

网络出版时间:2012-12-21 17:28

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/detail/61.1390.S.20121221.1728.015.html>

甘蓝型油菜“甘杂 1 号”种子纯度的 SSR 鉴定

孟 倩,董军刚,胡永敏,兰 刚,董振生

(西北农林科技大学 农学院,陕西 杨凌 712100)

【摘 要】 【目的】建立有效的鉴定“甘杂 1 号”种子纯度的 SSR 分子标记方法,为提高“甘杂 1 号”大田制种纯度提供分子辅助工具。**【方法】**以“甘杂 1 号”杂交种及其母本 3131A 和父本 3116C 种子为供试材料,利用 SSR 分子标记技术鉴定“甘杂 1 号”种子纯度,从 200 对引物中筛选出特异性强、稳定性高的 SSR 引物,并将 SSR 引物鉴定的“甘杂 1 号”种子纯度与田间种植鉴定结果进行比较。**【结果】**在 200 对 SSR 引物中,筛选出了 2 对在杂交种和父母本之间存在显著差异的引物(CB10569 和 Na12E03),且条带清晰可辨,即杂交种含有父母本的特异互补带型。将这 2 个引物在 120 株“甘杂 1 号”杂交种群体中进行重复验证,发现 CB10569 和 Na12E03 2 对引物鉴定出“甘杂 1 号”的种子纯度分别为 82%,79.5%。SSR 标记的鉴定结果与田间种植鉴定结果(83%)基本一致。**【结论】**得到的 2 对 SSR 引物 CB10569 和 Na12E03,可用于甘蓝型油菜品种“甘杂 1 号”种子纯度的鉴定。

【关键词】 甘蓝型油菜;甘杂 1 号;纯度鉴定;SSR 标记

【中图分类号】 S634.304⁺.1

【文献标志码】 A

【文章编号】 1671-9387(2013)01-0055-05

Hybrid purity identification of “Ganza No. 1” using SSR method

MENG Qian,DONG Jun-gang,HU Yong-min,LAN Gang,DONG Zhen-sheng

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: 【Objective】 This study established a rapid and reliable SSR method to identify the purity of hybrid “Ganza No. 1”, which provided an auxiliary tool to improve the field purity of “Ganza No. 1”. **【Method】** The purity of *Brassic napus* cultivar “Ganza No. 1” was identified by SSR marker, and the results were compared with the field planting appraisal in order to screen out SSR primers with high stability. **【Result】** Among the 200 pairs of SSR primers screened, 2 pairs of primers (CB10569 and Na12E03) had significant and legible differences between hybrid seeds and their parents. In other words, the bands amplified from the hybrid seeds contained complementary bands of both parents’ specific bands. 120 individual seeds of “Ganza No. 1” were tested with the selected primers (CB10569 and Na12E03), and the seed purities detected were 82% and 79.5%, respectively, which were close to the result of 83% identified in the field. **【Conclusion】** SSR primers CB10569 and Na12E03 could be used to identify the seeds purity of “Ganza No. 1”.

Key words: *Brassica napus*. ; Ganza No. 1; purity identification; SSR

油菜杂种优势利用是提高油菜产量的最有效途径,也是当今世界油菜研究的热点。自傅廷栋 1972

年在欧洲甘蓝型春油菜品种中发现波里马(*Polcms*)细胞质雄性不育系以来^[1],细胞质雄性不育系

【收稿日期】 2012-05-14

【基金项目】 陕西省科技统筹创新工程项目“主要粮油作物新品种选育”(2011KTZB02-01-03);西北农林科技大学基本科研业务费项目(2010BSJJ031)

【作者简介】 孟 倩(1987—),女,陕西咸阳人,在读硕士,主要从事作物杂种优势理论与应用研究。E-mail: qian6141868@163.com

【通信作者】 董振生(1957—),男,陕西永寿人,研究员,硕士生导师,主要从事油菜遗传育种研究。E-mail: dzs05319@163.com

统成为油菜杂种优势利用的主要类型^[2]。但是在利用胞质不育材料生产杂交种的过程中,由于受到温度、光照的影响产生微量花粉^[3]或人工去杂不彻底,往往导致母本自交产生假杂种;此外,人工制种过程中,由于隔离不严而导致的杂粉混入,以及收种和晒种过程中的机械混杂现象等都影响着杂交种的纯度,给生产造成很大损失。因此,对杂交种的纯度进行快速、准确、有效地鉴定,是安全生产的重要保证^[4]。

“甘杂 1 号”是陕西省审定的耐寒性强的优质甘蓝型油菜杂交种。制种过程中由于母本 3131A 与父本 3116C 花期间隔长达 1 周,导致杂交种的纯度一直较低。为提高“甘杂 1 号”种子纯度,采用不同的栽培措施,如提高母本种植密度使母本花期提前,而栽培措施是否能提高杂交种纯度还需要进行鉴定。传统的油菜杂交种鉴定方法主要有形态学鉴定和生化标记鉴定。形态学鉴定即大田异地鉴定,虽然结果可靠但鉴定周期长、费时费力,且受到经验的限制^[5]。主要的生化标记鉴定方法中,同工酶电泳^[6]和种子储藏蛋白电泳^[7]能对大多数品种纯度进行鉴定^[6],但难以鉴定亲缘关系较为密切的杂交种。而 SSR 分子标记可以弥补传统鉴定方法的缺陷,是目前快速、准确鉴定种子纯度的有效方法之一^[8]。SSR 作为共显性标记,比显性标记能提供更多的信息,具有数量丰富、多态性高、共显遗传、扩增谱带少、易于检测等优点^[9-11],而且 SSR 标记位点具有复等位性,可在种内的栽培品种之间获得多态性标记位点,尤其适用于杂交种的纯度鉴定^[12]。目前,利用 SSR 标记鉴定甘蓝型油菜纯度的报道已有很多^[9-12]。利用 SSR 标记鉴定油菜杂交种纯度存在的主要问题是分子标记鉴定结果与田间种植鉴定结果无法完全吻合,吻合率最高为 98.67%^[13],究其原因可能与亲本个别位点的纯合程度有关^[14],高度纯合的亲本将会有效提高分子标记鉴定结果与形态学鉴定结果的吻合度。

本研究利用 SSR 分子标记技术鉴定“甘杂 1 号”油菜种子的纯度,以筛选出特异性较强、稳定性高的 SSR 引物,建立“甘杂 1 号”种子纯度的鉴定方法,以期为提高“甘杂 1 号”大田制种纯度提供重要的辅助工具。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为“甘杂 1 号”杂交种及其母本 3131A

和父本 3116C 种子,杂交种分为手工制种和大田自然收获种子 2 种,其中手工制种种子为人工杂交所得,用于 SSR 引物筛选;大田自然收获种子为大田制种种子,用于种子纯度鉴定。以上材料均由西北农林科技大学油菜研究中心提供。

1.2 方法

1.2.1 引物设计与合成 200 对编号分别为 Na*、CB*、BRAS* 的 SSR 引物来自参考文献[5, 15-21],序列信息来源 <http://ukcrop.net>;另外一部分编号为 P* 的引物来自油菜数据中心(国家油菜工程技术研究中心, <http://www.rapedata.cn/>)。所有引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 DNA 的提取 在直径 7 cm 的培养皿中放 3 层薄棉纱布,用蒸馏水充分浸湿,将种子均匀播在吸水纸上,在室温下发芽 5~7 d 后,随机选取 120 株“甘杂 1 号”大田自然收获种子单株和 30 株手工制种种子单株提取 DNA;同时,随机选取父、母本各 10 株单株提取 DNA。将选取的单株分别放入事先预冷的小型匀浆器中,加入 350 μ L 抽提缓冲液(体积分数 2% CTAB、100 mmol/L Tris · HCl、20 mmol/L EDTA、1.4 mol/L NaCl,使用前加体积分数 2% 的 β -巯基乙醇, pH 8.0),充分匀浆后转移到 1.5 mL 离心管中,再加入 350 μ L 抽提缓冲液再次研磨,将 2 次研磨液合并之后置于 60 $^{\circ}$ C 水浴 1 h (每 10 min 振荡 1 次);然后加 700 μ L V(氯仿): V(异戊醇)=24:1 的混合液,充分振荡后于 4 $^{\circ}$ C、10 000 r/min 离心 8 min;将上清液转移至新的离心管中,加入等体积预冷的异丙醇,颠倒混匀后于 -4 $^{\circ}$ C 沉淀 30 min, 8 000 r/min 离心 15 min;弃上清液加入 200 μ L 体积分数 80% 乙醇洗涤 3 min 后, 500 r/min 离心 2 min,倒掉乙醇自然风干,最后加 50 μ L 双蒸水溶解 DNA,保存于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

1.3 “甘杂 1 号”杂交种及其亲本的 SSR 分析

1.3.1 SSR 扩增 PCR 反应体系: Reaction Mix 5.5 μ L (含 DNA Polymerase、2 $\times$ PCR Buffer、3 mmol/L MgCl₂ 和 400 μ mol/L dNTP Mix), 模板 DNA (50~100 ng/L) 1 μ L, 上、下游引物 (10 μ mol/L) 各 0.5 μ L, 加 PCR 专用无菌水至 10 μ L。PCR 循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 60 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 此后每个循环的退火温度降低 0.5 $^{\circ}$ C, 共计 10 个循环; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 然后 20 $^{\circ}$ C 保存。

1.3.2 电泳检测 在 SSR 扩增产物中加入 1/2 体积的变性上样缓冲液,95 ℃ 变性 5 min 后立即冷却,然后在 80 g/L 变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳(85 W,1.5 h)。电泳完成后,变性凝胶用体积分数 10% 冰醋酸溶液固定、水洗,然后用 1 g/L 硝酸银溶液染色、15 g/L 的 NaOH 溶液显色、再用体积分数 10% 冰醋酸溶液终止显影,经漂洗、风干后记录扩增结果。

1.3.3 SSR 差异引物的筛选 随机选取 10 株“甘杂 1 号”手工制种种子单株提取 DNA,将每个单株 DNA 质量浓度均稀释到 100 ng/ μ L 后混合,构建杂交种基因池。首先,用 200 对 SSR 引物在构建的“甘杂 1 号”杂交种基因池及其父母本中进行初筛,找到在父母本和杂交种中存在差异的引物;然后,将初筛引物在 5 个杂交种单株中进行重复验证,再次选择重复性好、稳定性高、条带清晰、差异明显的引物即为目标引物。

1.4 种子纯度的鉴定

1.4.1 SSR 分子标记鉴定 用确定具有显著差异的 SSR 引物鉴定“甘杂 1 号”大田收获种子纯度,计算“甘杂 1 号”杂交种的纯度。杂交种纯度=具有双

亲特征谱带的样本数/检测的样本总数 $\times 100\%$ 。

1.4.2 田间种植鉴定 2011-09—2012-04,在陕西杨凌西北农林科技大学油菜中心试验地进行田间种植鉴定。将大田收获的“甘杂 1 号”种子随机排列,设 10 行区,播种约 800 粒,不间苗。在初花期至盛花期,根据植株的育性和株型表现进行杂交种纯度鉴定。将 SSR 鉴定结果与田间种植鉴定结果进行比对,确定 SSR 标记鉴定是否有效,以及其最终是否可以用于“甘杂 1 号”种子纯度的鉴定。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物的筛选

本研究用 200 对 SSR 引物在“甘杂 1 号”杂交种及其亲本中进行初选、重复性验证和群体验证后,确定有 2 对引物(CB10569 和 Na12E03)在母本 3131A、父本 3116C 和杂种 F₁ 中存在多态性,扩增的谱带单一清晰、容易辨别,即典型杂种具有双亲的互补带型(图 1)。在其他 198 对引物中,有 21 对未扩增到明显产物,177 对引物虽扩增到清晰条带,但在父母本与杂交种间没有明显差异,不能用于“甘杂 1 号”杂交种纯度的检测。

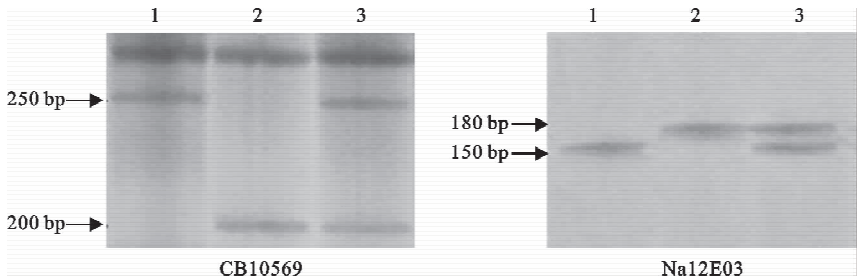


图 1 “甘杂 1 号”及其亲本的 SSR 引物扩增图谱

1. 父本 3116C;2. 母本 3131A;3. 杂交种基因池

Fig.1 Electrophoresis patterns of selected primers

1. Male line 3116C;2. Female line 3131A;3. F₁ hybrid gene bulk

2.2 “甘杂 1 号”杂交种纯度的鉴定

2.2.1 CB10569 和 Na12E03 鉴定 将引物 CB10569 和 Na12E03 在 120 株大田收获杂交种单株中进行群体验证,统计杂交种中具有与父母本完全互补带型的单株个数,结果显示,CB10569 和 Na12E03 2 对引物鉴定出“甘杂 1 号”的种子纯度分别为 82% 和 79.5%。非亲本种子主要为母本自交种子和少数父本种子的混杂,其中母本自交种子 18 株,父本种子 4 株,这些假种子的扩增结果只具有母本特异条带而不具有父本特异条带,或只具父本特异条带

而不具有母本特异条带(图 2 和图 3)。

比较发现,2 对引物鉴定的 120 粒种子中,有 117 株鉴定结果一致,3 株鉴定结果不同,鉴定结果的一致性可达 97.5%。说明 2 对引物均可用于“甘杂 1 号”种子纯度的鉴定。

2.2.2 田间种植鉴定 在大田种植,于初花期至盛花期根据植株的育性和株型表现鉴定 500 株“甘杂 1 号”群体,其中,杂交种有 415 株,母本自交 85 株,杂交种的纯度为 83%,假种子全部来自母本自交种子。

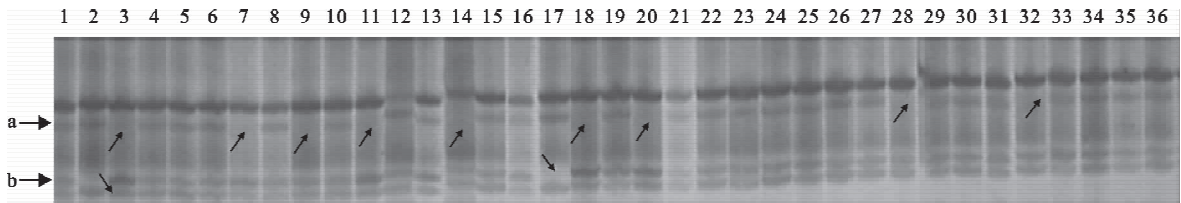


图 2 引物 CB10569 在“甘杂 1 号”大田收获杂交种群体验证的部分 SSR 扩增图谱
a. 父本特异带;b. 母本特异带;→. 只有亲本 1 条特异带型的单株;1~36.“甘杂 1 号”大田收获种子

Fig. 2 Selected SSR maps of “Ganza No. 1” verified by primes CB10569

a. Band of male line;b. Band of female line;The arrow show false hybrid seeds;1—36. Field harvest seeds of “Ganza No. 1”

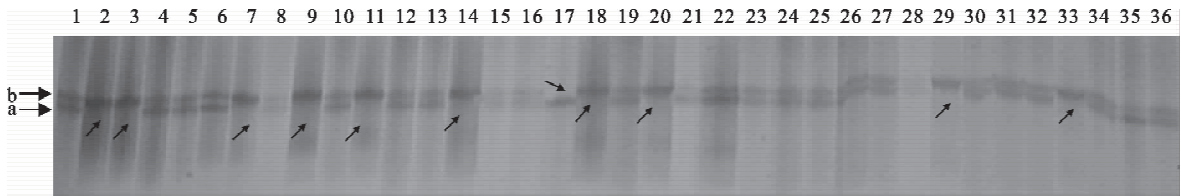


图 3 引物 Na12E03 在“甘杂 1 号”大田收获杂交种群体验证的部分 SSR 扩增图谱
a. 父本特异带;b. 母本特异带;→. 只有亲本 1 条特异带型的单株;1~36.“甘杂 1 号”大田收获种子

Fig. 3 Selected SSR maps of “Ganza No. 1” verified by primes Na12E03

a. Band of male line;b. Band of female line;The arrow show false hybrid seeds;1—36. Field harvest seeds of “Ganza No. 1”

3 讨 论

为提高油菜“甘杂 1 号”的纯度,通过提高母本的种植密度以缩短母本与父本的花期间隔时间,因此栽培措施改变后的种子纯度鉴定是良种繁育的一个重要研究内容,然而采用传统的形态鉴定方法需要较多的劳动力,且受到经验的限制,所得结果也不能准确反映种子的实际纯度,因此建立快速有效的“甘杂 1 号”种子纯度鉴定方法显得尤为重要。

本试验从 200 对 SSR 引物中甄选出 CB10569 和 Na12E03 2 对引物用于“甘杂 1 号”种子的纯度鉴定,利用这 2 对 SSR 引物对“甘杂 1 号”及其亲本进行分子标记,结果表明,2 对引物鉴定的杂交种纯度分别为 82%和 79.5%,与大田鉴定结果(83%)相比,2 对引物的鉴定结果稍微偏低,这可能是由于“甘杂 1 号”中的假种子除来自于母本自交种子外,还有少量父本种子混入,而大田中由于父本为可育株,不易从育性上与杂交种区分,故大田鉴定的结果要高于 SSR 鉴定结果,也高于种子实际纯度。说明试验中得到的 SSR 引物 CB10569 和 Na12E03 可用于“甘杂 1 号”种子纯度的鉴定。但在室内试验中,建议优先利用 Na12E03 鉴定杂交种纯度,主要是因为该引物的多态性条带仅有 2 条,试验中更易于区分和统计。

[参考文献]

[1] Fu T D. Production and research of rapeseed in the People Republic of China [J]. Cruefferae Newsletter, 1981, 6: 6-7.

[2] 傅廷栋. 杂交油菜的育种与利用 [M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1995: 1-5.

Fu T D. Breeding and application of hybrid *Brassica napus* [M]. Wuhan: Press of Hubei Science and Technology, 1995: 1-5. (in Chinese)

[3] 刘平武, 周国岭, 杨光圣, 等. 双低甘蓝型油菜杂交种亲本指纹图谱构建和杂交种纯度鉴定 [J]. 作物学报, 2005, 31(5): 640-646.

Liu P W, Zhou G L, Yang G S, et al. Fingerprints construction of hybrid parents in *Brassica napus* and its utilization in hybrid purity test [J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(5): 640-646. (in Chinese)

[4] 刘 静, 董振生, 李红兵. 白杂 1 号种子纯度的 RAPD 鉴定技术研究 [J]. 西北农业学报, 2007, 16(1): 131-135.

Liu J, Dong Z S, Li H B. Identification of genetic purity of the hybrid “Baiza No. 1” with RAPD in *Brassica campestris* L. [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2007, 16(1): 131-135. (in Chinese)

[5] 刘梓谕, 王新发, 刘贵华, 等. 三个高含油量甘蓝型油菜新品系 SSR 指纹图谱的构建 [J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(4): 389-396.

Liu Z B, Wang X F, Liu G H, et al. Construction of SSR fingerprinting maps for 3 high oil content cultivars in *Brassica napus* [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2008, 30(4): 389-396. (in Chinese)

[6] 梅德圣, 李云昌, 李英德, 等. 用酯酶同工酶和 AFLP 标记鉴定

- 甘蓝型油菜中油杂 2 号的种子纯度 [J]. 江西农业大学学报, 2005, 27(1): 59-62.
- Mei D S, Li Y C, Li Y D, et al. Identification of seed purity of *Brassica napus* “Zhongyouza No. 2” with esterase isozyme and AFLP markers [J]. Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis, 2005, 27(1): 59-62. (in Chinese)
- [7] 张文兰, 李 群, 谭振新, 等. 作物品种纯度快速鉴定技术及其应用 [J]. 山东农业科学, 2001(2): 45-47.
- Zhang W L, Li Q, Tan Z X, et al. Purity identification of crop varieties technology and its applications [J]. Shandong Agricultural Sciences, 2001(2): 45-47. (in Chinese)
- [8] 周红伟, 姚艳梅, 付 忠, 等. 春性双低甘蓝型油菜杂交种和亲本指纹图谱构建及杂交种纯度鉴定 [J]. 西北农业学报, 2010, 19(3): 81-86.
- Zhou H W, Yao Y M, Fu Z, et al. Fingerprint construction of hybrids and related parents in *Brassica napus* and hybrid purity test [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2010, 19(3): 81-86. (in Chinese)
- [9] 宋贤勇, 包月红, 杨俊涛, 等. 利用 SSR 标记鉴定甘蓝型油菜秦优 11 号种子纯度 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(3): 497-500.
- Song X Y, Bao Y H, Yang J T, et al. Purity identification of *Brassica* Qinyou No. 11 using SSR markers [J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(3): 497-500. (in Chinese)
- [10] 陆光远, 伍晓明, 张冬晓, 等. SSR 标记分析国家油菜区试品种的特异性和一致性 [J]. 中国农业科学, 2008, 41(1): 32-42.
- Lu G Y, Wu X M, Zhang D X, et al. SSR-based evaluation of distinctness and uniformity of rapeseed (*Brassic napus* L.) varieties under Chinese National Official Field Tests (*Brassic napus* L.) varieties under Chinese National Official Field Tests [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(1): 32-42. (in Chinese)
- [11] 曲 亮, 陈卫江, 李 莓, 等. SSR 标记技术在甘蓝型油菜杂交种纯度鉴定中的应用 [J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2009, 35(3): 229-232.
- Qu L, Chen W J, Li M, et al. Application of SSR molecular marker technique on purity identification of hybrid in rapeseed [J]. Journal of Hunan Agricultural University: Natural Sciences, 2009, 35(3): 229-232. (in Chinese)
- [12] 梅德圣, 李云昌, 胡 琼, 等. 甘蓝型油菜中油杂 8 号种子纯度的 SSR 鉴定 [J]. 中国农学通报, 2006, 30(5): 49-52.
- Mei D S, Li Y C, Hu Q, et al. Identification of seed purity of *Brassica napus* Zhongyouza No. 8 using SSR markers [J]. Chinese Agriculture Science Bulletin, 2006, 30(5): 49-52. (in Chinese)
- [13] 王爱娜, 王 灏, 赵亚军, 等. 甘蓝型化学杀雄杂交油菜品种秦优 33 种子纯度的 SSR 鉴定 [J]. 农业生物技术学报, 2011, 19(6): 1011-1018.
- Wang A N, Wang H, Zhao Y J, et al. Purity identification of chemical hybridizing male varieties of hybrid rape Qinyou 33 using SSR markers [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 2011, 19(6): 1011-1018. (in Chinese)
- [14] 沈金雄, 傅廷栋, 杨光圣. 甘蓝型油菜 SSR、ISSR 标记的遗传多样性及其与杂种表现的关系 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(4): 477-483.
- Shen J X, Fu T D, Yang G S. Relationship between hybrid performance and genetic diversity based on SSR and ISSR in *Brassica napus* L. [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2004, 37(4): 477-483. (in Chinese)
- [15] 田筑萍, 唐 容, 吴有祥, 等. 利用 SSR 指纹图谱技术对杂交油菜种质鉴定的研究 [J]. 种子, 2008, 27(6): 69-71.
- Tian Z P, Tang R, Wu Y X, et al. SSR utilization in yellow-seeded *Brassica napus* L. Guiyou 519 hybrid purity test [J]. Seed, 2008, 27(6): 69-71. (in Chinese)
- [16] Hasan M, Seyis F, Badani A G, et al. Analysis of genetic diversity in the *Brassica napus* L. gene pool using SSR markers [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2006, 53: 793-802.
- [17] Piquemal J, Cinquin E, Couton F, et al. Construction of an oil-seed rape (*Brassica napus* L.) genetic map with SSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2005, 111: 1514-1523.
- [18] Xu J S, Qian X J, Wang X F, et al. Construction of an integrated genetic linkage map for the A genome of *Brassica napus* using SSR markers derived from sequenced BACs in *B. Rapa* [J]. BMC Genomics, 2010, 11: 594-608.
- [19] Plieske J, Struss D. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*: I. Development in *Brassica napus* and abundance in *Brassicaceae* species [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 689-694.
- [20] Saal B, lieske J, Hu J, et al. Microsatellite markers for genome analysis in *Brassica*: II. Assignment of rapeseed microsatellites to the A and C genomes and genetic mapping in *Brassica oleracea* L [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 695-699.
- [21] Swarup K, Parida, Devendra K, et al. Microsatellites in *Brassica unigenes*: Relative abundance, marker design and use in comparative physical mapping and genome analysis [J]. Genome, 2010, 53(1): 55-67.