

墨白 964 群体 5 轮混合选择遗传变异的分子生物学研究

魏 昕, 荣廷昭, 潘光堂

(四川农业大学玉米研究所 / 教育部作物基因资源与遗传改良教育部重点实验室, 雅安 625014)

摘要:【目的】研究控制双亲的混合选择法对墨白 964 群体在四川生态条件下经过 5 轮适应性改良的效果。【方法】采用性状表型分析和 SSR 分子标记技术。【结果】经过 5 轮混合选择后, 开花期性状有显著的选择增益, 多数性状的表型变异系数随着选择世代的增加有所下降。40 对 SSR 引物在各轮群体中扩增出 418 个等位位点, 有 88.5% 的遗传多样性分布于群体内, 有 11.5% 分布于群体间。群体内的遗传多样性大于群体间的遗传多样性, 且群体内的遗传差异随着选择的增加呈下降趋势。基因杂合度、多态性位点数和多态性位点百分率都呈递减趋势。原始群体 C₀ 的基因型种类多, 为 418 种, 且频率分布较散, 选择后的高代群体 C₄、C₅ 的基因型种类少且频率分布较集中。【结论】选择群体的遗传变异逐渐减小, 这可能是由于连续对开花期性状定向选择的结果, 也可能还与群体的有效含量较小和选择强度大所引起的遗传漂变有关。

关键词: 玉米; 混合选择; 选择响应; SSR 标记; 性状

The Genetic Diversity Variation Revealed by SSR Markers in the Tropical Maize Population Pob32 After 5 Cycles of Mass Selection

WEI Xin, RONG Ting-zhao, PAN Guang-tang

(Maize Research Institute, Sichuan Agricultural University/ Key Laboratory of Crop Genetic Resources and Improvement, Ministry of Education, Yaan 625014)

Abstract: 【Objective】The biparental mass selection was used to improve the tropical population Pop. 32 for 5 cycles for photoperiod sensitivity in Sichuan Povince, China. 【Method】Phenotype analysis and SSR molecular markers were used in this research. 【Result】Results showed that the traits of flowering were significantly improved after 5 cycles of mass selection. The phenotypic variation coefficients of most of the traits decreased with the advances of generation of selection. With the 40 pairs of SSR markers used, a high level of genetic diversity was in C₀ population, a total of 418 alleles were detected in the populations. Some 88.5% of the genetic diversity were estimated intra-populations and 11.5% were estimated inter-populations. The inter-population's genetic diversity was much more than the intra-population's, and the genetic diversity within populations declined with the advances of generation of the selection. The number of polymorphic loci of per population and the ratio of polymorphic loci were also declined as selection. The genotypic numbers of Pop32.C₀ was 418, which was the most but the frequency was dispersed. The genotype of Pop32 C₄ and Pop32.C₅ were small and the frequencies were concentrated. 【Conclusion】The results suggest that the genetic variation declined slowly is possible due to the continuous artificially selection for the early silking and the genetic drift induced by selection intensity or smaller effective population size.

Key words: Maize; Mass selection; Response to selection; SSR markers; Traits

0 引言

【本研究的重要意义】以中国农业科学院从墨西哥

哥引进的墨白 964 及其改良群体作供试材料, 在利用常规方法分析控制双亲的混合选择对热带种质群体的改良效果的基础上, 对各轮群体进行基于 SSR 标记的

收稿日期: 2004-12-23; 接受日期: 2005-10-25

基金项目: 农业部“引进国际先进农业科学技术”项目(2003-Q03)、教育部长江学者和创新团队发展计划(IRT0453)、亚洲开发银行 AMBIONET 项目

作者简介: 魏 昕(1976-), 男, 博士研究生, 研究方向为分子数量遗传学。E-mail: weixin04@163.com。通讯作者荣廷昭, 教授, 博士生导师, 中国工程院院士, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: rongtz@sicau.edu.cn。通讯作者潘光堂, 教授, 博士生导师, 研究方向为作物遗传育种。Tel: 13608269331; E-mail: pangt@sicau.edu.cn

分子水平遗传变异评估, 以期为该群体的进一步改良和利用提供理论依据。【前人研究进展】玉米是利用分子标记最早的作物之一, 在玉米群体改良中, 分子标记主要用来检测玉米群体内和群体间的遗传变异^[1]。Labate 等^[2]1997 年用 82 个 RFLP 位点对 Iowa 抗螟综合种 (BSCB₁) 和 BSSS 在相互轮回选择后的群体 (C₀ C₁₂) 进行遗传多样性分析, 得出了在高代群体中遗传多样性下降的结论。Labate 等 1999 年用 82 个 RFLP 位点对 BSSS (R) 和 BSCB₁ (R) 的 C₀ 和 C₁₂ 群体比较了 55 个中性位点与 27 个非中性位点, 估计了群体间杂交 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 等 4 种分子标记, 分析了 31 个玉米自交系的遗传多样性的同时, 对不同标记系统的相对效率作了比较研究, 认为 AFLP 和 SSR 是研究遗传多样性的最好标记^[3-5]。Lamkey 等在 2000、2003、2005 年在 Crop Science 等刊物上发表了多篇群体数量遗传学方面的文献^[6-9]。袁力行等^[10]利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 等 4 种分子标记方法对中国常用的 15 个玉米骨干自交系进行的遗传多样性研究表明, 4 种标记都能用于遗传多样性研究, 结果与系谱分析基本一致, 其中 SSR 标记最适合玉米种质的遗传多样性分析。【本研究切入点】从热带、亚热带地区引进的玉米种质受光温影响在温带种植常表现出明显的不适应性, 因而需要在引种后进行驯化改良。目前许多这类种质已成功引入中国, 但对这些群体驯化改良效果和群体内、群体间的遗传变异情况的变化趋势尚缺乏定量分析。【拟解决的关键问题】分析并阐明上述问题, 对群体改良后遗传变异的评估和玉米种质的扩增具有十分重要的理论指导和实践意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为墨白 964 (Pob.32) 的原始群体 C₀ 和经过 5 轮混合选择的群体 (C₁~C₅)。墨白 964 属白粒 ETO (热带低地硬粒型) 种质, 是用哥伦比亚 1 号和委内瑞拉 1 号 (古巴黄硬粒) 的高代杂交组合与哥伦比亚、委内瑞拉、阿根廷、巴西、古巴、墨西哥、波多黎各和美国的复合种质杂交, 挑选出 11 个果穗合成的群体。具有抗病性强、持绿期长、生物学产量高等遗传特性。属热带中熟硬粒型白粒群体, 与 Tuxpeno 种质有极好的配合力。

1.2 改良群体的田间试验设计

试验于 2003 年 4 月 24 日在四川农业大学涪江农场播种。随机完全区组设计, 3 次重复, 每小区 20 行,

每行 10 穴, 每穴留单株; 行距 90 cm, 株距 30 cm。每小区随机选 30 株考察性状。以单株为单位调查株高、穗位、播种至抽丝日数, 播种至散粉日数、播种至成熟日数、穗长、穗行数、行粒数、穗重、轴重、穗粗、轴粗、秃尖、籽粒深度、百粒重和群体产量等性状。

1.3 基因组 DNA 提取

从每个群体中随机选取 30 个单株 (与田间调查的相同), 用 2×CTAB 法抽提并纯化基因组 DNA。

1.4 SSR 扩增

以基础群体 C₀, 用 CIMMYT 推荐的分析玉米遗传多样性的 85 对 SSR 引物, 进行扩增筛选, 从中选出扩增条带清晰、具明显多态性的引物, 对 5 轮改良群体进行扩增分析。PCR 扩增体系包括 MgCl₂、Taq Buffer (10×; Mg-free)、dNTPs、Taq Enzyme、Primers、基因组 DNA, ddH₂O 总体积 15 μl。扩增反应在 HB-PX220 PCR 或 PTC-100 PCR 上进行。PCR 扩增条件: 94℃ 5 min; 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 1 min, 35 个循环; 最后 72℃ 延伸 10 min, 然后 4℃ 保存。PCR 扩增产物采用 6% 变性聚丙烯酰胺凝胶 (7.67 mol·L⁻¹ Urea) 电泳。

1.5 数据分析

多态性谱带的数量化处理。根据 PCR 扩增结果, 对表现出多态性的扩增谱带数量化: 在相同迁移位置有带记为“1”, 无带记为“0”, 缺失数据记为“9”, 建立数据库。基因杂合度按根井正利^[11]提出的计算公式: h (位点的基因杂合度) = $1 - \sum fi^2$ (fi : i th 等位基因频率); 遗传多样性指数的估算参 Wachira^[12]。

所有数据是由软件 Excel、DPS3.01 和 NTSY Spc2.1 完成。

2 结果与分析

2.1 开花期性状的直接选择响应

方差分析表明, 各轮群体间播种至抽丝日数、播种至散粉日数、雌雄间隔天数 (ASI)、播种至成熟等性状差异达显著水平。改良群体播种至抽丝日数、播种至散粉日数和 ASI 等有显著缩短趋势。其中, C₅ 比 C₀ 提早抽丝 3.55 d, 平均每轮提早 0.71 d, 线性回归响应 (-0.78) 与实际选择增益相近 ($F=53.62$, 显著水平 0.0019, $R^2=0.93$); C₅ 比 C₀ 早散粉 1.51 d, 平均每轮提早 0.30 d, 线性回归响应 (-0.32) 与实际选择增益一致 ($F=24.17$, 显著水平 0.008, $R^2=0.858$); 经过 5 轮混合选择后 ASI 缩短了 2.04 d, 平均每轮提早

0.41 d, 线性回归响应 (-0.46) 与实际选择增益一致 ($F=15.01$, 显著水平 0.0179, $R^2=0.79$)。经过 5 轮混合选择, C_5 的播种至成熟日数比 C_0 缩短 3.18 d, 平均每轮缩短 0.64 d 与线性回归响应 (-0.66) 相吻合, 决定系数达 0.9207。图 1、2 仅列出 ASI 和播种至抽丝日数的线性响应。

2.2 各轮改良群体表型变异系数的比较

对差异显著的性状 (不含群体产量) 计算各轮群

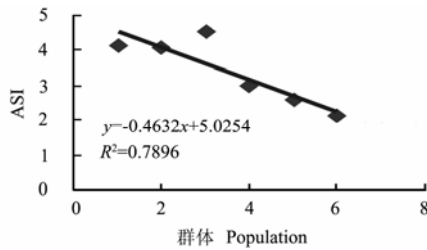


图 1 ASI 的线性回归响应

Fig. 1 The linear response of ASI over 5 cycles of mass selection in Pop 32

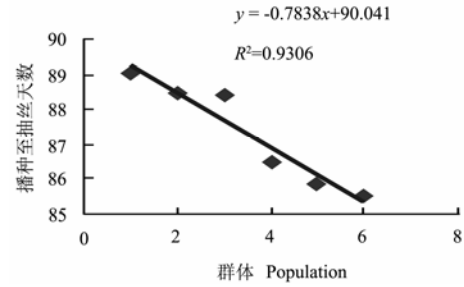


图 2 抽丝前天数的线性回归响应

Fig. 2 The linear response of to silking over 5 cycles of mass selection in Pop 32

体的表型变异系数 CV (%)。结果表明, 改良群体多数性状的表型变异系数均有不同程度下降, 但轴重、轴粗、ASI 的表型变异系数有所波动。且 ASI 的表型变异系数大, 说明 ASI 仍然保持着较丰富的遗传变异。总的来说, 适应性混合选择使群体的遗传变异逐渐变小 (表 1)。

表 1 各轮群体性状的表型变异系数 CV (%)

Table 1 Variation coefficient for traits in different cycles of improved Pob32 populations

群体 Pop	抽丝 Days to Silking	散粉 Pollen Shedding	ASI Cob Diameter	轴粗 Cob Diameter	轴重 Cob Weight	百粒重 100-kernell Weight	穗重 Ear weight	行粒数 Kernels per row	生育期 Maturity	穗长 Ear Length	穗粗 Ear diameter	籽粒 Kernel depth
C_0	5.93	4.9	74.6	10.96	25.24	16.92	33.97	24.08	5.21	15.78	10.52	17.6
C_1	5.75	3.92	85.8	11.72	30.11	14.87	33.91	24.72	4.44	16.36	10.3	17.71
C_2	4.86	3.36	74	10.5	26.76	14.87	28.03	25.68	4.62	15.14	9.07	15.02
C_3	4.24	3.49	80.6	9.64	25.34	14.41	26.85	21.22	4.78	13.15	8.35	15.51
C_4	5.47	4.02	94.2	10.14	27.37	15.35	26.68	19.34	5.23	15.87	8.17	12.84
C_5	4.71	3.41	81.1	10.52	32.61	14.77	29.29	21.51	4.6	14.57	9.14	14.8

2.3 改良群体遗传差异的分子检测

首先以墨白 964- C_0 群体的 30 个单株为材料, 根据 CIMMYT 推荐的分析玉米遗传多样性的 85 对 SSR 引物对进行筛选, 然后用差异引物对其余 5 轮群体的 150 个单株进行扩增。筛选结果表明, 其中 40 对引物的扩增产物在 6% 的聚丙烯酰胺凝胶上具有多态性, 带型稳定, 分布于玉米 10 条染色体上; 各轮群体间共检测到 418 个等位基因变异, 每对引物检测到 3~22 个等位基因, 平均为 10.5 个, 其余的 45 对引物有的没有差异。

2.3.1 改良群体轮间多态性位点比较 根井正利定

义多态性位点为群体内各等位基因频率小于或等于 0.99 的位点。陈家宽^[13]进一步解释为, 当居群中某位点有 2 个以上的等位基因, 且每个等位基因频率均在 0.01 以上时, 被认为是多态位点。表 2 给出按照上述指标 (0.01~0.99) 统计的各群体多态性位点数及其比例 (多态位点与扩增位点的百分比)。多态性位点越多和多态性位点比例越大, 说明群体的遗传变异就越丰富。以本试验 40 对有差异的 SSR 引物共 418 个扩增位点计, C_0 群体多态性位点数为 386 个, 多态性位点百分率为 88.0%; C_1 群体多态性位点数为 316 个 (75.6%); C_2 群体多态性位点数为 304 个 (72.7%);

C₃ 群体多态性位点数为 293 个 (70.1%); C₄ 群体多态位点数为 283 个 (67.7%); C₅ 群体多态位点数为 267 个 (63.9%)。多态性位点数的选择响应 (-0.4168) 与实际选择增益 (-0.4708) 基本吻合, 决定系数达 0.911 ($F=17.81$, 显著水平 0.0135); 多态性位点百分率的选择响应 (-0.0428) 也与实际选择增益 (-0.0491) 基

本吻合, 决定系数达 0.8767 ($F=53.88$, 显著水平 0.0018)。多态性位点数与百分率都呈依次递减趋势, 说明改良群体的遗传变异逐渐减小。从表 2 中可以很直观地看到每对引物的多态性位点数和多态性位点百分率在各轮群体中的变化情况。

表 2 多态性位点数及百分率

Table 2 The number and ratio of polymorphic loci for each SSR primer detected in improved Pob32 populations

引物 Primer	扩增位点数 No. of alleles amplified	C ₀ 多态位点		C ₁ 多态位点		C ₂ 多态位点	
		Polymorphic loci detected in C ₀		Polymorphic loci detected in C ₁		Polymorphic loci detected in C ₂	
		数量 No.	比例 Ratio	数量 No.	比例 Ratio	数量 No.	比例 Ratio
P123	13	12	0.923	8	0.615	8	0.615
P076	21	18	0.857	15	0.714	14	0.667
P328175	12	12	1.000	9	0.750	12	1.000
B118	14	14	1.000	14	1.000	12	0.857
P037	7	7	1.000	5	0.714	5	0.714
P047	14	9	0.643	11	0.786	9	0.643
U1279	12	9	0.750	12	1.000	9	0.750
P065	14	8	0.571	10	0.714	10	0.714
P087	17	17	1.000	11	0.647	7	0.412
P448880	11	10	0.909	5	0.455	4	0.364
U1304	6	4	0.667	6	1.000	6	1.000
P120	8	8	1.000	8	1.000	8	1.000
U1122	11	11	1.000	4	0.364	2	0.182
P083	22	20	0.909	12	0.545	11	0.500
P014	12	11	0.917	11	0.917	9	0.750
P070	9	9	1.000	6	0.667	8	0.889
U1152	17	17	1.000	15	0.882	15	0.882
P062	7	7	1.000	6	0.857	6	0.857
P032	4	2	0.500	2	0.500	2	0.500
U1169	5	5	1.000	5	1.000	5	1.000
P041	7	7	1.000	7	1.000	7	1.000
P108411	9	6	0.667	9	1.000	8	0.889
U1196	7	6	0.857	7	1.000	6	0.857
P029	6	6	1.000	6	1.000	6	1.000
U1061	9	9	1.000	2	0.222	9	1.000
P085	3	3	1.000	3	1.000	3	1.000
P420701	8	8	1.000	8	1.000	8	1.000
P423796	11	9	0.818	9	0.818	9	0.818
P308707	14	11	0.786	13	0.929	14	1.000
P96100	4	4	1.000	4	1.000	4	1.000
B1536	9	9	1.000				
P084	8	6	0.750	8	1.000	6	0.750
P079	13	11	0.846	13	1.000	11	0.846
P093	14	12	0.857	10	0.714	12	0.857
U1399	14	14	1.000	10	0.714	9	0.643
P072	13	13	1.000	10	0.769	6	0.462
P452693	5	5	1.000	5	1.000	5	1.000
P299852	9	7	0.778	7	0.778	9	1.000
P127	5	5	1.000	3	0.600	3	0.600
U1153	7	7	1.000	7	1.000	7	1.000
总计 Total	418	368	0.880	316	0.756	304	0.727

续表 2 Continued Table 2

引物 Primer	扩增位点数 No. of alleles amplified	C ₃ 多态位点		C ₄ 多态位点		C ₅ 多态位点	
		Polymorphic loci detected in C ₃		Polymorphic loci detected in C ₄		Polymorphic loci detected in C ₅	
		数量 No.	比例 Ratio	数量 No.	比例 Ratio	数量 No.	比例 Ratio
P123	13	7	0.538	7	0.538	8	0.615
P076	21	17	0.810	13	0.619	15	0.714
P328175	12	12	1.000	12	1.000	10	0.833
B118	14	5	0.357	4	0.286	4	0.286
P037	7	5	0.714	5	0.714	3	0.429
P047	14	9	0.643	9	0.643	2	0.143
U1279	12	9	0.750	7	0.583	9	0.750
P065	14	8	0.571	10	0.714	10	0.714
P087	17	9	0.529	9	0.529	9	0.529
P448880	11	8	0.727	6	0.545	6	0.545
U1304	6	3	0.500	4	0.667	2	0.333
P120	8	8	1.000	8	1.000	8	1.000
U1122	11	3	0.273	7	0.636	6	0.545
P083	22	11	0.500	11	0.500	11	0.500
P014	12	9	0.750	9	0.750	9	0.750
P070	9	6	0.667	9	1.000	6	0.667
U1152	17	13	0.765	14	0.824	15	0.882
P062	7	6	0.857	6	0.857	6	0.857
P032	4	4	1.000	4	1.000	4	1.000
U1169	5	5	1.000	4	0.800	5	1.000
P041	7	7	1.000	6	0.857	6	0.857
P108411	9	8	0.889	7	0.778	7	0.778
U1196	7	5	0.714	6	0.857	5	0.714
P029	6	6	1.000	6	1.000	6	1.000
U1061	9	9	1.000	9	1.000	8	0.889
P085	3	3	1.000	3	1.000	3	1.000
P420701	8	6	0.750	8	1.000	6	0.750
P423796	11	9	0.818	5	0.455	9	0.818
P308707	14	14	1.000	10	0.714	9	0.643
P96100	4	3	0.750	3	0.750	3	0.750
B1536	9						
P084	8	8	1.000	6	0.750	6	0.750
P079	13	7	0.538	6	0.462	6	0.462
P093	14	12	0.857	14	1.000	12	0.857
U1399	14	14	1.000	12	0.857	14	1.000
P072	13	6	0.462	6	0.462	4	0.308
P452693	5	5	1.000	4	0.800	3	0.600
P299852	9	6	0.667	7	0.778	3	0.333
P127	5	3	0.600	2	0.400	2	0.400
U1153	7	5	0.714	5	0.714	7	1.000
总计 Total	418	293	0.701	283	0.677	267	0.639

2.3.2 改良群体轮间基因杂合度比较 刘勋甲等^[14]认为群体基因杂合度是度量某一基因位点上杂合子基因型占该位点所有基因型的比例, 如果该位点某一等位基因频率为 1, 则其它等位基因频率为 0, 说明该位点这一等位基因已固定, 其它等位基因已丢失。假如某一群体所有基因频率均为 1, 无疑失去了重组交换产生新基因型的潜力, 其结果是遗传基础狭窄。Nei^[15]指出平均杂合度适用于测定基因的变异, 吕宝忠^[16]认为一个群体的遗传变异范围可由平均基因多样性 (平

均杂合度) 来度量。本试验就 40 对 SSR 引物计算了基因杂合度 (h) 的范围和平均基因杂合度 (H), C_0 为 0.926~0.366, 平均为 0.793; C_1 为 0.915~0.264, 平均为 0.781; C_2 为 0.985~0.408, 平均为 0.775; C_3 为 0.901~0.304, 平均为 0.763; C_4 为 0.913~0.493, 平均为 0.752; C_5 为 0.896~0.291, 平均为 0.727, 实际选择增益 (-0.013) 与线性回归响应 (-0.012) 相一致 ($R^2=0.957$, $F=82.37$, 显著水平 0.0008), 表明随着选择轮次的增加, 群体的遗传变异减小。从表 3 还可

表 3 各轮群体的基因杂合度

Table 3 The genetic heterosity in of improved population Pob32 of different cycles

Primers	H (C_0)	H (C_1)	H (C_2)	H (C_3)	H (C_4)	H (C_5)
P123	0.878	0.860	0.859	0.790	0.788	0.807
P076	0.920	0.915	0.895	0.901	0.913	0.896
P328175	0.880	0.772	0.813	0.844	0.875	0.856
B118	0.912	0.914	0.908	0.735	0.613	0.634
P037	0.794	0.769	0.731	0.700	0.689	0.580
P047	0.825	0.797	0.798	0.744	0.747	0.291
U1279	0.855	0.893	0.839	0.841	0.837	0.846
P065	0.835	0.877	0.835	0.860	0.864	0.877
P087	0.893	0.830	0.795	0.883	0.844	0.832
P448880	0.845	0.621	0.985	0.813	0.725	0.701
U1304	0.522	0.707	0.706	0.510	0.497	0.462
P120	0.379	0.871	0.838	0.872	0.874	0.873
U1122	0.827	0.736	0.500	0.609	0.595	0.569
P083	0.924	0.866	0.861	0.876	0.869	0.871
P014	0.886	0.867	0.866	0.864	0.865	0.856
P070	0.838	0.807	0.737	0.759	0.746	0.755
U1152	0.926	0.901	0.911	0.891	0.900	0.895
P062	0.656	0.764	0.610	0.666	0.742	0.607
P032	0.366	0.264	0.408	0.304	0.517	0.459
U1169	0.673	0.738	0.759	0.746	0.585	0.684
P041	0.840	0.818	0.825	0.806	0.802	0.755
P108411	0.794	0.807	0.798	0.785	0.728	0.730
U1196	0.804	0.868	0.817	0.645	0.654	0.717
P029	0.739	0.825	0.788	0.762	0.823	0.783
U1061	0.863	0.748	0.698	0.753	0.797	0.749
P085	0.625	0.387	0.461	0.594	0.600	0.657
P420701	0.855	0.833	0.836	0.773	0.769	0.708
P423796	0.844	0.806	0.850	0.814	0.799	0.807
P308707	0.894	0.907	0.910	0.896	0.871	0.880
P96100	0.616	0.709	0.444	0.471	0.549	0.526
B1536	0.766					
P084	0.769	0.736	0.804	0.769	0.746	0.762
P079	0.858	0.864	0.852	0.879	0.809	0.776
P093	0.874	0.837	0.854	0.869	0.888	0.873
U1399	0.909	0.832	0.861	0.891	0.883	0.889
P072	0.905	0.780	0.765	0.849	0.748	0.743
P452693	0.718	0.724	0.758	0.753	0.737	0.769
P299852	0.764	0.740	0.762	0.792	0.766	0.667
P127	0.760	0.640	0.648	0.662	0.493	0.482
U1153	0.844	0.840	0.828	0.774	0.780	0.745
平均 Average	0.793	0.781	0.775	0.763	0.752	0.727

以看出,同一引物对各轮群体检测的杂合度存在差异,反映了不同群体在这一引物扩增的片段上存在频率上的差异。其中 P065 的基因杂合度有所增加; U1169、P029、P452693 有增大趋势; U1399、P093、P076、P328175、P087、U1279 基本不变; P085、P448880 在 C_1 突然减小,随后又逐渐增加; P120 的选择群体比 C_0 大得多; U1304 的 C_1 和 C_2 也是突然增大。表明一些位点的基因频率增大,一些位点的基因频率保持稳定,即一些位点遗传变异范围较大,通过重组产生新基因型的概率也增大。

2.3.3 改良群体轮间遗传多样性比较 计算了 $C_0 \sim C_5$ 等 6 轮群体的遗传多样性指数 (H_0)、群体平均遗传多样性指数 (H_{pop}) 和总群体的遗传多样性指数 (H_{sp}),分析了遗传多样性在群体内和群体间的分布 (H_{pop}/H_{sp} 和 $1-H_{pop}/H_{sp}$)。结果表明,遗传多样性在群体内和群体间的分布随引物不同而异,遗传多样性指数也随引物不同而有所不同。40 对引物的遗传多样性指数 (H_0) 分布在 0.5527~2.756 之间,平均为 1.891; C_1 的 H_0 分布在 0~2.643,平均 1.730; C_2 的 H_0 分布在 0~2.536,平均 1.658; C_3 的 H_0 分布在 0~2.5834,平均 1.608; C_4 的 H_0 分布在 0~2.438,平均 1.579; C_5 的 H_0 分布在 0~2.421,平均 1.482。实际选择增益 (-0.818) 和线性回归响应 (-0.0728) 基本吻合 ($R^2=0.9351$, $F=57.58^{**}$, $P<0.0016$)。 $C_0 \sim C_5$ 群体平均遗传多样性指数 (H_0) 逐渐减小,表明改良群体的遗传变异是逐渐减小的,但引物 U1304 的 H_0 在 C_1 和 C_2 突然增大; P120、U1169、P029、P084、P032 从 $C_0 \sim C_5$ 的 H_0 也有增大趋势; P062 的 H_0 波动性较大; P108411 与 P308707 的 H_0 在 C_1 、 C_2 、 C_3 较大。此外,由 40 对引物检测到的遗传多样性平均有 88.5% 分布在群体内,仅有 11.5% 分布于群体间,这与夏九成^[17]的研究结果不同。说明改良群体内的遗传多样性仍远远大于各轮改良群体间的遗传多样性,即群体墨白 964 经混合选择后每轮群体内仍然保持着较丰富的遗传变异,进一步选择将是有效的。

2.3.4 各轮改良群体间遗传距离的比较 在一群体内,如果每对个体间都存在较大的遗传距离,则该群体一定具有较丰富的遗传变异,也就是说群体内每对个体间遗传距离的平均数,可作为度量群体遗传变异的指标。本试验利用 40 对 SSR 引物的 418 个扩增位点计算了每轮群体的遗传距离(GD)及平均遗传距离,得 C_0 为 0.488, C_1 为 0.480, C_2 为 0.502, C_3 为 0.475, C_4 为 0.436, C_5 为 0.423,其中 C_2 最大,其次为 C_0 ,

C_5 为最小。遗传差异的总体趋势是减小的,显然早代(1,2 轮)的遗传多样性保持较好。

2.3.5 改良群体轮间基因型种类及频率比较 了解群体中基因型种类及频率,对评价各群体遗传构成及追踪选择前后基因型变化动态是非常重要的^[14]。统计 40 对引物扩增各轮群体的基因型种类及频率,并计算总和发现,原始群体 C_0 的基因型种类最多,为 418,且频率分布较散; C_1 为 412, C_2 为 382, C_3 为 357, C_4 为 317, C_5 为 318,呈依次减小的趋势,高代群体 C_4 、 C_5 的基因型种类较少且频率分布较集中,这可能是由于连续对早开花性状选择的结果,也可能还与有效群体含量和选择强度引起的遗传漂变有关。用同一引物检测各轮群体,或表现不同基因型,或同一基因型具有不同的频率。如 Umc1304 基因型 c 在 C_0 的频率为 24.1%, C_1 为 6.7%, C_2 为 16.7%, C_3 为 23.3%, C_4 为 43.3%, C_5 为 43.3%; Umc1304 的 C_1 出现了 C_0 没有的 e 和 f 基因型, C_2 又出现了 C_1 没有的 g 和 h 基因型,这可能是在混合选择过程中该位点的等位基因发生了重组交换,产生了新的基因型,也可能是发生了等位基因代换^[18]。一般而言,较稀有的等位基因总是倾向于因漂变而灭绝,较常见的等位基因则趋向于被固定。如此漂变下去,其结果将导致群体变异减少,杂合体比例降低,如 Phi065 在 C_0 中的基因型 A 占 6.7%, I 占 3.3%,在 C_1 中就消失了。总体来说,基因型的种类随选择进行呈减少的趋势。

3 讨论

3.1 分子检测与表型分析的比较

本研究对墨白 964 群体不仅进行了表型分析,还进行了 SSR 分子标记分析。从结果看,分子标记的结果与表型分析相吻合,即各轮群体农艺经济性状的表型变异系数和由分子标记揭示的遗传多样性指数、基因型种类、基因型频率、多态位点数、多态位点百分率和遗传距离的变化等均随着选择的进行,群体内个体间的遗传差异下降。这可能是连续对开花期性状定向选择的结果,也可能还与抽样较少而引起的检测的基因频率波动有关,也可能还与群体的有效含量较小和选择强度大所引起的遗传漂变有关。Labate 等用 RFLP 对衣阿华坚秆综合种(BSSS)和衣阿华抗螟综合种(BSCB1)经 12 轮相互轮回选择后的群体 C_{12} 及原始群体 C_0 进行遗传多样性分析,发现群体遗传多样性随着选择的进行因发生遗传漂移而下降,群体内基因多样性从 C_0 群体的 0.49 和 0.58 下降到 C_{12} 群体

的 0.34 和 0.32。本试验用 40 对引物检测到的遗传多样性指数平均有 88.5% 分布在群体内, 只有 11.5% 分布在群体间, 这表明 5 轮混合选择后群体内仍然保持着丰富的遗传变异, 继续选择将继续有效。武仙山等用小麦做的群体内遗传分化研究结果表明, 基因杂合度与多态性位点百分率的相关达 0.909 ($P < 0.01$)^[19]。本试验表明, 基因杂合度、多态性位点百分率、遗传多样性指数、遗传距离等分析结果表现一致且与表型研究相吻合, 都适合于改良后群体遗传变异的分析研究, 其中遗传多样性在群体内与群体间的分布更能反映出选择的有效性, 可以作为研究群体遗传多样性的重要测量指标。从遗传距离的分析来看 C_1 、 C_2 的遗传多样性保持较好, 与夏九成的结果相吻合。因此, 笔者认为 SSR 等分子标记技术与表型分析结合可作为检测玉米种质资源遗传多样性和研究群体改良效果的重要手段, 以减少环境影响带来的试验误差, 提高鉴定的准确性。

3.2 分子位点数与群体遗传差异信息的可靠性

SSR 技术能检测整个基因组, 其标记位点数是无限的, 一般检测的位点越多, 所提供的信息越可靠。因受研究经费和时间等因素的限制, 实际可分析利用的位点数是有限的。周泽扬等用桑蚕和桑属植物为材料, 探讨了分子统计学研究中 RAPD 分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系。研究发现, 所分析的位点数量与所能提供的信息量和可靠性之间存在着明显的相关, 当位点数在 20 以下时, 得到的遗传差异的信息极不可靠, 而当位点数达到 70 时, 就可能获得比较稳定可靠的信息^[20]。按照周泽扬等提出的方法, 笔者作了相应的计算并认为 SSR 分子位点数达 100 以上时, 可获得比较稳定可靠的信息。本试验筛选了 40 对有差异的 SSR 引物, 共扩增出 418 个位点, 覆盖了玉米基因组的一定区域, 所提供的信息量是比较可靠的。

3.3 热带玉米种质群体适应性改良及墨白 964 的育种价值探讨

在温带玉米育种项目中引进热带种质后, 首先要进行适应性鉴定, 同时可采用控制双亲的混合选择法对光周期敏感性进行适应性改良, 使之适应当地的生态条件, 以满足育种要求。随着选择的进行, 群体内个体间的遗传差异会因连续对性状的定向选择以及因群体含量和选择强度所引起的遗传漂变而出现下降趋势。因此, 如需增加选择次数, 则应尽可能扩大群体规模, 增加有效群体含量, 适当降低选择强度, 减小遗传漂移, 以保持种质群体的遗传多样性。从四川的

生态条件和试验结果来看, 可以把混合选择控制在 1~2 轮, 这样可以保持种质群体有较大的遗传多样性, 同时又在较短时间内解决群体的适应性。墨白 964 引入前称为 Pop.32, 系国际玉米小麦改良中心热带种质群体, 具有抗病性强、持绿期长、生物学产量高等遗传特性。研究表明, 它是较适合四川生态条件的外源种质之一。本研究表明墨白 964 具有丰富的遗传多样性。夏九成认为在 C_0 群体或 C_1 、 C_2 群体中选择到抗病、持绿期长、生物学产量高的个体机会更大, 但其植株、穗位较高且光周期反应敏感而使得其在温带玉米育种中的应用价值大打折扣。若按杂种优势群的原理, 用恰当的温带适应性种质与其杂交产生复合群体, 则不仅可保持杂交后代的抗病性, 还可降低株高, 钝化光周期敏感性。因此, 在中国黄淮海和东北等温带玉米生态区中, 可以通过导入热带种质的方法构建复合群体, 并进行轮回选择, 从中选育优良自交系, 供育种利用。由于西南山地玉米生态区与热带地区的纬度相近, 且地形地貌多样, 玉米生产所需要的杂交种应具备较强的抗逆性、适应性和耐粗放栽培等特性。因此, 分别选育具有温带种质和经过适应性改良的热带种质的优良自交系, 然后选育杂交种, 应是一种最佳的策略抉择。

4 结论

SSR 分子标记技术适合与玉米群体改良效果的评估, 随着群体改良的进行, 群体内的基因杂合度、多态位点数和多态位点百分率、群体内单株的遗传距离减小。改良后, 群体内的遗传多样性大于群体间的遗传多样性, 它可以作为群体改良效果是否有效的有力指标。利用分子标记技术可以在短期内对玉米群体的改良效果进行有效评估, 而无需等到所有玉米成熟以后, 节省了人力、物力和大量的时间。这样可以避开环境或者人为因素对表型的评估的不利影响。随着分子标记技术的发展和传统的数量遗传学理论相结合会将一些生命机理研究的更加透彻。

致谢: 中国农业科学院张世煌研究员对本文也提出了宝贵的意见, 在试验数据处理过程中得到了四川农业大学博士后吴元奇副教授的热情帮助, 特此表示衷心的感谢。

References

- [1] 王天宇, 黎 裕. 分子标记技术在玉米基因定位和辅助选择中的应用. 玉米科学, 2000, 8(4): 3-8.

- Wang T Y, Li S. Applications of molecular markers in gene tagging and assisted selection in Maize. *Journal of Maize Sciences*, 2000, 8(4): 3-8. (in Chinese)
- [2] Labate J A, Lamkey K R, Lee M, Woodman W L. Molecular genetic diversity after reciprocal recurrent selection in BSSS and BSCB1 maize populations. *Crop Science*, 1997, 37: 413-423.
- [3] Labate J A, Lamkey K R, Lee M, Woodman W L. Temporal change in allele frequency in two directionally selected maize populations. *Theor. Appl. Genet.* 1999, 99: 1166-1178.
- [4] Papi J. Random amplified polymorphic DNA- based evaluation of diversity in the hierarchical, open-ended population enrichment Maize breeding system. *Crop Science*. 2000, 40: 619-625.
- [5] Pejic I, Ajmone-Marsan P, Morgante M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize inbred lines detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor. Appl. Genet.*, 1998, (97): 1248-1255.
- [6] Peter S G, K. R. Lamkey. Effective population size and genetic variability in the BSS11 maize population. *Crop Science*, 2000, 40: 338-346.
- [7] Hagdojn S, Lamkey K R, Frisch M, Guimaraes P E O, Melchinger A E. Molecular Genetic diversity among progenitors and derived elite lines of BSSS and BSCB1 maize populations. *Crop Science*, 2003, 43: 474-482.
- [8] Edwards J W, Lamkey K R. Dominance and genetic drift: Predicted effects of population subdivision in a maize population. *Crop Science*, 2003, 46: 2006-2017.
- [9] Ho J C, Kresovich S, Lamkey K R. Extent and distribution of genetic variation in U. S. Maize: Historically important lines and their Open-Pollinated Dent and Flint Progenitors. *Crop Science*, 2005, 45: 1891-1900.
- [10] 袁力行, 傅俊华, Warburton M, 李新海, 张世煌, Khairallah M, 刘新芝, 彭泽斌, 李连成. 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: 725-733.
- Yuan L X, Fu J H, Warburton M, Li X H, Zhang S H, Khairallah M, Liu X Z, Peng Z B, Li L C. Comparison of genetic diversity among maize inbred lines based on RFLPs, SSRs, AFLPs and RAPDs. *Acta Genetica Sinica*, 2000, 27: 725-733. (in Chinese)
- [11] 根井正利. 分子群体遗传学与进化论. 王家玉译. 北京: 农业出版社, 1983.
- Masatoshi Nei. *Molecular Population Genetics and Evolution*. Translated by Wang J Y. Beijing: Agricultural Press, 1983. (in Chinese)
- [12] Wachira F N, et al, Detection of genetic diversity in tea (*Gamellia sinesis*) Using RAPD markers. *Genome*, 1995, 38: 201-210.
- [13] 陈家宽, 杨 继. 植物进化生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 1994.
- Chen J K, Yang J. *Plant Evolution Biology*. Wuhan: Wuhan University Press, 1994. (in Chinese)
- [14] 刘勋甲, 郑用琰, 刘纪麟. 玉米轮回选择群体遗传多样性 RAPD 分子标记评估. *中国农业科学*, 1999, 32(3): 14-20.
- Liu X J, Zheng Y L, Liu J L. Genetic diversity evaluation of maize recurrent selection population with RAPD marker. *Scientia Agricultura Sinica*, 1999, 32(3): 14-20. (in Chinese)
- [15] Nei M. *Molecular Population Genetics and Evolution*. North-Holland Publishing Company, 1975.
- [16] 吕宝忠, 钟 扬, 高莉萍译, 分子进化与系统发育. 北京: 高等教育出版社[美] Masatoshi Nei Sudhir Kumar, 2002.
- LÜ B Z, Zhong Y, Gao L P. *Molecular Evolution and Phylogenetics*. Beijing: High Education Press, Masatoshi Nei Sudhir Kumar, 2002. (in Chinese)
- [17] 夏九成, 杨克诚, 张怀渝. 混合选择对热带玉米群体墨白 964 的改良效应. *作物学报*, 2004, 10: 980-989.
- Xia J C, Yang K C, Zhang H Y. Effects of population improvement by Mass Selection on tropic maize population MW964. *Acta Agronomica Sinica*, 2004, 10: 980-989. (in Chinese)
- [18] 郭平仲. 群体遗传学导论. 北京: 农业出版社, 1993.
- Guo P Z. *An Introduction on Population Genetics*. Beijing: Agricultural Press, 1993. (in Chinese)
- [19] 武仙山, 李雅轩, 宋书娟, 郭平仲. 小麦异交群体选择分化的 RAPD 分析. *遗传*, 2001, 23(1): 33-37.
- Wu X S, Li Y X, Song S J, Guo P Z. The RAPD marker analysis of wheat outbreeding population due to selection differentiation. *Hereditas* (Beijing), 2001, 23(1): 33-37. (in Chinese)
- [20] 周泽扬, 夏庆友, 鲁 成, 冯丽春, 向仲怀. 分子系统学研究中分子位点权与遗传差异信息可靠性的关系. *遗传*, 1998, 20(5): 12-15.
- Zhou Z Y, Xia Q Y, Lu C, Feng L C, Xiang Z H. The correlation between the number of RAPD-loci and the reliability of the information genetic variation molecular phylogenetic studies. *Hereditas* (Beijing), 1998, 20(5): 12-15. (in Chinese)

(责任编辑 张淑兰)