

利用分子标记对‘淮稻5号’进行品种真实性鉴定

顾伟航¹, 田佳琪¹, 朱明超^{2,*}, 文正怀², 严卫古², 王兴龙³, 张大兵^{1,3}, 袁政^{1,3,*}

¹上海交通大学生命科学技术学院, 上海200240

²江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所, 淮安市农业科学研究院, 江苏淮安223001

³淮安市作物分子辅助育种重点实验室, 江苏省区域现代农业与环境保护协同创新中心, 江苏天丰种业有限公司, 江苏淮安223001

摘要: ‘淮稻5号’具有抗倒性强、高产稳产、米质优良等优点, 自推广以来, 以其独有的优越性在粳稻市场中占有重要竞争份额。因此, 开发可用于该品种真实性鉴定的分子标记具有重要的经济和应用价值。本研究利用前期筛选获得的99对水稻InDel分子标记对‘淮稻5号’标准品(H1)和4个生产中与‘淮稻5号’无明显表型差异的供测品种进行基因型分析, 筛选获得4对‘淮稻5号’品种特异性InDel分子标记: chr1_3386-1、chr5_751、chr8_6491-1和 chr11_5641-0。为进一步验证这4对分子标记鉴定结果的可靠性, 对供测品种基因组进行了2b-RAD测序分析, 测序结果与InDel分子标记检测结果一致, 供测品种H2、H4虽然表型与其他供测品种几乎一致, 但与标准品(H1)及其他供测品种(H3、H5)在基因型上存在明显差异。在此基础上, 利用这4对InDel分子标记对来自不同地区以及举报的‘淮稻5号’问题材料进行了基因型检测, 结果进一步验证本研究获得的4对分子标记可用于‘淮稻5号’品种真实性的快速检测鉴定。因此, 本研究结果为加强‘淮稻5号’品种权的保护及种子质量监测工作提供了理论依据和技术支持。

关键词: ‘淮稻5号’; 分子标记; InDel; 2b-RAD; 真实性

种子是农业生产最重要的生产资料之一, 其质量直接关系到作物的产量和生产效益。‘淮稻5号’(原代号‘淮9508’)是江苏徐淮地区淮阴农业科学研究所‘武运粳3号’为父本, 以‘7208’为母本, 经多年杂交选育, 于1995年育成的迟熟中粳新品种。‘淮稻5号’因抗倒性强、高产稳产、米质优良、适口性好等特点而具有良好的市场推广价值(袁彩勇等2002)。据统计, ‘淮稻5号’自推广以来, 一直占据江苏水稻品种市场重要份额。然而, ‘淮稻5号’在市场上已经销售12年, 种子生产和经营中存在多个繁殖品系或品种的退化、假冒种子, 特别是套牌贴牌的侵权种子等现象。因此, 开发出简单高效的种子真实性鉴定技术对于实际生产具有重要意义。

目前市场上种子真实性鉴定主要有形态标记, 生化标记、近红外光谱鉴定和分子标记等。形态学标记研究物种是基于个体性状描述, 得到的结论往往不够完善, 且数量性状很难剔除环境的影响, 需生物统计学知识进行严密的分析。生化标记通常是以蛋白质多态性为基础, 主要包括同工酶、贮藏酶、等位酶等(张慧娜等2016)。生化标记主要是通过凝胶电泳法将所提取的各类蛋白转化为谱带后进行分析和研究, 但是所有蛋白质的表达易受环境和发育状况的影响(胡景涛等2009)。

近红外光谱鉴定基于近红外光谱和仿生模式识别技术, 近年来被成功应用于水稻、小麦等农产品种子质量的检测(贾仕强等2014)。近红外光谱鉴定可以一次完成不同样品不同指标的连续快速分析, 但因为近红外光谱鉴定需要基于相关数据库建立校正模型, 无论是数据库还是相关校正模型的建立都需要较高的技术, 限制了其在种子真实性鉴定中的应用和推广(黄艳华等2014)。分子标记是随着分子生物学和生物技术的迅速发展而发展起来的一种较为理想的遗传标记, 它以遗传物质(DNA)多态性为基础, 可以反映生物个体和群体的特征, 是一种最能揭示生物本质的标记技术(陈俊锋等2006)。目前, 在种子真实性鉴定上常用的分子标记技术主要有SSR (simple sequence repeat, 简单重复序列标记)(李海波等2017)、InDel (insertion/deletion polymorphism, 插入/缺失多态性)和2b-RAD (type IIB endonucleases restriction-site associated DNA, IIB型限制性酶切位点相关的DNA)(Wang等

收稿 2017-11-20 修定 2017-12-29

资助 国家重点研发计划(2016YFD0101107)和上海市水稻产业技术体系建设项目(沪农科产字(2017)第3号)。

* 共同通讯作者: 朱明超(574937902@qq.com)、袁政(zyuan@sytu.edu.cn)。

2012)等。SSR标记数量丰富,重复性好,但因需要预先知道重复序列以及较高的开发难度和开发费用影响了其在实际生产中的运用(李美芹等2016)。InDel标记覆盖性广,准确度高,稳定性好,避免了由于特异性和复杂性导致的后续分析模糊,可利用便捷的电泳平台进行分型,在基因组多态性分析中具有广泛的应用前景(杨洁等2016)。但SSR、InDel标记只能在已知位点进行分析。随着近年来测序技术的进步,全基因组基因多态性分析逐步在DNA多态性分析中得到应用,较全基因组测序而言,基于简并基因组测序技术的2b-RAD分析以相对较低的成本进行全基因组多态位点检测,在种资鉴定等方面具有非常广泛的应用前景(李全林等2016),但因其测序成本相对较高和基因型分析方法专业性强而在实际应用中受限。因此,开发简单高效的种子真实性鉴定技术是种子质量监管和植物育种者权利保护领域亟待解决的技术关键。

为了开发‘淮稻5号’品种特异性分子标记,本研究根据前期开发的InDel分子标记筛选平台(InDel Markers Development Platform, IMDP)的分析结果(Lü等2015),以‘淮稻5号’标准品(H1)和4个与‘淮稻5号’生长表型无明显差异的供测品种(H2、H3、H4、H5)为研究材料,从IMDP平台中挑选出99个InDel标记进行基因型检测(Lü等2015),筛选获得了4个可用于‘淮稻5号’真实性鉴定的InDel标记。并分别利用简并基因组测序和实际样品检测证明了这4对InDel标记的实用性。因此,本研究利用分子标记技术获得了可用于‘淮稻5号’种子真实性检测的InDel分子标记,为保护‘淮稻5号’品种权和维护种子市场的正常经营提供了技术保障和理论依据。

1 材料与方法

1.1 水稻材料种植及表型观察

本实验所用水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘淮稻5号’标准品及其他供测‘淮稻5号’种子材料均由江苏天丰种业有限公司提供。所有材料种植于上海交通大学科普实验基地(上海市闵行区)。按传统表型观察方法对植株表型进行基本的农艺性状观察和分析,包括整株表型、株高、分蘖、千粒重、一次枝梗。盲样检测水稻种子为来自江苏省

不同地区繁殖的‘淮稻5号’和其他水稻种子,具体信息为(命名依据种子来源地):淮安01 (X1),白马湖农场02 (X2),方强农场03 (X3),建湖04 (X4),临海农场05 (X5),临海农场06 (X6),临海农场07 (X7);其他水稻种子为:‘武运粳7号’(X8),‘日本晴’(X9)。

1.2 水稻基因组DNA提取和2b-RAD测序

DNA抽取采用改良的十六烷基三甲基溴化铵(cetyltrimethylammonium bromide, CTAB)方法(闫玖英等2017),取所有供测品种的幼叶于 -80°C 冰箱保存备用,并通过琼脂糖检测和NanoDrop 2000紫外可见分光光度计(Thermo Sensitive, USA)对所抽提基因组DNA样品的质量和浓度进行检测。2b-RAD测序由上海欧易生物医学科技有限公司Illumina HiSeq 2500二代测序平台完成,质量控制参照Wang等(2012)的方法并略有改动。

盲样种子DNA抽提采用CTAB法,并通过琼脂糖检测和NanoDrop 2000紫外可见分光光度计(Thermo Sensitive, USA)对所抽提基因组DNA样品的质量和浓度进行检测(李全林等2016)。

1.3 PCR反应

本研究所用的99对水稻InDel分子标记来自IMDP软件分析结果(Lü等2015)。DNA模板为所有供测水稻幼叶DNA,PCR采用 $20\ \mu\text{L}$ 反应体系,包含基因组DNA $1\ \mu\text{L}$ 、左右引物各 $0.5\ \mu\text{L}$ 、 $2\ \text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTPs $2\ \mu\text{L}$ 、 $10\times\text{PCR buffer}$ $2\ \mu\text{L}$ 、Taq酶 $1\ \mu\text{L}$ 、甘油 $1\ \mu\text{L}$ 和 ddH_2O $12\ \mu\text{L}$ 。PCR反应条件为: 94°C 预变性 $5\ \text{min}$; 98°C 变性 $10\ \text{s}$, 55°C 退火 $15\ \text{s}$, 72°C 延伸 $30\ \text{s}$, 36个循环; 72°C 延伸 $5\ \text{min}$, 16°C $1\ \text{min}$ 。

1.4 2b-RAD测序结果分析

利用Stacks软件对2b-RAD测序结果的高质量reads进行测序结果聚类分析(Catchen等2011)、主成分分析(principle component analysis, PCA)(谭亚芳等2017)和基因型分析,使用改进最优保留遗传算法(modified preserved elitist genetic algorithm, MEGA)计算出5个样品两两遗传距离矩阵(王海山等2009)。

2 实验结果

2.1 ‘淮稻5号’标准品和供测品种的表型分析

‘淮稻5号’具有可以直播、密植、成穗率高、出糙率高等特征(杨魁和张忠良2016)。在直播条件下的4个供测品种(H2、H3、H4、H5)与‘淮稻5

号’标准品(H1)无明显差异。为了对这此材料进行详细的表型观察,我们将标准品和供测品种人工种植在20 cm×25 cm株行距的条件下进行整个生育期的表型观察。结果显示,与‘淮稻5号’标准品(H1)相比,供测品种(H2~H5)在营养生长前期无明显差异。成熟期考种结果显示,标准品(H1)与供测品种在穗型、株高、一次枝梗数和千粒重方面均无明显差异(图1-A和B),但平均分蘖数存在显著差异(图1-B)。与标准品(H1)相比,供测品种H2和H4分蘖数明显增加(分别为19.19%和9.04%)。这一结果暗示供测品种H2和H4与‘淮稻5号’标准品(H1)可能来自不同的遗传背景,但在直播密植条件下这2个品种的分蘖差异显现不明显。

2.2 ‘淮稻5号’品种特异性分子标记的筛选

为了对供测品种进行遗传关系及真实性鉴定,开展了‘淮稻5号’品种特异性分子标记的筛选。首先,提取‘淮稻5号’标准品(H1)及4个供测品种

(H2~H5)的幼叶基因组DNA,利用前期筛选获得的99对水稻InDel分子标记对标准品(H1)及4个供测品种的幼叶基因组DNA进行PCR(Lü等2015),然后通过PAGE(polyacrylamide gel electrophoresis,聚丙烯酰胺凝胶电泳)鉴定各品种的基因型。结果显示(图2):‘淮稻5号’供测品种H2、H4供测品种与‘淮稻5号’标准品(H1)及其他供测品种(H3、H5)在基因型上存在明显差异。在InDel标记chr1_3386-1和chr5_751处,供测品种H4与其他供测品种存在带型差异。在InDel标记chr8_6491-1和chr11_5641-0处,供测品种H2和H4与其他供测品种存在带型差异。说明与标准品H1相比,供测品种H2和H4来源于不同的遗传背景,而且在基因型方面H4差异较H2大。99对InDel结果的一致性也暗示供测品种H3和H5是‘淮稻5号’同一遗传来源的繁殖材料。

2.3 2b-RAD测序及结果分析

为了验证以上InDel分子标记检测结果的可靠

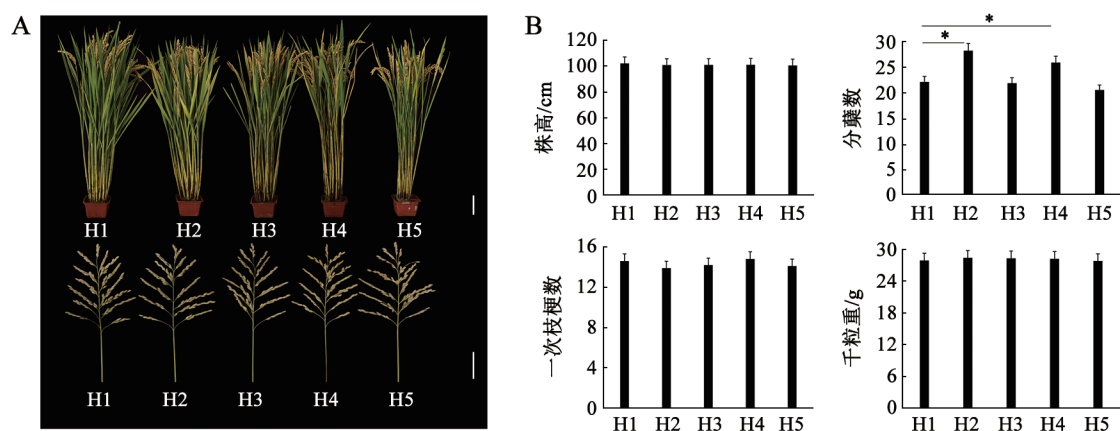


图1 ‘淮稻5号’标准品(H1)及4个供测品种表型观察

Fig.1 Phenotypes of ‘Huaidao 5’ standard sample (H1) and other four test samples

A: 上为整株表型,标尺=10 cm;下为穗型,标尺=5 cm。B: 产量性状分析,*表示在0.05统计水平有显著性差异。

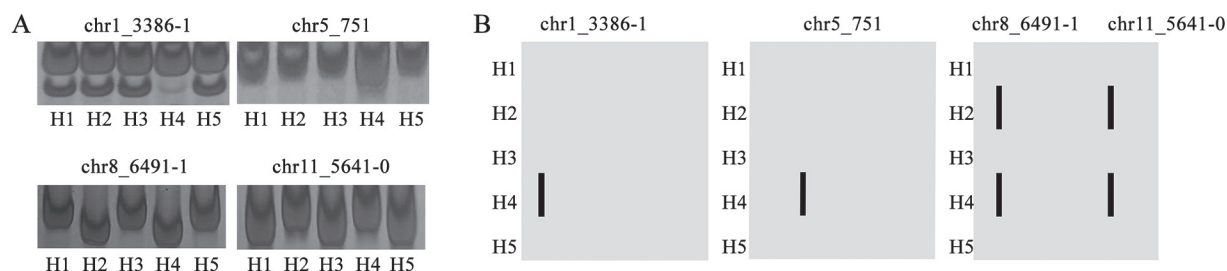


图2 ‘淮稻5号’标准品(H1)及4个供测品种InDel分子标记的PAGE鉴定结果

Fig.2 InDel markers genotyping of ‘Huaidao 5’ standard sample (H1) and other four test samples

A: 分子标记chr1_3386-1、chr5_751、chr8_6491-1和chr11_5641-0的PAGE电泳结果; B: 99对InDel分子标记结果聚合图。

性, 利用2b-RAD测序技术构建了‘淮稻5号’标准品(H1)和4个供测品种(H2、H3、H4、H5)的标签测序文库, 测序后共获得33 442 600条原始reads, ‘淮稻5号’标准品(H1)和4个供测品种(H2~H5)共5个样品平均测序reads为6 688 520。参照Wang等(2012)的方法对原始reads进行质量控制, 从标准品(H1)和4个供测品种的原始reads中筛选出含有*Bsa*XI酶切位点的高质量reads的比例均在95.57%以上(表1), 测序质量值的均值达到40, 即测序错误率在万分之一以下, 这说明2b-RAD构建的水稻样品测序文库质量达到了测序要求。

在此基础上, 利用Stacks软件对高质量reads进行了聚类分析(Catchen等2011), 结果表明, ‘淮稻5号’标准品(H1)和4个供测品种(H2~H5)文库的平均标签数为97 840, 平均测序深度约为44.2×(表1)。

‘淮稻5号’标准品(H1)和4个供测品种(H2~H5)的系统发育分析、主成分分析(PCA)以及基因型分析结果表明供测品种(H2和H4)与其他供测品种(H3和H5)在基因组水平上存在明显差异(图3和4)。系统进化树分析表明: 供测品种H2和供测品种H4与‘淮稻5号’标准品(H1)以及其他供测品种H3和H5之间的遗传距离远大于‘淮稻5号’标准品(H1)与其他供测品种H3和H5之间的遗传距离(图3-B), 而且‘淮稻5号’标准品(H1)与H3和H5之间的进化差异不明显(图3-A)。PCA是将多个变量通过线性变换以选出较少个数重要变量的一种多元统计分析方法(谭亚芳等2017)。本统计结果中PC1和PC2对差异的贡献率分别为50.88%和35.17%。供测品种(H2和H4)的PCA计算结果(两个重要变量PC1和PC2之和)与‘淮稻5号’标准品(H1)以及其他供测品

表1 ‘淮稻5号’标准品(H1)及4个供测品种2b-RAD测序数据基本分析

Table 1 Basic information of 2b-RAD sequencing data of ‘Huaidao 5’ standard sample (H1) and other four test samples

样品品种	原始reads数	高质量reads数	高质量reads比例/%	标签数	测序深度/×	覆盖度/%	测序质量值
H1	6 688 520	6 424 869	96.06	98 722	45	55.28	40
H2	6 688 520	6 423 957	96.04	100 149	66	56.69	40
H3	6 688 520	6 440 827	96.30	95 356	38	56.14	40
H4	6 688 520	6 474 290	96.80	96 368	37	55.78	40
H5	6 688 520	6 196 804	92.65	98 609	35	55.17	40

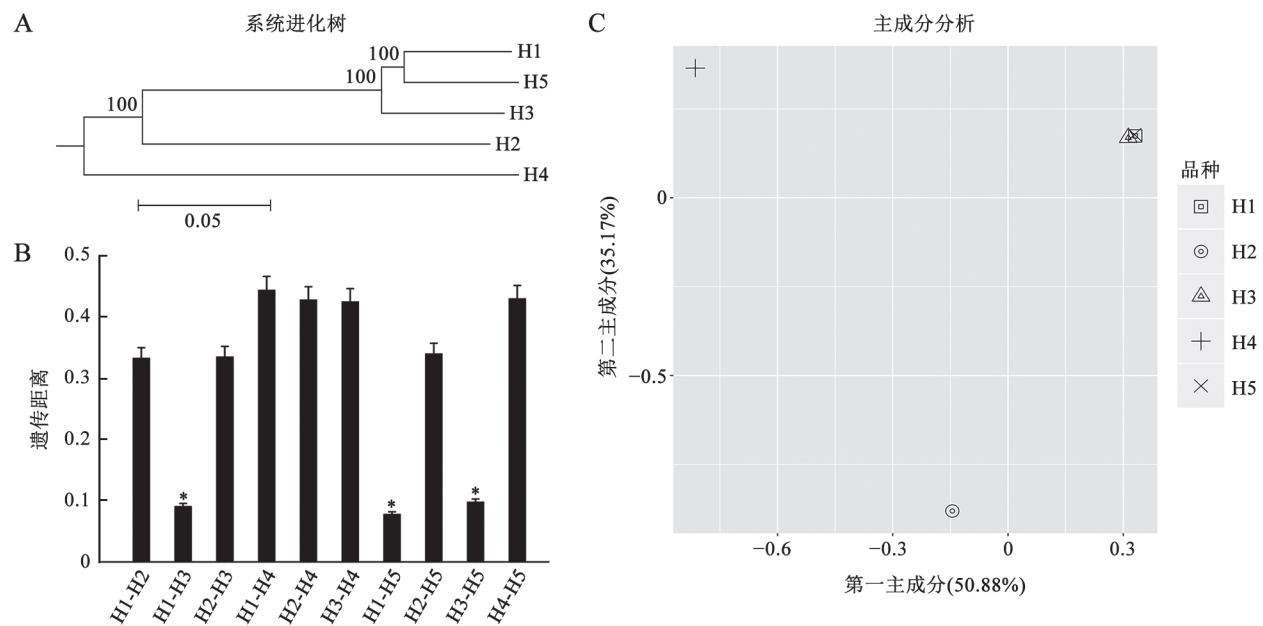


图3 ‘淮稻5号’标准品(H1)及4个供测品种的系统进化分析、遗传距离分析和主成分分析

Fig.3 Phylogenetic tree, genetic distance and PCA analysis among ‘Huaidao 5’ standard sample (H1) and other four test samples

A: 系统进化分析; B: 供测品种间遗传距离分析; C: 主成分分析。

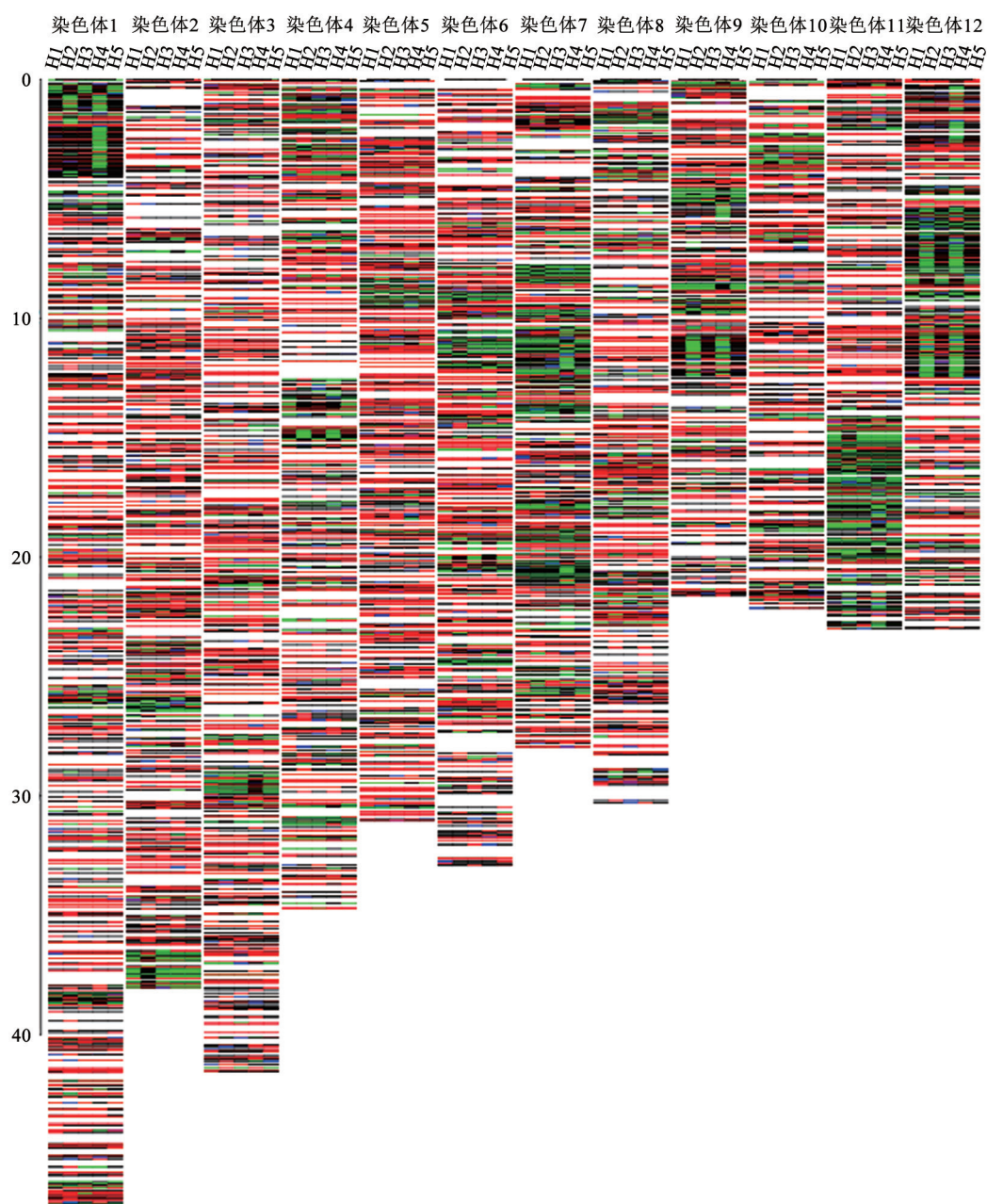


图4 ‘淮稻5号’标准品(H1)及4个供测品种的全基因组水平基因型分析

Fig.4 Genomic-level genotyping analysis of ‘Huaidao 5’ standard sample (H1) and other four test samples

种(H3和H5)之间的PCA计算结果存在明显差异(图3-C)。基因型分析结果表明供测品种(H2和H4)与‘淮稻5号’标准品(H1)以及其他供测品种(H3和H5)在多条染色体上存在明显差异,这种差异可以通过聚类结果图4中显示出来。综上所述,供测品种H2、H4与‘淮稻5号’的遗传产异较大,而供测品种H3和H5是‘淮稻5号’标准品的同源遗传材料。

2.4 利用InDel分子标记进行水稻实际样品检测

我们在实际生产中收集了来自不同地区种植的、以及举报的问题材料共7份,通过利用InDel分子标记chr1_3386-1、chr5_751、chr8_6491-1和chr11_5641-0(表2)对这些实际样品进行‘淮稻5号’真实性检测。PCR产物的PAGE鉴定显示(图5),用InDel分子标记chr1_3386-1和chr5_751检测时,X2

表2 本研究筛选获得的InDel引物信息

Table 2 InDel markers screened in this research

InDel标记名称	染色体	类型	正向引物(5'→3')	正向引物退火温度/°C	反向引物(5'→3')	反向引物退火温度/°C
chr1_3386-1	1	缺失	atcggtagcactaaatcttcc	57	gatagggttttaggttttcgag	58
chr5_751	5	缺失	gagagtattaattgttacggagcc	58	ctctctcataaacatctcatttgg	58
chr8_6491-1	8	插入	tagcctggaacatttttagatagag	57	tgtttatagtgtgttctagacg	58
chr11_5641-0	11	缺失	aactaaaccataagtgcagtagc	57	ctattcactactcaactaccatgctc	56

(白马湖农场02)、X4 (建湖04)、X6 (临海农场06)和X9 (‘日本晴’09)与供测品种H4带型一致; 而用InDel分子标记chr8_6491-1和chr11_5641-0鉴定时, X1 (淮安01)、X4 (建湖04)、X5 (临海农场05)、X6 (临海农场06)、X8 (‘武运粳7号’08)和X9 (‘日本晴’09)的带型与H2和H4一致, 而X2 (白马湖农场02)、X3 (方强农场03)和X7 (临海农场07)的带型与标准品H1相同。说明X3和X7是‘淮稻5号’同一遗传背景材料, 而X1和X5是H2型遗传背景来源的材料, X4和X6是H4来源的遗传材料, X2是另一种遗传背景的材料, 可能是套牌种子, 也可能是其他变异株系。同时, ‘武运粳7号’(X8)和‘日本晴’(X9)也能用这4个分子标记区分开来, 以上结果验证了4个InDel分子标记在实际生产中的实用性。

3 讨论

分子标记技术以遗传物质DNA的多态性为基础, 因多态性高、分布于整个基因组、检测方法简单快速等优点使其在品种真实性鉴定以及种子市场维护中得到了广泛的运用(杨华和毛从亚2016)。本研究利用InDel标记技术以及2b-RAD测序技术, 获得了可以直接应用于‘淮稻5号’品种真

实性鉴定的InDel分子标记, 对‘淮稻5号’品种特异性鉴定、品种权保护以及种子经营市场的监管具有重要意义。

在本研究中, 首先利用的99对InDel分子标记是从17个粳、粳品种的全基因组测序数据分析获得的, 多态性丰富, 可用于粳粳、粳籼和籼籼品种的基因型多态性分析, 具有适用程度高, 覆盖范围广, 鉴定快速高效等特点(Lü等2015)。本文的鉴定结果也说明, 通过实验筛选获得的InDel分子标记chr1_3386-1、chr5_751、chr8_6491-1和chr11_5641-0 (表2)不仅可用于不同亚种间水稻材料的基因型区分, 还可用于不同遗传来源的假冒‘淮稻5号’品种的真实性鉴定(图5); 同时也进一步证明了前期筛选的99对InDel分子标记在不同品种之间基因型多态性分析方面具有广泛的适用性。本研究的实验思路和方法也可在其他水稻品种特异性分子标记筛选和品种真实性鉴定中运用。

与‘淮稻5号’标准品(H1)相比, 4个供测品种在密植条件下无明显的表型差异, 即使在精细种植水平下, H2、H4也只与标准品H1、H3和H5存在分蘖数的差异(图1), 实际样品的检测也进一步证实生产中的确存在假冒伪劣或套牌‘淮稻5号’种子的情况。本研究利用2b-RAD技术进一步分析了供测品种的全基因组水平遗传性分析, 证实供测品种H2和H4在多条染色体, 特别是第8条和第11条染色体上与标准品存在较大基因型差异(图2和4), 暗示与标准品(H1)相比, H2和H4不仅仅只有分蘖数的差异, 其他不可见的生产特性, 如抗逆性和丰产性等方面可能与‘淮稻5号’也存在差异, 大量种植H2和H4基因型品种存在给种植户带来巨大经济损失的潜在风险。另一方面, 从不同地区收集的样品的检测结果进一步说明, 目前不同地区种植的‘淮稻5号’同样存在假冒伪劣、种子窜货或侵权套牌的可能性, 需要在种子生产和市场管理中加强监控。

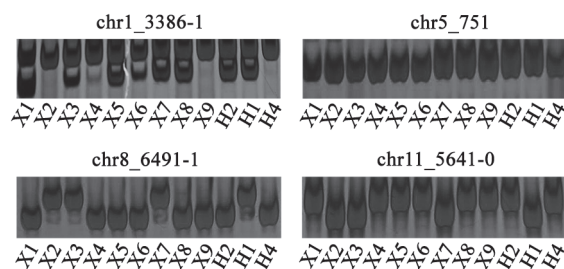


图5 盲样基因型检测

Fig.5 Genotyping analysis in blind samples

测试材料依次为X1: 淮安01; X2: 白马湖农场02; X3: 方强农场03; X4: 建湖04; X5: 临海农场05; X6: 临海农场06; X7: 临海农场07; X8: ‘武运粳7号’08; X9: ‘日本晴’09。

本研究使用的InDel分子标记和2b-RAD技术分别在个别基因位点和全基因组水平上检测了‘淮稻5号’和供测品种的基因型和遗传亲缘性,也进一步证实基于DNA水平的分子标记检测可广泛应用于植物品种真实性鉴定和种子品种权保护。虽然2b-RAD测序结果与InDel检测的结果相比更为全面精细(图3~5),但与InDel分子标记相比,2b-RAD技术的确在测序成本、基因型分析等方面具有费用高和技术门槛高的缺点。而本研究开发的4对InDel分子标记(表2)具有亚种间多态性高、结果可靠且重复性好、操作简单等应用优点,可在‘淮稻5号’品种权保护及种子生产监管中起到重要的作用。

参考文献(References)

- Catchen JM, Amores A, Hohenlohe P, et al (2011). *Stacks*: Building and genotyping loci *de novo* from short-read sequences. *G3* (Bethesda), 1 (3): 171–182
- Chen JF, Yu CF, Huang B, et al (2006). Application of molecular marker technology in classification and identification of parasites. *Prog Vet Med*, 27 (5): 23–27 (in Chinese with English abstract) [陈俊锋, 俞纯方, 黄兵等(2006). 分子标记技术在寄生虫分类鉴定上的应用. *动物医学进展*, 27 (5): 23–27]
- Hu JT, Huang WZ, Yan MJ (2009). Several methods for hybrid rice seed purity identification and the application prospects. *J Anhui Agri Sci*, 37 (4): 1493–1495 (in Chinese with English abstract) [胡景涛, 黄文章, 严明建(2009). 几种杂交水稻种子纯度鉴定的方法及其应用前景. *安徽农业科学*, 37 (4): 1493–1495]
- Huang YH, Du J, Xia T, et al (2014). The application of near infrared spectroscopy in identification of plant species and cultivars. *Chin Agri Sci Bull*, 30 (6): 46–51 (in Chinese with English abstract) [黄艳华, 杜娟, 夏田等(2014). 近红外光谱在植物种及品种鉴定中的应用. *中国农学通报*, 30 (6): 46–51]
- Jia SQ, Guo TT, Liu Z, et al (2014). Feasibility study on an approach for identifying corn kernel varieties with seed coating agents via near infrared spectroscopy. *Spectrosc Spect Anal*, 34 (11): 2984–2988 (in Chinese with English abstract) [贾仕强, 郭婷婷, 刘哲等(2014). 基于近红外光谱的带种衣剂玉米种子真实性鉴定方法研究. *光谱学与光谱分析*, 34 (11): 2984–2988]
- Li HB, Wang S, Ding HM, et al (2017). Development of EST-SSR molecular markers based on transcriptome sequencing of *Camellia oleifera*. *Plant Physiol J*, 53 (7): 1267–1278 (in Chinese with English abstract) [李海波, 王珊, 丁红梅等(2017). 普通油茶转录组EST-SSR分子标记开发. *植物生理学报*, 53 (7): 1267–1278]
- Li MQ, Pan YY, Qian PX, et al (2016). Development of EST-SSR primers for azalea and genetic analysis of cultivars. *Plant Physiol J*, 52 (3): 356–364 (in Chinese with English abstract) [李美芹, 潘叶羽, 钱萍仙等(2016). 杜鹃花EST-SSR标记的开发及遗传多样性分析. *植物生理学报*, 52 (3): 356–364]
- Li QL, Wang YF, Han Q, et al (2016). Development and application of molecular markers for event-specific identification of waxy corn ‘Huwucaihuanuo 1’ based on 2b-RAD technique. *Plant Physiol J*, 52 (5): 669–677 (in Chinese with English abstract) [李全林, 王义发, 韩晴等(2016). 糯玉米‘沪五彩花糯1号’品系特异性2b-RAD分子标记的开发及应用. *植物生理学报*, 52 (5): 669–677]
- Lü Y, Cui X, Li R, et al (2015). Development of genome-wide insertion/deletion markers in rice based on graphic pipeline platform. *J Integr Plant Biol*, 57 (11): 980–991
- Tan YF, Liu J, Wang CH, et al (2017). Sparse controllable principal component analysis method. *Comput Sci*, 44 (1): 243–246 (in Chinese with English abstract) [谭亚芳, 刘娟, 王才华等(2017). 一种稀疏可控的主成分分析方法. *计算机科学*, 44 (1): 243–246]
- Wang HS, Hou L, Chen WB (2009). Comparison of the five population genetics software. *Anhui Agri Sci Bull*, 15 (8): 49–50 (in Chinese with English abstract) [王海山, 侯林, 陈文博(2009). 五种群体遗传学软件比较. *安徽农学通报*, 15 (8): 49–50]
- Wang S, Meyer E, McKay JK, et al (2012). 2b-RAD: a simple and flexible method for genome-wide genotyping. *Nat Methods*, 9 (8): 808–810
- Yan JY, Ma CQ, Chang B, et al (2017). A modified CTAB method for genomic DNA extraction from apple fruit. *Mol Plant Breed*, 15 (9): 3610–3615 (in Chinese with English abstract) [闫玖英, 马长青, 常博等(2017). 改良CTAB法用于苹果果实基因组DNA的提取. *分子植物育种*, 15 (9): 3610–3615]
- Yang H, Mao CY (2016). Several methods of establishing the authenticity molecular authentication platform in Jiangsu province. *Seed World*, (6): 9–10 (in Chinese with English abstract) [杨华, 毛从亚(2016). 江苏省搭建品种真实性分子鉴定平台的几点做法. *种子世界*, (6): 9–10]
- Yang J, He J, Wang DB, et al (2016). Progress in research and application of InDel markers. *Biodiv Sci*, 24 (2): 237–243 (in Chinese with English abstract) [杨洁, 赫佳, 王丹碧等(2016). InDel标记的研究和应用进展. *生物多样性*, 24 (2): 237–243]
- Yang K, Zhang ZL (2016). The effect of different sowing time on the live rice paddy rice Huai 5. *Mod Agric Sci Technol*, (4): 30–37 (in Chinese with English abstract) [杨彪, 张忠良(2016). 不同播期对直播水稻淮稻5号的影响. *现代农业科技*, (4): 30–37]
- Yuan CY, Yuan ST, Wen ZH, et al (2002). Characteristics and high yield cultivation techniques of Huai5. *Chin Rice*, 8

(4): 14 (in Chinese with English abstract) [袁彩勇, 袁生堂, 文正怀等(2002). 淮稻5号的特征特性及高产栽培技术. 中国稻米, 8 (4): 14]
Zhang HN, Qi XL, Shen XP, et al (2016). Research advance

on origin and evolution of watermelon. Chin Agri Sci Bull, 32 (35): 232–236 (in Chinese with English abstract) [张慧娜, 齐秀玲, 申晓萍等(2016). 西瓜起源与演化研究进展. 中国农学通报, 32 (35): 232–236]

Development and application of variety-specific molecular markers in authenticity identification of *japonica* rice ‘Huaidao 5’

GU Wei-Hang¹, TIAN Jia-Qi¹, ZHU Ming-Chao^{2,*}, WEN Zheng-Huai², YAN Wei-Gu²,
WANG Xing-Long³, ZHANG Da-Bing^{1,3}, YUAN Zheng^{1,3,*}

¹School of Life Sciences and Biotechnology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

²Huaiyin Institute of Agricultural Science of Xuhuai Region in Jiangsu, Huaian Academy of Agricultural Sciences, Huaian, Jiangsu 223001, China

³Key Laboratory of Crop Marker-Assisted Breeding of Huaian Municipality, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture and Environmental Protection, Jiangsu Tianfeng Seed Company, Huaian, Jiangsu 223001, China

Abstract: ‘Huaidao 5’ is one of the best-welcomed rice varieties with advantage of strong lodging resistance, high and stable yield, and high grain quality etc. In Jiangsu province, the planting area of ‘Huaidao 5’ is always higher than other varieties since it had been authorized by the local government. Therefore, it is important to develop and apply variety-specific molecular markers in authenticity identification of ‘Huaidao 5’ due to economic and intellectual property value. In this study, we screened and obtained 4 pairs of InDel markers, chr1_3386-1, chr5_751, chr8_6491-1 and chr11_5641-0 from our 99 pairs InDel markers pool to perform genotyping analysis on standard ‘Huaidao 5’ (H1) and other four test samples (H2–H5), whose growth phenotypes seem identical to H1 under natural planting condition. To further validate our InDel genotyping results, we employed 2b-RAD sequencing technique to detect the genomic-level DNA polymorphisms in H1–H5 samples. It’s not surprising to find that consistent to the InDel markers analysis data, the H2 and H4 varieties have different DNA polymorphisms compared to that of H1, H3 and H4 varieties although they have similar growth phenotypes. Furthermore, we applied these four InDel markers to perform blind samples detection, including different ‘Huaidao 5’ samples collected from different planting areas of Jiangsu province and wild type varieties such as ‘Wuyungene 7’ etc. And the results further confirmed that the four InDel markers we developed in this study could be used for authenticity identification of the ‘Huaidao 5’. Therefore, our results provide theoretical evidences and technical supports for seed quality monitoring and variety rights protection of the ‘Huaidao 5’.

Key words: ‘Huaidao 5’; molecular markers; InDel; 2b-RAD; authenticity

Received 2017-11-20 Accepted 2017-12-29

This work was supported by National Key Research and Development Program of China (2016YFD0101107) and Project on Breeding from Shanghai Municipal Agriculture Commission (2017-3).

*Co-corresponding authors: Zhu MC (574937902@qq.com), Yuan Z (zyuan@sjtu.edu.cn).