

利用 SSR 分子标记鉴定杂交水稻真伪与纯度

黄成志, 黄文章, 严明建, 胡景涛, 吕直文, 雷树凡, 冉彦秀 (重庆三峡农业科学院, 重庆 404001)

摘要 [目的] 寻找快速有效鉴定杂交水稻种子真伪与纯度的方法, 以提高鉴定的效率。[方法] 利用 SSR 分子标记鉴定杂交水稻种子中优 88、协优 88 和全丰优 88 的真伪和纯度, 并将鉴定结果与田间鉴定结果进行比较。[结果] 杂交种的 DNA 带谱中均含有两个亲本的互补带, 说明杂交种为真种子。中优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 97.43% 和 97.60%; 协优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 98.00% 和 98.10%, 全丰优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 96.29% 和 96.60%, 3 个杂交种的 SSR 分子标记鉴定和田间鉴定的结果基本上一致, 没有明显的差异, 说明用 SSR 检测杂交水稻种子纯度是完全可行的。[结论] SSR 分子标记在杂交水稻种子真伪与纯度鉴定上具有较好的应用价值和前景。

关键词 杂交水稻; SSR 分子标记; 纯度鉴定; 真伪

中图分类号 S511 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611 (2009) 08 - 03437 - 02

Identification of True or False and Purity of Hybrid Rice with SSR Molecular Marker

HUANG Cheng-zhi et al (Three Gorges Academy of Agricultural Sciences in Chongqing, Chongqing 404001)

Abstract [Objective] The aim was to search for the quick and effective method for the identification of true or false and purity of hybrid rice seeds so as to improve the identification efficiency. [Method] The true or false and purities of seeds of the hybrid rice Zhongyou 88, Xieyou 88 and Quanfengyou 88 were identified with SSR molecular marker and the identification result was compared with the field identification result. [Result] Two complementary bands of the parents appeared in the DNA band spectra of the hybrid seeds, which showed that the hybrid seeds were true. The purities of the Zhongyou 88 identified by SSR molecular marker and in field were 97.43% and 97.60%, resp., that of Xieyou 88 were 98.00% and 98.10%, resp. and that of the Quanfengyou 88 were 96.29% and 96.60%, resp. The results identified by SSR molecular marker and in field were identical basically and had no obvious difference, which showed that using SSR to detect the purity of the hybrid seeds was completely feasible. [Conclusion] The SSR molecular marker had better application value and foreground in the identification of true or false and purity of hybrid rice seeds.

Key words Hybrid rice; SSR molecular marker; Purity identification; True or false

中国是世界上第一个在生产上成功利用水稻杂种优势的国家, 杂交水稻种子年使用量已达 2.5 亿 kg 左右^[1]。种子质量关系到广大生产者的切身利益, 而种子的纯度则是杂交水稻种子质量的核心指标, 是种子质量分级的主要标准, 也是企业购销种子的关键依据^[2], 因此, 准确、快速地鉴定杂交水稻种子的真伪和纯度尤显重要。水稻杂种纯度的鉴定方法很多, 如常规鉴定方法、叶色标记鉴定法、蛋白质指纹鉴定、DNA 指纹鉴定技术等。其中, DNA 指纹鉴定技术的应用使品种纯度的检验由传统技术进入了分子水平, 为品种纯度和真实性鉴定提供了准确、可靠、快速、方便的方法^[3], 而 SSR (Simple Sequence Repeats) 分子标记法是其中之一, 它具有试验操作简单、结果稳定可靠、引物序列易交流等优点^[4]。应用分子标记构建指纹图谱筛选品种间的特异带谱, 不仅为种子纯度鉴定提供了一种更准确的方法^[5-7], 还能大大减少鉴定时间。笔者利用 SSR 分子标记鉴定了杂交水稻种子中优 88、协优 88 和全丰优 88 的真伪和纯度, 并将鉴定结果与田间鉴定结果进行比较, 分析该方法的准确性和可行性, 拟寻找一种快速有效鉴定杂交水稻种子真伪与纯度的方法, 以提高鉴定的效率, 为利用 SSR 分子标记鉴定杂交水稻种子的真伪和纯度提供科学依据。

1 材料与方法

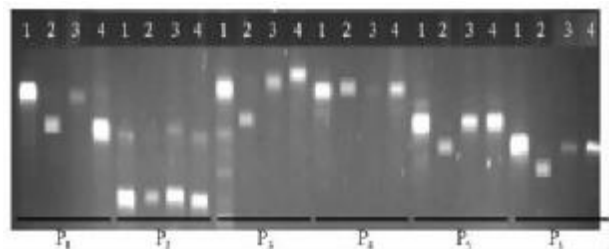
1.1 供试材料 杂交水稻中优 88 (中九 A/万恢 88)、协优 88 (协清早 A/万恢 88) 和全丰优 88 (全丰 A/万恢 88) 及其亲本万恢 88、中九 A、协青早 A 和全丰 A。

1.2 试验方法

1.2.1 提取 DNA。 取亲本 30 粒左右, 杂交种各取 400 ~ 500

粒 (保证有 350 根苗), 浸泡 (浸泡期间早晚换水 1 次) 到露白后, 分别转到垫有滤纸的发芽盒中, 在光照培养箱中 30 °C 光照条件下发芽育苗 (稻苗长到 5 cm 左右即可), 再将谷苗装入离心管 (每管装一苗) 并编号, 用 TCAB 法提取 DNA。

1.2.2 筛选引物。 利用亲本万恢 88、中九 A、协青早 A 和全丰 A, 通过 PCR 扩增、琼脂糖电泳及成像分析, 从 P₁ ~ P₁₂₄ 共 124 对引物中筛选出 P₁、P₃、P₅、P₆ 等 25 对多态性好的引物 (图 1), 用于鉴定杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的真伪。再用其中的 P₃₅、P₁₉ 和 P₆₈ 3 对引物分别鉴定中优 88、协优 88 和全丰优 88 纯度。



注: 1~4 分别表示全丰 A、万恢 88、中九 A、协青早 A; P₁ ~ P₆ 表示引物。

Note: 1. Quanfeng A; 2. Wanhui 88; 3. Zhongjiu A; 4. Xieqingzao A; P₁ - P₆, primers.

图 1 部分引物筛选情况

Fig. 1 Primers screening

1.2.3 真伪鉴定。 利用筛选出来的 25 对引物, 用各自的亲本作对照, 通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像, 分别检测杂交水稻种子中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA 谱带, 用数字统计 (有带记作 1, 无带记作 0) 出来。如在这 25 对引物的检测中, 杂交种 DNA 带谱均具有双亲 DNA 的互补带, 则该杂交种为真种子; 相反, 如果有 1 对以上引物检测的带型

作者简介 黄成志 (1982 -), 男, 贵州晴隆人, 助理农艺师, 从事水稻育种研究。

收稿日期 2008-12-26

中杂交种 DNA 不含有亲本 DNA 的互补带,即为假种子。

1.2.4 纯度鉴定。用各自的亲本作对照,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像,用引物 P₃₅、P₁₉和 P₆₈分别检测杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA,观察成像谱带。如谱带中杂交种 DNA 谱带含有双亲的互补带,则为该杂交种;相反,如果杂交种 DNA 带谱中不含亲本 DNA 的互补带,即为杂株。然后统计杂株数,计算出品种纯度,并将该纯度结

果与田间纯度鉴定结果相比较。

2 结果与分析

2.1 3 份杂交种的真伪鉴定 以亲本作对照,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像,分别检测杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA,再用数字统计出带谱上的条带情况(其中,表 1 为鉴定中优 88 的统计结果)。

表 1 中优 88 真伪鉴定结果统计

Table 1 The statistics of identification test results of Zhongyou 88

材料 Material	P ₁	P ₃	P ₅	P ₆	P ₉	P ₁₄	P ₁₈	P ₁₉	P ₂₀	P ₂₆	P ₂₉	P ₃₅	P ₃₆
万恢 88	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010
中九 A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
中优 88	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111

材料 Material	P ₄₁	P ₄₃	P ₄₉	P ₅₀	P ₅₅	P ₆₁	P ₆₈	P ₇₉	P ₉₁	P ₉₂	P ₉₄	P ₉₇
万恢 88	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010	010
中九 A	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
中优 88	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111	111

注:“1”表示有谱带,“0”表示无谱带。

Note:“1”ineicates there is spectral band,“0”indicates no spectral band.

从谱带统计结果可以看出,25 对引物对中优 88 检测的结果中,杂交种中优 88 的 DNA 谱带中均含有亲本万恢 88 和中九 A 的互补带,说明杂交种中优 88 为真种子。用同样方法鉴定出协优 88 和全丰优 88 均为真种子。

2.2 3 份杂交种的纯度鉴定 用各自的亲本作对照,通过 PCR 扩增、琼脂糖凝胶电泳、成像,用引物 P₃₅、P₁₉和 P₆₈分别检测杂交水稻种中优 88、协优 88 和全丰优 88 的 DNA,从成像谱带中统计出杂株数量,然后计算出纯度,结果见表 2。

表 2 杂交水稻中优 88、协优 88 和全丰 88 的纯度鉴定结果

Table 2 The purity test results of Zhongyou 88, Xieyou 88 and Quan-feng 88

杂交种 Hybrid seed	试验鉴定方法 Test method	群体数株 Colony no.	杂株株 Mixed plants	杂株率 % Mixed rate	种子纯度 % Seed purity
中优 88	SSR 分子标记	350	9	2.57	97.43
	田间鉴定	1 000	24	2.40	97.60
协优 88	SSR 分子标记	350	7	2.00	98.00
	田间鉴定	1 000	19	1.90	98.10
全丰优 88	SSR 分子标记	350	13	3.71	96.29
	田间鉴定	1 000	34	3.40	96.60

从表 2 可以看出,中优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 97.43% 和 97.60%; 协优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 98.00% 和 98.10%; 全丰优 88 的 SSR 分子标记和田间鉴定的纯度分别为 96.29% 和 96.60%。3 个杂交种的 SSR 分子标记鉴定和田间鉴定的结果基本上一致,没有明显的差异,说明用 SSR 检测杂交水稻种子纯度是完全可行的^[8]。

3 讨论

从上述试验结果可以看出, DNA 分子标记结果与田间鉴定的结果一致,说明了 DNA 分子标记的结果是可靠的,

利用分子标记鉴定杂交水稻的真伪和纯度是完全可行的。此外,DNA 分子标记鉴定纯度的方法与田间鉴定法相比,具有较多优点:首先,其操作极其简单。只要具有初中文化的人员,再由技术人员演示并教几次即能掌握基本操作。其次是用时少。从发芽开始,熟练人员只需要 1 周左右就可鉴定出结果了,而田间鉴定至少要 3~4 个月才能得到结果,可能会错过很多有利的机会。再次是准确度高。从该试验可以看出,用 DNA 分子标记鉴定纯度准确度较田间高(人为统计可能有漏统计等)。还有,DNA 分子标记不太受环境和人为因素的影响。DNA 的遗传特点比较稳定,很少受到环境和人为因素的影响,而田间鉴定可能会受到自然灾害、病虫害等影响,导致结果的误差较大,甚至结果不可用。综上所述,利用 SSR 分子标记应是快速有效鉴定杂交水稻种子真伪与纯度的重要方法之一,有着广阔的应用前景^[9]。

参考文献

[1] 刘之熙,陈祖武,朱克永,等.利用 SSR 分子标记快速鉴定杂交水稻种子纯度技术体系的优化[J].杂交水稻,2008,23(1):60-63.
 [2] 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.
 [3] 辛景树,郭景伦,张软斌.几种常用分子标记技术在种子纯度和品种真实性鉴定方面的比较与分析[J].种子,2005,24(1):58-60.
 [4] 陈红旗,陈宗祥,倪深,等.利用分子标记技术聚合 3 个稻瘟病基因改良金 23B 的稻瘟病抗性[J].中国水稻科学,2008,22(1):23-27.
 [5] 方宜钧,刘思衡,江树业.品种纯度和真伪的 DNA 分子标记及其应用[J].农业生物技术学报,2000(2):106-110.
 [6] 威华雄,杨蜀兰,王斌,等.用聚合酶链式反应技术鉴定杂交水稻种子纯度的初步研究[J].湖北农业科学,1999(1):12-14.
 [7] 郑成超,温孚江.DNA 分子标记技术与作物品种纯度鉴定[J].山东农业大学学报,1997,28(4):499-505.
 [8] 彭锁堂,庄杰云,颜启传,等.我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J].中国水稻科学,2003,17(1):1-5.
 [9] 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.