

120 份欧美玉米自交系的遗传多样性分析

刘海忠, 宋 炜, 王宝强, 王江浩, 张全国, 张动敏, 李兴华, 魏剑锋, 李荣改

(河北省作物遗传育种实验室/河北省农林科学院粮油作物研究所, 石家庄 050035)

摘要: 为了拓宽黄淮海玉米自交系的遗传基础, 加快欧美优异种质的融入与利用, 本研究利用 SSR 分子标记对 120 份来自美国和塞尔维亚及 2 份中国的玉米自交系进行遗传多样性和聚类分析。结果表明: 29 个多态性 SSR 标记共检测到 115 个等位位点, 平均 3.97 个, 位点多态性信息指数 (*PIC*) 平均为 0.50, 较好地揭示了自交系间的遗传多样性; 观测杂合度 (*Ho*) 仅为 0.03, 表明参试自交系遗传稳定、纯合度高; 美国 SS、美国 NSS、塞尔维亚和中国骨干自交系 4 个群之间相比, 美国 NSS 群的等位位点数 (3.55)、Shannon 信息指数 (0.93) 最高, 而塞尔维亚群的有效等位位点数 (2.37) 最高, 表明美国 NSS 和塞尔维亚自交系群比其他两个群遗传多样性高; 4 个自交系群间的遗传距离介于 0.1403 ~ 0.4695 之间, 美国 NSS 群与美国 SS 群、塞尔维亚群之间较小 (0.1419, 0.1403), 与中国骨干自交系群之间最大 (0.4695), 4 个群的遗传一致度介于 0.6253 ~ 0.8691 之间, 美国 NSS 群与美国 SS、塞尔维亚两个群之间的遗传一致度较高, 表明美国与塞尔维亚自交系之间基因交流频繁, 亲缘关系较近; 聚类分析将 122 份玉米自交系分为 9 大主要类群, 美国 SS 种质、NSS 种质自交系被明显的区分开, 并且 SS 种质被分为 2 个主要类群 (I 和 IX), NSS 种质被分为 6 个主要类群 (II-VII), 来自塞尔维亚的材料分散在美国 NSS 种质类群。本研究结果为来自欧美的自交系在玉米育种中合理利用提供可靠依据。

关键词: 玉米; 自交系; SSR 标记; 遗传多样性; 遗传距离

Genetic Diversity Analysis of 120 European and American Maize Inbred Lines

LIU Hai-zhong, SONG Wei, WANG Bao-qiang, WANG Jiang-hao, ZHANG Quan-guo,
ZHANG Dong-min, LI Xing-hua, WEI Jian-feng, LI Rong-gai

(Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Hebei Province/Institute of Cereal and Oil Crops,
Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050035)

Abstract: To increase the genetic diversity of maize inbred lines and accelerate the use of imported elite germplasm resources, 122 maize inbred lines from the United States, Serbia and China were subjected to analyze the genetic diversity and the phylogenetic analysis by using SSR molecular markers. A total of 115 alleles was detected by 29 polymorphic SSR markers, with an average of 3.97 alleles per SSR marker and with an average polymorphic information content (*PIC*) of 0.50, suggesting relatively high genetic diversity within this population. The observed heterozygosity (*Ho*) was 0.03 indicating the high genetic stability and homozygosity. Within sub-populations, the allele number (3.55) and Shannon's information index (0.93) in the American NSS group were the highest and the number of effective alleles (2.37) in the Serbs group was the highest that suggested higher genetic diversity in groups of American NSS and Serbs, in contrast to the other two groups. The genetic distances among the four groups ranged from 0.1403 to 0.4695 with being the largest genetic distance between American NSS and Chinese inbred lines and with being relatively smaller (0.1419, 0.1403) between American NSS and American SS or Serbs. The genetic consistency

收稿日期: 2017-12-21 修回日期: 2018-01-21 网络出版日期: 2018-05-18

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180517.1436.003.html>

基金项目: 国家重大研发计划项目 (2016YFD0101205-6); 国家玉米产业技术体系专项资金项目 (CARS-02-58); 河北省重点研发计划项目 (16226323D)

第一作者研究方向为玉米遗传育种和栽培。E-mail: lhz62@sina.com

通信作者: 李荣改, 研究方向为玉米分子生物学和遗传育种。E-mail: lironggai@hotmail.com

cy of the four groups ranged from 0.6253 to 0.8691. The higher genetic identity among the groups of American NSS, American SS and the Serbs indicated that the genetic exchanges between American and Serbia inbred lines are frequent and their genetic relationship is relatively close. The clustering analysis showed that 122 maize inbred lines could be divided into 9 major groups. Two groups of American SS and NSS were clearly distinguished. The American SS was further divided into 2 subgroups(I and IX). The American NSS was divided into six subgroups(II - VII), while the inbred lines from Serbia are dispersed in the NSS groups. Thus, this study provides a molecular basis for better use of maize inbred lines from the United States and Serbia in maize breeding.

Key words: Maize(*Zea mays* L.); inbred line; SSR markers; genetic diversity; genetic distance

玉米是重要的粮、经、饲兼用作物,在全球粮食生产和粮食安全上占有非常重要的地位^[1]。杂交种的使用和推广使玉米生产水平产生了巨大的变化。在我国随着硬粒型和马齿型玉米种质先后在 16 世纪和 20 世纪从美洲引种到我国,继而在 20 世纪 90 年代将美国温热带种质应用于自交系选系上,形成了我国的四平头、旅大红骨、瑞德和兰卡斯特四大骨干种质群。研究发现 20 世纪应用于我国主栽玉米杂交种的亲本种类比较集中、种质资源的遗传多样性趋于单一^[2-4]。加之长期高频率使用少数骨干自交系使我国的杂交种间的基因同质性较高,导致玉米单产增长缓慢、抗病和抗逆性能力下降^[5-8]。因此需要不断引进和创制新的种质,拓宽我国玉米种质的遗传基础。

美国玉米育种处于世界领先地位,拥有丰富的种质资源,特别是在 2001 年以来受美国植物品种保护法保护的玉米自交系陆续解密释放,为拓宽玉米种质的遗传基础提供了有利时机。欧洲的种质大部分属于 Minnesota 13 优势群,是早熟种质的主要来源^[9-10]。在 20 世纪 50 年代,欧洲建立了利用美国马齿型自交系与当地的欧洲硬粒型自交系杂交的杂种优势利用模式,该模式将美国种质的丰产性与欧洲种质的早熟性和适应性有机地结合在一起。近年来为了提高我国玉米育种水平,国家玉米产业技术体系通过美国农业部 ARS 等渠道逐批引进解密商业自交系,并向国内各玉米育种单位公开发放^[11]。河北省农林科学院粮油作物研究所玉米研究中心也加强了欧洲玉米种质的利用,通过与塞尔维亚国家玉米研究所合作交流获得多份自交系材料。但由于缺乏部分引进自交系的系谱和类群信息,难以确立自交系间的亲缘关系,影响在育种上的合理利用。研究发现 RAPD、RFLP、AFLP 和 SSR 等分子标记的利用,为 DNA 分子水平确定作物种质资源的遗传多样性和亲缘关系提供了强有力的工具^[12]。利用这些分子标记对玉米自交系进行遗传多样性和聚类分析,发现 SSR 标记提供的遗传多态性信息含量丰

富,其遗传多样性分析结果与系谱关系基本一致^[13-15]。进而 Warburton 等^[16]、Reif 等^[17]和孟义江等^[2]的研究结果证实利用 SSR 标记进行玉米遗传多样性及杂种优势群划分的可行性。近年来,石海春等^[18]、刘东军等^[19]利用 SSR 分子标记对我国育成的自交系及引进的俄罗斯玉米自交系进行遗传多样性和聚类分析,为其在我国玉米育种中的应用提供了参考。

为了拓宽黄淮海玉米自交系的遗传基础,加快欧美优异种质的融入与利用,采用 SSR 分子标记对部分从美国和塞尔维亚引进的玉米自交系进行了遗传多样性分析,明确其在玉米育种中的潜力,为其合理利用和种质的改良与创新提供可靠依据,进而在提升我国玉米育种水平中起到积极的推动作用。

1 材料与方法

1.1 供试材料

本试验针对本所玉米研究中心近几年收集的国外玉米自交系进行遗传多样性分析。供试自交系共 122 份(表 1),其中包含 2012 年中国农业科学院作物科学研究所从美国农业部 ARS 引进的自交系 93 份(其中 37 份 SS 种质自交系、56 份 NSS 种质自交系)、2013 年本所玉米研究中心与塞尔维亚国家玉米研究所交流的玉米自交系 25 份、铁岭先锋玉米种子公司提供的玉米杂交种先玉 335 的亲本和在我国大面积推广的玉米杂交种郑单 958 的亲本。

1.2 试验方法

1.2.1 田间试验设计 试验材料于 2015 年 6 月种植于河北省农林科学院粮油作物研究所石家庄市藁城区堤上试验站,采用单一区组设计,每份自交系单行区种植,行长 5 m,行距 0.6 m,每行播种 18 穴,出苗后每穴定苗 1 株。田间病、虫、草防治和肥水管理同一般大田。

表 1 来自不同地区的参试玉米自交系

Table 1 The maize inbred lines used in this study

序号 Code	自交系 Inbred lines	类型 Type	来源 Origin	序号 Code	自交系 Inbred lines	类型 Type	来源 Origin	序号 Code	自交系 Inbred lines	类型 Type	来源 Origin
1	FBLA	SS	美国	46	PHJ90	NSS	美国	91	IRF314	NSS	美国
2	NL001	SS	美国	47	PHK93	NSS	美国	92	IRF313	NSS	美国
3	LH208	SS	美国	48	PHM81	NSS	美国	93	IRF312	NSS	美国
4	PHN66	SS	美国	49	PHR55	NSS	美国	94	SPop1		塞尔维亚
5	LH209	SS	美国	50	PHR58	NSS	美国	95	SPop2		塞尔维亚
6	F118	SS	美国	51	29MIBZ2	NSS	美国	96	SPop3		塞尔维亚
7	LH222	SS	美国	52	MBUB	NSS	美国	97	SPop4		塞尔维亚
8	ICI 893	SS	美国	53	LH215	NSS	美国	98	SPop5		塞尔维亚
9	CS405	SS	美国	54	3IBZ2	NSS	美国	99	SPop6		塞尔维亚
10	PHP85	SS	美国	55	LIBC 4	NSS	美国	100	SPop7		塞尔维亚
11	PHPR5	SS	美国	56	83IBI3	NSS	美国	101	SPop8		塞尔维亚
12	PHV53	SS	美国	57	LH214	NSS	美国	102	SPop9		塞尔维亚
13	PHVA9	SS	美国	58	MQ305	NSS	美国	103	SPop10		塞尔维亚
14	PHWG5	SS	美国	59	OQ403	NSS	美国	104	SPop11		塞尔维亚
15	CS608	SS	美国	60	OS602	NSS	美国	105	SPop12		塞尔维亚
16	PHG86	SS	美国	61	PHBA6	NSS	美国	106	SPop13		塞尔维亚
17	PHG71	SS	美国	62	PHGG7	NSS	美国	107	SPop14		塞尔维亚
18	PHG47	SS	美国	63	PHR30	NSS	美国	108	SPop15		塞尔维亚
19	PHG39	SS	美国	64	PHT73	NSS	美国	109	SPop16		塞尔维亚
20	LH85	SS	美国	65	ZS01250	NSS	美国	110	SPop17		塞尔维亚
21	LH74	SS	美国	66	PHG83	NSS	美国	111	SPop18		塞尔维亚
22	LH146Ht	SS	美国	67	PHG72	NSS	美国	112	SPop19		塞尔维亚
23	LH143	SS	美国	68	PHG35	NSS	美国	113	SPop20		塞尔维亚
24	LH132	SS	美国	69	PHG29	NSS	美国	114	SPop21		塞尔维亚
25	LH119	SS	美国	70	MDF-13D	NSS	美国	115	SPop22		塞尔维亚
26	HBA1	SS	美国	71	LH82	NSS	美国	116	SPop23		塞尔维亚
27	G80	SS	美国	72	LH61	NSS	美国	117	SPop24		塞尔维亚
28	DJ7	SS	美国	73	LH52	NSS	美国	118	SPop25		塞尔维亚
29	78002A	SS	美国	74	LH51	NSS	美国	119	PH6WC	SS	中国铁岭 先锋种子 公司
30	78010	SS	美国	75	LH39-1	NSS	美国	120	PH4CV	NSS	中国铁岭 先锋种子 公司
31	807	SS	美国	76	LH38-1	NSS	美国	121	郑 58		中国河南省 农科院 粮作所
32	LH1	SS	美国	77	LH123Ht	NSS	美国	122	昌 72		中国河南省 农科院 粮作所
33	794	SS	美国	78	5707	NSS	美国				
34	792	SS	美国	79	IRF252	NSS	美国				
35	778	SS	美国	80	LH104	NSS	美国				
36	764	SS	美国	81	LH39-2	NSS	美国				
37	207	SS	美国	82	LH38-2	NSS	美国				
38	BCC03	NSS	美国	83	IRF321	NSS	美国				
39	6M502A	NSS	美国	84	IRF320	NSS	美国				
40	LH128	NSS	美国	85	LH39-3	NSS	美国				
41	LH181	NSS	美国	86	IRF319	NSS	美国				
42	LH212Ht	NSS	美国	87	IRF318	NSS	美国				
43	LH213	NSS	美国	88	IRF317	NSS	美国				
44	Lp215D	NSS	美国	89	IRF316	NSS	美国				
45	PHJ89	NSS	美国	90	IRF315	NSS	美国				

1.2.2 玉米基因组 DNA 提取及检测 在田间玉米苗期长至小喇叭口期时,剪取生长一致的 4~5 株幼苗的嫩叶片大约 100 g,利用高通量组织研磨器(Tissuelyer II,德国)在低温的条件下磨碎,用改良的 CTAB 法提取和纯化 DNA^[19]。用 1% 琼脂糖凝

胶电泳检测 DNA 质量后,经 NannoDrop 2000(Thermo Scientific,USA)型分光光度计测定 DNA 浓度后,于 -20 ℃ 保存备用。在用于 PCR 扩增时,统一加 ddH₂O 将 DNA 样品的浓度稀释至工作浓度为 20 ng/μL,放置于 4 ℃ 保存待用。

1.2.3 SSR 分子标记 PCR 扩增及产物检测 选用本所玉米中心利用骨干自交系 K36、S221 开发的、分布于玉米 10 条染色体上、多态性丰富的 40 对 SSR 分子标记,对 122 份玉米自交系进行同源位点扩增。引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。PCR 扩增反应在 EasyCycler 扩增仪上进行,反应体系总体积为 15 μL ,反应成分包括 $2 \times \text{Taq PCR}$ 缓冲液(包含 2 mmol/L MgCl_2 , 0.1 mmol/L dNTPs, Loading Buffer 缓冲液和 0.5 U Taq DNA 聚合酶;GenStar 公司)7.5 μL , 10 $\mu\text{mol/L}$ 正、反向引物各 0.5 μL , 20 ng DNA 模板 3 μL , 无菌 ddH_2O 3.5 μL 。PCR 反应程序为 95 $^\circ\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^\circ\text{C}$ 变性 30 s,55 $^\circ\text{C}$ 退火 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 延伸 30 s,35 个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。其中,退火温度根据引物的 T_m 值进行调整。将 PCR 产物在 96 $^\circ\text{C}$ 变性 8 min,采用 100 bp Plus II DNA 片段为分子量标准,用 10% 的变性聚丙烯酰胺凝胶在电压 200 V、恒功率 60 W 下电泳 1.5 h 分离。电泳结束后,将凝胶用蒸馏水洗涤 2 次,用 10% AgNO_3 染色 7 min,蒸馏水洗涤 2 次,加入 1.5% NaOH 和 0.5% 甲醛溶液显影至条带清晰,再用蒸馏水冲洗后,拍照读带。

1.3 数据统计分析

按照每一对 SSR 引物扩增片段在凝胶中迁移位置的不同,从低到高顺序依次记录为 1、2、3……,无扩增条带记为 0,缺失记为 9,建立 122 份自交系的分子标记数据库,并依据不同分析软件需求在 Excel 中相应转换数据格式。采用 PowerMarker 3.25 软件^[20] 计算每对引物扩增位点的多样性(Nei's allele diversity)以及扩增位点的多态性信息含量(PIC)。利用 Pop-Gen version 1.32^[21] 软件计算群体的观测等位点位数(N_a)、有效等位点位数(N_e)、观测杂合度(H_o)、期望杂合度(H_e)、Shannon 信息指数(I)、遗传距离和遗传一致度。同时利用 MEGA4^[22] 方法构建 122 份自交系的聚类图进行亲缘关系分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记特征分析

利用 40 对 SSR 标记引物对 122 份玉米自交系进行同源位点扩增,其中 29 对引物的扩增产物在 10% 的变性聚丙烯酰胺凝胶上具有多态性,带型稳定,重复性好;4 对引物在一些材料的 DNA 样品中无扩增产物或扩增质量差;7 对引物的扩增产物无多态性。利用 29 个具有多态性的 SSR 标记的引物对 122 份玉米自交系进行研究,结果显示 29 个 SSR

标记共检测到 115 个等位点,每对引物检测出等位点点的数目在 2~5 个之间,平均每个位点为 3.97 个(表 2)。其中等位点数为 5 个的引物有 8 个,等位点数为 4 个的引物有 13 个,等位点数为 3 个的引物有 7 个,等位点最少(2 个)的引物为 SYM19;平均有效等位点位数(N_e)为 2.52 个。等位点多样性的变化范围从 0.18 (SYM27)~0.77(SYM23),平均值为 0.55。多态性信息含量 PIC 值的变异范围为 0.17~0.74,平均值为 0.50。当位点的 $\text{PIC} < 0.25$ 时为低度多态位点,此研究中的 29 个 SSR 标记中只有 1 个标记 SYM27 的 PIC 小于 0.25;当位点的 $\text{PIC} > 0.50$ 时为高度多态位点,此研究共有 13 个标记(表 2),其中 SYM23 位点 PIC 值最高为 0.74,依次为 SYM10、SYM4、SYM13、SYM14、SYM3、SYM21、SYM29、SYM5、SYM11、SYM15、SYM1 和 SYM20,表明这 13 个 SSR 标记位点多态性高;其余 15 个位点为中度多态位点

表 2 29 个 SSR 标记在 122 份玉米自交系中的遗传多样性
Table 2 Genetic diversity of 122 maize inbred lines based on 29 SSR markers

标记 Marker	观测等位 点位数 N_a	有效等位 点位数 N_e	Nei's 位 点多样性 Nei's allele diversity	多态信息 含量 PIC
SYM1	5	2.36	0.58	0.53
SYM2	3	2.15	0.53	0.47
SYM3	5	3.62	0.72	0.67
SYM4	4	3.94	0.75	0.70
SYM5	4	3.03	0.67	0.61
SYM6	4	1.60	0.37	0.34
SYM7	4	2.28	0.56	0.50
SYM8	3	1.56	0.36	0.33
SYM9	4	2.36	0.58	0.49
SYM10	5	4.17	0.76	0.72
SYM11	4	2.48	0.60	0.54
SYM12	4	1.56	0.36	0.33
SYM13	5	3.84	0.74	0.70
SYM14	5	3.91	0.74	0.70
SYM15	4	2.54	0.60	0.54
SYM16	4	2.26	0.56	0.47
SYM17	5	2.10	0.52	0.49
SYM18	4	1.72	0.42	0.36
SYM19	2	1.64	0.39	0.31
SYM20	4	2.43	0.59	0.52
SYM21	5	3.47	0.71	0.66
SYM22	3	2.25	0.55	0.49
SYM23	5	4.41	0.77	0.74
SYM24	3	1.76	0.43	0.38
SYM25	3	1.59	0.37	0.31
SYM26	3	2.03	0.51	0.39
SYM27	4	1.21	0.18	0.17
SYM28	3	1.46	0.31	0.29
SYM29	4	3.28	0.70	0.64
平均	3.97	2.52	0.55	0.50
Mean				
总计	115	73.01		
Total				

($0.25 < PIC \leq 0.50$)。结果表明选取的 29 个 SSR 标记有较丰富的多态性,能较好的检测参试自交系的遗传多样性。

2.2 在不同的玉米自交系群中发现稀有等位点

根据玉米自交系的种质和来自地区的不同,将 122 份参试玉米自交系分为美国 SS 自交系群、美国 NSS 自交系群、塞尔维亚玉米自交系群和中国自交系群 4 个群体(表 1)。对本研究检测出的全部 115 个等位点进行分析,发现一些 SSR 标记的引物在不同的玉米自交系群中会扩增出或缺失一些条带(表 3),表现出地区特异性和品种特异性。SYM1 和 SYM3 两个标记的引物各扩增出 4 个等位点,第 4 个位点只在美国 SS 群中被检测到,在其他的 3 个群中未发现该位点;SYM27 的第 3 个等位点为美国 NSS 群所特有;SYM26 的第 1 个等位点和 SYM28 的第 3 个等位点为塞尔维亚自交系群所特有;11 个 SSR 标记的一些位点被发现在不同玉米群中缺失(表 3)。发现的这些稀有等位点或品种特异性等位点,可为挖掘和利用长期以来被忽视的地方种质资源提供一条有价值的线索。

表 3 在不同玉米自交系群中特有的等位点

Table 3 The alleles that were specifically detected in groups of maize inbred lines

标记位点 Site	美国 SS 群 America SS group	美国 NSS 群 America NSS group	塞尔维亚 自交系群 Serbia inbred line group	中国自交 系群 Chinese inbred line group
4-SYM1	特有	无	无	无
4-SYM3	特有	无	无	无
1-SYM26	无	无	特有	无
3-SYM27	无	特有	无	无
3-SYM28	无	无	特有	无
1-SYM2	有	有	有	无
2-SYM4	有	有	有	无
4-SYM5	有	有	有	无
3-SYM7	有	有	有	无
3-SYM8	有	无	有	有
1-SYM10	有	有	无	有
4-SYM11	有	有	有	无
1-SYM12	有	有	无	有
3-SYM15	有	有	有	无
3-SYM18	有	有	无	有
1-SYM22	有	有	有	无

1-SYM2 表示标记 SYM2 上的第 1 等位点,余此类推。下同

1-SYM2 represents the first allele on marker SYM2, and so on. The same as below

2.3 不同玉米自交系群的遗传多样性分析

由表 4 可以看出,4 个参试自交系群在总体水平上检测到 3.97 个等位点点数(N_a),且有效等位点点数(N_e)为 2.52,表明 63.48% 的等位点真实可靠;期望杂合度(H_e)为 0.55,观测杂合度(H_o)仅为 0.03,表明参试材料遗传稳定、纯合度高;多态位点百分率(PP)为 100%,Shannon 信息指数(I)为 0.99,表明能真实反映 29 个位点的多态性;4 个不同的玉米自交系群的 N_a 、 N_e 均比总体水平的数值低, N_a 值介于 1.59 ~ 3.55 之间,美国 NSS 群最高,中国群最低; N_e 值介于 1.57 ~ 2.37,塞尔维亚群最高,中国群最低; H_o 值塞尔维亚群最高,美国 NSS 群和中国群相同,美国 SS 群最低; I 值介于 0.39 ~ 0.93 之间,美国 NSS 群最高,中国群最低。这些结果表明,来自美国、塞尔维亚的玉米自交系的遗传变异比较丰富,其中美国 NSS 群的 N_a 和 I 值在 4 个群中最高,塞尔维亚群的 N_e 值最大,揭示美国 NSS 和塞尔维亚这两个群相比其他两个群遗传多样性高、遗传基因丰富,而美国 SS 群和中国群的遗传多样性较低,自交系间遗传基础比较窄。因在本研究中的中国玉米自交系比较少,仅有 2 个,这可能是造成遗传多样性低的原因。塞尔维亚群的 H_o 值在 4 个群中最高,表明来自塞尔维亚的自交系遗传基础比较广泛。

2.4 不同玉米自交系群的遗传距离和遗传一致度

从表 5 中可知,4 个群间的遗传距离介于 0.1403 ~ 0.4695 之间,总体趋势是中国群与国外的 3 个群之间遗传距离较大,美国 NSS 群与美国 SS 群、塞尔维亚群之间遗传距离均较小(0.1419, 0.1403)。从遗传一致度来看,4 个群的遗传一致度介于 0.6253 ~ 0.8691 之间,美国 NSS 群与美国 SS 群、塞尔维亚群之间的遗传一致度均较高,3 个群之间基因交流频繁,亲缘关系较近;中国群与美国 SS 群(0.6890)、美国 NSS 群(0.6253)以及塞尔维亚群(0.6603)的遗传一致度均较低,中国群与其他 3 个群之间基因交流频率较低,这 4 个玉米自交系群间的遗传距离和遗传一致度的结果与它们的地理位置相吻合。

2.5 122 份玉米自交系的聚类分析

利用 MEGA4 法将 122 份玉米自交系分为 9 大主要类群(图 1)。第 I 类群包括 13 份美国 SS 自交系,它们多为 B73 血缘的自交系,如由孟山都公司选育的 LH74、LH146Ht、LH143、LH132 和 LH119;第 II 类群包括 15 份美国 NSS 自交系,其中 IRF321、

表 4 29 对 SSR 标记在 4 个玉米自交系群中检测到的遗传多样性

Table 4 Estimates of genetic parameters for 4 groups based on 29 SSR markers

组群 Group	自交系数量 No. of inbred lines	观测等位 位点数 <i>Na</i>	有效等位 位点数 <i>Ne</i>	期望 杂合度 <i>He</i>	观测 杂合度 <i>Ho</i>	多态位点 Polymorphic loci	多态位点 百分率(%) <i>PP</i>	Shannon 信 息指数 <i>I</i>
美国 SS 群 America SS group	38	3.41	2.10	0.48	0.01	29	100	0.84
美国 NSS 群 America NSS group	57	3.55	2.31	0.53	0.02	29	100	0.93
塞尔维亚自交系 群 Serbia inbred line group	25	3.41	2.37	0.53	0.08	29	100	0.91
中国自交系群 Chinese inbred line group	2	1.59	1.57	0.37	0.02	16	55.2	0.39
总体 Total	122	3.97	2.52	0.55	0.03	29	100	0.99

表 5 4 个群的遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角)

Table 5 Genetic consistency (above diagonal) and genetic distance (below diagonal) among 4 groups

组群 Group	美国 SS 群 America SS group	美国 NSS 群 America NSS group	塞尔维亚自交系群 Serbia inbred line group	中国自交系群 Chinese inbred line group
美国 SS 群	****	0.8677	0.8261	0.6890
美国 NSS 群	0.1419	****	0.8691	0.6253
塞尔维亚自交系群	0.1910	0.1403	****	0.6603
中国自交系群	0.3725	0.4695	0.4151	****

IRF313、LH38-1、LH39-1、LH38-2、LH39-3 是由 Oh43 衍生的自交系,而 IRF314 至 IRF319 的 6 份材料衍生于同一杂交组合(PA91/LH98A),表明 IRF 系列的自交系具有 Oh43 的遗传背景;第Ⅲ类群由 7 份具有 PH207 类种质血缘的美国 NSS 自交系、1 份来自塞尔维亚的自交系(SPop4)和 3 份美国 SS 自交系共 11 份材料组成,其中 1 份美国 NSS 的 IRF252 与 1 份塞尔维亚的 SPop4 和 2 份美国 SS 的 PHG71、PHG47 组成一个更小的亚组,并且 SPop4 与 IRF252 聚在一起,表明 SPop4 可能是从美国引进的 IRF252 演变而来;第Ⅳ类群由 6 份塞尔维亚自交系和 6 份美国 NSS 自交系组成,其中塞尔维亚的 SPop22、SPop23、SPop24 和 SPop25 与美国 NSS 自交系 PHGG7、ZS01250 聚在一起,表明这 4 个塞尔维亚的血缘关系与美国的 PHGG7、ZS01250 相近;第Ⅴ类群,除 2 份美国 SS 的自交系 PHG39、HBA1 和 2 份塞尔维亚自交系 SPop20、SPop21 及 1 份中国自交系郑 58 外,其余的 6 份为美国孟山都公司改良 Mo17 而选育的 LH213 衍生的 NSS 自交系,表明 PHG39、

HBA1、SPop21 和郑 58 为具有 NSS 种质遗传背景自交系;第Ⅵ类群,除 3 份美国 SS 自交系 PHWG5、LH85、807 外,其余的 7 份为美国 NSS 自交系,并且优势杂交种先玉 335 的父本 PH4CV 被分在此类群,因此此类群的自交系的潜在利用价值有待研究;第Ⅶ类群包括 1 份美国 SS 自交系和 11 份美国 NSS 自交系,其中 9 份具有典型的 Iodent 种质的美国 NSS 自交系组成一个亚组,Iodent 种质在现代商业育种中起着非常重要的作用,而美国 SS 自交系 778 与 2 个美国 NSS 自交系 LH128、31BZ2 组成另一个小的亚组,表明 778 在遗传成分上更偏向 NSS 种质;第Ⅷ类群由 15 份为塞尔维亚自交系组成和 3 份美国 NSS 自交系 PHJ89、PHK93、PHM81 组成,表明这 15 份塞尔维亚自交系与 3 份美国 NSS 自交系血缘关系近;第Ⅸ类群共 17 份自交系组成,包括 PH6WC 在内的 14 份美国 SS 自交系和 1 份来自中国的自交系昌 72 及 1 份美国 NSS 自交系(PHR30),值得注意的是 PH6WC 和昌 72 分别是优势杂交种先玉 335、郑单 958 的父本,表明此类群具有配合力高的优势类群,

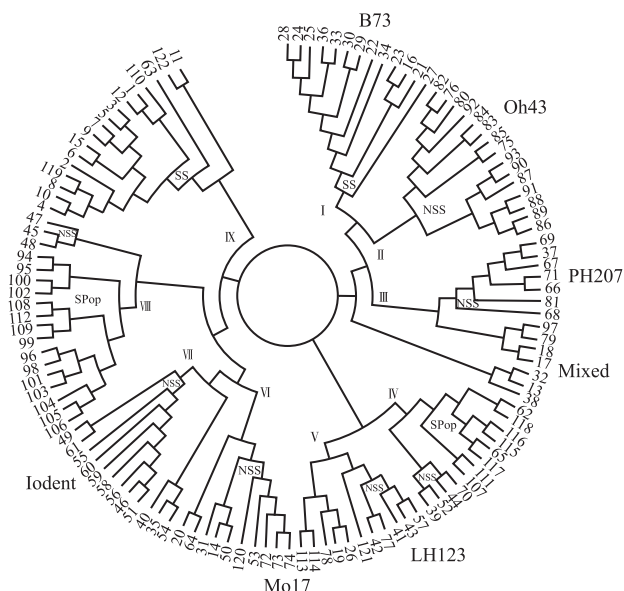


图1 122份玉米资源个体MEGA4聚类图

Fig. 1 MEGA4 dendrogram of 122 maize inbred lines

可用于广泛的测交选配优势组合。除9大主要类群以外,还有1个小类群包括2份美国SS自交系LH1、PHVA9和1份美国NSS自交系BCC03,3份材料之间的血缘关系有待进一步研究。

3 讨论

3.1 SSR标记的多态性

本研究利用29个SSR分子标记在122份玉米自交系中共检测到115个等位点,每个位点可检测到2~5个等位点,较好地揭示了参试自交系的遗传多样性,然而平均等位点数和多态性信息含量PIC值均比刘东军等^[19]和石海春等^[18]所得的结果低,原因可能是本研究利用的分子标记较少。在本研究中,有4对SSR引物不能有效地对一些参试自交系的基因组DNA扩增,导致这4对引物在122份参试自交系中检测的遗传信息不完整,不能用于数据分析,其原因可能是引物设计或合成质量差,或者是由于这些自交系的基因组DNA上不存在引物靶位结合点,不能启动扩增反应。若是后面的原因,这些引物不能用于参试材料的遗传多样性分析。鉴于采用的分子标记数量不同会影响遗传多样性分析结果的准确性,Pauli等^[23]采用614个SNP标记比较准确地预测了92份美国解密商用玉米自交系和17份公益单位常用玉米自交系的遗传背景和亲缘关系。因此利用覆盖全基因组高密度分子标记进行种质资源的遗传差异分析,可避免遗传信息的低估,

在今后的玉米遗传育种实践中,应利用先进的生物技术发掘更多高多态性的标记,并且加强各种玉米种质资源的收集,充分利用种质资源的遗传多样性创制优良的种质材料。

3.2 不同玉米自交系群的遗传多样性

玉米自交系的遗传多样性越高,适应能力越强;杂交种亲本之间存在遗传差异越大,获得强优势杂交种的可能性越大^[24]。因此,研究玉米的遗传多样性具有重要的意义。在对玉米遗传多样性研究上,有效等位点数(N_e)、期望杂合度大小(H_e)、多态位点百分率(PP)和Shannon信息指数(I)能够真实反映不同种质资源遗传变异程度的高低。本研究获得的 N_e 、 H_e 、 PP 以及 I 值高于二倍体的自花授粉作物^[25-26],证实玉米的遗传基础比较丰富,也间接表明本研究结果的真实可靠。通过对美国的SS和NSS、塞尔维亚和中国的4个自交系群比较发现,美国NSS和塞尔维亚群的 N_e 、 H_e 、 PP 以及 I 值较大,遗传变异水平较高,而美国SS和中国自交系群体的 N_e 、 H_e 及 I 值较小,遗传变异水平较低。由此可见在玉米杂交育种过程中,用于父本的美国NSS群的遗传组成更丰富。因对来自塞尔维亚的自交系群的系谱不清楚,他们可能是父、母本的混合群体,因此个体之间遗传差异大。美国SS种质群一般是由B37、B73和B14血缘衍生的自交系,而本研究的中国自交系群仅由2份自交系组成, I 值最小(0.39),致使这2个群的遗传基础相对比较窄。综上所述,本研究采用SSR标记对4个不同的自交系群的遗传多样性分析获得的结果与育种实践中种质资源的组成和遗传背景一致,表明利用SSR分子标记研究玉米种质资源遗传多样性的方法确实可行^[27-28]。

3.3 不同玉米自交系群的亲缘关系和遗传距离

遗传距离和遗传一致度是用来衡量群体间亲缘关系的重要参数,遗传一致度越大,表明群体间的亲缘关系越近,反之就越远。用于本研究的中国自交系群体与美国NSS群、美国SS群和塞尔维亚群之间的遗传距离都较大,其中与美国NSS群最大,表明中国与美国和塞尔维亚的种质资源之间亲缘关系较远,基因交流比较贫乏,在杂交种选育上应加强美国种质的特异基因的渗透和利用;美国SS群与美国NSS群、塞尔维亚群之间的遗传距离较小,但与这2个群的遗传一致度高,表明与中国群相比,国外的3个群之间遗传变异水平低、亲缘关系比较近、遗传基础比较狭窄,因此在今后育种中要注重选用遗传距

离相对较大且遗传一致度较低的自交系作为亲本。

3.4 不同玉米自交系的聚类分析

Mikel 等^[29-30]根据部分美国解密商用玉米自交系的系谱和表型性状分析,将其分为 SS、阿根廷 Maiz Amargo、Oh43、Minnesota13、Iodent、Lancaster (Mo17 的衍生系为代表)、Oh07、商业杂交种的选系和遗传基础广泛的外来种质 9 个类群,衣阿华坚秆综合种和 Maiz Amargo 种质类群被归为用做母本的 SS 种质群,而其余类群被归为用作父本的 NSS 种质群。本研究利用 SSR 标记在分子水平上将 122 份玉米自交系聚类为 9 大主要类群,并且将美国 NSS 种质和 SS 种质自交系明显地区分开,表明美国的母、父本群之间在遗传组成上真实地存在差异,但美国 SS 种质自交系被分为 2 大主要类群(I 和 IX),而美国 NSS 种质自交系被分为 6 大类群(II~VII)。因本研究的参试材料未包括典型类群的自交系如 B73、Mo17 等,通过与 Pault 等^[23]利用 614 个 SNP 标记对 92 份美国解密商用自交系的聚类结果比较推测得知,在美国用作母本的 SS 种质群的自交系,聚在第 I 类群的 13 份自交系可能由 B73 衍生而来,如 DJ7、LH74、LH119、LH132、PHG86,聚在第 IX 类群的自交系的来源和血缘关系不太清楚。再有 Mikel^[29,31]根据母本群的遗传组成,将美国母本群的玉米种质分为 SS 种质和阿根廷 Maiz Amargo 种质^[11],第 IX 类群的资源是否属于阿根廷 Maiz Amargo 种质有待进一步研究;在美国用作父本的 NSS 种质群的自交系中,聚在第 II 类群中的 15 份可能由 Oh43 类种质衍生而来,如 LH38 和 LH39,第 III 类群的 7 份自交系的血缘与 PH207 类种质相近,如 PHG29、PHG35、PHG72、PHG83、LH82,第 V 类群的美国 NSS 自交系为 LH123 类种质,如 LH213 和 LH212Ht,第 VI 类群的美国 NSS 自交系的血缘与 Mo17 种质相近,如 LH51、LH52、LH61,而第 VII 类群的美国 NSS 自交系属于 Iodent 种质,如 PHJ90。Oh43、Iodent、PH207、LH123 和 Mo17 等种质,是美国父本群的重要遗传组成,作为核心种质在美国玉米商业育种的种质类群的形成中起着重要作用。

在美国,随着自交系和杂交种系谱的演变,玉米种质群已从初期的 Reid 群演变为衣阿华坚秆综合种 SS 种质群,而从美国 Lancaster 群挖掘出的新种质越来越丰富,演变为现在的 NSS 群。再有各大商业种子企业为了培养特定区域的玉米杂交种、占领特定的种子市场,对 NSS 库的种质进行了改良和扩增,形成了自己各具特色的父本种质库,在 NSS 种

质群中,甚至还包含了部分在起源和遗传构成上属于瑞德黄马牙种质(SS)^[32],这在本研究的 DNA 水平的聚类分析上也得到证实(图 1)。Romay 等^[33]采用测序基因分型的方法对自交系间遗传关系进行了研究,发现无论将 NSS 群扩大多大而使之包括更高的多样性,NSS 群与 SS 群之间仍然存在重叠。从本研究的聚类结果看,在我国大面积推广的玉米杂交种先玉 335 为 SS×NSS 杂优模式,其母本 PH6WC 属于来源于 Reid 种群的 SS 种质,父本 PH4CV 属于来源于 Lancaster 种群的 NSS 种质,而郑单 958 为非典型的 SS(昌 72)与非典型的 NSS(郑 58)的杂交种。因此,在玉米育种中利用这些解密商用自交系时,需要广泛测配,不只局限于 SS 种质与 NSS 种质之间的测配,同一种质群内遗传差异较大的自交系间也可能配制出强优势杂交种,种质的适应性或抗逆性比杂优群之间的杂种优势更为重要。

参考文献

- [1] Messmer R, Fracheboud Y, Bänziger M, Vargas M, Stamp P, Ribaut J M. Drought stress and tropical maize: QTL-by-environment interactions and stability of QTLs across environments for yield components and secondary traits. *Theoretical and Applied Genetics*, 2009, 119(5): 913-930
- [2] 孟义江, 严建兵, 滕文涛, 李建生. 1991—2001 年中国主要玉米杂交种遗传基础的变化趋势及三大种质类群在育种中的应用. *中国农业科学*, 2010, 43(4): 670-679
- [3] 吴景锋. 我国主要玉米杂交种种质基础评述. *中国农业科学*, 1983, 16(2): 1-7
- [4] 曾三省. 中国玉米杂交种的种质基础. *中国农业科学*, 1990, 23(4): 1-9
- [5] 张世煌, 彭泽斌, 李新海. 玉米杂种优势与种质扩增、改良和创新. *中国农业科学*, 2000, 33(c00): 34-39
- [6] 潘光堂, 杨克诚. 我国西南地区玉米育种面临的挑战及相应对策探讨. *作物学报*, 2012, 38(7): 1141-1147
- [7] 吴元奇, 郑灵, 荣廷昭. 西南地区白玉米地方种质资源分布及遗传多样性. *草业学报*, 2013, 22(4): 160-169
- [8] 刘志斋, 吴迅, 刘海利, 李永祥, 李清超, 王风格, 石云素, 宋燕春, 宋伟彬, 赖锦盛, 黎裕, 王天宇. 基于 40 个核心 SSR 标记揭示的 820 份中国玉米重要自交系的遗传多样性与群体结构. *中国农业科学*, 2012, 45(11): 2107-2138
- [9] Reif J C, Hamrit S, Heckenberger M, Schipprack W, Maurer H P, Bohn M, Melchinger A E. Trends in genetic diversity among European maize cultivars and their parental components during the past 50 years. *Theoretical and Applied Genetics*, 2005, 111(5): 838-845
- [10] Losa A, Hartings H, Verderio A, Motto M. Assessment of genetic diversity and relationships among maize inbred lines developed in Italy. *Maydica*, 2012, 56(1): 95-104
- [11] 石雷. 现代美国马齿型玉米商业育种的种质基础. *玉米科学*, 2011, 19(5): 1-5
- [12] Melchinger A E, Staub J E. Concepts and Breeding of Heterosis in Crop Plants. *CSSA Special Publication*, Crop Science Society of America, 1998: 29-44
- [13] Pejic I, Ajmonemarsan P, Morgante M, Kozumplick V, Castiglioni P, Taramino G. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 1998, 97

- (8):1248-1255
- [14] 袁力行,傅骏骅,Warburton M,李新海,张世煌,Khairallah M,刘新芝,彭泽斌,李连城. 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比较研究. 遗传学报,2000,27(8):725-733
- [15] 李新海,傅骏骅,张世煌,袁力行,李明顺. 利用 SSR 标记研究玉米自交系的遗传变异. 中国农业科学,2000,33(2):1-9
- [16] Warburton M L, Xia X, Crossa J, Franco J, elchinger A E, Frisch M, Bohn M, Hoisington D. Genetic Characterization of CIMMYT Inbred Maize Lines and Open Pollinated Populations Using Large Scale Fingerprinting Methods. Crop Science, 2002, 42(6):1832-1840
- [17] Reif J C, Melchinger A E, Xia X C, Warburton M L, Hoisington D A, Vasal S K, Srinivasan G, Bohn M, Frisch M. Genetic Distance Based on Simple Sequence Repeats and Heterosis in Tropical Maize Populations. Crop Science, 2003, 43(4):1275-1282
- [18] 石海春,袁昊,李东波,余学杰,柯永培. 82 份玉米自交系遗传多样性分析. 华北农学报,2014,29(6):84-93
- [19] 刘东军,张宏纪,张举梅,孙德全,孙岩,马延华,郭怡璠,刘文林,杨淑萍,闫文义. 91 份俄罗斯玉米自交系的遗传多样性分析. 核农学报,2016,30(11):2112-2118
- [20] Liu K, Muse S V. PowerMaker: An integrated analysis environment for genetic marker analysis. Bioinformatics, 2005, 21(9):2128-2129
- [21] Yeh F, Yang R C, Boyle T. POPGEN (version 1.32), microsoft windows-based freeware for population genetic analysis. 2000, <http://www.ualberta.ca/~fyeh/pr01.htm>
- [22] Tamura K D J, Nei M, Kumar S. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24:1596-1599
- [23] Pault N, Nathand C, Jamesb H, Davidm B, Stephen S, Majorm G. Molecular characterization of maize inbreds with expired US plant variety protection. Crop Science, 2008, 48(5):1673-1685
- [24] Troyer A F, 姚杰, 黎裕. 美国当代玉米种质资源的历史演变 II. 自交系. 作物杂志, 2007(4):1-6
- [25] 任红晓,程须珍,徐东旭,高运青,尚启兵. 应用 SSR 标记分析中国北方名优绿豆的遗传多样性. 植物遗传资源学报, 2015, 16(2):395-399
- [26] Chen H, Qiao L, Wang L, Wang S, Blair M W, Cheng X. Assessment of genetic diversity and population structure of mung bean (*Vigna radiata*) germplasm using EST-based and genomic SSR markers. Gene, 2015, 566(2):175
- [27] Yang W P, Guan Q, Yang L Q, Wang W, Zhang W L, Zhu Y F, Pan M N, Shen J H, Zhao Z. Genetic Diversity and Heterotic Group of 70 Maize Inbred Lines in Guizhou by SSR Marker. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(2):241-248
- [28] Cui Y X, Zhang M C, Bai J R, Cheng Y K, Zhang X M, Ren Y. Analysis of Genetic Diversity of Maize Landraces in Shanxi by SSRs Markers. Journal of Plant Genetic Resources, 2012, 13(5):810-818
- [29] Mikel M A. Availability and Analysis of Proprietary Dent Corn Inbred Lines with Expired U. S. Plant Variety Protection. Crop Science, 2006, 46(6):2555-2560
- [30] Mikel M A, Dudley J W. Evolution of North American Dent Corn from Public to Proprietary Germplasm. Crop Science, 2006, 46(3):1193-1205
- [31] Mikel M A. Genetic composition of contemporary US commercial dent corn germplasm. Crop Science, 2011, 51(2):592-599
- [32] 吴权明. 美国玉米种质中 BSSS 与 Reid 的区别与联系. 玉米科学, 2014, 22(3):19-23
- [33] Romay M C, Millard M J, Glaubitz J C, Peiffer J A, Swarts K L, Casstevens T M, Elshire R J, Acharya C B, Mitchell S E, Flint-Garcia S A, McMullen M D, Holland J B, Buckler E S, Gardner C A. Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. Genome Biology, 2013, 14(6):R55