

光敏核不育水稻等位突变系的 AFLP 分析

李传友¹ 郑洪刚^{1,3} 翁曼丽¹ 贾建航¹ 牟同敏² Henry T. Nguyen³ 王 斌^{1*}

(中国科学院遗传研究所,北京 100101) (湖北农科院粮作所,武汉 430064)

(Dept. of Soil and Plant Sciences, Texas Tech University, Lubbock 79409, USA)

摘 要 通过对 NK58S 和 NK58F 这一对光敏核不育水稻等位突变系的 AFLP 分析,比较了 AFLP, RAPD 及 RFLP 检测 DNA 多态性的相对效率。结果表明,这三种分子标记的 DNA 多态性检出效率依次为 AFLP > RAPD > RFLP, 找出了水稻 AFLP 分析的最适反应条件,通过 AFLP 和集群混合分析(Bulked segregating analysis, BSA),筛选出了一批与水稻光敏核不育(PGMS)基因连锁的多态性 AFLP 产物,已完成了对 4 个多态性 AFLP 产物的克隆, Southern 杂交证明其中 2 个为单拷贝顺序,另外 2 个为低拷贝顺序。对上述三种分子标记各自的优缺点及它们在 DNA 多态性检测中的适用之处进行了分析探讨。

关键词 AFLP, 水稻, 分子标记, 多态性检测效率

中图分类号 Q813 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)01-0091-05

光敏核不育(PGMS)水稻的发现和杂交育种中的应用,对杂交水稻生产和水稻遗传学的发展都产生了巨大的影响^[1]。为了寻找与 PGMS 基因紧密连锁的分子标记以便将其精确定位,进而分离 PGMS 基因,我们曾用等位突变系 NK58S 和 NK58F 为材料,通过 RFLP 和 RAPD 分析寻找与 PGMS 基因连锁的分子标记^[2]。由于 NK58S 和 NK58F 之间的多态性是很少的,上述两种分子标记方法又存在其本身的局限性,因此结果不理想。最近发展起来的 AFLP 方法被认为是最有效的分子标记^[3~7],可以在短时间内提供巨大的信息量,因此,通过对 NK58S 和 NK58F 的 AFLP 分析,建立其 AFLP 分析系统,就有可能在短期内筛选到与 PGMS 基因更紧密连锁的分子标记,为最终克隆 PGMS 基因打下基础。

1 材料和方法

1.1 水稻材料

NK58S 是石明松先生从粳稻 NK58 中发现的光敏核不育(PGMS)材料^[8],NK58F 是湖北农科院粮作所从农垦 58S 中挑选出的可育恢复突变体,然后将 NK58S 和 NK58F 杂交,再以 NK58F 为轮回

亲本,经过多代回交及以后的连续选育、鉴定,直到 NK58S 和 NK58F 在形态和农艺性状上表现一致,只是育性不同,因此,本研究中使用的 NK58S 和 NK58F 是一对等位突变系。

以 NK58S 和 NK58F 为亲本构建含有 500 个单株的 F₂ 分离群体,挑选极端可育和极端不育的个体各 15 株组成极端可育和极端不育两个基因池,用于 BSA 分析。

1.2 DNA 制备

水稻 DNA 按照通用的标准程序制备^[9],并严格防止各种污染造成的部分降解。

1.3 RFLP 和 RAPD 分析

按照我们以前报道的方法进行^[10]。

1.4 AFLP 分析

AFLP 分析采用 Gibco-BRL 公司生产的 AFLP 试剂盒 I,并严格按照厂家提供的说明书进行。+2 引物是上海生工试剂公司合成。(γ-³³P)ATP 购自英国 Amersham 公司(γ-³²P)ATP 购自北京亚辉生物医学工程公司。PCR 反应是在 PE-480 PCR 仪上完成的,AFLP 扩增产物在 5% 的变性聚丙烯酰胺序列分析胶上电泳分离,条件是 100W,2000V,约 3 h,凝胶经干燥后,在 -70℃ 曝光 2~3d。

收稿日期:1998-07-06,修回日期:1999-07-08。

基金项目:国家高技术研究发展计划项目(863-HB-01-02-02)和洛克菲勒水稻生物技术项目(RF96001#424)资助。

* 联系人。

1.5 AFLP 多态性片段的回收及克隆

电泳结束后,把凝胶与 X-光片精确定位,做好标记并压片曝光 3~4 d。曝光后,把 X-光片与凝胶重新定位,用锋利的刀片切下含有多态性 AFLP 片段的凝胶。回收的凝胶溶于 400 μ L 高盐溶液(20% ethanol, 1 mol/L LiCl and 10 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)中,室温放置 24 h, 65 $^{\circ}$ C 温育 2 h, 无水乙醇沉淀 DNA 并溶于 20 μ L TE。取 5 μ L 回收的 DNA 为模板,用与选择性扩增时相同的引物按下列程序(94 $^{\circ}$ C, 30 s; 56 $^{\circ}$ C, 30 s; 72 $^{\circ}$ C, 60s)扩增 40 个循环。

重新扩增后的 AFLP 多态性 DNA 片段用 Gene clean 回收,并按厂家的说明克隆于 pGEM^o-T easy vector (Promega Corporation. Cat. No. A1360)中。

2 结 果

2.1 三种分子标记检测 DNA 多态性的相对效率

本实验中所用的 NK58S 和 NK58F 是一对等位突变系,它们之间的多态性是很少的。在 RFLP 分析中,将 NK58S 和 NK58F 的 DNA 分别用 12 种限制酶酶切, Southern 转移,然后分别用 PGMS0.7 等 10 个 RFLP 探针杂交,共用了 72 个探针/酶的组合,得到 340 条杂交带,但未能在 NK58S 和 NK58F 间检测到多态性。在 RAPD 分析中,共用 500 个 Operon 引物进行了筛选,得到 6120 个扩增产物,其中 5 个是有多态性的,但只有 1 个是单拷贝的,已把这个单拷贝的 RAPD 产物转换成了 SCAR 标记。在 AFLP 分析中,用来自 14 个 *Eco*RI 和 16 个 *Mse*I 构成的 30 个引物组合进行了扩增,得到 5106 个扩增产物,其中 9 个是多态性的。在比较过的这三种分子标记中, AFLP 的多态检出效率是最高的。这三种分子标记的 DNA 多态性检出效率依次为: AFLP>RAPD>RFLP(表 1)。

2.2 引物的选择性核苷酸数目及产物的检测方法对 AFLP 检测效果的影响

当按照厂家提供的说明书对 NK58S 和 NK58F 进行 AFLP 分析时,影响反应灵敏度最主要的因素是引物的选择性核苷酸的数目和对扩增产物的检测方法。结果表明对于水稻这样基因组较小的作物,引物选择性核苷酸数以 2+3 组合最适宜,用厂家生产的 3+3 组合对 NK58S 和 NK58F 进行扩增时,扩增产物较少,在电泳图谱上区带较稀,而用 2+2 引物组合进行扩增时电泳区带又太多,清晰度不够。如果预扩增用 +0 的引物,选择性扩增用 3+3 的引物组合,扩增出的产物数量与前面所用 kit 中 2+3

引物组合类似。对扩增产物的检测用同位素法比硝酸银染色法敏感度高,用 ³³P 又比 ³²P 标记的敏感度高(图 1)。

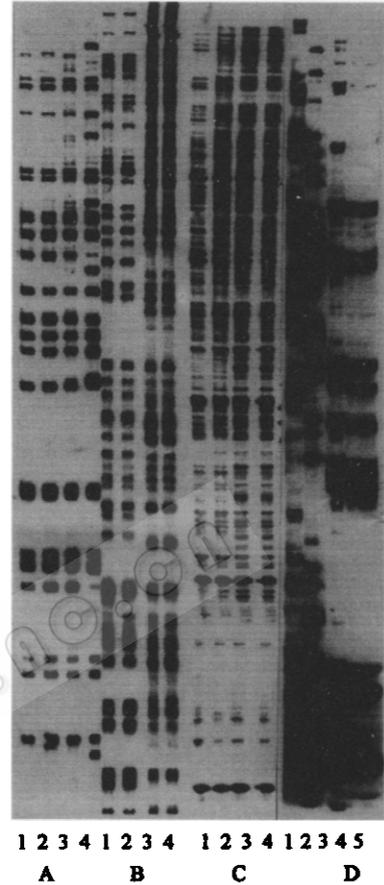


图 1 引物的选择性核苷酸数目及产物检测方法对 AFLP 检测效果的影响

Fig. 1 The relationship between AFLP detecting efficiency and its selectivenucleotide numbers in primer-combinations and the detecting method used

In blocks A, B and C, samples were labeled with ³³P. Samples in different lanes are as follows: 1. NK58S; 2. NK58F; 3. 5460S; 4. 5460F. In block D, Samples were labeled with ³²P. Samples in different lanes are as follows: 1. IR64; 2. Azucena; 3. Qjuguang; 4. NK58S; 5. NK58F. Samples in each block were amplified by same primer-combination. A. *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CAT (3 + 3 combination); B. *Eco*RI-ACA/*Mse*I-CT (3 + 2 combination); C. *Eco*RI-AA/*Mse*I-CT (2 + 2 combination); D. *Eco*RI-ACT/*Mse*I-CAT (3 + 3 combination).

2.3 水稻的 AFLP 分析

在用 ³³P 标记,并用 2+3 引物组合进行扩增的情况下,每个泳道中可以看出 50~80 个清晰的条带。在图 1-D 中 1, 2 为籼稻, 3, 4, 5 为粳稻,可以看出籼、粳之间存在明显的多态性,籼稻品种 IR64 和 Azucena(泳道 1 和 2)之间,粳稻品种秋光与 NK58S

或 NK58F(泳道 3, 4, 5)之间差异也很显著, 因此用 AFLP 很容易找出其多态性, 几乎每个引物组合都可以扩增出几个多态性片段。但在 NK58S 和

NK58F 这对等位突变系之间, 即使在最适条件下, 大多数 AFLP 引物组合也未能扩增出多态性, 只有少数引物组合扩增出了多态性产物(图 2)。

表 1 RFLP、RAPD 及 AFLP 三种分子标记对水稻 DNA 多态性的相对检测效率

Table 1 The relative efficiency of RFLP, RAPD and AFLP for polymorphism detection in rice (tested in a pair of allelic mutant lines, NK58S and NK58F)

Molecular markers	No. of probe/enzyme combinations	No. of primer pairs tested	No. of total bands detected	No. of polymorphic bands obtained	The relative efficiency for polymorphism detection/(%)
RFLP	72		340	0	Not detected
RAPD		500	6120	5	0.08
AFLP		30	5106	9	0.18

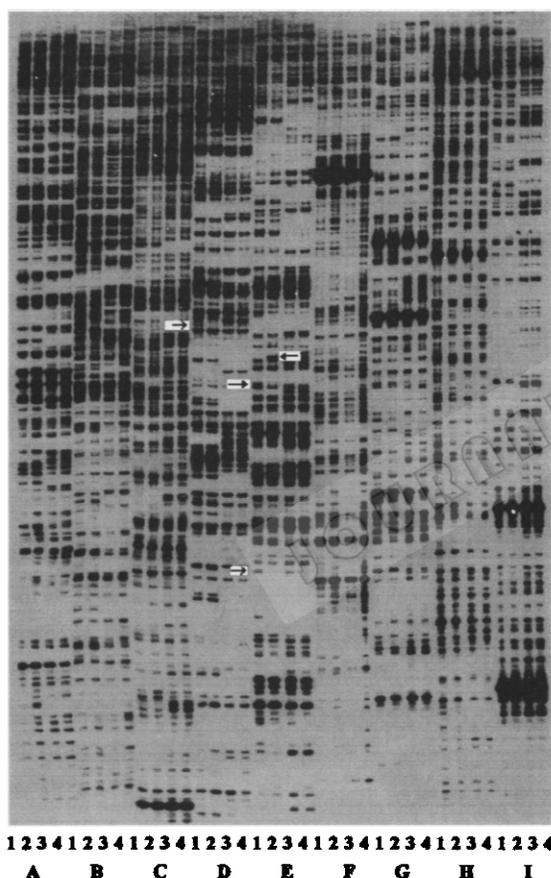


图 2 水稻等位突变系用不同的引物组合扩增出的 AFLP 指纹图谱

Fig. 2 AFLP pattern of rice allelic mutant lines amplified with different primer combinations

Samples in different lanes are as follows: 1. NK58S; 2. NK58F; 3. 5460S; 4. 5460F. Samples in the 4 lanes of each block were amplified by one primer-combination consisting of *Mse*I-AA and the following different *Eco*RI primers: A. *Eco*RI-AGT; B. *Eco*RI-AAC; C. *Eco*RI-AAG; D. *Eco*RI-ACA; E. *Eco*RI-ACT; F. *Eco*RI-ACC; G. *Eco*RI-ACG; H. *Eco*RI-AGG; I. *Eco*RI-AAG. Samples were labeled with 32 P. Arrows indicate the polymorphism between the allelic mutant lines. Only part of the gel was shown in this picture.

理论上讲, 在等位突变系 NK58S 和 NK58F 的基因组间, 除目标基因 PGMS 所在座位的局部区域外, 其余绝大部分 DNA 顺序是相同的。因此用一般的分子标记技术很难检测出多态性, 而一旦发现多态性标记, 这些标记就极有可能与目标基因紧密连锁。与传统的分子标记技术相比, AFLP 最大的优点是能够在短时间内检测出 DNA 样品间的细微差别, 因此用 AFLP 技术对等位突变系(或近等基因系)进行多态性分析是寻找与目标基因紧密连锁的分子标记的有效手段^[11]。本实验中, 用 30 个 *Eco*RI/*Mse*I 引物组合对 NK58S 和 NK58F 进行了 AFLP 分析, 共筛选了 5106 个 AFLP 扩增片段, 其中 9 个片段在 NK58S 和 NK58F 间表现多态性。

值得注意的是 *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CTG 这一引物组合扩增出了 4 条多态性片段其中两条为 NK58S 所特有, 另外两条为 NK58F 所特有。为了确证这些多态性扩增产物与 PGMS 基因的连锁关系, 对由于 NK58S 和 NK58F 为亲本产生的 F₂ 分离群体进行 BSA 分析, 结果表明 *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CTG 这一引物组合在 F₂ 极端不育基因池和极端可育基因池间也扩增出了与两亲本间相同的多态性差异(图 3), 因此这些多态性 AFLP 产物很可能是与 PGMS 基因连锁的。

2.4 多态性 AFLP 产物的回收及克隆

直接从聚丙烯酰胺凝胶上分离纯化多态性 AFLP 产物。但由此得到的 DNA 量甚微, 而且可能含有非目的片段, 难以直接用于克隆。因此我们以回收得到的 DNA 为模板, 按 AFLP 分析中选择性扩增的引物和 PCR 条件重新扩增这些多态性 DNA 片段, 图 4 显示了重新扩增的结果。重新扩增后的多态性 AFLP 产物用 gene clean 回收, 并按厂家的

说明克隆进 pGEM[®] T-easy vector 系统。目前我们已成功克隆了 NK58S 和 NK58F 间扩增出的 4 个多态性 AFLP 产物。以克隆的插入片段为探针进行

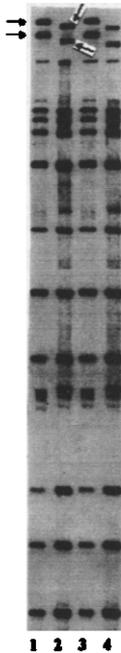


图 3 用引物组合 *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CTG 进行 BSA 分析的结果

Fig. 3 AFLP patterns of bulked segregating analysis using the primer combination of *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CTG

Samples in different lanes are: 1, NK58S; 2, NK58F; 3, Bulk S; 4, Bulk F

Southern 杂交分析证明其中 2 个为单拷贝序列, 另 2 个为低拷贝序列。

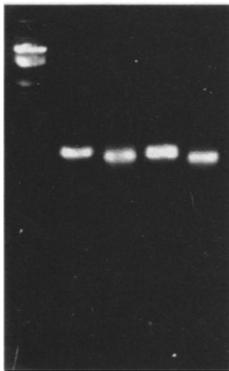


图 4 用引物组合 *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CTG 扩增出的 4 个多态性 AFLP 产物的重新 PCR 扩增图谱

Fig. 4 Reamplification patterns of the four polymorphic AFLP products amplified by the primer combination *Eco*RI-AAC/*Mse*I-CTG

3 讨 论

由于 RFLP 分析需要用同位素, 需做 Southern 杂交, 操作繁琐、费时、费力, 每个杂交膜上能检测出的杂交带数目有限, 要加大工作量难度较大, 因此, 在对等位突变系间进行多态性分析时, 用 RFLP 方法难以在短时间内得到理想的检测效果。RAPD 方法是以 PCR 为基础的, 它比 RFLP 要方便、快速, 多态性检测效率也比较高, 但由于在 RAPD 分析中, 引物与模板之间核苷酸是部分配对的, 因此反应条件对实验结果影响很大, RAPD 分析对反应条件要求非常严格, 对设备要求较高, 对操作人员技术要求也较高, 如果不能满足这诸多高标准要求, 反应结果的稳定性和重复性就难以保证。另外, 选出的多态性 RAPD 产物中, 只有少数是单拷贝的, 在本实验中只占 20%。因此对于等位突变系的多态性分析也不十分理想。

在 AFLP 分析中, 扩增产物的多少与待测材料基因组的大小有关, 当然检测方法的敏感度也很重要。像水稻这种基因组较小的作物, 当用 ³³P 标记时, 用 2+3 引物组合效果最理想。如果用 ³²P 标记或硝酸银染色法, 则只能用 3+3 引物组合。NK58S 和 NK58F 是一对等位突变系, 它们之间的多态性很低, 因此它们是检测某种分子标记方法对 DNA 多态性检出效率的理想试材。

AFLP 是在 RFLP 和 RAPD 的基础上发展起来的, 它集中了二者的优点, 而克服了二者各自的缺点。因此, 它不仅重复性好, 而且快速、高效。在 AFLP 分析中, 每个泳道中可以检测出 50~80 个区带, 每块 AFLP 胶板最多可以在其 80 个泳道中检测出 4000~5000 个区带, 能够在短时间内提供巨大的信息量, 从最终结果来看, 用 AFLP 检测多态性是最快速、有效的。从成本上看, 虽然启动 AFLP 分析需要投入较高的费用, 但它可分析的样品数量多, 所以从检出每一多态性扩增产物所用的平均费用来看并不高。在待测样品的多态性很小(如研究等位突变系和等位基因系之间的多态性时)或待测样品数目较少但需要用引物数目较多(如 BSA 分析)的情况下, AFLP 方法应是首选方案。对染色体上某个特定区域构建高密度分子标记图谱时, AFLP 方法也应是首选方案。

参 考 文 献

- [1] 袁隆平.《两系法杂交稻研究论文集》北京,中国农业出版社,P.1~5,1992
- [2] 王京兆,王斌,徐琼芳等.遗传学报,1995,22:53~58
- [3] Vos P,Hogers R,Bleeker M *et al.* *Nucleic Acids Res*,1995,23:4407~4414
- [4] Becker J,Vos P,Kuiper M. *Mol Gen Genet*,1995,249:65~73
- [5] Thomas C M,Vos P,Zabeau M *et al.* *plant Journal*,1995,8:785~794
- [6] 王斌,郑洪刚,谢纬武等.“中美农业科技与发展研讨会论文集”北京:中国农业出版社,p.46~48,1996
- [7] 翁曼丽,谢纬武,伏健民等.应用与环境生物学报,1996,2(4):424~429
- [8] 石明松.中国农业科学,1985,2:44~48
- [9] McCouch S R,Kochert G,Yu Z H *et al.* *TAG*,1988,76:815~829
- [10] Wang B,Xu W W,Wang J Z *et al.* *Theor Appl Genet*,1995,91:1111~1114
- [11] Tanksley S D,Ganal M W,Martin G B. *Trends in Genet*,1995,11:63~68

AFLP Analysis of Photoperiod-sensitive Genic Male Sterile (PGMS) Rice Mutant Lines

LI Chuan-you¹ ZHENG Hong-gang^{1,3} WENG Man-li JIA Jian-hang¹,

MOU Tong-min² Henry T. Nguyen³ WANG Bin¹

¹(Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

²(Institute of food crop, Hubei Academy of Agricultural Sciences, Wuhan 430064)

³(Department of Soil and Plant Sciences, Texas Tech University, Lubbock 79409, USA)

Abstract The reaction conditions for rice AFLP assay were optimized. The relative efficiencies for polymorphism detection of RFLP, RAPD and AFLP were compared through the analysis between a pair of PGMS allelic mutant lines (NK58S and NK58F). Results indicated that the efficiency for polymorphism detection in rice is in the order of AFLP > RAPD > RFLP, and also indicated that AFLP is a powerful DNA molecular marker technique for polymorphism detection, especially in the cases of extremely low polymorphism, such as isogenic lines and allelic mutant lines. The advantages and disadvantages of these three molecular marker systems were discussed. Using AFLP in conjunction with bulked segregating analysis, 5106 AFLP loci were screened and 9 of them showed polymorphism between NK58S and NK58F. 4 of the polymorphic AFLP products were cloned. Southern blotting analysis showed that two of them were single copy sequences while the other two were low copy sequences in rice genome.

Key words AFLP, rice, molecular marker, polymorphism detection efficiency