

## 利用 SSR 和 SFP 标记分析不同抗瘟性水稻品种的多态性

黄玲<sup>a</sup>, 黄红梅<sup>b,c</sup>, 肖应辉<sup>a\*</sup>, 刘雄伦<sup>a</sup>, 刘二明<sup>c\*</sup>, 戴良英<sup>c</sup>

(湖南农业大学 a.农学院; b.生物科学技术学院; c.生物安全科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 利用 914 对引物(848 对 SSR 引物和 66 对 SFP 引物), 对籼型广谱持久抗瘟水稻品种湘资 3150 和籼型感病品种 CO39 的基因组多态性进行研究。结果表明, 881 对引物(815 对 SSR 引物和 66 对 SFP 引物)有扩增产物, 扩增率为 96.39%。共筛选到 220 对多态性引物, 多态性检出率为 24.10%。SSR 标记的多态性检出率为 23.58%, 低于 SFP 标记的多态性检出率(30.30%)。不同染色体间多态性检出率差异较大, 第 10 染色体的供试引物多态性检出率最高, 为 30%; 第 9 染色体的多态性检出率最低, 为 14.55%。不同碱基数目基序的标记间多态性检出率有较大差异, 其中 4 碱基重复型的多态性检出率最高, 为 27.96%, 其后依次为 2 碱基重复型、复合型、3 碱基重复型和单碱基重复型。

**关键词:** 水稻; 微卫星标记; SFP 标记; 稻瘟病抗性; 多态性

中图分类号: S511.035.3; Q78 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)03-0267-05

## Polymorphism analysis of different rice varieties with SSR and SFP marks

HUANG Ling<sup>a</sup>, HUANG Hong-mei<sup>b,c</sup>, XIAO Ying-hui<sup>a\*</sup>, LIU Xiong-lun<sup>a</sup>, LIU Er-ming<sup>c\*</sup>, DAI Liang-ying<sup>c</sup>

(a.College of Agronomy; b.College of Bioscience and Biotechnology; c.College of Bio-Safety Science and Technology, HNAU, Changsha 410128, China)

**Abstract:** 914 marks(848 SSR and 66 SFP)were used to find the genomic polymorphism between the blast resistant rice variety Xiangzi3150 and the blast susceptible variety CO39. The results showed that expected bands were amplified from 96.39% of 881 markers (815 SSR and 66 SFP), among which 220 polymorphic tags were identified and 24.10% were. The polymorphism rate of the SSR mark (23.58%) was lower than that of the SFP mark (30.30%). The rate of polymorphic marks on the 12 chromosomes was different. Chromosome 10 had the highest rate (30.00%) and chromosome 9 had the lowest rate (14.55%). SSR marks with different units also showed a significant difference in polymorphism rate. The SSR marks with tetranucleotide repeats had the highest polymorphism rate (27.96%), followed by the repetitive dinucleotide, repetitive trinucleotide and repetitive single-nucleotide tags, respectively.

**Key words:** rice; SSR; SFP; rice blast resistance; polymorphism

微卫星标记(simple sequence repeat, SSR)覆盖整个基因组,数量丰富,揭示的多态性高,呈共显性<sup>[1]</sup>。2002年,McCouch等<sup>[2]</sup>开发出 2 240 对水稻 SSR 分子标记。2005年,国际水稻基因组测序计划完成,认为水稻基因组总共含有 18 828 个 SSR 位

点<sup>[3]</sup>。目前,这些 SSR 分子标记已被广泛应用于水稻遗传连锁图谱构建和基因定位研究中<sup>[4-7]</sup>。SFP 标记(single feaure polymorphism, SFP)是近年来基于微阵列技术开发出来的一种基因组插入/缺失差异(InDel)标记。Shen等<sup>[8]</sup>利用生物信息学方法,通过

收稿日期: 2010-01-28

基金项目: 国家“973”计划项目(2006CB101904); 国家“948”计划项目(2006-G61); 国家自然科学基金项目(30871335); 湖南省教育厅项目(20060537004)

作者简介: 黄玲(1984—),女,广西柳州人,硕士研究生,从事作物分子育种研究;黄红梅为共同第一作者; \*通讯作者, xiaoyh@yahoo.com.cn; emliu08@126.com

比较水稻品种日本晴和 93-11 的全基因组序列的差异,构建了日本晴和 93-11 全基因组DNA序列多态性数据库,该数据库包含 1 703 176 个单核苷酸多态序列(single nucleotide polymorphism, SNP)和 479 406 个InDel片段. Edwards等<sup>[9]</sup>基于这些差异开发出 880 个SFP标记,并成功用于水稻稻瘟病抗性基因的定位.

由稻瘟病菌(*Magnaporthe oryzae*)引起的稻瘟病严重威胁着世界的粮食生产<sup>[10-12]</sup>. 实践证明,培育和合理利用抗病品种是解决这一问题最经济、最环保和最有效的途径. 湘资 3150 是湖南省的一个地方水稻品种,该品种表现出对稻瘟病菌广谱持久的抗性<sup>[13]</sup>; CO39 是一个对稻瘟病菌高感品种<sup>[5, 14-16]</sup>,对大多数稻瘟病小种表现感病. 湖南农业大学水稻基因组学实验室构建了二者杂交后代F<sub>2</sub>衍生的重组自交系(RILs)群体,用于定位湘资 3150 的抗瘟基因. 本研究旨在找出湘资 3150 和CO39 间呈现多态性的DNA分子标记,并探讨多态性标记的分布特点,以期为进一步定位湘资 3150 中稻瘟病抗性基因奠定研究基础.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

水稻品种湘资 3150 和 CO39,由湖南农业大学水稻基因组实验室提供.

引物:在各条染色体上随机选取部分引物,其中 SSR 引物及其序列信息取自 <http://www.gramene.org/>网站的 gramene 数据库, SFP 的序列信息及引物设计参见文献<sup>[9]</sup>. 所有 SSR 和 SFP 引物由南京金斯特公司合成,湖南农业大学水稻基因组实验室保存.

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 水稻叶片 DNA 提取和 SSR 分析方法

水稻长至 3~4 叶期,剪取叶片提取DNA. DNA 样品的制备采用CTAB法. 每份DNA统一用dd H<sub>2</sub>O 稀释成 20 ng/μL,作为PCR分析的模板.

SSR 分析程序采用 10 μL 的 PCR 反应体系: 1 μL 10×Buffer, 0.2 μL 2.5 mmol/L·dNTPs, 0.7 μL primer(2 pmol/μL), 0.1 μL rTaq(5 U/μL), 1 μL DNA 模板(20 ng/μL), 7.0 μL ddH<sub>2</sub>O. 扩增反应在PTC-200

(MJ Research Inc.) PCR仪上进行: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C变性 30 s, 55 °C退火 30 s, 72 °C延伸 1 min, 34 个循环, 72 °C延伸 7 min. 扩增产物用 8% 的非变性聚丙烯酰胺(PAGE)胶分离,通过银染显色. DNA 条带观察利用WD-9406 型胶片观察仪进行.

#### 1.2.2 统计分析

采用MapDraw 2.1 软件<sup>[17]</sup>绘制多态分子标记图谱,其中, SFP和SSR标记在染色体上的相对位置分别根据标记在BAC克隆的位置而确定.

## 2 结果与分析

### 2.1 供试引物在 12 条染色体上的分布

共检测 914 对引物在湘资 3150 和 CO39 之间的多态性,其中 SSR 引物 848 对, SFP 引物 66 对,共覆盖水稻基因组 12 条染色体 1 701.1 cM. 表 1 表明,所有引物较均匀分布于 12 条染色体,平均每条染色体约 76 对,第 6 染色体分布最多,有 96 对引物,其次是第 1 染色体,有 91 对,第 5、第 9、第 10 和第 12 染色体上的供试引物最少,为 50~66 对. 914 对引物中, 881 对引物有扩增产物,扩增率为 96.39%,所有染色体上的引物扩增率都在 90% 以上,其中第 4 和第 5 染色体上的扩增率都是 100%,扩增良好.

表 1 供试标记在 12 条染色体上的分布和多态性检出率  
Table 1 Distribution of tested markers on 12 chromosomes and the rate of polymorphic marker between rice varieties Xiangzi3150 and CO39

染色体	供试引物/对	有扩增产物的引物/对	引物扩增率/%	多态引物/对	多态性检出率/%
1	91	87	95.60	26	28.57
2	82	75	91.46	17	20.73
3	84	79	94.05	20	23.81
4	75	75	100.00	18	24.00
5	66	66	100.00	16	24.24
6	96	92	95.83	24	25.00
7	84	82	97.62	20	23.81
8	81	78	96.30	18	22.22
9	55	54	98.18	8	14.55
10	60	55	91.67	18	30.00
11	77	76	98.70	19	24.68
12	63	62	98.41	16	25.40
总计	914	881	96.39	220	24.10

2.2 多态性检出率的比较

在湘资 3150 和 CO39 间,共检测出多态性引物 220 对,其中 SSR 引物 200 对, SFP 引物 20 对,平均每条染色体约 18 对.品种间分子标记的多态性检出率为 24.10%(表 1).

不同染色体之间比较,结果第 9 染色体的多态性检出率远低于全基因组平均水平,只有 14.55%.多态性检出率最高的是第 10 染色体,其次为第 1 染色体(表 1).由此可推测两品种在第 10 和第 1 染色体上的多态性差异比较丰富.

不同类型标记之间比较,发现 SFP 引物的多态性检出率为 30.30%,高于 SSR 引物的多态性检出率(23.58%);SFP 的引物扩增率为 100%,高于 SSR

引物的扩增率(96.11%).由此可见,SFP 的多态性更丰富,可以用来构建高密度的遗传图谱.此外,SFP 标记在 2 个品种间的多态性比 SSR 更明显,更易于识别.

2.3 多态性分子标记在图谱上的分布

采用 Mapdraw2.1 软件对检测到的 220 对多态性分子标记进行了图谱绘制(图 1),多态分子标记分布距离达 1 650.5 cM,占 914 对分子标记覆盖距离(1 701.1cM)的 97.03%,相邻多态标记间平均遗传距离为 7.5 cM.第 3 染色体上多态标记分布距离长 231 cM,其多态引物覆盖率达 100%;第 5、第 7、第 9 和第 11 染色体的多态覆盖率也接近 100%;多态覆

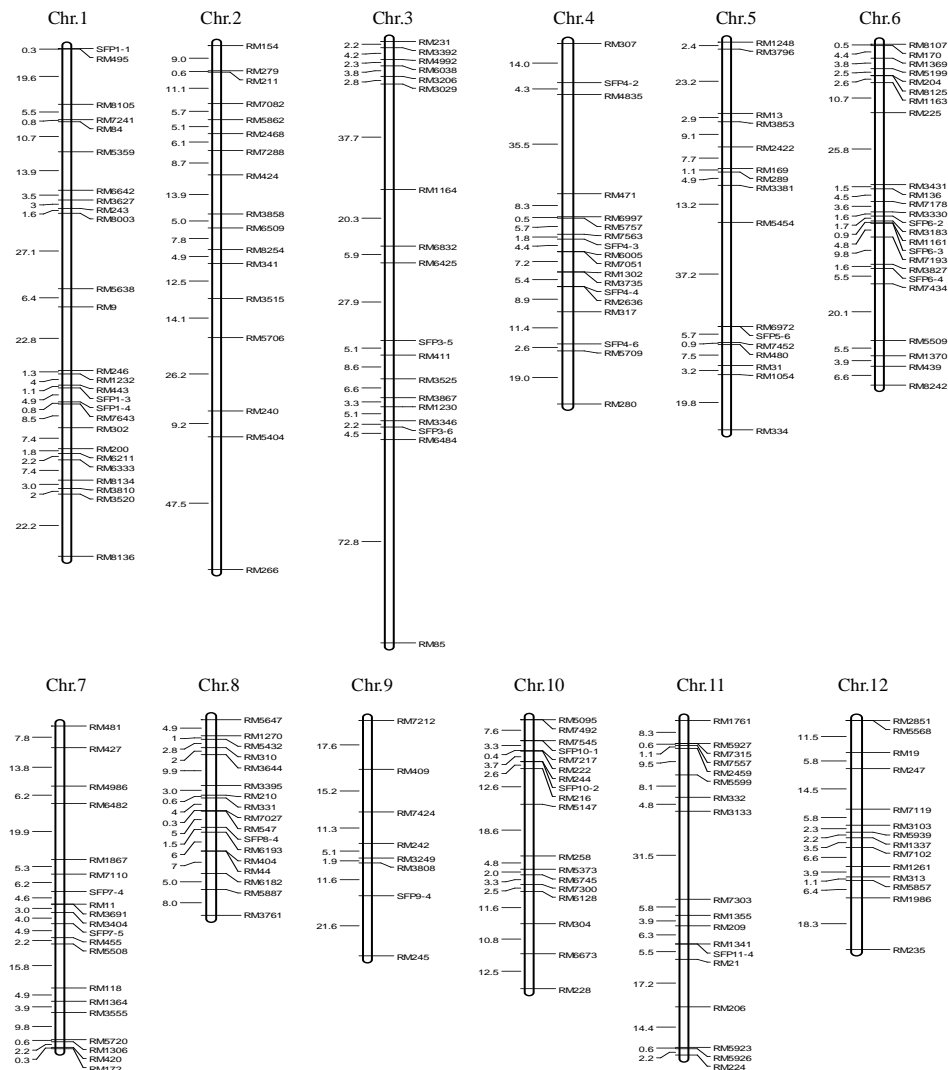


图 1 多态性分子标记在水稻 12 条染色体上的分布

Fig.1 Distribution of the polymorphic DNA markers on rice chromosomes

盖率最低的是第10和第12染色体,约为85%,未能覆盖整条染色体.多态引物平均间距最小的是第6染色体,为5.15 cM,其次为第10染色体,为5.35 cM.平均间距最大的是第9染色体,达到14.04 cM.此外,图谱中尚有一些染色体区域未被标记覆盖,如第2染色体上的RM5404至RM266间、第3染色体上的RM3029至RM1164间、RM6484至RM85间、第4染色体的RM4835至RM471间和第5染色体RM5454至RM6972间的图距较大,有的甚至达到70 cM以上.但是相邻多态标记的过大间距并不一定是由于供试引物在该染色体上的分布密度(平均间距)或者该染色体所有标记的最大间距过大造成的.如第3染色体的RM6484至RM85间,该区段有引物覆盖,但是没能找到在湘资3150和CO39间呈现多态的标记,因此,在有大量分子标记覆盖的情况下,这极有可能与双亲在这些染色体区段同源性较高有关.在没有足够标记覆盖的情况下,该区域多态引物间距过大,有待进一步增加该区域供试标记数量以获取更多多态引物,从而增加图谱的分子标记密度.

#### 2.4 不同类型SSR标记多态性检出率比较

根据基序碱基数目的不同,SSR分子标记可以分为5类,即单碱基重复型、2碱基重复型、3碱基重复型、4碱基重复型和不同碱基组成的复合重复型.其中2碱基重复型基序的标记数最多,共有481个,单碱基重复型的最少,仅有1个.4碱基重复型的多态性检出率最高,为27.96%,2碱基重复型的多态性检出率次之,为24.74%,与所有供试引物的平均多态性检出率24.10%接近;复合型和3碱基重复型的多态性检出率相对较差,分别为21.05%和20.08%,略低于平均水平.

在2碱基重复型中,以GA为基序的标记数目最多,为85个,占供试SSR引物总数的10.02%,其中多态引物为27个,多态性检出率为31.76%,以AT为基序的标记次之,为68个,占总数的8.02%,其中多态性引物为16个,多态性检出率为23.53%.

### 3 讨论

SSR为共显性的遗传标记,在水稻基因组内的

多态性高.比较发现,作为一种InDel标记,SFP标记的扩增率和多态性检出率都要高于SSR标记,并且其多态性差异也比SSR标记更明显.这与冯芳君等<sup>[18]</sup>的研究结果一致.此外,McCouch<sup>[2]</sup>等在最初发现的2240个SSR标记中,(GA)<sub>n</sub>数量最多,达36%,其次为(AT)<sub>n</sub>和(CCG)<sub>n</sub>.在本研究中,也以GA为基序的SSR标记最多,并且其多态性引物出现频率最高,这很可能是水稻基因组富含GA的原因.

有研究表明,相同生态类型品种间的SSR多态性检出率明显低于不同生态类型品种间的检出率,而相同生态类型内改良品种间的多态性检出率又低于地方品种的检出率<sup>[19]</sup>.说明品种间亲缘关系的远近和SSR多态性检出率高低是相关的,因此,在基因定位或构建遗传图谱的研究中,作图群体的亲本应优先考虑选择亲缘关系相对较远的或生态类型差异较大的亲本.本研究所用湘资3150具有广谱持久的抗稻瘟病特性,CO39是广谱感病品种,二者适用于构建基因定位作图群体,但可能由于二者同属籼稻亚种,基因组同源性相对较高的缘故,其多态性检出率只有24.10%,并且多态标记在染色体上的分布不够均匀,第3染色体短臂甚至存在达70 cM的间距,将给遗传连锁图谱构建带来很大的困难.但随着分子标记的广泛开发,利用分子标记构建遗传连锁图谱的成本已经大大降低,因此后期将通过综合使用各种类型的标记,如SSR、SFP、SNP、AFLP和RFLP等,或者进一步扩大供试标记数量,对目标区段图谱进行加密,以获得理想的遗传连锁图谱,从而缩短目标基因的定位距离.

#### 参考文献:

- [1] 方宣钧,吴为人,唐纪良.作物DNA标记辅助育种[M].北京:科学出版社,2001:15-18.
- [2] McCouch S R, Teytelman L, Xu Y B, et al. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.)[J]. DNA Research, 2002, 9: 199-207.
- [3] International Rice Genome Sequencing Project. The map-based sequence of the rice genome[J]. Nature, 2005, 436: 2-8.
- [4] Wu J L, Fan Y Y, Li D B, et al. Genetic control of rice blast resistance in the durably resistant cultivar Gumei2 against multiple isolates [J]. Theor Appl Genet, 2005,

- 111 : 50-56 .
- [5] Chen S , Wang L , Que Z Q , et al . Genetic and physical mapping of *Pi37(t)* , a new gene conferring resistance to rice blast in the famous cultivar St.No.1[J] . *Theor Appl Genet* , 2005 , 111 : 1563-1570 .
- [6] 陈庆全 , 张玉山 . 籼型水稻 SSR 标记遗传连锁图谱的构建及偏分离分析[J] . *分子植物育种* , 2009 , 7(4) : 685-689 .
- [7] Lee S , Wamishe Y , Jia Y , et al . Identification of two major resistance genes against race IE-1k of *Magnaporthe oryzae* in the indica rice cultivar Zhe733 [J] . *Mol Breeding* , 2009 , 24 : 127-134 .
- [8] Shen Y J , Jiang H , Jin J P , et al . Development of genome-wide DNA polymorphism database for map-based cloning of rice genes[J] . *Plant Physiology* , 2004 , 135 : 1198-1205 .
- [9] Edwards J D , Janda J , Megan T , et al . Development and evaluation of a high-throughput , low-cost genotyping platform based on oligonucleotide microarrays in rice [J] . *Plant Methods* , 2008 , 4 : 13 .
- [10] Couch B C , Hohn L M . A multilocus gene genealogy concordant with host preferenc indicates segregation of a new species , *Magnaporthe oryzae* , from *M. grisea* [J] . *Mycologia* , 2002 , 94 : 683-693 .
- [11] 杨勤忠 , 林菲 , 冯淑杰 , 等 . 水稻稻瘟病抗性基因的定位及克隆研究进展[J] . *中国农业科学* , 2009 , 42(5) : 1601-1615 .
- [12] Liu X Q , Yang Q Z , Lin F , et al . Identification and fine mapping of *Pi39(t)* , a major gene conferring the broad-spectrum resistance to *Magnaporthe oryzae* [J] . *Mol Genet Genomics* , 2007 , 278 : 403-410 .
- [13] 刘二明 , 彭绍裘 , 黄费元 . 水稻品种对不同纬度稻瘟病菌株的抗性和病菌鉴定[J] . *西南农业学报* , 1995(增刊) , 158-161 .
- [14] 刘二明 , 叶华智 , 孙雁 , 等 . 水稻抗瘟性分类及品种与病菌谱系互作[J] . *湖南农业大学学报 : 自然科学版* , 2005 , 31(2) : 147-152 .
- [15] Yu Z H , Mackill D J , Bonman J M , et al . Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers [J] . *Theor Appl Genet* , 1991 , 81 : 471-476 .
- [16] Wang G L , Mackill D J , Bonman J M , et al . RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar [J] . *Genetics* , 1994 , 136 : 1421-1434 .
- [17] 刘仁虎 , 孟金陵 . MapDraw 在 Excel 中绘制遗传连锁图的宏[J] . *遗传* , 2003 , 25(3) : 317-321 .
- [18] 冯方君 , 罗利军 , 李荧 , 等 . 水稻 InDel 和 SSR 标记多态性的比较[J] . *分子植物育种* , 2005 , 3(5) : 725-730 .
- [19] 鲍根良 , 富田桂 , 小林麻子 , 等 . 粳稻品种 SSR 多态性检出率的分析[J] . *中国农业科学* , 2005 , 38(12) : 2549-2554 .

责任编辑: 罗慧敏  
英文编辑: 胡东平