农作物种子检测中 SSR 与 SNP 分子标记方法的比较分析

李巧英
（山西省农业种子总站，太原 030006）

摘要：介绍了 SSR 与 SNP 两种分子标记方法在农作物种子检测中的应用，从检测原理、常用检测平台和方法应用 3 个方面进行比较分析。两种分子标记检测农作物种子真实性和种子纯度、一致性、特异性，方法简单快速，区分灵敏度高，易实现自动化，试验结果准确可靠，且便于数据整合、比较分析。SSR 分子标记方法通过测定核苷酸序列长度不同区分品种，引物数量少，结果准确，适合小样品量种子检测；SNP 分子标记方法利用碱基组成不同区分品种，位点多，通量高，适合大量样本进行品种分析。

关键词：SSR；SNP；农作物种子检测；比较分析

随着分子生物学理论和分子标记技术的发展，分子标记逐渐应用在农作物种子检测中，实现了在基因水平上分析农作物品种信息。品种间的差异通过多个位点 DNA 序列长度不同或碱基组成不同表现出来，利用不同检测平台展示指纹信息，便于分析各品种不同位点的基因型，进行比对。分子标记法快速检测，避免了应用传统检测方法受自然环境条件和人员主观因素等影响的困惑。

分子标记是一种以 DNA 序列变异为基础的标记，在生物体基因组中，DNA 序列差异是生物遗传多样性的直接体现，通过研究这些差异可进行品种间亲缘关系的分析。分子标记在生物体中分布广泛，多态性高，信息量丰富，遗传稳定，利用分子标记进行种子基因分析，实验结果及时可靠，在农作物种子质量监控、品种身份鉴定、品种权保护、品种审定、基因定位和遗传育种等方面具有重要的意义。经过研究与改进，第 1 代分子标记方法由于各种问题与缺陷逐渐被淘汰，目前 SSR 和 SNP 分子标记是农作物种子检测中应用的优良标记方法。

内部要加强管理，强化品种试验各环节的实施，形成“统一试验立标杆、其他试验起关键”的良好品种试验体系，从而为品种管理有序开展奠定坚实基础。

4.4 创新材料，提升水平 从参试品种晋级率看，西北春玉米组 1 年区域试验晋级率不高，在 25% 左右。一方面与对照先玉 335 综合表现较好有关；另一方面与育种资源狭窄有关。目前参试的品种以类 335 品种居多，虽然这些品种在某一试验点或某一性状上表现优于先玉 335，但在试验点多、分布广以及生态类型多样的试验条件下，与先玉 335 相比还存在一些差距。建议育种单位加大种质资源挖掘和创新，进一步丰富育种材料，培育适应性广、性状稳定的突破性品种，加快推动西北玉米在育种水平上向更高的台阶迈进。

参考文献

[1] 肖玮钰. 西北地区春玉米气候适宜性区划和干旱风险评估. 南京：南京信息工程大学，2013

[2] 程芳媛，雷秋萍. 西北春玉米品种区域试验研究. 种子科技，2018，36（10）：92–94，100

[3] 仇焕广，李新海，余嘉玲. 中国玉米产业：发展趋势与政策建议. 农业经济问题，2021（7）：4–16

[4] 国家农作物品种审定委员会. 关于印发国家审定品种同一适宜生态区的通知.（2016–07–16）[2021–10–12]. http：//www. zys. moa. gov. cn/flfg/201703/t20170310_6313827. html

（收稿日期：2021-10-12）

1 检测原理

SSR（简单重复序列）第2代DNA分子标记，是生物体内存在的以1~6个核苷酸为重复单元的DNA序列，由于寡核苷酸重复序列和重复次数不同形成长短不一的核苷酸片段。将作物品种在某一位点的特异核苷酸序列作为标记，根据核苷酸链两端保守的基因序列设计不同的引物，将这些DNA片段扩增出来，分析比较待测样品在该位点的基因序列，确定品种基因型，分析品种间的遗传关系。SSR标记是一种共显性标记，等位变异多，试验重复性好，数据分析简便，且易于样品间结果比对和与数据库信息比较。

SNP（单核苷酸多态性）第3代DNA分子标记，是指生物体内同一位点的不同等位基因之间由于插入、缺失、转换或颠换引起的单个核苷酸差异，多为转换和颠换。碱基差异是基因组中遗传变异的最小结构单位，直接导致遗传物质的不同，利用SNP分子标记检测这种差异可以帮助区分不同品种和研究品种间的关系。SNP标记在整个基因组中数量多，高密度分布，灵敏度高，突变频率较低，易于基因分型，是一种二态性标记，单个标记位点的区分能力较弱，需要结合多个特异位点组合形成特定指纹区分品种，要求高通量检测平台。

SSR与SNP标记方法中，SSR标记是以检测品种特定位点的核苷酸片段长度作为评价依据，SNP标记是以统计分析多个位点的碱基组成变化作为分析手段。SNP标记在生物体基因组中的密度比SSR标记高，遗传稳定性也高，在农作物种子检测中不同标记方法适合不同的检测需要，具有不同的应用价值。

2 检测平台

2.1 SSR分子标记法检测平台 SSR分子标记法常用的检测平台有变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光毛细管电泳。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳是利用4.5%或6%的聚丙烯酰胺凝胶作为支持物分离PCR扩增产物，经固定、染色后形成特异的指纹图谱，分析目标DNA片段的迁移率，与Marker标记条带进行比较，确定PCR产物的大小，通过指纹信息比较待测样品和标准样品，或与数据库信息比对，确认品种信息。变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测平台需要将待测样品和标准样品相邻泳道同时电泳，或将待测样品与相应Maker目的条带比较，估算DNA片段大小。这种电泳方法能比较SSR标准指纹数据库中目前没有标准样品指纹信息的品种，不需要标准样品的DNA作参照，但这种电泳检测方法数据精确度低，1~5bp差异不明显[1]，自动化程度低。

荧光毛细管电泳检测平台是根据引物扩增范围和目的等位基因的分布特征将40对引物进行分组，设立十重荧光毛细管电泳体系[2]，将不同颜色荧光标记的引物和具有自身分布特征的位点分为1组，多重电泳。基因分析仪分离PCR产物，数据分析软件（GeneMarker或SSR指纹分析器）分析待测样品在该位点的基因特征，将检测结果与SSR指纹数据库进行比对，确定待测样品的指纹信息，分析品种身份。荧光毛细管电泳检测平台只分析检测样品，不需用标准样品的DNA作参照，但要求该标准样品的指纹信息在SSR指纹数据库中完整备案。荧光毛细管电泳检测平台检测结果精确，峰值图可以明显标示品种间单个位点1bp的差异。由此可知，荧光毛细管电泳比变性聚丙烯酰胺凝胶电泳检测到的等位基因和基因型数目多，区分品种的能力强。

2.2 SNP分子标记法检测平台 SNP分子标记方法常用的检测平台有KASP检测平台和芯片平台。KASP技术是根据引物末端特异匹配的碱基进行SNP分型，扩增时需要多个特异的SNP引物及两个通用荧光探针和两个通用淬灭探针[3]，经过几个PCR扩增循环后，淬灭探针已被切碎，荧光探针退火结合到新合成的、无淬灭基团的互补链上，发出荧光，通过SNP分型仪检测荧光信号，数据分析软件KlusterCaller™自动确定该位点上的碱基，确定品种基因型。KASP技术通过Pherastar SNP分型仪扫描一块1536微孔板用时80s，时间短，效率高。

SNP芯片是将大量特定的探针分子有序地固定在一小块硅片、玻片或硝酸纤维素膜等载体上，加入已标记的待测样品，进行杂交，扫描信号的强弱与分布，确定目的基因的种类。SNP芯片一次能够平行分析大量基因，检测几十万到上百万个位点，且性能稳定、操作简单、检测方便。但芯片设计开发成本较高，生产工艺复杂，目前市场上还没有完善的种子质量检测SNP芯片目录，需要定制特定的SNP芯片，不适合小样本量检测和大范围推广应用。

SSR与SNP标记方法在数据分析方面各有优势,SSR标记方法是将每份待测样品分别与40个位点依次对应,独立分析;SNP标记可以将所有检测样品对应1对引物,在1张指纹图中叠加分析,数据统计简单,更容易实现整合。

3 在农作物种子检测中的应用

3.1 SSR技术在农作物检测中的应用 王凤格等[2]用SSR分子标记法构建了中国玉米审定品种SSR标准指纹数据库,绘制了玉米审定品种40对SSR引物的等位基因分布图,为玉米种子真实性检测提供标准样品参照;盖树鹏等[4]筛选出6对双亲互补型SSR引物,检测6个玉米杂交种种子纯度,能准确鉴定出样品中的自交株和异型株,与田间鉴定结果差异不显著;黄殿成等[5]从引进人才、仪器设备、试验操作、检测成本和工作效率等方面,总结种子企业应用SSR分子标记法鉴定棉花品种真实性和种子纯度,体现了SSR分子标记在企业经营管理中发挥的重要作用。截至2020年,农业农村部颁布了基于SSR标记的玉米、水稻、小麦、马铃薯等20余种作物的品种鉴定方法标准[6],在种业领域得到了广泛应用。

3.2 SNP技术在农作物检测中的应用 北京市农林科学院玉米研究中心开发的SNP芯片MaizeSNP3072[7]、MaizeSNP384[8]用于玉米品种真实性鉴定;中国水稻研究所开发的96个SNPs KASP检测和50K个SNPs芯片用于鉴定水稻真实性[6];金名捺等[9]利用水稻全基因组9K SNP芯片分析水稻栽培种黄华占和野生稻Y605,开发特异SNP位点检测,根据基因分型,能准确区分两个品种;匡孟等[10]基于KASP技术,利用SNPline平台从棉花63K全基因组芯片中筛选到26个SNP核心标记快速检测棉花杂交种纯度。利用SNP标记法鉴定水稻、玉米、小麦品种真实性3项行业标准已经通过审定[6],棉花和油菜、大白菜等蔬菜作物的相关标准和数据库构建正在完善中。

4 小结

SSR和SNP两种标记方法在检测通量、数据分析和试验操作中各有优势,在不同的检测项目中发挥各自的作用。李雪等[11]对11套玉米种子杂交种和亲本进行试验,用40对SSR引物和3072个SNP位点的数据比较两种标记方法在玉米种子真实性鉴定中的应用,分析结果表明,这两种方法在种子真实性鉴定方面具有较好的一致性,且这两种标记方法在区分品种能力和位点稳定性等方面差异较小。SSR分子标记引物数量少,适合少量样本检测,变性聚丙烯酰胺凝胶电泳费时、费力,检测结果精确度低,荧光毛细管电泳自动化程度高,结果精确,但仪器设备、试剂及仪器维护成本较高;SNP分子标记实现了位点和样本高通量检测,仪器操作智能化,试验数据易整合,但数据缺失和分型误差频率较高,购置仪器、试剂和芯片定制成本高。SSR和SNP两种标记方法和检测平台各有优缺点,今后应积极发挥SSR标记的灵活性,继续开发SNP技术的优势,适应市场需要。随着分子标记技术的不断优化完善和检测成本的逐渐降低,两种标记方法在农作物种子检测中将有更广阔的应用前景。

参考文献

[1] 李巧英,郑戈文,任路路,张华. SSR分子标记两种电泳方法快速区分玉米种子杂交种. 农业科技通讯,2021(5):46-49

[2] 王凤格,杨扬,易红梅,赵久然,任洁,王璐,葛建镕,江彬,张宪晨,田红丽,侯振华. 中国玉米审定品种标准SSR指纹库的构建. 中国农业科学,2017,50(1):1-14

[3] MedSci. 更灵活经济的SNP检测方法:KASP法.(2014-03-29)[2021-09-18]. https://www.medsci.cn/article/show_article.do?id=c430325441f

[4] 盖树鹏,盖伟玲,王日新. 6个玉米杂交种种子纯度的SSR鉴定. 种子,2010,2(7):44-47

[5] 黄殿成,王飞,刘建功,刘金海,周关印,李根源,张西岭. 种子企业应用SSR分子标记鉴定棉花品种真实性和种子纯度. 中国种业,2015(10):37-38

[6] 祖祎祎.《玉米品种真实性鉴定SNP标记法》等3项行业标准通过审定——为品种验明正身添"利器". 农民日报,2021-06-29(第007版)

[7] 王凤格,赵久然,田红丽. 玉米真实性检测及分子育种SNP芯片-maizeSNP3072及其检测方法:中国,103282519A. 2013-09-04

[8] 赵久然,王凤格,易红梅,田红丽,杨扬. 我国玉米品种标准DNA指纹库构建研究及应用进展. 作物杂志,2015(2):1-6

[9] 金名捺,潘英华,丘式浚,严维,邓汉超,陈慧,梁云涛. 基于全基因组芯片开发水稻HRM特异分子标记. 植物遗传资源学报,2018,19(6):1055-1063

[10] 匡孟,王延琴,周大云,马磊,方丹,徐双娇,杨伟华,魏守军,马峙英. 基于单拷贝SNP标记的棉花杂交种纯度高通量检测技术. 棉花学报,2016,28(3):227-233

[11] 李雪,田红丽,王凤格,赵久然,李云伏,王蕊,扬扬,易红梅. SSR和SNP两种标记技术在玉米品种真实性鉴定中的比较分析. 分子植物育种, 2014,12(5):1000-1004

(收稿日期:2021-09-18)