

卢霞,邓志军,刘梦华,等. 辣椒基因组 SSR 引物的开发及品种纯度分子鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(7):65-68.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.07.011

辣椒基因组 SSR 引物的开发及品种纯度分子鉴定

卢霞,邓志军,刘梦华,赵玉虎,司龙亭,李文虎,阿 门

(江苏绿港现代农业发展有限公司,江苏宿迁 223800)

摘要:辣椒是世界上重要的蔬菜作物之一,基因组简单重复序列(simple sequence repeats,简称 SSR)标记的开发对于辣椒分子育种和杂交种子纯度检测具有重要意义。为了检测辣椒品种绿院 3 号杂交种子的纯度,基于辣椒全基因组序列开发了 75 对 SSR 标记。结果表明,只有 SSR 标记 p50 对父母本的扩增结果表现为带型清晰、共显性,且具有高多态性,可进一步用于杂交种的纯度检测。为了确保标记 p50 的准确性和可靠性,对其 PCR 产物进行了进一步测序。测序结果表明,在父母本中分别扩增出了 251、293 bp 的序列。用标记 p50 对绿院 3 号辣椒进行纯度检测,结果显示,种子纯度为 100%,鉴定结果与田间纯度一致。新 SSR 分子标记的开发,为辣椒杂交种子纯度的鉴定提供了参考,也为辣椒种质资源遗传多样性分析及分子育种研究奠定了基础。

关键词:辣椒;SSR;分子标记;种子纯度鉴定

中图分类号: S641.303 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)07-0065-04

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 属于茄科 (Solanaceae) 辣椒属 (*Capsicum*), 是我国的主要蔬菜作物之一, 既可鲜食, 又是重要的调料。辣椒品种的好坏对其产量及品质均有直接而明显的影响, 因而辣椒新品种的选育至关重要。利用杂种优势选育优质高产的杂交种, 是辣椒育种中行之有效的途径。目前, 我国辣椒生产已经广泛使用杂交种, 但是在实际制种过程中, 由于人工去雄不及时、外来花粉干扰、母本自交、机械混杂等均影响了种子纯度, 因此, 为了保证辣椒种子的质量, 纯度鉴定是种子销售中不可或缺的重要步骤^[1]。在传统的形态

学角度, 辣椒种子的纯度鉴定主要依赖于果型、株型、绒毛等田间表型, 其检测周期长、用地多, 不仅费时费工, 而且易受环境因素的影响, 难以满足当年的生产需求。

近年来, 分子生物学的发展使种子纯度鉴定进入基因水平。用分子标记鉴定种子纯度采用电泳方法检测基因组 DNA 的结构与组成, 通过分析 DNA 水平上的差异来检验品种纯度与真实性, 其遗传性稳定、多态性高, 不受发育阶段、取材部位等环境因素的制约, 目前 DNA 分子标记技术已经被广泛用于辣椒、番茄、茄子、黄瓜、西葫芦、西瓜等主要蔬菜作物的鉴定与纯度检测中^[2-8]。目前, 在利用 DNA 分子标记检测辣椒种子纯度方面已有部分研究, 刘子记等对辣椒杂交种简单重复序列 (simple sequence repeats, 简称 SSR) 分子标记鉴定结果及表型鉴定结果进行比较分析, 结果表明, 筛选出的 SSR 分子标记可用于热辣 3 号杂交种纯度的快速鉴定^[9]; 张曼用筛选出的标记 CA885 分别对 2 份辣椒品种 F₁ 代杂交种的 96 株单株进行纯度检测, 检测

收稿日期:2019-03-22

基金项目:江苏省现代农业(蔬菜)产业技术体系(编号:JATS[2018]188);2017 年江苏省“双创人才”项目[编号:(2017)1388 号]。

作者简介:卢霞(1991—),女,甘肃天水人,硕士,主要从事分子标记辅助育种与种子纯度鉴定工作。E-mail:1344963751@qq.com。

通信作者:阿门,博士,中级农艺师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail:2582259972@qq.com。

RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. [J]. Science, 2012, 337: 816-821.

[23] Sander J D, Dahlborg E J, Goodwin M J, et al. Selection-free zinc-finger nuclease engineering by context-dependent assembly (CoDA) [J]. Nature Methods, 2011, 8(1): 67-69.

[24] Wood A J, Lo T W, Zeitler B, et al. Targeted genome editing across species using ZFNs and TALENs [J]. Science, 2011, 333(6040):

307-307.

[25] Rowena D J, Moretti F, McAllister G, et al. Functional CRISPR screening identifies the ufm1ylation pathway as a regulator of SQSTM1/p62 [J]. Elife, 2016, 5: e17290.

[26] Liang P, Xu Y, Zhang X, Ding C, et al. CRISPR/Cas9-mediated gene editing in human triploid zygotes [J]. Protein & Cell, 2015, 6(5): 363-372.

结果与田间鉴定结果一致^[10]。辣椒全基因组测序的完成^[11-13],不仅有助于了解辣椒基因组的结构与功能,而且对于辣椒 SSR 位点的开发、加速辣椒育种进程都有重要的指导作用。随着更多辣椒 SSR 位点得到开发及研究应用,有望进一步推动 SSR 标记在种子纯度检验、遗传育种中的应用^[14]。

本研究以江苏绿港现代农业发展有限公司选育的辣椒品种绿陇 3 号为试验材料,基于辣椒基因组序列,设计开发了 1 批 SSR 引物,筛选其中具有多态性、特异性强、重复性好的 SSR 引物,对绿陇 3 号杂交种子进行分子纯度鉴定,初步建立辣椒杂交种子室内纯度鉴定的 SSR 体系,以期对辣椒杂交种子的纯度鉴定及品种遗传多样性分析提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本试验所用辣椒品种购自江苏绿港现代农业发展有限公司,以绿陇 3 号的 F₁ 代及母本、父本种子作为试验材料,取 144 粒 F₁ 代种子、各 12 粒父母本种子播在穴盘中,在育苗棚中育苗,待长出第 1 张真叶时进行试验。

1.2 基因组 DNA 的提取与检测

辣椒基因组 DNA 的提取采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(hexadecyl trimethyl ammonium bromide,简称 CTAB)法^[15]。取 30 mg 幼嫩叶片放入 2 mL 离心管中,加入 1 个直径为 4 mm 的钢珠,盖紧盖子后将其放入液氮中 90 s,然后用组织研磨仪磨样;在磨好的样中加入 600 μ L 三氯甲烷 CTAB 缓冲液,55 $^{\circ}$ C 水浴 20 min;12 000 r/min 离心 1 min,吸取 400 μ L 上清于干净的 1.5 mL 离心管中,加入 350 μ L 体积比为 24 : 1 的三氯甲烷-异戊醇溶液,充分混匀;12 000 r/min 离心 1 min,取 300 μ L 上清于另 1 个干净的 1.5 mL 离心管中,加入 500 μ L 无水乙醇(提前于 -20 $^{\circ}$ C 预冷)与 50 μ L 乙酸铵,混匀,于 -20 $^{\circ}$ C 冰箱放置 2 h;13 000 r/min 离心 10 min,倒掉上清液,将离心管放置于室温条件下;待离心管中无乙醇味时,加入 100 μ L ddH₂O 溶解 DNA。分别用超微量紫外可见分光光度计与 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的浓度与质量。

1.3 SSR 分子标记的开发

从茄科基因组数据库(Sol Genomics Network)中下载辣椒的全基因组序列,通过 Pilot Edit 软件与

SSR 搜索工具 SSR Hunter 软件在基因组序列中有目的地搜索包含 SSR 位点的序列,以二、三、四、五、六核苷酸基序(motif)的最少重复次数在 10 次以上作为标准进行 SSR 位点序列的选择。用 Primer 5 设计引物,引物设计参数如下:引物长度为 18 ~ 30 bp,最适长度为 22 bp,正反引物的长度相差不超过 3 bp,退火温度为 50 ~ 60 $^{\circ}$ C,GC 含量在 40% 左右,PCR 预扩增产物大小为 100 ~ 300 bp。引物由浙江尚亚生物技术有限公司合成。

1.4 PCR 扩增与检测

PCR 采用 15 μ L 体系,包含 1 μ L DNA 模板、7.5 μ L Taq Mix、各 1 μ L 正反向引物、4.5 μ L ddH₂O。PCR 扩增条件如下:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 60 s,58 $^{\circ}$ C 退火 60 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min,16 $^{\circ}$ C 终止反应。

扩增完成后,将扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上电泳,电泳完成后,进行硝酸银溶液染色、氢氧化钠甲醛溶液显色。在自然光下,对每对引物扩增出来的条带进行判断,当某对引物的扩增条带在父母本中具有多态性,并在 F₁ 代中同时显示出父母本的特征条带时,则确定该引物可用于纯度鉴定,否则表明该引物不适合用于鉴定杂交种的纯度。

1.5 SSR 标记的克隆与测序

为了验证所选标记片段的大小,对父母本进行 PCR 扩增,对扩增产物进行胶回收,然后连接至 pMD19-T 载体上,送至浙江尚亚生物技术有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 多态性引物的筛选

利用笔者所在公司自主开发的 75 对 SSR 标记对辣椒品种绿陇 3 号及其父母本进行 PCR 扩增,对扩增产物进行 8% 聚丙烯酰胺凝胶电泳。由图 1 可以看出,标记 p50 在绿陇 3 号父母本中都能扩增出清晰的条带,且在绿陇 3 号中表现为父母本带型互补的条带。重复试验结果表明,标记 p50 扩增的带型稳定、多态性高,且为共显性标记。

2.2 新开发标记 p50 的序列信息及相应测序结果

2.2.1 标记 p50 的序列信息 以栽培辣椒品种 Zunla-1 全基因组序列开发的标记 p50 的序列信息见表 1。

2.2.2 标记 p50 扩增 DNA 的测序结果 为了在分子水平上确定所选 SSR 标记的准确性与可靠性,对

步骤,是衡量种子质量的关键。辣椒是我国的重要蔬菜作物之一,每年通过传统的田间试验来鉴定其纯度虽然有效,但是效率太低,不仅费时费力,且易受外界环境因素的影响。而利用分子标记技术,可以快速高效地完成种子纯度鉴定,不但节约了种子公司的成本,为市场提供了优质种子,还对我国的辣椒育种具有重要的指导意义^[1]。随着分子生物技术的飞速发展,分子标记技术已经成为作物品种真实性和纯度鉴定的发展方向。目前,SSR 分子标记技术在蔬菜作物品种鉴定与纯度检测方面已得到了广泛应用。近年来,国内外学者对辣椒全基因组测序的完成,为 SSR 标记的开发提供了新途径,使引物开发费用逐渐降低^[11,13],更多的辣椒 SSR 位点被开发,将进一步推动 SSR 标记在种子纯度检验、遗传育种及其他研究领域中的应用。

本研究基于栽培辣椒品种 Zunla-1 全基因组序列信息,开展了辣椒 SSR 位点的挖掘与设计,开发了 75 对 SSR 引物,并筛选出了 1 对特异性条带清晰、多态性强、便于识别、方便对辣椒杂交种绿陇 3 号进行种子纯度分析的 SSR 引物 p50。新开发的标记 p50 在基因组中的起始位点为第 606399 bp,重复单元为 AAG,重复了 26 次。但是有趣的是,对绿陇 3 号亲本的测序结果显示,双亲存在 42 bp 的序列差异,且母本序列比基因组参考序列多 12 个 GAA 与 1 个 GAG 序列,而父本序列较参考序列少 1 个 GAA 序列,这与 p50 的重复单元及数量并不相同,表明 GAG 可能是 1 个高变异位点,因而在不同辣椒品种中的存在模式有差异。本研究结果可用于亲缘关系较近的种质资源遗传分析研究。

本研究用标记 p50 对绿陇 3 号及其父母本进行 SSR 扩增后,能够准确地将父母本、杂交种及假杂种区分开来,绿陇 3 号种子的纯度为 100%,与田间表型鉴定的结果高度一致。为了确保鉴定结果的准确性和可靠性,对绿陇 3 号父母本的扩增产物进行测序后,在母本中检测出了 293 bp 的序列,在父本中检测出了 251 bp 的序列,该测序结果与电泳结果完全一致,表明新开发的标记 p50 符合绿陇 3 号的 DNA 特点,筛选出的引物针对性强,适用于绿陇 3

号辣椒杂交种纯度的鉴定。综合分析可知,本研究结果为亲缘关系较近的辣椒种质资源遗传多样性分析及分子标记辅助育种研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] 白占兵,李雪峰,戴雄泽. 利用 SSR 分子标记建立辣椒纯度鉴定体系[J]. 辣椒杂志,2010(1):32-34.
- [2] 王飞,姚明华,尹延旭,等. 辣椒 SSR 多态性引物的筛选及品种纯度鉴定[C]//中国园艺学会. 中国园艺学会 2017 年论文摘要集. 2017:126.
- [3] 卢国强,卢海林,潘学春,等. 辣椒品种镇研 22 种子纯度的 SSR 分子比较鉴定[J]. 辣椒杂志,2017(2):33-35.
- [4] 张录霞,甘中祥,李倍金,等. 利用 InDel 标记鉴定加工番茄杂交种纯度[J]. 分子植物育种,2016,14(6):1533-1537.
- [5] 刘军,周晓慧,庄勇. 茄子杂交品种种子纯度的 SSR 分子标记鉴定[J]. 分子植物育种,2013,11(6):790-794.
- [6] 周胜军,张鹏,朱育强,等. 黄爪‘浙秀 1 号’种子纯度的 SSR 鉴定[J]. 分子植物育种,2013,11(5):557-561.
- [7] 林春晶,张春宝,董英山. DNA 分子标记在作物杂交种纯度鉴定中的应用[J]. 分子植物育种,2015,13(3):702-710.
- [8] 李超汉,刘莉,刘翔,等. 基于 SSR 标记的 5 个西瓜新品种纯度鉴定及特异性分析的研究[J]. 中国农学通报,2015,31(33):177-185.
- [9] 刘子记,李静婷,杨衍,等. 辣椒杂交种 SSR 分子标记鉴定及表型比较分析[J]. 华北农学报,2014,29(1):69-72.
- [10] 张曼. 基于分子标记的辣椒杂交种真实性和纯度的检验[D]. 郑州:河南农业大学,2012.
- [11] Qin C, Yu C S, Shen Y, et al. Whole-genome sequencing of cultivated and wild peppers provides insights into *Capsicum* domestication and specialization [J]. PNAS, 2014, 111(14):5135-5140.
- [12] Lee J M, Nahm S H, Kim Y M, et al. Characterization and molecular genetic mapping of microsatellite loci in pepper [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 108(4):619-627.
- [13] Kim S, Park M, Yeom S I, et al. Genome sequence of the hot pepper provides insights into the evolution of pungency in *Capsicum* species [J]. Nature Genetics, 2014, 46(3):270-278.
- [14] 杜培粉. 14 个辣椒杂交种纯度鉴定的 SSR 引物筛选[J]. 长江蔬菜, 2017(14):46-49.
- [15] Aljanabi S M, Martinez I. Universal and rapid salt-extraction of high quality genomic DNA for PCR-based techniques[J]. Nucleic Acids Research, 1997, 25(22):4692-4693.