

贵州西山系列玉米杂交种 SSR 标记纯度鉴定的研究^①

曾桂萍¹, 戴保威¹, 田兴文²

1. 贵州大学农学院, 贵阳 550025; 2. 贵州省六枝地区种子分公司, 贵州 六枝 553000

摘要: 以 11 个贵州西山系列玉米杂交种及相应的 15 个亲本自交系为材料, 采用 SSR (Simple Sequence Repeat) 分子标记方法, 从 60 对多态性高的引物中分别筛选了双亲互补型特异引物, 并利用特异引物进行玉米杂交种纯度鉴定的检验。

关键词: 玉米; Simple Sequence Repeat (SSR); 纯度鉴定

中图分类号: S513

文献标识码: A

玉米杂交种室内纯度鉴定是玉米种子质量控制体系中的关键环节。种子纯度和品种真实性这项重要指标的检验, 采用籽粒形态鉴定、幼苗鉴定和田间小区种植鉴定等方法均存在一定缺陷。籽粒形态鉴定可供比较的性状差异少, 鉴定准确性差; 幼苗鉴定只适用于某些差异较大的品种, 可鉴定的品种少; 广泛采用的田间小区种植鉴定方法不仅费用高, 而且时间长, 几乎相当于一个生长发育周期, 种子企业常因在种子销售季节开始时还没有鉴定种子纯度而导致标签失真; 监督检验机构常在种子销售以后甚至农民播种以后才能鉴定出种子纯度, 失去了阻止劣质种子播种的机会^[1]。同工酶或种子储藏蛋白质电泳技术具有简单、快速、准确、成本低等优点, 根据该技术制定的玉米杂交种纯度鉴定技术标准正在得到广泛应用^[2], 然而, 仍有部分玉米杂交种因双亲间种子储藏蛋白质或同工酶谱带无多态性或杂交种谱带为非互补类型等原因, 利用蛋白质电泳技术难以找到杂交种特征谱带, 使得这部分玉米杂交种缺乏快速、可靠的纯度鉴定手段。上述方法的检测结果还常受到检验人员判断能力和掌握标准程度的影响, 以至于不同的检验员对同一样品可能有不同的鉴定结果。

SSR 标记数量丰富, 信息含量高, 呈共显性遗传, 不受任何环境因素的影响; 操作起来较灵活、简便、快速, 易于分析, 对 DNA 数量及质量要求不高, 检测结果准确可靠; 分离出的样品 DNA 可长期保存, 使进行追溯性或仲裁性鉴定成为可能; 重复性好, 引物序列易于交流^[1]。因此 SSR 分子标记技术比较适合用于玉米种子纯度和品种真实性鉴定。本研究以贵州山区玉米为材料, 筛选适合杂交种纯度鉴定的 SSR 位点引物, 建立一套完善的适用于玉米品种纯度鉴定的 SSR 标准体系。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试材料为 11 个目前贵州山区正在使用的西山系列玉米杂交种及相应的 15 个自交系亲本, 由贵州省六枝种子分公司提供, 如表 1 所示。60 对引物如表 2, 序列摘自 Maize D B, 由上海生物工程公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 DNA 提取

采用郭景伦等^[3]的玉米单粒种子 DNA 快速提取法并加以改进, 将单粒玉米种子的胚剥下, 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 300 μ L 氯仿和 300 μ L DNA 提取液(100 mmol/L Tris · HCl, 100 mmol/L EDTA 8.0, 500 mmol/L NaCl, 1.8% CTAB), 用锥形研杵研磨混匀, 在 12 000 r/min 下离心 2 min, 吸上清液。1% 琼脂糖电泳检测。紫外分光光度计测 OD₂₆₀ 值。

① 收稿日期: 2007-05-15

基金项目: 贵州省科学技术基金资助项目(黔科合 J 字[2005]2027 号)。

作者简介: 曾桂萍(1971-), 女, 四川隆昌人, 讲师, 硕士, 主要从事遗传育种教学及科研工作。

表 1 供试材料

编号	材料名称	编号	材料名称
1	西山 66 (西 12000-241×D6361)	14	苏 37 * S37
2	西山 99(苏 37×西 12000-241)	15	92 选 16-2-1
3	西山 70(苏 37 * S37×西 12000-241)	16	苏 1-1
4	西山 118(贞苏 3295-2B×西 12000-241)	17	西 02
5	西山 112(西 02×西 12000-241)	18	D18-7A
6	西山 121(92 选 16-2-1×甘肃白硬)	19	79-1E
7	西山 21(苏 37×D6361)	20	(白 3×DI)BC1-1×3 号
8	西山 7(苏 37 * S37×交 51 黄)	21	西 12000-241
9	西山 119((白 3×DI)BC1-1×3 号×D18-7A)	22	苏 37
10	西山 120(图×热抗病毒白 651)	23	D6361
11	西山 68(苏 1-1×79-1E)	24	热抗病毒白 651
12	贞苏 3295-2B	25	图
13	甘肃白硬	26	交 51 黄

表 2 供试 60 对 SSR 引物

引物	染色体位置	引物	染色体位置	引物	染色体位置	引物	染色体位置	引物	染色体位置
Bnlgl149	1.00	bnlg198	2.08	Umcl109	4.10	phi112	7.01	Phi065	9.03
Phi056	1.01	Phi101049	2.10	phi076	4.11	Phi034	7.02	Bnlgl209	9.05
Bnlgl083	1.02	phi104127	3.01	Phi024	5.01	phi328175	7.04	phi448880	9.06
bnlg439	1.03	Phi029	3.04	Phi109188	5.03	phi116	7.06	bnlg619	9.07
umc1122	1.06	phi053	3.05	phi085	5.07	umc1304	8.02	umc1277	9.07
phi064	1.11	bnlg197	3.06	bnlg238	5.06	Phi100175	8.03	phi041	10
Phi96100	2.01	umc1399	3.07	phi423796	6.01	Phi014	8.04	Phi059	10.02
bnlg125	2.02	umc1136	3.10	bnlg107	6.01	umc1161	8.06	phi062	10.04
umc1555	2.03	phi072	4.00	Phi031	6.04	bnlg240	8.06	umc1061	10.06
nc133	2.05	Nc004	4.03	phi123	6.07	Phi080	8.09	Bnlgl839	10.07
Bnlgl633	2.07	Phi079	4.05	phi089	6.08	umc1279	9.00	Phi065	9.03
phi127	2.08	Bnlgl1189	4.07	umc1545	7	Bnlgl1401	9.02	Bnlgl209	9.05

1.2.2 PCR 扩增反应体系

PCR 扩增反应体系总体积为 20 μL : 1×Buffer, 2.5 mmol/L Mg^{2+} , 150 $\mu\text{mol/L}$ dNTP, 0.3 $\mu\text{mol/L}$ SSR 引物, 1 U TaqDNA 聚合酶, 50 μg DNA 模板. 反应液上加盖 1 滴矿物油. PCR 扩增反应程序参照辛景树等^[4]并略作改进: 93 $^{\circ}\text{C}$ 5 min, 1 个循环; 93 $^{\circ}\text{C}$ 40 s, 58 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 45 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 5 min(其中: 退火温度视引物而定).

1.2.3 电泳检测及银染

PCR 扩增产物经 12% 聚丙烯酰胺凝胶电泳. 预电泳 60 V, 30 min; 120 V 电泳 3 h.

银染: 10% 酒精加 0.5% 冰醋酸固定 3 min; 1% AgNO_3 溶液染色 20 min; 蒸馏水快速漂洗 2~3 次; 3% NaOH 加 0.5% 甲醛显影.

照相. 在相同迁移位置上的 SSR 扩增产物, 有带记为 1, 无带记为 0.

2 结果与分析

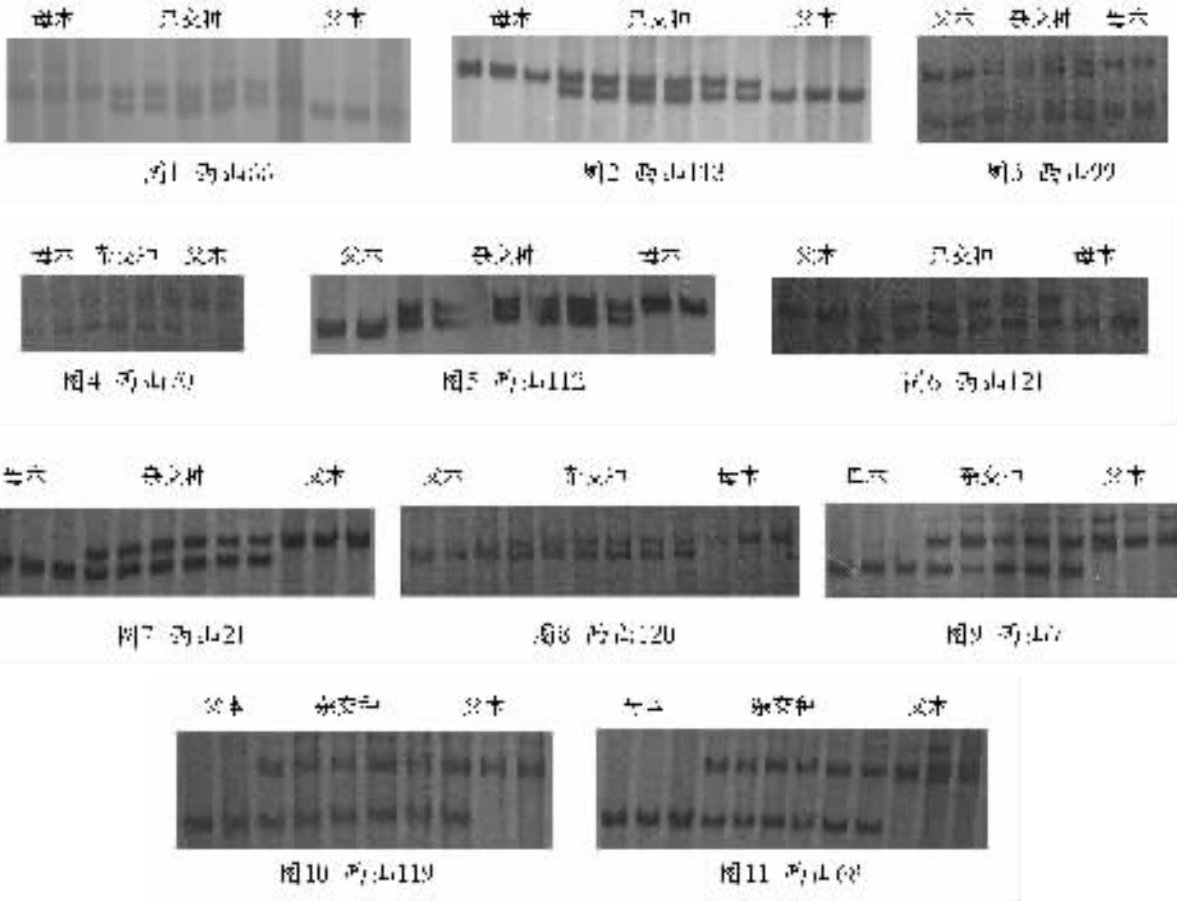
2.1 杂交种特征引物的筛选

将 SSR 分子技术用于种子纯度检测, 引物筛选是一个关键的技术前提. 理想的特征引物是双亲互补带型的特征引物. 本研究利用 SSR 标记技术在 60 对引物中, 筛选出 11 个杂交种和相应亲本自交系的双亲互补带型特征引物(表 3, 图 1-11 所示), 这些引物在相应杂交种及亲本中的扩增产物通过非变性聚丙烯酰胺电泳检测, 呈现双亲互补的特征谱带, 谱带间大小差异明显, 可以准确地鉴定父本、母本、混杂品种以及真实杂交种. 总结实验结果可知, Bnlgl238 可区别鉴定 6 个不同的杂交种, Bnlgl125 和 Phi072 都可区别鉴

定 4 个杂交种, 依次是 Phi126 有 3 个和 Phi065 有 2 个. 因此, 利用 SSR 标记进行种子纯度鉴定时, 集中使用一些多态性高的引物是可行的.

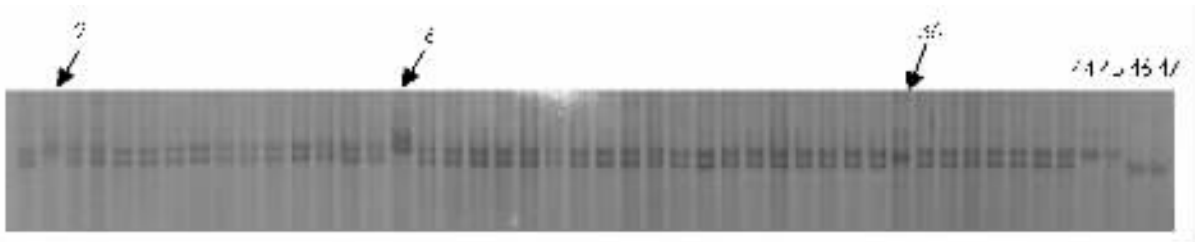
表 3 11 个杂交种的特征 SSR 引物

杂交种	引物	杂交种	引物
西山 66	Bnlg238	西山 21	Phi065
西山 99	Bnlg240	西山 7	Bnlg238、Phi080
西山 70	Bnlg125	西山 119	Bnlg238、Phi126、Bnlg125、Phi065
西山 118	Phi072、Bnlg125、Bnlg1083	西山 120	Bnlg238、Phi072
西山 112	Phi072	西山 68	Bnlg238、Phi126、Phi072
西山 121	Bnlg238、Phi126、Bnlg125		



2.2 纯度检验试验

提取西山 66(市场上购买的杂交种)及其亲本的 DNA 进行 SSR 分析, 结果见图 12. 可以非常清楚地发现, 2 号和 36 号样品是与母本相同的, 说明杂交种中混入了母本自交系的种子; 16 号样品与西山 66 杂交种不同, 与父本和母本都不同, 说明是混入了其它的种质. 这验证了本研究是可靠性和有实用价值的, 完全可应用于玉米的种质鉴定, 包括纯度和真实性的鉴定.



注: 1-43 为西山 66 杂交种; 44 和 45 为母本西 12000-241; 46 和 47 为父本 D6361.

图 12 西山 66 的纯度检验

3 讨 论

玉米杂交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.

特异引物对于亲缘关系很近, 可能飞入了其他父本的花粉或母本中混入接受了异源花粉的 F1 种子来说, 就不再是特异引物了^[5]. 这就需要进一步筛选多对扩增条带位置各不相同的双亲互补带型的引物来鉴别混杂其中的其他品种的种子. 多对引物组合起来扩增得到的特异分子标记, 可以更准确地检测出混入其中的亲本和其他品种的种子. 本研究结果中, 有 5 个杂交种只筛选到 1 对特异引物, 这就需要在以后的研究工作中进一步筛选补充, 以提高鉴定的准确性.

由于种质鉴定的时效性缘故, 需要的鉴定手段是不仅准确, 而且要快速. 本研究采用单籽粒 DNA 快速提取方法, 从种子胚中直接提取 DNA, 尽管其中含有各种细胞内含物, 如多糖、蛋白质、叶绿素、无机小分子等杂质, 但并不影响 PCR 扩增, 对 SSR 分析结果没有影响, 使用这样的 DNA 是可以满足纯度鉴定的要求. 这也说明 SSR 分析对 DNA 的质量要求不高. 因此, 用快速提取法提取 DNA 完全可以满足利用 SSR 分子标记进行种质鉴定的需要. 提取 100 个样品 DNA 只需 2 h, 大大缩短了 DNA 提取时间, 使利用 SSR 分子标记技术进行玉米种子纯度快速鉴定具有实用性.

参考文献:

- [1] 辛景树, 郭景伦, 贾希海. SSR 技术在玉米种子纯度鉴定上的应用(上) [J]. 种子科技, 2005, 3: 155—157.
- [2] 中华人民共和国农业部. 玉米种子纯度盐溶蛋白电泳鉴定方法 NY/T449—2001 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [3] 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.
- [4] 辛景树, 郭景伦, 贾希海. SSR 技术在玉米种子纯度鉴定上的应用(下) [J]. 种子科技, 2005, 4: 219—221.
- [5] 周 岚, 陈殿元. SSR 分子标记技术及其在玉米种子鉴定上的应用 [J]. 中国种业, 2005, 6: 51—52.

Study of Purity Identification of Hybrids of the Xishan Maize in Guizhou Using SSR Markers

ZENG Gui-ping¹, DAI Bao-wei¹, TIAN Xing-wen²

(1. Agronomy College, Guizhou University, Guiyang 550025, China; 2. Seed Company of Liuzhi, Liuzhi Guizhou, 553000)

Abstract: 11 maize hybrids of the Xishan in Guizhou and corresponding 15 inbred lines were analyzed with SSR molecular markers technique. 60 primer pairs were screened and specific primers of parent complementary type were identified for every hybrids seed. And test maize hybrid purity using specific primers.

Key words: maize; Simple Sequence Repeat(SSR); purity test

责任编辑 夏 娟