

采用SRAP 标记技术划分河南省常用玉米自交系类群的研究

赵新亮^{1,2}, 陈士林¹ (1. 西北农林科技大学, 陕西杨凌 712100; 2. 河南科技学院, 河南新乡 453003)

摘要 以河南省常用的29个玉米自交系为材料, 利用SRAP分子标记技术对河南省玉米种质遗传多样性及杂种优势群进行划分, 对河南省主要的审定玉米品种亲本间遗传距离及杂种优势模式进行分析。结果表明: 29个玉米自交系比较丰富多态, 可分为四大类群, 7个亚群, 分析结果与系谱亲缘关系基本一致。类间平均遗传相似系数均小于类内平均遗传相似系数, 分类合理。SRAP标记可用于玉米杂种优势群的划分。

关键词 玉米; SRAP分子标记; 杂种优势群

中图分类号 S513.032 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)07-01921-02

Study on Classification of Maize Inbred Lines in Henan with SRAP Marker Technology

ZHAO Xin-liang et al (Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract With 29 maize inbred lines utilized popularly in Henan, the genetic diversities and heterosis groups of Henan maize germplasm were classified by SRAP molecular markers. The genetic distance between parents and heterosis patterns of main popularized maize hybrids in Henan were analyzed. Based on the analyzed results of SRAP, 29 inbred lines were classified into 4 groups, 7 sub-groups. The clustering result was consistent with pedigree relationship. Average genetic resemblance coefficients among groups were smaller than that within groups, showing the classification was reasonable. It is concluded that SRAP markers could be applied to classification.

Key words Maize; SRAP molecular markers; Heterosis group

玉米自交系的类群划分, 是合理选配亲本及预测杂种优势的依据。近年来利用分子标记划分玉米杂种优势群的研究有了很大发展。SRAP标记(Sequence-related Amplified Polymorphism, 序列相关扩增多态性)是由Li和Quiros发展的一种新的分子标记技术, 应用于遗传多样性分析、比较基因组学、图谱构建等方面, 具有结果稳定可靠、简单、中等产率、在基因组中分布均匀的特点。在国外SRAP标记的研究应用较多, 但在国内该技术的应用较少。以河南省常用的29个玉米自交系为材料, 笔者首次利用SRAP分子标记技术对河南省玉米种质杂种优势群进行划分, 对河南省主要的审定玉米品种亲本间遗传距离及杂种优势模式进行分析。

1 材料与试验方法

1.1 试验材料 选用29个河南省近年来常用的玉米自交系(表1)。将玉米自交系种子消毒后培养, 取玉米幼苗幼嫩真叶提取DNA模板。供试玉米自交系由河南科技学院玉米育种中心提供。

表1 29个玉米自交系

自交系	自交系	自交系
1 郑22	11 P138	21 郑29
2 沈219	12 安246	22 9401
3 87-1	13 478	23 京7黄
4 郑13	14 许052	24 新7(红)
5 郑58	15 浚92-6	25 漯12
6 白107	16 9058	26 E28
7 昌7-2	17 浚92-8	27 郑36
8 综3	18 248	28 郑60
9 9212	19 郑35	29 新4白
10 丹340	20 济533	

1.2 试验方法

1.2.1 DNA模板提取。采用酚-氯仿(CTAB)法进行提取。

1.2.2 SRAP引物筛选。根据Li和Quiros推荐的5条正向引

物、6条反向引物(表2), 组成30个引物组合, 随机选择4个玉米自交系材料进行扩增反应, 从中选择产物电泳图谱带型清晰、重复性好的引物组合作为该试验用的引物组合。引物由上海鼎安生物科技有限公司合成。

表2 Li和Quiros推荐的正、反向引物序列

正向引物序列	反向引物序列
ne1 :5 TGAGTCCAAACCGGATA-3	en1 :5 GACTGCGTACGAATTAAT-3
ne2 :5 TGAGTCCAAACCGGAGC-3	en2 :5 GACTGCGTACGAATTTGC-3
ne3 :5 TGAGTCCAAACCGGAAT-3	en3 :5 GACTGCGTACGAATTGAC-3
ne4 :5 TGAGTCCAAACCGGACC-3	en4 :5 GACTGCGTACGAATTTGA-3
ne5 :5 TGAGTCCAAACCGGAAG-3	en5 :5 GACTGCGTACGAATTAAC-3
	en6 :5 GACTGCGTACGAATTCCA-3

1.2.3 SRAP分析。

1.2.3.1 PCR扩增。根据Li和Quiros的扩增程序, 采用反应总体积25 μl中, 模板DNA浓度为2.0 mmol/l Mg²⁺, 0.2 mmol/L dNTPs, Taq DNA聚合酶量为1.5 U, 2个引物均为15 × 10⁻¹² mol。94 预变性5 min; 94 变性1 min, 35 复性1 min, 72 延伸1 min, 5个循环; 94 变性1 min, 50 复性1 min, 72 延伸1 min, 35个循环, 最后72 延伸10 min, 4 保存。选用System9700扩增仪进行PCR扩增。

1.2.3.2 SRAP产物的检测。每个扩增的PCR管中加入3 μl 0.25% 溴酚蓝(用40%蔗糖溶液配制), 混匀, 取5 μl 点样电泳。采用6%聚丙烯酰胺凝胶, 垂直板电泳, 电泳缓冲液为1 × TBE, 用100 V电压、稳压电泳3 h, 电泳后银染, 银染后利用C+G/DPZ-E型凝胶成像系统拍照保存。

1.2.3.3 统计分析。根据扩增产物电泳图谱, 在相同迁移位置有谱带记为1, 无谱带记为0, 制成0-1表, 建立数据表格。利用Dps分析软件, 对结果以UPGMA进行聚类分析, 自动生成相似性系数和树状图, 对自交系类群进行划分, 结合其亲缘关系和生产实践对其杂种优势关系进行分析。

2 结果与分析

2.1 SRAP标记引物筛选 根据30个引物组合的扩增图谱(图略), 选择其中带型丰富、清晰的(ne1-en8)、(ne2-en1)、(ne4-en6)、(ne5-en1)、(ne5-en8)、(ne5-en6)等5个引物组

合作为玉米SRAP 标记的核心引物。采用这5 个引物组合对河南省常用玉米自交系进行PCR 扩增。

2.2 SRAP 标记扩增结果 利用该试验筛选的引物组合对

河南省29 个常用玉米自交系的DNA 组进行SRAP 标记。得到的扩增图谱(图1), 条带清晰, 带型稳定, 表现出了多态性。

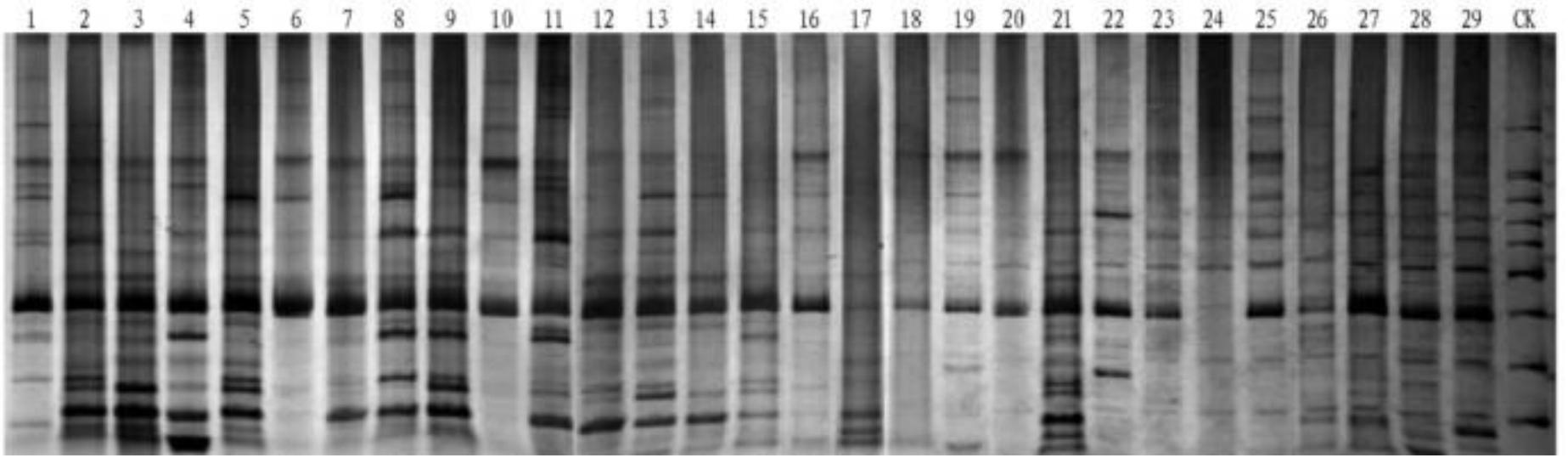


图1 利用引物 m5en1) 对29 个玉米自交系的SRAP 扩增图谱

2.3 SRAP 标记聚类分析结果 将29 个玉米自交系的扩增图谱转换为0,1 矩阵, 按UPGMA(类平均法) 方法对29 个玉米自交系进行聚类分析, 得到SRAP 分析聚类图(图2)。以遗传距离0.60 为标准, 29 个玉米自交系可分为四大类群, 进而以遗传距离0.49 为标准, 第 大类又可分为2 个亚群, 第 大类群又可分为3 个亚群, 29 个玉米自交系则可分为7 个亚群(表3)。从系谱亲缘关系上来看, 玉米自交系SRAP 标记的聚类分析结果与之基本相符。其中, 自交系248 既含有美国杂交种78599 的种质, 又含有亚热带种质, 但没有划入同样含有美国杂交种78599 种质类群 -1 中, 可能是由于自交系在选育及改良过程中亚热带种质占据了优势。综3 属于综合种自交系, 它含有多种类群亲本自交系的遗传基因, 在该试验中它被归入类群 -3, 即唐四平头杂优群。但如果把类群划分标准(遗传距离) 稍降低, 那么就可以把综3 从这个类群中划分出来的。这说明它本身含有该类群种质基因, 但与该类群其他自交系遗传距离较远。

2.4 SRAP 标记聚类后相似系数的变化 根据SRAP 标记数据对河南省常用29 个玉米自交系聚类, 划分为7 类(或亚类), 并计算出聚类后玉米自交系SRAP 分子标记平均遗传相似系数。从表4 可以看出, 类间平均遗传相似系数均小于类内平均遗传相似系数, 表明分类有利于选择合适的自交系配制组合, 避免群内自交系间杂交, 减少育种的工作量。

表3 29 个玉米自交系聚类分析

亚群	自交系	杂种优势群
	郑22、郑35、9212、丹340、E28	旅大红骨群
-1	87-1、郑36、PI38	外杂选群
-2	济533、	
-1	沈219、9058、248	其他
-2	郑13、郑29、安246、郑60、郑58、478、9401、新4	改良 Reid 群
-3	浚92-6、浚92-8、新7(红)、昌7-2、京7 黄	唐四平头群
	许052、漂12	Lan 杂优群

表4 7 个类群玉米自交系间SRAP 标记平均相似系数

	-1	-2	-1	-2	-3	
	0.763 9	0.541 4	0.416 1	0.361 7	0.538 3	0.509 4
-1		0.821 5	0.654 2	0.478 3	0.561 9	0.569 4
-2			-	0.424 9	0.448 0	0.476 9
-1				0.789 7	0.563 4	0.533 8
-2					0.701 8	0.604 3
-3						0.669 6
						0.750 0

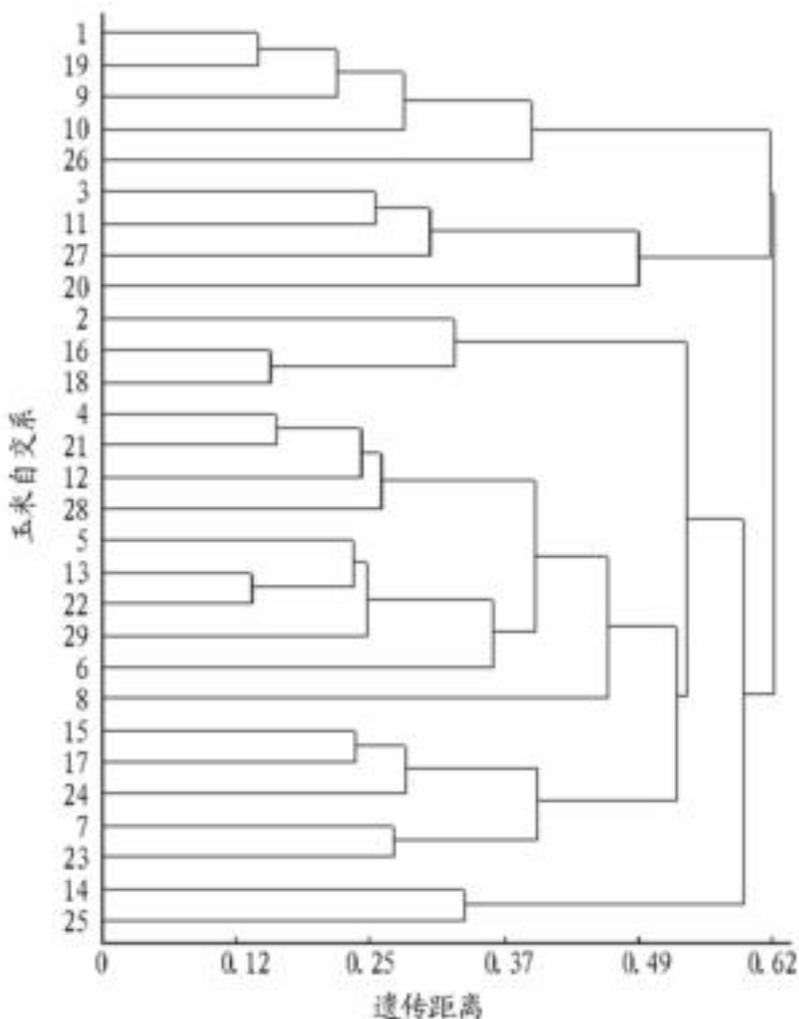


图2 29 个玉米自交系UPGMA 聚类分析

3 讨论

SRAP 标记是在总结已有的DNA 分子标记优缺点的基础上开发的一种新的基于PCR 的DNA 分子标记技术。SRAP 标记引物设计简单, 17 bp 正向引物、18 bp 反向引物、50 退火温度保证了扩增结果的稳定性。正向引物的CCGG 和反向引物的AATT 的核心序列使得SRAP 标记主要是对开放阅读框(ORF) 进行扩增, 提高了扩增结果与表现型的相关性。SRAP 标记不需要高纯度、高浓度的DNA 和放射性同位素, 不需要花费大量人力、物力进行引物开发, 不需要预扩增和连接, 但扩增结果的多态性很丰富。

由于经过反复杂交和多方向的选育, 优良的玉米自交系系谱关系已不大清楚, 因而单纯利用系谱关系划分杂种优势群比较困难。该试验利用SRAP 标记研究了29 个河南省常

(上接第1922页)

用玉米自交系的遗传多样性,将33个自交系进行了类群划分,划分结果与系谱关系基本一致;划群后群间平均遗传相似系数都小于群内平均遗传相似系数,表明分类是合理的。划分杂种优势群,可为选配强优势杂交组合提供理论依据。

参考文献

- [1] II G, QUIRO C F. Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet*, 2001, 103: 455 - 461.
- [2] 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 等. 棉花SRAP遗传连锁图构建[J]. 科学通

报, 2003, 48(15): 1676 - 1679.

- [3] 任羽, 王得元. 辣椒SRAP PCR反应体系的建立与优化[J]. *分子植物育种*, 2004, 2(5): 689 - 693.
- [4] 吴伟怀, 王玲, 程贯忠, 等. 稻瘟病菌群体的分子遗传学研究——广东省与云南省稻瘟病菌群体遗传及致病型结构的比较分析[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(5): 675 - 680.
- [5] 李严, 张春庆. 新型分子标记——SRAP技术体系优化及应用前景分析[J]. *中国农学通报*, 2005, 15(2): 108 - 112.
- [6] 奥斯伯·F. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1999.
- [7] 王振华, 张新, 王俊忠. 河南省玉米种质基础杂优群划分和杂交优势利用模式研究[J]. *河南农业科学*, 2002(7): 4 - 8.