

引物组合法在利用 DNA 指纹鉴定玉米自交系真伪中的应用研究

郭景伦, 赵久然, 孔艳芳, 尉德铭, 卢柏山, 王元东

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100089)

摘要: 利用 RAPD 分子标记方法对我国 46 个骨干玉米自交系进行了鉴定研究, 结果表明, 仅用 A6, C6, D2, F10, H19, N19 等 6 个引物的指纹组合即可将这 46 个自交系相互区分开来, 不需要针对每个自交系筛选特异性标记, 克服了利用特异性标记鉴定玉米自交系的局限性; 研究出基于 WINDOWS98 操作平台的玉米 DNA 指纹数据库和指纹分析软件。并且该数据库和分析软件对自交系的数量和引物数量都是开放性的, 如果要区分 m 个自交系, 最多只用 n 个引物即可, 二者的关系是: $2^n \geq m$ 。

关键词: 引物组合法; 玉米; DNA 指纹; 鉴定

中图分类号: S513.033 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2000)02-0027-05

对玉米自交系的鉴别, 最初采用形态学方法, 但可用于鉴别的形态特征数目有限, 且易受环境因素的影响, 所以仅靠简单的形态学方法来进行鉴别是不可靠的。现在应用比较多的是同工酶电泳技术^[1,2], 它在品种鉴定中确实发挥了一定的作用。但由于同工酶是基因表达的产物, 一定程度上受到不同器官、不同发育时期、环境等因素的影响, 并且所能提供的标记数目有限, 不能区分亲缘关系很近的品种, 尤其在遗传基础越来越狭窄的今天, 该方法更表现出了其局限性。

1990 年 Williams^[3] 和 Welsh^[4] 等发展的一种新的分子生物学技术——RAPD, 它是以 PCR 技术为基础, 通过随机引物的扩增来检测 DNA 的多态性。目前利用 DNA 指纹图谱技术鉴定玉米自交系和杂交种真伪及纯度的报道^[5~9] 越来越多, 不过有的报道是利用少数几个或十几个材料, 先经过大量的引物筛选, 寻找出针对某一材料特异的分子标记, 以后就利用该特异标记鉴定这个材料, 实践证明利用特异带鉴别自交系在一定范围内有效, 但具有很大的局限性。因为即使某一自交系在一定范围自交系中是特异带, 随着自交系数量的增多, 就不一定是特异带。因此如果想单纯依靠特异带将所有自交系完全区分开是根本不可能的。本研究尝试利用引物组合的方法彻底解决这一难题。

1 材料和方法

1.1 试验用自交系的种植鉴定与提纯

将表 1 中所列自交系种植于大田, 根据其植物学特性, 选择能代表本自交系种性的单株,

在吐丝散粉之前,将雄穗和雌穗套袋,严格自交。在收获时再根据穗部性状,选择有代表性的果穗,晾晒,脱粒备用。

表 1 试验所用的 46 个自交系

编号	名称	编号	名称	编号	名称	编号	名称
1	478	13	81515	25	218	37	黄 C
2	488	14	获唐黄	26	0013	38	167
3	3189	15	丹 340	27	P78	39	178
4	5005	16	E28	28	0007	40	P138
5	掖 107	17	52106	29	0008	41	Z5
6	黄早四	18	双 105	30	227	42	135
7	黄野四	19	双 741	31	混选- 2	43	145
8	四自四	20	7922	32	早 49	44	352
9	404	21	8112	33	多 22	45	M017
10	吉 853	22	比尖八	34	501	46	武 314
11	H21	23	S98	35	金 96		
12	502196	24	9725	36	综 31		

1.2 DNA 提取

采用郭景伦^[10]等改进的玉米单粒种子 DNA 提取新方法:将干种子的胚剥下,放入 1.5 mL 的离心管中,加入 100 μL 氯仿后研磨,然后加入 300 μL DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl,100 mmol/L EDTA,500 mmol/L NaCl,1.5% SDS)混均后于 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 100 μL TE,待充分溶解后备用。

1.3 随机引物

本试验所采用的随机引物 A6,C6,D2,F10,H19,N19 为美国 Operon 公司生产。

1.4 RAPD 扩增反应体系

每 25 μL 反应液中包括:10 mmol/L Tris HCl(pH 8.0),50 mmol/L KCl,2 mmol/L Mg-Cl₂,明胶 0.001%,4×dNTPs 分别为 0.2 mmol/L,引物 1 μmol/L,1.5 单位 Tag DNA 聚合酶,20 ng DNA 模板。

1.5 RAPD 扩增程序

该反应是在 PT G-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。

2 结果与分析

2.1 我国 46 个骨干自交系 DNA 指纹

从 520 个引物中筛选出 60 多个引物具有多态性,仅有 6 个引物具有特异带,并且仅能区分开 8 个自交系,即 M16 扩增结果中自交系混选-2 在 2 500 bp 位置具有特异带,在 G9 扩增结果中,丹 340 在 1 750 bp 处具有特异带,501 在 800 bp 处具有特异带,52106 在 C19 的 2 250

bp 处具有特异带, S98 在 2 500 bp 处具有特异带, M2 扩增结果中 7922 在 2 250 bp 处具有特异带, E28 在 N19 的 2 500 bp 处具有特异带。因此如果想单纯依靠特异带将这 46 个自交系完全区分开是十分困难的, 并且即使某一自交系在这 46 个自交系中是特异带, 但随着自交系数量的增多, 就不一定是特异带。因此利用特异带鉴别自交系在一定范围内是有效的, 具有很大的局限性。

经过本项研究表明, 利用引物组合法, 不需要将每个自交系都筛选出特异带, 仅用 A6, C6, D2, F10, H19, N19 等 6 个引物即可将 46 个自交系相互区分开来, 见图 1, 即使亲缘关系很

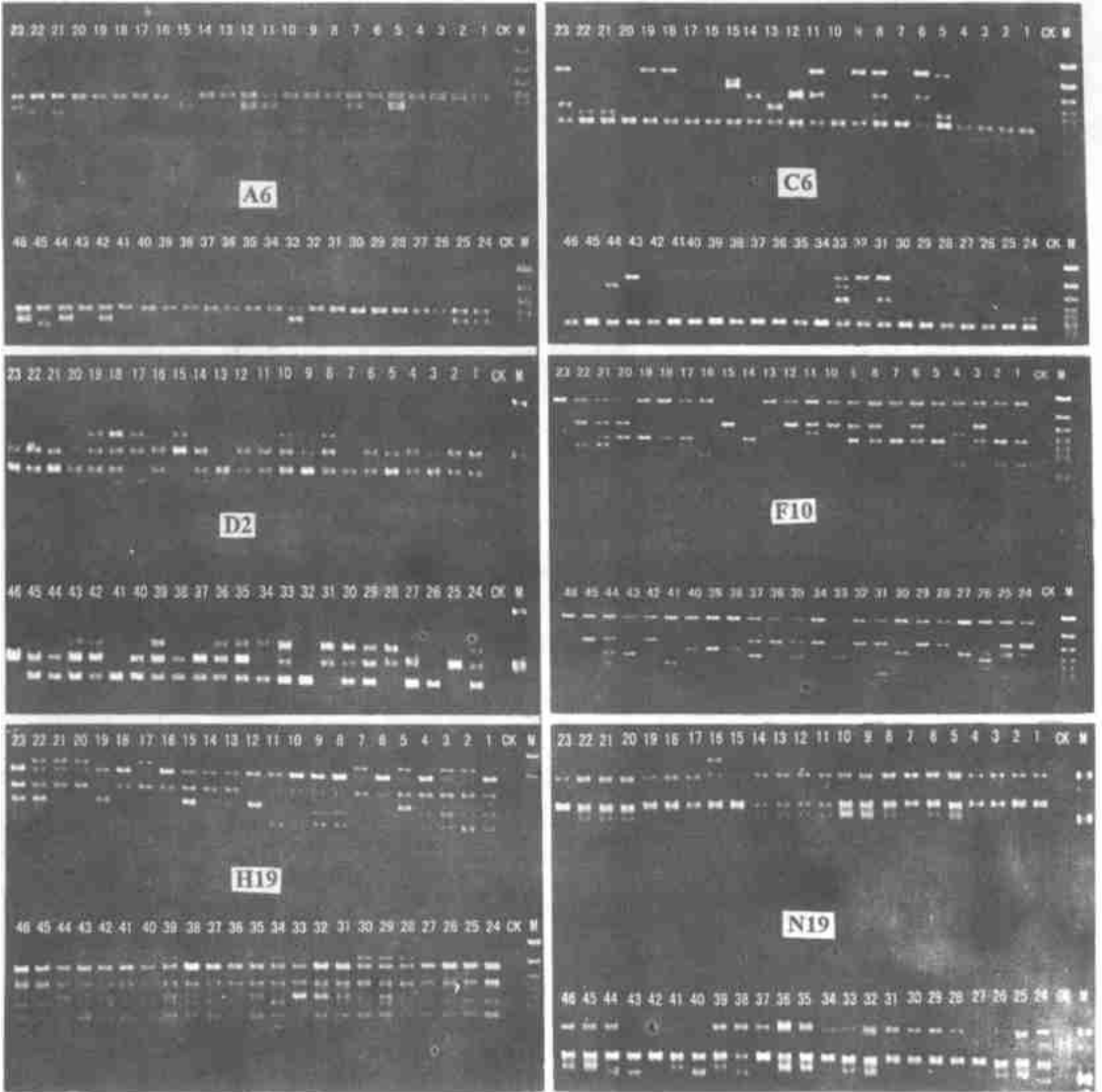


图 1 利用随机引物 A6, C6, D2, F10, H19, N19 扩增结果

近的姊妹系如 478, 488 和 3189, 双 105 和双 741, 0007 和 0008, 黄早四和黄野四等都能很容易区分开, 这是蛋白质和同工酶电泳无法比拟的。如果以后随着自交系数量的增加, 自交系间出现相同的 DNA 指纹, 只需将指纹相同的几个自交系进行引物的筛选, 很容易筛选出理想的引

物将这几个自交系区分开,然后在所有自交系的 DNA 指纹图谱中追加新引物的扩增结果即可。

2.2 玉米 DNA 指纹图谱数据库的建立和计算机分析系统

由于每个玉米自交系的 DNA 指纹图谱有很多片断,如果将大量的玉米自交系的 DNA 指纹图谱放在一起人工鉴别,难度很大,费工费时。因此本课题组研制出基于 WINDOWS98 操作平台的玉米 DNA 指纹计算机分析软件,本分析软件主要包括以下三个方面的功能。

2.2.1 DNA 指纹自检 利用该项功能可以对所有自交系的 DNA 指纹图谱进行自我检查,将上述 6 个引物的扩增结果进行统计,同一分子量大小的位置上有带计为 1,无带计为 0,建立玉米自交系 DNA 指纹图谱数据库,如果不同的自交系具有相同的 DNA 指纹,计算机将会加以指出,那么我们就可以增加新的引物进行扩增,直到能够将具有相同 DNA 指纹的自交系区分开来为止。这在建立标准的 DNA 指纹图谱时非常实用。

2.2.2 DNA 指纹 这部分功能主要是将经过自检,没有发现不同的自交系具有相同的 DNA 指纹以后,将每个自交系的标准 DNA 指纹图谱画出,使 DNA 指纹图谱更加直观。

2.2.3 DNA 指纹鉴定 对一个不知名的自交系,用建立标准 DNA 指纹所需的引物进行扩增,将扩增结果进行统计,然后将统计结果输入计算机,计算机就会立即告诉你该自交系是什么,或者标准指纹图谱里有没有这个自交系。和人工鉴别相比,省时省工,方便快捷,准确可靠。

3 讨论

RAPD 分子标记技术的出现特别是从种子中提取 DNA 方法的改进^[10~12],使得该技术在品种鉴定和纯度分析上更加快速发展,尤其在目前遗传基础狭窄,品种间难以区分的情况下非常有效。该方法应用于玉米种子纯度及真实性鉴定工作有其独特之处:首先是操作简便,易于推广。利用 RAPD 方法进行品种鉴定不需要操作人员掌握很多的专业知识,只需系统学习培训就可独立操作。二是快速。利用本研究所采用的方法分析一个样品(100 粒种子),从 DNA 提取到 PCR 扩增结果观察,一天即可完成。三是准确可靠。由于 RAPD 方法是对品种的 DNA 进行分析,不受环境条件影响,只需筛选到稳定重复的多态性引物,其结果准确可靠。四是廉价。利用 RAPD 方法分析 1 粒种子包括耗材和药品只需 1 元钱左右。随着今后国产试剂的大量应用,其成本还会降低。五是分辨率高,多态性好。该方法检测的是 DNA 水平,Williams 指出该方法能检测到基因组中每一个碱基的变化,所以亲缘关系再近的品种只要存在碱基序列的不同就可以通过该方法鉴别开,这是利用形态学标记、生化标记鉴定所不能比拟的。

利用该方法建立的 DNA 指纹图谱可以用于玉米种子纯度及真伪鉴定,为新品种登记提供依据,保护品种知识产权和育种家的权益。随着 DNA 模板获得的更加简便快捷,反应条件的优化,成本的不断降低,该技术定会更加完善和实用。

参考文献:

[1] 赵久然,李举杯,郭景伦,等.应用同工酶鉴定玉米自交系、杂交种纯度技术的研究[J].北京农业科学,

- 1996, 14(6) : 19– 21.
- [2] Wang Hongxin. Electrophoretic study on seed proteins of maize hybrids and inbreds [J] . Chinese J Bot, 1989, 1(2) : 139– 144.
- [3] Williams J G K, Kubelik A R, Lirak K J, *et al* . DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic marker [J] . Nucleic Acids Res, 1990, 18: 6531– 6535.
- [4] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primer [J] . Nucleic Acids Res, 1990, 18: 7213– 7218.
- [5] 张超良, 孙世梦, 金德敏, 等. RAPD 技术在 12 个玉米骨干自交系快速鉴定中的应用[J] . 作物学报, 1998, 24(6) : 718– 722.
- [6] 赵久然, 郭景伦, 孔艳芳, 等. 利用 RAPD 技术鉴别玉米自交系[J] . 玉米科学, 1998, 6(4) : 6– 9.
- [7] 赵久然, 孔艳芳, 郭景伦, 等. 利用 DNA 指纹鉴定农大 108 玉米杂交种纯度的研究[J] . 北京农业科学, 1998, 16(6) : 1– 2.
- [8] 郭景伦, 赵久然, 孔艳芳, 等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法及在玉米种质鉴定中的应用研究[J] . 种子, 1999, 2: 37– 38.
- [9] 赵久然, 郭景伦, 孔艳芳, 等. 利用 DNA 指纹图谱鉴别玉米杂交种纯度及真实性研究[J] . 玉米科学, 1999, 7(1) : 9– 13.
- [10] 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.
- [11] 王玉民, 庄炳昌, 邓崇辉. 玉米半粒种子 DNA 提取及 RAPD 分析[J] . 玉米科学, 1996, 3(3) : 27– 28.
- [12] McDonald M B, Elliot L J, Sweeney P M, *et al* . DNA extraction from dry seeds for RAPD analysis in varietal identification studies [J] . Seed Sci Technol, 1994, 22: 171– 176.

Studies on the Utilization of Primer Combination in Maize Inbred Lines Identification Using DNA Fingerprints

GUO Jing-lun, ZHAO Jiu-ran, KONG Yanyang,
YU Deming, LU Baishan, WANG Yuandong

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

Abstract: Forty-six important inbred lines widely used in China were identified by molecular marker. It is needless to select special molecular marker for each inbred. They were distinguished from each other just by the combination of amplification products of six primers A6, C6, D2, F10, H19 and N19. It resolved the limitation of identification of maize inbred lines using special markers. The database of DNA fingerprint of each inbred was established, and made out the software of DNA fingerprint analysis for Windows 98. With the increase of the inbred number, the software will play more and more important role in the inbred identification works. If the number of inbred lines and primers is respectively m and n , the relationship between m and n is $2^n \geq m$.

Key words: Primer combination; Maize; DNA fingerprint; Identification