

# 利用 DNA 指纹技术进行玉米 亲子鉴定方法研究

赵久然, 郭景伦, 孔艳芳, 尉德铭, 王元东,  
卢柏山, 邢锦丰, 滕海涛, 王继东

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089)

**摘要:** 利用 DNA 指纹分析技术, 分析了同母异父 5 个杂交组合分别与其父母本之间的遗传距离, 结果发现, 每个杂交组合与其相应的父本之间的遗传距离最小, 所有组合完全一一对应。因此, 可以通过计算遗传距离来进行玉米亲子鉴定, 只需计算出玉米杂交种与所有可能父本自交系之间的遗传距离, 与其遗传距离最小的自交系就是该杂交种的真正父本。

**关键词:** DNA 指纹; 玉米; 遗传距离; 亲子鉴定

**中图分类号:** S513.022 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2001)02- 0049- 04

亲子鉴定技术的研究最初主要在人和动物中开展。一般通过血型和其他一些生物化学多态性分析进行的。这些方法通常要求比较大的新鲜血液样本, 且经常受到动物生长的具体阶段影响。自 DNA 指纹技术问世以来, 由于该项技术需要样本量少, 任何极少量组织都可以用来进行鉴定, 并且鉴定结果准确可靠, 在国外被称之为终极鉴别法, 因此该方法越来越多地应用在人和动物的亲子鉴定中。但是将 DNA 指纹技术应用到玉米的亲子鉴定之中, 目前国内外还没有见相关报道。本文主要针对利用 DNA 指纹技术进行玉米亲子鉴定的方法进行研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

以自交系混 28A 为母本, 分别以鲁原 92, 齐 319, 853, H21, BA 为父本, 人工严格套袋杂交, 获得 5 个同母异父杂交组合。然后和父母本一起按顺序编号(表 1)。

### 1.2 DNA 提取

采用郭景伦等<sup>[1]</sup>改进的玉米单粒种子 DNA 提取新方法: 每个材料各取 5 粒种子, 将每粒种子的胚剥下, 一起放入 1.5 mL

表 1 试验材料

编号	名 称	编号	名 称
1	混 28A	7	853
2	混 28A× 鲁原 92	8	混 28A× H21
3	鲁原 92	9	H21
4	混 28A× 齐 319	10	混 28A× BA
5	齐 319	11	BA
6	混 28A× 853		

的离心管中，加入 300 μL 氯仿后研磨，然后加入 500 μL DNA 提取液( 100 mmol/ L Tris-HCl, 100 mmol/ L EDTA, 500 mmol/ L NaCl, 1. 5% SDS ) 混匀后于 10 000 r/ min 离心 2 min，吸上清液加入预先装有 500 μL 异丙醇的 1. 5 mL 离心管中，等 DNA 成团漂起后用枪头挑出，经 70% 乙醇洗涤后加入 200 μL TE 待充分溶解后备用。

1.3 随机引物

本试验所采用的多态性较好的随机引物 D2, F3, F9, F10, G6, G9, H7, H19, I10, M5, N11, O2, O20, X4 为美国 Operon 公司生产。

1.4 RAPD 扩增反应体系

每 25 μL 反应液其中包括：10 mmol/ L Tris-HCl ( pH 8. 0 ) , 50 mmol/ L KCl, 2 mmol/ L Mg-Cl<sub>2</sub>, 明胶 0. 001% , 4× dNTPs 分别为 0. 2 mmol/ L, 引物 1 μmol/ L, 1. 5 单位 TagDNA 聚合酶, 20 ng DNA 模板。

1.5 RAPD 扩增程序

该反应是在 PTG-100 PCR 反应仪上进行的。DNA 扩增程序为：94 ℃预变性 1 min, 94 ℃变性 20 s, 37 ℃引物与模板结合 1 min, 72 ℃延伸 1. 5 min, 共 40 个循环，完成最后一个循环后，72 ℃保温 5 min，使其延伸更完全。

1.6 电泳分析

RAPD 扩增产物用 1. 2% 琼酯糖凝胶分离，溴化乙锭染色，紫外灯下观察照相。

1.7 扩增结果统计分析

RAPD 扩增产物以 0, 1 统计建立 DNA 指纹数据库，在相同迁移位置上( 相同的 DNA 分子量片段) 有带赋值为 1，无带赋值为 0，计算各材料间的遗传距离，遗传距离计算公式为：

$$d_{ij}^2 = \frac{b}{a + b} \times 100$$

式中：a 表示两个材料具有相同配对带的数量，b 表示两个材料不同带的数量。

2 结果与分析

利用 14 个随机引物进行 DNA 指纹分析，将结果进行统计，计算出各杂交组合与其母本和所有父本之间的遗传距离( 表 2) 。

表 2 杂交组合与父母本之间的遗传距离

组合名称	父 本					母本混 28A
	鲁原 92	齐 319	853	H21	BA	
混 28A× 鲁原 92	4. 7	5. 6	6. 0	6. 6	6. 5	4. 8
混 28A× 齐 319	4. 7	2. 9	4. 1	5. 6	6. 0	4. 1
混 28A× 853	5. 4	4. 0	3. 7	5. 1	5. 9	4. 0
混 28A× H21	6. 3	5. 5	4. 7	4. 5	6. 2	5. 3
混 28A× BA	6. 1	5. 0	5. 4	6. 0	4. 4	4. 6

从表 2 可以看出，杂交组合混 28A× 鲁原 92 与 5 个可能父本之间的遗传距离大小不一，但是只有与鲁原 92 之间的遗传距离最小，为 4. 7；混 28A× 齐 319 与齐 319 之间的遗传距离最小，为 2. 9；混 28A× 853 与 853 之间的遗传距离最小，为 3. 7；混 28A× H21 与 H21 的

遗传距离最小，为 4.5；混 28A × BA 与 BA 之间的遗传距离最小，为 4.4。也就是说，每个组合都是与其真正父本的遗传距离最小，完全一一对应，无一差错。另外，聚类分析结果也与遗传距离分析结果完全一致(图 1)。因此，我们在对同母异父的杂交组合进行亲子鉴定时，只需将杂交组合与其可能的父本一起进行 DNA 指纹分析，计算出遗传距离，与其遗传距离最小的自交系就是该组合的真正父本。从表 2 中还可以看出，杂交组合与父本的遗传距离和与其母本的遗传距离之间有差异，但是不同组合二者之间的差异幅度有所不同，其中有 3 个组合差异在 10% 以内，有两个组合差异在 10% ~ 30% 之间。如果双亲自交系间遗传距离较小，即双亲之间亲缘关系较近，则杂交种与双亲之间遗传距离相差就越大，如，混 28A 和齐 319 中都有 P78599 血缘，混 28A × 齐 319 与 P78599 血缘较多的自交系齐 319 之间的遗传距离较小为 2.9，而与 P78599 血缘较少的自交系混 28A 的遗传距离较大为 4.1；二者差异明显。

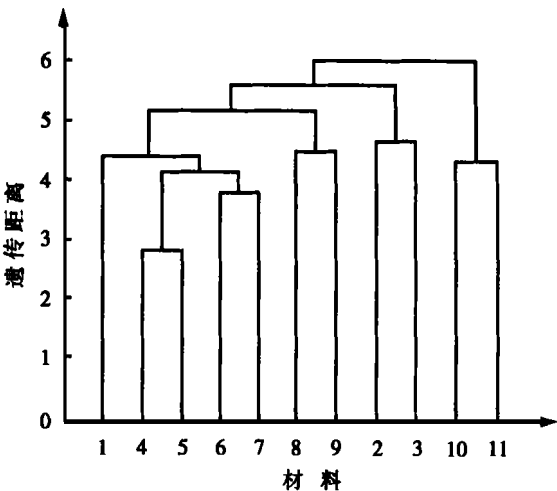


图 1 聚类分析结果

3 讨论

玉米亲子鉴定技术在玉米新品种知识产权保护和解决知识产权纠纷时十分实用，但是本人认为若将该项技术应用到玉米常规育种实践之中，意义将会更大。因为纵观目前国内外玉米育种的方法，即便是美国先锋种子公司，主要还是依靠常规玉米育种，虽然近年来已经将分子生物学技术应用到了玉米育种之中，但多局限在重要基因的定位，重要农艺性状和抗病、抗虫基因的分子标记和转基因育种，但对于整个玉米育种方法没有起到决定性的改进作用。因此在今后相当长的一段时间内，玉米新品种的选育仍然依靠常规育种方法，能否选育出优良的玉米杂交种，不在于育种手段多么先进，而在于种质资源的占有量，明确的育种目标和正确的育种思路，其中种质资源的占有量是关键。但是在常规玉米育种工作中，还有很多需要改进的地方，目前最需要改进的地方就是杂交组合的组配、种植、田间鉴定和收获考种等工作，这部分工作每年占到育种工作量的一半以上，并且该部分工作中绝大部分工作都是无效劳动。将玉米亲子鉴定技术应用到玉米育种实践之中，可以简化玉米杂交组合的组配方法，基本原理就是在一定隔离区内，让测配自交系间自由选择授粉，在后代中往往只有极少数表现优良的杂交组合，再主要针对这极少数优良组合，利用 DNA 指纹分析技术，在知道母本的前提下，进行父本鉴定，将鉴定出父本的优良组合组配一定量的种子参加区域试验。到那时，每年组配上万个组合将会是非常简单的事情，这样可以使育种者从繁重的杂交组合组配和种植鉴定工作中解放出来，集中精力进行优良自交系的选育，提高玉米育种效

率, 同时可以节省大量的人力、物力和财力。

在杂交组合组配工作中, 许多育种家也经常遇见同样的问题, 就是“有心栽花花不开, 无心插柳柳成荫”。具体表现在, 育种家往往费尽心思地选择测配用自交系, 就象包办婚姻一样, 人工一一强制授粉, 组配大量的组合, 单独收获、单独种植、单独调查、单独考种, 就像大海捞针一样, 迫切渴望选出一个优良的杂交组合来, 但是往往事与愿违, 有时组配了很多杂交组合, 一个优良杂交组合也选不出来。而有时随便收获一个自然授粉果穗, 种植以后, 往往却有非常优良的植株, 但是仅从植物学特性上很难鉴别出父本到底是哪一个自交系, 在室内利用同工酶和蛋白质电泳技术进行鉴别, 由于检测位点少, 也无法解决这一难题。经过本课题研究, 利用 DNA 指纹分析技术, 在已知母本的前提下, 完全能够进行父本自交系的准确鉴定, 因此今后在育种工作中若再次遇到此类棘手问题时, 即可迎刃而解。

参考文献:

- [1] 郭景伦, 赵久然, 尉德铭, 等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法[J]. 北京农业科学, 1997, 15(2): 1- 2.

## Study of Parent Identification of Maize Hybrids with DNA Fingerprint

ZHAO Jiu-ran, GUO Jing-lun, KONG Yan-fang, YU De-ming, WANG Yuan-dong,  
LU Bai-shan, XING Jin-feng, TENG Hai-tao, WANG Ji-dong

(Maize Research Center, Beijing Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100089, China)

**Abstract:** Genetic distance between 5 maize hybrids (crossed with the same female, but different male parents) and their parents were studied by using DNA fingerprint. The result showed that the genetic distance between each hybrid and its real male parent was the minimum one among all the male parents. It is a very useful method to identify the real male parent of maize hybrids by calculating the genetic distance between the hybrid and its all possible male parents.

**Key words:** DNA fingerprint; Maize; Genetic distance; Parent identification