

# 利用 SSR 标记构建萝卜种质资源分子身份证

邱 杨<sup>1</sup>, 李锡香<sup>1</sup>, 李清霞<sup>1</sup>, 陈亦辰<sup>2</sup>, 沈 镒<sup>1</sup>, 王海平<sup>1</sup>, 宋江萍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院蔬菜花卉研究所/农业部蔬菜作物基因资源与种质创制北京科学观测实验站, 北京 100081;

<sup>2</sup> 北京工业大学应用数理学院, 北京 100124)

**摘要:** 为了保护我国特有的优异萝卜资源, 促进资源的有效区分和合理利用, 保障我国萝卜产业发展, 目前需积极开展萝卜种质资源的特异性鉴定和种质识别技术研究。本研究基于 SSR 分子标记、信息处理和图像处理技术, 筛选出 22 对 SSR 引物对 75 份来源和特征不同的代表性萝卜种质进行鉴定, 共扩增出 153 条带, 其中多态性条带为 87 条, 平均多态性位点百分率为 55.49%, 平均每对引物可扩增出 6.95 条带和 3.95 条多态性带, 有效地显示出每份萝卜种质的特异性。基于最少引物鉴定最多种质的原则, 利用 MATLAB 程序筛选出 8 对 SSR 引物, 依据 8 对引物的扩增数据, 经过多态性谱带的有序编码转换, 构建出 75 份萝卜种质分子身份证。结果显示利用 SSR 标记构建萝卜种质分子身份证进行种质资源的鉴定和保护是可行的。

**关键词:** 萝卜; 分子身份证; SSR

## Establishment of the Molecular Identification for Radish Germplasm Using SSR Markers

QIU Yang<sup>1</sup>, LI Xi-xiang<sup>1</sup>, LI Qing-xia<sup>1</sup>, CHEN Yi-chen<sup>2</sup>, SHEN Di<sup>1</sup>, WANG Hai-ping<sup>1</sup>,  
SONG Jiang-ping<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Beijing Research Station of Vegetable Crop Gene Resource and Germplasm Enhancement, Ministry of Agriculture, Beijing 100081; <sup>2</sup> College of Applied Mathematics Science, Beijing University of Technology, Beijing 100124)

**Abstract:** In order to protect our unique and excellent radish resources, promote efficient resource discrimination and rational utilization, and protect development of radish industry, it is necessary to carry out the specific verification and germplasm identification technology for radish germplasms. Based on SSR markers, information and image processing technology, 153 bands were generated among 75 radish germplasms using 22 pairs of SSR primers in this study, of which 87 bands were polymorphic. The percentage of polymorphic alleles was 55.49%. On average, the numbers of alleles per SSR locus and polymorphic bands were 6.95 and 3.95, respectively. The genetic diversity among these radish germplasms was rich. After raw data processing and filtering by MATLAB, 75 radish germplasms could be distinguished and their molecular identities were constructed using 8 pairs of SSR primers. It showed that it was feasible to employ SSR markers to construct the molecular identities for elite germplasm resource and new varieties of radish.

**Key words:** radish; molecular identification; SSR

萝卜大约在 2000 年前传入我国<sup>[1]</sup>。古往今来, 萝卜一直是我国人民生活中的重要蔬菜之一。萝卜

种质资源丰富, 类型和品种繁多。根据 FAO 截止到 2009 年的统计数据, 全球种质资源库共保存萝卜资

收稿日期: 2013-08-02 修回日期: 2013-09-17 网络出版日期: 2014-04-08

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11/4996.S.20140408.0848.017.html>

**基金项目:** 国家科技支撑计划项目 (2006BAD13B06-4、2013BAD01B04、2012BAD02B01); “863” 课题 (2012AA021801); 农业部资源保护项目 (2012-2130135-28); 农业部园艺作物生物学与种质创制重点实验室

第一作者研究方向为蔬菜种质资源学。E-mail: qiu yang@caas.cn

通信作者: 李锡香, 研究方向为蔬菜种质资源学。E-mail: Lixx0612@163.com

源 1 万余份。其中,我国蔬菜种质资源中期库中就保存有 2164 份,主要是我国地方品种。为了保护我国特有和优异萝卜资源,促进资源的有效区分和合理利用,保障我国萝卜产业发展,需积极开展萝卜种质资源的特异性鉴定和种质识别技术研究。

P. D. Hebert 等<sup>[2]</sup>率先于 2003 年选取线粒体细胞色素 c 氧化酶亚基 I (COI, cytochrome c oxidase subunit I) 作为动物中通用的物种鉴定标记,并提出 DNA 条形码的定义。但是,关于一个物种内遗传变异的鉴定及其种质身份的识别技术源于 A. J. Jeffereys 等<sup>[3]</sup>1984 年报道的 DNA 指纹 (DNA fingerprinting) 或 DNA 图谱 (DNA profiling) 技术,该技术最先用于犯罪调查和亲子鉴定。随着各种分子标记技术的发展,育种家实现了新品种保护意识的加强,促进了作物 DNA 指纹图谱研究的发展<sup>[4-6]</sup>。但早期的指纹图谱大都是基于少数品种和有限标记识别位点,其应用的广度非常有限,而且指纹图谱鉴定在于对比图片中的众多差异,不易快速区分不同品种。近几年,分子身份证的概念应运而生。分子身份证与指纹图谱的功能相同,但前者原则上是以广泛基因组覆盖度的最少共显性特异变异位点或标记为基础,提取每份种质有代表性、稳定和特异的遗传信息,并通过数字化处理和软件分析建立分辨不同种

质的字符串形式,以达到简单明了地区分品种间差异,在广度上更直观地进行品种检索的目的<sup>[7]</sup>。目前,植物分子身份证建立仍然处于发展的初期。艾呈祥等<sup>[8]</sup>利用 10 对 SSR 引物对 38 份甜樱桃种质进行扩增,将分子指纹赋值后构建了其分子身份证。高运来等<sup>[7]</sup>利用 9 对 SSR 引物构建了 83 份黑龙江部分大豆品种的分子身份证。陈昌文等<sup>[9]</sup>从 80 对引物中筛选出来自桃 8 条染色体上的 8 对 SSR 核心引物,构建了 176 份种质的分子身份证。而在蔬菜作物中还没有相关报道。

作为构建蔬菜作物种质资源分子身份证的尝试,本研究基于萝卜 EST-SSR 标记和 75 份具有典型性和代表性的特异优异萝卜种质进行了分子身份证构建技术的研究,以期正确反映或标识我国萝卜种质的多样性和特异性,促进特异和优异萝卜资源的有效识别和保护利用。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

所用材料为中国农业科学院蔬菜花卉研究所种质资源室在萝卜表型核心种质构建的基础上,确定的 75 份萝卜特异和优异自交系种质(表 1)。营养钵育苗,取嫩叶供分析。

表 1 供试萝卜材料

Table 1 Source of radish materials

| 材料编号 Code | 统一编号 Accession number | 品种名称 Accession name | 类型 Type | 来源 Origin |
|-----------|-----------------------|---------------------|---------|-----------|
| HX08-1    | V01A0997              | 心里美                 | 绿皮红肉    | 天津西郊区     |
| HX08-12   | V01A0070              | 心里美                 | 绿皮红肉    | 北京        |
| HX08-15   | V01A0345              | 心里美                 | 绿皮红肉    | 河南引自北京    |
| HX08-21   | V01A0818              | 红心水萝卜               | 红皮红肉    | 山东兖州市     |
| HX08-33   | V01A0757              | 红心萝卜                | 红皮白肉    | 山东泰安市     |
| HX08-40   | V01A1832              | 莒县青皮红心              | 绿皮红肉    | 山东莒县      |
| HX08-46   | V01A1352              | 红皮心里美               | 红皮红肉    | 河北农科院蔬菜所  |
| HX08-49   | V01A1908              | 心里美                 | 绿皮红肉    | 新疆石河子     |
| HX08-51   | -                     | 陪陵红心 1              | 红皮红肉    | 重庆涪陵      |
| HX08-53   | V01A0983              | 小辛庄青萝卜              | 绿皮绿肉    | 天津南郊区     |
| HX08-54   | V01A0984              | 二路缨子                | 绿皮绿肉    | 天津南郊区     |
| HX08-57   | V01A0016              | 煨壶萝卜                | 绿皮绿肉    | 安徽阜南县     |
| HX08-58   | V01A0004              | 青皮脆                 | 绿皮绿肉    | 安徽蚌埠市     |
| HX08-66   | V01A0995              | 沙窝青萝卜               | 绿皮绿肉    | 天津西郊区     |
| HX08-86   | V01A0763              | 潍城潍县青               | 绿皮绿肉    | 山东潍城县     |
| KB07-15   | V01A0891              | 新生                  | 浅绿皮白肉   | 山西蔬菜所     |
| KB09-1    | -                     | 夏白玉株系 1             | 白皮白肉    | 韩国        |
| KB09-5    | V01A1032              | 三月萝卜                | 浅绿皮白肉   | 云南昆明市     |
| KB09-6    | V01A0316              | 武陟透心红               | 红皮白肉    | 河南武陟县     |
| KB09-7    | V01A0596              | 稍白尖                 | 粉红皮白肉   | 内蒙古丰镇县    |
| KB09-9    | V01A0377              | 柘城大红袍               | 红皮白肉    | 河南柘城县     |
| KB09-10   | -                     | 俄引 4-1 号            | 红皮白肉    | 俄罗斯       |

表 1(续)

| 材料编号 Code | 统一编号 Accession number | 品种名称 Accession name | 类型 Type | 来源 Origin |
|-----------|-----------------------|---------------------|---------|-----------|
| KB09-11   | V01A0174              | 小梅耙齿                | 绿皮白肉    | 广东新会县     |
| KB09-12   | V01A0610              | 红水萝卜                | 粉红皮白肉   | 内蒙古乌兰浩特市  |
| KB09-20   | V01A0319              | 西峡露头青               | 绿皮白肉    | 河南西峡县     |
| KB09-21   | V01A0918              | 大青皮                 | 白皮白肉    | 陕西引自北京    |
| KB09-22   | —                     | 心里美                 | 绿皮红肉    | 北京        |
| KB09-23   | —                     | 春早红                 | 红皮白肉    | 北京        |
| KB09-25   | V01A0817              | 水萝卜                 | 绿皮绿肉    | 山东邹平县     |
| KB09-32   | V01A0607              | 当地大萝卜               | 白皮白肉    | 内蒙古翁牛特旗   |
| KB09-35   | V01A0926              | 丹东青                 | 浅绿皮白肉   | 辽宁丹东市     |
| L08Q-1    | —                     | YR 株系 1             | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-5    | —                     | 生粹大根株系 1            | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-7    | —                     | 夏白玉株系 2             | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-8    | —                     | YR 株系 2             | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-11   | —                     | 世农 YR1010           | 紫红皮白肉   | 韩国        |
| L08Q-12   | V01A0653              | 大红袍                 | 红皮白肉    | 山东东平县     |
| L08Q-13   | V01A0274              | 临汝露头青               | 绿皮白肉    | 河南临汝县     |
| L08Q-16   | —                     | 夏秋美浓                | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-17   | —                     | 秋诒                  | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-19   | —                     | 东方黑根                | 黑皮白肉    | 俄罗斯       |
| L08Q-20   | —                     | 圆红                  | 红皮白肉    | 北京        |
| L08Q-21   | —                     | 涿州绿皮                | 绿皮白肉    | 河北        |
| L08Q-22   | V01A0956              | 秦菜二号                | 绿皮白肉    | 陕西西安市     |
| L08Q-27   | V01A0889              | 国光                  | 绿皮白肉    | 山西蔬菜所     |
| L08Q-29   | V01A0228              | 上碑白萝卜               | 白皮白肉    | 河北行唐县     |
| L08Q-30   | V01A0933              | 绛县白                 | 白皮白肉    | 山西绛县      |
| L08Q-32   | V01A0072              | 大红袍                 | 红皮白肉    | 北京        |
| L08Q-33   | —                     | 白秋美浓                | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-35   | —                     | 生粹大根株系 2            | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-37   | —                     | 半截绿                 | 绿皮白肉    | 山东        |
| L08Q-38   | V01A1054              | 大樱洋红萝卜              | 红皮白肉    | 浙江杭州市     |
| L08Q-39   | —                     | 韩引 1 号              | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-40   | —                     | 白玉小畔                | 白皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-41   | —                     | 俄引 4-2 号            | 红皮白肉    | 韩国        |
| L08Q-46   | V01A0857              | 河津牛角白               | 白皮白肉    | 山西河津县     |
| L08Q-49   | V01A0404              | 滩头坪萝卜               | 白皮白肉    | 湖南长沙市     |
| L08Q-50   | V01A0227              | 邢台心里美               | 绿皮紫红肉   | 河北邢台市     |
| L08Q-53   | V01A0104              | 四季红萝卜               | 红皮红肉    | 四川石棉县     |
| L08Q-56   | V01A0569              | 心里美                 | 绿皮红肉    | 辽宁农科院     |
| L08Q-57   | V01A0838              | 红心萝卜                | 红皮红肉    | 山东汶上县     |
| L08Q-58   | V01A1098              | 红心萝卜                | 红皮白肉    | 四川丰都县     |
| L08Q-61   | V01A1845              | 枣庄红皮红心              | 红皮红肉    | 山东枣庄市     |
| L08Q-62   | —                     | 陪陵红心 2              | 红皮红肉    | 重庆涪陵      |
| L08Q-63   | V01A0627              | 红旦旦水萝卜              | 红皮白肉    | 宁夏中卫县     |
| L08Q-64   | V01A1823              | 克谢尼亚(乌 15)          | 红皮白肉    | 山东引自乌克兰   |
| L08Q-65   | V01A1840              | 红皮白尖(俄 49)          | 紫红皮白肉   | 山东引自俄罗斯   |
| L08Q-66   | V01A0475              | 白杨花萝卜               | 白皮白肉    | 江苏句容县     |
| L08Q-67   | V01A1010              | 白蛋子春萝卜              | 白皮白肉    | 新疆乌鲁木齐县   |
| L08Q-70   | V01A0626              | 白旦旦水萝卜              | 白皮白肉    | 宁夏中卫县     |
| L08Q-71   | —                     | 俄引 3 号              | 浅绿皮白肉   | 俄罗斯       |
| L08Q-72   | —                     | 俄引 4-3 号            | 红皮白肉    | 俄罗斯       |
| L08Q-74   | —                     | 俄引 6 号              | 浅绿皮白肉   | 俄罗斯       |
| L08Q-75   | —                     | 俄引 8 号              | 红皮浅紫肉   | 俄罗斯       |
| L08Q-77   | —                     | 俄引 12 号             | 红皮白肉    | 俄罗斯       |

—: 未入库资源, 无统一编号

-: The resources are not conserved in genebank and without unique accession number

根据萝卜 cDNA 文库测序 (RadishDB) 已公布 SSR 引物序列 (表 2) 及引物在染色体上的位置,选择分布于染色体着丝粒两端的 71 对 SSR 引物,由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司合成。*Taq* DNA 聚合酶、dNTPs、Marker 购自北京天根生物技术公司。

表 2 入选萝卜 EST-SSR 引物序列

Table 2 Sequence of SSR primers based on radish EST

| 引物 Primer | 正向引物 Forward sequence   | 反向引物 Reverse sequence    |
|-----------|-------------------------|--------------------------|
| Bn26A     | TAAACTTGTGACAGCCGTTATC  | CCCGTAAATCAAGCAAAATGG    |
| Bn35d     | GCAGAAGGAGGAGAAGACTTGG  | TTGAGCCGTAAAGTTGTACACCT  |
| BRMS-005  | ACCTGCTGCAGATTGCTGTC    | GCTGACCTTTCTTACCGCTC     |
| Na10-D07  | CTACTTTGATGGACACTTGCC   | TCTGAAGTTGATTAGTCGGTCC   |
| Na10-G10  | TGGAACATTGCTGTTAAGGC    | CATAGATTCCATCTCAAATCCG   |
| Na10-H06  | AGAATGAGACCCAGAAACCG    | GCCACACTCTCTCTTACTAGGGC  |
| Na12-E05  | CGTATGTTTGTCCACCTGC     | ACTAGCAACCACACGGACC      |
| Na14-E08  | TTACTATCCCTCTCCGCAC     | GCGGATTATGATGACGCAG      |
| Ni3-D03   | ACCGGAGACGAAACTACCG     | CCTCTCGACGTTTTTGCTG      |
| OH10-G05  | TCAATGCTCTTGTAGCTTTGACC | AGAATGAGAGCGTGGAGAGG     |
| OH10-G05  | TCAATGCTCTTGTAGCTTTGACC | AGAATGAGAGCGTGGAGAGG     |
| Ra1-H08   | GTCGATGATCAGGAAGAGG     | CTTGACAGCTACGGTTTGTC     |
| Ra2-E11   | GGAGCCAGGAGAGAAGAAGG    | CCCAAACTTCCAAGAAAAGC     |
| JKC1      | TGCACGTGGTATGTGATAAA    | GAATGAGCAAATTAACCTAAGG   |
| JKC2      | TAACCCGTCAGGGAAGACAC    | AATGGCACCCACTACCATTT     |
| JKC4      | AGAAGCGACAATGGCTTTCA    | CACGAAAGCAGACCAAGACA     |
| JKC15     | AGCAACAGAAGGCAAAACACA   | CCTGGTGCTTCCAACAATTT     |
| 170       | ATCTTCATGCTGCCTTTCGC    | TTGCAAAGAGCAAAACGAGAG    |
| 343       | CGGTGGAATTTTCCAAAGAA    | TGCTTTTCTCTTCTCCCTATCACA |
| 391       | AGACCCGTTTGAGGGTTTCT    | CTAGTCCAAGCCGCTTCAGT     |
| 612       | CGGTCTAGCGAAAAGGAAGA    | GCCACAGAAAACAGAAACT      |
| 722       | AGGAGATCAACGACCCATGA    | TACACACCTGGCAGCTCGTTC    |
| 881       | TCGTACCCATGTTGTAATAACC  | CAACTTCTCTGAGCCTAACG     |
| 1142      | CTCTGCCCAACATTCTCTCC    | TCCGGACTCTTCTGCTCTC      |
| 1290      | CTCGAAGCTGCTCTCTCCAT    | CCGAGCACGAAGAGGAATAC     |
| 2170      | CAAGGAGGAAACCGTGAAAA    | GGAACTGATTTTTCCTTGG      |
| 2530      | AATCAAAGGAAACGCCAATG    | CCAAGCAAAGCCTTTACGAC     |
| 2925      | CGAGTGGATGTTCAATGTG     | GATTCGGGTAGCTTCAGCAG     |
| 3054      | CCCTCTACAAACCCAAAACAA   | GGTTTGACCCAAATCAGCAG     |
| 3518      | GGAGGAGCAATGTCGTCTTC    | TGCTGTGGAATCTCTGTGC      |
| 4386      | CTTTTCTTTTGGAAATTTCTT   | ACCGCCTGCTTACCAATCT      |
| 4533      | AAGTGAGAGGGAGGGACCAT    | GACATCGAACAAGCGCATCA     |
| 5425      | CCGCTACATCCTCTGACCTC    | CCGGAGTAGTTAGCGACTG      |
| 5487      | CACAAGCTGCCGTGAAAATG    | TCAAGCGGTACACAGCACA      |
| 5761      | ACCTTGAGGAGCAGCTGTGG    | AGGCCAACCGAGGAAGTAAT     |
| 5937      | CAAAAGTAACAGAGCGCGAGA   | GGAGAAGAAGACGACGGAGA     |
| 5950      | GATGGTGGACTCGGAAGAAA    | ACAATTTTGACGCGAGAAGC     |

表 2 (续)

| 引物 Primer | 正向引物 Forward sequence   | 反向引物 Reverse sequence   |
|-----------|-------------------------|-------------------------|
| 7024      | CAGATCGGAAACGGAAGAAA    | GGCTGCTTCTCTGCTGCTAG    |
| 7916      | CCTCGTTTCAGGAAAGGAAT    | GGTCGCAGCACAAGAGAGTA    |
| 1159      | CAAAGCAAAATAATGGCTTTGAA | GCAGCAACACTCACTTTCCA    |
| 1299      | TCGTAGGCAAAAATCAAAAGC   | CTTCCCATACCCGCAAGCTA    |
| 2044      | GGAGCCGAACTTGAAC TTGA   | CCTCCTCGACTGACGCTTAG    |
| 2128      | ATCCCACTGGCCACAGTTAG    | GAGAGGAACCCAGCAGTAGC    |
| 2333      | TTAGGGCTTTGGTCTTTGGA    | CACATCATGGCTTTCTCCAC    |
| 2486      | GCGGTGTTTGATTGCTTAT     | ATTCTTCTGCTCTCTGCTCCA   |
| 2540      | CGGTGCTCTTTCTCTCAGAA    | CCTCCTCAACACCGATTCTC    |
| 2917      | GGGTACCGAAGGAGACGAA     | GAGGAGCAAGACGAGGACAC    |
| 3022      | TGGGGTGAACGATACGAT      | GGCAAAACCCAAAGAACAAA    |
| 3027      | CTGTTCTGCGCATGATCGTA    | AATCCATGTCCACACATCTCC   |
| 3178      | CCGAACCGAGTCTTTGGATA    | ATTGAGGTCAAGTTGACACA    |
| 4113      | AGATGCTGACTTGGCAGGT     | CCTTTTCAACCATCACCATCA   |
| 4155      | TTGCTTGGCTCGATACAGAG    | GTTCTGCAATGCTGTGGCTA    |
| 7164      | TGTGAGAAAGAGTCCCTCTCTG  | GAGACAGCTCTAAGGAAACGGTA |
| 7304      | GAAGCCCTCAGATGTCAAGC    | CATCCGTTTTGAAGATGAAAA   |
| 7591      | GCTTCTGCATGTGGGATTCT    | GGATTGAGGCGTCTGCTAA     |
| 7936      | TTTCGCGGGAGAGAAGACTA    | CTCGACCAACGGAACATC      |
| 8640      | TACCCAAAATCGAATCGAAA    | TTCCCCCGTATACCTTCTCC    |
| 8670      | CAGTTAGCAGGCCAACCAGT    | CTCTGCTCTTGCTCGGTTGT    |
| 154 (2)   | AGGTCAAGGACGAGCAAGAA    | TTCTTGGTCCGAAAGATGG     |
| Na10-A08  | CATGTTTAAAAAATGGCCC     | CAAGAAACACCATCATTTCTCA  |
| Na10-F08  | AAACTTGCTTTTCGAGGATGG   | AAACCACTGACTCCATCGG     |
| Na12-H02  | CTATGGTTCATCTTTCGCCG    | GCTGCACATCCATCTCTCG     |
| Na14-F11  | CTATGGTTCATCTTTCGCCG    | CATGCTCCAACCAAGTTTG     |
| Na14-G06  | AAACGGCTTGCAATGTTCTC    | GGCTGCTTGATCCAGCTCTC    |
| Ni2-A02   | GAGTGAATCTTGCTACTGTG    | AAGGTCTGTGAAATGACAGG    |
| Ni2-C12   | ACATTCTTGATCTTGATTCTG   | AAAGGTCAAGTCTTCTCTCG    |
| Ni2-E05   | CTGCTCTCAGGATTATGTCG    | CAGACAGAGGATAGACCGAAC   |
| OH10-F09  | AGAGAGCGAGATTGATTGGC    | AAACGACCAAGAGTATTCC     |
| OH11-E03  | GCTCTCCAGTGAGAATCAC     | GAAAACCAATCCAGTGCCTG    |
| Ra3-D02B  | CACAGGAAACCGTGCTAGA     | AACCAACCTCAACGCTCTTG    |
| JKC3      | CCACTTCTTCCCACTA        | TTCAATCAATGGTGACCAAT    |

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取与检测 每份萝卜种质取 10 株,选取嫩叶混合取样,冷冻干燥后,粉碎。采用改良的 CTAB 方法<sup>[10]</sup>提取 DNA。利用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 浓度。并将每份样品的浓度稀释到 20 ~ 25 ng/ $\mu$ L。

1.2.2 SSR 分析 PCR 反应扩增体系为 20  $\mu$ L,其中 DNA 40 ng、10 mmol/L 引物 0.25  $\mu$ L、

25 mmol/L MgCl<sub>2</sub> 1.2 μL、1 mmol/L dNTPs 1.2 μL, *Taq* 1U。PCR 扩增在 PTC-100PCR 仪上进行。扩增程序为 94 ℃ 预变性 5 min; 94 ℃ 变性 30 s, 55 ~ 58 ℃ 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72 ℃ 延伸 7 min。PCR 产物采用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 160 V 稳压电泳 1.5 ~ 2.0 h。银染显色<sup>[11]</sup>。

**1.2.3 数据处理和分析** 将电泳图谱上清晰可见且可重复出现的条带记为 1, 同一位置没有出现带的记为 0, 生成由 1 和 0 组成的二进制代码编码。计算多态性位点百分率( $p$ ):  $p = (k/n) \times 100\%$ , 其中  $k$  为多态性位点数目;  $n$  为所测位点总数。按照各种质每对引物扩增出的条带类型, 将每对引物产生的各种质 1 和 0 二进制代码编码转换成十进制代码, 赋值固定。利用 MATLAB 软件进行编程, 本程序包括 1 个主函数 MAIN. m 和 4 个子函数 SAME. m、PICK. m、ID. m、Print-Name. m。每个子函数均可以独立使用, 集成使用时可以直接调用主函数即可完成 4 个函数的调用。利用该程序首先确认是否有完全相同的种质(如果有则进行剔除), 然后根据最少引物代表最多种质的原则, 挑选最具代表性的引物。最后, 利用条形码生成器, 将十进制数字转换成 Code128bWin 形条形码。

## 2 结果与分析

### 2.1 75 份萝卜种质 SSR 标记多态性分析

从 71 对引物中筛选出 22 对扩增多态性高、带型清晰、重复试验均出现同样带型的引物。22 对引物在 75 份种质中共扩增出 153 条谱带, 其中多态性条带 87 条, 平均多态性位点百分率为 55.49%, 平均每对引物可扩增出 6.95 条带和 3.95 条多态性带。不同引物扩增出的总带数和多态性带数差异较大。Ra2E11、7304、3518、343 多态性百分率为 100% (表 3)。

### 2.2 75 份萝卜种质的特异性分析

根据 75 份萝卜 SSR 扩增条带, 可以清晰的找到各引物扩增出的特异条带, 即特异位点。如在利用引物 BrmS005 扩增的条带中, 只有萝卜种质 L08Q-38 扩增出“2”编码的带型, 即 170 bp 和 140 bp 2 条带, 而 160 bp 和 150 bp 处无带; 在单一条带扩增中, 只有萝卜种质 L08Q-11、KB08-25、L08Q-65 能够扩增出 160 bp 的条带。引物 2170 扩增的条带中, 只有 HX08-58 能够扩增出

“8”号编码的带型。其他材料经过多态性带的组合便可得以区分。

### 2.3 75 份萝卜种质分子身份证的构建

统计各多态性引物在所有种质中扩增得到的各位点二进制代码的组合数, 并固定各引物及其条带组合类型的顺序, 继而对各组合进行十进制赋值并转换成十进制代码(表 3、表 4)。用最少的数字串确定每一个品种唯一的有序编号。经过原始数据的处理和在 MATLAB 中的筛选, 最终的数据表大小为 8 × 75, 即最终的编码长度为 8 位、按照引物顺序 BrmS005、2170、2333、5761、612、Bn35d、JKC4、2917 组成。利用条形码生成器将数字转换成条形码(表 5), 即得到每份种质唯一的身份证。

表 3 不同 SSR 引物对 75 份萝卜种质扩增产物多态性比较  
Table 3 Comparison of genetic diversity among 75 radish germplasms amplified by different SSR primers

| 引物对<br>Primer | 多态性<br>带数 No. of<br>polymorphic<br>bands | 总带数<br>Total<br>bands | 多态性<br>百分率(%)<br>Percentage of<br>polymorphic bands | 十进制代码<br>组合数<br>Combinations<br>of decimal<br>code system |
|---------------|------------------------------------------|-----------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------|
| Ra2E11        | 11                                       | 11                    | 100                                                 | 26                                                        |
| 7304          | 10                                       | 10                    | 100                                                 | 29                                                        |
| 3178          | 7                                        | 9                     | 77.78                                               | 7                                                         |
| 1290          | 7                                        | 8                     | 87.5                                                | 9                                                         |
| 2925          | 6                                        | 10                    | 60                                                  | 9                                                         |
| 3518          | 6                                        | 6                     | 100                                                 | 6                                                         |
| 7936          | 4                                        | 5                     | 80                                                  | 4                                                         |
| BrmS005       | 4                                        | 12                    | 33.33                                               | 6                                                         |
| Na14E08       | 4                                        | 6                     | 66.67                                               | 9                                                         |
| 343           | 3                                        | 3                     | 100                                                 | 5                                                         |
| 2170          | 3                                        | 10                    | 30                                                  | 8                                                         |
| 2333          | 2                                        | 6                     | 33.33                                               | 4                                                         |
| Na12H02       | 2                                        | 7                     | 28.57                                               | 2                                                         |
| 2486          | 2                                        | 6                     | 33.33                                               | 3                                                         |
| 4533          | 2                                        | 6                     | 33.33                                               | 3                                                         |
| 5761          | 2                                        | 7                     | 28.57                                               | 3                                                         |
| 612           | 2                                        | 8                     | 25                                                  | 3                                                         |
| Bn35d         | 2                                        | 8                     | 25                                                  | 3                                                         |
| JKC4          | 4                                        | 3                     | 75                                                  | 4                                                         |
| 2917          | 1                                        | 3                     | 33.33                                               | 2                                                         |
| 0110C02       | 1                                        | 5                     | 20                                                  | 2                                                         |
| 2540          | 2                                        | 4                     | 50                                                  | 4                                                         |
| 总体 Total      | 87                                       | 153                   |                                                     |                                                           |
| 平均 Average    |                                          |                       | 55.49                                               | 6.86                                                      |

表 4 入选引物原始矩阵组合

Table 4 Original matrix combination of selected primers

| 引物对<br>Primers | 二进制代码组合与十进制代码<br>Binary code combination and decimal code |   |   |   |   |   |   |   |   |
|----------------|-----------------------------------------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|
|                | PCR 产物长度 (bp)                                             | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 |
|                | Length of the PCR product                                 |   |   |   |   |   |   |   |   |
| BrmS005        | 170                                                       | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 |   |   |
|                | 160                                                       | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |   |   |
|                | 150                                                       | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 | 0 |   |   |
|                | 140                                                       | 0 | 1 | 0 | 0 | 0 | 1 |   |   |
| 2170           | 200                                                       | 1 | 1 | 1 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1 |
|                | 180                                                       | 1 | 0 | 0 | 1 | 1 | 0 | 0 | 1 |
|                | 170                                                       | 1 | 0 | 1 | 1 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 2333           | 160                                                       | 0 | 0 | 1 | 1 |   |   |   |   |
|                | 150                                                       | 0 | 1 | 0 | 1 |   |   |   |   |
| 5761           | 250                                                       | 1 | 1 | 0 |   |   |   |   |   |
|                | 230                                                       | 0 | 1 | 1 |   |   |   |   |   |
| 612            | 180                                                       | 1 | 1 | 0 |   |   |   |   |   |
|                | 170                                                       | 0 | 1 | 1 |   |   |   |   |   |
| Bn35d          | 250                                                       | 1 | 1 | 0 |   |   |   |   |   |
|                | 240                                                       | 0 | 1 | 1 |   |   |   |   |   |
| JKC4           | 220                                                       | 1 | 1 | 0 | 0 |   |   |   |   |
|                | 210                                                       | 1 | 0 | 1 | 0 |   |   |   |   |
| 2917           | 270                                                       | 0 | 1 |   |   |   |   |   |   |

表 5 萝卜种质分子身份证号码

Table 5 Molecular identification number for radish Germplasm

| 种质编号<br>Code | 分子身份证<br>号码 Molecular<br>identification<br>number | 分子身份证<br>条形码 Molecular<br>identification<br>barcode | 种质编号<br>Code | 分子身份证<br>号码 Molecular<br>identification<br>number | 分子身份证<br>条形码 Molecular<br>identification<br>barcode | 种质编号<br>Code | 分子身份证<br>号码 Molecular<br>identification<br>number | 分子身份证<br>条形码 Molecular<br>identification<br>barcode |
|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|--------------|---------------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| L08Q-12      | 12232121                                          | 12232121                                            | L08Q-64      | 51333331                                          | 51333331                                            | L08Q-40      | 55233321                                          | 55233321                                            |
| L08Q-5       | 12233121                                          | 12233121                                            | KB09-12      | 52213142                                          | 52213142                                            | KB09-9       | 55313341                                          | 55313341                                            |
| L08Q-22      | 13231222                                          | 13231222                                            | L08Q-30      | 52213321                                          | 52213321                                            | L08Q-37      | 55332131                                          | 55332131                                            |
| KB09-22      | 14223122                                          | 14223122                                            | L08Q-7       | 52233121                                          | 52233121                                            | L08Q-39      | 55333141                                          | 55333141                                            |
| HX08-49      | 14333321                                          | 14333321                                            | L08Q-75      | 52233141                                          | 52233141                                            | L08Q-77      | 55413132                                          | 55413132                                            |
| KB09-35      | 15231121                                          | 15231121                                            | L08Q-71      | 52233332                                          | 52233332                                            | L08Q-56      | 55413221                                          | 55413221                                            |
| L08Q-61      | 15233221                                          | 15233221                                            | L08Q-17      | 52331121                                          | 52331121                                            | HX08-1       | 55423221                                          | 55423221                                            |
| L08Q-53      | 15313231                                          | 15313231                                            | KB07-15      | 53133242                                          | 53133242                                            | HX08-66      | 55423321                                          | 55423321                                            |
| L08Q-57      | 15413221                                          | 15413221                                            | L08Q-16      | 53232222                                          | 53232222                                            | HX08-33      | 55433121                                          | 55433121                                            |
| KB09-21      | 16222121                                          | 16222121                                            | L08Q-35      | 53233141                                          | 53233141                                            | HX08-15      | 55433221                                          | 55433221                                            |
| L08Q-49      | 16323141                                          | 16323141                                            | L08Q-62      | 53333241                                          | 53333241                                            | L08Q-1       | 56213131                                          | 56213131                                            |
| HX08-58      | 18413221                                          | 18413221                                            | HX08-51      | 53333311                                          | 53333311                                            | HX08-46      | 56213321                                          | 56213321                                            |
| L08Q-38      | 25233131                                          | 25233131                                            | L08Q-8       | 54221131                                          | 54221131                                            | L08Q-74      | 56213341                                          | 56213341                                            |
| L08Q-72      | 32213141                                          | 32213141                                            | HX08-40      | 54223241                                          | 54223241                                            | L08Q-13      | 56231241                                          | 56231241                                            |
| KB09-5       | 34233141                                          | 34233141                                            | HX08-53      | 54333221                                          | 54333221                                            | KB09-32      | 56313121                                          | 56313121                                            |
| L08Q-66      | 34433221                                          | 34433221                                            | L08Q-46      | 54413221                                          | 54413221                                            | L08Q-29      | 56333241                                          | 56333241                                            |
| KB09-10      | 35213111                                          | 35213111                                            | HX08-54      | 54423221                                          | 54423221                                            | HX08-86      | 56413121                                          | 56413121                                            |
| KB09-23      | 35233141                                          | 35233141                                            | L08Q-21      | 54433221                                          | 54433221                                            | HX08-21      | 57213121                                          | 57213121                                            |
| KB09-7       | 35233322                                          | 35233322                                            | L08Q-20      | 55213121                                          | 55213121                                            | L08Q-63      | 57213141                                          | 57213141                                            |
| L08Q-70      | 35323122                                          | 35323122                                            | L08Q-67      | 55213131                                          | 55213131                                            | KB09-1       | 57333111                                          | 57333111                                            |
| KB09-6       | 35333211                                          | 35333211                                            | L08Q-32      | 55213341                                          | 55213341                                            | L08Q-27      | 57333121                                          | 57333121                                            |
| L08Q-58      | 35413121                                          | 35413121                                            | L08Q-33      | 55231141                                          | 55231141                                            | KB09-20      | 57333321                                          | 57333321                                            |
| L08Q-11      | 45323132                                          | 45323132                                            | L08Q-50      | 55233121                                          | 55233121                                            | L08Q-19      | 63233342                                          | 63233342                                            |
| KB09-25      | 46313121                                          | 46313121                                            | HX08-12      | 55233221                                          | 55233221                                            | L08Q-41      | 65233341                                          | 65233341                                            |
| L08Q-65      | 47333142                                          | 47333142                                            | HX08-57      | 55233222                                          | 55233222                                            | KB09-11      | 68333141                                          | 68333141                                            |

### 3 讨论

本研究基于 SSR 分子标记、信息处理和图像处理技术,尝试构建了萝卜优异种质分子身份证。分析表明,应用经筛选获得的 SSR 标记能有效地揭示 75 份萝卜种质丰富的遗传多样性和特异性;经过原始数据的处理和 MATLAB 筛选,8 对 SSR 引物能有效区分 75 份萝卜种质。萝卜分子身份证的初步构建及其应用有望为正确反映或标识种质的多样性和特异性、有效地防止我国特有资源的流失提供依据和技术支持。虽然植物种质资源分子身份证的研究有了一定的进展,但是从已发表的桃<sup>[9]</sup>、水稻<sup>[12-14]</sup>、葡萄<sup>[15]</sup>、甜高粱<sup>[16]</sup>、大豆<sup>[7,17]</sup>、亚麻<sup>[18]</sup>、苕麻<sup>[19]</sup>、红麻<sup>[20]</sup>、甘蔗<sup>[21]</sup>、茶等<sup>[22]</sup>不同研究材料的处理、标记种类及其核心引物的选择、身份证编码的规则以及身份证适用范围的验证上,同种作物及不同物种之间都缺乏统一的标准,该技术还有待于进一步的实践验证及标准化。

种质库中保存的种质大多为地方品种,对于自花授粉作物而言,其种质的纯度相对较高,但是对于异花授粉蔬菜而言,种群群体内不可避免地存在群体内遗传多样性。无论是自花授粉作物,还是异花授粉作物,任何一种质经过多代自交获得的自交系理论上群体内单株间应该是高度一致的,单株的每个位点也应该是纯合的。本研究认为,对于种质资源库保存的资源来说,群体内存在明显表型多样性的种质是不适合构建分子身份证的,因为以少数单株为代表的样本不能代表种质的整个群体。来源于原始种质高代自交系是种质中一个单株的后代,其分子身份证亦不能代表原始种质。因此,建议在构建分子身份证前,应该加强种质资源的整理使其成为表型上基本一致的种质。在以后的更新过程中,通过科学方法,尽可能保持其遗传多样性和遗传稳定性。

本研究所构建的分子身份证在现有材料的范围内是可以用于有效鉴定不同材料的。但是,仍未包含所有的种质类型,还不足用于鉴定和区分所有种质。在分子身份证应用过程中,当某份种质与现有标记的扩增谱带类型完全一致时,也不能断定两份种质是完全相同的。建议基于基因组测序或高密度连锁图谱构建开发一套备用引物,进一步分析鉴定

新的样本,以验证其是否完全一致或存在差异。随着萝卜核心种质构建或具有遗传多样性代表性种质资源的获得以及种质身份证的完善将更有利于分子身份证的应用。

### 参考文献

- [1] Crisp P. Radish, *Raphanus sativus* (Cruciferae) [M]//Smartt J, Simmonds N W. Evolution of crop plants, 2nd Edition. UK: Longman Scientific & Technical, 1995: 86-89
- [2] Hebert P D, Cywinska A, Ball S L, et al. Biological identifications through DNA barcodes [J]. Proc Biol Sci, 2003, 270: 313-321
- [3] Jeffreys A J, Wilson V, Thein S W. Hypervariable 'minisatellite' regions in human DNA [J]. Nature, 1984, 314: 67-73
- [4] 陈琛, 张兴桃, 程斐, 等. 秋甘蓝品种的 SSR 指纹图谱的构建 [J]. 园艺学报, 2011, 38(1): 159-164
- [5] 赵卫国, 王灏, 李殿荣, 等. 甘蓝型特高含油量油菜种质及其主栽品种的指纹图谱构建 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(6): 904-909
- [6] 高源, 田路明, 刘凤之, 等. 利用 SSR 荧光标记构建 92 个梨品种指纹图谱 [J]. 园艺学报, 2012, 39(8): 1437-1446
- [7] 高运来, 朱荣胜, 刘春燕, 等. 黑龙江部分大豆品种分子 ID 的构建 [J]. 作物学报, 2009, 35(2): 211-218
- [8] 艾呈祥, 张力思, 魏海蓉, 等. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立 [J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 55-58
- [9] 陈昌文, 曹珂, 王力荣, 等. 中国桃主要品种资源及其野生近缘种的分子身份证构建 [J]. 中国农业科学, 2011, 44(10): 2081-2093
- [10] 孔秋生, 李锡香, 向长萍, 等. 栽培萝卜种质亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 中国农业科学, 2005, 38(5): 1017-1023
- [11] Qin R Z, Qiu Y, Cheng Z J, et al. Genetic analysis of a novel dominant rice dwarf mutant 986083D [J]. Euphytica, 2008, 160: 379-387
- [12] 陆徐忠, 从夕汉, 刘海珍, 等. 杂交水稻亲本分子身份证及 SSR 指纹数据库的建立 [J]. 核农学报, 2012, 26(6): 853-861
- [13] 辜大川, 邱东峰, 殷明珠, 等. 水稻优异资源分子身份证的建立 [J]. 湖北农业科学, 2012, 51(24): 5579-5589
- [14] 颜静宽, 田大刚, 许彦, 等. 杂交稻主要亲本的 SSR 分子身份证数据库的构建 [J]. 福建农业学报, 2011, 26(2): 148-152
- [15] 杜晶晶, 刘国银, 魏军亚, 等. 基于 SSR 标记构建葡萄种质资源分子身份证 [J]. 植物研究, 2013, 33(2): 232-237
- [16] 王黎明, 焦少杰, 姜艳喜, 等. 142 份甜高粱品种的分子身份证构建 [J]. 作物学报, 2011, 37(11): 1975-1983
- [17] 丁俊杰, 姜翠兰, 顾鑫, 等. 利用与大豆灰斑病抗性基因连锁的 SSR 标记构建大豆品种(系)的分子身份证 [J]. 作物学报, 2012, 38(12): 2206-2216
- [18] 郝冬梅, 邱财生, 于文静, 等. 亚麻 RAPD 标记分子身份证体系的构建与遗传多样性分析 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(5): 168-174
- [19] 王晓飞, 陈建华, 梁明宝, 等. 苕麻种质资源分子身份证构建的初步研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 802-805
- [20] 郑海燕, 栗建光, 戴志刚, 等. 利用 ISSR 和 RAPD 标记构建红麻种质资源分子身份证 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(17): 3499-3510
- [21] 刘新龙, 马丽, 陈学宽, 等. 云南甘蔗自育品种 DNA 指纹身份证构建 [J]. 作物学报, 2010, 36(2): 202-210
- [22] 杨阳, 刘振, 赵洋, 等. 湖南省主要茶树品种分子指纹图谱的构建 [J]. 茶叶科学, 2010, 30(5): 367-373