

文章编号: 1005-0906(2004)03-0026-04

SSR 分子标记在玉米杂种优势群划分中的应用

聂永心¹, 张 丽², 潘光堂², 荣廷昭²

(1. 山东农业大学生科院, 山东 泰安 271018; 2. 四川农业大学玉米研究所, 四川 雅安 625014)

摘 要: 利用 SSR 标记研究了 20 个玉米自交系的遗传变异, 初步进行了杂种优势群划分, 从 85 对 SSR 引物中筛选出 70 对扩增产物具有稳定多态性的引物。70 对引物在供试材料中共检测出 270 个等位基因变异, 每对引物检测到等位基因 2~6 个, 平均 3.86 个, 多态性信息含量变化范围为 0.26~0.80, 平均多态性信息量为 0.59。20 个自交系之间的遗传相似系数变化范围为 0.594 6~0.771 1, 平均为 0.660 1。UPGMA 聚类分析结果表明, 供试自交系可分为 5 群, 分类结果与系谱基本一致, 划群后群间平均距离大于群内平均距离, 群间平均产量大于群内平均产量。SSR 标记可以进行玉米自交系遗传变异分析, 并用于杂种优势群的划分。

关键词: 玉米自交系; SSR 分子标记; 多态性信息量; 聚类分析; 杂种优势群

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Application of SSR Markers to Heterotic Grouping of Maize Inbred Lines

NIE Yong-Xin¹, ZHANG Li², PAN Guang-Tang², RONG Ting-Zhao²

(1. College of Life Science of Shandong Agriculture University, Taian 271018, China;

2. Maize Research Institute of Sichuan Agriculture University, Yaan 625014, China)

Abstract: Simple sequence repeats (SSRs) were used to detect genetic variation among 20 maize inbred lines. Seventy SSR primers selected from 85 primers gave stable profiles amplified in sample of 20 inbred lines. Seventy primers produced 270 polymorphic amplified fragments. The average number of alleles per SSR locus was 3.86 with a range from 2 to 6. The polymorphism information content(PIC) for the SSR loci varied from 0.26 to 0.80 with an average of 0.59. Genetic similarities among the 20 inbred lines ranged from 0.594 6 to 0.771 1 with an average of 0.660 1. The cluster analysis showed that the inbred lines could be classified into five distinct clusters which correspond to the heterotic groups determined by their pedigree analysis, average genetic distance among groups was greater than that within group, and average yield among groups was greater than that within group. Consequently, SSR markers could be used for measuring genetic variation and assigning maize inbred lines to heterotic groups.

Key words: Maize inbred line; Simple sequence repeats markers; Polymorphism information content (PIC); Cluster analysis; Heterotic groups

SSR(Simple Sequence Repeats, 简单序列重复)标记亦称微卫星, 是指由 2~6 个碱基组成的基本序列串联重复组成的短片段, 是建立在 PCR 反应基础上的一种新型遗传标记, 为共显性标记。由于该技术具有简便、快速、稳定性高和等位基因多样性高等特点, 在作物的遗传作图、基因定位和遗传多样性分析等方面得到广泛的应用。本研究采用 SSR 分子标

记技术分析了 20 个玉米自交系的遗传多样性, 并进行了杂种优势群的划分, 为玉米分子标记辅助育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

选择四川省常用的 20 个优良玉米自交系 (表 1), 2001 年春在四川农业大学玉米研究所多营农场, 按完全双列杂交配成 190 个杂交组合, 2002 年春在我所多营农场进行杂种田间比较试验。试验为随机区组设计, 单行种植, 行距 0.66 m, 每行 13 株, 株距 0.33 m, 两次重复。成熟期每小区去掉边株, 随

收稿日期: 2003-10-15

基金项目: 亚洲生物技术网基金(ABMBIONET)资助项目

作者简介: 聂永心(1977-), 男, 硕士, 现于山东农业大学生科院工作。Tel: 0538-8241771 13515483362

E-mail: nyx03@163.com

机收获 8 株,测定单株子粒产量。试验所使用的 85 对 SSR 引物,序列均由亚洲玉米生物技术网(AM-BIONET)提供,由北京赛百胜公司合成。

1.2 实验方法

(1)DNA 提取。采用 Saghai-marooof 等提出的 CTAB 法提取基因组 DNA。利用分光光度计检测 DNA 的浓度和质量,并把 DNA 浓度调至 20 ng/μL 备用。

(2)PCR 扩增。PCR 反应在 PTC-100PCR 仪上进行。反应总体积为 15 μL,其中包括 10 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L KCl,0.001% Gelatin,1.5 mmol/L KCl,4 种 dNTP 各 200 μm/L,0.4 μm/L SSR 引物,1 U Taq 酶,40 ng DNA 模板。PCR 反应程序为 94℃ 模板 DNA 预变性 4 min,1 个循环;94℃ 模板 DNA 变性 1 min,52 ~ 60℃(据引物而定)与模板靶位点结合 2 min,72℃引物沿模板延伸 2 min,共 35 个循环;最后在 72℃延伸 5 min。

(3)电泳。以 ΦX174/HaeⅢ片段为分子量 Marker,用 4.5%聚丙烯酰胺变性凝胶电泳,电泳仪为 Bio-RAD 公司的电泳设备,38 cm × 30 cm 板,恒定功率 75 W,电泳 1 h。

(4)银染。按照 CIMMYT 应用生物中心的银染程序进行。

(5)数据统计分析。SSR 产物银染结果,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失记为“9”,建立 0,1,9 数据库。以简单配对参数(simple matching coefficient)计算遗传相似系数 $GS=m/(m+n)$,其中 m 为基因型间共有带数目,n 为差异带数目。利用 NTSYS-pc version2.1 软件进行数据处理,按 UPGMA 方法(Un-weight Pair Group Method using Aritheic Averrages)对供试自交系进行聚类。每一个 SSR 位点的多态性信息量 (polymorphism information content, 简称 PIC)按 Smith 等提供的公式计算,即 $PIC=1-\sum f_i^2$,其中 f_i 为 i 位点的基因频率。

表 1 20 个玉米自交系的名称及来源

编号	自交系	来 源	编号	自交系	来 源
1	48-2	综合种	11	成 687	美国杂交种
2	5003	美 3147	12	7327	(矮广 10×内 6-2)×(0h43×齐 705)
3	R08	美国杂交种	13	273	外引杂交种
4	R09	美国杂交种	14	齐 205	(V 矮 141×中系 017)×群体 70
5	R15	美国杂交种	15	7922	美国杂交种 P3382
6	R18(白)	美国杂交种	16	238	美国杂交种
7	ES40	邻水大肚肚	17	698-3	美国杂交种
8	81565	墨西哥热带种质	18	200B	自 330×187-2
9	南 21-3	南斯拉夫杂交种	19	苏 37	苏湾 1 号热带种质
10	杜 32	美国杂交种 P3382	20	自 330	可利 67×0h43

2 结果与分析

2.1 SSR 标记检测结果

从 85 对 SSR 引物中筛选出对 20 个自交系扩增产物具有明显多态性且带型稳定的引物 70 个,分布于玉米 10 条染色体上,共检测出 270 个等位基因变异,平均每个位点检测到的等位基因数为 3.86 个,变化范围 2 ~ 6 个(表 2)。每个 SSR 位点的 PIC

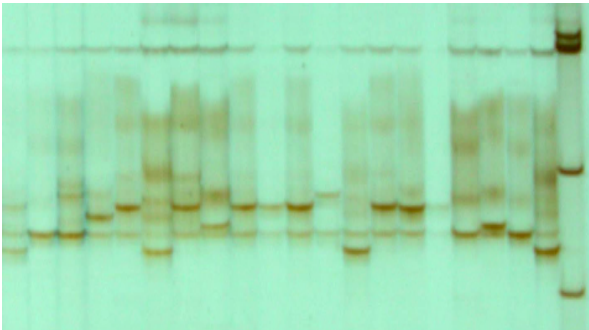
变化范围在 0.26 ~ 0.80,平均为 0.59(表 2)。PIC 值的大小取决于检测到的等位基因数目及基因频率,而与后者关系更密切。利用 270 个多态性 SSR 标记位点计算了 20 个自交系之间的遗传相似系数(GS),其范围在 0.594 6 ~ 0.771 1,平均为 0.660 1(GS 值未列出)。自交系 7922 和杜 32 的遗传相似系数最大(GS=0.771 1),因为二者选自同一美国杂交种 P3382。图 1 为引 Phi96100 对 20 个自交系的扩增图谱。

表 2 70 对 SSR 引物在 20 个玉米自交系中检测到的等位基因数目和 PIC 值

编号	SSR 引物	位置	等位基因数	多态信息量	编号	SSR 引物	位置	等位基因数	多态信息量
1	bn391	6.01	5	0.73	36	Phi109642	2.00	2	0.47
2	nc130	5.00	3	0.53	37	phi112	7.01	4	0.34
3	nc133	2.05	2	0.30	38	phi114	7.02	4	0.60
4	phi011	1.09	3	0.58	39	phi116	7.06	4	0.51
5	phi014	8.04	2	0.40	40	phi123	6.07	3	0.66
6	phi015	8.09	6	0.73	41	phi127	2.08	4	0.64
7	phi024	5.01	4	0.65	42	phi213984	4.01	2	0.40
8	phi029	3.04	3	0.53	43	phi233376	8.03	5	0.66
9	phi031	6.04	3	0.26	44	phi299852	6.08	6	0.76
10	phi032	9.04	3	0.53	45	phi308707	1.10	4	0.63

续表 2

编号	SSR 引物	位置	等位基因数	多态信息量	编号	SSR 引物	位置	等位基因数	多态信息量
11	phi034	7.02	4	0.66	46	phi328175	7.04	4	0.74
12	phi041	10.00	3	0.57	47	phi331888	5.04	4	0.66
13	phi050	10.03	3	0.50	48	phi374118	3.03	4	0.66
14	phi053	3.05	5	0.74	49	phi420701	8.01	4	0.60
15	phi056	1.01	4	0.65	50	phi423796	6.02	5	0.45
16	phi059	10.02	3	0.47	51	Phi448880	9.05	4	0.47
17	phi062	10.04	2	0.44	52	phi452693	6.06	5	0.70
18	phi063	10.02	3	0.64	53	phi453121	3.00	4	0.69
19	phi065	9.03	4	0.67	54	Phi96100	2.00-01	6	0.78
20	phi069	7.05	3	0.62	55	Phi96342	10.02	3	0.23
21	phi072	4.01	4	0.72	56	umc1061	10.06	3	0.56
22	phi073	3.05	3	0.37	57	umc1109	4.10	3	0.42
23	phi076	4.11	4	0.40	58	umc1122	1.06-07	3	0.52
24	phi078	6.05	3	0.54	59	umc1136	3.10	6	0.80
25	phi079	4.05	5	0.70	60	umc1143	6.00-01	6	0.74
26	phi083	2.04	5	0.76	61	umc1152	10.01	3	0.64
27	phi084	10.04	3	0.62	62	umc1153	5.09	4	0.72
28	phi085	5.07	4	0.65	63	umc1161	8.06	5	0.77
29	phi087	5.06	3	0.53	64	umc1169	1.04	4	0.67
30	phi093	4.08	3	0.66	65	umc1196	10.07	3	0.66
31	phil01049	2.09	6	0.74	66	umc1277	9.08	2	0.46
32	phil02228	3.04-05	3	0.51	67	umc1304	8.02	4	0.53
33	phi108411	9.06	3	0.34	68	umc1399	3.07	5	0.64
34	phi109188	5.00	5	0.70	69	umc1545	7.00	5	0.75
35	phi109275	1.00	4	0.73	70	umc1555	2.02-03	5	0.66



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 M

图 1 引物 phi96100 扩增的 SSR 图谱

2.2 聚类分析

用 SSR 标记遗传相似系数为原始数据,按 UP-GMA 方法对 20 个自交系进行聚类分析(图 2)。以相似系数 0.660 为标准,可将 20 个自交系分为 5 类,分别是第 I 群包括 48-2、S37、R08、R09、成 687 和齐 205;第 II 群包括 5003、R18、ES40、273、200B 和自 330;第 III 群包括 R15、7327、698-3、杜 32、7922 和 238;第 IV 群包括 81565;第 V 群包括南 21-3。SSR 聚类结果与自交系已知系谱关系还是具有较好的一致性。杜 32 和 7922 都是选自美国先锋杂交种 3382,因此二者亲缘关系比较近,首先聚在一起,该类中的其它自交系也都是选自美国杂交种,具有 Reid 血缘,可称该类为改良 Reid 群;200B 选自自 330×187-2,二者首先相聚是合理的,自 330 属于 Lancaster

群,因此该群可称 Lan.群;5003 据前人研究属于改良 Reid 群,在本研究中虽然被划入 Lan.群,但我们从聚类图可以看出,5003 与该群其它自交系亲缘关系并不是很近;81565 和南 21-3 分别来自墨西哥热带种质和南斯拉夫杂交种,与其它自交系具有较大遗传差异,因此各自聚为一类。另一方面,从杂种优势利用的实践来看,成单 18(698-3×齐 205)、成单 14(杜 32×200B)、成单 19(7327×成 687)、川单 9 号(48-2×5003)、雅玉 2 号(7922×S37)等多个四川地区生产上大面积推广的杂交种。从图 2 可以看出,这些组合的双亲均属于不同的类群,而在同一类群内几乎没有组合出高产杂交种。聚类分析能真实地揭示自交系间的遗传多样性,其聚类结果也比较合理,是进行杂种优势群划分的有效分子标记。

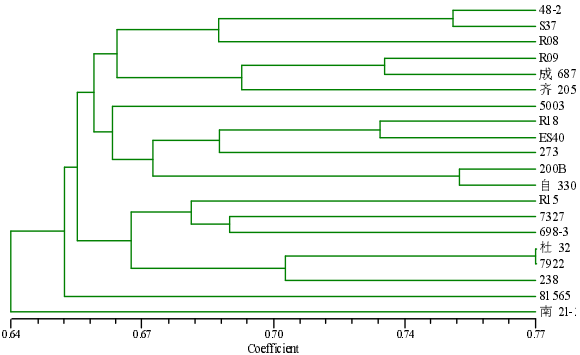


图 2 20 个玉米自交系 SSR 标记聚类图

2.3 SSR 标记聚类后的遗传距离与单株产量的变化

根据 SSR 数据对 20 个玉米自交系聚类, 划分为 5 类, 并计算出聚类后玉米自交系 SSR 分子标记平均遗传距离(表 3)和单株产量平均值(表 4)。从表 3 可以看出, 类间平均遗传距离均大于类内平均遗传距离, 表明分类是合理的。从表 4 中可以看出, 类间平均单株产量均大于类内平均单株产量, 但不同类群间杂交时, 产量有一定的差异, 因此, 合理分类可避免群内自交系间杂交, 减少育种的盲目性和工作量。

表 3 5 群玉米自交系间 SSR 分子标记平均遗传距离					
类群	I	II	III	IV	V
I	0.317 4	0.341 1	0.345 6	0.358 2	0.357 2
II		0.318 2	0.345 2	0.347 4	0.370 2
III			0.315 9	0.351 9	0.359 1
IV				-	0.362 9
V					-

表 4 5 群玉米自交系间平均产量 g/株					
类群	I	II	III	IV	V
I	92.92	100.85	105.18	108.49	106.30
II		97.24	105.49	119.40	115.67
III			90.18	112.15	108.33
IV				-	105.93
V					-

3 结论与讨论

3.1 SSR 分子标记在玉米杂种优势群划分中的应用

将玉米优良自交系划分成不同杂种优势群, 进而建立玉米的杂种优势模式, 已成为国内外玉米育种的一个重要研究方向。SSR 标记具有高丰度、高多态性、在基因组中分布均匀和共显性等特点, 在动植物连锁图谱构建、基因定位、杂种优势群划分以及遗传学分析中得到了广泛的应用。国内外学者利用 SSR 标记进行了杂种优势群划分, 大多取得了很好的结果。Smith 等、Senior 等利用 SSR 引物对玉米自交系进行杂种优势群的划分, 结果与系谱分析基本一致。中国农科院的李新海等、袁力行等也成功将玉米自交系进行了类群划分, 并将不同的分子标记系统进行了比较, 结果表明, SSR 标记具有最高的多态性信息量, 并且标记位点已定位在遗传图谱上, 以及基于 PCR 技术的快速方便等优点, 最适合玉米种质的遗传多样性分析。本实验利用 SSR 标记研究了 20 个四川省常用玉米自交系的遗传变异, 70 对引物在供试材料间共检测到 270 个等位基因变异, 平均

3.86 个, 平均 PIC 值为 0.59, 这一结果与 Smith 等得到的 PIC 值(0.62)和 Senior 等得到的 PIC 值(0.59)相差不多, 说明 SSR 标记具有丰富的多态性; 依据 270 条多态性片段估算出的遗传相似系数, 将 20 个自交系进行了类群划分, 划分结果与系谱关系基本一致。从分群后的单株产量和分子标记遗传距离可以看出, 分群后, 群间的单株产量和遗传距离均大于群内的产量和遗传距离, 说明 SSR 技术在玉米杂种优势群的划分上是可行的。通过划分杂种优势群, 可为选配强优势杂交组合提供理论依据。

3.2 本研究的不足及今后研究设想

本研究的供试材料多为四川地区新近选育的二环系, 没有将我国主要杂种优势群的标准测验种加入, 因此, 部分自交系没有被划分到相应杂种优势群; 本研究选了较多的 SSR 引物, 但是否与杂种优势有关的 QTL 连锁并不清楚; 本研究的双列杂交组合, 只进行了一年一点的田间鉴定试验, 由于环境条件的限制, 有些组合的杂种优势没能完全表现出来。今后的研究如果将我国主要杂种优势群的标准测验种加入, 选择少数与杂种优势 QTL 紧密连锁的、多态性好的引物, 再附之于多年多点杂交组合的田间鉴定, 将会更加经济有效、客观合理地对玉米种质的杂种优势群进行有效的划分。

参考文献:

[1] Hearne C, Ghosh S, Todd J. Microsatellites for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome*, 1993, 8: 288-294.

[2] Bird R M, Gonzalez D L D, Hoisington D. SSR finger prints of CIM-MYT and other inbred lines. *Maize Genet Cooperation News Lett*, 1997, 71: 62-63.

[3] Taramino G, Tarchini R, Ferrario S, et al. Characterization and mapping of simple sequence repeats (SSRs) in sorghum bicolor. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 95: 66-72.

[4] Smith J S C, et al. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.) comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, (95): 163-173.

[5] Senior M L, Murphy J P, Goodman M M, et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system[J]. *Crop Sci.*, 1998, 38: 1088-1098.

[6] 李新海, 傅骏骅, 张世煌, 等. 利用 SSR 标记研究玉米自交系的遗传变异[J]. *中国农业科学*, 2000, 33(2): 1-9.

[7] Saghai-Maroo F A, Biyashev R M, Yang G P, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1984, 91: 5466-5470.

[8] Hoisington D A, Khairallah M, Gonzales-de-Leon D. Laboratory protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. Mexico. D. F.: CIMMYT, 1994.

[9] Smith J S C, Chine E C L, Shu H, 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]. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 95: 163-173.

[10] 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比较研究[J]. *遗传学报*, 2000, 27 (8): 725-733.