

# 利用 RAPD 进行玉米自交系种质类群划分的研究

田曾元, 王懿波, 王振华, 王永普, 张新, 陆利行

(河南省农业科学院粮食作物研究所, 河南 郑州 450002)

摘要: 对 31 个玉米自交系进行了 RAPDs 分析, 结果表明: 31 个玉米自交系可分为 5 大群, 即旅群(IV-1 组), Lan. II 群(IV-2A 亚组)、Reid 群(IV-2B 亚组)、Lan. I 群(IV-1 组)和黄改群(IV-5 和 IV-6 两组)和 4 个小群: I 组的 P138、II 组的郑 22、III 组的综 31 和 IV-4 组的郑 32 和 U8112。依据 RAPDs 的划分结果同依据系谱关系、配合力和杂种优势的划分结果基本吻合。

关键词: 玉米种质; RAPDs; 种质类群划分

中图分类号: S513 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2001)02-0031-07

玉米自交系杂种优势群划分, 是提高玉米育种效率的重要基础性研究。以往对玉米自交系种质类群划分, 多是利用系谱关系或同工酶检验等方法进行。然而近年来育成的自交系种质交叉和渗透的情况日益严重, 使这些结果受材料、环境或研究方法等因素的限制, 很难真实地反映自交系间的遗传差异。近年来 RFLP 和 RAPD 等分子标记技术日趋成熟。由于它直接以 DNA 的形式表现, 在生物遗传多样性评估及遗传距离测定方面得到了广泛应用<sup>[1-5]</sup>。

我们在国家自然科学基金资助下进行了“中国玉米主要种质杂种优势群划分与杂交优势利用模式研究”<sup>[6,7]</sup>。这一结果, 还缺乏分子水平的有力证据。为此, 我们对核心种质代表系及新育系进行 RAPD 指纹图谱分析, 对前期的研究结果进行验证和完善, 以便更好地指导玉米育种实践。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

表 1 31 份玉米自交系编号与名称

编号	自交系名称	编号	自交系名称	编号	自交系名称	编号	自交系名称
1	B73	9	C103	17	掖 515	25	丹 232
2	丹 9046	10	Mo17	18	鲁原 133	26	郑 22
3	沈 5003	11	四 485	19	武 314	27	掖 107
4	铁 7922	12	丹 1324	20	四自四	28	P138
5	81832	13	77	21	旅 9 宽	29	吉 63
6	郑 32	14	oh43	22	E28	30	吉 818
7	U8112	15	成 200B	23	丹 340	31	综 31
8	四 F1	16	自 330	24	丹黄 02		

收稿日期: 2000-08-12

基金项目: 河南省自然科学基金重点资助项目(99-04-01-06-00)

作者简介: 田曾元(1972-), 男, 中国农大在读博士, 主要从事玉米育种工作。

## 1.2 玉米基因组 DNA 提取

取 0.2 g 幼嫩叶片, 用液氮研磨转入放有 500  $\mu$ L 的尿素缓冲液管中; 振荡器振荡 30 s, 加入 1 倍体积饱和酚, 混匀, 在 4  $^{\circ}$ C、4 000 r/min 离心 10 min, 转上清液至新管; 加 1/2 V 酚+ 1/2 V (氯仿: 异戊醇= 24 1) 混匀, 离心 10 min, 转上清液至新管; 加 1 V (氯仿: 异戊醇= 24 1), 混匀, 4  $^{\circ}$ C 离心 10 min, 转上清液至新管; 加 1/10 V 的 3 mol/L NaAc+ 2V 预冷纯乙醇, 混匀, 置冰箱- 20  $^{\circ}$ C 保存 15~ 30 min, 见白色絮状物漂动; 将粘稠絮状物挑出, 投入装有 70% 乙醇离心管中, 4  $^{\circ}$ C  $1.2 \times 10^4$  r/min 离心 10 min, 流尽液体。室温下 15~ 20 min 干燥, 加 20~ 200  $\mu$ L TE 彻底溶解沉淀。

## 1.3 RAPDs 分析

(1) RAPDs 反应在 PE-9600PCR 仪上进行, 引物选用 Operon 公司的 OPN<sub>1-20</sub>, POG<sub>1-20</sub> 和 OPE<sub>1-20</sub> 3 组 10 b 随机引物 60 条。

(2) 25 mL 反应体系: 10 mmol/L Tris-HCl (pH 8.3), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 明胶 0.001%, dNTP 分别为 0.1 mmol/L, 引物 15 ng, 模板 25 ng, Taq 酶 1 u。

(3) 扩增程序:

95  $^{\circ}$ C 4 min

94  $^{\circ}$ C 1 min 55  $^{\circ}$ C 1.5 min 72  $^{\circ}$ C 1 min 2 个循环

94  $^{\circ}$ C 1 min 37  $^{\circ}$ C 1 min 72  $^{\circ}$ C 1.5 min 41 个循环

94  $^{\circ}$ C 1 min 37  $^{\circ}$ C 1 min 72  $^{\circ}$ C 10 min 1 个循环

4  $^{\circ}$ C 保存

(4) 电泳检测 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶在  $1 \times$  TAE 缓冲液中电泳, 以  $\lambda$ DNA/EcoR I + Hind II 为分子量标准, 电压 2.5 V/cm, 电泳结束后 EB 染色, UV 灯下观察并拍照。

(5) 资料统计分析

对每个引物扩增产物的电泳图谱进行数据编码。在图谱上相对迁移率的位置上, 对应每一材料如有清晰可辨的扩增带则数据编码为 1, 否则为 0, 得到原始数据。参照 Nei 和 Li (1979) 提出的遗传相似性公式计算各自交系间在分子水平上的遗传距离。依据遗传距离矩阵, 应用最短距离法, 最长距离法, 类平均法, 重心法, 中间距离法等分别进行聚类分析, 所用聚类分析程序包 Clusterll 由南京农业大学编制。

## 2 结果与分析

### 2.1 玉米自交系间的多态性

用 60 个引物对 31 份玉米自交系的 DNA 进行扩增, 其中有 34 个引物能够产生扩增片段, 片段大小在 3 kb~ 0.2 kb 之间。在做遗传距离计算时, 选取其中扩增片段多且能较好显示多态性的 14 个引物, 对其扩增产物做了统计分析。共得到 154 条扩增片段, 其中有多态性片段 103 条, 在 14 个引物中 OPG-05 扩增的总片段数及多态性片段数均居首位, 其次为 OPG-14 (见图 1)。

M 为分子量标记 材料 1~ 31 名称见试验材料表 1, 各引物扩增产生的多态性片段及其频率见表 2。

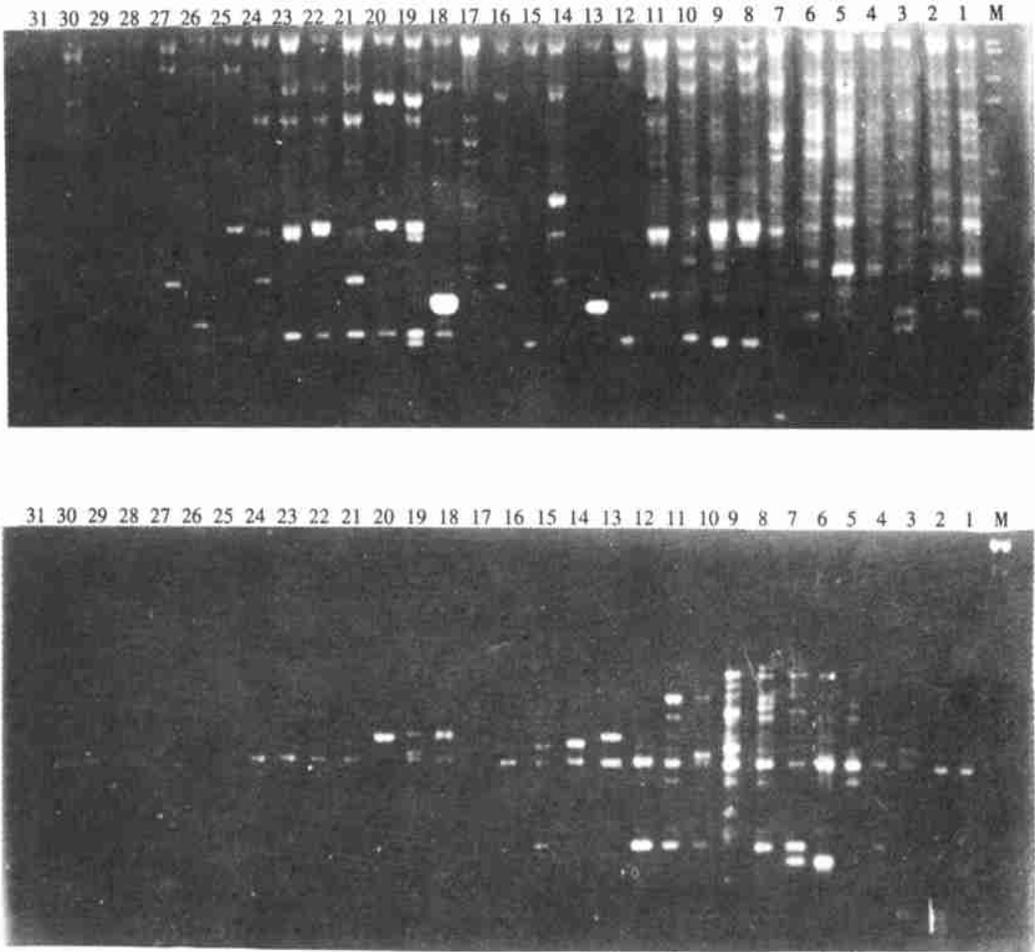


图1 OPG-05 和 OPG-14 引物扩增结果

表2 14个引物扩增的多态性片段及其频率

引物	序列	扩增片段数	多态性片段数	多态性频率(%)	引物	序列	扩增片段数	多态性片段数	多态性频率(%)
OPN-09	TGCCGGCTTG	12	8	66.67	OPN-10	ACAACTGGGG	15	10	66.67
OPG-04	AGCGTGTCTG	9	4	44.44	OPG-12	CAGCTCACGA	9	5	55.56
OPN-14	TCGTGCGGCT	15	13	86.67	OPG-02	GGCACTGAGG	13	6	46.15
OPN-08	ACCTCAGCTC	12	6	50.00	OPG-10	AGG GCCGTCT	13	8	61.54
OPN-13	AGCGTCACTC	14	12	85.71	OPG-03	GAGCCCTCCA	4	2	50.00
OPG-18	GGCTCATGTG	9	7	77.78	OPN-04	GACCGACCCA	6	3	50.00
OPG-05	CTGAGACGGA	17	14	82.35	OPG-14	ACTGGGACTC	6	5	83.33

## 2.2 31个玉米自交系聚类分析

将14个引物扩增产生的多态性片段数据化后,用Nei-Li遗传距离公式求得31个玉米自交系的遗传距离矩阵(表略)。E28与旅9宽遗传距离最小,为0.1111;而郑22与综31遗传距离最大,为0.5540;31个自交系的遗传距离在0.1110~0.5540。这表明亲缘关系近

的自交系间遗传距离小, 但亲缘关系不大的自交系间遗传距离也不够大。这说明我国当前利用的玉米种质资源的遗传多样性还相当狭窄, 应积极创造新的种质资源<sup>[8]</sup>。

根据 31 个玉米自交系遗传距离矩阵, 按类平均法聚类, 得到聚类分析图(见图 2)。

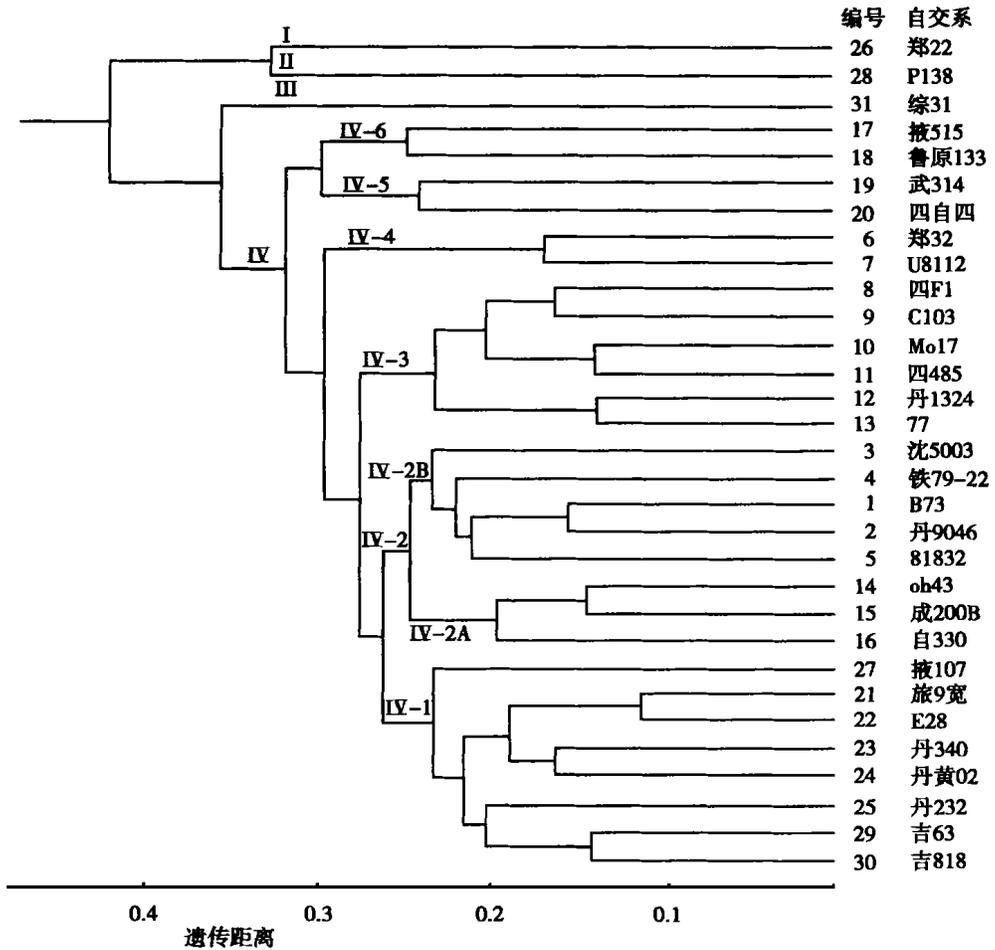


图 2 31 个玉米自交系类平均法聚类分析图

表 3 31 个玉米自交系类平均法分类情况表

组别	自 交 系
I	P138(28)
II	郑 22(26)
III	综 31(31)
IV- 1	旅 9 宽(21), E28(22), 丹 340(23), 丹黄 02(24), 丹 232(25), 吉 63(29), 吉 818(30), 掖 107(27)
IV- 2	A oh43(14), 成 200B(15), 自 330(16) B B73(1), 丹 9046(2), 沈 5003(3), 铁 79- 22(4), 81832(5)
IV- 3	四 F1(8), C103(9), Mo17(10), 四 485(11), 丹 1324(12), 77(13)
IV- 4	郑 32(6), U8112(7)
IV- 5	武 314(19), 四自四(20)
IV- 6	掖 515(17), 鲁原 133(18)

如图 2 所示, 在遗传距离值 0.31 处, 31 个玉米自交系可分为 I, II, III, IV 组。在遗传距离值 0.25 处, IV 组又可分为 6 个亚组; 其中 IV-2 亚组中, 当遗传距离为 0.23 处, 又可分为 IV-2A 和 IV-2B 两个亚亚组, 具体聚类结果见表 3。

由表 3 可以看出, I 组中, P138 来源于国外杂交种, 可能带有热带种质成分, 与 Reid 类、Lanc. 类及国内种质如旅大红骨类、黄早四类之间遗传距离较远, 故游离于 4 大群之外。II 组中的郑 22 单独划为一类。II 组中的综 31 亦然。

IV-1 亚组包括旅 9 宽[来自旅 9 杂株]、E28[选自 A619Ht × 旅 9 宽<sup>4</sup>]、丹 340[选自白骨旅 9 × 有稃玉米辐射]、丹黄 02[来自旅系统综合种]、丹 232[选自 (E28 × 丹 340) × oh43], 均较大程度来源于旅 9 或旅系统, 称为旅类。

IV-2A 亚组包括自 330 [来自 oh43 × 可利 67]、oh43 [选自 W8 × oh40B]、成 200B [选自 330 × 187-2], 称为 Lan. II 类。IV-2B 亚组包括 B73、丹 9046、沈 5003、铁 79-22 和 81832, 称为 Reid 类。

IV-3 亚组包括 C103 [来自 Lancaster sure group]、Mo17 [选自 C I .187-2 × C103]、四 485 [选自矮 331 × C103B<sup>3</sup>]、四 F1 和丹 1324 都选自 Mo17、77 选自 [(黄小 162 × 南 70) × (187-2 × 南 55)], 称为 Lan. I 类。

IV-5 亚组和 IV-6 亚组包括四自四 [选自黄早四<sup>2</sup> × 自 330]、武 314 [选自黄早四 × (武 302D+ 黄爆裂)]、掖 515 [选自 (华凤 100+ 矮 C103) × 黄早 4]、鲁原 133 [选自原齐 721 × 黄早 4 Co<sup>60</sup>辐射], 可合称为黄改类。

## 3 讨论

### 3.1 RAPD 分类结果与系谱关系、配合力和杂种优势分群结果比较

用 14 个随机引物对 31 个玉米自交系进行的类平均聚类分析结果从总的效果来说是比较可靠的。从对各类群的分析可以看出, 有一定亲缘成分的自交系多归于一类, 如旅类, 以 Mo17 为代表的 Lan. I 类, 以自 330 为代表的 Lan. II 类, Reid 类, 黄改类, 与我们根据系谱关系、配合力和杂种优势划分的结果基本一致<sup>[6]</sup>。而 U8112 和郑 32 归入 IV-4 类, 按系谱关系郑 32 应与铁 79-22 同归 IV-2B 亚组即 Reid 类中, 尚有待进一步研究; 含旅系统成分较多的郑 22 [(E28 × 独青) × 旅 9 宽] 与旅类相距较远, 有待进一步研究。由于 DNA 提取等原因, 掖 478、黄早 4 等未包纳进来, 实为缺憾。

### 3.2 RAPD 技术作为遗传多样性分类工具的局限性

RAPDs 分析主要是通过对扩增产物电泳条带有无的统计来进行遗传多样性分类。(1) 由于扩增产物未经严格的同源性鉴定, 因此扩增产物中具有相同迁移率的条带可能包含不同源的两种或两种以上的序列。再者, 在不同分类单位中扩增的迁移率相同的产物也可能是两种不同源的序列, 特别是当两物种亲缘关系较远时, 同一引物扩增的产物在不同物种基因组中分布不同的可能性增加, 这将导致上述情况的可能性比亲缘关系近时增加, 因此可能加大结果的误差<sup>[9]</sup>。(2) 多态性带检测分辨力大小随电泳方式的不同而不同。He 等<sup>[10]</sup>用变性梯度凝胶电泳法, 检测到比琼脂糖凝胶多出许多的稳定性条带, Caetanø-Anolles 等用聚丙烯酰胺凝胶电泳对 RAPD 条带的检测结果也支持上述结论。所以在对模糊带的统计上很难做出适

当的取舍和判断,因而在一定程度上影响试验的原始资料,进而影响遗传距离的计算结果。

### 3.3 如何正确看待利用 RAPD 分析得到的遗传距离和聚类结果

从对遗传距离矩阵利用最短距离法,最长距离法,类平均法等 8 种系统聚类法分析得到的聚类分析图看,大部分自交系分类趋势基本相同,但仍有少数自交系分类情况因聚类方法不同而不同,因而在统计分析方法上有待比较与探索。同时 RAPD 技术得到的聚类分析结果也仅能作为重要参考,因为育种家所关心的产量等性状是多因素控制,遗传距离差异并不是杂种优势产生的唯一决定因素<sup>[11]</sup>,故在亲本选配时必须结合系谱关系、配合力和杂种优势综合考虑,进行杂种优势群划分,并在育种实践中不断完善,才能取得事半功倍的育种效果。

### 参考文献:

- [1] Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, *et al.* Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree F<sub>1</sub> grain, grain yield, heterosis, and RFLPs[J]. *T A G*, 1990, 80: 833– 840.
- [2] Rita Hogan Munm, Lawrence J Hubert, Dudley J W, *et al.* A classification of 148 U S maize inbreds: II . Variation of cluster analysis based on RFLPs[J]. *Crop Sci*, 1994, 34: 852– 864.
- [3] Melchinger A E, Messmer M M, Lee M, *et al.* Diversity and relationships among U S maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms[J]. *Crop Sci*, 1991, 31: 669– 678.
- [4] Messmer M M, Melchinger A E, Herrmann R G, *et al.* Relationship among early European maize inbreds: II . Comparison of pedigree and RFLP data[J]. *Crop Sci*, 1993, 33: 944– 950.
- [5] Messmer M M, Melchinger A E, Boppermaier J, *et al.* Relationship among early European maize inbreds: I . Genetic diversity among flint and dent lines revealed by RFLPs[J]. *Crop Sci*, 1992, 32: 1301– 1309.
- [6] 王懿波,王振华,王永普,等. 中国玉米主要种质杂种优势群划分与利用[J]. *华北农学报*, 1998, 13(1): 74– 80.
- [7] 王懿波,王振华,王永普,等. 中国玉米主要种质杂种优势利用模式研究[J]. *中国农业科学*, 1997, 30(4): 16– 24.
- [8] 孙致良,张超良,金德敏,等. RAPD 技术在玉米自交系亲缘关系研究中的应用[J]. *遗传学报*, 1999, 26(1): 61– 68.
- [9] 惠东威,庄炳昌,陈受宜. RAPD 重建的大豆植物的亲缘关系[J]. *遗传学报*, 1996, 23(6): 460– 468.
- [10] He S, Ohm H, Mackenzie S. Detection of DNA Sequence Polymorphisms among wheat varieties[J]. *T A G*, 1992, 84: 573– 578.
- [11] 高之仁. 数量遗传学[M]. 成都: 四川大学出版社, 1986, 310– 313.

## A Study on the Classification of Maize Germplasm Using RAPDs

TIAN Zeng-yuan, WANG Yi-bo, WANG Zhen-hua, WANG Yong-pu,  
ZHANG Xin, LU Li-xing

(Cereal Crop Research Institute, Henan Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou Henan 450002, China)

**Abstract:** Thirty-one maize inbred lines were classified into five major groups by RAPDs: Ludahonggu group( IV- 1), Lan. II group( IV- 2A), Reid group( IV- 2B), Lan. I group( IV- 3) and Improved Huangzao 4 group ( IV- 5 and IV- 6), and four minor groups: P 138( I ), Zheng 22 ( II), Zong 31( III), Zheng 32 and U 8112( IV- 4). Comparison of the result based on RAPDs with that based on pedigree, combining ability and heterosis showed that the former is basically identical with the latter, while there is little difference for some inbred lines between the two results. And some aspects about the synthetical utilization of classification results in corn breeding were also discussed.

**Key words:** Maize germplasm; RAPDs; Classification