



王然,隋冬华,张冬雪,等.利用 SSR 技术鉴定玉米杂交种乡糯 4 的种子纯度[J].黑龙江农业科学,2025(3):7-11.

利用 SSR 技术鉴定玉米杂交种乡糯 4 的种子纯度

王 然,隋冬华,张冬雪,武新娟,高佳缘,李 鑫,唐 贵

(黑龙江省农业科学院 乡村振兴科技研究所,黑龙江 哈尔滨 150023)

摘要:种子纯度关乎农作物产量、质量和抗病能力,对农业可持续性、市场准入至关重要。乡糯 4 是黑龙江省农业科学院 2023 年选育成功的高产优质鲜食玉米杂交种。为促进黑龙江省鲜食玉米分子标记辅助育种,以乡糯 4 玉米杂交种及其亲本、近似品种乡糯 7 杂交组合为材料,从 40 对玉米 SSR 核心引物中筛选出在乡糯 4 双亲之间多态性明显、重复性较好的 2 对引物 bnlgl671y17、umc1936k4 用于纯度鉴定,并利用田间小区种植方法鉴定乡糯 4 纯度。结果表明,SSR 分子标记鉴定的纯度为 98.96%,而田间小区鉴定的纯度为 96.97%。田间小区鉴定的纯度略低于 SSR 分子标记鉴定的纯度,说明 SSR 分子标记可以为快速有效地鉴定生产中杂交种乡糯 4 的纯度增加准确性、可靠性及实用性。

关键词:玉米;SSR 标记;纯度鉴定;杂交种

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



玉米是全球最早利用杂种优势进行生产的作物之一,目前中国超过 90% 的生产使用单交种^[1-2]。因此,在玉米生产和种子质量控制体系中,快速、准确、简便且经济地鉴定杂交种子纯度是关键。传统形态鉴定方法受到品种表型差异、环境影响、工作量大、周期长、成本高和季节限制等因素的制约,不利于种子的市场推广。生理生化标记方法中同工酶和种子贮藏蛋白存在多态性不足、组织和器官特异性差、稳定性不佳等问题,

限制了其在玉米杂交种纯度鉴定中的应用^[3]。随着分子生物学技术的进步,作物种子纯度检测方法已经从传统的外观和生理生化水平鉴定发展到了分子水平鉴定。分子标记技术因其多态性高、遗传稳定、不受环境条件影响等优点,已经广泛应用于玉米品种鉴定和纯度检测^[4]。简单重复序列(Simple Sequence Repeats, SSR)分子标记技术作为一种 DNA 指纹技术,具有可靠性强、重复性好、多态性丰富等优点。由于 SSR 标记属于共显

收稿日期:2024-09-09

基金项目:黑龙江省农业科学院科技创新跨越工程农业特色产业项目(CX23TS02)。

第一作者:王然(1998—),女,硕士,研究实习生,从事玉米育种和高产栽培技术研究。E-mail: 13904527805@163.com。

通信作者:唐贵(1977—),男,硕士,副研究员,从事玉米育种和高产栽培技术研究。E-mail: hailuntangui@163.com。

Abstract: In order to systematically analyze the differences in cold germination tolerance characteristics of maize germplasm resources and screen the excellent low temperature tolerance germplasm resources, 52 new maize materials were used as experimental materials, and 12 indexes related to cold tolerance of maize seeds, such as germination rate, germination index, average germination time, germination potential and relative value of traits, were determined at 5 °C and 25 °C respectively. The cold resistance of maize materials was analyzed and evaluated comprehensively by using correlation analysis, principal component analysis, membership function analysis and cluster analysis. The results showed that the cold germination tolerance of 52 maize materials showed very rich genetic variation. Correlation analysis showed that there were significant positive correlations among the 8 cold tolerance traits. Principal component analysis divided 8 individual indicators into 3 independent comprehensive indicators, with a cumulative contribution rate of 93.84%. Based on the comprehensive *D* value of cold resistance, cluster analysis was conducted on 52 new maize materials, and they were divided into 4 low temperature resistance grades, among which 19 were the strongest, 19 were strong, 11 were weak and 3 were the weakest. This study provided the core parental selection basis for the innovation of cold tolerant germplasm and methodological reference for crop stress resistance evaluation.

Keywords: maize; germination stage; cold resistance; principal component analysis; cluster analysis

性标记,在杂交种纯度和真伪鉴定方面具有显著优势^[5]。田红丽等^[6]利用 40 对 SSR 标记构建了吉林省 2010 年至 2017 年审定的 290 个玉米品种标准 SSR-DNA 指纹并进行了遗传多样性分析;王风格等^[7]利用筛选的 40 对 SSR 核心引物对 3 998 份中国玉米审定品种标准样品进行建库,通过多实验室、多检测平台进行建库数据的质量评估;王安贵等^[8]利用 SSR 标记技术,从 30 对 SSR 引物中筛选出 2 个引物,对金单 999 玉米杂交种进行纯度检验。李巧英等^[9]通过 SSR 分子标记方法筛选出特异性高的引物,并比较了变性聚丙烯酰胺凝胶电泳和荧光毛细管电泳两种电泳方法的效果,指出两种方法均可有效区分不同玉米品种,但适用场景和精度有所不同。尹祥佳等^[10]利用 SNP 分子标记的 KASP 技术对甘肃省推广的玉米杂交种进行基因型和纯度鉴定,结果显示纯度在 95.83%~98.96%,证明了 SNP 分子标记技术在玉米杂交种纯度检测中的可靠性和高效性。同样,王蕊等^[11]通过筛选 60 个候选位点并最终确定 20 个核心引物,成功建立了高通量纯度检测方案,能够有效鉴定 99.7%的供试样品纯度,显示出 SNP 技术在玉米杂交种纯度鉴定中的应用潜力。我国农业部已经颁布了利用核心 SSR 分子标记技术对国家及省区试玉米品种真实性和一致性进行 DNA 指纹鉴定的国家标准《主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子标记检测 玉米(GB/T 39914—2021)》^[12]。种子纯度指品种在特征、特性方面典型一致的程度,是种子生产环节必须进行鉴定的指标。常规方法通过田间表型判定,但田间试验易受外界干扰,周期长且耗时耗力,而 SSR 分子标记法检测能够快速且高效地完成纯度的鉴定,保证了良种的质量,有效预防了假劣种子所带来的危害。本研究以鲜食玉米杂交品种乡糯 4 为供试材料,先后利用田间小区种植鉴定和 SSR 分子标记对乡糯 4 种子纯度进行鉴定,构建乡糯 4 种子纯度鉴定技术体系,为从源头上控制玉米品种混杂问题提供了技术支撑,有助于提升乡糯 4 种子质量控制,并促进乡糯 4 的大面积推广应用。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

乡糯 4 杂交种、亲本 SLN13 和 SLN14、近似

品种乡糯 7,亲本经严格自交繁殖去杂并组配杂交种乡糯 4,另外,为了验证本研究所筛选的 SSR 引物的准确性和实用性,试验用的种子均由随机抽样所得。

1.2 CTAB 法提取基因组 DNA

2023 年 5 月种植玉米,14 d 后,待植株生长至 6 叶期左右,将 1.5 g 的叶子切成小块,放入 2 mL 的离心式试管内,在液氮中快速冷冻,然后在组织粉碎机上进行粉碎。加入 750 μL CTAB 缓冲液,混合均匀,置于 65 ℃ 温浴 45 min 左右,其间颠倒混匀 4 次。加入 750 μL 氯仿或者 24:1 的氯仿:异戊醇,轻柔混匀,置于离心机 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。在新的 1.5 mL 离心管中,抽取 500 μL 上清液,加入等体积-20 ℃ 预冷的异丙醇,轻轻混匀静置 1 h,让 DNA 从溶液中充分沉淀出来,然后放到 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min。将上清液轻轻地倒出,用 500 μL 75% 的无水乙醇进行清洗,并以 12 000 r·min⁻¹ 的速度进行 10 min 的离心,将上清液倒出,并进行 2 次反复。在常温条件下,用 100 μL 的消毒水将该离心机试管中的 DNA 彻底溶解,并进行空气干燥。利用 Thermo Scientific NanoDrop 2000 分光光度计(Thermo, USA)检测 DNA 质量后置于-20 ℃ 储存,待用。

1.3 SSR 引物合成

40 对引物序列信息详见国家标准《主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子标记检测 玉米(GB/T 39914—2021)》^[12],引物合成由北大荒垦丰种业股份有限公司质量控制实验室完成(附表 1 详见 OSID)。

1.4 SSR 引物筛选

1.4.1 PCR 反应及程序 普通 PCR 扩增反应体系(表 1),所用试剂为 2×Es Taq Master Mix (南京诺唯赞生物科技股份有限公司),反应体系详见表 2。

表 1 普通 PCR 扩增反应体系

反应体系	用量/μL
2×Es Taq Master Mix	5.00
F-primer	0.75
R-primer	0.75
gDNA	1.00
ddH2O	2.50
Total	10.00

表 2 普通 PCR 反应程序

内容	时间/s	温度/℃	循环/个
预变性	120	94	1
变性	30	94	35
退火	30	58	
延伸	30	72	
终延伸	120	72	1

1.4.2 琼脂糖凝胶电泳 1.5%琼脂糖凝胶配制:在分析天平上称取 1.5 g 琼脂糖,放入烧杯中,加入 100 mL 0.5×TAE 溶液,充分摇匀。将混合物置于微波炉中煮沸,稍微冷却后,加入 5 μL Goldview 混匀,倒入胶槽制胶。制备好的琼脂糖凝胶终浓度为 1%或 3%。PCR 产物上样量 2.5 μL,180 V 恒压电泳 25~30 min。最后,使用 Bio-Rad 紫外扫描仪观察凝胶并拍照记录。

1.5 田间小区鉴定

在 2023 年 5 月将乡糯 4 种植于黑龙江省农业科学院乡村振兴科技研究所绥棱基地试验田内,行长 5.00 m,行距 0.65 m,株距 20 cm,田间管理依照常规大田生产的基本方法,合计种植 250 粒,最终成株 204 株。根据种子检验技术规程及国家种子质量标准,玉米大田用种的种子纯度要求达到 96%以上。

2 结果与分析

2.1 DNA 质量检测

随机挑取杂交种乡糯 4 及其亲本 SLN14、SLN13 的 DNA 样品,测得 OD₂₆₀/OD₂₈₀ 比值均接近 1.8,质量浓度在 210~330 ng·L⁻¹,表明本研究提取的样品 DNA 质量较好,可用于 PCR 鉴定(表 3)。

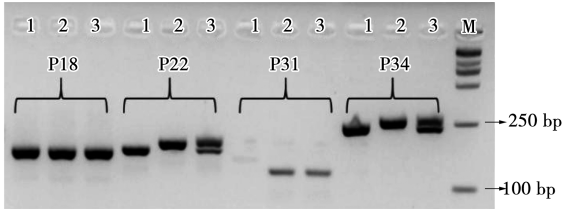
表 3 DNA 质量和质量浓度检测

样品	OD ₂₆₀ /OD ₂₈₀	质量浓度/(ng·μL ⁻¹)
乡糯 4	1.73	234.56
乡糯 4	1.76	314.45
乡糯 4	1.71	289.63
SLN14	1.80	210.46
SLN13	1.78	305.95

2.2 乡糯 4 核心引物筛选

从国家标准《主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子标记检测 玉米》^[12] 核心引物名单及序列中选择 40 对引物,在乡糯 4 及其亲本 SLN14 和 SLN13 之间进行扩增,利用 1.5%琼脂糖凝胶对引物进行筛选。依据亲本带互补原则筛选引

物,并根据条带亮度、清晰度和无拖尾原则筛选引物温度。结果表明,bnlg1671y17(P22)、umc1936k4(P34)的扩增产物主带清晰、背景少可在 SLN14 和 SLN13 之间扩增出清晰、稳定的多态条带,且它们在乡糯 4 中均能扩增出双亲杂合带型(图 1),因此可将这 2 对 SSR 核心引物用于乡糯 4 的纯度鉴定。



M. Maker;1. SLN14;2. SLN13;3. 乡糯 4。
图 1 琼脂糖凝胶电泳筛选核心引物

2.3 乡糯 4 纯度鉴定

如图 2 所示,箭头从 SSR 标记可以准确地区分杂交种乡糯 4 及其父母本,用引物 bnlg1671y17、umc1936k4 分别对乡糯 4 进行纯度鉴定时,共提取 192 株幼苗 DNA,其中引物 bnlg1671y17 共检测出 2 株杂株(图 2);引物 umc1936k4 共检测出 5 株杂株(图 3),两次鉴定的结果以测出杂株数少的为准,通过以上结果可计算出玉米杂交种乡糯 4 的种子纯度为(192-2)/192×100=98.96%。

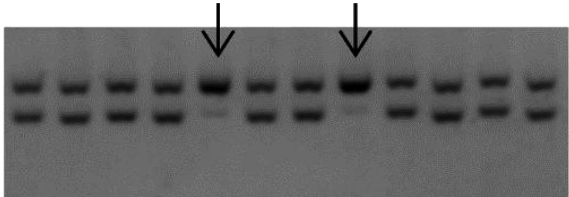


图 2 引物 bnlg1671y17 扩增乡糯 4 群体

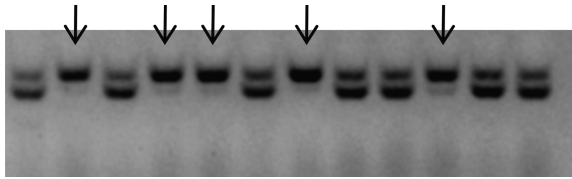
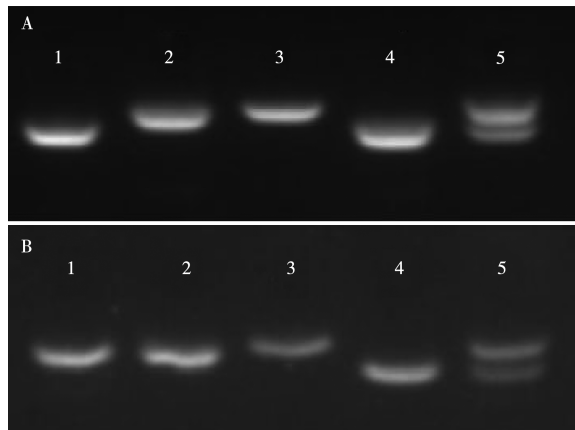


图 3 引物 umc1936k4 扩增乡糯 4 群体

2.4 乡糯 4 掺杂验证 SSR 标记

待检乡糯 4 杂交种子及其父母本 SLN14、SLN13 人为掺入近似品种杂交组合乡糯 7,用引物 bnlg1671y17、umc1936k4 分别对人为掺杂种子进行鉴定,得到的结果如图 4 所示,两对引物能够清晰区分开乡糯 4、SLN14、SLN13 和乡糯 7,可见,该方法能够准确地鉴定出人为掺入的种子。



1. 乡糯 7; 2. 乡糯 7; SLN13; 3. SLN13; 4. SLN14; 5. 乡糯 4。

图 4 引物 bnlgl671y17(A)、umc1936k4(B)

鉴定出掺杂的种子

2.5 田间小区种植鉴定

乡糯 4 于 2023 年 7 月 13 日抽雄, 7 月 15 日抽丝。于 2023 年 7 月 20 日进行第一次纯度鉴定, 鉴定了 204 株, 无异形株。于 2023 年 10 月 13 日进行第二次鉴定, 两次结果以成熟期为准。鉴定基于植株高度、株型、果穗形状、粒色、粒刺有无、粒型等特征, 共鉴定乡糯 4 总计 198 株, 自交系 6 株, 无其他异形株。纯度为 $(198 - 6) / 198 \times 100 = 96.97\%$ 。

3 讨论

随着分子标记技术的发展, 限制性片段长度多态性(RFLP)、随机扩增多态性(RAPD)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单序列重复(SSR)和单核苷酸多态性(SNP)等分子标记技术先后应用到玉米种子纯度的鉴定研究当中^[13]。其中, SSR 分子标记, 也称为微卫星标记, 是一种基于 DNA 序列中短的、重复的核苷酸序列的分子标记技术。这种技术因其高度多态性、共显性和易于检测等特点, 在遗传多样性分析、种质鉴定、遗传图谱构建和功能基因挖掘等领域, 具有重要应用价值^[14]。通过设计特定的引物, 可以选择性地扩增出具有特定基因型的 DNA 片段, 从而对玉米种子进行鉴定。这种高度特异性的分子标记技术使得在杂交种子中检测杂质的可能性大大提高, 确保了玉米种子的纯度^[15]。玉米 SSR 标记具有丰富的多态性, 利用已经研发出的近 2 000 对玉米 SSR 引物, 可以筛选出适用于任何一个玉米杂交种纯度鉴定的相应 SSR 引物, 除此之外, 与传统的鉴定

方法相比, SSR 分子标记技术更为快速和准确, 大大缩短了纯度鉴定的时间^[16]。

Yashitola 等^[17]认为, 对于特定品种, 仅需一对特异引物即可鉴定品种纯度。然而, 谭君等^[18]则认为, 仅用一对引物检测种子纯度是不准确的, 通常需要使用多对引物才能准确鉴定种子纯度。本研究从大量的玉米 SSR 引物中筛选出两对能在乡糯 4 中扩增出清晰、稳定的双亲互补带型的引物 bnlgl671y17、umc1936k4。通过这两对引物的组合使用, 可以满足对乡糯 4 种子纯度鉴定的需求, 根据朱国奇等^[19]的研究, 选用纯度较低的结果为准进行计算, 得到可靠的乡糯 4 的纯度值。同时, 这种方法结合了 DNA 小量制备和 SSR 快速鉴定的优点, (1)纯度鉴定时间快: 从种子 DNA 提取到获得纯度结果可在 1~2 个工作日内完成。(2)鉴定成本低: 采用 10 μ L PCR 反应体系, 大大减少了 Taq Mix 酶的用量, 降低了检测成本。(3)重复性好: 使用本研究筛选的两对引物进行两次纯度测定, 结果的重复性和一致性较高。

田间小区种植鉴定是监控品种是否保持特有特征特性或符合种子质量标准要求的重要手段之一。在田间小区鉴定中, 品种特征丰富, 性状多样, 且鉴定结果可靠, 特别适合用于异花授粉作物的纯度鉴定^[20]。因此, 田间小区种植鉴定被视为种子生产管理中最重要、准确且可靠的纯度和真实性鉴定方法。然而, 该方法的鉴定周期较长, 容易受到环境因素的影响, 对田间管理和种植要求较高, 同时对检验员的经验及其对品种特征特性的熟悉程度也有较高要求^[21]。

4 结论

本研究采用田间小区种植鉴定和 SSR 分子标记技术, 研究了同一批鲜食玉米杂交种乡糯 4, 供试样品种子纯度进行了反复检验和验证, 结果表明, 在 40 对 SSR 核心引物中 bnlgl671y17、umc1936k4 能准确鉴定出乡糯 4, 并且根据计算方法得出乡糯 4 的纯度为 98.96%; 利用田间小区种植鉴定的方法鉴定出乡糯 4 的纯度为 96.97%, 田间小区种植鉴定的结果略低于 SSR 分子标记鉴定的结果。综上, 两种试验方法鉴定乡糯 4 的纯度结果均符合国家标准。

参考文献:

[1] 孟庆长, 陈艳萍, 杨兴华, 等. 利用 SSR 技术鉴定苏玉 20 的

纯度[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(3): 508-512.

[2] 孙志玲, 提高杂交玉米种子纯度的技术措施[J]. 种子科技, 2011, 29(11): 35-36.

[3] 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, 50.

[4] 赵久然, 李春辉, 宋伟, 等. 利用 SSR 标记解析京科 968 等系列玉米品种的杂优模式[J]. 玉米科学, 2017, 25(5): 1-8.

[5] 卢媛, 韩晴, 王义发, 等. 糯玉米品种‘沪玉糯 3 号’种子真实性与纯度鉴定的 SSR 核心引物筛选[J]. 上海农业学报, 2018, 34(3): 45-49.

[6] 田红丽, 赵紫薇, 杨扬, 等. 290 个吉林省审定玉米品种 SSR-DNA 指纹构建及遗传多样性分析[J]. 作物学报, 2022, 48(12): 2994-3003.

[7] 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.

[8] 王安贵, 陈泽辉, 祝云芳, 等. 基于 SSR 标记的杂交玉米金单 999 种子的纯度检验[J]. 贵州农业科学, 2011, 39(5): 12-14.

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

[10] 尹祥佳, 李晶, 王雅琳, 等. 基于 SNP 分子标记的玉米杂交种基因型分析与纯度鉴定[J]. 现代农业研究, 2021, 27(6): 102-104, 132.

[11] 王蕊, 施龙建, 田红丽, 等. 玉米杂交种纯度鉴定 SNP 核心引物的确定及高通量检测方案的建立[J]. 作物学报, 2021, 47(4): 770-779.

[12] 国家市场监督管理总局, 国家标准化管理委员会. 主要农作物品种真实性和纯度 SSR 分子标记检测 玉米: GB/T 39914—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021.

[13] 罗黎明, 刘丽, 于丽娟, 等. DNA 分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用[J]. 生物技术进展, 2011, 1(1): 7-13.

[14] 杨梦婷, 黄洲, 干建平, 等. SSR 分子标记的研究进展[J]. 杭州师范大学学报(自然科学版), 2019, 18(4): 429-436.

[15] 赵欣欣, 赵晓东, 王奇, 等. SSR、AFLP 和 SRAP 分子标记用于玉米杂交种鉴定的多态性比较[J]. 吉林农业大学学报, 2018, 40(5): 545-550.

[16] 姚宗泽, 李阳, 郭宗娟, 等. 玉米品种“家佳荣 2 号”杂交种子纯度的 SNP 分子鉴定[J]. 西南农业学报, 2019, 32(11): 2486-2491.

[17] YASHITOLA J, THIRUMURUGAN T, SUNDARAM R M, et al. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers[J]. Crop Science, 2002, 42(4): 1369-1373.

[18] 谭君, 杨俊品. 玉米种子 DNA 快速提取及杂交种纯度的快速鉴定[J]. 分子植物育种, 2009, 7(4): 811-816.

[19] 朱国奇, 陈静萍, 詹伟捷, 等. 不同引物鉴定同一杂交水稻种子样品纯度结果的差异及其原因分析[J]. 杂交水稻, 2015, 30(3): 81-84.

[20] 吴春西, 宋小霞, 张勇跃, 等. 田间小区种植鉴定农作物种子纯度的方法[J]. 现代农业科技, 2006(4): 50, 56.

[21] 李阳, 范梦伟, 季晓坤, 等. 利用 SSR 技术鉴定玉米杂交种“家佳荣 2 号”的种子纯度[J]. 西南农业学报, 2018, 31(7): 1349-1354.

Identification of Seed Purity of Edible Maize Hybrid Xiangnuo 4 Using SSR Technology

WANG Ran, SUI Donghua, ZHANG Dongxue, WU Xinjuan, GAO Jiayuan, LI Xin, TANG Gui
(Institute of Rural Revitalisation Science and Technology, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150023, China)

Abstract: Seed purity is related to crop yield, quality and disease resistance, which is crucial for agricultural sustainability and market access. Xiangnuo 4 is a high-yield and high-quality fresh maize hybrid successfully selected and bred by Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences in 2023. In order to promote molecular marker assisted breeding of fresh maize in Heilongjiang Province, in this study, Xiangnuo 4 maize hybrid and its parents, the close variety Xiangnuo 7 hybrid combination were used as materials. And from 40 pairs of maize SSR core primers, two pairs of primers, bnlgl671y17 and umc1936k4 were screened, which had obvious polymorphism and good repeatability between the parents of Xiangnuo 4, were used for purity identification. The results showed that the purity of Xiangnuo 4 using SSR molecular markers was 98.96%, and the purity of Xingnuo 4 in field plots was 96.97%, which was slightly lower than that using SSR molecular markers. SSR molecular markers can increase accuracy, reliability, and practicality for quickly and effectively identifying the purity of hybrid variety Xiangnuo 4 in production.

Keywords: maize; SSR marker; purity identification; hybrids