

文章编号: 1005-0906(2009)04-0024-05

新选优良玉米自交系 SSR 遗传多样性分析

李丽华¹, 魏 昕¹, 潘光堂², 唐保军¹, 丁 勇¹, 赵发欣¹

(1. 河南省农业科学院粮食作物研究所, 郑州 450002; 2. 四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014)

摘 要: 利用 SSR 标记技术研究了 59 份新选玉米自交系的遗传多样性, 用 58 对 SSR 引物共检测出 681 个等位基因变异, 每对引物检测到等位基因 2 ~ 25 个, 平均为 11.7 个。聚类结果表明, 大部分玉米自交系聚到 4 大常见类群, 其他少部分材料形成单独的类群。所有材料中 4 大类群的占 78%, 其中 Reid 类群约占 51%, 且在相似系数 0.727 处又分为 2 个亚类, 说明这部分材料亲缘关系较近, 但也有一定的遗传差异; 其他类群约占 22%, 说明这些材料与其他材料之间遗传差异较大。从系谱的亲缘关系分析, 部分已知自交系其 SSR 聚类结果与系谱追踪结果有较好的一致性。

关键词: 玉米; 自交系; SSR; 遗传多样性**中图分类号:** S513.024**文献标识码:** A

Genetic Diversity Analysis Among New Maize Inbred Lines Revealed by SSR

LI Li-hua¹, WEI Xin¹, PAN Guang-tang², TANG Bao-jun¹, DING Yong¹, ZHAO Fa-xin¹(1. *The Cereal Crops Institute of Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450002;**2. Maize Research Institute of Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China*)

Abstract: SSR markers (Simple Sequence Repeat) were used to detect genetic diversities among 59 maize inbred lines. 58 SSR primers screened were produced 681 polymorphic amplified fragments. The average number of alleles per SSR locus was 11.7, ranging from 2 to 25. The clustering results showed some inbred lines clustered to four familiar groups occupied 78 percent, of which belonged to Reid group occupied 51 percent which were divided into two sub-groups. The pedigree among the inbred lines not only were kindred but also had inherited diversity. The other inbred lines belonged to other groups which occupied 22 percent. It meant there were biggish diversity between these groups and others. The pedigree of some known inbred lines was analyzed. The result of clustering by SSR were well consisted with family tree.

Key words: Maize; Inbred line; SSR; Genetic diversity

传统的遗传多样性研究主要是通过数量遗传学的方法, 依靠玉米种质的系谱来源、地理来源、主要农艺性状的配合力和杂种优势表现对玉米种质基础研究, 划分杂种优势类群。通过特定的杂交试

验和后代测定来分析性状在亲子代之间的传递规律、遗传和环境的交互作用, 检测遗传变异。但是利用表型性状研究遗传多样性存在着可供分析的基因位点太少、易受生物发育阶段和环境条件的影响等缺点, 不能得到客观全面的遗传变异信息, 试验的准确性不高。

随着分子水平检测遗传变异的发展, 促进了 DNA 分析技术在群体遗传学和遗传多样性研究中的应用。DNA 分子标记技术已发展成为研究遗传多样性的重要工具, 用来研究玉米自交系间的遗传多样性, 划分杂种优势类群, 正确地选择杂交组合和测验种, 为玉米自交系亲缘关系和遗传多样性研究提供了新手段和新方法。本研究利用 SSR 分子标记, 对新选的 59 份优良玉米自交系进行遗传多样性分

收稿日期: 2008-09-09; **修回日期:** 2008-11-14

基金项目: 引进国际先进农业科学技术项目(948 计划)(2003-Q03)、国家科技支撑计划项目(2006BAD01A03)、四川省“十一五”玉米育种攻关和生物技术攻关项目、四川省教育厅“十一五”重点项目、河南省重大科技专项(0620010200)

作者简介: 李丽华(1977-), 女, 硕士, 从事玉米品种评价工作。

Tel: 0371-65739114 E-mail: llhtg1997@163.com

潘光堂为本文通讯作者。Tel: 0835-2882714

E-mail: pangt@sicau.edu.cn

析,为充分利用这些种质提供理论指导,从而更好地进行亲本选配,选育优势组合,提高育种效率。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试材料是由四川农业大学玉米研究所提供的 59 份新选优良玉米自交系(表 1)。

1.2 试验方法

DNA 提取采用 CTAB 法提取并纯化。PCR 扩增反应体系为每 15 μ L 体积中含 1 $\times$ Buffer、2.5 mmol/L $MgCl_2$ 、0.4 mmol/L dNTP、SSR 引物 (由塞百胜公司合成)3.3 ng/ μ L、1 U Taq DNA 聚合酶、20 ng DNA 模板。

反应液上加盖一滴矿物油,于 PTC-100PCR 仪上进行扩增。反应程序为 95 $^{\circ}C$ 预变性 5 min,1 个循环;94 $^{\circ}C$ 变性 30 s,55 $^{\circ}C$ 退火 30 s (以后每个循环降低 1 $^{\circ}C$),72 $^{\circ}C$ 延伸 1 min, 共进行 35 个循环;最后在 72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。在扩增产物中加入 5 μ L 3 $\times$ SGB (98% 去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA、pH 8.0,0.025%溴酚蓝,0.025 二甲苯青)。每个样取 5 μ L,在 1 $\times$ TBE 缓冲液条件下用 6%的聚丙烯酰胺变性凝胶进行电泳,恒定功率 85 W 预电泳约 30 min,75 W 电泳约 1 h。银染程序参照《杂交玉米品种 DNA 指纹图谱》。

表 1 59 个玉米自交系编号及名称
Table 1 The name and code of 59 maize inbred lines

编 号 No.	名 称 Name	编 号 No.	名 称 Name	编 号 No.	名 称 Name	编 号 No.	名 称 Name
1	971124-3-1-1-2	16	975-13-2-1-2-1	31	丹试 56-2-2-3-1	46	SAM1001
2	971121-1-1-1-2	17	9603-1-1-3-1-1-1	32	01SRW443-2-2-1-1	47	SCML202
3	97512-2-2-1	18	94132V	33	99CX2030-1-1-1-1	48	SCML103
4	97512-2-2-2	19	中北 648	34	TF3 $\times$ A318-3-1-1-1	49	975-12
5	9771-2-1-1-1-1-3	20	6162	35	9CX2436-3-2-2-1	50	18-599
6	9636-1-3	21	P14	36	HAAUP-1-1-1-2	51	441950
7	99S2052-3-2-1-3-2	22	65232	37	03051-2	52	983015-6
8	RP125-2-1-2	23	L790	38	091-2-2-1-1 $\times$ 5022-1-2	53	SCML203
9	RP129-1-1-1	24	CAL23	39	3732-5	54	08-641
10	20FS206-1-1-2	25	9520-4-1-1-1-2-1	40	21-ES	55	478
11	9792-45-1-1-2-1	26	983015-4-2-1-1-1-1	41	SCML204	56	Mo17
12	9636-9-1-2-1-1-2	27	9814040 $\times$ 3066-3-1-1-1	42	东 54-3	57	丹 340
13	4783411-2-1-1	28	981R08 $\times$ R18-1-1-1-1	43	3066	58	黄早四
14	974-2-2-2-2	29	东 54-3-1-1-1	44	Lc995	59	5003
15	9508B	30	99S0033-3-1-1-2-1	45	SAM3001		

1.3 数据统计分析

根据 PCR 扩增结果,在相同迁移位置有带记为“1”,无带记为“0”,缺失数据记为“9”,建立数据库。根据简单相配系数 SM 计算自交系的遗传相似值(GS), $GS=m/(m+n)$, m 表示基因型间共有带数目, n 表示基因型间差异带数目。利用 NTSYS-pcversion2.1 软件进行数据处理,利用 UPGMA 对 SSR 数据进行聚类,构建树状图。每个 SSR 位点的多态性信息量(PIC)参照 Smith 等(1997)的公式计算: $PIC=1-\sum f_i^2$,其中 f_i 表示 i 位点的基因频率。标记索引系数(Marker index, MI)参照王风格(2003)的计算公式:MI=等位基因数 $\times$ PIC。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记检测结果

利用 58 对带型稳定、多态性好的引物,对 59 个玉米自交系的遗传多样性进行研究。这 58 对引物分布于玉米 10 条染色体上,在 59 个自交系中共检测出 681 个等位基因变异,每对引物检测到等位基因数 2 ~ 25 个,平均为 11.7 个。每个位点的多态性信息量(PIC 值)变幅为 0.34 ~ 0.94,平均为 0.83 ± 0.107 ,其中引物 phi299852 最大为 0.94,引物 phi062 最小为 0.34。标记索引值(MI)介于 0.69 ~ 23.49,其中引物 phi299852 最大为 23.49,引物 phi062 最小为 0.69。等位基因数、PIC 值和 MI 值的结果基本一致(表 2)。

2.2 遗传距离

根据 58 对玉米 SSR 引物扩增出的多态性带,

用 Nei 和 Li 法计算 59 个玉米自交系间的遗传距离。59 个自交系之间的遗传距离变化范围为 0.16 ~ 1.59, 平均为 0.98 ± 0.179 , 变异系数为 18%。平均遗传距离相对较大, 表明供试自交系间有较大的遗传差异。

表 2 58 对 SSR 引物在 59 个玉米自交系中检测到的等位基因数、PIC 值及 MI 值
Table 2 Allele numbers, PIC value and MI value of 58 SSR loci detected in 59 inbred lines of maize

编号 No.	SSR 引物 SSR primer	位置 Bin	等位基因数 No. alleles	多态性 信息量 PIC	标记索 引系数 MI	编号 No.	SSR 引物 SSR primer	位置 Bin	等位基因数 No. alleles	多态性 信息量 PIC	标记索 引系数 MI
1	phi96100	2.01	18	0.934	16.81	30	umc2287	4.09	12	0.878	10.54
2	phi299852	6.07	25	0.940	23.49	31	umc1479	1.03	10	0.871	8.71
3	phi127	2.08	11	0.845	9.29	32	umc1268	8.07	5	0.764	3.82
4	phi308707	1.1	16	0.921	14.73	33	phi084	10.04	6	0.753	4.52
5	nc130	5	14	0.897	12.56	34	umc2228	1.04	7	0.835	5.84
6	phi102228	3.06	17	0.907	15.42	35	umc1004	2.06	10	0.876	8.76
7	phi051	7.05	12	0.882	10.58	36	umc2133	9.05	10	0.818	8.18
8	phi056	1.01	10	0.873	8.73	37	umc2379	7.05-7.06	9	0.753	6.77
9	umc1161	8.06	16	0.893	14.29	38	phi075	6	12	0.890	10.68
10	phi063	10.02	11	0.841	9.26	39	bnlg391	6.01	18	0.922	16.6
11	phi029	3.04	19	0.920	17.47	40	phi041	10	6	0.818	4.91
12	phi083	2.04	4	0.645	2.58	41	umc1367	10.03	7	0.800	5.6
13	phi374118	3.02	20	0.927	18.55	42	phi062	10.04	2	0.344	0.69
14	umc1304	8.02	9	0.842	7.58	43	phi094	1.09	5	0.676	3.38
15	phi090	2.08	6	0.687	4.12	44	phi123	6.07	7	0.803	5.62
16	phi072	4.00-4.01	7	0.826	5.78	45	phi034	7.02	16	0.876	14.02
17	bnlg1257	3.09	11	0.865	9.52	46	umc1722	5.05	10	0.852	8.52
18	bnlg1302	2.02	18	0.896	16.14	47	umc1463	6.06	15	0.874	13.12
19	phi059	10.02	6	0.758	4.55	48	umc2246	2.03	12	0.868	10.42
20	phi108411	9.05	9	0.807	7.26	49	umc2385	1.08-1.09	13	0.867	11.27
21	umc2148	4.01	19	0.937	17.81	50	bnlg1129	9.08	18	0.925	16.65
22	bnlg1779	3.07	4	0.587	2.35	51	phi065	9.03	6	0.602	3.61
23	phi052	10.02	11	0.847	9.32	52	bnlg1306	5.07	14	0.896	12.54
24	bnlg1671	1.1	23	0.931	21.41	53	phi032	9.04	7	0.840	5.88
25	phi054	10.03	16	0.909	14.54	54	umc1675	9.07	10	0.870	8.7
26	phi022	9.03	4	0.635	2.54	55	bnlg2181	8.05	12	0.857	10.29
27	bnlg1031	8.06	19	0.930	17.67	56	umc1518	2.02	10	0.825	8.25
28	umc1083	6.02	16	0.914	14.62	57	umc1792	5.08	15	0.910	13.64
29	umc2136	5.08	14	0.890	12.46	58	dupssr13	7.04	12	0.863	10.36



图 1 SSR 引物 phi065 对 1 ~ 59 个自交系的扩增结果
Fig.1 Amplified results among 59 inbred lines with primer phi065

2.3 UPGMA 聚类分析

根据遗传相似系数矩阵,利用 UPGMA 法进行聚类分析。以遗传相似系数 0.723 为界,59 个自交系共聚成 10 类。其中第 4 类在相似系数 0.727 处又可分为 2 个亚类(表 3、图 2)。59 个自交系共聚为 4 大常见类群和 6 个其他类群,属 4 大类群的自交系占 78%,其中 Lancaster 群约占总数的 12%;塘四平头群约占 10%;旅大红骨群约占 5%;改良 Reid 群约占 51%,在遗传相似系数为 0.727 处分为 2 个亚类,说明这部分材料亲缘关系较近,但也有一定的遗传差异。其他类群约占 22%,其中除了第 8 类的材料较多外,其余类群都是由 1~2 个自交系聚成,说明这些材料与其他材料之间遗传差异较大。

从系谱的亲缘关系分析,针对部分已知自交系,SSR 聚类结果与系谱追踪结果有较好的一致性。其中 SCML203 与 RP125-2-1-2 血缘相近聚为一类;975-12 与 97512-2-2-1、97512-2-2-2 都有 78698 血缘,与 Mo17 聚为一类;东 54-3 与东 54-3-1-1-1 血缘相近,二者都含有 Reid 和热带血缘,没有聚到 Reid 群而是单独聚为一类,可能是这两个材料含热带血缘较多;SCML204、981R08 × R18-1-1-1-1 与 R18 血缘相近聚为一类;SCML103 与 99S2052-3-2-1-3-2 有相近的血缘聚为一类;983015-6、983015-4-2-1-1-1-1 与 R08 有相近的血缘聚为一类,同时聚到 Reid 群,从聂永心的聚类图上看 R08 也聚到 Reid 群,这两者的结果是一致的。

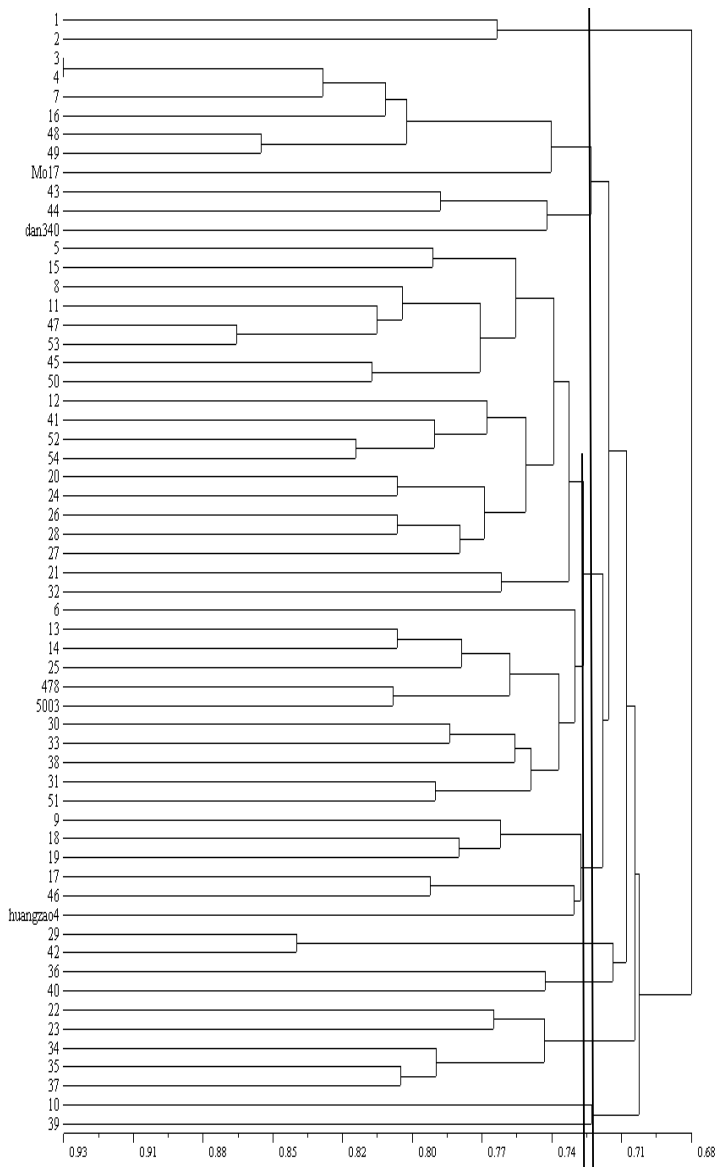


图 2 59 个玉米自交系的聚类图

Fig.2 The clustering map of 59 maize inbred lines

表 3 59 个自交系的聚类结果

Table 3 Heterosis groups clustered based on SSR genetic similarity of 59 maize inbred lines

类群	Group	亚群	Subgroup	自交系编号	The number of inbred lines
	1			1,2	
	2			Mo17,3,4,7,16,48,49,	
	3			丹 340,43,44	
	4	4 I		5,15,8,11,47,53,45,50,12,41,52,54,20,24,26,28,27,21,32	
		4 II		478,5003,6,13,14,25,30,33,38,31,51	
	5			黄早四,9,18,19,17,46	
	6			29,42	
	7			36,40	
	8			22,23,34,35,37	
	9			10	
	10			39	

3 讨 论

从本试验的研究结果来看,有 78%的材料聚到了 4 大常见类群,表明玉米育种工作面临的主要问题还是种质基础相对狭窄,需要进一步引入外来种质、地方种质,对这些种质进行扩增和改良。有22%的材料聚到我国 4 大常见类群以外的 5 个类群中,说明近年来进行的玉米种质资源的扩增改良有一定的成效,这些材料的种质基础有了明显的拓宽。应进一步加大种质创新和技术创新的步伐,改良和培育一批具有自主创新的核心种质和骨干亲本,以保证玉米育种和生产持续稳定发展。

本研究中少部分自交系的聚类结果是合理的,但对于其他大部分自交系的合理性分析,还应用生产实践予以明确,将供试材料按适当的方法组配成(不)完全双列杂交,再将田间鉴定的结果与分子标记聚类结果进行对比、验证,更客观合理地对这些新选系的杂优类群进行研究。

参考文献:

[1] Duvick D N. Genetic diversity in major farm crops on the farm and in reserve[J]. Econ. Bot., 1984, 38: 157-174.

[2] 吴景锋. 我国主要玉米杂交种种质基础评述[J]. 中国农业科学, 1983(2): 1-8.

[3] 曾三省. 中国玉米杂交种的种质基础[J]. 中国农业科学, 1990, 23 (4): 1-9.

[4] 王懿波,张庆吉,朱良骅. 我省玉米种质基础综合分析与评价[J]. 河南农业大学学报, 1986, 20(1): 1-11.

[5] 方宣钧,吴为人,唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[6] Pejic I, Ajmone M P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs[J]. Theor. Appl. Genet., 1998(98): 219-227.

[7] 袁力行,傅骏骅,等. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究[J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 725-733.

[8] 朱作峰,孙传清,姜廷波,等. 水稻品种 SSR 与 RFLP 及其与杂种优势的关系比较研究[J]. 遗传学报, 2001, 28(8): 738-745.

[9] 袁力行,傅骏骅,张世煌,等. 利用 RFLP 和 SSR 标记划分玉米自交系杂种优势群的研究[J]. 作物学报, 2001, 27(2): 149-156.

[10] 杜金友,黎 裕,王天宇,等. SSR 和 AFLP 分析玉米遗传多样性的研究[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 59-63.

[11] Maroof M A S, Biyashev R M, Allard R W, et al. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley, species diversity chromosomal locations, and population dynamics[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1994, 91: 5466-5470.

[12] 辛景树. 杂交玉米品种 DNA 指纹图谱[M]. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2004.

[13] Sokal R R. Distance as a measure of taxonomy similarity[J]. Systematic Zool, 1961, 10: 70-79.

[14] 王凤格,赵久然,郭景伦,等. 比较三种 DNA 指纹分析方法在玉米品种纯度及真伪鉴定中的应用[J]. 分子植物育种, 2003, 1(5): 655-661.

[15] 聂永心. 利用 SSR 分子标记对四川常用玉米自交系杂种优势群划分的研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2003.

(责任编辑:尹 航)