

网络出版时间:2012-04-16 15:34

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20120416.1534.006.html>

甘蓝一代杂种纯度 SSR 鉴定与 田间鉴定的一致性研究

高海娜¹, 张恩慧¹, 李殿荣², 王 灏², 马英夏¹, 许忠民¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 陕西省杂交油菜研究中心, 陕西 大荔 715105)

[摘 要] **【目的】**分析甘蓝杂交种纯度的 SSR 分子标记鉴定结果与田间形态学鉴定结果的一致性, 寻找一种快速、准确鉴定甘蓝杂交种纯度的方法。**【方法】**选用 SSR 分子标记, 筛选杂交种具有父母本互补带型的引物, 用其鉴定“秦甘 50”杂交种的纯度, 并与田间常规鉴定结果的一致性进行比较。**【结果】**300 对 SSR 分子标记引物中, 有 1 对引物 SQ1019 对“秦甘 50”杂交种表现为父母本互补带型; 利用引物 SQ1019 标记鉴定“秦甘 50”大田杂交种的纯度为 96.3%; “秦甘 50”大田杂交种经田间鉴定纯度为 96.0%, 2 种鉴定结果的一致性高达 99.7%。**【结论】**SQ1019 是 SSR 分子标记“秦甘 50”杂交种的特异引物, SSR 分子标记是一种快速、准确鉴定“秦甘 50”杂交种纯度的方法, 其结果与田间常规鉴定结果相一致。

[关键词] 甘蓝; SSR 分子标记; 种子纯度

[中图分类号] S635.036

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2012)05-0117-06

Research on SSR molecular marker identification technique of hybrids purity in cabbage

GAO Hai-na¹, ZHANG En-hui¹, LI Dian-rong², WANG Hao²,
MA Ying-xia¹, XU Zhong-min¹

(1 College of Horticulture, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Hybrid Rapeseed Research Center of Shaanxi Province, Dali, Shaanxi 715105, China)

Abstract: **【Objective】**The research analyzed consistency of SSR molecular marker technique with field morphological observation of hybrids purity in cabbage to seek a quick and accurate identification of seed purity. **【Method】**We screened out stable codominance banding pattern SSR primers by using SSR molecular marker technique, identified the purity of Qin'gan 50 hybrids and compared with the result of morphological observation in field. **【Result】**There were 1 pair of primers SQ1019 which presented stable codominance banding pattern among 300 pairs of screened SSR primers; The purity of Qin'gan 50 was 96.3% by SSR molecular marker using SQ1019; Field identification with its corresponding plant of SSR was 96.0%. The results indicated that they were the same for hybrid identification between SSR approach and morphological assessment, with the consistency rate of them reaching 99.7%. **【Conclusion】**SQ1019 is the specific primer to identify seed purity of Qin'gan 50, the identification between SSR approach and morphological assessment is the same, SSR molecular marker technique is a quick and accurate method to identify seed purity.

* [收稿日期] 2011-11-11

[基金项目] 国家大宗蔬菜产业技术体系项目(CARS-25-G-47); 国家农业科技成果转化资金项目(2010GB2G000462); 西北农林科技大学重点推广项目(XTG-2009-17, XTG-2010-18)

[作者简介] 高海娜(1988—), 女, 河南扶沟人, 在读硕士, 主要从事甘蓝生物技术研究。E-mail: danbai76@163.com

[通信作者] 张恩慧(1960—), 男, 陕西扶风人, 教授, 硕士生导师, 主要从事甘蓝育种与生物技术研究。

E-mail: ganlan606@126.com

Key words: cabbage; SSR molecular marker; seed purity

甘蓝(*Brassica oleracea* var. *capitata*)是世界各国的主要蔬菜作物,它富含营养物质,适应性强,品种类型多样,1年中可多季多茬栽培,对鲜菜周年均衡供应起着重要作用。甘蓝原产于欧洲地中海地区,自1690年传入我国以来,经过300多年的栽培,目前我国每年的种植面积已超过93.7万 hm^2 ^[1],栽培品种全部选用了杂种一代。甘蓝属于十字花科异花授粉作物,其杂种一代种子的生产主要采用自交不亲和系或雄性不育系与自交不亲和系大田虫媒杂交繁殖^[2]。制种时若亲本采用自交不亲和系,如果遇到父母本配比失调、花期不相遇、授粉昆虫缺少等情况,都有可能导致杂种一代种子纯度出现问题,会直接影响杂交种的品质或带来不必要的种子纠纷。因此,杂交种的纯度检验显得尤为重要。甘蓝种子常规田间形态学纯度检验需要完成一个营养生长期,我国北方地区甘蓝种子成熟收获期在6月中旬左右,常规得出种子纯度检验结果至少在10月下旬,这样会使当年收获的种子只能推迟1年使用。因而,寻找一种快速、准确且与常规结果相一致的甘蓝杂交种纯度检验方法就成为人们研究的目标。目前,分子标记技术已越来越多地被应用到种子纯度鉴定中,在常用的几种分子标记技术中,SSR标记一般表现为共显性,其具有遗传方式简单、多态性高、DNA所需量小、操作简便、稳定可靠等特点,特别适用于杂交种纯度的鉴定^[3]。目前,SSR标记已被用于水稻^[4-5]、玉米^[6-7]、棉花^[8]、油菜^[9-10]等作物杂交种的纯度鉴定,而在甘蓝杂交种纯度鉴定中的应用报道甚少。为此,本研究以甘蓝品种“秦甘50”为试验材料,对其杂交种纯度的SSR鉴定结果与田间常规鉴定结果的一致性进行比较,以期找到一种快速、准确鉴定甘蓝杂交种纯度的方法。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为甘蓝品种“秦甘50”,由西北农林科技大学园艺学院甘蓝育种研究室提供。“秦甘50”为甘蓝早熟杂种一代(F_1),供试种子由大田制种和少量人工杂交获得;其父本、母本均为自交不亲和系,供试种子由蕾期自交获得。

1.2 方法

1.2.1 样本种子的获得和育苗 选取“秦甘50”的父本B6、母本Y8和人工授粉杂交种(F_1)各20粒,

同时随机抽取“秦甘50”大田繁殖的杂交种300粒,于2010-07-25将种子分区播种于露地遮阴育苗床中,常规管理,培育壮苗,08-26定植于大田栽培。

1.2.2 双亲和杂交种DNA的提取 (1)双亲。采用SDS法提取DNA。当“秦甘50”的父本B6和母本Y8幼苗长有3~4片真叶时,摘取各自真叶叶片。取1g混合叶片,加50 μL 氯仿,迅速匀浆后,加3倍体积的提取液(100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 500 mmol/L NaCl, 10 mmol/L β -巯基乙醇,体积分数20% SDS, pH 8.0),混匀,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴30 min,其间颠倒2次。加入1/4体积5 mol/L KAc颠倒混匀后,置冰浴反应15~30 min, 12 000 r/min离心10 min。取上清液,加2~3倍体积-20 $^{\circ}\text{C}$ 无水乙醇,-20 $^{\circ}\text{C}$ 静置30 min以上, 10 000 r/min下离心5~10 min,将获得的DNA用体积分数70%乙醇洗1次,最后用100 μL 超纯水溶解,保存于冰箱(4 $^{\circ}\text{C}$)中。

(2)杂交种单株。其DNA提取也采取SDS法。当“秦甘50”的大田杂交种和人工杂交种(F_1)幼苗长有3~4片真叶时,单株挂牌标记,摘取真叶叶片,按上述方法提取DNA,溶解保存。

1.2.3 “秦甘50”人工杂交种及其父母本的SSR分析 (1)SSR扩增。20 μL PCR反应体系中含有buffer 2.0 μL , Mg^{2+} 1.5 μL , dNTP 0.4 μL , SSR引物2 μL , Taq DNA聚合酶0.1 μL ,模板DNA 1 μL ,用13.0 μL 超纯水补足。SSR反应程序为:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性4 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 50 s, 38 $^{\circ}\text{C}$ 90 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 60 s, 30个循环;最后72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸10 min。

(2)电泳检测。在SSR扩增产物中加1/2体积的变性上样缓冲液,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min后立即冷却,然后在6%的变性聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)上以70 W恒功率电泳2 h左右。电泳完成后,变性凝胶用体积分数10%冰醋酸溶液固定,然后用1 g/L的硝酸银溶液染色,30 g/L的NaOH溶液显色,再用体积分数30%冰醋酸溶液终止显影,经漂洗、风干后,记录各样本的标记基因型。

(3)SSR引物的筛选。试验所用的300对SSR引物,由上海生工生物工程技术有限公司合成。以“秦甘50”人工杂交种(F_1)及其父本B6、母本Y8各自的混合样DNA为模板,用300对SSR引物进行PCR扩增筛选。在杂交种扩增带型中同时具有父母本互补带型的引物即为目标引物。

1.2.4 “秦甘 50” F_1 代杂种田田间纯度鉴定与 SSR 分子标记鉴定的一致性分析 当苗床幼苗长有 6~7 片真叶时,选取“秦甘 50”的人工杂交种(F_1)及其父本 B6、母本 Y8 各 20 株,将用 SSR 标记的“秦甘 50”大田杂交种的每株幼苗定植于田间,采用平畦栽培,行距 40 cm,株距 35 cm。田间管理采用常规栽培管理措施。在甘蓝生长进入莲座期和结球期时,依据“秦甘 50”人工杂交种(F_1)和父本 B6、母本 Y8 的特征特性,逐株记录鉴定“秦甘 50”大田杂交种,将其结果与 SSR 分子标记结果进行比较,分析 2 种鉴定方法的一致性。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

用 300 对引物对“秦甘 50”人工杂交种(F_1)及其父本 B6、母本 Y8 的 DNA 进行 PCR 扩增和电泳检测,结果表明,300 对 SSR 引物中有 48 对引物扩增不到明显条带,有 252 对引物扩增到明显条带。在聚丙烯酰胺凝胶上,各引物扩增的不同长度重复序列片段在 2~10 个,人工杂交种(F_1)与父本 B6、母本 Y8 间的带型关系表现为 4 种,即同有型、偏父型、偏母型和互补型。其中互补型是指人工杂交种(F_1)的带型为父本 B6、母本 Y8 带型的互补,表现出三者带型的完全不同,其是进行杂种纯度鉴别的理想类型。通过不同引物对“秦甘 50”人工杂交种(F_1)及其父本 B6、母本 Y8 扩增的 SSR 图谱结果的重复验证,显示三者间有多态性的引物占 23%,而条带明显的仅有引物 SQ1019(图 1)。

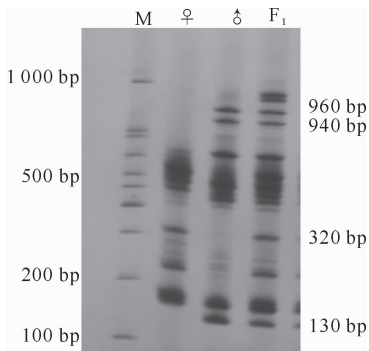


图 1 引物 SQ1019 对“秦甘 50”杂交种(F_1)及其父本 B6 和母本 Y8 的 SSR 扩增图谱
M. DNA Marker; ♀. 母本 Y8; ♂. 父本 B6;
F₁. “秦甘 50”人工杂交种

Fig. 1 SSR pattern of amplified primer SQ1019 in Qin’gan 50(F_1) and its parents

M. DNA Marker; ♀. Female parent Y8; ♂. Male parent B6;
F₁. Hybrid seeds by manual

由图 1 可以看出,经过引物 SQ1019 的扩增,父本 B6 和母本 Y8 在 130、320、940 和 960 bp 处各有 1 条多态性条带,人工杂交种(F_1)的带型恰好是两者的互补,同时具有 4 条带型。继续对引物 SQ1019 进行重复扩增检测,均能重复得到相同结果,且扩增条带稳定。

2.2 特异 SSR 引物标记在“秦甘 50”人工杂交种(F_1)和父母本中带型的一致性验证

用特异引物 SQ1019 对“秦甘 50”的父本 B6 和母本 Y8 的各自单株进行特异条带扩增,结果在每个单株中扩增出的带型均与筛选引物时扩增出的带型完全一致,表明从父本 B6 与母本 Y8 单株混合 DNA 中筛选出的差异条带在每个父本 B6 或母本 Y8 的单株间是稳定存在的,进一步表明“秦甘 50”的父本 B6、母本 Y8 都已高度纯合。利用引物 SQ1019 对“秦甘 50”人工杂交种(F_1)的单株 DNA 扩增后,引物 SQ1019 在“秦甘 50”(F_1)单株中同时表现出父母本的特征条带,且不同单株间表现一致。由此得出,可以用引物 SQ1019 来鉴定“秦甘 50”杂种纯度。

2.3 特异 SSR 引物对“秦甘 50”大田杂交种纯度的鉴定

选用从供试幼苗真叶中提取的 DNA 为模板,用引物 SQ1019 扩增,对“秦甘 50”大田杂交种 300 株单株及其父本 B6、母本 Y8 各自混合样进行 SSR 标记鉴定,图 2 为引物 SQ1019 对“秦甘 50”大田杂交种子的部分鉴定结果。由图 2 可知,8、19、32、35、52、64、67、68 号植株缺少父本特异条带,与母本扩增带型相同,均为母本自交株;61、181、203 号植株缺少母本特异条带,与父本扩增带型相同,为父本自交株。SSR 标记鉴定结果表明,“秦甘 50”大田杂交种的真实杂交株为 289 株,其杂交种纯度为 96.3%。

2.4 “秦甘 50”种子纯度田间鉴定与 SSR 标记鉴定的一致性

对田间种植“秦甘 50”大田杂交种每个标记单株,与“秦甘 50”人工杂交种(F_1)和父本 B6、母本 Y8 的性状进行比对鉴定,结果显示,同一单株在莲座期和结球期的性状与其比对植株性状表现一致。经比对 SSR 标记鉴定的 300 株“秦甘 50”大田杂交种与人工杂交种(F_1)性状,其中有 288 株与人工杂交种(F_1)表现一致,而 187 号单株表现出母本性状;8、19、32、35、52、64、67、68 母本带型单株田间栽培均与母本 Y8 性状表现一致;61、181、203 父本带型单株田间栽培后均与父本 B6 性状表现一致(表 1)。

“秦甘 50”大田杂交种田间鉴定出杂交种 288 株,其杂交种纯度为 96.0%,该结果与 SSR 标记鉴定的杂交种纯度(96.3%)基本相同,一致性高达 99.7%。

由此可见,利用 SSR 标记可以快速、准确地鉴定出甘蓝杂交种的纯度。

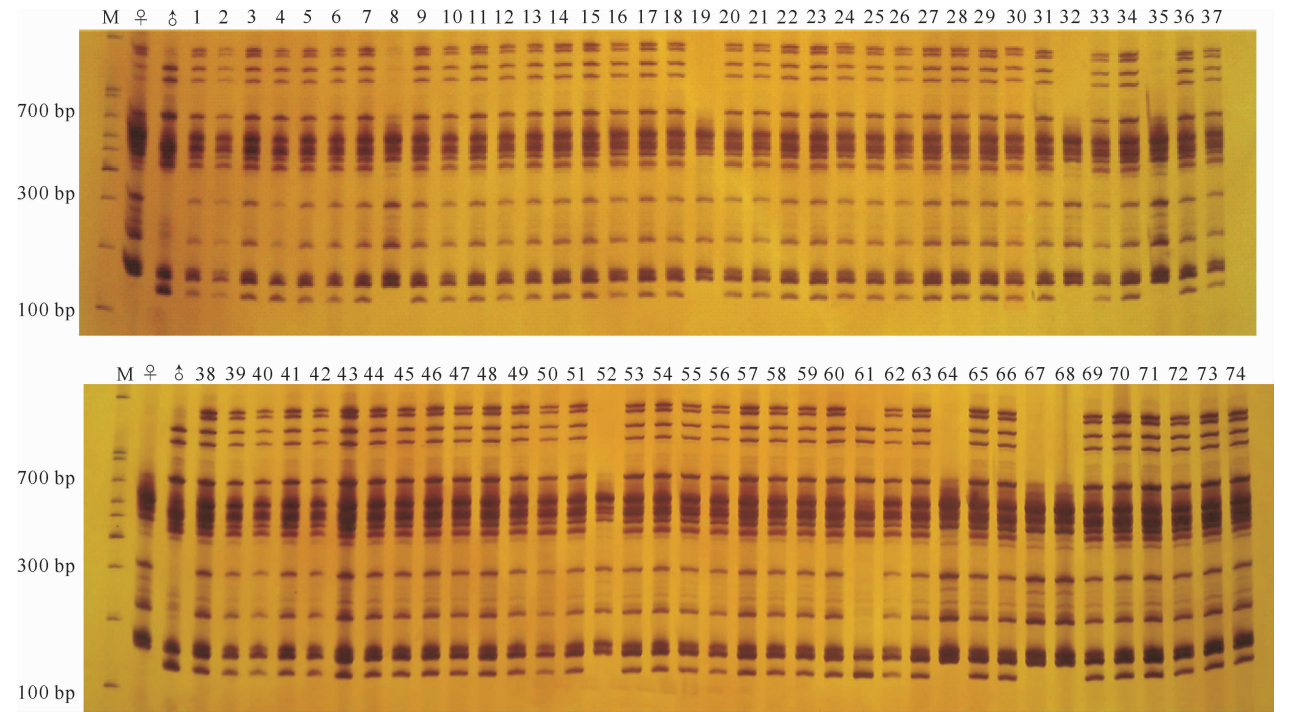


图 2 SSR 特异引物 SQ1019 对“秦甘 50”大田杂交种纯度的部分鉴定结果
M. DNA Marker; ♀. 母本 Y8; ♂. 父本 B6; 1~74. 大田杂交种

Fig. 2 Qingan 50 seed purity tested with SSR primer SQ1019
M. DNA Marker; ♀. Female parent Y8; ♂. Male parent B6; 1—74. Field hybrid seeds

表 1 “秦甘 50”大田杂交种 SSR 分子标记鉴定与田间鉴定单株的对应结果
Table 1 Consistency between SSR approach and morphological assessment in hybrid identification

SSR 标记鉴定异型单株标号 Coding No. of heterotypic plant in SSR approach	SSR 标记带型 Pattern in SSR marker	田间单株形态学鉴定表现 Morphological assessment in field		一致性 Consistency
		莲座期 Rosette stage	结球期 Heading stage	
8	+	+	+	✓
19	+	+	+	✓
32	+	+	+	✓
35	+	+	+	✓
52	+	+	+	✓
61	—	—	—	✓
64	+	+	+	✓
67	+	+	+	✓
68	+	+	+	✓
181	—	—	—	✓
187	o	+	+	×
203	—	—	—	✓

注: +. 性状表现为母本型; —. 性状表现为父本型; o. 性状表现为杂种型。✓ 表示 SSR 标记鉴定性状与田间鉴定性状一致; × 表示 SSR 标记鉴定性状与田间鉴定性状不一致。
Note: +. Female parent of Qingan 50; —. Male parent of Qingan 50; o. Hybrid seeds in field. ✓. Identification result of the field and SSR were same; ×. Identification result of the field and SSR were different.

3 讨 论

分子生物学技术在作物育种中已被广泛应用,

SSR 分子标记以其简单、快速和准确的独特优势被用于作物种子的纯度鉴定,SSR 分子标记在对种子纯度的鉴定中能够识别出父母本和其他混杂种的单

株,对杂交种中假杂种的识别性与田间鉴定的真实性具有相同效果^[11-12]。利用 SSR 分子标记筛选出具有双亲互补带型的引物,是鉴定杂交种纯度的一个关键技术前提。本研究选用 300 对 SSR 引物,对“秦甘 50”人工杂交种及其父本 B6 和母本 Y8 的 DNA 在聚丙烯酰胺凝胶上进行扩增筛选,获得 1 对具有双亲互补带型的引物 SQ1019,其能在父本 B6 和母本 Y8 之间扩增出互补的特异谱带,谱带间大小差异明显,很容易将“秦甘 50”人工杂交种与其亲本分辨开,经多次重复验证,结果稳定,证明将引物 SQ1019 用于“秦甘 50”纯度鉴定是可靠的。

十字花科作物利用自交不亲和系繁殖杂交种,由于自交不亲和系具有小于 1 的亲指数,其大田制种通过昆虫传粉获得杂交种,因此势必存在一定数量的自交种。杂交种必须达到国家规定的纯度标准方可用于生产,因此获得杂交种后快速检测出其杂交率显得尤为重要。杂交种纯度的形态学鉴定和分子标记鉴定是测定杂交率的 2 种主要的方法,其中形态学鉴定周期较长,易受栽培环境影响;而分子标记是基于物种 DNA 指纹特征的标记技术,不易受环境影响,鉴定速度快,分子标记中的 SSR 标记是一种基于 PCR 扩增的标记,具有很高的多态性和稳定性,测定结果可靠^[13-14]。本研究通过 SSR 分子标记鉴定得到“秦甘 50”大田杂交种的纯度为 96.3%,与田间鉴定结果(96.0%)一致,证明 SSR 分子标记是一种可靠的快速鉴定杂交种纯度的方法。

杂交种纯度检测标样的 SSR 分子标记鉴定与田间对应单株鉴定结果是否相同,是评价 2 种方法一致性的主要途径。本研究采用单株对应评价法,在“秦甘 50”大田杂交种检测样中,SSR 分子标记 300 株,测得其中有 11 株亲本,其结果得到田间验证,两者一致性高达 99.7%。田间鉴定比 SSR 分子标记多鉴定出 1 株 187 号母本株,可能是在 SSR 标记过程中此株发生了轻微的 DNA 混杂,也可能是与亲本个别位点的纯合程度有关^[15],其原因有待进一步研究。

4 结 论

用 SSR 分子标记筛选的引物 SQ1019 在“秦甘 50”(F₁)单株中同时扩增出了父本 B6 和母本 Y8 的特征条带,而且不同单株间表现一致,可以用引物 SQ1019 来对“秦甘 50”杂交种纯度进行快速鉴定。在 SSR 分子标记鉴定的“秦甘 50”大田杂交种 300

棵单株中,有 11 株为母本 Y8 自交株或父本 B6 自交株,真实杂交株为 289 株,其杂交种纯度为 96.3%。“秦甘 50”大田杂交种田间鉴定出杂交种 288 株,其杂交种纯度为 96.0%,两者鉴定结果一致性高达 99.7%。由此可见,SSR 分子标记是一种快速、准确鉴定“秦甘 50”杂交种纯度的方法。

[参考文献]

- [1] 杨丽梅,方智远,刘玉梅,等.“十一五”我国甘蓝遗传育种研究进展[J].中国蔬菜,2011(2):1-10.
Yang L M,Fang Z Y,Liu Y M,et al. Advances of research on cabbage genetics and breeding during the Eleventh Five-year Plan in China [J]. China Vegetables, 2011(2):1-10. (in Chinese)
- [2] 张恩慧,梁超英,许忠民,等.2 个甘蓝亲本的筛选利用及其 F₁ 目标性状鉴定[J].西北农林科技大学学报:自然科学版,2009,37(6):105-110.
Zhang E H,Liang C Y,Xu Z M,et al. Screening and utilization of two parents in cabbage and identification of hybrid F₁ target characters [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2009, 37(6):105-110. (in Chinese)
- [3] Plieske J,Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*. I: Development and abundance in *Brassica species* [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 689-694.
- [4] 谭智丹,余显权,高健强,等.利用 SSR 鉴定杂交水稻种子纯度的研究[J].种子,2006(4):27-33.
Tan Z D,Yu X Q,Gao J Q,et al. The application on testing the purity of hybrid rice by SSR [J]. Seed, 2006(4):27-33. (in Chinese)
- [5] 詹庆才.利用微卫星 DNA 标记进行杂交水稻种子纯度鉴定的研究[J].杂交水稻,2002(5):46-50.
Zhan Q C. Studies on identification of purity and factuality of hybrid rice seeds using microsatellite marker [J]. Hybrid Rice, 2002(5):46-50. (in Chinese)
- [6] 李晓辉,李新海,李文华. SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J].作物学报,2003,29(1):63-68.
Li X H,Li X H,Li W H. Application of SSR markers in hybrid seed purity test of maize [J]. Acta Agronomica Sinica, 2003, 29(1):63-68. (in Chinese)
- [7] 盖树鹏.玉米品种纯度 SSR 鉴定与田间鉴定的相关性[J].华北农学报,2010(S1):28-31.
Gai S P. The relativity between SSR method and field test in the hybrids purity identification of maize [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2010(S1):28-31. (in Chinese)
- [8] 贺道华,邢宏宜,李婷婷,等.92 份棉花资源遗传多样性的 SSR 分析[J].西北植物学报,2010,30(8):1557-1564.
He D H,Xing H Y,Li T T,et al. Genetic diversity of 92 cotton accessions evaluate SSR markers [J]. Acta Botanica Boreali-Occide Sinica, 2010, 30(8):1557-1564. (in Chinese)
- [9] 梅德圣,李云昌,胡琼,等.甘蓝型油菜中油杂 8 号种子纯度的 SSR 鉴定[J].中国农学通报,2006,22(5):49-52.

Mei D S, Li Y C, Hu Q, et al. Identification of seed purity of *Brassica napus* Zhongyouza No. 8 using SSR markers [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2006, 22(5): 49-52. (in Chinese)

[10] 王 灏, 王爱娜, 李殿荣, 等. 甘蓝型 CMS 杂交油菜品种种子纯度的分子鉴定及其吻合率研究 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(21): 54-58.

Wang H, Wang A N, Li D R, et al. The research on the molecular identification and coincidence rate on CMS hybrid seeds purity of *Brassica napus* [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2009, 25(21): 54-58. (in Chinese)

[11] 穆建新, 李殿荣, 郭蔼光, 等. 用 SSR 分子标记检测杂交油菜秦优 7 号的种子纯度 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(11): 64-68.

Mu J X, Li D R, Guo A G, et al. Seed purity test of hybrid rapeseed Qinyou No. 7 with SSR molecular markers [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(11): 64-68. (in Chinese)

[12] 干 滢, 曾凡亚, 赵 云, 等. 杂交油菜“蜀杂 6 号”特异序列扩增标记(SCAR)建立及其在杂种鉴定中的应用 [J]. 作物学报, 2001, 22(6): 722-727.

Gan Y, Zeng F Y, Zhao Y, et al. Development of SCAR markers to authenticate the hybrid seed lots of Shuza No. 6 (*Brassica napus* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2001, 22(6): 722-727. (in Chinese)

[13] 盖树鹏, 盖伟玲, 黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(3): 468-472.

Gai S P, Gai W L, Huang J Y. Comparison of SSR and SRAP marker for varieties identification in maize (*Zea mays* L.) [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(3): 468-472. (in Chinese)

[14] Wang F G, Zhao J R, Dai J R, et al. Selection and development of representative simple sequence repeat primers and multiplex SSR sets for high throughput automated genotyping in maize [J]. Chinese Science Bulletin, 2007, 52(2): 215-223.

[15] 沈金雄, 陆光远, 傅廷栋, 等. 甘蓝型油菜自交不亲和系杂种纯度鉴定 [J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(4): 12-15.

Shen J X, Lu G Y, Fu T D, et al. Purity analysis on hybrid of self-incompatibility in *Brassica napus* L. [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(4): 12-15. (in Chinese)

[9] 康源春. 杏鲍菇高效栽培技术 [M]. 郑州: 河南科学技术出版社, 2004.

Kang Y C. High yield cultivation techniques of *Pleurotus eryngii* [M]. Zhengzhou: Henan Science and Technology Press, 2004. (in Chinese)

[10] 马 璐. 杏鲍菇工厂化生产关键因素研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2010.

Ma L. Studies on key factors of industrialized production for *Pleurotus eryngii* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2010. (in Chinese)

[11] 沈 敏, 李文生. 杏鲍菇工厂化栽培技术研究与应用 [J]. 安徽农学通报, 2010, 16(11): 138-139.

Shen M, Li W S. Research and application on industrialized cultivation techniques for *Pleurotus eryngii* [J]. Anhui Agri Sci Bull, 2010, 16(11): 138-139. (in Chinese)

[12] 潘国才. 北方地区杏鲍菇日光温室栽培技术 [J]. 北方园艺, 2007(5): 235-236.

Pan G C. Cultivation techniques of sunlight greenhouse of *Pleurotus eryngii* in the Northern [J]. North Gardening, 2007(5): 235-236. (in Chinese)

[13] 刘瑞璧. 杏鲍菇栽培技术探讨 [J]. 食用菌, 2006, 28(5): 53-54.

Liu R B. Discuss cultivation techniques of *Pleurotus eryngii* [J]. Edible Fungi, 2006, 28(5): 53-54. (in Chinese)

[14] 任军凯, 姚祥坦. 浙北杏鲍菇简易架式栽培技术 [J]. 食用菌, 2007, 29(1): 51-52.

Ren J K, Yao X T. Simple and easy posture cultivation techniques of *Pleurotus eryngii* in North of Zhejiang [J]. Edible Fungi, 2007, 29(1): 51-52. (in Chinese)

[15] 徐代贵. 杏鲍菇高产栽培技术 [J]. 食用菌, 2005, 27(4): 44-45.

Xu D G. High yield cultivation techniques of *Pleurotus eryngii* [J]. Edible Fungi, 2005, 27(4): 44-45. (in Chinese)

[16] 王崇鼎. 杏鲍菇工厂化栽培中几个关键问题研究 [D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2011.

Wang C D. Studies of several key issues of industrialized production of *Pleurotus eryngii* [D]. Yangling, Shaanxi: Northwest A&F University, 2011. (in Chinese)

(上接第 116 页)