

云南紫稻细胞质无花粉型三系及杂种 F₁ 的 AFLP 指纹图谱的构建与分析

胡 侃[#] 余夏夏[#] 余金洪 丁 毅^{*}
(武汉大学 植物发育生物学教育部重点实验室/生命科学学院 , 湖北 武汉 430072 ; [#] 共同第一作者 ; ^{*} 通讯联系人 , E-mail : yiding@whu . edu . cn)

Construction of AFLP Fingerprinting and Comparative Analysis Between Three Lines of Cytoplasmic Non Pollen Type in Yunnan Purple Rice and Their Hybrid F₁

HU Kan[#] , YU Xia xia [#] , YU Jin hong , DING Yi^{*}
(Key Laboratory of Ministry of Education for Plant Developmental Biology/ College of Life Sciences , Wuhan University , Wuhan 430072 ;
[#] These authors contributed equally to this paper ; ^{*} Corresponding author , E mail : yiding@whu . edu . cn)

Abstract : An AFLP fingerprinting was constructed to conduct comparative analysis on three lines of cytoplasmic non pollen type in Yunnan purple rice and their hybrid F₁ . Eight of fourteen random primer pairs displayed significant polymorphisms . In Tianxiang 018 (Tianxiang A × Luohui 018) group , including cytoplasmic male sterile line , maintainer line , restorer line and F₁ , 179 bands were amplified , 52 of which were polymorphic (29 . 05 %) ; in Tianxiang 806 (Tianxiang A × Luohui 806) group (cytoplasmic male sterile line , maintainer line , restorer line and F₁) , 177 bands were amplified , 50 of which were polymorphic (28 . 25 %) . Particularly , two specific bands amplified by the primer pair E ATG / M CAC were found only in the maintainer line and could obviously distinguish maintainer line from the cytoplasmic male sterile (CMS) line , restorer line and F₁ respectively . Some characteristic bands between CMS line and its maintainer line were also observed in other primer pairs , and these would be valuable for identification and utilization of cytoplasmic non pollen CMS in Yunnan purple rice as well as for further study on mechanism of CMS in hybrid rice .

Key words : cytoplasmic male sterile line ; cytoplasmic non pollen type male sterility ; purple rice ; amplified fragment polymorphism ; fingerprinting ; hybrid rice

摘 要 : 利用 AFLP 分子标记对云南紫稻细胞质无花粉水稻三系及杂种 F₁ 进行了指纹图谱的构建与比较分析。从 14 对引物中筛选出 8 对具有明显多态性的引物。天香 018 (天香 A × 珞恢 018) 材料组 (不育系、保持系、恢复系及杂种 F₁) 共扩增出 179 条带 , 其中有 52 条多态性谱带 , 占总带数的 29 . 05 % , 平均每对引物可以扩增出 6 . 50 条多态性谱带 ; 天香 806 (天香 A × 珞恢 806) 材料组 (不育系、保持系、恢复系及杂种 F₁) 共扩增出 177 条带 , 其中有 50 条差异带 , 占总带数的 28 . 25 % , 平均每对引物可以扩增出 6 . 25 条多态性谱带。特别明显的是在引物对 E - ATG / M - CAC 的扩增中 , 在 AFLP 指纹图谱中出现两条特征带 (a 带和 b 带) , 为保持系所特有 , 能够明显区别于不育系、恢复系和 F₁。在另外一些引物对中也观察到不育系与保持系之间的差异带。

关键词 : 细胞质雄性不育系 ; 细胞质无花粉型雄性不育 ; 紫稻 ; 扩增片段长度多态性 ; 指纹图谱 ; 杂交水稻

中图分类号 : Q943 ; S511 . 03 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-7216 (2007) 04-0345-05

雄性不育是植物杂种优势利用中重要的一环。几十年来我国培育的不同细胞质源的水稻雄性不育类型达 60 多种 , 但在生产上应用的主要有野败型 (WA)、红莲型 (HL)、滇型 (DT)、K 型、包台型 (BT)、印尼水田谷型 (ID)、矮败型 (DA)、D 型、冈型 (G) 以及马协型 (MA) 等不同胞质不育系类型。其中杂交籼稻以野败型和印尼水田谷型为主 , 红莲型少有应用 , 杂交粳稻以 BT 型为主^[1]。显然 , 我国杂交水稻细胞质比较单一 , 组合类型少 , 这样长期下去会造成品质偏劣、抗性减退、优势变弱 , 具有爆发病害的潜在危险^[2]。发掘、创新和开拓利用新的不育种质资源 , 既是克服杂交水稻胞质单一性和种质

片面化的关键所在 , 也是增加水稻胞质遗传多样性以适应我国水稻生产的迫切需要。

经过近 10 年的努力 , 我们获得了云南紫稻细胞质无花粉雄性不育细胞质 , 在已育成新组合的基础上 , 进一步开展广泛配组和生产应用。利用云南紫稻细胞质无花粉不育系的细胞质转育出具该细胞质无花粉特性的、优良的系列不育系 , 并与超级稻恢复系等配组 , 筛选出适用于生产的实用性强的优

收稿日期 : 2006-12-05 ; 修改稿收到日期 : 2007-03-23。
基金项目 : 国家自然科学基金资助项目 (30571143) ; 湖北省科技攻关项目 (2006AA201C04)。
第一作者简介 : 胡 侃 (1982 -) , 男 , 博士研究生 ; 余夏夏 (1985 -) , 女 , 本科生。

势杂交稻优良组合。为了保持不育系的纯度和组合的真实性,有必要建立各组合的特征性的 DNA 分子指纹图谱,以区别真伪。AFLP 技术结合了 RFLP 和 RAPD 两项技术的优点,多态性高、重复性好、结果可靠^[3]。鉴于 AFLP 技术以上的特点,可以将它应用于对云南紫稻细胞质无花粉水稻雄性不育系、保持系、恢复系以及杂种 F₁ 分析,建立起相应的 AFLP 指纹图谱,以利于杂交水稻的生产实践。特别是在不育系和保持系中指纹图谱之间的差异带,对雄性不育的机理探讨也具有重要的作用。因此,利用 AFLP 分子标记区别不育系和保持系及其杂种,具有一定的理论和实践意义。以下是我们对云南紫稻细胞质无花粉型三系及杂种 F₁ 的 AFLP 指纹图谱的构建与分析的初步报道。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

供试水稻材料为云南紫稻细胞质型,包括杂种 F₁ 天香 018(天香 A × 珞恢 018)和天香 806(天香 A × 珞恢 806),不育系天香 A,保持系天香 B,恢复系珞恢 018 和珞恢 806(编号见表 1)。以上所有供试材料和组合均由本实验小组选配育成。不育系天香 A 细胞质来源于云南紫稻无花粉细胞质质源。

表 1 实验材料的编号及组合类型

Table 1 . The numbering and combination types of the experimental materials in the study .

编号 Number	材料名称 Material name	特性 Trait
1	天香 018(天香 A × 珞恢 018) Tianxiang 018(Tianxiang A × Luohui 018)	F ₁
2	天香 806(天香 A × 珞恢 806) Tianxiang 806(Tianxiang A × Luohui 806)	F ₁
3	天香 A Tianxiang A	不育系 Sterile line
4	天香 B Tianxiang B	保持系 Maintainer line
5	珞恢 018 Luohui 018	天香 018 的恢复系 Restorer line of Tianxiang 018
6	珞恢 806 Luohui 806	天香 806 的恢复系 Restorer line of Tianxiang 806

表 2 接头序列和引物序列

Table 2 . Adapter sequences and primer sequences in the study .

接头序列 Adapter sequence	<i>Eco</i> R :	<i>Mse</i> :
	5- CTCGTAGACTGCGTACG 3	5- GACGATGAGTCCTGAG 3
	3- CATCTGACGCATGGTTAA 5	3- TACTCAGGACTCAT 5
引物序列 Primer sequence	<i>Eco</i> R - primer + 1	5- GACTGCGTACCAATTCA 3
	<i>Eco</i> R - primers + 3	5- GACTGCGTACCAATTCA ^{NN} 3
	<i>Mse</i> - primer + 1	5- GATGAGTCCTGAGT AAG 3
	<i>Mse</i> - primers + 3	5- GATGAGTCCTGAGT AAC ^{NN} 3

注：“+ 1”为加 1 个选择性碱基；“+ 3”为加 3 个选择性碱基。
Note：“+ 1”，Add one selective base；“+ 3”，Add three selective bases .

1999 年春季在海南用“保持系 × 保持系”的方法,即用马协 B/绵香 B,从 F₂ 起用系谱法选择抗性、品质、粒型等综合性状符合育种目标的单株,与云南紫稻无花粉细胞质不育系紫稻 A 成对测交,经 4 年 10 代连续择株回交,于 2003 年育成育性稳定、农艺性状一致的云南紫稻无花粉细胞质雄性不育系天香 A(原名天香 2A),并于 2005 年通过湖北省科学技术厅组织的科学技术成果鉴定。目前利用天香 A 配组选育的一批组合,已经开始应用于生产或正在参加区域试验。杂交晚稻天香 17 已通过 2005 年、2006 年湖南省晚稻区域试验;天香 018 于 2006 年参加了重庆市区域试验,在国外参加了孟加拉国和越南的国家区域试验。天香 806 已申报 2007 年广西区域试验。

1.2 基因组 DNA 的提取

基因组 DNA 的提取参照楼巧君等的简化方法^[4]。

1.3 AFLP 分析

1.3.1 基因组双酶切及与接头相连接

所用酶组合为 *Eco*R / *Mse* (购自 NEB 公司),双酶切,在 37 ℃ 下温育混合物 3 h,然后 65 ℃ 下温育 3 h。所用接头和引物见表 2(引物和接头序列均由上海申能博彩公司合成)。

在 20℃ 下连接过夜 (连接酶为 T₄ DNA 连接酶,购自 NEB 公司)。

1.3.2 预扩增

预扩增条件为 :94℃ 下 2 min ;然后 94℃ 下 30 s ,56℃ 下 60 s ,72℃ 下 60 s ,共 24 个循环 ;最后 72℃ 下延伸 5 min。

1.3.3 选择性扩增

选择性扩增条件为 :94℃ 下 2 min ,接着 94℃ 下 30 s ,65℃ 下 30 s ,每个循环递减 0.7℃ ,72℃ 下 60 s ,共 13 个循环 ;94℃ 下 30 s ,56℃ 下 60 s ,72℃ 下 60 s ,共 23 个循环 ;最后 72℃ 下 5 min。

1.3.4 凝胶电泳与银染

采用 6% 聚丙烯酰胺变性凝胶电泳 ,恒功率 65 W ,电泳 3 h。电泳结束后 ,固定 ,水洗 ,用 1% 硝酸银银染。

1.4 AFLP 数据分析

从 14 对 AFLP 引物中筛选出 8 对具有多态性的引物组合 ,对云南紫稻细胞质无花粉水稻雄性不育系、保持系、恢复系以及杂种 F₁ 进行了 AFLP 分析。银染显色后 ,有带记为 1 ,无带记为 0。根据银染电泳图谱的比较来判断各供试材料的特征带型。实验重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 AFLP 分析的结果

从所用的 14 个引物组合 (E- AAC/M- CAC、E- AAC/M- CGA、E- AAC/M- CAT、E- ATG/M- CAC、

E- ATG/M- CGA、E- ATG/M- CAT、E- AGA/M- CAC、E- ACA/M- CAC、E- ACA/M- CAG、E- ACA/M- CAT、E- ACA/M- CTG、E- AGA/M- CAG、E- AGA/M- CAT、E- AGA/M- CTG) 中 ,筛选谱带清晰、多态性较丰富的 8 个引物组合 (表 3) ,进行数据分析。将供试材料分成两个组合 :组合 1 为杂种 F₁ 天香 018、恢复系珞恢 018、不育系天香 A 和保持系天香 B ;组合 2 为杂种 F₁ 天香 806、珞恢 806、天香 A 和天香 B。

从表 3 可知 8 对引物对两组材料进行多态性扩增的情况。在两组材料中 ,第 1 组共扩增出 179 条带 ,其中有 52 条多态性谱带即差异带 ,占总带数的 29.05% ,平均每对引物可以扩增出 6.50 条多态性带 ;第 2 组共扩增出 177 条带 ,其中有 50 条差异带 ,占总带数的 28.25% ,平均每对引物可以扩增出 6.25 条多态性带。8 对引物综合起来比较可见 ,两组材料的三系及杂种 F₁ 的带型虽各不相同 ,但这两个组合的 AFLP 多态性百分率相差不大。说明所筛选出的 8 对引物对供试材料进行 AFLP 分析 ,能够将供试材料三系和杂种 F₁ 有效地区别开来 ,而且该方法用于三系及杂种 F₁ 的鉴别是有效而稳定的。可见 AFLP 技术对于鉴定三系杂交水稻是行之有效的分子标记技术之一。

2.2 云南紫稻细胞质无花粉水稻雄性不育系天香 A 和保持系天香 B 的特征带

如图 1- A 所示 ,用引物对 E- ATG/M- CAC 对天香 B 进行扩增 ,出现两条特征电泳带 ,第 1 条大

表 3 8 对引物扩增所得到的组合 1 和组合 2 的多态性

Table 3 . Polymorphisms of combination 1 and combination 2 obtained by the amplification with eight primer pairs .

引物对 Primer pair	总扩增谱带数		多态性谱带数		共同谱带数		多态性百分率	
	No . of total bands		No . of polymorphic bands		No . of shared bands		Polymorphic percentage/%	
	组合 1	组合 2	组合 1	组合 2	组合 1	组合 2	组合 1	组合 2
	Combination 1	Combination 2	Combination 1	Combination 2	Combination 1	Combination 2	Combination 1	Combination 2
E- AAC/M- CAC	19	18	5	4	14	14	26.32	22.22
E- AAC/M- CGA	16	16	5	5	11	11	31.25	31.25
E- ATG/M- CAC	24	23	9	5	15	18	37.50	21.74
E- ATG/M- CAT	30	30	7	6	23	24	23.33	20.00
E- ACA/M- CAC	24	25	4	7	20	18	16.70	28.00
E- ACA/M- CAT	24	24	6	8	18	16	25.00	33.33
E- ACA/M- CTG	21	20	11	9	10	11	52.38	45.00
E- AGA/M- CTG	21	21	5	6	16	15	23.81	28.57
总体 Total	179	177	52	50	127	127		
平均 Average	23.38	22.13	6.50	6.25	15.88	15.88	29.05	28.25

注 :组合 1 为天香 018 杂种 F₁、恢复系珞恢 018、不育系天香 A 和保持系天香 B ;组合 2 为天香 806 杂种 F₁、恢复系珞恢 806、不育系天香 A 和保持系天香 B。

Note : Combination 1 includes F₁ (Tianxiang A × Luohui 018) , restorer line Luohui 018 , cytoplasmic male sterile line Tianxiang A and maintainer line Tianxiang B ; Combination 2 includes F₁ (Tianxiang A × Luohui 806) , restorer line Luohui 806 , cytoplasmic male sterile line Tianxiang A and maintainer line Tianxiang B .

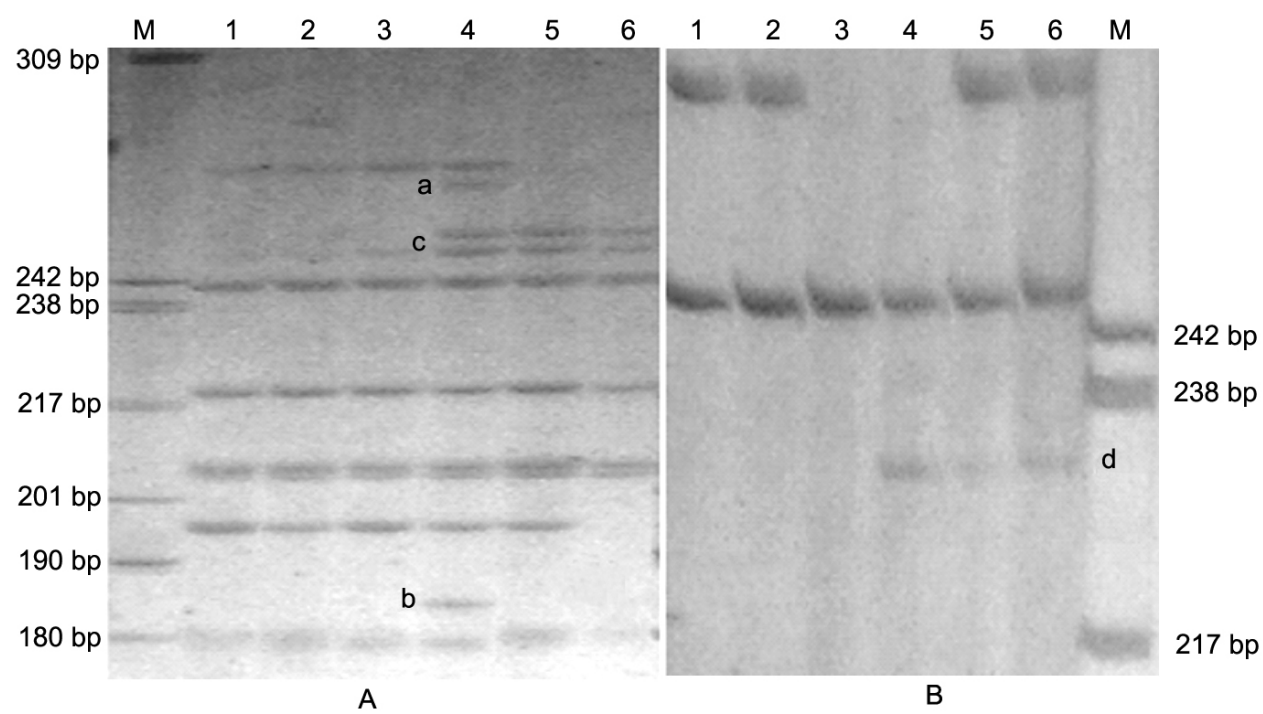


图 1 引物对 E-ATG/M-CAC(A)和 E-AAC/M-CAC(B)的部分 AFLP 结果
Fig.1 . Part of AFLP results by primer pairs E-ATG/M-CAC(A) and E-AAC/M-CAC(B) .
M - Marker ; 1 - 天香 018 ; 2 - 天香 806 ; 3 - 天香 A ; 4 - 天香 B ; 5 - 珞恢 018 ; 6 - 珞恢 806 .
M , Marker ; 1 , Tianxiang 018 ; 2 , Tianxiang 806 ; 3 , Tianxiang A ; 4 ,Tianxiang B ; 5 , Luohui 018 ; 6 , Luohui 806 .

约在 270 bp 处出现 ,将它称为 a 带 ;第 2 条大约在 185 bp 处出现 ,称为 b 带。这两条带在天香 A、珞恢 108 和珞恢 806 及杂种 F₁ 中均缺乏 ,这可能是云南紫稻细胞质型的保持系区别不育系、恢复系及其杂种 F₁ 的一个重要标记。在大约 240 bp 处的 c 带 ,是保持系和两个恢复系区别于不育系和杂种 F₁ 的差异带。同时这 3 处的条带也是保持系与不育系的差异带 ,在对保持系和不育系的研究中 ,能够较容易地进行鉴别。

利用引物对 E-AAC/M-CAC 对两个组合 6 个材料进行扩增 ,出现大小约 230 bp 的特征带型 d(图 1-B)。该带在天香 B 和恢复系珞恢 018、珞恢 806 中存在 ,而在天香 A 和天香 018、天香 806 中不存在 ,可能与育性相关。前面提到的 c 带与 d 带情况类似 ,只是 c 带在不育系和杂种 F₁ 中也有非常模糊的对应带。

3 讨论

云南紫稻细胞质无花粉水稻雄性不育系的细胞质是一种新型的细胞质类型^[5] ,对由它选配得到的两个组合材料进行了 AFLP 分析 ,证明利用 AFLP 分子标记来鉴别它们是十分稳定而有效的。在利用引物 E-ATG/M-CAC 对两种组合 6 种供试材料的扩增中发现了 a 带和 b 带 ,它们是云南紫稻的保持系所特有的。鉴于水稻细胞质雄性不育系是核质互作的产物 ,而保持系就是在选育不育系时作为多次

回交父本的水稻品种 ,一般认为 ,经过多次回交 ,不育系和保持系已具有了相同的核基因组 ,它们遗传背景上的差异在于具有不同的细胞质基因组^[6]。根据目前广为接受的二型学说中的核质互作雄性不育 ,与育性相关的基因中 ,保持系的细胞质基因型应为可育的 N ,与恢复系相同 ,而其核基因型应为纯合隐型 *rfrf* ,与不育系核基因相同。本实验中 a、b 两条带在保持系中出现而在不育系中缺乏 ,说明 a、b 两条带很可能与细胞质基因组相关 ,又由于 a、b 带在恢复系中也缺乏 ,推测它们应该跟育性基因无关 ,因为保持系、恢复系细胞质中与育性相关的基因相同。即使是 a、b 带出现在核基因中 ,那么它们也与恢复基因无关 ,因为核基因中 ,保持系和不育系同为 *rfrf*。d 带出现在保持系和两个恢复系中 ,而在不育系和两个杂种 F₁ 中均未出现 ,根据保持系的细胞质基因型与恢复系相同为可育的 N ,而不育系的细胞质基因型与杂种 F₁ 相同为不育的 S ,并且保持系与不育系的核基因型相同而细胞质基因型不同 ,这条带正好符合以上特点。因此 ,d 带有可能是在细胞质中与育性基因密切相关的带。而如果 d 带是在核基因中 ,由于恢复系与其对应的 F₁ 杂种亲缘关系极近 ,表现出这种带型的几率非常小。因此利用 AFLP 标记可以有效地将保持系和恢复系及其 F₁ 杂种区别开 ,而且通过对两个组合甚至更多组合的分析 ,利用 AFLP 标记寻找细胞质中雄性不育相关基因的可能性就大大提高。这样就能相对简

便地预测不育系和保持系中的差异带是否跟雄性不育相关,也就是将三系与杂种 F₁ 作为一个组合同时做 AFLP 分析,得到的保持系与不育系的差异带如果符合保持系中有的带在恢复系中也有而在不育系和杂种 F₁ 中没有,或者不育系中有的带在杂种中也有而在保持系和恢复系中没有的条件,那么这条带则很可能涉及到育性,而且做的组合数增多也将能增加筛选的精确性。当然,这还仅仅是一种推测,要证实这一点还需作进一步的研究。

在本实验中,用 8 对引物扩增得到不育系与保持系的差异带共 18 条,其中有 7 条符合上述情况。按照上述带的判断标准,差异带可能与育性相关的仅占 1/3 多,还有接近 2/3 的差异带很可能与育性不相关。这些差异带可能涉及到线粒体 DNA,目前已有很多研究表明线粒体基因组分子重排导致植物雄性不育。在水稻中最具代表性的是 Kadowaki 等^[7]对 BT 型的研究发现不育系相对于保持系的线粒体中 *atp6* 基因发生了重排,而利用分子标记来寻找与育性相关的差异带目前还在进行中。Ichii 等^[8]利用 RAPD 技术在水稻几组不育系和保持系中同时找到了一条 1600 bp 的差异带就很可能与育性相关。另外差异带甚至可能涉及到叶绿体 DNA,因为与育性相关的叶绿体 DNA 的差异带也有报道,何光华等^[9]利用 AFLP 发现不育系与保持系中叶绿体 DNA 的差异带,发现是 *leu tRNA* 基因转录起始点前一段 6 bp 序列。利用分子标记进行不育相关基因的定位也有报道,Liu 等^[10]和 Huang 等^[11]用 RAPD 技术为两个红莲型恢复基因位点做了较为精确的定位,并且还用 RFLP 分析了目前生产上应用的 9 种细胞质型的雄性不育,发现不育系与保持系主要在 *atp6* 和 *cob* 基因上发生 DNA 重排,进一步证实了雄性不育与线粒体内基因重排有密切联系。因此,利用分子标记的方法来研究雄性不育机理仍有较为广阔的前景。

一种新的细胞质类型的发现不仅增添了育种资源的选择性和多样性,因为生产上要求有尽量多的细胞质类型,有时单一细胞质类型对于杂交育种甚至是高风险性的^[12],而且新的细胞质类型对于雄性不育方面的研究工作也有很多贡献,很可能导致新的发现。Nahm 等^[13]在萝卜中发现了一种新型的细胞质雄性不育 NWB CMS,通过大量实验发现与

以往的雄性不育类型如 ogrua CMS 等有很大区别,而且 NWB CMS 在不育性方面表现出很高效率,研究结果反过来也可以对育种实践有很大的指导作用。因此,我们还将进一步对云南紫稻细胞质无花粉水稻雄性不育系的细胞质开展深入的研究和分析,搞清其不育的分子机制,为其开发和利用奠定基础。

参考文献：

[1] 汤述翥,张亚平,孙红芹,等.水稻同核异质广亲和不育系细胞质效应的研究.作物学报,2003,29(2):202-207.

[2] 胡兴明,钱 前.现阶段中国水稻种质创新的研究策略和应用思考.植物遗传资源学报,2004,5(2):193-196.

[3] 尹伶明,黄敏仁.AFLP 分子标记及其在植物育种上的应用.生物工程进展,1997,17(1):6-11.

[4] 楼巧君,陈 亮,罗利军.三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较.分子植物育种,2005,3(5):749-752.

[5] 余金洪,丁 毅,彭晓玲.水稻无花粉细胞质雄性不育系的选育方法:中国.ZL99120003.9.2002.

[6] 刘 俊,朱英国.水稻细胞质雄性不育的分子机制研究.武汉大学学报:自然科学版,1998,44(4):461-464.

[7] Kadowaki K, Suzuki T, Kazama S. A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male sterility of rice. *Mol Gen Genet*, 1990, 224: 10-16.

[8] Ichii M, Hong D L, Ohara Y, et al. Characterization of CMS and maintainer lines in indica rice (*Oryza sativa* L.) based on RAPD marker analysis. *Euphytica*, 2003, 129: 249-252.

[9] He G H, Hou L, Xiao Y H, et al. A common sequence difference between cytoplasmic male sterile lines and their maintainer lines existing in rice (*Oryza sativa* L.) chloroplast *tRNA^{Leu}* gene region. *Euphytica*, 2003, 131: 269-274.

[10] Liu X Q, Xu X, Tan Y P, et al. Inheritance and molecular mapping of two fertility restoring loci for Honglian gametophytic cytoplasmic male sterility in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 2004, 271: 586-594.

[11] Huang W, Wang L, Yi P, et al. RFLP analysis for mitochondrial genome of CMS rice. *Acta Genet Sin*, 2006, 33(4): 330-338.

[12] Ullstrup A J. The impacts of the southern corn leaf blight epidemics of 1970-1971. *Annu Rev Phytopathol*, 1972, 10: 37-50.

[13] Nahm S H, Lee H J, Lee S W, et al. Development of a molecular marker specific to a novel CMS line in radish (*Raphanus sativus* L.). *Theor Appl Genet*, 2005: 111(6): 1191-1200.