

吉林省玉米骨干自交系及 主推杂交种指纹图谱的构建*

李启云 王玉民 庄炳昌** 王绍平 方玉春 陆静梅

(吉林省农业科学院,公主岭 136100)

摘 要:本文以吉林省玉米骨干自交系及主推杂交种近 50 份为试材,利用 RAPD 分子标记技术,经过 40 个引物的重复筛选,构建了一套完整的 DNA 指纹图谱,其中仅用 4 个引物就可以完全区分所有的供试材料,并与蛋白、同工酶等分子标记进行比较,结果表明,多种分子标记手段相结合,将使玉米种子纯度及品种鉴定更完善。

关键词:玉米;杂交种;指纹图谱;骨干自交系;构建;吉林省

中图分类号:S 513.02

玉米是世界上主要粮食作物之一,目前生产上几乎全部使用杂交种,新培育出的自交系或杂交种由于管理或内外环境因素的影响可能出现纯度下降,从而影响品种的产量和品质等问题。因此,对品种的遗传纯度进行检测是玉米种子生产中急需解决的问题之一。以往种子纯度鉴定主要利用传统的形态学方法、同工酶电泳、种子蛋白电泳等方法,这些方法在玉米生产中起到了重要的作用,但由于品种间遗传多态性的限制,有些品种难以区别。随着分子生物学的发展,Williams 等^[1](1990)发展了随机扩增多态性 DNA 技术(RAPD),Quiros L F. 等(1991)利用 RAPD 标记成功的区别了 12 个 Brocoli 和 14 个向日葵品种,McDonald M B. 等^[2]利用几种材料种子提取 DNA 并进行 RAPD 扩增,表明 RAPD 可以用于品种鉴定,并可解决与品种专利有关的问题。更重要的是 RAPD 标记因其有扩增程序简单、易操作、省时、灵敏度高等优点,1990 年以来发展迅速,已在遗传图构建、基因定位与筛选,尤其在类群划分、遗传多样性分析及遗传距离测定等研究领域得到了广泛的应用。国内傅骏骅等人(1997)^[3],刘新芝等人(1997)^[4]证明了 RAPD 在玉米自交系类群划分中是可行的,但尚未见其用于品种鉴定的报道。

吉林省是我国的商品粮主产区,又是玉米生产大省,因此该研究显得尤为重要。本文以吉林省玉米骨干自交系及主推杂交种近 50 份为试材(表 1),在已有的研究基础上^[5],利用 RAPD 技术,通过 40 个引物的重复筛选,构建了一套完整的 DNA 指纹图谱,经统计分析,完全可以区分所有的自交系和杂交种,并与同工酶电泳、种子蛋白电泳作了比较,表明 RAPD 可以用于其它常规方法无法实现的品种鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

* 本研究为吉林省科委生物技术和国家自然科学基金资助项目

** 项目主持人

收稿日期:1997-12-02

供试材料见表 1,均由吉林省农科院玉米所和四平市农科院提供。

表 1 吉林省玉米骨干自交系及主推品种

编号	名称	↑/♀	编号	名称	↑/♀	编号	名称	↑/♀	编号	名称	↑/♀	编号	名称	↑/♀
1	吉单 180		2	853	↑	3	Mol7	♀	4	吉单 159		5	吉 846	♀
6	340	↑	7	吉 842	♀	8	330	↑	9	吉单 197		10	吉 878	♀
11	吉单 321		12	吉 921	♀	13	吉单 209		14	89cy-2	♀	15	吉单 222	
16	5003	♀	17	7922	↑	18	吉单 507		19	444	♀	20	1037	
21	吉单 511		22	169	♀	23	四单 19		24	四早 6		25	434	♀
26	4F1		27	四单 151		28	412	♀	29	7884	↑	30	合 344	
31	四密 21		32	4112	♀	33	四单 48		34	477		35	四早 11	
36	428		37	340		38	四单 105		39	495	♀	40	7922	↑
41	四早 25		42	本玉 9		43	7884-7	♀	44	白单 9		45	杂 C546	♀
46	吉 63	↑	47	中单 2		48	锦黄 795		49	吉单 156		50	锦单 6	

注:“↑”表示自交系父本,“♀”表示自交系母本,其余为主推杂交种。

1.2 方法

1.2.1 RAPD 分析

(1)DNA 提取:DNA 提取参照 H.Tai Thomas 的方法^[6],0.7% Agrose 凝胶电泳检测。

(2)RAPD 反应:反应体系总体积 25 μ L,其中模板 DNA 20 ng,200 μ mol $\cdot$ L⁻¹ dNTP,引物 200 nmol $\cdot$ L⁻¹(Opron 公司),25 μ L 10 倍反应缓冲液(100mmol $\cdot$ L⁻¹ Tris-HCl,pH=8.3,500mmol $\cdot$ L⁻¹ KCl,20mmol $\cdot$ L⁻¹ MgCl₂,0.001% geltatin,0.1% Np-40),1 单位 Taq DNA 聚合酶,加 2 滴石蜡油防止蒸发。反应循环参数为 94 $^{\circ}$ C 4 min,然后 94 $^{\circ}$ C 1 min,35 $^{\circ}$ C 2 min,72 $^{\circ}$ C 2 min,5 个循环;然后 94 $^{\circ}$ C 30 S,35 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 1 min30 S,40 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C,延伸 10 min,反应在 PE 480 PCR 循环仪上进行。

(3)电泳检测:反应产物加 3 μ L 上样缓冲液,1.4% Agrose 凝胶(内含 0.5 μ g/mL 溴化乙锭)电泳,Bio-Rad 公司的 Gel Doc 1000 紫外凝胶成像分析系统记录。

1.2.2 同工酶检测 SOD 同工酶凝胶电泳参照罗广华等(1994)的方法,样品编号顺序同 RAPD 分析。凝胶由 Bio-Rad 公司的 GS 690 Imaging Densimeter 扫描记录。

1.2.3 盐溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳 盐溶蛋白聚丙烯酰胺凝胶电泳参照王春等^[7]的方法,样品排序根据自交系父、母本及杂交种为一个组合,共 21 组(表 2)。凝胶由 GS 690 Imaging Densimeter 扫描记录。

表 2 种子蛋白电泳试材组合

编号	♀	杂交种	↑	编号	♀	杂交种	↑	编号	♀	杂交种	↑
1	853	吉单 180	Mol7	8	444	吉单 507	1037	15	477	四单 48	340
2	新吉 846	吉单 159	340	9	169	吉单 511	340	16	428	四早 11	合 344
3	吉 842	吉单 156	330	10	444	四单 19	Mol7	17	495	四单 105	7922
4	吉 878	吉单 197	新吉 846	11	434	四早 6	4F1	18	7884-7	本玉 9	Mol7
5	吉 921	吉单 321	吉 853	12	412	四单 151	四单 151	19	杂 C546	白单 9	吉 63
6	89cy-2	吉单 209	吉 853	13	合 344	四早 25	4112	20	Mol7	中单 2	2330
7	5003	吉单 222	7922	14	4112	四密 21	340	21	锦黄 795	锦单 6	Mol7

1.2.4 结果比较 对 RAPD 产物、种子盐溶蛋白谱带以及 SOD 同工酶图谱进行多态性统计分析,能区分杂交种及其父母本,记为“+”(表 3)。

表 3 三种分子标记结果比较

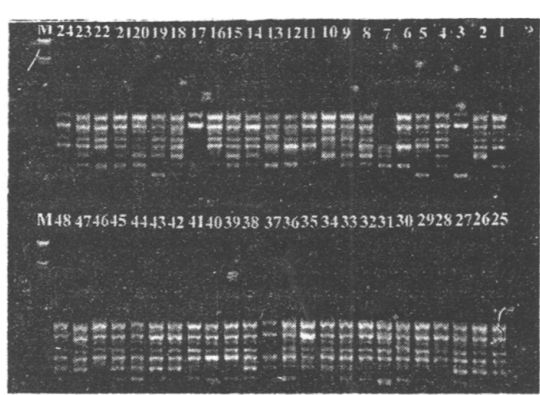
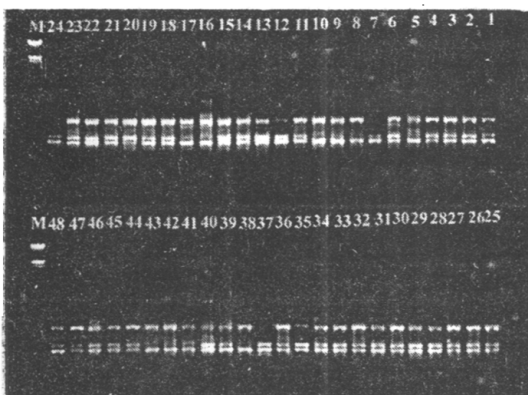
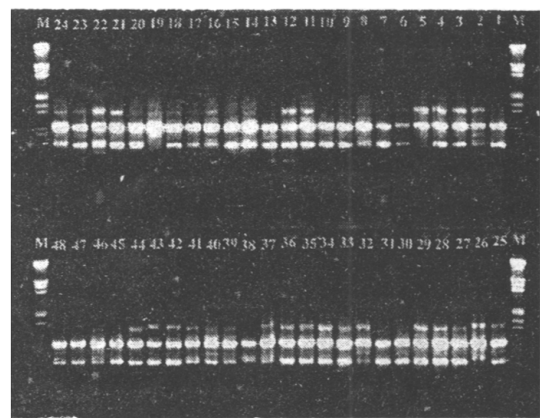
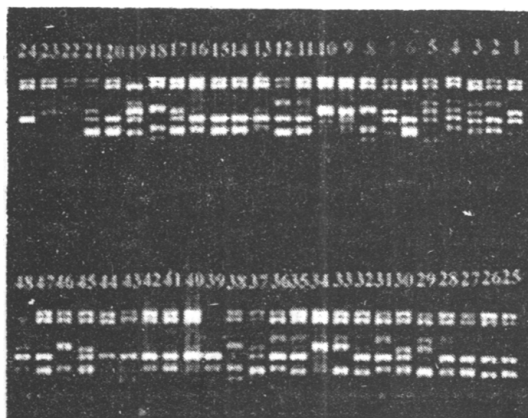
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	+	+	+					+	+	+		+			+		+	+	+	+	+
2		+	+			+					+	+	+			+	+	+		+	+
3						+	+			+			+	+							
4				+	+	+					+	+			+		+	+	+	+	+
5					+						+		+								+
6	+	+	+	+	+	+		+	+	+	+	+	+		+	+	+	+			+

注:表中编号与表 2 中 21 个组合一致,竖行中 1、2、3、4、5、6 分别代表 OPA-02、OPA-09、OPB-07、OPB-11、SOD 同工酶、盐溶种子蛋白,“+”表示该分子标记可以将其亲本自交系及杂交种区分开。

2 结 果

2.1 DNA 指纹图谱

通过对 40 个引物进行重复筛选,除 OPA15 只出现一条谱带以外,其它引物都表现出一定的多态性,其中有 10 个引物扩增产物具有较好多态性和重复性,选取 4 个引物(OPA-02, OPA-09, OPB-07, OPB-11)(图 1),对所有试材进行多态性统计分析,可区分开所有的骨干自交系及杂交种(表 3)。



注:图中编号与表 1 一致,M 为分子量标准(Λ DNA/EcoRI/HindIII),A、B、C、D 依次为引物 OPA-02, OPA-09, OPB-07, OPB-11 的扩增产物。

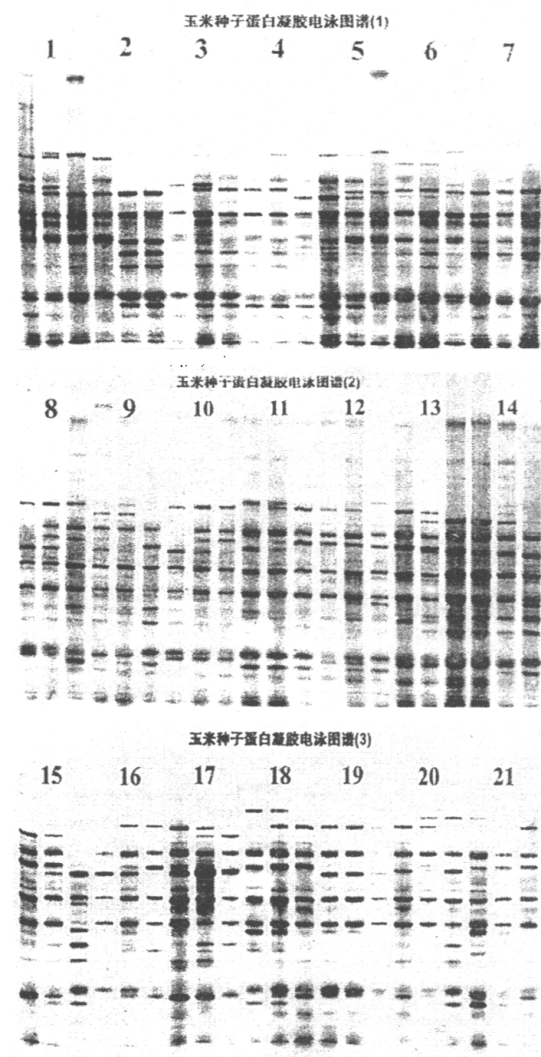
图 1 DNA 指纹图谱

2.2 SOD 同工酶谱

从 SOD 同工酶谱(图 2)可以看出,在所选试材中所有骨干自交系及主推杂交种显示的多

态性不明显,虽然在个别自交系(330、吉 921、5003、1037、434、合 344)中也有特异性谱带产生,在其相应的单交种中(330-中单 2 号、吉 921-吉单 321、434-四早 6 号、合 344-四早 11)也有同型谱带的出现,但毕竟只能区分开 4 个组合(5、11、13、20)(表 3)。过去我们曾对玉米 SOD 进行过研究^[8],SOD 同工酶不受环境条件及材料本身发育状况的影响,比较稳定。因此,对于可以区分开的组合,由于成本低,方法简单,该方法还是可以利用的。

2.3 盐溶蛋白指纹图谱(图 3)



注:图谱中编号与表 2 一致,编号所在位置分别代表 21 个杂交种,其左边为自交系母本,右边为自交系父本。

图 3 种子蛋白指纹图谱



注:图中编号与表 1 一致

图 2 SOD 同工酶图谱

在实验中,我们首先对所有 21 个组合中的每一个自交系及单交种分别进行大量筛选,找到它们的特征谱带,结果除第 7(5003、吉单 222、7922)、14(4112、四密 21、340)、19(杂 C546、白单 9、吉 63)、21(锦黄 795、锦单 6、Mo17)组以外,都表现出了很好的多态性(表 3),说明种子盐溶蛋白电泳是玉米品种鉴定的一种理想手段。

2.4 RAPD 重复性实验

为了验证本实验结果的可靠性,我们选取吉单 156 和锦单 6 号,用 OPA-02、OPA-09、OPA-16、OPA-19、OPB-07、OPB-11 共 6 个引物进行了重复性扩增(图 4),从谱带的数目及带型与第一次结果相近(图 1),说明该方法在我们的实验体系中,具有



注:1-6 所用材料为吉单 156,7-12 所用材料为锦单 6,1-6 所用引物依次为 OPA-02、OPA-09、OPA-16、OPA-19、OPB-07、OPB-11,7-12 同 1-6。

图 4 吉单 156 和锦单 6 号重复性实验

比较好的重复性和稳定性, 如引物 OPA-09 (2、8)、OPB-07 (11)。

3 讨 论

3.1 几种分析方法的比较

同工酶电泳和种子蛋白电泳由于方法简单, 要求条件与设施不高, 一般的科研单位与实验室都可以开展该项工作; 其次, 单纯用于大批量品种纯度鉴定时, 成本较低, 因此已广泛用于玉米种子纯度检测和品种鉴定, 但由于蛋白质水平上的差异较小, 有些品种的鉴定还有一定的难度。RAPD 作为品种和种子纯度检测手段, 具有其独特的优越性。首先, 它不受环境条件与发育状况等影响, 具有更高的分辨力和可靠性; 其次, 目前仅 Opron 公司生产的引物就有 1000 多种, 通过大量引物的筛选, 完全可以区分所有的自交系和杂交种。而 RAPD 标记由于其灵敏度高, 相应地对其反应条件要求也极其严格, 因此, 过去该技术应用的一个很大问题是在不同实验室所产生的“谱带”重复性差, 甚至同一实验室不同实验中也不一致。目前, PCR 仪自动化水平有了明显的提高, 国内外研究人员在应用该技术的同时, 对影响该技术的各种因素也作了深入的探讨^[9], 积累了一定的工作基础。我们认为, 只要针对不同材料摸索出一套适宜的反应条件, 并保证反应体系中的多种试剂来源和浓度的一致性, 严格控制反应程序的各个环节及保持各个循环参数的稳定性, 还是可以获得稳定的研究结果。

3.2 多种分子标记手段相结合, 可用于种子纯度检测和品种鉴定

本研究中, 种子盐溶蛋白标记获得了较好的结果, 在所有供试的 21 个组合中仅有 4 个组合没能区分开, 并且所能区分开的图谱中, 有较明显的特征谱带。因此, 可以用于一次性大量检测种子纯度, 而其成本也较低。尽管 RAPD 标记具有较高的灵敏性和较为丰富的多态性, 但由于其成本相对较高, 再加上实验条件要求较高, 因此, 不宜用于大量实验, 而有针对性地对常规标记所不能实现的材料进行鉴定是切实可行的。这样, 多种手段 (包括田间鉴定) 相结合, 将更好地服务于种子纯度检测及杂交种的鉴定。

3.3 RAPD 标记可为杂交育种及优势种群的构建提供分子证据

刘新芝等曾提出 RAPD 标记在玉米自交系组群划分上是可行的, 我们拟在本研究的基础上对有关研究方案与技术手段作更进一步的探索, 为各自交系之间的亲缘关系提供了分子水平上的线索, 与常规的血缘关系远近相结合, 也将为杂交育种工作者提供新的思路。当然, 应该首先保证 RAPD 标记程序的进一步标准化, 或运用更稳定的分子标记技术, 如 AFLP、RFLP、SSRs 等。

参 考 文 献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acid Research*, 1990, 18(22): 6531.
- [2] Mc Donald M B, et al. DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies. *Seed Science and Technology*, 1994, 22: 171 - 176.
- [3] 傅骏骅, 李连城, 刘新芝, 等. 玉米 RAPD 程序的优化研究及其初步探讨. *作物学报*, 1997, 23(1): 56 - 61.
- [4] 刘新芝, 彭泽斌, 傅骏骅, 等. RAPD 在玉米种群划分中的应用. *中国农业科学*, 1997, 30(3): 44 - 51.
- [5] 王玉民, 庄炳昌, 邓崇辉. 玉米半粒种子 DNA 提取及 RAPD 分析. *玉米科学*, 1996, 4(3): 27 - 28.
- [6] Thomas H Tati, et al. A rapid and inexpensive method of total DNA from dehydrated plant tissue. *Plant Biology Report*, 1990, 8(4): 297.
- [7] Wang Chun, et al. Polyacrylamide gel electrophoresis of salt soluble proteins for maize variety identification and genetic purity assessment. *Seed Science and Technology*, 1994, 22: 171 - 176.
- [8] 庄炳昌, 刘显华, 王玉民, 等. 玉米超氧化物歧化酶谱型的遗传分析. *作物学报*, 1994, 20(1): 126 - 128.
- [9] 刘勋甲, 郑用珪, 石永刚, 等. 玉米 RAPD 研究影响因素的探讨. *华中农业大学学报*, 1996, 15(5): 405 - 409.

Fingerprints of the Main Inbred – lines and Hybrids of Maize in Jilin province

LI Qi – yun WANG Yu – min ZHUANG Bing – chang * et al.

(*Jilin Academy of Agricultural Sciences , Gongzhuling 136100*)

Abstract: Fifty main inbred lines and hybrids of maize in Jilin Province were studied in this experiment. Utilizing RAPD (Random Amplified Polymorphism DNA), repetitively screening with 40 primers, a complete DNA fingerprinting was constructed. All of the materials can be discriminated with only 4 primers of them. Compared with seed protein electrophoresis analysis and SOD isozyme analysis, it was concluded that using several molecular marking techniques together can make identification of seeds purty and varieties of maize more easily and completely.

Key words: Maize; Fingerprint; Construct