

研究报告

Research Report

东乡野生稻渐渗系中外源 DNA 的遗传与序列变化

戴亮芳* 唐甸深* 赵俊 邓小娟 罗向东** 温秀芳 谢建坤**

江西师范大学生命科学学院, 南昌, 330022

* 同等贡献作者

**通讯作者, xdluolf@163.com; xiejiankun@yahoo.com

摘 要 本研究以东乡野生稻耐冷渐渗系 IL5243 和 IL5335 及其双亲为试验材料, 利用 139 对 SSR 引物和 35 对 AFLP 引物分析东乡野生稻 DNA 在两耐冷渐渗系中的遗传与 DNA 序列变化特征, 探讨基因组结构和序列变化对外源基因渐渗的作用及影响。SSR 和 AFLP 的分析结果表明, BC₁F₁₀ 的耐冷渐渗系对双亲基因组的继承趋于稳定、纯合, 绝大多数条带(85.15%~90.77%)与受体亲本协青早 B 一致, 4.33%~7.17%的东乡野生稻外源 DNA 条带已成功导入渐渗系中。DNA 测序及 BLAST 序列比对结果表明, 被导入的外源 DNA 序列具有抗逆、抗病或其他生物学功能, 但两耐冷渐渗系在遗传继承双亲遗传物质的同时, 还呈现一些基于基因组 DNA 序列变化的非孟德尔式变异, 包括亲本序列丢失和新序列出现以及碱基的颠换或转换, 这些序列变异不仅可发生在非编码区的重复序列中, 也可发生在功能基因序列中。研究结果表明东乡野生稻 DNA 渐渗诱发受体基因组产生广泛的变异, 对拓宽栽培种遗传变异具有重要意义。

关键词 东乡野生稻, 渐渗系, 遗传变异, 序列变化

Heredity and Sequence Changes of Alien DNA in Introgression Lines from Dongxiang Wild Rice

Dai Liangfang* Tang Dianshen* Zhao Jun Deng Xiaojuan Luo Xiangdong** Wen Xiufang Xie Jiankun**

College of Life Science, Jiangxi Normal University, Nanchang, 330022

* These authors contributed equally to this work

** Corresponding authors, xdluolf@163.com; xiejiankun@yahoo.com

DOI: 10.13271/j.mpb.012.001089

Abstract In the present study, a total of 139 pair of microsatellite (SSR) primers and 35 pair of amplified fragment length polymorphism (AFLP) primers were used to investigate the heredity and DNA sequence changes of Dongxiang wild rice DNA in cold tolerance introgression lines (ILs) (IL5243 and IL5335) and their parents. And meanwhile, the effect of genome structure variation and DNA sequence changes on the alien genes introgression was also discussed. The results of SSR and AFLP showed that most of sequences and loci inherited from their parents were basically stabilized and homozygous. The ILs possessed 85.15%~90.77% and 4.33%~7.17% homozygous bands from cultivated rice ‘Xieqingzao B’ and Dongxiang wild rice, respectively. DNA sequence and BLAST analysis indicated that many alien DNA sequence from Dongxiang wild rice have the abiotic stress resistance, diseases resistance, and other biology function. Further data analysis suggested that some heredity and variation of non-Mendelian were detected in IL5243 and IL5335, including parental sequence elimination, novel sequence emergence and base mutation. Blast comparison results showed that the sequence variation could happen in the coding sequence and non-coding region. These results indicated that the receptor genome presented

收稿日期: 2014-08-28

接受日期: 2014-10-09

网络出版日期: 2014-11-01

URL: <http://biopublisher.cn/index.php/mpbopa/article/view/2494>

基金项目: 本研究由国家自然科学基金项目(31260255)、江西省教育厅科技计划项目(GJJ12184)、江西省科技支撑计划项目(20122BBF60064)、江西省青年科学家培养计划(20112BCB23007)和江西省落地计划(KJLD12059)共同资助

extensive genetic variation during the introgression of exogenous DNA, which would provide very important effect for broadening the basis of genetic variation in cultivar rice.

Keywords Dongxiang wild rice, Introgression lines, Epigenetics, DNA sequence change

远缘杂交是利用野生优异基因,创造种间遗传变异,培育新品种的重要途径,也是基因组进化和新物种形成的重要驱动力(Li et al., 2010; 罗向东等, 2011)。通过种间杂交及不断地回交自交获得的渐渗系是转移外源优异基因、研究物种进化和优异基因演变的重要研究材料(Deng et al., 2012)。近年来的许多研究也表明,种间杂交渐渗过程不是简单地转移外源优异基因,期间还会诱发受体植物基因组结构和基因表达水平的改变,进而产生一些无法用孟德尔定律解释的表型变异,如强抗旱性、抗病虫能力等新表型(Qi et al., 2010; Li et al., 2013),为作物遗传改良提供了新的契机和途径。

前人对拟南芥、小麦、玉米、棉花和芸薹属等植物的研究发现,种间杂交诱发的遗传与表观遗传变异主要包括亲本 DNA 序列丢失和新序列出现(Sanetomo and Hosaka, 2011)。DNA 甲基化水平和模式的改变,以及由此引发的基因表达水平显著变化(Abid et al., 2011);或者是诱发转座子或逆转座子激活(Yasuda et al., 2013),导致基因组序列重排(Kopecky et al., 2011);有些种间杂种后代还伴有组蛋白修饰和核仁显性等(Ge et al., 2013)。目前关于遗传与表观遗传变异的分子机制和作用模式尚不十分明确,并且在不同物种中表现的类型和模式也不尽相同(Yang et al., 2012; Kantama et al., 2013)。因此,扩大作物种类,研究外源 DNA 渐渗诱发受体基因组结构和基因表达变化特征,有助于揭示种间杂交渐渗过程中遗传与表观遗传变异的分子机制和作用模式,为野生优异基因的挖掘与利用提供理论指导。

东乡野生稻是全球分布最北的国家二级保护野生植物,素有“植物大熊猫”之称,蕴藏着丰富的有利基因,如耐冷、高产、抗旱、耐低磷等(Luo et al., 2012)。此前我们通过种间杂交及不断的回交自交获得了一系列耐冷(简水溶等, 2011)、抗旱(付学琴等, 2012)和耐低磷等优异渐渗系。对其中两个耐冷渐渗系 IL5243 和 IL5335 研究发现,强耐冷渐渗系 IL5335 的自交后代在株高和谷粒颜色等形态学性状上还存在一定的变异或分离(陈雅玲等, 2013);减数分裂过程中,IL5335 和 IL5243 绝大多数花粉母细胞分裂正常,但也有少数花粉母细胞存在单价体、多价体、落后染色体及双核仁等(Luo et al., 2012);实时荧

光定量 PCR 结果显示,渐渗杂交诱发改变了 IL5335 和 IL5243 中逆转录酶序列的结构及其表达活性(陈雅玲等, 2013)。

为了更加全面地了解耐冷渐渗系优异基因渐渗过程中的遗传与表观遗传变异特征,探讨基因组序列变化对外源基因渐渗转移的作用及影响,本研究在前期研究的基础上,采用 139 对 SSR 引物和 35 对 AFLP 引物对已东乡野生稻耐冷渐渗系 IL5335 和 IL5243 进行基因组序列分析,研究高世代耐冷渐渗系中外源 DNA 在渐渗系后代中的遗传与序列变化特点及其规律,为东乡野生稻优异基因的挖掘与利用研究提供有益信息。

1 结果与分析

1.1 双亲 DNA 在高世代耐冷渐渗系中的遗传特点

耐冷渐渗系 IL5243 和 IL5335 及其双亲的 SSR 和 AFLP 分析结果见表 1。统计分析 139 个 SSR 多态性位点发现,IL5243 和 IL5335 中绝大多数 SSR 位点(85.15~90.77%)的条带均与受体亲本协青早 B 的纯合条带一致;IL5243 和 IL5335 中分别有 6 对和 10 对 SSR 引物扩增为东乡野生稻的纯合条带,分别占参试位点的 4.33%和 7.17%。此外,两耐冷渐渗系还存在少数 SSR 杂合位点,且 IL5335 中杂合比率更高(表 1)。35 对 AFLP 引物检测到 3 108 位点,两耐冷渐渗系中绝大多数位点的条带均与受体亲本协青早 B 一致,分别占总位点的 89.20%和 85.60%;4.46%~5.07%的条带与供体亲本东乡野生稻一致。因此,SSR 和 AFLP 的结果均表明,部分东乡野生稻 DNA 片段已整合到受体基因组中,高世代(BC_1F_{10})渐渗系 IL5243 和 IL5335 的基因组已基本稳定、纯合。SSR 标记和 AFLP 标记之间在检测双亲条带百分率方面存在一定差异,这可能是两种标记的原理和特点不同,它们检测位点的数量也差别较大所致。

1.2 高世代耐冷渐渗系基因组序列变异特点

139 对 SSR 引物分析结果显示(表 1),两耐冷渐渗系基因组序列的平均丢失率为 3.19%,平均新带率为 3.56%,且亲本序列的丢失和新序列的出现可单独或同时发生(图 1)。AFLP 分析结果也表明,耐冷渐渗后代 IL5243 和 IL5335 主要表现对双亲基因组 DNA

表 1 东乡野生稻基因渐渗系基因组 DNA 的遗传与变异特点

Table 1 The heredity and variation characteristics of alien DNA sequence in the introgression lines induced by Dongxiang wild rice

标记	材料	“0”	“1”	“2”	“3”	杂合条带数	丢失条带率(%) [*]	协青早 B 条带率(%) [*]	野生稻特异条带率(%) [*]	新带率(%) [*]
Marker	Material					No. of hetero-zygous bands	Rate of lost band (%) [*]	Band of Xieqingzao B (%) [*]	Specific band of wild rice (%) [*]	Rate of new bands (%) [*]
SSR	IL5243	4	5	6	126	2	2.83±0.5 ^a	90.77±1.5 ^a	4.33±0.2 ^a	3.55±0.6 ^b
	IL5335	5	5	10	118	7	3.55±0.6 ^a	85.15±3.9 ^a	7.17±0.4 ^c	3.57±0.6 ^b
AFLP	IL5243	135	61	141	2 771	-	4.66±0.3 ^{ab}	89.20±0.8 ^b	4.46±1.1 ^{ab}	1.95±0.2 ^a
	IL5335	208	80	160	2 660	-	7.29±0.6 ^b	85.60±1.4 ^b	5.07±1.2 ^b	2.58±0.6 ^{ab}

注:“0”: 亲本条带丢失;“1”: 新条带;“2”: 与“东乡野生稻”一样的条带;“3”: 与“协青早 B”一样的条带(包括与东乡野生稻一致的条带);*: Tukey 显著性分析($\alpha=0.05$), 相同字母表示无显著性差异; -: 数据未计算

Note: “0”: Parental bands lost; “1”: Bands similar to cultivated rice Xieqingzao B; “2”: Bands equaled to *O. rufipogon*; “3”: New bands which were not find in both parents; *: The same letters represent no significantly different ($\alpha=0.05$); -: The data was not calculated

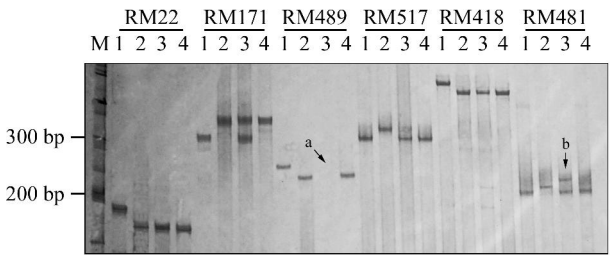


图 1 耐冷渐渗系及其双亲的部分 SSR 扩增与电泳检测

注: M: 50 bp DNA ladder marker; 1: 协青早 B; 2: 东乡野生稻; 3: IL5335; 4: IL5243; a: 亲本条带丢失; b: 出现新条带

Figure 1 SSR amplification and electrophoresis for cold tolerance introgression lines and their parents

Note: M: 50 bp DNA ladder marker; 1: Xieqingzao B; 2: Dongxiang wild rice; 3: IL5335; 4: IL5243; a: Parental bands absence; b: Novel bands appearance

继承,同时也表现出一定频率的亲本序列丢失(5.97%)和新序列出现(2.26%)(表 1;图 2)。两种分子标记的统计结果具有相似或相近的结果,但在 $\alpha=0.05$ 水平上具有显著性差异(表 1)。耐冷渐渗系 IL5243 和 IL5335 及其双亲的 SSR 和 AFLP 分析结果表明,两亲本的染色体在杂交后代中不仅发生了遗传重组,东乡野生稻基因组 DNA 在渐渗过程中发生了广泛的基因组序列变异,主要表现为双亲基因组 DNA 序列的丢失和亲本所没有的新条带出现。

1.3 耐冷渐渗中外源 DNA 片段的序列分析

1.3.1 外源 DNA 导入片段的 SSR 序列分析

对 IL5243 和 IL5335 中均具有东乡野生稻 DNA 条带的 6 对 SSR 引物(RM22, RM212, RM300, RM418, RM519 和 RM5620)的扩增产物进行回收、克隆和测序,利用软件 DNAMAN 进行多序列的比较分析。结果发现,大部分东乡野生稻供体片段可完整的传递

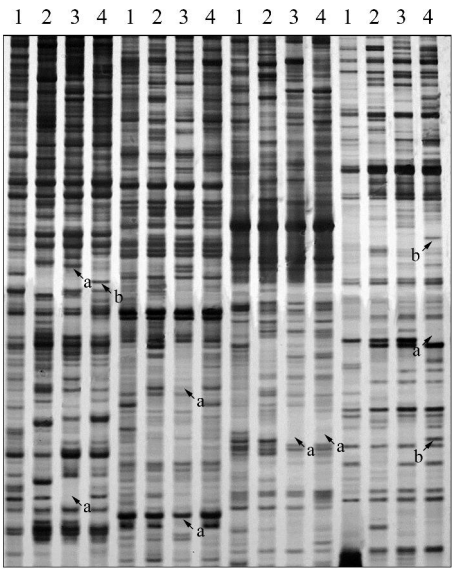


图 2 耐冷渐渗系及其双亲的部分 AFLP 扩增与电泳检测

注: 1: 协青早 B; 2: 东乡野生稻; 3: IL5335; 4: IL5243; a: 亲本条带丢失; b: 出现新条带

Figure 2 AFLP amplification and electrophoresis for cold tolerance introgression lines and their parents

Note: 1: Xieqingzao B; 2: Dongxiang wild rice; 3: IL5335; 4: IL5243; a: Parental bands absence; b: Novel bands appearance

给渐渗后代;但在一些回收测序 DNA 片段中也发现一些碱基的变异,包括碱基的转换和插入突变等。其中 RM519 和 RM5620 扩增的供体特异片段的长度分别为 119 bp 和 177 bp,两耐冷渐渗后代与供体序列的高度相似性(98.8%),序列比对发现耐冷渐渗系的 RM5620 扩增产物与供体(东乡野生稻)相比,插入了 GAA3 个碱基(图 3),碱基变异率为 1.7%,在 RM519 扩增产物中,两渐渗系在微卫星的侧翼序列上分别发现了 1 个和 2 个碱基的转换(C 变为 T 和 A 变为 G,碱基变异率为 0.8%和 1.7%)。

DWR	:	TCGACTTGAAGCATCACACCTACTGCTTACCTATATGATACTAAATTTCTTGTCACTTCTGTTATGATACTAAAAATAAAA	:	80
IL5243	:	TCGACTTGAAGCATCACACCTACTGCTTACCTATATGATACTAAATTTCTTGTCACTTCTGTTATGATACTAAAAATAAAA	:	80
IL5335	:	TCGACTTGAAGCATCACACCTACTGCTTACCTATATGATACTAAATTTCTTGTCACTTCTGTTATGATACTAAAAATAAAA	:	80
		<u>tcgacttgaagcatcacacactactgcttacctatatgatactaaatttcttgtcattctgtttatgatactaaaaataaaa</u>		
DWR	:	CAAATTGGCTCTATCGCAAAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA---AAGAAATAGGAAAGAAAGACAAATCGGC	:	160
IL5243	:	CAAATTGGCTCTATCGCAAAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA---AAGAAATAGGAAAGAAAGACAAATCGGC	:	160
IL5335	:	CAAATTGGCTCTATCGCAAAAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAAGAA---AAGAAATAGGAAAGAAAGACAAATCGGC	:	160
		<u>caaatggctctatccccaaaaagaagaagaacaagaagaagaagaagaa</u> aagaaataggaaagaagaagacaatcggc		
DWR	:	CCACTTGACATTTCAGA	:	174
IL5243	:	CCACTTGACATTTCAGA	:	177
IL5335	:	CCACTTGACATTTCAGA	:	177
		<u>ccacttgacatttcaga</u>		

图 3 SSR 位点 RM5620 在两耐冷渐渗系中的变异比对结果

注: 下划线为引物序列

Figure 3 Sequence variations of introgression lines compared with parents in SSR locus RM5620

Note: The sequence under line is primer sequence

1.3.2 外源 DNA 导入片段的 AFL 序列分析

35 对 AFLP 引物对渐渗系 IL5243 和 IL5335 分别扩增, 两渐渗系分别有 141 和 160 条与东乡野生稻相同的条带, 随机回收测序其中 8 条三者均一致的条带进行测序分析。结果表明, 有 6 条东乡野生稻的特异条带完整的转移到了渐渗系后代中, 未发现任何碱基突变。这 6 条 DNA 序列是相关基因的部分序列, 如 *CHY1*, SAGA 复合物 Ada1 结构域、Ty3-*gypsy* 类反转座子序列、NBS-LRR 和 2 个假拟蛋白, 其中 *CHY1* 在植物低温胁迫信号转导途径中具有作用 (Dong et al., 2009), SAGA 及其同源物参与了染色质重塑、mRNA 输出、DNA 损伤修复等重要的生物学功能, 表明东乡野生稻的一些重要的功能基因已导

入耐冷渐渗系中。进一步分析发现, 另外 2 条由引物组合 E-TA/M-CAA 和 E-AA/M-CTC 扩增获得的东乡野生稻特异条带, 大小分别为 293 bp 和 218 bp 的 DNA 序列与供体亲本特异序列的相似度非常高, 可达 99.1%, 在少数几个碱基上发生了碱基的转换和颠换(图 4)。Blast 序列比对发现, 耐冷渐渗系 IL5243 和 IL5335 中由 E-TA/M-CAA 扩增的来源于东乡野生稻 DNA 片段是存在于编码蛋白的基因(*PIE1*)序列, E-AA/M-CTC 扩增片段为编码假拟蛋白, 这表明种间杂交诱发的 DNA 序列变异也可发生在编码基因中。

1.3.3 耐冷渐渗新条带的 DNA 序列分析

对渐渗系 IL5243 和 IL5335 中出现的 AFLP 新条带(东乡野生稻和栽培稻“协青早 B”均未出现的条

DWR	:	GATGAGTCCTGAGTAACAAGCCTGTATGTAGTATGCATACATGGAAGTAATTTGGTTTCATC	:	80
IL5243	:	GATGAGTCCTGAGTAACAAGCCTGTATGTAGTATGCATACATGGAAGTAATTTGGTTTCATC	:	80
IL5335	:	GATGAGTCCTGAGTAACAAGCCTGTATGTAGTATGCATACATGGAAGTAATTTGGTTTCATC	:	80
		<u>gatgagtcctgagtaacaagcctgtatgtatgtatgcatacatggaagtaatttggtttcatc</u> aaccctgacgttttctg		
DWR	:	TTTTCTCTCTTTTCACTTCCAAAATATGTCTAGTATTTTAAACGCAGGACACCATTTGAGAAATTCAGTCTCCCAATTTA	:	160
IL5243	:	TTTTCTCTCTTTTCACTTCCAAAATATGTCTAGTATTTTAAACGCAGGACACCATTTGAGAAATTCAGTCTCCCAATTTA	:	160
IL5335	:	TTTTCTCTCTTTTCACTTCCAAAATATGTCTAGTATTTTAAACGCAGGACACCATTTGAGAAATTCAGTCTCCCAATTTA	:	160
		<u>ttttctctctttt cacttccaaaatgatgtcagttttttaaagcagggacacccatttgagaaattcagttctcccaattta</u>		
DWR	:	GCATAACACTAGTTGGCACTACAATAAGATGTGGACCCCATATCCCTTCTCACATGCAAGGTGTGTAGCAAGGAGATG	:	240
IL5243	:	GCATAACACTAGTTGGCACTACAATAAGATGTGGACCCCATATCCCTTCTCACATGCAAGGTGTGTAGCAAGGAGATG	:	240
IL5335	:	GCATAACACTAGTTGGCACTACAATAAGATGTGGACCCCATATCCCTTCTCACATGCAAGGTGTGTAGCAAGGAGATG	:	240
		<u>gcataaacactagttggcactacaataagatgtggaccccata tcccttctcacatgcaaggtgtg tagcaaggagatg</u>		
DWR	:	GTCATAATCGTCTTCCCCAACCATTTCATCTGCTAGAAATTGGTACGCAGTC	:	293
IL5243	:	GTCATAATCGTCTTCCCCAACCATTTCATCTGCTAGAAATTGGTACGCAGTC	:	293
IL5335	:	GTCATAATCGTCTTCCCCAACCATTTCATCTGCTAGAAATTGGTACGCAGTC	:	293
		<u>gtcataatcgctcttcccc aaccatttctcatctgcttagaattgggtacgcagtc</u>		

图 4 AFLP 引物组合 M-CAA/E-TA 特异扩增片段在两耐冷渐渗系中的变异比对结果

注: 下划线为引物序列

Figure 4 Sequence variations of specific amplification product by E-TA/M-CAA in introgression lines compared with parents

Note: The sequence under line is primer sequence

带),分别回收了3条,将这些新条带序列在NCBI中进行Blast比对可知,IL5243中的1条新条带序列可能功能是泛素相关蛋白(UBA)的部分序列,2条为模拟蛋白;IL5335中的1条新条带序列可能功能是模拟蛋白,1条为逆转座子序列,还有1条是未注释的基因序列。这些新条带的功能基因序列分析结果表明外源优异基因不仅能通过种间杂交渐渗导入到杂种后代中,在渐渗的同时还可能诱发基因组结构的变异而扩大栽培种的遗传变异基础。

2 讨论

本研究的SSR和AFLP结果均表明,东乡野生稻部分DNA(4.33%~7.17%)已成功导入到耐冷渐渗系IL5243和IL5335中,并且渐渗系对双亲基因组继承已基本趋于稳定,与我们此前的细胞学和SSR分析结果一致(Luo et al., 2012)。由于IL5335和IL5243是强耐冷渐渗系(简水溶等, 2011),导入了一些东乡野生稻的抗逆(*CHY1*)和抗病(*NBS-LRR*)以及其它生物学相关功能的DNA序列,因此强耐冷渐渗系丰富了栽培稻中耐冷性状的遗传变异基础,是利用东乡野生稻耐冷基因的重要遗传研究资源,同时这些渐渗系可为阐明外源基因渐渗机理提供重要的研究体系。

本研究表明两强耐冷渐渗系在外源基因渐渗过程除继承双亲的遗传物质外,也出现一些基于基因组序列变化的非孟德尔式变异,包括亲本序列丢失、新序列产生等。这些种间杂交诱发的序列变异不仅可发生在非编码的重复序列(如SSR引物RM519和RM5620的扩增产物)中,有些也发生在功能基因序列中,如*PIE1*。因此,通过远缘杂交,外源DNA可通过与受体基因组发生同源染色体间的遗传重组或交换,将供体亲本的部分小片段DNA整合到受体基因组中,有些则通过基因重排或其他的表观遗传修饰产生一些无法用孟德尔定律解释的新变异,这与菰(Wang et al., 2005; Yang et al., 2012)、黄瓜(Chen and Chen, 2008)等作物种间杂交变异结果相似。因此,本研究在不同的物种中再次证实种间杂交渐渗过程常伴随一系列非孟德尔式快速遗传与变异。研究这些遗传与变异的过程及特点将为我们阐明种间杂交渐渗机理提供有益的信息,同时也为人们有效地利用野生有利基因奠定基础。

耐冷渐渗系IL5335和IL5243中出现的新条带有些是功能基因序列,有些是未注释的DNA序列,还有些可能是逆转座子序列,表明种间杂交渐渗诱

发受体基因组序列的改变表现为随机性和多样性。我们此前的研究结果还表明,耐冷渐渗系中少数花粉母细胞存在多价体和十字形二价体等结构(Luo et al., 2012);渐渗杂交诱发改变了耐冷渐渗系中甲基化水平和模式以及逆转录酶的表达活性(陈雅玲等, 2013)。因而我们推测,渐渗系中新条带出现的可能原因至少包括以下两方面:一方面可能是两物种的染色体重组、易位导致基因组结构的改变;另一方面可能是耐冷渐渗系甲基化水平和模式的显著变化,激活了部分逆转座子的活性,进而改变了受体基因组的结构。这表明东乡野生稻种间杂交扩大栽培稻的遗传变异不仅仅是传统认识上的遗传物质简单地从一个亲本转移到另一个亲本,在外源遗传物质渐渗与转移过程中发生了各种全新的遗传和表观遗传变异等(Chapman and Abbott, 2010; Yang et al., 2012),为栽培种提供了新的变异来源,为利用野生优异基因培育新品种提供了新的思路和途径。

3 材料与方法

3.1 材料

本研究所用的东乡野生稻(*O. rufipogon* Griff.)是本课题组异位圃保存的株系,栽培稻协青早B(*O. sativa* sp. *indica* Kato.)是课题组自交保存资源。本研究通过以东乡野生稻为供体亲本,栽培稻协青早B为受体亲本,杂交获得F₁代,再与“协青早B”回交获得BC₁F₁群体,经单粒传加代获得BC₁F₁₀ BILs群体,从中耐冷鉴定获得IL5243和IL5335耐冷性渐渗系(简水溶等, 2011)。本研究以耐冷渐渗系IL5243和IL5335及其双亲为试材,研究外源DNA在两耐冷渐渗系中的遗传与序列变异特征。

3.2 东乡野生稻耐冷渐渗系的AFLP和SSR分析

采用CTAB法提取东乡野生稻耐冷渐渗系及其双亲的基因组DNA。AFLP研究主要参考Vos等(1995)和娄群峰等(2005)的方法进行。酶切连接反应体系见表2,酶切连接反应在37℃进行6h,反应结束后65℃下保温10min使酶失活。*EcoR* I接头和*Mse* I接头连接需分别提前12h配好使其变成双链接头。酶切连接后取5μL连接产物作为AFLP预扩增的模板,预扩增所用的引物是*EcoR* I接头+1个碱基、*Mse* I接头+1个碱基,随后用1%的琼脂糖凝胶电泳检测预扩产物的浓度,根据预扩增样品的浓度将其稀释10~20倍后作为选择性扩增的模板。酶切

表 2 AFLP 分析中的酶切连接反应体系
Table 2 Digestion and Ligation system of AFLP

试剂	浓度	反应体系所用体积(μL)
Reagent	Concentration	The volume for one reaction system (μL)
模板 DNA	25 ng/μL	20
Template DNA		
<i>EcoR</i> I 酶	10 U/μL	0.5
<i>EcoR</i> I enzyme		
<i>Mse</i> I 酶	10 U/μL	0.5
<i>Mse</i> I enzyme		
<i>EcoR</i> I 接头	5 pmol/μL	1
<i>EcoR</i> I -adaptor		
<i>Mse</i> I 接头	50 pmol/μL	1
<i>Mse</i> I -adaptor		
10 倍缓冲液	—	5
10×Buffer		
<i>T</i> ₄ 连接酶	1 U/μL	1
<i>T</i> ₄ ligase		
三磷酸腺苷	10 mmol/L	1
Adenosine triphosphate (ATP)		
牛血清蛋白	10 mg/μL	0.25
Bovine serum albumin (BSA)		
超纯水	—	19.75
ddH ₂ O		
总体积	—	50
Total volume		

连接体系中的 *EcoR* I 和 *Mse* I 购自 NEB 公司(New England Biolabs, Inc.), AFLP 所有的其它试剂购自 TaKaRa 大连宝生物公司。PCR 扩增反应在 Master cycler pro (Eppendorf, 德国) PCR 仪上进行。参照 Sanguinetti 等(1994)的方法,采用 6%的 PAGE 凝胶(变性聚丙烯酰胺胶)垂直电泳(JY-CX2B, 北京君意东方电泳设备有限公司)分离选择性 PCR 扩增产物,电泳结束后条带采用银染法染色。

SSR 分析是利用此前课题组筛选出的分布于水稻 12 条染色体上,在东乡野生稻和协青早 B 之间具有多态性的 139 对 SSR 引物。过程主要参照 Panaud 等(1996)方法进行。PCR 产物的聚丙烯酰胺凝胶电泳检测和银染与上述 AFLP 方法一致。对于条带不清楚、缺失和出现新条带的情况,进行 3 次重复扩增检测。

3.3 数据统计分析

AFLP 分析的数据统计以条带的有无来统计。渐

渗系中条带缺失率=(渐渗系中缺失双亲条带数 / 检测总位点数)×100%; 新带率=(渐渗系中双亲所没有的条带数 / 检测总位点数)×100%; 供体特异带率=(渐渗系中野生稻特有条带数 / 检测总位点数)×100%; 受体条带率=(渐渗系中与协青早 B 一致的条带数 / 检测总位点数)×100%。

SSR 分析的数据统计,渐渗系中不具有亲本条带(即亲本条带缺失)的记为“0”;出现双亲没有的条带记为“1”;与东乡野生稻条带一样的记为“2”;与协青早 B 条带一样的记为“3”;杂合条带记为“4”。各条带率计算分析方法与 AFLP 一致。

3.4 扩增条带的回收克隆测序

将耐冷渐渗系中来自东乡野生稻的特异条带及双亲中均未出现的新条带进行回收和克隆。采用灭菌过的手术刀片切下需要回收的条带,将其转入盛有 100 μL 灭菌超纯水的离心管中。随后 70℃ 水浴 80 min,冷却至室温后 10 000 rpm 离心 8 min。取回收上清液 2 μL 为模板,以相同的 PCR 反应体系和程序再次进行扩增,回收纯化后的目的片段与 pMD19-T 载体(TaKaRa 大连宝生物公司)连接,之后将连接产物转化至大肠杆菌 DH5a 感受态细胞中,筛选蓝白斑,单菌落质粒经鉴定后交于上海英骏生物技术公司完成 DNA 测序,每一样本 3 次重复。

DNA 测序完成后,将所得的目的片段序列提交至 NCBI 数据库并利用 BLAST 软件进行检索分析。另外还利用 DNAMAN4.0 软件对获得的 DNA 序列进行比较分析,比较渐渗系与供体东乡野生稻特异 DNA 片段全部核苷酸序列的异同。

作者贡献

戴亮芳、唐甸深和邓小娟是本研究的实验设计和实验研究的执行人;戴亮芳和唐甸深完成试验结果分析,论文初稿的写作;赵俊和温秀芳参与实验设计和数据分析;罗向东和谢建坤是项目的构思者及负责人,指导实验设计,数据分析,论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31260255)、江西省教育厅科技计划项目(GJJ12184)、江西省科技支撑计划项目(20122BBF60064)、江西省青年科学家培养计划(20112BCB23007)和江西省落地计划(KJLD 12059)共同资助。

参考文献

- Abid G., Muhoviski Y., Jacquemin J.M., Mingeot D., Sassi K., Toussaint A., and Baudoin J.P., 2011, Changes in DNA-methylation during zygotic embryogenesis in interspecific hybrids of beans (*Phaseolus* spp.), *Plant Cell Tiss. Org.*, 105 (3): 383-393
- Chapman M.A., and Abbott R.J., 2010, Introgression of fitness genes across a ploidy barrier, *New Phytol.*, 186(1): 63-71
- Chen L.Z., and Chen J.F., 2008, Changes of cytosine methylation induced by wide hybridization and allopolyploid in *Cucumis*, *Genome*, 51(10): 789-799
- Chen Y.L., Luo X.D., Zhang F.T., Dai L.F., Hu B.L., and Xie J.K., 2013, Cloning and expression analysis of retrotransposon reverse transcriptase in introgression lines from Dongxiang wild rice, *Zhiwu Xuebao* (Chinese Bulletin of Botany), 48(2): 138-144 (陈雅玲, 罗向东, 张帆涛, 戴亮芳, 胡标林, 谢建坤, 2013, 东乡野生稻基因渐渗系中逆转录子逆转录酶序列的克隆及表达分析, *植物学报*, 48(2): 138-144)
- Deng X.J., Luo X.D., Dai L.F., Chen Y.L., Hu B.L., and Xie J.K., 2012, Genetic diversity and genetic changes in the introgression lines derived from *Oryza sativa* L. mating with *O. rufipogon* Griff., *J. Integr. Agr.*, 11(7): 1059-1066
- Dong C.H., Zolman B.K., Bartel B., Lee B.H., Stevenson B., Agarwal M., and Zhu J.K., 2009, Disruption of Arabidopsis CHY1 reveals an important role of metabolic status in plant cold stress signaling, *Mol. Plant*, 2(1): 59-72
- Fu X.Q., He H.H., Wen P., Luo X.D., and Xie J.K., 2012, Drought resistance evaluation system for backcross lines of Dongxiang common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.), *Yingyong Shengtai Xuebao* (Chinese Journal of Applied Ecology), 23(5): 1277-1285 (付学琴, 贺浩华, 文飘, 罗向东, 谢建坤, 2012, 东乡野生稻回交重组系的抗旱性评价体系, *应用生态学报*, 23(5): 1277-1285)
- Ge X.H., Ding L., and Li Z.Y., 2013, Nucleolar dominance and different genome behaviors in hybrids and allopolyploids, *Plant Cell Rep.*, 32(11): 1661-1673
- Jian S.R., Wan Y., Luo X.D., Fang J., Chu C.C., and Xie J.K., 2011, Genetic analysis of cold tolerance at the seedling stage in Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*), *Zhiwu Xuebao* (Chinese Bulletin of Botany), 46(1): 21-27 (简水溶, 万勇, 罗向东, 方军, 储成才, 谢建坤, 2011, 东乡野生稻苗期耐冷性的遗传分析, *植物学报*, 46(1): 21-27)
- Kantama L., Junbuathong S., Sakulkoo J., Jong H.D., and Apisitwanich S., 2013, Epigenetic changes and transposon reactivation in Thai rice hybrids, *Mol. Breeding*, 31: 815-827
- Kopecky D., Bartoš J., Christelová P., Cernoch V., Kilian A., and Doležel J., 2011, Genomic constitution of *Festuca*×*Lolium* hybrids revealed by the DArTarray array, *Theor. Appl. Genet.*, 14(2): 355-363
- Li S.R., Zhang Y., Deng K.J., Peng J.H., Zeng X.L., Zhang H.Q., and Ren Z.L., 2013, Analysis of DNA methylation polymorphism in a set of stable chromosome translocation lines, *Mol. Breeding*, 32: 165-176
- Li X.L., Guo W.W., Wang B., Li X.S., Chen H.G., Wei L.H., Wang Y.J., Wu J.S., and Long H., 2010, Instability of chromosome number and DNA methylation variation induced by hybridization and amphidiploid formation between *Raphanus sativus* L. and *Brassica alboglabra* Bailey, *BMC Plant Biol.*, 10(1): 207
- Lou Q.F., Chen J.F., Jahn M., Chen L.Z., Geng H., and Luo X.D., 2005, Identification of AFLP and SCAR molecular markers linked to gynocious loci in *Cucumis sativus* L., *Yuanyu Xuebao* (Acta Horticulturae Sinica), 32(2): 256-261 (娄群峰, 陈劲枫, Jahn M., 陈龙正, 耿红, 罗向东, 2005, 黄瓜全雌性基因连锁的 AFLP 和 SCAR 分子标记, *园艺学报*, 32(2): 256-261)
- Luo X.D., Dai L.F., Cao J.F., Jian S.R., Chen Y.L., Hu B.L., and Xie J.K., 2012, Identification and molecular cytology analysis of cold tolerance introgression lines derived from *Oryza sativa* L. mating with *O. rufipogon* Griff., *Euphytica*, 187(3): 461-469
- Luo X.D., Dai L.F., Wan Y., Hu B.L., Li F.S., Li X., and Xie J.K., 2011, Cytological studies of male gametogenesis and development in the reciprocal interspecific hybrid F₁ of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon*) and *Oryza sativa*, *Zhiwu Xuebao* (Chinese Bulletin of Botany), 46(4): 407-412 (罗向东, 戴亮芳, 万勇, 胡标林, 李佛生, 李霞, 谢建坤, 2011, 东乡野生稻与栽培稻正反交种间杂种 F₁ 的雄配子发生与发育, *植物学报*, 46(4): 407-412)
- Panaud O., Chen X., and McCouch S.R., 1996, Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.), *Mol. Gen. Genet.*, 252(5): 597-607
- Qi B., Zhong X.F., Zhu B., Zhao N., Xu L.Y., Zhang H.K., Yu X.M., and Liu B., 2010, Generality and characteristics of genetic and epigenetic changes in newly synthesized allotetraploid wheat lines, *J. Genet. Genomics*, 37: 737-748
- Sanetomo R., and Hosaka K., 2011, Reciprocal differences in DNA sequence and methylation status of the pollen DNA between F₁ hybrids of *Solanum tuberosum*×*S. demissum*, *Euphytica*, 182(2): 219-229
- Sanguinetti C.J., Dias Neto E., and Simpson A.J., 1994, Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on

- polyacrylamide gels, *Biotechniques*, 17(5): 914-921
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Reijans M., van de Lee T., Hornes M., Friters A., Pot J., Paleman J., Kuiper M., and Zabeau M., 1995, AFLP: a new technique for DNA fingerprinting, *Nucleic Acids Res.*, 23(21): 4407-4414
- Wang Y.M., Dong Z.Y., Zhang Z.J., Lin X.Y., Shen Y., Zhou D., and Liu B., 2005, Extensive de novo genomic variation in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia* Griseb.), *Genetics*, 170(4): 1945-1956
- Yang C.W., Zhang T.Y., Wang H., Zhao N., and Liu B., 2012, Heritable alteration in salt-tolerance in rice induced by introgression from wild rice (*Zizania latifolia*), *Rice*, 5(1): 36
- Yasuda K., Tsukiyama T., Karki S., Okumoto Y., Teraishi M., Saito H., and Tanisaka T., 2013, Mobilization of the active transposon mPing in interspecific hybrid rice between *Oryza sativa* and *O. glaberrima*, *Euphytica*, 192(1): 17-24

《分子植物育种》中文网络版

《分子植物育种》(中文网络版, ISSN 1923-8258)是一本基于同行评审、开放取阅以及在线即时发表的期刊。主要发表植物育种领域中关于转基因育种与分子标记辅助育种的新知识与先进技术的原始研究论文。

本刊致力于为转基因育种与分子标记辅助育种服务, 主要发表在植物育种领域中涉及的分子遗传育种理论、分子育种技术与方法、分子育种产品研发等方面的基础和应用研究。所有发表的研究论文都应是在植物育种领域中具有创新意义的最新研究, 特别是转基因、分子遗传学、作物 QTL 分析、种质资源的遗传多样性和遗传育种等方面的研究成果。本刊发表的论文不仅针对植物遗传学家、植物育种家的研究兴趣, 而且还给在植物种子行业从事研发和市场的专家为本刊读者群提供参考。

- ◇同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ◇在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ◇开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ◇快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ◇论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

投稿《分子植物育种》中文网络版, 请通过以下网址:

<http://mpb.biopublisher.cn>, 或 E-mail: edit@mpb.biopublisher.cn。



请扫描二维码, 登录 MPB 中文网络版网站