

茄子种子纯度 SSR 标记快速鉴定

潜宗伟, 陈海丽, 崔彦玲

(北京市农林科学院 蔬菜研究中心, 农业部华北地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 北京 100097)

摘要:以茄子杂交种“京茄 218”及其父母本为试材, 采用 SSR 分子标记技术, 研究了其双亲及 F_1 之间的多态性, 并结合田间鉴定对其进行验证。结果表明: 在 152 对 SSR 引物中有 2 条引物(qzssr17 和 qzssr20)的扩增产物在杂交种中呈现父母本互补带型。利用 qzssr17 引物对 6 个制种单位繁制的“京茄 218”杂交种进行 SSR 纯度鉴定, 其鉴定结果与田间鉴定结果具有较好的一致性。试验证明, 与田间种植鉴定相比, SSR 标记是一种更准确、简单高效的茄子种子纯度鉴定方法。

关键词:茄子; SSR 标记; 纯度鉴定

中图分类号:S 641.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2014)23-0075-04

在杂交育种过程中, 纯度是种子质量的首要指标, 杂种纯度鉴定可以有效检测种子质量, 为作物的增产、稳产提供保证^[1]。由于目前茄子制种采用人工去雄的方法, 加上生物混杂和机械混杂等原因, 要保证茄子杂交种的质量, 就必须在种植之前对茄子种子的纯度进行鉴定。目前, 茄子纯度鉴定主要依靠田间种植的方法, 田间种植鉴定成本相对较高、鉴定周期长, 且受环境和技术人员熟练程度等条件的影响较大, 因此如何提高茄子种子纯度鉴定的速度和精度是茄子育种工作者亟待解决的问题之一。

近年来, 随着分子标记技术的发展, 研究人员已经开始尝试采用分子标记技术替代传统的田间鉴定^[2-6]。SSR(simple short repeat)又称为微卫星 DNA, 是有几个核苷酸(一般为 1~6)为重复单位串联组成的 DNA 序列, SSR 标记是以特异引物 PCR 为基础的分子标记技术^[7]。SSR 标记技术具有分布数量丰富、多态性高、共

显遗传、扩增稳定、扩增谱带少、易于检测等方面的优点, 是目前应用较多的鉴定种子纯度的分子标记^[8-11]。在茄子 SSR 标记研究方面, Nunome 等^[12]在 2001 年利用 SSR 标记对茄子作初步研究, 用(GA)和(GT)重复序列在基因文库中分离微卫星的克隆, 得到其频率分别为 3 200 和 820, 2009 年 Nunome 等^[13]又利用 1 054 对 SSR 引物对茄子的 236 个基因进行了标记, 并绘制了 SSR 指纹图谱。2011 年 Julio 等^[14]利用 SSR 和 EST-SSRs 对西班牙本地茄子 *Listada de Gandía* 的遗传多样性进行了分析。在国内, 韩洪强等^[15]应用正交实验设计对茄子的 SSR 体系进行了优化, 何娟娟等^[16]利用 SSR 分子标记分别对航天诱变茄子后代变异及其多态性, 卢婷等^[17]利用 25 对 SSR 引物对 66 份茄子材料的遗传多样性进行了分析。目前, 如何利用 SSR 分子标记技术鉴定茄子杂交种的纯度的研究相对较少。

该试验以茄子杂交品种“京茄 218”为研究对象, 利用 SSR 分子标记技术, 以期筛选出特异性较高、稳定性好的 SSR 引物, 旨在建立一套准确的、可靠的“京茄 218”种子纯度鉴定方法, 以期为确保其良种生产的质量奠定了科学基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由北京市农林科学院蔬菜研究中心茄子课题组提供, 用于引物筛选的“京茄 218”的父本、母本和

第一作者简介:潜宗伟(1982-), 男, 硕士, 助理研究员, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:qianzongwei@nercv.org.

责任作者:崔彦玲(1965-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向为蔬菜遗传育种。E-mail:cuiyanling@nercv.org.

基金项目:国家科技支撑资助项目(2012BAD50G01, 2012BAD02B02, 2011BAD35B07);北京市创新团队资助项目(GCTDZJ2014033002);北京市财政专项资助项目(KJCX20140111)。

收稿日期:2014-09-09

20 genera and 30 species, and temperate type including 21 families, 45 genera and 96 species. According to the genera distribution types, 10 distribution types were divided. The temperate elements held absolute predominance with 174 genera of temperate elements accounting for 72.50% of the total genus, and also were the main geographical elements of seed plant flora in Liangshui nature reserve area.

Keywords: seed plants; flora; geographical compositions; Liangshui nature reserve area

F₁ 的种子都采自 2012 年春季蔬菜中心茄子育种大棚中。待检测种子为甘肃制种基地 2013 年繁制“京茄 218”的杂交种。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取 引物筛选试验于 2013 年 5—7 月在北京市农林科学院蔬菜研究中心茄子实验室内进行。父母本及 F₁ 种子浸种 10 h 后铺放到发芽盒中的发芽床上,放置于 25℃ 的培养箱中催芽,15 d 后取发芽后的幼苗采用改良的 CTAB 法和碱裂解法提取 DNA。改良 CTAB 法:取 0.2 g 茄子叶片放入 2 mL 离心管中,加 500 μ L CTAB 打碎后 12 000 r/min 离心 10 min,然后加 300 μ L CTAB 65℃ 水浴 30 min,期间摇匀 3~4 次。加氯仿-异戊醇 800 μ L 摇匀 4℃ 静止 10 min 后 12 000 r/min 离心 15 min,取 600 μ L 上清液加入 420 μ L -20℃ 异戊醇,-20℃ 静止 40 min,12 000 r/min 离心 15 min,去掉上清液用 75% 酒精清洗 2 次,吹干后 -20℃ 保存备用。碱裂解法:取大约 50 mg 植株幼叶放 2 mL 离心管,加入 60 μ L 0.4 mol/L NaOH,将叶片打碎,沸水浴 1 min 后 10 000 r/min 离心 1 min,取 4 μ L 上清液加入 196 μ L 100 mmol/L Tris (pH 5.80) 混匀备用,上清液即可作为 PCR 反应模板 DNA 进行 PCR 扩增。

1.2.2 PCR 反应体系和程序 所有引物均由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。PCR 扩增:PCR 扩增使用伯乐 C-1000 PCR 仪,反应体系 25 μ L,各成分添加量:10 \times PCR buffer (含 Mg²⁺) 2.5 μ L, 0.2 mmol/L dNTP 1.2 μ L, 10 μ mol/L forward primer 1.6 μ L, 10 μ mol/L reverse primer 1.6 μ L, 25 ng/ μ L DNA 2 μ L, 2.5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.3 μ L,加 ddH₂O 至总体积 25 μ L。反应程序:94℃ 预变性 5 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,35 次循环,最后 1 个循环 72℃ 延伸 5 min,4℃ 保存。

1.2.3 电泳检测 PCR 扩增产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶 (PACE) 上分离,电压 8 V/cm,电泳 90 min。电泳结束后,采用简化的银染法染色:先用自来水冲洗整个电泳槽 2 min,剥离下凝胶,0.2% AgNO₃ 染色 10 min,银染后用 ddH₂O 水洗 20 s,随后浸没于显影液 (3% NaOH,0.5% 甲醛) 中显影 5~10 min,直至见到清晰的 DNA 条带为止。显影结束后,立刻用清水漂洗,裹上保鲜膜。最后,将胶平铺于胶片观察灯上,用数码相机照相,并存入电脑。

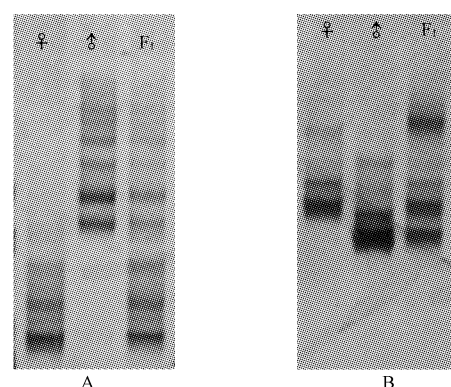
1.2.4 纯度的鉴定 “京茄 218”基地繁制杂交种按制种单位分别编号 JD01-06。SSR 分子标记和田间鉴定分别进行,将二者结果做对比验证。实验室鉴定:每个制种单位随机数 100 粒种子,铺设发芽床,然后放置于 25℃ 的培养箱中催芽,15 d 后取发芽后的幼苗提取 DNA,检测“京茄 218”纯度。田间鉴定:于 2013 年 5—9

月在北京市农林科学院蔬菜中心农场内进行。穴盘育苗,每盘播种 100 粒,期间不间弱小苗,待幼苗 5~6 片真叶时,定植于农场茄子大棚内,同时定植茄子父母本做对照,定植株行距为 70 cm \times 50 cm,采用高垄,膜下滴灌等常规管理方式。最后对茄子的熟性、果形、株型等田间性状进行调查,根据田间性状差异确定待测杂交种的田间调查纯度。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

利用 152 对 SSR 引物对“京茄 218”及其母本 (p1186)、父本 (p1177) 的 DNA 进行 PCR 扩增筛选,结果显示差异引物共 32 对,占检测引物的 21.05%。对这 32 对特异引物进一步筛选,最终有 2 对引物扩增条带清晰、特异性主带位置差异明显、呈双亲互补带型,如图 1 所示,分别为第 17 对引物 (qzssr17) 和第 20 对引物 (qzssr20)。这 2 对引物进行多次重复扩增检测,都具有结果稳定,重复性好的特点,该试验选取其中的 1 对引物 qzssr17 作为检测“京茄 218”纯度的引物。



注:A:引物 qzssr17 扩增结果,B:引物 qzssr20 扩增结果,♀:“京茄 218”母本,♂:“京茄 218”父本,F₁:“京茄 218”杂交一代。

Notes:A: primers qzssr17, B: primers qzssr20, ♀: female parent, ♂: male parent, F₁: generation.

图 1 引物 qzssr17 和 qzssr20 的扩增结果

Fig. 1 The amplification results of qzssr17 and qzssr20

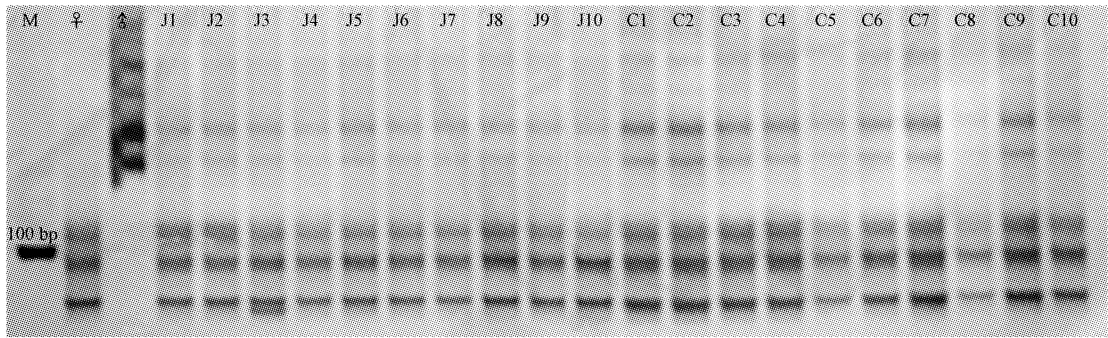
2.2 DNA 质量比较检测

利用 qzssr17 为引物,选取待检测“京茄 218”F₁ 植株 10 株,每株取样 2 份,分别利用改良 CTAB 法和碱裂解法分别提取 DNA 并进行 PCR 扩增,结果如图 2 所示。改良 CTAB 法提取茄子的 DNA 扩增谱带清晰,整齐一致,无拖尾,能够用于茄子 SSR 纯度的检测。碱裂解法提取的茄子 DNA 能够满足 PCR 反应的要求,扩增后的谱带较清晰,与 CTAB 法提取 DNA 的扩增谱带一致,能够满足对“京茄 218”种子纯度鉴定的要求。由于碱裂解法提取茄子 DNA 方法简单,快速,适合大量快速提取 DNA,可以用于“京茄 218”种子纯度的快速鉴定。

2.3 “京茄 218”种子纯度鉴定

2.3.1 SSR 分子标记纯度鉴定 统计引物 qzssr17 在各个制种单位的 100 粒杂交种的扩增结果,统计具有母本特异条带和其它特异条带的粒数,计算“京茄 218”的纯度。在 6 个制种单位中,除母本和 F₁ 代特异条带外,未发现其它特异条带。图 3、4 分别为 JD01 和 JD05 扩增的

部分结果,记录其中具有母本特异条带的分别有 2 粒和 40 粒,未扩增出任何条带的均为 2 粒,未出芽种子分别为 3 粒和 2 粒,计算纯度分别为 97.89% 和 59.18%。通过统计 SSR 鉴定方法检测 JD02、JD03、JD04 和 JD06 的纯度分别为 96.14%、97.24%、95.42% 和 96.38%。除 JD05 为纯度严重不合格种子外,其它种子的纯度均合格。



注:M;D-1 000 Marker, ♀:“京茄 218”母本, ♂:“京茄 218”父本, J1~10:碱裂解法提取 1~10 株“京茄 218”F₁ DNA, C1~10:CTAB 法提取 1~10 株“京茄 218”F₁ DNA。
Notes:M;D-1 000 Marker, ♀:female parent, ♂:male parent, J1-10;the 1-10 plants' NDA by using the alkaline lysis method, C1-10;the 1-10 plants' NDA by using the CTAB method.

图 2 碱裂解法和 CTAB 法提取 DNA 质量比较

Fig. 2 The quality of DNA by using the alkaline lysis and the CTAB method

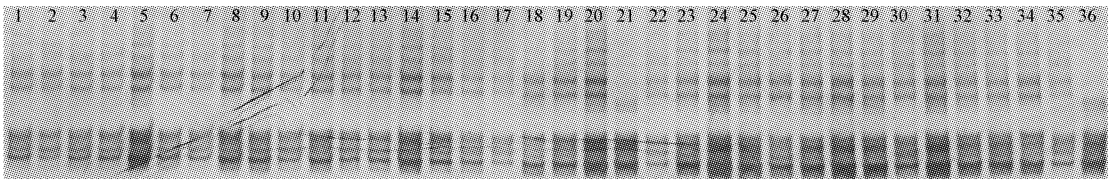


图 3 “京茄 218”JD01 扩增部分结果

Fig. 3 The amplification results of JD01

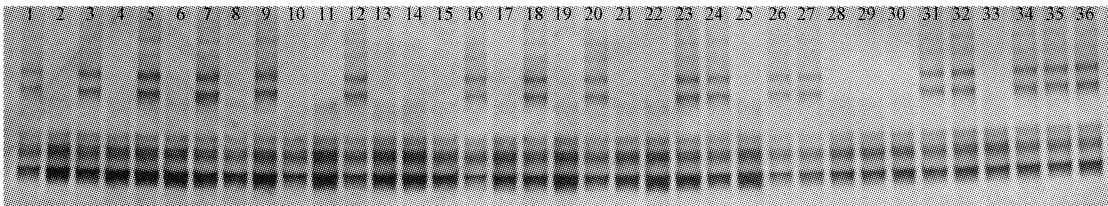


图 4 “京茄 218”JD05 扩增部分结果

Fig. 4 The amplification results of JD05

2.3.2 田间纯度鉴定 田间调查 F₁ 和对照亲本的果形、果萼片等特征特性,统计母本和其它杂株的株数,调查过程中,对于有些介于 F₁ 和母本性状之间的植株,按母本计算,最后计算“京茄 218”的田间调查纯度。由表 1 可知,除 JD02 有 1 株其它杂株外,其它制种单位均无其它未知杂株。JD05 的田间纯度最低,仅为 57.14%,为纯度严重不合格种子。其它制种单位的种子纯度田间鉴定基本能达到商品种生产要求,为合格种子。

表 1 “京茄 218”纯度田间种植鉴定结果

Table 1 The result of the morphological identification

编号 No.	定植苗数 Seedling number/株	死亡苗数 Death plants/株	母本株数 Female parent plants/株	其它杂株数 Others plants/株	纯度 Purity /%
JD01	99	2	3	0	96.91
JD02	98	0	4	1	94.90
JD03	97	0	4	0	95.88
JD04	96	0	5	0	94.80
JD05	98	0	42	0	57.14
JD06	98	1	5	0	94.85

3 讨论

由于目前茄子制种还主要采用去雄授粉技术,如果制种单位大意,去雄不彻底或开花去雄,都会导致生产上繁制的茄子种子纯度不合格。因此,在制种单位繁制种子后必须进行纯度鉴定,目前生产上主要采用田间种植鉴定来检验茄子杂交种纯度。该试验从 152 对 SSR 引物中筛选出了 2 对能够准确鉴定“京茄 218”的纯度的引物。利用 qzssr17 引物对 6 个制种单位繁制的杂交种分别进行了纯度鉴定,试验结果表明,利用 SSR 标记技术鉴定茄子的纯度与田间鉴定结果具有较好的一致性。

在鉴定过程中,SSR 标记技术的纯度都要略高于田间鉴定结果,这是由于在田间鉴定过程中由于地力不均等原因,有些茄子植株长势较弱,不能很好的分辨是否为杂株的均以母本计算。SSR 标记能够克服田间种植鉴定过程中费力、经验限制、不能准确反映实际纯度等缺点,是一种更准确、简单高效的种子纯度鉴定方法。

鉴定结果表明,制种单位 JD05 种子纯度非常低,严重不合格,为制种过程中的严重事故。这也说明茄子商品种在上市前进行纯度鉴定的必要性,对于不合格的种子要废弃,坚决禁止不合格种子在市场流通,以免受到不必要的损失。

随着茄子分子生物学的深入发展,SSR 等更多的分子标记位点和检测技术将被开发应用和普及,所以有理由相信,SSR 等分子检测技术必将代替田间种植鉴定方法,在种子纯度鉴定、新品种保护等方面广泛应用。

参考文献

- [1] 林琿,李永平,朱海生,等.应用 RAPD 标记鉴定苦瓜杂种纯度[J].福建农业学报 2011,26(6):977-980.
- [2] 兰青阔,张桂华,王永,等.基于 SNP 标记的黄瓜杂交种纯度鉴定方法[J].中国蔬菜,2012,1(6):58-63.

- [3] 徐艳芳,向珣朝,张艳丽,等.SSR 技术对杂交稻种冈优 188 的纯度鉴定[J].种子,2012(7):126-128.
- [4] 张春宝,李玉秋,彭宝,等.线粒体 ISSR 与 SCAR 标记鉴定大豆细胞质雄性不育系与保持系[J].大豆科学,2013,32(1):19-22.
- [5] 张永平,杨少军,陈幼源.SRAP 标记技术在甜瓜品种亲缘关系和种子纯度鉴定上的应用[J].生物学杂志,2012,29(4):86-95.
- [6] 赵新,王永,兰青阔,等.基于复合 EST-SSR 标记的大白菜种子纯度鉴定及 SNP 位点获取[J].中国蔬菜,2013(14):31-38.
- [7] 张志勇,詹先进,蓝家祥,等.利用 SSR 标记鉴定棉花品种和纯度研究进展[J].湖北农业科学,2013,9(5):1992-1994.
- [8] 张琳,杜鹃,齐丽霞,等.SSR 标记在杂交早稻新组合纯度鉴定中的应用[J].江西农业大学学报,2013,35(3):502-506.
- [9] 孟倩,董军刚,胡永敏,等.甘蓝型油菜甘杂 1 号种子纯度的 SSR 鉴定[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2013,41(1):55-59.
- [10] 戴金平,宋贤勇.基于 SSR 标记的“一管两步”法检测两系杂交稻种子纯度[J].江苏农业科学,2013,41(5):43-44.
- [11] 陈锋,张洁夫,陈松,等.杂交油菜宁杂 11 号种子纯度 SSR 标记快速检测方法[J].分子植物育种,2013,11(4):600-604.
- [12] Nunome T, Ishiguro K, Yoshida T. Mapping of fruit shape and color development traits in eggplant (*Solanum melongena* L.) based on RAPD and AFLP markers [J]. Breeding Science, 2001, 51(1):19-26.
- [13] Nunome T, Negoro S, Kono I, et al. Development of SSR markers derived from SSR-enriched genomic library of eggplant (*Solanum melongena* L.) [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2009, 119(6):1143-1153.
- [14] Julio E, Munoz-Falcon, Santiago V, et al. Diversity, relationships, and genetic fingerprinting of the *Listada de Gandia* eggplant landrace using genomic SSRs and EST-SSRs[J]. Scientia Horticulturae, 2011, 129(2):238-246.
- [15] 韩洪强,李怀志,刘杨,等.正交设计优化茄子 SSR 反应体系[J].上海交通大学学报(农业科学版),2008,26(4):313-315.
- [16] 何娟娟,刘富中,陈钰辉,等.茄子航天诱变后代变异及其 SSR 标记多态性研究[J].核农学报,2010,24(3):460-465.
- [17] 卢婷,汪国平,林明宝,等.应用 SSR 标记分析茄子种质资源的遗传多样性[J].中国蔬菜,2008(增刊):5-9.

Rapid Hybrid Purity Identification of Eggplant by SSR Markers

QIAN Zong-wei, CHEN Hai-li, CUI Yan-ling

(Beijing Vegetable Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (North China), Ministry of Agriculture, P. R. China, Beijing 100097)

Abstract: Taking the new eggplant hybrid “Jingqie 218” and their parents as experimental materials, the polymorphisms of the materials were analyzed and sifted by using SSR molecular markers, and the results were verified by morphological identification. The results showed that among the 152 pairs of SSR primers, 2 pairs of primers (qzssr17 and qzssr20) showed complementary pattern between hybrids and their parents. The hybrids “Jingqie 218” which were produced by 6 units had been identified by using the qzssr17 SSR molecular markers, the results had better consistency with the morphological identification results. The experiment proved that using SSR molecular markers was a simpler and effective method to identify the purity of eggplant.

Keywords: eggplant; SSR molecular marker; purity identification