

54份甜玉米自交系的SSR遗传多样性分析

黄君¹, 冯发强¹, 王青峰², 张晶¹, 周鹏¹, 李小琴^{1,2}

(1 华南农业大学农学院, 亚热带农业生物资源保护与利用国家重点实验室, 广东 广州 510642;

2 华南农业大学重点实验室建设办公室, 广东 广州 510642)

摘要:利用SSR标记对54份甜玉米自交系进行了遗传多样性分析,从150对引物中筛选出了56对扩增条带清晰、稳定性好的引物.结果表明:56对引物在54份甜玉米自交系中共检测到155个位点的等位基因变异,平均每对引物检测出的等位基因变异为2.77个,变异范围为2~5个,平均多态性信息含量为0.42,变异范围为0.13~0.71. UPGMA聚类结果表明,可将甜玉米自交系划分为三大类,其划分结果与系谱分析基本一致.

关键词:甜玉米; 自交系; 遗传多样性; SSR标记

中图分类号:S326

文献标志码:A

文章编号:1001-411X(2012)01-0001-04

Study on Genetic Diversity of 54 Sweet Corn Inbred Lines by SSR Markers

HUANG Jun¹, FENG Fa-qiang¹, WANG Qing-feng², ZHANG Jing¹, ZHOU Peng¹, LI Xiao-qin^{1,2}

(1 State Key Laboratory for Conservation and Utilization of Subtropical Agro-bioresources,
College of Agriculture, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;

2 Office of Key Laboratory Construction, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The technique of SSR markers was used to study the genetic diversity of the sweet corn inbred lines, 56 pairs of primers selected from 150 pairs of primers. A total of 155 polymorphic bands, an average of 2.77 alleles per primer, variation of 2–5 alleles for each primer, mean polymorphic information content of 0.42 and its range from 0.13 to 0.71 were detected. Clustering analysis in UPGMA classified the sweet corn inbred lines into 3 groups, which were similar to germplasmic genealogy.

Key words: sweet corn; inbred lines; genetic diversity; SSR markers

甜玉米 *Zea mays* L. *saccharata*, 作为玉米属的一个亚种, 即甜质型玉米亚种, 由于其乳熟期籽粒中富含水溶性多糖、蛋白质、多种游离氨基酸以及维生素等, 以其独特的风味和营养价值越来越受到广大消费者的青睐^[1-2]. 仅广东而言, 种植甜玉米的面积就由2000年的4.7万 hm² 增长到2009年的15.7万 hm². 然而, 由于我国不是甜玉米的起源中心, 种质资源十分匮乏, 所以对我国当前所拥有的甜玉米种质资源进行整理和分析就显得十分重要^[3].

近年来, 随着DNA分子标记技术特别是SSR标记的应用, 为种质资源遗传多样性的研究提供了新的手段. 目前, SSR标记已广泛应用于玉米种质资源的遗传多样性研究. Smith等^[4]用131对SSR引物对58份玉米自交系进行了遗传多样性分析, 认为运用SSR技术进行遗传多样性分析更为优越, 并与系谱来源基本一致. Senior等^[5]用70对SSR标记对94份美国自交系进行分析, 共检测到365个等位基因, 用SSR资料对其进行聚类分析, 其结果与系谱吻合. 目

收稿日期: 2010-12-01

作者简介: 黄君 (1986—), 男, 硕士研究生; 通信作者: 李小琴 (1967—), 女, 教授, 博士, E-mail: xiaoqinli2000@126.com

基金项目: 广东省农业科技计划项目 (2007A020400002); 广东省科技计划项目 (2008B050100046)

前国内也在这方面开展了大量的工作,袁力行等^[6]和李新海等^[7]分别对我国一些常用玉米自交系进行了分析,认为 SSR 标记在遗传多样性分析方面更具优势,并且分析结果与系谱一致.另外,陈婧等^[8]和肖木辑等^[9]也对我国的一些特用玉米自交系进行了遗传多样性分析.以上文献表明用 SSR 标记进行玉米自交系的遗传多样性研究是可行的.

本研究利用 56 对 SSR 引物对 54 份甜玉米自交系进行了遗传多样性分析,为提高甜玉米育种效率和水平、进行甜玉米种质资源改良和利用提供一定的理论依据.

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为华南农业大学农学院甜玉米课题组引进和选育的 54 份高代甜玉米自交系,依次编号为 A1 ~ A54.

1.2 DNA 的提取与检测

采用 Saghai-Maroo 等^[10]提出的 CTAB 法提取甜玉米叶片总 DNA.并用紫外分光光度计测量 DNA 浓度和相对纯度.用纯水将 DNA 稀释至 20 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$,置于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存备用.

1.3 引物筛选

结合 CIMMYT 公布的玉米核心引物,选取位于玉米 10 条染色体上的 150 对引物,并从中筛选出 56 对带型清晰、稳定性好的引物进行 SSR 分析.

1.4 PCR 扩增

PCR 扩增在 DNA Engine PTC-200 PCR 反应仪上进行,反应体系为 20 μL ,其中 10 $\times$ PCR Buffer 2.00 μL , 30 mmol/L Mg^{2+} 1.68 μL , 25 mmol/L dNTPs 0.32 μL , 5 U/ μL Taq 酶 0.20 μL , 30 ng/ μL Primer pairs 2.00 μL , 20 ng/ μL DNA 2.50 μL , dd H_2O 11.30 μL .

PCR 反应过程为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 1 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min, 58 $^{\circ}\text{C}$ 退火 1.5 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min; 最后于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.

1.5 聚丙烯酰胺凝胶电泳

扩增产物用质量分数为 6% 的聚丙烯酰胺变性凝胶电泳.电泳完后,记录结果并照相.

1.6 数据分析

根据 SSR 产物银染结果,有带记为 1,无带记为

0,数据缺失记为 9,建立数据库.采用 Nei 等^[11]的公式计算各自交系间的遗传相似系数 (Genetic similarity, GS) 和遗传距离 (Genetic distance, GD): $\text{GS} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$; $\text{GD} = 1 - \text{GS}$. 其中, N_{ij} 为第 i 个材料和第 j 个材料基因型间共有的条带数; N_i 和 N_j 分别为第 i 个材料和第 j 个材料各自的特有条带数.然后按 UPGMA 方法对各个自交系进行聚类作图,数据处理由 NTsys 2.10e 软件完成.每一个多态性位点的多态性含量 (PIC) 按 Smith 等^[4]的公式计算, $\text{PIC} = 1 - \sum f_i^2$, 其中 f_i 为 i 位点的基因频率,数据处理由统计分析软件 PowerMarker V3.25 完成.

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

从 150 对玉米 SSR 引物中筛选出 56 对扩增带型稳定性较高的引物进行 SSR 分析,结果见表 1. 由表 1 可见,在 54 份甜玉米自交系中共检测到 155 个等位基因变异,不同检测位点检测到的等位基因变异分别为 2 ~ 5 个,平均每个检测位点检测到的等位基因变异为 2.77 个.另外,155 个 SSR 位点共检测出 54 份甜玉米自交系的基因多样性指数平均为 0.49,变化范围为 0.14 (umc1808) ~ 0.75 (dupssr28 和 umc1653); 平均多态性信息含量 (PIC 值) 为 0.42,变化范围为 0.13 (umc1827) ~ 0.71 (umc1653).

2.2 聚类分析

根据 54 份甜玉米自交系遗传相似系数矩阵,利用 UPGMA 方法对供试自交系进行聚类分析.根据聚类分析树状图 (图 1),以相似系数 0.60 为标准,可以将 54 份甜玉米自交系分为三大类.其中第 I 类包含 A1、A21、A2、A30、A31、A11、A16、A12、A32、A13、A14、A15、A18、A19、A28,大部分来源于国内甜玉米品种选育的二环系;在第 II 类中若相似系数以 0.62 为标准,又可以将第 II 大类划分为 2 个亚类,其中 A3、A22、A33、A34、A50、A49、A51、A53、A52、A54、A9、A10、A39、A40、A41、A35、A36、A26、A27、A17、A37、A38、A29、A42 为第 1 亚类,大部分为美国甜玉米品种选育的二环系, A4、A6、A25、A24、A20、A5、A23、A7、A8 为第 2 亚类,大部分为美国血统甜玉米自交系的改良系;第 III 类包含 A43、A44、A47、A48、A46、A45,均为先正达公司引进的甜玉米种质资源.

表 1 甜玉米 SSR 检测的等位基因及多态性信息含量

Tab.1 The number of alleles and PIC value of sweet corn detected by SSR markers

编号	引物	染色体 位置	等位基 因数/个	多态性信息 量(PIC 值)	编号	引物	染色体 位置	等位基 因数/个	多态性信息 量(PIC 值)
1	bnlg1451	10.02	5	0.66	30	bnlg1740	6.07	4	0.63
2	umc1792	5.08	2	0.29	31	bnlg1217	4.05	4	0.67
3	phi123	6.07	3	0.46	32	umc1219	3.05	2	0.37
4	bnlg1189	4.07	3	0.41	33	bnlg2086	1.04	2	0.37
5	umc1273	3.08	2	0.37	34	umc1641	3.09	2	0.36
6	bnlg1055	1.11	5	0.64	35	bnlg2132	7.00	2	0.38
7	bnlg1160	3.06	3	0.25	36	hsbp1	2.05	2	0.18
8	dupssr28	4.08	4	0.70	37	umc1798	2.08	4	0.57
9	umc1221	5.04	3	0.56	38	umc2000	3.04	2	0.26
10	umc1653	6.07	6	0.71	39	umc2069	10.02	2	0.30
11	umc1393	7.02	2	0.30	40	umc2613	2.09	3	0.32
12	bnlg2122	9.01	3	0.45	41	umc1890	2.07	2	0.30
13	bnlg1194	8.02	3	0.54	42	umc1135	3.07	3	0.21
14	umc1714	9.07	2	0.37	43	umc1757	4.01	2	0.32
15	umc1407	7.05	2	0.36	44	bnlg210	10.03	2	0.29
16	bnlg244	9.02	4	0.56	45	umc1911	10.04	2	0.30
17	umc1131	9.02	3	0.42	46	umc1251	7.04	2	0.32
18	bnlg1012	9.04	2	0.37	47	umc1340	8.05	2	0.37
19	umc1796	6.04	2	0.29	48	umc1072	5.07	2	0.37
20	umc2191	1.02	2	0.32	49	umc1027	3.06	2	0.37
21	umc2012	1.01	4	0.64	50	umc1115	10.04	2	0.29
22	umc1225	5.08	2	0.22	51	umc1231	9.05	3	0.49
23	bnlg1879	5.02	2	0.37	52	bnlg2291	4.06	3	0.52
24	umc1707	4.11	2	0.24	53	umc1808	4.08	4	0.67
25	bnlg1839	10.07	3	0.43	54	umc1827	10.05	2	0.13
26	bnlg1031	8.06	4	0.62	55	umc2061	4.05	2	0.37
27	umc1137	9.08	3	0.57	56	bnlg1006	5.00	4	0.67
28	umc1029	7.04	4	0.59	合计			155	
29	bnlg1371	6.01	3	0.44	平均			2.77	0.42

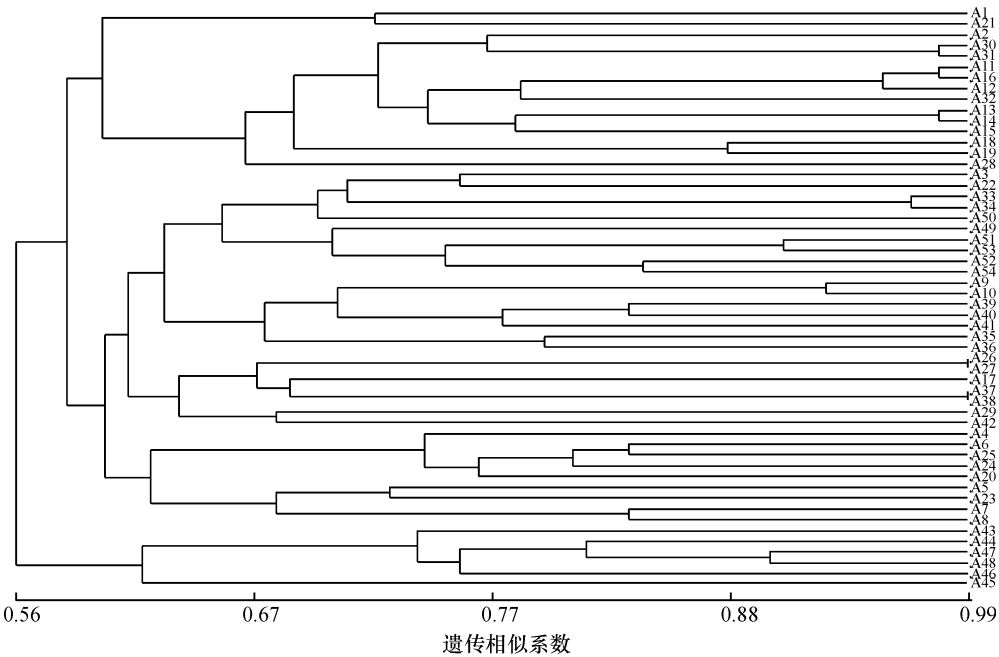


图 1 54 份甜玉米自交系的 UPGMA 聚类图

Fig.1 The dendrogram of 54 sweet corn inbred lines by SSR markers

3 讨论与结论

本研究利用 56 对 SSR 标记对 54 份甜玉米自交系进行了遗传多样性研究. 遗传相似系数从 0.463 (A3 与 A12) 到 0.989 (A37 与 A38), 变异范围较大, 表明甜玉米自交系遗传多样性较高. 以遗传相似系数 0.6 为标准, 可以将 54 份甜玉米自交系划分为三大类, 其划分结果与系谱分析基本是一致的. 如 A37、A38 均为同一美国品种选育的二环系, 遗传相似系数为 0.989; A26、A27 同样互为姊妹系, 其遗传相似系数为 0.987, 所以这 2 对姊妹系都直接聚在一起, 其与系谱记载是完全一致的. 所以从本研究来看, 利用 SSR 标记进行甜玉米自交系间的遗传多样性分析是可行的.

在本研究中, 总共检测到 155 个等位基因变异, 变异范围为 2~5 个, 平均等位基因数为 2.77 个, 这相对于国内外普通玉米以及糯玉米自交系研究而言较低. 陈婧等^[8]用 32 对 SSR 引物对 40 份糯玉米自交系进行遗传多样性分析, 共检测出 152 个等位基因变异, 平均为 4.75 个; Lu 等^[12]用 83 对 SSR 引物分析了 40 份美国温带普通玉米自交系, 检测到的平均等位基因变异(4.9)也高于本研究, 这可能与我国甜玉米自交系的选育来源不够广泛, 以及 SSR 引物的筛选不够合理有关. 在以后的育种过程中我们应该注重自身拥有资源的研究和整理并加强甜玉米种质资源的引进和改良, 以扩大我国甜玉米育种的种质资源库. 另外, 从本研究中我们也发现, 用 SSR 标记对甜玉米自交系进行遗传变异分析, 其结果与系谱来源基本上是一致的. 但还是有部分结果与系谱记载有一定差异, 例如 A18、A19 为先正达公司引进的甜玉米自交系, 却划入了第 I 大类, 这可能与甜玉米自身存在的广泛变异或者玉米自交系间经过反复杂交和多方向的选择, 系谱关系不大清楚有关^[13].

总体来说, 利用 SSR 标记技术研究甜玉米自交系间的遗传关系, 可以克服常规系谱分析法的不足, 这对于甜玉米种质资源的改良、扩增和进一步提高杂交组合的组配效率具有十分重要的参考价值. 但是, 不能仅仅依据分子标记结果来推断甜玉米自交系间的杂种优势, 应该结合自交系间的系谱、配合力

以及田间表现来划分合理的杂种优势群, 对甜玉米自交系的遗传多样性进行更加全面、仔细的研究.

参考文献:

- [1] 王立秋. Su1 型甜玉米杂种优势划分[J]. 玉米科学, 1997, 5(1): 27-29.
- [2] 于彦春, 朱芳, 武丽敏. 甜玉米的营养价值及综合利用前景[J]. 吉林蔬菜, 1998(6): 35-36.
- [3] 李小琴, 吴景强, 叶翠玉, 等. 我国甜玉米育种概况及面临的挑战[J]. 作物杂志, 2002(5): 45-46.
- [4] 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]. Theor Appl Genet, 1997 (95): 163-173.
- [5] 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 Science, 1998, 38: 1088-1098.
- [6] 袁力行, 傅骏骅, 李新海, 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.
- [7] 李新海, 袁力行, 李晓辉, 等. 利用 SSR 标记划分 70 份我国玉米自交系的杂种优势群[J]. 中国农业科学, 2003, 36(6): 622-627.
- [8] 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.
- [9] 肖木辑, 黄瑞冬, 许文娟, 等. 高淀粉玉米自交系 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 玉米科学, 2010, 18(1): 42-45.
- [10] SAGHAI-MAROOF M A, SOLIMAN K M, JORGENSEN R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics[J]. Proc Natl Acad Sci, 1984, 81: 8014-8018.
- [11] NEI M, LI W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci, 1979, 76(10): 5269-5273.
- [12] LU H, BERNARDO R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds[J]. Theor Appl Genet, 2001, 103: 613-617.
- [13] 赵新亮, 郭霭光. 利用 SRAP 分子标记划分玉米自交系类群初探[J]. 西北农学报, 2007, 16(3): 77-81.

【责任编辑 周志红】