植物遗传资源学报 2017,18(1):19-31
Journal of Plant Genetic Resources
DOI:10.13430/j.cnki.jpgr.2017.01.003

基于荧光 SSR 标记的玉米自交系遗传结构解析

张全芳[1],梁水美[1],李　燕[1],刘艳艳[1],范阳阳[1],郭庆法[2],鲁守平[2],步　迅[1]
([1]山东省农业科学院生物技术研究中心/山东省作物遗传改良与生态生理重点试验室,济南 250100;
[2]山东省农业科学院玉米研究所/小麦玉米国家工程试验室/农业部黄淮海北部玉米生物学与遗传育种重点试验室,济南 250100)

摘要:利用多重 SSR-PCR 荧光标记检测技术,对本单位自育和引进的 259 份玉米自交系进行遗传多样性和亲缘关系分析,并以 11 个归属于不同杂种优势群的代表自交系为参照进行群体结构分析。结果显示,50 对 SSR 引物共检测到 214 个等位基因变异,基因多态性指数的平均值为 0.50,每个 SSR 标记的多态性信息量(*PIC*)平均值为 0.44。用 UPGMA 方法将 270 份自交系划分成 3 大类群,进一步进行数值化杂种优势群分析,以明确所用种质资源的杂优类群利用方向,为玉米自交系的有效利用和品种的选育提供依据。

关键词:玉米自交系;分子标记;遗传多样性

Analysis of Genetic Diversity and Genetic Structure of Maize Germplasms using Fluorescent SSR Markers

ZHANG Quan-fang[1], LIANG Shui-mei[1], LI Yan[1], LIU Yan-yan[1], FAN Yang-yang[1],
GUO Qing-fa[2], LU Shou-ping[2], BU Xun[1]
([1]*Bio-Tech Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences/ Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100*; [2]*Maize Research Institute, Shandong Academy of Agricultural Sciences/ National Engineering Laboratory of Wheat and Maize/State Key Laboratory of the Ministry of Agriculture on Corn Biological and Genetic Breeding in the Northern of Huang Huai Plain, Jinan 250100*)

Abstract: Using automatic DNA analyzer multiple SSR-PCR fluorescent marker detection technology, we analyzed the genetic diversity of 259 maize germplasms and 11 kind of inbred lines through core 50 standard test simple sequence repeat loci which cover whole genome. Among 50 SSRs, the total allele No. was 214 for 270 inbred lines. The average of the gene diversity and *PIC* was 0.50 and 0.44, respectively. The 270 lines could be divided into 3 groups by UPGMA clustering method. Furthermore, we analysis the numerical value of heterosis group, in order to make clear the application of germplasm resources. The results in this study could provide the genetic basis for improving the efficiency of hybrid breeding.

Key words: maize (*Zea mays* L.) germplasms; SSR-PCR fluorescent marker; genetic diversity

玉米是我国重要的粮食作物之一,提高玉米品种的产量和品质,保障国家粮食安全,满足我国社会经济发展的需求,是玉米产业发展面临的重大课题。目前我国的玉米育种水平远远落后于美国等发达国家,单纯依靠传统的育种技术已经远不能满足玉米产业发展的需求。

收稿日期:2016-03-05　**修回日期**:2016-04-27　**网络出版日期**:2016-12-14
URL:http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20161214.1007.012.html
基金项目:国家玉米产业体系项目(CARS-02-06);山东省农业良种工程项目(2014);公益性行业(农业)科研专项经费项目(201303002);山东省农业科学院农业科技创新工程(CXGC2016A11);山东省中青年科学家科研奖励基金项目(BS2013SW003)
第一作者研究方向为玉米杂种优势研究。E-mail:zhquanfang@163.com
通信作者:鲁守平,研究方向为玉米遗传育种。E-mail:Lspinglsp@126.com
步迅,研究方向为分子生物学。E-mail:sherry6423@126.com

分子标记技术是现代作物育种的重要工具,利用分子标记技术分析玉米自交系的遗传多样性和类群间遗传关系可为改良玉米自交系和确定杂种优势模式提供参考,利用 SSR 标记和适合的代表自交系可以有效地将不同来源的玉米自交系划分到相应的种质类群,对划分玉米杂种优势群有重要的参考价值[1]。将分子标记研究与实际育种工作相结合,通过分子标记技术,解析自交系群体遗传结构,对提高玉米育种效率具有重要的意义[2]。SSR 标记具有共显性、高度重复性、多态性好、稳定可靠以及经济方便等优点,已经被广泛应用于玉米种质的遗传变异研究[3]。利用 SSR 标记可以划分不同来源自交系的类群,同时可以预测自交系间的杂优强度,为田间育种提供参考,缩短育种周期。传统 SSR 标记用 PAGE 胶分离银染检测法具有操作复杂、周期长、准确度低并且收集数据工作量大、分析量小等缺点,已远远满足不了现代分子设计育种的要求。基于全自动 DNA 分析仪的 SSR 荧光标记技术弥补了传统 SSR 标记的这些缺点,具有操作简单、周期短、通量大、准确率高、数据采集自动化等优点,为数值化大数据分析提供可能。刘晓鑫等[4]对利用荧光 SSR 技术计算自交系混合样本等位基因频率等定量化数据方向进行了探索,C. X. Xie 等[5]基于这项技术对自交系进行了群体结构分析。乔治军等[6]利用覆盖玉米全基因组的 22 对 SSR 引物,对 180 份玉米自交系的亲缘关系进行了分子评价。许洛等[7]利用 116 对 SSR 引物对不同来源的同名玉米骨干自交系的遗传同一性和遗传差异进行了分析。

本研究利用基于全自动 DNA 分析仪的多重 SSR 荧光标记检测技术,对山东省农业科学院玉米所自育和引进的 270 份玉米自交系进行遗传多样性分析,将这些自交系遗传多样性进行数值化,并用 11 个归属于不同杂种优势群的代表性自交系为参照进行群体结构分析,以研究清楚这些自育和引进自交系的亲缘关系和所属杂种优势群,评估育种群体的遗传多样性,为杂交种的选育和自交系的遗传改良提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料共有 270 份自交系,来自于山东省农业科学院玉米所的育种群体,其中自育自交系 193 份,外引自交系 66 份(表 1),代表不同杂种优势群的代表自交系 11 份(表 2)。自育自交系中,引入 PH6WC、PH09B、郑 58 等 Reid 血缘改良的材料 88 份,推测其所属杂种优势群为 SS 群;引入 Mo17、PH4CV、PHPMO 等兰卡斯特血缘的材料 78 份,推测其所属杂种优势群为 NSS 群;另外 27 份材料选自国外杂交种,不能确定其杂种优势群归属。外引自交系中,根据引进的来源系谱,22 份为 NSS 群,19 份为 SS 群,25 份不能确定其杂种优势类群归属。

表 1 259 份试验涉及的玉米自交系信息

Table 1 259 partial maize inbred lines

编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups	编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups
1	6Q85191	自育自交系	SS	14	65868	自育自交系	SS
2	6Q85192	自育自交系	SS	15	65869	自育自交系	SS
3	6Q81431	自育自交系	SS	16	658610	自育自交系	SS
4	6Q81432	自育自交系	SS	17	658611	自育自交系	SS
5	2Q81291	自育自交系	SS	18	658612	自育自交系	SS
6	DK1f	外引自交系	unrelated	19	658613	自育自交系	SS
7	65861	自育自交系	SS	20	658614	自育自交系	SS
8	65862	自育自交系	SS	21	658615	自育自交系	SS
9	65863	自育自交系	SS	22	658616	自育自交系	SS
10	65864	自育自交系	SS	23	658617	自育自交系	SS
11	65865	自育自交系	SS	24	658618	自育自交系	SS
12	65866	自育自交系	SS	25	LH16f	外引自交系	unrelated
13	65867	自育自交系	SS	26	4Q81432	自育自交系	NSS

表 1(续)

编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups	编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups
27	4Q81433	自育自交系	NSS	67	4Q8129-2	自育自交系	NSS
28	4Q81434	自育自交系	NSS	68	4Q8143	自育自交系	NSS
29	4Q81435	自育自交系	NSS	69	P5178	自育自交系	NSS/PB
30	4Q81436	自育自交系	NSS	70	P6319	自育自交系	NSS/PB
31	4Q81437	自育自交系	NSS	71	P56-1	自育自交系	NSS
32	4Q81438	自育自交系	NSS	72	P56-2	自育自交系	NSS
33	4Q81439	自育自交系	NSS	73	P56-3	自育自交系	NSS
34	4Q81440	自育自交系	NSS	74	4Q81432-1	自育自交系	NSS
35	4Q81441	自育自交系	NSS	75	4Q81432-2	自育自交系	NSS
36	4Q81442	自育自交系	NSS	76	4Q81432-3	自育自交系	NSS
37	4Q81443	自育自交系	NSS	77	4Q81432-4	自育自交系	NSS
38	4Q81444	自育自交系	NSS	78	4Q81432-5	自育自交系	NSS
39	4Q81445	自育自交系	NSS	79	4Q81432-6	自育自交系	NSS
40	4Q81446	自育自交系	NSS	80	4Q81432-7	自育自交系	NSS
41	4Q81447	自育自交系	NSS	81	4Q81432-8	自育自交系	NSS
42	4Q81448	自育自交系	NSS	82	4Q81432-9	自育自交系	NSS
43	4Q81449	自育自交系	NSS	83	4Q81432-10	自育自交系	NSS
44	4Q81450	自育自交系	NSS	84	PH6AT	自育自交系	NSS
45	4Q81451	自育自交系	NSS	85	XX658-1	自育自交系	SS
46	178M2-1	自育自交系	PB/SS	86	XX658-2	自育自交系	SS
47	178M2-2	自育自交系	PB/SS	87	XX658-3	自育自交系	SS
48	P4211111	自育自交系	SS	88	XX658-4	自育自交系	SS
49	PM64	自育自交系	NSS	89	XX658-5	自育自交系	SS
50	4Q8143BC2-1	自育自交系	NSS	90	XX658-6	自育自交系	SS
51	4Q8143BC2-2	自育自交系	NSS	91	XX658-7	自育自交系	SS
52	PH56	自育自交系	NSS	92	178M2-3	自育自交系	PB/SS
53	LM88f	外引自交系	unrelated	93	382	外引自交系	NSS
54	4Q8442BC2	自育自交系	NSS	94	LX6558	自育自交系	SS
55	4Q8143BC1	自育自交系	NSS	95	50036	自育自交系	SS
56	4Q8442BC1	自育自交系	NSS	96	K5161	外引自交系	unrelated
57	4Q8143P2-1	自育自交系	NSS	97	XD28m	外引自交系	SS
58	4Q8143P2-1	自育自交系	NSS	98	M2309	自育自交系	SS
59	SUC72	自育自交系	SPT	99	M22V	自育自交系	SS
60	LX42114	自育自交系	SPT/NSS	100	C986	外引自交系	unrelated
61	LX42113	自育自交系	SPT/NSS	101	6Q8519-1	自育自交系	SS
62	4Q8122-1	自育自交系	NSS	102	58MQ319	自育自交系	SS
63	4Q8122-2	自育自交系	NSS	103	58ML001	自育自交系	SS
64	4Q8126-1	自育自交系	NSS	104	6L028	自育自交系	SS
65	4Q8126-2	自育自交系	NSS	105	6L028-1	自育自交系	SS
66	4Q8129-1	自育自交系	NSS	106	31896M	自育自交系	SS

表 1(续)

编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups	编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups
107	DMY01	外引自交系	unrelated	147	9058B	自育自交系	SS
108	4Q8442-1	自育自交系	NSS	148	M3192	自育自交系	SS
109	178M2-4	自育自交系	PB/SS	149	3189M	自育自交系	SS
110	178M2-5	自育自交系	PB/SS	150	LX001M	自育自交系	SS
111	6Q8442-6	自育自交系	SS	151	M1786	自育自交系	SS
112	6Q8143	自育自交系	SS	152	D516M-1	自育自交系	unrelated
113	P24121	自育自交系	SS	153	D517-1	自育自交系	unrelated
114	P42121	自育自交系	SS	154	D517-2	自育自交系	unrelated
115	14J1454	自育自交系	SS	155	D517-3	自育自交系	unrelated
116	14J1455	自育自交系	SS	156	D516M-2	自育自交系	unrelated
117	14J1456	自育自交系	SPT	157	D516M-3	自育自交系	unrelated
118	6Q8778	自育自交系	SS	158	D516M-4	自育自交系	unrelated
119	P413*2	自育自交系	SS	159	D516M-5	自育自交系	unrelated
120	P413*41	自育自交系	SS	160	D516M-6	自育自交系	unrelated
121	P42121	自育自交系	SS	161	D516M-7	自育自交系	unrelated
122	P14-2221	自育自交系	SS	162	D516M-8	自育自交系	unrelated
123	LH150	外引自交系	unrelated	163	D516M-9	自育自交系	unrelated
124	T77	外引自交系	NSS	164	D516M-10	自育自交系	unrelated
125	X2114-1	自育自交系	NSS	165	DK1m	外引自交系	unrelated
126	S2776	自育自交系	NSS	166	DK3m	外引自交系	unrelated
127	4Q8442-2	自育自交系	NSS	167	M0113	外引自交系	unrelated
128	4Q8442-3	自育自交系	NSS	168	KW12	自育自交系	unrelated
129	K1-4	自育自交系	unrelated	169	3564f	自育自交系	unrelated
130	14J1469	自育自交系	NSS	170	J3564f	自育自交系	unrelated
131	G670-1	自育自交系	SS	171	GYZ01	自育自交系	unrelated
132	WY6	自育自交系	SS	172	957f	自育自交系	unrelated
133	6P245-11	自育自交系	SS	173	1568m	自育自交系	unrelated
134	6P2211	自育自交系	SS	174	XX043	外引自交系	NSS
135	6P81511	自育自交系	SS	175	Lx51541	自育自交系	NSS
136	XY1144-1	自育自交系	unrelated	176	Lx51542	自育自交系	NSS
137	XY1144-2	自育自交系	unrelated	177	LH35	外引自交系	NSS
138	MLX001-1	自育自交系	SS	178	GZ4CV	自育自交系	NSS
139	MLX001-2	自育自交系	SS	179	H124	自育自交系	NSS
140	6Q8126B2	自育自交系	SS	180	H654	自育自交系	NSS
141	6Q8129B2-1	自育自交系	SS	181	H134	自育自交系	NSS
142	6Q8129B2-2	自育自交系	SS	182	H244	自育自交系	NSS
143	Z58M2-1	自育自交系	SS	183	H94	自育自交系	NSS
144	Z58M2-2	自育自交系	SS	184	NH101	自育自交系	NSS
145	6LX02-4	自育自交系	SS	185	K239	外引自交系	NSS
146	6LX02-4M	自育自交系	SS	186	GYZ02	外引自交系	NSS

表 1(续)

编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups	编号 Code	自交系 Inbred lines	来源 Source	杂交优势类群 Heterotic groups
187	SN085f	外引自交系	NSS	224	X46m-1	外引自交系	SS
188	M11-2	外引自交系	NSS	225	X46m-2	外引自交系	SS
189	M14-2	外引自交系	NSS	226	X45m-1	外引自交系	SS
190	M16-3	外引自交系	NSS	227	X45m-2	自育自交系	SS
191	M27	外引自交系	NSS	228	X45m-3	自育自交系	SS
192	M56	外引自交系	NSS	229	X688M	外引自交系	SS
193	M63	外引自交系	NSS	230	X252M	外引自交系	SS
194	M76	外引自交系	NSS	231	X45F	外引自交系	NSS
195	M78	外引自交系	NSS	232	X688F-1	外引自交系	NSS
196	LH119	外引自交系	unrelated	233	X688F-2	外引自交系	NSS
197	09B	外引自交系	SS	234	X696F-1	外引自交系	NSS
198	3564M	外引自交系	unrelated	235	X696F-2	外引自交系	NSS
199	KA061	外引自交系	SS	236	3375F-1	外引自交系	NSS
200	KA062	外引自交系	SS	237	3375F-2	外引自交系	NSS
201	LH81	外引自交系	unrelated	238	铁 98033	外引自交系	unrelated
202	KA063	外引自交系	unrelated	239	铁 0102	外引自交系	unrelated
203	3372	自育自交系	SS	240	SN085M	外引自交系	unrelated
204	33M	外引自交系	unrelated	241	LH2144	自育自交系	unrelated
205	12RD	外引自交系	unrelated	242	郑 R311	外引自交系	unrelated
206	H506	自育自交系	SS	243	WK702-1	自育自交系	NSS
207	2Q319	自育自交系	SS	244	WK702-2	自育自交系	NSS
208	09b30	自育自交系	SS	245	WK702-3	自育自交系	NSS
209	LS118-1	外引自交系	SS	246	WK702-4	自育自交系	NSS
210	LS118-2	外引自交系	SS	247	MT02	自育自交系	NSS
211	LS118-3	外引自交系	SS	248	MT04	自育自交系	NSS
212	LS118-4	自育自交系	SS	249	XZD04	外引自交系	unrelated
213	MS6WC	外引自交系	SS	250	XZD03	外引自交系	unrelated
214	MZX－01	自育自交系	unrelated	251	XZD02	外引自交系	unrelated
215	12WY1	外引自交系	unrelated	252	XZD01	外引自交系	unrelated
216	12WY2	外引自交系	unrelated	253	6S121	自育自交系	SS
217	B4R ZGB3	自育自交系	SS	254	2807	自育自交系	SS
218	B4H ZGB3	自育自交系	SS	255	XX136	自育自交系	SS
219	XFP1-1	外引自交系	SS	256	ZC7-2	自育自交系	NSS
220	XFP1-2	外引自交系	SS	257	ZC7-3	自育自交系	unrelated
221	XFP1-3	外引自交系	SS	258	QZ58319	自育自交系	unrelated
222	XFP1-4	外引自交系	SS	259	LX8147	自育自交系	unrelated
223	696m	外引自交系	SS				

表 2 11 份不同杂种优势类群的代表自交系

Table 2 11 typical inbred lines of different heterotic groups

自交系 Inbred lines	类群 Group
PH4CV	兰卡斯特
T917	兰卡斯特
Mo17	兰卡斯特
昌 7-2	塘四平头
黄早 4	塘四平头
Lx03-2	塘四平头
Lx2111	塘四平头
Z121	塘四平头
PH6WC	Reid
H318	PB
齐 319	PB

1.2 SSR 荧光引物与基因型鉴定

所用引物参照刘晓鑫等[4]筛选出的 50 对均匀分布于全基因组的核心 SSR 标记引物,这些引物的多态性、稳定性、重复性等综合特性好,引物的 5′端分别用 FAM、HEX、TET 和 TAMRA 等荧光染料标记,不同颜色荧光标记引物扩增产物相组合,以 ROX500 为内标,进行毛细管电泳五重荧光检测,测得的所有扩增产物峰型电泳图谱,用于后续的数据分析。引物序列信息参见 MaizeGDB 数据库(http://www.maizegdb.org/ssr.php)。

1.3 方法

1.3.1 基因组 DNA 的提取、纯化和检测 供试材料于 2015 年 4 月在山东省农业科学院玉米研究所章丘基地育苗,2015 年 5 月采用混合取样法,从每个自交系种植群体中选取 10 个单株,每个单株统一叶位取 1 g 叶片,组成 1 个混合样本,置于 -20 ℃冰箱保存。

采用 CTAB 结合 Glass Milk 法提取玉米基因组 DNA,将新鲜材料的叶片剪碎,加到已放有钢珠的 2 mL 灭菌离心管中,液氮速冻,振荡粉碎叶片。加 65 ℃预热的 CTAB 提取液 600 ~ 700 mL,迅速摇匀;65 ℃水浴锅水浴 10 ~ 20 min;8000 r/min 离心 10 min,将上清液转到新的 1.5 mL 的离心管中。加入 3 ~ 5 μL Glass Milk 和 600 μL DNA Binding Buffer(6 mol/L NaCl),充分混匀,65 ℃水浴 15 min;室温放置 5 min 后 4000 r/min 离心 1 min,弃上清液;加入 500 μL 无水乙醇,洗涤,8000 r/min 离心 1 min,弃上清液,室温干燥;加入 100 μL TE(pH 7.0)70 ℃ 水浴 5 min 溶解基因组 DNA,离心后将上清液转移至新的离心管中,-20 ℃保存。使用 Merinton SMA1000 Nanodrop 分光光度计检测 DNA 浓度及纯度,保证 OD_{260}/OD_{280} 值≥1.8,浓度≥20 ng/μL,同时分别取 2 μL 进行琼脂糖凝胶电泳检测基因组 DNA 完整性。

1.3.2 PCR 扩增与产物多重荧光检测 采用 25 μL 的 PCR 扩增反应体系,其中含 10 × PCR Buffer(含 2 mmol/L Mg^{2+})2.5 μL、2.5 mmol/L dNTP 2 μL、5 U *Taq* 酶 0.2 μL、5 μmol/L 正反向引物各 1 μL,DNA 模板 2 μL,超纯水 16.3 μL。取 20 μL ROX500 内标加入 980 μL 去离子甲酰胺内,涡旋混匀,离心,按 10 μL/孔分装至新的 96 孔板内,取 1 ~ 2 μL PCR 产物对应的加入各孔中,3000 r/min 离心 1 min;于 PCR 仪上 95 ℃变性 5 min,立即置于冰上。

在 ABI 3730XL DNA 遗传分析仪上进行荧光毛细管电泳;50 cm 毛细管,使用 POP7 液体分离胶,15 kV 预电泳 18 s,待毛细管洗涤完毕后,15 kV 电泳 28 min。并使用 DNA Collection Software 软件收集原始数据。引物和荧光标记、Tag DNA 聚合酶和 dNTP 等试剂购自上海生工生物技术有限公司,POP7 液体分离胶均购于美国应用生物系统(Applied Biosystems)中国代理公司。

1.3.3 数据统计和分析方法 利用 GeneMapperV3.2 分析软件进行图像分析与数据收集。利用 PowerMarker V3.25 软件分析统计每对引物的等位基因个数、基因型个数、等位基因频率和多态性信息量(*PIC*),标记系数(MI, marker index)按公式 MI = Allele × *PIC* 计算,Allele 为该引物的等位基因数。利用 Structure V2.3.4 软件进行类群划分,研究材料的类群个数通过 ΔK 确定[8],并且画出基于模型的群体遗传结构图,计算各自交系的 Q 值(第 i 自交系其基因组变异源于第 k 群体的概率)。利用 PowerMarker V3.25 软件计算各自交系间的遗传相似系数(GS, genetic similarity),并按照非加权组平均法(UPGMA, unweight pair group method using arithmetic averages)进行聚类分析并绘制 270 份材料的亲缘关系树状图。

2 结果与分析

2.1 多重多色 SSR 荧光标记分析

根据 50 对 SSR 标记引物扩增条件和目的片段大小,分别进行两重、三重及四重组合(图 1),分别用 TET、FAM、HEX 和 TAMRA 荧光标记引物,图中 TET(绿色)标记共 3 对引物,片段大小分别为 84.36 bp、129.11 bp 和 165.63 bp;FAM(蓝色)标记共 2 对引物,片段大小分别为 96.99 bp 和 186.40 bp;HEX(黑色)标记共 2 对引物,片段大小分别为 124.09 bp 和 161.66 bp;TAMRA(红色)标记共 1 对引物,片段大小

为 163.15 bp;使用 ROX500(橙色)做为内标,片段大小分别为 75 bp、100 bp、139 bp、150 bp、160 bp 和 200 bp 等。多重 PCR 扩增条件与单重 PCR 完全相同。50 对引物按照片段大小分为 4 组,其中 phi331888(FAM)、phi024(FAM)和 umc1143(HEX)等 8 对引物为第 1 组,umc1124(FAM)、phi127(FAM)和 nc133(FAM)等 14 对引物为第 2 组,phi015(FAM)、phi053(FAM)、phi079(FAM)和 umc1277(FAM)等 15 对引物为第 3 组,phi050(FAM)、phi113(FAM)和 phi065(FAM)等 13 对引物为第 4 组(表 3)。

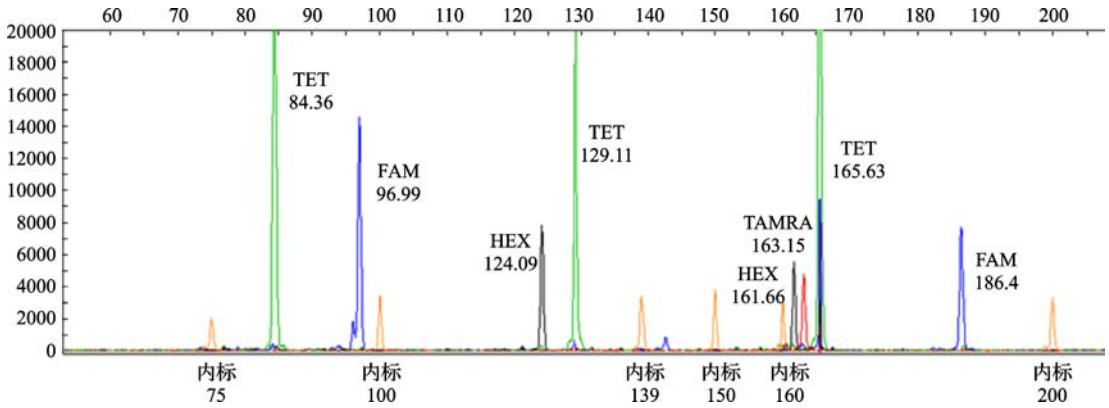


图 1　四重五色荧光 SSR 标记检测图

Fig. 1　The detection of four-multiple five colors fluorescent SSR markers

表 3　50 对 SSR 标记引物分组

Table 3　The grouping of 50 SSR molecular markers

组合 Combination	引物 Primer	扩增范围 Amplification range	标记荧光 Labeled fluorescence	组合 Combination	引物 Primer	扩增范围 Amplification range	标记荧光 Labeled fluorescence
1—1	phi331888	95-107	FAM	3—1	umc1277	280-288	FAM
1—1	phi024	182-194	FAM	3—2	phi064	109-141	HEX
1—2	umc1143	113-128	HEX	3—2	phi112	166-192	HEX
1—2	phi308707	149-176	HEX	3—2	phi011	233-266	HEX
1—3	phi121	84-87	TET	3—2	phi115	328-352	HEX
1—3	phi423796	123-133	TET	3—3	phi328175	127-168	TET
1—3	phi109188	160-184	TET	3—3	umc1152	226-246	TET
1—4	phi233376	162-177	TAMRA	3—3	phi057	300-312	TET
2—1	umc1124	107-115	FAM	3—3	phi420701	326-341	TET
2—1	phi127	149-165	FAM	3—4	umc1153	136-148	TAMRA
2—1	nc133	194-197	FAM	3—4	phi448880	206-227	TAMRA
2—1	phi029	304-316	FAM	3—4	phi085	272-297	TAMRA
2—2	phi006	119-134	HEX	4—1	phi050	113-121	FAM
2—2	phi102228	160-172	HEX	4—1	phi113	157-329	FAM
2—2	phi056	275-293	HEX	4—1	phi065	437-457	FAM
2—2	phi227562	348-363	HEX	4—2	phi059	120-126	HEX
2—3	umc1061	131-146	TET	4—2	phi108411	147-167	HEX
2—3	phi047	168-183	TET	4—2	phi084	188-197	HEX
2—3	phi96100	304-332	TET	4—2	phi046	250-260	HEX
2—3	phi072	451-471	TET	4—3	phi089	133-149	TET
2—4	phi116	189-210	TAMRA	4—3	phi027	176-196	TET
2—4	phi041	234-254	TAMRA	4—3	phi014	239-257	TET
3—1	phi015	119-143	FAM	4—3	umc1196	312-330	TET
3—1	phi053	199-227	FAM	4—4	umc1399	146-162	TAMRA
3—1	phi079	213-228	FAM	4—4	phi087	180-207	TAMRA

2.2 270 份玉米自交系遗传多样性分析

使用 50 对 SSR 引物对包括 11 份代表自交系在内的 270 份玉米自交系进行荧光毛细管电泳扩增,共检出 214 个等位基因变异,每对引物检测出 2 ~ 8 个等位变异,平均每个位点 4.28 个。片段大小在 84 ~ 471 bp 之间。50 对 SSR 引物中 phi064 和 phi015 的等位基因变异最丰富(8 个);nc133、phi014、phi046、phi059、phi089、phi121 和 phi115 的等位变异频率最低(2 个)。50 对 SSR 引物的基因多态性指数(gene diversity)的变化范围在 0.06 ~ 0.82 之间,平均值为 0.50。每个 SSR 的多态性信息量(*PIC*)的变化为 0.06 ~ 0.80,平均多态性信息量为 0.44,其中 nc133 最小,为 0.06;phi064 最大,为 0.80。标记指数 MI 范围在 0.12 ~ 6.41 之间,平均值为 2.01。具体信息见表 4。

表 4 50 对引物在 270 份自交系之间的扩增片段数目、等位基因数目、基因多样性、多态性信息量和标记指数

Table 4 Distribution of the 50 SSRs loci in the chromosome bin, allele numbers, *PIC* value and MI in 270 maize inbred lines.

SSR 引物 SSR Primer	基因多样性 Gene diversity	等位基因数 Allele No.	多态性信息含量 *PIC*	标记指数 MI
nc133	0.06	2	0.06	0.12
phi014	0.13	2	0.12	0.24
phi089	0.19	2	0.17	0.35
phi059	0.38	2	0.31	0.61
phi112	0.12	6	0.11	0.68
phi046	0.49	2	0.37	0.74
phi121	0.50	2	0.37	0.75
phi115	0.50	2	0.37	0.75
phi423796	0.32	3	0.30	0.90
phi087	0.25	4	0.24	0.95
umc1061	0.46	3	0.36	1.09
phi108411	0.32	4	0.30	1.19
phi072	0.32	4	0.31	1.23
phi050	0.47	3	0.42	1.25
phi085	0.37	4	0.34	1.37
phi233376	0.38	4	0.35	1.39
umc1277	0.45	4	0.37	1.49
umc1143	0.45	4	0.38	1.52
phi079	0.50	4	0.38	1.54
phi053	0.59	3	0.51	1.54
phi084	0.51	4	0.39	1.56
phi102228	0.51	4	0.41	1.64
phi448880	0.50	4	0.42	1.68
phi029	0.63	3	0.56	1.69
umc1124	0.55	4	0.44	1.78
phi127	0.54	4	0.48	1.93
phi227562	0.42	5	0.40	1.98
phi011	0.42	5	0.40	1.98
umc1399	0.51	5	0.41	2.03
phi331888	0.59	4	0.53	2.13
phi065	0.61	4	0.54	2.14
phi047	0.58	4	0.54	2.16
umc1196	0.66	4	0.59	2.37
phi109188	0.48	6	0.41	2.47
umc1153	0.68	4	0.62	2.48

表 4(续)

SSR 引物 SSR Primer	基因多样性 Gene diversity	等位基因数 Allele No.	多态性信息含量 *PIC*	标记指数 MI
phi027	0. 56	5	0. 50	2. 52
phi116	0. 59	5	0. 51	2. 57
phi420701	0. 59	5	0. 51	2. 57
phi056	0. 61	5	0. 54	2. 68
phi113	0. 63	5	0. 57	2. 83
phi057	0. 52	6	0. 47	2. 83
phi308707	0. 64	5	0. 58	2. 89
phi024	0. 66	5	0. 60	2. 98
phi041	0. 55	6	0. 50	3. 02
phi96100	0. 69	5	0. 64	3. 21
phi328175	0. 63	6	0. 56	3. 36
umc1152	0. 63	6	0. 58	3. 46
phi006	0. 78	6	0. 74	4. 44
phi015	0. 67	8	0. 61	4. 87
phi064	0. 82	8	0. 80	6. 41
平均 Mean	0. 50	4. 28	0. 44	2. 01

2. 3　270 份玉米自交系遗传结构分析及聚类分析

利用 Structure2. 3. 4 软件对 270 个玉米自交系进行群体遗传结构分析,当类群数(K 值)在 1 ~ 10 之间变化(运行 20 次)时,ΔK 值在 $K = 3$ 时出现明显峰值(图 2),表明 270 份(包含 11 份代表自交系)自交系可以划分为 3 个类群。根据各类群所含代表自交系及所含样本的系谱信息确定 3 个类群分别为 NSS-1、NSS-2 和 Reid 群(图 3),根据各类群属性比率,即基于 50 个 SSR 标记所揭示的自交系的遗传组分在各类群上的分布百分比,≥50% 的遗传组分称为类群属性比率,<50% 的遗传组分称为非类群属性比率,其中 71 份被划分到 NSS-1 群,占样本总数的 29. 30%,以 Mo17、黄早四、昌 7-2 和齐 319 为代表系;79 份被划分到 NSS-2 群,占样本总数的 29. 26%,以 PH4CV 为代表系;87 份被划分到 SS 群,占样本总数的 32. 22%,以 PH6WC 为代表系。另外,剩余 33 份样本分群不明确,占总数的 12. 22%。部分自交系的 Q 矩阵及系谱来源信息见表 5。

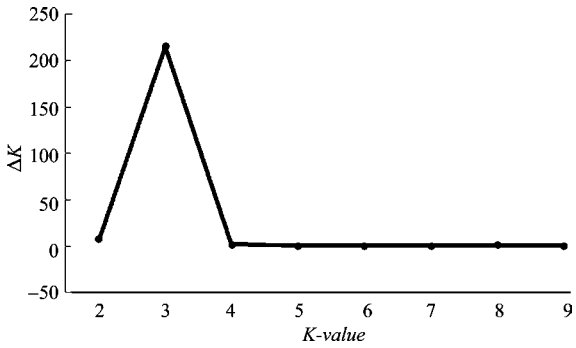


图 2　ΔK 的变化曲线图

图 2　Change curve in the log probability of data between successive *K*-values(ΔK)

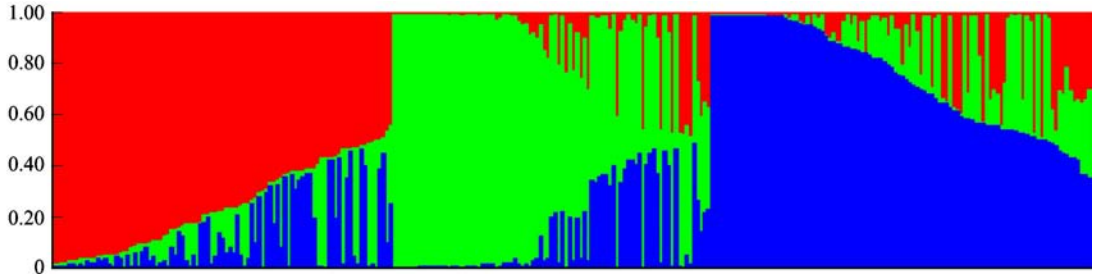


图 3　270 个玉米自交系群体的遗传结构

Fig. 3　Genetic structure of 270 maize inbred lines

表 5 部分自交系的 Q 矩阵及数值化杂种优势群分析

Table 5 Qmatrices of the lines and the analysis of numerical heterotic groups of partial maize inbred lines

编号 Code	NSS1	NSS2	SS	来源 Source	原推测杂交群 Original hybrid group
27	0.005	0.99	0.006	自育自交系	NSS
29	0.004	0.988	0.008	自育自交系	NSS
30	0.004	0.989	0.007	自育自交系	NSS
32	0.004	0.987	0.009	自育自交系	NSS
35	0.004	0.988	0.007	自育自交系	NSS
36	0.005	0.990	0.006	自育自交系	NSS
37	0.004	0.991	0.005	自育自交系	NSS
38	0.004	0.991	0.005	自育自交系	NSS
44	0.004	0.987	0.009	自育自交系	NSS
45	0.004	0.988	0.008	自育自交系	NSS
48	0.017	0.011	0.972	自育自交系	SS
51	0.006	0.989	0.005	自育自交系	NSS
55	0.006	0.989	0.005	自育自交系	NSS
74	0.007	0.061	0.932	自育自交系	NSS
86	0.007	0.024	0.969	自育自交系	SS
87	0.006	0.047	0.947	自育自交系	SS
88	0.006	0.026	0.968	自育自交系	SS
89	0.019	0.042	0.940	自育自交系	SS
107	0.964	0.018	0.018	外引自交系	unrelated
114	0.041	0.006	0.954	自育自交系	SS
119	0.010	0.037	0.953	自育自交系	SS
120	0.007	0.005	0.988	自育自交系	SS
134	0.043	0.006	0.952	自育自交系	SS
141	0.005	0.006	0.989	自育自交系	SS
143	0.031	0.010	0.959	自育自交系	SS
144	0.005	0.010	0.984	自育自交系	SS
163	0.959	0.009	0.032	自育自交系	unrelated
167	0.966	0.022	0.012	外引自交系	unrelated
190	0.959	0.015	0.025	外引自交系	NSS
208	0.009	0.004	0.988	自育自交系	SS
223	0.005	0.005	0.990	外引自交系	SS

2.4 270 份自交系遗传距离聚类分析

利用 PowerMarker V3.25 软件分析 270 份参试材料检测到的 214 个等位基因,根据代表自交系,将 270 个材料划分为 7 个组群(图 4),即以 Mo17 为代表的兰卡斯特群,包括 9 份样本,占样本总数的 3.33%;以 PH6WC 为代表的 Reid 群,包括 144 份,占样本总数的 53.33%,以齐 319 为代表代表的 PB 群,包括 8 份,占样本总数的 2.96%;以黄早四和昌 7-2 为代表的塘四平头群,包括 14 份样本,占样本总数的 5.19%;以 PH4CV 为代表的 PH4CV 群,包括 71 份样本,占样本总数的 26.30%。还有 24 份材料可以划分到 2 个未知群,占样本总数的 8.89%。

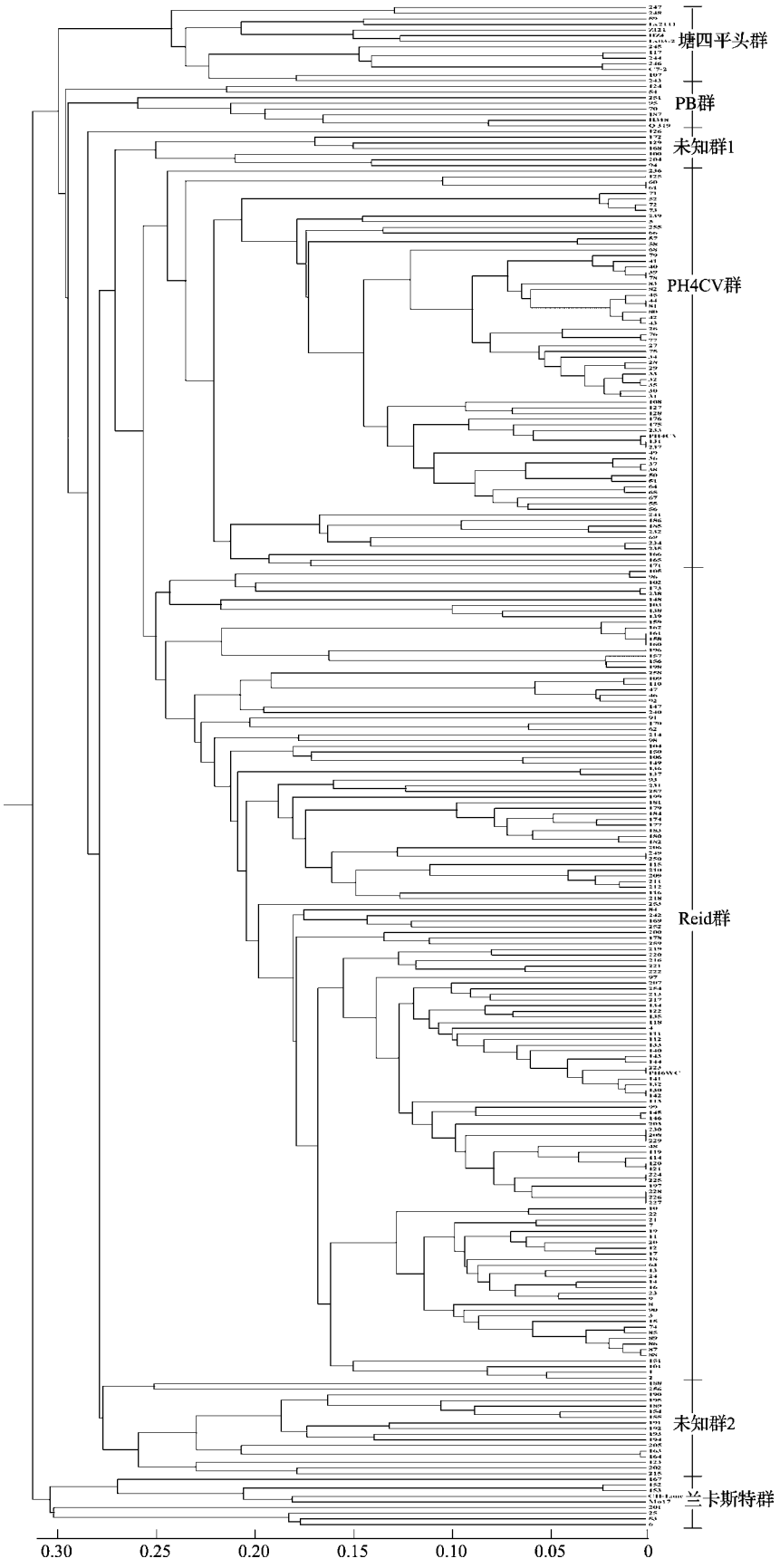


图 4　270 份玉米自交系 SSR 标记遗传距离聚类图

Fig. 4　Dendrogram of 270 maize inbred lines clustered by SSRs

2.4 类群划分不一致和系谱信息不明确的自交系解析

根据材料培育、引进的来源以及育种经验,推测 270 份样本的类群属性,但是也有部分样本类群属性不明确。本研究通过 50 对均匀分布于玉米染色体上的 SSR 引物,对 270 份玉米自交系进行聚类分析,在 $K=3$ 时,有 174 份材料与推测类群归属信息一致,有 27 份材料与推测类群归属不一致,44 份推测类群为不能确定的材料被划分到相应的类群,27 份材料在聚类分析中与已知类群不一致,13 份材料仍然不能确定其所属类群。具体信息见表 6。

表 6 270 份玉米自交系推测归属类群和聚类归属类群

Table 6 The groups of supposed and clustered for 270 maize inbred lines

编号 Code	类群 Group	推测归属类群样本数 Number of sample in deduced-groups	聚类归属类群样本数 Number of sample in cluster-groups	一致归属类群样本数 Number of consistent samples
1	NSS(NSS、SPT/NSS、SPT)	100	151	91
2	SS(PB/SS、SS)	107	87	75
3	unrelated	52	21	8

3 讨论

3.1 方法论-多重 SSR 荧光标记法

刘晓鑫[9]首次提出运用 SSR 荧光标记技术分析玉米群体混合样本基因频率的方法,并利用此技术分析了 96 份国内外玉米地方群体的遗传多样性,同时对多重 PCR(multiplex PCR)SSR 荧光检测方法的效率进行了验证。此后,雍洪军等[10]应用此技术进行了大量玉米自交系遗传多样性研究,且对群体结构进行了分析。王凤格等[11]对玉米数据库 MaizeGDB 上公布的 1900 个玉米 SSR 引物进行筛选,并建立了一套适合于毛细管五色荧光检测系统的高通量多重 PCR 复合扩增体系。本研究将 50 对 SSR 引物中的部分引物进行荧光标记,结合 M13 末端标记技术,只需要荧光标记 M13 通用引物,特异性引物无需标记,大大节约试验成本。使用 ABI 3730XL DNA 分析仪可分辨一个碱基的差异,并能完成同一泳道 5 种荧光标记(包括内标)的检测,显著提高了检测的准确性和效率。

虽然荧光 SSR 标记毛细管电泳技术较 PAGE 凝胶电泳方法更灵敏、准确和高效,但是也会产生检测噪音影响结果准确性。我们前期首先通过对大量玉米自交系的反复试验验证和综合分析,建立了包含所有 SSR 标记位点的标准 panel 和 bin;其次,在每板 PCR 中均加入同一代表自交系和一个阴性对照,分别排除噪音误差和试验中污染;最后,将代表自交系的所有特异峰微调至 bin 的中心区域,按照调整后的 bin 对待测样本进行判读,以排除判读误差。

3.2 自交系遗传结构分析

随着分子标记技术的快速发展,RAPD[12]、RFLP[13-14]、AFLP 和 SSR[15-17]标记分别被用来研究玉米自交系的遗传多样性,经过大量试验证明,SSR 标记最适合进行玉米种质的遗传多样性分析[18-22]。前人研究表明,模型结构聚类和遗传距离聚类法均可用于玉米自交系间遗传差异的分析,并能把来源不明的自交系划分到相应的类群。针对两种聚类方法的优劣,吴承来等[2]详细评价了二者的适用性,发现模型结构聚类法更适合于玉米自交系遗传关系的研究。

张世煌[23]提出两向分群育种策略,即杂种优势群的划分尽量向两群靠拢最终归纳为 NSS 和 SS 两个杂种优势群。近年来,大量针对国内玉米自交系遗传多样性的分析也发现了类似的结果,如赵旭等[24]将 106 份玉米自交系划分为 6 个杂种优势群,合并后为 SS(旅大红骨、PA、Reid)和 NSS(PB、四平头、Lancaster)两大种质类群。对于本研究而言,将 270 份核心自交系看作未知材料,模型结构聚类中 ΔK 在 $K=3$ 时出现明显峰值,根据代表品系位置,分别定义为 NSS-1、NSS-2 和 Reid 群。但是结合常用代表自交系的位置和前人的研究结果,可以将 NSS-1 和 NSS-2 合并成一个 NSS 类群,将 Reid 群归为 SS 群。

3.3 自交系系谱数值化及应用

本研究中使用的自交系来源比较复杂,通过遗传结构解析,可进一步对所研究的自交系进行数值化分析,以明确其所属杂种优势类群。有些材料系谱来源比较清晰,如试验涉及的育种群体中 7 号、9 号、43 号、51 号自交系等为 PH6WC、PH4CV 的一些派生系,以及国家玉米产业技术体系引进的自交系如 107 号、167 号等自交系,通过分子标记对其杂种

优势群归属进行数值化分析,可明显地聚到相应的类群中,在使用时可遵循“群内选系,群间组配”的原则,有利于提高循环育种的效率;有些自交系尽管来源清楚,如 163 号和 164 号自交系,但由于引入了一些中间类型的自交系,或者来源不清的自交系,在后代选择时,出现分离和变异,造成分子标记聚类时与推断的类群不一致,有些处于中间类群,有些甚至分到对向的类群中,对于这些自交系,可根据田间考察的性状和分子标记的结果,慎重选择,通过近亲回交继续向“两边推”;而对于一些优良杂交种选系,如 111 号、115 号、201 号等自交系,由于是 SS × NSS 中间类型自交,后代选择过程中出现偏分离,所以部分后代偏向于 SS 方向,部分后代偏向于 NSS 方向,还有部分为中间类型如 112 号自交系,育种者对其利用方向很难把握,通过分子标记数值化杂优类群分析,可明确其利用方向;还有部分自交系,如 5 号、22 号及 131 号自交系,尽管系谱来源表明其为 SS 类型,但通过分子标记分析,其归属于 NSS 杂种优势群,有可能在引入过程中标识出错,窜粉或者取样出现问题,对于这些种质材料,可根据数值化杂种优势分析的结果以及其田间性状表现,选择所需要的性状进行利用,与现有类群的骨干自交系进行组配基础材料选系或者组配杂交组合。

4　结论

应用 SSR 标记对 270 份玉米自交系的遗传多样性进行分析,通过模型聚类和遗传距离聚类综合分析,可对 270 份玉米自交系进行较准确的类群划分,SSR 引物部分荧光标记结合 M13 末端标记技术可大大节约试验成本,并且能够有效的提高检测效率和准确性。通过分子标记进行数值化杂种优势群分析,可进一步明确所用种质资源的杂优类群利用方向,为玉米新种质的创制和玉米新品种的选育提供理论依据。

参考文献

[1] 杨文鹏,关琦,杨留启,等. 贵州 70 份玉米自交系的 SSR 标记遗传多样性及其杂种优势群分析[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):241-248

[2] 吴承来,张倩倩,董炳雪,等. 我国部分玉米自交系遗传关系和遗传结构解析[J]. 作物学报,2010,36(11):1820-1831

[3] 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

[4] 刘晓鑫,谢传晓,赵琦,等. 基于 SSR 荧光标记技术的玉米群体混合样本基因频率分析方法[J]. 中国农业科学,2008,41(12):3991-3998

[5] Xie C X,Zhang S H,Li M H,et al. Inferring Genome Ancestry and Estimating Molecular Relatedness Among 187 Chinese Maize Inbred Lines[J]. Act Geneti Sinic,2007,34(8):738-748

[6] 乔治军,刘龙龙,南晓洁,等. 180 份玉米自交系亲缘关系的分子评价[J]. 植物遗传资源学报,2011,12(2):211-215

[7] 许洛,刘颖慧,石云素,等. 利用 SSR 标记研究不同来源的同名玉米骨干自交系的遗传同一性和遗传差异[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):32-36

[8] Evanno G,Regnaut S,Goudet J. Detecting the number of clusters of individuals using the software structure: A simulation study[J]. Molec Ecol,2005,14:2611-2620

[9] 刘晓鑫. 利用 SSR 荧光标记分析 96 份国内外玉米地方群体的遗传多样性[D]. 乌鲁木齐:新疆农业大学,2007

[10] 雍洪军,张世煌,张德贵,等. 利用 SSR 荧光标记分析 90 个糯玉米地方品种的遗传多样性[J]. 玉米科学,2009,17(1):6-12

[11] 王凤格,赵久然,戴景瑞,等. 玉米通用 SSR 核心引物筛选及高通量多重 PCR 复合扩增体系建立[J]. 科学通报,2006,51(23):2738-2746

[12] 刘新芝,彭泽斌,傅骏骅,等. RAPD 在玉米类群划分研究中的应用[J]. 中国农业科学,1997,30(3):44-51

[13] 李新海,傅骏骅,张世煌,等. 玉米自交系遗传变异的 RFLP 分析[J]. 植物学报,2000,42(11):1156-1161

[14] 袁力行,傅骏骅,张世煌,等. 利用 RFLP 和 SSR 标记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

[15] Lu Y L,Yan J B,Guimaraes C,et al. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms[J]. Theor Appl Genet,2009,120:93-115

[16] Senior M L,Murphy J P,Goodman M M,et al. Utility of SSRs for determining genetic similarities and relationships in maize using an agarosegel system[J]. Crop Sci,1998,38:1088-1098

[17] 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

[18] Li Y,Du J,Wang T Y,et al. Genetic diversity and relationships among Chinese maize inbred lines revealed by SSR markers[J]. Maydica,2002,47:93-101

[19] Lu H,Bernardo R. Molecular marker diversity among current and historical maize inbreds[J]. Theor Appl Genet,2001,103:613-617

[20] 袁力行,傅骏骅,刘新芝,等. 利用分子标记预测玉米杂种优势的研究[J]. 中国农业科学,2000,33(6):6-12

[21] 马延飞,卢新雄,陈晓玲,等. 基于 SSR 标记的 30 份玉米种质遗传完整性分析[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(4):387-391

[22] 王慧,卢有林,孙大鹏,等. 糯玉米种质品质性状鉴定和 SSR 标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(5):800-808

[23] 张世煌. 商业育种只需要两个杂种优势群[J]. 种子科技,2014(7):7-8

[24] 赵旭,方永丰,王汉宁. 玉米 SSR 标记杂优类群划分及群体遗传结构分析[J]. 核农学报,2013,27(12):1828-1838