

文章编号: 1005-0906(2006)01-0037-03

SSR 标记在玉米遗传育种中的应用

孙 琦, 孟昭东, 张发军, 丁照华, 张庆伟

(山东省农业科学院玉米研究所, 济南 250100)

摘 要: 微卫星标记(SSR)是一种共显性标记, 具有重复性好、可靠性高和多态性丰富等优点, 在玉米的遗传育种中具有重要的作用。阐述了 SSR 标记的原理与方法, 概括了其在玉米种质资源多态性、遗传图谱构建及基因定位、品种纯度检测方面的应用。

关键词: 玉米; SSR; 遗传育种

中图分类号: S513.032

文献标识码: A

Utilization of SSR Markers in Maize Genetic Breeding

SUN Qi, MENG Zhao-dong, ZHANG Fa-jun, DING Zhao-hua, ZHANG Qing-wei

(The Institute of Maize Germplasm Resource, Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan 250100, China)

Abstract: SSR is a co-dominant marker, with many advantages such as good repeatability, high reliability, abundant polymorphism, and so on. It acts important role in maize genetic breeding. The principle and technology of SSR markers were introduced. Its application was mainly reviewed in three aspects including studying maize germplasm resources polymorphism, constructing genetic linkage map and locating genes, detecting purity of variety.

Key words: Maize; SSR; Genetic breeding

玉米是一种重要的饲用、粮用和工业加工作物, 在国民经济中占有重要的地位。玉米育种方法的改进对农业发展具有重要意义。长期以来, 育种家们大多数是借用易于鉴别的形态学同工酶等遗传标记来辅助育种, 并取得了很大成功。但这类标记的最大不足之处在于其数量有限, 要找到与目标性状密切相关的标记往往很困难, 难以应用于育种实践。因此育种家们一直希望能够找到一类数量丰富、选择效应高的标记以提高育种效率和育种过程的预见性。

随着分子生物学的发展, 开发了基于 DNA 变异的分子标记。应用最广泛的主要有 RFLP、RAPD、SSR、AFLP 等, 其中 SSR 标记是一种共显性标记, 重复性好, 可靠性高, 分析简便, 易于实现自动化, 而且灵敏度高, 检测遗传变异的能力强, 近年来, SSR 标记在玉米育种中得到了广泛的应用。本文综述了 SSR 标记的原理与方法及其在玉米遗传育种上的应用。

1 应用原理

收稿日期: 2004-12-15

作者简介: 孙 琦(1978-), 女, 研究实习员, 主要从事玉米育种研究工作。Tel: 0531-8126920 E-mail: sunqi7804@tom.com

简单重复序列 (Simple Sequence Repeats, SSRs) 又称微卫星 DNA (Micro-satellite DNA) 或短串联重复 (Short Tandem Repeats), 是由几个核苷酸 (2 ~ 5 个) 为重复单位组成的长达几十个核苷酸的重复序列, 分布于整个基因组的不同位置上。由于重复次数的不同及重复程度的不完全造成了每个位点的多态性。根据微卫星 DNA 两端的保守序列设计一对特异性引物, 扩增这个位点的微卫星 DNA 序列, 经聚丙烯酰胺凝胶电泳即可显示不同基因型个体在这个 SSR 位点的多态性。这种用保守序列确定的分子标记可以检测出复等位基因的变异, 常表现为共显性。SSR 标记是物种的基因型鉴定与品种保护、种子纯度评价和种质保存、多样性研究、基因和 QTL 分析、系谱分析和分子标记辅助选择育种等领域的有用工具, 是应用较为广泛的遗传标记。

这一分子标记的特殊性及重要性在于具有以下特征: ①均匀、随机和广泛地分布于多种作物基因组中; ②多数 SSR 序列的两侧顺序常较保守, 在等位基因间多相同; ③多数 SSR 无功能作用, 增加或减少几个重复序列的重复次数不影响生物的正常发育, 因而品种间具有广泛位点变异, 比 RFLP 及 RAPD 标记更具多态性; ④呈孟德尔式遗传, 共显

性,因而对个体鉴定具有特殊性;⑤仅需微量组织,即便 DNA 降解,也能有效地分析鉴定。

SSR 操作程序包括 DNA 的提取、微卫星 DNA 的扩增和电泳 3 个主要环节,其中关键是 PCR 扩增和电泳技术。王风格等(2003)根据 21 对玉米 SSR 引物组合(扩增片段长度不同)进行多重 PCR 技术,研究表明,将多个 SSR 位点的引物放在一个离心管中进行复合 PCR 反应,得到了正常扩增带,从而提出了简化的多重 PCR 优化程序。这样可以同时检测不同基因型的许多位点,节省了时间和药品。李新海等(2001)利用 35 个 SSR 引物和 14 个自交系直接比较了 3%的 Metaphor 琼脂糖凝胶和 12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳对 SSR 位点多态性水平的影响。研究结果表明,聚丙烯酰胺凝胶在区分微小差异片段能力上明显高于琼脂糖凝胶,而且检出的等位基因位点多,多态性信息含量值亦较高。除此以外,还得出琼脂糖凝胶电泳比较适合在遗传作图或基因定位研究中应用;而在品种指纹图谱分析或遗传多样性研究中,应采用聚丙烯酰胺凝胶电泳作为检测工具。李凌雨等(2003)在对玉米自交系多态性检测中得到相同的结论。

2 SSR 标记在玉米遗传育种中的应用

2.1 种质资源的遗传多样性分析

遗传多样性分析是玉米种质资源利用与保护的基础,国内外学者利用不同的方法,从形态特征、亲缘关系到生化指标对玉米遗传多样性进行了细致的研究。分子标记的出现为遗传多样性分析提供了更深层次的技术,其中 SSR 标记因其具有高度多态性而成为遗传差异研究的主要工具。SSR 标记的等位基因变异来源于基因组 DNA 复制时滑动,从而引起重复序列数目的变化,而不是单碱基突变或插入缺失造成的,因此表现出高度的多态性。Peji 等(1998)研究发现,SSR 多态性信息量是 RAPD 和 AFLP 的 2 倍。袁力行等(2000)利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 这 4 种分子标记方法研究了 15 个玉米自交系的遗传多样性,研究结果发现,SSR 标记位点的平均多态性信息量(PIC)最大,并认为 AFLP 和 SSR 是研究遗传多样性的最好标记。

SSR 标记在玉米遗传多样性研究上的应用起步较晚,自 1998 年起我国开始应用。郭小平等(1998)利用 174 对 SSR 引物对 4 个玉米自交系进行了鉴定,研究结果表明,SSR 在玉米染色体上呈随机分布,可以有效揭示玉米自交系间的遗传差异,追踪亲本遗传物质在后代中的遗传动态。利用此技术,

田孟良等(2003)利用 SSR 标记揭示了云南省、贵州省糯玉米与普通玉米种质资源的遗传差异。曹永国等(2003)、杜金友等(2003)利用 SSR 标记对玉米种质材料的遗传多样性与杂种优势群划分进行研究,结果发现其划分结果与系谱分析基本一致。番兴明等(2003)根据 SSR 标记划分优质蛋白玉米自交系的杂种优势群,也得到同样的结论。由此可以得出,SSR 标记可用于玉米自交系遗传多样性分析,并且精确地划分杂种优势群,进而为建立杂种优势模式、估计和预测杂种优势打下基础。

2.2 遗传图谱构建及基因定位

SSR 的主要用途是遗传作图,与 RFLP 标记相比,SSR 检测的多态性要高很多,对于构建高密度的遗传图谱非常有用。在植物的遗传图谱中,SSR 标记还没占主导地位,最初只是将其添加到以 RFLP 标记为主的连锁图上。Gupta 等把 25 个随机扩增的微卫星位点作图到玉米的 9 条染色体上。Senior 等(1993)利用 3 个重组近交系,将 42 个 SSR 位点定位于图中,并且发现 SSR 位点散布于玉米基因组中,无聚集现象,每个 SSR 标记只能检测到一个位点。

近年来,我国也开始 SSR 遗传图谱的构建及基因定位工作。向道权等(2001)利用农大 3138 的 $F_{2:3}$ 家系为材料,构建了具有 80 对 SSR 标记的玉米遗传图谱,标记间平均距离为 25.42 cM,覆盖玉米基因组的 2 033.4 cM;并利用区间作图法分析了影响产量各性状的 QTL 定位。同样,刘章雄等(2003)构建了包含 74 个 SSR 标记的玉米遗传图谱,覆盖玉米基因组 2 165.9 cM,标记间平均距离为 29.27 cM,并将抗南方锈病基因定位于 10 号染色体上。王风格等(2003)构建了具有 65 个 SSR 位点的遗传图谱,覆盖玉米基因组 1 333.3 cM,标记间平均距离 20.5 cM,并对抗甘蔗花叶病毒的数量性状位点进行定位及遗传效应分析。除此以外,还有一些基因定位研究,如黎裕等(2002)利用 SSR 标记对玉米弯孢菌叶斑病基因进行了 QTL 分析,汤继华等(2001)利用 SSR 标记对玉米 C 型胞质育性恢复基因 *rf4* 与不育恢复基因 *rf5* 进行定位等等。随着分子生物学技术的发展,SSR 遗传图谱的构建会更加完善,可应用 SSR 标记将更多的基因定位到玉米基因的染色体上。

2.3 品种纯度及真伪鉴定

发展高度稳定可靠、区分能力强的 DNA 标记,对玉米杂交种纯度及真伪乃至新品种注册、产权登记保护等都是十分必要的。目前,RAPD、AFLP 技术都被应用到品种鉴定上,RAPD 具有简单、快捷、经济的优点,但多态性不高,重复性欠佳;AFLP 多态

性高,但操作步骤复杂,对实验技能及仪器设备的精密要求很高,限制了在实践中的应用。王风格等(2003)利用 SSR 技术鉴定了农大 108 的品种纯度,并建立了适用于玉米品种鉴定的 SSR 标准体系,结果发现,SSR 既具有 RAPD 简单、快捷、经济的优点,又具有 AFLP 多态性高的优点,同时克服了 RAPD 和 AFLP 重复性和稳定性差的缺点,在玉米品种鉴定中有很大优势。李小辉等(2003)以 21 份玉米骨干自交系及其组配的 13 个杂交种为材料,进行 SSR 标记分析,研究结果表明,应用 SSR 标记技术可快速、准确地鉴定玉米杂交种种子纯度。刘龙洲等(2003)用 SSR 分子标记鉴定 Sc704 玉米亲本及杂交种纯度,其检验结果与田间检验结果相差甚微。由此可以得出,应用 SSR 标记技术可以快速、准确的鉴定玉米杂交种的纯度,它可以作为真实性鉴定、纯度检测以及新品种保护的仲裁技术依据之一。

3 展 望

玉米是我国的主要粮食作物之一,加快玉米育种进程对于发展国民经济具有重要的意义。在玉米遗传育种领域,SSR 标记可以用于分析玉米自交系间的遗传多样性,划分杂种优势群;构建 SSR 遗传图谱,定位目的基因;鉴定杂交种纯度等等,从而为玉米育种提供了有力工具。从目前玉米育种的现状来看,SSR 技术若与现有的育种程序相结合,必将大大加快育种进程,很可能成为玉米商业育种中 fastest 取得经济效益的一种技术。

参考文献:

- [1] 蔡 健,王永杰,杨剑波. AFLP 分子标记在作物育种中的应用[J]. 安徽农业科学,2002,30(2):167-169.
- [2] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize(*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and peigree[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 163-173.
- [3] 车永和. 几种代表性分子标记技术[J]. 江苏农业科学,2003,(2):3-4,12.
- [4] Guiford P, Prakash S, Zhu J M, et al. Microsatellite in malus domestica(apple): abundance, polymorphism and cultivar identification [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 249-254.
- [5] 苏顺宗,黄玉碧,杨俊品,等. 利用 SSR 鉴定水稻杂交种纯度的研究[J]. 种子,2003,(1):23-25.
- [6] 韩柱强,高国庆,韦鹏霄,等. 利用 SSR 标记分析栽培种花生多态性及亲缘关系[J]. 花生学报,2003,32(11):295-300.
- [7] Liu Ping-wu, Zhou Guo-ling, Yang Guang-sheng, et al. Evaluation on genetic diversity of hybrid parents developed in brassica napus[J]. Agri-cultural Sciences in China, 2003, 2(9): 1054-1060.
- [8] Yu Y G. RFLP and microsatellite mapping of a gene for soybean mosaic virus resistance[J]. Phytopathology, 1994, 84: 60-64.
- [9] Wu K S, Tanksley S D. Abundance polymorphisms and genetic mapping of microsatellite in rice[J]. Mole Gren Genet, 1993, 241: 225-235.
- [10] 梁荣奇,张义荣,刘守斌,等. 利用 *wx* 基因分子标记辅助选择培育糯性小麦[J]. 遗传学报,2001,28(9):856-863.
- [11] 唐荣华,张君诚,吴为人. SSR 分子标记的开发技术研究进展[J]. 西南农业学报,2002,15(4):106-109.
- [12] 李新海,焦少杰,傅骏骅,等. 两种凝胶电泳系统对 SSR 标记多态性的影响[J]. 华北农学报,2001,16(2):43-48.
- [13] 李凌雨,畅志坚,夏宏征,等. 不同凝胶电泳对玉米自交系 DNA 多态性检测的影响[J]. 山西农业科学,2003,31(2):15-18.
- [14] Senior M L, Murphy J P, Goodman M M, et al. Utility of SSR for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system[J]. Crop Science, 1998, 38: 1088-1098.
- [15] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs and AFLPs [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1248-1255.
- [16] 袁力行, 傅骏骅, Warburton M, 等. 利用 RFLP, SSR, AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的研究[J]. 遗传学报,2000, 27(8):725-733.
- [17] 王风格,赵久然,余华娣,等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究Ⅲ. 多重 PCR 技术在玉米 SSR 引物扩增中的应用[J]. 玉米科学,2003,11(4):3-6.
- [18] 郭小平,赵元明,刘毓侠. SSR 技术在植物遗传育种中的应用[J]. 华北农学报,1998,13(3):73-76.
- [19] 田孟良,黄玉碧,刘永建,等. SSR 标记揭示云南省、贵州省糯玉米与普通玉米种质资源的遗传差异[J]. 四川农业大学学报, 2003, 21(3):213-216.
- [20] 曹永国,向道权,黄烈健,等. SSR 分子标记在玉米杂种优势关系的研究[J]. 农业生物技术学报,2002,10(2):120-123.
- [21] 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.
- [22] 番兴明,张世煌,谭 静,等. 根据 SSR 标记划分优质蛋白玉米自交系的杂种优势群[J]. 作物学报,2003,29(1):105-110.
- [23] 万平等,李大均. SSR 标记与植物遗传育种研究[J]. 安徽农业大学学报,1998,25(1):92-95.
- [24] Senior M L, Heun. Mapping maize microsatellites and polymerase chain rection confirmation of the targeted repeates using a CT primer. Genome, 1993, 36: 884-889.
- [25] 向道权,曹海河,曹永国,等. 玉米 SSR 遗传图谱构建及产量性状基因定位[J]. 遗传学报,2001,28(8):778-784.
- [26] 刘章雄,王守才,戴景瑞,等. 玉米 P25 自交系抗锈病基因的遗传分析及 SSR 分子标记定位[J]. 遗传学报,2003,30(8):706-710.
- [27] 王风格,刘贤德,王振华,等. 玉米抗甘蔗花叶病毒 QTL 的初步研究[J]. 作物学报,2003,29(1):69-74.
- [28] 黎 裕,戴法超,景蕊莲,等. 玉米弯孢菌叶斑病抗性的 QTL 分析[J]. 中国农业科学,2002,35(10):1221-1227.
- [29] 汤继华,胡彦民,季洪强,等. 玉米 C 型 Cms 育性恢复基因 *Rf4* 的 SSR 标记[J]. 河南农业大学学报,2001,35(1):1-8.
- [30] 汤继华, 刘宗华, 陈伟程, 等. 玉米 C 型胞质不育恢复主基因 SSR 标记[J]. 中国农业科学,2001,34(6):592-596.
- [31] 王风格,赵久然,郭景伦,等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 I. 玉米品种纯度及真伪鉴定中 SSR 技术标准实验体系的建立[J]. 玉米科学,2003,11(1):3-6.
- [32] 李小辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J]. 作物学报,2003,29(1):63-68.
- [33] 刘龙洲,赵久然,曲延英,等. SSR 鉴定 SC704 玉米亲本及杂交种纯度的研究[J]. 西北农业学报,2003,12(4):68-70.
- [34] 李向拓,毛建昌,吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用[J]. 玉米科学,2004,12(1):26-29.