

# 芸薹属 SSR 标记在菜薹中的通用性及其应用

陈静芳<sup>1</sup>, 李荣华<sup>1</sup>, 王直亮<sup>1</sup>, 夏岩石<sup>1</sup>, 郭培国<sup>1</sup>, Kadambot SIDDIQUE<sup>2</sup>

(1. 广州大学 生命科学院, 作物抗逆国际合作研究中心, 广东 广州 510006;

2. Institute of Agriculture, University of Western Australia, WA 6009, Australia)

**摘要:**以 4 份遗传背景差异较大的菜薹种质为试材, 检测 133 对芸薹属 SSR 引物在菜薹中的 PCR 扩增效果, 以期发现适用于菜薹的 SSR 标记。结果表明: 有 50 对引物在 4 份菜薹种质中表现出较好的通用性, 其扩增产物多在 100~350 bp, 多态性数目在 1~4, 共 91 个多态性位点。在此基础上, 利用在“四九-19 号菜心”和“3T6”中具有多态性的 40 对 SSR 引物, 对 130 份以“四九-19 号菜心”和“3T6”为亲本建立的 F<sub>2</sub> 重组自交系群体进行基因分型, 构建了一个具有 10 个遗传群、总长度为 641.39 cM 的菜薹遗传连锁图。研究结果可为今后菜薹遗传多样性、基因定位和分子标记辅助育种提供理论参考。

**关键词:**芸薹属; SSR; 通用性; 菜薹; 遗传连锁图

**中图分类号:**S 634.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)15-0086-06

菜薹 (*Brassica campestris* L. ssp. *chinensis* var. *utilis* Tsen et Lee) 属十字花科芸薹属重要的园艺作物之一, 是我国华南地区的特色蔬菜。尽管分子标记技术如 SSR 标记技术应用于多种作物的研究和应用已有多, 然而分子标记技术应用于菜薹研究工作的起步较晚, 且主要是利用 RAPD、ISSR、MFLP 和 SRAP 等分子标记<sup>[1-3]</sup>, 鲜见有利用简单重复序列 (simple sequence repeat, SSR) 标记开展相关研究的报道。

SSR 又称微卫星 DNA 或短串联重复序列, 为真核生物基因组中的核苷酸重复片段, 其串联的核心序列一般为 2~6 bp。研究表明 SSR 标记具有特异性强、共显性、数量丰富、操作简单和基因组覆盖性强等优点<sup>[4]</sup>, 具有较高的准确性以及稳定的重复性, 而且成本较低, 明显优于稳定性和重复性不高的 RAPD 等显性标记<sup>[5]</sup>。

开发 SSR 分子标记重要步骤就是分析检测出简单重复序列及其两侧的核苷酸序列, 用以设计 PCR 扩增的引物。例如在芜菁 SSR 引物的开发研究中, 利用已知的

DNA 序列开发了 680 对 SSR 引物组合, 并获得 141 对有多态性的引物组合<sup>[6]</sup>。但对既无大量 EST 信息又无各染色体基因组序列的菜薹来讲, 开发 SSR 标记存在着较大的挑战。已有研究报道相近属、种或亚种中间 SSR 标记存在通用性, 如王伟勇等<sup>[7]</sup>探讨了凤梨属、丽穗凤梨属、铁兰属、艳红凤梨属和帝王凤梨属中的 SSR 标记引物在近缘属光萼荷属中通用性情况, 发现这些近缘属 SSR 引物在光萼荷属的有效扩增比例高达 72.7% 以上。CARVALHO 等<sup>[8]</sup>探测了辣椒属不同种之间的 SSR 标记的通用性, 发现有 62.7% 的牛角椒 SSR 引物可以在“小米辣”和“黄灯笼”辣椒中扩增出清晰的产物, 且具有多态性的 SSR 引物对在 2 种辣椒种中分别为 16.37% 和 31.03%。龚亚明等<sup>[9]</sup>发现 163 对豌豆的 EST-SSR 引物, 有 36 对引物可应用于蚕豆的基因分型工作。在芸薹属植物 SSR 标记的通用性研究中, 荆赞革等<sup>[10]</sup>利用甘蓝的 SSR 标记发现在近缘种青花菜中存在通用性, 刘海霞等<sup>[11]</sup>探讨并发现了芸薹属中来自于白菜、甘蓝型油菜和黑芥中的 SSR 引物在甘蓝中的通用性等。这些结果表明根据 SSR 标记的通用性, 可在相近物种间开发出适用的 SSR 标记。

芸薹属植物如油菜和白菜的基因组学研究较深入, 已有一批可应用于遗传分析的 SSR 标记。根据 SSR 标记在物种间存在的通用性, 该研究利用芸薹属植物如油菜和白菜等种业已开发出的 SSR 标记, 探索并获得一批适用于菜薹的 SSR 标记; 利用筛选出的 SSR 标记对 1 个菜薹重组自交系进行了基因分型, 并构建了菜薹的遗传连锁图谱。研究结果可为菜薹的 SSR 标记开发和遗传

**第一作者简介:**陈静芳(1990-), 女, 硕士研究生, 研究方向为菜薹分子生物学。E-mail: jingfang.chen@qq.com.

**责任作者:**郭培国(1963-), 男, 博士, 教授, 现主要从事作物逆境生物学和分子育种的教学与科研工作。E-mail: guopg@gzhu.edu.cn.

**基金项目:**广州市属高校科技计划资助项目(1201420621); 广州市科技计划资助项目(2014J4100123); 广东省自然科学基金资助项目(2015A030310136, 2015A030313500); 广东省普通高校国际暨港澳台合作创新平台及国际合作重大资助项目(2015KGJHZ015); 国家自然科学基金资助项目(30871526)。

**收稿日期:**2016-04-21

分析提供借鉴。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

选用 4 份遗传背景差异较大的菜薹种质“四九-19 号菜心”“3T6”“柳叶 50”和“油绿 50”作为供试材料,用于分析 SSR 引物的通用性。另外,利用“四九-19 号菜心”和“3T6”建立的 130 份  $F_2$  代重组自交系作为遗传群体材料,用于分析 SSR 引物的适用性并构建遗传连锁图谱。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 基因组的 DNA 提取** 2014 年盆栽种植各供试菜薹材料,采收 3 叶期幼嫩的叶片,按照李荣华等<sup>[12]</sup>改进的 CTAB 方法提取各材料的基因组 DNA,通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳观察所提取 DNA 的质量,采用紫外分光光度法检测核酸浓度,并将其稀释到  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  作为 SSR 扩增的模板。

**1.2.2 芸薹属 SSR 引物组合的筛选** 参照 SUWABE 等<sup>[13-14]</sup>、LOWE 等<sup>[15-16]</sup>、PIQUEMAL 等<sup>[17]</sup>、CHOI 等<sup>[18]</sup>、于仁波等<sup>[19]</sup>发表的论文以及多国芸薹属基因组计划(Multinational *Brassica* Genome Project, MBGP)网页中的 SSR 标记信息(<http://www.brassica.info/resource/markers>),筛选出 133 个 SSR 标记。这些 SSR 标记引物的合成、用于 PCR 反应的 *Taq* DNA 聚合酶、dNTPs 及 DNA size Marker 均购自于生物工程(上海)有限公司。

**1.2.3 SSR 标记的 PCR 扩增及检测** 根据 SUWABE 等<sup>[13]</sup>的方法稍作修改,即在  $10 \mu\text{L}$  的 PCR 反应总体积中,含  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 DNA 模板  $2.0 \mu\text{L}$ ,  $10 \times \text{PCR Buffer}$   $1.0 \mu\text{L}$ ,  $25 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgCl}_2$   $0.8 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  正向引物  $0.25 \mu\text{L}$ ,  $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  反向引物  $0.25 \mu\text{L}$ ,  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs  $0.25 \mu\text{L}$ , *Taq* DNA 聚合酶 ( $5 \times 10^6 \text{ U} \cdot \text{L}^{-1}$ )  $0.15 \mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O  $5.3 \mu\text{L}$ 。PCR 扩增是在 ABI 9700 PCR 仪(Applied Biosystems, USA)上进行的,PCR 扩增循环反应程序为  $94^\circ\text{C}$  预变性 2 min,之后  $94^\circ\text{C}$  下变性 45 s、适宜退火温度(每个 SSR 扩增的最适退火

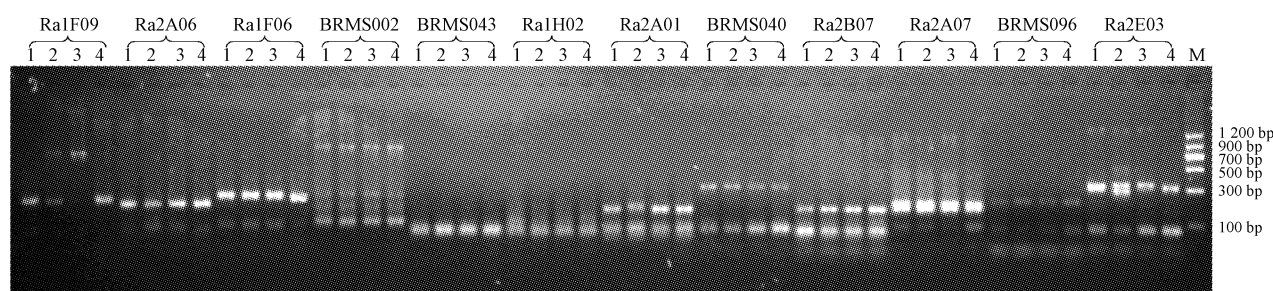
温度不一,在  $50 \sim 60^\circ\text{C}$ ) 45 s、 $72^\circ\text{C}$  1 min 的 PCR 程序运行 35 个循环;最后再在  $72^\circ\text{C}$  条件下延伸 10 min。利用 2% 琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物,电泳条件为 100 V、40 min。电泳结束后经溴化乙锭染色,在 Bio-Rad GelDoc XR 凝胶成像仪(Bio-Rad Laboratories Inc, USA)成像;观察每个 SSR 引物组合扩增产物在 4 个菜薹材料间的扩增效果及其多态性。使用 Quantity One 软件对电泳图进行判读,读取具有多态性的条带,统计各个样本的扩增条带情况,建立扩增产物原始数据矩阵(有条带记为“1”,无条带记为“0”,缺失记为“-”)。

**1.2.4 遗传连锁图谱的构建** 使用 Quantity One 软件(Bio-Rad Laboratories Inc, USA)统计各个自交系的扩增条带情况,有条带记为“1”、无条带记为“0”、不清或缺失记为“-”,建立扩增产物原始数据矩阵。进一步将各自交系中等位位点与“四九-19 号菜心”相同的记为“A”、与“3T6”相同的记为“B”、不清或缺失记为“-”。运用 MapMaker(Macintosh version 2.0)软件,用 Kosambi 函数将重组率转化为遗传距离 cM, LOD 值设定为 3.0,构建出菜薹的遗传连锁图。

## 2 结果与分析

### 2.1 芸薹属 SSR 引物在菜薹基因组 DNA 中的扩增

运用芸薹属 SSR 引物对 4 份菜薹进行 PCR 扩增,扩增产物再经琼脂糖凝胶电泳检测。从图 1 可以看出,芸薹属 SSR 在菜薹中的扩增产物具有 3 种类型。类型 1 为有些 SSR 引物组合扩增产物的主条带,在 4 份菜薹材料中清晰易辨且具有多态性,如 Ra1F09、Ra1F06、Ra2A01 和 Ra2E03 等。类型 2 为有些 SSR 引物组合扩增产物的主条带清晰,但在 4 份种质材料中不具有多态性或需进一步确认,如 Ra2A06、BRMS040、Ra2B07、Ra2A07 和 BRMS096 等。类型 3 为有些 SSR 引物组合的扩增产物未见明显的主条带,如 BRMS002 等;或虽有主条带但其大小在 100 bp 以下,可能属于非特异扩增条带,如 BRMS043 和 Ra1H02 等。



注:1~4 分别为菜薹材料“3T6”“四九-19 号菜心”“油绿 50”和“柳叶 50”。每 4 栏为 1 组,代表 1 个 SSR 引物组合。M 为分子量大小标样。

Note: 1 to 4 represent “3T6”“Siyu-19 Caixin”“Youlyu 50”“Liuye 50”, respectively. Each four lanes indicate a SSR combination. M is DNA size Marker.

图 1 芸薹属 12 对 SSR 引物在 4 份菜薹材料中扩增产物的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig. 1 Image of agarose gel electrophoresis for amplification products of 12 *Brassica* SSRs in 4 flowering Chinese cabbage accessions

该研究共检测了 133 对芸薹属 SSR 引物,具第 1、2 扩增产物类型的引物组合为 98 对,占总引物组合数的 73.7%;其中具第 1 种扩增产物类型的引物组合为 50 对,占总引物对数的 37.6%;这 50 对引物在 4 份菜薹材料间共有 91 个多态性条带,每对引物多态性位点数在 1~4,扩增产物大多介于 100~350 bp;这些引物组合的

信息如表 1 所示,可以转用到菜薹中。具第 2 种扩增产物类型的引物对数为 48 对,占总引物组合数的 36%,这类引物组合可能在具更多菜薹种质材料时呈现出多态性,这还需要今后的进一步检测与分析。第 3 类扩增产物的引物组合数为 35 对,占总组合数的 26.3%;该类组合不适合于菜薹。

表 1 在 4 种菜薹材料中扩增产物具有多态性的芸薹属 SSR 标记的引物组合信息

Table 1 Information of *Brassica* SSRs which possessed polymorphic locus/loci among four flowering Chinese cabbage genotypes

引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer	反向引物序列 Reverse primer	物种 Species	文献 Reference
BRAS029	CACTCACAGCCCTCTTCTTCT	CCTCCAGCTTCCTTTACCA	<i>B. napus</i> L.	1
BRMS001	GGTGGCTCTAATTCCTCTGA	ATCTTTCTCTCACCACCC	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS003	ACGAATGAATTGGACAGAG	CAGATGGGAGTCAAGTCAAC	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS006	TGGTGGCTTGAGATTAGTTC	ACTCGAAGCCTAATGAAAAG	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS016	TCCCGTATCAATGGCGTAACAG	CGATGGTGACATTATGTGGOG	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS019	CCAAAAGCTTTTGACACAT	GGCACAATCCACTCAGCTTT	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS031	TGCCACCAATGACAATGACACATC	GATGCACCTGGGACCACTTACATTTT	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS033	GCGGAAACGAACACTCTCCCATGT	CCTCCTTGCTCTTCCCTGGAGACG	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS034	GATCAAATAACGAACGGAGAGA	GAGCCAAGAAAGGACCTAAGAT	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS037	CTGCTCGCATTTTTCATAC	TACGCTTGGGAGAGAAAATAT	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS042	GGATCAGTTATCTGCACCACAA	TCGGAATTGGATAAGAAITCAA	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS042-2	AGCTCCGACAGCAACAAAAGA	TTGCTTCTCTTTCTGGGAATG	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS046	TTGGCCTTGCTATTACGAGCTG	ATGCGCAACCCCTAATTTTCAC	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS049	GATCTTCTCTCCAAAACCTCTCT	AAAGTCCAAGCTAAATACAAA	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS050	AACITTTGCTTCCACTGATTTT	TGCTTAAAGCTAAATCCATAT	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS051	GGCCAAGCCACTACTGCTCAGA	GCGGAGAGTGAGGGAGTTATGG	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS056	GATCAAGGCTACGGAGAGAGAG	CGTGACGCTAGAGTAATCGAGT	<i>B. rapa</i> L.	2
BRMS088	TATCGGTACTGATTGCTCTTCAAC	ATCGGTTGTATTTGAGAGCAGATT	<i>B. rapa</i> L.	3
CBI0330	AGGCGAGTTTACGAGGAT	ACCTGCACCACTCATTTG	<i>B. napus</i> L.	1
CBI0413	CTTAGCACACCACTCGG	GGTGATGAAGATGACGATG	<i>B. napus</i> L.	1
CBI0578	TGTCCACTCACTCTCTTGT	AGGCTAAGTTGAAGTGAAG	<i>B. napus</i> L.	1
ENA2	GATGGTGATGGTGATAGGTC	GAAGAGAAGGAGTCAGAGATG	<i>B. rapa</i> L.	4
ENA23	GCTGTGCCAGTTCTCTTTC	TCATTCCAAATGGCCTTACC	<i>B. rapa</i> L.	4
ENA9	CCTGAGACCAACCTACTOCT	ATCTTCAACACGCATACCA	<i>B. rapa</i> L.	4
KBRH139B23	ATCTCATGTTGGTTTACCG	ATTTCCAAAACACACACGCA	<i>B. rapa</i> L.	4
KBRH143D22	GATGTGATACTTTGGCGACGG	TGAAGGATAATATGGTCTTGCC	<i>B. rapa</i> L.	4
KBRH143H15	TCTGCATCAAAAATGCTAAATGA	TGATCTTTTAGAAAACAAAGATCGAG	<i>B. rapa</i> L.	4
MR014	GGGTTTCTCTCTCTGTTGTT	TGACGGTTGAGTGGTTGTGT	<i>B. napus</i> L.	1
Na10F06	CTCTTCGGTTTCGATCCTCG	TTTTTAACAGGAACGGTGGC	<i>B. oleracea</i> L.	5
Na10G08	ATTCCATGGACTGATCCTCG	AGAGGTATATTGCAGTTGCCG	<i>B. napus</i> L.	6
Na12C06	AACGGATGAAGAACACATTGC	TAGGCGCTGTTATTCGATGG	<i>B. napus</i> L.	6
Na12D04	ACGGAGTGATGATGGGTCTC	CCTCAATGAAACTGAAATATGTGTG	<i>B. napus</i> L.	6
Na14E02	ACTGGCTACATGAGTTTCAGTG	GAGGGAAGACAACCTGGTCTCA	<i>B. napus</i> L.	6
Ni4D09	AAAGACAAAGAGGAAGGGC	TTGAAATCAAATGAGAGTGACG	<i>B. napus</i> L.	6
OL10A02	ATGAAAACCAATCCAGTGCC	GATAGCAGATGGAAGAGCCG	<i>B. napus</i> L.	6
OL10C01	ATGACTGCTTAAACAGCGCC	CTTCTCCAACAAAAGCTCGG	<i>B. rapa</i> L.	6
OL10D08	TCCGAACACTCTAAGTTAGCTOC	GAGCTGTATGTCTCCCGTGC	<i>B. napus</i> L.	6
Ra1F03	AACTCGCTTTTACCGTCTGTC	CAAGACGTGGAGCTGAAGTG	<i>B. napus</i> L.	6
Ra1F06	ACCAAAATGTGTGAAGCCAC	CTTGTGGCCAGATTCATCAC	<i>B. napus</i> L.	6
Ra1F09	AAAACGGATAAACGTCACCG	GAACAGTCTTACACCGATTAG	<i>B. rapa</i> L.	6
Ra1H11	CGCTAATGTGTGGTGGATTG	ACCGAGCGGTTTACATAAC	<i>B. rapa</i> L.	6
Ra2A10	CCAGTGTGTGTGTGTGTGTG	TTTAACAGATAGCGCAGTGGTC	<i>B. napus</i> L.	6
Ra2B01	TGTTGTAGCCTAACCCGGAG	TTATGACGTAATATATATGTAACCTG	<i>B. rapa</i> L.	6
Ra2B05	AGGCGGTTTATACATCGG	GAAGGCATTTCTTTTCCACG	<i>B. rapa</i> L.	6
Ra2E03	AGGTAGGCCATCTCTCTCC	CCAAAACCTTGCTCAAAAACCC	<i>B. napus</i> L.	6
Ra2E12	TGTCAGTGTGTCCACTTCGC	AAGAGAAACCCAAATAAGTAGAACCC	<i>B. napus</i> L.	6
Ra3D02B	CACAGGAAACCGTGGCTAGA	AACCCAACTCAACGTCTTG	<i>B. napus</i> L.	6
Ra3D04	AAAAGGACCTACCAATTTCTGTG	CGACCCAAACTGAGCCATAC	<i>B. rapa</i> L.	6
Ra3E05	TTCTCATGCTCCAAACACAG	GTTTCTTCCAAGCCAAAGCTG	<i>B. rapa</i> L.	6
Ra3H10	TAATCGCATCTGGATTAC	ATCAGAACAGCGACGAGGTC	<i>B. rapa</i> L.	6

注:文献为提供 SSR 引物信息的参考文献或网站。1. <http://www.brassica.info/resource/markers>;2. SUWABE 等<sup>[13]</sup>;3. SUWABE 等<sup>[14]</sup>;4. CHOI 等<sup>[18]</sup>;5. LOWE 等<sup>[16]</sup>。

Note:Reference represent the reference and web site provided the SSR information. 1. <http://www.brassica.info/resource/markers>;2. SUWABE et al<sup>[13]</sup>;3. SUWABE et al<sup>[14]</sup>;4. CHOI et al<sup>[18]</sup>;5. LOWE et al<sup>[16]</sup>;6. LOWE et al<sup>[16]</sup>.

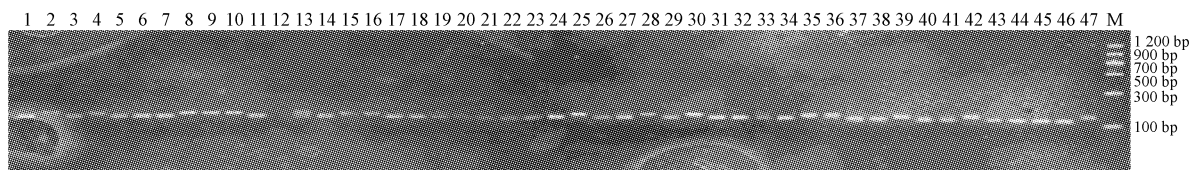


## 2.2 筛选出的芸薹属 SSR 在菜薹重组自交系中的基因分型分析

50 对具有多态性的 SSR 引物组合中,能在“四九-19 号菜心”和“3T6”2 个材料中扩增出清晰易辨的条带 115 条,其中只有 40 个引物对扩增出的 78 条条带在 2 个材料间具有多态性。具多态性 SSR 引物组合扩增产物多态性条带数在 1~4。

运用这些具有多态性的 SSR 引物组合对利用“四九-19 号菜心”和“3T6”构建的 130 份菜薹重组自交系

群体进行基因分型,进一步检测开发出的 SSR 引物组合的扩增效果。结果表明,筛选出的 40 个 SSR 引物组合扩增产物的条带清晰易辨,重复性好,在重组自交系群体中亦扩增出 78 个具有多态性的条带。所有 SSR 扩增产物的多态性与在 4 份菜薹材料扩增产物的多态性一致。表明筛选出的 SSR 引物适用于菜薹的分子遗传分析。图 2 为利用 SSR 引物组合 BRMS042 对 47 份重组自交系进行基因分型分析的琼脂糖凝胶电泳图。



注:1~47 为“四九-19 号菜心”与“3T6”作亲本的重组自交系编号,M 为 DNA 分子量标样。

Note:1-47 represent the No. of RILs crossed with ‘Sijiu-19 Caixin’ and ‘3T6’. M indicates DNA size Marker.

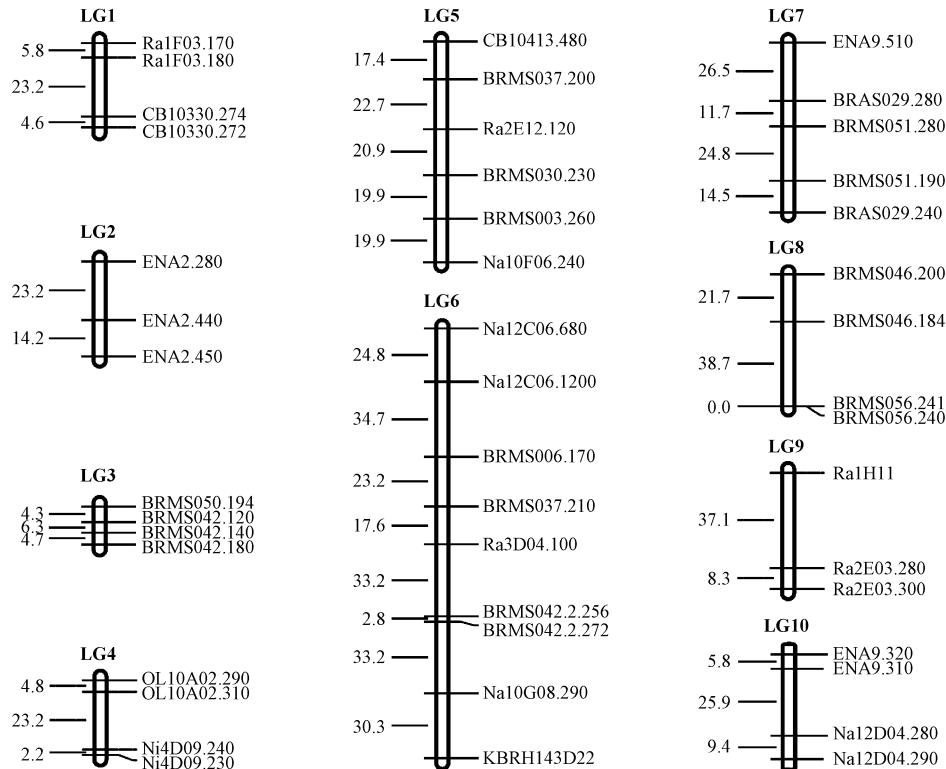
图 2 引物 BRMS042 对重组自交系扩增的凝胶电泳检测

Fig. 2 Image of agarose gel electrophoresis for the amplicons of BRMS042 in 47 RILs

## 2.3 遗传连锁图谱的构建

利用 40 对 SSR 引物在重组自交系中具有的 78 个多态性标记位点,运用 MapMaker 2.0 软件,选用 Kosambi 函数计算图距,构建出 1 张包含 10 个连锁群的

标记未能进入连锁群的构建。进入连锁群的 46 个多态性标记位点来自于 27 个 SSR 引物组合的扩增产物。所构建的遗传连锁图谱如图 3 所示,这是第 1 张以 SSR 作为分子标记构建的菜薹遗传连锁图。



注:各个连锁图中左边数值表示标记位点间的遗传距离(cM),右边为 SSR 标记位点。

Note:The genetic distance (cM) listed on the left and the SSR loci listed on the right in each linkage group.

图 3 基于 SSR 标记构建的菜薹遗传连锁图谱

Fig. 3 Genetic linkage map constructed with SSR markers in flowering Chinese cabbage

从表 2 可知,该遗传图谱总遗传距离是 641.39 cM。各个连锁群的标记位点数在 3~9,平均 4.6 个;其中连锁群 LG2 和 LG9 上的标记位点数目最少,只有 3 个, LG6 上位点最多,有 9 个。各个连锁群长度为 15.32~199.74 cM,平均标记位点密度为 12.72 cM;其中连锁群 LG3 标记位点密度最小,为 3.83 cM,连锁群 LG6 的最大,为 22.19 cM。

表 2 构建的菜薹遗传连锁图谱中各连锁群长度、标记数信息

Table 2 The length, marker numbers of each linkage group in the linkage maps

连锁群编号 Linkage group No.	图距 Length/cM	标记位点数目 No. of markers	位点平均图距 Average distance/cM
1	33.57	4	8.39
2	37.38	3	12.46
3	15.32	4	3.83
4	30.20	4	7.55
5	100.72	6	16.79
6	199.74	9	22.19
7	77.54	5	15.51
8	60.36	4	15.09
9	45.40	3	15.13
10	41.16	4	10.29
总计 Total	641.39	46	12.72

### 3 讨论

某一物种的 SSR 引物能在其近缘种和亲缘关系较远的物种中部分检测到具有多态性的扩增产物,表现出 SSR 标记具有一定的通用性<sup>[8,10,15,20]</sup>。芸薹属 SSR 标记在属间或属内表现出这种特性,如 SINGH 等<sup>[21]</sup>利用 66 对芸薹属的 SSR 引物,分析在十字花科植物亚非芥 (*Brassica tournefortii* L.)、白芥 (*Sinapis alba* L.)、黑芥 (*Brassica nigra* L.)、家独行菜 (*Lepidium sativum* L.) 和芝麻菜 (*Eruca sativa* L.) 中通用性,结果表明 84.8% (56 对) 的 SSR 引物可以在这些物种中扩增,其中 48.5% (32 对) 至少在一个物种的种质材料中表现出多态性;忻雅等<sup>[22]</sup>发现白菜的 EST-SSR 标记完全可以应用于甘蓝型油菜,对亲缘关系更远的玉米等 4 个物种的引物平均通用性达 88.3%,表现出很高的通用性比例。但亦有研究表明芸薹属 SSR 标记的通用性比率较低,如荆赞革等<sup>[10]</sup>开展的甘蓝 SSR 标记在近缘种青花菜的通用性研究中表明,50 对甘蓝 SSR 引物中,有 38 对 (76%) 引物在青花菜上可有效扩增,但其中只有 9 对 (18%) 在 20 份种质材料中具有较好的多态性;刘海霞等<sup>[11]</sup>开展芸薹属 SSR 引物在甘蓝中通用性研究表明,21 对芸薹属甘蓝、20 对白菜、27 对甘蓝型油菜和 10 对黑芥共 78 对 SSR 引物中,仅有 16 对 (20.51%) SSR 引物能在供试甘蓝材料中扩增出清晰的条带,具有多态性的引物组合则只有 11 对 (14.1%),其中来自于甘蓝、白菜、甘蓝型油菜和黑芥的引物对分别为 4、5、2 和 0,表现出通用性较低。

该试验 133 对 SSR 引物中,来源于白菜、甘蓝型油菜和甘蓝的 SSR 引物分别为 72、55 和 6 对,共 98 对 (73.68%) 引物能在 4 份菜薹材料中扩增出清晰条带,其中来自于白菜、甘蓝型油菜和甘蓝的分别为 62、34 和 2 对;仅有 50 对 (37.59%) 引物在 4 份菜薹材料中的扩增产物具有多态性,其中来自于白菜 31 对、甘蓝型油菜 18 对和甘蓝 1 对。该结果表明白菜、甘蓝型油菜和甘蓝的 SSR 引物在菜薹中是可通用的,与前人的研究结果一致;但通用性比例低于 SINGH 等<sup>[21]</sup>和忻雅等<sup>[22]</sup>所得的结果,高于刘海霞等<sup>[11]</sup>和荆赞革等<sup>[10]</sup>的通用性比例。另外,菜薹属于 AA 基因组类型,从具多态性的 50 对 SSR 引物来源来看,来自于具有 AA 基因组白菜的 SSR 引物对通用性比例最高,达 43.06%,具有 AACC 基因组甘蓝型油菜次之,为 32.73%,具有 CC 基因组的甘蓝最低,仅为 16.67%,该结果表明芸薹属 SSR 引物在菜薹中的通用性比例与引物来源有关,即基因组的特性有关<sup>[11]</sup>。

遗传连锁图谱是开展作物性状的遗传分析、基因定位及分子育种的重要基础,一些芸薹属植物如油菜和白菜等均已建立了高密度的遗传连锁图谱,确定基因及开发与性状相关的分子标记用于辅助育种工作<sup>[23-24]</sup>,但由于菜薹在此领域开展的研究较少,且缺少适宜的分子标记,因此直到目前为止尚鲜见利用分子标记特别是 SSR 标记建立菜薹遗传连锁图谱的报道。该研究利用在“四九-19 号菜心”和“3T6”具有多态性的芸薹属 SSR 标记,对以此 2 个材料为亲本的重组自交系进行基因分型,构建的一张包含具有 10 个连锁群的菜薹遗传连锁图谱。该图谱含有 46 个 SSR 标记位点,总长度为 641.39 cM,图谱中标记位点平均距离为 12.72 cM。尽管该图谱的总长度和标记位点数远小于已报道的芸薹属作物大白菜连锁遗传图谱如于仁波等<sup>[19]</sup>的 1 086.7 cM 和 497 个标记、甘蓝型油菜的遗传连锁图谱如李媛媛等<sup>[25]</sup>的 1 949.8 cM 和 398 个标记,但该图谱是菜薹的首张遗传连锁图谱,同时该连锁图谱的构建也是芸薹属 SSR 标记在菜薹中通用性应用的例证。

现通过芸薹属 SSR 标记在菜薹中的通用性研究,发现了一批适用于菜薹的 SSR 标记,并成功应用于菜薹重组自交系基因分型和遗传连锁图谱的构建,研究结果将为今后菜薹的遗传多样性、种质资源的评价与保存、基因定位以及分子标记辅助育种等提供重要的参考。

### 参考文献

- [1] 许兰桂,夏岩石,李荣华,等. 菜薹分子标记利用的研究进展[J]. 园艺学报,2012,39(9):1739-1748.
- [2] 郭培国,许兰桂,何嘉仪,等. 菜心种质材料的分子身份证构建研究[J]. 广东农业科学,2014,41(23):116-122.
- [3] 郭培国,许兰桂,夏岩石,等. 菜薹种质遗传多样性的荧光 MFLP 标记分析[J]. 园艺学报,2015,42(2):350-360.
- [4] POWELL W, MACHRAY G C, PROVAN J. Polymorphism revealed

by simple sequence repeats[J]. Trends in Plant Science, 1996, 1(7): 215-222.

[5] MCGREGOR C E, LAMBERT C A, GREYLING M M, et al. A comparative assessment of DNA fingerprinting techniques (RAPD, ISSR, AFLP and SSR) in tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L.) germplasm[J]. Euphytica, 2000, 113(2): 135-144.

[6] 罗丹, 吴委林, 周波, 等. 芜菁 SSR 引物的开发及多态性分析[J]. 生物技术通讯, 2012, 23(3): 402-406.

[7] 王炜勇, 俞少华, 张飞, 等. 近缘属 SSR 标记引物在光萼荷属植物中的通用性[J]. 分子植物育种, 2013, 11(4): 583-587.

[8] CARVALHO S I, RAGASSI C F, OLIVEIRA I B, et al. Transferability of microsatellite markers of *Capsicum annuum* L. to *C. frutescens* L. and *C. chinense* Jacq[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(3): 7937-7946.

[9] 龚亚明, 徐盛春, 毛伟华, 等. 豌豆 EST-SSR 标记在蚕豆中的通用性与应用[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2011, 37(5): 479-484.

[10] 荆赞革, 唐征, 罗天宽, 等. 甘蓝 SSR 标记在近缘种青花菜的通用性及其应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2010, 29(4): 685-690.

[11] 刘海霞, 颜建明, 康俊根. 芸薹属 SSR 引物在甘蓝分子育种中通用性的研究[J]. 北方园艺, 2010(3): 115-118.

[12] 李荣华, 夏岩石, 刘顺枝, 等. 改进的 CTAB 提取植物 DNA 方法[J]. 实验室研究与探索, 2009, 28(9): 14-16.

[13] SUWABE K, IKETANI H, NUNOME T, et al. Isolation and characterization of microsatellites in *Brassica rapa* L. [J]. Theoretical Applied Genetics, 2002, 104(6-7): 1092-1098.

[14] SUWABE K, TSUKAZAKI H, IKETANI H, et al. Identification of two loci for resistance to clubroot (*Plasmodiophora brassicae* Woronin) in *Brassica rapa* L. [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107(6): 997-1002.

[15] LOWE A J, JONES A E, RAYBOULD A F, et al. Transferability and

genome specificity of a new set of microsatellite primers among *Brassica* species of the U triangle[J]. Molecular Ecology Notes, 2002, 2(2): 7-11.

[16] 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]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(6): 1103-1112.

[17] PIQUEMAL J, CINQUIN E, COUTON F, et al. Construction of an oil-seed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111(8): 1514-1523.

[18] CHOI S R, TEAKLE G R, PRIKSHIT P, et al. The reference genetic linkage map for the multinational *Brassica rapa* genome sequencing project [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2007, 115(6): 777-792.

[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构建[J]. 园艺学报, 2008, 35(10): 1447-1454.

[20] SUWABE K, IKETANI H, NUNOME T, et al. Characteristics of microsatellites in *Brassica rapa* genome and their potential utilization for comparative genomics in Cruciferae[J]. Breeding Science, 2004, 54(2): 85-90.

[21] SINGH B K, THAKUR A K, TIWARI S K, et al. Transferability of *Brassica*-derived microsatellites to related genera and their implications for phylogenetic analysis[J]. National Academy Science Letters, 2012, 35(1): 37-44.

[22] 忻雅, 崔海瑞, 张明龙, 等. 白菜 EST-SSR 标记的通用性[J]. 细胞生物学杂志, 2006(28): 248-252.

[23] 王嘉, 荆凌云, 荐红举, 等. 甘蓝型油菜株高、第一分枝高和分枝数的 QTL 检测及候选基因筛选[J]. 作物学报, 2015, 41(7): 1027-1038.

[24] 高会超, 曾强, 张志刚, 等. 与大白菜 TuMV 抗病基因 TuRBCS01 紧密连锁的分子标记开发[J]. 农业生物技术学报, 2016, 24(2): 196-205.

[25] 李媛媛, 沈金雄, 王同华, 等. 利用 SRAP、SSR 和 AFLP 标记构建甘蓝型油菜遗传连锁图谱[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1118-1126.

## Transferability and Application of *Brassica* SSR Markers in Flowering Chinese Cabbage

CHEN Jingfang<sup>1</sup>, LI Ronghua<sup>1</sup>, WANG Zhiliang<sup>1</sup>, XIA Yanshi<sup>1</sup>, GUO Peiguo<sup>1</sup>, Kadambot SIDDIQUE<sup>2</sup>

(1. International Crop Research Center for Stress Resistance/College of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou, Guangdong 510006; 2. Institute of Agriculture, University of Western Australia, WA 6009, Australia)

**Abstract:** In order to develop SSR markers suitable for flowering Chinese cabbage, four flowering Chinese cabbage genotypes different in genetic background were selected to detect the amplification effects of 133 *Brassica* SSR primers. The results showed that 50 of 133 *Brassica* SSR primer combinations were confirmed to have the property of transferability in flowering Chinese cabbage. The amplicons of these SSR mainly ranged from 100 to 350 bp. 91 polymorphic loci among 4 genotypes were detected with 1 to 4 polymorphic locus/loci per SSR primer pair. The population containing 130 recombinant inbred lines from the cross of 'Shijiu-19 Caixin' and '3T6' was genotyped by using the SSR primer combinations which producing polymorphic loci between parents, and a genetic linkage map containing 10 linkage groups was established with a length of 641.39 cM. These results could be beneficial for the genetic diversity analysis, QTL mapping and marker-assisted selection in breeding program of flowering Chinese cabbage.

**Keywords:** *Brassica*; SSR; transferability; flowering Chinese cabbage; genetic linkage group