

水稻抗褐飞虱基因 SCAR 标记的获得

武 波, 韦 东, 欧 倩

(广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁 530005)

摘 要: 采用 282 个随机引物对药用野生稻 1665 和栽培稻桂 99 远缘杂交的抗褐飞虱近等基因系 B3F4 分离群体的不抗池 DNA 和抗池 DNA 进行了特异性 RAPD 标记筛选, 从中筛选到一个具有明显的特异性扩增带谱的 RAPD 标记 S1159, 序列分析表明, S1159 序列长度为 1 408 bp, 与基因库中已报道的水稻第四号染色体的 BAC 克隆(编号 OSJNBa0070O11)序列(67114-69100)有 51.86% 的同源性。为了提高所找到的 RAPD 标记 S1159 在应用上的稳定性, 将 RAPD 标记转化为 SCAR 标记检测近等基因系群体, 结果表明与 RAPD 标记结果一致, 说明该研究得到的 RAPD 标记具有较好的稳定性和重复性, 为进一步的研究打下了良好的基础。

关键词: 药用野生稻; 抗褐飞虱基因; RAPD 标记; SCAR 标记

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2006)06-0617-04

SCAR marker of *Bph* from rice

WU Bo, WEI Dong, OU Qian

(College of Life Sciences and Biotechnology, Guangxi University, Nanning 530005, China)

Abstract: 282 arbitrary primers were used to amplify the genomic DNA of the near isogenic lines(NIL)B₄F₄ pools(cv 1665 of *Oryza officinalis* ♂ × cv Gui99 of *Oryza sativa*) of resistance and nonresistance. The results showed that RAPD primer S1159 could generate a RAPD marker. The sequence length was 1 408 bp. Furthermore, SCAR marker transformed from RAPD marker was used to analyze progenies of inbred. The results are in accordance with RAPD marker's.

Key words: *Oryza officinalis* Wall EX Watt; *Bph*; RAPD marker; SCAR marker

水稻褐飞虱(*Nilaparvata lugens* Stal)是亚洲最严重的水稻害虫之一(秦学毅等, 1999), 是一种以稻属为食的单食性昆虫, 除了直接危害水稻植株外, 还同时传播稻草状矮缩病等, 引起水稻严重减产, 一般情况下, 水稻褐飞虱危害造成的谷物损失为 15% 以上, 严重年份达到 50%。而水稻是最重要的粮食作物之一, 全世界将近一半的人口是以水稻为主要粮食, 所以选育和种植抗褐飞虱水稻品种就显得尤为重要。目前已知的水稻抗褐飞虱基因共有 14 个, 近年来利用分子标记技术标记定位的有第 12 号染色体上的 *Bph1* 和 *Bph2*、*Bph10(t)*, 及第 2 号染色体上的 *Bph13(t)*(刘国庆等, 2001)。药用野生稻对褐飞虱具有很高的广谱抗性, 我们通过药用野生稻和栽

培稻桂 99 的远缘杂交和后代选择, 已将药用野生稻的抗源转入栽培稻中。本实验采用 RAPD 标记技术和 SCAR 标记技术对杂交后代自交分离群体筛选与抗褐飞虱基因连锁的 RAPD 标记, 作为辅助育种的分子标记(刘雄伦等, 2000), 同时通过将 RAPD 标记转换为 SCAR 标记作为标记辅助选择, 解决 RAPD 标记稳定性差的缺点(王春望等, 1999)。

1 材料与方法

1.1 实验材料

本实验所用的材料为药用野生稻 1665(*Oryza officinalis* Wall Ex Watt)与栽培稻桂 99 远缘杂交

收稿日期: 2005-05-27 修回日期: 2005-10-24

基金项目: 广西科技攻关项目(桂攻关 0228019-3)资助[Supported by Key Technologies Research and Development Program of Guangxi(0228019-3)]

作者简介: 武波(1962-), 男, 广西武宣人, 博士, 教授, 主要从事微生物和植物的分子生物学研究。

的 B3F4 代自交分离群体(秦学毅等,2002)。

1.2 水稻基因组 DNA 的提取

用 CTAB 法提取水稻总 DNA,分别溶于 $1 \times$ TE 中 -20°C 保存备用,经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测水稻总 DNA 的完整性,并根据 EB 染色强度计算其浓度(武波等,2001)。

1.3 RAPD 多态性引物的筛选

PCR 反应所需的 TaqDNA 聚合酶和随机引物购自宝生物工程(大连)有限公司, dNTP 购自 Promega 公司, PCR 仪为 PE 公司 9600 型。

选取 B3F4 代自交分离群体中 10 株不抗褐飞虱植株总 DNA 混合作为不抗池 DNA, 10 株抗褐飞虱植株总 DNA 混合作为抗池 DNA, 用每一条 RAPD 引物分别对不抗池 DNA 和抗池 DNA 分别

进行 RAPD-PCR, PCR 扩增反应体系建立: $10 \times$ buffer $2 \mu\text{L}$, 2.5 mM dNTP $2 \mu\text{L}$, 10 pM RAPD primer $1 \mu\text{L}$, 总 DNA ($20 \sim 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $1 \mu\text{L}$, ExTaq ($0.5 \text{ u}/\mu\text{L}$) $2 \mu\text{L}$, 加 ddH_2O 补足至 $20 \mu\text{L}$ 。 95°C 预变性 5 min ; 94°C 30 s , 36°C 30 s , 72°C 1 min 40 个循环; 然后 72°C 延伸 10 min (袁勇芳等, 2000)。 PCR 反应扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳然后经 EB 染色检测, 并记录每条扩增带谱在琼脂糖凝胶上的位置, 筛选具有抗褐飞虱基因多态性的随机引物。

1.4 RAPD 标记的克隆和测序分析

胶回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, pGEMOR-T Easy vector kit 购自 Promega 公司。用筛选的 RAPD 引物大量扩增 RAPD 标记, PCR 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳, 再用柱离心式

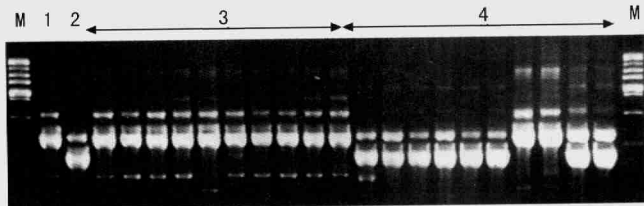


图 1 随机引物 S1159 对自交分离群体的 RAPD 指纹图谱

Fig. 1 RAPD fingerprinting of inbred progenies of S1159

M: 1 kb DNA 标准; 1: 自交分离群体 DNA 不抗池; 2: 自交分离群体 DNA 抗池;

3: 自交分离群体不抗株 1-10#; 4: 自交分离群体抗株 1-10#。

M: 1 kb DNA marker; 1: DNA pool of non-resistant progenies of inbred; 2: DNA pool of resistant progenies of inbred; 3: Non-resistant progenies of inbred 1-10#; 4: Resistant progenies of inbred 1-10#.

小量胶回收试剂盒回收 RAPD 特异性标记片段, 并连接克隆至克隆载体 pGEMOR-T Easy vector 上, 按照 BIO-RAD 公司电泳仪的操作程序, 采用电激法转化 *E. coli* DH5 α , 在含有 X-gal 和 IPTG 的氨苄青霉素 LA 选择培养基上挑选白色菌落, 并用限制性内切酶 EcoR I 酶切鉴定重组质粒(顾红雅等, 1997), 送宝生物工程大连有限公司测序。

1.5 SCAR 标记检测

根据 RAPD 标记特异性片段 DNA 测序结果, 设计特异性引物。用特异性引物对 15 株不抗株 DNA 和 15 株抗株 DNA 进行 SCAR-PCR, 体系为: $10 \times$ buffer $2 \mu\text{L}$, 2.5 mM dNTP $2 \mu\text{L}$, 10 pM primer 各 $1 \mu\text{L}$, 总 DNA ($20 \sim 50 \text{ ng}/\mu\text{L}$) $1 \mu\text{L}$, ExTaq ($0.5 \text{ u}/\mu\text{L}$) $2 \mu\text{L}$, 加 ddH_2O 补足至 $20 \mu\text{L}$ 。 95°C 预变性 5 min ; 94°C 30 s , 50°C 30 s , 72°C 1 min 30 个循

环; 然后 72°C 延伸 10 min 。 PCR 反应扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳然后经 EB 染色检测。

2 结果与分析

2.1 RAPD 引物筛选

在本实验中, 我们选用了 282 个随机引物分别扩增水稻不抗池 DNA 和抗池 DNA, 进行 RAPD 多态性分析, 选取 8 个在两个 DNA 池中表现多态性比较明显的随机引物, 分别对 10 株不抗株和 10 株抗株进行 RAPD 分析。其中, 随机引物 S1159 在不抗株中都没有扩增出 RAPD 特异性片段, 在抗性株中有 8 株扩增出 RAPD 特异性片段, 2 株没有扩增出 RAPD 特异性片段, 实验结果表明, 该 RAPD 标记与抗褐飞虱基因是连锁的(图 1)。

2.2 RAPD 标记的克隆和测序分析

用随机引物 S1159 大量扩增 RAPD 特异性片段,回收 1.4kb 左右特异性片段,克隆至克隆载体 pGEM®-T Easy vector 上,获得重组质粒 pS1159, DNA 测序结果表明, RAPD 标记 S1159 片段长度为 1 408 bp,用 BLAST 软件与 Genbank 中已知的序列进行同源性比较发现,该片段序列基因库中已报道的水稻第四号染色体的 BAC 克隆(编号为 OS-JNBa0070O11)序列(67114-69100)有 51.86%的同源性,其中在该序列中的(67114-67684)、(67680-68066)和(68998-69100)三个位点有 98%的同源性,证明这个位点在水稻遗传中具有高度的保守性(图 2,3)。

2.3 SCAR 标记检测

SCAR marker(sequence characterized amplified region)序列特征化扩增区域标记通常是由 RAPD 标记转化而来的。为了提高所找到的某一 RAPD 标记在应用上的稳定性,可将该 RAPD 标记片段从凝胶上回收并进行克隆和测序,根据其碱基

序列设计一对特异性引物(18~24 bp),也可只对该 RAPD 标记片段的末端进行测序,在原来的 10 个碱基引物的基础上增加相邻的 14 个左右的碱基,成为

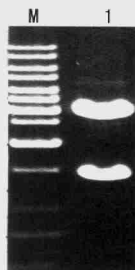


图 2 重组质粒 pS1159 EcoRI 酶切电泳分析
Fig.2 Electrophoresis analysis of recombinant plasmid pS1159 digested with EcoRI

M:1kb DNA 标准; 1:重组质粒 pS1159。
M:1kb DNA marker; 1:Recombinant plasmid pS1159.

1 GTTCTCGGACAGATAACTAGTAAACAGCTTTAAAAAGATGGAACATAGGTTGTTGTCACTATAAAAGACAGTACATTATCAGCAGGATTAGGTAATAA
101 TGTGTCTCTAGTACTAAATCAGCGGTACACGATGTACAGATATATGCTCAATTGGTTGTTATAGTACCTTCAAAACAAAAGATGATGAAATGCCAA
201 TTGATCATAGTAGCAACAAAAGAGATTAGGTTTAGAGGAGATAGCAACATGGAGATTAACTGCTCTTCAGGTTCTAATTGCTTTTCTGTTGCACTATT
301 GCTTAACCTCTCTGTGGATCTCTCATCTGCTCACCACACCTCTTCTTCTTAACCAATAGCATGTTTAGTTGATTTCACACTGATGCCAGGGTAGTAT
401 TTATCTCCACACTCCGCCAAAATCCACACTCCAAATGTGTGACGCCCTTAGTAGAGAGAAAAGCAGGCTATCTACACCTCGCTCAGTGAAGAAAAAATG
501 CAAGCTCTGCCAATTGTTTTTATATATACAGCGATATATCTTCGATAAAGTGCTAAGAAAAGAACAACTAACTATTACATGCTCTGTGAAGCTGTCT
601 TTCGGTCCGACTTAACATATTGGTAGGTCGACTATCTGTCTTTACCTGCTATCGATGTAACACTGCCCTATGTGGCAGCTCTGGTCTCTCCTTTACA
701 TTACCGTAGGTAAATTTGCTAGTGCTGTACCTTTCTTTGATAGAGGAGTCAGTGAAGCAATGCTTAGGTCCTCACTCCAGCCAATCAGAACT
801 GAAGTCAGCGGGTATTCCAATATAGTCACTTCTAAGGAGGTCGCTAGCATCAGAAACCCGGGAGGCCAGGCAGTGAACGTTCCGCAGACTGCTCAC
901 CCGGCCACACCTCGAGCGGATGAAGGCTGGCAATACAAGCATCATCTGTCCAACAGCCTACTTCTCATCCGTAACATCAGAGTTCGTTAGTGCAAGCG
1001GGAATGAGAACCACACTATCTTAGAAGAAATAGTAGAAGCCACGGAAAGAGCCACGGAACGAGCGGTTATTTTCTGCTAGCAAGTGGACAGG
1101CTCAGATGGCGTAGCTGATGTGTACGTGATAGTATCTTTATTGGCCATTTTGGATTTCTCTCAAGGATTGAAGACTTTCCTCTATACTGACAGAAGCA
1201GAGAGGCTGGTAAAAAAGAAACTACTGGGCGTATAGTTAGGACCCTACAAAACATATAGGACCATACGTAGGTTCGTATCCCTTGGCCCTACGTGACCTT
1301CTCCTATGCCATTCCCTCTTTCTGGGCGATTAGATTTTGTCTGTACTAGAAGTTAATCTTCTTACTCTGATGGTGAACACTACTCTGTGGGCGT
1401CCGAGAAC

图 3 RAPD 标记 S1159 的核苷酸序列

Fig.3 Nucleic acid sequence of RAPD marker S1159

与原来 RAPD 标记片段末端相配对的特异性引物。根据 RAPD 标记 S1159 DNA 测序结果,我们设计了一对特异性引物,PCR 产物大小 1381bp,序列为:

正向引物 TTCTCGGACAGATAACTAGTAAA-CAG,反向引物 CACCATCGAGTAATGAAGAT-GTTAAC,实验结果表明,不抗株没有扩增出特异

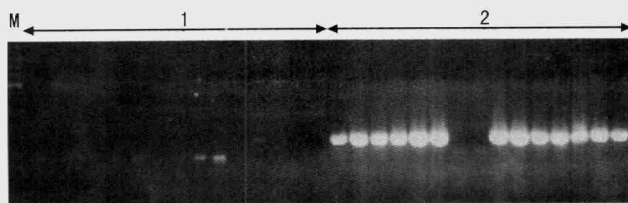


图 4 自交分离群体 SCAR 标记电泳分析

Fig. 4 Electrophoresis analysis of SCAR marker of inbred progenies

M, 1kb 标准; 1, 自交分离群体不抗株 1-15#; 2, 自交分离群体抗株 1-15#.

M, 1kb DNA marker; 1, Nonresistant progenies of inbred 1-15#; 2, Resistant progenies of inbred 1-15#.

性 DNA 片段, 抗植株有 13 株扩增出特异性 DNA 片段, 两株没有扩增出特异性 DNA 片段, 实验结果与 RAPD 扩增结果完全一致(图 4)。

3 讨论

野生稻由于长期经受各种自然灾害的影响和不利环境的自然选择分化, 产生了不同程度的抗逆性, 例如, 参与胁迫反应和衰老的基因在褐飞虱取食后表达增强(何青, 2005), 药用野生稻是我国三种野生稻资源的重要组成部分, 具有对很多种水稻主要病虫害的免疫高抗优质种质资源(钟代彬等, 1997)。广西药用野生稻对褐飞虱具有很强的抗性, 用栽培稻桂 99 连续不断地与广西药用野生稻 1665 抗源后代回交, 然后自交获得自交分离群体, 并进行抗褐飞虱鉴定。研究中利用 282 个 10 bp 随机引物分别扩增自交分离群体的不抗株 DNA 池和抗株 DNA 池, 结果筛选到 8 个随机引物能扩增抗褐飞虱基因的多态性带, 其中随机引物 S1159 特异性带与抗褐飞虱基因的重组很少, 说明该 RAPD 标记与抗褐飞虱基因是连锁的。自动测序结果分析表明, RAPD 标记 S1159 序列长度为 1 408 bp, 该序列与 GenBank 的序列进行同源性比较发现与库中已报道的水稻第四号染色体的 BAC 克隆(编号为 OSJNBa0070O11)具有 51.86% 的同源性, 而且其中三个区(67114-67684)、(67680-68066)和(68998-69100)有 98% 以上的同源性。根据 RAPD 标记序列, 转化为特异性和稳定性更好的 SCAR 标记检测自交分离群体, 实验结果表明, 与 RAPD 标记结果完全一致, 说明该 RAPD 标记具有比较好的稳定性和重复性。进一步的研究工作正在进行当中。

参考文献:

- 刘国庆, 顾辉传, 傅强, 等. 2001. 栽培稻的紧密野生稻抗褐飞虱主效基因的遗传定位[J]. 科学通报, 46(9): 738-742.
- 刘雄伦, 李 梅. 2000. RAPD 技术在植物遗传育种上的应用[J]. 生物工程进展, 20(5): 21-23.
- 顾红雅, 霍礼嘉, 明小天, 等. 1997. 植物基因与分子操作[M]. 第 2 版. 北京: 北京大学出版社: 100-102.
- He Q(何 青), Yun HY(袁红雨). 2005. The construction and screening of suppression subtractive cDNA library of rice seedlings exposed to BPH(受褐飞虱取食的水稻幼苗的抑制消除 cDNA 文库的构建及筛选)[J]. Guithaia(广西植物), 25(3): 237-240.
- Wang XW(王新望), Lai JR(赖晋茹), Yao DN(姚大年), et al. 1999. Identification of RAPD markers for Phl gene in common wheat Chinese Spring(中国春 Phl 基因的 RAPD 标记鉴定)[J]. J Agric Biotech(农业生物技术学报), (1): 29-35.
- Qin XY(秦学毅), Li RB(李容柏), Wei SM(韦素美), et al. 1999. Resistant genetic model of wild rice (*Oryza rufipogon*) to the brown planthopper and the application in breeding(普通野生稻对稻褐飞虱的抗性遗传模式及其在育种上的应用)[J]. Southwest China J Agric Sci(西南农业学报), 12(4): 74-77.
- Qin XY(秦学毅), Wei SM(韦素美), Wu B(武 波), et al. 2002. Inheritance of resistance to brown planthopper in *Oryza officinalis* and its utilization(药用野生稻抗源对褐飞虱的抗性遗传及利用研究)[J]. Southwest China J Agric Sci(西南农业学报), 15(4): 62-65.
- Wu B(武 波), Wei D(韦 东), Qin XY(秦学毅), et al. 2001. Random amplified polymorphic DNA(RAPD) analysis of wild rice and cultivated rice(野生稻和栽培稻的随机多态 DNA(RAPD)分析)[J]. Guithaia(广西植物), 21(4): 339-343.
- Yuan YF(袁勇芳), Li SG(李思光), Xu Y(许 杨), et al. 2000. Factors affect the reproducibility of RAPD(Random Amplified Polymorphic DNA)(RAPD 技术重复性的影响因素)[J]. Jiangxi Sci(江西科学), 18(2): 120-124.
- Zhong DB(钟代彬), Luo LJ(罗利军), Guo LB(郭龙彪), et al. 1997. Studies on resistance to brown planthopper(BPH) of hybrid between *Oryza sativa* and *Oryza officinalis*(栽培稻杂交转移药用野生稻抗褐飞虱基因)[J]. Southwest China J Agric Sci(西南农业学报), 10(2): 5-9.