

“三系”杂交大豆种子纯度鉴定 DNA 分析 方法 (SSR)

Assessment of the purity of "three-line" hybrid soybean -DNA analysis method
(SSR)

2015 - 12 - 15 发布

2016 - 01 - 25 实施

前 言

本标准按照GB/T 1.1-2009和GB/T 20001.4-2001给出的规则起草。

本标准由吉林省农业委员会提出并归口。

本标准起草单位：吉林省农业科学院。

本标准主要起草人：张春宝、彭宝、赵丽梅、张伟龙、张伟、张井勇、闫昊、赵鑫。

“三系”杂交大豆种子纯度鉴定 DNA 标记分析方法（SSR）

1 范围

本标准规定了“三系”杂交大豆种子纯度鉴定SSR标记分析方法的原理、纯度检测程序、结果计算及结果报告。

本标准适用于“三系”杂交大豆品种的纯度鉴定。

2 规范性引用文件

下列文件对于本文件的应用是必不可少的。凡是注日期的引用文件，仅所注日期的版本适用于本文件。凡是不注日期的引用文件，其最新版本（包括所有的修改单）适用于本文件。

- GB/T 3543.1 农作物种子检验规程 总则
- GB/T 3543.2 农作物种子检验规程 扦样
- GB/T 3543.4 农作物种子检验规程 发芽试验
- NY/T 1788 大豆品种纯度鉴定技术规程SSR分子标记法
- DB22/ 2209 杂交大豆种子

3 术语与定义

DB22/ 2209界定的以及下列术语和定义适用于本文件。为了便于使用，以下重复列出了DB22/ 2209中的一些术语和定义。

3.1

雄性不育系 cytoplasm male sterility line

雌蕊发育退化或败育，不能产生有功能的花粉，但它的雌蕊发育正常，能接受正常花粉而受精结实，并能将雄性不育性遗传给后代的品系。

3.2

保持系 maintainer line

保持系可以保持不育系的不育特性，保持系和不育系杂交，当代可以结实，但是子代仍然是不育系，可以让不育系得到繁殖，保有不育系材料。

3.3

恢复系 restorer line

常规大豆品种，它的特殊功能是用它的花粉授给不育系，所产生的杂交种育性恢复正常，能自交结实，如果该杂交种有优势，可用于生产。

3.4

三系 three line

雄性不育系、保持系和恢复系三系配套育种，不育系为生产大量杂交种子提供了可能性，借助保持系来繁殖不育系，用恢复系给不育系授粉来生产育性恢复且有优势的杂交种。

3.5

杂交大豆 hybrid soybean

用不育系作母本与恢复系杂交，得到的F₁种子。

4 原理

简单序列重复（simple sequence repeats, SSR）是由几个核苷酸为重复单元的长达几十至几百个核苷酸的串联重复序列；由于基本单元重复次数的不同，而形成SSR座位的多态性；根据SSR座位两侧保守的单拷贝序列设计一对特异引物来扩增SSR序列，即可揭示其多态性。SSR标记具有共显性的特点，鉴于母本不育系和父本恢复系在恢复基因的特征连锁区域存在差异，而F₁杂交种子具有双亲等位基因的互补带型，据此特征选择恢复基因连锁SSR标记进行分析，可用于区分杂交种和伪杂种。

5 纯度检测程序

5.1 取样

5.1.1 应按GB/T 3543.2的规定扦样，从供试样品中随机选取100粒种子。

5.1.2 应按GB/T 3543.4规定的方法进行发芽，随机选取其中不少于50株幼苗；也可从5.1.1中直接选取不少于50粒干种子。

5.2 引物确定

根据不同杂交种品种特异性从14对SSR引物（见附录A）中选取3对作为测试引物。

5.3 试验方法

5.3.1 DNA提取

以幼苗为供检测样品，需称取50 mg叶片放入2 ml离心管中，加液氮用玻璃棒研磨至粉末状；以干种子为供检测样品，需单粒研磨成粉，称取50 mg豆粉放入2 ml离心管中。以上样品DNA提取，应按NY/T 1788执行。

5.3.2 PCR扩增

5.3.2.1 PCR反应体系

反应体系包括1×PCR缓冲液；4种dNTPs混合物0.2 mmol/L；正、反向引物各0.15 μmol/L；Taq DNA聚合酶1 U；待测样品DNA 20 ng，加双蒸水补足至25 μL。

5.3.2.2 PCR反应程序

94 °C 预变性4 min；然后94 °C 变性30 s，46 °C~55 °C 退火30 s，72 °C 延伸30 s，运行30个循环；最后72 °C 10 min，4 °C 条件下保存。

5.3.3 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳

应按NY/T 1788的规定执行。

6 结果计算

杂交种纯度 (P) 按公式1计算:

$$P = \frac{N_T - N_F}{N_T} \times 100 \quad (1)$$

式中:

P ——杂交种纯度以%表示;

N_T ——供检种子数量, 单位为粒;

N_F ——判定为伪杂交种子数量, 单位为粒。

7 结果报告

应按 GB/T 3543.1 的规定执行。

附 录 A
(规范性附录)

用于“三系”杂交大豆种子鉴定的 SSR 分子标记引物

用于“三系”杂交大豆种子鉴定的SSR分子标记引物见表A.1。

表A.1 用于“三系”杂交大豆种子鉴定的 SSR 分子标记引物

核心引物名称	正向引物序列 (5' -3')	反向引物序列 (5' -3')	适用杂交大豆品种
BARCSOYSSR_16_0703	GCGCATTAAGGCATAAAAA AGGATA	GCACAATGACAATCACATA CA	杂交豆3号, 杂交豆5号, 吉 育607, 吉育608, 吉育609
BARCSOYSSR_16_1052	TTTAGAGACCTACTTAAAG CACCTCA	CATCGACCAAGTCAACGCT A	杂交豆3号, 杂交豆5号, 吉 育606, 吉育608, 吉育609
BARCSOYSSR_16_1052	TTTAGAGACCTACTTAAAGCACCTCA	CATCGACCAAGTCAACGCTA	杂交豆1号, 杂交豆3号, 杂 交豆4号, 吉育607
BARCSOYSSR_16_1060	AGCCTCACATGTCTCCTCT	ATTGTAAGGCCAGGTTTTT	杂交豆1号, 杂交豆3号, 杂 交豆4号, 吉育607, 吉育608
BARCSOYSSR_16_1073	CTCCGTTGCTGAT	TAAGCTGAATTAGTAAAA	杂交豆1号, 杂交豆2号, 杂 交豆3号, 杂交豆4号, 吉育 606, 吉育607, 吉育609
BARCSOYSSR_16_1075	CCCCAAACAATGGACAACA T	CGTTAAGATTTTTACATTAT CAACGAA	杂交豆1号, 杂交豆2号, 杂交豆3号, 吉育608, 吉 育609
BARCSOYSSR_16_1087	CACCCTTCATCTCACTGCA A	TTGTTCTTACTTGGGCAAA	吉育606, 吉育608
BARCSOYSSR_16_1095	CACCAATTTAAAGTTTGAT GGTC	TCCCACTTATTGGTTTC A	杂交豆1号, 杂交豆2号, 杂交豆3号, 杂交豆4号, 杂交豆5号, 吉育606, 吉 育607, 吉育609

表A.1 (续)

核心引物名称	正向引物序列 (5' -3')	反向引物序列 (5' -3')	适用杂交大豆品种
BARCSOYSSR_16_1097	GTTGCAATTGTCAGCATCG T	GAGTCGGTTAACAACGGAA A	杂交豆5号, 吉育609
BARCSOYSSR_16_1102	TTGCTTGTGACTCGAGAAA A	CGTGATTGCATATGACTGTT CA	杂交豆1号, 杂交豆3号, 杂交豆4号, 吉育606, 吉 育609
BARCSOYSSR_16_1 110	AAAAGAAGGAGGCACGTC AT	AGGATGTGCTTGACGGAAC T	杂交豆3号, 杂交豆4号, 杂 交豆5号, 吉育606, 吉育607, 吉育608, 吉育609
BARCSOYSSR_16_1 123	AGAAAAGAAATATATTCCC CAGATAA	ACAATGTTAAAGTCATCCA ATTATACA	杂交豆1号, 杂交豆2号, 杂 交豆4号, 杂交豆5号, 吉育 607
BARCSOYSSR_16_1 124	TGGAGTTATGGTAACAGTG ATGCT	CATGTTTGTACTTGGTGCAT GA	杂交豆1号, 杂交豆3号, 杂 交豆4号, 杂交豆5号, 吉育 606, 吉育607
BARCSOYSSR_16_1 165	GCGCTATCCGATCCATATG TG	TGATTTCGCTAGGTAAAATC A	杂交豆2号, 杂交豆4号, 杂 交豆5号, 吉育606, 吉育608