

辽宁省近15年的部分水稻主栽品种的简单重复序列(SSR)多态性分析

姜树坤, 王政海, 钟鸣*, 张丽, 徐正进, 刘少霞

沈阳农业大学辽宁省农业生物技术重点实验室, 辽宁省北方粳稻育种重点实验室, 沈阳 110161

摘要: 应用简单重复序列(SSR)标记方法对辽宁省近15年的14个大面积种植的水稻品种进行遗传多样性分析的结果表明, 17对引物共产生43个位点, 其中多态性位点17个, 平均每对SSR引物检测到2.53个, 占位点总数的39.53%。用Nei's公式计算水稻品种间的遗传距离, 并以算术平均非加权聚类(UPGMA)法进行聚类分析并结合系谱分析结果表明, 辽宁省近15年的水稻主栽品种遗传多样性不够丰富, 多数品种间的亲缘关系较近, 欲进一步提高产量还需拓宽遗传基础。

关键词: 水稻; 遗传多样性; SSR标记

Simple Sequence Repeat (SSR) Analysis of Main Rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars in Liaoning Province in the Last 15 Years

JIANG Shu-Kun, WANG Zheng-Hai, ZHONG Ming*, ZHANG Li, XU Zheng-Jin, LIU Shao-Xia

Key Laboratory of Agricultural Biotechnology of Liaoning Province, Key Laboratory of Rice Breeding of Liaoning Province, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China

Abstract: The present study used simple sequence repeat (SSR) markers to reveal the genetic diversity of the 14 extensive rice (*Oryza sativa*) cultivars of Liaoning province in the last 15 years. 17 markers detected 43 alleles with averaged 2.53 alleles per SSR locus. Based on the pair wise comparisons of amplification products the genetic distance was calculated using Nei's genetic distance and a dendrogram was constructed using an unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA). It was concluded that the genetic background was vulnerable among rice in Liaoning province.

Key words: rice (*Oryza sativa*); genetic diversity; SSR markers

20世纪80年代以来, 我国北方尤其是辽宁省水稻单产达到7 500~9 000 kg·hm⁻², 跃居世界先进水平。如何在较高产量基础上进一步提高产量, 达到超高产水平, 已成为稻作科研与生产的重要课题(陈温福等2003)。用简单重复序列(simple sequence repeat, SSR)标记技术对过去近15年的主栽品种进行遗传多样性分析, 将为实现超高产这一目标提供理论依据。SSR标记又称为微卫星(microsatellite)标记, 是近年来广泛应用的DNA标记, 因具有稳定、简便、多态性丰富、高度杂合性以及重组率低等优点, 而应用于遗传图谱构建、种质鉴定、亲缘关系、资源多样性分析等研究领域(朱作峰等2001; 黄青阳等1999; Akagi等1996a, b; 熊立仲等1998; 樊叶杨等2000; Zhang等1996; 潘爱虎等2005)。本文就此问题作了一些探讨。

材料与amp;方法

实验所用的水稻材料有水稻(*Oryza sativa* L.)

‘丰锦’、‘秋光’、‘辽粳454’、‘辽粳5’、‘辽粳263’、‘辽粳294’、‘辽粳9’、‘沈农606’、‘沈农9741’、‘沈农0266’、‘沈农265’、‘辽粳326’、‘辽盐16’、‘辽粳944’(表1)由本校稻作研究室提供。

水稻幼苗DNA的提取采用CTAB法(钟鸣等2002)。

随机选取17对SSR引物(表2)进行SSR分析。PCR反应体系为25 μL, 含10×缓冲液2.5 μL、1.5 mmol·L⁻¹ MgCl₂、1 mmol·L⁻¹ 正向引物和反向引物、10 mmol·L⁻¹ dNTPs、1 U Taq酶、15 ng DNA、ddH₂O 16.25 μL。用美国MJ Research公司的PTC-200进行扩增, 反应程序为94 °C预变

收稿 2006-10-23 修定 2006-12-11

资助 辽宁省重点实验室专项资金计划项目和辽宁省博士启动基金(2001102061)。

*通讯作者(E-mail: zhming@syau.edu.cn; Tel: 024-88487164)。

表1 部分实验所用的水稻材料及其系谱

Table 1 List of rice materials used in the experiment

品种	系谱
‘辽粳5’	[(‘矮脚南特’/‘Bata’/‘藤坂5号’)/(‘矮脚南特’/‘Bata’/‘越路早生’)/‘沈苏6号’]/‘丰锦’
‘辽粳9’	‘辽粳294’/‘辽粳454’
‘辽粳454’	‘辽粳326’/‘84-240’
‘辽粳294’	‘79-227’/‘辽粳326’
‘辽粳944’	‘辽粳294-4’
‘沈农265’	‘1308’/‘02428’/‘辽粳326’
‘沈农606’	‘辽粳326’/‘265-11’
‘辽粳326’	[(‘C26’/‘丰锦’/‘银河’)/(‘黎明’/‘福锦’/‘C31’//‘Pi5’)]/‘辽粳5’
‘沈农9741’	‘沈农159’(‘黄金光’/‘辽粳5’)/‘沈农1033’(‘福锦’/‘千重浪’)

表2 实验所用的引物

Table 2 List of primers used in the experiment

引物名称	引物序列	退火温度/°C	染色体
RM13	正向: 5' TCCAACATGGCAAGAGAGAG 3' 反向: 5' GGTGGCATTTCGATTCCAG 3'	57.5	5
RM141	正向: 5' CACCACCACCACCACGCCTCTC 3' 反向: 5' TCTTGGAGAGGAGGAGGCGCGG 3'	57.9	6
RM142	正向: 5' CTCGCTATCGCCATCGCCATCG 3' 反向: 5' TCGAGCCATCGCTGGATGGAGG 3'	65.7	4
RM16	正向: 5' CGCTAGGGCAGCATCTAAA 3' 反向: 5' AACACAGCAGGTACGCGC 3'	57.6	3
RM18	正向: 5' TTCCCTCTCATGAGCTCCAT 3' 反向: 5' GAGTGCCTGGCGCTGTAC 3'	57.8	7
RM20	正向: 5' ATCTTGTCCTGCAGGTCAT 3' 反向: 5' GAAACAGAGGCACATTTTCATTG 3'	56.3	12
RM202	正向: 5' CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC 3' 反向: 5' CCAGCAAGCATGTCAATGTA 3'	55.8	11
RM226	正向: 5' AGCTAAGGTCTGGGAGAAACC 3' 反向: 5' AAGTAGGATGGGGCACAAGCTC 3'	60	4
RM228	正向: 5' CTGGCCATTAGTCCTTGG 3' 反向: 5' GCTTGGGCTCTGCTTAC 3'	57.3	10
RM23	正向: 5' CATTGGAGTGGAGGCTGG 3' 反向: 5' GTCAGGCTTCTGCCATTCTC 3'	59.9	1
RM234	正向: 5' ACAGTATCCAAGGCCCTGG 3' 反向: 5' CACGTGAGACAAAAGACGGAG 3'	59.7	7
RM240	正向: 5' CCTTAATGGGTAGTGTGCAC 3' 反向: 5' TGTAACCATTCCCTCCATCC 3'	57.8	2
RM241	正向: 5' GAGCCAATAAAGATCGCTGA 3' 反向: 5' TGCAAGCAGCAGATTTAGTG 3'	55.8	4
RM242	正向: 5' GGCCAACGTGTGTATGTCTC 3' 反向: 5' TATATGCCAAGACGGATGGG 3'	59.9	9
RM250	正向: 5' GGTTCAAACCAAGCTGATCA 3' 反向: 5' GATGAAGGCCTTCCACGCAG 3'	61.9	2
RM4	正向: 5' ACACCAGGCTACCCAAACTC 3' 反向: 5' CGGAGAGATCTGACATGTGG 3'	58.6	12
RM50	正向: 5' ACTGTACCGGTCGAAGACG 3' 反向: 5' AAATCCACGTCAGCCTCC 3'	59.7	6

性5 min; 每个循环94 °C预变性1 min, 50、55或60 °C退火1 min, 72 °C延伸1 min, 35个循环; 最后72 °C延伸8 min。扩增产物经4.5%变性PAGE电泳, 银染检测(熊立仲等1998; 樊叶杨等2000; Zhang等1996; 钟鸣等2002)。

在水稻亲缘关系分析中, 将扩增产物的每一条带视为一个形态性状, 具有多态性的带赋值为“1”, 无此带时赋值为“0”。将数据输入NTSYSpc2.1软件中, 各材料间的遗传距离按下式计算: GD (遗传距离) = $-\ln 2N_{xy} / (N_x + N_y)$ 。式中, N_{xy} 为材料 x 、 y 的公共条带数, N_x 为材料 x 的条带数, N_y 为材料 y 的条带数 (Nei 1987)。

根据所得的遗传距离, 采用算术平均非加权聚类 (unweighted pair group method with arithmetic averages, UPGMA) 法进行聚类分析 (Mackill 1995),

并通过NTSYSpc2.1软件绘制树状图。

实验结果

1 水稻品种的SSR多态性分析

用17对引物对14份材料进行扩增, 共产生43个等位基因, 平均每对SSR引物检测到2.53个等位基因。每个SSR位点可检测到的等位基因数目为2~6个不等。大小范围主要在180~280 bp之间, 其中多态性位点17个, 占总数的39.53%。引物RM20共扩增出6个位点, 其中5个位点具有多态性 (图1)。

2 聚类分析

由Nei's标准遗传距离计算相似系数, 并利用聚类分析NTSYSpc2.1软件聚类处理, 对14个品种进行聚类分析。从聚类图中可以看出, 14个栽

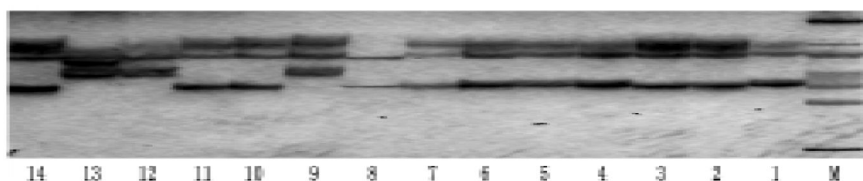


图1 引物RM20的SSR扩增

Fig.1 The SSR profiles of RM20

M: DNA 分子量标准; 1: '丰锦'; 2: '辽粳326'; 3: '辽盐16'; 4: '辽粳944'; 5: '辽粳454'; 6: '辽粳5'; 7: '辽粳263'; 8: '辽粳294'; 9: '辽粳9'; 10: '沈农606'; 11: '沈农9741'; 12: '秋光'; 13: '沈农0266'; 14: '沈农265'。

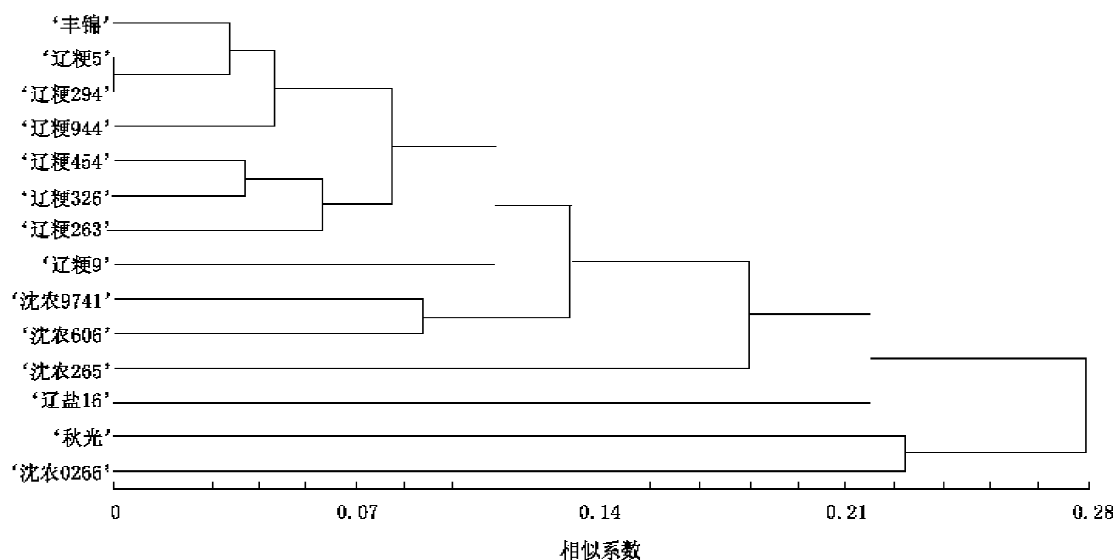


图2 14个水稻品种的相似性树状图

Fig.2 Dendrogram of similarity for 14 materials of rice

培稻品种在遗传距离为0.27处便可聚为一类, 大多数品种间的遗传距离不超过0.2。遗传距离小于0.2的品种都有一定的‘丰锦’血缘, 有近一半以‘辽粳5’为亲本。上世纪50~70年代, 日本品种在辽宁省稻区占主导地位, 主要有‘农林1号’、‘陆羽132’、‘三好’、‘日本海’、‘黎明’、‘丰锦’、‘秀岭’、‘秋光’等。虽然从1981年第1个直立穗型品种‘辽粳5’通过辽宁省农作物品种审定委员会审定后辽宁省已经基本结束种植从日本引进的水稻品种, 但目前主栽品种仍有一定的日本水稻品种血缘。要想进一步提高产量, 扩大遗传基础是必须的(王伯伦等2002; 邱福林等2001)。

讨 论

无论是常规育种还是杂交稻育种, 拓宽亲本的遗传基础都是最基本的策略。但目前不仅是辽宁, 甚至是全国范围都存在主栽品种遗传基础不够广泛的现象。其原因一方面可能是育种过程中亲本来源狭窄, 辽宁省多数品种以‘辽粳5’及其衍生系为亲本, 这就要求我们进一步将野生稻、杂草稻等材料中的有利基因导入栽培稻; 另一方面水稻育种的强大选择压力使得品种的大部分稀有变异类型在改良过程中丢失。从本文聚类分析的结果可以看出, 辽宁省主栽水稻品种遗传背景比较单一, 大部分材料间的遗传距离较小, 这就大大限制了辽宁省水稻产量的进一步提高, 这提示我们在今后的工作中, 如果以这些品种作为育种材料, 必须加大力度进一步丰富遗传基础并引进新的有利基因以提高产量。

用分子标记辅助育种及用分子标记评价遗传资源多样性是当今作物分子育种的热点之一, 然而选择何种分子标记是值得探讨的问题。我们曾利用随机扩增多态性DNA (random amplified polymorphic DNA, RAPD) 标记方法对30个水稻栽培品种进行过遗传多样性研究, 其多态性位点的比率为70.6%, 高于本文的39.53%, 表明在检测亲缘

关系较近的材料时, SSR比RAPD有检测位点不够丰富的缺点(姜树坤等2006)。但SSR标记具有RAPD技术快速、直接简便的特点, 又有限制性片段长度多态性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)技术结果稳定可靠、重复性好的优点, 究竟选择哪种标记应因事制宜。

参考文献

- 陈温福, 徐正进, 张龙步(2003). 水稻超高产育种生理基础. 沈阳: 辽宁科技出版社, 24~32
- 樊叶杨, 庄杰云, 吴建利(2000). 应用微卫星标记鉴别水稻粳籼亚种. 遗传, 22(6): 392~394
- 黄青阳, 何予卿, 景润春(1999). 利用微卫星标记定位水稻红莲型细胞质雄性不育恢复基因. 科学通报, 44(14): 218~224
- 姜树坤, 钟鸣, 徐正进(2006). RAPD标记进行水稻粳籼分类的研究. 沈阳农业大学学报, 37(4): 639~641
- 潘爱虎, 梁婉琪, 袁勤, 曹黎明(2005). 5种杂交粳稻亲本SCAR标记的建立及其在真伪纯度鉴定中的应用. 植物生理学通讯, 41(6): 805~810
- 邱福林, 邵国军, 李跃东(2001). 辽粳326亲本组配及其系谱分析. 垦殖与稻作, 3: 3~6
- 王伯伦, 刘新安, 陈健(2002). 1949年以来辽宁省水稻发展形势的分析. 沈阳农业大学学报, 33(2): 83~86
- 熊立仲, 王石平, 刘克德(1998). 微卫星DNA和AFLP标记在水稻分子标记连锁图上的分布. 植物学报, 40(7): 456~478
- 钟鸣, 牛永春, 徐世昌, 吴立人(2002). 小麦品种 *Triticum spelta album* 中抗条锈病基因 *Yr5* 的RAPD标记. 遗传学报, 29(8): 719~724
- 朱作峰, 孙传清, 李自超(2001). 用SSR标记对水稻品种的分类研究. 农业生物技术学报, 9(1): 58~61
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A (1996a). A co-dominant DNA marker closely linked to the rice nuclear restorer gene, *Rf-1*, identified with inter-SSR fingerprinting. *Genome*, 39: 1205~1209
- Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, Fujimura T (1996b). Microsatellite DNA markers for rice chromosomes. *Theor Appl Genet*, 93: 1071~1077
- Mackill DJ (1995). Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci*, 35: 889~894
- Nei M (1987). *Molecular Evolutionary Genetics*. New York: Columbia University Press, 190~191
- Zhang Q, Zhou ZQ, Yang GP, Xu CG, Liu KD, Saghai Maroof MA (1996). Molecular marker heterozygosity and hybrid performance in indica and japonica rice. *Theor Appl Genet*, 93(8): 1218~1224