

# 高州普通野生稻苗期耐寒性鉴定 及其 SSR 多态标记分析

王 兰,蔡东长

(华南农业大学 广东省植物分子育种重点实验室,广东 广州 510642)

**摘要:**水稻苗期寒害是引起水稻产量下降的主要因素之一。高州普通野生稻具有丰富的遗传多样性,可能蕴含苗期强耐寒基因。本研究通过苗期耐寒性鉴定,初步鉴定出2个编号(GZW5、GZW18)的高州普通野生稻具有苗期强耐寒性。利用平均分布于水稻12条染色体的225对SSR标记,对耐寒的高州普通野生稻与对照水稻不耐寒品种三百粒之间进行多态性筛选,共筛出83对引物具有SSR标记的多态性,多态率为36.9%。这些多态标记在第5、10、12号染色体上的标记数较少,分别只有4、3、4对,其他染色体的标记数较多且分布均匀。进一步通过构建高州普通野生稻与水稻品种三百粒杂交的分离群体,并通过具有多态的SSR标记检测 $F_2$ 分离群体,发现分子标记在 $F_2$ 中出现明显的分离,判断这些标记可能与耐寒基因连锁。研究结果为高州普通野生稻苗期耐寒基因的定位及其耐寒分子机制的研究提供基础。

**关键词:**普通野生稻;高州;苗期;耐寒;SSR标记

中图分类号:S511.03 文献标识码:A 文章编号:1000-7091(2011)06-0012-04

## Detection on Cold Tolerance and Analysis on Polymorphic SSR in *Oryza rufipogon* Griff. Indigenous to Gaozhou, Guangdong

WANG Lan, CAI Dong-chang

(Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South  
China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Cold damage at seedling stage is one of the major factors for reducing the rice products. Gaozhou wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) possesses abundant genetic diversity, and perhaps which carries some strong cold-tolerant genes. In this study, cold-tolerant ability was detected at seedling stage in Gaozhou wild rice, and of which two numbers (GZW5 and GZW18) was identified to have strong cold-tolerant ability. Then the polymorphism markers were screened between Gaozhou wild rice with strong cold resistance and its control Sanbaili with cold sensitive by using 225 simple sequence repeat (SSR) markers even distributing on 12 pairs of chromosomes in rice. A total of 83 pairs of SSR markers were identified to have polymorphism, and the polymorphic ratio was 36.9 percent. These polymorphic markers distributed equally on the chromosomes in rice except the chromosome 5, 10 and 12, which only of 4, 3 and 4 polymorphic markers, respectively. The hybrid  $F_1$  was constructed between Gaozhou wild rice and Sanbaili, and the genotype of its  $F_2$  individuals was investigated using some of the polymorphism markers, and in  $F_2$  groups these markers generated obviously separation, so we predicted these markers may be linkage with some cold tolerant genes. Our results will provide a basis for mapping the cold-tolerant genes at seedling stage in Gaozhou wild rice and researching further the molecular mechanism of their actions.

**Key words:** *Oryza rufipogon* Griff.; Gaozhou; Seedling stage; Cold tolerance; SSR markers

水稻属于喜温作物,我国南方早春的倒春寒常常引起早稻烂秧死苗、出苗不整齐和弱苗,而晚秋

收稿日期:2011-10-08

基金项目:国家自然科学基金青年基金项目(30800597);广东省自然科学基金博士启动项目(8451064201001015);教育部博士点基金(20094404120018);国家公益性行业(农业)科研专项(201003021)

作者简介:王 兰(1975-),女,湖南洞口人,讲师,博士,主要从事水稻分子遗传学研究。

寒露风则造成晚稻结实率下降,严重时颗粒无收。因此低温引起的水稻寒害是水稻生产中亟待解决的问题。培育耐寒性强的水稻品种,是防御低温的有效措施之一。

随着现代分子育种技术的发展,迄今,一些水稻育种家通过分子标记辅助育种,已选出一些耐寒性强的品种<sup>[1-2]</sup>,但目前的研究还主要集中在对粳稻耐寒基因源的耐寒基因定位<sup>[3-5]</sup>,对野生稻耐寒基因的定位研究很少,而野生稻中存在丰富的耐寒基因。

广东省高州普通野生稻(以下简称为高州野生稻)是目前广东境内分布面积最大的野生稻,面积为 17.3 hm<sup>2</sup><sup>[6]</sup>。高州市位于广东省西南部(东经 110°36′46″~111°22′44″,北纬 21°42′34″~22°18′49″),地处亚热带和北热带的过渡地带,属亚热带季风暖湿气候<sup>[7]</sup>。该地区早春最低气温为 -1.5℃<sup>[8]</sup>,此时,高州野生稻正处于生长的苗期,由此可知,高州野生稻可能具有很强的苗期耐寒性。

SSR(Simple sequence repeat),又称微卫星(Microsatellite)DNA,是一类由 1~6 个碱基组成的基序(Motif)串联重复而成的 DNA 序列,如(CA)<sub>n</sub>、(AT)<sub>n</sub>、(GGC)<sub>n</sub>、(GATA)<sub>n</sub>等重复(<sub>n</sub>指重复次数,为 10~60),它们广泛分布于基因组的不同位置。根据微卫星两端相对保守的单拷贝序列设计引物,可扩增出该位点的微卫星序列,经过电泳分离,可显示不同基因型个体的微卫星位点的多态性。

本研究旨在对高州野生稻的苗期耐寒性进行进一步鉴定,并用不耐寒的三百粒<sup>[9]</sup>为母本,高州野生稻为父本,构建苗期耐寒基因定位群体 F<sub>2</sub>,利用已开发的 225 对水稻 SSR 标记,对亲本高州野生稻、三百粒之间进行 SSR 多态标记筛选,以期为高州野生稻苗期耐寒基因定位和耐寒分子机制研究提供基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 水稻材料

2002 年按居群从广东省高州市的 6 个地点选取普通野生稻,共 141 个单茎(编号分别为 GZW1、GZW2、……、GZW141),种植在华南农业大学野生稻核心收集圃,各单株每年均自然越冬、无性繁殖。本试验所用的杂交父本来自华南农业大学野生稻核心收集圃的高州野生稻 GZW5 和 GZW18,母本来自中国农业大学水稻核心种质资源库的粳稻三百粒<sup>[9]</sup>,构建杂种 F<sub>1</sub> 及分离群体 F<sub>2</sub>。

### 1.2 高州野生稻的耐寒性鉴定

将高州野生稻与寒极端敏感品种三百粒的杂种

F<sub>2</sub> 分离群体种植在小纸盒中,并以三百粒为对照。水稻幼苗长到二叶一心时,转移到光照培养箱(宁波莱福,型号 PGX-330A-12H)中进行低温处理,5℃处理 11 d,每天光照 12 h,光强 12 000 lx,然后恢复生长 10 d,鉴定 F<sub>2</sub> 分离群体的抗寒性。如果分离群体中存在抗寒能力极强的植株,即说明高州野生稻具有苗期抗寒性。

### 1.3 PCR 引物

本实验室根据已开发的水稻 SSR 标记<sup>[10]</sup>,选取 225 对,约每 5 cM 一对,平均分布于水稻的 12 条染色体上,送上海生物工程技术服务公司合成。

### 1.4 SSR 标记分析

水稻总 DNA 的提取参照 Zheng 等<sup>[11]</sup>的简易 SDS 提取法,稍作修改。分别取各试验材料的幼嫩叶片提取水稻总 DNA,作为 PCR 扩增的模板。每个 PCR 反应液(20 μL)组成为:1 × PCR Buffer,0.2 mmol/L dNTPs,1 U Taq 酶,250 nmol/L 每种引物,1 μL 模板 DNA。PCR 反应在 My Cycler(BioRad)热循环仪上进行。反应程序为:94℃ 预变性 3 min,扩增 35 个循环,每个循环 94℃ 20 s,55~58℃ 30 s,72℃ 30 s;最后 72℃ 1 min。

PCR 扩增产物通过 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,银染检测试验结果,具体方法参照王兰等<sup>[12]</sup>的检测方法。用凝胶成像仪(BioRad)或数码相机拍照并记录试验结果。

## 2 结果与分析

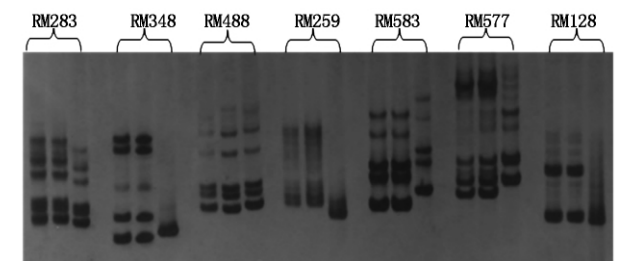
### 2.1 高州野生稻的耐寒性鉴定

所鉴定的高州野生稻来源于广州市华南农业大学野生稻核心收集圃,广州市每年 1~2 月的温度均很低,2011 年 1 月广州市出现 8 d 5℃ 以下的低温,最低温度为 2.6℃(资料来源于广州市气象局)。在这种条件下,高州野生稻能自然越冬,无性繁殖,说明高州野生稻可能含有苗期耐寒基因。本研究利用本实验室筛选出的寒极端敏感品种三百粒<sup>[9]</sup>为母本,高州野生稻为父本进行授粉杂交,获得杂种 F<sub>1</sub>。为了鉴定高州野生稻的苗期耐寒性,利用光照培养箱对 F<sub>1</sub> 自交后的分离群体 F<sub>2</sub> 进行苗期低温处理,5℃ 低温处理 11 d,再恢复生长 10 d。恢复生长后,在 F<sub>2</sub> 分离群体中,大部分植株死亡,有几株的叶子很绿,生长正常,这些植株具有极强的苗期耐寒性,而对照母本三百粒原种的植株全部死亡,研究结果表明所授粉的高州野生稻具有苗期耐寒性。

### 2.2 高州野生稻与三百粒之间 SSR 多态标记的筛选

由于高州野生稻单株每个分蘖开花非常不整

齐,花药外露,花粉很少,因此,选用2个单株的高州野生稻(编号为GZW5、GZW18)的花粉授粉。选用父本GZW5、GZW18的叶片与母本三百粒的叶片作为试验材料,利用分布在水稻12条染色体上的225对SSR标记对亲本进行多态筛选。如果父本GZW5、GZW18与母本三百粒的电泳带不在同一水平位置,说明他们之间存在多态,反之,即不存在多态(图1)。检测结果表明:139对标记在三百粒和高州野生稻之间存在多态,多态率为61.8%。



1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3 1 2 3  
RM283、RM348、RM259、RM583、RM577 和 RM128 在高州野生稻和三百粒之间存在多态性, RM488 在高州野生稻和三百粒之间不存在多态性。1. GZW5; 2. GZW18; 3. 三百粒。

Above of the markers have polymorphism between Gaozhou wild rice and Sanbaili except RM488. 1. GZW5; 2. GZW18. 3. Sanbaili.

图1 SSR标记检测高州野生稻和三百粒之间的多态性

Fig.1 Polymorphism between Gaozhou wild rice and Sanbaili was detected by using SSR markers

采用多个高州野生稻单株作为父本授粉,但在长期进化过程中,各单株之间的基因型可能出现一些差异。为进一步鉴定筛选出的有多态的标记,利用初步筛出的139对多态标记对三百粒/高州野生稻的杂种 $F_1$ 与三百粒之间进行再次多态筛选。结果表明:初步筛出的139对多态标记有83对仍然具有多态性,多态率为36.9%。

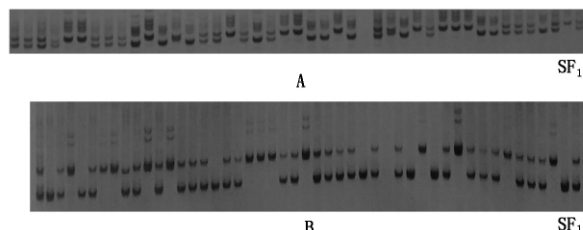
### 2.3 多态性SSR标记检测 $F_2$ 群体

为了验证所选出的多态标记在群体中是否可用,随机抽出其中的11对多态标记(PSM377、PSM379、PSM102、RM104、RM571、RM175、RM282、RM489、RM401、RM349和RM564)分别检测三百粒/高州野生稻杂种 $F_1$ 的 $F_2$ 分离群体103株,检测结果表明: $F_2$ 分离群体的带型清晰,带型判断简单易行,准确可靠;且有杂合型与亲本基因型的分离(图2)。由此判断,所检测出的多态标记可能与苗期抗寒基因连锁,可以用于水稻苗期耐寒基因定位。

### 2.4 多态性SSR标记分析

筛选了225对分布于水稻12条染色体的SSR标记,其中83对对三百粒和高州野生稻之间存在多态性,多态率为36.9%。这些多态标记在水稻12条染色体上均有分布,其中第4、9号染色体的多态率最高,均为47.4%;第10号染色体的多态率最

低,为15.0%(表1)。结果表明:除第5、10、12号染色体的多态标记数较少外,其余染色体各标记数分布均匀,可以用于水稻苗期耐寒基因的定位和与耐冷基因连锁分子标记的分析。



F<sub>1</sub>: 三百粒×高州野生稻的杂交种; S: 三百粒; 其他均为 $F_2$ 群体。  
F<sub>1</sub>: Cross-breed of Sanbaili and Gaozhou wild rice; S: Sanbaili;  
The others were  $F_2$  plants.

图2 RM571、RM489检测 $F_2$ 群体的基因型

Fig.2 Genotyping of the  $F_2$  population using RM571 and RM489

表1 多态性SSR标记分析

Tab.1 Analysis on the polymorphism SSR markers

染色体 Chromosome	总检测标记数/对 Numbers of all the detected markers	多态性标记数/对 Numbers of the polymorphism markers	多态率/% Polymorphic ratio
1	17	8	47.1
2	19	8	42.1
3	20	8	40.0
4	19	9	47.4
5	19	4	21.1
6	19	8	42.1
7	20	7	35.0
8	18	7	38.9
9	19	9	47.4
10	20	3	15.0
11	20	8	40.0
12	15	4	26.7

## 3 讨论

高州野生稻是广东普通野生稻的遗传多样性中心,也可能是中国普通野生稻最大的一个遗传多样性中心<sup>[13]</sup>。高州野生稻蕴含丰富的抗病、抗虫、抗寒、耐瘠薄等优良基因<sup>[13,14]</sup>,挖掘、利用高州野生稻的有利基因,对水稻遗传研究和育种具有深远的意义。但是,目前,对高州野生稻有利基因研究的报道很少。本研究利用光照培养箱低温处理(5℃处理11d,室温恢复生长),鉴定出高州野生稻中的GZW5和GZW18单株具有很强的苗期抗寒性。研究结果为利用高州野生稻的抗寒性提供理论依据。

随着分子生物技术的发展和水稻基因组测序工作的完成,单纯通过PCR技术进行基因定位已成为

可能。SSR 标记是一类以 PCR 技术为基础的 DNA 标记,在水稻基因组中分布极其丰富,目前,可利用的标记达 3 000 多个。Li 等<sup>[15]</sup>利用计算机搜索了粳稻品种日本晴 4 号染色体的序列,发现有 1 844 个 SSRs,平均每 18.8 kb 有 1 个 SSR。SSR 标记还具有共显性、重复性好、稳定可靠等优点,且操作简便、快速。因此,SSR 标记已广泛应用于分子标记连锁图谱的构建、基因定位和分子标记辅助育种等方面的研究<sup>[16,17]</sup>。本研究通过对高州野生稻与三百粒之间进行 SSR 多态标记筛选,从平均分布于水稻 12 条染色体的 225 对标记中获得 83 对具有多态的标记,多态率为 36.9%,较东乡野生稻和桂朝 2 号间 SSR 的多态率高(约 30%)<sup>[18]</sup>。且这些多态标记除第 5、10、12 号染色体标记数较少,其他染色体的标记数分布均匀。利用其中的 11 对标记对  $F_2$  分离群体进行检测,在  $F_2$  中,有杂合型与亲本基因型的分离,说明这些标记可能与高州野生稻苗期耐寒基因连锁。因此所筛选的这些多态标记完全能够满足水稻苗期抗寒基因定位和连锁标记分析。

目前,对于水稻苗期耐寒的研究不少,但大多都是生理方面的研究<sup>[19-21]</sup>,分子方面的研究主要是 QTL 定位及其遗传分析方面<sup>[3,4,22-24]</sup>,并且研究材料也多是粳稻或东乡野生稻,未见有报道苗期抗寒基因的克隆。本研究利用高州野生稻,构建苗期抗寒基因定位群体,筛选出亲本间有多态的 SSR 标记,利用这些多态标记可以进行高州野生稻苗期耐寒基因的定位与克隆,进而把高州野生稻的苗期耐寒基因转移到栽培稻中,克服水稻苗期寒害,为水稻抗寒育种提供依据。

致谢:试验得到本实验室刘向东教授、陈志雄副研究员、俞淑红老师的帮助,在此表示感谢。

#### 参考文献:

- [1] 王际凤,王 锦,涂 丹. 高蛋白高产多抗杂交水稻新组合汕优联合 2 号的选育[J]. 西南农业学报, 2004, 17(1): 19-21.
- [2] 向关伦,黄宗洪,杨占烈,等. 耐寒抗病杂交水稻黔优 18 的选育及栽培制种技术要点[J]. 种子, 2007, 26(6): 95-97.
- [3] 屈婷婷,陈立艳,章志宏,等. 水稻籼粳交 DH 群体苗期耐冷性基因的分子标记定位[J]. 武汉植物学研究, 2003, 21(5): 385-389.
- [4] 詹庆才,朱克永,陈祖武,等. 利用分子标记进行水稻苗期耐冷性相关性状的 QTLs 研究[J]. 杂交水稻, 2005, 20(1): 53-58.
- [5] Suh J P, Jeung J U, Lee J I *et al.* Identification and analysis of QTLs controlling cold tolerance at the reproductive stage and validation of effective QTLs in cold-tolerant genotypes of rice(*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet 2010, 120(5): 985-995.
- [6] 卢永根,刘向东,陈雄辉. 广东高州普通野生稻的研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2008, 9(1): 1-5.
- [7] 潘 坚. 对高州市森林分类经营的探讨[J]. 中南林业调查规划, 1997, 16(1): 30-33, 37.
- [8] <http://baike.baidu.com/view/1899836.htm> [EB/OL].
- [9] 王 兰,龙云铭,田 华,等. 水稻苗期抗寒种质的筛选与鉴定[J]. 核农学报, 2011, 25(2): 208-213.
- [10] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B *et al.* Development and Mapping of 2240 New SSR Markers for Rice(*Oryza sativa* L.) [J]. DNA Research 2002, 9(6): 257-279.
- [11] Zheng K L, Huang N, Bennett J. PCR-based marker-assisted selection in rice breeding [M]//IRRI discussion paper series No. 12. Los Banos: International Rice Research Institute, 1995.
- [12] 王 兰,龙云铭,刘耀光. 一种用于 PCR 的植物基因组 DNA 快速制备方法[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 425-428.
- [13] 李 晨,潘大建,毛兴学,等. 用 SSR 标记分析高州野生稻的遗传多样性[J]. 科学通报, 2006, 51(5): 551-558.
- [14] 黎华寿,聂呈荣,胡永刚. 模拟酸雨对杂交稻、栽培稻、野生稻影响的研究[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(2): 284-287.
- [15] Li C, Zhang Y, Ying K *et al.* Sequence variations of simple sequence repeats on chromosome 4 in two subspecies of the Asian cultivated rice [J]. Theor Appl Genet, 2004, 108: 392-400.
- [16] 史红丽,韩明玉,赵彩平. 桃遗传多样性的 SRAP 和 SSR 标记分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(6): 191-196.
- [17] 王美荣,许 勇,詹永乐,等. 甜瓜育种亲本材料遗传多样性及群体结构的 SSR 标记分析[J]. 华北农学报, 2010, 25(S1): 47-52.
- [18] 李德军,孙传清. 利用 AB-QTL 法定位江西东乡野生稻中的高产基因[J]. 科学通报, 2002, 47(11): 854-858.
- [19] 王晨光,王 希,苍 晶,等. 低温胁迫对水稻幼苗抗冷性的影响[J]. 东北农业大学学报, 2004, 35(2): 205-207.
- [20] 戴玉池,邓霞玲,姜孝成,等. 同水稻品种幼苗期的耐寒生理鉴定及其利用[J]. 湖南师范大学自然科学学报, 2004, 27(3): 86-89.
- [21] 傅泰露,马 均,李 敏,等. 杂交水稻苗期耐冷性综合评价及其鉴定指标的筛选[J]. 西南农业学报, 2009, 22(3): 608-614.
- [22] 谢建坤,陈大洲,肖叶青,等. 应用微卫星标记分析东乡野生稻遗传多样性初探[J]. 中国农业科学, 2003, 36(8): 873-878.
- [23] 夏瑞祥,肖 宁,洪义欢,等. 东乡野生稻苗期耐冷性的 QTL 定位[J]. 中国农业科学, 2010, 43(3): 443-451.
- [24] 简水溶,万 勇,罗向东,等. 东乡野生稻苗期耐冷性的遗传分析[J]. 植物学报, 2011, 46(1): 21-27.