

玉米杂交种农科大 8 号及其亲本指纹图谱构建

南文华¹, 吴权明^{1*}, 张瑞平², 王蕊², 孙佩², 张培凤², 赵彦峰³, 李合顺², 王学军², 刘文静²

(1. 西北农林科技大学, 陕西咸阳 712100; 2. 新乡市农业科学院, 河南新乡 453000; 3. 陕西省种子工作总站, 陕西西安 710000)

摘要 采用 SSR 分子标记技术, 利用 40 对玉米核心引物对玉米杂交种农科大 8 号及其亲本进行分析, 从中筛选出 8 对扩增产物条带清晰稳定, 且亲本条带互补的引物用来构建农科大 8 号及其亲本的指纹图谱, 这 8 对引物分别是 phi053k2, bnlg2291k4, bnlg2305k4, umc1147y4, bnlg1520k1, umc1489y3, bnlg490y4, umc1936k4, 并将指纹图谱数字化, 计算出现相同指纹图谱的概率为 7.63×10^{-6} 。结果表明: 出现相同指纹图谱的概率极低, 证明筛选出的这 8 对引物可用于玉米杂交种农科大 8 号的真实性鉴定。

关键词 玉米; 农科大 8 号; SSR; 指纹图谱

中图分类号 S513 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2022)23-0081-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2022.23.022



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Construction of Maize Hybrid Nongkeda No.8 and Its Parents' Fingerprint

NAN Wen-hua¹, WU Quan-ming¹, ZHANG Rui-ping² et al (1. Northwest A&F University, Xianyang, Shaanxi 712100; 2. Xinxiang Academy of Agricultural Sciences, Xinxiang, Henan 453000)

Abstract We used SSR molecular marker technology to construct fingerprints of maize hybrid Nongkeda No.8 and its parents by screening 8 primers with clear bands and complement each other from 40 pairs of core primers. The 8 pairs of primers screened were phi053k2, bnlg2291k4, bnlg2305k4, umc1147y4, bnlg1520k1, umc1489y3, bnlg490y4, umc1936k4. And we digitized the fingerprint of Nongkeda No.8 to calculate the probability of the same fingerprint, which was 7.63×10^{-6} . This explained that it was feasible to identify the authenticity of Nongkeda No.8 by the fingerprint which was constructed by the 8 pairs of primers.

Key words Maize; Nongkeda No.8; SSR; Fingerprint

玉米是我国主要粮食, 可用于动物饲料和工业原料等方面, 是具有多元用途的作物^[1-2]。同时, 玉米也是世界上最早且最充分利用杂种优势进行生产的作物之一, 国内目前 90% 以上的玉米生产用种是单交种^[3]。玉米产量的提高主要得益于杂种优势利用及优良杂种种的普及^[4]。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^[5]。因此, 对玉米杂交种的真实性和纯度能够快速、准确、有效地进行鉴定十分必要。但是, 随着国内种质资源的相互渗透, 遗传基础趋于狭窄, 导致玉米新品种性状表型相似, 在大田基础上很难区分^[6]。因此, 寻求一种操作简单、省时省力, 不受环境影响且结果可靠的方法非常必要^[7-8]。SSR 分子标记技术的发展为玉米杂交种真实性鉴定提供了新的技术手段。SSR 作为一种共显性标记, 具有多态性好、重复性高、安全高效及覆盖整个基因组的特点^[9], 已广泛应用于玉米杂交种真实性鉴定中。王风格等^[10]利用筛选出的 40 对 SSR 玉米核心引物对 3 998 份我国审定的玉米品种建立了 DNA 指纹库^[11]; 王蕾等^[12]利用 17 对 SSR 引物构建了 32 份黄瓜品种的指纹图谱; 尹祥佳等^[13]利用 SSR 技术与筛选出的引物鉴定玉米杂交种豫玉 22 的纯度; 陈国立等^[14]用筛选出的 7 对引物构建了玉米杂交种北青 340 及其亲本的指纹图谱; 李超等^[15]利用 SSR 标记构建了西州蜜

系列甜瓜指纹图谱。此外, SSR 分子标记技术还在甜菜^[16]、青花菜^[17]、食用黄花菜^[18]、马铃薯^[19]、棉花^[20]、金银花^[21]、桃子^[22]、辣椒^[23]等多种作物的指纹图谱构建、遗传多样性分析及纯度鉴定等方面发挥作用。

农科大 8 号是西北农林科技大学与杨凌三泰种业有限公司合作培育的品种, 父本是 F19, 母本是 F33。农科大 8 号 2012 年通过陕西省审定, 审定编号是陕审玉 2012022 号。笔者利用 SSR 分子标记技术, 用 40 对玉米核心引物, 对农科大 8 号及其亲本进行分析, 根据 SSR 分子标记共显性的原理^[24], 筛选出带型互补清晰、且稳定性、重复性好的引物, 用来构建农科大 8 号及其亲本的指纹图谱。同时, 根据在相同位置条带的“有”和“无”分别用“1”和“0”表示, 将指纹图谱数字化, 计算出现相同指纹的概率, 以期快速有效鉴定市场流通的玉米杂交种农科大 8 号的真实性提供鉴定手段和参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂 玉米杂交种农科大 8 号及其亲本由西北农林科技大学提供, 40 对玉米核心引物序列来自玉米基因数据库 (<http://www.maizegdb.org/ssr.php>), 并由上海生物工程有限公司合成。提取 DNA 所用 CTAB、PCR 扩增所需 2 × PCRMix, 以及电泳所用硼酸、EDTA、丙烯酰胺等药品均购自上海生物工程有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 DNA 提取。 将农科大 8 号及其亲本的种子沙培, 于光照培养箱中 28 ℃ 暗培养, 等玉米叶片长至约 10 cm 左右时, 取至少 20 株玉米单株的叶片, 用 CTAB 方法分别提取总 DNA^[25], 加 200 μL TE 缓冲液溶解, 用 1% 浓度琼脂糖, 于平板电泳槽检测 DNA 质量, PCR 扩增前可适当稀释, 4 ℃ 保存

基金项目 陕西省科技统筹创新工程计划项目“玉米优异种质创制及新品种培育”(2011KTB02-01-02); 陕西省重点产业链玉米种业关键技术研究与应用项目“突破性玉米新品种选育”(2017ZDCXL-NY-02-03); 陕西省科技厅重点研发计划“高产宜机收玉米种质资源创新及新品种选育”(2022NY-185)。
作者简介 南文华(1972—), 男, 陕西兴平人, 副研究员, 硕士, 从事玉米遗传育种、玉米新品种选育及种质资源创新利用研究。
* 通信作者, 副研究员, 从事玉米育种研究。
收稿日期 2022-06-06; **修回日期** 2022-07-07

备用,-20 ℃长期保存。

1.2.2 PCR 扩增及电泳分析。PCR 扩增反应总体积15 μL, 2×PCR Mix 7.5 μL,DNA 1.0 μL,引物 1.0 μL,用灭菌双蒸水补足体积。扩增程序为:94 ℃预变性 6 min,94 ℃ 40 s,60 ℃ 35 s,72 ℃ 45 s,35 个循环,72 ℃延伸 10 min^[26]。

在扩增产物中加入 1 μL 6×上样缓冲液,于 8.0%非变性聚丙烯酰胺凝胶上样 2 μL,电压 150 V 电泳,进行分离检测。最后用银染色,相机拍照保存并分析图片。

1.2.3 指纹图谱构建及数字化。根据电泳结果图,筛选带型清晰,且亲本条带互补的引物,用来构建农科大 8 号及其亲本的指纹图谱。同时,用数字“1”和“0”将指纹图谱数字化。“1”和“0”分别代表在相同迁移位置条带的“有”和“无”2 种

情况。根据公式 $P = 1/2^n$ 计算出出现相同指纹图谱的概率^[5,27]。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物筛选 根据 40 对玉米核心引物对农科大 8 号及其亲本 DNA 扩增的结果,从中筛选出 8 对条带清晰、亲本条带互补的引物,用来构建农科大 8 号及其亲本的指纹图谱。这 8 对引物分别为 phi053k2, bnlg2291k4, bnlg2305k4, umc1147y4, bnlg1520k1, umc1489y3, bnlg490y4, umc1936k4(表 1),均分布于 6 条染色体上,共检测出 17 个等位基因,每对引物检测出 2~3 个等位基因,平均 2.125 个,片段大小在 100~400 bp。

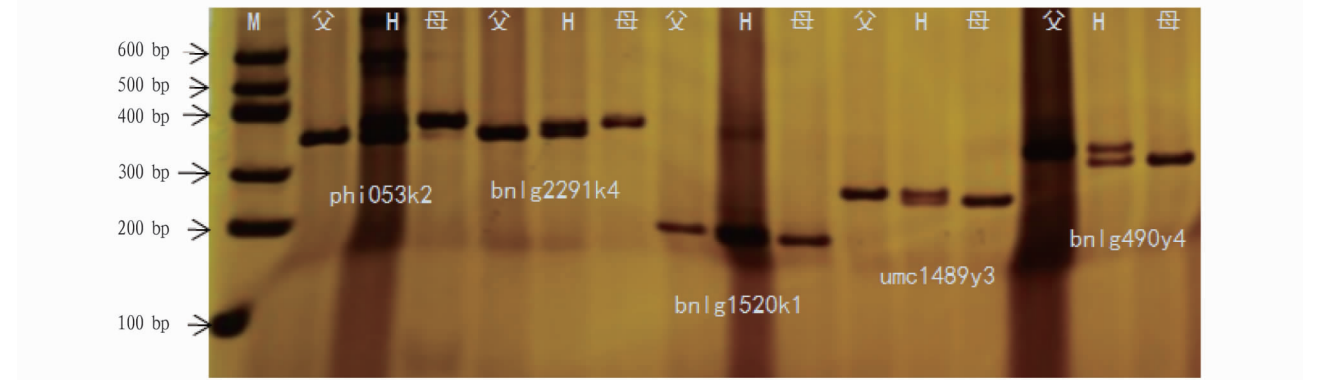
表 1 用于构建农科大 8 号及其亲本指纹图谱引物信息

Table 1 The information of the primers to construct the fingerprint of Nongkeda No.8

引物名称 Primer name	染色体位置 Chromosome position	引物序列 Primer sequence	等位基因数 Number of alleles	片段大小 Fragment size bp
phi053k2	3.05	上游:CCCTGCCTCTCAGATTCAGAGATTG 下游:TAGGCTGGCTGGAAGTTGTGTGC	2	300~400
bnlg2291k4	4.06	上游:GCACACCCGTAGTAGCTGAGACTTG 下游:CATAACCTTGCCTCCCAAAACCC	2	300~400
bnlg2305k4	5.07	上游:CCCCTCTTCTCAGCACCTTG 下游:CGTCTGTCTCCGTCCGTGTG	3	200~300
umc1147y4	1.07	上游:AAGAACAGGACTACATGAGGTGCGATAC 下游:GTTTCCTATGGTACAGTTCTCCCTCGC	2	100~200
bnlg1520k1	2.09	上游:CACTCTCCCTCTAAATATCAGACAACACC 下游:GCTTCTGCTGCTGTTTGTCTTG	2	100~200
umc1489y3	3.07	上游:GCTACCCGCAACCAAGAACTCTTC 下游:GCCTACTCTTGCCGTTTACTCCTGT	2	200~300
bnlg490y4	4.04	上游:GGTGTGGAGTCGCTGGGAAAG 下游:TCTCAGCCAGTGCCAGCTCTTATTA	2	300~400
umc1936k4	7.03	上游:GCTTGAGGCGTTGAGGTATGAG 下游:TGCACAGAATAAACATAGGTAGGTCAGGTC	2	100~200

2.2 农科大 8 号及其亲本指纹图谱构建 图 1 是筛选出的 8 对引物(phi053k2, bnlg2291k4, bnlg2305k4, umc1147y4, bnlg1520k1, umc1489y3, bnlg490y4, umc1936k4)所构建的农科大

8 号及其亲本的指纹图谱。从图 1 可以看出,这些引物所扩增的农科大 8 号及其亲本的带型稳定、清晰,且 SSR 分子标记是共显性的遗传^[28],因此,农科大 8 号父母本条带是互补的。



注:M.Mark;父.父本 F33;H.杂交种农科大 8 号;母.母本 F19
Note:M. Mark; Father. Male parent F33; H.Hybrid Nongkeda No.8; Mother.Female parent F19

图 1 部分 SSR 引物所构建的玉米杂交种农科大 8 号及其亲本指纹图谱

Fig.1 Partial PCR amplification product electrophoresis of hybrid Nongkeda No.8 and its parents identified by SSR primers

2.3 农科大 8 号及其亲本指纹图谱数字化 由表 2 可知,出现与农科大 8 号及其亲本相同指纹图谱的概率是 7.63×10^{-6} ,

概率极低,由此可推断由这 8 对引物构建的农科大 8 号及其亲本的指纹图谱是独一无二的。证明该研究所筛选出的这 8

对引物构建的指纹图谱可用于农科大 8 号的真实性鉴定。

表 2 农科大 8 号及其亲本的数字化指纹

品种名称 Variety name	号码 Number	概率 Probability
父本 F33Parent F33	01-01-011-01-10-10-10-01	7.63×10 ⁻⁶
农科大 8 号 Nongkeda No.8	11-11-111-11-11-11-11-11	7.63×10 ⁻⁶
母本 F19 Maternal F19	10-1—100-10-01-01-01-10	7.63×10 ⁻⁶

3 讨论

玉米作为我国重要的粮饲作物^[28],其安全性和真实性不容忽视。目前商业化育种已成为玉米育种的主要方式,玉米新品种以井喷式涌现^[29]。而玉米种子的生产和销售蕴含着巨大的经济利润,使得种子市场中的侵权现象严重^[30]。玉米杂交种的保护和真实性鉴定变得极为重要。

SSR 分子标记多态性极为丰富^[31],特别适合对玉米进行研究^[2],并且在玉米真实性、差异性以及遗传多样性等方面有很多成功的例子。战超等^[32]利用 SSR 分子标记技术对玉米自交系聚类及同源性进行分析,张华生等^[2]利用 SSR 标记对玉米的特异性进行分析,张瑞平等^[26]利用 SSR 标记构建玉米杂交种指纹图谱等。SSR 标记技术在玉米研究中被广泛应用,可操作性强,结果可靠。

该研究利用 SSR 分子标记技术构建农科大 8 号及其亲本的指纹图谱,并将指纹图谱数字化,计算出现相同指纹图谱的概率是 7.63×10⁻⁶,这个概率是极低的,更加客观和直接地证明该研究筛选出的 8 对引物所构建的农科大 8 号及其亲本的指纹图谱是特有的,是可以用于鉴定农科 8 号的真实性的。在生产实践中可从这 8 对引物中任选 2~3 对,用来鉴定市场流通的农科大 8 号的真实性,操作简单易行,结果高效可靠,值得在生产实践中应用推广。

参考文献

[1] 李水琴,王文瑞,刘海英,等.玉米胚乳遗传基础及相关基因研究[J].种子,2016,35(6):45-49.

[2] 张华生,王风格,赵久然,等.利用形态性状和 SSR 标记进行玉米品种的特异性鉴定[J].玉米科学,2011,19(3):51-55.

[3] 李少昆,王崇桃.中国玉米生产技术的演变与发展[J].中国农业科学,2009,42(6):1941-1951.

[4] 易红梅,张力科,葛建谔,等.SSR 标记与田间种植鉴定玉米品种纯度的比较[J].玉米科学,2021,29(4):29-34.

[5] 吴渝生,杨文鹏,郑用琰.3 个玉米杂交种和亲本 SSR 指纹图谱的构建[J].作物学报,2003,29(4):496-500.

[6] SETIMELA P S,WARBURTON M L,ERASMUS T.DNA fingerprinting of open-pollinated maize seed lots to establish genetic purity using simple sequence repeat markers[J].South African journal of plant and soil,2016,33

(2):141-148.

[7] 韩凤龙.用于河南省小麦品种特异性和一致性鉴定的 SSR 分子标记研究[D].南京:南京农业大学,2010.

[8] 张鹤,张文庆,赵敬东.DNA 分子标记在植物新品种保护中的应用现状及发展前景[J].安徽农业科学,2009,37(34):16897-16899.

[9] 杜青,郑加兴,吕巨智,等.利用 SSR 标记划分广西骨干玉米自交系的杂种优势群[J].玉米科学,2017,25(6):21-27.

[10] 王风格,杨扬,易红梅,等.中国玉米审定品种标准 SSR 指纹库的构建[J].中国农业科学,2017,50(1):1-14.

[11] 吴子温,路运才.SSR 标记在玉米研究中的应用研究进展[J].安徽农学通报,2020,26(S1):13-15,48.

[12] 王蕾,王福全,尹惠萍,等.基于 SSR 标记的黄瓜栽培品种遗传多样性分析及指纹图谱构建[J].分子植物育种,2021,19(8):2668-2677.

[13] 尹祥佳,李晶,王雅琳,等.豫玉 22 玉米杂交种子纯度的 SSR 和 SNP 分子比较鉴定[J].现代农业科技,2021(20):12-15.

[14] 陈国立,张瑞平,许运猛,等.玉米杂交种北青 340 及亲本指纹图谱构建[J].种子,2022,41(1):129-132.

[15] 李超,杨英,陈伟,等.西州密系列甜瓜 SSR 指纹图谱构建及聚类分析[J].园艺学报,2022,49(3):622-632.

[16] 丁刘慧子,邓植,吴则东.甜菜品种 SSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J].作物杂志,2021(5):72-78.

[17] 林朦婕,温慧萍,肖建中,等.四十八份青花菜品种 SSR 指纹图谱构建[J].浙江农业学报,2021,33(12):2304-2312.

[18] 刘新星,欧巧明,罗俊杰,等.食用黄花菜 SSR 标记开发及指纹图谱库构建[J].食品与发酵工业,2022,48(12):188-195.

[19] 孙小琼,王芳,王崇,等.马铃薯品种(系)资源的 SSR 遗传多样性分析及指纹图谱构建[J/OL].分子植物育种,2022-04-29[2022-04-30].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220428.1540.021.html>.

[20] 杨永林,李豪,杨名,等.利用 SSR 标记构建新石 K28 的指纹图谱及遗传多样性分析[J/OL].分子植物育种,2022-04-25[2022-04-30].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20220424.2050.028.html>.

[21] 侯立娜,李慧,王天琪,等.金银花及近缘种遗传多样性分析及 SSR 指纹图谱构建[J/OL].分子植物育种,2021-09-28[2022-04-30].<https://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20210928.1316.023.html>.

[22] 王淋,敖敦,包文泉,等.基于 SSR 分子标记的桃品种鉴别及指纹图谱构建[J].中南林业科技大学学报,2021,41(6):131-138.

[23] 冯鹏龙,韩睿,王亚艺,等.基于 SSR 标记辣椒品种 DNA 指纹图谱的构建[J].西北农业学报,2022,31(3):320-327.

[24] 滕海涛.利用 SSR 共显性判定玉米杂交组合父本效率分析[J].玉米科学,2009,17(5):53-54,64.

[25] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].2 版.北京:科学出版社,2002:744.

[26] 张瑞平,周联东,王文洁,等.玉米杂交种新科 891 及其亲本 SSR 指纹图谱的构建[J].中国种业,2019(5):74-76.

[27] Nanjing Agricultural University.Field experimentand statistics[M].Beijing:China Agriculture Press,1998:51-54.

[28] 孙琦,张世煌,李新海,等.中国不同年代主推玉米品种品质性状的变化趋势[J].中国农业科学,2014,47(14):2723-2730.

[29] 董占山,卢洪,柴宇超,等.中国特色的玉米商业育种体系构建[J].玉米科学,2015,23(1):1-9.

[30] 全国农业技术推广服务中心.全国农作物审定品种名录[M].北京:中国农业科学技术出版社,2005.

[31] ROUSE J R,HINZE L L,LAMKEY K R.Selection History and Developments from the BSSS and BSCB1 maize populations[M]//Hallner International Symposium on Plant Breeding.[s.l.]:CIMMYT,2003.

[32] 战超,陈国双,邵庆春,等.基于 SSR 标记的玉米自交系聚类及同源性分析[J].玉米科学,2021,29(1):54-60.