

利用微卫星标记鉴定杂交水稻冈优 22 种子纯度的研究

李晶焰^{1,2} 何平¹ 李仕贵³ 鲁润龙² 朱立煌^{1*}

¹(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

²(中国科技大学生物系 合肥 230026)

³(四川农业大学水稻研究所 温江 611130)

关键词 杂交水稻, 杂种纯度, 微卫星标记

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)02-0211-04

水稻是重要的粮食作物之一,早在 70 年代我国就已实行了杂交稻的三系配套,目前杂交水稻在我国已大面积种植。由于杂交稻种子的真伪无法从种子形态上鉴别,这给造假者以可乘之机。在正常的情况下,种子的纯度也会因质量控制不严而给农业生产造成大量损失。这些都迫切需要有一种快速、准确和易行的方法以鉴定杂交稻种子的纯度,保证杂交稻更好地推广及产量的稳定提高。

微卫星是指基因组中以少数几个核苷酸(一般为 2~4 个)为单位串联重复的 DNA 序列,这些重复序列的重复次数和重复程度高度可变,且随机分布于真核生物基因组中^[1]。由于重复次数的不同和重复程度的不完全均可以造成每个微卫星所在的遗传座位的多态性,因此这种多态性的信息量是相当丰富的。据 Panaud 等^[2,3]的研究,在水稻的基因组中,分别含有 1360 个以(GA)_n和 1230 个以(GT)_n为主要单位的微卫星。由数据库检索可知,(GAA)_n和(GCC)_n等微卫星在水稻基因组中的含量也相当丰富,估计在整个水稻基因组中微卫星的总数达到 5700~10000 个左右^[4,5]。Olufowofe 等^[6]选择了 4 种微卫星标记即可有效地评估栽培稻内的不同品种间的异质性。Akagi 等^[7]利用高度多变的含(AT)_n的 17 个微卫星标记能区别开 59 个亲缘关系极近的粳稻品种。由此可见,作为分子标记微卫星用于区分基因型间的差异是很有效的。

四川省是我国的产粮大省,杂交水稻冈优 22 已种植了 4 年,仍作为全省主要稻种继续推广,是我国的主要杂交水稻组合之一。在本研究中,我们使用微卫星引物,对该杂交水稻及其母本(雄性不育系冈 46A)和父本(恢复系 CDR22)进行 PCR 扩增,筛选出同时具有母本和父本特征且有多态性的特异谱带,并以该谱带作为分子标记对其纯度进行鉴定。

1 材料和方法

1.1 材料

冈优 22 杂交水稻种子由四川农业大学水稻研究所从某制种单位随机取样获得,取其 100 粒种子种于中国科学院遗传研究所试验场。冈优 22 的两个亲本(不育系冈 46A 和恢复系 CDR22),9 个常规稻品种(黑优占 171,IR64,特青 2 号,IR72,中早优 2 号,野吉占 3 号,中元 10 号,窄叶青 8 和京系 17)和 22 个常用恢复系(明恢 62,明恢 63,明恢 75,明恢 77,明恢 78,明恢 81,明恢 86,泸恢 6,川恢 802,宁恢 21,桂 501,多系 1,测 64-7,测 48-2,测 49,圭 630,HR195,725,6078,IR661,3028 迟和 IR36),由四川农业大学水稻研究所和中国农业科学院作物所提供。

1.2 水稻基因组 DNA 提取

取不育系冈 46A 和恢复系 CDR22 和常用恢复系的幼苗叶片分别提取 DNA。将 100 粒冈优 22 的种子在发芽后种在田间,用幼苗叶片提取 DNA 并进行植株形态观察。常规稻的 DNA 由种子直接提取。水稻 DNA 叶片和种子的提取方法分别按 McCouch 等^[8]和 Chunworse 等^[9,10]介绍的方法进行。

1.3 微卫星扩增

微卫星引物序列参见 Chen 等^[11],经上海 Sangon 公司合成,每个引物含有 20 个碱基左右。

微卫星扩增使用的 9600 型 PCR 扩增仪为 Perkin-Elmer 公司产品,Taq-G 聚合酶由中国科学院遗传研究所生产。PCR 反应体系(25 μ L)含有 10 mmol/L Tris-HCl pH8.3,50 mmol/L KCl,2.0 mmol/L MgCl₂,0.01% Tween-20,0.01% NP-40,dATP,dCTP,dTTP,dGTP 各为 0.1 mmol/L,15 ng 引物,10~20 ng 基因组 DNA,1 单位的 Taq-G 聚合酶。反应扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,60 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 链延伸

收稿日期:1999-03-31,修回日期:1999-12-24。

基金项目:国家九五攻关项目。

* 通讯联系人。

1 min,共 35 个循环,扩增产物用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。当用两对引物进行扩增时,PCR 反应体系同上。

2 结 果

2.1 微卫星分子标记在冈优 22 的亲本间的多态性

利用 160 对微卫星引物首先在不育系冈 46A 和恢复系 CDR22 的模板 DNA 中进行初筛扩增,其中有 29 对引物在

母本冈 46A 和父本 CDR22 之间显示出多态性。根据微卫星所在染色体的不同,从获多态性的 29 对引物进行复筛扩增,其中 10 对位于 9 条不同染色体上的引物(表 1),在父本及母本之间,可清晰地扩增出片段大小在 300 bp 以下的多态性特异片段(图 1)。鉴于不育系冈 46A 和恢复系 CDR22 均是籼稻、亲缘较近,在 9 条染色体上有 10 对微卫星引物可揭示它们之间的多态性应该是个比较理想的结果。

表 1 在冈优 22 的两个亲本间具有多态性的 10 个微卫星标记^[11]

Chromosome	Marker	Repeats(in IR36)	Chromosome	Marker	Repeats(in IR36)
1	RM246	20	6	RM204	44
2	RM208	17	7	RM248	25
2	RM263	34	9	RM201	17
3	RM168	15	10	RM228	36
5	RM163	20	11	RM202	30

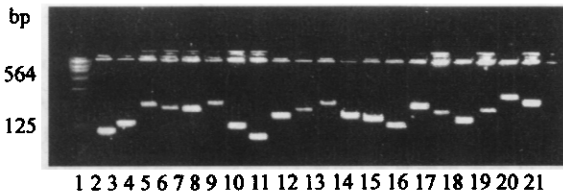


图 1 10 个微卫星在杂交稻冈优 22 的双亲间的多态性

Amplified microsatellites:RM246(lane 2 and 3);RM208(lane 4 and 5),RM263(lane 6 and 7);RM168(lane 8 and 9),RM163(lane 10 and 11),RM204(lane 12 and 13),RM248(lane 14 and 15,)RM201(lane 16 and 17),RM228(lane 18 and 19),RM202(lane 20 and 21). In lane 2,4,6,8,10,12,14,16,18 and 20,templet DNAs were from CDR22(restorer line);In lane 3,5,7,9 and 11,templet DNAs were from Gang46A(CMS line);Lane1, λ -DNA/*Hind* III.

2.2 微卫星引物鉴定冈优 22 真假杂种

用这 10 对引物对 100 粒冈优 22 杂种及其父、母本幼苗的 DNA 进行微卫星扩增,发现第 14 号和第 23 号两株的 DNA 只能被扩增出母本的特异条带,而其作 98 株的 DNA 均能同时扩增出两条分别来自母本和父本的特异条带。图 2 为其中两对引物 RM168 和 RM201 的扩增结果。将幼苗 DNA 的微卫星扩增结果与幼苗在田间长成的 100 个单株逐个进行比较,发现没有同时扩增出父本特异条带的单株(图 2 中第 10 和第 20 电泳泳道)在株高和结实等形态上与不育系相似,应为假杂种;而其余 98 个单株在田间的形态表现全部为真杂种。二者结果是一致的,符合率达到 100%,说明微卫星扩增结果是准确可靠的。由微卫星引物同时扩增出来的来自两个亲本的特异条带,可以在琼脂糖凝胶电泳中直接观察到。

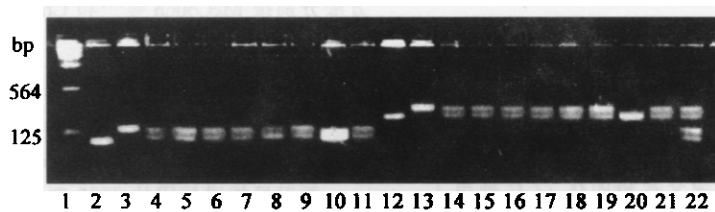


图 2 由两个微卫星 RM168 和 RM201 的引物扩增的产物

Amplified microsatellites:RM168 + RM201(lane 2~11);RM201(lane12~21),RM168(lane 22). DNA from Gang46A(lane2 and 12),CDR22(lane 3 and 13),hybrid Gangyou-22(lane4,14 and 22),Gnagyou 22 population(lane 5~11 and 15~21)were used as templets for amplification of microsatellites;Lane 1, λ -DNA/*Hind* III.

2.3 不同水稻品种的微卫星引物扩增多态性

用上述 10 个引物对四川地区的 22 种常用的恢复系幼苗、9 种常规稻种子及冈优 22 的 DNA 进行微卫星扩增,其中 RM168 引物的多态性最符合种子鉴定纯度的要求,对冈优 22 能同时扩增出 115 bp 和 140 bp 两条特异条带。而对其它 22 种常用恢复系只能扩增出一条带,均不同于由冈优 22 的父本 CDR22 的 DNA 扩增出的 140 bp 特异条带(图 3)。另

外对 9 种常规稻的 DNA 也不能同时扩增出 115 bp 和 140 bp 两条特异条带。这一结果说明 RM168 引物不仅能鉴定出由于不育系育性不稳而导致的假杂种,而且能鉴定出由其它恢复系与不育系冈 A 组合产生的假冈优 22 杂种以及机械混杂的常规稻种。因此,利用 RM168 可以有效地鉴定冈优 22 杂种种子的纯度。

为进一步提高鉴定的准确性,我们选取能揭示亲本间多

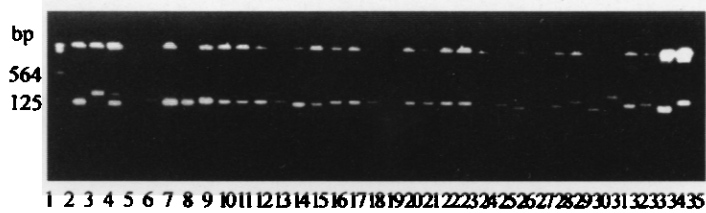


图 3 微卫星 RM168 在 22 种恢复系和 9 种常规稻品种中的扩增产物

Templet DNAs from Gang46A(lane2), CDR22(lane3), Gangyou22(lane4), Minghui62(lane5), Minghui63(lane6), Minghui75(lane7), Minghui77(lane8), Minghui78(lane9), Minghui81(lane10), Minghui86(lane11), Luhui6(lane12), Chuanhui802(lane13), Ninghui21(lane14), Gui501(lane15), Duxoxil(lane16), Ce64(lane17), Ce48(lane18), Ce49(lane19), Gui630(lane20), HR195(lane21), 725(lane22), 6078(lane23), IR661(lane24), 3028chi(lane25), IR36(lane26), Heiyouzhan171(lane27), IR64(lane28), Teqing2(lane29), IR72(lane30), Zhongzaoyou2(lane31), Yeizhan3(lane32), Zhongyuan10(lane33), Zhaiyeqing8(lane34), Jingci17(lane35) were amplified with microsatellite RM168; Lane1, λ -DNA/*Hind* III.

态性的两对微卫星引物, RM168 和 RM201, 在同一反应体系中同时进行 PCR 扩增。这样在琼脂糖凝胶电泳中可直接观察到来自母本和父本的四条特异条带(图 2)。这既扩展了微卫星标记在杂种纯度鉴定上的应用范围, 也提高了种子纯度检测的准确性。

3 讨论

杂交水稻杂种纯度一般受不育系育性不稳、不同水稻品种间的串粉、机械混杂和人为造假等因素的影响。杂交稻的大面积推广, 对以鉴定杂交稻种子纯度为目的的快速、准确和易行的方法的需求是十分迫切的。为此相继发展了以形态特征、同工酶标记、RFLP 和 RAPD 分子标记为基础的鉴定方法。形态鉴定虽较为直观, 但要待到成苗以后再行观察, 会延误农时。由于同工酶标记的多态性少, 因此无法鉴定出由一些水稻品种间的串粉所导致的杂种不纯, 且酶的活

性受发育时期及环境条件的影响很大, 难以准确掌握, 这就降低了纯度分析的可靠性^[12]。用 RFLP 标记鉴定周期长, 使用放射性同位素标记或非同位素的荧光标记, 操作复杂, 费用昂贵, 需要大量的 DNA, 因此也很难应用到种子纯度的鉴定上。而 RAPD 引物则对不同 DNA 片段有竞争扩增效应, 常常使一些扩增量少的 DNA 片段无法在电泳谱带上显示出来, 从而仅呈现出一个亲本的遗传信息, 无法在杂种的种子中检测出该亲本种子的混杂^[13]。微卫星因能揭示未知基因组 DNA 序列之间的丰富多态性而被广为应用^[14]。在实际操作中还可以利用从种子中提取的 DNA 作模板, 同时将真杂种中来源于父本和母本两种遗传信息在琼脂糖凝胶的电泳谱带中准确直观地表现出来。此外, 还可以使用两对引物在同一试管中进行 PCR 扩增, 这就更增加了其应用的可靠性。

参 考 文 献

- [1] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A *et al.* *Theor Appl Genet*, 1996, **93**:1071~1077
- [2] Panaud O, Chen X, McCouch S R. *Genome*, 1995, **38**:1170~1176
- [3] Kun-sheng W, Steven D, Tanksley S D *et al.* *A Mol Gen Genet*, 1993, **241**:225~235
- [4] Zhao X, Kochert G. *Mol Gen Genet*, 1992, **231**:353~359
- [5] McCouch S R, Chen X, Panaud O *et al.* *Plant Molecular Biology*, 1997, **35**:89~99
- [6] Olufowote J O, Xu y, Chen X *et al.* *Genome*, 1997, **40**:370~378
- [7] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A *et al.* *Theor Appl Genet*, 1997, **94**:61~67
- [8] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H *et al.* *Theor Appl Genet*, 1988, **76**:815~829
- [9] Chunwongse J Martin G B, Tanksley S D *et al.* *Theor Appl Genet*, 1993, **86**:694~698
- [10] 翟文学, 陆朝福, 朱立煌等. *生物工程学报*, 1996, **12**:416~421
- [11] Chen X, Temnykh S, Xu Y *et al.* *Theor Appl Genet*, 1997, **95**:553~567
- [12] 陆士伟, 黄炳权, 邝章标等. *中国农业科学*, 1982, **5**:10~16
- [13] 陈洪, 钱前, 朱立煌等. *科学通报*, 1996, **41**:833~836
- [14] 何平. *遗传*, 1998, **20**:42~47

Application of Microsatellite Markers for the Seed Purity Examination of a Hybrid Rice, Gangyou-22

Li Jing-Zhao^{1,2} He Ping¹ LI Shi-Gui³ LU Run-Long² ZHU Li-Huang^{1*}

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

²(Department of Biology, The Chinese University of Sciences and Technology, Hefei 230026)

³(Rice Research Institute of the Sichuan Agricultural University, Wenjiang 611130)

Abstract For seed commercialization of hybrid rice it is necessary to examine the purity of its seeds before field-production, because the seed purity is closely related to their heterosis performance and yield increase. In this research, 160 microsatellite markers were used for PCR amplification of rice seedling DNAs of Gangyou-22, which is a major hybrid rice in China, and its parents, Gang46A (CMS line) and CDR22 (restorer line). A microsatellite marker, RM168, was screened out for its ability to produce polymorphic bands specific to each of the two parents but different from other 22 restorer lines and 9 cultivars. This provides an accurate and efficient method to examine the purity of a hybrid rice at an earlier time. Amplification of DNAs extracted from seeds and application of two microsatellite markers in one PCR system can further simplify the procedure and improve the accuracy of the seed purity examination.

Key words Hybrid rice, seed purity, microsatellite markers

第三届全国酶工程学术讨论会 通 知

兹定于7月下旬至8月初在成都市召开第三届全国酶工程会议,会期为3天,会议论文发表分大会报告及分组报告,不以墙报形式发表。欢迎创新性研究工作综述及有前瞻性综述,目的是研讨我国二十一世纪酶工程的前沿与创新点。

会议内容:酶的发酵工程与酶制剂、酶的提纯、性质与鉴别、生物多样性与极端条件下的酶、酶的结构与功能、酶的化学修饰与固定化酶、酶的稳定化与机理、酶的基因工程与蛋白质工程、抗体酶与核酶、酶法转化、有机化合物与手性物合成、非水相酶促催化、酶在工业、医药、诊断、环境、农业、食品加工等领域的应用、生物传感器与生物芯片、生物反应器与过程监控、下游处理等。

论文提交:会议代表需提交中文论文较详细的摘要,内容不少于1000字,以A4纸印刷一面为最适,工作或前沿性综述两页,标题用三号字(黑体),内容用五号字,可列一、二个图表及主要文献(用小五号字),论文题目下注明作者姓名、单位学系、邮编、电话、传真及E-mail。用A4纸激光打印,文字篇幅宽×高为15×22cm,左右边各留2.5cm,上、下各留3cm,此摘要必须在4月20日前寄到北京中关村微生物所黎高翔收(邮编100080),逾期将不受理,经审校再通知是否录用。如内容格式不符合要求,将不录用或退改。

中国微生物学会酶工程专业委员会

2000.1.20

联系电话:010-62643074 010-62554677

Fax:010-62554677