

利用芯片毛细管电泳检测技术鉴定玉米种子纯度的研究

于滔^{1,2,3} 曹士亮^{1,2,3} 张建国^{2,3} 扈光辉^{2,3} 王成波^{2,3} 曹靖生^{2,3} 刘宝民^{2,3}

(¹ 黑龙江省农业科学院博士后科研工作站, 哈尔滨 150086; ² 黑龙江省农业科学院玉米研究所, 哈尔滨 150086;

³ 农业部东北北部玉米生物学与遗传育种重点实验室, 哈尔滨 150086)

摘要: 选用玉米杂交种先玉 335、郑单 958 及其亲本自交系 PH6WC、PH4CV、郑 58 和昌 7-2 作为试验材料, 采用 SSR 检测技术结合芯片毛细管电泳检测技术, 筛选出适用于鉴定先玉 335 和郑单 958 种子纯度的特异引物 umc2105、bnlg2291、bnlg161。

关键词: 玉米; 芯片; 毛细管电泳; 纯度

玉米(*Zea mays* L.)是我国第一大粮食作物, 2016 年总产量高达 2.2 亿 t。近年来, 随着我国种业市场的快速发展, 玉米种子作为我国种业的主导产品, 其杂交种质量的好坏直接影响玉米大田生产、新品种市场规模、种子企业及农民的经济效益^[1], 玉米种子纯度鉴定也已经成为种子质量检测的核心指标。因此, 加强玉米种子纯度鉴定的标准化对于保证种子质量、保护农民利益、维护育种家权益等具有非常重要的现实意义^[2]。目前, 玉米种子纯度鉴定已由传统的田间小区种植鉴定技术发展到了分子标记鉴定技术^[3], 其中, SSR 检测技术因具有操作简单、重复性好、多态性高和技术成熟等优点, 被广泛应用于玉米种子纯度鉴定^[4]。芯片毛细管电泳是在芯片上进行的毛细管电泳, 通过以高压直流电场为驱动力, 使待测样品在经过玻璃、石英或各种聚合物材料制成的微米级通道时进行高效分离及检测, 与传统毛细管电泳相比, 芯片毛细管电泳具备耗时短、通量高、系统体积小且易实现不同操作单元的集成等优点^[5]。本研究将 SSR 检测技术与芯片毛细管电泳相结合, 应用于具有代表性的玉米品种先玉 335 和郑单 958 的纯度鉴定, 为我国今后的玉米种子质量鉴定和种业市场监管提供方案支持。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料共 6 份, 为杂交种先玉

335 及其亲本自交系 PH6WC、PH4CV 和郑单 958 及其亲本自交系郑 58 和昌 7-2, 研究所用玉米种子由黑龙江省农业科学院玉米研究所保存且均为随机抽样所得。

1.2 供试材料基因组 DNA 提取 参考植物基因组 DNA 提取试剂盒(天根 DP305)说明书分别提取供试材料叶片 DNA, 应用 1% 琼脂糖凝胶电泳及微量分光光度计(IMPLEN NanoPhotometer P-class)检测玉米叶片 DNA 质量及浓度。

1.3 SSR 引物筛选 选择农业行业标准 NY1432-2007 玉米品种鉴定 DNA 指纹方法中 20 对基本核心引物其中的 10 对引物用于区分杂交种的父母本, 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 具体信息见表 1。PCR 反应体系为 20 μL, 包括 DNA 模板(50 ng/μL) 4.0 μL, 2 × Mix 10.0 μL, Left primer (10 μmol/L) 0.2 μL, Right primer (10 μmol/L) 0.2 μL, ddH₂O 5.6 μL。PCR 反应程序为, 94℃预变性 5 min, 94℃变性 40 s, 60℃退火 35 s, 72℃延伸 45 s, 共进行 35 个循环; 72℃延伸 10 min, 4℃保存。PCR 产物经 5% 琼脂糖凝胶电泳检测筛选亲本间存在多态性 SSR 引物, 染色采用 EB 替代物 GelRed。

1.4 玉米种子纯度鉴定 选用亲本间多态性 SSR 引物分别对杂交种及其父本、母本进行 PCR 扩增, 按照 LabChip GX Touch DNA 1K 芯片说明书对 PCR 产物进行芯片毛细管电泳, 使用 LabChip GX Touch 分析软件对获取的数据进行分析, 并计算玉米种子纯度 = 杂交种子数 / 检测种子总量 × 100%。

基金项目: 黑龙江省农业科学院院级科研项目(2017JS02); 七大作物育种专项项目(2017YFD0101100); 国家自然科学基金面上项目(31771814); 国家博士后基金面上资助(2017M621318)

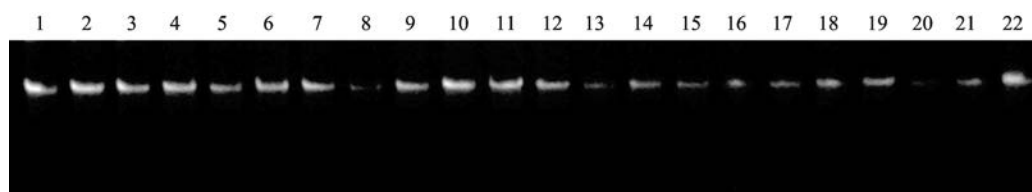
表 1 10 对引物信息

编号	引物名称	染色体位置	引物序列
P01	bnlg439	1.03	F: TTGACATCGCCATCTTGGTGACCA R: TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGGA
P02	bnlg2331	1.11	F: TCTGATATCATAAAGGAGGACCG R: GGAGCTTGGCGCTTTTAAACA
P04	mmc0191	2.07	F: GGTGTTCACTGTGAAAGGTTA R: AAGATTTCCGCAAGGTTAAAC
P05	umc2105	3.00	F: ACATACATAGGCTCCCTTTTTCGG R: TCCCGTGACACTCTCTTCTCTCT
P07	phi072	4.00	F: ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT R: GACAGCGCGCAAAATGGATTGAAC
P08	bnlg2291	4.06	F: CCTCTCGATGTTCTGAAGCC R: GTCATAACCTTGCTCCCAA
P09	umc1705	5.03	F: ATCTCACGTACGGTAATGCAGACA R: CATGACCTGATAAACCTCTCTCTC
P10	umc1225	5.08	F: CTAGTCCGTGTGAGTGAGTGAGT R: TTCCTTCTTTCTTCTGTGCAAC
P11	bnlg161	6.00	F: GCTTTCGTCATACACACATTTCA R: ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
P12	phi299852	6.07	F: GATGTGGGTGCTACGAGCC R: AGATCTCGGAGCTCGGCTA

2 结果与分析

2.1 供试材料 DNA 的质量检测 应用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测所提取的先玉 335、郑单 958、PH6WC、PH4CV、郑 58 和昌 7-2 叶片 DNA 质量, 结果如图 1 所示, DNA 条带清晰无拖尾, 说明所提取的 DNA 无降解, 质量较高。采用微量分光光度计测量玉米叶片 DNA 纯度, 结果显示所提 DNA 样品 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均在 1.9~2.0 之间, 说明本研究所制备的 DNA 纯度符合试验要求, 可以用于后续研究。

2.2 SSR 引物筛选 选择国准 NYT1432-2007 基本核心引物中的 10 对 SSR 引物分别对 PH6WC、PH4CV、郑 58、昌 7-2 4 份玉米自交系材料进行 PCR 扩增筛选亲本间多态性引物, SSR 引物筛选原则为该引物在父母本中的扩增产物大小差异明显, 且电泳条带尽量单一、清晰。5% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 扩增产物进行检测, 结果见图 2、图 3, 根据引物筛选原则, 选出适用于检测杂交种先玉 335 的 SSR 引物为 umc2105、bnlg2291, 适用于检测杂交种郑单 958 的 SSR 引物为 bnlg2291、bnlg161, 鉴于 bnlg2291 引物在 2 组供试材料中均有较好的多态性, 最终选择 bnlg2291 引物用于后续研究。



1~2: PH6WC, 3~4: PH4CV, 5~11: 先玉 335, 12~13: 郑 58, 14~15: 昌 7-2, 16~22: 郑单 958

图 1 玉米基因组 DNA 电泳检测结果

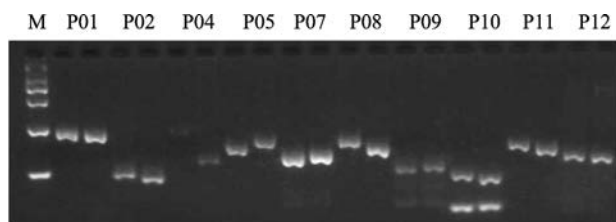


图 2 PH6WC、PH4CV SSR 引物筛选结果

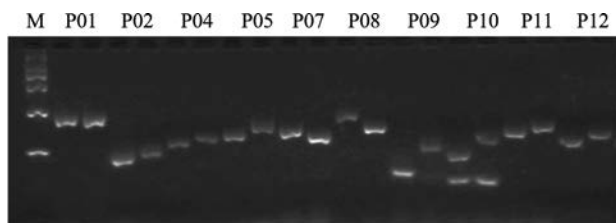
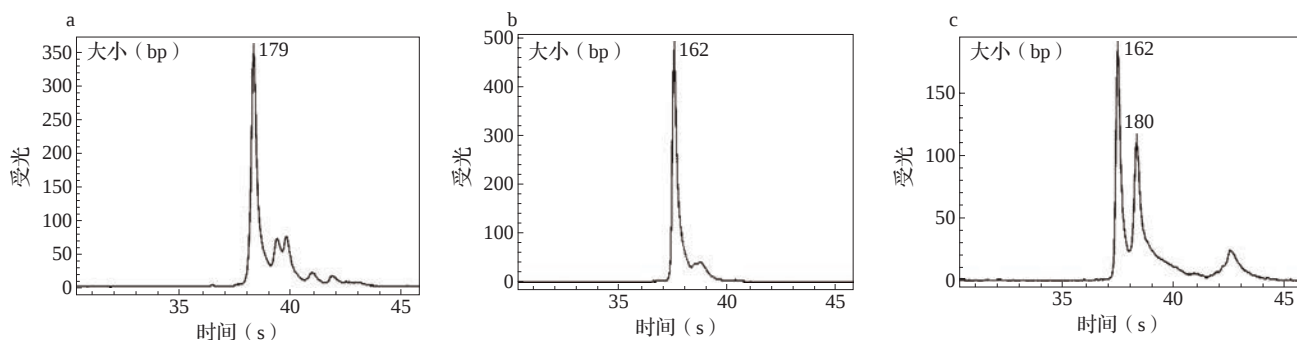


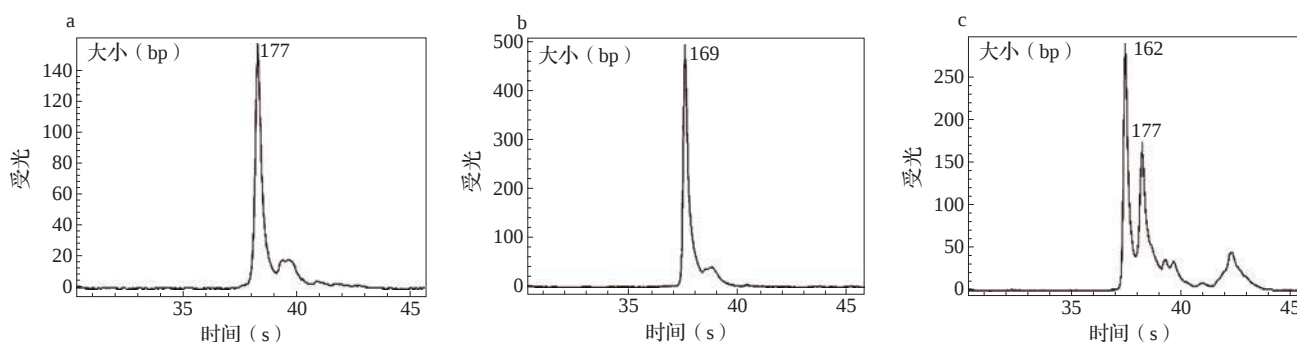
图 3 郑 58、昌 7-2 SSR 引物筛选结果

2.3 供试材料的纯度鉴定结果 选用 SSR 引物 bnlg2291 分别扩增 6 份供试材料, 其中杂交种先玉 335 和郑单 958 各单独提取 94 份叶片 DNA 用于 PCR 扩增, 对 PCR 产物进行芯片毛细管电泳, 并对获取的数据进行分析, 若所获得的峰图为双峰且均与 bnlg2291 引物在其父母本中筛选的峰值一致, 则认定为杂交种; 若所获得的峰图为双峰且只有 1 个峰值与 bnlg2291 引物在父母本中的峰值一致, 则认定为异交种; 若所获得的峰图为双峰但双峰均与 bnlg2291 引物在父母本中的峰值不一致, 则认定为杂株; 若所获得的峰图为单峰且峰值与 bnlg2291 引物在父母本中的 1 个峰值一致, 则认定为自交种。部分鉴定结果如图 4、图 5, 玉米杂交种先玉 335 的纯



a、b、c 分别为 PH6WC、PH4CV 和先玉 335 芯片毛细管电泳的峰图

图 4 先玉 335 及其亲本自交系芯片毛细管电泳纯度鉴定部分结果



a、b、c 分别为郑 58、昌 7-2 和郑单 958 芯片毛细管电泳的峰图

图 5 郑单 958 及其亲本自交系芯片毛细管电泳纯度鉴定部分结果

度为 $(94-2)/94 \times 100\% = 97.87\%$, 玉米杂交种郑单 958 的纯度为 $(94-1)/94 \times 100\% = 98.94\%$ 。

3 结论与讨论

SSR 分子标记基序一般为 1~6bp^[6], 玉米基因组中含有大量的 SSR 多态性标记, 利用 SSR 分子标记鉴定玉米种子纯度, 易于区分杂交种、自交种、异交种和杂株。但由于不同玉米品种间的纯度鉴定引物存在差异, 所以玉米种子纯度鉴定前首先要筛选在杂交种双亲间存在多态性的 SSR 引物, 通常选择 1 对引物或 2 对以上引物组合^[7-8]。在本研究中, 采用 5% 琼脂糖凝胶电泳检测 SSR 引物筛选结果, 该方法分辨率虽然较聚丙烯酰胺凝胶电泳稍低, 但能够清楚区分差异大小 20bp 左右的片段, 且操作简单, 大大降低试验成本及耗时, 同时应用无毒的 EB 替代物对环境及操作人员无危害。

芯片毛细管电泳原理基于微流体技术, 分辨率可以达到 1bp。与传统毛细管电泳相比, 芯片毛细管电泳所需样品量低于 1μL 检测灵敏度能够

达到 5pg/μL, 样品分析时间可短至 42s, 通量提高 70 倍, 而且分离检测过程全部由仪器自动来完成, 无人工介入, 无交叉污染。与荧光标记毛细管电泳相比, 芯片毛细管电泳引物不需要荧光标记, 且可用的引物范围较广, 适用于绝大多数 SSR 引物, 因此试验成本更经济。与聚丙烯酰胺凝胶电泳相比, 芯片毛细管电泳根据峰值获得的数值化数据更精确, 后期数据分析更简便, 操作过程简单, 且通量高, 全程无毒无害。

本研究选用玉米杂交种先玉 335、郑单 958 及其亲本自交系 PH6WC、PH4CV、郑 58 和昌 7-2 作为试验材料, 采用 SSR 检测技术结合芯片毛细管电泳检测技术, 筛选出适用于鉴定先玉 335 和郑单 958 种子纯度的引物 3 对, 应用 bnl2291 引物鉴定先玉 335 和郑单 958 的纯度分别为 97.87% 及 98.94%。研究结果建立一套简单、经济、高效、安全的玉米种子纯度鉴定方法, 为完善玉米种子纯度快速鉴定方法提供参考。

福建省近年来育成春大豆品种农艺性状的遗传变异、相关性分析及主成分分析

吕美琴

(福建省泉州市农业科学研究所, 泉州 362212)

摘要:对福建省 11 个春大豆品种的 10 个农艺性状进行了遗传变异分析、相关性分析和主成分分析。结果表明,大豆有效分枝数、主茎节数、单株荚数、单株粒数和单株粒重等变异系数较大;单株粒重与有效分枝数和单株荚数呈显著相关。主成分分析表明,前 3 个主成分,其累积贡献率为 83.78%,分别为荚粒性状因子、产量性状因子和株型性状因子。

关键词:春大豆;农艺性状;遗传变异;相关分析;主成分分析

大豆起源于中国,是人类植物蛋白的重要来源,也是最重要的食用植物油源^[1]。随着人民生活水平的不断提高,大豆需求也迅猛增加,国内大豆供需矛盾日益突出。造成这一困境的原因是我国大豆整体单产水平不高,因此,提高大豆单产已成为育种家的育种目标之一。大豆的产量是受多基因控制的数量性状,由多因素相互作用而决定,且遗传力低,直接选择效果较差,如果通过遗传力高且与产量关系密切的其他农艺性状进行间接选择则容易见效^[2]。因此,研究和探讨各性状之间的遗传关系已成为育种者十分关注的问题^[3]。福建省大豆常年播种面积在 6 万 hm^2 左右,春大豆面积占一半。近年来,先

后育成了福豆 310、泉豆 5 号、莆豆 10 号等多个高产春大豆品种。关于这些品种的选育和高产栽培技术已有报道^[4-7],但相关农艺性状的遗传分析鲜见报道。

本试验通过对福建省近年来育成的 11 个春大豆品种的 10 个农艺性状进行遗传变异分析、相关分析和主成分分析,旨在寻求和解析各农艺性状之间及其与产量之间的关系,从而为今后福建省春大豆新品种选育、亲本性状选择和高产栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料为 2002–2017 年通过福建省或国家审定的 11 个春大豆品种,品种编号、名称、来源及审定时间详见表 1。

基金项目:福建省区域发展项目(2016N3020);福建省星火计划项目(2017S0020);泉州市科技计划项目(2015N29);泉州市科技计划项目(2016N003)

参考文献

- [1] 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.中国种业,2015(5):17–20
- [2] 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.植物遗传资源学报,2011,12(3):468–472
- [3] 王风格,易红梅,赵久然.玉米纯度分子鉴定标准研制相关问题的探讨.玉米科学,2015,23(4):48–53
- [4] 赵久然,郭景伦,孔艳芳,池书敏,尉德铭,滕海涛.利用DNA指纹鉴定玉米杂交种纯度及其真伪技术的研究.玉米科学,1999(1):10–14
- [5] 刘军,方群,杜文斌.缺口型试样管阵列进样系统与紫外检测毛细管电泳联用技术.分析化学,2005,33(12):1799–1802
- [6] Song Q J, Jia G F, Zhu Y L, Grant D, Nelson R T, Hwang E Y, Hyten D L, Cregan P B. Abundance of SSR motifs and development of candidate polymorphic SSR markers (BARCSOYSSR-1.0) in soybean. Crop Science, 2010, 50(5): 1950–1960
- [7] 王风格,赵久然,王璐,易红梅,郭景伦,戴景瑞,原亚萍,卢柏山,杨国航.适于玉米杂交种纯度鉴定的SSR核心引物的确定.农业生物技术学报,2007(6):964–969
- [8] 冯博,许理文,王风格,蔚荣海,易红梅,刘文彬,葛建镭,田红丽,侯振华,王璐,任洁,王元东,赵久然.玉米品种京科968纯度鉴定引物的确定.分子植物育种,2017,15(11):4688–4694

(收稿日期:2019-03-26)