

文章编号: 1005-0906(2015)01-0058-05

利用 SNP 标记划分甜玉米自交系的杂种优势类群

卢柏山, 史亚兴, 宋伟, 徐丽, 赵久然

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100097)

摘要: 利用 1 031 个 SNP 标记对 39 份甜玉米自交系进行基因型分析, 结果表明, 1 031 个 SNP 标记在供试材料中的平均多态性信息含量(PIC)为 0.290, 最小等位基因频率(MAF)平均值为 0.275。39 份自交系间遗传距离变化范围为 0.032~0.678, 平均值为 0.430。通过 Neighbor-joining(NJ)聚类分析, 将供试材料划分为 5 个类群, 分别为华珍母本群、京甜糯 2 群、彩甜糯群、温带种质群和华珍父本群。5 个类群间遗传距离变化范围较小, 在 0.394~0.445 之间。华珍父本群与温带种质群之间的遗传距离为 0.394, 彩甜糯群与华珍父本群、温带种质群之间的遗传距离为 0.445。

关键词: 甜玉米; 自交系; SNP 标记; 类群划分

中图分类号: S513.053.3

文献标识码: A

Heterotic Grouping of Sweet Corn Inbred Lines by SNP Markers

LU Bai-shan, SHI Ya-xing, SONG Wei, XU Li, ZHAO Jiu-ran

(Maize Research Center, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China)

Abstract: One thousand and thirty-one Single Nucleotide Polymorphism(SNP) markers were adopted in heterotic grouping of 39 elite sweet corn inbred lines. Polymorphic Information Content(PIC) and Minor Allele Frequency(MAF) of these SNP markers was 0.290 and 0.275 on average, respectively. Genetic distance between 39 inbred lines ranged from 0.032 to 0.678, with an average value being 0.430. Five groups were divided from the 39 inbred lines by Neighbor-joining(NJ)clustering method which were Huazhen maternal group, Jingtiannuo2 group, Colorful sweet-waxy group, temperate group and Huazhen paternal group. Genetic distance between the groups ranged from 0.394 to 0.445. Huazhen paternal group and Temperate group have the minimum genetic distance being 0.394, while Huazhen paternal and Colorful sweet-waxy group, Temperate group and Colorful sweet-waxy group had the maximum genetic distance being 0.445.

Key words: Sweet corn; Inbred line; SNP marker; Genetic grouping

甜玉米(*Zea mays* L. *saccharata* Sturt)是玉米属(*Zea mays* L.)的一个玉米亚种, 即甜质型玉米亚种, 是子粒胚乳中控制糖分转化的基因发生隐性突变而产生的突变体。甜玉米子粒乳熟期含糖量高, 并富含多种氨基酸和维生素, 是一种具有高营养价值和

经济价值的特用型玉米^[1,2]。甜玉米原产于南美洲, 至今已有 100 多年的栽培历史。我国甜玉米育种始于 20 世纪 50 年代, 最初的育种材料引自美国。目前, 我国育种资源仍主要来自美国、泰国和我国台湾等地, 育种技术上主要以选育二环系为主, 基础较薄弱, 整体水平与国外先进水平相比还有一定差距^[3-5]。搜集与培育遗传基础复杂、适应性强的甜玉米育种资源, 并挖掘新的杂种优势群和杂种优势模式, 才能从整体上提高甜玉米育种的工作效率。

优良的种质是新品种选育的基础, 而成功选择种质的一个重要依据是杂种优势群。近几十年来, 研究者利用亲本形态差异、地理来源、系谱、配合力表现以及同工酶标记等划分杂种优势群。随着分子标记技术的飞速发展, 在分子水平上研究玉米的杂

收稿日期: 2014-11-15

作者简介: 卢柏山(1972-), 男, 研究员, 硕士, 主要从事鲜食玉米遗传育种研究。Tel: 010-51503562

E-mail: maizelu@126.com

史亚兴(1977-), 副研究员, 硕士, 主要从事鲜食玉米遗传育种研究。Tel: 010-51503400 E-mail: syx209@163.com

卢柏山和史亚兴为本文共同第一作者。

赵久然为本文通讯作者。

种优势群及其模式成为新的手段^[5]。Smith等^[6]利用131对SSR引物对58份玉米自交系进行聚类分析,并与RFLP标记进行比较,表明二者高度相关,分类结果与系谱分析基本吻合。袁立行等^[7]利用RFLP、SSR、AFLP及RAPD 4种分子标记对15个玉米自交系进行聚类分析,并指出SSR更适合玉米种质遗传多样性分析。钟昌松等^[8]利用15对SSR引物对20份特用玉米自交系的亲缘关系进行了研究。胡俏强等^[9]利用64对SSR引物对92份甜玉米自交系的遗传变异进行研究,划分了杂种优势群,分类结果与系谱基本吻合。

随着SNP研究的快速发展以及基因组测序和DNA芯片技术的发展,SNP标记目前已迅速取代SSR、RFLP等传统标记,开启了新的分子标记时代。SNP标记具有遗传稳定性好、位点丰富且分布广泛、代表性强和易于实现自动化分析检测等优点,

在高密度遗传图谱构建、基因精确定位、群体遗传结构分析以及系统发育等方面均已被应用^[10-14]。其中,Wu等^[15]利用1 015个在基因组中平均分布的SNP标记,对367份普通玉米自交系进行了群体遗传多样性的分析并进行聚类,将367份自交系分为2个大群和5个亚群,结果与系谱一致,表明SNP标记在玉米种质资源遗传多样性分析和类群划分上的可行性。本研究利用1 031个SNP标记,对39份甜玉米自交系进行杂种优势群划分的研究,为甜玉米种质改良与创新、杂种优势模式的开发与利用提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本研究选取39份甜玉米自交系为试验材料,自交系编号为T1~T39,其名称及系谱来源见表1。

表1 39份甜玉米自交系名称及系谱来源

Table 1 List of 39 sweet corn inbred lines and their pedigrees

编号 No.	名称 Name	系谱来源 Pedigree	编号 No.	名称 Name	系谱来源 Pedigree
T1	T68W	选自美国甜玉米杂交种麦哥娜姆	T21	BKL	选自杂交种巴卡拉
T2	T8367	选自美国甜玉米杂交种520	T22	T268	选自华珍
T3	SH-251	选自中农大超甜1号	T23	T784-3	选自ZBM二环系
T4	双金11	选自美国杂交种库普拉	T24	YC08	外引375种质
T5	矮大华	锦甜10母本	T25	YC09	选自美国杂交种脆王
T6	美白3	锦甜10父本	T26	YC10	外引101种质
T7	1118	美国温带种质选系	T27	YC27-1	选自美国超白种质
T8	26	美国温带种质选系	T28	T2497-4	选自瑞士杂交种
T9	TF60	选自温带种质	T29	T764-6	选自阿根廷杂交种
T10	T16	选自华珍母本群体	T30	T2501	选自美国杂交种奥弗兰
T11	T8345	选自美国甜玉米杂交种520	T31	T1093-1	选自品试27
T12	A203	华宝甜8号父本	T32	T1104-2	选自中农大甜419
T13	KY99	台湾种质华珍父本	T33	T1133-2	选自斯达206
T14	KY188	华珍母本	T34	TN98	选自彩甜糯6号
T15	CB1	选自美国超白种质	T35	ZN6	选自紫糯3号
T16	SH-241	选自中农大超甜1号	T36	京甜糯2	选自SH-251×白糯6
T17	金杂11	选自美国杂交种库普拉	T37	D6644	选自SH-251×白糯6
T18	TN2965	选自彩甜糯4号	T38	京甜糯68	选自SH-251×白糯6
T19	TN68	选自彩甜糯6号	T39	D6644-6	选自SH-251×白糯6
T20	T9	选自suse材料			

1.2 实验方法

1.2.1 DNA提取

玉米基因组DNA提取参照Rogers和Bendich^[16]提出的CTAB法进行。所提DNA质量需满足要求:①条带单一,完整无降解;②紫外分光光度计检测

A260/280介于1.8~2.0之间(DNA样品没有蛋白、RNA污染);③A260/230介于1.8~2.0之间(DNA样品盐离子浓度低);④样品DNA浓度至100 ng/μL。

1.2.2 SNP位点选取

利用北京市农林科学院玉米研究中心开发的

MaizeSNP3072芯片对供试自交系进行SNP基因分型^[17]。根据以下指标选用1031个SNP位点:①数据质量评估值 ≥ 0.7 ;②AA、AB、BB这3种基因型具备明显界限;③位点特异性探针设计评估值 ≥ 0.7 ;④在全基因组上均匀分布。

1.2.3 GoldenGate技术芯片实验操作流程

待提取的基因组DNA与激活的生物素充分结合,通过离心沉淀使DNA纯化;将探针与纯化的目的DNA链杂交,漂洗杂交产物,除去非特异结合试剂或过量试剂后进行延伸连接反应;延伸后产物经漂洗变性后作为模板进行PCR扩增,PCR产物与磁珠结合后过滤纯化;将纯化的PCR产物与芯片杂交,杂交结束后进行芯片清洗、真空抽干;风干后的芯片立刻在iScan仪上进行扫描,最后利用GenomeStudio软件进行数据分析。

1.2.4 数据统计分析

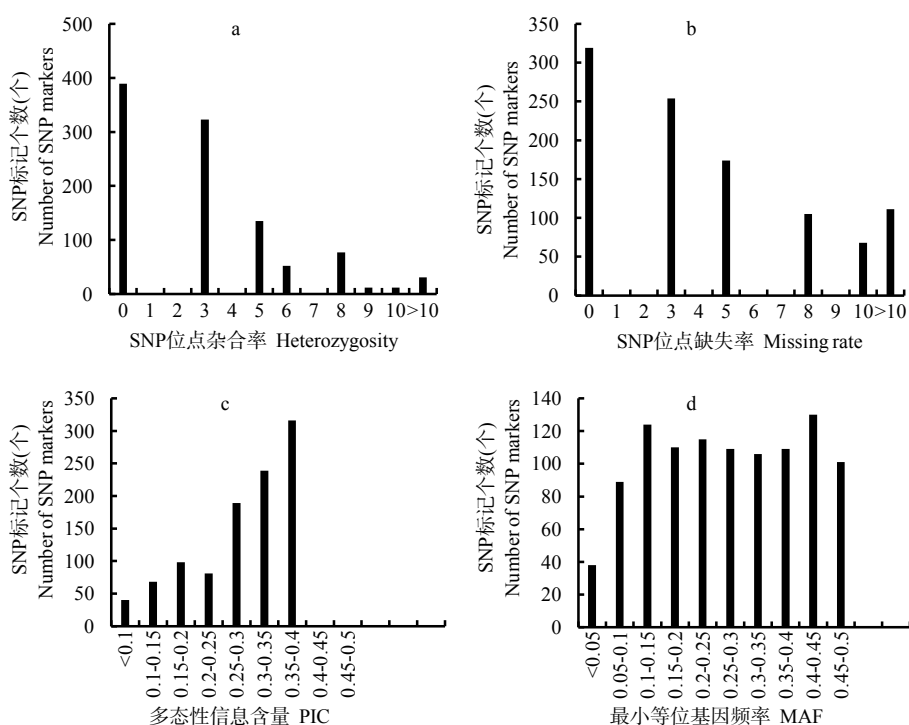
本研究数据利用PowerMarker V3.25软件^[18]进行分析,计算其最小等位基因频率(MAF)、多态性信息含量(PIC)、杂合率等;采用Nei's算法计算自交系间遗传距离,并利用Mega4.0软件构建NJ聚类图,进行杂种优势群的划分。

2 结果与分析

2.1 SNP位点总体评价

利用1031个SNP标记检测了39份甜玉米自交系的基因型,并用PowerMarker V3.25分析其基因分型数据,对1031个SNP位点进行评价。结果表明,1031个SNP位点在39份甜玉米自交系中的杂合率在0~30.8%之间,平均值为3%;在39份自交系中的缺失率在0~20.5%之间,平均值为4.6%;多态性信息含量(PIC)的变化范围为0.000~0.375,平均值为0.290;最小等位基因频率(MAF)的变化范围为0.000~0.500,平均值为0.275,其中 ≥ 0.1 的位点有917个,占88.9%(图1)。

PIC值是衡量DNA座位变异程度高低的重要指标。某DNA座位的PIC值 > 0.50 时,表明其为高度多态性座位; $0.25 < \text{PIC值} < 0.50$ 时,表明其为中度多态性座位;PIC值 < 0.25 时,表明为低度多态性座位^[19]。本研究中,1031个SNP标记在39份糯玉米自交系上的平均PIC值为0.29,说明为中度多态性,39份自交系遗传多样性较好。



注:a为SNP位点杂合率分布;b为SNP位点缺失率分布;c为39份自交系基于1031个SNP位点的多态性信息含量;d为39份自交系基于1031个SNP位点的最小等位基因频率分布。

Note: a, Heterozygosity of SNPs; b, Missing rate of SNPs; c, PIC of 39 inbred lines based on 1031 SNPs; d, MAF of 39 inbred lines based on 1031 SNPs.

图1 1031个SNP位点对39份甜玉米自交系的基因分型数据分布

Fig.1 Genotypic statistics of 39 sweet corn inbred lines based on 1031 SNPs

2.2 自交系聚类分析结果

根据39份自交系在1 031个SNP位点的基因分型数据,通过PowerMarker V3.25软件,并应用Nei's算法计算两两自交系之间的遗传距离,构建NJ聚类图,进行聚类分析(图2)。结果表明,自交系间的遗传距离变化范围为0.032~0.678,平均值为0.430。其中,自交系TN68与T1104-2之间遗传距离最大,自交系TN68与TN98之间遗传距离最小。

类群划分结果表明,供试39份自交系可被划分为5大杂种优势类群。矮大华、T16、KY188、T1133-2共4个自交系被划分为第一类群,因均含有华珍母本血缘,又称为华珍母本群;D6644、京甜糯2、

D6644-6、京甜糯68、ZN6共5个自交系被划分为第二类群,又称为京甜糯2群;TN98、TN68、TN2965共3个自交系被划分为第三类群,因均选自于彩甜糯杂交种,又称为彩甜糯群;第四类群由T2497-4、YC09、SH-241、SH-251、T1093-1、1118、26、T9、双金11、金杂11、TF60、BKL、T68W、YC09、T1104-2、YC10、美白3、A203、CB1、YC27-1、T8367、T8345、T784-3、T2501、T764-6共25个自交系组成,因其中大部分自交系为温带种质,又称为温带种质群;自交系KY99、T268被划分为第五类群,又称为华珍父本群。

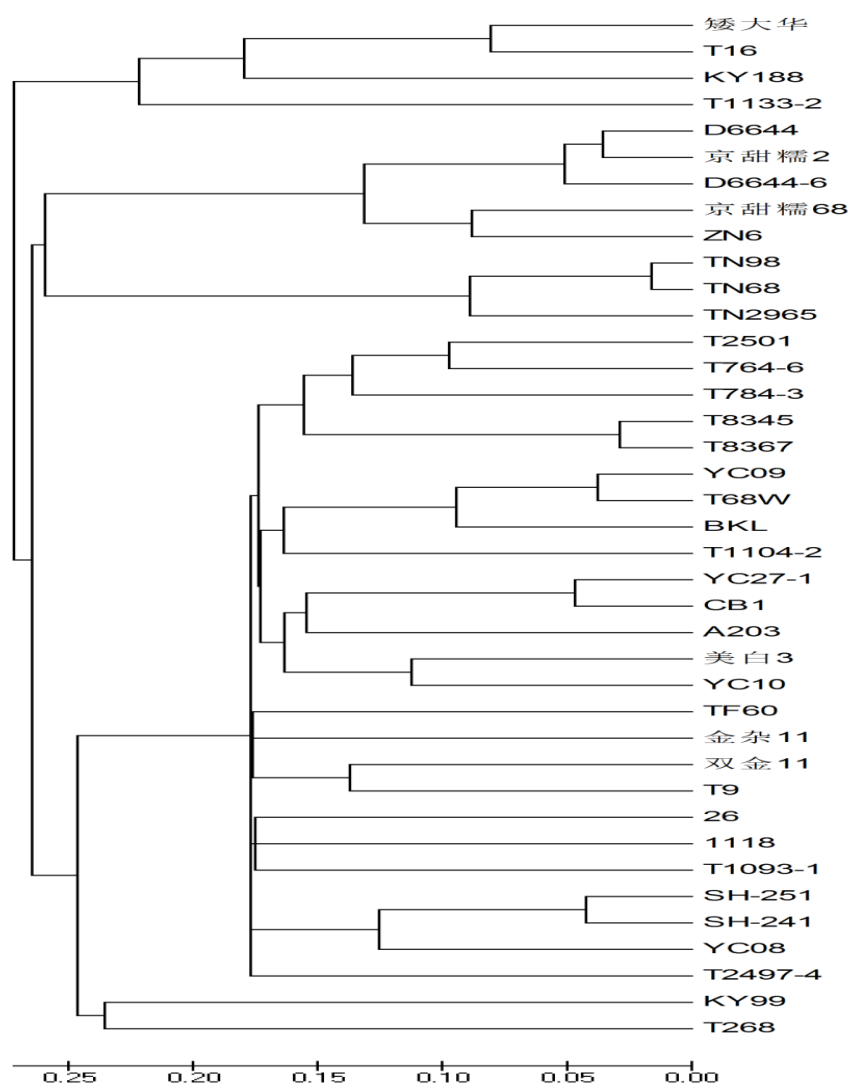


图2 基于SNP标记的39份自交系NJ聚类图

Fig.2 Neighbor-joining (NJ) trees for 39 inbred lines based on SNP markers

根据类群划分结果,计算出5个杂种优势群的群体间遗传距离(表2),5个类群之间的遗传距离变化范围较小,在0.394~0.445之间,其中华珍父本群

与温带种质群之间的遗传距离为0.394,彩甜糯群与华珍父本群、彩甜糯群与温带种质群之间的遗传距离最远,均为0.445。

表2 杂种优势群体间的遗传距离
Table 2 Genetic distance between different heterotic groups

群体 Group	华珍母本群 Huazhen maternal	京甜糯2群 Jingtiannuo2	彩甜糯群 Colorful sweet-waxy	温带种质群 Temperate
京甜糯2群	0.423			
彩甜糯群	0.437	0.410		
温带种质群	0.419	0.395	0.445	
华珍父本群	0.410	0.422	0.445	0.394

3 讨论

分子标记的发展使得在分子水平上研究玉米遗传多样性成为可能。国内外诸多学者利用SSR标记研究了不同来源甜玉米种质的遗传多样性并划分了类群。近年来,SNP标记因其位点丰富、自动化程度高等优点,逐渐取代了传统标记,并在普通玉米种质遗传组成分析上有了广泛的应用。

本研究选取1 031个SNP位点对39份甜玉米自交系进行基因型分析,结果表明,1 031个SNP位点的杂合率平均值为3%,缺失率平均值为4.6%,多态性信息含量的平均值为0.290。本研究选用的1 031个SNP位点具有较高的多态性和品种区分能力。杂种优势类群划分结果表明,39份自交系被划分为5个杂种优势群,划分结果与系谱来源有较好的一致性,如D6644、京甜糯2、D6644-6、京甜糯68均为二环系(SH-251×白糯6)选育而来,被聚为同一类群;自交系T8345与T8367均选自美国杂交种520,二者遗传距离为0.057,被聚到一起,说明利用SNP标记对甜玉米种质资源进行杂种优势群划分能够获得比较理想的结果。

本研究所划分的5个杂种优势群分别为华珍母本群、京甜糯2群、彩甜糯群、温带种质群和华珍父本群。通过聚类分析发现,我国优良超甜玉米品种华珍的父、母本被划分到不同类群。甜玉米品种锦甜10(矮大华×美白3)的母本来自华珍母本群,父本来自温带种质群,因此,华珍母本群×华珍父本群、华珍母本群×温带种质群是甜玉米品种选育的优良杂优模式;华珍母本群均为亚热带种质,因此亚热带种质×温带种质也是值得探索的主要模式。另外,本研究中彩甜糯群与华珍父本群、温带种质群间的遗传距离最远,可探讨他们之间新的杂优模式,以提高育种效率。

参考文献:

[1] 郑洪建,顾卫红,陈龙英,等. 甜玉米遗传育种研究进展及综合利用(综述)[J]. 上海农业学报, 2002, 18(2): 28-31.

Zheng H J, Gu W H, Chen L Y, et al. General situation about the research advance on genetic breeding of sweet maize and its exploitation[J]. Acta Agriculturae Shanghai, 2002, 18(2): 28-31. (in Chinese)

- [2] 宋同明. 甜玉米和超甜玉米[J]. 作物杂志, 1985(1): 18-19.
Song T M. Sweet corn and super-sweet corn[J]. Crops, 1985(1): 18-19. (in Chinese)
- [3] 曾孟潜,刘雅楠,杨涛兰,等. 甜玉米、笋玉米的起源与遗传[J]. 遗传, 1999, 21(3): 44-45.
Zeng M Q, Liu Y N, Yang T L, et al. Tiu Y N, evolution and genetics of sweet coweet Tbaby coab[J]. Hereditas, 1999, 21(3): 44-45. (in Chinese)
- [4] 胡建广,王子明,李余良,等. 我国甜玉米育种研究概况与发展方向[J]. 玉米科学, 2004, 12(1): 12-15.
Hu J G, Wang Z M, Li Y L, et al. General situation and development direction of sweet corn breeding in China[J]. Journal of Maize Science, 2004, 12(1): 12-15. (in Chinese)
- [5] 姚文华,韩学莉,汪燕芬,等. 我国甜玉米育种研究现状与发展对策[J]. 中国农业科技导报, 2011, 13(2): 1-8.
Yao W H, Han X L, Wang Y F, et al. Research status and development strategy for sweet corn breeding in China[J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2011, 13(2): 1-8. (in Chinese)
- [6] Smith J S C, Chin E C L, Shu H, et al. An evolution of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): Comparison with data from RFLPs and pedigree[J]. Theor Appl Genet, 1997(95): 163-173.
- [7] 袁力行,傅骏骅, Warburton M, 等. 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[J]. 遗传学报, 2000, 27(8): 725-733.
Yuan L X, Fu J H, Warburton M, et al. Genetic diversity analysis of maize (*Zea mays* L.) inbred lines using RFLP, SSR, AFLP and RAPD markers[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2000, 27(8): 725-733. (in Chinese)
- [8] 钟昌松,徐利远,余桂蓉,等. 20份特用玉米自交系亲缘关系的 SSR 标记研究[J]. 玉米科学, 2006, 14(4): 43-46.
Zhong C S, Xu L Y, Yu G R, et al. Genetic relationship among 20 specific maize inbreds studied by SSR Markers[J]. Journal of Maize Sciences, 2006, 14(4): 43-46. (in Chinese)
- [9] 胡俏强,张晓林,陈舜权,等. 92份甜玉米自交系的 SSR 遗传多样性分析[J]. 江苏农业学报, 2013, 29(5): 967-973.
Hu Q Q, Zhang X L, Chen S Q, et al. Genetic diversity in 92 sweet maize inbred lines revealed by SSR markers[J]. Jiangsu J. of Agri. Sci., 2013, 29(5): 967-973. (in Chinese)

(下转第 68 页)

- Wen K, Li L, Liu Y Q, et al. Study on bio-haploid inducing and doubling efficiency in maize[J]. Journal of China Agricultural University, 2006, 11(5): 17-20. (in Chinese)
- [8] 徐国良,代玉仙,刘晓丹,等. 玉米单倍体诱导率和加倍率研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(2): 1-5.
Xu G L, Dai Y X, Liu X D, et al. Research on the induced rates and the doubling rates of haploid in maize[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(2): 1-5. (in Chinese)
- [9] 才卓,徐国良. 玉米杂交诱导单倍生殖(单倍体)选育自交系技术规范(暂行版)[J]. 玉米科学, 2009, 17(5): 1-4.
Cai Z, Xu G L. The specification of using haploid breeding of hybrid maize breeding the inbred lines(Provisional Edition)[J]. Journal of Maize Sciences, 2009, 17(5): 1-4. (in Chinese)
- [10] 慈佳宾,李继竹,刘振库,等. 抗微管除草剂对玉米单倍体加倍效果研究[J]. 玉米科学, 2012, 20(5): 10-14.
Ci J B, Li J Z, Liu Z K, et al. Doubling effect of anti-microtubule herbicides on the maize haploid[J]. Journal of Maize Sciences, 2012, 20(5): 10-14. (in Chinese)
- [11] 唐启义,冯明光. 实用统计分析及其DPS数据处理系统[M]. 北京: 科学技术出版社, 2002.
- [12] 张如养,段民孝,赵久然,等. 单倍体技术在玉米种质改良和育种中的应用方向[J]. 作物杂志, 2012(5): 4-7.
Zhang R Y, Duan M X, Zhao J R, et al. Haploid technology direction in maize germplasm improvement and breeding[J]. Crops, 2012(5): 4-7. (in Chinese)
- [13] 刘志增,宋同明. 玉米单倍体雌雄育性的自然恢复以及染色体的化学加倍[J]. 作物学报, 2000, 26(6): 947-952.
Liu Z Z, Song T M. Fertility spontaneously restoring of inflorescence and chromosome doubling by chemical treatment in maize haploid[J]. Acta Agronomica Sinica, 2000, 26(6): 947-952. (in Chinese)
- [14] 黎亮,李浩川,徐小炜,等. 玉米孤雌生殖单倍体诱导效率优化方法研究[J]. 中国农业大学学报, 2012, 17(1): 9-13.
Li L, Li H C, Xu X W, et al. Preliminary optimization of *in-vivo* haploid induction in maize[J]. Journal of China Agricultural University, 2012, 17(1): 9-13. (in Chinese)
- [15] 段民孝,赵久然,刘新香,等. 不同种植地点对玉米单倍体自然加倍率的影响[J]. 作物杂志, 2012(2): 68-70.
Duan M X, Zhao J R, Liu X X, et al. Study on the effect of planting place in maize haploid doubling rate[J]. Crops, 2012(2): 68-70. (in Chinese)

(责任编辑:朴红梅)

(上接第62页)

- [10] 邹喻苹,葛颂. 新一代分子标记—SNPs及其应用[J]. 生物多样性, 2003, 11(5): 370-382.
Zou Y P, Ge S. A novel molecular marker—SNPs and its application [J]. Biodiversity Science, 2003, 11(5): 370-382. (in Chinese)
- [11] 宋伟,王凤格,田红丽,等. 利用核心 SNP 位点鉴别玉米自交系的研究[J]. 玉米科学, 2013, 21(4): 28-32.
Song W, Wang F G, Tian H L, et al. Identification of maize inbred lines using core SNP loci[J]. Journal of Maize Sciences, 2013, 21(4): 28-32. (in Chinese)
- [12] Yan J B, Yang X H, Hector S, et al. High-throughput SNP genotyping with the golden gate assay in maize[J]. Mol. Breed, 2010, 25: 441-451.
- [13] Xiao H Y, Shi B G, Shu T X, et al. Characterization of a global germplasm collection and its potential utilization for analysis of complex quantitative traits in maize[J]. Mol. Breeding, 2010, 28: 511-526.
- [14] 郑德波,杨小红,李建生,等. 基于SNP标记的玉米株高及穗位高QTL定位[J]. 作物学报, 2013, 39(3): 549-556.
Zheng D B, Yang X H, Li J S, et al. QTL identification for plant height and ear height based on SNP mapping in maize(*Zea mays* L.) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2013, 39(3): 549-556. (in Chinese)
- [15] Wu X, Li Y X, Shi Y S, et al. Fine genetic characterization of elite maize germplasm using highthroughput SNP genotyping[J]. Theor. Appl. Genet, 2014, 127: 624-631.
- [16] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from milligram amounts of fresh, herbarium and mummified plant tissues[J]. Plant Mol Biol, 1985, 5: 69-76.
- [17] 吴金凤,宋伟,王蕊,等. 利用SNP标记对51份玉米自交系进行类群划分[J]. 玉米科学, 2014, 22(5): 29-34.
Wu J F, Song W, Wang R, et al. Heterotic grouping of 51 maize inbred lines by SNP markers[J]. Journal of Maize Sciences, 2014, 22(5): 29-34. (in Chinese)
- [18] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis[J]. Bioinformatics, 2005, 21(9): 2128-2129.
- [19] Lu Y, Yan J, Guimaraes C T, et al. Molecular characterization of global maize breeding germplasm based on genome-wide single nucleotide polymorphisms[J]. Theor. Appl. Genet, 2009, 120(1): 93-115.

(责任编辑:李万良)