

研究报告

Research Report

利用 SSR 标记鉴定杂交粳稻‘花优 14’种子纯度

姚丹青^{1*} 夏建明¹ 楼坚锋¹ 顾芹芹¹ 刘建¹ 张玉¹ 张秋丽¹ 张微微²

1 上海市农业技术推广服务中心, 上海, 201103; 2 上海农林职业技术学院, 上海, 201699

* 通信作者, ydq_726@163.com

摘要 本研究以杂交粳稻‘花优 14’及其亲本为材料, 利用 SSR 分子标记技术, 对其多态性进行了引物筛选和种子纯度鉴定研究。从 48 对广泛分布在水稻 12 条染色体上的候选 SSR 分子标记中, 筛选得到 6 对引物, 在‘花优 14’和其双亲之间表现为稳定的共显性且能将杂交种及其亲本完全区分, 利用这些引物对‘花优 14’种子进行分子纯度鉴定, 并将鉴定结果与田间小区种植纯度鉴定结果相比较, 结果显示两者鉴定结果基本一致。因此, 最终确定了多态性位点最多且特异性差异最显著的 RM274 和 RM1195 标记组合作为核心引物, 建立了一套更为快速、有效的鉴定杂交粳稻‘花优 14’种子纯度的技术方法。

关键词 SSR 标记; 杂交粳稻; 花优 14; 纯度鉴定

Identification of Seed Purity on Hybrid Japonica Rice ‘Huayou 14’ Using SSR Markers

Yao Danqing^{1*} Xia Jianming¹ Lou Jianfeng¹ Gu Qinpin¹ Liu Jian¹ Zhang Yu¹ Zhang Qiuli¹ Zhang Weiwei²

1 Shanghai Agricultural Technology Extension and Service Center, Shanghai, 201103; 2 Shanghai Vocational College of Agriculture and Forestry, Shanghai, 201699

* Corresponding author, ydq_726@163.com

DOI: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0030

Abstract In this study, the hybrid japonica rice ‘Huayou 14’ and its parents were used as materials, using SSR molecular marker technology, to select primers and identify seed purity according to its polymorphism. From 48 pairs of candidate SSR molecular markers widely distributed on 12 rice chromosomes, 6 pairs of primers were screened, which showed stable codominance between the hybrid and its parents. Completely distinguished, using these primers to carry out molecular purity identification of ‘Huayou 14’ seeds, and comparing the identification results with the field planting purity identification results, the results showed that the identification results of the two were basically the same. Finally, the RM274 and RM1195 marker combinations with the most polymorphic sites and the most significant differences in specificity were finally determined as core primers, and a more rapid and effective technical method for identifying the seed purity of hybrid japonica rice ‘Huayou 14’ was established.

Keywords SSR marker; Japonica hybrid rice; ‘Huayou 14’; Purity identification

水稻(*Oryza sativa*)是世界上最重要的粮食作物之一, 尤其是具备亲本优良性状的杂交稻品种, 由于具有高产、优质等特点, 在中国各地被广泛种植和推广, 有效的保证了持续稳定、高产优质的农

本文首次发表在《分子植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2021 年 6 月 3 日; 接受日期: 2021 年 6 月 7 日; 发表日期: 2021 年 6 月 14 日

引用格式: 姚丹青, 夏建明, 楼坚锋, 顾芹芹, 刘建, 张玉, 张秋丽, 张微微, 2021, 利用 SSR 标记鉴定杂交粳稻‘花优 14’种子纯度, 分子植物育种(网络版) 19(30): 1-7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0030) (Yao D.Q., Xia J.M., Lou J.F., Gu Q.Q., Liu J., Zhang Y., Zhang Q.L., Zhang W.W., 2021, Identification of Seed Purity on Hybrid Japonica Rice ‘Huayou 14’ Using SSR Markers, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 19(30): 1-7 (doi: 10.5376/mpb.cn.2021.19.0030))

业生产。在实际生产中,杂交种纯度高低直接影响农作物的产量和质量,要充分发挥杂种优势潜力也必须以高纯度的杂交种为基础,所以种子纯度鉴定一直都是良种推广应用过程中最重要的指标。

田间小区种植鉴定是目前鉴定杂交水稻品种纯度应用最广泛的方法(孙海燕等, 2014)。但其鉴定周期长、工作量大、成本高、易受环境影响,不能满足种子企业生产经营的需求。为此,探索一种简单快速、准确低廉的杂交种纯度鉴定方法,对于促进企业合规经营生产种子和提高政府对种子市场的监管效率具有重要意义。近年来分子标记技术的飞速发展,使其成为鉴别种子纯度的重要方法(Yashitola et al., 2002),特别是 SSR 标记,具有简单便捷,易于标准化,对 DNA 数量及质量要求不高,检测结果准确可靠,重复性好等特点,已广泛应用于油菜(梅德圣等, 2010)、水稻(王明湖等, 2014)、玉米(武岩军等, 2012)、黄瓜(崔兴华等, 2015)等农作物杂交种的纯度鉴定,并且被国际种子检验协会(ISAT)推荐为品种纯度及真实性检测的首选方法。

‘花优 14’是上海近年来选育的粳型优质高产三系杂交水稻,较上海水稻平均产量增产 10%以上,品质主要指标达到国标优质米一级标准,在长三角地区已累计推广种植 7×10^5 亩,经济和社会效益显著。本研究拟用杂交粳稻‘花优 14’为试验材料,基于 SSR 标记技术建立一套更为快速、有效的鉴定杂交粳稻‘花优 14’种子纯度的技术方法,为大面积推广提供技术支持。

1 结果与分析

1.1 水稻‘花优 14’及其亲本的全基因组 DNA 提取

检测结果显示,从‘花优 14’及其母本‘申 9A’、父本‘繁 14’中提取的水稻基因组 DNA,以及待检测样品的全部 DNA 都只有 1 条带。结果表明提取的基因组 DNA 纯度及浓度皆满足后续 PCR 扩增要求(图 1)。

1.2 ‘花优 14’特异性引物的筛选及验证

1.2.1 建立‘花优 14’DNA 指纹数据筛选特异性引物

实验结果表明,大部分 SSR 引物可以扩增出稳定清晰的条带,其中,‘花优 14’与亲本之间能将杂交种与亲本区别开的有 15 对 SSR 引物(表 1)。检测结果所示(图 2),‘花优 14’的带型是两个亲本互补带型,能将亲本与‘花优 14’特异区分,初步表明用这 15 对 SSR 引物可以鉴定‘花优 14’品种纯度。

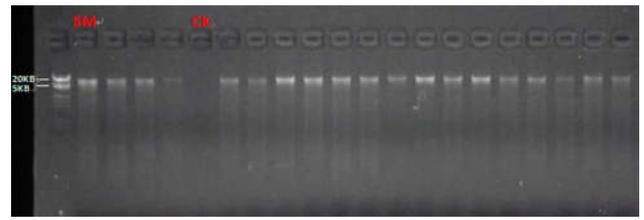


图 1 水稻 DNA 提取结果图

注: SM 孔为 size maker; CK 为阴性对照

Figure 1 Electrophoretogram of rice genomic DNA

Note: The first hole was size maker; The sixth hole was negative control

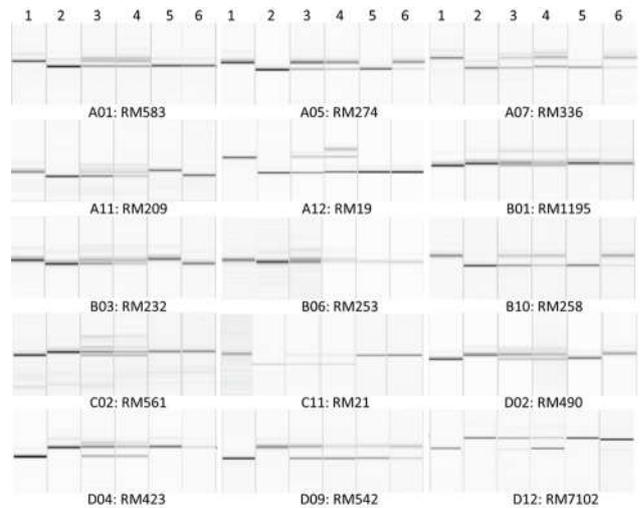


图 2 ‘花优 14’及其亲本 DNA 指纹数据及 2018120 小区种植鉴定杂株特异性分析图

注: 1: 父本; 2: 母本; 3: ‘花优 14’; 4: 2018120 样品小区种植鉴定圃 F1 代种子样品; 5, 6: 2018120 样品小区种植鉴定圃杂株样品

Figure 2 Results of primer specificity analysis of ‘Huayou 14’ hybrid and its parental Analysis of plant specificity in 2018120 plot planting identification

Note: 1: Male line; 2: Femaleline; 3: ‘Huayou 14’; 4: Sample of hybrid in plot planting identification field in 2018120; 5, 6: Sample of miscellaneous plants in plot planting identification field in 2018120

1.2.2 利用杂株类型定性鉴定筛选和验证特异性引物

通过对杂株进行 SSR 引物特异性分析,最终筛选出可将各杂株类型和 F1 代种子区分开的 15 对 SSR 标记(图 2, 图 3),结果显示,与前面借助杂交组合及其亲本 DNA 指纹图谱筛选出的双亲互补型的 15 对 SSR 引物一致,通过这 15 对标记可以有效鉴定出所有表现型的杂株。此外,在通过田间调查植株表型所选取的杂株类型 1-17 号样品中,存在部分杂株样品的基因型与‘花优 14’F1 代种子(18 号样品)的基因型一致(图 3),可见通过分子标记辅助验证,相比形态学观

表 1 ‘花优 14’及其亲本引物筛选结果汇总表

Table 1 ‘Huayou 14’ hybrid and its parental primer screening results

编号 Number	引物 Primer	染色体 Chromosomes	引物组别 Primer set	退火温度(°C) Annealing temperature (°C)	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')
A01	RM583	1	I	55	5'Primer: agatccatccctgtggagag 3'Primer: gcgaactcgcggttgaatc
A05	RM274	5	I	55	5'Primer: cctcgcttatgagagcttcg 3'Primer: cttctccatcactcccattgg
A07	RM336	7	I	55	5'Primer: cttacagagaacggcatcg 3'Primer: gctggtttgttcaggttcg
A11	RM209	11	I	55	5'Primer: atatgagttgctgctgcg 3'Primer: caactgcatcctcccctcc
A12	RM19	12	I	55	5'Primer: caaaaacagagcagatgac 3'Primer: ctcaagatggacccaaga
B01	RM1195	1	II	55	5'Primer: atggaccacaacgaccttc 3'Primer: cgactccctgtttctctgg
B03	RM232	3	II	55	5'Primer: ccggtatccttcgatattgc 3'Primer: ccgactttctcctgacg
B06	RM253	6	II	55	5'Primer: tcctcaagagtcaaaacc 3'Primer: gcattgcatgctgaagcc
B10	RM258	10	II	55	5'Primer: tgctgtatgtagctgcacc 3'Primer: tggcctttaaagctgctgc
C02	RM561	2	III	55	5'Primer: gagctgtttggactacggc 3'Primer: gtagtatttctcccacccc
C11	RM21	11	III	55	5'Primer: acagtattcctgtaggcagc 3'Primer: gctccatgaggggtgtagag
D02	RM490	1	IV	55	5'Primer: atctgcacactgcaaacacc 3'Primer: agcaagcagtgcttcagag
D04	RM423	2	IV	55	5'Primer: agcaccatgcttatgttg 3'Primer: ccttttcagtagccctccc
D09	RM542	7	IV	55	5'Primer: tgaatcaagcccctcactac 3'Primer: ctgcaacgagtaaggcagag
D12	RM7102	12	IV	55	5'Primer: taggagtgttagagtcca 3'Primer: tcggttgcttatacatcag

察而言,能够更加准确的鉴别杂株类型。

1.3 SSR 标记鉴定品种纯度的有效性验证

利用所筛选的 15 对 SSR 分子标记,进行了连续两年的 SSR 标记鉴定品种纯度技术方法的有效性验证,筛选确定了 6 个引物可用于鉴定品种纯度(图 4-5)。第一年,对编号为 2017108 号样品的 264 粒‘花优 14’单粒种子进行分子纯度鉴定。结果表明,以 A05 为例,具有与父母本完全互补特异条带的单株 260 粒,经计算,‘花优 14’品种纯度为 98.5%;其它假‘花优 14’中,‘花优 14’特异带型种子有 0 粒,具有‘申 9A’特异带型种子有 4 粒。田间鉴定统计,在 1 000 株杂交种当中与‘花优 14’形态不一致的有 17 株,即‘花

优 14’种子的纯度为 98.3%。第二年,对编号为 2018120 号样品的 196 粒‘花优 14’单粒种子进行分子纯度鉴定,方法同上,分别将两个样品的田间调查鉴定与分子标记检测结果进行比较(表 2),结果基本吻合,表明筛选出的引物鉴定‘花优 14’种子纯度的结果是正确可信的。整个繁种过程都有进行人工去杂,因此与亲本带型相同的假种子可能都来自母本种子的混杂。

2 讨论

杂交水稻种子纯度的高低严重影响其品质和产量,是鉴定杂交水稻种子质量的重要指标。以往,鉴

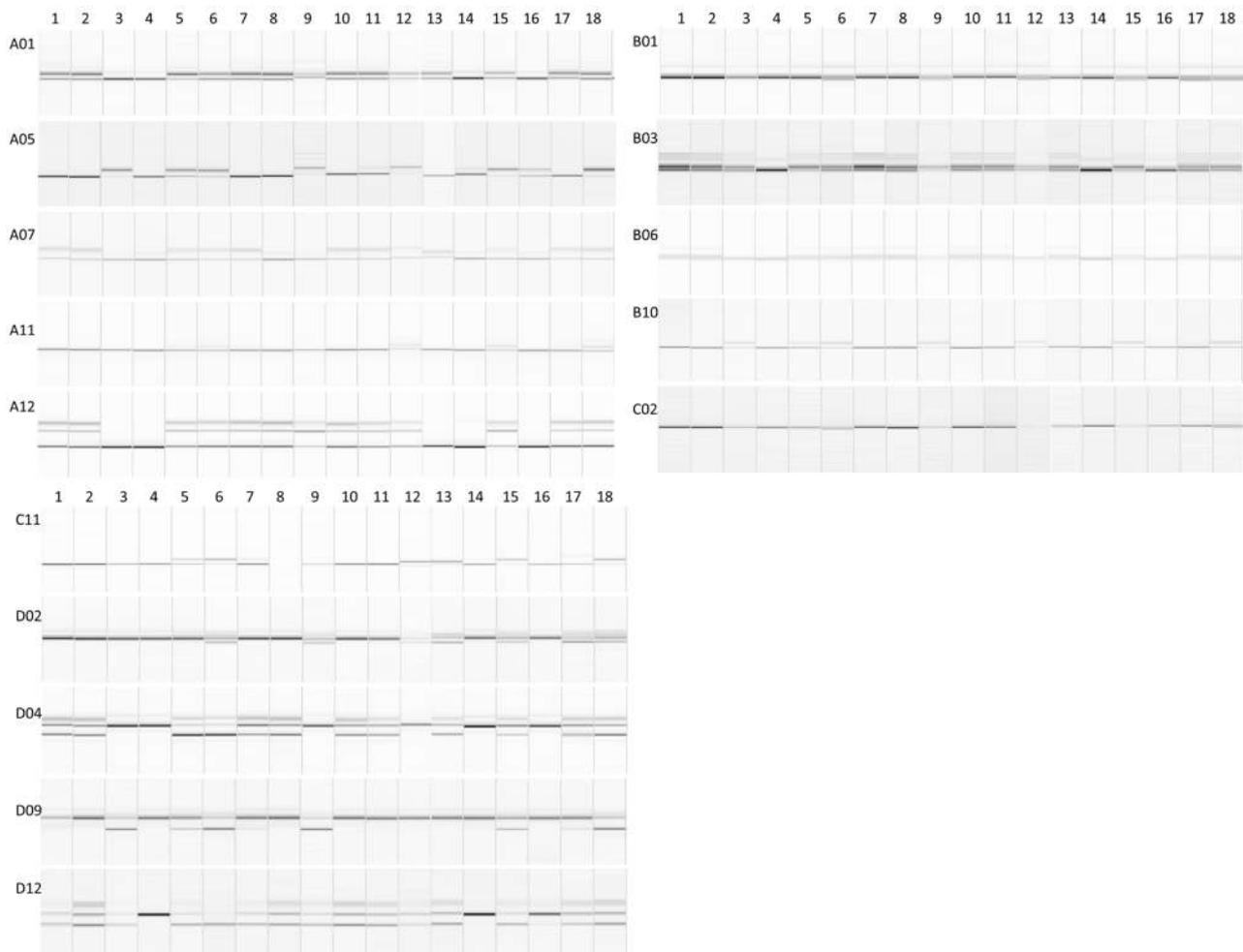


图3‘花优14’样品2017108小区种植鉴定杂株特异性分析图

注: 1-17: 2017108 样品小区种植鉴定圃杂株样品; 18: 2017108 样品小区种植鉴定圃 F1 代种子样品

Figure 3 Analysis of plant specificity in 2017108 plot planting identification

Note: 1-17: Sample of miscellaneous plants in plot planting identification field in 2017108; 18: Sample of hybrid in plot planting identification field in 2017108

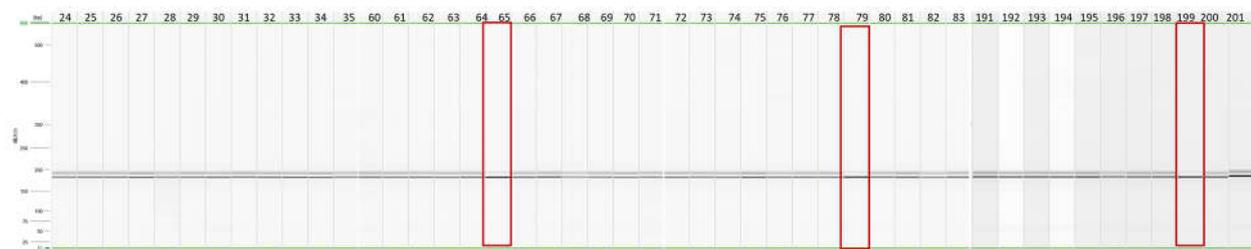


图4引物A1鉴定‘花优14’2017108样品单粒群体结果图

注: 65, 79, 199: 假种子, 其余全为杂交种

Figure 4 The results of primer A1 in the group of ‘Huayou 14’

Note: 65, 79, 199: The seeds were false, other of seeds were hybrids

定杂交水稻品种纯度通常采用田间小区种植鉴定方法,这种方法虽然结果比较准确,但鉴定过程对操作人员的专业素质要求比较高,需要有丰富的田间生产经验,而且鉴定周期长、鉴定成本高、效率低,现在

已很难满足杂交水稻种子市场化发展的要求。SSR分子鉴定技术不依赖于对品种特征特性的了解,也不受种植影响,所以鉴定结果更可靠,目前该技术已得到了广泛应用(孙海燕等, 2014)。

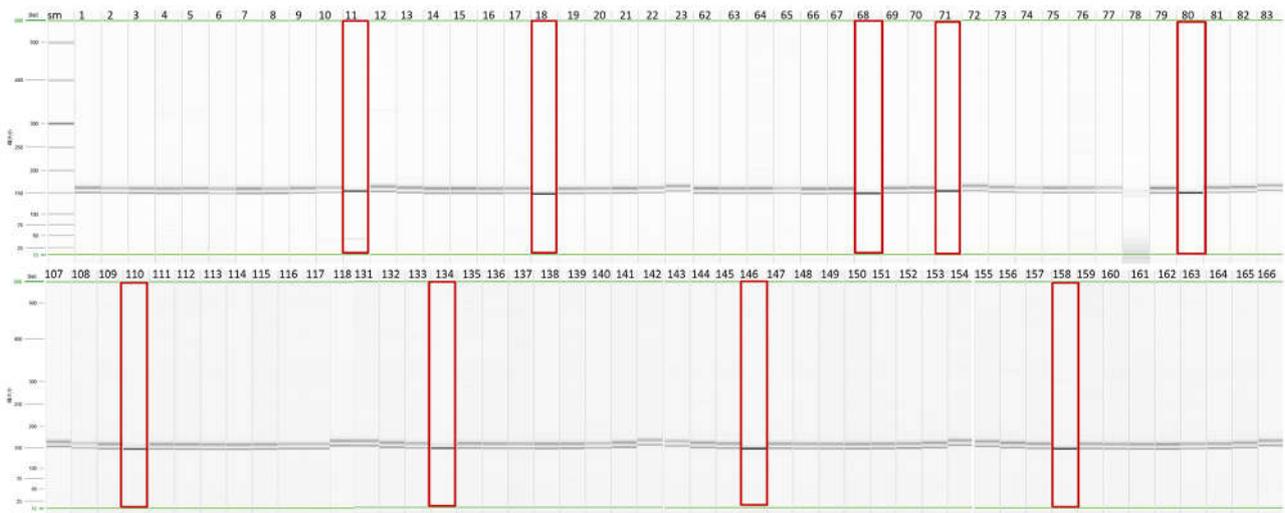


图 5 引物 A5 鉴定‘花优 14’2018120 样品单粒群体结果图
注: 11, 18, 68, 71, 80, 110, 134, 146, 158: 假种子, 其余全为杂交种

Figure 5 The results of primer A5 in the group of ‘Huayou 14’
Note: 11, 18, 68, 71, 80, 110, 134, 146, 158: The seeds were false, other of seeds were hybrids

表 2 田间纯度鉴定和分子纯度鉴定结果比较
Table 2 Comparison of field purity test and molecular purity test

待检样品 Sample	田间鉴定 Fieldtest			分子鉴定 Molecular test					
	纯度(%) Purity (%)	总株数 Total	杂株数 Number of number hybrid plants	引物 primers	纯度(%) Purity (%)	总粒数 Total grains	特异性个体 Specific individuals	偏差率(%) Deviation (%)	特异性个体编号 Specific individual number
2017108	98.3	1 000	17	A01: RM538	98.8	264	3	0.5	65, 79, 199
				A05: RM274	98.5	264	4	0.3	27, 65, 79, 199
				A07: RM336	98.5	264	4	0.3	27, 65, 79, 199
				B01: RM1195	98.5	264	4	0.3	27, 65, 79, 199
				C02: RM561	98.5	264	4	0.3	27, 65, 79, 199
				D02: RM490	98.5	264	4	0.3	27, 65, 79, 199
2018120	96.9	1 000	31	A01: RM538	95.9	196	8	1.0	18, 68, 71, 110, 134, 158, 165, 169
				A05: RM274	95.4	196	9	1.5	11, 18, 68, 71, 80, 110, 134, 146, 158
				A07: RM336	96.9	196	6	0.0	18, 68, 110, 117, 134, 158
				B01: RM1195	94.4	196	11	2.5	11, 18, 68, 71, 80, 110,
				C02: RM561	98.5	196	3	1.6	134, 146, 158, 165, 169 11, 80, 146
				D02: RM490	97.4	196	5	0.5	11, 80, 146, 165, 169

本研究利用 48 对 SSR 标准引物对杂交粳稻品种‘花优 14’及其亲本(恢复系‘繁 14’和不育系‘申 9A’)进行了基因型分析,建立了该杂交组合 DNA 指纹数据,筛选出 15 对区分‘花优 14’与亲本的特异性标记。同时,连续两年在田间小区种植鉴定圃进行杂株类型的调查鉴定,通过对杂株类型的定性分析,筛

选得到的 15 对特异性标记结果与前者一致,初步建立了杂交粳稻‘花优 14’种子纯度分子鉴定技术方法。为了验证该技术方法的有效性,挑选了 6 对特异性较显著的引物对 2017 年和 2018 年生产的杂交粳稻‘花优 14’种子进行了分子纯度鉴定,结果与大田鉴定结果基本一致。这说明利用这 6 对引物鉴定杂

交粳稻‘花优 14’种子的纯度比较准确,而且简单高效。此外,利用这 6 对引物为候选标记对其他长三角地区杂交粳稻种子进行纯度鉴定试验,发现其遗传多态性较高,今后也可以用于其他品种纯度鉴定试验当中。

鉴于 RM274 和 RM1195 的多态性位点最多且特异性差异最显著,考虑到分子鉴定成本,最终确定形成“基于 RM274 和 RM1195 标记组合的杂交粳稻‘花优 14’种子纯度分子鉴定技术方法”。该技术方法对于杂交粳稻品种‘花优 14’的合法经营以及政府的质量监控具有重要意义。

3 材料和方法

3.1 供试材料

‘花优 14’及其亲本(恢复系‘繁 14’和不育系‘申 9A’)标准样品以及 2017 和 2018 年生产的‘花优 14’F1 代种子(样品编号: 2017108 和 2018120),均由上海市农作物种子质量检测中心提供。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

分别从编号为 2017108 和 2018120 的样品中随机选取 1 000 粒种子,在海南进行田间小区种植鉴定,取鉴定圃中的主要杂株类型进行特异性分析,筛选出可将杂株类型区分开的 SSR 标记。

3.2 水稻基因组 DNA 提取

‘花优 14’及其亲本(恢复系‘繁 14’和不育系‘申 9A’),以及取自鉴定圃中的杂株材料,每样本取 20 粒种子,置于 2 mL 圆底离心管中,加入 2 颗钢珠,用 QIAGEN 研磨器,最大频率研磨 20 min,制备提取 DNA,采用 QIAGEN 植物基因组 DNA 试剂盒提取。DNA 提取后于 0.7% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, DNA 纯度和浓度测量利用 NanoDrop2000c 紫外可见光谱仪进行测定,稀释至 40~50 ng/ μ L 的工作液于冰箱 4 $^{\circ}$ C 备用。

用于验证分子纯度鉴定方法的水稻样品 2017-108 和 2018120 的单粒种子,利用种子 DNA 磁珠法提取水稻基因组 DNA,提取试剂盒为长春市志昂生物科技有限公司生产,型号为 GO-GPLF-FX96,使用仪器包括 Thermo FLEX 核酸提取仪,混匀小精灵,离心机,金属浴/水浴/空气浴。

3.3 引物的筛选及验证

3.3.1 建立‘花优 14’DNA 指纹数据筛选特异引物

以‘花优 14’及其亲本的基因组 DNA 为模板,

进行 PCR 扩增筛选多态性好的 SSR 引物。选择原农业部颁布的行业标准《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》中 48 对 SSR 引物对水稻品种进行 PCR 扩增及基因型鉴定。PCR 扩增为 20 μ L 体系,扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 先预变性 5 min,然后 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55~60 $^{\circ}$ C 退火 35 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s,共 37 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,扩增产物 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增结束后,采用毛细管电泳进行分析,通过 QIAxcelScreenGel 1.4 版软件对原始数据进行分析,确定每个 SSR 位点的基因型。杂交种带型为两个亲本互补型为目的引物。

3.3.2 利用杂株类型定性鉴定筛选和验证特异性引物

在田间小区种植鉴定圃(2017108 和 2018120)分别选取了 17 个杂株样品和 2 个杂株样品连续两年,通过形态学观察选取杂株样品,利用 48 对 SSR 标记对这些杂株进行特异性分析,进一步验证筛选引物的有效性。总反应体系和反应程序同上。

3.4 SSR 标记鉴定品种纯度技术方法的验证

分别从样品 2017108 和 2018120 中随机选取了 264 粒和 196 粒单粒种子,用所选取的群体单粒‘花优 14’种子验证筛选的 SSR 引物,SSR 引物筛选试验与上述实验相同,观察筛选引物对群体单粒种子检测结果并进行对比拟合。

3.5 水稻种子不同纯度鉴定方法的比较

在 SSR 分子鉴定中,用目的引物对随机选取的群体单粒‘花优 14’种子进行 SSR 鉴定,SSR 引物试验体系和程序与上述过程相同。在常规田间小区种植鉴定中,在海南陵水试验基地种植 1 000 株‘花优 14’,观察其表型性状一致性。纯度(%)= 杂交种子株数/总株数 \times 100。比较 SSR 分子鉴定方法和田间小区种植鉴定方法的结果相似性。

作者贡献

姚丹青是项目的负责人、本研究的实验设计者和实验研究的执行人,完成数据分析,论文初稿的写作;楼坚锋、顾芹芹、张玉、张秋丽提供了本研究的实验材料准备工作,张微微、刘建参与实验设计和试验结果分析;夏建明指导实验设计、论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由上海市农口系统青年人才成才计划项目基金(沪农青字(2018)第 9-1 号)、优质稻米全产业

链绿色生产模式开发项目专题二(沪农科推字(2018)第 1-1 号)和优质稻绿色生产技术的研究和示范(沪农科产字(2018)第 3 号专项)资助。

参考文献

- Cui X.H., Han Y.K., Du S.L., Wei A.M., Chen Z.W., and Liu N., 2015 SSR identification of seed purity of a New Cucumber Variety 'Jinyou 401', *Zhongguo Guacai (Cucumis melo)*, (3): 38-39. (崔兴华, 韩毅科, 杜胜利, 魏爱民, 陈正武, 刘楠, 2015, 黄瓜新品种‘津优 401’种子纯度的 SSR 鉴定, *中国瓜菜*, (3): 38-39.)
- Mei D.H., Li Y.C., Chen Y.F., Li Y.D., Xu Y.S., Hu Q., 2010, Identification of seed purity of Zhongyouza 12 by peroxidase isozyme and SSR markers, *Nongye Jishu Xuebao (Journal of agricultural biotechnology)*, 18 (4): 815-821. (梅德圣, 李云昌, 陈玉峰, 李英德, 徐育松, 胡琼, 2010, 用过氧化物酶同工酶和 SSR 标记鉴定中油杂 12 种子纯度, *农业生物技术学报*, 18(4): 815-821.)
- Sun H.Y., Gu W.W., Wang S.Y., Xu G.M., Luo B., Yang Z.G., Shen Z.G., and Duanmu Y.X., 2014, Identification of seed purity on hybrid japonica rice ‘Changyou 1’ using SSR markers, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 11 (5): 557-561. (孙海燕, 顾雯雯, 王淑园, 徐港明, 罗兵, 杨志刚, 沈宗根, 端木银熙, 2014, 利用 SSR 标记鉴定杂交粳稻‘常优 1 号’种子纯度, *分子植物育种*, 12(6): 1128-1132.)
- Wang M.H., Zhang X.T., Wu G., Jiang Q., and Shi Y., 2019, DNA fingerprints construction and purity identification based on SSR markers for rice varieties in Ningbo city, *Zhongguo Daomi (China Rice)*, 25(6): 50-54. (王明湖, 张孝天, 吴国林, 蒋琪, 施勇烽, 2019, SSR 标记在宁波地区水稻品种 DNA 指纹图谱构建及纯度鉴定中的应用, *中国稻米*, 25(6): 50-54.)
- Wang Y.F., Dong J.G., Dong Z.S., Qu L.Y., Ge J., Guo Y.F., Hu Y.M., and Lan G., 2011, Screening of SSR primers for identification the seed purity of variety qin10 in *B. napus*, *Jiyinzuxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 30(1): 72-77. (王一峰, 董军刚, 董振生, 瞿利英, 葛娟, 郭英芬, 胡永敏, 兰刚, 2011, 甘蓝型油菜秦优 10 号杂交种纯度鉴定的 SSR 引物筛选, *基因组学与应用生物学*, 30(1): 72-77.)
- Wu Y.J., Xu J., and Che X.X., 2012, Application of SSR marker technique to purity testing of maize hybrid qiangsheng 16, *Shanxi Nongye Kexue (Journal of Shanxi Agricultural Science)*, 40(6): 599-602. (武岩军, 许晶, 车星星, 2012, 应用 SSR 标记技术鉴定强盛 16 号玉米单交种纯度, *山西农业科学*, 40(6): 599-602.)
- Yashitola J., Thirumungan T., Sundaram R.M., Naseemllah M. K., Ramesha M.S., Sarma N.P., and Sonti Ramesh V., 2002, Assessment of purity of rice hybrid using microsatellite and STS markers, *Crop Sci.*, 42(4): 1369-1373.