

研究报告

A Letter

利用 SSR 分子标记评价高代恢复系及遗传多样性分析

蔡秋华[✉], 陈锦文[✉], 谢鸿光[✉], 朱永生[✉], 王颖姮[✉], 吴方喜[✉], 张建福[✉], 谢华安[✉]

福州国家水稻改良分中心, 农业部闽台农作物种质资源利用重点开放实验室, 福建省作物分子育种工程实验室, 福建省水稻分子育种重点实验室, 福建省农业科学院水稻研究所, 福州, 350003

✉ 通讯作者: jianfzhang@163.com; huaanxie@yahoo.com.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 17 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0017

收稿日期: 2010 年 08 月 19 日

接受日期: 2010 年 12 月 11 日

发表日期: 2011 年 02 月 23 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

蔡秋华等, 2011, 利用 SSR 分子标记评价高代恢复系及遗传多样性分析, 分子植物育种 Vol.9 No.17 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0017)

摘 要 本研究选取水稻新品种鉴定用的 24 对 SSR(Simple Sequence Repeats, SSR)标记, 对复合杂交系谱法选育的 27 份具有共同遗传背景的水稻高代恢复系材料进行遗传学分析。结果表明, 在所分析的 24 个位点中, 多态性位点有 9 个, 多态性频率为 37.5%。每个位点的等位基因数为 4.2 个, 变幅为 2~8 个, 平均多态性信息含量指数(PIC)为 0.592。在 9 个多态性位点中检测到 8 个位点存在杂合基因型个体。聚类分析表明在所检测的 27 份高代恢复系材料中可以选出遗传差异较大的株系用于配组杂交水稻新组合, 部分株系还有待于进一步加代选育稳定的性状。本研究为水稻高代恢复系的株系间选择提供了分子证据。

关键词 水稻; 恢复系; SSR; 遗传多样性

The Genetic Diversity Analysis And Stability Evaluation of High Generation Restorer Lines Of Hybrid Rice By SSR Marker

Cai Qiuhua[✉], Chen Jinwen[✉], Xie Hongguang[✉], Zhu Yongsheng[✉], Wang Yingheng[✉], Wu Fangxi[✉], Zhang Jianfu[✉], Xie Hua'an[✉]

Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China, Key Laboratory of Crop Germplasm Utilization between Fujian and Taiwan, Ministry of Agriculture, P.R.China, Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding, Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding, Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350003, Fujian province, P.R. China

✉ Corresponding authors, jianfzhang@163.com; huaanxie@yahoo.com.cn; ✉ Authors

Abstract In this study, 24 pairs of SSR (Simple Sequence Repeats, SSR) markers were used, which were used to identify new rice varieties to analyse 27 high generation restorer lines of hybrid rice. The results showed that there were 9 polymorphic loci with a polymorphic rate of 37.5%. The number of alleles per locus ranged from 2 to 8 with an average value 4.2. The value of polymorphism information content (PIC) was 0.592. 8 loci heterozygous genotypes were detected in all polymorphic loci. The results from cluster analysis showed that 27 high generation restorer lines had high genetic diversity, but some lines should be further increased in generations of breeding stable traits. This study provided molecular evidence for the selection of high generation restorer lines.

Keywords Rice (*Oryza sativa* L.); Restorer lines; SSR; Genetic variation

研究背景

自 1973 年杂交水稻实现“三系”配套以来, 恢复系的综合性状在决定一个杂交水稻品种应用推广中起着至关重要的作用(钱前, 2007)。近年来, 随着研究的不断深入, 亲本选配中少量优良核心种质的反复利用和人工定向选择致使大多数优良性状集

中于少数亲本材料上, 遗传改良基础日趋狭窄, 许多非育种目标所追求的多样化性状基因丢失, 从而进一步导致遗传多样性的下降, 一些品种性状各异的亲本组配创制新材料时在后代选择中趋于定向选择, 新品种之间的遗传差异越来越小(甘晓燕等, 2009)。育种工作者为快速选育出具有多个优良农艺

性状的新品种, 常常在原有优良亲本材料的基础上进行杂交改良创制新材料。在加快育种进程的同时, 也造成了创制的新品种遗传基础狭窄, 对育种水平的进一步提高有极大的局限性(王颖姮等, 2009)。在常规育种中, 主要依据育种经验及株型选择来选育新材料, 源于同一供体亲本的株系间较难筛选到遗传差异大的种质。复合杂交育种、航天诱变育种等技术能够在一定程度上创造更多的变异类型, 丰富遗传基础, 但在丰富遗传基础的同时, 性状的稳定需更多的世代, 甚至加代至高代仍未能稳定性状, 给新品种选育带来了新的挑战。

DNA 分子标记在研究水稻材料遗传多样性中被广泛应用。其中基于 PCR 的 SSR 分子标记快捷简便, 重复性好且多态性丰富, 在水稻遗传多样性检测中得到广泛应用, 此外 SSR 标记不仅能够鉴定纯合体和杂合体, 而且结果可靠, 方法简单, 省时省力(白玉, 2007)。王秋实和何光华(2007)利用 64 对 SSR 引物对 38 份材料进行分析, 鉴定到多份遗传差异较大的材料, 并提出选用抗病材料与遗传差异大的材料杂交选育新的抗病新品种的策略。段世华等(2002)采用 SSR 分子标记技术对 35 份恢复系材料进行遗传多样性分析, 结果表明我国杂交水稻恢复系资源丰富但遗传差异较小, 遗传背景较为单一。吕广磊等(2009)采用 64 对 SSR 标记对 96 份云南地方品种及选育品种进行比较分析, 表明云南栽培稻选育品种与地方品种亲缘关系较近, 其遗传基础可能源于云南地方品种, 同时也认为云南地方品

种遗传多样性丰富, 存在大量优质性状可供育种实践选择。因此, 如何有效地利用较为丰富的种质资源, 创制新材料, 提高育种效率是目前急待解决的难题。运用 SSR 标记技术分析评价复合杂交系谱选育的高代恢复系(8~10 代)稳定性及遗传多样性尚未见到报道。本研究采用 SSR 分子标记技术, 对源于诱变、籼粳杂交及复合杂交为一体的高代恢复系材料(8~10 代)进行遗传稳定性评价和遗传多样性分析, 为进一步利用这些高代恢复系材料进行杂交水稻新组合的配制提供依据并为分子标记技术评价遗传稳定性提供参考。

1 结果与分析

1.1 27 份高代恢复系材料的 SSR 扩增结果

本实验选用水稻新品种鉴定用的 24 对 SSR 标记对 27 份水稻高代恢复系材料进行遗传多样性分析, 结果显示所有引物均能扩增出稳定清晰可辨的扩增产物。24 对引物共扩增出 165 条 DNA 带, 其中 9 对引物具有共 38 个多态性位点, 占总条带的 23.03%。每对引物检测出 2~8 个多态性片段, 平均 4.2 个。每个多态性 SSR 位点的多态性信息量(PIC)变化范围在 0.299~0.866, 平均值为 0.592 (表 1)。图 1 为引物 RM71 对供试的 27 份材料的 SSR 电泳图, 图中所示的具有不同的 SSR 带型, 多态性检测率较高, 另从该图也可看出部分株系具有共显性的杂合带型, 说明该部分株系材料还有待进一步加代稳定农艺性状。

表 1 9 对 SSR 引物在 27 份高代恢复系材料中检测到的等位变异数和多态性

Table1 Allele numbers and PIC value of 9 SSR loci detected in 27 high generation restorer lines of hybrid rice

编号 NO.	SSR 引物 SSR Markers	染色体位置 NO.of Chromosome	重复单位 Repeat Units	多态位点数 Allele numbers of polymorphisms	PIC 值 Value of PIC
1	RM17	12	(GA) ₂₁	6	0.847
2	RM18	7	(GA)4AA(GA)(AG) ₁₆	8	0.865
3	RM71	2	(ATT)10T(ATT) ₄	8	0.866
4	RM209	11	(CT) ₁₈	3	0.571
5	RM219	9	(CT) ₁₇	3	0.537
6	RM224	11	(AAG)8(AG) ₁₃	2	0.493
7	RM273	4	(GA) ₁₁	2	0.495
8	RM336	7	(CTT) ₁₈	3	0.299
9	RM337	8	(CTT)4 ⁻ ₁₉ ⁻ (CTT) ₈	3	0.357

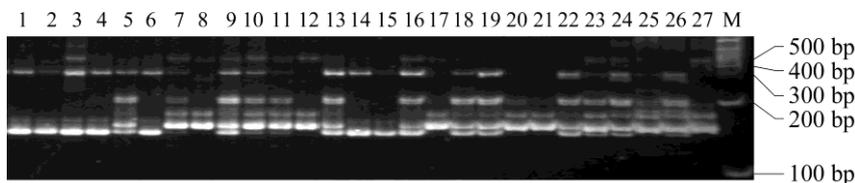


图 1 SSR 引物 RM71 对 27 份高代恢复系材料的 PCR 扩增的电泳图谱; 1~27 为高代恢复系材料 HA01~27; M: 分子量标记
Figure 1 Profile of the amplified products from genomic DNAs of 27 high generation restorer lines of hybrid rice with SSR marker RM71; The number 1~27 is HA01~27 respectively, M: Indicates DNA maker

1.2 聚类分析

根据 9 对多态性 SSR 引物在 27 份高代恢复系材料中检测到的 38 个等位基因, 采用 Ntsys 2.10 软件分析了 27 份高代恢复系材料间的遗传相似系数, 用 UPGMA 法对其进行聚类分析(图 2)。27 份材料

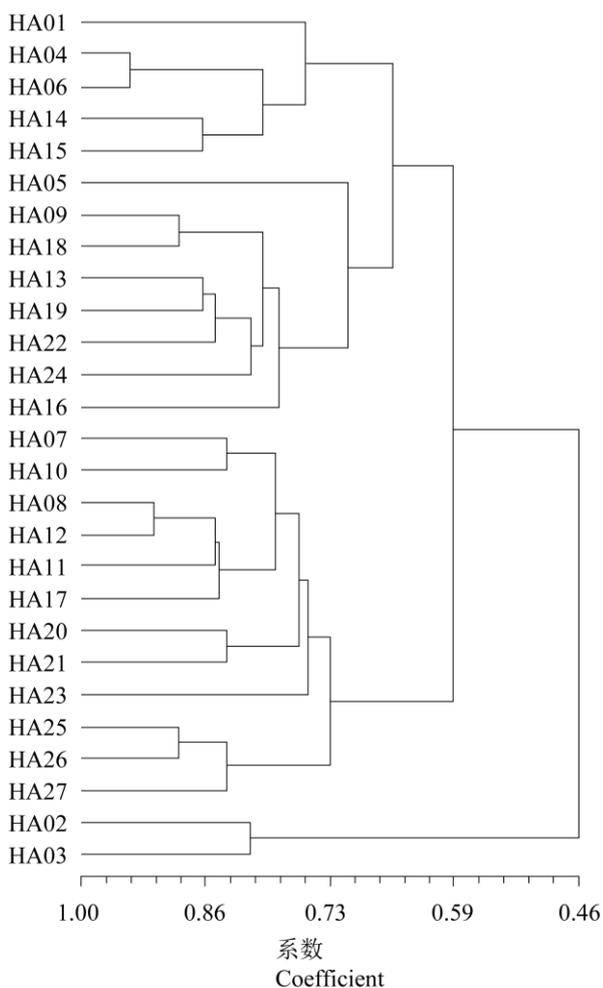


图 2 27 份高代恢复系材料 SSR 标记聚类分析图
Figure 2 The diagram tree of 27 high generation restorer lines of hybrid rice with SSR markers

的遗传相似系数在 0.95~0.46 之间, 表现出较为丰富的遗传多样性。当遗传距离以 0.46 为阈值时, 27 份高代恢复系材料可分为两类, 第 I 类包含有 25 份材料, 第 II 类只含 HA02、HA03 两份材料。当遗传距离取 0.59 阈值时, 可将此类材料分为三类, 第两个株系。从聚类结果上看出, 采用复合杂交和系 I 类分布有包含 HA01 等 13 个株系, 第 II 类中有 HA07 等 12 个株系, 第 III 类同样只含有 HA02、HA03 统选育的技术路线, 后代可选育出遗传差异较大的株系, 为强优势组合的配制和杂种优势的利用奠定基础。

2 讨论

常规育种中单交只采用两个亲本, 其遗传基础相对狭窄, 分离后代中较多保留了单一亲本的性状, 配制杂交组合, 其产量、抗性 etc 农艺性状难以有较大的突破。采用聚合杂交育种, 可以聚合多个亲本的优良基因于一体, 有利于拓宽和丰富遗传信息。秦学毅等(2006)通过聚合育种选育出多个高抗稻螟虫品系, 实现了抗性基因的重组聚合。

施勇烽等(2005)认为选用 12 个标记可将不同材料区别开的几率大于 99.9%, 如果要区别遗传相似性较高的水稻材料, 则需要挑选高多态性标记或者增加标记数。本研究选取水稻新品种鉴定的 24 对 SSR 引物对具有相似遗传背景的 27 份高代恢复系材料进行遗传多样性分析和稳定性评价, 初步研究表明, 在所选取的 27 份材料中, 可以选育出具有较大遗传差异的恢复系材料。另外在选育策略上, 复合杂交系统法选育, 因拓宽了亲本的遗传背景, 在稳定农艺性状及聚合多个优良基因上加大了难度, 结合分子标记辅助选择, 可以对农艺性状相对稳定的品系进行分子水平的评价, 有利于加快选育遗传差异大且性状稳定的新材料, 进一步拓宽恢

复系资源。

多数研究表明, 实验中选取的 SSR 引物对聚类分析的结果有很大影响, 肖小余等(2006)提出引物虽然用得越多越好, 但存在成本和效率等问题。本实验选取水稻新品种鉴定的 24 对 SSR 引物, 所选引物对于水稻种质资源多态性筛选具有一定的代表性, 能够对 27 份高代恢复系材料进行较好的多态性评价, 成本较低, 工作量相对较少, 效率较高。通过 SSR 分子标记筛选得到的具有较大遗传差异的株系在配组杂交组合后, 其 F₁ 代的综合性状及产量潜力是否能够符合当前生产所需还有待进一步验证。

3 材料与方 法

3.1 供试材料

选取通过复合杂交(航 2 号诱变 M2/粳稻//优良恢复系亲本明恢 63)后代系谱法选择加代至 8~10 代农艺性状稳定的 27 份株系(编号 HA01-HA27)。

3.2 基因组 DNA 提取

将 27 份高代恢复系材料各取 100 粒种子种植至 3 叶期, 每份材料单株取同等大小的叶片混合磨样, 采用 CTAB 法提取水稻基因组 DNA。利用 BECKMAN DU800 检测所提取的 DNA 浓度及质量, 并将 DNA 浓度统一调整为 50 ng/μL。

3.3 SSR 分析

选取水稻新品种鉴定用的 24 对 SSR 引物(由上海生工生物工程有限公司合成)进行 SSR 分析(庄杰云等, 2006)。PCR 反应体系为 10 μL: 10×PCR Buffer (Mg²⁺ free) 1 μL, MgCl₂ (2 mmol/μL) 0.6 μL, dNTPs (1 mmol/μL) 0.4 μL, 上下游 SSR 引物(10 μmol/μL) 各 0.25 μL, DNA 模板(50 ng/μL) 0.8 μL, Taq 酶 1 U, 不足部分用 ddH₂O 补足 (PCR 试剂购自 Takara 公司), 应用 BIO-RAD PTC-100 PCR 仪进行扩增。反应程序如下: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 1 min, 55℃ 退火 1 min, 72℃ 延伸 2 min, 重复 35 个循环, 72℃ 延伸 7 min, 保存 4℃。PCR 产物在 8% 聚丙烯酰胺凝胶上 120V 恒压电泳 90 min。用荧光染料 Genefinder (购于厦门百维信生物科技有限公司)在摇床上染色 20 min, 最后在 BIO-RAD 凝胶成像系统上拍照, 记录电泳结果。

3.4 数据分析

标记 SSR 扩增片段大小, 建立 1, 0 数据库, 在相同迁移位置上, 有带的记为 1, 无带记为 0, 缺失的记为 9。按照 DNA 分子标记数据分析方法, 将 SSR 标记作为等位基因进行多态性分析, 每扩增得到的一条带记为一个性状, 处理数据。SSR 位点的多态信息含量 PIC=1-∑f_i² 计算, f_i 表示第 i 位点的基因频率。采用 NTSYS2.10 数据分析软件进行 SHAN 聚类分析。

作者贡献

蔡秋华和陈锦文是本研究的执行人; 蔡秋华和陈锦文及王颖娟完成数据分析, 论文初稿的写作; 朱永生、吴方喜、谢鸿光参与实验设计, 试验结果分析; 张建福和谢华安是项目的构思者、负责人和实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家“863”项目“高产优质多抗水稻分子品种创制(2006AA100101)”、“强优势水稻杂交种的创制与利用(2009AA101101)”, 福建省国家项目配套资金项目(F2006AA100101)和福建省农业科学院创新团队之一项目(STIF-Y04)共同资助, 在此表示感谢!

参考文献

- Qian Q., 2007, Design breeding of rice gene, Science Press, Beijing, China, pp.6 (钱前, 编著, 2007, 水稻基因设计育种, 科学出版社, 中国, 北京, pp.6)
- Gan X.Y., Li M., Guan Y.J., Chen X.J., and Song Y.X., 2009, Genetic diversity of 89 Japonica Rice varieties in Ningxia province by using SSR, Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica), 29(9): 1772-1778 (甘晓燕, 李苗, 关雅静, 陈晓军, 宋玉霞, 2009, 宁夏 89 份粳稻种质遗传多样性的 SSR 分析, 西北植物学报, 29(9): 1772-1778)
- Wang Y.H., Zhu Y.S., Wu F.X., Cai Q.H., Liao C.J., Zheng Z., Zheng J.T., Zhang J.F., and Xie H.A. 2009, Genetic diversity analysis with SSR markers for main restorelines of hybrid rice, Fenzi Zhiwu Yuzhong(Molecular Plant Breeding), 7(2): 279-282(王颖娟, 朱永生, 吴方喜, 蔡秋华, 廖长见, 郑钊, 郑家团, 张建福, 谢华安, 2009, 杂交水稻骨干恢复系的遗传多样性分析, 分子植物育种, 7(2): 279-282)
- Bai Y., 2007, DNA molecular marker technology and its applications, Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agri. Sci.), 35(24): 7422-7424 (白玉, 2007, DNA 分子标记技

术及其应用, 安徽农业科学, 35(24): 7422-7424)

- Wang Q.S., and He G.H., 2007, Genetic divergence between rice germplasms of blast resistance and the major WA-CMS type restorers, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 5(1): 74-78 (王秋实, 何光华, 2007, 水稻抗稻瘟病资源与野败型骨干恢复系间的遗传差异, 分子植物育种, 5(1): 74-78)
- Duan S.H., Mao J.N., and Zhu Y.G., 2002, Genetic variation of main restorer lines of hybrid rice in china was revealed by microsatellite markers, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 29(3): 250-254 (段世华, 毛加宁, 朱英国, 2002, 用微卫星 DNA 标记对我国杂交水稻主要恢复系遗传差异的检测分析, 遗传学报, 29(3): 250-254)
- Lv G.L., Lin Z.L., Bai X.G., Ma K.H., Fu J., Liu F.F., Huang X.Q., Gway J.G., and Cheng Z.Q., 2009, Comparative assessment of Ssimple sequence repeat genetic diversity in cultivated rice from Yunnan, *Zhiwu Xuebao(Chinese Bulletin of Botan)*, 44(4): 457-463 (吕广磊, 藺忠龙, 白现广, Kyung-Ho Ma, 付坚, 刘芳芳, 黄兴奇, Jae-Gyun Gway, 程在全, 2009, 云南栽培稻种 SSR 遗传多样性比较, 植物学报, 44(4): 457-463)
- Qin X.Y., Wei S.M., Zhu N.C., Tang J.H., Li W.K., and Li K.A., 2006, Development of gall midge resistant breeding lines in rice through gathering hybridization, *Xinan Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 19(6):1054-1057 (秦学毅, 韦素美, 朱汝财, 唐健淮, 李维科, 黎坤爱, 2006, 采用聚合杂交创新稻瘿蚊抗性育种材料, 西南农业学报, 19(6): 1054-1057)
- Shi Y.F., Ying J.Z., Wang L., Zhu Z.W., and Zhuang J.Y., 2005, Screening SSR markers for rice variety identification, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 19(3): 195-201 (施勇烽, 应杰政, 王磊, 朱智伟, 庄杰云, 2005, 鉴定水稻品种的微卫星标记筛选, 中国水稻科学, 19(3): 195-201)
- Xiao X.Y., Wang Y.P., Zhang J.Y., Li S.G., and Rong Y.Z., 2006, SSR marker-based genetic diversity fingerprinting of hybrid rice in Sichuan, China, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 20(1): 1-7 (肖小余, 王玉平, 张建勇, 李仕贵, 荣廷昭, 2006, 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, 中国水稻科学, 20(1): 1-7)
- Zhuang J.Y., Shi Y.F., Ying J.Z., E Z.G., Zeng R.Z., Chen J., and Zhu Z.W., 2006, Construction and testing of primary microsatellite database of major rice varieties in china, *Zhong guo Shui dao Ke xue (Chinese Journal of Rice Science)*, 20(5): 460-468 (庄杰云, 施勇烽, 应杰政, 鄂志国, 曾瑞珍, 陈洁, 朱智伟, 2006, 中国主栽水稻品种微卫星标记数据库的初步构建, 中国水稻科学, 20(5): 460-468)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>