

我国杂交水稻主要恢复系的DNA 多态性研究

刘 殊 程 慧 王 飞 朱英国*

(武汉大学 生命科学学院 遗传研究所, 植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北 武汉 430072; *通讯联系人)

DNA Polymorphism of Main Restorer Lines of Hybrid Rice in China

LIU Shu, CHENG Hui, WANG Fei, ZHU Ying-guo*

(The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China; *Corresponding author)

Abstract: The RAPD analysis was conducted on the main 31 restorer lines of hybrid rice in China. Out of 48 random primers, 9 primers were screened, then amplified the 31 genomic DNAs. Seventy-eight RAPD fragments were generated in all, 61 of them were polymorphic markers. Every primer offered 8.7 markers on average. The molecular phylogenetic trees constructed by UPMGA method showed the genetic relationship among 31 restorer lines, which was identical with pedigree analysis.

Key words: hybrid rice; random amplified polymorphic DNA; restorer line; polymorphism; genetic relationship

摘 要: 利用RAPD引物对我国杂交稻主要的31个恢复系进行了DNA多态性分析。从152个随机引物中筛选出48个引物扩增恢复系的基因组DNA, 选取9个引物的扩增结果进行分析, 共获得78条带, 其中61条带为多态性标记, 每个引物平均提供8.7个标记信息。由UPMGA方法得到的聚类分析结果表明了31个恢复系间的亲缘关系, 聚类结果与它们的系谱关系基本吻合。

关键词: 杂交水稻; 随机扩增多态性DNA; 恢复系; 多态性; 亲缘关系

中图分类号: Q943; S511.032

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2002)01-0001-05

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 为全球60%以上的人口提供了首要的粮食和蛋白质来源。1964年, 袁隆平率先在中国着手水稻雄性不育的研究, 并提出了通过选育水稻雄性不育系、雄性不育保持系和雄性不育恢复系的三系法途径利用水稻的杂种优势¹。目前, 在我国基于水稻细胞质雄性不育的杂交水稻在生产上已取得了巨大成功, 杂交水稻的种植面积占水稻种植面积的80%以上。但是, 如果水稻细胞质过于单一, 容易造成遗传上的脆弱性, 潜伏着毁灭性病虫害大发生的危机。因此, 实现胞质的多样化已成为当今杂交水稻育种的重要目标²。杂种优势利用的关键在于亲本的选育, 突破性亲本的育成是培育突破性组合的前提。在三系和两系杂交水稻强优势组合选育过程中, 优良恢复系的选育起着举足轻重的作用^{2,3}。我国在杂交稻亲本的选育上取得了较大的进展, 选育出了许多恢复系, 为我国选配强优势组合提供了很好的亲缘。但现有的恢复系多数遗传差异较小, 背景单一, 势必限制水稻杂种优势的利用³。研究和评价恢复系的遗传多样性具有重要的理论和实践意义。

近年来, 以分子标记技术为重点的植物分子生物学研究迅猛发展, 为研究亲本之间的遗传差异提供了新的方法和手段^{4~7}。RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA, 随机扩增多态性DNA)技术是由Williams等(1990)首先创立的一种DNA分子标记技术, 该技术用一个(有时用两个)随机引物(一般8~10个碱基)非定点地扩增DNA片段, 然后用凝胶电泳分开扩增片段⁸。由于RAPD技术具有快速、简便、通用性好、多态性高、对DNA的需求量小、质量要求低等优点, 一经问世, 就受到了广泛的注意, 并被成功地用于动物、植物、人和微生物的遗传多样性检测、基因定位、品系鉴定、医学诊断、遗传图谱构建、系统学研究等^{8~11}。何光华等运用RAPD技术研究了四川省主要恢复系的DNA多样性¹², 但所选的恢复系及运用的RAPD引物均较少, 代表性不够。本实验使用RAPD分子标记技术

收稿日期: 2001-02-24; 修改稿收到日期: 2001-05-09。

第一作者简介: 刘殊(1965-), 男, 在读博士研究生, 湖北孝感学院副教授。

对我国主要的水稻恢复系 DNA 多态性进行了初步研究, 以期对杂交水稻育种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本次试验共使用 31 个水稻恢复系作为材料, 进行 RAPD 分析。这 31 个材料均为我国大量使用的恢复系材料, 详见表 1。

1.2 叶片 DNA 的提取

每个材料剪取新鲜幼叶 2~ 5 g, 在- 30 预冷的研钵中用液氮将叶片迅速磨成粉状, 装入 15 mL 离心管; DNA 提取参考文献 13 的 CTAB 法略加修改, 在离心管中加入预热至 95 的 1.67×CTAB 抽提液 2~ 4 mL, 加 1% β 巯基乙醇(约 60 μL), 65 温浴 60~ 90 min, 待冷却至 25 左右后加入等体积氯仿 异戊醇(24 1), 至有机相由无色变为绿色再变为黑色(深绿色), 25 、4000 r/min 离心 10 min, 取上清液加入等体积- 20 预冷的异丙醇, 用玻璃钩钩出 DNA 放入装有 70% 乙醇的离心管中, 浸泡 24 h; 倒去乙醇, 将 DNA 吹干, 加入少量 TE (pH 8.0) 溶解 DNA。冷却至室温后, 加入 20 μL 10 mg/mL RNase A, 混匀, 于 37 下温浴 2 h 以去除 RNA; 加入等体积氯仿 异戊醇(24 1), 混匀, 室温下 12000 r/min 离心 5 min, 上清液中加入 1/10 体积 3 mol/L NaOAc (pH 5.2) 和 2.5 体积无水乙醇, 钩出 DNA, 放入 1.5 mL Eppendorf 管中, 用 70% ethanol 洗涤 1~ 2 次(24 h 过夜); 瞬间离心使 DNA 贴壁, 小心倒去 ethanol, 吹干 DNA, 加入尽量少的 TE (pH 8.0) 充分溶解 DNA。溶好的 DNA 呈无色透明状, 用 biophotometer 测定 DNA 浓度。

1.3 基因组 DNA 的 RAPD 分析

用 R31 作模板对 152 个 10-mer 引物进行筛选, 从中选出扩增稳定、多态性适中的引物, 再分别

对所有材料进行扩增。PCR 反应体系为 10 × buffer 2.5 μL, 1.5 mmol/L Mg²⁺ 1.5 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.5 μL, Taq 酶(5 U/μL) 0.2 μL, RAPD primer 0.8 μL, ddH₂O 18.5 μL, 模板 DNA 1 μL, 反应总体积 25 μL。每管中加入一滴矿物油, 盖上盖子后置于 PTC-100 Programmable Thermal Controller 上进行 PCR 扩增。PCR 程序为: 94 变性 3 min, 再经 94 变性 1 min、38 退火 1 min、72 延伸 1.5 min, 共 40 个循环, 再 72 延伸 8 min。PCR 结束后在 1.4% 琼脂糖凝胶上 3 V/cm 稳压下电泳适当时间, 在紫外灯下观察照相, 再放入 Gel Doc 2000 凝胶成像仪中扫描分析。

1.4 RAPD 数据处理

对各材料各引物扩增情况做记录, 有带记为 1, 无带记为 0。根据 NTMA S (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.60, F. James Rohlf) 中的 Jaccard 公式计算杂交水稻亲本材料间的相似系数 (SC), 应用平均距离法 (UPGMA) 进行聚类分析, 通过 NTSYS 程序运算, 建立聚类图^{11, 14, 15}。

2 结果与分析

2.1 RAPD 扩增对杂交水稻各恢复系的区分结果

在 152 个 RAPD 引物中筛选出 48 个扩增稳定、多态性适中的引物对所有供试 31 个材料进行扩增, 共产生 85 条清晰多态性片段。为了用尽可能少的具有较好重演性的引物区分供试材料, 从中挑选出 9 个带型较好的 RAPD 引物, 共产生 78 条带, 其中多态性片段 61 条, 多态性位点比例 0.7820 (表 2), 它们能够有效区分所有 31 个恢复系材料, 且重复性良好 (图 1)。

2.2 杂交水稻恢复系遗传关系分析

根据 9 个多态性引物的扩增结果, 经聚类分析,

表 1 本研究所用的恢复系材料

Table 1 Rice restorer lines used in this experiment

编号	材料	编号	材料	编号	材料	编号	材料
Number	Restorer line	Number	Restorer line	Number	Restorer line	Number	Restorer line
R 1	IR 24	R 9	明恢 86 Minghui 86	R 17	多系 1 号 Duoxi 1	R 25	J413
R 2	IR 36	R 10	泸恢 6 号 Luhui 6	R 18	紫恢 88 Zihui 88	R 26	C418
R 3	IR 38	R 11	生恢 11 Shenghui 11	R 19	测 49 Ce 49	R 27	MBP98
R 4	IR 54	R 12	生恢 747 Shenghui 747	R 20	测 64 Ce 64	R 28	广 124 Guang 124
R 5	IR 64	R 13	绵恢 725 Mianhui 725	R 21	R 527	R 29	FORBIPROTFE
R 6	9311	R 14	绵恢 747 Mianhui 747	R 22	CDR 22	R 30	BONNEL
R 7	71068	R 15	紫恢 100 Zihui 100	R 23	密阳 23 Miyang 23	R 31	MORBEREKAN
R 8	明恢 63 Minghui 63	R 16	辐恢 838 Fuhui 838	R 24	6078		

表 2 筛选的引物及其 RAPD 标记数

Table 2 Selected primers and their RAPD marker numbers			
引物 Primer	引物序列 Primer sequence	扩增片段总数	多态性片段数
		Total number	Number of
		of amplified segment	polymorphism segment
S357	ACGCCA GTTC	7	6
S358	TGGTCGCA GA	6	3
S400	TGGTGGACCA	11	7
S410	TCTGGCGCAC	9	7
S456	TCGGCGGTTC	9	8
S1081	TGTGACGA GG	9	8
S1083	CCCA CCCTTG	10	8
S1088	GTCGCCCTCA	11	9
S1091	GTCACGTCTT	6	5

各亲本间的相似系数为 0.39~ 0.96, 在相似系数 0.61 附近可将这 31 个亲本分成四大类群(图 2)。

在这 4 类中,BONNEL 和MORBEREKAN 聚为一类,第 2 类有密阳 23、J413、C418、广 124、FOR-BIPRO TIFE 等 5 个材料,第 3 类包括 9311、明恢 86、绵恢 734、测 49、6078、MBP98 等 6 个材料,第 4 类包括 R 系列的 5 个材料和 71068、明恢 63、泸恢 6 号、生恢 11、生恢 747、绵恢 725、紫恢 100、辐恢 838、多系 1 号、紫恢 88、测 64、R 527、CDR 22 等共 18 个材料。在上述恢复系中,BONNEL 和MORBE-

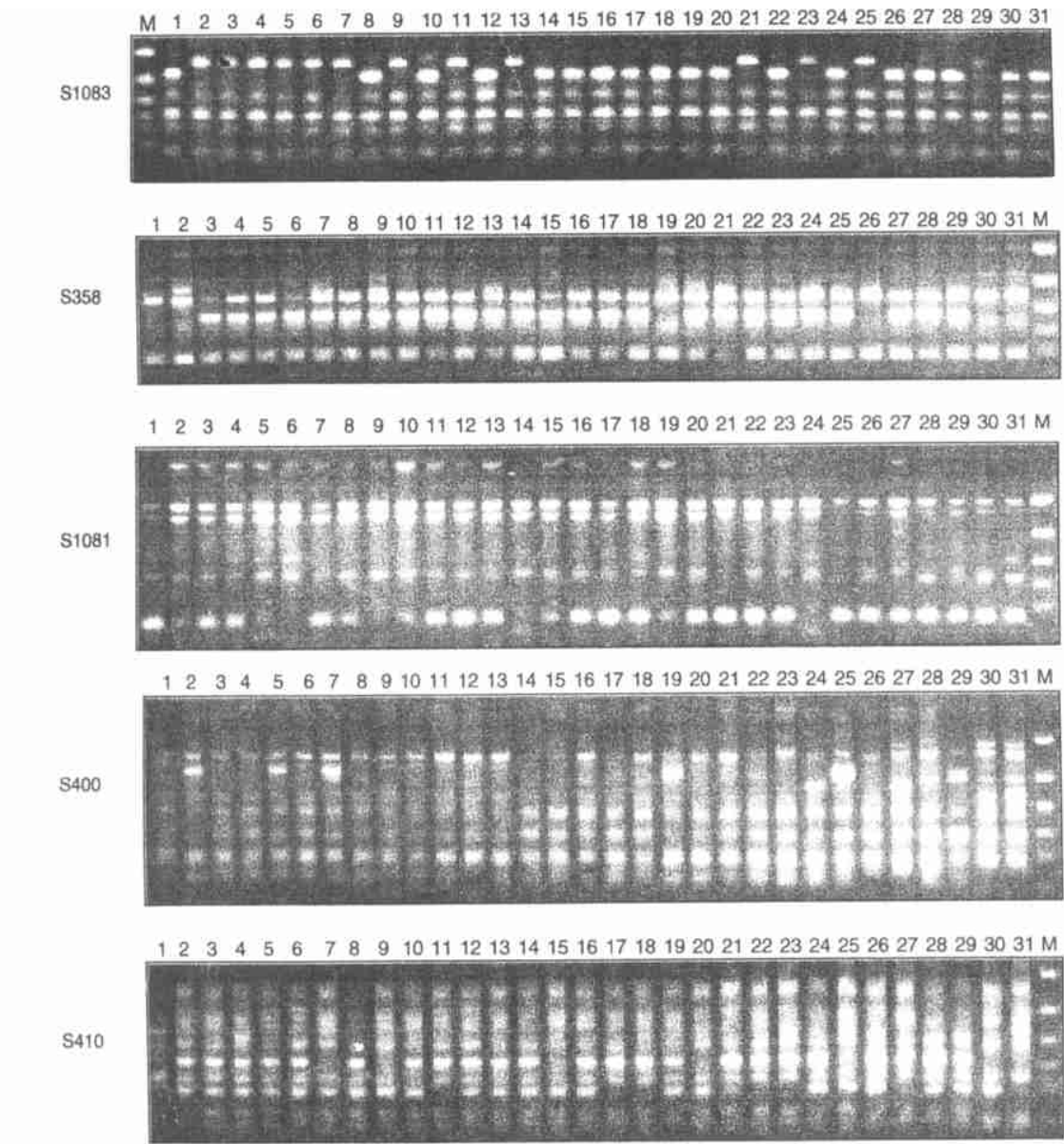


图 1 引物 S1083、S358、S1081、S400 和 S410 的扩增结果

Fig. 1. Amplified results of primer S1083, S358, S1081, S400, and S410
序号同表 1, M 为 PCR 标记。

The codes of tested materials were the same as Table 1, M for PCR marker.

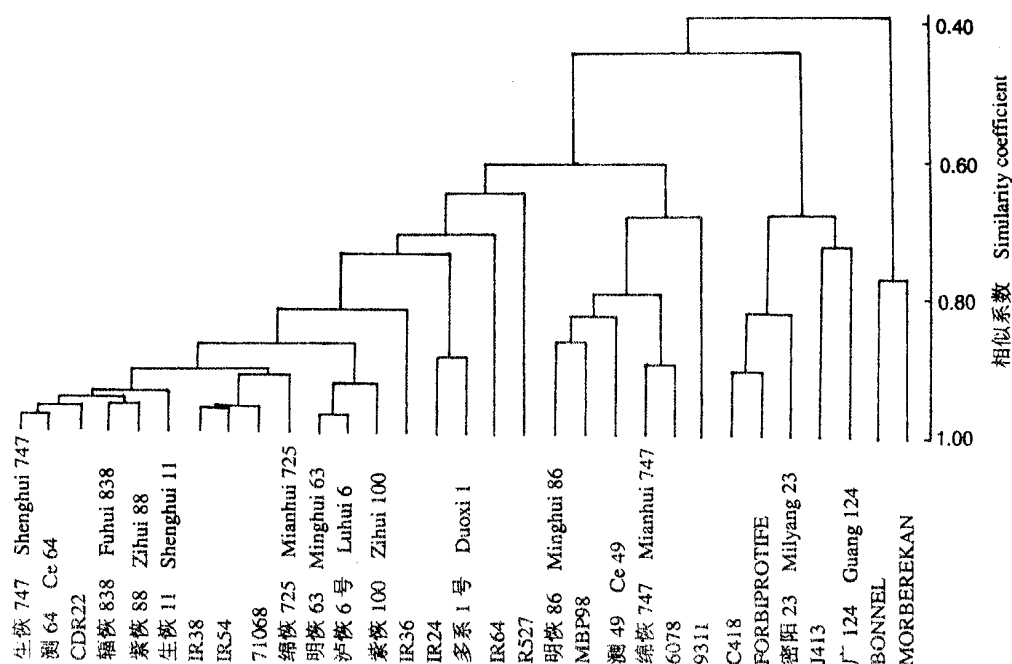


图2 31份杂交水稻恢复系相似性树状图

Fig. 2 Phylogenetic tree analysis of 31 hybrid rice restorer lines

REKAN 均引自国际水稻研究所, 原产东南亚地区¹⁶, 与中国选育的恢复系亲缘关系较远, 故单独聚为一类; 密阳 23 来自韩国, 与来自东南亚的 FORBIPROTIFE 聚为一类应属正常。IR 系列的 5 个材料均来自国际水稻研究所, 有 IR 24 共同的血缘¹⁶, 理应聚为一类; 明恢 63 是以 IR 30 为母本, 圭 630 为父本杂交育成¹⁷, 与 IR 系列关系较近; 多系 1 号是四川省内江地区农业科学研究所 1988 年以明恢 63 为母本 Tetep 为父本杂交 F₂ 用明恢 63 回交系选而成, CDR 22 是四川省农业科学院 1988 年以 IR 50 为母本明恢 63 为父本杂交育成, 辐恢 838 是以明恢 63 的辐射株系为亲本杂交育成¹⁶, 绵恢 725 是采用培矮 64 与高配合力的籼型恢复系明恢 63//泰引 1 号/IR 26 杂交选育而成的新恢复系¹⁸, 它们都有明恢 63 的血缘, 亲缘关系较近, 因而聚为一类。其他恢复系品种无明显亲缘关系, 但也没有与亲缘关系相违背的聚类结果。可见, 上述聚类结果与它们的系谱关系基本吻合。

从这些聚类结果可以看出, 我国水稻恢复系遗传资源比较丰富, 但就生产而言, 我国水稻恢复系遗传背景比较单一, 大部分材料之间的相似系数较大, 能将它们区分为 4 类的相似系数为 0.39, 有 24 个材料的相似系数在 0.60 以上, 其中 18 个材料的相似系数达 0.63, 表明它们的遗传差异较小。这可能

是目前我国虽然已推广了一些优势杂交组合, 但大多数三系杂交稻产量水平相当, 需要选育新的优良恢复系的原因¹⁹。

3 讨论

自 20 世纪 70 年代中期杂交稻推广以来, 我国南方中籼稻区杂交水稻经历了两次品种更换。第一次是以不育系珍汕 97A 为核心, 汕优 2 号当家。第二次是以恢复系明恢 63 为核心, 汕优 63 当家。近年来, 因恢复系和杂交稻组合单一, 逐渐导致稻瘟病的单向积累, 给大面积生产带来潜在威胁和极大危害, 生产上迫切需要产量更高、抗性更强的接替品种^{2, 3, 19, 20}。由于杂交水稻的抗性主要决定于父本恢复系, 因此选育抗性好、综合性状优良、配合力高的新恢复系是当前科研和生产上的一项长期而艰苦的重要任务。恢复系的选育与分子标记技术相结合, 定会对恢复系的选育产生重大影响。

本实验应用 RAPD 技术对我国主要水稻恢复系材料的遗传关系进行了分析, 可明显看出我国水稻恢复系遗传背景比较单一, 大部分材料之间的相似系数较大, 这就大大限制了我国水稻杂种优势的利用。所以, 需要加大力度选育新的恢复系, 利用亲缘关系较远、遗传差异较大的恢复系材料, 从而更好地利用水稻杂种优势。

RAPD 技术作为近年来迅速发展起来的一项分子标记技术, 其重要应用之一就是揭示亲本之间的遗传差异, 从而预测可能的杂种优势, 特别是近年来把亚种间杂交作为杂种优势利用的重要途径之一, 使得RAPD 技术的意义显得更加重要。但RAPD 标记的可靠性一直受到人们的关注。RAPD 可靠性包括三方面的内容²¹: (1) 序列同源性, 即PCR 扩增产物, 经电泳分离后, 具有相同迁移率(共迁移)的带具有序列同源性; (2) 重复性, 指同一人, 前后实验结果是否一致, 不同实验室之间同一实验结果是否重复; (3) 系统学价值, 是指利用RAPD 技术构建的亲缘关系图谱与传统亲缘图谱或RFLP 图谱的相同或相似程度。RAPD 技术中的影响因素很多, 如DNA 的质量、模板DNA 浓度、引物和dNTP 的浓度、Taq 酶的商品型号、Mg²⁺ 浓度、反应时间和温度参数等。RAPD 标记可靠性问题核心是共迁移带间是否具有序列同源性²¹。在属、种内和群体内, 特定大小的RAPD 片段具有序列同源和遗传相关性的假设是普遍有效的。所以, 如果建立比较完善的反应体系, 通过筛选足够多的引物, 总能找到配对率较高、重复性较好、完全能够胜任于品种鉴定的一些引物。本次实验中所选用的9 个RAPD 引物能够有效地区分所有供试的恢复系材料, 因此, 筛选在杂交水稻亲本材料间就有较高多态性和较好重演性的RAPD 引物, 建立杂交水稻亲本DNA 指纹图谱, 结合田间性状特征, 将对杂交水稻及其亲本的鉴定具有重要价值。

参考文献

- Li Z B (李泽炳), Xiao Y H (肖翊华), Zhu Y G (朱英国), *et al*. Study and Practice of Hybrid Rice (杂交水稻研究与实践). Shanghai: Shanghai Scientific and Technical Publishers (上海科学技术出版社), 1982 (in Chinese)
- Wu J H (吴京华), Liao F M (廖伏明), Luo R L (罗润良). The achievement, progress and prospect of the application of rice heterosis in China. *World Agriculture* (世界农业), 1999, (8): 20-22 (in Chinese)
- Zhang R X (张瑞祥), Liao J H (廖家槐), Zhang H L (张红林), *et al*. Present condition of the utilization of heterosis in hybrid rice in China and counter measures. *Acta Agr Univ Jiangxi* (江西农业大学学报), 1998, 20(2): 223-226 (in Chinese with English abstract)
- Welsh J, McClelland M. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 7213-7218
- Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, *et al*. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18(2): 1083-1088
- Li Y (黎 裕), Jia J Z (贾继增), Wang T Y (王天宇). Types of molecular markers and their development. *Biotech Info* (生物技术通报), 1999, 15(4): 19-22 (in Chinese with English abstract)
- Zhang D S (张德水), Chen S Y (陈受宜). DNA molecular markers, genome mapping and their applications for plant breeding. *Heredity* (Beijing) (遗传), 1998, 35(5): 35-38 (in Chinese)
- Yan W Z (阎文昭), Cai P Z (蔡平钟), Xuan P (宣 朴). Application of RAPD technique in biological study. In: Research and Progress of the World Science and Technology-21 Century Forum of Young Scholar Vol 2 (世界科学技术研究的进展——21世纪青年学者论坛, 第2卷). Beijing: Science Press (科学出版社), 1999: 82-85 (in Chinese)
- Gai S P (盖树鹏), Meng X D (孟祥栋). Application of RAPD techniques in the tagging of plants traits and marker-assisted selection (MAS). *Biotech Info* (生物技术通报), 1999, 15(6): 33-36 (in Chinese with English abstract)
- Kong X Y (孔秀英), Ge C M (葛春民), Jia J Z (贾继增), *et al*. RAPD analysis of phylogeny for five basic genomes in *Aegilops Acta Bot Sin* (植物学报), 1999, 41(4): 393-397. (in Chinese with English abstract)
- Li Y H (李云海), Qian Q (钱前), Zeng D L (曾大力), *et al*. Identification by RAPD analysis and studies on genetic relationship of main parents of hybrid rice in China. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2000, 26(2): 171-176 (in Chinese with English abstract)
- He G H (何光华), Tang M (唐 梅), Pei Y (裴 炎), *et al*. Polymorphism of the restorer lines of Sichuan Province in hybrid rice. *Hybrid Rice* (杂交水稻), 1999, 14(6): 39-40 (in Chinese with English abstract)
- Clark M S. Laboratory Manual of Plant Molecular Biology (植物分子生物学——实验手册). Beijing: High Education Press (高等教育出版社), 1998: 236-252. Translated by Gu H Y (顾红雅), Qu L J (瞿礼嘉). (in Chinese)
- Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al*. Short Protocols in Molecular Biology (精编分子生物学实验指南). Beijing: Science Press (科学出版社), 1998. Translated by Yan Z Y (颜子颖), Wang H L (王海林). (in Chinese)
- Gu H Y (顾红雅), Qu L J (瞿礼嘉). Introduction to Modern Biotechnology (现代生物技术导论). Beijing: High Education Press (高等教育出版社), Springer-Verlag, 1998 (in Chinese).
- Zhu Y G (朱英国). Biology of Male Sterile in Rice (水稻雄性不育生物学). Wuhan: Wuhan University Press (武汉大学出版社), 2000 (in Chinese)
- Xie H A (谢华安). Selection and utilization of Minghui 63. *Fujian J Agric Sci* (福建农业学报), 1998, 13(4): 1-6 (in Chinese with English abstract)
- Hu Y G (胡运高), Wei L (魏 灵), Li C Y (李成依). Breeding of a new restorer 725 and characters of its hybrid combination in rice. *Southwest China J Agric Sci* (西南农业学报), 1998, 11: 126-128 (in Chinese with English abstract)
- Li C Q (李成荃). Rice breeding for super high yield. *J Anhui Agric Sci* (安徽农业科学), 1998, 26(2): 95-97, 132 (in Chinese with English abstract)
- Wang D Y (王得元), Yin Q M (殷秋妙), Li Y (李 颖), *et al*. Advances in crop heterosis studies using molecular biology techniques. *Acta Univ Agric Botenli Occidentalis* (西北农业大学学报), 1999, 27(1): 94-99. (in Chinese with English abstract)
- Liu C L (刘春林), Guan C Y (官春云), Li Shun (李 木旬). Studies on the authenticity of plant RAPD markers. *Biotech Info* (生物技术通报), 1999, (2): 31-34 (in Chinese with English abstract)