

春小麦空间诱变 SP₂ 的 SSR 标记变异分析

郭怡璠,张宏纪,孙 岩,刘东军,宋 波,王广金,杨淑萍,郭 强,闫文义,孙光祖

(黑龙江省农业科学院 作物育种研究所/哈尔滨国家小麦改良分中心,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为了考察空间搭载对小麦的诱变效果,以实践八号育种卫星搭载的小麦品系为试材,对 SP₂ 的 DNA 分子标记突变频率进行分析。结果表明:12 对 SSR 引物共扩增出 3 种突变类型:扩增片段增多、扩增片段减少和扩增片段长度有差异。出现的单一突变类型居多,在同一品系的个体上同时出现多类型突变的情况很少。突变频率在供试的品系之间以及 SSR 染色体位点都存在差异。该研究又以 7 个 EST-SSR 标记对上述 SP₂ 个体的扩增结果显示,与一般的 SSR 位点相比,EST-SSR 标记检测到的突变类型单一,仅有“扩增片段增多”一种类型,且突变频率普遍较低,大部分基因位点无突变发生。表明空间搭载对小麦基因组产生的诱变主要发生在重复序列区,基因表达区相对较少。

关键词:空间诱变;春小麦;SSR 分子标记

中图分类号:S512

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2010)07-0009-04

黑龙江省是我国的重要春麦产区。近十年来小麦育种虽取得了很大进展,但有突破性的品种不多,审定推广品种的产量、品质和抗病抗逆性未能在更高的水平上有机结合,与生产要求还有较大差距。其主要原因是遗传基础狭窄、育种方法滞后和缺乏优异的种质资源。有性杂交是农作物新品种培育的主要技术手段,但是随着常规育种的不断发展,现有的优异种质资源被充分利用。因此,发掘和创造具有优良农艺性状的原始育种材料,得到了各国育种家的普遍重视。为了扩大变异,人们利用各种手段创造变异,核辐射诱变、化学诱变等技术已广泛用于小麦品种改良,并取得了骄人的成绩^[1-3]。空间诱变育种作为一种新兴的育种技术在作物品种改良和种质创新上已得到广泛应用^[4]。

空间诱变育种是利用返回式卫星、宇宙飞船和高空气球等将作物种子、组织器官或其它生命个体等材料送入宇宙空间,在宇宙空间特殊的诱变因子作用下使生物的遗传物质发生变异,再返回地面进行选育的作物育种新技术^[5]。我国自 1987 年以来,先后利用返回式卫星、神舟号飞船

和高空气球搭载植物种子进行航天诱变,并通过地面试验选育出了一批农作物新品种和优异的种质资源,取得可观的经济效益和社会效益^[3]。选用 20 份小麦品种(系)为试验材料,2006 年经过实践八号育种卫星搭载,返回地面后,经 2007~2008 年的田间种植构建变异群体,并采用 DNA 分子标记技术(SSR 和 EST-SSR)对其 SP₂ 个体植株进行突变分析,以期了解空间诱变对小麦后代的诱变效果和特点,为高产、优质等性状选择提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验共选用 6 份材料:龙辐 03K539、龙辐 01-0174、龙辐 02-0072、龙辐 02-0387、龙辐 01-0089、龙辐 02K418。

1.2 方法

1.2.1 卫星搭载 种子搭载于实践八号专用育种卫星,于 2006 年 9 月 9 日 15:00,在酒泉卫星发射中心发射,在轨运行 15 d 后,于 9 月 24 日 10 时 43 分返回。卫星运行的近地点高度为 180 km,远地点高度为 469 km,轨道倾角为 63°^[6]。

1.2.2 材料种植与 DNA 样品制备 田间种植采用双行区,每份材料 4 区,行长 3 m,每隔 4 区设 1 区对照,每区播种 250 粒,生育期间进行植物学特性调查,成熟后按垄单收,2007 年形成 SP₁。2008 年 6 份材料田间点播种植为 SP₂ 并点播相应对照,每份材料的群体为 1 000 株。待植株生

收稿日期:2010-04-29

基金项目:“十一五”国家科技支撑计划资助项目(2008BAD97B01);黑龙江省科技计划资助项目(GA09B101-4-3);黑龙江省博士后启动金资助项目(LBH2Q06008)

第一作者简介:郭怡璠(1982-),女,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,研究实习员,从事小麦生物技术育种研究。E-mail:fumai@163.com。

通讯作者:张宏纪(1969-),男,黑龙江省扶远县人,博士,研究员,从事小麦辐射诱变与生物技术育种研究。E-mail:fumai@163.com。

长至分蘖期时,每处理随机选取 40 株,取其幼嫩叶片,按照 CTAB 法^[7] 提取基因组 DNA,以备 SSR 分子标记检测。

1.2.3 SSR 分子标记分析 PCR 扩增仪为英国 Techne 公司生产的 TC-512 型梯度 PCR 仪。PCR 扩增在 25 μ L 反应体系中进行,10 \times PCR Buffer 2.5 μ L,10 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2.0 μ L,Taq DNA 聚合酶 (5 U \cdot μ L⁻¹) 0.2 μ L,上游引物 1.5 μ L,下游引物 1.5 μ L,模板 DNA 5.0 μ L,灭菌双蒸水 13.3 μ L。PCR 扩增程序:首先预扩增 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,60(55) $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 进行一个循环,以后每次降低 1 $^{\circ}$ C 退火温度进行 1 个循环,直到退火温度为 55(50) $^{\circ}$ C 为止,进入正式扩增程序 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,51 \sim 59 $^{\circ}$ C 复性 45 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s 共 35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min,扩增产物于 4 $^{\circ}$ C 保存。扩增产物采用非变性 PAGE 凝胶电泳技术分离,快速银染法显色^[8]。

2 结果与分析

2.1 SP₂ 的 SSR 标记突变分析

通过预备试验,并参考前人利用 SSR 分析小麦品种多样性研究结果,选用 12 对 SSR 引物对随机选取的 240 个 SP₂ 个体进行了基因组突变分析(见表 1),得出 12 对 SSR 引物在 SP₂ 的基因组 DNA 中共扩增出 3 种突变类型,即扩增片段增多、扩增片段减少和扩增片段长度差异。6 份供试品系个体在 12 个 SSR 位点上的第 2 种突变类型(扩增片段减少)居多,另外 2 种类型的扩增情况基本相近。个别品系同时出现多类型突变,如龙辐 01-0174 在 wmc522 位点上出现了扩增片段减少和扩增片段长度差异 2 种突变类型;龙辐 03K539 在 Xgwm415 位点上出现了扩增片段增多和扩增片段减少 2 种突变类型。12 对 SSR 引物在相应对照上均未出现差异扩增片段。

表 1 空间诱变 SP₂ 基因组 SSR 标记突变分析

品系	处理	SSR 标记												平均突变率/%
		Xgwm149	Xgwm312	Xgwm413	Xgwm469	Xgwm372	Xgwm408	Xgwm415	Xgwm437	Xgwm533	Xgwm400	wmc517	wmc522	
03K539	SP	—	—	b	b	b	—	a. b	—	b	a	b	—	11.25
	CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
02-0387	SP	b	c	—	b	—	—	b	—	—	—	—	b	5.42
	CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
02-0072	SP	c	—	—	b	b	b	—	—	—	—	b	b	7.08
	CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
01-0174	SP	b	—	c	a	c	b	b	—	—	a	b	b. c	10.83
	CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
01-0089	SP	b	—	b	b	a	b	b	a	b	b	b	c	12.08
	CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
02K418	SP	b	c	—	—	—	b	c	a	—	—	a	—	7.50
	CK	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	0
引物平均突变率/%	SP	5.83	10.83	5.00	13.33	12.50	10.00	11.67	3.33	4.17	8.33	15.00	8.33	
	CK	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	

注:a 为扩增片段增多;b 为扩增片段减少;c 为扩增片段长度差异;—为无变化。

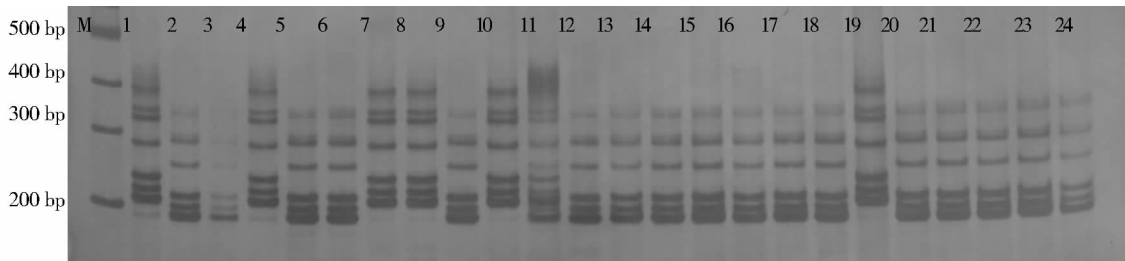


图 1 02-0387 空间搭载 SP₂ 部分个体及其对照的 SSR 引物 Xgwm312 扩增图谱
1 \sim 20 为 02-0387 SP₂ 不同个体,21 \sim 24 为对照 02-0387 亲本

供试的 6 份品系之间突变位点也存在差异。与各自对照相比,突变频率最低的是龙辐 02-0387,为 5.42%;突变频率最高的是龙辐 01-0089,为 12.08%。表明,不同小麦品系对空间搭载的敏感性有差异。龙辐01-0089有较高的突变频率,表明该品系基因组序列的重复区在空间条件下易产生变异。而龙辐02-0387 与之相反,基因组重复区相对保守。从 SSR 标记位点上看,突变频率介于 3.33%~15.00%。不同的 SSR 位点间突变频率各不相同,突变频率最低的是 Xgwm437,最高的是 wmc517。如果将所有 12 个 SSR 标记位点突变频率的平均数 9.03% 为基准,大于平均数的 6 个位点中,突变率最多的 3 个 SSR 位点在 A 组染色体上,最少的 1 个位点在 D 染色体上,有 2 个位

点在 B 组染色体上。A 组染色体上出现高频率的 SSR 位点突变,D 染色体上则少,表明小麦 A 组染色体基因组的重复区在空间条件下更容易产生变异,而 D 组染色体相对保守。这一结果与前面的研究结果不完全一致^[9]。

2.2 SP₂ 的 EST-SSR 标记突变分析

为了分析空间搭载对小麦基因的影响,选择了 7 个 EST-SSR 标记对空间搭载的 SP₂ 个体的表达基因位点突变进行了分析(见表 2),得出与 DNA 重复序列的 SSR 位点相比,EST-SSR 标记位点的突变类型单一,仅有扩增片段增多一种类型,且突变频率较低,标记位点的平均突变频率介于 0~8.33%;供试品系的平均突变频率介于 0~2.86%。

表 2 空间诱变后代 SP₂ 基因组 EST-SSR 标记变异分析

品种	处理	EST-SSR 标记							突变频率/%
		Xcwm3	Xcwm125	Xcwm2	Xcwm477	Xcwm319	Xcwm5	Xcwm7732	
03K539	SP	—	—	—	—	—	a	—	2.860
	CK	—	—	—	—	—	—	—	0
02-0387	SP	—	—	—	—	—	a	—	2.140
	CK	—	—	—	—	—	—	—	0
02-0072	SP	—	—	—	—	—	a	—	1.430
	CK	—	—	—	—	—	—	—	0
01-0174	SP	—	—	—	—	—	a	—	0.714
	CK	—	—	—	—	—	—	—	0
01-0089	SP	—	—	—	a	—	—	—	0.714
	CK	—	—	—	—	—	—	—	0
02K418	SP	—	—	—	—	—	—	—	0
	CK	—	—	—	—	—	—	—	0
引物平均	SP	0	0	0	0.83	0	8.33	0	
突变率/%	CK	0	0	0	0	0	0	0	

注:a 为扩增片段增多;—为无变化。

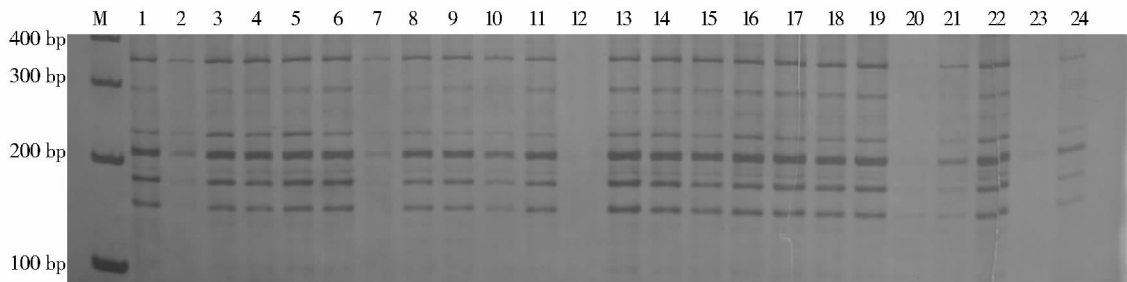


图 2 01-0089 空间搭载 SP₂ 部分个体及其对照亲本的 EST-SSR 引物 Xcwm3 扩增图谱
1~20 为 01-0089 空间搭载 SP₂ 不同个体,21~24 为对照亲本 01-0089

在所检测的 7 个 EST-SSR 标记位点上,大部分标记未检测到突变,只有 Xcwem477 和 Xcwem5 2 个标记位点有突变发生。这 2 个 EST-SSR 标记位点的突变频率相差较大,Xcwem477 仅在龙辐 01-0089 上检测到突变,其频率为 0.83%;而 Xcwem5 在龙辐 03K539、龙辐 02-0387、龙辐 02-0072 和龙辐 01-0174 品系上都检测到突变,其平均频率为 8.33%。这一结果表明,在所选择的 7 个表达基因位点上,只有 Xcwem5 位点所标记的基因组序列变异易受空间条件的影响,而其它 6 个 EST-SSR 位点标记的基因组序列对空间条件不敏感。

3 讨论

选用 6 份春小麦品系为试验材料,于 2006 年随育种卫星进行空间搭载,2008 年每个品系分别获得了 1 000 个单株组成的 SP_2 群体。12 对 SSR 引物对每个品系随机选取的 40 株个体进行 PCR 扩增发现,12 对 SSR 引物共扩增出 3 种突变类型:即扩增片段增多、扩增片段减少和扩增片段长度差异。240 个 SP_2 单株在 12 个 SSR 位点上以扩增片段减少突变类型居多,在同一品系的不同个体上同时出现多种类型突变的情况很少。突变频率在品系之间以及 SSR 染色体位点上都存在差异。6 份品系的突变频率介于 5.42%~12.08%。因此可以认为,突变频率的不同,反映了不同的品系在其基因组诱变效率上存在基因型差异。同时研究结果也显示,SSR 标记检测到的最高突变频率出现在 A 组染色体组上最多,D 染色体组上最少,B 染色体组上的介于二者之间。这方面的研究鲜有报道。前人利用 DNA 分子标记分析的大都是选出的高世代突变系,然后结合原始亲本进行多态性分析,其研究结果大多是对突变系差异性的描述。如周峰^[10]利用 SSR 标记对来自于同一亲本 5 个突变株后代的 DNA 多态性分析、蒲志刚^[11]利用 AFLP 分子标记对突变体黄金 1 号的检测、张宏纪^[8]对航天诱变品种龙辐麦 18 遗传特性分析等。因此,该研究结果对了解空间搭载后小麦 SP_2 个体的变异特点提供了更多信息。该研究在 A 染色体组上获得较高的 SSR 标记位点突变频率,与前人的研究结果不完全一致。前人在利用 SSR 分析小麦品种多样性时,一般认为小麦 B 组染色体基因组上的 SSR 标

记具有更高多态频率^[10],在该研究中,B 组染色体基因组上的 SSR 突变率仅处于第二位。这种结果上的差异可能与所选用的 SSR 标记数目较少、变异群体来源不同有关,或者就是空间搭载对小麦基因组诱变的特点有待进一步研究。

利用 DNA 分子标记研究空间搭载对小麦基因组诱变效果时,所选用的标记主要是 RAPD、SSR 和 AFLP 等^[10-12],但这些标记在空间搭载影响表达基因的诱变效果时,选择上存在盲目性。该研究选择了 7 个 EST-SSR 标记对空间搭载的 SP_2 个体的表达基因位点进行了突变分析。结果表明,与 DNA 重复序列的 SSR 位点相比,EST-SSR 标记位点的突变类型单一,仅有扩增片段增多一种类型,且突变频率较低,大部分基因位点都没有突变发生。这表明,空间搭载对小麦的表达基因的诱变具有一定的影响,即使有突变产生,也仅仅发生在个别表达基因位点上。同时也表明,空间搭载对表达基因的诱变效果存在基因型差别。

参考文献:

- [1] 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):2412-2461.
- [2] 张宏纪,王广金,孙岩,等.春小麦航天诱变入选后代的变异研究[J].核农学报,2007,21(2):111-115.
- [3] 刘录祥,郭会君,赵林妹,等.我国作物航天育种 20 a 的基本成就与展望[J].核农学报,2007,21(6):589-592.
- [4] 刘录祥,王晶,赵林妹,等.作物空间诱变效应及其地面模拟研究进展[J].核农学报,2004,18(4):247-251.
- [5] 刘录祥,郑企成.空间诱变与作物改良[M].北京:原子能出版社,1997.
- [6] 吕兑财,黄增信,赵亚丽,等.实践八号育种卫星搭载植物种子的空间辐射剂量分析[J].核农学报,2008,22(1):5-8.
- [7] 张宏纪,刁艳玲,孙连发,等.航天诱变新品种龙辐麦 18 的选育及其主要特征特性分析[J].核农学报,2008,22(3):243-247.
- [8] 尹静,王广金,张宏纪,等.小麦突变体 D51 抗秆锈性遗传分析及其抗性基因 SSR 标记[J].作物学报,2007,33(8):1262-1266.
- [9] 郭小丽,刘冬成,罗铮,等.我国部分优质小麦品种遗传差异的 SSR 标记分析[J].麦类作物学报,2004,24(1):1-5.
- [10] 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.
- [11] 蒲志刚,张志勇,郑家奎,等.水稻空间诱变的遗传变异及突变体的 AFLP 分子标记[J].核农学报,2006,20(6):486-489.
- [12] 王蜜,魏建民,郭慧琴,等.紫花苜蓿空间诱变突变体筛选及其 RAPD 多态性分析[J].草地学报,2009,17(6):841-844.

(下转第 16 页)

- 信息,2008(8):9.
- [4] 张亚华,冷玉杰,陈福军. 水稻新基质育苗技术应用[J]. 农村实用科技信息,2007(12):4.
- [5] 毛长玲,陈淑芹,董恩龙. 水稻新基质育苗技术应用[J]. 农村实用科技信息,2010(2):11.
- [6] 佟立杰. 谈应用稻壳作新基质早育苗[J]. 现代农业科技,2008(22):202.
- [7] 王春华,闫德强. 水稻新基质稻壳育苗技术[J]. 内蒙古农业科技,2004(S2):185-186.
- [8] 张阳,朱雪艳,春玲. 水稻新基质无土早育秧技术[J]. 黑龙江农业科学,2005(3):58.
- [9] 刘庆学,徐振华,马冬梅. 水稻工厂化育苗新基质筛选试验初报[J]. 河北农业科技,2008(8):51.
- [10] 温新华,于金华,暴振山,等. 水稻新基质无土早育苗技术[J]. 农村实用科技信息,2009(9):4.
- [11] 李玉海,董国忠. 水稻新基质早育苗技术[J]. 中国农技推广,2004(6):31.
- [12] 王立辉,李秀民,刘学文,等. 水稻新基质(稻壳)早育秧技术[J]. 中国农技推广,2008(7):17.
- [13] 李广宇,彭显龙,刘元英,等. 前氮后移对寒地水稻产量和稻米品质的影响[J]. 东北农业大学学报,2009,40(3):7-11.
- [14] 彭显龙,刘元英. 寒地稻田施氮状况与氮素调控对水稻投入和产出的影响[J]. 东北农业大学学报,2007(4):467-472.

Effect of Two Seedling Technologies on Rice Seedling Quality and Yield and Quality

ZHANG Zhong-chen,GAO Hong-xiu,LIU Hai-ying,JIN Zheng-xun

(Agronomy College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030)

Abstract: Comparison of new matrix(rice husk) disk seedling(NMDS) and conventional soil seedling(control) was investigated by using of Longjing 18 in Xinhe village in Qiqihar city. The results showed that the seedling quality was better in NMDS than that of the control, especially rooting capacity, which could promote seedling growth after transplanting. Otherwise, yield in NMDS was slightly higher than that of the control; quality traits in NMDS were slightly better than that of the control. Therefore, NMDS was better than soil seedling, and could replace soil seedling for rice cultivation as a new seedling technology.

Key words: rice; new matrix disk seedling; yield; quality

(上接第 12 页)

Variance Analysis of Microsatellite Markers in Spring Wheat SP₂ Induced by Space Flight

GUO Yi-fan,ZHANG Hong-ji,SUN Yan,LIU Dong-jun,SONG Bo,

WANG Guang-jin,YANG Shu-ping,GUO Qiang,YAN Wen-yi,SUN Guang-zu

(Crop Breeding Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences/Harbin Branch of National Wheat Improvement Center, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to study wheat induced by space flight, using the wheat by seed-breeding satellite, Shijian-8 us experimental materials, the wheat SP₂ DNA molecular marker mutation frequency were determined. The results showed that 12 groups SSR primers amplified all 3 types of mutations; increased fragments amplification, decreased amplified fragment and amplified fragment length difference. A single mutation majority, in the same type of individual strains on the situation drastically mutation appears at the same time. Mutation frequency in the test strains and SSR chromosome loci was different. While this study through 7 EST-SSR on the individual's expansion SP₂, the results showed that compared with the general SSR sites, EST-SSR marker loci of detecting the mutation was simple: a single type of mutation, only 'amplification increased a type' fragments, and mutations in the low frequency statistics, most without mutation genetic loci. Space flight launch on wheat of mutation occurs mainly in the repeat sequences, but gene expression area was relatively rare.

Key words: space induction; spring wheat; SSR markers