

杨亚桐,董安忆,刘松涛,等. 基于 SSR 分子标记的糯玉米遗传多样性研究[J]. 江苏农业科学,2020,48(2):83-86.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2020.02.014

# 基于 SSR 分子标记的糯玉米遗传多样性研究

杨亚桐,董安忆,刘松涛,Zenda Tinashe,段会军

(河北农业大学/华北作物种质资源研究与利用教育部重点实验室,河北保定 071001)

**摘要:**为明确糯玉米自交系间的亲缘关系,利用 19 对简单重复序列(SSR)标记对 32 份糯玉米自交系进行遗传多样性分析,共检测到 80 个等位基因变异,每个位点可检测到 2~7 个等位基因变异,平均每个位点检测到 4.21 个。通过 NTSYS 聚类分析方法,在遗传相似系数为 0.53 处将 32 份糯玉米自交系划分为 6 个类群,分别包含 3 份、2 份、11 份、11 份、2 份和 3 份,其中亲缘关系较近的白糯 6 和突变体 N17 聚在了一起,3 个杂交种(郑黄糯 2 号、石彩糯和京科糯)的父母本被划分在不同的类群中,进一步从分子水平上揭示了亲本种质的遗传差异与玉米杂种优势的关系,为玉米育种和改良奠定了理论基础。

**关键词:**糯玉米;SSR;遗传多样性;聚类分析

**中图分类号:** S513.032 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2020)02-0083-04

糯玉米(*Zea mays* L. var. *ceratina* Kulesh)是玉米属的一个亚种<sup>[1]</sup>,是普通玉米第 9 染色体短臂上的 *Wx* 基因发生隐性突变形成的一种蒸煮后呈糯性的突变体<sup>[2-3]</sup>,由于糯玉米籽粒干燥后胚乳呈角质不透明、无光泽的蜡质状,所以又被称作蜡质玉米<sup>[4]</sup>。根据糯玉米籽粒的颜色可以分为:白糯、黄糯、紫糯、黑糯以及彩糯等,其中白糯和黄糯较为常见<sup>[5]</sup>。糯玉米具有富含支链淀粉<sup>[6]</sup>、营养丰富和适口性良好等优良特性,现已成为深受人们欢迎的食品和工业原料,具有较高的经济价值。

SSR(simple sequence repeats,简单重复序列)又称为微卫星 DNA<sup>[7]</sup>,是共显性分子标记,是建立在 PCR(Polymerase chain reaction,聚合酶链式反应)基础之上的一种遗传标记,具有很高的多态性和覆盖率,测得结果的稳定性和重复性比较好,试验操作程序简单,对 DNA 的数量和纯度要求较低<sup>[8]</sup>。国内外研究学者在玉米遗传多样性方面做了大量的研究工作,李锐等利用 SSR 技术对来源于 144 份甜玉米群体的 40 个位点进行了分析,共检测到 343 个等位变异,每对引物测出 4-17 个等位变异,平均 8.

58 个,SSR 聚类分析将 144 份甜玉米群体划为 7 个类群<sup>[9]</sup>;谷静丛利用 28 对 SSR 引物对 110 份普通玉米自交系进行遗传多样性分析,将其划分为六大类群,19 个亚类群<sup>[10]</sup>;Warburton 等<sup>[11]</sup>、Reif 等<sup>[12]</sup>的研究结果证实了利用 SSR 标记进行玉米遗传多样性及杂种优势群划分的可行性。

尽管 SSR 分子标记较普遍地应用于植物的遗传多样性研究上,但在糯玉米种质资源中的研究报道比较少。本研究利用 SSR 分子标记对 32 份糯玉米自交系进行遗传多样性分析,确定供试糯玉米自交系间的遗传背景差异,为糯玉米优良品种选育和杂种优势模式构建提供研究基础和理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料选自河北农业大学鲜食玉米课题组选育的 26 份糯玉米自交系,编号为 N1、N2、N3、N4、N5、N6、N7、N8、N9、N10、N11、N12、N13、N14、N15、N16、N17(白糯 6 突变体)、N18、N19(石白糯 1 号)、N20、N21、N22、N23、N24、N25、N26 和引进的国审糯玉米品种郑黄糯 2 号父母本(郑黄糯 04、郑黄糯 03)、石彩糯父母本(石糯 1 号、石糯 2 号)及京科糯父母本(白糯 6、京糯 6)。

### 1.2 方法

1.2.1 用 CTAB 法提取玉米叶片基因组 DNA 将玉米种子浸泡 1 夜,播种(每个品种播 3 粒);待玉米长到 3~4 叶时取叶提取玉米基因组 DNA。具体

收稿日期:2019-01-14

基金项目:河北省现代农业产业技术体系玉米产业创新团队建设  
项目(编号:HBCT2018020207)。

作者简介:杨亚桐(1994—),男,河北河间人,硕士研究生,主要从事  
作物遗传资源与利用研究。E-mail:1539245869@qq.com。

通信作者:段会军,博士,教授,主要从事作物遗传资源与利用研究。  
E-mail:hjduan@hebau.edu.cn。

提取步骤:(1)将无水乙醇放入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中预冷,CTAB 放入 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中预热 $1\text{ h}$ 。(2)取新鲜玉米叶片加入适量已预热好的 CTAB 中研磨,分别装入 $1.5\text{ mL}$ 离心管中,放入 $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中水浴 $60\sim 75\text{ min}$ 。(3)从水浴锅中取出,加入等体积的氯仿异戊醇( $24:1$ )。使用摇床摇晃或用手上下翻转 $20\text{ min}$ 。(4)放入离心机中, $10\ 000\text{ r/min}$ 离心 $10\text{ min}$ 。(5)取上清液至新离心管中,加入等体积氯仿异戊醇,摇晃 $15\text{ min}$ 。放入离心机中, $10\ 000\text{ r/min}$ 离心 $10\text{ min}$ 。(6)取上清液至新的离心管中,加入 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷好的无水乙醇至 $1.5\text{ mL}$ ,缓缓摇晃,出

现白色絮状沉淀(DNA),放入冰箱 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中冷却 $5\text{ min}$ 。(7)从冰箱中取出 DNA,放入离心机中离心, $10\ 000\text{ r/min}$ , $10\text{ min}$ ,弃上清液。(8)加入 $75\%$ 乙醇( $75\text{ mL }95\%$ 乙醇+ $20\text{ mL}$ 蒸馏水) $70\text{ }\mu\text{L}$ ,将 DNA 弹起,摇晃 $10\text{ min}$ ,充分洗涤 DNA,放入离心机中 $10\ 000\text{ r/min}$ 离心 $2\sim 3\text{ min}$ 。弃上清,共洗脱 $3$ 次。(9)将洗脱好的 DNA 开盖晾干,晾 $1$ 夜即可,第 $2$ 天可加去离子水溶解( $100\text{ }\mu\text{L}$ )。(10)测量 DNA 浓度(放 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存)。

1.2.2 SSR 引物 选用 $19$ 对 SSR 引物(表 1),由北京天一辉远生物科技有限公司合成。

表 1 19 对 SSR 引物

| 序号 | 正向引物名称      | 正向引物序列(5'→3')                | 反向引物名称      | 反向引物序列(5'→3')                 |
|----|-------------|------------------------------|-------------|-------------------------------|
| 1  | bnlg439 F   | TTGACATCGCCATCTFTGGTGACCA    | bnlg439 R   | TCTTAATGCCATCGTACGAAGTTGTGGAA |
| 2  | bnlg2331 F  | TCTGATATCATAAAGGAGGACCCG     | bnlg2331 R  | GGAGCTTGGCGTTTTTAAACA         |
| 3  | bnlg125 F   | GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG        | bnlg125 R   | GAAATGGGACAGAGACAGACAAT       |
| 4  | mmc0191 F   | GGTGTTCAGTGTGAAAGGTTA        | mmc0191 R   | AAGATTTCCGCAAGGTTAAAC         |
| 5  | umc2105 F   | ACATACATAGGCTCCCTTTTTCGG     | umc2105 R   | TCCCGTGACACTCTCTTCTCTCT       |
| 6  | bnlg1496 F  | CTGGGCAGACAGCAACACTA         | bnlg1496 R  | AGCCAAAGACATGATGGTCC          |
| 7  | phi072 F    | ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT | phi072 R    | GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT      |
| 8  | bnlg2291 F  | CCTCTCGATGTTCTGAAGCC         | bnlg2291 R  | GTCATAACCTTGCCCTCCCAA         |
| 9  | umc1225 F   | CTAGCTCCGTGTGAGTGAGTGACT     | umc1225 R   | TTCCTTCTTTTCTTCTGTGCAAC       |
| 10 | bnlg161 F   | GCTTTCGTACATACACACATTCA      | bnlg161 R   | ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT       |
| 11 | phi299852 F | GATGTGGGTGCTACGAGCC          | phi299852 R | AGATCTCGGAGCTCGGCTA           |
| 12 | bnlg1792 F  | CGGGAATGAATAAGCCAAGA         | bnlg1792 R  | GCGCTCCTTCACCTTCTTTA          |
| 13 | phi116 F    | GCATACGGCCATGGATGGGA         | phi116 R    | TCCCTGCCGGGACTCCTG            |
| 14 | umc1741 F   | AGAGGAACCCACCATCATCTTTC      | umc1741 R   | CGCTTGGCATCTCCATGTATATCT      |
| 15 | phi080 F    | CACCCGATGCAACTTGGCTAGA       | phi080 R    | TCGTACAGTTCACGACATCAC         |
| 16 | phi065 F    | AGGGACAAATACGTGGAGACACAG     | phi065 R    | CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC      |
| 17 | bnlg1191 F  | AATCATGCGTAGGCGTAGCT         | bnlg1191 R  | GCCAGAGGAAAAAGAAGGCT          |
| 18 | umc2163 F   | AAGCGGGAATCTGAATCTTTGTTC     | umc2163 R   | GAAATGTGCGGGTTCTCATTTC        |
| 19 | bnlg1450 F  | ACAGCTCTTCTTGGCATCGT         | bnlg1450 R  | GACTTTGTGCTCAGCTGGT           |

1.2.3 PCR 反应  $20\text{ }\mu\text{L}$  PCR 反应体系如下: cDNA  $2.0\text{ }\mu\text{L}$ ; Buffer  $2.0\text{ }\mu\text{L}$ ; 上下游引物各 $1.0\text{ }\mu\text{L}$ ; Taq DNA Polymerase  $0.2\text{ }\mu\text{L}$ ; dNTP  $1.6\text{ }\mu\text{L}$ ; ddH<sub>2</sub>O  $12.2\text{ }\mu\text{L}$ 。体系混合均匀后加 $1$ 小滴矿物油(全过程在冰上进行)。

PCR 程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 $5\text{ min}$ ;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 $40\text{ s}$ ,  $X\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火 $35\text{ s}$ ,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $45\text{ s}$ ,  $30$ 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 $5\text{ min}$ 。 $10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保温。注意  $X\text{ }^{\circ}\text{C}$ 退火,具体退火温度参考引物  $T_m$  值;扩增完成后,放入冰箱 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存。

1.2.4 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 在每个 DNA 体系中加入 $2\text{ }\mu\text{L}$ 的 Loading buffer, 磕打混匀后,放于冰箱 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 中保存。(1)清洗玻璃板:用洗洁精将玻璃板在水龙头下冲洗干净,再用蒸馏水洗净,晾干。(2)封琼脂糖胶:待玻璃板晾干后,组装,用 $1\%$

琼脂糖封底缝。开始配制琼脂糖( $0.4\text{ g}$ 琼脂糖+ $40\text{ mL}$ 去离子水),在微波炉里加热至液体呈透明状时取出,晾至 $45\text{ }^{\circ}\text{C}$ 左右时,用注射器吸取琼脂糖均匀注射到 $2$ 个玻璃板底部,封好。(3)晾至琼脂糖凝胶颜色为白色时,安装电泳槽。(4)非变性聚丙烯酰胺凝胶的配制:将 $40\text{ mL}$ 的 $10\%$  Acrylamide 胶贮存液加到锥形瓶中。灌胶前加入 $560\text{ }\mu\text{L}$   $10\%$  过硫酸铵, $25\text{ }\mu\text{L}$  TEMED,并迅速混匀。(5)灌胶:制胶后迅速混匀开始灌胶,把胶沿玻璃板边缘缓慢匀速地灌进,在灌入的过程中可以轻轻敲打防止出现气泡。双手分别拿梳子的三分之一处平行插入。(6)将电泳槽翻转 $90^{\circ}$ 放置,使其聚合至少 $40\text{ min}$ 。(7)点样:将电泳槽放正,倒入 $1\times$  TAE 缓冲液没过较低的玻璃板上端,向上垂直拔出梳子,若有气泡则先吹赶气泡。在点样孔中点样 $2\text{ }\mu\text{L}$ ,其中 Marker

点 1  $\mu\text{L}$  即可。(8)电泳:连接电泳仪,设置(300 V, 200 mA, 100 W),恒功率电泳至溴酚蓝跑到胶板底部停止电泳。(9)电泳结束后,倒出缓冲液,卸下电泳装置,取出胶片,用去离子水漂洗 1 min。(10)银染:将胶放入刚配制好的银染液(0.6 g  $\text{AgNO}_3$  + 300 mL 去离子水)中,轻轻摇晃染色 1 min,倒出银染液,用去离子水洗涤 30 s,洗涤 2 次。(11)显影:将胶放入显影液(6 g  $\text{NaOH}$  + 400 mL 去离子水 + 4 mL 甲醛)中,摇晃至出现清晰的条带,取出,用去离子水洗 2 次,每次 20 s。(12)保存并拍照。

## 2 数据处理

根据 DNA 的 SSR 扩增图谱结果,建立 SSR 的 0 到 1 数据库,即在同一引物的 SSR 扩增产物的同一迁移率位置上,有带的记为 1,无带的记为 0。最后

M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32

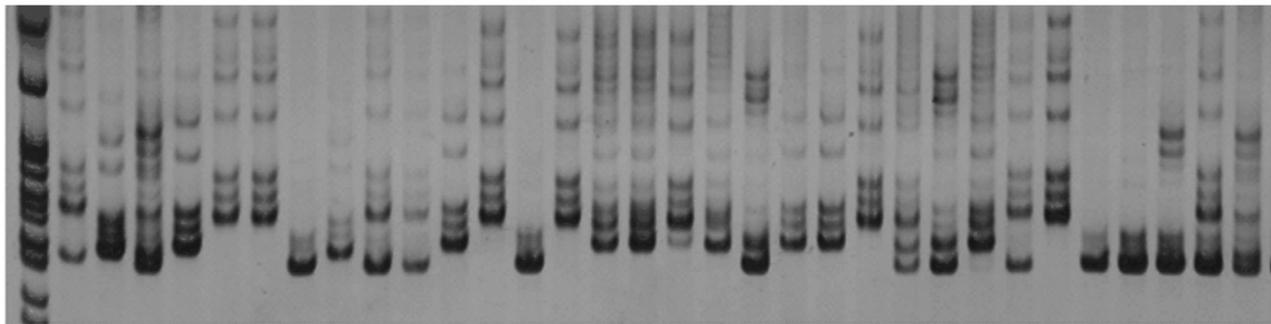


图1 引物11的 SSR 电泳图谱

## 3.3 聚类分析

聚类分析树状图结果如图 2 所示,在相似系数为 0.53 处可将 32 份糯玉米自交系划分为 VI 类。第 I 类群包括 N15、N11 和 N10;第 II 类群包括 N1 和石糯 1 号;第 III 类群包括 N8、N9、N13、N16、N23、N24、郑黄糯 03、N20、N22、白糯 6 和 N17;第 IV 类群包括 N2、N3、N4、N12、N6、N14、郑黄糯 04、N21、京糯 6、N26 和 N25;第 V 类群包括 N5 和 N7;第 VI 类群包括 N18、石糯 2 号和 N19。

## 4 讨论

近年来,分子标记技术发展迅速,这在分子水平上研究玉米的遗传多样性提供了新的手段<sup>[13]</sup>。相对于 SSR 分子标记技术<sup>[14]</sup>,RFLP (restriction fragment length polymorphism, 限制性片段长度多态性) 试验操作繁琐,检测周期长,成本高昂<sup>[15]</sup>;RAPD (random amplified polymorphism DNA, 随机扩增多态性) 的 PCR 退火温度相对较低,重复性和稳定性较

在 NTSYS 软件中进行聚类分析。

## 3 结果与分析

### 3.1 扩增结果分析

利用 19 对 SSR 引物对 32 个糯玉米自交系进行 PCR 反应,扩增出的条带清晰而稳定(图 1),共检测到 80 个等位基因位点,每对 SSR 引物检测出的等位基因数为 2~7 个,平均每个 SSR 位点检测出的等位基因数为 4.21 个。

### 3.2 基于 SSR 分子标记的遗传多样性分析

本研究根据 UPGMA 方法,得出 32 份糯玉米自交系间的遗传相似系数,其变化范围在 0.53~0.83,平均值为 0.68,说明其遗传多样性不明显,遗传基础相对狭窄。

差<sup>[16]</sup>。本研究利用 19 对 SSR 引物对 32 个糯玉米自交系进行 PCR 扩增,共检测到 80 个等位基因变异,每个位点可检测到等位基因变异为 2~7 个,平均每个检测位点检测到的等位基因数为 4.21 个,扩增条带清晰而稳定,较好地揭示了参试糯玉米自交系的遗传多样性,与孟强等的研究结果<sup>[17-18]</sup> 基本一致。由于采用不同数量的分子标记会影响遗传多样性分析结果的准确性,因此利用覆盖全基因组、高密度的分子标记进行种质资源的遗传多样性分析,可避免遗传信息的低估,在今后的玉米遗传育种实践中,应利用先进的生物技术发掘更多的多态性高的标记。

本试验根据 UPGMA 方法,得出 32 份糯玉米自交系间的遗传相似系数,其变化范围在 0.53~0.83,平均值为 0.68,说明其遗传多样性不明显,遗传基础相对狭窄,这与选取的材料亲缘关系相近有关。所以,在今后的玉米遗传育种实践中,应加强糯玉米种质资源的收集,拓宽糯玉米种质资源的遗

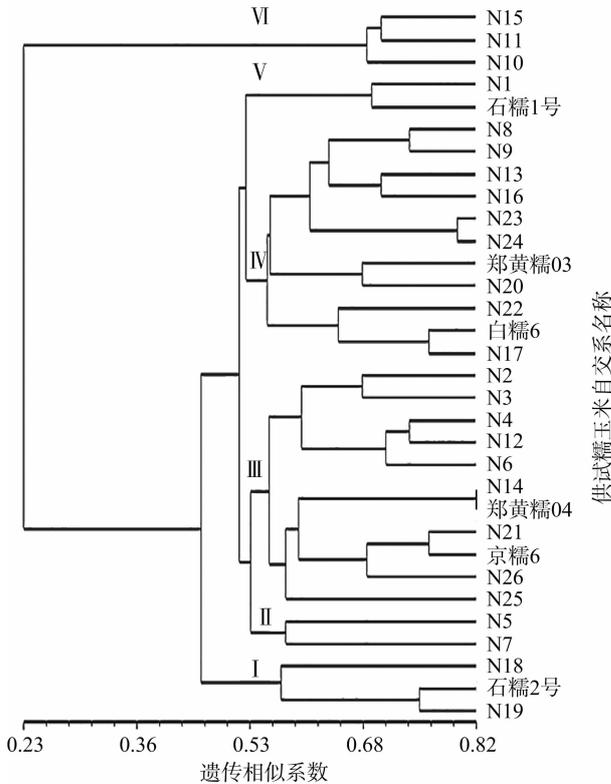


图2 32个糯玉米自交系聚类分析结果

传多样性。

本研究利用聚类分析方法将 32 份供试糯玉米自交系分为 VI 类,其中石糯 2 号与 N19 来源于同一地区,亲缘关系相近,在树状图中被分为一类;白糯 6 与其突变体 N17 被分到第 III 类群,与遗传系谱分析一致,也间接表明本研究结果的真实可靠;郑黄糯 2 号父母本、石彩糯父母本及京科糯父母本均被划分到不同类群,进一步从分子水平上揭示了亲本种质的遗传差异与玉米杂种优势的关系,为玉米育种和改良奠定了理论基础。

参考文献:

[1] 卢媛,艾为大,韩晴,等. 糯玉米自交系 SSR 标记遗传多样性及群体遗传结构分析[J]. 作物学报,2019,45(2):214-224.

[2] Collins, G. N. A new type of Indian corn from China[J]. Bureau of Plant Industry, 1909, 161: 1-30.

[3] 鲍坚东. 中国糯玉米起源与育种选择分子机制[D]. 杭州:浙江大学, 2011.

[4] 李欣欣. 蜡质玉米变性淀粉的制备及其应用研究[D]. 长春:吉林大学, 2013.

[5] 田蜜. 糯玉米配合力和杂种优势的分析[D]. 长春:吉林农业大学, 2017.

[6] 邹春华,徐勋志,陈同良. 东北地区糯玉米高效栽培技术[J]. 吉林蔬菜, 2015, (11): 6-7.

[7] Kantety R V, La R M, Matthews D E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 48 (5/6): 501-510.

[8] 蒋思霞,倪正斌,印志同,等. 糯玉米自交系遗传多样性及其产量、农艺性状与 SSR 分子标记的关联研究[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(6): 3212-3217, 3283.

[9] 李锐,白建荣,王秀红,等. 144 份甜玉米群体的遗传多样性分析[J]. 作物杂志, 2018(2): 17-24.

[10] 谷静丛. 110 份玉米自交系遗传多样性分析[D]. 天津:天津农学院, 2015.

[11] Warburton M L, Xianchun X, Crossa J, et al. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods [J]. Crop Science, 2002, 42(6): 1832.

[12] Reif J C, Melchinger A E, Xia X C, et al. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize populations [J]. Crop Science, 2003, 43(4): 1275.

[13] 杨文鹏,关琦,杨留启,等. 贵州 70 份玉米自交系的 SSR 标记遗传多样性及其杂种优势群分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 241-248.

[14] 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.

[15] 程宇坤. 山西省糯玉米自交系的遗传多样性分析及类群划分[D]. 太原:山西大学, 2012.

[16] 胡建广,祁喜涛,李余良. RAPD 技术应用于超甜玉米种子鉴定[J]. 中国农学通报, 2002(6): 25-27.

[17] 孟强. 糯玉米种质 SSR 标记遗传分析及品质性状评价[D]. 长春:吉林农业大学, 2014.

[18] 邢政. 东北地区主要糯玉米自交系聚类分析及杂种优势的利用[D]. 长春:吉林农业大学, 2017.