

SSR 技术及其在植物遗传育种中的应用

郭小平 赵元明

(河南省农业科学院经济作物研究所, 郑州 450002)

刘毓侠

(河南省农业科学院信息研究所, 郑州)

摘 要 利用 174 对 SSR 引物对 4 个玉米自交系进行鉴定, 详细介绍了一种新的分子标记 SSR 的操作技术。鉴定结果表明, SSR 在玉米染色体上呈随机分布, 可以有效地揭示玉米自交系间的遗传差异, 追踪亲本遗传物质在后代中的遗传动态。

关键词 SSR 分子标记 植物遗传育种

分子标记能够反映植物在遗传物质 DNA 水平上的差异, 是植物遗传育种领域内的一项新兴技术^[1]。RFLP 标记自 Paterson(1988) 在蕃茄上首次应用以来, 一直居重要地位, 但因其技术操作复杂, 耗时多且花费较大等原因, 又相继出现了其它许多类型的分子标记, 如 RAPD、AFLP 和 STS 等, 这些分子标记虽各有特点, 但均不理想。理想的分子标记应具备如下条件: 遗传上呈共显性, 具有高度变异性, 分析简便, 易于实现自动化, 便于交换和传播等。

SSR(Simple Sequence Repeat) 又称微卫星 DNA (Microsatellite), 是一种由 2~5 个核苷酸为重复单位组成的长达几十个核苷酸的串联重复序列, 它广泛分布于整个真核生物基因组的不同座位上, 每个座位重复单位的数量可能不完全相同, 因而形成多态性, 即 SSR 分子标记。由于 SSR 两端多为相对保守的单拷贝序列, 可以通过设计特异性引物进行 PCR 扩增。SSR 兼具 RFLP 和 RAPD 的优点, 克服了它们的不足, 成为目前分子标记技术的热点^[2,4,5], 但国内尚未有这方面的研究报道。作者采用这一新的分子标记对玉米自交系进行鉴定, 介绍 SSR 的操作技术, 研究其在植物遗传育种上的应用效果。

1 材料和方法

1.1 供试材料

B14, B96, B64 和 B68 4 个玉米自交系。其中 B14 和 B96 为美国衣阿华坚秆综合种 BSSS 轮回选择群体中选出的自交系; B64 和 B68 为(B14 × B96) × B14 群体中选出的妹妹系。

初始采用 SSR 引物共 174 对,均为美国 GENETIC 公司产品。

1.2 DNA 提取

分别在田间取供试玉米自交系单株叶片,然后混合,按照 Saghai-Maroof 等的方法^[3],提取 DNA 样品。

1.3 PCR 反应物组成

成对引物各 25μg, 100μM dNTP, 1 个单位 Tag DNA 聚合酶, 1 倍反应缓冲液(10mM Tris-HCl, 1.5mM MgCl₂, 50mM KCl, 100μg/ml 明胶; pH8.3), 1mg/μl 非乙酰化 BSA, 50ng 模板 DNA, ddH₂O。反应物总体积 25μl, 上面覆盖液体石蜡油。

1.4 PCR 反应条件

扩增反应在 PTC-100 PCR 仪上完成。反应程序为在 95℃ 下预变性 1min, 然后 95℃ 下变性 1min, 65℃ 下退火 1min, 72℃ 延伸 2min, 两个循环; 以后每两个循环, 退火温度降低 1℃, 直到 55℃; 最后一个循环重复 20 次; 反应终止在 4℃。

1.5 电泳分辨

扩增产物的分辨采用 4% 的 Metaphor 琼脂胶进行平板电泳, 胶中加入 0.15μg/ml 溴化乙锭(EB), 梳子厚度 1mm。取 24μl 样品点样, 用 1 倍 TBE 缓冲液, 在 95V 电压下电泳 4h, 用紫光灯进行结果显示。

2 结果与分析

2.1 SSR 的扩增表现及在染色体上的分布

本试验共测试 174 对引物, 在本试验条件下, 37 对引物没有扩增产物, 137 对引物显示清晰的带。其中 136 对引物在不同自交系上只有一条带, 说明这些 SSR 标记是玉米染色体上的特异性片段; bngl 345 在被测自交系中显示两条带, 说明 bngl 345 在染色体上有两份拷贝。这些 SSR 标记在玉米染色体上的分布见表 1, 其中 7 个标记的位置尚未确定。从表 1 中可以看出, SSR 标记在染色体上呈随机分布。

2.2 SSR 揭示的遗传差异和自交系系谱的关系

通过 137 对有扩增产物的引物对 B14 和 B96 两个自交系进行分析, 有 67 对引物显示多态性(表 2), 即扩增 DNA 片段长度不同, 反映了两个自交系在遗传物质上的差异, 占所测引物的 48.9%。由于 B14 和 B96 同为 BSSS 综合种轮回选择群体中分离出的自交系, 如此高的多态性显示了 SSR 标记的高度变异性。B64 和 B68 与回交亲本 B14 的遗传差异较小, 分别为 11.7% 和 5.8%, 而和非回交亲本 B96 的遗传差异较大, 分别为 37.2% 和 43.1%。该结果和自交系间的系谱关系完全吻合, 显示 SSR 标记在揭示自交系间遗传差异上的可靠性和精确性(表 3)。

表 1 SSR 分子标记在染色体上的分布

染色体	标记数目	染色体区间
1	20	1.01—11.1
2	9	1.03—2.08
3	7	3.04—3.07
4	17	4.01—4.10
5	17	5.00—5.09
6	10	6.00—6.07
7	13	7.01—7.06
8	11	8.02—8.08
9	18	9.01—9.07
10	8	10.02—10.06
?	7	

表 2 B14 和 B96 间多态性分子标记

染色体		多 态 性 SSR 标 记					
1	phi 097 phi 011	bngl 176	bngl 182	phi 095	phi 001	bngl 615	bngl 100
2	bngl 125	bngl 108	bngl 166	phi 083	bngl 198	M A G. 1F03	
3	nc 030	phi 029	bngl 420	phi 073	M A G. 1A 03		
4	phi 072	phi 074	bngl 490	M T T G. B02	phi 019		
5	bngl 143 bngl 118	MAC.E00B03 bngl 386	bngl 565 bngl 389	phi 113	MAC.E01A 03	bngl 278	bngl 609
6	phi 075	bngl 161	bngl 249	bngl 426	phi 077	bngl 345	phi 070
7	phi 034	phi 114	bngl 155	bngl 434	MAC.E01C02	bngl 082	
8	bngl 669	phi 115	bngl 162	bngl 666	MAC.E01C01	phi 080	phi 015
9	M A C. T02B08 phi 061	phi 028 bngl 292a	phi 044	phi 017	bngl 469a	phi 065	phi 027
10	bngl 640						
?	M A G.1E07	M A C. T02H12	M A C. T02B10				

表 3 4 个玉米自交系间的遗传差异

项 目	B14 和 B96	B64 和 B14	B68 和 B14	B64 和 B96	B68 和 B96	B64 和 B68
不同位点数目	67	16	8	51	59	18
差异性百分率(%)	48. 7	11. 7	5. 8	37. 2	43. 1	13. 1

2. 3 亲本遗传物质在杂交后代中的传递动态

采用SSR 分子标记可以清楚地揭示亲本遗传物质在杂交后代中的传递动态。B64 和 B68 均来自(B14× B96) × B14 群体, 在 B64 中有 54 个位点来自回交亲本 B14, 占 76. 1%, 16 个位点来自非回交亲本 B96, 占 23. 9%; 而在 B68 中有 59 个位点来自 B14, 占 88. 1%, 8 个位点来自 B96, 占 11. 9%。B68 自交系中回交亲本的遗传物质高于 B64 自交系。结合 SSR 标记在染色体上的位置, 可以进一步明确亲本染色体不同区段在后代中的传递动态, 为定向转移某些目标片段提供有效手段。

3 讨论

SSR 是较为理想的分子标记, 目前在玉米、水稻、大豆、蕃茄和棉花等许多重要作物上刚刚开展研究和应用。玉米上迄今已开发出数百个 SSR 分子标记, 并已实现商品化。在研究玉米自交系间遗传差异方面, SSR 和 RFLP 技术具有同样的优点: 和 RAPD 相比, 具有很好的稳定性和重复性, 便于不同实验室间试验结果的交流和比较; 和形态性状方法相比, 能够在更深层次上反映自交系间本质差异。SSR 和 RFLP 都能追踪亲本遗传物质在杂交后代中的遗传动态, 但 SSR 简便快速的分析技术, 能够在短时间内对大量样品进行分析, 具有更强的实用性和更大的应用前景。但是这种分子标记需对不同物种的重复片段进行序列测定, 设计特异性引物。因此初始开发阶段耗费较大, 一旦开发工作完成, 将一直受益。

参 考 文 献

- 1 陆朝福. 植物育种中的分子标记辅助选择. 生物工程进展, 1995, 15(4): 11 ~ 17
- 2 Rongwei J, et al. The use of microsatellite DNA markers for soybean genotype identification. TAG, 1995, 90: 43 ~ 48
- 3 Saghai Maroof MA, et al. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosome location and population dynamics. PNAS, USA, 1984, 81: 8014 ~ 8018
- 4 Senior ML, Heun M. Mapping maize microsatellites and polymerase chain reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer. Genome, 1993, 36: 884 ~ 889
- 5 Yang GP, et al. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. MGG, 1994, 245: 187 ~ 194

SSR Technique and Its Application in Plant Genetics and Breeding

Guo Xiaoping Zhao Yuanming

(Economic Crops Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002)

Liu Yuxia

(Science and Technology Information Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou)

Abstract The technique of SSR was introduced in detail through the test of four inbred lines using 137 primer pairs in maize. The results of the application showed that the SSR markers randomly distributed on the chromosomes. It could be used to study the genetic divergence of the inbred lines and the genetic dynamics of parents in pedigree efficiently.

Key words: SSR; Molecular marker; Plant breeding and genetics