

文章编号:1003-8701(2011)03-0009-03

应用 SSR 标记技术进行引物筛选 及玉米杂交种纯度的鉴定

闫米格, 骈跃斌, 李素玲, 原佳敏, 张君捷

(山西省农业科学院食用菌研究所, 太原 030031)

摘 要 利用 SSR 标记技术分别筛选出玉米杂交种强盛 16、强盛 9、强盛 62、强盛 11 的特异引物, 建立了 4 个品种的种子纯度鉴定试剂盒。试验表明, 应用此试剂盒可快速、有效地鉴定 4 个杂交种种子纯度。

关键词 玉米杂交种; SSR 标记技术; 种子纯度鉴定; 引物筛选

中图分类号 S513

文献标识码 A

Screening of Primers and Testing of Seed Purity of Maize Hybrid by SSR Marker Technique

YAN Mi-ge, PIAN Yue-bin, LI Su-ling, YUAN Jia-min, ZHANG Jun-jie

(Edible Fungi Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China)

Abstract: In this study, polymorphic SSR primer pairs were screened for maize hybrids 'Qiangsheng 16', 'Qiangsheng 9', 'Qiangsheng 62', 'Qiangsheng 11', respectively. With SSR marker technique, the seed purity testing kits of four hybrids were established. The results showed that the testing kits could be effectively and rapidly used for seed purity analysis of four hybrids.

Keywords: Maize hybrid; SSR; Seed purity; Screening of Primers

种子纯度是评定玉米种子质量等级的主要依据。目前室内鉴定玉米杂交种纯度的方法主要是种子贮藏蛋白质凝胶电泳技术, 但种子贮藏蛋白质为基因表达产物, 种类有限, 多态性差, 或由于杂交种谱带表现为非互补类型, 所以该技术并不能适用于所有玉米杂交种的纯度鉴定^[1]。强盛 16、强盛 9、强盛 62、强盛 11 均为本单位培育出的玉米新品种, 目前已在生产上大面积推广, 但这些品种难以用种子蛋白质电泳技术进行室内纯度鉴定。

SSR 分子标记技术, 对于玉米杂交种纯度和真实性鉴定来说, 是一次技术革命, 该技术因具有数量丰富、多态性好、遗传上呈共显性、扩增稳定、引物序列易于交流等特点而受到广泛重视^[2], 在玉米种子纯度和品种真实性鉴定中得到了广泛应用^[3-5],

从而解决了一些玉米品种利用蛋白质电泳技术无法进行纯度鉴定的难题^[6-7]。

本文旨在利用 SSR 标记技术筛选出适合上述玉米杂交种纯度鉴定的特异性 SSR 引物, 并建立相应的种子纯度鉴定试剂盒。

1 材料与方法

1.1 供试材料

试验材料为玉米杂交种强盛 16、强盛 9、强盛 62、强盛 11 及其相应的亲本自交系(表 1)。

试验引用 20 对国家标准引物序列(表 2)。该引物序列由上海生工合成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 的提取

采用 CTAB 提取法。(1)取 4 个玉米杂交种及其亲本自交系各 50 粒, 用沙培法, 置于 30℃光照培养箱中, 在无光照条件下发芽 7~10 d、长至两叶一心;(2)每个材料取 25 株, 剪其新鲜黄化苗 3 cm, 分别装入 2 mL 离心管中, 于液氮中迅速研成

收稿日期:2011-04-06

基金项目:山西省农业科学院攻关项目(YYZJC 1013)

作者简介:闫米格(1959-), 男, 副研究员, 主要从事玉米育种、开发推广工作。

表 1 杂交种及其亲本自交系

编号	材料名称	编号	材料名称	编号	材料名称	编号	材料名称
1	强盛 16	4	强盛 9	7	强盛 62	10	强盛 11
2	强 113	5	100G	8	3412	11	大 913
3	白侯	6	001A	9	9284	12	B4

表 2 引物名称及编号

编号	名称	位置	等位基因数	编号	名称	位置	等位基因数
P01	bnlg439	1.03	5	P11	bnlg161	6.00	2
P02	bnlg2331	1.11	10	P12	phi299852	6.07	15
P03	bnlg125	2.02	2	P13	bnlg1792	7.02	8
P04	mmc0191	2.07	8	P14	phi116	7.06	4
P05	umc2105	3.00	9	P15	umc1741	8.03	6
P06	bnlg1496	3.09	8	P16	phi080	8.08	5
P07	phi072	4.00	5	P17	phi065	9.03	18
P08	bnlg2291	4.06	5	P18	bnlg1191	9.07	5
P09	umc1705	5.03	6	P18	umc2163	10.04	2
P10	umc1225	5.08	2	P20	bnlg1450	10.07	5

粉末 ;(3) 加入 CTAB 提取缓冲液,65℃ 保温 30 min ;(4)取出离心管,冷却片刻,加入等体积氯仿 / 异戊醇(24:1),摇床震荡 10 min ;(5)室温下 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清液并加入等体积的氯仿 / 异戊醇(24:1),摇床震荡 10 min ;(6)室温下 10 000 rpm 离心 10 min, 取上清液并加入 0.8 倍体积的异丙醇,小心摇匀至有白色沉淀出现 ;(7)4℃ 下 10 000 rpm 离心 5 min,弃上清液 ;(8)加入 75%乙醇洗涤 2 次,离心后倒去乙醇,风干 DNA ;(9) 加入 R40,4℃ 保存备用。

1.2.2 DNA 浓度的测定及模板的制备

将提取的 DNA,每管吸取 2 μ L,用 ddH₂O 稀释至 200 μ L,在蛋白质核酸定量测定仪上分别测定其浓度和纯度,根据测定的浓度值配制成浓度为 0.02 μ g/ μ L 的工作液。

1.2.3 SSR 反应体系

15 μ L 反应体系包括 5 μ L DNA 模板 ; 0.2 μ L Taq 聚合酶 ;10 $\times$ Buffer ;(0.75+0.75) μ L SSR 引物 ;6.4 μ L ddH₂O。

1.2.4 SSR 反应程序

PCR 反应在 PTC- 100PCR 仪上进行。反应程序为 :95℃ 预变性 2 min,94℃ 变性 1 min,55℃ 退火 40s,72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环 ;最后在 72℃ 延伸 5 min。

1.2.5 电泳

在扩增产物中分别加入 8 μ L 变性缓冲液,95℃ 变性 7 min 后,在 6%聚丙烯酰胺变性胶上电泳。预电泳 1 500 v30 min,电泳 1 500v 1~3 h。电泳时间根据不同引物序列、SSR 分子量大小及差异带型的可变程度进行调节。

1.2.6 染色

脱色与固定 :电泳后,将胶板放入 10%的冰乙酸固定液中,摇床摇 20 min,直至指示剂蓝色褪去。

漂洗 :将胶板从固定液中取出,沥干,用双蒸水洗 2 次,彻底去除残余的固定液。

染色 :将冲洗后的胶板放入银染液中,轻摇 30min。

过水 :将银染过的胶板取出,沥干,用双蒸水快速充分过水 10s,去除银染液。

显影 :将胶板放入显影液中,先用手摇几下,然后在摇床上摇荡,直至 DNA 条带现出。

定影 :将胶板从显影液中取出,沥干,放入固定液中 5min。然后用大量的水冲洗胶板,除掉残留的显影液,待晾干后扫描,统计带数。

2 结果和分析

2.1 特异引物的筛选

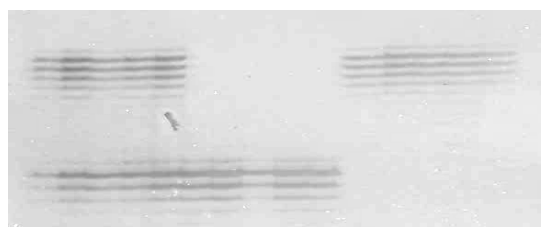


图 1 引物 bnlg2331 对强盛 16 及母本、父本的扩增结果

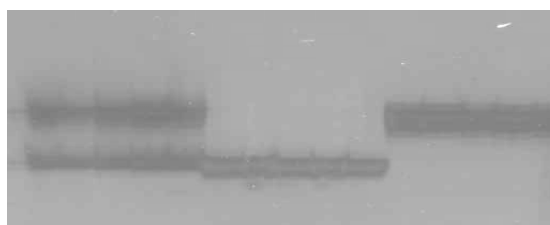


图 2 引物 bnlg1450 对强盛 9 及母本、父本的扩增结果

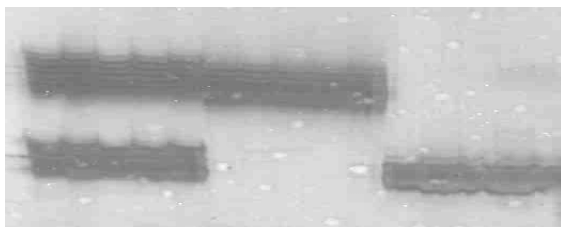


图 3 引物 umc2163 对强盛 62 及母本、父本的扩增结果

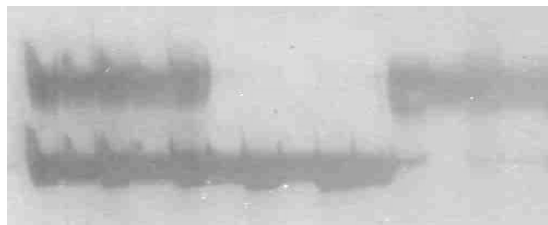


图 4 引物 bnlgl792 对强盛 11 及母本、父本的扩增结果

从表 1 所示的 20 对国家标准引物中, 筛选出

用于强盛 16、强盛 9、强盛 62、强盛 11 种子纯度鉴定的引物分别为 bnlg2331、bnlg1450、umc2163、bnlg1792。图 1、图 2、图 3、图 4 分别显示利用 4 种引物对 4 个杂交种及相应亲本自交系的 SSR 标记结果, 从中可以看出带型互补, 4 对引物的扩增带型可以清晰地区分开杂交种及其亲本自交系。

2.2 玉米杂交种纯度鉴定

对 4 个玉米杂交种强盛 16、强盛 9、强盛 62、强盛 11, 采用单粒种子胚 DNA 快速提取技术, 随机选取杂交种及亲本自交系的种子, 提取 DNA。用筛选到的引物 bnlg2331、bnlg1450、umc2163、bnlg1792 进行 SSR 标记分析。由图 5、图 6、图 7、图 8 可见, SSR 标记可以准确地区分出杂交种、父母本自交系及混入的其他种子样本。

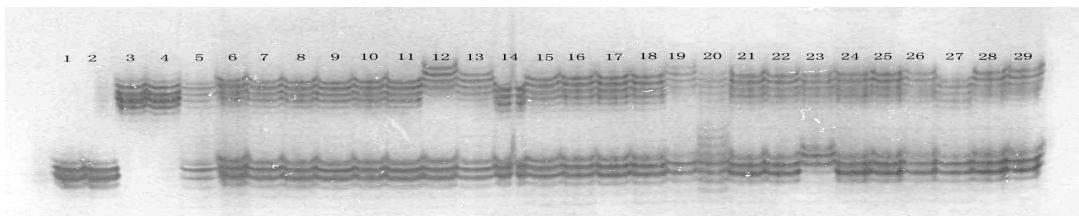


图 5 利用 bnlg2331 对玉米杂交种强盛 16 及亲本自交系的 SSR 标记分析结果

1~2 泳道为母本, 3~4 泳道为父本, 5~29 泳道为杂交种

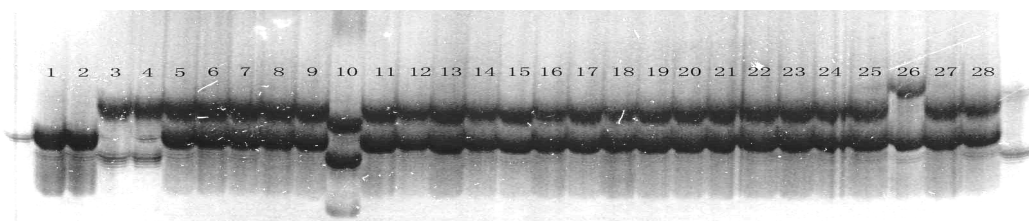


图 6 利用 bnlgl450 对玉米杂交种强盛 9 及亲本自交系的 SSR 标记分析结果

1~2 泳道为母本, 3~4 泳道为父本, 5~29 泳道为杂交种

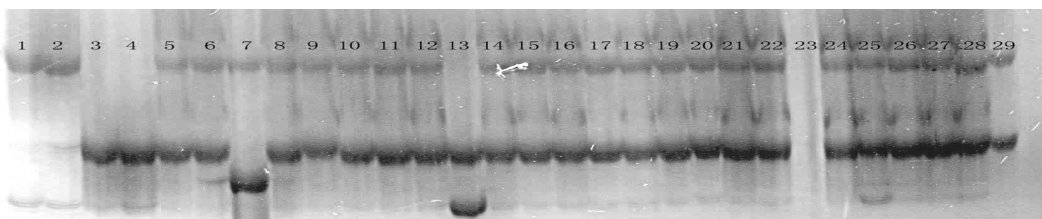


图 7 利用 umc2163 对玉米杂交种强盛 62 及亲本自交系的 SSR 标记分析结果

1~2 泳道为母本, 3~4 泳道为父本, 5~29 泳道为杂交种

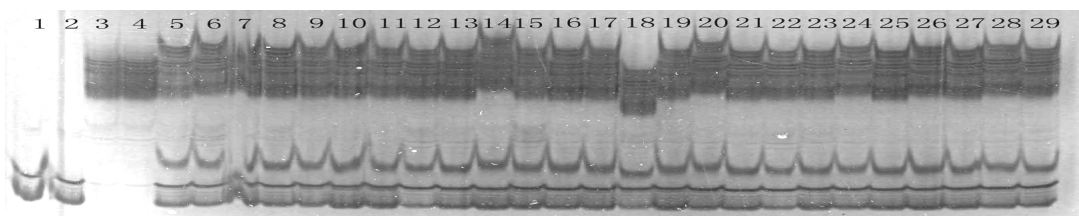


图 8 利用 bnlgl792 对玉米杂交种强盛 11 及亲本自交系的 SSR 标记分析结果

1~2 泳道为母本, 3~4 泳道为父本, 5~29 泳道为杂交种

3 结论和讨论

3.1 不同引物在退火温度、热循环程序等反应参数上存在较大的差异。通过对引物的筛选,找出适合不同玉米杂交种中可以扩增出大小差异明显的共显性谱带的相应引物。

3.2 鉴于玉米 SSR 标记丰富的多态性和目前已开发出大量玉米 SSR 引物数量,不难利用本程序筛选出适合任何一个玉米杂交种纯度鉴定的相应引物,彻底解决种子贮藏蛋白质电泳技术纯度鉴定方法不能适用于全部玉米杂交种纯度鉴定的难题^[8]。

3.3 为适应种子纯度快速检验的需求,我们建立了难以用种子蛋白电泳进行纯度鉴定的强盛 16、强盛 9、强盛 62、强盛 11 玉米新品种纯度鉴定试剂盒,包括特异引物、SSR 标记技术流程、扩增带型、种子纯度计算方法,以及相应注意事项等。

参考文献:

- [1] 李 群,李汝玉,颜廷进,等.应用 SSR 标记技术鉴定登海 11 号玉米杂交种纯度的研究[J].种子,2004,23(10):21-23.
- [2] 张文兰,李 群,段乃彬,等.玉米种子 DNA 快速提取及纯度鉴定新方法[J].种子科技,2006(1):37-38.
- [3] 关荣霞,刘 燕、刘章雄,等.利用 SSR 方法鉴定大豆品种纯度[J].分子植物育种,2003,1(3):357-360.
- [4] 苏顺宗,黄玉碧,杨俊品,等.利用 SSR 鉴定水稻杂交种子纯度的研究[J].种子,2003(1):23-35.
- [5] 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鉴定中的应用[J].作物学报,2003,29(1):63-68.
- [6] 赵久然,郭经伦,孔艳芳,等.利用 DNA 指纹技术进行玉米杂交种纯度及其真伪技术的研究[J].玉米科学,1999,7(1):9-13.
- [7] 郭经伦,赵久然,辛景树,等.玉米单株幼芽 DNA 快速提取新方法[J].华北农学报,2005,20(1):38-40.
- [8] 李汝玉,李 群,谭振馨,等.利用 SSR 标记鉴定玉米杂交种纯度技术规程[J].种子,2005(9):54-56.

(上接第 8 页)

3.4 水分胁迫研究是当前研究的热点,盆栽试验研究较多,但在大田条件下有许多问题有待于深入探讨,如适宜水分胁迫指标(水分胁迫时间、不同层次土壤持水量)的确定,水分胁迫复水后作物的生理代谢和补偿功能的作用研究,以及水分胁迫与农业技术、灌溉技术的配合研究等都属于起步研究^[2~4],这些问题的最终解决必然依赖于大量的田间试验资料的分析和研究。本研究成果初步结论尚有待于生产实践的检验。

参考文献:

- [1] 史文娟,胡笑涛,康绍忠.干旱缺水条件下作物调亏灌溉技术研究状况与展望 [J].干旱地区农业研究,1998,16(2):84-88.
- [2] 康绍忠,史文娟,胡笑涛,等.调亏灌溉对玉米生理指标及水分生产效率的影响[J].农业工程学报,1998,14(2):82-87.
- [3] 胡笑涛,梁宗锁,康绍忠.模拟调亏灌溉对玉米根系生长及水分利用效率的影响[J].灌溉排水,1998,17(2):11-15.
- [4] 孟兆江,刘安能,庞鸿宾,等.夏玉米调亏灌溉的生理机制与指标研究[J].农业工程学报,1998,14(4):88-92.