

文献著录格式: 吴新义, 吴晓花, 徐沛, 等. 瓠瓜浙蒲8号 DNA 指纹图谱构建及纯度检测 [J]. 浙江农业科学, 2017, 58 (7): 1150-1152.
DOI: 10.16178/j.issn.0528-9017.20170717

瓠瓜浙蒲8号 DNA 指纹图谱构建及纯度检测

吴新义, 吴晓花, 徐沛, 汪宝根, 鲁忠富, 余晓虹, 李国景*

(浙江省农业科学院蔬菜研究所 省部共建农产品质量安全国家重点实验室培育基地, 浙江 杭州 310021)

摘要: 浙蒲8号是浙江省农业科学院蔬菜研究所最新育成的 F₁ 代耐热瓠瓜新品种。为品种权保护及杂交种纯度鉴定提供科学依据, 该研究从 162 对瓠瓜 InDel 标记中筛选出 8 对诊断性标记, 在此基础上构建了浙蒲8号的 DNA 指纹图谱; 利用其中 1 对标记 BID046, 使用 KAPA3G Plant PCR 试剂盒建立了快速、准确鉴定种子纯度的技术, 该技术实现了一步法进行 DNA 提取和 PCR 扩增, 大大提高了鉴定效率, 为浙蒲8号建立了指纹图谱和种子纯度快速鉴定技术, 可以为其他瓠瓜品种鉴定所借鉴, 促进了瓠瓜种子产业的健康发展。

关键词: 瓠瓜; 指纹图谱; 种子纯度; InDel 标记

中图分类号: S642.9

文献标志码: A

文章编号: 0528-9017(2017)07-1150-03

瓠瓜 [*Lagenaria siceraria* (Molina) Standl.] 又名瓠子、长瓜、蒲瓜、夜开花、葫芦等, 是中国南方地区夏季主要的瓜类蔬菜作物, 目前全国栽培总面积超过 20 万 hm²。浙江省为瓠瓜主栽地区之一, 仅设施栽培面积就超过 0.67 万 hm²。目前, 市场上的商品种子主要有杂交种和常规自交种, 品种繁多, 纯度不一, 同种异名现象严重, 种子质量纠纷时有发生。建立能快速准确地鉴定品种和进行纯度分析的技术对于种子质量标准化、品种审定、假种辨别、产权纠纷均有重要作用。

传统的种子鉴别方法一般有田间种植鉴定、室内生化鉴定等方法^[1-2]。田间种植需要一定的种植

面积, 受环境影响较大, 试验周期长且难以获得准确的测试结果; 室内生化鉴定包括组织化学鉴定、同工酶检测、籽粒醇溶蛋白检测等方法, 虽比田间鉴定准确, 但大部分方法只能用于检测部分作物的个别品种, 且常因材料间遗传背景相似或操作技术复杂降低了检测的灵敏度。随着分子标记技术的飞速发展, 越来越多的作物已经使用分子标记鉴别种子纯度和真伪, 并根据不同标记的多态性建立可以识别品种身份的 DNA 指纹图谱^[3-5]。分子标记源于 DNA 水平的差异, 在植株幼苗阶段即可进行检测, 且不受基因表达和环境条件的影响, 技术简单、快速, 结果准确可靠, 目前已经广泛用于作物种子

收稿日期: 2017-02-08

基金项目: 浙江省重大科技专项 (2016C02051); 浙江省公益性行业 (农业) 科研专项 (201403032); 浙江省农业科学院青年人才培养项目 (2016R23R08E04)

作者简介: 吴新义 (1984—), 男, 河南南阳人, 助理研究员, 博士, 从事蔬菜分子育种工作, E-mail: wuxinyi@mail.zaas.ac.cn。

通信作者: 李国景 (1966—), 男, 浙江东阳人, 研究员, 博士, 从事蔬菜育种与栽培技术研究工作, E-mail: lig@mail.zaas.ac.cn。

参考文献:

- [1] 孙芳芳. 浅议灰色关联度分析方法及其应用 [J]. 科技信息, 2010, 2 (17): 886-888.
- [2] 李清超, 马浪浪, 文琼, 等. 玉米杂交组合主要农艺性状与产量的灰色关联度分析 [J]. 中国农学通报, 2015, 31 (30): 74-78.
- [3] 郑国栋, 黄金堂, 陈海玲. 花生产量与主要农艺性状之间的灰色关联度分析 [J]. 安徽农学通报, 2013 (16): 22-24.
- [4] 常建军, 于澄宇, 赵锁芳, 等. 甘蓝型油菜杂交组合的灰色评判 [J]. 西北农业学报, 2007, 16 (3): 89-92.
- [5] 江银荣, 潘宝国, 陆虎华. 江苏省水稻产量与产量性状的灰色关联分析 [J]. 浙江农业科学, 2009 (6): 1130-1132.
- [6] 陈伟, 蒋卫. 烤烟烟碱含量与烟叶物理性状的关联分析 [J]. 南方农业学报, 2011, 42 (7): 782-785.
- [7] 蓝新隆, 唐兆秀, 徐日荣. 福建花生产量与主要农艺性状之间的灰色关联度分析 [J]. 江西农业学报, 2011, 23 (8): 61-63.
- [8] 张建国, 袁本威, 刘冬梅, 等. 油菜杂交种单株产量与相关因素灰色关联分析 [J]. 陕西农业科学, 2001 (1): 9-11.
- [9] 钟丽. 油菜产量与主要性状的灰色关联度分析 [J]. 南方农业学报, 2012, 43 (4): 421-424.

(责任编辑: 侯春晓)

鉴定^[6-8]。

浙蒲 8 号为浙江省农业科学院蔬菜研究所最新育成的耐热瓠瓜新品种^[9], 于 2015 年 2 月通过浙江省非主要农作物品种审定委员会审定, 目前已在浙江、山东、湖北、福建和安徽等地进行示范, 累计推广约 100 hm², 为了保护浙蒲 8 号的品种权, 为杂交种纯度鉴定提供科学依据, 本研究使用 InDels 标记构建了浙蒲 8 号的 DNA 指纹图谱, 并建立了快速鉴别种子纯度的技术体系。

1 材料与方法

1.1 材料

浙蒲 8 号杂交种 (F₁) 及其父本 (P₁) 和母本 (P₂)。所有材料播于穴盘中, 置于光照培养箱内, 控制温度为白天 30 ℃, 夜晚 25 ℃, 光照时间为白天 14 h, 夜晚 10 h。

1.2 InDel 标记信息

本课题组前期对 2 个瓠瓜品种杭州长瓜和 J129 进行了简化基因组测序, 利用这 2 个品种的序列开发了 892 对 InDels 标记, 本研究使用其中插入-缺失长度超过 2 bp 的 162 对标记^[10]。

1.3 DNA 指纹图谱构建

取生长 2 周的浙蒲 8 号幼嫩叶片, 液氮研磨后利用 DNA 提取试剂盒 [天根生化科技 (北京) 有限公司] 提取基因组 DNA。PCR 反应体积为 12.5 μL, 包含 2 μL 模板 DNA (10 ~ 20 ng · μL⁻¹), 1.25 μL 10 × PCR buffer (成分为 15 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 100 mmol · L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.3, 500 mmol · L⁻¹ KCl), 1 μL dNTP (2.5 mmol · L⁻¹), 上下游引物各 0.3 μL, 0.01 μL *Taq* 聚合酶 (5 U · μL⁻¹), 7.64 μL ddH₂O。PCR 反应程序: 94 ℃ 3 min; 94 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 40 s, 35 个循环; 72 ℃ 5 min, 4 ℃ 保存。取 3 μL PCR 产物在 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳 (AcrBis 为 19:1 或 39:1), 指示剂为二甲苯青, 电泳电压为 200 V, 电泳时间 1 h, 用银染法染色显带^[11], 照相后用 Photoshop 软件对图片进行处理, 观察。

1.4 种子纯度鉴定

待浙蒲 8 号单株生长至 1 叶 1 心期, 用打孔器取直径约 0.3 ~ 0.5 cm 的叶片, 加入 KAPA3G Plant PCR 试剂 (KAPABIOSYSTEMS, KK7251) 和引物, 直接放入 PCR 仪进行扩增。PCR 反应体系为 50 μL: 25 μL 2 × KAPA Plant PCR Buffer, 10 μL

MgCl₂ (25 mmol · L⁻¹), 上下游引物各 1 μL, 0.4 μL KAPA3G 植物 DNA 聚合酶 (2.5 U · μL⁻¹), 加入 ddH₂O 使终体积为 50 μL。PCR 反应程序: 95 ℃ 3 min; 95 ℃ 30 s, 55 ℃ 40 s, 72 ℃ 40 s, 35 个循环; 72 ℃ 5 min, 4 ℃ 保存。采用普通的 PAGE 凝胶电泳对 PCR 产物进行分离和观察。

2 结果与分析

2.1 浙蒲 8 号 DNA 指纹图谱构建

根据 162 对标记在浙蒲 8 号和其他 8 份材料中的扩增情况, 从扩增条带的稳定性、引物多态性和多态性条带的易分辨程度综合考虑, 从中选择了 BID039、BID046、BID052、BID089、BID096、BID105、BID122、BID137 共 8 对标记, 作为浙蒲 8 号的诊断性标记 (表 1)。这 8 对标记均为共显性标记, 据此构建了浙蒲 8 号基于 InDel 标记的 DNA 指纹图谱 (图 1)。

表 1 8 对诊断性 InDel 标记的引物序列信息

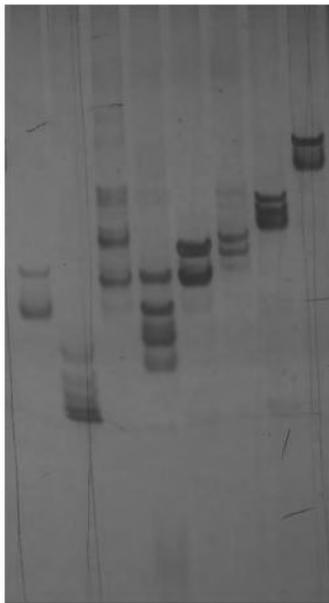
引物名称	正向序列 5'-3'	反向序列 5'-3'
BID039	TTAACTTTTCCACAAGCATTTT	GGAAGGAGTACCTCATCCATAA
BID046	CAACTCCACAGATAGTTGAACA	TCCTTGTGGGTCTTTCTCAAT
BID052	CCATACCAAAATACAACCAAGA	TGTTAGTTGATGGTGTGAAT
BID089	CGTTCTGGTTTATAGGTTTAC	GCTAAACCAATCAAAACCTAAG
BID096	CCAATCGACATTTTGATTC	GGCCACACACTTCTTTTATG
BID105	GAAGCTCAAGAAAATGAAAATC	TGAAACCGGAAGAATAAGAA
BID122	AAGTTCAATAACCGAAAGAAAA	CGAAAACCAATGGTTACAAAT
BID137	ATGTAAGTCGCCCGCTG	TTCAATTTAGTGACATTGGGT

2.2 浙蒲 8 号种子纯度检测

根据浙蒲 8 号的指纹图谱, 从中选择 1 个标记 BID046 来检测种子的纯度。从图 2 可以看出, BID046 在浙蒲 8 号、亲本 P₁ 和 P₂ 中扩增出 3 种带型, 其中亲本 P₁ 的带型较高, 亲本 P₂ 的带型较低, 而浙蒲 8 号为 2 条带型。在检测的 62 株中, 发现 1 株为假杂种, 种子纯度为 98.4%。假杂种单株的带型为母本 P₁ 的带型, 推测可能是自花授粉造成。

3 讨论

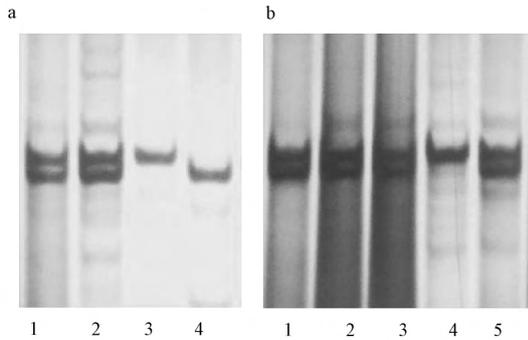
基于全基因组重测序的 InDel 标记, 因其具有在基因组内分布广、密度高、变异稳定、多态性强、检测容易等优点, 受到越来越多的关注。与传统的 SSR 标记相比, InDel 标记扩增出的带型简单, 特异性更强, 在遗传分析和基因诊断中准确性和分辨率更高。目前, InDel 标记已经应用于黄瓜、水稻等作物种子鉴定^[12-13]。本研究从 162 对 InDel 标记中筛



1 2 3 4 5 6 7 8

1~8 依次为 BID039、BID046、BID052、BID089、BID096、BID105、BID122 和 BID137

图1 浙蒲8号的标准DNA指纹图谱



a 中1、2 为标准浙蒲8号, 3、4 为其母本和父本; b 为浙蒲8号的代表性单株, 第4株为假杂种

图2 浙蒲8号的纯度检测情况

选出8对标记构建了浙蒲8号的指纹图谱, 为该品种未来的生产推广提供了特殊、唯一的身份证明, 有助于品种权保护和打击种子伪冒现象。

在传统的分子标记鉴定种子纯度过程中, DNA提取耗时费力, 是限制大规模鉴定的主要因素。本研究使用 KAPA3G Plant PCR 试剂盒, 实现了一步法进行DNA提取和PCR扩增, 大大提高了工作效率。本研究建立了快速鉴定浙蒲8号种子纯度的技术体系, 该体系有以下几个优点: 1) 耗时短, 从

播种到获得鉴定结果, 最快只需5d, 其中植株生长4d, 鉴定1天; 2) 效率高, 无论是子叶还是真叶, PCR扩增效果基本没有差别, 可以在子叶露出后立即取样, 无需提取基因组DNA, 大大节省了时间和工作量; 3) 纯度鉴定取样很少, 其余整株可以用来做其他鉴定, 如CGMMV检测, 实现1次发苗检测多个指标; 4) 费用低, 普通的试剂盒每个样品仅DNA提取的费用为6元以上, KAPA3G试剂盒从提DNA到PCR扩增, 每个样本费用也约为6元。本研究建立的瓠瓜种子纯度鉴定技术体系也可以用于其他蔬菜作物的种子鉴定。

参考文献:

- [1] 李淑娟. 种子纯度鉴定方法概述 [J]. 青海大学学报, 2003, 21 (1): 16-19.
- [2] 穆建新, 李殿荣, 郭蔼光, 等. 用SSR分子标记检测杂交油菜秦优7号的种子纯度 [J]. 西北农业学报, 2010, 19 (11): 64-68.
- [3] 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.
- [4] 翟文强, 田清震, 贾继, 等. 哈密瓜杂交种纯度的AFLP指纹鉴定 [J]. 园艺学报, 2002, 29 (6): 587.
- [5] 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.
- [6] 鲁忠富, 徐沛, 吴晓花, 等. SSR分子标记技术在瓠瓜种子纯度快速鉴定中的应用 [J]. 浙江农业学报, 2012, 24 (4): 578-581.
- [7] 石海波, 王立新, 李宏博, 等. 利用SSR标记区别小麦品种种子混杂和SSR位点不纯的研究 [J]. 分子植物育种, 2006, 4 (4): 513-519.
- [8] 郭民华, 王志红, 黎东亮, 等. 利用SSR标记快速检测玉米品种纯度 [J]. 农学学报, 2013, 3 (5): 4-7.
- [9] 吴晓花, 汪宝根, 鲁忠富, 等. 瓠瓜新品种浙蒲8号的选育 [J]. 中国蔬菜, 2015 (6): 61-64.
- [10] XU P, XU S, WU X, et al. Population genomic analyses from low-coverage RAD-Seq data: a case study on the non-model cucurbit bottle gourd [J]. Plant Journal, 2014, 77 (3): 430-442.
- [11] BASSAM B J, CAETANO-ANOLLÉS G, GRESSHOFF P M. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1991, 196 (1): 80-83.
- [12] 兰青阔, 张桂华, 王永, 等. 基于InDel标记快速检测黄瓜津优38种子纯度 [J]. 种子, 2011, 30 (6): 19-23.
- [13] 冯芳君, 罗利军, 李荧, 等. 水稻InDel和SSR标记多态性的比较分析 [J]. 分子植物育种, 2005, 3 (5): 725-730.

(责任编辑: 侯春晓)