

# 利用 RAPD 分子标记对三组三系杂交水稻及亲本的遗传分析和鉴定

毛加宁,段世华,李绍清,朱英国

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室,武汉大学生命科学院遗传研究所,武汉 430072)

**摘要:**利用 RAPD 技术,从 248 个随机寡聚核苷酸(10bp)中筛选出 13 个引物能在供试的三组三系杂交水稻及亲本间扩增出 43 条稳定性较好的多态性片段,其中 6 个引物能在供试材料间扩增出 20 个强的多态性标记。利用这些标记能有效地区分各组合中不育系、保持系、恢复系和  $F_1$ ,并能看出各组合中不育系与保持系、不育系与恢复系、 $F_1$  与亲本间的遗传关系。

**关键词:**RAPD;杂交水稻;遗传关系;鉴定

中图分类号:Q943

文献标识码:A

文章编号:0253-9772(2002)03-0283-05

## Genetic Analysis and Identification of Three Groups Three-line Hybrid Rice and Their Parents by RAPD Markers

MAO Jia-ning, DUAN Shi-hua, LI Shao-qing, ZHU Ying-guo

(The Key Laboratory of MOE for Plant Development Biology and Institute of Genetics,  
College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

**Abstract:** A total of 248 arbitrary 10-mer oligonucleotide primers were screened using RAPD (random amplified polymorphic DNA) techniques with the genome DNA of three groups of three-line hybrid rice and their parents. Thirteen primers produced 43 polymorphism fragments. Six primers of them produced 20 obviously repeatable polymorphic markers among rice lines tested. Using this RAPD markers, the hybrid rice combinations (sterile-line, maintainer-line, restorer-line and  $F_1$ ) can be effectively identified, and the genetic relationship among them can be shown.

**Key words:** RAPD; Hybrid rice; Genetic relationship; Identification

优良品种是作物高产优质的基础,品种混杂或质量低劣会明显降低作物的产量。有效鉴别不同杂交组合及其亲本,阐明其遗传关系,对保证杂交稻种质量与纯度、解决产权纠纷和确保杂种优势的利用等具有非常重要的意义。过去对杂交水稻及亲本的鉴定和遗传关系的研究,主要依靠形态标记、同工酶鉴定和系谱分析。这些方法都很难快速、准确地进行鉴别与研究。1990年 Williams 等<sup>[1,2]</sup>建立以 PCR 为基础的 RAPD 分子标记技术,开辟了实验室

快速可靠鉴定农作物种子的真伪和质量及遗传关系研究的新途径。随后,许多学者先后利用 RAPD 分子标记技术对水稻、玉米、大豆等经济农作物的纯度、真假鉴定,以及系谱分析、基因组遗传多样性分析等进行了研究<sup>[3~13]</sup>。但在我国,主要的以及新近培育的三系杂交水稻组合内部成员间遗传关系和区别的研究报道较少,更多的是从不育系、恢复系间进行比较研究<sup>[3~7]</sup>。因此,为进一步揭示三系杂交水稻组合的遗传关系,有效区分组合内不育系、保持

收稿日期:2001-06-29;修回日期:2001-11-15

基金项目:国家自然科学基金(批准号:39770455)资助

作者简介:毛加宁(1961-),男,四川乐山人,乐山师范学院生物系讲师,从事植物学与植物分子生物学教学与科研工作。

通讯作者:朱英国(1939-)男,湖北人,教授,博导,专业:植物遗传学。Tel:027-87876530, E-mail:zhuyg@public.wh.hb.cn

系、恢复系和  $F_1$ , 本文利用 RAPD 技术对我国主要的三系杂交水稻汕优 63、马协 63 组合以及由武汉大学新近育成的红莲 2 号组合进行了研究, 以期阐明这些组合间遗传关系及准确、快速鉴定种子的质量提供可靠的实验依据和鉴定标记。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

实验中选用的三个水稻杂交组合  $F_1$  及相应的亲本 (表 1) 均由本实验室提供。其中红莲 2 号组合为武汉大学新近育成的优质高产杂交水稻, 其产量、米质优于汕优 63。

表 1 供试材料

Table 1 Materials for the experiment

组合编号 No. combinations	不育系 Sterile lines	保持系 Maintainer lines	恢复系 Restore lines	杂交组合 Hybrid
I(红莲型)	YT-07A	YT-07B	扬稻 6号-05	红莲2号
CMS- Honglian-type			Yangdao -6-05	Honglian-2
II(野败型)	珍汕 97A	珍汕 97B	明恢 63	汕优 63
CMS-Wild abortive	Zhenshan 97A	Zhenshan 97B	Minghui63	Shanyou63
III(马协型)	马协 A	马协 B	明恢 63	马协 63
CMS-Ma xie-type	MaxieA	MaxieB	Minghui63	Maxie63

### 1.2 DNA 的提取

参见 Dellaporta<sup>[14]</sup>的方法, 稍有修改。供试种子于 30℃ 浸泡 12h 后, 5% NaClO 消毒 30min, 无菌水冲洗, 然后常规方法催芽, 28℃ 暗培养。当黄化苗长至 10cm 左右, 取其茎叶 4~5g 剪碎, 立即加液氮研磨, 置于 50ml 的离心管中, 加入预热至 65℃ 的 CTAB 抽提液 [2% (w/v) CTAB; 100mmol/L Tris-Cl, pH8.0; 20mmol/L EDTA, pH8.0; 1.4mol/L NaCl] 4~5ml/g (约 25ml), 加入适量的  $\beta$ -巯基乙醇使终浓度为 1%。轻摇离心管混匀后, 置 65℃ 水浴 60~90min, 期间每 5 min 轻倒转离心管使之分散均匀, 待冷至室温后加入等体积 (25ml) 氯仿: 异戊醇 (24:1), 室温振荡 (60r/min) 至有机相变为黄色。然后 4℃, 4000r/min 离心 30min。取上清至另一 50 ml 离心管中, 加等体积的 -20℃ 异丙醇沉淀

DNA 至成棉絮状小团漂于液面, 用玻璃钩勾出 DNA 于 1.5ml 的 Eppendorf 管中, 加 70% 乙醇洗涤 2~3 次, 用 1ml TE (pH8.0), 65℃ 水浴 15min 以溶解 DNA, 冷却至室温后, 加入适量 10mg/ml RNaseA, 37℃ 温浴 1h 以除去 RNA。纯化后溶解于适量 (约 500~700 $\mu$ l) TE 中备用。

### 1.3 RAPD 反应及电泳

RAPD 反应总体积为 25 $\mu$ l, 反应体系中含 1 $\times$  PCR 缓冲液 [10mmol/L Tris-HCl (pH8.3), 50mmol/L KCl, 0.001% 明胶], 加入 1.5mmol/L MgCl<sub>2</sub>, dNTP 各 100 $\mu$ mol/L (Promega 公司), Taq-DNA 聚合酶 1U (Promega 公司), RAPD 引物 15ng (Sangon 公司), 模板 DNA 50ng。加入 1 滴矿物油 (约 30 $\mu$ l) 后, 短暂离心, 置 PTC-100 Programmable Thermal Controller PCR 仪上扩增。扩增程序为: 94℃ 预变性 5min, 再 94℃ 变性 1min, 38℃ 复性 1min, 72℃ 延伸 1.5min, 共 40 个循环, 最后 72℃ 延伸 5min, 扩增产物 10 $\mu$ l 在 1.4% 的琼脂糖凝胶中电泳 2~3h (4~5V/cm), 经溴化乙锭染色后, 在紫外灯下观察照相, 然后在 Gel Doc2000 凝胶成像仪中扫描分析并保存文件。

### 1.4 RAPD 数据处理

从 248 个随机引物中筛选出 13 个稳定性、多态性较好的引物, 用这 13 个引物对 11 个供试材料作 RAPD 比较和聚类分析。并从中挑选出重复性好、多态性条带清晰、各材料间差异性较显著的 6 个引物对 11 个材料进行比较区别 (图 1、2、3、4、5、6)。对各材料 13 个引物扩增情况做记录, 有带记为 1, 无带记为 0。根据 NTMAS (Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System Version 1.60, F. James Rohlf) 中的 Jaccard 公式计算各材料间的遗传相似系数 ( $G_s$ ), 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。

## 2 结果与分析

### 2.1 杂交组合及其亲本间的 RAPD 分析

从图 1 发现, 各组合亲本的条带数和位置均存在差异。YT-07A、扬稻 6 号-05 均有 3 条带, 但其中有一条带的位置在二者间不同; 珍汕 97A、马协 A 各有 4 条带, 明恢 63 有 3 条带; 其中有一条带位置不同。通过这一引物, 不但能区别同一组合中的两个亲本, 还可将三个组合中的所有亲本 (YT-

07A、扬稻 6 号-05、珍汕 97A、马协 A、明恢 63) 都区分开。这一结果表明:利用 RAPD 扩增完全能够区分同一杂交组合或几个不同杂交组合的双亲。

从图 2 分析,3 个组合中不育系与保持系间条带数和位置同样也存在着差异。在同一组合中,YT-07A 有 4 条主带,YT-07B 有 3 条主带,且位置上也有差异;珍汕 97A、珍汕 97B 均有 3 条主带,但第二条位置不同;马协 A 有 3 条主带,马协 B 有 4

条主带。在 3 个组合间,不育系间、保持系间、不育系与保持系间都不同程度地存在着条带数或位置的差异(图 1、2、3、4、5、6),从而可利用 1 个或多个引物将供试材料中的全部不育系、保持系分开。这一结果进一步表明,利用特意引物的 RAPD 多态性不但能从分子水平上区别遗传差异较大的不育系和恢复系,还能区分遗传差异微小的同源不育系和保持系。

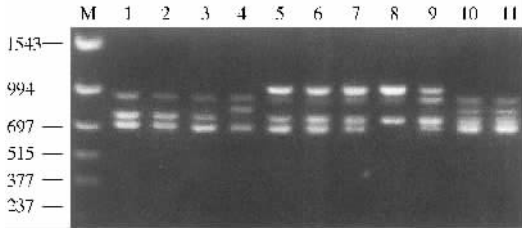


图 1 引物 S490 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 1 Profile of the amplified primer S490

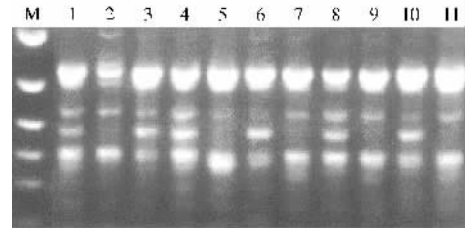


图 2 引物 S477 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 2 Profile of the amplified primer S477

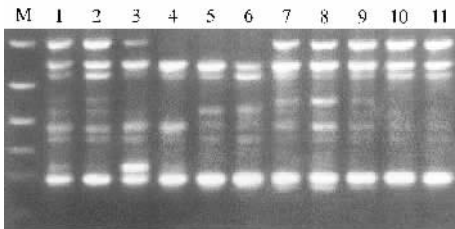


图 3 引物 S438 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 3 Profile of the amplified primer S438

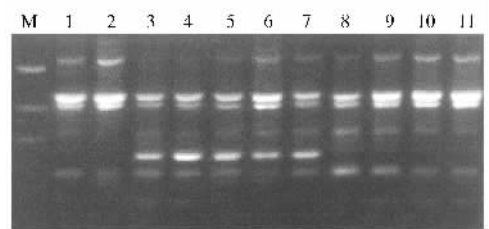


图 4 引物 S1053 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 4 Profile of the amplified primer S1053

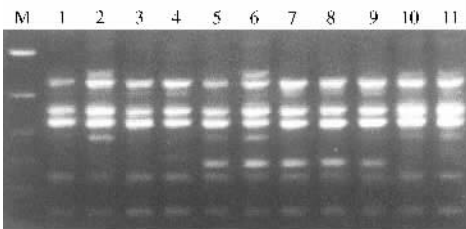


图 5 引物 S1405 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 5 Profile of the amplified primer S1405

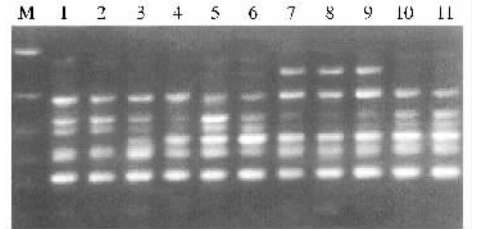


图 6 引物 S1496 扩增的 RAPD 图谱

Fig. 6 Profile of the amplified primer S1496

材料编号:1. YT-07A;2. YT-07B; 3. 红莲 2 号; 4. 扬稻 6 号-05; 5. 珍汕 97A;6. 珍汕 97B;

7. 汕优 63; 8. 明恢 63; 9. 马协 63; 10. 马协 B; 11. 马协 A; M. 分子量标记。

No. :1. YT-07A; 2. YT-07B; 3. Honglian-2; 4. Yangdao-6-05; 5. Zhenshan97A; 6. Zhenshan97B;

7. Shanyou 63; 8. Minghui 63; 9. Maxie 63; 10. Maxie B; 11. Maxie A; M. PCR Marker.

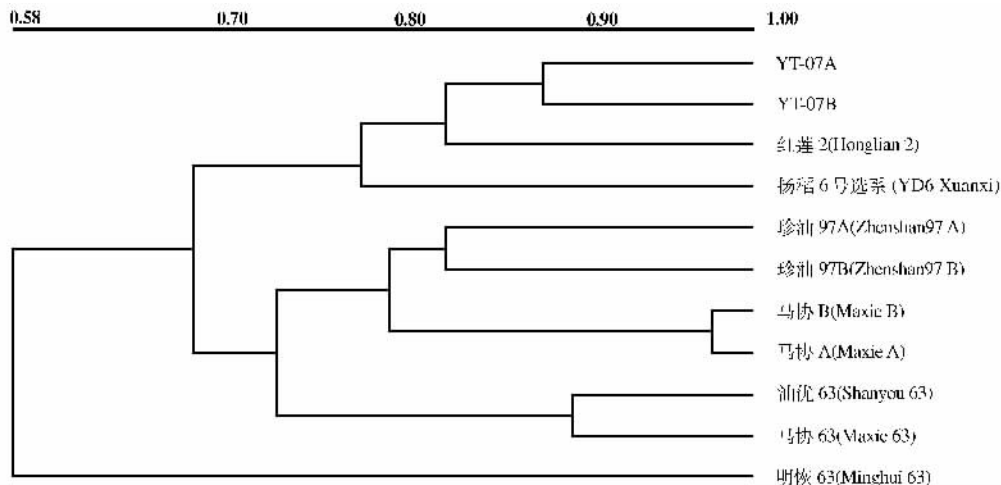


图 7 11 份供试水稻材料相似性树状图

Fig. 7 Dendrogram of similarity for 11 materials of rice

从上述选定的 S490、S477、S438、S1053、S1405、S1496 6 个引物对供试的 11 个材料进行扩增分析看出,杂种扩增带型主要与扩增条带较为丰富的一方亲本相同(图 1、2、3)或为双亲带型的互补(图 4、6),这一现象与杂交理论相吻合。理论上,杂种包含了双亲的全部信息,双亲任何一方能扩增出的条带,杂种也应具有;再者 RAPD 为显性标记,故杂种的扩增带应包含双亲的所有带型。即便是部分显性的标记带,杂种带的强度(或亮度)可能弱于对应的亲本带或介于双亲之间,一般不会出现双亲或双亲之一具有而杂种缺失、或杂种具有而双亲缺失的扩增带。但实验结果并非完全如此,图 1、2、3、4 显示父本或母本具有的条带, $F_1$  却没有。

## 2.2 三组杂交组合的聚类分析

13 个稳定引物在供试的 11 个材料中扩增出 43 条稳定性较好的多态性片段,经聚类分析(图 7),结果表明:(1)所有不育系与保持系的遗传相似性( $G_s$ )均在 0.83 以上,说明其彼此间的遗传关系很近,差异较小。其中马协 A 与马协 B 关系最近, $G_s = 0.97$ ;YT-07A 与 YT-07B 关系次之, $G_s = 0.88$ ;珍汕 97A 与珍汕 97B 关系相对较远, $G_s = 0.83$ 。这反映了不同保持系对其相应不育系的核置换程度不一而导致彼此间在基因组上存在的差异程度不同。(2)恢复系扬稻 6 号-05 与 YT-07A 的遗传相似性相对较大  $G_s = 0.77$ ,而明恢 63 与珍汕 97A、马协 A 的  $G_s < 0.58$ 。(3)所有的  $F_1$  相对于父本恢复系而言与母本不育系遗传关系较近,其中红

莲 2 号与 YT-07A 的遗传关系最近, $G_s = 0.82$ ;汕优 63、马协 63 与珍汕 A、马协 A 的遗传关系次之, $G_s = 0.74$ 。(4)汕优 63、马协 63 两杂种的遗传相似性较高  $G_s = 0.88$ ,这与二者的遗传背景相吻合;从败育类型来看,珍汕 97A、马协 A 均属于野败型,且两组合均以明恢 63 为父本,造成两者的亲缘关系较近,从而使得汕优 63 和马协 63 较为接近地聚在一起。

从图 7 可看出在  $G_s = 0.73$  附近,可将 11 个供试材料聚为三类:第一类包括 YT-07A、YT-07B、红莲 2 号、扬稻 6 号-05;第二类包括珍汕 97A、珍汕 97B、马协 A、马协 B、汕优 63、马协 63;明恢 63 由于与另外 10 个材料间遗传差异较大,被单独聚为一类。

## 3 讨 论

RAPD 是利用寡聚核苷酸对基因组 DNA 进行多态性检测,检测区域几乎覆盖了整个基因组,因而可以检测不同品种间的微小差异<sup>[15]</sup>。从本实验结果看,三系杂交水稻亲本间、亲本与杂种间都有较为明显的多态性差异,即使是遗传背景相近的不育系与保持系间也存在多态性。同时由于 RAPD 样品用量少,只需要 20~50ngDNA,从单株秧苗或单粒种子提取 DNA 已足够用于扩增。因而 RAPD 技术用于三系水稻品种鉴定和纯度检测是可行的。

RAPD 虽然扩增随机性较强,但每个引物所能检测的基因组区域有限,不同引物在扩增同一水稻

品种时,出现的带型不同;有些引物扩增可表现很强的多态性,有些引物则多态性表现较差。我们的实验结果也表明,利用某一个引物就能区别或确定杂种与其亲本间的遗传关系,往往是相当困难的,特别是不育系与  $F_1$  间、不育系与保持系间以及同时区别不育系、保持系、恢复系、 $F_1$  就更难。所以必须大量进行引物筛选,进而建立 RAPD 标准模式,才能较为有效地利用 RAPD 分子标记对供试水稻品种进行区别鉴定和纯度分析并进行相关的遗传分析。通过我们的实验结果也初步建立了重复性较好的供试三组三系杂交水稻组合的标准 RAPD 电泳图谱,以此为基础可建立相应的 RAPD 标准模式,从而可以快速准确地进行品种鉴定和纯度分析。

关于 RAPD 技术在作物品种鉴定和纯度分析上应用的可靠性,虽有不少报道认为,由于其重复性较差和非特异性扩增,使得其稳定性较差。但同时许多研究也表明,只要反应条件严格控制,重复结果是可以得到的。本实验结果进一步表明 RAPD 技术在水稻品种鉴定和纯度分析上应用的可靠性关键在于引物的筛选及标准模式的建立。但对于不同的材料,尚需进行深入探索,才能筛选到合适的引物并建立起多态性扩增的标准模式与图谱,使鉴定手段快速简便,鉴定结果准确可靠。

杂交种是双亲杂交的后代,集中了父母本的遗传物质。而一个引物只能扩增基因组 DNA 的有限区域,因而在  $F_1$  代用不同引物往往出现不同的 RAPD 图谱,我们的实验结果表明(图 1、2、3、4、5、6), $F_1$  代由于所用引物的不同,同一  $F_1$  出现了不同 RAPD 图谱,主要有 5 种类型,即“双亲型”,“偏父型”,“偏母型”,“杂种型”,“缺失型”,其中“双亲型”为双亲带的互补,它既不同于不育系,又不同于恢复系,是鉴别杂交种与其双亲的最好类型,因此筛选“双亲型”类型的引物将有利于杂交种的鉴别和纯度分析。

杂交种的 RAPD 图谱出现多种类型,尤其出现缺失带、增加带,在其他作物上也有发现<sup>[8]</sup>,其原因

是什么,是否因为双亲杂交而导致杂交种 DNA 发生变异有关?还有待进一步研究。

## 参 考 文 献 (Reference):

- [1] Williams J G K, *et al.* DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6513~6535.
- [2] Welsh J, *et al.* Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18(24): 7213~7218.
- [3] 李云海, 钱 前, 曾大力, 等. 我国主要杂交水稻亲本的 RAPD 鉴定及遗传关系研究[J]. *作物学报*, 2000, 26(2): 171~176.
- [4] 向太和, 汪秀峰, 李 莉, 等. 利用 RAPD 标记对我国主栽的汕优杂交稻和亲本进行区别和鉴定[J]. *作物学报*, 2000, 26(3): 292~296.
- [5] 马文宾, 庄杰云, 彭应财, 等. 三系杂交亲本随机扩增多态性 DNA(RAPD)分析[J]. *遗传*, 1998, 20(2): 1~4.
- [6] 何光华, 唐 梅, 裴炎, 等. 四川主要水稻恢复系的 DNA 多态性初步研究[J]. *杂交水稻*, 1999, 14(6): 39~40.
- [7] 钱 前, 陈 洪, 孙修宗, 等. 真、假杂交水稻 II 优 63 的 RAPD 鉴定[J]. *中国水稻科学*, 1996, 10(4): 241~242.
- [8] 吴敏生, 戴景瑞, 王守才, 等. RAPD 在玉米品种鉴定和纯度分析中的应用[J]. *作物学报*, 1999, 25(4): 489~493.
- [9] 汪小全, 邹瑜苹, 张大明, 等. RAPD 应用于遗传多样性和系统学研究中的问题[J]. *植物学报*, 1996, 38(12): 954~962.
- [10] 吴京华等. 我国水稻杂种优势利用的成就、进展与前景[J]. *世界农业*, 1999, 8: 20~22.
- [11] 张瑞祥等. 中国水稻杂种优势利用现状和对策[J]. *江西农业大学学报*, 1998, 20(2): 223~226.
- [12] Xiao J, *et al.* Genetic diversity and its relationship to hybrid performance and heterosis in rice as revealed by PCR-based marker[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 637~643.
- [13] Zhang Qifa, *et al.* Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 93: 1218~1224.
- [14] Dellaporta S L, Wood J, and Hicks J B. A plant DNA mini-preparation: Version II [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1983, 1(4): 19.
- [15] Welsh J, C Peterson, M Mocllell and. Polymorphisms Generated by Arbitrary PCR in the Mouse—Application to Strain Identification and Genetic Mapping[J]. *Nucleic Acids Research*, 1991, 19: 303~306.