

1 个控制水稻绿苗分化率 QTL 的效应验证

李 菁 林拥军

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 HJ-37 是日本晴(供体)/珍汕 97(受体)通过连续回交所构建的重叠导入系中的一个家系, 该家系在其导入片段的区域内部存在一个与绿苗分化率相关的 QTL。以 HJ-37 与珍汕 97B 杂交后的 F_2 代群体为研究对象, 采用 SSR 分子标记筛选重组单株与绿苗分化率检测相结合的办法来对此 QTL 进行效应验证并缩短该 QTL 的距离。最终, 10 号株系绿苗分化率平均值为 53.13%, t 值为 4.897 6, 此数据表明该株系的绿苗分化率与对照相比明显升高。同时该 QTL 在遗传图谱上的距离缩小到了 RM3289-RM6295 区段内。该研究为最终分离克隆提高绿苗分化率的相关基因打下了基础。

关键词 水稻; 重叠导入系; SSR; 重组单株; 绿苗分化率

中图分类号 S 511.503 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)03-0270-05

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 亦是功能基因组研究的模式植物。水稻组织培养体系的建立是深入研究基因功能及利用基因工程技术对水稻进行遗传改良的基础。至今, 与粳稻转基因技术相配套的组织培养体系已经成熟^[1]; 虽然已报道过经优化的高效籼稻培养基^[2], 但由于受基因型的限制, 籼稻的转基因体系仍存在一定的困难^[3], 尤其在愈伤组织绿苗分化率上表现最为明显。前期研究表明, 水稻愈伤组织绿苗分化率受环境影响较小, 基因型对表型起主导作用^[4]。因此, 可以通过分子标记辅助选择的方法确定控制水稻绿苗分化率的 QTL, 进而用图位克隆的办法克隆到该基因。

在 QTL 的研究中, 导入系是一种较理想的次级分离群体。所谓导入系就是通过杂交、回交等方式将外源目标染色体片段导入到另一不同的遗传材料中所形成的特异遗传材料。这类群体除了少数目标区间的差异外, 株系间基因组其余部分完全一致, 最大程度地减少了株系间背景不同对目标性状考察的干扰。1998 年, Bernacchi 等^[5]将番茄中野生种的染色体片段导入到栽培种中, 鉴定出包括 7 个农艺性状在内的 25 个 QTL。夏鹏等^[6]利用日本晴(粳稻)序列设计探针筛选珍汕 97 和明恢 63(籼稻)的 BAC 文库膜, 完成了 1 个产量 QTL 区段珍汕 97

和明恢 63 物理图谱的补缺; 为了选择粳稻中的优良基因, 穆俊祥^[7]以在国际上完成测序的水稻品种日本晴为供体, 以珍汕 97B 为轮回亲本, 经过多次回交之后, 对目标区段及遗传背景进行分子标记的验证分析, 最后获得了包括 145 份株系的覆盖粳稻全基因组的重叠导入系。利用该导入系, Zhao 等^[4]在 2008 年定位到了与绿苗分化率相关的 QTL。本研究的目的就是利用包含此 QTL 的单染色体片段导入系, 通过对片段重组单株的筛选及其表型的鉴定来缩短该 QTL 的距离, 为分离克隆相关基因提供基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

以日本晴(Nipponbare)为供体亲本、珍汕 97B 为受体亲本, 经过回交构建重叠导入系^[8-9](该材料由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室余四斌教授提供), 经 Zhao 等^[4]的 QTL 定位, 筛选出 1 个在籼稻培养体系中绿苗分化率与珍汕 97B 相比有显著提高的家系 HJ-37, 该家系在水稻第 2 染色体上与标记 RM263 和 RM525 紧密连锁的区间携带来自日本晴的高分化率等位基因。将这个家系与珍汕 97B 杂交后产生的 F_2 代群体为材料进行本课

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 抗虫转基因水稻新品种培育专项(2008ZX08001-001)

李 菁, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: lijing2008@webmail.hzau.edu.cn

通讯作者: 林拥军, 博士, 教授, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

题的研究。

1.2 技术路线

本研究的技术路线见图 1。

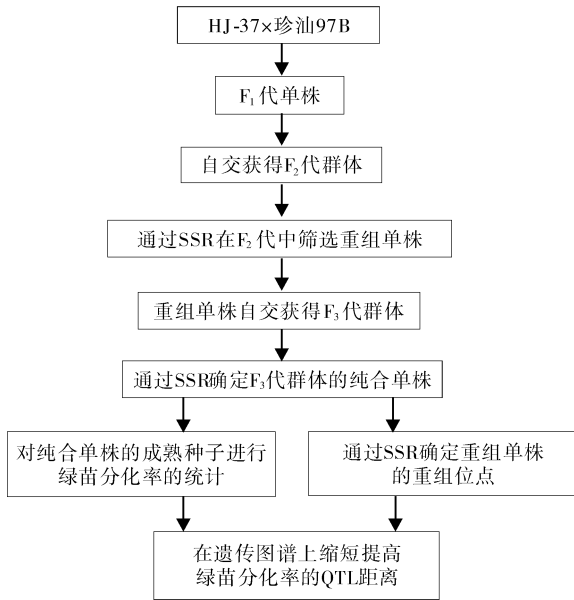


图 1 技术路线

Fig. 1 Experiment process diagram

1.3 筛选纯合的重组单株

根据 Gramene 网站 (<http://www.gramene.org/>)2009 年更新的水稻 SSR 标记遗传连锁图谱, 选择位于导入片段两端的标记在 1 000 株 F₂ 代植株中筛选导入片段重组的单株。由于 F₂ 代中的重组单株在后代存在基因的分离, 其 F₃ 代种子于 2009

年底在海南试验基地播种并分别移栽 40 棵秧苗, 每行种植 10 棵。抽提叶片的 DNA, 利用相同标记筛选纯合单株。

1.4 DNA 抽提方法

用 800 μ L 的 1.5 \times CTAB DNA 抽提液 [15 g/L CTAB, 75 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0), 15 mmol/L EDTA (pH 8.0), 61.4 g/L NaCl] 将水稻叶片用研钵研碎后转移到 1.5 mL 离心管中, 65 $^{\circ}$ C 水浴 20 min, 每 8 min 振荡 1 次。水浴结束后, 加入 500 μ L 氯仿/异戊醇 (24 : 1), 轻柔上下颠倒 10 min, 10 000 r/min 离心 10 min。取 400 μ L 上清转入新的离心管, 加入 800 μ L 冰冻 95% 乙醇混合均匀, 冰上静置 20 min 后 12 000 r/min 离心 15 min。倒掉上清, 加入 500 μ L 75% 乙醇洗涤沉淀, 空气中干燥 30~60 min 后, 加入 200 μ L 灭菌 ddH₂O 溶解 DNA。

1.5 PCR 检测

引物信息均来自于 Gramene 数据库 (<http://www.gramene.org/>), 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成 (表 1), 在 BIO-RAD S1000 PCR 反应仪上进行扩增。反应体系包括: 1 μ L DNA 模板, 1 \times PCR buffer, 150 μ mol/L dNTPs, 0.1 μ mol/L SSR 引物 (表 1), 0.6 U *Taq* 酶, 20 μ L 反应体系。扩增程序为 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 保温 7 min。反应产物用 4% 聚丙烯酰胺凝胶 (PAGE) 电泳, 银染后记录结果。

表 1 SSR 标记引物信息

Table 1 Information about primer sequence of SSR markers

标记名称 Markers	正向引物序列 Forward primer sequence(5'→3')	反向引物序列 Reverse primer sequence(5'→3')
RM1920	CAAACACAGTGTGACAGAA	GCTATTGACTTATCCGTTCA
RM6295	AGCTGGGCTTCGAGATTTTC	AATCAAACGACGACGACGAG
RM1307	GCATCCGACTATTCTCCAGC	CCCTTCAGGATTAGCATTGC
RM13693	ATTCGGAAGCACCACAAGATGC	CAATCAGGGTGGTGATTTGAAGC
RM7511	GAAGCCATGTCCCTTTTCTG	CACAGCGAACGTGATGTCTC
RM13732	CCCATCACGTAGGCTCACTCC	ATCCTTCCCAAATCCAACTGC
RM3512	ATACATGCATACTCCGATCC	TCGAGTTGTGAAAGATAGGG
RM3289	CCATCTCTACCGCGACTAG	CAGGCACTGTTTGGAGTGAG
RM6122	CCGCCCTCTTCTTCTTCTC	TAGACACCAACAATGGCGTC
RM497	TCCTCTTCACCTATGGGTGG	GCCAGTGCTAGGAGAGTTGG
RM13855	GCAGTCAAGTGACCGAAGTCAAGG	TGCCGCGTTGATCTCACACC
RM3685	AAACGTATTAGTGCGCCAG	TCTCGCTTCTCTCTCTCC

1.6 组织培养方法

1) 愈伤组织诱导。纯合株系的成熟种子去壳, 75% 乙醇表面消毒 1 min, 0.15% 升汞浸泡 20 min,

无菌水清洗 6 遍, 然后接入到诱导培养基, 每个株系诱导 10 瓶, 每瓶接 10~12 颗种子, 26 $^{\circ}$ C 暗培养 40 d 后分别转入相应的分化培养基。培养基成分包括:

$L_3 + 3.0 \text{ mg/L } 2,4\text{-D} + 800 \text{ mg/L CH}$ (水解酪蛋白)+3% Maltose+0.25% Phytigel,pH 6.0。

2) 愈伤组织分化。诱导后,取长势相对一致的愈伤接入到分化培养基。每个株系设置 3 个重复,每个重复接 5 瓶分化培养基,每瓶接 4 颗愈伤组织,26 °C 光照(16 h 光期/8 h 暗期)培养 50 d 后记录每瓶分化培养基上分化绿苗的愈伤组织数,计算愈伤组织绿苗分化率(绿苗分化率=分化绿苗的愈伤数/接入分化培养基的愈伤数 $\times 100\%$)。培养基成分包括:DL₃ + 2.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L KT + 0.2 mg/L IAA + 0.2 mg/L NAA + 1 000 mg/L CH + 3% Maltose + 0.25% Phytigel,pH 6.0。

1.7 数据测定及分析方法

数据分析采用 *t* 测验。比较各株系和对照材料珍汕 97B,相对值显著大于珍汕 97B 的株系判断为携带来自日本晴的高分化率等位基因。

2 结果及分析

2.1 纯合重组单株筛选

对位于导入片段两端的 SSR 标记进行多态性验证后,最终确定 RM1920 及 RM6295 为筛选重组单株的标记。试验最终筛选获得了 10 棵重组单株及其纯合后代。

2.2 纯合后代的表型鉴定

对重组单株的纯合后代成熟种子进行诱导及分化,统计每个重组单株愈伤组织的绿苗分化率,计算其平均值、方差及 *t* 值(表 2)。统计数据显示,10 号株系的绿苗分化率平均值为 53.13%,*t* 值为 4.897 6,表明株系 10 的绿苗分化率升高显著。

2.3 利用 SSR 标记对重组单株进行精细定位

根据 Gramene 网站的水稻 SSR 标记遗传连锁图谱,在覆盖整个导入片段的 SSR 标记中,筛选出 10 对具有多态性的标记,按物理距离从小到大排列分别为:RM1307、RM13693、RM7511、RM13732、RM3512、RM3289、RM6122、RM497、RM13855、RM3685。利用以上标记对重组单株的重组位点进行定位,最后获得各重组片段的侧翼标记,如表 2 所示。

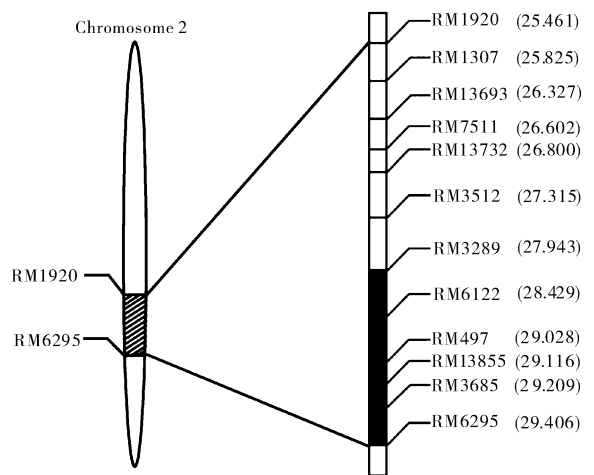
株系 10 的片段与标记 RM3289 及 RM6295 紧密连锁,并在绿苗分化率上表现为明显上升。由此我们可以把提高绿苗分化率的 QTL 范围缩小到 RM3289-RM6295 这个区段内(图 2)。

表 2 利用 *t* 测验统计法分析籼稻培养体系下重组单株的绿苗分化率¹⁾

Table 2 The data analysis for plant regeneration frequency with *t* test in indica culture system

株系编号 Lines No.	侧翼标记 Flank mark	绿苗分化率/% Plant regeneration frequency	<i>t</i> 值 <i>t</i> value
CK		35.45±0.072	
1	RM1920-RM1307	52.64±0.097	3.073 5
2	RM1307-RM6295	32.30±0.283	-0.193 1
3	RM1920-RM6122	26.59±0.107	-1.439 1
4	RM13732-RM6295	23.61±0.024	-8.525 7
5	RM6122-RM6295	29.32±0.017	-6.289 0
6	RM1920-RM1307	47.92±0.090	2.393 1
7	RM1307-RM6295	39.83±0.057	1.319 4
8	RM3512-RM6295	32.29±0.079	-0.696 1
9	RM3685-RM6295	35.42±0.036	-0.017 1
10	RM3289-RM6295	53.13±0.097	4.897 6*

1) * 表示显著性水平为 0.05 * shows significant at 0.05 level.



■ 表示定位的区段;括号内数字表示标记所在位置的物理距离/Mbp ■ Shows the position of PRF; Numbers in brackets mean physical distance of the SSR makers with unit of Mbp.

图 2 绿苗分化率 QTL 分布的遗传连锁图

Fig. 2 Linkage map and position of QTL for plant regeneration frequency

3 讨论

近年来,有不少提高水稻绿苗分化率的相关研究报道,但大部分都是从改变培养基成分或浓度这一方面着手去改善愈伤组织的生长情况^[8-10]。在基因型方面,虽然之前已经有人定位到相关的 QTLs^[11-12],但对其进行深入研究的报道则较少。2005 年,Nishimura 等^[13]通过图位克隆技术成功地从水稻品种 Kasalath 中分离出 1 个控制水稻分化率的基因,该基因编码 1 个亚硝酸盐铁氧还原蛋白

还原酶(ferredoxin nitrite reductase, NiR)。该研究还发现此酶可以代替潮霉素等作为转化培养过程中的筛选标记^[13]。

由本研究结果可以看出,可以通过图位克隆缩小目的片段的范围,直至最终能克隆到相关的基因。同时,本研究的试验数据显示,株系 2、4、7、8 也包含了定位的片段在内,但在绿苗分化率上却未表现出明显上升。众所周知,数量性状位点有着复杂的遗传机制,其中包括基因主效应、基因间互作效应及基因与环境的互作效应^[14]。由于 2、4、7、8 这几个株系的导入片段较长,应该是由基因间相互作用所造成。首先,在这几个导入片段中可能存在抑制基因,从而削弱了目标基因的表达。其次,基因的上位效应^[15]也可以解释这一现象。在这几个株系的导入片段中,存在某些能够掩盖目标基因表达的基因,所以在表型上没有显著效果^[16]。

高效的农杆菌转化组织培养体系^[17]加速了粳稻在转基因方面的研究,而在籼稻中,虽然也有成功转化的先例,但偏低分化效率阻碍了籼稻转基因研究的进程。有研究^[4]认为,粳稻和籼稻之间组织培养能力的差异来源于愈伤组织对糖类或其他营养物质代谢能力的差异。所以,如果利用软件在相关 QTL 中预测基因功能,可以将与糖类代谢相关的基因作为候选基因进行研究。另外,经观察发现,在转基因组织培养过程中,筛选阶段抗性愈伤的生长情况对绿苗分化率有一定的影响,而抗性愈伤是侵染之后的产物。这可能意味着籼稻与粳稻在农杆菌侵染这一步骤中就存在区别。农杆菌的侵染过程是由农杆菌基因调控的^[18-20],但受体基因组很有可能也影响着侵染的全过程以及最终的侵染效率。因此,后续研究中除了糖代谢相关基因,也可以从农杆菌受体基因的角度出发对籼稻进行研究。这样,从分化率和农杆菌侵染效率两方面出发,能够更全面更高效地提高籼稻转基因的整体水平。

SSR 标记是转基因研究中的重要工具。其优点是可用少量的 DNA 对许多样品进行快速分析,并且在基因组内分布广泛、稳定性强且在结果上呈共显性^[21]。由于 SSR 标记巨大的利用价值,近年来对该标记的研究也越来越深入,发掘的标记数量也越来越多。Gramene 网站(<http://www.gramene.org/>)在 2009 年公布了一批新的 SSR 标记,同时,染色体上的标记连锁图谱也直接利用物理距离来表示标记间的距离。遗传距离有时会因为染

色体中交换热点的存在而使得该距离的数值与实际情况有一定的偏差,而物理距离则能更直观更准确地表现出标记间的片段长度。为了继续缩小目标基因所在的区段,可以将绿苗分化率显著提高的单株继续与珍汕 97B 进行回交,并利用本试验所确定的标记对后代进行选择。

参 考 文 献

- [1] 林拥军,陈浩,曹应龙,等. 农杆菌介导的牡丹江 8 号高效转基因体系的建立[J]. 作物学报, 2002, 28(3): 294-300.
- [2] LIN Y J, ZHANG Q F. Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23: 540-547.
- [3] ALDEMITA R R, HODGES T K. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of japonica and indica rice varieties [J]. Planta, 1996, 199: 612-617.
- [4] ZHAO L N, YU S B, LIN Y J, et al. The identification of quantitative trait loci controlling rice mature seed culturability using chromosomal segment substitution lines [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 247-256.
- [5] BERNACCHI D, BUNN T B, EMMATTY D, et al. Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium* [J]. Theor Appl Genet, 1998, 97: 170-180.
- [6] 夏鹏,林海艳,罗美中. 1 个水稻产量 QTL 区段及品系特异性重复序列的比较分析 [J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(3): 261-265.
- [7] 穆俊祥. 水稻重叠导入系的创建及其产量相关 QTL 的遗传研究 [D]. 武汉: 华中农业大学生命科学技术学院, 2005: 23-38.
- [8] GREWAL D, GILL R, GOSAL S S. Factors enhancing induction of high frequency plant regeneration from somatic embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Afr J Biotechnol, 2005, 5(6): 697-702.
- [9] SIVAKUMAR P, LAW Y S, HO C L, et al. High frequency plant regeneration from mature seed of elite, recalcitrant Malaysian indica rice (*Oryza sativa* L.) cv. MR 219 [J]. Acta Biologica Hungarica, 2010, 61(3): 313-321.
- [10] 王维旭,张骥诚,刘学群,等. 微量元素对籼稻品种愈伤组织诱导和褐化的影响 [J]. 华中农业大学学报, 2010, 29(1): 6-8.
- [11] KWON Y S, KIM K M, EUN M Y, et al. Quantitative trait loci (QTLs) mapping associated with plant regeneration ability from seed derived calli in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Cell, 2001, 11: 64-67.
- [12] TAGUCHI S F, YAMAMOTO T, YANO M, et al. Mapping QTLs that control the performance of rice tissue culture and evaluation of derived near isogenic lines [J]. Theor Appl Genet, 2006, 112: 968-976.

- [13] NISHIMURA A, ASHIKARI M, MATSUOKA M, et al. Isolation of a rice regeneration quantitative trait loci gene and its application to transformation systems[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 11940-11944.
- [14] WADE M J. Epistasis, complex traits, and mapping genes[J]. Genetics, 2001, 112/113: 59-69.
- [15] 王亚馥, 戴灼华. 遗传学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999: 37-39.
- [16] 杨盖宇, 张玉山, 鄢文豪, 等. 利用水稻近基因系群体进行 *Ghd7* 和 *Qph1* 上位性分析[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(1): 1-7.
- [17] TOKI S, HARA N, ONO K, et al. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice[J]. Plant J, 2006, 47: 969-976.
- [18] ALTABE S, IANNINO N I, DE-MENDEZA D, et al. Expression of the *Agrobacterium tumefaciens* chv B virulence region in *Azospirillum* spp. [J]. J Bacterial, 1990, 172: 2563-2567.
- [19] CANGELOSI G A, HUNG L, PUVANESARAJAH V, et al. Common loci for *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium meliloti* exopolysaccharide synthesis and their roles in plant interaction[J]. J Bacterial, 1987, 169: 2086-2091.
- [20] STACHEL S E, NESTER E W. The genetic and transcriptional organization of the vir region of the A6 Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*[J]. EMBO J, 1986, 5: 1445-1454.
- [21] 周岚, 陈殿元. SSR 分子标记技术及其在玉米种子鉴定上的应用[J]. 中国种业, 2005(6): 51-52.

Effect of a plant regeneration frequency QTL in rice

LI Jing LIN Yong-jun

*National Key Laboratory of Crop Genetics Improvement,
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China*

Abstract HJ-37 was developed through backcross and marker-aided selection by using japonica variety Nipponbare as donor parent and indica variety Zhenshan 97B as recurrent parent. F₂ seeds from crossing HJ-37 with Zhenshan 97B were used to select the recombinant plants with SSR markers. Then, the homozygous seeds from the recombinant plants were used to test the plant regeneration frequency. Meanwhile, SSR was utilized to map the recombinant sites. Finally, the effect of this QTL was verified. Average of plant regeneration frequency and *t* value of plant 10 is 53.31% and 4.897 6. This data shows plant 10 is obviously improved in PRF. Meanwhile, the distance of QTL was narrowed to the segment between SSR markers RM3289 and RM6295. The result will be useful for isolating and cloning the gene of high frequency of plant regeneration.

Key words rice; single chromosomal segment substitution lines; SSR; recombinant plant; plant regeneration frequency

(责任编辑: 张志钰)