

文章编号: 1005-0906(2006)06-0062-04

# SSR 标记在糯玉米遗传多样性研究上的应用

杨 勇<sup>1,2</sup>, 王鹏文<sup>2</sup>, 张树光<sup>1</sup>

(1. 黑龙江八一农垦大学植物科技学院, 黑龙江 大庆 163319; 2. 天津农学院农学系, 天津 300384)

**摘要:** 利用 SSR 标记研究了 30 份我国主要糯玉米(*Zea mays* L. *ceratina* Kulesh) 自交系的遗传变异。用 21 对扩增型稳定的引物, 从供试材料中检测出 101 个等位基因变异, 每对引物检测等位基因 2~10 个, 平均 4.81 个, 平均多态性信息量 0.60。

**关键词:** 糯玉米; 遗传多样性; SSR 标记

**中图分类号:** S513.04

**文献标识码:** A

## Application of SSR Markers in Studying Genetic Diversity of Waxy Corn

YANG Yong<sup>1,2</sup>, WANG Peng-wen<sup>2</sup>, ZHANG Shu-guang<sup>1</sup>(1. *Plant Science and Technology College, Heilongjiang August First Land Reclamation University, Daqing 163319;**2. Department of Agronomy, Tianjin Agricultural University, Tianjin 300384, China)*

**Abstract:** Simple sequence repeats(SSR) marker were adopted in heterotic grouping of 30 waxy corn inbred lines. Twenty-one SSR primers giving stable amplified profiles detected 101 alleles among the lines tested. The average number of alleles per SSR locus was 4.81 with a range from 2 to 10. The value of polymorphism information content (PIC) for each SSR locus varied from 0.43 to 0.87 with an average of 0.60.

**Key words:** Waxy corn; Genetic diversity; Simple sequence repeats marker

糯玉米起源于中国, 是玉米属玉米种的一个亚种。由于糯玉米的种质材料多数来源于农家种和地方种, 大多数自交系无系谱可查, 亲缘关系不清楚, 无法利用系谱追踪法研究其遗传多样性。配合力测定、同工酶标记等方法具有一定的局限性。借鉴普通玉米自交系杂种优势群划分的研究方法, 利用 SSR 标记技术研究糯玉米遗传多样性并用于指导糯玉米育种。本研究利用糯玉米 SSR 分子标记技术对 30 份糯玉米的遗传多样性进行研究, 为糯玉米种质扩增改良与创新研究提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

从全国各地搜集到的糯玉米自交系 30 份: 垦环 7 号、W 选-2、W 选-3、WN07、白糯 567、白糯 567-2、黄糯 566-7、鲁糯 326、黄糯 599-1、鲁糯 314-2、鲁糯

326、黄糯 WP566-8、粘 595-3、02 选 422、黑糯 989-1、黑糯 1191、黑糯 974-1、黑糯 974-2、白糯 976-1、黄糯 569、02 选 302-3、系保 2、02 选 496-3、02 选 498-1、02 选 457-1、黄糯 566-6、黄糯 983-2-2、02 选 491、沪糯 329-2、黄糯 983-1, 编号为 1~30。

### 1.2 SSR 标记分析

采用 CTAB 法提取 DNA。PCR 反应体系为: 反应总体积 30  $\mu$ L, 其中含 1  $\times$  PCR buffer 200  $\mu$ M dNTPs, 1.5 mm MgCl<sub>2</sub>, 50 ng 前引物、50 ng 后引物、1.2U Tag 酶和 50 ng 基因组 DNA。扩增反应在德国 Eppendorf 公司的 Mastercycler gradient 上进行, 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 65 $^{\circ}$ C  $\rightarrow$  55 $^{\circ}$ C (每循环降低 1 $^{\circ}$ C), 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 11 个循环; 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 冷却 10 min。

### 1.3 统计分析

PCR 扩增产物经 3% 琼脂糖凝胶电泳、EB 染色、凝胶成像系统上拍照。在相同迁移率位置上的 SSR 扩增产物, 有带记为 1, 无带记为 0。利用软件 DPS v3.01 版, 采用 Nei 和 Li(1979)的方法, 按 UPG-

收稿日期: 2006-08-19

作者简介: 杨 勇(1978-), 男, 黑龙江逊克人, 硕士, 主要从事分子育种研究工作。

王鹏文为本文通讯作者。Tel: 022-23792078

MA(Unweight Pair Group Method Using Arithmetic Averages)计算数据,获得聚类分析图。以简单配对参数(simple matching coefficient)估计基因频率,SSR 位点的多态性信息量按  $PIC=1-\sum_{i=1}^n f_i^2$  计算,其中  $f_i$  为  $i$  位点的基因频率。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR 引物的遗传多样性

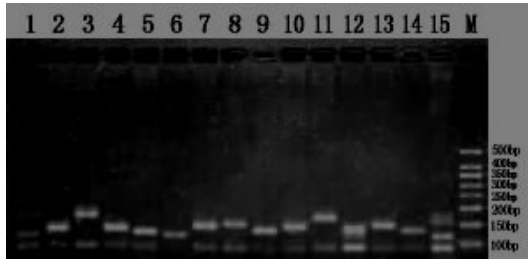


图 1 SSR 引物 bnlg1792 在 15(1~15)个自交系上的遗传多样性

Fig.1 The genetic polymorphisms of 15(1-15) inbred lines using SSR primer bnlg 1792

SSR 引物 bnlg1792 在 30 个糯玉米自交系上的遗传多样性。利用 3.0%的琼脂糖、0.5 × TBE 缓冲液,电泳方向为:由上至下,50bp DNA Ladder(购于北

京赛百盛),由下至上分别为:100bp,150bp,200bp,250bp,300bp,350bp,400bp 和 500bp。编号同试验材料(图 1、图 2)。

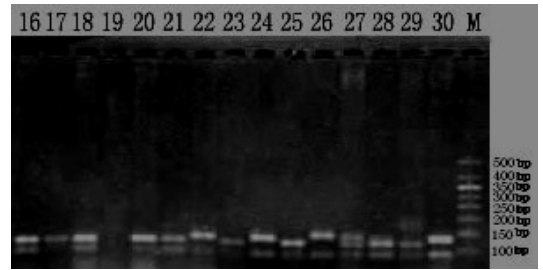


图 2 SSR 引物 bnlg1792 在 15(16~30)个自交系上的遗传多样性

Fig.2 The genetic polymorphisms of 15(16-30) inbred lines using SSR primer bnlg 1792

### 2.2 SSR 标记结果分析

利用 36 对 SSR 引物对 30 份糯玉米自交系 DNA 多态性进行分析,选出扩增带型稳定、多态性较强、重复性较好的 21 对引物(表 1)。这些引物分布在玉米的 10 条染色体上,共检测出 101 个等位基因,每对引物可以检测到 2~10 个数目不等的等位基因,平均为 4.81 个。

表 1 30 个糯玉米自交系用 SSR 分析鉴定的遗传变异

Table 1 Genetic variability identified with SSR analysis for 30 waxy corn inbred lines

编号 Code	引物 Primers	染色体位置 Genomic position	等位基因数 Allelic number	多态性信息量 PIC	编号 Code	引物 Primers	染色体位置 Genomic position	等位基因数 Allelic number	多态性信息量 PIC
2	umc1200	1.02	2	0.43	23	phi034	7.02	5	0.62
4	phi120	1.11	7	0.63	24	bnlg1792	7.02	10	0.87
5	bnlg1327	2.02	2	0.43	25	bnlg434	7.03	4	0.59
8	phi099	3.02	3	0.53	26	phi051	7.06	4	0.59
11	phi047	3.09	8	0.85	27	phi116	7.06	4	0.59
12	umc1017	4.01	4	0.59	28	phi125	8.03	4	0.59
15	bnlg565	5.02	6	0.62	30	bnlg1056	8.08	5	0.62
17	bnlg118	5.07	7	0.63	33	bnlg292	9.06	3	0.53
18	bnlg1538	6.01	7	0.63	35	phi063	10.02	3	0.53
20	phi123-2	6.06	2	0.43	36	phi062	10.04	2	0.43
21	bnlg1367	7.00	9	0.85					

### 2.3 糯玉米自交系间树状图

将 SSR 所得的 0,1 型数据,利用 DPS v3.01 版软件,按 Nei 和 Li(1979)和非加权配对算数平均法(UPGMA)进行遗传多样性分析的方法计算遗传距离(图 3)。

### 2.4 30 份糯玉米自交系遗传多样性分析

为了验证实验的合理性,人为加入相同的糯玉

米自交系,并随机编号。鲁糯 326、鲁糯 326 为同一糯玉米自交系,遗传距离 0.000 0,同样,本试验中两份白糯 567、白糯 567-2 糯玉米自交系,为姊妹系,遗传距离 0.000 0,由树状图可以看出,划分结果比较合理。

从图 3 可以看出,30 个玉米自交系之间遗传距离范围 0.000 0~0.820 4。遗传距离最小者为糯玉米

自交系白糯 567、白糯 567-2、黄糯 566-7、黄糯 326、黄糯 566-8、和 02 选 422 之间以及黑糯 974-2、黑糯 974-1、黄糯 569 三者之间，遗传距离均为 0.0000；遗传距离最大者为 02 选 302-3 和垦环 7，遗传距离为 0.8204，02 选 302-3 是来自于上海的糯玉米自交系，垦环 7 是来自于东北的糯玉米自交系。

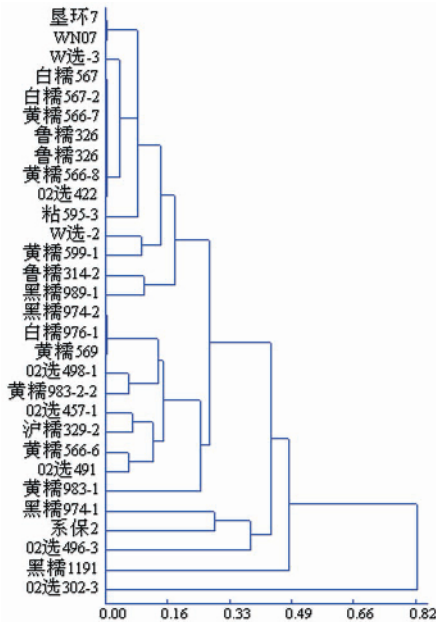


图3 30个糯玉米自交系的SSR聚类树状图

Fig.3 Dendrogram by cluster analysis based on SSR genetic similarity of 30 waxy corn inbred lines

以遗传距离 0.1818 为标准,30 个糯玉米自交系可以分为 VII 大类群,第 I 类群为:垦环 7、WN07、W 选 -3、白糯 567、白糯 567-2、黄糯 566-7、鲁糯 326(两份自交系材料)、黄糯 566-8、02 选 422、粘 595-3、W 选 -2、黄糯 599-1、鲁糯 314-2 和黑糯 989-1;第 II 类群为:黑糯 974-2、白糯 976-1、黄糯 569、02 选 498-1、黄糯 983-2-2、02 选 457-1、沪糯 329-2、黄糯 566-6、02 选 491 和黄糯 983-1;第 III 类群为:黑糯 974-1;第 IV 类群为:系保 2;第 V 类群为:02 选 496-3;第 VI 类群为:黑糯 1191;第 VII 类群为:02 选 302-3。

根据地理来源垦环 7、W 选 -2、W 选 -3、WN07 同属于东北的糯玉米自交系材料。垦环 7、W 选 -2 是津鲜糯 101 的母本和父本,二者的遗传距离为 0.2173,两者杂交有可能产生比较优良糯玉米杂交种;W 选 -3 和 WN07 是津农 3 的父母本,两者的遗传距离为 0.1111;W 选 -3、白糯 567 是津鲜糯 106 的父母本,两者的遗传距离为 0.0344。同一群内自交系杂交也可以培育出优良的杂交种,只是几率相

对较小。

白糯 567、白糯 567-2、鲁糯 326、黄糯 599-1、鲁糯 314-2、系保 2 等 5 个自交系均来源于山东,白糯 567、白糯 567-2、鲁糯 326 相互之间的遗传距离都为 0.0000;黄糯 599-1 与鲁糯 314-2 的遗传距离为 0.1818;黄糯 599-1 与系保 2 的遗传距离为 0.5294,鲁糯 314-2 与系保 2 的遗传距离也为 0.5294;黄糯 599-1 与白糯 567、白糯 567-2、鲁糯 326 的遗传距离均为 0.1200;鲁糯 314-2 与白糯 567、白糯 567-2、鲁糯 326 的遗传距离均为 0.1200;系保 2 与白糯 567、白糯 567-2、鲁糯 326 的遗传距离均为 0.5000;黄糯 599-1 与系保 2、鲁糯 314-2 与系保 2、系保 2 与白糯 567、白糯 567-2、鲁糯 326 的遗传距离都大于或等于 0.5000。说明系保 2 与其它山东糯玉米自交系有很大不同,可能系保 2 不是本地品种,这有可能为其它远缘基因介入或由基因突变形成的。

02 选 496-3、02 选 498-1、02 选 457-1、02 选 491 这 4 个糯玉米自交系缘自海南。02 选 496-3 与 02 选 498-1 的遗传距离为 0.4285,02 选 496-3 与 02 选 457-1 的遗传距离为 0.2857,02 选 496-3 与 02 选 491 的遗传距离为 0.2000,02 选 498-1 与 02 选 457-1 的遗传距离为 0.1250,02 选 498-1 与 02 选 491 的遗传距离为 0.1764,02 选 457-1 与 02 选 491 的遗传距离为 0.1764。02 选 496-3 与 02 选 498-1 的遗传距离最大,具有杂种优势,可以进行组配。4 个糯玉米自交系之间的遗传距离都大于 0.1000,遗传差异明显。

02 选 302-3 与沪糯 329-2 来源于上海,遗传距离为 0.7500,遗传差异大。02 选 302-3 与所有其它糯玉米自交系的遗传距离都大于 0.6667,是所有 30 个糯玉米自交系中最特殊的一个,与其它自交系的遗传距离大,与其它自交系产生杂种优势的几率相当大,具有较大利用前景。

### 3 结论及讨论

(1)SSR 扩增结果为共显性标记,具有丰富的多态性,结果重复性好。PCR 扩增不受季节、环境和基因表达与否的限制,可以快速将大量材料划到相应的杂种优势群中。本研究根据 SSR 标记聚类分析结果为:30 个糯玉米自交系可以分为 VII 大类群,30 个糯玉米自交系之间遗传距离范围为 0.0000~0.8204,表明糯玉米间的遗传多样性较高,与刘永建(2002)研究结果一致。

(2)SSR 标记的出现为寻找新的种质资源,拓宽

玉米种质基础提供了较理想的方法。保持不同种质间的遗传距离是获得杂种优势的基础。因此,在合成新种质时应选择相似系数较小或遗传距离大的材料。根据本研究结果,糯玉米自交系 02 选 302-3 与垦环 7 遗传距离为 0.820 4,两者产生杂种优势的可能性较大。

(3)本实验的关键在于 SSR 引物的筛选,PCR 进行引物筛选工作时尤显重要。在进行 PCR 时,有时会遇到一些问题,需要改变各种影响 PCR 的参数及条件以保证反应产物的产量及特性。比如调整退火温度,改变循环次数,调整  $Mg^{2+}$  浓度等等。

(4)姊妹系白糯 567、白糯 567-2 与黄糯 566-7、黄糯 326、黄糯 566-8、02 选 422 四者之间的遗传距离为 0.000 0;黄糯 569 与黑糯 974-2、黑糯 974-1 两者之间的遗传距离也为 0.000 0,所选的引物没有把这两类控制颜色的基因扩增出来,需要进一步筛选引物来区分它们之间的细微差别,除控制颜色的基因片断以外,其他基因差别不大。

(5)由于大多数糯玉米自交系来源于农家品种,大多数自交系无系谱可查,亲缘关系不清楚,用系谱追踪方法无法对糯玉米类群进行划分,而其它常规划分方法具有种种局限性,致使糯玉米育种处于低效率、低水平状态。用 SSR 标记对糯玉米自交系遗传多样性进行分析,可以为糯玉米育种人员提供理论指导。

(6)本研究所用的糯玉米自交系数数量尚显不足,

没能包括所有的糯玉米自交系。由于 SSR 分子标记结果重复性好,本研究只利用 SSR 一种分子标记方法,而没有利用其它的分子标记方法如 RAPD、RFLP、AFLP,后续工作应利用其它分子标记结果与 SSR 标记结果作比较并结合田间调查,从而对糯玉米自交系遗传多样性进行更细致、全面的分析。

#### 参考文献:

- [1] 王鹏文,高大翔. 玉米种质类群划分和利用研究对天津市玉米育种的启示[J]. 天津农业科学,2004,10(4):1-5.
- [2] Saghai-Marooif M A, Soliman K M, Jorgensen R A, Allard R W. Ribosomal DNA spacer length poly-morphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics[C]. Proceeding of the National Academy of Science USA, 1984, 81: 8014- 8018.
- [3] Provan J, Powell W, Dewar H, et al. An extreme cytoplasmic bottleneck in the modern European cultivated potato(*Solanum tuberosum*) is not reflected in decreased levels of nuclear diversity[C]. Proceedings of the Royal Society of London B, 1999, 266: 633-639.
- [4] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1979, 76: 5269-5273.
- [5] 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[J]. Theoretical Applied Genetics, 1997, 95: 163-173.
- [6] 刘永建. 用 SSR 标记研究西南糯玉米种质资源的遗传多样性[D]. 四川:四川农业大学硕士学位论文,2002.

(责任编辑:朴红梅)