

利用 RFLP 和 SSR 标记划分玉米自交系杂种优势群的研究*

袁力行¹ 傅骏骅¹ 张世煌¹ 刘新芝¹ 彭泽斌¹ 李新海¹

Warburton, M.² Khairallah, M.²

(¹中国农业科学院作物所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室, AMBIDNET 中国实验室, 北京 100081; ²国际玉米小麦改良中心应用生物技术中心, 墨西哥城 06600, 墨西哥)

提 要 利用 RFLP 和 SSR 标记对 29 个玉米自交系进行杂种优势群划分, 筛选出 56 个多态性 RFLP 探针酶组合, 66 对多态性 SSR 引物, 分别在供试材料中检测到 187 个和 232 个等位基因变异。两种方法比较表明, SSR 标记的平均多态性信息量(PIC, 0.54)高于 RFLP(0.42); 但对供试材料的遗传多样性评价基本一致, 平均遗传相似系数(GS)分别为 0.64 和 0.62。综合 RFLP 和 SSR 分析结果进行聚类分析, 将供试材料划分为四平头, 旅大红骨, LSC, BSSS 和 PA 五个类群, 划分结果与系谱分析基本一致, 并把系谱来源不清的种质划分到相应的杂种优势群。其中 PN 群的确认, 进一步完善了我国玉米种质杂种优势群的基本框架, 为育种实践提供了有价值的信息。

关键词 玉米; RFLP; SSR; 遗传相似系数; 杂种优势群

Heterotic Grouping of Maize Inbred Lines Using RFLP and SSR Markers

YUAN Li-Xing¹ FU Jun-Hua¹ ZHANG Shi-Huang¹ LU Xin-Zhi¹ PENG Ze-Bin¹
LI Xin-Hai¹ Warburton, M.² Khairallah, M.²

(¹ Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding, Ministry of Agriculture, AMBIDNET China Lab, Beijing 100081, China; ² Applied Biotechnology Center, CIMMYT, Mexico, D. F., 06600, Mexico)

Abstract Five heterotic groups were determined among 29 maize inbred lines using RFLP and SSR markers. A total of 56 polymorphic probe enzyme combinations and 66 polymorphic SSR primers were identified among the inbred lines, which produced 187 and 232 alleles respectively. Mean polymorphism information content (PIC) for RFLPs (0.42) was lower than that for SSRs (0.54), but mean genetic similarity (GS) were similar (0.62 & 0.64). The five heterotic groups based on both RFLPs and SSRs were Sipingtou, Luda Red cob, LSC, BSSS, and PA groups. They were consistent with the grouping based on the available pedigree data. Moreover, inbreds with unknown pedigree were assigned to the established heterotic groups. The identification of PA group provided a valuable guidance for maize hybrid breeding.

* 本研究受“九五”国家重点科技攻关项目(96-002-02-05-4)和亚洲玉米生物技术协作网(AMBIDNET)基金项目资助
收稿日期: 1999-11-19, 接受日期: 2000-04-20

Received on: 1999-11-19, Accepted on: 2000-04-20

Key words Maize (*Zea mays* L.); RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms); SSRs (Simple Sequence Repeat); Genetic similarity; Heterotic groups

合理准确地划分玉米杂种优势群, 建立相应的杂种优势模式, 才能有的放矢地改良自交系和选配杂交组合, 提高育种效率。近几十年来, 形态差异、地理来源、系谱追踪、配合力表现以及同功酶标记等方法相继被用于杂种优势群划分, 但都表现出局限性^[1, 2]。分子标记技术为玉米杂种优势群划分提供了新的工具。Mumm等(1994)^[3]利用46个RFLP探针酶组合将美国玉米生产上常用的148个自交系划分为LSC和BSSS两大群, 11个亚群。Dubreuil等(1996)^[4]利用63个RFLP探针酶组合将欧洲和北美的116个自交系划分为马齿和硬粒两大群, 12个亚群。Smith等(1997)^[5]报道了利用131对SSR引物对58个玉米自交系的划分结果, 并与RFLP标记进行比较, 表明两种划分结果高度相关($r=0.85$), 并与系谱分析基本吻合。众多研究表明, 应用分子标记划分玉米杂种优势群可行有效, 结果与系谱分析基本一致, 并且可以将系谱来源不清的种质划分到相应的杂种优势群^[6]。我国玉米种质日趋复杂, 对现有种质进行杂种优势群划分将对当前和今后的玉米育种工作有重要指导意义。国内虽有相关工作开展, 但鉴于实验方法的局限而难以得到合理的结论^[7-11]。本研究旨在利用分子标记技术对我国主要玉米自交系进行杂种优势群划分, 构建当前玉米种质杂种优势群的基本框架, 进一步提高杂种优势利用水平。

1 材料和方法

1.1 供试材料

所选29个供试自交系中大部分为我国玉米生产及育种上广泛应用的骨干自交系, 少量为本单位近年来选育的优良自交系, 均经多年自交, 遗传稳定。其中包括1997年郑州会议所确定的B73、丹340、Mo17和黄早四这4个标准测验种。自交系名称及系谱来源见表1。

1.2 分子标记分析

1.2.1 DNA提取 玉米植株于温室生长8~10周后, 每个自交系取10~12株混合收获叶片。按Saghai-Maroof(1984)CTAB方法抽提并纯化DNA^[12]。

1.2.2 RFLP分析 采用地高辛标记的非放射性RFLP分析。限制性酶切, 琼脂糖凝胶电泳, Southern吸印, 探针标记及分子杂交与检测等操作均参考CMMYT应用生物技术中心的实验流程^[13]。HindIII酶切的λDNA为分子量标准。每个样品泳道加入24.5 kb和1.5 kb的DNA片段作为中间分子量标准, 用于判断样品在凝胶中的迁移质量。研究采用70个UMC和BNL探针和两种限制性内切酶(*EcoRI*和*HindIII*)进行分析, 从中选择杂交带清晰且有多态性的探针酶组合统计数据。

1.2.3 SSR分析 采用20 μl PCR反应体系, 包括10 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 2.5 mmol/L MgCl₂, 150 μmol/L dNTP, 10%甘油, 0.3 μmol/L SSR引物, 1单位Taq酶, 50 ng DNA模板。扩增程序为94℃预变性1分钟, 再按94℃1分钟, 60℃2分钟, 72℃2分钟扩增25个循环; 最后72℃延伸5分钟。PCR扩增在PTC-225型PCR仪(MJ Research)上完成。SSR扩增产物在16%非变性聚丙烯酰胺胶上分离, 银染检测。HaeIII酶切ΦX174DNA为分子量标准, 每个样品泳道加入523 bp的DNA片段作为中间分子量标准。研究采用100对SSR引物进行分析, 从中选择扩增条带清晰且有多态性的SSR引物统计数据。

表 1 玉米自交系及系谱来源
Table 1 Maize inbred lines and their pedigrees

编号 No.	自交系 Inbred line	来源 Source
1	D 黄 212(DHuang212)	D 729 × 黄早四(D 729 × Huangzao4)
2	黄早四(Huangzao4)	塘四平头杂株(Tangshipingtou open pollination)
3	汶黄(W enhuang)	黄早四 × 汶青 1331 抗(Huangzao4 × W enqing1331 R)
4	中黄 204(Zhonghuang204)	M o 17 二环系(M o 17 recycling line)
5	关 17(Guan17)	M o 17 × 关 73(M o 17 × Guan73)
6	M o 17	C 103 × 187-2
7	B 37	B SSSC ₀
8	B 73	B SSSC ₅
9	B 84	B SSSC ₇
10	旅 9(L u9)	旅大红骨(L üDa Red Cob)
11	E 28	旅 9 × A 619(L ü × A 619)
12	丹 340(Dan340)	白骨旅 9 × 有稃玉米(Baigu Lu9 × Pod corn)
13	自 330(Zi330)	可利 67 × Oh43(Keli67 × Oh43)
14	5003	美 3147(M ei 3147)
15	掖 478(Ye478)	U 8112 × 5003
16	吉 853(J i853)	黄早四 × 自 330(Huangzao4 × Zi330)
17	鲁原 133(L uyuan133)	原齐 721 × 黄早四(Yuanqi721 × Huangzao4)
18	吉 846(J i846)	M o 17 × 吉 63(M o 17 × J i63)
19	掖 107(Ye107)	美国单交种 XL 80(U. S. XL 80 Recycling line)
20	冀 53(J i53)	冀群 2C ₀ -2(J i group 2C ₀ -2)
21	丹黄 02(Danhuang02)	旅大红骨系统综合种(L üDa Red Cob Group)
22	中自 01(Zhongzi01)	PA 78641
23	中自 03(Zhongzi03)	PA 78599
24	品 1 P ₆ C ₀ (Pin 1 P ₆ C ₀)	PA 综合种(PA gemplasm)
25	沈 118(Shen 118)	朝 23 × 超甜(Chao23 × Super sweet)
26	48-2	综合种(Synthetic)
27	3H-2	(咸大 202 × 自 330) × H 84(Xianda203 × Zi330) × H 84
28	77	(黄小 162 × 美 1865) × (187-2 × 南 55) (Huangxiao162 × M eil865) × (187-2 × N an55)
29	多 29(Duo29)	PA 78599

1.3 数据分析

根据分子杂交和 PCR 扩增结果, 在相同迁移位置有带记为 1, 无带记为 0, 建立数据库。标记位点的多态性信息量(Polymorphism information content, PIC)按公式 $PIC = 1 - \sum f_i^2$ 计算, f_i 表示 i 位点的基因频率^[5]。遗传相似系数(Genetic similarity, GS)按公式 $GS = m / (m + n)$ 计算, 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^[14]。聚类分析按 UPGMA (unweighed pair group method arithmetic averages) 方法进行。对 RFLP 和 SSR 标记得到的遗传相似系数矩阵进行简单相关分析。所有数据统计均由 NTSYS 软件(Version 1.8)完成^[15]。

2 结果与分析

2.1 分子标记分析

RFLP 分析中选取 34 个探针, 共 56 个探针酶组合用于数据统计, 涉及 61 个 RFLP 位

点, 其中 93% 的探针酶组合表现为单拷贝形式。在供试材料中共检测到 187 个等位基因变异, 平均每个位点的等位基因数为 3.06 个, 其变化范围为 2~ 7 个。SSR 分析中选取 66 对 SSR 引物用于数据统计, 涉及 66 个 SSR 位点, 共检测到 232 个等位基因变异, 平均每个位点的等位基因数为 3.52 个, 其变化范围为 2~ 7 个。RFLP 和 SSR 分析共检测到 419 个等位基因变异, 涉及 127 个位点, 平均每个位点的等位基因数为 3.30 个。所用 34 个 RFLP 探针和 66 个 SSR 位点均已定位在玉米遗传图谱上, 较好地覆盖了所有 10 条染色体, 平均每条染色体有 10 个标记位点(图 1)。

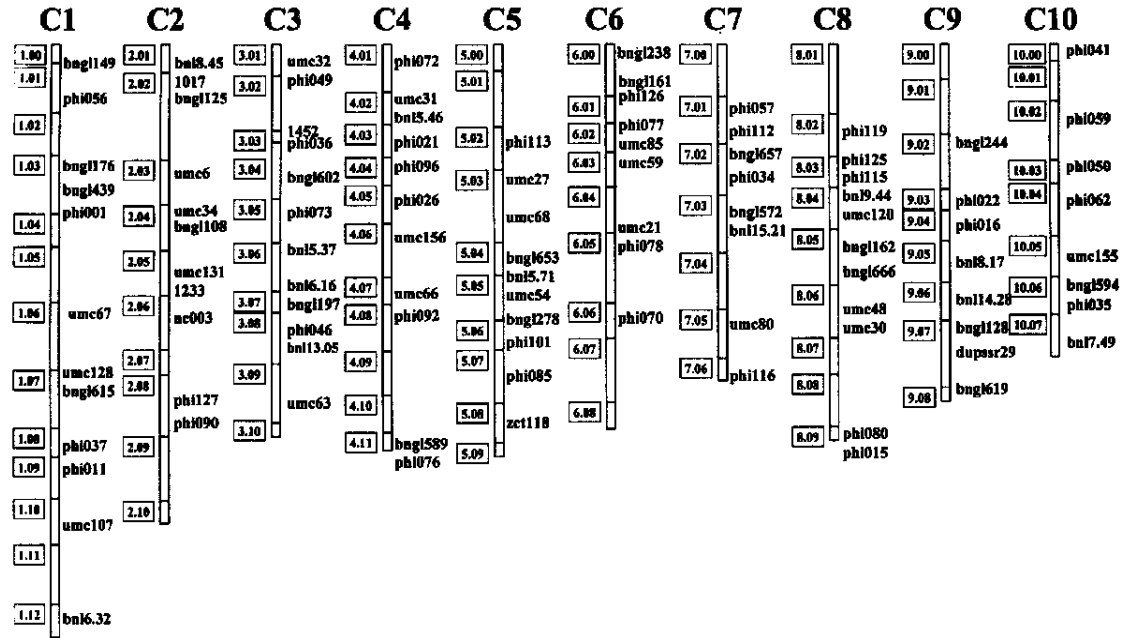


图 1 所用 RFLP 和 SSR 标记及其在玉米染色体上的位置(参考M aize DB, 1999)

Fig 1 RFLP & SSR markers used and their location on maize chromosomes (M aize DB, 1999)

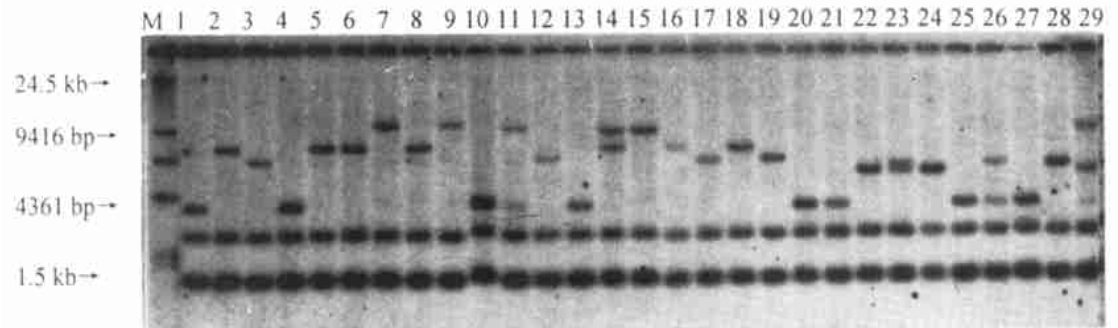


图 2 利用 RFLP 探针酶组合 umc68/H indIII 对 29 个自交系的分析结果 1~ 29 为供试自交系(表 1)

M: 分子量标准(λ DNA/H indIII) M: 中间分子量标准(24.5 kb 和 1.5 kb)

Fig 2 RFLP analysis for 29 inbred lines using umc68/H indIII Number of maize inbred lines are shown in table 1

M: Molecular weight marker (λ DNA/H indIII) M: Internal molecular weight marker (24.5 kb & 1.5 kb)

RFLP 分析位点的平均多态性信息量(PIC)为 0.42, 变化范围为 0.05(umc54/H indIII)



至 0.77 (bn113.05/*H indIII*); SSR 分析位点的 PIC 在 0.13 (ϕ i035) 至 0.83 (ϕ i126) 之间, 平均为 0.54, 高于 RFLP 标记 0.12, 说明 SSR 比 RFLP 标记有较高的多态性。

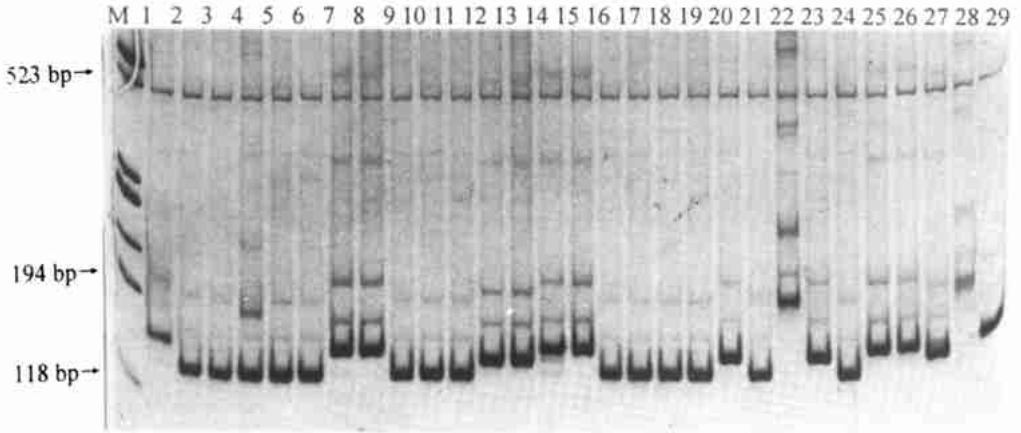


图 3 利用 SSR 引物 bng1589 对 29 个自交系的分析结果 1~29 为供试自交系 (表 1)

M: 分子量标准 (Φ 174/*H aeIII*) M: 中间分子量标准 (523 bp)

Fig. 3 SSR analysis for 29 inbred lines using primer bng1589 Number of maize inbred lines are shown in table 1

M: Molecular weight marker (Φ 174/*H aeIII*) M: Internal molecular weight marker (523 bp)

2.2 遗传多样性分析

根据 RFLP 分析结果计算 29 个自交系间的遗传相似系数 (GS), 其范围在 0.53~0.91 之间, 平均 0.62。其中自交系汶黄和旅 9 间的遗传相似性最小 (GS=0.53), E28 和旅 9 间的遗传相似性最大 (GS=0.91)。根据 SSR 分析结果得到的遗传相似系数在 0.53 (48-2 和中自 03) 至 0.99 (黄早四和汶黄) 之间, 平均 0.64。综合 RFLP 和 SSR 标记分析得到的遗传相似系数位于 0.59 (沈 118 和汶黄) 到 0.96 (E28 和旅 9) 之间, 平均 0.62。

RFLP 分析所得平均遗传相似系数 (GS=0.62) 与 SSR 分析结果 (GS=0.64) 基本一致, 反映两种标记方法对供试自交系的遗传多样性水平有较一致的评价。此外, GS-RFLP 与 GS-SSR 简单相关分析表明两者呈极显著相关 ($P < 0.001$), 相关系数为 0.51。相关系数不高表明两种标记得到一定差别的遗传多样性分析, 这可能是由于两种标记位点分布于玉米基因组上不同的区域造成的; 因而将两种标记结果综合起来将对供试材料作出更合理的遗传多样性分析。

2.3 聚类分析

综合 RFLP 和 SSR 标记结果对 29 个供试自交系进行聚类分析, 结果如图 4。供试自交系被划分为五个类群: 四平头群: 包括黄早四、D 黄 212、汶黄、吉 853、鲁原 133、3H-2、48-2、77; 旅大红骨群: 包括旅 9、E28、丹黄 02、丹 340、自 330、沈 118; LSC 群: 包括 Mo17、中黄 204、关 17、吉 846、掖 107、冀 53; BSSS 群: 包括 B37、B73、B84; PA 群: 包括 5003、掖 478、中自 01、中自 03、品 1P₆C₀、多 29。

黄早四选自四平头杂株, 而 D 黄 212、汶黄、吉 853、鲁原 133 均含有黄早四血缘, 因此都划分到四平头群。旅 9、E28、丹 340、丹黄 02 均来自旅大红骨种质, 故划分至旅大红骨群。本研究把自 330 划分到旅大红骨群, 这与传统上将自 330 归于 LSC 群的结论不符。Mo17 选

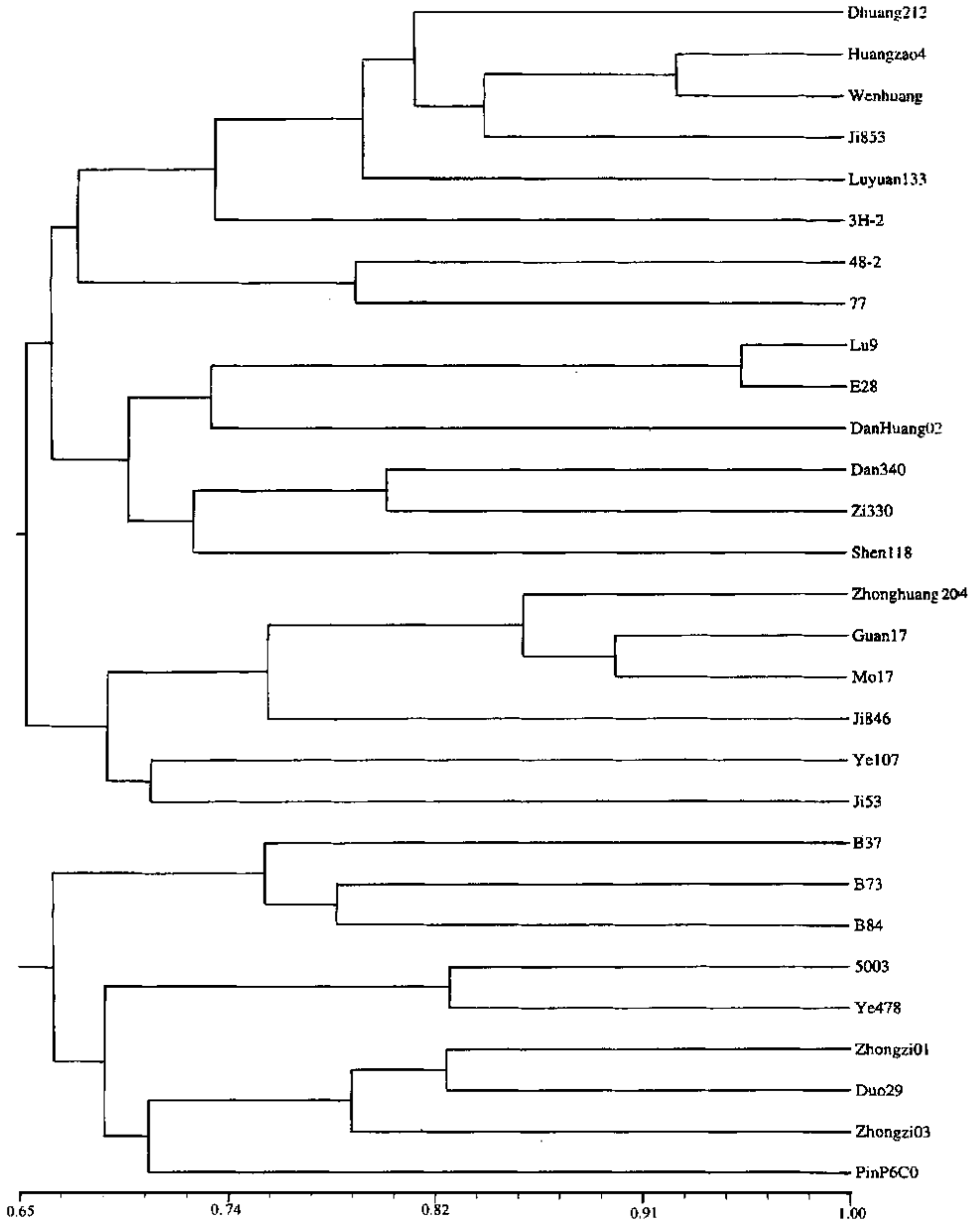


图4 29个自交系的RFLP和SSR标记综合聚类结果

Fig 4 Clustering analysis of 29 inbred lines using RFLPs and SSRs

自C103×187-2, 属于LSC系统, 关17, 中黄204, 吉846均有Mo17血缘, 因此划在一群。B37, B73, B84都选自BSSS系统, 属于瑞德群。对于划分到PA群的5003, 掖478, 中自01, 中自03, 品1P₆C₀, 多29均来源于PN种质, 因而暂时划分到同一类群。以上结果说明, 利用分子标记划分玉米杂种优势群行之有效, 划分结果与系谱来源基本一致, 并且还可以将系谱来源不清或者血缘不直接相关的种质划分到相应的杂种优势群。

3 讨论

3.1 RFLP 和 SSR 标记在种质类群划分中的应用

利用 RFLP 和 SSR 标记有效地研究种质的遗传多样性已被众多研究所证实^[3-5, 16]; 作者在 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 四种分子标记比较研究中也得出 RFLP 和 SSR 标记适用于玉米种质的遗传多样性分析的结论^[19]。前人研究表明 SSR 的多态性高于 RFLP 标记^[5, 16-17], 与本研究一致。GS-RFLP 与 GS-SSR 的相关性显著, 相关系数(r)有时高达 0.85^[5]; 在本研究中两种标记方法所得 GS 的相关性不高($r=0.51$), 这说明两种分子标记分析了基因组上不同区域的遗传变异, Ajmone-Marsan (1998)^[18]在 RFLP 与 AFLP 的比较分析中也得到类似的结论。要获得对种质遗传变异的精确评价, 所选标记位点在染色体上的均匀覆盖程度是一个重要因素。RFLP 和 SSR 标记在遗传图谱上的位置可知, 能够很好地反映这种覆盖程度。本研究综合 RFLP 和 SSR 标记结果进行统一分析, 增强了标记位点在染色体上的覆盖程度, 从而获得更为准确的遗传多样性分析。

3.2 自交系自 330 和丹 340 的关系

根据育种者的资料(私人通讯, 1999), 自 330 选自 Oh43 × 可利 67, 因而传统的系谱分析法将其划分到兰卡斯特群。本研究发现自 330 与旅大红骨群的代表系丹 340 遗传关系紧密, 并归为一类。袁力行等(2000)^[19]用另外两种分子标记 AFLP 和 RAPD 所进行的研究也得到了一致的结论。根据遗传相似性分析, 自 330 与旅大红骨群遗传关系较近, 但是否将自 330 划入旅大红骨群还有待进一步确认。自 330 和丹 340 及其衍生系已在育种生产上广泛应用, 两者关系的确认对育种实践有重要意义。对此, 在今后划分杂种优势群研究中, 使用自 330 的亲本 Oh43 和可利 67 以及一定数量的自 330 衍生系, 其结果可能会有助于明确这一种质的归属。

3.3 我国玉米种质的杂种优势群

我国学者在中国玉米种质的杂种优势群划分方面已经做了一些初步探索。曾三省(1990)^[8]将我国玉米种质划分为国内系和国外系两大类。陈彦惠等(1995)^[9]根据杂种优势和配合力表现将我国玉米种质划分为四平头、旅大红骨、兰卡斯特、瑞德和其它共 5 类。王懿波等(1997)^[10]根据系谱来源, 杂种优势和配合力表现把我国主要玉米自交系分为 5 大群和 9 个亚群。这些划分都是依据育种经验, 杂种优势表现或不完善的系谱追踪, 因而在方法上有一定的局限性。本研究采用分子标记技术, 将供试材料划分为五类, 其中四平头群、旅大红骨群、LSC 群和 BSSS 群四大类与前人工作是一致的。对于 PA 群的提出, 主要是基于分子标记划分的结果。从聚类图上分析, PA 群与 BSSS 群遗传关系最近, 它们之间的遗传相似值为 0.67。但如果放在五大类群的背景下分析, 它们之间还是存在一定的遗传差异, 所以独立划分为 PA 群。有报告表明, PN 育种材料总体上含有 50% 左右的瑞德种质, 因而来源于 PN 材料的 PA 群与 BSSS 群遗传关系较近是合理的; 但是育种家在利用 PN 材料选育二环系时, 没有用双测验种定向筛选, 获得的二环系已经融合了不同优势群的遗传基础, 与 BSSS 代表的瑞德群会有明显的遗传变异。我们曾经在以往的研究报告中把选自 PN 材料的自交系类群冠名为 PN 群^[19, 20], 但考虑到利用 PN 材料选出的二环系可能向两个方向分离, 因此在本文将研究得到的与 BSSS 群遗传关系近这类 PN 种质进一步命名为 PA 群。此外, 五群中以 BSSS 为基础的瑞德群在我国玉米生产上并未大量使用, 考虑到今后深入研究杂种优势的需

要以及与国际研究资料的可比性, 仍有必要将其作为一个模式群用于理论研究。掖 478、5003 及衍生系在当前生产上已有大量组合, 所以 PA 群的建立初步完善了我国玉米杂种优势群的基本框架, 对当前玉米育种有重要指导意义。我国玉米育种家已经在 1997 年郑州会议上把黄早四、丹 340、B73 和 Mo17 这四个自交系定为当前使用的标准测验种; 本研究结果证明这四个标准测验种具有充分的代表性, 在今后的一段时间内仍可继续使用。作者同时建议以掖 478 作为 PA 群的代表加入标准测验种。依据本研究结果得到了五个类群, 在此基础上结合育种实践经验进一步分析表明: 四平头群与旅大红骨群遗传关系较近, 可以合并为一个杂种优势群, 暂时冠名为 DOM。而 BSSS 与 PA 两个群则合属于 Reid 杂种优势群。因此, 这五个类群可以进一步概括为三个杂种优势群 (DOM, Reid, LSC), 为顺利构建我国玉米杂种优势群模式奠定了基础。

3.4 进一步划分我国玉米种质杂种优势群的必要性

我国作为玉米生产大国, 有着丰富的种质资源, 既有从国外引入的外来种质, 又有类型各异的农家品种, 人工改良种等; 随着近年来多元复合种质的应用以及育种过程中发生的种质交流与渗透, 我国玉米种质日趋复杂; 因此对当前玉米种质进行系统研究已迫在眉睫。今后应利用分子标记技术对玉米主产区骨干自交系和应用前景较好的新系进行系统的杂种优势群划分, 再根据育种经验总结和归纳我国常用的杂种优势模式, 这对我国玉米育种有重要的指导意义, 将使我国玉米育种研究水平和效率得到明显提高。本项研究构建了我国玉米杂种优势群的基本框架, 筛选出合适的分子标记体系, 为进一步研究打下较好的基础。

参 考 文 献

- Hallauer A R, W A Russell, K R Lankey. In: G F Sprague, J W Dudley, Corn and Corn Improvement, 3rd edn, Wisconsin: American Society of Agronomy, 1988. 463~ 564
- Smith J S C, O S Smith. *Maidica*, 1989, 34: 151~ 161
- Mumm R H, J W Dudley. *Crop Sci*, 1994, 34: 842~ 851
- Dubreuil P, P Dufour, E Krejci, et al. *Crop Sci*, 1996, 36: 790~ 799
- Smith J S C, E C L Chin, H Shu, et al. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 163~ 173
- Melchinger A E. In: *The Genetic and Exploitation of Heterosis in Crops*. Wisconsin: ASACSSA-SSSA, 99~ 118
- 吴景锋. 中国农业科学, 1983, 16(2): 1~ 8
- 曾三省. 中国农业科学, 1990, 23(4): 1~ 9
- 陈彦惠, 刘新芝, 彭泽斌. 河南农业大学学报, 1995, 29(4): 56~ 61
- 王懿波, 王振华, 王永普等. 中国农业科学, 1997, 30(4): 16~ 24
- 刘新芝, 彭泽斌, 傅骏骅等. 中国农业科学, 1997, 30(3): 44~ 51
- Saghai-Maroof M A, R M Biyashev, G P Yang, et al. *Proc Natl Acad Sci*, 1984, 91: 5466~ 5470
- Hoisington D A, M M Khairallah, D Gonzales-deLeon. *Laboratory protocols: CIMM Y T Applied Molecular Genetics Laboratory*. Mexico. D. F.: CMMYT, 1994. 7~ 35
- Sneath P H A, R R Sokal. *Numerical taxonomy*, San Francisco: Freeman, 1973
- Rohlf F J. *N T S Y S - p c N umerical Taxonomy and Multivariate Analysis System, Version 1.80*. New York: Exeter publications, 1990
- Senior M L, J P Murphy, M M Goodman, et al. *Crop Sci*, 1998, 38: 1088~ 1098
- Pejic I, Ajmone-Marsan, P, M Morgante, et al. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 1248~ 1255
- Ajmone-Marsan P, P Castiglioni, F Fusari, et al. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 219~ 227
- 袁力行, 傅骏骅, M. Warburton 等. 遗传学报, 2000, 27(8): 725~ 733
- 袁力行, 傅骏骅, 刘新芝等. 中国农业科学, 2000, 33(6): 6~ 12