

RAPD 鉴定栽培稻与野生稻体细胞杂种

李文彬 梁红健 孙勇如 颜秋生 张雪琴 滕 胜

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

(中国水稻研究所 杭州 310006)

摘 要 利用随机引物扩增 DNA (RAPD) 技术,对栽培稻和野生稻原生质体融合获得的体细胞杂种进行了鉴定。证实了它们包含有双亲的基因组成分,但来自双亲的基因组成分并不是对等的。一些体细胞杂种含有一个亲本更多的基因组成分,而另一些相反。利用 RAPD 数据和聚类图讨论了体细胞杂种和双亲的亲缘关系。

关键词 水稻, 体细胞杂种, RAPD

通过原生质体融合获得体细胞杂种,可以打破有性生殖隔离实现遗传物质重组,从而可以转移多基因及细胞质基因调控的性状。

RAPD 技术是分析植物基因组的有力工具^[1]。由于该技术可以分析到基因组相当大的部分,因此它可以检测到基因组的变化,如在转基因植株中外源基因的存在^[2],突变体基因组 DNA 序列改变以及有性杂交杂种中双亲基因组的重组等^[3]。同样道理,RAPD 技术也可以用于体细胞杂种的鉴定并分析体细胞杂种与双亲的亲缘关系。

我们用 PEG 法和电融合法获得了栽培稻和野生稻的体细胞杂种。本文报道用 RAPD 技术对获得的体细胞杂种的鉴定和分析。

1 材料和方法

1.1 植物材料

共使用了 7 个水稻材料(表 1),其中体细胞杂交的亲本材料 02428 为广亲和梗稻品种。*Oryza officinalis* 为药用野生稻,*Oryza eichingeri* 为紧穗野生稻。

表 1 本实验使用的植物材料

Table 1 Plant materials used in the study

No.	Plant materials
a	<i>O. officinalis</i> (wild <i>Oryza</i> species)
b	pf9279 (somatic hybrid, <i>O. officinalis</i> +02428)
c	pf9252 (somatic hybrid, <i>O. officinalis</i> +02428)
d	pf9244-17 (somatic hybrid, <i>O. officinalis</i> +02428)
e	02428 (<i>O. sativa</i> L. cultivar, japonica)
f	pf9301 (somatic hybrid, <i>eichingeri</i> +02428)
g	<i>O. eichingeri</i> (wild <i>Oryza</i> species)

1.2 DNA 制备

取各供试材料的嫩叶片,按以前的方法^[4]分别提取并纯化其总 DNA。

1.3 引物

共使用了 10 个随机引物,均为 20bp 的叶绿体寡核苷酸,各引物的 GC 含量均在 50% 以上。该引物系列为意大利 Pavia 大学 F. Sala 教授提供。

1.4 DNA 扩增反应

按以前报道的程序进行 DNA 扩增^[4],20 μ l 的反应体积。

1.5 扩增产物的琼脂糖胶电泳及记录

取 10 μ l 的反应产物按以前的方法^[4]电泳、照相并严格按照片上扩增条带的有无做记录。

1.6 数据分析

根据对电泳结果的记录,计算单匹配系数,其运算公式为:

$$S_{sm} = \frac{a}{a+b}$$

其中 S_{sm} 为单匹配系数(Simple matching coefficient); a 为两个材料均为 0(无扩增条带)或 1(有扩增条带)的总数; b 为两个材料分别为 0 和 1 的条带总数。使用 UPGMA 方法进行聚类分析。

2 结 果

2.1 扩增反应

10 个引物中,只有 6 个引物对各个材料都有扩增产物。它们是:Ch1. 23、Ch1. 32、Ch1. 2、Ch1. 26、Ch1. 3N。各引物的序列列于表 2。另外 4 个引物只有部分材料有扩增产物,可能是由于这些引物的序列与基因 DNA 同源性低,缺乏互补位点造成的。其结果未用来做结果分析。

表 2 本实验的引物及其序列

Table 2 The name and sequence of pe used

Name	Sequence
Ch1. 2	AATGCGTTGAGGCGCAGCAG
Ch1. 3N	AACGTATTCGTTCCGGTTGCG
Ch1. 23	ACGCTGTACCTAGAGGATAG
Ch1. 26	CAATTCGAGGATCCAGAGAC
Ch1. 32	TGCCCTTGATCCACTTGGCTA
Ch1. 33	ATTATCGCCTTCATCGTGC

2.2 单匹配系数计算

计算结果见表 3。

表 3 单匹配系数矩阵*

Table 3 The mat of simple matching coefficient*

<i>a b c d e</i>					
1.000000					
0.475000	1.000000				
0.575000	0.600000	1.000000			
0.450000	0.675000	0.775000	1.000000		
0.500000	0.675000	0.675000	0.850000	1.000000	
<i>e f g</i>					
1.000000					
0.6097561	1.000000				
0.5121951	0.3658537	1.000000			

* $a \sim g$; See Table 1

2.3 聚类分析

经计算机处理,获得聚类图(图 1A、B)。

3.1 野生稻 *O. eichingeri* 和栽培品种 02428 的体细胞杂种 pf9301

在一些引物的情况下,如引物 Ch1. 23 和 Ch1. 33,以 pf9301 基因组 DNA 为模板的 RAPD 产物,其电泳图谱与亲本之一 02428 很接近(图版 1-1,2)。这说明在基因组水平上,体细胞杂种 pf9301 更接近栽培品种的亲本。但在另一些引物的情况下,pf9301 的

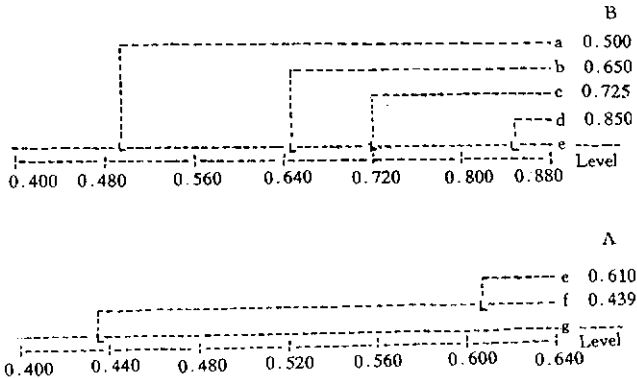


图 1 根据 RAPD 数据构建的聚类图

Fig. 1 Dendrogram based on RAPD data

* a-g see Table 1

RAPD 图谱和两亲本有明显的差异。在图版 I-4 (引物 Ch1.26) 中, pf9301 的两条主带, 上边的一条来自野生稻亲本, 而下一条则来自另一亲本栽培稻 02428。作为体细胞杂种 pf9301, RAPD 图谱中不仅包括了两个亲本的主带, 而且能产生双亲都不具备的扩增带 (图版 I-3)。出现新的扩增带的原因应该是原生质融合后, 双亲基因组发生了重组。在重组后的体细胞杂种基因组

DNA 链上, 出现了可与引物杂交的新位点。因此扩增出双亲都没有的 DNA 片断。

上述结果证实了 pf9301 是体细胞杂种植株, 它包含了双亲的部分遗传物质, 其中之一 02428 所占的比例大于另一亲本野生稻 *O. eichingeri*。聚类分析也说明了这一结果 (图 1A)。从聚类图上可以看出, 体细胞杂种 pf9301 距亲本 02428 较近, 而距亲本野生稻较远。对体细胞杂种的表型与两亲本做了比较, 其结果与 RAPD 分析一致。

3.2 野生稻 *O. officinalis* 和栽培品种 02428 的体细胞杂种 pf9279、pf9252 和 pf9244-17

分析了这一组合的 3 个体细胞杂种。几个引物的 RAPD 图谱显示 pf9244-17 和 pf9259 与亲本 02428 基本一致 (图版 I-5~8)。和少数引物使 pf9244-17/pf9252 与 02428 有小的差异 (图版 I-片 9)。RAPD 图谱分析表明 pf9244-17/pf9252 确为体细胞杂种, 但重组后的基因组更接近亲本 02428。从聚类图上也可以看出 pf9244-17 和 pf9252 与亲本 02428 的关系更近一些。

在大多数引物的情况下, pf9279 的 RAPD 图谱表现出明显的杂种性质, 包含了双亲的主要扩增带 (图版 I-5、6、8)。在引物 Ch1.2 时, 其图谱近似亲本野生稻 (*O. officinalis*) (图版 I-2-9); 而 D 引物 Ch1.26 的情况下, 它的主带近似另一亲本 02448, 但出现了扩增带的缺失 (图版 I-7)。从聚类分析图上可以看出, 它几乎居于两个亲本的中间。这些结果不仅证明了 pf9279 的杂种性质, 而且表明了它与基其它细胞杂种不同的是更多地包含了野生稻亲本的遗传物质。

结果表明, 通过 RAPD 分析体细胞杂种的基因组, 是一个鉴定体细胞杂种的简便有效的方法。同时通过 RAPD 的结果, 可以进一步分析体细胞杂种与双亲遗传上的距离。

通过原生质体融合获得的体细胞杂种中, 包含有不等量的双亲的遗传物质, 这在体细胞杂交中是比较普遍的现象。造成这种情况的原因一种可能是两亲本游离原生质体的供体细胞生长 (分裂) 活跃程度的差异而导致不对称杂种; 另一种可能是两亲本细胞核的 DNA 复制速度不同而造成分配到每个杂种细胞核中的染色体数不相同。

参 考 文 献

- [1] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J *et al.* Nucleic Acids Res, 1990, **18**: 6531-6535.
[2] Hamill J D, Rounsley S, Spencer A *et al.* Plant Cell Reports, 1991, **10**: 221~224.
[3] Wang G, Castiglione S, Zhang J *et al.* Plant Cell Reports, 1994, **14**: 112~115.
[4] 李文彬、周小梅、张 健等, 农业生物技术学报, 1995, **3** (2): 1~6.

Identification of Somatic Hybrids Between Rice Cultivar and Wild *Oryza* Species by RAPD

Li Wenbin Liang hongjian Sun Yongru

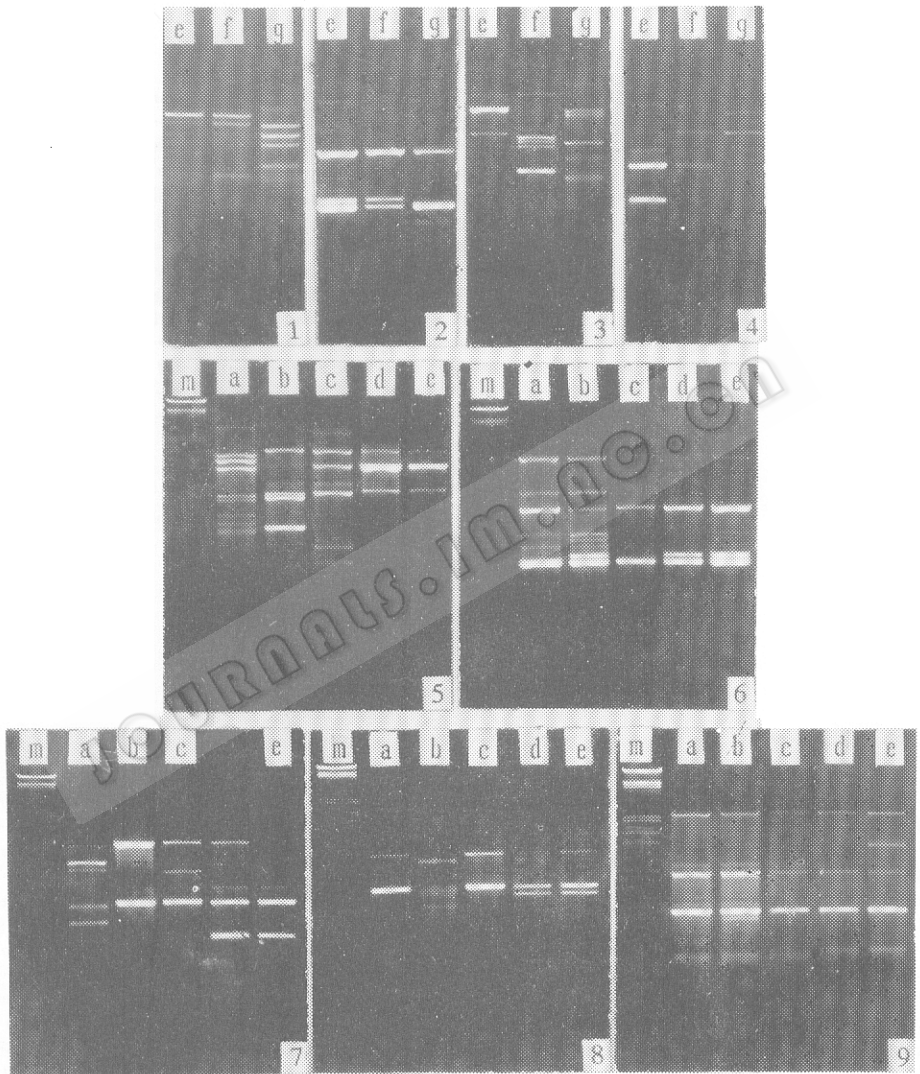
(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Yan Qiusheng Zhang Xueqin Teng Sheng

(*China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006*)

Abstract The somatic hybrids between rice cultivar and wild *oryza* species were obtained by PEG and electrical fusion method. The somatic hybrids were identified with RAPD. It was verified that the genome of somatic hybrids contained section genome of both parents, but they were not equivalent one with the another. In the some somatic hybrids, the section genome from one parent was more than that from anohter. The relationship between somatic hybrids and their parents was analyzed based on RAPD data.

Key words Rice, somatic hybrids, RAPD



The RAPD fingerprints of rice cultivar, wild *Oryza* species and their somatic hybrids with different primers. a. *O. officinalis*, b. pf9279, c. fp9252, d. pf9244-17, e. 02428, f. pf9301, g. *O. eichingier*, m. marker