

陈锦文, 朱永生, 张建福, 等. 四个杂交水稻骨干恢复系的多态性分析 [J]. 福建农业学报, 2014, 29 (4): 319—323.

CHEN J-W, ZHU Y-S, ZHANG J-F, et al. Polymorphism Analysis for Four Mainly Restore Lines of Hybrid Rice with SSR Markers [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2014, 29 (4): 319—323.

四个杂交水稻骨干恢复系的多态性分析

陈锦文^{1,2,3,4,5,6}, 朱永生^{2,3,4,5,6}, 张建福^{2,3,4,5,6*}, 谢华安^{2,3,4,5,6*}

(1. 福建省泉州市农业科学研究所, 福建 晋江市 362212; 2. 福建省农业科学院水稻研究所, 福建 福州 350019;
3. 农业部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/福州国家水稻改良分中心/福建省作物分子育种工程实验室
/福建省水稻分子育种重点实验室, 福建 福州 350003; 4. 福建省作物种质创新与分子育种省部共建国家重点
实验室培育基地, 福建 福州 350003; 5. 水稻国家工程实验室, 福建 福州 350003;
6. 杂交水稻国家重点实验室华南基地, 福建 福州 350003)

摘要: 选取均匀分布于水稻 12 条染色体上的 134 对 SSR (Simple Sequence Repeats, SSR) 标记, 对明恢 63、明恢 86、航 1 号和航 2 号等 4 个具有相似遗传背景的水稻骨干恢复系进行遗传多态性分析。结果表明, 经航天诱变选育的“航 1 号、航 2 号”与原种明恢 86 之间存在不同程度的遗传多样性。在筛选的 134 对 SSR 引物中, 具有多态性标记为 39 对, 多态性频率为 29.10%。每个标记位点的平均等位基因数为 2.10 个, 变幅为 1~4 个, 平均多态性信息含量指数 (PIC) 为 0.37。聚类分析结果表明, 当以 0.87 为阈值时可将航天诱变选育的“航 1 号、航 2 号”与原种“明恢 86”区分开。其中在标记 RM234 两侧邻近的 7 个含有重要基因区段的 SSR 标记中有 5 个标记存在多态性, 表明明恢 86 在航天诱变过程中可能在具有重要生物学功能的基因座发生了突变, 再经系统选育成航 1 号、航 2 号优良恢复系, 为航天诱变中因发生有利变异而选育新品种提供分子证据。

关键词: 航天育种; 骨干恢复系; SSR; 多态性

中图分类号: S 511

文献标识码: A

Polymorphism Analysis for Four Mainly Restore Lines of Hybrid Rice with SSR Markers

CHEN Jin-wen^{1,2,3,4,5,6}, ZHU Yong-sheng^{2,3,4,5,6}, ZHANG Jian-fu^{2,3,4,5,6*}, XIE Hua-an^{2,3,4,5,6*}

(1. Quanzhou Institute of Agricultural Sciences, Jinjiang, Fujian 362212, China; 2. Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350019, China; 3. Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture, P. R China/
Fuzhou branch, National Rice Improvement Center of China/Fujian Engineering Laboratory of Crop
Molecular Breeding/ Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding, Fuzhou, Fujian 350003,
China; 4. Incubator of National Key Laboratory of Fujian Germplasm Innovation and Molecular
Breeding between Fujian and Ministry of Sciences & Technology, P. R. China, Fuzhou,
Fujian 350003, China; 5. National Rice Engineering Laboratory of China, Fuzhou,
Fujian 350003, China; 6. South China Bases of National Key Laboratory of
Hybrid Rice for China, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: The genetic evolution analysis of four mainly restore lines for hybrid rice including Minghui63, Minghui86, Hang1 and Hang2 with similarly genetic background were carried out in the paper. A total of 134 pairs of simple sequence repeats (SSR) were selected distributed evenly from twelve chromosomes of rice (*Oryzae sativa* L.). The results indicated that there were a lot of polymorphic loci between breeding varieties under space flight mutation (Hang1, Hang2) and original variety (Minghui86), 39 polymorphic loci with a polymorphic ratio of

收稿日期: 2014—01—20 初稿; 2014—03—06 修改稿

作者简介: 陈锦文 (1984—), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事水稻遗传育种研究 (E-mail: tankim@126.com)

* 通讯作者: 张建福 (1971—), 男, 博士, 研究员, 主要从事水稻分子生物学与分子育种研究 (E-mail: jianfzhang@163.com);

谢华安 (1941—), 男, 研究员, 中国科学院院士, 主要从事水稻遗传育种研究 (E-mail: huaanxie@yahoo.com.cn)

基金项目: 国家“863”计划重点项目 (2006AA100101); 福建省科技厅国家科技项目 (F2006AA100101); 福建省财政专项——福建省农业科学院科技创新团队建设项目 (CXTD-1-1301)

29.10%。The number of alleles per loci ranged from 1 to 4 with an average of 2.1. The value of polymorphism information content (PIC) was 0.37. The four mainly restore lines were classified into 2 groups by clustering. It is distinction between Hang 1, Hang2 and Minghui 86 when the threshold value is 0.87. A further analysis on SSR markers distributed in two sides of marker RM234 which have key gene regions, indicated that there were 5 polymorphism sites from 7 pairs of SSR markers. Bioinformatics analysis showed that those loci have important biological function in Minghui 86, was mutated under space flight mutation. Furthermore, breeding excellent restoring line Hang 1 and Hang 2, provided a molecular evidence that advantageous variations are in space flight mutation for rice breeding.

Key words: space breeding; mainly restorer lines; SSR; polymorphism

航天辐射诱变育种是利用返回式卫星搭载农作物干种子在太空微重力、高真空、强辐射和交变磁场等条件下，使农作物产生可遗传的变异，进而在地面进行加代选择，选育出农作物新品种的育种技术。我国从 20 世纪 80 年代后期开展航天辐射诱变育种，通过几十年的选育获得了一大批性状优良的航天辐射诱变农作物新品种，并在生产上得到广泛的推广种植^[1-10]。

目前，航天辐射诱变育种更侧重于实践，对诱变机理的研究相对较少，主要集中在对空间诱变主要环境因子及其作用上，而在引起诱变的分子生物学、细胞学及生物化学的研究上涉及较少，在分子水平上阐述航天辐射诱变育种效率的研究也鲜有报道^[11]。近年来，随着分子标记技术的发展，多种分子标记包括限制性片段长度多态性 (Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP)、随机扩增多态性 DNA (Random Amplified Polymorphism DNA, RAPD)、扩增片段长度多态性 (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP)、微卫星标记 (Simple Sequence Repeat, SSR) 及近年来发展迅速的第三代分子标记技术单核苷酸多态性 (Single Nucleotide Polymorphism, SNP) 等广泛应用于动植物 DNA 水平的差异检测中。Lu 等^[12]通过 22 对 AFLP 标记和 267 对 SSR 标记阐述了通过航天搭载后的种子与原种之间的多态性位点，在 DNA 水平上找出了诱变后与原种之间的遗传差异。Li 等^[13]利用 16 对 AFLP 标记对通过航天搭载后代及原种比较分析后发现多个位点发生变异，并指出在 DNA 水平上含有多个潜在的变异区域。杨存义等^[14]通过随机挑选的覆盖 12 条染色体的 121 对 SSR 引物检测经航天搭载地面选育的稳定系进行分子检测，结果发现在多个区段内发生重组或者缺失等结构变异。航天辐射诱变育种的诱变因素、诱变作用机理及遗传特点等还有待于更进一步深入研究。本研究采用 SSR 分子标记技术对生产上大面积应用的“明恢 63、明恢 86、航 1 号和航 2 号”

等 4 个具有相似遗传背景的杂交水稻骨干恢复系进行遗传多样性分析，以期在 DNA 分子水平上对航天辐射诱变育种的有效性及变异幅度作一定的阐述，同时也为更深入地研究航天辐射诱变育种在 DNA 水平上的变异规律提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

选取具有相似遗传背景的 4 个在生产上大面积推广应用的杂交水稻骨干恢复系（表 1），试验材料均由农业部闽台农作物种质资源利用重点开放实验室保存。

表 1 供试骨干恢复系材料

Table 1 Mainly restore lines used in this experiment

编号	名称	系谱
1	明恢 63	IR30/圭 630
2	明恢 86	(IR54/明恢 63//IR60/圭 630)/GK148//明恢 63
3	航 1 号	明恢 86 空间搭载选育
4	航 2 号	明恢 86 空间搭载选育

1.2 水稻基因组 DNA 提取

将 4 份骨干恢复系材料各取 150 粒种子种植至 3 叶 1 心期，每份材料均独立取等量的叶片混合研磨成粉状后，CTAB 法提取水稻基因组 DNA，DNA 的质量及浓度用 BECKMAN DU800 检测并将浓度均调整为 $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 备用。

1.3 SSR 分析

本试验选取均匀分布于水稻 12 条染色体的 134 对引物（图 1）进行 SSR 分析。选取的引物由上海生物工程有限公司合成。DNA 片段扩增为 $10.0 \mu\text{L}$ 体系，其中包括 40 ng 模板 DNA ($50 \text{ ng} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.8 \mu\text{L}$ ， $10 \times \text{PCR buffer}$ (Mg^{2+} Plus) $1 \mu\text{L}$ ，dNTPs Mixture (各 $2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.4 \mu\text{L}$ ，SSR 引物 ($10 \text{ umol} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) 正、

反向引物各 0.25 μL , Taq 酶 (5 U $\cdot \mu\text{L}^{-1}$) 0.2 μL , ddH₂O 6.5 μL (PCR 试剂购自 Takara 公司), 应用 GeneAmp PCR System 9700 进行扩增。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 30 个循环, 最后

72℃ 延伸 7 min, 4℃ 保存备用。PCR 产物在 8% 浓度的聚丙烯酰胺凝胶上 90 V 恒压电泳 120 min, 用荧光染料 Genefinder (购置厦门百维信生物科技有限公司) 在摇床上染色 15 min, 最后在 BIO-RAD 凝胶成像系统上拍照, 记录电泳结果。

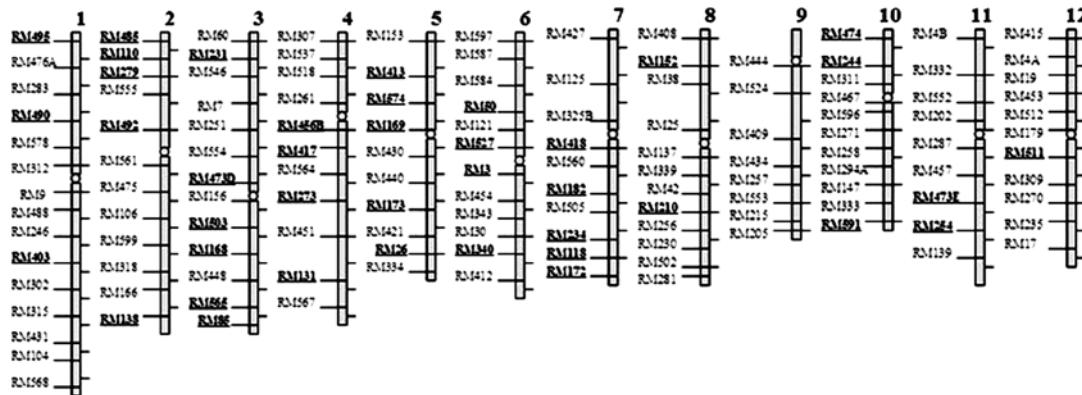


图 1 选取的 SSR 分布情况及多态性位点分布

Fig. 1 SSR loci and their distribution of polymorphism of the chromosome in rice

注: SSR 标记名称加黑及下划线的标记为多态性位点。

1.4 数据分析

每对 SSR 引物检测 1 个位点, 每条多态性条带视为 1 个等位基因, 参考 <http://www.gramene.org/> 中相关 SSR 标记信息记录扩增片段的大小。根据引物扩增结果, 选取扩增条带清晰且具有多态性的引物进行统计分析。根据扩增片段大小, 建立 1、0 数据库, 在相同迁移位置上, 有条带的记为 1, 无条带记为 0, 缺失条带的记为 9。按照 DNA 分子标记数据分析方法^[15], 将 SSR 标记作为等位基因进行多态性分析, 每扩增得到的一条带记为一个性状, 处理数据。SSR 位点的多态信息含量 (polymorphism information content, PIC) 按公式 $\text{PIC} = 1 - \sum f_{ij}$ 计算, f_i 表示第 i 位点的基因频率。应用 NTSYS2.10 数据分析软件进行 SHAN 聚类分析, 数据统计采用 Excel 2003 软件完成。

1.5 多态位点 RM234 两侧区域的多态性检验及生物信息学分析

在完成 134 对 SSR 引物的多态性分析后, 选取明恢 63、明恢 86 和航 1 号航 2 号多态性差异明显的 SSR 位点 RM234, 在其两端搜索 SSR 引物, 共找到附近的 RM21969、RM21971、RM21972、RM21973、RM21974、RM21975 和 RM21976 等 7 对标记。多态性分析后, 为进一步了解经航天诱变后选育的航 1 号、航 2 号”在该区域内的基因功能、变异幅度及变异规律, 应用 Softberry (<http://www.softberry.com/>)、Gramene (<http://www.gramene.org/>) 及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等生物网站对该区段内的基因及序列进行生物信息学在线分析预测比较。

gramene.org/) 及 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 等生物网站对该区段内的基因及序列进行生物信息学在线分析预测比较。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性分析

4 份杂交水稻骨干恢复系材料的 SSR 分析结果及多态性位点见图 1 及表 2。在选取的 134 个 SSR 位点中, 多态性位点有 39 个, 多态性频率为 29.10%。由图 1 可以看出, 在水稻 12 条染色体中除 9 号染色体外均含有多态性位点, 最多的 2、3 号染色体上分别含有 5~6 个多态性位点, 并且好几个位点存在成簇分布的现象。39 个多态性位点共扩增出 81 个等位基因差异位点, 每个位点平均检测到的等位基因数为 2.1 个。不同位点的等位基因数量不等, 在 1~4 的变化范围内。每个 SSR 多态性位点的多态性信息量 (PIC) 变化在 0.000~0.719, 平均为 0.370, 表明所选取的 134 对 SSR 引物的多态性较高。计算 4 份材料间的遗传距离和遗传相似系数 (表 2), 航 1 号、航 2 号与原种明恢 86 的遗传距离为 0.113、0.138。图 2 为 RM473E 等 8 对 SSR 标记的多态性检测结果。

2.2 聚类分析

根据 39 对多态性 SSR 引物检测出的 81 个等位基因, 采用 NTSYS 2.10 软件分析 4 份具有相似遗传背景的骨干恢复系材料间的遗传相似系数, 用

UPGMA 法对其进行聚类分析,结果如图 3 所示。4 份材料的遗传相似系数在 0.07~0.97,表现出较为丰富的遗传多样性。当遗传距离以 0.07 为阀值时,可将 4 份材料划分为两类,第 I 类为明恢 63,第 II 类包含了明恢 86、航 1 号及航 2 号,从 4 份材料的遗传背景上可以说明该结果与实际的差异相符合。当遗传距离选取 0.87 为阀值时,可将经航天辐射诱变后经地面选育的“航 1 号、航 2 号”与诱变原种“明恢 86”分成两个亚群,由此说明在航天辐射诱变过程中水稻染色体多个位点发生了变异。从聚类结果上看出航天辐射诱变育种改良作物性状的实质,是由于在 DNA 水平上发生了可遗传的变异。

表 2 4 份恢复系间的遗传距离与遗传相似系数

Table 2 Genetic distances and genetic similarities for the 4 restore lines of hybrid rice

品种	明恢 63	明恢 86	航 1 号	航 2 号
明恢 63		0.101	0.063	0.038
明恢 86	0.899		0.887	0.862
航 1 号	0.937	0.113		0.975
航 2 号	0.962	0.138	0.025	

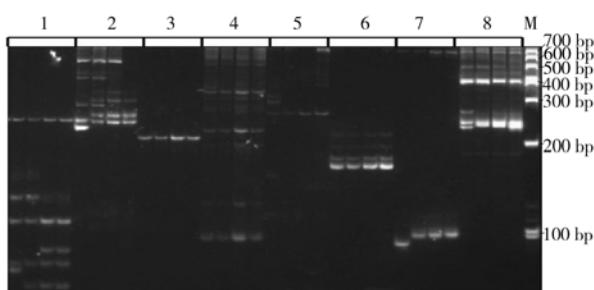


图 2 SSR 标记的多态性检测

Fig. 2 The polymorphism analysis of the 4 restore lines with SSR markers

注: ①1~8 标记分别为 RM473E、RM474、RM475、RM476、RM485、RM488、RM490、RM492; ②每个标记对应的样品从左到右依次为: 明恢 63、明恢 86、航 1 号及航 2 号, M 为 100 bp DNA Ladder Marker。

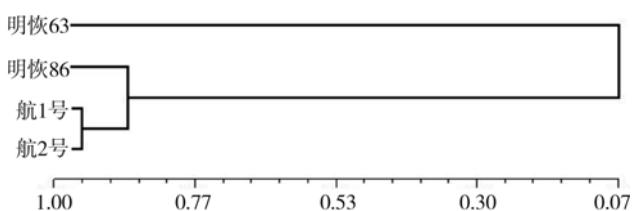


图 3 4 份骨干恢复系的 SSR 聚类分析

Fig. 3 The diagram tree of 4 mainly restorer lines of hybrid rice with SSR markers

2.3 RM234 两侧区域的多态性分析及生物信息学分析

位于 7 号染色体末端的 SSR 标记 RM234 对 4 个材料的多态性检测结果显示, 明恢 63、明恢 86 之间没有多态性, 明恢 63、明恢 86 与航 1 号、航 2 号之间具有明显的多态性差异。进一步选取 RM234 两端的 7 对 SSR 引物, 检测结果显示其中 5 对在明恢 63、明恢 86 与航 1 号、航 2 号之间均存在多态性差异, 而在明恢 63、明恢 86 之间没有多态性差异, 结果显示在该区段, 经航天诱变后选育的航 1 号、航 2 号发生了可遗传的变异(图 4)。生物信息学分析表明该区段跨越了约 119 400 bp, 该区域内含富亮氨酸跨膜蛋白激酶、锌指、跨膜协助蛋白、锌指结构及含 T-DNA 插入位点等多个重要基因或基因座。

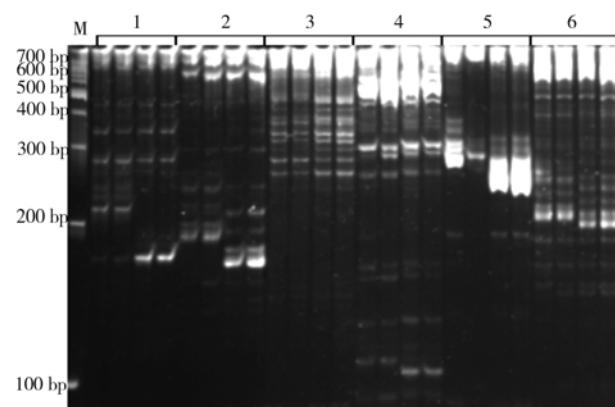


图 4 SSR 标记的多态性检测

Fig. 4 The polymorphism analysis of the 4 restore lines with SSR markers

注: ①1~6 标记分别为 RM21971、RM21972、RM21973、RM21974、RM21975、RM21976; ②每个标记对应的样品从左到右依次为: 明恢 63、明恢 86、航 1 号及航 2 号; M 为 100 bp DNA Ladder Marker。

3 讨论与结论

3.1 航天诱变育种机理的研究

多年来, 我国通过返回式卫星搭载农作物种子进行空间辐射诱变, 随后进行地面选育, 已经选育出一大批农作物新品种并在生产上得以广泛推广种植, 为我国作物新品种的更替做出很大贡献^[7]。但关于航天辐射诱变育种更多的是在实践利用中, 对其辐射诱变机理、诱变因素及诱变效率的研究均较少涉及^[16]。宋美珍等研究棉花航天辐射诱变后代生长发育、产量性状分析及采用 180 对 SSR 引物进行扩增, 获得 19.4% 的多态性频率引物, 在一

定水平上阐述了航天辐射诱变的分子机理^[1]。周峰等利用 SSR 标记分析“特籼占 13”的空间变异后代，结果表明引物多态性频率介于 0.35% ~ 2.47%，且多态性位点在水稻基因组中呈随机分布^[18]，本研究获得的结果与该结果相一致。

3.2 航天辐射诱变育种效率

实践表明空间诱变育种呈变异幅度大、变异频率高、良性变异多、变异可达到快速稳定等优点且诱变后代中含大量的早熟、优质、抗病虫等优良性状，通过航天搭载诱变地面选育已经成为生物新品种选育的有效途径。大量的研究报道表明，航天辐射诱变育种具有很高的效率，并且可以选育出变异范围大的农作物新品种^[3,19]。

3.3 研究特色及前景

本研究选用的 4 个杂交水稻骨干恢复系在我国杂交水稻的发展历程中均具有一定的代表性，并且具有相似的遗传背景，为本研究的顺利进行奠定了良好的材料基础。谢华安等研究比较了航 1 号与原种明恢 86 在表型性状上的主要差异，通过航天搭载经地面选育的航 1 号与原种明恢 86 相比在株高、生育期等多个农艺性状上均存在差异^[20]。本研究通过较均匀选取分布于水稻 12 条染色体上的 134 对扩增条带清晰的 SSR 引物，获得了比较理想的试验结果，进一步在 7 号染色体末端多态性位点 RM234 两端选取了 7 对 SSR 引物，多态性分析表明其中 5 对标记在经过航天诱变选育的航 1 号、航 2 号与原种明恢 86、明恢 63 之间存在多态性。

本研究结果只能在一定水平上说明航天诱变辐射变异幅度，航天辐射诱变后代在 DNA 水平上的碱基序列及表达水平上的差异有待进一步研究。

本研究应用 SSR 分子标记技术分析经航天辐射诱变地面选育获得的稳定品种与原种之间的差异，获得了比较理想的结果。在分子水平上初步说明了航 1 号、航 2 号与明恢 86 之间的差异程度。SSR 聚类分析结果表明具有相似遗传背景的 4 个杂交水稻骨干恢复系材料能够分为 2 个大类，这个结果与 4 个材料的系谱来源相符合。通过较均匀分布的 SSR 分子标记阐述品种之间的遗传差异，进一步选取一个两侧具有多个重要基因功能的多态性位点进行增加 SSR 标记多态性研究，初步确定 7 号染色体末端 RM234 两侧区域约 119 400 bp 长度的片段经航天诱变后的变异幅度范围，生物信息学分析该区段内含多个重要功能的基因，表明明恢 86 在航天诱变过程中在具有重要生物学功能的基

因座发生了突变，再经系统选育成航 1 号、航 2 号优良恢复系，为航天诱变中因发生有利变异而选育新品种提供了分子证据，为更深入地研究航天诱变育种在分子水平上的变异机理奠定基础。

参考文献：

- [1] 张建伟, 杨保安, 杨忠强, 等. 河南省航天诱变育种现状与展望 [J]. 河南农业科学, 2010, (7) : 123~126.
- [2] 王曾珍, 张玉, 白史且. 植物诱变育种研究进展 [J]. 草业与畜牧, 2009, (6) : 1~5, 23.
- [3] 彭选明, 庞伯良, 彭伟正, 等. 湖南水稻空间诱变育种研究进展及其展望 [J]. 湖南农业科学, 2009, (5) : 1~3, 7.
- [4] 徐得泽, 吴建平, 陈宏伟. 水稻航天诱变育种探析 [J]. 现代农业科技, 2009, (19) : 66~67.
- [5] 萨如拉, 胡晓林. 我国航天诱变育种研究进展 [J]. 西藏农业科技, 2009, 31 (4) : 1~3.
- [6] 韦明兵, 韦瑞霞. 航天育种及其在园艺植物上的应用 [J]. 广西园艺, 2008, 19 (3) : 62~64.
- [7] 王艳芳, 王世恒, 祝水金. 航天诱变育种研究进展 [J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2006, 34 (1) : 9~12.
- [8] 温贤芳, 张龙, 戴维序, 等. 天地结合开展我国空间诱变育种研究 [J]. 核农学报, 2004, 18 (4) : 241~246.
- [9] 郑家团, 谢华安, 王乌齐, 等. 水稻航天诱变育种研究进展与应用前景 [J]. 分子植物育种, 2003, 1 (3) : 367~371.
- [10] CYRANOSKI D. Satellite will probe mutating seeds in space [J]. Nature, 2001, 410: 857.
- [11] 袁存权, 李云, 管耀义, 等. 航天诱变育种机理研究进展 [J]. 河北林业科技, 2009, (S1) : 39~43.
- [12] LU J Y, ZHANG W L, XUE H, et al. Changes in AFLP and SSR DNA polymorphisms induced by short-Term space flight of rice seeds [J]. Biologia Plantarum, 2010, 54 (1) : 112~116.
- [13] LI Y, LIU M, CHENG Z, et al. Space environment induced mutations prefer to occur at polymorphic sites of rice genomes [J]. Advances in Space Research, 2007, (40) : 523~527.
- [14] 杨存义, 陈芳远, 王应祥, 等. 梗稻品种秋光空间诱变突变体的微卫星分析 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(9): 1550~1555.
- [15] 周延清. DNA 分子标记技术在植物研究中的应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2005: 249~252.
- [16] 高永利, 郭亚华, 谢立波, 等. RAPD 标记在植物航天诱变育种研究中的应用 [J]. 北方园艺, 2009, (5) : 108~110.
- [17] 宋美珍, 喻树迅, 范术丽, 等. 棉花航天诱变的农艺性状变化及突变体的多态性分析 [J]. 中国农业科技导报, 2007, 9 (2) : 30~37.
- [18] 周峰, 易继财, 张群宇, 等. 水稻空间诱变后代的微卫星多态性分析 [J]. 华南农业大学学报, 2001, 22 (4) : 55~57.
- [19] 韦明兵, 韦瑞霞. 航天育种及其在园艺植物上的应用 [J]. 广西园艺, 2008, 19 (3) : 62~64.
- [20] 谢华安, 王乌齐, 陈炳煥, 等. 超级杂交稻恢复系“航 1 号”的选育与应用 [J]. 中国农业科学, 2004, 37(11): 1688~1692.

(责任编辑: 林海清)