

SSR 分子标记鉴定两系杂交水稻“荃两优 2118”的种子纯度

王立广, 张翔, 黄贯刘, 汪仁举, 康圣好, 熊延军, 张奎

(安徽华安种业有限责任公司, 安徽合肥 230031)

摘要 采用 SSR 分子标记技术鉴定两系杂交水稻“荃两优 2118”的种子纯度。从 48 对 SSR 引物中筛选到 2 组引物(RM7120、RM8277)。随机选取“荃两优 2118”种子 6 组, 每组样品随机取 192 棵种子苗种进行纯度检测, 结果显示同一样品 SSR 标记与田间鉴定结果接近, 最大、最小差异分别为 2.05% 和 0.23%。因此, SSR 标记技术适用于“荃两优 2118”的种子纯度鉴定。

关键词 SSR 分子标记; 两系杂交水稻; 种子纯度; 田间鉴定

中图分类号 S511 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)01-0042-03

doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2020.01.012

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Detection of Seed Purity of Two-line Hybrid Rice “Quanliangyou 2118” by SSR Marker Technique

WANG Li-guang, ZHANG Xiang, HUANG Guan-liu et al (Anhui Hua'an Seed Co., Ltd., Hefei, Anhui 230031)

Abstract The seed purity of two-line hybrid rice “Quan liangyou 2118” was identified using simple sequence repeat (SSR) molecular markers. Two pairs of primers (RM7120 and RM8277) were screened out from 48 pairs of SSR primers. A total of 2 pairs of primers were used to test the purity of 6 groups of the “Quan liangyou 2118”, with 192 seed seedlings in each group. The SSR identification results were basically agreed with the field identification results, the difference of which ranged from 0.23%–2.05%. The research results indicated that SSR markers could be utilized to identify the purity of “Quan liangyou 2118”.

Key words Simple sequence repeat (SSR) molecular markers; Two-line hybrid rice; Seed purity; Field identification

杂交水稻质量的核心指标是种子纯度, 因此准确、快速、经济地检测杂交水稻种子的纯度是种子企业在生产加工销售中最关心的问题^[1]。两系杂交水稻种子纯度检验的方法有很多, 目前被种子企业广泛运用的方法主要为田间种植鉴定和 SSR 分子标记鉴定。其中, 田间鉴定是目前运用最广、最有效、最准确的检验方法, 田间鉴定主要通过海南加代种植或正季种植, 在抽穗前及齐穗后多次进行观察记载, 比较各单株间的植物学特征, 通过品种的农艺特征特性鉴别真实杂交种及杂株^[2]。不同品种或品系间存在大量的 DNA 序列差异, 其中微卫星序列广泛分布在每条染色体上, SSR 分子标记鉴定种子的纯度正是利用这种 DNA 序列的差异达到检测的目的。此外, SSR 标记具有成本低、数量丰富、结果稳定、试验周期短等特点, 因而 SSR 分子标记检测技术被广泛应用于杂交种子的纯度鉴定^[3]。

鉴于此, 笔者利用 SSR 分子标记检测技术, 对荃两优 2118 母本及父本进行多态性筛选, 筛选出了 2 对特异性好的引物(RM7120、RM8277), 并且这 2 对引物对荃两优 2118 的双亲均显示出很好的多态性, 在荃两优 2118 上显示出共显性特征, 因此适宜于对这 2 对引物进行纯度鉴定。

1 材料与方 法

1.1 材料与试剂 试验材料两系杂交水稻“荃两优 2118”及亲本样品由安徽华安种业有限责任公司提供。2108 年入库的种子中, 随机选取了 6 个批次的杂交种子, 分别编号为 18-1、18-2、18-3、18-4、18-5、18-6。在光照培育箱中培育 7 d, 取合适的幼苗进行后续的试验。试验所用的 Tag 酶为 TaKaRa 的高保真酶, 引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 模板的制备。①亲本 DNA 的提取。分别取父本与母本的种子苗嫩叶 0.2 g 左右, 分别装入 2.0 mL 离心管中。用液氮冷冻后磨碎, 加入提取液, 水浴, 再加入三氯甲烷、异戊醇、乙醇等试剂, 提取 DNA。②杂交种子苗的 DNA 提取。首先, 将上述已培育 7 d 左右的幼苗每个批次随机取 192 棵, 每棵幼苗剪取 1~2 cm 左右的嫩叶, 分别置于 96 孔 PCR 板中; 其次, 在 PCR 板孔中加入 90 μL 的 1 mol/L NaOH 溶液, 确保将植物组织完全浸泡, 沸水浴 5 min; 然后, 在 PCR 板孔中加入 45 μL 的 1 mol/L Tris-HCL (pH 8.0), 沸水浴 1 min; 最后, 再分别加入 45 μL 的 TE (pH 8.0), 静止片刻后吸取 2.0 μL 液体作为后续 PCR 反应模板^[4]。

1.2.2 DNA 指纹鉴定。PCR 扩增引物采用 SN/T3402-2012《两系杂交水稻与亲本真实性及品种纯度鉴定 DNA 分析法》中用于纯度鉴定的 48 对 SSR 多态性引物^[5]。PCR 扩增体系(总体积 10 μL): 10×Buffer 1.0 μL, 10 mmol/L dNTP 0.2 μL, 50 ng/mL 的上下游引物各 0.2 μL, Tag 酶 0.6 μL, 按上述方法制备 DNA 模板 2.0 μL, ddH₂O 5.8 μL。PCR 扩增程序: 95 °C 下预变性 2 min, 进行 32 次扩增反应循环, 94 °C 下变性 45 s, 55 °C 下退火 45 s, 72 °C 下延伸 1 min。然后 72 °C 下延伸 8 min, 至最后 10 °C 恒温。将 PCR 产物用非变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳及染色检测, 观察胶片并记录结果^[6]。

1.2.3 田间种植鉴定。每个批次在海南田间种植 1 个小区, 每个小区种植 400 株, 单苗移栽, 并设亲本对照。在整个生长阶段检查小区的种植情况, 观察品种的特征特性, 注意减少化肥、除草剂的使用, 以免影响植株的特征特性。在抽穗前及齐穗后依据 GB/T 3543.5-1995《农作物种子检验规程真实性和品种纯度鉴定》进行田间纯度鉴定, 根据品种特征特性鉴定并记录下杂株类型和数量^[7]。

作者简介 王立广(1989—), 男, 安徽霍邱人, 助理农艺师, 硕士, 从事分子育种与种子检验工作。

收稿日期 2019-06-25; **修回日期** 2019-07-05

2 结果与分析

2.1 “荃两优 2118”F₁ 种子特异性引物的筛选 试验参照行业标准 SN/T 3402-2012《两系水稻品种真实性与纯度鉴定 DNA 分析法》,对 48 对引物进行筛选,最后选择 RM7120 和 RM8277 作为“荃两优 2118”F₁ 种子纯度 SSR 鉴定引物。引物 RM7120 的上游为 5'-TGCCCAAAATATATGAAACC-3',下游为 5'-TTTTCTTGTGAATGGGAAC-3';引物 RM8277 的上游为 5'-AGCACAAGTAGGTGCATTTC-3',下游为 5'-ATTTGCCTGTGATGTAATAGC-3'。

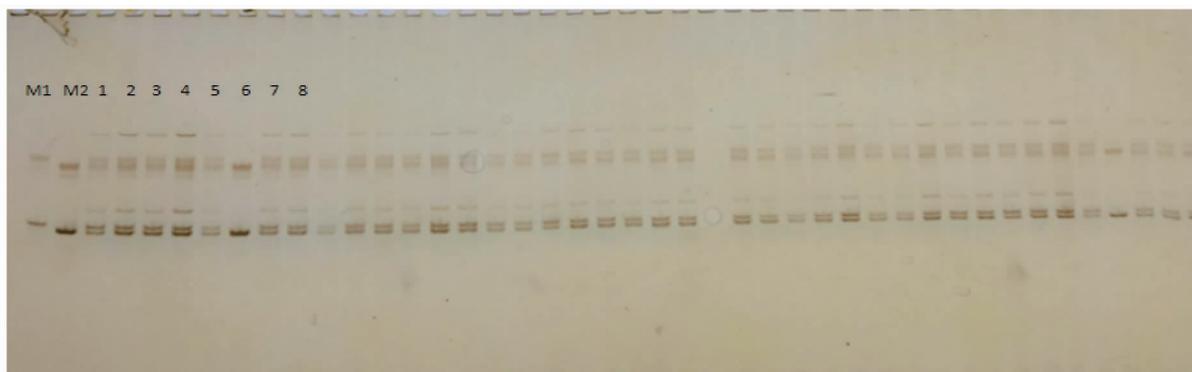
2.2 DNA 指纹鉴定与田间种植鉴定结果的比较 利用引物 RM7120 和 RM8277 对 6 批“荃两优 2118”各 96 棵幼苗进行 SSR 分子标记鉴定,田间鉴定种植 400 株,结果见表 1。从表 1 可以看出,SSR 分子标记与田间鉴定结果比较接近,差值最大为 2.05%,差值最小为 0.23%。图 1 为利用引物 RM7120 进行 SSR 鉴定的电泳结果,M₁、M₂ 双亲的带型为单

一带型,杂交种 1、2、3、4、5、7、8 为杂合带型并具有双亲的带型,自交结实的不育系 6 的带型与不育系 M₂ 一致。

表 1 DNA 指纹鉴定与田间鉴定结果比较

Table 1 Comparison between the DNA finger-print identification and field identification

样品编号 Sample code	品种名称 Variety name	DNA 指纹鉴定 DNA finger-print identification		田间鉴定 Field identification	
		纯度苗数 Seedlings 个	纯度 Purity %	纯度苗数 Seedlings 个	纯度 Purity %
18-1	荃两优 2118	192	98.2	400	99.01
18-2	荃两优 2118	192	98.9	400	96.85
18-3	荃两优 2118	192	98.4	400	98.84
18-4	荃两优 2118	192	98.9	400	98.21
18-5	荃两优 2118	192	97.9	400	98.72
18-6	荃两优 2118	192	99.0	400	99.23



注:M₁ 为恢复系;M₂ 为不育系;1、2、3、4、5、7、8 为杂交种;6 为自交结实的不育系

Note:M₁ was restorer;M₂ was male sterile line;1、2、3、4、5、7、8 were hybrid;6 was self-bred sterile line

图 1 DNA 指纹鉴定电泳分析结果

Fig. 1 Results of electrophoretic analysis of DNA fingerprint identification

3 结论与讨论

DNA 分子标记技术直接分析遗传物质的多态性,其中 SSR 标记由于具有数量丰富、多态性高、遗传上的共显性、试验操作简单、结果稳定等优点,已成为杂交水稻种子纯度鉴定的一种理想分子标记^[8]。相比较而言,田间种植鉴定是目前公认的杂交水稻种子纯度鉴定中比较可靠、准确的鉴定方法,也是国家标准规定的、目前鉴定杂交水稻种子纯度应用最广泛的方法之一^[9]。

试验结果显示,SSR 鉴定与田间鉴定所得杂交水稻种子纯度存在差异,并且差异的变化无规律可寻。这一方面是因为 SSR 标记可准确区分不育系和恢复系,但对于窜粉混杂和变异株较难区分,此外 SSR 鉴定的准确性也受到 DNA 提取质量、电泳操作和引物的影响;另一方面是因为田间种植鉴定的结果准确性受到鉴定者的经验、栽培管理、环境条件等因素干扰^[6]。但总体来看,SSR 鉴定与田间种植鉴定的结果十分接近。

对于企业而言,种子入库后到播种之前开始包装销售,而海南加代种植鉴定需要在次年 4 月份才能得到鉴定结果。为了给包装销售提供可靠的质量依据,就需要在室内先进行

纯度鉴定。在实际操作中,应采用以室内鉴定为辅,田间鉴定为主的指导种子的生产加工。研究掌握室内检测与田间鉴定结果的关系可以更清楚地了解品种特性,而 DNA 指纹鉴定是一种快速、可靠、优良的杂交水稻种子纯度鉴定方法^[10]。

参考文献

- [1] 郭承亮. SSR 分子标记在杂交水稻种子纯度精确鉴定中的应用[J]. 中国种业,2014(1):21-23.
- [2] 阳庆华,李秀琼,鲁孟海. SSR 分子检测与田间小区种植鉴定扬两优 6 号纯度的比较[J]. 中国种业,2014(7):49-50.
- [3] 周会,苏秀,毛双林,等. 利用 SSR 分子标记鉴定两系杂交水稻品种纯度试验[J]. 种子世界,2014(4):30-32.
- [4] 王伟威,孟庆虹,张瑞英,等. 5 种主要农作物 DNA 快速提取方法研究[J]. 黑龙江农业科学,2008(5):1-2.
- [5] 杨剑波,姚剑,陆徐忠,等. 两系水稻品种真实性与纯度鉴定 DNA 分析法:SN/T 3402-2012[S]. 北京:中国标准出版社,2012.
- [6] 宗凯,李云飞,盛旋,等. 利用多对 SSR 标记引物鉴定两系杂交水稻“C 两优 513”和“深两优 5814”的种子纯度[J]. 植物检疫,2018(4):57-59.
- [7] 支巨振,毕辛华,杜克敏,等. 农作物种子检验规程真实性和品种纯度鉴定:GB/T 3543.5-1995[S]. 北京:中国标准出版社,1995.
- [8] 曹栋栋,詹艳,王洋,等. 杂交水稻种子纯度鉴定方法对比研究[J]. 浙江农业科学,2015,56(5):718-722.
- [9] 胡景涛,黄文章,严明建. 几种杂交水稻种子纯度鉴定的方法及其应用前景[J]. 安徽农业科学,2009,37(4):1493-1495,1536.
- [10] 张雯,丁显萍,张萍,等. 杂交水稻种子纯度 DNA 指纹鉴定与田间鉴定结果的比较[J]. 安徽农学通报,2018,24(13):11-12.