

方珊茹, 郑燕梅, 吴春珠, 等. 基于 SSR 标记的杂交籼稻主要不育系遗传多样性分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (11): 1173-1177.
FANG S-R, ZHENG Y-M, WU C-Z, et al. Genetic Diversity Analysis of Main Male Sterile Lines for Indica Hybrid Rice Based on SSR Markers [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27 (11): 1173-1177.

基于 SSR 标记的杂交籼稻主要不育系遗传多样性分析

方珊茹, 郑燕梅, 吴春珠, 刘玉芹, 熊雪娇

(福建省农业科学院水稻研究所, 福建 福州 350018)

摘要: 采用 SSR 标记对我国杂交籼稻 15 个主要不育系进行遗传多样性分析。结果表明, 在水稻基因组中平均分布的 99 个 SSR 位点其中 71 个 SSR 位点具有多态性, 多态性位点率 71.7%。71 个 SSR 标记共检测到 175 个等位基因, 每个 SSR 位点检测到 2~5 个, 平均为 2.47 个等位基因, H_e 平均为 0.716, PIC 平均为 0.393。供试不育系在遗传距离 0.693 处聚为两大类群, 广占 63S 单独聚为一类; 另一大类包括其余 4 个光温敏核不育系和所有的三系不育系。聚类结果与系谱分析基本吻合。

关键词: 杂交籼稻; 不育系; SSR 标记; 遗传多样性

中图分类号: S 511

文献标识码: A

Genetic Diversity Analysis of Main Male Sterile Lines for Indica Hybrid Rice Based on SSR Markers

FANG Shanru, ZHENG Yanmei, WU Chunzhu, LIU Yuqin, XIONG Xuejiao

(Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350018, China)

Abstract: Genetic diversity was analyzed among 15 main male sterile lines of *indica* hybrid rice from China with 99 pairs of SSR marker evenly distributed in the 12 chromosomes of rice. The results indicated that 71 (71.1%) pairs of SSR marker showed polymorphism. There were 171 alleles detected with those 71 pairs of SSR marker. The number of alleles for per locus ranged 2—5 with an average of 2.47. The average of H_e was 0.716 and average of PIC was 0.393. The 15 main male sterile lines were divided into two groups at genetic distance 0.693. The sterile line Guangzhan 63S could be grouped alone. Another group was composed of four photo-thermo-sensitive genic male sterile lines and all main three-line male sterile lines. The clustering results based on SSR analysis was basically consistent with the pedigree of 15 main male sterile lines.

Key words: *India* hybrid rice; male sterile lines; simple sequence repeats; genetic diversity

水稻是我国最重要的粮食作物。目前全国水稻种植面积 3 067 万 hm^2 , 其中杂交籼稻的种植面积已达 1 733 万 hm^2 , 占全国水稻总面积的 57%^[1]。可见, 杂交籼稻是杂交稻的主力军, 对保障国家粮食安全和社会稳定具有十分重要的意义。

研究杂交稻亲本间的遗传差异是杂种优势利用的基础。一般来说, 亲本间亲缘关系越远, 杂种优势越大。作为亲本之一的不育系对杂种优势的贡献很大, 因此, 了解我国杂交籼稻主要不育系的遗传多样性, 有助于选配强势杂交籼稻组合, 从而更有效地利用杂种优势^[2~4]。王胜军等^[2]分析了 41 个

杂交籼稻主要亲本的遗传多样性, 认为其遗传基础狭窄、背景单一。彭锁堂等^[3]认为 1976~2005 年期间育成的三系主要不育系多数含有野败型的珍汕血缘。贺浩华等^[5]研究认为南方地区生产上应用的不育系遗传背景比较单一。

SSR 标记属共显性标记, 多态性高、稳定性好、准确度高、易检测、成本较低, 已成为研究水稻、小麦、玉米、大豆、马铃薯等作物的遗传多样性分析最常用的标记^[6~12]。本研究利用 SSR 标记, 对目前生产上大面积应用的杂交籼稻不育系以及本课题组选育的部分不育系的遗传差异进行检测, 以

期为杂交籼稻遗传改良和亲本组配提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取国内生产中广泛应用的籼型不育系及本课题组选育的部分不育系, 共 15 份材料(表 1)。

表 1 供试籼型不育系及来源

Table 1 The CMS lines used and their origins

序号	名称	类型	来源
1	珍汕 97A	三系不育系	江西
2	冈 46A	三系不育系	四川
3	II-32A	三系不育系	湖南
4	金 23A	三系不育系	湖南
5	龙特甫 A	三系不育系	福建
6	IR58025A	三系不育系	菲律宾
7	23A 23A	三系不育系	福建
8	25A 25A	三系不育系	福建
9	福伊 A	三系不育系	福建
10	宜香 1A	三系不育系	四川
11	广占 63S	温敏核不育系	辽宁
12	SE21S	光敏核不育系	福建
13	45S	光温敏互补核不育系	福建
14	FJS-1	温敏核不育系	福建
15	86315S	光温敏互补核不育系	福建

1.2 基因组 DNA 提取

取水稻新鲜嫩叶片, 按照 Doyle and Doyle^[13] 的 CTAB 法进行水稻基因组 DNA 微量提取。

1.3 SSR 分析

在水稻 12 条染色体上较均匀地选取 99 个 SSR 标记进行遗传多样性分析。所用标记均由上海生工生物工程有限公司合成。

PCR 反应在 PTC-100 扩增仪上进行。采用 10 μL 反应体系, 其中包括 10 \times PCR Buffer (20 mmol \cdot L $^{-1}$ Mg $^{2+}$) 1 μL , dNTPs (2.5 mmol \cdot L $^{-1}$) 0.5 μL , Primer (10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 正反引物各 0.25 μL , Taq 酶 1 U, DNA 6 ng, 最后用灭菌高纯水补至 10 μL 。反应程序为: 94°C 预变性 5 min, 94°C 变性 1 min, 55°C (根据引物有所变动) 退火 1 min, 72°C 延伸 2 min, 35 个循环; 最后 72°C 补充延伸 7 min。退火温度参照 <http://www.gramene.org/microsat/ssr.html> 网站”推荐的 SSR 引物退火温度。扩增产物在 8% 非变性聚丙

烯酰胺凝胶上电泳分离, 用花青类染料 GeneFinder 染色 30 min 后, 在美国 Ultra-lum 公司的 Explorer 10 凝胶成像系统上拍照分析。若同一个标记出现 2 个或 2 个以上的迁移率不同的条带, 此标记视为具有多态性的标记。

1.4 数据分析

每 1 个 SSR 标记检测 1 个位点, 每 1 个多态性条带视为 1 个等位基因; 根据 PCR 扩增产物的电泳结果, 采用 0~1 记录谱带位置, 观察某一扩增条带的有无, 有带记为 1, 无带记为 0。利用 NTSYS 2.1 软件计算任意 2 个品种间的遗传距离。根据品种间遗传距离按非加权成对算术平均法 (UPGMA) 进行聚类, 并绘制树状聚类图。0~1 数据采用 DataTrans 1.0 程序转化后^[14], 应用 Popgene 3.2 计算等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Nei 基因多样性指数 (H_e) 和平均多态性信息含量指数 (PIC)。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记多态性

选用水稻基因组上均匀分布的 99 个 SSR 标记对供试不育系进行多态性分析, 共筛选出多态性标记 71 个, 多态性位点百分率为 71.7%。71 个多态性标记共检测到 175 个等位基因。不同标记所检测到的等位基因数目不同, 变异范围为 2~5 个, 平均为 2.47 个。其中 RM168、RM473E 标记等位变异最丰富, 检测到 5 个等位基因; 其次是 RM481, 为 4 个等位基因; 大部分标记只检测到 2~3 个标记。基因多样性指数 H_e 平均为 0.716, 变幅为 0.562~0.952; 平均多态性信息含量指数 PIC 为 0.393, 变幅为 0.124~0.760。高于 PIC 平均值的多态性位点数是 39 个, 占 54.9%; 其中 RM473E 的 PIC 最高, 遗传多样性最丰富。

2.2 聚类分析

基于 71 个多态性标记所得的数据应用 NTSYS 软件计算出供试不育系间的遗传距离为 0.137~0.820, 平均为 0.510。根据遗传距离采用 UPGMA 法进行聚类(图 1), 结果表明, 供试不育系在阈值 0.693 处聚为两大类群, 其中温敏核不育系广占 63S 单独聚为一类, 与其他不育系间的遗传距离为 0.531~0.820, 平均为 0.693, 表现出较大的遗传差异; 另一大类群包括本研究所涉及的全部三系不育系和 4 个光温敏核不育系, 该类群又在阈值 0.507 处分为 3 个亚群, 其中三系不育系群分为 M₁ 和 M₂ 2 个亚群, SE21S 等 4 个光温敏核不育

系聚为 M₃ 亚群。M₁ 亚群包括 IR58025A、23A 和 25A 这 3 个不育系, 23A 和 25A 是 IR58025A 的衍生系; M₂ 为生产上大面积应用的珍汕 97A 等 7 个三系不育系, 彼此间遗传距离为 0.170~0.527,

平均遗传距离为 0.327, 可见该亚群不育系亲缘关系较近。M₃ 亚群有 SE21S、45S、FJS-1、86315S 等 4 个光温敏核不育系, 这些不育系是由 W6111S 或其衍生系 164S 选育出来的。

表 2 71 个 SSR 标记在供试不育系中的遗传多样性信息

Table 2 The information of genetic diversity with 71 SSR loci in the CMS lines used

位置	染色体	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H_e</i>	PIC	位置	染色体	<i>N_a</i>	<i>N_e</i>	<i>H_e</i>	PIC
RM315	1	2	1.301	0.616	0.231	RM539	6	2	1.642	0.696	0.391
RM428	1	3	2.103	0.764	0.529	RM585	6	3	1.991	0.833	0.498
RM443	1	2	1.142	0.764	0.124	RM11	7	2	1.142	0.562	0.124
RM462	1	2	1.991	0.562	0.498	RM455	7	2	1.991	0.749	0.498
RM488	1	2	1.923	0.749	0.480	RM481	7	4	2.368	0.894	0.578
RM490	1	2	1.142	0.740	0.124	RM500	7	3	1.510	0.671	0.342
RM529	1	3	1.718	0.562	0.418	RM25	8	2	1.142	0.562	0.124
RM543	1	2	1.471	0.806	0.320	RM38	8	3	2.103	0.842	0.524
RM600	1	2	1.301	0.660	0.231	RM223	8	3	1.718	0.806	0.418
RM6	2	2	1.800	0.616	0.444	RM337	8	3	2.419	0.862	0.587
RM138	2	3	2.103	0.722	0.529	RM483	8	3	2.228	0.850	0.551
RM166	2	2	1.471	0.764	0.320	RM201	9	2	1.923	0.740	0.480
RM183	2	2	1.991	0.660	0.498	RM219	9	3	2.528	0.868	0.604
RM211	2	2	1.471	0.749	0.320	RM296	9	2	1.642	0.696	0.391
RM250	2	2	1.142	0.660	0.124	RM410	9	3	1.718	0.711	0.422
RM263	2	2	1.800	0.562	0.444	RM434	9	2	1.923	0.740	0.480
RM290	2	2	1.142	0.722	0.124	RM244	10	2	1.142	0.562	0.124
RM341	2	2	1.471	0.562	0.320	RM258	10	2	1.923	0.740	0.480
RM555	2	2	1.800	0.660	0.444	RM311	10	2	1.991	0.749	0.498
OSR13	3	2	1.142	0.722	0.124	RM330A	10	2	1.991	0.749	0.498
RM168	3	5	4.091	0.562	0.756	RM590	10	2	1.991	0.749	0.498
RM231	3	3	1.510	0.951	0.338	RM21	11	3	2.778	0.880	0.640
RM232	3	2	1.471	0.779	0.320	RM229	11	3	1.316	0.622	0.244
RM489	3	3	1.316	0.660	0.244	RM254	11	3	2.273	0.853	0.560
RM520	3	2	1.991	0.622	0.498	RM286	11	3	2.419	0.862	0.587
RM554	3	2	1.142	0.749	0.124	RM287	11	2	1.991	0.749	0.498
RM565	3	2	1.301	0.562	0.231	RM332	11	2	1.142	0.562	0.124
RM142	4	2	1.301	0.616	0.231	RM441	11	2	1.800	0.722	0.444
RM273	4	3	2.103	0.616	0.529	RM473E	11	5	4.091	0.952	0.760
RM280	4	2	1.800	0.764	0.444	RM4A	12	3	1.718	0.806	0.418
RM401	4	3	2.103	0.722	0.524	RM12	12	2	1.642	0.696	0.391
RM159	5	3	1.510	0.842	0.356	RM17	12	3	2.273	0.800	0.600
RM233B	5	3	1.744	0.678	0.427	RM277	12	3	1.510	0.671	0.342
RM289	5	2	1.471	0.809	0.320	RM313	12	2	1.142	0.562	0.124
RM413	5	2	1.301	0.660	0.231	RM463	12	2	1.471	0.660	0.320
RM275	6	3	2.228	0.616	0.551	Mean		2.5	1.780	0.716	0.393

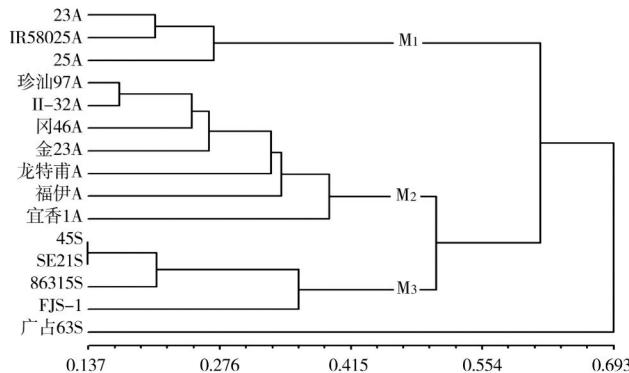


图 1 供试不育系的聚类图

Fig. 1 Clustering of the CMS lines used based on genetic distance

3 讨论与结论

随着分子标记技术的兴起，基于 PCR 技术的 RAPD、AFLP、RFLP、SSR 等方法被广泛应用于遗传多样性研究^[6-12,15-17]。Pejic 等^[18]、袁力行等^[19]、Belaj 等^[20]曾经对这 4 种方法进行比较，认为 SSR 的多态性信息量是最高的。SSR 标记是共显性标记，具有多态性丰富、操作简便、检验快速等优点，已成为遗传多样性研究的首选方法。

本研究采用 SSR 标记法将供试不育系分为两大类群 3 个亚群。广占 63S 独自聚为一类，它是籼型常规稻广占 63 与粳稻不育系 N422S 的杂交后代选育而来的，属偏籼型^[21]。M₁ 亚群是来源于国际水稻研究所的 IR58025A 及其 2 个衍生系，与国内选育的其他不育系遗传差异较大。M₂ 亚群是生产上大面积应用的三系不育系，大部分含有野败血缘，可看出，该亚群遗传背景单一、遗传基础狭窄，这与彭锁堂等^[3]、李云海等^[22-23]、肖小余等^[24]的研究结论是一致的；珍汕 97A 来源于野败/珍汕 97，II-32A 是印水珍鼎 A//珍汕 97/IR665 的杂交后代选育而成，冈 64A 是冈二九矮 A///二九矮/V41A//珍汕 97/雅矮早选育而成的；本研究 SSR 法与 AFLP 法的聚类结果都表明^[25]，II-32A 与珍汕 97A 的亲缘关系更近，与系谱分析结果一致；但是，RAPD 法分析结果则认为冈 64A 与珍汕 97A 亲缘关系更近^[15]。相对 AFLP 法，SSR 法更能快速且准确地反映亲缘关系较近的材料间的关系^[26]。SE21S、45S 是由 W6111S 的衍生系 164S 与 192 份优良品种（系）自由串粉后代群体，根据不同性状选择育成的。FJS-1 是 W6111S/广抗梗 2 号杂交后代选育出来的。从系谱上看，45S 与 SE21S 的亲缘关系更近，本研究结果与郑燕梅

等^[27]的结果略有不同，可能是选用不同的标记引起的。

多年来，含有野败血缘的种质资源被重复利用，造成生产上大面积应用的不育系遗传背景单一，导致育成品种遗传基础狭窄、抗病虫和抗逆性脆弱。本单位选育的 SE21S 等不育系与珍汕 97A 等主要不育系的遗传差异较大，丰富了我国杂交籼稻不育系的遗传多样性。SE21S 是具有制种安全系数大、所配组合丰产优质等特点，是福建省乃至南方稻区配组应用最多的两系不育系^[28-29]。SE21S 所配的两优 2186、两优 2163 等优质两系稻品种在生产上大面积推广，福两优 366 表现高产、米质达部颁三级、抗稻瘟病，两优 2161 表现超高产、优质、抗病，尤其是抗旱性非常突出。利用 SSR 标记对 SE21S 等主要不育系进行多样性研究，可为杂交籼稻遗传改良和亲本组配提供理论依据，对提高福建省分子育种水平和不育系新材料的发掘利用有着积极的推动作用。

参考文献：

- [1] 张宏根, 孔宪旺, 朱正斌, 等. 梗稻三系亲本的性状特征与杂种优势分析 [J]. 作物学报, 2010, 36 (5): 801-809.
- [2] 王胜军, 陆作楣. 中国杂交籼稻遗传多样性演变及其分析 [J]. 江苏农业学报, 2006, 22 (3): 192-198.
- [3] 彭锁堂, 王海岗, 魏兴华, 等. 我国三系杂交稻主要不育系的微卫星标记多样性和遗传结构分析 [J]. 中国水稻科学, 2008, 22 (4): 365-369.
- [4] 陆作楣. 我国杂交稻育种研究的亮点及难点 [J]. 中国水稻科学, 2011, 25 (3): 231-235.
- [5] 贺浩华, 罗小金, 朱昌兰, 等. 杂交稻部分不育系与恢复系的 SSR 分类 [J]. 作物学报, 2006, 32 (2): 169-175.
- [6] 江云珠, 汤圣祥, 余汉勇, 等. 利用 SSR 标记对中国水稻品种进行遗传多样性评价和品种分类的研究 [J]. 中国稻米, 2010, 16 (4): 19-24.
- [7] 陈新民, 何中虎, 史建荣, 等. 利用 SSR 标记进行优质冬小麦品种(系)的遗传多样性研究 [J]. 作物学报, 2003, 29 (1): 13-19.
- [8] 聂永心, 张丽, 潘光堂, 等. 四川省常用玉米自交系 SSR 遗传多样性分析 [J]. 分子植物育种, 2005, 3 (1): 43-51.
- [9] 薛林, 张丹, 徐亮, 等. 玉米抗粗缩病自交系种质的发掘和遗传多样性及其在育种中的应用 [J]. 作物学报, 2011, 37 (2): 2123-2129.
- [10] 李英慧, 刘燕, 关荣霞, 等. “十五”大豆创新种质和 1963~1995 年间育成品种的 SSR 遗传结构及遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2007, 33 (10): 1630-1636.
- [11] 段艳凤, 刘杰, 卞春松, 等. 中国 88 个马铃薯审定品种 SSR 指纹图谱构建与遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2009, 35 (8): 1451-1457.
- [12] 王丽鸳, 姜燕华, 段云裳, 等. 利用 SSR 分子标记分析茶树地方品种的遗传多样性 [J]. 作物学报, 2010, 36 (12):

- 2191—2195.
- [13] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid total DNA preparation procedure for fresh plant tissue [J]. Focus, 1990, 12: 13—15.
- [14] 盖红梅, 任民. SSR 数据处理宏程序 DataTrans 1.0 [J]. 分子植物育种(网络版), 2011, (9): 1359—1365.
- [15] 唐梅, 何光华, 裴炎, 等. 中籼杂交稻遗传多样性的 RAPD 分析 [J]. 西南农业学报, 2002, 15 (3): 7—9.
- [16] 陈亮, 梁春阳, 孙传清, 等. AFLP 和 RFLP 标记检测水稻亲本遗传多样性比较研究 [J]. 中国农业科学, 2002, 35 (6): 589—595.
- [17] 杨友才, 周清明, 尹哈琪, 等. 烟草种质资源遗传多样性及亲缘关系的 AFLP 分析 [J]. 中国农业科学, 2006, 39 (11): 2194—2199.
- [18] PEJIC I, AJMONE-MARSAN P, MORGANTE M, et al. Comparative analysis of genetic similarity among maize imbedded lines detected by RFLPs, RAPDs, SSRs, and AFLPs [J]. Theor Appl Genet, 1998, (97): 1248—1255.
- [19] 袁力行, 傅骏骅, WARBURTON M, et al. 利用 RFLP, SSR, AFLP 和 RAPD 标记分析玉米自交系遗传多样性的比
较研究 [J]. 遗传学报, 2000, 27 (8): 725—733.
- [20] BELAJ A, SATOVIC Z, CIPRIANI G, et al. Comparative study of the discriminating capacity of RAPD, AFLP and SSR markers and of their effectiveness in establishing genetic relationships in olive [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2003, 107 (4): 736—744.
- [21] 许旭明. 水稻籼粳亚种间杂交衍生系遗传基础的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2009.
- [22] 李云海, 肖晗, 张春庆, 等. 用微卫星 DNA 标记检测中国主要杂交水稻亲本的遗传差异 [J]. 植物学报, 1999, 41 (10): 1061—1066.
- [23] 李云海, 钱前, 曾大力, 等. 中国主要杂交稻亲本的 RAPD 鉴定及遗传关系研究 [J]. 作物学报, 2000, 26 (2): 171—176.
- [24] 肖小余, 王玉平, 张建勇, 等. 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]. 中国水稻科学, 2006, 20 (1): 1—7.

(责任编辑: 柯文辉)