

利用 SSR 技术对黄瓜新品种津优 35 号进行种子纯度鉴定

张桂华, 李家旺, 张文珠, 李愚鹤

(天津科润农业科技股份有限公司 黄瓜研究所 天津 300192)

摘 要:利用天津科润公司建立并优化了的黄瓜种子纯度鉴定技术体系,筛选黄瓜新品种津优 35 号特异分子标记。试验选用 80 多对 SSR 引物中,有 2 对引物(85 号和 212 号)在杂交种和亲本间表现多态性,杂交种条带为父母本的互补型,且特异性强,适合做杂交种纯度鉴定。用这 2 对引物对津优 35 号 50 粒种子进行了 SSR 鉴定。结果表明:这 2 对引物鉴定结果相同,且与田间鉴定结果吻合率高达 96% 以上,表明所筛选到的 2 个 SSR 标记可以作为津优 35 的特异分子标记用于其种子纯度的鉴定。

关键词:津优 35 号;纯度;SSR

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)12-0140-02

种子纯度鉴定是保证种子质量的关键环节。田间纯度鉴定一直是各育种单位采用的方法,但是田间种子纯度鉴定需要等到结瓜期才能看到结果,周期长、工作量大;易受环境因素影响,导致表型特征会有一定程度偏差;或者由于不可抗拒的自然因素,如连阴雨或冰雹等恶劣天气,导致观察不到结果。以上种种不足都直接影响到了种子的及时推广和销售,造成种子积压。

分子标记技术的快速发展为种子的纯度鉴定提供

了一种更为快速、高效的方法^[1-4]。天津科润公司近几年来一直致力于建立利用分子标记技术进行种子纯度鉴定的技术体系研究,现取得了很好的效果^[5]。自 2007 年开始,利用成熟的分子标记技术对大量的不同黄瓜品种进行了纯度检测,纯度检测结果与田间纯度鉴定的结果吻合率高达 90% 以上,为新品种的及时推广与销售赢得了时间,提高了效率。试验以天津科润农业科技股份有限公司黄瓜研究所培育的黄瓜新品种津优 35 号及其亲本为试材,进行特异引物的筛选研究,以期对津优 35 号新品种种子纯度的鉴定提供快速高效的鉴定方法。

1 材料与方法

1.1 供试材料

黄瓜新品种“津优 35”及其亲本。

1.2 种子基因组 DNA 提取

第一作者简介:张桂华(1972-),女,博士,现从事黄瓜分子标记辅助育种研究工作。

基金项目:天津市农业科技成果转化与推广资助项目(0802160);天津市应用基础研究计划资助项目(07JCYBJC12200)。

收稿日期:2010-04-16

The Establishment of Tissue Culture of Submerged Plant *Potamogeton Crispus* L.

CHEN Bo¹, HAO Wen-tao²

(1. Liuzhou Vocational Technical College, Liuzhou, Guangxi 545006; 2. School of Environment Science and Technology, Tianjin University, Tianjin 300072)

Abstract: It is very important to restoration and phytoremediation of aquatic plants that tissue culture of *Potamogeton Crispus* L. was established. The experimental results showed that the optimal way to sterilization for tissue culture of *Potamogeton Crispus* L. was 3% H₂O₂ (30 min) with sterile water washing 3 times, 5% ethanol and 1.0% NaClO (15 ~ 20 min), and the optimal medium was mother liquor I 25%, IBA 2.0 mg/L and Sucrose 2%. The experiments also showed the results that liquid medium was advantageous to proliferation culture, and the growth speed of adventitious bud of *Potamogeton Crispus* L. was faster than that of solid medium.

Key words: *Potamogeton Crispus* L.; tissue culture; system

采用催芽 48 h 的黄瓜根尖部分,进行种子基因组 DNA 的提取,在王全等^[5]采用的提取方法的基础上稍作改动。取单粒黄瓜发芽种子的根尖,放到 1.5 mL 离心管中,加入 200 μ L CTAB 提取液,研磨机研碎,倒置混匀后,65℃水浴 10 min;加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分倒置混匀,于 12 000 r/min 离心 5 min;取上清液,加入 2/3 倍体积异丙醇混匀(轻轻倒转),于常温下放置 5 min,8 000 r/min 离心 5 min;弃上清液,倒置吸干后,加入适量 1×TE,置于-20℃冰箱中保存。

1.3 黄瓜新品种津优 35 特异谱带的筛选

以津优 35 号及其亲本的基因组 DNA 为模板,采用以下反应体系和 PCR 程序进行 PCR 扩增。SSR 反应总体系为 10 μ L,包括:1×buffer、dNTP(2 mmol)、Primer(150 ng)、DNA(30 ng)、*Taq* 酶(0.5 U)。PCR 反应程序:94℃ 3 min,1 个循环;94℃ 30 s,55℃ 30 s,72℃ 60 s,30 个循环;72℃ 7 min。扩增结束后,采用 5%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。杂交带型为父母本互补型的引物入选。

1.4 特异谱带的验证

用入选的引物对 50 粒津优 35 号种子进行 SSR 鉴定,比较分子标记方法与田间鉴定方法的可靠性,并利用筛选到的特异分子标记进行种子纯度鉴定。

2 结果与分析

2.1 黄瓜新品种津优 35 特异谱带的筛选

利用 SSR 技术对黄瓜新品种津优 35 号及其亲本进行了特异分子标记分析。共利用 80 多对 SSR 引物进行了 PCR 扩增,有 7 对 SSR 引物在双亲及杂种后代中表现共显性分离,即杂种后代的带型为父母本的互补型,其中 85 号引物(图 1)和 212 号引物(图 2)带型清晰,且特异性强,可以用来进行杂交种子的纯度鉴定。

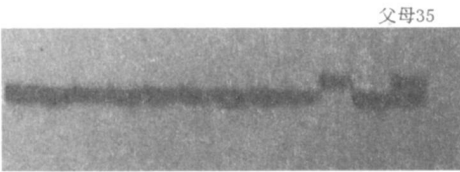


图 1 津优 35 号的特异引物 85

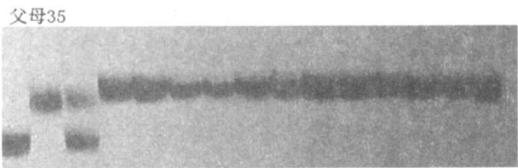


图 2 津优 35 号的特异引物 212

2.2 特异谱带的验证

用以上入选的 2 对引物对 50 粒津优 35 号种子进

行了 SSR 鉴定,结果显示,分子标记方法与田间鉴定方法可靠性都在 96%以上(表 1)。

表 1 分子标记鉴定与田间纯度鉴定比较

特异标记	分子标记纯度结果/%	田间纯度结果/%
85 号引物	98	96
212 号引物	96	

2.3 黄瓜新品种津优 35 种子纯度鉴定

自 2008 年开始,采用分子标记技术对黄瓜新品种津优 35 号进行大规模室内纯度鉴定,2 a 共对 30 000 kg 津优 35 号新品种的种子进行了纯度检测,与田间检测

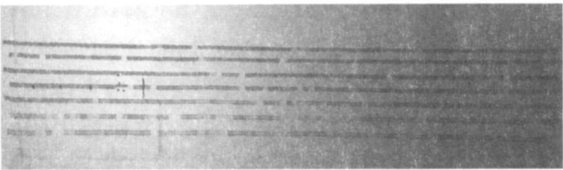


图 3 黄瓜新品种津优 35 号种子纯度的大规模鉴定
相比,检测效率大大提高,也大大节省了时间和成本。图 3 为津优 35 号种子纯度检测的图片。

3 讨论

通过对 50 粒津优 35 号种子的田间鉴定和分子鉴定进行比较分析,认为分子鉴定与田间鉴定纯度有很好的-一致性,鉴定结果从统计上没有明显差异,可以用 SSR 标记鉴定来代替田间纯度鉴定,从而克服田间鉴定周期长、易受环境条件的影响等缺点。

天津科润黄瓜研究所已连续 3 a 采用 SSR 技术进行种子纯度鉴定,鉴定结果准确,效率高。该研究在此基础上,对鉴定技术体系进行了不断优化。引进了研磨机,一次研磨(30 s)可以同时研磨 45 个样品,原来人工研磨 1 个样品就需要 15 s 左右,效率是原来的 20 多倍;对 PCR 反应程序进行了优化,在不影响扩增效果的前提下,减少了 PCR 反应的循环数,将循环数由原来的 35 个减少到 30 个,这样一次 PCR 可以缩短时间至少 21 min;电泳过程的优化,由于筛选到的标记带型清晰,没有杂带干扰,在一块 PAGE 胶上点样 10 批次,每个批次 100 个样品,这样一块 PAGE 胶点样容量为 1 000 个样品。不仅节省了时间,而且降低了成本。

参考文献

[1] 刘静,董振生,李红兵. 白杂 1 号种子纯度的 RAPD 鉴定技术研究[J]. 西北农业学报,2007,16(1):131-135.
[2] 刘之熙,陈祖武,朱克永,等. 利用 SSR 分子标记快速鉴定杂交水稻种子纯度技术体系的优化[J]. 杂交水稻,2008,23(1):60-63.
[3] 李菊芬,许玲,马国斌. 应用 SSR 分子标记鉴定甜瓜杂交种纯度[J]. 农业生物技术学报,2008,16(3):494-500.
[4] Yashitola J, Thirumurugan T, Sundaram, et al. Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers [J]. Crop Science, 2002, 42 (4):1369-1373.
[5] 王全,张桂华,苗伟利. 应用 SSR 技术进行黄瓜杂交种种子纯度鉴定[J]. 长江蔬菜,2009(7):43-44.