

宜昌地区杂交籼稻品种 DNA 指纹图谱构建

张弩, 申露露, 杜芹, 汪倩芳, 申良宝, 王惠 (宜昌市种子监督站, 湖北宜昌 443005)

摘要 通过 SSR 引物多态性分析, 构建了宜昌地区 49 份杂交籼稻品种的 DNA 指纹图谱。35 对 SSR 引物共检测到 61 个多态性位点, 其中最少的为 2 个, 最多的为 6 个, 平均每对引物可以检测到 2.5 个位点。利用 10 对核心引物, 构建了不同杂交籼稻品种 DNA 指纹图谱, 为宜昌地区水稻品种保护和种子鉴定提供了基础。

关键词 水稻; SSR; DNA; 指纹图谱

中图分类号 S511.2⁺1 文献标识码 A

文章编号 0517-6611(2020)16-0109-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.16.029

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



Construction of DNA Fingerprint of *indica* Hybrid Rice Varieties in Yichang Area

ZHANG Nu, SHEN Lu-lu, DU Qin et al (Yichang Seed Supervision Station, Yichang, Hubei 443005)

Abstract To establish DNA fingerprint of *indica* hybrid rice varieties in Yichang area, 49 tested varieties were studied using SSR markers. The results showed that 35 primers detected 61 alleles in total among 49 varieties, with 2-6 alleles (2.5 alleles an average) amplified by each primer. According to the analysis of 10 pairs of core SSR markers, we constructed DNA fingerprint database for 49 *indica* hybrid rice varieties, which would be helpful for the application of SSR markers in rice variety and purity identification in Yichang area.

Key words Rice; SSR; DNA; Fingerprint map

水稻是世界主要粮食作物之一。杂交水稻的研究和推广为我国粮食安全提供了重要保障。水稻种子产业快速发展是杂交水稻大面积推广的前提条件, 而现今不同程度的水稻品种雷同、侵权等现象已经制约了水稻种子产业的发展, 构建水稻品种种子身份证是解决这一问题的有效途径。

分子标记是以 DNA 多态性为基础的遗传标记, 具有准确性高、信息量大、稳定性好等优点; 利用分子标记构建 DNA 指纹图谱已成为农作物品种真伪性鉴定的发展趋势和重要手段。SSR (simple sequence repeat) 标记是一种共显性分子标记, 具有操作简单、多态性丰富、稳定性好等优点^[1-2], 在农作物 DNA 指纹图谱构建、遗传多样性分析、基因克隆等方面得到了广泛的应用^[3-7]。利用 SSR 标记构建 DNA 指纹图谱在杂交水稻研究方面已有不少报道。蔡海亚等^[8]报道了湖北省两系不育系指纹图谱构建; 陆徐忠等^[9]通过建立 SSR 指纹图谱, 构建了杂交水稻亲本身份证; 徐港明等^[10]对太湖地区 24 份杂交粳稻进行了指纹图谱构建及遗传相似性分析。但关于杂交籼稻不同品种 DNA 指纹图谱的报道不多。本研究通过 SSR 引物多态性分析, 构建了宜昌地区 49 份杂交水稻品种的 DNA 指纹图谱, 以期为宜昌地区水稻生产过程中品种培育、品种鉴定提供理论基础和技术支撑。

1 材料与与方法

1.1 材料 49 份杂交籼稻材料种子由宜昌市种子监督站提供。其中三系杂交稻 14 份, 两系杂交稻 35 份, 品种名称、来源及类型见表 1。种子催芽 7 d 后取芽苗, 液氮冷冻后, -70 °C 低温冰箱保存。

试验所用分子生物学试剂购自宝生物工程(大连)有限公司, 引物由上海生工生物工程股份有限公司合成。

1.2 DNA 提取 采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[11], 0.8% 琼

脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, 通过核酸蛋白仪测定所有样品的 DNA 浓度, 再用适量 TE 稀释为相同浓度, -20 °C 保存备用。

1.3 PCR 扩增 扩增反应在 Biometra T-Gradient PCR 仪上进行。反应体系 20 μL, 包括 10×Buffer 2 μL、DNA 模板 30 ng、1.5 mmol/L Mg²⁺、0.2 mmol/L dNTP、0.2 μmol/L 引物、0.5 U Taq DNA 聚合酶; 扩增条件为 94 °C 预变性 2 min; 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 共 33 个循环; 72 °C 延伸 5 min。

1.4 电泳检测 取 1.5 μL PCR 扩增产物与溴酚蓝混匀, 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 2 h, 用 NaOH 银染方法进行染色显影, 凝胶成像系统采集图像。

1.5 数据统计及分析 通过观察聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱, 进行带型统计, 只统计清晰主带, 忽略杂带、弱带。同一水平上有条带记为 1, 没有条带记为 0, 转化为 1/0 格式^[12]。

2 结果与分析

2.1 多态性引物筛选 利用已经建立的水稻 SSR 分子标记体系, 挑选分布于水稻 12 条染色体上 120 对 SSR 引物, 从试验材料中随机挑选 4 个品种, 进行 SSR 多态引物筛选。结果发现, 35 对 SSR 引物能在不同杂交籼稻品种间扩增出差异性条带, 多态性引物占可扩增引物的 29.2%。35 对多态性引物共检测到 61 个多态性位点, 最少的为 2 个, 最多的为 6 个, 平均每对引物可以检测到 2.5 个位点, 表明 35 对引物对 49 份测试材料具有较好的多态性, 部分多态性引物序列见表 2。

2.2 宜昌地区杂交籼稻品种的 SSR 多态性分子标记分析 从筛选出的 SSR 多态性引物中, 选取扩增条带清晰、分辨率高的引物, 对宜昌地区 49 个杂交籼稻品种进行多态性分析(图 1)。综合考虑引物扩增的有效等位基因数、杂合度、多态性信息含量以及扩增产物分子量大小等因素, 确定了 10 对引物, 作为构建宜昌地区不同杂交籼稻品种 DNA 指纹图谱的核心引物。10 对核心引物分别为 R1-2193、R2-

2876、R3-1658、R4-27、R4-3321、R5-744、R5-2790、R7-2122、R8-978、R11-251(表2)。

表1 试验材料

Table 1 The tested rice varieties

序号 No.	品种名称 Variety name	品种来源 Variety origin	品种类型 Variety type	序号 No.	品种名称 Variety name	品种来源 Variety origin	品种类型 Variety type
1	银两优丝苗	2148S×五山丝苗	籼型两系杂交稻	26	和两优 332	和 620S×R332	籼型两系杂交稻
2	川优 6023	川 106A×成恢 3203	籼型三系杂交稻	27	荃优丝苗	荃 9311A×五山丝苗	籼型三系杂交稻
3	两优 688	SE21S×南恢 688	籼型两系杂交稻	28	天优华占	天丰 A×华占	籼型三系杂交稻
4	晶两优 534	晶 4155S×R534	籼型两系杂交稻	29	C 两优 343	C815S×岳恢 9113	籼型两系杂交稻
5	晶两优 1212	晶 4155S×R1212	籼型两系杂交稻	30	Y 两优 1998	Y58S×新恢 1998	籼型两系杂交稻
6	C 两优 513	C815S×R513	籼型两系杂交稻	31	Y 两优 7 号	Y58S×B163	籼型两系杂交稻
7	C 两优雅占	C815S×雅占	籼型两系杂交稻	32	星两优华占	星 88S×华占	籼型两系杂交稻
8	荃两优丝苗	荃 211S×五山丝苗	籼型两系杂交稻	33	丰两优二号	M8064S×1175	籼型两系杂交稻
9	珞优 9348	珞红 4A×成恢 9348	籼型三系杂交稻	34	E 两优 476	E 农 1S×R476	籼型两系杂交稻
10	珞优 8 号	珞红 3A×8108	籼型三系杂交稻	35	吉两优 3885	吉 S×R3885	籼型两系杂交稻
11	荃优华占	荃 9311A×华占	籼型三系杂交稻	36	深两优 136	深 08S×R136	籼型两系杂交稻
12	Y 两优 800	Y58S×R800	籼型两系杂交稻	37	隆两优 1212	隆科 638S×R1212	籼型两系杂交稻
13	荃优 822	荃 9311A×YR0822	籼型三系杂交稻	38	C 两优粤农丝苗	C518S×粤农丝苗	籼型两系杂交稻
14	荃优 298	荃 9311A×ZR298	籼型三系杂交稻	39	旺两优 950	W115S×创恢 950	籼型两系杂交稻
15	Y 两优 957	Y58S×创恢 957	籼型两系杂交稻	40	荃优粤农丝苗	荃 9311A×粤农丝苗	籼型三系杂交稻
16	隆两优华占	隆科 638S×华占	籼型两系杂交稻	41	Y 两优 1928	Y58S×R1928	籼型两系杂交稻
17	隆两优 534	隆科 638S×R534	籼型两系杂交稻	42	赣优 735	赣 73A×苏恢 5 号	籼型三系杂交稻
18	桃优香占	桃农 1A×黄华占	籼型三系杂交稻	43	两优 566	1892S×R566	籼型两系杂交稻
19	晶两优 1377	晶 4155S×R1377	籼型两系杂交稻	44	荃两优 2118	荃 211S×YR0822	籼型两系杂交稻
20	两优 3917	HD9802S×R3917	籼型两系杂交稻	45	晶两优 1125	晶 4155S×R1125	籼型两系杂交稻
21	A 优 338	A4A×R338	籼型三系杂交稻	46	隆两优 248	隆科 638S×R248	籼型两系杂交稻
22	荃优 737	荃 9311A×YR737	籼型三系杂交稻	47	隆两优晶占	隆科 638S×玉晶占	籼型两系杂交稻
23	丰两优七号	丰 39S×丰恢七号	籼型两系杂交稻	48	梦两优 534	梦 S×R534(五山丝苗)	籼型两系杂交稻
24	丰两优一号	广占 63S×9311	籼型两系杂交稻	49	荃早优丝苗	荃早 A×五山丝苗	籼型三系杂交稻
25	丰两优香一号	广占 63S×丰香恢一号	籼型两系杂交稻				

表2 多态 SSR 引物信息

Table 2 Information of polymorphic SSR markers

引物 Primer	染色体 Chr.	正向引物 序列(5'-3') Forward primer sequence(5'-3')	反向引物 序列(5'-3') Reverse primer sequence(5'-3')
R1-2193	1	GGGACGGATGTGG-TATTAAG	CAATGCATGGCTAA-CAGGAC
R2-2876	2	GGAGAGCTATAGTTGT-GAAG	GAGAGAACCAACG-CAAACCTG
R3-1658	3	GTGGGAGTAGCCA-CAGAATA	GGAGACTTTGTAATG-TACCC
R4-27	4	GCGTG-GAAGAAAGCTAGTGA	GGCAAACCTTTCT-GTCGCTGA
R4-3321	4	GTCGGTTTTGGTTGT-GTAC	GTTGCTAAACAAC-CCTAAC
R5-744	5	CTAGTGCCCAATCTTC-CCAT	CTTCAACCCGGTAG-TAGCTA
R5-2790	5	GCATGGTGCTTGTGT-GAGAA	GCAGTAAAGGAAC-CAATGCC
R7-2122	7	GCCAACAGTCAT-CAGCCAT	GTGCCAATAACTT-GATTGAGC
R8-978	8	GGTGTGGTACAACCTG-TAGA	CTCCATTCCTGATTA-ACAGG
R11-251	11	CCGTCGACGATGAAT-GTTCA	GGTGATCACAG-CAAACCACT

2.3 DNA 指纹图谱构建 根据 10 对核心引物扩增出的等位基因分子量大小,对不同品种 DNA 等位基因进行赋值编码,没有扩增出等位基因的赋值 0,扩增出等位基因的赋值

1,将编码依次串联在一起就形成该品种的 DNA 指纹数据库编码,最终得到宜昌地区不同杂交水稻品种 DNA 指纹数据库(表 3)。

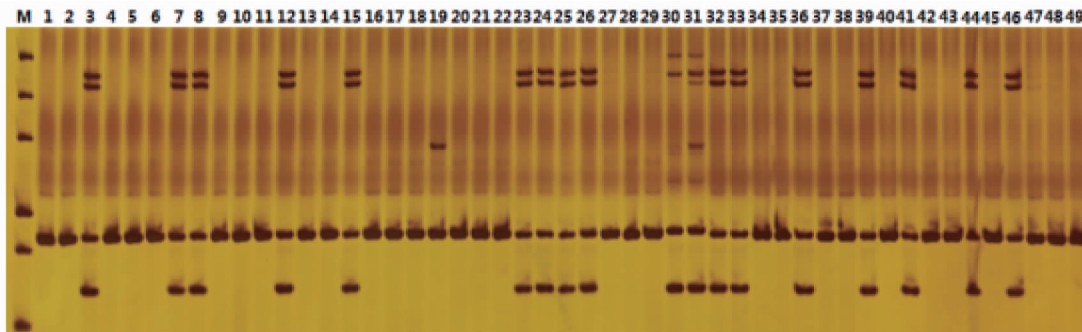
3 讨论

该研究选用 35 对 SSR 引物,对 49 份杂交水稻品种进行多态性分析,共检测到 61 个多态性位点,最少的为 2 个,最多的为 6 个,平均每对引物可以检测到 2.5 个位点,明显低于已有的一些研究报道。黄瑞等^[6]报道 36 对 SSR 引物在 62 份水稻材料中检测到 192 个等位基因,平均每个位点 5.3 个等位基因;唐浩等^[13]报道用 24 对 SSR 引物在 19 个籼稻和 30 个粳稻品种中分别检测到 141 和 156 个位点,平均每对引物可以检测到 5.88(籼稻)和 6.50(粳稻)个等位位点。究其原因,除了所用的引物不同外,该研究所用试验材料都是杂交水稻品种,由于在育种过程中基础育种材料的广泛交流,不同水稻品种之间的趋同性增强可能也是主要原因之一;另外,在统计条带的过程中,只记录了 100~300 bp 清晰的主带,其他条带没有统计也是导致引物扩增位点减少的一个因素。

依据较少引物构建指纹图谱的原则,选用 R1-2193 等 10 对引物(表 2)作为构建宜昌地区 49 份杂交水稻 DNA 指纹图谱的核心引物。没有 1 对核心引物能单独区分测试水稻材料,必须多对引物结合分析才能区分。在构建的不同水稻品种 DNA 指纹图谱中,除了丰两优一号与丰两优二号、荃

优 822 与荃优粤农丝苗外,其他品种都具有唯一的 DNA 指纹图谱。虽然用更多的多态引物进行了分析,但也没有能够

找到有效区分丰两优一号与丰两优二号、荃优 822 与荃优粤农丝苗的标记,可能与它们品种之间遗传背景高度相似有关。



注:M.DL500 Marker;1-49.对应表 1 中的编号品种

Note:M.DL500 Marker;1-49.Variety codes correspond with those listed in Table 1

图 1 引物 R11-251 对 49 个杂交籼稻的扩增图谱

Fig.1 Amplification profile of 49 indica hybrid rice by R11-251

表 3 不同杂交籼稻品种 DNA 指纹数据库编码

Table 3 The fingerprint map of indica hybrid rice varieties

序号 No.	品种名称 Variety name	指纹编码 Fingerprint code	序号 No.	品种名称 Variety name	指纹编码 Fingerprint code
1	银两优丝苗	010101110010100110100010	26	和两优 332	010100101111111101101011
2	川优 6023	010110110101101111110010	27	荃优丝苗	010100110010100111100010
3	两优 688	010100101111111101001011	28	天优华占	0101001101111111011101010
4	晶两优 534	011101111010100110101010	29	C 两优 343	110101101111011101011010
5	晶两优 1212	111101111010100111001010	30	Y 两优 1998	011000111010011111011011
6	C 两优 513	110101111111011101011010	31	Y 两优 7 号	1111001110101111101101111
7	C 两优雅占	010101111010111001101011	32	星两优华占	1111001111111111010100011
8	荃两优丝苗	010100110111110111101011	33	丰两优二号	010100110101100111110011
9	珞优 9348	110101110101100101101010	34	E 两优 476	010100110101100111100010
10	珞优 8 号	110100110101100101101010	35	吉两优 3885	110100110010111001101010
11	荃优华占	010100110010101111100010	36	深两优 136	0101001110101111101101011
12	Y 两优 800	011100101111111111011011	37	隆两优 1212	110101110111100101001010
13	荃优 822	110100110010100101101010	38	C 两优粤农丝苗	110101111111111101001010
14	荃优 298	010100110010110101100010	39	旺两优 950	011100110010110111001011
15	Y 两优 957	011100111010011111101011	40	荃优粤农丝苗	110100110010100101101010
16	隆两优华占	01010111011101111101010	41	Y 两优 1928	111100111111111111011011
17	隆两优 534	010101110111100111101010	42	赣优 735	11010111101101111101010
18	桃优香占	111101110111100101101010	43	两优 566	01010111111111111101010
19	晶两优 1377	011101111010101111001110	44	荃两优 2118	110100110111110101001011
20	两优 3917	111000110101011111100010	45	晶两优 1125	011101111010101111001010
21	A 优 338	010100110101111111010010	46	隆两优 248	011101110111101111101011
22	荃优 737	010100110010100101101010	47	隆两优晶占	110101110111101101001010
23	丰两优七号	010101110101100111100011	48	梦两优 534	010100111111110111101010
24	丰两优一号	010100110101100111110011	49	荃早优丝苗	010100110010111111101010
25	丰两优香一号	010100110111100110100011			

利用 SSR 标记构建 DNA 指纹图谱在水稻中已经得到了广泛应用。在 2007 年农业农村部颁布《水稻品种鉴定 DNA 指纹方法》(NY/T 1433—2007)中,推荐了 24 个 SSR 引物;在 2014 年修订的《水稻品种鉴定技术规程 SSR 标记法》(NY/T 1433—2014)中,推荐了 48 个 SSR 引物。随着水稻新品种的不断增多,需要发掘更多的 SSR 标记来满足水稻 DNA 指纹图谱构建和新品种鉴定的需要。该研究筛选出 35 对特异性强、稳定性好、多态性丰富的 SSR 引物,对今后水稻品种 DNA 指纹图谱构建和遗传多样性分析等研究具有参考价值,

为我国水稻新品种的审定以及新品种的分子遗传多态性评价提供了一定的技术支持。

参考文献

[1] POWELL W, MORGANTE M, ANDRE C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. Mol Breeding, 1996, 2: 225-238.
 [2] CHEN X, TEMNYKH S, XU Y, et al. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Theoretical and applied genetics, 1997, 95(4): 553-567.
 [3] 王凤格, 赵久然, 戴景瑞, 等. 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.

表 2 施肥专家系统 NE 对水稻籽粒产量的影响

Table 2 Effects of nutrient expert recommended fertilization on rice yield

处理 Treatment	籽粒产量 Grain yield//kg/hm ²					产量指数 Yield index//%				
	2013	2014	2015	2016	平均	2013	2014	2015	2016	平均
NE	7 384	9 400	9 765	9 246	8 949	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
NE-N	5 071	5 450	7 095	7 476	6 273	57.98	68.62	72.66	80.86	70.10
NE-P	6 704	8 100	8 628	8 637	8 017	90.79	86.17	88.36	93.41	89.59
NE-K	7 009	8 750	8 370	7 752	7 970	94.92	93.09	85.71	83.84	89.06
CK	4 688	5 100	6 270	7 344	5 851	63.49	54.26	64.21	79.43	65.38
ST	8 139	9 450	9 203	8 706	8 875	110.22	100.53	94.24	94.16	99.17
FP	6 542	8 700	8 706	7 959	7 977	88.60	92.55	89.16	86.08	89.14

3 结论

(1) 水稻养分专家系统 NE 氮肥投入量大幅度降低,4 年 4 地试验,相较于农民习惯施肥 FP 和当地农技术部门推荐施肥 ST,减氮幅度分别为 13.4%~27.5%和 7.1%~19.0%,平均减氮 23.1%和 14.9%。磷肥投入,NE 较 FP 和 ST 分别增加 -23.3%~50.0%和 -16.7%~20.0%,平均增加 12.4%和 0.6%,NE 比 FP 多施磷 12.4%而与 ST 相当。钾肥施用量,NE 处理较 FP 明显提高,4 年增长 25.0%~50.0%,平均提高 41.6%;但 NE 又显著低于 ST 处理,其中 2 年持平另 2 年少施钾 33.6%和 30.0%,4 年平均 NE 较 ST 节钾 16.6%。NE 处理氮磷钾比例较为适宜。

(2) 水稻养分专家系统 NE 推荐的氮磷钾施肥量对沿淮淮北一季中稻具有较为明显的增产效应。4 年 4 地试验,NE 较不施氮的对照增产 23.68%~72.48%,施磷产量相对提高 7.05%~16.05%,施钾增产 5.35%~19.27%,相比无肥的 CK 产量增长 25.90%~84.31%,平均增产 42.66%、11.63%、12.28% 和 52.95%,总体上施氮的增产率很高,施磷、施钾的增产效应也较明显,但磷钾的增产率远低于氮、钾又略高于磷。氮磷钾的增产效应表现为 N>>K>=P。

(3) 当地农技部门测土配方施肥 ST 水稻籽粒产量与养分专家系统 NE 相近,农民习惯施肥 FP 表现较差,产量明显低于 NE 和 ST 处理。4 年 4 地试验,NE 较 FP 和 ST 分别增产 8.05%~16.17%和 -9.28%~6.20%,平均提高 12.19%和 0.83%,NE 较 ST 产量基本持平,NE 与 FP 相比增产效应较为明显,总体上 NE 具有很好的应用效果和技术优势。

参考文献

- [1] 李录久,王家嘉,吴萍萍,等.秸秆还田下氮肥运筹对白土田水稻产量和氮吸收利用的影响[J].植物营养与肥料学报,2016,22(1):254-262.
- [2] 国家统计局.2018 年全国农作物生产统计调查资料[Z].2018.
- [3] 安徽省统计局.安徽农村统计调查资料[Z].2017.
- [4] Nutrient Expert 养分专家系统:基于产量反应和农学效率的推荐施肥方法[J].中国土壤与肥料,2014(4):96.
- [5] 徐新朋,魏丹,李玉影,等.基于产量反应和农学效率的推荐施肥方法在东北春玉米上应用的可行性研究[J].植物营养与肥料学报,2016,22(6):1458-1467.
- [6] 何萍,金继运,PAMPOLINO M F,等.基于作物产量反应和农学效率的推荐施肥方法[J].植物营养与肥料学报,2012,18(2):499-505.
- [7] 姚礼发,吴萍萍,姚文麒,等.专家系统推荐施肥对水稻生长和氮素利用的影响[J].现代农业科技,2019(24):3-4,6.
- [8] 黄厚宽,王家嘉,李录久,等.施用氮肥对小麦生长和经济效益的影响[J].安徽农业科学,2011,39(24):14684-14686.
- [9] 浙江农业大学.植物营养与施肥[M].北京:中国农业出版社,1998.
- [10] 宋蝶,陈新兵,董洋阳,等.养分专家系统推荐施肥对苏北地区水稻产量和肥料利用率的影响[J].中国生态农业学报,2020,28(1):68-75.
- [11] 陆徐忠,从夕汉,刘海珍,等.杂交水稻亲本分子身份证及 SSR 指纹数据库的建立[J].核农学报,2012,26(6):853-861.
- [12] 徐港明,孙海燕,顾雯雯,等.太湖地区 24 份杂交粳稻 DNA 指纹图谱的构建及遗传相似性分析[J].广东农业科学,2014(20):1-4.
- [13] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J].Nucleic acids research,1980,8(19):4321-4326.
- [14] WENG M L, LIU B, JIN D M, et al. Identification of 27 *Porphyra* lines (Rhodophyta) by DNA fingerprinting and molecular markers[J].Journal of applied phycology,2005,17:91-97.
- [15] 唐浩,余汉勇,张新明,等.水稻新品种测试的标准品种 DNA 指纹图谱多样性分析[J].植物遗传资源学报,2015,16(1):100-106.
- [16] 王黎明,焦少杰,姜艳喜,等.142 份甜高粱品种的分子身份证构建[J].作物学报,2011,37(11):1975-1983.
- [17] 丁俊杰,姜翠兰,顾鑫,等.利用与大豆灰斑病抗性基因连锁的 SSR 标记构建大豆品种(系)的分子身份证[J].作物学报,2012,38(12):2206-2216.
- [18] 黄瑞,周雷,何卫,等.非洲水稻种质资源 SSR 指纹图谱的构建及遗传多样性分析[J].分子植物育种,2015,13(7):1476-1486.
- [19] 费云燕,杨杰,范方军,等.水稻咪草烟抗性的遗传分析及其紧密连锁分子标记的筛选与应用[J].作物学报,2018,44(5):716-722.
- [20] 蔡海亚,谢红卫,周雷,等.湖北省水稻区试两系不育系指纹图谱构建及遗传相似性分析[J].分子植物育种,2016,14(9):2412-2417.

(上接第 111 页)