

张振良,郝德荣,陈国清,等. SSR标记在糯玉米品种鉴定上的应用[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):104-106.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.025

# SSR 标记在糯玉米品种鉴定上的应用

张振良<sup>1</sup>, 郝德荣<sup>1</sup>, 陈国清<sup>1,2</sup>, 陆虎华<sup>1</sup>, 石明亮<sup>1</sup>, 冒宇翔<sup>1</sup>, 吴嘉点<sup>3</sup>, 黄小兰<sup>1</sup>, 程玉静<sup>1</sup>, 周广飞<sup>1</sup>, 薛林<sup>1</sup>

(1. 江苏沿江地区农业科学研究所, 江苏如皋 226541; 2. 江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏南京 210095;

3. 江苏省农业委员会, 江苏南京 210036)

**摘要:**采用 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》中的 20 对简单重复序列(SSR)引物对市场抽检的苏玉糯 11、苏玉糯 901、苏玉糯 13、苏玉糯 14、苏玉糯 639 等 5 个糯玉米品种进行真实性鉴定。结果表明,每个抽检品种与标准品种至少有 6 个差异位点,这 5 个品种均与相应的标准品种不同;此外,umc1545y2、umc1335y5、umc2105k3、umc1705w1、umc1125y3、umc2007y4、phi053k2、bnlg2305k4 等 8 对引物多态性较好,在今后糯玉米品种鉴定中可优先采用。

**关键词:**糯玉米;SSR 标记;品种;鉴定;应用

**中图分类号:** S513.03

**文献标志码:** A

**文章编号:** 1002-1302(2016)06-0104-02

糯玉米因其营养丰富、风味独特、适口,越来越受到广大消费者欢迎。糯玉米种植面积越来越大,品种数量逐年上升,品种真实性鉴定需求也急剧增加。糯玉米育种中由于少数骨干亲本的集中应用,造成品种间遗传基础狭窄,仅从形态上鉴定存在一定困难,给玉米品种的生产、经营、使用以及种子管理部门的监督带来一定挑战。随着 DNA 指纹图谱技术的发展,以简单重复序列(SSR)为代表的分子标记技术逐渐成熟并应用于农业种子生产研究和种子质量管理<sup>[1-2]</sup>。2014 年,中国农业部公布了一系列主要农作物品种鉴定的行业标准,如 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》、NY/T 1433—2014《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》,代替了 2007 年公布的行业标准,使 SSR 标记技术对农作物品种真实性鉴定的方法更加完善和准确。为进一步明确 SSR 标记在糯玉米品种真实性鉴定中的作用,本研究采用 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》标准鉴定 5 个疑似套牌糯玉米杂交种的真实性,同时探讨 SSR 分子标记技术在糯玉米品种真实性鉴定中的应用前景。

## 1 材料与与方法

### 1.1 材料

市场上抽检的苏玉糯 11、苏玉糯 901、苏玉糯 13、苏玉糯 14、苏玉糯 639 等 5 个糯玉米品种,疑是套牌种子依次编号为 A、B、C、D、E,标准品种分别编号为 A1、B1、C1、D1、E1。其中套牌种子由种子管理部门提供,标准品种由江苏沿江地区农业科学研究所玉米室提供。分别对每个样品(品种)的 5 个个体单独进行分析。

### 1.2 DNA 提取

收稿日期:2015-05-15

作者简介:张振良(1987—),男,山东东平人,硕士,研究实习员,研究方向为玉米分子遗传和育种。E-mail:zhenliang1110@163.com。

通信作者:薛林,研究员,研究方向为玉米育种。E-mail:417803648@qq.com。

取约 0.2 g 玉米幼嫩叶片于液氮中研磨,转入 2 mL 离心管中,加入 800  $\mu$ L 预热 65  $^{\circ}$ C 的 CTAB 提取缓冲液,混匀,水浴 60 min,每隔 10 min 小心摇动离心管;取出离心管,待冷却至 25  $^{\circ}$ C,加入 800  $\mu$ L 三氯甲烷:异戊醇(24:1),小心充分摇动试管至有机相呈深绿色,室温下于 8 000 r/min 离心 10 min;用剪口的 1 mL 枪头将上清液转移到另一离心管中,加入 2/3 体积预冷的异丙醇(-20  $^{\circ}$ C),小心混匀;8 000 r/min 离心 2 min,弃上清液,用 500  $\mu$ L 70%乙醇清洗 2 次,弃上清液,干燥沉淀,加 150  $\mu$ L TE 溶解。

### 1.3 PCR 扩增

根据 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》标准,选用 bnlg439w1、umc1335y5、umc2007y4、bnlg1940k7、umc2105k3、phi053k2、phi072k4、bnlg2291k4、umc1705w1、bnlg2305k4、bnlg161k8、bnlg1702k1、umc1545y2、umc1125y3、bnlg240k1、phi080k15、phi065k9、umc1492y13、umc1432y6、umc1506k12 等 20 对 SSR 标记,均匀分布在玉米 10 对染色体上。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 反应体系(10  $\mu$ L)为:1  $\mu$ L 模板 DNA(100~150 ng),上、下游引物(10  $\mu$ mol/L)各 0.2  $\mu$ L、1  $\mu$ L 10  $\times$  Taq buffer、0.7  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub>、0.8  $\mu$ L dNTP(2.5 mmol/L)、DNA Polymerase(2.5 U/ $\mu$ L)0.2  $\mu$ L(TIANGEN),其余以超纯水补足至所需体积。反应液上加盖 15  $\mu$ L 石蜡油,以防反应过程中水分蒸发。PCR 程序为:94  $^{\circ}$ C,5 min;94  $^{\circ}$ C 30 s,60  $^{\circ}$ C 30 s,72  $^{\circ}$ C 30 s,共 31 个循环;72  $^{\circ}$ C 10 min,4  $^{\circ}$ C 恒温冷藏。

### 1.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳及显色。

PCR 产物用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,银染显色。

### 1.5 品种真实性鉴定标准

从样品中随机抽取 5 个单株作为检测样本。根据抽检样本电泳谱带和标准品种电泳谱带的一致性鉴定品种的真实性。结果按照农业部颁布的行业标准 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》判定。当样品间差异位点数 $\geq 2$ ,判定为不同;当样品间差异位点数=1,判定为近似;当样品间差异位点数=0,判定为极近似或相同。

2 结果与分析

2.1 糯玉米杂交种 DNA 检测

对提取的糯玉米基因组 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳检测,检测结果见图 1。结果表明,提取的玉米基因组 DNA 主带清晰一致,适合进一步的 SSR 分析。

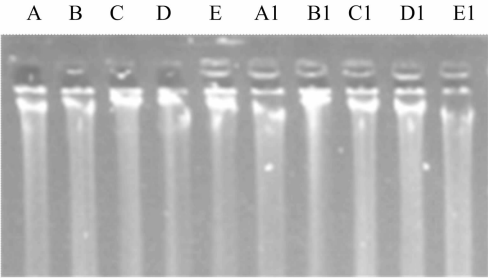
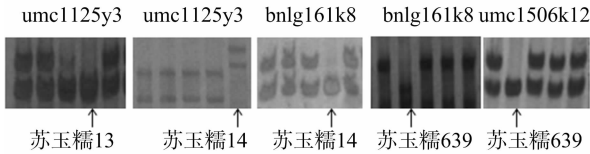


图1 糯玉米基因组DNA检测结果

2.2 品种内遗传一致性分析

20 对引物中有 umc1125y3、bnlg161k8、umc1506k12 等 3 对引物在品种内发生变异,均发生在抽检的苏玉糯 13、苏玉糯 14、苏玉糯 639 中,且都属于在 5 个单株检测重复中只发现 1 个不一致的情况(图 2)。20 对引物对 10 个糯玉米杂交种的 200 次扩增中,出现了共计 5 次品种内变异,占 2.5%,说明品种内变异较小,电泳谱带比较结果是可靠的。



5个泳道为同一品种的5个重复,箭头指示差异位点泳道  
图2 品种内差异位点

2.3 糯玉米 SSR 鉴定分析

对抽检的 5 个糯玉米杂交种和标准品种电泳谱带比较可知,抽检的苏玉糯 11 与标准品种相比有 11 个差异位点,占引物总数的 55%;苏玉糯 901 与标准品种相比有 7 个差异位点,占引物总数的 35%;苏玉糯 13 与标准品种相比有 6 个差异位点,占引物总数的 30%;苏玉糯 14 与标准品种相比有 9 个差异位点,占引物总数的 45%;苏玉糯 901 与标准品种有 6 个差异位点,占引物总数的 30%(表 1)。按照农业部颁布的行业标准 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》,可判定待检测的 5 个抽检样品与相应的标准品种为不同品种。

2.4 引物多态性分析

umc1545y2 在 5 个品种鉴定中均为差异位点(图 3), umc1335y5、umc2105k3、umc1705w1、umc1125y3 在 4 个品种中均检测到差异位点, umc2007y4、phi053k2、bnlg2305k4、bnlg1702k1 在 3 个品种中均检测到差异位点(表 1)。上述差异位点均在多个抽检品种与标准品种间检测到,说明这些位点多态性较高。

3 结论与讨论

SSR 分子标记为共显性遗传,反映的是具体 DNA 片段的大小,既不受组织器官及发育阶段的影响,也不受季节和环境

表 1 抽检 5 个糯玉米杂交种与相应标准品种差异位点

编号	引物名称	有无差异位点				
		A 与 A1	B 与 B2	C 与 C3	D 与 D1	E 与 E1
1	bnlg439w1					
2	umc1335y5	√		√	√	√
3	umc2007y4	√	√		√	
4	bnlg1940k7					
5	umc2105k3	√	√	√		√
6	phi053k2	√	√		√	
7	phi072k4					
8	bnlg2291k4					
9	umc1705w1	√		√	√	√
10	bnlg2305k4	√	√		√	
11	bnlg161k8	√	√			
12	bnlg1702k1	√	√		√	
13	umc1545y2	√	√	√	√	√
14	umc1125y3	√		√	√	√
15	bnlg240k1				√	
16	phi080k15					
17	phi065k9					
18	umc1492y13					
19	umc1432y6			√		√
20	umc1506k12	√				

注:“√”表示抽检糯玉米杂交种与标准品种有位点差异。

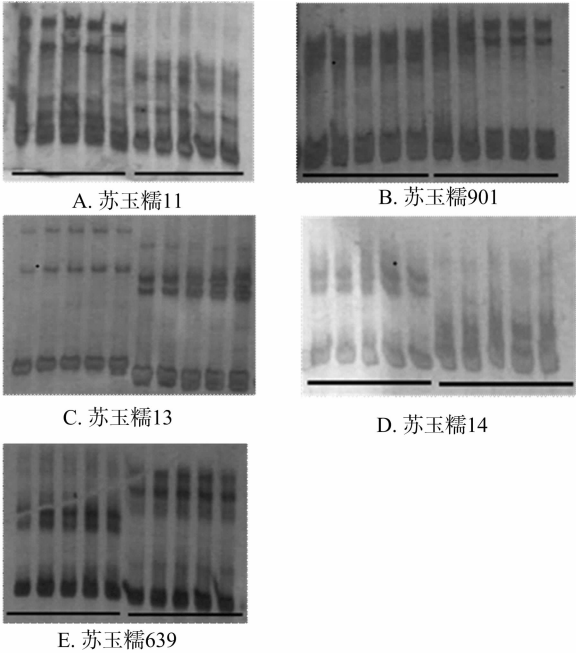


图3 umc1545y2 在 5 个糯玉米杂交种中的片段差异

因素的制约,与传统田间种植鉴定相比,是一种更加快速、准确鉴定品种真实性的方法,广泛应用于种质资源分析和农作物品种鉴定<sup>[3-7]</sup>。本研究采用 SSR 标记对市场上抽检的 5 份糯玉米品种进行鉴定,结果表明,抽检的 5 个糯玉米品种均与相应的标准品种不同,与田间鉴定结果一致,说明 SSR 标记鉴定结果可靠准确。

引物筛选是 SSR 标记鉴定品种真实性的关键,选用多态性高、染色体上分布均匀、稳定性好的引物可有效提高工作效率

李华勇,王艳平,王显生,等. 不同氮肥条件下水稻 DUS 测试性状表达的差异性[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):106-110.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.026

# 不同氮肥条件下水稻 DUS 测试性状表达的差异性

李华勇,王艳平,王显生,吴燕,沈奇

(江苏省农业科学院粮食作物研究所,江苏南京 210014)

**摘要:**为了研究不同氮肥用量对水稻 DUS 测试性状表达结果的影响,选取了 3 种不同类型的水稻品种,通过 4 种不同氮肥处理方案,依据《植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 水稻》规定的相关性状,研究水稻测试中不同类型性状田间表达的变化差异,为水稻 DUS 测试种植管理规范的制定提供理论依据。同时,通过探讨这些性状表达得是否稳定,为水稻 DUS 测试结果判定提供参考。

**关键词:**水稻;DUS 测试;性状表达;不同氮肥;差异性分析

**中图分类号:** S511.06 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0106-05

植株新品种特异性(distinctness)、一致性(uniformity)和稳定性(stability)测试(以下简称“DUS 测试”)植物新品种保护的技术审查,是保证植物新品种授权客观、公正和准确的基础。如何使植物新品种 DUS 测试性状在种植管理过程中得到完整、准确地表达,是进行 DUS 判定和品种真实性评价的重要科技基础<sup>[1-3]</sup>。水稻(*Oryza sativa*)是我国主要的粮食作物之一,也是我国目前植物新品种权申请量最大的作物之一,全国水稻种植面积约占粮食作物面积的 30%,产量接近粮食总产量的一半<sup>[4]</sup>。

收稿日期:2016-02-29

基金项目:江苏省农业科技自主创新资金[编号: CX(14)2001]。

作者简介:李华勇(1977—),男,江苏南京人,助理研究员,主要从事植物新品种 DUS 测试及指南研制工作。E-mail: lhy@jaas.ac.cn。

率、降低成本<sup>[7-8]</sup>。本研究采用农业部公布的 NY/T 1432—2014《玉米品种鉴定技术规程 SSR 标记法》中的前 20 对引物,这 20 个 SSR 位点的带型清晰、稳定性较好,平均分布在玉米的 10 条染色体上,其中有 9 对引物在至少 3 个糯玉米品种中检测出差异位点,说明这 9 对引物在糯玉米品种中多态性较好,在今后糯玉米品种鉴定中可优先采用,以减少工作量、降低成本。

由于剩余遗传效应作用,品种内变异普遍存在,品种内变异导致品种内不同个体之间重复带型不一致,在品种真实性鉴定中会干扰判断<sup>[3]</sup>。为避免糯玉米品种内产生遗传变异造成的误差,本研究对每份糯玉米杂交种均采用 5 个单株重复。结果表明,20 对引物只有 3 对引物发生品种内变异,且 5 个单株检测重复中只发现 1 个不一致情况,属于可控范围内。针对品种内重复性差的样品,则需要扩大检测样品的重复次数。

品种真实性鉴定作为种子生产和种子检验的重要环节,应得到种子管理部门的高度重视。SSR 标记因其多态性高、重复性强的特点已被农业部确定为品种真实性鉴定的有效方法。SSR 分子标记技术在种子管理中应充分发挥作用,一方面应用于市场糯玉米种子质量监督检查,以阻止套牌侵权品种上市流通,保障农民合法权益;另一方面应用于糯玉米

水稻 DUS 测试是通过评价品种的特异性、一致性和稳定性,为水稻新品种授权提供科学依据,在水稻 DUS 测试中,性状表达的准确与否直接影响其品种“三性”的科学判定。性状是 DUS 测试、审查的基础<sup>[5]</sup>,性状的观测结果是水稻 DUS 测试的重要组成部分,是水稻品种权审查、品种真实性评价、维权打假的重要依据。但是,性状的表达受栽培管理因素影响较大,特别是栽培管理措施中的施肥量不同会直接影响到其品种的田间真实表达。氮肥是影响水稻生长发育和产量最敏感的因素之一,在我国水稻高产栽培中,纯氮用量已达 200~350 kg/hm<sup>2</sup>,远高于发达国家约 150 kg/hm<sup>2</sup> 的水平<sup>[6]</sup>。前人对于玉米、番茄等作物在不同栽培模式下对其数量性状表达的影响都进行了相关研究<sup>[7-9]</sup>,并根据性状的表达差异的不同,提出了相应的对策与建议。本试验选取 3 种不同类型的水稻品种,在不同施氮量下,研究水稻品种测试性状表达

品种审定区域试验,以维护区试工作中的公正、公平,维护育种单位以及广大种子生产者的利益。

## 参考文献:

- [1] 李俊芳,张雪原,孙世贤,等. 国家玉米主产区预试品种的 SSR 分析 I. 预试品种的真实性和一致性评价[J]. 玉米科学,2006,14(6):38-42.
- [2] 王风格,赵久然,易红梅,等. DNA 指纹技术在玉米品种权保护中的应用[J]. 玉米科学,2009,17(6):136-139.
- [3] 彭锁堂,庄杰云,颜启传,等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定[J]. 中国水稻科学,2003,17(1):1-5.
- [4] 程本义,施勇峰,沈伟峰,等. 水稻品种 DNA 指纹检测技术体系及其应用[J]. 杂交水稻,2008,23(1):54-59.
- [5] 华蕾,袁筱萍,余汉勇,等. 我国水稻主栽品种 SSR 多样性的比较分析[J]. 中国水稻科学,2007,21(2):150-154.
- [6] 李新海,傅骏骏,张世煌,等. 利用 SSR 标记研究玉米自交系的遗传变异[J]. 中国农业科学,2000,33(2):1-9.
- [7] 赵静,张仁和,张兴华,等. 利用 SSR 技术构建陕西省主要玉米自交系的指纹图谱[J]. 玉米科学,2008,16(2):26-29.
- [8] 赵久然,王风格. 玉米品种 DNA 指纹鉴定技术研究与应用[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2009.