

SSR 分子标记技术在玉米育种中的应用

王勇 张元旭 方忠 (广西大学农学院, 广西南宁530005)

摘要 介绍了SSR 分子标记技术的原理、特点、类型及其在玉米遗传图谱的构建、品种纯度鉴定和玉米遗传多样性等育种中的应用。

关键词 玉米; SSR; 遗传育种

中图分类号 S513 .032 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2007) 01 - 00052 - 03

Utilization of SSR Markers in Maize Genetic Breeding

WANG Yong et al (Agricultural College, Guangxi University, Nanning, Guangxi 530005)

Abstract The principle, characteristics and types of SSR markers were introduced. In addition, its application was mainly reviewed in three aspects including the construction of the genetic linkage map, the detection of the purity of variety and the study of the maize genetic diversity.

Key words Maize; SSR; Genetic breeding

玉米是重要的粮食与饲料作物, 是世界三大作物之一。但是由于对玉米中许多性状的遗传机制缺乏了解, 从而限制了玉米产量的提高与品质的改善, 阻碍了玉米育种工作的进程。建立在分子遗传学基础上的分子标记技术的迅速发展, 促进了作物育种研究各个领域的发展。分子标记能在DNA水平上反映植物遗传基础的差异, 是植物遗传育种领域内的一项新兴技术。SSR(Simple Sequence Repeat, 简单重复序列)就是当今四大分子标记技术之一。1989年3个独立的研究小组几乎同时建立了该技术, 并且证实它作为位点特异遗传标记具有巨大潜力。SSR技术的特点是呈共显性遗传; 在数量方面没有生物学上的限制; 其标记带型简单, 记录的条带一致、客观、明确; 采用PCR技术进行检测只需少量DNA样品, 且质量要求不高, 即使是部分降解的样品也可进行分析; 每个位点均有许多等位形式; 另外, 它还具有多态性高、实验程序简单等优点^[1]。

1 SSR 分子标记技术简介

1.1 原理和特点 SSR 又称为微卫星 DNA(Microsatellite DNA)、短串联重复(Tandem repeats) 或简单序列长度多态性(Simple sequence length polymorphism), 通常是指以2~4个核苷酸为单位多次串联重复的DNA序列, 也有少数以1~6个核苷酸为串联重复单位。SSR标记具有多态性高的特点, 需要的DNA的量很少, 比较适合育种工作。SSR在基因组中的分布是随机的, 它可以存在于内含子、外显子及染色体的其他任何区域。在不同植物中, SSR重复单位的碱基组成及拷贝数随物种的不同而有所差异, 但SSR两端的序列是保守的。因此, 可以设计出与SSR两端保守序列互补的引物, 通过PCR扩增重复序列和凝胶电泳检测其多态性。SSR序列多态性的出现是由于同一物种中不同基因型的寡聚核苷酸重复次数不同以及重复序列在染色体复制时的滑动或染色单体的不等交换造成的, 因此SSR可用作分子标记。由于玉米中存在转座子, 微卫星的多态性表现得极为丰富, 所以SSR技术较其他分子标记技术更适用于玉米研究^[2]。

1.2 类型 根据SSR核心序列排列方式, 可将SSR分为完全型(Perfect)、不完全型(Imperfect)和复合型(Compound)^[3]。完全型SSR是指核心序列以不间断的重复方式首尾相连构

成的DNA; 不完全型SSR是指在SSR的核心序列之间有3个以下的非重复碱基, 但两端的连续重复核心序列重复数大于3; 复合型SSR是指2个或2个以上的串联核心序列由3个或3个以上的连续的非重复碱基分隔开, 但这种连续性的核心序列重复数不少于5。3种类型内完全型是SSR标记中应用较多的一种类型^[4]。

根据SSR核心序列碱基数目, 可将SSR分为单碱基重复型、2碱基重复型、3碱基重复型、4碱基重复型等。各种SSR在植物基因组中的丰度(频率)不同。WANG对EMBL和GenBank中的54个植物种的核DNA(3 026 kb)和28个植物种的细胞器DNA(1 268 kb)进行了各类SSR(1~4 bp)的搜索, 发现(AT)_n是植物基因组中最丰富的SSR, 然后依次为(A)_n·(T)_n、(AG)_n·(CT)_n、(AAT)_n·(ATT)_n、(AAC)_n·(GTT)_n、(AGC)_n·(GCT)_n、(AAG)_n·(CTT)_n、(AATT)_n·(TTAA)_n、(AAAT)_n·(AATT)_n以及(AC)_n·(GT)_n^[5]。同一类型内核心序列碱基种类不同的SSR的丰度也差别很大。MORGANTE和OLIVERI从GenBank和EMBL查询了植物SSR序列, 发现在2碱基重复型SSR中(n>10), 各种SSR相对频率是(AT)_n 74%、(AG)_n 24%、(AC)_n 1%、(CG)_n 0; 在3碱基重复型(n>7)SSR中, 各种SSR相对频率是(TAT)_n 27%、(TCT)_n 25%、(CAG)_n 12.5%、(TGT)_n 10%、(ATC)_n 7.5%, 其他均小于5%。

1.3 在玉米基因组中的分布 研究SSR在植物基因组中分布的方法有2种: 对基因数据库中已有的DNA序列进行分析; 用SSR作探针与大片段基因文库进行杂交。尽管不同作者所用方法不同, 但是所得结果大致相同。玉米中SSR的主要重复单位及其拷贝数分别是GA 3.1 × 10³和AC 1.9 × 10³。通过EMBL检索到玉米的DNA长度是410.5 kb, SSR的数目是7, 估计总数目为4.3 × 10³^[7]。李新海等利用69对SSR引物筛选出43对扩增产物具有稳定性和多态性的引物, 研究了21个玉米自交系的遗传变异, 共检测出127个等位基因变异, 每对引物检测等位基因2~7个, 平均2.95个, 多态性信息量平均为0.511^[8]。

2 SSR 分子标记技术在玉米育种中的应用

2.1 玉米遗传图谱的构建及基因定位 构建玉米遗传图谱及寻找与目标性状紧密连锁的分子标记是进行分子辅助选择育种的基础。而玉米最初的遗传图谱是以RFLP标记为主的连锁图。与RFLP相比, SSR检测的多态性要高很多, 对于构建高密度的遗传图谱有用, 也能更好地应用于玉米育种中。以

SSR 为主的遗传图谱构建的基本原理是以 SSR 位点为基础,在基因组中每隔一定距离找一个多态性的 SSR 标记,当这些标记达到足够的饱和度后则可利用 SSR 标记找到基因组中的任何功能基因和数量性状位点(Quantitative trait loci, QTL),并进行连锁分析,确定该功能基因和 QTLs 的位置。

近年来利用 SSR 标记在玉米主要经济性状、抗性性状的遗传图谱构建及基因定位方面取得了显著成果。向道权等以中国农业大学培育的高产、多抗性玉米杂交组合农大 3138 的 F_2 家系为材料,构建了具有 80 对 SSR 标记的玉米遗传图谱,标记间平均距离 25.42,覆盖了玉米基因组的 2 033.4 cm,并检测到了同玉米产量有关的 8 个性状的 QTLs^[9]。汤继华等用 SSR 标记将 A619C 型不育恢复基因定位在第 8 染色体短臂上,与 SSR 引物 b1g2301 连锁,并确定该基因为 R4^[10]。王凤格等构建了具有 65 个 SSR 位点的遗传图谱,覆盖玉米基因组 1 333.3 cm,标记间平均距离 20.5 cm,并抵抗甘蔗花叶病毒的数量性状位点进行定位及遗传效应分析^[11]。刘章雄等以玉米南方型锈病免疫自交系 P25 与感病自交系 F349 的杂交组合的 F_2 家系为构图群体,构建了玉米 SSR 遗传连锁图,将玉米抗南方型锈病基因定位于 10 号染色体上,与 Phi059 标记连锁^[12]。赵茂俊等以玉米自交系 R15(抗纹枯病) × 478(感纹枯病) F_2 分离群体为作图群体,构建包含 146 个 SSR 标记位点的遗传连锁图谱,覆盖玉米基因组 1 666 cm,平均图距 11.4 cm,结果共检测到 6 个抗性 QIL,分别位于第 2、6、10 染色体上^[13]。Song 等用 439 对 SSR 引物对 2 个亲本 By804(BHO 群体)和 B73 进行多态性检测,在 F_2 和 F_3 群体中获得 153 个共显性标记位点,构建了包含 151 个 SSR 标记位点高油玉米分子标记连锁图,图谱总长度为 1 759.1 cm,相邻两标记间的平均距离为 11.65 cm,而且在 F_2 群体中定位了 27 个影响玉米籽粒油分含量的 QIL^[14]。由此可见,随着分子技术的发展,以 SSR 为主的遗传图谱的构建会更加完善,可应用 SSR 标记将更多的基因定位到玉米基因的染色体上。

2.2 玉米杂交种的纯度鉴定 玉米杂交种纯度和亲本遗传的真实性是玉米种子质量的重要标志之一。目前我国 95% 玉米生产都采用杂交种,因此建立一套简便、快速、准确的玉米种子质量检测方法对于规范种子产业,保护广大农民的切身利益,促进农业增产、农民增收,保障国家粮食安全具有重要意义。同一物种的不同品种具有区别于其他品种的独特 SSR 标记,这些特异性标记的组合就构成了这一品种的指纹图谱。因此,通过检测品种的指纹片段可以有效鉴定品种的纯度和真伪。

Smith 研究表明,绝大多数玉米杂交种 SSR 位点等位基因呈共显性^[15]。李汝玉等提出可利用 SSR 位点上等位基因间大小的差异和共显性遗传特点鉴定玉米等作物杂交种的纯度^[16]。李小辉等以 21 份玉米骨干自交系及其组配的 13 个杂交种为材料进行 SSR 标记分析,发现应用 SSR 标记技术可快速、准确地鉴定玉米杂交种种子纯度^[17]。吴渝生等以 3 个云南省大面积推广的玉米杂交种及其亲本为试材,从 96 对 SSR 引物中筛选出 24 对多态性丰富的引物,建立了标准 SSR 标记指纹图谱^[18]。王凤格等以玉米杂交种

农大 108 的纯度鉴定为例,探索了 SSR 技术在玉米杂交种鉴定中实际应用的可行性,建立了适用于玉米品种鉴定的 SSR 标准体系^[19]。赵久然等利用玉米果皮中提取的 DNA 进行 SSR 分析,发现玉米 F_1 代种子具有与杂交种母本完全相同的 DNA 指纹,可用于种子的真实性鉴定^[20]。高文伟等利用 SSR 标记技术分别筛选出玉米杂交种农大 108 和豫玉 27 的特异性引物,有效地鉴定两个杂交种的种子纯度^[21]。李群等以登海 11 号玉米杂交种及其亲本和 9 对玉米 SSR 位点引物为材料,筛选出了适合该杂交种纯度鉴定的 SSR 位点引物^[22]。李汝玉等在对玉米籽粒 DNA 提取和 SSR 扩增片段检测方法等研究的基础上,建立了一套利用 SSR 标记进行玉米杂交种纯度鉴定的技术规程^[23]。由此可见,SSR 标记技术可以作为真实性鉴定、纯度检测以及新品种保护的仲裁技术依据之一。

2.3 玉米自交系遗传多样性分析及杂种优势群划分 亲本的遗传多样性分析是杂种优势研究的一个重要组成部分。国内外学者采用了多种方法对玉米遗传多样性进行了研究,其中 SSR 标记因其具有高度多态性而成为遗传差异研究的主要工具。

袁力行等利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 4 种分子标记方法研究了 15 个玉米自交系的遗传多样性,发现 SSR 标记位点的平均多态性信息量(PI)最大,并且认为 AFLP 和 SSR 是研究遗传多样性的最好标记^[24]。番兴明等研究了代表我国温带玉米主要杂种优势群的 4 个标准测验种、5 个热带玉米群体及 Auitigua 种族的 25 个典型自交系,根据产量配合力并结合 SSR 分子标记将供试自交系划分为四个类群^[25]。李新海等利用 SSR 标记研究了 70 份我国主要玉米自交系的遗传变异^[26]。李玉玲等利用 113 对多态性 SSR 引物研究了来源于 8 个基础材料的 26 个爆裂玉米自交系的遗传多样性及其与分属 6 个杂种优势类群的 20 个普通玉米骨干自交系的种质关系^[27]。聚类结果将 46 个供试自交系分为爆裂和普通玉米自交系 2 个大类;26 个爆裂玉米自交系分为 8 个类群,高杂种优势组合的双亲自交系均属于不同类群,而在同一类群自交系间尚未组配出具有高杂种优势的组合;普通玉米自交系的分类结果与以往研究和育种实践相一致,表明 SSR 标记技术可以用于爆裂玉米自交系间的遗传多样性研究。吴渝生等利用 SSR 标记技术,通过聚类分析将云南糯玉米分为 3 个类群和 5 个亚群,云南爆裂玉米分为 3 个类群和 4 个亚群^[28]。这 2 种类型的玉米聚类结果与云南不同海拔地势的变化走向基本相符。王铁固等以 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,表明在 6 个玉米群体中检测到了丰富的遗传变异,依据 SSR 标记的遗传距离将供试材料分为四大类^[29]。刘希慧等利用 SSR 分子标记技术对当前和过去广泛应用的 12 个玉米自交系进行遗传多样性分析,并划分了杂种优势群,表明用 SSR 标记划分杂种优势群与自交系系谱关系基本一致^[30]。刘世建等利用 SSR 标记技术研究了四川地方玉米种质和辽宁省主要玉米自交系遗传多样性,表明分类结果与系谱来源基本一致^[31-32]。生产上杂交种的亲本大多来自不同的类群。由此可以得出,SSR 标记可用于玉米自交系遗传多样性分析,并且精确地划分杂种优

势群,进而为建立杂种优势模式、估计和预测杂种优势打下基础。

3 讨论

SSR 标记技术以其丰富的多态性、共显性遗传、重复性好和操作简单等优点成功地应用于玉米遗传图谱的构建、品种纯度鉴定和玉米遗传多样性等方面的研究中。但是,在遗传图谱的构建中,SSR 技术只能对重复序列区域进行染色体定位,因此若要构建高密度的遗传图谱则必须结合其他分子标记技术以增加相邻重复序列之间的遗传标记数目。此外,SSR 标记分析中还存在一些问题。例如,开发和合成新的 SSR 引物投入高、难度大。所以,要加大研究力度,使 SSR 标记在玉米遗传育种中得到更为广泛的应用。

参考文献

- [1] 曾莉娟,郑成木. SSR 技术及其应用[J]. 热带农业科学, 2001(3):56-59.
- [2] 肖璇,乔爱民,王心燕,等. SSR 技术及其在玉米研究中的应用[J]. 仲恺农业技术学院学报, 2005,18(1):56-60.
- [3] WEBER J L. Informativeness of human (dG dA) n-(dG dT) n polymorphisms [J]. *Genomic*, 1990,7:524-530.
- [4] 席章营,张桂权. SSR 标记及其在作物遗传育种中的应用[J]. 河南农业大学学报, 2002,36(3):293-297.
- [5] WANG Z, WEBER J L, ZHONG G, et al. Survey of plant short tandem DNA repeats [J]. *Theor Appl Genet*, 1994,88:1-6.
- [6] MORGANIE M, OLIVER A M. PCR amplified microsatellite as markers in plant genetics [J]. *The Hart Journal*, 1993,3:175-182.
- [7] 李向拓,毛建昌,吴权明. 分子标记在玉米育种中的应用[J]. 玉米科学, 2004,12(1):26-29.
- [8] 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.
- [9] 向道权,曹海河,曹永国,等. 玉米 SSR 遗传图谱的构建及产量性状基因定位[J]. 遗传学报, 2001,28(8):778-784.
- [10] 汤继华,胡彦民,季洪强,等. 玉米 C 型 Cms 育性恢复基因 R4 的 SSR 标记[J]. 河南农业大学学报, 2001,35(1):1-3.
- [11] 王凤格,赵久然,余华娣,等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究——多重 PCR 技术在玉米 SSR 引物扩增中的应用[J]. 玉米科学, 2003,11(4):3-6.
- [12] 刘章雄,王守才,戴景瑞,等. 玉米 P25 自交系抗锈病基因的遗传分析及 SSR 分子标记定位[J]. 遗传学报, 2003, 30(8):706-710.
- [13] 赵茂俊,张志明,张世煌,等. 玉米 SSR 连锁图谱构建及抗纹枯病基因定位[J]. 高技术通讯, 2005, 15(5):71-76.
- [14] SONG X F, SONG T M, DAI J R, et al. QTL mapping of kernel oil concentration with high oil maize by SSR markers [J]. *Maydca*, 2004,49:41-48.
- [15] SMITH J S C, REGISTER III J C. Genetic purity and testing technologies for seed quality: a company perspective [J]. *Seed Science Research*, 1998, 8:285-293.
- [16] 李汝玉,杨平平,宋国安. 简单重复序列 (SSR) 及其在品种鉴定及种子检测中的应用[J]. 种子, 1999(5):33-35.
- [17] 李晓辉,李新海,李文华,等. SSR 标记技术在玉米杂交种种子纯度测定中的应用[J]. 作物学报, 2003,29(1):63-68.
- [18] 吴渝生,杨文鹏,郑用璉. 3 个玉米杂交种 3 和亲本 SSR 指纹图谱的构建[J]. 作物学报, 2003,29(4):496-500.
- [19] 王凤格,赵久然,郭景伦,等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究——玉米品种纯度及真伪鉴定中 SSR 技术标准实验体系的建立[J]. 玉米科学, 2003,11(1):3-6.
- [20] 赵久然,刘龙洲,王凤格,等. 利用杂交玉米 F₁ 代种子果皮组织鉴定母本真实性的 SSR 研究[J]. 玉米科学, 2004,12(3):6-8,12.
- [21] 高文伟,李晓辉,田清震,等. 利用 SSR 标记快速鉴定玉米杂交种农大 108 和豫玉 27 的种子纯度[J]. 种子, 2004, 23(5):32-33.
- [22] 李群,李汝玉,颜廷进,等. 应用 SSR 标记技术鉴定登海 11 号玉米杂交种纯度的研究[J]. 种子, 2004,23(10):21-23.
- [23] 李汝玉,李群,谭振馨,等. 利用 SSR 标记鉴定玉米杂交种纯度技术规程[J]. 种子, 2005,24(9):54-56.
- [24] 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研究[J]. 遗传学报, 2000,27(8):725-733.
- [25] 番兴明,陈洪梅,谭静,等. 利用配合力和 SSR 标记对热带和温带玉米自交系进行杂种优势群划分[J]. 西南农业学报, 2003,16(1):1-8.
- [26] 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.
- [27] 李玉玲,吕德彬,王延召,等. 利用 SSR 标记研究爆裂玉米自交系的遗传变异及其与普通玉米的遗传关系[J]. 中国农业科学, 2004,37(11):1604-1610.
- [28] 吴渝生,郑用璉,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.
- [29] 王铁固,库丽霞,陈彦惠,等. 利用 SSR 分析玉米群体的遗传变异[J]. 华北农学报, 2005,20(5):13-16.
- [30] 刘希慧,刘文欣,张义荣,等. 利用 SSR 分子标记鉴定若干玉米自交系的亲缘关系[J]. 分子植物育种, 2005,3(2):179-187.
- [31] 刘世建,荣廷昭,杨俊品,等. 四川地方玉米种质的 SSR 聚类分析[J]. 作物学报, 2004,30(3):221-226.
- [32] 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.