

doi: 10.16104/j.issn.1673-1891.2022.03.003

利用 SSR 分子标记鉴定华南型黄瓜‘川绿 15 号’杂交种子纯度

李 春^{1,2}, 梁根云^{1,2}, 蔡 鹏^{1,2}, 李跃建^{1,2}, 房 超^{1,2}, 刘独臣^{1,2}, 刘小俊^{1,2*}

(1. 四川省农业科学院园艺研究所蔬菜种质与品种创新四川省重点实验室, 四川 成都 610066;
2. 农业农村部西南地区园艺作物生物学与种质创制重点实验室, 四川 成都 610066)

摘要: [目的]为了快速、简便和准确地鉴定华南型黄瓜‘川绿 15 号’杂交种子的纯度, [方法]选用 240 个均匀分布在黄瓜基因组上的 SSR 分子标记对‘川绿 15 号’及其亲本进行多态性筛选及纯度鉴定。[结果]本研究从 240 个黄瓜 SSR 分子标记筛选到 2 对 SSR 标记(Cs100 和 Cs109)符合父母本间呈互补带型的要求, 可用于川绿 15 号’杂交种子的纯度鉴定。准确性验证结果显示 Cs100 和 Cs109 的分子鉴定结果与田间形态的鉴定结果一致并且均能将掺入的其他品种黄瓜种子区分开来。[结论]本研究构建了以黄瓜特异性 SSR 分子标记 Cs100 和 Cs109 为核心引物的‘川绿 15 号’杂交种子纯度鉴定的技术方法, 可快速、简便和准确地鉴定该品种的种子纯度, 为该品种的制种和大规模推广提供技术支持。

关键词: SSR 标记; 黄瓜; ‘川绿 15 号’; 纯度鉴定

中图分类号: S642.2 文献标志码: A 文章编号: 1673-1891(2022)03-0013-05

Identification of Hybrid Seed Purity on south China Type Cucumber 'Chuanlv15' Using SSR Molecular Markers

LI Chun^{1,2}, LIANG Genyun^{1,2}, CAI Peng^{1,2}, LI Yuejian^{1,2}, FANG Chao^{1,2},
LIU Duchun^{1,2}, LIU Xiaojun^{1,2*}

(1. Horticultural Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences / Vegetable Germplasm Innovation and Variety Improvement Key Laboratory of Sichuan Province, Chengdu, Sichuan 610066, China; 2. Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Horticultural Crops (Southwest Region), Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Chengdu, Sichuan 610066, China)

Abstract: [Objective] To identify seed purity of south China type cucumber 'Chuanlv15' quickly, simply and accurately. [Method] 240 SSR molecular markers evenly distributing in cucumber genome were screened for polymorphism and purity identification. [Result] Two SSR molecular markers (Cs100 and Cs109) showed diversity between parents and were selected to identify the seeds purity of 'Chuanlv15'. The identification result using SSR markers was consist with the results from morphology in the field, and the two SSR markers could separate the 'Chuanlv15' seeds from other varieties of seeds. [Conclusion] In this study, we established a quick, easy and accurate technical method to identify the seed purity of 'Chuanlv15' with two specific SSR molecular markers (Cs100 and Cs109), which could supply the technical support for the seed commercialization and large extension of 'Chuanlv15'.

Keywords: SSR molecular marker; cucumber; 'Chuanlv 15'; purity identification

0 引言

黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 属于葫芦科 (Cucur-

bitaceae) 甜瓜属 (*Cucumis*) 一年生攀缘性草本植物, 原产于喜马拉雅山南麓的印度北部、锡金、尼泊尔、缅甸以及中国云南, 栽培黄瓜于汉武帝时代由丝绸

收稿日期: 2022-06-15

基金项目: 国家现代农业产业技术体系专项资金项目 (CARS-23-G38); 四川省自然科学基金项目 (2022NSFSC0177); 国家现代农业产业技术体系四川蔬菜创新团队 (川农函[2019]427号); 四川省蔬菜育种攻关项目 (2021YFYZ0022); 四川省科技计划项目 (2022YFYZ0004)。

作者简介: 李春 (1986—), 男, 湖南龙山人, 助理研究员, 博士, 研究方向: 蔬菜分子育种。*通信作者: 刘小俊 (1972—), 男, 江西安义人, 研究员, 博士, 研究方向: 蔬菜育种。

之路传入我国^[1]。至今,黄瓜是世界范围内栽培最广泛的蔬菜之一,具有重要的农业、生物和经济价值^[2]。杂种优势是生物界的普遍现象,是指2个遗传组成不同的亲本杂交产生的杂种一代,在生长势、生活力、繁殖力、抗逆性、产量和品质上比其双亲优越的现象。当前世界上主要作物的优良品种通常是通过杂交育种的方法育成^[3]。但是,在作物杂交种子制种过程中可能会混入其他品种的花粉而导致种子不纯,进而影响作物的产量和品质,造成一定的经济损失。因此,杂交种子的纯度是种子的重要质量指标之一,销售前需要进行种子纯度鉴定,达到国家标准后才能上市销售。

传统的种子纯度鉴定是采用田间小区种植鉴定法,以作物植株以及果实或者种子等的农艺性状为依据对种子的纯度进行鉴定^[4-5]。该方法鉴定周期长,需要占用大量的土地,同时由于受到环境和鉴定人的因素影响而导致结果不准确和不稳定^[6]。DNA分子标记技术的快速发展为作物种子纯度的鉴定提供了一种省时、省力而且准确的方法^[6-7]。DNA分子标记包括Random Amplified Polymorphic DNA(RAPD)、Amplified Fragment Length Polymorphism(AFLP)、Sequence-related amplified polymorphism(SRAP)、Cleaved Amplified Polymorphic Sequences(CAPS)、Simple Sequence Repeat(SSR)、Single Nucleotide Polymorphism(SNP)和 Insertion-Deletion(InDel)等,其中SSR以其共显性、高多态性、高稳定性以及广泛分布等特点在水稻^[4,8]、玉米^[9-10]、油菜^[11]、棉花^[12]、黄瓜^[13-14]、茄子^[15-16]和甜瓜^[17-18]等主要作物的种子纯度鉴定中广泛使用。

‘川绿15号’是四川省农业科学院园艺研究所选育的杂种一代无苦味华南型黄瓜新品种,极早熟,果实品质好,口感脆嫩、汁多,黄瓜香味浓,667 m²产5 000 kg左右,在西南地区市场前景很好。本研究从240对黄瓜SSR引物中筛选到2对在亲本中呈互补带型的多态性引物Cs100和Cs109^[19],并基于PCR扩增和聚丙烯酰胺凝胶电泳分析技术建立一套高效和准确的杂交种子纯度鉴定技术,为‘川绿15号’的市场化推广提供技术支撑。

1 材料与方 法

1.1 试验材料与仪器

本研究所用材料为‘川绿15号’及其亲本,由四川省农业科学院园艺研究所黄瓜课题组提供。所有材料于2021年8月底播种于四川省农业科学院郫都区的实验基地。种子纯度鉴定及验证群体按

照随机区组设计,共3次重复,总计300株‘川绿15号’植株,待植株成熟后通过田间性状鉴定种子的纯度。240对公开发表的黄瓜SSR引物^[19]由北京擎科生物科技有限公司合成。

本研究所用主要仪器包括组织研磨仪(MM400, Retsch)、离心机(Legend Micro 17, Thermo scientific)、微量紫外可见分光光度计(NanoDrop one, Thermo scientific)、PCR仪(T100 Thermal Cycler, BIO-RAD)和电泳仪(PowerPac, BIO-RAD)

1.2 试验方法

1.2.1 基因组DNA提取

使用CTAB法提取基因组DNA。步骤如下:(1)取幼嫩叶片于2.0 ml离心管(离心管A)中,加入2粒钢珠,用组织磨样仪研磨;(2)加入600 μL 65 °C预热的CTAB提取液于离心管A中,65 °C水浴30 min,期间混匀2次;(3)加入350 μL 24:1氯仿-异戊醇抽提液于离心管A中,混匀抽提10 min,然后12 000 r/min离心10 min,将上清转入新的1.5 mL离心管(离心管B)中;(4)加入等体积-20 °C预冷的异丙醇于离心管B中,混匀,-20 °C冷冻20 min,然后12 000 r/min离心10 min,去掉上清液,加入1 mL 75%乙醇漂洗沉淀;(5)去掉漂洗液,室温干燥,然后加入200 μL灭菌水溶解;(6)使用Nano Drop one微量紫外可见分光光度计检测DNA浓度和质量,并将DNA浓度统一稀释为200 ng/μL,备用。

1.2.2 PCR扩增及聚丙烯酰胺电泳

PCR反应体系(25 μL):1.0 μL DNA模板(200 ng/μL),12.5 μL 2×PCR Mix,1.0 μL 正反向引物(10 μmol/L),加ddH₂O至25 μL。PCR扩增程序:95 °C预变性3 min,95 °C变性15 s,55 °C退火20 s,72 °C延伸20 s,循环35次,最后72 °C延伸5 min。使用8%非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测,点样孔加入2 μL PCR产物,电压200 V下电泳2 h左右,然后进行银染和显影。

1.2.3 特异性引物筛选

‘川绿15号’及其亲本各10份DNA混成2个混池用于特异性引物的筛选,‘川绿15号’种子纯度鉴定的特异性引物需满足以下条件:(1)‘川绿15号’2个亲本仅扩增出一条带,且父母本的条带大小有明显差异;(2)‘川绿15号’扩增出2条条带,分别来自父母本。

1.2.4 田间形态验证

在盛果期,随机选取100株‘川绿15号’植株,

通过黄瓜植株的农艺性状(包括株高、株型、叶型、果实形状、瓜长等)进行植株鉴定,同时使用候选分子标记进行纯度鉴定,对候选引物的有效性进行验证。

1.2.5 掺假法验证

选择本课题组选育的黄瓜品种川翠3号和川翠13号(与‘川绿15号’没有共同的亲本)作为假种子,使用候选分子标记对其进行扩增,并通过电泳检测扩增的条带,再次检验候选分子标记对‘川绿15号’种子纯度鉴定的特异性和有效性。

2 结果与分析

2.1 特异性SSR分子标记的筛选结果与分析

使用240对均匀分布在黄瓜基因组上的SSR分子标记对‘川绿15号’及其亲本DNA的混池进行扩

增,经过聚丙烯酰胺凝胶电泳后对照1.2.4中的筛选条件对SSR引物进行筛选。结果显示符合筛选条件的引物共计17对。然后进一步对这17对引物扩增条带的清晰度、稳定性以及差异性进行再次评估,最终确定2对最佳表现的引物(Cs100和Cs109)(表1)。如图1所示,‘川绿15号’亲本为纯合单一条带,而‘川绿15号’为父母本的杂合条带。

2.2 田间形态验证结果与分析

田间农艺性状(包括株高、株型、叶型、果实形状、瓜长等)鉴定结果显示,100株‘川绿15号’植株均为杂交种,其田间纯度为100%;Cs100和Cs109分子标记的鉴定结果也是100株‘川绿15号’植株均为杂交种,田间纯度为100%(图2)。试验结果表明:Cs100和Cs109分子标记的鉴定结果与田间农艺性状鉴定结果一致,2对候选引物可以有效和准确地鉴定‘川绿15号’种子的纯度。

表1 ‘川绿15号’特异性SSR引物

引物编号	原编号	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')	片段大小/bp
Cs100	SSR12442	TCCCACAAAACATTTTCCAA	CAATGACAGGAAACAAACCCT	184
Cs109	SSR17736	AAGAAGATGCTGATGCTGCC	AAAAACCAGAGATTGAGCCG	195

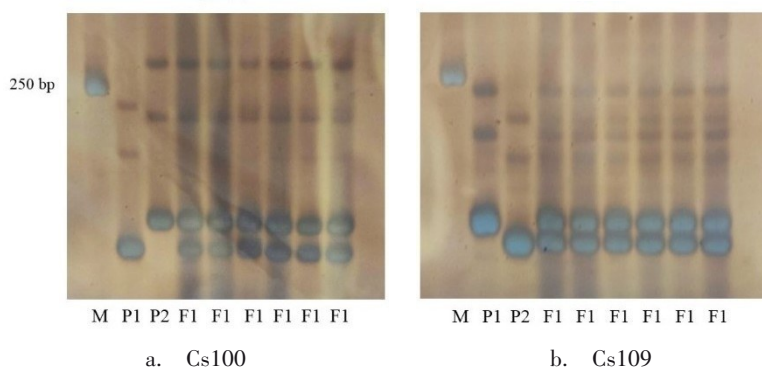


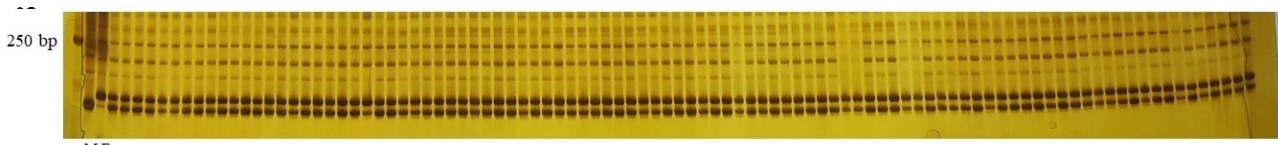
图1 ‘川绿15号’杂交种特异性引物扩增的条带(M:DL2000 Marker;P1:母本,P2:父本,F1:‘川绿15号’)

2.3 掺假法验证

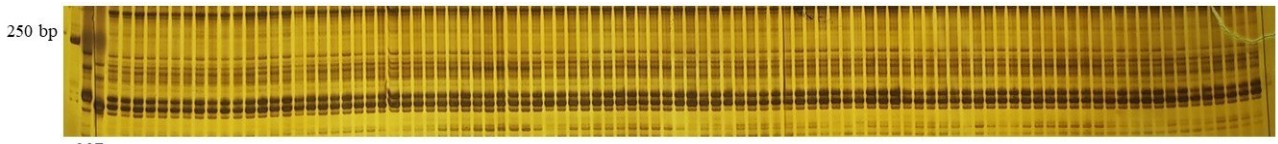
在‘川绿15号’种子中增加本课题组选育的黄瓜品种‘川翠3号’和‘川翠13号’种子作为“假种子”,并使用Cs100和Cs109分子标记对‘川绿15号’种子进行鉴定。结果显示,Cs100和Cs109引物在‘川绿15号’中为杂合互补带型,而在‘川翠3号’和‘川翠13号’中为纯合带型,且与‘川绿15号’的母本带型一致,结果说明Cs100和Cs109分子标记可以明显地将‘川绿15号’种子与本课题组选育的‘川翠3号’和‘川翠13号’种子区分开来(图3)。

3 讨论与结论

SSR分子标记因其分布广、多态性高、共显性和重复性好等优点成为分子生物学各个领域最受欢迎的分子标记^[20]。越来越多的作物选择使用SSR分子标记对种子纯度进行鉴定^[4,6,8-17]。姚丹青等^[8]从原农业部颁布的行业标准《NY/T1433—2014水稻品种鉴定技术规程SSR标记法》^[21]公布的48对SSR引物中筛选到2个SSR标记RM274和RM1195,作为标记组合用于杂交粳稻‘花优14’种子纯度的鉴定;李汝玉等^[9]构建一套玉米种子纯度

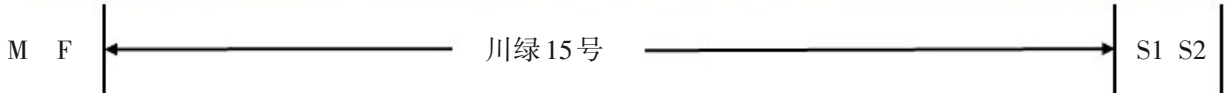
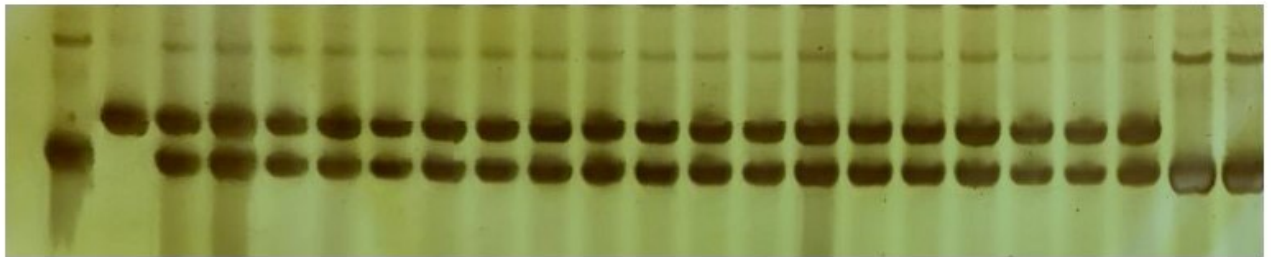


a. Cs100的验证结果

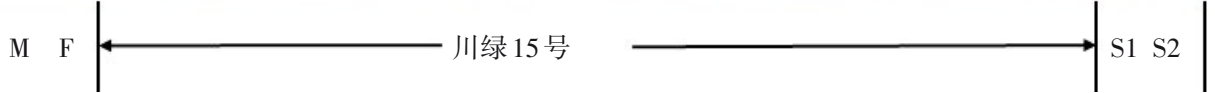
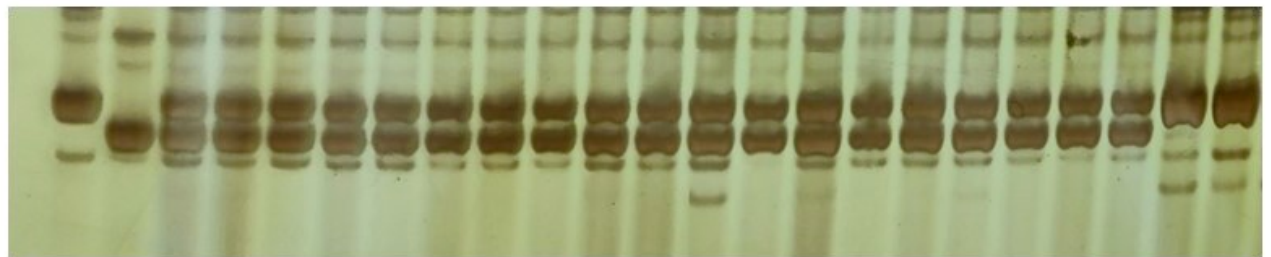


b. Cs109的验证结果

图2 ‘川绿 15 号’特异性引物的验证(M:母本,F:父本)



a. Cs100的验证结果



b. Cs100的验证结果

图3 掺假法验证‘川绿 15 号’分子标记。(M:母本,F:父本,S1:‘川翠 3 号’,S2:川翠 13 号’)

鉴定的技术规程,使用 9 对 SSR 分子标记鉴定 4 个利用常规种子贮藏蛋白质电泳技术难以鉴定纯度的玉米杂交种及相应自交系;杨宏等^[13-14]使用 SSR 分子标记分别构建了‘川绿 2 号’和‘川翠 3 号’的指纹图谱以及种子纯度鉴定的方法。

本研究选择 240 对已公开发表的黄瓜 SSR 引物对华南型黄瓜品种‘川绿 15 号’及其亲本进行种子纯度鉴定 SSR 标记的筛选,结果共筛选出 17 对父母本间多态的纯合引物。根据条带清晰度、差异度以

及稳定性等条件,最终确定了 2 个特异性 SSR 标记 Cs100 和 Cs109 用于‘川绿 15 号’杂交种子纯度的鉴定。然后进一步结合田间农艺性状鉴定的结果对 Cs100 和 Cs109 用于‘川绿 15 号’杂交种子纯度鉴定的准确性进行验证,结果显示,通过 Cs100 和 Cs109 分子鉴定的结果与田间农艺性状鉴定的结果一致;同时,使用掺假法对 Cs100 和 Cs109 分子标记鉴定结果进行验证,结果显示,Cs100 和 Cs109 可以准确地将‘川绿 15 号’杂交种子与本课题组选育的‘川翠

3号’和‘川翠13号’种子区分开。结果说明,这2对引物在鉴定‘川绿15号’杂交种子纯度时很准确。与传统方法相比,利用Cs100和Cs109鉴定种子纯度的方法更加快速、简便和高效,对‘川绿15号’杂交种子纯度鉴定工作的快速和高效开展具有一定的参考意义。

参考文献:

- [1] 林德佩. 黄瓜植物的起源和分类研究进展[J]. 中国瓜菜, 2017(7):1-3.
- [2] GEBRETSADIK K, QIU X, DONG S, et al. Molecular research progress and improvement approach of fruit quality traits in cucumber[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2021, 34:3535-3552.
- [3] 王孟宇. 作物遗传育种[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2018:191.
- [4] 孙海燕, 顾雯雯, 王淑园, 等. 利用SSR标记鉴定杂交粳稻‘常优1号’种子纯度[J]. 分子植物育种, 2014(6):1128-1132.
- [5] 颜启传. 杂交水稻三系及其杂交种种子真实性鉴定和纯度检验[J]. 种子, 1984(3):17-20.
- [6] 罗黎明, 刘丽, 于丽娟, 等. DNA分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用[J]. 生物技术进展, 2011(1):7-13.
- [7] 孙正文, 黄兴奇, 李维蛟, 等. 分子标记技术及其在水稻基因定位上的应用[J]. 基因组学与应用生物学, 2011(1):78-86.
- [8] 姚丹青, 夏建明, 楼坚锋, 等. 利用SSR标记鉴定杂交粳稻‘花优14’种子纯度[J]. 分子植物育种, 2021(16):5398-5404.
- [9] 李汝玉, 李群, 谭振馨, 等. 利用SSR标记技术检测玉米杂交种纯度[J]. 玉米科学, 2005(1):15-18.
- [10] 李阳, 范梦伟, 季晓坤, 等. 利用SSR技术鉴定玉米杂交种“家佳荣2号”的种子纯度[J]. 西南农业学报, 2018(7):1349-1354.
- [11] 张宁洁, 陈丽, 朱文秀, 等. SSR标记在油菜隐性核不育杂交种的纯度鉴定研究[J]. 安徽农业科学, 2012(11):6376-6377.
- [12] 郎需勇, 吴建功, 杨亮, 等. SSR分子标记技术在杂交棉纯度鉴定中的应用[J]. 中国棉花, 2012(9):17-20.
- [13] 杨宏, 刘小俊, 梁根云, 等. 川翠3号黄瓜SSR指纹图谱的构建及种子纯度鉴定[J]. 长江蔬菜, 2015(2):13-16.
- [14] 杨宏, 刘小俊, 梁根云, 等. 黄瓜品种‘川绿2号’SSR指纹图谱的构建和纯度鉴定[J]. 西南农业学报, 2016(2):374-378.
- [15] 王利英, 乔军, 石瑶, 等. 茄子SSR多态性引物的筛选及品种纯度鉴定[J]. 华北农学报, 2012(4):98-101.
- [16] 蔚亚楠, 龚亚菊, 汪莺, 等. 基于SSR分子标记‘云茄3号’的种子纯度鉴定[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2020(4):804-810.
- [17] 李超, 孙玉萍, 杨英, 等. 应用SSR标记鉴定甜瓜新品种纯度与真实性研究[J]. 分子植物育种, 2017(8):3088-3096.
- [18] 蔡鹏, 房超, 李跃建, 等. 应用DNA速提法和SSR标记技术高效鉴定甜瓜种子纯度[J/OL]. 分子植物育种:1-10[2022-10-19]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20211106.0949.002.html>
- [19] REN Y, ZHANG ZH, LIU J H, et al. An integrated genetic and cytogenetic map of the cucumber genome[J]. PLoS One, 2019(6):e5795.
- [20] BARGELLONI L, PATARNELLO T. Strategies for microsatellite isolation: a review[J]. Molecular Ecology, 2002(1):1-16.
- [21] 徐群. NY/T1433—2014水稻品种鉴定技术规程 SSR标记法[M]. 北京: 中国农业出版社, 2014.