

利用 SSR 标记研究东北北部常用自交系遗传多样性

蔡 泉,曹靖生,史桂荣,张建国,郭晓明,李树军,殷 跃
(黑龙江省农业科学院 玉米研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了明确东北北部常用玉米自交系遗传基础,更好地改良和利用玉米种质,利用 70 对玉米 SSR 引物,对 131 个东北北部常用自交系和 6 个标准测验种共 137 个自交系进行遗传多样性分析。结果表明:将 PA、BSSS 和 LRC 划为 A 群,PB、Lan 和 SPT 归为 B 群,有 61 个自交系属于 A 群,50 个属于 B 群,中间型 26 个。

关键词:玉米;SSR;自交系;遗传多样性

中图分类号:S513.032 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2013)08-0001-08

SSR 标记技术具有简便,快速,重复性高,稳定性好的特点,近年来大量玉米 SSR 引物被开发,使得该技术在玉米遗传多样性、划分玉米种质类群等方面得到广泛的应用^[1-2]。

东北北部由于其生态特殊性,玉米种质与其它地区相比具有一定的差异性,虽然近年来国内不少研究人员对我国常用玉米自交系进行了遗传多样性分析,但涉及到的东北北部常用自交系较少。因此,为了明确东北北部常用自交系遗传基础,

更好地改良、利用现有玉米种质,2011 年黑龙江省农业科学院玉米研究所高产玉米研究室利用 70 对玉米 SSR 引物,对 131 个东北北部和本室常用自交系加上 6 个标准测验种(掖 478、B73、丹 340、齐 319、Mo17、444)进行了遗传分析^[3-5]。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用的自交系来自于收集到的东北北部常用系和本室常用自交系,共 137 个(见表 1)。

表 1 试验选用的 137 个常用自交系

Table 1 137 commonly used inbred lines

试验代号 Test number	自交系名 Inbred line	试验代号 Test number	自交系名 Inbred line	试验代号 Test number	自交系名 Inbred line
G01	鲁原 92	G47	多黄 6-1	G93	GY246A
G02	丹 9064	G48	515	G94	吉 842
G03	龙系 292-2	G49	KWS731-2	G95	5912
G04	吉 992	G50	龙系 232-2	G96	601
G05	鲁原 42	G51	4112(四密 21 母)	G97	B317(434×444)
G06	A112YS475	G52	龙系 247	G98	龙系 372
G07	合 344	G53	龙系 266	G99	龙系 393
G08	龙系 287	G54	P6C1-50	G100	龙系 381
G9	丹 342	G55	818 杂 1421	G101	02-6549
G10	613-2-1	G56	甸 C6-123F	G102	龙系 310
G11	龙系 334	G57	沈 138	G103	93349
G12	龙系 284	G58	黄 A 杂 1-2	G104	B144
G13	长 3. YSCA2	G59	龙系 352	G105	502
G14	海 894	G60	龙系 339	G106	488

收稿日期:2013-04-07

第一作者简介:蔡泉(1979-),男,黑龙江省牡丹江市人,硕士,助理研究员,从事玉米新品种选育与推广工作。E-mail:
cq6539@163.com。

续表 1

Continuing Table 1

试验代号 Test number	自交系名 Inbred line	试验代号 Test number	自交系名 Inbred line	试验代号 Test number	自交系名 Inbred line
G15	石 33	G61	龙系 335	G107	G253
G16	4003	G62	东 5414	G108	H274
G17	N03-62	G63	苏 4A-1	G109	龙系 311
G18	龙系 336	G64	琼 151	G110	龙系 308
G19	GY237B	G65	9573	G111	龙系 319
G20	(478.712)/偏 478	G66	龙系 305	G112	龙系 318
G21	龙系 342	G67	金黄 225	G113	龙系 340
G22	龙系 344	G68	龙系 304	G114	龙系 345
G23	龙系 332-2	G69	龙系 361	G115	龙系 337
G24	MAOS	G70	西农 11	G116	陕单 902-3-3
G25	San5	G71	471(抗寒)	G117	龙系 346
G26	ZPTC2378.8112-2	G72	矮单 88 选(黄早 4)	G118	P35
G27	94 克母	G73	海 863(黄 331.520)	G119	龙系 347
G28	长 3	G74	龙系 300	G120	1547-2
G29	中 7490-92	G75	龙系 312	G121	463-3. 黄早 4
G30	Mo113	G76	龙系 348	G122	龙系 349
G31	龙系 2	G77	龙系 316	G123	龙系 329
G32	龙系 96-5	G78	龙系 292-1	G124	B73
G33	龙系 12	G79	龙系 350	G125	丹 340
G34	龙系 45-3	G80	龙系 322-2	G126	444
G35	ZPSC475	G81	龙系 297-2	G127	Mo17
G36	冀 815	G82	龙系 351	G128	PH6WC(先玉 335 母)
G37	九 33	G83	龙系 301	G129	PH4CV(先玉 335 父)
G38	多 9116	G84	478	G130	四—287(吉单 27 母)
G39	7922-2	G85	龙系 352	G131	四—144(吉单 27 父)
G40	沈 110	G86	WL2	G132	郑 58
G41	866	G87	K22	G133	昌 7-2
G42	吉 959	G88	LSH2	G134	龙抗 11
G43	C8665	G89	93533(8112/416×Mo17 改)	G135	K10
G44	龙系 360	G90	1853N(Mo17 血缘)A	G136	兴垦自 167-1
G45	东 248-3	G91	H275	G137	齐 319
G46	龙系 173	G92	G279		

试验选用的 70 对引物见表 2, 其信息来自于网上(www.maizegdb.org), 并由上海生工生物

工程公司合成。

表 2 试验采用的 70 对玉米 SSR 引物
Table 2 Seventy pairs of SSR primers of maize

编号 Number	引物 Primer	重复序列 Repeat sequence	染色体位置 Loci on chromosome	编号 Number	引物 Primer	重复序列 Repeat sequence	染色体位置 Loci on chromosome
1	nc130	AGC	5.00	36	phi108411	AGCT	9.05
2	nc133	GTGTC	2.05	37	phi109188	AAAG	5.00
3	phi006	CCT	4.11	38	phi109275	AGCT	1.00
4	phi011	AGC	1.09	39	phi112	AG	7.01
5	phi014	GGC	8.04	40	phi113	GTCT	5.03~5.04
6	phi015	AAAC	8.08	41	phi114	GCCT	7.03
7	phi024	CCT	5.01	42	phi115	AT/ATAC***	8.03
8	phi027	GCGCT	9.03	43	phi116	ACTG/ACG***	7.06
9	phi029	AG/AGCG***	3.04	44	phi121	CCG	8.04
10	phi034	CCT	4.11	45	phi123	AAAG	6.07
11	phi041	AGCC	10.00	46	phi127	AGAC	2.08
12	phi046	ACGC	3.08	47	phi227562	ACC	1.12
13	phi047	ATC	3.09	48	phi233376	CCG	8.03
14	phi049	ACT	3.01	49	phi308707	AGC	1.10
15	phi050	AAGC	10.03	50	phi328175	AGG	7.04
16	phi053	ATAC	3.05	51	phi331888	AAG	5.04
17	phi056	CCG	1.01	52	phi339017	AGG	1.03
18	phi057	GCC	7.01	53	phi374118	ACC	3.02
19	phi059	ACC	10.02	54	phi402701	CCG	8.00
20	phi062	ACG	10.04	55	phi423796	AGATG	6.01
21	phi063	TATC	10.02	56	phi448880	AAG	9.05
22	phi064	ATCC	1.11	57	phi96100	ACCT	2.00
23	phi065	CACTT	9.03	58	umc1061	(TCG)6	10.06
24	phi072	AAAC	4.00	59	umc1122	(CGT)7	1.06~1.07
25	phi073	AGC	3.05	60	umc1124	TCCC	1.05
26	phi076	AGCGGG	4.11	61	umc1143	AAAAT	6.00
27	phi078	AAAG	6.05	62	umc1152	(ATAG)6	10.01
28	phi079	AGATG	4.05	63	umc1153	(TCG)4	5.09
29	phi080	AGGAG	8.08	64	umc1161	(GCTGGG)5	8.06
30	phi083	AGCT	2.04	65	umc1196	CACACG	10.07
31	phi084	GAA	10.04	66	umc1277	(AATA)G	9.08
32	phi085	AACGC	5.05	67	umc1279	(CCT)6	9.00
33	phi087	ACC	5.06	68	umc1399	(CTAG)5	3.07
34	phi089	ATGC	6.08	69	umc1545	(AAGA)4	7.00
35	phi102228	AAGC	3.04~3.05	70	umc1555	(TTCA)7	2.02~2.03

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 采用 CTAB 法, 每个自交系取 5 粒种子栽于营养钵内, 置于人工光照培养箱内, 待幼苗长至 3 叶期时, 剪取幼嫩叶片, 利用组织研磨仪磨碎叶片, 提取基因组 DNA。利用分光光度计检测 DNA 的浓度和质量, 把浓度调至 $10 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用^[6]。

1.2.2 PCR 反应 反应总体积 10 μL , 包括 PCR buffer 1 μL , dNTP 0.1 μL , SSR 引物 0.125 μL , *Taq* 酶 0.25 μL , 模板 DNA 2.5 μL , ddH₂O 5.725 μL 。将各反应组分混匀后, 加入 25 μL 矿物油覆盖, 在 PCR 仪上扩增, 反应程序为 95℃ 预变性 4 min, 一个循环; 95℃ 变性 35 s, 55℃ 或 60℃(视引物而定)退火 35 s, 72℃ 延伸 45 s, 共 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。反应程序结束后, 4℃ 暂时保存 PCR 扩增产物, 在扩增后的样品中加入 5 μL Loading Buffer 混合, 95℃ 变性 5 min 后立刻转到冰浴中待用。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及银染 用 4.5%

聚丙烯酰胺变性凝胶电泳, 使用 Bio-RAD 公司的电泳设备, 38 cm × 30 cm × 0.4 mm 测序胶板, 恒定功率 60 W, 电泳 50 min。用硝酸银法进行染色, 主要步骤: 1 350 mL 水 + 150 mL 酒精 + 7.5 mL 醋酸, 固定 10 min, 1 500 mL 水漂洗 3 min, 1 500 mL 水 + 2 g 硝酸银, 银染 10 min, 1 500 mL 水漂洗 2~3 s, 1 500 mL 水 + 22.5 g NaOH + 2 mL 甲醛显影, 时间以出现带为准, 定影放入醋酸中, 碳酸钠 15 g + 水 2 000 mL, 水洗 5 min。

1.2.4 数据统计分析 根据扩增结果, 在相同迁移位置有带记为“1”, 无带记为“0”, 缺失记为“9”。数据整理后利用 NTSYS2.10e 进行数据分析, 生成聚类图及计算遗传相似系数^[5-6]。

2 结果与分析

2.1 玉米遗传多样性分类

根据遗传相似系数结果, 推测了 137 个自交系遗传多样性分类(见表 3)。

表 3 137 个自交系主要遗传基础
Table 3 Genetic basis of 137 inbred lines

编号 Number	自交系 Inbred line	PA	BSSS	LRC	PB	Lan	SPT	A 群 Group A	B 群 Group B
G1	鲁原 92		0.34	0.47				0.81	
G2	丹 9064			0.814				0.814	
G3	龙系 292-2					0.793		0.793	
G4	吉 992					0.915		0.915	
G5	鲁原 42			0.745				0.745	
G6	A112YS475					0.793		0.793	
G7	合 344	0.39				0.41		0.39	0.41
G8	龙系 287		0.44				0.4	0.44	0.4
G9	丹 342		0.38	0.4				0.78	
G10	613-2-1			0.3		0.44		0.3	0.44
G11	龙系 95					0.73		0.73	
G12	龙系 284	0.53	0.35					0.88	
G13	龙系 279			0.356		0.332		0.356	0.332
G14	海 894			0.41		0.37		0.41	0.37
G15	石 33					0.734		0.734	
G16	4003				0.798			0.798	
G17	N03-62			0.38			0.37	0.38	0.37
G18	龙系 336		0.84					0.84	
G19	GY237B		0.2	0.36		0.36		0.56	0.36
G20	(478.712)/偏 478	0.4	0.4					0.8	
G21	龙系 342					0.835		0.835	
G22	龙系 344		0.39	0.37				0.76	

续表 3

Continuing Table 3

编号 No.	自交系 Inbred line	PA	BSSS	LRC	PB	Lan	SPT	A 群 Group A	B 群 Group B
G23	龙系 332-2						0.78		0.78
G24	MAOS		0.4	0.39				0.79	
G25	龙系 33					0.81			0.81
G26	龙系 113-2			0.36			0.38	0.36	0.38
G27	94 克母		0.73					0.73	
G28	长 3		0.38	0.41				0.79	
G29	中 7490-92					0.8			0.8
G30	MO113					0.86			0.86
G31	龙系 2	0.38					0.38	0.38	0.38
G32	龙系 96-5		0.3	0.3			0.375	0.6	0.375
G33	龙系 12			0.4			0.42	0.4	0.42
G34	龙系 45-3					0.829			0.829
G35	ZPSC475		0.39				0.38	0.39	0.38
G36	冀 815		0.4				0.36	0.4	0.36
G37	九 33					0.872			0.872
G38	多 9116	0.771						0.771	
G39	7922-2		0.893					0.893	
G40	沈 110		0.894					0.894	
G41	866		0.814					0.814	
G42	吉 959			0.3		0.37	0.3	0.3	0.67
G43	C8665			0.793				0.793	
G44	ZPTC459		0.4	0.38				0.78	
G45	东 248-3					0.744			0.744
G46	龙系 173					0.38	0.38		0.76
G47	多黄 6-1	0.73						0.73	
G48	515			0.77				0.77	
G49	KWS731-2		0.39	0.38				0.77	
G50	龙系 232-2						0.521		0.521
G51	4112		0.4				0.4	0.4	0.4
G52	龙系 347					0.845			0.845
G53	龙系 266		0.3	0.3			0.3	0.6	0.3
G54	P6C1-50						0.792		0.792
G55	818 杂 1421					0.761			0.761
G56	甸 C6-123F					0.72			0.72
G57	沈 138					0.38	0.35		0.73
G58	黄 A 杂 1-2		0.787					0.787	
G59	龙系 352		0.38		0.13	0.32	0.38		0.45
G60	龙系 339		0.813					0.813	
G61	龙系 335					0.38	0.38		0.76
G62	东 5414					0.797			0.797
G63	苏 4A-1						0.856		0.856
G64	琼 151		0.84					0.84	

续表 3

Continuing Table 3

编号 No.	自交系 Inbred line	PA	BSSS	LRC	PB	Lan	SPT	A群 Group A	B群 Group B
G65	9573		0.94					0.94	
G66	龙系 305					0.86			0.86
G67	金黄 225	0.787						0.787	
G68	龙系 304	0.1	0.36	0.38				0.84	
G69	龙系 361			0.792				0.792	
G70	西农 11					0.808			0.808
G71	471(抗寒)		0.41	0.4				0.81	
G72	矮单 88 选(黄早 4)						0.73		0.73
G73	海 863(黄 331.520)			0.84				0.84	
G74	龙系 300	0.39		0.36				0.75	
G75	龙系 312			0.797				0.797	
G76	龙系 348		0.36	0.38				0.74	
G77	龙系 316			0.75				0.75	
G78	龙系 292-1						0.77		0.77
G79	龙系 350			0.82				0.82	
G80	龙系 322-2		0.38			0.35		0.38	0.35
G81	龙系 297-2					0.38	0.36		0.74
G82	龙系 351			0.35		0.39		0.35	0.39
G83	龙系 301					0.707			0.707
G84	掖 478	1						1	
G85	龙系 352		0.39	0.36				0.75	
G86	WL2					0.829			0.829
G87	K22	0.856						0.856	
G88	LSH2	0.38		0.36				0.74	
G89	93533(8112/416×Mo17 改)	0.808						0.808	
G90	1853N(Mo17 血缘)A	0.2	0.34	0.4				0.94	
G91	H275						0.819		0.819
G92	G279						0.851		0.851
G93	GY246A					0.36	0.36		0.72
G94	吉 842						0.744		0.744
G95	5912					0.824			0.824
G96	601						0.872		0.872
G97	B317(434×444)						0.84		0.84
G98	龙系 372	0.846						0.846	
G99	龙系 393					0.888			0.888
G100	龙系 381	0.862						0.862	
G101	02-6549		0.771					0.771	
G102	龙系 310						0.712		0.712
G103	93349						0.728		0.728
G104	B144	0.776						0.776	
G105	502						0.882		0.882
G106	488		0.771					0.771	

续表 3

Continuing Table 3

编号 No.	自交系 Inbred line	PA	BSSS	LRC	PB	Lan	SPT	A 群 Group A	B 群 Group B
G107	G253	0.33	0.2	0.37				0.9	
G108	H274		0.904					0.904	
G109	龙系 311	0.4	0.4					0.8	
G110	龙系 308			0.851				0.851	
G111	龙系 319			0.38		0.38	0.38	0.38	
G112	龙系 318		0.39	0.38				0.77	
G113	龙系 340	0.38		0.4				0.78	
G114	龙系 345		0.36			0.38	0.36	0.38	
G115	龙系 337		0.3	0.35	0.33		0.65	0.33	
G116	陕单 902-3-3					0.797		0.797	
G117	龙系 346					0.803		0.803	
G118	P35					0.765		0.765	
G119	龙系 347			0.56				0.56	
G120	1547-2		0.375		0.39		0.375	0.39	
G121	463-3. 黄早 4					0.814		0.814	
G122	龙系 349		0.38	0.39				0.77	
G123	龙系 349		0.808					0.808	
G124	B73		1					1	
G125	丹 340			1				1	
G126	444					1		1	
G127	Mo17					1		1	
G128	PH6WC(先玉 335 母)		0.824					0.824	
G129	PH4CV(先玉 335 父)				0.813			0.813	
G130	四-287(吉单 27 母)					0.882		0.882	
G131	四-144(吉单 27 父)		0.813					0.813	
G132	郑 58	0.765						0.765	
G133	昌 7-2					0.781		0.781	
G134	龙抗 11				0.712			0.712	
G135	K10		0.765					0.765	
G136	兴垦自 167-1	0.898						0.898	
G137	齐 319				1			1	

2.2 归类

根据表 3 结果,利用谢传晓等人归类方法^[1],将 PA、BSSS 和 LRC 划为 A 群,PB、Lan 和 SPT 归为 B 群,将遗传相似系数之和为 0.6 以上的列为 A 群或 B 群,小于 0.6 的划为中间型;137 份自交系共有 61 份属于 A 群,50 份属于 B 群,中间型有 26 份。

2.3 遗传相似性分析

遗传相似系数数值大于 0.5 的 PA 种质有 11 份,BSSS 种质有 13 份,LRC 种质有 13 份,Lan 种质有 22 份,SPT 种质有 21 份,PB 种质仅有 2 份。

3 结论与讨论

该试验与前人结果总体趋势一致,但个别自交系与他人研究结果不完全相同^[7-8],如郑 58 在该试验中 PA 数值为 0.765,而谢传晓等人研究 PA 数值仅 0.099,相差较大。分析其变化原因可能有几种:一是六大种质所用代表系不同,二是引入系的来源不同,三是试验准确性的问题,因为该研究工作量大,熟练程度、技巧和经验等方面欠缺,会对试验结果有影响。

从该研究结果来看,东北北部近年来的种质与前几年有较大差别^[9-10],SPT、BSSS、PA 种质应用呈上升趋势,Lan 种质虽然目前应用较多,但

随着对品种耐密性的要求越来越高,Lan种质应用所占比例将会有所下降,而SPT、BSSS等耐密性好的种质应用比例会进一步上升。

随着全程机械化种植比例的扩大,对收获期含水量的要求将进一步严格,因此LRC种质应用比例将进一步下降,如何在改良籽粒脱水慢等缺陷的基础上利用LRC种质是今后需要解决的难题^[11]。

PB种质具有持绿性好,耐旱性强,抗病性好等优点,在我国黄淮海地区组配出了许多优良的玉米单交种,如农大108、农大3138、鲁单981等,但因其对光温反应较敏感,在东北北部一直未能广泛利用,如何改良、利用这些种质也是本区域玉米育种工作需要研究的重要内容^[12]。

从该研究的遗传多样性结果来看,目前东北北部大多数品种属于A群×B群,如郑单958、先玉335、兴垦3、吉单27、龙单13、龙单38、龙单52等,但也有部分品种属于A群或B群内杂交组配,如龙单51、龙单56、龙单57等,这样的结果比较符合目前本地区育种的实际情况,随着近几年育种工作者逐步对两群论的认同,都注重在新自交系选育过程中向A群或者B群两边推,但是这个工作需要长时间的积累,因此目前还有许多种质并不能准确的划分到A群或者B群中去,也就是该研究所提到的中间型。在未来商业育种中,东北北部主要杂交模式必然是A群×B群,因此,对中间型骨干自交系应进一步研究其遗传基础,以便更好地应用^[13]。

该研究受知识产权保护限制,部分推广面积较大的品种的亲本自交系未能收集到,通过国家玉米产业体系平台,进一步征集东北北部地区主

栽品种亲本自交系,以期完善常用自交系遗传基础分析。

参考文献:

- [1] Xie Chuanxiao, Zhang Shihuang, Li Mingshun. Inferring genome ancestry and estimating molecular relatedness among 187 Chinese maize inbred lines[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2007, 34(8): 38-748.
- [2] 孙友位,李明顺,张德贵,等.利用SSR标记研究85个玉米自交系的遗传多样性[J].玉米科学,2007,15(6):19-26.
- [3] 袁力行,傅骏骅,张世煌,等.利用RFLP和SSR划分玉米自交系杂种优势群的研究[J].作物学报,2001,27(2):149-156.
- [4] 李新海,傅俊骅,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] 肖木辑,李明顺,孙有位,等.辽宁省主要玉米自交系的SSR遗传多样性分析[J].玉米科学,2006,14(1):33-36.
- [6] 张世煌,田清震,李新海,等.玉米种质改良与相关理论研究进展[J].玉米科学,2006,14(1):1-6.
- [7] 袁力行,傅骏骅,Warburton M,等.利用RFLP,SSR,AFLP和RAPD标记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.
- [8] 李明顺,张世煌,李新海,等.根据配合力分析玉米自交系杂种优势群[J].中国农业科学,2002,35(6):600-605.
- [9] 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.
- [10] 张世煌,彭泽斌,李新海.玉米杂种优势与种质扩增、改良和创新[J].中国农业科学,2000,33(增刊):34-39.
- [11] 张世煌.论杂种优势利用的循环育种策略[J].作物杂志,2006(6):1-3.
- [12] 焦仁海,刘兴武,孙发明,等.浅谈78599种质杂种优势模式[J].玉米科学,2004,12(3):52-54.
- [13] 鲁宝良,赵文媛,刘日尊,等.Mo17衍生系组配杂交种对我国玉米生产的影响和贡献[J].玉米科学,2004,12(增刊):127-128.

Study on Genetic Diversity by SSR among Maize Inbred Lines Used in the North of Northeastern of China

CAI Quan, CAO Jing-sheng, SHI Gui-rong, ZHANG Jian-guo, GUO Xiao-ming, LI Shu-jun, YIN Yue

(Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to define the genetic basis of maize inbred lines, the genetic diversity of 131 maize inbred lines in the north of northeastern of China and 6 tests was analyzed by simple sequence repeat(SSR). Seventy pairs of primers of maize were used. The results showed that if PA, BSSS, LRC were group A, PB, Lan, SPT were group B, 61 inbred lines belonged to group A, 50 inbred lines belonged to group B, and there were 26 inbred lines belong to the intermediate types.

Key words: maize; simple sequence repeat; inbred line; genetic diversity