

我国中籼杂交稻亲本的DNA 变异性研究^X

何光华^{1, 2, 33} 裴炎^{1, 333} 杨光伟¹ 谢戎²

(¹西南农业大学生物技术中心, 重庆 北碚, 400716; ²四川省农业科学院水稻高粱研究所, 四川 泸州, 646100)

提 要 利用9个随机引物对42个中籼“三系”杂交稻骨干亲本(保持系和恢复系)进行了DNA 遗传差异分析。结果表明: 恢复系、保持系遗传多样性小, 恢保间遗传一致性高达0.87, 遗传距离则为0.1377。保持系已选育出较多的材料遗传差异超过了珍汕97B, 而恢复系选育仍未突破明恢63, 杂交稻遗传差异未明显大于汕优63。双亲遗传差异小可能是产量徘徊的重要原因之一, 限制因素在于恢复系。增加亲本遗传多样性和增大双亲遗传差异是当前中籼“三系”杂交稻育种的重要任务之一, 开展亚种间杂种优势利用有着重要意义。

关键词 杂交水稻; 骨干亲本; RAPD; 遗传差异

DNA Variance of Parental Lines for Semilate Indica Hybrid Rice in China

HE Guanghua^{1, 2} PEI Yan¹ YANG Guangwei¹ XIE Rong²

(¹Center of Biotechnology, Southwest Agricultural University, Chongqing 400716; ²Rice and Sorghum Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Sciences, Sichuan Luzhou, 646100)

Abstract RAPD analysis for genetic diversity was conducted on 42 backbone parental lines in *Indica* hybrid rice breeding with 9 primers selected from 250 random primers. The results indicated that the genetic diversity in maintainer and restoring lines was small. The genetic similarity between them was up to 87 percent, and the genetic distance was 0.1377. In general, new maintainer lines were more different from Zhenshan 97 B compared with the new restoring lines which did not show obvious discrimination to Minghui 63. The limited genetic difference between parental lines, especially in restoring lines, was an important reason for the stagnant yield in cytoplasmic male sterility hybrid rice. Therefore expanding the genetic diversity and difference among parental materials was a key task in the present “three lines” cytoplasmic male sterility *Indica* hybrid rice breeding and the utilization of heterosis between subspecies was an urgent need.

Key words Hybrid rice; Backbone parental; RAPD; Genetic difference

分子标记技术的出现和发展为揭示遗传差异提供了新的方法和手段, 利用分子标记技术对水稻种质资源的遗传多样性进行评价已开展了较多的研究^[1-7], 也取得了良好的效果, 而我国已选育出了一大批保持系和恢复系, 它们的遗传多样性如何? 恢保间遗传差异怎样? 中籼杂交稻育种徘徊的原因是否与双亲遗传差异小有关等? 目前尚未见报道, 带着这些问题,

X 四川省应用基础项目、四川省生物技术重点项目资助

33 现在西南农业大学攻读博士学位; 333 通讯联系人。 Author for correspondence

收稿日期: 1998210229, 接受日期: 1999206213

我们开展了本项研究,以期从DNA水平上分析目前的育种局面,进而为超高产育种提供一点依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

在生产上和育种上大面积使用或新选育的骨干保持系16个、常规稻2个、光(温)敏核不育系2个、恢复系22个(表1)。

表1 供试材料一览表
Table 1 Materials studied

保持系 Maintainer lines			恢复系 Restoring lines		
编号 No.	名称	Name	编号 No.	名称	Name
1	青四矮	Qingsiai	22	J413	
2	辐74B	Fu74B	23	密阳46	Miyang46
3	马协B	MaxieB	24	130	
4	K19B		25	725	
5	D汕B	DShanB	26	838	
6	K青B	KqingB	27	R24	
7	°232B		28	早恢402	Zaohui 402
8	珍汕97B	Zhenshan 97B	29	测64	Ce 64
9	金23B	Jin 23B	30	矮脚南特	Aijiaonante
10	早显B	Zaoxian B	31	多恢57	Duohui 57
11	D297B		32	149	
12	朝阳1号	Chaoyang 1	33	802	
13	K17B		34	明恢63	Minghui 63
14	110B		35	CDR22	
15	冈46B	Gang 46B	36	沪恢6号	Luhui 6
16	优1B	You 1B	37	多系1号	Duoxi 1
17	红B	Hong B	38	6078	
18	枝B	Zhi B	39	缙恢1号	Jinhui 1
19	1103S		40	N45	
20	沪光2S	Luguang 2S	41	沪恢17	Luhui 17
21	绵恢501	Mianhui 501	42	R36	

1.2 DNA提取与RAPD分析

DNA提取:每个材料剪取幼嫩叶片提取总DNA,按文献[8]所介绍的方法进行。

RAPD分析:扩增反应总体积为25 μL,其中含dATP、dCTP、dGTP、dTTP各200 μmol/L;随机引物15 ng;10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.3, 50 mmol/L KCl, 2.0 mmol/L MgCl₂, 0.01% 明胶;模板DNA约20~50 ng;DNA聚合酶IU;用无菌纯水补充至总体积25 μL。扩增仪为Perkin Elmer Gene Amp PCR System 2400, dNTP和DNA聚合酶购自Promega公司,引物购自Operon公司。扩增产物10 μL在含EB的1.4%琼脂糖胶中电泳,紫外灯下拍照记录。

1.3 数据处理

按照照片上各材料各引物扩增情况作记录,有带记为1,无带记为0,以此为基础进行以下分析:

多态性频率:单个引物一对品种所有带型完全一致,记为无多态性,如果一对品种至少在一个片段上有差异,则记为多态性^[3]。多态性频率=多态性品种对数/总品种对数。

群体杂合性^[9]: 分别对保持系和恢复系计算群体内杂合性, $H_e = 1 - \sum X_i^2 / M$, 其中 X_i 是第 i 等位基因的频率, M 为品种数。

遗传一致性^[9]: $I = 2X_i Y_i / (2X_i^2 + 2Y_i^2)^{1/2}$, 其中 X_i 、 Y_i 是保持系群体和恢复系群体中第 i 等位基因的频率。

遗传距离^[9]: $D = -\ln I$

遗传分类: 按 Nei^[9] 的方法计算品种间的相似系数 (GS): $GS = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_{ij} 表示两品种共同拥有的带数, N_i 、 N_j 分别表示各自所扩增出的带数, 遗传差异 $GD = 1 - GS$, 利用 GD 按 UPGMA 法进行遗传分类。

2 结果与分析

2.1 亲本间的多态性

首先以1个恢复系和1个保持系为模板对250个 Operon 公司的102mer 引物进行筛选, 从中选出了9个扩增稳定、多态性丰富的引物再对所有供试材料进行扩增。9个引物在42个亲本品种间共扩增出了97条带, 其中有多态性片段78条, 多态性位点比例为0.8041。从各引物的多态性频率看, 除OPJ10和OPJ9为80%以外, 其余均大于90%, 其中OPA12达到97.44%。分割恢、保多态性频率表明, 恢、保间不同引物存在一定差异, 但多数也在90%以上(表2), 说明所筛选的9个引物完全可以用于本试验(图1)。

表2 供试引物的多态性频率

Table 2 Polymorphism frequency of the primers studied

引物 Primers	扩增片段总数 Total No. of amplified fragments	多态性片段数 No. of polymorphic fragments	多态性频率 Frequency of polymorphism		
			恢复系 Restoring lines	保持系 Maintainer lines	总群体 Whole group
OPA12	12	11	98.27	93.68	97.44
OPA20	14	12	92.64	95.26	96.98
OPE1	13	11	97.84	96.84	98.72
OPE9	8	7	93.51	91.05	94.89
OPE15	10	6	97.40	81.05	92.92
OPG17	10	9	97.40	84.21	93.38
OPJ9	9	6	91.77	54.21	81.77
OPJ10	9	6	52.81	77.37	82.35
OPY16	12	10	96.54	92.11	95.59

2.2 恢复系和保持系的群体内杂合性

由于青四矮和朝阳1号为早籼品种, 也是保持系选育的亲本源, 1103S 和泸光2S 为光(温)敏核不育系, 因此我们将这4个品种按保持系进行分析。根据基因频率分别计算出保持系的群体杂合性为0.5578, 恢复系的群体杂合性为0.4786, 说明保持系的群体多样性比恢复系丰富。

2.3 遗传一致性和遗传距离

恢复系与保持系间的遗传一致性为0.8714, 遗传距离为0.1377, 表明恢复系与保持系间的遗传一致性较高, 遗传距离较小, 这可能是中籼杂交稻产量徘徊的重要原因之一。

2.4 保持系与恢复系的遗传分类

利用RAPD扩增出的遗传差异, 按UPGMA法将42个亲本材料进行了归类, 结果如

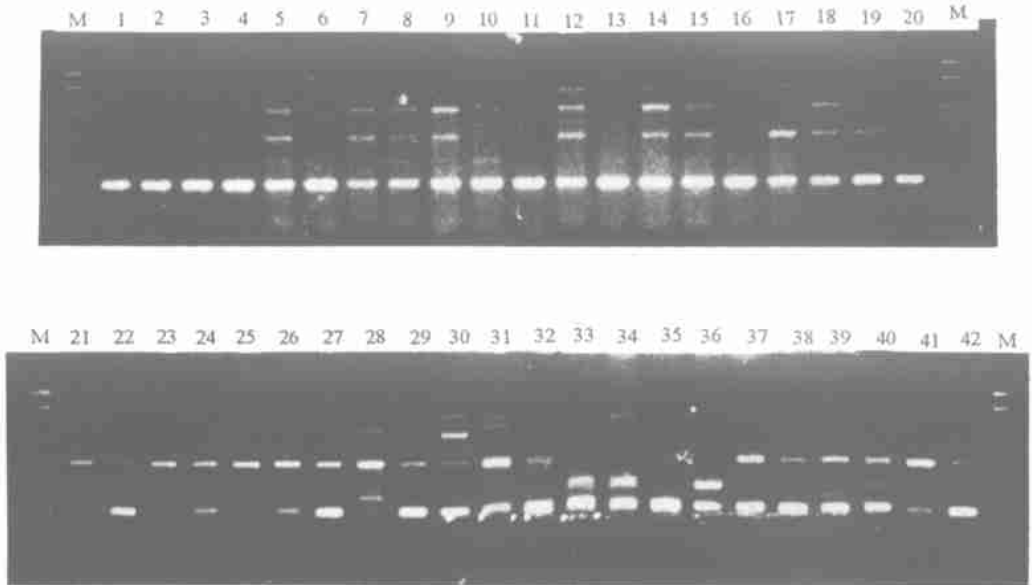


图1 利用引物OPG17对42个水稻基因型 PCR 扩增的琼脂糖凝胶电泳结果
点样孔1~ 42为表1中的基因型, M: 分子量标记

Fig 1 Ethidium bromide stained amplification products from genomic DNAs of 42 rice genotypes using primer OPG17, separated on 1.4% agarose gel

Lane 1 Lane 42 correspond to the genotype number listed in Table 1. M: Marker

图2。从图2可以看出: 1. 选用的9个引物能明显区分出42个亲本的遗传差异和差异大小; 2. 42个亲本可明显地分为2类, 20个保持系和22个恢复系各自归为一类, 说明了杂交稻具有杂种优势的原因; 3. 20个保持系间、22个恢复系间的遗传差异小, 反应了遗传基础的匮乏性; 4. 除泸恢6号外, 其余恢复系与保持系间的遗传差异没有超过明恢63与保持系间的遗传差异, 这一方面说明了明恢63的广泛适应性, 另一方面也说明了目前的恢复系育种并未明显超过明恢63, 可能是导致杂交稻产量水平难以上新台阶的重要原因之一。

2.5 保持系、恢复系的平均遗传差异性

表3列出了20个保持系与22个恢复系、22个恢复系与20个保持系间的平均遗传差异。表3表明, 在恢复系中, 除泸恢6号极显著大于明恢63、802与明恢63无显著差异外, 其余恢复系均极显著低于明恢63, 说明恢复系选育进展缓慢。从保持系来看, 青四矮、K19B、K青B、°232B、金23B、早显B、朝阳1号、K17B、110B、冈46B、优B、1103S、泸光2S显著或极显著超过了珍汕97B, 其余保持系与珍汕97B相当, 可喜的是生产上和育种上大量使用的°232B、K17B、冈46B、优B(特别是具有高制种产量的K17B和°232B)等优于珍汕97B, 两个光(温)敏不育系的遗传差异也大于珍汕97B, 这说明保持系的改良明显优于恢复系, 限制杂交稻产量的原因与恢复系有关。

2.6 恢×保遗传差异超过汕优63的组合分析

去掉1、14、19、20号常规稻和光(温)敏不育系, 根据16个保持系与22个恢复系构成352个可能的“杂交”组合, 从中筛选出遗传差异大于汕优63的组合, 列于表4。结果表明, 114个组合超过了汕优63, 仅占总组合的32.39%, 而且大多数组合遗传差异处于汕优63至0.35

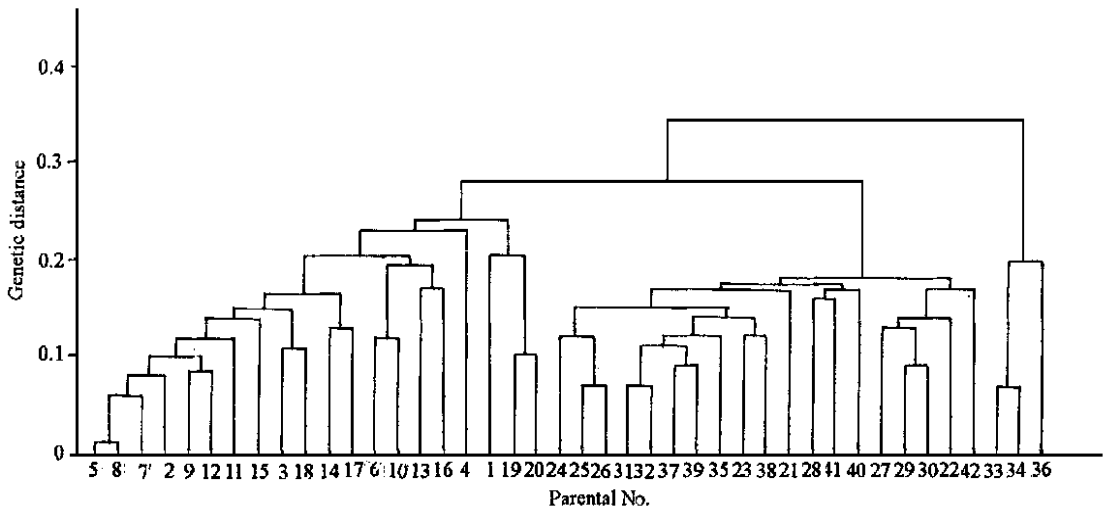


图2 42个水稻基因型按RAPD 标记遗传距离聚类图

Fig 2 Dendrogram of 42 rice genotypes constructed from RAPD-based genetic distance

表3 保持系、恢复系的平均遗传差异

Table 3 Average genetic difference in both maintainer and restoring lines

保持系 Maintainer lines			恢复系 Restoring lines		
亲本代号 Parental No.	平均遗传差异 Average genetic difference	与珍汕97B 的 差异显著性 Compared with Zhenshan 97B	亲本代号 Parental No.	平均遗传差异 Average genetic difference	与明恢63的 差异显著性 Compared with Minghui 63
1	0.3336 ± 0.0435	6.0952 ^{3,3}	22	0.2490 ± 0.0465	- 8.2645 ^{3,3}
2	0.2713 ± 0.0601	1.5320	23	0.2636 ± 0.0409	- 7.7227 ^{3,3}
3	0.2654 ± 0.0490	1.3168	24	0.2918 ± 0.0275	- 6.5076 ^{3,3}
4	0.3276 ± 0.0316	6.3262 ^{3,3}	25	0.3032 ± 0.0346	- 4.8327 ^{3,3}
5	0.2496 ± 0.0491	0.2814	26	0.2846 ± 0.0308	- 6.9043 ^{3,3}
6	0.3293 ± 0.0383	6.0855 ^{3,3}	27	0.2985 ± 0.0358	- 5.1721 ^{3,3}
7	0.2820 ± 0.0376	2.6758 ³	28	0.3012 ± 0.0415	- 4.5411 ^{3,3}
8	0.2453 ± 0.0522		29	0.2901 ± 0.0424	- 5.3915 ^{3,3}
9	0.2781 ± 0.0498	2.1325 ³	30	0.2594 ± 0.0484	- 7.2683 ^{3,3}
10	0.3022 ± 0.0242	4.6385 ^{3,3}	31	0.2811 ± 0.0401	- 6.3322 ^{3,3}
11	0.2650 ± 0.0644	1.1146	32	0.2840 ± 0.0315	- 6.8924 ^{3,3}
12	0.3148 ± 0.0439	4.7794 ^{3,3}	33	0.3544 ± 0.0367	- 0.1421
13	0.2934 ± 0.0463	3.2334 ^{3,3}	34	0.3560 ± 0.0345	
14	0.3265 ± 0.0653	4.5558 ^{3,3}	35	0.2842 ± 0.0285	- 7.1755 ^{3,3}
15	0.2820 ± 0.0487	2.4251 ³	36	0.4417 ± 0.0407	7.1833 ^{3,3}
16	0.3423 ± 0.0395	6.9503 ^{3,3}	37	0.2820 ± 0.0433	- 5.9775 ^{3,3}
17	0.2546 ± 0.0808	0.4535	38	0.3136 ± 0.0382	- 3.4666 ^{3,3}
18	0.2559 ± 0.0612	0.6181	39	0.2477 ± 0.0492	- 8.0600 ^{3,3}
19	0.2956 ± 0.0609	2.9414 ^{3,3}	40	0.2764 ± 0.0404	- 6.7007 ^{3,3}
20	0.3247 ± 0.0443	5.4396 ^{3,3}	41	0.2685 ± 0.0352	- 7.9393 ^{3,3}
21	0.2426 ± 0.0431	- 9.1861 ^{3,3}	42	0.2468 ± 0.0548	- 7.7428 ^{3,3}

3、3 3 : 表示差异达5%、1% 水平

Note: 3, 3 3 : Level of the difference by 5% and 1% respectively

之间, 占据了20.74%, 只有15个组合遗传差异大于0.4, 占总组合的4%。进一步分析表明这15个组合都是用泸恢6号“配制”的组合, 因此可以认为绝大多数组合遗传差异未明显大于汕优63。

表4 恢×保遗传差异超过汕优63的组合统计
Table 4 The genetic difference of restorer × maintainer beyond Shanyou 63

遗传差异(GD)	组合数 No. of combinations	占总组合的比例 Ratio (%)
Shanyou 63 < GD	114	32.39
Shanyou 63 < GD < 0.35	73	20.74
0.35 < GD < 0.40	26	7.39
0.40 < GD < 0.45	9	2.56
0.45 < GD	6	1.70

3 讨论

3.1 恢复系、保持系遗传基础匮乏

保持系、恢复系育种实际上是材料育种,而许多育种者将其作为品种选育对待,追求的农艺性状目标接近,因此,通过长期定向改造培育,导致遗传基础日益狭窄。王三良等^[1]分析了“八五”期间全国

通过杂交选育的18个恢复系,近80%来自于测6427和明恢63的后代,20%来自于R系统,其中中粳恢复系全部选用了明恢63作亲本。不育系选育上,在增强抗性、改进米质、提高制种产量等方面取得了进展,但在对产量具有重要作用的细胞核改良方面进展较小,用不同不育胞质不育系与明恢63配组产量均未显著超过汕优63,导致了育种进程缓慢。本文从DNA水平上直接证明了当前我国“三系”杂交稻骨干亲本遗传基础的狭窄性,特别是恢复系改良进展尤为缓慢,是限制杂交稻产量进一步提高的重要因素之一。

3.2 杂交稻组合遗传差异小

众所周知,在一定范围内,杂种优势与亲本遗传差异呈正相关^[10, 11]。Zhang等^[12, 13]认为增加阳性座位的杂合性可提高杂种优势。Smith等^[14]在玉米上研究表明,分子标记所检测的遗传差异与F₁产量和F₁杂种优势的相关系数高达0.93和0.87。Figdore发现染色体RFLP位点的杂合性与杂种优势有明显的关系。朱立煌等^[15]发现秀岭A与C8411间有26%的位点有等位差异。我们研究发现,中粳杂交稻保持系与恢复系间的遗传一致性很高,达到0.87,在352个组合中只有32.39%的组合遗传差异超过了汕优63,而且遗传差异大于0.4的组合仅有4%。因此,要从目前的群体中筛选出比汕优63优势强的组合具有一定难度。而亚种间杂交具有强大的杂种优势这一理论近年来也得到了分子生物学的支持^[16-20]。所以,增加亲本多样性和增大双亲遗传差异是当前育种工作的重要任务之一。

参 考 文 献

- 1 王三良, 许可. 杂交水稻. 1996, (3): 1~4
- 2 刘克德, 张启发, 张端品等. 植物学报, 1995, 37(9): 718~724
- 3 马文宾, 庄杰云, 彭应财等. 遗传, 1998, 20(2): 1~4
- 4 郑康乐. 分子标记在作物遗传育种中的应用. 南京: 江苏科学技术出版社, 1991. 117~121
- 5 Wang Z Y, S D Tanksley. *Genome* 1989, 32: 1113~1119
- 6 Zhang Q F, M A Saghaimaroof, T Y Lu, et al. *TAG*, 1992, 83: 495~499
- 7 Zhou Z, J P Gustafson. *TAG*, 1995, 91: 481~488
- 8 McCouch S P, G Kochert, Z H Yu, et al. *TAG*, 1988, 76: 815~829
- 9 根井正利著 王家玉译. 分子群体遗传学. 北京: 农业出版社, 1983. 143~172
- 10 杨振玉, 张忠旭, 华泽田等. 中国水稻科学, 1990, 4(2): 49~55
- 11 郑家奎, 何光华, 杨正林. 西南农业学报, 水稻专辑: 1995, 23~27
- 12 Zhang Q F, Y J Gao, Y J Yang, et al. *China 2EU workshop on plant genome mapping*, Shanghai China, March, 1995, 42~54
- 13 Zhang Q F, Y J Gao, S H Yang, et al. *TAG*, 1994, 89: 185~192
- 14 Smith Q S, J S C Smith, S L Bowen, et al. *TAG*, 1990, 80: 833~840
- 15 朱立煌, 徐吉臣, 胡乃璧等. 作物学报, 1992, 18(2): 99~106
- 16 钱前, 朱立煌, 熊振民等. 作物学报, 1998, 24(1): 74~77
- 17 Kato H, K Tanaka, H Nakazumi et al. *Breeding Science*, 1994, 44: 271~277
- 18 杨振玉, 高勇, 赵迎春等. 作物学报, 1996, 22(4): 422~428
- 19 杨守仁, 张龙步, 徐正进等. 中国水稻科学, 1996, 10(2): 115~120
- 20 袁隆平. 杂交水稻. 1996, (4): 1~2