

文章编号: 1005-0906(2007)06-0016-03

利用 ISSR 标记鉴别玉米品种的初步研究

景建洲^{1,2}, 李东亮¹, 张 勇¹, 陈小科², 李建辉¹

(1. 郑州轻工业学院食品与生物工程学院, 郑州 450002; 2. 河南省生物工程技术研究中心, 郑州 450002)

摘 要: 采用 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法从 10 个玉米品种种子胚中提取全基因组 DNA, 用正交实验法优化 ISSR-PCR 反应体系, 筛选扩增条带清晰的引物, 然后用所筛引物对 10 个玉米品种 DNA 扩增, 分析其扩增带纹差异, 找出能够鉴别 10 个玉米品种的合适引物。研究结果表明: ①优化的 ISSR-PCR 反应参数为: 1.5 mmol/L Mg^{2+} 、0.375 mmol/L dNTP、0.5 μ mol/L 引物、2.5U Taq DNA 聚合酶; ②从 40 条 ISSR 引物筛选出 11 条扩增条带清晰、多态性较高的引物, 它们共扩增出 101 条条带; ③利用引物 UBC808 能将 10 个供试玉米样品区分开。

关键词: 玉米; 分子标记; ISSR; 品种鉴别

中图分类号: S326; S513

文献标识码: A

Preliminary Studies on Using ISSR Marker of Differentiate Maize Varieties

JING Jian-zhou^{1,2}, LI Dong-liang¹, ZHANG Yong¹, CHEN Xiao-ke², LI Jian-hui¹

(1. College of Food and Biology Engineering, Zhengzhou University of Light Industry, Zhengzhou 450002, China;

2. Henan Bioengineering Technology Research Center, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Genomic DNA of 10 maize varieties were extracted from the embryos using CTAB method, and suitable ISSR(Inter-simple sequence repeats) reaction system was established with multifactor orthogonal experiment. The feasible ISSR primers were screened which could be used to distinguish 10 varieties based on the ISSR fingerprints. The results showed that: ①The optimized ISSR reaction system, namely 20 μ L reaction system contained 1 $\times$ PCR buffer, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 0.375 mmol/L dNTP, 0.5 μ mol/L primer and 2.5U Taq DNA polymerase. ②101 polymorphism bands were obtained steadily in 10 maize varieties by 11 ISSR primers chosen from 40. ③All of the 10 varieties could be differentiated from each other based on their specific bands established by primer UBC808.

Key words: Maize; Molecular markers; ISSR; Identification of varieties

玉米种质的传统鉴定比较繁琐、工作量大且可靠性较差。随着分子生物学的发展, 分子标记技术被广泛应用生物学的每个角落。分子标记技术的发展为玉米的种质鉴定提供了新的手段, 分子标记在玉米育种中主要是用于新种质的鉴定和自交系杂优类群划分。

本研究利用 ISSR 标记进行 10 个玉米品种的种质鉴定, 以期为玉米的真伪鉴定和品种产权保护提供技术支持。

1 材料与方法

收稿日期: 2006-11-30

基金项目: 河南省青年骨干教师资助项目(教高 2005-461-110)

作者简介: 景建洲(1964-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物分子标记的研究。Tel: 0371-63557375

E-mail: jzjing@zzuli.edu.cn

1.1 实验材料

10 个品种玉米种子: 沈单 10(YM01)、LN3(YM02)、豫玉 29(YM03)、豫玉 25(YM04)、鲁单 981(YM05)、沈单 16 号(YM06)、豫玉 32(YM07)、浚单 22(YM08)、郑单 958(YM09)、郑单 21(YM10), 2006 年 3 月购于河南省农业科学研究院, 室温干燥储藏。

1.2 玉米总 DNA 的提取

将玉米种子用去离子水浸泡 1 d, 剥出胚 -20℃ 冷冻 2 d。取 5 粒胚在瓷研钵中加液氮研磨成粉末, 用 CTAB 法提取 DNA, 用 Pharmacia LKB. Biochrom 4060 UV-Visible Spectrophotometer 测定 DNA 的紫外光吸收值, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检查 DNA 的纯度和完整性。

1.3 ISSR-PCR 扩增体系优化

参考文献 8 设计了原始的 ISSR 实验条件。采用单因素梯度实验考察 Mg^{2+} 离子浓度(A)、dNTP 浓度

(B)、引物浓度(C)和 Taq 酶的用量(D)等因素的影响,根据实验结果设计因素 A、B、C、D 的正交实验表 L9 (3⁴)(表 1)进行正交实验。1.5%琼脂糖凝胶,97 V 电压在 0.5 × TBE 缓冲液中电泳 1.5 h,0.5 μg/mL EB 染色,紫外灯下检测,MEGA10TM Gel-pro ANALUZER 凝胶成像系统照相记录结果。

表 1 ISSR 体系成分正交实验表
Table 1 The orthogonal design for optimizing ISSR reaction system

编 号	A	B	C	D
No.	(Mg ²⁺ , mmol/L)	(dNTP, mmol/L)	(Primer, μmol/ L)	(Taq, U)
1	1.5	0.125	0.25	0.5
2	2.5	0.250	0.50	0.5
3	4.0	0.375	0.75	0.5
4	2.5	0.375	0.25	1.5
5	4.0	0.125	0.50	1.5
6	1.5	0.250	0.75	1.5
7	4.0	0.250	0.25	2.5
8	1.5	0.375	0.50	2.5
9	2.5	0.125	0.75	2.5

1.4 ISSR 引物筛选

选取 YM01 进行预备实验,按照优化的 ISSR-PCR 扩增条件,从 40 个 ISSR 引物(哥伦比亚大学公布的序列,上海生工合成)筛选扩增条带多、带纹清晰、带纹之间没有拖尾的引物作为品种鉴定的候选引物。每条引物都需进行退火温度的梯度实验优化条件。

1.5 品种区别与鉴定

用所筛选的引物分别对 10 个玉米品种的 DNA 扩增,扩增产物进行电泳检测,分析其带纹差异。挑出能够明显区分 10 个玉米品种的引物,以图片的形式记录实验结果。

2 结果与分析

2.1 DNA 提取结果与分析

由图 1 可以看出,电泳条带清晰、均匀,无拖尾现象,说明所提取 DNA 比较完整,纯度较高,RNA、蛋白质和多糖等杂质污染极少。

2.2 优化扩增结果

正交实验中,实验 2 和 8 扩增效果较好,实验 1 扩增的信息量较少,实验 3、4、5、7、9 扩增拖尾现象较严重(图 2)。因此,确定 ISSR-PCR 反应体系(20 μL)的最优扩增条件为:1.5 mmol/L Mg²⁺、0.375 mmol/L dNTP (购于上海生工)、0.5 μmol/L 引物和 2.5U Taq

DNA 聚合酶(购于天为时代)。PCR 反应在 PTC-200 Peltier Thermal Cycler(MJ RESEARCH)上进行;扩增程序为:94℃预变性 5 min,再进行 94℃变性 45 s、54℃退火 60 s、72℃延伸 90 s 的 35 次循环扩增,最后 72℃延伸 5 min。

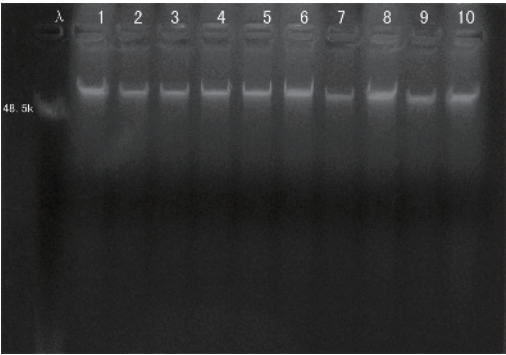


图 1 玉米品种 YM01–YM10 的 DNA 电泳
Fig.1 The electrophoresis of YM01–YM10 DNA

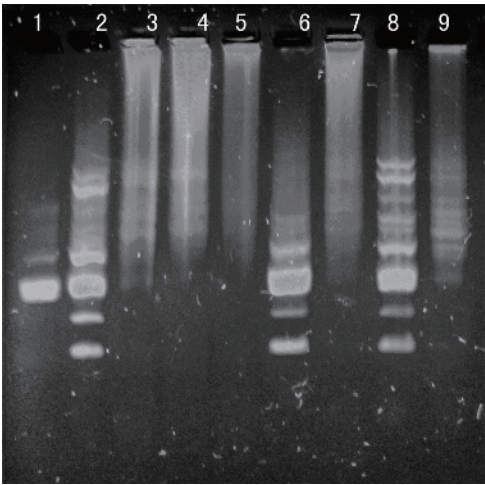


图 2 ISSR 正交实验扩增结果
Fig.2 ISSR amplification result based on orthogonal test

2.3 引物的筛选

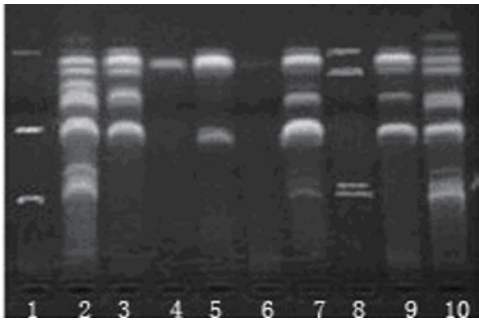
按照优化后的扩增条件,从 40 条 ISSR 引物中筛选出扩增结果稳定、多样性高的 11 个引物(表 2)。11 个 ISSR 引物对其扩增出 101 条稳定性好、清晰度高的条带,平均每个引物能扩增出 9.2 条带,大小在 300 ~ 2 500 bp 之间。其中 94 条具有多态性,多态性比率达 93.1%。

2.4 品种鉴别

通过实验筛选出了能够完全区别 10 个玉米品种的 ISSR 引物 UBC808(表 2),它们能够比较好的显示 10 个玉米品种的分子差异,成功建立了玉米品种间差异分子标记。

表 2 11 个 ISSR 引物序列
Table 2 The sequence of 11 ISSR primers

编号 No.	序列 Sequence
UBC ₈₀₇	AGAGAGAGAGAGAGAGT
UBC ₈₀₈	AGAGAGAGAGAGAGAGC
UBC ₈₁₅	CTCTCTCTCTCTCTCTG
UBC ₈₁₇	CACACACACACACACAA
UBC ₈₁₈	CACACACACACACACAG
UBC ₈₂₃	TCTCTCTCTCTCTCTCC
UBC ₈₂₆	ACACACACACACACACC
UBC ₈₂₇	ACACACACACACACACG
UBC ₈₄₂	GAGAGAGAGAGAGAGAYG
UBC ₈₆₇	GGCGGCGGGCGGCGGGC
UBC ₈₇₈	GGATGGATGGATGGAT



1、沈单 10;2、LN3;3、豫玉 29;4、豫玉 25;5、鲁单 981;
6、沈单 16;7、豫玉 32;8、浚单 22;9、郑单 958;10、郑单 21

图 3 UBC₈₀₈ 引物 ISSR-PCR 产物

Fig.3 The electrophoresis of ISSR-PCR with UBC₈₀₈

3 讨 论

Mg²⁺ 浓度、dNTP 及引物浓度都是 PCR 扩增中非常重要的影响因素。Mg²⁺ 是 Taq DNA 聚合酶实现其聚合反应所必需的,但 Mg²⁺ 最终反应浓度还会受到体系中其它成分尤其是 dNTP 的影响,因此,Mg²⁺ 浓度的确定应同时考虑这些因素。dNTP 会对 Mg²⁺ 产生拮抗作用,主要原因是 dNTP 分子中的磷酸基

团能定量地与 Mg²⁺ 结合,使实际反应中 Mg²⁺ 的浓度下降。另外,Mg²⁺ 浓度对反应的特异性和扩增效率都有影响。Mg²⁺ 浓度过高会使非特异性扩增产物增加,过低则使扩增产物减少。而 dNTP 是 PCR 的原料,浓度过高产生错误掺入,浓度过低效率过低。而引物浓度太低不能扩增,浓度太高产生新的扩增带。如何优化这些因素是成功的关键,本次实验经过综合比较,Mg²⁺ 浓度为 1.5 mmol/L、dNTP 为 0.375 mmol/L、引物浓度为 0.5 μmol/L 效果最好。

ISSR 是从 SSR 发展而来的,属于微卫星标记类。每个引物可以扩增出 6 条左右的带,多态性高,在扩增条件相同时,稳定性和重复性可以保证。IS-SSR 标记成本低、耗时少、可靠性高,已被证明是目前最有发展前景的分子标记之一。

目前约有 100 种 ISSR 引物,基于不同实验可筛选出适当数量的引物。本研究仅用 1 条引物就能鉴别 10 个玉米材料,如果有更多的材料需要进行分析,则能否将所有材料分开,尚需进一步验证。但随着材料增加,适当增加引物,完全能建立起各材料的特征性分子指纹图谱。虽然目前分子标记技术主要限于基础领域的研究,与育种实践结合较少,但在不久的将来,分子标记技术对中国玉米种质资源鉴定、辅助育种、优良性状基因筛选等方面将会产生深远的影响。

参考文献:

[1] 马纯艳,郑 莹. 分子标记技术在玉米品种分析中的初步应用[J]. 生物技术,2005,15(3):57-58 .
[2] 李向拓,毛建昌,吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用[J]. 玉米科学,2004,12(1):26-29 .
[3] 周延清,景建洲,李振勇,等. 利用 RAPD 和 ISSR 分子标记分析怀地黄种质遗传多样性[J]. 遗传,2004,26(6):922-928 .
[4] Doyle J. DNA protocols for plants - CTAB total DNA isolation [J]. In: Hewitt GM, Johnston A, eds. Molecular techniques in taxonomy. Berlin: Springer, 1991: 283-293.

(责任编辑:朴红梅)