



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111235299 B

(45) 授权公告日 2021.04.27

(21) 申请号 202010209250.1

C12N 15/11 (2006.01)

(22) 申请日 2020.03.23

(56) 对比文件

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 111235299 A

李光光. 利用SSR标记研究菜心资源的遗传多样性分析.《基因组学与应用生物学》.2018,第37卷(第3期),摘要,表1.

(43) 申请公布日 2020.06.05

审查员 杨光

(73) 专利权人 北京市农林科学院
地址 100097 北京市海淀区板井彰化路50号,2443信箱

(72) 发明人 温常龙 张建 张德双 杨静静
罗江 刘慧

(74) 专利代理机构 北京五洲洋和知识产权代理
事务所(普通合伙) 11387
代理人 荣红颖 王蔚林

(51) Int. Cl.
C12Q 1/6895 (2018.01)

权利要求书4页 说明书22页
序列表7页 附图11页

(54) 发明名称

一种鉴定菜心品种真实性的方法及其专用SSR引物组合

(57) 摘要

本发明属于分子标记及其检测领域,具体涉及一种鉴定菜心品种真实性的方法及其专用SSR引物组合。鉴定菜心品种真实性的SSR位点,根据白菜的参考基因组Brassica_rapa V1.5与20份种质资源全基因组重测序数据进行数据挖掘所获得;上述SSR引物组合选自:第一SSR引物对至第二十SSR引物对,分别用于PCR扩增上述第一SSR位点至第二十SSR位点,分别优选为与序列表中的SEQ ID NO:1-40的核苷酸序列的同源性为85%-100%的核苷酸序列。本发明可用于对菜心品种进行自种子开始的全生命周期的真实性鉴定,并为菜心种质资源和新品种保护提供技术支持。



1. 鉴定菜心品种真实性的SSR引物组,其特征在于:

所述SSR引物组用于鉴定以下179个菜心品种真实性:金满田,红亮1号,珠海矮脚,翠绿1号,穗美888,迟80天,06秋保1号,利隆矮脚1号,联记柳叶,东莞尖叶,长合70,名优尖叶,金苗美绿702,长合,佳信,黄心701,金顺利,红亮2号,红亮3号,广研菜场,金韩,农普绿宝,广绿60,圣达新西兰,欣农50,欣农极品菜心王,红亮50,红亮超级,范记50,日本甜脆,利隆矮脚,利隆矮脚45,一哥白沙,坤记菜心,广研3号,坤记菜心王,菜心4号,19号菜心,19号早菜心,兴田粗苔6号,金韩春梅,金韩春早,金韩冬竹,农家乐8,农家乐,华绿中花油青,惟勤全年粗条,美青一号,坡头31号,旺田翠绿,香港油青,冬竹菜心,广良油青,广良早油青,粤友迟心1号,金韩秋菊,新世纪20号,农鑫抗病油青旺,农鑫抗病油青,09A保,日本油美1号,洲008柄白,广东1只花,288甜菜心,王中王抗热,宝丰矮脚,06秋保-A,伟兴黄叶四九,金利达19号,农悦49,纯白梗菜心,农鑫夏绿,兴田油青25,伟雄A-3,绿冠608,新苗002,新苗T28,超级菜心皇,绿满园香脆,星原极早,民安日本,12保,13A9-保,12菜心1号,12菜心3号,青梗A,青梗B,14A9-保-22号,45天菜心,青翠菜心,尖叶49菜心,佰顺2号,双盈80天,49-19菜心,日本60丛,桂华特青70天甜菜心,圣农粗条,湘蔬脆嫩四九,揭研31号油青甜菜心,14广州菜心,广府2号,06秋保-B,四九黄菜心,广研美绿,天牌,恒利达澳选快大甜菜心,农普油绿701,金韩70天菜心,金韩港种70天油青,利隆油青矮脚70天,南蔬极品70天甜菜心,坡头70天油青菜心,伟兴三元里,青翠701,油绿702菜心,联记东莞白沙,特选80天特青菜心,伟星80天尖叶特青,爱普农超级迟心808,爱普农超级迟心809,碧绿80天油青甜菜心,翠绿,翠绿80天菜心,广海超级80天,利坚802,利坚805,联记东莞坡头,油绿801,粤友超靓,伟雄28号菜心,益农80天特青菜心,金韩广府青,林忠民大种迟花赤叶,赤叶翡翠大花菜心,金韩赤叶迟花菜心,丰满迟花2号甜菜心,伟兴迟花,15广州菜心-10号,15大种,15大种80,62036x62013 RaaC0.5xC2030,PI175054Aaa-1 BAREPOP 15376,Aaa-1,White Stemmed Taitsai,中心苔菜,エウサイタイ,荆楚牌九月鲜红菜苔,早白菜苔,红金秋菜薹,香港新种49菜心,香港宝青60天菜心,迟心2号,八十天油青菜心,宝青50天油心,金秋红二号,迟花粗苔特青菜苔,019菜心×紫芥菜,20菜心×紫芥菜,14A-P2-21菜心×紫芥菜,CMS1.菜心,CMS2.菜心,CMS3.菜心,CMS4.菜心,CMS5.菜心,CMS6.菜心,CMS7.菜心,CMS8.菜心,(07-882×abc3-1)2,019菜心,小花菜,16E9-16②-24,17E9-22③,16E9-16②-24×16E9-13②-21,16E9-49①-24×16E9-22②-21,丸叶壬生菜77-44,千筋京菜,广岛菜,壬生菜,小松菜;

所述SSR引物组由第一SSR引物对,第二SSR引物对,第三SSR引物对,第四SSR引物对,第五SSR引物对,第六SSR引物对,第七SSR引物对,第八SSR引物对,第九SSR引物对,第十SSR引物对,第十一SSR引物对,第十二SSR引物对,第十三SSR引物对,第十四SSR引物对,第十五SSR引物对,第十六SSR引物对,第十七SSR引物对,第十八SSR引物对,第十九SSR引物对和第二十SSR引物对组成;

所述第一SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2所示;

所述第二SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4所示;

所述第三SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6所示;

所述第四SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8所示;

所述第五SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10所示;

所述第六SSR引物对的序列如列表中的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12所示;

所述第七SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14所示；
所述第八SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16所示；
所述第九SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18所示；
所述第十SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20所示；
所述第十一SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22所示；
所述第十二SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24所示；
所述第十三SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26所示；
所述第十四SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28所示；
所述第十五SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30所示；
所述第十六SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32所示；
所述第十七SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34所示；
所述第十八SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36所示；
所述第十九SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38所示；
所述第二十SSR引物对的序列如序列表中的SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40所示；
每对所述引物对的一条引物连接有荧光分子，所述荧光分子选自ROX、TAMRA、FAM、HEX。

2. 鉴定菜心品种真实性的SSR试剂盒，其特征在于：所述SSR试剂盒配制为PCR反应体系；所述PCR反应体系包括：

权利要求1所述SSR引物组，

所述SSR引物组中的每一对的上游引物和下游引物在所述体系中浓度之比为1:1；所述上游引物和下游引物在体系中终浓度均为0.25 μ mol/L。

3. 如权利要求2所述的SSR试剂盒，其特征在于：所述体系还包括：

dNTPs：体系中终浓度为每种0.15mmol/L，

氯化镁：体系中终浓度为2.5mmol/L，

DNA聚合酶：体系中终浓度为0.05U/ μ L，

PCR缓冲液：由体系中终浓度为10-50mmol/L的氯化钾与体系中终浓度为1-10mmol/L pH7.5-9.0的Tris-HCL配制而成。

4. 一种鉴定菜心品种真实性的检测方法，其特征在于：所述检测方法包括以下步骤：

步骤一：检测待测菜心的SSR位点的基因型；

步骤二：所述待测菜心的品种判定：

如果所述待测菜心基于所述20个SSR位点的基因型，和菜心标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2，则待测菜心与所述菜心标准品种的该指定品种判定为相似的品种；

如果所述待测菜心基于所述20个SSR位点的基因型，和菜心标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2，则待测菜心与所述菜心标准品种的该指定品种判定为不同的品种；

所述检测待测菜心的SSR位点基因型步骤包括以下分步骤：

分步骤一：分别以所述待测菜心的基因组DNA和菜心标准品种的基因组DNA为模板，分别采用权利要求1所述的引物组的进行PCR扩增，得到PCR扩增产物；

分步骤二：对所述PCR扩增产物进行检测，获得所述待测菜心和所述菜心标准品种基于

20个所述SSR位点的基因型；

所述检测方法用于鉴定以下179个菜心品种真实性：

金满田,红亮1号,珠海矮脚,翠绿1号,穗美888,迟80天,06秋保1号,利隆矮脚1号,联记柳叶,东莞尖叶,长合70,名优尖叶,金苗美绿702,长合,佳信,黄心701,金顺利,红亮2号,红亮3号,广研菜场,金韩,农普绿宝,广绿60,圣达新西兰,欣农50,欣农极品菜心王,红亮50,红亮超级,范记50,日本甜脆,利隆矮脚,利隆矮脚45,一哥白沙,坤记菜心,广研3号,坤记菜心王,菜心4号,19号菜心,19号早菜心,兴田粗苔6号,金韩春梅,金韩春早,金韩冬竹,农家乐8,农家乐,华绿中花油青,惟勤全年粗条,美青一号,坡头31号,旺田翠绿,香港油青,冬竹菜心,广良油青,广良早油青,粤友迟心1号,金韩秋菊,新世纪20号,农鑫抗病油青旺,农鑫抗病油青,09A保,日本油美1号,洲008柄白,广东1只花,288甜菜心,王中王抗热,宝丰矮脚,06秋保-A,伟兴黄叶四九,金利达19号,农悦49,纯白梗菜心,农鑫夏绿,兴田油青25,伟雄A-3,绿冠608,新苗002,新苗T28,超级菜心皇,绿满园香脆,星原极早,民安日本,12保,13A9-保,12菜心1号,12菜心3号,青梗A,青梗B,14A9-保-22号,45天菜心,青翠菜心,尖叶49菜心,佰顺2号,双盈80天,49-19菜心,日本60丛,桂华特青70天甜菜心,圣农粗条,湘蔬脆嫩四九,揭研31号油青甜菜心,14广州菜心,广府2号,06秋保-B,四九黄菜心,广研美绿,天牌,恒利达澳选快大甜菜心,农普油绿701,金韩70天菜心,金韩港种70天油青,利隆油青矮脚70天,南蔬极品70天甜菜心,坡头70天油青菜心,伟兴三元里,青翠701,油绿702菜心,联记东莞白沙,特选80天特青菜心,伟星80天尖叶特青,爱普农超级迟心808,爱普农超级迟心809,碧绿80天油青甜菜心,翠绿,翠绿80天菜心,广海超级80天,利坚802,利坚805,联记东莞坡头,油绿801,粤友超靚,伟雄28号菜心,益农80天特青菜心,金韩广府青,林忠民大种迟花赤叶,赤叶翡翠大花菜心,金韩赤叶迟花菜心,丰满迟花2号甜菜心,伟兴迟花,15广州菜心-10号,15大种,15大种80,62036x62013 RaaC0.5xC2030,PI175054Aaa-1 BAREPOP 15376,Aaa-1,White Stemmed Tait sai,中心苔菜,エウサイタイ,荆楚牌九月鲜红菜苔,早白菜苔,红金秋菜薹,香港新种49菜心,香港宝青60天菜心,迟心2号,八十天油青菜心,宝青50天油心,金秋红二号,迟花粗苔特青菜苔,019菜心×紫芥菜,20菜心×紫芥菜,14A-P2-21菜心×紫芥菜,CMS1.菜心,CMS2.菜心,CMS3.菜心,CMS4.菜心,CMS5.菜心,CMS6.菜心,CMS7.菜心,CMS8.菜心,(07-882×abc3-1)2,019菜心,小花菜,16E9-16②-24,17E9-22③,16E9-16②-24×16E9-13②-21,16E9-49①-24×16E9-22②-21,丸叶壬生菜77-44,千筋京菜,广岛菜,壬生菜,小松菜。

5. 根据权利要求4所述检测方法:其特征在于:

所述判定的结果是根据聚类分析得到的。

6. 根据权利要求4所述检测方法:其特征在于:

所述分步骤二的检测方法包括:

荧光信号检测:检测所述PCR扩增产物的荧光信号,获得所述待测菜心和所述标准菜心品种基于所述20个SSR位点的基因型;或:

扩增产物片段检测:检测所述PCR扩增产物的片段大小,获得待测菜心和标准菜心品种基于所述20个SSR位点的基因型。

7. 权利要求1所述SSR引物组,或权利要求2或3所述SSR试剂盒,或权利要求4-6任一所述检测方法,在以下X1或X₂或X₃中的应用:

X1: 鉴定待测菜心的品种是否属于标准菜心品种中的某一种;

X2: 鉴定待测菜心的品种具体为标准菜心品种中的哪一种;

X3: 鉴定待测菜心样本是否为相同的品种;

所述标准菜心品种选自以下179个菜心品种:金满田,红亮1号,珠海矮脚,翠绿1号,穗美888,迟80天,06秋保1号,利隆矮脚1号,联记柳叶,东莞尖叶,长合70,名优尖叶,金苗美绿702,长合,佳信,黄心701,金顺利,红亮2号,红亮3号,广研菜场,金韩,农普绿宝,广绿60,圣达新西兰,欣农50,欣农极品菜心王,红亮50,红亮超级,范记50,日本甜脆,利隆矮脚,利隆矮脚45,一哥白沙,坤记菜心,广研3号,坤记菜心王,菜心4号,19号菜心,19号早菜心,兴田粗苔6号,金韩春梅,金韩春早,金韩冬竹,农家乐8,农家乐,华绿中花油青,惟勤全年粗条,美青一号,坡头31号,旺田翠绿,香港油青,冬竹菜心,广良油青,广良早油青,粤友迟心1号,金韩秋菊,新世纪20号,农鑫抗病油青旺,农鑫抗病油青,09A保,日本油美1号,洲008柄白,广东1只花,288甜菜心,王中王抗热,宝丰矮脚,06秋保-A,伟兴黄叶四九,金利达19号,农悦49,纯白梗菜心,农鑫夏绿,兴田油青25,伟雄A-3,绿冠608,新苗002,新苗T28,超级菜心皇,绿满园香脆,星原极早,民安日本,12保,13A9-保,12菜心1号,12菜心3号,青梗A,青梗B,14A9-保-22号,45天菜心,青翠菜心,尖叶49菜心,佰顺2号,双盈80天,49-19菜心,日本60丛,桂华特青70天甜菜心,圣农粗条,湘蔬脆嫩四九,揭研31号油青甜菜心,14广州菜心,广府2号,06秋保-B,四九黄菜心,广研美绿,天牌,恒利达澳选快大甜菜心,农普油绿701,金韩70天菜心,金韩港种70天油青,利隆油青矮脚70天,南蔬极品70天甜菜心,坡头70天油青菜心,伟兴三元里,青翠701,油绿702菜心,联记东莞白沙,特选80天特青菜心,伟星80天尖叶特青,爱普农超级迟心808,爱普农超级迟心809,碧绿80天油青甜菜心,翠绿,翠绿80天菜心,广海超级80天,利坚802,利坚805,联记东莞坡头,油绿801,粤友超靓,伟雄28号菜心,益农80天特青菜心,金韩广府青,林忠民大种迟花赤叶,赤叶翡翠大花菜心,金韩赤叶迟花菜心,丰满迟花2号甜菜心,伟兴迟花,15广州菜心-10号,15大种,15大种80,62036x62013 RaaC0.5xC2030,PI175054Aaa-1 BAREPOP 15376,Aaa-1,White Stemmed Tait sai,中心苔菜,エウサイタイ,荆楚牌九月鲜红菜苔,早白菜苔,红金秋菜薹,香港新种49菜心,香港宝青60天菜心,迟心2号,八十天油青菜心,宝青50天油心,金秋红二号,迟花粗苔特青菜苔,019菜心×紫芥菜,20菜心×紫芥菜,14A-P2-21菜心×紫芥菜,CMS1.菜心,CMS2.菜心,CMS3.菜心,CMS4.菜心,CMS5.菜心,CMS6.菜心,CMS7.菜心,CMS8.菜心,(07-882×abc3-1)2,019菜心,小花菜,16E9-16②-24,17E9-22③,16E9-16②-24×16E9-13②-21,16E9-49①-24×16E9-22②-21,丸叶壬生菜77-44,千筋京菜,广岛菜,壬生菜,小松菜。

一种鉴定菜心品种真实性的方法及其专用SSR引物组合

技术领域

[0001] 本发明属于分子标记及其检测领域,具体涉及一种鉴定菜心品种真实性的方法及其专用SSR引物组合。

背景技术

[0002] 菜心是华南地区种植规模最大的叶菜类蔬菜作物之一,并在近年来逐渐传播到全国各地,以及东南亚沿海地区。菜心是十字花科芸薹属作物,可以认为是白菜的一个专门食用花薹的变种,适合播种在南方温暖的地区,是我国南方的特产蔬菜之一,一年四季均可播种,现在世界各地均有引种栽培。

[0003] 今年来随着育种工作的不断进展,与新育种技术的不断引入,菜心的品种数量日益增加,甚至呈现出了井喷式的增加,依靠现行标准的鉴定方案应当采用DUS测试的方法来完成品种鉴定,但是DUS鉴定需要耗费大量的人力物力,尤其是对鉴定人员的经验有很高要求,现有人力是无法完成如此大规模的鉴定任务的。此时我们应当引入更加先进的分子鉴定技术,SSR分子标记技术是现阶段绝大部分作物进行真实性鉴定的现行分子鉴定标准,其鉴定结果稳定可靠,同时鉴定方式简单高效,相对于DUS测试的鉴定成本也更低。

[0004] 但是菜心的分子研究基础比较薄弱,现阶段的有关于菜心分子鉴定的技术完全无法满足需求,因此现有技术中尚无利用SSR分子标记来鉴定菜心品种真实性的方法。

发明内容

[0005] 本发明提供了一种鉴定菜心品种真实性的方法及其专用SSR引物组合,可以得出稳定、高效的鉴定结果:待测菜心品种是否属于标准菜心品种中的某一种,以及具体是哪一种。

[0006] 本发明是通过以下的技术方案实现的:

[0007] 鉴定菜心品种真实性的SSR位点,所述SSR位点选自如下第一SSR位点到第二十SSR位点中的任1到20种:第一SSR位点,位于白菜参考基因组第6染色体第16508732-16508752位,或其种间同源基因组片段;第二SSR位点,位于白菜参考基因组第3染色体第29633824-29633849位,或其种间同源基因组片段;第三SSR位点,位于白菜参考基因组第5染色体第22898915-22898932位,或其种间同源基因组片段;第四SSR位点,位于白菜参考基因组第7染色体第20048333-20048347位,或其种间同源基因组片段;第五SSR位点,位于白菜参考基因组第5染色体第3713470-3713479位,或其种间同源基因组片段;第六SSR位点,位于白菜参考基因组第8染色体第3292094-3292113位,或其种间同源基因组片段;第七SSR位点,位于白菜参考基因组第1染色体第24843934-24843945位,或其种间同源基因组片段;第八SSR位点,位于白菜参考基因组第1染色体第24887368-24887377位,或其种间同源基因组片段;第九SSR位点,位于白菜参考基因组第10染色体第7545410-7545424位,或其种间同源基因组片段;第十SSR位点,位于白菜参考基因组第2染色体第6297691-6297705位,或其种间同源基因组片段;第十一SSR位点,位于白菜参考基因组第4染色体第17713412-17713441位,

或其种间同源基因组片段;第十二SSR位点,位于白菜参考基因组第10染色体第6277936-6277951位,或其种间同源基因组片段;第十三SSR位点,位于白菜参考基因组第4染色体第16090886-16090906位,或其种间同源基因组片段;第十四SSR位点,位于白菜参考基因组第9染色体第14318215-14318228位,或其种间同源基因组片段;第十五SSR位点,位于白菜参考基因组第8染色体第11405907-11405918位,或其种间同源基因组片段;第十六SSR位点,位于白菜参考基因组第9染色体第37194484-37194495位,或其种间同源基因组片段;第十七SSR位点,位于白菜参考基因组第7染色体第22746168-22746179位,或其种间同源基因组片段;第十八SSR位点,位于白菜参考基因组第2染色体第23245100-23245115位,或其种间同源基因组片段;第十九SSR位点,位于白菜参考基因组第3染色体第27883995-27884012位,或其种间同源基因组片段;第二十SSR位点,位于白菜参考基因组第6染色体第9752435-9752446位,或其种间同源基因组片段;所述参考基因组为白菜参考基因组*Brassica oleracea* V2.1。

[0008] 鉴定菜心品种真实性的SSR引物组,所述SSR引物组用于分别扩增所述的SSR位点,所述SSR引物组包括:第一SSR引物对至第二十SSR引物对,分别用于扩增所述第一SSR位点至所述第二十SSR位点。

[0009] 在一些实施方式中,所述SSR引物组中,所述第一SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第二SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第三SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第四SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第五SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第六SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第七SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第八SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第九SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十一SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十二SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十三SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;所述第十四SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的核苷酸序

列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；所述第十五SSR引物对，与序列中的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；所述第十六SSR引物对，与序列中的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；所述第十七SSR引物对，与序列中的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；所述第十八SSR引物对，与序列中的SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；所述第十九SSR引物对，与序列中的SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；所述第二十SSR引物对，与序列中的SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%，优选为100%；优选地，每对所述引物对的一条引物连接有荧光分子，更优选，所述荧光分子选自ROX、TAMRA、FAM、HEX。

[0010] 鉴定菜心品种真实性的SSR试剂盒，所述SSR试剂盒配制为PCR反应体系；所述PCR反应体系包括：

[0011] 所述SSR引物组；优选地，所述SSR引物组中的每一对的上游引物和下游引物在所述体系中浓度之比为1:1；所述上游引物和下游引物在体系中终浓度均优选为0.25 μ mol/L；优选地，所述体系还包括：dNTPs：体系中终浓度为每种0.15mmol/L，氯化镁：体系中终浓度为2.5mmol/L，DNA聚合酶：体系中终浓度为0.05U/ μ L，PCR缓冲液：由体系中终浓度为10-50mmol/L的氯化钾与体系中终浓度为1-10mmol/L的Tris-HCL (pH7.5-9.0) 配制而成。

[0012] 一种鉴定菜心品种真实性的检测方法包括以下步骤：步骤一：检测待测菜心的如前述SSR位点的基因型；步骤二：所述待测菜心的品种判定：

[0013] 如果所述待测菜心基于所述20个SSR位点的基因型，和菜心标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2，则待测菜心与所述菜心标准品种的该指定品种判定为相似的品种；如果所述待测菜心基于所述20个SSR位点的基因型，和菜心标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2，则待测菜心与所述菜心标准品种的该指定品种判定为不同的品种；优选地，所述判定的结果是根据聚类分析得到的。

[0014] 在一些实施方式中，所述检测待测菜心的SSR位点基因型步骤包括以下分步骤：分步骤一：分别以所述待测菜心的基因组DNA和菜心标准品种的基因组DNA为模板，分别采用前述SSR引物组合中的引物组的进行PCR扩增，得到PCR扩增产物；分步骤二：对所述PCR扩增产物进行检测，获得所述待测菜心和所述菜心标准品种基于20个所述SSR位点的基因型。

[0015] 在一些实施方式中，所述分步骤二的检测方法包括：荧光信号检测：检测所述PCR扩增产物的荧光信号，获得所述待测菜心和所述标准菜心品种基于所述20个SSR位点的基因型；或：扩增产物片段检测：检测所述PCR扩增产物的片段大小，获得待测菜心和标准菜心品种基于所述20个SSR位点的基因型。

[0016] 在一些实施方式中，所述标准菜心品种选自以下179个菜心品种：金满田，红亮1号，珠海矮脚，翠绿1号，穗美888，迟80天，06秋保1号，利隆矮脚1号，联记柳叶，东莞尖叶，长合70，名优尖叶，金苗美绿702，长合，佳信，黄心701，金顺利，红亮2号，红亮3号，广研菜场，

金韩,农普绿宝,广绿60,圣达新西兰,欣农50,欣农极品菜心王,红亮50,红亮超级,范记50,日本甜脆,利隆矮脚,利隆矮脚45,一哥白沙,坤记菜心,广研3号,坤记菜心王,菜心4号,19号菜心,19号早菜心,兴田粗苔6号,金韩春梅,金韩春早,金韩冬竹,农家乐8,农家乐,华绿中花油青,惟勤全年粗条,美青一号,坡头31号,旺田翠绿,香港油青,冬竹菜心,广良油青,广良早油青,粤友迟心1号,金韩秋菊,新世纪20号,农鑫抗病油青旺,农鑫抗病油青,09A保,日本油美1号,洲008柄白,广东1只花,288甜菜心,王中王抗热,宝丰矮脚,06秋保-A,伟兴黄叶四九,金利达19号,农悦49,纯白梗菜心,农鑫夏绿,兴田油青25,伟雄A-3,绿冠608,新苗002,新苗T28,超级菜心皇,绿满园香脆,星原极早,民安日本,12保,13A9-保,12菜心1号,12菜心3号,青梗A,青梗B,14A9-保-22号,45天菜心,青翠菜心,尖叶49菜心,佰顺2号,双盈80天,49-19菜心,日本60丛,桂华特青70天甜菜心,圣农粗条,湘蔬脆嫩四九,揭研31号油青甜菜心,14广州菜心,广府2号,06秋保-B,四九黄菜心,广研美绿,天牌,恒利达澳选快大甜菜心,农普油绿701,金韩70天菜心,金韩港种70天油青,利隆油青矮脚70天,南蔬极品70天甜菜心,坡头70天油青菜心,伟兴三元里,青翠701,油绿702菜心,联记东莞白沙,特选80天特青菜心,伟星80天尖叶特青,爱普农超级迟心808,爱普农超级迟心809,碧绿80天油青甜菜心,翠绿,翠绿80天菜心,广海超级80天,利坚802,利坚805,联记东莞坡头,油绿801,粤友超靚,伟雄28号菜心,益农80天特青菜心,金韩广府青,林忠民大种迟花赤叶,赤叶翡翠大花菜心,金韩赤叶迟花菜心,丰满迟花2号甜菜心,伟兴迟花,15广州菜心-10号,15大种,15大种80,62036x62013 RaaC0.5xC2030,PI175054Aaa-1 BAREPOP 15376,Aaa-1,1976FAST FLOWEING P0,White Stemmed Tait sai (德国),中心苔菜,エウサイタイ,荆楚牌九月鲜红菜苔,早白菜苔,红金秋菜薹,香港新种49菜心,香港宝青60天菜心,迟心2号,八十天油青菜心,宝青50天油心,金秋红二号,迟花粗苔特青菜苔,019菜心(平)×紫芥菜,20菜心(平)×紫芥菜,14A-P2-21菜心×紫芥菜,CMS1.菜心(紫),CMS2.菜心(紫),CMS3.菜心(紫),CMS4.菜心(紫),CMS5.菜心(紫),CMS6.菜心(紫),CMS7.菜心(紫),CMS8.菜心(紫),(07-882×abc3-1)2,019菜心,小花菜,16E9-16②-24,17E9-22③,16E9-16②-24×16E9-13②-21,16E9-49①-24×16E9-22②-21,丸叶壬生菜77-44(日本),千筋京菜(日本),广岛菜(日本),壬生菜(日本),小松菜(日本)。

[0017] 一种鉴定菜心品种是否相同的检测方法,待测菜心为两种未知品种的菜心;所述检测方法包括:步骤一:检测所述待测菜心的所述SSR位点的基因型;步骤二:所述待测菜心的品种是否相同的判定:

[0018] 如果所述待测菜心基于前述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测菜心判定为相似的品种;如果所述待测菜心基于如前所述20个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则待测菜心判定为不同的品种。

[0019] 所述SSR位点,或所述SSR引物组合,或4所述SSR试剂盒,或所述检测方法,在以下X1或X2或X3中的应用:X1:鉴定待测菜心的品种是否属于标准菜心品种中的某一种;X2:鉴定待测菜心的品种具体为标准菜心品种中的哪一种;X3:鉴定待测菜心样本是否为相同的品种。

[0020] 本发明相比现有技术具有以下有益效果:

[0021] 1、本发明提供了一种可以快速,准确,稳定地进行品种真实性检测的SSR分子标记鉴定方法。本发明根据白菜的参考基因组与大量重测序数据进行了数据挖掘,选出了成千

上万的候选SSR标记,并进一步根据各种条件进行优化筛选,最终获得了一套鉴定结果稳定可靠,鉴定手段快速高效的分子标记。本发明SSR引物组合可用于对菜心品种在种子或幼苗期进行早期鉴定,也可以进行自种子开始的全生命周期的真实性鉴定,保证品种的真实性,可以解决国内种子种苗市场的同名异种与同种异名问题,切实保护生产者和育种家的权益,并为菜心种质资源和新品种保护提供强有力的技术支持。

[0022] 2、本发明提供的方法可以鉴定得出:待测菜心品种是否属于标准菜心品种中的某一种,以及具体是哪一种。故此方法可以对已知品种进行真实性鉴定,也可以对有标准样品的未知菜心品种进行真实性鉴定;还可以鉴定两种未知的品种是否属于相似品种。

[0023] 3、本发明提供的方法具有高通量、准确、低成本、操作简单、节约人力、物力等优点,具有十分广阔的应用前景。

[0024] 4、本发明相比现有技术中其他SSR相关技术方案还有以下区别:①首先,植物大规模测序刚兴起没几年,之前的绝大部分SSR相关技术是没有参考基因组作为数据基础的,所以只能盲选,随机选,选出来的标记完全是看运气的,其潜在鉴别能力根本无从谈起。②本发明投入的大量劳动,对20份品种进行了重测序,并以这些数据作为数据基础,与参考基因组联合使用进行大数据分析,进行了海量的数据挖掘与计算,与其现有技术引用别人文献使用过的标记或者从某些免费数据库选标记是有本质区别的。③本发明采用育种专家提供的品种作为验证材料,使SSR标记的鉴别能力有充分保障。④由于本发明使用的数据挖掘方法,所选出的SSR标记可以非常有效的代表全基因组信息,同时采用的菜心品种材料涵盖了所有市售品种的类型,故而本发明所选出的SSR标记具有非常强的潜在鉴别未知菜心品种的能力。

[0025] 5、本发明还有以下特点:①快速,通过本发明进行品种鉴定的时候,可以使用幼苗甚至种子直接提取的DNA进行检测,区别于DUS鉴定必须有成熟植株才能进行鉴定,将鉴定时间从几个月缩短到几个小时。②相对于表型鉴定方法,本发明基于DNA检测的鉴定方法不受外在环境的影响,不会因环境条件的变化而变化,其结果稳定可靠。③用本发明的方法进行鉴定,在菜心的各个物候期进行鉴定,其结果稳定一致。④本专利的20个SSR位点均通过Target-seq测序检测,3730荧光毛细管检测以及聚丙烯酰胺凝胶电泳检测,多平台检测结果的高度一致,充分证明了本发明各SSR位点的可靠性。⑤相对于DUS测试,本发明的操作不需要长时间的经验积累。

附图说明

[0026] 图1为实施例1中建立在20个引物组上的179个供试菜心品种的聚类图。

[0027] 图2-图21为实施例2中20个引物组在部分供试菜心品种中的SSR分型效果图。

[0028] 其中,图2:引物为BcSSr067,采用的品种为伟兴三元里;图3:引物为BcSSR039,采用的品种为广府2;图4:引物为BcSSR057,采用的品种为揭研31号油青甜菜心;图5:引物为BcSSR083,采用的品种为长合1号;图6:引物为BcSSR051,采用的品种为CMS.菜心(紫)1号;图7:引物为BcSSR090,采用的品种为赤叶翡翠大花菜心;图8:引物为BcSSR007,采用的品种为广研美绿;图9:引物为BcSSR008,采用的品种为湘蔬脆嫩四九;图10:引物为BcSSR113,采用的品种为联记东莞坡头;图11:引物为BcSSR016,采用的品种为青翠701;图12:引物为BcSSR045,采用的品种为金满田;图13:引物为BcSSR111,采用的品种为南蔬极品70天甜菜

心;图14:引物为BcSSR044,采用的品种为伟兴三元里;图15:引物为BcSSR099,采用的品种为长合2号;图16:引物为BcSSR092,采用的品种为翠绿80天菜心;图17:引物为BcSSR107,采用的品种为新世纪20号;图18:引物为BcSSR085,采用的品种为伟兴迟花;图19:引物为BcSSR024,采用的品种为青翠菜心;图20:引物为BcSSR127,采用的品种为15大种80;图21:引物为BcSSR066,采用的品种为金韩港种70天油青。图22为实施例2为SSR标记个数(即SSR位点个数)与区分179个供试大白菜品种的差异标记图。

具体实施方式

[0029] 定义如下:

[0030] 菜心品种真实性:本质上是指一个菜心品种与其遗传背景的真实对应性;在实际工作中,某供检品种是否具有真实性,是该指供检品种与文件记录(如品种说明书、标签等)是否相符。

[0031] 种间同源基因组片段:是指在白菜参考基因组Brassica_rapa V1.5之外,其他品种的菜心中与白菜参考基因组Brassica_rapa V1.5同源的基因组片段。比如,就特定基因组片段,在本发明的179个标准品种中与白菜参考基因组Brassica_rapa V1.5存在相同的基因。

[0032] 第一方面,本发明提供鉴定菜心品种真实性的SSR位点,分别位于白菜基因组,数量为20个,可选用其中的1个或多个,具体信息如表1所示。

[0033] 上述SSR位点选自如下第一SSR位点到第二十SSR位点中的任1到20种:第一SSR位点,位于白菜参考基因组第6染色体第16508732-16508752位,或其种间同源基因组片段;

[0034] 第二SSR位点,位于白菜参考基因组第3染色体第29633824-29633849位,或其种间同源基因组片段;

[0035] 第三SSR位点,位于白菜参考基因组第5染色体第22898915-22898932位,或其种间同源基因组片段;

[0036] 第四SSR位点,位于白菜参考基因组第7染色体第20048333-20048347位,或其种间同源基因组片段;

[0037] 第五SSR位点,位于白菜参考基因组第5染色体第3713470-3713479位,或其种间同源基因组片段;

[0038] 第六SSR位点,位于白菜参考基因组第8染色体第3292094-3292113位,或其种间同源基因组片段;

[0039] 第七SSR位点,位于白菜参考基因组第1染色体第24843934-24843945位,或其种间同源基因组片段;

[0040] 第八SSR位点,位于白菜参考基因组第1染色体第24887368-24887377位,或其种间同源基因组片段;

[0041] 第九SSR位点,位于白菜参考基因组第10染色体第7545410-7545424位,或其种间同源基因组片段;

[0042] 第十SSR位点,位于白菜参考基因组第2染色体第6297691-6297705位,或其种间同源基因组片段;

[0043] 第十一SSR位点,位于白菜参考基因组第4染色体第17713412-17713441位,或其种

间同源基因组片段；

[0044] 第十二SSR位点,位于白菜参考基因组第10染色体第6277936-6277951位,或其种间同源基因组片段；

[0045] 第十三SSR位点,位于白菜参考基因组第4染色体第16090886-16090906位,或其种间同源基因组片段；

[0046] 第十四SSR位点,位于白菜参考基因组第9染色体第14318215-14318228位,或其种间同源基因组片段；

[0047] 第十五SSR位点,位于白菜参考基因组第8染色体第11405907-11405918位,或其种间同源基因组片段；

[0048] 第十六SSR位点,位于白菜参考基因组第9染色体第37194484-37194495位,或其种间同源基因组片段；

[0049] 第十七SSR位点,位于白菜参考基因组第7染色体第22746168-22746179位,或其种间同源基因组片段；

[0050] 第十八SSR位点,位于白菜参考基因组第2染色体第23245100-23245115位,或其种间同源基因组片段；

[0051] 第十九SSR位点,位于白菜参考基因组第3染色体第27883995-27884012位,或其种间同源基因组片段；

[0052] 第二十SSR位点,位于白菜参考基因组第6染色体第9752435-9752446位,或其种间同源基因组片段；

[0053] 所述白菜参考基因组*Brassica_rapa* V1.5。

[0054] 第二方面,本发明提供鉴定菜心品种真实性的SSR引物组,可以通过PCR扩增反应得基于上述SSR位点的PCR扩增产物。

[0055] 上述SSR引物组合选自:第一SSR引物对至第二十SSR引物对,分别用于PCR扩增上述第一SSR位点至第二十SSR位点。上述第一SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:1和SEQ ID NO:2的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第二SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第三SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第四SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第五SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第六SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第七SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第八SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第九SSR引物对,与序列表中的SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十

SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十一SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十二SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:24的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十三SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十四SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十五SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:30的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十六SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十七SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十八SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第十九SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%;上述第二十SSR引物对,与序列中的SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40的核苷酸序列的同源性大于等于85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%,优选为100%。

[0056] 在优选的实施方式中,上述SSR引物组合选自引物组01-20中的一组或多组;上述引物组01-20的DNA序列信息如序列SEQ ID:1-40所示,参见表2。

[0057] 上述引物组中,上游引物的5'端可带有荧光标签序列以便荧光PCR检测,例如FAM荧光标签序列的荧光信号为蓝色,HEX荧光标签序列的荧光信号为绿色。

[0058] 第三方面,本发明提供鉴定菜心品种真实性的SSR试剂盒,SSR试剂配制为PCR

[0059] 反应体系,该体系优选包括:

反应组分	原浓度	在体系中的终浓度	体积 (μL)
ddH ₂ O	—	—	6.6
10×Buffer (不含 Mg ²⁺)	10×	1×	2.0
MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.0
dNTPs	2.5 mmol/L each	每种 dNTP 均为 0.15 mmol/L	1.2
Taq 酶	5 U/ μL	0.05U/ μL	0.2
引物	1.25 $\mu\text{mol/L}$	上下游引物均为 0.25 $\mu\text{mol/L}$	4.0
DNA	50-150 ng/ μL	10- 30 ng/ μL	4.0
总体积			20

[0060] 上述SSR引物组,上游引物和下游引物的终浓度之比为1:1。

[0062] 第四方面,本发明提供一种鉴定菜心品种真实性的检测方法,包括以下步骤:

[0063] 步骤一:检测待测菜心的SSR位点基因型。

[0064] 分步骤一:分别以上述待测菜心的基因组DNA和菜心标准品种的基因组DNA为模板,分别采用上述SSR引物组合中的引物组的进行PCR扩增反应,得到PCR扩增产物;

[0065] 分步骤二:对上述PCR扩增产物进行检测,获得待测菜心和菜心标准品种基于20个上述SSR位点的基因型。

[0066] 所述检测可以为荧光信号检测:检测上述PCR扩增产物的荧光信号,获得待测菜心和标准菜心品种基于上述20个SSR位点的基因型;

[0067] 上述检测也可以为扩增产物片段检测:利用毛细管电泳检测上述PCR扩增产物的片段大小,获得待测菜心和标准菜心品种基于上述20个SSR位点的基因型。

[0068] 步骤二:待测菜心的品种判定步骤:

[0069] 通过聚类分析待测菜心和标准菜心品种基于上述20个SSR位点的基因型得出结论以下结果:

[0070] 如果所述待测菜心基于所述20个SSR位点的基因型,和菜心标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则待测菜心与所述菜心标准品种的该品种属于相似的品种;

[0071] 如果所述待测菜心基于所述20个SSR位点的基因型,和菜心标准品种中的某指定品种的基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点数为大于2,则待测菜心与所述菜心标准品种的该指定品种判定为不同的品种。

[0072] 上述PCR扩增反应的程序优选为:

[0073] 94℃预变性5min;94℃变性30s,60℃退火45s,72℃延伸45s,每循环降0.8℃,共12个循环;94℃变性30s,50℃退火45s,72℃延伸45s,共25个循环;72℃终延伸10min。扩增产物电泳前于-20℃或冰上保存。

[0074] 上述标准菜心品种包括以下179个菜心品种:

[0075] 金满田,红亮1号,珠海矮脚,翠绿1号,穗美888,迟80天,06秋保1号,利隆矮脚1号,联记柳叶,东莞尖叶,长合70,名优尖叶,金苗美绿702,长合,佳信,黄心701,金顺利,红亮2号,红亮3号,广研菜场,金韩,农普绿宝,广绿60,圣达新西兰,欣农50,欣农极品菜心王,红亮50,红亮超级,范记50,日本甜脆,利隆矮脚,利隆矮脚45,一哥白沙,坤记菜心,广研3号,坤记菜心王,菜心4号,19号菜心,19号早菜心,兴田粗苔6号,金韩春梅,金韩春早,金韩冬竹,农家乐8,农家乐,华绿中花油青,惟勤全年粗条,美青一号,坡头31号,旺田翠绿,香港油青,冬竹菜心,广良油青,广良早油青,粤友迟心1号,金韩秋菊,新世纪20号,农鑫抗病油青旺,农鑫抗病油青,09A保,日本油美1号,洲008柄白,广东1只花,288甜菜心,王中王抗热,宝丰矮脚,06秋保-A,伟兴黄叶四九,金利达19号,农悦49,纯白梗菜心,农鑫夏绿,兴田油青25,伟雄A-3,绿冠608,新苗002,新苗T28,超级菜心皇,绿满园香脆,星原极早,民安日本,12保,13A9-保,12菜心1号,12菜心3号,青梗A,青梗B,14A9-保-22号,45天菜心,青翠菜心,尖叶49菜心,佰顺2号,双盈80天,49-19菜心,日本60丛,桂华特青70天甜菜心,圣农粗条,湘蔬脆嫩四九,揭研31号油青甜菜心,14广州菜心,广府2号,06秋保-B,四九黄菜心,广研美绿,天牌,恒利达澳选快大甜菜心,农普油绿701,金韩70天菜心,金韩港种70天油青,利隆油青矮脚70天,南蔬极品70天甜菜心,坡头70天油青菜心,伟兴三元里,青翠701,油绿702菜心,联记东莞白沙,特选80天特青菜心,伟星80天尖叶特青,爱普农超级迟心808,爱普农超级迟心809,碧绿80天油青甜菜心,翠绿,翠绿80天菜心,广海超级80天,利坚802,利坚805,联记

东莞坡头,油绿801,粤友超靛,伟雄28号菜心,益农80天特青菜心,金韩广府青,林忠民大种迟花赤叶,赤叶翡翠大花菜心,金韩赤叶迟花菜心,丰满迟花2号甜菜心,伟兴迟花,15广州菜心-10号,15大种,15大种80,62036x62013 RaaC0.5xC2030,PI175054Aaa-1 BAREPOP 15376,Aaa-1,1976FAST FLOWEING P0,White Stemmed Tait sai(德国),中心苔菜,エウサイタイ,荆楚牌九月鲜红菜苔,早白菜苔,红金秋菜薹,香港新种49菜心,香港宝青60天菜心,迟心2号,八十天油青菜心,宝青50天油心,金秋红二号,迟花粗苔特青菜苔,019菜心(平)×紫芥菜,20菜心(平)×紫芥菜,14A-P2-21菜心×紫芥菜,CMS1.菜心(紫),CMS2.菜心(紫),CMS3.菜心(紫),CMS4.菜心(紫),CMS5.菜心(紫),CMS6.菜心(紫),CMS7.菜心(紫),CMS8.菜心(紫),(07-882×abc3-1)2,019菜心,小花菜,16E9-16^②-24,17E9-22^③,16E9-16^②-24×16E9-13^②-21,16E9-49^①-24×16E9-22^②-21,丸叶壬生菜77-44(日本),千筋京菜(日本),广岛菜(日本),壬生菜(日本),小松菜(日本)。

[0076] 第五方面,本发明提供一种鉴定菜心品种是否相同的检测方法。

[0077] 其中,待测菜心为两种未知品种的菜心;

[0078] 该检测方法包括:

[0079] 步骤一:检测待测菜心的上述20个SSR位点的基因型;检测方法如第四方面所述。

[0080] 步骤二:待测菜心的品种(两个未知的菜心品种)是否相同的判定:

[0081] 如果两个未知的菜心品种基于上述20个SSR位点的基因型的差异位点数为0-2,则两个未知的菜心判定为相似的品种;

[0082] 如果两个未知的菜心品种基于所述20个SSR位点的基因型的差异位点大于2,则两个未知的菜心判定为不同的品种。

[0083] 第六方面,本发明提供上述SSR位点,SSR引物组合,SSR试剂盒,述检测方法,在以下X1或X₂或X₃中的应用:

[0084] X1:鉴定待测菜心的品种是否属于标准菜心品种中的某一种;

[0085] X2:鉴定待测菜心的品种具体为标准菜心品种中的哪一种;

[0086] X3:鉴定待测菜心样本是否为相同的品种。

[0087] X1、X2和X3均属于鉴定菜心品种真实性的应用。

[0088] 以下的实施例便于更好地理解本发明,但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法,如无特殊说明,均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料,如无特殊说明,均为自常规生化试剂商店购买得到的。

[0089] 实施例1

[0090] 用于鉴定菜心品种真实性的SSR引物组合的获得

[0091] 一、20个SSR位点的发现:这些位点是根据近缘种白菜的参考基因组Brassica_rapa V1.5与20份种质资源全基因组重测序数据进行数据挖掘所获得的。

[0092] 1、区别于其他分子标记鉴定方法中,随机盲目选取SSR标记的方法,本发明使用白菜参考基因组,并使用独有的,具有代表性的,20份菜心品种重测序数据(重测序结果未公开),通过特定的大数据分析手段,对全基因组的SSR位点进行分析,通过PIC、MAF、序列保守性等一系列的筛选条件进行筛选,最终获得了一个SSR位点的集合,通过数据降维等手段选取能充分代表本作物基因组的SSR位点。通过Target-Seq简化测序技术,ABI3730荧光毛细管电泳等不同检测手段进行验证,最终结合20份实际材料选出了20个鉴别能力最强的

SSR位点作为本发明中所使用的SSR位点。

[0093] 本发明基于20份菜心代表资源的重测序数据,首次发现并获得20个SSR位点。这20份菜心资源类型丰富,涵盖了市场上现有的白菜主要的生态类型与农艺性状,尽可能多地体现了种质代表性,具有较高的遗传多样性。

[0094] 2、本发明的SSR位点的筛选包括以下步骤:

[0095] 首先通过20份菜心材料的重测序结果,与白菜参考基因组Brassica_rapa V1.5参考基因组序列进行比对一共找到668325个SSR位点,过滤碱基重复次数小于5次的之后剩余84267个SSR位点,再过滤掉缺失比例大于30%的之后剩余38435个SSR位点,再过滤掉MAF小于0.1的剩余6777个SSR位点,再过滤掉两翼150bp序列内含有indel与SNP的位点之后,剩余1254个SSR位点。之后对这1254个SSR位点进行数据降维,选出了117个最具代表性的SSR位点,之后对这些位点进行PCR引物设计。

[0096] 对179个品种(参见实施例2)使用这117对SSR引物进行扩增后,通过简化测序技术获得其SSR序列信息,并进行数据分析,去掉缺失比例大于10%的SSR位点数据剩余103个SSR位点作为备选位点。再使用minimal marker算法选出20个SSR位点,此算法优先考虑其对179个菜心品种的鉴别能力,并综合考虑SSR位点多态性,均匀分布于10对染色体等条件。

[0097] 为了确定这20个SSR位点鉴别能力的可靠性,发明人重新设计适用于荧光毛细管电泳检测的引物,使用这20对引物对179个菜心品种进行了PCR扩增,并使用AB 3730荧光毛细管电泳系统进行片段长度检测,其结果证明所选20个SSR位点具有非常高的鉴别能力与可靠性。

[0098] 3、具体的,SSR位点的筛选标准如下:在全基因组范围内选择位置均匀、多态性好、杂合度小、MAF>0.3、PCA聚类效果好、区分度高且两翼150bp序列保守(无InDel,无SNP,无其它SSR)的SSR位点。20个SSR位点的基本信息详见表1。其中SSR位点在染色体上的位置和motif信息是基于白菜参考基因组序列比对确定的,所述白菜Brassica_rapa参考基因组序列的版本号为V1.5,网址参见:网址:

[0099] http://brassicadb.org/brad/datasets/pub/BrassicaceaeGenome/Brassica_rapa/V1.0/Bra_Chromosome_V1.5/

[0100] 表1中PIC值和主要等位变异扩增长度是根据实施例2的179个品种得到的。

[0101] 表1. 20个SSR位点的基本信息

[0102]

	SSR 位点名称	染色体	起止位置(bp)	参考基因组_motif	PIC	主要等位变异扩增长度 (bp)
1	BcSSR067	A06	16508732-16508752	(CCA)7	0.61	90 93 96 99
2	BcSSR039	A03	29633824-29633849	(AG)13	0.66	104 102 100 90
3	BcSSR057	A05	22898915-22898932	(TG)9	0.58	96 102 104
4	BcSSR083	A07	20048333-20048347	(GAA)5	0.60	93 99 102 90
5	BcSSR051	A05	3713470-3713479	(TC)5	0.58	115 119 117
6	BcSSR090	A08	3292094-3292113	(TC)10	0.56	148 150 152 154
7	BcSSR007	A01	24843934-24843945	(AG)6	0.65	150 152 154 148
8	BcSSR008	A01	24887368-24887377	(TA)5	0.57	150 152 148
9	BcSSR113	A10	7545410-7545424	(GAA)5	0.56	149 158 164

[0103]	10	BcSSR016	A02	6297691-6297705	(AGG)5	0.59	143 161 140 152
	11	BcSSR045	A04	17713412-17713441	(CT)15	0.58	189 197 199 195
	12	BcSSR111	A10	6277936-6277951	(TCTT)4	0.56	193 201 197 205
	13	BcSSR044	A04	16090886-16090906	(CTC)7	0.64	197 200 203 212
	14	BcSSR099	A09	14318215-14318228	(GA)7	0.55	199 201 203
	15	BcSSR092	A08	11405907-11405918	(AG)6	0.58	216 220 224 204
	16	BcSSR107	A09	37194484-37194495	(AG)6	0.42	278 317 280 311
	17	BcSSR085	A07	22746168-22746179	(TCC)4	0.67	286 289 292 298
	18	BcSSR024	A02	23245100-23245115	(CT)8	0.41	288 290
	19	BcSSR127	A03	27883995-27884012	(GAA)6	0.59	289 292 295 301
	20	BcSSR066	A06	9752435-9752446	(AT)6	0.58	295 299 301

[0104] 二、用于鉴定菜心品种真实性的SSR引物组合的获得

[0105] 基于步骤一发现的20个SSR位点,本发明的发明人开发了具有较高的多态性信息量(即PIC值,PIC值指的是一个标记,用于在群体检测多态性的价值;PIC值取决于检测的等

位基因的数目和等位基因它们的频率分布;PIC值等于1减去所有等位基因频率的平方的总和)的用于鉴定菜心品种真实性的SSR引物组合。基于前述SSR位点在白菜Brassica_rapa参考基因组序列的版本号为V1.5中的上下游序列设计引物,SSR引物组合由20个引物组组成,每个引物组的名称见表2中第2列。每个引物组由2条引物序列组成,用于扩增一个SSR位点。20个引物组中各个引物的核苷酸序列如表2。

[0106] 表2. 20个引物组的信息

	引物对应的 SSR位 点名称	引物编号	引物的核苷酸序列(5'-3')	序列 编号 (SEQ ID NO)	5'荧光 修饰
1	BcSSR067	上游引物 01F	TCCATTGAAGACTGACCAAAAGATTG	1	TAMRA
		下游引物 01R	CATGAGCGGTGGTGGTGG	2	
2	BcSSR039	上游引物 02F	GTAGATTCAGAGTAGAGATTTTGGAAAGT	3	TAMRA
		下游引物 02R	GGCGTTTCACTCTCCTTCTCTC	4	
3	BcSSR057	上游引物 03F	GATTTTACTCTCACATGTGCCATG	5	TAMRA
		下游引物 03R	TTCCTTGCATCATCCTACCCT	6	
4	BcSSR083	上游引物 04F	CATTCCTCGTTGCAATCAAAACA	7	TAMRA
		下游引物 04R	GCTTATGGTTTTGCCGTACATTTCT	8	
5	BcSSR051	上游引物 05F	GAATTTGGAGCTCTCTCTAGGTGAT	9	TAMRA
		下游引物 05R	TCTGTAATACACAACACCAAATGGT	10	
6	BcSSR090	上游引物 06F	GTAACGGCCGTCGGTGAC	11	ROX
		下游引物 06R	TAACATAACACGATCGCTTTAAGGC	12	
7	BcSSR007	上游引物 07F	AATGGAGTGATCGAGAATGGAGG	13	ROX
		下游引物 07R	GCTGTCTAATTTGGGCATACTAGAA	14	
8	BcSSR008	上游引物 08F	TCGTTTCCAAATGCGACATTCTAAC	15	ROX
		下游引物 08R	GTTCTTGTTTGCTGTGGAAGTTTTT	16	
9	BcSSR113	上游引物 09F	AGAGAGAGAGTCAGAGACAGCTATT	17	ROX
		下游引物 09R	AATGCACTATCTTGCTTCCTTTCTC	18	

[0107]

[0108]	10	BcSSR016	上游引物 10F	TCTAAGGTAGAGATAGTAGTAGCTGCT	19	ROX	
			下游引物 10R	CAAATAGGACATGTCTTTGAAGCCA	20		
		11	BcSSR045	上游引物 11F	CCGTTTGGAAGCTGTTATTGCAAATG	21	HEX
				下游引物 11R	TAGAAGCAACCGTGTACATGTTGT	22	
		12	BcSSR111	上游引物 12F	AAACCGTGAATCTTAATTGGCCG	23	HEX
				下游引物 12R	TTGATTCTCTAGTTCAGCTACTCGG	24	
		13	BcSSR044	上游引物 13F	AACAATGGCGTTTGTCCGAAAT	25	HEX
				下游引物 13R	TCTGAAAAGCTCTTTGAATGCAACT	26	
		14	BcSSR099	上游引物 14F	AAAGAAGCTTCGTTCAAACCTTCGA	27	HEX
				下游引物 14R	AGTTTGAAGTTCATCCTACAAAGCC	28	
		15	BcSSR092	上游引物 15F	AACTACATTGGCATAGTTGTTTCAGA	29	HEX
				下游引物 15R	GCTGGTACTTACAGTGGCAAAC	30	
		16	BcSSR107	上游引物 16F	GACTTGTAAGAGAGATGACCTGTGT	31	FAM
				下游引物 16R	TCACATTCTCTTACCTGTACTCTC	32	
		17	BcSSR085	上游引物 17F	TGGCGACTCTACTAATGATGTTCTT	33	FAM
				下游引物 17R	GACATGATCCATCTTCATCCCACC	34	
		18	BcSSR024	上游引物 18F	AAGCAGAGACATTAAGTTCTGAGGT	35	FAM
				下游引物 18R	TTTGGTCTTGTTTTGTCTCTGTCTG	36	
		19	BcSSR127	上游引物 19F	GGATTCAGTTACAGAGGCAAAACAA	37	FAM
				下游引物 19R	CACGTGTCTCAGACGATAAAAGAAG	38	
	20	BcSSR066	上游引物 20F	CAAATCGGCTCCATAGTGCATAATT	39	FAM	
			下游引物 20R	CCCTTGATTTGCAATGTTGAGTACT	40		

[0109] 实施例2

[0110] 本实施例为实施例1开发的SSR引物组合的有效性检验。

[0111] 本实施例的179个供试菜心品种均为常见的优良品种或部分国外引进品种,来源均为北京市农林科学院蔬菜中心种质库。具体品种如下:

[0112]

编号	品种名称	来源	编号	品种名称	来源
CX1	金满田	蔬菜中心种质库	CX92	尖叶 49 菜心	蔬菜中心种质库
CX2	红亮 1 号	蔬菜中心种质库	CX94	佰顺 2 号	蔬菜中心种质库
CX3	珠海矮脚	蔬菜中心种质库	CX95	双盈 80 天	蔬菜中心种质库
CX4	翠绿 1 号	蔬菜中心种质库	CX96	49-19 菜心	蔬菜中心种质库
CX5	穗美 888	蔬菜中心种质库	CX97	日本 60 丛	蔬菜中心种质库
CX6	迟 80 天	蔬菜中心种质库	CX98	桂华特青 70 天甜菜心	蔬菜中心种质库
CX7	06 秋保 1 号	蔬菜中心种质库	CX99	圣农粗条	蔬菜中心种质库
CX8	利隆矮脚 1 号	蔬菜中心种质库	CX100	湘蔬脆嫩四九	蔬菜中心种质库
CX9	联记柳叶	蔬菜中心种质库	CX101	揭研 31 号油青甜菜心	蔬菜中心种质库
CX10	东莞尖叶	蔬菜中心种质库	CX102	14 广州菜心	蔬菜中心种质库
CX11	长合 70	蔬菜中心种质库	CX103	广府 2 号	蔬菜中心种质库
CX12	名优尖叶	蔬菜中心种质库	CX104	06 秋保-B	蔬菜中心种质库
CX13	金苗美绿 702	蔬菜中心种质库	CX105	四九黄菜心	蔬菜中心种质库
CX14	长合	蔬菜中心种质库	CX106	广研美绿	蔬菜中心种质库
CX15	佳信	蔬菜中心种质库	CX107	天牌	蔬菜中心种质库
CX16	黄心 701	蔬菜中心种质库	CX108	恒利达澳选快大甜菜心	蔬菜中心种质库
CX17	金顺利	蔬菜中心种质库	CX109	农普油绿 701	蔬菜中心种质库
CX18	红亮 2 号	蔬菜中心种质库	CX110	金韩 70 天菜心	蔬菜中心种质库
CX19	红亮 3 号	蔬菜中心种质库	CX111	金韩港种 70 天油青	蔬菜中心种质库
CX20	广研菜场	蔬菜中心种质库	CX112	利隆油青矮脚 70 天	蔬菜中心种质库
CX21	金韩	蔬菜中心种质库	CX113	南蔬极品 70 天甜菜心	蔬菜中心种质库
CX22	农普绿宝	蔬菜中心种质库	CX114	坡头 70 天油青菜心	蔬菜中心种质库
CX23	广绿 60	蔬菜中心种质库	CX115	伟兴三元里	蔬菜中心种质库
CX24	圣达新西兰	蔬菜中心种质库	CX116	青翠 701	蔬菜中心种质库
CX25	欣农 50	蔬菜中心种质库	CX117	油绿 702 菜心	蔬菜中心种质库
CX26	欣农极品菜心王	蔬菜中心种质库	CX118	联记东莞白沙	蔬菜中心种质库
CX27	红亮 50	蔬菜中心种质库	CX119	特选 80 天特青菜心	蔬菜中心种质库
CX28	红亮超级	蔬菜中心种质库	CX120	伟星 80 天尖叶特青	蔬菜中心种质库
CX29	范记 50	蔬菜中心种质库	CX121	爱普农超级迟心 808	蔬菜中心种质库
CX30	日本甜脆	蔬菜中心种质库	CX122	爱普农超级迟心 809	蔬菜中心种质库
CX31	利隆矮脚	蔬菜中心种质库	CX123	碧绿 80 天油青甜菜心	蔬菜中心种质库
CX32	利隆矮脚 45	蔬菜中心种质库	CX124	翠绿	蔬菜中心种质库
CX33	一哥白沙	蔬菜中心种质库	CX125	翠绿 80 天菜心	蔬菜中心种质库
CX34	坤记菜心	蔬菜中心种质库	CX126	广海超级 80 天	蔬菜中心种质库
CX35	广研 3 号	蔬菜中心种质库	CX127	利坚 802	蔬菜中心种质库
CX36	坤记菜心王	蔬菜中心种质库	CX128	利坚 805	蔬菜中心种质库
CX37	菜心 4 号	蔬菜中心种质库	CX129	联记东莞坡头	蔬菜中心种质库
CX38	19 号菜心	蔬菜中心种质库	CX130	油绿 801	蔬菜中心种质库
CX39	19 号早菜心	蔬菜中心种质库	CX131	粤友超靚	蔬菜中心种质库
CX40	兴田粗苔 6 号	蔬菜中心种质库	CX133	伟雄 28 号菜心	蔬菜中心种质库
CX41	金韩春梅	蔬菜中心种质库	CX134	益农 80 天特青菜心	蔬菜中心种质库

[0113]

CX42	金韩春早	蔬菜中心种质库	CX137	金韩广府青	蔬菜中心种质库
CX43	金韩冬竹	蔬菜中心种质库	CX138	林忠民大种迟花赤叶	蔬菜中心种质库
CX44	农家乐 8	蔬菜中心种质库	CX139	赤叶翡翠大花菜心	蔬菜中心种质库
CX45	农家乐	蔬菜中心种质库	CX140	金韩赤叶迟花菜心	蔬菜中心种质库
CX46	华绿中花油青	蔬菜中心种质库	CX142	丰满迟花 2 号甜菜心	蔬菜中心种质库
CX47	惟勤全年粗条	蔬菜中心种质库	CX143	伟兴迟花	蔬菜中心种质库
CX48	美青一号	蔬菜中心种质库	CX145	15 广州菜心-10 号	蔬菜中心种质库
CX49	坡头 31 号	蔬菜中心种质库	CX146	15 大种	蔬菜中心种质库
CX50	旺田翠绿	蔬菜中心种质库	CX147	15 大种 80	蔬菜中心种质库
CX51	香港油青	蔬菜中心种质库	CX149	62036x62013 RaaC0.5xC2030	蔬菜中心种质库
CX52	冬竹菜心	蔬菜中心种质库	CX150	PI175054 ^{Aaa-1} BAREPOP 15376	蔬菜中心种质库
CX53	广良油青	蔬菜中心种质库	CX151	Aaa-1, 1976 FAST FLOWEING PO	蔬菜中心种质库
CX54	广良早油青	蔬菜中心种质库	CX152	White ^{Stemmed} Taitsai (德国)	蔬菜中心种质库
CX55	粤友迟心 1 号	蔬菜中心种质库	CX154	中心苔菜	蔬菜中心种质库
CX56	金韩秋菊	蔬菜中心种质库	CX155	エウサイタイ	蔬菜中心种质库
CX57	新世纪 20 号	蔬菜中心种质库	CX156	荆楚牌九月鲜红菜苔	蔬菜中心种质库
CX58	农鑫抗病油青旺	蔬菜中心种质库	CX157	早白菜苔	蔬菜中心种质库
CX59	农鑫抗病油青	蔬菜中心种质库	CX160	红金秋菜薹	蔬菜中心种质库
CX60	09A 保	蔬菜中心种质库	CX161	香港新种 49 菜心	蔬菜中心种质库
CX61	日本油美 1 号	蔬菜中心种质库	CX162	香港宝青 60 天菜心	蔬菜中心种质库
CX62	洲 008 柄白	蔬菜中心种质库	CX163	迟心 2 号	蔬菜中心种质库
CX63	广东 1 只花	蔬菜中心种质库	CX164	八十天油青菜心	蔬菜中心种质库
CX64	288 甜菜心	蔬菜中心种质库	CX165	宝青 50 天油心	蔬菜中心种质库
CX65	王中王抗热	蔬菜中心种质库	CX166	金秋红二号	蔬菜中心种质库
CX66	宝丰矮脚	蔬菜中心种质库	CX167	迟花粗苔特青菜苔	蔬菜中心种质库
CX67	06 秋保-A	蔬菜中心种质库	CX168	019 菜心(平)×紫芥菜	蔬菜中心种质库
CX68	伟兴黄叶四九	蔬菜中心种质库	CX169	20 菜心(平)×紫芥菜	蔬菜中心种质库
CX69	金利达 19 号	蔬菜中心种质库	CX170	14A-P2-21 菜心×紫芥菜	蔬菜中心种质库
CX70	农悦 49	蔬菜中心种质库	CX171	CMS1.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX71	纯白梗菜心	蔬菜中心种质库	CX172	CMS2.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX72	农鑫夏绿	蔬菜中心种质库	CX173	CMS3.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX73	兴田油青 25	蔬菜中心种质库	CX174	CMS4.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX74	伟雄 A-3	蔬菜中心种质库	CX175	CMS5.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX75	绿冠 608	蔬菜中心种质库	CX176	CMS6.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX76	新苗 002	蔬菜中心种质库	CX177	CMS7.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX77	新苗 T28	蔬菜中心种质库	CX178	CMS8.菜心(紫)	蔬菜中心种质库
CX78	超级菜心皇	蔬菜中心种质库	CX179	(07-882×abc3-1)2	蔬菜中心种质库
CX79	绿满园香脆	蔬菜中心种质库	CX180	019 菜心	蔬菜中心种质库
CX80	星原极早	蔬菜中心种质库	CX182	小花菜	蔬菜中心种质库
CX81	民安日本	蔬菜中心种质库	CX185	16E9-16②-24	蔬菜中心种质库
CX82	12 保	蔬菜中心种质库	CX186	17E9-22③	蔬菜中心种质库
CX83	13A9-保	蔬菜中心种质库	CX187	16E9-16 ②	蔬菜中心种质库

				-24×16E9-13②-21		
[0114]	CX84	12 菜心 1 号	蔬菜中心种质库	CX188	16E9-49 -24×16E9-22②-21 ^①	蔬菜中心种质库
	CX85	12 菜心 3 号	蔬菜中心种质库	CX189	丸叶壬生菜 77-44(日本)	蔬菜中心种质库
	CX86	青梗 A	蔬菜中心种质库	CX190	千筋京菜(日本)	蔬菜中心种质库
	CX87	青梗 B	蔬菜中心种质库	CX191	广岛菜(日本)	蔬菜中心种质库
	CX88	14A9-保-22 号	蔬菜中心种质库	CX192	壬生菜(日本)	蔬菜中心种质库
	CX89	45 天菜心	蔬菜中心种质库	CX193	小松菜(日本)	蔬菜中心种质库
	CX90	青翠菜心	蔬菜中心种质库			

[0115] 1、供试菜心品种的基因组DNA的获得

[0116] 采用CTAB法分别提取179个供试菜心品种的叶片(混取30粒种子的真叶,即每个品种取30粒种子长出来的真叶,指的是:同一品种取30个不同植株的真叶混合)的基因组DNA,得到供试菜心品种的基因组DNA。

[0117] 上述CTAB法的操作具体为:

[0118] 分别摘取幼苗期的上述149个品种的叶片,置于冷冻干燥仪(CoolSafe 55-4)中脱水;然后用高通量研磨仪(Geno/Grind6875)打碎叶片,再取200mg叶片干粉,向其中加入800 μL CTAB提取液(2%CTAB,1.4mM NaCl,100mM Tris-HCl pH8.0,20mM EDTA pH8.0,1%PVP-40,0.2%β-巯基乙醇),混匀,于65℃水浴30min,加入等体积的氯仿/异戊醇(v:v=24:1),在10000rpm/min条件下离心10分钟,吸取上清液转移至新的离心管中,加入0.8倍体积预冷的异丙醇,轻轻颠倒混匀,-20℃放置30min后在4℃、12,000r/min离心10min。弃上清液,加入70%乙醇溶液洗涤2遍,自然条件下干燥加100μL ddH₂O溶解DNA,得到供试菜心品种基因组DNA,检测浓度后4℃备用。

[0119] 供试菜心品种的基因组DNA的质量和浓度均须满足PCR要求,达标标准为:紫外分光光度计Nanodrop2000(Thermo)检测A260/A280比值在1.8左右,A260/A230比值大于1.8;供试菜心品种的基因组DNA的浓度在30-50ng/μL。

[0120] 2、分别以179个供试菜心品种的基因组DNA为模板,分别采用20个引物组进行PCR扩增,得到PCR扩增产物。各个PCR反应体系中,名称中含有“F”的引物和名称中含有“R”的引物浓度比为1:1。

[0121] 反应体系包括:

[0122] 上游引物(名称中含有“F”)和下游引物(名称中含有“R”)在体系中浓度之比为1:1。

[0123]

反应组分	原浓度	体系中的终浓度	体积(μL)
ddH ₂ O	—	—	6.6

	10×Buffer (不含 Mg ²⁺)	10×	1×	2.0
	MgCl ₂	25 mmol/L	2.5 mmol/L	2.0
[0124]	dNTPs	2.5 mmol/L each	每种 dNTP 0.15 mmol/L	1.2
	Taq 酶	5 U/μL	0.05U/μL	0.2
	引物	1.25 μmol/L	上下游引物均为 0.25 μmol/L	4.0
	DNA	50-150 ng/μL	10- 30 ng/μL	4.0
	总体积			20

[0125] 反应程序为：预变性：94℃5min；扩增：94℃变性30s，60℃退火45s，72℃延伸45s，每循环降0.8℃，共12个循环；94℃变性30s，50℃退火45s，72℃延伸45s，共25个循环；终延伸：72℃10min。形成的扩增产物电泳前于4℃保存。

[0126] 3、荧光毛细管电泳

[0127] 完成步骤2后，根据SSR分子标记扩增片段大小的不同，可以根据不同仪器选用多个引物组合进行电泳。按照预先确定的组合引物，分别取等体积同一组合引物的不同荧光标记的扩增产物，TAMRA稀释50倍，其它荧光产物稀释100倍后充分混匀。从混合液中吸取1μL，加入到DNA分析仪专用上样板孔中。各孔再分别加入0.1μL分子量内标和8.9μL去离子甲酰胺，在PCR仪上95℃变性5min，取出立即置-20℃冰箱内或冰上，冷却5min。瞬时离心10s后置放到DNA分析仪上。开始检测。

[0128] 部分结果见图2-21。结果表明，各个引物组在供试菜心品种中可以得到很好的分型效果。

[0129] 4、聚类分析

[0130] 根据179个供试菜心品种基于20个SSR位点的基因型，利用MEGA7软件对179个供试菜心品种进行聚类分析。

[0131] 建立在20个引物组上的179个供试菜心品种的聚类图如图1所示。结果表明，20个引物组可以完全区分179个供试菜心品种。由此可见，实施例1开发的SSR引物组合可以应用于菜心品种DNA指纹数据库构建和品种真实性鉴定。

[0132] 5、效率评价

[0133] 品种真实性鉴定可以采用序贯分析方式减少工作量。本发明的发明人比较了SSR标记个数（即引物组数）与区分179个供试菜心品种区分率的关系。

[0134] 如图22所示的179个品种两两之间比较并统计的差异标记数，其中两两之间比较的结果的个数为 $C_{179}^2 = 179 \times 178 \div 2 = 15931$ 个；在这15931个结果中，差异位点个数为2的约占总数的2%，差异位点个数为3的约占总数的4%，差异位点个数为4的约占总数的10%，差异位点个数为5的约占总数的16%，差异位点个数为6的约占总数的18.5%，差异位点个数为7的约占总数的18%，差异位点个数为8的约占总数的14%，差异位点个数为9的约占总数的8.5%，差异位点个数为10的约占总数的5%，差异位点个数为11的约占总数的2.5%，差异位点个数为12的约占总数的1%，差异位点个数为13的约占总数的0.5%，差异位点个数为14-20的约占总数的0%，此结果说明用这些标记在179个品种的多态性好；20个引物组（即20个SSR标记个数）在179个供试大白菜品种中的区分率达到100%。

[0135] 实施例3

[0136] 本实施例是检测待测菜心品种是否属于179个供试菜心品种中的品种的方法,该待测菜心的品种未知,需要经过本实施例的检测方法得到该待测菜心的品种是否是这179个品种之一。

[0137] 1、待测菜心品种的基因组DNA的获得

[0138] 待测菜心品种的叶片取自北京市农林科学院蔬菜研究中心试验基地。

[0139] 按照实施例2中的步骤1的方法,将“供试菜心品种的叶片”替换为“待测菜心品种的叶片”,其它步骤均不变,得到待测菜心品种的基因组DNA。

[0140] 2、SSR引物及PCR反应体系的配置

[0141] 按照实施例2中的步骤2的方法,将“供试菜心品种的基因组DNA”替换为“待测菜心品种的基因组DNA”,其它步骤均不变,得到待测菜心品种的PCR产物。

[0142] 3、荧光毛细管电泳检测

[0143] 取待测菜心品种的PCR产物。

[0144] 将待测菜心品种的20个SSR扩增产物的片段大小分别与179个供试菜心品种的20个SSR位点进行对比,统计待测菜心品种和20个标准菜心品种的差异位点数,然后进行如下判断:

[0145] 如果待测菜心品种与某标准菜心品种的差异位点数为2个以上,则待测菜心品种和该标准菜心品种判定为不同的菜心品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远。

[0146] 如果待测菜心品种与某标准菜心品种的差异位点数为0-2,则待测菜心品种和该标准菜心品种判定为相似的菜心品种。

[0147] 结果表明,待测菜心品种在20个SSR位点上与179个供试菜心品种的差异位点数均为2个以上,因此,待测菜心品种不属于179个供试菜心品种中的任何一个品种,即待测菜心品种并不是上述179个供试菜心品种之一。

[0148] 实施例4

[0149] 本实施例是采用毛细管电泳对比片段大小来判定菜心品种,而不是采用荧光信号判定。

[0150] 本案例是以ABI 3730荧光毛细管检测平台为参考,如使用其他平台则根据设备操作要求做相应调整。

[0151] 根据SSR分子标记扩增片段大小的不同,可以根据不同仪器选用多个引物组合进行电泳。

[0152] S1:按照预先确定的组合引物,分别取等体积同一组合引物的不同荧光标记的扩增产物,TAMRA稀释50倍,其它荧光产物稀释100倍后充分混匀。从混合液中吸取1 μ L,加入到DNA分析仪专用上样板孔中。各孔再分别加入0.1 μ L分子量内标和8.9 μ L去离子甲酰胺,在PCR仪上95 $^{\circ}$ C变性1min,取出立即置冰上,冷却5min。瞬时离心10s后置放到DNA分析仪上。

[0153] S2:打开ABI 3730 DNA分析仪,检查仪器工作状态和试剂状态。将装有样品的上样板放置于样品架基座上,将装有电极缓冲液的buffer板放置于buffer板架基座上,打开数据收集软件,按照DNA分析仪的使用手册进行操作。DNA分析仪将自动运行参数,并保存电泳原始数据。检测荧光引物所用激发波长及颜色参照仪器默认值。

[0154] S3:导出电泳原始数据文件,采用数据分析软件按照下列步骤进行数据甄别:在数据分析软件中预先设置好SSR引物名称及荧光类别、分子量内标、相应引物的扩增片段大

小;将电泳原始数据文件导入分析软件,选择panel、分子量内标、Bin、质量控制参数等进行分析;分析软件会对检测质量赋以颜色标志进行评分,绿色表示质量可靠无需干预,红色表示质量不过关或未落入规定片段大小范围内,黄色表示有疑问需要查验原始图像进行确认。

[0155] S4:分别通过同时进行试验的标准样品、参照样品(依据引物选择少量的对照),校准不同电泳板间的数据偏差后再读取扩增片段大小。甄别后的特异峰如果落入规定的片段大小范围内,则直接读取扩增片段大小;若其峰大多不在规定范围内,可将其整体平移尽量使峰落设置范围内后读取数据。

[0156] S5:将待测菜心品种的20个SSR扩增产物的片段大小分别与179个供试菜心品种的20个SSR位点进行对比,统计待测菜心品种和20个标准菜心品种的差异位点数,然后进行如下判断:

[0157] 如果待测菜心品种与某标准菜心品种的差异位点数为2个以上,则待测菜心品种和该标准菜心品种判定为不同的菜心品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远。

[0158] 如果待测菜心品种与某标准菜心品种的差异位点数为0-2个,则待测菜心品种和该标准菜心品种判定为相似的品种。

[0159] 实施例5

[0160] 本实施例是检测两个未知的菜心品种是否为同一种,本实施例的待测菜心品种为两个未知的菜心品种。

[0161] 1、待测菜心品种的基因组DNA的获得

[0162] 分别取两个待测菜心品种的叶片,采用CTAB法分别提取这两个待测菜心品种的基因组DNA,该CTAB法的操作见实施例2,得到待测菜心品种的基因组DNA。

[0163] 2、SSR引物及PCR反应体系的配置

[0164] 按照实施例2中的步骤2的方法,将“供试菜心品种的基因组DNA”替换为“待测菜心品种的基因组DNA”,其它步骤均不变,得到待测菜心品种的PCR产物。

[0165] 3、荧光毛细管电泳检测和数据记录

[0166] 步骤2的PCR反应完成后,对PCR产物根据不同引物的主要等未变异扩增长度的不同,结合检测设备进行分组电泳,检测其PCR产物的片段大小并进行数据记录,其记录方法为:某样品在某个位点仅出现1个等位变异,大小为150bp,则在该位点的主要等位变异的基因型写作150/150;某样品在某个位点有两个等位变异,大小分别为141bp、150bp,则在该位点的主要等位变异的基因型写作141/150。

[0167] 4、在步骤3中分别获得两个未知菜心品种(待测菜心品种)的20个SSR位点数据,分别对比两个未知菜心品种在相同上述20个SSR位点中每个SSR位点上的数据,记录有差异位点的个数。

[0168] 如果两个未知菜心品种在上述20个SSR位点的差异位点数为2个以上,则两个未知菜心品种判定为不同的菜心品种;差异位点数越多,遗传亲缘关系越远;

[0169] 如果两个未知菜心品种在上述20个SSR位点的差异位点数为0-2个,则两个未知菜心品种判定为相似的菜心品种。

[0170] 最后所应说明的是,以上具体实施方式仅用以说明本发明的技术方案而非限制,尽管参照较佳实施例对本发明进行了详细说明,本领域的普通技术人员应当理解,可以对

本发明的技术方案进行修改或者等同替换,而不脱离本发明技术方案的精神和范围,其均应涵盖在本发明的权利要求范围当中。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 北京市农林科学院
- [0003] <120> 一种鉴定菜心品种真实性的方法及其专用SSR引物组合
- [0004] <141> 2020-02-24
- [0005] <160> 40
- [0006] <170> SIPOSequenceListing 1.0
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 26
- [0009] <212> DNA
- [0010] <213> Artificial Sequence
- [0011] <400> 1
- [0012] tccattgaag actgaccaa agattg 26
- [0013] <210> 2
- [0014] <211> 18
- [0015] <212> DNA
- [0016] <213> Artificial Sequence
- [0017] <400> 2
- [0018] catgagcggg ggtggtgg 18
- [0019] <210> 3
- [0020] <211> 28
- [0021] <212> DNA
- [0022] <213> Artificial Sequence
- [0023] <400> 3
- [0024] gtagattcag agtagagatt ttggaagt 28
- [0025] <210> 4
- [0026] <211> 22
- [0027] <212> DNA
- [0028] <213> Artificial Sequence
- [0029] <400> 4
- [0030] ggcgtttcac tctccttctc tc 22
- [0031] <210> 5
- [0032] <211> 24
- [0033] <212> DNA
- [0034] <213> Artificial Sequence
- [0035] <400> 5
- [0036] gattttactc tcacatgtgc catg 24
- [0037] <210> 6
- [0038] <211> 21

- [0039] <212> DNA
[0040] <213> Artificial Sequence
[0041] <400> 6
[0042] ttccttgcat catcctaccc t 21
[0043] <210> 7
[0044] <211> 23
[0045] <212> DNA
[0046] <213> Artificial Sequence
[0047] <400> 7
[0048] cattcctcgt tgcaatcaaa aca 23
[0049] <210> 8
[0050] <211> 25
[0051] <212> DNA
[0052] <213> Artificial Sequence
[0053] <400> 8
[0054] gcttatggtt ttgccgtaca tttct 25
[0055] <210> 9
[0056] <211> 25
[0057] <212> DNA
[0058] <213> Artificial Sequence
[0059] <400> 9
[0060] gaatttggag ctctctctag gtgat 25
[0061] <210> 10
[0062] <211> 25
[0063] <212> DNA
[0064] <213> Artificial Sequence
[0065] <400> 10
[0066] tctgtaatac acaacaccaa atggt 25
[0067] <210> 11
[0068] <211> 18
[0069] <212> DNA
[0070] <213> Artificial Sequence
[0071] <400> 11
[0072] gtaacggccg tcggtgac 18
[0073] <210> 12
[0074] <211> 25
[0075] <212> DNA
[0076] <213> Artificial Sequence
[0077] <400> 12

[0078] taacataaca cgatcgcttt aaggc 25
[0079] <210> 13
[0080] <211> 23
[0081] <212> DNA
[0082] <213> Artificial Sequence
[0083] <400> 13
[0084] aatggagtga tcgagaatgg agg 23
[0085] <210> 14
[0086] <211> 25
[0087] <212> DNA
[0088] <213> Artificial Sequence
[0089] <400> 14
[0090] gctgtctaataa ttgggcatac tagaa 25
[0091] <210> 15
[0092] <211> 25
[0093] <212> DNA
[0094] <213> Artificial Sequence
[0095] <400> 15
[0096] tcgtttccaa atgcgacatt ctaac 25
[0097] <210> 16
[0098] <211> 25
[0099] <212> DNA
[0100] <213> Artificial Sequence
[0101] <400> 16
[0102] gttcttgttt gctgtggaag ttttt 25
[0103] <210> 17
[0104] <211> 25
[0105] <212> DNA
[0106] <213> Artificial Sequence
[0107] <400> 17
[0108] agagagagag tcagagacag ctatt 25
[0109] <210> 18
[0110] <211> 25
[0111] <212> DNA
[0112] <213> Artificial Sequence
[0113] <400> 18
[0114] aatgcactat cttgcttctt ttctc 25
[0115] <210> 19
[0116] <211> 27

- [0117] <212> DNA
[0118] <213> Artificial Sequence
[0119] <400> 19
[0120] tctaaggtag agatagtagt agctgct 27
[0121] <210> 20
[0122] <211> 25
[0123] <212> DNA
[0124] <213> Artificial Sequence
[0125] <400> 20
[0126] caaataggac atgtctttga agcca 25
[0127] <210> 21
[0128] <211> 25
[0129] <212> DNA
[0130] <213> Artificial Sequence
[0131] <400> 21
[0132] ccgtttgaa ctgttattgc aaatg 25
[0133] <210> 22
[0134] <211> 25
[0135] <212> DNA
[0136] <213> Artificial Sequence
[0137] <400> 22
[0138] tagaagcaac cgtgttacat gttgt 25
[0139] <210> 23
[0140] <211> 23
[0141] <212> DNA
[0142] <213> Artificial Sequence
[0143] <400> 23
[0144] aaaccgtgaa tcttaattgg ccg 23
[0145] <210> 24
[0146] <211> 25
[0147] <212> DNA
[0148] <213> Artificial Sequence
[0149] <400> 24
[0150] ttgattctct agttcagcta ctgg 25
[0151] <210> 25
[0152] <211> 22
[0153] <212> DNA
[0154] <213> Artificial Sequence
[0155] <400> 25

[0156] aacaatggcg tttgtccgaa at 22
[0157] <210> 26
[0158] <211> 25
[0159] <212> DNA
[0160] <213> Artificial Sequence
[0161] <400> 26
[0162] tctgaaaagc tctttgaatg caact 25
[0163] <210> 27
[0164] <211> 25
[0165] <212> DNA
[0166] <213> Artificial Sequence
[0167] <400> 27
[0168] aaagaagctt cgttcaaact ttcga 25
[0169] <210> 28
[0170] <211> 25
[0171] <212> DNA
[0172] <213> Artificial Sequence
[0173] <400> 28
[0174] agtttgaagt tcatcctaca aagcc 25
[0175] <210> 29
[0176] <211> 25
[0177] <212> DNA
[0178] <213> Artificial Sequence
[0179] <400> 29
[0180] aactacattg gcatagttgt tcaga 25
[0181] <210> 30
[0182] <211> 22
[0183] <212> DNA
[0184] <213> Artificial Sequence
[0185] <400> 30
[0186] gctggactt acagtggcaa ac 22
[0187] <210> 31
[0188] <211> 25
[0189] <212> DNA
[0190] <213> Artificial Sequence
[0191] <400> 31
[0192] gacttgtaag agagatgacc tgtgt 25
[0193] <210> 32
[0194] <211> 25

- [0195] <212> DNA
[0196] <213> Artificial Sequence
[0197] <400> 32
[0198] tcacattcct cttacctgta ctctc 25
[0199] <210> 33
[0200] <211> 25
[0201] <212> DNA
[0202] <213> Artificial Sequence
[0203] <400> 33
[0204] tggcgactct actaatgatg ttctt 25
[0205] <210> 34
[0206] <211> 24
[0207] <212> DNA
[0208] <213> Artificial Sequence
[0209] <400> 34
[0210] gacatgatcc atcttcatcc cacc 24
[0211] <210> 35
[0212] <211> 25
[0213] <212> DNA
[0214] <213> Artificial Sequence
[0215] <400> 35
[0216] aagcagagac attaagttct gaggt 25
[0217] <210> 36
[0218] <211> 25
[0219] <212> DNA
[0220] <213> Artificial Sequence
[0221] <400> 36
[0222] ttttggcttt gttttgtctc tgtcg 25
[0223] <210> 37
[0224] <211> 25
[0225] <212> DNA
[0226] <213> Artificial Sequence
[0227] <400> 37
[0228] ggattcagtt acagaggcaa aacaa 25
[0229] <210> 38
[0230] <211> 25
[0231] <212> DNA
[0232] <213> Artificial Sequence
[0233] <400> 38

-
- [0234] cacgtgtctc agacgataaa agaag 25
[0235] <210> 39
[0236] <211> 25
[0237] <212> DNA
[0238] <213> Artificial Sequence
[0239] <400> 39
[0240] caaatcggct ccatagtgca taatt 25
[0241] <210> 40
[0242] <211> 25
[0243] <212> DNA
[0244] <213> Artificial Sequence
[0245] <400> 40
[0246] cccttgattt gcaatgttga gtact 25



图1

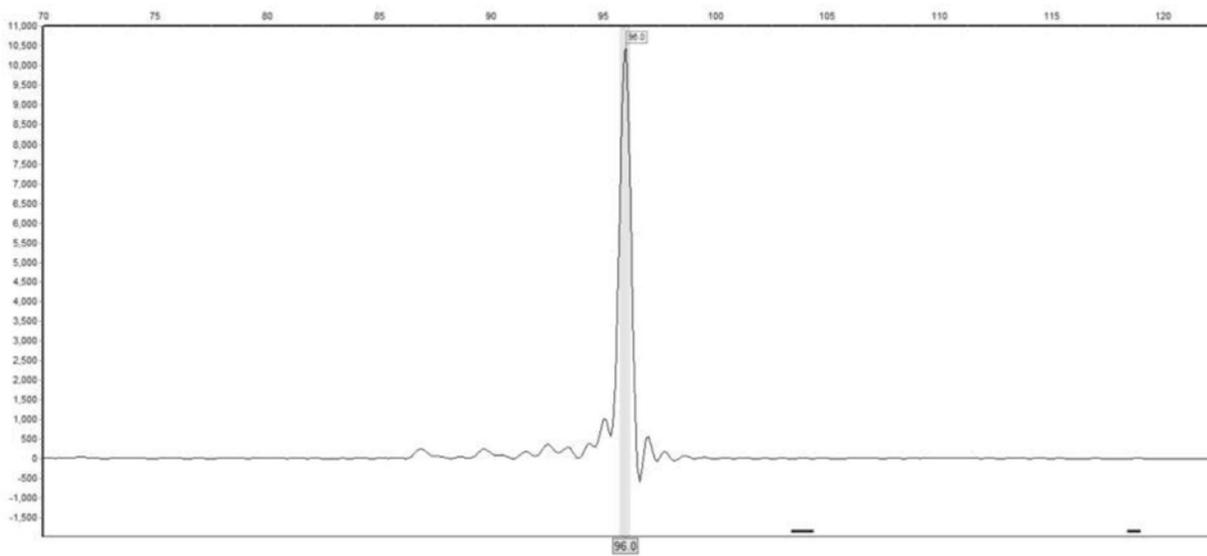


图2

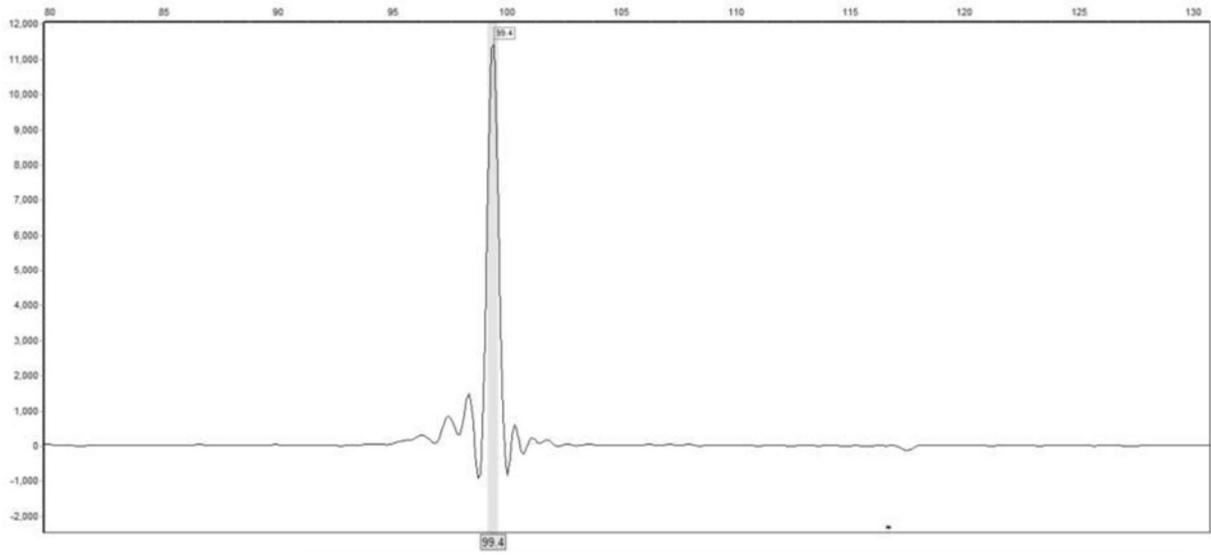


图3

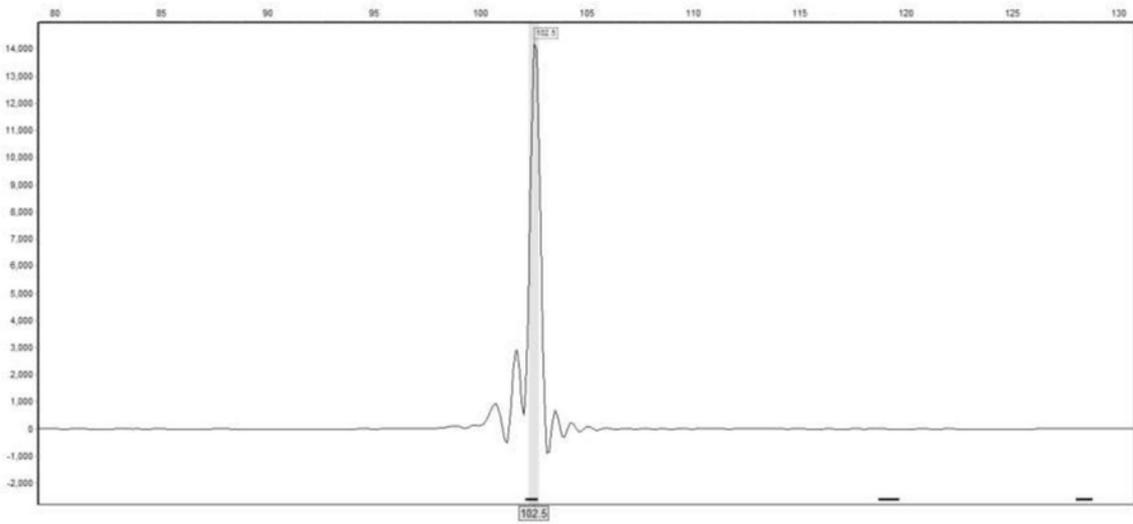


图4

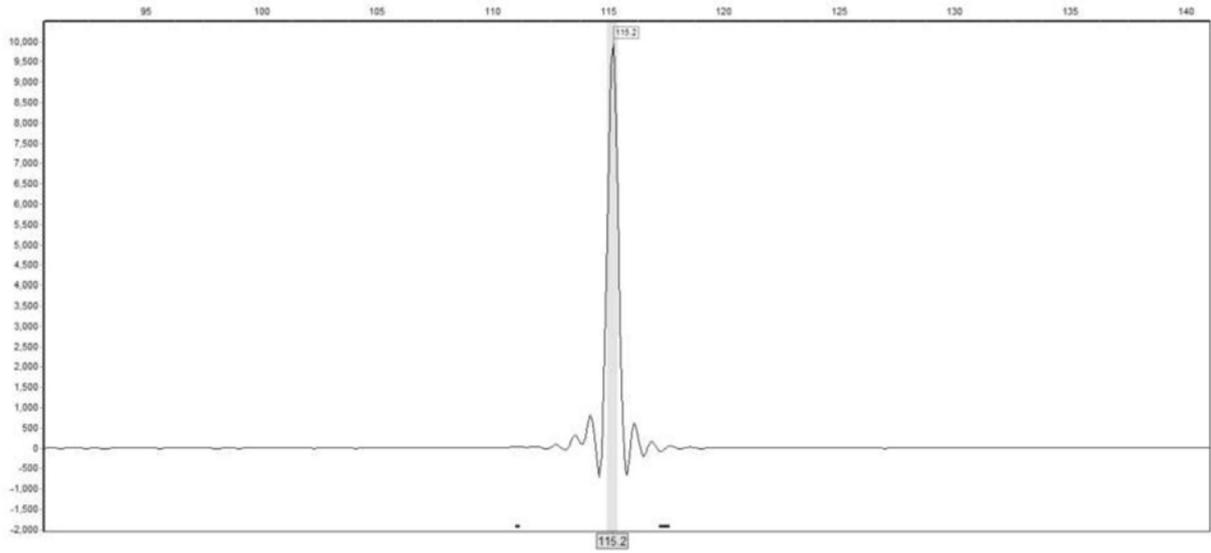


图5

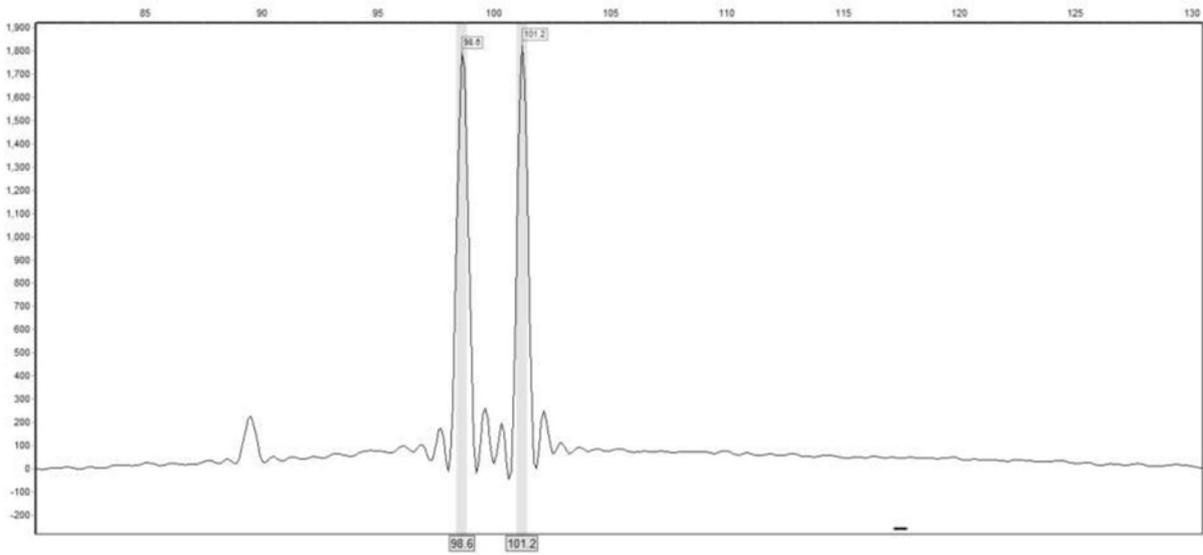


图6

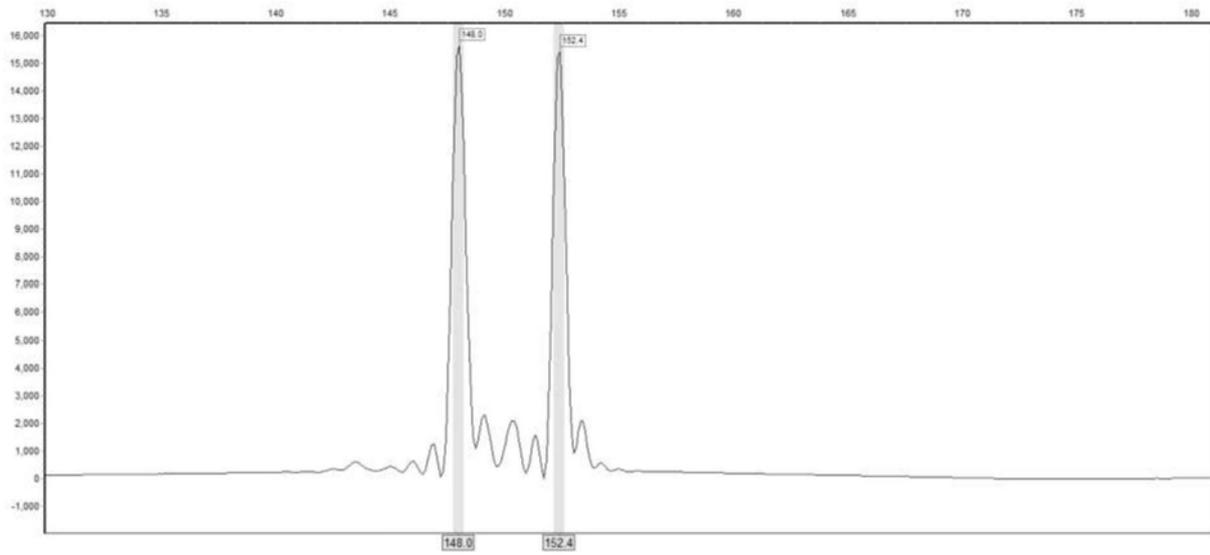


图7

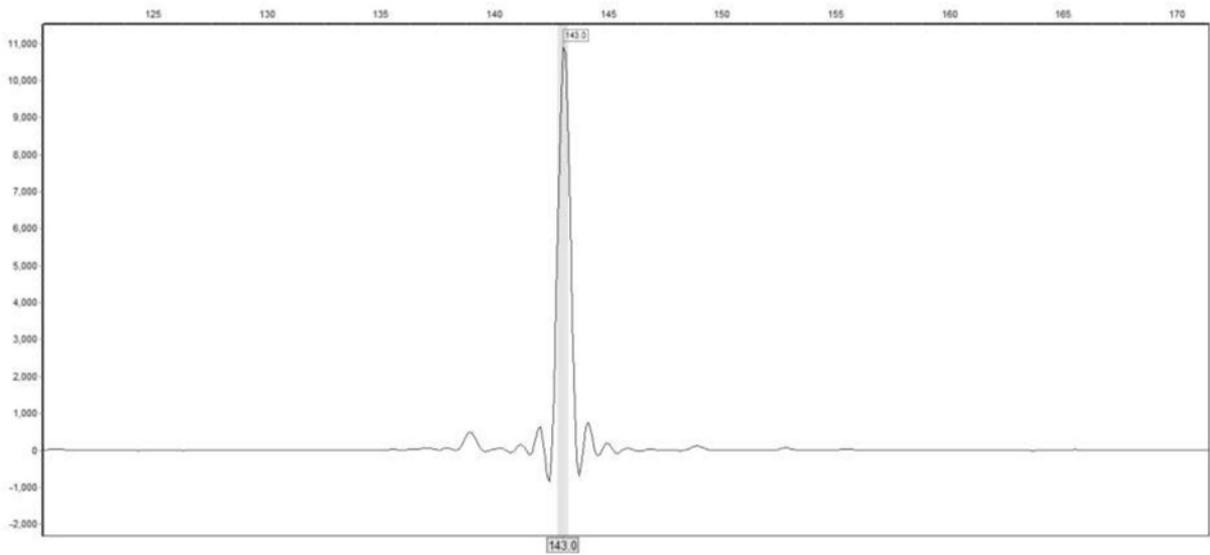


图8

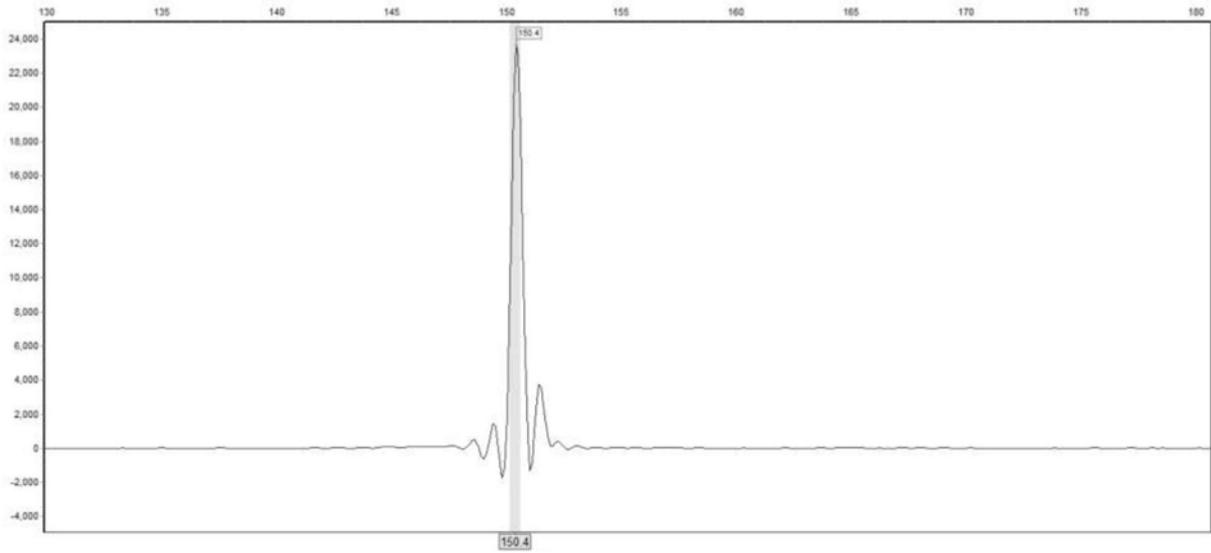


图9

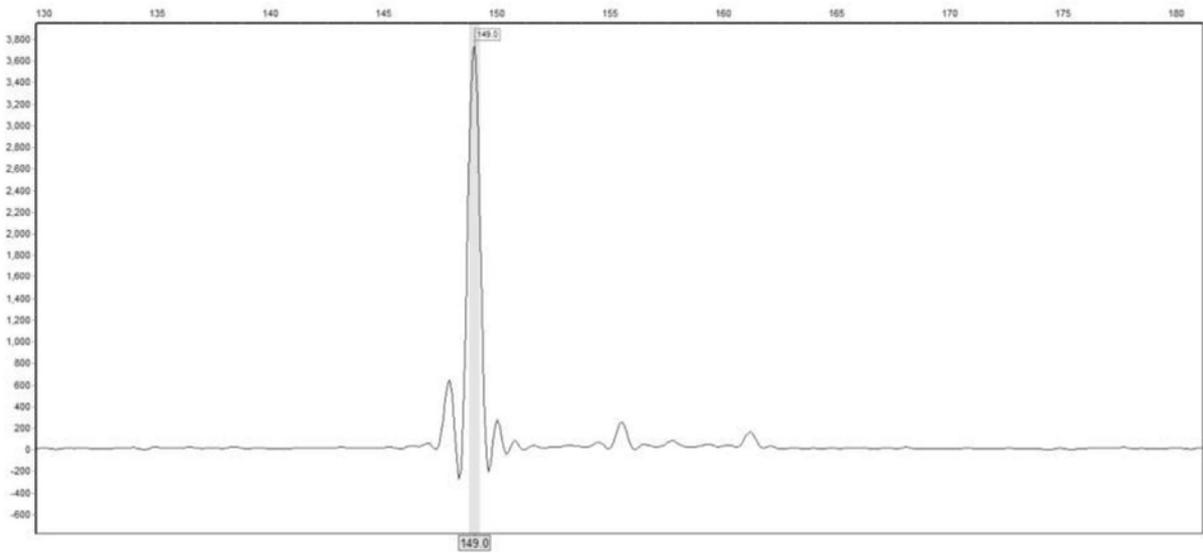


图10

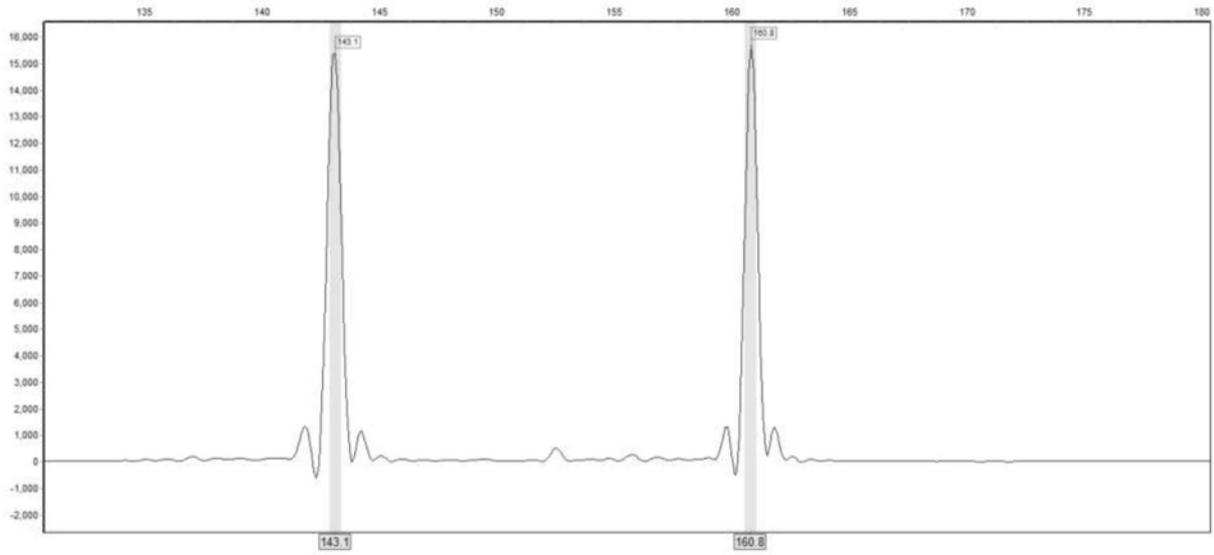


图11

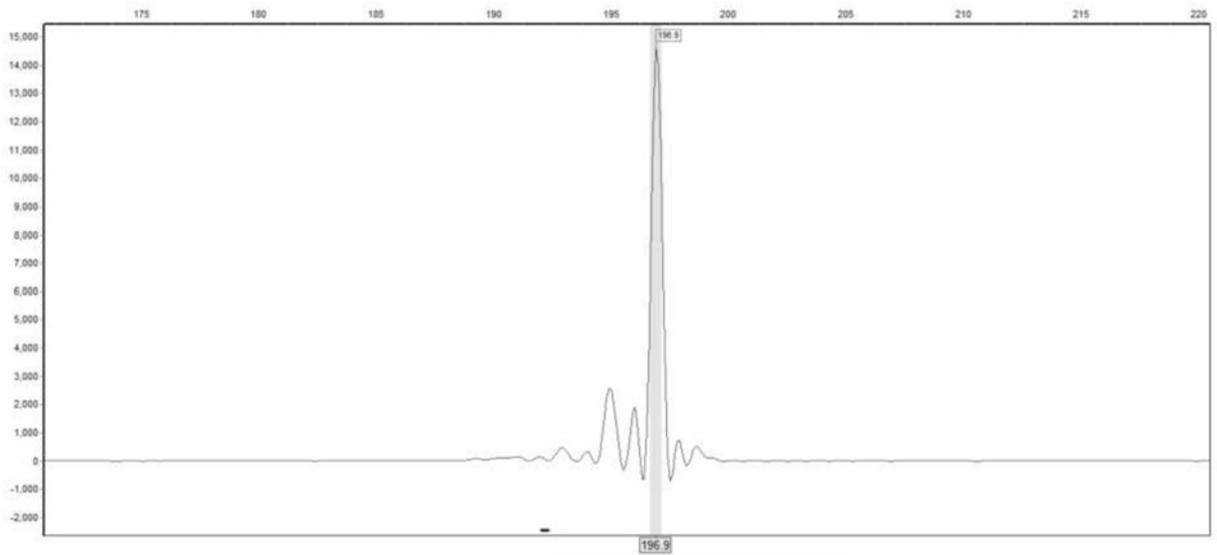


图12

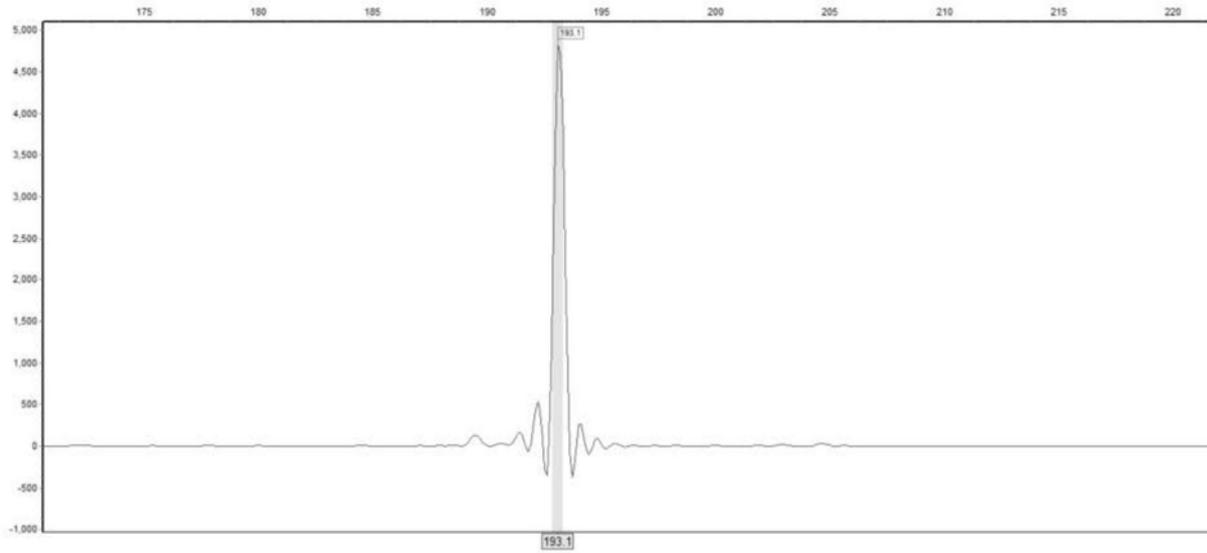


图13

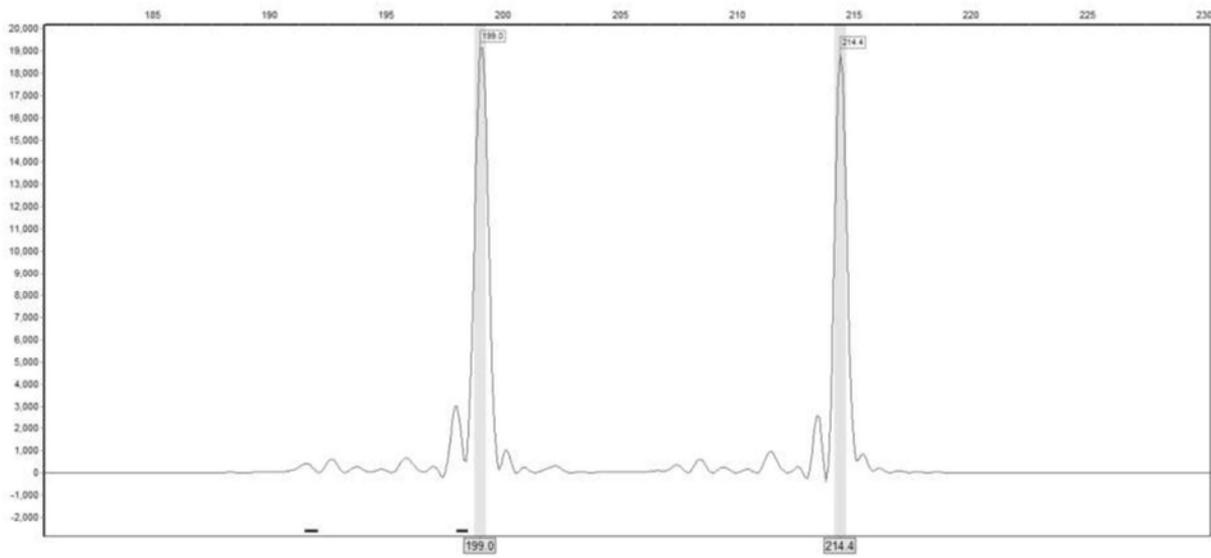


图14

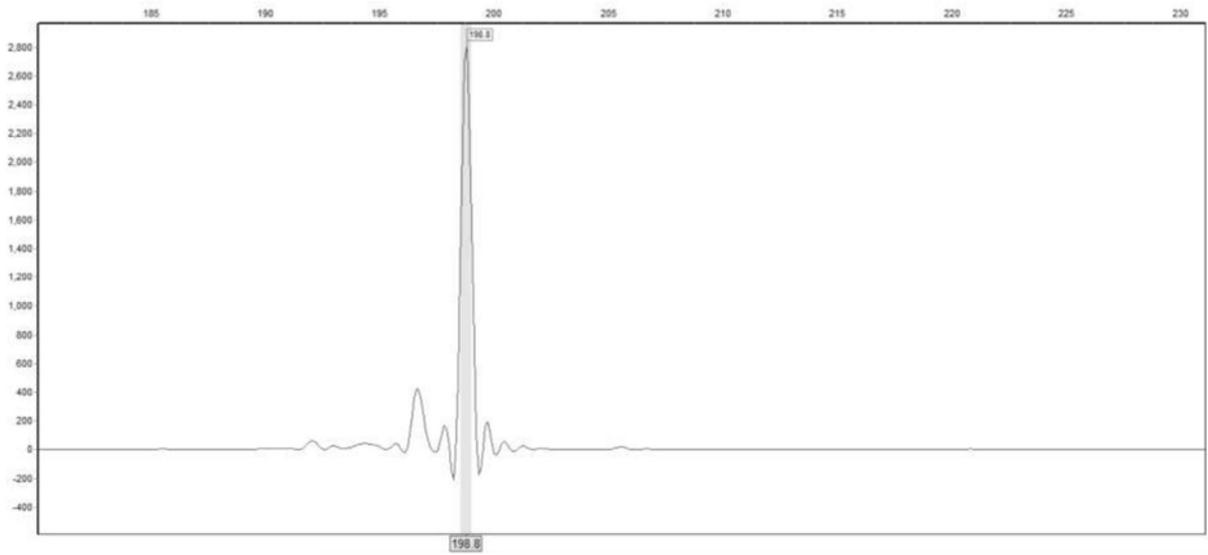


图15

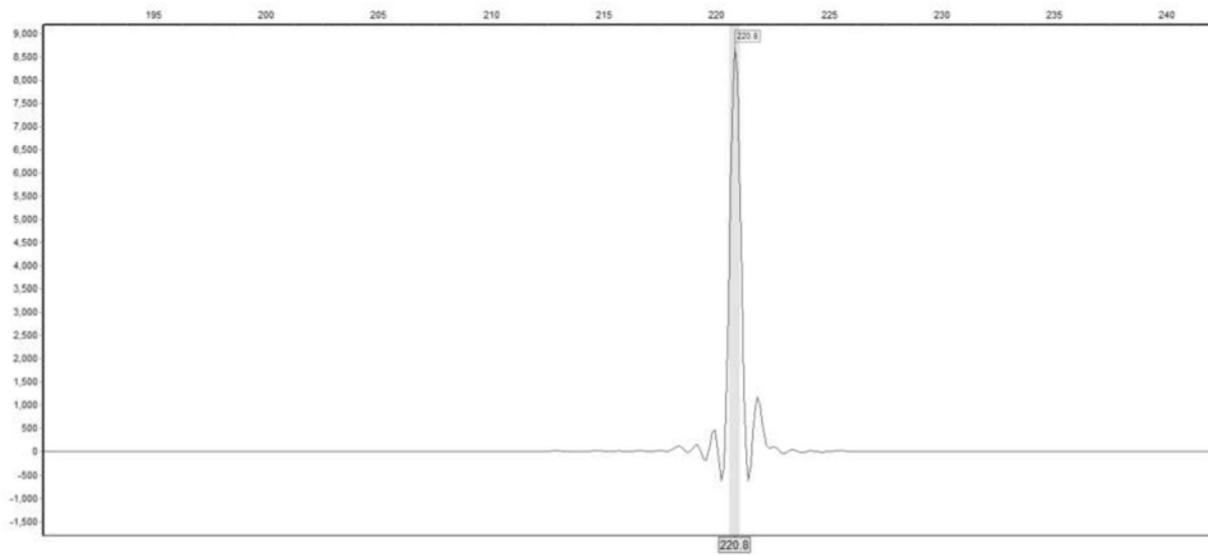


图16

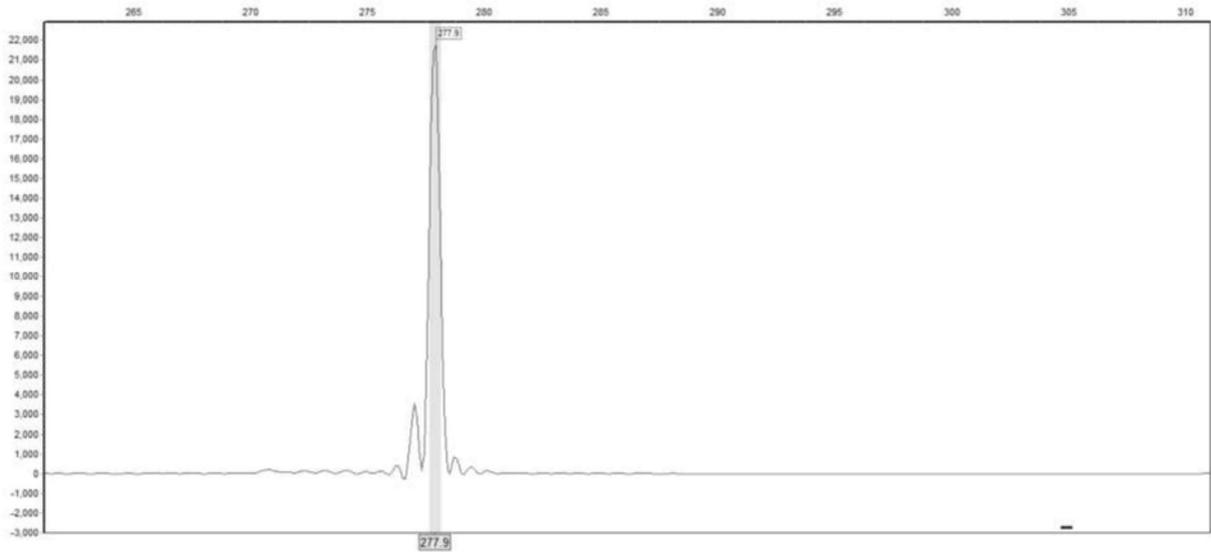


图17

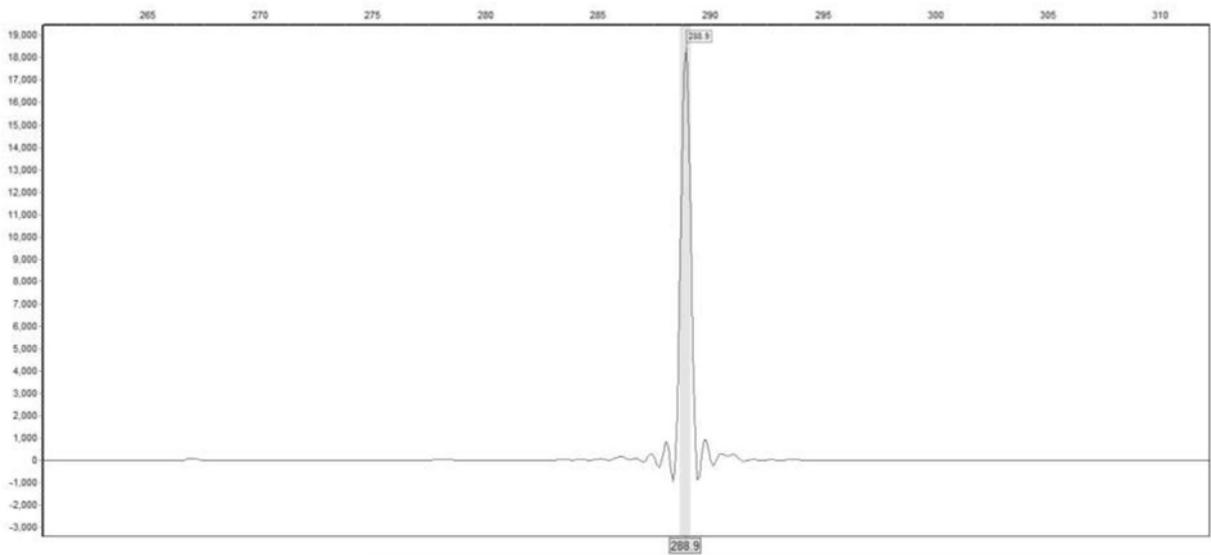


图18

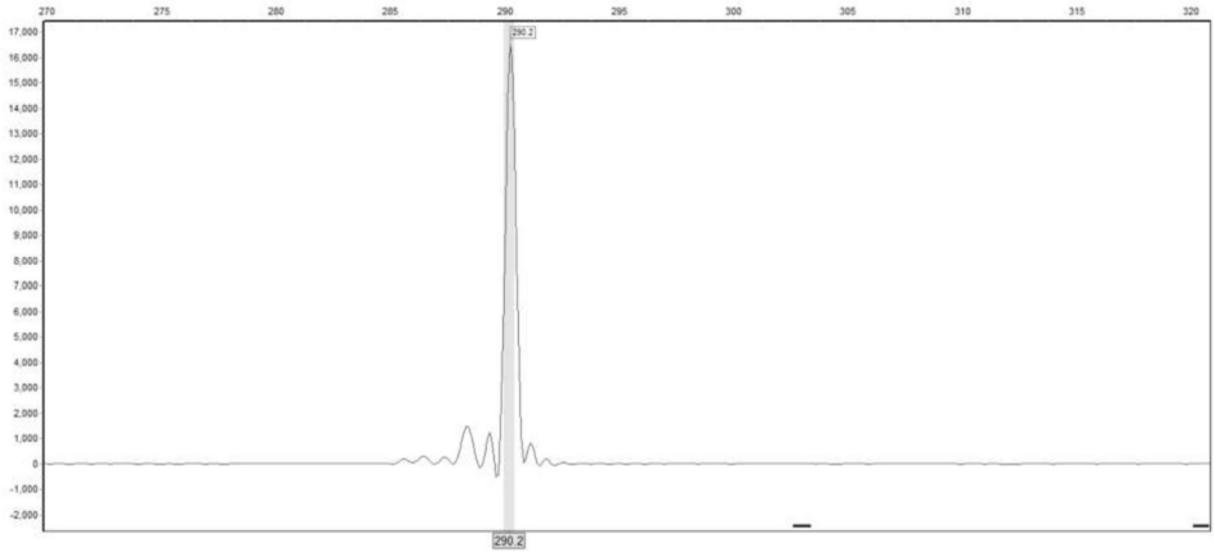


图19

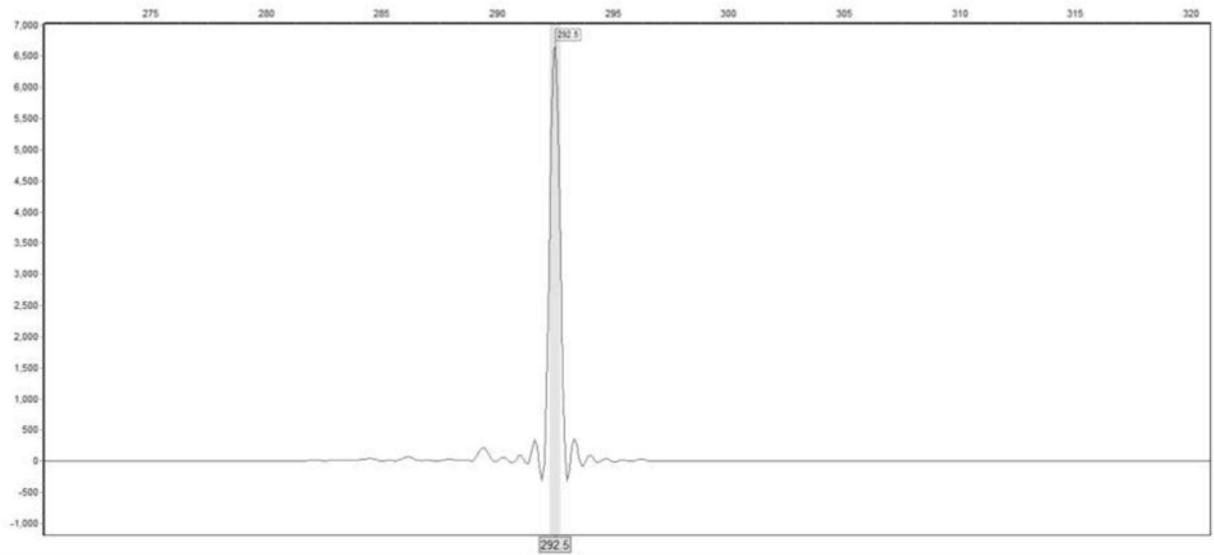


图20

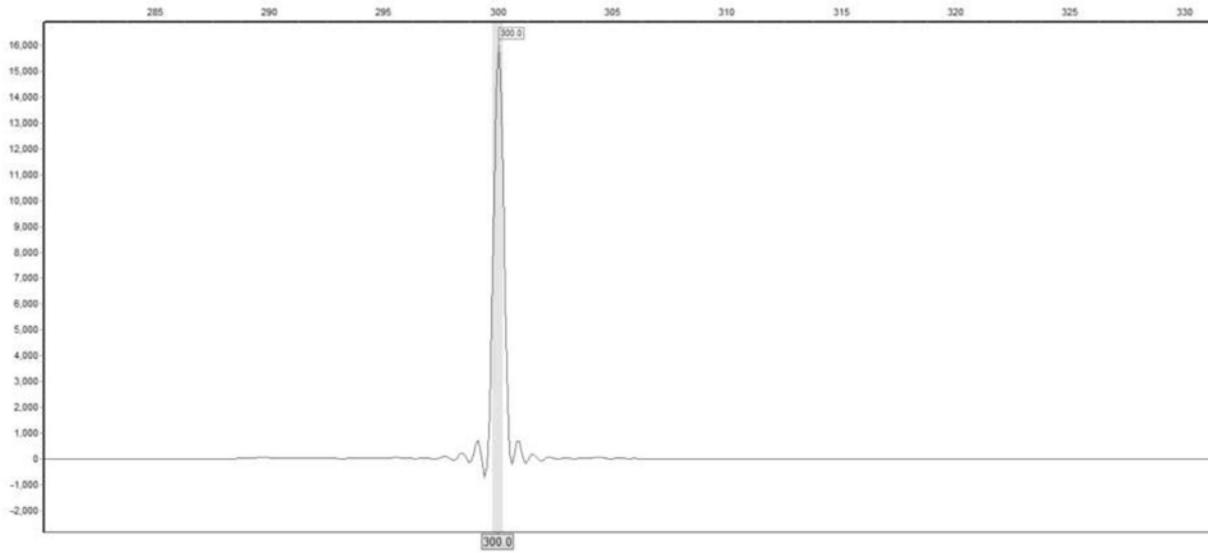


图21

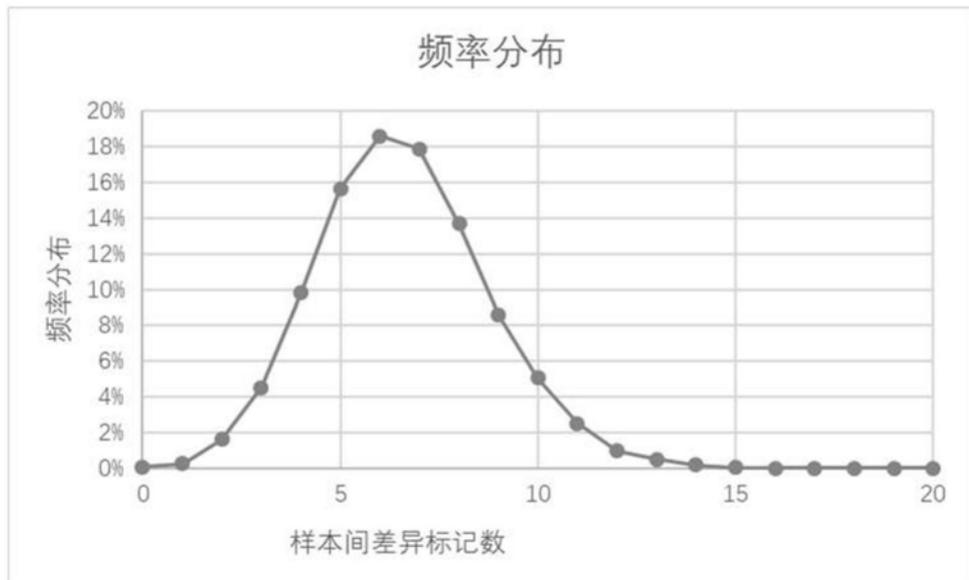


图22