

遗传快报

三系杂交稻亲本随机扩增多态性 DNA (RAPD) 分析^①马文宾^{1, 2} 庄杰云¹ 彭应财¹ 王侯聪² 郑康乐¹

(1. 中国水稻研究所, 杭州 310006) (2. 厦门大学生物系, 厦门 361005)

摘要 选用 9 个随机引物对 31 份杂交水稻亲本材料进行了 RAPD 分析, 共检测到 60 条多态性带。聚类分析结果表明, 所有供试材料可以被明确地区分。在 9 个随机引物中, 有 8 个具有较高的多态性检测能力。以这 8 个引物为基础, 选用任两个引物即可在任一对材料中检测出多态性的频率在 96.13% 以上, 而选用任 3 个引物则该频率在 99.21% 以上。这显示了运用 RAPD 鉴定稻种具有简便、灵敏、高效的优点, 在鉴定杂交稻种的实践中有着良好的应用前景。

关键词 杂交水稻, RAPD, 多态性频率

中图分类号 Q37

RAPD Studies of Parents of Three-Line Hybrid Rice

MA Wenbin^{1, 2} ZHUANG Jieyun¹ PENG Yingcai¹ WANG Houcong² ZHENG Kangle¹

(1. Biotechnology Department, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

(2. Biology Department, Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract Seven rice male sterile lines, 12 maintainer lines and 12 restorer lines were analyzed by RAPD with 9 primers. Altogether, 118 fragments were generated, of which 60 detected polymorphisms among rice lines tested. Cluster analysis showed that all lines could be uniquely distinguished by at least one RAPD marker. Eight of nine primers can detect high polymorphism. The frequencies of polymorphism in any pairs of lines would be higher than 96.13% when any two of the 8 primers were used. If any three of the 8 primers were used, the frequencies would be higher than 99.21%. The eight primers were therefore recommended as candidates for the identification of hybrid rice seeds.

Key words Rice, Random amplified polymorphic DNA (RAPD), Frequency of polymorphism

近年建立的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 技术^[1, 2], 具有程序简便、快速灵敏等优点, 所以在遗传图谱构建、基因定位及亲缘关系分析中得到了广泛应用。自七十年代后期, 杂交水稻在我国广泛种植, 为保证我国的粮食生产发挥了重大作用。但是, 近年来假冒杂交水稻种子的事件屡有发生, 迫切需要建立简便、快速、准确的真假稻种鉴定技术。最近, 已有研究者将 RAPD 技术应用于真假杂交水稻的鉴定^[3]。但是, 要将 RAPD 技术成功地运用于鉴定未知材料的真假, 必须首先了解两个相关的问题: (1) 栽培稻材料之间的 RAPD 多态性程度如何? (2) 要应用多少个引物才能够有把握地进行鉴定? 本研究以育种家提供的杂交稻亲本材料为样本进行

① 本研究受到国家水稻基因组计划和农业部重点项目资助。中国水稻研究所育种系张惠廉先生提供实验材料, 特此致谢。

② 马文宾, 男, 26 岁, 硕士学位, 助教; 专业方向: 生物技术

RAPD 分析, 为筛选一套适用于鉴定真假杂交稻种的引物进行了初步的探索。

1 材 料 和 方 法

1.1 实验材料

本研究所用的水稻材料包括 7 个不育系、12 个保持系和 12 个恢复系, 其中有 5 对为相应的不育系与保持系。这些材料选自杂交稻推广组合亲本以及育种家正在应用的骨干亲本, 所有材料均由中国水稻所育种系张惠廉先生提供。

1.2 实验方法

DNA 提取: 从新鲜叶片中提取总 DNA, 方法同文献 [4]。

RAPD 分析: 从本实验室基因定位研究所应用的 280 个引物中, 挑选出扩增稳定、带型较清晰的 9 个 10 碱基的引物, 引物购自 Operon 公司。在以前介绍的反应体系中^[5]进行扩增。使用的扩增仪为 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600, 循环条件为 93℃ 15 sec, 36℃ 30 sec, 72℃ 30 sec, 共 45 个循环, 最后在 72℃ 维持 5 min。扩增产物取 10 μl 在 1.5% 的琼脂糖凝胶中电泳, 经溴化乙锭染色后紫外灯下拍照记录。

数据分析: 按照片上各扩增片段的有无做记录, 1 和 0 分别代表某扩增片段的有和无, 将所得数据输入微机。根据 Nei 氏公式 (1987, 公式 5.53)^[6] 计算各材料之间的相似性, 按其介绍的平均距离法 (UPGMA) 进行聚类分析, 通过 NTSYS 程序^[7]运算。然后, 以单个引物为基础, 记录成对品种间的多态性。如果一对品种的所有带型完全一致, 则记为无多态; 如果一对品种至少在一个片段上有差异, 则记为多态。将多态性品种对的数值除以总品种对的数值, 则得到该引物的多态性频率, 即应用该引物在成对水稻材料间扩增出多态性的频率。

2 结 果 与 讨 论

2.1 水稻材料间的多态性

9 个引物对 31 份杂交水稻亲本材料的总 DNA 进行扩增, 共产生 118 条扩增片段, 片段大小范围主要在 0.2~3kb 之间, 其中多态性片段为 60 条。在各引物中, OPD-2 扩增的总片段数及多态性片段数均居首位 (图 1, 表 1)。



图 1 OPD-2 的扩增结果

M. 分子量标记; 1~31. 材料 1~31. 各材料名称见图 2。

表 1 9 个引物的多态性频率

引 物	扩增片段总数	多态性片段数	多态性频率 (%)	引 物	扩增片段总数	多态性片段数	多态性频率 (%)
OPB-1	15	9	90.46	OPE-11	11	7	84.62
OPB-11	10	5	88.62	OPE-17	8	2	56.92
OPC-6	13	7	95.69	OPF-5	16	6	80.92
OPD-2	17	12	96.62	OPK-4	13	4	79.69
OPD-4	15	8	91.38				

聚类分析结果显示 (图 2), 所有供试材料都可以被明确地区分开。这表明, 用 RAPD 技术鉴定水稻材料间差异性是完全可行的。同时, 从图 2 中可以看到, 有 8 个恢复系形成一组, 与 V20B 以外的所有不育系和保持系有较高的差异性。有研究表明在籼亚种内遗传距离与杂种优势呈正相关^[8, 9]。因此, 这种差异为杂种优势的形成奠定了基础。

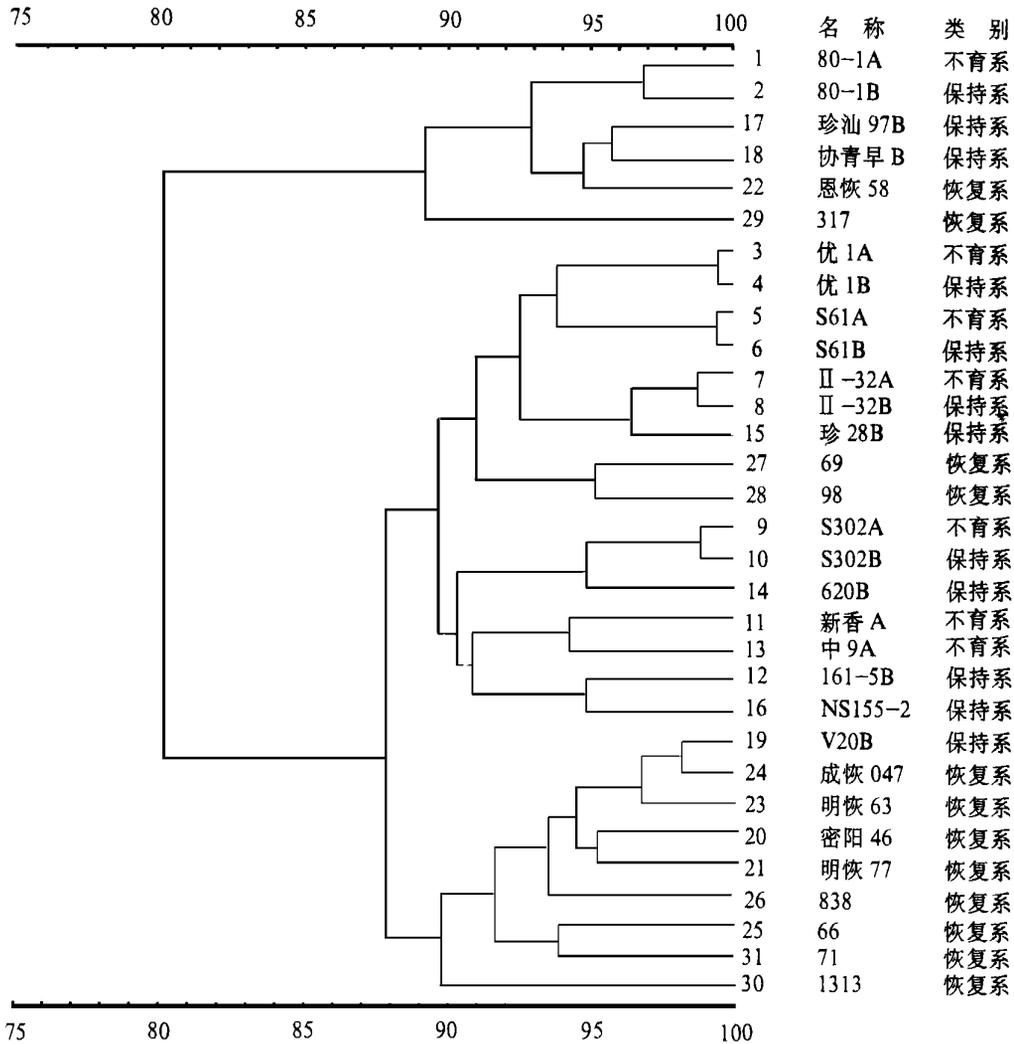


图 2 供试品种的相似性树状图

图下标尺示等长片段比例 (%)。

在相应的不育系和保持系之间, 仍存在一定的差异, 其相似性最高的为 99.4%, 最低的为 96.9%。这表明运用 RAPD 技术可以灵敏地分析不育系和保持系的遗传背景, 在不育系的转育研究中具应用价值。不育系和保持系之间的差异有两个可能的来源, 第一, 由于不育系和保持系之间细胞质的差异导致了扩增的差异; 第二, 不育系的核基因组尚未完全被保持系的核基因组代换。

2.2 各引物检测多态性的能力

多态性频率的计算结果表明, 所选用的 9 个 10 碱基引物在供试材料间检测多态性的能力有所差异, 其中 OPE-17 的检测能力明显低于其他引物 (表 1)。因此, 应用该引物显然不利于提高检测效率, 而其它 8 个引

物检测多态性的能力均较高, 可以作为候选引物应用于杂交稻种的真假鉴别。经计算, 除 OPE-17 外, 使用任两个引物在任两个供试材料中能检测出多态性的频率为 96.13~99.85%, 使用任 3 个引物在任两个供试材料中能检测出多态性的频率为 99.21~99.99%。这不仅表明了所选用的引物在供试材料中多态性较高, 同时也显示了 RAPD 应用于基因组指纹分析的高效性。

RAPD 的稳定性一直是个令人关注的问题, 本研究中的 9 个引物是在基因定位研究的基础上选用的。在亲本多态性筛选时两亲本的带型分别与群体分析时两亲本的带型完全一致, 同时两亲本的带型在群体中也得到很好的重复, F_2 群体中的分离符合 3:1 (庄杰云等, 未发表资料)。再者, 两亲本的带型也在本研究的杂交稻亲本材料中得到重复。因此, 有理由认为在本实验室所应用的反应体系下, 所用引物用于水稻研究可获得稳定的结果。

本研究提供了 8 个候选引物, 通过将这 8 个引物应用于更广泛的稻种材料, 就有可能建立一套鉴定我国杂交稻稻种的引物。另外, 值得一提的是, 实际鉴定中应同时分析不育系、保持系和恢复系 3 种材料, 而不仅仅只分析不育系和恢复系。大家知道, 在杂交水稻生产中, 不育系是由不育系/保持系获得的。考虑到不育系和保持系可能有差异, 且不能排除有部分差异来源于二者核基因组, 因此, 难以保证不同时候的不育系材料具有完全一致 DNA 标记基因型。同时鉴定相应的不育系和保持系能更好地保证结果的可靠性。

水稻 DNA 的提取已建立了一些更为快速简便的方法, 如从 1~2 厘米的幼叶叶尖中提取总 DNA^[10], 这种方法不需要液氮, 且大大节省了时间和费用。可以相信, 随着低成本、简便规范的操作体系的建立, RAPD 在鉴定杂交稻种的实践中有着良好的应用前景。

参 考 文 献

- 1 Williams J G K *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (22): 6531~6535
- 2 Welsh J *et al.* Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18 (24): 7213~7218
- 3 钱 前等. 真、假杂交稻 II 优 63 的 RAPD 鉴定. *中国水稻科学*, 1996, 10 (4): 241~242
- 4 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法. *中国水稻科学*, 1992, 6 (1): 47~48
- 5 陆军等. 利用 RAPD 技术检测水稻的基因组变化. *科学通报*, 1993, 38 (23): 2181~2182
- 6 Nei M. *Molecular evolutionary genetics*. Columbia University Press, New York, 1987
- 7 Rohlf F J. *NTSYS—pc manual version 1.70*. Exeter software, Setauket, NY, 1990
- 8 Xiao J *et al.* Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based markers. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 92: 637~643
- 9 Zhang Qifa *et al.* Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. *Theor. Appl. Genet.*, 1996, 93: 1218~1224
- 10 Zheng K *et al.* Rapid DNA isolation for marker-assisted selection in rice breeding. *Rice Genet. Newsl.*, 1995, 12: 255~258

1997-07-23 收稿, 1997-09-15 修回。

。会议消息。

第十八届国际遗传学大会将在北京召开

第十八届国际遗传学大会将于 1998 年 8 月 10~15 日在北京召开。会议的主题是: “遗传学——造福于全人类”。第十八届国际遗传学大会由国际遗传学联合会、中国遗传学会和中国科学院共同主办, 大会主席为谈家桢院士, 秘书长为陈受宜教授。

目前, 大会的第二轮通知已经发出, 欲参加大会需要通知的同志, 请向中国遗传学会办公室索取, 地址: 北京亚运村大屯路 917 大楼, 邮政编码 100101。电话: (010) 64914896; 传真: 64973199。Email: xh_igt.ac.

cn (安锡培)