

应用毛细管电泳技术鉴定 杂交稻豪两优 729 种子纯度

李婧婧 丁 龙 夏金凤 黄 冠 方先勇 余洪根

(安徽国豪农业科技有限公司,合肥 230088)

摘要:为提高种子纯度检测效率,选用两系杂交稻豪两优 729 及其亲本自交系 63-8S、R729 作为试验材料,采用 SSR 标记结合聚丙烯酰胺凝胶电泳检测技术,筛选出适用于鉴定豪两优 729 种子纯度的特异引物 RM336。采用毛细管电泳检测技术鉴定了 4 个豪两优 729 分户样的纯度,与田间正季鉴定结果一致。分析比较了聚丙烯酰胺凝胶电泳检测技术和毛细管电泳检测技术,综合多方因素,建议在引物筛选阶段选择聚丙烯酰胺凝胶电泳检测技术,在大量材料分析检测时,毛细管电泳检测技术的高效率优势不言而喻。

关键词:水稻; SSR; 毛细管电泳; 纯度

近年来,两系杂交稻不断发展壮大,是继我国三系法杂交水稻后又一世界领先的原创性重大科技成果^[1]。两系法育种具有不受细胞质和恢保关系制约、配组自由、能广泛利用遗传资源聚合优良性状的技术优势,为保障我国和世界粮食安全提供了新方

法和新途径。两系法杂交水稻主要是利用光温敏不育材料的育性转化来实现的,所以易受光、温等环境条件的影响,在制种期间若遇异常天气则导致不育系育性转化,使其部分自交结实。此外,在制种生产时未能有效隔离则会造成串粉,在收获、加工、包装等环节疏忽则会造成种子机械混杂^[2]。以上因素均会造成种子纯度降低,因此,在种子销售前必须对种

基金项目:安徽省科技重大专项(202103c08020006)

相对较弱,不宜在本地推广,其余 3 个品种在产量、抗倒伏能力等方面表现较好,适宜在鲁中地区夏播种植。

近年来,随着人们对营养保健的关注,膳食结构发生了改变,以小米为主的杂粮产品消费量越来越大。糯小米因具有食用消化率高、含糖量低等优点,越来越受到消费者的青睐。同时,糯小米支链淀粉含量高,是制作小米黄酒、小米醋等产品的优质原料,因此也越来越受到加工企业的关注。目前,谷子育种多集中于优质高产食用米方向,对糯谷等加工专用型品种关注度较少,抗除草剂糯谷品种未见报道,选育品质优、产量高、抗逆性强、抗除草剂的糯谷新品种,不仅可以提高谷子的经济效益,还能拓宽谷子的应用领域,促进谷子深加工和产业化发展。因此,深入研究谷子种质资源的遗传性状,筛选适用不同用途的谷子种质资源,对促进谷子的品质育种和加工利用具有重要意义。

参考文献

- [1] 马力,李新华,路飞,赵前程. 小米淀粉与玉米淀粉糊性质比较研究. 粮食与油脂,2005(2): 22-25
- [2] 郑宗坤,陈志行,游新奎,蒲一涛,周万龙,杨飏. 影响泰国香米直链淀粉测定值因素的研究. 西部粮油科技,1999(3): 40-41,43
- [3] 张超,张晖,李冀新. 小米的营养以及应用研究进展. 中国粮油学报,2007(1): 51-55,78
- [4] Crosbie B G. The relationship between starch swelling properties, paste viscosity and boiled noodle quality in wheat flour. Journal of Cereal Sciences,1991,13(2): 145-150
- [5] 包劲松. 稻米淀粉品质遗传与改良研究进展. 分子植物育种,2007,5(S1): 1-20
- [6] 程方民,杨宝平,吴平. 小样品稻米直链淀粉含量的简易测定法. 植物生理学通讯,2001,37(1): 45-47
- [7] 杨慧卿,王根全,郝晓芬,秦玉忠,宋艳芳. 糯质谷子育种研究进展. 江苏农业科学,2019,47(20): 41-47
- [8] 李顺国,刘斐,刘猛,赵宇,王慧军. 我国谷子产业现状、发展趋势及对策建议. 农业现代化研究,2014,35(5): 531-535
- [9] 张爱霞. 谷子的营养价值. 河北科技报,2014-12-18(B04)

(收稿日期:2022-04-02)

子的纯度进行检测,以确保销售的种子纯度合格。

种子纯度是种子四大质量指标中重要的一项,纯度的高低直接影响新品种市场规模、种子企业及农民的经济效益。目前,种子纯度鉴定有3种形式:正季鉴定、海南鉴定、分子标记鉴定。正季鉴定时间滞后,其结果出来后种子已经销售。海南鉴定因其特殊的气候条件,植株形态可能与正季不同。随着生物技术的发展,分子标记可以从DNA水平上快速、准确地对种子纯度进行检测。SSR标记因其鉴别能力强、稳定、多态性好、检测方便等优点,成为现在室内鉴定种子纯度应用最为广泛的分子标记^[3]。利用SSR标记进行检测的方法多为聚丙烯酰胺凝胶电泳法,此方法程序繁杂,耗时耗力且使用有毒试剂,污染实验室环境。随着检测技术的发展,毛细管电泳解决了这一问题,在大量分户样品的纯度检测中快速简便、安全可靠。

豪两优729是安徽国豪农业科技有限公司自主选育的籼型两系杂交水稻品种,于2019年10月通过了国家农作物品种审定委员会审定(审定编号:国审稻20190109)。豪两优729在长江中下游作一季中稻种植。2016年区域试验、2017年续试、2018年生产试验均比对照丰两优四号增产,分别增产3.32%、4.57%、4.14%。经农业农村部稻米及制品质量监督检验测试中心(杭州)检测分析,米质达部颁NY/T 593—2013《食用稻谷品种品质》标准三级。豪两优729被农业农村部认定为绿色水稻品种。

本研究以豪两优729及其母本63-8S(安徽省农业科学院水稻研究所育成的水稻温敏核不育系)和父本R729(自主选育的恢复系)为试验材料,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测法,对NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程 SSR标记法》中推荐的48对核心引物进行筛选,获得适合豪两优729测纯的引物。利用毛细管电泳检测技术对豪两优729的分户样进行快速纯度检测。

1 材料与方法

1.1 试验材料 父本R729标准样是由安徽国豪农业科技有限公司提供,母本63-8S标准样是由安徽省农业科学院水稻研究所提供,豪两优729杂交种的分户样共4份,其中2份来自江西省赣州市会昌县农户(张起新-1、张起新-2),另2份分别来自江西省赣州市宁都县农户(曾辉)、江苏省盐城市阜宁县农户(唐

守成)。SSR引物采用NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程 SSR标记法》附录C中推荐的核心引物中的6对。试验在安徽农业大学国家重点实验室完成,所用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提取 随机选取健康幼苗,分别取0.5~1.0cm大小的叶片放入96孔PCR板中,每孔中加入40μL 0.25mol/L的NaOH溶液(NaOH溶液应该浸没植物组织),盖上软胶盖,放置于100℃的水浴锅内,加热1min,取出后每孔加入60μL 0.17mol/L的Tris-HCl溶液,再置于水浴锅沸水中煮3min,水煮后的样品冷却后即可作为PCR反应的模板,备用。

1.2.2 SSR引物筛选 采用6对SSR引物分别对豪两优729杂交种子及其双亲进行多态性筛选。聚丙烯酰胺凝胶电泳对PCR扩增产物进行检测,染色采用银染法。

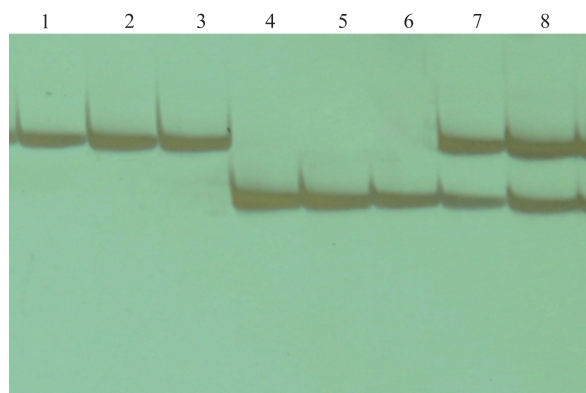
1.2.3 PCR扩增 用筛选得到的SSR引物分别对分户样的DNA进行扩增。10μL PCR反应体系:10×Buffer(含Mg²⁺),2mmol/L dNTPs,5U/μL Taq DNA聚合酶,50ng/μL SSR引物。反应程序:94℃预变性4min,1个循环;94℃变性30s,55℃退火30s,72℃延伸40s,共31个循环;72℃延伸5min,1个循环;4℃保存待用。

1.2.4 水稻种子纯度检测 使用美国AATI毛细管电泳仪(ZAG)对每个分户样的188株种子苗的扩增产物进行检测。根据仪器使用说明,对PCR产物进行处理。一次可以上机9板PCR产物,并实现不间断循环自动化检测。使用PROSize 2.0分析软件对获取的数据进行分析,并计算水稻种子纯度。

种子纯度(%)=(检测种子总数-杂株种子数)/检测种子总数×100

2 结果与分析

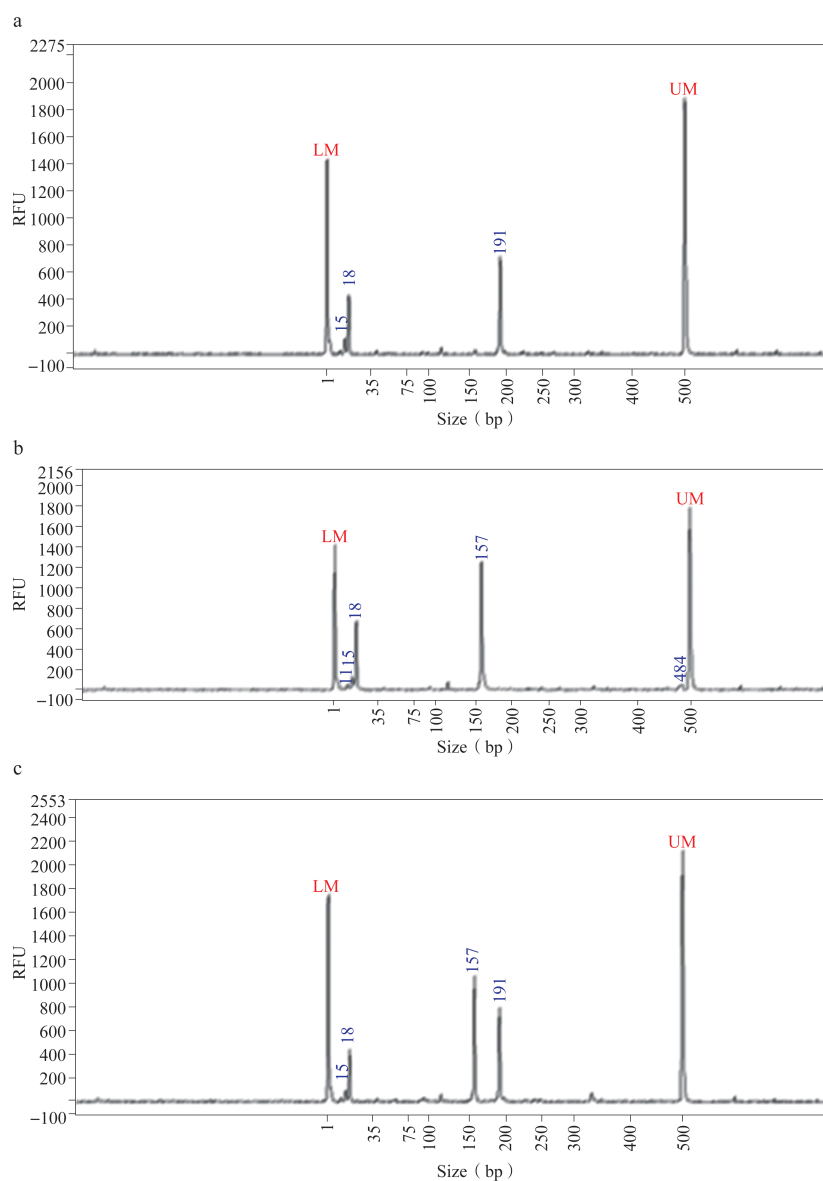
2.1 SSR引物筛选 本试验从48对引物中随机选取了6对引物(RM253、RM278、RM336、RM331、RM289、RM316)进行多态性筛选,结果显示RM336的多态性最好,在母本中扩增的条带大小为191bp,在父本中扩增的条带大小为157bp,且在杂交种中呈现共显性(图1),可以用于豪两优729杂交种子的纯度鉴定。RM336的引物序列(5'→3')如下。RM336F:CTTACAGAGAAACGGCATCG;RM336R:GCTGGTTTGTTCAGGTTTCG。



1-3 为豪两优 729 的母本 63-8S ; 4-6 为豪两优 729 的父本 R729; 7-8 为豪两优 729 的杂交种

图 1 RM336 对豪两优 729 及其双亲的扩增结果

2.2 分户样的毛细管电泳纯度鉴定结果 选用 SSR 引物 RM336 分别扩增 4 份豪两优 729 的分户样,每户取 200 粒种子发芽,分别提取 188 份叶片 DNA 用于 PCR 扩增,对 PCR 产物进行毛细管电泳检测,并用 PROSize 2.0 数据分析软件对获得的数据进行分析。若所获得的峰图为双峰且与 RM336 引物在其父母本中筛选的峰值一致,则认定为杂交种;若所获得的峰图为双峰且只有 1 个峰值与 RM336 引物在父母本中的峰值一致,则认定为异交种;若所获得的峰图为双峰但双峰的峰值均与 RM336 引物在父母本中的峰值不一致,则认定为杂株;若所获得的峰图为单峰且主峰大小与 RM336 引物在父本或者母



a、b、c 分别代表样品 63-8S、R729 和豪两优 729

图 2 豪两优 729 及其父母本毛细管电泳纯度鉴定峰图

本中的一个主峰大小一致,则认定为自交种。部分鉴定结果如图2。4个豪两优729的分户样中,张起新-2有2粒异交种、2粒自交种,其余3个分户样中均仅有2粒自交种,纯度分别为:98.9%、97.9%、98.9%、98.9%。

2.3 分户样的田间纯度鉴定结果 每个分户样田间鉴定,分别在苗期、抽穗期等整个生育期进行观察,记录各分户样的杂株类型和杂株数。田间正季鉴定结果显示(表1),4个豪两优729分户样种子纯度结果分别为99.5%、98.5%、99.4%、99.0%,与毛细管电泳检测技术鉴定结果趋势一致,验证了毛细管电泳技术鉴定杂交稻纯度的可靠性。

表1 豪两优729分户样的田间纯度调查结果

分户样	总株数	杂株数	纯度(%)
张起新-1	400	2	99.5
张起新-2	400	6	98.5
曾辉	500	3	99.4
唐守成	400	4	99.0

3 结论与讨论

不同水稻品种的SSR分子纯度鉴定所使用的引物不同,所以在水稻种子纯度检测前要筛选出在杂交种的父母本之间存在多态性的SSR引物。本试验在筛选能够用于豪两优729杂交种纯度鉴定的SSR引物时,基于成本考虑选用了聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法。聚丙烯酰胺凝胶电泳银染法无需昂贵的试验仪器,且试剂耗材成本较低,对试验人员的要求也较低,一般操作工在经过培训后即可进行,在分析少量的材料时经济适用,所以在SSR标记筛选时宜选择此种方法。

在进行大量材料分析时,毛细管电泳检测技术的优势就显而易见了。首先,毛细管电泳检测技术可以实现全程自动化,自动灌胶、上样、电泳、收集数据等,一轮上样可以检测9板PCR产物,且24h不停运转,中间无需人员操作,省时省力,将操作者从低效率、大强度的工作中释放出来,大大提高了工作效率,且避免了操作中的人为误差,增强了试验结果

的可重复性和稳定性^[4]。其次,毛细管电泳检测技术不需要使用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测中的甲醛、甲叉丙烯酰胺等有毒有害化学试剂,不仅对人体无害,而且对环境特别友好,有效保障了实验室环境的安全卫生。最后,因在上样前,PCR产物各孔中均加入了分子量内标,各泳道的产物大小直接与其内标比较,毛细管电泳检测技术的检测结果更加准确。而聚丙烯酰胺凝胶不可能在每个泳道中点入分子量标准,只能用肉眼与分子量标准比较估测得出,远离分子量标准泳道的数据准确性难免会受到人为因素影响。

种子企业在大量制种时,通常委托多家制种企业,收到大量的分户样。种子企业要对各分户样进行质量检测,以确保入库的种子质量符合国家标准。大量分户样的纯度检测耗时耗力,采用一般的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测方法,一般从收获到年关,2个人每天都在做此项工作。而采用自动化程度较高的毛细管电泳检测技术,只需要1人即可提前完成。这也关系到生产商是否能够及时拿到种子生产款,所以快速准确地进行分户样质量检测很有必要。在不考虑仪器成本的前提下,对大量样品的分析,毛细管电泳检测技术与聚丙烯酰胺凝胶电泳检测法的费用基本持平^[5],但毛细管电泳检测技术的效率以及环境安全性明显较高,所以在大规模材料分析时,选择用毛细管电泳检测技术来完成,更加高效精准。

参考文献

- [1] 袁隆平. 杂交水稻的育种战略设想. 杂交水稻, 1987(1): 1-3
- [2] 阴云伙, 温和植, 陈龙, 程攀, 曲姗姗, 田发春, 彭炳生, 吴帅, 李土明, 周卫营. 利用SSR标记鉴定两系杂交稻“广两优7203”的种子纯度. 江西农业学报, 2015, 27(11): 20-22
- [3] 郭承亮, 袁国保, 耿月明, 王世才, 许双全, 王菁, 李炫丽, 梅军. 利用SSR标记鉴定两系杂交稻种子纯度. 中国种业, 2011(11): 40-43
- [4] 易红梅, 王风格, 赵久然, 王璐, 郭景伦, 原亚萍. 玉米品种SSR标记毛细管电泳荧光检测法与变性PAGE银染检测法的比较研究. 华北农学报, 2006, 21(5): 64-67
- [5] 郝晨阳, 王兰芳, 贾继增, 董玉琛, 张学勇. SSR荧光标记和银染技术的比较分析. 作物学报, 2005, 31(2): 144-149

(收稿日期: 2022-04-08)