

利用若干单株混合提取 DNA 方法 进行玉米群体 SSR 的分析

王铁固,陈彦惠,吴连成,库丽霞,侯本军

(河南农业大学 农学院,河南 郑州 450002)

摘要:以金皇后玉米群体 90 个单株 DNA 和 6 个自交系 DNA 为供试材料,利用 15 对 SSR 引物,比较了同一群体 4 种 DNA 样品处理(单株 DNA 样品、3 个单株混合 DNA 样品、10 个单株混合 DNA 样品、15 个单株混合 DNA 样品)的 SSR 遗传多态性。结果表明,利用单株 DNA 样品能获得等位基因数、基因频率、基因型杂合度等较全面的遗传信息,适宜进行单个或少量群体的遗传结构研究,但试验工作量大;利用混合 DNA 样品所能获得的遗传信息有所减少,比较 4 种 DNA 样品处理的检测结果发现,15 个单株混合样品的检测结果误差较大,而采用 3~10 个单株 DNA 混合的样品基本可以反映出一个群体的等位基因数目和 SSR 带型的差异,由于试验工作量大大减少,可以应用于较多玉米群体间遗传差异的比较。

关键词:SSR;玉米;群体;遗传多样性

中图分类号:S513.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2005)01-0006-06

The Use of Bulk DNA for Analysis of Genetic Diversity in Maize Populations by SSR

WANG Tie-gu, CHEN Yan-hui, WU Lian-cheng, KU Li-xia, HOU Ben-jun

(Agronomy College, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: By use of 90 individuals DNA from Gold Queen maize population, 6 inbred lines DNA, and 15 pair SSR primers, the effect of 4 kinds of DNA sample treatments of the individual DNA sample, the mixed DNA sample with 3 individuals, with 10 individuals, and with 15 individuals for the genetic diversity in the same population were compared and analyzed. The result indicated that using individual DNA sample could get comparatively complete genetic information including allele numbers, the gene frequency, the proportion of heterozygosity etc. It could applied to the analysis of genetic structure of a single or a few populations of maize. But this method needs much more work than the bulk sample. The use of bulk DNA sample will make the genetic information decrease. Comparison of detective result of 4 kinds of DNA sample treatments suggested that the detective result of the mixed DNA sample with 15 individuals had a bigger error, but utilizing the mixed DNA sample with 3-10 individuals could reflect allele numbers and difference of a maize population, because of consumedly reducing the experiment workload, it can be applied to the comparison for genetic difference in the more maize populations.

Key words:SSR; Maize; Population; Genetic diversity

国内外许多学者利用 SSR 对玉米自交系的遗传变异和杂优模式进行了大量研究。但迄今国内尚未见到利用 SSR 研究玉米群体遗传变异的报道。用群体作为研究对象,有一个样本容量问题。玉米

收稿日期:2004-03-17

基金项目:国家高技术研究发展计划资助项目(2002AA207008);河南省杰出人才创新基金资助项目(0221000800)

作者简介:王铁固(1971-),男,河南洛阳人,在读硕士,主要从事作物遗传育种研究工作;陈彦惠为通讯作者。

自交系个体间是同质的纯合基因型,可以用一个样本代表一个自交系,这个样本可以是单株 DNA,也可以是多个单株混合提取的 DNA,而玉米群体内个体间是高度异质的杂合基因型,必须要用一定数量的样本才能代表一个群体,这势必在利用 SSR 研究玉米群体遗传变异时大大增加了工作量。Marilyn 等曾用 48 个单株样品代表一个群体,研究了 7 个 CIMMYT 玉米群体的遗传多样性,这相当于 336 个玉米自交系的工作量。因此,工作量大是利用 SSR 研究和比较多个玉米群体遗传变异的重要限制因素。本试验的目的在于,通过对群体不同 DNA 样本容量的比较,探索利用若干单株混合提取 DNA 的方法,对玉米群体进行 SSR 遗传多态性研究的可行性,以期在 SSR 在玉米群体研究上得到广泛应用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

试验材料为“金皇后综合种”的玉米群体,以下简称金皇后群体,它是我国一个优良的地方种质,另选用 6 个自交系 Mo17、B73、掖 478、黄早 4、丹 340、许 178 作对照,分别代表目前国内玉米育种上常用自交系的主要杂优类群。2002 年春田间种植上述材料,玉米 6~7 片叶时,从金皇后群体中随机选取 150 个单株作为样本,从 6 个自交系各取 6 个单株作为样本,采摘其幼嫩叶片置于 -80℃ 冰箱内保

存。金皇后群体按单株叶片,自交系按 6 个单株叶片混合,采用 SDS 法提取 DNA,用琼脂糖凝胶电泳和上海 UNICO 公司的 UV-2000 型紫外分光光度计检测 DNA 的质量和浓度,根据检测结果从金皇后综合种样本中选出 90 个单株 DNA 和 6 个自交系 DNA 样品,用去离子水统一调整至 10 ng/μL,置于 4℃ 冰箱备用。

1.2 DNA 的处理

设置 4 种 DNA 样品处理:用金皇后群体 90 个单株 DNA 样品作为处理 1;取每一个单株 DNA 的一部分,按取样时编号顺序,每 3 个单株 DNA 混合配成 3 合 1 的混合样,为处理 2,共 30 个样品;每 10 个单株 DNA 混合配成 10 合 1 的混合样,为处理 3,共 9 个样品;每 15 个单株 DNA 混合配成 15 合 1 的混合样为处理 4,共 6 个样品。受电泳时梳子孔数的限制,所有试验样品不能同时操作,将其分为 3 组,第 1 组:1~45 个单株样品,加上 6 个自交系;第 2 组,46~90 个单株样品,加上 6 个自交系;第 3 组 45 个混合样品,加上 6 个自交系。

1.3 引物筛选

从 Maize D B 按均匀分布在玉米 10 条染色体上的原则,随机查到 43 对 SSR 引物序列,由上海生工合成。用金皇后群体的 4 个单株样品和自交系 Mo17 为材料,按同一条件扩增电泳 43 对引物,从中筛选出带型好,多态性高的 15 对引物(表 1)用于试验。

表 1 SSR 引物序列

Tab.1 SSR sequences of used 15 primers

编号 Codes	引物名称 Names of primer	图谱位置 Position of loci	碱基序列 Base sequences
1	bnlg439	1.03	TTGACATCGCCATCTTGGTGACCA//TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGGAA
2	bnlg1811	1.04	ACACAAGCCGACCAAAAAAC//GTAGTAGGAACGGCGATGA
3	umc1676	1.05	AGTCGTACGATGACGGAGGC//GCACCACCGACTGATCAAGA
4	phi011	1.09	TGTTGCTCGGTACCATACC//GCACACACACAGGACGACAGT
5	bnlg125	2.02	GGGACAAAAGAAGAAGCAGAG//GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
6	phi453121	3.00	ACCTTGCTGTCTTCTTCT//CAAGCAAGACTTTTGATCAGC
7	phi049	3.01	CTTCTGTTCCGCCATCCAGTATGTT//GATTGCGATAACATTGCGGCAAGTTGT
8	phi053	3.05	CTGCCTCTCAGATTCAGAGATTGAC//AACCCAACGTAAGTCCGGCAG
9	bnlg1890	4.00	ACCGGAACAGACGAGCTCTA//GTCCTGCAAAGCAACCTAGC
10	bnlg278	5.06	CATGCATCAACGTAACCTCCCT//CATGTCACGCGTTCCACTTG
11	bnlg161	6.00	GCTTTCGTCATACACACATTCA//ATGGAGCATGAGCTTGTCATATTT
12	phi299852	6.08	GATGTGGGTGCTACGAGCC//AGATCTCGGAGCTCGGCTA//
13	phi116	7.06	GCATACGGCCATGGATGGGA//TCCCTGCCGGGACTCCTG
14	bnlg162	8.05	ACTAGCAGCAGTAAACCTAATAAAGGGA//CAAGTAGCTAGCAGTCATTGTCAGTG
15	phi117	10.00	ATCGGATCGGCTGCCGTCAAA//AGACACGACGGTGTGTCCATC

1.4 PCR 反应体系的优化

PCR 反应所需试剂均购自上海生工,PCR 反应体系总体积为 20 μL。针对每一引物,参照筛选引物时的电泳结果,结合上海生工提供的资料,调整

PCR 反应体系中各种成份比例和退火温度,找到该引物的最优体系和最佳退火温度,按 maizeDB 和有关文献中的片段大小,找到每一引物的特异带,使其最清晰。

1.5 电泳检测

电泳检测用 8% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒功率 40 W, 电泳 80 min 左右, 电泳时加上标记, 当 3 次电泳 6 个自交系带型完全一致时, 统计结果。

1.6 数据处理

基因频率 f_i = 某一等位基因数 / 2N (N 是样本容量)

观察杂合度 H_0 = 观察杂合单株数 / N

按 Hardy-weinberg 平衡比例估计期望杂合度 $H_e = 1 - \sum (f_i^2)$ (f_i 是第 i 等位基因的频率)

2 结果与分析

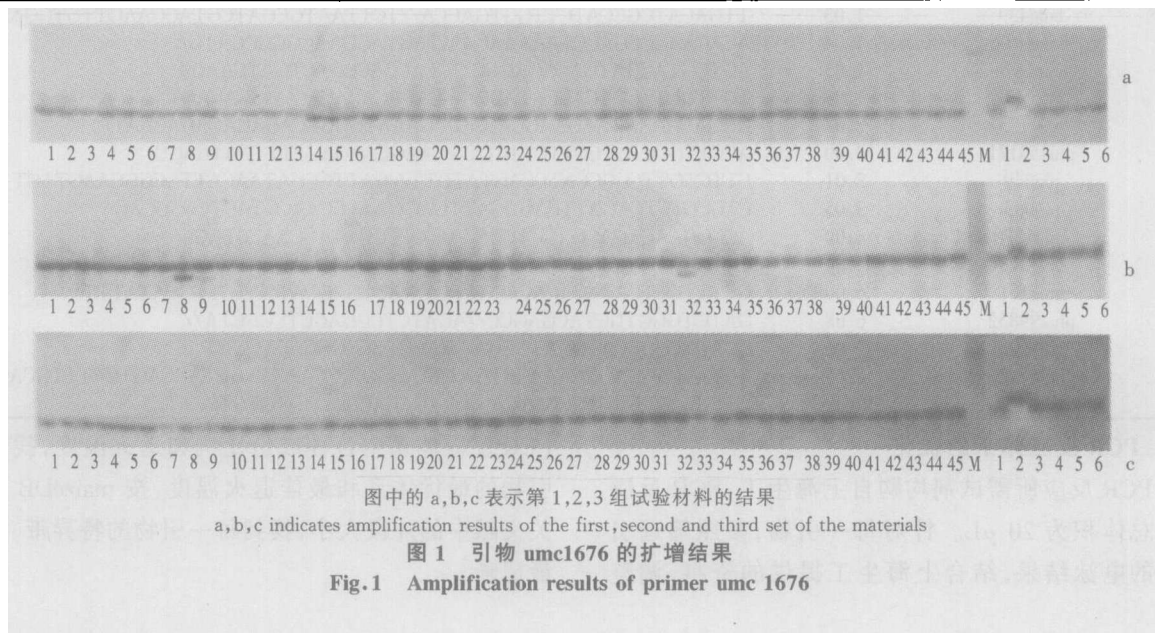
2.1 单株样品的扩增结果

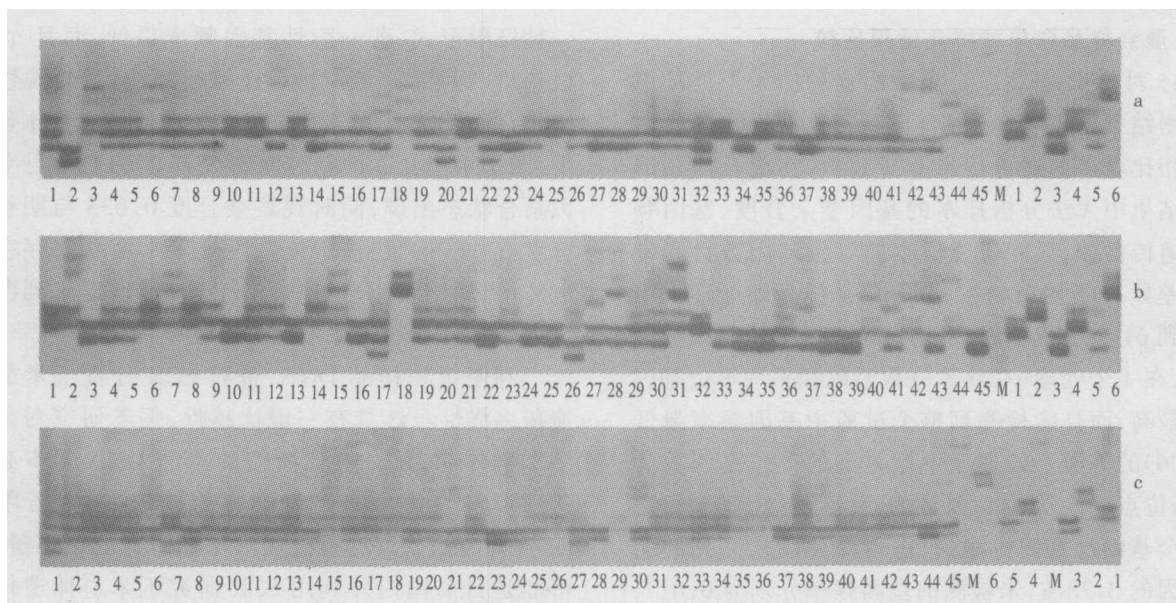
15 对 SSR 引物对金皇后群体的 90 个单株样品

表 2 单株样品的扩增结果

Tab.2 Amplification results of the sample with individual plant

编号 Codes	等位基因数 Allele numbers		基 因 频 率 Gene frequency								观察杂合度 Observed heterozygosity	期望杂合度 Expected heterozygosity
	自交系 Lines	群体 Population	1	2	3	4	5	6	7	8		
1	3	3	0.111	0.211	0.678						0.511	0.483
2	4	5	0.244	0.072	0.328	0.350	0.006				0.700	0.705
3	2	2	0.017	0.983							0.033	0.033
4	3	3	0.108	0.335	0.557						0.500	0.566
5	3	3	0.351	0.172	0.477						0.172	0.620
6	3	3	0.330	0.458	0.212						0.271	0.636
7	2	2	0.611	0.389							0.467	0.475
8	3	3	0.311	0.089	0.600						0.533	0.535
9	3	6	0.309	0.112	0.247	0.152	0.028	0.152			0.326	0.784
10	2	8	0.028	0.006	0.072	0.033	0.394	0.350	0.056	0.067	0.656	0.708
11	5	6	0.028	0.072	0.022	0.378	0.461	0.039			0.600	0.637
12	3	4	0.378	0.194	0.350	0.078					0.678	0.691
13	3	5	0.195	0.506	0.126	0.121	0.052				0.356	0.673
14	4	5	0.072	0.406	0.067	0.078	0.378				0.672	0.677
15	3	3	0.124	0.421	0.455						0.449	0.600
总计	46	61									6.930	8.820





图中的 a,b,c 表示第 1,2,3 组试验材料的结果

a,b,c indicates amplification results of the first,second and third set of the materials

图 2 引物 bnlg 161 的扩增结果

Fig.2 Amplification results of primer bnlg 161

将 15 对引物在自交系和群体中检测到的 66 个等位基因(表 3)进行比较可以发现,有 42 个等位基因为 6 个自交系和金皇后群体所共有,4 个基因为 6 个自交系所特有,19 个基因为金皇后群体所特有,这表明代表国内主要种质类型的 6 个自交系具有自己的特有基因,金皇后群体具有自己更多的特有基因,因此金皇后群体有着更丰富的遗传变异。

在所有检测到的基因中,引物 3 的基因频率最高,为 0.983(图 1),引物 2 和 10 的基因频率最低,为 0.006,频率小于 0.05 的基因有 9 个,频率大于

0.5 的基因有 6 个,大部分的基因频率位于 0.05 ~ 0.5。15 个位点的平均观察杂合度 0.462,低于平均期望杂合度 0.588,在这 15 个位点中,引物 1 的位点的观察杂合度 0.511 略高期望杂合度 0.483,但未达到显著水平,有 8 个位点的观察杂合度与期望杂合度基本一致,说明这些位点的基因处于 Hardy-Weinberg 平衡状态,有 6 个位点的观察杂合度低于期望杂合度,说明这 6 个位点的基因偏离了平衡状态,金皇后群体是一个轮回选择群体,受选择和掺入种质的影响,本身应该是一个非遗传平衡群体。

表 3 单株样品和混合样品的比较

Tab.3 The comparison the individual samples with the bulk samples

编号 Codes	等位基因数 Numbers of gene						退火温度 Annealing temp.	片段大小 Sizes of fragments
	自交系 Lines	处理 1 Treat 1	处理 2 Treat 2	处理 3 Treat 3	处理 4 Treat 4	总计 Sum		
1	3	3	3	3	3	3	57	205~230
2	4	5	5	5	5	5	54	175~202
3	2	2	1	1	1	3	55	160~165
4	3	3	3	3	3	3	56	210~230
5	3	3	3	3	3	3	55	235~270
6	3	3	3	3	3	3	55	215~225
7	2	2	2	2	2	2	55	140~145
8	3	3	3	3	2	4	57	165~195
9	3	6	6	6	6	7	55	144~192
10	2	8	8	6	7	8	55	78~102
11	5	6	5	4	4	7	55	146~196
12	3	4	4	4	4	4	55	115~145
13	3	5	5	5	4	5	55	150~170
14	4	5	5	4	4	6	56	215~240
15	3	3	3	3	3	3	55	105~115
总计 Sum	46	61	59	55	54	66		
平均 Mean	3.07	4.07	3.93	3.67	3.60	4.40		

2.2 混合样品和单株样品结果比较

15对SSR引物在金皇后综合种的4个处理中的检测结果列于表3。混合样品和单株样品的检测结果相比获得的遗传信息有所减少,在混合样品的检测结果中无法分析样本的基因型杂合度、基因频率等遗传参数,只能研究样本的等位基因数目和带型的差异。15对引物在90个单株样品即处理1中检测到61个等位基因,平均每位点的等位基因数为4.07,在4个处理中,其等位基因数和平均等位基因数均最高,而且能检测到整个试验中基因频率最低(0.006)的基因。处理2中检测到的等位基因数为59,每位点平均等位基因数为3.93,与处理1相比有两个基因没有被检测到,占单株样品检测到的所有基因的3.28%,未检测的基因频率分别为0.017,0.028(见表2和图1,2)。处理3中检测到的等位基因数为55,每位点平均等位基因数为3.67,与处理1、处理2相比分别有6个和4个基因没有被检测到,处理3未检测的基因占单株样品检测到的所有基因的9.84%,未检测到的6个基因频率分别为0.017,0.028,0.006,0.022,0.033,0.078。处理4中检测到的等位基因数为54,每位点平均等位基因数为3.6,与处理3相比,有两个基因没有被检测到,它们的基因频率分别为0.052,0.089,引物10的频率为0.006的基因在处理3中没有检测到,但在处理4中却检测到了。处理4未检测的基因占单株样品检测到的所有基因的11.48%,未检测到的7个基因频率分别为0.017,0.022,0.028,0.033,0.052,0.078,0.089。

上述结果表明,与单株样品相比,利用混合样品可以检测到群体内大多数等位基因的变异,基本可以反映群体的遗传变异性,但随着混合单株数的增加,检测到的低频率基因数和每位点平均等位基因数均略有下降。

3 讨论

3.1 利用单株样品DNA进行SSR玉米群体遗传变异分析具有一定优越性

本研究结果显示,利用单株样品DNA进行SSR分析玉米群体遗传变异具有优越性,一是可以反映玉米群体中等位基因数、基因频率、基因型杂合度等遗传结构,有利于对群体进行比较全面的遗传分析;二是可以检测到群体内频率极低的杂合的稀有基因。根据Hardy-Weinberg定理,平衡群体中有

一种极限形式,若一隐性基因频率很低,而且 q^2 可以忽略,则平衡比例应为 $(1-2q, 2q, 0)$,即:隐性基因将几乎全部以杂合形式存在于群体中。在本研究中,图1中引物3的基因频率仅有0.017,而且全部以杂合状态出现,同时观察杂合度0.033与期望杂合度0.033一致,显示该基因处于平衡状态存在于群体中,说明利用单株样品DNA,可以检测到群体内处于杂合状态频率极低的隐性基因。

利用单株样品DNA,进行SSR分析玉米群体遗传多样性虽然具有一定优越性,但若研究对象为多个群体时,每个群体所需的单株DNA样本必须达到一定数量才能代表群体的遗传变异,若单株DNA样本增大势必就会大大增加研究的工作量,这可能是目前国内外利用SSR研究玉米群体遗传变异的一个重要限制因素。根据Crossa等估算样本容量与基因频率关系的公式 $n > \{ \log[1 - P^{(1/m)}] - \log(k-1) \} / \log(1 - p_0)$ (这里 n 表示样本容量, P 为检测到低频率基因的概率, m 为位点数, k 为每位点的平均等位基因数, p_0 表示低频率基因的频率),若用48个单株DNA作为样本,检测概率为0.95情况下,可以检测到群体内频率为0.05的基因。Marilyn等曾采用48个单株DNA作为群体的样本进行了多个玉米群体遗传多样性的研究,48个单株DNA样本的研究就相当于48个自交系所需的工作量,在用多个群体多个引物研究时工作量显然会增加很多。根据Crossa等的公式,若用24个单株的样本,检测概率仍为0.95情况下,但检测到的低频率基因的频率提高为0.12。徐立安等曾用SSR研究了异花授粉植物的4个栲树群体的遗传结构,各个群体所用的样本数分别为20,22,31,23,虽然已相当于96个自交系的工作量,但显然对群体遗传结构的研究具有一定的局限性。因此,如何才既减少工作量,又提高检测群体遗传变异的准确性,是一个值得研究的问题。

3.2 混合样品DNA在利用SSR研究玉米群体遗传变异的可行性

研究表明,与单株样品相比,利用混合样本虽然所获得的遗传信息有所减少,但仍可以检测到群体内大多数等位基因的变异,基本可以反映群体的遗传变异性。随着混合单株数的增加,检测到的低频率基因数和每位点平均等位基因数均略有下降。3个单株混合的混合样品与单株样品的检测结果相比,在等位基因数目上有3.28%的差异,未达到统

计上 0.05 的显著水平,且 3 个单株混合的混合样品中未检测到的两个基因的频率为 0.017,0.028,都是频率非常低的稀有基因,因此若只分析等位基因数目的变异和群体间等位基因带型的差异时,采用 3 个单株混合的混合样品是可行的。

10 个单株混合的混合样品与单株样品的检测结果相比,在等位基因数目上有 9.84% 的差异;相差的 6 个基因当中除 1 个频率为 0.078 外,其余的频率均低于 0.05,因此若对研究的结果要求不是十分精确时,采用 10 个单株混合的混合样品也是可行的。

15 个单株的混合样品与单株样品的检测结果相比,在等位基因数目上有 11.48% 的差异,且未被检测到的 2 个基因的频率高于 0.05,因此 15 个单株以上的混合样品与单株样品的检测结果有较大误差,是不可行的。

总之,在利用 SSR 研究玉米群体的遗传变异时,若对研究结果要求非常精确时我们可以采用单株 DNA 样品;若对研究结果要求不是十分精确时,为了既能减少工作量,又能提高检测群体遗传变异的相对准确性,采用 3~10 个单株的混合样品是可行的,这就为大规模的进行群体间遗传变异研究提供了可能,这一限制因素的突破对利用 SSR 研究其他异花授粉作物及动物、人类都具有一定的借鉴意义。

参考文献:

- [1] 吴仲贤译. 群体遗传学[M]. 北京: 农业出版社, 1981. 365-390.
- [2] 王家玉译. 分子群体遗传学与进化论[M]. 北京: 农业出版社, 1983. 235-297.
- [3] 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.
- [4] 徐立安, 李新军, 潘惠新, 等, 用 SSR 研究栲树群体遗传结构[J]. 植物学报, 2001, 43(4): 409-712.
- [5] 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.
- [6] Millar C I, Westfall R D. Allozyme markers in forest genetic conservation[J]. New Forests, 1992, 6: 347-371.
- [7] Marshall D R. Crop genetic resources: current and emerging issues[A]. Brown A H D, Clegg M T, Kahler A L, et al. Plant Population Genetics, Breeding and Genetic Resource[M]. Sunderland: Sinauer, 1989. 367-388.
- [8] Smith J S C. An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in Maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 163-173.
- [9] Senior M L, Heun M. Mapping maize microsatellites and polymerase-chain-reaction confirmation of the targeted repeats using a CT primer[J]. Genome, 1993, 36: 884-889.
- [10] Chin E C, Senior M L, Shu H, et al. Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation. Genome[J]. 1996, 39: 866-873.
- [11] Marilyn L, Warburton, Xia Xian-chun, et al. Genetic characterization of CIMMYT inbred maize lines and open pollinated populations using large scale fingerprinting methods[J]. Crop Sci, 2002, 42: 1832-1840.
- [12] 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.
- [13] Pejic L, Ajmone Marson P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPD, SSRs and AFLPs[J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 1248-1255.
- [14] Marshall D R, Brown A H D. Optimum sampling strategies in genetic conservation[A]. In: Frankel O H, Hawkes J D (eds). Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow[M]. Cambridge Cambridge University Press, 1998. 53-80.
- [15] Crossa J, Hernandez C M, Bretting P, et al. Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 673-678.