

# 中国主栽水稻品种微卫星标记数据库的初步构建

庄杰云<sup>1</sup> 施勇烽<sup>1</sup> 应杰政<sup>1</sup> 鄂志国<sup>1</sup> 曾瑞珍<sup>2</sup> 陈洁<sup>1,3</sup> 朱智伟<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国水稻研究所, 浙江 杭州 310006; <sup>2</sup>华南农业大学 广东省植物分子育种重点实验室, 广东 广州 510642; <sup>3</sup>国际水稻研究所, 菲律宾 马尼拉 DAPO 7777 信箱)

## Construction and Testing of Primary Microsatellite Database of Major Rice Varieties in China

ZHUANG Jie yun<sup>1</sup>, SHI Yong feng<sup>1</sup>, YING Jie zheng<sup>1</sup>, E Zhi guo<sup>1</sup>, ZENG Rui zhen<sup>2</sup>, CHEN Jie<sup>1,3</sup>, ZHU Zhi wei<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China; <sup>2</sup>Guangdong Provincial Key Laboratory of Plant Molecular Breeding, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; <sup>3</sup>International Rice Research Institute, DAPO Box 7777, Metro Manila, Philippines)

**Abstract:** Sixty three major conventional varieties and parental lines of major F<sub>1</sub> hybrids used in the commercial rice production in China were assayed with microsatellite markers screened in a previous study and additional markers on four chromosomes. A set of 24 markers was selected and proposed for its application in the variety identification of rice, which are distributed on all the 12 rice chromosomes with two markers on each chromosome. The 63 major varieties and parental lines, as well as 41 major F<sub>1</sub> hybrids, were genotyped with the markers, and alleles detected at each marker locus were verified. By matching marker genotypes of corresponding F<sub>1</sub>, maternal and paternal lines of hybrid rice, high reliability of the maternal lines was verified, data on paternal lines were modified, and a false hybrid was removed. A database containing genotype data of 103 major rice varieties and parental lines at the 24 marker loci was constructed and analyzed. The influence of the authenticity of rice materials on the database quality was discussed, and a threshold for microsatellite marker based variety identification in rice and an approach for authentication of rice materials and genotype data were proposed.

**Key words:** microsatellite marker; rice (*Oryza sativa*); variety identification; frequency of polymorphism; database

**摘要:** 以前期筛选的微卫星标记为基础,并在4个染色体上增加新标记,进一步检测了63个主栽常规稻品种和杂交稻亲本,推荐了24个微卫星标记(每条染色体2个)作为水稻品种鉴别的标记;除了63个常规稻品种和杂交稻亲本外,这24个标记还应用于检测41个主栽杂交稻组合,并确定了各个标记在试验材料中检测到的等位基因类型。通过杂交稻组合与其亲本的标记匹配性检验,确认了杂交稻母本的高真实性,提高了恢复系数数据的可靠性,剔除了1个假杂交稻,建立了103个水稻材料×24个标记的主栽水稻品种微卫星标记数据库,并分析了数据库中各个标记、各组材料的多态性表现。此外,还讨论了材料真实性和典型性对数据库构建的影响,提出了水稻品种间差异判别标准的建议及其应用风险和解决途径。

**关键词:** 微卫星标记;水稻;品种鉴定;多态性频率;数据库

中图分类号: Q943; S511.02

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)05-0460-09

特异性、一致性和稳定性(DUS)是植物新品种必须具备的特征。长期以来,品种特性鉴定一直采用形态性状为主、生理特性为辅的方法。这些特性是授予新品种权的依据,也是开展品种鉴定、解决品种争议的基础。不过,这种经典鉴定一般只有在植物完成整个生长周期、甚至在收获后才能完成;同时,很多性状属于数量性状,存在变异连续、易受环境影响的特点,不利于品种特性的明确描述;再者,同一物种、同一类型的品种数目巨大,且新品种逐年累加,鉴定机构实际上无法确定待审品种是否有别于所有已知品种。越来越多的研究表明,DNA标记的应用可以极大地推动这些问题的解决,在各种DNA标记中又以微卫星标记为佳<sup>[1-5]</sup>。在开展品种鉴别工作中,如果只针对少数特定材料,则可以同时鉴定,如果要判断所鉴定的材料是否与主栽品种存在差异,则需要建立主栽品种数据库。近年来,以

微卫星标记为基础的番茄<sup>[6]</sup>和小麦<sup>[7]</sup>主栽品种DNA指纹数据库构建已大规模开展,而在水稻品种鉴定上的应用虽有大量报道,但仅局限于少数品种的纯度鉴定或真假鉴别<sup>[4,8-12]</sup>,主栽水稻品种数据库的构建才刚刚起步<sup>[13]</sup>。在本研究中,以我国的63个代表性常规稻品种和杂交稻亲本为材料,在前期工作<sup>[14]</sup>基础上,进一步调整并推荐了一套开展水稻品种鉴定的微卫星标记,同时应用该套标记建立了这63个常规水稻品种和另外40个杂交稻组合的微卫星标记指纹图谱数据库。

收稿日期: 2006-02-08; 修改稿收到日期: 2006-03-22。

基金项目: 中央级科研院所科技基础性工作专项资助项目(2003DEB5J046); 农业部农业标准制定和修订项目(06249); 浙江省重大项目(200524007)。

第一作者简介: 庄杰云(1965-),男,研究员, E-mail: jz1803@hzrc.com。

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻材料

根据全国农技推广总站的统计资料,以2002年推广面积 $6.67 \times 10^4$  hm<sup>2</sup>(100万亩)以上的常规稻品种、杂交稻组合及其亲本为目标材料,从中国水稻研究所11个研究组和16家其他单位共征集到63个品种或亲本(将对应的不育系和保持系作同一个亲本计,下同;下文统称为品种)和41个杂交稻组合(材料清单详见在线辅助性材料S1, <http://www.ricesci.cn>)。在63个品种中,除了扬稻6号(9311)以常规稻品种扬稻6号和两系杂交稻父本9311分别征集并作同一品种计外,包括常规籼稻品种7个、常规粳稻品种14个、不育系(保持系)14个、恢复系和两系杂交稻父本27个,其中5份材料(粳稻品种秀水04、杂交稻母本丰源A和优A、恢复系926和明恢70)虽未包含在原始目标清单中,但考虑与前期工作<sup>[14]</sup>的连续性,也应用于本研究。按对应不育系和保持系征集到任何之一则不作缺失计,目标材料缺常规稻品种3个(早丰9号、湘晚粳11、鄂早14)、杂交稻母本2个(新香A和B、香125S)、恢复系5个(80、288、898、928、抗恢98)、杂交稻组合10个(优98、优162、岗优151、冈优527、汕优64、汕优559、汕优多系1号、特优898、协优57、协优64)。

所征集的63个品种含1个来源的21个、2个来源的23个和3个以上来源的19个,共150份材料。参照前期实验结果<sup>[14]</sup>选用5个高多态性微卫星标记(RM17、RM72、RM171、RM297、RM1195)检测了每份材料各2个单株,初步判断材料内同质性和各材料是否确实为纯系,并通过不同来源比较等手段来尽量保证所应用材料的真实性。在1个来源者中,有1个杂交稻母本检测后发现为杂交稻,重新征集并经与相应杂交稻和父本比较确认了其真实性;对2个以上来源者,无品种内变异者随机挑选,发现品种内变异则取重复数高者,如重复数一样则取原产单位提供的材料或与杂交稻匹配者。一般每品种挑选1个单株应用于后续的标记检测和数据库构建研究中,有两个例外为:金23A和金23B、扬稻6号和9311同时各选用1个单株。

### 1.2 DNA提取和微卫星标记检测

所有常规稻品种和亲本材料均采用简易法<sup>[15]</sup>分别提取2个单株的DNA,其中应用于标记挑选和数据库构建的单株、杂交稻组合的20株混合样再采

用一般方法<sup>[16]</sup>提取,以满足今后比较和验证之需。

以前期初步筛选出的58个候选微卫星标记为基础,进一步应用63个代表性品种筛选高多态性和高分辨率标记,并考虑各标记的位置。目标标记总数为24,分布于所有12条水稻染色体,每条染色体2个标记,同一染色体的2个标记分别位于长短臂或同一染色体臂的非紧密连锁区域。所用检测方法为前期研究推荐的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,电泳装置为DYCZ-24B型加宽垂直电泳系统(北京市六一仪器厂),PCR反应、电泳、银染检测均遵循前研究<sup>[14]</sup>。各样品扩增后,先取1 μL上样于2.0%琼脂糖凝胶电泳,经溴化乙锭染色后观察,确定其良好扩增后再上样于非变性聚丙烯酰胺凝胶。

应用确定的24个微卫星标记,检测了63个代表性品种(包括中选单株和特定重复样)和41个杂交稻组合,部分微卫星标记还应用于恢复系与杂交稻匹配性的验证研究中(详见2.2)。另外,除了在中国水稻研究所按不同批次检测、不同操作者检测验证了所用方法在同一实验室的重复性外(资料未示),还挑选10份代表性材料,其中常规籼稻品种2个(粳小占、湘早粳31)、常规粳稻品种2个(垦稻8号、垦稻10号)、不育系(保持系)3个(-32B、V20B、广占63S)、恢复系2个(恩恢58、密阳46)、两系杂交稻父本兼常规稻品种1个(9311),在华南农业大学和国际水稻研究所验证了方法的再现性。所用电泳装置华南农业大学为DYY-28D型夹心式垂直电泳系统(北京市六一仪器厂),国际水稻研究所为MGV-20233型垂直电泳系统(美国C.B.S. Scientific Co.)。

### 1.3 数据分析

每一个标记的多态性检测结果经重排确定后(确定过程详见2.1),根据各个多态性片段的分子量从大到小按1、2、3……排列,以1和0分别代表检测到和未检测到相应片段,记录各材料的等位基因类型。虽然各个标记在纯系材料间往往检测到多片段多态性,但各组多态性片段呈共分离,可将其分别看作一个等位基因,故按单基因共显性标记的方式记录,即每份纯系材料仅按其主带多态性记录一次;当杂交稻的双亲呈多态时,其F<sub>1</sub>除了出现双亲两者的片段外,往往在分子量较高的位置出现新的片段,这种新片段不作记录,但作为确定杂合体的辅助证据。

以最后确定的带型为依据,遵循前文<sup>[14]</sup>介绍,计算各个标记的多态性频率(frequency of polymor-

phism, FP) 即微卫星标记在研究材料的各对个体间检测到差异性的频率。同时,应用软件 NT-SYS<sup>[17]</sup>、以共有 DNA 片段比例<sup>[18]</sup> (软件中参数为 DICE) 为指标计算各对水稻材料之间的遗传相似性。

## 2 结果与分析

### 2.1 标记和基本检测结果

对 63 份水稻品种进行筛选,前期实验所用的 58 个候选标记无法完全符合基因组分布的要求,增加了新标记的筛选,最终挑选出符合要求的一套标记,其退火温度全部为 55。其中,4 个标记 (RM85、RM5414、RM190 和 RM18) 从新增加的标记中筛选出,20 个标记从 58 个候选标记中筛选出,这些标记包括第 6 染色体短臂 2 个标记,第 3、4、7、10 和 11 染色体长臂各 2 个标记,其他 6 条染色体长、短臂各 1 个标记。根据这些标记的染色体分布和不同等位基因差异情况,每一条染色体分别挑选一个分辨率较高的标记,推荐为首选标记,其余推荐为候补标记。这些标记的名称、基因组位置、引物序列和其他特性详见在线辅助性材料 S2 (<http://www.ricesci.cn>)。

在标记筛选过程中,逐步完成了 24 个标记对 63 个品种和 7 个杂交稻组合 (金优 928、新香优 80、培两优 288、两优培九、培杂双七、丰两优 1 号、香两优 68) 的检测。在实验中,将这些材料分成两部分上样于不同胶板,所有标记采用同一个品种顺序,试样清单及其排序、24 个标记的 48 个图版详见在线辅助性材料 S3 (<http://www.ricesci.cn>)。由于扩增产物分开在两块凝胶上电泳,为便于比较,除了设置标准分子量对照外,还设置了重复样品,其中多系 1 号和培矮 64S 每胶各置 1 个样品,扬稻 6 号和 9311、金 23A 和金 23B 分别置于两胶中。应用上述材料确定了标记后,随即扩增了其他 34 个杂交稻组合,并重复放置了金优 928、新香优 80 和香两优 68 的样品,在同一块胶中电泳,所有标记采用同一个品种顺序,其检测结果 (24 个图版) 详见在线辅助性材料 S4 (<http://www.ricesci.cn>)。

尽管设置了标准对照和重复材料,在不同凝胶的材料之间、同一凝胶中相隔较远的材料之间,有时其差异性仍难以判断。为尽可能地避免误判,根据 63 个品种和 7 个杂交稻组合按固定品种序号的检测结果,在每一个标记上判断各多态性片段的长度排列,将 63 个品种 (扬稻 6 号和 9311 同时取样,其

他品种不设重复) 和缺少双亲样品或亲本之一的 4 个杂交稻组合 (金优 928、新香优 80、培两优 288 和香两优 68) 的扩增产物按片段长度从大到小排列,分成两部分重新上样,其中第一块胶上的最后 1 个样品与第二块胶上的第 1 个样品相同,电泳检测后确定其差异 [48 个图版详见在线辅助性材料 S5 (<http://www.ricesci.cn>)]。完成该过程后,绝大部分差异性都可明确判断,但个别标记大片段产物之间的差异仍不够明显,故将它挑出重新电泳,通过延长电泳时间来提高分辨率 [代表性图版及其材料清单详见在线辅助性材料 S6 (<http://www.ricesci.cn>)] ,最终确定了所有材料的带型。

24 个标记分别在研究材料中检测到 2~9 个多态性片段,平均每个标记的多态性片段数为 5.7。其中, RM337 的 1 个片段 (编号 4) 只在 3 个杂交稻中检测到,这些杂交稻为缺少对应恢复系的金优 928 和培两优 288、以及缺少对应不育系和恢复系的新香优 80; RM219 的最小片段 (编号 9) 仅在双七占中检测到,而该双七占如后文所述为错误或非典型材料,典型双七占材料具有其他带型;其他多态性片段都在验证前后的杂交稻亲本和 (或) 常规稻品种中检测到。每个标记在本研究中检测到的多态性片段数、近似片段长度范围、电泳时间设定参照、多态性片段梯度图版详见在线辅助性材料 S2 (<http://www.ricesci.cn>)。

在不同实验室的比较中,3 个实验室 10 个品种 24 个标记的基本带型表现一致,但存在记录结果不一致的情况。本验证共含 1080 个标记 × 品种对,其中 9 个标记 × 品种对在不同实验室存在差异,占 1.67%。与完整材料检测中观察到的不明确差异性类似,不同实验室出现记录差异的发生情况有两种: 1) 两片段分子量差异很小且非相邻排列,将其误判为相同; 2) 等长两片段非相邻排列,受相邻多态性片段和 (或) 凝胶不够均匀的影响,将其误判为不同。该结果表明,对于非相邻排列的材料,其单态性的确定、小差异多态性的确定需要重排验证,以降低误判的发生几率。在实际测试中,如果将待测材料和对照材料相邻排列,则误判的可能性将大大降低。

### 2.2 恢复系材料及其带型的再确认

本研究同时检测了 F<sub>1</sub> 杂交稻及其父母本,因此,可以应用成套材料检验其真假。如后文所述,所用不育系 (保持系) 的真实性首先得到证实,因此,该检验主要应用于比较恢复系和杂交稻,先应用于 150 份材料的初筛,再应用于 24 个标记检测完成后

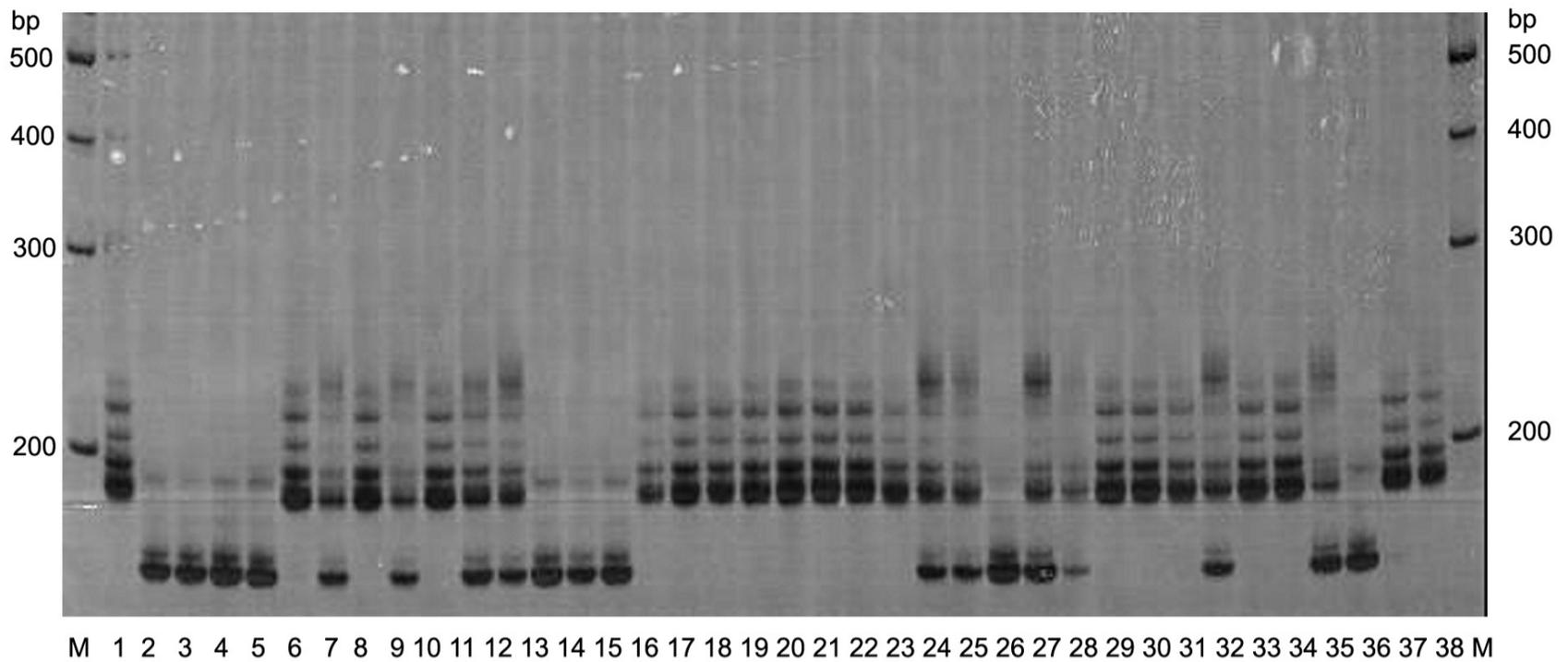


图 1 成套恢复系、不育系和杂交稻的 RM17 带型比较

Fig. 1. Comparison of corresponding restorer line, CMS line and their hybrids at marker locus RM17.

1~5 - 5 个来源的桂 99 ; 6 - 博 B ; 7 - 博优 903 ; 8 - 中 9A ; 9 - 中优桂 99 ; 10 - 金 23A ; 11~12 - 2 个来源的金优桂 99 ; 13 - 珍汕 97A ; 14 - 汕优桂 99 ; 15~21 - 7 个来源的明恢 63 ; 22~23 - 2 个来源的金优 63 ; 24~25 - 2 个来源的汕优 63 ; 26 - - 32A ; 27~28 - 2 个来源的优 63 ; 29 - 龙特甫 A ; 30~31 - 2 个来源的特优 63 ; 32~34 - 3 个来源的绵恢 501 ; 35 - 优 501 ; 36~37 - 2 个来源的盐恢 559 ; 38 - 特优 559.

Lanes 1 to 5, Gui 99 (5 sources); Lane 6, Bo B; Lane 7, Boyou 903; Lane 8, Zhong 9A; Lane 9, Zhongyougui 99; Lane 10, Jin 23A; Lanes 11 and 12, Jinyougui 99 (2 sources); Lane 13, Zhenshan 97A; Lane 14, Shanyougui 99; Lanes 15 to 21, Minghui 63 (7 sources); Lanes 22 and 23, Jinyou 63 (2 sources); Lanes 24 and 25, Shanyou 63 (2 sources); Lane 26, - 32A; Lanes 27 and 28, You 63 (2 sources); Lane 29, Longtefu A; Lanes 30 and 31, Teyou 63 (2 sources); Lanes 32 to 34, Mianhui 501 (3 sources); Lane 35, You 501; Lanes 36 and 37, Yanhui 559 (2 sources); Lane 38, Teyou 559.

材料真实性的检验和校正。如图 1 所示,在 5 个不同来源的桂 99 中,来源 1(序号 1)的 RM17 带型与其他来源不同,又与博 B 博优 903、中 9A 中优桂 99、金 23A 金优桂 99、珍汕 97A 汕优桂 99 所反映出的恢复系带型不一致,而其他来源的桂 99 不仅带型一致,而且与检测的几个杂交稻完全匹配,故可判断来源 1 的桂 99 为错误或非典型材料。同样地,可判断明恢 63 的来源 1(序号 15)、绵恢 501 的来源 1(序号 32)和盐恢 559 的来源 1(序号 36)为错误或非典型材料。

经选用的 24 个标记检测,41 个杂交稻中的“协优 63”在所有座位上都呈纯合状态,显然为假杂种,故将其排除在外。在 14 个不育系(保持系)中,丰源 A 和优 B 因缺乏对应杂交稻无法检验,暂以检测材料的带型代表;广占 63S、V20B 和协青早 B 分别只与 1 个杂交稻相对应,其带型与根据对应杂交稻和恢复系推测的带型完全一致,故认为它们为真实材料;其他母本分别与 2~8 个杂交稻相对应,且其片段均能在杂交稻中检测到,故判断它们为真实材料。

在认定了 12 个杂交稻母本真实性的基础上,分

析了 28 个杂交稻父本与杂交稻的吻合程度。6 个恢复系(ZDZ057、测 64、江恢 151、明恢 70、蜀恢 162 和 926)因缺乏对应杂交稻无法检验,暂以检测材料的带型代表。“晚 3”在 13 个标记座位上与杂交稻汕优晚 3 不匹配,且聚类分析将它归入粳稻组,经重新核对发现,所征集的实际上是常规粳稻品种晚 3 2,故更改其品种名称和属性。其余 21 个恢复系分别具有 1~4 个对应杂交稻,共涉及 35 个组合,其标记带型匹配性列于表 1。在这 21 个恢复系中,8 个与对应杂交稻完全匹配,认定它为真实材料;13 个与对应杂交稻不完全匹配,可根据其表现形式分为 4 种类型。

第一种类型为典型材料,包括 3 个恢复系。它们各具有 2 个以上对应杂交稻,并与其中部分杂交稻完全匹配。尽管不能排除恢复系存在品种内变异,但所检测的材料起码可作为相应恢复系的典型材料看待,故采用其带型作为相应恢复系的代表。

9311(扬稻 6 号):作为两系杂交稻父本征集的 9311 和作为常规稻品种征集的扬稻 6 号在所有 24 个标记座位上均表现一致,且均与丰两优 1 号完全匹配,但在 RM72 座位上,9311 与两优培九不匹配。

表 1 21 个水稻恢复系与对应杂交稻在 24 个微卫星标记座位上的带型匹配情况

Table 1 . Matching 21 rice restorer lines to corresponding hybrids at 21 SSR loci .

恢复系 Restorer line	杂交稻 Hybrid	不匹配标记 Unmatched marker
207	金优 207 Jinyou 207	无 None
	中优 207 Zhongyou 207	无 None
253	博优 253 Boyou 253	无 None
To 974	金优 974 Jinyou 974	无 None
恩恢 58 Enhui 58	优 58 You 58	无 None
桂 99 Gui 99	博优 903 Boyou 903	无 None
	金优桂 99 Jinyougui 99	无 None
	汕优桂 99 Shanyougui 99	无 None
	中优桂 99 Zhongyougui 99	无 None
泸恢 17 Luhui 17	优 7 号 You 7	无 None
密阳 46 Milyang 46	汕优 46 Shanyou 46	无 None
	威优 46 Weiyou 46	无 None
	协优 46 Xieyou 46	无 None
蜀恢 527 Shuhui 527	D 优 527 D You 527	无 None
9311	丰两优 1 号 Fengliangyou 1	无 None
	两优培九 Liangyoupeijiu	RM72
明恢 63 Minghui 63	优 63 You 63	无 None
	汕优 63 Shanyou 63	无 None
	特优 63 Teyou 63	RM337
	金优 63 Jinyou 63	RM5414、RM273、RM337、RM278
绵恢 725 Mianhui 725	冈优 725 Gangyou 725	无 None
	金优 725 Jinyou 725	RM1195、RM337、RM17
	优 725 You 725	RM208、RM5414、RM273、RM337、RM209
明恢 77 Minghui 77	金优 77 Jinyou 77	RM297、RM336、RM18、RM311
	汕优 77 Shanyou 77	RM297、RM336、RM18、RM311
双七占 Shuangqizhan	培杂双七 Peizashuangqi	RM71、RM208、RM267、RM274、RM337、 RM219、RM258、RM209、RM17
CDR22	冈优 22 Gangyou 22	RM71、RM208、RM311、RM209、RM224、RM17
多系 1 号 Duoxi 1	D 优 68 D You 68	RM1195、RM5414、RM278
R402	金优 402 Jinyou 402	RM336
	中优 402 Zhongyou 402	RM336
广恢 128 Guanghui 128	优 128 You 128	RM18
盐恢 559 Yanhui 559	特优 559 Teyou 559	RM273
镇恢 084 Zhenhui 084	优 084 You 084	RM273、RM18
辐恢 838 Fuhui 838	优 838 You 838	RM1195、RM85、RM337、RM311、RM224、RM17
绵恢 501 Mianhui 501	优 501 You 501	RM273、RM336、RM18、RM219、RM311

经重新应用各标记检测 3 份独立来源的 9311 ,以及杂交稻两优培九、丰两优 1 号和不育系培矮 64S、广占 63S ,发现不同来源的 9311 在 RM72 座位上存在变异 2 份与丰两优 1 号匹配 ,1 份与两优培九匹配。

明恢 63 :与 优 63 和汕优 63 完全匹配 ,但与特优 63 和金优 63 分别在 1 和 4 个标记上不吻合。经重新检测 7 个不同来源的明恢 63 ,发现它们在这些标记座位上亦存在差异 ,且其变异类型与特优 63 和金优 63 所反映出来的一致。

绵恢 725 :与冈优 725 完全匹配 ,但与金优 725 和 优 725 分别在 3 和 5 个标记上不吻合。因只征集到 1 个来源的绵恢 725 ,无法分析绵恢 725 是否

存在同名异型的问题。

第二种类型为修正材料 ,包括 2 个恢复系。经重新检测和比较 ,发现最初选用的材料为错误或非典型材料 ,故对其带型进行了校正。

明恢 77 :在 4 个标记座位上与杂交稻金优 77 和汕优 77 不匹配 ,而根据两个杂交稻和相应不育系可推断出一致的恢复系带型。重新检测了 3 份独立来源的明恢 77 ,以及杂交稻金优 77、汕优 77 和不育系金 23A、珍汕 97A。结果表明 3 份恢复系材料各不相同 ,其中 1 份材料的带型与两个杂交稻完全匹配 ,故以该材料的带型代表明恢 77。

双七占 :在 9 个标记座位上与杂交稻培杂双七

不匹配。重新检测了 3 份独立来源的双七占,其中 1 份来源于育成者单位、2 份为其他来源。结果表明,非原产地来源的 2 份材料表现一致,但与育成者单位提供的材料在上述 9 个标记座位上出现差异;育成者单位提供的双七占与杂交稻培杂双七完全匹配,故以该材料的带型代表双七占。

第三种类型为待验证材料,包括 6 个恢复系。CDR22 和多系 1 号分别具有 2 个和 4 个来源,前者与杂交稻冈优 22 在 6 个标记座位上不相匹配,后者与杂交稻 D 优 68 在 3 个标记座位上不相匹配,但两个恢复系均未表现出来源间差异;R402、广恢 128、盐恢 559 和镇恢 084 各仅具单来源,并分别与对应杂交稻在 1 或 2 个标记座位上不相匹配。根据这些结果认为,这 7 份材料可较好地代表相应的恢复系,故保留其带型,但部分标记尚需应用更多的相关材料确认或校正。

第四种类型为疑问材料,包括 2 个恢复系。辐恢 838 和绵恢 501 分别具有 2 个和 3 个来源,不同来源的材料在多个标记座位上存在差异,且均不与对应杂交稻完全匹配,难以判断何份材料的可靠性较高,暂保留原带型。

综上所述,通过匹配性检验,确认了不育系(保持系)的高度可靠性,发现了 1 个假恢复系,确定或保留了 27 个恢复系的带型,其中 13 个恢复系(表 1 中的头 13 个,含 8 个原完全匹配材料、3 份验证为典型材料者和 2 份更正者)的真实性和典型性得到确认,14 个恢复系的真实性或典型性尚待进一步验证。相应地,除假协优 63 外的 40 个杂交稻中,与不育系、恢复系完全匹配的 22 个杂交稻(18 个原完全匹配的材料和两优培九、金优 77、汕优 77、培杂双七等 4 个已重新确认的材料)可判断为真实材料,其他杂交稻的真实性或典型性则尚需进一步验证。

### 2.3 微卫星标记数据库及其多态性表现

根据上述研究结果,在剔除了假杂交稻协优 63 的基础上,建立了 103 个水稻材料 × 24 个标记的水稻主栽品种微卫星标记数据库[在线辅助性材料 S7

(<http://www.ricesci.cn>)] ,每个标记的各个多态性片段按分子量从大到小往下排列,各材料的等位基因类型按 1 代表检测到相应片段、0 代表未检测到的方式表示。其中,恢复系晚 3 更改为“常规粳稻品种晚 3 2”,保留其数据,但因该品种既非主栽品种、又是较早时期的品种,在下述数据分析中不予采用。

24 个微卫星标记的多态性频率(FP)计算结果详见在线辅助性材料 S2(<http://www.ricesci.cn>)。在包含 62 个主栽常规稻品种和杂交稻亲本的纯系材料组中,各个标记的 FP 值均较高,变幅为 0.480 ~ 0.840,平均值为 0.681;在包含 40 个 F<sub>1</sub> 的杂交稻组中,标记多态性亦较高,其 FP 变幅为 0.224 ~ 0.895,平均值为 0.665。不同类型纯系材料的多态性则存在明显差异,7 个标记在 14 个常规粳稻品种间呈单态,3 个标记在 8 个常规籼稻品种(含扬稻 6 号)之间呈单态,而在分别包含 14 个和 27 个材料的杂交稻母本组和父本组中,虽然个别标记多态性较低,但未发现单态性标记。从各组的 24 个标记平均值看,杂交稻最高(0.665),杂交稻父本次之(0.530),往下为杂交稻母本(0.502)和常规籼稻品种(0.494),常规粳稻品种最低(0.366)。

各组别多态性频率之间的线性相关分析表明(表 2)除了杂交稻 F<sub>1</sub>分别与杂交稻母本组、父本组呈极显著正相关外,常规籼稻组与杂交稻 F<sub>1</sub>、母本组、父本组均呈显著或极显著正相关,而杂交稻母本组与父本组之间、常规粳稻组与其他组别之间的相关性均未达显著水平。该结果与本研究所用杂交稻均为籼型组合、杂交稻母本和父本血缘差异较大的事实是相符合的。

比较每个标记座位上杂交稻 F<sub>1</sub>、母本和父本三组的 FP 值(图 2),可以发现,F<sub>1</sub>的 FP 值除了在 1 个标记座位上略低于两组亲本的平均值外,其他标记上均接近或超过两组亲本的高值。也就是说,这些标记对主栽杂交稻组合的鉴别能力高于对杂交稻亲本的鉴别能力。此外,相似性分析结果表明,所有

表 2 24 个微卫星标记座位上不同水稻组别多态性频率的线性相关性

Table 2. Linear correlation between frequencies of polymorphism calculated in different rice groups at 24 SSR loci.

材料 Material	IV	A	R	F <sub>1</sub>
常规粳稻品种 Conventional japonica variety (JV)	0.072	0.010	0.113	0.212
常规籼稻品种 Conventional indica variety (IV)		0.437*	0.604**	0.599**
杂交稻母本 Female parent of F <sub>1</sub> hybrid (A)			0.237	0.790**
杂交稻父本 Male parent of F <sub>1</sub> hybrid (R)				0.642**

\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ .

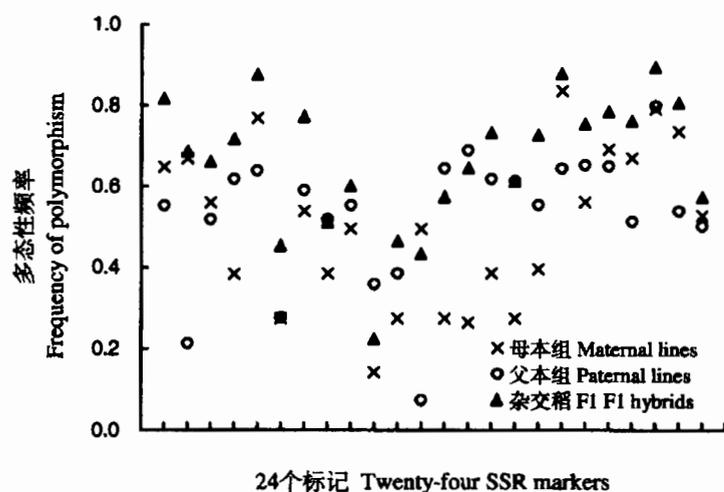


图2 杂交稻F<sub>1</sub>、母本组(A)、父本组(R)在24个微卫星标记座位上的多态性频率(FP)比较

Fig. 2. Frequency of polymorphism (FP) at each of the 24 SSR marker loci determined at rice groups of F<sub>1</sub> hybrids, maternal lines (A) and paternal lines (R), respectively.

供试杂交稻组合、母本和父本之间均在2个以上标记座位上存在差异,且3组组内的相对差异性程度与FP值类似:在杂交稻组合、母本和父本各组内,两两材料之间检测到差异的平均标记数分别为 $16.0 \pm 3.8$ 、 $12.0 \pm 4.7$ 和 $12.7 \pm 3.4$ 个,杂交稻组合之间的差异性总体上超过杂交稻母本间和父本间。

### 3 讨论

DNA标记在植物新品种鉴定、注册及保护上显示了巨大的应用潜力,主栽品种微卫星标记数据库构建、技术体系优化、判别标准探讨等方面的工作已在番茄<sup>[6]</sup>、小麦<sup>[7]</sup>、水稻<sup>[13]</sup>、大麦<sup>[2]</sup>和油菜<sup>[5]</sup>等物种逐步展开,国际植物新品种保护联盟(UPOV)也将DNA标记的DUS测试应用列入议事日程<sup>[19]</sup>。虽然微卫星标记检测的技术稳定性已得到大量实验结果的证实,但要应用于植物新品种保护领域,则尚需两个必要条件,其一是微卫星标记数据库的构建,其二是品种间差异判别标准的制定。

我国于1997年开始实施植物新品种保护,水稻是我国植物新品种保护条例涵盖的第一批保护作物之一,水稻品种的DNA指纹鉴定研究越来越受到重视。除了针对零散材料的大量研究外,肖小余等<sup>[13]</sup>应用微卫星标记检测四川省主要杂交稻亲本,在国内外首次报道了主栽水稻品种DNA标记数据库构建的系统工作。本研究筛选了具有较好基因组分布的24个微卫星标记,并应用这些标记建立了我国主栽常规稻品种、杂交稻亲本和杂交稻组合的指

纹图谱。不过,由于我国水稻品种众多,长期以来又缺乏品种权保护,所选用材料的真实性和典型性问题,是数据库构建中面临的一个关键性问题。

本研究在构建数据库之前,应用5个标记对水稻材料的真实性和典型性进行了初步的验证,但在选中的杂交稻父本中,品种的真实性和典型性仍存在严重的疑问。21个恢复系和35个杂交稻之间的匹配性检验结果表明,13个恢复系(61.9%)与对应的杂交稻不完全匹配,涉及17个杂交稻(48.6%)。这种不匹配性可能部分来源于品种内变异,但有2个恢复系(明恢77和双七占)的原中选材料被证明为错误或非典型材料;其中,双七占的3个材料来源中,原产地材料与杂交稻培杂双七完全匹配,2个非原产地材料之间表现一致,却与原产地来源差异很大,说明在我国水稻亲本交流中可能存在以讹传讹的现象。

在其他不匹配材料中,有8个恢复系未能查到与杂交稻完全匹配的材料,另外3个恢复系则分别与部分杂交稻完全匹配。不同来源的9311在RM72座位上检测到两种类型,并分别与1个杂交稻匹配;明恢63的中选材料与2个杂交稻匹配、与另两个杂交稻分别在1和4个标记上不匹配,但7个来源的明恢63具有与杂交稻同样的变异类型;绵恢725的中选材料与1个杂交稻匹配、与另两个杂交稻分别在3和5个标记上不匹配。显然,这3个恢复系的原中选材料起码属典型材料,但它们与其他同名异源材料的差别、与部分杂交稻的不匹配性,是来源于剩余遗传变异,还是由于以讹传讹等原因造成,则需要追踪原始材料。国际水稻研究所在IR64突变体库构建过程中,发现不同IR64单株在第2染色体短臂微卫星标记上存在变异,经追踪种质库中保存的IR64及其亲本原始种子,证实了其变异来源为剩余遗传效应(吴建利,私人通讯)。但要开展这样的工作,需要应用品种的原始材料,对于我国的大部分推广水稻品种及其亲本,恐不具备该条件。

品种内变异除了与数据库材料真实性和典型性的确定有关外,更与品种间差异判别标准的制定密切相关。由于剩余遗传效应的存在,有时从表现型看非常整齐一致的品种,其后代仍有分离,在推广种植过程中,特别是不同部门在不同产地生产或分别提纯复壮后,所获得的品种可能存在差别。如何判别两份材料之间的差异是属于不同品种之间的差异,还是由于剩余遗传效应引起的品种内变异,一直

是个未得到很好解决的问题。近年来,已在多种作物上开展了主栽品种微卫星标记数据库构建和(或)品种鉴别标准探讨的研究<sup>[3 5 7]</sup> 均表明微卫星标记虽具有高可靠性的品种间鉴别能力,但仍难以排除品种内变异对鉴定结果的干扰。根据实际检测结果,多个研究者提出了以 0.95 的相似性作为品种鉴别阈值的一般性建议。

水稻品种内变异在 DNA 标记上的表现,已得到大量研究结果的支持<sup>[1,12,20-22]</sup>。在现代水稻品种中,品种内微卫星标记变异性一般较低,迄今报道的均低于 1%<sup>[4 8,12-22]</sup>。本研究在应用 5 个标记对 150 份材料各 2 个单株进行初筛的研究中,发现平均品种内变异为 0.93%。总的看来,水稻品种间微卫星标记的鉴别标准可参照其他作物推荐的 0.95 相似性阈值。如果按本研究应用的 24 个标记检测,2 个以上标记呈现差异则判断为不同品种。在实际检测过程中,可先应用 12 个标记[在线辅助性材料 S2(<http://www.ricesci.cn>)中的推荐类型 I]检测,只要待测水稻品种和对照品种在 2 个标记呈现差异,毋需考虑已检测的标记数,可将待测水稻品种和对照品种判断为不同品种;如完成首选 12 个标记后,差异性标记数仍少于 2,则应用其他 12 个标记[在线辅助性材料 S2(<http://www.ricesci.cn>)中的推荐类型 II]检测。

不过,应用微卫星标记进行品种鉴别,存在两方面的风险。其一是,对于单基因突变材料和高代姊妹系等类似于近等基因系的材料,应用一般标记往往难以辨别,存在将不同品种误判为同一个品种的风险;其二是,有些已大规模应用的品种,如果其原始材料本身存在较大变异,根据特定材料的数据判断,存在将真品种误判为假品种的风险。目前,不宜将微卫星标记的鉴定结果作为判断真假水稻品种的唯一依据,而需要结合性状鉴定相互验证。同时,从源头抓起,将 DNA 指纹鉴定纳为水稻品种 DUS 测试的一项辅助指标,以比较 DNA 指纹异同性和常规 DUS 异同性之间的吻合程度,并建立原始材料的 DNA 指纹数据库,作为将来鉴定的依据。通过积累,就可以逐步建立完整的水稻品种及其亲本 DNA 指纹数据库,并完善品种鉴别标准。

谢辞:承蒙福建省三明市农业科学研究所、福建省漳州市农业科学研究所、广东省农业科学院水稻研究所、广东省佛山市农业科学研究所、国家杂交水稻工程技术研究中心、黑龙江省农垦科学院水稻研

究所、黑龙江省农业科学院第二水稻研究所、湖北省恩施市红庙农业科学研究所、湖南金健种业、江苏里下河地区农业科学研究所、江苏省连云港市农业技术推广中心、江苏省武进市农业科学研究所、江苏省镇江市农业科学研究所、辽宁省农业科学院稻作研究所、浙江省嘉兴市农业科学院、浙江省农业科学院等单位和中国水稻研究所 11 个研究组提供水稻材料,特致谢忱。

#### 参考文献:

- [1] Garland S H, Lewin L, Abedinia M, et al. The use of microsatellite polymorphisms for the identification of Australian breeding lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 1999, 108: 53-63.
- [2] Karakousis A, Barr A R, Chalmers K J, et al. Potential of SSR markers for plant breeding and variety identification in Australian barley germplasm. *Aust J Agric Res*, 2003, 54: 1197-1210.
- [3] Leigh F, Lea V, Law J, et al. Assessment of EST and genomic microsatellite markers for variety discrimination and genetic diversity studies in wheat. *Euphytica*, 2003, 133: 359-366.
- [4] Singh R K, Sharma R K, Singh A K, et al. Suitability of mapped sequence tagged microsatellite site markers for establishing distinctness, uniformity and stability in aromatic rice. *Euphytica*, 2004, 135(2): 135-143.
- [5] Tommasini L, Batley J, Arnold G M, et al. The development of multiplex simple sequence repeat (SSR) markers to complement distinctness, uniformity and stability testing of rape (*Brassica napus* L.) varieties. *Theor Appl Genet*, 2003, 106: 1091-1101.
- [6] Bredemeijer G M M, Cook R J, Ganai M W, et al. Construction and testing of microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 1019-1026.
- [7] Röder M S, Wendehake K, Korzun V, et al. Construction and analysis of a microsatellite based database of European wheat varieties. *Theor Appl Genet*, 2002, 106: 67-73.
- [8] 李莉,杨剑波,汪秀峰,等.利用 RAPD 和微卫星标记对协优杂交稻及其亲本进行区别与鉴定. *中国水稻科学*, 2000, 14(4): 203-207.
- [9] 李进波,牟同敏,夏建武,等.利用微卫星标记鉴定两系杂交稻两优培胜的种子纯度. *中国农学通报*, 2002, 18(6): 10-13.
- [10] 苏顺宗,黄碧玉,杨俊品,等.利用 SSR 鉴定水稻杂交种子纯度的研究. *种子*, 2003, 127(1): 23-25.
- [11] 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.
- [12] Nandakumar N, Singh A K, Sharma R K, et al. Molecular fingerprinting of hybrids and assessment of genetic purity of hybrid seeds in rice using microsatellite markers. *Euphytica*, 2004, 136: 257-264.
- [13] 肖小余,王玉平,张建勇,等.四川主要杂交稻亲本的 SSR 多态性分析和指纹图谱的构建与应用. *中国水稻科学*, 2006, 20

(1) : 1-7 .

- [14] 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 .
- [15] Zheng K L, Huang N, Bennett J, et al. PCR-based marker assisted selection in rice breeding. IRRI Discussion Paper Series No. 12. Manila: International Rice Research Institute, 2005 .
- [16] 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
- [17] NTSYSpc Version 2.11Q. Copyright (C) 2000-2003 Applied Biostatistics Inc., New York .
- [18] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76 : 5269-5273 .
- [19] International Union for the Protection of New Varieties of

Plants (UPOV). Progress report on the work of the technical committee, the technical working parties and the working groups on biochemical and molecular techniques, and DNA-profiling in particular. C/38/10 Add, Oct 18, 2004 .

- [20] Olufowote J O, Xu Y B, Chen X L, et al. Comparative evaluation of within-cultivar variation of rice (*Oryza sativa* L.) using microsatellite and RFLP markers. *Genome*, 1997, 40 : 370-378 .
- [21] 舒庆尧, 吴殿星, 夏英武, 等. 籼稻和粳稻中蜡质基因座位上微卫星标记的多态性及其与直链淀粉含量的关系. 遗传学报, 1999, 26(4) : 350-358 .
- [22] Yashitola J, Thirumurugan T, Sundaram R M, et al. Assessment of purity of rice hybrids using microsatellite and STS markers. *Crop Sci*, 2002, 42(4) : 1369-1373 .

## 在线辅助信息 Online Supplementary Information

共有 7 个辅助性材料放在《中国水稻科学》网站上 网址: <http://www.ricesci.cn/added/20060502.htm>

文件(文件夹)	说明
辅助性材料 S1 :文件 Rice line .doc	本研究所应用的水稻材料清单
辅助性材料 S2 :文件夹 Marker & Allele 标记信息(Marker) .xls Allele 1(RM19) .jpg Allele 2(RM273-RM219) .jpg Allele 3(RM72) .jpg Allele 4(RM72-RM208-RM274-RM18) .jpg Allele 5(RM336-RM337-RM311-RM17) .jpg Allele 6(RM311-RM17-RM232-RM267-RM278) .jpg Allele 7(RM278-RM258-RM297-RM253) .jpg Allele 8(RM1195-RM71-RM209-RM224) .jpg Allele 9(RM224-RM190-RM5414) .jpg Allele 10(RM85) .jpg	本研究所应用的 24 个标记及其多态性片段梯度图版 标记清单及相关参数 RM19 的多态性片段梯度图版 所列 2 个标记的多态性片段梯度图版 RM72 的多态性片段梯度图版 所列 4 个标记的多态性片段梯度图版 所列 4 个标记的多态性片段梯度图版 所列 5 个标记的多态性片段梯度图版 所列 4 个标记的多态性片段梯度图版 所列 4 个标记的多态性片段梯度图版 所列 3 个标记的多态性片段梯度图版 RM85 的多态性片段梯度图版
辅助性材料 S3 :文件夹 V & P by line 品种清单 1(Variety list 1) .xls rm#-1 .jpg/rm#-2 .jpg	63 个品种和 7 个杂交稻组合按固定顺序排列的检测结果 品种名称及其序号 24 个标记的检测结果 每标记 2 个图版
辅助性材料 S4 :文件夹 Hybrid 品种清单 2(Variety list 2) .xls rm# .jpg	37 个杂交稻组合按固定顺序排列的检测结果 组合名称及其序号 24 个标记的检测结果 每标记 1 个图版
辅助性材料 S5 :文件夹 V & P by band 备注 1(Remark 1) .doc rm#-s1 .jpg/rm#-s2 .jpg	辅助性材料 S3 中样品按片段长度从大到小重新排列的结果 对图版的说明 24 个标记的检测结果 每标记 2 个图版
辅助性材料 S6 :文件夹 Band rechecked 备注 2(Remark 2) .doc 品种清单 3(Variety list 3) .xls rm# .jpg	辅助性材料 S2 中样品按片段长度从大到小重新排列的结果 对图版的说明 品种名称及其序号 3 个标记的检测结果 每个标记 1 个图版
辅助性材料 S7 :文件 Marker data .xls	103 份水稻材料在 24 个微卫星标记座位上的带型数据