

玉米杂交种新科 891 及其亲本 SSR 指纹图谱的构建

张瑞平 周联东 王文洁 孙 佩 王 蕊 刘经纬 李和顺 王学军

(河南省新乡市农业科学院, 新乡 453000)

摘要:利用 SSR 分子标记技术,构建杂交种新科 891 及其亲本的指纹图谱。结果表明:从 56 对均匀分布在玉米 10 条染色体上的 SSR 引物中筛选出 7 对条带清晰、多态性及重复性好的引物,分别是:bnlg439w1、umc2007y4、umc2015k3、bnlg2291k4、umc1705w1、bnlg1702k1 以及 phi0801k15。这 7 对引物共检测出 23 个等位基因,每对引物可以检测到 2~4 个,平均 3.29 个。将这 7 对引物扩增的杂交种新科 891 及其亲本的条带数字化,计算出现与其相同数字指纹图谱的概率均为 1.19×10^{-7} ,概率极低,所构建的指纹图谱是特有的,因此,用这 7 对引物鉴定杂交种新科 891 的真实性和纯度是可行的、结果是可信的。

关键词:玉米;新科 891;SSR 标记;指纹图谱;真实性鉴定

玉米杂交种和亲本遗传真实性是种子质量的重要标志之一,直接影响着玉米生产的产量和质量^[1]。新品种逐年增加,高频率使用骨干自交系使品种的遗传基础趋于狭窄,加大了品种鉴定的难度^[2]。同工酶和蛋白电泳多态性不够丰富,试验条件要求严格,鉴定结果稳定性低^[3],已经不能很好地鉴定种子的真实性和纯度。SSR 标记因具有快速、准确、信息含量高、呈共显性分离、易于分析、重复可靠等优点,在分析自交系亲缘关系^[4-5]和杂交种纯度^[6-8]等方面

发挥了重要作用。赵久然等^[9]建立了 46 个玉米自交系和杂交种的 DNA 指纹图谱数据库,为更好地鉴定种子的纯度和真实性提供了方便。

新科 891 于 2018 年通过国家农作物品种审定委员会审定,审定编号:国审玉 20186115。本文利用 SSR 分子标记技术,对新科 891 及其亲本进行分析,构建 SSR-DNA 指纹图谱,并将 SSR 引物扩增的条带数字化,计算出现相同数字指纹图谱的概率,以期更为准确地鉴定该品种提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 杂交种新科 891 及其父本 PHA458 和母本 S155 均由河南省新乡市农业科学院玉米选

基金项目:河南省科技攻关计划项目(182102110360);河南省产学研合作计划项目(152107000021)

通信作者:王文洁

3 结论

试验结果显示,北玉 1501、金秋玉 45、文津 12 号和白玉 59 综合性状较优,增产显著,较适合在新平县中海拔地区推广;金秋玉 2751、尚单 3721 和霖白 99 综合性状好,适合在新平县中海拔地区推广;实地 616 和北玉 1572 综合性状稍差,较海禾 2 号(CK)减产但差异不显著,可继续在当地进行试验观察。

玉米品种的产量、抗性性状表现,除了受品种自身特性决定外,还受土壤肥料、气象环境等因素的影响,尤其是气象因素的影响较大也最为不稳定^[3-6]。因此,本研究结论主要适用于新平县中海拔地区,其他自然环境条件与试点相同或相近地区可参照推广。

参考文献

- [1] 英敏,余虎,李其义. 玉米品种区域试验精确度和品种比较精确度分析. 种子,2004,23(10): 65-67
- [2] 孟静娇,邵思全. 2016 年北玉玉米品种联合体区域试验初报. 中国种业,2017(1): 58-62
- [3] 陈国斌,刘婷婷,杨钊杰,孟静娇,谢志坚. 2017 年云南北玉玉米品种联合体区域试验简报. 上海农业科技,2018(3): 45-47
- [4] 方绍军. 2017 年玉米新品种筛选试验. 种子世界,2018(6): 23-26
- [5] 谢志坚,刘婷婷,杨钊杰. 2017 年云南省金秋联合体普通玉米区域试验(中海拔组)结果分析. 农业科技通讯,2018(5): 62-66
- [6] 刘婷婷,谢志坚,孟静娇,杨纪明. 2017 年田丰玉米品种联合体区域试验(西南春玉米组)结果分析. 农业科技通讯,2018(5): 73-76

(收稿日期:2019-02-20)

题提供。试验所用 DNA 聚合酶、dNTP 购买于宝生物工程(大连)有限公司。用于 SSR 分析的 56 对引物序列来自玉米基因组数据库(<http://www.maizgedb.org/ssr.php>),由上海生物工程股份有限公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取 将杂交种新科 891 及其亲本 PHA458 和 S155 种子沙培,置于 30℃ 培养箱暗培养。3 叶 1 心时取叶片混样,用 CTAB 的方法提取总 DNA^[10],紫外分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,加水稀释至 25ng/μL, -20℃ 保存备用。

1.2.2 扩增体系及电泳分析 反应总体积为 20μL,包括 dNTPs 0.2mmol/L、引物 0.25μmol/L 和模板 DNA 25ng,加灭菌纯水补足体积。PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5min; 94℃ 40s, 60℃ 35s, 72℃ 45s, 35 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 扩增反应在 BIOER TC-96/G/H (b) 型 PCR 仪上进行。在扩增产物中分别加入上样缓冲液 6× Loading Buffer,混匀后各取 3.5μL 在 8.0% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检

测,凝胶通过银染显色。然后在胶片观测灯上观察电泳结果,用凝胶成像系统扫描图片或者用相机拍照保存图片。

1.2.3 指纹图谱构建及数字化 筛选带型清晰、稳定的引物构建杂交种新科 891 的指纹图谱,并将指纹图谱数字化。在相同迁移率位置(分子量相同片段)有带记为 1,无带记为 0,建立数据库。根据公式 $P=1/2^n$ 计算相同指纹图谱有可能出现的概率^[11],式中“2”为相同迁移率位点上等位基因存在的“有”或“无”(数字化处理中用 1 或 0 表示)两种关系;“n”为等位基因的数目;2ⁿ 为检测 n 个等位基因时有可能涉及的所有自交系的个数。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物筛选 从 56 对分布于玉米 10 条染色体上的 SSR 引物中筛选出扩增带型稳定、重复性好的 7 对引物,用于构建杂交种新科 891 的指纹图谱,这 7 对引物分布在玉米的 7 条染色体上,共检测出 23 个等位基因,每对引物可检测出 2~4 个等位基因,平均为 3.29 个,片段大小在 200~400bp 之间(表 1)。

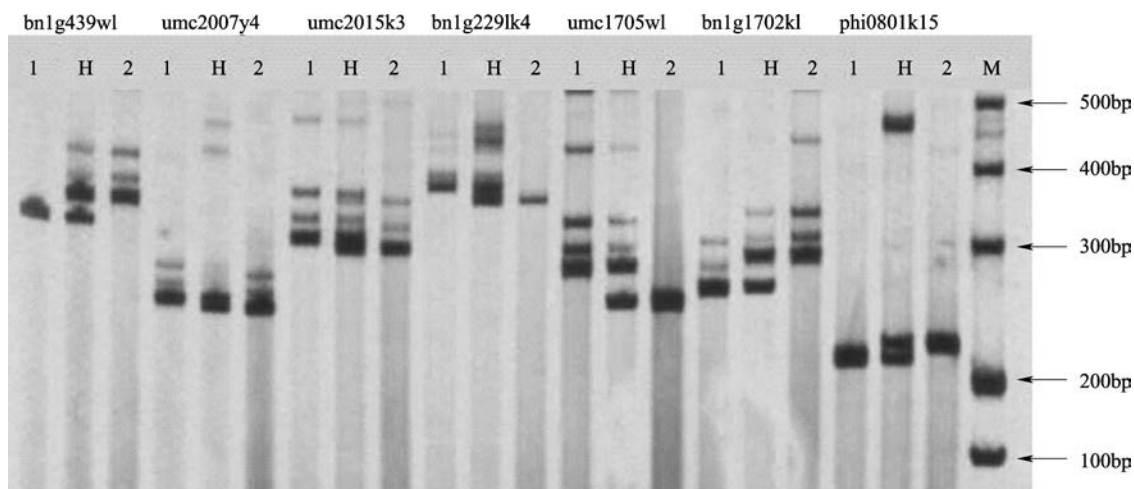
表 1 用于构建新科 891 指纹图谱的引物信息

引物名称	染色体位置	引物序列	等位基因数	片段大小(bp)
bnlg439w1	1.03	上游: AGTTGACATCGCCATCTTGGTGAC 下游: GAACAAGCCCTTAGCGGTTGTC	4	300~400
umc2007y4	2.04	上游: TTACACAACGCAACACGAGGC 下游: GCTATAGCCCGTAGCTTGCTAGACAC	2	200~300
umc2015k3	3.00	上游: GAAGGGCAATGAATAGAGCCATGAG 下游: ATGGACTCTGTGCGACTTGTACCG	4	200~400
bnlg2291k4	4.06	上游: GCACACCCGTAGTAGCTGAGACTTG 下游: CATAACCTTGCTCCCAAAACCC	3	300~400
umc1705w1	5.03	上游: GGAGGTCGTCAGATGGAGTTCG 下游: CACGTACGGCAATGCAGACAAG	4	200~400
bnlg1702k1	6.05	上游: GATCCGCATTGTCAAATGACCAC 下游: AGGACACGCCATCGTCATCA	4	200~400
phi0801k15	8.08	上游: TGAACCAACCGATGCAACTTG 下游: TTGATGGGCACGATCTCGTAGTC	2	200~300
总数			23	
平均			3.29	

2.2 指纹图谱构建 杂交种新科 891 的指纹图谱如图 1 所示,杂交种 891 及其父母本由引物 bnlg439w1、umc2007y4、umc2015k3、bnlg2291k4、umc1705w1、bnlg1702k1 以及 phi0801k15 扩增的主条带大小在 200~400bp 之间。这 7 对引物所扩出的杂交种新科 891 的主条带均是父本和母本主条带

的叠加,很好地印证了 SSR 分子标记共显性的遗传特点^[12]。

2.3 指纹图谱数字化 将筛选出的 7 对引物扩增的片段数字化,并计算出杂交种新科 891 及其亲本出现相同数字指纹图谱的概率(表 2),以父本 PHA458 为例,数字指纹由 23 个顺序不同的数字



从左到右每3个泳道为一个小组,泳道上方为每个小组所用的引物;1:父本 PHA458; H:杂交种新科 891; 2:母本 S155; M: Marker

图1 杂交种新科 891 及其亲本 SSR 指纹图谱

构成,出现与其完全相同数字的概率为 1.19×10^{-7} ($P=1/223$),即在 8.4×10^6 (223)份自交系中,只有1份自交系与上述指纹号码相同。由此可见,出现与之完全相同数字指纹的概率极低,这个数字指纹图谱是其特有的。同理,由这7对引物构建的杂交种新科 891 及其母本 S155 的数字化指纹图谱也是特有的,可用于品种的真实性和纯度鉴定。

表2 新科 891 及其亲本的数字化指纹图谱

材料	号码	概率
父本 PHA458	0001-10-1110-110-1110-0111-01	1.19×10^{-7}
新科 891	1111-11-1111-111-1111-1111-11	1.19×10^{-7}
母本 S155	1110-01-1101-001-0001-1110-10	1.19×10^{-7}

3 结论

相对于其他标记,SSR 标记比较稳定并且随机性更强,能提供更多的遗传信息。同时 SSR 标记检测简便、快捷,又是共显性标记,所以越来越多的应用在遗传多样性分析、遗传图谱构建、自交系系谱研究、杂交优势群和 DNA 指纹图谱建立上^[1]。本研究针对杂交种新科 891 及其父母本,利用 SSR 分子标记,从 56 对引物中筛选出 7 对重复性及稳定性好、带型清晰的引物,用于构建新科 891 及其亲本的指纹图谱,并且将扩出的条带数字化,建立杂交种新科 891 及其亲本的数字指纹图谱,计算出现相同指纹的概率均为 1.19×10^{-7} ,概率极低。因此,这 7 对引物构建的杂交种新科 891 的指纹图谱是特有的,在生产上可随机选择 1~2 对引物用于杂交种新科 891 纯度和真实性鉴定,可操作性强。

参考文献

- [1] 吴淦生,杨文鹏,郑用琰. 3 个玉米杂交种和亲本 SSR 指纹图谱的构建. 作物学报,2003,29 (4): 496-500
- [2] 盖树鹏,王日新,黄进勇. 山东省玉米骨干自交系和杂交种的 SSR 指纹图谱构建. 中国农学通报,2011,27 (24): 40-44
- [4] Menkir A, Kling J G, Badu-Apraku B, Ingelbrecht I. Molecular marker-based genetic diversity assessment of Striga-resistant maize inbred line. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 110 (6): 1145-1153
- [5] Reif J C, Hamrit S, Heckenberger M, Schipprack W, Maurer H P, Bohn M, Melchinger A E. Trends in genetic diversity among European maize cultivars and their parental components during the past 50 years. Theoretical and Applied Genetics, 2005, 111: 838-845
- [6] 王风格,赵久然,王璐,易红梅,郭景伦,戴景瑞,原亚萍,卢柏山,杨国航. 适于玉米杂交种纯度鉴定的 SSR 核心引物的确定. 农业生物技术学报,2007,15 (6): 964-969
- [7] 张雪原,赵攀峰,王风格,孙世贤,王守才. 玉米品种 SSR 分子标记与田间小区种植一致性鉴定结果的比较. 玉米科学,2009,17 (1): 40-45,50
- [8] 郭景伦,赵久然,王风格,张静梅,苏瑞平,任杰,付小燕. 玉米杂交种纯度室内与田间鉴定结果比较. 种子世界,2004 (7): 22-24
- [9] 赵久然,王风格,郭景伦,陈刚,廖琴,孙世贤,陈如明,刘龙洲. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 II: 适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的 SSR 核心引物的确定. 玉米科学,2003,11 (2): 3-5
- [10] 王关林,方宏筠. 植物基因工程. 2 版. 北京: 科学出版社,2002: 744
- [11] Nanjing Agricultural University. Field experiment and statistics. 2th ed. Beijing: China Agriculture Press, 1998: 51-54
- [12] 滕海涛. 利用 SSR 共显性判定玉米杂交组合父本效率分析. 玉米科学,2009,17 (5): 53-54,64

(收稿日期: 2019-02-02)