

应用 SSR 分子标记比较佳禾早占水稻组培苗与种植苗的性状差异

周克夫 张 凯 戎文婷 黄育明 王侯聪

(厦门大学生命科学学院、细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 361005)

摘 要 株高是水稻重要的农艺形状之一, 植株过高将导致倒伏和减产, 目前, 很多新的技术究被用来鉴定, 图位克隆与水稻株高相关的基因及机理的研究, 本实验选择优质早籼稻佳禾早占种植苗和经过组培获得的矮化突变水稻为材料, 为研究比较它们间的遗传物质上差异, 根据康耐尔大学的资料设计了 311 对 SSR 引物对佳禾早占种植材料和组培材料进行分析, 对两种材料进行 PCR 多态性扩增, 结果发现两者间存在多态性的引物有 88 对, 多态性比例达到 30.3%。在矮杆材料中不但验证了已报道的 11 个与调控株高性状基因相连锁的标记连锁群, 同时第 3 号染色体和第 9 号染色体上还获得了两个以前基本未有报道的标记集中分布区域。结果说明, 该培养基培育出的佳禾早占水稻后代所表现出的矮杆性状与亲本在遗传物质上确有明显差别。该结果有助于挖掘和定位新的矮杆基因, 并有利于今后在水稻育种中进行水稻株高性状的控制, 同时也为开展矮化性状机理的研究提供有利的实验材料。

关键词 分子标记; 微卫星 DNA; 矮化

Studied the difference of genetic feature between tissue cultured and cultivated paddy rice of Jia He Zao Zan via microsatellite (SSR) markers

ZHOU Ke-Fu ZHANG Kai RONG Wen-Ting HUANG Yu-Ming WANG Hou-Cong

(The Key Laboratory of Education Ministry for Cell Biology and Tumor Cell Xiamen University, Fujian 361005)

Abstract Plant height is one of the important agronomic traits of rice. Overhigh plant easily led to lodge and reduce output. Recently, great advances have been made in the identification, mapping, cloning and action mechanism of plant height genes in rice. This present paper selected the tissue cultured and cultivated paddy rice of Jia He Zao Zan (J. H. Z. Z) as experimental object, which were significant different on the height, the tissue cultured plant was only less than half height of the cultivated plant. In order to compare their differences of genetic and determine whether there are relationship between the dwarf gene and the dwarf character of tissue cultured plant, Polymorphism analysis was conducted between them by 311 pairs of rice SSR primers, designed by Cornell University, the result indicated that 88 pairs of primers had polymorphism between two kinds of materials, the ration in total primers was about 30.3%, the experimental result not only verified 11 multiple groups which regulate the height gene, but also obtained two group regions which control the dwarf character on chromosome 3 and chromosome 9, which have not been reported previously, these results will help to explore and determine the situation of new dwarf gene, and will be of benefit to act genetic manipulation of plant height of in rice breeding. These results also provided the evidence for studying the mechanism of dwarf.

基金项目: 本研究获得国家 863 项目(2002AA211091), (20001AA11091) 及厦门大学细胞生物学和肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金资助(NO:2005108)资助

第一作者简介: 周克夫(1966—), 男, 博士, 主要从事分子免疫学研究。

收稿日期: 2006-07-04

Key words molecular marker; SSR; dwarf character

株高是水稻重要的农艺性状之一,植株过高容易引起折断和倒伏,适当矮化有利于耐肥抗倒增产,矮秆品种的选育一直是育种工作的一个重要方面,上世纪 60 年代,随着“矮脚南特”、“矮仔占”、“IR8”、“统一”和“Calrose”等一批籼型矮秆高产品种的育成,水稻产量一举提高了 20%~30% 以上,这在水稻育种史上是前所未有的重大突破,被誉为水稻育种的一场“绿色革命”。之后,对水稻株高性状的研究一直经久不衰,不断发掘和鉴定控制株高的基因,开展控制株高的相关的基因定位、克隆以及作用机理等方面的研究,实现对水稻株形的合理改良,是水稻主要农业性状的遗传学研究和育种实践的重要内容,随后,一系列矮秆良种的选育和推广显著地提高了水稻的生产潜力,取得了较显著的增产效果。因此,发掘和鉴定控制水稻株高的基因,开展株高基因定位、克隆及作用机理等方面的研究,实现对水稻株高的定向改良,具有重要的理论意义和应用价值^[1,2]。国内外已报道了不少调控水稻株高性状的基因,如 sd 基因和 d 基因及其等位基因等。sd21 在育种上产生的巨大利用价值以及单一 sd21 矮秆基因所面对的遗传脆弱性问题,因此发掘和鉴定新的水稻矮秆品种从而获得新的控制水稻株高的基因也一直是水稻遗传研究的重点之一。根据水稻遗传委员会(RGC)的公布,目前矮秆和半矮秆基因已多达 60 多个。尚有相当一部分非 sd21 的水稻矮秆基因并未被 RGC 收录^[3]。水稻株高基因的定位原先大部分是通过经典遗传学方法进行的^[2]。80 年代以后,分子标记技术迅速发展,随着 RFLP、RAPD、AFLP、SSR 等分子标记技术的发展及广泛应用,水稻分子图谱中已有相当饱和的分子标记,许多控制重要农艺性状的基因都已得到精细定位。迄今,用分子标记定位的水稻株高基因已达到 14 个。至此,国内外已报道的矮秆半矮秆基因中 30 多个基因所在的染色体已经确定^[1]。日本和美国分别构建了 1383 个(探针编号 RG)和 726 个(探针编号 Npb)水稻分子图谱标记,覆盖水稻的全部 12 条染色体;我国也利用水稻 DH 群体构建了分子遗传图谱。在通过经典遗传或其他方法已知矮秆基因所属染色体或与另一基因连锁时,可直接利用该染色体上与已知基因连锁的探针定位该矮秆基因,并估算其重组值。

SSR 标记技术是基于 PCR (Polymerase Chain

Reaction) 技术的 DNA 分子标记技术,即为简单序列重复又称微卫星 (microsatellite),是由一类由几个核苷酸(1~6bps 一般为 2~5bps)为重复单位组成的简单串联重复序列,其重复次数在物种间、品种间甚至个体间具有非常大的变异性。具有重复性好、稳定程度高、多态性丰富, DNA 用量少,结果分析容易等优点,已被广泛用于品种鉴定、遗传多样性分析、遗传作图等研究。

佳禾早占是厦门大学生命科学学院水稻育种组于 1989 年采用[(E₉₄ × 大粒种)F₈ × 713] × [外引 30(成熟花粉经辐照诱变)]复合杂交,经多代系统选择,于 1996 年早季育成的迟熟早籼稻新品种。本实验利用在成熟种胚组培过程中获得的 20 几株矮化突变佳禾早占组培个体收获的种子培育的植株通过自交后得到的 F₃ 代和同期种植获得的佳禾早占分别建立 DNA 池,组培条件参见周克夫^[4]。应用 SSR 分子标记技术对两组材料进行差异分析,以期获得与两组材料的株高这个主要差异性状相连锁的引物信息。并为进一步开展基因定位和克隆奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

组培材料:佳禾早占(株高约 30 cm 左右)

种植材料:佳禾早占(株高约 100 cm 左右)

1.2 性状对比

对组培材料和种植材料进行性状调查,主要包括株高、结实率,千粒重等性状。

1.3 DNA 提取

组培突变佳禾早占的 F₂ 代及正常田间收获的佳禾早占分别构建两个 DNA 池,方法参照《植物分子生物学 - 实验手册》(Clark M S 1996)并加以改进。

100 mg 叶片组织液氮研磨加入提取液及 0.01 mol · L⁻¹ 2-巯基乙醇各 1.5 mL, 200 μL 20% SDS (pH7.2); 65℃ 水浴 10 min; 5 mol · L⁻¹ KAc 1 mL 冰浴 20 min; 12 000 g 20 min; 取上清,加入等体积的异丙醇混匀, -20℃ 40 min; 10 000 g 10 min; 去上清, 100 μL 50 × TE 溶解; 加入 3 μL 的 RNA 酶, 37℃ 保温 30 min; 1/10 体积的 3 mol · L⁻¹ NaAc, 10 000 g 10 min; 上清转移到 1.5 mL 管中; 加入 500 μL 异丙醇, 10 000 g 10 min; 用 500 μL 75% 的乙醇

洗涤, 10 000 g 离心 10 min, 30 μ L TE 溶解。

1.4 SSR 引物选择

采用 311 对 SSR 引物, 所有引物信息均来自于文献^[5,6]。

1.5 PCR 扩增

ddH₂O 14 μ L; 10 \times buffer (含 Mg²⁺) 3 μ L; dNTP0.3 μ L; 模板 DNA1.5 μ L; Primer 1 μ L; Taq 0.2 μ L; 总体积 20 μ L。

反应程序: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 45 s; 55 $^{\circ}$ C 45 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min; 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。

1.6 电泳及银染

参照海南省农作物分子育种重点实验室的方法, 见文献^[7]。

2 实验结果

2.1 正常种植的佳禾早占与组培植株特征比较

从株高特征发现两者出现明显差异, 正常佳禾早占抽穗时高 100 ~ 110 cm, 而组培植株只有 35 ~ 40 cm, 与亲本相比结实率低, 只有 50% ~ 80%, 亲本为 90%, 千粒重为 22 ~ 24 g, 亲本为 26 ~ 27.5 g, 由此可见, 组培植株不仅在株高上变矮, 在特征方面也有衰退特征(见图 1)。



图 1 组培植株(左)与正常植株(右)的比较

Fig. 1 The comparative between the tissue cultured plant (left) and the normal plant (right)

2.2 SSR 扩增结果

利用 311 对水稻 SSR 引物对两个 DNA 池进行特异扩增, 发现有 21 对引物在佳禾早占组培苗和种植苗上均无法扩增出目的条带, 有 290 对引物可以特异扩增出清晰稳定的条带, 其中在组培苗与种植苗的间无多态性的引物为 202 对, 达到 69.7%; 多态性引物为 88 对, 多态性比例达到 30.3%, 引物 RM236, RM255, RM258 的 SSR 扩增结果见图 2。

根据文献^[5,6]资料分析, 发现分布在第 1, 2, 3, 5, 6, 8 号染色体上的多态性引物数量比较多(见表 1), 并根据对多态性引物在各染色体上分布的具体位置分析得到 11 个位置比较紧密的连锁群(见表 2)。

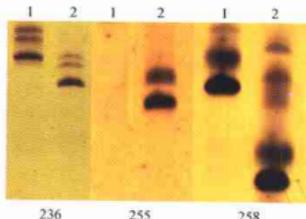


图 2 引物 RM236-RM255-RM258 的 SSR 扩增结果

1. 种植; 2. 组培

Fig. 2 Electrophoresis results of RM255-RM256-RM258

1. Normal plant; 2. Tissue cultured

表 1 具多态性引物在各染色体上的分布

Table 1 The distribution of primers with polymorphism in each chromosome

染色体 Chromosome	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
引物数 Primers	10	12	12	6	10	8	4	8	5	7	4	2

表 2 各连锁群所在的染色体号码和其中的 SSR 引物编号

Table 2 The number of multiple groups on chromosome and their corresponding number of SSR primers

连锁群 Multiple groups	染色体 Chromosome	SSR 引物 SSR primers
LSQ1	1	RM292 RM312 RM24 RM446
LSQ2	1	RM443 RM297 RM302 RM212
LSQ3	2	RM327 RM27 RM29 RM324 RM424
LSQ4	3	RM448 RM293 RM468 RM227 RM442
LSQ5	4	RM349 RM280
LSQ6	5	RM305 RM233B RM31 RM178 RM26
LSQ7	6	RM204 RM225 RM217 RM253 RM276
LSQ8	7	RM346 RM336 RM455
LSQ9	8	RM310 RM330B
LSQ10	8	RM210 RM256 RM149
LSQ11	9	RM278 RM201 RM160

对比已经报道的与水稻株高性状连锁的分子标记或标记区间发现在本实验发现的 88 个具有多态性的引物中有 32 个与已报道株高性状的标记区间完全一致或包含在其区间内, 占 36.4%; 与已报

道标记区间相距 5 cm 以内的多态性引物有 23 个,占 26.1%;与已报道标记区间相距 10 cm 以内的多态性引物有 19 个,占 21.6%;总共为 74 个引物,占 84.1%。

在本实验获得的 11 个连锁群中除了 LSQ4 和 LSQ11 外其余连锁群均和已经报道的基因或标记区间完全或部分重叠。LSQ-1 完全与 R596-RZ413 标记区间^[8]及 R210 标记^[9]重叠,并且与 d-10 基因的遗传距离仅 2 cm。LSQ-2 与 R2201-RM212 标记区间^[10]、RM212-PK34-1 标记区间^[11]及 RG690-RZ801 标记区间^[12]部分重叠,并且距离 d-1 基因和 d-10 基因分别为 1 cm 和 6 cm。LSQ-3 与 d-30 基因部分重叠。LSQ-5 与 d-31 基因、RG163-RZ590 标记区间^[13]及 RG143-RG620 标记区间^[14]大部分重叠。LSQ-6 与 RG573-RG470 标记区间^[15]标记区间部分重叠。LSQ-7 与 RZ398-RG138 标记区间^[15]标记区间完全重叠。LSQ-8 与 RZ626-RG650 标记区间^[11]、C285-RG650 标记区间^[16]、RZ395-RZ989 标记区间^[15]及 RZ395-RG404 标记区间^[15]部分或

全部重叠(见图 3)。

LSQ-4 和 LSQ-11 没有和已经报道的标记区间重叠。此外,有相当数量分散分布的多态性引物与已报道标记区间重叠或紧密相连。如第 1 号染色体上的 RM428 与 RG612^[9]标记位置一致;RM462 与 d-18 基因的位置非常接近。第 2 号染色体上 RM106 位于 RZ717-RG252 标记区间^[11]中又同时位于 d-32 基因中, RM166 和 RM213 位于 RM240-RM213 标记区间^[17]中,同时也位于 d-5 基因中。第 3 号染色体上的 RM231 位于 d-56 基因中,同时与 RG104-RG348 标记区间^[14]及 C515 - RG348 标记区间^[18]的遗传距离只有 2.7 cm。第 4 号染色体上 RM252 位于 d-11 的一个等位基因中。第 5 号染色体上 RM169 位于 sd-g 基因中,并与 RG182 标记^[14]仅相距 3.9 cm。第 10 号染色体上 RM271 与 RG241 标记^[11]仅相距 1.1 cm。第 12 号染色体上 RM260 位于 d-33 基因中。以上对比均以康奈尔 - SSR-2001 图谱为基础。

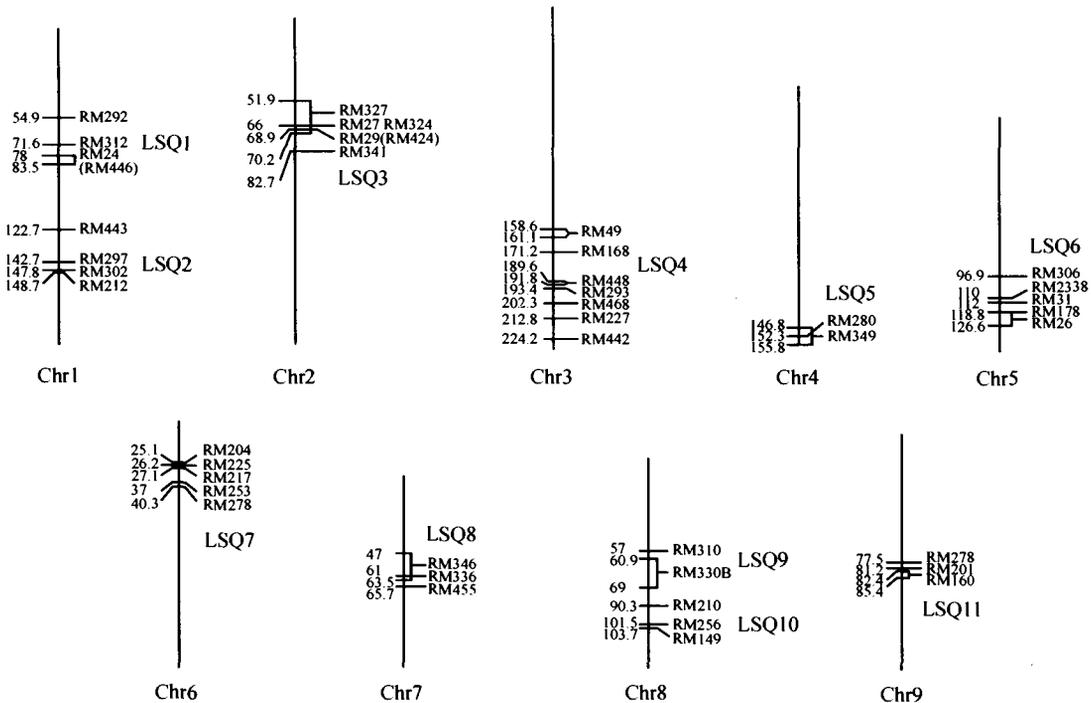


图 3 1~9 号染色体上的连锁群的分布

Fig. 3 The distribution of multiple group on chromosome 1~9

3 讨论

由于水稻株高是数量性状,由多基因共同作用,已有报道的基因或标记区间的分布包括了所有 12 条染色体,并且主要集中在第 1、2、3、4、5、7、8 号染色体上。本实验获得的具多态性的引物主要

集中在第 1、2、3、5、6、8 号染色体上,基本与前人的报道一致,并且在 88 对多态性引物中共有 84.1% 的引物是和以报道的基因或标记区间重叠或是距离很近,因此,本实验的结果是具有一定可信性。由于不同的报道采用不同的材料组合和分子标记因而获得的基因或标记区间分布较广,涵盖了水稻

全部染色体的相当一部分长度,但是各个区间的贡献率都较低,大部分都不到 10%。正是基于这样的分析考虑,本实验中的 LSQ4 和 LSQ11 虽然没有同已报道的基因或标记区间有很好的重叠,但是由于多态性引物分布集中,因而这两个区域也有可能存在个别还没有被报道和验证的标记区间,因此这两个区域是我们真正感兴趣的区域。在这两个区域寻找真正与调控株高性状的基因相连锁的标记区间的工作将进一步进行。从以上采用 SSR 方法对佳禾早占母本及组培后代进行分析,试验结果可以看出,经过采用周克夫^[4]选择的培养基培育出的佳禾早占水稻后代所表现出的矮秆性状与亲本在遗传物质上确有明显差别,说明该培养基在产生水稻矮秆性状上有促进作用,其中的苯乙酸(PAA)原先主要用于水稻花药的组培,把它运用到成熟种胚中不仅愈伤组织诱导率高(95%)以上,而且分化成苗率也高(85%),并且还具促使培育成的后代矮化的效果。而有关矮化的机理的研究大多涉及到内源和外源激素^[19~25]的影响。因此,该工作的结果不仅为后续的相关主效基因的定位也为矮化机理的研究奠定实验材料和基础。

参 考 文 献

- 高奋明,姜勇,孔德伟. 水稻株高的遗传控制及其在育种上的应用[J]. 分子植物育种,2005,3(1):87-93.
- 李秀兰,吴成,邓晓建. 水稻株高基因及其分子生物学研究进展[J]. 植物学通报,2003,20(3):264-269.
- 马良勇,李西明,朱旭东. 水稻株高性状的研究进展[J]. 福建稻麦科技,2001,19(4):20-23.
- 周克夫,陈启伟. 佳禾早占成熟种胚组织培养方法的研究[J]. 实验生物学报,2002,35(3):191-193.
- S Temnykh, W D Park, N Ayres, et al. Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet,2000,100:697-712.
- Svetlana Temnykh, Genevieve DeClerck, Angelika Lukashova, Computational and Experimental Analysis of Microsatellites in Rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, Length Variation, Transposon Associations, and Genetic Marker Potential [J]. Genome Research,2001,11(8):1441-1452.
- 郑景生,吕蓓. 分子植物育种实验室方法(二),PCR 技术及实用方法 [J]. 分子植物育种,2003,1(3):381-394.
- 祝莉莉,谭光轩,任翔,等. 5 种重要农艺性状基因在水稻重组自交系群体中的定位 [J]. 武汉大学学报:理学版,2003,49(6):787-792.
- 李晶召,何平,郑先武,等. 利用水稻重组自交系群体对一些重要农艺性状进行基因定位和互作分析 [J]. 植物学报,1999,41(11):1199-1203.
- 邢永忠,徐才国,华金平,等. 水稻株高和抽穗期基因的定位和分离 [J]. 植物学报,2001,43(7):721-726.
- Yuan Aiping, Cao Liyong, Zhuang Jiyun, et al. Analysis of Additive and AE Interaction Effects of QTLs Controlling Plant Height, Heading Date and Panicle Number in Rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Acta Botanica Sinica,2003,30(10):899-906.
- 吴平. 应用 RFLP 标记分析水稻株高与分蘖的遗传相关性 [J]. 中国科学,1996,26(3):264-270.
- 刘桂富,卢永根,王国昌,等. 水稻产量、株高及其相关性状的 QTLs 定位 [J]. 华南农业大学学报,1998,19(3):5-9.
- 林鸿宣,庄杰云,钱惠荣,等. 水稻株高及其构成因素数量性状基因座位的分子标记定位 [J]. 作物学报,1996,22(3):257-263.
- 樊叶杨,庄杰云,李强,等. 水稻株高 QTL 分析及其与产量 QTL 的关系 [J]. 作物学报,2001,27(6):915-922.
- 潭震波,况浩池,陆朝福,等. 水稻上部节间长度等数量性状基因的定位及其遗传效应分析 [J]. 遗传学报,1996,23(6):439-446.
- 郭龙彪,罗利军,邢永忠,等. 水稻汕优 63 重组自交系重要农艺性状的 QTLs 和互作分析 [J]. 农业生物技术学报,2002,10(4):327-333.
- 钟代彬,罗利军,梅捍卫,等. 水稻主茎总叶数及其相关性状的 QTL 分析 [J]. 中国水稻科学,2001,15(1):7-12.
- Kumar I, Singh T H. A rapid method for identifying different dwarfing genes in rice [J]. RGN, 1984, 1:134-135.
- 林鸿宣,熊振民,俞桂林. 矮生性水稻对赤霉素反应的初步研究 [J]. 中国水稻科学,1991,5(1):13-18.
- 汤日圣,张远海,张金渝,等. 矮秆基因对水稻性状控制的机理探讨 [J]. 中国农业科学,1991,24(2):51-56.
- 何祖华,Etchokossi,石春海,等. 水稻株高基因对 GA3 敏感性以及与酶的关系 [J]. 中国水稻科学,1993,7(3):143-147.
- 汤日圣,张远海,张金渝,等. 矮秆基因对水稻性状控制的机理探讨 [J]. 中国农业科学,1991,24(2):51-56.
- 徐建龙,张金渝. 半矮秆水稻内源 GA 与 IAA 和 ABA 的含量 [J]. 浙江农业大学学报,1992,18(3):49-52.
- 金卫,孙漱芬. 赤霉素对筛选水稻非等位矮秆突变基因作用的探讨 [J]. 浙江农业科学,1995,4:167-168.