

戴金平, 宋贤勇. 基于 SSR 标记的“一管两步”法检测两系杂交稻种子纯度[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(5): 43–44.

基于 SSR 标记的“一管两步”法检测两系杂交稻种子纯度

戴金平¹, 宋贤勇²

(1. 江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400; 2. 江苏中江种业股份有限公司, 江苏南京 211500)

摘要: 利用 SSR 分子标记技术, 对两系杂交稻盐两优 888 的双亲及 F₁ 之间的多态性进行引物筛选及纯度检测技术体系优化研究。结果表明, 在已筛选的 48 对引物中有 2 对引物(RM208 和 RM225)表现出稳定的共显性, 即杂交种呈现父母本互补的带型, 采用“一管两步”简易法提取的 DNA 完全满足引物 RM208 纯度检测需要。利用 RM208 对 4 个盐两优 888 样品进行纯度鉴定, SSR 标记结果和田间鉴定结果差异不显著, 说明筛选的 SSR 分子标记能够快速、准确地鉴定盐两优 888 杂交种纯度。

关键词: 育性转换; SSR 标记; 盐两优 888

中图分类号: S511.03 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2013)05–0043–03

两系法杂交稻育种是我国继三系法杂交稻育种之后水稻遗传育种上的又一重大科技创新, 它的优越性在于不育系的“一系两用”。该方法育性转换是基础, 环境条件影响育性的稳定性, 盛夏一定频率的低温, 不育系经过 3~4 代的繁殖, 部分植株的育性转换临界温度上升, 生产上易造成制种失败或种子纯度不达标^[1]。田间小区种植鉴定是进行纯度鉴定的可靠方法, 但周期长, 受气候因素影响较大; 此外, 随着种子产业快速发展, 水稻品种数量大大增加, 表现型差异日渐缩小, 有时田间种植也难以满足鉴定的需求, 给种子及时收购、加工和销售造成一定困难。2009 年在盐城地区两系水稻授粉关键期遇到了短期的低温阴雨天气, 严重影响两系杂交稻制种纯度, 据湖北省种子管理站 SSR 分子标记检测结果可知, 2010 年市场上售卖的两系杂交稻种子纯度合格率仅为

67.7%, 杂株类型主要为不育系^[2], 可见利用 SSR 标记及时检测两系杂交稻种子的纯度对杂交稻安全生产具有重要意义。盐两优 888 属籼型两系杂交稻, 由江苏沿海地区农业科学研究所育成, 采用具有共显性的 SSR 引物, 以期能够简便、快速地鉴定杂交种纯度, 为杂交稻制种和良种及时销售提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

水稻不育系盐 582S、恢复系盐恢 888、标准杂交种 F₁、盐两优 888 样品均由江苏沿海地区农业科学研究所提供。试验所用的生化试剂、酶及缓冲液均购自南京基天生物技术有限公司。

杂交种 A 和 B 为 2009 年制种混合样品; 杂交种 C 和 D 为 2010 年制种混合样品, 代表数量为 25 000 kg, 随机抽取一定数量进行室内纯度分析和田间种植鉴定。

1.2 SSR 扩增程序优化方法

1.2.1 DNA 提取及扩增 一是参考 Liu 等的方法^[3]采用 CTAB 方法提取亲本、标准杂交种 F₁ 和部分杂交种 DNA。二是采取简易法提取, 即随机剪取每株幼苗展开嫩叶 0.5 cm 3~4 段放入 96 孔 PCR 扩增板中, 加入 50 μL 提取液

收稿日期: 2012–11–14

基金项目: 江苏省农业三项工程项目[编号: SX(2009)32]。

作者简介: 戴金平(1965 年—), 男, 江苏姜堰人, 硕士, 副教授, 研究方向为作物栽培与良种推广。E-mail: djp9928@163.com。

通信作者: 宋贤勇, 硕士, 助理研究员, 主要从事作物分子育种。

E-mail: 13770693841@163.com。

无论是叶绿素 a、叶绿素 b, 还是叶绿素总量都比对照增加; 当 HgCl₂ 浓度大于 10 μg/mL 时, 试管苗叶绿素 a、叶绿素 b、叶绿素总量均较对照降低; 当 HgCl₂ 高于 150 μg/mL 之后, 植株全部死亡。叶绿素影响着植物的光合作用, 而光合作用又是植物非常重要的营养来源, 说明低浓度的 HgCl₂ 对草莓的生长影响不大, 浓度高于 10 μg/mL 后, 会对草莓的叶绿素合成起到抑制作用。

3 结论与讨论

通过对草莓组培苗的叶片数、株高、鲜重、叶绿素含量的测定结果分析, 可以看出, 低浓度的 Hg²⁺ 对草莓的生长影响不大, 表现为叶片数、株高、鲜重均比对照增加, 叶绿素能正常合成, 说明低浓度的 Hg²⁺ 对草莓试管苗细胞的分裂和伸长有促进作用; 但当 HgCl₂ 的浓度高于 10 μg/mL 时, 就会对草莓试

管苗的生长及叶绿素的合成起到抑制作用。所以说 HgCl₂ 对草莓的临界浓度为 10 μg/mL, 当 HgCl₂ 浓度达到 150 μg/mL 时, 草莓的叶片数不再增加, 超过 150 μg/mL 时, 植株会死亡, 说明 HgCl₂ 对草莓产生毒害的致死浓度为 150 μg/mL。

参考文献:

- [1] 杜兰芳, 沈宗根, 郁 达, 等. 汞胁迫对豌豆种子的毒害效应[J]. 西北植物学报, 2004, 24(12): 2266–2271.
- [2] 郭淑华. 氯化汞对南瓜组培苗生长影响的研究[J]. 潍坊学院学报, 2004, 8(6): 108–109.
- [3] 孙瑞芬, 李天然, 李 坤, 等. 草莓组培快繁及叶片诱导植株再生的研究[J]. 华北农学报, 2002, 17(3): 49–53.
- [4] 顾建新, 李芳艳, 王 蓉, 等. 草莓组培工厂化育苗大规模生产技术[J]. 新疆农业科学, 2008, 45(增刊 1): 131–133.

(0.1 mol/L NaOH), 高速离心后, 盖上硅胶密封盖, 沸水加热 10 min, 避免剧烈沸腾, 然后每孔分别加入 50 μ L TE 缓冲液 (pH 值 2.0), 离心后, 放在 4 $^{\circ}$ C 冰箱保存备用。

1.2.2 PCR 反应体系和程序 PCR 反应在 8 μ L 的反应体积中进行, 包含 1 μ mol 引物、0.5 μ mol dNTP、0.05 U/ μ L *Taq* DNA 聚合酶、1.0 μ L 10 \times PCR buffer (含 Mg^{2+})、2.0 μ L 模板 DNA, 不足 8 μ L 的部分用超纯水补足。扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 57 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min, 反应在 Eppendorf Mastercycler gradient PCR 仪中进行。

1.2.3 电泳和简易显带方法 扩增产物在 5% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 上分离, 简易银染色。电泳结束后, 用自来水冲洗整个电泳槽 1 min, 剥下凝胶, 浸没于 200 mL 0.2% 硝酸银 (含 10% 乙醇和 0.5% 乙酸) 混合溶液中, 于脱色摇床上轻轻振荡 10 ~ 20 min。银染后, 快速用 ddH₂O 洗涤 1 次, 随后浸没于 3% NaOH 溶液 (含 0.4% 甲醛) 中约显影 5 ~ 10 min, 直至见到清晰的 DNA 条带为止。显影后, 立刻用自来水洗涤 5 ~ 6 次, 将胶平铺于胶片观察灯上, 用数码相机照相, 并存入电脑。

1.3 田间种植鉴定

田间种植鉴定在江苏省盱眙县马坝镇基地进行, 每个样品约鉴定 500 株, 在盛花期和成熟期根据植株的特征和育性表现进行纯度鉴定, 设盐 582S 为田间对照。

1.4 分析方法

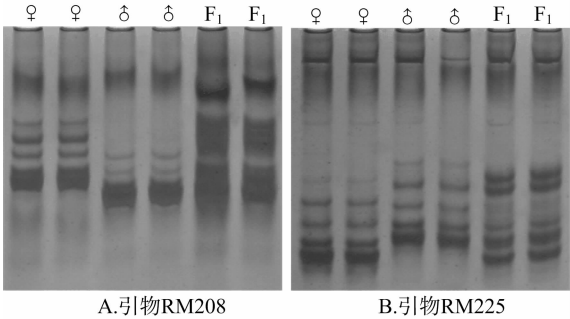
分别统计 SSR 标记和田间鉴定纯度结果, 经 *t* 检验检测差异显著性, 经回归分析得出 SSR 标记和田间纯度的相关性线性方程。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

在盐两优 888 及其双亲中共使用 48 对 SSR 引物, 进行

PCR 扩增筛选。有 2 对引物 (RM208 和 RM225) 在亲本和 F₁ 中存在多态性, 即表现出共显性 (图 1)。对 2 对引物进行重复扩增检测, 结果表明在 F₁ 群体中杂株鉴定类型完全一致, 重复性好, 扩增结果稳定。



♀—不育系盐582S; ♂—恢复系盐恢888; F₁—盐两优888

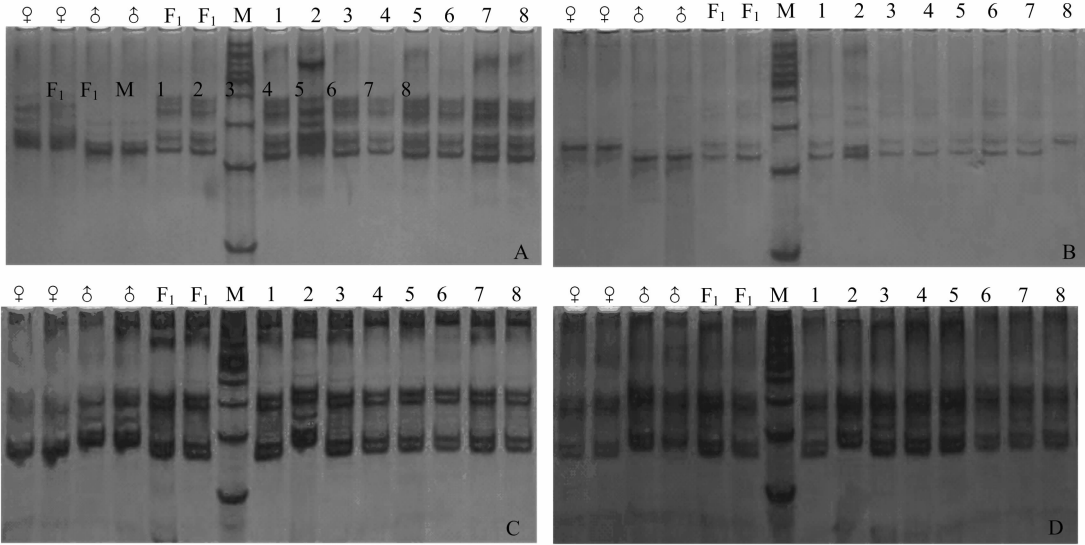
图1 引物RM208和RM225的筛选结果

2.2 DNA 质量比较

由图 2 可见, CTAB 法提取的 DNA 扩增谱带多且清晰, 除了目的片段外, 存在大量的其他片段; 简易法提取的 DNA 用 RM208 扩增目的片段很清晰, 不会影响结果的准确性和分辨率, 完全能够满足辨别自交株的要求。简易法提取的 DNA 质量相对差, RM225 电泳结果不理想, 不利于不育系的辨别, 故选用 RM208 进行杂交种纯度快速鉴定。图 3 中箭头所指为自交结实株。简易法比 CTAB 法更能节省大量的时间和费用, 而且无需使用氯仿、异戊醇等有毒化学试剂。

2.3 盐两优 888 种子纯度鉴定

2.3.1 SSR 分子标记鉴定 利用 RM208 对 4 个 F₁ 群体进行 PCR 扩增, 结果见表 1。由表 1 可知, 采用 SSR 分子标记鉴定, A、B 样品不育系比例分别高达 10.8%、7.7%, C、D 样品不育系比例分别为 1.1%、2.9%, 说明 2009 年的低温使不育系盐 582S 发生了育性转换。



♀—不育系盐582S; ♂—恢复系盐恢888; F₁—盐两优888; M—DL1000 Marker; 1~8—大田杂交种;

A、C—CTAB法提取的DNA; B、D—简易法提取的DNA

图2 引物RM208(A、B)和RM225(C、D)的扩增结果