

研究报告

A Letter

云南省 134 个水稻新品种 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析

吴毅歆^{1*}, 刘春明^{2*}, 毛自朝¹, 李学进³, 何月秋^{1,2}

1. 云南农业大学农业与生物技术学院, 昆明, 650201
2. 云南农业大学农业生物多样性应用技术国家工程中心, 昆明, 650201
3. 云南省农业厅种子管理站, 昆明, 650031

* 同等贡献作者

✉ 通讯作者: ynh2007@163.com ✉ 作者

分子植物育种, 2012 年, 第 10 卷, 第 39 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0039

收稿日期: 2012 年 06 月 25 日

接受日期: 2012 年 07 月 06 日

发表日期: 2012 年 08 月 08 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, 版权所有人允许和同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

吴毅歆等, 2012, 云南省 134 个水稻新品种 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析, 分子植物育种(online) Vol.10 No.39 pp.1287-1296 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0039)

引用格式(英文):

Wu et al., 2012, Establishment of DNA Fingerprinting Profile and Genetic Analysis for 134 New Released Rice Varieties in Yunnan Province, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding) Vol.10 No.39 pp.1287-1296 (doi: 10.5376/mpb.cn.2012.10.0039)

摘要 利用 SSR 标记研究 134 个云南省水稻新品种的种子纯度、遗传多样性, 并构建 DNA 指纹图谱。结果表明, 95.52% 品种纯度达 90% 以上, 4.48% 品种纯度低于 90%。12 对引物共检测出 55 个等位基因, 平均每个标记 4.583 3 个, 变幅 2~7 个; 平均有效等位基因总数为 4.257 5 个, 变幅 1.342 0~3.771 9 个, Shannon 多样性指数(I)平均值 1.133 6, 变化幅度 0.537 8~1.502 2; 多态性信息含量(PIC)平均值为 0.605 5, 变动范围 0.254 8~0.734 9。134 个品种之间的遗传相似性系数变异范围为 0.222 2~0.975 6, 平均遗传相似性系数为 0.592 9, 其中遗传相似性系数大于 0.500 0 的品种对占供试品种对的 77.06%, 表明大部分供试品种之间的亲缘关系较近, 遗传基础狭窄。UPGMA 聚类分析果表明, 在遗传相似系数为 0.560 4 处, 134 个供试品种划分为 8 个类群, 类群 I 包括 115 个品种, 占有测试品种总数的 85.82%, 表明供试品种的遗传背景比较单一。

关键词 水稻; 新品种; 简单重复序列; DNA 指纹; 遗传分析

Establishment of DNA Fingerprinting Profile and Genetic Analysis for 134 New Released Rice Varieties in Yunnan Province

Wu Yixin^{1*}, Liu Chunming^{2*}, Mao Zichao¹, Li Xuejin³, He Yueqiu^{1,2}

1. School of Agriculture and Biological technology, Yunnan Agricultural University (YAU), Kunming, 650201;
2. National Engineering Center for Agricultural Biodiversity, YAU, Kunming, 650201
3. Seed Management Station, Agriculture Department of Yunnan Province, Kunming, 650031

* These authors contributed equally to this paper

✉ Corresponding author, ynh2007@163.com; ✉ Authors

Abstract Simple sequence repeats (SSR) were used to detect variety purity, genetic diversity among 134 new released rice cultivars in Yun Nan province and attempt to establish DNA fingerprinting. The results showed that, 95.52% of the tested cultivars had 90% purity above and 4.48% of them had less 90% purity. Twelve SSR primers generated 55 polymorphic fragments. The average number of allele per SSR locus was 4.583 3 with average from 2 to 7 While the average number of effective allele per SSR locus was 4.257 5 with average from 1.342 0 to 3.771 9. The Shannon's Information index (I) for the SSR loci varied from 0.537 8 to 1.502 2 with an average of 1.133 6, while The polymorphism information Content (PIC) for the SSR loci varied from 0.254 8 to 0.734 9 with an average of 0.605 5. Genetic similarities among the 134 new released rice cultivars ranged from 0.222 2 to 0.975 6 with an average of 0.592 9, and genetic similarities coefficient with above 0.500 0 accounted for 77.06% in the 134 new released rice cultivars. It was clear that there is closer relationship among the tested cultivars with narrow genetic base. The cluster analysis showed that the tested cultivars could be classified into 4 distinct groups at 0.560 4 of the criteria of genetic similarities coefficient, which the group I contained 115 tested cultivars, accounting for 85.82 % of all cultivars. The results indicated the narrow genetic base existed among the detected cultivars that were latest released in the Yunnan Province.

Keywords Rice; New released cultivars; Simple sequence repeat (SSR); DNA fingerprinting; Genetic analysis

研究背景

微卫星标记即简单重复序列(Simple sequence repeats, SSR), 是指存在于真核生物体由 1~6 个碱基对组成的简单重复序列。与 RFLP、RAPD、ALFP 等其他分子标记相比, 微卫星标记具有多态性高、重复性好、准确度高、共显性和符合孟德尔遗传等优点, 更适合亲缘关系较近品种的遗传多样性分析(Akagi et al., 1997)。目前, 微卫星标记已经广泛应用于基因组作图、群体遗传和进化研究、种质资源多样性分析、杂种优势预测及分子育种等诸多领域(齐永文等, 2006, 科学通报, 51(6): 693-699)。

目前, 利用 SSR 标记技术构建水稻指纹图谱(肖小余等, 2006; 陈英华等, 2009; 从夕汉等, 2010)、构建水稻的指纹数据库(庄杰云等, 2006; 程本义等, 2007)、进行遗传多样性分析(应杰政等, 2007; 甘晓燕等, 2009; 刘传光和张桂权, 2010)和品种鉴定(樊叶杨等, 2000; 施勇烽等, 2005)等研究的报道很多。在前人工作基础上, 本研究采用中国水稻所推荐的 12 对首选 SSR 引物(庄杰云等, 2006)分析水稻品种的种子纯度, 构建了 134 个水稻新品种的 DNA 指纹图谱, 分析其遗传多样性, 为云南省水稻新品种登记注册、品种真实性、纯

度鉴定、知识产权保护、遗传资源评价及亲缘关系分析提供理论依据和技术支持。

1 结果与分析

1.1 SSR 标记的多态性

134 个水稻品种在 12 对多态性位点上共检测到 55 个等位基因数(表 1), 平均每个标记 4.583 3 个, 变幅 2~7 个, 其中引物 RM336 多态性最高, 在供试品种中共检测到 7 个多态性片段, 引物 RM297 次之, 分别检测到 6 个多态性条带, 但引物 RM311 多态性差, 只在供试品种中检测到 2 个多态性条带, 引物 RM274 多态性较差, 只在供试品种中检测到 3 个多态性条带。按照不同类型看, 籼稻组和粳稻组检测到的多态性条带数差异明显, 其中籼稻组共检测到 55 个多态性条带, 粳稻组共检测到 43 多态性条带。12 个微卫星标记检测到的等位基因数大致呈梯形分布。12 个微卫星标记有效等位基因总数为 33.398 0 个(表 1), 平均每个标记 4.257 5 个, 其中引物 RM190 的有效等位基因数最多, 为 3.771 9 个, 而引物 RM85 的有效等位基因总数最少, 为 1.342 0 个。分类型看, 籼稻组和粳稻组的有效等位基因数差异不大, 籼稻组的有效等位基因数位 32.901 1, 粳稻组的有效等位基因

表 1 SSR 标记的等位基因数和有效等位基因数

Table 1 Number of alleles and number of effective alleles for SSR markers

标记 Locus	等位基因数 No. of alleles			有效等位基因数 No. of effective alleles		
	籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>	总数 Total	籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>	总数 Total
RM297	6	5	6	3.508 5	3.174 6	3.523 9
RM71	5	4	5	2.861 9	1.526 7	2.719 8
RM85	4	3	4	1.177 1	1.515 2	1.342 0
RM5414	4	4	4	1.965 5	2.105 3	1.981 4
RM274	3	3	3	2.305 2	1.360 5	2.277 1
RM190	4	3	4	3.784 4	2.666 7	3.771 9
RM336	7	5	7	3.200 9	2.985 1	3.295 6
RM72	5	4	5	3.140 8	3.508 8	3.195 6
RM219	5	2	5	3.093 5	1.470 6	3.169 9
RM311	2	2	2	1.785 3	2.000 0	1.813 3
RM209	5	4	5	3.523 0	3.703 7	3.571 6
RM19	5	4	5	2.555 0	3.846 2	2.735 9
平均值 Mean	4.583 3	3.583 3	4.583 3	2.741 8	2.488 6	2.783 2

数位 29.863 4。12 个微卫星标记的有效等位基因数大致呈梯形分布。籼稻组在每个首选标记上检测到的等位基因数和 134 个水稻品种检测到的有效等位基因数一致, 但籼稻组和水稻品种总数之间的有效等位基因数存在一定差异。

1.2 品种的遗传多样性水平分析

用 Shannon 多样性指数(I)、多态性信息含量(PIC)来衡量水稻品种的遗传多样性水平(表 2), Shannon 多样性指数平均值 1.133 6, 变化幅度 0.537 8~1.502 2; PIC 平均值为 0.605 5, 变动范围 0.254 8~0.734 9。其中引物 RM85 的 Shannon 多样性指数和 PIC 值最小, 分别为 0.537 8 和 0.254 8, 引物 RM297 的 Shannon 多样性指数最大, 为 1.502 2, 引物 RM190 的 PIC 值最大, 为 0.734 9。

按照不同类型看, 籼稻组和粳稻组的 Shannon 多样性指数(I)、多态性信息含量(PIC)总数差异不大(表 2), 而籼稻组和粳稻组只在少数位点上的 Shannon 多样性指数和多态性信息含量差异较大, 如籼稻组中 RM219 的 I 值为 1.310 4, PIC 值为 0.676 8, 而粳稻组 RM219 的 I 值为 0.500 4, PIC 值为 0.320 0。

由表 3 可知, 各标记的等位基因在 134 个水稻品种中的出现频率差异很大, 依据基因频率的不同将其分成主导、一般和稀有三类等位基因, 如 RM297

标记的 6, 5 和 3 号等位基因。进一步分析发现, 籼型与粳型的等位基因频率分布差异明显, 如籼稻 RM85 标记的 1, 3 和 4 号等位基因频率分别为, 0.919 4, 0.004 0 和 0.012 1, 而粳稻的 RM85 标记的 1, 3 和 4 号等位基因频率分别为, 0.100 0, 0.800 0 和 0。

1.3 水稻新品种纯度分析

134 个水稻新品种的种子纯度测定结果见表 4。这些水稻品种的种子纯度都分布在 80.00% 及以上, 其中 128 个水稻品种的种子纯度 90.00%, 占有品种数的 95.52%; 其中有 113 个水稻品种的种子纯度 95.00%, 占供试品种总数的 84.33%, 但仍有 1 个品种的纯度仅为 80.00%。

1.4 品种亲缘关系聚类分析

根据扩增产物在聚丙烯酰胺电泳凝胶上的相对位置, 并参照 100 bp DNA Marker 条带位置, 确定不同的谱带类型, 并按扩增片段从大到小的顺序编号, 按照 0、1、9 统计 SSR 扩增产物, 组成 134 个水稻新品种的二元数据矩阵, 构成 134 个水稻品种的数字指纹图 134 个云南省水稻新品种的遗传相似性系数变异范围为 0.222 2~0.975 6, 平均遗传相似性系数为 0.592 9, 其中冈香 1 号和冈香 5 号、内优 3016 和宜优 1016 的遗传相似性系数最大, 为 0.975 6, 其

表 2 12 对 SSR 标记在不同类型水稻品种中的 Shannon 多样性指数和多态性信息含量

Table 2 Shannon's Information index and polymorphism information content at 12 SSR loci in different types of rice cultivars

标记 Locus	Shannon 多样性指数(I)			多态性信息含量(PIC)		
	Shannon's information index (I)			Polymorphism information content (PIC)		
	籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>	总数 Total	籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>	总数 Total
RM297	1.499 8	1.330 8	1.502 2	0.715 0	0.685 0	0.716 2
RM71	1.313 5	0.708 3	1.279 5	0.650 6	0.345 0	0.632 3
RM85	0.329 8	0.639 0	0.537 8	0.150 4	0.340 0	0.254 8
RM5414	0.797 5	0.981 9	0.820 6	0.491 2	0.525 0	0.495 3
RM274	0.912 5	0.518 2	0.907 9	0.566 2	0.2650	0.560 8
RM190	1.358 8	1.039 7	1.356 3	0.735 8	0.625 0	0.734 9
RM336	1.352 4	1.262 9	1.373 0	0.687 6	0.665 0	0.696 6
RM72	1.274 2	1.319 5	1.293 3	0.681 6	0.715 0	0.687 1
RM219	1.314 0	0.500 4	1.318 3	0.676 8	0.320 0	0.684 6
RM311	0.631 8	0.693 1	0.640 7	0.439 9	0.500 0	0.448 5
RM209	1.421 4	1.345 2	1.427 3	0.716 2	0.730 0	0.720 0
RM19	1.066 4	1.366 2	1.146 4	0.608 7	0.740 0	0.634 4
平均值 Mean	1.106 0	0.975 4	1.133 6	0.593 3	0.537 9	0.605 5

表 3 12 个 SSR 位点在 134 个水稻品种中的等位基因频率

Table 3 Frequency of alleles at 12 SSR loci in different types of 134 rice cultivars

标记 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Frequency of alleles			标记 Locus	等位基因 Allele	等位基因频率 Frequency of alleles		
		籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>	总体 Total			籼稻 <i>Indica</i>	粳稻 <i>Japonica</i>	总体 Total
RM297	1	0.072 6	0.100 0	0.074 6	RM336	1	0.016 3	-	0.015 0
	2	0.197 6	0.100 0	0.190 3		2	0.386 2	0.100 0	0.364 7
	3	0.088 7	-	0.082 1		3	0.008 1	0.050 0	0.011 3
	4	0.056 5	0.050 0	0.056 0		4	0.138 2	0.400 0	0.157 9
	5	0.121 0	0.300 0	0.134 3		5	0.374 0	0.400 0	0.375 9
	6	0.463 7	0.450 0	0.462 7		6	0.061 0	0.050 0	0.060 2
RM71	1	0.104 3	0.050 0	0.100 0	RM72	1	0.036 6	0.200 0	0.048 9
	2	0.082 6	-	0.076 0		2	0.264 2	0.150 0	0.255 6
	3	0.134 8	0.050 0	0.128 0		3	0.028 5	-	0.026 3
	4	0.134 8	0.100 0	0.132 0		4	0.231 7	0.250 0	0.233 1
	5	0.543 5	0.800 0	0.564 0		5	0.439 0	0.400 0	0.436 1
RM85	1	0.919 4	0.100 0	0.858 2	RM219	1	0.080 6	-	0.074 6
	2	0.064 5	0.100 0	0.067 2		2	0.116 9	0.200 0	0.123 1
	3	0.004 0	0.800 0	0.063 4		3	0.048 4	-	0.044 8
	4	0.012 1	-	0.011 2		4	0.467 7	-	0.432 8
RM5414	1	0.326 6	0.200 0	0.317 2	RM209	1	0.112 9	0.250 0	0.123 1
	2	0.036 3	0.100 0	0.041 0		2	0.173 4	0.250 0	0.179 1
	3	0.633 1	0.650 0	0.634 3		3	0.072 6	-	0.067 2
	4	0.004 0	0.050 0	0.007 5		4	0.197 6	0.150 0	0.194 0
RM274	1	0.411 3	0.050 0	0.384 3	RM19	1	0.012 1	-	0.011 2
	2	0.080 6	0.100 0	0.082 1		2	0.415 3	0.200 0	0.399 3
	3	0.508 1	0.850 0	0.533 6		3	0.455 6	0.200 0	0.436 6
RM190	1	0.197 6	-	0.182 8	RM19	4	0.104 8	0.300 0	0.119 4
	2	0.197 6	0.250 0	0.201 5		5	0.012 1	0.300 0	0.033 6
	3	0.342 7	0.250 0	0.335 8					
	4	0.262 1	0.500 0	0.279 9					
RM311	1	0.673 4	0.500 0	0.660 4					
	2	0.326 6	0.500 0	0.339 6					

注：“-”：未检测到的等位基因

Note：“-”：Means undetected alleles

次内优 3016 和 26A 成恢 177, 泸香 8258 和内 5 优 317, 分别为 0.974 4 和 0.971 4, 再次为 T 优 300 和中优 891, 宜优 1016 和 26A 成恢 177, 红瑞一号和 26A 成恢 177, 分别为 0.950 0, 0.950 0, 0.944 4。除以上 7 对品种之间的遗传相似性系数大于 0.900 0 外, 另外还有 14 对品种间的遗传相似性系数大于 0.900 0, 说明这些品种间遗传背景相似, 亲缘关系较近。而滇优 37 和 G 优 2138 的遗传相似性系数最小, 为 0.222 2, 滇优 701 和冈 1 优 2637 之间的遗传相似性系数也小于 0.230 0, 为 0.228 6, 另外滇杂 42 和内优 5022, 滇优 38 和辐香优 98, 两优 5519 和内香 5A/制 4 之间的遗传相似性系数也都小

于 0.230 0, 说明这些品种间的遗传背景差异较大, 亲缘关系较远。

根据遗传相似值(GS)矩阵, 按照 UPGMA 进行聚类分析, 构建 134 个云南省水稻新品种的树状图, 结果见图 1, 从图 1 中看出, 在遗传相似性系数为 0.560 4 处, 134 个品种被分成八个类群, 1 个大类群 I 和 7 个较小 II、III、IV、V、VI、VII、VIII 类群。

类群 I 包括竹优 1013、武香 9 号和广优 1186 等 115 个品种, 占有测试品种总数的 85.82%。在遗传相似性系数为 0.605 8 处, 类群 I 被进一步分为两个亚群, 如图 1 所示, 分别为亚群 IA、亚

表 4 134 个水稻品种种子纯度分布表

Table 4 The seed purity of 134 rice new cultivars

种子纯度范围 (%)	100	95.00~98.83	90.00~93.33	85.00~88.33	80.00
Seed purity (%)					
品种数目	65	48	15	5	1
No.of cultivars					
百分比 (%)	48.51	35.82	11.19	3.73	0.75
Percentage (%)					

群 IB 其中亚群 IA 包括竹优 1013、武香 9 号和广优 1186 等 50 个品种, 占测试品种总数的 43.48%; 亚群 IB 包括内 2 优 11, 莲优 852 和内 2 优 3 号等 65 个品种, 占测试品种总数的 56.52%。

类群 II 仅包括 2 个品种, 分别为 Y 两优 9988、Y 两优 342, 占有测试品种总数的 1.49%。类群 III 只包括 4 个品种, 分别为千乡优 416、珍优 17、XF 优 2399 和宜香 2516, 占有测试品种总数的 2.99%, 类群 IV 和 V 都只包括 1 个品种, 分别为皖稻 131 和滇杂 49, 分别占有测试品种总数的 0.75%, 类群 VI 也包括 2 个品种, 分别为明两优 863、2002-11, 占有测试品种总数的 1.49%, 类群 VII 包括 5 个品种, 分别为滇优 37、滇优 38、滇杂 43、滇杂 47 和滇杂 44, 占有测试品种总数的 3.73%, 类群 VIII 也包括 4 个品种, 分别为保粳杂 2 号、滇杂 701、滇杂 42 和两优 5519, 占有测试品种总数的 2.99%。

进一步观察, 发现类群 VII 和 VIII 包括 9 个水稻品种全为粳稻, 而余下的 1 个粳稻品种—滇杂 49 则被归在类群 V 中。进一步分析遗传相似性表, 这 10 个粳稻品种之间的平均遗传相似性系数为 0.544 2, 滇杂 42 和滇杂 701 的遗传相似性系数最大, 为 0.838 7, 滇杂 49 和滇优 38 的遗传相似性系数最小, 为 0.315 8。说明 10 个粳稻品种间的遗传背景差异比较大。

综上所述, 大量品种集中分布在某类群中, 如类群 I 包括品种数占测试品种总数的 85.82%; 而类群 II、III、IV、V、VI、VII 和 VIII 共包括 19 个品种, 仅占测试品种总数 14.18%。造成这种现象的原因很多, 如品种之间具有共同的亲本或亲缘关系较近的亲本, 其生长环境相似等。

2 讨论

2.1 SSR 引物的多态性

等位基因数(N_a)和多态性信息含量(PIC)用来衡量分子标记的多态性的重要指标。由表 1 和表

2 可知, 这两个指标并不完全一致, 如引物 RM336 的检测到等位基因数最多, 但多态性信息含量为 0.696 6, 并不是 PIC 值为最大的引物, PIC 值最大的引物为 RM190, 为 0.734 9。按照水稻分型来看, 虽然引物 RM336 在籼稻和粳稻检测到等位基因数最多, 分别为 7 个和 5 个, 但是籼稻中多态性信息含量最高的引物是 RM190, 值为 0.745 8, 而粳型稻中引物 RM19 的多态性信息含量最高, 为 0.740 0。尽管这两个指标并不能一致地反应引物的多态性, 但是它们在一定程度上能反应 SSR 标记的多态性。

2.2 种子的纯度

目前, 我国种子生产和经营管理单位还不太规范, 品种引种混乱或品种造假的现象屡有发生, 极大地损害了品种权的有者和广大农民的经济利益, 因此开展作物品种资源鉴定显得尤为重要(余花娣等, 2003)。水稻杂交种子纯度鉴定包括田间小区种植检验, 生理生化特性鉴定技术, 前者多采用异地鉴定, 费时费力, 后者采用的生理生化指标存在组织特异性强、多态性较少等限制因素(谭智丹等, 2006)。为了避免常规技术的局限性, 我们采用 SSR 标记技术构建水稻指纹图谱, 利用 SSR 标记的多样性客观地反映出供试水稻 DNA 组成上的差异和群体间的遗传多样性, 为种子纯度的检测奠定基础。为了保证品种的真实性, 所有 134 个水稻品种均来自云南省区试主管部门和留有备份, 以备查对复检。

利用国标推荐的 12 对引物检测结果表明, 有 95.52% 品种纯度达 90% 以上, 仍有 1 个品种纯度仅为 80%, 这要求育种者高度关注自交系的提纯复壮和制种过程中隔离条件, 没有很好的纯度, 种子质量难以保证。另一方面, 一般情况下, 育种者总是希望把自认为纯度高、有生产潜力的品种参加区试鉴定, 在自己的多点试验中未发现种子不纯的现象。而 SSR 技术仍然检测到了 6 个品

种纯度低于 90%，这一方面是 SSR 较为灵敏，另一方面 SSR 标记不是检测功能基因区域所致。

2.3 品种的遗传多样性

UPGMA 聚类分析果表明，在遗传相似性系数为 0.560 4 处，134 个供试品种划分为 1 个大类群和 7 个小类群。根据 8 911 个品种对组成的遗传相似性系数表(本文未给出)，可以得出遗传相似性系数<0.500 0 的品种对只有 1 747 个，占品种对总数的 19.60%，其中遗传相似性系数<0.300 0 的品种对只有 50 个；遗传相似性系数>0.700 0 的品种对有 1 568 个，占品种对总数的 17.60%，其中遗传相似性系数>0.900 0 的品种对只有 21 个，而其中有 4 个品种对之间的遗传相似性系数>0.960 0；遗传相似性系数位于 0.500 0 和 0.600 0 之间的品种对为 2 448 个，占供试品种对总数的 27.47%，遗传相似性系数 0.600 0 和小于 0.700 0 的品种对为 2 681 个，占供试品种对总数的 30.09%，表明大部分供试品种之间的遗传相似性系数分布在这个区间内。综上所述，占供试品种对总数的 77.06% 的品种之间的遗传相似性系数大于 0.500 0，表明大部分供试品种之间的亲缘关系较近，遗传基础较单一。

进一步分析图 1，发现中优系列(包括 5 品种)、冈系列(包括 5 品种)和 II 优系列(包括 4 个品种)分布亚群 IA 中，结合中国水稻品种及其系谱数据库(<http://www.ricedata.cn>)和中国杂交水稻品种资源数据库(<http://www.hybridrice.com.cn/>)的品种来源信息分析，表明这三个系列内各个品种间的母本来源相似，其中富优 4 号因和 II 优系列具有相同的母本(II-32A)，也被聚在亚群 IA 中。另外，内系列品种(包括 13 个品种)也因具有相同遗传基础而分布在亚群 IB 中。说明相同的不育系或恢复系因其很好的广义配合力等优良的性状，而被不同育种者或单位所引用，结果使采用这些亲本育成的新品种(跨区域)大幅度增加，造成了生产上同一作物的遗传基础趋于单一化。品种遗传基础单一性的结果不仅降低了品种抗病虫害和抵御不良环境的能力，而且容易在大范围内引发新的病虫害等灾害的发生从而影响水稻生产的稳定性。因此构建 134 个水稻新品种的指纹图谱，分析其遗传多样性对云南省的水稻品种的育种工作，品种保护和水稻生产实践有重要的指导作用。

3 材料与方法

3.1 供试材料

供试品种为 2011 年云南水稻新品种，共 134 个，由云南省种子管理站和云南农大稻作所等单位送样(表 5)。其中 10 个品种为粳稻，分别是滇优 37、滇优 38、滇杂 42、滇杂 43、滇杂 44、滇杂 47、滇杂 49、滇杂 701、两优 5519、保粳杂 2 号，剩余 124 个品种，全为籼稻。

3.2 方法

3.2.1 DNA 提取

每份材料分别取 2~3 片新鲜幼嫩的叶片，用 CTAB 法(Murray and Thompson, 1980)提取水稻基因组 DNA。

3.2.2 SSR 扩增

反应体系：10 μL 反应液包括：1×easy taq polymerase DNA buffer (+Mg²⁺)，0.2 mmol/L dNTP，0.25 μmol/L SSR 引物(由上海生工生物公司合成)，1 单位 Taq DNA 聚合酶，0.5 μL DNA 模板。反应液上加盖 15 μL 矿物油，防止反应过程中水分蒸发。实验中所使用的 12 对 SSR 基本核心引物信息，请参见 <http://www.gramene.org> 和 NY/T1433-2007。

反应程序参照 NY/T1433-2007。PCR 扩增在基因扩增仪 WD-9402A (北京六一仪器厂)和 L96+(杭州朗基科学仪器有限公司)进行。

3.2.3 电泳检测

扩增产物在 6.0% 聚丙烯酰胺凝胶上分离。电泳结束后用 0.007 5% AgNO₃ 溶液染色，1.5% NaOH 和 0.4% 甲醛溶液显影，观察结果。

3.3 数据统计与分析

采用人工读带的方式，同时参照程本义等(2007)的读带方式，按照分子量的大小对各标记的多态性片段编号，对于统计过程中新发现的多态性片段，按上述规则插入或追加并编号，以 1 和 0 分别代表某个基因座相应的等位基因位点扩增 DNA 条带的有无，9 代表缺失带型，记录所有品种等位基因的类型(带型)，并构建(0, 1)的数据矩阵，然后转换为基因型矩阵。种子纯度的计算公式为：

$$\text{种子纯度}(\%) = \left(1 - \frac{\sum_{i=1}^n V_i}{n \times m}\right) \times 100\%$$

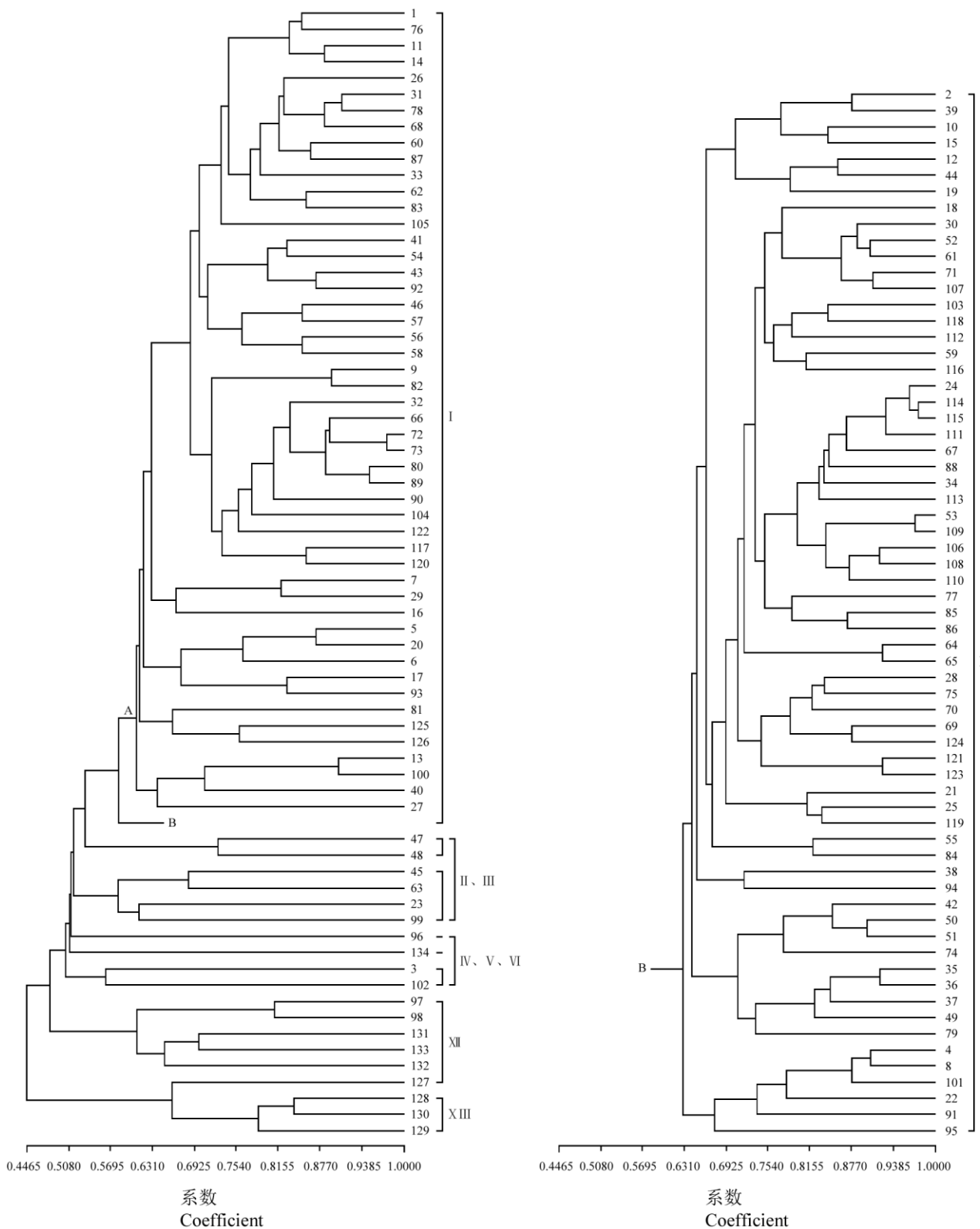


图 1 134 个水稻新品种的 UPGMA 树状图

注: 在树状图中, 类群 I, II, III, IV, V, VI, VII 和 VIII 按照先后顺序从上往下标注; “A, B” 分别表示类群 I 下面的一个亚群

Figure 1 UPGMA dendrogram of 134 rice new cultivars

Note: Group I, II, III, IV, V, VI, VII and VIII were noted in UPGMA dendrogram along with their orders; “A, B”, means one subgroup in group I respectively

表 5 134 个水稻品种编号, 名称

Table 5 Codes and names of 134 new rice cultivars used in this study

编号 Code	品种名称 Name	编号 Code	品种名称 Name	编号 Code	品种名称 Name	编号 Code	品种名称 Name
1	竹优 1013 Zhuyou 1013	35	Y 两优 1 号 Yliangyou 1	69	成优 981 Chengyou 981	103	华优广抗占 Huayouguangkangzhan
2	内 2 优 11 Nei2you 11	36	Y 两优 302 Yliangyou 302	70	深优 9790 Shenyou 9790	104	华优 75 Huayou 75
3	明两优 863 Mingliangyou 863	37	Y 两优 1188 Yliangyou 1188	71	宜香 22 Yixiang 22	105	富优 4 号 Fuyou 4
4	宜香 800 Yixiang 800	38	明两优 829 Mingliangyou 829	72	冈香 1 号 Gangxiang 1	106	两优 15 Liangyou 15
5	谷丰优 1571 Guofengyou 1571	39	莲优 852 Lianyou 852	73	冈香 5 号 Gangxiang 5	107	德香 4103 Dexiang 4103
6	富优 2-2 Fuyou2-2	40	冈 1 优 2637 Gang1you 2637	74	明优 708 Mingliangyou 708	108	泸香 658 Luxiang 658
7	奥龙优 282 Aolongyou 282	41	辐优 550 Fuyou 550	75	明两优 527 Mingliangyou 527	109	泸香 8258 Luxiang 8258
8	裕优 530 Yuyou 530	42	内 5 优 4 号 Nei5you 4	76	武香 9 号 Wuxiang 9	110	辐香优 98 Fuxiangyou 98
9	科优 21 Keyou 21	43	G 优 2138 Gyou 2138	77	内香 75308 Neixiang 75308	111	红瑞一号 Hongrui 1
10	内 2 优 3 号 Nei2you 3	44	蓉优 8211 Rongyou 8211	78	冈优 662 Gangyou 662	112	Y 两优 2 号 Yliangyou 2
11	广优 1186 Guangyou 1186	45	千乡优 416 Qianxiangyou 416	79	成两优二号 Chengliangyou 2	113	宜香 5979 Yixiang 5979
12	内 5 优 167 Nei5you 167	46	川香优 3203 Chuanxiangyou 3203	80	中优 891 Zhongyou 891	114	宜优 1016 Yiyou 1016
13	宜香优 7808 Yixiangyou 7808	47	Y 两优 9988 Yliangyou 9988	81	宜香 5577 Yixiang 5577	115	内优 3016 Neiyou 3016
14	绵 5 优 662 Mian5you 662	48	Y 两优 342 Yliangyou 342	82	中优 808 Zhongyou 808	116	宜香 99E-4 Yixiang 99E-4
15	宜香 3728 Yixiang 3728	49	隆两优 340 Longliangyou 340	83	川香优 69 Chuanxiangyou 69	117	陵优 2 号 Lingyou 2
16	中优 17 Zhongyou 17	50	隆两优 6 号 Longliangyou 6	84	两优 1186 Liangyou 1186	118	两优 688 Liangyou 688
17	新优 818 Xinyou 818	51	奥龙优 8866 Aolongyou 8866	85	内优 2016 Neiyou2 016	119	奥两优 1 号 Aoliangyou 1
18	中浙优 8 号 Zhongzheyou 8	52	金稻 7 号 Jingdao 7	86	宜香 318 Yixiang 318	120	金优 894 Jinyou 894
19	内优 5022 Neiyou 5022	53	内 5 优 317 Nei5you 317	87	II 优 536 Ilyou 536	121	天龙优 472 Tianlongyou 472
20	成乐 5066 Chengle 5066	54	赣优明占 Ganyoumingzhan	88	B6 优 4761 B6you 4761	122	天龙优 272 Tianlongyou 272
21	两优 7213 Liangyou 7213	55	两优 1188 Liangyou 1188	89	T 优 300 T-you 300	123	内香 5A/制 4 Neixiang5A/zhi4
22	宜优 115 Yiyou 115	56	川谷优 399 Chuangyou 399	90	中优 169 Zhongyou 169	124	内香 6A/制 2 Neixiang6A/zhi 2
23	XF 优 2399 XFyou 2399	57	川农优 549 Chuannongyou 549	91	两优 816 Liangyou 816	125	泸优香占 Luyouxianzhan
24	26A 成恢 177 26Achenghui177	58	腾优 527 Tengyou 527	92	红优 88 Hongyou 88	126	泸优 868 Luyou 868

续表 5

Continuing table 5

编号 Code	品种名称 Name	编号 Code	品种名称 Name	编号 Code	品种名称 Name	编号 Code	品种名称 Name
25	奥富优 1199 Aofuyou 1199	59	云两优 209 Yunliangyou 209	93	II 优 6078 II you 6078	127	保粳杂 2 号 Baojingza 2
26	II 优 1127 II you 1127	60	江优 381 Hongyou 381	94	泸优 578 Luyou578	128	滇杂 701 Dianza 701
27	特优 586 Teyou 586	61	花香 7 号 Huaxiang 7	95	圣丰优 819 Shefengyou819	129	两优 5519 Liangyou 5519
28	内 5 优 8015 Nei5you 8015	62	汕优联合 2 号 Shanyoulianhe 2	96	皖稻 131 Wandao 131	130	滇杂 42 Dianza 42
29	中优 727 Zhongyou 727	63	珍优 17 Zhenyou 17	97	滇优 37 Dianyou 37	131	滇杂 43 Dianza 43
30	宣优 039 Yiyou 039	64	花香 926 Huaxiang 926	98	滇优 38 Dianyou 38	132	滇杂 44 Dianza 44
31	冈优 550 Gangyou 550	65	金香 6 号 Jinxiang 6	99	宜香 2516 Yixiang 2516	133	滇杂 47 Dianza 47
32	II 优 3301 II you 3301	66	友稻 5 号 Youdao 5	100	奇丰优 518 Qifengyou 518	134	滇杂 49 Dianza 49
33	K 优 8602 Kyou 8602	67	德优 4727 Deyou 4727	101	宜香 37 Yixiang 37		
34	内优 15 Neiyou 15	68	抗丰优 7329 Kangfengyou 7329	102	2002-11		

其中, n 表示供试的 SSR 引物总数, m 表示同一品种中待测模板总数(本实验中 $m=5$), V_i 表示第 i 对引物检测到差异位点的模板总数($0 \leq V_i \leq m$)。

多态性信息含量(polymorphism information content, PIC)按照 Smith 等(1997)描述公式计算。该参数是衡量微卫星片段多态性的指标。其计算公式为:

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

式中, n 为所分析的某个微卫星标记在水稻品种中检测到的多态性片段总数, p_i 为第 i 个等位基因出现的频率。

利用 POPGENE32 软件计算 Shannon 多样性指数(Shannon, 1948) (Shannon's Information index), 等位基因频率(Alele Frequency), 有效等位基因数(Kimura and Crow, 1964) (Effective number of alleles)。同时, 应用软件 NTSYSpc2.10 处理数据, 利用 DICE 参数计算水稻品种间的遗传相似系数(Genetic similarity, GS), 并按非加权平均数(unweighted pair group method, UPGMA)进行聚类分析, 构建 134 个水稻新品种的聚类图。

作者贡献

吴毅歆是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 论

文写作与修改; 刘春明是本实验研究的执行人, 负责分子标记实验, 参与实验数据整理与分析, 论文写作与修改, 与第一作者同等贡献; 李学进参与样品的采集, 实验设计; 何月秋、毛自朝是项目的构思者, 参与实验设计, 试验结果分析和论文修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由农业部公益性行业(农业)科研专项(201203014)资助。作者感谢中国水稻研究所庄杰云老师在实验数据统计以及云南农业大学郭力维、尹海霞、张照然同学在实验数据获得过程中提供帮助。

参考文献

- Akagi H., Yokozeki Y., Inagaki A., and Fujimura T., 1997, Highly polymorphic microsatellites of rice consist of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci, *Theor. Appl. Genet.*, 94(1): 61-67 <http://dx.doi.org/10.1007/s001220050382> PMID:19352746
- Cong X.H., Li L., Teng B., Liu H.Z., Ni D.H., Lu X.Z., Song F.S., and Yang J.B., 2010, Establishment of SSR fingerprint map and analysis of genetic similarity among 56 backbone parental lines in hybrid rice, *Shengwuxue Zazhi (Journal of Biology)*, 27(1): 87-91 (从夕汉, 李莉, 滕斌, 刘海珍, 倪大虎, 陆徐忠, 宋丰顺, 杨剑波, 2010, 56个杂交水稻骨干亲本SSR指纹图谱的构建及遗传相似性分析, *生物学杂志*, 27(1): 87-91)
- 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., Shi Y.F., Shen W.F., Zhuang J.Y., and Yang S.H., 2007, Microsatellite marker-based analysis of rice varieties in national regional yield trial of Southern China, *Zhongguo Shuidao Kexue (Chinese Journal of Rice Science)*, 21(1): 7-12 (程本义, 施勇烽, 沈伟峰, 庄杰云, 杨仕华, 2007, 南方稻区国家水稻区域试验品种的微卫星标记分析, *中国水稻科学*, 21(1): 7-12)
- Fan Y.Y., Zhuang J.Y., Wu J.L., Sun B.L., and Zheng K.L., 2000, SSLP-based Identification of Subspecies in Rice (*Oryza sativa* L.), *Yichuan (Hereditas (Beijing))*, 22(6): 392-394 (樊叶杨, 庄杰云, 吴建利, 孙宝龙, 郑康乐, 2000, 应用微卫星标记鉴别水稻籼粳亚种, *遗传*, 22(6): 392-394)
- 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)
- Kimura, M. and Crow J.F., 1964, The number of alleles that can be maintained in a finite population, *Genetics*, 49: 725-738
- Liu C.G. and Zhang G.Q., 2010, SSR analysis of genetic diversity and the temporal trends of major commercial inbred Indica rice cultivars in South China in 1949-2005, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 36(11): 1843-1852 (刘传光, 张桂权, 2010, 用SSR标记分析 1949-2005 年华南地区常规籼稻主栽品种遗传多样性及变化趋势, *作物学报*, 36(11): 1843-1852)
- Murray, M.G. and Thompson W.F., 1980, Rapid isolation of high molecular weight plant DNA, *Nucleic Acids Res.*, 8(19):4321-4325 <http://dx.doi.org/10.1093/nar/8.19.4321> PMID: 7433111 PMCID: 324241
- Shannon C.E., 1948, A mathematical theory of communication, *The Bell System Technical Journal*, 27: 379-423, 623-656
- She H.D., Chen J.T., Huang Y.Q., Zhu L.Y., and Chi S.M., 2003, Progress on variety identification of crop using DNA fingerprinting, *Hebei Nongye Daxue Xuebao (Journal of Agricultural University of Hebei)*, 26(S): 28-30 (余花娣, 陈景堂, 黄亚群, 祝丽英, 池书敏, 2003, 利用DNA指纹图谱进行农作物品种鉴定的研究进展, *河北农业大学学报*, 26(S): 28-30)
- 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)
- Smith, J.S.C., Chin E.C.L., Shu H., Smith O.S., Wall S.J., Senior M.L., Mitchell S.E., Kresovich S., and Ziegler J., 1997, An evaluation of the utility of SSR loci as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparisons with data from RFLPS and pedigree, *Theor. Appl. Genet.*, 95: 163-173, <http://dx.doi.org/10.1007/s001220050544>
- Tan Z.D., Yu X.Q., Gao J.Q., and Chen N.G., 2006, The application on testing the seeds purity of hybrid rice by SSR, *Zhongzi (seed)*, 25(4): 27-29 (谭智丹, 余显权, 高健强, 陈能刚, 2006, 利用SSR鉴定杂交水稻种子纯度的研究, *种子*, 25(4): 27-29)
- Xiao X.Y., Wang Y.P., Zhang J.Y., Li S.G., and Rong T.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)
- Ying J.Z., Shi Y.F., Zhuang J.Y., and Xue Q.Z., 2007, Microsatellite marker evaluation on genetic diversity of the major commercial rice varieties in China, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 40(4): 649-654 (应杰政, 施勇烽, 庄杰云, 薛庆中, 2007, 用微卫星标记评估中国水稻主栽品种的遗传多样性, *中国农业科学*, 40(4): 649-654)
- 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, *Zhongguo Shuidao Kexue (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)