

水稻新品种测试的标准品种 DNA 指纹图谱多样性分析

唐浩¹, 余汉勇², 张新明¹, 魏兴华²

(¹农业部科技发展中心, 北京 100122; ²中国水稻研究所, 杭州 310006)

摘要:以植物新品种特异性、一致性和稳定性(DUS)测试指南中选定的49个水稻标准品种为材料,采用农业行业标准(NY/1433-2077)中推荐的24对水稻SSR引物进行DNA指纹图谱构建和遗传多样性分析。结果表明,24对SSR引物在19个籼稻和30个粳稻品种中分别检测到141和156个等位变异,平均每对引物可以检测到5.88(籼稻)和6.50(粳稻)个等位变异;籼、粳稻类群中24对SSR引物的平均Shannon's多样性指数分别为1.5141(1.0460~1.9959)和1.4389(0.4677~2.4503);经聚类分析后,籼、粳稻群体内品种间的相似系数分别介于0.45~0.81和0.36~0.76,取相似系数0.72为阈值,可将19个籼稻和30个粳稻品种分别分为16类和28类。由此可见,本研究的49个品种的遗传多样性丰富。结合形态性状和基因型聚类分析结果,可将现有的49个水稻DUS测试标准品种减少到46个。

关键词:新品种测试;标准品种;DNA指纹;多样性分析

Analysis on the Diversity of DNA Fingerprinting of the Example Varieties Used for the Test of Rice New Varieties

TANG Hao¹, YU Han-yong², ZHANG Xin-ming¹, WEI Xing-hua²

(¹Development Center of Science and Technology of Ministry of Agriculture, Beijing 100122;

²China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

Abstract: Using the 24 SSR markers recommended by “Sector Standard of Agriculture(NY/1433-2077)”, this study analyzed the DNA fingerprint and genetic diversity of the 49 rice varieties(the example varieties listed in “Distinctness, Uniformity and Stability(DUS)Test Guideline for Rice New Varieties”). The results showed that 141 and 156 alleles could be amplified by the 24 SSR primers in 19 *indica* rice varieties and 30 *japonica* rice varieties respectively, meaning each pair of primers could amplify 5.88 alleles(*indica* rice) and 6.50 alleles(*japonica* rice). The average shannon's diversity indexes of the 24 SSR primers were 1.5141(1.0406-1.9959) and 1.4389(0.4677-2.4503) for *indica* and *japonica* group respectively. Based on the results of cluster analysis, the similarity coefficient of varieties within *indica* and *japonica* rice group were 0.45-0.81 and 0.36-0.76 respectively, and 19 varieties of *indica* rice and 30 varieties of *japonica* rice could be sorted into 16 sets and 28 sets respectively using similarity coefficient of 0.72 as threshold. Thus, the genetic diversity of the 49 rice varieties was rich. Based on the consideration of cluster analysis of morphological characteristics(previous results) and genetic diversity, the number of example varieties used in Rice DUS test could be reduced from 49 to 46.

Key words: new variety test; example variety; DNA fingerprint; diversity analysis

水稻是世界上最主要的粮食作物之一,世界上 40% 的人口以稻米为主食,90% 以上的水稻生产量

收稿日期:2014-03-26 修回日期:2014-05-12 网络出版日期:2014-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141211.2220.018.html>

基金项目:公益性行业(农业)科研专项(200903008); Special Fund for Agro-scientific Research in the Public Interest

第一作者主要从事植物新品种保护、种子工程与科学研究。E-mail: tanghao1973@126.com

与消费量在亚洲^[1]。品种改良为水稻增产和粮食安全起到了非常重要的作用。随着市场经济的发展,水稻新品种知识产权的保护和开发利用越来越重要。截至 2014 年 2 月底,我国申请植物新品种保护的水稻新品种已达 3567 个,其中授权 1351 个。目前,我国研制的水稻新品种特异性 (distinctness)、一致性 (uniformity) 和稳定性 (stability) (简称 DUS) 测试指南中列出了 49 个标准品种^[2]。然而,这些标准品种的筛选主要是依据其形态性状。随着分子标记技术的发展和完善,有必要利用分子标记对这些标准品种的遗传多样性进行分析,在分子水平上评价当前标准品种选择的科学性。

DNA 指纹图谱是建立在 DNA 标记基础上的某一品种所具有区别于其他品种的特异 DNA 片段。自 1997 年水稻被列入第 1 批植物新品种保护名录以来,水稻品种的 DNA 指纹图谱鉴定研究日益受到重视。国际植物新品种保护联盟 (UPOV, International Union for the Protection of New Varieties of Plants) 在 2005 年拟定的分子测试指南中将 SSR (simple sequence repeat) 和 SNP (single nucleotide polymorphism) 确定为构建 DNA 指纹图谱数据库的 2 种标记方法。SSR 标记具有操作简便、多态性高和稳定性好等特点,在水稻品种分子技术鉴定中也得到最为广泛的应用^[3-13]。肖小余等^[14]应用 24 对

SSR 引物对四川省 42 个杂交稻亲本的遗传相似性进行了分析,选取其中 12 对引物构建了 42 个主栽水稻品种的指纹数据库。丁立等^[15]利用 36 对 SSR 引物对我国 128 个三系杂交恢复系进行了遗传多样性分析。程本义等^[16]利用 12 对 SSR 标记对 2005 年国家水稻区域试验中南方稻区的 199 个水稻品种进行了 DNA 指纹鉴定,构建了这些水稻品种的 DNA 指纹库。目前我国水稻新品种保护的 DUS 测试体系中已筛选出 24 对 SSR 引物作为评价新品种“三性”(DUS)的重要依据。本研究应用《水稻品种鉴定 DNA 指纹方法》中确定的 24 对 SSR 引物对 49 个标准品种进行 DNA 指纹图谱多样性研究,并根据其基因型多样性参数对标准品种进行聚类分析,旨在评价当前标准品种及分子标记选择的合理性,并为 DUS 测试标准的完善改进提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

本研究采用水稻 DUS 测试指南中列出的 49 个水稻品种为材料,其中籼稻品种 19 个,粳稻品种 30 个,分别来自中国、日本、韩国、俄罗斯和国际水稻研究所 (IRRI, International Rice Research Institute),具体材料信息见表 1。DNA 标记采用《水稻品种鉴定 DNA 指纹方法》标准中规定的 24 对 SSR 核心引物。

表 1 供试水稻品种及其来源

Table 1 The experimental rice varieties and their origins

品种	来源	亚种	品种	来源	亚种
Variety	Origin	Subsp.	Variety	Origin	Subsp.
川 7 号 Chuan No. 7	中国 China	籼 indica	浙 9 号 Zhechang No. 9	中国 China	籼 indica
Sariqueen	日本 Japan	粳 japonica	白秆稻 Baigandao	中国 China	粳 japonica
培矮 64S Pei'ai 64S	中国 China	籼 indica	陆川早 1 号 Luchuanzao No. 1	中国 China	籼 indica
轮回 01 Lunhui 01	中国 China	粳 japonica	Dasanbyeol	韩国 Korea	粳 japonica
花溪筒稻 Huaxijiantao	中国 China	粳 japonica	协青早 A Xieqingzao A	中国 China	籼 indica
丽水糯 Lishuino	中国 China	籼 indica	三粒寸 Sanlicun	中国 China	粳 japonica
PSBRC2	IRRI	籼 indica	99Z-239	中国 China	粳 japonica
CPY2199	俄罗斯 Russia	粳 japonica	Beniroman	日本 Japan	粳 japonica
特矮选 Te'aixuan	中国 China	粳 japonica	旱轮稻 Hanlundao	中国 China	粳 japonica
Tsukushiakamochi	日本 Japan	粳 japonica	井田 36-2 Jingtian 36-2	中国 China	粳 japonica
紫香糯 Zixiangnuo	中国 China	粳 japonica	Asamurasaki	日本 Japan	粳 japonica
盘蝶谷 Pandiegu	中国 China	籼 indica	Kusahonami	日本 Japan	粳 japonica
丽江新团黑谷 Lijiangxintuanheigu	中国 China	粳 japonica	Hwasungbyeol	韩国 Korea	粳 japonica
丛矮 2 号 Cong'ai No. 2	中国 China	籼 indica	广陆矮 4 号 Guanglu'ai No. 4	中国 China	籼 indica
黑龙黑米 Heilongheimi	中国 China	粳 japonica	Koshihikari	日本 Japan	粳 japonica
竹金穗 Zhujinsui	中国 China	籼 indica	元子占稻 Yuanzizhandao	中国 China	粳 japonica
稻翅 Daochi	中国 China	粳 japonica	雨粒 Yuli	日本 Japan	粳 japonica
合江 18 Hejiang 18	中国 China	粳 japonica	桂花黄 Guihuahuang	中国 China	粳 japonica
Yumetoiro	日本 Japan	籼 indica	当地水稻 Dangdishuidao	中国 China	粳 japonica
矮糯 Ainuo	中国 China	籼 indica	红壳老来青 Hongmilaolaiqing	中国 China	粳 japonica
Heukjinju	韩国 Korea	粳 japonica	Heuknambyeol	韩国 Korea	粳 japonica
珍汕 97A Zhenshan 97A	中国 China	籼 indica	白芒稻 Baimangdao	中国 China	粳 japonica
Hoshiyutaka	日本 Japan	粳 japonica	竹云糯 Zhuyunnuo	中国 China	籼 indica
IR1552	IRRI	籼 indica	Daelip1	韩国 Korea	粳 japonica
IR30	IRRI	籼 indica			

1.2 DNA 提取、扩增及电泳

参考郑康乐等^[17]的 DNA 微量提取法,进行 DNA 的提取与纯化,具体步骤如下。

从幼苗或植株上取水稻叶片 2 ~ 3 cm 放入研钵中,加入 DNA 提取液 400 μL,研碎,再加入 DNA 提取液 400 μL;移取 500 μL 混合液至 1.5 mL 离心管;或直接将叶片剪碎放入 2.0 mL 离心管中,每管加入 DNA 提取液 500 μL,将样品研碎。每离心管加入 500 μL 三氯甲烷萃取液,混匀后置于 65 ℃ 金属浴或水浴锅上,保温 30 min。经 12000 r/min 离心 30 s 至分相,取上清液 400 μL,转入新的 1.5 mL 离心管中。加入 800 μL -20 ℃ 预冷乙醇,混匀,经 12000 r/min 离心 3 min 至分相,弃上清液。再用 70% 乙醇溶液洗涤 2 遍,自然条件下干燥后,加入 50 μL 1 × TE 缓冲液溶解 DNA,检测浓度, -20 ℃ 保存留用。

DNA 扩增在 ABI Thermal Cycler 2720 扩增仪上进行,PCR 反应体系为 10 μL,含 10 × buffer 1.0 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 1.0 μL, 25 mmol/L MgCl₂ 0.6 μL, 5 μmol/L 正、反向 SSR 引物各 1.0 μL, 2.0 U/μL Taq 聚合酶 0.25 μL,模板 DNA 1.0 μL。扩增反应条件为:94 ℃ 预变性 2 min;94 ℃ 变性 45 s,55 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 1 min,30 个循环;然后 72 ℃ 延伸 8 min,最后 10 ℃ 恒温冷却。扩增产物经变性后,在 ABI3730XL DNA 遗传分析仪上进行毛细管电泳,用 Data Collection 软件收集原始数据。再利用 Genemapper 软件对收集的原始数据进行分析。将各峰值的位置与其泳道中的分子量内标进行比较得出扩增产物大小。

1.3 数据分析

1.3.1 多样性分析 采用 Shannon-Weaver 多样性指数为指标^[18],利用 PopGen32^[19] 软件分析不同 SSR 标记的多样性大小。Shannon-Weaver 多样性指数的计算公式为^[12]:

$$H' = - \sum_{i=1}^n P_i \ln(P_i)$$

式中 P_i 为某性状第 i 个代码值出现的概率。

1.3.2 聚类分析 将每个引物扩增的多态性片段根据分子量从大到小排列,以 1 和 0 分别代表检测到和未检测到的相应片段,记录各供试材料的等位基因类型,采用 NTSYSpc 2.10e^[20] 统计软件中 similarity 程序计算相似系数,以 clustering 程序中 SHAN 进行非加权组平均法 (UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means) 聚类分析,并绘

出各组合的遗传聚类系统树图。

2 结果与分析

2.1 籼型标准品种的 SSR 遗传多样性分析

DUS 测试指南中选定的 49 个水稻标准品种中有 19 个是籼稻品种,30 个是粳稻品种,其中粳稻品种所占比例为 61.2%。利用 24 对 SSR 引物对 49 个标准品种的 DNA 指纹图谱多样性进行分析(表 2),结果表明,不同 SSR 位点在 19 个籼稻品种中的等位基因数分别为 3 ~ 8 个,显示出较好的多态性,其中 RM336、RM219 等标记的等位变异数多,应用于 DUS 测试中的效果会较理想,而部分标记如 RM274 和 RM71 等的等位变异数相对较少,因此不太适合应用于 DUS 测试,宜选用一些等位变异数多的 SSR 标记替代这些等位变异数较少的标记(表 2、表 3)。分析还发现有些 SSR 引物在籼稻中无相应条带,而在粳稻中出现特异性条带,如 RM1195 有 2 个条带在籼稻中是缺失的, RM72 有 7 个条带在籼稻中是缺失的。

为揭示 19 个籼稻标准品种的 DNA 指纹图谱多样性水平,进一步利用 PopGen32 软件计算了籼稻品种中 24 个标记的等位变异数 (N_a)、有效等位变异数 (N_e) 和 Shannon's 多样性信息指数 (H)。从表 3 可以看出,24 对 SSR 引物在 19 个籼稻品种中共检测到 141 个等位变异,平均每对引物可以检测到 5.88 个等位变异,变幅介于 3 ~ 9;平均有效等位变异为 4.07,变幅介于 2.3595 ~ 6.3333;Shannon's 多样性指数平均为 1.5141,变幅介于 1.0460 ~ 1.9959。

2.2 粳稻标准品种的 SSR 遗传多样性分析

利用 24 对 SSR 引物分析 30 个粳稻品种的 DNA 指纹图谱多样性,结果表明,不同 SSR 位点在 30 个粳稻品种中的等位基因数为 3 ~ 13 个,其中 RM72、RM336 等标记的等位变异数较多,分别为 13 个和 10 个,应用于 DUS 测试的效果会较理想,而部分标记如 RM274、RM85 和 RM71 等的等位变异数偏少(表 2、表 3),因此不太适合应用于 DUS 测试,宜选用一些等位变异数多的标记替代这些等位变异数较少的标记或者增加一些等位变异数多的 SSR 标记。分析还发现有些标记在粳稻中无相应条带,而在籼稻中出现特异性条带,如 RM1195 有 1 个条带在粳稻中是缺失的, RM219 有 5 个条带在粳稻中是缺失的。

表 2 不同等位基因在 19 个籼型和 30 个粳型标准品种中的分布频率

Table 2 The distribution frequency of different alleles in 19 *indica* and 30 *japonica* rice varieties

RM1195			RM17			RM18			RM19			RM190			RM208			RM209			RM219		
等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency	
	籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>
140	0.0526	0	158	0.3684	0.6333	150	0.2632	0.0333	217	0.0526	0.5333	106	0.1579	0.0333	165	0.0526	0.0333	116	0.0526	0	190	0	0.1429
142	0.0526	0.0333	160	0	0.1333	152	0.2632	0.0667	220	0.0526	0.2333	108	0.5263	0.0333	167	0.2105	0.4333	125	0.3684	0.7333	193	0.0556	0.1786
144	0.2105	0.2667	168	0.0526	0.1333	154	0.1053	0	228	0.0526	0.0333	120	0.1579	0.3333	171	0.2105	0.2667	132	0.2632	0.1000	195	0	0.1429
146	0.2632	0.2333	176	0.1579	0	156	0.1053	0.0667	245	0.1053	0.1000	122	0.1579	0.3000	175	0.2105	0.1667	134	0.0526	0.0667	197	0	0.0714
148	0.3158	0.1333	184	0.3684	0.0667	158	0.1579	0.2667	250	0.4211	0.0667	124	0	0.2000	179	0.1053	0.0667	152	0.1579	0.0667	199	0.0556	0.1071
150	0.1053	0.2000	188	0.0526	0.0333	160	0.0526	0.2333	253	0.3158	0.0333	126	0	0.1000	181	0.2105	0	154	0.0526	0.0333	201	0.1667	0.2500
152	0	0.1000				162	0.0526	0.3333							183	0	0.0333	158	0.0526		208	0	0.0357
158	0	0.0333																215	0.3889	0	215	0.3889	0
																		217	0	0.0357	217	0	0.0357
																		221	0.1667	0	221	0.1667	0
																		225	0.0556	0	225	0.0556	0
																		232	0	0.0357	232	0	0.0357
																		236	0.0556	0	236	0.0556	0
																		240	0.0556	0	240	0.0556	0

RM224			RM232			RM253			RM258			RM267			RM273			RM274			RM278		
等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency		等位 基因 Allele	频率 Frequency	
	籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>
120	0.0526	0.2333	138	0.0526	0.0333	117	0	0.0333	128	0.1579	0.7333	135	0.0526	0.4333	197	0.3684	0.1000	148	0.3158	0.8667	128	0.0526	0.5667
123	0	0.2000	141	0.0526	0.1000	121	0.1053	0.0667	132	0.2632	0.1000	137	0.0526	0.3667	199	0.3158	0.2000	161	0.4737	0.1000	130	0.0526	0.2000
125	0	0.1667	147	0.1053	0.0667	129	0	0.1333	136	0.3158	0.0333	150	0.0526	0	201	0.1053	0.6000	163	0.2105	0.0333	136	0.1053	0.0333
128	0.1053	0	149	0	0.3000	131	0.3158	0.0667	138	0	0.0333	154	0.3684	0.1000	203	0	0.0667				138	0.3684	0.0667
131	0.2105	0.1333	156	0.1579	0.1667	133	0.0526	0.2000	146	0.2632	0.1000	156	0.1579	0.1000	211	0.2105	0.0333				140	0.3684	0.0667
134	0	0.0333	158	0.1053	0.1333	135	0	0.1000				158	0.3158								142	0.0526	0.0333
139	0	0.0667	160	0.3158	0.1333	137	0.1579	0.1667													148		0.0333

表 2(续)

RM224			RM232			RM253			RM258			RM267			RM273			RM274			RM278		
等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency
基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻
Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>
143	0.1579	0	162	0.1053	0.0333	139	0.2105	0.1333															
153	0.2105	0	164	0.1053	0.0333	141	0.1053	0															
155	0.0526	0.1667				143	0.0526	0.1000															
158	0.2105																						

RM297			RM311			RM336			RM337			RM5414			RM71			RM72			RM85		
等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency	等位	频率	Frequency
基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻	基因	籼稻	粳稻
Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>	Allele	<i>Indica</i>	<i>Japonica</i>
148	0.6316	0.0667	159	0	0.0333	130	0	0.0667	152	0.4211	0.1000	99	0	0.3333	122	0.2105	0.8333	154	0.1579	0	79	0.2105	0.7667
158	0.0526	0.1000	161	0.0526	0.1333	136	0.0526	0	155	0.1579	0.0333	101	0	0.0667	138	0.4737	0.0333	160	0.1579	0.069	88	0.1579	0
160	0	0.0333	165	0.4211	0.4333	146	0	0.1000	185	0.1579	0.7667	105	0.0526	0	148	0.3158	0.1333	163	0.3158	0.1724	95	0.0526	0.0333
170	0.0526	0	169	0.1579	0.2333	149	0	0.1000	191	0.2632	0.1000	107	0.3158	0.0667				166	0.0526	0.0690	103	0.5789	0.2000
174	0.0526	0	180	0.2105	0.0667	152	0.2105	0.1000				109	0.1579	0.0667				169	0.1579	0			
176	0	0.1000	182	0.1053	0	155	0.2105	0.1667				111	0.1053	0.0333				172	0	0.0345			
182	0.0526	0.0667	184	0	0.0667	158	0.0526	0.1333				113	0	0.0667				175	0.0526	0.0690			
184	0	0.2000	186	0.0526	0.0333	161	0.0526	0.1333				115	0.1053	0.2000				178	0	0.0690			
188	0.0526	0.0667				164	0.0526	0.1333				117	0.2632	0.1667				181	0	0.0345			
192	0	0.1667				167	0	0.0333										184	0	0.0690			
194	0.1053	0.2				170	0.0526	0										187	0	0.1034			
						176	0.1053	0										190	0	0.0690			
						193	0.2105	0.0333										193	0.0526	0.0690			
																		196	0	0.1379			
																		202	0.0526	0.0345			

数值为 0 者表示在籼稻(或粳稻)中无相应条带,仅在粳稻(或籼稻)中出现
The values“0” indicate there is no band in *indica* rice or *japonica* rice, and the corresponding band appears in *japonica* rice or *indica* rice

表 3 24 个分子标记在籼稻和粳稻品种中的多样性分布参数

Table 3 Diversity statistics of 24 SSR markers in 19 *indica* and *japonica* rice varieties

分子标记 SSR marker	所在染色体 Distribution on chromosome	籼稻 <i>Indica</i> rice				粳稻 <i>Japonica</i> rice			
		样本量 Sample size	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>	样本量 Sample size	<i>Na</i>	<i>Ne</i>	<i>H</i>
RM1195	1	38	6	4.3494	1.5903	60	7	5.1136	1.7396
RM17	12	38	5	3.3119	1.3371	60	5	2.2613	1.1205
RM18	7	38	7	5.2319	1.7780	60	6	4.0541	1.5327
RM19	12	38	6	3.3738	1.4301	60	6	2.8125	1.3124
RM190	6	38	4	2.8425	1.2122	60	6	3.9474	1.5063
RM208	2	38	6	5.2319	1.7041	60	6	3.4091	1.4208
RM209	11	38	7	4.1494	1.6305	60	5	1.7928	0.9322
RM219	9	36	8	4.5000	1.7674	56	9	6.4262	1.9950
RM224	11	38	7	5.7302	1.8225	60	7	5.7692	1.8213
RM232	3	38	8	5.7302	1.9133	60	9	5.8442	1.9480
RM253	6	38	7	5.0845	1.7674	60	9	7.5000	2.0928
RM258	10	38	4	3.8000	1.3581	60	5	1.7857	0.9147
RM267	5	38	6	3.7216	1.4882	60	4	2.9221	1.1908
RM273	4	38	4	3.4381	1.2969	60	5	2.4064	1.1526
RM274	5	38	3	2.7143	1.0460	60	3	1.3120	0.4677
RM278	9	38	6	3.4381	1.4376	60	7	2.6786	1.3449
RM297	1	38	7	2.3595	1.3021	60	9	7.0312	2.0579
RM311	10	38	6	3.8000	1.5306	60	7	3.6885	1.5584
RM336	7	38	9	6.3333	1.9959	60	10	8.4906	2.2026
RM337	8	38	4	3.3738	1.2984	60	4	1.6423	0.7776
RM5414	4	38	6	4.5696	1.6357	60	8	5.0562	1.8222
RM71	2	38	3	2.7143	1.0460	60	3	1.4019	0.5340
RM72	8	38	8	5.3881	1.8582	58	13	10.3827	2.4503
RM85	3	38	4	2.4558	1.0909	60	3	1.5901	0.6390

Na: 等位变异数; *Ne*: 有效等位变异数; *H*: Shannon's 多样性信息指数

Na: Observed number of alleles, *Ne*: Effective number of alleles, *H*: Shannon's information index

进一步利用 PopGen32 软件计算了粳稻品种中 24 个标记的等位变异数、有效等位变异数和 Shannon's 多样性信息指数(表 3)。24 对 SSR 引物在 30 个粳稻品种中共检测到 156 个等位变异,平均每对引物可以检测到 6.50 个,变幅介于 3~13;平均有效等位变异为 4.14,变幅介于 1.3120~10.3827;Shannon's 多样性指数平均为 1.4389,变幅介于 0.4677~2.4503。

2.3 聚类分析

采用非加权配对算术平均法(UPGMA),分别对 19 个籼稻和 30 个粳稻品种进行了聚类分析(图 1 和图 2)。籼稻群体内品种间的基因型相似系数介于 0.45~0.81,粳稻群体内品种间的基因型相似系数介于 0.36~0.76。粳稻群体内品种间基因型相似系数与籼稻群体差别不大,与前述的粳稻和籼稻群体多样性指数平均值大小基本吻合。

以相似系数为 0.72 为界值,19 个籼稻品种可以分为 16 类,30 个粳稻品种可以分为 28 类,结果表明 49 个测试标准品种在籼稻和粳稻亚种内品种

间相似性均较低。在籼稻群体内,出现了 2 组相似系数大于 0.72 的类群,第 1 类群包含 PSBRC2、Yumetoiro 和 Dasanbyeo,其中 Yumetoiro 和 Dasanbyeo 二者的相似系数高达 0.81;第 2 类群包含竹金穗和广陆矮 4 号,其相似系数为 0.81。粳稻品种群体同样出现了 2 组相似系数大于 0.72 的类群,第 1 类群包括当地水稻和白芒稻,第 2 类群包括 Hwasungbyeo 和 Koshihikari,2 个类群相似系数达 0.76。

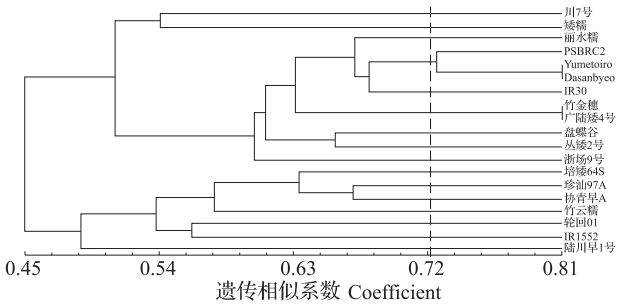


图 1 基于 24 个 SSR 分子标记的 19 个籼稻品种的聚类结果

Fig. 1 Clustering analysis of 19 *indica* rice varieties based on 24 SSR marker

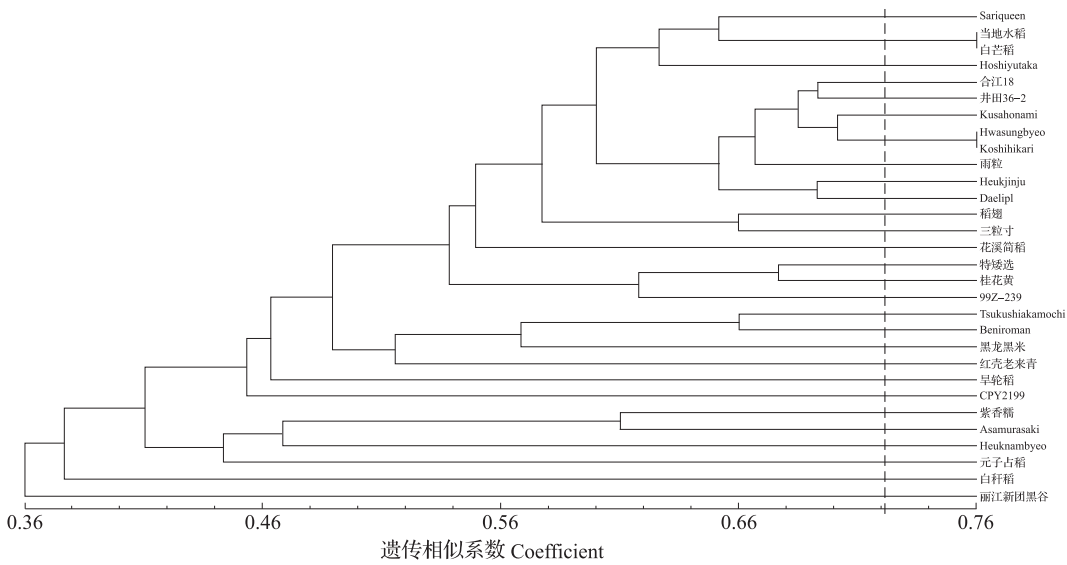


图2 基于 24 个 SSR 分子标记的 30 个粳稻品种的聚类结果
Fig.2 Clustering analysis of 30 japonica rice varieties based on 24 SSR markers

3 结论与讨论

总体上看,24 个 SSR 标记的平均等位变异数目、有效等位变异数目和 Shannon's 多样性信息指数,均表现为粳稻品种大于籼稻品种,表明本研究中粳稻品种的多样性较籼稻更为丰富,这可能与标准品种中粳稻品种数目较籼稻品种多且粳稻品种来源更为广泛有关。

通过比较 SSR 分子标记和形态学标记^[21] 聚类结果可以看出,2 种标记方法分析结果基本一致,但也有一定的差异。导致结果不一致的原因可能是分子标记检测的多态性位点并不一定和形态学性状相关联。根据本研究结果,有必要在原有 24 个 SSR 标记基础上,删除一些等位变异数较少的标记,如 RM71、RM274、RM336,并增加一些同典型形态学性状关联的 SSR 标记。

本研究利用 DNA 基因型多样性指数为参数进行聚类分析,发现在籼稻和粳稻群体中分别有 2 组品种的相似系数在 0.72 以上,甚至有部分品种的相似系数达 0.81,这些相似系数较大的品种间的基因型差异小,难以起到标准品种的示例和校正作用。根据本研究结果,籼稻品种中的 PSBRC2、Yumetoiro 和 Dasanbyeol 类群以及竹金穗和广陆矮 4 号类群,每组中都可以只选留一个标准品种;粳稻品种中,当地水稻和白芒稻类群,以及 Hwasungbyeol 和 Koshihikari 的类群,每组中只需保留其中之一。这样,经过基因型多样性分析筛选,水稻 DUS 测试标准品种数目可以减至 44 个,但其基因型多样性指数并未明

显降低。更为重要的是,PSBRC2、广陆矮 4 号和白芒稻的删除并不影响水稻 DUS 测试标准品种的形态多样性,综合 49 个标准品种的形态性状和基因型多样性分析结果,在保证标准品种多样性的前提下,现有的水稻 DUS 测试标准品种数目至少可以从 49 个减少到 46 个,从而达到减少工作量、减低成本和提高效率的目的。

参考文献

[1] Meyer R S, Purugganan M D. Evolution of crop species: genetics of domestication and diversification[J]. Nat Rev Genet, 2013, 14 (12): 840-852
[2] 王汝锋, 崔野韩, 朱智伟, 等. 植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南: 水稻[S]. 北京: 中国农业出版社, 2007: 6-13
[3] Zheng K L, Subudhi P K, Domingo J, et al. Rapid DNA isolation for marker assisted selection in rice breeding[J]. Rice Genet Newsl, 1995, 12: 255-258
[4] 刘海珍, 李莉, 藤滨, 等. 42 个杂交粳稻亲本 SSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J]. 安徽农业科学, 2009, 37 (10): 4420-4423
[5] Wu K S, Tanksley S D. Abundance, polymorphism and genetic mapping of microsatellites in rice[J]. Mol Gen Genet, 1993, 241: 225-235
[6] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*O. sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 597-607
[7] Chakravathi K B, Naravaneni R. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*O. sativa* L.) [J]. African J Biotech, 2006, 5 (9): 684-688
[8] 束爱萍, 刘增兵, 余丽琴, 等. 水稻 SSR 标记的遗传多样性研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14 (5): 778-783
[9] 朱勇良, 谢裕林, 黄凌哲, 等. 太湖稻区及国内部分香稻 SSR 指纹图谱构建及遗传多样性初析[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13 (4): 666-671