

文章编号: 1005-0906(2004)02-0016-05

应用生理学方法和分子手段进行玉米抗旱育种

黎 裕,王天宇,石云素,宋艳春

(中国农业科学院作物品种资源研究所,北京 100081)

摘要: 干旱是包括中国在内的世界上大多数玉米生产国家的重要农业灾害之一,解决干旱问题的有效途径包括培育抗旱型和节水型的玉米杂交种。多年来,通过常规手段进行玉米抗旱育种取得了一定进展,但由于多方面原因,其育种效率没有得到进一步提高。而与此同时,对玉米在干旱胁迫下的生理生化途径研究很多,其成果可以为抗旱育种提供理论指导;尤其是近年来应用分子标记技术和基因组学技术对玉米抗旱性进行了深入的遗传剖析,其研究结果也为玉米抗旱分子育种提供了新的手段和思路。同时评述了相关研究领域的进展,并讨论今后的发展趋势。

关键词: 玉米;抗旱性;育种;生理学方法;分子手段

中图分类号: S513.034

文献标识码: A

Integration of Physiological and Molecular Approaches in Maize Breeding for Drought Tolerance

LI Yu, WANG Tian-yu, SHI Yun-su, SONG Yan-chun

(Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: Drought is one of the disastrous limiting factors for maize production in the world including China. The development of maize hybrids with drought tolerance and high water use efficiency is an effective approach to solving the problem. In the past decades, considerable progress has been made in maize breeding for drought tolerance using conventional methods, but with low breeding efficiency due to various causes. Meanwhile, physiological and biochemical studies on drought tolerance in maize have obtained a large amount of knowledge and information which can guide practical breeding programs. Particularly, in-depth genetic dissection of drought tolerance in maize using molecular markers and genomics approaches has been carried out in the past decade, which generated the knowledge to be used in molecular breeding. The present paper reviews and discusses the advances and the trends in related fields of breeding for drought tolerance in maize.

Key words: Maize; Drought tolerance; Breeding; Physiological approaches; Molecular tools

干旱是影响玉米生产的重要因子之一。不仅热带和亚热带地区的玉米经常受到干旱的袭击,而且在温带地区的玉米如美国玉米带中部地区也受到季节性干旱的严重影响。在热带地区,每年因干旱造成的玉米产量损失达到 2 400 万 t,占正常水分条件下产量的 17%,1991 和 1992 年在非洲南部曾造成产量损失高达 60%。在我国,干旱对玉米生产的影

响也十分严重,每年均会造成巨大的产量损失。研究表明,培育抗旱品种是解决这一问题的有效途径之一,通过育种手段可以提高产量 20% 以上。近年来,由于科技水平的不断提高,培育抗旱玉米品种的策略和方法也不断得到丰富,并取得了一定进展。下面将对玉米抗旱育种的相关问题进行阐述和说明。

1 玉米抗旱育种涉及到的几个关键问题

1.1 抗旱性与产量的关系

首先要明确的是,抗旱性和产量均是由数量性状位点(QTL)控制的,两者由不同的遗传网络系统所控制,因而分析抗旱性与产量的关系需要从不同的

收稿日期: 2003-08-01

基金项目: 国家自然科学基金(30170581)、科技部国际合作重点项目和 863 项目

作者简介: 黎 裕(1966-),男,博士,副研究员,从事玉米种质资源和基因组学研究。Tel:010-62186632

Email:yuli@mail.caas.net.cn

角度来看。在水分充足的条件下,玉米基因组中的一些与抗旱性有关的基因不会表达,最终的产量表现主要与控制产量的遗传系统有关;而在水分胁迫条件下,则有可能涉及到抗旱性的一些基因要诱导表达,另外一些基因会抑制表达,最终的产量表现则是抗旱性和产量两大遗传系统相互作用的结果。因此,有一些玉米品种在水分条件良好的情况下产量潜力高,而在水分胁迫条件下产量潜力低;另外一些品种则在水分条件良好的情况下产量潜力低,在水分胁迫条件下产量潜力高;还有一些品种在两种条件下产量潜力均表现高。

玉米作为一种作物,必然以收获产品为目的,因此在玉米抗旱育种甚至一些基础研究中有必要把产量性状当作衡量抗旱性的直接指标,尽管如上所述抗旱性和产量是由不同遗传系统控制的。这种做法的另外一个原因是目前还没有合适的研究手段来把两套遗传系统分开,何况也有部分基因在产量和抗旱性的遗传控制中均起作用,只是这些基因在不同水分条件下的表达存在差异而已。还有一个原因就是从目前的研究结果来看,没有任何一个单独的生理生化性状指标能够代表抗旱性,因为抗旱性是多种生理生化代谢途径的综合表现。

关于产量,有三个表达公式,即:

$$GY=RAD \times \%RI \times GLD \times RUE \times HI$$

$$GY=W \times WUE \times HI$$

$$GY=PD \times EPP \times GPE \times WPG$$

式中:GY 为子粒产量,RAD 为每天单位面积的阳光辐射量,%RI 为作物一生中所截获的辐射百分比,GLD 为绿叶天数,RUE 为作物一生中的辐射利用效率,HI 为收获指数,W 为作物的蒸腾水量,WUE 为水分利用效率,PD 为植株密度,EPP 为每株穗数,GPE 为每穗粒数,WPG 为单粒重。

由此可见,干旱导致减产的途径很多,因为干旱对植株密度、叶面积、截获的辐射量、绿叶天数、每株穗数、每穗粒数和单粒重均有直接的负面影响。同时,当水分胁迫导致降低每株穗数、每穗粒数和单粒重时,收获指数也会降低;干旱还可能降低辐射利用效率,也可能增加水分利用效率,但这种影响比对截获的辐射量和收获指数的影响要小得多。从这里也可以看到玉米抗旱性的复杂性,要全面解析抗旱性这个复杂性状可能还有很长的路要走。

1.2 不同生长发育时期的抗旱性问题

1.2.1 发芽期和苗期抗旱性

要获得高产,必须要保证有合适的植株密度,也就是说要求全苗。在这个阶段,幼苗的存活是最重要

的考察性状。当在玉米播种期和出苗后遭遇干旱时,出苗不好和幼苗生长迟缓或死亡是一个普遍的现象,但是用一个熟期较短的品种或用其它作物再次播种可以部分解决这个问题。同时还应该看到,解决发芽期和苗期抗旱性问题还缺乏更多的办法,尽管已发现存在遗传变异,但这些遗传变异还不足以用来真正解决问题。国际小麦玉米改良中心(CIMMYT)的研究表明,通过育种手段只能使水分胁迫下的玉米幼苗存活率有一定程度的提高,但对出苗后的抗旱性选择(以存活率和生物产量为指标)难度很大,其主要原因有二:第一,在田间筛选时环境变异太大;第二,遗传变异小。

1.2.2 开花期抗旱性

与其它生育期相比,玉米开花期因干旱造成的损失可以达到 2~3 倍以上。导致这种情况的主要原因在于玉米的雌雄花器分离。要使玉米获得子粒,开花和吐丝时间必须较近(一般相差不超过 1 周),因此快速的花丝生长就变得非常重要。快速的花丝生长可以用开花到吐丝间隔时间(ASI)来衡量,在干旱条件下 ASI 较大的植株往往子粒数很少或根本就没有子粒。另外,收获指数的高低与开花前后 10~14 d 的植株情况也是密切相关的,因为雌穗的生长还受到其它正在生长的器官的竞争,ASI 越大,雌穗生长越慢。研究还发现,在干旱条件下,雄穗生长是以雌穗的生长为代价的,也就是说,先要保证雄穗的生长;在高植株密度下,雄穗小与雌穗生长速度快有相关性;植株株高降低,ASI 变小,抗旱性有提高的趋势;根的生物量减少,雌穗生长也加快。如果吐丝推迟,即使有新鲜花粉授粉,也经常观察到不能产生子粒的情况。ASI 是一个容易观察的性状,代表了同化物向雌穗的分配、雌穗生长速度、粒数甚至植株水势的情况。另一方面,干旱也会减少散粉量,造成减产的后果。

1.2.3 灌浆期抗旱性

在灌浆期,需要把茎秆和其它器官中储存的碳水化合物转移到子粒中,与此同时还存在着光合同化作用,这两个因素决定了最终的粒重。Setter 等的研究表明,光合作用产物的流动和 ABA 含量是这个期间调控系统的重要组成部分。如果在这个期间遭遇干旱,则需要维持绿色冠层和转运碳水化合物的能力才可能达到高产的目的。但研究发现叶片的“持绿能力”与产量的相关关系并不大,其原因可能在于植株的氮平衡存在问题,因为如果每株子粒数较多,则对氮的需求将会增多,而在干旱土壤中的氮摄取有限,这样子粒只能从叶片中摄取氮。这是为什么直

接选择“持绿性”来提高玉米抗旱性不太成功的主要原因,也是要求在改良抗旱性的同时需要提高氮利用效率(NUE)的重要原因。

1.3 抗旱性鉴定与评价问题

迄今为止,在包括玉米在内的各种作物上还没有一套鉴定评价抗旱性的标准方法和体系,其主要原因在于抗旱性及其对植株生产力的影响涉及到植物水分关系和植物生理功能之间的复杂互动问题,使得植物对干旱胁迫的反应与胁迫程度、胁迫时间长短、植株发育阶段等密切相关。因此,在进行抗旱性鉴定时,必须把对植物功能的测定和植物水分状况的测定清楚地分开,如果要把一种植物生理功能作为抗旱性指标,则要求在同一水分状况下测定所有基因型的生理功能,然后再加以比较。

要弄清抗旱性鉴定的问题,必须先了解哪些性状在种质资源中存在遗传变异。从大量的研究中发现,有三类性状对抗旱性有贡献并存在遗传变异:①维持良好植物水分状况的能力,它可推迟因水分胁迫所带来的典型症状(如萎蔫);②在不好的植物水分状况下维持其功能的能力,这是一般意义上的“耐旱性”;③从非常差的植物水分状况下恢复水分吸收功能的能力,这是一般意义上的“存活”。从这三大类性状出发,就可以确定抗旱性鉴定中的主要指标。

主要的水分状况指标包括水势(WP)、膨压(TP)和相对含水量(RWC),其中RWC是最好的指标,因为它可以代表WP、TP和渗透调节(OA)的变化,并且研究还发现RWC与植株的生产力存在遗传相关性。高RWC的机制可能包括:通过根对深层土壤水分进行摄取、渗透调节能力高、气孔关闭、组织伸展能力强和植株小。而植物生理功能的鉴定指标可以包括:植株或器官的生长状况、叶绿素荧光、细胞膜稳定性(CMS)等。此外,植株的复原能力也是非常重要的鉴定指标,它是干旱胁迫期间维持RWC的能力的体现。但要强调的是,对于玉米育种来说,产量是最重要的鉴定指标,但由于在干旱胁迫下的产量受到产量潜力和抗旱性两套遗传机制影响,在田间鉴定时有必要设置一系列不同胁迫程度的处理,这样才能分析基因型和环境之间的相互作用,把两种效应分开。在抗旱育种中还常用到一些二级性状,这些二级性状的情况后面还将比较详细地说明。

2 玉米抗旱的常规育种

玉米抗旱育种的成功需要三个方面的基本条件:①有确实可用的抗旱种质资源;②可以准确地鉴定抗旱性;③在进行选择时,需要施加较高的选择压

力。在玉米常规育种项目中,育种家往往在高代时,才对早代筛选出来的较少材料在干旱胁迫条件下进行抗逆性评价,在这个时期施加的选择强度往往不大。育种家这样做有如下几个方面的考虑:首先,在干旱条件下,子粒产量的遗传力和遗传方差降低,个体或家系间的产量差异变小,这样就难以对产量进行改良;其次,由于存在显著的基因型与环境互作,在不同胁迫条件下的排序结果往往不同,难以鉴定出最好的种质资源;再次,育种家期望在高产环境下获得的材料在胁迫条件下也能有较高的产量。但也正因为这种做法,使玉米抗旱育种的进展多年来一直较为缓慢。

从全世界来看,在玉米抗旱育种特别是常规抗旱育种方面,工作做得最好的是CIMMYT。其基本方法概括起来就是,在干旱胁迫环境中对很大的群体进行选择,这样就可以鉴定出最大程度的抗旱性遗传变异。CIMMYT的玉米抗旱育种项目取得了较大的成功,其选择增益达到了每年 $100\text{ kg}/\text{hm}^2$ 。其主要经验有以下几点:①为了培育稳产的品种,不能过于强调早熟性状;②一般情况下,没有胁迫时的产量和有胁迫时的产量存在一定程度的正相关,但在严重胁迫条件下这种相关性不显著,因此在干旱条件下的产量可降低40%以上时,应该结合特定的二级性状来进行选择以保证中等或严重干旱时的产量表现;③多点试验是必要的,但如果降雨量的年际间变化太大,则需要有能很好地控制水分胁迫时间和强度的旱棚或其它设施;④抗旱育种的策略应该是培育既在干旱环境下高产又在正常水分条件下高产的品种;⑤在高植株密度下筛选种质有助于提高抗旱性,因为ASI既与耐密性有关,又与抗旱性有关。

3 应用生理学方法进行玉米抗旱育种

多年来,植物生理学家对玉米在水分胁迫下的生理生化性状做了大量研究。例如研究表明,在开花期和灌浆期遇到严重的水分胁迫,玉米产量与单株粒数高度相关($r=0.90$)。在干旱条件下,单株粒数的多少取决于开花前后 $10\sim 14\text{ d}$ 内光合产物的流动,开花前茎中的同化物量少或基本不向穗转移。此外,水分胁迫下的植株子房中的酸性转化酶活性大幅度降低,这样同化物就不能快速转化为淀粉,从而导致“库”的大小降低。

尽管目前直接把生理生化指标用在玉米抗旱育种的成功例子还很少,但水分生理学研究已给育种提供了很多指导,尤其是在育种中,一般把产量作为选择的第一性状,而众多的二级性状则来自生理学

研究的成果。二级性状在玉米的抗旱育种改良中相当重要,因此下面将对此做简要说明。

一个理想的二级性状应具有如下特点:①在遗传上与干旱胁迫下的产量有相关性;②是高度遗传的;③存在遗传变异;④测定经济、快速;⑤测定没有破坏性;⑥在测定期间是稳定的;⑦在开花时或开花前就可测定,这样不良材料就不用再作杂交;⑧是最终收获前产量潜力的一种间接指标;⑨与非胁迫环境下的产量损失没有相关性。这些特点中前4个是最重要的。但目前还没有任何一个提出的二级性状能完全满足上面提到的所有条件。从育种的角度来说,在幼苗期存活率是最重要的指标;在开花和灌浆期,能维持光合作用产物向发育中的雌穗转运的性状是首选的性状。

3.1 渗透调节(OA)

渗透调节影响产量的途径包括:通过从土壤中吸取更多的水以提高蒸腾水量,通过维持气孔导度以增加水分利用效率,通过推迟叶片衰老提高收获指数。利用渗透调节这个指标来选择亲本在小麦、水稻和高粱等作物中比较有效。但有研究报道,由于在玉米中渗透调节的遗传变异太小(约 0.4 Mpa),对产量的影响很小,在育种上的价值不大,但也有相反的一些报道。总之,利用渗透调节来进行选择还需要做更多的研究。

3.2 根生长能力

已经明确的是,根生长能力与抗旱性有关。但是,根生长到什么程度最好却没有一个肯定的答案。在其它作物上发现,根密度和根长与水分吸收量并非线性关系,根长增加只有在该土层中有水分利用时才有好处。相反,在玉米上,发现干旱条件下子粒产量的增加与土壤 50 cm 土层中的根生物量减少有相关性。另一方面,在育种项目中,根测定的难度限制了对这个性状的利用价值。应用电容测定法可以快速估计根的生长量情况,但却不能对根的分布进行分析。因此,根生长能力作为二级性状还需要继续评估。

3.3 冠层温度

应用近红外温度测定法可以较准确地快速估计蒸腾水量的差异。冠层温度与玉米在干旱条件下的生产力有相关性,但在自交系后代中的遗传力较低,因而限制了个性状作为二级性状的利用。这里要提到的是,一般来说,直立上冲的叶片比平展的叶片在干旱胁迫条件下的温度会更低,并且有较高的辐射利用效率和水分利用效率。

3.4 叶片卷曲和叶片夹角

通过肉眼观察叶片卷曲程度,可以估计水势情况,但是由于叶片卷曲会降低辐射的截获量,大多数育种家认为叶片卷曲对生产并不利。在玉米上,叶片卷曲存在基因型差异,并且这个性状是高度遗传的,但是它也可能是叶片的结构特征,与蒸腾水量并没有关系,叶片卷曲是否是干旱条件下的适应性性状还没有明确的答案。因此,在把叶片卷曲程度作为二级性状来使用时,应持慎重的态度。

3.5 叶片衰老程度

叶片衰老推迟意味着蒸腾水量会更大,从而产量有可能更高。在玉米上,杂种优势可能使干旱环境下的玉米叶片衰老慢一些。由于从干旱土壤中难以摄取氮,因而“库”小则也可能使植株保持“持绿”性状。Chapman 等估计,干旱胁迫下玉米子粒产量从每公顷 2.0 t 提高到 2.8 t,发育中的子粒的氮需求量则相当于 30%的叶片生物量中的含氮量。另外也有证据表明,表现出“持绿”性状的玉米叶片在代谢上也并不总是活跃的。这说明叶片衰老程度作为二级性状也存在一定的局限。

3.6 同化物分配和转运能力

前面曾经提到,在开花期雌穗的生长受到其它器官的竞争,因此,减少同时生长的雄穗的大小和雌穗数量可以提高留下来的繁殖器官成功繁育的机会。例如,Edmeades 等通过 8 轮的轮回选择减少了雄穗大小,从而提高了干旱环境下玉米的单穗粒数。另外,转运以前固定碳的能力在基因型间存在差异,但相关的其它研究并不多,在育种上的利用价值还不是特别清楚。

3.7 二级性状的选择

CIMMYT 的研究表明,叶片生长速率、冠层温度和叶片叶绿素含量的遗传力较低,叶片上冲性、雄穗大小、叶片衰老程度和 ASI 的遗传力较高;在这些性状中,只有 ASI 和雄穗大小有显著的干旱适应性,而且干旱环境下的子粒产量主要是由单株粒数决定的。考虑到选择二级性状的 9 条标准,Edmeades 等和 Betran 等曾详细讨论了不同性状在育种项目中的实用价值,其基本结论是在热带玉米的抗旱育种中,产量是首选性状,二级性状中以每株穗数最为重要,ASI、叶片衰老程度、雄穗大小和叶片上冲和卷曲程度也可以考虑用于育种选择中。在我国,目前很多杂交种都是单穗型或少穗型,因此每株穗数的重要性需要进一步研究。其它植物水分状况的指示性状或生化性状如 ABA 含量往往因测定困难或与干旱条件下的子粒产量关系不大,在实际应用中的价值有限。不过,叶片 ABA 含量作为二级性状存在争议,

支持的一方认为对叶片 ABA 含量进行选择可以带来更好的农艺性状表现,但反对的一方则认为 ABA 的测定较难,并且与产量的关系也并不明确。

4 应用分子方法进行玉米抗旱育种

抗旱分子育种主要包括应用分子标记辅助选择和转基因技术进行抗旱性改良。而现在比较成熟的技术是分子标记辅助选择。

分子标记辅助选择的基础是对抗旱性相关性状进行数量性状位点(QTL)作图,迄今为止在玉米上已经有了不少的研究。但是,这些 QTL 分析的结果在育种中成功应用的例子不多。CIMMYT 在应用分子标记辅助选择进行抗旱育种方面做了大量工作,并取得了一定进展。

例证 1:把玉米自交系 P₁ (Ac7643)中的正效抗旱 QTL 转移到自交系 CML247 中。针对的主要性状是 ASI 和产量,在每个回交世代用 SSR 标记进行选择。选取了 5 个控制 ASI 的重要 QTL 区域,在两个回交世代分别对约 2 000 个单株进行分子标记辅助选择,这样在回交两代和自交两代后,这 5 个基因组区域在最好的基因型中得到了固定。之后又用选出的 70 个 BC₂F₃ 与两个测验自交系进行了测交,大田试验表明,利用分子标记辅助选择选出的材料表现比对照好得多,70 个基因型中最好的材料的测交种比对照的测交种在严重干旱胁迫下的产量高 2~4 倍,但在中度和轻度干旱胁迫条件下差异没有这么明显,甚至在产量降低 40%的胁迫环境下产量几乎没有差异,并且在不同水分胁迫环境下的表现也不太一致,基因型的表现与环境有很大的互作。这些研究表明,在不同胁迫强度下可能有不同基因参与了植物的适应性反应,也说明了抗旱育种的难度和复杂性。

例证 2:改良开放授粉群体 Tuxpeno Sequia 的抗旱性。用 40 个 RFLP 标记对 C₀、C₄ 和 C₈ 世代各 120 个基因型进行鉴定,认为随选择世代的增加频率提高的等位基因应该对抗旱性有利,然后用 21 个标记对 C₀ 和 C₄ 世代的 400 个植株进行筛选,根据等位基因组合的情况,在每个世代各选出 40 个“最好的”和“最差的”基因型,经在正常水分、中度胁迫和重度胁迫的田间条件下进行产量分析,发现两组基因型的产量在干旱条件下相差 20%以上。

在分子标记辅助选择中,需要注意以下几点:①要求有足够大的分离群体,这样才能保证选择的效率;②回交是一个重要的转移有益基因的手段,但也可以采取用两个抗旱性均很好的种质进行杂交,然

后利用分子标记技术来聚合有益基因的新策略。

另外一个开展分子标记辅助选择研究的策略是基于“通用抗旱 QTL”的策略。这需要建立一个一致性图谱,在该图谱上综合了产量组分、形态学性状和生理学性状的 QTL 信息,同时还有候选基因、代谢途径和基因表达方面的信息。这种策略的理论假设是,不管种质表现如何,在不同种质中的抗旱基因非常可能位于同一基因组区域,种质间的表型差异只是这些位点上等位基因不同而造成的,这样在一些基因上的有益等位基因的积累就可以提高抗旱性。

在至少 5 年以前,科学界对分子标记辅助育种热情很高,但近年来的实践逐渐证明,由于存在针对每个性状鉴定出来的 QTL 有限、单个 QTL 造成的表型差异小、基因型与环境互作很大和难于评估上位性效应等原因,要成功应用分子标记辅助选择技术来改良抗旱性这类复杂性状,还需要做更多的努力。

参考文献:

- [1] Edmeades G O, Bolanos J, Lafitte H R. Progress in breeding for drought tolerance in maize. In Wilkinson D (ed) Proceedings 47th Annual Corn and Sorghum Industry Research Conference, 1992, 93-111. Chicago, December 8-10, 1992. Washington, DC: ASTA.
- [2] Banziger M, Edmeades G O, Quarrie S. Drought stress at seedling stage—Are there genetic solutions? In Edmeades G O, et al. (eds.) Developing Drought- and Low-N-tolerant Maize, 1997, 348-354. Mexico DF, Mexico: CIMMYT.
- [3] Grant R F, Jackson B S, Kiniry J R, Arkin G F. Water deficit timing effects on yield components in maize. *Agron. J.*, 1989, 81: 61-65.
- [4] Bolanos J, Edmeades G O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. *Field Crops Res.*, 1993, 31: 253-268.
- [5] Edmeades G O, Bolanos J, Elings A, et al. The role and regulation of the anthesis-silking interval in maize. In Michelson S (ed.) Physiology and Modeling Kernel Set in Maize, Special publication number 29. 2000, 43-73. Madison, WI: Crop Science Society of America.
- [6] Setter T L, Flannigan B A, Melkonian J. Loss of kernel set due to water deficit and shade in maize. Carbohydrate supplies, abscisic acid, and Cytokinins. *Crop Sci.*, 2001, 41: 1530-1540.
- [7] Blum A. Towards standard assays of drought resistance in crop plants. In Ribut J-M, D Poland (eds.) Molecular Approaches for the Genetic Improvement of Cereals for Stable Production in Water-limited Environments, 1999, 29-35. Mexico DF, Mexico: CIMMYT.
- [8] Banziger M, Edmeades G O, Beck D, Bellon M. Breeding for drought and nitrogen stress tolerance in maize: From Theory to Practice. Mexico, D. F.: CIMMYT. 2000.
- [9] Banziger M, Edmeades G O, Lafitte H R. Selection for drought tolerance increases maize yields over a range of N levels. *Crop Sci.*, 1999, 39: 1035-1040.

(上接第 20 页)

- [10] Bolanos J, Edmeades G O. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. I. Responses in grain yield, biomass, and radiation utilization. *Field Crops Res.*, 1993, 31: 233–252.
- [11] Bolanos J, Edmeades G O. The importance of the anthesis–silking interval in breeding for drought tolerance in tropical maize. *Field Crops Res.*, 1996, 48: 65–80.
- [12] Bolanos J, Edmeades G O, Martinez L. Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. III. Responses in drought–adaptive physiological and morphological traits. *Field Crops Res.*, 1993, 31: 269–286.
- [13] Byrne P F, Bolanos J, Edmeades G O, Eaton D L. Gains from selection under drought versus multilocation testing in related tropical maize populations. *Crop Sci.*, 1995, 35: 63–69.
- [14] Chapman S C, Edmeades G O. Selection improves drought tolerance in tropical maize populations. II. Direct and correlated responses among secondary traits. *Crop Sci.*, 1999, 39: 1315–1324.
- [15] Edmeades G O, Bolanos J, Chapman S C, et al. Selection improves drought tolerance in tropical maize populations. I. Gains in biomass, grain yield, and harvest index. *Crop Sci.*, 1999, 39: 1306–1315.
- [16] Schussler J R, Westgate M E. Assimilate flux determines kernel set at low water potential in maize. *Crop Sci.*, 1995, 35: 1074–1080.
- [17] Zinselmeier C, Schussler J R, Westgate M E, Jones R J. Low water potential disrupts carbohydrate metabolism in maize ovaries. *Plant Physiol.*, 1995, 107: 385–391.
- [18] Edmeades G O, Bolanos J, Chapman S C. Value of secondary traits in selecting for drought tolerance in tropical maize. In Edmeades G O, et al. (eds.) *Developing Drought– and Low–N–tolerant Maize*. 1999, 222–234. Mexico DF, Mexico: CIMMYT.
- [19] Bolanos J, Edmeades G O. Value of selection for osmotic potential in tropical maize. *Agron. J.*, 1991, 83: 948–956.
- [20] Chimenti C A, Cantagallo J, Guevara E. Osmotic adjustment in maize: Genetic variation and association with water uptake. In Edmeades G O, et al. (eds.) *Developing Drought– and Low–N–tolerant Maize*. 1997, 200–204. Mexico DF, Mexico: CIMMYT.
- [21] Lemcoff J H, Chimenti C A, Davezac T A E. Osmotic adjustment in maize (*Zea mays* L.): Changes with ontogeny and its relationship with phenotypic stability. *J. Agron. Crop Sci.*, 1998, 180: 241–247.
- [22] Edmeades G O, Bolanos J, Hernandez M, Bello S. Causes for silk delay in lowland tropical maize. *Crop Sci.*, 1993, 33: 1029–1035.
- [23] Betran F J, Beck D, Banziger M, Edmeades G O. Secondary traits in parental inbreds and hybrids under stress and non–stress environments in tropical maize. *Field Crops Res.*, 2003, 83: 51–65.
- [24] Conti S, Landi P, Sanguineti M C, et al. Genetic and environmental effects on abscisic acid accumulation in leaves of field–grown maize. *Euphytica*, 1994, 78: 81–89.
- [25] Landi P, Sanguineti M C, Conti S, Tuberosa R. Direct and correlated responses to divergent selection for leaf abscisic acid concentration in two maize populations. *Crop Sci.*, 2001, 41: 335–344.
- [26] Ribaut J M, Banziger M, Hosington D. Genetic dissection and plant improvement under abiotic stress conditions: drought tolerance in maize as an example. *JIRCAS Working Report*: 2002. 85–92.
- [27] Ribaut J M, Jiang C, Gonzalez–de–Leon D, et al. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize. II. Yield components and marker–assisted selection strategies. *Theor. Appl. Genet.*, 1997, 94: 887–896.
- [28] Ribaut J M, Betran F J. Single large–scale marker–assisted selection (SLS–MAS). *Mol. Breed*. 1999, 5: 531–541.