

文章编号: 1001-411X(2001)04-0055-03

水稻空间诱变后代的微卫星多态性分析

周 峰, 易继财, 张群宇, 王 慧, 梅曼彤

(华南农业大学遗传工程研究室, 广东 广州 510642)

摘要: 选用 299 对微卫星引物, 对经卫星搭载回收的水稻品种“特籼占 13”种子种植后选育出的 5 个突变株的后代进行 DNA 多态性分析, 结果表明: 变异植株与原种之间均存在着不同程度的微卫星多态性. 在有效扩增的 283 对引物中, 引物多态性频率介于 0.35%~2.47% 之间, 且多态性位点在水稻基因组中是随机分布的.

关键词: 水稻; 空间诱变; 微卫星多态性

中图分类号: Q754

文献标识码: A

空间环境与人类生存的地球环境条件差别很大, 能够对进入其中的植物材料具有明显的诱变作用. 已有的研究表明, 空间诱变具有变异频率高、变异幅度大、多数性状的变异能够遗传等特点, 有些变异是迄今地球上用其他诱变因素处理难以出现的, 因此把空间诱变作为农作物遗传育种的一种新途径已受到遗传育种界的广泛重视^[1].

中国是世界上开展农作物空间诱变育种最早的国家之一, 随着对人造卫星和高空气球等技术的不断完善, 为空间诱变育种提供了有利的条件. 自 1987 年以来, 我国已成功地利用返回式卫星先后搭载了水稻、小麦、大麦、玉米、油菜、棉花、谷子、青椒等重要农作物^[1], 已获得了许多宝贵的突变材料, 并从中选育出一批优良品系, 但一般都是从育种角度出发, 将有利的突变性状用于育种中, 而对突变后代的分子水平的分析很少报道. 1996 年 10 月笔者将水稻品种“特籼占 13”种子搭载于返地卫星, 回收种植, 经过连续 5 代的选育初步获得了一些基本稳定的突变株系, 本文即对其中的几个突变株系进行了微卫星分析, 从 DNA 水平上找出了它们之间的遗传变异.

1 材料和方法

1.1 供试材料

把籼稻品种“特籼占 13”种子于 1996 年 10 月置于返回式卫星(飞行高度 178~320 km, 倾角 63°, 辐射吸收剂量 2.65 mGy)搭载, 回收种植后, 从第一代及第二代中选出 5 个突变株系, 以其突变稳定后代为材料. 其中, 1 为雄性不育, 2 为穗型变大, 3 为穗粒变紫, 4 为株高增高, 5 为株高降低(半矮生), 6 为从半矮生突变株后代中分离的株高回复植株, 同时用 5 个不同单株的原种作为对照. 所有材料均种植于华南农业大学实验农场, 并进行田间观察分析, 以确保

所选突变性状的可靠性.

1.2 DNA 提取

参照 Zheng 等(Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding. IRRI Discussion Paper, 1995, series No. 12)的方法, 稍加修改, 具体方法如下: 取一长约 5 cm 的叶片放入 2 mL 离心管中, 加适量液氮, 迅速用玻棒将叶片捣碎, 加入 800 μ L 提取液(200 mmol/L Tris-HCl pH 7.5, 250 mmol/L NaCl, 25 mmol/L EDTA, 0.005 kg/L SDS), 摇匀, 室温放置 1 h, 14 000 r/min 离心 10 min, 将上清液移至 1.5 mL 离心管中, 加入等体积异丙醇, 摇匀后于室温放置 10 min, 4 000 r/min 离心 3 min, 去上清, 沉淀用 $\varphi=70\%$ 乙醇洗涤 1 次, 自然风干, 加入 200 μ L TE(10 mmol/L Tris-HCl pH 8.0, 1 mmol/L EDTA)使其溶解, 以浓度梯度(10×10^{-3} , 25×10^{-3} , 50×10^{-3} , 100×10^{-3} g/L) λ DNA 为标准, 电泳检测样品的 DNA 浓度.

1.3 微卫星分析

所用引物根据 Cornell 大学(网址: <http://ars-genome.cornell.edu/rice/microsat>)公布的序列, 由上海生工公司合成, 共 299 对, 均匀地分布于水稻的 12 条染色体上. PCR 反应在 MJ PTC-100 PCR 仪上进行. PCR 反应体系(25 μ L)中含有 1 $\times$ PCR buffer(50 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl pH 8.9, 1.5 mmol/L MgCl₂, $\varphi=0.1\%$ Triton X-100), 0.2 mmol/L dNTP, 0.15 μ mol/L 引物, 50 ng 水稻基因组 DNA, 1U Taq DNA 聚合酶. 反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 然后 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 共 35 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min. 扩增产物用 60 g/L 的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳, 电泳所用分子量标记为 Φ X174/Hae III 银染检测, 银染程序参照 Panaud 等^[2]报道的方法.

收稿日期: 2001-03-27

作者简介: 周 峰(1972-), 男, 硕士研究生.

基金项目: 国家 863-2 资助项目(863-2-7-10-1).

1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

2 结果与分析

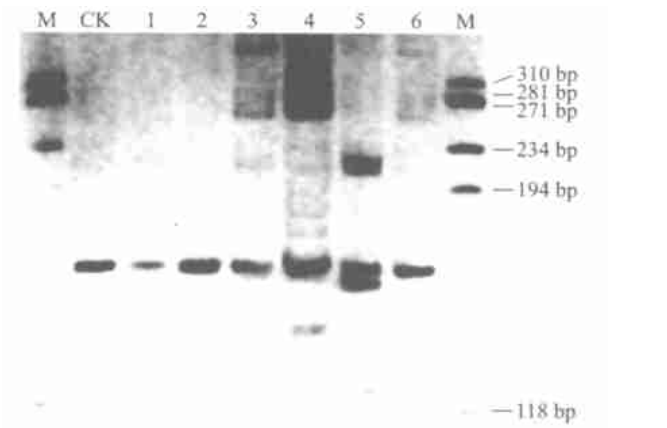
2.1 多态性的表现形式

微卫星多态性的表现形式共有 3 种: (1) 扩增片段(电泳谱带)数的增多, 与原种相比, 突变株中增加了某些片段; (2) 片段数的减少, 与原种相比, 突变株中缺少了某些片段; (3) 扩增片段长度的差异, 与原种相比, 扩增片段的长度发生了变化. 在本试验检测出的多态性中, 这 3 种形式所占的比例分别为 25%、30%和 45%. 其中, 出现差异带所占的比例最高. 这些结果可能是由于小片段的缺失, 导致上下游引物间区段的变化, 这一结果说明 DNA 水平的变异可能并非是点突变, 而是一些较大的变异, 如缺失等. 由于微卫星引物原设计为特异扩增约 100 ~ 300 bp 的片段, 本研究观察到的微卫星主带以外的片段相当于 RAPD 标记. 这些标记对本研究的目的具有增加信息量的作用. 图 1 所示的即为引物 RM 105 在半矮生突变株中检测出多态性的电泳结果.

2.2 多态性(突变)频率

在所用的 299 对引物中, 共有 283 对引物得到了有效扩增, 扩增产物的大小介于 50 ~ 1 000 bp 之间.

在有效扩增的 283 对引物中, 共有 14 对引物分别在 5 个性状发生变异的植株中检测出多态性(表 1),



CK: 原种(特籼占 13); 1: 雄性不育突变株; 2: 穗型变大突变株; 3: 穗粒变紫突变株; 4: 株高增高突变株; 5: 株高降低(半矮生)突变株; 6: 从半矮生突变株后代中分离的株高回复的植株
CK: original variety (Texianzhan13); 1: male-sterile mutant; 2: larger-panicle mutant; 3: purple-kernel mutant; 4: higher-plant mutant; 5: shorter-plant (semidwarf) mutant; 6: height-restored plant segregated from shorter-plant (semidwarf) mutant

图 1 微卫星引物 RM105 的扩增结果

Fig. 1 Amplification result generated by RM105, a microsatellite primer pair

表 1 不同变异株系的微卫星多态性分析结果¹⁾

Tab. 1 The results of microsatellite DNAs polymorphic analysis in various rice mutants

SSR 标记名称 name of SSR marker	染色体编号 chromosome No.	雄性不育 male sterile	穗型变大 larger panicle	穗粒变紫 purple kernel	株高增高 taller plant	株高降低 shorter plant
RM1	1	—	—	—	A	—
RM4A	12	—	C	C	C	—
RM26	5	—	C	—	A	—
RM105	9	—	—	—	—	A
RM107	9	—	—	B	—	—
RM110	2	—	—	B	—	—
RM154	2	—	—	A	—	—
RM158	2	B	—	—	—	—
RM181	11	—	C	—	C	—
RM211	2	—	C	—	—	—
RM216	10	—	—	—	B	—
RM252	4	—	—	—	A	—
RM270	12	—	B	—	—	B
RM305	5	—	C	—	C	—
多态性频率 polymorphic frequency / %		0. 35	2. 12	1. 41	2. 47	0. 71

1) —: 无差异; A: 扩增片段数增多; B: 扩增片段数减少; C: 扩增片段大小有差异

原种的5个不同单株间对这些引物均无多态性,表明原种均一性较好.各个突变株与原种间的多态性频率为0.35%~2.47%,此比率反映出各突变株中遗传物质的变异频率.而半矮生突变株后代中株高回复的植株,283对引物均未检测出多态性.

2.3 多态性位点的分布

检测出多态性的14对引物随机地分布于水稻12条染色体中的8条上,而且,即使在同一染色体上,也是随机分布的,并无一定的规律可循.由此可见,空间条件导致的DNA水平的变化是随机发生的.

上述多态性分析结果经过重复试验,仍能重现,表明各突变株性状的变异确实是由于DNA的变化所引起的.

3 讨论

3.1 关于空间条件对植物影响的研究,国际上早在50年代就已开始,但国外对空间生物学效应的研究,着眼点在于其对宇航员健康的危害以及相应的解决办法.我国在1987年开始以返回式卫星搭载植物种子以来,在回收种子地面种植、观察、选择、多代培育等方面做了不少工作,在利用空间特殊环境诱导植物性状变异,以培育性状优良的新品种及创造新的种质资源等方面取得了可喜的成果,开拓了“空间诱变育种”这一新领域^[1].

3.2 关于模拟空间条件下诱发突变的分子生物学研究在国际上已有不少报道^[3,4],但对于空间条件诱发植物突变的分子生物学分析目前尚只有国内的少数报道^[5].这些研究大多采用RAPD分析方法,难以直接对突变基因进行定位.本文利用微卫星标记对空间诱变水稻后代进行了DNA水平上的分析,从分子水平上解释空间条件对植物材料的诱变作用,分析的结果为今后对某些突变基因的定位及克隆打下了基础.

3.3 本研究中所用的半矮生突变是一个特殊的材料,它是“特粳占13”种子经卫星搭载,回收种植后从第一代中选出的,经过连续5代田间种植观察,每代选出的矮生植株在下一代都会分离,因此笔者推测它可能是由于生长过程中一个重要的基因发生了纯合致死突变所造成的.该基因只有在杂合状态下植株才能成活,并表现为矮秆.在引物RM105的扩增结果中,只有半矮生突变株后代分离出的矮秆植株比原种多了一条扩增带,而分离出的高秆植株与原种的带型一致,这也从DNA水平上为上述推测提供了一定的依据.本研究还发现在能有效扩增的283个微卫星引物中,半矮生突变株后代分离出的矮秆植株与原种间的多态性频率为0.71%,而分离出的高秆植株与原种均没有差异,表明半矮生突变株与原种间只有个别位点的差异,笔者将对该突变基因进行进一步的分析研究.

参考文献:

- [1] 蒋兴村. 863—2 空间诱变育种进展及前景[J]. 空间科学学报, 1996, 16(增刊): 77—82.
- [2] PANAUD O, CHEN X, McCOUCH S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 597—607.
- [3] MEI M T, DENG H, LU Y, et al. Mutagenic effects of heavy ion radiation in plants [J]. Adv Space Res, 1994, 14(10): 363—372.
- [4] MEI M T, QIU Y L, HUANG Y Q, et al. Morphological and molecular changes of maize plants after seeds been flown on recoverable satellite [J]. Adv Space Res, 1998, 22(12): 1 691—1 697.
- [5] 王 斌, 李金国, 陈芳远, 等. 绿豆空间诱变育种及其分子生物学分析[J]. 空间科学学报, 1996, 16(增刊): 121—124.

Polymorphic Analysis of Microsatellite Markers in *Oryza sativa* L. Mutants Induced by Space Flight

ZHOU Feng, YI Ji-cai, ZHANG Qun-yu, WANG Hui, MEI Man-tong

(Genetic Engineering Laboratory, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: The genomic DNA polymorphism of five mutants, selected from rice variety Texianzhan13 seeds which had been flown on a recoverable satellite, was analyzed by using 299 rice SSR (simple sequence repeats) primer pairs selected throughout the 12 chromosome of rice genome. The results indicated that the polymorphism among mutants and original variety was various. The polymorphic frequency, based on the ratio of number of primers amplifying polymorphic band pattern to the number of amplifying any bands, was 0.35% to 2.47% in different mutants.

Key words: rice (*Oryza sativa* L.); space mutagenesis; microsatellite DNAs polymorphism

【责任编辑 柴 焰】