

文章编号: 1005-0906(2014)06-0027-05

# 利用 SSR 标记分析 35 份糯玉米种质的遗传多样性

王玉民<sup>1</sup>, 尹大鹏<sup>2</sup>, 张春宵<sup>1</sup>, 康岭生<sup>1</sup>, 金峰学<sup>1</sup>, 姜 昱<sup>1</sup>

(1. 吉林省农业科学院, 长春 130033; 2. 吉林省农作物新品种引育中心, 长春 130062)

**摘要:** 以引进的 35 个糯玉米自交系和 5 个我国普通玉米杂种优势群的标准检验种为供试材料, 利用 SSR 标记分析他们的遗传多样性和亲缘关系。结果表明, 30 对 SSR 引物共检测到 140 个等位基因变异, 每对引物的等位变异数为 2~8 个, 平均为 4.67 个; SSR 标记的多态性信息量在 0.198 6~0.794 7 之间, 平均为 0.584 0; 材料间的遗传距离在 0~0.923 1 之间, 平均值为 0.645 3。40 份材料可以分为 4 个类群, 与可追踪的系谱信息基本一致。

**关键词:** 糯玉米; 分子标记; 遗传多样性

**中图分类号:** S513.023

**文献标识码:** A

## Genetic Diversity of 35 Waxy Maize Germplasms Based on SSR Markers

WANG Yu-min<sup>1</sup>, YIN Da-peng<sup>2</sup>, ZHANG Chun-xiao<sup>1</sup>, KANG Ling-sheng<sup>1</sup>, JIN Feng-xue<sup>1</sup>, JIANG Yu<sup>1</sup>(1. *Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;**2. New Crop Variety Introduction and Breeding Center of Jilin Province, Changchun 130062, China*)

**Abstract:** Thirty-five waxy maize germplasms and five standard test inbred lines represented for 5 maize heterotic group in China were analyzed by using SSR markers. The results showed that a total of 140 alleles were detected by using 30 pairs of SSR primers, the number of alleles per SSR locus ranged from 2 to 8, with an average of 4.67; the polymorphism information content of SSR markers ranged from 0.198 6 to 0.794 7, with an average of 0.584 0; the pair-wise genetic distance between 40 accessions ranged from 0 to 0.923 1, with an average of 0.645 3. Cluster analysis showed that 40 accessions of waxy and common maize germplasms could be divided into 4 groups, consistent with the pedigree information traceable.

**Key words:** Waxy maize; Molecular marker; Genetic diversity

糯玉米是玉米属玉米种的一个亚种, 起源于中国的西南地区, 在我国栽培历史悠久, 有着丰富的遗传多样性<sup>[1]</sup>。糯玉米种质资源多数来源于农家种和地方种, 亲缘关系不清楚, 无法利用系谱追踪法研究其遗传多样性。张建华等<sup>[2]</sup>对 332 份云南糯玉米资源的表型多样性进行了分析, 将其划分为 5 类 6 个生态型。蔚荣海等<sup>[3]</sup>根据 50 个糯玉米自交系的 18 个性状将其划分为 7 个类群。表型性状易受环境和

栽培条件等因素影响, 因此, 通过表型分析进行类群划分具有局限性。

随着现代分子生物学的发展, 分子标记技术广泛应用于玉米遗传多样性研究和类群划分。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, 广泛应用于玉米遗传多样性研究和类群划分。许多学者利用 SSR 标记技术研究糯玉米地方品种和糯玉米自交系的遗传多样性, 研究结果表明, 不同来源的供试糯玉米地方品种具有丰富的遗传多样性<sup>[4~9]</sup>。供试糯玉米自交系间的遗传差异较小, 遗传基础比较狭窄<sup>[10]</sup>。山西省糯玉米自交系的遗传多样性非常丰富, 很多自交系具有频率很高的独特基因, 他们可能具有一定的特异性<sup>[11]</sup>。关于糯玉米类群划分研究方面, 由于所用的材料不同, 划分的类群数也不尽相同。

吉林省位于中国黄金玉米带的腹地, 糯玉米育

收稿日期: 2014-04-04

基金项目: 现代农作物种业发展专项资金项目“吉林省主要农作物种质资源、育种方法及制种技术研究”、吉林省财政厅科研育种项目“糯玉米新种质创制”

作者简介: 王玉民(1968-), 男, 研究员, 从事作物种质资源研究。

E-mail: wangym@cjaas.com

金峰学和姜 昱为本文通讯作者。

种工作开展较早,育成了吉农糯系列、吉糯系列和春糯系列糯玉米品种,关于糯玉米遗传多样性研究和杂种优势类群划分等研究工作起步较晚。本研究利用SSR标记技术分析35份糯玉米种质资源和5个标准测验种的遗传多样性并进行类群划分,为吉林省糯玉米种质创新和利用提供参考。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 实验材料

40份供试材料由2部分组成,一部分材料为近年引进的35个糯玉米自交系,另一部分材料为5个国内普通玉米杂种优势群的标准检验种Mo17、黄早四、B73、丹340、78599,分别代表Lancaster、塘四平头、Reid、旅大红骨和P群(表1)。

### 1.2 实验方法

**DNA提取:**每份供试材料各取5粒种子播种于装有蛭石的营养钵中,室内培养10 d。取新鲜叶片

在液氮下混合研磨,采用改良CTAB法提取总DNA,采用紫外分光光度计检测DNA浓度和质量。用纯水将DNA样品浓度稀释至20 ng/ $\mu$ L, -20 $^{\circ}$ C下保存备用。

**SSR引物:**根据Maize GDB([www.maizegdb.org](http://www.maizegdb.org))中公布的玉米SSR引物序列,选取分布在玉米10个染色体连锁群上的40对SSR引物,由上海生物工程公司合成引物,对40份玉米材料进行扩增。

**PCR扩增:**PCR总反应体系为25  $\mu$ L,包括宝生物工程(大连)有限公司编号为D335A的Premix溶液12.5  $\mu$ L、DNA 2  $\mu$ L(40 ng)、浓度为10 ng/ $\mu$ L引物2  $\mu$ L、超纯水8.5  $\mu$ L。PCR反应程序为,94 $^{\circ}$ C预变性5 min,94 $^{\circ}$ C变性45 s,55 $^{\circ}$ C退火45 s,72 $^{\circ}$ C延伸1 min,共进行35个循环;72 $^{\circ}$ C延伸10 min,最后4 $^{\circ}$ C保存。

**凝胶电泳:**PCR反应产物用6.0%变性聚丙烯酰胺凝胶90 W恒功率电泳1 h,硝酸银染色,照相记录。

表1 供试糯玉米和普通玉米材料及其系谱

Table 1 Waxy and common maize germplasms and their pedigrees

序号 No.	名称或代号 Name or code	系谱信息 Pedigree	序号 No.	名称或代号 Name or code	系谱信息 Pedigree
C01	317(N)黄		C21	491	
C02	糯1	依兰农家种232-2 $\times$ 原辐17/原辐17	C22	487	
C03	糯2	依太白粘 $\times$ 黄早四/黄早四	C23	500	
C04	糯3		C24	486	
C05	地方品种		C25	560	
C06	法B-3(N)黄		C26	春171	Reid血缘
C07	糯1	依兰农家种232-2 $\times$ 原辐17/原辐17	C27	长801	
C08	吉203	8个白糯玉米组成的群体	C28	62036	
C09	春317	垦粘1二环系	C29	9590	
C10	衡白522	衡水多穗wx突变体	C30	VS9922	
C11	JY	云南杂交种	C31	M2001-5	
C12	春317	垦粘1二环系	C32	B1-2-2	
C13	吉202	2个农家黑糯玉米杂交种	C33	37N-7-21	
C14	D13	地方品种	C34	长707	
C15	春542	白糯玉米 $\times$ Mo17	C35	CA8917	
C16	糯2	依太白粘 $\times$ 黄早四/黄早四	C36	78599	PN78599
C17	糯1	依兰农家种232-2 $\times$ 原辐17/原辐17	C37	丹340	(旅9宽 $\times$ 有稈玉米) $F_2$ 辐射 $^{60}Co$
C18	511		C38	黄早四	塘四平头
C19	488		C39	B73	BSSS C5
C20	512		C40	Mo17	C103 $\times$ 187-2

**数据分析:**SSR扩增结果稳定,根据各条带的迁移率及其有无统计得到所有位点的二元数据,有带记为“1”,无带记为“0”。然后根据每个引物扩增的条带数,用英文字母进行编码(A对应第1条带,B对

应第2条带,……缺失条带用?表示)。利用PowerMarker 3.25分析标记的等位变异数和基因多样性和多态性信息含量,然后采用SharedAllele参数计算材料之间的遗传距离,按类平均法(Unweighted pair group

method using arithmetic averages, UPGMA)进行聚类分析,利用TreeView 1.6.6绘制40份材料的亲缘关系树状图。

## 2 结果与分析

### 2.1 SSR标记结果分析

从40对SSR引物中共筛选出30对扩增结果较

好的引物(图1)。在35份糯玉米材料和5份普通玉米材料中共检测到140个等位基因变异,平均每个SSR位点检测到的等位基因变异为4.67个,30对SSR引物所扩增的等位变异最少为2个(引物umc1492和umc1147),最多为8个(bnlg1702)。SSR标记的多态信息量PIC在0.198 6(umc1147)~0.794 7(umc1705)之间,平均为0.584 0(表2)。

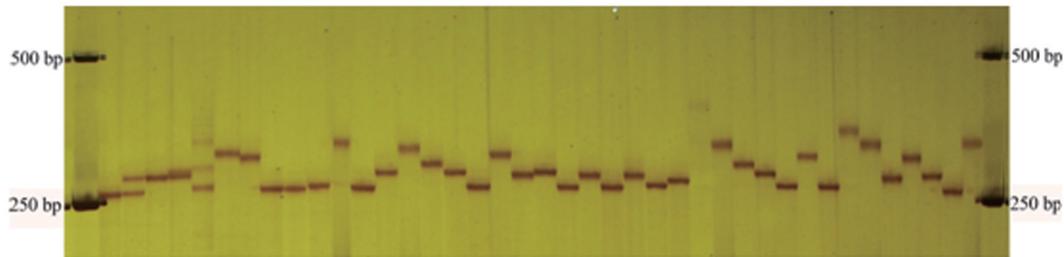


图1 引物bnlg1702对40份材料扩增结果

Fig.1 DNA fingerprints of 35 waxy and 5 common maize gerplasms amplified by bnlg1702

表2 30个SSR标记的等位变异数及多态性信息量

Table 2 Thirty SSR markers and their allelic variance and polymorphism information content

标 记 Marker	染色体位置 Chromosome location	等位变异数 No. of Allele	多态性信息含量 PIC	标 记 Marker	染色体位置 Chromosome location	等位变异数 No. of Allele	多态性信息含量 PIC
bnlg439	1.03	4	0.559 6	umc2115	5.02	5	0.584 2
umc1147	1.07	2	0.198 6	umc1705	5.03	7	0.794 7
umc1335	1.07	3	0.355 4	bnlg249	6.01	5	0.609 9
umc084	1.11	4	0.659 7	bnlg1702	6.05	8	0.779 4
phi96100	2.01	5	0.695 7	phi299852	6.07	5	0.613 6
umc2007	2.04	7	0.751 9	umc2323	6.07	4	0.477 3
bnlg1940	2.08	5	0.723 0	umc2160	7.01	6	0.694 5
umc1536	2.08	4	0.642 8	umc1125	7.04	4	0.625 5
bnlg1520	2.09	5	0.655 8	phi065	9.03	4	0.469 4
umc2105	3.00	7	0.719 8	umc1492	9.04	2	0.365 9
umc1489	3.07	3	0.474 4	phi041	10.00	6	0.655 0
phi072	4.01	4	0.648 9	umc1432	10.02	5	0.316 9
bnlg490	4.04	4	0.670 4	umc2163	10.04	5	0.651 4
umc1963	4.04	4	0.611 0	phi233377		5	0.526 0
bnlg2291	4.06	5	0.583 2	平均 Mean		4.67	0.584 0
umc1999	4.09	3	0.406 8				

### 2.2 材料间遗传距离

根据SSR标记数据,采用SharedAllele参数计算40份材料之间的遗传距离,其变幅在0(C31和C33)~0.923 1(C14和C25)之间,平均遗传距离为0.645 3。C14(D13)与其他材料之间的遗传距离均值最大,为0.735 1;C10(衡白522)次之,为0.731 6,表明这2份材料与其他材料在分子水平上遗传差异较

大;C20(512)与其他材料之间的遗传距离均值最小,为0.570 1,表明C20与其他材料在分子水平上遗传差异较小。对于5个标准测验种,C36(78599)与C27之间的遗传距离最小(0.440 0);C37(丹340)与C23之间的遗传距离最小(0.500 0);C38(黄早四)与C16之间的遗传距离最小(0.259 3);C39(B73)与C21之间的遗传距离最小(0.448 3);C40(Mo17)与C35之间的遗

传距离最小(0.333 3)。

### 2.3 40份材料聚类分析

根据遗传相似性系数矩阵,用UPGMA法进行聚类分析,40份玉米材料共聚为4个类群(图2)。第I个类群只有1份材料,为C10(衡白522)。第II个类群包括8份材料,标准测验种78599(C36)和Mo17(C40)属于该类群,可以分为3个亚群:第1个亚群包括4份材料(C11, C34, C35, 和C40);第2个亚群包括2份材料(C27和C36);第3个亚群包括2份材料(C05和C14),其中C05为地方品种, C14为地方品种选系。第III个类群包括21份材料,标准测验种黄早四(C38)属于该类群,可以分为4个亚群:第1个亚群包括3份材料(C19, C22和C24);第2个亚群包括3份材料(C06, C13和C25);第3个亚群包括8份材料(C01, C02, C09, C12, C17, C18, C20和C28),其中C09和C12是来源不同的春317(春糯1号父本),较好地

聚在了一起,但他们之间也存在遗传差异;C02和C17是来源不同的糯1(垦粘1号母本),C17与C09和C12首先聚在一起,然后再与C02聚在一起,这4份材料再与C01[317(N)黄]聚在一起,说明这5份材料之间存在一定差异,但亲缘关系较近;第4个亚群包括7份材料(C03, C04, C07, C16, C30, C32和C38),其中C03和C16是不同来源的糯2(垦粘1号父本),较好地聚在了一起,根据糯2的系谱(依太白粘×黄早四/黄早四),含有75%的黄早四血缘,因此, C03、C16与黄早四聚在一起是合理的。第IV个类群包括10份材料,标准测验种丹340(C37)和B73(C39)属于该类群,可以分为2个亚群:第1个亚群包括3份材料(C21, C26和C39);第2个亚群包括7份材料(C08, C15, C23, C29, C31, C33和C37),其中C31和C33亲缘关系很近,本实验所用的30对SSR引物无法将其区分开来,可能是姊妹系。

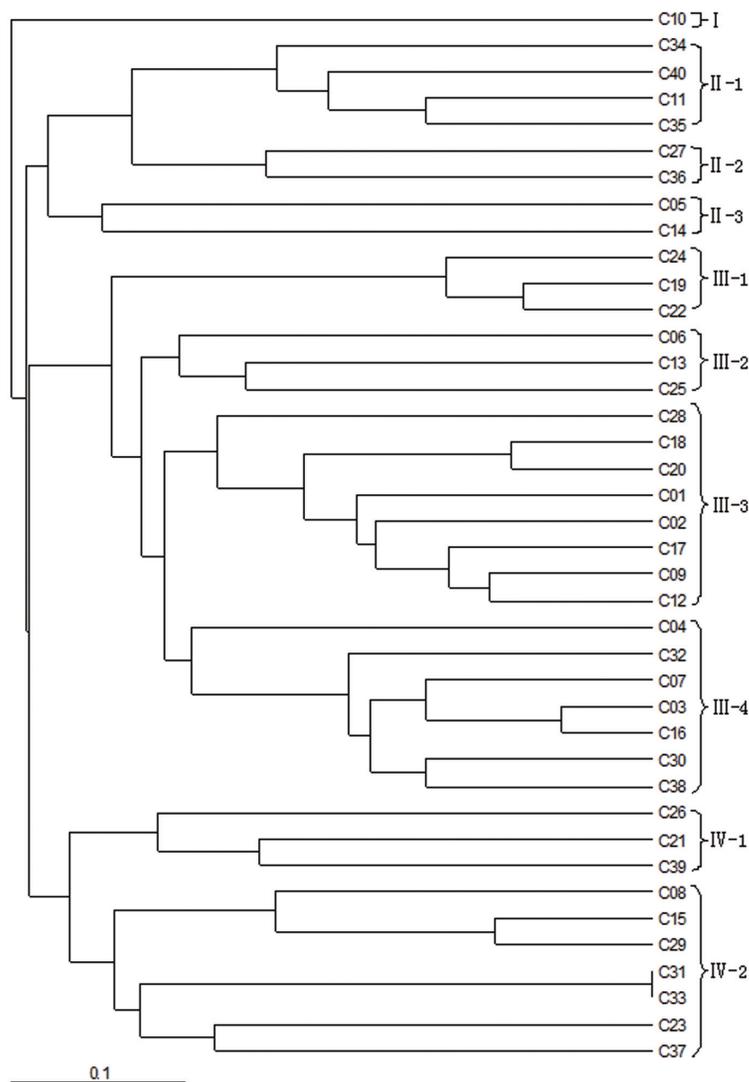


图2 35份糯玉米自交系和5份标准测验种聚类图

Fig.2 UPGMA dendrogram of 35 waxy and 5 common maize germplasm based shared allele distance

### 3 结论与讨论

由于糯玉米系谱不详,利用分子标记技术对糯玉米资源进行遗传多样性研究和类群划分已成为重要技术手段之一。SSR标记的等位变异数是衡量遗传多样性的重要指标之一,本研究30个SSR标记的平均等位变异为4.67个,高于吴渝生等(3.70个)的研究结果;接近杨勇等(4.81个)和倪正斌(4.78个)的研究结果,但低于其他研究结果。由于不同研究中所用的引物不同,使用的材料数目也不相同,而且等位变异会随着材料数的增加而有所增加,无法简单地通过比较等位变异数来判断遗传多样性的高低。总体来说,本研究中所用的材料遗传多样性并不高。为了使不同研究结果具有可比性,相互借鉴,必须建立一套标准的糯玉米SSR标记分析体系,使用特定的引物,统一实验方法,明确扩增片段的大小,建立统一的指纹图谱数据库,便于糯玉米育种工作者随时查询和分析,这样才能真正促进糯玉米育种研究水平的不断提高。

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利用模式,已成为国内外玉米育种的一个重要研究方向<sup>[12,13]</sup>。在普通玉米育种中,国内育种家通过多年育种实践将国内玉米材料划分为5大类群,即塘四平头、旅大红骨、Reid、Lancaster和PN群。春糯1号是吉林省比较有代表性的糯玉米品种,其杂种优势利用模式与垦粘1号相同,利用的是第Ⅱ类群中第1亚群和第2亚群之间的遗传差异。

在糯玉米育种中,关于杂种优势利用模式报道较少。赵文明等<sup>[14]</sup>报道了通系5类群×衡白522类群是江苏糯玉米育种主要的杂种优势模式,已育成有苏玉糯1号、苏玉糯2号、江南花糯、苏科花糯2008和苏科糯4号等品种。本研究利用SSR标记进行类群划分结果显示,衡白522为一个单独的类群,与其他材料之间的遗传距离均较远,但在吉林省尚未利用其育成品种,可以尝试利用其与其他类群糯玉米材料进行测配,明确其在糯玉米育种中的价值。此外,还可以利用不同类群之间的材料设计双列杂交,明确其杂种优势类群,同时也可以验证利用SSR标记进行聚类分析的结果。

利用优良普通玉米自交系与糯玉米杂交,然后以普通玉米作为轮回亲本,可以将糯质基因引入到普通玉米自交系中,育成的糯系可以较好地保持普通自交系的特殊配合力,然后利用普通玉米杂交种亲本组合信息,快速组配出杂交种,是提高糯玉米产

量的有效途径之一<sup>[15,16]</sup>。利用此方法已经育成莱农糯7823(白糯478/×白糯T123)、莱农糯10(LN478-6×LN21-10)。因此,借鉴普通玉米杂种优势利用成果已成为糯玉米育种有效的途径。本研究通过对5个标准测验种与35份糯玉米材料之间的遗传距离进行比较,明确其中与标准测验种遗传距离最小的糯玉米材料,可将糯质基因引入到5个类群普通玉米骨干自交系中,丰富吉林省糯玉米遗传基础。

#### 参考文献:

- [1] 范红伟,曹林奎.糯玉米新品种栽培与加工[M].北京:中国农业出版社,2002.
- [2] 张建华,米艳华,张金渝,等.云南糯玉米资源的多样性及其利用[J].西南农业学报,2004,17(6):712-715.  
Zhang J H, Mi Y H, Zhang J Y, et al. Diversities and utilizations of waxy maize germplasm in Yunnan[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2004, 17(6): 712-715. (in Chinese)
- [3] 蔚荣海,韩蕾,王玉兰,等.糯玉米自交系的遗传距离分析及类群鉴定[J].玉米科学,2006,14(3):10-12,16.  
Yu R H, Han L, Wang Y L, et al. Analysis on genetic distance and classification identification of glutinous maize inbred lines[J]. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(3): 10-12, 16. (in Chinese)
- [4] 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].成都:四川农业大学,2002.
- [5] 吴渝生,郑用璠,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.  
Wu Y S, Zheng Y L, Sun R, et al. Genetic diversity of waxy maize and popmaize landraces in Yunnan by SSR Markers[J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30(1): 36-42. (in Chinese)
- [6] 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.  
Zhang J Y, Zhang J H, Yang X H, et al. A study on genetic group classification of waxy maize landraces in Yunnan by SSR Markers [J]. Journal of Maize Sciences, 2007, 15(1): 53-58. (in Chinese)
- [7] 雍洪军,张世煌,张德贵,等.利用SSR荧光标记分析90个糯玉米地方品种的遗传多样性[J].玉米科学,2009,17(1):6-12.  
Yong H J, Zhang S H, Zhang D G, et al. Analysis of genetic diversity among 90 waxy maize landraces using fluorescent SSR Markers [J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(1): 6-12. (in Chinese)
- [8] 杨引福,郭强,陈婧,等.中国温带糯玉米自交系遗传及品质性状分析[J].西北植物学报,2009,29(11):2213-2220.  
Yang Y F, Guo Q, Chen J, et al. Analysis of genetic and quality traits of waxy maize inbred lines in China temperate zone[J]. Acta Bot. Boreal.-Occident. Sin., 2009, 29(11): 2213-2220. (in Chinese)
- [9] 陈婧,杨引福,郭强.利用SSR标记分析40个糯玉米自交系遗传多样性[J].玉米科学,2009,17(4):32-35.  
Chen J, Yang Y F, Guo Q. Study on genetic diversity about 40 waxy maize inbred lines by SSR Markers[J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(4): 32-35. (in Chinese)
- [10] 倪正斌.糯玉米自交系遗传多样性及产量、农艺性状与SSR分子标记的关联研究[D].扬州:扬州大学硕士论文,2010.