

文章编号: 1003-8701(2015)03-0014-04

黑米种皮色素的遗传分析和分子标记

杨 彬¹, 杨 烈^{2*}

(1. 安徽农业大学茶与食品科技学院, 合肥 230036; 2. 安徽农业大学农学院, 合肥 230036)

摘 要: 为明确黑米种皮色素的遗传基础, 利用籼稻黑米黑 B 和无色东北粳稻杂交, 获得 F₁ 和 F₂ 分离群体。F₁ 种皮表现黑色, 说明种皮中的黑色性状受显性基因控制。同时, 其 F₂ 代后代表现 3:1 的孟德尔分离比, 表明黑色性状基因是受一对显性基因控制, 暂定名为 BP(black pericarp)。利用 F₂ 分离群体作为定位群体, 用均匀分布在水稻 12 条染色体上的 128 对 SSR 引物和 45 对 indel 引物进行 BSA 和分子标记分析, 利用 MAPMAKER3.0 软件进行连锁分析, 将控制黑色性状基因定位在第 4 染色体上。目的基因 BP 位于引物 R4M23 和 R4M43 之间, 遗传距离分别为 10.2cM 和 14.6cM。

关键词: 黑米; 种皮色素; 遗传分析; 分子标记

中图分类号: S511.035

文献标识码: A

DOI:10.16423/j.cnki.1003-8701.2015.03.004

Genetics Regularity and Molecular Marker of Pericarp Pigment in Black Rice

YANG Bin¹, YANG Lie^{2*}

(1. College of Tea & Food Science, Anhui Agricultural University, Hefei 230036;

2. College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: The genetic regularity and molecular marker of pericarp pigment in black rice were investigated by analyzing the F₁ and F₂ populations from the crosses of black pericarp line (Hei B) × white pericarp line originated from northeast of China. The results showed that plants were all black pericarp in the F₁ population. While in the F₂ populations, the segregation ratio of black pericarp plants and white pericarp plants was 3:1. This suggests that the trait of black pericarp was completely controlled by one dominant gene. The gene controlling black pericarp trait, designated BP, was mapped in chromosome 4 based on BSA analysis and linkage mapping using 128 SSRs and 45 INDELs scattered on whole chromosomes. The BP was located between R4M23 and R4M43, with a distance of 10.2cM and 14.6cM, respectively.

Key words: Black rice; Black pericarp; Genetic regularity; Molecular marker

黑米具有黑色的外表, 其色素 98% 集中于种皮^[1], 是我国古老而名贵的特种稻资源, 我国黑米资源占世界黑米资源的 90.8%^[2], 含丰富蛋白质、氨基酸、维生素和矿物质, 并含有大量的花色苷等色素成分, 具有珍贵的医疗保健价值^[3]。国内外对黑米的研究相对较少, 研究内容主要集中在黑米色素的医疗保健价值评价研究, 特别是花色苷的医疗保健价值^[4], 而对黑米的遗传育种、色素

基因分子标记等研究较少。目前国内外对黑米色素性状的遗传规律和基因定位做了一定研究。陈廷文^[5]发现黑色素颜色性状由一对显性基因控制, 有色为显性, 与细胞质基因无关。庄杰云等^[6]认为一个显性主效基因控制黑米米色的差异。而吴爱忠等^[7]认为黑色糙米种皮色素受两对基因互作所控制, 互作的形式是隐性上位, 因为有不同的色调强度, 所以还可能存在复等位基因。顾信媛等^[8]用 3 个黑米品种与白米杂交, 说明黑色种皮由 3 对基因控制, 属数量性状遗传, 色素基因具有剂量效应。

张名位等^[9]采用 3 个种皮颜色深浅不同的黑米稻品种与 1 个白米稻品种配制 6 个杂交组合,

收稿日期: 2014-12-27

基金项目: 国家自然科学基金(31101760、31360579)

作者简介: 杨 彬(1978-), 女, 实验师, 在读硕士, 研究方向: 食品营养与卫生。

通讯作者: 杨 烈, 男, 博士, 副教授, E-mail: yanglie2000@163.com

黑米种皮中的色素表现出多基因控制的数量性状遗传。

对水稻色素分子标记目前主要以紫米为主,对黑米色素的分子标记尚未见报道。Kinoshita T等^[10]认为紫米色素基因是由两对基因控制,控制稻米紫色、棕色和无色性状的两对互补基因定位于第1染色体上的Rd和第7染色体上的Rc。庄杰云等^[6]用RFLP标记将一个控制水稻紫色种皮的基因定位在4号染色体上,位于RG 329下方18.9cM。Hsieh S. C等^[11]将控制红米色素基因定位于第1染色体的Prpa与第4染色体的Prpb。Takahashi M等^[12]还定位了2个控制紫米色素的基因,即第6染色体上的IP14与另一基因IP15。廖金花将控制红米色素性状的两个基因其中一个定位在1号染色体上^[13]。

本研究利用分子标记对黑米色素基因定位,以期发现新基因,为育种和研究提供新材料。

1 材料和方法

1.1 材料

亲本分别为选育的籼稻黑B,种皮黑色,及东北粳稻,种皮无色。材料来自四川大学。利用黑B和东北粳稻进行正反杂交获得F₁代植株,并利用黑B为母本的杂交构建F₂分离群体进行遗传分析及基因分子标记。

1.2 F₂构建大规模分离群体

本研究以籼稻黑B为父本、东北粳稻为母本进行亚种间远缘杂交建立复杂色素性状分离群体。F₁杂交群体自交构建大规模F₂分离群体。

1.3 黑米色素基因的遗传分析

利用F₁表型来鉴定黑米色素基因的显隐性,利用F₂分离情况,分析控制黑米色素的等位受几对基因控制。

1.4 黑米色素基因的分子标记

参照Michelmore R W等^[14]提出的建立抗、感池的方法,提取亲本及F₂分离群体单株叶片DNA,

随机选取10个等量混合的黑米单株DNA构建显性DNA池(RB),10个无色单株DNA样品等量混合构建隐性DNA池(SB),用于Indel、SSR标记的初步筛选。

1.5 Indel、SSR引物、PCR扩增和扩增产物检测

Indel和SSR引物由上海生物工程技术有限公司合成。PCR扩增反应总容积15 μL,其中包括10×buffer1.5 μL, 15 mmol·L⁻¹ MgCl₂ 1.3 μL, 2.5 mmol·L⁻¹ dNTPs 1.3 μL, 30 ng上下游引物各1.5 μL, 30 ng基因组DNA 1.5 μL, 0.8 U Taq酶。PCR反应程序为:94℃预变性4 min;94℃变性1 min, 50~60℃退火1 min(依具体引物而定),72℃延伸10 min,共35个循环;最后72℃延伸10 min。扩增产物用6%变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,经硝酸银染色后观察照相。

1.6 遗传距离估算与制图

应用Mapmaker EXP 3.0b软件进行SSR标记和BP黑色种皮基因的连锁性分析,用Kosambi作图函数将重组率转化为遗传距离(cM),LOD的阈值设为3.0。应用Mapdraw 2.0软件绘制该基因的遗传连锁图谱。

2 结果与分析

2.1 黑米色素基因的遗传分析

利用东北粳米(白米)和黑米进行杂交,再利用F₁自交获得F₂分离群体。对F₁、F₂群体的种皮颜色进行统计分析。结果表明,F₁性状各单株均表现有色,证实黑色种皮性状(暂命名为BP, black pericarp)为显性。

对F₂分离群体进行种皮颜色的统计,结果如表1,经检验,控制色素分离的基因,其分离 $0.072 < \chi^2 = 3.84$,符合3:1的显性单基因分离规律,表明其受一对等位基因控制。

综上所述,黑米基因受一对显性等位基因控制,黑色对无色为显性。

表1 黑B×东北粳稻F₂群体黑色种皮性状分离情况

总株数	有色单株	无色单株	黑/白比值	理论比	X ²	X ² _{0.05,1}	基因数
1000	756	244	3.1:1	3:1	0.072	3.84	1

2.2 黑米色素的分子标记

用分布在水稻12条染色体上的128对SSR引物和45对Indel引物,筛选在黑B、东北粳稻亲本

间具有多态性的引物,筛选出了在亲本之间多态性好、条带清晰的25对Indel引物和1对SSR引物(见表2、图1、图2)。

表 2 本实验采用的 SSR 和 Indel 标记

标 记	染色体位置	前引物序列 5'-3'	后引物序列 5'-3'
R1M30	1	AAGGGGCCCTAATTTATCTA	TGTTTACTTTTGTCTTGGACTG
R1M47	1	AATAGAATTACTGATGAAACCTTA	GCCCGTTACCGCTTATGT
R2M10	2	CCCAGTCTGCTGCCATCT	GAATGTATTTTCAGTTCAGTAAG
R3M10	3	CCGAGTACCATTGCTTTTC	CTGCCATAGTTACTGCTCTGTT
R3M53	3	ACACTGGCTACGGCAAAG	TTGTTCGGAATAATGATGC
R4M17	4	AGTGCTCGGTTTTGTTTTTC	GTCAGATATAATTGATGGATGTA
R4M30	4	GCTTCTCCTGGTTGTATGC	AAAATAGGGAGGCAGATAGAC
R4M43	4	CTTGAACTGAGTGAGTGG	CGATGAAAATGATGTCTA
R4M50	4	TTTTGTGAAACTTGACCCTC	GCGTCCATGTCTTTATTGTG
R5M13	5	GAGAAAGAGTGGAAGGAG	AGTATCGTCAGGAGGGTC
R5M30	5	CTCAATTCACCCATCCC	CGTCCGTCTCCAACCTC
R6M14	6	CGCTCCGTCTCCAACCTC	CATGTGTGGAATGTGGTTG
R6M44	6	TTAGGAATAAAGGCTGGATA	TTACCGTTAATAGGTGGAA
R7M7	7	ACCTTCCCTCCCTTTTGAT	AACTTGGTCTTCTGTTTTATTG
R7M37	7	CAGCCCTAAATCTAAATACCC	ACGTTGAGACAGGCGAGC
R8M23	8	CCTATTCACTCTACCGACAT	GTTTAGTTCCCATTGCTTT
R8M46	8	AGCAGAGTCCAGAGAAGAT	GCATAAGATGGCGAGTGA
R9M10	9	CTTTGGATTCAAGGGGA	AACTTGAAACGGAGGCAG
R9M42	9	CTATAAGACCAAAACGAAAAC	GAAAACCATTTGTGTCACTGTA
R10M10	10	GAATACAACCCCTAAAAAC	ATGGACCGTTGAGGAGAC
R10M40	10	GTCCCTAGGCCATCTCTTG	GCGAATAGGGGTGGACAG
R11M23	11	AAGGTTGACAAGGACAGAAG	TCGCAGGAATGGATAAAA
R11M40	11	AAGAAAAATATCTATTGAGGAGTG	GGAGGACCATAAATGACGG
R12M27	12	ATTCATTGCCATCAGTT	GTAATCTTCTATCCGTTCA
R12M43	12	CCGCCGAGAAGAAACAAA	CCCAAGAACAGGATTACA
RM303	4	GCATGGCCAAATATTAAAGG	GTTTGAAATAGAAGTTCGGT

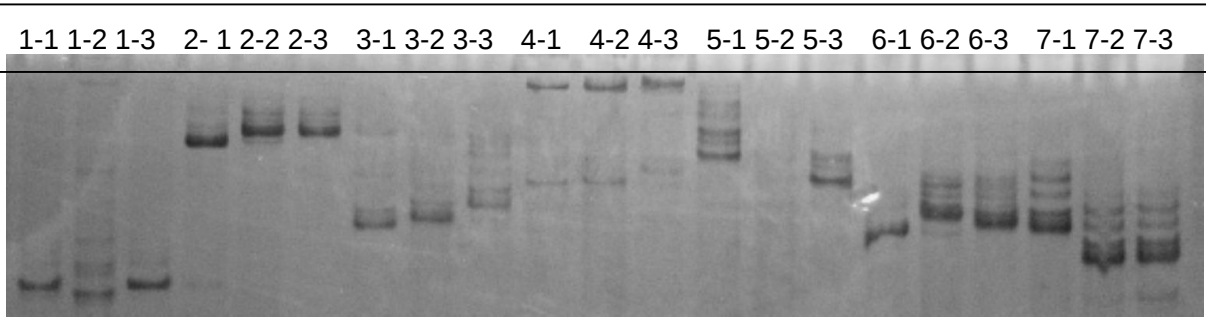


图 1 水稻 SSR 引物在东北粳稻、黑 B、黑恢间的扩增多态性(引物 1-7 均位于第 6 染色体)



图 2 InDel 标记在日本晴、9311、东北粳米、黑保、黑恢之间的多态性(1、R7M17;2、R7M37;3、R8M23;4、R8M46)

为明确这些引物位点与目的基因位点是否存在连锁关系,在所构建的F₂代分离群体中随机选取 10 株黑色种皮植株和 10 株无色种皮植株构建显性 DNA 池和隐性 DNA 池,采用黑 B 粳稻亲本和无色东北粳稻亲本作为参照,用所筛选 SSR 和 In-

del 引物对其进行了抗病性遗传连锁性分析。结果显示,Indel 引物 R4M43 在显性池扩增出与黑 B (黑色种皮)亲本相同的带型;隐形池扩增出与东北粳稻(无色种皮)相同的带型(图 3)。证明用 In-del 引物 R4M43 扩增出的差异 DNA 片段位点与黑

色种皮基因BP存在遗传连锁关系。

用这些引物对显性DNA池和隐性DNA池进行多态性鉴定,结果表明,水稻第4染色体上的Indel标记R4M43与籼稻黑米色素基因连锁。

2.3 遗传连锁性分析

为检测目的基因位点与所获标记位点的遗传连锁性,从构建的1000株F₂代群体中随机选取200株分别提取基因组DNA。利用这些连锁标记进一步对这200个单株进行分析,以确定BP基因

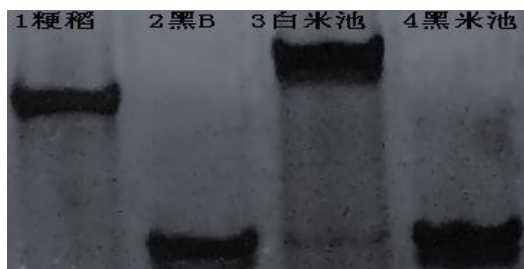


图3 R4M43的分池鉴定图

3 讨论

研究发现,黑米花色苷含量高于紫色米、棕色米^[13],因此具有更大的保健医疗价值。目前稻米色素基因的定位研究较少,主要相关文献集中在紫米色素基因定位。本研究利用SSR标记和新型Indel分子标记发掘黑米色素基因连锁的分子标记,找到的分子标记将可用于黑米育种实践,提高育种效率。同时为下一步克隆相关基因打下了基础。

参考文献:

- [1] 孔令瑶,汪云,曹玉华,等. 黑米色素的组成与结构分析[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 25-29.
- [2] 张名位,杜应琼. 中国黑米种质资源的评价与利用研究进展[J]. 湖北农学院学报, 1995, 15(4): 309-317.
- [3] 胡秋林,钟丽玉. 黑米营养成分的基础分析[J]. 武汉食品工业学院学报, 1997(1): 5-9.
- [4] Koh H J, Won Y J, Cha G W, et al. Varietal variation of pigmentation and some nutritive characteristics in colored rices[J]. Korean J Crop Sci, 1996, 41(5): 600-607.
- [5] 陈廷文. 稻谷黑米种皮的遗传特性研究[J]. 四川农业大学学报, 1995, 13(4): 498-505.

与标记位点之间的连锁关系。用Mapmaker EXP 3.0b软件对黑色种皮BP基因与Indel位点连锁分析结果表明,2对Indel标记R4M23、R4M43均与BP基因连锁,标记分布于BP基因的两侧,在染色体上的排列顺序为R4M23-BP-R4M43,遗传距离分别为10.2和14.6cM(图4)。根据水稻分子标记图谱网,Indel引物R4M23、R4M43均位于第4染色体上,据此推测BP亦位于水稻第4染色体上。

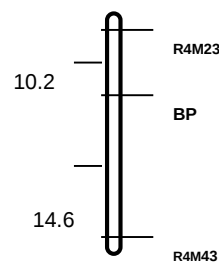


图4 BP基因在第4染色体上的遗传图

- [6] 庄杰云,杨长登,钱惠荣,等. 紫米基因与RFLP标记的连锁分析[J]. 遗传学报, 1996, 23(5): 372-375.
- [7] 吴爱忠. 上农特种稻植株色泽遗传的初步研究[J]. 上海农学院学报, 1994, 12(2): 104-106.
- [8] 顾信媛. 稻米黑色种皮的遗传分析[A]. 中国特种稻学术研讨会论文集[C]. 上海: 上海科技教育出版社, 1992: 129.
- [9] 张名位,彭仲明,徐运启. 黑米稻种皮色素含量的遗传效应分析[J]. 中国水稻科学, 1995, 9(3): 149-155.
- [10] Kinoshita T, Takamure I. Gene mapping of the first and second linkage groups in rice[J]. J Fac Agr Hokkaido Univ, 1990, 64(3): 208-217.
- [11] Hsieh S C, Chang T M. Genic analysis in rice: Genes for purple pericarp and other characters [J]. Japanese Journal of Breeding, 1964, 14(3): 141-149.
- [12] Takahashi M, Kinoshita T, Morri K. Genic constitution on red coloration in rice grains of an Indian variety, Surjamkhi (Japanese)[J]. Res Bull Univ Farm, Hokkaido Univ, 1972, 18(1): 47-53.
- [13] 廖金花. 特种稻米色遗传分析及其杂种优势的利用[D]. 雅安: 四川农业大学, 2003.
- [14] Michelmore R W, Paran I, Kesseli R V. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations[J]. Proc Natl Acad Sci, 1991, 88(21): 9828-9832.