

SSR 分子标记技术在瓠瓜种子纯度快速鉴定中的应用

鲁忠富, 徐 沛, 吴晓花, 汪宝根, 王 莎, 刘永华, 李国景*

(浙江省农业科学院 蔬菜研究所, 浙江 杭州 310021)

摘 要: 当前生产上应用的瓠瓜品种众多, 且商业品种间的遗传相似性愈来愈高, 种子质量纠纷时有发生。为提供一种快速、准确、可靠的瓠瓜种子纯度检测方法, 本研究以 44 份瓠瓜种质为试材, 通过高通量测序自主设计开发适用于瓠瓜研究的 SSR 引物, 从中筛选出 8 对诊断性引物, 在此基础上建立基于 SSR 分子标记技术的瓠瓜种子纯度快速检测方法。根据本方法建立的瓠瓜主栽品种标准 DNA 指纹可高效鉴别瓠瓜种子真伪及纯度, 满足瓠瓜种子产业化健康发展的需要。

关键词: 瓠瓜; SSR; 纯度鉴定; 遗传指纹图谱

中图分类号: S 652.9

文献标志码: A

文章编号: 1004–1524(2012)04–0578–04

A rapid and precise SSR-based procedure for bottle gourd seed quality survey

LU Zhong-fu, XU Pei, WU Xiao-hua, WANG Bao-geng, WANG Sha, LIU Yong-hua, LI Guo-jing*

(Institute of Vegetables, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China)

Abstract: Current application of large number of commercial bottle gourd cultivars with very high genetic similarity has caused many disputes on seed quality. To provide a rapid, precise and reliable method for bottle gourd seed purity assay, we developed a set of SSR markers based on DNA sequences obtained from high-throughput sequencing. Eight of these markers were defined as diagnostic markers by genotyping a collection of 44 bottle gourd genotypes. Based on this, a rapid and precise SSR-based procedure as well as standard DNA fingerprints for bottle gourd seed quality survey was established, which will be beneficial for the industrialization of bottle gourd seeds.

Key words: bottle gourd; SSR; purity survey; genetic fingerprinting

瓠瓜 (*Lagenaria siceraria*) 属葫芦科 (Cucurbitaceae) 蔓生或攀缘藤本植物, 又称瓠子、扁蒲、葫芦, 是我国重要的蔬菜作物。在我国有多家不同研究机构和众多企业从事瓠瓜育种和种子生产、经营, 每年都有新品种育成。然而, 尽管品种众多, 但瓠瓜商业资源的亲本来源总体较为局限, 遗传多样性缺乏, 商业品种间的遗传相似性

愈来愈高, 种子伪冒、易名等现象严重, 种子质量纠纷案例不断。

目前我国市场上和检测机构对瓠瓜品种真伪与纯度鉴定基本依靠田间鉴定。这一鉴定方法所需时间长(一般需 30~50 d), 并受环境、土地和人力的限制。由于瓠瓜品种的田间表现常受环境条件的变化发生较大差异, 该方法尤其对于一些形态差异较小的品种鉴定难度很大, 可靠性不高。因此, 瓠瓜研究和生产经营者都盼望能研究开发一种快速、准确而经济地鉴定瓠瓜品种真伪和纯度的方法。

越来越多的作物上已应用 DNA 分子标记技术鉴别不同品种之间的差异^[1-3]。DNA 分子标

收稿日期: 2012–02–02

基金项目: 浙江省科技厅重大优先主题项目(2008C120031)

作者简介: 鲁忠富(1963–), 男, 浙江杭州人, 实验师, 主要从事蔬菜育种和栽培技术研究工作。E-mail: luzhongfu@163.com

* 通讯作者, 李国景, E-mail: Guojing_li@yahoo.com.cn; Tel (Fax): 0571–86403050

记技术通过鉴定和比对品种的 DNA 指纹图谱来鉴别不同品种。由于在同一物种的各个品种间存在有大量的多态性标记,这些特异性标记 DNA 片段的组合就构成该品种的 DNA 指纹图谱。指纹图谱技术基于 DNA 水平的差异,因此与传统的依据表型性状鉴定相比具有不受基因表达和环境条件的影响,鉴定方便、快速,并可以在植株幼苗阶段进行等优点。

SSR 分子标记技术是最常用的 DNA 指纹图谱技术之一。SSR 是指生物基因组中存在的大量微卫星重复序列。通过设计引物和 PCR 扩增串联的重复序列,依据微卫星的重复次数在同一物种不同基因型间的差异,可以揭示长度多态性^[4]。SSR 分布广,稳定性、重复性和多态率高,操作简单,常为共显性,且对 DNA 质量要求较低,是最值得信赖的分子标记类型之一,因此倍受育种家和种子生产检验部门的欢迎。

本研究建立了基于 SSR 分子标记技术的瓠瓜种子纯度快速检测方法,对规范瓠瓜种子产业,保护育种者的合法权益和农民的切身利益,促进农业增产、农民增收具有重要意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试的 44 份瓠瓜种质材料由浙江省农业科学院蔬菜研究所提供,包括了我国当前生产上主栽品种、代表不同地域分布和具有形态多样性的材料。SSR 反应用试剂,Tris、硝酸银、硼砂等生化试剂购自北京鼎国生物技术有限公司,Taq 酶、dNTP 等购自 Promega 公司。

1.2 方 法

1.2.1 基因组 DNA 的提取

将瓠瓜种子散播于装有基质(蛭石与泥炭体积比为 1:2)的育苗穴盘中,置于 25~30℃ 下育苗,待第一对真叶平展时,取叶片 0.1 g,加液氮研磨成粉末,参照 Murry 等^[5]的 CTAB 法提取 DNA。

1.2.2 瓠瓜基因组 DNA 的部分测序

以提取的‘杭州长瓜’DNA 为材料,用 Roche454-测序仪对构建的基因组 DNA 进行 1/4 通量的一次测序,测序由上海美吉生物技术公司完成。

1.2.3 SSR 引物开发设计

用默认参数运行 Newbler 序列拼接程序,对测序所得序列进行序列拼接以去除重复,获得无冗余的 DNA 序列。运行 Mreps 2.5 SSR 序列鉴定程序,鉴定 DNA 序列上含 SSR 的序列区段,同时设计出跨越 SSR 位点的 PCR 引物。交由上海桑尼生物技术公司合成 100 对 SSR 引物。

1.2.4 SSR 引物扩增和电泳检测

PCR 分析反应体积为 12.5 μL ,各组分分为 10 \times buffer 1.25 μL ,25 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ MgCl₂ 0.75 μL ,2.5 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs 1 μL ,Taq 酶(5U $\cdot\mu\text{L}^{-1}$) 0.1 μL ,模板 DNA 10 ng,加水至 12.5 μL 。SSR 反应程序为:94℃ 预变性 3 min,94℃ 变性 30 s,52℃ 退火 30 s,72℃ 延伸 50 s,循环 35 次,最后 72℃ 延伸 5 min。在 PTC-225 扩增仪上进行 PCR 扩增,扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,银染显色^[6,7]。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多态性信息含量计算和诊断性 SSR 引物筛选

提取 44 份有代表性的瓠瓜基因组总 DNA,经检测其 DNA 质量符合研究所需。用设计合成的 100 对 SSR 引物分别扩增这些材料的 DNA,PCR 反应体积为 12.5 μL ,退火温度为 52℃。经对每对引物的扩增情况进行统计,并对扩增条带进行 0 或 1 赋值,计算各引物的多态性信息含量。从这 100 对 SSR 引物扩增条带的稳定性、引物多态性指数和多态性条带的易分辨程度三方面进行综合评价,从中选取 LSR011,LSR015,LSR040,LSR045,LSR047,LSR056,LSR063,LSR077 共 8 对引物作为诊断性引物组合,引物序列见表 1。

2.2 瓠瓜 5 个主栽品种标准 DNA 指纹图谱的制备

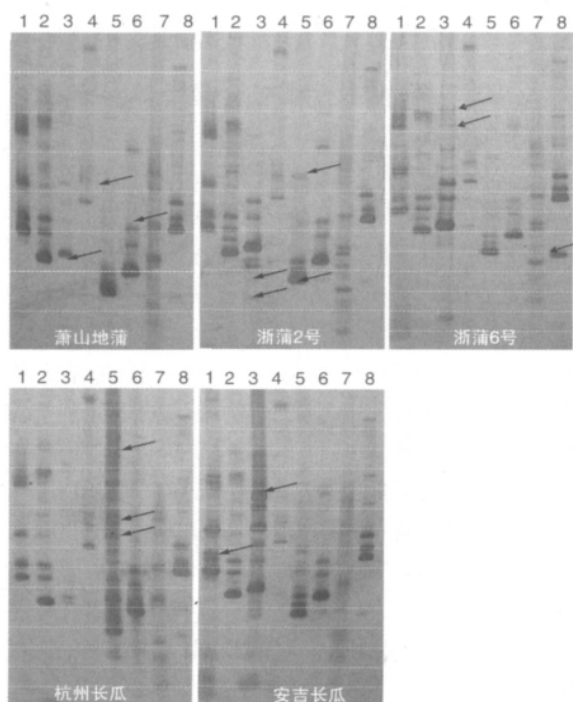
用上述 8 对诊断性 SSR 引物分别扩增‘浙蒲 2 号’、‘浙蒲 6 号’、‘安吉长瓜’、‘萧山地蒲’及‘杭州长瓜’5 个主栽品种标准样的 DNA 后,对扩增产物进行电泳观察并经 Photoshop 软件处理获得主栽品种标准指纹图谱(图 1)。

表 1 八对诊断性引物序列

Table 1 Sequences of the eight pairs of diagnostic primers

序号	引物名称	正向序列 5'-3'	反向序列 5'-3'
1	LSR011	TTCGCCTCAGTCCATCTAGTTT	ATGTCGTACCTTTTCCCCTTTT
2	LSR015	CTTACCTTCACAAAACCCCATC	ACTCTGTTTCGACTCTGCCTTC
3	LSR040	TTCCATCCAGACCAAACCTATC	CAAAGGCCATAGACAAACACAA
4	LSR045	TATTGCCCCAAACTCTTCTCTC	ATGGACAAAACCTTCATAACGCC
5	LSR047	CAATAGAGTAGGGTGGGGCATA	TAAAATAGTGGGAGAGCAAGGG
6	LSR056	TAATAATGCCACTGCACATGGT	AGATGAATCCCAATATCCCAGA
7	LSR063	AAGAGAGGGGCAGGAAGTAAAT	AGAAAACACACAGTACGCCTCC
8	LSR077	GACAGATCCTTCTGGGACTTTT	TTCTGCAATAGACTACGTTGGC

由图 1 可以清楚地看出检测的 5 个主栽品种彼此间在 SSR 扩增条带的数目、条带大小和相对位置以及条带相对亮度方面均有明显可识别的差异,从而为利用其各自 DNA 指纹图谱进行品种特异性鉴定提供了基础。图中箭头标示部分即为品种间存在的主要差异指纹带型。



其中 1: LSR011; 2: LSR015; 3: LSR040; 4: LSR045; 5: LSR047; 6: LSR056; 7: LSR063; 8: LSR077。箭头表示各品种 DNA 指纹的主要差异之处。

图 1 我国 5 个瓠瓜主栽品种的标准 DNA 指纹图谱

Fig. 1 DNA fingerprinting patterns of five popular bottle gourds cultivars in China

2.3 瓠瓜种子纯度 SSR 标记快速检测技术要点

以前述步骤研究结果为基础,提出了一套利用自主开发的诊断性 SSR 引物进行瓠瓜种子纯度检测的技术规程,其主要步骤和技术要点包括:

① DNA 提取: 将待检种子散播于装有基质(蛭石与泥炭体积比为 1:2)的育苗穴盘中,置于 25~30℃ 下育苗,待第一对真叶平展时,单株取叶片 0.1 g,加液氮研磨成粉末,用常规 CTAB 法提取 DNA。

② SSR 引物扩增: 用上述 8 对诊断性 SSR 引物进行常规 PCR 分析。建议的 SSR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min, 94℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 50 s, 循环 35 次,最后 72℃ 延伸 5 min。

③ 电泳检测: PCR 扩增产物在 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳分离,然后进行银染显色,数码相机照相记录结果,获得待检材料的 DNA 指纹图谱。

④ DNA 指纹图谱比对: 将待检材料的 DNA 指纹图谱与本品种 5 个主栽品种标准 DNA 指纹图谱进行比对,如两者的指纹图谱完全相吻合,则该待检材料即为真种子,否则即为伪种子。

⑤ 种子纯度计算: 检测完成后用公式(1)计算种子纯度。

$$\text{种子纯度} = (\text{检测所得真种子数} / \text{检测种子总数}) \times 100\% \quad (1)$$

3 讨论

迄今,瓠瓜的分子生物学基础研究远远落后于黄瓜、西瓜、甜瓜等其他瓜类作物。瓠瓜的基因组序列信息和位点特异性分子标记如 SSR, SNP, SCAR 等长期以来没有研究报道,阻碍了分子标记等现代育种手段在瓠瓜育种和种子鉴定上的应用。本试验利用 454 测序技术部分测序获得的瓠瓜基因组序列信息,在此基础上设计引物,成功筛选了 8 对诊断性 SSR 标记用于瓠瓜商业品种的种子纯度鉴定,可为瓠瓜育种者和种子生产经营人员提供极大的便利^[8]。

当前分子标记正逐步替代形态学标记被用于进行良种质量(真假杂种、纯度)检测。自从 1974 年 Grodzicker 创立 RFLP 分子标记技术以来, DNA 分子标记技术得到了迅猛的发展,十余种新型标记相继问世,并在动物、植物和微生物等学科中得到了广泛的应用。与传统的依据表型性状鉴定相比,基于 DNA 水平差异的分子标记技术,具有可以在植株生长的任何阶段进行,鉴定快速,并不受基因表达和环境条件的影响等优点^[9]。

本研究提出了一套利用 SSR 标记快速、准确鉴定瓠瓜品种种子纯度的方法,其优势包括:(1) 应用自主开发和筛选出的 8 对诊断性 SSR 引物组合,增强了鉴别近似品种的能力。经过近似品种扩增比较(图 1)及大量检测实践证明这套引物能有效区分瓠瓜常见品种,完全可以满足对当前生产上主要瓠瓜品种进行真伪检测的需要;(2) 操作方便,重复性,具有高度的可靠性和权威性。本方法直接鉴定遗传物质,使种子纯度的鉴定在 DNA 水平上进行,避免了表型鉴定、生化鉴定等间接鉴定方法所可能带来的误差;(3) 实现了检测的标准化、规范化。一般种子质检室只需具备常规的分子生物学设备就可利用本技术提

供的操作程序进行实际检测,其结果稳定可靠,易于实现标准化,检测时间仅需 4~5 h,一次可对多达上百份样品同时进行检测。检测无需专门试剂、设备,检测成本低廉,仅为传统表型鉴定的六分之一左右。因此该技术完全可用于生产上种子纯度快速鉴定的需要,服务于产业化开发。

参考文献:

- [1] 王玲平,戴丹丽,吴晓花,等. AFLP 分子标记技术在浙蒲 2 号种子纯度快速鉴定中的应用[J]. 浙江农业学报, 2008, 20(2): 84-87.
- [2] 翟文强,田清震,贾继增,等. 哈密瓜杂交种纯度的 AFLP 指纹鉴定[J]. 园艺学报, 2002, 29(6): 587.
- [3] 李丽,郑晓鹰. AFLP 分子标记应用于白菜品种鉴定[J]. 分子植物育种, 2006, 4(5): 685-689.
- [4] Kantety RV, La Rota M, Matthews DE, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 48: 501-510.
- [5] Murry HG, Thompson WF. Rapids isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8: 4321-4325.
- [6] Bassam BJ, Gaetano-Anolle G, Gresshoff PM. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. *Analytical Biochemistry*, 1991, 196: 80-83.
- [7] 许绍斌,陶玉芬,杨昭庆,等. 简单快速的 DNA 银染和胶保存方法[J]. 遗传, 2002, 24(3): 335-336.
- [8] Xu P, Wu X, Wang B, et al. Development and polymorphism of *Vigna unguiculata* ssp. *unguiculata* microsatellite markers used for phylogenetic analysis in asparagus bean (*Vigna unguiculata* ssp. *sesquipedialis* (L.) Verdc.) [J]. *Molecular Breeding*, 2010, 25: 675-684.
- [9] 梅眉,陆璐. DNA 分子标记技术在农作物种子质量检验中的应用[J]. 分子植物育种, 2005, 3(1): 129-134.

(责任编辑 张 韵)