

利用 SSR 标记鉴定不结球白菜春福种子纯度

孙中伟¹, 吕晨晨², 徐友莲³, 李嫚嫚³, 郭涛², 高琪会²

(1. 河南豫农种业科技发展有限公司 郑州 450002; 2. 河南普威生物科技有限公司 郑州 450002;
3. 无锡普威农业科技有限公司 江苏无锡 214000)

摘要: 目前不结球白菜的种子纯度鉴定以田间鉴定为主, 该方法除耗时耗力外, 鉴定结果还易受环境影响。为控制种子流入市场的质量、获得一种高效且能够批量鉴定不结球白菜春福种子纯度的方法, 以分子标记为切入点, 利用分子标记技术对种子进行纯度鉴定, 从 96 对 SSR 引物中筛选出 3 对在春福父本、母本中表现出多态性的引物, 其中 Rapa57 表现优异, 适于对春福进行纯度鉴定。利用 Rapa57 对 210 份春福杂交种进行纯度鉴定, 与田间鉴定结果的偏差仅为 1.9%, 吻合度为 98.1%, 表明 SSR 标记适于对不结球白菜进行纯度鉴定。该方法不仅提高了鉴定效率, 还具有较好的稳定性和准确性, 能够为种子生产与质量控制提供科学依据。

关键词: 不结球白菜; 春福; 杂交种; 纯度鉴定

中图分类号: S634.3

文献标志码: A

文章编号: 1673-2871(2025)08-161-05

Hybrid purity identification of *Brassica campestris* ssp. *chiensis* variety Chunfu by SSR marker

SUN Zhongwei¹, LÜ Chenchen², XU Youlian³, LI Manman³, GUO Tao², GAO Qihui²

(1. Henan Yuyi Seed Industry Technology Development Co., LTD., Zhengzhou 450002, Henan, China; 2. Henan Power Biotechnology Co., LTD., Zhengzhou 450002, Henan, China; 3. Wuxi Power Agricultural Technology Co., LTD., Wuxi 214000, Jiangsu, China)

Abstract: Currently, the assessment of seed purity in *Brassica campestris* primarily relies on field identification methods. These methods are not only time-consuming and labor-intensive, but also susceptible to environmental factors. To ensure the quality of seeds entering the market and to expedite the market penetration of Chunfu seeds, this study developed an efficient identification method for Chunfu seeds by molecular marker technology. To develop an efficient method for identification the seed purity of *Brassica campestris* (syn. *Brassica rapa*) ssp. *chiensis* variety Chunfu, three SSR primers were selected from 96 SSR primer pairs that exhibited polymorphism between the parental lines of Chunfu. Among these, Rapa57 demonstrated superior performance and deemed suitable for purity identification. The Rapa57 was selected to identify the seeds purity of Chunfu. Molecular detection matched field phenotypic identification with 1.9% deviation, the consistency was 98.1%. These results indicated that SSR marker can be applied to identify the purity of *Brassica campestris*. This method approach enhances identification efficiency, exhibits excellent stability and accuracy, also provides a robust scientific basis for seed production and quality control.

Key words: *Brassica campestris* ssp.; Chunfu; Hybrid; Purity identification

不结球白菜 [*Brassica campestris* (syn. *Brassica rapa*) ssp. *chiensis*], 又称小白菜、胶菜、瓢儿菜、瓢儿白、油菜, 属于十字花科芸薹属芸薹种不结球白菜亚种。不结球白菜起源于中国, 原产中国南方, 在中国有悠久的栽培历史, 栽培十分普遍, 主要产区为中国长江以南地区^[1-2]。不结球白菜 2022 年种植面积约 30 万 hm², 年总产量约 1800 万 t, 在蔬菜周年供应上具有重要地位^[3]。随着杂种优势在育种中的应用, 不结球白菜的优秀杂交种在市场中逐渐

占据重要地位, 其较强的抗病性和适应性, 使产量和品质显著提升^[4]。然而在制种过程中可能存在亲本物理隔离不严格、自交不亲和性较低、田间除杂不彻底、收获过程中机械混杂等一系列问题, 导致种子纯度下降, 影响后续种植效果, 甚至影响到企业的经济效益和市场竞争能力。因此种子纯度鉴定对优异不结球白菜杂交种的生产和销售具有重要意义。

目前种子纯度的鉴定方法有田间鉴定、蛋白质电泳和 DNA 分子标记鉴定, 由于受外界环境、鉴定

收稿日期: 2024-12-31; 修回日期: 2025-03-12

基金项目: 河南省农业良种联合攻关项目(2022010504)

作者简介: 孙中伟, 男, 高级农艺师, 主要从事蔬菜作物育种及栽培技术推广工作。E-mail: sunzhongwei011@126.com

周期、可重复性、准确性等因素的影响,田间鉴定和蛋白质电泳逐渐被淘汰,DNA 分子标记鉴定方法已成为检测杂交种纯度的主流方法。

钟开琴等^[9]利用 SRAP 标记可快速准确地鉴定出福春 1 号大白菜纯度,冯健起等^[9]利用 InDel 分子标记可准确鉴定出汴早九号大白菜种子纯度,唐昊等^[7]利用 KASP 分子标记完成了吉美 8 号大白菜杂交种的纯度鉴定,魏小春等^[8]利用 S 单元开发相关分子标记也可对大白菜杂交种进行纯度鉴定。

1991 年由 Moore 等^[9]率先创立了 SSR 分子标记,一般有 1~6 个碱基的重复序列^[10],碱基、碱基数目、碱基的重复次数在不同品种或基因型中发生不同的变异,进而造成重复序列的多态性。SSR 标记具有极为丰富的多态性,且能够提供远高于其他分子标记的多态性^[11],具有操作简单、重复性高、结果稳定、呈共显性等优点^[12]。利用 SSR 标记可以完成大白菜遗传多样性分析^[13-14]、大白菜抗根肿病基因标记开发^[15-16]、大白菜新型育种材料的创制^[17]、大白菜相关基因的精确定位^[18-19]等多方面研究。SSR 分子标记在大白菜杂交种子纯度鉴定中也得到了广泛应用,和禹廷等^[20]利用 SSR 分子标记可快速鉴定大白菜陕秋白 3 号种子纯度,刘小愿等^[21]利用 SSR 分子标记完成了对陕秋白 2 号的纯度鉴定,孟艳^[22]利用 3 对 SSR 标记快速准确地鉴定了 15 杂 85 的种子纯度。

虽然 SSR 分子标记已在大白菜的各项研究中得到广泛应用,然而在不结球白菜的研究中鲜有报道。笔者利用 SSR 分子标记对春福种子纯度进行分子水平的快速鉴定,以期在种子销售前为客户提供准确的纯度信息,确保种子质量,提升市场信任度,保障种植效益,维护品牌声誉。同时填补 SSR 分子标记在不结球白菜种子纯度鉴定领域的应用空白,推动种业科技进步。

1 材料与方 法

1.1 材料

供试材料为来源于无锡普威农业科技有限公司(简称普威科技)的春福板叶小白菜,春福杂交种口感柔嫩,叶片宽,叶柄中长,黄绿色,生长快速,定植后 20 d 左右即可采收。其母本叶色深,叶片宽,叶柄宽且短;父本叶色浅,叶片细长,叶柄长且窄,如图 1 所示。春福杂交种及其父母本于 2024 年秋季定植于江苏省无锡市的普威农业科技有限公司的试验田中。

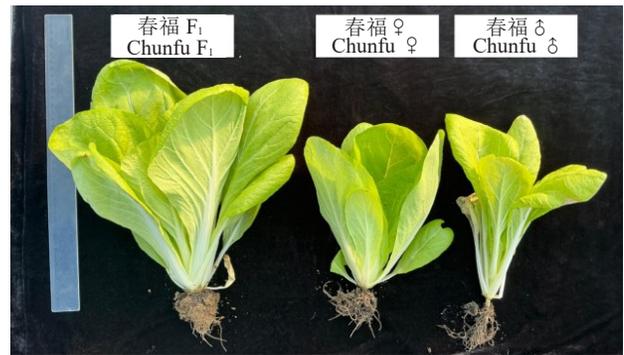


图 1 春福及其父、母本
Fig. 1 Chunfu and parents

1.2 方法

1.2.1 育苗及定植 2024 年 9 月 1 日穴盘育苗于育苗棚内,待其出苗后编号,9 月 25 日按编号顺序定植于试验田中,试验田预先做好 1.5 m 宽的高垄,为了能够清晰观察杂交种中的杂株,定植株行距均为 20 cm,生长期秉持见干见湿、每 10 d 薄施氮肥的管理方式进行管理。

1.2.2 DNA 提取 穴盘育苗 10 d 后随机采取春福及其父本、母本各 10 株,在每株幼嫩叶片上采取 9 mm² 大小叶片组织,获得春福及其父本、母本的混合样品,置于预先放置直径 2 mm 钢珠的 2 mL 离心管中,加入 30 s 提取液^[23],放入研磨机 50 Hz 研磨 15 s,取上清液到新的 1.5 mL 离心管中,4 °C 冷藏备用。

穴盘育苗 10 d 后按顺序采取 210 株春福待测杂交种叶片,提取 DNA 备用。

1.2.3 PCR 体系及反应程序 笔者采取 10 μL 反应体系:模版 1 μL,引物 1 μL, magic mix 5 μL, 0.2 mol · L⁻¹ Tris- HCl 3 μL; 反应程序采用 Touch-down 程序:(1)95 °C 预变性 5 min;(2)94 °C 变性 45 s,68~58 °C 退火,6 个循环,每个循环降低 2 °C,每次 1 min,72 °C 延伸 2 s;(3)94 °C 变性 30 s,58~50 °C 退火,8 个循环,每个循环降低 1 °C,每次 1 min,72 °C 延伸 2 s;(4)94 °C 变性 30 s,50 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 2 s,该环节进行 20 个循环;(5)72 °C 延伸 5 min;(6)10 °C 保温。

1.2.4 电泳及银染 利用 30%聚丙烯酰胺凝胶对获得的 PCR 产物进行电泳,每孔上样量 0.8 μL,180 V,120 mA,22 W 电泳 2 h,待电泳结束后,取出凝胶于染色液(1.2 g · L⁻¹ AgNO₃ 溶液)中摇晃染色 2.5 min,倒出染色液,蒸馏水清洗凝胶,然后加入显色液(15 g · L⁻¹ NaOH + 1.5% CH₂O)摇晃至显现微弱条带,迅速倒出显色液后用蒸馏水清洗,小心捞出置于灯箱上,记录并拍照留存。

1.2.5 引物筛选及验证 利用普威农业科技有限公司的96对小白菜SSR引物对春福及其父本、母本3个混池进行筛选,以筛选出能够特异性扩增春福父本、母本的SSR引物,且要求杂交种同时具有其父本、母本的特异性条带。然后选取春福父本、母本各2株,春福杂交种32株,利用筛选到的多态性SSR引物对该36份样品进行扩增,通过观测其清晰度、可判读性、特异性等方面来验证所获得的多态性SSR引物的适用性,为批量对春福进行纯度鉴定做准备。

1.2.6 SSR分子标记纯度鉴定 经引物筛选验证后,利用筛选到的合适引物对春福杂交种群体进行

纯度鉴定。分子纯度/%=真实杂交种条带数/总扩增条带数×100。

1.2.7 田间纯度鉴定 田间纯度鉴定于定植后的20 d开始观察田间表现,5 d观察1次,共计观察3次。田间纯度/%=(供检单株数-杂株数)/供检单株数×100。

2 结果与分析

2.1 春福多态性引物筛选

利用96对引物对春福及其父本、母本混池进行筛选,最终获得3对在春福父本、母本间具有多态性、条带清晰的SSR引物(表1)。

表1 3对多态性SSR引物信息
Table 1 Three polymorphic SSR primer information

编号 Number	引物名称 Primer name	正向引物 Forward primer(5'-3')	反向引物 Reverse primer(5'-3')
1	Rapa12	ACAAGAAGTTCAGCGGCG	TCGACGCGAGAAAGAACACA
2	Rapa18	CACGGTTCGAACTCCACAGA	TGTTCTCCGTTGCGTCGTA
3	Rapa57	GGGCGAAAGAAGCTTGCAGAG	AGCACCAGCAAGACTTGTGA

2.2 多态性引物验证

分别利用3对多态性引物对春福父本、母本各2个样本及春福32个样本进行扩增。通过电泳结果发现,Rapa12扩增条带在目的条带附近非特异扩增较多,不易判读;Rapa18的父本、母本位置较近,影响判读结果;Rapa57条带清晰,无非特异性扩增条带,扩增稳定,父本、母本相对位置合适,易于判读(图2)。其中Rapa18和Rapa57两对引物在杂交种的扩增条带中均检测到1个母本条带类型的杂株,且为同一株,表明在鉴定杂株方面这两对引物

可以互相验证,但鉴于Rapa18条带不易判读,为此笔者采用Rapa57对春福种子进行纯度鉴定。

2.3 SSR分子标记纯度鉴定

利用Rapa57对春福210株F₁单株进行PCR扩增,结果如图3所示,在F₁群体中发现共计有4个杂株,分别为P1的30号、P2的61号以及P3的28号和66号,4株杂株均表现为母本条带类型,其余206株为真正的杂交种。分子标记鉴定春福杂交种纯度为98.1%。

2.4 田间纯度鉴定

经过3次田间多人共同鉴定后未发现差异株,

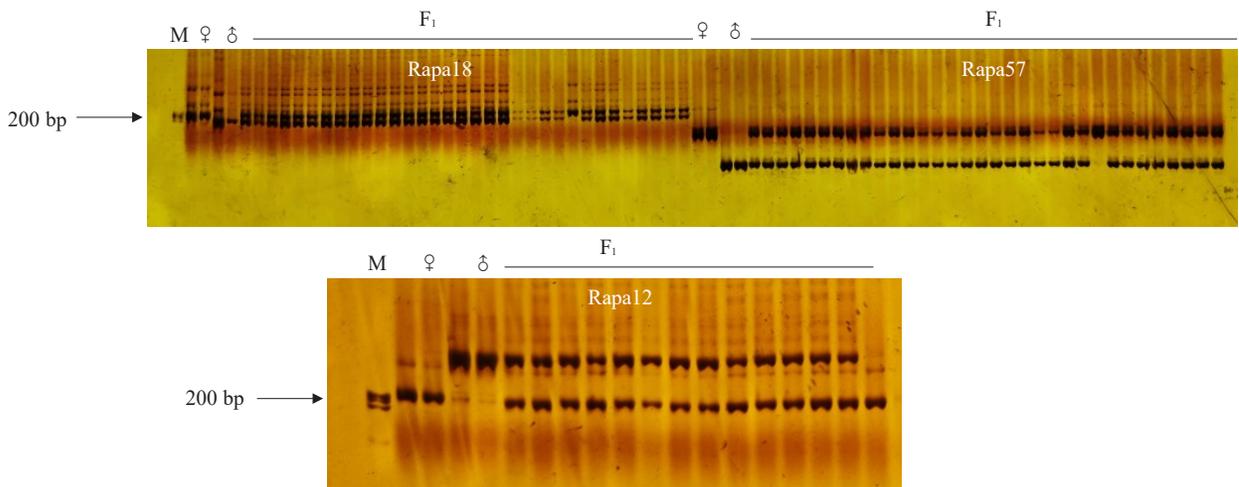


图2 3对多态性SSR引物验证结果

Fig. 2 The verification result of three pairs polymorphic SSR primers

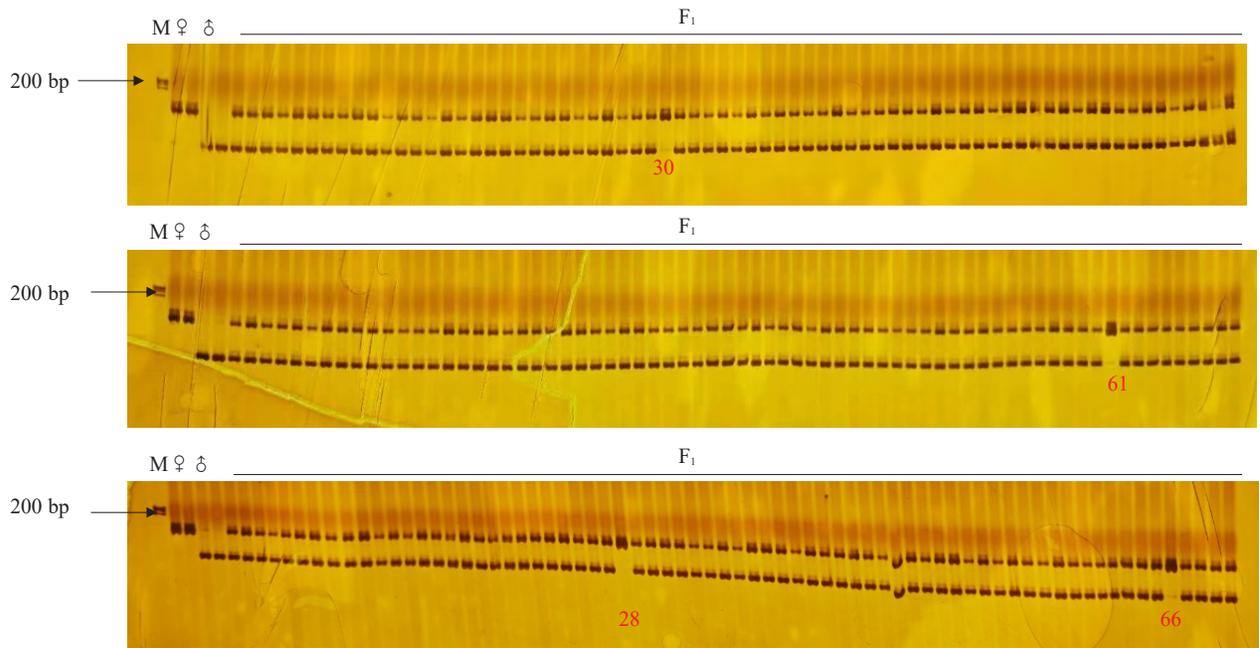


图3 春福 SSR 标记纯度鉴定

Fig. 3 Purity identification of Chunfu using the SSR marker

田间鉴定纯度为 100%。田间鉴定结果与 SSR 分子标记 Rapa57 的鉴定结果相比,偏差为 1.9%,吻合度为 98.1%。

3 讨论与结论

伴随着时代的发展,育种方法越来越丰富,育种技术越来越成熟,杂交种新品种数量以爆发式增长并逐渐占领市场,杂交种能够有效提高作物产量和品质,是现代农业发展的重要推动力。然而,在生产过程中杂交种可能出现机械混杂、自交不亲和系母本自交现象,进而影响杂交种的纯度。在生产实践中,种子纯度与种子质量息息相关,不合格的种子纯度直接影响种植表现和经济效益,甚至给农户造成不可挽回的损失^[5]。

传统的田间纯度鉴定法方法简单、直观、操作便捷,通常在当年收到种子后适期播种,有时可能需要异地种植,一般通过子叶形态、苗期性状等大田表现进行观察和判定,耗时较长,且结果易受主观判断的影响,而且在结果未出来前存在不确定性,没有办法对种子进行销售,因而引入分子标记技术成为提高种子纯度鉴定效率和准确性的关键手段。

随着生物技术的迅速发展,尤其在 2012 年之后,SRAP、InDel、KASP、SSR、SCAR 等分子标记均在实践中表明,分子标记鉴定种子纯度可以替代田间纯度鉴定^[5-7,20-21,24]。分子标记纯度鉴定在很大程

度上提高了鉴定的效率和准确性。共显性标记在纯度鉴定中具有多态性好、易于判别、操作简单、稳定可靠、可重复性高等诸多优点,因此,目前已经成为杂交种子纯度鉴定的主流方法^[6]。相较于其他标记,SSR 标记多态性更高,不需要通过重测序和大数据比对就可以利用,在大田作物及蔬菜作物中均有较为广泛的应用^[25-26]。然而在十字花科作物中应用较少,笔者利用 SSR 标记填补了十字花科作物相关研究的空白。利用 SSR 分子标记能够实现大规模、高效率的杂交种纯度鉴定。不结球白菜春福早熟、叶片口感鲜嫩、产量高,但没有高效的纯度鉴定方法,将直接影响其市场推广工作,因此,笔者针对不结球白菜春福的特定 SSR 标记进行优化,确保其快速准确地识别真伪杂交种,为该品种的推广提供了坚实的技术支撑。

在十字花科的相关分子纯度鉴定中,冯健起等^[6]对大白菜汴早九号的分子鉴定结果和田间鉴定纯度分别为 97.57%和 98.26%,其田间结果略高于分子鉴定结果,与本研究结果相似,这可能是由于田间杂株表现不明显,难以判别,进而影响了种子纯度;和禹廷等^[20]在大白菜陕秋白 3 号的纯度鉴定中,分子正交和反交杂交率分别为 96.7%和 88.3%,田间鉴定正交和反交率分别为 96%和 89%,除了反交结果与本研究相似外,正交分子鉴定纯度略高于田间鉴定纯度,与本研究相反,有可能是受环境影响,将长势不好或过好的单株也判定为了杂株;方

小雪等^[27]在萝卜杂交种圆都1号的纯度鉴定中,分子鉴定和田间鉴定纯度分别为98.6%和97.77%,结果也存在分子鉴定纯度高于田间鉴定纯度,其田间鉴定杂株的主要依据为长势、叶色和株幅,这3个农艺性状均易受到水分、温度、肥料等外界环境的影响,进而造成了偏差。因此,无论是受亲本和杂交种遗传性状接近的影响不易判别差异株,还是由于外界环境影响多选差异株,均表明了田间鉴定的不可控性,不如分子鉴定结果简单明了。

本研究的春福不结球白菜的分子鉴定纯度和田间鉴定纯度分别为98.1%和100%,表明普威农业科技有限公司的小白菜品种春福有较高的纯度,而分子鉴定和田间鉴定纯度偏差仅有1.9%,小于2%,符合误差允许范围^[28-29],分子鉴定完全能够代替田间鉴定,同时节约了田间鉴定的时间和劳动成本。

综上所述,笔者从96对不结球白菜SSR引物中筛选出3对在春福父本、母本中表现出多态性的引物,其中Rapa18和Rapa57可以用于春福的杂交种纯度鉴定,但鉴于Rapa57更易于判读结果的特性,选用Rapa57对春福的杂交种进行纯度鉴定。结果显示,分子鉴定纯度为98.1%,田间鉴定纯度为100%,偏差小于2%,分子鉴定能够有效代替田间鉴定。该方法能够快速、有效、准确地鉴定出杂交种纯度,在生产和种子推广上相较于田间鉴定节约了近75%的时间,为不结球白菜杂交种的大规模纯度鉴定提供了新方向和技术支撑,也为其他作物建立高通量纯度鉴定提供了参考。

参考文献

- [1] 侯喜林,李英,黄菲艺.不结球白菜(*Brassica campestris* ssp. *chinensis*)主要性状及育种技术的分子生物学研究新进展[J].园艺学报,2020,47(9):1663-1677.
- [2] FRANZKE A,LYSAK A M,AL-SHEHBAZ I A,et al. Cabbage family affairs: The evolutionary history of brassicaceae[J]. Trends in Plant Science,2011,16(2):108-116.
- [3] 北京博研智尚信息咨询有限公司.中国小白菜行业市场情况研究及竞争格局分析报告[EB/OL].(2024-09-11)[2024-11-02].<https://www.docin.com/p-4726004592.html#:~:text=1.1>.
- [4] 侯喜林,宋小明.不结球白菜种质资源的研究与利用[J].南京农业大学学报,2012,35(5):35-42.
- [5] 钟开勤,曾小玲,朱朝辉,等.福春1号大白菜一代杂种纯度的SRAP鉴定[J].中国农学通报,2017,33(20):50-54.
- [6] 冯健起,王培云,蔡亚平,等.利用InDel标记鉴定汴早九号大白菜杂交种纯度[J].中国瓜菜,2023,36(12):33-38.
- [7] 唐昊,杨双娟,张晓伟,等.利用KASP标记鉴定吉美8号大白菜种子纯度[J].分子植物育种,2024,22(14):4583-4589.
- [8] 魏小春,原玉香,赵艳艳,等.一种新的广适性大白菜杂交种纯度分子鉴定方法的研究[J].中国瓜菜,2023,36(2):19-28.
- [9] MOORE S S,SARGEANT L L,KING T J,et al. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species[J]. Genomics,1991,10(3):654-660.
- [10] ZHU H Y,SONG P Y,KOO D H,et al. Genome wide characterization of simple sequence repeats in watermelon genome and their application in comparative mapping and genetic diversity analysis[J]. BMC Genomics,2016,17:1-17.
- [11] 张照远,黄妹平,徐建民,等.基于SSR标记的桉树枝瘦姬小蜂的关联分析[J].基因组学与应用生物学,2017,36(4):1660-1666.
- [12] THOMAS M R,SCOTT N S. Microsatellite repeats in grapevine reveal DNA polymorphisms when analysed as sequence-tagged sites (STSS)[J]. Theoretical and Applied Genetics,1993,86(8):985-990.
- [13] 韩睿,赵孟良,孙世英,等.47份大白菜品种的遗传多样性研究[J].西北农业学报,2021,30(5):707-716.
- [14] 龚颖,包永蓉,霍建宇,等.72份紫橙色大白菜种质资源多样性分析[J].中国蔬菜,2024(9):51-60.
- [15] 兰梅,张丽琴,徐学忠,等.抗根肿病大白菜材料SSR分子标记的初步筛选[J].农学学报,2023,13(12):20-27.
- [16] ZHANG Y T,JIANG M L,SUN S R,et al. Chinese cabbage orphan gene *BR3* confers bolting resistance to *Arabidopsis* through the gibberellin pathway[J]. Frontiers in Plant Science,2025,15:1518962.
- [17] 宁子辰.高再生率、多心室及自交亲和多基因聚合大白菜种质资源创制[D].沈阳:沈阳农业大学,2023.
- [18] XUE M H,LI J H,LIAO R Q,et al. Fine mapping and expression characteristics analysis of male-sterile gene *BrRNR1* in Chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*)[J]. BMC Plant Biology,2025,25(1):49.
- [19] ZHANG Y Q,XUAN S X,ZHAO J J,et al. Transcriptional regulation and gene mapping of internode elongation and late budding in the Chinese cabbage mutant *lcc*[J]. Plants-Basel,2024,13(8),1083.
- [20] 和禹廷,何琼,张妮南,等.大白菜新品种陕秋白3号种子纯度的分子鉴定[J].种子,2022,41(5):1-4.
- [21] 刘小愿,孟艳,张妮南,等.利用SSR分子标记鉴定陕秋白2号大白菜种子纯度[J/OL].分子植物育种,1-7[2022-02-09].<http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220209.1345.008.html>.
- [22] 孟艳.大白菜种质资源多样性及炮弹形大白菜杂种优势研究及杂种纯度鉴定[D].陕西杨凌:西北农林科技大学,2021.
- [23] 胡倩梅,宋芄菡,丁郅真,等.DNA提取液及利用此DNA提取液的快速从植物叶片提取DNA的方法:CN202411537865.1[P].2024-12-17.
- [24] 孙亚玲,李艳伟,王振宝,等.基于干种子DNA的洋葱杂交种纯度分子标记快速鉴定[J].山东农业科学,2023,55(11):169-175.
- [25] 徐晓明,王会民,阴云伙,等.利用SSR标记鉴定杂交水稻万象优337种子纯度[J/OL].分子植物育种,1-7[2024-05-07].<https://link.cnki.net/urlid/46.1068.S.20240430.1557.018>.
- [26] 李春,梁根云,蔡鹏,等.利用SSR分子标记鉴定华南型黄瓜川绿15号杂交种子纯度[J].西昌学院学报(自然科学版),2022,36(3):13-17.
- [27] 方小雪,张铨锋,吴新胜.InDel标记在萝卜杂交种圆都1号纯度鉴定中的应用[J].中国瓜菜,2022,35(12):27-32.
- [28] 焦荻,商纪鹏,高素燕,等.西瓜品种蜜多种子纯度SSR标记鉴定[J].中国瓜菜,2019,32(7):19-22.
- [29] 范伟强,王超楠,黄志银,等.青梗菜速俊109杂交种纯度SSR分子标记鉴定[J].种子,2020,39(8):146-148.