

胡俏强, 陆海燕, 李 炯, 等. 糯玉米杂交种纯度 InDel 分子标记鉴定与田间鉴定的相关性分析[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 999-1004.

doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.007

糯玉米杂交种纯度 InDel 分子标记鉴定与田间鉴定的相关性分析

胡俏强¹, 陆海燕², 李 炯³, 陈舜权¹, 吴月琴³, 戴惠学¹

(1. 南京市蔬菜科学研究所, 江苏 南京 210042; 2. 江苏省农业科学院农业生物技术研究所, 江苏 南京 210014; 3. 上海种业(集团)有限公司, 上海 松江 201615)

摘要: 为发展更快捷、简便的新型分子标记技术并研究其在糯玉米杂交种纯度鉴定中的应用, 对 4 个糯玉米杂交种进行了 InDel 共显性分子标记纯度分析, 筛选出 5 对多态性好的引物, 并与田间鉴定结果进行了相关性分析。结果显示, InDel 标记鉴定结果与田间鉴定结果呈极显著正相关, 相关系数达到 0.998。因此, InDel 标记鉴定可用于糯玉米杂交种纯度鉴定, 且结果准确可靠。

关键词: 糯玉米; InDel; 纯度鉴定; 相关性

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2016)05-0999-06

The relativity between InDel method and field test in purity identification of waxy maize hybrids

HU Qiao-qiang¹, LU Hai-yan², LI Jiong³, CHEN Shun-quan¹, WU Yue-qin³, DAI Hui-xue¹

(1. *Nanjing Institute of Vegetables Science, Nanjing 210042, China*; 2. *Institute of Agro-biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China*; 3. *Shanghai Seed Industry (Group) Co., Ltd., Songjiang 201615, China*)

Abstract: To develop an efficient and simple molecular marker technique in the hybrid seed purity test of waxy maize, the purity of 4 waxy maize hybrids was analyzed by co-dominant InDel molecular markers. Five pairs of high polymorphic primers were selected. Correlation analysis showed that the result of InDel markers identification was significantly positively correlated with that of field test, with the correlation coefficient of 0.998. InDel marker is a potential technique in hybrid seed purity identification of waxy maize.

Key words: waxy maize; InDel; purity identification; relativity

收稿日期: 2016-01-20

基金项目: 上海市“科技创新行动计划”医学和农业领域科技支撑项目(14391900200); 江苏省“六大人才高峰”第十二批高层次人才资助项目(2015-NY-036); 南京市科技发展计划项目

作者简介: 胡俏强(1984-), 男, 河北秦皇岛人, 硕士研究生, 农艺师, 主要从事鲜食玉米新品种选育及栽培技术研究。(Tel) 025-86165330; (E-mail) huqiaoqiang@126.com

通讯作者: 戴惠学, (Tel) 13952097487; (E-mail) 5409781@163.com

糯玉米(*Zea mays* L. *sinensis* Kulesh) 又称蜡质玉米、黏玉米, 为玉米属糯质型玉米亚种。与普通玉米相比, 糯玉米胚乳所含淀粉全部为支链淀粉, 营养丰富, 富含人体必需的赖氨酸及维生素等营养成分, 其适口性好且具有甜、糯、香的风味, 倍受消费者的青睐^[1-2]。由于糯玉米与普通玉米在种植要求及产品用途上有较大差别, 所以对种子的纯度、发芽率、发芽势、活力等质量指标要求更高。尤其品种纯度是影响糯玉米产量的重要因素之一, 也是评定种子等级的主要依据, 因此企业生产和销售的每一批种

子都必须经过严格的纯度检验^[3]。生产上造成玉米种子纯度下降的主要原因有:母本去雄不彻底或收获时造成杂交种中混有父母本自交种;亲本去杂不彻底或隔离不充分使杂交种混有其他自交系或杂交种种子^[4]。

由于糯玉米杂交种生产过程中存在诸多因素可以直接影响种子纯度,因此发展精确快速检测杂交种纯度的方法十分重要。目前,主要的方法包括籽粒形态鉴定法、幼苗鉴定法、田间小区种植鉴定法、生化鉴定法和分子标记鉴定等方法。分子标记鉴定法具有不受环境影响、多态性高、数量丰富、结果准确可靠等特点。随着功能基因组学研究的不断发展,分子标记鉴定法已成为种子纯度检测中的主要方法^[5-8]。目前玉米品种纯度鉴定主要利用 SSR 分子标记,但 SSR 多态在植物基因组中的频率大约是每 6 040 bp 才出现 1 个^[9],从 EST 中开发 SSR 标记的效率更低,大约只有 1.5% 的 EST 才可用于开发 SSR 标记^[10]。相比之下,玉米基因组每 309 bp 就有 1 个 InDel 存在,并且通过琼脂糖凝胶电泳很容易检测共显性 InDel 位点 PCR 产物的长度差异,然而糯玉米中相关研究却鲜有报道。因此本研究以 4 个糯玉米杂交种为对象,利用 InDel 标记检测其纯度,通过与田间鉴定结果的比较分析,探讨 InDel 分子检测结果的可靠性,为糯玉米杂交种子生产及销售部门进行分子检测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试 4 个糯玉米杂交种及其亲本材料由上海种业(集团)有限公司提供,品种名称及对应亲本如下:申糯 2 号(17×1)、申糯 3 号(14×17)、申糯 8 号(11×19)以及申糯 9 号(17×280)。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 试验采取单因素随机区组设计,4 个杂交种每个设 3 次重复,每重复种 100 粒。选择地势平坦、肥力均衡、水利条件好的地块,每小区开沟单粒点播,行距 60 cm,株距 25 cm。试验地的管理采用常规栽培措施,但不定苗不去杂,调查出苗率。品种纯度鉴定分别在花期和采收期 2 次进行,依据各品种及亲本的特征特性逐株进行鉴定。每个杂交种随机选取 1 个小区,将小区内所有单株进行编号,用于 InDel 分子标记纯度鉴定。

1.2.2 DNA 的提取 杂交种叶片及亲本胚乳 DNA 提取按照 Karroten 植物基因组 DNA 提取试剂盒(南京塞吉科技有限公司产品)相关步骤操作。提取的 DNA 样本测定浓度并用 1% 的琼脂糖凝胶检测质量。

1.2.3 PCR 扩增 采用 25 μl 常规 PCR 反应体系。PCR 反应程序:98 ℃ 预变性 4 min;98 ℃ 变性 40 s,55 ℃ 退火 40 s,72 ℃ 延伸 40 s,38 次循环;72 ℃ 延伸 5 min,16 ℃ 保存。扩增产物采用 2% 的琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.2.4 共显性 InDel 标记的筛选 通过生物信息学方法,在比较玉米 B73 和二代测序组装的 Mo17 拼接序列后,发展了 118 个均匀分布在玉米染色体组 10 条染色体上的与基因相关的功能性 InDel 标记。这些 InDel 标记可以稳定地揭示 B73 和 Mo17 基因型之间的多态^[11]。利用该 118 个 InDel 标记(引物由江苏省农业科学研究院生物技术研究所提供)在 4 个糯玉米杂交种及亲本间进行多态性筛选,引物由上海生物工程公司合成。

2 结果与分析

2.1 共显性 InDel 标记的筛选

利用 118 个 InDel 标记在 4 个糯玉米杂交种及亲本间进行多态性筛选,发现杂交种与亲本间扩增条带清晰、特异性强的 5 个共显性标记可用于相应杂交种的纯度鉴定(表 1)。其中,45 号引物在申糯 2 号、申糯 3 号和申糯 9 号 3 个杂交种中均存在共显性多态性,83 号引物只在申糯 8 号中可以使用。

表 1 共显性 InDel 标记引物序列及适用鉴定品种

Table 1 The primer sequences of co-dominant InDel markers used in the purity test of 4 waxy maize hybrids

序号	引物序列(5'→3')	可用于鉴定的杂交种
3	F:TCCACATCATCGGCATCAGATC R:CAAGGAATACGAGGAGGTGCTC	申糯 3 号、申糯 9 号
31	F:GGATGAGGAAGATGCACTCAAC R:TCGGCTGCGACTGTGTGTG	申糯 2 号、申糯 3 号
40	F:TCTCACTCCATGCAACGTAGG R:TCTCGTCTCGCCCAACAC	申糯 3 号
45	F:AAACCCTAGTGCTTTGAATGGC R:CCTCCTCGGTGCCTACGTAC	申糯 2 号、申糯 3 号、 申糯 9 号
83	F:AGTGATTGTGAGGCTCCATCCC R:CACGCCATCACCAACAAGAGG	申糯 8 号

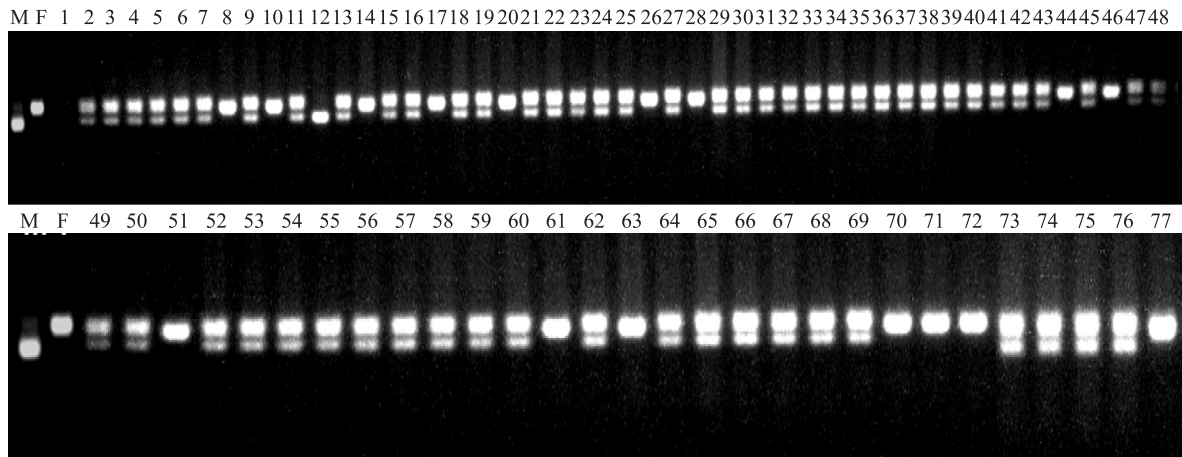
2.2 杂交种纯度 InDel 标记鉴定与田间鉴定结果的比较

从上述 5 对引物(表 1)中选取 2 对扩增条带稳

定、清晰的引物用于 4 个糯玉米品种纯度鉴定。其中,引物 45 用于申糯 2 号、申糯 3 号和申糯 9 号 3 个糯玉米品种单株样品的检测,引物 83 则用于申糯 8 号单株样品的检测。

从图 1 可以看出,申糯 2 号杂交种大部分单株扩增出了双亲的特异条带,可确定为杂交单株。其中编号为 8、10、14、17、20、26、28、44、46、51、61、63、

70、71、72、77 的 16 株单株检测为母本单一条带,确定为母本自交系混杂;编号为 12 号的单株检测为父本单一条带,确定为父本自交系混杂。InDel 标记鉴定结果:申糯 2 号送检样品的纯度为 77.92%。从田间性状来看,除 17 号植株为真杂交种外,其余 16 株确为自交系(表 2)。



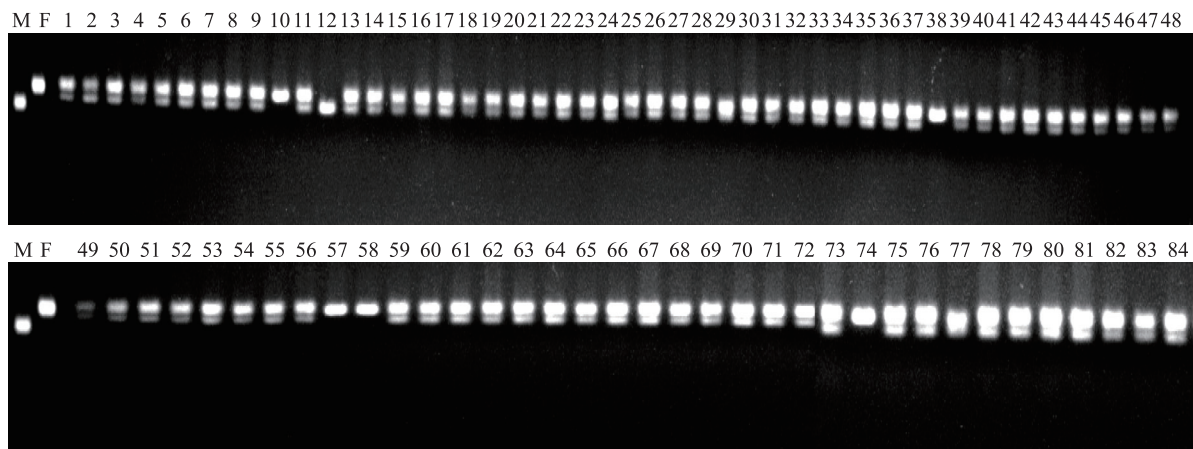
M:申糯 2 号父本;F:申糯 2 号母本;1~77:申糯 2 号杂交种。

图 1 申糯 2 号玉米共显性 InDel 标记纯度鉴定

Fig.1 The purity test of waxy maize hybrid Shennuo No.2 by co-dominant InDel markers

申糯 3 号杂交种大部分单株扩增出了双亲的特异条带,可确定为杂交单株(图 2)。其中 10、38、57、58、74 号单株检测为母本单一条带,确定为母本自交系混杂;12 号单株检测为父本单一条带,确定

为父本自交系混杂。InDel 鉴定结果:申糯 3 号送检样品的纯度为 92.86%。然而田间调查结果(表 2)显示 12 号植株并非父本自交系,而是异源假杂种,其余 5 株结果与分子鉴定结果一致。



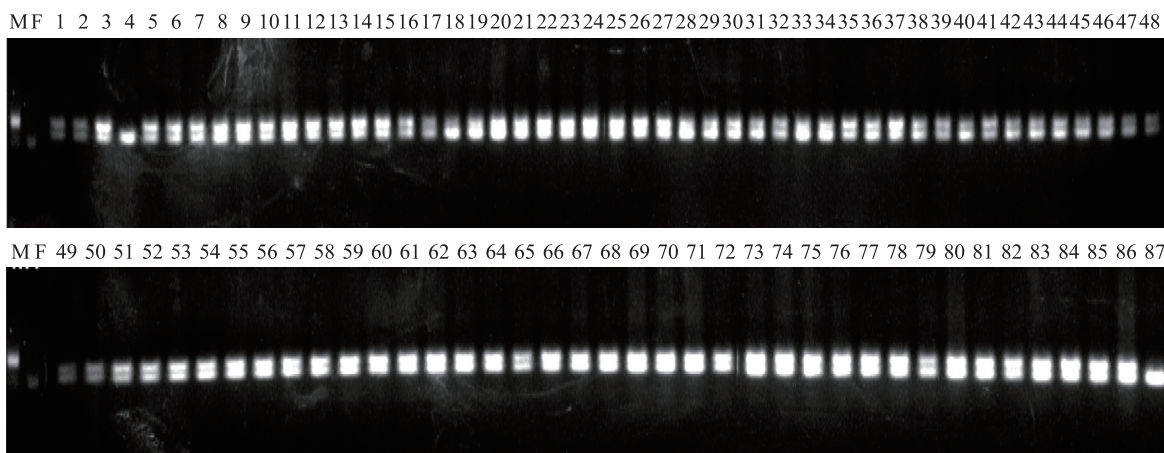
M:申糯 3 号父本;F:申糯 3 号母本;1~84:申糯 3 号杂交种。

图 2 申糯 3 号糯玉米共显性 InDel 标记纯度鉴定

Fig.2 The purity test of waxy maize hybrid Shennuo No.3 by co-dominant InDel markers

申糯 8 号杂交种大部分单株扩增出了双亲的特异条带,可确定为杂交单株,其中编号为 4、18、87 的 3 株单株检测为母本单一条带,确定为母本自交系

混杂(图 3)。InDel 鉴定结果显示申糯 8 号送检样品的纯度为 96.55%,与田间鉴定结果一致(表 2)。



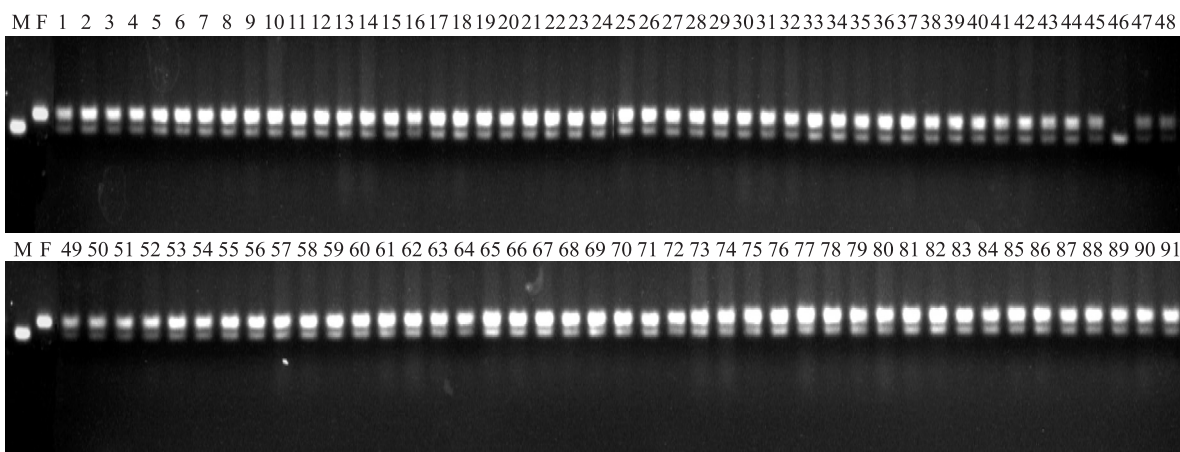
M:申糯 8 号父本;F:申糯 8 号母本;1~87:申糯 8 号杂交种。

图 3 申糯 8 号糯玉米共显性 InDel 标记纯度鉴定结果

Fig.3 The purity test of waxy maize hybrid Shennuo No.8 by co-dominant InDel markers

申糯 9 号杂交种大部分单株扩增出了双亲的特异条带,可确定为杂交单株,其中只有编号为 46 的单株检测为父本单一条带,确定为父本自交系混杂(图 4)。InDel 鉴定结果:申糯 9 号送检样品的纯度

为 98.90%。然而田间鉴定结果除支持上述单株为父本自交系外,还鉴定出 83、85 号单株为母本自交系(表 2),与分子鉴定结果有一定出入。



M:申糯 9 号父本;F:申糯 9 号母本;1~91:申糯 9 号杂交种

图 4 申糯 9 号糯玉米共显性 InDel 标记纯度鉴定结果

Fig.4 The purity test of waxy maize hybrid Shennuo No.9 by co-dominant InDel markers

从以上结果可以看出,大部分杂交株的 InDel 鉴定结果与田间形态鉴定结果一致,从一定程度上说明 InDel 鉴定结果是可靠的。但仍有少量单株两种方法的判断结论不一致,有待进一步分析。

2.3 杂交种纯度 InDel 标记鉴定标准及 4 个糯玉米杂交种鉴定结果

对送检样品的纯度检测标准:当杂交种样品的琼脂糖凝胶电泳条带为双亲互补类型的条带时,判

定为该双亲的杂交种;当杂交种样品的琼脂糖凝胶电泳条带为亲本的单一条带时,判定为该亲本自交种;当杂交种样品的琼脂糖凝胶电泳条带不同于亲本互补带或亲本单一条带的其他条带类型时,判定为外来花粉污染的异交种。在 4 个糯玉米杂交种的 339 份送检样本中有 24 个样品出现了母本的单一条带,3 个样品出现了父本的单一条带,说明杂交种

中混杂了 24 个母本自交系和 3 个父本自交系的自交种,在所有杂交种的送检样品中均没有检测出外源花粉导致的异交种污染(表 2)。上述 339 份样品田间植株纯度调查结果显示,25 个样品为母本自交系混杂,2 个样品为父本混杂,且出现 1 个样品被鉴定为异源杂交种(表 2)。

表 2 4 个糯玉米杂交种纯度 InDel 标记鉴定及田间鉴定结果的比较

Table 2 The comparison of purity identification of 4 waxy maize hybrids between InDel markers and field-planting results

品种名称	样品数	InDel 标记鉴定				田间鉴定			
		母本株 编号	父本株 编号	异源株 编号	纯度 (%)	母本株 编号	父本株 编号	异源株 编号	纯度 (%)
申糯 2 号	77	8、10、14、17、20、26、 28、44、46、51、61、63、 70、71、72、77	12	—	77.92	8、10、14、20、26、28、 44、46、51、61、63、70、 71、72、77	12	—	79.22
申糯 3 号	84	10、38、57、58、74	12	—	92.86	10、38、57、58、74	—	12	92.86
申糯 8 号	87	4、18、87	—	—	96.55	4、18、87	—	—	96.55
申糯 9 号	91	—	46	—	98.90	83、85	46	—	98.90

2.4 分子标记鉴定结果与田间鉴定结果的相关性分析

为减少田间鉴定的误差,取 3 小区平均值与分子鉴定结果进行比较,发现 4 个糯玉米品种平均纯度为 78.93%~98.55%, InDel 纯度鉴定结果为 77.92%~98.90%。除申糯 9 号外,其余 3 个杂交种分子鉴定结果均低于田间鉴定结果,相差 0.78~1.26 个百分点。

经 Pearson 相关性分析, InDel 标记鉴定与田间鉴定结果间的相关系数(r)=0.998, 双侧检验(t)结果为极显著正相关,表明 InDel 标记鉴定与田间鉴定结果高度一致,是一种适用于糯玉米杂交种纯度鉴定的快速、简便的新方法。

3 讨论

种子纯度是评定种子等级的主要依据,目前最权威的种子纯度鉴定方法仍是田间种植鉴定。糯玉米新品种数量的增加和种质来源的日趋狭窄,加大了田间鉴别杂交种与自交系以及真实杂交种与异源假杂种的难度。而且由于田间鉴定周期太长,往往影响种子当年销售。分子标记鉴定是直接检测不同品种间基因组 DNA 序列多态性的鉴定技术。一个品种的基因型是稳定的,分子标记技术可以使某些 DNA 位点得以显现。当一个品种混有其他品种时,

可以用分子标记检测植株间基因型的差异,有效鉴别出表型上难以鉴别的植株,而且理论上分子鉴定结果能更准确反映真实纯度^[12]。

本研究结果显示常规纯度鉴定结果比分子鉴定结果略高,但是差别不大。实践中也发现,相同样品分子鉴定的纯度一般会低于大田鉴定纯度,造成这种现象的原因可能有以下 2 个方面:一方面是由分子标记引起的。从我们的试验结果看,特异标记在不同世代自交系中的检测率通常低于 100.00%,而且有逐代降低的趋势。自交系虽经过多代自交,仍不能保证 100.00%纯合,而分子标记是与目标性状相连锁的,在有性繁殖过程中可能发生基因重组,导致检测率的下降。另外,PCR 扩增过程中的随机误差也可能降低标记的检出率。而田间鉴定方法是根据植株的性状表现进行判断的,低频率的基因重组对结果判断影响较小。从这个角度看,分子标记通常会低估杂交种的纯度。另一方面是由田间种植鉴定方法引起的。任何种子都不能保证 100.00%发芽,表现在田间出苗率低于 100.00%。而杂交籽粒的出苗率通常要高于自交籽粒,统计结果显示,分子标记与田间鉴定结果的差值与籽粒出苗率间表现显著相关关系。因此,出苗率是导致田间鉴定和分子鉴定差异的重要原因,田间鉴定的纯度往往要高于实际值。另外,常规鉴定法较容易区分杂交种与自

交系,但有的外源杂交种的混淆很难人为区分,然而分子鉴定可以将外源基因片段扩增出来,较好地区分二者之间的差异。

InDel 标记作为一种极具应用前景的遗传标记得到了研究者的广泛关注^[13-14]。尽管玉米品种纯度鉴定主要利用 SSR 分子标记,但 InDel 标记用于玉米品种纯度的分析已有报道^[11]。本研究用于杂交种纯度鉴定的 InDel 标记,是利用琼脂糖凝胶电泳检测等位基因扩增片段的差异,较之于 SSR 标记需要的聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染过程,InDel 标记鉴定的后续操作更简便易行,成本更低。随着 InDel 标记的逐步释放,可利用的 InDel 标记越来越多,本方法可大规模用于杂交种的鉴定,无需自主开发 InDel 标记。该方法所用的试剂、仪器等都是常规分子实验室所具备的,不需要特殊的操作及设备,检测成本低,操作简单,也适用于具有可用 InDel 标记的其他作物杂交种的鉴定。

参考文献:

- [1] 李艳茹,吉士东,郑大浩. 糯玉米的营养价值和发展前景[J]. 延边大学农学学报,2003,25(2):145-148.
- [2] 玄宏侠. 我国鲜食玉米的研究现状及发展前景[J]. 农业与科技,2013,33(12):138.
- [3] 刘丽,王洋. 浅析电泳法鉴定玉米种子纯度[J]. 种子世界,2000(1):21.
- [4] 薛艳颖,陈兴奎,樊严,等. SSR 分子标记技术在杂交玉米种子纯度鉴定中的应用[J]. 杂粮作物,2007,27(1):6-7.
- [5] 李晓辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J]. 作物学报,2003,29(1):63-68.
- [6] 郭向阳,陈泽辉,祝云芳,等. 利用 SSR 标记鉴定玉米杂交种黔单 16 号纯度的研究[J]. 种子,2011,30(4):42-44.
- [7] 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.
- [8] 王艳娜,王益奎,李文嘉,等. 利用 SSR 分子标记技术鉴定和分析茄子杂种 F₁ 的纯度[J]. 南方农业学报,2015,46(9):1551-1556.
- [9] CARDLE L, RAMSAY L, MILBOURNE D, et al. Computational and experimental characterization of physically clustered simple sequence repeats in plants[J]. Genetics, 2000, 156(2):847-854.
- [10] KANTETY R V, LA R M, MATTHEWS D E, et al. Data mining for single sequence repeat tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat[J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48:501-510.
- [11] 张体付,葛敏,韦玉才,等. 玉米功能性 Insertion/Deletion (InDel) 分子标记的挖掘及其在杂交种纯度鉴定中的应用[J]. 玉米科学,2012,20(2):64-68.
- [12] 张雪原,赵攀峰,王风格,等. 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[J]. 玉米科学,2009,17(1):40-45.
- [13] 翟国伟,王华,邹桂花,等. 高粱芒基因 *Awn3.1* 的精细定位[J]. 江苏农业学报,2014,30(3):486-490.
- [14] 李冰,张照贵,王佳佳,等. 小麦 *GDHI* 基因克隆及其功能标记开发[J]. 山东农业科学,2014,46(10):6-11.

(责任编辑:张震林)