

滇寻 1 号 A 中可育株的 RAPD 分析*

龙雯虹¹, 许明辉^{2**}, 张树华³

- (1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201;
2. 云南省农业科学院生物技术研究所, 云南 昆明 650223;
3. 云南农业大学稻作研究所, 云南 昆明 650201)

摘要: 首次用 RAPD 技术分析了滇寻 1 号 A 与其大田中自然产生的可育株的差异。在所用的 33 个随机引物中, 引物 OPA-13 在不育系和可育株间可扩增出差异性片段, 不育系与可育株的 DNA 在个别位点上存在差异。初步认为此差异与育性相关, 不育系中的可育株是由基因回复突变引起的。

关键词: 水稻; 不育系; 育性回复突变体; RAPD

中图分类号: S 511.032 文献标识码: A 文章编号: 1004-390X(2003)02-0140-02

Analysis of Fertile Plants Generation from Dianxun No.1 A with RAPD Marker

LONG Wen-hong¹, XU Ming-hui², ZHANG Shu-hua³

- (1. College of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;
2. Institute of Biotechnology, Yunnan Agricultural Academy of Sciences, Kunming 650223, China;
3. Rice Research Institute, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: The difference between Dianxun No.1 A and fertile plants generation from Dianxun No.1 A was analyzed with RAPD technique for the first time. Among 33 primers, primer OPA-13 can amplify a polymorphic fragment, that is difference occurred at one locus. The result indicated that the difference related to fertility or sterility, and the fertile plants were fertile revertant.

Key words: rice; sterile line; fertile revertant; RAPD

不育系的育性稳定性关系到杂交稻种子纯度的高低,大量的调查表明,杂交稻种子纯度每降低 1%,每 hm^2 将减产 60~70 kg,严重的达 150 kg 左右^[1]。因此,育性的研究是重要的课题,SHEN^[2]和朱旭东^[3]等用 RAPD, RFLP 等技术对育性回复突变体和不育位点进行了一定研究。但关于自然回复突变以及滇寻 1 号 A 的育性问题研究较少,滇寻 1 号 A 是由滇 I 型粳稻不育系转育的主干不育系,近年来发现在该不育系中发现了自交结实株,它们除在育性上发生变化外,其它性状与不育系并无差

别。RAPD 可以比较高效地对基因组 DNA 进行差异分析,因此试验用 RAPD 技术对滇寻 1 号 A 及可育株进行分析,试图找到与育性相关基因连锁的分子标记。

1 材料和方法

1.1 材料

对云南农业大学稻作研究所提供的滇寻 1 号 A 及其中产生的可育株进行 RAPD 分析。

* 收稿日期: 2002-09-10

** 通讯作者

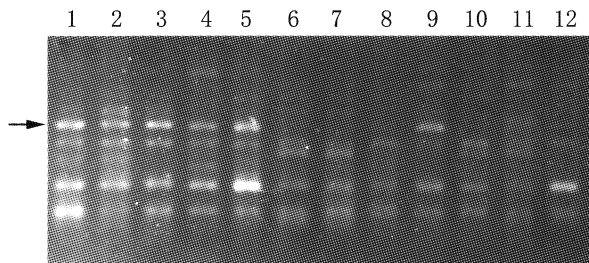
基金项目: 云南省后备人才基金项目(97-16)

作者简介: 龙雯虹(1972-),女,彝族,云南开远人,硕士,主要从事作物遗传育种研究。

1.2 方法

DNA的提取、RAPD反应条件及电泳检测方法同文献[4]。提取DNA的试剂为国产分析纯。扩增所用的33个随机引物是OPA-07, OPA-13, OPA-16, OPB-01, OPB-02, OPB-18, OPD-11, OPE-09, OPE-11, OPE-15, OPE-20, OPF-14, OPG-09, OPG-16, OPI-16, OPI-18, OPI-19, OPM-18, OPO-16, OPO-19, OPP-03, OPP-05, OPQ-11, OPS-13, OPU-01, OPU-03, OPU-06, OPU-09, OPW-07, OPW-16, OPX-03, OPX-14和OPX-20,均由美国Operon公司生产,其余试剂购自华美生物工程公司。

播种不育系群体,严格防止保持系滇寻1号B种子混入不育系滇寻1号A群体,根据散粉和结实情况,将该群体分为不育系和可育株两类植株,从两类植株中各随机抽取10株提取DNA用于RAPD分析。首先分别以所有不育株的混合DNA和所有可育株的混合DNA为模板,用上述引物进行扩增,选出可扩增出差异性产物的引物;再以各个单株的DNA为模板,用选出的引物进行扩增。



1 可育株 1; 2 可育株 2; 3 可育株 3; 4 可育株 4;
5 可育株 5; 6 滇寻 1 号 A 植株 1; 7 滇寻 1 号 A 植株 2;
8 滇寻 1 号 A 植株 3; 9 可育株 6; 10 滇寻 1 号 A 植株 4;
11 滇寻 1 号 A 植株 5; 12 滇寻 1 号 A 植株 6

图 1 引物 OPA-13 对滇寻 1 号 A 和可育株的扩增电泳图
Fig. 1 Agarose electrophoretic analysis of amplified products of genomic DNA of sterile line and fertile plants

2 结果与分析

33个引物都能扩增出产物,但只有引物OPA-13在不育系混合DNA和可育株混合DNA之间扩增出多态性产物,且只有个别位点上存在差异,即有差异的位点少。用引物OPA-13对不育系和可育株各个单株的DNA进行扩增,电泳结果见图1,图中箭头所指片段为可育株所特有。RAPD为

显性标记,经典遗传分析表明细胞质雄性不育系控制育性的核基因为隐性,由此可初步认为在箭头所指位点发生了显性突变,此位点可能与育性有关,这种突变导致可育。

3 讨论

不育系中可育株产生的原因可能有机械混杂、生物学混杂或自身的变异。本试验所用的滇寻1号A群体在繁殖、收获及播种过程中严格操作,排除机械混杂可育株的可能性,群体中的可育株表现为散粉,且自交结实率正常,因此也排除了串粉结实(即生物学混杂)的可能性。RAPD分析表明,可育株和不育系间多数位点无差异,仅一个位点上存在差异,从基因的角度进一步排除了机械混杂和生物学混杂产生可育株的可能性,而是基因回复突变的结果。另外,不育系和可育株除在育性上存在差异外,其它性状一致,据我们观察,回复突变可育株能恢复不育系,RAPD分析也表明在分析的众多位点中只有个别位点存在差异,因此滇寻1号A和其中产生的可育株构成恢复基因的近等基因系,这为进一步开展细胞雄性不育性及育性恢复的遗传研究和分子生物学研究提供了很好的试验材料。

研究人员已从植株的形态特征、同工酶谱带、氨基酸的含量等角度研究回复突变体^[5~7],结果认为回复突变体除产生可育花粉和自交结实外,其它性状与不育系一致;两者在同工酶谱带及脯氨酸与天冬氨酸的含量上都存在差异。但是,同工酶与氨基酸的差异是由于基因间的差异所致,DNA能更直接反应两者间的差异。本试验及前人^[2]的研究结果都表明,回复突变体与不育系在RAPD上不同,即回复突变体与不育系的DNA存在差异,RAPD还可标记出温敏不育系与原始株(即可育株)的差异^[8];另外,由于可以通过缩短PCR反应时间,以及不断对反应条件进行简化和优化,提高RAPD在育性研究中的可行性^[8]。因此,RAPD技术是分析育性的有力手段。

根据突变性质,可将育性回复突变分为两类^[9]:一类是从不育系回复为保持系,即突变体可育但无恢复力,称为B型回复,另一类是从不育系回复为恢复系,即突变体可育并能恢复不育系的育性,称为R型回复。B型回复突变体由细胞突变所

(下接第145页)

[参 考 文 献]

- [1] 娄成后. 育苗移栽为大田生产登上新台阶[J]. 北京农业大学学报, 1991, 17(2): 1-4.
- [2] 刘桂华. 贵州玉米地膜覆盖栽培技术推广回顾与发展对策[J]. 耕作与栽培, 1998, (3): 6-7.
- [3] 方继友. 春玉米薄膜育苗移栽技术[J]. 河北农业科技, 1990, (3): 9-11.
- [4] 阮培均. 玉米不同育苗方式移栽与产量相关试验[J]. 耕作与栽培, 1992, (3): 35-37.
- [5] 倪念雄. 玉米芯育苗[J]. 四川农业科技, 1989, (1): 13-15.
- [6] 余肇福. 玉米育苗移栽栽培技术[J]. 东北农学院学报, 1986, (2): 30-41.
- [7] 黄煦鹏. 玉米营养钵育苗移栽技术效益分析[J]. 陕西农业科学, 1990, (1): 43-47.
- [8] 阮培均. 玉米不同育苗期及不同叶龄移栽对产量的影响[J]. 耕作与栽培, 1993, (1): 35-38.
- [9] 孙秀英. 育苗移栽夏玉米高产原因及栽培技术[J]. 江苏农业科技, 1990, (3): 25-27.
- [10] 黄俊明. 贵州杂交玉米高产栽培综合配套技术[J]. 耕作与栽培, 1998, (2): 24-26.
- [11] 王夫玉, 朱茂顺, 李本良, 等. 夏玉米育苗移栽高产机理研究[J]. 江苏农业科学, 1994, (1): 18-21.
- [12] 朱晓康, 陆正明. 不同移栽叶龄对玉米肥球育苗移栽的影响[J]. 耕作与栽培, 2001, (4): 34.
- [13] 戴俊英译. 玉米的矿质营养和杂种优势[M]. 上海: 上海科技出版社, 1983.
- [14] Васильков. 在玉米早期发育阶段进行植株营养诊断[J]. 农学文摘(作物栽培), 1987, 870838.
- [15] BARRY D J A, MILLER M H. Phosphorus nutritional requirement of maize seedlings for maximum yield[J]. Agronomy Journal, 1989, 81: 95-99.

=====

(上接第 141 页)

致,与线粒体 DNA 的重复和缺失有关,而 R 型回复突变由核基因产生显性突变所致。本试验的结果和我们的大田观察结果(即滇寻 1 号 A 中的可育株能恢复不育系)表明,滇寻 1 号 A 中自然产生的可育株是由核基因产生显性突变所致,应归属于 R 型回复。前人^[2,5,6,7,9]用⁶⁰Co- γ 射线处理 II-32A 得到 R 型回复突变体,该突变体与不育系的遗传差异还小于不育系与相应的保持系之间的差异,回复突变体只发生少量的变异。本研究也表明,回复突变体与不育系的差异很小,可见无论是射线照射诱发产生,还是自然突变产生的回复突变体与原始不育系间的差异都小,但自然产生的滇寻 1 号 A 中的可育株、不育系和保持系三者之间的遗传差异大小有待进一步的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 施文娟. 杂交稻及其三系种子混杂的原因及其防止措施[J]. 种子, 1999, (4): 67-68.
- [2] SHEN Y W, GUAN Z Q, LIU J, et al.. Linkage analysis of a fertility restoring mutant generated from CMS rice[J]. Thor Appl Genet, 1998, 97: 261-266.
- [3] 朱旭东, 王建林, 钱前, 等. 籼粳位点的发现及其遗传分析[J]. 遗传学报, 1998, 25(3): 245-251.
- [4] 龙雯虹, 许明辉. 籼稻和粳稻在 RAPD 上的差异[J]. 云南农业大学学报, 2002, 17(3): 245-247.
- [5] 沈毓渭, 蔡其华, 高明尉. 水稻细胞质雄性不育性恢复突变的初步研究[J]. 中国水稻科学, 1994, 8(1): 27-31.
- [6] SHEN Y W, CAI Q H, GAO M W, et al.. Isolation and genetic characterization of a fertility-restoring revertant induced from cytoplasmic male sterile rice[J]. Euphytica, 1996, 90: 17-23.
- [7] 沈毓渭, 高明尉. 水稻细胞质雄性不育系 R 型育性回复突变体的同工氨基酸分析[J]. 作物学报, 1996, 22(2): 241-246.
- [8] 张忠廷, 李松涛, 王斌. RAPD 在水稻温敏不育研究的应用[J]. 1994, 21(5): 373-378.
- [9] 沈毓渭, 蔡其华, 高明尉. 一个恢复力受单基因控制的水稻 CMS 育性回复突变体[J]. 遗传学报, 1995, 22(6): 437-444.