

宁夏 60 份粳稻种质资源遗传多样性分析

陈小龙^{1,2}, 马利奋¹, 王 鹏¹, 王学龙¹, 李亚婷¹, 李 鹏¹, 马晓燕¹, 李培富¹

(¹宁夏大学农学院,银川 750021; ²永宁县小麦育种繁殖所,永宁 750100)

摘要:试验用 SSR 分子标记对 60 份宁夏粳稻种质资源进行遗传多样性分析。103 对 SSR 引物表现多态性的有 58 对,共扩增出 212 条多态性条带,等位变异范围为 2~9,平均每对引物 3.7 个;多态性信息含量(*PIC*)变幅为 0.032~0.788,平均为 0.403;高多态性位点主要发生在 3 号、6 号和 11 号染色体上,而无多态性或低多态性位点主要发生在 1 号和 10 号染色体上;成对供试材料的遗传相似系数 GS 值变幅为 0.642~0.958,平均为 0.790,单个供试材料的平均 GS 值变幅为 0.710~0.816,平均为 0.781,亲缘关系较近;UPGMA 聚类表明,在遗传相似系数约 0.785 处,供试材料可被分为 11 类,大部分材料被聚在一类中。

关键词:粳稻;种质资源;SSR 分子标记;遗传多样性

Genetic Diversity of 60 Japonica Rice Germplasms in Ningxia Province

CHEN Xiao-long^{1,2}, MA Li-fen¹, WANG Peng¹, WANG Xue-long¹,
LI Ya-ting¹, LI Peng¹, MA Xiao-yan¹, LI Pei-fu¹

(¹Agricultural College of Ningxia University, Yinchuan 750021;

²Wheat Breeding and Propagating Institution of Yongning, Yongning 750100)

Abstract: This test focuses on the genetic diversity of 60 Japonica rice germplasms in Ningxia province. These Japonica rice germplasms were analyzed by using SSR molecular markers. The results indicated that 58 of 103 pairs SSR primers performed polymorphisms, and 212 alleles were detected. Each pair of primer ranged from 2 to 9 alleles, and the average value was 3.7 alleles. Polymorphic information content (*PIC*) ranged from 0.032 to 0.788, and the average value was 0.403. High-polymorphic loci emerged mainly at chromosome 3, chromosome 6, and chromosome 11, while non-polymorphic loci and low-polymorphic loci emerged at chromosome 1 and chromosome 10. Genetic similarity (*GS*) of paired varieties ranged from 0.642 to 0.958 and mean was 0.790, while that of single varieties ranged from 0.710 to 0.816 and mean was 0.781. Genetic relationship was close among these single varieties. UPGMA cluster analysis showed that 60 rice varieties could be clustered into 11 groups and the overwhelming varieties were clustered into the same group.

Key words: Japonica rice; germplasm; SSR molecular marker; genetic diversity

宁夏是西北地区优质粳稻生态区,非常适宜粳稻的生长,生产出的稻米品质优良。多年来,宁夏的育种工作者培育、引进了一批优良的粳稻品种(系),并形成了具有地方特色的粳稻种质资源。为进一步开展宁夏粳稻育种工作,加强粳稻种质资源的创新与利用,必须掌握现有种质资源的遗传背景,

对育种中经常使用的种质材料的遗传多样性进行详细分析和精确评价。

SSR 标记方法具有方法简便、标记结果可靠、可重复性高、多态性高等优点,是一种较理想的鉴定各作物种质资源遗传多样性的分子标记方法^[1-2]。近些年,SSR 分子标记被广泛的用于各种作物种质资

源遗传多样性的鉴定^[3-6]。本研究使用 SSR 分子标记对宁夏水稻育种中经常使用的 60 份粳稻种质材料的遗传多样性进行鉴定,以了解这些材料的遗传背景,为宁夏水稻种质资源利用、创新及水稻育种提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

根据宁夏粳稻资源状况,选取宁夏各育种单位育成的品种(系)及引进的品种(系),共 60 份。材料名称见表 1。

1.2 方法

2009 年 4 月试验材料种植于宁夏永宁县通桥乡三队水稻育种试验田,水稻分蘖盛期采集新鲜无

病害的叶片,采用稍有改动的 SDS 法提取、纯化核基因组 DNA^[7]。从水稻基因组数据库 (<http://www.gramene.org>) 中搜索 SSR 引物序列,选择均匀分布于水稻染色体的 103 对 SSR 引物,由北京奥科生物技术公司合成。PCR 反应体系总体积为 10 μL ,含 10 ng/ μL DNA 模板 1 μL ,10 \times buffer 1 μL , 25 mmol/L Mg²⁺ 0.6 μL ,2.5 mmol/L dNTPs 1 μL , 4 pmol/ μL Mixed SSR 引物 0.7 μL ,5 U/ μL Taq 聚合酶 0.1 μL 。应用 PTC-200 型 PCR 扩增仪进行扩增,反应程序为:94 °C 预变性 5 min,每个循环 94 °C 变性 45 s,55 ~ 62 °C 退火 45 s,72 °C 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 °C 延伸反应 10 min,4 °C 保存。PCR 反应产物在 8% 的聚丙烯酰胺凝胶上电泳分离,银染显色^[8-9]。

表 1 60 份粳稻种质材料

Table 1 Materials of 60 Japonica rice varieties

编号 No.	材料名称 Name of materials	编号 No.	材料名称 Name of materials	编号 No.	材料名称 Name of materials
1	宁梗 16 号	21	花 98	41	2003Y-266
2	宁梗 24 号	22	优引 3 号	42	吉 2003G39
3	宁梗 28 号	23	宁梗 43 号	43	通禾 03-6025
4	宁梗 29 号	24	雨田 208	44	秋光
5	杨和白皮稻	25	抚 105	45	宁大 62
6	宁梗 33 号	26	铁 9638	46	2004D4
7	宁梗 34 号	27	吉 2000F45	47	吉 T22
8	宁梗 35 号	28	通丰 8 号	48	980127
9	宁梗 36 号	29	田丰 302	49	2004J-33
10	宁梗 37 号	30	丰优 520	50	富禾 9 号
11	宁梗 38 号	31	2004JJ-58	51	吉 2000F59
12	宁梗 40 号	32	九 0308	52	吉 2843
13	宁梗 41 号	33	沈农 9675	53	04-17
14	吉梗 105	34	辽优 2005	54	LDC-3505
15	花 94	35	丰优 5110	55	通梅 586
16	花 86	36	沈农 9806	56	LD3075
17	花 92	37	沈稻 11	57	铁 9466
18	宁原优 6 号	38	丰优 5130	58	沈稻 8 号
19	宁大 142	39	96D10	59	04-27
20	宁大 95	40	平梗 8 号	60	200070

1.3 数据分析

选择扩增效果好的 SSR 引物进行统计分析。每对 SSR 引物检测 1 个位点,视每条多态性带为 1 个等位基因;有带记为 1,无带记为 0,建立 DNA 指纹数据

库。根据所得数据,计算多态位点百分数和位点多态性信息含量(PIC)^[10],以遗传相似系数(GS)^[11]按非加权配对算数平均法(UPGMA)用统计分析软件 NT-SYSpc 2.1 进行聚类分析,并绘制树状图。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性分析

103 对 SSR 引物对 60 份粳稻种质材料的基因组 DNA 进行 PCR 扩增反应,结果有 58 对引物扩增出有多态性的清晰条带,12 对引物扩增出的条带为单一位点,无多态性,33 对引物没有出现扩增条带或扩增条带不完全。多态位点百分率为 56.3%。

对有多态性的 58 对引物进行统计分析,计算等位变异数和多态性信息含量,结果列于表 2。表 2 数据显示,58 对 SSR 引物共检测到 212 个等位变异

(Ae),等位变异范围为 2~9,平均每对引物 3.7 个。扩增条带介于 75~350 bp,以 100~200 bp 的扩增片段居多。在 58 对引物中,RM8276 的等位变异数最多,达到 9 个;其次是 RM1089、RM1880,等位变异数为 8 个;RM3850、RM3826 等引物等位变异数为 7 个;有 18 对引物检测到 2 个等位变异,多态性较差。引物等位变异多态性信息含量 (PIC) 变幅为 0.032~0.788,平均为 0.403。引物 RM7027 的 PIC 最小,引物 RM1089 的 PIC 最大。PIC 大于平均值的 SSR 位点有 29 个,占 50%,表明这些引物对供试材料有较强的区分能力。

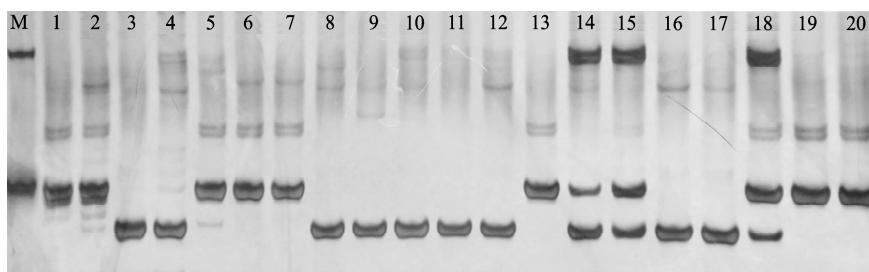
表 2 58 个 SSR 标记检测到的等位变异数及其多态性信息含量 (PIC)

Table 2 Number of alleles and PIC values of 58 SSR markers

引物 Primer	染色体 Chromosome	等位变异 Alleles	多态性信息含量 PIC	引物 Primer	染色体 Chromosome	等位变异 Alleles	多态性信息含量 PIC
RM1254	1	2	0.320	RM3826	7	7	0.642
RM8105	1	2	0.064	RM1132	7	2	0.033
RM6289	1	2	0.231	RM1295	8	2	0.358
RM6190	1	2	0.033	RM5432	8	3	0.182
RM7075	1	3	0.315	RM3181	8	3	0.429
RM5389	1	3	0.235	RM7027	8	2	0.032
RM6696	1	6	0.710	RM6215	8	3	0.063
RM3482	1	5	0.727	RM3459	8	4	0.492
RM6141	1	2	0.124	RM6845	8	3	0.533
RM3703	2	2	0.033	RM1308	8	5	0.647
RM6895	2	2	0.339	RM6475	9	3	0.303
RM3850	2	7	0.770	RM3700	9	4	0.419
RM8277	3	5	0.631	RM6670	9	5	0.695
RM3166	3	2	0.444	RM6370	10	4	0.536
RM3586	3	2	0.480	RM5348	10	4	0.235
RM5688	4	6	0.732	RM5620	10	2	0.231
RM3367	4	4	0.382	RM1108	10	2	0.124
RM6504	4	4	0.126	RM3451	10	3	0.384
RM8276	4	9	0.722	RM3701	11	4	0.579
RM4915	5	2	0.153	RM7277	11	4	0.576
RM1089	5	8	0.788	RM6293	11	3	0.575
RM3663	5	3	0.096	RM7654	11	5	0.717
RM2126	6	3	0.508	RM7212	11	5	0.289
RM6298	6	4	0.252	RM1880	12	8	0.736
RM1370	6	6	0.699	RM6288	12	2	0.033
RM1150	6	3	0.590	RM3472	12	2	0.267
RM4098	7	2	0.420	RM1036	12	5	0.706
RM6872	7	3	0.585	RM3739	12	4	0.399
RM7338	7	4	0.424	合计 Total		212	23.359
RM3186	7	3	0.210	平均 Mean		3.7	0.403

此外,每条染色体上选用的 SSR 引物平均多态性信息含量变幅为 0.302~0.547。其中,3 号、6 号和 11 号染色体平均多态性信息含量较高,分别为 0.518、0.512 和 0.547;4 号、9 号和 12 号染色体平均多态性信息含量次之,分别为 0.491、0.472 以及 0.428;1 号和 10 号染色体平均多态性信息含量最低,仅为 0.307 和 0.302。数据说明,本试验所选用

的 SSR 引物多态性较好,且位于不同染色体上的 SSR 标记多态性表现并不一致;高多态性位点主要发生在 3 号、6 号和 11 号染色体上,4 号、9 号和 12 号染色体次之,而无多态性或低多态性位点主要发生 1 号和 10 号染色体上。图 1 显示的是引物 RM6845 对部分粳稻种质资源的 PCR 扩增电泳图,图中 1~20 号供试材料显示出不同的 SSR 带型。



1~20为试验材料编号同表1

Variety codes of 1-20 are the same as Table 1

图1 引物RM6845对部分粳稻种质材料的PCR扩增结果

Fig.1 The amplification results of PCR reaction using RM6845 for partial Japonica rice varieties

2.2 SSR 标记遗传相似性分析

根据58对SSR引物在60份种质资源中所获得的212条扩增条带计算供试种质材料间的分子标记

遗传相似系数(GS),根据遗传相似系数计算单个供试种质资源材料GS的平均值,并将其与成对供试种质资源材料的最大GS值和最小GS值列于表3。

表3 供试粳稻种质资源材料配对遗传相似系数

Table 3 The paired genetic similarity of tested Japonica rice varieties

编号 No.	平均值 Mean	最小值 Min.	最大值 Max.	编号 No.	平均值 Mean	最小值 Min.	最大值 Max.
1	0.786	0.698(34)	0.851(6,23,49)	32	0.784	0.698(34)	0.865(58)
2	0.763	0.674(34)	0.874(23)	33	0.802	0.712(34)	0.940(36)
3	0.763	0.651(31)	0.935(8)	34	0.710	0.642(5)	0.781(46)
4	0.787	0.684(34)	0.879(27)	35	0.763	0.647(34)	0.874(30)
5	0.716	0.642(34)	0.786(19)	36	0.813	0.726(34)	0.940(33)
6	0.799	0.707(34)	0.884(16)	37	0.782	0.698(34)	0.847(33)
7	0.795	0.721(23)	0.856(33)	38	0.784	0.698(34)	0.958(42)
8	0.764	0.679(31)	0.935(3)	39	0.777	0.712(5)	0.916(46)
9	0.756	0.651(34)	0.851(30)	40	0.747	0.679(34)	0.833(53)
10	0.782	0.693(31)	0.916(17)	41	0.739	0.651(5)	0.935(22)
11	0.786	0.679(31)	0.930(16)	42	0.807	0.707(5)	0.958(35)
12	0.773	0.674(34)	0.870(10,17)	43	0.809	0.721(5)	0.888(54)
13	0.796	0.707(45)	0.940(46)	44	0.793	0.698(34)	0.916(18)
14	0.790	0.665(5)	0.861(43,44)	45	0.750	0.679(34)	0.828(10)
15	0.779	0.674(5)	0.865(10)	46	0.811	0.730(45)	0.940(13)
16	0.810	0.726(5)	0.930(11)	47	0.779	0.693(31)	0.856(14)
17	0.768	0.679(5)	0.916(10)	48	0.782	0.674(34)	0.874(52)
18	0.785	0.684(5)	0.916(44)	49	0.802	0.707(34)	0.888(19,46)
19	0.790	0.679(34)	0.888(49)	50	0.795	0.726(17)	0.870(55)
20	0.766	0.661(41)	0.842(06)	51	0.786	0.684(5)	0.949(27)
21	0.782	0.693(34)	0.856(49)	52	0.816	0.726(34)	0.935(36)
22	0.749	0.661(5)	0.935(31,41)	53	0.785	0.674(5)	0.907(51)
23	0.761	0.670(41)	0.874(2)	54	0.806	0.730(45)	0.888(43)
24	0.745	0.670(34)	0.828(58)	55	0.805	0.744(34)	0.879(46)
25	0.802	0.716(5)	0.874(26)	56	0.799	0.716(5)	0.916(42)
26	0.810	0.721(5)	0.888(57)	57	0.809	0.726(34)	0.926(36,52)
27	0.794	0.688(5)	0.949(51)	58	0.809	0.726(5)	0.884(26,57)
28	0.784	0.679(5)	0.856(26,54)	59	0.790	0.698(5)	0.870(56)
29	0.772	0.707(45)	0.842(8)	60	0.756	0.679(4)	0.828(48)
30	0.751	0.651(34)	0.874(38)	平均 Mean	0.781	0.691	0.889
31	0.741	0.651(3)	0.935(22)				

括号内数字为该遗传相似系数对应的粳稻种质资源材料编号

The number in the bracket represented the Japonica rice variety number corresponding to the genetic similarity

由表3可知,成对供试材料的GS值变幅为0.642~0.958,平均为0.790。其中,杨和白皮稻和辽优2005的GS值最小(0.642),遗传距离最远,遗传相似程度最低,其次是辽优2005和丰优5110、宁梗28号和2004JJ-58、宁梗36号和辽优2005、丰优520和辽优2005、杨和白皮稻和2003Y-266等,GS值分别为0.647和0.651;丰优5130和吉2003G39的GS值最大(0.958),遗传相似性最高,其次是吉2000F45和吉2000F59、宁梗41号和2004D4、沈农9675和沈农9806等,GS值分别是0.949、0.940和0.940。

单个供试材料的平均GS值变幅为0.710~0.816,总平均值为0.781。共有23份种质资源材料平均GS值小于总平均值(0.781),分别是:宁梗24号、宁梗28号、杨和白皮稻、宁梗35号、宁梗36

号、宁梗40号、花94、花92、宁大95、优引3号、宁梗43号、雨田208、田丰302、丰优520、2004JJ-58、辽优2005、丰优5110、96D10、平梗8号、2003Y-266、宁大62、吉T22、200070。其中,辽优2005和杨和白皮稻的平均GS值最小,分别为0.710和0.716,遗传基础与其他材料最远。其他37份材料的平均GS值大于总平均值(0.781),占供试材料的61.7%。其中,吉2843的平均GS值最大(0.816),其次是沈农9806,平均GS值为0.813,与其他供试材料的亲缘关系最近。总体上,大部份供试材料的平均GS值较高,遗传基础狭窄,亲缘关系较近。

2.3 SSR 标记的聚类分析

依据SSR分子标记数据构建供试种质资源的聚类图,其结果见图2。图2显示,在遗传相似系数

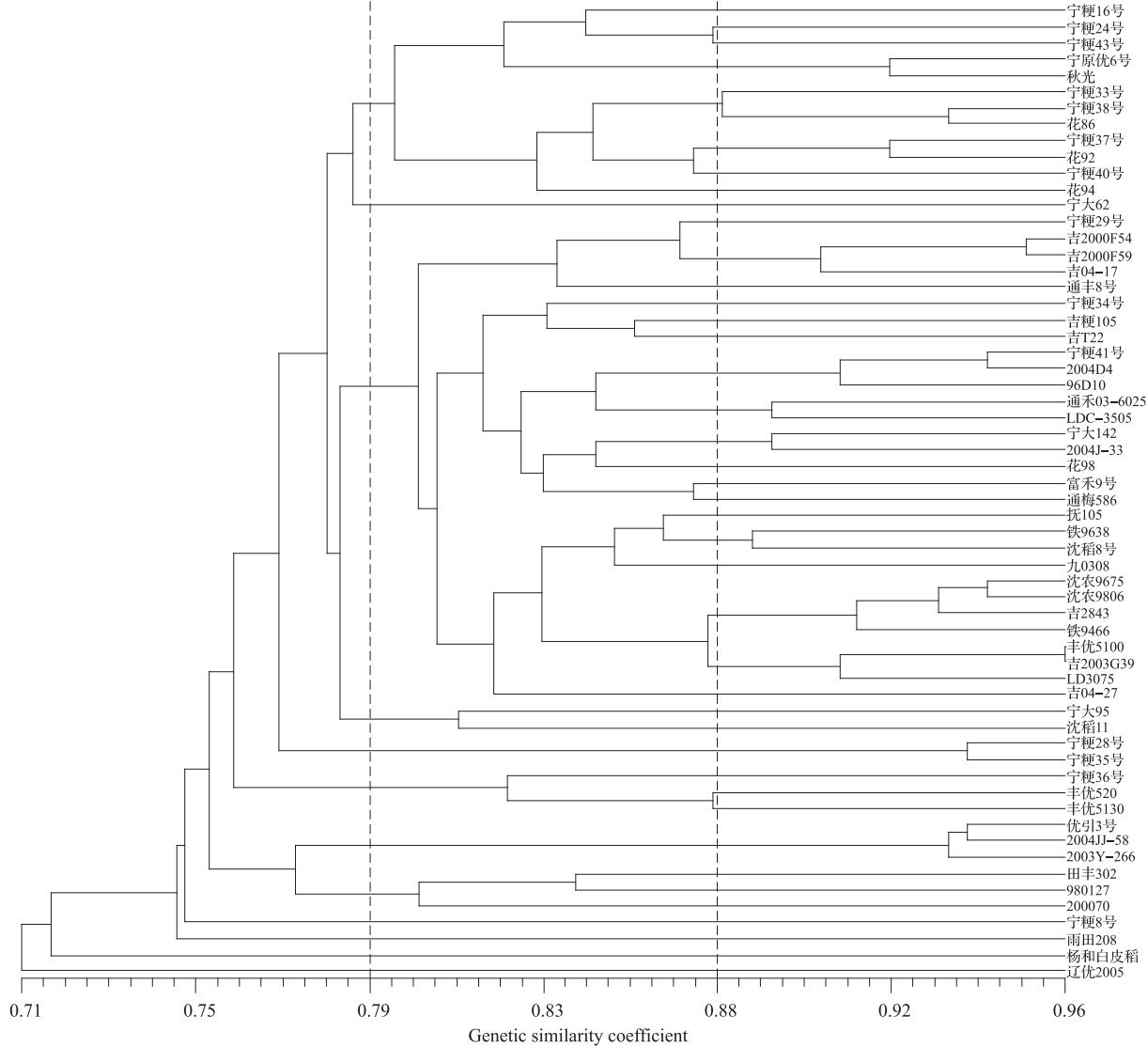


图2 根据SSR数据用UPGMA法构建的树状图

Fig. 2 The diagram tree generated by SSR data using UPGMA method

约0.785处,供试材料被分为11类。其中,第1、2、3、4类各自只包含1个品种,分别是辽优2005、杨和白皮稻、雨田208、平梗8号。第5类包含3个材料,分别是200070、980127和田丰302。第6类包含3个材料,分别是2003Y-266、2004JJ-58和优引3号。第7类包含3个材料,分别是丰优5130、丰优520和宁梗36号。第8类包含2个材料,分别是宁梗28号和宁梗35号。第9类包含2个材料,分别是沈稻11和宁大95。第10类包含30个材料,绝大部分材料是外引品种(系)。第11类包含13个材料,基本是宁夏育成的品种(系)。聚类分析结果表明,60份宁夏粳稻种质资源在分子水平上存在一定的差异,但大多数品种被聚在少数几个类别中,表明大多数资源材料间的遗传变异较小,亲缘关系较近,少数种质资源在分子水平上具有较高的遗传变异,亲缘关系较远,遗传基础丰富;来源相同的材料能被聚在一起,但并不是十分明显。

3 讨论

本研究结果表明,58对有多态性的标记共检测出212条多态性条带,等位变异范围为2~9,平均每对引物3.7个,多态性信息含量(PIC)变幅为0.032~0.788,平均为0.403。表明SSR分子标记在水稻种质资源遗传多样性检测上具有很高的效率。从相似性分析和聚类结果上看,大部分粳稻种质材料遗传相似性较高,遗传基础狭窄,GS值变幅较小,其范围为0.642~0.958,平均为0.781。以杨和白皮稻为代表的宁夏地方品种与其他材料相比有较大的遗传差异,说明充分挖掘、利用宁夏地方水稻品种,对提高宁夏今后所育水稻品种(系)的遗传多样性水平是很有价值的。宁夏育成的品种(系)大部分聚在一起,但不明显。总体上,宁夏粳稻种质资源材料之间的遗传背景均比较相似,多数品种显示出较近的亲缘关系,遗传基础相对单一。

甘晓燕等^[12]、刘炜等^[13]选用与本研究不同的宁夏粳稻种质资源和SSR分子标记研究宁夏粳稻种质资源遗传多样性,得出与本试验相同的结论,这说明宁夏的粳稻种质资源整体上亲缘关系较近,遗传基础狭窄。导致这种结果的原因可能有以下几点:宁夏特殊的地理环境,只适合生育期相对较短、温光反应迟钝的寒地稻作品种;在引种过程中,大多

数品种(系)为东北水稻资源,适合本地的其他地理环境的水稻资源相对较少;在杂交育种中,多数杂交亲本亲缘关系较近,可选择的范围比较狭窄,造成选育品种(系)的某些性状趋于一致。水稻种质资源是水稻育种工作顺利进行的基础,应保持水稻种质资源有较大的遗传距离和多样性水平^[14-15]。根据本试验结果,宁夏水稻育种非常急需拓宽遗传资源,解决资源材料多样性狭窄及亲缘关系较远的品种不具备优良品质性状的问题。应加强对特异亲本类型的培育及优良基因的挖掘,扩大宁夏粳稻品种的遗传基础;在继续引进利用东北的优良品种外,应积极考虑其他地理环境可引进应用的品种,以扩大杂交亲本的亲缘关系及范围。否则,将会面临种植品种亲缘关系近而受到毁灭性的自然灾害危害,而且育种工作也难以打破现阶段徘徊局面^[16]。

参考文献

- [1] 杨进. SSR标记技术在植物遗传多样性研究上的应用[J]. 中国农学通报, 2006, 22(7): 90-93
- [2] 曾莉娟, 郑成木. SSR技术及其应用[J]. 热带农业科学, 2001(3): 56-59
- [3] 杨冬娟, 马瑞军. SSR分子标记在作物遗传多样性研究中的应用现状[J]. 甘肃科技, 2007, 23(8): 99-102
- [4] 齐永文, 张冬玲, 张洪亮, 等. 中国水稻选育品种遗传多样性及其近50年变化趋势[J]. 科学通报, 2006, 51(6): 693-699
- [5] 华蕾, 袁筱萍, 余汉勇, 等. 我国水稻主栽品种 SSR多样性的比较分析[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(2): 150-154
- [6] 杨静. 黑龙江省水稻品种 SSR标记遗传多样性分析[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2006
- [7] Zheng K L, Subudi P K, Domingo J, et al. Rapid DNA isolation for marker-assisted selection in rice breeding [J]. Rice Genet News, 1995, 12: 255-258
- [8] 郑景生, 吕蓓. PCR技术及实用方法[J]. 分子植物育种, 2003, 1(3): 381-394
- [9] 王廷华, 景强. PCR理论与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2005: 3-25
- [10] 吴秋花, 李晓方, 毛兴学. 水稻微卫星标记与遗传多样性检测[J]. 分子植物育种, 2005, 3(5): 744-748
- [11] Sokal R R, Sneath P H A. Principles of numerical taxonomy [M]. San Francisco: WH Freeman and Company, 1963: 359-360
- [12] 甘晓燕, 李苗, 关雅静, 等. 宁夏89份粳稻种质遗传多样性的SSR分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(9): 1772-1778
- [13] 刘炜, 李自超, 史延丽, 等. 利用SSR标记进行粳稻品种的遗传多样性研究[J]. 西南农业学报, 2005, 18(5): 509-513
- [14] 玄英实, 姜文洙, 刘宪虎, 等. 中国东北地区水稻主要栽培品种的遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2): 206-212
- [15] 张立娜, 曹桂兰, 韩龙植. 利用SSR标记揭示中国粳稻地方品种遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2012, 45(3): 405-413
- [16] 赵庆勇, 张亚东, 朱镇, 等. 30个粳稻品种 SSR标记遗传多样性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(2): 218-223