

文章编号: 1005-0906(2003)02-0003-04

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

赵久然¹, 王凤格¹, 郭景伦¹, 陈刚¹, 廖琴², 孙世贤², 陈如明³, 刘龙洲¹

(1. 北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089; 2. 全国农技推广服务中心, 北京 100026;

3. 农业部植物新品种保护办公室, 北京 100026)

摘要: 本研究利用 60 个玉米自交系对初选出的 158 个 SSR 引物对进行进一步筛选, 综合考虑 PIC 值大小、扩增带型统计的难易及引物的重复性高低, 确定 bnlg439、bnlg125、phi053、bnlg197、phi072、bnlg238、phi126、bnlg161、bnlg240、bnlg619 共 10 个引物对作为构建玉米自交系和杂交种指纹库的核心引物; 同时提出适用于计算玉米 SSR 指纹图谱概率的公式: $P=1/N$, 对自交系 $N=n$; 对杂交种, $N=C_n^1+C_n^2$ 。n 为所用引物的等位基因数。

关键词: 玉米; SSR; DNA 指纹; 核心引物

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

II. Confirmation of a Set of SSR Core Primer Pairs

ZHAO Jiu-ran¹, WANG Feng-ge¹, GUO Jing-lun¹, CHEN Gang¹,LIAO Qin², SUN Shi-xian², CHEN Ru-ming³, LIU Long-zhou¹(1. *Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China;*2. *The Whole Country's Service Center on Agricultural Technique Popularization, Beijing 100026, China;*3. *Plant New Variety Protection Office, Agricultural Ministry, Beijing 100026, China*)

Abstract: The conception of core primer was defined. 60 maize inbred lines were used to screen 158 SSR prime pairs and finally a set of core prime pairs fitting for establishing maize inbred line and hybrid DNA fingerprint pool were confirmed, which were bnlg439, bnlg125, phi053, bnlg197, phi072, bnlg238, phi126, bnlg161, bnlg240 and bnlg619. At the same time a formula for calculating existence probability of maize SSR fingerprint was advanced: $P=1/N$, for inbred lines, $N=n$; for hybrids, $N=C_n^1+C_n^2$. n is the allele number of the primer pairs.

Key words: Maize; SSR; DNA fingerprint; Core primer

目前在 Maize Database 上已公布了 1 700 多个玉米 SSR 引物对, 但这些引物在构建玉米自交系和杂交种指纹图谱中的利用价值不同: 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指纹库构建。因此, 通过总结已有的研究成果^[1]和进一步的实验, 确定一套适用于玉米指纹库构建的核心引物, 将对 SSR 技术在玉米种质鉴定上的普及起到极大的推动作用。所谓核心引物, 是指多态性、稳定性、重复性等综合特性好, 可作为初步研究优先选用的

一套引物。本研究采用 60 个玉米自交系为试验材料, 对初步拟定的 158 个 SSR 引物对进行进一步筛选, 通过比较不同 SSR 标记的 PIC 值(引物的多态性信息量), 并综合考虑带型统计的难易及结果的重复性高低, 初步确定了一套 SSR 引物作为构建玉米自交系和杂交种指纹图谱的核心引物。

1 材料与方法

1.1 材料

选用 60 个来自不同育种单位的自交系, 其中多数为国内玉米生产上高产杂交种的主要亲本(表 1)。根据已有的研究基础, 从 Maize Database 上已公布的 1 700 多个 SSR 引物对中初选了 158 对 SSR 引物, 由上海生工合成。

收稿日期: 2002-11-21

作者简介: 赵久然(1962-), 男, 博士, 研究员, 现任北京市农林科学院玉米研究中心主任, 兼任中国作物学会副秘书长、玉米产业化专业委员会副秘书长等。

* 农业部及北京市重点科技项目

致谢: 本研究得到 AMBIONET 中国实验室软件支持, 特此致谢

表 1 供试 60 个玉米自交系

编号	自交系	编号	自交系	编号	自交系
1	B73	21	(美杂 96-14)-111541	41	桂糯-611111
2	Mo17	22	(178/C111)-121732	42	黄糯系
3	E28	23	(P3354)-213221	43	PBC 垦糯
4	黄早四	24	(C111/黄四 3)-1(12)33	44	紫糯
5	掖 478	25	(先 17/黄四 3)-1(20)16	45	科甜-黄
6	87-1	26	244	46	沿 414
7	178	27	丹 341	47	812
8	沈 137	28	引-6	48	D141
9	郑 58	29	P-138	49	1143
10	素湾 1611	30	太 411	50	昌 7-2
11	齐 319	31	502	51	249
12	鲁 951-父	32	D5501	52	农系 110
13	200B(1)	33	720/9	53	CN1483
14	200B(2)	34	引-7	54	黄 C
15	许 052	35	引-8	55	系 02
16	1145	36	多黄 02	56	黄 480
17	京 24	37	沈 201(白)	57	京 404
18	京 89	38	农大糯(白)	58	C136
19	京 501	39	中糯 08	59	B84
20	C123	40	中糯 04	60	90110

注: 200B(1)和 200B(2)为不同来源的两份 200B 自交系。

1.2 试验方法

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 扩增 反应体系:20 μ L 反应液中包括:10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 2.5 mmol/L MgCl₂, 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。

反应程序:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 一个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 35 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 共 35 个循环。PCR 扩增在 PTC-100 PCR 仪(MJ Research, Watertown, MA)上进行。

1.2.3 电泳检测 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。银染:10%冰醋酸固定 3 min;双蒸水快速漂洗 1 次,不超过 10 s;0.2% AgNO₃ 溶液染色 5 min;显影液(3% NaOH, 0.5% 甲醛)显影;10%冰醋酸定影。

1.2.4 数据统计分析 SSR 扩增产物以 0, 1, 9 统计

建立数据库。在相同迁移率位置上,有带记为 1, 无带记为 0, 缺失记为 9。每个 SSR 位点的多态性信息量(Polymorphic Information Content, 简称 PIC)按 Senior M S^[3]等提供的公式计算,即 $PIC=1-\sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率。采用 NTSYS-pc version-2.02^[4]统计软件,根据公式 $F=2N_{xy}/(N_x+N_y)$ 计算任意两个个体间的片段共享度(N_x 和 N_y 分别为第 x 和第 y 个个体共享的条带数, N_{xy} 为任意两个个体共享的条带数)。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记测定结果

利用 158 对 SSR 引物对 60 个玉米自交系进行扩增,最终选取带型清晰且有多态性的 27 对引物统计结果(图 1, 表 2)。

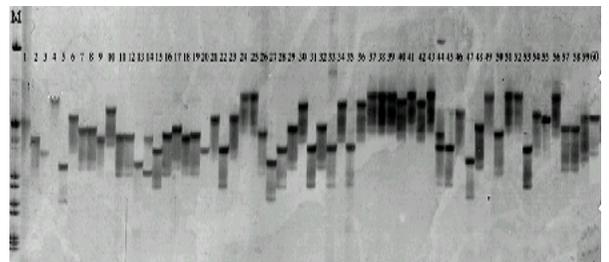


图 1 60 个玉米自交系的 SSR 指纹图谱

(引物: bnlgl61)

M: 分子量标准(pBR322/Msp I);

1-60 为供试自交系(序号与表 1 中的编号相同)

表 2 27 对 SSR 引物在 60 个玉米自交系中检测到的等位基因数及 PIC 值

编号	引物	图谱位置	等位基因数	PIC	编号	引物	图谱位置	等位基因数	PIC
1	phi056	1.01	4	0.66	15	phi048	5.07	3	0.50
2	bnlg439	1.03	6	0.70	16	phi126	6.00	8	0.85
3	bnlg125	2.02	5	0.73	17	bnlg161	6.00	8	0.85
4	umc1165	2.02	3	0.44	18	phi123	6.07	2	0.40
5	bnlg198	2.08	5	0.64	19	phi116	7.06	5	0.60
6	phi099	3.02	2	0.49	20	phi119	8.02	3	0.64
7	phi053	3.05	4	0.67	21	phi115	8.03	2	0.49
8	bnlg197	3.07	6	0.72	22	bnlg240	8.05	5	0.78
9	phi047	3.09	3	0.57	23	bnlg162	8.05	6	0.70
10	phi072	4.01	4	0.70	24	phi080	8.08	4	0.65
11	bnlg589	4.11	3	0.64	25	phi065	9.03	4	0.63
12	phi024	5.01	4	0.72	26	bnlg619	9.07	6	0.78
13	bnlg238	5.06	6	0.82	27	umc1196	10.07	4	0.71
14	phi085	5.07	3	0.60					

27 对 SSR 引物分布于玉米 10 条染色体上,在 60 个玉米自交系间共检测出 118 个等位基因变异,每对引物检测出 2~8 个等位基因,平均为 4.4 个。其中 PIC 值超过 0.7 的有 12 个,即 bnlg439、bnlg125、bnlg197、phi072、phi024、bnlg238、phi126、bnlg161、bnlg240、bnlg162、bnlg619、umc1196。结合考虑扩增带型统计的难易及引物的重复性高低,初步确定 bnlg439、bnlg125、phi053、bnlg197、phi072、bnlg238、phi126、bnlg161、bnlg240、bnlg619 共 10 个引物对作为一套核心引物(表 3),可以利用这套引物对今后所有送检材料进行初步鉴定。

表 3 适用于玉米自交系和杂交种指纹图谱构建的核心引物名单

编号	引物	图谱位置	等位基因数	PIC
1	bnlg439	1.03	6	0.70
2	bnlg125	2.02	5	0.73
3	phi053	3.05	4	0.67
4	bnlg197	3.07	6	0.72
5	phi072	4.01	4	0.70
6	bnlg238	5.06	6	0.82
7	phi126	6.00	8	0.85
8	bnlg161	6.00	8	0.85
9	bnlg240	8.05	5	0.78
10	bnlg619	9.07	6	0.78

2.2 核心引物有效性的理论验证

从分子遗传学的理论可知,对于 SSR 引物,其基因座位上的等位基因通常没有显隐性之分而表现共显性。因此,对一个玉米自交系来说,一个引物对一般仅扩增出 1 个特征带(由于存在剩余变异,某些自交系中扩增出 2 个特征带^[4],但概率很低);由于目前玉米杂交种绝大多数是单交种,对一个玉米杂交种来说,一个引物对一般仅扩增出 1 个或 2 个特征带。如果某个引物对的等位基因数是 n ,则该引物

理论上可区分的最大自交系数为 $N=n$,最大品种数 $N=C_n^1+C_n^2$,或出现相同指纹图谱的概率 $P=1/N$ 。如引物 bnlg439 的等位基因数是 6,则该引物可区分的最大自交系数 $N_1=6$,最大品种数 $N_1=C_6^1+C_6^2=6+6\times 5/2=21$,引物 bnlg125 的等位基因数是 5,则该引物可区分的最大自交系数 $N_2=5$,最大品种数 $N_2=C_5^1+C_5^2=5+5\times 4/2=15$,引物 phi072 的等位基因数是 4,则该引物可区分的最大自交系数 $N_3=4$,最大品种数 $N_3=C_4^1+C_4^2=4+4\times 3/2=11$,其余类推。因而引物 bnlg439、bnlg125、phi072 的组合可区分的最大自交系数 $N=N_1\times N_2\times N_3=6\times 5\times 4=120$,出现相同指纹图谱的概率 $P=8.3\times 10^{-3}$,最大品种数 $N=N_1\times N_2\times N_3=21\times 15\times 11=3465$,出现相同指纹图谱的概率 $P=2.8\times 10^{-4}$;本研究中确定的一套 10 个引物对的核心引物组合可区分的最大自交系数 $N=4\times 6\times 5\times 4\times 6\times 6\times 8\times 8\times 5\times 6=33177600$,出现相同指纹图谱的概率 $P=3.0\times 10^{-8}$,最大品种数 $N=11\times 21\times 15\times 11\times 21\times 21\times 36\times 36\times 15\times 21=6.5\times 10^{11}$,出现相同指纹图谱的概率 $P=1.5\times 10^{-12}$ 。因此,理论上而言,利用这套引物构建玉米自交系和杂交种指纹库是完全可行的。

2.3 核心引物有效性的实践验证

为进一步验证这套核心引物的有效性,利用这套引物的指纹数据计算任意两个自交系间的片段共享度(F),F 值均小于 1,其范围在 0.60~0.92 之间,平均为 0.74(F 值未列出),任意两个自交系的带型均不同,这套引物完全可以区分开 60 个自交系。因此建议在今后的玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制中,可优先从这套引物中选择适合的引物。

3 讨论与结论

(1)核心引物概念的明确及筛选确定(下转第 8 页)

(上接第 5 页) 在玉米 DNA 指纹库的构建上具有重要的意义。玉米指纹库构建的核心引物与核心探针及玉米杂种优势群划分的核心引物均不同: 在玉米上的核心探针是指在染色体上每隔 20 cM 均匀选取的起界标作用的探针, 其选择的重要指标是在染色体上均匀分布; 玉米杂种优势群划分的核心引物与核心探针有相似之处, 即选择的重要指标也是在染色体上均匀分布; 而玉米指纹库构建的核心引物选择的重要指标是 PIC 值要高, 而与引物在染色体上的分布无直接关系。核心引物的确定是 SSR 标准实验体系的重要组成部分, 也是 SSR 指纹鉴定商业化的关键环节, 它不仅大大减少了合成引物的成本, 也大大减少了筛选引物的繁重工作, 并使得不同研究者的指纹图谱可以相互比较和整合。本研究提出的一套核心引物为建立中国玉米新品种标准 DNA 指纹库奠定了基础。当然, 随着实验的进一步深入, 可能会有更好的引物不断补充到核心引物中, 某些引物也会从核心引物中去掉, 因此, 核心引物的确立又是一个不断调整, 不断优化的过程。

(2) 在以往的对指纹图谱的研究中, 从理论上

计算所获图谱出现概率的研究较少。吴渝生等^[5]提出的计算玉米 SSR 指纹图谱出现概率的公式为 $P=1/2^n$, 其中 n 为等位基因数目。而玉米品种一般为单交种, 即一个引物对一般仅能扩增出 1 个或 2 个特征带, 因此该公式得出的概率值偏低, 不能反映玉米品种指纹的真实情况。本研究提出的计算玉米品种 SSR 指纹图谱出现概率的公式更加接近玉米指纹图谱的真实情况, 可以作为今后玉米新品种保护和品种真伪鉴定的依据。

参考文献:

- [1] 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.
- [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 Science, 1998, 38: 1088-1098.
- [4] Rolf J F. NTSYS-pc: Numerical taxonomy and multivariate analysis system [M]. Version 1.7 Exeter Software, Setauket, NY. 1992.
- [5] 吴渝生, 郑用珪, 杨文鹏. 玉米杂交种和亲本 SSR 指纹图谱的构建. 玉米生物技术与育种高级研讨会论文集[C]. 2002.