

应用微卫星标记评估我国水稻主栽品种的一致性

应杰政^{1 2} 施勇烽² 庄杰云² 薛庆中^{1,*}

(¹ 浙江大学 农业与生物技术学院 农学系, 浙江 杭州 310029 ;² 中国水稻研究所 国家水稻改良中心/水稻生物学国家重点实验室, 浙江 杭州 310006 ; * 通讯联系人, E-mail : qzhxue@hotmail .com)

Assessment of Uniformity of Major Rice Varieties in China Using Microsatellite Markers

YING Jie zheng^{1,2}, SHI Yong feng², ZHUANG Jie yun², XUE Qing zhong^{1,*}

(¹ Department of Agronomy, College of Agriculture and Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China ;² Chinese National Center for Rice Improvement/ State Key Laboratory of Rice Biology, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006, China ;
* Corresponding author, E-mail : qzhxue@hotmail .com)

Abstract : To have a better assessment of the within variation variation of the major rice varieties in China , 41 varieties from two to seven sources were assayed with a set of five well chosen microsatellite markers , 18 varieties (43 .90%) of which showed heterogeneity among the different sources with the same name at 1 to 4 loci . Eleven varieties were further selected and analyzed with larger samples containing 50 individuals per variety . Non uniformity of the varieties varies from 0 .0 - 10 .0% with an overall average of 1 .67% on average five SSR loci , and the heterogeneity of the markers ranges from 0 .36% to 5 .45% . It also showed that 6 of the 11 typical rice varieties were completely uniform , and the non uniformities within varieties across all loci were lower than 5% . Therefore , it is advisable that the sources of the materials should be selected carefully in constructing a microsatellite database , and that the number of markers should be correspondingly increased when identifying some specific materials .

Key words : rice ; simple sequence repeat ; uniformity ; variety protection ; variety identification

摘 要 : 为较准确地评估我国水稻主栽品种的一致性 , 挑选 5 个微卫星标记 , 对 41 个有 2 ~ 7 个来源的水稻品种进行了微卫星标记检测。结果表明 , 18 个 (43 .90%) 品种存在同一品种名称不同来源间的差异。进一步选择 11 个代表性水稻品种或杂交稻组合作较大样本分析 (50 个单株) , 它们在 5 个微卫星标记上的不一致率为 0 .0% ~ 10 .0% , 平均为 1 .67% , 每个微卫星标记的异质率变化幅度为 0 .36% ~ 5 .45%。11 个品种中有 6 个 (54 .55%) 在所有位点上完全一致 , 不一致率通常都不超过 5%。因此 , 在构建水稻品种微卫星数据库时 , 必须慎重选择取样来源。当鉴别特定材料时 , 则应相应增加标记数。

关键词 : 水稻 ; 微卫星标记 ; 一致性 ; 品种保护 ; 品种鉴定

中图分类号 : Q943 ; S511 .02 文献标识码 : A 文章编号 : 1001-7216(2006)04-0367-05

遗传一致性是品种鉴定的重要内容。传统的形态鉴定包括形态、农艺、品质及抗病虫害四方面性状^[1] , 这些表型性状多数属数量性状 , 受多基因控制 , 易受环境影响 , 需要多年的田间或温室试验才能给予准确评估。近年来 , 基于 DNA 指纹图谱的微卫星标记 (SSR) 分析新技术 , 已开始应用于植物品种鉴定 , 并将有可能产生全新的品种登录系统 , 因而引起了广泛关注^[2]。如何区分品种间的差异和剩余变异引起的品种内差异仍是品种鉴定工作中的一个难题。研究表明 , 低水平的遗传变异在植物品种内广泛存在^[3-5]。Djé 等^[6] 选用 5 个微卫星标记分析 25 个高粱品种各 10 个单株 , 结果没有 1 份材料在所有座位上完全一致。当采用较大样本量 (20 个个体) 评估欧洲小麦和番茄品种的遗传一致性时 , 品种内变异更为明显 , 表明样本量对品种内变异评价结果有较大影响^[7]。有关水稻品种内变异的研究 , 以往主要涉及地方品种等异质程度较高的材

料^[8-11]。本研究则旨在分析我国主栽常规稻品种和杂交稻组合亲本内的微卫星标记变异程度 , 试图为水稻种子生产以及品种鉴定提供信息和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

根据全国农技推广总站统计的 2002 年推广品种信息 , 向全国各农业科研院所、推广站、种子公司征集种植面积 6 .67 万 hm² (100 万亩) 以上的常规水稻品种和杂交稻组合亲本 63 个 , 选择其中具 2 ~ 7 个来源的 41 个品种 (成对的不育系与保持系当作

收稿日期 : 2005-12-21 ; 修改稿收到日期 : 2006-04-14。
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) ; 浙江省重点项目 (2003C22007)。
第一作者简介 : 应杰政 (1972 -) , 男 , 助理研究员 , 硕士研究生。

表 1 对 41 个品种不同来源材料的 SSR 标记差异分析

Table 1 Within variety heterogeneity among different sources of 41 varieties detected by SSR markers .

品种名称 Variety	来源数 No . of sources	标记数 ¹⁾ No . of markers ¹⁾
常规籼稻 Conventional indica rice		
嘉育 948 Jiayu 948	2	0
特籼占 25 Texianzhan 25	2	0
粤香占 Yuexiangzhan	2	0
舟 903 Zhou 903	2	0
9311	3	1
双七占 Shuangqizhan	3	0
扬稻 6 号 Yangdao 6	4	1
常规粳稻 Conventional japonica rice		
空育 131 Kongyu 131	2	0
辽粳 294 Liaojing 294	2	0
五优稻 1 号 Wuyoudao 1	2	1
豫粳 6 号 Yujing 6	2	1
垦稻 10 号 Kendao 10	2	3
武育粳 3 号 Wuyujing 3	3	3
秀水 110 Xiushui 110	4	1
不育系/保持系 Male sterile line or maintainer line		
D62 A、B	2	0
V20 A、B	2	0
冈 46B Gang 46B	2	0
优 A、B You A ,B	2	0
金 23A、B Jin 23A ,B	3	0
龙特甫 A、B Longtefu A , B	3	0
珍汕 97A、B Zhenshan 97A ,B	5	1
- 32A、B	6	0
中 9A、B Zhong 9A ,B	6	0
协青早 A、B Xieqingzao A ,B	7	0
恢复系 Restorer line		
先恢 207 Xianhui 207	2	0
CDR22	2	0
To 974	2	0
蜀恢 162 Shuhui 162	2	0
辐恢 838 Fuhui 838	2	3
江恢 151 Jianghui 151	2	4
明恢 70 Minghui 70	2	4
盐恢 559 Yanhui 559	2	3
测 64 Ce 64	3	1
泸恢 17 Luhui 17	3	1
绵恢 501 Mianhui 501	3	2
明恢 77 Minghui 77	3	3
蜀恢 527 Shuhui 527	3	0
多系 1 号 Duoxi 1	4	0
桂 99 Gui 99	5	2
密阳 46 Milyang 46	5	0
明恢 63 Minghui 63	7	1
合计 Total	125	36

¹⁾ 来源间差异标记数。

¹⁾ No . of markers showing within variety variation .

同一品种的不同来源),共计 125 份材料 ,应用于分析同一品种不同来源间的遗传差异(表 1)。同时 ,选择其中有代表性的 11 个水稻品种(表 2) ,其中常规籼稻品种 2 个、常规粳稻品种 3 个、不育系/保持系 3 个、恢复系 3 个 ,每个品种取同一来源 50 个单

株 ,应用于分析同一品种同一来源不同单株之间的遗传差异 ,作为评估我国水稻品种的遗传一致性的主要依据。

1.2 SSR 标记检测

供试品种的种子直播于水田 ,4 叶期时 ,从每个取样苗上剪取嫩叶片 3~4 cm ,采用 Zheng 等^[12]的方法提取总 DNA。根据前期的试验结果选择 5 对引物 RM17、RM72、RM171、RM297、RM1195 分别用于 PCR 扩增 ,再用 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶检测 ,方法参照施勇烽等^[13]。

2 结果与分析

2.1 同一品种名称不同来源间的遗传差异比较

通过 SSR 检测发现供试 41 个品种中有 18 个(43.90%)存在同一品种不同来源间差异(表 1)。其中 ,1 个标记表现差异的品种有 9 个(五优稻 1 号、豫粳 6 号、秀水 110、扬稻 6 号、珍汕 97A、9311、测 64、泸恢 17 和明恢 63) ,2 个标记差异的有 2 个(桂 99、绵恢 501) ,3 个标记差异的有 5 个(垦稻 10 号、辐恢 838、盐恢 559、武育粳 3 号) ,4 个标记差异的有 2 个(江恢 151、明恢 70)。以上结果表明 ,同一品种名称不同来源间仍存在一定程度的遗传差异。

SSR 标记分析还表明异质品种的检出率随标记的不同存在差异。RM72、RM17、RM171、RM1195、RM297 标记分别在 11、9、6、8、5 个品种中检测到遗传差异。同时 ,我们发现不育系/保持系来源间的差异明显低于常规籼型、常规粳型和恢复系品种 ,究其原因 ,可能是生产上应用的不育系在选育过程中通常采用多代连续回交 ,育性纯度已达到 99.9%。因此在不育系/保持系的不同来源间保持了较高水平的遗传一致性。值得注意的是 ,在具有 3 个以上来源的品种中检测到遗传差异时 ,不管差异是在 1 个标记上检测到 ,还是在多个标记上检测到的 ,表现差异的材料均为同一来源。明恢 77 有 3 个来源 ,其中 1 个来源在 3 个标记上与其他 2 个来源显示不一致。这可能与所选材料编号混淆有关。

2.2 遗传一致性评估

为进一步分析水稻品种内的遗传差异 ,我们选择了 11 个代表性品种作较大样本的检测。结果发现 ,6 个品种(连粳 3 号、辽粳 294、- 32B、优 B、蜀恢 527、双七占)在所有标记上均表现一致 ,占检测总品种数的 54.55%(图 1 示辽粳 294 在 RM1195 标记上的检测结果) ,其他品种在 1 个或 1 个以上标记上出现两种以上的带型 ,占 45.45%。如将一半

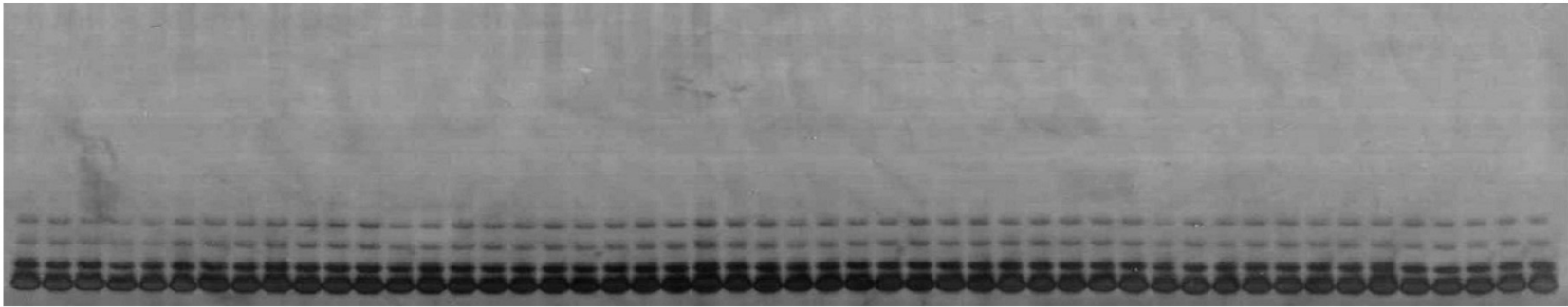


图 1 RM1195 对辽粳 294 的 50 个植株的 SSR 扩增结果
Fig .1 . Amplification results of primer RM1195 with 50 plants of Liaojing 294 .

以上单株的共有带型作为典型带型 ,将其他带型作为副带型 ,在 11 个测试品种中有 2 个(特粳占 25、粳小占)在 1 个标记上出现副带型 ,3 个(秀水 110、中 9A、先恢 207)出现多个标记副带型。各微卫星标记平均副带型率变化幅度为 0.36% ~ 5.45% ,各品种在 5 个微卫星标记上的平均副带型率变化幅度为 0.0% ~ 10.0% ,平均为 1.67% (表 2)。对于上述定型品种中所存在的遗传变异作具体分析 ,如 :秀水 110 和中 9A 相同个体在多个标记上与典型株呈现不一致(图 2) ,推测很有可能是在种子的生产、收获、包装或取样过程中 ,混入了非本品种的种子。颇为有趣的是粳小占 ,在 RM17、RM72、RM297、RM171 标记上 50 单株均表现一致 ,但在 RM1195

标记上出现 2 种等位基因 ,其中杂合型个体 2 株、两种纯合型个体分别为 25 和 23 株(图 3)。这些植株在田间没有呈现表型分离 ,说明带型的差异并未影响粳小占的形态一致性。

3 讨论

近年来 ,在番茄、小麦、胡椒、油菜、印度香稻等作物上应用微卫星标记进行品种一致性的研究已相继报道 ,显示了微卫星标记在该研究领域中的应用的良好前景^[7,11,14-15]。以往多数研究表明 ,微卫星标记对水稻品种的纯度检测结果与田间种植的表型鉴定结果完全一致或无显著差异^[16-19] ,但是 ,本研究中发现在生产上已大面积应用的品种 ,如粳小占 ,在

表 2 11 个代表性品种的遗传一致性
Table 2 . Uniformity data of 11 typical varieties .

品种 Variety	微卫星标记 ¹⁾ SSR marker ¹⁾					各个座位的异型率 Off types within varieties across all loci /%
	RM17	R M72	RM171	RM297	RM1195	
常规籼稻 Conventional indica rice						
籼小占 Xianxiao zhan	50	50	50	50	25(23)(2)	10 .00
特籼占 25 Texian zhan 25	50	50	47(3)	50	50	1 .20
常规粳稻 Conventional japonica rice						
连粳 3 号 Lianjing 3	50	50	50	50	50	0 .00
辽粳 294 Liaojing 294	50	50	50	50	50	0 .00
秀水 110 Xiushui 110	49(1)	49(1)	50	49(1)	49(1)	1 .60
不育系或保持系 Male sterile line or maintainer line						
优 B You B	50	50	50	50	50	0 .00
- 32B	50	50	50	50	50	0 .00
中 9A Zhong 9A	48(2)	50	50	48(2)	48(2)	2 .40
恢复系 Restorer line						
先恢 207 Xianhui 207	49(1)	49(1)	50	46(2) (2)	48(2)	3 .20
蜀恢 527 Shuhui 527	50	50	50	50	50	0 .00
双七占 Shuangqizhan	50	50	50	50	50	0 .00
单个座位异质率 Single heterogeneity at locus /%	0 .73	0 .36	0 .55	1 .27	5 .45	1 .67 ²⁾
异质品种数 No . of nonuniform varieties	8	9	10	8	7	

¹⁾ 括号内的数字为在该微卫星座位上表现为副带型的植株数 ; ²⁾ 平均值。
¹⁾ The numbers in parentheses represent the number of off types carrying a particular allele ; ²⁾ Mean of the off types within varieties across all loci .

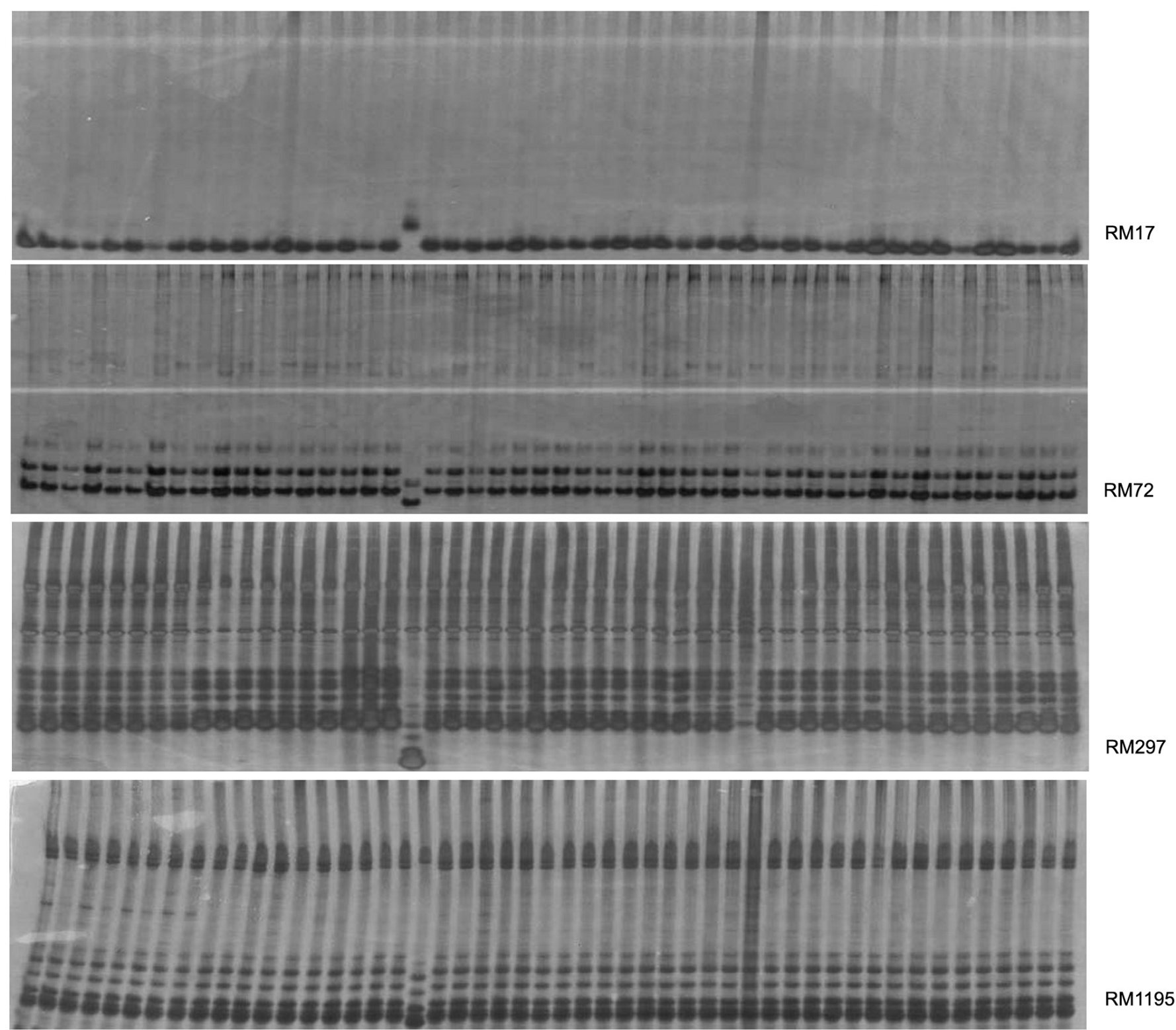


图 2 4 个微卫星标记对秀水 110 的 50 个植株的检测结果
Fig 2 . Amplification results of four primers with 50 plants of Xiushui 110 .

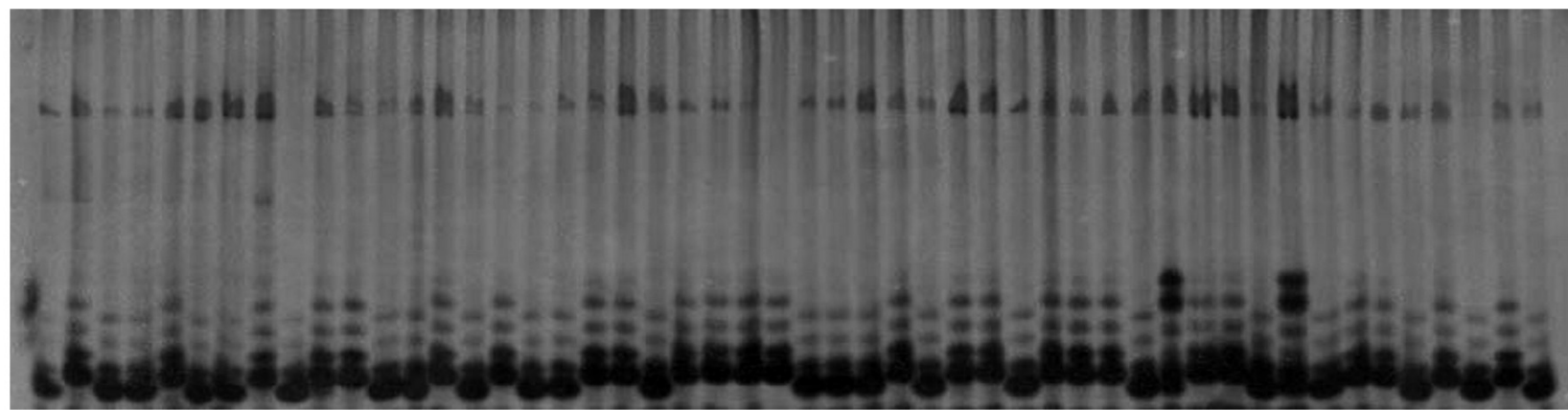


图 3 籼小占 50 个植株在 RM1195 座位上的等位基因差异
Fig 3 . Within variety variation in Xianxiaozhan with 50 plants detected by microsatellite marker R M1195 .

RM1195 标记上却观察到单基因式的分离 ,暗示品种选育过程中尚存在剩余变异。由于常规育种以表型为基础 ,表型稳定的品种仍可能有微卫星标记变

异。因此 ,不能简单地将形态鉴定的标准应用于微卫星标记鉴定中。目前 ,我国水稻的一致性评估以经典性状为基础 ,常规水稻品种允许变异度为 2% ,

杂交组合为 4% ,不育系育性为 0 .1 %。据 Cooke 等^[7]报道 ,表型一致的 25 个小麦品种经 9 个微卫星标记检测 ,有 15 个品种在 1 个以上标记上达不到 3% 的标准。在本研究中 ,11 个水稻品种的平均异型率为 1.67% ,而且除了籼小占外 ,其他品种的异型率都低于 5%。因此 ,以所有微卫星检测标记的平均异型率不超过 5% 作为稻麦等谷类作物一致性评估的标准似乎是合适的。当然 ,通过微卫星检测与田间形态性状鉴定相结合 ,则所得结果将更为完善。

应用微卫星标记鉴定品种内变异时 ,其鉴定结果还可能与应用标记的数目和多态性检测能力有关 ,变异类型的比例有可能随着标记数的增加而增加^[8]。一般认为 ,选择少数几个高多态性的微卫星标记进行鉴定 ,可以反映品种内变异总体情况。但欲鉴别特定的材料 ,则需要相应增加标记数。如测定两组欧洲小麦品种的遗传一致性时 ,分别用了 7 个和 9 个微卫星标记评估^[7] ;评估欧洲番茄品种的遗传一致性时 ,则用了 6 个微卫星标记^[4] ;本研究评估我国水稻主栽品种的一致性时 ,挑选了 5 个微卫星标记。

在构建欧洲小麦品种和番茄品种的微卫星数据库时发现 ,低水平的同一品种名称不同来源间的差异在推广品种中广泛存在^[4 5]。本研究也发现 ,我国水稻主栽品种中 ,同个品种名称的不同来源间仍存在较高水平的遗传差异(占 43 .90%)。因此 ,在构建水稻品种微卫星数据库时必须加倍小心取样 ,特别是材料来源 ,若有可能 ,最好对同一品种名称的多个来源进行分析比较。

谢辞 承蒙全国各地相关研究、推广、种业机构(16 家)及中国水稻研究所 11 个研究组提供水稻材料 ,特致谢忱。

参考文献：

[1] B/T 19557 .7 2004 .中华人民共和国国家标准 .植物新品种特异性、一致性和稳定性测试指南 .水稻 .北京 :中国标准出版社 ,2004 .
[2] UPOV- BMT . BM T/36/10 Progress Report of the 36th Session of the Technical Committee , the Technical Working Parties and Working Group on Biochemical and Molecular Techniques and DNA profiling in Particular . Geneva :[s . n .] , 2002 .
[3] 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 .
[4] 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 .
[5] R öder 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 .
[6] Djé Y , Heureta M , Lefebvre C , et al . Assessment of genetic diversity within and among germplasm accessions in cultivated sorghum using microsatellite markers . *Theor Appl Genet* , 2000 , 100 : 918 925 .
[7] Cooke R J , Bredemeijer G M M , Ganai M W , et al . Assessment of the uniformity of wheat and tomato varieties at DNA microsatellite loci . *Euphytica* , 2003 , 132 : 331 341 .
[8] 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 .
[9] 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 .
[10] 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 .
[11] 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 .
[12] Zheng K L , Huang N , Bennett J , Khush G S . PCR- based marker assisted selection in rice breeding . IRRI Discussion Paper Series No . 12 . Manila : International Rice Research Institute , 1995 .
[13] 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 .
[14] Kwon Y S , Lee J M , Yi G B , et al . Use of SSR markers to complement tests of distinctiveness , uniformity , and stability (DUS) of pepper (*Capsicum annum* L .) . *Mol Cells* , 2005 , 19(3) : 428 435 .
[15] Tommasini L , Batelly 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 .
[16] 李进波 , 周元飞 , 万丙良 , 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 .
[17] 李进波 , 杨国才 , 费震江 , 等 . 两系杂交稻亲本 SSR 指纹图谱的建立及其在种子纯度鉴定中的应用 . 杂交水稻 , 2005 , 20(2) : 50 53 .
[18] 李 莉 , 杨剑波 , Mackill D J , 等 . RAPD 和 SSR 标记对不同样点(产地)水稻品种分析的比较 . 安徽农业科学 , 2000 , 28(2) : 129 131 .
[19] 苏顺宗 , 黄玉碧 , 杨俊品 , 等 . 利用 SSR 鉴定水稻杂交种子纯度的研究 . 种子 , 2003(1) : 23 25 .