

利用分子标记预测玉米杂种优势的研究

袁力行, 傅骏骅, 刘新芝, 彭泽斌, 张世煌, 李新海, 李连城

(中国农业科学院作物育种栽培研究所, 农业部作物遗传育种重点开放实验室,

AMBIONET 中国实验室, 北京 100081)

摘要: 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 分子标记对 15 个玉米 (*Zea mays* L.) 骨干自交系进行遗传多样性分析, 继而研究分子标记遗传距离与 105 个双列杂交组合的产量及特殊配合力的相关性, 探讨预测杂种优势的可能性。结果表明: (1) 利用分子标记把 15 个供试材料划分为唐四平头、旅大红骨、兰卡斯特、瑞德和 PN 共 5 个类群, 与系谱分析基本一致; (2) 分子标记遗传距离与 F_1 产量、分子标记特殊遗传距离与特殊配合力之间都呈显著正相关 ($P < 0.01$), 相关系数介于 0.52~0.72 之间, 但相关程度还不足以预测杂种优势。使用与杂种优势相关的 QTL 连锁的分子标记位点可能提高杂种优势的预测能力, 但最终解决将依赖于杂种优势遗传机理的阐明。

关键词: 玉米; 分子标记; 遗传距离; 杂种优势预测

中图分类号: S513.035.1; Q321.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 0578-1752(2000)06-0006-07

经济有效地预测杂种优势一直是玉米育种工作者共同关心的重要课题。通过测交鉴定亲本配合力来预测杂种优势尽管直接有效, 但需对大量组合进行田间评价, 费时费力, 并且易受到环境影响。育种家们很早就注意到亲本遗传距离与 F_1 杂种优势表现存在一定的相关性。因此, 亲缘关系、地理来源、形态标记和同工酶等方法相继用于亲本遗传距离的测算并预测杂种优势, 但鉴于方法的局限性, 预测能力不尽理想^[3]。DNA 分子标记的发展为杂种优势预测提供了新的手段。利用 RFLP (restriction fragment length polymorphism) 标记^[4]预测玉米杂种优势已有大量的文献报道, 但结果并不一致。Lee 等^[5], Smith 等^[6]和 Melchinger 等^[7]研究发现 RFLP 遗传距离与 F_1 杂种优势表现存在高度的相关性, 可用于杂种优势预测。然而 Godshalk 等^[8], Melchinger 等^[9]和 Boppenmaier 等^[10]研究得到较低的相关性, 无预测价值。Melchinger 等^[7]认为不同结果的产生主要与供试材料的遗传变异程度有关。随后基于 PCR 技术的分子标记逐步发展起来, 如 RAPD (random amplification polymorphic DNA)^[11], SSR (simple sequence repeat)^[12]和 AFLP (amplification fragment length polymorphism)^[13], 相继被用于杂种优势预测的研究。Ajmone 等^[14]比较 RFLP 和 AFLP 两种标记方法得出 AFLP 标记更适用于杂种优势预测。除玉米之外, 利用分子标记预测杂种优势在水稻、小麦、大豆等其它作物中也有类似的研究^[15-17]。本研究以我国玉米生产上的 15 个骨干自交系为材料, 利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 4 种分子标记进行遗传多样性分析^[1]; 在此基础上研究不同分子标记遗传距离与 F_1 产量和特殊配合力的相关性, 探讨利用分子标记预测杂种优势的可能性。

收稿日期: 1999-12-30

基金项目: “九五”国家重点科技攻关项目(96-002-02-05-4); 国家攀登计划(PD-XZ-3-2); 亚洲玉米生物技术协作网

(AMBIONET)基金

作者简介: 袁力行(1975-), 男, 江西泰和人, 硕士, 主要从事作物分子遗传研究。

1 材料与方法

1.1 供试材料

所选 15 个供试材料为我国玉米生产及育种上广泛应用的骨干自交系, 其名称和系谱来源见表 1。供试材料均经多年自交, 遗传稳定。

表 1 玉米自交系及系谱来源

Table 1 Maize inbred lines and their pedigree

编号 No.	自交系 Inbred line	来源 Source
1	D 黄 212 D huang212	D729× 黄早四 D729× Huangzao4
2	黄早四 Huangzao4	唐四平头杂株 Tangsipingtou open pollination
3	汶黄 Wenhuaug	黄早四× 汶青 1331 抗 Huangzao4× Wenqing1331 R
4	中黄 204 Zhonghuang204	Mol 7 二环系 Mol 7 recycling line
5	关 17 Guan17	Mol 7× 关 73 Mol 7× Guan73
6	Mol 7	C103× 187-2
7	B37	BSSSC ₀
8	B73	BSSSC ₅
9	B84	BSSSC ₇
10	旅 9 Lu9	旅大红骨 Lu Da Red Cob
11	E28	旅 9× A619 Lu9× A619
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 Mei3147
15	掖 478 Ye 478	U8112× 5003

1.2 实验方法

1.2.1 分子标记实验 基因组 DNA 的提取, RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 4 种分子标记分析的实验流程均参照袁力行等^[1]的方法, 结果选取重复性好的多态性探针和引物统计数据。

1.2.2 田间试验 15 个供试自交系按 Griffing 方法 4 进行双列杂交, 配制 105 个杂交组合; 1994 年在河南郑州、陕西杨凌、北京昌平和安徽凤阳共 4 点进行田间评价。采用四重格子方设计, 4 次重复, 单行区, 行长 4m, 15 株, 行距 0.67m, 株距 0.27m。籽粒产量以每小区 10 株计。F₁ 产量和配合力以 1 年 4 点 4 次重复平均值计。

1.3 数据统计与分析

根据分子杂交和 PCR 扩增结果, 在相同迁移位置上有带记为 1, 无带记为 0, 构建数据库。遗传距离(genetic distance, GD)按公式 $GD = 1 - m / (m + n)$ 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^[18]。聚类分析按 UPGMA(unweighted pair group method arithmetic averages)方法进行。根据 F₁ 产量按 Griffing 方法 4 计算一般配合力(GCA)和特殊配合力(SCA)^[2], 按同样的方法将遗传距离分解为一般遗传距离(GGD)和特殊遗传距离(SGD)^[9]。对分子标记遗传距离和 F₁ 产量、特殊配合力进行简单相关分析。所有数据统计均由 NTSYS-pc 软件^[19]完成。

2 结果与分析

2.1 分子标记分析

RFLP 分析使用 EcoRI 和 HindIII 两种限制性内切酶, 最终得到 34 个多态性探针, 共 54 个探针酶组合, 涉及 59 个 RFLP 位点, 在供试材料中共检测到 167 条多态性带, 平均每

个位点 2.83 条,变化范围 2~7 条。SSR 分析获得多态性引物 62 对,涉及 62 个 SSR 位点,共检测到 201 条多态性带,平均每个位点 3.24 条,变化范围 2~7 条。在 AFLP 分析中使用 9 个引物组合,最终选取 180 条多态性带用于数据统计,平均每个引物组合 20 条,变化范围 13~31 条。RAPD 分析得到 20 个多态性引物,检测到多态性带 87 条,平均每个引物 4.35 条,变化范围 1~10 条。综合 4 种分子标记结果共得到 635 条多态性带。

2.2 聚类分析

分别根据 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 标记结果以及 4 种标记的综合(ALL)结果计算 15 个供试材料间的遗传距离(表 2)。其中 ALL、RFLP、SSR 和 AFLP 分析所得平均遗传距离(0.36~0.39)及标准差(0.08~0.09)基本一致,但 RAPD 的平均值(0.45)和标准差(0.12)都较大。

表 2 分子标记遗传距离

Table 2 Genetic distance calculated by molecular markers

标记 Marker	平均值 Mean	最小值 Min	最大值 Max	标准差 SD
ALL	0.38	0.09	0.49	0.08
RFLP	0.38	0.03	0.52	0.09
SSR	0.36	0.01	0.45	0.08
AFLP	0.39	0.07	0.51	0.08
RAPD	0.45	0.11	0.69	0.12

根据遗传距离对 15 个供试自交系进行聚类分析,4 种分子标记及其综合(ALL)所得的聚类结果基本一致,将供试材料分为 5 个类群,在此仅给出综合遗传距离(ALL)的聚类图(图 1)。黄早四选自唐四平头的田间杂株,D 黄 212 和汶黄都含有黄早四的血缘,此类为唐四平头群。B37、B73 和 B84 都来自于美国的 BSSS 坚秆综合种,属于典型的瑞德群。

Mol7 选自 C103×187-2,属于兰卡斯特血统,

中黄 204 和关 17 都含有 Mol7 的血缘,此类为兰卡斯特群。掖 478 选自 5003×U8112,因而与 5003 分在一类;这类种质来源于 PN 材料,属于 PN 群。旅 9、E28 和丹 340 来源于旅大红骨种质,因此划归一类。自 330 选自 Oh43×可利 67,传统上根据系谱分析将其划分到兰卡

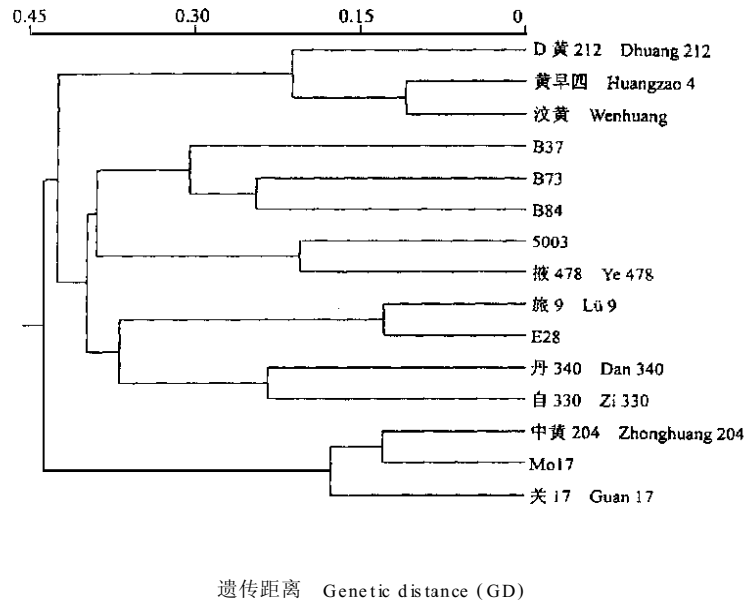


图 1 15 个自交系的 4 种分子标记综合(ALL)聚类结果

Fig. 1 Clustering analysis of 15 inbred lines based on all markers data

斯特群, 但在此却划在旅大红骨群, 这还有待于进一步研究。以上结果表明, 分子标记聚类结果与系谱分析基本一致。

2.3 田间试验

田间试验得到 105 个双列杂交组合的单株产量(F_1Y), 并计算特殊配合力(SCA), 数据未给出。联合方差分析表明, 组合间 F_1 产量和特殊配合力的 F 值分别为 10.32 和 14.43, 均达极显著水平($P < 0.01$) (表 3)。单株产量变幅为 60.7~160.4g, 平均 114.3g。特殊配合力变幅为 -58.94~37.74。

表 3 105 个杂交组合间 F_1 产量和特殊配合力的联合方差分析

Table 3 F-test of F_1 grain yield and SCA among 105 crosses

变异来源 Variation source	自由度 F	F_1 籽粒产量 F 值 F value of F_1 grain yield	特殊配合力 F 值 F value of SCA
地点 Location	3	9.42*	14.32*
小区 Block	12	0.97	1.34
处理 Treat	14	10.32**	14.43**
处理×地点 Treat×Location	42	2.75**	5.03**
机误 Error	168		

*、** 分别表示 5% 和 1% 显著水平 Significant at the 5% and 1% probability levels respectively

2.4 分子标记遗传距离与 F_1 产量、特殊配合力的关系

简单相关分析表明, 对于所有杂交组合, 分子标记遗传距离与 F_1 产量, 特殊遗传距离与特殊配合力之间相关性极显著($P < 0.01$), 相关系数介于 0.52~0.72 之间, 属于中等程度相关。4 种分子标记相比, AFLP 标记的相关程度略高。根据上述 15 个自交系的聚类结果, 将 105 个杂交组合划分为杂种优势群内组合和杂种优势群间组合两类, 分别对其进行相关性分析。结果表明, 与所有组合相比, 杂种优势群内组合的相关性仍呈极显著($P < 0.01$), 相关程度变化很小; 而杂种优势群间组合的相关性则表现不显著, 仅在 AFLP 标记中出现弱相关(表 4)。

表 4 分子标记遗传距离与 F_1 产量、特殊遗传距离与特殊配合力之间的简单相关分析

Table 4 Simple correlation of genetic distance (GD) with F_1 yield (F_1Y) and specific genetic distance (SGD) with specific combining ability (SCA) for all crosses and in different sub-groups of maize

遗传距离 GD	所有组合 All crosses (n=105)	杂种优势群内 Within groups (n=16)	杂种优势群间 Between groups (n=89)
		F ₁ 产量 F ₁ Y	
GD-ALL	0.65**	0.54*	0.21
GD-RFLP	0.58**	0.61*	0.02
GD-SSR	0.52**	0.25*	-0.02
GD-AFLP	0.64**	0.62*	0.28**
GD-RAPD	0.58**	0.53*	0.18
		特殊配合力 SCA	
SGD-ALL	0.71**	0.68**	0.08
SGD-RFLP	0.62**	0.69**	-0.13
SGD-SSR	0.65**	0.47*	0.02
SGD-AFLP	0.72**	0.66**	0.27*
SGD-RAPD	0.64**	0.77**	0.02

*、** 分别表示 5% 和 1% 显著水平 Significant at the 5% and 1% probability levels respectively

分别对分子标记综合遗传距离和 F_1 产量、特殊遗传距离与特殊配合力做散点图(见图 2)。结果表明, 遗传距离与 F_1 产量及特殊配合力存在一定的线性关系。利用分子标记遗传距离能够解释 F_1 产量变异的 42%, 特殊遗传距离能够解释特殊配合力变异的 51%。

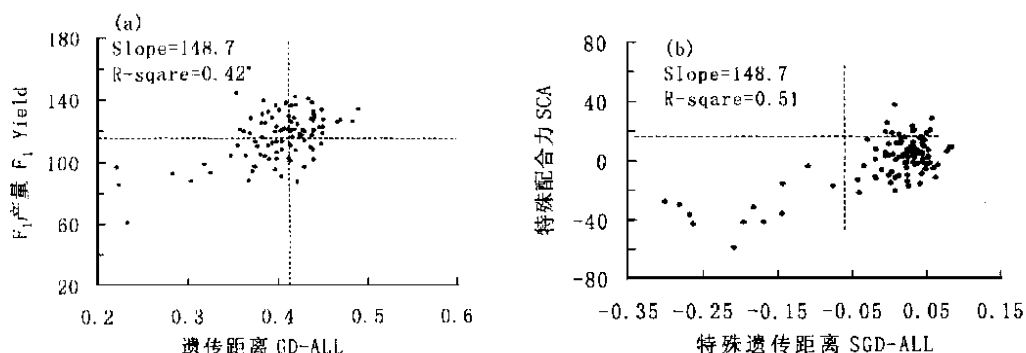


图 2 分子标记遗传距离与 F_1 产量(a)和分子标记特殊遗传距离与特殊配合力(b)的关系

Fig. 2 Plot of F_1 yield with genetic distance (GD) (a) and specific combining ability (SCA) with specific genetic distance (SGD) (b) based on all molecular markers

综上所述,分子标记遗传距离与 F_1 杂种优势表现呈极显著正相关,但相关程度还不足以预测杂种优势。

3 讨论

本研究得到分子标记遗传距离与 F_1 杂种优势表现呈显著正相关,这与前人在玉米和水稻中的研究结论是一致的。在小麦、大豆的研究中没有发现这种相关性,这可能与这两种作物表现出较低的杂种优势($< 15\%$)有关。然而,众多研究在得到显著正相关的同时,相关程度却从高到低都有分布,影响因素是多方面的。本研究中 4 种分子标记遗传距离与 F_1 杂种优势表现之间的相关性在同一水平,均呈中度相关,说明不同标记类型对这种相关性影响不大。Melchinger^[20]为了说明相关程度与供试材料的变异程度有关,将供试材料分为 3 类:(1)近缘自交系之间的杂交组合;(2)来自同一杂种优势群的非近缘系之间的杂交组合;(3)不同杂种优势群之间的杂交组合。以此再次分析前人的数据,结果表明分子标记遗传距离与 F_1 杂种优势表现的相关性在(1)和(2)类显著,在(1)类还能得到高度相关;而在(3)类中则相关性不显著。本研究中,依据亲缘关系和聚类结果可以发现供试材料分属于(1)和(3)类,即杂种优势群内组合和杂种优势群间组合,其相关性表现与上述结论完全一致;在所有组合的分析中之所以得到中度相关的表现是因为占有一定比例的(1)类材料。然而,对于育种中的典型情况来说,杂交种通常来源于不同杂种优势群间的杂交组合,即第(3)类,但其间不显著的相关性显然不能用于杂种优势预测。

众多研究表明,影响分子标记遗传距离与 F_1 杂种优势表现的相关性的决定因素是所用标记与杂种优势有关的 QTL 的连锁程度。Beppennaien 等^[10]和 Charcosset 等^[21]分别从理论和计算机模型的分析得出,要获得较高的相关性,必须增加与杂种优势有关的 QTL 连锁的标记位点的绝对数目,并且减少与杂种优势 QTL 无关的标记位点数目以提高相关位点的相对数目。本研究与前人的大多数研究一样,只是利用了一套较好地覆盖基因组的随机标记来测算遗传距离,至于是否与杂种优势相关的 QTL 连锁并不清楚,因而所得相关程度不高。此外,本研究中综合标记(ALL)分析在位点数目远远高于其它标记系统,但其相关程度

较其它标记并未提高,说明无选择地增加标记位点的密度并不能提高预测杂种优势的能力,其它研究也证实了这一点^[6,15]。不同标记类型在与杂种优势的相关性上表现基本一致,但是 RFLP 和 SSR 标记因共显性和位点可知等优点适用于 QTL 定位,在杂种优势预测方面比其它标记类型有较好的应用前景。然而,尽管利用与杂种优势有关的 QTL 连锁的标记位点能够提高相关性,但怎样通过合理的实验去鉴定出这些连锁关系还有待于进一步研究。利用多元回归分析法可以鉴定与 QTL 连锁的标记,但是最终被选择的变量可能多于甚至远远超过所观察的表型数目;并且在不同群体 QTL 比较作图研究中发现,这种连锁关系并不能在广泛的种质杂交中一直存在^[22,23]。

解释杂种优势的显性假说和超显性假说都是建立在遗传差异的基础之上,利用遗传距离预测杂种优势正是遵循这一思路。然而杂种优势是一个非常复杂的生物学现象,涉及大量相关基因间的组合与互作,并且受到遗传背景的影响,因而仅仅简单地根据标记位点的差异来精确预测杂种优势是不够的。利用分子标记遗传距离预测杂种优势尚处于探索阶段,理论和方法上均未成熟,离育种实践还有一定差距。杂种优势预测的最终解决将依赖于杂种优势遗传机理的阐明。

致谢:本研究中的 RFLP、SSR 和 AFLP 标记分析在国际玉米小麦改良中心应用生物技术中心完成,在此对 Warburton M 博士和 Khairallah M 博士的热心指导予以衷心感谢。

参考文献:

- [1] 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.
- [2] 郭平仲. 数量遗传分析[M]. 北京:北京师范学院出版社, 1987: 292~ 298.
- [3] Hallauer A R, Russell W A, Lamkey K R, et al. Corn and Corn Improvement[M]. 3rd edn. Agronomy Monograph 18, American Society of Agronomy Madison/WI, 1988.
- [4] Botstein D, White R L, Skolnick M H, et al. Construction of a genetic linkage map on men using restriction fragment length polymorphisms[J]. Am. J. Hum. Genet. 1980, (32): 314~ 331.
- [5] Lee M, Godshalk K, Lamkey K R, et al. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize inbreds with agronomic performance of their crosses[J]. Crop Sci. 1989, (29): 1067~ 1071.
- [6] Smith O S, J S C Smith, S L Bowen, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, F₁ grain yield, grain yield heterosis, and RFLPs[J]. Theor. Appl. Genet. 1990, (80): 833~ 840.
- [7] Melchinger A E, Boppenmaier J, Dhillon B S, et al. Genetic diversity for RFLPs in European maize inbred II. Relation to performance of hybrids within versus between heterosis groups for forage trait[J]. Theor. Appl. Genet. 1992, (84): 672~ 681.
- [8] Godshalk E B, Lee M, Lamkey K R. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize[J]. Theor. Appl. Genet. 1990, (80): 273~ 280.
- [9] Melchinger A E, Lee M, Lamkey K R, et al. Genetic diversity for restriction fragment length polymorphisms and heterosis for two dilute sets of maize inbreds[J]. Theor. Appl. Genet. 1990, (80): 488~ 496.
- [10] Boppenmaier J, Melchinger A E, Brunklaus-June E, et al. Genetic diversity for RFLPs in European maize inbreds. I. Relation to performance of flint x dent crosses for forage trait[J]. Crop Sci. 1992, (32): 895~ 902.
- [11] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primes[J]. Nucleic Acid Res. 1990, (18): 7213~ 7218.
- [12] Tautz D, et al. Hypervariability of simple sequence as general source for polymorphic DNA markers[J]. Nucleic Acids Res. 1989, (12): 6463~ 6467.
- [13] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting[J]. Nucleic Acids Res.

- 1995, (23): 4407~ 4414.
- [14] Ajmone-Marsan P, Castiglioni P, Fusari F, et al. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1998, (98): 219~ 227.
- [15] Zhang Q, Y J Gao, M A Saghai-Maroof, et al. Molecular divergence and hybrid performance in rice [J]. *Molecular Breed.* 1995, (1): 133~ 142.
- [16] Martin Bohn, Friedrich Utz H, Melchinger A E. Genetic similarities among winter wheat cultivars determined on the basis of RFLPs, AFLPs, and SSRs and their use for predicting progeny variance [J]. *Crop Sci.* 1999, (39): 228~ 237.
- [17] Cerna F J, S R Cianzio, A Rafalski, et al. Relationship between seed yield heterosis and molecular marker heterozygosity in soybean [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1997, (95): 460~ 467.
- [18] Sneath P H A, Sokal R R. *Numerical Taxonomy* [M]. Freeman, San Francisco, 1973.
- [19] Rohlf F J. *NTSYS- pc Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System*, version 1.80 [M]. New York: Exeter Publications, 1990.
- [20] Melchinger A E. Genetic diversity and heterosis [A]. *The Genetic and Exploitation of Heterosis in Crops* [C]. ASA-CSSA-SSSA Madison, 1999, WI 53711: 99~ 118.
- [21] Charcosset A, M Lefort-Buson, A Gallais. Relationship between heterosis and heterozygosity at marker loci: a theoretical computation [J]. *Theor. Appl. Genet.* 1991, (81): 571~ 575.
- [22] Stuber C W. Mapping and manipulating quantitative trait in maize [J]. *TIG.* 1995, (11): 477~ 481.
- [23] Lubberstedt T, A E Melchinger, S Fahr, et al. QTL mapping in testcrosses of flint lines of maize: III. Comparison across populations for forage trait [J]. *Crop Sci.* 1998, (38): 1278~ 1289.

Study on Prediction of Heterosis in Maize (Zea mays L.) Using the Molecular Markers

Yuan Lixing, Fu Junhua, Liu Xinzhi,

Peng Zebin, Zhang Shihuang, Li Xinhai, Li Liancheng

(Institute of Crop Breeding and Cultivation, CAAS, Crop Genetics and

Breeding, Ministry of Agriculture Key Laboratory, AMBIONET China-Lab, Beijing 100081)

Abstract: Genetic diversity among 15 elite maize inbred lines was studied using the molecular markers, and the relationship between genetic distance (GD) and hybrid performance in a diallel set of crosses between them was assessed. These inbred lines were assayed for DNA polymorphism using 167 RFLPs, 201 SSRs, 180 AFLPs and 80 RAPDs, and were classified into five groups, which are Tangsipingtou, Lüda Red Cob, Lancaster, Reid, and PN group. They are consistent with the grouping based on the available pedigree data. The hybrid performance were revealed as F_1 grain yield (F_1Y) and specific combining ability (SCA), and GD were partitioned into general (GGD) and specific (SGD) components. Correlation ($r=0.52\sim 0.72$) of GD with F_1Y and SGD with SCA were positive but not too large to have a practical utility in predicting hybrid performance. The better correlation would be the pre-selection of specific markers linked to quantitative trait loci (QTL) correlated to heterosis.

Key words: Maize; Molecular markers; Genetic distance; Heterosis