

玉米纯度高通量 InDel 快速检测体系的建立

胡丽萍¹, 彭飞飞¹, 许理文¹, 田红丽¹, 张茗起¹,
葛建镛¹, 王蕊¹, 王凤格^{1,2}

(1. 北京市农林科学院玉米研究所/农业农村部农作物 DNA 指纹创新利用重点实验室(部省共建), 北京 100097;

2. 三亚中国农业科学院南繁研究院, 海南 三亚 572024)

摘要: 为实现玉米品种纯度高效准确鉴定, 通过建立快速 DNA 提取方案常温研磨法及适配的多重扩增体系, 构建玉米纯度高通量 InDel 快速检测方案。结果表明, 与对照碱煮法相比, 常温研磨法提取的 DNA 在琼脂糖凝胶电泳中显示清晰条带, 玉米纯度 InDel 引物单重和多重扩增效果稳定。经人工掺混样品验证, 本体系的纯度检测结果与国家标准方法所得结果一致。

关键词: 玉米; InDel 标记; 高通量; 快速; 纯度

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Establishment of High-Throughput InDel Rapid Detection System for Maize Purity

HU Li-ping¹, PENG Fei-fei¹, XU Li-wen¹, TIAN Hong-li¹, ZHANG Ming-qi¹,

GE Jian-rong¹, WANG Rui¹, WANG Feng-ge^{1,2}

(1. Beijing Key Laboratory of Maize DNA Fingerprint and Molecular Breeding, Key Laboratory of Crop DNA Fingerprint Innovation and Utilization of Ministry of Agriculture and Rural Affairs

(Co-construction by Ministry and Province), Beijing 100097;

2. National Nanfan Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Sanya 572024, China)

Abstract: In order to achieve efficient and accurate identification of maize variety purity, a high-throughput InDel rapid detection scheme for maize purity was constructed by establishing a rapid DNA extraction scheme at room temperature grinding method and an adaptive multiple amplification system. The results showed that compared with the control alkali boiling method, the DNA extracted by room temperature grinding method showed clear bands in agarose gel electrophoresis, and the single and multiple amplification effects of maize purity InDel primers were stable. Validation by using artificially blended samples confirmed that the purity detection results of this system are consistent with those obtained using the GB standard method.

Key words: Maize; InDel marker; High throughput; Rapid; Purity

作为评价种子质量标准的常规四项检测之一, 品种纯度检测技术的迭代与作物产量的增长和农业的发展息息相关^[1]。品种纯度检测技术主要经历了田间形态学鉴定、蛋白质(同工酶)电泳鉴定和分子

标记鉴定等阶段。田间形态学鉴定易受环境影响, 且极度依赖鉴定人员的经验^[2], 难以制定统一的检测标准, 存在检测周期长、用地面积广的不足; 蛋白质电泳鉴定技术的检测精度低于分子标记鉴定法, 在部分样品中难以区分双亲差异, 鉴定自交苗难度较大^[3]; 分子标记鉴定技术具有标准化程度高、检测周期短、精确性高的优势。目前, 玉米纯度分子鉴定方案中常用的 SSR 标记变异区间较大, 多重 PCR 的难度较高, 在实际应用中难以满足快速检测大批量样品的需求^[4]。InDel 标记具有二态性和变异区间小的特征, 有利于组建多重检测体系, 实现快速高通量

录用日期: 2024-05-13

基金项目: 海南省重点研发项目(ZDYF2023XDNY077)、北京市农林科学院科技创新能力建设专项项目(KJCX20230301)

作者简介: 胡丽萍(2000-), 女, 硕士, 主要从事农作物品种分子鉴定研究。E-mail: hulipinguo@foxmail.com

彭飞飞为本文共同第一作者。

王凤格和王蕊为本文通信作者。

和低成本检测^[5],但尚未广泛应用于玉米纯度检测中。

种子纯度需对大量单株进行检测,现常用DNA提取方法如CTAB法、试剂盒法和SDS法耗时较长^[6],存在依赖大量人工与仪器耗材、成本较高的问题^[7]。快速提取方法如棉签法^[8]和滤纸片法等,无法实现样品高通量提取。纯度检测中优先推荐的碱煮法^[9]可以实现通量和速率的提升,但其所用试剂酸碱度易受环境影响且难以获取高质量DNA,不同批次提取质量不稳定,因此无法满足样品高通量快速纯度检测的需求^[10]。多重PCR方案需筛选多个引物间互不干扰、扩增区间不重叠或荧光颜色不同的标记组合^[11],在单位时间内能扩增出多种核酸片段^[12],提升扩增效率,降低试剂成本。现已有多种作物在纯度检测中应用多重PCR技术。张璐^[13]利用多重PCR检测甜瓜品种纯度。王超等^[14]建立稳定高效的多重PCR检测技术鉴定玉米德美亚系列品种纯度等。由于多重PCR技术对DNA质量要求更高,目前尚无广泛应用的基于DNA快速提取方法进行多重PCR的纯度检测方案。

本研究建立一种DNA快速提取方法,并在团体标准的基础上利用InDel标记构建多重PCR检测体系,结合荧光标记毛细管电泳平台进行复合检测和快速纯度结果判定,实现玉米品种纯度的高通量快速检测。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究所用玉米杂交种京科968和其母本京724为北京市农林科学院玉米研究所提供。取90粒京科968、3粒匿名玉米杂交种和2粒京724,形成一份人工制备的纯度待检样品,用于测试本研究建立的玉米纯度高通量快速检测体系。

1.2 样品处理及DNA提取和质量检测

玉米种子置于湿润沙土内光照培养7 d。使用改良自Zou等研究的DNA提取方法^[15]。与之相比,改良后得到的常温研磨法无需用到滤纸也无需单管滤纸蘸洗的步骤。本试验DNA提取具体步骤如下:取两段0.4 cm绿色幼苗叶片于96深孔板,京科968和京724分别各取4个单株即4个孔,每孔加入一颗2 mm钢珠,加入300 μ L提取液^[15],1 200 r/min研磨1 min,3 800 r/min离心6 min(Beckman, Avanti J-26S XP落地式高效离心机);取上清200 μ L至96孔板,4 $^{\circ}$ C保存。采用碱煮法^[9]提取京科968和京724同株叶片DNA作为对照。配制1%的琼脂糖凝胶电泳检

测DNA质量,并使用荧光定量仪(Thermofisher Qubit 4.0)检测DNA浓度。

采用上述常温研磨法单株提取待检样品DNA,并以SDS法单株提取待检样品DNA作为对照,设置单孔空白对照。

1.3 PCR体系和程序

1.3.1 InDel 标记

单重扩增体系:2 $\times$ Taq Plus Master Mix,20 μ mol/L引物工作液0.2 μ L,2.5 μ L DNA;多重扩增体系:2 $\times$ Taq Plus Master Mix, EMID04、EMID08、EMID09各加0.1 μ L,EMID01、EMID06、EMID10、EMID12、EMID11各加0.2 μ L,2 μ L DNA;体系总体积均为20 μ L。反应程序:95 $^{\circ}$ C、5 min,95 $^{\circ}$ C、40 s,60 $^{\circ}$ C、35 s,72 $^{\circ}$ C、45 s,35个循环;72 $^{\circ}$ C、10 min;4 $^{\circ}$ C保存。在ABI VeritiPro 96 PCR上进行扩增反应。引物信息来源于中国作物学会发布的团体标准《玉米品种纯度鉴定:InDel分子标记法》(T/CROPSSC 002-2023)。

1.3.2 SSR 标记

对照待检样品DNA按国家标准《玉米品种纯度SSR分子标记检测》(NGB/39914-2021)中的鉴定方法进行PCR扩增。

1.4 产物检测

单重扩增的PCR产物等体积混合,取混合物2 μ L加入96孔电泳板中,多重扩增PCR产物直接取2 μ L加入96孔电泳板中;向各孔中加入10 μ L去离子甲酰胺和0.1 μ L分子量内标(GS3730-500)。95 $^{\circ}$ C变性5 min,于ABI3730XL DNA分析仪上进行荧光标记毛细管电泳^[16]。

1.5 结果分析

将荧光标记毛细管电泳原始fsa数据导入SSR指纹分析器(V1.2.6,北京市农林科学院玉米研究所研发),得到各孔位的指纹图谱,再进行纯度结果分析。基于InDel标记的纯度实验结果,数据记录时均用I代表InDel位点的插入等位变异,D代表InDel位点的缺失等位变异,基因型记录为II、ID、DD;基于SSR标记的纯度实验结果用扩增产物片段大小来表示。综合多位点判定每个单株类型,H代表杂交种带型,M代表亲本带型,Q代表其他类型杂株。待测样品纯度计算为正常个体数目(待测样品总数减去非典型个体数目)与待测样品总数的百分比。

2 结果与分析

2.1 常温研磨法DNA质量检测

使用常温研磨法提取玉米叶片DNA,琼脂糖凝胶电泳检测到了清晰条带(图1),且孔道内蛋白质等

表 1 玉米 InDel 引物信息表
Table 1 InDel primer information table of maize

引物编号 Primer number	位点编号 Locus number	引物序列(5′-3′) Primer sequence(5′-3′)	预期产物大小(bp) Expected product size	推荐荧光 Recommended fluorescence
EMID01	MID01	F: CCCCTTCGTCAAGTCTGCATCC R: GGACCTTCTGATAACTCGGGTGGCA	186/191	FAM
EMID04	MID04	F: GAGAGGGAGGGAGGACGAGTG R: GGTAGCTTGCGTTGAAGGTGATG	109/114	FAM
EMID06	MID06	F: GCTGCTGGAACACCCAACCTTG R: GGCTGATGTCATCCTCGTCTTGTG	198/201	FAM
EMID08	MID08	F: AGCCAGCCAAATCCTAAACGAAG R: GCAGTACCCGAAGCAGGAAATC	121/124	FAM
EMID09	MID09	F: TTTCCAGTGTCTTGCCAGTTTGC R: ATCAACGTCTCCGATGCTTCTC	144/147	FAM
EMID10	MID10	F: AAGGCATCAGGCAGGTGCTAAG R: CGCAGGTGACCGTGGTGATC	207/210	FAM
EMID11	MID11	F: ACATCAAGCACCCACAGAAACAG R: GCGTGGATCGGTGGATGAATC	238/241	FAM
EMID12	MID12	F: AGAAAGAGCATGACCGTTGAACC R: GTGCCAGCGTTAGACTGTACTG	224/228	FAM

杂质含量不高,没有明显白色拖尾。碱煮法提取的 DNA 未能用琼脂糖凝胶电泳检测出条带。荧光定量仪(Thermofisher Qubit 4.0)检测出常温研磨法提取的玉米叶片 DNA 浓度在 29.8 ~ 36.9 ng/μL(表 2),均一性较好且 DNA 的浓度可以满足下游实验 PCR 扩

增等需求;碱煮法提取的玉米叶片 DNA 仅 0.2 ~ 0.9 ng/μL。以 96 孔板为单位,使用常温研磨法单人提取时间为 15 min,耗时仅常规 CTAB 法、SDS 法的 1/8 ~ 1/6,实现样品提取的快速高通量;碱煮法提取 DNA 虽然快速,但 DNA 浓度过低。

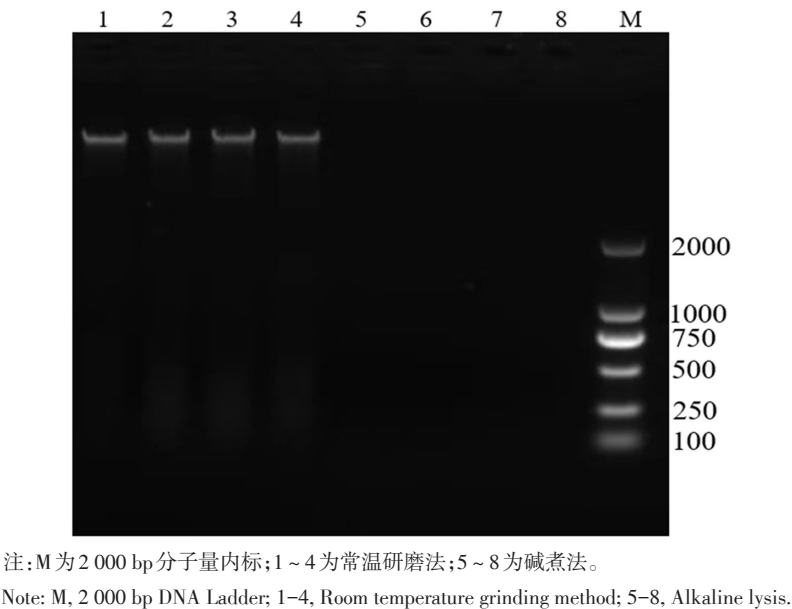


图 1 常温研磨法和碱煮法 DNA 琼脂糖凝胶电泳结果
Fig.1 The results of DNA agarose gel electrophoresis by room temperature grinding method and alkaline lysis

表2 常温研磨法和碱煮法 Qubit 检测结果

Table 2 Qubit test results of room temperature grinding method and alkaline lysis

方法 Method	序 号 Serial number	浓度(ng/μL) Concentration
常温研磨法	1	33.1
	2	29.8
	3	31.0
	4	36.9
碱煮法	5	0.9
	6	0.2
	7	0.3
	8	0.6

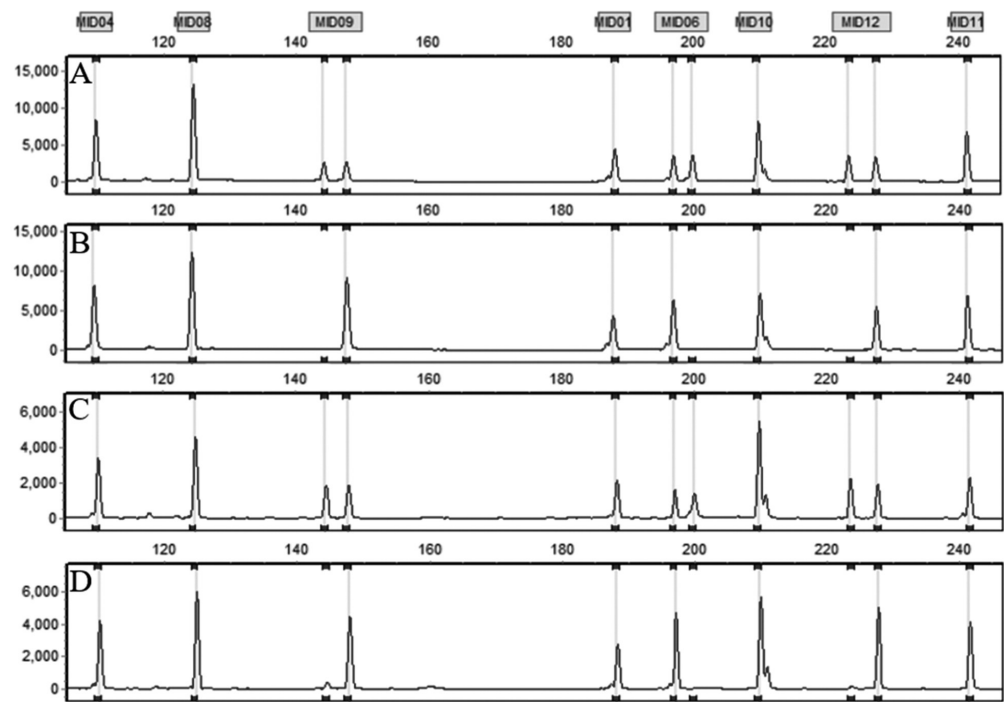
注:1~4 为常温研磨法;5~8 为碱煮法。
Note: 1-4, Room temperature grinding method; 5-8, Alkaline lysis.

表3 不同DNA提取方法的比较

Table 3 Comparison of different DNA extraction methods

方 法 Method	耗时(以单人 96 孔板为单位,min) Time required(per 96-well plate by a single operator)	成 本 Cost	浓 度 Concentration
常温研磨法	15	低	中
碱煮法	25	低	低

2.2 单重 PCR 体系和程序的确立



注:A 为常温研磨法京科 968;B 为常温研磨法京 724;C 为碱煮法京科 968; D 为碱煮法京 724。下图同。
Note: A, Room temperature grinding method Jingke968; B, Room temperature grinding method Jing724; C, Alkaline lysis Jingke968; D, Alkaline lysis Jing724. The same below.

图2 玉米叶片 DNA 单重扩增电泳图

Fig.2 Fingerprints of maize leaf DNA by single-amplification and eight-fold fluorescence capillary electrophoresis

将常温研磨法、碱煮法提取的京科 968 及其亲本京 724 叶片 DNA,采用单重扩增八重电泳的方式得到电泳结果。荧光标记毛细管电泳指纹图谱结果显示(图 2),在 MID09、MID06 和 MID12 位点上京科 968 表现为杂合,其他位点表现为纯合,京 724 在所有位点表现为纯合。常温研磨法与碱煮法提取的 DNA 荧光标记毛细管电泳结果一致,碱煮法 DNA 其整体峰高明显低于常温研磨法 DNA 的峰高,峰高均满足纯度检测需求。碱煮法 DNA 在 MID09 和 MID12 两个位点的非特异性扩增比常温研磨法 DNA 的更明显。由此建立了适配常温研磨法的单重扩增

体系和程序。

2.3 八重PCR体系和程序的确立

依据产物扩增效果,调整引物浓度,建立八重 PCR 检测体系。结果显示,常温研磨法八重 PCR 与单重 PCR 的片段大小结果一致(图 3)。碱煮法 DNA 八重 PCR 失败,仅两个位点扩增出与预期一致的片段。常温研磨法 DNA 多重 PCR 电泳峰值与单重基本差异不大,能够满足纯度鉴定中对区分杂合双峰和纯合单峰的需求,且通过引物浓度调整,引物间不对称扩增现象减弱。相比于单重扩增,八重扩增体系进一步的大幅降低了试验成本,提升扩增效率。

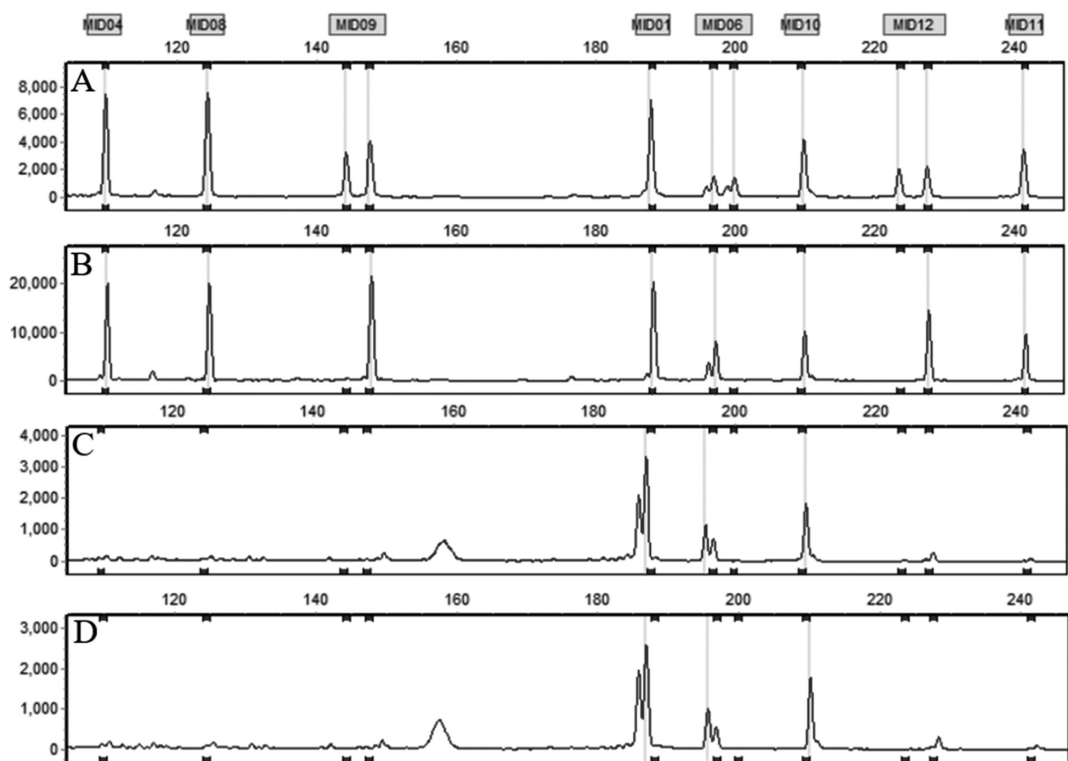


图3 玉米叶片 DNA 八重扩增电泳图

Fig.3 Fingerprints of maize leaf DNA by eight-fold amplification and eight-fold fluorescence capillary electrophoresis

2.4 测试样品纯度鉴定结果

用常温研磨法提取的待测样品 96 个单株叶片 DNA 并进行多重扩增,获得了 MID04、MID08、MID09、MID01、MID06、MID10、MID12、MID11 共 8 个位点的基因型。按照国家标准的 SSR 纯度鉴定流程,采用两步法,从标准推荐引物中筛选出了两个目标引物 PM06 和 PM13,得到了对应扩增产物片段大小信息。空白对照均未扩增出特异峰,表明检测体系未出现系统性污染,检测结果可信。以其中 12 个孔的基因型结果为例(表 4)。InDel 标记综合 8 个位点判断株型,SSR 标记综合筛选出的 PM06 和 PM13 两个位点进行纯度判定。本研究建立的纯度检测体

系鉴定结果为 95 个个体,其中 90 个个体在所有位点的基因型/扩增产物片段大小一致,判定为 H(杂交种带型),指纹与京科 968 一致;3 个个体带型与主带型不一致,综合判定为 Q(其他类型杂株);两个个体在所有位点均表现为亲本纯合,判定为 M(亲本带型),指纹与京 724 一致。本研究基于常温研磨法的纯度高通量快速检测体系和国家标准 SSR 鉴定体系对该份人工混合测试样品的纯度鉴定结果均为 94.7%,并且符合预期。

3 结论与讨论

本研究改良建立的常温研磨法具有快速、稳定、

表4 测试样品纯度鉴定结果示例

Table 4 Example of purity identification results of test samples

序号 Serialnumber	MID04	MID08	MID09	MID01	MID06	MID10	MID12	MID11	P06	P13	综合判定 Comprehensive judgment
1	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
2	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
3	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
4	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
5	DD	DD	ID	DD	DD	DD	II	ID	335/362	191/208	Q
6	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
7	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
8	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
9	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
10	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
11	DD	II	ID	II	ID	DD	ID	II	335/343	191/201	H
12	DD	II	II	DD	DD	DD	II	II	335/335	191/191	M

注:DD和II表示此样品在该位点表现为纯合;ID表示在该位点表现为杂合;H为杂交种带型;M为亲本带型;Q为其他类型杂株。

Note: DD and II indicate that the sample is homozygous at this locus; ID indicates that it is heterozygous at this locus; H, hybrid belt type; M, parental banding pattern; Q, other types of hybrid plants.

适于多重检测的特点,适于纯度高通量鉴定。以96孔板为单位,单人提取时间仅需要15 min左右,比常规的CTAB法、SDS法大致节省60~80 min;与快速碱煮法时间相比,该方法不需要高温裂解,减少了操作步骤,提高大批量样品的DNA提取效率^[17]。已有的快速高通量提取方法如碱煮法提取的DNA浓度较低,导致在应用中常常需要增加取样量以提高浓度,但同时带来杂质增加抑制扩增的问题^[18]。常温研磨法提取的DNA在琼脂糖凝胶电泳中检出明亮条带,与碱煮法等快速提取方法相比,提取的DNA质量、浓度均有大幅提升。常温研磨法的提取试剂都是稳定安全常规试剂,且成本低廉。相较于滤纸法而言省去了人工滤纸蘸洗的步骤,节省人力成本、简化了提取步骤,能够实现DNA提取的快速高通量,解决大量样品检测时DNA提取这一环节限速的难题。对于不同作物因取样量不同、基因组大小不同,对应的提取液体积也需相应进行调整^[19]。目前,常温研磨法实现了农作物叶片、黄化苗DNA的快速提取,且提取的质量较稳定。当面对多场景的检测需求如送检样品为种子时,提取步骤和试剂可能需要进行一定调整。

本研究采用的InDel标记应用于多重检测具有独特的优势和潜力。一是变异区间小,仅存在3~10 bp的插入或缺失,可减少引物内部的不对称扩增问题;二是扩增的产物片段小,使得扩增效率高^[20]。

以往的SSR标记用于纯度检测时需要先筛选出在送检样品上表现为双亲互补的多态性标记,再利用选中标记进行PCR扩增、电泳和数据分析,这一过程增加了时间与经济成本。本研究的高通量纯度检测体系选用的InDel标记不再需要针对每批样品单独筛选双亲互补型多态性标记,直接进行多重扩增,再根据多位点的结果进行综合判断,提高效率的同时保证了结果的准确性。本研究建立的高通量快速检测体系基于8对团体标准的InDel引物进行多重PCR,相较于单重扩增,在进行八重扩增时进一步优化引物浓度,降低了组合多重引物扩增的难度。由于碱煮法等快速提取方法提取的DNA质量较差,无法适配多重PCR,多重PCR体系要求配套高质量DNA,从而出现限速步骤。本研究通过将DNA提取、引物选择、PCR体系优化、自动化数据读取等多个环节紧密结合,实现了样品的高通量快速纯度检测。

本研究结合常温研磨法快速提取DNA、多重PCR、荧光标记毛细管电泳复合检测和综合多InDel位点的快速纯度结果判定,构建玉米纯度高通量InDel检测体系,实现玉米纯度的快速检测。

参考文献:

[1] 赵侠科,李延峰. 农作物种子纯度检测技术研究进展[J]. 河南农业, 2013(23):44-45.

ZHAO X K, LI Y F. Research progress of crop seed purity detection

- technology[J]. *Henan Agriculture*, 2013(23): 44–45. (in Chinese)
- [2] 张守润. 利用幼苗及籽粒形态鉴定玉米品种真实性和纯度研究[J]. *甘肃农业科技*, 2010(4): 11–14.
- ZHANG S R. Identifying reliability and purity of maize varieties by the seedling and grain morphology[J]. *Gansu Agricultural Science and Technology*, 2010(4): 11–14. (in Chinese)
- [3] 王建丽. 盐溶蛋白质电泳测定玉米种子纯度常见几种谱带的分析[J]. *内蒙古农业科技*, 2005(增刊): 77.
- WANG J L. Analysis of several common bands of salt-soluble protein electrophoresis for the determination of maize seed purity[J]. *Inner Mongolia Agricultural Science and Technology*, 2005(S2): 77. (in Chinese)
- [4] 王凤格, 赵久然, 王璐, 等. 适于玉米杂交种纯度鉴定的SSR核心引物的确定[J]. *农业生物技术学报*, 2007(6): 964–969.
- WANG F G, ZHAO J R, WANG L, et al. Determination of SSR core primers for maize hybrid purity identification[J]. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2007, 15(6): 964–969. (in Chinese)
- [5] 陆海燕, 陈璐, 王显生, 等. 基于高通量测序的棉花 InDel 标记开发及其应用[J]. *棉花学报*, 2019, 31(4): 297–306.
- LU H Y, CHEN L, WANG X S, et al. Development and application of cotton InDel markers based on high throughput sequencing[J]. *Cotton Science*, 2019, 31(4): 297–306. (in Chinese)
- [6] 朱万豪, 葛建镛, 刘志浩, 等. 适用于玉米种子分子检测的DNA快速提取新方法[J]. *分子植物育种*, 2022, 1–16.
- ZHU W H, GE J R, LIU Z H, et al. A new method for rapid DNA extraction suitable for molecular testing of maize seeds[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022: 1–16. (in Chinese)
- [7] 李艺, 铁双贵, 朱卫红, 等. 快速CTAB法提取玉米种子胚基因组DNA[J]. *河南农业科学*, 2008, 37(2): 17–20.
- LI Y, TIE S G, ZHU W H, et al. DNA extraction from maize embryo by a new rapid CTAB method[J]. *Henan Agricultural Science*, 2008, 37(2): 17–20. (in Chinese)
- [8] 张天琦, 刘平平, 吕佳, 等. 高效非损伤性扇贝DNA提取方法的建立及效果评价[J]. *中国海洋大学学报(自然科学版)*, 2021, 51(5): 24–31.
- ZHANG T Q, LIU P P, LÜ J, et al. Development and evaluation of a rapid, cost-effective and non-destructive DNA extraction method in scallops[J]. *Journal of Ocean University of China(Natural Science Edition)*, 2021, 51(5): 24–31. (in Chinese)
- [9] 高玉峰, 张攀, 郝晓敏, 等. 一种快速提取玉米大群体基因组DNA的方法[J]. *中国农业大学学报*, 2011, 16(6): 32–36.
- GAO Y F, ZHANG P, HAO X M, et al. A rapid DNA extraction method for large maize populations[J]. *Journal of China Agricultural University*, 2011, 16(6): 32–36. (in Chinese)
- [10] 李委, 戴祖云, 杨中周, 等. 一种适用于辣椒大规模PCR鉴定的DNA快速提取技术[J]. *中国农学通报*, 2018, 34(4): 43–48.
- LI W, DAI Z Y, YANG Z Z, et al. A rapid DNA extraction of pepper: suitable for high throughput PCR identification[J]. *Chinese Agronomy Bulletin*, 2018, 34(4): 43–48. (in Chinese)
- [11] 任星旭, 易红梅, 刘丰泽, 等. 快速多重SSR法在玉米种子纯度鉴定中的分析[J]. *分子植物育种*, 2022, 20(3): 880–886.
- REN X X, YI H M, LIU F Z, et al. Analysis of identification of maize seeds purity by rapid multiplex SSR[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2022, 20(3): 880–886. (in Chinese)
- [12] 常宏, 王汉宁, 张金文, 等. 玉米品种真实性和纯度鉴定的SSR标记多重PCR体系优化[J]. *草业学报*, 2010, 19(2): 204–211.
- CHANG H, WANG H N, ZHANG J W, et al. Optimization on multiplex PCR amplification system of SSR markers for authenticity and purity identification of maize varieties[J]. *Journal of Grass Industry*, 2010, 19(2): 204–211. (in Chinese)
- [13] 张璐. 多重PCR检测甜瓜品种纯度和甜瓜F₂代群体果实性状的遗传分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2024.
- [14] 王超, 马雪娜, 冯博, 等. 玉米品种德美亚多重SSR-PCR系统的建立及应用[J]. *中国糖料*, 2022, 44(2): 8–16.
- WANG C, MA X N, FENG B, et al. Establishment and application of multiple SSR-PCR system of maize varieties Demeiya[J]. *Chinese Sugar*, 2022, 44(2): 8–16. (in Chinese)
- [15] ZOU Y, MASON M G, WANG Y. Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds[J]. *T. Misteli. PLOS Biology*, 2017, 15(11): e2003916.
- [16] 冯博, 许理文, 王凤格, 等. 玉米品种京科968纯度鉴定引物的确定[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(11): 4688–4694.
- FENG B, XU L W, WANG F G, et al. Determination of primers for purity identification of maize variety Jingke968[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2017, 15(11): 4688–4694. (in Chinese)
- [17] 郭景伦. 适用于分子标记辅助育种的玉米单粒胚乳DNA快速提取方法[J]. *农业与技术*, 2005, 10(5): 113–118.
- GUO J L. A new rapid DNA extraction method from maize single endosperm and utilization in molecular marker assistant maize breeding[J]. *Agriculture and Technology*, 2005, 10(5): 113–118. (in Chinese)
- [18] 李葱葱, 刘娜, 李飞武, 等. 一种快速提取玉米基因组DNA的方法[J]. *玉米科学*, 2011, 19(1): 52–55.
- LI C C, LIU N, LI F W, et al. Method for rapid extracting of maize genomic DNA[J]. *Journal of Maize Sciences*, 2011, 19(1): 52–55. (in Chinese)
- [19] 孙稚成, 孙兆法, 段玉军, 等. 碱解法快速提取菠菜基因组DNA方法的优化[J]. *中国农学通报*, 2020, 36(36): 79–83.
- SUN Z C, SUN Z F, DUAN Y J, et al. Rapid extraction of genomic DNA in spinach: Optimization of sodium hydroxide hydrolysis method[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2020, 36(36): 79–83. (in Chinese)
- [20] 蓝碧秀, 王凇, 吴子恺, 等. 利用改良CTAB法快速小量提取微胚乳玉米基因组DNA[J]. *基因组学与应用生物学*, 2015, 34(1): 190–194.
- LAN B X, WANG L, WU Z K, et al. Rapid miniprep extraction of genomic DNA from micro-endosperm maize with modified CTAB method[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2015, 34(1): 190–194. (in Chinese)

(责任编辑: 栾天宇)