

黄其椿, 卢东长城, 陈东奎, 等. 沃柑 SSR 分子标记筛选及其在品种鉴定上的应用[J]. 江苏农业科学, 2020, 48(1): 75–79.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.01.013

沃柑 SSR 分子标记筛选及其在品种鉴定上的应用

黄其椿¹, 卢东长城², 陈东奎¹, 江 东³, 刘吉敏⁴, 谢 健², 施平丽¹, 张 兰¹, 刘福平¹

(1. 广西农业科学院园艺研究所, 南宁 530007; 2. 南宁维尔凯生物科技有限公司, 南宁 530022;

3. 中国农业科学院柑桔研究所, 重庆 400712; 4. 广西农业科学院植物保护研究所, 南宁 530007)

摘要:采集不同品种的柑橘叶片标样, 进行 SSR 分子标记检测和筛选, 确认 SSR 分子标记准确有效。然后在不同时期、不同地块采集更多品种的叶样, 进行 SSR 分子标记检测, 比对试验结果与采样记录, 检查 SSR 分子标记能否准确有效的鉴定沃柑品种。结果表明, 3 对 SSR 分子标记可以准确有效地从 16 个广西、重庆、四川种植的柑橘品种中鉴定出沃柑和无核沃柑(但沃柑和无核沃柑两者之间无法有效区分), 该品种鉴定技术可应用于沃柑产业化发展中。

关键词:沃柑; 柑橘; SSR; 分子标记; 品种鉴定

中图分类号: S666.103.7 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)01-0075-04

柑橘是全球种植面积最大和总产量最高的水果之一。中国是柑橘的起源中心之一, 柑橘种质资源丰富。杂交选育是柑橘育种的重要策略, 也造成了柑橘品种的高度遗传杂合性。近 20 年来, 柑橘新品种主要来源于芽变选育^[1-2]。芽变选育得到的新品种大部分性状来自原品种。近年通过引种和育种, 使中国柑橘品种更加多样化。在鉴别柑橘品种上, 虽然可通过枝叶形态等鉴定柑橘品种, 但是形态学标记较少, 特别在苗期时, 由于营养、日照等环境因素影响叶片没有完全展开, 有时难以进行品种鉴定。沃柑(Orah)是坦普尔柑橙与丹西红橘杂交的晚熟柑橘品种^[3], 由于经济效益显著, 近年来在广西、重庆、四川、云南等地快速推广, 种植面积超过 15.0 万 hm²^[4]。随着种植面积的快速增加, 如何确保沃柑品种的纯正, 保证种苗的质量, 加强种苗的检测工作变得更为重要。随着分子生物学的发展, SSR(simple sequence repeat)分子标记鉴定因快速准确, 不受时间、环境条件影响等优点逐渐发挥

重要作用, 能够满足沃柑育苗的要求。DNA 分子标记技术广泛应用于植物遗传多样性和种质鉴定中, 其中常用的技术包括 SSR、AFLP、RAPD、SNP 等已应用于柑橘品种鉴定^[5-8]。SSR 分子标记的发展历史长, 应用简易方便, 为共显性分子标记, 具有多态性丰富和 PCR 扩增结果重现性高的优点, 被认为是研究群体遗传变异最好的标记之一^[9]。刘通等利用 SSR 和 SRAP 分子对 34 份广西野生柑橘种质和地方品种进行遗传多样性分析^[10]。李益等用 503 份种质经过多轮筛选出 21 个 SSR 标记^[11]。曾涛利用 SSR 分子标记构建了南丰蜜橘的指纹图谱并分析了各南丰蜜橘的遗传多样性^[12]。刘召亮等应用 SSR 分子标记对江西各金沙柚主栽区的金沙柚及相关近缘种质进行分析, 为金沙柚品种的鉴定、保存和评价等提供参考^[13]。目前, 国内沃柑 SSR 分子标记研究未见报道, 生产上应用较少。本研究通过筛选 SSR 分子标记, 可在不同时期、不同地块的多种柑橘品种中准确鉴定出沃柑, 准确率 100%, 为 SSR 分子标记应用于沃柑的品种鉴定打下了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

第一批柑橘标样(I)于 2018 年 9 月 27 日在广西农业科学院本部采集(记录好编号和品种)。第二批柑橘样品(II)于 2019 年 1 月 25 日在广西农业科学院本部采集(第二、三、四批采集的样品由采集人记录好编号和品种。不告知检测人员品种信息)。第三批柑橘样品(III)于 2019 年 2 月 23 日在

收稿日期: 2019-06-28

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2017YFD0202006-01); 广西科技重大专项(编号: 桂科 AA17204045-4、桂科 AA17202017-2); 协同创新项目(编号: CAAS-GXAAS-XTCX2019026-2); 广西特色作物试验站(编号: 桂 TS2016001); 北铁科合 201996001; 果树无病良种繁育中心的建立。

作者简介: 黄其椿(1983—), 男, 广西灵山人, 硕士, 助理研究员, 从事沃柑育苗与栽培研究。E-mail: hqchun1288@163.com。

通信作者: 陈东奎, 研究员, 主要从事柑橘研究。E-mail: 421808088@qq.com。

广西农业科学院里建科研基地的柑橘采穗圃采集。第四批柑橘样品(Ⅳ)于2019年2月23日在广西农业科学院里建科研基地的柑橘观察圃和示范园采集。样品信息详见表1。成熟期剪取+1叶,4℃冰箱保存,采样后3d内完成DNA提取。

1.2 DNA 提取

每个样品取适量叶片,超纯水冲洗干净,晾干。剪取约0.1g置于干净的2mLEP管中,加入800μLCTAB后用组织研磨仪研磨。混匀,65℃水浴预热40~60min,每隔10min振荡混匀1次。12000r/min离心5min,吸取上清转入新的2mL离心管中,按照1:1加入氯仿剧烈振荡混匀,室温放置10min。12000r/min离心10min,吸取上清。加入1/10的3mol/LNaAc和2倍体积的无水乙醇沉淀DNA。12000r/min离心10min,沉淀用70%乙醇洗2遍,晾干。100~400μLTE溶解DNA,-20℃保存。

1.3 柑橘 SSR 检测

使用李益等报道的SSR引物^[14],这些SSR引

表 1 用于沃柑 SSR 分子标记检测的柑橘材料

编号	品种	编号	品种
I-1	沃柑	Ⅲ-1	爱媛38
I-2	沃柑	Ⅲ-2	沃柑
I-3	沃柑	Ⅲ-3	晚血8号
I-4	无核沃柑	Ⅲ-4	濂户水
I-5	少核茂谷柑	Ⅲ-5	沃柑
I-6	茂谷柑	Ⅲ-6	明日见
I-7	华晚无籽沙糖橘	Ⅲ-7	沃柑
I-8	贡柑	Ⅲ-8	无核沃柑
I-9	茂谷柑	Ⅲ-9	长叶香橙
Ⅱ-1	茂谷柑	Ⅲ-10	沃柑
Ⅱ-2	沃柑	Ⅳ-1	沃柑
Ⅱ-3	无核沃柑	Ⅳ-2	清秋脐橙
Ⅱ-4	少核茂谷柑	Ⅳ-3	沃柑
Ⅱ-5	沃柑	Ⅳ-4	纽荷尔脐橙
Ⅱ-6	华晚无籽沙糖橘	Ⅳ-5	沃柑
Ⅱ-7	沃柑	Ⅳ-6	沃柑
Ⅱ-8	沃柑	Ⅳ-7	甘平
Ⅱ-9	茂谷柑	Ⅳ-8	大雅1号
Ⅱ-10	贡柑	Ⅳ-9	沃柑
		Ⅳ-10	红肉脐橙

物由苏州金唯智生物科技有限公司合成。引物序列见表2。

表 2 SSR 引物编号及序列

引物名称	引物序列(5'→3')
P4	F:TAAAAACCAACGTCCCTCA;R:CGGCGAGGTAGAAGTAATG
P7	F:GTTGCGCAGTTATTCTCAA;R:CCGACCACTTTTACCCACTG
P114	F:TCTCAGTCAAAAGACGACG;R:TCGCCATAAACCGATACAT

PCR反应体系为:10×PCR buffer 2μL;Mg²⁺(25mmol/L)2μL;dNTP(10mmol/L)0.4μL;引物F(0.5μmol/L/μL)1μL;引物R(0.5μmol/μL)1μL;Taq DNA Polymerase(5U)0.2μL;模板gDNA(25ng/μL)2μL;用ddH₂O补足至20μL。PCR反应程序为:94℃预变性5min;94℃30s,56℃30s,72℃30s,35个循环;72℃延伸10min。PCR扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 多态性分析

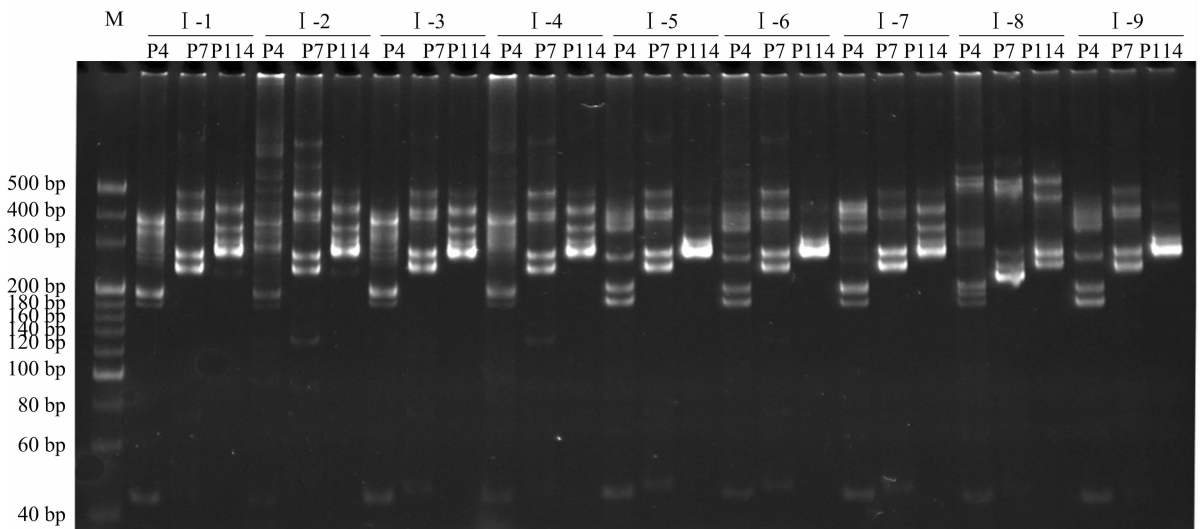
使用标品检测3对SSR引物的多态性时,每对引物均要检测到5条以上条带。在1%琼脂糖凝胶电泳图中,3对SSR引物扩增产物可清晰区分沃柑、少核茂谷柑、茂谷柑、华晚无籽沙糖橘、贡柑5个品种,但沃柑与无核沃柑SSR引物扩增产物之间未见显著差异(图1)。

2.2 多样本检验

为进一步检验这3个SSR分子标记在沃柑育苗、生产中的可靠性,在不同时期、不同地点取样,并增加更多的品种类型,进行SSR分子标记检测。结果发现,根据这3个SSR分子标记的检测结果(图2),可在16个品种(沃柑、无核沃柑、少核茂谷柑、茂谷柑、华晚无籽沙糖橘、贡柑、爱媛38、晚血8号、濂户水、明日见、长叶香橙、清秋脐橙、纽荷尔脐橙、甘平、大雅1号、红肉脐橙)中准确、有效地检测到沃柑和无核沃柑,准确率达到了100%(表3)。

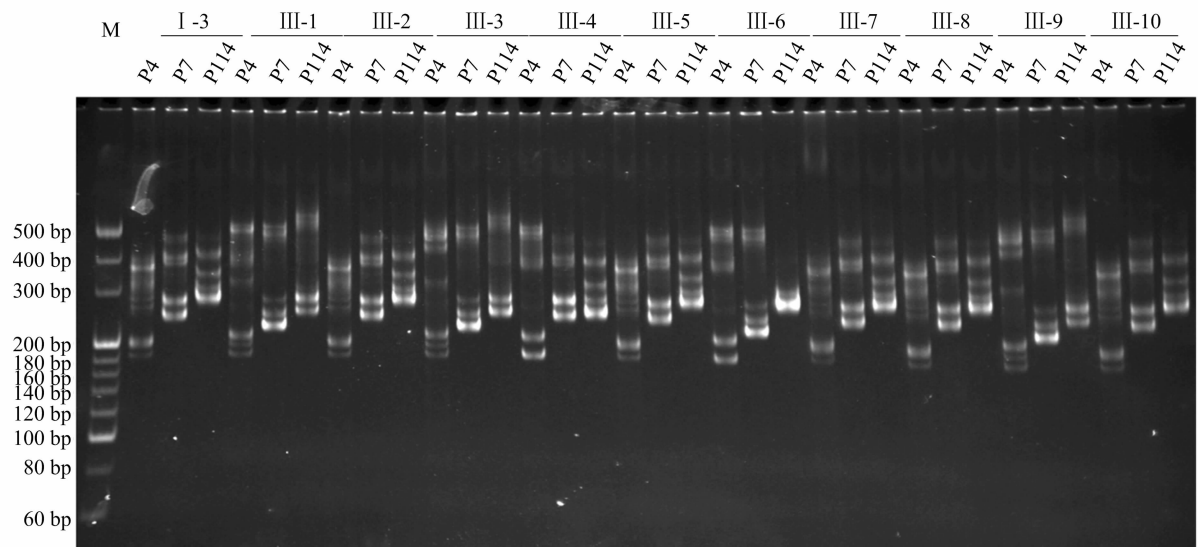
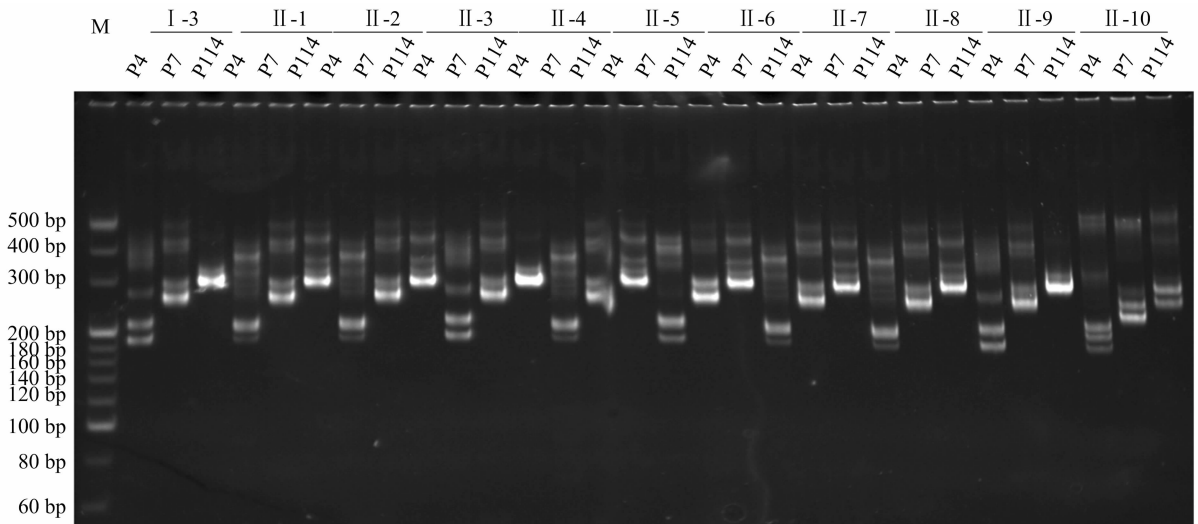
3 讨论

沃柑是坦普尔柑橙与丹西红橘杂交的晚熟柑橘品种。无核沃柑是由γ射线辐射诱变育成的沃柑新品种,在保留了沃柑生长势强、高糖、肉脆、多汁、味浓、越冬落果少、成熟后挂树期长等优点的同时,克服了普通沃柑多籽的缺点。由于经济效益显著,近年来在广西、重庆、四川、云南等地,沃柑和无



M 为 100 bp marker, I-1、I-2、I-3、I-4、I-5、I-6、I-7、I-8、I-9 (从左向右) 分别为沃柑、沃柑、沃柑、无核沃柑、少核茂谷柑、茂谷柑、华晚无籽沙糖橘、贡柑、茂谷柑, P4、P7、P114 为 SSR 引物名称

图1 使用标样检测 SSR 多态性



M 为 100 bp marker, II-1、II-2、II-3、II-4、II-5、II-6、II-7、II-8、II-9、II-10、III-1、III-2、III-3、III-4、III-5、III-6、III-7、III-8、III-9、III-10、IV-1、IV-2、IV-3、IV-4、IV-5、IV-6、IV-7、IV-8、IV-9、IV-10 为样品编号, P4、P7、P114 为 SSR 引物名称

图2 沃柑 SSR 分子标记多样品检测

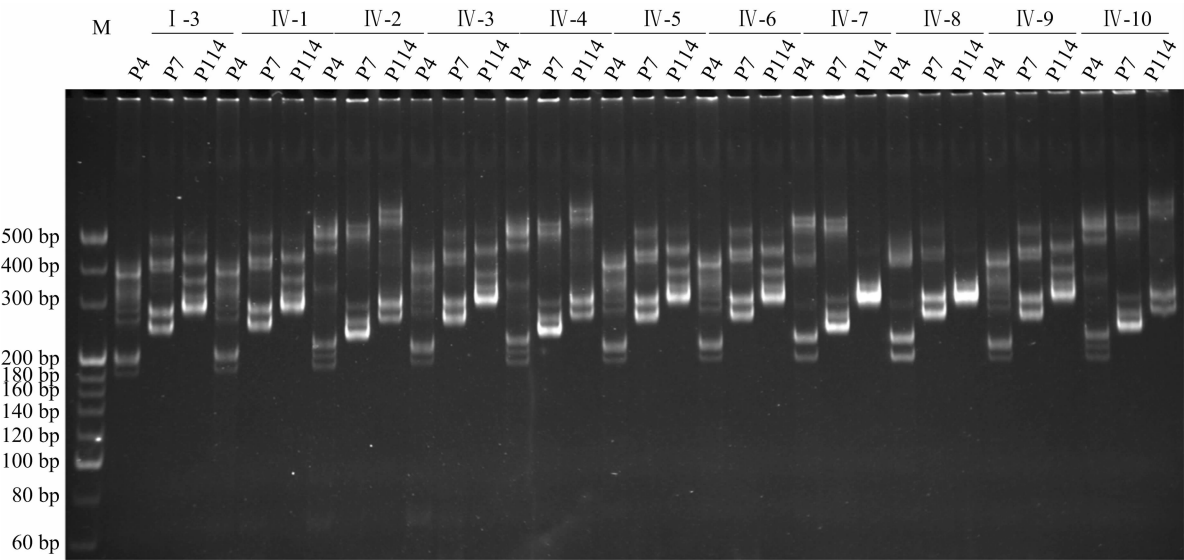


图2(续)

表 3 根据检测结果判断是否为沃柑

样品编号	是否为沃柑	样品编号	是否为沃柑
Ⅱ - 1	否	Ⅲ - 6	否
Ⅱ - 2	是	Ⅲ - 7	是
Ⅱ - 3	是	Ⅲ - 8	是
Ⅱ - 4	否	Ⅲ - 9	否
Ⅱ - 5	是	Ⅲ - 10	是
Ⅱ - 6	否	Ⅳ - 1	是
Ⅱ - 7	是	Ⅳ - 2	否
Ⅱ - 8	否	Ⅳ - 3	是
Ⅱ - 9	否	Ⅳ - 4	否
Ⅱ - 10	否	Ⅳ - 5	是
Ⅲ - 1	否	Ⅳ - 6	是
Ⅲ - 2	是	Ⅳ - 7	否
Ⅲ - 3	否	Ⅳ - 8	否
Ⅲ - 4	否	Ⅳ - 9	是
Ⅲ - 5	是	Ⅳ - 10	否

核沃柑得到快速推广。沃柑和无核沃柑从苗期到挂果需要 2~3 年时间,期间需要大量人力和财力投入。如不能有效鉴定沃柑种苗,一旦种植到假苗将对果农造成巨大的经济损失。

本研究使用的 3 个 SSR 分子标记可以准确地从 16 个不同的广西、重庆、四川种植的主要柑橘品种中筛选出沃柑和无核沃柑,但因沃柑和无核沃柑的 SSR 条带没有差异,因此无法区分沃柑和无核沃柑。无核沃柑是由 γ 射线辐射诱变育成的沃柑新品种,其遗传背景与沃柑非常相似,目前暂未见可有效区别这 2 个品种的分子标记的相关报道。目前沃柑和无核沃柑在广西的种植表现和经济收益都较高,因此即便本研究使用的 SSR 分子标记无法区分无核沃柑和沃柑,但有效地从多种柑橘品种

中区分出无核沃柑和沃柑,在生产实践中仍然具有应用价值。

本研究中使用低分辨率的琼脂糖电泳仍可以有效地筛选出沃柑和无核沃柑。由于与毛细管电泳相比,琼脂糖电泳对实验室设备要求不高,而与聚丙烯酰胺电泳相比,琼脂糖电泳更快速便利,因此低分辨率的琼脂糖电泳可作为沃柑品种鉴定和杂交选育新品种中 SSR 分子标记筛选的有效而经济的实验技术。另一方面,随着基因组测序技术的发展,简化基因组测序成本大大降低,开发更新一代的 SNP 分子,有希望更准确高效地广泛筛选柑橘品种,包括有效区分近缘品种(如沃柑和无核沃柑)。

参考文献:

[1] 邓秀新,郭文武,孙绪华. 我国无核柑桔类型选育研究进展[J]. 园艺学报,1996,23(3):29-34.
[2] 邓秀新. 世界柑橘品种改良的进展[J]. 园艺学报,2005,32(6):1140-1146.
[3] 谢庆丰. 优质沃柑丰产栽培管理技术[J]. 南方农业,2017,11(5):20-21.
[4] 黄其椿,陈香玲,陈东奎,等. 沃柑黄化原因分析及对策[J]. 农业科学与技术,2016,17(6):1387.
[5] 雷天刚,何永睿,吴鑫,等. 柑橘栽培品种(系)DNA 指纹图谱库的构建[J]. 中国农业科学,2009,42(8):2852-2861.
[6] 李果果,陈香玲,秦荣耀,等. 大果沙糖橘的遗传鉴定及引种栽培表现[J]. 南方农业学报,2018,49(6):1171-1176.
[7] 曾燕如,胡瑛,斯金平,等. 浙江丽水 16 个柑橘特色品种的 RAPD 分析[J]. 浙江林学院学报,2005,22(5):481-485.
[8] 姜波,钟云,吴波,等. 利用 SNP 分子标记分析鉴定不同形态的化橘红(*Citrus grandis* var. *tomentosa*)单株[J]. 果树学报,2015,32(6):1007-1011.

姚宗泽,李 阳,郭宗娟,等. 杂交玉米品种家佳荣 2 号种子纯度的 InDel 分子标记鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(1):79-84.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.01.014

杂交玉米品种家佳荣 2 号种子 纯度的 InDel 分子标记鉴定

姚宗泽¹, 李 阳², 郭宗娟¹, 张思亲¹, 胡 晓³, 赵自仙¹

(1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 云南昆明 650201; 2. 杭州中软安人网络通信股份有限公司, 浙江杭州 310012;

3. 普洱市澜沧县东河乡农业服务中心, 云南普洱 665628)

摘要:为建立一个简捷、经济、准确可靠的室内杂交玉米种子纯度鉴定方法,以玉米杂交种家佳荣 2 号及其父母本、JR02 杂交组合为材料,用 InDel(插入-缺失)分子标记技术和田间小区种植鉴定 2 种方法对家佳荣 2 号杂交种子进行纯度鉴定。结果显示,InDel 分子标记鉴定的纯度为 95.6%,田间小区种植鉴定的纯度为 97.8%,InDel 的结果略低于田间小区种植鉴定的结果。18 对 InDel 引物中能与家佳荣 2 号双亲基因组稳定结合且具有多态性的引物共有 11 对,多态性检测率为 61%,其中有 1 对引物带型偏父本,其余 10 对 InDel 引物都能与家佳荣 2 号稳定结合,可用于鉴定家佳荣 2 号的种子纯度。在 10 对引物中随机选取 2 对引物,有 1 对引物能从家佳荣 2 号中区分出其相似品种 JR02。2 种方法鉴定结果高度一致,表明 InDel 分子标记可作为玉米杂交种室内纯度鉴定的方法。

关键词:纯度鉴定;InDel 分子标记;CTAB;家佳荣 2 号;杂交玉米

中图分类号:S513.037 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2020)01-0079-06

玉米作为世界三大粮食作物之一,集饲用、能源以及食用于一体。因此保障玉米生产稳定发展、促进玉米产量稳步提升,对我国的社会稳定和人民生活水平的维持在很大程度上都有着一定的促进作用。

种子纯度是衡量种子质量的重要指标^[1],种子纯度一直以来都是世界各国关注的主要问题,种子

纯度的鉴定在种子生产、销售以及大田种植过程中至关重要。种子纯度鉴定技术涉及的知识面较广、技术性强、新问题多。常用方法有种子形态鉴定、幼苗鉴定、物理鉴定、化学鉴定、田间小区种植鉴定等^[2]。自 1974 年 Grodzicker 等发明了限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism,简称 RFLP)技术^[3]以来,随着科学技术的不断进步,人们对分子标记的认识也在不断地深入,目前已有多种分子标记为人们所知,其中一部分已被运用于种子纯度鉴定中,如 RFLP 技术、随机扩增多态性 DNA(random amplified polymorphism DNA,简称 RAPD)标记、简单重复序列(simple sequence repeats,简称 SSR)标记、插入缺失标记(insertion-deletion,简称 InDel)、基于 SNP(单核苷酸多态性)的分子标记等^[4],传统的农作物纯

收稿日期:2018-11-11

基金项目:云南农业大学博士启动基金(编号:A2002276)。

作者简介:姚宗泽(1993—),男,云南大理人,硕士研究生,主要从事玉米种子质量分子鉴定技术体系研究,E-mail:1712726709@qq.com;共同第一作者:李 阳(1991—),男,河南信阳人,硕士,主要从事玉米种子质量分子鉴定技术体系研究,E-mail:669012226@qq.com。

通信作者:赵自仙,博士,副教授,主要从事玉米育种及种质创新研究。E-mail:zhaozix@126.com。

[9]刘 勇,孙中海,刘德春,等. 柚类种质资源 AFLP 与 SSR 遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2005,38(11):2308-2315.

[10]刘 通,邓崇岭,程玉芳,等. 利用 SSR 和 SRAP 技术分析广西柑橘种质遗传多样性[J]. 华中农业大学学报,2016,35(2):23-29.

[11]李 益,马先锋,唐 浩,等. 柑橘品种鉴定的 SSR 标记开发和指纹图谱库构建[J]. 中国农业科学,2018,51(15):2969-2979.

[12]曾 涛. 南丰蜜橘 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性分析[D]. 南昌:江西农业大学,2012.

[13]曾召亮,万水林,闫承璞,等. 金沙柚及其近缘种质基于 SSR 分子标记的遗传多样性分析[J]. 中国南方果树,2017,46(3):1-4.

[14]李 益,马先锋,唐 浩,等. 柑橘品种鉴定的 SSR 标记开发和指纹图谱库构建[J]. 中国农业科学,2018,51(15):2969-2979.