

谷类作物半粒种子的 PCR 分析 及其在标记辅助选择育种中的应用

翟文学 陆朝福 朱立煌

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

杨文才 赵开军

(中国农业科学院作物育种栽培研究所 北京 100081)

摘要 建立了适于种子 DNA 分析的快速简便的 PCR 方法。水稻、小麦和玉米的半粒种子用提取缓冲液处理,产生的提取液可用于 PCR 和 RAPD 分析。水稻半粒种子的 DNA 和来自叶片的 DNA 用专一的 PCR 引物扩增后可以产生同样的 PCR 产物。含有胚的另半粒种子可以正常发芽。将半粒种子的 PCR 分析方法用于水稻白叶枯病抗性基因型的鉴定,证明是植物育种和遗传学研究中一种非常实用的方法。

关键词 PCR, 半粒种子, RAPD, 标记辅助选择

聚合酶链反应(PCR)作为分子生物学中的一种基本技术已广泛用于临床诊断中^[1,2]。PCR 技术的最大优点在于只需极少的生物材料作模板,快速地分析各种 DNA 样品^[3~6]。将 PCR 扩增用于分析大量植物群体时,最大的限制因素是 DNA 提取过程的耗时与费力。通常植物组织 DNA 的提取要比动物细胞复杂得多^[7],虽然最近发表了几篇从植物组织中快速提取 DNA 的方法,但多数方法都需要研磨以及采用多种化学试剂,所有方法都需要来自植物的组织^[8~11]。为了解决这些问题,Chunwongse J. 等首先发展了半粒种子 PCR 扩增方法^[12]。我们从实用出发,发展了半粒种子 RAPD 分析,并且研究了半粒种子 PCR 在基因型鉴定中的实际应用。

利用分子标记进行基因型鉴定是作物育种和遗传研究中经常遇到的一个问题^[13]。对个体进行基因型鉴定筛选,可以加速选种和育种的过程。在种子时期进行基因型鉴定比苗期筛选更能提高育种效率。我们利用与水稻白叶枯病抗性基因 Xa21 连锁的分子标记,在种子时期对白叶枯病抗性进行选择,作为半粒种子 PCR 分析在标记辅助选择中的应用示范。已知水稻白叶枯病是由 *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* 引起的细菌性病害^[14]。Xa21 是一个对白叶枯病具有广谱抗性的显性基因,该基因已被成功地转移到水稻栽培品种中^[15],定位在第 11 染色体上并与分子标记 RAPD248 紧密连锁^[16]。因此可以利用根据 RAPD248 序列设计的一对引物 B₇ 和 B₈^[16],通过半粒种子的 PCR 分析对 Xa21 抗性进行选择。

1 材料与方法

1.1 植物材料与菌系

国家高技术“863”项目。

本文于 1995 年 5 月 29 日收到。

建立半粒种子 PCR 和 RAPD 分析方法所用的材料是水稻金刚 30, 小麦京冬 1 号和玉米紫 24。基因型鉴定所用材料是水稻白叶枯病抗性品系 IRBB21 与感病品种金刚 30 杂交的 F_3 代。

白叶枯病接种实验采用的菌系是与抗性基因 Xa21 相对应的 P_0 。

1.2 半粒种子的处理

整粒种子对等切成两部分, 参照 Chunwongse J 方法^[12], 胚乳部分放入 1.5ml 离心管中, 加入 200 μ l PCR 缓冲液, 其中含 10mmol/L Tris.HCl pH9.0, 50mmol/L KCl, 1.8mmol/L $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100 0.45% NP-40, 0.45% Tween-20 和 40 μ g 蛋白酶 K。50℃至 55℃保温 1h, 快速离心, 100℃加热 5min, 离心, 上清液可用于 PCR 分析。带有完整胚的部分在室温下保持干燥, 用于发芽。

1.3 PCR 扩增

特异 PCR 扩增的引物 B_7 和 B_8 是根据基因组克隆 RAPD248 序列设计的^[16], 序列为:

B_7 : 5'd [AGACGCGGAAGGGTGGTTCCCCGGA] 3',

B_8 : 5'd [AGACGCGGTAATCGAAAGATGAAA] 3'。

这对引物已用于用叶片 DNA 进行的白叶枯病抗性分析中^[17]。

取水稻半粒种子提取液 10~20 μ l 用于 50 μ l PCR 反应, 其中含 10mmol/L Tris. HCl pH 9.0, 50mmol/L KCl, 1.8mmol/L $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 每种 dNTP 200 μ mol/L, 每一引物 50pmol, Taq 酶 2 单位。PCR 反应在 PE-480 或 PE-9600 热循环仪上进行, 反应条件为 94℃ 1min, 60℃ 1min, 72℃ 2min, 35 个循环。PCR 产物在 1.4% 的琼脂糖凝胶上, 用 1 倍 TBE 作电泳缓冲液, 80 伏电泳 4h, EB 染色后, 在紫外灯下观察或照像。

1.4 RAPD 分析

RAPD 分析所用引物为 Operon 公司 10 碱基寡核苷酸引物。实验方法参照 Williams 方法^[18]进行。取半粒种子 DNA 提取液或稀释液 1 μ l 用于 25 μ l RAPD 反应, 其中含 10mmol/L Tris. HCl pH9.0, 50mmol/L KCl, 2.0mmol/L $MgCl_2$, 0.1% Triton X-100, 每种 dNTP 100 μ mol/L, RAPD 引物 15ng, Taq 酶 2 单位。反应体系于 94℃ 变性 5min, 再以 94℃ 1min, 36℃ 1min, 72℃ 2min 进行 45 个循环, 最后于 72℃ 保温 5min。整个过程在 PE-480 热循环仪上进行。RAPD 产物的电泳分析同上。

1.5 半粒种子的发芽

将含有胚的半粒种子放入发芽盘内加入适量的水或 0.1% 的多菌灵溶液, 放进 18~32℃ 的培养箱内浸泡 12~24h, 然后将温度升高 3~5℃, 催芽 36~48h, 待种子萌芽 (芽长 0.2~0.5cm) 后, 再将种子播种到温室或大田, 让其生长。不同作物半粒种子的发芽条件详见表 1。

表 1 3 种作物半粒种子的发芽条件与结果

Table 1 Germinating conditions and results of half-seeds of rice, wheat and maize

Crop	Seed soaking temperature/℃	Seed soaking time/h	Germinating temperature/℃	Germinating time/h	Survival rate of half-seeds/%	Survival rate of whole seeds/%
Rice	30~32	18~24	32~35	36~48	87	95
Wheat	18~20	6~12	20~22	36~48	93	95
Maize	25~28	18~24	30	36~48	100	100

1.6 白叶枯病的抗病鉴定

将随机取样的 F_3 代种子经半粒种子 PCR 分析及催芽处理后种植在温室或大田中, 待植株长至分蘖盛期用剪叶法接种。白叶枯病菌种保存于低温冻干状态, 使用前一个月进行复壮、毒性测定。接种物的菌龄为 2d, 接种浓度为 $10^9/\text{ml}$ 。接种 15d 后发病情况趋于稳定, 此时调查各亲本和 F_3 个体植株的感病性。本研究将病斑面积在 20% 以下的记为抗病 (R), 20% 以上的记为感病 (S)。

2 结果与讨论

2.1 半粒种子 DNA 提取

水稻、小麦和玉米种子具有一定的大小, 其中胚乳占据了结构的绝大部分, 胚位于种子的一端, 便于进行切割操作。半粒种子提取的 DNA 主要来自胚乳。胚乳细胞经上述含蛋白酶 K 的提取缓冲液处理后能够释放出 DNA, 半粒种子产生的 DNA 的一部分足够用 PCR 或 RAPD 方法分析 (图 1, 图 2)。蛋白酶 K 对 DNA 的提取是必需的。如果不加蛋白酶 K, 获得的 DNA 将很少。含有蛋白酶 K 的提取液可在 -20°C 贮存。用这种方法处理了 600 多粒三种作物的种子, 几乎全部样品都获得成功。个别样品 (不到 5%) 没能获得足以分析的 DNA, 可能是种子不饱满或切割时胚乳部分取样太少。如果种子经过挑选并精心操作, 将会增加成功的比例。我们还用这种方法处理了马尾松的种子也获得了成功 (另文发表)。上述结果表明, 这种提取 DNA 的方法是快速实用的。

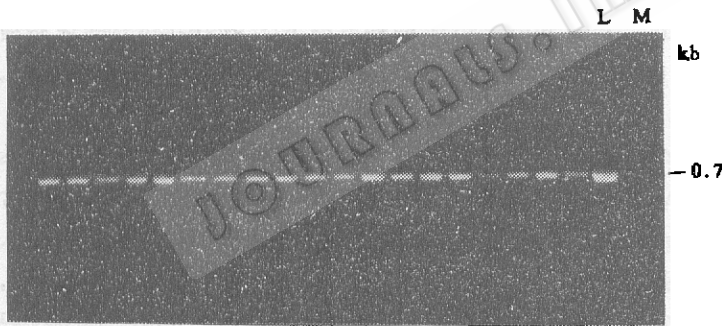


图 1 水稻金刚 30 DNA 的 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification of DNAs from the rice line Jingang 30

Primers B_7 and B_8 were used in the reactions

L. Templet DNA isolated from leaves, M. molecular weight markers (pBR328 DNA/Bgl I-Hinf I), others were 19 template DNAs from half-seeds.

2.2 半粒种子的 PCR 分析和 RAPD 分析

用水稻金刚 30 种子作材料提取 DNA, 用 B_7 和 B_8 作引物进行 PCR 扩增, 同时扩增来自叶片的 DNA, 图 1 显示了随机取样的 19 粒金刚 30 的种子 DNA 样品及叶片 DNA 样品的扩增结果。结果表明半粒种子 DNA 样品的扩增产物基本是均匀一致的。另外每一 PCR 反应需用 $10\mu\text{l}$ 提取液, $200\mu\text{l}$ 提取液就可进行 20 次反应, 因此可对同一样品进行多种遗传分析。

用 Operon 随机引物对半粒种子 DNA 样品进行 RAPD 分析 (图 2)。结果表明三种作

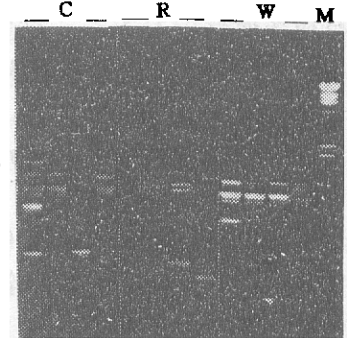


图 2 3 种作物半粒种子 DNA 的 RAPD 分析

Fig. 2 RAPD analysis of DNAs from half-seeds of rice, wheat, and maize.

C. Maize DNAs, R. Rice DNAs, W. wheat DNAs, M. Molecular weight markers (λ -DNA/Hind III).

物的 DNA 样品都能给出清晰的带型。RAPD 已被用于作物抗病品系的分析^[19], 半粒种子的 RAPD 分析在此方面有更大的优越性。由于每一 RAPD 反应所用提取液很少 (1 μ l 或 0.25 μ l), 每一提取液可以进行几百次 RAPD 反应, 这就使我们能够在短时间内, 利用已知群体快速构建 RAPD 图谱。

2.3 半粒种子的发芽出苗

将 3 种作物带有完整胚的半粒种子进行发芽出苗实验, 同时与整粒种子比较, 结果见表 1。3 种作物的半粒种子的发芽条件略有不同, 半粒种子的出芽率与整粒种子差不多, 几乎为 100%。半粒种子出芽后移栽到土壤中的成活率比整粒种子略低, 3 种作物略有差异, 这并不影响这种技术在生产上使用。实验中发现, 部分半粒种子的幼苗在移栽后从根部发生霉烂, 逐渐死亡, 可能是半粒种子受到真菌侵染, 特别是水稻在温室水池中栽苗更易发生这种情况。如果用多菌灵一类的杀菌剂处理, 可能有助于提高成活率。在室外大田栽苗, 幼苗受菌侵染的可能要小得多。另外还发现水稻去壳半粒种子的发芽比不去壳的快。玉米半粒种子苗的成活率与长势与整粒种子一样, 可能与玉米种子大胚乳多有关。

2.4 水稻白叶枯病抗性基因型的鉴定

将随机取样的 IRBB21 与金刚 30 杂交获得的 F₃ 种子, 用 B₇ 和 B₈ 一对引物进行半粒种子 PCR 分析 (图 3), 同时将含有完整胚的半粒种子发芽种植。植株的编号与 PCR 反应的编号一一对应。待植株长到分蘖期进行白叶枯病接种实验, 检验植株对白叶枯病的抗感。在温室条件下, 我们分析了 50 个 F₃ 植株, 其 PCR 结果与抗感分析结果见表 2。在 F₃ 群体中, PCR 分析有 3 种带型, 分别是与抗性亲本 IRBB21 相同的带型 (抗性纯合型 I), 与感病亲本金刚 30 相同的带型 (感病纯合型 J) 和同时出现双亲条带的带型 (抗性杂合型 IJ)。白叶枯病抗感分析中只有抗病和感病两种情况。PCR 结果与抗感分析结果基本符合, 证明利用分子标记在种子时期对白叶枯病抗性进行选择是可行的。有 1 个植株例外可能是接种或观察误差造成。

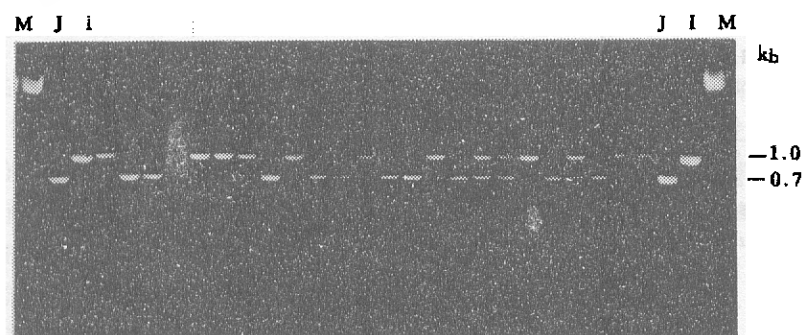


图 3 金刚 30/IRBB21F₃ 群体半粒种子的 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of half-seeds from F₃ populations of Jingang 30/IRBB21

Primers B₇ and B₈ were used in the reactions

J. Jingang 30 DNAs from leaves, I. IRBB21 DNAs from leaves,

M. Molecular weight markers (BRL 123 Ladder), others were 24

DNAs from half-seeds of F₃ populations.

表 2 金刚 30/IRBB21F₃ 群体半粒种子 PCR 分析与白叶枯病抗感分析比较Table 2 Comparision between PCR analysis of half-seeds and bacterial blight resistance of Jingang 30/IRBB21F₃ populations

PCR analysis		Phenotype analysis	
Band pattern	Individuals	Resistant individuals	Susceptible individuals
I	33	32	1
IJ	23	23	0
J	34	0	34

2.5 半粒种子的 PCR 分析在育种和遗传学研究中的应用

半粒种子的分析已用来分析种子时期的性状以及某些酶的活性^[20]。与这种分析不同,半粒种子的 PCR 分析可用来分析基因组的任何 DNA 序列,包括与重要农业性状相连锁的位点以及数量性状位点 (QTL)。另外,由于每半粒种子的提取液可以进行 10 至 20 次 PCR 反应,这就可能同时分析基因组的多个位点。

半粒种子的 PCR 分析过程简单,操作方便,如果与不用电泳的 PCR 产物的直接检测方法^[5]结合,更有可能在短时间内处理大量种子,对生产上应用更为有利。育种者可以先对所要的基因型进行筛选,然后再进行发芽。

半粒种子的 PCR 在基因组作图中非常有用。由于每一提取液可进行几百次 RAPD 反应,因此可以用已知群体的种子快速构建 RAPD 图谱。也可以用这种方法构建品种的指纹图谱,研究品种的分化与亲源关系。在构建精细遗传图谱时,用这种方法快速筛选大量的分离群体在很小的遗传图距内寻找交换事件也是非常有效的。

致谢 章 琦、王春莲、赵显锋和王亚非同志参加了部分工作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1] Saiki R K *et al.* Science, 1985, **230**: 1350~1354.
- [2] Kazzazian H H. PCR Technology, (1989), 153~169.
- [3] Li H *et al.* Nature, 1988, **335**: 414~417.
- [4] Higuchi R *et al.* Nature, 1988, **332**: 543~546.
- [5] Higuchi R *et al.* Bio/Technology, 1992, **10**: 413~417.
- [6] Mercier B *et al.* Nucleic Acides Res, 1990, **18**: 5908.
- [7] 徐吉臣等. 遗传学报, 1994, **21** (3): 205~214.
- [8] Edwards K *et al.* Nucleic Acids Res, 1991, **19**: 1349.
- [9] Berthoumieu P, Meyer C. Plant Mol Biol, 1991, **17**: 555~557.
- [10] Langridge U *et al.* Nucleic Acids Res, 1991, **19**: 6954.
- [11] Heng Z *et al.* Nucl Acids Res, 1993, **21**: 5279.
- [12] Chunwongse J *et al.* Theor Appl Genet, 1993, **86**: 694~698.
- [13] Tanksley S D *et al.* Bio/Technology, 1989, **7**: 257~264.
- [14] 章 琦, 中国农业科学, 1991, **24** (3): 26~36.
- [15] Khush G S *et al.* Rice Genet Newsl, 1990, **7**: 121~122.
- [16] Ronald P C *et al.* Mol Gen Genet, 1992, **236**: 257~264.
- [17] 陆朝福等. 遗传学报, 1996, **23** (2): 110~116.
- [18] Williams J G K *et al.* Nucl, Acids Res, 1990, **18**: 6531.

[19] Mao Long *et al.* Chinese Science Bulletin, 1995, 40 (7): 591~594.

[20] Tiwari A S *et al.* Genome, 30 [supplle]: 464.

PCR Analysis of Half-seeds of Cereal Crops and Its Application in Marker-assisted Selection and Breeding

Zhai Wenxue Lu Chaofu Zhu Lihuang

(*Institute of Genetics, Academia sinica, Beijing 100101*)

Yang Wencai Zhao Kaijun

(*Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081*)

Abstract A simple and rapid PCR method were established in analyzing DNAs of seeds. Half-seeds of rice, wheat and maize were treated with an extraction buffer. The resulting supernatants were used in PCR and RAPD reactions. Identical PCR products were amplified with specific primers using either the half-seed DNA extracts or leaf tissue DNA extracts as templets. The remnant half-seeds with embryo could germinated nomally. PCR analysis of half-seeds were used in identification of bacterial blight resistance of rice and proved to be useful in plant breeding and genetics studies.

Key words PCR, half-seeds, RAPD, marker-assisted selection