

云南元江普通野生稻群体 Wx 基因 $(CT)_n$ 重复序列和第 1 内含子 G/T 位碱基分析

孙一丁, 陆 辉, 许明辉

(云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所/云南省农业生物技术重点实验室/
农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223)

摘要: 对云南元江普通野生稻 90 个个体 Wx 基因区段内的重复序列 $(CT)_n$ 和第 1 内含子供体 +1 位碱基 G/T 分别进行了比较分析。结果表明云南元江普通野生稻 3 个居群中的 90 个单株在重复序列 $(CT)_n$ 和 G/T 位点纯合一致, 没有多态性; 其 G/T 位点碱基均为 G; 其重复序列 $(CT)_n$ 基因型与云南地方籼稻品种优势基因型相似但又有所区别。本研究结果为云南元江普通野生稻 Wx 基因利用和在稻种进化上的地位提供了信息。

关键词: 云南; 普通野生稻; Wx 基因; 微卫星重复序列; G/T 碱基; 遗传多样性

Genetic Diversity of Microsatellite Sequence $(CT)_n$ and Intron 1 G/T in Wx Gene of *O. rufipogon* Population in Yuanjiang of Yunnan Province

SUN Yi-ding, LU Hui, XU Ming-hui

(Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture /
The Key Laboratory of Biotechnology Research of Yunnan Province /
Institute of Biotechnology and Genetic Resources, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223)

Abstract: In the present study, the genetic diversity of microsatellite sequence $(CT)_n$ and intron 1 G/T in Wx gene were determined for 90 individuals in the natural population of *O. rufipogon* from Yuanjiang of Yunnan Province. In the loci of the microsatellite sequence $(CT)_n$ and intron 1st G/T in Wx gene, all of individuals from the natural population of wild rice in Yuanjiang were homogenetic, whose intron 1 G/T were base G, the band type of microsatellite sequence $(CT)_n$ was similar to one of the local *indica* cultivars from Yunnan.

Key words: Yunnan; *Oryza rufipogon*; Wx gene; Microsatellite sequence; Intron 1 G/T; Genetic diversity

蜡质基因(Wx)是控制水稻直链淀粉含量的主要遗传因子。从目前的研究来看,水稻直链淀粉含量与 Wx 基因第 1 内含子剪切点上游 55bp 处的一段 $(CT)_n$ 简单重复序列和第 1 内含子供体 +1 位的碱基有重要的关联。1994 年, Wang^[1] 等公布了对籼稻 Wx 基因序列分析的结果。1995 年, 英国的 Bligh 等^[2] 在该 Wx 核苷酸序列中发现了 1 段位于第 1 内含子剪切点上游 55bp 处的一段 $(CT)_n$ 简单重复序列, 据此设计了一对引物 484/485, 对该 CT

重复序列进行 PCR 扩增。大量的研究已证实不同水稻品种 $(CT)_n$ 标记和表观直链淀粉含量(AAC)存在显著相关性^[3-5], SSR 可以作为分子标记直接用于水稻品质的改良。进一步的研究显示蜡质基因第 1 内含子的剪接效率与第 1 内含子供体 +1 位的碱基是正常的 G 还是突变成 T 有关^[6-8]。若蜡质基因第 1 内含子供体 +1 位是正常的 G 碱基, 蜡质基因第 1 内含子能被正常剪接, 胚乳中直链淀粉含量就高; 碱基 G 突变成 T 后, 剪接效率低, 直链淀粉的合成水

收稿日期: 2011-09-01 修回日期: 2012-01-25

基金项目: 国家转基因重点项目(2011ZX08001-002); 云南省作物资源生物技术创新研究团队项目

作者简介: 孙一丁, 助理研究员。研究方向: 作物遗传育种

通讯作者: 许明辉, 研究员。研究方向: 作物遗传育种

平也降低。基于此,蔡秀玲等^[9]设计了可以检测水稻 *Wx* 基因第 1 内含子供体 +1 位碱基的 PCR-*AccI* 分子标记来研究籼稻品种的直链淀粉含量。毛兴学等^[10]又根据 PCR 扩增时引物 3'末端碱基与模板的匹配程度对扩增效率的影响而设计了 PCR 一步法,张娅丽等^[11]证实了该方法在资源鉴定中的作用。

云南元江是目前发现的海拔最高(780m)的普通野生稻分布点。元江普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)不仅是水稻育种的重要材料,而且为品种的起源、演变及分化的理论研究提供了物质基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

元江普通野生稻共 90 个个体,采集于云南省元江县红光农场分布点的 3 个主要自然居群,各个居群随机采集,每个采样点相距 3m 以上,以保证每个点采集的样品为 1 个单株,每个点采 1 片叶。

云南地方栽培品种大墨谷、长芒巴启、安南谷、接骨糯等为对照。

1.2 DNA 的提取

单株新鲜叶片提取 DNA,提取方法参考许明辉等^[12]改进的 CTAB 法,利用紫外分光光度计测定浓度 0.8% 琼脂糖检测 DNA 质量,用 TE 稀释至 10ng/μl 备用。

1.3 微卫星(CT)_n多态性检测

PCR 反应条件:采用 Bligh 等^[8]发表的引物序列 484/485,其序列分别为(5'→3')CTTTGTC-TATCTCAAGACAC 和 TTGCAGATGTTCTTCCT-GATG。PCR 反应采用 PTC-200 型热循环仪,在 0.2ml 离心管中进行。扩增反应物的总体积为 20μl,其中包括 1×PCR 缓冲液, Mg²⁺ 1.5mmol/L, dNTPs 0.2mol/L,引物各为 0.1ng/μl,水稻基因组 DNA 1.5ng/μl, Taq 酶 1 个单位(5U/μl)。反应程序为:95℃ 预变性 5min, 94℃ 模板 DNA 变性 30s, 55℃ 引物与模板靶位点结合 30s, 72℃ 引物沿模板延伸 1min, 35 个循环, 72℃ 延伸 7min。

PCR 扩增产物加入上样缓冲液,在测序电泳仪上用 8% 聚丙烯酰胺凝胶分离。DNA 染色采用银染法,按文献[13]方法染色,照相记录。与 4 个云南地方栽培品种典型带型比较。

1.4 *Wx* 基因第 1 内含子供体 +1 位碱基 G/T 检测分析

参考毛兴学等^[10]报道的 PCR 一步法。PCR 一步法是将引物 3'末端碱基设计为 G,如果模板链

DNA 相应位置是 C,那么扩增产物在琼脂糖电泳图上清晰可见;如果模板链 DNA 相应位置是 A,那么扩增产物在琼脂糖电泳图上只有模糊影子。引物序列为 5'-TCAGGAAGAACATCTGCAAGG-3' 和 5'-TCAGCCTAACCAAACATAACGAA-3',由上海生物工程公司合成。扩增产物在 3% 琼脂糖上电泳检测。以 IR36 作为 GG 型对照。

2 结果与分析

2.1 元江野生稻 *Wx* 基因微卫星(CT)_n多态性

利用引物 484/485 对元江普通野生稻 3 个居群共 90 个个体进行 PCR 扩增,并与云南地方栽培品种的 4 种 *Wx* 基因型相比较,其聚丙烯酰胺凝胶电泳结果如图 1 所示。云南地方栽培品种可归为 4 种带型(图 1),每种带型一般由 1 条染色浓黑的主带和 3 条附带组成(图 1 中 I~IV,主带下 1 条,主带上 2 或 3 条),主带扩增稳定清晰,附带有时不能清晰染色。元江普通野生稻与栽培稻一样由 1 条染色浓黑的主带和 3 条附带组成,每个个体的 PCR 扩增结果聚丙烯酰胺凝胶电泳条带都完全一致(图 1 中 1~12),没有多态性,说明元江普通野生稻整个群体 *Wx* 基因内该(CT)_n微卫星序列没有任何差异。与云南地方品种的 4 种带型相比,元江普通野生稻带型与云南地方品种的 II、III、IV 差异较大,而与栽培稻带型 I 相近,主带(箭头所示)分子量相近,但 3 条附带却不同,所以严格来讲,元江野生稻与云南栽培稻中的带型 I 也有区别。

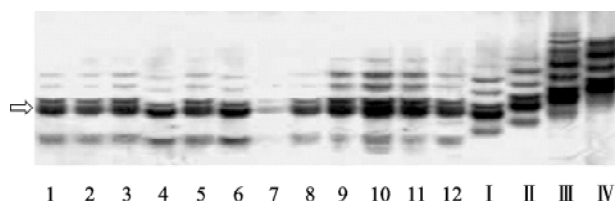


图 1 引物 484/485 对元江野生稻的 PCR 扩增电泳图

Fig. 1 Results of PCR amplification by 484/485

1~12 元江普通野生稻单株; I~IV 栽培稻典型带型:

I 大墨谷; II 长芒巴启; III 安南谷; IV 接骨糯

1~12 *O. rufipogon* Griff.; I~IV Patterns: I Damogu;

II Changmangbaqi; III Annangu; IV Jiegunu

2.2 第 1 内含子供体 +1 位碱基 G/T 多态性

应用 PCR 一步法对元江普通野生稻每个个体 DNA 进行 PCR 扩增,所有个体均可以扩增出一条清晰的带(图 2)。根据 PCR 一步法原理可以判定元江普通野生稻在 *Wx* 基因第 1 内含子供体 +1 位碱基均为 GG 型。

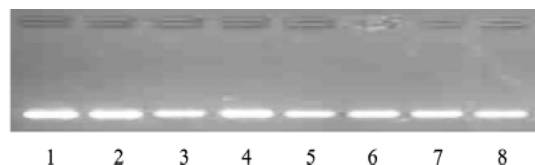


图2 PCR一步法对部分元江普通野生稻单株扩增产物琼脂糖电泳图

Fig.2 Results of PCR amplification by one-step PCR method

1~7 元江普通野生稻单株; 8: IR36(GG 型对照)

1~7: *O. rufipogon* Griff.; 8: TR36 (GG type)

3 讨论

云南元江是目前发现的海拔最高的普通野生稻分布点。Morishama^[14]认为元江普通野生稻是比较纯而原始的普通野生稻之一。李亚莉等^[15]利用 SSR 分子标记研究表明 89.47% 位点上个体间无差异,认为云南元江普通野生稻主体比较纯而原始。晏慧君等^[16]的研究中元江普通野生稻个体间差异小,聚为单独的一类。王美兴等^[17]研究认为云南省的普通野生稻几乎在所有的 SSR 位点上的基因多样性指数都是较小的,并不是个别位点造成的,而是在整个基因组上的基因多样性都较低。而杨庆文等^[18]对云南元江 3 个野生稻自然居群的研究表明,该分布点的平均遗传多样性指数为 0.52,3 个居群的遗传分化较明显,遗传分化系数高达 41.08%。本研究对 *Wx* 基因区段内的重复序列(CT)_n和第1内含子供体+1位碱基 G/T 分析表明在此两个位点上元江野生稻个体之间没有任何差异,说明云南元江普通野生稻 *Wx* 位点遗传上的一致性,也表明云南元江普通野生稻群体在该位点上较为纯合。

元江普通野生稻 *Wx* 基因重复序列(CT)_n带型与云南地方品种中的优势类型相似,而第1内含子供体+1位碱基 G/T 均是 G,这对元江普通野生稻是云南栽培品种的祖先之一产生了疑问。Hirano 等^[19]的研究发现普通野生稻和籼稻的 *Wx* 基因第1内含子供体+1位碱基都是 G,而粳稻是 T,认为粳稻的 *Wx* 基因是从普通野生稻 *Wx* 基因中分化而来。Olsen 等^[20]研究认为 *Wx* 基因第1内含子供体+1位碱基 G→T 突变是导致糯性性状产生的原因。李春^[21]的研究认为南亚、东南亚普通野生稻和籼稻亲缘关系最近,与粳稻亲缘关系较远,我国糯性突变来自广东、广西、海南 3 省,华南地区是我国栽培稻的起源中心。陈有桃^[22]也发现在广东和海南省有 4 份野生稻具有 T。本研究分析的元江普通野生稻第

1 内含子供体+1位碱基都是 G,而云南栽培稻品种中 19.51% 籼稻和 33.33% 的粳稻品种却发现了 T^[11]。黄燕红等^[23]分析了中国和东南亚、南亚的 96 份普通野生稻的 10 个酶位点的遗传多样性,发现中国和南亚是两个独立的稻作起源中心,元江普通野生稻和中国其他地区普通野生稻以及南亚、东南亚普通野生稻 *Wx* 基因位点变异情况如何,云南地方品种中的 T 突变从何而来,是外来还是野生稻驯化后发生突变而来,这需要对云南及周边、国内外更多地区的野生稻群体进行分析才可知,值得进一步的研究。

参考文献

- [1] Wang Z. Characterization of two transposon like elements in rice *Wx* gene[J]. Sci China Series B, 1994, 37: 437-447
- [2] Bligh H F J, Till R L, Jones C A, et al. A microsatellite sequence closely linked to the waxy gene of *Oryza sativa* [J]. Euphytica, 1995, 86: 83-85
- [3] Aryes N M, McClung A M, Park W D, et al. Microsatellites and a single nucleotide polymorphism differentiate apparent amylase classes in an extended pedigree of US rice germplasm [J]. Theor Appl Genet, 1997, 94: 773-781
- [4] 舒庆尧, 吴殿星, McClung A 等. 籼稻和粳稻中蜡质基因座位上微卫星标记的多态性及其与直链淀粉含量的关系 [J]. 遗传学报, 1999, 26(4): 350-358
- [5] 包劲松, 何平, 李仕贵. 异地比较定位控制稻米蒸煮食用品质的数量性状基因 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(5): 8-13
- [6] Cai X L, Wang Z Y, Xing Y Y, et al. Aberrant splicing of intron 1 leads to the heterogeneous 5'UTR and decreased expression of waxy gene in rice cultivars of intermediate amylose content [J]. Plant J, 1998, 14(4): 459-465
- [7] 程世军, 葛鸿飞, 王宗阳, 等. 在转基因水稻植株中蜡质基因第1内含子对基因表达影响的分析 [J]. 植物生理学报, 2001, 27(5): 381-386
- [8] Bligh H F J, Larkin P D, Roach P S, et al. Use of alternate splice sites in granule-bound starch synthase mRNA from low-amylose rice varieties [J]. Plant Mol Biol, 1998, 38: 407-415
- [9] 蔡秀玲, 刘巧泉, 汤述翥, 等. 用于筛选直链淀粉含量为中等的籼稻品种的分子标记 [J]. 植物生理与分子生物学报, 2002, 28(2): 137-144
- [10] 毛兴学, 肖昕, 陈建伟, 等. PCR 一步法检测水稻蜡质基因第一内含子剪接供体+1位碱基 [J]. 中国水稻科学, 2005, 19(3): 285-287
- [11] 张娅丽, 许明辉, 曾亚文, 等. 云南地方稻种 *Wx* 基因第一内含子供体+1位碱基变异与直链淀粉含量关系 [J]. 中国水稻科学, 2007, 21(1): 20-24
- [12] 许明辉, 郑明慧, 刘彦中, 等. 烟草品种 RAPD 分子标记多态性与品种鉴定 [J]. 种子, 1998(5): 23-25
- [13] Sourdille F G. Linkage between RFLP molecular markers and the dwarfing gene Rht-BL and Rht-D in wheat [J]. Hereditas, 1998, 25: 205-210
- [14] Morishama H. An observation of wild rice populations in Hainan and Yuanjiang, China [R] // Report of the National Institute Genetics (NIG). Mishima: NIG, 1992
- [15] 李亚莉, 杨晓曦, 赵丰萍, 等. 云南元江普通野生稻群体籼粳分化的 SSR 分析 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20(2): 137-140
- [16] 晏慧君, 付坚, 李俊, 等. 云南普通野生稻遗传多样性和亲缘关系 [J]. 植物学通报, 2006, 23(6): 670-676
- [17] 王美兴, 张洪亮, 张冬玲, 等. 中国普通野生稻 (*O. rufipogon* Griff.) 的地理多样性与分化 [J]. 科学通报, 2008, 53(22): 2768-2775

(下转第 654 页)

究结果相比,这3个彩色马蹄莲品种的染色体数目与 Yao 等^[14]完全一致,即都是二倍体且染色体数均为32条。染色体形态与上述的第2组也比较相似,3个品种的核型公式 $2n=2x=32=14m(2SAT)+2sm$, $2n=2x=32=14m+2sm$ 和 $2n=2x=32=1M+15m(1SAT)$ 表明除随体数目有差别外,其染色体同样仅具有中部或者近中部着丝点。其实,对当今世界上所栽培的大部分商业品种而言,它们多来自于彩色马蹄莲第2组内6个种间而不是组间杂交所选育出的园艺栽培种。结合试验用材料的生物学特性及核型分析,证实这3个新引进的品种同样属于组内杂交种。彩色马蹄莲组间杂种缺少的主要原因是因为两组间亲缘关系较远,存在严重的杂交障碍,如胚乳的衰退、胚败育和核质不兼容等^[15-16]。也正是因为如此,培育出能结合两组优点、具有花色丰富且抗病性强的新品种一直是目前彩色马蹄莲育种团体或个人的主要目标。鉴于荷兰是彩色马蹄莲育种强国以及当前所引进的3个品种均为2010年最新选育,彩色马蹄莲未来的主要育种目标仍将围绕两组间杂交种的选育及优良品种的推出作为重点的研究目标和方向。另外,依据本研究所检测的3个品种均为二倍体而不是多倍体这个情况,似乎反映出常规杂交仍然是目前彩色马蹄莲种的主要育种手段。20世纪末新西兰农业与食品研究院的 Cohen 等^[17]、Yao 等^[18]就率先开展彩色马蹄莲的倍性育种研究,虽然他们已经形成了较为成熟和完善的技术体系并且还获得多个三倍体以及四倍体杂交种,但是显然这种育种方式并没有被其他国家如荷兰所普遍应用和接受。当然,这还需要对更多的引进品种进行细胞核型检测来加以印证。但无论如何,这至少给我国起步较晚并且缺少育种材料的彩色马蹄莲育种研究工作提供了一个积极的信号,那就是多倍体育种前景广阔。所以,我国不少花卉研究单位将倍性育种特别是多倍体育种作为现在研究重点内容。一般,系统演化上处于比较古老或原始的植物,大多具有较对称的核型,而不对称的核型则常见于衍生的或进化较高级的植物中^[9,12]。因此核型进化的基本趋势是由对称向不对称方向发展。本研究对这3个品种的核型分析结果显

示其不对称系数较小并且还基本相似,分别为56.72%、56.25%和56.38%,而核型分类也全部相同,均为1A型,这些都表明这些彩色马蹄莲品种极为原始。根据人工选育能促进核型进化的观点。本研究认为尽管彩色马蹄莲已经历了一个多世纪的杂交育种,其仍有很大育种潜力有待激发与发掘。

参考文献

- [1] Letty C. The genus *Zantedeschia* [J]. Bothalia, 1973, 11(1-2): 5-26
- [2] Singh Y. Contributions to the systematic of the genus *Zantedeschia* Spreng. (Araceae) [M]. Pretoria: University of Pretoria, 1996: 169
- [3] 周涤, 吴丽芳. 马蹄莲研究进展 [J]. 中国农学通报, 2006, 22(9): 284-290
- [4] 邵果园, 梁国鲁. 黄色马蹄莲多倍体诱导研究 [J]. 浙江林学院学报, 2008(25): 630-634
- [5] 张锡庆, 吴红芝, 周涤, 等. 新型除草剂 Oryzalin 的浓度和处理时间对诱导彩色马蹄莲多倍体的影响 [J]. 云南农业大学学报, 2008(23): 806-810
- [6] 李洁筠, 吴红芝, 陈溪, 等. 彩色马蹄莲 $2n$ 配子育种技术初探 [J]. 中国农学通报, 2011, 27(6): 108-113
- [7] 吴红芝, 张锡庆, 郑思乡, 等. 彩色马蹄莲多倍体的诱导 [J]. 园艺学报, 2008, 35(3): 443-446
- [8] Zhang X Y, Wu Q Q, Li X L, et al. Haploid plant production in *Zantedeschia aethiopica* 'Hong Gan' using anther culture [J]. Sci Hort, 2011, 129: 335-342
- [9] Stebbins G L. Chromosome Evolution in Higher Plants [M]. London: Edward Arnold, 1971
- [10] 闫素丽, 安玉麟, 孙瑞芬. 内囊杂3号染色体核型分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(6): 784-788
- [11] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题 [J]. 武汉植物学研究, 1985, 3(4): 297-302
- [12] Levan A, Fredga K, Sandberg A A. Nomenclature for centromeric position on chromosomes [J]. Hereditas, 1964, 52(2): 201-220
- [13] Arano H. Cytological studies in subfamily *Carduoideae* of Japan IX [J]. Bot Mag, 1963, 76(5): 32-39
- [14] Yao J L, Rowland R E, Cohen D. Karyotype studies in the genus *Zantedeschia* (Araceae) [J]. South African J Bot, 1994, 60(1): 4-7
- [15] Yao J L, Cohen D, Rowland R E. Plastid DNA inheritance and plastome-genome incompatibility in interspecific hybrids of *Zantedeschia* (Araceae) [J]. Theor Appl Genet, 1994, 88(2): 255-260
- [16] Yao J L, Cohen D, Rowland R E. Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia* [J]. Plant Sci, 1995, 109(2): 199-206
- [17] Cohen D, Yao J L. *In vitro* chromosome doubling of nine *Zantedeschia* cultivars [J]. Plant Cell Tissue Organ Cul, 1996, 47(1): 43-49
- [18] Yao J L, Cohen D. Production of triploid *Zantedeschia* hybrids using embryo rescue [J]. New Zealand J Crop Hort Sci, 1996, 24(1): 297-301
- [19] 杨庆文, 戴陆国, 时津霞, 等. 云南元江普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 遗传多样性分析及保护策略研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 1-5
- [19] Hirano H Y, Eiguchi M, Sano Y, et al. A single base change altered the regulation of the *waxy* gene at the post-transcriptional level during evolution of rice [J]. Mol Biol Evol, 1998, 15: 978-987
- [20] Olsen K M, Purugganan M D. Molecular evidence on the origin and evolution of glutinous rice [J]. Genetics, 2002, 162: 941-950
- [21] 李春. 东南亚普通野生稻与亚洲栽培稻的遗传多样性及其相互关系 [D]. 南昌: 南昌大学, 2008
- [22] 陈有桃. 中国稻种资源 *Waxy* 基因多样性研究 [D]. 北京: 中国农业科学院, 2010
- [23] 黄燕红, 才宏伟, 王象坤. 亚洲栽培稻分散起源的研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(3): 185-190

(上接第649页)