

杨 华,李亚春,毛从亚. 基于新版本农业行业标准的水稻品种真实性 SSR 检测方法[J]. 江苏农业科学,2016,44(7):87-89.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.07.024

# 基于新版本农业行业标准的水稻品种真实性 SSR 检测方法

杨 华<sup>1</sup>, 李亚春<sup>2</sup>, 毛从亚<sup>1</sup>

(1. 江苏省种子管理站, 江苏南京 210036; 2. 江苏中江种业股份有限公司, 江苏南京 211500)

**摘要:**新的农业行业标准 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程:SSR 标记法》于 2014 年 6 月 1 日实施,笔者所在实验室依据新的标准建立了新的水稻品种真实性鉴定体系。将 2 个水稻样品(编号为 A、B)与其标注的品种名称相同的标准样品(编号:SD20140244)进行了比对,结果表明,样品 A 与标准样品无位点差异,判定为近似品种;样品 B 与标准样品有 6 个位点差异,判定为不同品种。

**关键词:**水稻;行业标准;品种真实性鉴定

**中图分类号:** S511.037 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)07-0087-03

水稻品种真实性鉴定即鉴定一份种子样品与所属的品种、种或文件描述是否相符。最初一般采取田间种植鉴定的方法对品种真实性进行鉴定,但是由于此方法周期长,有时鉴定结果出来后种子销售已经结束,不能满足种子市场管理机构快速、准确鉴定种子真实性的新要求。另外由于江苏省以常规水稻为主,部分品种亲缘关系比较近,田间种植表型差异很小,甚至基本无表型差异,给鉴定工作造成了困扰。随着生物技术的飞速发展,分子标记技术尤其是 SSR 分子标记技术在品种真实性鉴定工作中被广泛应用<sup>[1-4]</sup>。SSR 分子标记具有非组织和发育阶段特异性、不容易受外界环境影响、多态性高、在基因组中分布广泛、呈共线性遗传等优点<sup>[5-7]</sup>。采用 SSR 分子标记技术检测品种真实性的方法快速、简便且重复性高。2007 年,国家出台了农业行业标准 NY/T 1433—2007《水稻品种鉴定:DNA 指纹方法》,一直以来,种子检测机构进行水稻品种真实性鉴定工作时都是以此标准作为检测和结果判定的依据。2014 年,农业部在深入研究和广泛征求基层单位意见的基础上更新了此标准,出台了新的农业行业标准 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程:SSR 标记法》。本实验室依据新的技术标准建立起新的水稻品种真实性鉴定体系,并进行了大量的检验工作对新体系进行验证。本研究以 2 个水稻样品(编号为 A、B)与其标注的品种名称相同的标准样品(编号:SD20140244)比对为例,说明此方法的可操作性和适用性。

## 1 材料与方法

### 1.1 标准样品

选取保存在江苏省农作物种子质量检验中心标准样品库中编号为 SD20140244 的标准样品。

### 1.2 待测样品

2 个待测样品分别来自市场抽检中标签标注与编号为

SD20140244 的标准样品品种名称相同的样品,编号为 A、B。

### 1.3 方法

**1.3.1 DNA 提取** 本试验采用水稻干种子直接提取方法,样品经 SPEX Geno 2010 高通量冷冻研磨机磨碎后,用 Omega 公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒(E. Z. N. A.™ Plant DNA Kit D3485-01)提取水稻全基因组 DNA,详细方法见试剂盒说明书。用微量紫外分光光度计(Thermo Scientific ND2000)检测 DNA 质量浓度,并稀释到 50 ng/μL 备用。

**1.3.2 PCR 扩增** 采用 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程:SSR 标记法》标准中规定的 48 对引物进行 PCR 扩增。采用北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司 PER001-2 型号 Taq 酶混合物作为反应体系。反应程序为:94℃下预变性 2 min;进行 35 次扩增反应循环(94℃下变性 45 s,58℃下退火 45 s,72℃下延伸 1 min);72℃下延伸 8 min;10℃恒温冷却。

**1.3.3 电泳及染色** 采用 NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程:SSR 标记法》中规定的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和染色方法。染色结束后用 Bio-RAD 公司的 Gel Doc XR+ 型号凝胶成像系统进行扫描成像,并用 Image lab 4.1 软件进行数据分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 DNA 提取

鉴于之前标准中需要先发芽再提取 DNA 的周期太长,近 1 周时间,本研究直接采用干种子磨碎 DNA 提取试剂盒的方法进行提取,每个样品只需 1.5 h 就能提取到水稻全基因组 DNA,提取的 DNA 经过检测质量较高(表 1),完全符合 PCR 扩增的需要,极大提高了检测效率。

表 1 提取的 DNA 检测结果

品种名称	DNA 浓度 (ng/μL)	$D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$	$D_{260\text{ nm}}/D_{230\text{ nm}}$
SD20140244	150.5	1.89	2.45
A	158.8	1.92	2.25
B	164.4	1.75	2.55

收稿日期:2015-05-14

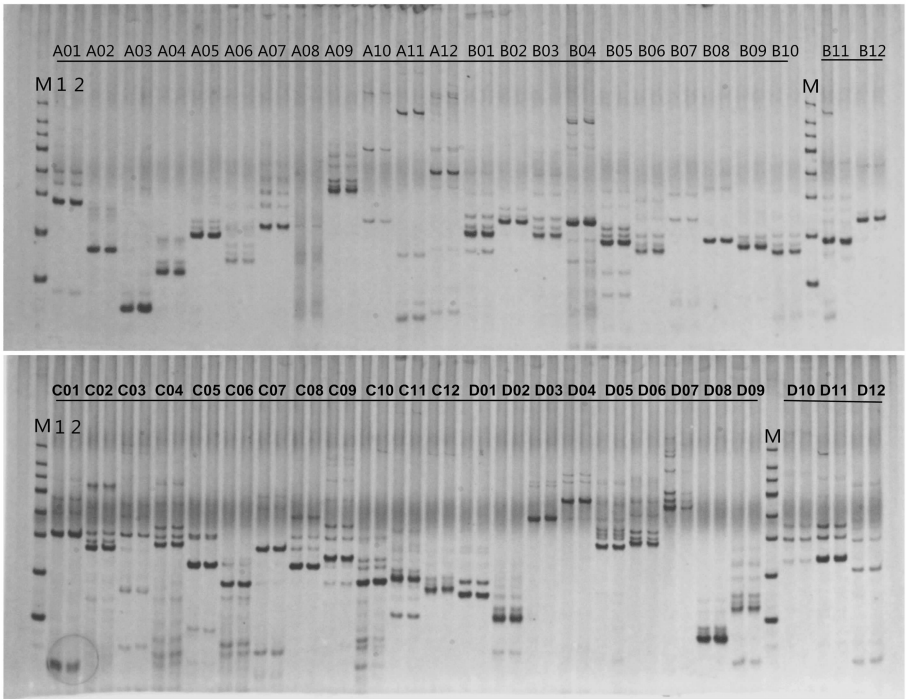
基金项目:2015 年江苏省农作物种子安全监管项目。

作者简介:杨 华(1982—),女,天津人,博士,农艺师,研究方向为种子质量管理。E-mail:652324875@qq.com。

2.2 PCR 反应优化

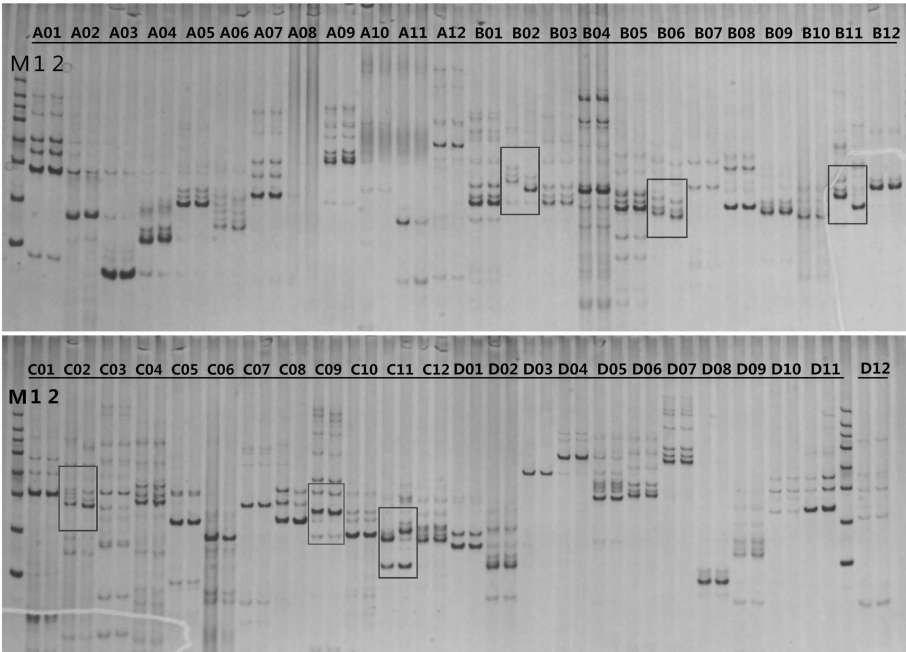
新标准中规定的 48 对引物最适合的退火温度不同,为 50 ~ 67 ℃,为最大限度地标准样品和待测样品放于同一

PCR 板中进行检测,经过不同温度试验,选取 58 ℃ 为退火温度,在此温度下 48 对引物均能得到特异性比较好的目的条带(图 1、图 2)。



M、1、2泳道分别代表 marker、待测样A、标准样品; A01~D12代表48对引物顺序。下图同。

图1 待测样品A与标准样品 SD20140244 比对指纹图谱



方框代表有差异的位点。

图2 待测样品 B 与标准样品 SD20140244 比对指纹图谱

2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳结果分析

依据新标准中的电泳方法、染色方法,2 组比对试验均得到了较为清楚的指纹图谱。清晰的指纹图谱是分析、判定结果的重要前提,不同的实验室应根据自己的情况选择合适的药品和设备进行试验,以得到特异性条带清楚、背景干净的图

谱,才能进行接下来的数据分析。指纹图谱经凝胶成像系统成像后,导入分析软件进行分析,分别标记泳道和条带,计算条带大小。按照新标准中的数据记录方式记录条带信息。纯合位点的基因型数据记录为 X/X,其中 X 为该位点等位变异的大小;杂合位点的基因型数据记录为 X/Y,其中 X、Y 为该

位点上 2 个不同等位变异。小片段在前,大片段在后。缺失位点记录为 0/0。此种记录方法的优点是不仅能够反映待测样品与标准样品的差异,还能反映位点的基因型及变异的大

小,将数据记录的结果统一,也便于后期指纹图谱数据库构建和不同实验室之间标准样品信息的共享(表 2)。

表 2 真实性鉴定数据

引物信息		等位变异大小			引物信息		等位变异大小		
编号	名称	标准样品	样品 A	样品 B	编号	名称	标准样品	样品 A	样品 B
A01	RM583	187/187	187/187	187/187	C01	RM493	203/203	203/203	203/203
A02	RM71	129/129	129/129	129/129	C02	RM561	181/181	181/181	186/186
A03	RM85	100/100	100/100	100/100	C03	RM8277	200/200	200/200	200/200
A04	RM471	107/107	107/107	107/107	C04	RM551	186/186	186/186	186/186
A05	RM274	147/147	147/147	147/147	C05	RM598	158/158	158/158	158/158
A06	RM190	118/118	118/118	118/118	C06	RM176	134/134	134/134	134/134
A07	RM336	157/157	157/157	157/157	C07	RM432	179/179	179/179	179/179
A08	RM72	157/157	157/157	157/157	C08	RM331	157/157	157/157	157/157
A09	RM219	206/206	206/206	206/206	C09	OSR28	166/166	166/166	168/168
A10	RM311	163/163	163/163	163/163	C10	RM590	137/137	137/137	137/137
A11	RM209	124/124	124/124	124/124	C11	RM21	142/142	142/142	132/132
A12	RM19	244/244	244/244	244/244	C12	RM3331	129/129	129/129	129/129
B01	RM1195	149/149	149/149	149/149	D01	RM443	122/122	122/122	122/122
B02	RM208	163/163	163/163	174/174	D02	RM490	100/100	100/100	100/100
B03	RM232	147/147	147/147	147/147	D03	RM424	234/234	234/234	234/234
B04	RM119	161/161	161/161	161/161	D04	RM423	275/275	275/275	275/275
B05	RM267	137/137	137/137	137/137	D05	RM571	182/182	182/182	182/182
B06	RM253	128/128	128/128	132/132	D06	RM231	187/187	187/187	187/187
B07	RM481	165/165	165/165	165/165	D07	RM567	260/260	260/260	260/260
B08	RM339	140/140	140/140	140/140	D08	RM289	85/85	85/85	85/85
B09	RM278	133/133	133/133	133/133	D09	RM542	109/109	109/109	109/109
B10	RM258	127/127	127/127	127/127	D10	RM316	194/194	194/194	194/194
B11	RM224	140/140	140/140	153/153	D11	RM332	166/166	166/166	166/166
B12	RM17	165/165	165/165	165/165	D12	RM7102	154/154	154/154	154/154

2.4 SSR 标记法鉴定水稻品种真实性结果判定

新标准对于结果判定也进行了规定,当样品间差异位点 $\geq 2$ ,则判定为“不同品种”;当样品间差异位点 = 1,则判定为“近似品种”;当样品间差异位点 = 0,则判定为“极近似品种或相同品种”。从表 2 可以看出,样品 A 与标准样品之间无差异位点,即差异位点 = 1,所以判定样品 A 与标准样品为相同品种;样品 B 与标准样品在引物(B02、B06、B11、C02、C09、C11)扩增出的基因位点上存在差异,即样品间差异位点为 6,判定样品 B 与标准样品为“不同品种”。

3 结论与讨论

江苏省是种业大省,同时也是中国水稻主产省和高产省之一,素有“鱼米之乡”之称,从事农作物品种选育的科研单位 40 余家,目前为止通过江苏省审定的水稻品种有 213 个,通过国家审定的有 78 个,品种众多<sup>[8]</sup>。正是因为品种多、品种杂以及从事水稻生产销售的主体多,使得种子市场上制售假劣种子、套牌侵权、未审先推等问题屡屡出现,在社会上引起了广泛关注,严重损害了农民和品种权人权益,阻碍了现代种业可持续发展。这就要求从事相关种子检测工作的检验中心具备有据可依、快速、准确的品种真实性鉴定手段。2014 年实施的农业行业新标准在试验方法、数据记录与统计、结果判定等方面都进行了优化和改进,并且将原来的 24 对引物保留了 19 对,新增了 29 对引物,最终确定了 48 对引物;此外还

增加了变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和毛细管电泳荧光检测等新的检测平台。新标准的实施为水稻品种真实性鉴定室内分子检测方法提供了判定依据,新标准检测体系也能为农业行政执法部门开展执法工作以及种子市场监管工作提供相应的技术支撑,减少假劣种子进入市场的概率,促进江苏省种业健康、有序、可持续发展。

参考文献:

[1]王 飞. SSR 分子标记在棉种真实性和纯度中的应用研究[D]. 北京:中国农业科学院,2013.

[2]王风格,赵久然,戴景瑞,等. 利用 SSR 标记进行玉米品种一致性检测研究[J]. 分子植物育种,2007,5(1):95-104.

[3]周 会,苏 秀,毛双林,等. 杂交水稻品种真实性和纯度的 SSR 分子标记鉴定[J]. 种子世界,2014(3):34-35.

[4]张冰清,陆徐忠,吴新杰,等. 利用 SSR 标记进行杂交油菜品种鉴定[J]. 中国油料作物学报,2014,36(6):728-734.

[5]罗 冉,吴委林,张 旸,等. SSR 分子标记在作物遗传育种中的应用[J]. 基因组学与应用生物学,2010,29(1):137-143.

[6]罗 兵,孙海燕,徐港明,等. SSR 分子标记研究进展[J]. 安徽农业科学,2013,41(12):5210-5212,5246.

[7]杨文柱,焦 燕. SSR 分子标记技术在生物遗传学领域的应用[J]. 安徽农业科学,2012,40(2):640-642.

[8]殷钱茜,殷海军. 江苏水稻种子产业现状、问题及发展对策[J]. 山西农业科学,2013,41(5):515-519.