

文章编号: 1005-0906(2003)01-0003-04

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

王凤格, 赵久然, 郭景伦, 刘龙洲

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089)

摘要: 本研究从 DNA 提取、PCR 扩增、电泳检测等环节对 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。并以玉米杂交种农大 108 的纯度鉴定为例, 探索了该体系在玉米杂交种鉴定中实际应用的可行性。

关键词: 玉米; SSR; 纯度鉴定

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Series of Research on Establishing DNA Fingerprinting Pool of Chinese New Maize Cultivars

I. The Establishment of a Standard SSR System Fitting for Maize Cultivars' Identification

WANG Feng-ge, ZHAO Jiu-ran, GUO Jing-lun, LIU Long-zhou

(Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

Abstract: SSR technique was optimized from DNA extraction, PCR procedure and electrophoresis detection. A standard SSR system fitting for maize hybrid identification was established finally. The hybrid purity identification of Nongda108 was used as an example to explore the possibility of application of SSR technique on maize hybrid identification.

Key words: Maize; SSR; Purity identification

在玉米杂交种生产与销售过程中, 建立以质量检测为中心的良种繁育与种子管理体系, 对稳定和推广优良品种起着重要作用。蛋白质和同工酶电泳是目前通用的玉米杂交种纯度室内检测技术, 多数玉米杂交种和自交系能够用这种方法鉴别, 但由于蛋白质和同工酶是基因表达的产物, 产生的多态性有限, 对亲缘关系较近及遗传基础复杂的材料难以鉴别, 还有一些杂交种应用上两种方法得出的室内纯度检验结果与实际纯度不符, 实践中迫切需要开发新的检测技术。

理想的品种鉴定技术不但要准确可靠, 还要简单快速经济, 这是品种鉴定实现商业化的前提, 也是品种鉴定技术的发展趋势。SSR 是近年来发展起来的建立在 PCR 基础上的新型的 DNA 指纹技术, 具

有可靠性强、重复性高、多态性丰富等优点^[1], 同时, 由于 SSR 标记属共显性标记, 在玉米杂交种的纯度和真伪鉴定方面具有明显优势, 目前玉米数据库上已公布了 1 700 多个 SSR 引物对, 为 SSR 技术在玉米品种鉴定上的应用提供了有利条件。然而, 现有的 SSR 技术仍存在操作步骤较多、实验成本较高和耗费时间较长的问题, 不能完全适应实际检测的要求。为实现 SSR 技术的商业化, 本研究从 DNA 提取、PCR 扩增、电泳检测等环节对 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, 并探索了该体系在玉米杂交种鉴定中实际应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究使用的材料是目前我国推广面积最大的玉米杂交种农大 108 及其父本自交系黄 C 和母本自交系 178。自交系种子均是经过 2 年严格套袋

收稿日期: 2002-11-20

作者简介: 王凤格(1975-), 女, 硕士, 北京市农林科学院玉米研究中心助理研究员, 从事玉米分子生物技术应用研究。

※ 农业部及北京市重点科技项目。

自交获得,种植鉴定确定其为稳定纯和。杂交种种子为人工严格套袋杂交获得。

1.2 研究方法

1.2.1 DNA 提取

采用郭景伦等^[2]的玉米单粒种子 DNA 快速提取法并加以改进:将单粒干种子的胚剥下,放入 1.5 mL 离心管中,加入 300 μ L 氯仿后研磨,然后加入 300 μ L DNA 提取液(100 mM Tris-HCl,100 mM EDTA 8.0,500 mM NaCl,1.5% SDS)混匀后于 10 000 r/min 离心 2 min,吸上清液加入预先装有 300 μ L 异丙醇和 300 μ L NaCl (500 mM) 的 1.5 mL 离心管中,等 DNA 成团后用灭菌枪尖挑出,经 70%乙醇洗涤后加入 200 μ L TE 8.0,待充分溶解后备用。

1.2.2 SSR 引物

参考国内外文献资料^[3,4],选用多态性高,带型清晰稳定的 24 对 SSR 引物(表 1),由上海生工合成。

表 1 实验中使用的 24 对 SSR 引物

编号	引物	编号	引物	编号	引物
1	phi056	9	phi053	17	bnlg161
2	bnlg439	10	bnlg197	18	bnlg162
3	phi001	11	phi072	19	bnlg666
4	phi037	12	bnlg589	20	bnlg240
5	bnlg125	13	bnlg278	21	phi080
6	bnlg198	14	bnlg238	22	phi015
7	nc003	15	phi126	23	bnlg244
8	phi036	16	phi077	24	umc1196

1.2.3 SSR 扩增

(1) 反应体系。20 μ L 反应液包括:10 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L KCl,0.001% Gelatin,2.5 mmol/L $MgCl_2$,0.16 mmol/L 4dNTP,0.25 μ mol/L SSR 引物,1 单位 Taq DNA 聚合酶,2 μ L DNA 模板。

(2) 反应程序。试验比较了两种 SSR 扩增程序,第一种来自 CIMMYT 实验手册^[5]:94℃预变性 5 min,一个循环;94℃变性 1 min,60℃退火 2 min,72℃延伸 2 min,共 35 个循环;最后在 72℃延伸 5 min;一种为武耀廷等^[6]应用于棉花的 SSR 扩增:95℃预变性 2 min,一个循环;94℃变性 40 s,60℃退火 45 s,72℃延伸 60 s,共 30 个循环;最后在 72℃延伸 7 min。并对第二种程序作了进一步改进:将退火时间减少为 35 s,延伸时间减少为 45 s。以最终确定更为省时有有效的玉米 SSR 反应程序。PCR 扩增在

PTC-100 PCR 仪 (MJ Research, Watertown, MA) 上进行。

1.2.4 电泳检测

(1) 电泳。PCR 产物变性后在 4.5% 测序胶上分离。预电泳 85 W,20 min;电泳 80 W,40 min。

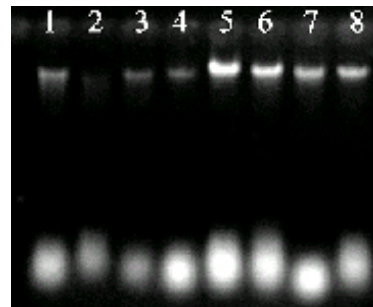
(2) 银染检测。试验比较了目前常用的两种银染方法,并对第二种方法作了进一步改进,以最终确定更为省时、经济有效的染色方法。第一种参考 CIMMYT 实验手册^[5]:10%冰醋酸固定 30 min;双蒸水漂洗 3 次,每次 3 min;新配的染色液中(0.1% $AgNO_3$,0.3% 甲醛)染色 30 min;双蒸水漂洗,时间不超过 10 s;预冷显影液中(3% Na_2CO_3 ,400 μ L $Na_2S_2O_3$,3 mL 37% 甲醛)显影;10%醋酸溶液中定影。第二种参考吴冠芸等^[7]介绍的银染法:10%乙醇加 0.5%冰醋酸固定 6 min,两次;0.2% $AgNO_3$ 溶液染色 10 min;双蒸水漂洗 2 次,每次 3 min;0.002% $Na_2S_2O_3$ 水溶液漂洗 2 min;显影液(3% $NaOH$,0.4% 甲醛)显影;0.75% Na_2CO_3 定影。改进后的银染法为:10%冰醋酸固定 3 min;双蒸水快速漂洗 1 次,不超过 10 s;0.2% $AgNO_3$ 溶液染色 5 min;显影液(3% $NaOH$,0.5% 甲醛)显影;10%冰醋酸定影。

2 结果与分析

2.1 适于玉米杂交种纯度和真伪鉴定的快速简单 SSR 技术的建立

2.1.1 玉米单粒种子 DNA 快速提取技术的确立

本研究在郭景伦等^[2]的单粒种子 DNA 快速提取方法的基础上,作了进一步改进:沉淀 DNA 采用异丙醇加 500 mM NaCl,而不是只用异丙醇。两种方法提取的 DNA 经琼脂糖电泳检测(图 1),其主带一致,改进后提取的 DNA 主带更清晰,无拖尾,紫外分光光度计检测 A260/A280 约为 1.8,表明该方法得到 DNA 无降解、去掉了大部分蛋白、质量更高。



1~4 为郭景伦等的单粒种子 DNA 快速提取法提取的 DNA;
5~8 为改进的快速提取法提取的 DNA。

图 1 电泳比较不同提取方法获得的玉米种子 DNA

2.1.2 玉米 SSR 反应程序的优化

第一种 SSR 扩增程序在 PTC-100 PCR 仪上约需要 4 h; 第二种 SSR 扩增程序由于缩短了变性、复性、延伸时间和循环次数, 在 PTC-100 PCR 仪上约需要 2.5 h; 改进后的 SSR 扩增程序进一步缩短了退火和延伸时间, 在 PTC-100 PCR 仪上仅需要约 2 h。比较三种反应程序对农大 108 杂交种 SSR 扩增效果的影响(图 2), 可见缩短反应时间对玉米 SSR 谱带无明显影响。



M: 分子量标准(pBR322/Msp I); 1-5、6-10、11-15, 分别为第 1、2、3 种扩增程序对 5 份农大 108 杂交种的电泳结果

图 2 采用三种 SSR 扩增程序(引物: bnlgl25)对农大 108 杂交种的电泳结果

2.1.3 玉米 SSR 电泳检测技术的优化

第一种银染法整个染色过程约需 1.5 h; 第二种银染法整个染色过程约需 1 h, 且两种方法均步骤较多, 试剂配制复杂。改进后的银染法简化了操作步骤, 整个染色过程不超过 20 min, 且试剂配制简单。与前两种银染法相比, 改进后的染色法染色较深, 显带快, 需注意不要在染色液里时间太长, 最好不超过 10 min, 否则凝胶容易从胶板上脱落。三种染色方法对结果的观察无明显差异。

最终我们建立了适用于玉米杂交种纯度和真伪检测的 SSR 标准检测体系如下:

DNA 提取采用改进后的玉米单粒种子 DNA 提取方法, 提取一份样品(100 粒种子)约需 1~2 h;

PCR 扩增采用第二种程序, 约需 2 h;

电泳采用 4.5% 测序胶, 预电泳 20 min, 电泳 40 min;

检测采用改进的银染法, 约 20 min。

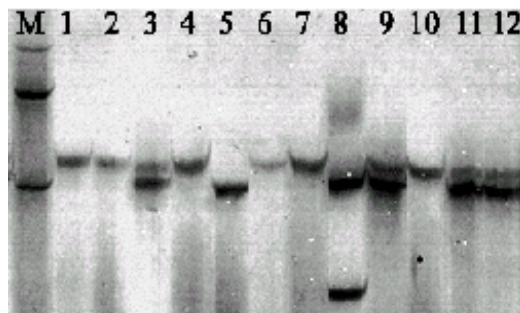
利用上述检测体系, 一个熟练的实验员可在一个工作日内对一份送检玉米品种(100 粒种子)进行纯度检测, 当日就可提供检测结果。

2.2 玉米杂交种农大 108 纯度的 SSR 鉴定

2.2.1 引物筛选

适用于玉米杂交种纯度鉴定的 SSR 引物应具有以下两个特征: ①引物本身 PIC 值(多态性信息量)要高, 从而具有较强的鉴别杂株的能力。②在玉米杂交种及其双亲间表现多态性, 从而可以鉴别杂交种中最常见的自交苗, 这是进行纯度鉴定的前提。基于以上认识, 首先根据文献资料, 初步确定 25 对具有较高多态性的引物, 然后通过试验进一步筛选, 找到在农大 108 及其双亲间表现多态性的引物 6 对, 这些引物是: bnlgl25、bnlg666、phi072、bnlg439、

bnlg161、umc1196。通过多次重复和比较, 最终确定带型清晰、稳定性好的引物 bnlgl25 作为检测农大 108 纯度的特异引物, 该引物具有以下特点(图 3): 杂交种具有两条带, 且恰好是双亲谱带的互补类型; 自交苗具有与母本相同的带型; 杂株具有 1~2 条带, 至少有一条带与杂交种的谱带位置不同, 从而极易与杂交种区分; 谱带的片段大小范围较集中, 片段较大(约 270 bp 左右), 从而适于在一块测序胶上多次点样; 重复性高, 不同批次试剂和不同批次合成的引物试验结果完全相同, 均得出相同的谱带类型。



M: 分子量标准(pBR322/Msp I); 3、9、11、12 真杂交种; 1、2、4、6、7、10 为母本; 5 为父本; 8 为其它杂交种

图 3 引物 bnlgl25 对农大 108 母本、父本、杂交种及杂株种子扩增结果

2.2.2 结果准确性验证

为验证纯度检测结果的准确性, 在一份农大 108 纯种样品中人为随机混入若干粒母本种子、父本种子和其它品种种子, 通过单粒法提取的 DNA 用引物 bnlgl25 检测, 观察记录不同的类型和带型数目, 可以准确的鉴别父本、母本、真杂交种和其它品种的数目。如图 3, 引物既可以准确地鉴定出母本(1、2、4、6、7、10 号)和父本(5 号)种子; 也可以鉴定出混杂的其它杂交种种子(8 号)。

自 2002 年 10 月以来, 北京市农林科学院玉米研究中心已采用该技术对几十份送检的农大 108 种子进行了纯度检测, 鉴定简单快速, 结果稳定可靠, 证明 SSR 技术完全可以应用于玉米种子纯度室内检测的实践中。

3 结论及讨论

(1) 单粒种子 DNA 快速提取技术是 SSR 技术应用于玉米杂交种纯度和真伪检测的前提。郭景伦等改进的玉米单粒种子 DNA 提取方法比常规的 CTAB 法节省了很多步骤, 简单易行, 使过去需要在液氮条件下粉碎, 一天才能完成的 DNA 提取工作, 改进为不需要液氮条件, 常温下只需 1~2 h 即可完成一份样品(100 粒种子)的 DNA 提取。本试验室在郭景伦等的玉米单粒种子 DNA 提取方法的基础上,

曾成功地将 RAPD 技术应用于玉米纯度和真伪检测的实践中^[8,9]。本研究在此基础上作了进一步改进, 获得了更高质量的 DNA, 为 PCR 扩增的稳定性提供了更可靠的保证。

(2) 发展高度稳定可靠并有较高区分能力的鉴定玉米杂交种的 DNA 标记对玉米杂交种纯度及真伪鉴定乃至新品种注册、产权登记保护等都是十分必要的。除 SSR 外, RAPD、AFLP 技术都被应用到品种鉴定中, RAPD 具有简单快捷经济的优点, 但多态性不高, 结果重复性欠佳; AFLP 多态性高, 但操作步骤复杂, 对实验技能及仪器设备的精密度要求很高, 加之是专利技术, 限制了其在实践中的应用; SSR 既具有 RAPD 简单快捷经济的优点, 又具有 AFLP 多态性高的优点, 同时克服了 RAPD 和 AFLP 重复性和稳定性差的缺点, 改进后的 SSR 技术操作更为简单快速, 检测时间和成本大大降低, 在玉米品种鉴定中更具优势。

(3) 本研究仅用少量引物就筛选到适于玉米杂交种农大 108 纯度鉴定的特异引物。目前在玉米上已开发了 1700 多对 SSR 引物, 但这些引物在玉米品种鉴定中的利用价值不同, 只有那些多态性高、带型清晰稳定、重复性好的引物才最适于进行品种鉴定, 因此, 通过总结已有的研究结果和进一步的实验, 确定一套适用于玉米品种鉴定的专用引物 (约 10 ~ 20 对), 可大大简化品种纯度和真伪鉴定中引

物的筛选工作, 对 SSR 技术在玉米品种鉴定上的普及将起到极大的推动作用。

参考文献:

- [1] 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.): Comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. Theor. Appl. Genet. 1997, 95: 163-173.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] 袁力行, 傅骏骏, Warburton M, 等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. 遗传学报. 2000, 27(8): 725-733.
- [5] Hoisington D A, Khairallah M M, Gonzales-de-Leon D. In: Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory[M]. CIMMYT, Mexico. D. F. 1994.
- [6] 武耀廷, 张天真, 郭旺珍, 等. 陆地棉品种 SSR 标记的多态性及用于杂交种纯度检测的研究[J]. 棉花学报, 2001, 13(3): 131-133.
- [7] 吴冠芸, 潘华珍. 生物化学与分子生物学实验常用数据手册[M]. 科学出版社, 1999, 263.
- [8] 赵久然, 郭景伦, 孔艳芳, 等. 利用 DNA 指纹图谱鉴别玉米杂交种纯度及真实性研究[J]. 玉米科学, 1999, 7(1): 9-13.
- [9] 郭景伦, 赵久然, 孔艳芳, 等. 引物组合法在利用 DNA 指纹鉴定玉米自交系真伪中的应用研究[J]. 华北农学报, 2000, 15(2): 27-31.