

玉米种质材料遗传多样性的 ISSR 分析

祁丽婷,李中青,赵晋峰,李齐霞,李颜芳,王 瑞,孙万荣,王 敏,王枫叶

(山西省农业科学院谷子研究所,山西长治 046011)

摘要 [目的]明确山西主要玉米品系的主要遗传多样性特点。[方法]利用 ISSR 分子标记技术,对供试的玉米种质资源进行遗传多样性分析。[结果]用筛选出的 9 个多态性高、重复性好的引物对供试种质材料进行扩增,共扩增出清晰条带 74 条,多态性条带 56 条,多态性条带比率为 75.7%。应用 DPS 软件对试验结果进行聚类分析,构建聚类分析树状图,在遗传相似系数为 0.55 处,将供试种质材料分为 5 个类群。[结论]为今后山西玉米育种与杂交亲本的选择提供理论依据。

关键词 ISSR;玉米;遗传多样性;聚类分析

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)34-12046-02

Genetic Diversity of Maize Accessions Using Inter-simple Sequence Repeat (ISSR) Markers

QI Li-ting, LI Zhong-qing, ZHAO Jin-feng et al (Millet Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Changzhi, Shanxi 046011)

Abstract [Objective] The aim was to clear main genetic diversity characteristics of main corn strain in Shanxi. [Method] Using ISSR molecular markers to analyze the genetic diversity of maize germplasm resources. [Result] Nine primer of high polymorphism and good repeatability were used to amplify the germplasm material on the test. 74 bands were amplified, including 56 polymorphism bands. The percentage of polymorphism bands was 75.7%. Application of DPS software clustering analysis was carried out on the experimental results, and built the cluster analysis tree. The test germplasm materials were divided into five groups at the genetic similarity coefficient of 0.55. [Conclusion] The study provided theoretical reference for the selection of hybrid parent and maize breeding in the future.

Key words ISSR;Maize;Genetic diversity;Cluster analysis

玉米是现代食品、饲料、医药及化工的重要原料作物,在国民经济中占有非常重要的地位。山西省玉米种植面积达 160 万 hm²,已取代小麦成为山西省的第一大粮食作物。生态适应性分析表明,玉米是山西最适宜种植的作物,在山西具有明显的区域优势。近年来,由于分子生物学的飞速发展,不仅可以在分子水平上了解育种材料的遗传变异信息,有针对性地选择杂交亲本,在后代中获得优良变异,从而培育出优良品种,同时了解这些品种的遗传多样性,对于指导亲本选配和培育优质高产品种具有重要意义。

笔者拟采用最为广泛应用的 ISSR 分子标记技术^[1],对山西生产区域内主要自交系进行遗传多样性分析,明确山西主要玉米品系的主要遗传多样性特点,为今后山西玉米育种与杂交亲本的选择提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 供试材料均由山西省农科院谷子研究所早熟课题组提供(表 1)。

1.2 试验方法

1.2.1 玉米总 DNA 提取。将供试材料播种在装有沙子的营养钵中,在温室(25℃左右)内培养。每个材料种 10 株左右,待幼苗长至 3~4 叶,叶片长度为 10 cm 左右时剪去叶片,采用通用的 CTAB 方法提取总 DNA,于 -20℃冰箱保存。

1.2.2 反应程序。①反应体系(20 μl):2.5 mmol/L dNTPs 1.6 μl,10×buffer 2.0 μl,2 μmol/L 引物 2 μl,5 U/μl *Taq* 酶 0.2 μl,DNA 模板 3.0 μl,ddH₂O 11.2 μl,另加 mineral oil 密

封,在 PCR 板中进行。②PCR 反应程序:94℃变性 7 min;94℃变性 30 s,52℃退火 45 s,72℃延伸 2 min,45 个循环;72℃后延伸 7 min,4℃保存。③电泳检测:扩增产物采用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。PCR 产物中加入 6×loading buffer 4 μl,混匀后点样于孔中,接通电源后,电泳仪电压调至 120 V 进行电泳。④电泳结束后,将电泳结果在紫外凝胶成像系统上观察、照相、保存。

表 1 供试试验材料

编号	自交系名称	编号	自交系名称	编号	自交系名称
1	C190	15	C206	29	Mo17
2	C191	16	C209	30	郑 58
3	C192	17	C212	31	H51
4	C193	18	C213	32	H391
5	C194	19	C214	33	先玉 128M
6	C195	20	C216	34	冀海 57
7	C196	21	C217	35	478
8	C198	22	C219	36	M2
9	C199	23	C221	37	K12
10	C200	24	C220	38	先玉 508M
11	C202	25	C222	39	先父
12	C203	26	C223	40	9903
13	C204	27	C224		
14	C205	28	昌 7-2		

1.3 数据处理与分析 人工读取条带,采用 1/0 记录方式。相同迁移率位置上有条带的记为 1,无条带的记为 0,建立数据矩阵。用 DPS 6.05 分析软件中 UPGMA 对其进行聚类分析并绘制亲缘关系树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 ISSR 扩增多态性 从 52 对引物中筛选出 9 条条带清晰、稳定且无拖尾的引物(表 2)。用筛选出的引物对供试自交系材料进行扩增(图 1、2),共扩增出清晰条带 74 条,多态

性条带 56 条,多态性条带比率为 75.7% ,表明供试自交系材料扩增出的片段具有较高的多态性。

表2 ISSR 引物序列及其扩增产物的多态性比较

引物名称	引物序列	总带数	多态条带	多态性比例//%
ISSR 807	5'-AGAGAGAGAGAGAGACT-3'	9.0	7.0	77.78
ISSR 808	5'-AGAGAGAGAGAGAGAGC-3'	8.0	6.0	75.00
ISSR 810	5'-GAGAGAGAGAGAGAT-3'	10.0	9.0	90.00
ISSR 811	5'-GAGAGAGAGAGAGAC-3'	10.0	8.0	80.00
ISSR 815	5'-CTCTCTCTCTCTCTG-3'	7.0	4.0	57.14
ISSR 817	5'-CACACACACACACAA-3'	8.0	6.0	75.00
ISSR 818	5'-CACACACACACACAG-3'	7.0	5.0	71.43
DISSR 825	5'-ACACACACACACACT-3'	9.0	5.0	55.56
ISSR 827	5'-ACACACACACACACG-3'	8.0	6.0	75.00
ISSR 864	5'-ATGATGATGATGATG-3'	7.0	5.0	71.43
总数		83.0	61.0	
平均		8.3	6.1	72.83

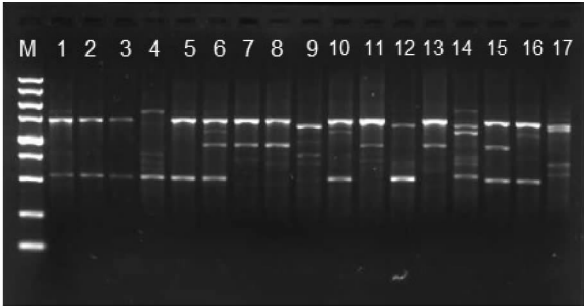


图1 P811 对部分玉米自交系 ISSR 的扩增图谱

2.2 聚类分析 将构建好的 ISSR 数据输入 DPS 6.50 中,应用类平均法(UPGMA)获得聚类图(图3)。在遗传相似系数为 0.55 处,40 份玉米自交系可以分为 5 个类群。第Ⅰ类包括 C190、C192、C200、C191、C193、C194、H391、C203、C205、昌 7-2、9903 共 11 个株系;第Ⅱ类包括 C195、C204、郑 58、478、C206、C209、C213、C214、C216、C217、M2、先玉 508M、先玉 128M、C196、C198、Mo17、H51、先父、K12 共 19 个株系;第Ⅲ类包括 C212、C222、C223、C224、C219、C221、C220 共 7 个株系;第Ⅳ类包括 C199 一个株系;第Ⅴ类包括 C202、冀海 57 2 个株系。

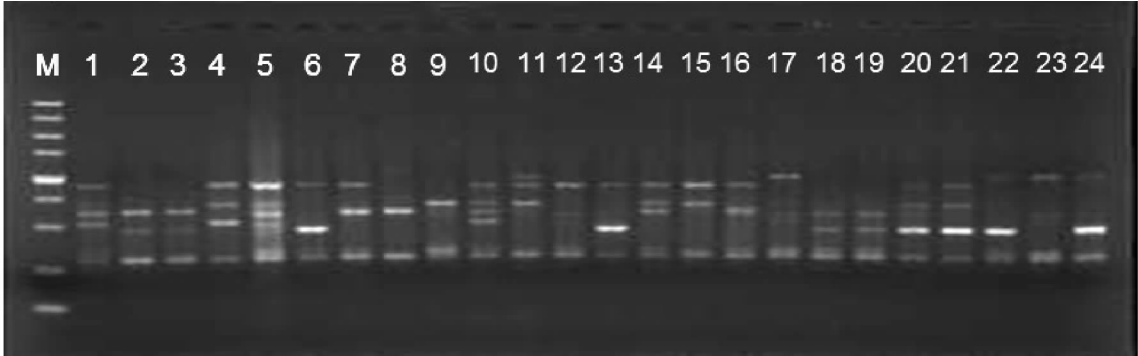


图2 P864 对部分玉米自交系 ISSR 的扩增图谱

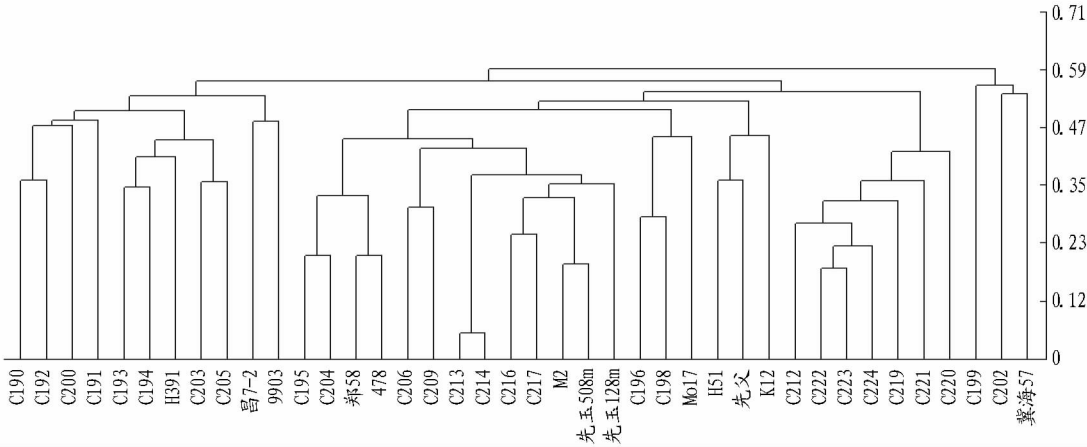


图3 玉米自交系的 ISSR 亲缘关系聚类图谱

段和载体,回收连接后 S9 基因片段定向插入 pDS1301 载体上,获得阳性克隆,命名为 S9-ds1(图 3A)。此载体上带有 S9 基因的第一链,还需要连接一个反向的第二链。用限制性内切酶 *Spe* I 和 *Sac* I 双酶切 S9-pGEM 和 S9-ds1,回收连接后 S9 基因片段反向插入 S9-ds1 上,即完成了 pDS1301-S9 的构建(图 3B),构建的载体结构见图 3C。

3 讨论

将水稻黄斑驳病毒(Rice yellow mottle virus, RYMV)复制所需酶的基因部分序列构建 RNAi 载体转化水稻,诱发基因沉默,使水稻具有 RYMV 抗性,且抗性能稳定遗传^[11]。利用大麦黄矮病毒(Barley yellow dwarf virus, BYDV)的复制酶基因片断为靶位点构建 RNAi 载体,并将其导入大麦,在 25 个转化系中,有 9 个转化系表现出较强的抗性,且稳定遗传的 2 个株系后代中,用酶联免疫吸附法检测不到接种病毒的存在^[12]。水稻对 SRBSDV 缺乏抗性品种,利用 RNAi 技术创建抗病新种质是一种有效的手段。该研究选择 SRBSDV 的 S9 基因作为靶标创建新种质,这是因为 S9 是 SRBSDV 病毒一个重要的基因,且与 RBSDV 病毒中的 S9 基因具有 76% 以上的同源性。RNA 干涉的机制表明同源基因同源性达到 70% 以上时,双链 RNA 产生的小 RNA 可以干涉同源基因的表达。所以利用 SRBSDV 病毒 S9 基因构建的 RNAi 载体创制的转基因水稻植株可能具备 SRBSDV 和 RBSDV 抗性,为进一步研究用一种病毒的基因序列进行 RNA 干涉从而创制抗 2 种病毒的水稻新种质提供研究基础。

参考文献

[1] 周国辉,温锦君,蔡德江,等. 呼肠孤病毒科斐济病毒属一新种;南方水

(上接第 12047 页)

3 讨论

分子生物学的发展使得种质资源之间的遗传性以及亲缘关系得到了明确。特别是 ISSR 标记技术,凭借其较好的稳定性、试验的可重复性以及操作简单、快速、高效等优点^[2-4],广泛应用于基因定位、品种鉴定、遗传作图、系统发育^[5]、进化及分子生态学等研究中,特别是应用于遗传多样性和亲缘关系研究中^[6-7]。

从该试验看,ISSR 分子标记是一种较为理想的标记方法,在一定程度上可以确定各个种质材料之间的遗传关系。但由于目前的种质材料繁多,特别是经过多年的种植和应用,难免会有基因漂移、突变等因素,所以笔者只能确定该试验材料之间的亲缘关系。该试验却与公认的分类有出入。如郑 58 属于瑞种质,Mo17 属于兰卡斯特种质,却被分在了同一个类群。这也与王寒玉等得出的试验结论相同^[8-9]。另外,读取条带时有人工读带,可能会存在不同的人读取的条带会有所差异,以及聚类分析软件的不相同,这也是试验结果可能不一致的原因。所以划分的种群是相对的。

4 结论

该研究表明,利用 ISSR 分子标记技术对玉米进行遗传

稻黑条矮缩病毒[J]. 科学通报,2008,53(20):2500-2508.

- [2] POWELL A P, NELSON R S, DE B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 2: 738-743.
- [3] GOLEMBOSKI D B, LOMONOSOFF G P, ZAITLIN M. Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6311-6315.
- [4] TENLLADO F, GARCÍA-LUQUE I, SERRA M T, et al. Rapid detection and differentiation of tobamoviruses infecting Lresistant genotypes of pepper by RT-PCR and restriction analysis[J]. J Virol Methods, 1994, 47: 165-174.
- [5] SEPPÄNEN P, PUSKA R, HONKANEN J, et al. Movement protein-derived resistance to triple gene block-containing plant viruses[J]. J Gen Virol, 1997, 78: 1241-1246.
- [6] COOPER B, LAPIDOT M, HEICK J A, et al. A defective movement protein of TMV in transgenic plants confers resistance to multiple viruses whereas the functional analog increases susceptibility[J]. Virology, 1995, 206: 307-313.
- [7] YUAN B, SHEN X, LI X, et al. Mitogen-activated protein Kinase OsMPK6 negatively regulates rice disease resistance to bacterial pathogens[J]. Planta, 2007, 226: 953-960.
- [8] 刘红艳, 潘凤英, 李建勇, 等. 广西南方水稻黑条矮缩病毒的 RT-PCR 检测[C]//彭友良, 王宗华. 中国植物病理学会-2010 年学术年会论文集. 北京: 中国农业科学技术出版社, 2010: 369.
- [9] 王朝辉, 周益军, 范永坚, 等. 应用 RT-PCR、斑点杂交和 SDS-PAGE 检测水稻黑条矮缩病毒[J]. 南京农业大学学报, 2001, 24(4): 24-28.
- [10] ZHANG H M, YANG J, CHEN J P, et al. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus[J]. Arch Virol, 2008, 153: 1893-1898.
- [11] PINTO Y M, KOK RA, BAULCOMBE D C. Resistance to rice yellow mottle virus (RYMV) in cultivated African rice varieties containing RYMV transgenes[J]. Nature Bio, 1999, 17: 702-707.
- [12] WANG M B, ABBOTT D C, WATERHOUSE P M. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus[J]. Mol Plant Path, 2000, 1: 347-356.

多样性分析是可行的。但此方面研究还应与实际育种工作相结合,使得育种工作者可以充分了解材料的育种变异信息,有针对性地选择亲本,有效提高育种效率^[10],培育优质的新品种,才能更好地为育种工作提供理论依据。

参考文献

- [1] ZIETKIEWICZ E, RAFALSKI A, LABUDA D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. Genomics, 1994, 20(2): 176-183.
- [2] 方宣均, 吴为人, 唐纪良. 作物 DNA 标记辅助育种[M]. 北京: 科学出版社, 2001.
- [3] 李洪伟, 沙伟. ISSR 技术及其在玉米研究中的应用[J]. 齐齐哈尔大学学报, 2007, 7(4): 88-90.
- [4] 罗海燕, 陈业渊. ISSR 分子标记及其应用[J]. 安徽农学通报, 2008, 14(19): 45-46.
- [5] 陈龙, 王家良, 杨贤松. ISSR 分子标记及其在植物分子生物学中的应用[J]. 种子, 2007, 10(26): 49-52.
- [6] 钱伟, 葛洪, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741-750.
- [7] 马朝芝, 傅廷栋, STINE TUEVESSON, 等. 用 ISSR 标记技术分析中国和瑞典甘蓝型油菜的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1403-1408.
- [8] 王寒玉, 杜艳伟, 李萍, 等. 40 份玉米自交系的 ISSR 遗传多样性分析[J]. 山西农业科学, 2010, 38(7): 11-15.
- [9] 程春明, 石云素, 宋燕春, 等. ISSR 分子标记技术在分析玉米自交系遗传关系研究中的适用性[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 172-177.
- [10] 赵欣欣, 崔克艳, 刘光涛, 等. 玉米自交系的 ISSR 聚类分析[J]. 吉林农业大学学报, 2009, 31(2): 131-134.