

应用微卫星标记鉴别水稻籼粳亚种

樊叶杨, 庄杰云, 吴建利, 孙宝龙, 郑康乐

(中国水稻研究所国家水稻改良中心 杭州 310006)

摘要:应用 70 个微卫星标记分析了 3 个籼稻测验种和 3 个粳稻测验种的多态性,发现其中 36 个标记可以区分籼粳测验种。再以 18 个籼粳品种进一步筛选,找到了分布于 12 条染色体的 21 个籼粳特异性微卫星标记。在这 21 个标记中,20 个在籼粳亚种间带型相异,其中 7 个在亚种内带型一致,13 个在亚种内带型不一致;1 个标记在 12 个籼稻品种和 1 个粳稻品种检测到相同的带型,其余 11 个粳稻品种具有另一种带型。微卫星标记和 RFLP 标记检测籼粳亚种不仅具有一致性,而且还有互补性。

关键词:微卫星 DNA 标记 籼粳特异性 亚洲栽培稻

中图分类号 Q943 S511

文献标识码 A

文章编号 0253-9772(2000)06-0392-03

SSLP-based Identification of Subspecies in Rice (*Oryza sativa* L.)

FAN Ye-yang, ZHUANG Jie-yun, WU Jian-li, SUN Bao-long, ZHENG Kang-le

(National Center for Rice Improvement, CNRRI, Hangzhou 310006, China)

Abstract: Six indica and japonica testers were assayed using 70 microsatellite markers. Thirty-six markers distinguishing indicas from japonicas were detected. By further-screening among 18 indica and japonica varieties, 21 markers distributed on 12 rice chromosomes were found to be indica-japonica differentiated. No indica varieties shared same patterns with any japonica varieties at 20 marker loci, of which identical patterns were observed within subspecies at 7 loci while within-subspecies variations were observed at 13 loci. At the remaining locus, 12 indica and 1 japonica varieties had the same allele, while other 11 japonica varieties had another allele. It also showed that SSLP was not only consistent, but also complementary, to RFLP for the subspecies identification.

Key words: microsatellite DNA markers; indica-japonica differentiation; *Oryza sativa* L.

亚洲栽培稻的分类是一个重要而复杂的问题,一般将其分为籼、粳两个亚种。育种工作者常常应用形态特征来区分籼、粳,如程氏形态指数法,也有根据杂交亲和力和同工酶的分析方法^[1,2]。这些均不能满足育种工作者的需要。因此,有必要发展精确、可靠、快速、简便的鉴别方法。随着分子标记技术的发展,各种各样的 DNA 标记如限制性片段长度多态性(RFLP)、扩增片段长度多态性(AFLP)、简单序列长度多态性(SSLP)、随机扩增多态性 DNA(RAPD)和序标位(STS)等已经被应用于水稻的遗传变异和育种研究^[3-7]。我们的早期工作已经找到了一批对籼粳特异性具有鉴别能力的 RFLP 探针^[4],但操作较繁琐,成本较高。微卫星 DNA 标记,亦称简单序列重复(SSR),其长度多态性(SSLP)是由于 2~4 个核苷酸

串联重复的程度差异而引起的。使用特异的引物对,经过 PCR 扩增和凝胶电泳就可以检测到 SSLP。微卫星不仅具有 RFLP 的优点,而且操作简单、快速经济^[8],更适于在育种上应用。本研究是在早期工作的基础上,寻找具有籼粳特异性的微卫星标记,为微卫星标记在遗传育种上的应用提供基础。

1 材料和方法

1.1 实验材料

本研究所用的水稻品种(系)分别为:3 个籼稻测验种(南京 11、南特号、IR36)和 3 个粳稻测验种(秋光、早沙粳、巴利拉)^[10],以及 9 个籼稻品种(矮仔占、低脚乌尖、先锋 1 号、广四、桂朝 2 号、浙福 802、TN1、闽科早 1 号、珍龙 13)和 9 个粳稻品种(大

收稿日期:1999-10-21;修回日期:2000-02-01

基金项目:国家水稻基因组计划(101-09-06)

作者简介:樊叶杨(1975-11),男(汉),浙江人,学士学位,专业方向:分子遗传育种。

黑、老来青、雪河矮早、台中 65、黎明、越光、农垦 58、日本晴、螃蟹谷)。所有材料均由本所遗传育种系和品种资源系提供。首先应用籼粳测验种筛选能区别籼粳的微卫星引物,然后再以 18 个籼粳品种进一步筛选。

1.2 DNA 标记分析

DNA 提取:水稻总 DNA 的提取按原来的方法进行^[11] 稀释 20 倍应用。

SSR 分析:本研究所用的 SSR 引物对购自 Re-

表 1 籼粳特异性微卫星标记的引物序列

Table 1 Primer sequences of subspecies differentiating microsatellite markers

标记(Marker)	引物序列(5'-3')(Primer sequence)
RM4	TTGACGAGGTCAGCACTGAC AGGGTGTATCCGACTCATCG
RM13	TCCAACATGGCAAGAGAGAG GCTGGCATTTCGATTCCAG
RM16	CGCTAGGGCAGCATCTAAAA AACACAGCAGGTACGCCG
RM18	TTCCCTCTCATGAGTCCAT GAGTGCCTGGCCCTGTAC
RM20	ATCTTGTCCTGCAGGTCAT GAAACAGAGGCACATTTTCATTG
RM23	CATTGGAGTGGAGGCTGG GTCAGGCTTCTGCCATTCTC
RM25	GGAAAGAATGATCTTTTCATGG CTACCATCAAAACCAATGTTTC
RM29	CAGGGACCCACCTGTCTATAC AACGTTGGTCATATCGGTGG
RM202	CAGATTGGAGATGAAGTCTCTCC CCAGCAAGCATGTCAATGTA
RM205	CTGGTTCTGTATGGGAGCAG CTGGCCCTTACGTTTCAGTG
RM217	ATCCGAGCAATGCCTCGT GGTGTGAACAAAGACAC
RM226	GGTCACGTTTACGGATTCCAGATC GTAGTTACCGAATTGGTTTCATCC
RM228	CTGGCCATTAGTCTCTTGG GCTTGGGCTCTGCTTAC
RM234	ACAGTATCCAAGGCCCTGG CACGTGAGACAAAGACGGAG
RM245	ATGCCGCCAGTGAATAGC CTGAGAATCCAATTATCTGGGG
RM247	TAGTGCCGATCG ATGTAACGGGTTTTGACAAAGCG
RM248	TCCTTGTGAAATCTGGTCCC GTAGCCTAGCATGGTGCATG
RM250	GGTTCAAACCAAGCTGATCA GATGAAGGCCTTCCACGCAG
RM251	GAATGGCAATGGCGCTAG ATGCGGTTCAAAGATTTCGATC
RM258	TGCTGTATGTAGTCTGCACC TGGCCTTTAAAGCTGTCCG
RM259	TGGAGTTTGAGAGGAGGG CTTGTGTCATGGTGCATGTT

search Genetics Inc., 所选用的 SSR 为 (GA)_n 或 (CT)_n, 共选用了 70 对引物。反应体系参照厂商提供的方法, 使用的扩增仪为 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600, 循环条件为 94℃ 45s、57℃ 45s、升温 45s、72℃ 1min, 共 30 个循环, 最后在 72℃ 延伸 5min。其中部分引物对的退火温度调整为 56.5℃ 或 56.0℃。扩增产物在 3.0% 的 MetaPhor 琼脂糖凝胶 (FMC) 上电泳。分子量标准为 100bp DNA Ladder Plus (MBI)。凝胶经溴化乙锭染色后应用凝胶图象分析系统 GDS-7600 (UVP) 记录, 利用 LabWorks 软件计算各条带的分子量。

2 结果与讨论

在 70 个引物对中, 发现有 55 个可以揭示多态性, 其中 36 个可以区分籼粳测验种。将 36 对引物在 18 个籼粳品种中进一步筛选, 找到了 21 个籼粳特异性的微卫星标记, 其引物序列详见表 1^[8,9,10]。它们

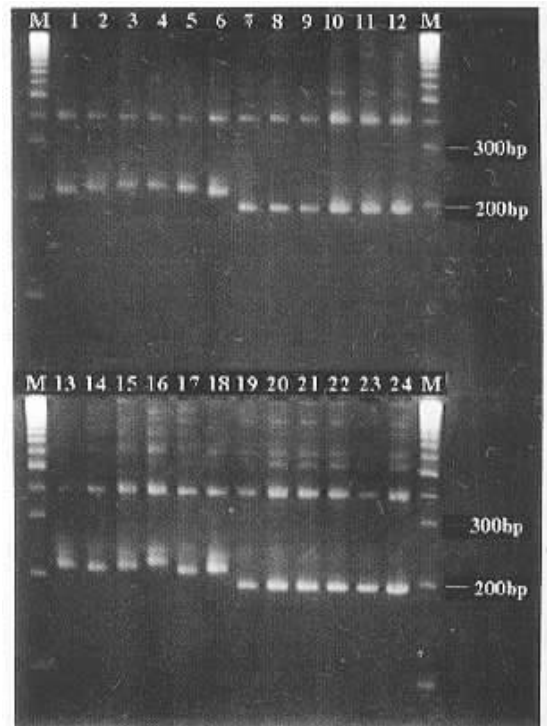


图 1 RM226 对水稻籼粳亚种的特异鉴别

1~3: 籼稻测验种; 4~6 及 13~18: 籼稻品种; 7~9: 粳稻测验种; 10~12 及 19~24: 粳稻品种; M: 100bp DNA 分子量标准。

Figure 1 RM226 distinguishing indica from japonica
1~3: indica testers; 4~6 and 13~18: indica varieties;
7~9: japonica testers; 10~12 and 19~24: japonica
varieties M: 100bp DNA ladder Plus.

表 2 籼粳特异性微卫星标记的染色体分布及其分子量大小

Table 2 Distribution and molecular weights of the indica-japonica differentiating SSLP markers

标记	染色体	分子量 (bp)		连锁的特异性 RFLP标记
		籼稻	粳稻	
RM23	1	142	134	
RM29	2	190	200	RG437
RM18	7	198	210	RG351
RM234	7	150	130	RG351
RM245	9	146	138	RG358
RM4	12	152	144	
RM20	12	232	210	
RM16	3	180~224	170	
RM251	3	110~144	118	
RM226	4	218~230	192	
RM258	10	144~154	130	
RM202	11	164, 184	176	
RM247	12	134, 180	154	
RM259	1	154~160	166~170	
RM250	2	152~156	168~180	RG256
RM217	6	144~160	116~120	RG64
RM248	7	98~106	86~92	RG351
RM25	8	142~150	116~138	
RM205	9	116~122	152~158	RG358
RM228	10	134~144	110~118	
RM13	5	140	126	

a. 微卫星标记的位置根据 Chen 等(1997)的结果^[8]。

b. 三个粳稻测验种和 8 个粳稻品种为 126bp, 1 个粳稻品种为 140bp。

分布于水稻基因组的 12 条染色体上(表 2)。在 21 个标记中,有 20 个标记在籼粳亚种间带型不一致,其中 7 个标记在亚种内带型一致,称之为核心标记(位于表 2 最上部);13 个标记在亚种内带型不完全一致,其中 6 个标记在粳稻中只有一个等位基因,而在籼稻中有多个等位基因,如 RM226 的鉴别标记在粳稻中仅有一个等位基因,其长度为 192bp,而在籼稻中有多个等位基因,其长度为 218bp~230bp(图 1);7 个标记在籼粳中都有多个等位基因,如 RM259 在籼稻中等位基因的长度为 154bp~160bp,粳稻中为 166bp~170bp。还有 1 个标记 RM13 在 12 个籼稻品种和 1 个粳稻品种检测到相同的带(140bp),在其余 11 个粳稻品种中检测到另一条带(126bp)。

总的来看,这些标记在染色体上是随机分布的,

4、5、6、8 号和 11 号染色体上各有 1 个标记,7 号和 12 号染色体上各有 3 个,其他染色体上各有 2 个。我们在以前的工作中确定了 21 个籼粳特异性的 RFLP 探针(包括 13 个核心探针),分别位于 1、2、3、4、6、7、9 号和 12 号染色体上^[4]。通过比较,发现 2、6、7 号和 9 号染色体上的标记分布的区域与这些染色体上的 RFLP 探针分布的区域是一致的;另外,在非籼粳特异性的 RFLP 探针分布的区域附近,也发现了籼粳特异性的微卫星标记,说明微卫星标记检测和 RFLP 标记检测除了具有一致性外,还有互补性。

RFLP 所反映的差别主要是由于酶切位点碱基对的置换,或者是酶切位点之间发生了插入、缺失等重排所引起的,变异的范围相差很大;而 SSLP 的差别主要是简单序列重复的程度不同。籼粳特异性的分子标记中包括 RFLP 和 SSLP,反映了分子中不同类型的变异参与了籼粳分化。

参考文献:

- [1] 周汇等.栽培稻分类方法的比较[J].中国水稻科学,1988,2(1):1~7.
- [2] Glaszmann JC. Isozymes and classification of Asian rice varieties[J]. Theor Appl Genet, 1987, 74: 21~30.
- [3] Zhang QF, et al. Genetic diversity and differentiation of Indica and Japonica rice detected by RFLP analysis[J]. Theor Appl Genet, 1992, 83: 495~499.
- [4] Qian HR, et al. Identification of a set of RFLP probes for subspecies differentiation in *Oryza sativa* L.[J]. Theor Appl Genet, 1995, 90: 878~884.
- [5] Beverley J, et al. Contrasting genetic diversity relationships are revealed in rice (*Oryza sativa* L.) using different marker types[J]. Molecular Breeding, 1997, 3: 115~125.
- [6] Hason J, et al. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers[J]. Genome, 1997, 40: 370~378.
- [7] Ghareyazie B, et al. Classification of rice germplasm I. Analysis using ALP and PCR-based RFLP[J]. Theor Appl Genet, 1995, 91: 218~227.
- [8] Wu K-S, et al. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[J]. Mol Gen Genet, 1993, 241: 225~235.
- [9] Panaud O, et al. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 597~607.
- [10] Chen X, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 553~567.
- [11] 顾铭洪,等.我国现用水稻广亲和性测验种的亲和性分析[J].中国农业科学,1991,24(6):27~32.
- [12] 卢扬江,郝康乐.提取水稻 DNA 的一种简易方法[J].中国水稻科学,1992,6(1):47~48.