

用 ISSR 分子标记技术分析 16 个蝴蝶兰品种的亲缘关系研究

李敏, 王尧峰, 明凤

(复旦大学生命科学学院, 国家遗传工程重点实验室, 植物研究所, 上海 200433)

摘要:从 DNA 提取、退火温度、扩增循环数、镁离子浓度等方面对 ISSR-PCR 反应体系的条件进行了优化, 筛选出 8 个引物, 共扩增出 193 条片段(多态性条带比例为 92.2%), 所扩增的条带数分布范围为 300 ~ 2 500 bp, 表明供试品种间具有丰富的遗传多态性。聚类分析结果表明: 来源于不同地域的 16 个品种在遗传距离 $L=0.2225$ 处可分为 2 个类群; 来源于日本、台湾的品种分别聚类为一簇, 公司新育成的品种为一簇。根据分子标记确定的亲缘性远近提出了可能的杂交组合。蝴蝶兰 ISSR 分子标记优化体系的建立为兰科类观赏植物的亲缘关系分析提供了理论依据。

关键词:ISSR; 蝴蝶兰; 亲缘关系; 分子育种

doi:10.3969/j.issn.1008-0864.2010.01.11

中图分类号:S682.31 **文献标识码:**A **文章编号:**1008-0864(2010)01-0060-06

Studies on Genetic Relationship Analysis of 16 *Phalaenopsis* hybrid Cultivars by ISSR Molecular Marker Technology

LI Min, WANG Yao-feng, MING Feng

(National Key Laboratory of Genetic Engineering, Institute of Plant Biology, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract: By optimizing DNA extraction method, annealing temperature, amplification of cycle number and Mg^{2+} concentration, we established an optimal ISSR-PCR reaction system for *Phalaenopsis* in this study. 8 primers were used to generate 193 brands of DNA fragments, the average percentage of polymorphic bands was 92.2%, and the range of amplified fragments was 300 ~ 2 500 bp. This result indicated that the tested species possessed abundant genetic polymorphism. The 16 species of *Phalaenopsis* can be divided into 2 groups at $L=0.2225$, one stand for Japanese/Taiwan species, and the other is for species newly cultured by the Company. The potential hybrid combinations of different species were suggested according to the affinity distance determined by molecular marker. The establishment of ISSR molecular marker system in *Phalaenopsis* has provided theoretical basis for analyzing genetic relationship of Orchidaceae ornamental plants.

Key words: ISSR; *Phalaenopsis* hybrid; genetic relationship; molecular breeding

ISSR(inter simple sequence repeat)是一种简单重复序列区间扩增多态性的分子标记技术^[1]。该技术是一种用于品种鉴定的重要工具,对于构建遗传图谱的研究和群体遗传学的研究来说也是一种有效的分子标记技术。ISSR 标记技术所用的 PCR 引物序列广泛地定位于植物基因组中^[2],由于其具有较高的退火温度(45 ~ 60℃)以及相

对较长的引物序列(16 ~ 25 bp),其 PCR 较其他分子标记技术有可重复性更强以及多态性更高的优点^[3,4],已经被广泛应用到物种亲缘关系和遗传多态性的分析及鉴定当中^[5,6]。另外分子标记技术具有成本低、操作简单、DNA 样品用量少、事先不需要知道太多待分析对象的序列特征^[7-9]等特点,也让 ISSR 分子标记技术成功地应用于农艺

收稿日期:2009-09-08;修回日期:2009-09-30

基金项目:国家 863 计划项目(2008AA10Z116);上海市科委重点科技攻关(08391910400);上海市青年科技启明星计划(08QH14003);国家基础科学人才培养基金(J0630643)资助。

作者简介:李敏,硕士研究生,主要研究方向为花卉无性繁殖及其优良品种培育以及非生物逆境生理。通讯作者:明凤,副教授,博士生导师,主要从事植物生理学及遗传学研究。E-mail:fming@fudan.edu.cn

植物的研究中,包括各种木本和草本园艺植物,例如越橘属植物^[10]、草莓^[11-13]、马铃薯^[14]和铁线莲^[15]等。

蝴蝶兰属于被子植物门单子叶植物纲中的兰科(Orchidaceae)蝴蝶兰属(*Phalaenopsis*),是一种名贵的观赏花卉植物,目前是世界上第二大盆栽植物^[16]。虽然蝴蝶兰物种都拥有相同的染色体数目($2n = 2x = 38$),但是基因组之间差异很大^[17],因此加深对其不同种类遗传多样性的认识,从而提高花卉的观赏价值和经济价值等也显得十分重要。另外,研究物种的多样性以及物种之间的亲缘关系对育种以及种质遗传变异也具有指导意义^[18]。

国内外有关蝴蝶兰的分类与鉴定研究包括花瓣形态特征学、基础细胞学特征、组织培养以及生理生化特性等。随后,分子生物学的分类遗传鉴定手段也开始应用于蝴蝶兰的研究中,Lin 等^[17]于 2005 年报道 GISH 是很有效的鉴定蝴蝶兰遗传关系的工具;另外 Chang 等^[16]对 AFLP 在蝴蝶兰遗传多样性以及物种保守性的应用研究也做了阐述。但是运用 ISSR 技术分析蝴蝶兰遗传多态性以及亲缘关系的报道较少,并且具体哪一类或哪种形态特征能够与分类学密切相关,尚无深入报道。本研究运用优化了的 ISSR-PCR 技术初步探讨了蝴蝶兰花色、唇瓣与遗传变异关系,对蝴蝶兰的不同品种的亲缘关系鉴定以及分子生物学辅助育种提供研究基础。通过我们的研究,能够为蝴蝶兰不同品种间杂交组合的确定提供借鉴,提高品种育成的高效性,丰富蝴蝶兰花卉市场的多样性。

1 材料与方法

1.1 实验材料和样本采集

上海鼎汉生物科技有限公司培养基地馈赠有代表性的观赏蝴蝶兰品种。每个系列根据颜色等不同特征而以不同数字作为代号。16 个不同品种及各自特征如下:CSM6,萼片、翼瓣白色,唇瓣内侧呈粉红色,外侧白色,翼瓣圆,唇瓣较大;CSM7,萼片、翼瓣白色,唇瓣边缘呈黄色,翼瓣圆;CSM10,花瓣肉色,基部粉红色,唇瓣偏橘黄色,翼瓣圆;CSM21,花冠粉红色,末端色深,翼瓣圆;JM670,花冠紫红色,翼瓣大、伞型;JM711,花冠粉

红色,翼瓣大、伞型;JM722,花冠粉红色,翼瓣大、伞型;S051,花冠淡黄色,基部白色,翼瓣尖而瘦小,唇瓣末端呈金黄色;S020,萼片、翼瓣为淡黄、分红条纹相间,唇瓣为纯粉红色,翼瓣呈圆三角形;S142,花冠深紫红色,有淡黄色边缘,翼瓣呈圆三角形,唇瓣收拢;S157,萼片、翼瓣白色偏粉,唇瓣粉红色,翼瓣略向内卷曲,伞型;S167,萼片、翼瓣黄绿色底,粉红色脉,均向内卷曲,唇瓣粉红色,较开放;S201,花冠紫褐色,尖端白色,翼瓣尖而平直,唇瓣聚拢;S271,萼片、翼瓣黄色底,有粉红色短弧状斑点同心排布,唇瓣白色;S175,花冠白色底,有粉红色大斑点,翼瓣伞型,萼片长;S402,花冠淡黄色,有紫红色斑点内密外疏分布,翼瓣尖而平直。

16 个供试品种(图 1)均为市场上主销品种,分别具有抗病、花型和花色的优势。根据来源分为三个系列,CSM 系列为日本引进品种;JM 系列为台湾引进品种;而 S 系列为上海鼎汉生物科技有限公司育成的品种。16 个品种在花型、唇瓣、花色等方面存在很大的差异。这些特征为其分子标记筛选与辅助性育种提供丰富的材料基础。



图 1 取样蝴蝶兰的花瓣图片

Fig. 1 Photos for corolla of 16 species used as material in the study.

1: CSM6; 2: CSM7; 3: CSM10; 4: CSM21; 5: JM670; 6: JM711; 7: JM722; 8: S051; 9: S020; 10: S142; 11: S157; 12: S167; 13: S201; 14: S271; 15: S175; 16: S402

1.2 蝴蝶兰样本基因组 DNA 的提取

取各品种蝴蝶兰新鲜叶片,洗涤干净后置于 -70°C 备用。叶片基因组 DNA 的提取采用改良的 SDS 提取方法。每个样品取 0.4 g 叶片,在液

氮中充分研磨,加入 0.7 mL SDS 提取液 [SDS 1.5% (W/V), NaCl 0.5 mol/L, EDTA (pH 8.0) 0.02 mol/L, Tris-HCl (pH 8.0) 0.01 mol/L, 2-mercaptoethano 12% (V/V)] 进行提取,65℃保温 40 min,期间充分混匀几次,12 000 r/min 室温离心 10 min,上清液转移至新的离心管,加等体积酚:氯仿:异戊醇 (V/V/V, 25:24:1),混匀后于 12 000 r/min 离心 10 min,加入 RNase A (终浓度 0.5 μg/mL),65℃保温 1 h,消化污染的 RNA,以酚:氯仿:异戊醇重新抽提一次去除杂蛋白,最后以 2 倍体积乙醇沉淀 DNA,70% 乙醇洗涤 2 次,室温干燥 10 min,以 TE (10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1 mmol/L EDTA) 缓冲液溶解 DNA。纯化的 DNA 经电泳检测,稀释为 10 ng/μL 的均一浓度。

1.3 ISSR 引物筛选与 PCR 扩增

ISSR 的引物由上海生工公司合成。25 个引物根据在三个品种中每个都要有清晰重复性好稳定性高的条带为指标,共计筛选出 8 个引物进行 PCR 分析。PCR 反应在 Thermo Cycler 2720 PCR 仪上进行。反应体系 (20 μL) 为: *Taq* DNA 聚合酶 (5 U/μL) 0.2 μL, 10 × PCR buffer 2.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 1.6 ~ 2 μL, 10 mmol/L dNTPs 0.8 μL, 10 μmol/L 引物 1.0 μL, 10 ng/μL 模板 DNA 1.0 μL, ddH₂O 13.0 ~ 13.4 μL。扩增程序为: 94℃ 4 min, 94℃ 55 s, 52 ~ 53℃ 55 s, 72℃ 1.5 min, 45 个循环数; 72℃ 7 min。PCR 扩增产物以 1.3% 的琼脂糖凝胶, 1.0 × TBE 缓冲液, 4 V/cm

的电压为条件进行电泳分离并在凝胶成像仪下成像,用专门的 Touch 软件进行截图与记录。

1.4 数据分析

将 ISSR 电泳图记录后进行人工读带,以 DNA2000 为分子量标准,同一引物扩增的电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性,属于同一位点的产物。按扩增阳性记为 1 和扩增阴性记为 0 的格式输入计算机,构成 ISSR 表型数据矩阵。用 MEGA 软件对群体进行 UPGMA 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 随机引物筛选及扩增结果

通过对退火温度、Mg²⁺ 等的筛选,优化了蝴蝶兰的 ISSR-PCR 反应体系,结果见表 1。

首先参照李萍等^[19] 的 ISSR-PCR 反应体系确定了 (UBC881、UBC862、UBC864、UBC868 等) 4 个引物的退火温度为 53℃, Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L, 循环数为 45 个。但是 UBC864、UBC868 扩增效果不理想。基于此原因对于 Mg²⁺ 浓度条件进行优化, UBC864、UBC868 的 Mg²⁺ 浓度设为 2 mmol/L 后, 扩增效果理想, 以 UBC864 为例: Mg²⁺ 浓度为 2.5 mmol/L 时扩增结果如图 2A, Mg²⁺ 浓度为 2 mmol/L 时扩增结果如图 2B。在此条件下, 4 个引物均得到较多的条带, 其中以 UBC827 扩增出的多态性位点最多, 为推荐的首选引物 (图 3)。另外, 为了使扩增效果更加理想,

表 1 8 个 ISSR 引物及其对 16 个蝴蝶兰品种的扩增条件

Table 1 ISSR amplification profiles of 16 populations using 8 primers respectively.

引物 Primer (UBC)	引物序列 Primer sequence	退火温度(℃) Annealing temperature (℃)	循环数 Cycle number	Mg ²⁺ 浓度 (mmol/L) Concentration of Mg ²⁺ (mmol/L)	扩增片段大小 范围(bp) Scope of DNA fragments generated (bp)	多态性条带数/ 扩增条带数 Polymorphic bands
814	5'-CTCTCTCTCTCTCTA-3'	53	45	2	150 ~ 1 400	24/24
827	5'-ACACACACACACACAG-3'	55	35	2.5	100 ~ 1 500	29/29
862	5'-AGCAGCAGCAGCAGCAG-3'	53	45	2.25	180 ~ 2 000	28/33
864	5'-ATGATGATGATGATGATG-3'	53	45	2	300 ~ 2 500	28/31
867	5'-GGCGGCGGCGGCGGCGG-3'	52	45	2	200 ~ 1 200	8/8
868	5'-GAAGAAGAAGAAGAAGAA-3'	53	45	2	150 ~ 2 200	22/28
881	5'-GGTGGGGTGGGGTG-3'	53	45	2.25	150 ~ 2 500	21/21
895	5'-AGAGTTGGTAGCTTGTATC-3'	55	35	2.5	220 ~ 2 500	18/19
	平均值 Average	52 ~ 55	35 ~ 45	2.25 ~ 2.5	100 ~ 2 500	178/193 = 92.2%

本实验最后对所用引物分别进行了 35 个、45 个循环数的尝试,除了 UBC895 和 UBC827 为 35 个循环数,其他均为 45 个循环数,可得到清晰的主条带,条带大小分布在 300~2 500 bp 范围内(表 1)。在所选用的 25 个随机引物中,共筛选确定 8 个条带清楚且多态性丰富的随机引物(表 1),共扩增出 193 条片段,多态性条带比例为 92.2%(表 1),表现出丰富的遗传多态性。其结果较本室 2003

年采用 RAPD 分析的蝴蝶兰亲缘关系^[20]得到的多态性片段要多,可能与 ISSR 标记优势于 RAPD 有关。因此,本研究在优化 PCR 反应体系、反应程序、引物筛选方面都有一定的改进。

引物 864 可以作为鉴定物种 S020(图 2,条带 9)的特异引物;引物 827 可以作为鉴定物种 CSM7(图 3,条带 2,大约为 400 bp 左右)、JM722(图 3,条带 7,大约为 150 bp 左右)的特异引物。

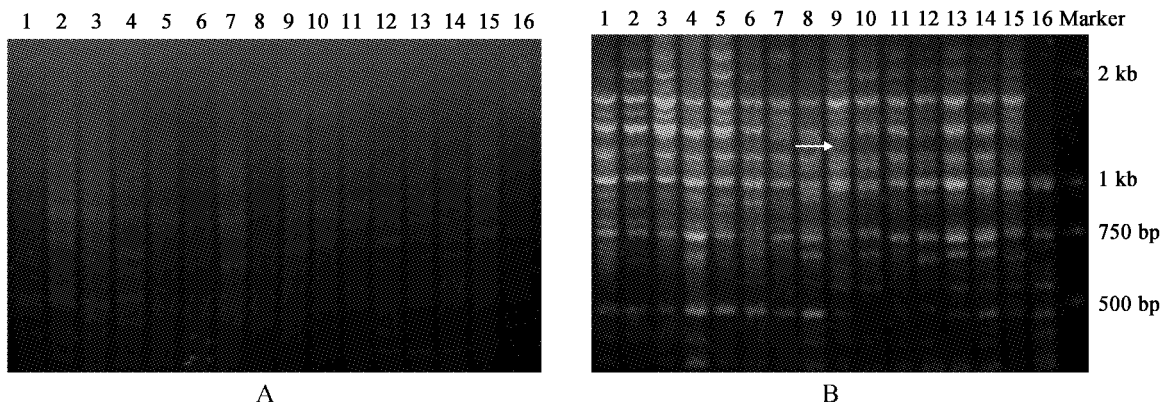


图 2 引物 UBC864 的 ISSR 图谱

Fig. 2 ISSR amplification profiles of 16 populations using primer 864.

A: 2.5 mmol/L Mg^{2+} ; B: 2.0 mmol/L Mg^{2+} .

1: CSM6; 2: CSM7; 3: CSM10; 4: CSM21; 5: JM670; 6: JM711; 7: JM722; 8: S051; 9: S020; 10: S142; 11: S157; 12: S167; 13: S201; 14: S271; 15: S175; 16: S402; Marker: DL2000.

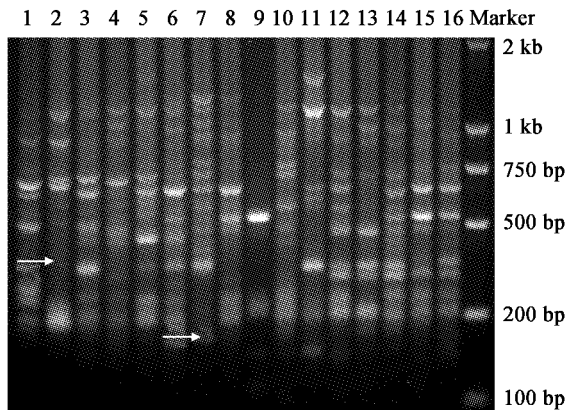


图 3 引物 UBC827 的 ISSR 图谱

Fig. 3 ISSR amplification profiles of 16 populations using primer UBC827.

1: CSM6; 2: CSM7; 3: CSM10; 4: CSM21; 5: JM670; 6: JM711; 7: JM722; 8: S051; 9: S020; 10: S142; 11: S157; 12: S167; 13: S201; 14: S271; 15: S175; 16: S402; Marker: DL 2000.

2.2 系统树的构建与分析

通过对 16 个品种的聚类分析(图 4),可以明显地看出不同产区供试样品之间相似系数最小为

$L=0.4$,最大的能达到 $L=0.63$,显示品种间具有复杂的多样性,因此从统计学上分析表明这些材料对分子育种学是很有意义的。

品种 S051 是供试样品中唯一有香味的品种, S051 从进化的角度讲单独成为一个类群,其在大约 $L=0.28$ 处首先独立分化成一支。另外,在表型上也可以看出它花型简单。其他品种在约 $L=0.472$ 处分为两个类群, A 类群中 A1 中的品种皆为白颜色和纹理较单一的品种; A2 类群中的品种背景色上分别点缀有零星的杂色斑点或条纹,纹理脉络较清晰。相似度大小与蝴蝶兰花色、条纹、花心等的特征的相似性基本保持一致。在 A1 群中, JM 系列均聚类在一起,各品种间的 L 值均大于 0.6。其中 JM670 和 JM711 的 L 值大于 0.675; 同时在表型上,这三个品种均具有紫红色的花色和较大而圆的翼瓣; $L=0.58$ 处 CSM7 和 CSM10 与 JM670 和 JM711 分化为两支,但是相对其他类群来讲亲缘关系较近,这也与它们的花瓣纹理单一,颜色均一没有斑点或杂色等特点相吻合。来

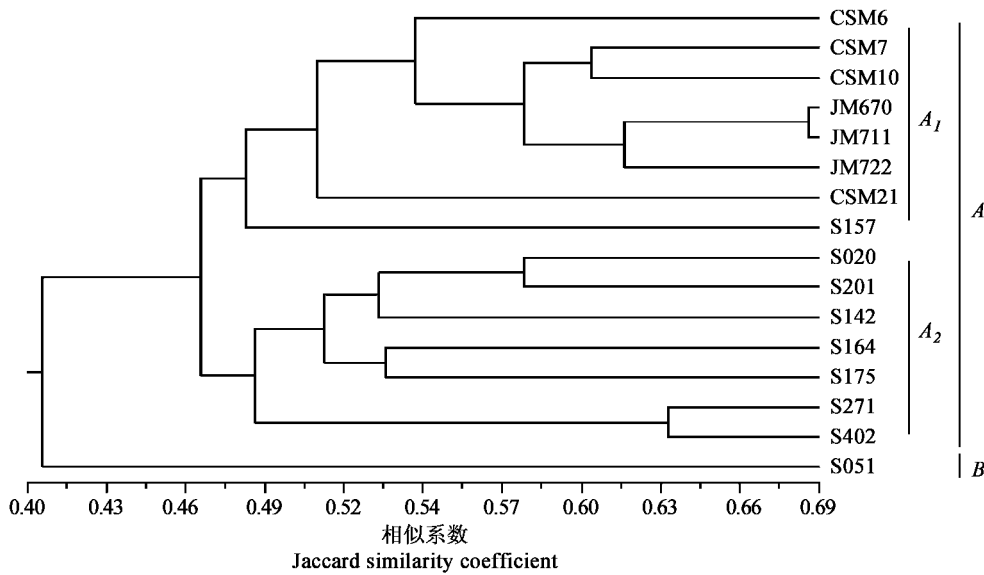


图4 16个蝴蝶兰品种的 Similarity-coefficient 聚类分析图

Fig.4 Similarity-coefficient dendrogram of 16 populations from *Phalaenopsis*.

自同一产区的品种之间在进化上更为相近:CSM系列和JM系列分别聚类到一起,与实验结果的2.1部分所观察到的形态表型吻合。A2类群中S271与S402相似系数达 $L=0.63$,从花瓣颜色也可看到它们整体颜色均为黄色。在A2组中,除具有杂色的斑点或条纹外,多数品种的翼瓣较尖锐,其中S271和S402之间的L值大于0.63,具有相似的黄底红斑纹的表型。

3 讨论

由于兰科植物ISSR研究报道较少^[20-22],因而主要参照水稻等其他草本植物的反应体系进行扩增,因此其稳定性与可靠性有待提高。本实验对各个影响ISSR-PCR的因素进行综合筛选,是根据PCR相关的各个条件的共同作用,而不是由某一个组分浓度和质量单独决定的^[23]。实验优化了退火温度、循环次数等对反应影响较大的参数,发现退火温度在52~55℃之间, Mg^{2+} 浓度为2~2.5 mmol/L更为合适,同时通过对各个影响PCR反应结果的因素进行探讨,最终获得了较为合适的ISSR-PCR体系(表1)。实验选取扩增谱带清晰稳定、重复性好的引物,对蝴蝶兰的亲缘关系进行了分析,建立了优化的反应体系,为蝴蝶兰品种鉴定及遗传多样性研究提供了有效的方法。

仅仅根据形态上的不同而人为地将蝴蝶兰不同物种分开是非常含糊不清的,分子标记筛选与

辅助性育种技术在蝴蝶兰这类园艺植物的亲缘关系分析以及新品种培育方面中显得尤为重要。本研究中亲缘性极高的品种如CSM7,CSM10的相似系数达0.55,证明它们适宜杂交。而对于CSM6和CSM21,由于它们的相似性较低约为 $L=0.50$,若在它们之间进行杂交,会避免长期近缘杂交带来的品种优势退化。另外白色花瓣的S157与同样为白色花瓣的CSM6,CSM7,CSM10等品种的相似系数 $L=0.482$,可尝试进行杂交,从而获得优良的浅色、粉色或者粉色与其他颜色混合色花瓣的新品种。另外,S167和S175之间杂交也可能得到花瓣向上翘起的即花瓣聚拢型的新品种。可见对于繁育新品种来说,较为精细的分子标记分类方法也体现出了它的优势。本研究对这些蝴蝶兰是否来源于近源属的杂交及其分类标准科学化进行了研究,为蝴蝶兰的分子育种提供理论依据,也将为新品种繁育奠定了理论基础。

参 考 文 献

- [1] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification [J]. *Genomics*, 1994, 20:176-183.
- [2] Wang Z, Weber J L, Zhong G, et al.. Survey of plant short random DNA repeats [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1994, 88:1-6.
- [3] Qian W, Ge S, Hong D Y. Genetic variation within and among populations of a wild rice *Oryza granulate* from China detected by RAPD and ISSR markers [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2001, 102: 440-449.
- [4] Debnath S C. Development of ISSR markers for genetic

- diversity studies in *Vaccinium angustifolium* [J]. *Nordic. J. Bot.*, 2009, 27:141-148.
- [5] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, *et al.*. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 2000, 100:1311-1320.
- [6] Wolfe A D, Randle C P. 2001. Relationships within and among species of the holoparasitic genus *Hyobanche* (*Orobanchaceae*) inferred from ISSR banding patterns and nucleotide sequences [J]. *Syst. Bot.*, 26:120-130.
- [7] Reddy P M, Sarla N, Siddiq E A, *et al.*. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding [J]. *Euphytica*, 2002, 128:9-17.
- [8] Kalita M C, Mohapatra T, Dhandapani A, *et al.*. Comparative evaluation of RAPD, ISSR and anchored-SSR markers in the assessment of genetic diversity and fingerprinting of oilseed *Brassica* genotypes [J]. *Plant Biochem. Biotech.*, 2007, 16:41-48.
- [9] Yao M Z, Chen L, Liang Y R. Genetic diversity among tea cultivars from China, Japan and Kenya revealed by ISSR markers and its implication for parental selection in tea breeding programmes [J]. *Plant Breed.*, 2008, 127:166-172.
- [10] Debnath S C. Inter simple sequence repeats (ISSR) to assess genetic diversity within a collection of wild lignonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) clones [J]. *Can. J. Plant Sci.*, 2007, 87:337-344.
- [11] Arnau G, Lallemand J, Bourgoin M. Fast and reliable strawberry cultivar identification using inter simple sequence repeat (ISSR) amplification [J]. *Euphytica*, 2002, 129:69-79.
- [12] Korbin M, Kuras A, Zurawicz E. Fruit plant germplasm characterization using molecular markers generated in RAPD and ISSR-PCR [J]. *Cell Mol. Biol. Lett.*, 2002, 7:785-794.
- [13] Debnath S C, Khanizadeh S, Jamieson A R, *et al.*. Inter simple sequence repeat (ISSR) markers to assess genetic diversity and relatedness within strawberry genotypes [J]. *Can. J. Plant. Sci.*, 2008, 88:313-322.
- [14] Prevost A, Wilkinson M J. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars [J]. *Theor. Appl. Genet.*, 1999, 98:107-112.
- [15] Gardner N, Hokanson S C. Inter simple sequence repeat fingerprinting and genetic variation of *Clematis* cultivars and commercial germplasm [J]. *HortScience*, 2005, 40:1982-1987.
- [16] Chang Y K, Veilleux R E, Iqbal M J. Analysis of genetic variability among *Phalaenopsis* species and hybrids using amplified fragment length polymorphism [J]. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, 2009, 134(1):58-66.
- [17] Lin C C, Chen Y H, Chen W H, *et al.*. Genome organization and relationships of *Phalaenopsis* orchids inferred from genomic *in situ* hybridization [J]. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 2005, 46:88-100.
- [18] Paterson A H, Tanksley S D, Sorrells M E. DNA markers in plant improvement [J]. *Adv. Agron.*, 1991, 46:39-90.
- [19] 李 萍, 石金磊, 胡永红, 等. 凤梨亚科光萼荷属与其近源属亲缘关系的 ISSR 分子鉴定 [J]. *种子*, 2007, 26(11):35-40.
- [20] 明 凤. 蝴蝶兰不同花色品种遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. *上海农业学报*, 2003, 19(2):44-47.
- [21] 赵 谦, 杜 虹, 庄东红, 等. 14 个蝴蝶兰品种遗传关系的 ISSR 分析 [J]. *植物研究*, 2008, 28(2):227-231.
- [22] 赵 谦, 庄东红, 杜 虹, 等. ISSR 在蝴蝶兰亲缘关系分析中的初步应用 [J]. *汕头大学学报 (自然科学版)*, 2007, 22(4):66-70.
- [23] 付 燕, 罗 楠, 杨 芬, 等. 枇杷属植物 ISSR 反应体系的建立和优化 [J]. *果树学报*, 2009, 26(2):180-185.

【863 课题介绍】

课题名称: *Osfad8* 介导水稻耐低温胁迫应答网络的定位及其应用研究

课题编号: 2008AA10Z116

课题内容、目标:

1. 利用生物信息学的方法以及启动子序列删除分析策略, 研究 *Osfad8* 与上游胁迫应答网络的联接口。

2. 通过比较低温下水稻 *Osfad8* 突变体、野生型水稻和过表达 *Osfad8* 水稻的不同株系的叶绿体蛋白谱和核基因转录组, 建立低温下水稻叶绿体蛋白组成和丰度数据库与叶绿体膜系统脂肪酸不饱和程度数据库。

3. 利用 *Osfad8* 启动子受低温诱导的特性, 改变 *Osfad8* 上游以及内质网上的脂肪酸脱氢酶基因的条件表达特性, 并通过在野生型水稻中单独或组合式转入这些启动子改良基因, 使

其直接参与到低温胁迫的应答网络中, 以获得一系列抗寒能力更强的转基因水稻株系。

课题进展:

已获得了低温诱导启动子, 证明目标基因启动子的低温响应特性; 对获得的 4 个水稻脂肪酸脱氢酶 *OsFAD2*, *OsFAD6*, *OsFAD7* 和 *OsFAD8* 进行了深入的研究, 研究了其光、温表达谱; 构建了 12 个表达载体; 获得了 5 个表达载体的共计 32 个转基因水稻株系 (T_1)。已对转基因水稻的低温响应进行研究, 申请专利 2 项, 核心文章 2 篇, 两篇 SCI 论文在审稿中, 培养 3 名硕士。目前已经完成该课题 70% 的研究内容。