

## 研究报告

### A Letter

# 元阳梯田月亮谷与测序水稻日本晴多态性 SSR 标记筛选

何玉忠<sup>1,2</sup>, 高东<sup>1</sup>, 何霞红<sup>1</sup>, 余磊<sup>3</sup>

1 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心, 昆明, 650201

2 元阳县新街镇农业综合服务中心, 元阳, 662416

3 昆明学院, 昆明, 650214

✉ 通讯作者: gaodong521@yahoo.com.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 11 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0011

收稿日期: 2012 年 03 月 12 日

接受日期: 2012 年 03 月 24 日

发表日期: 2012 年 04 月 26 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议最佳引用格式:

引用格式(中文):

何玉忠等, 2012, 元阳梯田月亮谷与测序水稻日本晴多态性 SSR 标记筛选, 分子植物育种(online) Vol.10 No.11 pp.1087-1091 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0011)

引用格式(英文):

He et al., 2012, Screening Polymorphic SSR Markers between Yuelianggu in Yuanyang Terrace and Sequenced Variety Nipponbare, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.11 pp.1087-1091 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0011)

**摘要** 试验以元阳梯田月亮谷为材料, 利用水稻 387 对 SSR 标记, 与测序品种粳稻日本晴的基因组进行比较, 共筛选到月亮谷与日本晴具多态性的标记 164 条, 占有效扩增引物的 50.5%。多态性标记间隔均匀, 可用于构建分子遗传图谱。这些标记对于构建地方品种基因的渗入系或近等基因系、定位克隆地方品种有益基因具有重要作用。

**关键词** 水稻; 微卫星标记筛选; 哈尼梯田; 地方品种; 日本晴

## Screening Polymorphic SSR Markers between Yuelianggu in Yuanyang Terrace and Sequenced Variety Nipponbare

He Yuzhong<sup>1,2</sup>, Gao Dong<sup>1</sup>, He Xiaohong<sup>1,2</sup>, Yu Lei<sup>3</sup>

1 The National Center for Agricultural Biodiversity, Yunnan Agricultural University, Kunming, 650201

2 Agricultural Comprehensive Service Center of Xinjie Town, Yuanyang, 662416

3 Kunming University, Kunming, 650214

✉ Corresponding author: zwsjsxz@zaas.org; ✉ Authors

**Abstract** Rice genome of Yuelianggu in Yuanyang terrace was compared with that of Nipponbare using 387 pairs of SSR markers. 164 pairs of polymorphism markers from Yuelianggu and Nipponbare were selected, and they are 50.5 percent of all effective amplification primer pairs. The interval of these polymorphic SSR markers was even and they could be used to construct a molecular genetic map. These polymorphism markers are important in constructing introgression lines or near-isogenic lines of local varieties and in cloning desirable genes of local varieties.

**Keywords** *Oryza sativa* L.; SSR marker selection; Hani terrace; Landraces; Nipponbare

### 研究背景

云南边远少数民族地区, 地方水稻品种资源丰富, 元阳梯田永续发展的稻作“人工湿地”保存并仍在栽种着大量地方稻种资源(高东等, 2009b), 此类地方稻种资源具有育成品种所遗失的优异种质, 是水稻育种、起源和进化研究不可缺失的过渡材料。有关元阳梯田水稻地方多样性的研究较少, 所见报道主要集中在普查整个稻作

系统水稻地方品种数多样性(徐福荣等, 2010a)及其遗传多样性(白秀红等, 2012); 在农业发展进程中, 元阳不同时期水稻地方品种表型多样性(徐福荣等, 2010b)和遗传多样性(徐福荣等, 2011)的变化; 以自然村为单位当前种植水稻地方品种的遗传多样性(高东等, 2011b); 不同收集地当前主栽水稻地方品种内部遗传异质性解析(高东等, 2009b); 当前主栽水稻地方品种和现代品种的内

部遗传异质性与其适应性差异(高东等, 2010)等。迄今为止, 对元阳梯田水稻地方品种分子遗传图谱构建, 有益基因的定位及克隆的研究未见报道。本试验利用 387 对 SSR 标记, 旨在对元阳梯田代表品种月亮谷和测序品种日本晴基因组的多态性 SSR 标记进行筛选, 构建分子遗传图谱, 为定位和克隆月亮谷中有益性状的基因及 QTL 奠定基础。

表 1 供试 SSR 标记扩增结果

Table 1 Summary of researched loci

染色体 Chromosome	供试位点数 No. of loci	有效位点数 No. of effective loci	多态性位点数 No. of polymorphic loci	有效扩增位点百分率(%) Percentage of effective loci (%)	多态性位点百分率(%) Percentage of polymorphic loci (%)
1	44	39	19	88.6	48.7
2	38	36	17	94.7	47.2
3	41	29	20	70.7	69.0
4	26	21	9	80.8	42.9
5	34	23	10	67.6	43.5
6	36	32	13	88.9	40.6
7	38	34	19	89.5	55.9
8	32	27	15	84.4	55.6
9	24	22	11	91.7	50.0
10	24	18	8	75.0	44.4
11	25	23	9	92.0	39.1
12	25	21	14	84.0	66.7
合计 Total	387	325	164	84.0	50.5

## 1 结果与分析

### 1.1 SSR 标记扩增结果

供试 387 对 SSR 引物及多态性筛选结果见表 1, 其中 325 对为有效扩增引物, 占 84.0%; 各染色体有效扩增率变幅为 67.6~94.7%, 其中 2 号染色体最高, 5 号染色体最低。多态 SSR 引物有 164 对, 占总有效扩增引物的 50.5%; 多态性标记百分率变幅为 39.1~69%, 其中 3 号染色体最高, 11 号染色体最低。

### 1.2 SSR 标记在日本晴基因组中的位置

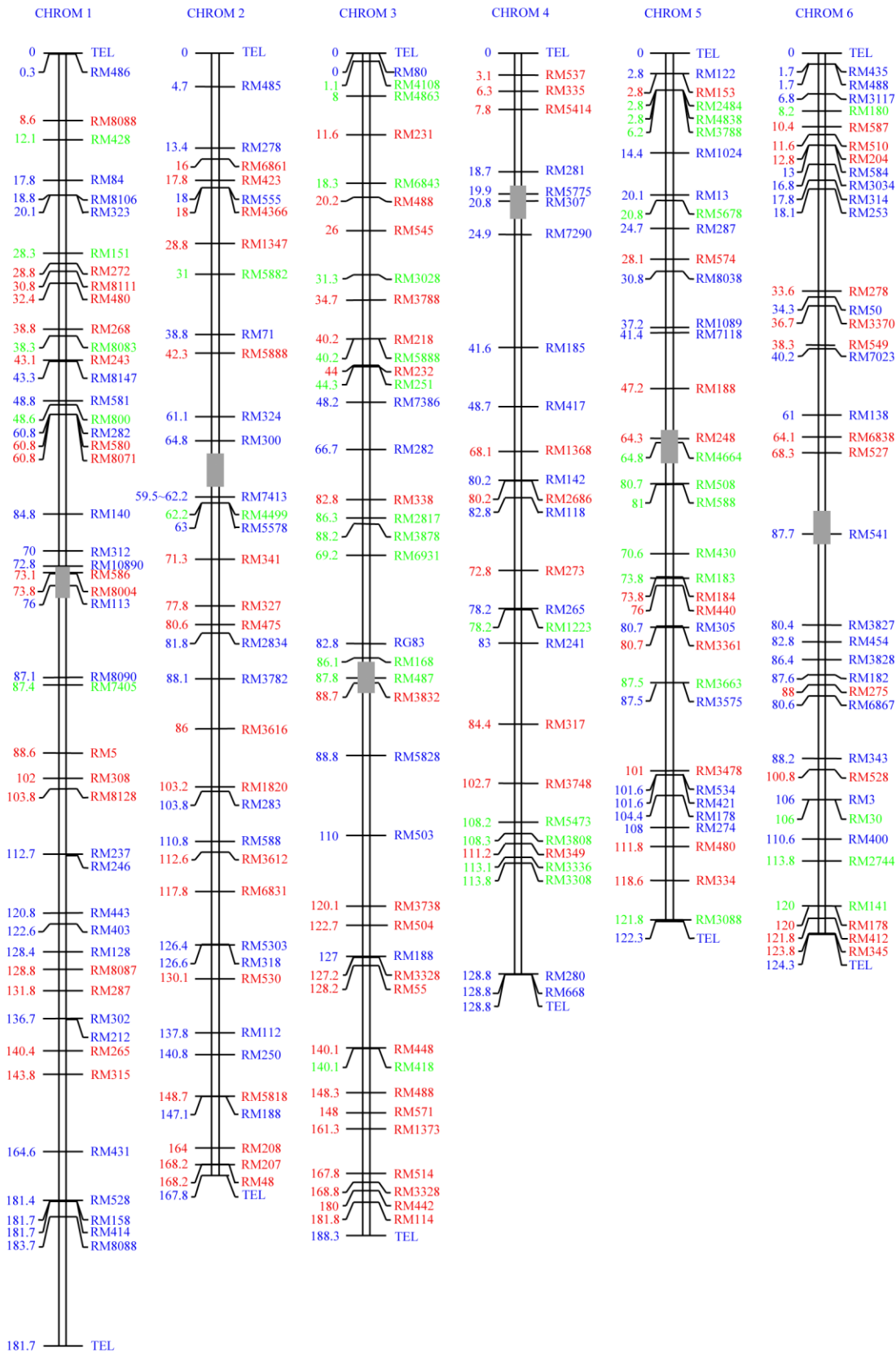
参照微卫星标记在日本晴基因组中的位置, 将供试 SSR 标记在遗传图谱中的位置分类标注, 其中具多态性的标记用红色标记表示, 非多态性的标记用蓝色标记, 未扩增出的用绿色标记。由图 1 看出, 本研究中所用的微卫星标记均匀覆盖了整个基因组, 并且多态性标记间隔均匀, 可选作用来构建遗传图谱(图 1)。

## 2 讨论

同源克隆和图位克隆是目前水稻基因克隆采用的主要方法。利用近缘生物的基因组 DNA 具有的保守性的特征, 借助已知序列信息, 把未知基因克隆出来的方法称为同源克隆, 这种方法简单, 但是需要事前知道类似基因的序列。通过染色体减数分裂时的交换特性, 利用表型和染色体上标记的交换数目确定标记与基因的连锁及远近, 一步步地靠近目的基因, 直至找到目的基因的方法称为图位克

隆, 这种方法不需要知道目的基因的任何信息。在遗传材料之间筛选多态性的分子标记是构建分子遗传图谱的首要任务。本研究利用 387 对 SSR 引物开展了元阳梯田月亮谷与测序水稻日本晴多态性 SSR 标记筛选, 发现多态性标记的比例较高, 反映了两之间遗传多样性较丰富。获得的多态性标记较均匀地分布于整个基因组, 能较好地适用于构建分子遗传图谱。

近年来, 在元阳梯田稻作生态系统中发现了白脚老粳、红脚老粳和月亮谷等栽种历史悠久的优良稻谷地方品种(高东等, 2010), 这些稻谷地方品种在低肥水、低农药的栽培管理条件下至少连续栽种了上百年, 相反, 由于产量或病虫害的原因, 现代品种一般 3~5 年就需要更换品种(高东等, 2011a)。要研究这些品种可持续栽种能力的形成机制, 对其基因组的 DNA 研究是必不可少的, 本研究获得的多态性标记为构建分子遗传图谱, 月亮谷有益基因定位、克隆和利用奠定了基础。



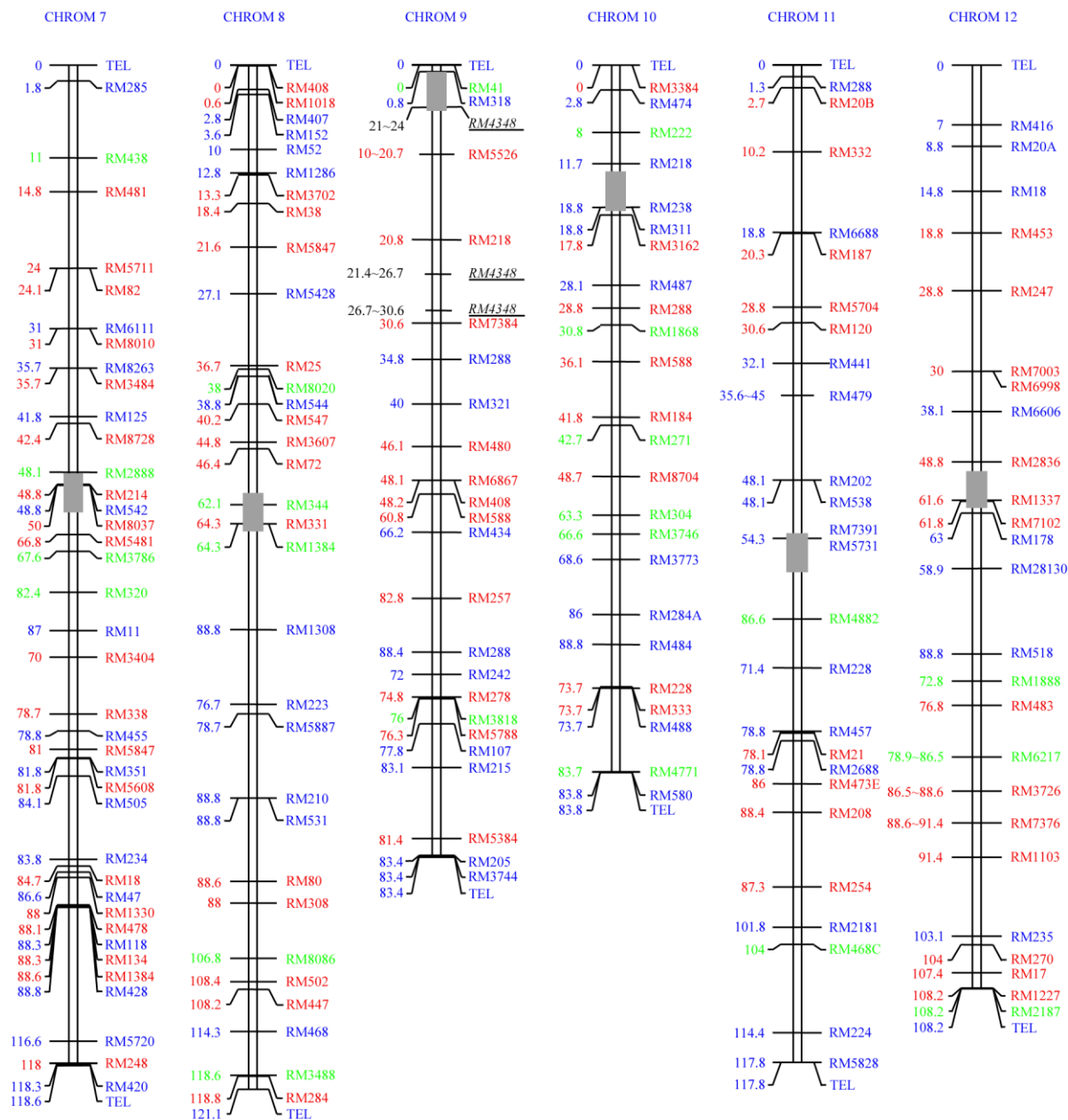


图 1 多态性 SSR 标记在日本晴基因组图谱中的位置  
 Figure 1 Polymorphic SSR markers in the Nipponbare genome position

### 3 材料与方法

#### 3.1 材料

试验材料选用元阳梯田代表水稻地方品种月亮谷和测序品种日本晴(Nipponbare), 供试 SSR 标记 387 对, 由上海生工生物工程技术有限公司合成, 序列及遗传距离参照 McCouch 等(2002)及 Gramene 网站 (<http://www.gramene.org>; IRGSP 2005)资料。

#### 3.2 方法

供试材料经浸种、发芽、水培 15 d, 剪取适量

嫩叶, 参照高东等(2010)的方法 CTAB 法提取 DNA, 测定 DNA 浓度。参照高东等(2009a)的方法进行 PCR 扩增反应体系及扩增程序设置, 聚丙烯酰胺凝胶电泳和银染。参照刘仁虎等(2003)的方法采用 MapDraw 做连锁作图。

#### 作者贡献

高东为本研究的构思者及负责人, 试验设计和试验研究的执行人; 何玉忠参与样品采集, 试验设计与分析, 及论文初稿的写作; 何霞红和余磊参与数据分析及论文修改。全

体作者都阅读并同意最终的文本。

## 致谢

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 项目)课题(2011CB100406)资助。

## 参考文献

- Bai X.H., Gao D., Yu L., and Su Y., 2012, Genetic diversity of rice landraces from Yuanyang Hani's terraced wetland in Yunnan, China, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.3 pp.1017-1024 (白秀红, 高东, 余磊, 苏源, 2012, 云南元阳梯田湿地水稻地方品种遗传多样性分析, 分子植物育种(online), 10(3): 1017-1024)
- Gao D., Du F., and Zhu Y.Y., 2009a, Low-background and high-resolution contracted silver-stained method in polyacrylamide gels electrophoresis, *Yichuan* (Hereditas), 31(6): 668-673 (高东, 杜飞, 朱有勇, 2009a, 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法, 遗传, 31(6): 668-673)
- Gao D., Wang Y.Y., He X.H., Li C.Y., and Zhu Y.Y., 2009b, Intra-variety heterogeneity and implications of Baijiaolaojing rice landraces in Yuanyang County, Yunnan, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 7(2): 283-291 (高东, 王云月, 何霞红, 李成云, 朱有勇, 2009b, 元阳白脚老粳水稻地方品种内遗传异质性及意义, 分子植物育种, 7(2): 283-291)
- Gao D., Mao R.Z., and Zhu Y.Y., 2010, Comparative analysis of intra-variety heterogeneity between rice landraces and improved varieties, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 8(3): 432-438 (高东, 毛如志, 朱有勇, 2010, 水稻地方品种与改良品种内部遗传异质性的比较分析, 分子植物育种, 8(3): 432-438)
- Gao D., He X.H., and Zhu Y.Y., 2011a, Changes of rice landrace diversity and rules of seed exchange in Yuanyang, *Zhiwu Yichuanziyuan Xuebao* (Journal of Plant Genetic Resources), 12(2): 311-313 (高东, 何霞红, 朱有勇, 2011a, 元阳水稻地方品种多样性变化及换种规律研究, 植物遗传资源学报, 12(2): 311-313)
- Gao D., Li R., Yang M.Q., and He X.H., 2011b, Rice landraces' genetic diversity of Hani terrace wetland in Qingkou village of Yuanyang county, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (online) (Molecular Plant Breeding), Vol.9 No.118 pp.1857-1863 (高东, 李锐, 杨木青, 何霞红, 2011b, 元阳箐口村哈尼梯田水稻品种 SSR 遗传多样性分析, 分子植物育种(online) 9 No.118 pp.1857-1863)
- Liu E.H., and Meng R.H., 2003, MapDraw: A microsoft excel macro for drawing genetic linkage maps based on given genetic linkage data, *Yichuan* (Hereditas), 25(3): 317-321 (刘仁虎, 孟金陵, 2003, Mapdraw 在 Excel 中绘制连锁遗传图的宏, 遗传, 25(3): 317-321)
- McCouch S.R., Teytelman L., Xu Y., Lobos K.B., Clare K., Walton M., Fu B., Maghirang R., Li Z., Xing Y., Zhang Q., Kono I., Yano M., Fjellstrom R., DeClerck G., Schneider D., Cartinhour S., Ware D., and Stein L., 2002, Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.) (supplement). *DNA Res.*, 9(6): 257-279 <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/9.6.257> <http://dx.doi.org/10.1093/dnares/9.6.199>
- Xu F.R., Tang C.F., Yu T.Q., Dai L.Y., and Zhang H.S., 2010a, Diversity of paddy rice varieties from Yuanyang Hani's terraced fields in Yunnan, China, *Shengtai Xuebao* (Acta Ecologica Sinica), 30(12): 3346-3357 (徐福荣, 汤翠凤, 余腾琼, 戴陆园, 张红生, 2010a, 中国云南元阳哈尼梯田种植的稻作品种多样性, 生态学报, 30(12): 3346-3357)
- Xu F.R., Zhang E.L., Dong C., Dai L.Y., and Zhang H.S., 2010b, Comparison of phenotypic traits of rice landraces, grown in two different periods in Hani's terraced fields in Yuanyang County, Yunnan, *Shengwu Duoyangxing* (Biodiversity Science), 18(4): 365-372 (徐福荣, 张恩来, 董超, 戴陆园, 张红生, 2010b, 云南元阳哈尼梯田两个不同时期种植的水稻地方品种表型比较, 生物多样性, 18(4): 365-372)
- Xu F.R., Dong C., Yang W.Y., Tang C.F., A X.X., Zhang E.L., Yang Y.Y., Zhang F.F., Dai L.Y., and Zhang H.S., 2011, Comparison of genetic diversity of rice landraces planted in two periods in Hani's terraced fields in Yuanyang County, Yunnan Province, China Using Microsatellite Markers, *Zhongguo Shuidao Kexue* (Chinese Journal of Rice Science), 25(4): 381-386 (徐福荣, 董超, 杨文毅, 汤翠凤, 阿新祥, 张恩来, 杨雅云, 张斐斐, 戴陆园, 张红生, 2011, 利用微卫星标记比较云南元阳哈尼梯田两个不同时期种植的水稻地方品种的遗传多样性, 中国水稻科学, 25(4): 381-386)