



研究报告

A Letter

山东省 12 份水稻种质的 DNA 指纹数据库构建

王俊峰¹, 李娜娜¹, 张煜¹, 马玉敏¹, 姚方印², 余华¹, 丁汉凤¹

1 山东省农作物种质资源中心, 济南, 250100

2 山东省农业科学院高新技术中心, 济南, 250100

✉ 通讯作者: dinghf2005@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 107 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0107

收稿日期: 2011 年 08 月 24 日

接受日期: 2011 年 10 月 08 日

发表日期: 2011 年 10 月 12 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(中文):

王俊峰等, 2011, 山东省 12 份水稻种质的 DNA 指纹数据库构建, 分子植物育种(online) Vol.9 No.107 pp.1776-1783 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0107)

引用格式(英文):

Wang et al., 2011, Construction of DNA Fingerprinting Database for 12 *Oryza Species* in Shandong, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.9 No.107 pp.1776-1783 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0107)

摘要 本文以 12 份山东省特有、优异的水稻种质资源为材料, 根据国家水稻数据中心公布的水稻 DNA 指纹数据库构建标准, 通过 SSR 技术对其进行了 DNA 指纹数据库的构建。结果显示, 所采用的 24 对引物在本实验材料中共检测到 73 个等位基因, 有较好的多态性。利用 NTSYS 进行 UPGMA 聚类分析后, 发现这 12 种材料在遗传相似系数 0.696 为阈值处可以分为 3 个类群。实验证明该方法能够分辨各个种质间的亲缘关系, 能够较好满足水稻 DNA 指纹数据库的构建要求, 对保护山东省特有的水稻种质资源具有重要意义。

关键词 水稻; SSR; DNA 指纹数据库

Construction of DNA Fingerprinting Database for 12 *Oryza species* in Shandong

Wang Junfeng¹, Li Nana¹, Zhang Yu¹, Ma Yumin¹, Yao Fangyin², Yu Hua¹, Ding Hanfeng¹

1. Crop Germplasm Resources Centres of Shandong, Jinan, 250100, P.R., China

2. Bioscience Net of Shandong Academy of Agricultural Sciences, Jinan, 250100, P.R., China

✉ Corresponding author, dinghf2005@163.com; ✉ Authors

Abstract SSR technique was used to construct DNA fingerprint database of 12 *Oryza species* in Shandong Province according to the criteria proposed by China Rice Data Center. The results showed that 73 alleles were detected with considerable polymorphism by 24 pairs of primers. For UPGMA cluster analysis, 12 *Oryza species* were classified into three cluster groups with the similarity coefficient of 0.696 using the software NTSYS. SSR technique could effectively detect the genetic relationships among the *Oryza species*, and meet the requirements for the construction of rice DNA fingerprint database. This is facilitating the conservation for rice germplasm resources of Shandong Province.

Keywords Rice; SSR; DNA fingerprint database

研究背景

电泳指纹图谱技术, 特别是 DNA 指纹图谱技术, 具有不受环境、遗传稳定, 多态性高, 且不影响目标性状等优点, 目前已被广泛用于农作物种质资源的鉴定(陈杰等, 2007, 农业考古, 3: 69-71), 并在农作物种质资源的亲缘关系鉴定、品种审定和杂优类群划分等方面发挥着巨大的作用(滕海涛等, 2009, 1: 1-6)。通过计算机对可见的条码式的 DNA 指纹图谱进行系统管理而构建的数据库就被称为 DNA 指纹数据库。国际植物品种权保护组织(UPOV)

于 2005 年拟定的 BMT 测试指南草案中将简单序列重复(Simple Sequence Repeats, SSR)和单核苷酸多态性(Single Nucleotide Polymorphisms, SNP)等分子标记技术确定为构建 DNA 指纹数据库的标记方法。

国外在 DNA 指纹数据库的构建领域的研究刚刚起步(Rekha et al., 2011; Fleury et al., 2010; Nelson et al., 2005)。我国在农作物种质资源 DNA 指纹数据库的构建上取得了重要进展(王凤格等, 2006, 2007; 刘冠明等, 2006; 王立新等, 2007; 陈英华等, 2009; 王俊芳等, 2009, 中国棉花, 36(3): 26-24), 目

前已有少数农作物在 DNA 指纹数据库的构建方面形成了一个统一的标准(王凤格等, 2006, 2007; 王俊芳等, 2009, 中国棉花, 36(3): 26-24), 水稻是为数不多的几种农作物之一。尽管中国水稻研究所国家水稻数据中心(<http://www.ricedata.cn>)目前已公布了一系列的水稻分子标记的信息和技术标准, 但是由于我国拥有比较丰富的水稻种质资源, 目前我国仍处于进行种质资源的调查和整理阶段。

当前我国的水稻种质资源的来源地多集中于种质资源丰富的南方和东北等地区, 所以目前关于水稻的研究大多集中在此范围内。2009 年, 陈英华等从 500 对 SSR 引物中筛选出 10 对核心引物, 用于构建东北地区近两年区域试验的水稻品种的 DNA 指纹图谱, 并在 100 对多态性位点上检测到 300 个等位基因(陈英华等, 2009)。同年马红勃等以福建省三明市农科所选育, 福建六三种业有限责任公司经营的 24 份杂交稻品种和 18 份杂交稻亲本为材料, 依据中国水稻研究所推荐的 12 个 SSR 标记, 建立了 42 份材料的 12 个 SSR 标记的 DNA 指纹图谱(马红勃等, 2009, 三明农业科技, 3(115): 1-4)。也是在 2009 年, 中国水稻研究所的程本义等, 利用前期研究建立的一套水稻品种 DNA 指纹检测技术体系, 对 2002-2006 年浙江省主要的 98 个水稻品种、以及 2007-2008 年 155 个浙江省区试水稻品种(181 个, 含 26 个续试品种)进行了 DNA 指纹检测, 构建了 279 个次水稻品种 × 12 个微卫星标记的 DNA 指纹图谱数据库(程本义等, 2009)。2010 年, 贵州大学马琳等, 从 145 对 SSR 引物中筛选出 21 对, 对 24 份贵州地方水稻品种/禾 0 品种进行遗传多样性分析,

初步建立了其 DNA 指纹图谱, 并通过聚类分析将所有材料分为 5 类, 聚类结果表明品种间的亲缘关系与地理来源关系不大(马琳等, 2010)。而对于黄淮海地区, 特别是山东等非水稻传统种植区域, 由于水稻种质资源不多, 对其所属地域中的水稻的研究相对于其他地区还比较少。本文根据中国水稻研究所国家水稻数据中心公布的信息和技术标准, 对当前山东省特有的几种优异水稻种质资源进行了 SSR 分析, 构建了其 DNA 指纹图谱数据库。由于山东省特有的水稻种质资源是国家水稻种质资源的有效补充, 所以本研究对保护水稻种质资源的丰富性具有重要意义。现将主要结果公布如下。

1 结果与分析

1.1 SSR 引物标记多态性分析

在本实验采用的 12 份品种中(表 1), 所用 24 对引物共检测到 73 个等位基因, 每个 SSR 位点检测到的等位基因为 1~7 个, 平均每对引物的等位基因 3.04 个(表 2)。其中引物 RM71、RM85、RM267、RM278、RM258 和 RM19 检测到的等位基因数最少(各 1 个), 引物 RM274 检测到的等位基因数最多(7 个)。实验表明, 上述的 24 对引物在实验材料中有较好的多态性, 基本上能够满足水稻 DNA 指纹数据库的构建要求。

在与国家水稻数据中心公布的等位基因的信息进行比对时, 我们发现在本实验中个别 SSR 位点检测到的等位基因数目比国家水稻中心公布的多。如 RM274 在本实验中分别检测到 7 个等位基因, 比国家水稻中心公布的等位基因多出 5 个(图 1)。

表 1 试验材料名称, 来源及编号

Table 1 List of cultivars used

编号 Serial number	品种 Cultivars	品种来源 Cultivar origin	编号 Serial number	品种 Cultivars	品种来源 Cultivar origin
1	彩之恢 Caizhihui		7	临稻 3 号 Lindao 3	山法师/黄金选系 Shanfashi/Huangjinxuan
2	黑壳香稻 Black shell fragrant		8	临稻 10 号 Lindao 10	临 89-27-1/日本晴 Lin89-27-1/Japqing
3	香血稻 Xiang xue		9	临稻 11 号 Lindao 11	镇稻 88 (变异株) Zhendao 88
4	抗虫 1 Insect-Resistant 1		10	红旗 16 号 Hongqi 16	野地黄金 Yedihaungjin
5	盐粳 8 号 Yanjing 8		11	鲁粳 1 号 Lujing 1	福稔/桂花黄 Funian/Guihuahuang
6	临稻 2 号 Lindao 2	桂花黄 Guihuahuang	12	宫 808 Gong 808	

表 2 24 个 SSR 标记座位上的带型数据

Table 2 Alleles detected at 24 SSR loci

标记 Marker	染色体位置 Chromosome	等位基因(个) Allele	标记 Marker	染色体位置 Chromosome	等位基因(个) Allele
RM1195	1S	6	RM336	7L	5
RM297	1L	2	RM18	7L	2
RM71	2S	1	RM337	8S	4
RM208	2L	6	RM72	8L	6
RM232	3L	2	RM219	9S	3
RM85	3L	1	RM278	9L	1
RM5414	4S	3	RM311	10L	4
RM273	4L	3	RM258	10L	1
RM267	5S	1	RM209	11L	2
RM274	5L	7	RM224	11L	2
RM190	6S	5	RM19	12S	1
RM253	6S	3	RM17	12L	2

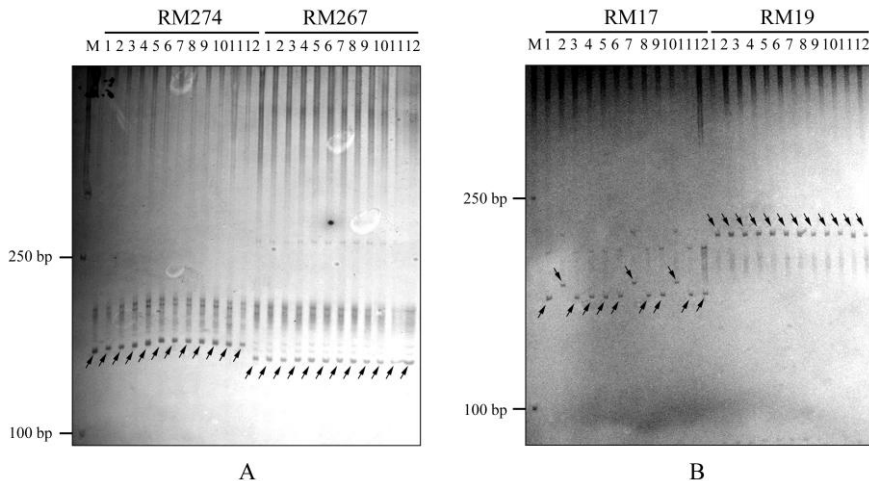


图 1 12 种山东省特有水稻品种中第五染色体长臂和短臂分子标记 RM274, RM267, RM17 和 RM19 的多态性分布; 1~12 分别代表 12 种不同的水稻品种, 见表 1

注: M: 为标准分子量 marker D2000; 箭头为不同的等位基因; A: RM274 和 RM267 的多态性分布; B: RM17 和 RM19 的多态性分布

Figure 1 Polymorphism of markers RM274, RM267, RM17 and RM19 on the fifth chromosome for 12 kinds of unique rice cultivars in Shandong Province; 1~12: 12 kinds of unique rice cultivars, respectively, shown in table 1

Note: M: marker D2000; Arrows indicate bands of the alleles; A: Polymorphism of markers RM274 and RM267; B: Polymorphism of markers RM17 and RM19

1.2 12 种水稻种质资源的 DNA 指纹数据库的初步构建

根据带型清晰、可重复的原则, 由 24 个 SSR 标记中认定了 73 个等位基因, 并依据 AlphaView 软件中条带与 Marker 的相对电泳位移计算出相应的分子量, 将等位基因按分子量从大到小按引物名称加序号的方式进行编号, 于是得到了 12 种水稻材料的 DNA 指纹数据库(表 3), 每种材料的指纹信息分别包含 24 个 SSR 标记所检测到的不同等位基因的所处染色体位置等基本信息(表 4)。

1.3 品种相似性及聚类分析

根据 24 个 SSR 引物所检测出的 73 个等位基因, 对 12 份材料进行聚类分析。在图 2 中, 遗传相似系数的变异范围为 0.68~0.84。在遗传相似系数 0.696 为阈值处, 可以将 12 份材料均为粳稻, 可分为 3 个类群, 第 I 类群包含彩之恢、黑壳香稻、香血稻、抗虫 1 和盐粳 8 号, 它们都属于糯稻。第 II 类群包含临稻 10 号、临稻 11 号、红旗 16 号、鲁粳 1 号和宫 808, 它们都属于粳型常规水稻。第 III 类群包含临稻 2 号和临稻 3 号它们属于粳型常规水

表 3 24 个 SSR 引物构建的 12 种山东水稻的 DNA 指纹图谱

Table 3 DNA finger print for 12 kinds of unique rice cultivars in Shandong Province at 24 SSR makers

编号	彩之恢	黑壳香稻	香血稻	抗虫 1	盐粳 8 号	临稻 2 号	临稻 3 号	临稻 10 号	临稻 11 号	临稻 16 号	红旗鲁粳 1 号	宫 808
serial number	Caizhi hui	Black shell fragrant rice	Xiang xue	Insect-Resistant 1	Yanjing 8	Lindao 2	Lindao 3	Lindao 10	Lindao 11	Hongqi 16	Lujing 1	Gong 808
RM1195-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RM1195-2	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0
RM1195-3	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM1195-4	0	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RM1195-5	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
RM1195-6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM297-1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
RM297-2	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RM71	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM208-1	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM208-2	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
RM208-3	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	0
RM208-4	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM208-5	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
RM208-6	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
RM232-1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0
RM232-2	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RM85	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM5414-1	1	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0
RM5414-2	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1
RM5414-3	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RM273-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0
RM273-2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0
RM273-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1
RM267	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM274-1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0
RM274-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0
RM274-3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
RM274-4	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0
RM274-5	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM274-6	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM274-7	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM190-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RM190-2	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
RM190-3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
RM190-4	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1
RM190-5	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0
RM253-1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
RM253-2	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0
RM253-3	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1
RM336-1	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	1	1
RM336-2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM336-3	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RM336-4	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0
RM336-5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM18-1	1	1	0	1	1	0	0	1	0	1	1	0
RM18-2	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
RM337-1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
RM337-2	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1	0	0
RM337-3	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0
RM337-4	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0

续表 3
Continuing table 3

编号	彩之恢	黑壳香稻	香血稻	抗虫 1	盐粳 8 号	临稻 2 号	临稻 3 号	临稻 10 号	临稻 11 号	红旗 16 号	鲁粳 1 号	宫 808
serial number	Caizhi hui	Black shell fragrant rice	Xiang xue	Insect-Resistant 1	Yanjing 8	Lindao 2	Lindao 3	Lindao 10	Lindao 11	Hongqi 16	Lujing 1	Gong 808
RM72-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0
RM72-2	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0
RM72-3	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0
RM72-4	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0
RM72-5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM72-6	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1
RM219-1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1
RM219-2	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
RM219-3	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
RM278	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM311-1	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1
RM311-2	1	0	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0
RM311-3	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0
RM311-4	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0
RM258	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM209-1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	1
RM209-2	0	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0
RM224-1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM224-2	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RM19	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
RM17-1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1
RM17-2	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0

表 4 水稻 SSR 引物基本信息

Table 4 List of the 24 SSR markers selected for the identification of rice cultivars

标记	染色体	臂	位置	正向引物序列(5'→3')	反向引物序列(5'→3')
Marker	Chromosome	Arm	Position	Forward primer (5'→3')	Reverse primer (5'→3')
RM1195	1	S	6153085	ATGGACCACAAACGACCTTC	CGACTCCCTTGTTCTTCTGG
RM297	1	L	32093949	TCTTTGGAGGCGAGCTGAG	CGAAGGGTACATCTGCTTAG
RM71	2	S	8761504	CTAGAGGCGAAAACGAGATG	GGGTGGGCGAGGTAATAATG
RM208	2	L	35160202	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTTGTGTGGACC
RM232	3	L	9734810	CCGGTATCCTTCGATATTGC	CCGACTTTTCCTCCTGACG
RM85	3	L	36287160	CCAAAGATGAAACCTGGATTG	GCACAAGGTGAGCAGTCC
RM5414	4	S	2021760	ACCATGGTTCAAGAGTGAAA	ACAGCTCAACCTGTTGAGTG
RM273	4	L	23825125	GAAGCCGTGCTGAAGTTACC	GTTTCCTACCTGATCGCGAC
RM267	5	S	2849973	TGCAGACATAGAGAAGGAAGTG	AGCAACAGCACAACCTTGATG
RM274	5	L	26661876	CCTCGCTTATGAGAGCTTCG	CTTCTCCATCACTCCCATGG
RM190	6	S	1764638	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCCTGATG
RM253	6	S	5437340	TCCTTCAAGAGTGCAAAAACC	GCATTGTCATGTCGAAGCC
RM336	7	L	21818658	CTTACAGAGAAAACGGCATCG	GCTGGTTTGTTCAGGTTCCG
RM18	7	L	25651810	TTCCCTCTCATGAGCTCCAT	GAGTGCCTGGCGCTGTAC
RM337	8	S	146952	GTAGGAAAGGAAGGGCAGAG	CGATAGATAGCTAGATGTGGCC
RM72	8	L	6757363	CCGGCGATAAAAACAATGAG	GCATCGGTCCTAACTAAGGG
RM219	9	S	7887585	CGTCGGATGATGTAAAGCCT	CATATCGGCATTTCGCTG
RM278	9	L	19320020	GTAGTGAGCCTAACAATAATC	TCAACTCAGCATCTCTGTCC
RM311	10	L	9347372	TGGTAGTATAGGTACTAAACAT	TCCTATACACATACAAAACATAC
RM258	10	L	17570591	TGCTGTATGTAGCTCGCACC	TGGCCTTTAAAGCTGTCCG
RM209	11	L	17767906	ATATGAGTTGCTGTCTGTCG	CAACTTGATCCTCCCTCC
RM224	11	L	26796502	ATCGATCGATCTTACGAGG	TGCTATAAAAAGGCATTCGGG
RM19	12	S	2432080	CAAAAACAGAGCAGATGAC	CTCAAGATGGACGCCAAGA
RM17	12	L	26949995	TGCCCTGTTATTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCATTTCA

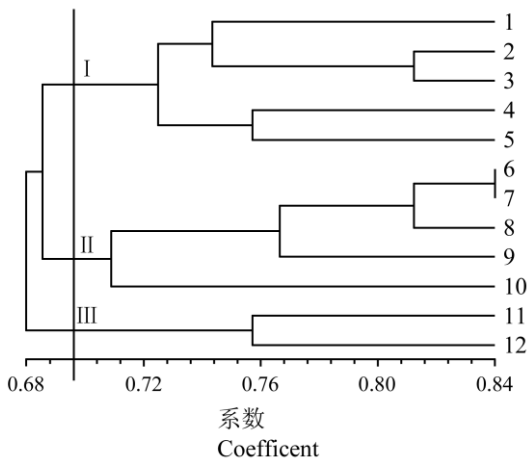


图 2 12 份材料的 SSR 聚类分析
注: 1: 彩之恢; 2: 抗虫 1; 3: 盐粳 8 号; 4: 黑壳香稻; 5: 香血稻; 6: 临稻 10 号; 7: 临稻 11 号; 8: 鲁粳 1 号; 9: 宫 808; 10: 红旗 16 号; 11: 临稻 2 号; 12: 临稻 3 号

Figure 2 Cluster dendrogram of 12 cultivars based on SSR makers

Note: 1: Caizhihui; 2: Insect-Resistant 1; 3: Yanjing 8; 4: Black shell fragrant rice; 5: Xiangxue; 6: Lindao 10; 7: Lindao 11; 8: Lujing 1; 9: Gong 808; 10: Hongqi 16; 11: Lindao2; 12: Lindao 3

稻。实验结果分析表明, SSR 的聚类结果能较好地反映出材料之间的亲缘关系。

2 讨论

2.1 SSR 引物标记多态性分析

本实验中, 由于所采用的材料为山东省特有的几种优异水稻种质资源, 总材料数目较少, 遗传多样性较窄(表 2), 绝大多数 SSR 引物检测到的等位基因数相对于国家公布数据较低, 如国家水稻数据中心公布的 RM71、RM336 和 RM278 等位基因数分别为 5、7 和 6, 而本实验材料中所检测到的上述引物等位基因数分别为 1、5 和 1。但是也有个别引物检测到的等位基因数高于国家水稻数据中心公布的数据, 如本实验材料中 RM274 和 RM190 检测到的等位基因数分别为 7 和 5, 高于国家水稻数据中心公布的 2 和 4。这表明, 山东省特有的、优异的水稻有着独特的遗传背景和基因资源, 是水稻遗传育种工作不可多得的重要遗传种质材料, 应该引起有关部门的重视并予以相应的保护。

2.2 水稻 DNA 指纹数据库的兼容

经过国内专家多年的努力, 国家初步制定了水稻的 DNA 指纹数据库标准。然而在构建山东省特有的、优异的水稻 DNA 指纹数据库时我们发现,

各个省份所建立的数据库在兼容性上还存在一定的问题, 导致了各个数据库在交换信息上有一定的障碍, 不能整合为一个有效的全国性的综合数据库。兼容性问题主要表现在以下几个方面:

(一)建立水稻 DNA 指纹数据库的几个关键性因素仍没有统一标准。标记方法和标记来源、严格规范的检测平台和核心引物的选定。目前国内 DNA 指纹数据库的标记方法和来源一般是参照国际上的通用标准 SSR 标记方法, 个别的采用非主流的方法和标准(陈英华等, 2009; 程本义等, 2009; 马琳等, 2010; 马红勃等, 2010; 马红勃等, 2009, 三明农业科技, 3: 1-4)。检测平台则因各个科研单位人员、技术、设备和资金等方面因素的差异而有所不同, 一般为聚丙烯酰胺凝胶电泳, 少数单位采用毛细管电泳。特别是核心引物的选用方面比较多样化, 由于核心引物的选择差异, 导致了各个数据库的兼容性方面出现了一定的难度, 这可能成为今后工作的重点之一。

(二)国家标准上的一些漏洞。尽管国家水稻数据中心公布了水稻 DNA 指纹数据库构建要素的几个标准, 如核心引物、凝胶选用和电泳方式。但是我们还是发现, 在一些基本要素以外仍有必要进行进一步的规范。比如各个引物退火温度, 这一问题直接影响了实验的可重复性和与国家数据库进行比对的可操作性。其次实验的精度问题也应引起注意, 国家数据中心公布的个别等位基因(如 RM208)在 10 个碱基内有 7 个等位基因, 而其所用的 6% 的丙烯酰胺凝胶和分子量 Marker 分辨率不够, 明显的不能够对它们进行精确定位。最后国家数据中心公布的等位基因的信息不完整, 如 RM85 的等位基因变异范围是 90~100 bp, 然而标准图板中给出的最小分子量 Marker 只有 100 bp, 明显不能分辨 100 bp 以下的等位基因, 类似的问题在 RM208 和 RM219 的等位基因上也出现过。

(三) DNA 数据库信息化标准不一。有些地方采用的是本实验用的数据处理方式, 即根据国家数据中心公布的等位基因进行比对, 对自身检测到的等位基因进行编号。然而个别地方没有与国家数据中心数据进行比对, 直接按自身实验结果进行编号(马红勃等, 2009, 三明农业科技, 3: 1-4)。这就为以后各地数据库的兼容在信息处理层面造成了一定的困难。

总之, DNA 指纹图谱技术已经在种质品种鉴

定、种子质量和保护专利权上发挥着重要作用, 它也被应用到品种的亲缘关系划分、农作物育种和农作物遗传作图等方面(王忠华, 2006; 陈杰等, 2007, 农业考古, 3: 69-71)。但是, 由于我国在水稻 DNA 指纹图谱的研究上才刚刚起步, 国内各个研究机构研究水平不一, DNA 指纹数据库构建所采用的技术、标准和软件等各不相同, 存在着若干个不同的 DNA 指纹数据库, 且大多数数据库间存在不能兼容的现状(陈英华等, 2009; 程本义等, 2009; 马琳等, 2010; 马红勃等, 2010; 马红勃等, 2009, 三明农业科技, 3: 1-4)。这种情况的存在限制了各个数据库之间的数据交换并导致资源的浪费, 更为重要的是它使水稻 DNA 指纹数据库间没有了统一标准, 造成了单个数据库容量不足、覆盖率不足、分辨率不足和不稳定等缺点, 阻碍了水稻 DNA 指纹数据库的构建和发展, 影响了对水稻分子育种工作的深入研究, 对该问题的研究及解决应该引起我们的重视。我国具有丰富且独特的水稻种质及其基因资源, 加速构建水稻 DNA 指纹数据库的基本平台, 统一技术标准, 对实现我国水稻 DNA 指纹数据库的标准化、自动化和数字化有着重要意义。

3 实验材料与方法

3.1 实验材料

本研究的实验材料由山东省农业科学院高新技术中心的姚方印研究员提供。选取山东省特有、优异水稻资源 12 份品种名称及编号见表 1。

3.2 水稻的萌发

在 15 cm×15 cm 的方形培养皿中, 放入 4 张大小合适的方形滤纸, 加入蒸馏水润湿后, 摆放水稻种子。将放有种子的培养皿置于 27℃ 的培养箱中, 暗培养 7 d。

3.3 DNA 的提取

取出于 27℃ 暗培养 7 d 后的水稻幼苗, 放入研钵中并加入液氮, 研成粉末后, 通过 CTAB 法提取其 DNA (Doyle and Doyle, 1990)。加入 RNaseA (北京天根), 去除样品中的 RNA。加入酚氯仿, 变形样品中剩余的蛋白, 并通过冷冻的异丙醇沉淀 DNA。

3.4 PCR

在 10 μL 的 *Taq Plus PCR MasterMix* (北京天根) 中体系中加入 0.1 μg DNA 和 1 μL 引物(中国水稻研究所国家水稻数据中心, 表 4), 通过以下条件进行

PCR: 94℃ 预热 3 min, 94℃ 30 s, 51℃ 30 s, 72℃ 30 s, 35 个循环结束后 72℃ 延伸 5 min。

3.5 SSR 电泳

电泳采用 6% 的非变性丙烯酰胺凝胶电泳, 设备为 BIO-RAD 的核酸序列分析电泳 Sequi-Gen GT。每个泳道上样 2 μL, 恒定功率 65 W, 电泳 80 min 后, 通过碳酸钠银染的方法显示条带(Röder et al., 1998)。

3.6 数据记录与分析

利用 AlphaView 1.2.0.1 软件(Alpha, 美国)进行 SSR 位点检测与分子量计算, 所采用的分子量 Marker 为由单独制备的 PCR 产物混合而成的 D2000 (北京天根)。根据国家水稻数据中心公布的 24 对 SSR 引物扩增所得的等位基因分子量及多态性等信息, 对比本实验所检测到的位点多态性, 将符合条件的条带视为 1 个等位基因并进行记录。根据相同迁移位置上(即分子量相同的 DNA 片段)条带分布情况对数据进行记录, 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 NTSYS2.10e 软件中 similarity 程序计算相似系数, 以 clustering 程序中 SHAN 进行 UPGMA (非加权组平均法)聚类分析(马红勃等, 2010)。

作者贡献

王俊峰为本实验的主要构思和实施者, 为论文初稿的主要编写人员。李娜娜, 张煜和马玉敏参与了部分实验的实施, 余华参与了实验数据的分析。姚方印提供了本实验的材料并对实验实施进行了指导。丁汉凤为本文通讯作者, 构思者及负责人, 指导论文写作、修改及定稿。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本文由山东省农业良种工程(主要农作物物种种质资源的收集, 鉴定与入库保存, 2010LZ01-01)和国家科技基础性工作专项资金(山东省沿海地区抗旱耐盐优异性状农作物种质资源调查, 2007FY110500)共同提供支持。

参考文献

Chen Y.H., Hou Y.M., Li H.Y., Li M.B., Yuan Y., and Xu Z.J., 2009, Establishment of DNA fingerprinting and analysis of genetic diversity among japonica rice cultivars attended regional trials in northeast region of China, *Zhongzi (Seed)*, 28(3): 28-35 (陈英华, 侯昱铭, 李宏宇, 李茂柏, 袁媛, 徐正进, 2009, 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, *种子*, 28(3): 28-35)

- Cheng B.Y., Wu W., Xia J.H., Liu X., Zhuang J.Y., and Yang S.H., 2009, Construction and application of DNA finger-print database of rice varieties in Zhejiang Province, *Zhejiang Nongye Xuebao (Acta Agriculturae Zhejiangensis)*, 21(6): 555-560 (程本义, 吴伟, 夏俊辉, 刘鑫, 庄杰云, 杨仕华, 2009, 浙江省水稻品种DNA指纹数据库的初步构建及其应用, *浙江农业学报*, 21(6): 555-560)
- Doyle J.J., and Doyle J.L., 1990, Isolation of plant DNA from fresh tissue, *Focus*, 12(1): 13-15
- Fleury D., Luo M.C., Dvorak J., Ramsay L., Gill B.S., Anderson O.D., You F.M., Shoaie Z., Deal K.R., and Langridge P., 2010, Physical mapping of a large plant genome using global high-information-content-fingerprinting: the distal region of the wheat ancestor *Aegilops tauschii* chromosome 3DS, *BMC Genomics*, 11: 382
- Liu G.M., Zheng Y.X., and Li G.L., 2006, SSR Fingerprinting map of 20 peanut cultivars, *Zhongguo Nongxue Tongbao (Chinese Agricultural Science Bulletin)*, 22(6): 49-51 (刘冠明, 郑奕雄, 黎国良, 2006, 20个花生品种的SSR标记指纹图谱构建, *中国农学通报*, 22(6): 49-51)
- Ma H.B., Xu X.M., Wei X.Y., Yang W.X., and Zou W.G., 2010, DNA fingerprints and genetic diversity analysis based on SSR markers for rice cultivars in Fujian, *Fujian Journal of Agricultural Sciences*, 25(1): 33-38 (马红勃, 许旭明, 韦新宇, 杨旺兴, 邹文广, 2010, 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, *福建农业学报*, 25(1): 33-38)
- Ma L., Yu X.Q., and Zhao F.S., 2010, Establishment of SSR Fingerprint Map of Local Rice Varieties “He” in Guizhou, *Xinana Nongye Xuebao (Southwest China Journal of Agricultural Sciences)*, 23(1): 5-10 (马琳, 余显权, 赵福胜, 2010, 贵州地方水稻品种“禾”的SSR指纹图谱构建, *西南农业学报*, 23(1): 5-10)
- Nelson W.M., Bharti A.K., Butler E., Wei F., Fuks G., Kim H., Wing R.A., Messing J., and Soderlund C., 2005, Whole-genome validation of high-information-content fingerprinting, *Plant Physiol.*, 139(1): 27-38
- Rekha T., Martin K.P., Sreekumar V.B., and Madassery J., 2011, Genetic diversity assessment of rarely cultivated traditional indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties, *Biotechnol Res. Int.*, doi: 10.4061/2011/784719
- Röder M.S., Korzun V., Wendehake K., Plaschke J., Tixier M.H., Leroy P., and Ganal M.W., 1998, A microsatellite map of wheat, *Genetics*, 149(4): 2007-2023
- Teng H.T., Lv B., Zhao J.R., Xu Y., Wang F.G., Du Y.Y., Yang K., Tang H., and Li X.Y., 2009, DNA fingerprint profile involved in plant variety protection practice, *Biotechnology Bulletin*, 1: 1-6 (滕海涛, 吕波, 赵久然, 徐岩, 王风格, 堵苑苑, 杨坤, 唐浩, 李祥羽, 2009, 利用DNA指纹图谱辅助植物新品种保护的可能性, *生物技术通报*, 1: 1-6)
- Wang F.G., Zhao J.R., Dai J.R., Guo J.L., Yuan Y.P., Wang L., Yi H.M., Sun S.X., and Lv B., 2006, Criteria for the construction of maize DNA fingerprint database, *Yumi Kexue (Journal of Maize Sciences)*, 14(6): 66-68 (王风格, 赵久然, 戴景瑞, 郭景伦, 原亚萍, 王璐, 易红梅, 孙世贤, 吕波, 2006, 玉米DNA指纹数据库建库标准规范的建立, *玉米科学*, 14(6): 66-68)
- Wang F.G., Zhao J.R., Dai J.R., Guo J.L., Yuan Y.P., Wang L., Yi H.M., Sun S.X., and Lv B., 2007, Criteria for the construction of maize DNA fingerprint database, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 5(1): 128-132 (王风格, 赵久然, 戴景瑞, 郭景伦, 原亚萍, 王璐, 易红梅, 孙世贤, 吕波, 2007, 玉米品种DNA指纹数据库构建的标准化规范, *分子植物育种*, 5(1): 128-132)
- Wang L.X., Li Y.F., Chang L.F., Huang L., Li H.B., Ge L.L., Liu L.H., Yao J., and Zhao C.P., 2007, Method of ID Constitution for Wheat Cultivars, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 33(10): 1738-1740 (王立新, 李云伏, 常利芳, 黄岚, 李宏博, 葛玲玲, 刘丽华, 姚骥, 赵昌平, 2007, 建立小麦品种DNA指纹的方法研究, *作物学报*, 33(10): 1738-1740)
- Wang Z.H., 2006, DNA fingerprinting technology and its application in crop germplasm resources, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(3): 425-430 (王忠华, 2006, DNA指纹图谱技术及其在作物品种资源中的应用, *分子植物育种*, 4(3): 425-430)



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>