 杂合度指数 0~0.1880, 平均为 0.0511; 主要等位基因频率为 0.3277~0.9664, 平均为 0.6638; 每对引物的多态性信息含量为 0.0629~0.6654, 平均为 0.3444。94.2% 的引物杂合度低于 0.1, 表明所选材料纯度较高。采用 NTSYS 软件对供试材料进行 UPGMA 聚类分析, 当相似系数为 0.60 时所有试材料分为合抱型(类群 I)与叠抱型(类群 II)明显的两个类群。叠抱型所在的类群 II 在相似系数 0.63 时又进一步分为 4 个亚群。4 个杂种优势非常明显的叠抱型品种的亲本材料分别处于不同的亚群或同一亚群中的不同分支。对双亲标记检测结果的进一步分析后挖掘了一批适宜 4 个杂交种纯度鉴定的引物, 从中筛选了 3 对适宜 4 个杂交种纯度鉴定的通用引物。研究结果不仅提供了大白菜杂种优势育种的分子证据, 同时也为育种实践中杂交组合的高效选配提供了帮助。

关键词: 大白菜; 育种材料; 亲缘关系; 杂种优势; 插入/缺失标记

Identification of Genetic Relationships of Chinese Cabbage Inbred Lines Using InDels Markers

LIU Shuan-tao¹, ZHANG Zhi-gang¹, SI Li-ying², WANG Rong-hua¹, LI Qiao-yun¹, WANG Li-hua¹,
ZHAO Zhi-zhong¹, LIANG Shui-mei³, ZHANG Quan-fang³, BU Xun³

(¹ Vegetable and Flower Institute of Shandong Academy of Agricultural Sciences/
Shandong Branch of National Center for Vegetables Improvement/Shandong Key
Laboratory for Biology of Greenhouse Vegetables, Ji'nan 250100;

² Shandong Liaocheng Dongchangfu agricultural bureau, Liaocheng 252000

³ Bio-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Ji'nan 250100)

Abstract: To classify the genetic relationships of 105 elite Chinese cabbage breeding lines, 86 pairs of InDel PCR primers were employed. By that, we identified 189 polymorphic sites, with a range of 2 to 4 alleles per primer combination. The major allele frequency ranged from 0.3277 to 0.9664 with a mean of 0.6638. The polymorphic information content (PIC) for each primer ranged from 0.0629 to 0.6654 with the average value of 0.3444. The heterozygosity ranged from 0 to 0.1880 and averaged at 0.0511. The heterozygosity in 94.2% of primer combinations was lower than 0.1, suggesting that the inbred lines were almost pure. The unweighted pair-group method with arithmetic means (UPGMA) were used to classify the genetic relationship of inbred lines. The similarity coefficient among these accessions varied from 0.55 to 0.98, and there lines could be assigned into two groups when the similarity coefficient was 0.60. Most of pairing-type and folded-type accessions were clustered into Group 1 and Group 2, respec-

收稿日期: 2017-12-19 修回日期: 2018-02-01 网络出版日期: 2018-04-24

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180424.1659.004.html>

基金项目: 山东省自然科学基金 (ZR2015YL073); 山东省重点研发社会公益类项目 (2017GNC10124); 山东省农业科学院创新工程项目 (CXGC2016A11); 山东省泰山学者计划 (2016~2020)

第一作者研究方向为大白菜分子遗传学。E-mail: liushuantao870@163.com

通信作者: 赵智中, 研究方向为大白菜遗传育种。E-mail: zhaozhizhong454@163.com

tively. Accessions in Group 2 were further divided into four subgroups when similarity coefficient was 0.63. Four folded-type accessions with known significant heterosis fell into different subgroups or different branches of the same subgroup. Further analysis identified a set of primers suitable for detecting hybrid purity of these four accessions. These results provided not only the molecular evidence for heterosis usage but also the theoretical guidelines for high-efficient hybrid combination test in practical.

Key words: Chinese cabbage; inbred lines; genetic relationship; heterosis; InDels markers

大白菜(*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis* Kitam.) 又称结球白菜, 属于十字花科(Cruciferae)芸薹属(*Brassica* L.), 在世界范围内广泛栽培。根据其结球习性的不同, 大白菜又被分为直筒型、平头型与卵圆型^[1], 根据其叶球抱合形式的不同常分为竖(舒)心型、叠抱型与合抱型^[2]。中国是大白菜主要起源地, 有着丰富的种质资源, 而山东省则是中国大白菜种质资源最丰富的省份之一, 其中沿海地区以合抱类型为主, 鲁东南山区和鲁中南山区以叠抱类型为主^[2]。

自 20 世纪 60 年代以来, 山东省农业科学院蔬菜研究所大白菜课题组在张焕家先生的带领下广泛收集国内各地大白菜种质资源, 尤其系统收集整理和鉴定了山东各地的大白菜品种资源, 为国家种质资源库提供了大量原始材料, 创制了一批优良的自交系。同时在国内率先开展大白菜杂种优势利用的杂交育种新途径及配套技术措施研究, 培育了一大批叠抱类型的大白菜杂交种, 如山东(2、4、5、6、7 号等)系列、鲁白(1、2、3、6 等)系列等, 在全国广泛推广。但是, 随着农业生态环境的恶化、新的病害(如根肿病)不断涌现, 再加之市场对大白菜品种类型的需求呈现个性化、专用化、周年化等趋势, 原有的很多品种越来越难以满足市场的需求, 急需培育适合不同栽培季节(春、夏、秋)、不同消费需求(熟食、腌制、泡菜等)的抗病、优质大白菜新品种。

优良的育种材料是培育新品种的基础, 对育种材料亲缘关系的鉴定可以有效避免近亲材料之间的杂交组合测配、提高组合测配效率, 同时也可以为大白菜杂种优势群划分提供分子证据^[3]。前人对大白菜种质资源亲缘关系、遗传多样性等方面的研究已经有很多报道, 如孟淑春^[4]分别以 26 个形态指标和 6 对 AFLP 引物对 89 份来源各异的大白菜种质进行了亲缘关系鉴定, 将主要参试材料分为台湾种质和大陆种质两个亚群, 同时发现日韩品种属于大陆种质亚群。宋顺华等^[5]利用 16 条 RAPD 引物对 64 份白菜类(包括大白菜、小白菜和芜菁)种质进行

了遗传多样性研究。李国强^[6]对国家种质库中保存的 1691 份大白菜种质进行基于 43 个形态指标的鉴定, 构建了初级核心种质 501 份, 并用 45 对 SSR 引物对初级核心种质进行亲缘关系鉴定, 结合形态指标和分子标记检测结果, 最终确定了 251 份核心种质。这些研究结果对于大白菜种质资源的分类、鉴定和评价有着较好的参考价值, 但由于研究对象都是比较原始的种质资源, 而不是直接用于育种的亲本材料, 所以对指导育种实践还有一定距离。赵美华等^[7]将山西保存的 41 份自交系进行了基于 AFLP 标记的遗传多样性研究, 认为平头型(叠抱型)大白菜遗传多样性最为丰富, 并且发现特殊配合力强、杂交优势明显的材料其遗传距离较远, 该研究结果对指导育种实践有着重要的参考价值。然而, AFLP 标记操作复杂、开发过程比较繁琐且对模板 DNA 的要求较高, 难以普及。随着高通量测序技术成本的降低, 越来越多物种的参考基因组序列予以公开, 大白菜参考基因组序列也已经释放^[8], 基于全基因组重测序技术的新一代分子标记如 InDels 标记、SNP 标记得到普遍应用。尤其是 InDels 标记, 它在基因组中一般呈共显性分布, 且变异在基因组中的位置是清楚的、稳定的, 这是 RAPD、AFLP、SSR 等标记不能比拟的^[9]。董森森^[10]曾利用扩增带型易于判断的 InDels 标记并结合 SSR 标记对 55 份抗根肿病大白菜材料进行了聚类分析, 并发现了与不同抗根肿病类型连锁的标记。

本研究在前期研究的基础上, 从全基因组中筛选出 86 对 InDels 引物对本课题组收集和创制的大白菜育种材料进行了亲缘关系聚类分析, 旨在为大白菜育种材料的鉴定、杂交组合选配以及杂种优势群划分研究提供分子证据和有效的数据, 也可以为育种材料的 DNA 指纹数据库构建、育成品种的纯度和真实性鉴定等方面提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料总计 105 份, 包括合抱春、秋材料 34

份,其中 1 份是大白菜全基因组测序所用的材料即 Chiifu 白菜,由中国农业科学院蔬菜花卉研究所王晓武研究员惠赠;直筒材料 8 份,包括 2 份抗 TuMV 抗源材料即 8407 与 322,为张焕家老师于 20 世纪 80 年代分别收集自内蒙古与河北的地方品种并经自交分离纯化所得,在“七五”期间,经国家科委组织的大白菜抗病育种协作攻关课题组鉴定为高抗病毒,并将其确定为国家级抗源;叠抱夏、秋材料

63 份,均为本课题组从国内引进(凡是引进的材料,都是地方品种引进后自交分离的优良自交系)自交分离或回交转育后创制的育种材料,其中包括 4 对叠抱类品种的亲本材料,这些品种均为本课题组自主培育,分别是山东 7 号、山东 19、牛牌 19、牛早秋 1 号,所有材料信息详见表 1。将供试材料的种子 8~10 粒直播于 10 cm×10 cm 的花盆内,待出苗后取 5~8 棵幼苗的真叶用液氮速冻后-80℃保存备用。

表 1 供试材料详细信息

Table 1 Information of accession

种质编号 Germplasm number	品系名称 Strain name	备注 Note	种质编号 Germplasm number	品系名称 Strain name	备注 Note
R1	06-247	合抱春材料	R32	2015-369-3	高桩叠抱秋材料/引自北京
R2	08-359	叠抱秋材料	R33	2015-363-1	叠抱秋材料
R3	07-373	叠抱秋材料	R34	2017-M2	合抱春材料
R4	13-397	叠抱秋材料	R35	2017-DB1	叠抱秋材料
R5	07-293	叠抱秋材料	R36	2016-ZC39	叠抱秋材料
R6	08-352/8407	直筒秋材料	R37	He102	叠抱秋材料/引自河南
R7	05-46	叠抱秋材料	R38	2017-YM20	叠抱秋材料
R8	09-586	叠抱秋/山东 7 号 P1	R39	2012-YZ6	叠抱秋材料
R9	09-587	叠抱秋/山东 7 号 P2	R40	2015-361	叠抱秋材料/引自陕西
R10	13-351	合抱春材料	R41	2015-355	叠抱秋材料
R11	09-110	合抱春材料	R42	2015-389	叠抱秋材料
R12	08-112	叠抱秋材料	R43	Guan291	叠抱秋材料
R13	Chiifu	合抱材料	R44	2015-374	叠抱秋材料
R14	94610	叠抱秋材料	R45	07-273	叠抱夏、秋材料/引自福建
R15	2017-YM4	叠抱秋/牛 19P1 (R48 转育)	R46	07-274	叠抱夏、秋材料/引自福建
R16	2017-YM5	叠抱秋/牛 19P2	R47	2013-36-1	叠抱秋材料
R17	2017-YM6	叠抱秋/山 19P1	R48	2016-ZC16	叠抱秋材料/引自河南
R18	2017-YM7	叠抱秋/山 19P2	R49	2016-ZC30	叠抱秋材料
R19	2017-YM8	叠抱夏、秋材料	R50	2017-YM58	叠抱秋材料/引自浙江
R20	2015-YZ6	叠抱秋材料	R51	2016-XC29-1	叠抱秋材料
R21	2017-YM63	叠抱夏材料/引自广东	R52	09-574	叠抱秋材料
R22	2017-YM64	叠抱秋材料	R53	2016-XC32-1	叠抱秋材料
R23	2017-M4	叠抱秋材料	R54	2016-XC32-2	叠抱秋材料
R24	2017-F4	叠抱秋材料	R55	2012-DB6-1	叠抱夏材料
R25	2017-M1	合抱秋材料	R56	2014-DB5-31	叠抱夏材料
R26	2017-F1	叠抱秋材料	R57	2015-ZC59	叠抱秋材料
R27	2017-YZ8	合抱秋材料	R58	2015-ZC52	叠抱秋材料
R28	2017-YZ9	叠抱秋材料	R59	2016-72-1	叠抱秋材料/引自湖北
R29	2012-YZ1	叠抱秋/牛早秋 1 号 P1	R60	2016-126-1	叠抱秋材料
R30	2012-YZ2	叠抱秋/牛早秋 1 号 P2	R61	2016-153-1	叠抱材料
R31	2017-YM61	叠抱秋材料	R62	2016-165-2	合抱春材料

表 1(续)

种质编号 Germplasm number	品系名称 Strain name	备注 Note	种质编号 Germplasm number	品系名称 Strain name	备注 Note
R63	2016-256-2	叠抱春、秋材料	R85	2017-YM59	合抱春材料/引自韩国
R64	2016-261-1	叠抱秋材料/引自西藏	R86	2016-XC22	合抱春材料/引自韩国
R65	2016-331-2	叠抱秋材料	R87	2016-XC23	合抱春材料/引自韩国
R66	2016-DB1-11	合抱春材料	R88	2016-XC24	合抱春材料/引自韩国
R67	2016-DB14-3	叠抱夏材料	R89	2016-XC25	合抱春材料/引自韩国
R68	08-73	高合抱秋材料	R90	2016-XC26	合抱春材料/引自韩国
R69	09-552	直筒春材料	R91	2016-129-2	合抱秋材料
R70	07-48	高桩叠抱秋材料/引自北京	R92	2016-133-3	叠抱秋材料
R71	08-354/322	直筒秋材料	R93	2016-138-1	叠抱秋材料
R72	2016-156	直筒秋材料	R94	2016-139-1	合抱春材料
R73	2014-198	直筒秋材料	R95	2016-142-1	合抱春材料
R74	2016-332	直筒秋材料/引自河北	R96	2016-150-3	合抱春材料
R75	2016-315	直筒秋材料	R97	2016-161-2	叠抱秋材料
R76	2015-189	直筒秋材料	R98	2016-171-3	合抱春材料
R77	2015-378	合抱秋材料	R99	2016-175-2	合抱春材料
R78	2015-395	合抱秋材料	R100	2016-185-3	合抱春材料
R79	2015-382	合抱春材料	R101	2016-186-2	合抱秋材料/322 转育
R80	2017-YM3	合抱春材料	R102	2016-189-1	合抱春材料
R81	2017-YM11	合抱春材料	R103	2011-ZC39	叠抱秋材料
R82	2017-YM12	合抱秋材料	R104	2014-249-1	合抱春材料
R83	2017-YM56	合抱春材料/引自日本	R105	2014-251-1	叠抱秋材料
R84	2017-YM57	合抱春材料/引自日本			

1.2 基因组 DNA 提取、引物筛选与合成

DNA 提取参考刘栓桃等^[11]的方法,用 Ultra-Spec 3300pro(GE Healthcare)分光光度计测定 DNA 浓度,将基因组 DNA 浓度稀释至 50 ng/ μ L 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

从前期鉴定的 593 对 InDels 标记中筛选^[12],选择标准是在前期所用材料 06-247 (R1) 与 He102 (R37) 中扩增条带单一且清晰、插入/缺失位于编码区,且基本均匀分布于大白菜 10 条染色体上。共选择这样的 InDels 标记引物 86 对,分别利用 6-FAM、HEX、ROX 和 TAMRA 等 4 种荧光染料中的一种对 InDels 位点的 5'-末端引物进行标记,杂交种纯度鉴定引物不做任何标记。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。

1.3 PCR 扩增及产物检测

毛细管电泳 PCR 反应体系参照张全芳等^[13]的方法,25 μ L 的 PCR 反应体系,包括 10 $\times$ PCR Buffer (含 2 mmol/L Mg^{2+}) 2.5 μ L, 2.5 mmol/L 的 dNTP 2 μ L, 5 μ mol/L 的正、反向引物各 1 μ L, 5U 的 Taq

酶 0.2 μ L, 模板 DNA 2 μ L, ddH₂O 16.3 μ L。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 模板变性 5 min, 1 个循环;95 $^{\circ}$ C 模板变性 1 min, 58 $^{\circ}$ C 与模板靶位点结合 45 s, 72 $^{\circ}$ C 引物延伸 45 s, 共 35 个循环;最后 60 $^{\circ}$ C 延伸 30 min, 16 $^{\circ}$ C 保存。取 20 μ L ROX500 内标加入 980 μ L 去离子甲酰胺内,涡旋混匀,离心,以每孔 10 μ L 分装到新的 96 孔板内,取 1~2 μ L PCR 产物对应地加入各孔中,3000 r/min 离心 1 min;PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min,立即置于冰上。

在 ABI 3730XL DNA 分析仪上电泳:50 cm 毛细管,使用 POP7 液体分离胶,15 kV 预电泳 18 s,待毛细管洗涤完毕后,15 kV 电泳 28 min。使用 DNA Collection Software 软件收集原始数据。

杂交种纯度鉴定 PCR 扩增体系及扩增产物的检测参照张志刚等^[12]的方法。

1.4 数据统计与分析

将原始数据转化为 TXT 格式后直接导入 Powermarker 3.25 软件,对位点杂合度 (heterozygosity)、主要等位基因频率 (major allele frequency)、等位基

因数目 (allele No.)、引物的多态性信息含量 (PIC, polymorphism information content) 进行分析。所有材料的位点杂合率均为手动统计,计算方法为:位点杂合率 = 杂合位点数/检测位点数 $\times 100\%$ ^[14]。将原始数据中某样本在相同迁移率的位置有条带记为“1”,无条带为“0”,建立供试材料的原始数据 0/1 矩阵,再采用 NTSYS PC II -10 软件计算遗传相似系数,并按照不加权成对群算术平均法 (UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic means) 进行聚类分析,绘制树状聚类图。以聚类分析结果为依据,用 Powermaker 3. 25 软件统计不同类群中各等位基因的频率,通过比较类群间等位基因频率差异,筛选用于杂交种纯度和真实性鉴定的引物组合。

2 结果与分析

2.1 位点杂合度分析

86 对引物检测到的等位基因杂合度介于 0 ~ 0. 0504 之间,平均杂合度为 0. 0274。杂合度小于 0. 01 的引物有 14 对,其中包括 8 对杂合度为 0 (即 100% 的材料在该位点纯合) 的引物;杂合度介于 0. 01 ~ 0. 03 和 0. 031 ~ 0. 05 的引物分别有 32 对、37 对。杂合度小于 0. 03 的引物占比达 53. 5%,

杂合度小于 0. 05 的引物占比则高达 96. 5%。仅有 3 对引物的杂合度大于 0. 05,它们是 IDA04061、IDA07092 和 IDA01070。105 份材料中,41 份材料在所有检测位点均为纯合,分别有 42 份材料的位点杂合率介于 0 ~ 2. 75% 之间,15 份材料位点杂合率介于 2. 76% ~ 5. 00% 之间,仅有 7 份材料位点杂合率大于 5. 0%,最大杂合位点率为 7. 0% (即 86 对引物中有 6 对处于杂合状态),是 R104。

2.2 InDels 标记的多态性分析

86 对 InDels 引物从检测的育种材料中共扩增出 189 个多态性位点,平均每对引物可以检测出 2. 1977 个等位基因。事实上,在 86 对引物中,有高达 82. 6% (71 对) 的引物都只扩增出了 2 个多态性位点,15. 1% (13 对) 的引物扩增出了 3 个多态性位点,仅有 2 对引物,即 IDA02060 和 IDA03048,分别扩增出了 4 个多态性位点 (表 2)。检测到两个等位基因的引物其主要等位基因频率 (major allele frequency) 介于 0. 5042 ~ 0. 9664 之间;检测到 3 ~ 4 个等位基因的引物其主要等位基因频率介于 0. 3277 ~ 0. 6923 之间。引物的 PIC 值介于 0. 0629 ~ 0. 6654,最高和最低值相差 10 倍多,平均为 0. 3444。

表 2 86 对 InDels 引物的多态性分析结果

Table 2 The polymorphism among the tested accessions by 86 pairs of InDels primers

标记编号 Marker No.	主要等位 基因频率 Major allele frequency	等位基因 数目 Allele No.	引物 多样性 指数 PIC	引物序列 (正向/反向) Primer sequences (Forward/Reverse)
IDA01042	0. 3950	3. 0000	0. 5861	TCTGTCTCTCCCTTTTCATTCATA/ACGCCTACTCTCTCAAATTCCT
IDA01047	0. 8361	2. 0000	0. 2365	CAAGTCAGTGAACATAAACCGTCAA/GAAACACTTCTTTTCATCGGAGAG
IDA01054	0. 7647	2. 0000	0. 2951	ATGAATCTTGGCAACTCTTGTGTG/ACTCCATCATATTCTCTAGCTGGATC
IDA01070	0. 8376	2. 0000	0. 2350	AGTGGTGATGCTAACGGTATGAA/CGAGGAGGAGTTTGAATGAGGT
IDA01078	0. 6218	2. 0000	0. 3597	TCGTGCTCAGTGATGAAACCG/AAGAAGCGTGATGGACTCTGTCT
IDA01093	0. 9664	2. 0000	0. 0629	CCTTTCCCAAATCTAATAAAAGAGC/ACTTCCAGCACAAGTTCATCATG
IDA01105	0. 8487	2. 0000	0. 2238	CTACGTGAGACTCGGAAAATCGT/GACAGCAAATCCAAGTGCATCAT
IDA02035	0. 6092	3. 0000	0. 4261	TCTCACGTCAATCGAAATTGTTTC/TACTTGGAGGGGTTTTGGGTAT
IDA02042	0. 5294	2. 0000	0. 3741	ATCTGTCTTTGCGTCATCTGTTTC/ATTAATATCGGACTGTGAGTGTGCT
IDA02045	0. 8067	2. 0000	0. 2632	CATGTCATCATACTTCAAGTTCCTT/TCGGTTCGGTGTGAGTTGCG
IDA02049	0. 7437	2. 0000	0. 3086	GCATAAGACCCACACACGAAAAT/AGAAGTGAGCTGCTGGTAAGAGG
IDA02053	0. 6681	2. 0000	0. 3452	CCCAGATAGGGAGAGAATACCG/CATCCTGAGATCAATTGCCAAA
IDA02057	0. 9454	2. 0000	0. 0979	AAAGAAGTGCAGCAAGTTCCTCA/TCCTCTGCTTTTATACCGCAAAG
IDA02060	0. 4790	4. 0000	0. 4989	GGCCGACGCTTTTAACTAG/ACGGTGACCCCTTGTATGTT
IDA02071	0. 6765	2. 0000	0. 3419	TTTCTTTTCGCTCTCAGTTGG/GATTTCATCGGATGTAGTAAACG
IDA02075	0. 6822	2. 0000	0. 3396	TGAATCCGCAGAAACCAACG/GATACTCTCCGGGAAACAACGA
IDA02079	0. 8109	2. 0000	0. 2596	CTAAGCAAAAGCGTTCTATTTC/AGCGAGCTCAGTACGTGTAGATG
IDA02084	0. 7973	2. 0000	0. 2710	TTGGCGTTGATGGTTTAAATG/ACGGATGGTGTATACGAGGTGC
IDA03034	0. 5210	2. 0000	0. 3746	GGTTTGACTGAGACAGAGACTTCG/TTTCCTGACTGAATCGAATCTTCT
IDA03046	0. 5336	2. 0000	0. 3739	TCCTTTTTCACTAGGCTATCTTCG/CTTACAGTAAGCCGAGCTGAGTC

表 2(续)

标记编号 Marker No.	主要等位 基因频率 Major allele frequency	等位基因 数目 Allele No.	引物 多样性 指数 <i>PI</i>	引物序列(正向/反向) Primer sequences(Forward/Reverse)
IDA03048	0.3277	4.0000	0.6654	ATGACTCATATGCCATGCAACAT/ATTAACGCTACTCCGAAGACAAG
IDA03051	0.5720	2.0000	0.3698	CCAAACATGAATCAGTCGCACA/AAATCGCCGAGAAGGTAAATAAAC
IDA03071	0.7479	2.0000	0.3060	ACGAGTACCTTGGTATTGGGATC/CATGCGAGAGAGCAAAGAGATG
IDA03079	0.6059	2.0000	0.3635	CCCTTCCTCATTCACGGATTC/TACTTACTTACACCTGCAACACCAAA
IDA03086	0.8445	2.0000	0.2281	GCCCTCATATACATTACATCACCAC/AGAAAGTTCTGAAGGCGCTTG
IDA03091	0.6975	2.0000	0.3330	TCTTCTTTGGCTTTTCATTCTCTTA/CTTGTATCCTTTTCTCATCCTCTA
IDA03112	0.7269	2.0000	0.3182	TCATGGTTTCTCTAAGCCTGGAC/TCTTGGTGCCTCATATTTGATCTG
IDA04009	0.5672	2.0000	0.3704	CTTGGAATGAACCTGTCGACTAAC/AATCTGAACGCATGTCTTTGG
IDA04034	0.8824	2.0000	0.1861	AGAAAGGGGACTACCAACTATGAGA/GCTTGGTGGTTTGAAAGACATG
IDA04043	0.4464	3.0000	0.5065	TCTCCATCGTTGCGTGAGG/CCGACAATGGCTACTTTCCTAA
IDA04044	0.7017	2.0000	0.3310	GACATGGGTGCTACTGGAGTTG/AAGGATGCTACCGTCTCTGAAC
IDA04051	0.5252	2.0000	0.3744	TACCGTGCAAAGGAGGTGATT/TTGGGGCAAAAGAGAGGAAC
IDA04053	0.4664	3.0000	0.5679	TAGGTATCGATTTGAGTCCCCTT/CGTTATCAACAGATGTTCTGCTTT
IDA04058	0.8613	2.0000	0.2103	TGAGCAAGTTTAACCGATAAACTG/ATTGTGCGAAATGATAGATAGGA- CA
IDA04061	0.7476	2.0000	0.3062	GATTGGTTCAGTTACTCGCCACT/GTAGATACCGCCGCATAGGG
IDA05046	0.8347	2.0000	0.2378	CGGACAACTTTCTTATCTCCACG/CGGTTTCAATTTTTCAGGCTCT
IDA05053	0.5641	2.0000	0.3709	AGAAAAAGGGCAGACCCAGTT/CCGATGACGACGGAATCAG
IDA05058	0.7521	2.0000	0.3034	CTGCTGGGTTCAGAGTGATTT/CATCTCCACCTCCAACCTTAC
IDA05061	0.5556	2.0000	0.3719	GGTCATGTAGGATTTTGGAGTAGC/CACCGAAGCTCAGCAACCT
IDA05069	0.8866	2.0000	0.1809	GACAGTAAACAGCTTCCTTCCACC/TCTAATCGAGCTCCTATGACAAACA
IDA05071	0.8686	2.0000	0.2022	GCTTCCTAGCAAACCCATTT/TTGGAGCAATACAAACCAAGAGC
IDA05074	0.5042	2.0000	0.3750	AAGAATCGCTGGATAGTTGTGT/GTGAAAGTTGGAGAAAATTCAGGA
IDA05081	0.7636	2.0000	0.2958	CTGCTGGGTTCAGAGTGATTT/CATCTCCACCTCCAACCTTAC
IDA06062	0.5603	2.0000	0.3713	GGTCTGACCACCCATCTGATTT/GTCTGCTTGAGGGGTTGTGAA
IDA06077	0.6134	2.0000	0.3618	TCGCGTCTCACCAAACCTGC/AAGATAGTGAGTCCGAAAATGGC
IDA06087	0.4286	3.0000	0.5484	TGCCATAGCCACGACTTGC/CCTTCTTTCTGCGCTGATGTTCT
IDA06091	0.7689	2.0000	0.2922	ATCTGAATGTGAACCTAAACTAGACC/GAATCGGCTGATAATAT- GAACCA
IDA06093	0.6483	2.0000	0.3520	GGATACGAGCCACTATTCAATCTAG/CATCCTCTTCTCATTTGGAATCTC
IDA06097	0.5588	2.0000	0.3715	ACGAGTTTGGTTCTGTTGCTACG/CAAAAGGAGGAGAAATTTGGGATT
IDA07066	0.6345	2.0000	0.3563	TCGTGGGAAAAGAAGAGAGAGC/TCATCACCACCAAGGGACAAGTA
IDA07069	0.5420	2.0000	0.3732	TGGGCTGCGTCTGAACCTCTAA/GCAATGTCTTGCCCTAACAAACAG
IDA07072	0.6923	3.0000	0.3794	TTGAAGTCTCATCCTTCCGTC/TTATGAAGTACCAGAAATTTGTAGG
IDA07078	0.6667	3.0000	0.4070	GACTGATACTGATAAATTAGCCAAGGA/AGAGAAGCAAGAAATAGAG- GTGGG
IDA07081	0.5714	3.0000	0.3980	TCAATGTTTCCAGTAACAAAGGGT/TCCGTTGTGAGTTCCAACTTTC
IDA07085	0.7246	2.0000	0.3195	TTTGAGAGAATGCTGGAGGAGG/AAATCAGTGAAGCCCGGTTA
IDA07092	0.5588	2.0000	0.3715	TAAGTTTTCAGTTGAAACTGGCAAA/TTTTCTGTATCTTCTTGGATGTCGA
IDA07098	0.4661	3.0000	0.5681	AATCGAAAAGAAACAAGAAGAGG/TGGCTGCTAAAGTTGAAGGAGAG
IDA07102	0.7647	2.0000	0.2951	AGATTAGCATCGCTTGATGATGTAC/GGCAACCTGTCTCGTCTGATA
IDA07105	0.6681	2.0000	0.3452	TTGTTATGCCCGTGTGTAGG/GACGAACTAACAGCTTTCTCCA
IDA08007	0.5420	2.0000	0.3732	TGCGTGAGATGGTCTTTTGGTA/CGGCTCTCTTTTCAGGGATA
IDA08012	0.6581	2.0000	0.3487	CTGGTTTAGGAAAAGAAGAAAGCA/GGACAAGAATGGACTGTT- GAAAAA
IDA08015	0.3590	3.0000	0.5897	CATTCTGAAAAATGGGAATTGC/AGTCATCTCCATCGTCTTGCTCT
IDA08019	0.6807	3.0000	0.3598	ACCTTTCCGCTCCTTCCCTA/TCGCTTGTGCGCGAGTTTAC
IDA08025	0.5924	3.0000	0.5042	TGGCGTCCAACAGCAGAGA/CTAGTCCGAGAGGAGATTGAGA
IDA08029	0.6652	2.0000	0.3462	GAGCCAGTTAAATCTCGACCCT/TTCCATTTTCTCCACATGCTC
IDA08033	0.6709	2.0000	0.3441	ACACTTACGGAAGGCTGATTGG/CGTCTCCTTCCCTCTGTTAC
IDA08040	0.7773	2.0000	0.2863	TCGTTGTGCTTAAACCTTACC/GCATCAGATTCATCAAATCGTGT
IDA09022	0.9068	2.0000	0.1548	AGAAGGGTGACATAGCAATCTGG/TTGATACTTTGGGGAATGGAGTT
IDA09080	0.5588	2.0000	0.3715	GTTAAGCCAACACGCACCG/TCAATAAGAGGAAGCGTCCAAGA
IDA09083	0.4496	3.0000	0.5712	ATTGGAGGATCAATGCTGGAG/TTGAGTTGAAACAAGAACTCTGTCC

表 2 (续)

标记编号 Marker No.	主要等位 基因频率 Major allele frequency	等位基因 数目 Allele No.	引物 多样性 指数 <i>PIC</i>	引物序列(正向/反向) Primer sequences(Forward/Reverse)
IDA09087	0.6607	2.0000	0.3478	GCGGGAGACGTAGGGAAAGA/ATCACACCATCCATGATATGAACC
IDA09089	0.8487	2.0000	0.2238	TCTTTGACTGGAAGTTGCCTGAT/CCATTTTTTGCCAGAGAGTGTATT
IDA09097	0.6471	2.0000	0.3524	CCCGCAGATGCTAGTTCCTC/TCCTCCTTCTGTAAATCCAAAACA
IDA09100	0.7143	2.0000	0.3249	AGGTGACAAATTACCAGTGGGTG/TGTTGCTTCCAGTAATCTGCCAT
IDA09112	0.5336	2.0000	0.3739	CTTTGGGTTTATGAACTCACTTATCC/AGCTGAGGGTGCAAGAGCAA
IDA09113	0.5714	2.0000	0.3698	AACTCCCATTTCAAACACAAACCC/ATGGCTTGAGAGCATCTGACTTG
IDA09115	0.5577	2.0000	0.3716	ATCAGCGAACGGCTTCAAGTT/CCTGGCTATGAGGTGTGTGGTAT
IDA10036	0.8319	2.0000	0.2405	CATGAATCTCTTTGTTGATCTCAGG/TCAGTAATTTTAAGGCCAATGCTTA
IDA10041	0.5420	2.0000	0.3732	CTTATTTATCTCTCTGCCCAACA/AAATTCGGAAACATACCAAGC
IDA10050	0.6483	2.0000	0.3520	ATCGGAGTCTAGCATGTTCTGA/CAATCTCCCCCATCCCTAC
IDA10053	0.8151	2.0000	0.2560	TCGGACATATTGGAGTAGTGAAGC/GAGGGTGAAGACGACTGAGAAAG
IDA10055	0.7857	2.0000	0.2800	TCTCTGTAGTAACGTGGCAAGTTAGA/CTCATATTCTATACATACTTGT- GACGCA
IDA10068	0.6050	2.0000	0.3637	GCAAAAGCTCAAAGACAATACAAGC/CATGGAACCATTTTCTCGCACA
IDA10076	0.7941	2.0000	0.2735	TAGGATCTAATGGATCATAAGCAGC/TTAAAGAACCGTATCAAGAAC- CAAG
IDA10079	0.6849	2.0000	0.3385	ACCAGCAGAATCAGAGGTAAGCC/TGAAACCCTATCCGTGGAAGATAT
IDA10083	0.5924	2.0000	0.3663	ATGCTCTGCTGATTATGATGAACG/GTGAAGCAGCAAGAAAGGC

ID 表示标记的类型是 InDels,紧接着 3 个字符表示染色体来源,如 A01 表示来源于染色体 A01,最后 3 位数是引物的序号,按合成先后 ID means Insertions and Deletions mutation,then it was succeeded by three character,which means chromosome No. The last three number means the numeral order of primers which was given according to synthetic order

2.3 育种材料的亲缘关系聚类分析

105 份种质的 UPGMA 聚类结果如图 1 所示,这些材料之间的相似系数介于 0.55~0.98 之间。当相似系数在 0.60 时,所有种质分为两个主要的类群,类群 I 包含 27 份种质,其中大部分都是合抱类型的育种材料(表 1),类群 II 包含 78 份种质,包含了绝大部分叠抱和直筒类型的育种材料,还有少量合抱类型的材料(表 1)。类群 II 在相似系数为 0.63 时又进一步分为多个亚类,即亚群 II-1、II-2、II-3 和其他(图 1)。其中亚群 II-1 和 II-2 分别包含 38 和 16 份种质,基本都是叠抱类型的材料,由于牛牌 19 和山东 19 的两个亲本(R16、R17 与 R15、R18)分别在亚群 II-1 的两个相对较远的分支上,因此进一步将亚群 II-1 分为 II-1a 与 II-1b。亚群 II-3 与其他亚群共包含 24 份种质,这些材料的抱合类型不典型,既有直筒类型的材料如典型的直筒抗原材料 8407(R6)和 322(R71)等,也有少数叠抱与合抱类型的育种材料。山东 7 号的两个亲本分别属于亚群 II-2 和 II-3,牛早秋 1 号的两个亲本(R29 与 R30)则分别属于类群 II 中的 II-1b 和其他亚群,亲缘关系更远。

2.4 杂交种纯度鉴定的引物筛选

以牛牌 19、山东 19、山东 7 号、牛早秋 1 号双亲的检测结果为依据,从中选择双亲等位基因扩增结果有差异的引物,确定为适宜上述品种纯度和真实性鉴定的引物,结果见表 3。在 86 对 InDels 引物中,可用于鉴定杂交种纯度和真实性的引物基本遍布全基因组,其中可用于鉴定牛早秋 1 号的引物最多,有 40 对,而用于鉴定山东 7 号的引物最少,仅有 25 对。通过进一步比较,从中筛选出 3 对适合 4 个品种纯度鉴定的通用引物,分别是 IDA02053、IDA07098 和 IDA10079,这 3 对引物对 4 个品种的鉴定结果见图 2。同时也筛选出了各品种特有的引物,山东 19 特征引物 4 对(IDA02084、IDA05061、IDA07072、IDA09097),牛牌 19 特征引物 4 对(IDA03071、IDA07085、IDA09113、IDA10050),山东 7 号特征引物 6 对(IDA01047、IDA02079、IDA04044、IDA04061、IDA07066、IDA08007),牛早秋 1 号特征引物 8 对(IDA01093、IDA02057、IDA02071、IDA02075、IDA03079、IDA04053、IDA09100、IDA09112)。

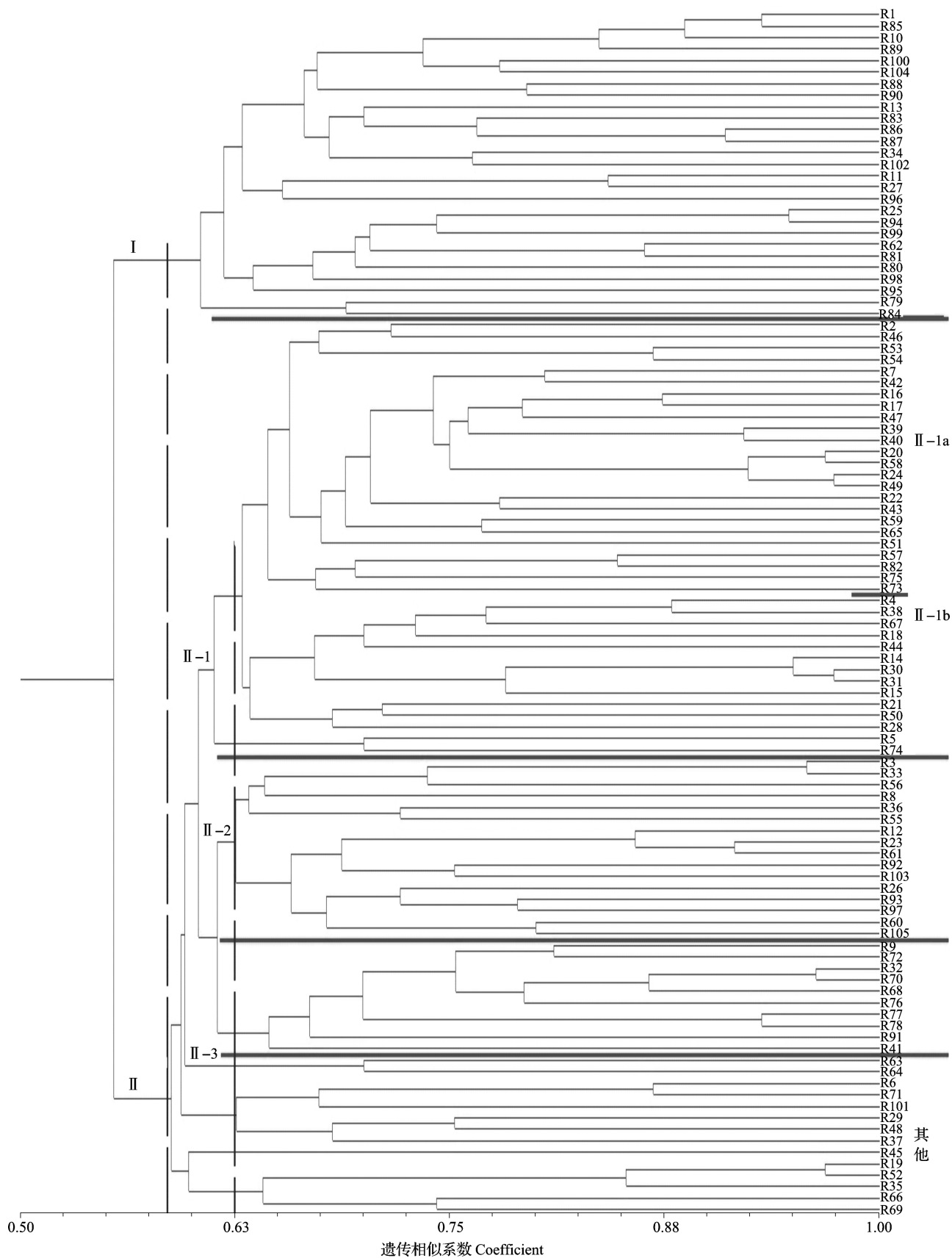


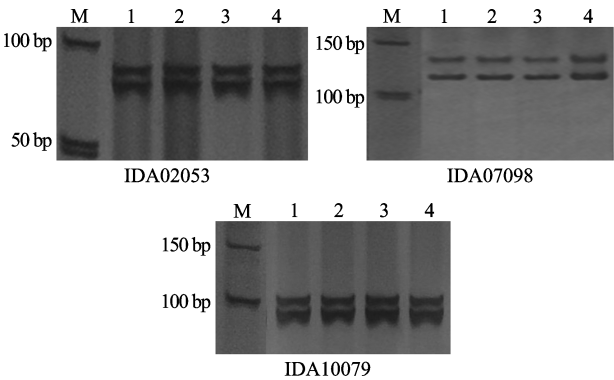
图1 105份育种材料的聚类结果

Fig.1 Cluster dendrogram of 105 Chinese cabbage breeding materials

表 3 适宜叠抱类大白菜杂交种纯度鉴定的 InDel 引物清单

Table 3 Primers suitable forpurity detection of folded-type Chinese cabbage hybrid verities

品种名称 Hybrid name	杂种鉴定引物数 Primer number for hybrid identification	备注 Note
山东 19	31	IDA01042、IDA02042、IDA02053、IDA02084、IDA03046、IDA03048、IDA03091、IDA04009、IDA04051、 IDA04058、IDA05058、IDA05061、IDA05074、IDA06087、IDA07069、IDA07072、IDA07078、IDA07092、 IDA07098、IDA07105、IDA08012、IDA08019、IDA08025、IDA08029、IDA08033、IDA09087、IDA09097、 IDA10041、IDA10053、IDA10076、IDA10079
牛牌 19	36	IDA01042、IDA02042、IDA02053、IDA02060、IDA03046、IDA03048、IDA03051、IDA03071、IDA03091、 IDA03112、IDA04009、IDA04051、IDA04058、IDA05058、IDA06087、IDA06091、IDA06093、IDA07069、 IDA07081、IDA07085、IDA07092、IDA07098、IDA07105、IDA08012、IDA08019、IDA08029、IDA08033、 IDA09080、IDA09083、IDA09113、IDA10036、IDA10041、IDA10050、IDA10053、IDA10068、IDA10079
山东 7 号	25	IDA01047、IDA02035、IDA02049、IDA02053、IDA02079、IDA04009、IDA04044、IDA04061、IDA05053、 IDA05074、IDA06077、IDA06091、IDA07066、IDA07078、IDA07092、IDA07098、IDA08007、IDA08015、 IDA09080、IDA09089、IDA10036、IDA10068、IDA10079、IDA10083、IDA02060
牛早秋 1 号	40	IDA01093、IDA02035、IDA02042、IDA02049、IDA02053、IDA02057、IDA02060、IDA02071、IDA02075、 IDA03051、IDA03079、IDA03112、IDA04051、IDA04053、IDA05053、IDA05061、IDA05074、IDA06077、 IDA06091、IDA06093、IDA07069、IDA07078、IDA07081、IDA07092、IDA07098、IDA08012、IDA08015、 IDA08019、IDA08025、IDA08029、IDA08033、IDA09083、IDA09087、IDA09100、IDA09112、IDA10036、 IDA10041、IDA10076、IDA10079、IDA10083



M: DNA 分子量标准 50 bp ladder;1~4 代表 4 个杂交种,
依次是山东 19、牛牌 19、山东 7 号以及牛早秋 1 号

M: DNA molecular marker 50 bp ladder,1-4 represent 4 hybrids,
they are Shandong No. 19, Niupai No. 19,
Shandong No. 7 and Niuzaoqiu No. 1 successively

图 2 杂交种纯度鉴定通用引物在 4 个
叠抱型品种中的扩增结果

Fig. 2 PCR amplification by common primers used for
hybrid purity identification

3 讨论

大白菜是常异花授粉植物,杂种优势比较明显,目前市场上销售的大白菜品种基本上都是杂交种。然而关于大白菜杂种优势机理的研究比较欠缺,导致近些年基于二环系选种法选育的大白菜育种材料之间亲缘关系趋同,杂交组合的优势不明显,使得突破性杂交种的培育出现瓶颈效应。为了研究大白菜

杂种优势机理、构建杂种优势群,首先有必要对亲本材料的亲缘关系进行精准鉴定,而基于分子标记的种质资源亲缘关系鉴定不受环境等因素的影响,结果更可靠,技术也非常成熟。如研究者采用 SRAP、SSR、AFLP 等传统标记分别构建了薏苡^[15]、黔东南香禾糯^[16]、药用野生稻^[17]、茶树^[18]、3 年桐^[19]等植物资源的 DNA 指纹图谱,对相应物种的种质资源保护和创新奠定了基础。InDels 标记是随着高通量测序技术的普及而出现的一种基于全基因组重测序数据而开发的新型标记,其优点是特定 InDels 标记在基因组中的位置是清楚的,且一般呈共显性存在。如果是基于功能基因编码区的插入/缺失突变而开发的 InDels 标记,则突变有可能对应于农艺性状的差异,为后续农艺性状的 QTL 定位、功能基因验证等研究提供参考。本研究采用了基于全基因组重测序技术而开发的 InDels 标记鉴定大白菜育种材料的亲缘关系,InDels 在大白菜种质鉴定方面的相关研究国内报道较少。董森森^[10]曾利用扩增带型易于判断的 InDels 标记并结合 SSR 标记对 55 份抗根肿病大白菜材料进行了聚类分析,其目的是用于开发与不同抗根肿病类型连锁的标记,并未用于杂种优势预测。本研究从 593 对^[12] InDel 标记中,精选了 86 对分布于全基因组的 InDels 引物对 105 份育种材料进行了检测。对引物的杂合度进行了详细分析,因为引物的杂合度(heterozygosity)检测结果可

以从侧面反映供试材料整体的纯合程度,对典型的共显性标记而言,杂合度数值越小,表明该位点在所检测的群体中纯合度越高。从本研究检测结果看,引物的平均杂合度仅为 0.0274,仅有 3 对引物的杂合度检测值大于 0.05。从材料在所有检测位点的杂合率看,有 42 份材料在 86 个基因位点均为纯合状态,93.3% 的材料位点杂合率低于 2.75%,相当于自交 6 代以上或回交 4 代再自交 1~2 代的情况,仅有 7 份材料的位点杂合率大于 5% 且最大杂合率仅有 7.00%,即使这些杂合程度较高的材料也大约相当于自交 5 代或回交 4 代的基因纯合情况^[20-21]。由此可见所选材料都是比较纯的自交系或育种材料。

从引物的多态性分析结果看,82.6% 的 InDels 引物仅能产生 2 个等位基因位点,这与前人的研究结果一致。如朱东旭等^[22]在利用 InDels 标记构建结球甘蓝连锁群、魏利斌等^[23]利用 InDels 标记研究芝麻的遗传多样性时,均发现 InDels 标记检测到 2 个等位基因的频率最高,前者在甘蓝中发现 2 个等位基因的频率为 44.41%,而后者在芝麻中开发的 39 对 InDels 引物中只有 1 对引物检测出了 3 个等位基因,其余都只能检测出 2 个等位基因。究其原因,这与 InDels 标记的开发特点有直接的关系。由于 InDels 标记开发完全基于全基因组重测序发现的序列差异,与其他分子标记相比,基因组同一位点发生不同长度大小的 InDel 突变的几率较小,所以开发过程中多型位点较少^[9]。这一点与 SSR 标记形成鲜明的对比。在重测序技术普及之前,广泛使用的 SSR 引物在一定数量的物种群体内产生的多态性位点远大于 2,如李国强^[6]和杨金雪^[24]用 SSR 标记检测大白菜种质资源,平均每对引物分别可以产生 5.16 个和 4 个多态性条带,显著大于本研究中的 2.1977;最多的则分别有 12 个^[6]和 10 个^[24],显著高于本研究的 4 个。其他物种如花生^[25]、棉花^[26]、玉米^[27]等的 SSR 引物所能扩增出的等位基因数目也都远大于 2。InDels 标记准确性高、变异稳定,避免了由于特异性和复杂性导致的后续分析模糊。尤其当用 InDels 标记鉴定农作物育种材料或杂交种时,其优点更为突出,如果在精确筛选的基础上全部选用仅能检测出 2 个等位基因的 InDels 标记构建种质的 DNA 指纹,则只需要 2 份材料作为标准或对照,就能实现对物种的鉴定,而 SSR 引物在构建农作物种质或品种的 DNA 指纹时,往往需要多个标准或对照材料^[28]。

本研究多态性引物的来源是 06-247 (R1) 与 He102 (R37) 的全基因组测序数据,其中 06-247 是日本春白菜品种健春的自交后代,为合抱型,He102 是叠抱类型的河南地方品种河南二包头的自交后代。所选的其他 103 份育种材料中大部分是叠抱类型,因为山东地区叠抱类型种质资源比较丰富^[2]。另外为了满足市场需求,近些年利用引进的日韩春白菜品种,通过回交转育也创制了部分耐抽薹合抱类型的春、秋白菜材料。从聚类结果看(图 1),R1 (06-247) 与 R37 (He102) 位于聚类树的两端,亲缘关系几乎最远,符合理论预期。整体上看,大部分合抱类型的材料单独聚为一类即类群 I,而大部分叠抱类型的材料也聚在了一起即类群 II。这与孟淑春等^[3]采用 AFLP 的研究结果基本一致,可见大白菜的球顶抱合状态在大白菜分类中的确占据重要的地位。由于本研究所选的直筒型材料较少,它们并没有形成一个单独的类群,而是在类群 II 的不同分支中散在分布,如 R73、R74、R75 在亚群 II-1, R72 和 R76 在亚群 II-3, R6 和 R71 在其他亚群,主要原因在于我们将其作为优良性状的供体材料。值得提及的是亚群 II-3,其中有直筒材料(R72、R76)、高桩叠抱材料(R9、R32、R68、R41),还有合抱材料(R77、R78、R91)。其中的叠抱与合抱材料大部分来自市售 F₁ 品种的自交分离后代,是基于二环系选种模式产生的材料,系谱关系混杂,另外也从侧面反映出基于形态观察和田间经验对育种材料的分类其准确性有待提高。本研究基于 InDels 标记对育种材料的聚类分析,有助于从分子水平实现育种材料的精准鉴定。

本研究鉴定育种材料亲缘关系的主要目的在于探索大白菜杂种优势群划分模式,为杂交组合选配提供一定的依据。因此在材料的选择上特意选择了几组已经获得品种审定并大面积推广的叠抱类杂交种的双亲。从聚类结果看,这几组杂交种双亲分别被聚在叠抱类群中亲缘关系较远的不同分支上,这为下一步开展杂种优势群划分的机理研究以及构建大白菜杂种优势群提供了参考,同时本研究结果也为利用这些材料配制杂交组合提供了重要依据,如基于山东 19 和牛牌 19 双亲的聚类结果可以在 II-1a 与 II-1b 之间进行杂交组合双亲的选择,基于山东 7 号与牛早秋 1 号双亲的聚类结果可以在亚群 II-2 与 II-3 之间以及 II-1b 与其他亚群之间进行组合测配。同时通过尝试其他不同组合如 II-1a 与 II-2、II-1b 与 II-2、II-1a 与 II-3、II-1b 与 II-3 等多种

亚群之间的组合测配及田间表现,通过研究杂交组合的优势表现,进一步明确杂种优势群划分的标准,以提高优良杂交组合测配的效率。

大白菜是杂种优势明显的蔬菜植物,市场销售的大白菜多是杂交种,种子纯度是种子质量的重要指标,杨晓芸等^[29]利用 SSR 分子标记技术构建了青研系列 7 份大白菜杂交种及其 11 个亲本的 DNA 指纹图谱,得到了良好的效果。本研究通过分析 4 个杂交种的双亲标记检测结果,筛选出了双亲间具有多态性的引物组合,可以作为相应杂交种纯度鉴定的备选标记。目前常用的杂交种纯度鉴定主要依赖田间种植观察,即新收获的种子需要等待 1 年的田间种植试验第 2 年才能销售,这不仅增加了田间鉴定的成本而且也增加了种子的仓储成本。如果采用分子标记鉴定种子纯度,则当年收获的种子可以当年鉴定当年销售,大大节约了成本、提高了效率。本研究筛选出了适合杂交种纯度鉴定的通用引物,无形中也节约了引物的合成成本,有利于室内鉴定的高通量操作。至于种子的真实性鉴定,可以选择各品种的特征引物再结合筛选到的位于基因组其他位点的引物一起进行,必要时还需要开发新的特征引物。

参考文献

- [1] 李家文. 大白菜的分类学与杂交育种. 天津农业科学, 1980, 7(2): 1-9
- [2] 谭其猛. 试论大白菜品种的起源、分布和演化. 中国农业科学, 1979, 12(4): 68-75
- [3] 孟淑春, 刘玉梅, 郑晓鹰, 王永健. 大白菜亲缘关系研究. 中国农学通报, 2008, 24(7): 307-313
- [4] 孟淑春. 大白菜种质资源的亲缘关系研究. 北京: 中国农业科学院, 2005: 20-50
- [5] 宋顺华, 郑晓鹰, 徐家炳, 余阳俊. 大白菜种质资源的遗传多样性分析. 华北农学报, 2006, 21(3): 86-90
- [6] 李国强. 大白菜核心种质的构建与评价. 北京: 中国农业科学院, 2008: 18-38
- [7] 赵美华, 逯保德, 兰创业, 赵军良. 大白菜种质资源遗传多样性分析. 山西农业科学, 2011, 39(1): 12-16
- [8] Wang X, Wang H, Wang J, Sun R, Wu J, Liu S, Bai Y, Mun J H, Bancroft I, Cheng F, Huang S, Li X, Hua W, Wang J, Wang X, Freeling M, Pires J C, Paterson A H, Chalhoub B, Wang B, Hayward A, Sharpe A G, Park B S, Weissshaar B, Liu B, Li B, Liu B, Tong C, Song C, Duran C, Peng C, Geng C, Koh C, Lin C, Edwards D, Mu D, Shen D, Soumpourou E, Li F, Fraser F, Conant G, Lassalle G, King G J, Bonnema G, Tang H, Wang H, Belcram H, Zhou H, Hirakawa H, Abe H, Guo H, Wang H, Jin H, Parkin I A, Batley J, Kim J S, Just J, Li J, Xu J, Deng J, Kim J A, Li J, Yu J, Meng J, Wang J, Min J, Poulain J, Wang J, Hatakeyama K, Wu K, Wang L, Fang L, Trick M, Links M G, Zhao M, Jin M, Ramchiary N, Drou N, Berkman P J, Cai Q, Huang Q, Li R, Tabata S, Cheng S, Zhang S, Zhang S, Huang S, Sato S, Sun S, Kwon S J, Choi S R, Lee T H, Fan W, Zhao X, Tan X, Xu X, Wang Y, Qiu Y, Yin Y, Li Y, Du Y, Liao Y, Lim Y, Narusaka Y, Wang Y, Wang Z, Li Z, Wang Z, Xiong Z, Zhang Z. The genome of the mesopolyploid crop species *Brassica rapa*. Nature Genetics, 2011, 43(10): 1035-1039
- [9] 杨洁, 赫佳, 王丹碧, 施恩, 杨文字, 耿其芳, 王中生. InDel 标记的研究和应用进展. 生物多样性, 2016, 24(2): 237-243
- [10] 董森森. 白菜类作物抗根病种质资源遗传多样性分析及分子标记辅助选择. 郑州: 郑州大学, 2014
- [11] 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 王淑芬, 赵智中, 卢金东, 张晓燕, 徐文玲, 刘贤嫻, 付卫民. 光敏色素 B 基因(*PHYB*)启动子突变及与白菜开花时间的关联分析. 农业生物技术学报, 2014, 22(7): 853-861
- [12] 张志刚, 赵智中, 李巧云, 王淑芬, 刘栓桃, 王淑芬, 徐文玲, 刘贤嫻, 刘辰. 大白菜 InDels 标记开发及其在剩余杂合体鉴定中的应用. 农业生物技术学报, 2016, 24(4): 510-518
- [13] 张全芳, 梁水美, 李燕, 刘艳艳, 范阳阳, 郭庆法, 鲁守平, 步迅. 基于荧光 SSR 标记的玉米自交系遗传结构解析. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 19-31
- [14] 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 赵智中, 王立华, 王淑芬, 徐文玲, 刘贤嫻, 刘辰. 大白菜重组自交系群体构建过程中剩余杂合位点的变化趋势. 分子植物育种, 2017, 15(7): 2730-2735
- [15] 夏法刚, 黄金星, 季彪俊, 詹福杨, 谢萍萍, 邓邦柱, 林宏, 郑金贵. 基于 SRAP 标记的薏苡种质资源遗传多样性及 DNA 指纹图谱构建. 植物遗传资源学报, 2017, 18(3): 413-420
- [16] 雷启义, 熊勇, 周江菊, 张文华, 孙军, 龙春林. 黔东南香禾糯 AFLP 遗传多样性分析与评价. 植物遗传资源学报, 2017, 18(6): 1023-1031
- [17] 苏龙, 徐志健, 乔卫华, 郑晓明, 梁云涛, 丁膺宾, 刘莎, 齐兰, 公婷婷, 梁新霞, 王君瑞, 张丽芳, 程云连, 兰进好, 杨庆文. 广西药用野生稻遗传多样性分析及 SSR 引物数量对遗传多样性结果的影响研究. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 603-610
- [18] 陈世军, 张明泽, 姚玉仙, 谢维斌. 基于 SSR 标记的黔南茶树种质资源 DNA 指纹图谱构建. 植物遗传资源学报, 2017, 18(1): 106-111
- [19] 贾宝光, 林青, 谭晓风, 李泽, 龙洪旭, 向晖, 张琳. 3 年桐 EST-SSR 标记的开发与种质遗传多样性分析. 植物遗传资源学报, 2016, 17(4): 625-636
- [20] 吴为人, 李维明, 卢浩然. 建立一个重组自交系群体所需的自交代数. 福建农业大学学报, 1997, 26(2): 129-132
- [21] 周元昌, 吴为人, 祁建民. 标记辅助回交育种中所需最小样本容量的近似估计. 遗传学报, 2003, 30(7): 625-630
- [22] 朱东旭, 王彦华, 赵建军, 刘博李, 晓峰轩, 淑欣, 申书兴. 结球甘蓝相对于大白菜连锁群特异 InDel 标记的建立及应用. 园艺学报, 2014, 41(8): 1699-1706
- [23] 魏利斌, 苗红梅, 李春, 段迎辉, 徐芳芳, 张海洋. 芝麻 SNP 和 InDel 标记遗传多样性、群体结构及连锁不平衡分析. 分子植物育种, 2017, 15(8): 3070-3079
- [24] 杨金雪. 用于大白菜品种核酸指纹库构建的 SSR 核心引物筛选. 扬州: 扬州大学, 2013: 18-42
- [25] 任小平, 郑艳丽, 黄莉, 陈玉宁, 周小静, 陈伟刚, 雷永, 晏立英, 万丽云, 廖伯寿, 姜慧芳. 花生 SSR 核心引物筛选及育成品种 DNA 指纹图谱构建. 中国油料作物学报, 2016, 38(5): 563-571
- [26] 匡猛, 杨伟华, 许红霞, 王延琴, 周大云, 冯新爱. 中国棉花主栽品种 DNA 指纹图谱构建及 SSR 标记遗传多样性分析. 中国农业科学, 2011, 44(1): 20-27
- [27] 赵久然, 王凤格, 易红梅, 田红丽, 杨扬. 我国玉米品种标准 DNA 指纹库构建研究及应用进展. 作物杂志, 2015, 30(2): 1-6
- [28] 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. 大白菜高通量 SSR 标记鉴定体系的建立和应用. 植物遗传资源学报, 2014, 15(4): 815-823
- [29] 杨晓芸, 田术美, 张清霞, 张淑霞, 司朝光, 王媛, 王德森. 青研系列大白菜杂交种及亲本指纹图谱构建和杂种纯度鉴定. 分子植物育种, 2013, 11(1): 107-112