

8个杂交水稻新组合种子纯度的分子标记鉴定

蒋钰东^{1,2} 何茹薇^{1,2} 罗俊涛^{1,2} 杨扬^{1,2} 郑军^{1,2} 付均^{1,2} 曾正明^{1,2}

(¹ 四川省农业科学院水稻高粱研究所/农业部西南水稻生物学与遗传育种重点实验室, 德阳 618000;

² 国家水稻改良中心四川泸州分中心, 泸州 646100)

摘要:本研究利用 SSR 标记和田间种植观察对新创制的 8 份杂交组合水稻种子进行纯度鉴定, 除杂交组合 6026A/R4149 采用 1 个标记之外, 其余 7 个杂交组合均采用 2 个标记鉴定, 分子标记和田间观察均鉴定 200 个单株。SSR 标记检测结果与田间种植鉴定结果基本相同, 因此, 筛选出的共显性标记适用于这 8 个杂交组合的水稻种子纯度鉴定。

关键词: 杂交组合; 水稻种子; SSR 标记; 纯度鉴定

水稻是我国最重要的粮食作物之一, 我国约有 65% 的人口以稻米为主食, 因此保障水稻的正常生产对我国粮食安全有着重要作用。目前我国水稻常年种植面积维持在 3000 万 hm^2 , 杂交水稻占我国水稻种植面积的 55% 左右, 杂交水稻比常规水稻品种产量优势明显, 一般可增产 20% 左右, 优势品种增产幅度更大, 杂交水稻的应用和推广使得我国水稻单产大幅度提高, 对保障我国水稻生产具有重要贡献^[1]。杂交种纯度的高低直接影响杂交水稻的种子质量, 种子质量是决定水稻大田生产中产量表现的关键, 也是决定种子公司生产的产品在市场上具备强大竞争力的重要因素, 是种子公司安身立命之本。检验杂交种子的纯度是每个种子公司将杂交种子推向市场前的必要环节^[2]。目前田间种植鉴定种子纯度是最为普遍的检验方法, 主要通过在海南海代种植或正季种植期间, 对水稻进行全生育进程的农艺性状观察, 比对各单株间的典型性状, 通过品种的农艺特征特性鉴别真实杂交种及杂株^[3]。海南种植鉴定有时间相对提前优势, 在当年冬季就能鉴定出纯度结果, 但在海南冬季短日照低温的条件下, 对感光类型的杂交水稻品种的鉴定结果往往不太准确。正季种植鉴定结果准确度高, 但时间明显滞后, 从生产上重大种子纯度事故来看, 当得知种子纯度不合格时, 种子已流入市场, 损失也已无法挽回。随着分子标记技术的发展, SSR

分子标记检测技术被广泛应用于杂交种子的纯度鉴定中, SSR 标记是在水稻分子层面上鉴定, 主要是利用不同水稻品种遗传组成不同, 基因组 DNA 中简单重复序列的重复次数有差异。通过 PCR 扩增及电泳方法检测出差异, 从而能够将不同品种精准区分。SSR 标记具有数量丰富、多态性高、遗传上呈共显性、实验操作简单、结果稳定可靠等特点^[4]。

本研究利用 SSR 标记技术对新配制杂交组合的双亲进行多态性筛选, 分别筛选出在双亲之间显示出良好多态性的引物, 然后对杂交种子进行纯度鉴定, 同时进行田间种植鉴定, 两种方法的结果进行比较来验证 SSR 标记检测 8 个杂交组合种子纯度的准确性。

1 材料与方 法

1.1 试验材料 亲本不育系为新育三系不育系 6026A。亲本恢复系共计 8 份: 德恢 6099、旌香占、粤禾丝苗、德恢 5292、泸恢 1611、R2195、R5004 和 R4149。

8 个杂交水稻新组合: 6026A/ 德恢 6099、6026A/ 旌香占、6026A/ 粤禾丝苗、6026A/ 德恢 5292、6026A/ 泸恢 1611、6026A/R2195、6026A/R5004、6026A/R4149。试验所用种子均是 2020 年夏季新生产的杂交水稻种子。

1.2 基因组 DNA 提取和检测 采用简易 CTAB 法^[5] 提取水稻嫩叶片总 DNA, 并利用核酸检测仪检测提取 DNA 样品浓度和质量。利用 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 扩增产物。

1.3 筛选引物 利用 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴

基金项目: 德阳市重点研发项目(2020NZ020); 四川省重点研发项目(2020YFN0107); 四川省农转资金项目(21NZZH0018); 四川省农业科学院现代农业学科建设项目(2021XKJS113, 2021XKJS114)

通信作者: 曾正明

定技术规程 SSR 标记法》中的 48 对引物进行双亲多态性检测,引物由擎科生物科技有限公司合成。选用各组合多态性标记用于后续杂交稻种子纯度检测。

1.4 SSR 标记鉴别种子纯度 利用双亲间具有多态性的 SSR 引物,对 200 株杂交种幼苗进行纯度鉴定,尽量选择 2 对 SSR 引物进行检测,扩增带型与标准带型不一致时,判定其为杂株。统计父本、母本和杂种种子数占被测种子数的比例。

1.5 田间种植鉴定种子纯度 每个组合在海南田间分别种植 200 株,单本栽插,栽插规格 16.5cm × 26.4cm。在整个生长阶段观察品种的特征特性,控制化肥和除草剂的使用剂量,以免影响植株本身的特征特性。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,根据品种特征特性对明显杂株及可疑植株用掐叶的方法进行标记,并详细记录下杂株类型和数量^[6]。

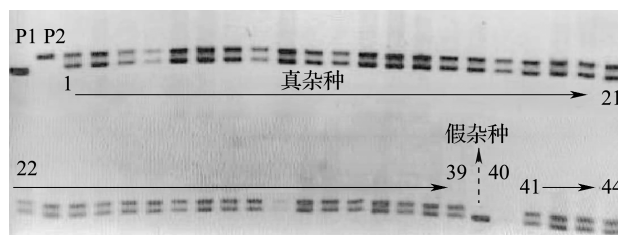
2 结果与分析

2.1 杂交组合引物筛选 由表 1 可知,经过对双亲间引物多态性筛选,在 6026A/德恢 6099 亲本间表现多态性的引物有 RM208、RM232、RM17、RM493、RM2877、RM21 和 RM3331;在 6026A/德恢 5292 亲本间表现多态性的引物有 RM19、RM274;在 6026A/R2195 亲本间表现多态性的引物有 RM219、RM19;在 6026A/R5004 亲本间表现多态性的引物有 RM311、RM19;在 6026A/泸恢 1611 亲本间表现多态性的引物有 RM71、RM19;在 6026A/旌香占亲本间表现多态性的引物有 RM17、RM432;在 6026A/R4149 亲本间表现多态性的引物仅有 RM17;在 6026A/粤禾丝苗亲本间表现多态性的引物有 RM274、RM201、RM232。

表 1 杂交稻组合及可用于纯度鉴定的 SSR 标记

组合名称	双亲间多态性 SSR 标记
6026A/德恢 6099	RM208、RM232、RM17、RM493、 RM2877、RM21、RM3331
6026A/德恢 5292	RM19、RM274
6026A/R2195	RM219、RM19
6026A/R5004	RM311、RM19
6026A/泸恢 1611	RM71、RM19
6026A/旌香占	RM17、RM432
6026A/R4149	RM17
6026A/粤禾丝苗	RM274、RM201、RM232

2.2 利用 SSR 标记的杂交种纯度检测 分别选取 8 个杂交组合 F₁ 中的 200 个单株,利用在 6026A/德恢 6099 双亲表现为多态性的 2 个 SSR 标记(RM208 和 RM17)检测发现,有 195 个单株在 2 个标记座位上均呈现为双亲的互补带型,可判断为真实的 6026A/德恢 6099 F₁ 种子,余下 5 个单株在其中 1 个标记座位上(RM17)呈现为双亲的互补带型,但在另外 1 个座位上(RM208)表现为德恢 6099 纯合型,说明该单株为混杂的其他杂合型材料(图 1,表 2)。利用 6026A/德恢 5292 双亲表现为多态性的 2 个 SSR 标记进行检测发现,有 6 个单株在 2 个座位上(RM19 和 RM274)表现为其他类型,其余 194 个单株在此 2 个座位上均呈现双亲的互补带型;利用 6026A/R2195 双亲表现为多态性的 2 个位点(RM219 和 RM19)进行检测发现,有 12 个单株在 2 个座位上表现为其他型,其余 188 个单株在此 2 个座位上均呈现双亲互补带型;利用 6026A/R5004 双亲表现为多态性的 2 个位点(RM311 和 RM19)进行检测发现,27 个单株在 2 个座位上表现为其他型,其余 173 个单株均呈现双亲互补带型;利用 6026A/泸恢 1611 双亲表现为多态性的 2 个位点(RM71 和 RM19)进行检测发现,有 8 个单株在 2 个座位上表现为其他型;利用 6026A/旌香占在 RM17 和 RM432 位点上表现为多态性,检测发现 5 个单株在 2 个座位上表现为其他型;利用 6026A/R4149 仅在 RM17 位点上表现为多态性,检测发现仅有 3 个单株表现为其他型,其他单株表现为双亲互补带型;利用 6026A/粤禾丝苗在 RM274 和 RM201 位点上表现为多态性,检测发现 7 个单株表现为其他型,193 个单株呈现双亲互补带型。



P1: 6026A; P2: 德恢 6099; 1~39、41~44: 6026A/德恢 6099 杂交组合种子; 40 为假杂种

图 1 标记 RM17 对 6026A 和德恢 6099 及其杂交种纯度检测

表2 杂交水稻种子 SSR 纯度鉴定结果

杂交组合	杂株苗数	种子纯度(%)
6026A/德恢 6099	5	97.5
6026A/德恢 5292	6	97.0
6026A/R2195	12	94.0
6026A/R5004	27	86.5
6026A/泸恢 1611	8	96.0
6026A/旌香占	5	97.5
6026A/R4149	3	98.5
6026A/粤禾丝苗	7	96.5

2.3 田间种植鉴定结果 同年冬季在海南基地种植各杂交组合 200 个单株进行田间观察,从表 3 结果发现,杂交组合 6026A/R5004 发现 3 株相近异

形株,其生育期、植株形态与鉴定组合相似,只是叶边缘、叶鞘颜色和粒宽上有明显不同。其次,发现每个组合都有不同程度杂株,6026A/德恢 6099 与 6026A/旌香占杂株类型主要表现为植株矮、生育期早以及完全不同形态的植株(疑是制种田飞花所致);6026A/泸恢 1611 和 6026A/粤禾丝苗杂株类型主要表现为抽穗期迟、高株、株型差异大等;6026A/R2195、6026A/德恢 5292 和 6026A/R4149 的杂株类型主要表现为株叶形态和籽粒性状上的差异。8 个组合中,田间纯度最好的是 6026A/德恢 6099,为 95.5%;最差的为 6026A/R5004,仅为 81.5%,但所有组合的纯度整体还是较差,均达不到杂交稻 96% 的纯度标准。

表3 试验组合抽穗期及田间纯度结果

组合名称	始穗期(月/日)	齐穗期(月/日)	非正常植株类型及数量	纯度(%)
6026A/德恢 6099	3/20	3/24	杂株 5 株、不育系 4 株	95.5
6026A/德恢 5292	3/15	3/19	杂株 8 株、不育系 5 株	93.5
6026A/R2195	3/17	3/21	杂株 10 株、不育系 6 株	92.0
6026A/R5004	3/15	3/19	杂株 24 株、不育系 10 株、异形株 3 株	81.5
6026A/泸恢 1611	3/10	3/14	杂株 6 株、不育系 7 株	93.2
6026A/旌香占	3/21	3/25	杂株 8 株、不育系 3 株	94.5
6026A/R4149	3/17	3/21	杂株 10 株、不育系 5 株	92.5
6026A/粤禾丝苗	3/12	3/17	杂株 10 株、不育系 11 株	89.5

2.4 SSR 鉴定与田间种植鉴定结果对比 比较表 2 和表 3 可以看出,SSR 鉴定与田间鉴定结果比较接近,差值范围 2%~7%,各杂交组合田间种植纯度鉴定与 SSR 鉴定纯度的趋势是一致的,而 SSR 鉴定纯度结果比田间鉴定结果数值高(图 2)。

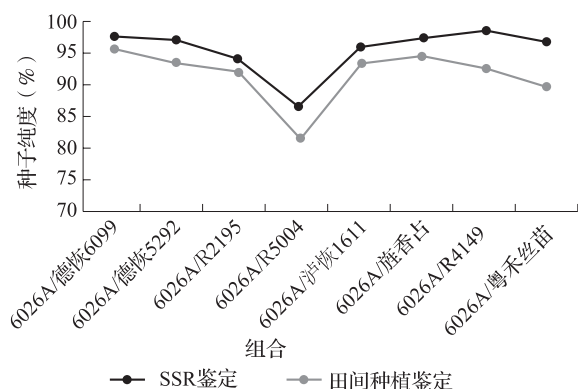


图2 SSR 鉴定与田间鉴定的种子纯度对比

3 讨论

传统的种子纯度鉴定方法主要是田间种植观

察鉴定,而田间种植鉴定的结果准确性受到鉴定者的技术经验、田间栽培管理水平、天气环境等因素影响^[7]。随着 DNA 分子标记技术不断发展,SSR 标记检测快速高效的优势使其在杂交水稻种子纯度鉴定中越来越广泛使用^[8]。众多研究结果表明,SSR 标记检测与田间鉴定种子纯度均有一定差异,这种差异变化呈无规律性,主要因为 SSR 鉴定针对单一的不育系、恢复系和混入的常规品种可以准确区分,但对于部分串粉混杂和变异株不容易区分,主要因为田间串粉混杂造成的杂株类型很复杂,部分杂株类型在单个 SSR 标记可能没有表现出多态性,此外 SSR 鉴定的准确性还受到 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^[9]。总体结果比较,SSR 标记检测和田间鉴定结果趋势相同,差异幅度较小^[10]。对于现代种企而言,可以利用室内和田间鉴定相结合的方式,快速、精准、高效地鉴定杂交种子纯度,以保证推向市

场种子的质量^[11]。

本研究利用 SSR 标记技术检测新配制的 8 个杂交组合的种子纯度,并同田间鉴定结果相比较。研究表明,利用 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》中 48 对标记,筛选出 8 个杂交组合的共显性标记鉴定各杂交组合种子纯度,SSR 标记检测结果显示各组合的种子纯度在 86.5%~98.5% 之间,种子纯度比海南田间鉴定结果稍高,这种情况有可能是样本数或 SSR 标记数较少的原因。整体而言,2 种方法鉴定结果较为相近,说明利用 SSR 标记检测杂交组合种子纯度是可行的。因此,为保证杂交水稻种子纯度,一是扩大样本量,二是选择多个共显性标记进行检测,但考虑成本及检测时间,应至少选取 2 对及以上共显性标记进行检测,当 2 个标记检测纯度一致时,检测结果更加准确。

本研究通过利用 SSR 分子标记技术,筛选出可利用的共显性标记,形成了一套准确、快速、简单的鉴定杂交种纯度的技术体系,对新配制的 8 个杂交组合种子纯度进行了快速鉴定,加快了育种工作进程。

参考文献

[1] 李黎红,倪建平,陈乾,李西明. 中国杂交水稻种业的发展和展望.

种子,2013,32(2): 56-60

[2] 郭承亮. SSR 分子标记在杂交稻种子纯度精确鉴定中的应用. 中国种业,2014(1): 21-23

[3] 殷兆晴,王玉平,周黎军,肖小余,李仕贵. 杂交稻种子纯度的 SSR 分子检测及应用研究. 西南农业学报,2006,19(6): 1000-1004

[4] 周会,苏秀,毛双林,吕季娟. 利用 SSR 分子标记鉴定两系杂交水稻品种纯度试验. 种子世界,2014(4): 30-32

[5] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T. Microsatellite DNA markers for rice chromosome. Theoretical and Applied Genetics, 1996, 93: 1071-1077

[6] 宗凯,李云飞,盛旋,谢超,华陈意,孙娟娟,姚剑. 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. 植物检疫,2018,32(4): 57-59

[7] 曹栋栋,詹艳,王洋,阮晓丽,徐小优. 杂交水稻种子纯度鉴定方法对比研究. 浙江农业科学,2015,56(5): 718-722

[8] 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. 安徽农业科学,2009,37(4): 1493-1495, 1536

[9] 王立广,张翔,黄贯刘,汪仁举,康圣好,熊延军,张奎. SSR 分子标记鉴定两系杂交水稻“荃两优 2118”的种子纯度. 安徽农业科学,2020,48(1): 42-43

[10] 陈年伟,张体刚,徐昌能,余敖,林琦,肖华. SSR 分子检测与田间种植鉴定杂交稻种子纯度的研究. 西南农业学报,2009,3(33): 553-555

[11] 张雯,丁显萍,张萍. 杂交水稻种子纯度 DNA 指纹鉴定与田间鉴定结果的比较. 安徽农学通报,2018,24(13): 11-12

(收稿日期: 2021-11-14)

简讯

山东省省级农作物种质资源保护单位名单 (第一批)

序号	保护库(圃)名称	依托单位
1	山东省花生种质资源库(青岛)	山东省花生研究所
2	济宁市农科院粮油作物种质资源库(济宁)	济宁市农业科学研究院
3	山东圣丰大豆种质资源库(嘉祥)	山东圣丰种业科技有限公司
4	山东中农天泰粮油作物种质资源库(平邑)	山东中农天泰种业有限公司
5	山东希森马铃薯种质资源库(乐陵)	乐陵希森马铃薯产业集团有限公司
6	山东黄河三角洲耐盐碱作物种质资源库(东营)	山东省盐碱地现代农业有限公司
7	山东金种子蔬菜种质资源库(济南)	山东金种子农业发展有限公司
8	山东寿光蔬菜种业集团蔬菜种质资源库(寿光)	山东寿光蔬菜种业集团有限公司
9	山东华良大白菜种质资源库(临朐)	山东华良种业有限公司
10	山东省水生蔬菜种质资源圃(济南)	山东省农业科学研究院
11	烟台农科院大樱桃、梨、葡萄种质资源圃(烟台)	烟台市农业科学研究院
12	潍坊农科院桃种质资源圃(潍坊)	潍坊市农业科学院
13	烟台现代果业苹果种质资源圃(烟台)	烟台现代果业发展有限公司
14	肥城桃种质资源圃(肥城)	肥城市肥城桃产业发展有限公司
15	山东中医药大学药用植物种质资源圃(济南)	山东中医药大学
16	山东华夏高科中药材种质资源圃(临沂)	山东华夏高科农业科技发展有限公司
17	山东省食用菌种质资源库(济南)	山东省农业科学研究院
18	鲁东大学食用菌种质资源库(烟台)	鲁东大学
19	泰安农科院食用菌种质资源库(泰安)	泰安市农业科学研究院