

文章编号: 1005-0906(2006)01-0033-04

# 辽宁省主要玉米自交系的 SSR 遗传多样性分析

肖木辑<sup>1,2</sup>, 李明顺<sup>2</sup>, 孙有位<sup>2</sup>, 李新海<sup>2</sup>, 张世煌<sup>2</sup>

(1. 沈阳农业大学, 沈阳 110161; 2. 中国农业科学院作物科学所玉米研究中心, 北京 100081)

**摘要:** 利用 SSR 标记研究了 37 份玉米自交系的遗传多样性, 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。这 70 对引物在供试材料中检测出 260 个等位基因变异, 每对引物检测等位基因 2~7 个, 平均 3.71 个, 每个位点的多态性信息量(PIC)变化为 0.157~0.813, 平均为 0.564。37 份自交系之间的遗传相似系数变化范围为 0.69~0.89。UPGMA 聚类分析结果表明, 37 份供试自交系划分为 6 个类群, 分类结果与系谱来源基本一致。生产上主要推广杂交种的亲本大多来自不同的类群。

**关键词:** SSR; 玉米; 自交系; 多态性信息量; 聚类分析; 辽宁省

**中图分类号:** S513.024

**文献标识码:** A

## Genetic Diversity Revealed by SSR Among Maize Inbred Lines Used Predominantly in Liaoning Province

XIAO Mu-ji<sup>1,2</sup>, LI Ming-shun<sup>2</sup>, SUN You-wei<sup>2</sup>, LI Xin-hai<sup>2</sup>, ZHANG Shi-huang<sup>2</sup>(1. *Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China;**2. Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)*

**Abstract:** Simple sequence repeats(SSR) were used to detect genetic diversity among 37 maize(*Zea mays* L.) inbred lines, which were used widely in Liaoning province. Seventy SSR primers selected from 85 primers produced stable profiles amplified in sample of 37 inbred lines. Seventy primers produced 260 polymorphic amplified fragments. The average number of allele per SSR locus was 3.71 with a range from 2 to 7. The polymorphism information content(PIC) for the SSR loci varied from 0.157 to 0.813 with an average of 0.564. Genetic similarities among the 37 inbred lines ranged from 0.69 to 0.89. The cluster analysis showed that the inbred lines could be classified into 6 distinct clusters. The clustering results were consistent with the groups based on the available pedigree. Most of the parents used in commercial maize hybrids came from the opposite clusters.

**Key words:** Simple sequence repeats, Maize, Inbred line, Polymorphism information content(PIC), Cluster analysis; Liaoning province

SSR 标记是指由 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 反应基础上的通常表现为共显性的遗传标记。该技术简便、快速、稳定性高和等位基因多态性丰富, 因此在作物的遗传作图、基因定位和遗传多样性分析等方面得到广泛应用<sup>[1~9]</sup>。长期以来, 辽宁省的许多育种家创造了大量的优良玉米(*Zea mays* L.)自交系和杂交种, 对全国玉米育种材料的发展产生了重要影响。因

此, 深入分析辽宁省的玉米育种材料及其在杂种优势利用中的规律, 对于推动我国北方乃至全国的玉米种质扩增、改良与创新研究都有重要的参考意义。本研究中利用 SSR 标记对辽宁省应用的主要玉米自交系进行遗传多样性分析, 然后对各类种质在育种实践中的应用进行概括性的评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

表 1 给出了 6 份 CIMMYT 和 6 份国内标准测验种及辽宁省玉米生产中广泛使用的 25 份主要自交系的基本信息。实验所用的引物目录和序列信息均由亚洲玉米生物技术协作网(AMBIONET)推荐和提供, 由上海生工(Sangon)生物工程公司合成。

收稿日期: 2005-07-27; 修回日期: 2005-11-10

基金项目: 亚洲玉米生物技术协作网基金 (AMBIONET ICC5247B24) 资助项目

作者简介: 肖木辑(1965-), 男, 辽宁省朝阳市人, 沈阳农业大学在读博士, 高级农艺师, 从事玉米育种工作, 现在中国农科院从事玉米遗传多样性研究。E-mail: mujixiao@163.com  
张世煌为本文通讯作者。E-mail: cshzhang2000@yahoo.com

表1 辽宁主要玉米自交系和12个标准自交系及系谱来源

编号	自交系	来源	编号	自交系	来源
1	CML396	CIMMYT, 选自 Pob21	20	本 M130	7884-7 × M67
2	CML236	CIMMYT, 选自 EV8232	21	丹 3130	P78599 杂交种选系
3	CML206	CIMMYT, 津巴布韦 EV7922	22	丹 598	含 P78599 种质
4	CML202	CIMMYT, 津巴布韦 ZSR923	23	丹 599	P78599 杂交种选系
5	CML292	CIMMYT, 选自 Pob28	24	7884	78-6 × H84/78-6
6	CML51	CIMMYT, 选自 STA.ROSA8079	25	沈 139	P78599 杂交种选系
7	丹 340	白骨旅 × 有稃玉米	26	K12	黄早四 × 潍春
8	齐 319	P78599 杂交种选系	27	沈 5003	美国杂交种 3147
9	掖 478	沈 5003 × U8112	28	铁 7922	美国杂交种 P3382
10	B73	BSSS	29	自 330	可利 67 × Oh43
11	黄早四	塘四平头杂株	30	丹黄 02	旅大红骨系统综合种
12	Mo17	C103 × 187-2	31	沈 118	朝 23 × 超甜
13	C8605-2	铁 7922 × 沈 5003	32	辽 138	丹 340 改良系
14	辽 2345	铁 7922 × 沈 5003	33	旅九宽	旅九变异株
15	辽 3053	(铁 7922 × B68)/沈 5003	34	铁 9010	抗 1 × 丹 340
16	辽 5114	铁 7922 × 沈 5003	35	丹 9046	铁 7922 × 沈 5003
17	辽白 371	大白粒二环系	36	沈 137	6JK111 ⊗
18	辽巨 311	哈达顶变异株(南斯拉夫)	37	E28	A619 <sup>mi</sup> × (旅九宽) × 旅九宽
19	沈 136	P78599 杂交种选系			

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 DNA 提取

采用 Saghai-Maroo 等提出的 CTAB 法提取基因组 DNA, 用分光光度计检测 DNA 的浓度和质量, 把 DNA 浓度调至 10 ng/μL 备用。在 PTC-200 PCR 仪上进行。反应总体积为 10 μL, 其中包括 10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 1.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 4 种 dNTP 各 0.25 mol/L, 0.3 mol/L SSR 引物, 5Utaq 酶, 25 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 35 s, 52 ~ 60℃ (据引物而定) 与模板靶位点结合 35 s, 72℃ 引物沿模板延伸 1 min, 共 35 个循环; 最后在 72℃ 延伸 5 min, 降至 4℃ 取出后变性。

### 1.2.2 电泳、银染

以 PBR322 片段为分子量标记, 用 4.5% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 使用 Bio-RAD 公司的电泳设备, 38 cm × 30 cm × 0.4 mm 测序胶板, 恒定功率 60 W, 电泳 50 min。按照 CIMMYT 应用生物技术中心的程序进行银染 (Hoisington, et al. 1994)。

### 1.2.3 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 version 2.11 软件进行数据处理, 按 UPGMA 方法 (Unweight Pair Group Method using Arithmetic Averages) 对供试自交系进行聚类。每一个 SSR 位点的多态性信息量 (简称 PIC) 按 Smith 等 (1997) 的公式计算, 即  $PIC = 1 - \sum p_i^2$ , 其中  $p_i$  为  $i$  位点的基因频率。⊗

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 标记检测结果

利用 85 对 SSR 引物对 37 份自交系进行同源位点扩增, 其中 70 对 SSR 引物的扩增产物在 4.5% 聚丙烯酰胺凝胶上具有多态性, 带型稳定, 其余 15 对引物在某些自交系中不能有效地启动基因组 DNA 或扩增质量较差, 无法进行统计分析。这 70 对 SSR 引物 (表 2) 分布在玉米 10 条染色体上, 在 37 份自交系间共检测出 260 个等位基因变异, 每对引物检测到 2 ~ 7 个等位基因, 平均 3.71 个。每个位点的多态性信息量 (PIC) 变化为 0.157 ~ 0.813, 平均 0.564, 其中引物 umc1061 位点的 PIC 最大为 0.813, nc133 最小为 0.157。

表2 70对引物在37份自交系之间扩增的片断数目及多态性信息量

编号	引物	染色体位置	片断数	信息量	编号	引物	染色体位置	片断数	信息量
1	nc130	5.00	2	0.489 8	10	phi034	4.11	5	0.686 3
2	nc133	2.05	2	0.156 7	11	phi041	10.00	4	0.637 8
3	phi006	4.11	5	0.690 0	12	phi046	3.08	2	0.475 3
4	phi011	1.09	4	0.665 1	13	phi047	3.09	3	0.573 1
5	phi014	8.04	2	0.455 8	14	phi049	3.01	2	0.156 7
6	phi015	8.08	7	0.761 1	15	phi050	10.03	3	0.523 1
7	phi024	5.01	4	0.707 1	16	phi053	3.05	4	0.683 7
8	phi027	9.03	3	0.496 5	17	phi056	1.01	4	0.654 7
9	phi029	3.04	4	0.733 0	18	phi057	7.01	4	0.651 1

续表 2

编号	引物	染色体位置	片断数	信息量	编号	引物	染色体位置	片断数	信息量
19	phi059	10.02	4	0.677 9	45	phi123	6.07	3	0.540 8
20	phi062	10.04	2	0.482 1	46	phi127	2.08	3	0.604 9
21	phi063	10.02	4	0.713 5	47	phi227562	1.12	4	0.689 0
22	phi064	1.11	5	0.751 5	48	phi233376	8.03	6	0.723 8
23	phi065	9.03	4	0.796 6	49	phi308707	1.10	3	0.589 1
24	phi072	4.00	4	0.648 6	50	phi328175	7.04	4	0.696 1
25	phi073	3.05	4	0.584 7	51	phi331888	5.04	4	0.635 8
26	phi076	4.11	3	0.552 7	52	phi339017	1.03	4	0.244 0
27	phi078	6.05	5	0.683 4	53	phi374118	3.02	3	0.589 8
28	phi079	4.05	4	0.450 6	54	phi420701	8.00	3	0.600 3
29	phi080	8.08	5	0.670 6	55	phi423796	6.01	3	0.527 1
30	phi083	2.04	4	0.673 5	56	phi448880	9.05	3	0.349 2
31	phi084	10.4	2	0.486 1	57	phi96100	2.00	5	0.692 8
32	phi085	5.05	4	0.617 6	58	umc1061	10.06	3	0.813 0
33	phi087	5.06	4	0.658 0	59	umc1122	1.06 ~ 1.07	5	0.674 0
34	phi089	6.08	3	0.598 7	60	umc1124	1.05	3	0.429 5
35	phi102228	3.04 ~ 3.05	3	0.594 6	61	umc1143	6.00	5	0.496 3
36	phi108411	9.05	3	0.369 8	62	umc1152	10.01	4	0.665 1
37	phi109188	5.00	6	0.634 0	63	umc1153	5.09	4	0.653 0
38	phi109275	1.00	4	0.695 1	64	umc1161	8.06	5	0.697 3
39	phi112	7.01	4	0.517 0	65	umc1196	10.07	5	0.768 4
40	phi113	5.03 ~ 5.04	4	0.672 2	66	umc1277	9.08	4	0.599 2
41	phi114	7.03	4	0.452 2	67	umc1279	9.00	2	0.819 4
42	phi115	8.03	2	0.500 0	68	umc1399	3.07	4	0.657 4
43	phi116	7.06	5	0.674 3	69	umc1545	7.00	4	0.730 9
44	phi121	8.04	2	0.152 8	70	umc1555	2.02 ~ 2.03	3	0.419 9

## 2.2 聚类结果

从聚类结果可知:37 份自交系可分为 6 个类群。CML396、CML292、CML236、CML206、辽巨 311 为一群,属于 Reid 或 Tuxpeno 种质;CML202、CML51、沈 137、沈 136、齐 319、丹 9046、沈 139 丹 3130、丹 599 为一群,属于 PB 种质;黄早四和 K12 为一群,属于塘四平头种质;掖 478、沈 5003、辽白 371、本 M130、B73、铁 7922、C8605-2、辽 2345、辽 3053、辽 5114 为一群,属于 PA 种质;Mo17、自 330、沈 118 为一群,偏向于 Lan.种质;丹 340、辽 138、旅九宽、E28、铁 9010、丹黄 02 为一群,属于旅大红骨种质。

## 3 结论与讨论

从聚类结果可以看到:在辽宁的玉米育种中,利用的主要种质属于 3 种类型,即:PA (Reid)、旅大红骨和最近出现的美国杂交种 P78599 及相近种质选系(沈 137 虽然不是 P78599 的选系,但仍聚在一起,现在把这一类群称作 PB 种质<sup>[1]</sup>)。虽然 Lan.种质的代表系 Mo17 在辽宁玉米育种中曾经发挥过重要作用,如丹玉 13(Mo17 × E28),但是现在 Lan.种质已经用得较少。因黄早四的衍生系在沈单 10(Q1261 × 沈 137)、沈单 16(K12 × 沈 137)及沈单 18(沈 152 × 沈 137)中使用,塘四平头种质也开始在辽宁省应用。但在辽宁省使用黄早四的衍生系应注意选择抗丝黑穗病的类群。

玉米商业育种的基本原则是在杂种优势群内选

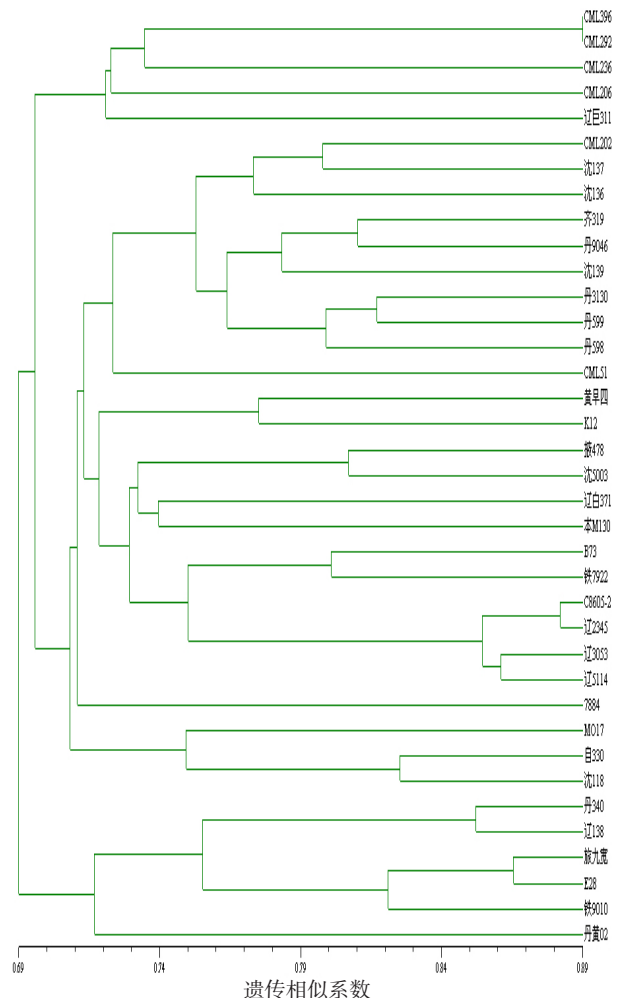


图 1 根据 70 对 SSR 引物检测的遗传相似系数对 37 份自交系的聚类图

系,在杂种优势群间组配杂交组合。辽宁省在群内选系最成功的例子是PA群的沈5003和铁7922杂交选育出C8605-2、辽2345、辽3035、辽5144等优良自交系。其中C8605-2组配了铁单10(C8605-2×丹340)、铁单12(C8605-2×铁9010)及丹玉39(C8605-2×丹598),它们分别属于PA×旅大红骨和PA×PB杂种优势类群。这些品种在辽宁省都有很大的种植面积。

从聚类结果可知,辽宁省大面积推广的杂交种都属于杂种优势类群间的杂交组合,利用的主要杂种优势模式为PA×旅大红骨。例如铁单10(C8605-2×丹340)即属于该类型的杂交种。根据以往的研究(张世煌等2002<sup>[11]</sup>),中单2号(Mo17×自330)应属于LAN×旅大红骨类型,本研究组把Mo17和自330聚在同一个亚群内,与王懿波的结果相近<sup>[12-13]</sup>,但这两个自交系之间的相似系数在0.75左右,已经处于划分杂种优势类群的临界值附近。这似乎暗示旅大红骨亚群的某些种质具有中间类型的特征。

在辽宁省所利用的杂种优势模式是早期的Lan×旅大红骨(如中单2号、丹玉13、丹玉15)、PA×旅大红骨(如铁单10)等骨干模式,到现在PA×PB(如丹玉39、丹玉26)、塘四平头×PB(如沈单16)及PB×旅大红骨(如丹玉24),呈现多元化的趋势。但由于国内种质相对于PA和PB具有中间类型的特征(张世煌等2002<sup>[11]</sup>),随着种质扩增与改良,杂种优势群和模式可能会逐渐朝着简单化的方向演变。

利用SSR分子标记划分杂种优势类群的结果与系谱关系基本吻合,只有丹9046与系谱完全不一致,可能是实验样品有问题,需进一步验证。CIMMYT的6个标准测验种中CML396、CML292、CML236和CML206自成一类,理论上可以与其它自交系组配杂交种,但CIMMYT种质是热带或亚热带材料,需经过驯化和改良才能在我国北方使用。因此,有必要研究这些热带种质与温带种质的对应关系。CML51、CML202与PB种质聚在一起,可用来改良PB种质。

PB种质是近年由美国杂交种选育而成的系列自交系,具有持绿性好、耐旱性强、活秆成熟、根系发达、品质优良、多数为硬粒或偏硬粒型子粒、抗多种病害、长穗、白轴、花粉量大等优点。在全国大部分地区都可以使用,组配了许多优良杂交种<sup>[14-16]</sup>,有一些成为生产上主推品种,如农大108、农大3138、鲁单

981等。PB种质在我国的成功应用,证明了引进外来种质,拓宽玉米育种的遗传基础,同时挖掘现有的国内种质和地方种质,对提高我国玉米育种水平具有重要意义。

#### 参考文献:

- [1] Liu Kejun, Goodman Major, Muse Spencer, et al. Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 2003, 165: 2117-2128.
- [2] Labate J A, Kendall R, Mitchell Sharon E, et al. Molecular and historical aspects of corn belt dent diversity. *Crop Sci.*, 2003, 43: 80-91.
- [3] Mumm R H, Dudley J W. A classification of 148 US inbreds: I. Cluster analysis based on RFLPs. *Crop Sci.*, 1994, 34: 842-851.
- [4] Muehlbauer G J, Specht J E, Thomas-Compton M A, et al. Near-isogenic lines: A potential resource in the integration of conventional and molecular marker linkage maps. *Crop Sci.*, 1988, 28: 729-735.
- [5] Reif J C, Melchinger A E, Xia X C. Genetic distance based on simple sequence repeats and heterosis in tropical maize population. *Crop Sci.*, 2003, 43: 1275-1282.
- [6] Jiang C, Zeng Z B. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative traits loci. *Genetics*, 1995, 140: 1111-1127.
- [7] 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.): Comparisons with data from RFLPs and pedigree. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 95: 163-173.
- [8] 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. *Crop Sci.*, 1998, 38: 1088-1098.
- [9] George M L C, Regalado E, Li W, et al. Molecular characterization of Asian maize inbred lines by multiple laboratories. *Theor. Appl. Genet.*, 2004, 109: 80-91.
- [10] 李新海,袁力行,李晓辉,等.利用SSR标记划分70份我国玉米自交系的杂种优势群[J].*中国农业科学*,2003,36(6):622-627.
- [11] Zhang S H, Li X H, Peng Z B, et al. Heterotic groups and exploitation of heterosis—the methodology, strategy, and its use in hybrid maize breeding in China. *Proceedings of the 8th Asian regional maize workshop*. Bangkok, Thailand, 2002, 64-68.
- [12] 王懿波,王振华,王永普,等.中国玉米主要种质杂种优势利用模式研究[J].*中国农业科学*,1997,30(4):16-24.
- [13] 王懿波,王振华,王永普,等.中国玉米主要种质杂种优势群的划分及其改良利用[J].*华北农学报*,1998,13(1):74-80.
- [14] 焦仁海,刘兴武,孙发明,等.浅谈78599种质杂种优势模式[J].*玉米科学*,2004,12(3):52-54.
- [15] 鲁宝良,赵文媛,刘日尊,等.Mo17衍生系组配杂交种对我国玉米生产的影响和贡献[J].*玉米科学*,2004,12(增刊):127-128.
- [16] 杨雨明,刘日尊,赵文媛.丹玉系列玉米自交系杂交种应用[J].*杂粮作物*,2003,23(6).