

## 粳稻 SRAP 分子标记遗传群的构建与分析

张丽<sup>1</sup>, 姜树坤<sup>1</sup>, 张喜娟<sup>2</sup>, 李丽<sup>1</sup>, 郭志富<sup>1</sup>, 马慧<sup>1</sup>, 陈丽静<sup>1</sup>, 王学英<sup>1</sup>, 徐正进<sup>2</sup>, 钟鸣<sup>1,\*</sup>  
沈阳农业大学<sup>1</sup> 辽宁省农业生物技术重点实验室, <sup>2</sup>辽宁省北方粳稻育种重点实验室, 沈阳 110161

**摘要:** 用超级稻品种‘沈农606’和普通粳稻‘丽江新团黑谷’为亲本杂交获得的102份F<sub>2</sub>代单株, 通过SRAP分子标记遗传分析, 构建了包含14个连锁群, 由129个多态性位点组成的水稻连锁图谱, 此图谱覆盖基因组长度1671.5 cM, 平均图距13.0 cM。连锁群上有17.2%的多态性位点表现偏分离, 偏分离标记在连锁群上存在热点区域。

**关键词:** 粳稻; 遗传图谱; 相关序列扩增多态性

## Construction and Analysis of a SRAP Molecular Genetic Map of *japonica* Rice (*Oryza sativa* L. sp. *japonica*)

ZHANG Li<sup>1</sup>, JIANG Shu-Kun<sup>1</sup>, ZHANG Xi-Juan<sup>2</sup>, LI Li<sup>1</sup>, GUO Zhi-Fu<sup>1</sup>, MA Hui<sup>1</sup>, CHEN Li-Jing<sup>1</sup>, WANG Xue-Ying<sup>1</sup>, XU Zheng-Jin<sup>2</sup>, ZHONG Ming<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province, <sup>2</sup>Key Laboratory of Rice Breeding of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

**Abstract:** A molecular genetic map of rice (*Oryza sativa*) was constructed with a 102 F<sub>2</sub> population from a cross of two rice cultivars ‘Shennong 606’ and ‘Lijiangxintuanheigu’ by using SRAP markers. The map consisted of 14 linkage groups, which include 129 genetic markers, and covers 1671.5 cM with an average genetic distance of 13.0 cM. A total of 17.2% distorted markers distributed in the map as Segregation Distortion Regions.

**Key words:** rice (*Oryza sativa*); molecular genetic map; sequence related amplified polymorphism (SRAP)

遗传图谱既是遗传学研究的内容, 又是作物育种及分子克隆等许多应用研究的理论依据和基础。近年来, 分子标记的迅速发展极大地促进了水稻遗传图谱的构建, 自 McCouch 等(1988)建立第一张水稻的 RFLP 标记连锁图(135 个标记)以来, 其染色体上的标记数不断增多, 据日本水稻基因组计划研究项目发表的水稻新连锁图, 已定位的标记达 2 275 个(Sakata 等 2000)。McCouch 等 2002 年又发表了新增的 2 240 个 SSR 标记。但目前构建图谱所用的群体主要是亚种间杂交得到的群体, 少数为籼—粳杂交群体, 至今仍未发现使用两粳稻为亲本材料的连锁图谱的报道。本文尝试采用超级粳稻和地方特异粳稻材料构建图谱, 为研究超级粳稻高产的机制提供参考, 同时为进一步将地方种质优良基因导入超级稻品种建立基础; 目前, SRAP 标记已经应用于马铃薯、苹果、辣椒、樱桃、梅子、油菜、大蒜、莴苣、芹菜、棉花以及柑橘类果树等植物的研究(林忠旭等 2003; 任羽等 2004; Li 等 2003; Riza 等 2001),

本文将 SRAP 用于水稻连锁群的构建, 以探讨 SRAP 在水稻中应用的可行性。

### 材料与方法

材料为超级粳稻(*Oryza sativa* L. sp. *japonica*) 品种‘沈农606’(本校徐正进先生惠赠)和普通粳稻品种‘丽江新团黑谷’(本校植保学院刘志恒先生惠赠)。2004年以两品种为亲本配制杂交组合, F<sub>1</sub>自交获得F<sub>2</sub>代群体。

基因组DNA的提取采用CTAB法(奥斯伯等 2005)。

引物采用 Li 和 Quiros (2001)已发表的引物组合: me1~me10/em1~em11, 共计 110 对, 引物由北京赛百胜生物公司合成(表 1)。PCR 扩增总体积为 15 μL, 包括 25 ng DNA 模板、引物各 0.3

收稿 2007-01-11 修定 2007-04-26  
资助 辽宁省重点实验室专项资金计划、沈阳农业大学青年基金。  
\* 通讯作者(E-mail: zhming@syau.edu.cn; Tel: 024-88487164)。

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  dNTP、 $1\text{ U Taq DNA}$  聚合酶、 $2.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Mg}^{2+}$ , 不足部分用双蒸水补充。扩增程序参照 Li 和 Quiros (2001) 文中的方法:  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  3 min;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 min, 5 个循环;  $94\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  1 min,  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  2 min, 35 个循环;  $72\text{ }^{\circ}\text{C}$  5 min。

扩增产物用 6% 的变性聚丙烯酰胺凝胶分离, 电泳缓冲液为  $0.5\times\text{TBE}$ 。电泳时, 先用 70 W 预电泳至 50 cm, 上样后用 50 W 恒功率电泳至二甲苯青为胶板的 2/3 处, 电泳过程中确保胶板温度不高于  $55\text{ }^{\circ}\text{C}$  以免玻璃板破裂。电泳后采用银染法进行染色 (Panaud 等 1996)。多态性位点的命名采用“引物组合 + 标记片段长度”的方法, 如“M4E3-600”表示引物组合 me4 和 em3, “600”表示该标记片段长度为 600 bp。

根据聚丙烯酰胺电泳谱带结果, 将其转换为数据结果; 共显性位点的记载, 与父本‘沈农 606’相同的带型记为 A, 与母本‘丽江新团黑谷’相同的带型记为 B, 杂合( $F_1$ )带型记为 H, 缺失或模糊记为 -。显性位点的记载, 相同于‘沈农 606’的纯合带型(无带)记为 A, 和  $F_1$  相同的其他纯合或杂合带(有带)型记为 C, 相同于‘丽江新团黑谷’的纯合带型(无带)记为 B, 和  $F_1$  相同的其他纯合或杂合带型(有带)记为 D, 缺失或模糊带型记为 -。对所有  $F_2$  单株带型按孟德尔分离比 3:1 (共显性标记按 1:2:1) 进行  $\chi^2$  检验, 分析标记是否偏分离。

应用 Mapmaker/exp 3.0 软件 (Lander 1993) 在

PC 机上构建连锁图谱, 先用 Group 命令进行标记间连锁分组 (LOD=3, 最大图距 50 cM), 然后用 Order 和 Ripple 命令进行排序, 用 Try 和 Build 命令插入标记。采用 Kosambi 函数将重组率转换成图距单位 (cM)。

## 实验结果

### 1 SRAP 标记的多态性筛选

用 110 对 SRAP 引物组合在 2 个亲本间进行 PCR 扩增, 其中 35 对引物能在两亲本间检测到多态性, 约占所用引物对的 31.8%。35 对引物共扩增出 1 683 个位点, 平均每对组合扩增出 48 个位点, 其中多态性位点 143 个, 平均每对组合扩增出 4.09 个多态性位点, 占总位点数的 8.5%, 集中在 550~900 bp 之间; 显性位点 109 个, 占 76.2%, 共显性位点 34 个, 占 23.8% (图 1)。

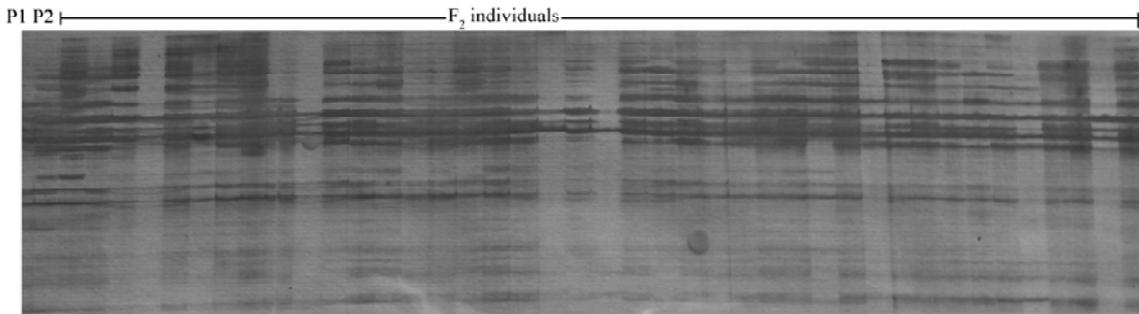
### 2 偏分离位点的分布

143 个多态性位点中有 24 个位点在  $F_2$  群体中的分离显著或极显著地偏离了理论比值而表现异常分离, 比率为 16.8%, 其中呈极显著性的有 21 个, 比率为 14.7%。这些偏分离位点中偏向‘沈农 606’(A) 基因型的有 11 个, 比例为 45.8%; 偏向‘丽江新团黑谷’(B) 基因型的有 12 个, 比例为 50%; 仅有 1 个都是偏杂合体类型(H), 比例为 4.2%。在所有引物对中, 以 me2 为前引物和以 em5、em6 为后引物的引物组合表现出偏向‘丽江新团黑谷’偏离程度最高, 其占偏分离位点的频率分别为 25%、16.7%、16.7%, 以 me4

表 1 实验所用的 SRAP 引物

Table 1 The SRAP primers used in the experiment

引物编号	序列(5' 3')	引物编号	序列(5' 3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAA	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTCC	em7	GACTGCGTACGAATTCAA
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC	em8	GACTGCGTACGAATTCTG
me9	TGAGTCCAAACCGGTAG	em9	GACTGCGTACGAATTCTGA
me10	TGAGTCCAAACCGGTCT	em10	GACTGCGTACGAATTCTAG
		em11	GACTGCGTACGAATTCCA

图1 引物组合 me4-em1 在部分 F<sub>2</sub> 群体中的扩增图Fig.1 The amplification result of primer combination me4 and em1 in some F<sub>2</sub> individuals

为前引物的引物组合表现出偏向‘沈农606’偏离程度最高,其频率为16.7%。

### 3 遗传图谱的构建

应用在 F<sub>2</sub> 群体中按 3:1 或 1:2:1 分离的 120 个 SRAP 位点进行连锁分析,得到 1 张包含 14 个连锁群的遗传图谱框架,其中包括 92 个显性位点,28 个共显性位点。然后在连锁群图距增加不大于 10 cM 的条件下,将偏分离位点逐个进行插入,最终插入偏分离位点 9 个。最后得到 1 张由 129 个 SRAP 位点组成的粳稻连锁图谱(图 2),该图谱覆盖长度 1 671.5 cM,平均图距 13.0 cM。每个连锁群上的位点数在 3~15 个之间,连锁群长度在 27.8~226.1 cM 范围内。

从连锁分析可以看出,偏分离的位点被分别定位到两个连锁群,在每个连锁群上各有 1 个偏分离的热点区域(segregation distortion regions, SDR),在 9 号连锁群上, M2E4-850、M1E7-600、M7E5-600、M2E5-650 所在的位点形成了第 1 个 SDR,暂命名为 SDR1;在 13 号连锁群上, M10E8-1000、M4E3-800、M4E1-900 所在的位点形成了第 2 个 SDR,暂命名为 SDR2。13 号连锁群上的 M4E1 系列引物有共分离的趋势。13 号连锁群上的偏分离位点偏向于‘沈农 606’,而 9 号连锁群上的偏分离位点偏向于‘丽江新团黑谷’。这两个 SDR 位点与已经定位的偏分离位点的关系有待进一步研究。

### 讨 论

SRAP 标记是一种基于 PCR 的新型的分子标记技术,与其他几种分子标记相比,其在水稻基因定位和克隆中有较高的应用价值。首先,它的引

物设计简单,17 bp 的正向引物、18 bp 的反向引物以及 50 的退火温度都可保证其扩增结果的稳定性。经多次体系优化实验证明 SRAP 标记的扩增产物重复性高,受反应条件影响小,能够保证实验结果的准确性。其次,SRAP 标记合成引物的费用低,扩增产物多态性高且在基因组上分布均匀,这些特点都可大大降低实验成本及劳动强度。再次,SRAP 有较高的多态性,SSR 标记在本文中的两亲本间的多态性情况为平均为每 5 对引物中能筛选出 1 个多态位点(私人通讯)。最重要的是 Li 和 Quiros (2001) 对 SRAP 标记的测序结果表明多数标记为外显子区域,这为农艺性状基因的克隆提供了一条捷径。本文所构建的图谱中位点间距较大,这可能是由于所选亲本同为粳稻,亲缘较近引起的。

关于本文中的 14 个连锁群与水稻 12 条染色体的锚定关系,我们提出两种锚定策略:其一,用已经有固定染色体位置的分子标记进一步增加图谱密度并进一步将 14 个连锁群锚定于染色体上,目前能满足要求的分子标记有 RFLP 和 SSR 两种,RFLP 操作复杂,我们认为 SSR 应该是一个较好的选择,但本文所用的两个亲本都是粳稻,所以可能筛选到足够数量标记是一个瓶颈;其二,我们在每个连锁群上随机选择 3 个标记位点,对其相应片段进行测序,将测序结果与已经完成测序的粳稻品种‘日本晴’的序列数据比对后完成锚定,此步工作正在进行中。

遗传偏分离是自然界非常普遍的现象,并被认为是生物进化的动力之一,产生偏分离的原因主要是由配子体或孢子体选择以及基因型分类错误等引起的,基因型分类错误主要是由表型鉴别错

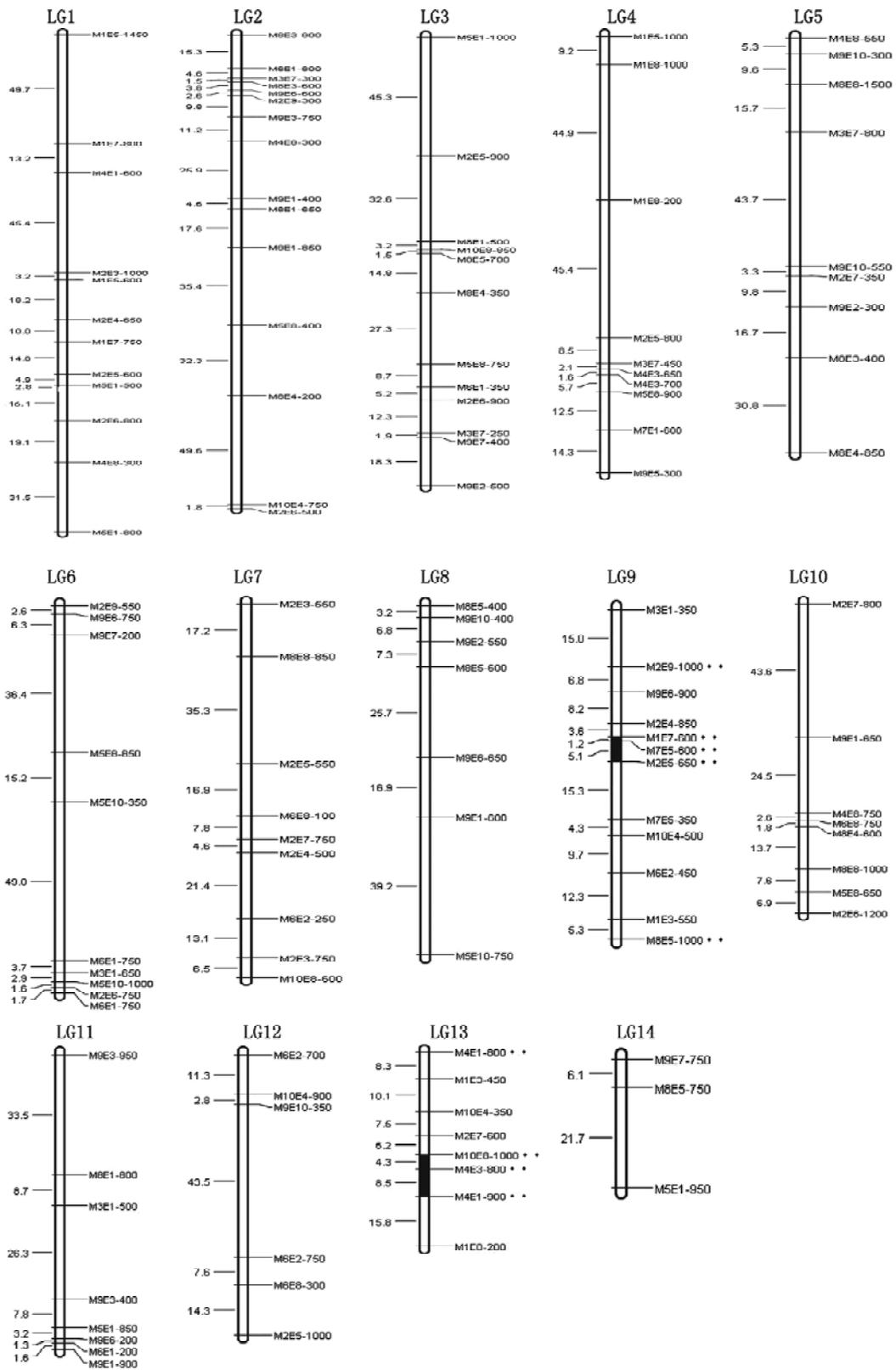


图2 水稻SRAP连锁图谱

Fig.2 Rice linkage map based on SRAP

误或不完全外显率造成的(张德水等 1997)。水稻和大麦等的偏分离标记在染色体上的分布并不是随机的,而是存在着一些热点区域(Matsushita 等 2003; Konishi 等 1992; Harushima 等 1996; Kinoshita 1991, 1993, 1995; 徐云碧等 1995)。本文中也发现了两个偏分离热点区域,这可能是由于固有的遗传差异导致的,同时由于 SRAP 揭示的是 ORF 区的多态性,这为我们将来进一步研究有关机制奠定了基础。同时,在本文中我们还发现,偏分离的方向主要偏向于双亲,只有一个偏向杂合体,由此我们认为这种配子体选择作用应该是在基因纯合状态下发生的,这与徐云碧等(1995)的报道基本一致。

### 参考文献

- 奥斯伯 FM, 金斯顿 RE (2005). 马学军, 舒跃龙译. 精编分子生物学实验指南. 第 4 版. 北京: 科学出版社, 54
- 徐云碧, 申宗坦, 陈英, 朱立煌(1995). 水稻籼粳杂种 F<sub>2</sub> 群体中 RFLP 标记的异常分离及其染色体分布. 植物学报, 37 (2): 91~96
- 张德水, 陈受宜, 惠东威, 压炳昌(1997). 栽培大豆与半野生大豆杂种 F<sub>2</sub> 群体中 RFLP 标记的偏分离及其形成原因的分析. 遗传学报, 24 (4): 362~367
- 林忠旭, 张献龙, 聂以春, 贺道华, 吴茂清(2003). 棉花 SRAP 遗传连锁图构建. 科学通报, 48 (15): 1676~1679
- 任羽, 王得元, 张银东, 李颖, 王恒明(2004). 辣椒 SRAP-PCR 反应体系的建立与优化. 分子植物育种, 5 (2): 689~693
- Harushima Y, Kurata N, Yano M, Nagamura Y, Sasaki T, Minobe Y, Nakagahra M (1996). Detection of segregation distortions in an indica-japonica rice cross using a high-resolution molecular map. Theor Appl Genet, 92: 145~150
- Kinoshita T (1991). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage group. Rice Genet Newsl, 8: 2~37
- Kinoshita T (1993). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage group. Rice Genet Newsl, 10: 7~39
- Kinoshita T (1995). Report of the committee on gene symbolization, nomenclature and linkage groups. Rice Genet Newsl, 12: 9~153
- Konishi T, Yano Y, Abe K (1992). Geographic distribution of alleles at the *Ga2* locus for segregation distortion in barley. Theor Appl Genet, 85: 419~422
- Lander ES (1993). Mapmaker/EXE 3.0 and Mapmaker/QTL 1. Tutorial and reference manual. Cam-bridge, Massachusetts: Whitehead Institute
- Li G, Gao M, Yang B, Quiros CF (2003). Gene for gene alignment between the *Brassica* and *Arabidopsis* genomes by direct transcriptome mapping. Theor Appl Genet, 107 (1): 168~180
- Li G, Quiros CF (2001). Sequence related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*. Theor Appl Genet, 103: 455~461
- Matsushita S, Iseki T, Fukuta Y, Araki E, Kobayashi S, Osaki M, Yamagishi M (2003). Characterization of segregation distortion on chromosome 3 induced in wide hybridization between indica and japonica type rice varieties. Euphytica, 134: 27~32
- McCouch SR, Kochert G, Yu ZH, Wang ZY, Khush GS, Coffman WR, Tanksley SD (1998). Molecular mapping of rice chromosomes. Theor Appl Genet, 76: 815~8290
- McCouch SR, Teytelman L, Xu YB, Lobos KB, Clare K, Walton M, Fu BY, Maghirang R, Li ZK, Xing YZ et al (2002). Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). DNA Res, 9: 199~207
- Panaud O, Chen X, McCouch SD (1996). Development of microsatellite marker and characterization of sample sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza sativa* L.). Mol Gen Genet, 252: 597~607
- Riza A, Li G, Quresh Z, Swati MS (2001). Genetic diversity of oilseed brassica napu inbred lines based on sequence related amplified polymorphism and its relation to hybrid performance. Plant Breed, 120 (5): 411~415
- Sakata K, Antonio BA, Mukai Y, Nagasaki H, Sakai Y, Makino K, Sasaki T (2000). INE: a rice genome database with an integrated map view. Nucleic Acids Res, 28 (1): 97~101