

# 玉米抗丝黑穗病基因 SSR 分析

邱红波, 彭忠华\*, 胡安龙, 韦贵芹 (贵州大学农学院, 贵州贵阳 550025)

**摘要** [目的] 筛选出能较好标记玉米抗丝黑穗病基因的 SSR 多态性引物。[方法] 以 5 个玉米品种为试材, 从玉米黄化苗提取基因组 DNA 后, 对提取 DNA 浓度和质量进行检测后, 选用 85 对引物进行抗丝黑穗病基因的 SSR 扩增。[结果] 16 对引物具有较好的多态性, 共扩增出 45 条多态性谱带, 其片段大小为 50~1300 bp。其中, 引物 BnlG1755 扩增出多态性谱带最多。引物 BnlG1246、BnlG1194 和 BnlG125 在抗病材料和感病材料中表现出明显差异。[结论] 引物 BnlG1246、BnlG1194 和 BnlG125 可作为分析玉米抗丝黑穗病基因 SSR 标记的引物。

**关键词** 玉米; SSR 分子标记技术; 丝黑穗病; 抗病基因; 引物

**中图分类号** S435.131.4\*2 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)08-3139-03

## SSR Analysis of Resistant Genes to Head Smut in Maize

QIU Hong-bo et al (College of Agronomy, Guizhou University, Guiyang, Guizhou, 550025)

**Abstract** [Objective] The research aimed to screen out SSR polymorphic primers that could better mark the resistance gene to head smut in maize. [Method] With 5 maize varieties as tested materials, genomic DNA was extracted from the etiolated corn seedlings of maize. After the concn. and quality of the extracted DNA was detected, 85 pairs of primers were selected to make SSR amplification on the resistance gene to head smut. [Result] Sixteen pairs of primers had better polymorphism and 45 polymorphic bands were amplified, with the fragment size of 50~1300 bp. Among them, the polymorphic bands amplified by primer BnlG1755 was most. Primers BnlG1246, BnlG1194 and BnlG125 showed an obvious difference between resistant materials and susceptible materials. [Conclusion] BnlG1246, BnlG1194 BnlG125 could be taken as the primers of analyzing the SSR markers for the resistance gene to head smut in maize.

**Key words** Maize; SSR molecular marker technology; Head smut; Disease resistance gene; Primer

玉米丝黑穗病自 20 世纪 70 年代后期逐渐成为影响我国玉米生产的主要病害, 主要分布于东北、华北及西部地区, 贵州主要发生在玉米主产区。防治玉米丝黑穗病最经济有效的途径是应用抗病育种。我国玉米育种者进行了大量的抗源筛选工作, 选育和推广一些抗病品种, 使该病得到初步控制。但自 20 世纪 90 年代以来, 由于玉米丝黑穗病菌的分化, 新的生理小种不断产生, 一般发病率在 7%~35%, 严重者达到 62%<sup>[1]</sup>, 影响了当地人民的生产、生活, 因此必须不断选育新的抗病品种, 才能使玉米产业不断发展。传统玉米抗丝黑穗病育种, 首先要筛选抗源, 然后通过杂交、回交、自交相结合育成一批抗性、配合力均好的自交系, 再通过组配才能得到抗丝黑穗品种。采用田间接种鉴定选择的方法, 必须对每一个后代进行田间接种, 选择农艺性状优良、抗丝黑穗病的品系。这就使得育种进程受到田间鉴定的限制<sup>[2]</sup>。分子标记技术的产生与应用, 为作物抗病育种开辟了新天地。该试验旨在利用 SSR 技术筛选出能较好标记玉米抗丝黑穗病基因的 SSR 多态性引物, 为加快玉米抗丝黑穗病育种研究进程提供参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 该试验使用的 DNA 是从供试的玉米幼苗嫩叶中提取, 试验所用玉米种子为贵州大学玉米所提供的 5 个不同玉米材料, 分别为 1(抗病母本 G<sub>182</sub>)、2(感病父本 P<sub>0</sub>)、3(亲本杂交 F<sub>1</sub>)、4(F<sub>2</sub> 抗池)、5(F<sub>2</sub> 感池)。其中, 母本为抗丝黑穗病自交系, 是旅系衍生系, 父本为感病材料, 亲本杂交一代 F<sub>1</sub> 为抗病材料, 在 F<sub>2</sub> 分离群体中选择抗病材料, 建立 F<sub>2</sub> 抗池, 感病材料建立 F<sub>2</sub> 感池。

**药品:** 引物由上海生物工程公司合成; Taq 酶及 dNTPs

等均购自于上海生物工程公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取。** 基因组 DNA 参照孙辉等<sup>[3]</sup>的方法提取并作适当改动。取 2 g 新鲜的玉米黄化苗在含有 0.75 ml CTAB 提取缓冲液(含有 100 mmol/L Tris-HCl pH 值 8.0, 50 mmol/L EDTA-Na<sub>2</sub> pH 值 8.0, 浓度 1%CTAB)的研钵中迅速研磨, 后转移至 1.5 ml 的离心管中, 65 °C 水浴 1 h, 其间颠倒几次。取出离心管, 待冷却至室温后加入等体积氯仿/异戊醇(24:1)混合液, 混匀并轻轻振荡 10 min, 室温下 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液转置新的离心管中, 将其滴加到有 2 倍体积预冷的无水乙醇中沉淀(以前是将 2 倍体积预冷的无水乙醇滴加到上清液中), 4 °C 下静置后用玻璃棒挑出 DNA, 用浓度 75%乙醇洗 1~2 次后干燥, 然后用无离子水溶解, -20 °C 下保存备用。

**1.2.2 DNA 质量检测 and 浓度测定。** 用紫外分光光度仪(UV2100 Spectrophotometer)测定 DNA 浓度, 然后用无离子水将 DNA 浓度分别调至 40 ng/μl, 取适量基因组 DNA, 用浓度 0.8%琼脂糖凝胶电泳检测其质量(以 40 ng/μl 的 DNA 为分子量 Marker)。

**1.2.3 引物筛选。** 以供试玉米材料的基因组 DNA 为模版, 选用上海生物工程公司合成的 85 对引物进行抗丝黑穗病基因的 SSR 分析。

**1.2.4 SSR 扩增反应。** 扩增反应溶液体积为 20 μl, 其中 1× buffer[10 mmol/L Tri-HCl (pH 值 8.8), 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, Nonidet P40 0.08%], 0.2 mmol/L dNTPs, 1U Taq DNA 聚合酶, 0.4 μmol/L SSR 引物, 20~50 ng 模板 DNA, 加无离子水至终体积 20 μl。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 3min; 94 °C 1 min, 55~60 °C 1 min, 72 °C 2 min, 预扩增 40 个循环; 72 °C 延伸 5 min; 最后在 4 °C 保存。PCR 扩增在 eppendorf 5331 型 PCR 仪上完成。

**1.2.5 扩增产物检测。** SSR 扩增反应结束后, 在扩增产物中

**基金项目** 贵州省科技计划项目(黔科合 2004NGY023)资助。

**作者简介** 邱红波(1978-), 女, 黑龙江伊春人, 硕士, 讲师, 从事玉米遗传育种及分子研究。\* 通讯作者。

**收稿日期** 2008-01-16

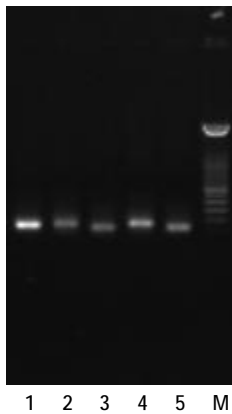
分别加入体系 0.08%的 Loading Buffer(浓度 40%蔗糖、0.2% 溴酚蓝),混合后在 0.8%琼脂糖凝胶(含 EB 500 ug/L)上 100 V 恒压电泳 1.0~1.5 h(电泳缓冲液为 1×TAE),经过 UVP 凝胶成像系统观察分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性引物筛选结果 SSR 分析结果表明,85 对引物中 16 对引物的多态性较好(表 1),并且该 16 对引物分布于玉米的 10 条染色体上共扩增出 45 条多态性谱带,变幅为 2~6 条,平均每个引物得到 2.81 条多态性谱带,片段大小介于 50~1 300 bp。引物 Bnlq1755 扩增出的多态性谱带最多,达到 6 个。部分扩增结果见图 1~3。

表 1 16 对 SSR 引物及其在玉米基因组中的图谱位置和重复种类  
Table 1 16 pairs of SSR primer and their position and repetition types in corn genome

编号 No.	SSR 引物 SSR primer	图谱位置 Position in gene map	重复种类 Repetition type
1	Phi053	3.05	ATAT(5)
2	Phi057	7.01	GCC
3	Phi374118	3.02	ACC
4	Phi001	1.03	AG
5	Bnlq278	5.05	
6	Bnlq125	2.02	
7	Bnlq439	1.03	
8	Bnlq2144	2.08	AG(32)
9	Bnlq1246	5.05	AG(17)
10	Bnlq1194	8.01	AG(33)
11	Nc130	5.00	AGC
12	Phi076	4.11	AGCGGG
13	Dμpssr12	1.08	AC(15)
14	Bnlq1755	4.05	AG(27)
15	Bnlq2123	1.11	AG(31)
16	Bnlq1041	1.06	AG(13)



注:1 为抗病母本 G<sub>18-2</sub>;2 为感病父本 P<sub>6</sub>;3 为亲本杂交 F<sub>1</sub>;4 为 F<sub>2</sub> 抗病池;5 为 F<sub>2</sub> 感池。下同。  
Note: 1. Disease resistance female parent G<sub>18-2</sub>; 2. Susceptible male parent P<sub>6</sub>; 3. Parent hybridization F<sub>1</sub>; 4. F<sub>2</sub> resistant bulk; 5. F<sub>2</sub> susceptible bulk. The same as follows.

图 1 Phi057 对试材的多态性扩增图谱

Fig. 1 Polymorphism amplified patterns of Phi057 against tested materials

2.2 SSR 扩增出多态性谱带分析 SSR 引物 Bnlq1246 和 Bnlq1194 对供试玉米材料进行 PCR 扩增得到的多态性图谱(图 4-5)表明,1、3、4 这 3 个抗病材料扩增出的多态性谱带位于同一条直线上,分子量约为 200 bp,较感病材料的扩增谱带分子量大。引物 Bnlq125 的多态性扩增图谱(图 6)表明,1、3、4 这 3 个抗病材料扩增出的多态性谱带位于同一条直线上,分子量约为 250 bp,较感病材料的扩增谱带分子

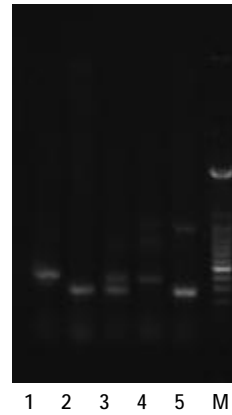


图 2 Bnlq278 对试材的多态性扩增图谱  
Fig. 2 Polymorphism amplified patterns of Bnlq278 against tested materials

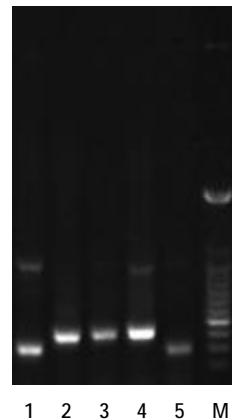


图 3 Bnlq1755 对试材的多态性扩增图谱  
Fig. 3 Polymorphism amplified patterns of Bnlq1755 against tested materials

量小。16 对多态性引物中引物 Bnlq1246、Bnlq1194 和 Bnlq125 在抗病材料(1、3、4)和感病材料(2、5)中表现出明显差异。因此,该引物能进一步作为玉米抗丝黑穗病基因 SSR 标记的分析引物,但还需要验证是否真正标记到了抗病基因。

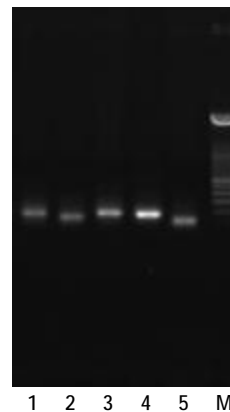


图 4 Bnlq1246 对试材的多态性扩增图谱  
Fig. 4 Polymorphism amplified patterns of Bnlq1246 against tested materials

3 讨论

3.1 SSR 反应体系条件的优化 SSR 标记技术以 PCR 技术为基础,优化后 PCR 反应系统为:扩增反应体系为 20 μl,其中 1×buffer[10 mmol/L Tri-HCl(pH 值 8.8),50 mmol/L KCl,2.0 mmol/L MgCl<sub>2</sub>,Nonidet P40 0.08%],0.2 mmol/L dNTPs,1 U Taq DNA 聚合酶,0.4 μmol/L SSR 引物,20~50 ng 模板 DNA。

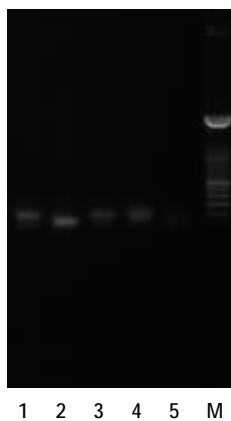


图 5 BnlG1194 对试材的多态性扩增图谱  
Fig. 5 Polymorphism amplified patterns of BnlG1194 against tested materials

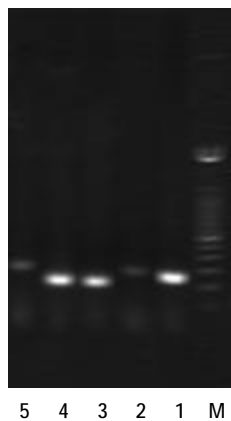


图 6 BnlG125 对试材的多态性扩增图谱  
Fig. 6 Polymorphism amplified patterns of BnlG125 against tested materials

PCR 反应程序为:94 ℃预变性 3 min;94 ℃1 min,55~60 ℃ 1 min,72 ℃ 2 min,预扩增 40 个循环;72 ℃延伸 5 min;最后在 4 ℃保存。PCR 扩增在 eppendorf 5331 型 PCR 仪上完成,获得了较为理想的效果。

**3.2 利用 SSR 分析玉米抗丝黑穗病基因** 由于所用材料、环境条件以及研究方法不同,研究结果不尽一致。但多数报道认为,玉米丝黑穗病的抗性属数量性状遗传。易受环境影响;同时受加性和显性、上位性效应控制,其中基因加性效应占主导,非加性效应作用较小,抗性能稳定遗传<sup>[4]</sup>。鉴于此,抗性基因片段的大小和数量决定着抗病的程度,所以利用 SSR 标记出玉米抗丝黑穗病基因的主效基因是关键,而筛选到标记该基因的 SSR 引物是前提。标记到玉米抗丝黑穗病基因,一方面可以筛选抗病材料,用于辅助选择育种,加快育种进程;另一方面,用特殊的限制内切酶来处理,截取符合要求的 DNA 片段,再用转基因技术将抗病基因导入感或高感材料中,选出能表达的受体细胞,进行分子克隆,即可获得高抗丝黑穗病材料,分子标记技术结合转基因技术。为拓宽玉米抗丝黑穗病种质基础提供一个新途径,也为玉米抗丝黑穗病育种开辟了新天地。

**参考文献**

[1] 晋齐鸣,李建平,张秀文,等.松辽平原玉米主要病虫害综合治理体系的研究[J].玉米科学,2000,8(2):84-88.  
[2] 李钥莹,董雪卉,许丽,等.玉米抗丝黑穗病基因 RAPD 分析[J].生物技术,2006,16(5):16-18.  
[3] 孙辉,刘志勇,李保云,等.利用 PCR 技术鉴别普通小麦 Glu-1 位点的某些等位基因[J].作物学报,2002,11(6):734-737.  
[4] 王振华,姜艳喜,王丽丰,等.玉米丝黑穗病的研究进展[J].玉米科学,2002,10(4):61-64.

(上接第 3138 页)

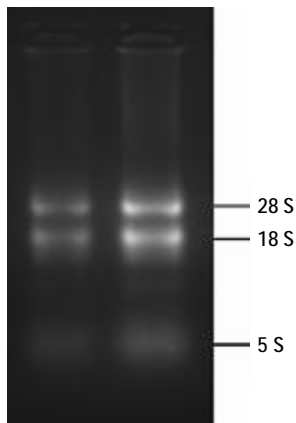


图 1 半夏叶片 RNA 凝胶电泳  
Fig. 1 RNA gel electrophoresis of Pinellia ternata (Thunb.) Berit leaves

18S 清晰可见,5S 稍有弥散(图 1),但在亮度上 28S 及 18S 差别不大,这可能是电泳过程中外源 RNA 酶降解所致。

**3 讨论**

提取完整的总 RNA 是植物分子生物学的基本实验技术之一,目前已经建立了多种 RNA 提取方法,如异硫氰酸胍法、苯酚法、LiCl-尿素法等,市场上也有不同的

RNA 提取试剂盒。总之,一种好的 RNA 提取方法要求 RNA 没有降解,同时还应该有较高的产量,特别是 mRNA

没有丢失,这是建立 cDNA 文库、扩增目的基因 cDNA 的关键。RNA 的提取除选择合适的方法外,在操作过程中还有很多事项需要注意:首先,材料的研磨及磨碎后的材料加入到提取液中动作要迅速,避免材料在研钵中解冻而遭 RNase 降解;其次,要把握好起始材料与提取液的比例,起始材料的加入不应该过多,也不宜太少,应该让材料在提取液中充分溶解,如果材料过多,核酸溶解就不充分,离心时就会与杂质一同沉淀丢失,得率低且 RNA 质量不高。笔者选用改进的 CTAB 法提取半夏叶片 RNA 有较高产量,纯度也较高,且经济实用,为半夏分子生物学的研究提供了方便。

**参考文献**

[1] 肖培根.新编中药志[M].北京:化学工业出版社,2002:372.  
[2] 薛建平,张爱民,盛玮,等.半夏人工种子贮藏技术的研究[J].中国中药杂志,2005,30(23):1820.  
[3] CHANG S,PURYEAR J,CAIRNEY J.A simple and efficient method for isolation RNA from pine tree [J].Plant Mol Biol Rep, 1993,11:113-116.  
[4] 林金科,开国银.茶树 RNA 的提取与鉴定[J].福建农林大学学报,2003,32(1):70-73.