

微卫星分子标记在黑龙江省水稻种子纯度鉴定中的应用

肖佳雷¹, 辛爱华¹, 张国民¹, 马军韬¹, 尹 静², 张成亮³, 孟 英¹

(1. 黑龙江省农科院耕作栽培所, 哈尔滨 150086, 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030; 3. 黑龙江省农科院开发办, 哈尔滨 150086)

摘要: 介绍了水稻种子纯度鉴定的几种方法及 SSR 分子标记在水稻种子纯度鉴定方面的应用, 总结了各种方法的优缺点, 并对 SSR 方法在黑龙江省水稻种质纯度鉴定方面进行了展望。

关键词: 微卫星标记; 水稻; 纯度鉴定

中图分类号: S 511 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2007)02-0079-03

Application of Microsatellite Marker on Purity Identification of Paddy Seed in Heilongjiang Province

XIAO Jia-lei¹, XIN Ai-hua¹, ZHANG Guo-min¹, MA Jun-tao¹, YIN Jing²,
ZHANG Cheng-liang³, MENG Ying¹

(1. Crop Tillage and Cultivation Institute, Heilongjiang Academy, Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. Agronomy College, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 3. Personnel Department, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: A few method on purity identification of paddy seed and application of microsatellite marker on purity identification of paddy seed were introduced. The merit and demerit of different methods were concluded. The application and prospect of Microsatellite marker on paddy seed purity identification in Heilongjiang Province were analyzed.

Key words: microsatellites; paddy; purity identification

我国是水稻生产的大国, 分子生物技术广泛应用在水稻育种中, 各种分子标记技术也被逐渐应用于水稻研究中, 如 RFLP、RAPD、AFLP、SSR、ISS 等。水稻是黑龙江省主要农作物之一。2005 年水稻种植面积占全省粮食作物种植面积的 19.8%, 总产占 38.6%。水稻面积由 2005 年 194.2 万 hm^2 增加到 2006 年的 207.5 万 hm^2 , 占北方粳稻的 54%, 而种子市场出现售假种现象日趋严重。因此, 纯度鉴定也是品种鉴定的一项重要工作。种子纯度是评价种子质量的主要指标, 种子纯度的降低会明显降低农作物产量和产品品质。在杂交水稻生产中, 由于忽视种子真实性和品种纯度检验, 伪劣掺假种子时有发生, 给农业生产造成了不可弥补的损失。因

此对水稻种子纯度的快速、准确、有效的鉴定显得十分重要^[1]。目前, 在黑龙江省, 应用生物技术鉴定杂交水稻种子纯度的报道较少。因而, 水稻 SSR 分子标记技术在黑龙江省种子生产、种子经营及种子质量检验方面具有很大的潜力。

1 微卫星分子标记

微卫星又叫简单重复序列, 是指以少数几个核苷酸(多数为 2~4 个)为重复单位组成的串联重复序列, 微卫星的两侧为保守的单拷贝序列。不同品种间微卫星基序重复次数的不同而形成了多态性, 这种多态性可以通过设计 PCR 引物扩增检测出来, 此即为简单序列长度多态性。微卫星标记具有共显性、高多态性、实验操作简单、快捷和检测结果稳定

收稿日期: 2006-10-22

第一作者简介: 肖佳雷(1978-), 男, 黑龙江省勃利县人, 硕士, 从事水稻分子育种和栽培研究。E-mail: j_l_x@163.com。

可靠等优点,是一种理想的分子标记。微卫星标记在水稻基因组中非常丰富,且分布均匀,水稻微卫星标记已发展了 2 740 多个。微卫星标记在水稻分子标记连锁图的构建、基因(QTL)定位、系谱分析和分子标记辅助选择、遗传多样性研究和种质鉴定等许多方面得到了广泛应用^[9]。SSR 技术是目前最常用的微卫星标记之一,它主要是基因组中某一特定的微卫星的侧翼序列,通常都是保守性较强的单一序列^[11]。

2 微卫星分子标记(SSR)在水稻种质纯度鉴定中应用

谭智丹等^[1]应用 SSR 技术鉴定了 6 个杂交水稻组合的种子纯度,并对其相应的不育系、保持系、恢复系进行多态性分析,筛选出 10 对多态性、特异性较好的引物,利用这些引物进行纯度检测,结果都可以较好地地区分杂交组合和父母本,在每个组合 100 粒单种子的鉴定中,纯度检测达 98%,与田间鉴定纯度 98.8% 相接近。施勇烽等^[2]在前期工作基础上,挑选了 58 对 SSR 引物,鉴定 28 份水稻代表性亲本,分析各个标记的多态性,为最终确定一套适用于水稻品种鉴定的微卫星标记提供基础。周峰等^[3]选用 299 对微卫星引物,对经卫星搭载回收的水稻品种特粒占 130 粒种子种植后选育出的 5 个突变株的后代进行 DNA 多态性分析,结果表明:变异植株与原种之间均存在着不同程度的微卫星多态性。在有效扩增的 283 对引物中,引物多态性频率介于 0.35%~2.47% 之间,且多态性位点在水稻基因组中是随机分布的。李云峰等^[4]进行中国稻和美国稻 SSR 多态性分析表明:美国稻与中国稻之间的遗传差异,大于美国稻之间的遗传差异大于中国稻的遗传差异。美国稻与中国稻之间、部分美国稻之间遗传背景差异显著。李云海等用微卫星标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异,筛选出的 5 对引物,能够有效地区分所有供试的水稻雄性不育系和恢复系^[6];李晶焰等构建了冈优 22 的指纹图谱,能鉴定出由其他恢复系与冈 46A 配组产生的假冈优 22 杂种以及机械混杂的常规稻种^[7];于永红等应用筛选出的 4 对 SSR 引物,建立了杂交水稻不育系宁 2A 以及宁 2B 的 DNA 指纹图谱^[8];詹庆才利用微卫星分子标记,对湖南推广的 6 个杂交稻组合及其亲本之间的多态性进行了研究,用表现多态性的两对引物分别对掺假的威优 46 和金优 207 进行纯度鉴定,结果发现两者都能有效地将掺入组合中的

假种子区分开^[9];彭锁堂等利用 SSR 标记对我国 9 个主要杂交稻组合及其亲本进行分析,构建了指纹图谱和纯度鉴定研究,为水稻材料的 DNA 指纹图谱构建工作奠定了基础^[10]。但是系统地进行杂交稻品种 DNA 指纹图谱构建和应用的研究目前还较少,特别是黑龙江省几乎没有研究。

3 种子纯度鉴定的方法

3.1 常规鉴定法

主要包括种子形态鉴定法、化学鉴定法、幼苗鉴定法和田间小区种植鉴定等^[11]。

3.1.1 种子形态鉴定法 根据杂交水稻种子的形态特征,借助放大镜、解剖镜等进行观察,与标准样品或鉴定图片和有关资料进行比较,判别真假种子。该法简单、快速、方便、直观,目前在生产上使用最广泛。Agrawal 运用此法对水稻品种进行了鉴定并划分了不同的类型。但由于杂交水稻品种繁多,有些亲缘关系较近的品种种子在形态上根本无法识别,而且同一品种的各籽粒形态不尽一致,统一标准很难掌握,只能粗略识别,准确性不高。

3.1.2 化学鉴定法 根据不同品种皮壳的成分和化学物质的差异,对不同化学试剂反应显色的差异来鉴定品种。现在应用苯酚染色法鉴别籼稻、粳稻亚种效果显著。用碘化钾染色可鉴别籼稻、粳稻及糯稻。该方法快速简便,但因要求被鉴定的种子必须具有特异反应,其应用范围受到很大的限制。

3.1.3 幼苗鉴定法 水稻种子在培养室或温室中进行培养,当幼苗达到适宜评价的发育阶段后,对全部或部分幼苗进行鉴定;或让植株生长在特殊的逆境条件下,对显现的不同抗性进行区分。此法是一种设备简单、易于操作、成本较低、鉴定周期短、结果相对准确可靠的室内检验方法,在生产上已广泛应用。但很难在群体内把两个遗传基础接近的组合种子区分开来,适用范围窄,有待于进一步研究探索。

3.1.4 田间小区种植鉴定 它是目前水稻杂交种子纯度鉴定的直接且比较可靠的方法。但该法多采用异地鉴定,所需周期长且费工占地,并受季节限制,对当年生产的杂交种子纯度难以确定,给种子收购定级和调用造成困难。另外,对因环境条件影响所引起的变异与品种遗传所产生的变异区分较困难,所以不适应当前生产的需要。

3.2 电泳鉴定法

电泳法是根据蛋白质的差异来揭示基因的差异,即由生化表现型、反映基因型的生化标记方法。由于直接测定的是蛋白质,具有快速、准确性高、重

复性好的优点。它包括同工酶电泳和蛋白质电泳^[12]。

3.2.1 同工酶电泳 水稻同工酶的研究始于 20 世纪 60 年代, 80 年代中期达到高峰。经过近 40 年的研究和探索, 电泳作为一种分析手段越来越多地在杂交水稻种子纯度研究领域中得到应用。我国最早开展这项工作的陆士伟于 1982 年用酯酶同工酶 PAGE 测定了杂交水稻种子的纯度。1983 年, Yan-qichuan 利用统一技术检测了杂交水稻及其三系种子的真实性和品种纯度, 研究证明此法具有灵敏度高、准确、经济、易于操作等优点。李卓杰于 1992 年建立了同工酶等电聚焦鉴定种子纯度的技术, 该法操作简单、准确, 提高了分辨率。但是蛋白质提取和电泳技术的实验条件要求严格, 操作难度较大, 通过有限种类酶谱分析难于鉴定细小差异, 遗传关系比较近似的品种间难以找到较大的多态性, 而且可利用的同工酶非常有限, 并不是所有的同工酶都适用于种子纯度鉴定^[12, 13], 并存在结果不稳定的缺陷。因而未能列入杂交稻种子纯度鉴定的国家标准, 在生产实践中一直没有得到推广应用。

3.2.2 蛋白质电泳 不同品种由于遗传组成不同, 其蛋白质在种类、数量、大小及结构等方面也不同, 通过电泳形成不同的蛋白质谱带, 从而鉴别品种的真实性和纯度^[13]。用于检测的种子蛋白质主要是种子(或幼苗)的贮藏蛋白质, 如醇溶蛋白、清蛋白、球蛋白和谷蛋白等。电聚焦(IEF)电泳技术的迅速发展, IEF 弥补了以分子大小和电荷密度分离带电颗粒的不足, 分辨率高、操作简便、信息量大、不易受外界环境等因素的影响, 被认为是一种简便、快捷、可靠和成本较低的种子纯度鉴定方法, 已被列入《国际种子检验规程》。

蛋白质电泳技术是目前种子纯度检验中广泛适用的方法。蛋白质提取容易, 无需低温, 需时较短。成分数量稳定, 具有较高的准确性和广泛的适应性。但值得注意的是, 由于基因表达有时会受到器官、发育阶段甚至环境条件的影响, 故进行电泳鉴定时, 除了电泳条件的适当选择外, 试验材料的采集也直接影响了鉴定的准确性。另外对于某些遗传组成非常接近的品种如保持系和不育系, 不易找到特异蛋白, 采用蛋白质电泳难以发现特征带, 另外, 蛋白质电泳图谱易受种子发育阶段及表达器官的影响, 有时不够稳定, 影响了电泳图谱的分析, 从而影响了鉴定结果的准确性^[14]。

5 展望

综上所述, 杂交稻种子纯度鉴定和纯度分析检验方法各有千秋, 在具体的应用中应根据需要和实际情况选择利用, 同时不断探索简便、快速、可靠、经济、准确的鉴定技术, 进而扩大其应用范围。随着分子生物学技术的迅速发展, DNA 指纹图谱将成为对杂交水稻品种进行鉴定强有力的工具。如果能够有效地利用 DNA 指纹技术建立当前黑龙江省水稻主要栽培品种的 DNA 指纹图谱档案和品种特有的 DNA 指纹数据库将是解决杂交水稻纯度鉴定的有效途径之一, 也将是今后水稻纯度鉴定方法的主要研究方向。我们相信, 随着 DNA 指纹技术的不断完善和发展, 这种快速、准确、简便、经济的鉴定技术不久将直接服务于农业生产, 这将是作物品种鉴定的发展方向, 也是黑龙江省对水稻纯度鉴定一项新的技术。

参考文献:

- [1] 谭智丹, 余显权, 高健强, 等. 利用鉴定杂交水稻种子纯度的研究[J]. 种子, 2006, 25(4): 27-32.
- [2] 施勇烽, 应杰政, 王磊, 等. 鉴定水稻品种的微卫星标记筛选[J]. 中国水稻科学, 2005, 19(3): 195-201.
- [3] 周峰, 易继财, 张群宇, 等. 水稻空间诱变后代的微卫星多态性分析[J]. 华南农业大学学报, 2001, 22(4): 55-57.
- [4] 李云飞, 杨正林, 罗洪发, 等. 中国稻与美国稻的 SSR 标记多态[J]. 分子植物育种, 2004, 2(1): 801-806.
- [5] 何风华. 水稻基因组中的微卫星标记及其应用[J]. 湖南农业大学学报, 2004, 30(5): 488-491.
- [6] 李云海, 肖晗, 张春庆, 等. 用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异[J]. 植物学报, 1999, 41(10): 1061-1066.
- [7] 李晶焰, 何平, 李仕贵, 等. 利用微卫星标记鉴定杂交水稻冈优 22 种子纯度的研究[J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 211-214.
- [8] 于永红, 李云海, 马荣荣, 等. 用微卫星 DNA 标记建立宁 2A 的指纹图谱[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(3): 215-217.
- [9] 詹庆才. 应用 SSLP 技术鉴定杂交水稻种子纯度的研究[J]. 杂交水稻, 2002, (3): 15-18.
- [10] 彭锁堂, 庄杰云, 颜启传, 等. 我国主要杂交稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(1): 1-5.
- [11] 张凤, 陈伟. 杂交水稻种子纯度鉴定方法概述[J]. 种子, 2004, 23(9): 55-58.
- [12] 李淑娟. 种子纯度鉴定方法概述[J]. 青海大学学报(自然科学版), 2003, 21(1): 16-18.
- [13] 严莉. 现代生物技术在作物品种纯度鉴定上的研究进展[J]. 种子, 2002, (6): 45-46.
- [14] 管晓春, 刘康. 浅淡种子纯度及真实性室内鉴定[J]. 种子, 1998, (3): 74.
- [15] Dhar Ms. et al. Organization and properties of repeated DNA sequences in rice genome[J]. Plant Science, 1988, 55: 43-52.