

EST-SSR 标记在黄瓜 F_1 种子纯度鉴定中的应用

卢 锐, 叶永亮, 冯国军

(哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘 要:以黄瓜杂交品种哈研 808 及其亲本为试验材料, 利用 102 对 EST-SSR 引物对其进行纯度分析, 筛选合适的引物。结果表明: 有 2 对 EST-SSR 引物能够用于黄瓜杂交种子纯度的鉴定。

关键词:黄瓜; 种子; 纯度鉴定; EST-SSR 分子标记

中图分类号:S 642.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)18-0136-03

种子纯度是种子质量的核心指标, 是种子质量分级的主要标准。由于制种过程中母本自交和姊妹交形成的假杂种以及不法分子出售假种子, 经常给黄瓜生产及农民经济收入造成重大损失。目前应用于黄瓜种子纯度鉴定的方法主要有: 种子形态鉴定、同工酶鉴定、田间小区种植鉴定、DNA 分子标记鉴定。

不同黄瓜品种种子形态差异有限, 而同工酶法是鉴别不同品种基因表达产物蛋白质之间的差异, 多态性不够丰富, 且有组织和器官特异性, 使取材受到严格限制, 从而限制了其应用^[1]。田间小区种植因鉴定周期长, 易受环境影响, 因而不能完全满足生产经营的需要。而 DNA 分子标记反映了 DNA 水平上生物个体间的遗传差异, 具有数量丰富、多态性高、不受环境影响、检测快速等优点而逐渐得到应用。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^[2-5], 其中 SSR 标记技术是最为简便、可靠的鉴定方法之一。

SSR 标记由于具有数量丰富、多态性高、遗传上呈共显性、实验操作简单、结果稳定可靠、引物序列易交流等优点, 已成为杂交种子纯度鉴定的一种理想分子标记。EST-SSR 标记是基于表达序列标签数据信息, 并结合 SSR 标记特点开发出的一种新型分子标记。具有 SSR 标记的优点, 但因引物设计是依据 EST 数据库进行的, 因而比 SSR 标记更加简单、快捷, 花费少。Kazair^[6]等用 SSR 研究了不同葫芦科蔬菜品系的多态性, 7 个 SSR 对 11 个黄瓜品种进行扩增, 有 4 个 SSR 显示出多态性, 并得出 11 个黄瓜品种间遗传多样性值在 0.18~

0.64 之间, 证实了 SSR 在黄瓜中存在较高的多态性。Yu^[7]等将 58 个通用多态性引物用于比较作图, 产生的 131 个 EST-SSR 位点被定位到水稻图谱上, 并将其与已发表的 EST-SSR 位点做了比对。

该试验以哈研 808 黄瓜品种及其亲本为试材, 研究 EST-SSR 技术在黄瓜种子纯度鉴定过程中的方法、步骤, 筛选其特异谱带, 并以该谱带作为分子标记对其纯度进行鉴定。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为哈研 808 号及其亲本, 由哈尔滨市农业科学院蔬菜花卉分院提供。

1.2 试验方法

1.2.1 EST-SSR 引物的开发 利用 GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/index.html>) 上的黄瓜 EST 或 cDNA 序列, 通过 SSRIT (<http://www.gramme.org/granene/searches/ssrtool>) 在线搜索具有 SSR 序列的 EST 序列。根据侧翼保守序列, 应用引物设计软件 Primer Premier 5.0, Oligo6 设计合成引物^[8-9]。引物设计原则为: EST 序列长度大于 100 bp; 引物长度为 18~25 bp; GC 含量 40%~60%; PCR 扩增产物长度为 100~300 bp。同时, 避免错配、引物二聚体或发夹结构的形成^[10]。共设计 102 对 EST-SSR 引物, 引物由上海生工合成。

1.2.2 黄瓜基因组 DNA 提取 利用 SDS 法提取黄瓜叶片基因组 DNA。称取黄瓜叶片于预冷的研钵中, 加入液氮研磨成粉末, 转移至 -20℃ 预冷的 1.5 mL 离心管内, 然后加入 800 μ L 经 65℃ 预热的 SDS 提取缓冲液, 65℃ 水浴 30 min; 水浴后立即置冰上, 加入 150 μ L 5 mol/L KAc, 冰浴 20 min, 4℃, 12 000 r/min 离心 20 min, 取上清液; 加入等体积酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1), 震荡 5 min 后, 4℃ 12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液; 加入等体积氯仿: 异戊醇 (24: 1), 震荡 5 min

第一作者简介: 卢锐 (1982-), 女, 在读硕士, 现从事黄瓜杂交种子纯度鉴定的研究工作。E-mail: hnqk528@163.com。

通讯作者: 冯国军 (1966-), 男, 研究员, 现从事蔬菜育种研究工作。E-mail: feng998@126.com。

收稿日期: 2010-06-09

后,4℃ 12 000 r/min,离心 10 min,取上清液;加入经-20℃ 预冷的等体积异丙醇,-20℃ 放置 30 min,4℃ 12 000 r/min,离心 10 min,弃上清液;用 500 μ L 预冷的 70%乙醇洗涤沉淀,弃 70%乙醇,于通风柜中吹干,加入 50 μ L 超纯水,溶解沉淀,加入 RNase(1 mg/mL)2.5 μ L,37℃ 消化 1 h,-20℃ 保存备用。

1.2.3 哈研 808 号黄瓜特异谱带筛选 以哈研 808 号及其亲本基因组 DNA 为模板,采用以下反应体系和 PCR 程序进行扩增。SSR 反应总体系 25 μ L,包括:2.5 μ L 10 \times PCR buffer,2 μ L dNTP,0.25 μ L forward-Primer,0.25 μ L reward-Primer,2 μ L templet,0.25 μ L Taq enzyme。PCR 反应程序:94℃,5 min,1 cycle;94℃ 30 s,X℃ 30 s,72℃ 30 s,40 个 cycles;72℃ 10 min,1 cycle。X 为不同 SSR 引物的退火温度。扩增结束后,用 6%聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离,染色后杂交种带型为父母本互补带型的引物入选。

1.2.4 特异谱带的验证 随机抽取哈研 808 品种 20 株、父母本材料各 10 株,3 次重复。提取材料基因组 DNA,用筛选出的引物对其进行 SSR 鉴定,比较分子标记方法与田间鉴定方法的可靠性。

2 结果与分析

2.1 黄瓜叶片基因组 DNA 提取方法

利用 SDS 方法提取到了 DNA,琼脂糖检测发现,所提取的 DNA 带型整齐,没有降解。进一步用该方法提取到的 DNA 进行 SSR 扩增的时候,能扩增出条带,条带清晰,具有多态性(图 1)。

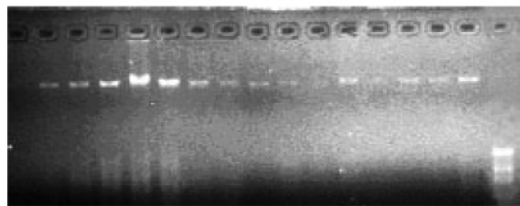


图 1 部分样本基因组 DNA 电泳图

2.2 特异谱带的筛选

利用 SSR 技术对哈尔滨市农业科学院黄瓜哈研 808 号及其亲本进行了特异分子标记分析,共利用 102 对 EST-SSR 引物进行了 PCR 扩增,其中有 2 对 EST-SSR 引物(76 号和 81 号引物)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,可以用来进行杂交种子的纯度鉴定。可用于杂种纯度鉴定的图谱如图 2 所示。

2.3 利用筛选到的引物进行大规模种子纯度鉴定

用 2 对 EST-SSR 引物对哈研 808 进行种子纯度鉴定的重复试验,每次重复取父本和母本各 10 粒种子,哈研 808 取 20 粒种子,进行种植,3 次重复。

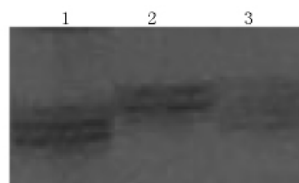


图 2 用作杂种纯度鉴定

注:1 为父本,2 为母本,3 为哈研 808。

2.3.1 76 号引物鉴定哈研 808 纯度的验证 用 76 号引物 SSR 扩增哈研 808 及其亲本材料的 DNA 样品,进行重复试验,验证 76 号引物鉴定哈研 808 纯度的可行性,试验结果如图 3~5 所示,图中 1~10 为哈研 808 父本 302,10~30 为哈研 808,30~40 为哈研 808 母本 220。3 次重复试验的结果表明,76 号引物 SSR 扩增后的电泳谱带中,哈研 808 的条带为父本、母本的互补带,因此 76 号引物可以用于哈研 808 杂种纯度鉴定。

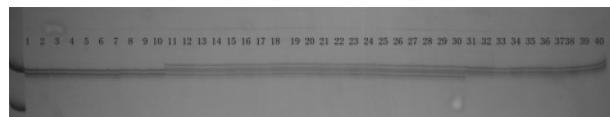


图 3 76 号引物扩增哈研 808 及其亲本

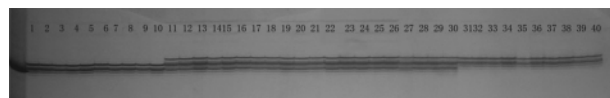


图 4 76 号引物扩增哈研 808 及其亲本

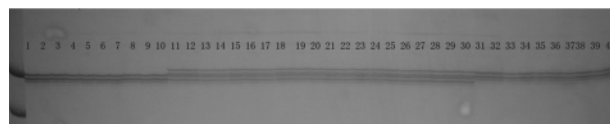


图 5 76 号引物扩增哈研 808 及其亲本

2.3.2 81 号引物鉴定哈研 808 纯度的验证 用 81 号引物 SSR 扩增哈研 808 及其亲本材料的 DNA 样品,验证 76 号引物鉴定哈研 808 纯度的可行性,试验结果如图 6~8 所示,图中 1~10 为哈研 808 父本 302,10~30 为哈研 808,30~40 为哈研 808 母本 220。3 次重复试验结果表明,81 号引物 SSR 扩增后的电泳谱带中,哈研 808 的条带为父本、母本的互补带,因此 81 号引物可以用于哈研 808 杂种纯度鉴定。研究结果表明,76 号和 81 号引物能用于哈研 808 及其亲本纯度鉴定,将 EST-SSR 鉴定结果与田间种植结果相比较,表明 EST-SSR 分子标记对纯度的检验与田间鉴定方法相一致,EST-SSR 标记可用于种子纯度鉴定的研究和运用,结果可靠。

3 讨论

该研究通过搜索黄瓜 EST 序列进行引物设计,大

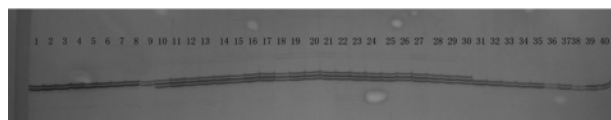


图6 81号引物扩增哈研808及其亲本

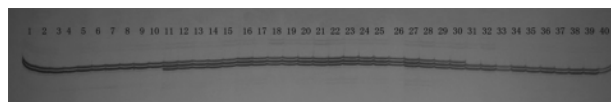


图7 81号引物扩增哈研808及其亲本

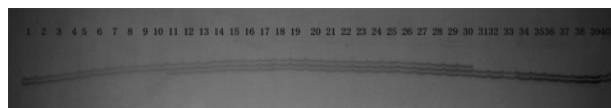


图8 81号引物扩增哈研808及其亲本

大节省了引物设计成本和时间。引物是根据已知序列两侧的序列设计的特异引物,具有很强的专一性,SSR扩增结果经聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分析,PAGE电泳具有很高的灵敏度,即使1 bp的差异也能在银染结果中显示出来。能用于种子纯度鉴定的 F_1 条带应是父母本的互补带,且三者的带型均不相同。

结果表明,76号和81号EST-SSR引物扩增后的父本和母本带的互补带是哈研808的带型,可以用于其纯度鉴定。因为哈研808母本是欧洲温室型黄瓜,父本是亚洲型密刺黄瓜,二者亲缘关系较远,容易找到合适的引物鉴定其纯度。在田间鉴定中,通过观察结果期瓜刺瘤的有无可以直接鉴定哈研808纯度,母本无刺瘤,哈研808有稀刺瘤。

该研究还对60粒哈研808种子的田间鉴定和分子鉴定进行比较分析,认为在对种子进行纯度鉴定时,分子鉴定与田间鉴定纯度有较好的一致性,鉴定结果没有明显差异。而用EST-SSR标记鉴定纯度更加简单、快捷,可克服田间鉴定周期长、易受环境条件影响等缺点。

Application of EST-SSR Markers in F_1 Hybrid Seed Purity Identification of Cucumber

LU Rui, YE Yong-liang, FENG Guo-jun

(Harbin Academy of Agricultural Science, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: In order to find a more convenient methods to identify cucumber hybrid seed purity, this research used cucumber hybrids Hayan 808 and its parents as materials, 102 pairs of EST-SSR primers were used for purity analysis to select appropriate primers. The results showed that there are two pairs of EST-SSR primers can be used for cucumber hybrid seed purity identification.

Key words: cucumber; seed purity identification; EST-SSR markers

SSR标记的主要特点有,数量相对丰富,对基因组有很好的覆盖性;具有较多的等位性变异,多态性高;共显性标记,可鉴别出杂合子和纯合子;试验重复性好,结果可靠,且容易用PCR检测。引物设计是SSR标记技术的关键,EST开发的分子标记具有信息量较高,通用性好,开发简单、快捷等优点,还避免了基因组SSR开发过程中需要构建基因组DNA文库等繁琐步骤。EST数据库提供了不同物种的大量EST序列,可供免费下载,又有很多软件可用来直接从EST中快捷的筛选出候选标记,因此,开发的费用很低。

EST-SSR技术结合了SSR标记和EST技术的优点,目前已经在植物基因组学研究如遗传图谱构建、比较作图、亲缘关系鉴定、遗传多样性评价、种质鉴定、系统发育与进化研究等方面被广泛应用,具有广阔的应用前景。

参考文献

- [1] 纪颖彪,朱其杰.同工酶在黄瓜杂种一代纯度检测上的应用研究[J].园艺学报,1995,22(3):251-255.
- [2] 方宣钧,吴为人,唐纪良.江树业品种纯度和真伪的DNA分子标记及其应用[M].北京:科学出版社,2000:31-90.
- [3] 戚华雄, Yang S L, Wang B, 等.用PCR技术鉴定杂交水稻种子[J].湖北农业科学,1999(1):212-214.
- [4] 郑成超,温淳江. DNA分子标记技术与作物品种纯度鉴定[J].山东农业大学学报,1997,28(4):499-505.
- [5] Yashitola J, Thirnmrnrgan T, Snndaram, et al. Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers [J]. Crop Scicnc, 2002, 42(4):1369-1373.
- [6] Katzir N. Length polymorphism and homologies of microsatellites in several Cucurbitaceae species [J]. Theor Appl Gent, 1996, 93(8):1282-1290.
- [7] Yu J K, LaRota M, Kantety R V, et al. EST derived SSR markers for comparative mapping in wheat and rice[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2004, 271(6):742-751.
- [8] 汤继凤,曹永生,高丽锋,等.用生物信息学技术构建cSSR分子标记开发体系[J].中国农业科学,2004,37(3):328-332.
- [9] 张新宇,高燕宁. PCR引物设计及软件使用技巧[J]. 生物信息学, 2004(4):15-18.
- [10] 任亮,朱宝芹,张轶博,等.利用软件Primer Premier 5.0进行PCR引物设计的研究[J].锦州医学院学报,2004,25(6):43-46.