

文章编号: 1005-0906(2009)04-0032-04

# 利用 SSR 标记分析 40 个糯玉米 自交系遗传多样性

陈 婧<sup>1,2</sup>, 杨引福<sup>1</sup>, 郭 强<sup>1</sup>

(1. 西北农林科技大学农学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 天水市农业局, 甘肃 天水 741000)

**摘 要:** 利用 SSR 标记研究了 40 个糯玉米自交系的遗传多样性。用 32 对扩增带型稳定的 SSR 引物从供试材料中检测出 152 个等位基因变异, 每对引物检测等位基因 2~9 个, 平均 4.75 个。SSR 引物的 PIC 介于 0.303~0.862, 平均多态性信息量为 0.632。利用 UPGMA 聚类分系法将供试自交系划分为 5 类, 该划分结果与根据地理来源、种质系谱的分类结果基本一致。SSR 分子标记辅助的自交系改良是糯玉米品种改良的重要途径。

**关键词:** 糯玉米; 自交系; 遗传多样性; SSR

**中图分类号:** S513.024

**文献标识码:** A

## Study on Genetic Diversity About 40 Waxy Corn Inbred Lines by SSR Markers

CHEN Jing<sup>1,2</sup>, YANG Yin-fu<sup>1</sup>, GUO Qiang<sup>1</sup>

(1. College of Agronomy, Northwest A&amp;F University, Yangling 712100;

2. Agricultural Bureau of Tianshui, Tianshui 741000, China)

**Abstract:** The genetic diversity of 40 waxy corn inbred lines were studied by simple sequence repeats (SSR) markers. 32 SSR primers giving stable amplified band pattern detected 152 alleles among the lines tested. The average number of alleles per SSR locus were 4.75 with a range from 2 – 9. The value of polymorphism information content (PIC) for each SSR locus varied from 0.303 to 0.862 with average of 0.632. The 40 inbred lines were divided into 5 groups by UPGMA method based on SSR fingerprinting. The clustered results were similar to that based on geographical resource and germplasmic genealogy. SSR marker could be an accurate and reliable method to study diversity of waxy corn inbred line. SSR marker assisted genetic improvement of waxy corn inbred lines would be an important way to breed new waxy corn cultivars.

**Key words:** Waxy corn; Inbred line; Genetic diversity; SSR

糯玉米是起源于我国的宝贵玉米种质资源, 经过数百年的变异, 在粒色、产量、品质、抗性等方面形成了较大差异, 有着丰富的遗传多样性。育种实践表明, 杂交种亲本的选配关键在于对亲本的血缘关系、系统关系及遗传差异的掌握程度。由于糯玉米的种质材料多数来源于农家品种和杂交种, 多数自交系

无系谱可查, 致使亲缘关系不清楚, 无法利用系谱追踪法研究其遗传多样性。利用配合力测定、同工酶标记等方法研究糯玉米杂种优势群也有一定的局限性。近年来, 随着现代生物技术的发展, 出现了许多在 DNA 水平上揭示生物遗传多样性的分子标记。其中, SSR 标记以其多态性高、稳定性好、具有共显性、操作简单等优点已广泛应用于玉米自交系遗传多样性的研究。本研究利用 SSR 标记技术分析了 40 个糯玉米自交系遗传多样性, 为提高杂交组配的科学性、提高育种效率和育种水平, 为糯玉米种质改良利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2008-08-30

基金项目: 陕西省 13115 科技创新重大专项(2007ZDG-03)

作者简介: 陈 婧(1982-), 女, 在读硕士, 从事玉米遗传育种研究。

Tel: 15929300182 E-mail: chenjing0909@tom.com

杨引福为本文通讯作者。E-mail: yinfuyang@tom.com

1.1 供试材料

供试材料为 40 个糯玉米自交系,由西北农林科技大学农学院玉米研究所提供(表 1)。

表 1 供试糯玉米自交系的来源或系谱  
Table 1 40 waxy corn inbred lines tested in the study

| 编 号<br>No. | 自交系来源<br>Source of inbred line | 编 号<br>No. | 自交系来源<br>Source of inbred line |
|------------|--------------------------------|------------|--------------------------------|
| 1          | W <sub>x2</sub>                | 21         | W <sub>x3</sub>                |
| 2          | 秦母                             | 22         | W <sub>x4</sub>                |
| 3          | 白糯选 1                          | 23         | W <sub>x5</sub>                |
| 4          | 张 H1                           | 24         | 苏玉糯选                           |
| 5          | 中华黑 × Y75 选白                   | 25         | 农华糯 1 号选                       |
| 6          | 中华黑 × Y75 选黄                   | 26         | 郑黄糯选                           |
| 7          | W <sub>x1</sub>                | 27         | 中华黑选白                          |
| 8          | 中白糯选                           | 28         | 陕黑糯选白                          |
| 9          | 白糯一号选                          | 29         | 京科糯 123 选                      |
| 10         | 张 H2                           | 30         | 甜糯选 1                          |
| 11         | 鲁黄糯杂选                          | 31         | 甜糯选 2                          |
| 12         | G2007                          | 32         | 美玉 5 号选                        |
| 13         | 中白糯 4-1                        | 33         | 金凤 5 选                         |
| 14         | 中群 14 糯选                       | 34         | 04 黑 09-3                      |
| 15         | 太黑 3 选                         | 35         | 凤糯 476 选                       |
| 16         | 陕黑糯选                           | 36         | 光成选                            |
| 17         | 丰达黄金玉选                         | 37         | 渝糯 301 选                       |
| 18         | 太黑 1                           | 38         | 西垦糯白 13 号选                     |
| 19         | 04 红 32                        | 39         | 新白糯 9596 选                     |
| 20         | 双紫糯                            | 40         | 燕甜糯 301 选                      |

1.2 DNA 的提取与检测

各供试材料取 20 粒于恒温培养箱中培养 7 d。取 5~10 株新鲜叶片在液氮下混合研磨,采用改良 CTAB 法提取糯玉米总 DNA。紫外分光光度计(EV300,USA)检测 DNA 浓度和质量。用纯水将 DNA 样品浓度稀释至 50 ng/μL,-20℃下保存备用。

1.3 引物的选择

从 CIMMYT 公布的玉米核心引物选取位于 10 条玉米染色体上的 90 对 SSR 引物,由上海生工公司合成,筛选出 32 对带型清晰、稳定性好、多态性高

的引物用于 SSR 分析。

1.4 PCR 扩增

扩增反应在德国 Eppendorf 公司的 mastercycler gradient 上进行。PCR 反应体系为:反应总体积为 20 μL,其中 10 PCR × Buffer 2 μL,25 mmol/L Mg<sup>2+</sup> 2 μL,10 mmol/L dNTP 0.3 μL,0.5 μmol/L SSR 引物 10 μL,Taq DNA 聚合酶(5 U/μL)0.2 μL,DNA 模板(25 ng/μL)3.2 μL,ddH<sub>2</sub>O 2.3 μL。

PCR 反应过程为 94℃预变性 5 min,1 个□环;94℃变性 1 min,56℃复性 1 min,72℃延伸 1 min,共 35 个循环;最后于 72℃延伸 5 min。

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

反应产物用 4.5%变性聚丙烯酰胺凝胶 90 W 恒功率电泳 1 h 后,硝酸银染色,照相。

1.6 数据分析

对于 SSR 扩增产物,有带记为“1”,无带记为“0”,缺失或带弱记为“9”。按 Nei 和 Li 的方法计算自交系间的遗传相似系数:Gs=2N<sub>ij</sub>/(N<sub>i</sub>+N<sub>j</sub>);遗传距离:GD=1-Gs,其中 N<sub>i</sub> 为 i 品种出现的谱带数;N<sub>j</sub> 为 j 品种出现的谱带数。利用 GD 值按不加权成对群算术平均法(UPGMA)进行遗传相似性聚类分析。利用 NTSYS 软件处理数据。每个 SSR 位点的多态性信息量(Polymorphism information content,PIC)按公式 PIC=1-Σf<sub>i</sub> 计算,f<sub>i</sub> 表示 i 位点的基因频率。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记分析

从 90 对玉米 SSR 引物中筛选出 32 对扩增谱带稳定的引物。在 40 个糯玉米自交系中共检测到 152 个等位基因变异,平均每个位点检测到的等位基因数为 4.75 个,变化范围为 2~9 个。SSR 多态信息量(PIC)在 0.303~0.862(表 2),平均为 0.632,检测到等位点最多(9 个)的是 Umc1065 和 Phi126。Phi093 和 Phi331888 检测到的等位点最少,分别为 2 个(图 1)。

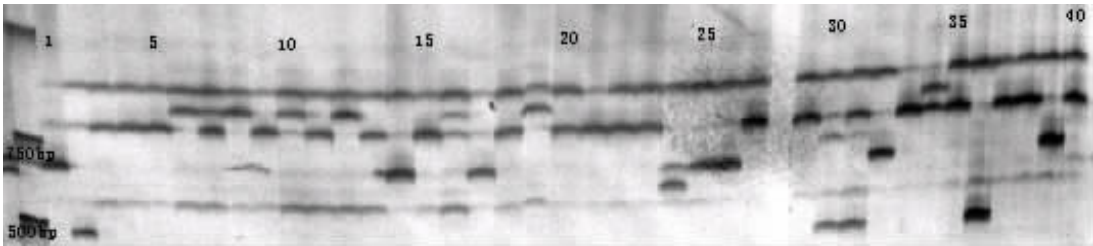


图 1 引物 Umc1590 在 40 个自交系中的扩增结果  
Fig.1 DNA fingerprints of 40 waxy corn inbred lines using SSR primer Umc1590

表 2 糯玉米自交系 SSR 检测的等位基因数及多态性信息量

Table 2 SSR primers, the number of alleles and PIC value amplified in 40 waxy corn inbred lines

| 编 号 | 引 物       | 染色体位置            | 等位基因数   | 平均多态性信息量 | 编 号 | 引 物     | 染色体位置            | 等位基因数   | 平均多态性信息量 |
|-----|-----------|------------------|---------|----------|-----|---------|------------------|---------|----------|
| No. | Primer    | Genomic location | Alleles | PIC      | No. | Primer  | Genomic location | Alleles | PIC      |
| 1   | Umc1269   | 1.01             | 3       | 0.588    | 17  | Umc1153 | 5.09             | 4       | 0.593    |
| 2   | Umc1590   | 1.06             | 7       | 0.761    | 18  | Phi126  | 6.00             | 9       | 0.852    |
| 3   | Phi011    | 1.09             | 4       | 0.485    | 19  | ZAG238  | 6.00             | 5       | 0.659    |
| 4   | Phi96100  | 2.01             | 5       | 0.711    | 20  | Umc1143 | 6.00             | 4       | 0.604    |
| 5   | Nc133     | 2.05             | 5       | 0.730    | 21  | Phi077  | 6.01             | 4       | 0.730    |
| 6   | Umc1065   | 2.06             | 9       | 0.818    | 22  | ZAG107  | 6.01             | 4       | 0.664    |
| 7   | Phi029    | 3.03             | 3       | 0.429    | 23  | Phi031  | 6.04             | 4       | 0.689    |
| 8   | Phi053    | 3.05             | 6       | 0.699    | 24  | Phi057  | 7.01             | 5       | 0.689    |
| 9   | ZCT197    | 3.06             | 4       | 0.656    | 25  | Phi116  | 7.06             | 7       | 0.755    |
| 10  | Umc1136   | 3.09             | 7       | 0.862    | 26  | ZCA162  | 8.05             | 4       | 0.699    |
| 11  | Phi072    | 4.01             | 4       | 0.711    | 27  | Phi080  | 8.08             | 6       | 0.744    |
| 12  | Phi093    | 4.08             | 2       | 0.303    | 28  | Phi027  | 9.03             | 3       | 0.526    |
| 13  | Phi019    | 4.11             | 4       | 0.560    | 29  | Phi065  | 9.03             | 3       | 0.433    |
| 14  | Phi331888 | 5.04             | 2       | 0.444    | 30  | ZCT619  | 9.07             | 4       | 0.652    |
| 15  | ZCT161    | 5.05             | 6       | 0.785    | 31  | Phi063  | 10.02            | 3       | 0.520    |
| 16  | Phi085    | 5.06             | 5       | 0.526    | 32  | Umc1196 | 10.07            | 7       | 0.675    |

2.2 自交系间遗传差异

根据 SSR 标记数据计算的糯玉米自交系的 SSR 遗传相似系数( $G_s$ ),其变幅为 0.506 6~0.934 2, 平均  $G_s$  值为 0.677 2。其中 18 号(太黑 1)与 20 号(双紫)的遗传相似系数最高,为 0.934 2;7 号( $W_{x1}$ )与 28 号(陕黑糯选白)的遗传相似系数低,为 0.506 6。7 号( $W_{x1}$ )与其他自交系间的平均遗传相似系数(0.589)小于其他自交系间的平均遗传相似系数,表明  $W_{x1}$  与其他自交系间分子水平上的遗传差异较大,分子特异性水平较高。

2.3 自交系间聚类结果

根据各玉米自交系间的 SSR 遗传相似矩阵,利用 UPGMA 法进行聚类分析,40 个玉米自交系共聚成 5 类(以  $G_s$  值 0.662 为标准,图 2、表 3)。其中第 I 类在相似系数为 0.693 2 时又可以分为 3 个亚类,第 1 亚类包括  $W_{x2}$ 、中群 14、张 H1 和鲁黄糯杂选;第 2

亚类包括秦母、甜糯选 1、甜糯选 2、苏玉糯选、农华糯 1 号选以及美玉 5 号选;第 3 亚类包括白糯选 1、白糯 1 号选、 $W_{x4}$ 、京科糯 123 选、 $W_{x5}$ 、华黑选白、渝糯 301 选、西垦糯白 13 号选、中白糯选、G2007、张 H2、太黑-3、太黑 1、双紫、 $W_{x3}$ 、金凤 5 选、风糯 476 选、燕甜糯 301 选和郑黄糯选。第 II 类包含陕黑糯选和陕黑糯选白。第 III 类包括中白糯 4-1 和 04 黑 09-3。第 IV 类只包括 04 红 32。第 V 类在  $G_s$  值 0.854 7 可分为 2 个亚类,包括华黑×Y75 选白、华黑×Y75 选黄及  $W_{x1}$ 。

利用 SSR 标记划分的类别与自交系的来源具有较好的一致性。如来源同一品种经过十几年选育的陕黑糯选和陕黑糯选白直接聚在一起,华黑×Y75 选白、华黑×Y75 选黄也聚在一起。利用该研究的 32 对 SSR 引物在聚类分析方面效果较好,与实践相吻合。

表 3 SSR 标 记 聚 类 结 果

Table 3 Results of clustering analysis with SSR markers

| 群类编号 | Group No. | 自交系                                                                                                                                                                                                           | Inbred lines |
|------|-----------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|--------------|
| I    |           | $W_{x2}$ 、中群 14、张 H1、鲁黄糯杂选、秦母、甜糯选 1、甜糯选 2、苏玉糯选、农华糯 1 号选、美玉 5 号选、白糯选 1、白糯 1 号选、 $W_{x4}$ 、京科糯 123 选、 $W_{x5}$ 、华黑选白、渝糯 301 选、西垦糯白 13 号选、中白糯选、G2007、张 H2、太黑-3、太黑 1、双紫、 $W_{x3}$ 、金凤 5 选、风糯 476 选、燕甜糯 301 选、郑黄糯选 |              |
| II   |           | 陕黑糯选、陕黑糯选白                                                                                                                                                                                                    |              |
| III  |           | 白糯 4-1、04 黑 09-3                                                                                                                                                                                              |              |
| IV   |           | 04 红 32                                                                                                                                                                                                       |              |
| V    |           | 华黑×Y75 选白、华黑×Y75 选黄、 $W_{x1}$                                                                                                                                                                                 |              |

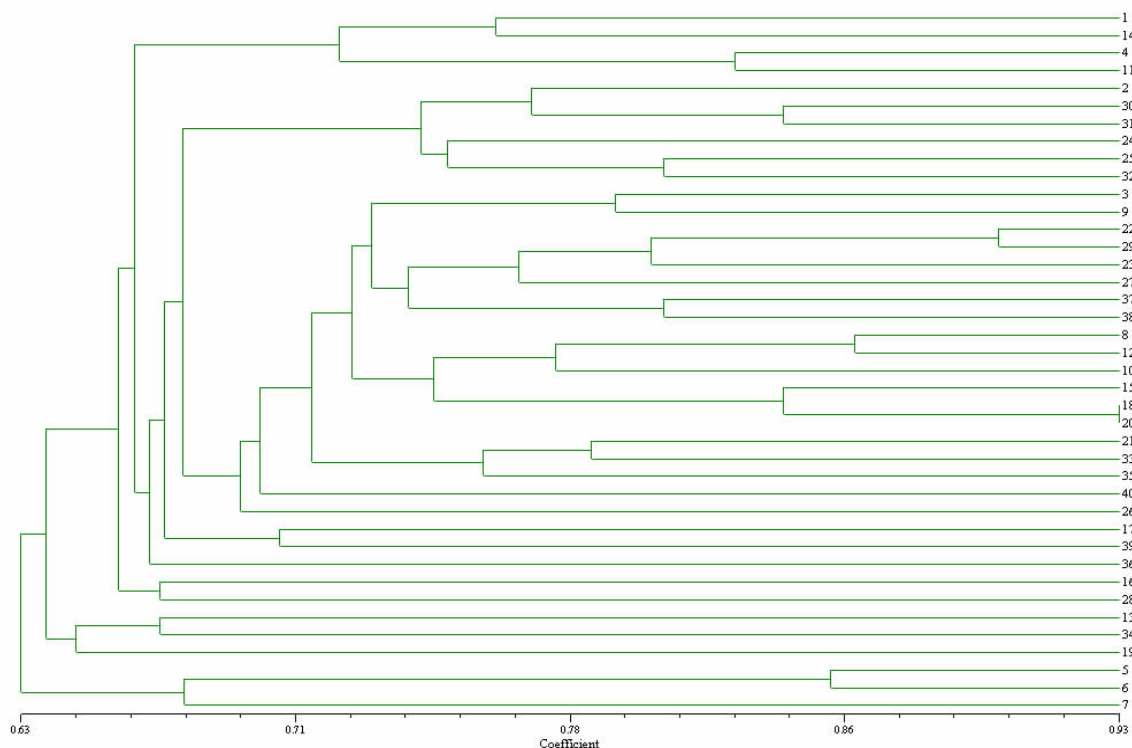


图 2 SSR 标记聚类图

Fig.2 Clustering map of SSR markers

### 3 结论与讨论

本研究用 32 对 SSR 引物将 40 个糯玉米自交系基本分开,并较好地反映了供试材料的亲缘关系,进一步证明 SSR 标记是鉴定糯玉米种质资源亲缘关系的一条有效途径。所选用的 40 个材料的遗传相似系数在 0.506 6~0.934 2,平均为 0.677 2,说明多数材料间具有一定的遗传差异,但总体供试材料遗传基础相对比较狭窄,这可能与选材范围不够广泛及核心 SSR 引物的筛选有关。因此,在糯玉米育种中利用好现有的优良种质资源,广泛收集和创造新的种质资源,尤其重视国外引进的优异种质资源,挖掘其优良基因,扩大我国糯玉米育种的资源基因库,对进一步提高我国现有糯玉米品种是非常重要的。进一步筛选其核心 SSR 引物,使其能准确地反映出糯玉米自交系间的遗传变异关系。

鉴于各地气候、地理生态条件复杂,在今后玉米育种中实现创新和突破,应在此研究基础上将供试材料按适当方法组配成不完全双列杂交,再通过田间表现的鉴定结果与分子标记的聚类结果进行比较,更为客观、合理地对玉米种质的杂种优势群进行划分。

参考文献:

- [1] 杨引福. 特种玉米生产及加工[M]. 北京: 中国标准出版社, 2001.
- [2] 李俊芳, 孙世贤, 王守才. 国家玉米主产区预试品种的 SSR 分析 II. 预试品种的遗传多样性[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 16-20.
- [3] Murray H G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucl Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [4] Reif J C, Warburton M L, Xia X C, et al. Grouping of accessions of Mexican races of maize revisited with SSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2006, 113(2): 177-185.
- [5] Nei M, Li W H. Mathemacal model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Nat Acad Sci., USA, 1979, 76: 5256-5273
- [6] 王鹏文, 杨 勇. 利用 SSR 标记划分糯玉米的杂种优势群[J]. 华北农学报, 2007, 22(3): 35-38.
- [7] 吴渝生, 郑用琰, 孙 荣, 等. 基于 SSR 标记的云南糯玉米、爆裂玉米地方种质遗传多样性研究[J]. 作物学报, 2004, 30(1): 36-42.
- [8] 张金渝, 张建华, 杨晓洪, 等. 用 SSR 标记划分云南糯玉米地方品种资源遗传类群的研究[J]. 玉米科学, 2007, 15(1): 53-58.
- [9] 陈先红, 徐利远, 彭正松, 等. 中国西南地区小麦品种(系)遗传多样性的 SSR 分析[J]. 麦类作物学报, 2008, 28(1): 6-10.
- [10] 王日新, 盖树鹏, 夏连胜, 等. 玉米自交系亲缘关系的 SSR 分析[J]. 农业生物技术, 2008, 24(5): 100-104.
- [11] 赵 静, 孙 娟, 张仁和, 等. 基于 SSR 技术分析陕西省玉米主栽品种的遗传多样性[J]. 西北农业学报, 2008, 17(3): 124-128.
- [12] 杨耀迥, 张述宽, 腾辉升, 等. 广西玉米骨干自交系的 SSR 分群及杂种优势模式分析[J]. 分子植物育种, 2007, 5(6): 833-838.

(责任编辑: 尹 航)