

研究
简报

利用 AFLP 分子标记预测水稻杂种优势

蔡 健 兰 伟*

(阜阳师范学院生物系,安徽阜阳 236032)

Prediction of Heterosis in Rice Using the AFLP Molecular Marker

CAI Jian, LAN Wei

(The Biological Department of Fuyang Normal University, Fuyang 236032, Anhui, China)

杂种优势是生物界普遍存在的现象,通过测定两个亲本之间的遗传距离可进而预测水稻杂种优势。迄今已提出了许多预测方法,从表型预测、生化预测,到现在的分子标记预测,DNA 分子标记的发展为杂种优势预测提供了新的手段。Lee 等^[1]和 Smith 等^[2]研究发现 RFLP 遗传距离与 F₁ 杂种优势的表现存在高度的相关性,可用于杂种优势的预测。随后基于 PCR 技术的分子标记逐步发展起来,如 RAPD^[3]、SSR^[4]和 AFLP^[5]等相继被用于杂种优势预测的研究。Ajmone 等^[6]比较了水稻 RFLP 和 AFLP 两种标记方法,认为 AFLP 标记更适用于杂种优势的预测。AFLP 技术是近年来发展起来的一种新的分子标记技术,具有较高的多态性和重复性,已被广泛用于作物遗传连锁图的构建和重要基因的定位克隆。本文利用由国际水稻所提供的来自不同生态型和不同籼粳分化程度的 20 个水稻品种(系),用 AFLP 分子标记技术研究这些材料之间的遗传距离与杂种产量、产量构成因素的相关性,探讨 AFLP 分子标记与杂种优势预测的关系,旨在为水稻

杂交种产量和产量构成因素、杂种优势的预测提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验材料由 IRRI 提供,来自世界上 6 个国家和地区(见表 1)。1999 年在云南省元阳县将 20 个供试品种(系)按 Giffing 方法 4 进行双列杂交,配制 190 个杂交组合;2000 年在云南省元阳县、河口县、昆明市和楚雄州共 4 点进行田间评价。采用四重格子方法设计,4 次重复,每区 2 行,每行 10 株,株行距 13 cm × 20 cm。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;另外每小区随机抽取 10 株分别考察分蘖数、有效穗数、穗长、穗实粒数、穗颖花数、结实率、千粒重等。

表 1 20 个水稻品种的名称及来源

Table 2 The name and origin of 20 cultivars

编号 No.	品种名称 Cultivar	类型 Type	来源 Origin	编号 No.	品种名称 Cultivar	类型 Type	来源 Origin
1	Feng-Ai-Zhan	Indica	中国	11	MR106	Japonica	马来西亚
2	M202		美国	12	Hmbbyeo	Japonica	朝鲜
3	GUANG122	Indica	中国	13	Iksan438	Indica	朝鲜
4	Y134		中国	14	CS94		越南
5	IR6	Japonica	巴基斯坦	15	Pluar-Gen-Xian74	Indica	中国
6	Haopuka	Japonica	中国	16	R644	Indica	中国
7	C418	Japonica	中国	17	Gyabyeo	Japonica	朝鲜
8	X21	Japonica	越南	18	OM1706	Japonica	越南
9	Shwe Thwe Yinlly		越南	19	GB072		中国
10	MR84	Japonica	马来西亚	20	Yue-Xiang-Zhan	Indica	中国

1.2 接头和引物

均由宝生物工程(大连)有限公司(Takara)合成。所用接

头为 EcoR 和 Mse 接头, EcoR 引物和 Mse 引物的 3' 末端选择性核苷酸数目为 3 个。

*基金项目: 云南省国际科技合作项目(98C010)。

作者简介: 蔡健(1968 -), 男, 硕士, 讲师。主要从事分子生物学和水稻杂种优势等方面的研究工作。Tel & Fax: 0558-2712757, E-mail: fsyswx6148@163.com

Received (收稿日期): 2004-05-08, Accepted (接受日期): 2004-09-06.

1.3 DNA 提取

基因组 DNA 的提取参照谭学林等^[7]的方法,略作修改。

1.4 AFLP 扩增方法

按 Vos 等^[5]方法进行。

1.5 AFLP 数据分析

AFLP 扩增产物以 0、1 统计建立数据库,在相同迁移位置上(相同分子量片段)有带记为 1,无带记为 0,按照 Nei 和 Li^[8]的方法计算品种(系)间的相似系数(GS)和遗传距离(GD)。 $GS = 2N_{ij}/(N_i + N_j)$,其中 N_i 、 N_j 是自交系 i 、 j 的带数, N_{ij} 是自交系 i 和 j 的共有带数。 $GD = 1 - GS$ 。

用类平均聚类法(unweighted pair group method with arithmetic mean,UPGMA)构建系统聚类树。

1.6 杂种优势计算

田间试验资料,首先进行方差分析,确定显著性后,再计算特殊配合力和一般配合力、杂种优势。根据 F_1 产量按 Griffing 方法 4 计算一般配合力(GCA)和特殊配合力(SCA)^[9],杂种优势计算以中亲优势表示,中亲优势($H\%$) =

$(F_1 \text{ 值} - \text{双亲平均值}) / \text{双亲平均值}$ 。

2 结果与分析

2.1 20 个水稻品种的 AFLP 多态性

从 20 个水稻品种中,选取 IR6(粳稻)、MR84(粳稻)、Iksan 438(籼稻)、R644(籼稻)等 4 个品种作为模板,对 49 对引物组合进行筛选,从中选出 4 对多态性高、分辨能力强的引物组合,再分别对所有材料进行扩增分析。这 4 对组合共扩增出 246 条带,其中多态性带 162 条,多态性是 65.9%,单态性带(某一品种特有的带)8 条,占 3.3%,共同带(所有品种都有的带)86 条带,平均每个引物组合,可扩增出 40.5 条多态性带,2 条单态性带。可见 AFLP 分子标记具有较强的多态性,AFLP 从 DNA 分子水平上可检测出水稻品种的遗传多样性。

2.2 20 个水稻品种的 AFLP 聚类分析

利用 UPGMA 方法,对数据进行聚类分析,得到 AFLP 聚类图(图 1)。

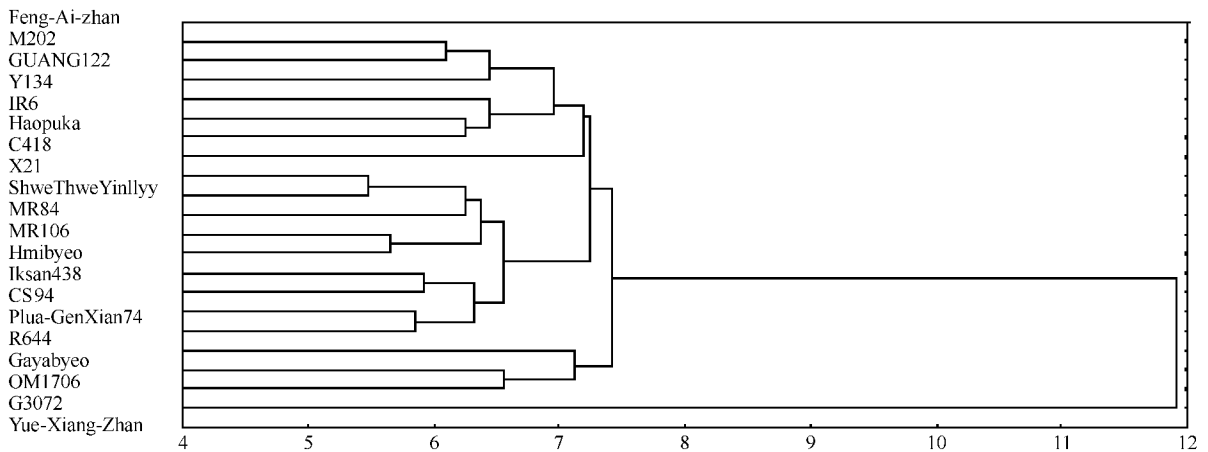


图 1 20 个水稻品种 AFLP 聚类分析图

Fig. 1 Dendrogram by cluster analysis for 20 rice species based on AFLP data

从图 1 可知,在平均遗传距离为 6.5 处取一结合线,可将 20 个品种分为 8 个类群,分别是类 Feng-Ai-Zhan, M202, GUANG122; 类 Y134, IR6, Haopuka; 类 C418; 类 X21, ShweThweyinlly, MR84, MR106, Hmibyeo; 类 Iksan438, CS94, Plua-GenXian 74, IR64; 类 Gayabyeo; 类 OMI1706, G3072; 类 Yue-Xiang-Zhan。籼、粳稻分化明显,同一类群(亚群)内,或同为籼稻品种(系),或同时为粳稻品种(系),并把来源不明的品种(系)划分到相应类群中,结合田间性状调查分析,可以对这些来源不明的供试材料进行初步鉴定和归类。从图 1 可以看出, Yue-Xiang-Zhan 品种明显不同于其他供试材料,自成一类。田间性状调查表明,在所有供试材料中,该品种植株最高(155.70 cm),剑叶最长(49.4 cm)、穗较长(32.5 cm),许多生物学性状明显区别于其他供试材料。从

本研究的亲本组配来看,同一类群内,适度遗传距离的亚群品种(系)间杂交较易获得杂种优势,类群间亲本杂交杂种优势不明显。说明利用 AFLP 标记可以确定水稻品种(系)之间的遗传差异,并把来源不明的品种(系)划分到相应类群,从而对这些材料进行初步的鉴定和亲缘关系追溯,并为供试材料间的亲本组配在分子水平上提供了理论依据。

2.3 田间试验结果

田间试验得到 190 双列杂交组合单株产量($F_1 Y$),并计算特殊配合力(SCA ,数据略)。联合方差分析表明,组合间 F_1 产量和特殊配合力 f 值分别为 15.74 和 17.52,均达到显著水平($P < 0.01$) (表 2)。可用于与室内 AFLP 结果的相关分析。

表2 190个杂交组间F₁产量和特殊配合力的联合方差分析
Table 2 *t*-test of F₁ grain yield and SCA for 190 crosses

变异来源 Variation source	自由度 <i>df</i>	F ₁ 籽粒产量 <i>f</i> 值 <i>f</i> value of F ₁ grain yield	特殊配合力 <i>f</i> 值 <i>f</i> value of SCA
地点 Location	3	9.31 *	11.32 *
小区 Block	12	1.31	1.54
处理 Treat	19	15.74 **	17.52 **
处理 × 地点 Treat × Total	57	3.03 **	5.75 **
机误 Error	228		

注: *, ** 分别表示 5% 和 1% 显著水平。

Note: *, ** significant at the 5% and 1% probability levels, respectively.

2.4 亲本 AFLP 遗传距离与杂种优势相关关系

AFLP 遗传距离与杂种产量及产量构成因子杂种优势的关系,按照传统的直线相关法进行分析,表明遗传距离与穗粒数、结实率优势极显著负相关,相关系数分别为 -0.546 79 和 -0.534 32;与分蘖数优势显著正相关,相关系数为 0.341 52;与穗颖花数优势显著负相关,相关系数为 -0.413 82;与杂种产量、千粒重、有效穗数和穗长优势不相关,且决定系数都较小。AFLP 虽与一些产量构成因子存在或正或负的相关关系,但这些因子相互制约的结果是遗传距离与产量优势无相关关系。

3 讨论

分子标记技术用于杂种优势及表型预测,迄今已出现了两种截然不同的观点,有研究者认为,这种相关性较高,可用于预测,如 Stuber^[10]对玉米的研究和 Saghai 等^[11]在水稻上的研究均认为 F₁ 产量与杂合性呈显著正相关,但也有不少文献认为分子标记遗传差异与杂种优势及性状表现无显著相关性或相关性较小,如 Gdshalk^[12]和 Moser^[13]在水稻各性状上的研究结果认为分子标记不能用于杂种优势的预测。本研究结果表明,根据 AFLP 分子标记遗传距离预测杂种优势的效果是有限的,应与其他方法相结合。

出现这一现象的原因大致有以下几点:(1)用分子标记预测杂种优势常因材料不同而得出不同的结果,甚至完全相反的结论。(2)标记位点仅仅反映了基因组的很少一部分,导致只有有限比例的遗传因子的抽样是有效的。本研究中虽然任何一对 AFLP 引物均能将供试材料进行杂种优势群的划分,但是任何一对 AFLP 引物所检测到的多个位点或多或少地随机分布在多条染色体上,在连锁图上呈簇状分布,比较集中地分布在多条染色体的两端。因此用于杂种产量、产量构成因子杂种优势的预测是很困难的。(3)分子标记不受环境影响,而杂种产量和杂种优势的表现易受环境的影响。QTL(quantitative trait loci)存在环境效应,Bernard^[14]利用数学模型推导和田间数据分析研究发现,分子标记遗传距离与产量杂种优势的相关性大小与 QTL 有密切关系,他认为至少有 30%~50%的 QTL 与分子标记连锁,不超过 20%~30%的分子标记是随机分布或不与 QTL 连锁的。因此本研究中用于计算遗传距离的 AFLP 数据,即用 AFLP 扩增的多态性带可能大部分是与杂种优势无关的 QTL 位点,因而影响杂种优势预测。可见,利用遗传距离预测杂种优势离实际应用还很远,

还有许多工作要做。何光华等^[15]研究表明,增效座位和减效座位可以大幅度提高相关系数,在不同的环境下也表现一致,可用来预测杂种产量及其构成因素的杂种优势。

众多研究表明,增效座位和减效座位以及增加与杂种优势有关的 QIL 连锁标记位点的绝对数目可能提高杂种优势的预测能力,但最终解决将依赖杂种优势遗传机理的阐明。

致谢:对云南农业大学生物技术学院李本逊教授、谭学林教授给予本研究的指导和帮助致以衷心感谢!

References

- [1] Lee M, Gdshalk E B, Lamkey K R, Woodman W W. Association of restriction fragment length polymorphisms among maize. *Crop Sci*, 1989, **29**:1 067 - 1 071
- [2] Smith O S, Smith J C S, Bowen S L, Tenborgk A, Wall S J. Similarities among a group of elite maize inbreds as measured by pedigree, grain yield, grain yield heterosis, and RFLPs. *Theor Appl Genet*, 1990, **80**: 833 - 840
- [3] Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acid Res*, 1990, **18**: 7 213 - 7 218
- [4] Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet*, 1993, **241**:225 - 235
- [5] Vos Phogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M, Zabeau M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res*, 1995, **23**:4 407 - 4 414
- [6] Ajmone-Marsan P, Castiglioni P, Fusari F. Genetic diversity and its relationship to hybrid performance in maize as revealed by RFLP and AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 1998, **98**:219 - 227
- [7] Tan X L, Vanavichit A, Amornsilpa S, Tragoonrun S. Genetic analysis of rice CMS-WA fertility restoration based on QIL mapping. *Theor Appl Genet*, 1998, **96**:994 - 999
- [8] Nei M, Li W. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonuclease. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, **76**:5 269 - 5 273
- [9] Guo P-Z(郭平仲). Quantitative Genetic Analysis(数量遗传分析). Beijing: Capital Normal University Press, 1993. 305 - 310(in Chinese)
- [10] Stuber C W, Lincoln S E, Wolff D W, Helentaris T, Lander E S. Identification of genetic factors contribution to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics*, 1992, **132**:823 - 839
- [11] Saghai Maroof M A, Yang G P, Zhang Q F, Ahan K A. Correlation between molecular marker distance and hybrid performance in US southern long grain rice. *Crop Sci*, 1997, **37**:145 - 150
- [12] Gdshalk E B, Lee M, Lamkey K R. Relationship of restriction fragment length polymorphisms to single-cross hybrid performance of maize. *Theor Appl Genet*, 1990, **80**:273 - 280
- [13] Moser L. RFLP variation and genealogical distance, Multivariate distance, heterosis, and genetic variance in rice. *Theor Appl Genet*, 1994, **87**:947 - 956
- [14] Bernardo R. Relationship between single-cross performance and molecular marker heterozygosity. *Theor Appl Genet*, 1992, **83**:628 - 634
- [15] He G-H(何光华), Hou L(侯磊), Li D-M(李德谋), Luo X-Y(罗小英). Prediction of yield components in hybrid rice by using molecular markers. *Acta Genetic Sinica(遗传学报)*, 2002, **29**(5):438 - 444(in Chinese with English abstract)