

## 技术主题

### Technology Feature

# 利用 SSR 快速鉴别花生杂交 F<sub>1</sub> 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

**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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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, F<sub>1</sub> 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

DOI: 10.3969/mpb.010.000110

**Abstract** In this research, we used six peanuts varieties as parents to make hybrid combinations for hybrid identification. Our practice showed that the authenticity of F<sub>1</sub> hybrids would be easy validated by field agronomic investigation, if whose parents had visible and distinguishable phenotypic differences, otherwise it might be very difficult to identify the authenticity of F<sub>1</sub> hybrids. Therefore, we established an SSR-PCR rapid detection system for peanut identification by modifying Thomson's one-step protocol to prepare DNA template, which was applied to identify the authenticity of peanut F<sub>1</sub> hybrids. The results showed that DNA templates extracted from Thomson's one-step protocol and modified Thomson's one-step protocol were able to generate sharp bands. Peanut DNA prepared by the modified protocol stored at 4℃ for almost a month was still fresh and working well, whereas peanut DNA prepared by Thomson's was completely degraded only staying a day at 4℃. The authenticity of F<sub>1</sub> hybrid combinations in this study were identified to be 38%~56%, the results further indicated that hybrid rates should be differences among different parents, even one pair parents for reciprocal cross. Therefore, we thought that using SSR markers to identify the authenticity of peanut hybrid might be great potential in future.

**Keywords** Peanut (*Arachis Hypogaea* L.), SSR, Hybrid seed, Authenticity of hybrid

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 F<sub>1</sub> 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 1 d,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 F<sub>1</sub> 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

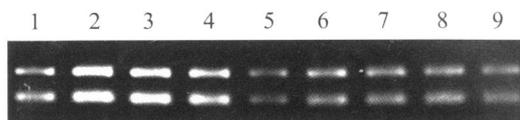


图 1 三种方法制备的 DNA 模板的 PCR 扩增比较

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

正反交 F<sub>1</sub> 形态表型一致,且均与亲本存在较大差异,肉眼容易辨别真伪。经田间鉴定,在 F<sub>1</sub> (粤油 101×崖县小粒)中发现伪杂种 53 株,而在 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> (粤油 223×汕油 71)和 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> 有 47 株真杂种,反交 F<sub>1</sub> 真杂种比正交少,仅 38 株。粤油 223 与汕油 71 正反交组合 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> (粤油 101×崖县小粒,崖县小粒×粤油 101)真伪,但 F<sub>1</sub> (粤油

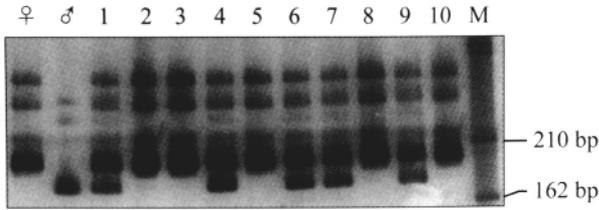


图2 引物 pPGSseq17E3 在亲本粤油 101 和崖县小粒及其 F<sub>1</sub> 的扩增结果

注: ♀: 粤油 101; ♂: 崖县小粒; 1-10: F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> by primer pPGSseq17E3

Note: ♀: Female parent Yueyou 101; ♂: Male parent Yaxianxiaoli; 1-10: F<sub>1</sub>, M: Marker; 1,4,6,7,9: Atrue hybrids basedon heterozygote banding pattern; 2,3,5,8,10: False hybrids

223×汕油 71)和 F<sub>1</sub> (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

表 1 花生 F<sub>1</sub> 真假杂种的田间和 SSR 鉴定结果

Table 1 The identifying results of the authenticity among peanut hybrid F<sub>1</sub>

F <sub>1</sub> 组合名称 F <sub>1</sub> 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

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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> 杂种, 其中 F<sub>1</sub> (粤油 101×崖县小粒)种子 134 粒, F<sub>1</sub> (崖县小粒×粤油 101)种子 126 粒, F<sub>1</sub> (粤油 223×汕油 71)种子 150 粒, F<sub>1</sub> (汕油 71×粤油 223)种子 127 粒, F<sub>1</sub> (粤油 13×粤油 20)种子 165 粒, F<sub>1</sub> (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 F<sub>1</sub> 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 克水溶液 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、蚜虫、斜纹夜蛾, 防治虫害 4 次。随机选取 F<sub>1</sub> 单株进行编号挂牌, 每个组合选取 100 株。在成熟期观察 F<sub>1</sub> 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; (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 Buffer A 配方, 增加 β- 巯基乙醇, 使得配方变为: 100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0, 1 mol/L KCl, 10 mmol/L EDTA, 0.1% β- 巯基乙醇。剪取 3 mm<sup>2</sup> 花生嫩叶, 置入 1.5 mL 离心管, 加入 100 μL 改良后的 Buffer A, 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 MasterMix (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% AgNO<sub>3</sub> 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(915100701000 0001)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 F<sub>1</sub> 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, 邹成, 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 Agronomica Sinica)*, 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 F<sub>1</sub> 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 Agronomica Sinica)*, 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 F<sub>1</sub> 代真假杂种 SSR 标记鉴定体系的建立, *广东农业科学*, (10): 49-51)



<http://bm.sophiapublisher.com>



**Reasons to publish in BioPublisher**  
*A BioScience Publishing Platform*

- ★ Peer review quickly and professionally
- ☆ Publish online immediately upon acceptance
- ★ Deposit permanently and track easily
- ☆ Access free and open around the world
- ★ Disseminate multilingual available

*Submit your manuscript at:* <http://bio.sophiapublisher.com>