

SSR 标记与田间种植鉴定玉米品种纯度的比较

易红梅^{1,2}, 张力科³, 葛建镨², 张云龙², 王凤格², 赵久然², 徐明良¹

(1. 中国农业大学/国家玉米改良中心, 北京 100094;

2. 北京市农林科学院玉米研究中心/玉米 DNA 指纹及分子育种北京市重点实验室, 北京 100097;

3. 全国农业技术推广服务中心, 北京 100026)

摘要: 从行业标准中筛选出 8 对适用于玉米品种纯度鉴定的引物组合, 能区分 90% 以上的审定品种。96% 的审定品种在 8 个引物组合中有 4 个以上的杂合位点, 具有较高的杂合率和品种区分能力。38 份来自全国种子市场的样品同时进行田间种植和 SSR 纯度鉴定, 8 对 SSR 引物组合检测出自交苗平均值为 0.6%, 异型株为 1.8%, 纯度为 97.7%; 田间种植鉴定检测出的自交苗平均值为 1.4%, 异型株为 0.6%, 纯度为 97.9%, 两种方法检测的纯度值具有良好的相关性。对田间鉴定出的自交苗、弱苗、异型株和典型株进行 SSR 鉴定, 结果表明, 自交苗、异型株与典型株两种方法检测结果一致, SSR 能准确区分田间难以鉴定的弱苗和病株。7 份 SSR 检测一致性为 3 ~ 5 级的样品, SSR 基因型和田间表型均表现出明显的分离, 样品一致性差引起的非典型株界于典型株和异型株之间, 是品种纯度鉴定的难点。

关键词: 玉米; 纯度; SSR; 田间鉴定

中图分类号: S513.037

文献标识码: A

Comparison of SSRs and Field Inspection in Assessment of Seed Purity in Maize

YI Hong-mei^{1,2}, ZHANG Li-ke³, GE Jian-rong², ZHANG Yun-long², WANG Feng-ge²,
ZHAO Jiu-ran², XU Ming-liang¹

(1. National Maize Improvement Center of China, China Agricultural University, Beijing 100193;

2. Maize Research Center, Beijing Academy of Agriculture & Forestry Sciences, Beijing Key Laboratory of Maize DNA Fingerprinting and Molecular Breeding, Beijing, 100097;

3. National Agro-Tech Extension and Service Center, Beijing 100026, China)

Abstract: A combination of eight pairs of primer was selected from the industry standards suitable for purity assessment which had high heterozygosity and variety discrimination ability could identify more than 90% of approved varieties, and 96% of approved varieties have more than four heterozygous loci. SSRs and plant inspection were used to compare their ability to assess seed purity, 38 maize samples collected from national seed market were both tested by field planting and SSR purity. An average rate of 0.6% of inbred seedlings and 1.8% of off-types was detected by 8 SSR markers combination, and compared with the average rate of 1.4% for inbred seedlings and 0.6% for off-types in field planting identification. The purity values detected by the two methods had good correlation. The result of field inspection was consistent with SSR for identifying off-types and typical individuals, and SSR could accurately distinguish weak seedlings and diseased plants that were difficult to identify in the field. Significant separation of genotypes and phenotypes was observed in 7 samples with grade 3-5 of uniformity detected by SSR markers. Atypical seedlings caused by poor uniformity are difficult to identify in a variety purity assessment both for SSR and field inspection.

Key words: Maize; Purity; SSR; Field inspection

录用日期: 2020-09-09

基金项目: 北京市农林科学院科技创新能力建设项目(KJCX20200305)

作者简介: 易红梅(1982-), 女, 副研究员, 从事玉米品种分子鉴定工作。Tel: 010-51503635 E-mail: yhm maize@163.com

徐明良为本文通讯作者。

玉米是全球第一大作物,也是我国第一大作物,全年用种量在10亿hm²以上。玉米产量的提高主要得益于杂种优势的利用及优良杂交种的普及,优良杂交种的推广应用需要大量优质的种子。自2016年起,随着我国品种审定制度的改革和区域试验渠道的拓宽,每年审定的品种呈现井喷之势。近几年,随着大量品种的审定和品种更替的加速,我国西北甘肃和新疆玉米制种基地的单个品种制种面积大幅下降,一般的品种制种面积仅几百亩,大幅增加了田间制种隔离的压力及生产的种子纯度质量风险。过去生产企业检验种子纯度比较关注自交苗,近几年种子中的异型株也成为种子纯度检测的重点。

目前,我国鉴定种子纯度常用的方法有小区种植鉴定法和盐溶蛋白电泳法。小区种植鉴定法的优势是可以在花期同时观测十几个性状,有较多的性状能用于纯度鉴定;缺点是受季节限制和环境影响,鉴定人员的经验和对品种了解的程度也会影响结果的准确性。盐溶蛋白电泳法是目前种子生产企业采用的主要检测方法,优点是成本低廉,对人员素质要求不高,也无需昂贵的仪器设备,能有效鉴定大部分的杂交种中混入的自交苗;缺点是区分能力较弱,难

以区分异型株,对部分品种也无法鉴定自交苗。

分子标记由于多态性高、不受季节限制和环境影响,结果准确稳定,目前已广泛应用于玉米^[1]、水稻^[2]、小麦^[3]、棉花^[4]、蔬菜^[5,6]等农作物品种DNA指纹数据库构建及真实性鉴定中。国内外已有多篇报道采用分子标记开展农作物品种纯度鉴定,我国也开始研究制定玉米^[7]、水稻^[8]、小麦^[9]、棉花^[10]、油菜^[11]等作物品种纯度鉴定SSR标记检测技术规程标准,分子标记在品种纯度鉴定中有良好的应用前景。本文对来源于种子市场的45个玉米品种同时采用SSR和田间小区种植鉴定方法检测种子纯度,比较两种方法检测结果的相关性,探讨玉米种子纯度分子标记鉴定的基本思路和技术方案,为我国玉米品种纯度分子标记规程的制定与应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 供试材料

45份纯度检测样品分别来源于全国不同种子市场,样品名称详见表1。3998份审定品种为2016年前国家和省级审定玉米品种^[1]。

表1 45份样品信息
Table 1 Sample information

序 号 Number	样品名称 Sample name	序 号 Number	样品名称 Sample name	序 号 Number	样品名称 Sample name
N1	信玉 168	N16	绿育 9915	N31	五谷 8567
N2	荣玉 9 号	N17	恒宇 709	N32	先玉 508
N3	绵单 581	N18	吉东 56	N33	龙特 999
N4	川单 455	N19	利禾 1	N34	先玉 335
N5	必胜 3 号	N20	辽禾 6	N35	雅玉 78
N6	吉农玉 833	N21	五谷 702	N36	五谷 568
N7	绿育 9935	N22	五谷 704	N37	五谷 310
N8	金秋 119	N23	金园 130	N38	先玉 1225
N9	金园 130	N24	金艾 130	N39	金湘 369
N10	金山 6 号	N25	绿育 4118	N40	雅玉 68
N11	绿育 4117	N26	先玉 698	N41	蓉玉 294
N12	玉龙 7899	N27	先玉 027	N42	楚白单 4 号
N13	金苹果 618	N28	金园 15	N43	福得二号
N14	32D22	N29	平安 169	N44	比玉 777
N15	绿育 9911	N30	五谷玉 68	N45	仲玉 518

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取

种子发苗后,取1 cm芽尖放入96孔深孔板中,每孔加入150 μL DNA提取液,沸水加热10 min,然后每孔再分别加入150 μL TE缓冲液,直接取2 μL

进行SSR扩增,或4℃保存。

1.2.2 引物

纯度鉴定引物筛选:参考行业标准NY/T1432-2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR标记法》中公布的40对引物及其信息。

1.2.3 PCR 扩增

PCR 总反应总体积为 20 μ L,模板 DNA 3 μ L,0.25 μ mol/L引物,1 $\times$ PCR Buffer,0.15 μ mol/L dNTP,2.5 μ mol/L MgCl₂,1单位 Taq 酶。每对引物中的1条5'端用荧光染料标记,选用 PET、NED、VIC、FAM 4种荧光染料(Applied Biosystems, USA 公司合成)。PCR 反应程序为,94℃预变性 5 min;94℃变性 40 s,60℃退火 35 s,72℃延伸 45 s,共进行 35 个循环;72℃延伸 10 min,4℃保存。

1.2.4 检测扩增产物

毛细管电泳:PCR 产物在毛细管荧光电泳系统 ABI 3730XL DNA 分析仪(Applied Biosystems, USA)上进行电泳,在 96 孔电泳板的单个孔中分别加入 1.5 μ L PCR 产物、9 μ L 甲酰胺、0.1 μ L 分子量内标(GeneScanTM-500 LIZ)。95℃变性 5 min,4℃保存 10 min,1 000 r/min 离心 1 min 后,于 ABI 3730XL DNA 分析仪上进行电泳。预电泳时间为 15 kV,2 min;电泳时间为 15 kV,20 min。用 Date Collection v1.0 软件收集原始数据。

1.3 小区田间种植鉴定

田间试验在海南基地进行,每份样品设 2 个重复,每个重复每小区种 2 行,每行 110 粒。所有样品

在品种性状表现充分的盛花期开展田间鉴定。

1.4 SSR对小区田间种植鉴定结果的复核

对两个品种田间鉴定出的 66 个异型株、5 个品种田间鉴定出的 50 个自交苗、10 个品种各取 3 个典型株共 30 个典型株以及 29 个田间难以确定的弱苗和病株进行 SSR 复核。

1.5 一致性鉴定

每个样品取 20 个单株,采用 10 个引物进行一致性鉴定^[12]。

1.6 结果统计与分析

采用 IBM SPSS Statistics 25.0 软件进行统计分析。组间比较采用独立样本 *t* 检验和相关性分析,*P*<0.05 表示具有显著性差异。

2 结果与分析

2.1 适用于玉米品种纯度鉴定核心引物的筛选与确定

根据纯度鉴定引物筛选条件,采用碱裂解快速 DNA 提取法对行业标准中的 40 对核心进行筛选,结合引物的杂合率和品种识别能力,最终确定了 8 个(umc1506k12、umc1545y2、bnlg240k1、phi96100y1、bnlg249k2、bnlg439w1、bnlg2291k4、phi065k9)适用于

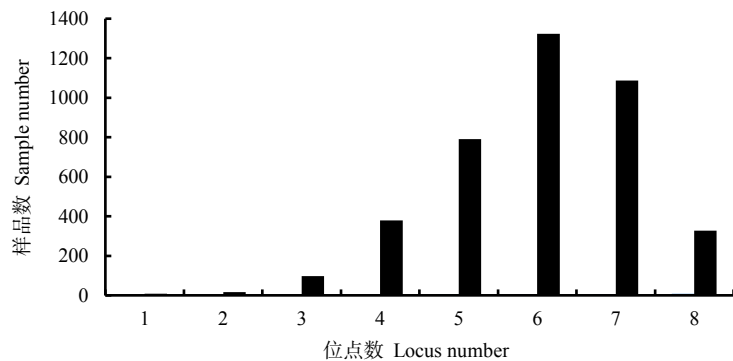


图1 SSR引物组合在审定品种中杂合位点的分布

Fig.1 Distribution of heterozygous loci of SSR primer combinations in approved varieties

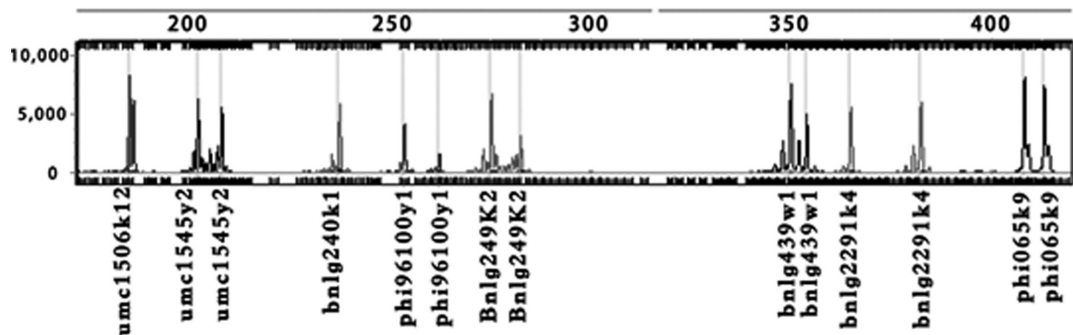


图2 8个SSR引物组合荧光毛细管电泳基因分型图

Fig.2 Genotyping by fluorescence capillary electrophoresis of 8 SSR primer combinations

玉米品种纯度鉴定的引物组合,8个引物平均杂合率为0.76,平均多态性(PIC)为0.74。8个引物组合对DNA指纹数据库中3998份审定品种进行分析,结果表明,3998个审定品种中,6个位点为杂合基因型的频率最高,96%以上的审定品种杂合位点在4个以上(图1),表明引物组合具有较高的杂合率,能有效区分杂交种的双亲,准确鉴定自交苗。8个引物组合是品种识别能力的拐点,能有效识别90%以上的审定品种,再增加引物对品种区分能力影响较小,表明8个引物组合具有较高区分异型株的能力。采用快速碱煮法,8个引物能获得较好的基因分型结果(图2),适用于玉米品种纯度的快速鉴定。

2.2 45份样品SSR和小区种植鉴定纯度检测结果与比较

45份样品各检测110个个体,结果表明,有7份样品田间鉴定和SSR检测一致性均较差,38份样品一致性较好。38份样品采用8对SSR引物组合检测

出的平均自交苗比例为0.6%、异型株为1.8%、纯度为97.7%,纯度低于96.0%的样品有3个,纯度最低值为86.2%。采用田间种植鉴定检测出的平均自交苗比例为1.4%、异型株为0.6%、纯度为97.9%,纯度低于96.0%的样品有3个,纯度最低值为88.7%(图3)。采用 t 检验,两种方法检测出的自交苗、异型株和最终的纯度值差异显著性值分别为0.668、0.129和0.281,表明两种方法检测出的自交苗、异型株和最终的纯度值差异不显著。两种方法检测的纯度值相关系数为0.7588,检测结果相关性较高(图4)。采用SSR对田间鉴定出的66个异型株、50个自交苗、30个典型株以及29个田间难以确定的弱苗和病株进行验证,结果表明,66个异型株、50个自交苗和30个典型株SSR鉴定与田间鉴定结果完全一致。29个田间难以确定的弱苗和病株,SSR检测出20个为正常典型株,7个为自交苗,2个为异型株。

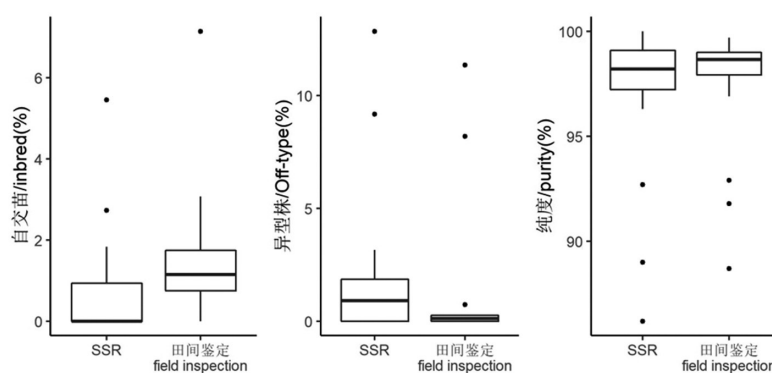


图3 38份样品田间种植和SSR鉴定纯度结果

Fig.3 Purity results of 38 samples by field inspection and SSR identification

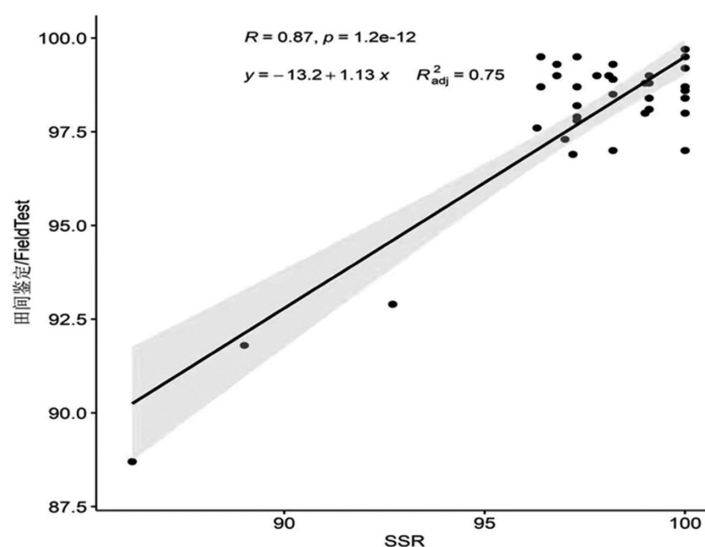


图4 田间种植和SSR纯度检测结果相关性分析

Fig.4 Correlation analysis of purity results tested by field inspection and SSR identification

2.3 品种一致性对纯度检测的影响

45份样品纯度检测中,有7份样品在多个位点上基因型出现明显的分离,同时田间观测也表现为多个性状上一致性较差。对7份样品采用SSR进行一致性检测,结果表明,7份样品中一致性最高的为0.92,最低的为0.60。7份样品有2份样品的一致性为3级,一致性级别为一般;5份样品一致性为5级,一致性级别为差。在单个引物上,平均一致性最高的引物为PM05,一致性为0.84;平均一致性最低的引物为PM11,一致性为0.68。在一致性检测的10

个位点中,7份样品平均在6个位点上一致性低于0.85。7份样品一致性检测结果详见图5。由于样品一致性导致的非典型株介于典型株和异型株之间,与典型株有差异,且差异是由于遗传分离导致的。7份样品SSR检测出的非典型株比率平均为25%。田间纯度鉴定时,由于样品一致性差,多个性状出现分离,无法有效区分典型株和由于一致性差导致的非典型株,表明由于遗传一致性差引起的非典型株是纯度判定中的难点。

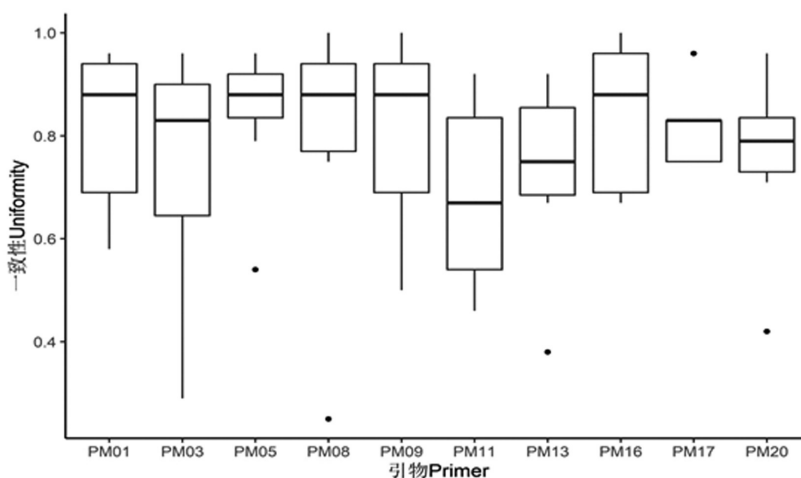


图5 7份样品在10个SSR位点的一致性检测结果

Fig.5 Uniformity results of 7 samples at 10 SSR loci

3 讨论

3.1 引物的选择对SSR鉴定种子纯度的影响

影响分子标记鉴定玉米品种纯度结果准确性的最关键因素是鉴定引物的选择。受引物异型株识别能力、亲本遗传稳定性等因素的影响,选择不同的引物,纯度鉴定的结果可能会出现差异。不同实验室对同一份样品要获得一致的检测结果,要选择出能有效区分自交苗、异型株和由于亲本遗传不稳定造成的非典型株的引物进行纯度的鉴定才能实现。与田间鉴定相比,SSR标记1次鉴定较多的标记会增加成本,应充分利用各种信息,包括已构建的数据库筛选引物,结合制种亲本、制种田等信息,在保证结果准确的前提下,采用最少的引物进行鉴定。本文中的实验样品由于没有亲本、制种过程等信息,直接采用了8个引物组合进行纯度的鉴定,这样的鉴定方案的优点是检测结果准确,也无需进行引物的筛选,缺点是成本较高,这种方案适用于监督抽查等信息较少、问题比较复杂的样品。对于企业内部的质量控制,可以先进行小样本多引物的筛选后,再从中

选择适宜的引物进行纯度的鉴定,既能保证结果的准确性,又能降低检测成本。

3.2 SSR与田间种植鉴定结果的一致性

影响SSR与田间鉴定结果一致性的因素,一是SSR实验中样品是检测种子还是发芽后的组织,亲本种子发芽率低于杂交种种子,对发芽率偏低的样品,如果取发芽后的组织,SSR鉴定的纯度值可能会略高于田间种植鉴定;二是异型株的判定标准,田间种植和SSR鉴定,都没有明确的异型株的判定标准。田间纯度鉴定异型株时重点关注性状差异较为明显的植株,忽略性状差异较小的植株,在差异性状判定时,还要充分考虑种子质量和环境影响,田间鉴定结果准确性受鉴定人员的经验以及对品种的熟悉程度的影响。SSR在进行异型株判定时,不能简单地以真实性鉴定标准(2个位点)作为异型株的判定标准。当1个位点能准确区分典型株和异型株时,采用这1个位点就可以进行纯度鉴定。在纯度结果分析时,要考虑样品内是否存在遗传剩余变异,需要明确区分遗传剩余变异的基因型与异型株基因型的差异。从本研究的结果来看,SSR标记鉴定结果与

田间鉴定结果在正常株、自交苗和明显的异型株上判定的结果是一致的,说明采用SSR标记与田间鉴定能获得一致的鉴定结果。由于SSR标记不受环境影响,没有田间鉴定中弱株、病株的问题,自交苗采用分子标记检测结果更准确。

3.3 异型株与非典型株的判定

异型株包括异交个体和混杂个体,同一类型的异交和混杂的个体在SSR位点上的基因型是相同的,与典型株能明显区分开。由于亲本未稳定纯合后代出现分离造成的非典型株,界于典型株和异型株之间,在SSR基因分型上表现为不同个体在不同位点上基因型是随机分离的,且不同个体的基因型不同,田间表现为1个或多个表型性状的分离。当一致性较差时,一致性差的样品无论是田间还是SSR均是纯度鉴定的难点,并直接影响到分子与田间鉴定结果的准确性和一致性。纯度鉴定时,如果一致性差的SSR位点较少或表型较少,可以剔除这些SSR位点或田间表型性状,只采用纯合稳定的位点或表型性状进行纯度检测,建议在结果中将非典型株与异型株予以区分,以免误判。当出现较多的非典型株时,生产企业应对亲本进行提纯,保证生产种子的质量。

参考文献:

- [1] 王风格,杨 扬,易红梅,等. 中国玉米审定品种标准SSR指纹库的构建[J]. 中国农业科学,2017,50(1):1-14.
Wang F G, Yang Y, Yi H M, et al. Construction of an SSR-Based standard fingerprint database for corn variety authorized in China[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2017, 50(1): 1-14. (in Chinese)
- [2] 王明湖,张孝天,吴国林,等. SSR标记在宁波地区水稻品种DNA指纹图谱构建及纯度鉴定中的应用[J]. 中国稻米,2019,25(6):50-54.
Wang M H, Zhang X T, Wu G L, et al. DNA fingerprints construction and purity identification based on SSR markers for rice varieties in Ningbo city[J]. China Rice, 2019, 25(6): 50-54. (in Chinese)
- [3] 郑永胜,张 晗,王雪梅,等. 小麦DUS测试已知品种DNA指纹数据库构建及其应用[J]. 植物遗传资源学报,2019,20(4):845-853.
Zheng Y S, Zhang H, Wang X M, et al. Construction of DNA profile database of wheat reference varieties and its application in wheat DUS test[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2019, 20(4): 845-853. (in Chinese)
- [4] 匡 猛,杨伟华,许红霞,等. 中国棉花主栽品种DNA指纹数据库初步构建研究[J]. 棉花学报,2012,24(3):229-237.
Kuang M, Yang W H, Xu H X, et al. Primary construction of a DNA fingerprint database of leading cotton varieties in China[J]. Cotton Science, 2012, 24(3): 229-237. (in Chinese)
- [5] 隋光磊,于拴仓,杨金雪,等. 大白菜品种鉴定的SSR核心引物筛选及其应用[J]. 园艺学报,2014,41(10):2021-2034.
Sui G L, Yu S C, Yang J X, et al. Validation of a core set of microsatellite markers and its application for varieties identification in Chinese cabbage[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2014, 41(10): 2021-2034. (in Chinese)
- [6] 赵胜杰,朱红菊,路绪强,等. 无籽西瓜品种SSR指纹图谱构建及遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(6):1142-1146.
Zhao S J, Zhu H J, Lu X Q, et al. Construction of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity with SSR markers for seedless watermelon major varieties in China[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2013, 14(6): 1142-1146. (in Chinese)
- [7] 王风格,易红梅,赵久然. 玉米纯度分子鉴定标准研制相关问题的探讨[J]. 玉米科学,2015,23(4):48-53.
Wang F G, Yi H M, Zhao J R. Discussion about the purity of maize standard molecular identification development[J]. Journal of Maize Sciences, 2015, 23(4): 48-53. (in Chinese)
- [8] 朱国奇,陈静萍,詹伟捷,等. 不同引物鉴定统一杂交水稻种子样品纯度结果的差异及其原因分析[J]. 杂交水稻,2015,30(3):81-84.
Zhu G Q, Chen J P, Zhan Y J, et al. Analysis on seed purity difference of same hybrid rice variety identified by different SSR primers[J]. Hybrid Rice, 2015, 30(3): 81-84. (in Chinese)
- [9] 刘丽华,庞斌双,王立新,等. 醇溶蛋白法和SSR标记法检测小麦种子纯度的比较[J]. 麦类作物学报,2013,33(3):429-434.
Liu L H, Pang B S, Wang L X, et al. Comparison of seed purity detection of wheat using gliadin analysis and SSR markers[J]. Journal of Triticeae Crops, 2013, 33(3): 429-434. (in Chinese)
- [10] 匡 猛,杨伟华,张玉翠,等. 棉花杂交种纯度的SSR标记检测及其与田间表型鉴定的相关性[J]. 作物学报,2011,37(12):2299-2305.
Kuang M, Yang W H, Zhang Y C, et al. Cotton hybrid purity tested by SSR markers and its correlation with phenotype identification in field[J]. Acta Agronomica Sinica, 2011, 37(12): 2299-2305. (in Chinese)
- [11] 沈金雄,陆光远,傅廷栋,等. 甘蓝型油菜自交不亲和系杂种纯度鉴定[J]. 中国油料作物学报,2004,26(4):12-15.
Shen J X, Lu G Y, Fu T D, et al. Purity analysis on hybrid of self-incompatibility in *Brassica napus* L.[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2004, 26(4): 12-15. (in Chinese)
- [12] 王风格,赵久然,戴景瑞,等. 利用SSR进行玉米品种一致性检测研究[J]. 分子植物育种,2007,5(4):95-104.
Wang F G, Zhao J R, Dai J R, et al. Uniformity analysis of maize varieties by a set of SSR markers[J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(4): 95-104. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)