

## 利用 SSR 分子标记构建玉米自交系的指纹图谱

李丽华 魏昕 潘光堂\*

(四川农业大学玉米研究所, 四川雅安 625014)

E-mail: [llhtg1997@163.com](mailto:llhtg1997@163.com)。

\*E-mail: [pangt@sicau.edu.cn](mailto:pangt@sicau.edu.cn)

**摘要:** 本实验利用 80 对 SSR 引物对 20 个玉米自交系进行扩增, 综合考虑扩增带的清晰程度及多态性、条带多少、引物重复性高低, 筛选出 Phi080, Phi123, Umc1061, Phi126, Phi065, Dupssr13, Phi102228, bnlg240, Phi083, Phi024 等 10 对引物, 构建了 20 个玉米自交系的指纹图谱。其中有 7 个材料各用 1 对引物就可确定其特征性谱带, 有 3 个材料各需用 2 对引物组合就能区分, 有 2 个材料需 4 对引物组合方能予以有效区分, 其余材料则需 8 对引物组合才可区分。本实验还对这 10 对引物的重复性作了验证, 再次证明利用 SSR 标记构建玉米自交系指纹图谱是可行的, 也是可靠的。

**关键词:** 玉米 自交系 SSR DNA 指纹图谱

DNA 分子标记技术本质上指能反映生物个体或种群间基因组中某种差异的特异性 DNA 片段<sup>[1]</sup>。简单序列重复 SSR 分子标记又称微卫星<sup>[2]</sup>, 是由 1-4 个碱基组成的重复序列, 在真核生物基因组中普遍存在, 表现为共显性标记。SSR 标记已经成为研究种质资源遗传多样性, 基因作图, 亲子鉴定的首选标记<sup>[3,4]</sup>。

近代指纹分析的概念结合生物技术的发展, 延伸到了 DNA 指纹图谱分析, 而且应用范围也从犯罪学扩大到医学和其他生命科学领域<sup>[5]</sup>。DNA 分子标记大多以电泳谱带的形式表现生物个体之间 DNA 差异, 通常也称为 DNA 的指纹图谱<sup>[6]</sup>。

近年来, 一些学者在玉米指纹图谱的利用方面做了大量研究工作。谭君等(2003)<sup>[7]</sup>对西南地区在生产上正在使用的 73 份玉米自交系构建了 SSR 指纹图谱表明利用 SSR 技术进行玉米自交系鉴定是可行、有效的。赵久然等(2003)<sup>[8,9]</sup>利用 SSR 分子标记对中国玉米新品种 DNA 指纹库建立进行了一系列系统研究, 他们对 SSR 技术进行了优化, 最终建立一套完善的适用于玉米品种鉴定的 SSR 标准体系。

DNA 指纹图谱技术可以对植物基因型做出明确的鉴定, 特别是对那些没有准确系谱记载的育种材料进行遗传分类, 弥补系谱记载的缺失; 育种家可以采用这项技术鉴定自交系的遗传特征, 保护这些自交系的品种权免受侵犯<sup>[10]</sup>。因此, 研究玉米自交系的指纹图谱具有重要意义。

---

本项目得到“北京农业育种基础研究创新平台, 北京市自然科学基金项目‘中国玉米标准 DNA 指纹库构建及关键技术研究’课题”和“四川省生物技术攻关项目”的资助。

本研究利用 SSR 分子标记技术, 目的是构建四川农业大学玉米研究所近年选育的优良自交系的指纹图谱, 以期找出其特征谱带, 更有效地保护它们的知识产权。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

表 1 列出四川农业大学玉米研究所的 15 个骨干自交系和 5 个代表常见的四大类群的模式自交系。

表 1 供试材料的名称及编号

编号	名称	编号	名称
1	21-ES	11	18-599
2	SCML204	12	441950
3	东 54-3	13	983015-6
4	3066	14	SCML203
5	Lc995	15	08-641
6	SAM3001	16	478
7	SAM1001	17	Mo17
8	SCML202	18	丹 340
9	SCML103	19	黄早四
10	975-12	20	5003

### 1.2 DNA 提取

每个供试材料各取种子 6-9 粒, 置于恒温培养箱中暗培养 7 天。采用 Maroof 等 (1994)<sup>[1]</sup>提出的 CTAB 法<sup>[1]</sup>提取叶片总 DNA, 并纯化, 用 BeckmanDU800 型紫外可见分光光度计检测 DNA 的质量和浓度, 将 DNA 样品稀释至 10ng/μl 备用。

### 1.3 PCR 扩增

SSR 扩增反应所用引物由塞百胜公司合成。反应体系: 每 20 μl 体积中含 1 X Buffer, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.4 mmol/L dNTP, SSR 引物 (前引物和后引物) 各 0.25 μmol/l, 1 U Taq DNA 聚合酶, 20ng DNA 模板, 反应液上加盖一滴矿物油, 于 PTC-100PCR 仪上进行扩增。

反应程序: 94℃ 预变性 5 min, 1 个循环; 94℃ 变性 40S, 60℃ 退火 35S, 72℃ 延伸 45S, 共进行 30 个循环, 最后在 72℃ 延伸 5min。

### 1.4 电泳、银染

在扩增产物中加入 3 μl 3×SGB (98% 去离子甲酰胺; 10mMEDTA, pH8.0; 0.025% 溴酚兰; 0.025 二甲苯青)。

上样量 4.5 μl, 在 1×TBE 缓冲液条件下, 用 4.5% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒定功

率 75W, 预电泳约 20 分钟, 75W 电泳约 40 分钟。银染参照辛景树<sup>[12]</sup>的程序进行。

### 1.5 数据的统计与分析

在相同的迁移位置上, 有带记为 1, 无带记为 0, 建立数据库。每个 SSR 位点的多态性信息量 (Polymorphic Information Content, PIC) 按 Senior M S<sup>[13]</sup>的公式计算。

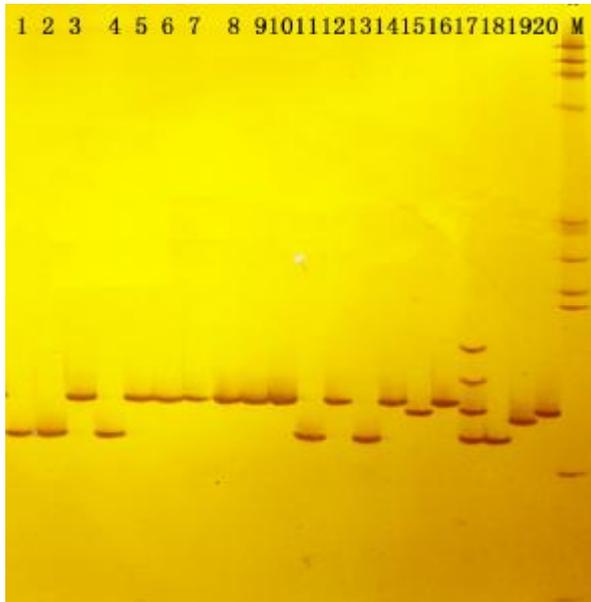
## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记测定结果

利用 80 对 SSR 引物对 20 个玉米自交系进行扩增, 最终选取带型清晰, 且有多态性的 17 对引物统计结果 (图 1, 表 2)

这 17 对 SSR 引物分布于玉米 10 条染色体上, 在 20 个玉米自交系之间共检测出 73 个等位基因变异, 每对引物检测出 2-8 个等位基因, 平均为 4.3 个。

图 1 20 个自交系的 SSR 指纹图谱



引物 P065

M: 分子量标准 (ΦX174-Hae III digest)

1-20 为供试自交系的序号, 与表 1 中的编号相同

表 2 17 对 SSR 引物在 20 个玉米自交系中检测到的等位基因数及 PIC 值

编号	引物	PIC 值	图谱位置	等位基因数
1	Phi056	0.67	1.01	4
2	Phi96100	0.84	2.01	8
3	Phi083	0.54	2.04	3
4	Phi127	0.69	2.08	4
5	Phi029	0.67	3.04	4
6	Phi102228	0.66	3.04-05	3
7	Phi072	0.73	4.01	6
8	Phi024	0.57	5.01	4
9	Phi331888	0.69	5.04	4
10	Phi126	0.31	6	2
11	Phi123	0.54	6.07	3
12	Dupssr13	0.76	7.04	6
13	Phi115	0.5	8.03	2
14	bnlg240	0.8	8.05	6
15	Phi080	0.67	8.08	5
16	Phi065	0.7	9.03	6
17	Umc1061	0.54	10.06	3

### 2.2 SSR 标记构建指纹图谱的结果

根据扩增的带型, 选出在大部分材料中都仅扩增出一条谱带, 且有多态性、重复性好能区分所有的供试材料的引物, 用于构建本实验的 20 个玉米自交系的指纹图谱。其中有 Phi080, Phi123, Umc1061, Phi126, Phi065, Dupssr13, Phi102228, bnlg240, Phi083, Phi024, 10 对引物组合可以将供试材料分开。引物 Phi080 对材料 7, 19 有特征性谱带; 引物 Umc1061 对材料 18 有特征性谱带; 引物 Phi126 对材料 9 有特征性谱带引物 Phi065 对材料 17 有特征性谱带; 引物 Dupssr13 对材料 12 有特征性谱带; 引物 Phi083 对材料 8 有特征性谱带; 引物 Phi123 与引物 Phi080 组合区分材料 1; 引物 Dupssr13 与 Umc1061 组合区分材料 4; 引物 P065 与 P080 组合区分材料 15; 引物 bnlg240, Phi102228, Phi123 与 Phi080 组合区分材料 2, 6; 其余材料由引物 Dupssr13, Phi080, Phi083, Phi123, Phi126, Phi024, bnlg124 与 Phi065 的组合来区分。

### 2.3 SSR 引物重复性的验证

本实验对这 10 对 SSR 引物的重复性也作了验证, 表明无论是调节反应体系还是反应程序, 只能造成非特异的扩增产物的变化, 但特异性产物的带型和在胶板上的相对位置是不会改变的, 说明 SSR 分子标记有较好的稳定性和重复性, 利用 SSR 分子标记构建 DNA 的指纹图谱是可靠的。

## 3 讨论与结论

### 3.1 对核心引物的补充及选用

本实验优先选用赵久然(2003)<sup>[9]</sup>选出的对构建指纹图谱较好的 27 对 SSR 引物进行扩增, 有 9 对引物扩增带型清晰, 6 对可用于构建 20 个自交系的指纹图谱, 表明确立构建自交系指纹图谱的核心引物是可行的, 但核心引物对于不同的材料, 而有所调整。本实验又补充进了 8 对引物, 特别是用于构建 20 个自交系指纹图谱的 4 对引物, 无论是从扩增带型还是重复性都很理想, 适用于构建玉米自交系的指纹图谱。由于对指纹图谱研究的不断深入, 可以对那些适合于指纹图谱研究的引物进行归类, 最终会确立一套适合构建玉米 DNA 指纹库的核心引物。对于后续研究者, 可以借鉴前人的经验, 减少合成引物的成本, 同时也减少筛选引物的成本和繁重工作。

多态性信息量高的引物, 说明其扩增产物的多样性好, 能区分较多的供试材料, 从而用较少的引物就可以将供试材料分开; 对于少数特殊的材料不易找出特征谱带或不易区分, 而实验室可筛选利用的引物又有限时, 只有个别 PIC 值较低的引物, 对其有特征性谱带或与其它引物组合才能区分开, 为了便于区分供试材料也只能保留这些引物, 如本实验中引物 Phi126, 虽然它的 PIC 值低于 0.5<sup>[4]</sup>, 但由于其对材料 9 有特征性谱带, 且材料 8、10、14 等位基因相同与其他材料相区别, 可以用 Phi126 与其他引物组合来区分材料 10、14, 在没有筛选到更为合适的引物的情况下本实验保留了这个引物。

### 3.2 在常规 SSR PAGE 检测和分析过程中遇到的问题和精确实验数据的获得

对于那些 PIC 值较高的引物,在材料又多的情况下,由于扩增片段相差几个碱基,用肉眼不容易辨别其相对位置时,为保证分析结果的准确性会放弃该引物而结合其它更多的引物来区分供试材料,势必造成人力,物力的浪费而增加成本。电泳时间难以控制、电压不稳定、银染效果不同等因素往往造成一些系统误差。

谭君等(2003)<sup>[7]</sup>曾提出研制基于 WINDOWS 2000 操作平台的玉米 DNA 指纹计算机应用软件的设想,通过利用软件自动识别大量供试材料的指纹,这样可以节省时间,提高分析效率,同时避免个体分析误差。郝晨阳等(2005)<sup>[3]</sup>用 SSR 荧光标记-全自动基因分析技术,通过 Genescan 和 Genotyper 程序分析试验结果,可以精确读出 SSR 等位变异扩增片段的大小,避免了使用分子量 Maker 粗略估计片段的大小以及片段大小差异不大样本量又多时谱带在胶板上的相对位置难以确定等问题。从而更有效的区分供试材料,大大提高试验效率,使指纹图谱的构建更精确、有效,更好的为产权保护提供依据。

## 4 本实验的不足及后续工作

为进一步提高现在 SSR 指纹分析的精确性、准确性和唯一性,我们将尝试用 SSR 荧光标记-全自动基因分析技术,通过 Genescan 和 Genotyper 软件对这 20 个玉米自交系的部分指纹图谱进行分析,与本试验的结果进行对比验证。

### 参考文献:

- [1] 傅荣昭.DNA 分子标记技术及其在药用植物研究上的应用前景[J].生物工程进展,1998,18(4):14-16
- [2] LITT M, LUTY J A.A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of dinucleotide repeats within the cardiac muscle actin gene[J].Am J Hum Gene,1998,44:397-401.
- [3] 郝晨阳,王兰芬,张学勇等.SSR 荧光标记和银染技术的比较分析.作物学报,2005,31(2):144-149.
- [4] 李晓辉,李新海,张世煌等.玉米杂交种 DNA 指纹图谱及其在亲子鉴定中的应用.作物学报,2005,3:1-8
- [5] 郑颖,吴凤镔.中药指纹图谱的研究进展.天然产物研究与开发,2003,15(1).
- [6] 王志林,吴新荣,赵树进.分子标记技术及其进展.生物技术,2002,(3).
- [7] 谭君,黄玉碧,杨俊品等.西南常用玉米自交系SSR指纹图谱构建.西南农业学报,2003,16(2).
- [8] 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.玉米科学,2003,11(1):3-6.
- [9] 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.玉米科学,2003,11(2):3-5,8.
- [10] 张世煌,李新海,田志国等.生物技术对玉米育种和新品种保护的影响.作物杂志,2000.
- [11] Maroof M.A.S.,Biyashev R.M.,Allard R.w.,*et al.* Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley,species diversity chromosomal locations,amd population dynamics,Proc.Natl.Acad.Sci,1994, 91:

5466-5470.

[12] 辛景树.杂交玉米品种 DNA 指纹图谱.中国农业科学技术出版社,2004.

[13] Smith J.S.C.,Chin E.C.L.,Shu H.,*et al.*An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize(*Zea mays* L.):comparition with data from RFLPs and pedigree.Theor Appl Genet,1997, 95: 163-173.

## The construction of fingerprints for maize inbred line by SSR markers

LI li-hua , WEI xin, PAN guang-tang\*

(*Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Ya'an625014*)

### Abstract

Fingerprints were established for 20 maize inbred lines by SSR markers.20 maize inbred lines were used to screen 80 SSR primers and finally a set of primer pairs fitting for establishing maize inbred lines DNA fingerprinting were conformed, which were Phi080, Phi123, Umc1061, Phi126, Phi065, Dupssr13, Phi102228, bnlg240, Phi083 and Phi024.At the same time the uniformity of repetitive experiments indicated it was a reliable method to construct maize inbred lines fingerprinting by SSR.

**Keywords:** *Maize Inbred lines SSR DNA fingerprinting*

李丽华: 女, 1977 年出生, 在读硕士研究生, 研究方向作物遗传育种。

\*潘光堂: 男, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种。