

甬优系列杂交水稻 SSR 标记指纹图谱和籼粳属性

陆永法^{1, #} 马荣荣^{1, #} 王晓燕² 李信年¹ 周华成¹ 章志远² 华国来¹

(¹宁波市农业科学研究院 作物研究所, 浙江 宁波 315040; E-mail: luyongfa2002@yahoo.com.cn; ²宁波市种子公司, 浙江 宁波 315012;

共同第一作者)

SSLP Based SSR Fingerprinting and indica/japonica Classification of Yongyou Series Hybrid Rice

LU Yong fa^{1, #}, MA Rong rong^{1, #}, WANG Xiao yan², LI Xin nian¹, ZHOU Hua cheng¹, ZHANG Zhi yuan², HUA Guo lai¹

(¹Crop Research Institute, Ningbo Academy of Agricultural Sciences, Ningbo 315040, China; E-mail: luyongfa2002@yahoo.com.cn;

²Ningbo Seed Company, Ningbo 315012, China; * These authors contributed equally to this paper)

Abstract: Three standard indica test varieties, three standard japonica test varieties and other thirteen rice accessions, which are Yongyou series hybrid rice combinations and their parents, were analyzed by using 22 simple sequence repeat (SSR) primer pairs. Totally 87 alleles were detected. These primers revealed polymorphism with a range of 2 - 8 alleles per primer pair. Fingerprints of Yongyou series hybrid rice combinations and their parents were set up. The cluster analysis showed that the tested materials were grouped into two clusters in accordance with the indica/japonica classification based on the Cheng's index. It was confirmed that Yongyou 4 and Yongyou 6 are inter subspecific hybrid rice combinations between indica and japonica at molecular levels.

Key words: hybrid rice; simple sequence repeat (SSR); fingerprinting; indica/japonica classification

摘要: 用 22 个 SSR 分子标记对 13 份甬优系列杂交水稻组合及其亲本材料和 6 份籼粳对照种进行分析, 共获得 87 个等位基因, 每对引物扩增的等位基因数为 2~8 个。所有供试材料间均检测到了差异, 从而建立起甬优 1 号~甬优 6 号杂交水稻组合及其亲本的 DNA 指纹图谱。聚类分析结果表明, 9 份供试材料与 3 份粳稻对照种聚于一类, 属粳稻; 4 份供试材料与籼稻对照种 IR36 聚于一类, 属籼稻。这与形态分类结果基本一致。从分子水平确认了杂交水稻甬优 6 号和甬优 4 号为籼粳亚种间杂交稻。

关键词: 杂交水稻; 微卫星标记; 指纹图谱; 籼粳分类

中图分类号: Q943; S511.03

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2007)04-0443-04

分子标记技术近年得到了迅速发展。DNA 标记以其高度的品种特异性和环境稳定性, 以及检测快速、结果准确等优点, 已在水稻的品种鉴定、纯度检验、遗传分析和辅助选育等方面建立了作业程序, 并得到初步的应用^[1-4], 为从事传统水稻育种的研究工作者将分子标记纳入常规育种奠定了基础。

近年来, 宁波市农业科学研究院作物研究所和宁波市种子公司先后选育出了甬优系列杂交水稻组合(甬优 1 号~甬优 6 号)^[5], 并且选育出了一批苗头组合及其亲本。本研究运用水稻 SSR 标记对甬优系列杂交水稻组合及其亲本进行了鉴定, 根据检测到的 SSLP(简单序列长度多态性)建立了这些组合及其亲本的分子标记指纹图谱, 以期对杂交水稻及其亲本的分子鉴别和纯度鉴定提供基础。同时利用聚类分析方法, 分析了这些杂交水稻组合及其亲本的遗传关系和籼粳属性。

1 材料与amp;方法

1.1 供试水稻材料

供试水稻材料 13 份(表 1), 均为宁波市农业科学研究院作物研究所和宁波市种子公司育成的三系材料和杂交水稻组合, 其中杂交粳稻甬优 2 号材料未列, 其不育系甬粳 2 号 A 和恢复系 K1722 分别是表 1 中的序号 7 和序号 1。另加籼

稻对照种 3 份即南特号、南京 11 和 IR36, 分别用 I1、I2、I3 表示, 粳稻对照种 3 份即有芒早粳、巴里拉、秋光, 分别用 J1、J2、J3 表示。

1.2 程氏指数计算

参照文献[6]进行程氏指数计算。

1.3 DNA 提取

DNA 提取参照文献[7]方法进行。

1.4 SSR 标记及 PCR

采用庄杰云等^[8]推荐的 24 个 SSR 标记作为水稻品种鉴别标记, 这些标记分布于水稻的所有 12 条染色体。SSR 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

10 μL 的 PCR 反应体系中包括 1.0 μL (约 20 ng) 的模板 DNA, 1.5 mmol/L Mg²⁺, 0.36 μmol/L 引物, 0.2 mmol/L dNTPs, 5 × SSR buffer 2.0 μL 和 0.5 U Taq DNA 聚合酶。反应在 PTC-200 Thermal Cycler (MJ Research) 上进行。扩增条件为 94 °C 下预变性 45 s; 94 °C 下 45 s, 55 °C 下 45 s, 72 °C 下 1 min, 30 个循环; 最后 72 °C 下延伸 8 min。

收稿日期: 2006-09-27; 修改稿收到日期: 2007-04-13。

基金项目: 浙江省重大科技攻关项目(2004C12020-15); 宁波市重大攻关项目(2004C100087)。

第一作者简介: 陆永法(1963-), 男, 高级农艺师; 马荣荣(1960-), 男, 农艺师。

表 1 用于 SSR 标记检测的杂交水稻组合及其亲本

Table 1 .Rice materials used for SSR analysis .

序号 No .	材料名称 Material name	程氏指数 Cheng s index	籼粳分类 indica/japonica classification	材料类型 Type
1	K1722	22	粳 japonica	恢复系 Restorer line
2	K1863	20	粳 japonica	恢复系 Restorer line
3	K2001	9	偏籼 indicaclinous	恢复系 Restorer line
4	K4853	19	粳糯 japonica(glutinous)	恢复系 Restorer line
5	K4806	10	偏籼 indicaclinous	恢复系 Restorer line
6	甬糯 2 号 A Yongnuo 2A	20	粳糯 japonica(glutinous)	不育系 CMS line
7	甬粳 2 号 A Yongjing 2A	21	粳 japonica	不育系 CMS line
8	宁 67A Ning 67A	21	粳 japonica	不育系 CMS line
9	甬优 1 号 Yongyou 1	22	粳 japonica	杂交组合 Hybrid rice
10	甬优 3 号 Yongyou 3	22	粳 japonica	杂交组合 Hybrid rice
11	甬优 4 号 Yongyou 4	13	偏籼 indicaclinous	杂交组合 Hybrid rice
12	甬优 5 号 Yongyou 5	22	粳糯 japonica(glutinous)	杂交组合 Hybrid rice
13	甬优 6 号 Yongyou 6	13	偏籼 indicaclinous	杂交组合 Hybrid rice

注 :杂交粳稻甬优 2 号材料未列 ,其组合为甬粳 2 号 A/K1722。甬优 1 号、甬优 3 号、甬优 4 号、甬优 5 号和甬优 6 号的组合分别为宁 67A/K1722、甬粳 2 号 A/K1863、甬粳 2 号 A/K2001、甬糯 2 号 A/K4853 和甬粳 2 号 A/K4806。甬粳 2 号 A 原名为宁 2A。

Note : japonica hybrid rice Yongyou 2 is not listed ,its combination is Yongjing 2A /K1722 . Yongyou 1 , Yongyou 3 , Yongyou 4 , Yongyou 5 and Yongyou 6 are hybrid rice combinations from Ning 67A/K1722 , Yongjing 2A/K1863 , Yongjing 2A/K2001 , Yongnuo 2A/K4853 , and Yongjing 2A/K4806 , respectively . Original name of Yongjing 2A is Ning 2A .

1.5 电泳检测和数据分析

扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离。分子量标记为 100 bp DNA Ladder Plus (MBI)。按照施勇烽等^[4]介绍的方法银染观察 ,在扫描仪上扫描记录。

根据每个 SSR 座位上某一等位基因的存在分别赋值 1 和 0 ,计算材料间的相似系数 ;应用非加权平均数 (UPGMA) 进行聚类分析 ,通过 NTSYS 程序运算。

2 结果与分析

2.1 供试材料的形态分类

根据程氏指数法^[6]对供试材料进行了形态分类(表 1)。其中有 9 份材料属于粳型 ,有 4 份材料属于偏籼。

2.2 标记的多态性及对供试材料的差异检测能力

除 RM5414 和 RM71 因数据不全未予统计外 ,22 对 SSR 引物均扩增出条带 ,共扩增出等位基因 87 个 ,每对引物可扩增的等位基因数目为 2~8 个 ,平均为 4 个(表 2)。

鉴于这 22 个标记在所有供试材料间均检测到了差异 ,说明这 22 个标记对品种差异的鉴别能力很强。

2.3 甬优系列杂交水稻亲本间具有多态性的引物

本研究筛选到的对甬优 1 号~甬优 6 号的亲本具有多态性的引物见表 3 ,可以据此对杂交稻进行扩增以鉴定混有不育系、保持系或恢复系的杂交稻种子。其中杂交粳稻甬优 1 号、甬优 2 号、甬优 3 号和杂交粳糯稻甬优 5 号具有多态性引物仅 7~10 个 ,占供试引物的 31.8%~45.5% ,而杂交水稻甬优 4 号、甬优 6 号各有 17 个引物在亲本间具有多态性 ,占 77.3%。表明后两组合亲本的遗传距离远 ,遗传差异大。

2.4 遗传相似性

供试材料的相似性系数范围在 0.05~0.88(数据未列)。相似性系数与供试材料亲缘关系的吻合度高。两个籼稻对照种南特号和南京 11 与其他材料相似度差 ,在 0.05~0.36 ,

而另一个籼稻对照种 IR36 与其他材料的相似性系数在 0.09~0.59 ,这是由于供试材料恢复系的恢复基因多由 IR 系统品种导入 ,其中有来自 IR36 的血统。相似性系数大小与供

表 2 供试材料经不同 SSR 引物扩增的等位基因数目及分子量
Table 2 Alleles and their molecular weight of tested rice materials amplified by SSR primers .

引物 Primer	染色体 Chromosome	等位基因数目 No . of alleles	分子量 Molecular weight/bp
RM297	1	5	140~190
RM232	3	4	150~170
RM273	4	3	200~210
RM267	5	2	150~170
RM190	6	3	110~120
RM336	7	6	150~190
RM72	8	8	160~200
RM219	9	6	200~250
RM258	10	4	130~150
RM209	11	3	130~170
RM17	12	3	170~190
RM1195	1	3	120~150
RM208	2	4	170~180
RM85	3	3	80~100
RM274	5	2	150~160
RM253	6	5	145~155
RM18	7	5	150~165
RM337	8	5	160~190
RM278	9	3	130~140
RM311	10	4	290~300
RM224	11	3	120~170
RM19	12	3	210~250
合计 Total		87	

表 3 甬优系列杂交水稻组合亲本间具有多态性的 SSR 标记

Table 3. Polymorphic SSR primers for parents of Yongyou series hybrid rice combinations.

杂交组合 Combination	多态性 SSR 标记 Polymorphic SSR primer
甬优 1 号 Yongyou 1	RM232, RM190, RM72, RM1195, RM253, RM18, RM224
甬优 2 号 Yongyou 2	RM232, RM219, RM209, RM1195, RM208, RM253, RM18, RM224, RM190, RM311
甬优 3 号 Yongyou 3	RM232, RM72, RM219, RM209, RM208, RM18, RM19
甬优 4 号 Yongyou 4	RM297, RM232, RM273, RM267, RM190, RM336, RM72, RM258, RM209, RM1195, RM85, RM253, RM18, RM337, RM278, RM224, RM19
甬优 5 号 Yongyou 5	RM72, RM219, RM1195, RM208, RM18, RM337, RM278, RM224, RM19
甬优 6 号 Yongyou 6	RM297, RM232, RM273, RM267, RM190, RM336, RM72, RM219, RM258, RM1195, RM85, RM253, RM18, RM337, RM278, RM224, RM19

试材料籼粳属性有关,在粳大类内材料间相似度高,相似性系数在 0.36~0.88,在籼大类内材料间相似度低,相似性系数在 0.18~0.73,在籼粳材料间相似度更低,相似性系数在 0.05~0.72。在供试的杂交稻亲本中,粳稻材料间的相似性系数在 0.58~0.82,偏籼材料 K2001 与 K4806 间的相似系数为 0.64,而粳稻与偏籼材料间的相似系数则为 0.14~0.36,相似度低。作为杂交水稻配组的亲本,甬优 1 号的亲本间相似系数为 0.68,甬优 2 号为 0.59,甬优 3 号为 0.68,甬优 5 号为 0.58,这些杂交粳稻的亲本间相似系数在 0.58~0.68;而籼粳亚种间杂交水稻甬优 4 号的亲本间相似系数为 0.18,甬优 6 号的亲本间相似系数为 0.27,亲本间的遗传距离远。

2.5 聚类分析

对 SSR 扩增结果的聚类分析表明,籼稻对照种南特号 (I1) 和南京 11 (I2) 与供试其他材料距离远,单独聚于一类,其他材料在相似性系数 0.36 处明显分为两个类群,9 份程氏指数分类为粳稻的材料与 3 份粳稻对照种聚于一个类群,4 份程氏指数分类为偏籼的材料与籼稻对照种 IR36 (I3) 聚于一个类群,表明 SSR 聚类与亲缘关系和籼粳分类相关,结合

供试材料的亲缘关系分析可用于籼粳分类。在本研究中,可认定与粳稻对照种聚于一个类群的材料为粳稻,而与籼稻对照种 IR36 聚于一类的为籼稻,分类结果与形态分类结果是相符的。其中杂交水稻甬优 4 号和甬优 6 号的母本甬梗 2 号聚类为粳,父本 K2001 和 K4806 聚类为籼,从而从分子水平证明甬优 4 号和甬优 6 号属于籼粳亚种间杂交水稻 (图 1)。3 个粳稻对照种都聚于一个类群,而 3 个籼稻对照种分别聚于两个类群,表明粳稻的遗传变异较小,而籼稻遗传变异较大。

从相似性树状图还可以看出,品种间杂交水稻与其亲本聚在同一个大类,而亚种间杂交水稻甬优 4 号和甬优 6 号的父母本分居两个不同的大类,此两组合与各自的父本虽然聚在一大类,但也有较远的遗传距离。

3 讨论

3.1 SSR 标记的品种特异性检测能力和 DNA 指纹的应用

甬优系列杂交水稻组合已经在生产上得到广泛应用,并已经获得较高的市场信誉。本研究利用 22 个适宜作品种鉴定的 SSR 分子标记,检测 13 份甬优系列杂交水稻组合及其

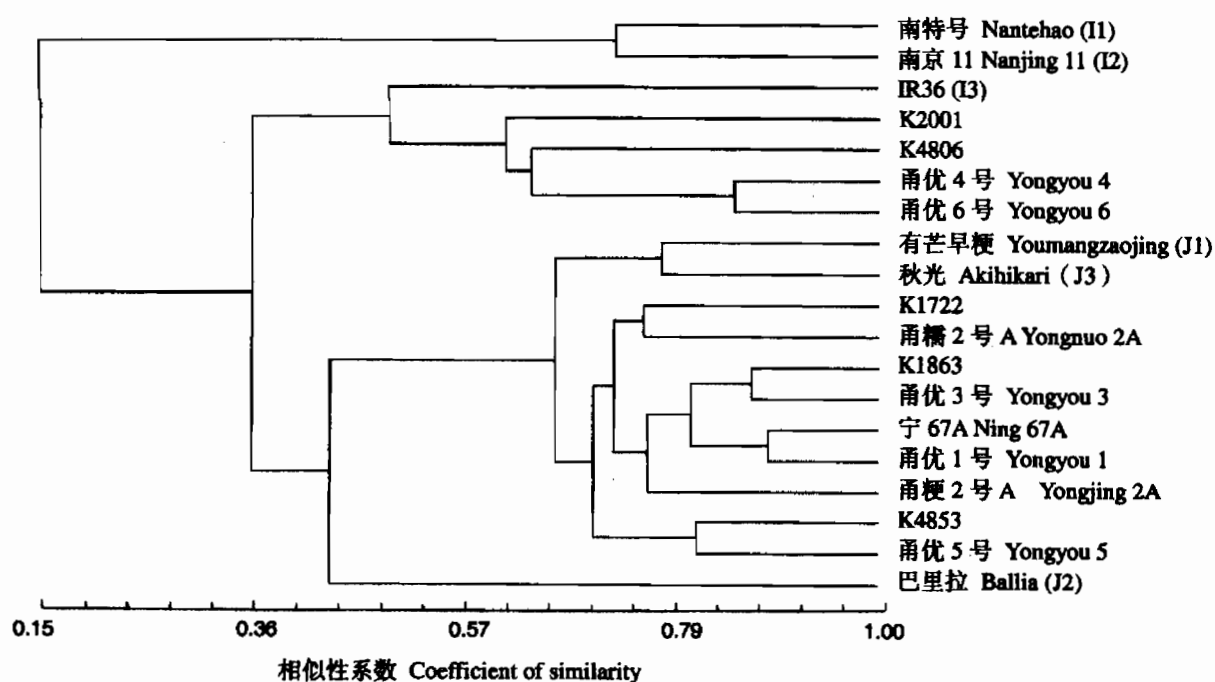


图 1 甬优系列杂交水稻及其亲本相似性树状图

Fig. 1. Dendrogram of similarity among tested rice materials according to SSR data.

I1, I2 and I3, indica check varieties; J1, J2 and J3, japonica check varieties.

亲本材料,能有效区别所有供试材料。这再一次证明了这 22 个经推荐的 SSR 标记对品种特异性检测具有较好的效果。甬优系列杂交水稻组合的 DNA 指纹图谱的建立,对于保护甬优系列杂交水稻的知识产权和保证种子质量,从而确保品牌信誉,无疑将会起重要作用。

3.2 分子标记与遗传组分分析

3.2.1 基于 SSR 聚类分析的籼粳属性分类

籼粳是亚洲栽培稻的两个亚种,其分类比较复杂。本研究运用程氏指数法确定了供试 13 份材料的籼粳属性,同时 SSR 扩增结果聚类分析结合亲缘关系分析表明供试材料分别属于籼粳,其中依据程氏指数法分类的 9 份粳稻材料与 3 份粳稻对照种聚为一个类群,依据程氏指数法分类的 4 份偏籼材料与籼稻对照种 IR36 聚为一个类群。这与本研究中的形态分类结果是吻合的。于永红等^[9]曾利用 4 个 SSR 标记对该系列中的不育系/保持系宁 2A/宁 2B 和宁 67A/宁 67B 进行了比较,发现宁 2A/宁 2B 含有籼稻的遗传成分。而本研究把甬粳 2 号 A(即宁 2A)聚类于粳稻,是根据 22 个 SSR 标记,从对基因组的覆盖程度来看,甬粳 2 号 A 的粳稻属性更为可信。

3.2.2 甬优 6 号和甬优 4 号的籼粳亚种间杂交水稻属性

SSR 标记数据聚类分析结果表明甬优 6 号和甬优 4 号的母本甬粳 2 号属于粳稻,各自的父本 K4806 和 K2001 属于籼稻,甬优 6 号和甬优 4 号是粳型不育系/籼型恢复系的籼粳亚种间杂交水稻组合。这与依据程氏指数法的分析结果是完全一致的。

对甬优 1 号~甬优 6 号的亲本具有多态性的引物进行分析,杂交粳稻甬优 1 号、甬优 2 号 A、甬优 3 号和杂交粳糯稻甬优 5 号具有多态性引物仅 7~10 个,占供试引物的 31.8%~45.5%,而杂交水稻甬优 4 号、甬优 6 号各有 17 个引物在亲本间具有多态性,占 77.3%。表明后两组合的遗传距离远,遗传差异大。另一方面,相似性系数分析表明,杂交粳(糯)稻甬优 1 号、甬优 2 号、甬优 3 号和甬优 5 号的亲本(恢复系和不育系)间相似系数在 0.58~0.68,甬优 6 号和甬优 4 号亲本(恢复系和不育系)间相似系数分别为 0.27 和 0.18,也表明这两个组合亲本的遗传距离远。这些均说明此两组合为籼粳亚种间杂交水稻。

3.3 杂种类型与杂种优势

研究表明,在供试的 6 个杂交组合中,甬优 1 号、甬优

2 号、甬优 3 号和甬优 5 号为粳型杂交稻,甬优 4 号和甬优 6 号为籼粳亚种间杂交水稻。在生产实践中,甬优 6 号和甬优 4 号的杂种优势较强,特别是甬优 6 号,茎秆高大粗壮,株型新颖,穗大粒多,在近年的高产示范和高产攻关中获得了超高产。这与前人较远的遗传距离有较强的杂种优势以及籼粳亚种间杂种优势大于品种间杂种优势的研究结果是吻合的^[10-12],证明了籼粳亚种间杂种优势利用的光明前景。

谢辞:本研究实验室部分在中国水稻研究所国家水稻改良中心完成,实验得到庄杰云博士指导,论文得到郑康乐研究员指导,NTSYS 程序运算由应杰政先生完成,谨致谢意。

参考文献:

- [1] 辛业芸,张展,熊易平,等.应用 SSR 分子标记鉴定超级杂交水稻组合及其纯度.中国水稻科学,2005,19(2):95-100.
- [2] 邱福林,庄杰云,华泽田,等.北方杂交粳稻骨干亲本遗传差异的 SSR 标记检测.中国水稻科学,2005,19(2):101-104.
- [3] 鲍根良,小林麻子,富田桂,等.粳稻近缘品种的 SSR 分析.中国水稻科学,2005,19(1):21-24.
- [4] 施勇烽,应杰政,王磊,等.鉴定水稻品种的微卫星标记筛选.中国水稻科学,2005,19(3):195-201.
- [5] 马荣荣,王晓燕,陆永法,等.甬优系列杂交水稻组合的选育和推广//杂交粳稻理论和实践.北京:中国农业出版社,2006.
- [6] 程侃声,王象坤,卢义宣,等.云南省稻种资源的综合研究与利用 IX.论亚洲栽培稻的籼粳分类.作物学报,1986,23(1):1-5.
- [7] 卢扬江,郑康乐.提取水稻 DNA 的一种简易方法.中国水稻科学,1992,6(1):47-48.
- [8] 庄杰云,施勇烽,应杰政,等.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,2006,20(5):460-468.
- [9] 于永红,李云海,马荣荣,等.用微卫星 DNA 标记建立宁 2A 的指纹图谱.中国水稻科学,2001,15(3):215-217.
- [10] 孙宗修,程式华.杂交水稻育种:从三系、两系到一系.北京:中国农业科技出版社,1994:22.
- [11] 张培江,才宏伟,袁平荣,等.RFLP 标记水稻遗传距离及其与杂种优势的关系.杂交水稻,2001,16(5):50-54.
- [12] 袁隆平.两系法杂交水稻研究的进展.中国农业科学,1990,23(3):1-6.