

文章编号: 1005-0906(2006)02-0035-05

利用醇溶蛋白、盐溶蛋白和 RAPD 标记划分玉米自交系类群的比较研究

黄世全¹, 王爱琴², 戴保威³

(1. 河南大学生命科学学院, 河南 开封 475001; 2. 河南省农业技术推广总站, 郑州 450002; 3. 贵州大学玉米研究所, 贵阳 550025)

摘要: 利用醇溶蛋白、盐溶蛋白和 RAPD 分子标记研究了 16 个玉米自交系的遗传多样性, 并对这 16 个自交系进行聚类分析。结果显示, 在供试材料中筛选到多态性、重复性均比较好的随机引物 13 个, 检测到醇溶蛋白、盐溶蛋白和 RAPD 标记的多态性条带分别为 30 条、34 条和 112 条, 分别占总带数的 83.3%、85.0% 和 86.8%。3 种标记所得遗传相似系数的相关性均达到了极显著水平, 所得平均遗传相似系数(0.597、0.541、0.554)基本一致, RAPD 标记的遗传相似系数标准差最小(0.080), 相对较可靠。依据醇溶蛋白、盐溶蛋白和 RAPD 分子标记分别将 16 个供试自交系划分为 3 类、3 类和 4 类, 聚类分析结果都与系谱分析大体相似, 同时也存在与所知系谱不符的现象。

关键词: 玉米自交系; 醇溶蛋白; 盐溶蛋白; RAPD; 类群划分**中图分类号:** S513.023**文献标识码:** A

Heterotic Grouping Comparison of Maize Inbred Lines Based on Zeins, Salt-soluble Proteins and RAPD Markers

HUANG Shi-quan¹, WANG Ai-qin², DAI Bao-wei³

(1. College of Life Science, Henan University, Henan Kaifeng 475001; 2. Agricultural Technique Extension Station of Henan, Zhengzhou 450002; 3. Maize Research Institute, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Zeins, salt-soluble proteins and RAPD markers were used to detect the genetic diversity among 16 maize inbred lines, based on which the heterotic groups were classified. 13 random primers were identified with polymorphism and reproducibility among the entries. The numbers of polymorphic bands of zeins, salt-soluble proteins and RAPD makers were 30, 34, and 112 correspondingly, which were about 83.3%, 85.0% and 86.8% of total alleles respectively. A comparison of genetic similarity matrices revealed that the estimates of correlation coefficients based on zeins, salt-soluble proteins and RAPD markers were significantly correlated. The average genetic similarity coefficients of the three markers(0.597, 0.541, 0.554) were consistent with each other, but the standard deviation of the one based on RAPD markers was the smallest. These inbred lines were classified into three, three and four groups respectively based on zeins, salt-soluble proteins and RAPD markers data, which were all consistent with the grouping based on the available pedigree data, except for some discordance.

Key words: Maize inbred lines; Zeins; Salt-soluble proteins; RAPD; Cluster analysis

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, 将极大减少育种的盲目性, 提高育种效率。玉米自交系类群划分的方法概括起来主要有: ①根据农艺性状进行聚类分析, 该方法易受环境条件影响^[1]; ②配合

力聚类分析, 该法需要组配大量的杂交种, 并进行多年多点的综合分析, 耗费大量人力、物力, 耗时长^[2]; ③利用同工酶技术进行聚类划分, 由于同工酶标记所能检测到的差异性座位较少, 以及酶的种类和生长发育阶段的影响, 使很多材料难以区分^[3]; ④利用蛋白质电泳生化指纹图谱对玉米类群进行划分, 这是一种快速、准确、经济和可批量鉴定的有效方法, 但数量有限, 覆盖基因组程度不高^[4,5]; ⑤分子标记技术的应用, 为玉米类群的划分提供了新的手段^[6,7], 但分子标记技术常因成本高、操作繁琐、技术复杂等原

收稿日期: 2005-03-23**基金项目:** 贵州大学硕士教育基金和河南大学科研启动经费资助项目(S2004082)**作者简介:** 黄世全(1977-), 男, 硕士, 从事作物遗传育种和教学研究
工作。Tel: 13937898058

E-mail: huangshiquan1227@163.com

因,难以运用于大批量检测。不同的方法有不同的优缺点,在国内关于不同方法的比较有了一定的研究工作。牛应泽^[8]等根据醇溶蛋白和盐溶蛋白区分不同玉米品种,认为在玉米品种鉴定中盐溶蛋白比醇溶蛋白有优势;池书敏等^[9]利用醇溶蛋白、过氧化物酶和脂酶多态性的综合分析来划分玉米优势类群,他们的聚类结果均与系谱来源基本吻合;袁力行^[10]等利用 RFLP、SSR、AFLP 和 RAPD 分子标记分析玉米自交系遗传多样性,认为 SSR 和 RFLP 比较适合玉米种质遗传多样性的研究。本研究利用醇溶蛋白、盐

溶蛋白和 RAPD 分子标记,对贵州省 16 个黄粒玉米自交系的遗传多样性进行比较分析,旨在分析自交系间在两种蛋白和 DNA 水平上的遗传差异,并基于此进行类群划分,为玉米杂种优势预测提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料由贵州省六枝种子公司提供,除张 2 外,其他均为贵州省目前生产上推广杂交种的主要亲本(表 1)。

表 1 供试玉米自交系及来源

编 号	自交系	来 源	编 号	自交系	来 源
1	P98-1B62	78599 衍生系	9	西 ,2000-2444	西南山区种质改良的 78599
2	Z137	78599 衍生系(热带经温带改良)	10	Sd99-10B	Mo17 衍生系
3	79-1E	Reid 衍生系	11	G18	旅大红骨衍生系
4	豫雄繁	黄早四衍生系	12	交 51	贵州地方种一环系
5	张 2	苏湾经亚热带种质改良系	13	D40	黄早四衍生系
6	P98-3 矮	非洲马齿型衍生系	14	S37	苏湾衍生系
7	AC 杂 2000-11	78599 衍生系(寒亚热带种质改良)	15	六苏繁	苏湾衍生系
8	西 ,2000-113	西南山区种质改良的 78599	16	山东 51	美杂系(二环系)

注:为简便起见,后文以编号代替玉米自交系。

1.2 实验方法

1.2.1 蛋白质提取

将单粒玉米干种子磨碎后,移入 1.5 mL 离心管,按体积比为 1:1 加入提取液(醇溶蛋白提取液含 0.05%甲基绿和 25% 2-氯乙醇;盐溶蛋白提取液含 0.58% NaCl、20%蔗糖和 0.015%甲基绿),混匀,室温提取 2~4 h,12 000 × g 离心 10 min,上清液上样 20 μL 电泳。每样品重复试验 3 次。

1.2.2 电泳

聚丙烯酰胺凝胶电泳采用乳酸-乳酸钠缓冲系统。分离胶含 11.25% Acr、0.375% Bis、0.025% 抗坏血酸和 0.000 8% FeSO₄,由分离胶缓冲液(每 100 mL 含 0.143 mL 乳酸钠,并用乳酸调至 pH 3.0)配制,按每 30 mL 分离胶溶液加入 27 μL 3% H₂O₂ 制分离胶;浓缩胶含 6% Acr、1% Bis、0.03% 抗坏血酸和 0.000 8% FeSO₄,由浓缩胶缓冲液(每 100 mL 含 0.3 mL 乳酸钠,并用乳酸调至 pH 5.2)配制,按每 10 mL 浓缩胶溶液加入 35 μL 3% H₂O₂ 制浓缩胶。电泳以 0.6% 甘氨酸(用乳酸调至 pH 3.3)为电极缓冲液,在 500 V 电压下,由正极向负极稳压电泳至甲基绿距凝胶末端约 1 cm,结束电泳。

1.2.3 染色

凝胶在 30℃ 恒温下染色 2~4 h(醇溶蛋白染色液含 0.04% 考马斯亮蓝 G250 和 10% 三氯乙酸;盐溶蛋白染色液含 0.04% 考马斯亮蓝 R250 和 10% 三

氯乙酸),清水稍脱色,用 OLYMPIA UVP 凝胶成像系统照相。

1.2.4 RAPD 分析

①DNA 的提取。基因组 DNA 参照孙辉等^[11]的方法提取并作适当改动。取 2 g 玉米黄化苗在含有 0.75 mL CTAB 提取缓冲液(含 100 mmol/L Tris-HCl pH 8.0,50 mmol/L EDTA-Na₂ pH 8.0,1% CTAB) 的研钵中迅速研磨,后转移至 1.5 mL 的离心管中,65℃ 水浴 1 h,其间颠倒几次,加入等体积氯仿/异丙醇(24:1)混合液,混匀并轻轻振荡 10 min,12 000 × g 离心 10 min,上清液用 2 倍体积的预冷无水乙醇沉淀,挑出 DNA,用 75% 乙醇洗 1~2 次后干燥,然后用无离子水溶解,保存备用。

②RAPD 反应。RAPD 反应在 PE-480PCR 仪上进行。扩增反应溶液体积为 25 μL,其中 1 × buffer [10 mmol/L Tri-HCl (pH 8.8),50 mmol/L KCl,2.0 mmol/L MgCl₂,Nonidet P40 0.08%], 0.2mmol/L dNTPs,1.5 U Taq DNA 聚合酶,0.4 μmol/L 10 碱基随机引物,20~50 ng 模板 DNA;加无离子 H₂O 至终体积 25 μL。混合后加一滴石蜡油覆盖,防止反应过程蒸发。PCR 反应程序参考刘红彦等^[12]的研究结果进行调试,根据效果确定为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 1 min,38℃ 1 min,72℃ 2 min,预扩增 4 个循环;94℃ 10 s,38℃ 1 min,72℃ 2 min,扩增 39 个循环;72℃ 延伸 5 min;最后 4℃ 保存。

③扩增产物检测。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶(含溴化乙锭 0.5 μg/mL)在电压 120 V 下电泳检测。电泳结果用 OLYMPIA UVP 凝胶成像分析系统观察照相。

1.2.5 数据处理

选择重复性好、清晰可辨的照片进行谱带统计,电泳谱带根据带的有无进行 0,1 型数据处理 (在相同迁移位置有带的记为 1,无带的记为 0),利用 SPSS 统计软件,根据欧氏距离,采用 Ward 方法对 16 个自交系进行系统聚类^[6]。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。遗传距离(genetic distance,GD)为 $GD=1-GS$ 。

2 结果与分析

2.1 多态性比较分析

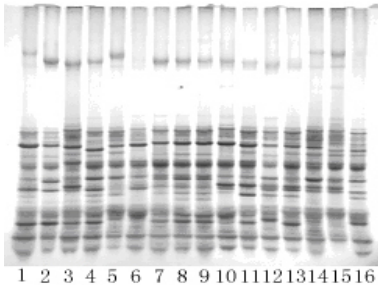


图 1 16 个自交系醇溶蛋白电泳图谱

16 个玉米自交系的醇溶蛋白电泳共分离出 36 条迁移率不同的谱带(图 1),其中多态性谱带 30 条,占谱带总数的 83.3%,平均每个自交系分离出 1.9 条多态性谱带,在 36 个位点上,自交系谱带数变异范围在 17~22 条,即自交系分离出谱带数最多的达到 22 条(P98-1B62、豫雄繁),最少的 17 条(P98-3 矮、六苏繁)。盐溶蛋白电泳共分离出 40 条迁移率不同的谱带(图 2),其中多态性谱带 34 条,占 85.0%,平均每个自交系分离出 2.1 条多态性谱带,在 40 个位点上,自交系谱带数变异范围在 14~27 条,即自交系分离出谱带数最多的达到 27 条(豫雄繁),最少的 14 条(P98-3 矮)。从 85 个随机引物中,筛选出对 16 个自交系扩增产物具有多态性的引物 21 个,占所用引物的 20%,其中多态性、重复性均较好的引物有 13 个(部分扩增结果见图 3),它们分别是 S2087、S27、S76、S148、S149、S2096、S111、S431、S389、S2104、S2105、S156 和 S37。这些引物的 RAPD 图谱一般有 5~15 条带,所有 13 个引物共扩增出 129 条带,其中 112 条带具有遗传多态性,占谱带总数的 86.8%,平均每个引物有 8.6 条多态性谱带,其中引物 S389 扩增出

的多态性谱带最多,达到 14 条。每个自交系扩增出的谱带数目在 53(山东 51)~78(西,2000-113),平均每个自交系扩增出 7 条多态性谱带(表 2)。

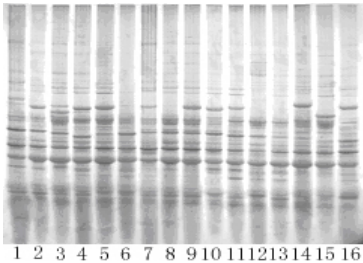


图 2 16 个自交系盐溶蛋白电泳图谱

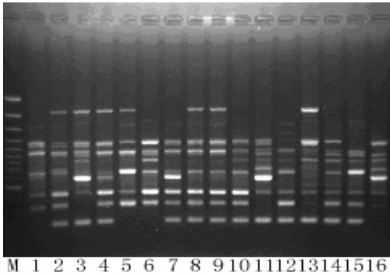


图 3 16 个自交系使用引物 S2087 扩增的 RAPD 产物

表 2 3 种标记的结果比较				条
标记类型	总谱带数	多态性谱带数及比例	变异范围	自交系平均多态性谱带
醇溶蛋白	36	30(83.3%)	17~22	1.9
盐溶蛋白	40	34(85.0%)	14~27	2.1
RAPD	129	112(86.8%)	53~78	7.0

2.2 聚类分析

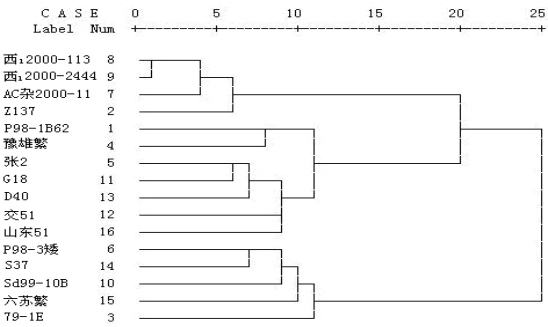


图 4 16 个玉米自交系醇溶蛋白聚类图

根据醇溶蛋白电泳结果进行聚类分析,可将 16 个自交系划分为三大类(图 4):第一大类包括自交系 8、9、7 和 2,其中自交系 8 和 9 为 78599 温亚热带改良系,自交系 7 为(78599 衍生系×爆裂种)回交改良系,而自交系 2 为 78599 衍生系,它们都含有 78599 血缘,说明该聚类结果与所知系谱分析基本一致。第二大类包括自交系 1、4、5、11、13、12 和 16,前 2 个自交系组成一个亚类,后 5 个组成另一个亚类,其中自交系 1 为 78599 与地方种质天然杂交株中分离出来的二环系,遗传基础复杂,不能聚到第一大类,依

系谱记载自交系 4 属黄早四衍生系, 后 5 个自交系分别来源于不同的种质。第三大类包括自交系 6、14、10、15 和 3, 由所知系谱, 自交系 14 苏湾 1 号群改系, 自交系 15 为苏 37 衍生系, 而苏 37 来源于苏湾 1 号, 其遗传基础比较相近, 但含有苏湾血缘的自交系 5 不能与自交系 14 和 15 聚到同一类, 可能因为它们不是来源于同一个苏湾基础群体。另外, 含有不同血缘的自交系 10(Lancaster 血缘)与自交系 3(Reid 血缘)聚到了第三大类中。说明根据醇溶蛋白聚类结果与系谱分析大体相似, 同时也存在与所知系谱不符的现象。

根据盐溶蛋白电泳结果也可将 16 个自交系划分为三大类(图 5): 第一大类包括自交系 8、9、7、2 和 4, 自交系 4 属黄早四衍生系, 自交系 1 仍然未能聚到该大类中。第二大类包括自交系 6、16、12、14 和 15, 其中自交系 6 和 16 组成一个亚类, 自交系 6 来源于非洲马齿型玉米, 自交系 16 为美国一杂交种二环系; 自交系 12 为贵州一个地方种一环系, 与自交系 14、15 组成另一个亚类。第三大类包括自交系 3、10、11、13、5 和 1, 其中自交系 3 和 10 组成一个亚类, 后 4 个自交系组成另一个亚类, 前 4 个自交系分别带有 Reid、Lancaster、旅大红骨和塘四平头血缘, 这是中国玉米种质的四大主要类群, 自交系 5 和 1 分别为苏湾经亚热带种质改良系和寒亚热带种质改良的 78599 衍生系, 可能都含有一定的亚热带种质。与醇溶蛋白分析相比较, 除自交系 4、16、12、3 和 10 这 5 个自交系外, 其余 11 个自交系的聚类结果与醇溶蛋白聚类结果基本一致(第二、三大类与醇溶蛋白的第三、二大类相对应)。说明盐溶蛋白聚类、醇溶蛋白聚类与系谱分析大体吻合, 也存在不符。

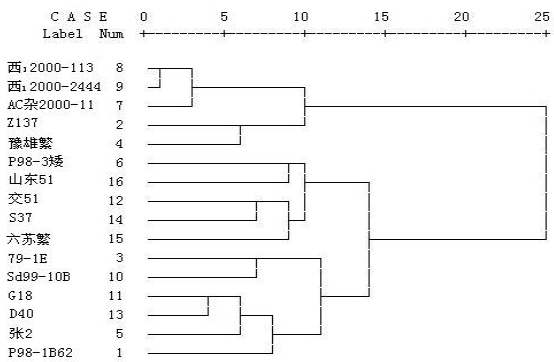


图 5 16 个玉米自交系盐溶蛋白聚类图

根据 13 个引物的扩增结果可将 16 个供试自交系聚成四大类(图 6): 第一大类包括自交系 8、9、7、2 和 4, 与盐溶蛋白聚类结果相同。第二大类包括自交系 14 和 15, 前两种方法虽能将自交系 14 和 15 聚

到一个大类中, 但都分在不同的亚类或亚亚类, 而 RAPD 方法则可将它们单独聚为一个大类, 与系谱基本一致。第三大类包括自交系 5、10、6 和 1, 其中自交系 1 和 5 聚在同一个大类的不同亚类中, 与前两种方法相同。第四大类包括自交系 12、16、11、13 和 3, 其中自交系 12 和 16 组成一个亚类, 自交系 11、13 和 3 分属于旅大红骨衍生系、黄早四衍生系和 Reid 衍生系, 却组成一个亚类, 出现了与上两种结果相似的现象。本试验结果表明, 根据 RAPD 的聚类结果与醇溶蛋白和盐溶蛋白聚类结果基本相似, 也存在与所知系谱不符的现象。

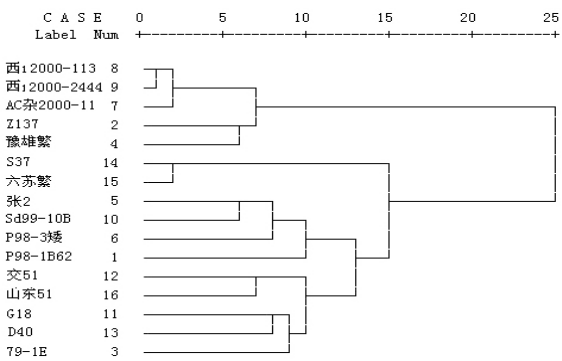


图 6 16 个玉米自交系 RAPD 聚类图

2.3 遗传相似性分析

根据醇溶蛋白、盐溶蛋白及 RAPD 标记结果计算 16 个自交系间的遗传相似系数。根据醇溶蛋白谱带计算出的遗传相似系数在 0.33 ~ 1.00, 盐溶蛋白的遗传相似系数在 0.32 ~ 0.88, RAPD 标记的遗传相似系数在 0.42 ~ 0.84, 3 种标记所得的平均遗传相似系数分别是 0.597、0.541、0.554, 非常相近, 但醇溶蛋白、盐溶蛋白的遗传相似系数标准差较大(0.136、0.104), 而 RAPD 的遗传相似系数标准差较小(0.080), 结果相对可靠。对 3 种标记所得的遗传相似性矩阵进行相关分析, 结果醇溶蛋白与盐溶蛋白的相关系数最高($r=0.618^{**}$), RAPD 与盐溶蛋白的相关系数最低($r=0.460^{**}$), RAPD 与醇溶蛋白的相关系数居中($r=0.545^{**}$), 但 3 种标记间的相关性均达到了极显著水平。说明根据醇溶蛋白、盐溶蛋白和 RAPD 标记对供试的玉米自交系进行遗传多样性分析, 结果非常相似。

3 结论与讨论

本研究表明, 醇溶蛋白、盐溶蛋白及 RAPD 标记在所研究的玉米自交系中都具有比较丰富的多态性, 而 RAPD 标记具有较高的多态性信息, 如多态性条带达 86.8%, 在聚类分析中能将亲缘关系比较

近的自交系 14、15 与其他自交系区分开来,而根据醇溶蛋白和盐溶蛋白则不能。因为蛋白质标记数量有限,覆盖基因组程度不高,检测遗传背景只能代表很小一部分基因型,由此得出的遗传差异并不能完整地代表亲本间的差异;而 RAPD 标记直接反映 DNA 水平上的差异,多态性更丰富,信息量大,原理上覆盖基因组的面更广,由此得出的遗传差异更能代表亲本间的差异。

但在本试验中,根据醇溶蛋白、盐溶蛋白和 RAPD 标记进行聚类分析,虽然聚类结果与系谱分析大体吻合,但是聚类结果中还是出现了与自交系所知系谱不符的现象。前人的许多研究也出现了类似情况^[7,9,10]。这些现象的发生不排除为实验方法的局限性所致,因为蛋白质水平上的差异相对较小,RAPD 标记又具有随机性,并不一定能均匀地分布于基因组上,具有一定的局限性。但是也应该考虑到自交系的系谱记载并不一定能准确无误地反映它的血缘关系,更不能准确地体现自交系间的遗传差异。因为玉米育种工作者在选育自交系的过程中,受各种条件的影响,容易出现外来基因的侵入或自身某些位点基因漂移,使遗传基础发生变化,或者因为早代选择群体较小,选株数目太少,而且不同的人对目标性状的典型单株选择标准不一致,往往致使选出的自交系偏向于某一亲本,甚至造成姊妹系具有不同的基因型,或将非典型株(杂株)直接选育成同名的自交系,以至出现“异名同种”或“异种同名”的情况。另外,衍生系在引入各个地区以后已经经过多次改良,特别是引入西南高山及高原特殊生态区以后,地方特异性种质的导入,使其遗传基础发生了很大变化。由于自交系血缘关系的混杂,不仅导致自交系外观性状的表现出现差异,而且致使杂种优势群的划分以及构建杂种优势模式出现与前人不符的情况。正因为系谱记载不能准确反映亲本间的差异,因

此,判断一种划分玉米杂种优势类群的方法是否可行,不是看它是否与系谱分析吻合,关键是看它能否预测玉米杂种优势,能否指导生产实践。聚类结果与血缘不符现象的产生,同时也从侧面反映出西南山区这种复杂的生态区域,其地方种质非常复杂,外引种质的遗传基础在引入当地以后已发生变化,过去的系谱记载已不能够反映其真实的血缘关系,因而有必要对现有所利用的种质重新进行类群的划分,以便对现有的种质资源进行合理的利用。

参考文献:

- [1] 吴建宇.玉米自交系性状及分类研究[J].河南农业大学学报,1992,26(2):163-168.
- [2] 池书敏,刘志增.几个常用玉米自交系的优势类群划分[J].河北农业大学学报,1995,18(1):23-26.
- [3] Rrei O M, Stuber C W, Goodman M M. Use of allozymes as genetic markers for predicting performance in maize single cross hybrids. *Crop Science*, 1986, 26: 37-42.
- [4] 陈景堂,池书敏,马占元,等.应用清蛋白 PAGE 技术进行玉米自交系类群划分的初步研究[J].玉米科学,2001,9(2):18-21.
- [5] 张文龙,徐如宏,戴保威,等.利用改进的醇溶蛋白 APAGE 技术划分玉米自交系类群[J].山地农业生物学报,2003,22(4):283-286.
- [6] 刘新芝,彭泽斌,傅骏骅,等.RAPD 在玉米类群划分研究中的应用[J].中国农业科学,1997,30(3):44-51.
- [7] 孙世孟,李素美,郑芝荣,等.山东省玉米骨干自交系间亲缘关系的 RAPD 分析研究[J].作物学报,1999,25(6):727-732.
- [8] 牛应泽,刘容山,李方安.玉米种子蛋白质电泳鉴定品种的研究——醇溶蛋白和盐溶蛋白的比较[J].四川农业大学学报,1995,13(2):150-153,255.
- [9] 池书敏,孟义江,刘志增,等.玉米优势类群划分及其杂交模式的研究——过氧化物酶、脂酶和醇溶蛋白多态性的聚类分析[J].华北农学报,1998,13(2):35-41.
- [10] 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.
- [11] 孙 辉,刘志勇,李保云,等.利用 PCR 技术鉴别普通小麦 Glu-1 位点的某些等位基因[J].作物学报,2002,11(6):734-737.
- [12] 刘红彦,牛永春,钟 鸣.小麦 RAPD 分析中温度循环参数的优化[J].麦类作物学报,2001,21(4):1-4.