

Hybrid Purity Identification of Liyouza No. 3 in *Bassica napus*

Shiyi Zhou¹, Xia Zhang¹, Di Xiong², Lei Xiong², Qingbiao He², Yun Li^{1*}, Pingwu Liu^{1*}

¹National Demonstration Center for Experimental Plant Science Education, College of Agriculture, Guangxi University, Nanning Guangxi

²Hubei Lizhong Seed Industry Technology Co., Wuhan Hubei

Email: gxuliyun@gxu.edu.cn, gxulpw@gxu.edu.cn, 248981897@qq.com

Received: Apr. 23rd, 2019; accepted: May 9th, 2019; published: May 17th, 2019

Abstract

In this experiment, Liyouza No. 3 and its parents (sterile line T21, restorer line P12-7) were used as experimental materials. Two pairs of primers (BN12A, CB10099) whose bands were clear and co-dominant were selected in 43 pairs of SSR primers and could be used for the purity identification of Liyouza No. 3. There are 4 male plants, 16 female plants and 117 hybrids with parental-specific complements in 137 hybrids about BN12A, with a purity of 85.40%. CB10099 also shows 121 hybrids with parental-specific complements in 137 hybrids, 2 male plants and 14 female plants, with the hybrid purity identification of 88.32%. Comparing the results of two pairs of primer purity identification, both of them have the phenomena that one primer is identified as female parent or male parent, and the other primer is identified as hybrid. The hybrids of the combining bands of two primers are 125, 1 male plant and 11 female plants, and the hybrid purity identification is 91.24%. The total ratio of the male-type plants and hybrid-type plants is 91.97%, which is close to the field purity identification result (93%). It indicates that the purity of Liyouza No. 3 is in accordance with the quality standards of commercial varieties. At the same time, when using molecular markers for the identification of indoor hybrid purity, we need two pairs of SSR markers at least for comprehensive evaluation. This study can provide effective identification for the establishment of molecular marker purity identification technique systems for other hybrids of *Brassica napus*.

Keywords

Brassica napus, Liyouza No. 3, Purity Identification, SSR

甘蓝型油菜利油杂3号杂种纯度鉴定

周时艺¹, 张霞¹, 熊迪², 熊雷², 何庆彪², 李赞^{1*}, 刘平武^{1*}

¹广西大学农学院, 植物科学国家级实验教学示范中心, 广西 南宁

*通讯作者。

²湖北利众种业科技有限公司, 湖北 武汉

Email: gxuliyun@gxu.edu.cn, gxulpw@gxu.edu.cn, 248981897@qq.com

收稿日期: 2019年4月23日; 录用日期: 2019年5月9日; 发布日期: 2019年5月17日

摘要

本试验以甘蓝型油菜利油杂3号及其亲本(不育系T21、恢复系P12-7)为供试材料, 在43对SSR引物中筛选出2对条带清晰且均为共显性的SSR引物(BN12A、CB10099)用于利油杂3号种子纯度鉴定。BN12A在137株杂交种样本出现父母本特异互补的杂交种带型共117株, 父本带型4株, 母本带型16株, 杂交种纯度为85.40%; CB10099则出现父母本特异互补的杂交种带型共121株, 父本带型2株, 母本带型14株, 杂交种纯度为88.32%。比较2对引物纯度鉴定结果, 两者均存在单一引物鉴定为母本或父本, 而另一引物鉴定为杂交种的现象。综合二者的带型结果杂交种带型共125株, 父本带型1株, 母本带型11株, 杂交种纯度为91.24%。父本带型株与杂交种带型株总计比例为91.97%, 与大田调查结果93%基本一致。说明该批次甘蓝型油菜利油杂3号杂种纯度符合商品种质量标准。同时, 利用分子标记进行室内杂种纯度鉴定时, 至少需要有两对及以上SSR标记扩增的结果进行综合评价。本研究可为其它甘蓝型油菜杂交种建立分子标记纯度鉴定技术体系提供有效的鉴定。

关键词

甘蓝型油菜, 利油杂3号, 纯度鉴定, SSR标记

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

油菜是世界各地栽培的四大油料作物之一[1] (大豆、油菜、花生、葵花籽), 也是我国主要种植且具有代表性的食用油料作物之一, 在我国占据极其重要的地位, 种植面积和总产量在世界名列首位[2] [3]。随着杂交种产量优势不断被挖掘与应用, 越来越多的种植户青睐杂交种, 而杂交种子的纯度是有效保障农户收入和权益的前提。商品杂交种纯度主要受以下因素影响: 大田制种时隔离条件不严或田间杂株去除不彻底导致不同品种间串粉[4]; 去雄不彻底导致母本自交或者不育系受温度、光照的影响产生微量花粉自交[5]; 父本砍除不彻底导致混杂父本种子; 收种、晒种时机械混杂其他种子等。SSR 分子标记技术因其易于操作、特异性强、共显性遗传、稳定性高[6] [7] [8]等方面的优点, 可有效区分上述商品杂交种中混杂的父本、母本等植株, 被运用于多种作物的种子纯度检测, 如油菜[9] [10]、水稻[4]、玉米[11] [12] [13]、苦瓜[14]、榨菜[15]。近年来, 为响应国家绿色高效、减施化肥的可持续农业发展政策, 广西自治区利用水稻冬闲田大力发展冬季绿肥, 甘蓝型油菜因其生物量大、翻耕后茎叶易沤烂等优点得到大力推广。甘蓝型油菜利油杂3号于2018年6月获得农业农村部种子管理局登记, 本课题组在广西经过连续2年引种观察, 甘蓝型油菜利油杂3号适合晚稻-绿肥-早稻的耕作制度, 有在广西自治区推广应用的潜力, 因此, 有必要开发适合鉴定甘蓝型油菜利油杂3号种子纯度的分子标记, 为绿肥种子纯度测定提供技术保障。

本试验以利油杂 3 号及其父母本为材料, 利用 SSR 分子标记技术鉴定甘蓝型油菜利油杂 3 号种子纯度, 筛选出稳定性高、特异性强的 SSR 引物, 以建立稳定、可靠的利油杂 3 号纯度鉴定体系, 为后续大田推广应用奠定基础。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

利油杂 3 号及其亲本种子均由湖北利众种业科技有限公司提供。其母本 T21 为细胞质雄性不育系, 父本 P12-7 为恢复系。筛选出的两对共显性分子标记引物均为课题组前人设计合成, 序列分别为: BN12A (F: GCCGTTCTAGGGTTTGTGGGA R: GAGGAAGTGAGAGCGGGAAATCA); CB10099 (F: CTTCCCCTTTCATCGAACT R: TAGAAGCATTTGGAAACGCA)。

2.2. DNA 提取及浓度检测

取 F1、父本及母本种子, 均匀放入发芽盒置于种子发芽箱中萌发, 早晚各浇水一次保湿, 发芽 7 天后取单株幼芽上半部分放入研钵中, 加入 0.8 ml CTAB 裂解液(100 mmol/L Tris HCl, pH = 8.0; 50 mmol/L EDTA, pH = 8.0; 500 mmol/L NaCl), 磨成匀浆后转入 2.0 ml 离心管; 65℃水浴 30 min; 冷却后加入等体积氯仿:异戊醇(24:1), 4℃、10,000 r/min 离心 10 min, 收集上清液约 800 μl; 加入等体积的 24:1, 10,000 r/min 离心 10 min, 收集上清液 500 ul, 加入 2 倍体积预冷的无水乙醇, -20℃沉淀 DNA 1 h 以上; 10,000 r/min 离心 10 min, 弃上清液后加入 75%乙醇漂洗两次; 倒扣干燥后加入 50 ul ddH₂O 溶解; 4℃保存。

用超微量紫外分光光度计(Thermo NANODROP 2000, USA)测定样品 DNA 浓度并观察 260 nm 和 280 nm 波长吸光度比值, 稀释至 25 ng/ul 保存于-20℃备用。

2.3. SSR 反应体系

反应液总体积为 10 ul, Green Taq Mix 包括 Taq DNA Polymerase、dNTPs, PCR 反应体系: Green Taq Mix 5 ul, 左右引物(5 μm)各 0.25 ul, 50 ng DNA 模板, 加 ddH₂O 至 10 ul。Green Taq Mix 购自南京诺唯赞生物科技有限公司(Vazyme Biotech Co., Ltd.), 引物由华大基因(深圳)合成。

2.4. SSR 反应程序

SSR 反应程序为: 94℃预变性 5 min; 94℃变性 45 s, 51℃/59℃退火 45 s, 72℃延伸 1 min, 32 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。

2.5. 7%非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

在每管扩增产物中加入 2 ul 6 × loading Buffer, 在 1 × TBE 电泳缓冲液进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(600 V, 200 mA, 100 W 30 min/①600 V, 200 mA, 100 W 10min; ②130 V, 80 mA, 50 W 60 min)。银染显色读取条带, 拍照保存。

2.6. 引物筛选

随机选取母本、父本 20 株单株 DNA 等量混合, 构建父、母本 DNA 样品混合基因池, 按照上述 PCR 反应程序及扩增产物检测方法进行亲本差异引物筛选。再用筛选出来的引物进一步在少量杂交种群体中进行验证, 在亲本间表现出差异条带且在杂交种中表现为共显性的引物即可用于利油杂 3 号纯度鉴定。

2.7. 杂交种纯度鉴定

利用筛选获得的在杂交种及双亲间表现稳定, 且杂交种带型表现为亲本互补带型的引物 BN12A、CB10099, 鉴定分析杂交种材料的纯度。根据扩增带型, 与母本条带相同的记为母本带型, 与父本条带相同的记为父本带型, 综合父、母本条带的记为杂交种带型。

杂交种纯度 = (样本总数 - 母本带型样本数 - 父本带型样本数) / 检测样本总数 × 100%。

于初花期至盛花期调查大田植株育性与株型, 进行鉴定、记录分析, 计算大田杂交种纯度。

大田调查杂交种纯度 = (调查样本总数 - 不育株数) / 调查样本总数 × 100%。

3. 结果与分析

3.1. SSR 引物筛选

利用 43 对筛选自前人实验结果中表现较好的 SSR 引物在亲本中进行扩增, 所有引物均能扩增出条带, 仅有 BN12A、CB10099 在亲本间扩增出的带型具有明显差异, 进一步利用 F1 植株进行验证发现 BN12A、CB10099 在 F1 中出现双亲特异互补带型(图 1), 这 2 对引物可用于利油杂 3 号纯度鉴定。

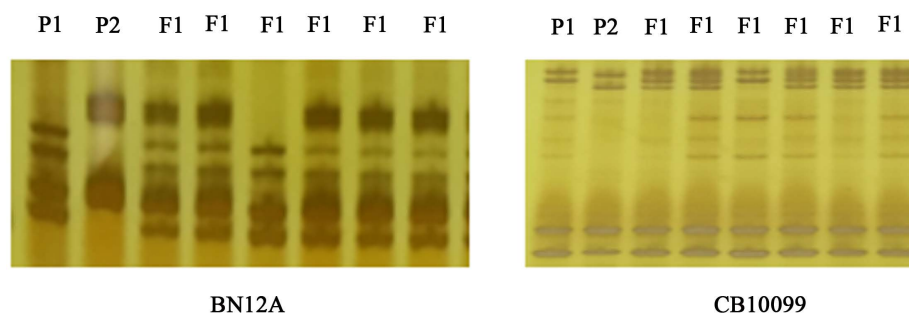


Figure 1. Amplification results of Liyouza No. 3 hybrids and their parents with two SSR primers. P1: Sterile line T21; P2: Restorer line P12-7; F1: Liyouza No. 3 hybrids

图 1. SSR 引物在利油杂 3 号及其亲本中的扩增图谱。P1: 母本 T21; P2: 父本 P12-7; F1: 利油杂 3 号不同单株

3.2. 杂交种纯度 SSR 分子标记鉴定

利用引物 BN12A 与 CB10099 分别对 137 株利油杂 3 号杂种群体进行 PCR 扩增(图 2)。结果表明, BN12A 在 137 株杂交种样本出现父母本特异互补的杂交种带型共 117 株, 父本带型 4 株, 母本带型 16 株, 杂交种纯度为 85.40%; CB10099 则出现父母本特异互补的杂交种带型共 121 株, 父本带型 2 株, 母本带型 14 株, 杂交种纯度为 88.32% (表 1)。

Table 1. Purity of hybrid Liyouza No. 3 identified by SSR markers

表 1. 利油杂 3 号杂种纯度的 SSR 分子标记结果

引物	不育系株数	恢复系株数	总株数	不育系比率%	恢复系比率%	杂交种纯度%
BN12A	16	4	137	11.68	2.92	85.40
CB10099	14	2	137	10.22	1.46	88.32
(BN12A + CB10099)*	11	1	137	8.03	0.73	91.24

*: 综合两对引物的跑胶结果, 同一个油菜单株下, 如果两对引物所呈现的带型一致为 P1 或者 P2, 则统一记录为 P1 或者 P2; 如果其中一对引物呈现出 F1 带型, 另一对是 P1 或者 P2 带型, 则统一记录为 F1。

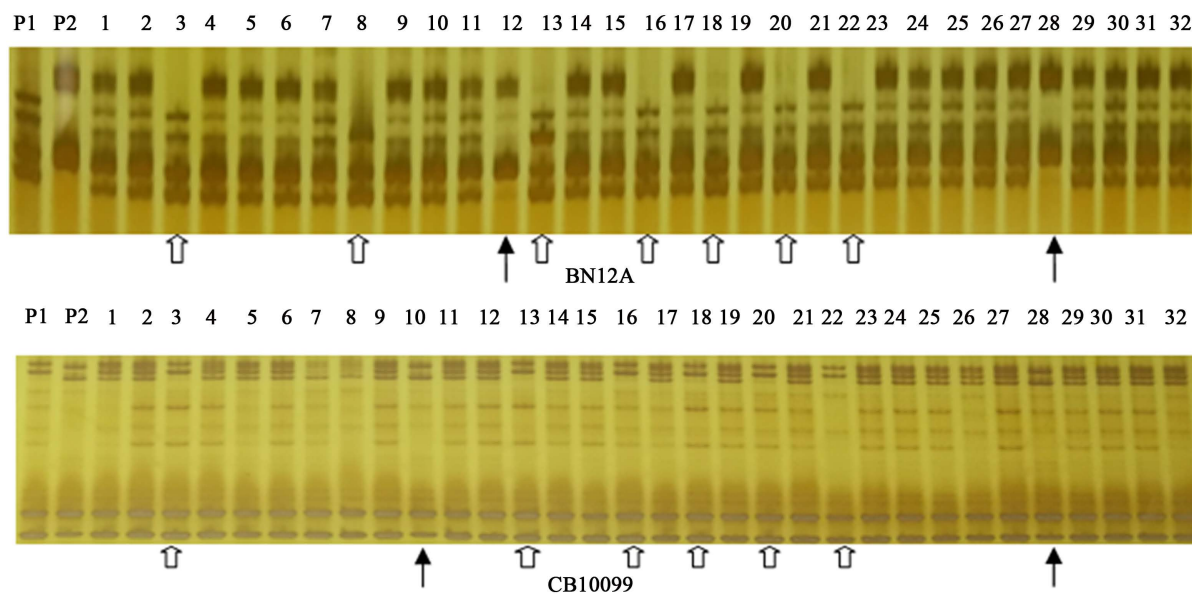


Figure 2. PCR results of partial Liyouza No. 3 amplified by two SSR primers. P1: Sterile line T21, P2: Restorer line P12-7, F1: hybrid Liyouza No. 3, \uparrow : Band of Sterile line; \uparrow : Band of Restorer line; Unlabeled: hybrids

图 2. 部分 F1 植株利用引物 BN12A 与 CB10099 进行 PCR 扩增的效果。P1: 母本 T21; P2: 父本 P12-7; 1-32: 利油杂 3 号杂种群体; \uparrow : 母本带型株; \uparrow : 父本带型株; 未标注: 杂交种

在 137 个单株中, 两对引物鉴定出的杂株, 部分结果一致, 如图 2 中 3、13、16、18、20、22 共 6 个单株带型均为母本带型, 而 12 和 28 号单株为父本带型; 另外一共有 12 个单株在两对引物中呈现出不同的结果: 106、107 号单株在引物 CB10099 中的带型同 F1, 在 BN12A 中同 P2; 8、10、38、43、72、86、94、111、112、113 号单株在引物 CB10099 中的带型分别是 F1、P2、F1、F1、P1、P1、F1、P1、F1、F1, 在 BN12A 中的带型分别是: P1、F1、P1、P1、F1、F1、P1、F1、P2、P1 (图 2、图 3)。

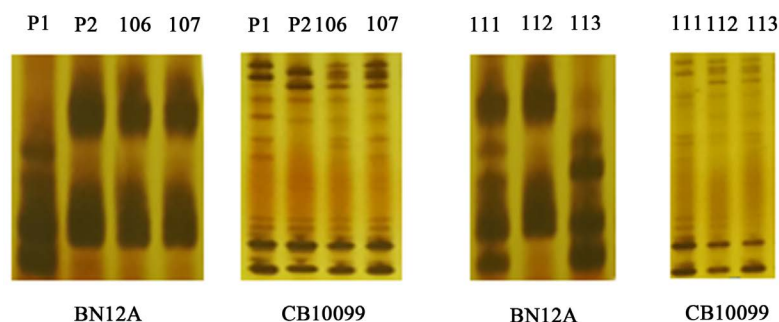


Figure 3. Partial plants identification results of Liyouza No. 3 detected by two s SSR primers. P1: Sterile line T21; P2: Restorer line P12-7; 106-107, 111-113: Five plants of Liyouza No. 3

图 3. 两对 SSR 引物鉴定出的利油杂 3 号部分单株结果。P1: 母本 T21; P2: 父本 P12-7; 106-107、111-113: 5 个利油杂 3 号单株

比较 2 对 SSR 引物纯度鉴定结果, 两者均存在单一引物鉴定为母本或父本, 而另一引物鉴定为杂交种的现象。将在同一个油菜单株两对引物所呈现的带型一致为母本带或父本带, 则统一标记为 P1 或者 P2, 如图 2 中 3、13、16、18、20、22、28 号单株等; 如其中一对引物呈现出 F1 带型, 另一对是母本带或父本带, 统一记为 F1, 如图 3 中 106-107 和 111-113。综合比较 2 对引物鉴定结果, 合计杂交种带型 125 株, 父本带型 1 株, 母本带型 11 株, 杂交种纯度为 91.24%。

3.3. SSR 标记室内鉴定结果与大田鉴定结果比较

本研究中 BN12A 和 CB10099 等 2 对引物对利油杂 3 号纯度鉴定结果相对大田鉴定 93% 的纯度分别低了 7.6% 和 4.68%，两引物结合的杂种纯度则低 1.76%。如再加上父本带型单株，三者相对大田鉴定的纯度分别低了 4.68%，3.22% 和 1.03%。说明不同引物鉴定的标记位点在亲本群体中的纯合度对杂种纯度鉴定结果存在不同的影响。所有分子标记鉴定结果均表明该批次甘蓝型油菜利油杂 3 号杂种纯度符合商品种质量标准。同时，鉴定结果中的母本带型比率均大于父本带型比率，说明影响该批次利油杂 3 号大田制种纯度的主要影响因素是母本微粉自交，后续可进一步控制母本微粉提高种子纯度。

4. 讨论

4.1. 影响利油杂 3 号杂交种纯度的原因

从鉴定结果可以看到，不管是 2 对 SSR 分子标记鉴定结果还是田间调查结果均发现不育株占较大比例，分别是 11.68%、10.22% 和 7%，同时 2 对引物的不育系比率均比恢复系比率高出 8.76%，说明不育系微粉自交结实和少许父本杂种混入是导致该批次种子纯度降低的主要原因，这与前人[16]所得结论一致。后续大田制种时可调整母本播期，促使不育系在高温时段开花，降低其微粉自交结实，若发现其雄蕊带有花粉应及时人工去雄或者化学杀雄[10]，确保母本高度不育，如母本比父本花期早，可及时打顶。此外，可酌情增加父本比例，提高父本花粉比例。收种时注意与父本隔离，避免混入恢复系种子，影响种子纯度。

4.2. 引物鉴定结果与引物的选择

本次研究发现 2 对引物纯度鉴定结果(85.40%、88.32%)均低于田间纯度鉴定结果(93%)，与卢虹等[10]、王同华等[17]研究结果相符。根据扩增图谱发现，利油杂 3 号纯度鉴定的假杂种主要来自母本自交种子和少许父本种子混杂；而大田鉴定从育性与形态上较难区分父本与杂交种，主要通过统计不育株数计算大田纯度结果，因此田间鉴定的假杂种主要是母本自交结实，没有父本种子混杂，此外鉴定人的经验水平也会影响大田纯度调查结果，因此大田纯度调查结果高于分子标记室内鉴定结果。这说明利用 SSR 分子标记鉴定的纯度结果比田间表型鉴定结果更加真实可靠。

由于亲本繁殖过程中也可能存在机械混杂、田间滋生苗等各种因素影响亲本的纯度，或亲本群体个别单株某些位点尚未完全纯合，从而使得最终大田制种的杂交种群体在某些分子标记位点表现为杂合，而这种杂合的程度与亲本及亲本混杂株间的遗传差异有关，通常不同引物揭示的标记位点间的杂合度是不一致的，这就导致本研究中两条单引物纯度鉴定结果不一致，且均明显低于大田纯度调查结果。实际研究过程中可通过多引物联合鉴定矫正。如本研究中综合二对 SSR 引物的带型结果，杂交种纯度矫正为 91.24%，父本带型株与杂交种带型株总计 91.97%，与大田调查结果 93% 基本一致，可以预见，如果再增加 1~2 对甚至更多的 SSR 引物进行鉴定，在不存在父本混杂的情况下可将结果矫正至大田鉴定的水平。总之，只用一对引物来检测种子纯度会存在很大误差，因为单位点单引物检测不育系数与恢复系数会偏高，最后会误判种子的真实纯度。为了能够更科学、严谨地检测种子纯度，避免出现因为不同引物的检测位点不一致以及其他花粉或者自然因素干扰，导致在一对引物上检测为真杂种，在其他引物中则是假杂种的情况，至少需要两对 SSR 位点来共同检测[18]，综合判断种子纯度。

5. 结论

本试验利用 2 对条带清晰且均为共显性的 SSR 引物(BN12A、CB10099)对利油杂 3 号进行种子纯度鉴定。BN12A 在 137 株杂交种样本出现父母本特异互补的杂交种带型共 117 株，父本带型 4 株，母本带

型 16 株, 杂交种纯度为 85.40%; CB10099 则出现父母本特异互补的杂交种带型共 121 株, 父本带型 2 株, 母本带型 14 株, 杂交种纯度为 88.32%。比较 2 对引物纯度鉴定结果, 两者均存在单一引物鉴定为母本或父本, 而另一引物鉴定为杂交种的现象。综合二者的带型结果杂交种带型共 125 株, 父本带型 1 株, 母本带型 11 株, 杂交种纯度为 91.24%。父本带型株与杂交种带型株总计比例为 91.97%, 与大田调查结果 93% 基本一致。说明该批次甘蓝型油菜利油杂 3 号杂种纯度符合商品种质量标准。同时, 利用分子标记进行室内杂种纯度鉴定时, 需要综合两对及以上 SSR 标记扩增的结果对杂交种纯度进行综合评价。

基金项目

广西水稻冬闲田利用开发研究(桂科协[2016]Z-36)。

参考文献

- [1] 刘志文, 单连民, 韩旭, 等. 现代生物技术在油菜遗传改良上的应用和进展[J]. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 900-906.
- [2] 刘后利. 油菜遗传育种学[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 1-319.
- [3] 赵庆华. 双低油菜新品种与栽培技术[M]. 北京: 金盾出版社, 2003: 1-246.
- [4] 宗凯, 李云飞, 盛旋, 等. 利用多对 SSR 标记引物鉴定两系杂交水稻“C 两优 513”和“深两优 5814”的种子纯度[J]. 植物免疫, 2018, 32(4): 57-59.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 孟倩, 董军刚, 胡永敏, 等. 甘蓝型油菜“甘杂 1 号”种子纯度 SSR 鉴定[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2013, 41(1): 55-59.
- [10] 卢虹, 徐爱霞. SSR 分子标记技术在甘蓝型油菜杂交种陕油 16 纯度鉴定中的应用[J]. 种子, 2016, 35(6): 123-126.
- [11] 卢媛, 韩晴, 卢义发, 等. 糯玉米品种“沪玉糯 3 号”种子真实性与纯度鉴定的 SSR 核心引物筛选[J]. 上海农业学报, 2018, 34(3): 45-49.
- [12] 李阳, 范梦伟, 季晓坤, 等. 利用 SSR 技术鉴定玉米杂交种“家佳荣 2 号”的种子纯度[J]. 西南农业学报, 2018, 31(7): 1349-1354.
- [13] 尹祥佳, 焦珍珠, 赵慧军, 等. 利用 SSR 荧光标记鉴定玉米杂交种纯度的研究[J]. 中国种业, 2018(9): 56-63.
- [14] 刘子记, 牛玉, 杨衍. 热研一号油绿苦瓜种子纯度的 SSR 鉴定[J]. 热带作物学报, 2013, 34(11): 2179-2182.
- [15] 沈进娟, 刘雪姣, 冉广葵, 等. 茎瘤芥(榨菜)杂交种涪杂 2 号种子纯度 SSR 鉴定[J]. 南方农业学报, 2016, 47(7): 1064-1070.
- [16] 孟倩, 董军刚, 葛娟, 等. 甘蓝型油菜“西农 18”种子纯度的 SSR 鉴定[J]. 中国农学通报, 2013, 29(3): 153-156.
- [17] 王同华, 陈卫红, 李莓, 等. 基于 SSR 标记技术的油菜杂交品种沔油 958 的种子纯度鉴定[J]. 现代农业科技, 2014(18): 25-26.
- [18] 梅德圣, 胡琼, 李英德, 等. 杂交油菜品种大地 55 的遗传基础分析及种子纯度分子鉴定[J]. 分子植物育种, 2014, 12(2): 246-253.

知网检索的两种方式：

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择：[ISSN]，输入期刊 ISSN：2168-5665，即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入，输入文章标题，即可查询

投稿请点击：<http://www.hanspub.org/Submission.aspx>

期刊邮箱：br@hanspub.org