

基于 SSR 标记的福建省若干水稻品种 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析

马红勃, 许旭明, 韦新宇, 杨旺兴, 邹文广

(福建省三明市农业科学研究所, 福建 沙县 365509)

摘要: 以 24 份杂交稻品种和 18 份杂交稻亲本为材料, 利用 SSR 分子标记进行 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析。24 对引物在研究材料中共检测到 74 个多态性片段, 平均每对引物的多态性片段为 3.1 个。基于 24 个 SSR 标记的扩增结果, 利用 NTSYS 2.10e 软件计算 Dice 遗传相似系数, 并建立 UPGMA 聚类图, 结果表明: 42 份材料之间的相似系数变化范围为 0.60~1.00, 在遗传相似系数 0.68 处可以将 42 份材料分为 6 个类群, 较好地反映了供试材料的亲缘关系, 可为水稻育种中亲本选择提供参考。同时建立了 42 份材料 × 12 个 SSR 标记的指纹图谱, 为杂交水稻品种纯度和真伪鉴定提供科学数据。

关键词: 水稻; SSR; 指纹图谱; 遗传多样性

中图分类号: S 511; S 326

文献标识码: A

DNA fingerprints and genetic diversity analysis based on SSR markers for rice cultivars in Fujian

MA Hong-bo, XU Xu-ming, WEI Xin-yu, YANG Wang-xing, ZOU Wen-guang

(Sanming Institute of Agricultural Science, Shaxian, Fujian 365509, China)

Abstract: SSR was used to construct the DNA fingerprints and analyze the genetic diversity of 24 hybrid rice cultivars and 18 parental cultivars. Twenty four SSR primers amplified a total of 74 polymorphic DNA bands, averaging 3.1 bands per primer. Based on the amplification of 24 markers, genetic similarity coefficient of dice was calculated using the software, NTSYS 2.10e, and a dendrogram of genetic relationship was constructed using UPGMA method. The results showed that the genetic similarity among 42 cultivars ranged from 0.60~1.00, that 42 cultivars were classified into six cluster groups with the similarity coefficient of 0.68, and that the genetic relatives among cultivars was well revealed. It would provide a scientific basis for selection of parents for cross breeding rice. A fingerprint of SSR for 42 cultivars at the 12 primer loci was obtained, which would provide scientific data for identification as well as determination of purity of the hybrid rice.

Key words: Rice; SSR; fingerprint map; genetic diversity

近年来, DNA 指纹鉴定技术飞速发展, 无论是在理论还是技术方面都取得了长足的进步。利用 DNA 指纹技术构建作物品种的 DNA 指纹库, 可以有效地进行品种纯度和真伪鉴定、新品种 DUS 测试、区试品种监控、侵权案司法鉴定、种质资源遗传多样性分析等相关工作^[1~7]。SSR 为共显性标记, 与其他标记鉴定 (如 SRA P^[8]) 相比较, SSR 具有稳定性高、专一性强、带型简单、可靠性高等优点, 在水稻主栽品种 SSR 数据库构建、技术体系优化、判别标准探讨等^[2,9] 方面开展应用, 具有广阔的前景。

SSR 标记是目前在水稻品种纯度和真伪检测

方面应用最多的标记^[10]。本研究以 24 份杂交稻品种和 18 份杂交稻亲本为材料, 采用中国水稻研究所推荐的 24 个 SSR 标记^[9], 对其遗传多样性进行分析, 并建立了 42 份材料 × 12 个 SSR 标记的 DNA 指纹图谱, 旨在为杂交水稻品种纯度和真伪鉴定提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料由福建省三明市农业科学研究所和福建省六三种业有限责任公司提供, 品种名称及编号见表 1。

收稿日期: 2009-11-30 初稿; 2009-01-13 修改稿

作者简介: 马红勃 (1983-), 男, 硕士, 研究实习员, 主要从事作物分子育种研究 (E-mail: mahongbo863@163.com)

通讯作者: 许旭明 (1964-), 男, 博士, 研究员, 主要从事水稻遗传育种研究工作 (E-mail: fj63x xm@sina.com)

基金项目: 福建省科技计划重点项目 (2007N0070)

表 1 试验材料名称及编号
Table 1 List of cultivars used

编号	品种名称	品种来源	编号	品种名称	品种来源
1	协青早 A		22	II 优 398	II- 32A × 明恢 398
2	中 9A		23	II 优 1259	II- 32A × 明恢 1259
3	T 78A		24	II 优明 118	II- 32A × 明恢 118
4	金 23A		25	II 优 907	II- 32A × 明恢 907
5	广抗 13A		26	全丰优 2155	全丰 A × 明恢 2155
6	元丰 A		27	金优 2155	金 23A × 明恢 2155
7	明香 10S		28	金优 07	金 23A × 明恢 07
8	II- 32A		29	金优明 100	金 23A × 明恢 100
9	明恢 2155		30	T 78 优 2155	T 78A × 明恢 2155
10	明恢 86		31	T 78 优 07	T 78A × 明恢 07
11	明恢 401		32	特优 73	龙特甫 A × 明恢 73
12	明恢 100		33	特优 884	龙特甫 A × 明恢 884
13	明恢 884		34	谷优 1259	谷丰 A × 明恢 1259
14	明恢 70		35	谷优 929	谷丰 A × 明恢 929
15	明恢 122		36	两优 1259	SE21 × 明恢 1259
16	明恢 73		37	明两优 527	明香 10S × 蜀恢 527
17	明恢 1259		38	汕优 82	珍汕 97A × 明恢 82
18	蜀恢 527		39	广优明 118	广抗 13A × 明恢 118
19	II 优明 86	II- 32A × 明恢 86	40	中优 2155	中九 A × 明恢 2155
20	II 优 1273	II- 32A × 明恢 1273	41	九丰优 2155	九丰 A × 明恢 2155
21	II 优 339	II- 32A × 明恢 339	42	协优 1259	协青早 A × 明恢 1259

1.2 方法

1.2.1 DNA 的提取 取水稻幼苗期叶片, 基因组 DNA 的提取采用 SDS 法^[11]。

1.2.2 PCR 扩增 SSR-PCR 扩增总体积 20 μL, 其中包括 1× buffer (10 mmol · L⁻¹ Tris HCl pH 8.0, 50 mmol · L⁻¹ KCl, 2.5 mmol · L⁻¹ MgCl₂, 0.08% Nonidet P40), dNTP 25 μmol · L⁻¹, 引物 40 μmol · L⁻¹, DNA 模板 20 ng, *Taq* 酶 1.5 U (*Taq* 酶、1× buffer、SSR 引物和 dNTP 均购自上海生工生物工程技术服务有限公司)。扩增条件为: 94℃ 5 min, 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 30 s, 30 个循环; 最后 72℃ 10 min; 10℃ 保存。PCR 扩增在 MG96G 梯度 PCR 仪中进行。

1.2.3 电泳检测 采用北京六一仪器厂生产的 DYY-11B 型三恒多用泳仪, 用 6% 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离 PCR 产物。电泳缓冲液为 1× TBE, 电泳电压 300 V, 时间 1.5 h, 银染检测。

1.2.4 数据记录与分析 每个 SSR 标记检测到 1 个 SSR 位点, 视每条多态性带为 1 个等位基因,

依据等位基因分子量从大到小的顺序按 1、2、3、4、5……进行编号, 记录 42 份材料在各 SSR 位点处的等位基因类型, 对于杂合带则两个等位基因同时记录 (如等位基因 1 和 2 杂合, 则记为: 12)。在记录过程中只记录主要带型、忽略弱杂带型, 并与 100 bp DNA ladder marker 比对。记录完毕, 按照在相同迁移位置上 (相同的 DNA 分子量片段), 有带时赋值为“1”, 无带时赋值为“0”的标准, 全部转化为 1/0 格式。数据采用 NTSYS 2.10e 软件中 similarity 程序计算相似系数, 以 clustering 程序中 SHAN 进行 UPGMA (unweighted pair-group method with arithmetic means, 非加权组平均法) 聚类分析。

2 结果与分析

2.1 SSR 多态性分析

24 对引物在研究材料中共检测到 74 个多态性片段, 平均每对引物的多态性片段为 3.1 个, 每个 SSR 位点可以检测到的等位基因为 2~5 个不等

(表 2)。其中引物 RM 5414、RM 274、RM 219、RM 17、RM 273、RM 267 和 RM 253 在供试材料中检测到 2 个等位基因, 引物 RM 297、RM 85、RM 190、RM 336、RM 337、RM 1195、RM 208、RM 72 和 RM 224 检测到 3 个等位基因, RM 71、

RM 311、RM 209、RM 232、RM 228、RM 18、RM 278 和 RM 258 检测到 4 个等位基因, RM 19 检测到 5 个等位基因, 表明 24 对引物在供试材料中表现出较好的多态性, 杂交组合带型多表现为两个亲本带型的杂合状态。

表 2 24 个 SSR 标记的基本信息

Table 2 Basic information on 24 SSR markers

引物	染色体及臂	等位基因数 (个)	引物	染色体及臂	等位基因数 (个)
首选标记	Preferred marker		候选标记	Candidate marker	
RM 297	1 L	3	RM 1195	1 S	3
RM 71	2 S	4	RM 208	2 L	3
RM 85	3 L	3	RM 232	3 L	4
RM 5414	4 S	2	RM 273	4 L	2
RM 274	5 L	2	RM 267	5 S	2
RM 190	6 S	3	RM 253	6 S	2
RM 336	7 L	3	RM 18	7 L	4
RM 337	8 S	3	RM 72	8 L	3
RM 219	9 S	2	RM 278	9 L	4
RM 311	10 L	4	RM 258	10 L	4
RM 209	11 L	4	RM 224	11 L	3
RM 17	12 L	2	RM 19	12 S	5

注: S= Short , L= Long。

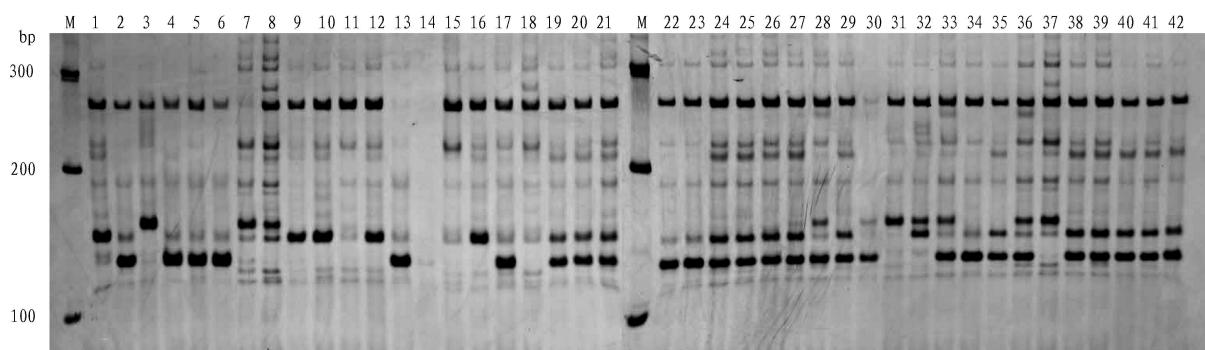


图 1 引物 RM 71 对 42 份材料的扩增结果

Fig 1 Amplifications of 42 cultivars using primer RM71

注: M 为 100 bp DNA ladder marker; 1~42 编号与表 1 相同

2.2 DNA 指纹图谱的建立

以 11 个核心标记和 1 个被选标记建立了 42 份材料的 DNA 指纹图谱 (表 3)。从表 3 可知, 每一列数据 (第一列除外) 正是某一 SSR 标记在 42 份材料中检测出的带型的数字化代号, 一个代号代表一个等位基因。表 3 每一行中的数字按从左到右的顺序构成一条字符串 (第一列除外), 共可建立 42 条字符串。字符串的位数至少是 12 (有杂合带时

则多于 12 位)。当 42 条字符串无一重复时即表明这 12 个 SSR 标记能将 42 份材料全部区分开, 也即每一条字符串能唯一标识一份品种, 因此, 可以将每一条字符串形象地称作为每一份品种的分子身份证号码。对于已存入 DNA 指纹库中的每一份品种来说, 其分子身份证号码是唯一的。如从表 3 中可知品种编号为 1 的分子身份证号码是 331213221342。

表 3 42 份材料的 DNA 指纹图谱
Table 3 DNA fingerprint of 42 cultivars

编号	RM 297	RM 71	RM 85	RM 5414	RM 274	RM 190	RM 336	RM 337	RM 219	RM 311	RM 209	RM 19
1	3	3	1	2	1	3	2	2	1	3	4	2
2	2	4	1	2	1	3	2	2	1	4	4	5
3	2	2	1	2	1	3	2	2	1	4	2	2
4	2	4	1	2	1	3	2	2	1	4	2	1
5	2	4	1	2	2	3	2	2	1	4	4	2
6	3	4	1	2	1	1	3	2	1	4	2	1
7	2	2	3	2	1	2	2	3	2	4	1	2
8	3	4	1	1	1	2	2	2	1	4	2	2
9	3	3	1	1	1	2	1	2	2	3	4	2
10	3	3	2	1	2	2	1	1	1	1	3	2
11	3	1	1	1	2	2	2	1	2	2	4	2
12	3	3	1	1	2	2	1	2	1	3	4	2
13	3	4	1	1	2	2	3	2	2	3	4	2
14	3	4	1	1	1	2	1	2	1	3	4	4
15	3	1	2	1	2	2	1	1	2	1	4	2
16	3	3	1	1	1	2	2	2	1	3	4	3
17	3	4	3	1	1	2	2	1	1	1	3	2
18	1	1	1	1	2	2	2	1	1	2	4	2
19	3	34	12	12	12	23	2	12	12	14	23	2
20	3	34	12	12	12	23	2	12	1	14	23	2
21	3	34	12	12	12	23	2	2	1	14	24	2
22	3	4	1	12	12	23	2	12	1	14	24	2
23	3	4	13	12	1	23	2	12	1	14	23	2
24	3	34	1	12	12	23	2	12	12	14	24	23
25	3	34	12	12	12	23	2	2	1	34	23	2
26	3	34	1	12	1	23	2	2	12	3	4	2
27	23	34	1	12	1	23	2	2	12	34	24	2
28	2	24	1	2	1	23	2	2	12	34	24	2
29	23	34	1	12	12	23	2	2	1	34	24	2
30	23	24	13	12	12	23	2	12	12	34	34	2
31	3	2	1	2	12	13	2	2	12	14	2	1
32	3	23	12	12	12	23	2	12	1	3	4	13
33	3	24	12	12	12	23	2	12	12	3	4	2
34	3	4	13	1	1	23	2	12	1	13	34	2
35	3	34	12	1	12	13	2	12	1	13	34	2
36	3	24	3	12	1	2	2	1	2	14	13	2
37	2	2	13	12	12	2	2	13	2	24	14	2
38	2	34	1	12	12	23	2	2	12	34	24	2
39	23	34	1	12	2	23	2	12	12	14	4	23
40	23	34	1	12	1	23	2	2	12	34	4	25
41	23	34	1	12	1	23	2	2	12	34	4	2
42	3	34	13	12	1	23	2	12	1	1	34	2

2.3 聚类分析

根据 24 对 SSR 引物所检测出的 74 个位点, 对 42 份材料进行聚类分析。从图 2 可以看出, 遗

传相似系数的变异范围为 0.60~1.00。在遗传相似系数 0.68 处可以将 42 份材料分为 6 个类群, 第 I 类群包含协青早 A、中 9A、金 23A、T78A、广

抗 13A 和 T78 优 07, 除 T78 优 07 外均属于三系不育系; 第 II 类群包含 21 个杂交稻品种和 II-32A; 第 III 类群包括明香 10S、两优 1259 和明两优 527, 为两系不育系和两系不育系为亲本的杂交稻品种; 第 IV 类群均为三系恢复系, 分别为明恢 2155、明恢 100、明恢 73、明恢 70、明恢 86、明恢 122、明恢 1259、明恢 401 和蜀恢 527 等品种; 第 V 类群仅有品种元丰 A; 第 VI 类群仅有品种明恢 884。

在遗传相似系数 0.76 处可将第 II 类群分为 4

个亚类, 第 1 亚类主要是 II-32A 及其所配制的杂交中晚稻品种, 包括 II-32A、II 优明 86、II 优 1273、II 优 339、II 优 907、II 优 1259、II 优 398、II 优明 118 和协优 1259; 第 2 亚类有全丰优 2155、金优 2155、中优 2155、九丰优 2155、金优明 100、金优 07 和汕优 82 等早熟杂交稻品种; 第 3 亚类包括 T78 优 2155、特优 884、谷优 1259、谷优 929 和特优 73 等含有龙特普 A 血缘的杂交稻组合; 第 4 亚类仅有品种广优明 118。结果表明, SSR 聚类结果能较好地反映供试材料的亲缘关系。

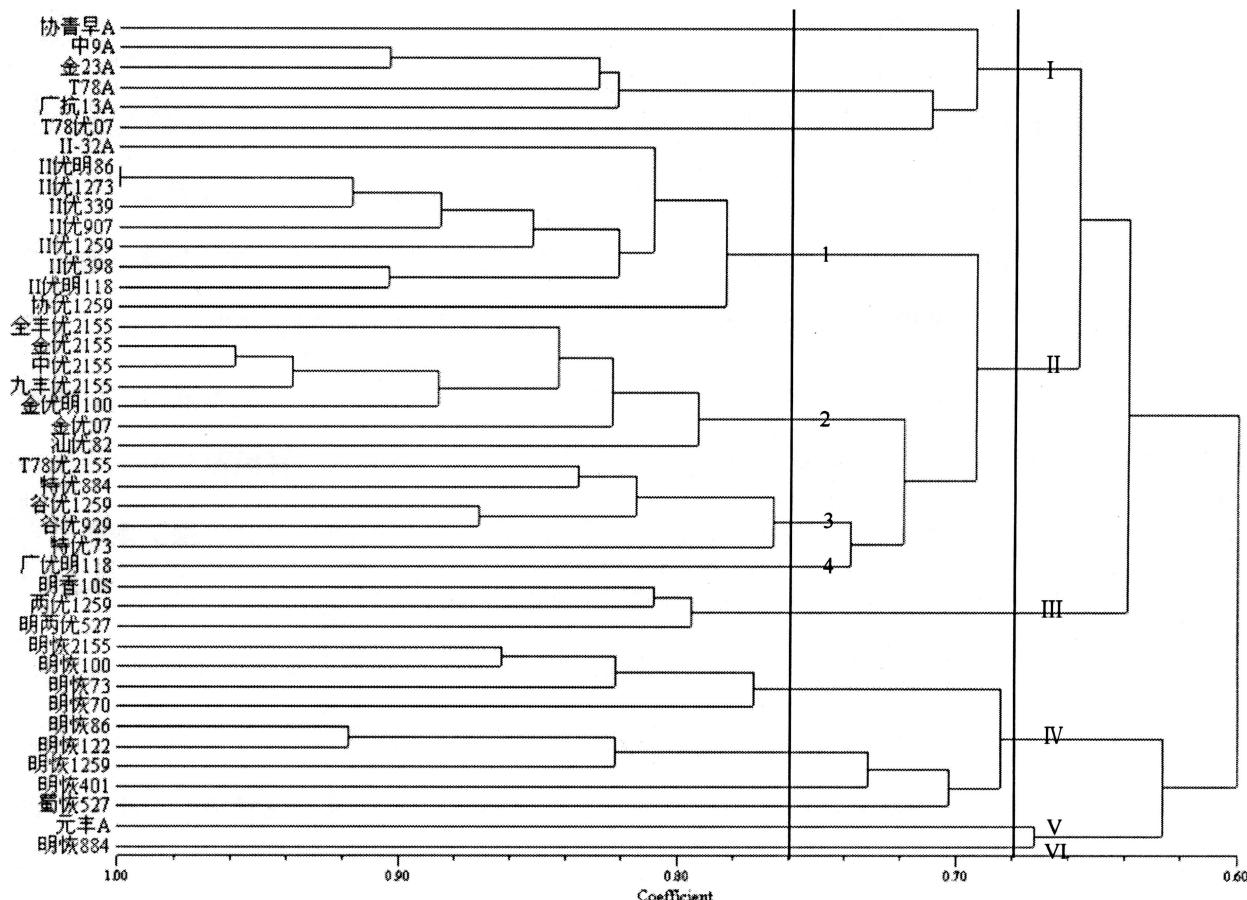


图 2 42 份材料的 SSR 分子聚类图

Fig 2 Cluster dendrogram of 42 cultivars based on SSR makers

3 讨 论

3.1 遗传多样性分析

目前 SSR 标记已经应用于部分地区水稻遗传多样性的分析, 如肖小余等^[3]对四川省主要杂交稻亲本的 SSR 多态性进行了分析, 李红宇和陈英华等^[12~14]对东北地区水稻种质资源遗传多样性进行了 SSR 分析。本研究利用 24 对 SSR 引物对 42 份

水稻材料进行检测, 共检测出 74 个多态性片段, 每个 SSR 位点可以检测到的等位基因为 2~5 个不等, 平均每对引物的多态性片段为 3.1 个, 明显低于程本义等^[9]在南方稻区国家水稻区域试验品种的微卫星标记分析中的平均每个首选标记 5.5 个多态性片段, 其原因可能与本研究所用材料数较少, 遗传多样性相对较低有关。本研究 42 份材料聚类分析表明, 恢复系、不育系和杂交组合能较好的区分

开, 从一定程度上反映了 SSR 标记的准确性。

3.2 数据库扩充

随着育种技术的发展, 作物新品种如雨后春笋, 已经构建的 DNA 指纹图谱无法应用于新品种的鉴定。因此应该定期对指纹库进行更新, 在原有的基础上加入新审定的品种^[12]。本研究中收集的建库材料品种数量有限, 信息量不够丰富, 有待进一步补充。

4 结论

构建了 42 份材料×12 个 SSR 标记的指纹图谱, 为杂交水稻品种纯度和真伪鉴定提供依据。在遗传相似系数 0.68 处可以将 42 份材料分为 6 个类群, 能较好地反映供试材料的亲缘关系, 可为水稻育种中亲本选择提供参考。

参考文献:

- [1] 张彦, 郭士伟, 何冰, 等. 利用 SSR 标记建立杂交水稻分子指纹图谱数据库 [J]. 江苏农业学报, 2006, 22 (2): 181–183.
- [2] 庄杰云, 施勇烽, 应杰政, 等. 中国主栽水稻品种 SSR 标记数据库的初步构建 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20 (5): 460–468.
- [3] 肖小余, 王玉平, 张建勇, 等. 四川省主要杂交稻亲本的 SSR 多态性分析和指纹图谱的构建与应用 [J]. 中国水稻科学, 2006, 20 (1): 1–7.
- [4] 赵久然, 王凤格, 郭景伦, 等. 中国玉米新品种 DNA 指纹库建立系列研究 II – 适于玉米自交系和杂交种指纹图谱绘制的核心标记的确定 [J]. 玉米科学, 2003, 11 (2): 3–5, 8.
- [5] 艾呈祥, 张力思, 魏海蓉, 等. 甜樱桃品种 SSR 指纹图谱数据库的建立 [J]. 中国农学通报, 2007, 23 (5): 55–58.
- [6] 付瑜华, 李杰, 王海燕, 等. 木薯商业品种的指纹图谱构建 [J]. 植物遗传资源学报, 2007, 8 (1): 51–55.
- [7] 梁明山, 刘煜, 侯留记, 等. 烟草品种的 DNA 指纹图谱和品种鉴定 [J]. 烟草科技, 2001 (1): 34–37.
- [8] 李建军, 肖层林, 刘志坚, 等. 陆两优 996 种子纯度的 SRAP 指纹图谱鉴定 [J]. 中国农学通报, 2007, 23 (6): 112–114.
- [9] 程本义, 施勇烽, 沈伟峰, 等. 南方稻区国家水稻区域试验品种的微卫星标记分析 [J]. 中国水稻科学, 2007, 21 (1): 7–12.
- [10] 汪爱顺, 李进波, 刘汉珍. DNA 指纹用于杂交水稻种子纯度和真伪鉴定的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2005, 3 (3): 393–400.
- [11] 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法 [J]. 中国水稻科学, 1992, 6 (1): 47–48.
- [12] 陈英华, 侯昱铭, 李宏宇, 等. 东北地区水稻区试新品种的 DNA 指纹图谱构建及遗传多样性分析 [J]. 种子, 2009, 28 (3): 28–35.
- [13] 李红宇, 侯昱铭, 陈英华, 等. 用 SSR 标记评估东北三省水稻推广品种的遗传多样性 [J]. 中国水稻科学, 2009, 23 (4): 383–390.
- [14] 陈英华, 李红宇, 侯昱铭, 等. 东北地区水稻种质资源遗传多样性分析 [J]. 华北农学报, 2009, 24 (3): 165–173.

(责任编辑: 柯文辉)