

## 研究报告

### A Letter

# 云南省 222 个玉米新品种 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析

吴毅歆<sup>1\*</sup>, 刘春明<sup>2\*</sup>, 毛自朝<sup>1</sup>, 李学进<sup>3</sup>, 何月秋<sup>1,2</sup>

1. 云南农业大学农学与生物技术学院, 昆明, 650201
2. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程研究中心, 昆明, 650201
3. 云南省农业厅种子管理站, 昆明, 650031

\*共同第一作者

✉ 通讯作者: ynh2007@163.com   ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 28 篇   doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0028

收稿日期: 2012 年 05 月 08 日

接受日期: 2012 年 05 月 15 日

发表日期: 2012 年 06 月 13 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

吴毅歆等, 2012, 云南省 222 个玉米新品种 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.28 pp.1199-1205 (doi:10.5376/mpb.cn.2012.10.0028)

引用格式(英文):

Wu et al., 2012, Establishment of DNA Fingerprinting Map and Genetic Analysis of 222 New Maize Cultivars in Yunnan Province, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.28 pp.1199-1205 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0028)

**摘要** 利用 SSR 标记研究 222 个云南省玉米新品种的种子纯度、遗传多样性, 并构建了 DNA 指纹图谱。结果表明, 92.79% 品种纯度达 90% 以上, 7.21% 品种纯度低于 90%。20 对引物共检测出 115 个等位基因数, 平均每个标记 5.75 个, 变幅 3~9 个; 平均有效等位基因总数为 4.256 6 个, 变幅 1.964 8~7.333 5 个; 多样性指数(I)平均值 1.508 7, 变化幅度 0.851 5~2.042 1; 多态性信息含量(PIC)平均值为 0.729 0, 变动范围 0.491 1~0.863 6; 标记索引指数(MI)平均值为 4.317 5, 变幅 1.473 3~7.707 0。222 个品种之间的遗传相似性系数变异范围为 0.482 1~0.982 1, 平均遗传相似性系数为 0.655 6, 其中遗传相似性系数大于 0.600 0 的品种对占供试品种对的 86.68%, 表明供试品种之间的亲缘关系较近, 遗传基础狭窄。UPGMA 聚类分析果表明, 在遗传相似系数为 0.648 5 处, 222 个供试品种划分为 5 个类群, 其中类群 I、类群 II 包括 189 品种, 占测试品种总数的 85.14%, 表明供试品种遗传背景比较单一。

**关键词** 玉米; 简单重复序列; DNA 指纹; 遗传分析

## Establishment of DNA Fingerprinting Map and Genetic Analysis of 222 New Maize Cultivars in Yunnan Province

Wu Yixin<sup>1\*</sup>, Liu Chunming<sup>2\*</sup>, Mao Zichao<sup>1</sup>, Li Xuejing<sup>3</sup>, He Yueqiu<sup>1,2</sup>

1. School of Agriculture and Biological technology, Yunnan Agricultural University (YAU), Kunming, 650201
2. National Engineering Center for Agricultural Biodiversity, YAU, Kunming, 650201
3. Seed Management Station, Agriculture Department of Yunnan Province, Kunming, 650031

\*These authors contributed equally to this paper

✉ Corresponding author, ynh2007@163.com;   ✉ Authors

**Abstract** The purities, genetic diversities of 222 new maize cultivars in Yunnan Province were researched with Simple sequence repeats (SSR) markers and DNA fingerprinting map was established. The results show that 92.79% of cultivars have purities higher than 90% and 7.21% of them have purities lower than 90%. 20 pairs of primers produced 115 amplified polymorphic fragments. The average number of alleles per SSR locus is 5.75 with a range from 3 to 9. The average number of effective alleles per SSR locus is 4.256 6 with a range from 1.964 8 to 7.333 5. The Shannon's information index (I) for the SSR loci varied from 0.851 5 to 2.042 1 with an average of 1.508 7. The polymorphism information content (PIC) for the SSR loci varied from 0.491 1 to 0.863 6 with an average of 0.729 0. The marker index (MI) for the SSR loci varied from 1.473 3 to 7.707 0 with an average of 4.317 5. Genetic similarity coefficient (GSC) among the 222 new maize cultivars ranged from 0.482 1 to 0.982 1 with an average of 0.655 6, and those cultivars whose GSC is above 0.600 0 accounted for 86.68%. This indicates that there is a closer relationship among different cultivars and the genetic base is narrow for detected cultivars. The cluster analysis shows that the cultivars could be classified into 5 distinct clusters when GSC is 0.648 5. Moreover, group I and group II include 189 cultivars, accounting for 85.14% of all cultivars, and that indicates the genetic base of all cultivars is uniform.

**Keywords** Maize; Simple sequence repeat (SSR); DNA fingerprinting; Genetic analysis

## 研究背景

作物高产离不开优良的品种, 种子质量直接关系到“三农”问题。种子纯度是保证优良品种增产潜力得以发挥的关键因素, 因而品种纯度检验对保证种子质量具有重要意义。从遗传学角度上来看, 品种纯度和真伪鉴定实质上是对品种基因型的鉴定。近年来, 随着国家和企业的大量投入, 加快了玉米育种速度。品种数量增多给种子管理部门、品种保护部门以及广大的种子生产者、经营者和种植者带来诸多不便, 另一方面也给一些单位和个人以可乘之机, 经常出现以甲品种充当乙品种、以未审定品种充当审定品种或以劣质品种充当畅销优质品种等现象(左生力等, 2008)。每年省级玉米品种预备试验、区域试验中有很多品种参试, 而参试品种的特异性、一致性、纯度以及参试品种与已经审定品种是否雷同或近似, 长期以来一直是预备试验、区域试验工作中的重点和难点(朱卫红等, 2007)。以往种子鉴定采用形态鉴别或蛋白质电泳技术, 但较难识别和区分。又由于我国玉米生产上使用的亲本自交系较为集中, 造成种质基础日趋狭窄, 原有的检测方法已不能满足实际需要, 实践中迫切需要开发新的检测技术(罗黎明等, 2011; 梅眉和陆璐, 2005; 王凤格等, 2005)用于检测传统鉴定方法难以判别品种间的亲缘关系。

NY/T1432-2007《玉米品种鉴定 DNA 指纹方法》是中华人民共和国农业行业标准, 即玉米(*Zea mays* L.)品种依据 SSR 分子标记的 DNA 指纹鉴定标准方法(张文玲, 2008)。该方法适用于玉米自交系和单交种的品种真实性和品种纯度鉴定, 同时可高效、准确地检测生物体中的遗传变异。本文依据该标准检测 222 个云南玉米新品种的种子纯度, 初步建立其指纹图谱, 并进行遗传多样性分析, 为云南省玉米新品种登记注册、遗传资源评价及亲缘关系分析提供理论依据和技术支持, 对规范种业市场以及对玉米新品种权保护具有重要意义。

## 1 结果与分析

### 1.1 SSR 标记多态性分析

222 个玉米品种在 20 对多态性位点上共检测到 115 个等位基因数(表 1), 平均每个标记 5.75 个, 变幅 3~9 个, 其中引物 bnlgl450 多态性最高, 在供试品种中共检测到 9 个多态性片段; 引物 bnlgl496 和 bnlgl161 次之, 分别检测到 8 个多态性条带; 引物 mmc0191, umc1225, umc2163 表现出较高的多态

性, 分别检测到 7 个多态性片段; 但引物 bnlgl439, umc1705 多态性差, 都只在供试品种中检测到 3 个多态性条带。20 个微卫星标记检测到的等位基因数大致呈梯形分布。20 个微卫星标记总的有效等位基因数为 85.132 7 个(表 1), 平均每个标记 4.256 6 个, 变幅 1.964 8~7.333 5 个, 其中引物 bnlgl161 的有效等位基因数最多, 为 7.333 5 个, 而引物 bnlgl439 的有效等位基因总数最少, 为 1.964 8 个。20 个微卫星标记的有效等位基因数大致呈梯形分布。

用 Shannon 多样性指数(I)、多态性信息含量(PIC)和标记索引数(MI)来衡量玉米品种的遗传多样性水平(表 1), Shannon 多样性指数平均值 1.508 7, 变化幅度 0.851 5~2.042 1; 多态性信息含量平均值为 0.729 0, 变动范围 0.491 1~0.863 6; 标记索引指数平均值为 4.317 5, 变幅 1.473 3~7.707 0。其中引物 bnlgl439 的 I 值, PIC 值和 MI 值最小, 分别为 0.851 5, 0.491 1 和 1.473 3; 引物 bnlgl1450 的 I 值, MI 值最大, 分别为 2.042 1 和 7.707 0; 引物 bnlgl161 的 PIC 值最大, 为 0.863 6。

从表 1 中看出, 用来衡量分子标记的多态性指标, 即等位基因数( $N_a$ ), 多态性信息含量(PIC)和标记索引值(MI), 并不完全一致, 如引物 bnlgl1450 的检测到等位基因数最多, 但多态性信息含量为 0.856 3, 并不是 PIC 值的最大引物, PIC 值最大的引物是 bnlgl161, PIC 值达 0.863 6, 而引物 bnlgl1450 的 MI 值最大, 为 7.707 0。尽管这 3 个指标并不完全反应引物的多态性, 但是多态性信息含量(PIC)和标记索引值(MI)基本随着引物检测到等位基因数目的增加而增大, 即在一定程度上代表 SSR 标记的多态性。

分析等位基因的出现频率发现, 只有少数标记座位上的等位基因出现频率较为均衡, 大部分标记座位上的等位基因出现频率差异很大, 且在一个标记座位上存在 1~2 个等位基因的出现频率明显高于其他等位基因, 可称其为主导等位基因。从表 2 可知, 引物 mmc0191, bnlgl1496, bnlgl2291 和 umc1705 位点内最大的等位基因频率与最小的等位基因频率的比值(MAX/MIN)分别为 2.318 5, 2.784 5, 2.920 8, 1.500 4, 表明其标记座位上的等位基因出现频率比较均衡, 而其他标记座位上 MAX/MIN 值均大于 3.000 0, 表明这些位点上存在主导等位基因现象, 其中有 5 对引物 bnlgl1792, phi080, phi065, bnlgl1191, umc2163 的主导等位基因现象突出, 其 MAX/MIN 值大于 10.0000, MAX/MIN 值分别为 29.132 7, 13.349 9, 13.407 3, 10.418 2, 14.820 2。

表 1 20 对 SSR 引物扩增特性

Table 1 The characteristics of 20 SSR primers for 222 maize cultivars amplification

引物名称 Primers	等位基因数 Na	有效等位基因数 Ne	多样性指数 I	多态性信息含量 PIC	标记索引指数 MI
bnlg439	3	1.964 8	0.851 5	0.491 1	1.473 3
bnlg2331	6	4.862 7	1.672 6	0.794 3	4.765 9
bnlg125	4	3.551 9	1.310 8	0.718 5	2.873 8
mmc0191	7	6.376 1	1.896 7	0.843 2	5.902 2
umc2105	5	2.850 8	1.306 2	0.649 2	3.246 1
bnlg1496	8	7.223 2	2.021 8	0.861 5	6.892 3
phi072	6	4.395 3	1.637 1	0.772 5	4.635 0
bnlg2291	5	4.320 1	1.534 2	0.768 5	3.842 4
umc1705	3	2.885 4	1.079 5	0.653 4	1.960 3
umc1225	7	4.575 9	1.715 9	0.781 5	5.470 3
bnlg161	8	7.333 5	2.028 2	0.863 6	6.909 1
phi299852	6	4.618 9	1.642 9	0.783 5	4.700 9
bnlg1792	6	2.158 9	1.145 7	0.536 8	3.220 6
phi116	5	3.772 6	1.439 3	0.734 9	3.674 6
umc1741	5	3.878 3	1.438 1	0.742 2	3.710 8
phi080	5	2.900 6	1.271 5	0.655 2	3.276 1
phi065	4	2.309 5	0.962 9	0.567 0	2.268 0
bnlg1191	6	3.693 3	1.528 1	0.729 3	4.375 6
umc2163	7	4.502 5	1.648 5	0.777 9	5.445 2
bnlg1450	9	6.958 4	2.042 1	0.856 3	7.707 0
平均值 Average	5.75	4.256 6	1.508 7	0.729 0	4.317 5

表 2 20 个微卫星标记在不同玉米品种中的等位基因频率

Table 2 Frequency of alleles at 20 SSR loci in 222 maize cultivars

引物名称 Primers	等位基因\位点 Allele\Locus										MAX	MIN	MAX/MIN
	Allele A	Allele B	Allele C	Allele D	Allele E	Allele F	Allele G	Allele H	Allele I				
bnlg439	0.673 4	0.130 6	0.195 9	-	-	-	-	-	-	-	0.673 4	0.130 6	5.156 2
bnlg2331	0.294 1	0.183 3	0.237 6	0.129 0	0.065 6	0.090 5	-	-	-	-	0.294 1	0.065 6	4.483 2
bnlg125	0.099 1	0.310 8	0.317 6	0.272 5	-	-	-	-	-	-	0.317 6	0.099 1	3.204 8
mmc0191	0.214 0	0.182 4	0.164 4	0.153 2	0.096 8	0.096 8	0.092 3	-	-	-	0.214 0	0.092 3	2.318 5
umc2105	0.101 4	0.074 3	0.121 6	0.159 9	0.542 8	-	-	-	-	-	0.542 8	0.074 3	7.305 5
bnlg1496	0.067 6	0.105 9	0.117 1	0.155 4	0.063 1	0.146 4	0.175 7	0.168 9	-	-	0.175 7	0.063 1	2.784 5
phi072	0.128 4	0.094 6	0.175 7	0.078 8	0.141 9	0.380 6	-	-	-	-	0.380 6	0.078 8	4.829 9
bnlg2291	0.175 7	0.114 9	0.137 4	0.236 5	0.335 6	-	-	-	-	-	0.335 6	0.114 9	2.920 8
umc1705	0.284 8	0.287 9	0.427 3	-	-	-	-	-	-	-	0.427 3	0.284 8	1.500 4
umc1225	0.044 0	0.083 3	0.178 2	0.085 6	0.069 4	0.169 0	0.370 4	-	-	-	0.370 4	0.044 0	8.418 2
bnlg161	0.097 2	0.048 6	0.129 6	0.106 5	0.150 5	0.171 3	0.164 4	0.131 9	-	-	0.171 3	0.048 6	3.524 7
phi299852	0.056 1	0.149 5	0.109 8	0.105 1	0.292 1	0.287 4	-	-	-	-	0.292 1	0.056 1	5.206 8
bnlg1792	0.074 7	0.022 6	0.131 2	0.061 1	0.052 0	0.658 4	-	-	-	-	0.658 4	0.022 6	29.132 7
phi116	0.164 4	0.148 6	0.047 3	0.252 3	0.387 4	-	-	-	-	-	0.387 4	0.047 3	8.190 3
umc1741	0.238 7	0.038 3	0.117 1	0.270 3	0.335 6	-	-	-	-	-	0.335 6	0.038 3	8.762 4
phi080	0.065 3	0.038 3	0.150 9	0.511 3	0.234 2	-	-	-	-	-	0.511 3	0.038 3	13.349 9
phi065	0.040 5	0.038 3	0.513 5	0.407 7	-	-	-	-	-	-	0.513 5	0.038 3	13.407 3
bnlg1191	0.150 9	0.042 8	0.087 8	0.101 4	0.445 9	0.171 2	-	-	-	-	0.445 9	0.042 8	10.418 2
umc2163	0.022 8	0.029 7	0.143 8	0.057 1	0.168 9	0.262 6	0.315 1	-	-	-	0.315 1	0.022 8	13.820 2
bnlg1450	0.033 9	0.033 9	0.058 8	0.117 6	0.167 4	0.210 4	0.178 7	0.104 1	0.095 0	-	0.210 4	0.033 9	6.206 5

### 1.2 玉米新品种纯度分析

222 个玉米新品种的种子纯度测定结果见表 3, 可以看出 222 个玉米品种的种子纯度都分布在 82%

及以上, 其中 206 个玉米种子的纯度 $\geq 90\%$ , 占有品种数的 92.79%; 其中有 160 个玉米种的种子纯度 $\geq 95\%$ , 占供试品种总数的 72.07%。

表 3 222 个玉米品种种子纯度分布表

Table 3 The seed purity of 222 maize new cultivars

种子纯度范围(%)	$\geq 95$	90~94	85~89	84	82
Range of seed purity (%)					
品种数目	160	46	14	1	1
Number of cultivars					
百分比(%)	72.07	20.72	6.31	0.45	0.45
Percentage (%)					

### 1.3 玉米新品种指纹图谱构建

根据扩增产物在聚丙烯酰胺电泳凝胶上的相对位置, 并参照 100 bp DNA Marker 条带位置, 确定不同的谱带类型, 并按扩增片段从大到小的顺序编号, 按照 0、1、9 统计 SSR 扩增产物, 组成 222 个玉米新品种的二元数据矩阵, 构成 222 个玉米品种的数字指纹图谱(保存在云南农业大学农业生物多样性国家技术应用工程中心)。

### 1.4 玉米新品种聚类分析

222 个云南省玉米新品种的遗传相似性系数(GS)变异范围为 0.482 1~0.982 1, 平均遗传相似性系数为 0.655 6, 其中文单 4 号和绿 2009 的遗传相似性系数最大, 为 0.982 1, 其次为云 D007 和康农 20, 为 0.947 8, 再次为金禾玉 1 号和滇都 8 号, 昭黄 9 号和山州 2011, 分别为 0.843 5, 0.840 0, 说明这些品种间遗传背景相似, 亲缘关系较近。而金州玉 2 号和 S-8-1 的遗传相似性系数最小, 为 0.482 1, 兴华单 7 号和和玉 808, 7203 和宣宏 2 号的遗传相似性系数也较小, 都为 0.495 7, 说明这些品种间的遗传背景差异较大, 亲缘关系较远。另外由 222 个品种之间组成 24 531 个品种对中, 遗传相似性系数大于 0.600 0 品种对为 21 264 个, 占供试品种对的 86.68%, 表明供试品种之间的亲缘关系较近, 遗传基础狭窄。

据遗传相似值(GS)矩阵, 按照 UPGMA 进行聚类分析, 构建 222 个云南省玉米新品种的遗传关系树状图(图 1)。以遗传相似性系数为 0.648 5 为标准, 将 222 个品种被分成 5 个类群, 类群 I 和 II 为 2 个大类群, III、IV 和 V 为 3 个小类群。

类群 I 包括曲辰 12 号、秋玉 1 号和海选 1 号等 78 个品种, 占有供试材料的 35.14%。在遗传相

似性系数为 0.655 6 处, 被分成 3 个亚群, 图 1 中所示分别为亚群 IA、亚群 IB、亚群 IC。其中亚群 IA 包括曲辰 12 号、秋玉 1 号和海选 1 号等 69 个品种, 占类群 I 中测试品种数的 88.46%。亚群 IB 只包括 3 个品种分别为绿星 699、路单 17 号和雅玉 78; 亚群 IC 包括 CUB201、五谷 8567 和 YS201 等 6 个品种。

类群 II 包括黔 1103、辽科 308 和山川 907 等 111 个品种, 占有供试材料的 50.00%。在遗传相似性系数为 0.661 3 处, 被分成 2 个亚群, 图 1 中所示分别为亚群 IIA、亚群 IIB。其中亚群 IIA 包括黔 1103、辽科 308 和山川 907 等 13 个品种; 亚群 IIB 包括强硕 68、滇都 8 号和金禾玉 1 号等 98 个品种, 占亚群 II 中测试品种数的 88.29%。

类群 III 包括田玉 6 号、TY802 和罗单 20 等 26 个品种, 仅占有供试材料的 11.71%。在遗传相似性系数为 0.660 8 处, 被分成 2 个亚群, 图 1 中所示分别为亚群 IIIA、亚群 IIIB。其中亚群 IIIA 仅包括 3 个品种, 分别为田玉 6 号、TY802 和罗单; 亚群 IIIB 包括田玉 7 号、西抗 18 和 BS07 等 23 个品种。

而类群 IV 只包括明增 31、博玉 2 号和美嘉玉 6 号等 5 个品种; 类群 V 只包括 2 个品种, 分别为临玉 6 号和金州玉 2 号。由上可知, 大量品种集中分布在类群 I、类群 II 中, 占测试品种总数的 85.14%; 亚群 IA 占类群 I 中测试品种数的 88.46%, 亚群 IIB 占类群 II 中测试品种总数的 88.29%。造成这种现象的原因是品种之间具有共同的亲本或亲缘关系较近的亲本, 遗传背景比较单一。

## 2 讨论

目前, 我国种子生产和经营管理单位还不太规范, 品种引种混乱或品种造假的现象屡有发生, 极

大地损害了品种权的有者和广大农民的经济利益, 因此开展作物品种资源鉴定显得尤为重要(佘花娣等, 2003)。品种纯度检验的传统方法主要包括形态特征、生理特性、同工酶、种子贮藏蛋白等鉴定技术(罗黎明等, 2011)。这些方法需投入大量人力、物力, 且检测结果易受环境的影响。为了避免常规技术的局限性, 我们采用 SSR 标记技术构建玉米指纹图谱, 利用 SSR 标记的多样性客观地反映出供试玉米 DNA 组成上的差异和群体间的遗传多样性, 为种子纯度的检测奠定基础。为了保证品种的真实性, 所有 222 个玉米品种均来自云南省区试主管部门和留有备份, 以备查对复检。

利用国标推荐的 20 对引物检测结果表明, 有 92.79% 品种纯度达 90% 以上, 仍有 7.21% 品种纯度低于 90%, 这要求育种者高度关注自交系的提纯复壮和制种过程中隔离条件, 没有很好的纯度, 种子质量难以保证。另一方面, 一般情况下, 育种者总是希望把自认为纯度高、有生产潜力的品种参加区试鉴定, 在自己的多点试验中未发现种子不纯的现象。而 SSR 技术仍然检测到了 16 个品种纯度低于 90%, 这一方面是 SSR 较为灵敏, 另一方面 SSR 标记不是检测功能基因区域所致。

DNA 指纹身份证构建的关键是核心引物。我们选用多态信息量(PIC)、Shannon 多样性指数(I)、有效等位基因数(Na)、标记索引数(MI)作为衡量核心引物多态性的指标, 实验结果表明所选微卫星标记的多态性存在一定的差异, 但均具有较高鉴别效率, 适合用于构建 222 个玉米新品种的 DNA 指纹图谱。

依据育种者将表型一致的品种进入区试的观点, 和各个供试品种一致的主要条带作为品种的特征带, 忽略杂带来做聚类分析。UPGMA 聚类分析结果表明, 在遗传相似性系数为 0.648 5 处, 222 个供试品种划分为 2 个大类群和 3 个小类群。根据 24 531 个品种对组成的遗传相似度表中(本文未给出), 可以得出遗传相似性系数 $\leq 0.600 0$ 的品种对只有 3 267 个, 占品种对总数的 13.32%, 其中遗传相似性系数 $< 0.500 0$ 的品种对只有 3 个; 遗传相似性系数 $\geq 0.700 0$ 的品种对有 4 163 个, 占品种对总数的 16.97%, 其中遗传相似性系数 $> 0.8000$ 的品种对只有 31 个, 而遗传相似性系数 $> 0.900 0$ 的品种对仅有 2 个; 遗传相似性系数位于 0.600 0 和 0.700 0 之间的品种对为 17 101 个, 占供试品种对总数的 69.71%, 表明大部分供试品种之间的遗传相似性系数分布

在这个区间内。综上所述, 占供试品种对总数的 86.68% 的品种之间的遗传相似性系数 $> 0.600 0$ , 表明大部分供试品种之间的亲缘关系较近, 遗传基础单一化。造成供试品种间遗传多样性较差的主要原因是, 由于某些具有优良性状的遗传材料在改良种质过程中的重要作用, 使采用这些亲本育成的新品种(跨区域)大幅度增加, 造成了生产上同一作物的遗传基础趋于单一化。品种遗传基础单一性的结果不仅降低了品种抗病虫害和抵御不良环境的能力, 而且容易在大范围内引发新的病虫害等灾害的发生从而影响玉米生产的稳定性。彭泽斌和刘新芝报道玉米杂交种的大面积推广使农民种植的品种主要来源于几个自交系(彭泽斌和刘新芝, 1998, 作物杂志, S1: 1-5)。从 20 世纪 80 年代中期开始, 虽然玉米品种数在不断增长, 然而“黄早四”、“Mo17”、“E28”、“丹 340”和“自 330”等 5 个骨干自交系对中国玉米生产的遗传贡献率超过了 50%, 玉米杂交种遗传基础单一的问题已相当严重(李海明等, 2005)。因此构建 222 个玉米新品种的指纹图谱, 可以为玉米多个领域提供丰富的有价值的信息, 同时通过对指纹图谱的进一步分析, 可以对云南省内玉米品种资源的遗传多样性做出总体评价, 从而为云南省的育种工作, 品种保护等提供理论依据, 并对生产实践有一定提供帮助。

## 3 材料与amp;方法

### 3.1 供试材料

供试品种为 2011 年云南省玉米区域试验新品种, 共 222 个, 分别由云南省种子管理站送样 218 个, 昆明市种子管理站送样 4 个(表 4)。

### 3.2 方法

#### 3.2.1 DNA 提取

采用赵久然等(2003)的玉米单粒种子 DNA 快速提取法, 提取玉米基因组 DNA。

#### 3.2.2 SSR 扩增

反应体系: 10  $\mu\text{L}$  反应液其中包括: 1 $\times$  easy Taq polymerase DNA Buffer (+Mg<sup>2+</sup>), 0.2 mmol/L dNTP, 0.25  $\mu\text{mol/L}$  SSR 引物(由上海生工生物公司合成), 1 单位 Taq DNA 聚合酶, 0.5  $\mu\text{L}$  DNA 模板。反应液上加盖 15  $\mu\text{L}$  矿物油, 防止反应过程中水分蒸发。实验中所使用的 20 对 SSR 基本核心引物详细信息, 请参见 <http://www.maizegdb.org/>和 NY/T1432-2007。

反应程序: 94 $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$  变性 40 s,

60℃退火 35 s, 72℃延伸 45 s, 循环次数 30; 72℃延伸 5 min, 4℃保存。PCR 扩增在基因扩增仪 WD-9402A (北京六一仪器厂)和 L96+(杭州朗基科学仪器有限公司)进行。

### 3.2.3 电泳检测

变性的 PCR 产物用 6.0%PAGE 电泳检测。电泳结束后用 0.007 5% AgNO<sub>3</sub> 溶液染色, 1.5% NaOH 和 0.4% 甲醛溶液显影, 观察结果。

### 3.3 数据统计与分析

采用人工读带的方式, 各标记的多态性片段依据分子量从大到小按 1、2、3、4、5……进行编号, 对于鉴定过程中新发现的多态性片段, 按上述规则插入或追加并编号, 以 1 和 0 分别代表某个基因座相应的等位基因位点扩增 DNA 条带的有无, 9 代表缺失带型, 记录所有品种等位基因的类型(带型), 并构建(0, 1)的二元数据矩阵, 同时转换成基因型矩阵。在记录过程中只记录主要带型、忽略弱杂带型, 并注重与标准带型对照和 100 bp DNA Marker (TransGen)的比对, 同时参考比较鉴定品种之间带型。

种子纯度的计算公式为: 种子纯度(%) =

$$\left(1 - \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n \times m}\right) \times 100\%$$

其中, n 表示供试的 SSR 引物总数, m 表示某一品种中待测品种总数(本实验中 m=5), V<sub>i</sub> 表示第 i 对引物检测到差异位点的品种数目(0=<V<sub>i</sub><=m)。

多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)按照 Smith 等(1997)描述公式计算。该参数是衡量微卫星片段多态性的指标。其计算公式

$$\text{PIC} = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

公式中, n 为所分析的某个微卫星标记在玉米品种中检测到的多态性片段总数, p<sub>i</sub> 为第 i 个等位基因出现的频率。标记索引系数(marker index, MI)按 Senior 等(1998)提供的公式 MI=Allele×PIC 计算, Allele 为该引物的等位基因数。

利用 POPGENE32 软件计算 Shannon 多样性指数(Shannon, 1948) (Shannon's Information index), 等位基因频率(Allele frequency), 有效等位基因数(Effective number of alleles, Kimura and Crow, 1964), 以简单相配系数(Simple matching coefficient, SM)计算品种间的遗传相似系数(genetic similarity, GS) GS=m/(m+n), 其中 m 表示基因型间共有带数目;

n 表示基因型间差异带数目。同时, 应用软件 NTSYSpc 2.10 (Rohlf, 2001)处理数据, 按非加权平均数(unweighted pair group method, UPGMA)进行聚类分析, 构建 222 个玉米新品种的聚类图。

### 作者贡献

吴毅歆是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 论文写作与修改; 刘春明是本实验研究的执行人, 负责分子标记实验, 参与实验数据整理与分析, 论文写作与修改, 与第一作者同等贡献; 李学进参与样品的采集, 实验设计; 何月秋、毛自朝是项目的构思者, 参与实验设计, 试验结果分析和论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

### 致谢

本研究由云南省支撑计划项目(2006NG19), 云南省农业产业技术体系项目共同资助。作者感谢中国农业科学院烟草研究所任民老师在实验数据统计和转换以及云南农业大学陈卓君、郝昆、胡洲、刘鸿骄、杨珍福、岑爽、武丽娜同学在实验数据获得过程中提供帮助。

### 参考文献

- Kimura M., and Crow J.F., 1964, The number of alleles that can be maintained in a finite population, *Genetics*, 49(4): 725-738 PMID:14156929 PMCID:1210609
- Li H.M., Zhang S.H., and Hu R.F., 2005, Impacts of genetic uniformity on maize production in China, *Shengwu Duoyangxing (Biodiversity Science)*, 13(2): 91-96 (李海明, 张世煌, 胡瑞法, 2005, 中国玉米遗传单一性的经济影响, *生物多样性*, 13(2): 91-96)
- Luo L.M., Liu L., Yu L.J., and Fan X.M., 2011, Application of Molecular marker technology in seed purity identification of maize, *Shengwu Jishu Jingzhang (Current Biotechnology)*, 1(1): 7-13 (罗黎明, 刘丽, 于丽娟, 潘兴明, 2011, DNA 分子标记技术在玉米种子纯度鉴定中的应用, *生物技术进展*, 1(1): 7-13)
- Mei M., and Lu L., 2005, Application of DNA molecular markers technique on quality testing of crop seed, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 3(1): 129-134 (梅眉, 陆璐, 2005, DNA 分子标记技术在农作物种子质量检验中的应用, *分子植物育种*, 3(1): 129-134)
- Rohlf F.J., ed., 2001, NTSYS: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1, Exeter Software Press, New York, USA, pp.33
- Senior M.L., Murphy J.P., Goodman M.M., and Stuber C.W., 1998, Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarose gel system, *Crop Science*, 38: 1088-1098 <http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1998.0011183X003800040034x>
- Shannon C.E., 1948, A mathematical theory of communication,

- Bell System Technical Journal, (27): 379-423, 623-656
- She H.D., Chen J.T., Huang Y.Q., Zhu L.Y., and Chi S.M., 2003, Progress on variety identification of crop using DNA fingerprinting, Hebei Nongye Xuebao (Journal of Agricultural University of Hebei), 26(S): 28-30, 33 (余花娣, 陈景堂, 黄亚群, 祝丽英, 池书敏, 2003, 利用 DNA 指纹图谱进行农作物品种鉴定的研究进展, 河北农业大学学报, 26(S): 28-30, 33)
- Smith J.S.C., Chin E.C.L., Shu H., Smith O.S., Wall S.J., Senior M.L., Mitchell S.E., Kresovich S., Ziegler J., 1997, An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPs and pedigree, Theor. Appl. Genet., 95: 163-173 <http://dx.doi.org/10.1007/s001220050544>
- Wang F.G., Zhao J.R., Guo J.L., and Sun S.X., 2005, Review of research into establishing a DNA fingerprinting database of new Chinese maize cultivars, Zhiwuxue Tongbao (Chinese Bulletin of Botany), 22(1): 121-128 (王凤格, 赵久然, 郭景伦, 孙世贤, 2005, 中国玉米新品种标准 DNA 指纹库构建研究的几点思考, 植物学通报, 22(1): 121-128)
- Zhang W.L., 2008, Technical points in identification maize varieties with DNA finger, Zhongzi Keji (Seed Science and Technology), 26(6): 53-54 (张文玲, 2008, DNA 指纹鉴定玉米品种技术要点, 种子科技, 26(6): 53-54)
- Zhao J.R., Wang F.G., Guo J.L., Chen G., Liao Q., Sun S.X., Chen R.M., and Liu L.Z., 2003, Series of research on establishing DNA fingerprinting pool of Chinese new maize cultivars, II. Confirmation of a set of SSR core primer pairs, Yumi Kexue (Journal of Maize Sciences), 11(2): 3-5, 8 (赵久然, 王凤格, 郭景伦, 陈刚, 廖琴, 孙世贤, 陈如明, 刘龙洲, 2003, 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 II. 适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的 SSR 核引物的确定, 玉米科学, 11(2): 3-5, 8)
- Zhu W.H., Qi J.S., Tie S.G., Lu C.X., Shu J.J., Li Y., and Zhou K., 2007, Application of DNA fingerprinting in identification of maize hybrids, Henan Nongye Kexue (Journal of Henan Agricultural Sciences), (10): 33-36 (朱卫红, 齐建双, 铁双贵, 卢彩霞, 孙建军, 李艺, 周柯, 2007, DNA 指纹图谱在玉米杂交种真伪及纯度鉴定中的应用, 河南农业科学, (10): 33-36)
- Zuo S.L., Lang J.H., Ling J.H., and Xu S.Y., 2008, Research progress on DNA fingerprint databases of crop varieties in China, Fujian Daomai Keji (Fujian Science and Technology of Rice and Wheat), 26(4): 41-45 (左生力, 兰华雄, 林金虎, 徐淑英, 2008, 中国作物品种 DNA 指纹库的研究进展, 福建稻麦科技, 26(4): 41-45)

表 4 供试 222 个玉米品种

Table 4 The 222 maize cultivars used in this study

编号 No.	品种名称 Name	编号 No.	品种名称 Name	编号 No.	品种名称 Name	编号 No.	品种名称 Name
1	曲辰 12 号 Quchen 12	57	辽科 308 Liaoke 308	113	罗单 18 Luodan 18	169	2010
2	金竹 109 Jinzhu 109	58	绿单 2 号 Lvdan 2	114	新昭 5 号 Xinzhao 5	170	中白 106 Zhongbai 106
3	绿星 699 Lvxing 699	59	贵单 102 Guidan 102	115	新昭 6 号 Xinzhao 6	171	雅玉 88 Yayu 88
4	屏单 106 Pingdan 106	60	康玉 3 号 Kangyu 3	116	镇单 2 号 Zhendan 2	172	文丰 10 号 Wenfeng 10
5	贵农玉 007 Guinong 007	61	天玉 22 Tianyu 22	117	青秆 5 号 Qinggan 5	173	广玉 7 号 Guangyu 7
6	海选 1 号 Haixuan 1	62	金试 01 Jinshi 01	118	青秆 7 号 Qinggan 7	174	西单 13 号 Xidan 13
7	和玉 808 Heyu 808	63	盛单 216 Shengdan 216	119	ZH4-3	175	兴农单 1 号 Xingnongdan 1
8	黔金 906 Qianjin 906	64	金创 117 Jinchuang 117	120	明增 31 Mingzeng 31	176	绿 2009 Lv 2009
9	丘试 05 Qianjin 906	65	蠡试 1056 Lishi 1056	121	博玉 2 号 Boyu2	177	文单 4 号 Wendan 4
10	强硕 68 Qiangshuo 68	66	滇都 8 号 Diandu 8	122	宣宏 2 号 Xuanhong 2	178	JD008
11	罗单 299 Luodan 299	67	路单 17 号 Ludan 17	123	S1001	179	红育 1 号 Hongyu1
12	金玉 618 Jinyu618	68	红育 3 号 Hongyu 3	124	金庚 6 号 Jingeng 6	180	西单 8 号 Xidan 8
13	贵单 103 Guidan 103	69	胜玉五号 Shengyu 5	125	S-8-1	181	迪卡 008 Dika 008
14	YA5889	70	金禾玉 1 号 金禾玉 1 号	126	XH201	182	罗单 20 Luodan 20
15	文单 6 号 Wendan6	71	M319×M277	127	美嘉玉 6 号 Meijiayu 6	183	五谷 8567 Wugu 8567
16	百思得 9542 Baiside 9542	72	先玉 696 Xianyu 696	128	朴金 6 号 Pujin 6	184	圣单 1 号 Shengdan 1
17	旭玉 818 Xuyu 818	73	贵单 936 Guidan 936	129	红单 10 号 Hongdan 10	185	源凰谷 615 Yuanhuanggu 615
18	正大 8082 Zhengda 8082	74	FY009	130	DR7312	186	绿晶 4 号 Lvjing4
19	奥玉 025 Aoyu 025	75	吉东 88 Jidong88	131	Dr518	187	路单 18 Ludan18
20	卓玉 8 号 Zhuoyu 8	76	M413×M277	132	胜境 008 Shengjing 008	188	路单 19 Ludan19
21	京滇 6 号 Jingdian 6	77	五谷 8818 Wugu 8818	133	3631	189	美嘉玉 1 号 Meijiayu1
22	大玉 7 号 Dayu 7	78	YR220	134	FL003	190	奥玉 3628 Aoyu 3628
23	田玉 6 号 Tianyu 6	79	北玉 0913 Beiyu 0913	135	JF178	191	永瑞 16 号 Yongrui 16
24	秋玉 1 号 Qiuyu 1	80	YA74824	136	Y3X6A	192	黔兴 201 Qianxing 201



续表 1

Continuing Table 1

25	CUB201	81	海玉 9 号 Haiyu9	137	1522X18051	193	京滇 8 号 Jindian 8
26	金都玉 2 号 Jinduyu 2	82	康农 20 Kangnong 20	138	FL110	194	南校 201 Nanxiao 201
27	先达 901 Xianda 901	83	云 D007 YunD007	139	园玉 707 Yuanyu 707	195	昭白单 5 号 Zhaobaidan 5
28	纪元 10-1 Jiyuan 10-1	84	纪元 08-9 Jiyuan 08-9	140	盛玉 2000 Shengyu 2000	196	佳单 108 Jiadan 108
29	云瑞 619 Yunrui 619	85	广玉 9 号 Guangyu 9	141	高新 88 Gaoxin 88	197	山州 2011 Shanzhou 2011
30	耕源 135 Gengyuan 135	86	JR001	142	美玉 668 Meiyu 668	198	昭黄 9 号 Zhaohuang 9
31	西单 17 Xidan 17	87	YR17	143	益玉 918 Yiyu 918	199	师单 2 号 Shidan 2
32	汉单 1 号 Handan 1	88	亚航 639 Yahang 639	144	潞玉 6 号 Luyu 6	200	红瑞 8 号 Hongrui 8
33	曦丰 1 号 Xifeng 1	89	YS201	145	雅玉 78 Yayu 78	201	安单 3 号 Andan 3
34	金玉 7025 Jinyu 7025	90	西单 6 号 Xidan 6	146	地宠 3 号 Dichong 3	202	红单 9 号 Hongdan 9
35	涿单 21 Zhuodan21	91	朴金 4 号 Pujin 4	147	彩稼 8 号 Caijia 8	203	金玉 99 Jinyu 99
36	皓鑫 618 Haixin 618	92	朴金 5 号 Pujin5	148	黔 973 Qian 973	204	汇元 738 Huiyuan 738
37	纳峰 610 Nafeng 610	93	金禾 1 号 Jinhe 1	149	玉禾 606 Yuhe 606	205	金州玉 2 号 Jinzhouyu 2
38	田玉 7 号 Tianyu 7	94	春喜 6 号 Chunxi 6	150	兴华单 7 号 Xinghuadan 7	206	金州玉 3 号 Jinzhouyu3
39	农玉 11 Nongyu 11	95	楚玉 1 号 Chuyu 1	151	盛衍 4 号 Shengyan4	207	ZY05-1
40	子玉 6 号 Ziyu 6	96	S093	152	艾农 6 号 Ainong 6	208	BS07
41	至玉 7011 Zhiyu 7011	97	林新 4 号 Linxin 4	153	艾农 7 号 Ainong 7	209	昌玉 1 号 Changyu1
42	盛单 309 Shengdan 309	98	中禾 6 号 Zhonghe 6	154	贵玉 8 号 Guiyu8	210	M688
43	奥玉 008 Aoyu 008	99	中单 815 Zhongdan 815	155	佛试 08-2 Foshi 08-2	211	乐单 99 Ledan99
44	红 2009-5 Hong 2009-5	100	春喜 091 Chunxi 091	编号 No.	金 8203 Jin 8203	212	得玉 5 号 Deyu5
45	海 272 Hai 272	101	云金 2 号 Yunjin 2	113	SW1823	213	中单 927 Zhongdan927
46	安玉 123 Anyu 123	102	黔 948 Qian 948	114	正大 999 Zhengda999	214	西单 5 号 Xidan5
47	临玉 6 号 Linyu6	103	YX-9	115	白玉 808 Baiyu 808	215	7207
48	黔 1103 Qian 1103	104	家富 5 号 Jiafu 5	116	K9-10	216	7203
49	大丰 123 Dafeng 123	105	金 8209 Jin 8209	117	毕单 18 Bidan 18	217	纪元 8 号 Jiyuan8

续表 1

Continuing Table 1

50	良禾 7 号 Lianghe 7	106	丰源 203 Fenyuan 203	118	MH 2009-1	218	唐玉 10 号 Tangyu10
51	安玉 2166 Anyu 2166	107	贵单 8 号 Guidan 8	119	TY802	219	北玉 0917 Beiyu 0917
52	云瑞 10 号 Yunrui 10	108	西抗 18 Xikang 18	120	红 2007-48 Hong 2007-48	220	海禾 17 Haihe 17
53	丰玉 777 Fengyu 777	109	昌隆 99 Changlong 99	121	红 2007-5 Hong 2007-5	221	正大 808 Zhengda 808
54	IE8114	110	丰源 1 号 Fengyuan 1	122	红 2007-104 Hong2007-104	222	华选 6 号 Huaxuan 6
55	五谷 1573 Wugu 1573	111	A3116	123	靖丰 18 Jingfeng 18		
56	山川 907 Shanchuan 907	112	山丰 269 Shanfeng 269	124	红瑞 6 号 Hongrui 6		

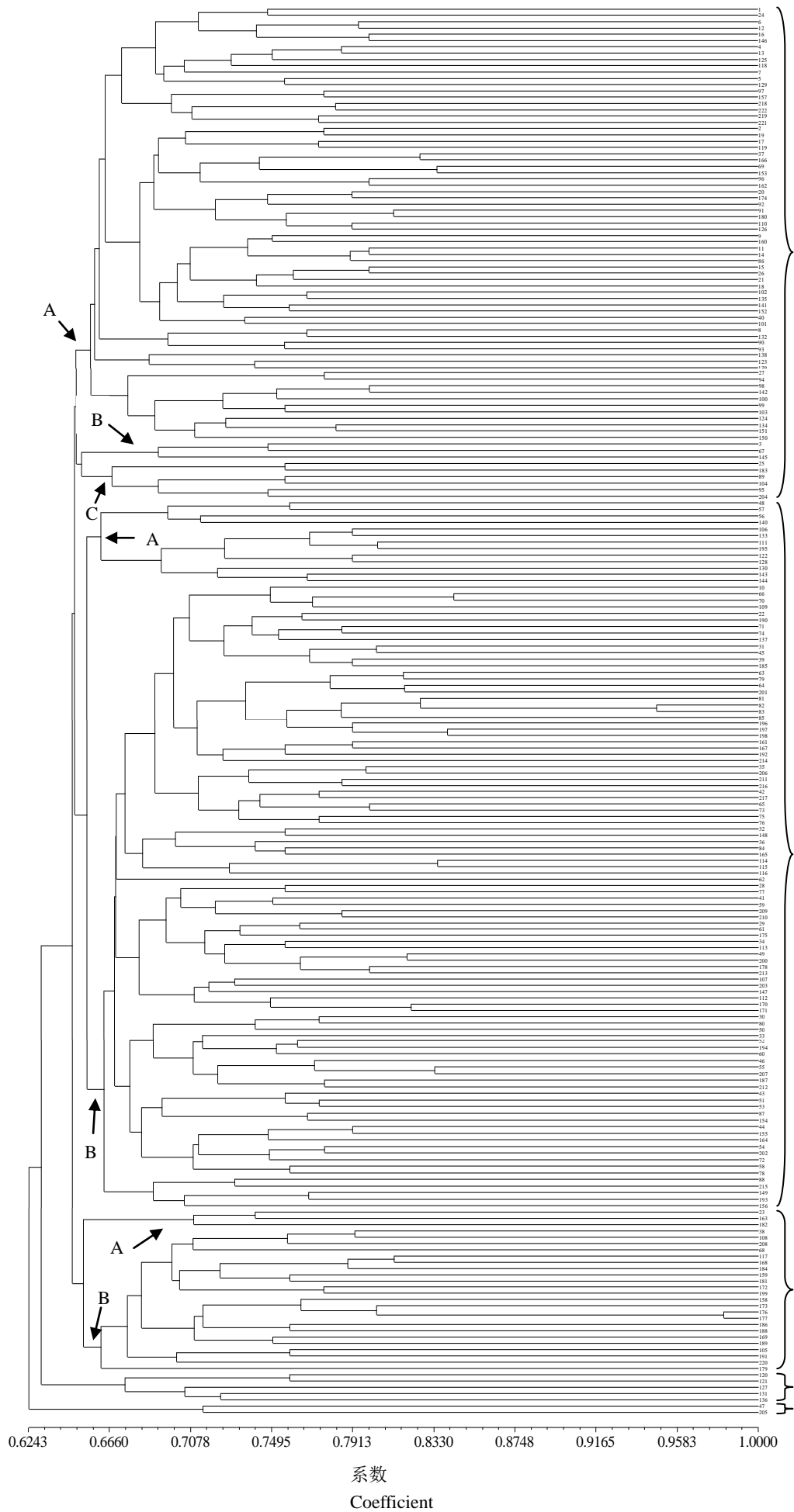


图 1 222 个玉米新品种的 UPGMA 树状图

注：“A, B, C”分别表示某类群下面的一个亚群

Figure 1 UPGMA dendrogram of 222 maize new cultivars

Note: “A, B, C”, mean a subgroup in a certain group respectively