

5 种杂交粳稻亲本 SCAR 标记的建立及其在真伪纯度鉴定中的应用

潘爱虎^{1,2} 梁婉琪² 袁勤³ 曹黎明³ 陈亮^{1,*} 张大兵^{2,4,*}

¹ 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, 福建厦门 361005; ² 上海市农业科学院生物技术研究中心, 上海市农业遗传育种重点实验室, 上海 201106; ³ 上海市农业科学院作物育种栽培研究所, 上海 201106; ⁴ 上海交通大学生命科学技术学院, 上海 200240

Establishment of SCAR Markers and Its Application in Identification and Authenticity of Parent Purity of Five Hybrid japonica Rice Lines

PAN Ai-Hu^{1,2}, LIANG Wan-Qi², YUAN Qin³, CAO Li-Ming³, CHEN Liang^{1,*}, ZHANG Da-Bing^{2,4,*}

¹The Key Laboratory of Ministry of Education for Cell Biology and Tumor Cell Engineering, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China; ²Agro-biotech Center, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Genetic Breeding, Shanghai 201106, China; ³Crop Breeding and Cultivation Research Institute, Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai 201106, China; ⁴School of Life Science and Biotechnology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200240, China

提要 选用 36 个随机引物对“寒丰 A”、“寒丰 B”、“8204A”、“8204B”、“R161”等 5 份杂交粳稻亲本材料进行 RAPD 扩增, 对其中特异 RAPD 标记片段进行克隆和测序。根据获得的特异 DNA 序列设计序列特征扩增区 (SCAR) 特异的引物, 将 18 个 RAPD 标记转化成 6 个稳定的 SCAR 标记。用这些 SCAR 标记对亲本和杂种 F₁ 代单株进行检测, 实验室检测种子纯度的结果与海南田间种植的结果基本一致。此外, 应用水稻细胞质雄性不育特异的 1 对 PCR 引物, 分辨出 2 对不育系/保持系亲本: “寒丰 A”与“寒丰 B”、“8204A”与“8204B”。

关键词 杂交粳稻; 种子纯度鉴定; RAPD 标记; SCAR 标记

杂交粳稻亲本的纯度直接影响原种生产过程中制种的效果, 而杂交种的纯度又直接影响杂交水稻的产量, 因此, 纯度低或真实性差的种子会给农业生产和农民带来重大损失。

在种质鉴定中, 传统的遗传标记如形态标记、细胞标记、生化标记等都是基因表达型的标记, 可利用的多态位点较少, 且易受环境影响, 不能满足种质资源鉴定的需要。

随着分子生物学技术的发展, 一些分子标记逐渐应用于种质资源的鉴定中, 如随机引物扩增多态性 DNA (random amplification of polymorphic DNA, RAPD)^[1-4]、核酸限制性片段长度多态性 (restriction fragment length polymorphisms, RFLP)、简单序列重复 (simple sequence repeat, SSR) 等。其中 RAPD 的多态性检出率高, 但是实验重复性和可靠性较差, 难以推广应用。而一种基于常规 PCR 反应、由 RAPD 标记转换而来的序列特征扩增区 (sequence characterized amplified region, SCAR) 标记, 则可以克服这一缺点, 受到广泛的关注。

本文在对 15 种上海地区主要杂交粳稻亲本材料进行 RAPD 分析^[3]的基础上, 建立了其中 5 个亲

本的特异 SCAR 分子标记, 并对目前上海地区杂交粳稻三系法生产中使用的主要不育系: “寒丰 A”、“8204A”, 主要的保持系: “寒丰 B”、“8204B”, 主要的恢复系“R161”, 以及杂交粳稻组合“8 优 1 6 1”、“寒优湘晴”、“申优 1 号”进行了真伪和纯度鉴定。

材料与方法

选用的粳稻 (*Oryza sativa*) 亲本品种包括“寒丰 A”、“8204A”等 2 个不育系, “寒丰 B”、“8204B”等 2 个保持系, “恢复系 R161”, 这些材料为上海地区杂交稻推广应用的骨干亲本。选用的杂交组合有“8 优 1 6 1”、“申优 1 号”、“寒优湘晴”等, 其中“8 优 1 6 1”是以“8204A”为母本, “R161”为父本杂交配组育成的杂交粳稻新组合; “寒优湘晴”是上海市近

收稿 2005-01-27 修定 2005-09-19

资助 上海市科技兴农重点攻关项目 [农科攻字 (2000) 号第 1-3 号]、上海市农业科学院青年科技基金 (2000-09-02-1)。*通讯作者 (E-mail: zhangdb@sjtu.edu.cn, Tel: 021-34201073)。

年来主推的优质杂交稻品种,其父本为“湘晴”,母本为“寒丰”;“申优1号”的父本为“R161-10”,母本为“寒丰”。这些材料均由上海市农业科学院作物育种栽培研究所提供。

主要生化试剂Taq DNA聚合酶和dNTPs等均购自TaKaRa公司。

按文献5方法从新鲜幼苗叶片中提取基因组总DNA。

RAPD扩增共选用了36个10碱基的随机引物(购自上海生工生物工程有限公司,编号为S1、S3、S11、S13、S17、S21、S42、S43、S44、S48、S66、S67、S68、S84、S118、S125、S151、S157、S341、S353、S364、S371、S433、S442、S444、S459、S464、S496、S1001、S1019、S1020、S1036、S1143、S1237、S1257、S1325)。RAPD扩增反应采用已建立的条件和体系^[3]。RAPD扩增产物在1.2%琼脂糖凝胶上电泳后,溴乙锭(EB)染色,用上海天能公司生产的凝胶成像系统拍照分析。

从凝胶上切割下RAPD扩增的多态性DNA片段,采用电洗脱法回收,方法参照文献6。再将回收的DNA片段克隆入pMD18-T,筛选阳性克隆进行测序分析。

根据杂交粳稻亲本“寒丰A”、“寒丰B”、“8204A”、“8204B”、“R161”特异的RAPD多态性DNA片段的测序结果,分别合成序列特异性引物,进行PCR扩增。PCR引物序列、扩增片段大小见表1。PCR反应在PTC100 PCR仪(MJ Research)上进行。PCR反应体积为30 μ L;PCR

反应体系中包括:50 mmol·L⁻¹ KCl、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.6 μ mol·L⁻¹引物、1.5 U Taq DNA聚合酶、50 ng基因组DNA模板。PCR反应条件为:94 预变性3 min;然后94 变性30 s,58 退火40 s,72 延伸50 s,35个循环;72 再延伸7 min。PCR扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳分析。

不育系与保持系亲本的PCR鉴别参照 Akagi等^[7]的结果,合成1对引物,区分2对不育系与保持系(“寒丰A”与“寒丰B”、“8204A”与“8204B”)。将这对引物称之为细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility,CMS)引物。其序列为:CMS1, 5' ATGGCAAATCTGGTCCGATG 3'; CMS2, 5' ACTTCATAAGGAAAGACTAC 3'。其扩增产物为239 bp。PCR反应体积为30 μ L;PCR反应体系中包括:50 mmol·L⁻¹ KCl、10 mmol·L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3)、1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、0.2 mmol·L⁻¹ dNTPs、0.6 μ mol·L⁻¹ CMS引物、1.5 U Taq DNA聚合酶、50 ng基因组DNA模板。PCR反应条件为:94 预变性3 min;然后94 变性30 s,56 退火40 s,72 延伸50 s,35个循环;72 再延伸7 min。PCR扩增产物进行2%琼脂糖凝胶电泳分析。

鉴定杂交粳稻亲本和杂交种真伪纯度时,提取杂交粳稻亲本(如“寒丰A”、“寒丰B”、“8204A”、“8204B”、“R161”)和杂交种(“8优161”、“寒优湘晴”、“申优1号”)单株幼苗基因组总DNA,分别用序列特异性引物进

表1 序列特异的SCAR-PCR引物设计和预期的扩增片段大小

引物编号	SCAR引物序列	特异性	长度/bp
98F	5' GGA CCC AAC CAC TGA CTC 3'	“8204A”、“8204B”	863
98R	5' GGA CCC AAC CTT AAC TAC C 3'		
1041F	5' GAA CGG ACT CCT AAC TAC 3'	R161	262
1041R	5' TAT GAC GGA GGA GCA TGT 3'		
1061F	5' GAA CGG ACT CCA AGA CGT 3'	“寒丰A”、“寒丰B”	191
1061R	5' GGA CCC AAC CCA AAC TGT 3'		
1071F	5' ATC GCT GCG TGC AGC AAG 3'	“寒丰A”、“寒丰B”	339
1071R	5' GAA CGG ACT CCT AAT TAT AGC 3'		
109F	5' CTA CTG CCG TTT TCA ACC 3'	R161	684
109R	5' CTA CTG CCG TCA CAT GGA 3'		
112F	5' TCT GGT GAG GTT GCC AGC 3'	“8204A”、“8204B”、“R161”	633
112R	5' TCT GGT GAG GGA AAG GGA 3'		

行PCR扩增,记录和统计实验结果。与海南田间种植的结果进行比对,验证实验室分子标记鉴定的准确性。

实验结果

1 5种杂交粳稻亲本的RAPD标记

先后选用了36条RAPD随机引物对5种杂交粳稻亲本,包括“寒丰A”、“寒丰B”、“8204A”、“8204B”和“R161”的DNA多态性进行了分析。为了找到更多的DNA分子标记,我们还尝试了将2种引物组合使用,扩增出两端分别具有其中一条引物的DNA区段,从而产生新的带型。PCR扩增共得到差异性DNA条带31条。以S157引物为例,分析5种粳稻亲本材料的RAPD电泳结果如图1。

2 RAPD标记转化为SCAR标记

对31个特异性片段进行了克隆、测序,其中18个差异位点有明显的多态性,已根据这些设计专一引物(即SCAR引物)共18对,并用这些引

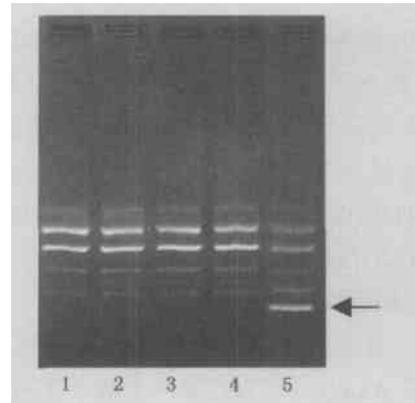


图1 S157引物分析5种粳稻亲本材料RAPD的电泳
1:“寒丰A”;2:“寒丰B”;3:“8204A”;
4:“8204B”;5:“R161”(箭头示特异条带)。

物对5种水稻的DNA进行了PCR扩增,发现其中有6对引物(表1)在某些水稻种中显示为有差异的特征带,表明由RAPD标记转化为SCAR标记成功(图2),而其余12对引物在几种水稻中的扩增结果无明显差异。

实验中, ID1041Q的测序结果是1854 bp,

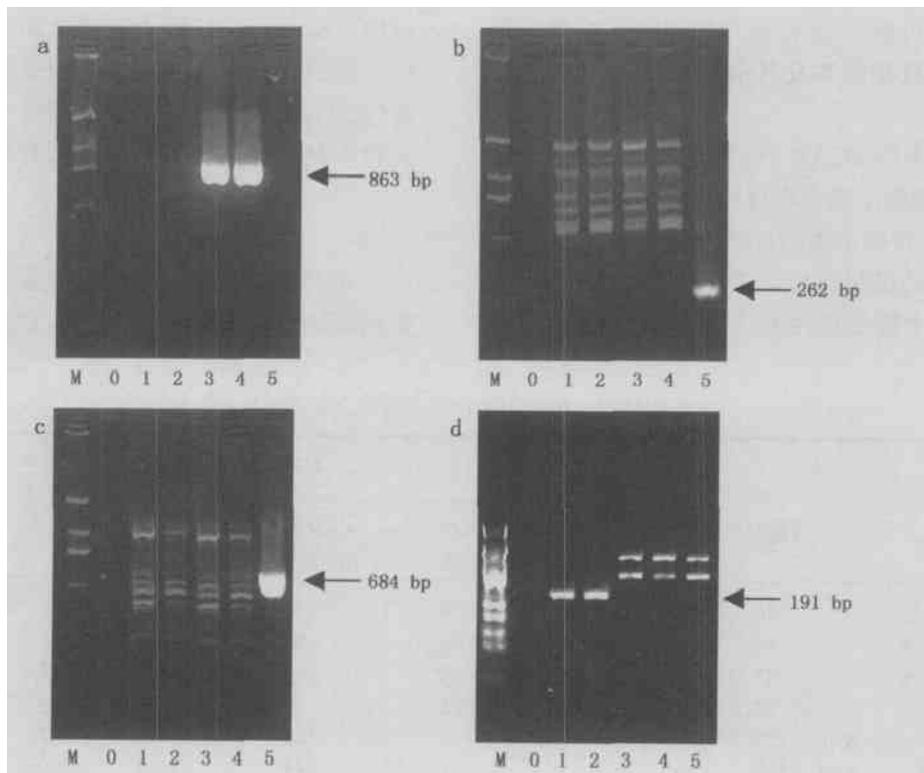


图2 不同引物鉴定水稻SCAR-PCR的电泳

引物:a,98F/98R;b,1041F/1041R;c,109F/109R;d,1061F/1061R。M:DL2000分子量标记,大小分别为2000、1000、750、500、250、100 bp;M:pGEM-7Zf(+)/HaeIII;0:空白对照,无DNA模板;1:“寒丰A”;2:“寒丰B”;3:“8204A”;4:“8204B”;5:“R161”。

ID1071 的测序结果是 362 bp。由于要考虑引物中 GC 碱基的含量,设计引物的位置没有从测序片段的两个末端开始,而是向片段的中间靠拢了一部分,因此最后得到的 SCAR 片段的大小分别是:引物 1041F/1041R 得到的 PCR 产物为 262 bp,引物 1071F/1071R 得到的 PCR 产物为 339 bp。

3 不育系和保持系亲本的 PCR 鉴别

针对难以区别水稻不育系与保持系的问题,我们参照 Akagi 等^[7]的结果,合成了 1 对 CMS 引物。由于水稻不育系中含有这一专一序列,因此采用这对引物,可以将两对不育系与保持系(“寒丰 A”与“寒丰 B”、“8204A”与“8204B”)区分开来。实验结果表明,在“寒丰 A”、“8204A”这两个杂交粳稻亲本不育系中可以扩增得到预期的目的片段 239 bp,而在其相应的保持系“寒丰 B”、“8204B”和恢复系“R161”中没有该大小的目的条带(图 3)。另据报道,某些不育的胞质杂种植物中,PCR 扩增不出这一序列,这里,其后代恢复了育性,显示在这些胞质杂种中,可能是体细胞突变导致了不育之果。

4 5 种杂交粳稻亲本及其杂交种真伪纯度的鉴定和应用

采用已有的 SCAR 标记的引物和 CMS 引物,对上海市农业科学院作物育种栽培研究所送检的第 1 批 4 个杂交粳稻亲本的样品进行了分子鉴定。经与田间种植的结果比较,4 个样品的不育株率基本吻合,4 个样品纯度有 3 个基本吻合,另有 1



图 3 用 CMS 引物对 5 种水稻进行 PCR 反应的结果

M: DL2000 分子量标记,大小分别为 2 000、1 000、750、500、250、100 bp; 0: 空白对照,无 DNA 模板; 1: “寒丰 A”; 2: “寒丰 B”; 3: “8204A”; 4: “8204B”; 5: “R161”。

个样品(8204A1)的分子检测纯度偏低,可能是由于检测样本数目太少导致误差偏大。在此基础上,对送检的第 2 批 3 种水稻种子“寒丰 A”(农科-1) A46、“8204A”(农科-2) A47 和“寒优湘晴”进行了纯度鉴定,并与海南种植的情况进行相互验证。鉴定结果表明:加大了样本数量之后,实验室鉴定的结果与田间鉴定的结果更加接近(表 2)。“8 优 161”和“申优 1 号”仅进行了实验室分子检测,未得到田间种植鉴定结果。

讨 论

杂交水稻在繁殖、制种过程中造成的人为或机械混杂是亲本混杂退化的主要原因,外来花粉

表 2 实验室和海南田间种植鉴定杂交粳稻纯度的比较

品种	检测 数/株	不育系特异标记		SCAR 特异标记		海南田间种植鉴定		
		CMS 引物扩增 阳性数/株	不育株 率/%	SCAR 特异标 记阳性数/株	百分 率/%	实验室 纯度/%	实际纯 度/%	不育 率/%
“寒丰 A” 1 号	36	36	100.0	36	100.0	100.0	99.6	—
“寒丰 A” 2 号	66	58	87.9	64	97.0	86.4	90.0	—
“8204A” 1 号	45	44	97.8	35	77.8	77.8	99.5	99.5
“8204A” 2 号	52	41	78.8	40	76.9	76.9	89.5	89.5
“寒丰 A”(农科-1) A46	127	—	—	126	99.2	99.2	99.9	—
“8204A”(农科-2) A47	143	—	—	143	100.0	100.0	99.9	—
“寒优湘晴”	137	—	—	135	98.5	98.5	98.0	—
“8 优 161”	150	—	—	138	92.0	92.0	—	—
“申优 1 号”	122	112	91.8	112	91.8	90.2	—	—

“—”: 未测。

侵入会造成亲本后代的生物学混杂、亲本本身的基因突变等自然变异也会造成混杂退化^[8]。此外,不育系育性不稳、人为造假会影响杂交水稻杂种纯度。假种坑农事件曾经给农业生产带来巨大损失。由于水稻种子的纯度难以从种子形态上辨认,因而简便、快速、准确、早期地对水稻品种纯度进行鉴定十分重要^[2,9]。

传统的种植鉴定最为直接可靠,但周期长、费工占地,会延误农时;同工酶技术所能检测的多态性位点少,无法鉴定出一些水稻品种间的串粉所导致的杂种不纯,另外种子的生长时期不同常常会影响同工酶酶谱的结果,故而对鉴定时期要求严格^[2]。RAPD技术在种质鉴定中有广泛的应用前景,它所需的样品DNA量少,反应灵敏度高,没有组织和发育阶段的特异性,易于早期快速检测,能大量揭示从形态和生理生化指标上无法检测到的丰富差异^[10,11],但这项技术还有不够稳定以及分析相对复杂的缺点。如将RAPD标记转化为SCAR-PCR标记后,则可以增强所获得的RAPD标记的特异性,并可简化PCR分析。

鉴于目前对上海推广的粳稻分子标记的研究很少,我们在对上海地区15种主要杂交粳稻亲本材料进行RAPD分析^[3]的基础上,建立了其中5个亲本的SCAR标记,并对目前上海地区杂交粳稻三系法生产中使用的主要不育系、保持系、恢复系以及杂交粳稻组合进行了真伪和纯度的鉴定。由于RAPD标记中的一条EB染色的带可能是一种单一的片段,也可能是一种混合标记,即在基因组DNA中扩增位点不一、长度相同或不同的一组片段的混合片段标记^[12],因此,并非所有的RAPD标记都能成功转化为SCAR特异标记,在转化过程中,有部分SCAR引物扩增不出目标条带或者在所有的基因型中都扩增出相同的条带而导致多态性的丧失。这些RAPD的多态性可能是由于引物结合位点的点突变造成的,而SCAR引物可减轻突变区核苷酸序列的差异程度^[13]。王斌等^[14]也认为并非所有RAPD或AFLP标记都可以转变成SCAR标记,仅有1/3的RAPD标记可转变成SCAR标记,因为严紧的反应条件常常使反应的特异性比较高。

从理论上讲,能够区分杂交水稻亲本的标

记,可有效地对这些亲本组合的杂交种进行鉴定^[9]。我们的结果表明,采用SCAR分子标记技术进行杂交种纯度的鉴定是可行的,样本较少时虽然有部分偏差,但若加大样本量后,实验室分子鉴定的结果与田间种植鉴定的结果可以更加接近。根据我们的经验,采用这一方法进行纯度鉴定,单个样本的检测周期为2~3个星期,而海南鉴定纯度则约需90 d。另外,采用高压对SCAR-PCR产物进行快速电泳,所用的琼脂糖材料节省、电泳时间短,这为采用分子方法鉴定大批量杂交种子的纯度与真实性提供了快速简单的检测SCAR-PCR扩增产物的方法^[15]。

参考文献

- 1 干滢, 曾凡亚, 赵云等. 杂交油菜“蜀杂6号”特异序列扩增标记(SCAR)建立及其在杂种鉴定中的应用. 作物学报, 2001, 27(6): 722-728
- 2 陈洪, 钱前, 朱立煌等. 杂交水稻汕优63杂种纯度的RAPD鉴定. 科学通报, 1996, 41(9): 833-836
- 3 梁婉琪, 黄亚红, 潘爱虎等. 杂交粳稻亲本随机扩增多态性DNA(RAPD)分析. 上海农业学报, 2001, 17(2): 33-36
- 4 Williams JGK, Kubelik AR, Livak KJ et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Res, 1990, 18(22): 6531-6535
- 5 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻DNA的一种简易方法. 中国水稻科学, 1992, 6(1): 47-48
- 6 Sambrook J, Russell DW. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础等译. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 1995. 404-406
- 7 Akagi H, Nakamura A, Sawada R et al. Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile hybrid plants of rice. Theor Appl Genet, 1995, 90: 948-951
- 8 颜龙安, 刘宜柏, 李季能等. 杂交水稻繁殖学. 北京: 中国农业出版社, 1999. 377-380
- 9 吴景锋, 傅廷栋, 荣廷昭等. 作物遗传育种工程技术. 郑州: 河南科学技术出版社, 2000. 1-62
- 10 余四斌, 徐才国. 用RAPD技术鉴定水稻种子纯度初探. 种子, 1996, 5: 56-57
- 11 钱前, 陈洪, 孙宗修等. 真假杂交水稻II优63的RAPD鉴定. 中国水稻科学, 1996, 10(4): 241-242
- 12 许占友, 张爱民, 张树榛等. 快速克隆RAPD片段方法的研究. 生物技术, 2000, 10(5): 34-38
- 13 Horejsi T, Box JM, Staub JE. Efficiency of randomly amplified polymorphic DNA to sequence characterized amplified region marker conversion and their comparative polymerase chain reaction sensitivity in cucumber. J Am Soc Horticult Sci, 1999, 124(2): 128-135
- 14 王斌, 张超良, 翁曼丽等. 玉米自交系8112特异SCAR标记的获得. 高技术通讯, 1999, 3: 45-47
- 15 许勇, 张海英, 康国斌等. 西瓜抗枯萎病育种分子标记辅助选择的研究. 遗传学报, 2000, 27(2): 151-157