

水稻 DNA 限制性片段长度多态性的初步研究

郑康乐 沈波 于飞 赵成章 戚秀芳 徐星明(中国水稻研究所,杭州 310006)

Restriction Fragment Length Polymorphism in Rice

ZHENG Kangle, SHEN Bo, YU Fei, ZHAO Chengzhang, QI Xiufang, and XU Xingming
(China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

Abstract: Eight genotypes of cultivated (*Oryza sativa* L.) and wild rice (*Oryza glumaepatula*) were surveyed for restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) using 9 probes and 4 endonucleases, all together 19 probe / enzyme combinations. Results indicated that RFLPs existed generally in rice. The RFLPs were more obvious between subspecies than within the subspecies. The RFLPs between cultivated and wild rice were obvious. The RFLPs between *japonica* and wild rice were the greatest, which were 58-68%. Nei's average gene diversity was used as a measure of genetic variability for restriction fragment lengths within genotypes and a dendrogram was constructed from genetic distance estimates between genotypes. Genotypes of *japonica* and *indica* were grouped respectively. The *indica* was closer relative of wild rice than *japonica*. The *javanica* variety Ketan Nangka, which showed wide compatibility, was more closer to *indica*.

Key words: *Oryza sativa* L., *Oryza glumaepatula*, RFLP, Genetic distance

提 要: 应用 19 个不同的探针 / 限制性内切酶组合, 测定了 8 个不同基因型水稻间的 DNA 限制性片段长度多态性(RFLP)。结果表明: RFLP 在水稻中普遍存在, 同一亚种内的 RFLP 较少, 而在不同亚种间则较大; 栽培稻与野生稻间的 RFLP 较多, 而以粳稻和野生稻之间 RFLP 最多, 达 58%~68%。用 IBM / PC 计算机分析了这些基因型之间的遗传距离, 粳稻和籼稻可明显地分成二组, 野生稻与籼稻的亲缘大于与粳稻的亲缘。具有广亲和能力的爪哇型品种 Ketan Nangka 偏向籼型。

关键词: 水稻; 分子标记; RFLP; 亲缘关系

DNA 限制性片段长度多态性(Restriction Fragment Length Polymorphism, RFLP) 是一种新类型的遗传标记, 它首先是在人类基因组的研究中发展起来的⁽⁷⁾, 现已广泛应用于基因定位、产前诊断等领域⁽²⁾。

高等植物中 RFLP 的研究, 开始于经典遗传学研究比较详细的一些种, 如玉米和番茄⁽⁶⁾, 研究表明这些植物基因组中的 RFLP 相当丰富, 用 RFLP 标记构建了较为详细的连锁图, 并用 RFLP 标记研究某些数量性状的遗传⁽¹³⁾。近来, 在一些重要

作物, 如水稻、苜蓿、马铃薯等^(5,9,11), 都有 RFLP 遗传图谱的报道。RFLP 的研究正引起国内外植物遗传学家和育种家们的重视。

在国内, 有关植物 RFLP 研究的报道还不多。本文对水稻 8 个不同基因型之间的 RFLP 进行了初步研究和分析, 讨论了它们之间的相互关系, 为进一步研究和应用 RFLP 打下基础。

1990 年 3 月 23 日收到。Received March 23, 1990

本研究得到美国洛克菲勒基金会及浙江省自然科学基金(389234)资助。

材 料 和 方 法

选用一些具有代表性的材料(表 1)。Tetep 和美洲野生稻(*Oryza glumaepatula*)的种子由本所品种资源系提供, 其他品种的种子由本所遗传育种系提供。采用盆栽幼苗或网室植株为分离 DNA 的材料, 新鲜使用或贮放在 -20°C 冰箱内待用。

DNA 提取 根据曾以申的方法加以修改⁽¹⁾。10 g 材料剪细, 加入液氮研磨, 磨碎后迅速转入离心管, 加入 30ml 缓冲液(0.14mol/l NaCl-0.1mol/l EDTA-0.1 mol/l Tris HCl, pH8.2), 并加入胰蛋白酶 10 mg, 置 37°C 水浴保温半小时。再加入 10%(W/V)SDS 水溶液, 使最终浓度为 1%, 在 65°C 保温 30 分钟。5000 rpm 离心 10 分钟, 取上清液, 加入等体积氯仿/异戊醇(24/1 体积比), 萃取 1~2 次, 取水相加入 1/10 体积 3mol/l 醋酸钠, 再加入二倍体积预冷的乙醇, 缓缓混匀, 出现絮状沉淀, 可以直接将沉淀挑出, 或者在冻室内静置约 1 小时。然后, 在 5000 rpm 离心 10 分钟, 加入 4 ml TE(10 mmol/l Tris, 1 mmol/l EDTA), 在 65°C 溶解, 加核糖核酸酶(最终浓度为 $10 \mu\text{g/ml}$), 37°C 保温 30

分钟, 再经一次氯仿萃取, 加醋酸钠及预冷的乙醇, 沉淀 DNA, 经 70%乙醇洗涤, 真空抽干, 加 1 ml TE 溶解。测定 OD_{260} 和 OD_{280} 值。

DNA 的酶解 应用 4 种限制性内切酶: EcoR I、EcoR V、Hind III 和 Xba I, 它们均以 6 个碱基对为识别位点, 分别用厂商推荐的缓冲液, 每微克 DNA 加 2 个单位的酶, 酶解在 37°C 下进行 4 小时。

琼脂糖凝胶电泳 根据 Maniatis 等(1982)的方法进行⁽¹⁰⁾。凝胶的琼脂糖浓度 0.8%, 以溴酸蓝为指示剂, TBE 为缓冲液, λDNA 经 Hind III 酶解为分子量标记。上样量为 $5 \mu\text{g}$, 电泳电压 $< 5 \text{ V/cm}$ 。凝胶板加入溴化乙锭溶液染色, 在紫外光下观察。

Southern 印迹转移 也是根据 Maniatis 等(1982)的方法⁽¹⁰⁾。凝胶板首先在 0.25 mol/l HCl 中处理 15 分钟, 在 1.5mol/l NaCl 和 0.5 mol/l NaOH 中处理 1 小时, 使 DNA 变性, 再在 1 mol/l Tris HCl (pH 8.0) 和 1.5mol/l NaCl 中中和 1 小时。以 $10\times\text{SSC}$ 溶液为缓冲液, 经过 16 小时以上, 将 DNA 转移至硝酸纤维素滤膜或 Gene Screen Plus 尼龙膜上, 在 $6\times\text{SSC}$

表 1 试验材料及特性

Table 1. List and characters of genotypes

基因型 Genotype	类型 Type	基因组 Genome	产地 Origin	特性 Characters
中 83-49 Zhong 83-49	籼 <i>indica</i>	AA	浙江 Zhejiang, China	密穗, 高产
农虎 6 号 Nong-Hu 6	粳 <i>japonica</i>	AA	浙江 Zhejiang, China	高产, 抗倒伏
矮仔占 Ai-Zi-Zhan	籼 <i>indica</i>	AA	广西 Guangxi, China	半矮生性基因 sd1
Ketan Nangka	爪哇 <i>javanica</i>	AA	印尼 Indonesia	广亲和
<i>Oryza glumaepatula</i>	野生稻 wild rice	A ^{cu} A ^{cu}	美洲 America	多年生, 大粒, 有芒, 黑壳
原丰早 Yuan-Feng-Zao	籼 <i>indica</i>	AA	浙江 Zhejiang, China	辐照育成品种, 感稻瘟病
旱谷(2) Han-Gu(2)	粳 <i>japonica</i>	AA	云南 Yunnan, China	陆稻, 非主基因控制的新矮源
Tetep	籼 <i>indica</i>	AA	越南 Vietnam	高秆, 高抗稻瘟病

中漂洗 5 分钟, 80°C 下真空干燥 2 小时。

杂交 探针由康乃尔大学 Tanksley 实验室提供, 试验中用了 9 个探针: RG95、RG134、RG213、RG224、RG256、RG358、RG409、RG530 和 RG780。根据随机六聚体法制备 ^{32}P 标记的 DNA 探针^[4]。在低强度条件下 ($5 \times \text{SSC}$) 先进行预杂交至少 4 小时, 然后加入放射性探针, 在 65°C 培养过夜。杂交滤膜在中等强度条件下 ($0.5 \times \text{SSC}$) 洗涤, 然后进行放射自显影。

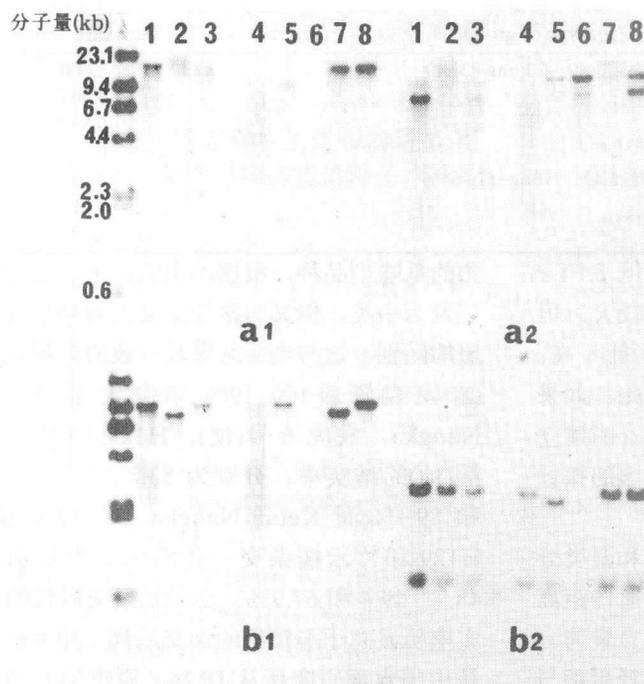
遗传距离的计算和遗传距离树状图的构建 根据各样本与每一标记探针杂交的限制性片段中共有片段的百分比, 可以将这些样本分组。用自行设计的计算机程序, 在 IBM/PC 机上进行计算和聚类分组。将实验结果输入计算机, 计算机即可打印出样本间遗传距离矩阵和聚类结果。

结果和分析

本实验中 DNA 抽提的得率一般在 $50 \mu\text{g/g}$ 鲜重左右, $\text{OD}_{260} / \text{OD}_{280}$ 在 1.8

左右, 电泳结果表明提取的总 DNA 为大分子, 酶解后 DNA 降解基本完全。

本实验中一共应用 19 个不同的探针/酶的组合, 测定供试材料的 RFLP, 杂交结果多数表现为清楚的能区别的带(图 1), 说明选用的探针为单拷贝顺序。由于原丰早的 DNA 较少, 只用了 6 个探针/酶的组合, 因此在部分结果分析时, 不包括在内。有 15 个探针/酶至少测定到一对基因型之间的差异。结果表明: 籼稻材料之间的 RFLP 仅为 $1/19 \sim 3/19$; 粳稻之间为 $5/19$; 籼粳之间为 $4/19 \sim 9/19$; 籼稻和野生稻之间为 $4/19 \sim 6/19$; 粳稻和野生稻之间为 $11/19 \sim 13/19$; 爪哇型材料与籼、粳、野生型之间的 RFLP 分别为 $1/19 \sim 2/19$ 、 $6/19 \sim 9/19$ 和 $6/19$ (表 2)。在为构建连锁图寻找 F_2 群体的亲本时, 丰富的 RFLP 是一个先决条件。McCouch 等(1988)应用一个籼稻与爪哇稻的组合(预试验中双亲的 RFLP 为 $7/12$), 成功地构建了第一张水稻的分子遗传图谱。本实验中尽管采用了识



探针/酶(Probe/enzyme):

- a₁ = PG780/EcoR V
- a₂ = RG780/EcoR I
- b₁ = RG256/Xba I
- b₂ = RG256/Hind III

材料(Materials):

- 1) 中 83-49 Zhong 83-49;
- 2) 农虎 6 号 Nong-Hu 6;
- 3) 矮仔占 Ai-Zi-Zhan;
- 4) Ketan Nangka
- 5) *Oryza glumaepatula*;
- 6) 原丰早 Yuan-Feng-Zao;
- 7) 早谷(2) Han-Gu (2);
- 8) Tetep

图 1 水稻的 RFLP

Fig. 1. RFLP of rice

表2 基因型间的 RFLP

Table 2. RFLPs between genotypes

基因型 Genotype	<i>Oryza glumaepatula</i>	Tetep	中 83-49 Zhong 83-49	矮仔占 Ai-Zi- Zhan	Ketan Nangka	农虎 6 号 Nong- Hu 6	旱谷(2) Han- Gu(2)
<i>Oryza glumaepatula</i>	×	4 / 19	4 / 19	6 / 19	6 / 19	11 / 19	13 / 19
Tetep		×	1 / 19	2 / 19	2 / 19	7 / 19	9 / 19
中 83-49 Zhong83-49			×	3 / 19	2 / 19	8 / 19	9 / 19
矮仔占 Ai-Zi-Zhan				×	1 / 19	5 / 19	8 / 19
Ketan Nangka					×	6 / 19	9 / 19
农虎 6 号 Nong-Hu 6						×	5 / 19
旱谷(2) Han-Gu 2							×

表3 基因型间的遗传距离

Table 3. Genetic distances between genotypes

基因型 Genotype	中 83-49 Zhang 83-49	农虎 6 号 Nang- Hu 6	矮仔占 Ai-Zi- Zhan	Ketan Nangka	<i>Oryza glumaepatula</i>	旱谷(2) Han Gu(2)	Tetep	原丰早 Yuan- Feng- Zao
中 83-49 Zhong 83-49		0.481	0.895	0.737	0.728	0.556	0.947	1.000
农虎 6 号 Nong-Hu 6			0.568	0.549	0.419	0.684	0.428	0.578
矮仔占 Ai-Zi-Zhan				0.842	0.623	0.655	0.842	0.833
Ketan Nangka					0.483	0.614	0.684	0.667
<i>Oryza glumaepatula</i>						0.490	0.763	0.611
旱谷(2) Han-Gu(2)							0.691	0.744
Tetep								1.000
原丰早 Yuan-Feng-Zao								

表4 8个水稻基因型遗传距离聚类结果

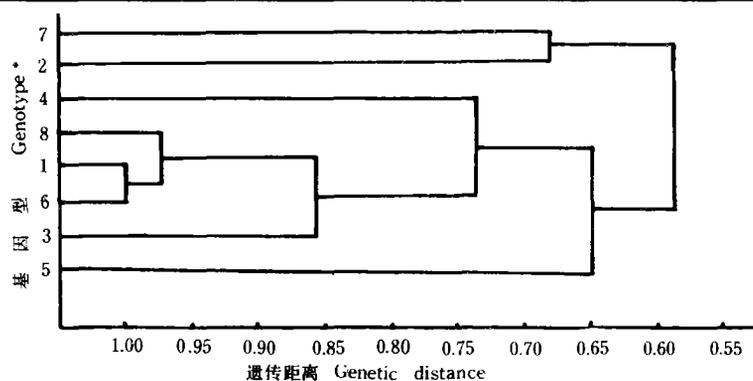
Table 4. Genetic distance clustering of 8 genotypes of rice

类别 Group	基因型或类别 Genotype or group	遗传距离 Genetic distance
G(1)	原丰早 Yuan-Feng-Zao, 中 83-49 Zhong 83-49	1.000
G(2)	G(1), Tetep	0.947
G(3)	G(2), 矮仔占 Ai-Zi-Zhan	0.857
G(4)	G(3), Ketan Nangka	0.736
G(5)	旱谷(2) Han-Gu(2), 农虎 6 号 Nong-Hu 6	0.684
G(6)	G(4), <i>Oryza glumaepatula</i>	0.694
G(7)	G(6), G(5)	0.591

别位点为 6 个碱基对的内切酶, 但 RFLP 还不够多; 野生稻与梗稻间的差别较大, 但野生稻与栽培稻杂交后代的育性可能不高, 很难得到一个理想的 F₂ 群体。因此, 如果希望用本试验中的材料作亲本构图, 或建立 RFLP 与性状的联系, 还应筛选更多的探针/酶的组合。

8 个供试材料的遗传距离矩阵和聚类分组结果如表 3、表 4, 由此构建的遗传距离树状图如图 2 所示。籼稻和粳稻各自聚为一类, 能很好区分。本研究中所用的野生稻与籼稻的亲缘比与粳稻的亲缘近。值得一提的是 Ketan Nangka, 这是一个具有广亲和能

力的爪哇型品种, 根据本实验结果, 它与籼稻聚为一类, 但又与常规意义上的籼稻有明显的区别, 这与杂交结果是一致的。程式华(未发表资料)在 1988 年测定了 Ketan Nangka、农虎 6 号(粳)、H129(粳)和竹云糯(籼)的结实率, 分别为 83.8、93.8、92.6 和 89.1%; 而 Ketan Nangka 与农虎 6 号、H129 和竹云糯杂交一代的结实率分别为 48.7、49.4 和 67.9%, 与籼稻杂交后代的结实率明显高于与粳稻的杂交后代。中 83-49 是中国水稻研究所从 IR24 / 原丰早 // 竹科 2 号复交组合中选出的新品种, 就本研究所用的探针-酶组合来说, 中 83-49 与原



注(Note): *基因型序号同图1。Number of genotype is the same as in Fig. 1

图2 8个水稻基因型之间的遗传距离

Fig.2. Dendrogram of genetic distance between 8 genotypes of cultivated and wild rice for restriction fragment lengths

丰早之间无差异(遗传距离为1),说明两者亲缘关系非常相近。中83-49和原丰早及Tetep亲缘关系都非常相近,这也可能是由于对原丰早只用了6个探针-酶组合进行检测,没有能发现原丰早与中83-49和Tetep之间更多的差异。

本实验所用探针,分布在1, 2, 3, 4, 9, 10六个连锁群上^[7],在进行RFLP分析和遗传距离测定时受到限制,尽管如此,实验结果已经清楚地表明了RFLP在水稻中存在的普遍性及其在遗传学研究和育种工作中的应用潜力。

谢辞:余志宏同志对本工作帮助颇多;程式华、赵式英、林鸿宣同志提供种子,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] 曾以中, 1978. 几种植物 DNA 的转化及其性质, 生物化学与生物物理学报 10(4):391-397
- [2] 曾溢滔, 1986. 中国人 β -珠蛋白基因簇限制性内切酶切点多态性和单体型研究, 遗传学报 13(4):317-322
- [3] 于飞、葛旭华、沈波、郑康乐, 1990. 利用 RFLP 研究作物亲缘关系的计算机程序设计(待发发表)
- [4] Feinberg A P and Vogelstein B, 1983. A Technique for Radiolabelling DNA Restriction Fragments to A High Specific Activity. *Anal. Biochem.* 132:6-13
- [5] Gebhardt C, Ritter E, Debener T, Schachtschabel U, Walkemeler B, Uhrig H, Salamini F, 1989. RFLP Analysis and Linkage Mapping in *Solanum tuberosum*. *Theor. Appl. Genet.* 78:65-75
- [6] Helenjaris T, Slocum M, Wright S, Schaefer A, Nienhuis J, 1986. Construction of Genetic Linkage Maps in Maize and Tomato Using Restriction Fragment Length Polymorphism. *Theor. Appl. Genet.* 72:761-769
- [7] Kan Y W and Dozy A M, 1978. Antenatal Diagnosis of Sickle-cell Anaemia by DNA Analysis of Amniotic Fluid. *Lancet* 2: 910-912
- [8] Kochert G and Tanksley S D, 1989. RFLP Training Course Laboratory Manual
- [9] Landry B S, Kesseli R V, Farrara B, and Michelmore R W, 1987. A Genetic Map of lettuce (*Lactuca sativa* L.) with Restriction Fragment Length Polymorphism, Isozyme, Disease Resistance and Morphological Markers. *Genetics* 116:331-337
- [10] Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J, 1982. Molecular Cloning. A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor NY
- [11] McCouch S R, Kechert G, Yu Z H, Wang Z Y, Khush G S, Coffman WR, Tanksley S D, 1988. Molecular Mapping of Rice Chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829
- [12] Tanksley SD and Hewitt J, 1988. Use of Molecular Markers in Breeding for Soluble Solids Content in Tomato—A Reexamination. *Theor. Appl. Genet.* 75:811-823