

# 红莲型杂交稻(红莲 2 号)及其骨干亲本的 RAPD 分析与鉴定\*

段世华<sup>1,2</sup> 毛加宁<sup>3</sup> 朱英国<sup>1\*\*</sup>

(1. 武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 武汉大学遗传研究所, 武汉 430072;

2 江西井冈山师范学院生物系, 江西吉安 343009; 3 四川乐山师范学院生物系, 四川乐山 614000)

**摘要:** 利用 RAPD 技术, 从 248 个随机寡核苷酸引物(10-mer)中筛选出 18 个引物对红莲型杂交稻组合红莲 2 号及其亲本(T-07A、T-07B、YD6-05), 另 6 个红莲型胞质不育系的骨干恢复系和汕优 63 及其亲本共 14 份水稻材料进行分析。共检测到 173 个多态性标记。聚类分析结果表明: 不育系与保持系间因核背景相似, 遗传差异很小; 杂种(F<sub>1</sub>)的基因型更倾向于恢复系; 恢复系与保持系间遗传距离相对较大, 但各恢复系之间的遗传距离较小。利用这些标记能有效地区分杂交组合中不育系、保持系、恢复系和杂种(F<sub>1</sub>)。

**关键词:** 杂交水稻; RAPD; 骨干亲本; 遗传分析; 鉴定

中图分类号: Q344.4

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2002)03-0171-06

## Genetics Analysis and Identification of Hybrid Rice HL-Type (Honglian-2) and Their Backbone Parental with RAPD Markers

DUAN Shi-Hua<sup>1,2</sup>, MAO Jia-Ning<sup>3</sup>, ZHU Ying-Guo<sup>1\*\*</sup>

(1. The Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Institute of Genetics, Wuhan University, Wuhan 430072, China;

2 Department of Biology, Jinggangshan Normal College, J'ian, Jiangxi 343009, China;

3 Department of Biology, Leshan Normal College, Leshan, Sichuan 614000, China)

**Abstract:** A total of 248 arbitrary 10-mer oligonucleotide primers were screened using RAPD (random amplified polymorphic DNA) technique on the genome DNAs of 14 rice materials which included HL-type hybrid rice (Honglian-2) and their parental(T-07A, T-07B, YD6-05), six other backbone restore lines of CMS-Honglian-type, Shanyou 63 and their parental Eighteen primers produced 173 polymorphic fragments. The results from cluster analysis showed: There was little genetic diversity between sterile lines and maintainer lines because of their similar nuclear background. The genome-type of hybrid rice was inclined to restore lines. There was large genetic variation between restorer lines and sterile lines, but the genetic distance was small among restorer lines. Using this RAPD markers, the hybrid rice combinations (sterile line, maintainer line, restorer line and hybrid rice(F<sub>1</sub>)) could be effectively identified.

**Key words:** Hybrid rice; RAPD; Backbone parental; Genetics analysis; Identification

植物雄性不育是作物杂种优势利用的基础。水稻细胞质雄性不育系按其花粉败育时期和花粉败育

收稿日期: 2001-09-17, 修回日期: 2001-11-27。

\* 基金项目: 国家转基因专项基金资助项目(J99-A-002)。

作者简介: 段世华(1968-), 男, 江西永新人, 在读硕士, 井冈山师范学院讲师, 从事生物化学与分子生物学教学与科研工作。

\*\* 通讯作者。武汉大学遗传研究所, Tel: 027-87684560。

的形态特征及恢保关系可以归纳为三大类型: 野败型(WA)、包台型(BT)和红莲型(HL)<sup>[1]</sup>。分子标记技术的出现和发展为揭示作物的遗传差异和种质鉴定提供了新的方法和手段。继 Grodzicker 等(1974)开始把限制性片段长度多态性 RFLP (Restriction fragment length polymorphism) 作为遗传分析的工具之后, 1990 年 Williams 等<sup>[2]</sup>建立了 RAPD (Random amplified polymorphic DNA) 分子标记技术, 由于其程序简便、快速灵敏等特点, 所以在遗传图谱构建、基因定位、种质鉴定和遗传关系分析中得到了广泛的应用。利用 RAPD 分子标记技术对野败型和包台型三系杂交水稻及其亲本的遗传多样性和种质鉴定已经开展了较多的研究<sup>[3-7]</sup>。但对红莲型杂交水稻及其亲本间的遗传分析与鉴定未见报道。本研

究利用 RAPD 技术对武汉大学新近培育的红莲型杂交水稻红莲 2 号组合(T-07A、T-07B、YD6-05、红莲 2 号)及其另 6 个骨干恢复系进行分析, 同时以野败型杂交水稻汕优 63 组合参与比较研究, 以期能揭示它们之间遗传多样性及其差异, 并为杂交育种实践和种质鉴定提供一定的分子生物学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验选用了武汉大学新近培育的红莲型杂交水稻红莲 2 号组合及其骨干恢复系和野败型杂交稻汕优 63 组合共 14 份水稻材料进行 RAPD 分析(见表 1)。材料种子均由本实验室提供。

表 1 供试材料  
Table 1 Materials for the experiment

编号 No.	名称 Name	类型 Type	亲缘关系 Original relation
1	T-07A	不育系(红莲型) CMS-Honglian-type	杂交稻红莲 2 号亲本( ) Parental side of hybrid rice Honglian-2 ( )
2	T-07B	保持系 Maintainer line	
3	红莲 2 号 Honglian-2	杂种 Hybrid rice	T-07A ( ) × YD6-05 ( )
4	YD6-05	恢复系 Restore line	杂交稻红莲 2 号亲本( ) Parental side of hybrid rice Honglian-2 ( )
5	特青 Teqing	恢复系 Restore line	
6	E32-1	恢复系 Restore line	
7	R 24	恢复系 Restore line	
8	R 64	恢复系 Restore line	
9	测 64 Ce 64	恢复系 Restore line	
10	CDR 22	恢复系 Restore line	
11	明恢 63 Minghui 63	恢复系 Restore line	杂交稻汕优 63 亲本( ) Parental side of hybrid rice Shanyou 63 ( )
12	汕优 63 Shanyou 63	杂交稻 Hybrid rice	珍汕 97A ( ) × 明恢 63 ( ) Zhenshan97A ( ) × Minghui 63 ( )
13	珍汕 97B Zhenshan 97B	保持系 Maintainer line	
14	珍汕 97A Zhenshan 97A	不育系(野败型) CMS- Wild abortive	杂交稻汕优 63 亲本( ) Parental side of hybrid rice Shanyou 63 ( )

1.2 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。

1.3 RAPD 反应

25 μL PCR 反应体系, 包括 10 mmol/L Tris-

HCl (pH9.0), 50 mmol/L KCl, 0.001% Gelatin, 2.5 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 100 μmol/L dNTP (上海 Promega 公司), 0.4 μmol/L RAPD 引物 (Sangon 公司), 1 U Taq-DNA 聚合酶 (上海 Promega 公司), 50 ng 水稻基因组 DNA 模板。程序为: 94 预

变性 5 min; 再按 94 1 min, 38 1 min, 72 1.5 min, 共 39 个循环; 72 延伸 5 min。PCR 扩增在 PTC-100 Programmable Thermal Controller PCR 仪上完成。RAPD 扩增产物 10 μL 在 1.5% 琼脂糖凝胶中电泳 2~ 3 h (4~ 5 V/cm), 经溴化乙锭染色后, 紫外检测并照相, 然后在 GelDoc 2000 凝胶成像仪中扫描分析并保存文件。以 PCR marker 为分子量标准。

1.4 数据分析

选择重复性好, 多态性强, 扩增条带清晰的引物作记录。将有带赋值为 1, 无带赋值为 0。用 RAPD IST 程序计算个样品间的 Nei 氏遗传距离  $D$ 。  $D = 1 - 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ , 其中  $N_x$  为样品  $x$  具有的条数,  $N_y$  为样品  $y$  具有的条带数,  $N_{xy}$  为 2 样品共有带的条数。再用 PHYLIP3.5c 软件包的 Neighbor 程序按 UPGMA (Unweighted pair group method with arithmetic mean) 方法进行聚类分析。

2 结果与讨论

2.1 RAPD 扩增对杂交水稻亲本材料的区分结果

对 Sangon 公司的 248 个 10-mer 引物进行筛选, 选择能够扩增出清晰、稳定带的 18 个引物进行正式扩增并参与分析统计。18 个引物共扩增出 216 条带, 单个引物的扩增带在 7~ 16 之间, 平均每个引物扩增出 12 条带, 在 216 条带中, 173 条为多态性条带 (70.09%), 表现出良好的多态性(表2)。在上述 18 个引物中发现 5 个 RAPD 引物, 能够分别区分所选的 2 个杂交水稻组合中各材料(图1: A、B、C、D, 表3)。

通过对杂交组合和双亲进行分析发现杂种带型主要表现为和扩增条带数较为丰富的一方亲本相同(图1: D)或者为双亲的互补(图1: B)。从理论上讲, 杂种包含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 为显性标记, 故杂种的多态性应为双亲的互补型或扩

表 2 18 个 RAPD 引物的序列及标记数  
Table 2 List of 18 RAPD primers, their sequences and amplification results

引物 Primer	5'~ 3' 序列 5'~ 3' sequence	G+ C (%)	扩增片段总数 Total No. of amplified fragments	多态性片段数 No. of polymorphic fragments
S207	GGCA GGCTGT	70	14	12
S208	AACGGCGACA	60	13	9
S215	GGA TGCCACT	60	9	5
S232	ACCCCCCACT	70	7	4
S429	TGCCGGCTTG	70	16	16
S436	AA GCGACCTG	60	13	10
S438	GGTGA GGTC A	60	12	10
S440	GGTGCTCCGT	70	8	7
S1053	CA GCCGTTCC	70	15	12
S1398	TGGTCCA GCC	70	10	8
S1418	CTGGGGTGTC	70	11	9
S1422	GTCGTCGTCT	60	15	14
S1424	AGGGGACCTG	70	12	9
S1483	GAA GGA GGCA	60	10	8
S1492	GACGCACTTC	60	9	6
S1494	GGTGCGCACT	70	14	12
S1496	TCCCGGTGAG	70	14	11
S1520	TGCGCTCCTC	70	12	9
Total	18		216	173

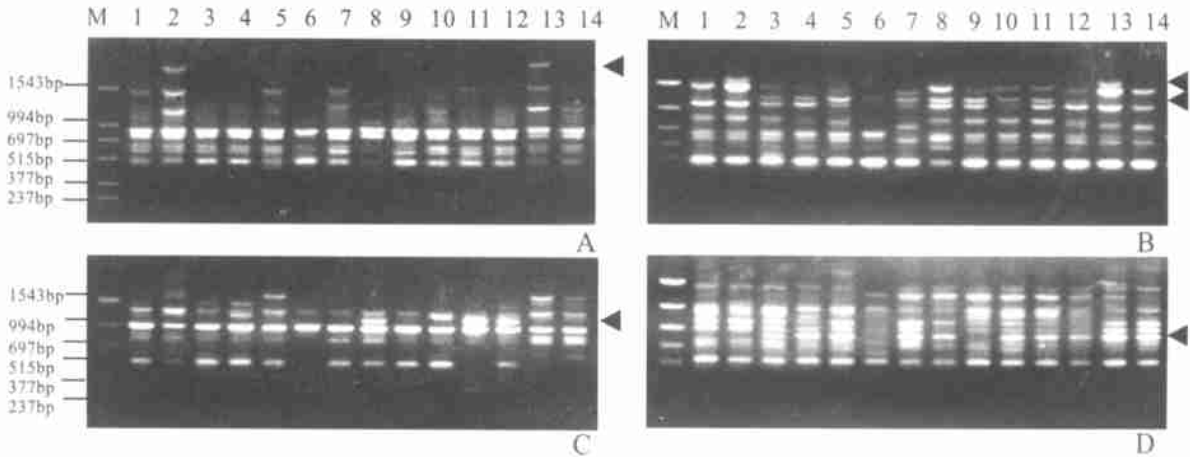


图 1 A、B、C 和 D 分别为 RAPD 引物 S436、S438、S1398 和 S1496 的扩增图谱  
(1~ 14 为材料编号同表 1, “M” 为 DNA 分子量标准, “▶” 表示多态性位点)  
Fig 1 A、B、C and D are the amplified profile with primer S436, S438, S1398 and S1496, 1~ 14 represents the accession number listed in table 1 on fig 1~ 4 “M” indicates DNA marker: PCR marker, “▶” indicates polymorphism locus

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, 或杂种出现双亲不具有的扩增带<sup>[9]</sup>。

表 3 杂交水稻(F<sub>1</sub>)及其亲本的 RAPD 多态性标记  
Table 3 RAPD markers in hybrid rice(F<sub>1</sub>) and their parental

引物 Primer	分子量 Marker size (bp)	杂交水稻(F <sub>1</sub> )/亲本				Hybrid rice(F <sub>1</sub> )/Paternal			
		T-07A	T-07B	红莲 2 号 Honglian-2	YD 6-05	明恢 63 Minghui-63	汕优 63 Shanyou-63	珍汕 97B Zhenshan-97B	珍汕 97A Zhenshan-97A
S436	1 700	-	+	-	-	-	-	+	-
S438	1 560	-	+	-	-	-	-	+	-
	1 150	-	-	+	+	+	+	-	-
S1398	1 100	-	-	-	-	+	+	-	-
S1492	1 200	+	+	+	-	-	+	+	+
	1 100	+	+	+	-	-	+	+	+
S1496	600	-	-	+	+	+	+	+	+

注: +、- 分别代表随机扩增片段的有无, 仅记录具有较好重复性的多态性片段。  
Notes: + or - represents the polymorphic state, + present; - absent The reproducible and polymorphism fragments were recorded

通过对表 3 结果的分析和比较, 我们发现一些标记只在杂种和其恢复系(父本)中出现而在不育系(母本)和保持系中不存在, 故这些标记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 3 中的 S438/1150, S1398/1100 等标记, 也有一些标记在保持系中出现而在不育系中则不存在, 如 S436/1700 标记, 能用于对不育系和保持系的区分。

2.2 杂交水稻亲本遗传关系分析

根据 18 个强多态性引物的扩增结果, 计算出

Nei 氏遗传距离(见表 4)并进行聚类分析(见图 2)。聚类结果表明: 不育系和保持系之间, 由于它们具相同的核背景, 遗传差异很小。T-07A、T-07B 是分别从粤泰 A、粤泰 B 中经过高度纯化选育的同核异质体, 它们的相似系数(GS)非常高, 达到 0.99; 恢复系与不育系间的遗传距离相对较大, 这说明了杂种优势的原因; 各恢复系之间遗传差异较小, 从一定程度上反应了恢复系遗传基础的匮乏; 杂种(F<sub>1</sub>)的基因型更倾向于恢复系, 而与不育系遗传距离大些。在 GS = 0.77 处, 可将 14 个供试材料聚为两大类: 第一

表 4 杂交水稻(F<sub>1</sub>)及其亲本之间的遗传距离\*  
Table 4 Genetic distance between hybrid rice(F<sub>1</sub>) and their parental

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	Q 0000													
2	Q 0209	Q 0000												
3	Q 1813	Q 1938	Q 0000											
4	Q 2998	Q 3282	Q 1447	Q 0000										
5	Q 3210	Q 3354	Q 3210	Q 2655	Q 0000									
6	Q 5806	Q 5993	Q 5442	Q 3952	Q 6280	Q 0000								
7	Q 2998	Q 2998	Q 3427	Q 3282	Q 2521	Q 4920	Q 0000							
8	Q 5993	Q 5993	Q 5993	Q 4920	Q 5353	Q 4669	Q 4752	Q 0000						
9	Q 3282	Q 3282	Q 2193	Q 1567	Q 2929	Q 3354	Q 2723	Q 4107	Q 0000					
10	Q 2860	Q 2998	Q 2193	Q 2587	Q 3210	Q 4264	Q 2723	Q 4752	Q 1938	Q 0000				
11	Q 3210	Q 3500	Q 2521	Q 2257	Q 3427	Q 4029	Q 3210	Q 4669	Q 1875	Q 1507	Q 0000			
12	Q 2587	Q 2723	Q 1813	Q 2323	Q 3500	Q 4920	Q 3427	Q 5091	Q 1813	Q 2193	Q 1751	Q 0000		
13	Q 1938	Q 1813	Q 2723	Q 2860	Q 2929	Q 5442	Q 2998	Q 5806	Q 2998	Q 3427	Q 3952	Q 2064	Q 0000	
14	Q 2064	Q 2193	Q 2723	Q 2860	Q 2929	Q 5442	Q 3282	Q 5806	Q 2860	Q 3282	Q 3799	Q 1813	Q 0423	Q 0000

\* 材料序号同表 1。  
\* The accession number of materials is the same as table 1.

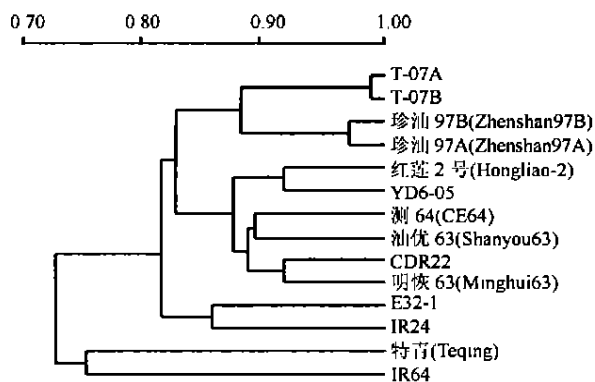


图2 根据RAPD数据用UPGMA法构建的树状图

Fig. 2 The dendrogram generated by RAPD data using UPGMA method

类包含12个水稻材料。在 $GS = 0.88$ 处, 又可以将12个材料分为3个亚类: 2种类型的不育系与其相应的保持系聚在一起后并为I类; II类包含有杂种与其相应的父本(恢复系)及CDR22和测64两个恢复系; III类为E32-1、IR24两个恢复系。特青和IR64两个恢复系聚为第二类。从聚类结果也反应出红莲-2号组合较强于汕优63组合, 这与本实验室的育种实践相符。

### 3 讨论

分子标记技术对作物的遗传关系和种质鉴定研究与以往的形态标记、系谱分析、配合力表现及同工酶等方法比较, 其表现出明显的优越性。RAPD技术由于引物短(10mer), 退火温度较低, 易导致引物与模板的错配, 因此相对于其它分子标记, 如RFLP、AFLP (Amplified fragment length polymorphism) 和SSR (Simple sequence repeat) 等来说稳定性较低<sup>[10]</sup>。但其快速、简便、灵敏度高和检测区域广等特点, 使之在众多的分子标记技术中仍具有较大的应用空间。许多研究表明, 只要严格控制反应条件, 重复结果是可以得到的<sup>[6, 11, 12]</sup>。本研究中所选用的18个引物在稳定的扩增条件下, 均表现出非常好的重复性, 并对所选的水稻材料具良好的区分效果。

我国水稻雄性不育系遗传资源丰富, 但在生产中应用面积较大的雄性不育系数量不多, 而大多数集中在对野败型雄性不育系的选育和利用, 它们的遗传背景比较单一。为了避免出现遗传的脆弱性, 防止因遗传单一而造成的潜在危机, 需加大对不同细胞质不育类型的不育系和保持系的开发力度, 使在生产中的胞质不育类型向多极化发展。红莲型细胞

质雄性不育系的遗传特点, 虽然与其它类型的胞质不育特点不同, 但从它们的选育过程来看却与其它类型有着相同的来源<sup>[1]</sup>, 因此在聚类分析中表现出较近的亲缘关系。另外, 生产中推广的籼型不育系的恢复性基本上含有东南亚地区品种或品系的血缘<sup>[13]</sup>, 因此它们之间也表现出较大的遗传相似性, 这也就导致它们在实际生产应用上具有很大的局限性。研究表明, 具有强优势组合的恢复性与不育系之间, 表现出较远的遗传距离, 但由于它们的遗传背景的单一性, 也提示我们利用现有的这些籼型不育系和恢复系配制超高产组合的可能性较小。为了实现杂交水稻的超高产, 有待于开发新的稻种资源, 充分利用籼粳间遗传变异(粳型或籼粳型不育系、恢复系), 引进新的有利基因。因此, 在分子水平了解杂交水稻各亲本间的遗传关系, 对指导亲本的选配, 加快育种进程具有非常重要的意义。

**致谢:** 在本论文的写作和修改过程中, 武汉大学遗传研究所的李绍清博士对论文提出了宝贵的修改意见, 在此表示衷心感谢!

### 参考文献

- [1] 朱英国主编 水稻雄性不育生物学[M] 武汉: 武汉大学出版社, 2000 12—31
- [2] Williams J G K, Kubelik A R, Kennen J A, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers[J]. *Nucleic Acids Research*, 1990, 18: 6531—6535
- [3] Wang B, Xu W W, Wang J Z, et al. Tagging and mapping the thermo-sensitive genetic male-sterile gene in rice (*Oryza sativa* L.) with molecular markers [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 1111—1114
- [4] 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* [J], 1996, 10 (4): 241—242
- [5] 何光华, 裴炎, 杨光伟, 等. 我国中籼杂交稻亲本的 DNA 变异性研究[J]. *作物学报*, 2000, 26 (4): 449—454
- [6] Zhou Z, Gustafson J P. Genetic variation detected by DNA fingerprinting with a rice minisatellite probe in *Oryza sativa* L [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 481—488
- [7] 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
- [8] 段世华, 毛加宁, 朱英国. 利用 RAPD 分子标记对我国杂交水稻主要恢复性的 DNA 多态性研究[J]. 武

- 汉大学学报, 2001, **47**(4): 508—512
- [9] 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其亲本进行区别和鉴定[J]. 作物学报, 2000, **26**(3): 292—296
- [10] 孙传清, 毛龙, 王振山, 等. 栽培稻和普通野生稻基因组的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 初步分析[J]. 中国水稻科学, 1995, **9**(1): 1—6
- [11] 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
- [12] 汪小全, 邹喻萍, 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
- [13] 李云海, 肖晗, 张春庆, 等. 用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异[J]. 植物学报, 1999, **41**(10): 1061—1066