

SSR 分子标记对菜豆品种鉴定的研究

田 甜, 冯国军, 盛 慧, 刘大军, 赵春梅, 王 杰

(哈尔滨市农业科学院, 黑龙江 哈尔滨 150070)

摘 要:以“将军”和“太空将军”2个近似的菜豆品种为试材, 利用 SSR 引物进行品种鉴定, 以筛选分析品种鉴定所需要的引物, 为菜豆种质资源的保存、品种的纯度鉴别提供理论依据。通过对 65 对 SSR 引物进行筛选, 筛选出 3 对作为鉴定上述品种的特异性引物。结果表明: 利用 PM1040、PM1050、PM1065 3 对 SSR 引物可以对上述 2 个品种的随机或混合样品进行快速、准确的品种鉴定。

关键词:菜豆; SSR; 品种鉴定

中图分类号:S 643. 103. 7 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0111-03

作物品种纯度鉴定是农业生产、作物育种和种子检测的重要内容, 也是保护新品种, 防止假冒伪劣品种进入市场, 维护农民利益的重要手段。传统的田间种子鉴定费时、费力、成本高, 且易受环境因素影响, 导致表型特征会有一定程度的偏差。“将军”油豆是哈尔滨市农业科学院蔬菜花卉分院经人工杂交后采用系统选育方法育成的品种, “太空将军”油豆角是通过搭载卫星的“将军”油豆种子经过 5 a 精心选育获得的品种。2 个品种的种子外观相近(图 1), 田间的区分度小(图 2), 差异不明显, 传统的种子鉴定方法很难将二者区分开。

分子标记技术的快速发展为种子鉴定提供了快速和高效的方法。在各种 DNA 分子标记中, SSR 分子标记应用于种子鉴定, 具有很多的优越性。SSR 以其共显性遗传, 在群体中常存在大量复等位性, 以及引物在种内或种间的保守性, 重复性高、灵敏度高、稳定性好、操作简单而成为构建遗传图谱、基因定位等的理想工具^[1]。研究集中在“将军”和“太空将军”的品种鉴定上, 只要筛选到能明确区分的共显性 SSR 标记, 1 对引物便足以鉴别真假杂种。但对于菜豆品种纯度的检测, 没有可以参照的标准, 该研究针对菜豆生产和种子检验等实际问题, 研究利用 SSR 快速鉴定菜豆品种的方法。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的 2 个菜豆品种为“将军”、“太空将军”, 由哈

第一作者简介:田甜(1983-), 女, 硕士, 农艺师, 现主要从事菜豆分子育种研究工作。E-mail: tiantian94520@163. com。

责任作者:冯国军(1966-), 男, 博士, 研究员, 现主要从事蔬菜育种研究工作。E-mail: feng998@126. com。

基金项目:国家科技部科技成果转化资助项目(2009GB2B200099)。

收稿日期:2011-11-30

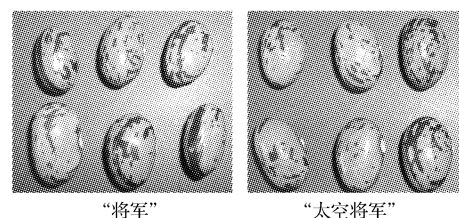


图 1 “将军”和“太空将军”种子形态

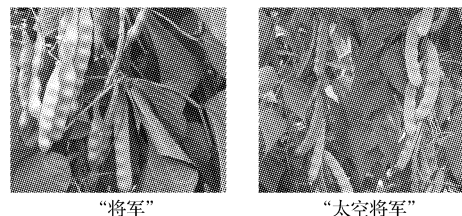


图 2 “将军”和“太空将军”田间形态

尔滨市农业科学院蔬菜花卉分院菜豆育种实验室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 制备 种子分组浸泡 5~10 h 后, 播种于营养钵, 每个品种播 7 个营养钵, 每个营养钵 3 粒, 置于 20~25℃温室, 出苗 10 d 后, 从每份材料的 3 株幼苗上采收刚要展开的嫩叶 1 g 左右, 在液氮中研磨成细粉, 依照 CTAB 法提取基因组总 DNA^[2], 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 紫外灯下观察并且照相。检测后-20℃保存备用。

1.2.2 PCR 扩增和电泳 选引物 65 对, 由北京三博远志生物技术有限公司合成(部分见表 1)。PCR 扩增反应在 PE-9700PCR 扩增仪上进行, 扩增体系 25 μL, 含 DNA 模板 2 μL, 10×buffer 2 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 2.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.25 μL, 10 μmol/L 正、反引物各 0.5 μL, 5 U/μL Taq DNA 聚合酶 0.25 μL, ddH₂O 17 μL。反应程序为 94℃ 模板预变性 5 min; 94℃ 变性

30 s, 49~65℃温度梯度退火 30 s, 72℃延伸 30 s, 40 个循环, 最后 72℃延伸 10 min。取扩增产物 5 μ L, 加 2 μ L 溴酚蓝, 在 2% 琼脂糖胶中以 1×TBE 为电泳缓冲液, 在 80~120 V 电压下电泳 100~120 min, 电泳之后经凝胶成像系统, 紫外灯下观察并照相。根据电泳结果, 将各引物的扩增产物情况进行记录。

表 1 SSR 引物名称与序列

Table 1 Primer used for SSR analysis of *Phaseolus vulgaris* L.

引物名称 Primer code	引物序列 Sequence of primer(5'-3')
PM-1001	GCTCAGTACGAGTTGAATCTCAG ATCTGAGAGCAGGACATGGTAG
PM-1005	TGTCCCTAAGAACGAATATGGAATC GAATCAAGCAACCTTGGATCATAAC
PM-1010	GCAGATCGCTACTACAAAA CGTTGACGAGAAGCATCAAG
PM-1015	GTTGCCACCGGTGATAATCT GTGAGGCAAGAAGCCTTCAA
PM-1020	TTATCACCATCACCAGGTT CCTTCGTGTTTGTGTTGTT
PM-1025	TTGAGGTGACGTAAAGATT TCAACAAGGATGGAGAAGAT
PM-1030	GGAAGACACATGTGAAGAGG CTTCTCTCACTTTCCACTG
PM-1035	TATGTCTACGAGGGTTGAT CCCGTTGAAAAGATCAAGT
PM-1040	CGTTGGTTGGAGCAGCAGC CACAGACACCTCGCGATG
PM-1045	TCTGTGTCATTTAGCACTTAGCAG TTGTTGTTTACTAAGAGCCGTGT
PM-1050	GGTTGGTAGTGTCTTTGCTGAGG CCTTGCTTTAAGCTCAGAACTCG
PM-1055	GCCAAGGTGAACGGTGGTG GAGCGAGAATGGCGGAAGG
PM-1060	GATTCCCTTCTAGCTATGG CTGCTGGACATGAAGATTACAG
PM-1065	GCTGACGTAGGTGACAAAC CGGCTTGTGCTTCAITGTCTG

2 结果与分析

2.1 SSR 分析

通过 65 对 SSR 引物针对 2 份菜豆材料进行扩增筛选, 结果有 42 对引物能够扩增出条带, 占检测引物的 64.61%; 在 42 对引物中, 有 3 对引物能够扩增出清晰条带且具有稳定的多态性, 占检测引物的 4.62%。其它未扩增出条带的引物, 在改变 PCR 反应条件及电泳条件的情况下, 也能够将供试材料全部或部分扩增出条带。

2.2 能区分供试菜豆的引物多态性分析

根据对比分析, 发现 3 对引物 PM1040、PM1050、PM1065 扩增出多态性的条带, 而且各有其特异性。从图 3 中可看出, DNA 片段大小集中在 150~500 bp。PM1065 对“将军”产生 3 条条带, 对“太空将军”产生 1 条条带。PM1050、PM1040 扩增带型的胶像, 也呈现较好的多态性, 扩增出特异性条带 1 条及非特异性条带 2 条, 很容易区分出“将军”和“太空将军”。

综上所述, 3 对引物都可以将“将军”和“太空将军”2 个品种区分开。

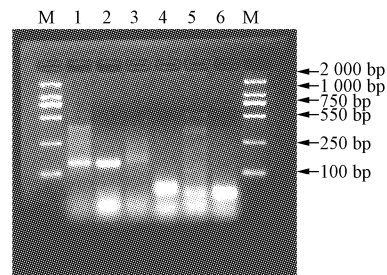


图 3 引物 PM1040、PM1050 和 PM1065 扩增多态性结果

注: 电泳图中泳道 1, 3, 5 是“将军”; 2, 4, 6 是“太空将军”。

Fig. 3 Amplification results of primers PM1040, PM1050 and PM1065

Note: Lane 1, 3, 5 was ‘Jiangujun’ was ‘Taikongjiangujun’ in Electrophoresis figure.

3 结论与讨论

该试验旨在对表观特征相近的“将军”、“太空将军”2 个品种进行鉴定分析, 通过对 2 个优良菜豆品种的鉴定分析结果可以看出, 在进行种子鉴定时, 可以用 SSR 分子标记鉴定来代替田间鉴定, 从而克服田间鉴定周期长、易受环境条件的影响、田间差异小等缺点。该试验从 65 对引物中筛选获得 3 对多态性引物, 可将供试材料鉴别开。

经济的发展需要良好的市场环境秩序, 为了适应经济发展新形势, 菜豆研究与开发的知识产权保护工作尤为重要, 特别是具有广阔应用前景的品种, 更需要产权的保护。因此, 加强和改进品种鉴定工作是形势所需。将先进的分子标记技术应用于菜豆品种鉴定中, 可以有效防止假冒种子充斥市场。“太空将军”是由“将军”搭载第 18 颗返回式卫星后经过系统选育育成的新品种, 它比“将军”油豆成熟期早 3 d 左右, 产量比“将军”油豆增产 10% 以上。市场上有不法经销商以“将军”油豆冒充“太空将军”油豆销售的行为, 由于这 2 个品种的种子外观相似, 植物学性状相似, 区分这 2 个品种有一定困难, 通过该研究的探索有助于鉴定这 2 个相近的菜豆品种, 可为知识产权的保护提供高效的技术检测手段。

该研究选用 SSR 分析标记技术做为“将军”和“太空将军”2 个品种的鉴定手段。由于 SSR 标记多态性丰富, 且目前已有许多现有的 SSR 引物, 因此, 可以直接利用现有的 SSR 引物进行 PCR 扩增, 技术难度低, 成本不高, 是十分理想的品种鉴定的分子标记方法。

该研究采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳 80~100 V 电压电泳, 可以显现出良好的扩增产物带型, 而不需要进行繁杂的聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染过程, 实用性较强。鉴于菜豆 SSR 标记目前已开发出来的 SSR 引物数量有限, 不能够彻底解决菜豆种子鉴定的难题, 尚需对 SSR 引物进行进一步的筛选。

长白山笃斯越桔优良单株组培快繁技术的研究

宗长玲, 宗成文, 赵巍巍, 金炳奎, 曹后男

(延边大学 农学院, 吉林 延吉 133002)

摘 要:以长白山笃斯越桔优良单株的茎尖、茎段为外植体, 对其组培快繁技术进行了研究。结果表明: 笃斯越桔的幼芽分化适宜的启动培养基为 WPM+ZT 2.0 mg/L; 增殖培养基为改良 MS+ZT 0.5 mg/L+IBA 0.15 mg/L, 继代培养 30 d 后的增殖倍数可达 5.3 倍; 适宜的生根培养基为 1/4 改良 MS+IBA 0.5 mg/L, 培养 50 d 后的生根率可达 80%。将笃斯越桔组培苗在纯沙子中练苗 20 d, 将苗移栽至草炭土: 腐殖土为 1:2 的基质中, 组培苗移栽成活率达 78%。

关键词:笃斯越桔; 优良单株; 组织培养; 快速繁殖

中图分类号:S 666.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)04-0113-04

笃斯越桔(*Vaccinium uliginosum* Linn.) 是杜鹃花科常绿小灌木, 主要分布在内蒙古、黑龙江、吉林、辽宁等地^[1-4], 是我国重要的野生浆果资源之一。笃斯越桔浆果酸甜适口, 可生食, 也是制果酒、果醋、果酱、速冻果及提取天然食用色素的良好原料。笃斯越桔还具有一定的药用价值, 其中的总酚和花青素是重要的抗氧化物质, 这种物质对视网膜有特异性功效^[5-8]。由于乱摘乱挖, 笃斯越桔

野生资源遭到极大破坏, 并且有性繁殖发芽率低^[9], 无性繁殖扦插条件要求严格等^[10-11], 使其开发和利用受到极大的限制。现于 2007 年起对长白山笃斯越桔天然群落中的大果型、长势健壮的优良单株进行选择, 拟应用植物组织培养方法对这些宝贵优良野生资源进行快繁, 在保护野生资源的同时, 建立高效、遗传稳定的组培快繁体系, 为今后优良的笃斯越桔保存和大规模推广奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以采自吉林省长白山区笃斯越桔(*Vaccinium uliginosum* Linn.) 为优良单株的休眠枝, 实验室水培 2 周左右获得的茎段、茎尖为材料。

1.2 试验方法

1.2.1 笃斯越桔外植体消毒及初代培养 水培后, 待萌

第一作者简介:宗长玲(1983-), 女, 吉林榆树人, 在读硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail: zongchangling0925@163.com。

责任作者:宗成文(1974-), 男, 博士, 副教授, 现主要从事果树遗传育种与生物技术研究。E-mail: zongchengwen@yahoo.com.cn。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30960231)。

收稿日期:2011-11-29

参考文献

[1] Paglia G P, Olivieri A M, Morgante M. Towards second-generation STS (sequence-tagged sites) linkage maps in conifers: a genetic map of Norway spruce (*Picea abies* K.) [J]. Mol. Gen. Genet, 1998, 258(5): 466-478.

[2] 何光源, 陈明杰, 杨广笑. 植物基因工程实验手册[M]. 北京: 清华大学出版社, 2007.

(该文作者还有李建红, 单位同第一作者。)

Research of SSR Molecular Markers for *Phaseolus vulgaris* L. Variety Identification

TIAN Tian, FENG Guo-jun, SHENG Hui, LIU Da-jun, ZHAO Chun-mei, WANG Jie, LI Jian-hong
(Harbin Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150070)

Abstract: In order to determine the number of SSR primers that used in the identification of varieties of *Phaseolus vulgaris* L. cultivars, taking two cultivars of 'Jiangjun' and 'Taikongjiangjun' as the materials by SSR markers were studied. In total of 65 SSR primers distributing on two cultivars were used, three of them showed specific. The results indicated that PM1040, PM1050, PM1065 would be sufficient for assessing cultivar variety identification.

Key words: *Phaseolus vulgaris* L.; SSR; variety identification