

## SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用\*

李晓辉<sup>2</sup> 李新海<sup>1,\*</sup> 李文华<sup>2</sup> 王振华<sup>2</sup> 马凤鸣<sup>2</sup> 袁力行<sup>1</sup> 张世煌<sup>1,\*</sup>

(<sup>1</sup>中国农业科学院作物育种栽培研究所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室, 北京 100081; <sup>2</sup>东北农业大学农学院, 黑龙江省哈尔滨 150030)

**摘要** 以 21 份玉米骨干自交系及其组配的 13 个杂交种为材料, 进行 SSR 标记分析。从 220 对引物中, 筛选出扩增带型稳定、多态性丰富的 58 对引物; 杂交种的 SSR 图谱基本上表现为双亲互补带型。利用两个或三个引物组合构建的 SSR 图谱, 通过统计测验可以将 13 个杂交种区分。实验表明, 应用 SSR 标记技术结合单籽粒 DNA 快速提取方法, 可以快捷、准确地鉴定玉米杂交种种子纯度。

**关键词** 玉米; SSR 标记; 杂交种纯度鉴定  
**中图分类号**: S513 **文献标识码**: A

## Application of SSR Markers in Hybrid Seed Purity Test of Maize

L I X i a o - H u i<sup>2</sup> L I X i n - H a i<sup>1</sup> L I W e n - H u a<sup>2</sup> W A N G Z h e n - H u a<sup>2</sup> M A F e n g - M i n g<sup>2</sup> Y U A N L i - X i n g<sup>1</sup>  
Z H A N G S h i - H u a n g<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China; <sup>2</sup>College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract** The polymorphism of 21 maize elite inbred lines and 13 hybrids were analyzed with SSR marker system. Fifty-eight out of 220 pairs of SSR primers were selected, which gave stable and polymorphic amplification profiles. Basically, the amplification bands of hybrids were complementary with that of the parents. Thirteen hybrids could be distinguished by combinations of two or three primers selected and statistical analysis. The rapid DNA extracting procedure from single kernel was established. The experiment showed that SSR technique could be effectively exploited in hybrid seed purity test of maize.

**Key words** *Zea mays* L.; Simple sequence repeats maker; Hybrid seed purity test

玉米种子真伪和纯度检验对玉米生产具有重要影响。以往, 人们多利用形态特征、生理特性、同工酶、种子贮藏蛋白进行品种纯度检验<sup>[1]</sup>。由于我国玉米生产上使用的亲本自交系较为集中, 导致种质基础渐趋狭窄<sup>[2]</sup>。上述检验手段易受环境影响, 不能有效地区分遗传关系较近的杂交种<sup>[3]</sup>。

随着科技进步, 分子生物学技术已开始用于品种纯度的检验。吴敏生、张超良<sup>[4, 5]</sup>等探讨了 RAPD 分子标记在玉米品种纯度检验中的应用。SSRs 是近年来发展起来的建立在 PCR (Polymerase Chain Reaction) 基础上的分子遗传标记, 已被广泛用于基因定位, 种群进化及遗传多样性研

究<sup>[6]</sup>。但 SSR 标记技术在玉米品种纯度鉴定中的应用尚未见报道。本课题组筛选出一组核心 SSR 引物, 构建了 21 份骨干自交系及其组配的 13 个杂交种的 DNA 指纹图谱; 本文旨在比较杂交种与亲本自交系的 SSR 图谱, 结合单籽粒 DNA 快速提取方法, 探讨 SSR 标记技术在玉米杂交种纯度鉴定中应用的可行性。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

供试材料包括 21 份玉米骨干自交系及其组配的 13 个杂交种(表 1), 其中杂交种都是我国大面积

\* 基金项目: 科技部重点项目(K2000-20-43)和亚洲玉米生物技术协作网项目(AMBDNET)资助。

作者简介: 李晓辉(1977-), 男, 黑龙江肇东人, 硕士研究生, 从事玉米分子标记技术研究。

\* 通讯联系作者。

Received on (收稿日期): 2001-11-23, Accepted on (接受日期): 2002-06-06

种植的优良品种。21 份自交系是经过套袋自交获得, 杂交种为手工配制。

## 1.2 扩增反应

采用 CTAB 法<sup>[7]</sup>提取 DNA。PCR 扩增反应在 PTC-200 PCR 仪 (MJ Research, Waterson, MA) 上进行。每 10  $\mu\text{L}$  反应体积中含有 10 mmol/L

Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 0.5 单位 Taq DNA 聚合酶, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.15 mmol/L 4-dNTP, 10% 甘油, 0.25  $\mu\text{mol/L}$  SSR 引物对, 20 ng DNA 模板。反应液上加盖 15  $\mu\text{L}$  矿物油 (Sigma), 防止反应过程中水分蒸发。

表 1 21 份玉米自交系及 13 个杂交种

Table 1 The 21 inbred lines and 13 hybrids of maize

序号 Code	材料 Material	序号 Code	材料 Material	序号 Code	材料 Material
1	7884-7	13	丹 340 Dan340	25	农大 108 Nongda108 (X178×HC)
2	本育 9 Benyu9 (7884-7×Mo17)	14	掖单 13 Yedan13 (丹 340×掖 478) (Dan340×Ye478)	26	HC
3	Mo17	15	掖 478 Ye478	27	铁 7922 Tie7922
4	烟单 14 Yandan14 (Mo17×黄早四) (Mo17×Huangzao4)	16	西玉 3 号 Xiyu3 (掖 478×502) (Ye478×502)	28	雅玉 2 号 Yayu2 (铁 7922×S37) (Tie7922×S37)
5	黄早四 Huangzao4	17	502	29	S37
6	掖单 2 号 Yedan2 (黄早四×掖 107) (Huangzao4×Ye107)	18	K12	30	S7913
7	掖 107 Ye107	19	陕单 902 Shandan902 (K12×K22)	31	华玉 4 号 Huayu4 (S7913×HZ85)
8	444	20	K22	32	HZ85
9	四单 19 Sidan19 444×Mo17	21	齐 319 Qi319	33	金黄 96B Jinhuang96B
10	Mo17	22	鲁单 50 L u dan50 (齐 319×鲁原 92) (Qi319×L u yuan92)	34	晋单 36 J indan36 (金黄 96B×海 9-21) (Jinhuang96B×Hai9-21)
11	中单 2 号 Zhongdan2 (Mo17×自 330) (Mo17×Zi330)	23	鲁原 92 L u yuan92	35	海 9-21 Hai9-21
12	自 330 Zi330	24	X178		

热循环反应: 94 模板 DNA 预变性 5 min, 1 个循环; 94 模板 DNA 变性 1 min, 60 引物与模板靶位点结合 2 min, 72 引物沿模板延伸 2 min, 共 35 个循环; 最后在 72 延伸 5 min。4 保存。

## 1.3 聚丙烯酰胺凝胶 (4.5%) 电泳检测

采用 Bio-Rad 测序胶板装置 (美国制造, 规格 38 cm × 30 cm × 0.04 cm), 单面电泳。配制 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶 75 mL, 含有 8.4 mL 40% polyacrylamide (acrylamide: bisacrylamide = 19:1), 7.5 mL 1×TBE 缓冲液, 33.75g 尿素, 19 mL ddH<sub>2</sub>O, 75  $\mu\text{L}$  TEMED, 75  $\mu\text{L}$  25% APS (Ammonium persulfate 25% w/v)。在加入 TEMED 和 APS 后, 立即灌胶, 约 30 min 后, 胶凝固。安装电

泳槽, 倒入大约 1800 mL 1×TBE 缓冲液。在 85W 功率下, 预电泳 40 min。PCR 产物变性后, 上样 5  $\mu\text{L}$ 。在 70W 功率下, 电泳大约 1h。然后凝胶依次在 10% 冰乙酸中浸泡 30 min, 水洗 2 次 (每次 3 min), 0.1% AgNO<sub>3</sub> 中浸泡 30 min, 快速用水冲洗 1 次, 然后在 3% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> (加入 200  $\mu\text{L}$  1% Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) 中显影至带型可以区分为止。用 10% 冰乙酸终止显影。在白炽灯下观察电泳结果, 进行数据统计和扫描照相。

## 1.4 数据统计

标记 SSR 扩增片段大小, 以 0、1、9 建立数据库。在相同迁移率位置上, 有带记为 1, 无带记为 0, 缺失数据记为 9。

## 2 结果与分析

### 2.1 引物筛选

本实验所使用的 SSR 引物序列来自 Maize DB (2000), 由上海 Sangon 公司合成。利用 SSR 标记技术分析 21 份骨干自交系的 DNA 多态性。从 220

对 SSR 引物中筛选出扩增带型稳定, 多态性较丰富的 58 对引物(表 2); 共检测到 195 条多态性片段, 平均每个位点的等位基因数 3.36 个, 变化范围 2~8 个。用 195 条多态性片段初步构建了 21 份自交系的 DNA 指纹图谱, 获得了大多数自交系的特异扩增片段, 可对其进行特异性鉴定。

表 2 58 对核心 SSR 引物  
Table 2 Fifty-eight SSR primers

SSR 引物 SSR primer	染色体位置 Bin no.	扩增片段数 No. alleles	片段大小 Size range(bp)	SSR 引物 SSR primer	染色体位置 Bin no.	扩增片段数 No. alleles	片段大小 Size range(bp)
phi056	1.01	4	84-93	phi048	5.07	3	157-169
phi097	1.01	2	97-100	phi058	5.07	2	148-151
bnlg176	1.03	3	183-220	phi085	5.07	3	70-90
bnlg439	1.03	5	413-417	phil28	5.07	3	100-110
umc1124	1.05	3	76-83	phil26	6.00	7	142-172
phi002	1.08	2	151-153	phi077	6.01	7	124-144
phi037	1.08	3	130-158	phi078	6.05	3	122-158
phi011	1.09	2	110-122	phi081	6.05	3	160-169
phi055	1.09	3	103-112	phi070	6.07	2	78-83
phi064	1.11	7	69-101	phil23	6.07	2	143-147
phil20	1.11	4	64-88	phi057	7.01	3	145-151
phi083	2.04	3	126-134	phi034	7.02	4	120-141
phi090	2.08	2	141-151	phil14	7.02	4	135-163
phil27	2.08	3	112-128	phil16	7.06	4	151-173
phi374118	3.02	4	417-435	phil19	8.02	3	162-170
phi029	3.04	3	149-170	phil15	8.03	3	93-113
phi036	3.04	8	63-91	phi014	8.04	2	157-163
phi053	3.05	3	170-186	phil21	8.04	2	99-102
phi073	3.05	3	90-99	bnlg162	8.05	5	225-255
phi047	3.09	2	140-143	phi015	8.08-8.09	3	82-102
phi072	4.00	4	110-138	phi080	8.09	5	140-165
phi074	4.04	3	89-95	phi028	9.01	3	63-78
phi096	4.04	2	102-112	phi017	9.02	3	101-107
phi026	4.05	6	80-110	phi022	9.02	3	124-148
phi086	4.08	2	70-73	phi061	9.03	2	80-88
phi092	4.08	2	120-128	phi065	9.03	4	132-152
phi019	4.11	3	93-99	phi059	10.02	2	147-156
phi076	4.11	4	330-374	phi050	10.03	3	80-88
phil13	5.03~5.04	4	120-336	phi062	10.04	2	161-164

### 2.2 杂交种与亲本自交系的 SSR 图谱比较

多数引物在 21 份自交系中扩增出 1 条片段, 但部分引物在某些自交系中扩增出 2 条片段, 如 phi029(图 1)在金黄 96B(泳道 33)中扩增出 2 条带, 这可能与基因组内存在两个与引物结合的靶位点等有关。

实验过程中, 杂交种出现“双亲互补型”、“偏父型”、“偏母型”以及“杂种型”4 种带型。“双亲互补型”是指杂交种显现双亲的全部扩增带。在 SSR

图谱分析中, 杂交种带型基本上表现为“双亲互补型”, 易与亲本分开, 如图 1 中本育 9(泳道 2)、烟单 14(4)等。“偏父型”和“偏母型”是指杂交种与亲本之一的扩增带型一致。图 1 中的晋单 36(34)表现为“偏母型”, 杂交种与母本自交系不能被分开; 但多数情形是在双亲共同拥有一条扩增带情况下亲本之一又有另外一条扩增带, 杂交种亦相同。这从侧面验证了杂交种所显示的“双亲互补型”。“杂种型”是本实验中出现的特殊谱带类型, 是指杂交种

比双亲多了一条扩增带。如果所用引物在亲本间扩增产物无多态性,则杂交种带型与亲本相同,但亮度明显增强,如图1中陕单902(19)、农大108(25)

等。实验结果显示,“双亲互补型”是杂交种SSR图谱的主要类型。

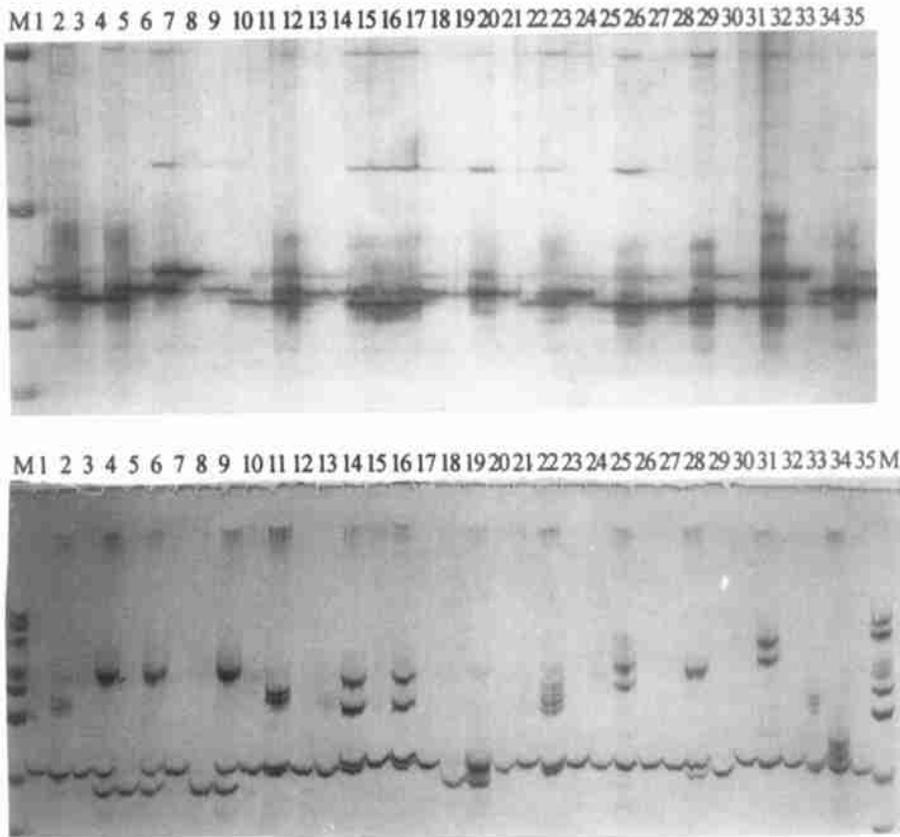


图 1.2 引物 phi029 和 phi374118 扩增的 SSR 图谱

M 为分子量标准( $\Phi$ X174/ $\lambda$ DNA f I) 1~35 供试材料序号(编号与表 1 相同)

Fig. 1.2 SSR profile of the amplified bands with primer phi029 and phi374118, respectively

M: molecular standard ( $\Phi$ X174/ $\lambda$ DNA f I) 1~35: Material code same as in table 1

表 3 引物 phi029 和 phi374118 扩增的 13 个杂交种 SSR 图谱

Table 3 The fingerprinting of 13 hybrids amplified by phi029 and phi374118

引物 Primer	泳道 Lane													分子量标准 M (bp)
	2	4	6	9	11	14	16	19	22	25	28	31	34	
phi029	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	170
	1	1	1	1	1	1	1	1*	1	0	0	0	1	153
	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1*	1*	1	1	149
phi374118	1*	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	435
	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1*	1	1*	1*	433
	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	429
	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	417

\* 表示杂交种谱带亮度是双亲谱带亮度的叠加

\* the brightness of amplification bands of hybrids is the sympathetic response of that of the parents

### 2.3 杂交种间 SSR 图谱比较

从引物 phi029 的扩增带型来看,13 个杂交种之间共分为 5 种类型,即本育 9(2)、烟单 14(4)、四单 19(9)、中单 2(11)、掖单 13(14)、西玉 3 号(16)、鲁单 50(22)、晋单 36(34)为一类;农大 108

(25)、雅玉 2 号(28)为一类,表明仅用引物 phi029 不能区分这些杂交种;掖单 2 号(6)为一类,陕单 902(19)为一类,华玉 4 号(31)为一类。

从引物 phi374118 的扩增带型来看,13 个杂交种之间共分为 6 种类型,即烟单 14(4)、掖单 2 号

(6)、四单 19(9)为一类;中单 2(11)、掖单 13(14)、西玉 3 号(16)、鲁单 50(22)为一类;农大 108(25)、华玉 4 号(31)、晋单 36(34)为一类;表明仅用引物 phi374118 不能分开这些杂交种;本育 9(2)为一类,陕单 902(19)为一类,雅玉 2 号(28)为一类。

分析表明单独使用 phi029 和 phi374118 可区分 5 个杂交种,即本育 9(2)、掖单 2 号(6)、陕单 902(19)、雅玉 2 号(28)和华玉 4 号(31)。如果同一杂交种对不同引物扩增的带型分属不同类型,则把 2 个引物结合使用,可以区分更多杂交种。如将 phi029 和 phi374118 对农大 108(25)、华玉 4 号(31)、晋单 36(34)、雅玉 2 号(28)、中单 2 号(11)的扩增图谱叠加,则可以将 5 个杂交种完全区分开;若进一步结合 phi048 的扩增图谱,则可以将 13 个杂交种区分开。在利用 SSR 图谱鉴别杂交种时,应通过统计检验进行。在此采用  $X = \sum |a_i - e_i| / SE$ , 取置信度  $\alpha = 0.01$  对未知杂交种与已知杂交种进行显著性测验。当  $X$  值大于置信度的临界值时,则认为两个杂交种差异显著。公式中  $a_i$ ,  $e_i$  为杂交种 a 和 e 的扩增片段,

$$SE = \sqrt{[\sum(a_i - \bar{a})^2 + \sum(e_i - \bar{e})^2] / (n-1)n}$$

为标准误,  $n$  为扩增片段数。如采用上述公式和 phi029 及 phi374118 对鲁单 50(22)、农大 108(25)

的扩增图谱,可以进行显著性测验。两个杂交种平均差异为 2 个片段,  $SE = 0.272$ , 因  $X = 7.353$  大于  $t_{0.01, 12} = 3.055$ , 表明鲁单 50 与农大 108 差异显著。总之,杂交种鉴定比自交系要困难,但利用多个引物构建的 DNA 指纹图谱,结合统计检验,可以对其进行有效地鉴定。

## 2.4 SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度鉴定中的应用

玉米杂交种种子纯度主要受母本去雄不及时或不彻底形成自交籽粒,或者收获时混入父本种子的影响;同时,混入其他品种也会影响种子纯度。因此,如何快速、有效地鉴别双亲、混杂品种和真实杂交种就成为品种纯度鉴定的关键。本实验通过单籽粒 DNA 快速提取方法(100 ng Lambda 为分子量标准),从种子胚中直接提取 DNA(图 3);然后进行 PCR 扩增,通过电泳检测扩增产物,可以准确地鉴定父本、母本、混杂品种以及真实杂交种。在图 4 中,泳道 1~5 和 43~47 为农大 108 亲本自交系;第 20~24 泳道为混杂品种,其余 28 条泳道表现为清晰明显的“双亲互补带型”,为真实杂交种农大 108。综合运用 SSR 核心引物和 DNA 指纹图谱数据,通过 DNA 快速提取、PCR 扩增和电泳检测,可以准确地鉴定玉米杂交种纯度。

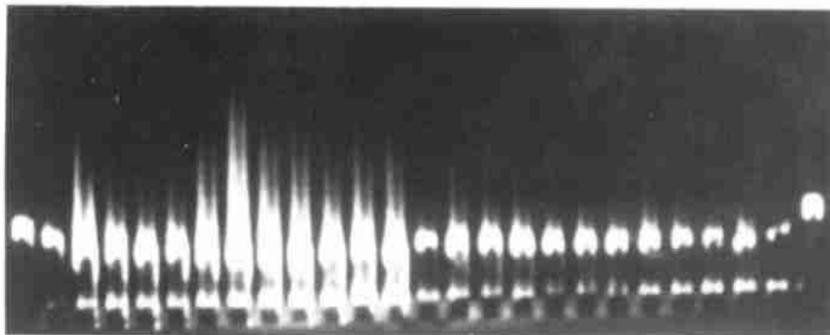


图 3 单籽粒快速提取的 DNA 电泳检测结果

Fig 3 Electrophoresis of DNA extracted by rapid method from single seed

## 3 讨论

### 3.1 SSR 引物筛选及标记检测技术

利用单一或少数引物难以区分亲缘关系较近的杂交种,必需采用引物组合。此外,对于特定的 SSR 引物应确定最佳反应条件,包括引物浓度和退火温度等。因此,随着品种鉴定和保护意识的增强,对玉米杂交种筛选 SSR 核心引物及优化检测

技术是非常必要的。

本实验根据扩增主带清晰、带型稳定、多态性丰富及在杂交种中主要表现为“双亲互补带型”,筛选出 58 对 SSR 引物,同时建立了 SSR 标记检测技术体系,包括单籽粒 DNA 快速提取方法,PCR 扩增和热反应体系、电泳检测及统计方法等。这套检测技术可用于玉米杂交种纯度鉴定和真实性判别。

### 3.2 杂交种的谱带类型与品种鉴定

实验表明,同一品种用不同 SSR 引物扩增往往表现不同的谱带特征,其中“双亲互补带型”是鉴别杂交种与亲本的最佳类型,因此筛选“双亲互补带型”的引物将有利于杂交种纯度鉴定。在双亲之一的基因组内若存在两个或两个以上与引物结合的

靶位点,则将有两个或两个以上扩增带,杂交种的谱带类型亦表现出“偏父型”或“偏母型”。对于“杂种型”SSR 图谱,是否与双亲杂交导致杂交种 DNA 发生的变异等因素有关,有待深入研究。

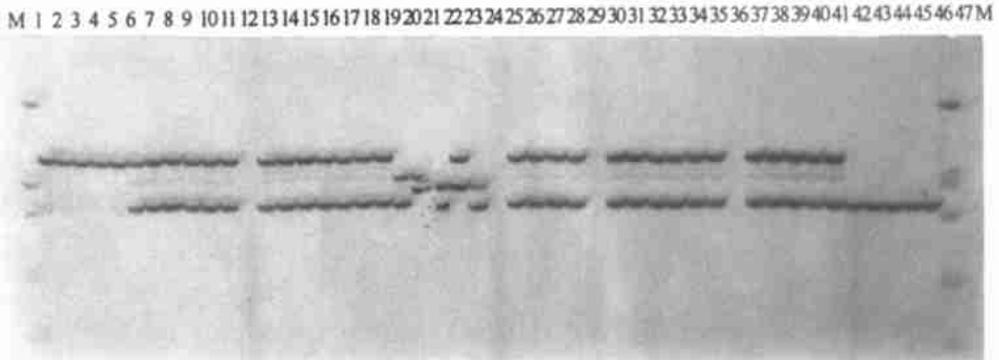


图4 农大108杂交种、亲本自交系及混杂品种的SSR标记检测结果

Fig. 4 SSR profile of Nongda 108 hybrid, parental lines and mixed seeds amplified by *phi*72

1~ 5: 父本农大178, 6~ 42: 农大108和混合样品, 43~ 47: 母本HC, M: 分子量标准

1~ 5: male line X178, 6~ 42: hybrid Nongda108 and mixed seeds, 43~ 47: female line HC, M: molecular standard

### 3.3 SSR 标记技术在玉米杂交种纯度鉴定中应用的可行性

SSR 标记是利用引物对间短核苷酸序列重复级数不同,从而揭示品种间多态性,检测区域几乎可以覆盖玉米10条染色体。本实验室采用Bio-Rad测序胶装置和4.5%聚丙烯酰胺凝胶,可以检测出1个碱基对的微小差异。实验测试表明,SSR 标记具有极好的稳定性和重复性。以引物 $\phi$ 1057为例,重复两次,仅在3个泳道中扩增片段有微小差异,这极大地克服了RAPD 标记需要严格控制反应条件、保证环境均匀一致,否则结果重现性差的缺点。此外,玉米单籽粒DNA 快速提取方法,不需要种子发芽和液氮,操作简单、快速、实用性强,使SSR 标记技术更快捷、方便地用于品种鉴定与纯度分析。

随着SSR 标记技术的进一步完善,其检测技术将逐步程序化、标准化,包括快速提取玉米单籽粒DNA 通过分析DNA 指纹图谱数据,选择特异性SSR 引物进行PCR 扩增(多重PCR) 测序凝胶电泳 扩增片段读取(通过凝胶识别软件) 数据处理及统计分析 杂交种纯度鉴定。总之,应用SSR 标记技术可以较快速、准确地鉴定玉米杂交种的纯

度。它可以用作品种真实性鉴定、纯度检测以及新品种保护的仲裁技术依据之一。

### References

- [1] Li X-H (李新海), Yuan L-X (袁力行), Li M-S (李明顺). Methods and techniques of variety purity test in maize. In: Liu X (刘旭) ed. *Theory and Application of Crop Research* (作物科学研究理论与实践). Beijing: Science Press, 2000, 56~ 63
- [2] Wang Y-B (王懿波), Wang Z-H (王振华), Wang Y-P (王永普), et al. Studies on the heterosis utilizing models of main maize germplasm in China. *Scientia Agricultura Sinica* (中国农业科学), 1997, 29(4): 16~ 24
- [3] Smith J S C, Smith O S. Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among U. S. maize hybrids. *Crop Sci*, 1991, 31: 893~ 899
- [4] Wu M-S (吴敏生), Dai J-R (戴景瑞), Wang S-C (王守才). Application of RAPD in cultivar identification and purity test in maize. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1999, 25(4): 489~ 493
- [5] Zhang C-L (张超良), Sun S-M (孙世孟), Jin D-M (金德敏), et al. Rapid identification of twelve elite maize inbred lines using RAPD markers. *Acta Agronomica Sinica* (作物学报), 1998, 24(11): 718~ 721
- [6] Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet*, 1993, 241: 225~ 235
- [7] Saghai M, Aroof M A, Soliman K M, Jorgenson R, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci (USA)*, 1984, 81: 8014~ 8018