



冷春旭,郑福余,赵北平,等. 利用 SSR 标记鉴定粳稻杂交 F₁ 真伪[J]. 黑龙江农业科学,2020(6):10-13,14.

利用 SSR 标记鉴定粳稻杂交 F₁ 真伪

冷春旭,郑福余,赵北平,刘海英,张书利,王玉杰

(黑龙江省农业科学院 生物技术研究所以/黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150028)

摘要:SSR 分子标记具有多态性高、数量丰富、稳定性好和检测方便等优点,特别适用于粳稻杂交 F₁ 真伪性的鉴定,解决了田间鉴定种植时间长及表型相似不易区分等问题。本研究利用 24 对 SSR 引物对 6 个粳稻杂交组合进行鉴定,有 3 对引物扩增产物出现明显差异,利用这 3 对引物对所有杂交后代进行筛选。结果表明:试验发现真杂交种具双带型且与双亲大小一致,真杂率为 80.0%~93.3%,与田间鉴定结果相一致。说明利用该方法鉴定粳稻杂交 F₁ 真实性是可行的。

关键词:SSR 标记;粳稻;杂交 F₁

水稻是世界主要的粮食作物之一,也是我国最重要的主粮作物,对保障国家粮食安全具有不可替代的作用^[1]。目前,水稻新品种选育的主要方式仍然是选用具有目标性状的品种或中间材料进行杂交^[2]。但由于水稻是典型的自交作物若人工去雄不彻底常常造成 F₁ 中混有伪杂种的现象。因此,鉴定水稻杂交 F₁ 真实性是育种过程中必不可少的环节,一般通过田间比较杂交后代与亲本间的农艺性状特征鉴别真假杂交株^[3]。但此方法周期长且误差大,易受环境影响,尤其对于常规粳稻育种来说,由于亲本间的遗传背景狭窄,田间性状差异不显著,难以通过田间鉴定辨别杂交 F₁ 真实性^[4]。随着现代分子生物学的发展,分子标记成为鉴定种质资源的重要工具,为杂交后代的鉴定提供了新的途径^[5]。

SSR(Simple sequence repeat)作为分子标记的一种,广泛分布于水稻基因组中,是由 2~6 个碱基为重复单位组成的串联重复序列,具有多态性高、数量丰富、稳定性好及不易受环境影响等优点^[6]。目前,SSR 分子标记已在水稻遗传多样性分析、指纹图谱构建和种子纯度鉴定等方面得到广泛应用。张科等^[7]利用 38 个 SSR 标记对黑龙江省审定的 73 个水稻常规品种进行遗传性分析,发现供试的 73 个品种亲缘关系较近且分为 6 个亚群。李松等^[8]利用 48 对 SSR 核心引物对云南

腾冲种植的 20 个水稻品种进行遗传多样性分析,将这 20 个品种划分为 4 类。胡书娟等^[9]利用 SSR 标记确定杂交水稻品种与亲本间的亲缘关系。王立广等^[10]通过 SSR 标记鉴定两系杂交水稻的种子纯度。

综上所述,利用 SSR 分子标记鉴定水稻杂交后代,在苗期就能快速获得鉴定结果,省去田间鉴定伪杂浪费的时间和人力。本研究利用 SSR 分子标记技术对 6 个粳稻杂交组合 F₁ 苗期植株进行真伪鉴定,以期建立一套快速、准确且高效的分子鉴定技术体系,提高了粳稻杂交育种工作效率。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验于 2019 年 4 月至 2019 年 8 月进行。选择 6 个粳稻杂交组合作为试验材料,亲本分别为龙粳 20、松粳 9 号、富源 4 号、吉粳 95、龙粳 27 和龙粳 26,具体配制组合见表 1。每个组合选取父母本和 F₁ 各 30 株植株种植在黑龙江省农业科学院国家现代农业示范区(45.8°N,126.8°E)。

表 1 粳稻杂交组合

Table 1 The hybrid combination of japonica rice

| 组合编号 Combination number | 母本 Female parent | 父本 Male parent | 杂交组合 Hybrid combinations |
|-------------------------------|------------------------|----------------------|--------------------------------|
| 1 | 龙粳 20 | 松粳 9 号 | 龙粳 20×松粳 9 号 |
| 2 | 龙粳 20 | 富源 4 号 | 龙粳 20×富源 4 号 |
| 3 | 龙粳 20 | 吉粳 95 | 龙粳 20×吉粳 95 |
| 4 | 松粳 9 号 | 龙粳 26 | 松粳 9 号×龙粳 26 |
| 5 | 吉粳 95 | 龙粳 27 | 吉粳 95×龙粳 27 |
| 6 | 吉粳 95 | 龙粳 26 | 吉粳 95×龙粳 26 |

收稿日期:2020-04-01

基金项目:黑龙江省农业科学院院级科研项目(2019YYYYF011)。

第一作者:冷春旭(1979-),女,博士,助理研究员,从事水稻分子育种研究。E-mail:lengchunxu@163.com。

通信作者:王玉杰(1963-),男,学士,副研究员,从事水稻分子育种研究。E-mail:Lkwangyujie@126.com。

1.2 方法

1.2.1 双亲和杂交 F₁ 样品 DNA 的提取 水稻幼苗长到三叶期时挂牌取幼嫩叶片 0.1 g,采用 CTAB 法提取 DNA,具体操作流程如下:将幼嫩叶片放入 2 mL 离心管中,置于组织研磨仪中研磨,加入 600 μL 65 ℃ 预热的 CTAB 提取缓冲液充分混匀后温育 30 min;加入等体积的氯仿:异戊醇(24:1),混匀后 12 000 r·min⁻¹ 室温离心 10 min,取上清于新的 1.5 mL 离心管中;加入等体积的异丙醇混匀后,−20 ℃ 沉淀 20 min,12 000 r·min⁻¹ 室温离心 10 min;弃上清,加入预冷的 70% 乙醇 1 mL,12 000 r·min⁻¹ 室温离心 2 min,弃上清,室温干燥加 70 μL ddH₂O 溶解沉淀,−20 ℃ 保存备用。

CTAB 提取缓冲液成分:2% CTAB,100 mmol·L⁻¹ Tris-Cl (pH8.0),1.4 mol·L⁻¹ NaCl 和 10 mmol·L⁻¹ EDTA(pH8.0)。

1.2.2 SSR 分子标记的检测 根据 GRAMENE 数据库(<https://archive.gramene.org/>)中的序列信息选择 24 对 SSR 引物对 6 个组合的亲本和 F₁ 进行 PCR 扩增。PCR 反应体系(总体积 20 μL):DNA 模板 1 μL,2×Es Taq MasterMix 10 μL,10 μmol·L⁻¹ 的正反向引物各 1 μL,ddH₂O 7 μL。PCR 反应程序:第一轮:94 ℃ 预变性 5 min;第二轮:94 ℃ 变性 30 s,55 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 30 s,共 35 个循环;第三轮:72 ℃ 延伸 10 min,最后 16 ℃ 恒温。反应结束后,2.5% 琼脂糖凝胶电泳检测结果。

表 2 24 对 SSR 引物信息

Table 2 24 pairs of SSR primer sequence information

| 引物名称 The name of primers | 正向引物 Forward primer | 反向引物 Reverse primer |
|-----------------------------|------------------------|------------------------|
| RM3600 | TGCCCACACATGATGAGC | AACGGGCAAGAGATCTTCTG |
| RM3164 | TCCTCCTGCTAGCTGCCTAG | TCGCCTTCCTTTTCACTCAC |
| RM7492 | AGATGGTTGCCAAGAGCATG | GTCACGTGGCGATTTAGGAG |
| RM3229 | CTTGCAACTTGCAACGTCC | GCATAGCAAGAGGCCAAGAG |
| RM7504 | GGCTCTGTTTCTGAATTCGG | ACGTGGCAGCTTGAGAGC |
| RM1142 | AAGCACACGTAAAACGGAGG | CGTCACTCTCACCACCACC |
| RM7003 | GGCAGACATACAGCTTATAGGC | TGCAAATGAACCCCTCTAGC |
| RM1223 | CAGCGTCTCCAAGAAACTCC | GCTACCAGGTCAGAGTTGCC |
| RM3395 | ACCTCATGTCCAGGTGGAAG | AGATTAGTGCCATGGCAAGG |
| RM3404 | AGTCCTGAGTCTCCTGTCCT | CCTGTTTCGATCTTGAACTTC |
| RM7454 | TGCTCAAAATTGCGCAGG | AAACAGCTTCACACACACGC |
| RM1332 | AACTACATGTATTGCAATGA | AGAACACTCCAGATTATTTTC |
| RM324 | CTGATTCCACACACTTGTGC | GATTCCACGTCAGGATCTTC |
| RM7288 | TTTCTCAACTGAAACAACAT | AGTTTAAGAGCGTTTCTAGG |
| RM5389 | TCTTGCATGAGAGCCAACAC | GCTATTGCGCGAGATTATCC |
| RM583 | AGATCCATCCCTGTGGAGAG | GCGAACTCGCGTTGTAATC |
| RM7193 | ATGTGGGAATTTCTAGCCCC | CCCTAGTTTTCCAAATGGCC |
| RM6948 | GGTAAGTTGTTCGGTTGCCTC | ACGTCCATACCAGGTCAAGC |
| RM26 | GAGTCGACGAGCGGCAGA | CTGCGAGCGACGGTAACA |
| RM3805 | AGAGGAAGAAGCCAAGGAGG | CATCAACGTACCAACCATGG |
| RM8208 | GCCCAAACCTACACTCTCTTG | GTAAATGCCTGAGTGCCTAC |
| RM6487 | AGAAGCTGTAGACGATGGCC | CTAGACCTCATCCCCTTCCC |
| RM1359 | AACGAATTCTATTTTGCGTC | TTCTTCTCATTTCAATTGCG |
| RM289 | TTCCATGGCACACAAGCC | CTGTGCACGAACTTCCAAAG |

1.2.3 田间形态学鉴定 对杂交群体的 F₁ 和双亲进行农艺性状观察,主要包括株高、株型和生育期等性状,并结合 SSR 分子标记结果确定真杂交植株的数量。

1.2.4 数据分析 应用 Microsoft Excel 2016 软件处理分析所有数据。

2 结果与分析

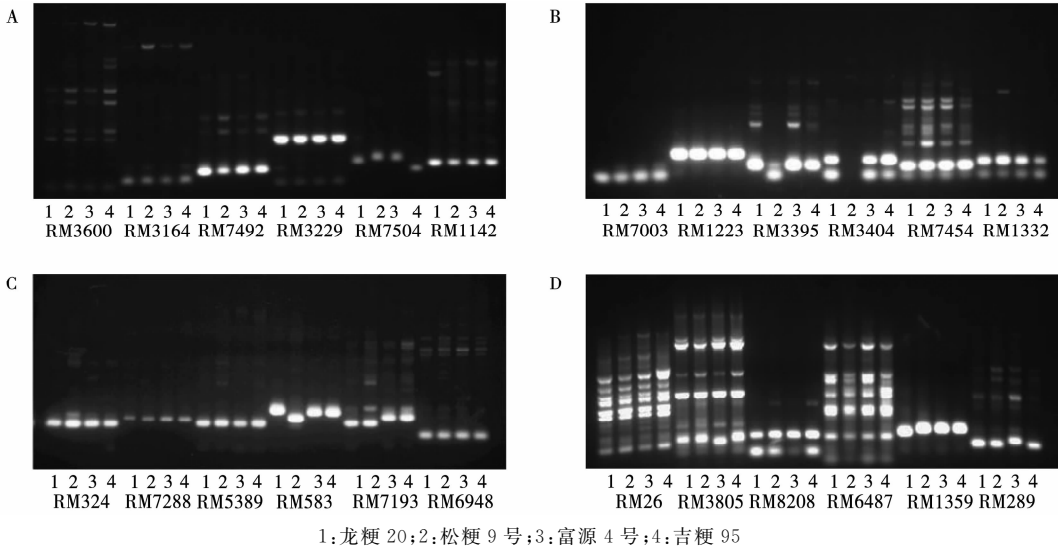
2.1 SSR 多态性引物的筛选

选取 24 对 SSR 引物分别对 6 个杂交组合的父母本进行 PCR 扩增,产物经电泳后选择仅显现 1 个清晰条带且在双亲中位置不同的引物用于杂

交后代群体鉴定(图 1 和图 2)。

根据图 1-D 的结果,杂交组合 1(龙粳 20×松粳 9 号)的筛选引物为 RM1359,根据图 1-C 的结果杂交组合 2(龙粳 20×富源 4 号)的筛选引物为 RM7193,杂交组合 3(龙粳 20×吉粳 95)的筛选引物也为 RM7193。

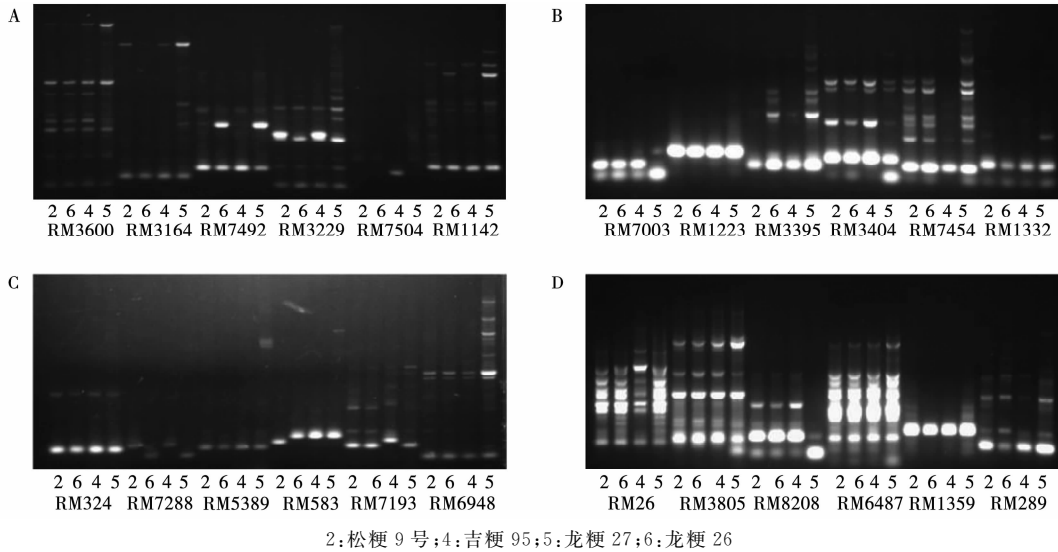
根据图 2-C 的电泳结果,杂交组合 4(松粳 9 号×龙粳 26)的筛选引物为 RM583,杂交组合 5(吉粳 95×龙粳 27)的筛选引物为 RM7193,杂交组合 6(吉粳 95×龙粳 26)的筛选引物也为 RM7193。



1:龙粳 20;2:松粳 9 号;3:富源 4 号;4:吉粳 95
1:Longjing20; 2:Songjing No. 9; 3:Fuyuan No. 4; 4:Jijing 95

图 1 杂交组合 1-3 亲本 SSR 多态性引物 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplified of hybrid parents 1-3 based on SSR polymorphic primers



2:松粳 9 号;4:吉粳 95;5:龙粳 27;6:龙粳 26
2:Songjing No. 9; 4:Jijing 95; 5:Longjingb27; 6: Longjing 26

图 2 杂交组合 4-6 亲本 SSR 多态性引物 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplified of hybrid parents 4-6 based on SSR polymorphic primers

2.2 杂交 F₁ 的 PCR 检测

利用以筛选的引物 RM1359、RM583 和 RM7193 分别对 6 个杂交组合的 F₁ 幼苗进行 SSR 分子标记鉴定,SSR 引物 RM1359 鉴定杂交组合 1 部分幼苗的电泳结果如图 3 所示,样品 15、19 和 21 只有一条电泳带,且位置与母本龙

粳 20 一致,说明这 3 个材料不是真正的杂交 F₁ 后代,是伪杂种;而其余材料为双带型且与双亲大小一致,为真杂交种。

按照上述方法对 6 个组合杂交 F₁ 鉴定结果进行统计,根据表 3 中的结果,杂交率为 80.0%~93.3%,与田间鉴定结果相一致。

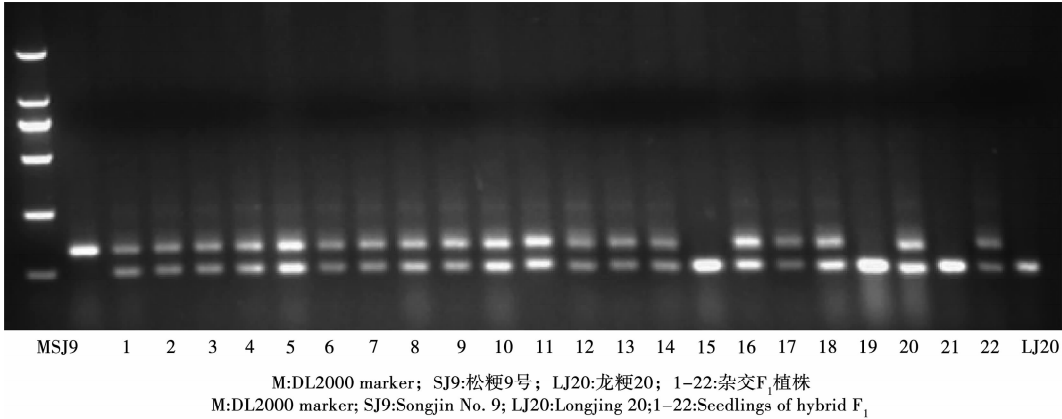


图 3 杂交 F₁ 的 PCR 扩增
Fig. 3 PCR amplified of hybrid F₁

表 3 杂交 F₁ 植株 PCR 鉴定情况表
Table 3 PCR identification of hybrid F₁ seedlings

| 杂交组合编号 Number of hybrid combination | 杂交组合 Hybrid combination | 总株数 Total plants | F ₁ 株数 Number of F ₁ plants | 杂交百分比 Percentage of hybrid/% | SSR 引物 SSR primers | 田间鉴定 F ₁ 株数 Number of F ₁ plants in the field |
|---|-------------------------------|---------------------|---|------------------------------------|--------------------------|---|
| 1 | 龙梗 20×松梗 9 号 | 30 | 26 | 86.7 | RM1359 | 26 |
| 2 | 龙梗 20×富源 4 号 | 30 | 28 | 93.3 | RM7193 | 28 |
| 3 | 龙梗 20×吉梗 95 | 30 | 24 | 80.0 | RM7193 | 24 |
| 4 | 松梗 9 号×龙梗 26 | 30 | 26 | 86.7 | RM583 | 26 |
| 5 | 吉梗 95×龙梗 27 | 30 | 25 | 83.3 | RM7193 | 28 |
| 6 | 吉梗 95×龙梗 26 | 30 | 27 | 90.0 | RM7193 | 29 |

注:杂交百分比(%)=F₁株数/总株数×100。
Note:Percentage of hybrid (%) is equal to the number of F₁plants divided by total plants.

3 结论与讨论

杂交 F₁ 的鉴定一直是水稻常规育种的难题,传统的方法通过田间种植观察杂交后代与亲本表型差异鉴定,往往需要一个生长季的时间,浪费了大量的人力和物力,而且由于粳稻的亲缘关系较近,有些品种表型差异不显著,对缺乏经验的育种者很难通过表型判断杂交后代的真实性,往往容易混入伪杂种。而 SSR 标记由于具有数量丰富,多态性高和结果稳定等优点成为鉴定杂交 F₁ 的一种理想分子标记。

本研究应用 24 对 SSR 引物对苗期粳稻杂交

F₁ 鉴定伪杂,筛选出 3 个引物,其中引物 RM7193 的特异性非常好,可鉴定 4 个粳稻杂交组合,在后续的研究中可对当地主栽粳稻品种进行一次集中鉴定,构建一个具地方特色的特异性 SSR 标记库,直接用于杂交后代的鉴定,为杂交种真实性提供了判定的理论依据,降低了粳稻育种的难度,节省了时间和空间,该方法还可用于籼稻之间、籼稻和粳稻之间以及其他农作物的杂交种鉴定。

参考文献:

[1] 陈明江,刘贵富,余泓,等. 水稻高产优质的分子基础与品种设计[J]. 科学通报,2018,63(14): 1276-1289.

号、龙粳 1851、建原 181、垦稻 1927、华研 1 号、龙庆稻 16、中科 651、鸿丰稻 8 号、苗稻 28、鸿源 136 等 15 个品种产量与对照在 0.05 水平差异显著,且田间未发现稻瘟病病害和倒伏现象,建议当地适当种植。

参考文献:

[1] 吴振明. 黑河市水稻产业发展研究[D]. 吉林: 吉林大学, 2013.
[2] 商全玉, 杨秀峰, 张习文, 等. 2017 年黑河市不同水稻品种比较试验. 黑龙江农业科学[J]. 2018(1): 11-13.

Study on Comparative Experiment of Different Rice Varieties in Red Frontier Farm

SHANG Quan-yu

(Heihe Branch, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Heihe 164300, China)

Abstract: In order to promote the development of rice production in Heihe area, the comparison experiment research was performed on 25 varieties of rice in Red Frontier Farm, the phenophase, yield and its component factors were analyzed. The results showed that 15 varieties of rice were higher significantly on 5% level than Heijing No. 10. They all could be mature safely, and there was no field disease and no plant lodged. They were suggested planting in the local suitably.

Keywords: Red Frontier Farm; rice varieties; comparative experiment

(上接第 13 页)

[2] 刘宝海, 高世伟, 常汇琳, 等. 黑龙江省近 10 年审定粳稻品种现状与育种思路分析[J]. 中国种业, 2020(1): 21-24.
[3] 孙海燕, 顾雯雯, 王淑园, 等. 利用 SSR 标记鉴定杂交粳稻‘常优 1 号’种子纯度[J]. 分子植物育种, 2014, 12(6): 1128-1132.
[4] 邱福林, 庄杰云, 华泽田, 等. 北方杂交粳稻骨干亲本遗传差异的 SSR 标记检测[J]. 中国水稻科学, 2005(2): 101-104.
[5] 牛付安, 程灿, 周继华, 等. 分子标记在杂交粳稻育种上的应用现状及展望[J]. 中国稻米, 2015, 21(1): 18-23.
[6] Kaur S, Panesar P S, Bera M B, et al. Simple sequence repeat markers in genetic divergence and marker-assisted se-

lection of rice cultivars: A review[J]. Critical Review in Food Science and Nutrition, 2015, 55(1): 41-49.
[7] 张科, 魏海峰, 卓大龙, 等. 黑龙江省近年审定水稻品种基于 SSR 标记的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2016, 17(3): 447-454.
[8] 李松, 张世成, 董云武, 等. 基于 SSR 标记的云南腾冲水稻的遗传多样性分析[J]. 作物杂志, 2019(5): 15-21.
[9] 胡书娟, 刘璐, 陈希, 等. 利用 PCR 产物确定杂交水稻品种与亲本间的亲缘关系[J]. 杂交水稻, 2020, 35(1): 45-47.
[10] 王立广, 张翔, 黄贯刘, 等. SSR 分子标记鉴定两系杂交水稻“荃两优 2118”的种子纯度[J]. 安徽农业科学, 2020, 48(1): 42-43.

Identification of Authenticity of japonica Rice Hybrid F₁ by SSR Markers

LENG Chun-xu, ZHENG Fu-yu, ZHAO Bei-ping, LIU Hai-ying, ZHANG Shu-li, WANG Yu-jie

(Key Laboratory of Crop and Livestock Molecular Breeding of Heilongjiang, Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150028, China)

Abstract: SSR molecular marker has the advantages of high polymorphism, abundant quantity, good stability, convenient detection and so on. It is especially suitable for the identification of F₁ generation of japonica hybrid rice, which solves the problems such as the long planting time in field or indistinguishable similar phenotypes. In this study, twenty-four pairs of SSR primers were used to identify six hybrid combination, and three pairs of primers showed significant differences in their amplification products. These three pairs of primers were applied to screen all hybrid offsprings, and it was found that the true hybrid had double bands, which was consistent with the size of both parents. The percentage of hybrid rate was 80.0%-93.3%, the same with the rate in paddy field. It showed that the method is feasible to identify F₁ generation of japonica rice.

Keywords: SSR markers; japonica rice; hybrid F₁ generation