

利用 SSR 技术快速鉴定 2 个辣椒杂交品种纯度

陈 琛¹, 罗俊杰¹, 陈卫国²

(1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所以, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃绿星农业科技有限责任公司, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 利用 SSR 分子标记技术, 对辣椒杂交种甘科 4 号和甘科 10 号及其父母本进行引物筛选和纯度鉴定, 旨在建立供试品种的高效纯度鉴定体系, 并对公布的辣椒 SSR 核心引物进行验证。结果表明, 2 个品种各筛选出 1 对引物在亲本间有明显差异, 在杂交种中表现为共显性, 分别为 Es330 和 Epms923。利用这 2 对引物分别对供试品种进行纯度鉴定, 甘科 4 号的纯度为 96.4%, 与田间种植鉴定纯度 98.2% 相差 1.8 个百分点; 甘科 10 号的纯度为 91.8%, 与田间种植鉴定纯度 92.7% 相差 0.9 个百分点。说明筛选出的 2 对引物对甘科 4 号和甘科 10 号种子纯度的鉴定结果真实可靠, 可以用于杂交种纯度的高效快速鉴定。

关键词: 辣椒; SSR 分子标记; 纯度鉴定

中图分类号: S641.3 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)04-0053-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1463.2020.04.013

Rapid Identification of Two Pepper Hybrid Cultivars Purity by SSR Markers

CHEN Chen¹, LUO Junjie¹, CHEN Weiguo²

(1. Institute Biotechnology, Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou Gansu 730070, China; 2. Gansu Lüxing Agricultural Technology Co., Ltd., Lanzhou Gansu 730070, China)

Abstract: In this study, pepper hybrid cultivars Ganke 4, Ganke 10 and their parental inbred lines were used to identify hybrid purity by SSR markers, aiming at establishing a quick and efficient purity identification system for tested varieties, verifying the published pepper SSR core primers at the same time. The results showed that there was one primer pair selected in each cultivars, named Es330 and Epms923, which had significant difference between the parental inbred lines, and showed co-dominance in the hybrids. Using the two primer pairs to identify the purity of the tested varieties, the purity of Ganke 4 was 96.4%, which had 1.8 percentage point difference from the purity of 98.2% identified in field. the purity of Ganke 10 was 91.8%, which had 0.9 percentage point difference from the purity of 92.7% by field identification. It was proved that the identification of hybrid purity of Ganke 4 and Ganke 10 were authentic and reliable, the two SSR markers could be used for efficient and rapid identification of hybrid purity.

Key words: Hybrid pepper; SSR markers; Purity identification

辣椒 (*Capsicum annuum* L.) 在中国每年的种植面积超过 200 万 hm^2 , 是中国栽培面积最大的蔬菜作物之一^[1]。生产上使用的

大多数品种为杂交一代。中国的辣椒杂交育种的研究始于 20 世纪 70 年代, 培育出了许多优良品种, 如早丰 1 号、湘研系列、杭椒

收稿日期: 2020-02-02

基金项目: 甘肃省农业科学院科技支撑计划项目(2017GAAS50)。

作者简介: 陈 琛(1989—), 女, 甘肃临夏人, 助理研究员, 主要从事细胞工程及分子标记育种研究工作。Email: sjschench@gsagr.ac.cn。

通信作者: 陈卫国(1963—), 男, 甘肃临夏人, 副研究员, 主要从事辣椒育种栽培和良种繁育研究工作。Email: chenweiguo2092@sina.com。

1 号、陇椒 2 号等^[2]。杂交品种能整合亲本的优良基因, 显著提高辣椒产量、质量及抗病抗逆性。但辣椒是常异花授粉植物, 在杂交种子生产过程中常因隔离区不好、去雄不彻底、风媒虫媒传粉等原因导致种子混杂, 使品种的纯度和真实性下降。

目前鉴定种子纯度的常用方法有田间形态鉴定法、同工酶电泳技术、种子贮藏蛋白电泳技术和 DNA 分子标记鉴定法^[3]。田间形态鉴定要经历一个植物学生长周期, 耗时长, 成本高, 且易受到栽培环境、气候因素影响, 对鉴定人员的要求也较高, 需要鉴定者有丰富的工作经验, 熟悉鉴定品种及其亲本的植物学性状差异和亲子间的遗传特性等; 其次, 由于部分骨干亲本的频繁使用使育成品种间的差异也逐渐缩小, 仅根据外观形态难以准确区分不同品种间的差异。同工酶具有组织特异性, 多态性较低, 且酶易失活, 对操作的要求较为严格。蛋白质电泳是基于种子贮藏蛋白的多样性通过电泳加以区分, 但当品种数量较多, 亲缘关系相近时难以鉴别^[4]。SSR(Simple sequence repeat)是一类可遗传的 DNA 串联重复序列, 通常由 1~6 个核苷酸串联重复组成, 是一种常用的分子标记。除了操作简便、多态性高、准确性高等优点, SSR 标记呈共显性遗传, 可以用以区分纯合体和杂合体, 是杂交种纯度鉴定的理想手段, 也是目前应用最为广泛的分子标记技术^[5]。目前, SSR 分子标记技术已经被应用于西瓜^[6]、油菜^[3]、玉米^[7]、马铃薯^[8]等农作物种子纯度的鉴定上, 并且被证实是一种高效、可靠的方法。我们选取辣椒杂交一代品种甘科 4 号和甘科 10 号及其父母本为材料, 应用 NY/T 2475-2013 行业标准中报道的 22 对辣椒 SSR 核心引物对以上 2 个品种进行纯度鉴定, 初步建立甘科 4 号和甘科 10 号种子纯度的 SSR 检测体系, 并对标准中公布的核心引物的有效性进行验证。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试辣椒杂交种甘科 4 号、甘科 10 号及亲本材料均由甘肃绿星农业科技有限责任公司选育并提供。每品种选取饱满种子 120 粒, 于 2019 年 5 月均匀播种在育苗盘中, 长出 2 片真叶时随机选取 110 株幼苗剪下叶片提取 DNA。同时在塑料大棚内种植 2 个供试品种材料各 100 株以上进行田间种植鉴定。将 SSR 分子标记鉴定结果与田间种植鉴定结果进行对比分析。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 提取 SSR 标记引物筛选所使用的 DNA 采用植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根生化科技有限公司)提取, 提取完成后用 1%的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 测定 DNA 样品的浓度和质量, 将 DNA 稀释至 50 ng/ μ L, 保存在 -20 $^{\circ}$ C 冰箱备用。杂交种纯度鉴定所用的 DNA 参照 Weigel 的 DNA 快速提取法^[9], 所提 DNA 经 1%的琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 进行质量和浓度检测, 保存于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。所用试剂包括 Tris-HCl (pH 7.5)、NaCl、EDTA、SDS、异丙醇等。

1.2.2 SSR 引物筛选 根据 NY/T 2475-2013 行业标准中公布的辣椒 SSR 核心引物序列合成引物 22 对, 由西安擎科生物技术有限公司合成。以甘科 4 号和甘科 10 号及各自亲本 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 筛选在父母本中有差异且在杂交种中表现为共显形的引物。PCR 反应体系 15 μ L, 由 2 \times taq MasterMix 7.5 μ L、DNA 模板 1 μ L、上下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.6 μ L、ddH₂O 5.3 μ L 组成。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。退火温度根据每对引物的 T_m 值设置。取 PCR 扩增产物 2 μ L 经 6%的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,

银染显色后拍照记录。

1.2.3 SSR 标记鉴定种子纯度 以每个品种单株 DNA110 份和亲本 DNA 为模板，用筛选出的引物进行 PCR 扩增，根据电泳结果计算杂交种纯度。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

经试验发现，甘科 4 号和甘科 10 号 2 个辣椒品种各有 1 对引物 Es330 和 Epms923 在亲本间有明显差异，且在 F₁ 代杂交种中表现为共显形。引物 Es330 可以鉴定甘科 4 号(图1D)，引物 Epms923 可以鉴定甘科 10 号(图1E)。其余引物大致可分为以下几种：在父、母、子代中均具有无差异条带(图1A)；在父、母本中分别扩增出不同的条带，而在子代中扩增出的条带与父母本中一方相同(图1B)；在父、母本中扩增出的条带无差异，而在子代中扩增出不同的条带(图

1C)。Es330 和 Epms923 的序列及 PCR 程序见表 1。

2.2 杂交种纯度鉴定

用筛选出的两对 SSR 引物分别对甘科 4 号和甘科 10 号的 110 个单株 DNA 样本进行扩增鉴定纯度。引物 Es330 对甘科 4 号的鉴定结果(图2)所示，第 75、106 号单株的条带与母本一致，属于母本特异谱带；第 92 号单株的条带与父本带型一致，属父本特异谱带；第 37 号单株既无母本条带也没有父本条带，其余的 106 个单株都具有父母本杂合条带，种子纯度为 96.4%。

引物 Epms923 对甘科 10 号的鉴定结果图 3 所示，表现为母本特异谱带的单株有第 16、19、26、37、54、79、85、90 号，共 8 株。第 52 号单株既无母本特异条带也没有父本特异条带，应为混杂的其他品种种子。没有检测到只具有父本特异条带的单株。其

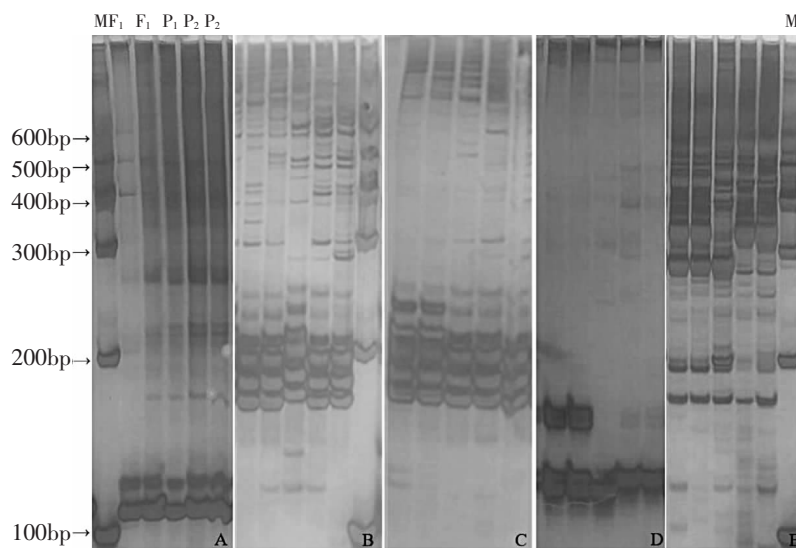


图 1 部分 SSR 引物筛选结果^①

①M 为 DNA Marker I，F₁ 为杂交种条带，P₁ 为母本条带，P₂ 为父本条带。A~E 分别是引物 Es363、Es64、Es120、Es330、Epms923 扩增出的条带。

表 1 Es330 和 Epms923 的序列及 PCR 程序

引物名称	引物序列	PCR 程序
Es330	F: GTAGCCATGGCAGAATTGGAAG	94 °C/5 min, 94 °C/30 s, 55 °C/30 s, 72 °C/1 min, 30 cycles
	R: TTCAGCAGGTTCTGTTCTGTT	
Epms923	F: CAAAACCAAATAGGTCCCCC	94 °C/5 min, 94 °C/30 s, 51 °C/30 s, 72 °C/1 min, 30 cycles
	R: CGCGCAATAATTCAATATCG	

余 101 个单株具有双亲杂合条带，种子纯度为 91.8%。电泳结果统计见表 2。

2.3 田间种植纯度鉴定与 SSR 分子标记鉴定结果比较

田间种植鉴定在最佳鉴定时期（果实成熟期）进行，此时辣椒鉴定品种特有的植物学性状已完全表现出来，便于准确鉴定。主

要依据鉴定品种的植物学性状表现（植株高矮、茎节颜色、叶片长宽比、花器颜色、果实纵横径及比例、果实形状及颜色、果面皱褶多少等）。进行形态学差异鉴别，将田间种植鉴定结果与 SSR 分子标记鉴定结果进行对比，2 个品种的鉴定结果偏差分别为 1.8、0.9 百分点(表3)。

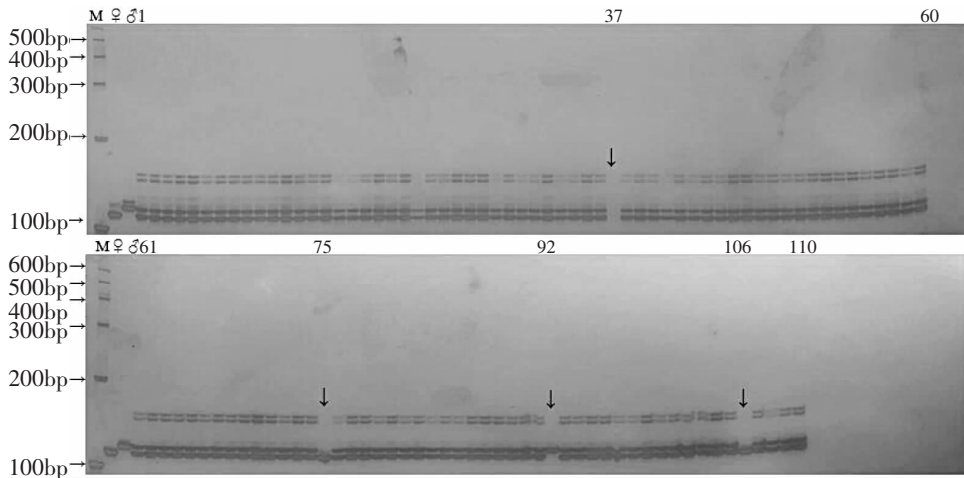


图 2 SSR 引物 Es330 对甘科 4 号鉴定的电泳结果

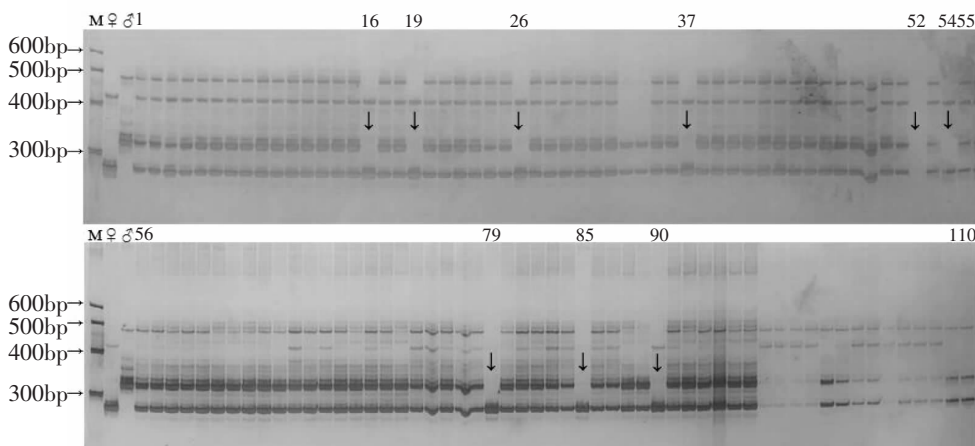


图 3 SSR 引物 Epms923 对甘科 10 号鉴定的电泳结果

表 2 2 个辣椒品种的电泳结果

品种	不纯单株总数 /株	母本带型单株 /株	父本带型单株 /株	杂株数 /株	具有双亲杂合条带单株 /株	杂交种纯度 /%
甘科4号	4	2	1	1	106	96.4
甘科10号	9	8	0	1	101	91.8

表 3 2 个辣椒品种田间鉴定结果

品种	田间种植鉴定结果		SSR标记鉴定结果		结果偏差 /百分点
	杂合单株数 /株	种子纯度 /%	杂合单株数 /株	种子纯度 /%	
甘科4号	108	98.2	106	96.4	1.8
甘科10号	102	92.7	101	91.8	0.9

3 结论与讨论

利用 SSR 分子标记技术,对辣椒杂交种甘科 4 号和甘科 10 号及其父母本进行引物筛选和纯度鉴定,并对公布的辣椒 SSR 核心引物进行验证。结果表明,2 个品种各筛选出 1 对引物在亲本间有明显差异,在杂交种中表现为共显形,分别为 Es330 和 Epms923。利用这 2 对引物分别对供试品种进行纯度鉴定,甘科 4 号的纯度为 96.4%,与田间种植鉴定纯度 98.2%相差 1.8 百分点;甘科 10 号的纯度为 91.8%,与田间种植鉴定纯度 92.7%相差 0.9 百分点。说明筛选出的 2 对引物对甘科 4 号和甘科 10 号种子纯度的鉴定结果真实可靠,可以用于杂交种纯度的高效快速鉴定。

辣椒杂交种生产通常采取蕾期人工去雄杂交授粉完成,造成种子不纯的原因主要有去雄不彻底导致母本自交、由于风媒虫媒等原因导致母本被非父本的花粉污染、机械或人为疏漏导致种子混杂。从试验结果来看,2 个品种的不纯单株大部分是母本自交后代,说明造成种子不纯的最主要原因为去雄不彻底形成的母本自交种。这与李淑红等^[10]对 3 个辣椒品种鉴定纯度得出的结论一致。SSR 鉴定结果与田间种植鉴定结果的纯度偏差在 2 个品种中均小于 2%,说明利用分子标记鉴定辣椒杂交种子纯度是一种准确、可靠的方法,也证明了本文采用的引物来源 NY/T 2475-2013 行业标准的有效性。

本试验对每个品种只用了 1 对 SSR 引物进行鉴定,结果与田间种植鉴定结果相近。刘子记等^[11]利用 3 对 SSR 标记对热辣 2 号杂交种进行纯度鉴定,结果显示 3 对标记的鉴定结果完全一致,并且与田间鉴定的结果也完全一致;杨双娟等^[12]用 2 对引物鉴定了豫椒 101 杂交种的纯度,结果只相差 0.5%,近乎一致。这些研究结果表明,单对 SSR 引物就可以对杂交种纯度进行鉴定。但

是,也有研究中发现,并非所有引物都具有这样的准确性。傅鸿妃等^[1]利用 2 对引物用于杭椒新品种 H12 的纯度鉴定,结果分别为 95.8%和 89.6%,田间鉴定结果为 94.5%,存在较大偏差。Sundaram 等^[13]利用多对 SSR 引物用于杂交水稻的纯度鉴定,指出多对引物比单对引物的检测结果更准确。因此在纯度鉴定时选择合适的 SSR 引物十分重要。

分子标记相关试验中,通常需要大批量提取 DNA。常用的 DNA 提取方法一般采用 CTAB 法或使用试剂盒,不仅耗时耗力,且后者成本较高。本文采用的 DNA 提取方法,是在 Weigel 的 SDS 快速提取植物 DNA 方法的基础上加以改进,无须使用液氮研磨和氯仿、PVP、异戊醇等有毒化学试剂,且经后续试验检测 DNA 的质量也较好。该方法能够实现短时间大批量植物 DNA 样本的制备,为 SSR 分子标记试验提供了极大便利。

参考文献:

- [1] 傅鸿妃. 杭椒新品种 H12 纯度的 SSR 快速鉴定技术[J]. 浙江农业科学, 2019(10): 1804-1806.
- [2] 杨中周. 我国辣椒品种选育进展与展望[J]. 中国瓜菜, 2017, 30(5): 1-6.
- [3] 兰刚, 董军刚, 孟倩, 等. 油菜杂交种合油杂 2 号纯度鉴定的 SSR 引物筛选[J]. 西北农业学报, 2012, 21(9): 74-78.
- [4] 王灵敏, 孟小莽, 许豫南, 等. 浅议种子真实性与品种纯度鉴定方法的适用范围与优劣[J]. 种子科技, 2016, 34(8): 33-34.
- [5] MCCOUCH S R, CHEN X L, PANAUD O, et al. Microsatellite marker development mapping and applications in rice genetics and breeding[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35: 89-99.
- [6] 孙波, 邹甜, 王志伟, 等. 利用 SSR 技术鉴定西瓜品种纯度[J]. 中国瓜菜, 2018, 31(6): 16-19.
- [7] 尹祥佳, 郝楠, 南铭, 等. SSR 分子标

9个冬小麦品种(系)在黑膜微垄穴播栽培条件下的表现

石芳红¹, 张立功², 马建辉², 苏忠太², 石 瑞²

(1. 庄浪县通化镇人民政府, 甘肃 庄浪 744621; 2. 庄浪县农业技术推广中心, 甘肃庄浪 744699)

摘要: 试验观察了黑膜微垄穴播栽培条件下 9 个不同旱地冬小麦品种的主要性状及产量表现。结果表明, 兰天 093、兰天 094 号和 06-129-3-2-1 早熟, 落黄好, 白粒, 角质, 中矮秆, 抗冻, 抗倒伏, 中抗条锈病和白粉病, 经济性状优良, 产量较高, 比对照品种庄浪 14 号分别增产 1.84%、3.71%、4.81%, 可在庄浪县及与庄浪县同等气候条件下的地区作为黑膜微垄穴播栽培的配套品种。

关键词: 黑色地膜; 全覆盖; 微垄; 穴播; 品种; 冬小麦

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1463(2020)04-0058-05

[doi:10.3969/j.issn.1001-1463.2020.04.014](https://doi.org/10.3969/j.issn.1001-1463.2020.04.014)

庄浪县地处陇中黄土高原丘陵沟壑区, 属于旱半干旱气候。小麦常年播种面积 2 万 hm² 以上, 是第一大主粮作物。针对“旱寒、瘠薄、粗放”等生产问题, 农业科技人员研究提出了小麦黑膜微垄穴播栽培技术。该技术整合了集雨、增温、保墒等增产要素, 大

幅度提高降水利用效率, 操作简便, 是集“免放苗、少除草、聚水增墒、提高地温”于一体的重大创新技术^[1-6]。在旱半干旱区有很大的推广价值, 有效促进了小麦体质增效。为了筛选适宜的新品种, 完善技术配套, 为大田生产提供技术支撑, 我们于

收稿日期: 2019-10-28; 修订日期: 2020-03-03

作者简介: 石芳红(1978—), 女, 甘肃庄浪人, 农艺师, 主要从事农业技术推广工作。联系电话: (0)15825859669。Email: 547353251@qq.com。

通信作者: 张立功(1966—), 男, 甘肃庄浪人, 高级农艺师, 主要从事旱作农业技术推广工作。联系电话: (0)15109336418; (0933)6621063。Email: gszhlzhlgl@163.com。

记鉴定玉米杂交种纯度的研究及应用综述 [J]. 甘肃农业科技, 2018(11): 97-102.

[8] 李建武, 李灏德, 文国宏, 等. 甘肃省主栽马铃薯品种遗传多样性的 AFLP 与 SSR 分子标记分析[J]. 甘肃农业科技, 2016(7): 1-6.

[9] WEIGEL D, GLAZEBROOK J. Quick miniprep for plant DNA isolation[M]. Cold Spring Harb. Protoc, NY, USA: CSHL Press, 2002.

[10] 李淑红, 赖黎丽, 李淑琴, 等. 利用 SSR 标记鉴定 3 个辣椒杂交种品种的纯度[J]. 辣椒杂志, 2018, 16(1): 17-21.

[11] 刘子记, 杨 衍, 孙继华, 等. 热辣 2 号辣

椒纯度鉴定及优良自交系遗传多样性分析 [J]. 热带作物学报, 2014, 35(5): 847-853.

[12] 杨双娟, 于文涛, 原玉香, 等. 辣椒品种豫椒 101 纯度鉴定的 SSR 标记筛选[J]. 分子植物育种, 2019, 17(222): 7433-7437.

[13] SUNDARAM R M, NAVEENKUMAR B, BI-RADAR S K, et al. Identification of informative SSR markers capable of distinguishing hybrid rice parental lines and their utilization in seed assessment[J]. Euphytica, 2008, 163: 215-224.

(本文责编: 杨 杰)