

利用SSR标记技术鉴定玉米品种真实性的研究

岳静¹,朱志成²,申雅娟²,张卉¹,王汝宝²

(¹沈阳化工大学环境与生物工程学院,沈阳 110142;²辽宁省种子管理局,沈阳 110034)

摘要:从20对SSR基本引物中筛选出核心引物,并对辽宁省主推玉米品种进行真实性研究。利用SSR标记技术,选取均匀覆盖玉米染色体组的20对SSR引物对玉米品种进行PCR扩增分析。依据带型清晰与否、稳定性等筛选出14对核心引物用于辽宁省主推玉米品种的真实性鉴定,其中以引物bnlg161k8的多态性最好,且仅采用bnlg161k8、bnlg2305k4及umc1705w1三对引物即可对实验中所选玉米品种进行真实性鉴定。bnlg161k8、bnlg2305k4及umc1705w1这3对引物可作为玉米品种真实性鉴定的首选引物,既节约成本,又提高效率。

关键词:玉米;SSR标记;核心引物;真实性

中图分类号:S-513.037

文献标志码:A

论文编号:2010-3683

Study on Identifying the Authenticity of Maize Varieties by SSR Markers

Yue Jing¹, Zhu Zhicheng², Shen Yajuan², Zhang Hui¹, Wang Rubao²

(¹Shenyang University of Chemical Technology, Shenyang 110142;

²Seeds Administration Bureau of Liaoning Province, Shenyang 110034)

Abstract: In this study, the core primers were selected from 20 pairs of SSR primers to identify the authenticity of maize varieties in Liaoning Province. PCR amplified products of 10 maize hybrids were detected by 20 basic primer pairs averagely distributed on 10 chromosomes of maize by using SSR markers. 14 pairs of core primers were selected to identify the authenticity of maize varieties on electrophoresis maps and the stability, et al. Among all the core primer pairs, bnlg161k8 was the best on polymorphism and the authenticity of 10 maize varieties was identified only by 3 pairs of primers (bnlg161k8, bnlg2305k4, umc1705w1). 3 pairs of primers (bnlg161k8, bnlg2305k4, umc1705w1) could be the preferred primers by costing savings and improving efficiency.

Key words: maize (*Zea mays* L.); simple sequence repeat marker; core primers; authenticity

0 引言

玉米是中国重要的粮食、饲料及工业原料作物,其种植区域广泛,品种资源丰富,然而在玉米育种中少数骨干亲本的集中应用,造成品种间遗传基础狭窄,单从形态上鉴定存在一定困难,这就给玉米品种的选育、生产、经营和使用等方面造成不同程度的困扰,同时也给种子管理部门带来一定的挑战。因此,研究利用SSR标记技术鉴定玉米品种真实性,对品种管理、质量监控等方面具有重要意义,而且也对杂种优势群的划分、种

质创新及新品种的选育等具有指导意义。玉米品种的分子鉴定技术经过10多年的系统研究和检测实践,从最初使用RAPD标记技术,到目前基于SSR标记技术的检测体系日趋成熟,许多优秀的科研工作者做了大量的工作^[1]。Smith等利用131个SSR引物和80个RFLP探针对58个玉米自交系和4个杂交种进行了鉴定,结果表明,SSR比RFLP能更有效地鉴定玉米种质资源^[2-3];Senior等利用70对SSR引物对94个玉米自交系的扩增产物在琼脂糖上进行检测,共检测到365个

第一作者简介:岳静,女,1978年出生,辽宁葫芦岛人,讲师,硕士,研究方向为生物技术与食品分析。通信地址:110142 沈阳经济技术开发区11号街沈阳化工大学环境与生物工程学院, Tel: 024-89388160, E-mail: yuejing@yeah.net。

通讯作者:申雅娟,女,1955年出生,辽宁沈阳人,研究员,硕士,研究方向为农业生物技术及农业管理。通信地址:110034 沈阳市于洪区长江北街33号辽宁省种子管理局, Tel: 024-86117022, E-mail: lnzgj@126.com。

收稿日期:2010-12-21,修回日期:2011-03-17。

等位基因变异,认为SSR标记在种质遗传多样性鉴定、杂种优势群划分及DNA指纹鉴定中等同于甚至超过了RFLP标记^[4]。国内,李新海等利用43对SSR引物在21份玉米材料中检测到127个等位基因变异,表明SSR具有较高的多态性,适合于玉米品种的鉴定研究^[5];赵久然、王风格等建立了SSR技术鉴定玉米品种真实性的标准实验体系,并提出了SSR核心引物理论^[6];谭君等利用SSR标记技术对西南地区73份玉米自交系进行了分析,从20对引物中筛选出6对核心引物将供试自交系完全区分开来^[7]。笔者的研究采用王风格等人建立的检测体系,拟从20对SSR基本引物中筛选出条带清晰、主带可判的核心引物,对目前辽宁省主要推广的杂交玉米品种进行真实性鉴定。尽量找出扩增最好的首选核心引物或引物组合^[8],即可以把玉米品种加以区分鉴定,节省成本、提高效率,为种子管理部门提供技术支持,同时也为更好地利用辽宁优良玉米品种及玉米DNA标准图谱的建立奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试玉米样品

此研究使用的10个玉米品种,由辽宁省种子管理局收集,见表1。

1.2 用于玉米品种真实性鉴定的SSR引物

根据国内外相关文献^[9-10]对引物多态性的评价,并考虑其在染色体上分布的均匀性,筛选出20对基本引

物,由大连TaKaRa生物工程公司合成,见表2。

1.3 方法

1.3.1 DNA提取 采用CTAB法提取玉米种子DNA^[11-13]。

1.3.2 玉米品种DNA质量检测

(1)琼脂糖凝胶电泳检测:提取的DNA在1.0%琼脂糖凝胶上电泳,紫外灯下观察并记录。

(2)紫外分光光度计检测:VARIAN 50紫外可见分光光度计测DNA样品在260 nm、280 nm波长出的光吸收值。

$$\text{DNA浓度}(\text{ng}/\mu\text{L}) = OD_{260} \times 50 \times \text{稀释倍数}$$

此实验是在3 mL的纯水中加入4 μL DNA提取液原液。

1.3.3 SSR扩增

(1)PCR反应组成:1×PCR Buffer, Mg²⁺ 2.5 mmol/L, dNTPs 0.3 mmol/L, 正、反向引物 0.2 μmol/L, Taq DNA聚合酶1.0 U,样品DNA 20~40 ng,总体积25 μL。

(2)反应程序:94℃预变性5 min, 94℃变性40 s, 60℃退火35 s, 72℃延伸45 s, 循环35次, 72℃延伸5 min, 4℃保存待测。

1.3.4 电泳检测 PCR扩增产物变性后在4.5%变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。预电泳恒功率90 W, 20 min; 电泳恒功率80 W, 40 min。10%冰醋酸固定5 min, 0.2% AgNO₃溶液染色5 min; 双蒸水漂洗2次, 每次10 s; 显影液(3% NaOH, 0.4%甲醛)显影; 10%冰醋酸定影。

1.3.5 核心引物的筛选 利用SSR标记技术对上述10个玉米品种进行DNA多态性分析,从随机分布于玉米10条染色体上的20对基本引物(见表2)中筛选出核心引物,以期用于玉米品种真实性的鉴定。

2 结果与分析

2.1 玉米品种DNA质量检测结果

2.1.1 玉米品种DNA琼脂糖凝胶电泳检测结果 如图1所示,1~10各有一条清楚完整的亮带,表明已提取出10

表1 10个玉米杂交种

序号	杂交种名称	序号	杂交种名称
1	铁单10	6	东单90
2	新铁18	7	东单16
3	铁单21	8	东单335
4	铁研24	9	富友1号
5	东单60	10	富友9号

表2 真实性鉴定用基本引物

序号	引物	染色体位置	重复单元	序号	引物	染色体位置	重复单元
1	bnlg439w1	1.03	(TC)	11	bnlg161k8	6.00	(AG)
2	umc1335y5	1.06	(AG)	12	bnlg1702k1	6.05	(CT)
3	umc2007y4	2.04	(TC)	13	umc1545y2	7.00	(AAGA)
4	bnlg1940k7	2.08	(CT)	14	umc1125y3	7.04	(CTCG)
5	umc2105k3	3.00	(AG)	15	bnlg240k1	8.06	(GA)
6	phi053k2	3.05	(GTAT)	16	phi080k15	8.08	(GGAGA)
7	phi072k4	4.01	(TGTT)	17	phi065k9	9.03	(GTGAA)(GTGCA)
8	bnlg2291k4	4.06	(AG)	18	umc1492y13	9.04	(GCA)
9	umc1705w1	5.03	(CT)	19	umc1432y6	10.02	(TC)
10	bnlg2305k4	5.07	(GA)	20	umc1506k12	10.05	(TTTG)



图1 10个玉米品种DNA琼脂糖凝胶电泳检测结果图

个品种的基因组DNA,并且质量很高,没有降解;而且,从图中还能看到点样孔中没有杂质,很干净,表明DNA中所含杂质很少,且RNA的含量也非常少。所提品种基因组DNA符合SSR鉴定玉米品种真实性的要求。

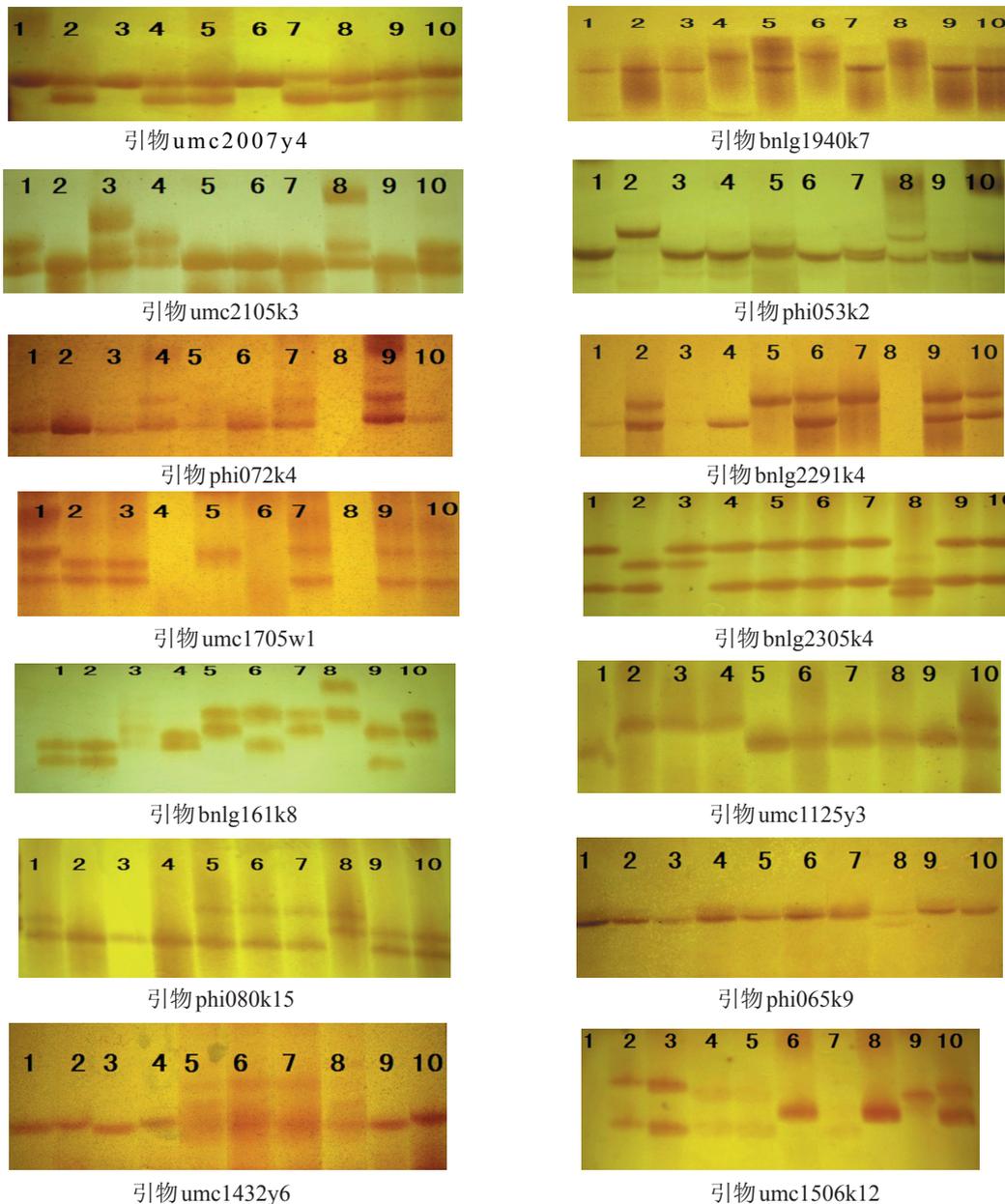
2.1.2 玉米品种DNA浓度检测结果 DNA的质量可以用 OD_{260}/OD_{280} 值来表示,若 OD_{260}/OD_{280} 值在 1.8~2.0 之

间,则说明提取的DNA较纯,质量高;若 OD_{260}/OD_{280} 值小于 1.8 或大于 2.0,说明DNA中含有RNA或蛋白质过多,导致DNA质量下降(表3)。

2.2 变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果及核心引物的筛选

此实验共筛选出 14 对引物作为玉米品种真实性鉴定的核心引物,分别为 umc2007y4、bnlg1940k7、umc2105k3、phi053k2、phi072k4、bnlg2291k4、umc1705w1、bnlg2305k4、bnlg161k8、umc1125y3、phi080k15、phi065k9、umc1432y6、umc1506k12。

这 14 对核心引物对 10 个玉米品种 PCR 扩增产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测结果见图 2。



编号 1~10 为表 2 所示玉米品种

图2 10个玉米品种在14对核心引物下PCR产物的PAGE胶电泳图谱

从图2可知,这14对引物的扩增条带清晰可辨,多态性较好。另外,由图2中还可看出,仅采用 bnlgl161k8、bnlg2305k4 及 umc1705w1 三对引物即可把10个品种区分开来。引物 bnlgl161k8 可以区分玉米品种的8种基因带型:其中3、4、6、8、9、10号品种的基因带型各不相同;1号与2号品种带型相同;5号与7号品种带型相同。说明1号与2号、5号与7号不能用引物 bnlgl161k8 加以区分;而同时采用引物 bnlgl2305k4 可以区分1号和2号品种;引物 umc1705w1 可以区分5号和7号玉米品种,3对引物组合即可完全区分10个玉米品种。

另外,通过比对,发现引物 bnlgl161k8 多态性最好,可以作为玉米品种真实性鉴定的首选引物,而其他引物仅能区分2~4个基因带型。

表3 DNA提取液浓度检测结果

编号	品种	OD ₂₆₀	OD ₂₈₀	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	浓度/(ng/μL)
1	铁单10	0.0058	0.0029	2.0	217.5
2	新铁18	0.0065	0.0034	1.91	243.75
3	铁单21	0.0059	0.0033	1.79	221.25
4	铁研24	0.0059	0.0035	1.69	221.25
5	东单60	0.0065	0.0036	1.81	243.75
6	东单90	0.0072	0.0040	1.80	270
7	东单16	0.0043	0.0025	1.72	161.25
8	东单335	0.0072	0.0037	1.95	270
9	富友1号	0.0081	0.0045	1.80	303.75
10	富友9号	0.0089	0.0044	2.02	333.75

3 结论

实验通过对辽宁省主推玉米品种真实性的研究,验证了利用SSR标记技术鉴定玉米品种真实性的检测体系;并依据扩增条带的清晰程度、稳定性、重复性、条带的多少以及能够鉴别品种的数量等因素,从20对基本引物中筛选出了14对核心引物用于此实验中玉米品种真实性的鉴定,这14对核心引物中以引物 bnlgl161k8 的多态性最好;对于此实验中10个玉米品种的真实性,仅采用 bnlgl161k8、bnlg2305k4 及 umc1705w1 三对引物即可以加以区分,表明这3对引物可作为玉米品种真实性鉴定的首选引物,既节约成本,又提高效率。

4 讨论

此实验所用玉米材料为近几年辽宁省主推品种,具有一定的代表性。但玉米品种真实性鉴定仅依靠这10个品种远远不足,应尽可能地多收集审定推广的玉米品种,使真实性鉴定发挥更大的监督效力。

此实验对所选20对基本引物进行扩增,筛选出14

对引物扩增条带清晰、稳定,主带可判。另外6对引物扩增条带过多,对于真实性鉴定及建立DNA标准图谱都不是很理想。这些引物还需要进行退火温度的摸索,有些引物还可以根据实际情况进行 touch-down PCR,使其减少非特异性扩增;或对这些SSR位点重新进行引物设计^[14-15]。对于玉米品种的真实性鉴定,建议最好先采用核心引物进行筛选,一般都会获得良好的结果。这样既可以减少引物筛选过程中的工作量,提高检测效率,又降低了引物合成的成本。如果利用核心引物还未达到预期效果,则可扩大引物筛选的范围。而且核心引物是也不是一成不变的,它始终处于一个动态的更新过程。如果在引物筛选过程中发现有符合核心引物标准的引物也可及时补充到核心引物库中,扩大核心引物库的范围或剔除其中的某些引物^[16]。

参考文献

- [1] 赵久然,王风格.玉米品种DNA指纹鉴定技术研究与应用[M].北京:中国农业科学技术出版社,2009
- [2] Smith J.S.C, Chin E O L, Shu H, et al.An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and Pedigree[J]. Theoretical and Applied Genetics,1997,95(1,2):163-173.
- [3] 于新艳,赵久然,王风格,等. SSR标记及其在玉米研究中的应用[J]. 安徽农业科学,2007,35(7):1918-1920.
- [4] Senior M L, Murphy J P, Goodman M M, et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system[J]. Crop Sci,1998,38:1088-1098.
- [5] 李新海,傅骏骅,张世煌,等.利用SSR标记研究玉米自交系的遗传变异[J].中国农业科学,2000,33(2):1-9.
- [6] 王风格,赵久然,郭景伦,等.中国玉米新品种DNA指纹库建立系列研究I.玉米品种纯度及真伪鉴定中SSR技术标准实验体系的建立[J].玉米科学,2003,11(1):3-6.
- [7] 谭君,丁仲芳,孙仕贤,等.西南常用玉米自交系SSR指纹图谱构建[J].西南农业学报,2003,16(2):1-6.
- [8] 赵静,张仁和,张兴华,等.利用SSR技术构建陕西省主要玉米自交系的指纹图谱[J].玉米科学,2008,16(2):26-29.
- [9] GB/T 3543.1-7—1995农作物种子检验规程[S].
- [10] 李晓辉,李新海,李文华,等.SSR标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J].作物学报,2003,29(1):63-68
- [11] 郭景伦,赵久然,尉德铭,等.玉米单粒种子DNA提取新方法[J].北京农业科学,1997,15(2):1-2.
- [12] 赵久然,王风格,郭景伦,等.中国玉米新品种DNA指纹库建立系列研究II.适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的SSR核心引物的确定[J].玉米科学,2003,11(2):3-5,8.
- [13] 郭景伦,赵久然,王风格.适用于SSR分子标记的玉米单粒种子DNA快速提取新方法[J].玉米科学,1997,15(2):1-2.
- [14] 王风格,易红梅,赵久然,等.适于玉米SSR核心引物的通用PCR扩增反应程序的建立[J].玉米科学,2005,13(2):16-17,25.
- [15] 刘旭光,张杰.分子生物学软件应用[M].北京:北京大学医学出版社,2007.
- [16] 王风格,赵久然,王璐,等.适于玉米杂交种纯度鉴定的SSR核心引物的确定[J].农业生物技术学报,2007,15(6):964-969.