

滇 I 型杂交粳稻两个高产组合保持系、 恢复系的 RAPD 标记分析*

陈升位, 杨 德, 张琼仙, 徐 洁, 王朝佐, 张雪梅, 谢昌华
(云南农业大学应用分子生物学实验室, 云南 昆明 650201)

摘要: 以滇 I 型杂交粳稻高产组合榆杂 29 保持系滇榆 1 号 B、恢复系南 29-1 和寻杂 36 保持系滇寻 1 号 B、恢复系南 29-2 为材料。采用混合筛选法, 从 200 个 RAPD 引物中, 筛出在两个组合保持系与恢复系间表现 RAPD 差异的 3 个标记: OPE-11₇₀₀, OPE-11₈₂₀, OPE-11₁₅₄₃。分别随机提取 4 个材料的 150 个单株 DNA, 构建 4 个随机单株 DNA 群体。利用 OPE-11₇₀₀, OPE-11₈₂₀, OPE-11₁₅₄₃ 3 个标记鉴别随机单株 DNA 群体。结果表明: OPE-11₇₀₀, OPE-11₈₂₀, OPE-11₁₅₄₃ 3 个标记在 4 个材料间均能扩增出明显的多态性产物, 重复性好, 4 个材料的单株正确鉴别率分别为: 滇榆 1 号 B: 97.3%, 南 29-1: 96%, 滇寻 1 号 B: 95.3%, 南 29-2: 92%。

关键词: 滇 I 型杂交粳稻; 保持系; 恢复系; RAPD 标记

中图分类号: S 511.2+2.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-390X(2001)03-0191-04

滇型杂交水稻是世界上较重要的杂交水稻类型之一, 其高产组合曾多次打破世界粳稻单产最高记录, 最高单产达到 16 628 kg/hm²。探讨杂交水稻三系间的遗传多态性, 将对滇型杂交水稻分子图谱构建、分子标记辅助选择育种、基因定位具有重要意义。目前, 常用的分子标记方法有: RFLP, STS, STR, RAPD 等^[1], 其中 RAPD 技术以其经济、高效、操作简单等特点得到了广泛的应用^[1]。近年来提出了集群分离分析、混合筛选等 RAPD 标记方法^[1,2,3], 利用 RAPD 标记方法鉴定、定位特定基因位点已成为现实^[1,2,3,4,5]。但滇型杂交水稻三系亲本间分子标记多样性研究仍处于起步阶段, 若要挖掘、利用滇型杂交水稻特有的遗传资源, 还须做许多工作。以滇 I 型杂交粳稻高产组合榆杂 29 保持系滇榆 1 号 B, 恢复系南 29-1 和寻杂 36 保持系滇寻 1 号 B, 恢复系南 29-2 为材料, 采用混合筛选法^[6], 筛选保持系与恢复系间 RAPD 差异标记。

1 材料和方法

1.1 材料

研究所用材料滇 I 型杂交粳稻高产组合榆杂 29 保持系滇榆 1 号 B, 恢复系南 29-1 和寻杂 36 保持系滇寻 1 号 B, 恢复系南 29-2 共 4 个材料均由云南农业大学稻作研究所提供。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取方法

云南农业大学应用分子生物学实验室改良 CTAB 法。

1.2.2 DNA 检测

采用 0.8% 的琼脂凝胶电泳检测 DNA 片断的大小及是否发生降解, 利用 751 分光光度计定量检测 DNA 浓度及纯度。

1.2.3 RAPD 分析

1.2.3.1 引物

RAPD 引物为 Operon 公司产品中的 E, F, G, H, M, O, P, W, V, Y 10 组共 200 个。

1.2.3.2 PCR 扩增反应

* 收稿日期: 2000-10-20

基金项目: 云南省应用基础重点基金项目(96C004Z)。

作者简介: 陈升位(1967-), 男, 云南永善人, 硕士, 讲师, 主要从事分子遗传学研究。

所用 PCR 为美国 Perkin Elmer 公司生产的 480 型 PCR 扩增仪。Taq 酶由中国华美公司提供。PCR 反应体系 25 μ L, 其成分为: 10 mmol/L tris - HCl (pH 9.0), 50 mmol/L KCl, 1.0 mmol/L Mg-Cl₂, 0.1 mmol/L 的每种 dNTP, 0.2 μ mol/L 引物、25 ng 的基因组 DNA, 1.2 μ L DNA 聚合 Taq 酶。反应混合物用 20 μ L 石蜡油覆盖。

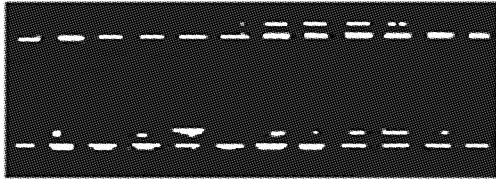
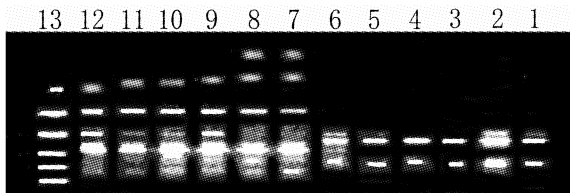


图 1 总 DNA 电泳图

Fig. 1 Figure of genome DNA electrophoresis

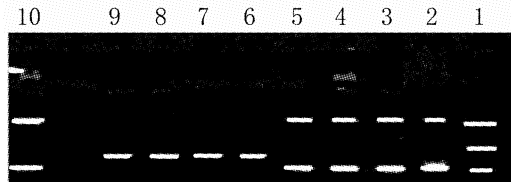
反应条件按厂家推荐的优化组合进行, 即 45 循环, 每个循环包括: 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 36 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 70 $^{\circ}$ C 延伸 2 min。首次循环前, 94 $^{\circ}$ C 变性 5 min, 最后一次循环结束后, 70 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。RAPD 产物经 1.4% 琼脂糖凝胶电泳分离, EB 染色后, 于紫外光下观察、拍照。



1 - 6 泳道为滇榆 1 B 单株; 7 - 12 泳道为南 29 - 1 的单株; 13 泳道为 Marker

图 2 OPE - 11 对滇榆 1 号 B 及南 29 - 1 的单株扩增

Fig. 2 the amplified result of Dianyu 1B and Nan 29 - 1's single plant with OPE - 11



6 - 9 泳道为滇寻 1 B 单株; 1 - 5 及 10 泳道为南 29 - 2 的单株

图 3 OPE - 11 对滇寻 1 号 B 及南 29 - 2 的单株扩增

Fig. 3 the amplified result of Dianxun 1B and Nan 29 - 2's single plant with OPE - 11

1.2.3.3 混合法筛选法

从 4 个材料中, 随机抽取 12 个单株 DNA, 等量混合, 组成样本 DNA 混合池^[6]。用 E, F, G, H, M, O, P, W, V, Y 10 组共 200 个 RAPD 引物, 对 4 个材料 DNA 混合池进行扩增。凡是扩增在 1 条以上, 且亲本间扩增带出现差异的, 再进行复选, 经 4 次复选后, 在入选引物中, 选出重复性相对较稳定的引物 OPE - 11。该在榆杂 29 保持系滇榆 1 号 B, 恢复系南 29 - 1 之间、寻杂 36 保持系滇寻 1 号 B, 恢复系南 29 - 2 之间均能扩增出 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 3 个标记。

1.2.3.4 600 个随机单株 DNA 的 RAPD 鉴别分析

在 4 个材料中, 分别随机提取每个材料的 150 个单株 DNA, 共 600 个单株 DNA 构建成 4 个随机单株 DNA 群体。用引物 OPE - 11 的 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 标记, 对 4 个材料 600 个随机单株 DNA 群体进行 RAPD 扩增, 其 DNA 能扩增 OPE - 11 的 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 标记的为 RAPD 标记正确鉴别单株, 否则, 为 RAPD 标记未正确鉴别单株。由于在 4 个材料的所有扩增中, 均能同时扩增出 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 3 个标记, 3 个标记对 4 个材料的 600 个随机单株 DNA 群体扩增具有相同的正确鉴别单株数, 3 个标记中的任一个标记的鉴别结果均能代表其他两个标记的鉴别结果, 因此, 按以一个标记计算正确鉴别单株百分率 (%) 及未正确鉴别单株百分率 (%)。计算方法如下:

正确鉴别单株百分率 (%) = 鉴别为相应材料的单株数 / 相应材料单株总数 \times 100

未正确鉴别单株百分率 (%) = 1 - 鉴别为相应材料的单株百分率 (%)

2 结果与分析

2.1 DNA 提取和检测

分别提取滇 I 型杂交粳稻组合榆杂 29 保持系滇榆 1 号 B, 恢复系南 29 - 1, 寻杂 36 保持系滇寻 1 号 B, 恢复系南 29 - 2, 4 个材料 150 个单株的 DNA。所提取的 DNA 经稀释 100 倍后, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳初步检测 DNA 浓度、质量, 结果表明, 该方法 DNA 的提取效果较好, 未发生降解, 含量较高, 如图 1 所示。

再用 751 分光光度计对 DNA 浓度、质量进行

定量检测,并按公式:DNA 浓度 = OD260/OD280 * 50/1000,计算 DNA 浓度,根据 OD260/OD280 值判断 DNA 纯度,结果表明,该方法提取的 DNA 150 $\mu\text{g/g}$ 鲜叶片,OD260/OD280 值在 1.76 ~ 1.83 之间,DNA 纯度较高。

2.2 混合 DNA 筛选引物及随机单株 DNA 群体鉴别

用 200 个(E, F, G, H, M, O, P, W, V, Y 10 组) RAPD 引物对混合 DNA 进行扩增。选出的物有: OPE04, OPE01, OPE11, OPE20, OPF09, OPF19, OPH02, OPH19, OPM02, OPO20, OPP08, OPY01

共 12 个引物。根据扩增多态性、扩增带形整齐度和相对稳定性,决定选用 E11 这个引物来鉴别随机单株 DNA 群体。600 个随机单株 DNA 群体中,4 个材料的 150 个单株均以较高的百分率扩增出 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 3 个标记(见图 2,图 3),4 个材料的正确鉴别单株数分别为:滇榆 1 号 B: 146,南 29 - 1: 144,滇寻 1 号 B: 143,南 29 - 2: 138。4 个材料的 150 个单株中 3 个标记的单株鉴别率(见表 1)分别为:滇榆 1 号 B: 97.3%,南 29 - 1: 96%,滇寻 1 号 B: 95.3%,南 29 - 2: 92.0%。

表 1 4 个材料的单株鉴别结果(以 OPE - 11₇₀₀ 标记计算)

Fig. 1 Identific result of four material single plant

材料	鉴别单株 总数	正确鉴别 单株数	未正确鉴别 单株数	正确鉴别 单株百分率/%	未正确鉴别 单株百分率/%
滇榆 1 号 B	150	146	4	97.3	2.7
南 29 - 1	150	144	6	96.0	4.0
滇寻 1 号 B	150	143	7	95.3	4.7
南 29 - 2	150	138	12	92.0	8.0

3 讨论

滇型杂交水稻榆杂 29,寻杂 29 等组合曾多次创世界粳稻单产最高记录,最高单产达到 16 628 kg/hm^2 ,具有较强的产量杂种优势,受到了国内外同行专家的高度重视。这暗示了榆杂 29,寻杂 29 等滇型杂交组合的亲本间具有较大的遗传差异。因此,研究滇型杂交水稻榆杂 29,寻杂 29 等组合三系亲本的遗传差异,不仅有利于滇型杂交水稻具有的一些高产基因的分选、克隆,有利于水稻杂种优势的遗传基础研究。目前,本课题组已筛选了一定的反映滇型杂交水稻榆杂 29,寻杂 29 等组合三系亲本的遗传差异的 RAPD 标记,并进一步采用 F₂ 代材料、DH 群体分析这些标记与性状间的关系^[1,5]。同时将该标记 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 标记转化为 RFLP 标记,利用 F₂ 分离群体、DH 群体等,进一步鉴别 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 3 个标记与性状间的关系,为定位与该标记相连锁的遗传性状的基因位点、分离克隆这些基因位点以及利用这些基因位点研究滇型杂交水稻的遗传机理奠定了一定的基础。

选择具有一定的遗传差异的亲本配组是获得

强优势组合的前提,而形态标记非常有限,不能满足这方面的要求^[1]。RAPD 标记具有较丰富的多态性、操作简便等优点。因此,RAPD 标记在构建水稻等材料的指纹图谱、分子标记辅助选择育种方面已有较多的应用^[1,5,6]。从扩增分析结果看,4 个材料对 OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 3 个标记均有一定的未扩增出相应差异带单株数,其中南 29 - 2 的百分率稍高,为 8%,这可能是四个材料本身的纯度不同造成的。但从试验的总体结果来看,各材料鉴别单株百分率均较高,滇榆 1 号 B: 97.3%,南 29 - 1: 96%,滇寻 1 号 B: 95.3%,南 29 - 2: 92.0%,说明 OPE - 11₇₀₀ 等 3 个标记较好地反映了以上 4 个材料的遗传多样性,OPE - 11₇₀₀, OPE - 11₈₂₀, OPE - 11₁₅₄₃ 3 个标记可作为滇型杂交水稻指纹图谱的部分内容、也可作为以上滇型杂交水稻 4 个材料分子标记辅助选择育种的参考标记。

[参 考 文 献]

- [1] 徐运碧,朱立煌.分子数量遗传学[M].北京:中国农业出版社,1994.
- [2] ZHANG G, BHARAJ T S, Lu Y et al.. Mapping of the Rf-3 nuclear fertility-restoring gene for WA cyto-

- plasmic male sterility in rice using RAPD and RFLP markers[J]. Theor Appl Genet, 1997, 94:27 – 33.
- [3] SCHOLTEN O E, MKLEIN-LANKHORST R D, ESSELINK G et al. . Identification and mapping of random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers linked to resistance against beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) in Beta accessions [J]. Theor Appl genet, 1997, 94:123 – 130.
- [4] YEFIM I, RONIE ABRAHAON B. korel Tzion Pahi-
ma ect Sequential estimation of Linkage Between PCR-generated markers and a Target Gene Empling Step-wise Bulked[J]. Analysis Bionetrics, 1996, 12: 1 429 – 1 439.
- [5] 陈洪, 朱立煌. RAPD 标记构建水稻分之连锁图谱 [J]. 植物学报, 1995, 23(3) :357 – 362.
- [6] 陆朝福. 植物育种中的分子标记辅助选择 [J]. 生物工程进展, 1995, 15(4) :211 – 217.

RAPD Marker Analysis about Two Combinations' Maintainer Line and Restoring Line of Dian I Type Japonic Rice

CHEN Sheng-wei, YANG De, ZHANG Qiong-xian, XU Jie,
WANG Cao-zhuo, ZHANG Xue-Mei, XIE Chang-hua

(Applied Molecular Biological Laboratory in Yunnan Agricultural University , Kunming 650201, China)

Abstract: The materials researched in the article are Dianyu I B, Nan29 – 1, Dianxun I B and NAN29 – 2, Dianyu I B is maintainer line of high yield combination Yuza29 and Nan29 – 1 is it's restoring line , Dianxun I B is maintainer line of high yield combination Xunza29 and Nan29 – 2 is it's restoring line . Two combines are all belong to Dian I type Japonic Rice. The different marker OPE – 11₇₀₀ ect between maintainer line and restoring line of two combinations was fond. We identified 600 random single plant DNA group with the marker OPE – 11₇₀₀, OPE – 11₈₂₀, OPE – 11₁₅₄₃, which composed of 150 random single plant DNA of each material, the result shows the amplactive repeat of the markers are well and the single plant percent about four kinds of material identified as fellow: Dianyu I B : 97.3% , Nan29 – 1: 96% , Dianyu I B: 95.3% , Nan29 – 2: 92.0% .

Key words: Dian I type Japonic Rice; Maintainer line; Restoring line; RAPD marker