

阮燕晔, 郭 瑞, 崔震海, 等. 利用 SSR 技术分析辽宁省 32 个骨干玉米自交系的遗传多样性[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(11): 29-32.

利用 SSR 技术分析辽宁省 32 个骨干玉米自交系的遗传多样性

阮燕晔, 郭 瑞, 崔震海, 张立军

(沈阳农业大学生物科学技术学院, 辽宁沈阳 110866)

摘要:利用简单序列重复(SSR)标记技术,选用 NY/T 1432—2007《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》的 20 对引物以及本实验室前期筛选的 7 对引物,对辽宁省 32 个骨干玉米自交系的血缘关系进行了分析。结果表明,27 对引物均具有多态性,共扩增出 125 个等位基因,每对引物检测到 3~10 个等位基因,平均为 4.63 个等位基因;其多态性信息量 PIC 值为 0.348 1(ϕ 051)~0.8645(umc0191),平均值为 0.624 7。非加权组平均法(UPGMA)聚类分析表明,32 个自交系被划分为 5 个类群,基本与系谱一致。对以 32 个自交系为父本、母本的 24 个杂交种进行杂种优势模式分析表明,瑞德×PB 杂种优势模式所占比例最高。

关键词:SSR;玉米自交系;多态性;聚类分析;辽宁省

中图分类号:S513.035.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2013)11-0029-04

在世界玉米主产区中,普遍存在玉米种质资源匮乏及资源遗传基础狭窄的问题^[1]。近年来在辽宁省玉米育种中,部分自交系被反复利用^[2],不仅不利于辽宁省玉米生产安全,也导致辽宁省种质资源血缘关系复杂,种质间的系谱关系不清楚,不利于后续育种工作进行。系统研究种质的遗传关系,划分杂种优势群和分析杂种优势模式是玉米育种的重要内容,分子标记技术是解决这些问题的有力工具。简单序列重复(SSR)技术是建立在 PCR 反应基础上的共显性遗传标记,具有简便、快捷、稳定、多态性高的特点,近年来得到了广泛应用^[3-6]。研究者利用 SSR 技术对多个省份的部分审定品种和骨干自交系进行了遗传多样性和指纹图谱方面的分析。王伟等构建了 2000 年以来贵州省审定的 48 个玉米杂交种及其亲本的 SSR 数字化指纹图谱,为玉米品种及其亲本的纯度和真实性鉴定以及知识产权保护提供了重要参考^[7-8]。王明泉等利用 SSR 技术对黑龙江省部分审定玉米品种亲本自交系进行了遗传多样性分析,结果表明黑龙江省推广品种的亲本自交系仍集中在兰卡斯特群和瑞德群两大杂种优势群^[9]。辽宁省是我国重要玉米种植区,肖木楫等对辽宁省玉米自交系进行了遗传多样性分析^[10],但并未涉及部分辽宁省重要自交系,如丹 988、辽 2379、辽 4584、辽 7990、辽 3180 等。另外,SSR 引物选择是确定自交系遗传多样性的重要因素。本研究对辽宁省 32 个骨干玉米自交系进行了遗传关系分析,以期对辽宁省玉米骨干自交系血缘关系鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取辽宁省玉米生产中具有代表性的 32 个骨干自交系,各自交系基本信息见表 1。本研究选用 NY/T 1432—2007《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》所指定的基本核心引物 20 对以及本实验室前期筛选的 SSR 引物 7 对,由大连宝生物公司合成。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 在玉米幼苗长到一叶一心时采集样品,采用试剂盒法(赛百盛公司生产)提取大量玉米基因组 DNA,用分光光度计检测 DNA 浓度和质量。将 DNA 浓度调至 10 ng/ μ L 备用。

1.2.2 SSR 扩增 PCR 反应总体积为 10 μ L: ddH₂O 6.1 μ L, 10× Buffer (mg^{2+}) 1.0 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 0.8 μ L, Taq (5 U/ μ L) 0.1 μ L, DNA (10 ng/ μ L) 1.0 μ L, Primer (10 μ mol/L) 0.5×2 μ L。PCR 反应程序:94℃下模板 DNA 预变性 5 min;94℃下模板 DNA 变性 40 s,60℃下引物与模板靶位点结合 35 s,72℃下引物沿模板延伸 45 s,共 30 个循环;72℃下终延伸 5 min,温度降至 4℃后取出^[11]。

1.2.3 电泳-银染 利用 8% 非变性聚丙烯酰胺凝胶对 PCR 产物进行电泳,电泳设备为伯乐 Powerpac HV 高压电源和北京六一 DYCZ-24A 电泳仪。恒定电压 200 V,电泳约 1.5 h。按照 CIMMYT 应用生物技术中心的程序进行银染。

1.2.4 数据统计分析 (1)SSR 产物银染结果,有条带的记为“1”,无条带的记为“0”,缺失的记为“9”,建立数据库。

(2)以简单配对参数计算遗传相似系数:

$$GS = m / (m + n)。$$

式中:GS 为遗传相似系数; m 为基因型间共有带数目; n 为差异条带数目。

(3)利用 NTSYS-PC version 2.10 软件分析数据,按照非加权组平均法(UPGMA)^[10]对自交系进行聚类分析。

收稿日期:2013-04-11

基金项目:国家自然科学基金(编号:31000673);辽宁省植物基因工程技术研究中心计划(编号:2010402005)。

作者简介:阮燕晔(1971—),男,安徽池州人,博士,副教授,从事植物生理研究。E-mail: yanyeruan@yahoo.com.cn。

通信作者:张立军,教授,从事植物生理与作物生物技术研究。E-mail: lijunzhang8@yahoo.com.cn。

表 1 玉米自交系名称及系谱

编号	自交系	来源	编号	自交系	来源
1	掖 478	沈 5003 × U8112	17	昌 7-2	黄早 4 × 维 54
2	掖 52106	矮金 526 × 掖 106	18	黄 C	黄小 162 × 自 330602/墨白
3	A801	丹 9042/(丹 9046 × 莫黄 9)	19	丹 340	旅大红骨
4	C8605-2	铁 7922 × 沈 5003	20	辽 3162	兰卡斯特
5	0201	未知	21	沈 137	国外杂交种二环系选系
6	郑 58	掖 478 改良系	22	Mo17	兰卡斯特
7	X178	含 P78599 种质	23	RX502	未知
8	中 106	未知	24	辽 2379	美国杂交种 EO2, EO3 选系
9	E28	旅大红骨	25	辽 4584	(5001/辽 8713) × (7922/5003)
10	丹 599	含 78599 种质	26	辽 7990	7922/9046
11	丹 9046	未知	27	辽 3180	美国杂交种 PN3180
12	丹 598	含 78599 种质	28	Q1261	K12 改良系
13	丹 988	含 78599 种质	29	辽 5088	美国杂交种 78479
14	K12	黄早 4 × 维春	30	丹 138	未知
15	A57	未知	31	沈 3336	铁 7922 × 沈 137
16	A6159	未知	32	沈 151	沈 2805 × 丹 340

(4)按 Smith 等^[12]的公式计算每个 SSR 位点的多态性信息量 (简称 PIC),即:

$$PIC = 1 - \sum P_i^2。$$

式中: P_i 为 i 位点的基因频率。

2 结果与分析

2.1 SSR 引物多态性分析

利用 27 对 SSR 引物对自交系进行扩增,均扩增出清晰条带。由表 2 可见,这 27 对引物分布于玉米 10 条染色体上,在 32 份自交系中共检测到 125 个多态性条带,每对引物检测到的多态性条带为 3~10 个,平均每对引物有 4.63 个多态性条带,即每个位点平均有等位基因数 4.63 个。多态性信息量

表 2 引物的多态性片段数目及多态性信息

编号	引物	染色体位置	片段数(个)	PIC 值	上游引物	下游引物
1	bnlg439	1.03	3	0.461 4	TTGACATCGCCATCTTGGTGACCA	TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGGAA
2	bnlg2331	1.11	5	0.673 9	TCTGATATCATAAAGGAGGACCG	GGAGCTTGCCTTTTTTAACA
3	bnlg125	2.02	4	0.696 2	GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG	GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
4	mmc0191	2.07	10	0.864 5	GGTGTTCAGTGTGAAAGGTTA	AAGATTTCCGCAAGGTTAAAC
5	umc2105	3.00	5	0.703 8	ACATACATAGGCTCCCTTTTTCCG	TCCCGTGACACTCTCTTTCTCTCT
6	bnlg1496	3.09	5	0.627 6	CTGGGCAGACAGCAACAGTA	AGCCAAAGACATGATGCTCC
7	phi072	4.00	4	0.366 7	ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT	GACAGCGCGCAAATGGATTGAAC
8	bnlg2291	4.06	3	0.575 7	CCTCTCGATGTTCTGAAGCC	GTCATAACCTTGCCTCCCAA
9	umc1705	5.03	5	0.692 1	ATCTCACGTACGGTAATGCAGACA	CATGACCTGATAAACCCCTCCTCTC
10	umc1225	5.08	4	0.663 3	CTAGCTCCGTGTGAGTGAGTGAGT	TTCTTCTTTCTTTCTCTGTGCAAC
11	bnlg161	6.00	7	0.747 7	GCTTTCGTGATACACACACATTTCA	ATGGAGCATGAGCTTGACATATT
12	phi299852	6.07	7	0.822 4	GATGTGGGTGCTACGAGCC	AGATCTCGGAGCTCGGCTA
13	bnlg1792	7.02	5	0.692 4	CGGGAATGAATAAGCCAAGA	GCGCTCCTTACCTTCTTTTA
14	phi116	7.06	3	0.510 6	GCATACGCCATGGATGGGA	TCCCTGCCGGGACTCCTG
15	umc1741	8.03	4	0.611 9	AGACGAACCCACCATCATCTTTC	CGCTTGGCATCTCCATGTATATCT
16	phi080	8.08	3	0.583 8	CACCCGATGCAACTTGCGTAGA	TCGTACGTTCCACGACATCAC
17	phi065	9.03	4	0.577 8	AGGGACAAATACGTGGAGACACAG	CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC
18	bnlg1191	9.07	5	0.677 7	AATCATGCGTAGGCGTAGCT	GCCAGAGGAAAAAGAAGGCT
19	umc2163	10.04	5	0.657 6	AAGCGGAATCTGAATCTTTGTTTC	GAAATTGCTGGGGTTCTCATTTTCT
20	bnlg1450	10.07	7	0.740 5	ACAGCTCTTCTTGGCATCGT	GACTTTGCTGGTCAGCTGGT
21	bnlg1671	1.10	7	0.774 3	TCACGATCAGCAAGCAATTC	CCCCACCAACCTTAGAGTCA
22	phi96100	2.01	3	0.549 9	AGGAGGACCCCACTCCTG	TTGCACGAGCCATCGTAT
23	bnlg1257	3.09	4	0.634 0	CGGACGATCTTATGCAAACA	ACGGTCTGCGACAGGATATT
24	umc1792	5.08	3	0.555 5	CATGGGACAGCAAGAGACACAG	ACCTTCATCACCTGCAACTACGAC
25	phi051	7.05	3	0.348 1	GGCGAAAGCGAACGACAACAATCTT	CGACATCGTCAGATTATATTGCAGACCA
26	phi022	9.03	4	0.573 0	TGCGCACCAAGCGACTGACC	GCGGGCGACGCTTCCAAAC
27	Phi054	10.03	3	0.485 3	AGAAAAGAGAGTGTGCAATTGTGATAGAG	AATGGTGCCTCGCACCAAG

注:1~20 号引物为 NY/T 1432—2007《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》指定的核心引物,21~27 号引物为本实验室筛选。

(PIC)的变化范围为 0.348 1($\phi i051$)~0.864 5($mmc0191$), 平均值为 0.624 7。

2.2 聚类结果

聚类结果如图 1 所示,32 份自交系可分为 5 个类群。第 1 个类群包括丹 340、沈 151、K12、Q1261、掖 52106、辽 2379、E28,属于旅大红骨血缘。K12、Q1261 与其系谱存在差异,系谱中 K12 应为唐四平头血缘,Q1261 为 K12 的改良系,也应为唐四平头血缘。第 2 个类群为中 106、昌 7-2,属于唐四平头血缘。第 3 个类群包括掖 478、C8605-2、0201、郑 58、A801、丹 9046、辽 4584、辽 7990、丹 138,属于瑞德群血缘。本研究将属于 PA 群的掖 478、C8605-2、0201、郑 58 划为瑞德

群,与前人研究结果^[13]一致。第 4 个类群为兰卡斯特血缘,包括 Mo17、沈 3336、RX502、辽 5088、A6159、辽 3180、辽 3162。从图 1 可以看出,Mo17 与本类群中其他自交系的遗传距离较远,原因是本研究中 Mo17 是在国内经过不断自交获得的,环境可能使其基因发生改变,导致它与本群中其他自交系遗传距离较远。第 5 个类群为 PB 血缘,包括丹 598、丹 599、A57、丹 988、沈 137、X178。丹 599、A57 遗传距离很近,但是在国家标准的引物中差异位点数为 2,在另外 7 对引物中差异位点数为 3,可以确定其为不同种质。此外,黄 C 作为综合亚群独立于其他群存在,聚类结果与系谱划分一致。

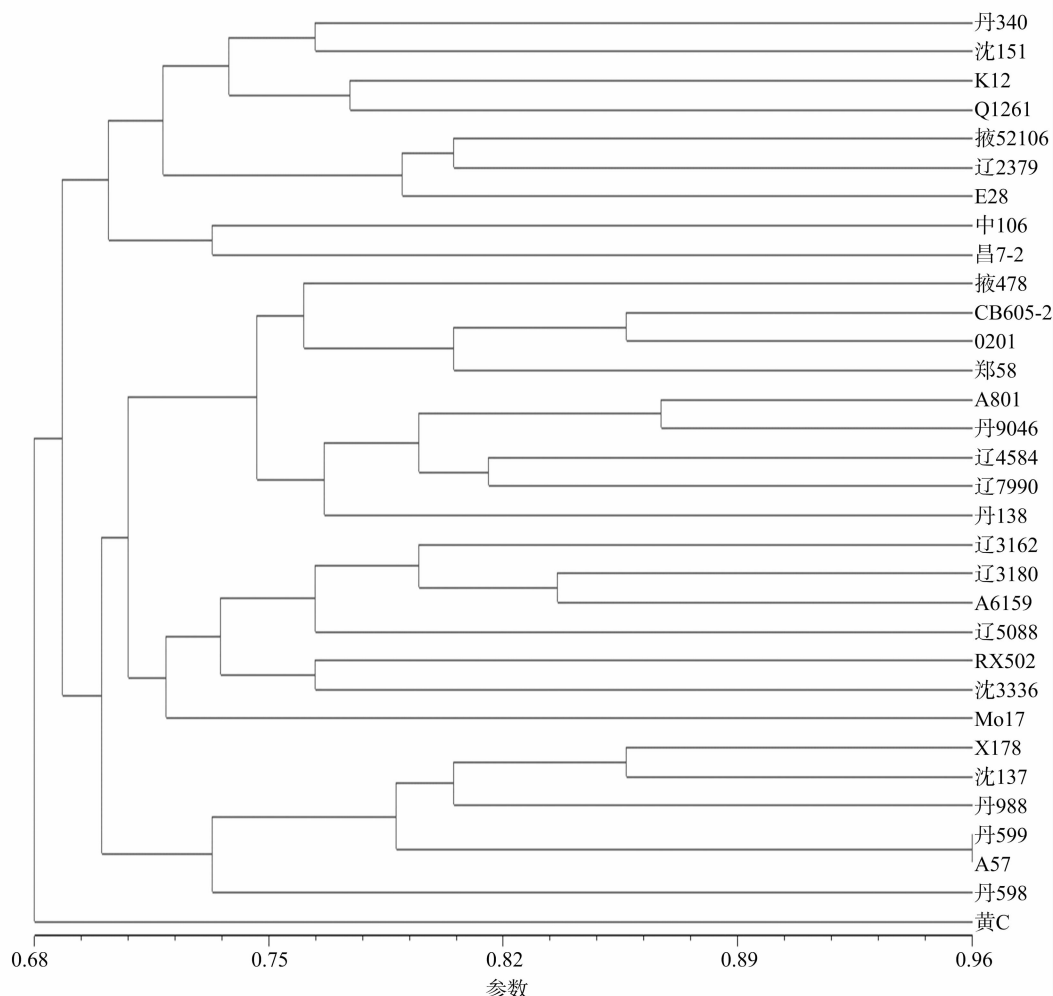


图1 基于 SSR 标记的辽宁省骨干玉米自交系聚类

2.3 杂交优势模式分析

如表 3 所示,以 32 个玉米自交系为父本、母本的 24 个杂交种的杂种优势模式可归纳为:旅大红骨群×瑞德群、瑞德群×PB 群、瑞德群×兰卡斯特群、瑞德群×唐四平头群、瑞德群×旅大红骨群、PB 群×旅大红骨群、PB 群×兰卡斯特群、唐四平头群×兰卡斯特群、旅大红骨群×PB 群、PB 群×黄 C、旅大红骨群×兰卡斯特群、PB 群×瑞德群等 12 种模式。从模式分析可以看出,瑞德群×PB 群出现的频率较高,包括 7 个杂交组合。沈单 16、沈单 10 的母本分别为 K12、Q1261,在系谱中 K12、Q1261 均为唐四平头血缘,根据本研究聚类结

果这 2 个自交系被归为旅大红骨血缘,因此沈单 16、沈单 10 的杂种优势模式被归为旅大红骨×PB。

3 结论与讨论

本研究所用 27 对引物的平均 PIC 值为 0.6247,与 Smith 等得到的 PIC 值(0.62)^[12]基本相同,其中 NY/T 1432—2007《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》指定的 20 对核心引物的平均 PIC 值为 0.647 4,本实验室筛选 7 对引物的平均 PIC 值为 0.560 0。国家标准所用引物的多态性高,表现出较强的鉴别不同自交系的能力。32 个玉米自交系中,除丹 599 和 A57 在

表 3 杂交种的杂种优势模式分析

品种名称	母本	父本	杂种优势模式
掖单 12	掖 52106	掖 478	旅大红骨 × 瑞德
东单 60	A801	丹 598	瑞德 × PB
东单 90	A801	A57	瑞德 × PB
东单 606	A801	A6159	瑞德 × 兰卡斯特
东单 335	A801	昌 7-2	瑞德 × 唐四平头
富友 1 号	C8605-2	丹 598	瑞德 × PB
富友 9 号	0201	丹 598	瑞德 × PB
郑单 958	郑 58	昌 7-2	瑞德 × 唐四平头
农大 108	X178	黄 C	PB × 黄 C
掖单 13	掖 478	丹 340	瑞德 × 旅大红骨
辽单 565	中 106	辽 3162	唐四平头 × 兰卡斯特
沈单 16	K12	沈 137	旅大红骨 × PB
沈单 10	Q1261	沈 137	旅大红骨 × PB
沈单 17	沈 151	沈 137	旅大红骨 × PB
辽单 145	辽 2379	丹 598	旅大红骨 × PB
辽单 43	辽 4584	辽 5088	瑞德 × 兰卡斯特
辽单 526	辽 7990	丹 598	瑞德 × PB
丹玉 78	郑 58	丹 598	瑞德 × PB
丹玉 13	E28	Mo17	旅大红骨 × 兰卡斯特
丹玉 24	丹 599	丹 340	PB × 旅大红骨
丹玉 26	丹 9046	丹 598	瑞德 × PB
丹玉 39	丹 598	C8605-2	PB × 瑞德
丹玉 29	丹 988	RX502	PB × 兰卡斯特
铁单 10	C8605-2	丹 340	瑞德 × 旅大红骨

20 个引物位点中差异数为 2 外,其他品种间的差异数都大于 2,基本可以确定这 32 个自交系无相同种质出现。其余 7 对引物虽然在多态性上小于国家标准所用引物,但是在区分个别自交系上具有独特优势,如丹 599、A57 在这 7 个位点中有 3 个位点不同,对这 2 个品种具有较强的鉴别能力。

SSR 技术在可靠性、可重复性、辨别率、标准化、经济性等方面较目前使用的其他分子标记技术有明显优势,使之成为鉴别玉米种质和分析血缘关系比较理想的方法^[12]。本研究自交系血缘聚类划分结果与实际系谱基本一致,个别自交系存在出入,如 K12 与肖木辑等的研究结果^[10]不同,其原因可能有:(1)由于电泳条带位置相近,肉眼观察容易出现鉴别误差;(2)自然突变的积累,即使对于严格自交的自交系也难免产生一定变化。针对上述问题,笔者认为应在以下几方面进行改进:(1)采用更方便、有效的自动检测技术,如荧光 SSR 检测技术,数字化统计有助于消除人为读取带来的误差^[14];(2)建立辽宁省玉米种质资源库,用于保存和管理该省重要的玉米自交系,供研究者使用。利用 SSR 分子标记划分玉米杂种优势群是可行的,但是仍须结合数量遗传分析、配合力分析、系谱分析、育种家实践经验才能得出更加准确的结果^[15]。

聚类结果显示,本研究涉及的 24 个杂交种均为杂种优势类群间的杂交组合,主要杂种优势模式为瑞德 × PB,而肖木

辑等提出的杂种优势模式为 PA × 旅大红骨^[10],可能是由于近年来品种更替,PB 杂种优势群在辽宁省育种实践中体现出更多优势。PB 群是我国育种家在美国杂交种 P78599 基础上选育出的二环系或其改良系。P78599 具有抗病性强、耐逆性强、品质优良、保绿性好等特点,被改良和利用后取得了良好效果^[16]。PB 种质在辽宁省被成功应用,显示了引进国外优良种质、拓宽玉米育种遗传基础对该省玉米育种的重要作用,同时还要加强对本地优秀种质的研究、改良、利用。

参考文献:

[1] 杨沫. 辽宁玉米品种科技创新现状与建议[J]. 农业科技与装备,2011(2):11-13.

[2] 王俊卿,哈娟. 辽宁玉米育种现状和几个令人思考的问题[J]. 辽宁农业科学,2000(2):26-28.

[3] 石欣,李亚,杨如同,等. 中国楸树(*Catalpa bungei* C. A. Mey)种质资源遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 江苏农业学报,2011,27(3):634-639.

[4] 曾维英,梁江,陈渊,等. 广西野生大豆 SSR 标记的遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2012,40(3):22-25.

[5] 刘鹏飞,赵琛,王晓明. SSR 分子标记在玉米遗传育种中应用的进展[J]. 仲恺农业工程学院学报,2009,22(3):65-70.

[6] 周宁宁,张颢,王其刚,等. 峨眉蔷薇居群遗传多样性的 SSR 分析[J]. 江苏农业科学,2012,40(1):33-36.

[7] 王伟,杨文鹏,张文龙,等. 贵州 48 个玉米杂交种及其亲本 SSR 指纹图谱的构建与分析[J]. 贵州农业科学,2009,37(11):1-8,14.

[8] 刘丽君,张丹,薛林,等. 基于 SSR 标记的江苏沿江地区糯玉米种质资源遗传多样性研究[J]. 江苏农业学报,2011,27(4):723-729.

[9] 王明泉,苏俊,李春霞,等. 黑龙江省部分审定玉米品种亲本自交系的遗传多样性分析[J]. 中国农学通报,2009,25(22):274-279.

[10] 肖木辑,李明顺,孙有位,等. 辽宁省主要玉米自交系的 SSR 遗传多样性分析[J]. 玉米科学,2006,14(1):33-36.

[11] NY/T 1432—2007 玉米品种鉴定 DNA 指纹方法[S]. 北京:中国标准出版社,2007.

[12] Smith O S, Wall S J, Senior M L, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize(*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree[J]. Theoretical and Applied Genetics,1997,95(1/2):163-173.

[13] 丰光,李妍妍,景希强,等. 中国不同时期玉米自交系聚类及杂优模式分析[J]. 杂粮作物,2010,30(2):63-67.

[14] 高玉倩. 吉林省玉米新品种 SSR 标记指纹数据库的构建及其分析[D]. 长春:吉林农业大学,2011:8-10.

[15] 姜敏,刘欣芳,王贺,等. 利用 SSR 标记划分辽宁省部分骨干玉米自交系的杂种优势群[J]. 沈阳农业大学学报,2010,41(1):8-12.

[16] 高翔,王进,彭忠华,等. 国外玉米种质 P78599 的杂种优势利用模式初探[J]. 作物杂志,2004(6):46-50.