

## 野生稻和栽培稻的随机多态 DNA(RAPD)分析

武波<sup>1</sup>, 韦东<sup>1</sup>, 秦学毅<sup>2</sup>, 陈成斌<sup>2</sup>, 黄娟<sup>2</sup>, 唐纪良<sup>1</sup>

(1. 广西大学农业部农业分子遗传重点开放实验室, 广西南宁 530005; 2. 广西农科院品种资源研究所, 广西南宁 530007)

**摘要:** 应用 RAPD 方法对药用野生稻、普通野生稻、梗稻和籼稻进行基因组多态性分析。12 个随机引物共扩增出 132 条 RAPD 带, 片段大小在 300~3 500 bp 之间, 其中有 106 条表现出多态性, 占总扩增片段的 86.4%。根据遗传距离分析, 用 UPGMA 法构建了聚类树状图, 结果表明, 普通野生稻的遗传特性比药用野生稻更接近于栽培稻。

**关键词:** 野生稻; 栽培稻; RAPD; 聚类分析

**中图分类号:** S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2001)04-0339-05

## Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis of wild rice and cultivated rice

WU Bo<sup>1</sup>, WEI Dong<sup>1</sup>, QIN Xue-yi<sup>2</sup>, CHEN Cheng-bin<sup>2</sup>,  
HUANG Juan<sup>2</sup>, TANG Ji-liang<sup>1</sup>

(1. The Key Laboratory of Agricultural Molecular Genetics of the Chinese Ministry of Agricultural, Guangxi University, Nanning 530005, China; 2. Institute of Crop Resources, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China)

**Abstract:** The genomic DNA variations of wild rice (*Oryza officinalis* and *Oryza rufipogon*) and cultivated rice were analyzed using random amplified polymorphic DNA (RAPD). Twelve arbitrary primers generated 132 RAPD bands with the size ranging from 300 bp to 3 500 bp, 106 of these bands were polymorphic (86.4%). The UPGMA cluster was conducted on the base of matrix of genetic distance. It was shown that *O. rufipogon* was closer to the cultivated rice than the *O. officinalis*.

**Key words:** wild rice; cultivated rice; RAPD; cluster analysis

水稻是重要的粮食作物, 全球有近一半的人口以水稻为主要食物。随着全球人口的快速增长, 对粮食, 特别是水稻的需求也在快速增长。近几十年来, 由于水稻杂交技术的广泛利用, 通过水稻品种间的杂交, 世界各国的水稻育种学家培育了大量高产、优质、抗病虫害的杂交水稻, 并在世界各地大面积推广应用, 使得水稻的产量大幅度提高。但是杂交水稻的推广应用中也带来了一些问题。例如, 随

着杂交水稻取代原有的地方品种, 使得生物多样性减少, 生产用种的遗传基础狭窄, 遗传侵蚀扩大。因此如何在保证杂交水稻高产、优质的前提下, 保持水稻的生物多样性, 特别是如何利用野生稻的优质基因(如抗虫、抗病和对非生物胁迫的耐性)来改良杂交水稻, 已引起水稻育种学家的普遍关注。

稻属(*Oryza*) 现有 22 个种, 有 2 个种为栽培稻, 即亚洲栽培稻(*Oryza sativa* L.) 和非洲栽培稻(*O-*

收稿日期: 2001-05-25

作者简介: 武波(1962-), 男, 广西武宣人, 博士, 副研究员, 分子生物学专业, 主要从事微生物和植物的分子生物学研究。

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化专项资助(编号: J00-A-003)

*ryza glaberrima* Steud), 其余种均为野生稻。野生稻主要分布在亚洲、非洲和中、南美洲。野生稻具有较强的抗虫、抗病和抗逆性, 是一种非常珍贵的遗传资源。在我国, 现存 3 种野生稻, 即普通野生稻 (*Oryza rufipogon*.)、药用野生稻 (*Oryza officinalis* Wall. ex Watt) 和疣粒野生稻 (*Oryza meyeriana* Baill.), 主要分布在我国南方, 如广西、广东、云南和海南等省区。广西位于我国的南方, 气候温和、雨水充沛。广西水稻栽培的历史悠久, 稻种资源丰富。在“七五”期间, 广西农科院等单位对广西的野生稻资源进行了普查发现, 广西的野生稻资源分布很广泛, 主要为普通野生稻 (*Oryza rufipogon*.) 和药用野生稻 (*Oryza officinalis*)。这些野生稻具有抗虫、抗病

和抗逆等优良的农艺性状, 特别是药用野生稻中, 普遍具有抗褐飞虱、稻瘰蚊、抗白叶枯病和稻瘟病, 以及抗旱、抗寒和蛋白含量高、优异的农艺性状<sup>[1,2]</sup>。水稻育种学家对于如何将野生稻资源中的优异性状导入栽培稻中加以利用非常感兴趣。但是由于野生稻的遗传背景与栽培稻有一定的差距, 给这一研究工作带来了一定的难度。特别是药用野生稻, 在形态上与栽培稻存在一定的差异, 染色体组型也不同 (栽培稻为 AA 型, 药用野生稻为 CC 型), 两者的杂交后代是不育的。因此进一步开展稻种的起源、演变和分化的理论研究, 特别是利用分子生物学的方法, 对不同稻种的亲源关系进行研究, 为今后更好的利用野生稻的优质基因提供理论依据。

表 1 材料来源

Table 1 The origin of materials

编号 No.	种名 Species	样品代号或品种名 Code or Variety	来源 Source
A1	药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Waii. Ex Watt	I665	广西农科院作物品质所
A2	药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Waii. Ex Watt	I666	广西农科院作物品质所
A3	药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Waii. Ex Watt	I667	广西农科院作物品质所
A4	药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Waii. Ex Watt	I668	广西农科院作物品质所
B1	普通野生稻 <i>O. sativa</i> L. f. <i>spontanea</i> Roschev	94-24-1	广西农科院作物品质所
B2	普通野生稻 <i>O. sativa</i> L. f. <i>spontanea</i> Roschev	94-24-2	广西农科院作物品质所
B3	普通野生稻 <i>O. sativa</i> L. f. <i>spontanea</i> Roschev	94-24-3	广西农科院作物品质所
B4	普通野生稻 <i>O. sativa</i> L. f. <i>spontanea</i> Roschev	94-24-4	广西农科院作物品质所
C1	梗稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. Keng Ting	Toplea57/77	广西大学农学院
C2	梗稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. Keng Ting	IR68333-R-R-B-22	广西大学农学院
C3	梗稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. Keng Ting	海梗	广西大学农学院
C4	梗稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. Keng Ting	AG8	广西大学农学院
D1	籼稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. hsien Ting	沪恢 17	广西大学农学院
D2	籼稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. hsien Ting	IR72	广西大学农学院
D3	籼稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. hsien Ting	密阳 82	广西大学农学院
D4	籼稻 <i>O. sativa</i> L. subsp. hsien Ting	明恢 63	广西大学农学院

RAPD (random Amplified Polymorphic DNA) 是 90 年代建立、发展起来的一种快速、简便、有效的多态性检测技术, 主要用于遗传和分类方面的研究工作。近年来, 国内有不少学者利用 RAPD 技术, 对多种作物品种进行了遗传和分类分析<sup>[3~5]</sup>。在本文中, 我们利用 RAPD 技术, 对来源于广西的药用野生稻、普通野生稻和籼稻、梗稻的亲源关系进行了探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

本实验所用的稻种品种、来源见表 1。

### 1.2 水稻基因组 DNA 的提取

对于每一份水稻样品, 均分别剪取 3~4 片新

鲜、幼嫩的叶片, 用 CTAB 法提取总 DNA<sup>[6]</sup>, 分别溶于 1 X TE 中, 然后用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的分子量, 并根据 EB 染色强度计算 DNA 的浓度。

### 1.3 PCR 反应条件

PCR 反应所需的 Taq 酶、dNTP 和随机引物购于上海生工公司。PCR 仪为 PE 公司 480 型。

PCR 扩增的条件为: 反应体积 20  $\mu$ L。其中 10 x PCR buffer 2  $\mu$ L, 2.5 mM dNTP 1.5  $\mu$ L, 20  $\mu$ mol/ $\mu$ L 引物 0.5  $\mu$ L, 总 DNA 1  $\mu$ L, Tag 酶 1  $\mu$ L (1 u/ $\mu$ L), 加水补足 20  $\mu$ L。反应条件为: 96  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 36  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 5 个循环后, 再按下列条件: 94  $^{\circ}$ C 变性 30 s, 36  $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 进行 40 个循环, 然后 72  $^{\circ}$ C 延伸 5 min。

### 1.4 数据处理与统计分析

PCR 反应后,用 1.4% PCR 反应后,用 1.4% 琼脂糖凝胶电泳、染色、照相、并记录每一条清晰的扩增带的位置。

比较同一引物对 16 个样品的扩增结果,在同一琼脂糖凝胶上具有不同迁移率的扩增带称为不同的 RAPD 标记(RAPD marker),相对迁移率相同的扩增带为同一 RAPD 标记。判读每个样品的全部 PCR 扩增结果,若有 RAPD 标记,则将其记为 1,若无标记则记为 0;所有 16 个样品都具有的扩增带为公共带,反之则称为特异带。将所有引物扩增的结果编辑成文件,在计算机上,用 RAPDistance 软件,计算遗传相似度(Similarity, S)和遗传距离(Genetic distance);遗传相似度的计算应用 Nei 的公式<sup>[7]</sup>:

$$S = 2m_{xy} / (m_x + m_y)$$

$m_x$  为一个样品的总扩增带数;  $m_y$  为另一个样品的总扩增带数;  $m_{xy}$  为 2 个样品共有的扩增带数;  $S$  为 2 个样品之间的相似度。

遗传距离按以下公式计算:

$$P = 1 - S$$

$P$  为遗传距离,  $S$  为遗传相似度。

然后根据遗传距离,按 UPGMA 方法对 RAPD 扩增结果进行聚类分析,构建分子聚类图谱。

表 2 十二条引物的序列和产生的 RAPD 标记  
Table 2 RAPD markers produced by 12 selected primers

引物 Primer	序列(5'~3') Sequence(5'~3')	扩增带 Amplified bands		
		总带数 No. of ob- tained	多态性带数 No. of po- lymorphic	多态性百分比 Percent of po- lymorphic(%)
S1	GTTTCGCTCC	8	7	87.5
S62	GTGAGGCGTC	7	5	71.4
S70	TGTCTGGGTG	11	10	91.7
S83	GAGCCCTCCA	10	7	70.0
S101	GGTCGGAGAA	10	9	90.0
S107	CTGCATCGTG	10	9	90.0
S115	AATGGCGCAG	12	11	91.7
S122	GAGGATCCCT	14	13	92.9
S128	GGGATATCGG	11	9	75.0
S151	GAGTCTCAGG	10	9	90.0
S301	CTGGGCACGA	10	8	80.0
S306	ACGCCAGAGG	18	17	94.4
总计 Total		132	114	84.4

表 3 十六个水稻样品的遗传距离矩阵

Table 3 Matrix of genetic distance of 16 samples of rice

样品 samples	A1	A2	A3	A4	B1	B2	B3	B4	C1	C2	C3	C4	D1	D2	D3	D4
A1	0.0															
A2	0.2462	0.0														
A3	0.2898	0.1939	0.0													
A4	0.2294	0.1491	0.1728	0.0												
B1	0.7219	0.7169	0.7242	0.7287	0.0											
B2	0.7276	0.7223	0.7300	0.7346	0.2013	0.0										
B3	0.7421	0.7559	0.7443	0.7485	0.2582	0.3118	0.0									
B4	0.7500	0.7646	0.7523	0.7567	0.3381	0.3232	0.2970	0.0								
C1	0.7802	0.7838	0.7820	0.7855	0.5416	0.5774	0.5234	0.6063	0.0							
C2	0.7727	0.7765	0.7746	0.7784	0.5490	0.5855	0.5567	0.6155	0.2374	0.0						
C3	0.7573	0.7614	0.7594	0.7634	0.5453	0.5439	0.5401	0.5730	0.2887	0.2928	0.0					
C4	0.7707	0.7746	0.7727	0.7765	0.5186	0.5562	0.5123	0.5861	0.2526	0.2563	0.2813	0.0				
D1	0.7653	0.7691	0.7672	0.7710	0.4730	0.5102	0.4932	0.5517	0.3076	0.2835	0.3511	0.3015	0.0			
D2	0.7653	0.7599	0.7579	0.7619	0.5000	0.5234	0.5199	0.5647	0.3487	0.3333	0.3701	0.3645	0.2582	0.0		
D3	0.7746	0.7689	0.7670	0.7708	0.5151	0.5259	0.5222	0.5686	0.3645	0.3285	0.3472	0.3612	0.2994	0.2491	0.0	
D4	0.7614	0.7653	0.7634	0.7672	0.5292	0.5652	0.5364	0.6063	0.3097	0.2907	0.3727	0.3262	0.2647	0.3288	0.3239	0.0

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻样品的 RAPD 片段的多态性分析

在本实验中,我们分别用 50 个随机引物对 16 个水稻样品进行了 PCR 扩增。从中筛选出 12 个扩增效果较好随机引物对 16 个样品再次进行 PCR 扩增。实验结果表明,不同的随机引物扩增出的 RAPD 片段有差异,最少的为 7 条,最多的达 18 条;12 个随机引物共获得 132 条 RAPD 片段,平均每条随机引物可以扩增出 11 条 RAPD 片段(图 1)。扩增出的

RAPD 片段的长度在 300~3 500 bp 之间;在获得的 132 条 RAPD 片段中,有 106 条表现出多态性,占 86.4%,16 个样品均有的单态性片段为 18 条,占 13.6%(表 2)。

### 2.2 水稻样品的遗传距离

根据 Nei 等人的遗传相似度公式和 12 条引物的 PCR 扩增带的数目,计算出 16 个水稻样品的遗传相似度,然后再换算成遗传距离,结果见表 3。

### 2.3 十六个水稻样品的聚类关系

根据遗传距离,按 UPGMA 法,对 16 个水稻样

品进行聚类分析,构建系统树,结果见图3。

从UPGMA聚类分析结果看,16个水稻样品可以分为2类。第一类为4份药用野生稻样品。这4个药用野生稻样品的遗传距离为0.1491~0.2898;但与其他3种水稻样品的差异较大,遗传距离在0.7169~0.7838之间。第二类为4份普通野生稻样品、4个梗稻品种和4个籼稻品种。其中4份普通

野生稻首先聚类,遗传距离为0.2013~0.3381。4个梗稻品种之间的遗传距离为0.2374~0.2928,首先聚类在一起;而4个籼稻品种的遗传距离约为0.2491~0.3288,首先聚类在一起,再与4个梗稻品种聚为一类(遗传距离为0.2635~0.3701),然后再与4份普通野生稻聚类,普通野生稻与栽培稻(梗稻和籼稻)的遗传距离为0.4730~0.6155。

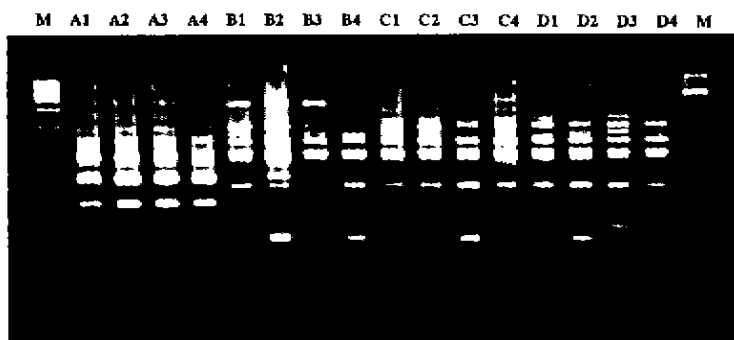


图1 引物S62的RAPD电泳结果

Fig. 1 RAPD products of primers S62

M为1 kb DNA Ladder Marker;A<sub>1</sub>~A<sub>4</sub>为药用野生稻样品;B<sub>1</sub>~B<sub>4</sub>为普通野生稻样品;C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>为梗稻品种;D<sub>1</sub>~D<sub>4</sub>为籼稻品种。

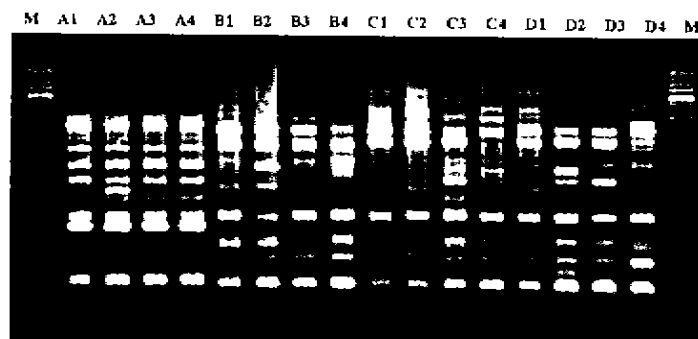


图2 引物S331的RAPD电泳结果

Fig. 2 RAPD products of primers S62

M为1 kb DNA Ladder Marker;A<sub>1</sub>~A<sub>4</sub>为药用野生稻样品;B<sub>1</sub>~B<sub>4</sub>为普通野生稻样品;C<sub>1</sub>~C<sub>4</sub>为梗稻品种;D<sub>1</sub>~D<sub>4</sub>为籼稻品种。

聚类分析结果表明,普通野生稻与栽培稻(梗稻和籼稻)的亲源关系较近,而药用野生稻与普通野生稻、栽培稻的亲源关系较远(遗传距离在0.7169~0.7838之间)。

### 3 讨论

水稻(特别是栽培稻)的起源问题一直是科学家们感兴趣的研究课题。通过形态、染色体组型和同工酶分析等,现在普遍认为普通野生稻是亚洲栽培稻的祖先。而药用野生稻与栽培稻的亲源关系较远。对于水稻的起源和水稻品种间亲源关系的研

究,长期以来主要以常规方法为主。随着分子生物学技术的发展,越来越多的科学家将分子生物学方法(如RAPD技术和RFLP技术等)应用到物种的起源和进化研究中。近10年来,国内也有将分子生物学技术应用于水稻的起源、分类和亲源关系等方面的报道。庄杰云<sup>[8]</sup>等应用RFLP标记研究了普通野生稻、梗稻和籼稻的亲源关系。他们认为普通野生稻、梗稻和籼稻的遗传距离基本一致。肖晗等<sup>[9]</sup>比较了普通野生稻与栽培稻的叶绿体DNA的RFLP片段的多态性,结果表明普通野生稻与梗稻的叶绿体基因组类型相同。孙传清等<sup>[10]</sup>利用RAPD技术分

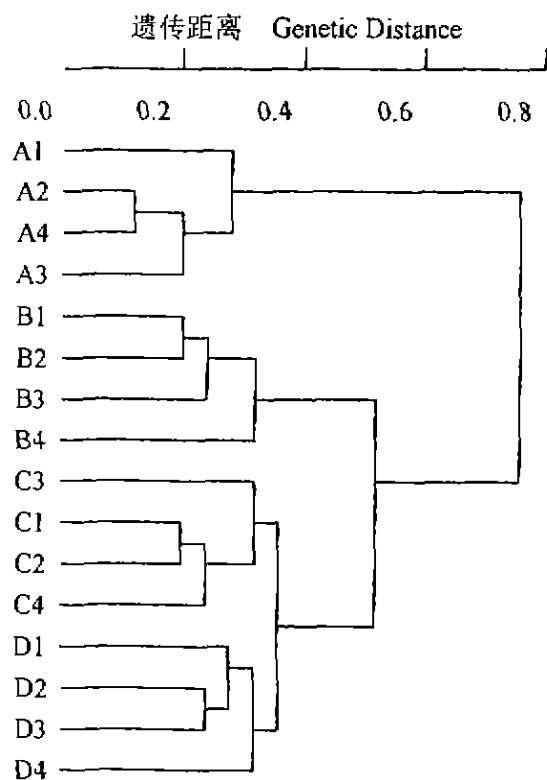


图 3 十六个水稻样品的 UPGMA 聚类图  
Fig. 3 The dendrogram of 16 samples of rice  
constructed by UPGMA

析了梗稻、籼稻和普通野生稻的亲源关系。他们认为多数普通野生稻偏梗稻,但也存在偏籼稻的普通野生稻。王振山等<sup>[11]</sup>通过 RAPD 分析则认为并没有完全分化为梗稻和籼稻的普通野生稻。

在本文的研究中,我们利用 RAPD 技术分析了 4 份药用野生稻样品、4 份普通野生稻样品,与 4 个梗稻品种和 4 个籼稻品种的亲源关系。通过聚类分析,我们发现,4 个品种内的样品首先分别聚类,然后梗稻与籼稻聚类,再与普通野生稻聚类;而药用野生稻与其余 3 个品种的亲源关系较远,遗传距离在 0.716 9~0.783 8 之间。这一研究结果,与通过常规方法对药用野生稻、普通野生稻与栽培稻的亲源关系进行研究所得的结果基本一致。

药用野生稻具有许多优良性状,如果将这些优良性状导入栽培稻中,培育出高产、优质、抗逆性强的杂交水稻,将能取得巨大的社会效益和经济效益。但是由于药用野生稻与栽培稻的杂交后代的不育性,给利用药用野生稻的优良性状带来了一定的难度。虽然可以通过胚胎拯救(embryo rescue)方法获得药用野生稻与栽培稻的杂交后代,但获得的杂

交后代多为异源单体附加系,这给今后进一步应用增加了困难。若药用野生稻与栽培稻的染色体间存在部分同源关系,则可通过染色体组间的稀有重组(rare recombination)来实现目的基因的转移。Jena 等<sup>[12]</sup>对药用野生稻和栽培稻的 RFLP 图谱进行了比较,发现药用野生稻 12 条染色体中有 9 条与栽培稻有高度同源序列。我们的研究表明,虽然药用野生稻与栽培稻的亲源关系较远,但是仍然存在一定的同源性。这些研究结果,为今后将药用野生稻优良性状转移到栽培稻中提供了一定的理论依据。

#### 参考文献:

- (1) 吴崇妙. 野生稻资源研究论文选编[C]. 北京: 中国科学技术出版社, 1990.
- (2) 应存山, 盛锦山, 罗利军, 等. 中国优异稻种资源[M]. 北京: 中国农业出版社, 1997.
- (3) 梁红健, 刘敏, 钟志宇, 等. 中国部分兰花品种的 RAPD 分析[J]. 园艺学报, 1996, 23(4): 365-370.
- (4) 孟祥栋, 马红, 张卫华. RAPD 技术对葱属品种遗传关系的分析[J]. 生物多样性, 1998, 6(1): 37-41.
- (5) 邱丽娟, Randall L Nelson, Lila O Vodkva, 等. 利用 RAPD 技术标记鉴定大豆资源[J]. 作物学报, 1997, 23(4): 408-417.
- (6) 顾红雅, 瞿礼嘉, 明小天, 等. 植物基因与分子操作[M]. 北京: 北京大学出版社, 1995.
- (7) Nei M. Molecular evolutionary genetics. Columbia University Press, New York, 1987.
- (8) 庄云杰, 钱惠荣, 林鸿宣, 等. 应用 RFLP 标记研究亚洲稻的起源与分化[J]. 中国水稻科学, 1995, 9(3): 135-140.
- (9) 肖晗, 应存山, 黄大年. 中国栽培稻及其近缘野生种叶绿体 DNA 的限制性片段长度多态性分析[J]. 中国水稻科学, 1996, 10(1): 121-124.
- (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[J]. 中国水稻科学, 1995, 9(1): 1-6.
- (11) 王振山, 陈洪, 朱立煌, 等. 中国普通野生稻遗传分化的 RAPD 研究[J]. 植物学报, 1996, 38(9): 749-752.
- (12) Jena K K, Khush G S, Kochert G. Comparative RFLP mapping of a wild rice, *Oryza officinalis*, and cultivated rice[J]. *O. sativa*. Genome, 1994, 37(3): 382-389.