

利用 SSR 标记鉴定杂交旱稻新品种鑫两优 212 纯度的研究

张彩娟¹, 吴宇光¹, 郑文寅¹, 王文余², 朱宗河^{1*}

(1. 安徽农业大学农学院, 安徽合肥 230036; 2. 合肥市蜀香种子有限公司, 安徽合肥 230011)

摘要 杂交水稻纯度鉴定对水稻种子质量控制和降低生产经营风险具有重要意义。利用 SSR 标记技术, 以籼稻杂交旱稻新品种鑫两优 212 及其亲本 DNA 为材料, 从 48 对 SSR 引物中筛选出 3 对在杂交种鑫两优 212 中呈现双亲带型的引物。研究表明, 这 3 对引物均可用于杂交种鑫两优 212 种子纯度鉴定。

关键词 鑫两优 212; SSR 标记; 水稻; 纯度

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2018)34-0068-03

Application of SSR Molecular Marker Technology in Seed Purity Identification of New Hybrid Upland Rice Xinliangyou 212

ZHANG Cai-juan, WU Yu-guang, ZHENG Wen-yin et al (Agricultural College, Anhui Agriculture University, Hefei, Anhui 230036)

Abstract It is important to identify the purity of the hybrid rice seed on managing rice seed quality and controlling risks. In this study, genomic DNA extracted from F₁ hybrid of Xinliangyou 212 and its parental lines was used to SSR analysis with 48 pairs of primer, 3 pairs of SSR primers were selected, which with the male and the female parents polymorphism. The 3 pairs of SSR primers could be used to identify the purity of this hybrid.

Key words Xinliangyou 212; SSR; Rice; Purity

种子质量包括纯度、净度、发芽率、水分等, 其中种子纯度是最重要, 也是最容易引起生产纠纷的质量指标。我国是杂交水稻研究最早、种植面积最大的国家。在我国广泛推广的两系杂交水稻由于其母本为光、温敏核不育系, 制种过程中受气候变化影响较大, 如低温天气, 易引起不育系的育性转换, 直接影响到杂交种子纯度^[1]。杂交水稻纯度影响着杂种优势强弱和产量高低。种植纯度不合格的杂交水稻种子不仅阻碍优良品种优良遗传性能的充分发挥, 还会导致大面积减产, 给国家、种子企业和农民带来巨大的经济损失^[2]。因此, 种子纯度是杂交稻种子生产经营过程中最突出、种子企业最关心的核心问题之一。

目前应用于杂交水稻种子纯度鉴定的方法主要有种植鉴定、籽粒形态鉴定、同工酶鉴定、DNA 分子标记鉴定^[3]。不同杂交水稻品种种子籽粒形态差异有限; 同工酶法, 多态性不够丰富, 且有组织和器官特异性, 从而限制了其应用^[4]; 种植鉴定是最直观、最有效、最符合生产实践的纯度鉴定方法, 是种子企业最倚重的鉴定方法, 但由于其鉴定周期长, 鉴定结果不能及时指导种子加工和销售。因此, 研究和应用其他简便、快速、准确、不受时空限制的鉴定方法, 辅助种植鉴定结果, 弥补种植鉴定的滞后性, 作为在种植鉴定结果出来之前大量销售时的初步依据, 是种子企业最希望采取的方法。SSR 分子标记具有数量丰富、多态性高、无环境影响、操作快速简单、结果稳定可靠、引物序列易交流等优点, 已经广泛应用于杂交稻纯度鉴定^[5-12]。

鑫两优 212 是合肥市蜀香种子有限公司利用抗旱性较强的两系不育系蜀鑫 1S 与抗高温恢复系鑫恢 212 2009 年配

组, 2014 年通过安徽省审定的杂交水稻新品种(审定编号: 皖稻 2014022), 经上海市农业生物基因中心 2012 年抗旱性鉴定, 抗旱性达 1 级, 是国内选育的首个杂交籼型旱稻品种^[13]。笔者拟利用农业部颁布的行业标准《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》(NY/T 1433—2014) 中推荐的 48 个 SSR 标记, 筛选适合的特异引物用于该杂交种纯度的快速鉴定。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料为鑫两优 212 杂交标准种及其亲本, 以及纯度待测的鑫两优 212 样品, 均由合肥市蜀香种子有限公司提供, 在光照培养箱(恒温 30 ℃)中培养 7 d 左右。SSR 引物和 DNA 聚合酶购自上海生工, 引物序列(表 1)源于中华人民共和国农业行业标准《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》(NY/T 1433—2014)。

1.2 方法

1.2.1 供试材料发芽。按照《农作物种子检验规程》(GB/T 3543.4—1995)要求, 从鑫两优 212 杂交标准种、亲本及纯度待测样品中均随机取 200 粒种子, 均匀置于发芽床上, 在温度为 30 ℃、光照为 750 lx、湿度为 75% 的条件下发芽 3~7 d。

1.2.2 DNA 提取。DNA 提取采用常规的 CTAB 法: 取 2~3 g 的水稻幼苗, 剪碎放入 2 mL 离心管中, 加入 1~2 颗钢珠, 放入液氮中 5 min, 将离心管取出用漩涡振荡仪粉碎, 向离心管中加入 500 μL 预热的 CTAB, 盖好离心管盖放在 65 ℃ 水浴锅中预热 30 min, 期间来回颠倒 2~3 次, 预热后加入氯仿: 异戊醇(24:1)抽提液 500 μL, 振荡混匀后放入高速冷冻离心机中 10 000 r/min 离心 5 min, 离心结束后吸取 400 μL 上清液转移到 1.5 mL 离心管中, 加入 800 μL 无水乙醇放入 -20 ℃ 冰箱中冷冻 30 min, 沉淀 DNA, 然后放入离心机中 10 000 r/min 离心 10 min, 取出离心管可以看到白色透明沉淀, 弃上清液。再加入 70% 乙醇洗涤 2 次, 放置通风处风干, 加入 100 μL TE 缓冲液溶解 DNA, -20 ℃ 保存, 使用时对母液进行稀释, DNA 工作液保持在 50 ng/μL。

基金项目 国家星火计划(2015GA710007)。

作者简介 张彩娟(1993—), 女, 安徽亳州人, 硕士, 从事水稻育种研究。吴宇光(1995—), 男, 安徽合肥人, 从事水稻育种研究。张彩娟与吴宇光为共同第一作者。* 通讯作者, 副教授, 博士, 从事油菜育种研究。

收稿日期 2018-03-05

1.2.3 PCR 扩增。采用 10 μL 的 PCR 反应体系:1 μL 样品 DNA,1 μL 10 \times buffer,0.6 μL 25 mmol/L MgCl_2 ,0.4 μL 5.0 mmol/L dNTP,0.1 μL 5 U *Taq* 酶,上下游引物各 0.5 μL ,最后加 5.9 μL 的超纯水补足到 10 μL 。反应程序为 94 $^\circ\text{C}$ 预变性 4 min;95 $^\circ\text{C}$ 45 s,57 $^\circ\text{C}$ 45 s,72 $^\circ\text{C}$ 1 min,36 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 8 min,最后 4 $^\circ\text{C}$ 冷却 10 min。

1.2.4 电泳检测。PCR 扩增产物采用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶进行电泳检测。点样后,1 000 V 电泳预热 30 min,上样后稳压 1 000 V 电泳 60~90 min。电泳完毕后,用 10% 冰醋酸溶液(1 L)固定 30 min,用 2% 硝酸银溶液染色 30 min,用预冷的 3% 无水碳酸钠溶液显色,ddH₂O 漂洗 1~5 min,室温下自然晾干。拍照、观察带型、统计结果数据。

表 1 研究所用的 48 对 SSR 引物

Table 1 48 pairs of SSR primers used in the present research

序号 No.	引物 Primer	正向引物序列(5'—3') Forward primer (5'—3')	反向引物序列(5'—3') Reverse primer (5'—3')	所在染色体 Chromosome
1	RM278	GTAGTGAAGCCTAACATAATC	TCAACTCAGCATCTCTGTCC	B09
2*	RM258	TGCTGTATGTAGTCCGACC	TGGCCTTTAAAGCTGTCCG	B10
3*	RM224	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCGGG	B11
4*	RM17	TGCCCTGTTATTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCATTTCA	B12
5*	RM493	TAGCTCCAACAGGATCGACC	GTACGTAACCGCGAAGGTG	C01
6	RM561	GAGCTCTTTTGACTACGGC	GAGTAGCTTTCTCCACCCC	C02
7	RM8277	AGCACAAGTAGGTGCATTTTC	ATTTGCCCTGTGATGTAATAGC	C03
8	RM551	AGCCCAGACTAGCATGATTG	GAAGCGGAGAAGGATCACAG	C04
9	RM598	GAATCCGACACGTGATGAAC	ATCGGACTGATCGGTACTCC	C05
10	RM176	CGGCTCCGCTACGACGTCTCC	AGCGATGCGCTGGAAGAGGTGC	C06
11	RM432	TTCTGTCTCACGCTGGATTG	AGCTGCGTACCTGATGAATG	C07
12	RM331	GAACCAAGAGGACAAAAATGC	CATCATACATTTGCAGCCAG	C08
13	OSR28	AGCAGCTATAGCTTAGCTGG	ACTGCACATGAGCAGAGACA	C09
14	RM590	CATCTCCGCTCTCCATGC	GGAGTTGGGGTCTGTGTTCC	C10
15*	RM21	ACAGTATTTCCGTAGGCACGG	GCTCCATGAGGGTGGTAGAG	C11
16*	RM3331	CCTCTCCATGAGCTAATGC	AGGAGGAGCGGATTTCTCTC	C12
17*	RM7102	TAGGAGTGTTFAGACTGCCA	TCCGTTTGTATACATCAG	D12
18	RM332	TGCAAGCGGCAAGGTGAAG	TGCAACTTGGAGAGCGGTGTGG	D11
19	RM316	CTAGTTGGGCATACGATGGC	ACGCTTATATGTTACGTCAAC	D10
20	RM542	TGAATCAAGCCCTCACTAC	CTGCAACGAGTAAGGCAGAG	D09
21*	RM583	AGATCCATCCCTGTGGAGAG	GCGAACTCCGCTTGTAAATC	A01
22*	RM71	CTAGAGCGGCAAAACGAGATG	GGGTGGGGCAGGTAATAATG	A02
23	RM85	CCAAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC	A03
24*	RM471	ACGCACAAGCAGATGATGAG	GGGAGAAGACGAATGTTTGC	A04
25*	RM274	CCTGCTTATGAGAGCTTCG	CTTCTCCATCAGTCCCATGG	A05
26	RM190	CTTTGCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCTGATG	A06
27	RM336	CTTACAGAGAAAGGGCATCG	GCTGTTTGTTCAGGTTCCG	A07
28*	RM72	CCGCGGATAAAACAATGAG	GCATCGGTCTTAACAAAGGG	A07
29*	RM219	CCTCGGATGATGTAAGCCT	CATATCGGCATTCGCCTG	A09
30	RM311	TGGTAGTATAGTACTAAAACAT	TCCTATACACATACAAAACATAC	A10
31*	RM209	ATATGAGTTGCTGTCTGTGCG	CAACTTGCATCCTCCCTCC	A11
32	RM19	CAAAAAACAGAGCAGATGAC	CTCAAGATGGAGCCCAAGA	A12
33	RM1195	ATGGACCACAACACGACCTTC	GCACCTCCCTGTCTCTGG	B01
34	RM208	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCCATCATTGTGTGGACC	B02
35	RM232	CCGGATGCTTCGATATTGC	CCGACTTTTCTCTCTGACC	B03
36*	RM119	CATCCCCCTGCTGTCTGCTG	CGCCGGATGTTGGGACTAGCC	B04
37	RM267	TGCAGACATAGAGAAGGAAGTG	AGCAACAGCACAACTTGATG	B05
38	RM253	TCCTTCAAGAGTGC AAAACC	GCATTGTCATGTCGAAGCC	B06
39	RM481	TAGCTAGCCGATGGAATGGC	CTCCACCTCCTATGTTGTTG	B07
40	RM339	GTAATCGATGCTGTGGGAAG	GAGTCATGTGATAGCCGATATG	B08
41	RM423	AGCACCCATGCCATTATGTTG	CCTTTTTAGTAGCCCTCC	D04
42	RM443	GATGGTTTTCATCGGCTACG	AGTCCGAAATGTCGTTTCCG	D01
43*	RM571	GGAGGTGAAAGCGAATCATG	CCTGCTGCTTTTTCATCAGC	D05
44	RM289	TTCCATGGCACACAAGCC	CTGTGCACGAAGCTTCCAAAG	D08
45	RM567	ATCAGGGAAATCCTGAAGGG	GGAAGGAGCAATCACCCTG	D07
46	RM490	ATCTGCACACTGCAAAACACC	AGCAAGCAGTGCITTCAGAG	D02
47*	RM231	CCAGATTATTTCTGAGGTC	CACTTGCATAGTTCTGCATTG	D06
48*	RM424	TTTGTGCTCACCACTTGAG	TGGCGCATTCATGTCATC	D03

注: * 表示在鑫两优 212 父母本及杂交种间表现多态性的引物

Note: * indicates the polymorphic markers between the parents of Xinliangyou 212

2 结果与分析

2.1 特异引物筛选 对鑫两优 212 标准杂交种及其亲本使用《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》(NY/T 1433—2014)中 48 对 SSR 引物进行 PCR 扩增,结果有 18 对引物在父母本间具有多态性,且在鑫两优 212 标准杂交种各单株中呈现双亲互补带型(图 1),约占检测引物的 37.5% (表 1),可用于该品种的纯度鉴定。

2.2 鑫两优 212 杂交种纯度鉴定

随机选取纯度待测的鑫两优 212 幼苗 100 株,分别提取 DNA 进行纯度鉴定,以亲本(父、母本)作为对照,选取多态性好、谱带清晰稳定、非特异性扩增少的 3 对引物(RM72、RM3331、RM493)进行 PCR 扩增,在 4% 变性聚丙烯酰胺凝胶上点样、电泳并分析结果。谱带中出现双亲互补带型的为杂交种,其他带型为杂株(图 2),以此计算纯度的百分率 = 杂交种单株数/检测单株数 \times

100%。结果表明,用 RM72、RM3331、RM493 标记检测鑫两优 212,都检测到第 16、25、32、40、68、78 和 87 号 7 个单株为非双亲互补带型杂株,且都是母本带型,据此计算出鑫两优

212 待测样品的纯度为 93%。该批次样品经过合肥市蜀香种子有限公司海南异地种植鉴定和合肥正季种植鉴定,纯度鉴定结果分别为 96.0%和 94.5%。

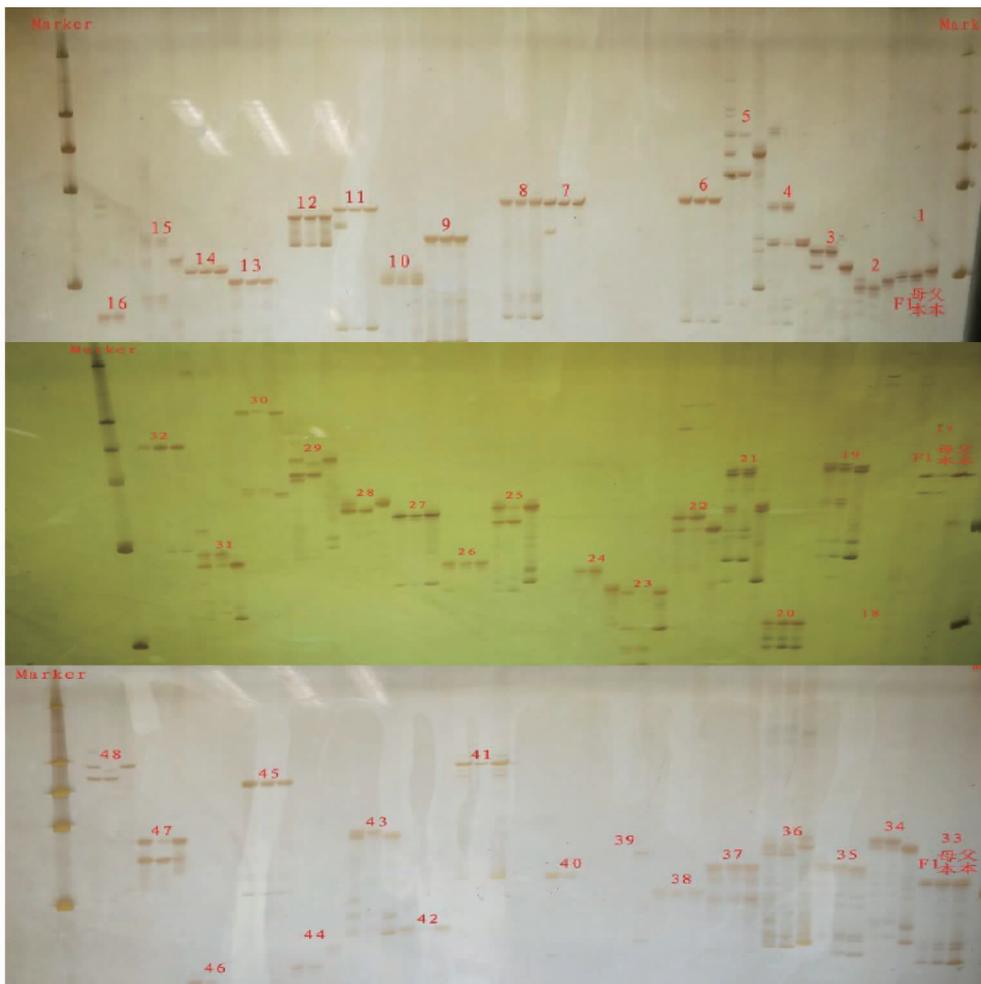


图 1 48 对引物在鑫两优 212 及其双亲中的多态性扩增结果

Fig.1 The polymorphism of 48 SSR markers between F_1 hybrid of Xinliangyou 212 and its parental lines

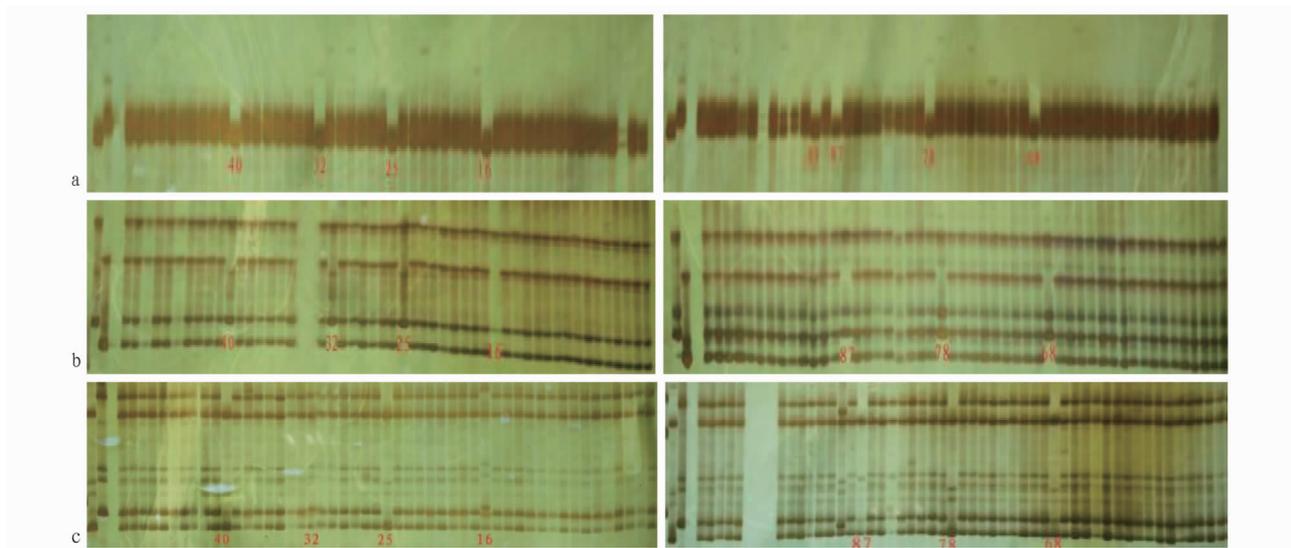


图 2 3 对引物对鑫两优 212 种子纯度检测结果 (a.RM72;b.RM3331;c.RM493)

Fig.2 Seed purity identification results of Xinliangyou 212 with 3 pairs of primers(a.RM72;b.RM3331;c.RM493)

(图 5a), 而野生型植株叶色表现全绿(图 5b), 可能是体细胞变异, 使香龙血树表现型出现了差异, 虽然市场上已经有金边香龙血树, 但该研究中的金色叶缘变异和现有的金边性状

还存在很大差异, 可能是一种新的变异类型。这种变异产生的原因是否属于可遗传的变异, 以及后代能否 100% 保持这种变异还有待进一步研究。



注: a. 金色叶缘(突变型); b. 正常叶缘(野生型)

Note: a. Golden leaf margin (mutant); b. Normal leaf margin (wild type)

图 5 生根香龙血树移栽后表现

Fig.5 Performance of rooted *Dracaena fragrans* after transplantation

参考文献

- [1] 刘志政, 张广楠. 香龙血树的扦插与栽培技术[J]. 青海农林科技, 2004(2): 59-60.
- [2] 刘颂颂, 朱剑云, 何业华, 等. 也门铁工厂化育苗技术[J]. 经济林研究, 2006, 24(4): 71-73.
- [3] 刘和平, 何业华, 林剑波, 等. 也门铁及其嵌合体叶绿素合成特性研究[J]. 北方园艺, 2011(14): 120-122.
- [4] 杜文成. 香龙血树[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2004(11): 30-31.
- [5] 李锦, 李彦明. 北方室内盆栽香龙血树[J]. 中国花卉园艺, 2007(18): 40-41.
- [6] 胡一民. 时尚观叶新宠——也门铁[J]. 中国花卉盆景, 2007(1): 8-9.
- [7] 卢思聪. 香龙血树及其常见同属植物[J]. 中国花卉盆景, 1998(1): 4-6.
- [8] 钟志权. 关于也门铁爆发式开花[J]. 花木盆景(花卉园艺), 2007(8): 28.

- [9] 陈兴华, 何旭君, 张华通, 等. 也门铁组培工厂化育苗技术路线[J]. 仲恺农业工程学院学报, 2010, 23(2): 21-24.
- [10] 陈丽文, 杨利平, 荣慧, 等. 金心也门铁工厂化育苗技术研究[J]. 北方园艺, 2013(13): 138-141.
- [11] 何业华, 刘和平, 刘颂颂, 等. 也门铁嵌合体品种在离体培养中的变异规律及调控[J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(2): 70-73.
- [12] 侯占铭, 满都拉. 香龙血树和紫铁的组织培养与快速繁殖[J]. 内蒙古大学学报(自然科学版), 2001, 32(6): 642-643.
- [13] 易清, 何业华, 刘颂颂, 等. 3个也门铁品种高效离体繁殖体系的建立[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2007, 33(4): 440-446.
- [14] 黄莉雅, 陈国臣, 马锦林. 剑叶龙血树芽外植体诱导分化[J]. 广西林业科学, 2010, 39(3): 144-146.
- [15] 杨本鹏, 张树珍, 蔡文伟, 等. 海南龙血树组织培养过程中血竭形成的诱导[J]. 热带作物学报, 2009, 30(2): 181-185.

(上接第 70 页)

3 讨论

分子标记技术能从分子水平上反映生物个体间差异, 具有较高的多态性与重演性, SSR 分子标记技术用于作物纯度鉴定已是成熟的技术, 能以较小的成本、较短的时间准确、稳定地鉴定品种的纯度。该研究从均匀分布在水稻染色体上的 48 对 SSR 引物中筛选到 18 对用于鑫两优 212 杂交种纯度鉴定, 选用其中的 3 对引物可以快速、较为准确地鉴定出鑫两优 212 纯度。从筛选的 18 对引物中筛选特异性较强的引物组合对鑫两优 212 杂交种进行鉴定, 能够减少很多的工作量和成本, 且效果更好, 可靠性更高。

利用 SSR 分子标记技术进行纯度鉴定时, 有些与杂交种带有明显差异的单株在种植鉴定时并不一定表现出表型性状的差异, 因此 SSR 分子标记技术用于纯度鉴定时, 可以有效鉴别出大田无法确定的表型以及难以鉴别的植株, 因而分子鉴定和种植鉴定结果必然存在一定的差异, 而种植鉴定是最符合生产实践的纯度鉴定方法, 如何使分子鉴定结果更接近种植鉴定、更好地辅助种植鉴定结果还需进一步研究。

参考文献

- [1] 王兆贤, 高前宝, 王友存, 等. 两系杂交水稻纯度检测方法探讨[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(10): 5011-5034.
- [2] 乔兰兰. 利用 SSR 分子标记鉴定杂交稻种子齐两优 918 纯度[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(17): 120, 129.
- [3] 叶尚. 利用温泉热能与控光技术鉴定杂交稻种子纯度的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2004.
- [4] 李召华, 朱克永, 陈祖武, 等. SSR 分子标记技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用[J]. 杂交水稻, 2006, 21(4): 11-14.
- [5] 黄成志, 黄文章, 严明建, 等. 利用 SSR 分子标记鉴定杂交水稻真伪与纯度[J]. 安徽农业科学, 2009, 37(8): 3437-3438.
- [6] 吕桂兰, 丁芬, 沈枫, 等. SSR 标记技术在水稻遗传育种中的应用[J]. 北京水稻, 2007(3): 23-26.
- [7] 张琳, 杜娟, 齐丽霞, 等. SSR 标记在杂交早稻新组合纯度鉴定中的应用[J]. 江西农业大学学报, 2013, 35(3): 502-506.
- [8] 陈荣林, 黄运川, 唐梅, 等. SSR 分子标记检测超级杂交稻桂两优 2 号种子纯度的研究[J]. 杂交水稻, 2013, 28(4): 75-78.
- [9] 阳庆华, 李秀琼, 鲁孟海. SSR 分子检测与田间小区种植鉴定两优 6 号纯度的比较[J]. 中国种业, 2014(7): 49-50.
- [10] 肖子发, 朱克永, 刘之熙, 等. 利用 SSR 标记构建湖南省审杂交水稻品种 DNA 指纹图谱[J]. 杂交水稻, 2011, 26(3): 51-56.
- [11] 周桂林, 范家萌, 周贤达, 等. 两系超级稻丰两优四号指纹图谱构建及纯度快速鉴定[J]. 安徽农学通报, 2017, 23(13): 138-141.
- [12] 尤佳, 王晋, 王朝慧, 等. 应用 SSR 技术鉴定杂交种种子纯度的方法探究[J]. 种子, 2015, 34(5): 46-49.
- [13] 王文余, 陈海洲, 张孝国, 等. 两系杂交早稻鑫两优 212 的选育与应用[J]. 安徽农学通报, 2014, 20(18): 39, 63.