

利用 RAPD 标记对我国主栽的汕优杂交稻和其亲本进行区别和鉴定^X

向太和 汪秀峰 李莉 吴家道 杨剑波

(安徽省农业科学院水稻遗传育种农业部重点实验室, 安徽合肥, 230031)

提 要 利用 RAPD 技术, 从500个随机寡核苷酸引物(10聚体)中筛选出8个引物能在3个主栽的汕优系统杂交稻组合汕优63、汕优64 和汕优晚3 及其亲本之间稳定地扩增出12个强的多态性标记。利用这些多态性标记能够有效地区别汕优63、汕优64 和汕优晚3 及其亲本。

关键词 RAPD 技术; 多态性标记; 杂交水稻; 鉴定

Identification of Rice Hybrids (Shanyou 63, Shanyou 64 and Shanyouwan 3) and Their Parents Using RAPD Markers

XIANG TaiHe WANG XiuFeng LILi WU JiaDao YANG JianBo

(Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding of Agricultural Ministry, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031)

Abstract A total of 500 arbitrary 10mer oligonucleotide primers were screened using RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique on the genome DNA s of Shanyou 63, Shanyou 64, Shanyouwan 3 and their parents. Eight primers produced twelve obviously repeatable polymorphic markers. Using these RAPD markers, the rice hybrid combinations (Shanyou 63, Shanyou 64 and Shanyouwan 3) and their parents can be identified.

Key words RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique; Polymorphic markers; Hybrid combination of rice; Identification

有效区别和鉴定不同杂交组合和其亲本, 对确保杂交稻制种质量和杂交稻种子的真实性具有非常重要的意义。过去传统的杂交稻种的鉴定, 主要是依据植株的形态指标和田间表现, 需要借助于温室或异地温暖地区(如海南岛)种植, 通常耗费大量人力、物力和时间。80年代我国学者曾利用同功酶作标记进行杂交种子的快速鉴定, 但同功酶的多态性较少, 且易受环境影响, 加之杂交稻组合的种类增多, 因此同功酶鉴定已显得无能为力。1990年 Williams 等^[1]建立了 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 分子标记技术, 为实验室快速鉴定杂交稻种子的真实性和质量提供了一条新途径。我国学者陈洪等^[2]曾对300个随机引物筛选, 发现 P18 引物能将杂种汕优63与其不育系珍汕97A 加以区别, 虽然汕优63和其恢复系明恢63带型一致, 但两者在种子外型上差异十分明显, 能够肉眼分辨, 故该引物在一定范围内可以用于汕优63的鉴定工作。但目前我国种值的杂交稻组合种类很多, 种性各异, 汕

X 安徽省政府专项基金资助种子工程项目。Supported by special foundation of Anhui Province Administration.

收稿日期: 1998207221, 接收日期: 1999204222

© 1995-2005 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

优系统除主栽组合汕优63以外, 还有汕优64、汕优晚3等, 它们种子外型相像, 虽同为杂交稻, 但所适宜种植的季节、区域各有不同, 一旦混淆, 对水稻生产的危害十分严重。针对这一问题, 我们选择在生产上广为种植的汕优系统的3个组合(汕优63、汕优64和汕优晚3), 使用500个随机的寡核苷酸引物进行 RAPD 分析, 以期找到更多、更有效的标记在更大的范围内使用, 从而实现对我国主栽杂交稻组合及其亲本进行有效地区别与鉴定。

1 实验材料与方法

1.1 实验材料 实验所使用稻种由本院水稻所提供。杂交稻种是在严格隔离的条件下, 人工套袋杂交制成, 亲本品种也经过提纯和隔离种植, 种子纯度均在99.9%以上。不同组合的亲缘关系见表1。

1.2 DNA 的提取

参见卢扬江等^[3]的方法。供试种子26粒, 发芽, 取4叶期幼苗1~2g, 剪碎, 立即加液氮研磨, 置于50 mL的离心管中, 加20 mL的抽提液(100 mmol L⁻¹

表1 供试品种、组合及亲缘关系

Table 1 Varieties combinations used in the study and their original relations

品种组合	Varieties Combinations	亲缘关系	Original relation
Zhenshan 97B		Maintainer line	
Zhenshan 97A		Sterile line as maternal side	
Shanyou 63		Zhenshan 97A () × M inghui 63 (fi)	
M inghui 63		Restoring line as paternal side of hybrid Shanyou 63	
Shanyou 64		Zhenshan 97A () × Ce 64 (fi)	
Ce 64		Restoring line as paternal side of hybrid Shanyou 64	
Shanyou wan 3		Hybrid of Zhenshan 97A () × Wan 3 (fi)	
Wan 3		Restoring line as paternal side of hybrid Shanyou wan 3	

TrisHCl, 20 mmol L⁻¹ EDTA, 500 mmol L⁻¹ NaCl, 1.5% SDS), 60℃水浴1 h后, 37℃振荡(60 r/min) 20 min, 加等体积的氯仿: 乙醇: 异戊醇(80:16:4, v/v)轻轻摇匀, 离心10 min (4℃, 11000 r/min), 取上层液相用异丙醇沉淀, 70%乙醇清洗2次, 用RNase酶降解RNA, 纯化后溶解于无菌的去离子水中备用。

1.3 RAPD 反应及电泳 RAPD反应体积为35 μL, 其中包括0.1 mmol L⁻¹的dNTP混合物, 0.2 μmol L⁻¹的10聚体随机引物(本实验室自行合成), 2U Tag DNA聚合酶和50 ng左右的水稻基因组DNA, 用美国PE9600型DNA扩增仪进行扩增, 反应程序为: 94℃5 min变性后, 按94℃1 min、36℃1 min、72℃2 min的设置进行30个循环, 反应结束后在72℃下延伸5 min。扩增产物在1.4%的琼脂糖凝胶上电泳1.5 h (5 V/cm), 以HaeI酶切的5X174 DNA为分子量标记, 溴乙锭(ethidium bromide)染色, 紫外灯下观察, Polaroid一次成像拍照。

2 实验结果与分析

2.1 引物和标记的选择 实验使用的500个随机寡核苷酸引物(102mer)中, 有422个能够在供试水稻基因型材料中扩增出1~13条大小不等的DNA电泳条带(分子量从200 bp到3000 bp), 另外78个引物或不能扩增出肉眼可见的DNA条带或出现严重弥散现象(smear)。对上述有明显扩增条带的422个引物, 进行反复的实验和筛选, 发现28个引物(占供试引物的5.6%)能够在不同的水稻杂交组合及其亲本之间扩增出具有明显多态性的条带, 其中有8个引物扩增出的12条多态性条带, 绝大多数表现为强带的差异, 这种差异主要表现为条带的有或

无,因而清晰又易于分辨,具有较好的直观性且能多次重复,是区别或鉴定种性的理想标记;而另外20个引物扩增出的27条多态性条带则主要表现为弱带的差异,其中很大一部分重现性较前者差,清晰度、分辨率不高,不太适宜于用作区别和鉴定种性的差异。

2.2 杂交种与其双亲的 RAPD 分析 用上述选定的12个标记对供试的3个汕优杂交组合和其双亲进行分析发现,杂种带型主要表现为和扩增条带较为丰富的一方亲本相同(图版2、3、6、7)或者为双亲带型的互补(图版4)。从理论上讲,杂种包含了双亲的全部遗传信息,双亲无论任何一方能扩增出的条带,杂种也应该同时具有;又由于RAPD标记主要表现为显性,故杂种的多态性应为双亲的互补型或和扩增条带较为丰富的一方亲本相同,即便是不完全显性或部分显性的标记带,杂种带的强度(或亮度)可能较对应的亲本带弱些或介于双亲之间,一般不会出现双亲或双亲之一具有而杂种却不具有的扩增带,或杂种出现双亲均不具有的扩增带。而实际上却有个别例外,如表2所示,恢复系明恢63(杂种的父本)具有PLC11ö1450扩增带,杂种汕优63就没有出现(图版1);不育系珍汕97A(杂种的母本)和恢复系晚3(杂种的父本)都有PXY05ö900扩增带,而杂种汕优晚3无此扩增带,并且杂种汕优晚3出现其双亲均无的扩增带PXY05ö700(图版8)。比较有说服力的解释是由于竞争性抑制作用,杂合双链DNA可能表现对某些引物结合的空间干扰或竞争作用,使得杂种本应显现的条带受到了完全的或部分的抑制,或者使杂种出现双亲都不具有的扩增带^[4]。

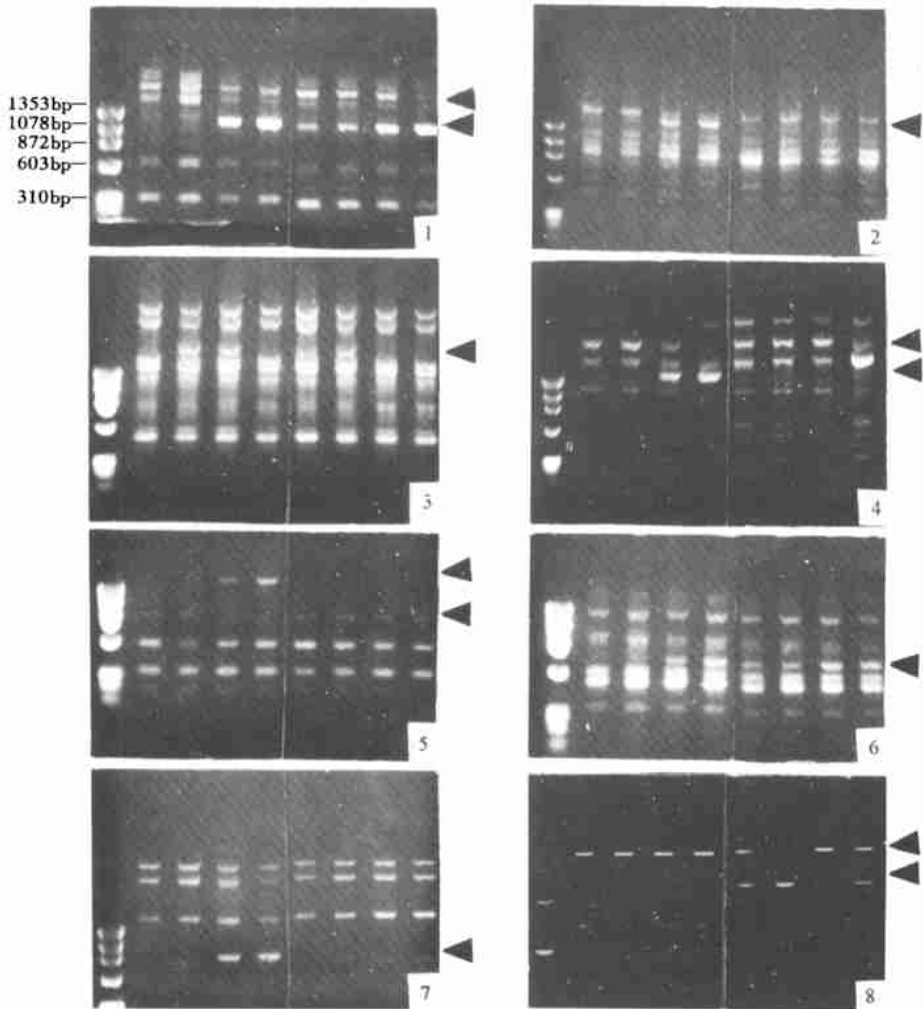
表2 供试品种与组合的 RAPD 多态性标记
Table 2 RAPD markers of varieties combinations used in the study

引物编号 Primer No.	分子量 Marker size (bp)	品种组合 Varieties Combinations							
		珍汕 97B Zhenshan 97B	珍汕 97A Zhenshan 97A	汕优 63 Shanyou 63	明恢 63 Minghui 63	汕优 64 Shanyou 64	汕优晚 3 Shanyou wan 3	晚 3 Wan 3	测 Ce 64
PLC11	1450	1	1	0	1	0	0	0	0
	1200	0	0	1	1	1	1	1	1
PXE06	1400	0	0	1	1	0	0	0	0
PWH17	1700	0	1	1	0	1	1	0	0
P XK03	2000	1	1	1	0	1	1	1	1
	1400	0	0	1	1	0	0	0	0
PWR05	1400	0	0	1	1	0	0	0	0
	1000	1	1	0	0	1	1	1	1
PWT16	800	0	0	1	1	1	1	1	1
PXW01	900	0	0	1	1	0	0	0	0
PXY05	900	1	1	1	1	1	0	1	1
	700	0	0	0	0	1	1	0	1

Notes: "1" means "present", "0" means "absent"

通过对表2结果的分析 and 比较我们发现,一些标记只在杂种和其恢复系(父本)中出现而不育系(母本)和保持系则不存在。由于通常杂交种与其恢复系在种子外型上能够加以区别,故这些标记也能有效地用于鉴定杂种,尤其是用于区别杂种与其不育系和保持系。如表2中的PLC11ö1200、PXE06ö1400、P XK03ö1400、PWR05ö1400和PWT16ö800 5个标记带,均可以用于汕优63的鉴定,尤其是用于汕优63和不育系珍汕97A及保持系珍汕97B的区别(图版1、2、4、5、6)。另外,PLC11ö1200、PWT16ö700两个标记还可分别用于汕优64、汕优晚3和其不育系及保持系的区别(图版1、6)。

2.3 汕优系统杂交组合间及其亲本的区别与鉴定 本实验选用的汕优63、汕优64和汕优晚3杂交组合具有共同的不育系, 其种子外型和不育系珍汕97A 相同, 一旦混淆或错用, 会给水稻生产带来损失。我们通过对已筛选出的8个引物所产生的12个标记比较分析发现: 对任何一个汕优组合或其亲本来说, 都能从表2中至少找到一个或多个引物或标记的组合使之加以区别。例如, 同时利用引物 P X K 03所产生的两条标记带 P X K 03 δ 2000和 P X K 03 δ 1400(图版4), 可以把汕优63与其不育系、保持系、恢复系以及供试的其它汕优组合和亲本一次性区别开来。对于汕优64, 利用组合 P W H 17 δ 1700、P X Y 05 δ 900和 P X Y 05 δ 700(图版3、8)



图版说明

图1~8分别是引物 PLC11、PXE06、PWH17、PXK03、PWR05、PWT16、PXW01和PXY05扩增图谱。每张图从左到右分别是标准分子量和模板珍汕97B、珍汕97A、汕优63、明恢63、汕优64、汕优晚3、晚3和测64扩增图谱。多态性标记以箭头“!”标示。

Explanation of Plates

Fig 1~8 are RAPD products with primers of PLC11, PXE06, PWH17, PXK03, PWR05, PWT16, PXW01 and PXY05 respectively. Lanes from left to right of each figures are molecular weight marker and products with templates of Zhenshan 97B, Zhenshan 97A, Shanyou 63, M inhui 63, Shanyou 64, Shanyouwan 3, Wan 3 and Ce 64 respectively. RAPD markers were indicated by arrows (“!”).

可以将它与其余供试的7个基因型加以区别。此外,仅利用一个标记 PXY05ö900(图版8)即可将汕优晚3和其它7个基因型一次性加以区别。即使是互为近等位基因系的不育系珍汕97A 和其同型保持系珍汕97B,也有标记 PWH17ö1700(图版3)可以使之有效区分。由于不育系和其同型保持系遗传基础基本一致,仅有极个别基因的差异,形态性状十分相像,极易发生混淆,能从DNA 分子水平上加以标记区别,对杂交稻制种质量的监督十分有利。

3 讨论

3.1 水稻属自花授粉作物,遗传基础相对狭窄,变异度也不甚丰富。本实验使用500个引物,只有28个引物(仅占5.6%)能够在供试的8份基因型材料中找到多态性。而异花授粉作物(如玉米等)和常异花授粉作物(如油菜等)的遗传基础和变异度远较水稻丰富。Heum 等^[5]用21个随机寡核苷酸引物检测21个供试基因型材料的多态性,发现在140条扩增带中,有79.2%的条带有多样态性差异。M ailer 等^[6]用100个随机寡核苷酸引物,对23个不同油菜基因型材料进行多态性分析,发现22个引物的扩增产物有多态性(占供试引物的22%),仅使用其中6个引物所产生的23条多态性标记带,便能将供试的23个基因型材料相互予以区别。

3.2 由于RAPD 分析,通常是在事先并不了解被检测基因组DNA 序列信息情况下进行的寡聚体随机引物扩增,使用的退火温度一般较低,这就不可避免地会产生一些非特异性的扩增,实验条件的某些差异,有可能导致扩增结果的不同,故一些学者^[7, 8]认为RAPD 结果的重复性较差,常因为模板的质量及纯化方法的不同、RAPD 反应的条件不同(引物浓度、Tag 酶的生产厂家和使用浓度、Mg²⁺ 浓度等)乃至使用DNA 扩增设备的不同而引起实验结果的不稳定。但我们认为:在一定的反应条件下,通过大量的筛选能够找到具有稳定扩增多态性的引物,本文表2所列出的引物所产生的标记带,就具有非常好的重复性,我们分别用几种不同的扩增设备(机械手动型上海DKB 28D、电脑自控型PE9600)、不同厂家生产的Tag 酶(德国Boehringer mannheim 公司、美国PerkinElmer 公司、加拿大B idstar 公司)乃至国内外两个不同的实验室(农业部水稻遗传育种重点实验室、美国加州大学戴维斯分校水稻遗传实验室),均显示一致的扩增结果,因此完全能够可靠地用于供试水稻基因型材料的区别和鉴定。我们认为能否筛选到与水稻DNA 模板产生较好特异性结合的引物,而且该结合位点的空间阻抑性又比较弱是保证重复性的关键,所以在引物筛选和标记选择上,应尽可能选择那些分子量大小适中(约500~ 2000 bp)、在遗传上表现完全显性的主带或强带作为标记。

参 考 文 献

- 1 William s J G K, A R Kubelik, K J L ivak et al *N ucleic A cids Res*, 1990, 18: 6531~ 6535
- 2 陈洪,钱前,朱立煌等 科学通报, 1996, 41(9): 833~ 836
- 3 卢扬江,郑康乐 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47~ 48
- 4 M icheal F R, J H W illiam, F A Charles *N ucleic A cids Res*, 1992, 20: 913~ 918
- 5 Heum M, T Helentjaris *Theor A ppl Genet*, 1993, 85: 961~ 968
- 6 M ailer R J, R Scarth, B Fristensky. *Theor A ppl Genet*, 1994, 87: 697~ 704
- 7 Hallden C, O M Hansen, O N Nilsm et al *Theor A ppl Genet*, 1996, 93: 1185~ 1192
- 8 M icheli H R, R Bova, E Pascale *N ucleic A cids Res*, 1994, 22: 1921~ 1922