

利用 SSR 荧光标记鉴定玉米杂交种纯度的研究

尹祥佳¹ 焦珍珍² 赵慧军¹ 李艳玫¹ 贾国军¹ 郝楠¹ 南铭³ 李世风⁴ 张东峰²

(¹ 兰州职业技术学院, 兰州 730070; ² 北京通州国际种业科技有限公司, 北京 101100;

³ 定西市农业科学研究院, 甘肃定西 743000; ⁴ 甘肃省敦煌种业股份有限公司, 酒泉 735000)

摘要: 玉米种子作为我国种业的主导产品, 种子质量直接影响着玉米生产的产量和质量。为有效开展玉米种子纯度鉴定研究, 选用甘肃推广的 5 份玉米杂交种, 采用 15 个单株混合取样提取 DNA 的方法, 用 4 种荧光标记的 20 对 SSR 核心引物, 筛选出了 7 对引物, 分别为 bnlg439w1、umc1705w1、umc2007y4、umc1506k12、bnlg2291k4、phi080k15、umc2015k3。纯度鉴定研究结果在 96.88%~98.44% 之间, 达到了国家规定的 96% 的玉米杂交种纯度标准。为快速鉴定玉米杂交种纯度提供了参考, 为逐步完善玉米纯度鉴定方法奠定了基础。

关键词: SSR 荧光标记; 玉米纯度; 鉴定研究

玉米是第一个成功利用杂种优势的作物, 也是利用杂种优势面积最大的作物^[1]。2017 年我国玉米播种面积 3544.5 万 hm^2 , 总产量 2158.9 亿 kg ^[2], 成为近 10 年来种植面积和产量增加最多、最快的农作物^[3], 播种面积和产量均居我国四大作物之首。国内 90% 以上的玉米生产用种是单交种^[4], 近年来国内玉米新品种种类较多, 2017 年就有国审玉米品种 171 个, 国家完成统一试验程序的品种 302 个, 联合体 292 个、绿色通道 278 个、引种备案玉米品种 861 个。因此, 玉米种子作为我国种业的主导产品, 杂交种质量好坏直接影响玉米大田生产、新品种市场规模及种子企业的经济效益^[5]。

玉米种子的纯度是质量监管的重要指标之一。快速、标准的玉米种子质量检测方法是保护农民利益、维护育种家权益的重要措施^[6]。传统的玉米种子纯度鉴定主要有形态鉴定、同工酶和贮藏蛋白质电泳技术, 但由于多态性有限, 随着玉米品种数量逐年增多, 特别是大量近似品种的存在, 难以做出有效鉴定^[7]。DNA 是生物遗传信息的直接载体, 分子标记是以个体间遗传物质内核苷酸序列变异为基础的标记, 是 DNA 水平遗传多态性的直接反映^[8]。分子标记主要有限制性片段长度多态性 (RFLPs)、

随机扩增多态性 (RAPDs)、扩增片段长度多态性 (AFLPs)、单核苷酸多态性 (SNP) 和简单序列重复 (SSRs)。简单序列重复具有技术简单、结果可靠、重复性好、共显性遗传、可区分杂合子和纯合子等众多优点在玉米种子纯度鉴定中有着广泛的应用^[9]。目前, SSRs 分析大多用 PAGE 胶分离银染检测, 试验存在耗时、耗力、非自动化, 不适用大规模、多批次的数据收集和分析等问题。SSR 荧光标记技术因具有高效、精确、灵敏、自动化的优点, 主要应用于玉米品种的遗传分析, 但用于鉴定玉米杂交种纯度的文献报道很少^[10-11], 因此, 本研究利用 SSR 荧光标记技术对 5 个推广的玉米杂交种进行了纯度鉴定研究, 研究结果可为 SSR 荧光标记快速鉴定玉米杂交种纯度提供参考依据, 为逐步完善玉米纯度鉴定方法奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料 金穗 1203、金艾 130、武科 8 号、方玉 36 和甘玉 801 共计 5 份玉米杂交种, 购于甘肃省农科院农资市场。

1.2 SSR 标记引物 SSR 标记引物参考《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》(NY/T 1432-2014), 以及 George 等^[12]、Kahler 等^[13]、王风格等^[14]、吴金凤^[15]和兰琴英等^[16]报道的文献, SSR 引物的 5' 端分别用 NED、PET、FAM、VIC 等进行荧光标记 (Applied Biosystems, USA 公司合成), 20 对核心引物信息见表 1。

基金项目: 兰州市科技计划项目 (2016-3-15); 兰州职业技术学院 2017 年院内科研项目 (2017XY-25)

焦珍珍为并列第一作者

通信作者: 张东峰

表 1 20 对引物信息

编号	引物名称	重复序列	染色体位置	引物序列(5' -3')	荧光类型	等位基因变异范围
P01	bnlg439w1	(CT)	1.03	F : AGTTGACATCGCCATCTTGGTGAC R : GAACAAGCCCTTAGCGGGTTGTC	NED	319~382
P02	umc1335y5	(AG)	1.06	F : CCTCGTTACGGTTACGCTGCTG R : GATGACCCCGCTTACTTCGTTTATG	PET	232~257
P03	umc2007y4	(TC)	2.04	F : TTACACAACGCAACACGAGGC R : GCTATAGGCCGTAGCTTGGTAGACAC	FAM	238~298
P04	bnlg1940k7	(CT)	2.08	F : CGTTTAAGAACGGTTGATTGCATTCC R : GCCTTTATTTCTCCCTTGCTTGCC	PET	334~388
P05	umc2015k3	(AG)	3.00	F : GAAGGGCAATGAATAGAGCCATGAG R : ATGGACTCTGTGCGACTTGTACCG	PET	287~354
P06	phi053k2	(GTAT)	3.05	F : CCCTGCCTCTCAGATTGAGAGATTG R : TAGGCTGGCTGGAAGTTTGTTC	NED	332~367
P07	phi072k4	(TGTT)	4.01	F : GCTCGTCTCCTCCAGGTCAGG R : CGTTGCCCATACATCATGCCTC	VIC	409~434
P08	bnlg2291k4	(AG)	4.06	F : GCACACCCGTAGTAGCTGAGACTTG R : CATAACCTTGCTCCCAAACCC	VIC	364~420
P09	umc1705w1	(CT)	5.03	F : GGAGGTCGTGAGATGGAGTTCG R : CACGTACGGCAATGCAGACAAG	VIC	266~335
P10	bnlg2305k4	(GA)	5.07	F : CCCCTCTTCCTCAGCACCTTG R : CGTCTTGTCTCCGTCCGTGTG	NED	243~314
P11	bnlg161k8	(AG)	6.00	F : TCTCAGCTCCTGCTTATTGCTTTTCG R : GATGGATGGAGCATGAGCTTGC	VIC	144~220
P12	bnlg1702k1	(CT)	6.05	F : GATCCGCATTGTCAAATGACCAC R : AGGACACGCCATCGTCATCA	VIC	263~327
P13	umc1545y2	(AAGA)	7.00	F : AATGCCGTTATCATGCCATGC R : GCTTGCTGCTTCTTTAATTGCGT	NED	190~248
P14	umc1125y3	(CTCG)	7.04	F : GGATGATGGCGAGGATGATGTC R : CCACCAACCCATACCCATACCAG	VIC	144~174
P15	bnlg240k1	(GA)	8.06	F : GCAGGTGTCGGGGATTTTCTC R : GGAAGTGAAGAACAGAAGGCATTGATAC	PET	220~246
P16	phi080k15	(GGAGA)	8.08	F : TGAACCAACCCGATGCAACTTG R : TTGATGGGCACGATCTCGTAGTC	PET	200~233
P17	phi065k9	(GTGAA) (GTGCA)	9.03	F : CGCCTTCAAGAAATATCCTTGTGCC R : GGACCCAGACCAGTTCCACC	NED	391~415
P18	umc1492y13	(GCA)	9.04	F : GCGGAAGAGTAGTCGTAGGGCTAGTGTAG R : AACCAAGTCTTCAGACGCTTCAGG	PET	272~302
P19	umc1432y6	(TC)	10.02	F : GAGAAATCAAGAGTGCGAGCATC R : GGCCATGATACAGCAAGAAATGATAAGC	PET	216~264
P20	umc1506k12	(TTTG)	10.05	F : GAGGAATGATGTCCGCGAAGAAG R : TTCAGTCGAGCGCCCAACAC	FAM	166~196

1.3 试验方法 基因组 DNA 提取。采取改良的 CTAB 法提取基因组 DNA:取种子发芽长出的新叶按顺序放到 2mL 96 深孔板中,加 2 颗 3mm 钢珠,将采集好的样品放到冻干机里进行冻干干燥 20~24h 后加 600 μ L CTAB,盖上硅胶盖,研磨 3min,取出看是否磨碎,根据情况可再研磨 2~5min;将研磨好的深孔板放到离心机中,4000r/min 离心 2min;75 $^{\circ}$ C 烘箱放置 30min,每 10min 轻轻摇动 1 次;冷却后,加 600 μ L 氯仿抽提,恒温振荡培养箱 25 $^{\circ}$ C,摇匀 5min;4000r/min 离心 10min,取 300 μ L 上清液移至新的 1.2mL 96 深孔板;向上清液中加入 0.7 倍体积的冰异丙醇沉降 DNA,加盖硅胶盖后放置 -20 $^{\circ}$ C 条件下 15~30min;4000r/min 离心 10min,去上清,然后加入 200 μ L 75% 的乙醇,4000r/min 离心 10min,去上清后晾干;加入 50 μ L ddH₂O 溶解。DNA 质量和浓度用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific)紫外分光光度计进行测定,然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,调节工作液浓度。

SSR 荧光标记引物筛选。根据相关文献^[17-18]报道的玉米群体遗传多样性研究的取样技术,采用每份样品随机选取 15 粒种子培养成单株取样组成一个混合样本的方法提取 DNA 作为引物筛选 PCR 扩增模板。从 20 对引物中随机选取 10 对核心引物。PCR 反应在 Veriti 96 well Thermalcycler (Eppendorf) 上进行。PCR 反应体系为 10 μ L,其中,DNA (50ng/ μ L) 2 μ L,2xMix5.0 μ L,Left primer (10 μ mol/L) 0.1 μ L,Right primer (10 μ mol/L) 0.1 μ L,ddH₂O 2.8 μ L。PCR

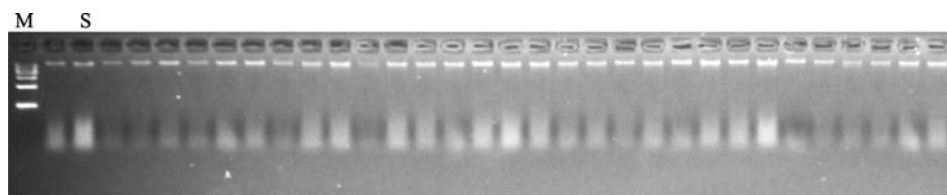
反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 10min,95 $^{\circ}$ C 变性 20s,60 $^{\circ}$ C 复性 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 终延伸 10min,4 $^{\circ}$ C 循环,复性温度根据不同引物进行调整。反应完后取 PCR 产物 1 μ L,加入甲酰胺 (HIDI) 8.9 μ L,分子量内标 LIZ0.1 μ L 混匀后在 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 变性 5min,于 4 $^{\circ}$ C 保存 10min,2000r/min 离心 1min,用 ABI3730XL (Applied Biosystems) DNA 分析仪对 PCR 产物进行自动荧光检测。

SSR 荧光标记纯度鉴定。每份杂交玉米种随机取 96 粒种子作为纯度鉴定样品,单独提取 DNA,用筛选的具有多态性的 2 对荧光标记核心引物分别进行 PCR 反应,用 ABI3730XL (Applied Biosystems) DNA 分析仪对 PCR 产物进行自动荧光检测。

数据分析统计。采用 Data Collection v3.0 软件整理数据,用 Gene Marker 2.2.0 软件确定分子量。将毛细管电泳检测所得的 SSR 扩增片段信息输入 Microsoft Excel,计算玉米杂交种的纯度,公式为 $P(\%) = (NT - ND) / NT \times 100$,其中,P 为种子纯度,NT 为供检种子数,ND 为杂交种子数。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取质量分析 用 NanoDrop2000 (Thermo Scientific)紫外分光光度计测定提取的玉米杂交种基因组 DNA 浓度,并调节浓度为 50ng/ μ L,然后用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,检测结果见图 1,结果表明,提取的玉米基因组 DNA 主带清晰一致,适合进一步的 SSR-PCR 分析。



M: DL2000 marker; S: 玉米杂交种样品

图 1 玉米基因组 DNA 检测结果

2.2 SSR 荧光标记引物筛选结果 采用了 15 个单株混合取样的方法,随机选取引物 P01、P03、P05、P08、P09、P11、P13、P16、P17、P20 等 10 对 SSR 荧光标记引物分别对金穗 1203、金艾 130、武科 8 号、方玉 36 和甘玉 801 等 5 份玉米品种进行多态性引物筛选,筛选结果见图 2~6。SSR 荧光标记引物筛选

的 3 个原则:一是具有双峰;二是峰值尽量单一、清晰;三是双峰的峰值差异不大。根据引物筛选原则,各筛选出了鉴定 5 份玉米品种纯度的 2 对 SSR 荧光标记引物,共筛选出了 7 对引物,分别为 bnlg439w1、umc1705w1、umc2007y4、umc1506k12、bnlg2291k4、phi080k15、umc2015k3 (表 2)。

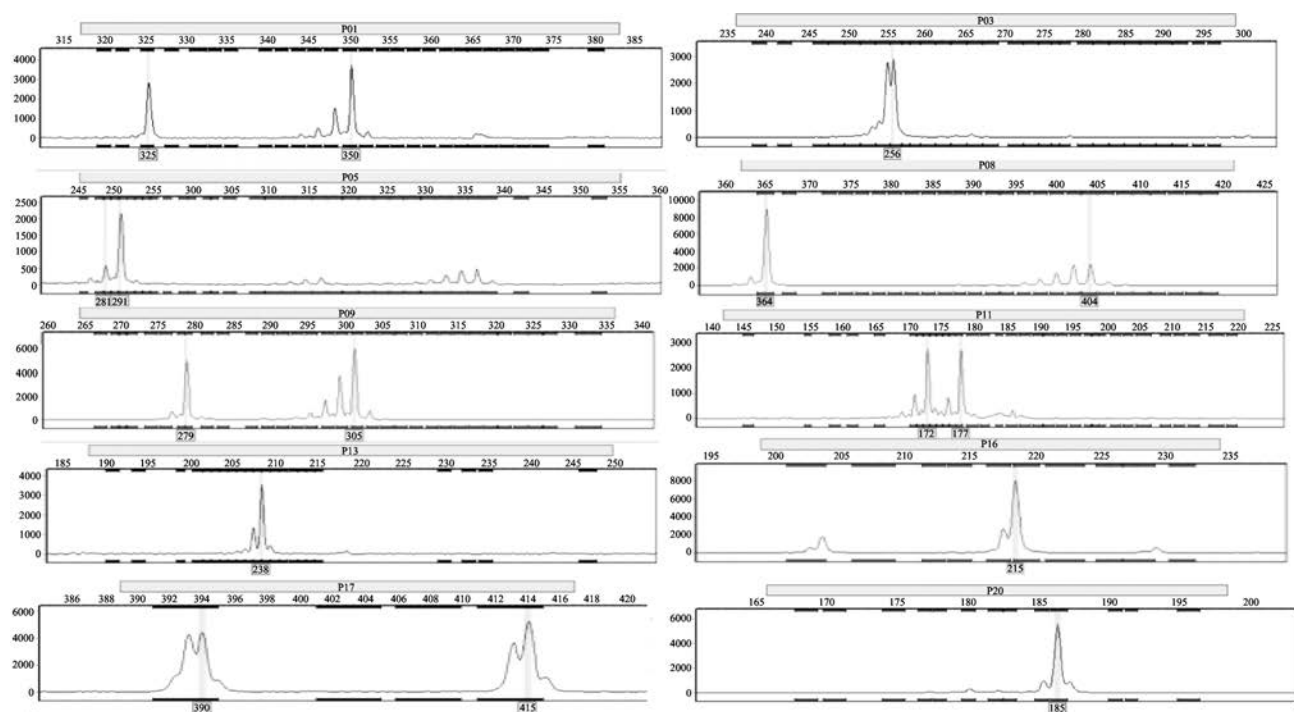


图2 金穗 1203 玉米品种 SSR 引物筛选结果

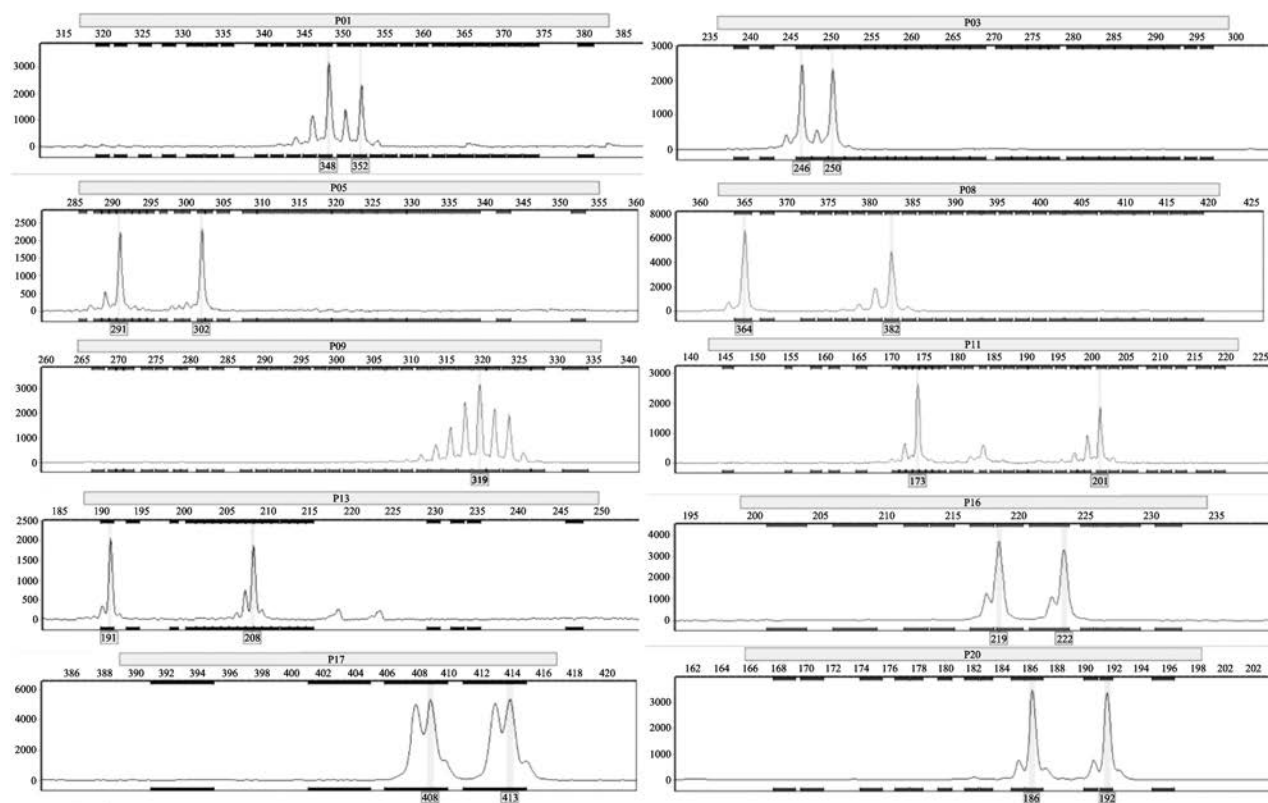


图3 金艾 130 玉米品种 SSR 引物筛选结果

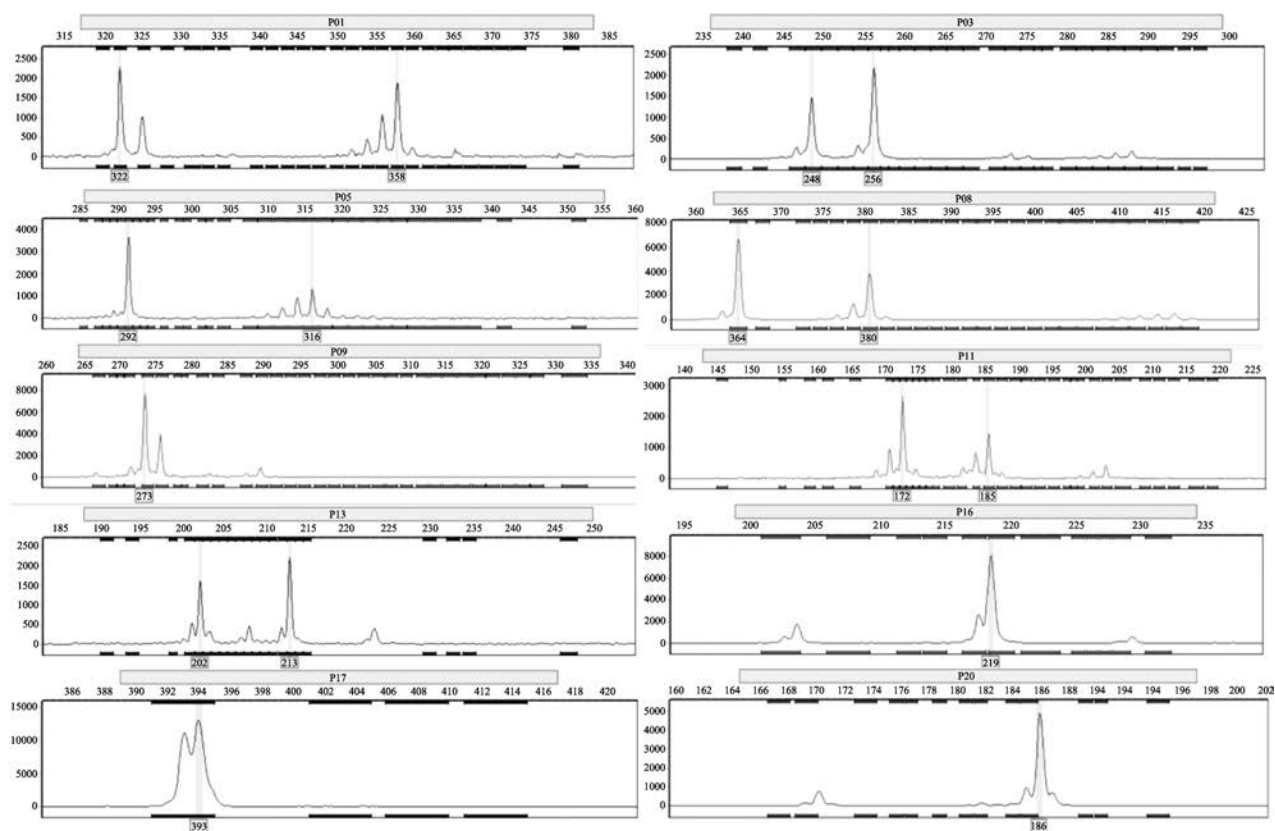


图4 武科8号玉米品种 SSR 引物筛选结果

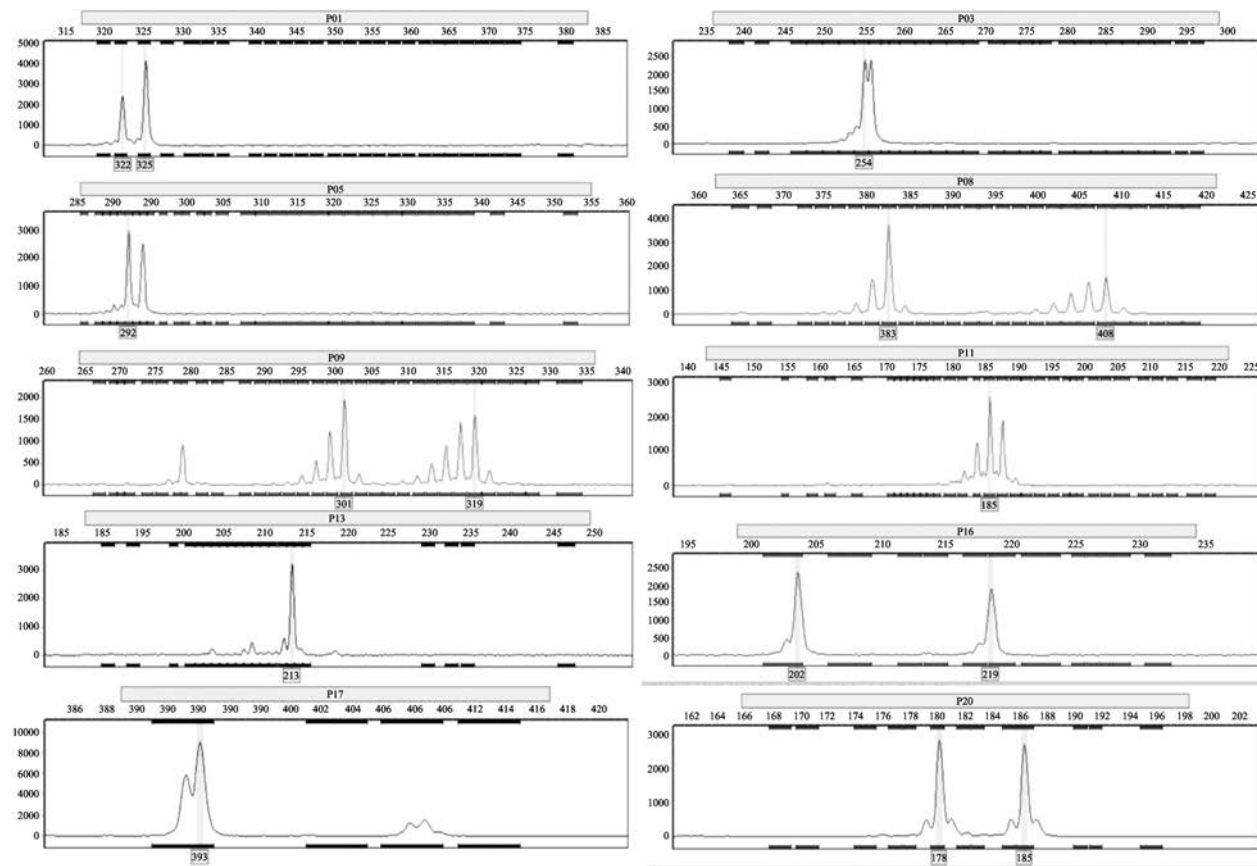


图5 方玉36玉米品种 SSR 引物筛选结果

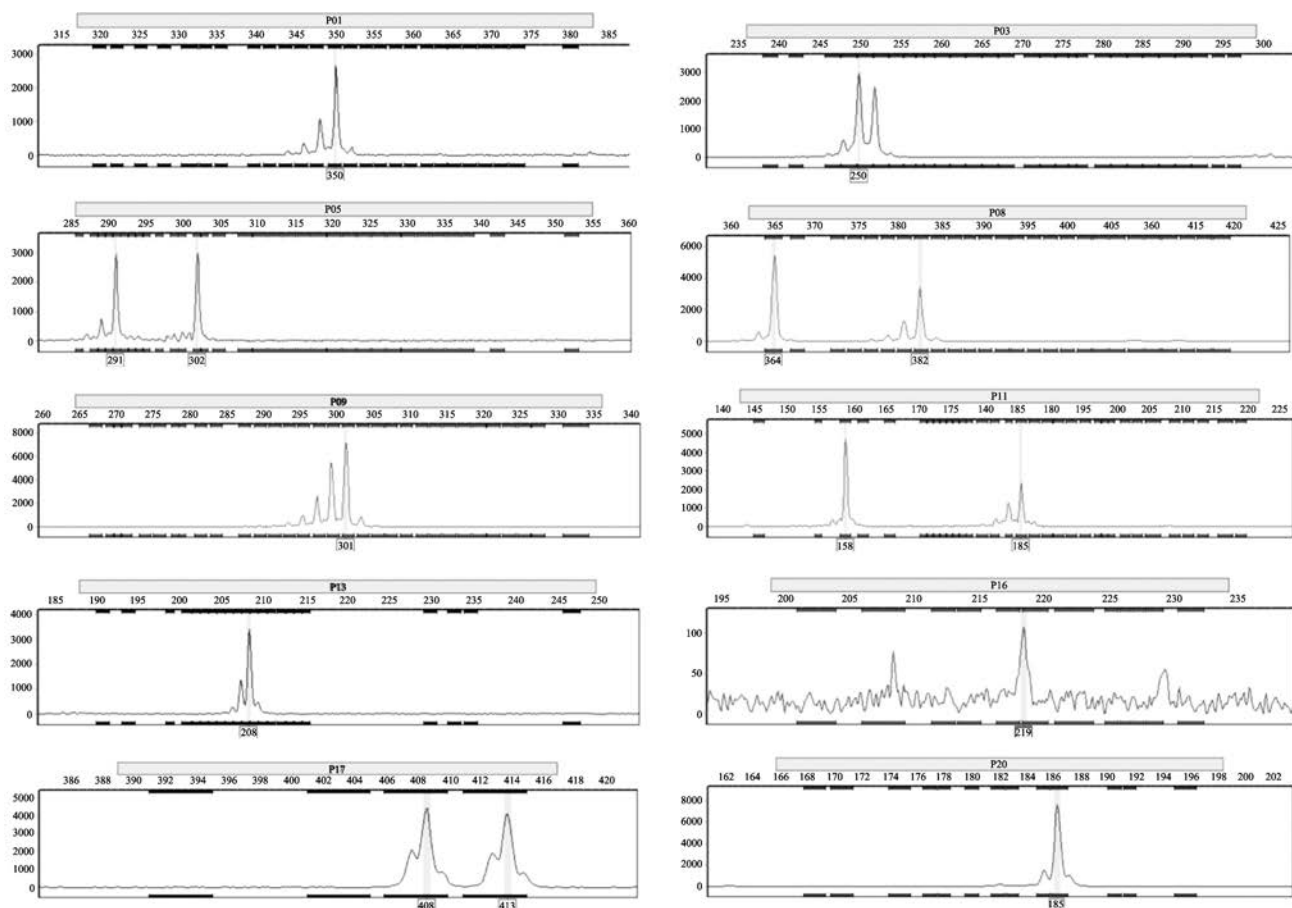


图6 甘玉801玉米品种SSR引物筛选结果

表2 鉴定5份玉米品种纯度的引物

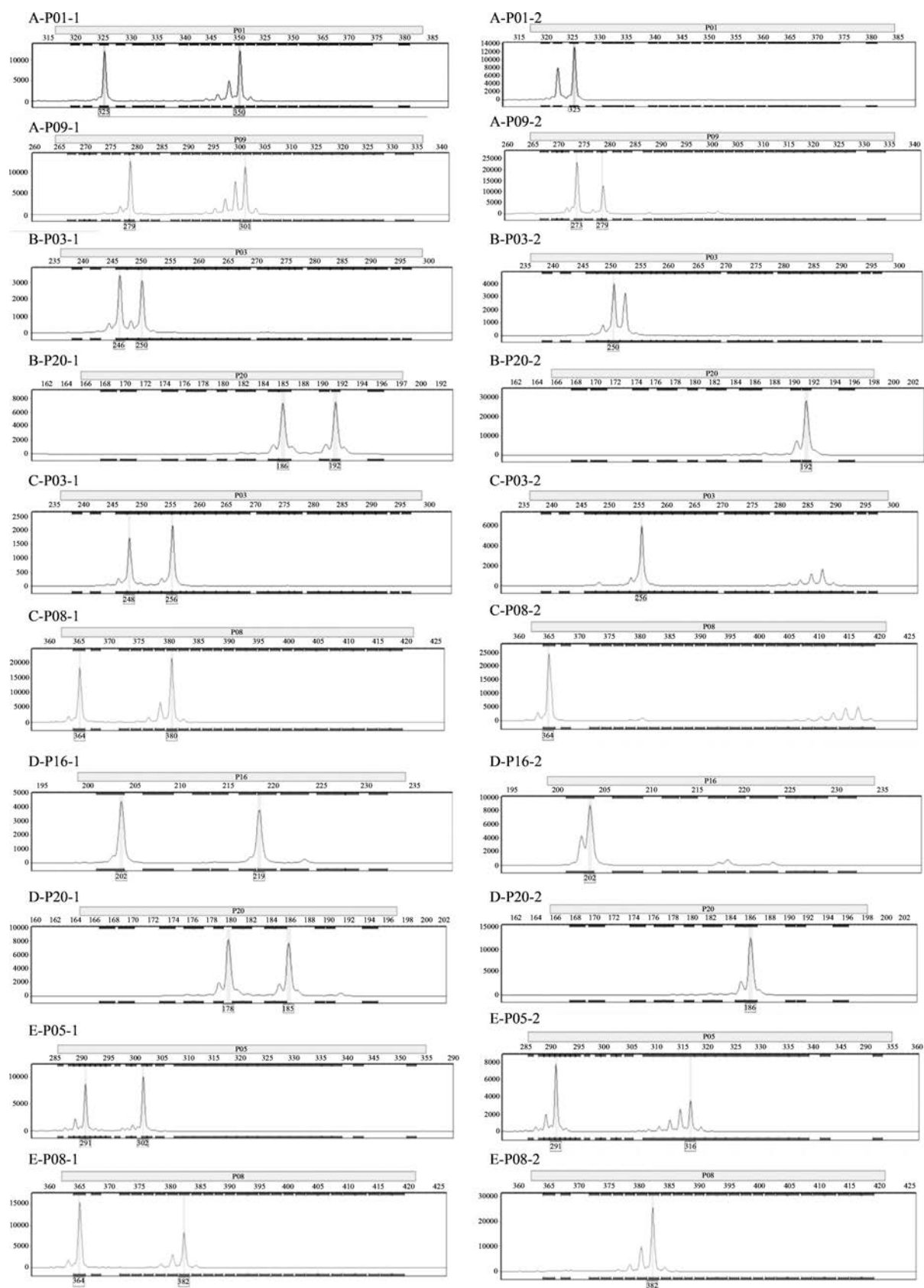
编号	玉米品种	引物名称	荧光类型	等位基因变异范围
A	金穗1203	P01	NED	319~382
		P09	VIC	266~335
B	金艾130	P03	FAM	238~298
		P20	FAM	166~196
C	武科8号	P03	FAM	238~298
		P08	VIC	364~420
D	方玉36	P16	PET	200~233
		P20	FAM	166~196
E	甘玉801	P05	PET	287~354
		P08	VIC	364~420

2.3 SSR荧光标记纯度鉴定结果 每份玉米品种随机选取96粒种子样品单独提取基因组DNA作为PCR扩增模板,根据筛选出的2对荧光标记引物进行了纯度鉴定,若鉴定结果峰图是双峰,且是引物筛选的峰值,则判断为是杂交种;若结果是双峰,但有一个位点是筛选的峰值,另一个位点是非峰值,则判断为是异交种;若结果是双峰,但2个位点都不是

引物筛选时的峰值,则判断为是杂株;若2个引物在该位点都是单峰,且峰值是引物筛选中的一个峰值,则判断为是自交种。鉴定部分结果见图7,纯度值在96.88%~98.44%之间(表3),达到了96%的玉米杂交种纯度国家标准。

3 结论与讨论

玉米中SSR多态性标记极为丰富,利用SSR分子标记技术可检测玉米染色体上不同位点的简单重复序列多态性,能够有效鉴定杂交种的纯度。玉米杂交种纯度鉴定需要用特异引物或引物组合来完成自交苗和异型株检测区分,因此,引物的筛选就显得尤为重要。朱盛安等^[19]利用50对SSR引物对收集到的18个玉米杂交种及其亲本进行SSR标记分析,筛选了一套玉米杂交种纯度鉴定的核心SSR引物。刘文彬等^[20]分别用Qiagen和ABI3730两种DNA分析仪,从111对新型玉米SSR引物中筛选出多态性高、稳定性好、适于自动化分型的9对引物。冯博等^[21]确定京科968玉米品种纯度鉴定的SSR荧光



A-P01-1、A-P09-1、B-P03-1、B-P20-1、C-P03-1、C-P08-1、D-P16-1、D-P20-1、E-P05-1、E-P08-1 分别表示 5 个玉米品种杂交种鉴定峰图；

A-P01-2、A-P09-2、B-P03-2、B-P20-2、C-P03-2、C-P08-2、D-P16-2、D-P20-2、E-P05-2、E-P08-2 表示自交种、异交种或杂株

图 7 SSR 荧光标记鉴定玉米品种纯度的部分结果

表3 玉米品种纯度鉴定结果

编号	玉米品种	引物名称	纯度(%)	平均值(%)
A	金穗 1203	P01	95.83	96.88
		P09	97.92	
B	金艾 130	P03	96.88	96.88
		P20	96.88	
C	武科 8 号	P03	96.88	97.40
		P08	97.92	
D	方玉 36	P16	97.92	98.44
		P20	98.96	
E	甘玉 801	P05	96.88	97.92
		P08	98.96	

标记引物组合。本试验在 20 对 SSR 核心引物中分别筛选到了鉴定 5 个推广玉米品种的 7 对纯度鉴定引物,使用高分辨率的 ABI3730xI DNA 分析仪进行了纯度鉴定。选用 4 种荧光标记,根据峰值来判断引物相对扩增效率,且通量较高,数据分析简便。能够有效克服聚丙烯酰胺凝胶电泳带来的操作较为繁琐、耗时长、通量低、不适于大量引物的筛选鉴定问题。

SSR 荧光标记应用于鉴定玉米品种纯度,可以大大缩短种子纯度的检测时间,及时确定不同玉米品种种子质量,主要表现在 3 个方面:一是玉米种业企业可以准确快速检测玉米种子的纯度,保证种子的真实性,可以建立起玉米种业企业的制种质量监控体系,有效促进玉米田间制种技术规程的使用效果,严格做好去杂和去雄的工作;二是农业农村部植物新品种保护办公室在受理玉米新品种保护时,利用 SSR 荧光标记帮助做好 DUS 测试,给申请品种一个身份权利保护标识,加强玉米新品种保护的效力;三是在每年各级种子管理部门的种子市场执法检查时可以快速对种子纯度进行检测,以此来保护农户的权益,保障玉米生产安全。

本研究选用甘肃推广的金穗 1203、金艾 130、武科 8 号、方玉 36 和甘玉 801 等 5 个玉米杂交种,采用 15 个单株混合取样法提取 DNA 作为荧光标记引物筛选 PCR 扩增模板,筛选了 7 对 SSR 荧光标记引物并进行了纯度鉴定研究,结果表明,纯度值在 96.88%~98.44% 之间,达到了 96% 的玉米杂交种纯度国家标准。研究结果为应用 ABI3730XL DNA 分析仪快速鉴定玉米杂交种纯度提供了参考,同时为逐步完善玉米纯度鉴定方法奠定了基础。

参考文献

- [1] 彭倩,薛亚东,张向歌,等. 利用单片段代换系测交群体定位玉米产量相关性状的杂种优势位点[J]. 作物学报,2016,42(4): 482-491
- [2] 刘笑然,曹乐乐,张波. 2017/2018 年度我国玉米市场前期分析与后期展望[J]. 中国粮食经济,2018(5): 44-49
- [3] 韩国明,朱侃,黄雪松. 玉米种植时空变迁与供给侧结构性改革研究[J]. 东北农业大学学报:社会科学版,2018,16(2): 1-11
- [4] 张振良,郝德荣,陈国清,等. 利用 SSR 标记鉴定苏玉 30 杂交种遗传纯度研究[J]. 中国农学通报,2016,32(3): 86-90
- [5] 孙卫永,尹航,郝德荣. 玉米杂交种生产中存在的主要问题及关键措施[J]. 中国种业,2015(5): 17-20
- [6] 盖树鹏,盖伟玲,黄进勇. SSR 与 SRAP 标记在玉米品种鉴定中的比较研究[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(3): 486-472
- [7] 盖树鹏,盖伟玲,王日新. 6 个玉米杂交种种子纯度的 SSR 鉴定[J]. 种子,2010,29(7): 44-47
- [8] 赵久然,王风格,易红梅,等. 我国玉米品种标准 DNA 指纹库构建研究及应用进展[J]. 作物杂志,2015(2): 1-6
- [9] 关淑艳,董昭旭,李晖,等. 生物技术在玉米育种中的应用[J]. 吉林农业大学学报,2016,38(2): 127-137
- [10] 赵久然,李春辉,宋伟,等. 利用 SSR 标记解析京科 968 等系列玉米品种的杂优模式[J]. 玉米科学,2017,25(5): 1-8
- [11] 张全芳,梁水美,李燕,等. 基于荧光 SSR 标记的玉米自交系遗传结构解析[J]. 植物遗传资源学报,2017,18(1): 19-31
- [12] George M L C,Regalado E,Li W,et al. Molecular characterization of Asian maize inbred lines by multiple laboratories[J]. Theor Appl Genet,2004,109(1): 80-91
- [13] Kahler A L,Kahler J L,Thompson S A,et al. North American study on essential derivation in maize: II. selection and evaluation of a panel of simple sequence repeat loci[J]. Crop Sci,2010,50(2): 486-503
- [14] 王风格,杨扬,易红梅,等. 中国玉米审定品种标准 SSR 指纹库的构建[J]. 中国农业科学,2017,50(1): 1-14
- [15] 吴金凤. 利用 SSR 和 SNP 标记研究玉米自交系的遗传多样性[D]. 长春:吉林农业大学,2014
- [16] 兰琴英,陈泽辉,祝云芳,等. 优良玉米杂交种金玉 818 指纹图谱构建及其纯度鉴定[J]. 贵州农业科学,2015,43(6): 1-6
- [17] Dubreuil P,Warburton M,Chastanet M,et al. More on the introduction of temperate maize into Europe: large-scale bulk SSR genotyping and new historical elements[J]. Maydica,2006,51(2): 281-291
- [18] 刘晓鑫. 中国玉米地方品种遗传多样性研究[D]. 长春:吉林农业大学,2015
- [19] 朱盛安,李璐,孔祥云,等. SSR 标记检验玉米杂交种子纯度核心引物的构建[J]. 种业导刊,2017(11): 20-24
- [20] 刘文彬,许理文,王风格,等. 基于两种荧光毛细管电泳平台筛选评估玉米新型 SSR 引物[J]. 玉米科学,2017,25(2): 24-30
- [21] 冯博,许理文,王风格,等. 玉米品种京科 968 纯度鉴定引物的确定[J]. 分子植物育种,2017,15(11): 4688-4694

(收稿日期: 2018-07-10)