

太湖稻区 32 个水稻品种 DNA 指纹图谱的构建及遗传多样性分析

钮玉伟, 杨志刚*, 罗兵, 孙海燕 (常熟理工学院生物科学与工程系, 江苏常熟 215500)

摘要 [目的]采用 SSR 标记构建太湖稻区 16 个常规粳稻品种和 16 个杂交水稻品种 DNA 指纹图谱并进行遗传多样性分析。[方法]以筛选出的 12 对多态性高、稳定性好且在染色体上分布均匀的引物作为核心引物,构建太湖稻区 32 个主要栽植水稻品种 DNA 指纹图谱,以 NTSYS-PCV2.10 软件分析遗传多样性。[结果]12 对 SSR 引物在 32 份材料中共扩增出了 47 个等位基因,平均每对引物 4.7 个,变幅 2~6 个;12 对引物的多态性频率(*FP*)平均值为 0.627,变幅 0.266~0.833;以遗传相似系数 0.74 为阈值可将供试 32 个水稻品种分成 4 类。[结论]太湖稻区 32 个水稻品种遗传多样性相对狭窄。

关键词 SSR; 遗传多样性; 指纹图谱; 水稻

中图分类号 S511 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2014)36-12833-03

Construction of Fingerprint and Analysis of Genetic Diversity with SSR Markers for Thirty-Two Rice Cultivars in Taihu Lake Area NIU Yu-wei, YANG Zhi-gang*, LUO Bing et al (Department of Bioengineering, Changshu Institute of Technology, Changshu, Jiangsu 215500)

Abstract [Objective] The aim of this study was to construct a DNA fingerprinting database of 32 rice cultivars in Taihu lake area, and the genetic diversity was analyzed based on simple sequence repeats(SSR). [Method] Twelve evenly distributed SSR primer pairs with high polymorphisms and good repeatability were successfully screened to construct the fingerprinting database. [Result] Among the 32 varieties, 12 primer pairs had 47 polymorphic locis, and 4.7 polymorphic locis were detected by each SSR primer pair on an average with the range from 2 to 6. Results show that, SSR markers are suitable for using in construction of rice DNA fingerprint with polymorphism differences between the selected varieties. The genetic diversity analyzed by the software of NTSYS-pc V2.10 indicated that, 32 rice varieties can be divided into 4 types based on the genetic similarity coefficient of 0.74 threshold. [Conclusion] The genetic diversity of 32 rice cultivars in Taihu lake area is relatively narrow.

Key words SSR; Genetic diversity; DNA fingerprint; Rice

随着现代生物技术的发展,以 DNA 分子标记为基础的品种 DNA 指纹技术也飞速发展,并开始应用于品种鉴定等领域^[1-2]。利用 DNA 指纹图谱鉴别作物品种具有简单快捷、重复性好、对品种变异鉴别能力灵敏的优点,可直接反映生物的遗传物质在 DNA 分子水平上的差异,甚至可以区分一些基因组中的微小变异^[3]。DNA 指纹图谱具有较高的多态性和个体特异性,能够避免外界的环境干扰,不受生长发育时间的制约,快速、稳定及准确鉴定品种(系),包括表型难以鉴定的品种^[4],为作物育种和种子管理提供极大的便利^[5]。

已有学者利用微卫星标记(SSR)进行部分地区水稻品种鉴定、指纹库构建、遗传多样性分析^[6-9]。陈跃进等^[6]选用 55 对微卫星标记引物对 23 个水稻品种进行了亲缘关系分析。陈英华等^[7]构建了东北地区水稻区试新品种的 DNA 指纹图谱,刘炜等^[8]用 37 对 SSR 引物分析了 72 个不同生态类型籼粳稻品种的遗传多样性。笔者采用筛选的 12 对水稻 SSR 引物,构建了太湖稻区主要栽植的 32 个水稻品种的 DNA 指纹图谱,以期对太湖稻区水稻品种鉴定、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 材料与方法

1.1 试验材料

32 份供试水稻品种为 2013 年太湖稻区栽

植的水稻品种,在常熟市农业科学研究所水稻品种展示区按常规栽培和管理收获,材料编号、品种名称来见表 1。

表 1 32 个水稻品种名称

编号	常规稻	编号	杂交稻
1	南粳 47	17	常优 12-11
2	宁 47	18	常优 12-8
3	镇稻 17 号	19	常优 11-5
4	常粳 12-8	20	常优 4 号
5	常粳 12-9	21	苏优 72
6	嘉 33	22	通梗优 9
7	南农大 09-4240	23	常优 3 号
8	常糯 1 号	24	常优 12-6
9	苏虞香粳 12-2	25	常优 12-18
10	常粳 12-10	26	常优 12-4
11	常粳 11-5	27	常优 09-3
12	南粳 46	28	常优 12-5
13	常农粳 6 号	29	常优 12-13
14	苏虞香粳 12-1	30	常优 12-16
15	常农粳 5 号	31	常优 2 号
16	镇稻 13 号	32	常优 5 号

1.2 DNA 提取 按照 CTAB 法提取水稻基因组 DNA。操作流程:①研钵中加入 100 mg 水稻叶子样品和 700 μ l CTAB 提取液,充分研磨;②转移混合液至 1.5 ml 离心管中,65 $^{\circ}$ C 水浴 30 min,每隔 5 min 振荡混匀;③取出离心管,冷却到室温后 8 000 r/min 离心 2 min;④取出离心管,上清液转移至 1.5 ml 离心管中,加入等体积氯仿混匀,振荡 10 min;⑤ 12 000 r/min 常温离心 10 min;⑥转移上清液至 1.5 ml 离心管中,加等体积异丙醇,混匀后静置 10 min,12 000 r/min 离心 10 min,弃上清液。70%~75% 乙醇漂洗沉淀 2 次,超净工

基金项目 江苏省自然科学基金项目(BK20140417);苏州市科技计划项目(SZS201102, SYN201110 和 SNG201323);苏州市吴江区科技计划项目(WN201311, WN201317);常熟市科技计划项目(CS201205)。

作者简介 钮玉伟(1992-),男,江苏东海人,本科生,专业:生物工程。* 通讯作者,高级实验师,硕士,从事天然产物研究与开发。

收稿日期 2014-11-10

作台上吹干;⑦加 ddH₂O 50 μl,沉淀 DNA 溶解后冰箱保存备用。

1.3 PCR 扩增及电泳检测 20 μl 反应液中包括 10 × PCR buffer、0.1 mmol/L dNTP、1 U *Taq* DNA 聚合酶、1.5 mmol/L Mg²⁺、50 ng DNA 模版和 0.3 μmol/L EST-SSR 引物。反应程序为 94 °C 预变性 4 min;94 °C 变性 1 min,55 °C 退火 60 s,72 °C 延伸 1 min,共 35 个循环;72 °C 延伸 10 min。PCR 扩增产物选用 60 g/L 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,36 W 电泳 3 h。参考王风格等^[9]快速银染法,稍加修改如下:50% 无水乙醇、2.5% 冰醋酸组成的固定液固定 5 min;双蒸水快速漂洗 1 次;0.2% AgNO₃ 溶液染色 5 min;1.5% NaOH、0.4% 甲醛组成的显影液显影;固定液定影。

1.4 数据分析 根据 SSR 扩增产物在电泳凝胶上的相对位置,观察稳定且易于辨别的差异性条带,选出具有多态性的

引物,记录并进行统计分析,建立其 DNA 指纹图谱。统计每对引物扩增的条带数,计算多态性频率(frequency of polymorphism,FP)。用 Excel 的方法计算物种间相似系数(GS)和遗传距离指数(D),根据所得遗传系数矩阵用 NTSYS2.1 软件进行统计分析并聚类分析。

2 结果与分析

2.1 品种 DNA 指纹库的建立 对所有品种的带型进行记录整理后,将 12 对 SSR 引物产生的 47 个多态位点依次排序,形成一个 SSR 数据矩阵(表 2),建立 32 个水稻区试材料的 DNA 指纹库,以区分供试的每个品种。12 对引物中 RM 1195 能鉴别常粳 12-8,RM489 能鉴别南粳 46、常优 12-18、常优 2 号,RM5414 能鉴别嘉 33,RM253 能鉴别常优 4 号,RM337 能鉴别南农大 09-4240、常优 12-11、常优 11-5,其余引物无法单独地鉴别某一材料。

表 2 32 份水稻材料的 DNA 指纹图谱

编号	材料名称	DNA 指纹库
A1	南粳 47	111111-0001-111-0100-111-01100-001-1111-01010-10101-01-001
A2	宁 47	111111-0001-111-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-01-001
A3	镇稻 17 号	111111-0001-111-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-10-010
A4	常粳 12-8	000001-0001-111-0100-111-01100-001-0010-01010-00001-10-010
A5	常粳 12-9	111111-0001-111-0100-111-01010-000-0010-01010-00001-01-010
A6	嘉 33	000111-1111-111-0001-111-01100-001-0010-00000-00001-01-010
A7	南农大 09-4240	000111-0001-111-0100-111-01010-010-0001-01010-10101-01-010
A8	常糯 1 号	111111-0001-111-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-01-101
A9	苏虞香粳 12-2	111111-0001-111-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-01-101
A10	常粳 12-10	111111-0001-110-0100-111-01100-000-0010-01010-00001-01-010
A11	常粳 11-5	000000-0001-111-0100-111-01100-000-0010-01010-00001-01-001
A12	南粳 46	000000-0001-101-0100-111-01110-000-0010-01010-00001-01-001
A13	常农粳 6 号	000000-0001-111-0000-000-00000-000-0010-01010-00000-00-000
A14	苏虞香粳 12-1	111111-1111-111-0100-111-01110-010-0010-01010-10101-01-010
A15	常农粳 5 号	000000-0001-111-0100-111-01100-010-0010-00000-00001-10-010
A16	镇稻 13 号	000111-0001-111-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-01-001
B1	常优 12-11	000000-0001-000-0100-111-01100-010-0011-01010-00001-00-010
B2	常优 12-8	000000-0001-111-0100-111-00000-010-1111-00011-10101-00-111
B3	常优 11-5	000000-0001-111-0100-000-01100-000-1110-01010-00001-01-010
B4	常优 4 号	000000-0000-111-0100-111-01000-000-0010-01010-00001-01-001
B5	苏优 72	000111-0001-111-0100-111-01110-000-0010-01010-00001-01-111
B6	通粳优 9	000000-0001-111-0100-111-01100-100-0010-00011-00001-01-010
B7	常优 3 号	000111-0001-111-0100-111-01100-100-0010-10100-00001-00-001
B8	常优 12-6	000111-0001-111-0100-111-01100-100-0010-00000-00001-10-001
B9	常优 12-18	000111-1111-001-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-01-010
B10	常优 12-4	111111-0001-111-1110-111-10001-010-1101-01010-01010-00-001
B11	常优 09-3	111111-0001-111-1110-111-10001-010-0000-01010-01010-10-001
B12	常优 12-5	000000-0001-111-0100-111-01100-010-1101-10100-00001-01-111
B13	常优 12-13	111111-0001-110-0100-111-01100-010-0010-01010-10101-01-111
B14	常优 12-16	111111-0001-111-0100-111-01100-010-0010-01010-00001-01-001
B15	常优 2 号	000000-0001-011-0100-111-01100-100-0010-01010-00001-00-001
B16	常优 5 号	000000-0001-010-0100-111-01100-010-0010-01010-10101-01-000

2.2 SSR 引物的多态性分析 用 12 对 SSR 标记引物在 32 份参试材料中共检测到 47 个等位基因,每对标记引物的等位基因数不等,变幅为 2~6 个,平均 4.7 个,这些引物对所有供试材料的扩增结果重复性好,特异性高,条带清晰且多态性丰富。其中 RM1195 的等位基因数最多,为 6 个,RM209

的等位基因数最少,为 2 个。用多态性频率 FP 值(local variety)来衡量所有参试水稻品种的遗传多样性(表 3),12 对 SSR 引物平均的 FP 值为 0.550,其中 FP 值最大为 RM1195 的 0.833,最小为 RM5414 的 0.266。在常规品种中 FP 值最大的为 RM1195 的 0.843,最小的为 RM5414 的 0.133,平均值

为 0.516;而在杂交品种中 FP 值最大的为 RM1195 的 0.838,最小的为 RM209 的 0.327,平均值为 0.612。12 对 SSR 引物在供试材料中表现了一定的多态性。

表 3 12 对 SSR 引物的基本信息及在 32 份供试材料中的遗传多样性信息

位点	染色体	位置 cm	等位基因 数 NA	常规品种 多态性频 率 (FP)	杂交品种 多态性频 率 (FP)	总体 (FP)
RM1195	1S	40.0	6	0.843	0.838	0.833
RM71	2S	49.8	4	0.468	0.386	0.392
RM489	3S	22.2	3	0.695	0.683	0.675
RM5414	4S	25.5	4	0.133	0.642	0.266
RM267	5S	30.0	3	0.682	0.682	0.674
RM253	6S	37.0	5	0.619	0.664	0.635
RM336	7L	61.0	3	0.436	0.462	0.475
RM337	8S	1.1	4	0.380	0.680	0.563
RM553	9S	76.7	5	0.587	0.687	0.632
RM258	10S	70.8	5	0.471	0.641	0.558
RM209	11S	73.9	2	0.248	0.327	0.271
RM19	12S	20.9	3	0.632	0.648	0.627

2.3 SSR 标记的聚类分析 根据 22 对 SSR 引物所检测出的 47 个位点,对 32 份材料进行聚类分析。从图 1 可以看出,遗传相似系数的变异范围为 0.58 ~ 1.00。其中宁 47 和常优 12-16、常糯 1 号和苏虞香粳 12-2 两组材料间的遗传相似系数达 1.00,在 12 对 SSR 标记检测到的位点上尚不存在差异,需结合植株或种子外形加以区分。

从图 1 可以看出,品种间的遗传变异较小。以 0.74 为阈值,可以将 32 个材料分为 4 个群。第 1 个群包括 2 种供试材料(常优 12-8 和常优 12-5),第 2 个群包括 2 种供试材料(嘉 33,常优 12-18),第 3 个群包括 13 种供试材料(南梗 46、宁 47、常优 12-16、常糯 1 号、苏虞香粳 12-2、镇稻 13 号、镇稻 17 号、常优 12-13、常粳 12-9、常粳 12-10、苏优 72、南农大 09-4240、苏虞香粳 12-2),剩下的 13 个供试材料在第 4 个群中,这些材料之间具有较近的遗传距离。

3 讨论

3.1 遗传多样性分析 根据 DNA 指纹的差异程度进行遗传聚类分析,可以掌握品种间的亲缘关系和遗传距离,以帮助分析品种的特性。该研究所分析的 32 个水稻品种,12 个微卫星标记的多态性频率介于 0.266 ~ 0.833,平均 FP 值为 0.550。表明所选 SSR 标记的多态性存在较大差异,部分多态性频率较小,不利于水稻品种的遗传多样性分析和品种鉴定。此外,基于常规水稻品种的标记多态性频率平均值为 0.516,低于杂交水稻品种的标记多态性频率平均值 0.612。该研究检测出的 47 个等位基因,每个位点的等位基因数目不等,变幅为 2 ~ 6 个,平均 4.7,低于相关文献报道中平均标记 5.5 个多态性片段,其原因可能与该研究所用材料及 SSR 引物数较少,遗传多样性相对较低有关,也可能与材料间遗传距离小、所用亲本相近有关。

3.2 DNA 指纹图谱数据库 该研究利用分子标记技术对江苏太湖稻区 32 份水稻材料进行了鉴定,聚类分析的结果

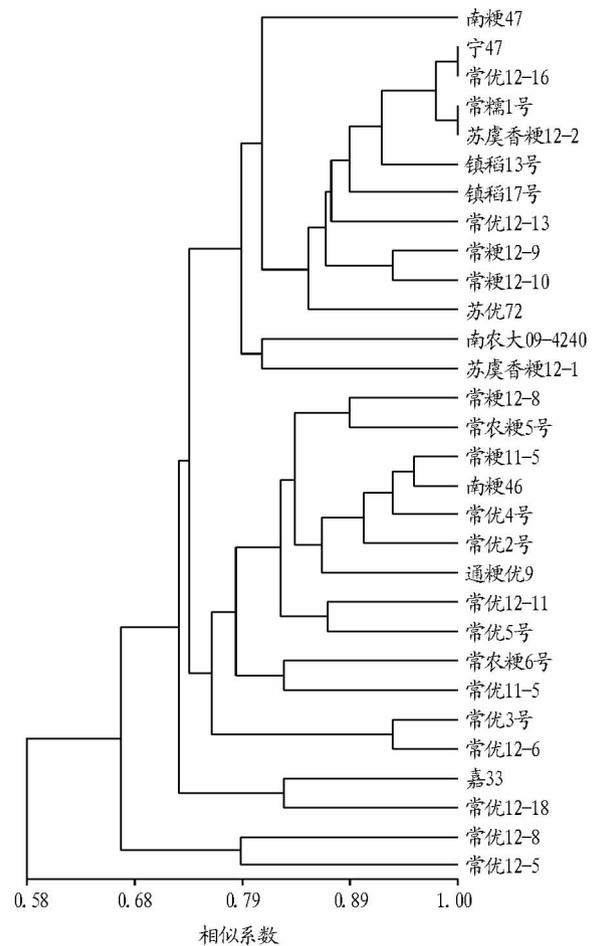


图 1 32 份水稻材料的聚类分析

反映了材料之间在 DNA 水平上的相似性。供试材料间遗传相似系数都大于 0.58,大多数品种显示出较近的遗传距离,遗传基础相对狭窄。部分材料可以单对引物的特征带加以鉴别区分,大部分供试材料必须结合多对引物使用,引物之间依靠彼此所能区分的品种不同,从而组合在一起相互弥补区分开图谱库中的全部品种。聚类分析显示,宁 47 为常优 12-16 的亲本,常糯 1 号为苏虞香粳 12-2 的亲本,亲缘关系近,不能把它们区别开。聚类分析中,聚类结果有一定的地域分布特点,不同地区的育成品种往往遗传差异较大,不容易聚在一起;同一单位的育成品种遗传差异较小,容易归为一类,如常农粳 5、6 号、常优 2 号和常优 4 号;另外,同一系列水稻品种的遗传差异也较小,容易聚在一起,如部分常优系列品种聚为一小类,但也可能归于其他类群中,这可能是不同品种亲本的遗传差异较大所致。

参考文献

- [1] 王风格,赵久然,郭景伦,等. 玉米品种纯度及真伪鉴定中 SSR 技术标准实验体系的建立[J]. 玉米科学,2003,11(1):3-6.
- [2] 李俊芳,张雪原,孙世贤,等. 预试品种的真实性和一致性评价[J]. 玉米科学,2006,14(6):38-42.
- [3] 王风格,赵久然,戴景瑞. 玉米品种 DNA 指纹数据库构建的标准化规范[J]. 分子植物育种,2007,5(1):128-132.
- [4] 朱卫红,齐建双,铁双贵. DNA 指纹图谱在玉米杂交种真伪及纯度鉴定中的应用[J]. 河南农业科学,2007(10):33-36.

用,严禁棚内温度超 30 ℃ 以上使用,忌阴雨天使用;三是严禁同一雌花重复使用,以及过量、高浓度、不均匀使用。坐果时严格按照药剂浓度要求配制药水。药后挂牌方法做好标记,注明坐果时间。待果实长到鸡蛋大小时,进行疏果,以三蔓整枝留 2 果为宜。一齐坐果达不到目标果数时,必须在其后的雌花上继续授粉让植株继续坐果,直到每株达到目标果数为止。

5.4 追肥 幼瓜鸡蛋大小时施膨瓜肥,每隔 7~10 d 每 667 m² 滴灌三元复合肥 10 kg,或结合灌水施用水融肥;后期可用 0.3% 磷酸二氢钾水液叶面喷施 2~3 次,每隔 7 d 喷一次。采收前 5~7 d 停止浇水施肥。首茬瓜采摘完毕后,及时滴灌补水补肥。一般在瓜垄一侧每 667m² 施三元复合肥 10 kg、硫酸钾 5~10 kg,或滴灌随水施氮、磷、钾复合肥 8~10 kg,并叶面喷 0.3% 磷酸二氢钾液或春泉 883 等腐殖酸叶面肥 1~2 次。每茬瓜收获后,都要及时加强肥水管理,加强棚内温湿度调控,促进生长,延缓早衰。

6 收获

根据授粉标志确定采收期,或根据拍打声音、瓜的颜色等确定采收期,例如,果实附近的卷须开始萎蔫;果柄茸毛大部分消失;果皮发亮;瓜蒂凹陷。采收西瓜最好在 10:00 前或傍晚时进行。

6.1 头茬瓜 坐果时必须作好座果日(开花日)的标记,以开花后的日数进行收获时期的判断最准确。由于拿比特小型西瓜属于早熟品种,以坐果为基准,一般从雌花开放到该果实成熟所需天数为 28~35 d,其中第 1 茬果相对时间较长,随外界气温升高,成熟期逐步缩短。由于前期春季气温不稳定,收获前最好进行数次的开刀试食,以确定收获的适期。收获前 15 d 内严禁使用任何农药。

6.2 二次坐果 头茬瓜收获开始时,及时对顶端开出的雌花进行授粉,开始二次坐果,方法同一次坐果。此外,头茬瓜收获完后,视植株长势进行追肥和灌水,并注意防治病虫害。随后还可进行三、四次坐果,方法与前次相同。

6.3 拉秧 一般在 10 月上中旬(温光条件适宜情况下可至 10 月底)收获 4~5 茬瓜后,全生育过程结束,即可拉秧。

7 包装

拿比特西瓜采收后,及时张贴无公害标识及产品商标标

识,便于查询产品质量安全追溯管理档案信息,采用瓜类专用箱分级包装,包装箱的规格根据果实大小和预装个数而定,一般每箱装 4 或 8 个,质地以硬板纸箱为好,并注明产地、品种名称及特性、等级、净重、采收日期、商标等内容。

8 病虫害防治

8.1 常见病害 有猝倒病、立枯病、蔓枯病、炭疽病、病毒病、枯萎病、疫病、白粉病等,常见的虫害有蚜虫、白粉虱、美洲斑潜蝇、瓜绢螟、瓜蓟马、夜蛾科害虫等,可根据病虫害发生情况采取相应防治措施。

8.2 防治原则 坚持“预防为主、综合防治”的植保方针,采取农业防治、物理防治、生物防治和化学防治相结合的方法,将有害生物控制在允许的经济阈值以下,同时控制西瓜农药残留不超标,达无公害要求。农业防治主要是轮作、培育适龄壮苗、科学管理、清理病枝残叶等,物理防治主要应用阳光照种、温汤浸种、利用防虫网、黄蓝板及频振灯诱杀等,生物防治利用天敌和生物农药进行防治。

8.3 化学防治方法 要严格按 NY/T393 规定执行,严格控制农药浓度和安全间隔期,交替使用农药,合理混用。禁止使用禁用农药。

(1) 齐苗:真叶吐露用药,间隔 4~5 d 喷施多菌灵 500 倍稀释液或立枯灵 500 倍稀释液。移栽前用药 1 次,药剂同前。

(2) 闷棚结束及摘心、整枝等农事操作后用多菌灵 500 倍稀释液或百菌清 500~1 000 倍稀释液喷雾。

(3) 主要病虫害防治用药:枯萎病可用杀霉矾、百菌清、速克灵、瓜枯宁防治;蔓枯病可用代森锰锌、粉霉灵、百菌清防治;炭疽病用百菌清防治;立枯病用井冈霉素、菌核净防治;病毒病用病毒 A、病毒必克防治;白粉病用农抗 120 防治;蚜虫用吡虫啉、蚜虱净防治;白粉虱用噻虫嗪防治;美洲斑潜蝇用爱福丁、乐斯本防治;对于瓜蓟马,在蓝板诱杀基础上,可用毒死蜱或三氟氯氰菊酯乳油防治。

参考文献

- [1] 黎书伟,郭玉英,陈剑坚.拿比特西瓜大棚栽培技术[J].现代农业科技,2007(9):29-30.
- [2] 黎书伟,龚衍兰,郭玉英,等.小型西瓜拿比特大棚栽培密度试验初报[J].现代农业科技,2007(17):23-24.

(上接第 12835 页)

- [5] 肖小余,王玉平,张建勇.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[J].水稻科学,2006,20(1):1-7.
- [6] 陈跃进,张桂权,卢永根.利用微卫星分子标记法研究水稻亲缘关系 [1].湖南农业科学,2007,33(3):258-261.
- [7] 陈英华,侯昱铭,李洪宇,等.东北地区水稻区试新品种的 DNA 指纹图

- [8] 刘伟,李白超,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.
- [9] 王风格,赵久然,郭景伦,等.一种改进的玉米 SSR 标记的 PAGE 快速银染检测新方法[J].农业生物技术学报,2004,12(5):606-607.