

利用 SSR 分析玉米群体的遗传变异

王铁固^{1, 2}, 库丽霞², 陈彦惠², 吴连成², 侯本军²

(1. 郑州大学离子束诱变育种及生物工程重点实验室, 河南 郑州 450052; 2. 河南农业大学 农学院, 河南 郑州 450002)

摘要:以 6 个玉米群体为材料, 利用 SSR 标记分析其遗传多样性并进行聚类分析。结果表明, 在 6 个玉米群体中检测到了丰富的遗传变异, 平均每 SSR 位点的变异等位基因数达到 7.79。依据 SSR 标记的遗传距离将供试材料分为 4 大类: 第 I 类为黄综群、金皇后综合种, 第 II 类 pob21, 第 III 类为豫综 5 号、BSSS, 第 IV 类为辽旅综。

关键词: 玉米群体; SSR; 遗传多样性; 聚类分析

中图分类号: S513.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2005)05-0013-04

Analysis of Genetic Variability of Maize Population by SSR

WANG Tie-gu^{1, 2}, KU Li-xia², CHEN Yan-hui², WU Lian-cheng², HOU Ben-jun²

(1. Ion Beam Biotechnology Key Laboratory, Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China;

2. Agronomy College of Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract: Analyzed genetic diversity of maize populations by SSR marker and clustered. The results showed that the abundant variability were detected among the 6 maize populations. Average allele of per SSR loci is 7.79. Materials were divided into 4 groups according to genetic distance of SSR marker. Huangzongqun, Jinhuanhou are a group. Pob21 is another. Yuzong 5 hao, BSSS are the third group. Liaolvzong is the last.

Key words: Maize population; SSR; Genetic distance; Cluster analysis

玉米群体是玉米育种重要的基础材料, 是玉米自交系的源泉, 玉米群体的深入研究对玉米种质资源创新、优良自交系选育、组配优良杂交组合都有重要的指导意义。SSR 是目前已广泛应用于研究作物遗传变异的一种分子标记, 玉米育种工作者们已经利用 SSR 标记对玉米自交系进行了大量研究, 但对玉米群体的研究报道甚少。本课题组曾用金皇后综合种为试验材料分析了若干单株混合提取 DNA, 利用 SSR 标记研究玉米群体遗传变异的可行性, 结果表明: 3~10 个单株的混合 DNA 样品在进行玉米群体间遗传差异比较时既能减少工作量, 又在一定程度上能保证检测结果的可靠性。因此本试验利用收集到的和我们保存的 6 个玉米群体为材料, 采用 10 个单株混合提取 DNA 的方法和 SSR 分子标记技术研究玉米群体的遗传多样性并进行聚类。

1 材料和方法

1.1 试验材料

以黄综群、BSSS、辽旅综、Pob21、金皇后综合种、豫综 5 号为试验材料(表 1), 用 Mo17、B73、丹 340、黄早 4、掖 478、许 178 等 6 个自交系为对照, 2002 年冬从各群体中随机选取 100 粒种子, 温室种植, 待玉米长至 4~5 叶时, 各群体取 50 个单株做样本, 每 10 个单株的地上部分混合一起研磨, 用 SDS 法提取 DNA, 然后用紫外分光光度计和琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量和浓度, 依据检测结果, 选取黄综群 3 个样品, 其他 5 个群体各 4 个样品 DNA 用于试验, 即最终用于试验的样本数黄综群为 30 株, 另 5 个群体为 40 株, 将选用的样品 DNA 用去离子水统一调至 10 ng/μL, 放置于 4℃冰箱备用。

收稿日期: 2005-02-11

基金项目: 河南省杰出人才创新基金项目(0221000800)

作者简介: 王铁固(1971-), 河南伊川人, 在读博士, 主要从事作物遗传育种工作; 陈彦惠为通讯作者。

表 1 6 个玉米群体的基本情况及特性

Tab. 1 Basic circumstances and speciality of 6 maize populations

名称 Name	来源 Source	胚乳型 Type of endospem	粒色 Color of seed	熟期 Ripe schedule
黄综群 Huangzongqun	唐四平头系统	半硬	黄	早熟
Pob21	从 CIMMYT 引进的热带种质	马齿	红	晚熟
金皇后综合种 Jinhuanghou	54 个金皇后自交系组成, 多轮轮回选择和改良	马齿	黄	中早熟
豫综 5 号 Yuzong 5 hao	16 个美国种质自交系组成, 多轮轮回选择和改良	半马齿	黄	中熟
BSSS	1983 年美国引入	马齿	浅黄	中熟
辽旅综 Liaolizong	旅大红骨系统	马齿	黄	中晚熟

1.2 SSR 引物筛选

以金皇后综合种和自交系 Mo17, 用同一条件扩增电泳, 从 43 对引物中筛选出 14 对多态性高, 带型好的引物用于试验, 其名称、图谱位置及碱基序列见表 2。

1.3 PCR 和电泳检测

SSR 的反应体系是 20 μ L, 除 PCR buffer 为 1 倍外, 其他各成分因引物不同略有调整, 包括引物的退火温度, PCR 仪为 MJ 公司的 PTG-200, 扩增产物用

8.0% 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 恒功率 40 W, 电泳 90 min 左右, 银染检测。

1.4 数据处理

SSR 扩增产物以 0, 1 统计建立数据库, 在相同迁移位置上, 有带记为 1, 无带记为 0, 从电泳板上按泳道统计带型, 然后, 将各群体的所有泳道结果合并, 作为该群体检测结果, 将最后合并结果输入计算机, 计算相似系数和遗传距离, 用 SAS 系统按 Average 法进行聚类分析。

表 2 SSR 引物的图谱位置及序列

Tab 2 Map position and sequence of SSR prime

编 号 No.	图谱位置 Map position	名 称 Name	序 列 Sequence
1	1. 01	phi 056	ACTTGCTGCTGCGTTAC//CGCACACCACTTCCCAGAA
2	1. 03	phi 001	TGACGGAAGTGATCGCTTAC//AGCAGGCAGCAGGTCAGCAGCG
3	1. 03	bnlg439	TTGACATGCGCATCTTGGTGACCA//TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGGAA
4	1. 09	phi 011	TGTGTCTGGTCCATACC//GCACACACACAGACGACAGT
5	2. 02	bnlg 125	GGGACAAAAGAAGAGCAGAG//GAAATGGGACAGAGACAGACAAT
6	3. 05	phi 053	CTGCCCTCAGATTTCAGAGATTGAC//AACCCAAAGTCTCCGGCAG
7	3. 07	bnlg197	GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA//CGCCAAGAAAGAACACATCACA
8	5. 06	bnlg 278	CATGCATCAACGTAACTCCCT//CATGTCACGCGTTCACCTTG
9	6. 00	bnlg238	CCTATTGCTTTCGTATACACACATTCAT//GAGCATGAGCTTGCATATTTCTTGTGG
10	6. 00	bnlg 161	GCTTTCGTATACACACATTCAT//ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
11	6. 00	phi 126	TCCTGCTTATGCTTTCGTAT//GAGCTTGCATATTTCTTGTGGACA
12	8. 05	bnlg162	ACTAGCAGCAGTAAACCTAATAAGGGA//CAAGTAGCTAGCAGTCATTTGCACTG
13	8. 06	bnlg 240	AAGAACAGAAAGCATTGATACATAA//TGCAAGGTGTATGGGCAGCTA
14	9. 07	bnlg619	ACCCATCCCACTTCCACCTCCTCT//GCTTTCAGCGAATACTGAATAACGCGGA

2 结果与分析

2.1 群体间等位基因数目的变异

14 对 SSR 引物均能在 6 个玉米群体的 10 个单株混合样中扩增出相当清晰的谱带(图 1), 其检测到的等位基因数目变异的结果列于表 3。由表 3 可以看出, 14 对引物在 6 个群体中共检测到 109 个等位基因, 在 6 个自交系中共检测到 50 个等位基因,

平均每位点的等位基因数分别为 7.79, 3.57, 在所有材料中共检测到 115 个等位基因, 平均每 SSR 位点的等位基因数为 8.21, 其中引物 8 位点的等位基因数目最多为 12 个, 引物 1 和 6 的等位基因数目最少, 均为 4 个, 其他各引物的等位基因数目分布于 5~11 个之间。在所检测到的 115 个等位基因中, 只有 44 个是所有群体和自交系所共有的, 有 65 个基因是 6 个群体所共有的, 而只有 6 个基因是 6 个自

交系所共有。由此可见, 选用的 6 个自交系分别代表了目前主要的玉米杂优类群, 各系之间存在着丰富的变异, 而群体间的变异远大于此自交系间的变异。各群体内也检测到了很丰富的遗传变异, 15 对引物在黄综群、金皇后综合种中都分别检测到了 57

个等位基因, Pob21 中检测到了 55 个等位基因, 其平均等位基因数分别 4. 07 和 3. 93, 均高于 6 个自交系间的变异, 豫综 5 号、BSSS、辽旅综等群体的平均等位基因数也分别为 3. 57, 2. 79, 2. 79, 略低于 6 个自交系间的变异。

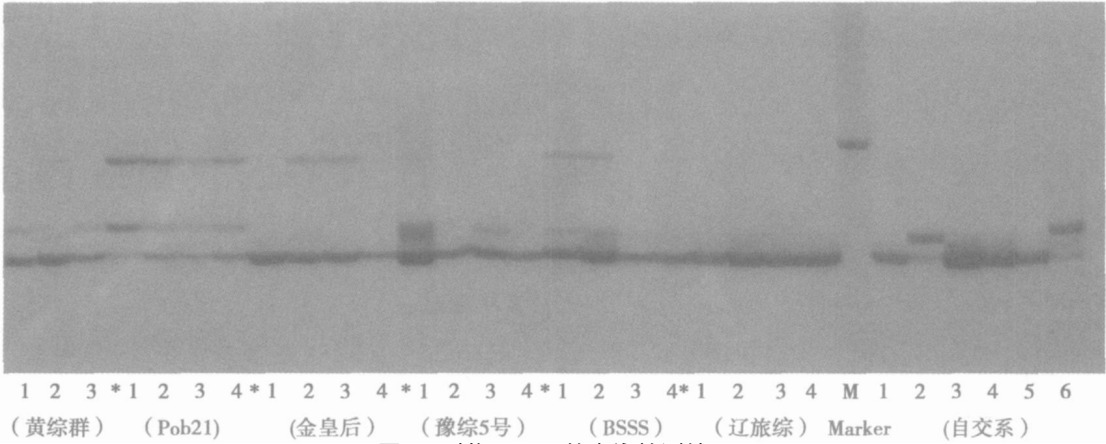


图 1 引物 phi053 的电泳检测结果

Fig 1 The examined result of gel of prime phi053

表 3 14 对 SSR 引物对 6 个玉米群体的检测结果

Tab 3 The examined result of 6 maize populations of 14 pairs SSR primes

引物编号 No. of prime	黄综群 Huangzong qun	Pob21	金皇后 Jin huang hou	豫综 5 号 Yuzong 5 hao	BSSS	辽旅综 Liaoluzong	群体总计 Total of population	自交系总计 Total of inhbreing	总计 Total
1	2	3	2	3	3	2	4	3	4
2	5	3	3	4	3	3	10	5	12
3	3	5	3	5	2	3	9	4	9
4	5	3	4	3	3	2	5	3	5
5	4	4	2	3	2	3	6	3	6
6	3	3	3	4	3	1	4	3	4
7	4	4	3	3	2	3	7	3	7
8	6	5	6	4	3	4	12	2	12
9	4	5	5	4	3	3	10	5	11
10	4	5	5	4	3	3	10	5	11
11	4	5	5	4	3	3	10	5	11
12	4	2	5	3	2	3	7	3	7
13	5	4	6	4	5	3	6	4	7
14	4	4	5	2	2	3	9	2	9
总计 Total	57	55	57	50	39	39	109	50	115
平均 Average	4. 07	3. 93	4. 07	3. 57	2. 79	2. 79	7. 79	3. 57	8. 21

2.2 聚类分析

按公式 $GS = n / (n + m)$ 计算遗传相似系数, 这里 n 为两群体间共有条带数, m 为两群体所特有条带数之和, 标记的遗传距离 $GD = 1 - GS$, 6 个玉米群体间的相似系数列于表 4。利用 SSR 标记的遗传距离为原始数据, 应用 SAS 软件, 按 Average 法对 6 个玉米群体进行聚类分析, 结果见图 2, 从图 2 可以看出, 可以分为 4 大类: 第 I 类为黄综群、金皇后综合种, 第 II 类 pob21, 第 III 类为豫综 5 号、BSSS, 第 IV 类为辽旅综, 我们从计算的遗传相似系数可以看出,

金皇后综合种与黄综群的相似系数最大, 为 0. 574, 聚为一类, 黄综群体和金皇后综合种均是温带种质, 它们之间的高相似性为我们构建黄金群提供了参考, 豫综 5 号具有美国 Lancaster 和 Reid 血缘, 与 BSSS 聚为一类是符合系谱关系的, 热带种质 Pob21 在我们进行田间试验中与测验种掖 478 的特殊配合力量最高, 居所有组合首位, 掖 478 是改良 Reid 的代表系, BSSS 属于改良 Reid 群, 本试验的结果中, pob21 与 BSSS 的遗传相似系数最小, 为 0. 322, 二者结果是相吻合的。

表 4 6 个玉米群体间的遗传相似系数
Tab. 4 Genetic similarity coefficient between 6

maize populations					
群体名称	黄综群		金皇后	豫综 5 号	
Population name	Huang zong qun	Pob21	Jin huang hou	Yu zong 5 hao	BSSS
Pob21	0.403				
金皇后	0.574	0.438			
豫综 5 号	0.422	0.426	0.435		
Yu zong 5 hao				0.471	
BSSS	0.367	0.322	0.404		
辽旅综	0.339	0.339	0.306	0.357	0.314
Liao lv zong					

测结果中黄综群、金皇后综合种和 Pob21 的平均等位基因数分别 4.07 和 3.93, 均高于 6 个自交系间的变异, 这说明这些群体内的变异比这 6 个自交系间的变异更丰富, 而豫综 5 号、BSSS、辽旅综等群体的平均等位基因数分别为 3.57, 2.79, 2.79, 略低于 6 个自交系间的变异, 由于这 6 个自交系代表了国内的主要杂优类群, 遗传基础相当广泛, 群体内的变异低于此 6 个自交系间的变异也是可能的。本试验分子标记的聚类结果与系谱分析结果相吻合, 这都进一步证明了若干单株混合取样研究玉米群体 SSR 遗传多样性并进行聚类分析的可行性。

参考文献:

[1] Li C C. 吴仲贤译. 群体遗传学[M]. 北京: 农业出版社, 1981.

[2] 袁力行, 傅骏骅, Warbuton 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.

[3] 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.

[4] 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.

[5] 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.

[6] Chin E C, Senior M L, Shu H, *et al.* Maize simple repetitive DNA sequences: abundance and allele variation [J] . Genome, 1996, 39: 866- 873.

[7] Marilyn L, Warbuton, 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.

[8] Pejic L, Ajmone-Maison 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.

[9] Crossa J, Hernandez C M, Bretting P. Statistical genetic considerations for maintaining germ plasm collections[J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 673- 678.

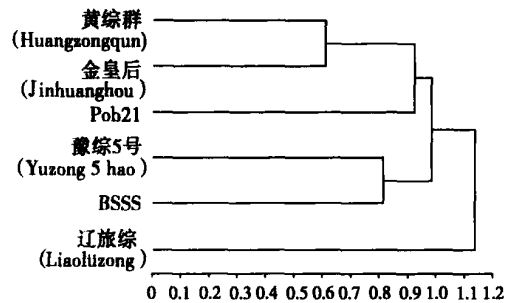


图 2 6 个玉米群体的聚类结果
Fig 2 Clustering result of 6 maize populations

3 结论与讨论

本试验的研究结果表明, 利用 10 个单株混合提取的 DNA 能够检测到玉米群体丰富的 SSR 标记的遗传变异, 李新海等用 43 对引物在 21 个自交系中共检测到 127 个等位基因, 平均等位基因数为 2.95, Marilyn 等用 85 对引物在 7 个玉米群体中共检测到 531 个等位基因, 平均等位基因数为 6.3, 而本试验中 14 对引物在 6 个群体中共检测到 109 个等位基因, 在 6 个自交系中共检测到 50 个等位基因, 平均每位点的等位基因数分别为 7.79, 3.57, 均稍高于二者的研究结果, 这说明本试验选用材料之间存在着更丰富的遗传变异, 而本试验所选用的 6 个自交系和 6 个群体都是目前玉米种质资源中 4 大类群的代表性材料, 遗传基础非常广泛, 试验结果也吻合了这一点。检测结果中只有 44 个变异基因是所有群体和自交所共有的, 有 65 个基因是 6 个群体所共有的, 而只有 6 个基因是 6 个自交所共有, 这也与玉米群体间的变异远大于自交系间的变异相吻合。检