

朱海生,李祖亮,李永平,等. 基于 SSR 分子标记的普通丝瓜杂交种子纯度鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):53-56.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.009

基于 SSR 分子标记的普通丝瓜杂交种子纯度鉴定

朱海生^{1,2}, 李祖亮³, 李永平^{1,2}, 刘建汀^{1,2}, 王 彬^{1,2}, 陈敏敏^{1,2}, 温庆放^{1,2,3}

(1. 福建省农业科学院作物研究所, 福建福州 350013; 2. 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建福州 350013;

3. 福建省农业科学院农业生物资源研究所, 福建福州 350003)

摘要:为了建立一种高效、准确的普通丝瓜品种纯度检测方法,以普通丝瓜丝盛 2 号及其亲本为试验材料,利用 SSR 分子标记技术鉴定杂交种子纯度,从 106 对 SSR 引物中筛选出 1 对引物(SCSSR4),其在杂交种和双亲之间存在显著差异条带,且杂交种含有父、母本的特异互补带型。利用该引物对 26 株丝盛 2 号杂交种进行纯度鉴定,鉴定结果为 96.15%,与大田种植鉴定结果一致,表明该引物可用于丝盛 2 号杂交一代种子纯度的快速检测和准确鉴定。

关键词:普通丝瓜;ISS 分子标记;种子纯度;鉴定

中图分类号: S642.403.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)08-0053-03

丝瓜(*Luffa cylindrica*)起源于印度,主要分布于温带、热带和亚热带地区,为葫芦科(Cucurbitaceae)丝瓜属(*Luffa* Mill.)一年生攀缘藤本植物,是我国最主要的瓜类蔬菜之一,在我国各地均有大面积栽培^[1]。丝瓜属主要有 8 个种,普通丝瓜(俗称肉丝瓜)是其中最为重要的栽培种之一,我国大部分地区以栽培普通丝瓜为主^[2-3]。普通丝瓜肉质清香软滑,营养价值高,同时具有天然保健及药用价值,深受广大消费者喜爱,其栽培面积和需求量正在不断增大,具有巨大的经济潜力和广阔的应用前景。利用杂种优势,培育一代杂交丝瓜品种是目前普通丝瓜育种的主要方法。由于在普通丝瓜杂交制种过程中,人工去雄不彻底或漏去雄等原因,常会出现假杂交种,导致种子遗传纯度降低,给生产造成巨大的经济损失。因此,杂交种品种纯度和种子真实性准确、简便、快速鉴定成为普通丝瓜生产中最为迫切解决的问题之一。

分子生物学的迅速发展,使从 DNA 分子水平上

对品种纯度进行基因鉴定和分析成为可能。采用分子标记技术进行种子纯度鉴定是一种快速、便捷、准确、有效的方法。微卫星序列即简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)分子标记,广泛存在于真核和原核生物基因组中。SSR 分子标记具有重复性好、稳定可靠、位点特异、复等位、呈共显性等优点,已经成为最为广泛的分子标记之一^[4-5],也是目前作物品种鉴定和种子纯度鉴定研究中最常用的标记之一^[6-7]。本研究利用 SSR 分子标记技术,筛选出特异性 SSR 引物,建立了一套快速检测普通丝瓜种子纯度的方法,以期为准快速、简单高效的普通丝瓜杂交种子纯度鉴定提供参考。

1 材料与方法

1.1 普通丝瓜转录组测序与 SSR 分子标记筛选

普通丝瓜转录组数据来源于笔者所在课题组 Illumina 高通量深度测序结果。委托基迪奥生物科技有限公司进行 RNA-Seq 转录组测序,利用 Primer 3.0 对含 SSR 位点序列进行引物设计,引物序列长度 18~25 bp,扩增产物长度 100~280 bp, GC 含量 40%~60%,退火温度 55~65℃,随机选择其中 20 bp 以上 SSR 序列的 150 对标记进行合成,进行 SSR-PCR 扩增以验证其有效性。

1.2 材料及其 DNA 提取

供试材料为普通丝瓜丝盛 2 号杂交种及其父母本,为福建省农业科学院培育品种。基因组 DNA 提取采用 CTAB 法进行^[8],选取 2~3 张嫩叶,加入 1~2 勺的 PVP 和液氮,迅速研磨成粉状,移入 1.5 mL

收稿日期:2019-04-03

基金项目:福建省自然科学基金(编号:2019J011112);福建省科技计划项目-省属公益类科研院所基本科研专项(编号:2018R1026-5);福建省农业科学院“青年科技英才百人计划”(编号:YC2017-5);中央引导地方科技发展专项(编号:2018L3005);福建省农业科学院科技创新团队建设项目(编号:STIT2017-1-2);国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站项目(编号:CARS-23-G-53)。

作者简介:朱海生(1978—),男,安徽枞阳人,博士,研究员,主要从事蔬菜生物技术与育种方面的研究。E-mail: zhs0246@163.com。

的离心管后加入 600 μL 预热至 65 $^{\circ}\text{C}$ 的 2% CTAB Buffer 和 7 μL β -巯基乙醇,充分混匀后,65 $^{\circ}\text{C}$ 水浴 1 h,期间多次摇匀;室温冷却后三氯甲烷等体积的加入三氯甲烷/异戊醇,混匀静置 10 min,在 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min;取上清液,加入 100 μL 3 mol/L NaAc 和 300 μL 的三氯甲烷/异戊醇充分混匀,离心 10 min;再次取上清液,并加入 0.6 倍体积异丙醇,混匀至能看到白色絮状物,在 12 000 r/min、4 $^{\circ}\text{C}$ 条件下离心 10 min,75% 乙醇洗涤 DNA 2~3 次,风干后的 DNA 溶于 100 μL TE 溶液,加入 2.5 μL RNase A 去除 RNA,保存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 或 -20 $^{\circ}\text{C}$ 备用。

1.3 普通丝瓜杂交种丝盛 2 号纯度鉴定 SSR 特异引物的筛选

以丝盛 2 号杂交种及其父母本为模板,利用“1.1”节筛选的引物,进行 PCR 扩增,筛选能区分丝盛 2 号杂交种及其父母本的特异性引物。

PCR 扩增时采用的反应体系:75 ng 基因组 DNA 1 μL ,0.2 mmol/L dNTP 1 μL ,500 u *Taq* DNA 聚合酶 0.3 μL ,0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的引物各 1 μL ,2.5 μL 10 \times Buffer,加入灭菌的超纯水至 25 μL 。PCR 扩增程序:先在 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;接下来 35 个循环,每个循环包括 94 $^{\circ}\text{C}$ 下变性 30 s,56 $^{\circ}\text{C}$ 下退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 30 min;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 下延伸 7 min,反应结束后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 扩增产物电泳分离后观察拍照分析。

1.4 普通丝瓜杂交种丝盛 2 号纯度鉴定

随机抽取丝盛 2 号杂交种,利用筛选出来的 SSR 特异引物进行鉴定,结合田间种植鉴定结果,验证利用 SSR 分子标记鉴定种子纯度的准确性。只有同时具有亲本特异性条带的单株才为真正的杂交种,缺少其中的任意一条带记为假杂种,计算种子纯度。

2 结果与分析

2.1 普通丝瓜 DNA 提取与鉴定

应用改良后 CTAB 法提取的 DNA,通过浓度为 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测,结果表明:DNA 条带清晰,拖带现象不明显,带形集中。 $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 值在 1.8~2.0 之间,表示所提取的 DNA 杂质含量少,纯度较高,适合于做进一步研究(图 1)。

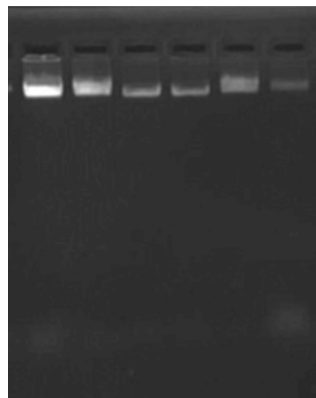


图1 DNA 电泳图谱

2.2 普通丝瓜 SSR 分子标记数据来源与筛选

普通丝瓜转录组经组装后共获得 58 073 条 Unigene,利用 MISA 工具进行搜索,其中 6 916 条 Unigene 序列中含有 7 478 个 SSR 位点。对含 SSR 位点的 6 916 条 Unigene 序列利用 Primer 3.0 设计引物,共设计出 SSR 引物 7 563 对。选取长度在 20 bp 以上的 SSR 序列,合成长度 18~25 bp、扩增产物长度 100~280 bp 的引物 150 对,进行 SSR-PCR 扩增有效性检测。SSR-PCR 扩增结果表明,106 对 SSR 引物实现有效扩增,且带型清晰、重复性好(图 2)。

2.3 SSR 特异引物筛选

利用筛选出的 106 对有效扩增 SSR 引物对丝盛 2 号杂交种及其父母本进行 PCR 扩增及特异引物筛选。筛选到共显性标记的引物 SGSSR 4

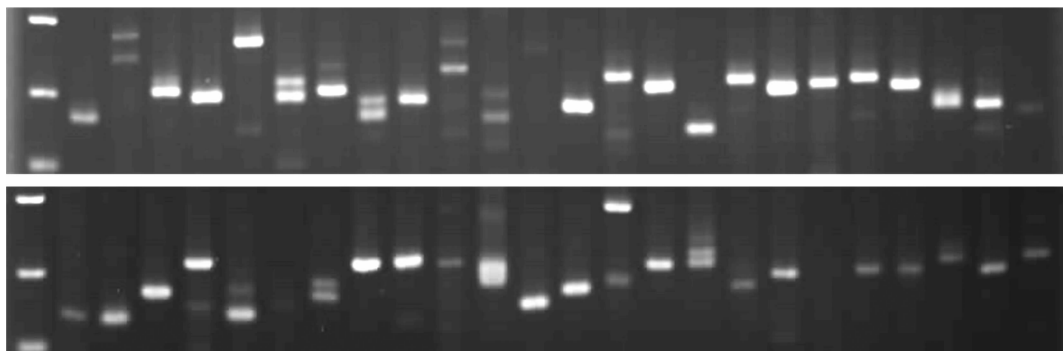
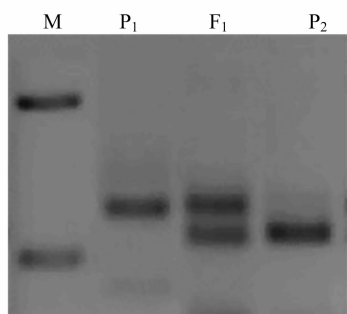
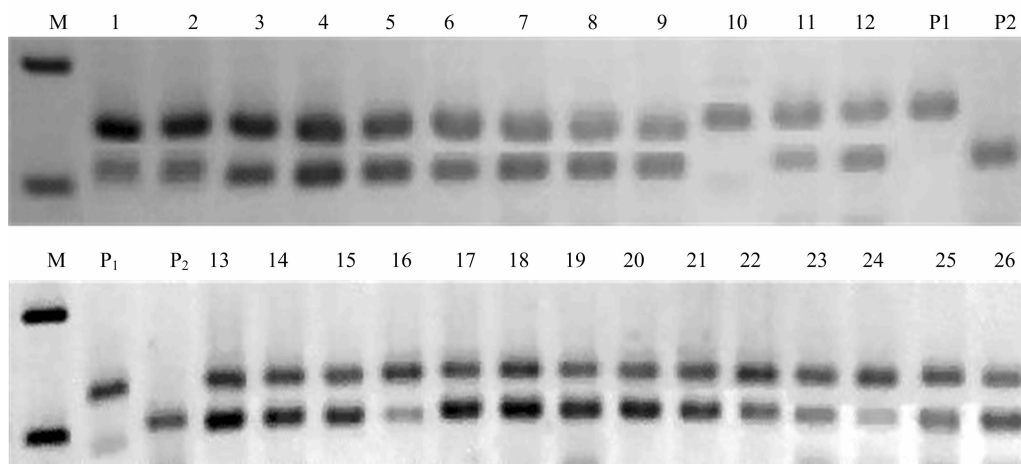


图2 引物有效性扩增验证

(SGSSR4 - F: 5' - AGGGGTTAGTCGACCGATTT - 3'; SGSSR4 - R: 5' - TGCTTGCCACTTGAAGAAAC - 3')。引物 SGSSR4 能同时产生父本和母本特异性标记,并在丝盛 2 号杂交种中扩增出互补条带(图 3),表明该对引物可用于丝盛 2 号种子纯度的检测。



M—marker; P₁—父本; P₂—母本; F₁—杂交种
图3 特异引物 SGSSR25 筛选



M—marker; P₁—父本; P₂—母本; 1~26—抽样丝瓜杂交种

图4 SSR 引物 SGSSR25 对丝盛 2 号群体的验证结果

大量开发 SSR 标记仍是目前普通丝瓜研究的重要工作之一。本研究利用普通丝瓜转录组测序获得的 SSR 标记,筛选出能有效扩增,且带型清晰、重复性好的 SSR 引物,为后期普通丝瓜杂交种子纯度鉴定提供了参考。

鉴于采用传统的田间性状鉴定技术鉴定种子纯度周期长、成本高、工作量大,且以播种后植株的田间形态观察为依据,易受外界环境和检测人员水平等因素影响,导致结果存在偏差^[11]。SSR 分子标记技术直接反映不同品种的遗传基础差异,为植物品种种子纯度鉴定提供了一种更准确、快速、简便、高效的方法。SSR 标记数量多,具有很高多态性,带型易于区分判断,能区分纯合基因型和杂合基因型,是一项很有潜力的技术,在黄瓜^[12]、青花菜^[13]、

2.3 杂交种纯度鉴定

从田间随机选取 26 株丝盛 2 号普通丝瓜,利用筛选得到的特异性引物对 SGSSR4 进行纯度检测,PCR 扩增结果表明,25 株能清晰地扩增出与亲本互补的条带,扩增出父本特异条带各 1 株(图 4),种子纯度为 96.15%,与田间检测结果一致。

3 讨论与结论

近些年随着分子标记技术的深入研究,使得分子标记技术成为鉴定普通丝瓜种子纯度的快速、准确的方法。基于转录组的 SSR 分子标记较一般的分子标记具有信息量大、通用性好、在基因组序列中分布广泛等优势,在杂交种的鉴定和种子纯度检测方面具有很大优越性,已在多种植物中广泛应用^[9-10]。现有的普通丝瓜 SSR 分子标记数量有限,

甘蓝^[14]等蔬菜中都有相关报道,但是利用 SSR 分子标记技术鉴定品种种子纯度时,前提条件是能够准确筛选出能在双亲中清晰、特异扩增的条带。本研究从 106 对引物中筛选出 1 条特异性强的引物 SGSSR4,引物 SGSSR4 能同时产生父本和母本特异性标记,可将普通丝瓜杂交种子与其父母本区分开来,快速检测出杂交种子的纯度,具有准确、低成本、操作方便等优势,能够代替传统杂交种子纯度鉴定的方法,具有较高的商业应用价值,为普通丝瓜种子质量控制和纯度鉴定提供了参考依据。

参考文献:

- [1] Xu Y, Liu Z, Lou L, et al. Identification of browning - related microRNAs and their targets reveals complex miRNA - mediated

陈 军,周 平,王朝海,等. 马铃薯糖转运蛋白系统进化关系分析和顺式调控元件鉴定[J]. 江苏农业科学,2020,48(8):56-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.08.010

马铃薯糖转运蛋白系统进化关系分析和顺式调控元件鉴定

陈 军,周 平,王朝海,陆 燚,梁振娟,王宗明,吴 显,李晓川

(贵州省毕节市农业科学研究所,贵州毕节 551700)

摘要:利用 Clustal 和 MEGA 6 程序进行序列分析,建立了 54 个马铃薯糖转运子之间以及它们与其他物种中的同源蛋白的进化关系。利用 PLACE 程序鉴定了 42 个糖转运子的顺式调控元件。此研究结果有利于对马铃薯糖转运子加深理解,从而挑选出提高马铃薯经济性的位点。

关键词:马铃薯;糖转运子;基因组;系统进化关系;顺式调控元件

中图分类号: S532.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)08-0056-07

在先前的研究中,通过序列比对在马铃薯基因组中共鉴定出了 54 个糖转运蛋白基因^[1],它们分别归属于 8 个基因家族,包括蔗糖转运蛋白(SUC 或

SUT)家族、糖转运蛋白(STP)家族、糖促进蛋白(SFP)家族、多元醇/单糖转运蛋白(PMT)家族、肌醇转运蛋白(INT)家族、质体葡萄糖转运蛋白(pGlcT)家族、液泡单糖转运蛋白(TMT)家族、液泡葡萄糖转运蛋白(VGT)家族。在本研究中,使用系统进化分析的方法,在每个家族内,将马铃薯与其他植物的糖转运子进行了对比进化关系的分析。同时,为了研究调控糖转运子基因的信号传导,也调查了它们的启动子序列,分析了位于启动子中的顺式调控元件。

收稿日期:2019-03-25

基金项目:贵州省科技计划(编号:黔科合基础[2019]1002)、黔科合基础[2016]1003);现代农业产业技术体系建设专项(编号:CARS-10-ES23)。

作者简介:陈 军(1971—),男,研究实习员,研究方向为马铃薯遗传育种。E-mail:jevenlee111@aliyun.com。

通信作者:李晓川,博士,研究实习员,研究方向为马铃薯遗传育种。E-mail:475383510@qq.com。

- browning regulatory networks in *Luffa cylindrica* [J]. Scientific Reports, 2018, 8(1):16242.
- [2] An J, Yin M, Zhang Q, et al. Genome survey sequencing of *Luffa cylindrica* L. and microsatellite high resolution melting (SSR-HRM) analysis for genetic relationship of *Luffa* genotypes [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2017, 18(9):1942.
- [3] 朱海生,刘建汀,陈敏氢,等. 丝瓜铜锌超氧化物歧化酶 Cu/Zn-SOD 基因家族的克隆与表达分析[J]. 中国农业科学, 2017, 50(17):3386-3399.
- [4] Kalia R K, Rai M K, Kalia S, et al. Microsatellite markers: an overview of the recent progress in plants [J]. Euphytica, 2011, 177(3):309-334.
- [5] Birendra, Kumar, Umesh, et al. Identification of EST-SSRs and molecular diversity analysis in *Mentha piperita* [J]. The Crop Journal, 2015, 3(4):335-342.
- [6] 李 丽,张万清,刘 玲,等. SSR 标记对甜瓜品种纯度和真实性的鉴定[J]. 分子植物育种, 2015, 13(11):2522-2530.
- [7] 石星星,纪小红,张 磊,等. 利用 SSR 标记鉴定结球甘蓝杂交

- 种真实性及纯度[J]. 分子植物育种, 2015, 13(2):331-337.
- [8] 叶新如,朱海生,温庆放,等. 丝瓜 SRAP 反应体系的建立与优化 [J]. 分子植物育种, 2016, 14(3):673-678.
- [9] 李海梅,沈 佳,赵 娟,等. 黄瓜线粒体基因组 SSR 标记开发及其在种子纯度鉴定中的应用[J]. 南京农业大学学报, 2015, 38(5):764-771.
- [10] 周志成,王惠林,王贤磊,等. SSR 标记鉴定甜瓜品种‘红月亮’种子纯度[J]. 中国瓜菜, 2014, 27(1):21-24.
- [11] 李 阳,范梦伟,季晓坤,等. 利用 SSR 技术鉴定玉米杂交种“家佳荣 2 号”的种子纯度[J]. 西南农业学报, 2018, 31(7):1349-1354.
- [12] 崔兴华,韩毅科,杜胜利,等. 黄瓜新品种‘津优 401’种子纯度的 SSR 鉴定[J]. 中国瓜菜, 2015, 28(3):38-39, 45.
- [13] 江汉民,文正华,刘莉莉,等. SSR 分子标记鉴定青花菜杂交种‘津青一号’的纯度[J]. 天津农业科学, 2016, 22(12):57-59, 63.
- [14] 陈 琛,庄 木,李康宁,等. 甘蓝 EST-SSR 标记的开发与应用[J]. 园艺学报, 2010, 37(2):221-228.