

重复 DNA 顺序 pRRD9 在稻属中的拷贝数测定*

肖真 蔡业统** 刘良式

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要

本文应用狭缝印渍杂交方法, 把水稻基因组总 DNA 和含水稻中度重复顺序片段的质粒 (pRRD9) DNA 分别转移到尼龙膜上形成狭缝印渍, 然后用 ^{32}P 标记的 pRRD9 插入片段进行杂交, 根据各狭缝印渍的放射性强度, 测定水稻 (*Oryza*) 一些栽培种和野生种基因组中重复 DNA 顺序的拷贝数, 并就拷贝数与水稻进化关系及基因组型的联系进行讨论。

关键词: 水稻; 重复 DNA 顺序; 拷贝数

前 言

大量重复 DNA 顺序的存在, 是真核生物基因组的显著特点。迄今, 许多动植物物种的重复顺序的长度、数量、在染色体上的分布状态, 以及它们的核苷酸序列都得到了很好的研究。尽管这些基因组重复 DNA 顺序的起源和功能仍不清楚, 但它们在进化过程中都表现出迅速变化的特点^[3, 8, 9, 12, 16]。这种变化包括由于突变、碱基置换、修饰、转座等引起的重复顺序家族内单一序列结构、碱基排列的变化, 以及由于复制、重组、配对引起同源重复顺序的扩增、缺失, 从而导致重复单位数量上的变化^[7, 17]。因此, 重复 DNA 顺序对于从分子水平研究基因组进化是很有帮助的。

重复 DNA 顺序组织结构变化, 可以通过 Southern 印渍杂交进行分析。但是, 对于那些在植物相关种属的基因组或同一种属不同基因组内含量表现出很大差异的重复 DNA 顺序, 通过 Southern 印渍来进行定量分析, 困难较多, 因为基因组总 DNA 在经限制性内切酶消化后, 一些家族 (或成员) 的重复顺序如果散布在整个基因组中, 常常不能形成单一电泳带形, 而在 Southern 杂交图谱中呈现拖尾形状或多条杂交带 (Ladder pattern), 会给定量分析带来不少麻烦。另外, 不同分子量大小的酶切片段从电泳凝胶转移结合到尼龙膜上的效率是不同的, 片段越大, 转移越慢, 效率也越低, 这也使散布的重复顺序难以定量^[13, 14]。为了测定和比较不同来源 DNA 样品中重复顺序含量的差异, 我们应用一种有效的可以定量的狭缝印渍

*本研究受国家八六三计划 (101-01-02 课题) 及美国洛克菲勒基金会水稻生物技术国际合作项目 (RF90032**55 课题) 支持。

** 广东仲恺农业技术学院农学系

收稿日期: 1993-08-09; 修回日期: 1993-10-11

(Slot-blot) 杂交技术进行实验研究^[6, 13, 14]。其基本原理是: 经精确测知浓度的 DNA 样品, 变性之后, 通过一个狭缝模具转移到尼龙膜上, 形成一条窄带。尼龙膜经烘干后, 按 Southern 杂交的方法与重复 DNA 片段探针杂交。根据自显影图谱和测量杂交上各狭缝的放射性强度, 就可以计算出不同 DNA 样品中重复 DNA 顺序的含量。

水稻属于禾本科稻属 (*Oryza*), 包括 20 个野生种和 2 个栽培种 (*Oryza sativa* L. & *O. glaberrima* Steud.)^[4], 被划分成八个基因组: AA, BB, BBCC, CC, DD, CCDD, EE 和 FF^[9]。复性动力学分析显示水稻核基因组包括大约 58% 的重复顺序 DNA。本文应用狭缝印渍方法, 测定来自栽培稻品种 Cpslo-17 (AA 基因组型) 一个 560bp 的重复 DNA 顺序克隆片段在不同水稻野生种和栽培种基因组中的拷贝数, 分析这些水稻基因组之间重复顺序 DNA 含量的差异, 并讨论其与水稻进化历程的关系。

材料与方 法

一、质粒 pRRD9 是一个栽培稻品种 Cpslo-17 的中度重复顺序克隆, 其插入片段为 560bp, 已测定核苷酸顺序。由本实验室提供^[1]。

二、水稻籼稻 (*Oryza sativa* L. *Indica*) 及粳稻 (*O. sativa* L. *Japonica*) 品种, 以及野生稻等水稻材料均由广东省农科院水稻所梁能先生和广东仲恺农业技术学院提供。

三、主要试剂 α -³²PdCTP 购自北京福瑞生物工程公司; 随机引物探针标记试剂盒 (Prime-a-Gene Labeling System Kit) 购自 Promega 公司; 尼龙膜购自 Sigma 公司。

四、水稻高分子量 DNA 的提取与纯化 主要参照 G. Kochert 等人^[11]的程序进行。10-15g 水稻叶片材料, 加液氮研磨成细粉状。转入 60℃ 盛有 25ml 提取缓冲液 (350 mmol/L NaCl, 50mmol/L Tris-HCl, pH8.0, 20mmol/L EDTA, 7mol/L 脲, 1% N-Lauroylsarcosine, 每 100ml 含 5ml TE 饱和酚) 的离心管中, 加 0.75ml 20% SDS, 轻搅 2-3 次, 60℃ 水浴 10min, 加 5ml 氯仿异戊醇 (24:1), 室温放置 15min 并来回倒置 10-15 次以保证混合物处于乳化状态。2500xg 离心 5min, 用宽口吸管吸出上清液并经纱布过滤到一新管中。加 2/3 体积异丙醇, 轻摇几次使 DNA 粘集成团, 用细玻璃棒挑出 DNA, 70% 乙醇浸洗两次, 真空干燥。加 4ml TE 缓冲液 (pH8.0), 60℃ 水浴溶解 1h。7500xg 离心 10min 去除不溶物。加 RNaseA 至 10 μ g·ml⁻¹, 37℃ 保温 30min。加 1/10 体积 6mol/L LiCl 及 2 倍体积预冷无水乙醇, 沉淀 30min, 以 7500xg 4℃ 离心 10min, 倒去上清液, 真空干燥。70% 乙醇浸洗两次, 真空干燥, -20℃ 保存。取用时, 加适量 TE (pH8.0) 缓冲液, 60℃ 充分溶解, 取 10 μ l 稀释至 1ml, 测 O. D. 260 和 O. D. 280。

五、质粒 DNA 提取与纯化 主要参照 J. Sambrook^[12]的方法。

六、狭缝印渍方法 将狭缝印渍模具^[13]洗净, 剪一张大小合适的尼龙膜, 在变性液 (1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L NaOH) 中浸润, 下垫一张同样大小的新华滤纸, 置于模具上中两层之间, 用四角的螺丝固定好模具, 下层接通微型台式真空泵。

根据紫外分光光度计测定的 DNA 浓度, 用 TE (pH8.0) 将不同样品水稻 DNA 稀释到 50 ng· μ l⁻¹。质粒 DNA 稀释到 10 ng· μ l⁻¹, 取印渍所需量的 DNA 稀释液在 70 μ l 1.5 mol/L NaCl, 0.5 mol/L

NaHO 中变性 5min, 加入相应的模具狭缝中, 启动真空泵, 帮助溶液通过狭缝印渍到尼龙膜上, 形成印渍狭带。用 200 μ l 变性液清洗模具狭缝中残留 DNA, 抽真空几分钟后, 待狭缝中无残留溶液, 拆下装置, 尼龙膜放置在 1.5mol/L NaCl, 1mol/L Trist-HCl, pH7.4 溶液中中和 5min, 再于 6xSSC 中漂洗数分钟, 室温晾干, 80 $^{\circ}$ C 真空干燥 2h。

七、探针制备, Southern 杂交及自显影 用 Promega 公司 Prime-a-Gene Labeling System Kit 标记重复 DNA 顺序克隆的插入片段, Southern 杂交是在 68 $^{\circ}$ C 条件下与 32 P 标记的探针杂交 16h, 洗膜在如下条件下进行: 2xSSC-0.1% SDS 室温下 15min 后, 1xSSC-0.05% SDS 65 $^{\circ}$ C 保温 30min, 接着 0.5xSSC-0.025% SDS 65 $^{\circ}$ C 保温 30min, 最后用 0.1xSS-0.5% SDS 在室温下迅速漂洗一下, 晾干后进行 X 光片放射自显影^[9]。根据 X 光片所显示狭缝带中 DNA 的位置, 将尼龙膜剪成小块, 分别放入液闪小瓶中, 用液体闪烁计数分析仪 (Liquid Scintillation Analyzer, PACKARD 2000CA Tri-carb) 测定膜上质粒 DNA 及水稻 DNA 的杂交放射性强度 (每分钟射线计数 cpm), 再代入公式计算水稻基因组中所含相应重复 DNA 顺序的拷贝数。

实验结果

一、对照实验

作为探针的重复 DNA 片段必须特异地与尼龙膜上 DNA 结合, 才能使杂交信号强弱与同源 DNA 含量成正比, 从而保证重复 DNA 顺序定量分析的准确。通过预备实验, 证实狭缝印渍杂交技术的可靠性。

为了达到这个目的, 以系列稀释的 pRRD9 质粒 DNA 样品, 进行狭缝印渍, 然后以 pRRD9 克隆插入片段制备探针进行杂交, 所得结果如图 1。杂交点的强度可以用两种方法进行测量: (1) 在有液体闪烁计数仪的情况下可以直接测定尼龙膜上各狭缝的放射强度, 即每分钟放射性计数 (cpm); (2) 也可利用密度扫描仪 (Densitometer) 来测定所得 X 光片上各狭缝的黑度值。

从所得的杂交放射自显影图谱可以看到: 在狭缝加样量不“超载”的范围内, 随着印渍到尼龙膜上的质粒 DNA 量增加, 特异地结合到质粒 DNA 上的探针 DNA 量及其放射性强度成直线关系。由此说明, 可以通过这种狭缝印渍杂交技术对基因组的重复 DNA 顺序进行定量分析。

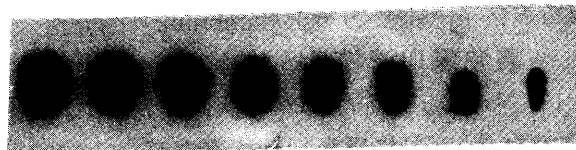


图 1 狭缝印渍杂交技术的放射自显影图谱

Fig. 1 Autoradiographs of slot blots technique

从左至右 From left to right: 200, 100, 50, 20, 10, 5, 1ng pRRD9 DNA

二 不同水稻基因组中重复顺序拷贝数的测定

将来自 15 个栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 包括 7 个粳稻品种 (*Oryza sativa* L. *Japonica*), 8 个籼稻品种 (*Oryza sativa* L. *Indica*) 以及 16 个野生稻种的基因组总 DNA 500ng 分别印渍到两张尼龙膜上。另将含水稻重复 DNA 顺序的质粒 pRRD9 DNA, 做一系列稀释: 200ng, 100ng, 50ng, 同时印渍到尼龙膜上。用 pRRD9 的插入片段做探针, 所得的杂交结果如图 2 所示。

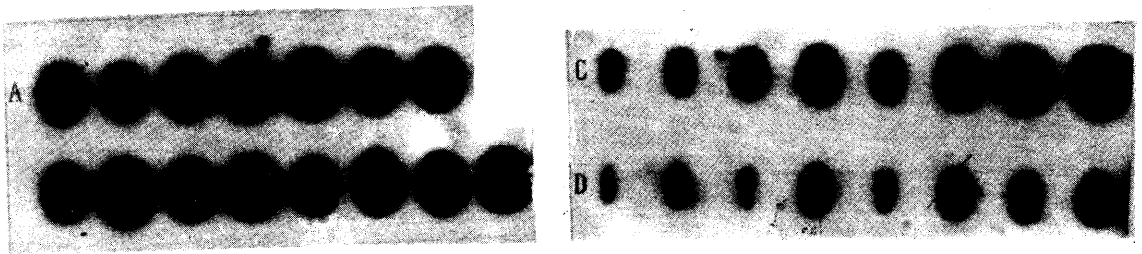


图 2 来自 15 个栽培稻 (A, B) 以及 16 个野生稻种 (C, D) 的基因组总 DNA 500 ng 通过狭缝印渍杂交所得自显影图谱
Fig. 2 Autoradiographs of slot blots containing 500 ng genome DNA from 15 varieties of cultivated rice and 16 types of wild rice 从左至右 From left to right:

A: 67, 68, 64, 63, 54, 55, 78 (*Oryza sativa* L. *Japonica*), B: 87, 85, 73, 63, 77, 84, 83, 79 (*Oryza sativa* L. *Indica*),
C: E₁₋₉, S₁₀₄₀, E₈₋₂, E₈₋₅, E₁₁₋₉, E₁₁₋₁₀, E₁₃₋₈, E₁₆₋₅ (Wild Rice) D: E₁₃₋₁₆, E₁₅₋₁₉, E₁₋₁, E₂₋₉, E₂₋₁₁, E₄₋₈, E₃₅₋₂, M₃ (Wild Rice).

根据液体闪烁计数分析仪测得各狭缝的放射性强度, 代入下列公式^[6] 计算出拷贝数:

该重复 DNA 顺序占水稻基因组的百分比 (%)

$$= \frac{\text{每狭缝水稻 DNA 放射性计数 (cpm)}}{\text{每狭缝质粒 DNA 放射性计数 (cpm)}} \times \frac{\text{质粒 DNA 量 (ng)}}{\text{水稻 DNA 量 (ng)}} \times \frac{\text{插入片段大小 (bp)}}{\text{整个质粒大小 (bp)}} \times 100\%$$

$$\text{重复 DNA 顺序拷贝数} = \frac{\text{水稻基因组大小 (bp)}}{\text{重复 DNA 顺序片段大小 (bp)}} \times \text{重复 DNA 顺序占水稻基因组的百分比}$$

其中水稻单倍基因组大小 (C=0.3pg) 约为 $2.9 \times 10^8 \text{bp}^{[18]}$, 计算四倍体水稻重复顺序拷贝数时, 基因组大小相应增加一倍; pkk175-6 载体大小: 4400bp (参见 pharmacia 公司产品目录); 插入的重复 DNA 顺序片段大小: 560bp; 整个质粒大小: $4400 + 560 = 4960 \text{bp}$; 实验结果见表 1。

表1 不同水稻基因组重复 DNA 顺序 (pRRD9) 拷贝数测定结果
Table 1 Copy number determination of cloned repetitive DNA sequence (pRRD9) in different rice genomes.

No.	Species	Name in Chinese	Genome type	Cpm per slot ¹⁾	Percentage of haploid genome	Copy number in haploid genome ²⁾
67	<i>Oryza sativa</i> L. Japonica	丰内	AA	540	0.771	3990
68	"	日本晴	AA	471	0.672	3480
64	"	秋光	AA	715	1.021	5290
62	"	巴利拉	AA	796	1.136	5880
54	"	辽梗 5 号	AA	831	1.186	6140
55	"	京 16-13	AA	547	0.781	4040
78	"	蓬莱	AA	586	0.836	4330
87	<i>O. sativa</i> L. Indica	马尾齐	AA	397	0.567	2940
85	"	玻璃基	AA	386	0.551	2850
73	"	IR-30	AA	417	0.595	3080
63	"	IR-36	AA	588	0.840	4350
77	"	IR-24	AA	385	0.550	2850
84	"	南京 11	AA	511	0.729	3780
83	"	早金凤	AA	402	0.574	2970
79	"	南特	AA	499	0.712	3690
E ₃₋₉ ³⁾	<i>O. barthii</i>	巴蒂(短叶舌)野稻	AA	131	0.205	1060
S ₁₀₀	<i>O. rufipogon</i>	海南 1 年生野稻 红芒野稻(英)	AA	163	0.254	1320
E ₃₋₂	<i>O. glumaepatula</i>	多年生野稻 (古巴型)	A ^o A ^o	255	0.398	2060
E ₃₋₅	<i>O. glumaepatula</i> Steud.	多年生野稻	A ^o A ^o	241	0.376	1950
E ₁₁₋₉	<i>O. longistaminata</i>	长药野稻	A ¹ A ¹	214	0.334	1730
E ₁₁₋₁₀	<i>O. longistaminata</i>	长药野稻	A ¹ A ¹	399	0.623	3230
E ₁₃₋₈	<i>O. minuta</i> J. S. Presl	小粒野稻	BBCC	293	0.457	1180
E ₁₆₋₅	<i>O. punctata</i>	斑点野稻	BBCC	361	0.564	1460
E ₁₅₋₁₆	<i>O. officinalis</i>	药用野稻	CC	51	0.080	410
E ₁₅₋₁₉	<i>O. officinalis</i>	药用野稻	CC	97	0.152	790
E ₁₋₁	<i>O. alta</i>	高秆野稻	CCDD	68	0.106	280
E ₂₋₅	<i>O. australiensis</i>	澳洲野稻	EE	82	0.132	680
E ₂₋₁₁	<i>O. australiensis</i>	澳洲野稻	EE	52	0.081	410
E ₄₋₄	<i>O. brachyantha</i> A.	短药野稻(1年生)	FF	117	0.186	960
E ₂₃₋₂	<i>O. meyeriana</i>	疣粒野稻(国外)	未定	89	0.139	720
M ₃	<i>O. meyeriana</i>	疣粒野稻(国内)	未定	113	0.179	930

注 1) 与水稻 DNA 样品同时印渍到尼龙膜上的 pRRD9 质粒 DNA 杂交后测得放射性计数 (cpm) 从 67 号至 79 号: 100ng, 1491; 50ng, 843; 从 E₃₋₉ 号至 M₃ 号: 100 ng, 1290; 50 ng, 824. 2) 本文的全部实验结果来自两次重复实验。

3) 野生稻的来源, E. 表示国外引进品种; M.S. 表示国内采集品种。

Note 1) Hybridization signals (cpm) of pRRD9 plasmid DNA blotted onto nylon membrane simultaneously with rice genome DNA are, from 67 to 79; 100ng, 1491; 50ng, 843; from E₃₋₉ to M₃, 100 ng, 1290; 50 ng, 824.

2) All the experiment results in this research come from twice repeats.

3) Wild rice resource, E.nears from foreign countries; M and S from China.

讨论和分析

本文所述的狭缝印渍杂交技术进行重复 DNA 顺序拷贝数的测定, 是一种方便可靠的方法。在我们进行预备实验中, 质粒 DNA 在 1-200ng 范围内, 杂交信号强度和 DNA 含量成直线关系, 这是通过直接测定尼龙膜上杂交产生的放射性强度得知的。我们曾经注意到, X 光片的感光在一定范围内会达到饱和。如图 1 所示 X 光片在 100, 200ng 时, 感光呈现饱和状态, 但在测量每张杂交膜的放射信号强度时, 仍与 DNA 含量成直线关系。在进行这种实验时, DNA 样品系列稀释的准确性非常重要, 可以说是实验成功的关键。本实验中采用的纯化 DNA 条件是普通实验室都具备的, 获得的 DNA 制品质量比较稳定, 常规琼脂糖凝胶电泳显示其分子量在 50kb 以上, 交变电泳显示它们的分子量实际上达到 200-250kb^[2], 所以 DNA 分子量是符合要求的; 所有样品的 DNA 均能被限制性内切酶完全消化; DNA 样品 O.D. 260/O.D 280 的比值大部分达到 1.6-1.9。由于 DNA 的纯度直接影响加到每个 Slot 的 DNA 量, 因此, 对 DNA 样品的纯度需要有一种要求。本实验中所用的 DNA 样品未经特别的纯化程序, 如 CsCl 密度梯度离心, 除个别样品外, 均达到上述的纯度要求。

C. A. Cullis 和 Carol J. Rivin 等人曾利用这种方法对玉米 (*Zea mays*) 基因组的多个重复顺序克隆进行拷贝数测定, 发现不同基因组型的株系间拷贝数存在差异, 同一杂交系各植株间拷贝数差别很小, 而同一杆株中不同重复 DNA 顺序拷贝数有高有低, 并初步提出将重复 DNA 顺序在基因组中的拷贝数大小作为一种分子标记, 研究玉米各品种之间的亲缘及进化关系^[13, 14]。X. Zhao 和 R. Wu 等人在水稻 (*Oryza*) 基因组中开展了类似的研究, 提出以这种拷贝数测定方法为基础, 快速简便地鉴定水稻种间亲缘关系, 并应用于水稻杂交育种和基因工程的想法^[19]。另外, Kikuchi, Oono 等人把这种测定方法应用到研究水稻生长发育过程基因调控上, 监测这个过程中水稻各器官、组织甚至细胞核、叶绿体中重复顺序 DNA 含量变化与水稻生长发育调控、周围环境改变之间的联系^[10]。

从上述的实验结果可以发现: 供本实验分析用的水稻中度重复 DNA 顺序 pRRD9 克隆片段, 在水稻基因组中约占有 0.1% 到 1.1% 的比例, 通过限制性内切酶 Hae III 消化水稻 DNA 的 EB 电泳图谱和 Southern 杂交图谱 (图 3) 可以看到 pRRD9 片段在基因组 DNA 中的分布状态, 即兼有串联重复和散布分布的特点。更有兴趣的是, 该重复顺序在栽培稻基因组内的拷贝数普遍高于野生稻, 显示栽培稻和野生稻种之间明显程度的差异, 但同时又表明栽培稻和野生稻种之间存在一定的亲缘关系 (图 4)。一般认为, 野生稻是栽培稻的原始祖先, 从 pRRD9 这个重复顺序看来, 不管是野生稻还是栽培稻的基因组中都已经存在。但是野生稻基因组中它的拷贝数低, 特别是 CC、CCDD、EE、FF 这几个基因组型的野生稻种, 它们的拷贝数大约为 300-900, 而在栽培稻中则在 3000-6000 份拷贝的范围。我们知道, DNA 重复顺序的进化是以一种不等交换放大机理进行, 因此, 随着野生稻到栽培稻的进化, 拷贝数从低到高的变化显然符合重复顺序的进化规律, 而且从这个结果还可以看到, 这个重复 DNA 顺序在水稻的进化中似乎存在一种连续性, 该重复 DNA 顺序在若干野生稻基因组型如 AA、A¹A¹ 和 A^αA^α、BBCC 的拷贝数有一种居间的数值, 似乎意味着这些种是在野生稻和栽培稻之间的一个“接合部”。

所得到拷贝数结果还涉及一个十分有趣的问题,即在栽培稻起源分化过程中,是先籼后粳,还是先粳后籼的问题。在本实验结果中,可以看出一种趋势,该重复 DNA 顺序在粳稻基因组的平均拷贝数为 4740,籼稻为 3310, AA 基因组型的野生稻为 1890, BBCC 为 1320,其它基因组型的野生稻为 650。显然,籼稻的拷贝数比较接近野生稻的拷贝数(这里仅仅说明一种趋势,例外的情况如 IR36,它的拷贝数高达 4350,接近粳稻的平均值。在进行籼粳亚种间杂交,亲本若使用 IR36, F1 的自交结实率相当高,这两者之间也许存在某种联系。至于 E₁₁₋₁₀ 的长药野稻,为何具有特别高的拷贝数 3230,这些都还值得进一步探讨)。当然,也不能根据一种重复 DNA 顺序的拷贝数测定结果,就可以得到栽培稻的进化是先籼后粳的结论,但是,这里的结果至少提供了一条研究这个问题的新线索。一些研究表明,若干重复 DNA 顺序具有基因组特异性,可能作为分子标记,通过简单快速的杂交实验,探索水稻不同基因组类型和水稻种间、种内的进化关系。我们的实验结果为研究水稻种的分化和基因组进化过程提供了一些有用的信息。

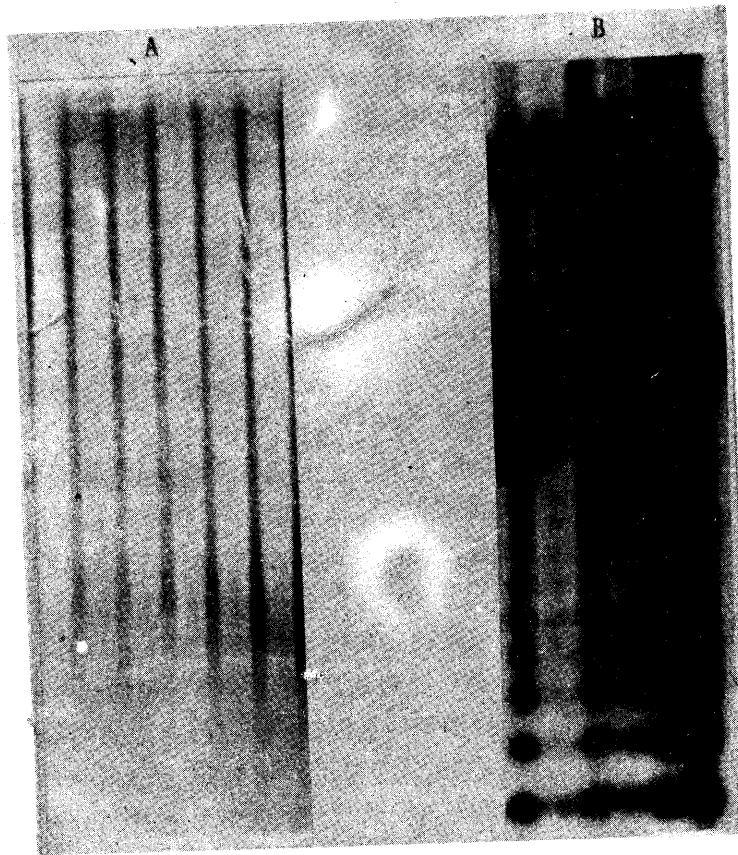


图 3 Hae III 消化水稻 DNA 的电泳图谱(A) 及用 pRRD9 作为探针的 Southern 杂交图谱(B)
Fig. 3 Agarose gel electrophoresis(A) and Southern hybridization autoradiograph of Hae III digested rice genome DNA, using pRRD9 as probe(B)

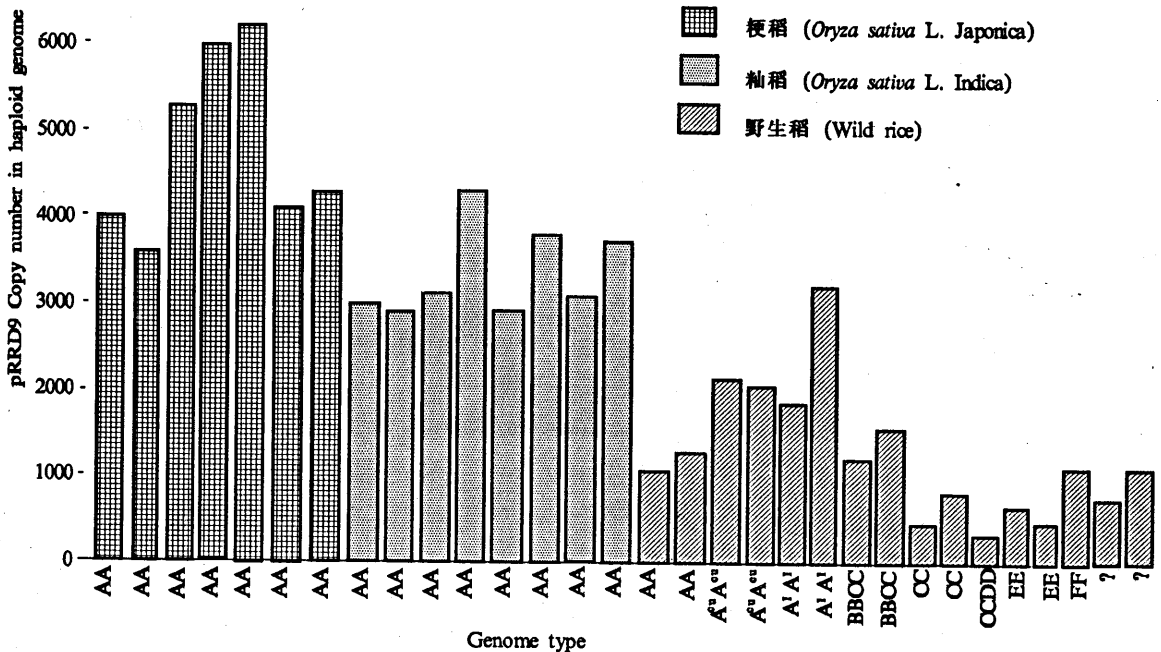


图4 各水稻基因组中重复DNA顺序 pRRD9拷贝数的比较
Fig. 4 Comparison of copy number of pRRD9 in rice genomes

参考文献

- [1] 何木兰、唐东江、侯永敏等, 水稻 (*Oryza sativa*) 重复DNA顺序的克隆及序列分析. 华南植物学报, 1993, 试刊II, 62-72.
- [2] 钟翎、李文哲、刘良式, 水稻染色体DNA的交变脉冲电泳分析. 生物化学与生物物理学进展, 1992年, 19(5) 3 52-356.
- [3] bernatzky, R., E. Pichersky, V. X. Malic and S. D. Tanksley, CRI-A Dispersed Repeated Element Associated with the Cab-1 Locus in Tomato. Plant Molecular Biology, 1988, 10:423-433.
- [4] Chang, T. T., Conservation of Rice genetic Resources; Luxury or Necessity. Science, 1984, 224:251-256.
- [5] Chang, T. T., The Origin, Evolution, Cultivation, Dissemination and Diversification of Asian and African Rices. Euphytica, 1976, 25:425-441
- [6] Cullis, A., C. J. Rivin & V. Walbot, A Rapid Procedure for the Determination of the Copy number of Repetitive Sequences in Eukaryotic Genomes. Plant Molecular Reporter 1984, 2:24-31.
- [7] Flavell, R. B., Repetitive DNA and Chromosome Evolution in Plants. Philos. Trans. R. Soc. London, 1986, 312:227-242.
- [8] Grellet, F., D. Delcasso, F. Panabieres & M. Delseny, Organization and Evolution of a Higher Plant Alplloid-like Satellite DNA Sequence. J. Mol. Biol., 1986, 187:495-507.
- [9] Kato, A., K. Yakura & S. Tanifuji, Sequence Analysis of *Vicia faba* Repeated DNA. the FokI repeat element. Nucleic Acids Research, 1984, 12:6415-6426.
- [10] Kikuchi, S., F. Takaiwa, K. Oono, Variable Copy Number DNA Sequences in Rice. Mol. Gen. Genet., 1987, 210: 373-380.

- [11] Kochert, G., et al, RFLP Training Course Lab Manual Sponsored by the Rockefeller Foundation Program on Rice Biotechnology.
- [12] Martinez-Zapater, J. M., M. A. Estelle, C. R. Somerville, A Highly Repeated DNA Sequence in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Gen. Genet.*, 1986, 204: 417-423.
- [13] Rivin, C., Analyzing Genome Variation in Plants. *Meth. in Enzymology*, 1986, 118:75-76.
- [14] Rivin, C. J., C. A. Cullis & V. Walbot, Evaluating Quantitative Variation in the Genome of *Zea mays*. *Genetics*, 1986, 113:1009-1019.
- [15] Sambrook, J., E. F. Fritsch & T. Maniatis, *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2ed, 1989, Cold Spring Harbor Lab Press.
- [16] Simoens, C. R., J. Gielen, M. V. Montagu & D. Inze, Characterization of Highly Repetitive Sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acids Research*, 1988, 14:6753-6766.
- [17] Singer, M. F., Highly Repeated Sequences in Mammalian Genomes. *Int. Rev. Cytol.*, 1982, 76:67-112.
- [18] Soryu Nishibayashi, Is the Size of the Rice Genome Relatively Small? *Rice Genetics Newsletter*, 1991, 8:152-154.
- [19] Zhao, X., T. Wu, Y. Xie & R. Wu, Genome-specific Repetitive Sequence in the Genus *Oryza*. *Theor. Appl. Genet.*, 1989, 78:201-209.

DETERMINATION OF COPY NUMBER OF REPETITIVE DNA SEQUENCE pRRD9 IN GENUS *ORYZA**

Xiao Zhen Cai Yetong Liu Liangshi

(Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275)

Abstract

Copy number of cloned repetitive DNA sequence pRRD9 has been determined within the genus *Oryza*, including 15 cultivated rice (7 belonging to *Oryza sativa* L. Japonica, 8 belonging to *Oryza sativa* L. Indica) and 16 wild rice entries (belonging to AA, A¹A¹, A^{su}A^{su}, BBCC, CC, CCDD, EE and FF genome types respectively). This was done by using quantitative filter hybridization technique named 'SLOT-BLOTTING'.

The result shows that pRRD9 copy number is markedly variable between cultivated and wild rice entries, while the average copy number among all types of rice genomes are, from high to low, Japonica, 4740; Indica, 3310; wild rice (AA genome type), 1890; wild rice (other genome types excluding AA), 780. The data also throw more light on the heavily-argued problem of rice genome divergence and evolution process.

Key words: Rice; Repetitive DNA sequence; Copy number

* This research was supported by grants from National 863 project (No. 101-01-02) and the Rockefeller Foundation's International Program on Rice Biotechnology (RF 90032#55).