

应用 RAPD 分子标记技术对我国骨干玉米自交系进行类群划分*

赵久然 郭景伦 郭 强 尉德铭 孔艳芳

(北京市农林科学院玉米研究中心, 北京 100081)

摘 要 利用 RAPD 分子标记技术, 对我国目前 25 个主要玉米自交系进行亲缘关系类群划分。本项研究建立了从玉米种子、幼芽以及叶片组织中提取微量 DNA 的方法。从 RAPD 引物试验盒 A 至 O 共计 300 个引物中, 筛选出对玉米扩增产物具有多态性的引物 40 个, 其中具有特别明显多态性的引物 10 个。它们是 F_3 、 O_{20} 、 A_{19} 、 M_2 、 M_6 、 N_{11} 、 N_{12} 、 N_{19} 、 C_7 和 G_{14} 等。依据 10 个引物扩增谱带建立 0, 1 型数据, 计算 25 个自交系间遗传距离, 并进行聚类分析。结果表明: 供试的 25 个自交系共可划分为 5 个类群。 类为四平头血缘系统: 包括黄早四、吉 853、黄野四、四自四、196、81515、404、 H_{21} 等共 8 个; 类为瑞德黄马齿血缘系统: 包括 478、488、3189、7922、8112、B 尖 8、5005 等共 7 个自交系; 类为兰卡斯特血缘系统: 包括 M_{017} 、早 49、多 22 等共 3 个; 类为旅大红骨血缘系统: 只有 E28 一个自交系; 类共有 P78、9502、178、P138、007、P17 等 6 个自交系。这一类群都是由杂交种 P78599 后代选系而来, 与美国另外两个类群瑞德黄马齿系统和兰卡斯特系统关系较远, 它们之间选配的杂交组合大多具有较强的杂交优势。这一类群的自交系在我国玉米育种和生产上的应用将进一步扩大。研究结果表明: 用 RAPD 分子标记进行玉米自交系类群划分与系谱法相吻合。通过不同自交系之间杂交, 其产量杂交优势的表现, 也验证了应用 RAPD 标记划分的 5 个不同亲缘关系类群的正确性。

关键词 RAPD 玉米 类群划分

准确划分玉米自交系亲缘关系类群, 建立相应的杂交优势利用模式, 有的放矢地选配杂交组合, 将大大减少育种的盲目性, 提高育种效率。以往国内外学者常采用的划分类群方法主要有: ①根据形态特征差异划分。该方法易受环境条件影响; ②根据地域来源和系谱来源划分。但地域远的自交系间不一定存在杂种优势, 对系谱来源不明或来源复杂的种质难以准确划分; ③通过大量亲本测交观测配合力表现来确定。该方法耗费大量人力、物力, 且耗时较长; ④同工酶技术的应用为类群划分提供了一个途径。但其提供的遗传位点有限, 很多材料难以区分; ⑤ RFLP 分子标记技术。能够提供较为丰富的多态性, 克服上述方法的缺陷, 已成功地用于玉米自交系类群划分^[5,6], 其结果与系谱相吻合。但因其操作繁琐, 技术复杂, 费用高, 通常使用同位素标记, 不易为广大玉米育种工作者所掌握。而后来居上的 RAPD 分子标记技术因操作简单, 样品用量少, 多态性丰富, 不受环境条件和发育阶段的影响, 经济快捷等优点而被广泛应用。Fukuoka^[13] 等人利用 28 个引物, 对 16 个水稻品种进行了 RAPD 扩增反应, 将它们分成三类, 与 RFLP 分类的结论相吻合。Yang 和 Quiros^[11] 等人利用该技术对芹菜进行分类也获得

了令人满意的结果。在玉米上,刘新芝^[2]等人用 6 个 RAPD 引物对 15 个玉米自交系进行了类群划分研究,结果与系谱法一致。本研究应用 RAPD 分子标记技术对我国骨干玉米自交系和部分优秀自选系,共计 25 个材料进行了类群划分研究。从分子水平为我国玉米育种工作者利用杂种优势模式组配优良杂交种,提供了依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

本研究所选用的 25 个玉米自交系为我国玉米生产中有代表性的骨干系和部分近年来本单位选育的优系。所有供试材料均经过 2 年田间观察,证明其遗传上纯合稳定,整齐一致,并套袋自交。应试自交系名称、编号及系谱来源见表 1。

1.2 实验方法

1.2.1 DNA 提取 采用郭景伦等^[3]改进的玉米单粒种子 DNA 提取新方法:取干种子,将一粒种子胚剥下,放入 1.5 ml 离心管中,加入

100 μ l 氯仿后研磨,然后加入 300 μ l DNA 提取液(100 mmol/L Tris-HCl, 50 mmol/L EDTA, 50 mmol/L NaCl, 1.5% SDS)混均后于 10000 r/min 离心 2 min,吸上清液加入预先装有 500 μ l 无水乙醇的 1.5 ml 离心管中,轻轻来回倒置 2 次,12000 r/min 离心 1min,倒掉上清液,加 70% 乙醇洗涤,空气干燥后直接加入 100 μ l TE,待充分溶解后取上清液备用。

1.2.2 RAPD 反应条件及扩增产物检测方法 RAPD 反应是在 PTC-100PCR 仪上进行,所用引物为美国 OPERON 公司生产,长度为 10 bp。其反应程序为:94 预变性 1 min,94 变性 20 s,37 引物与模板结合 1 min,72 保温 5 min,使其延伸更完全。

反应体系:第 25 μ l 反应液中包括 10 mmol/L Tris-HCl(pH8.0),50 mmol/L KCl,2 mmol/L MgCl₂,明胶 0.001%,4 \times dnTps 分别为 0.2 mmol/L;引物 1 μ mol/L,1.5 单位 TaqDNA 聚合酶,40 ngDNA 模板。

扩增产物在 1TAE 缓冲液条件下,1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离,溴化乙锭染色,紫外灯下观察照相。

表 1 供试自交系名称及其系谱来源

编号	自交系名称	系谱来源
1	478	8112 \times 5003
2	488	5003 \times 8112
3	3189	5003 \times 8112
4	5005	美国杂交种 3147
5	黄早四	塘四平头天然变异株
6	黄野四	(野鸡红 \times 黄早四) \times 墩子黄
7	四自四	黄早四 \times 自 330
8	404	黄早四 \times 墨西哥系
9	853	黄早四 \times 自 330
10	H21	黄早四 \times H84
11	196	黄早四 \times 340
12	81515	(华凤 100 \times 矮 C103S ₂) \times 黄早四
13	E28	美国系 A419 ^{HT} \times 旅 9 宽
14	7922	美国杂交种 3382
15	8112	美国玉米杂交种 U 8
16	比尖八	(B73 \times 尖端 2 号) \times 8112
17	P78	美国玉米杂交种 P78599
18	007	美国玉米杂交种 P78599
19	先早 17	美国玉米杂交种 P78599
20	9501	美国玉米杂交种 P78599
21	早 49	
22	多 22	
23	178	美国玉米杂交种 P78599
24	P138	美国玉米杂交种 P78599
25	M o17	187-2 \times C103

1.2.3 统计方法 每一个可分辨的 RAPD 扩增产物分别代表 1 个位点, 根据每个位点扩增谱带的有无进行统计, 有计为 1, 无计为 0。样品间距离公式为:

$$d_{ij} = b / (a + b) \times 100$$

式中, a: 表示两个品种具有相同谱带的数; b: 表示两个品种具有不相同的谱带数。

类间距离采用类平均法进行分类, 计算在微机上完成。

2 结果与分析

2.1 RAPD 分子标记测定结果

从 300 个引物中筛选出对 25 个自交系扩增产物具有多态性的引物 40 个, 占所用引物的 13.3%。具有特别明显多态性引物 10 个, 它们是: F₃, O₂₀, A₁₉, M₂, M₆, N₁₁, N₁₂, N₁₉, C₇和 G₁₄等, 其引物序列见表 2。对 25 个自交系在相同位置上 DNA 片断, 有 RAPD 带的记为 1, 无记为 0(见图 1 和图 2 例子)。将 10 个引物扩增带型结果转化为 0-1 型数据。

表 2 25 个玉米自交系具有特别明显多态性的 10 个引物序列

引物	序列(5'—3')	引物	序列(5'—3')
A19	CAAACGT CGG	M06	CTGGGCAACT
C07	GTCCCGACGA	N11	TCGCCGCAAA
G14	GGATGAGACC	N12	CACAGACACC
F03	CCTGATCACC	N19	GTCCGTACTG
M02	ACAACGCCTC	O20	ACACACGCTG



图 1 25 个自交系使用引物 N11(TCGCCGCAAA)扩增的 RAPD 产物
(从右至左 1~25 编号分别代表 25 个玉米自交系)



图 2 25 个自交系使用引物 N19(GTCCGTACTG)扩增的 RAPD 产物
(从右至左 1~25 编号分别代表 25 个玉米自交系)

表 3 25 个自交系 RAPD 遗传距离

	478	488	3189	5005	黄早 4	黄野 4	四自四	404	853	H21	196	81515	7922	8112	比尖 8	P78	0007	先早 17	9501	早 49	多 22	178	P138	Mo17
488	1.39																							
3189	7.94	6.35																						
5005	15.87	14.29	17.46																					
黄早 4	19.05	20.63	20.63	25.40																				
黄野 4	15.87	17.46	23.81	25.40	12.70																			
四自四	19.05	20.63	26.98	25.40	15.87	15.87																		
404	17.46	15.87	19.05	23.81	14.29	17.46	17.46																	
853	19.05	20.63	26.98	25.40	9.52	15.87	12.70	14.29																
H21	23.81	22.22	23.40	26.98	20.63	26.98	23.81	12.70	20.63															
196	22.22	23.81	30.16	22.22	19.05	22.22	15.87	20.63	15.87	20.63														
81515	17.46	19.05	22.22	23.81	20.63	23.81	17.46	22.22	20.63	22.22	17.46													
7922	12.70	11.11	14.29	19.05	19.05	19.05	22.22	14.29	22.22	20.63	22.22	20.63												
8112	12.70	14.29	14.29	19.05	19.05	15.87	22.22	20.63	25.40	26.98	28.57	17.46	15.87											
比尖 8	11.11	12.70	15.87	20.63	20.63	17.46	20.63	22.22	20.63	28.57	23.81	22.22	17.46	20.63										
P78	14.29	15.87	22.22	20.63	23.81	23.81	20.63	25.40	23.81	19.05	20.63	19.05	20.63	23.81	15.87									
0007	25.40	26.98	30.61	28.57	31.75	31.75	25.40	26.98	28.57	26.98	25.40	23.81	28.57	28.57	23.81	20.63								
先早 17	25.40	26.98	30.16	31.75	25.40	25.40	22.22	23.81	25.40	26.98	25.40	26.98	28.57	26.98	29.98	12.70								
9501	17.46	19.05	22.22	17.46	30.16	30.16	26.98	25.40	23.81	25.40	26.98	22.22	23.81	23.81	22.22	15.87	17.46							
早 49	22.22	23.81	26.98	25.40	25.40	28.57	25.40	30.16	22.22	26.98	22.22	23.81	31.75	28.57	26.98	26.98	28.57	25.40	26.98					
多 22	22.22	23.81	30.16	25.40	31.75	31.75	25.40	33.33	25.40	33.33	22.22	20.63	28.57	31.75	26.98	26.98	22.22	25.40	23.81	15.87				
178	25.40	26.98	30.33	31.75	31.75	28.57	28.57	30.16	25.40	26.98	28.57	30.16	34.92	31.75	30.16	26.98	19.05	19.05	17.46	28.57	22.22			
P138	23.81	25.40	31.75	30.16	33.33	36.51	26.98	26.98	31.75	23.81	26.98	31.75	33.33	36.51	25.40	19.05	20.63	26.98	15.87	30.16	23.81	14.29		
Mo17	23.81	25.40	31.75	23.81	30.16	30.16	26.98	28.57	20.63	31.75	23.81	28.57	30.16	30.16	25.40	28.57	23.81	30.16	25.40	20.63	14.29	23.81	25.40	
E28	19.05	17.46	20.63	19.05	28.57	31.75	31.75	26.98	25.40	23.81	25.40	26.98	22.22	25.40	23.81	20.63	28.57	31.75	26.98	25.40	25.40	34.92	30.16	26.98

2.2 25 个玉米自交系聚类分析结果

将上述 RAPD 分析所得 0、1 型数据, 用聚类分析统计软件计算所得 25 个自交系间遗传距离列入表 3。

从表 3 可以看出, 25 个自交系间遗传距离在 1.59~36.51 之间。遗传距离最小者为 478 和 488 之间, 两者来自同一二环系。遗传距离最大的是自交系 178 和 7922 之间。两者虽都来自美国杂交种, 但分别为 P78599 和 3382 后代, 为不同的类群。

根据各自交系间距离, 按类平均法聚类, 结果如图 3 所示。25 个自交系共聚成 5 个类。第 1 类包括黄早四、吉 853、黄野四、四自四、196、81515、404、H21 等 8 个自交系; 第 2 类包括 478、488、3189、7922、8112、比尖八、5005 等共 7 个自交系; 第 3 类包括 Mo17、早 49、多 22 等共 3 个; 第 4 类只有 E28 一个自交系; 第 5 类共有 P78、9502、178、P138、007、P17 等 6 个自交系。

2.3 划分类群的阈值

其值为为 4.5922, 此时 $T = 21$, 可将 25 个自交系划分为 5 个类群。这一结果与系谱来源是相吻合的。

如在第 类中, 吉 853、黄野四、四自四、196、81515、404、H 21 等都是由包含有黄早四亲本血统的二环系选育而来, 自然就与黄早四血缘关系相近。这些系之间配组合, 也未有强优组合产生。划在第 类群中的 478、488、3189、7922、8112、比尖八、5005 等, 查其系谱来源均与属美国瑞德血统的 BSSS 群体有关, 属典型的瑞德系统。第 类群的 Mo17、早 49、多 22 三者遗传距离均在 21 之内, 而与其他类群间距离大于 25。Mo17 属典型的兰卡斯特血缘系, 因此这 3 个系均为兰卡斯特系统。E28 自交系与其他各群体距离均在 25 以上, 自成一系, 属典型的旅大红骨系统。(表 4)。值得重点指出的是第 类, 它们均来自美国玉米杂交种 P78599 后代选系, 它们与我国原有的 4 个血缘系统塘四平头系、瑞德系、兰卡斯特系、旅大红骨系其遗传距离均在 26 以上。这一类群与其他各类群的自交系杂交均可能产生强优组合。这是我国近年来引进的新种质, 并在我国玉米育种和生产中发挥越来越大的作用, 如近几年几个表现突出的杂交种农大 108(P178×黄 C)、农大 3138(综 31×P138) 等。今后对于玉米育种者, 利用 P 群与其他 4 个群的优系组合将是选配强优玉米杂交组合的重要模式。

本研究结果证明: 利用 RAPD 分子标记进行类群划分的结果与已知系谱追溯相吻合, RAPD 标记在玉米自交系类群划分上是可行的。利用这一方法可在更大范围内对我国的玉米自交系进行类群划分研究。

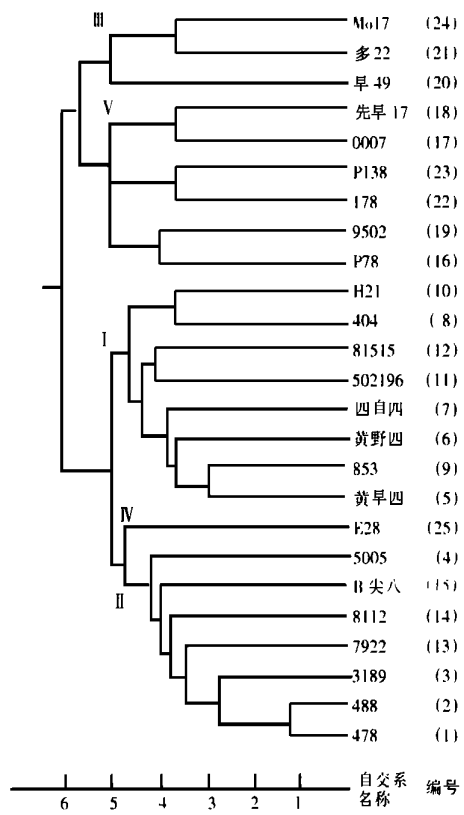


图 3 25 个自交系 RAPD 分析聚类谱系

表 4 玉米自交系 5 个类群之间的遗传距离

	瑞德	旅大红骨	兰卡斯特	塘四平头
旅大红骨	21. 0886			
兰卡斯特	25. 3944	25. 9267		
塘四平头	21. 7961	27. 2050	27. 0500	
P78599 选系	25. 9636	28. 8250	26. 0139	26. 6535

参 考 文 献

1 曾三省. 中国玉米杂交种的种质基础. 中国农业科学, 1990, 23(4): 1~9

2 刘新芝, 等. RAPD 在玉米类群划分研究中的应用. 中国农业科学, 1997, 30(3): 44~51

3 郭景伦, 赵久然, 等. 玉米单粒种子 DNA 提取新方法. 北京农业科学, 1997, (2): 1~2

4 王懿波, 等. 中国主要种质杂种优势群的划分及其改良利用. 华北农学报, 1998, 13(1): 74~80

5 Smith O S, Smith J S C, Bowen S L, et al. Similarities among a group of elite maize inbreds as mesured by pedigree F₁ grain yield, heterosis, and RFLPs. Theor Appl Gennt, 1990, 80: 833~840

- 6 Rita Hogan Mum, Lawrence J Hubert, Dudley J W. A classification of 148 U. S. Maize intrreds. 2 validation of cluster analysis based on RFLPs. *Crop Sci*, 1994, 34: 852 ~ 864
- 7 Millis K, *et al.* Specific-enzymatic amplification of DNA *in vitro*: The polymorphisms chain reaction. Cold Spring Harbor Sgmp. *Quant Biol*, 1986, 51: 263
- 8 Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl Acids Res*, 1990, 18: 6531 ~ 6535
- 9 Halward T, Stalker T, LaRue E, *et al.* Use of single-primer DNA amplifications in genetic studies of peanut (*Arachisypogaea* L.). *Plant Molecular Biology*, 1992, 18: 325
- 10 Yu L X, Nguyen H T. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1994, 87: 668 ~ 672
- 11 Yang X, Ouiros C. Identification and classification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 205 ~ 212
- 12 Susan E Wilkie, Peter G Isaac, *et al.* Randon amplified polymorphic DNA (RAPD) markers for genetic analysis in Allium. *Theor Appl Genet*, 1986: 497 ~ 504
- 13 Yu K F, *et al.* Optimization of the PCR program for RAPD analysis. *Nucl Acids Res*, 1992, 20: 2606
- 14 Welsh J, Peterson C, MoClelland M. Polymorphisms generated by arbitrarilypripped PCR in the mouse: application to strain identification and genetic mapping. *Nucl Acids Res*, 1991, 19: 303 ~ 306

Heterotic Grouping of 25 Maize Inbreds with RAPD Markers

Zhao Jiuran Guo Jinglun Guo Qiang Yu Deming Kong Yanfang

(Maize Research Centre, Beijing Municipal Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Beijing 100081)

Abstract Heterotic groups were classified by cluster analysis with RAPDs based on 25 important maize inbreds utilised widely in hybrid maize production in China. Ten primers: F₃, O₂₀, A₁₉, M₂, M₆, N₁₁, N₁₂, N₁₉, C₇ and G₁₄, selected from 300 candidate primers from the operation A₁ to O₂₀ were used as polymorphic DNA (RAPD) markers for 25 maize inbred lines. Genetic distance among 25 inbreds was calculated and clustered with RAPD markers. The results showed that 25 inbreds lines could be classified into five groups. Groups I consisting of Huangzao 4, 853, Huangye 4, Sizi4, 196, 81515, 404, H21 is included in the Sipingtou heterotic group. Group II consisting of 478, 488, 3189, 7922, 8112, Bijian 8, and 5005, is included in the Reid heterotic group. Group III consisting of Mo17, Zao 49, and Duo 22, belong to the Lancaster heterotic group. Group IV only consisting of E28, belongs to the Lüda Honggu heterotic group. Group V consists of P78, 9502, 178, P138, 007, and P17. They belong to a new heterotic group different from the above four heterotic groups. The five groups by cluster analysis with RAPD markers conforms to the pedigree method. The results of the study indicated that it is practical to group maize inbred line with RAPDs.

Key words: Maize inbred; RAPD; Heterotic group; Cluster analysis