

研究报告

A Letter

SSR 标记简便快速鉴定玉米品种纯度

王帮太¹, 秦贵文^{1,2}, 郭华¹, 张守林¹, 常见智¹, 张同香¹, 刘海霞¹

1. 鹤壁市农业科学院, 鹤壁, 458031

2. 河南浚单种业科技有限公司, 鹤壁, 458031

✉ 通讯作者: qgw6666@126.com; bangtaiw@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011年, 第9卷, 第60篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0060

收稿日期: 2011年03月12日

接受日期: 2011年04月28日

发表日期: 2011年05月17日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

王帮太等, 2011, SSR 标记简便快速鉴定玉米品种纯度, 分子植物育种 Vol.9 No.60 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0060)

摘要 为了提高 SSR 标记检测玉米纯度效率, 节约检测成本。本研究通过最大限度优化分子标记检测体系中 DNA 提取、PCR 扩增体系、电泳检测等环节。建立起以单籽粒微量胚乳碱煮法提取 DNA、2.5 μL PCR 扩增体系、多排上样电泳检测及两步法银染显影为一体高效、快速、经济的 SSR 标记检测玉米种子纯度体系。应用所建立的检测体系对浚单系列品种纯度进行检测, 能够迅速、准确地得出结果。

关键词 玉米; 种子纯度; PCR 扩增; SSR 标记

Simple and Rapid Identification of Maize Cultivars Purity by SSR Markers

Wang Bangtai¹, Qin Guiwen^{1,2}, Guo Hua¹, Zhang Shoulin¹, Chang Jianzhi¹, Zhang Tongxiang¹, Liu Haixia¹

1. Hebi Academy of Agricultural Sciences, Hebi, 458031, P.R. China

2. Henan Xundan Seed Tech CO., LTD, Hebi, 458031, P.R. China

✉ Corresponding author, qgw6666@126.com; bangtaiw@163.com; ✉ Authors

Abstract To improve the efficiency of the maize-purity detection by SSR marker, and save the testing costs. In this study, molecular marker technology was maximizing optimized from DNA extraction, PCR amplification system, electrophoresis detection. Established the efficient, rapid and economical maize-purity detection system by SSR markers on the base of alkaline-heating for DNA extraction from a single grain endosperm, 2.5 uL PCR amplification system, and multi-row loading gel electrophoresis combined with two-step silver staining. Applying the system to detect the purity of the Xundan cultivars, we can get a quick and accurate outcome.

Keywords Maize; Cultivars purity; PCR amplification; SSR

研究背景

玉米种子真伪和纯度检验是种子企业生产过程中的重要环节, 对稳定和推广优良品种起着重要的作用。目前, 蛋白质和同工酶电泳检测种子纯度的技术在多数种子企业中应用广泛, 但这种方法存在着多态性有限、对亲缘关系较近及遗传基础复杂的材料难以鉴别, 鉴定结果准确度有待提高等缺点(王风格等, 2003)。SSR 标记检测作为目前成熟的 DNA 指纹检测技术, 具有可靠性强、多态性丰富、标记数量多、重复性高、操作简单等优点, 其逐渐在种子纯度检测上得到了应用研究(王风格等, 2003; 刘龙洲等, 2003; 李晓辉等, 2003)。

李晓辉等(2003)应用 SSR 标记技术结合单籽粒 DNA 快速提取方法, 利用 21 份玉米骨干自交系及其组配的 13 个杂交种为材料, 研究了 SSR 标记在玉米杂交种种子纯度的鉴定技术; 刘龙洲等(2003)建立了一套应用 SSR 分子标记技术鉴定 SC704 玉米亲本及杂交种纯度的方法; 王风格等(2003)从 DNA 提取、PCR 扩增、电泳检测等环节对 SSR 技术进行了优化, 最终建立了一套完善的适用于玉米品种鉴定的 SSR 标准体系; 陈兆贵等(2010)利用 ISSR 技术对甜玉米种子纯度鉴定技术进行了研究, 为甜玉米的真伪鉴定和品种的选育提供了技术依据; 王帮太等(2009a)通过对分子标记检测各环节的进一步优化, 建立了

5 μL 的微量扩增体系,加快了分子标记检测的速度,降低了分子标记检测过程中的消耗。

为了进一步优化SSR分子标记检测环节,缩短检测时间,降低检测中的消耗,研究适合于玉米种子纯度检测的高效、快速、经济的SSR标记检测体系。本试验在以往研究的基础上,建立了以单籽粒微量胚乳碱煮法提取DNA、2.5 μL 超微量PCR扩增体系、多排上样电泳检测及两步法银染显影为一体的SSR标记检测玉米种子纯度的新型检测体系,并利用该体系对河南浚单种业浚单系列品种进行了种子纯度的检测。

1 结果与分析

1.1 高效、快速、经济的玉米种子SSR标记纯度检测体系

1.1.1 DNA提取方法的优化

本研究在赵久然(2009)的单粒种子胚乳DNA快速提取方法的基础上,作了进一步的优化:将提取液降至50 μL ,将TE缓冲液降至100 μL ,这样更有利于DNA样品的混合,节省了药品,且提取DNA质量完全可以满足SSR标记扩增需求(图1)。

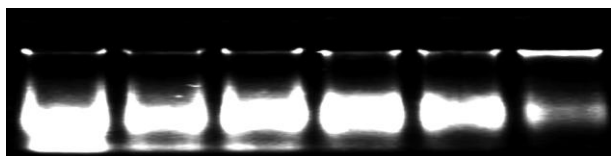


图1 DNA琼脂糖凝胶电泳图

注: 1~4: 碱煮法微量胚乳提取; CK: 普通方法小量叶片提取未纯化

Figure 1 Agarose gel electrophoresis results of DNA

Note: 1~4: Alkaline-heating for DNA extraction, CK: unpurified DNA with leaves extraction

1.1.2 玉米SSR扩增体系的优化

在前研究的5 μL 扩增体系的基础上(王帮太, 2009a),采用Taq PCR MasterMix高效扩增剂,进一步缩小扩增体系,将体积降至2.5 μL 。结果表明,三种扩增体系均能清楚地扩增目标带型,相比而言,2.5 μL 扩增量稍小,电泳检测时间不宜过长(图2)。但2.5 μL 检测体系成本最低,扩增结束后,加入2 μL 变性剂进行变性,总体积在4.5 μL 左右,上样量约2.5 μL 进行电泳检测,可以保证第二次重复检测的需要。

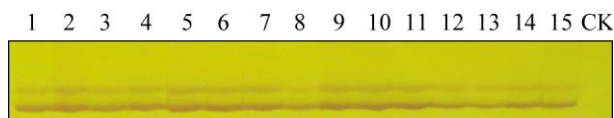


图2 umc1666在7.5 μL (1~5), 5 μL (6~10), 2.5 μL (11~15)扩增体系电泳图

注: CK: 空白对照

Figure 2 PCR amplification results of umc1666 with 7.5 μL , 5 μL , and 2.5 μL system

Note: CK is for blank contrast

1.1.3 玉米SSR电泳检测技术的优化

采用4.5%的变性聚丙烯酰胺胶对扩增样品进行检测(王帮太, 2009b),如果选取的引物多态性较好、特异性高,每块测序胶可以检测4排样品。对银染显影技术进行了优化,省去了传统显影过程中的固定步骤,采用直接银染后显影的两步显影法,由于不需要对胶带进行特殊保存,只需照相保存即可,省去对胶带的终止固定,显影完成后只需用自来水冲洗残余氢氧化钠即可。

利用本研究建立的SSR检测体系,一个熟练的实验操作员在一个工作日内对两份送检的玉米品种(200粒)进行纯度检测,统筹安排工作流程,当日即可提供检测结果。

1.2 玉米SSR检测体系的应用

采用本研究建立的SSR玉米纯度检测体系。选用10对SSR引物对浚单22、浚单26、浚单28、浚单29进行亲本多态性筛选,最终确定了使用引物bnlg1396检测浚单22、浚单26、浚单28种子纯度,引物umc1666检测浚单29种子纯度,这两个引物多态性好、带型清晰、稳定性好。

利用确定的引物分别对浚单系列品种进行种子纯度检测,测序胶每排样品均有相应的浚单系列亲本及标准杂交种作为对照(图3;图4)。共检测3000个样品,其中检测出母本带型的有35个样品,占检测样品数的1.17%,检测出父本带型的有13个样品,占检测样品总数的0.43%,没有检测到异株样品。检测的车次中最高纯度为100%,最低为96%,平均为98.4%。

2 讨论

玉米杂交种制种一般采用人工去雄、人工自然授粉的方法以保证种子纯度,但生产中常出现杂交

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28

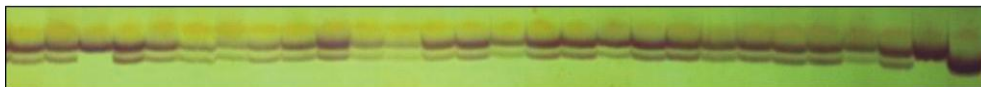


图3 引物bnlg1396在部分浚单26品种中的检测扩增带型

注: 26,27,28分别为: 标准浚单26带型, 浚单26母本对照带型, 父本对照带型; 3为检测出的母本自交苗带型

Figure 3 PCR fragments amplified with the marker bnlg1396 in some Xundan 26 individuals

Note: 26: standard Xundan 26 profile; 27: mother of Xundan 26 profile; 28: father of Xundan 26 profile; 3: the detection of mother of Xundan 26 profile

1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24



图4 引物umc1666在部分浚单29品种中的检测扩增带型

注: 22,23,24分别为: 标准浚单29, 浚单29母本对照, 父本对照; 17号为检测出的母本自交苗

Figure 4 PCR fragments amplified with the marker umc1666 in some Xundan 29 individuals

Note: 22: standard Xundan 29 profile; 23: mother of Xundan 29 profile; 24: father of Xundan 29 profile; 17: the detection of mother of Xundan 29 profile

种纯度较低的现象。导致杂交种混杂的主要原因: 一是基础材料混杂; 二是制种过程中防杂、去杂、保纯技术措施控制不严, 造成母本自交甚至异品种授粉, 从而出现自交株和异型株; 三是种子处理等过程中的机械混杂。在实际的种子纯度的检测过程中发现, 母本自交是影响种子纯度的主要原因, 其次为父本自交苗, 这主要是由于人工去雄不干净、不彻底造成的, 另外制种田往往在母父本种植一定比例后还零星种植父本以增加授粉效果, 收获时去除不彻底往往会混杂入父本自交苗。

与已报道的SSR标记鉴定玉米种子纯度的方法相比(王风格等, 2003; 刘龙洲等, 2003; 李晓辉等, 2003; 李淑娟, 2003), 本实验使用的碱煮法微量胚乳提取DNA方法通过减少药品的使用量, 操作更快捷、简便; 使用的2.5 μL 超微量PCR扩增体系在国内还未见有相关报道, 超微量体系的应用可以最大限度节省SSR标记检测过程中相对成本较高的taq酶、DNTP等药品的用量, 使扩增成本降至最低; 通过选择合适的引物, 还可以在测序胶上多次点样, 配合两步快速银染显影方法, 很大程度上节约了电泳检测成本。这样就最大限度降低了标记检测的总成本。玉米SSR标记高效、快速、经济的种子纯度检测体系的建立, 最大化的缩短了检测时间, 节约了检测成本。

本实验在银染过程中曾探索使用一种无毒、无味的试剂代替甲醛的还原作用, 目前还未找到合适

的试剂, 对于该研究本课题将继续进行探索, 争取使SSR标记检测玉米种子纯度体系更经济、环保。

3材料与方法

3.1材料

试验材料为浚单29母本材料。检测材料为公司繁育的浚单系列品种, 包括浚单22、浚单26、浚单28、浚单29四个品种。按照GB/T3543.5-1995的抽样规定, 每车皮抽取2个样品, 每样品随机取100粒种子待检测。浚单系列亲本及标准杂交种材料由鹤壁市农业科学院玉米育种研究室提供。

3.2仪器设备

PCR扩增仪、电泳仪、电泳槽、刀片等。

3.3单籽粒微量胚乳碱煮法快速提取DNA

碱煮法快速提取玉米胚乳DNA参考赵久然等(2009)的方法, 作少量修改。具体步骤为: ①将籽粒种皮沿一侧轻轻切下, 再切1-3薄片胚乳放入PCR管中。②加入50 μL 提取液(0.1 Mol/L NaOH), 加盖。③放入PCR扩增仪中99 $^{\circ}\text{C}$, 12 min。④降到室温后, 加入100 μL TE (1 mol/L Tris-HCl 5 mL, 0.5 mol/L EDTA 1 mL, 定容至500 mL, 浓盐酸调PH=2), 静止备用。

3.4 PCR扩增

分别采取7.5 μL 、5 μL 、2.5 μL 的反应体系进行

PCR扩增。5 μL 的反应体系中含有1 μL 实验提取的DNA、0.05 μL Primer1 (40 $\mu\text{mol/L}$)、0.05 μL Primer2 (40 $\mu\text{mol/L}$)、2.5 μL 2 \times Taq mix、1.4 μL ddH₂O。7.5 μL 和2.5 μL 反应体系按比例增减。PCR扩增在SensoQuest LabCycler PCR仪上进行。扩增程序为95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性3 min, 1个循环, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性40 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 退火30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸40 s, 共30个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸8 min, 最后在10 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后加入2 μL 6 \times loading buffer 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 min, 取出放入-20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱低温保存。

试验中使用的引物由上海生物工程有限公司合成, 2 \times Taq PCR MasterMix购买于天根公司。

3.5电泳检测

4.5%的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳。预电泳: 功率100 W, 时间5 min; 电泳: 功率75 W, 时间30 min; 加样量: 2.5 μL 。银染程序: (1)银染: 放入染色液(1 g AgNO₃+1 000 mL蒸馏水)中, 轻轻摇动约5 min。(2)漂洗: 将染色后的凝胶放入蒸馏水中, 迅速漂洗2-3 s。(3)显影: 把胶板放入显影液(1 000 mL蒸馏水+20 g NaOH+5 mL甲醛)中摇动至DNA带显示。(4)洗涤: 用自来水(注: 本实验室自来水为地下水直接供给)冲洗胶面上残留的NaOH后统计带型数据。

作者贡献

王帮太、秦贵文、郭华是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 王帮太完成了数据分析、论文初稿的写作; 张同香完成实验样品的取样、初步分析; 刘海霞参与完成实验分析; 张守林提供实验材料标准对照; 郭华、常见智完成对文稿英文、中文的校正工作; 秦贵文是项目的负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由河南省重大科技专项(081100110400)、国家农业科技成果转化资金项目(2010GB2D000270)资助。作者感谢河南农业大学付志远老师在本实验过程中的技术支持和有益的建议。

参考文献

Chen Z.G., Jiang X.X., Ceng X.W., Zhang T., and Huang Q.T., 2010, Studies purity identification of sweet corn seeds using ISSR molecular marker technique, *Yumi Kexue* (Journal of Maize Sciences), 18(1): 46-48 (陈兆贵, 江新晓, 曾秀文, 张涛, 黄肖婷, 2010, 利用ISSR标记技术鉴定甜玉米种子纯度的研究, 玉米科学, 18(1): 46-48)

Liu L.Z., Zhao J.R., Qv Y.Y., and Wang F.G., 2003, Assessment on identification the purity of maize hybrid SC704 and its parents by using SSR, *Xibei Nongye Xuebao* (Acta Agriculturae Borealioccidentalis Sinica), 12(4): 68-70 (刘龙洲, 赵久燃, 曲延英, 王风格, 2003, SSR鉴定SC704玉米亲本及杂交种纯度的研究, 西北农业学报, 12(4): 68-70)

Li S.J., 2003, Summary of identification method on seed purity, *Qingdao Daxue Xuebao* (Journal of Qinghai University), 21(1): 16-19 (李淑娟, 2003, 种子纯度鉴定方法概述, 青海大学学报(自然科学版), 21(1): 16-19)

Li X.H., Li X.H., Li W.H., Wang Z.H., Ma F.M., Yuan L.X., and Zhang S.H., 2003, Application of SSR markers in hybrid seed purity test of maize, *Zuowu Xuebao* (Acta Agronomica Sinica), 29(1): 63-68 (李晓辉, 李新海, 李文华, 王振华, 马凤鸣, 袁力行, 张世煌, 2003, SSR标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用, 作物学报, 29(1): 63-68)

Wang B.T., Shen C.T., Zhang Z.J., Li X.H., and Xi Z.Y., 2009a, Study micro-PCR reaction system on maize, *Yumi Kexue* (Journal of Maize Sciences), 17(4): 29-31 (王帮太, 申灿庭, 张建尊, 李新海, 席章营, 2009a, 玉米微量PCR反应体系研究, 玉米科学, 17(4): 29-31)

Wang B.T., Lv X.L., Xi Z.Y., Shi L.Y., Xie C.X., Zhang S.H., and Li X.H., 2009b, Validation and detection system of two indel markers for sugarcane mosaic virus resistance in maize, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 7(4): 817-821 (王帮太, 吕香玲, 席章营, 史利玉, 谢传晓, 张世煌, 李新海, 2009b, 玉米抗甘蔗花叶病毒分子标记与检测技术, 分子植物育种, 7(4): 817-821)

Wang F.G., Zhao J.R., Guo J.L., and Liu L.Z., 2003, Series of research on establishing DNA fingerprinting pool of chinese new maize cultivars I, the establishment of a standard SSR system fitting for maize cultivars identification, *Yumi Kexue* (Journal of Maize Sciences), 11(1): 3-6 (王风格, 赵久然, 郭景伦, 刘龙洲, 2003, 中国玉米新品种DNA指纹库建立系列研究 I 玉米品种纯度及真伪鉴定中SSR,技术标准实验体系的建立, 玉米科学, 11(1): 3-6)

Zhao J.R., and Wang F.G., 2009, Application and research on DNA fingerprinting pool of maize cultivars, *Zhongguo Nongye Keji Chubanshe* (China Agricultural Science and Technology Press), pp.17-27 (赵久然, 王风格, 2009, 玉米品种DNA指纹鉴定技术研究与应用, 中国农业科技出版社, pp.17-27)