








研究报告

Research Report

利用 SSR 快速鉴别花生杂交 F1 真伪

洪彦彬 , 李少雄 , 李杏瑜 , 朱方何 , 梁炫强 

广东省农科院作物研究所, 国家油料作物改良中心南方花生分中心, 广州, 510640

 通讯作者, liang804@yahoo.com  作者

豆科基因组学与遗传学, 2012 年, 第 3 卷, 第 6 篇 doi: 10.5376/lgg.cn.2012.03.0006

收稿日期: 2012 年 01 月 04 日 接受日期: 2012 年 01 月 04 日 发表日期: 2012 年 01 月 04 日

© 2012 BioPublisher 生命科学中文期刊出版平台






本文首次发表在《分子植物育种》2012 年, 第 10 卷, 第 1 期, 第 110-114 页上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/) 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

摘要 本研究, 我们以 6 个花生品种为亲本配置杂交组合, 田间调查发现亲本间形态表型差异大的杂交 F1 容易鉴别真伪, 而形态表型差异小的则难于鉴别, 甚至无法鉴别。为此, 我们通过改良 Thomson 一步法制备 DNA 模板, 建立了一套花生 SSR-PCR 快速检测体系, 并在此基础上利用 SSR 鉴别花生杂交 F1 真伪。结果表明, 采用 Thomson 一步法和改良后的一步法提取的 DNA 模板均能扩展出清晰条带, 但改良后制备的 DNA 模板在 4℃ 下可保存约 1 个月, 未改良的仅能保存一天。利用 SSR 检测上述群体表明, F1 真杂种率为 38%~56%, 不同亲本间杂交成功率存在差异, 同一亲本正反交成功率也存在一定差异。可见, SSR 标记用于杂种真伪鉴定具有一定的应用潜力。



关键词 花生(*Arachis Hypogaea* L.); SSR; 杂交种; 真伪鉴定

Rapidly Identifying Hybrids of Peanut (*Arachis Hypogaea* L.) Using SSR

Molecular Markers

Hong Yanbin , Li Shaoxiong , Li Xingyu , Zhu Fanghe , Liang Xuanqiang 

Crops Research Institute, Guangdong Academy of Agricultural Sciences; South China Peanut Sub-Center, National Center of Oilseeds Crop Improvement, Guangzhou, 510640

 Corresponding author, liang804@yahoo.com;  Authors

Abstract 48 soybean (36 large grain varieties and 12 small grain varieties) varieties are collected from many areas of China, including different ecological types. 7 pairs of location-known molecular markers are used for systematically practical confirmation and value evaluation. Amplified by PCR, ran electrophoresis with a 9% acryla-mide gel, counted each SSR loci and finally analysed variance with SPSS software. The results are as follows: 3 practical molecular markers (GNE070, Satt126, Satt633) were selected in the large/small grain group. In short, 35 materials can be detected by one or more markers (the number of large-seed material is 36), and the coincident rate is as high as 97.2%. The experimental results show that the joint use of GNE070, Satt126 and Satt633 is feasible in molecular marker-assisted breeding (large-grain breeding) practice.

Keywords Soybean; 100-seed weight; Molecular marker; Practicability

花生(*Arachis hypogaea*L.)属严格的自花授粉作物, 通过人工操作可进行杂交制种, 但成功率不高, 容易产生假杂种。长期以来, 对花生杂种的真伪鉴别主要依靠田间表型观察。由于花生品种间遗传基础狭窄, 形态表型差异较小且不易区分, 通过形态表型鉴别杂种真伪难度较大, 育种家常因田间鉴定不正确导致育种工作无功而返。许多遗传群体的创建, 如回交群体、代换系群体和近等基因系群体,

往往要求在苗期完成杂种真伪鉴定, 而在苗期株系间、或回交后代间的形态表型差异则更小, 用肉眼几乎是无法辨别其杂交后代之真伪。显然, 发展一种高效的花生杂种真伪鉴别方法是十分必要的。

DNA 分子标记, 如 RFLP、RADP 和 AFLP 等, 是杂交种真伪和品种纯度鉴定有效的手段之一, 在水稻、棉花、油菜等作物上已有广泛应用(郭向阳等, 2011; 李景环和云锦凤, 2009; 刘平武等, 2005; 马

秀芳等, 2006)。但对花生栽培种而言, 由于其较低的 DNA 多态性导致分子标记在花生上的应用受到限制。近年来, 许多研究表明 SSR(simple sequence repeats)在花生栽培种中具有较高的遗传多态性, 因此, 利用 SSR 分子标记开展花生杂交种鉴定成为可能, 已有研究也报道了 SSR 可有效鉴别花生杂种真伪(陈静等, 2009; 李双铃等, 2009; 张平湖和刘冠明, 2009)。

要快捷准确地进行杂种真伪鉴别, 除了需要选择合适的 DNA 标记外, 还必须建立一套快速的实验检测体系。以往的检测体系通常包含 DNA 提取和 PCR 分析两个环节, 显得费时费力。如果能够简化及整合 DNA 提取过程, 直接制备 DNA 模板进行 PCR 分析, 鉴定过程将明显变得快捷。

本研究试图发展一套针对花生这类多糖多酚植物, 无需进行 DNA 单独提取的 SSR-PCR 快速检测流程, 用于鉴别花生杂交 F1 的真伪, 在此基础上系统研究在人工规范操作下花生品种间杂交的成功率。

1 结果与分析

1.1 三种方法制备的 DNA 模板的 SSR-PCR 扩增比较

本研究用常规方法、Thomson 一步法以及改良 Thomson 一步法制备 DNA 模板, 并进行 SSR-PCR 分析, 结果表明, 三种方法均能扩增出清晰的 PCR 产物。与常规方法制备的 DNA 模板相比, 后两者制备 DNA 模板扩增的产物条带较暗淡, 但其亮度已能满足实验要求(图 1)。采用 Thomson 方法也能扩增出产物, 且条带亮度与改良方法相似, 但由于缺乏抗氧化剂, 该法制备的 PCR 模板只能在常温下保存数小时, 在 4℃ 下保存 1d, 随后严重褐化, 最终无法扩增出产物。而改良方法制备的模板在 4℃ 下最长可保存 1 个月(数据未列出)。

1.2 杂交 F1 种子田间真伪鉴定

粤油 101 和崖县小粒的形态表型差异明显, 其正反交 F1 形态表型一致, 且均与亲本存在较大差异

图 1 三种方法制备的 DNA 模板的 PCR 扩增比较
注: 1~3: 常规方法提取制备的 DNA 模板; 4~6: 改良 Thomson 一步法制备的 PCR 模板; 7~9: Thomson 一步法制备的 PCR 模板; 扩增引物为 pPGSseq10H1A

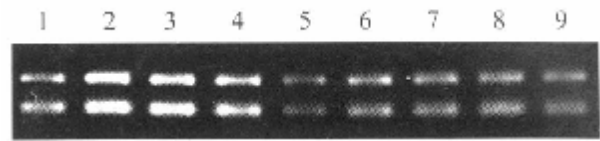


Figure 1 Comparison of PCR-amplification with different DNA templates prepared by three protocols

Note: 1~3: DNA templates prepared by conventional method; 4~6: DNA templates by modified Thomson's one-step protocol; 7~9: DNA templates by Thomson's one-step protocol; The primer is pPGSseq10H1A

异, 肉眼容易辨别真伪。经田间鉴定, 在 F1(粤油 101×崖县小粒)中发现伪杂种 53 株, 而在 F1(崖县小粒×粤油 101)中发现伪杂种 62 株。粤油 223 与汕油 71 的正反交 F1 形态表型与粤油 223 较接近, 根据形态表型无法完全鉴别杂种真伪。通过仔细观察, 最终分别从 F1(粤油 223×汕油 71)和 F1(汕油 71×粤油 223)中鉴别出伪杂种 25 和 42 株。由于粤油 13 和粤油 20 的形态表型高度相似, 且其正反交后代也均与亲本高度相似, 根据形态表型根本无法辨别杂种真伪, 本研究最终放弃其杂交 F1 真伪的田间鉴定。

1.3 SSR-PCR 鉴定真假杂种

利用 40 对 SSR 引物检测杂交亲本多态性, 结果发现, 共有 5 对引物(pPGSseq17E3, pPGSseq19E9, pPGPseq4G2, pPGPseq7G2 和 pPGPseq3A1)在粤油 101 和崖县小粒间检测出多态性, 在粤油 223 和汕油 71 间检测出多态性的引物有 3 对(pPGSseq17E3, pPGPseq2G42 和 pPGPseq8H1), 而在粤油 13 和粤油 20 间检测出多态性的引物仅 1 对(pPGSseq18C5)。利用 pPGSseq17E3 检测 F1(粤油 223×汕油 71, 汕油 71×粤油 223, 粤油 13×粤油 20, 粤油 20×粤油 13)群体单株, 根据带型鉴别杂种真伪, 同时出现父母本带型的为真杂种, 只出现母本带型的为伪杂种(图 2)。结果表明, 粤油 101 与崖县小粒的正交 F1 有 47 株真杂种, 反交 F1 真杂种比正交少, 仅 38 株。粤油 223 与汕油 71 正反交组合 F1 真杂种率较接近, 分别为 56%和 54%。粤油 13 与粤油 20 的正反交结果也较相似, 真杂种率分别为 53%和 54%。比较田间和 SSR-PCR 鉴定结果发现, 田间观察能够准确鉴别 F1(粤油 101×崖县小粒,

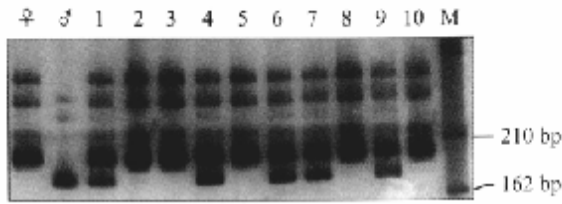


图2 引物 pPGSseq17E3 在亲本粤油 101 和崖县小粒及其 F₁ 的扩增结果

注: ♀: 粤油 101; ♂: 崖县小粒; 1-10: F₁ 单株; M: Marker; 1,4,6,7,9: 同时出现父母本杂合带型为真杂种; 2,3,5,8,10: 带型与母本一致, 为假杂种

Figure 2 The amplified result of Yueyou 101, Yaxianxiaoli and their F₁ by primer pPGSseq17E3

Note: ♀: Female parent Yueyou 101; ♂: Male parent Yaxianxiaoli; 1-10: F₁; M: Marker; 1,4,6,7,9: True hybrids based on heterozygote banding pattern; 2,3,5,8,10: False hybrids

崖县小粒×粤油 101)真伪, 但 F₁(粤油 223×汕油 71) 和 F₁(汕油 71×粤油 223) 分别有 19 和 4 株被误判为真杂种。

1.4 不同组合杂交成功率的差异

SSR-PCR 检测结果表明, 不同组合间杂交成功率存在一定差异(表 1)。例如, 组合(粤油 223+汕油 71)的平均杂交成功率与组合(粤油 13+粤油 20)相似, 分别为 55%和 53.5%, 而组合(粤油 101+崖县小粒)的平均成功率仅 42.5%, 小于其他两个组合。另外, 同一组合正反交成功率也不完全一致。如崖县小粒×粤油 101 的成功率仅 38%, 小于粤油 101×崖县小粒(47%)。

2 讨论

尽管田间形态表型观察仍是花生杂种真伪鉴别的主要方法, 然而该方法存在不准确的缺点。本研究表明, 针对形态表型差异明显的亲本, 田间观察能准确鉴别其杂交 F₁ 真伪, 但对于形态表型较相似的亲本则不然。由于 SSR-PCR 是从 DNA 水平上鉴定杂种真伪, 具有高度可靠性。因此在作物杂交后代真伪和种子纯度鉴定中有广泛应用。本研究采用的“一步法”极大地简化 DNA 模板制备流程, 从根本上实现 SSR-PCR 的快速检测, 使分子标记鉴定杂种真伪在实际操作中具有可行性。

本研究中 F₁ 群体真杂种率较低(37%~56%), 与品种的开花特性存在一定关系。尽管理论上花生人

工杂交成功率可达 100%, 但实际操作中常由于花器结构小, 母本去雄不彻底, 导致自交形成伪杂种(陈静等, 2009)。本研究中粤油 101 与崖县小粒的反交成功率低于正交, 可能与崖县小粒花器小, 去雄难度大有关。此外, 不同组合间杂交成功率存在一定的差异, 其中 F₁(粤油 101×崖县小粒)的杂交成功率均低于其他四个组合, 这可能与两个品种的其他特性有关, 例如花期。崖县小粒的开花时间通常比粤油 101 迟一周以上。另外, 根据多年的杂交经验, 影响杂交成功率还包括杂交技术、天气条件。熟练的杂交技术是成功的关键、阴雨天气则会影响授粉的成功率。

3 材料与方法

3.1 材料

以 6 个花生品种(粤油 101, 崖县小粒, 粤油 223, 汕油 71, 粤油 20 和粤油 13)为亲本(品种由广东农科院作物所种子资源库提供), 于 2010 年春季通过人工杂交获得 6 个正反交组合的 F₁ 杂种, 其中 F₁(粤油 101×崖县小粒)种子 134 粒, F₁(崖县小粒×粤油 101)种子 126 粒; F₁(粤油 223×汕油 71)种子 150 粒, F₁(汕油 71×粤油 223)种子 127 粒; F₁(粤油 13×粤油 20)种子 165 粒, F₁(粤油 20×粤油 13)种子 138 粒。

3.2 供试材料的田间种植与表型鉴定

2011 年 3 月 1 日进行田间播种, 杂交亲本和 F₁ 植株按 5 行区种植, 行距 25 cm, 株距 20 cm。播种时亩施钙镁磷肥 25 kg, 45% 复合肥 15 kg, 喷施 48% 毒死蜱 100 g 水溶液 30 kg, 覆土、喷施乙草胺除草剂。4 月 4 日追施 45% 复合肥 25 kg, 4 月 29 日喷施 0.2% 磷酸二氢钾亩追施 45% 复合肥 15 kg。由于花生整个生育阶段气候干旱, 灌水 3 次。分别用 10% 吡虫啉、48% 毒死蜱、阿维菌素 100 克配成 500 倍液喷施, 防治蓟马、蛴螬、斜纹夜蛾, 防治虫害 4 次。随机选取 F₁ 单株进行编号挂牌, 每个组合选取 100 株。在成熟期观察 F₁ 单株形态表型进行真假杂种判断。

3.3 DNA 模板制备

本研究采用三种方法制备 DNA 模板并进行比较。(1)常规方法, 参照克拉克 M.S.等(1998)的方法;

表1 花生 F₁ 真假杂种的田间和 SSR 鉴定结果

Table 1 The identifying results of the authenticity among peanut hybrid F₁

F ₁ 组合名称 F ₁ combination	杂种数量 Number of hybrids	真杂种数量 Number of true hybrids	
		田间观察 Field investigation	SSR 鉴定 SSR identification
粤油 101×崖县小粒 Yueyou 101×Yaxianxiaoli	100	47	47
崖县小粒×粤油 101 Yaxianxiaoli×Yueyou 101	100	38	38
粤油 223×汕油 71 Yueyou 223×Shanyou71	100	75	56
汕油 71×粤油 223 Shanyou71×Yueyou 223	100	58	54
粤油 13×粤油 20 Yueyou 13×Yueyou 20	100	无法判断 Indeterminable	53
粤油 20×粤油 13 Yueyou 20×Yueyou 13	100	无法判断 Indeterminable	54

(2)Thomson 和 Henry(1995)的“一步法”。(3)改良 Thomson 的方法。针对花生叶片的多糖多酚特性, 引用 Thomson 和 Henry (1995)的方法中的植物裂解液 BufferA 配方, 增加 β-巯基乙醇, 使得配方变为: 100 mmol/L Tris-HCl, pH8.0; 1 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA, 0.1% β-巯基乙醇。剪取 3 mm² 花生嫩叶, 置入 1.5 mL 离心管, 加入 100 μL 改良后的 BufferA, 充分震荡, 95℃水浴 10 min, 再次充分震荡, 取 1 μL 上清作为 DNA 模板用于 SSR-PCR 扩增。

3.4 SSR 检测

采用 40 对花生栽培种基因组 SSR 引物筛选亲本 DNA 多态性, 引物序列来自 Ferguson 等(2004)。PCR 扩增缓冲液为 2×Power Taq PCR Master Mix (Bioteke, 北京, 中国)。PCR 程序: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环; 72℃ 7 min。扩增产物采用 6.0% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(电泳槽型号: DYCZ-30 (六一牌, 北京, 中国), 电泳缓冲液 1×TBE, 电压 150 V, 时间 1 h), 0.1% AgNO₃ 染色, BIORAD 凝胶成像系统观察(洪彦彬等, 2009)。

作者贡献

洪彦彬、李少雄、李杏瑜和朱方何是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 洪彦彬、李少雄完

成数据分析, 论文初稿的写作; 李杏瑜和朱方何参与实验设计, 试验结果分析; 梁炫强是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(30900907, 30971819)、广东省自然科学基金项目(9151007010000001)和粤港关键领域重点突破项目(2008A0242000-09)共同资助。

参考文献

- Chen J., Hu X.H., Shi Y.Q., Miao R.H., and Yu S.L., 2009, Identification of peanut hybrids (*Arachis hypogaea* L.) using SSR markers, *Henongxue Bao (Acta Agriculturae Nucleatae Sinica)*, 23(4): 617-620 (陈静, 胡晓辉, 石运庆, 苗华荣, 禹山林, 2009, 花生品种间杂种 F₁ 代的 SSR 标记分析, *核农学报*, 23(4): 617-620)
- Clark M.S., ed., Gu H.Y., and Zhai L.X., trans., 1998, *Plant molecular biology-A laboratory manual*, Higher Education Press, Beijing, China, pp.4-12 (克拉克 M.S., 主编, 顾红雅, 翟礼喜, 主译, 1998, *植物分子生物学实验手册*, 高等教育出版社, 中国, 北京, pp.4-12)
- Ferguson M.E., Burow M.D., Schulze S.R., Bramel P.J., Paterson A.H., Kresovich S., and Mitchell S., 2004,

- Microsatellite identification and characterization in peanut (*A. hypogaea* L.), *Theor. Appl. Genet.*, 108(6): 1064-1070
- Guo X.Y., Chen Z.H., Zhu Y.F., Wang A.G., Wu C., and Li J., 2011, Study on identification the purity of maize Qiandan No.16 by SSR marker, *Zhongzi (Seed)*, 30(4): 42-44 (郭向阳, 陈泽辉, 祝云芳, 王安贵, 邬成, 李娟, 2011, 利用 SSR 标记鉴定玉米杂交种黔单 16 号纯度的研究, *种子*, 30(4): 42-44)
- Hong Y.B., Liang X.Q., Chen X.P., Liu H.Y., Zhou G.Y., Li S.X., and Wen S.J., 2009, Construction of genetic linkage map in peanut (*Arachis hypogaea* L.) cultivars, *Zuowu Xuebao (Acta Aaronomic Sinice)*, 35(3): 395-402 (洪彦彬, 梁炫强, 陈小平, 刘海燕, 周桂元, 李少雄, 温世杰, 2009, 花生栽培种 SSR 遗传图谱的构建, *作物学报*, 35(3): 395-402)
- Li J.H., and Yun J.F., 2009, Study on purity of hybrid F1 of *Elymus canadensis* and *Elymus sibiricus* by RAPD, *Zhongzi (Seed)*, 28(11): 65-70 (李景环, 云锦凤, 2009, RAPD 标记法鉴定加拿大披碱草×老芒麦杂种 F1 纯度的研究, *种子*, 28(11): 65-70)
- Li S.L., Wang H., Ren Y., Shi Y.M., He G.H., Yu S.L., and Yuan M., 2009, Identification of peanut hybrids using SSR marker with fluorescence labeled M13-tailed primer, *Huasheng Xuebao (Journal of Peanut Science)*, 38(4): 35-38 (李双铃, 王辉, 任艳, 石延茂, 何国浩, 禹山林, 袁美, 2009, 利用荧光标记 SSR 技术鉴定花生 F1 代杂交种, *花生学报*, 38 (4): 35-38)
- Liu P.W., Zhou G.L., Yang G.S., and Fu T.D., 2005, Fingerprints construction of hybrid parents in *Brassica napus* and its utilization in hybrid purity test, *Zuowu Xuebao (Acta Aaronomic Sinice)*, 31(5): 640-646 (刘平武, 周国岭, 杨光圣, 傅廷栋, 2005, 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, *作物学报*, 31(5): 640-646)
- Ma X.F., Hua Z.T., Sui G.M., Hao X.B., Lv G.L., and Wang Z., 2006, Studies on identification of seed purity of japonica hybrid rice in north China using microsatellite markers, *Zajiao Shuidao (Hybrid Rice)*, 21(5): 56-58 (马秀芳, 华泽田, 隋国民, 郝宪彬, 吕桂兰, 王铮, 2006, 利用微卫星标记鉴定北方杂交粳稻种子纯度的研究, *杂交水稻*, 21(5): 56-58)
- Thomson D., and Henry R., 1995, Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR, *Biotechniques*, 19 (3): 394-397, 400
- Zhang P.H., and Liu G.M., 2009, Construction of identification technology program for peanut hybrid with SSR markers, *Guangdong Nongye Kexue (Guangdong Agricultural Sciences)*, (10): 49-51 (张平湖, 刘冠明, 2009, 花生杂交 F1 代真假杂种 SSR 标记鉴定体系的建立, *广东农业科学*, (10): 49-51)