

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

彭锁堂¹ 王海岗^{1 2} 魏兴华^{2,*} 吕建珍² 张晓丽^{1 2} 袁筱萍² 杨武德¹
(¹山西农业大学 农学院,山西 太谷 030801 ;²中国水稻研究所 水稻生物学国家重点实验室,浙江 杭州 310006 ;* 通讯联系人 ,E mail :xwei@mail .hz .zj .cn)

SSR Diversity and Genetic Structure of Main Male Sterile Lines of Three Line Hybrid Rice in China

PENG Suo tang¹ , WANG Hai gang^{1 2} , WEI Xing hua^{2,*} , LU Jian zhen¹ , ZHANG Xiao li^{1 2} , YUAN Xiao ping² , YANG Wu de¹
(¹ College of Agriculture , Shanxi Agricultural University , Taigu 030801 , China ;² State Key Laboratory of Rice Biology , China National Rice Research Institute , Hangzhou 310006 , China ;* Corresponding author , E mail : xwei@mail .hz .zj .cn)

Abstract : A total of 28 male sterile lines for major three line hybrid rice in China were investigated by SSR assay with 48 pair primers distributed on 12 chromosomes of rice . The results revealed that 41 loci were polymorphic , with a polymorphic rate of 85 .4% . The number of alleles per locus (*A*) ranged from 2 to 6 with an average value of 3 .5 . Nei ' s genetic diversity index (*H_e*) and the values of polymorphism information content (*PIC*) were 0 .40 and 0 .36 , respectively . Analysis of molecular variance (AMOVA) showed that the genetic differentiation among the breeding periods was rather small (*F_{st}* = 0 .033) and not significant (*P* > 0 .05) . However , the differentiation within the breeding periods was very high . Model based analysis showed that it contained similar ancestry for main male sterile lines of three line hybrid rice in China , implying that enriching genetic diversity in male sterile lines should be important in hybrid rice breeding program .

Key words : hybrid rice ; male sterile lines ; genetic structure ; genetic diversity ; simple sequence repeat

摘 要 :选取均匀分布在水稻 12 条染色体上的 48 对 SSR 引物 ,对 28 份我国杂交水稻主要不育系进行了多样性和遗传结构分析。在所分析的 48 个位点中 ,多态性位点 41 个 ,多态性位点百分率(*P*)为 85 .4% ,每 1 个位点平均等位基因数(*A*)为 3 .5 ,变幅 2 ~ 6 个 ,平均基因多样性指数(*H_e*)和平均多态性信息含量指数(*PIC*)分别为 0 .40 和 0 .36。AMOVA 分析表明 ,不育系遗传变异主要存在于各选育时期内 ,时期间的遗传变异仅占总变异的 3 .3% ,且未达到显著水平。基于模型的遗传结构分析表明 ,我国三系杂交稻主要不育系多数含有相近血缘 ,背景单一。

关键词 :杂交水稻 ;不育系 ;遗传结构 ;遗传多样性 ;微卫星标记

中图分类号 :Q943 ;S511 .032 文献标识码 :A 文章编号 :1001-7216(2008)04-0365-05

我国杂交水稻的发展经历了三系、两系和超级杂交水稻三个发展阶段^[1-2]。在各个阶段 ,通过使用不同的材料和方法选育出了许多优良不育系。目前 ,我国生产上大面积使用的不育系有 7 种细胞质类型^[3] ,不育系资源丰富 ,为提高水稻产量作出了巨大贡献。

作物遗传多样性是农业可持续发展的基础^[4]。水稻是世界上最重要的粮食作物之一^[5] ,丰富的水稻遗传多样性可以满足人口、环境、病虫害以及品质等诸多因素对未来水稻生产的挑战^[6]。充分了解我国杂交水稻不育系的遗传多样性和遗传结构 ,对于杂交水稻育种及不育系选育具有重要的指导意义。利用系谱资料 ,王胜军等^[7]比较分析了 1981 - 2002 年我国杂交水稻主要亲本 ,认为其遗传基础狭窄、背景单一。李云海等^[8]、何光华等^[9]及肖小余等^[10]则分别从 DNA 水平推断了我 国部分杂交稻

亲本的遗传狭窄性。本研究通过 SSR 标记技术 ,对 1976 - 2005 年杂交稻主要推广组合不育系进行系统的多样性和遗传结构比较分析 ,从分子水平来研究我国主栽杂交稻不育系 30 年间的遗传变化。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选取我国生产上使用的不育系 28 份 ,材料编号、名称和细胞质类型见表 1。供试材料选择的主要依据 :1)年推广面积在 6 .7 × 10⁴ hm² 以上的杂交组合不育系 ;2)近年新选育的主要不育系。所有试

收稿日期 :2007-11-30 ;修改稿收到日期 :2008-05-12。

基金项目 :国家 973 计划资助项目(2004CB117201) ;农业部农业野生植物保护专项资助项目 ;中央级公益性科研院所专项基金资助项目(100006) ;浙江省重点科研国际合作项目(2006C24012)。

第一作者简介 :彭锁堂(1964 -) ,男 ,博士 ,副教授。

表 1 试验材料

Table 1 . Male sterile lines of rice used in this experiment .

编号	名称	类型	编号	名称	类型
No .	Name	Type	No .	Name	Type
1	二九南 1 号 A Erjiunan 1A	野败型 Wild abortive type	15	K 22 A	K 型 K type
2	二九矮 4 号 A Erjiu ai 4A	野败型 Wild abortive type	16	冈 46 A Gang 46A	冈型 Gang type
3	K17A	K 型 K type	17	D 汕 A D shan A	D 型 D type
4	龙特甫 A Longtefu A	野败型 Wild abortive type	18	天丰 A Tianfeng A	野败型 Wild abortive type
5	V20A	野败型 Wild abortive type	19	- 32 A	印尼水田谷型 Indonesian paddy rice type
6	71-72A	野败型 Wild abortive type	20	中 9A Zhong 9A	印尼水田谷型 Indonesian paddy rice type
7	金南特 43A Jinnante 43A	野败型 Wild abortive type	21	沪 A Hu A	野败型 Wild abortive type
8	V41A	野败型 Wild abortive type	22	武香 A Wuxiang A	野败型 Wild abortive type
9	菲改 A Feigai A	野败型 Wild abortive type	23	天香 A Tianxiang A	野败型 Wild abortive type
10	中浙 A Zhongzhe A	野败型 Wild abortive type	24	珍汕 97A Zhenshan 97A	野败型 Wild abortive type
11	金 23A Jin 23A	野败型 Wild abortive type	25	IR69700A	野败型 Wild abortive type
12	优 A You A	印尼水田谷型 Indonesian paddy rice type	26	博白 A Bobai A	野败型 Wild abortive type
13	内香 2A Neixiang 2A	野败型 Wild abortive type	27	粤泰 A Yuetai A	红莲型 Honglian type
14	协青早 A Xieqingzao A	矮败型 Dwarf abortive type	28	粤丰 A Yuefeng A	红莲型 Honglian type

验材料由中国水稻研究所国家水稻种质中期库提供。

1 2 基因组 DNA 的提取

取幼嫩叶片 1 ~ 2 cm ,加液氮充分研磨 ,参照卢扬江和郑康乐^[11]方法提取水稻核基因组 DNA。

1 3 SSR 分析

选取均匀分布在水稻 12 条染色体上的 48 对引物(上海生工生物工程有限公司)进行 SSR 分析。10 μL PCR 反应体系中含有 10 × PCR buffer (20 mmol/L Mg²⁺) 1 μL ,1 mmol/L 正、反 SSR 引物各 1 μL ,dNTPs(10 mmol/L)0 .2 μL ,*Taq*酶 0 .4 μL ,ddH₂O 5 .4 μL。应用 MJ Research 公司 PTC 100 96v 进行扩增。反应程序为 :95 下预变性 5 min ; 94 下变性 1 min ,55 下退火 45 s(其中 ,RM135、RM161 和 RM162 退火温度为 61 ,RM142、RM178 和 RM169 退火温度为 67) ,72 下延伸 1 min ,30 个循环 ;最后在 72 下延伸 10 min。扩增产物在 6% 非变性聚丙烯酰胺凝胶上恒压电泳(电压 8 V/cm) ,银染法染色记录^[12]。

1 4 数据分析

每 1 对 SSR 引物检测 1 个位点 ,每 1 条多态性条带视为 1 个等位基因 ,参照 [http ://www . gramene .org/](http://www.gramene.org/)中相关引物信息记录扩增片段大小。应用 Powermarker3 .25^[13]计算平均等位基因 (*A*)、基因多样性指数 (*He*) 和多态性信息含量指数 (*PIC*) ,群体遗传结构的分析使用 Structure2 .2 分析软件^[14] ;不同选育时期各位点遗传分化采用 Arlequin3 .11^[15]中的 AMOVA^[16] (analysis of mo-

lecular variance)程序计算 *Fst*(*F* statistics)。

2 结果与分析

2 .1 遗传多样性

28 份不育系材料在被检测的 48 个 SSR 位点中 ,多态性位点有 41 个 ,多态性位点百分率 (*P*) 为 85 .4% ,其中 RM135、RM409、RM147、RM162、RM340、RM420、RM161 为单态位点(表 2)。因此 ,只对 41 个多态性位点进行遗传多样性分析。

41 个多态性位点共扩增出 143 个等位基因 ,平均 3 .5 个。不同位点等位基因数目不等 ,变化范围在 2 ~ 6 个。平均基因多样性指数 (*He*) 为 0 .402 ,变幅 0 .071 ~ 0 .776。平均多态性信息含量指数 (*PIC*) 为 0 .362 ,范围在 0 .067 ~ 0 .741。

2 2 遗传分化

根据不育系育成年份 ,将试验材料分成 3 个时期组 ,即 1976 - 1985 年(时期)、1986 - 1995 年(时期)和 1996 - 2005 年(时期) ,比较 3 个时期我国杂交水稻主要不育系各遗传多样性参数 ,发现时期 与时期 的 *P* 值相近且低于时期 ;平均等位基因数的变化为时期 > 时期 > 时期 ;而 *He* 和 *PIC* 在 3 个时期期间的变化较小且差异不显著(表 3)。这就从分子水平上反映了我国杂交水稻发展的 3 个阶段不育系遗传基础较为狭窄。

表 4 表明 ,SSR 遗传变异绝大部分存在于各时期内 ,时期间遗传变异仅占总变异的 3 .3% ,且未达到显著水平。分析每 1 个位点的遗传分化(数据未显示)表明 ,在 41 个多态性位点中 ,38 个位点(占

表 2 48 对 SSR 引物的染色体位置及其在 28 份不育系中的遗传多样性信息

Table 2 Chromosomal location , number of alleles , Nei s gene diversity and polymorphism index content at the 48 SSR loci in the 28 male sterile lines of rice .

位点	染色体	等位基因数	Nei 基因多样性指数	多态性信息含量
Locus	Chromosome	Number of alleles (A)	Nei s gene diversity (He)	Polymorphism index content (PIC)
RM128	1	4	0 .681	0 .621
RM265	1	2	0 .500	0 .375
RM283	1	4	0 .620	0 .546
RM495	1	2	0 .069	0 .067
RM211	2	3	0 .304	0 .274
RM341	2	3	0 .135	0 .131
RM221	2	2	0 .069	0 .067
RM438	2	2	0 .302	0 .256
RM231	3	4	0 .518	0 .460
RM293	3	2	0 .252	0 .221
RM22	3	4	0 .610	0 .536
RM135	3	1	0 .000	0 .000
RM317	4	4	0 .403	0 .364
RM261	4	2	0 .490	0 .370
RM142	4	2	0 .490	0 .370
RM335	4	4	0 .411	0 .380
RM178	5	2	0 .069	0 .067
RM169	5	5	0 .668	0 .613
RM437	5	4	0 .324	0 .307
RM161	5	1	0 .000	0 .000
RM190	6	3	0 .255	0 .240
RM162	6	1	0 .000	0 .000
RM340	6	1	0 .000	0 .000
RM435	6	3	0 .255	0 .240
RM455	7	3	0 .390	0 .353
RM125	7	3	0 .135	0 .131
RM420	7	1	0 .000	0 .000
RM427	7	3	0 .196	0 .186
RM152	8	4	0 .459	0 .427
RM404	8	6	0 .776	0 .741
RM408	8	3	0 .253	0 .234
RM230	8	4	0 .311	0 .292
RM288	9	3	0 .426	0 .361
RM409	9	1	0 .000	0 .000
RM219	9	2	0 .293	0 .250
RM444	9	3	0 .446	0 .401
RM311	10	4	0 .474	0 .414
RM269	10	6	0 .645	0 .614
RM147	10	1	0 .000	0 .000
RM216	10	5	0 .367	0 .348
RM332	11	4	0 .564	0 .491
RM21	11	5	0 .697	0 .643
RM206	11	5	0 .707	0 .654
RM286	11	5	0 .610	0 .566
RM19	12	6	0 .732	0 .691
RM463	12	2	0 .191	0 .173
RM277	12	2	0 .071	0 .069
RM247	12	4	0 .314	0 .298

表 3 各时期不育系多态性位点百分率 (P)、平均等位基因数 (A)、基因多样性指数 (He)和多态性信息含量指数 (PIC)的变化

Table 3 Percentage of polymorphic loci (P) , average alleles per locus (A) ,genetic diversity index (He) and polymorphism index content (PIC) calculated for each period grouped by the breeding year .

时期	样本数	多态性位点百分率	平均等位基因数	平均 Nei 基因多样性指数	平均多态性信息含量
Period	Sample size	P/ %	A	He	PIC
1976 - 1985	12	0 .646	3 .1 ±0 .96 a	0 .445 ±0 .162 a	0 .394 ±0 .148 a
1986 - 1995	7	0 .646	2 .6 ±0 .76 b	0 .454 ±0 .156 a	0 .391 ±0 .148 a
1996 - 2005	9	0 .792	2 .8 ±0 .95 ac	0 .443 ±0 .175 a	0 .391 ±0 .164 a
1976 - 2005	28	0 .854	3 .5 ±1 .23	0 .402 ±0 .204	0 .362 ±0 .186

同一栏中 ,数据后跟有相同小写字母者表示 Wilcoxon Matched Pairs Test 未达 0 .05 显著水平。

Within a column ,data followed by the common letters mean no significant difference at 0 .05 level according to the Wilcoxon Matched Pairs Test .

表 4 不同时期育成不育系的分子方差分析(AMOVA)

Table 4 .Analysis of molecular variance (AMOVA) based on the breeding periods of the 28 male sterile lines of rice .

来源	自由度	方差分量	变异百分率	P
Source	df	Variance component	Percentage of variation/%	
时期间 Among periods	2	0.275	3.31	0.898
时期内 Within periods	25	8.047	96.69	
总计 Total	27	8.322		

92.7%)时期间的遗传分化不显著,仅有 3 个位点(RM455、RM427、RM435)遗传分化达到显著水平($P<0.05$),其中 RM455 在时期间的遗传分化最为明显,达 28.3%。

2.3 遗传结构

采用 Structure2.2 软件分析了 28 份不育系的遗传结构,当 $K=5$ 时,似然值(log likelihood)取得最大值,预示不育系可分为 5 个类群(图 1)。类群 I 包括天丰 A、-32A、中 9A 和粤丰 A。金南特 43A、K22A、沪 A、粤泰 A 和珍汕 97A 划为类群 II。其中珍汕 97A 是生产上应用面积最大的不育系,沪 A 是一个野败型的旱稻不育系。类群 III 包括天香 A、IR697000A。类群 IV 包含了 K17A、龙特甫 A、V41A、中浙 A、金 23A、优 A、内香 2A、协青早 A、冈 46A、D 汕 A、武香 A 和博白 A 共 12 个不育系。类群 V 中的二九南 1 号 A、二九矮 4 号 A、V20A、71-72A 和菲改 A 都含有相同血缘,这从系谱分析中也能够得到证实,而且这 5 个不育系均在同一时期育成。生产上使用较广的不育系主要集中在类群 II 和类群 V 中,且多数含有相同血缘。野败型不育系中有 14 份(占 77.8%)材料含有相同的血缘。

3 讨论

本试验研究材料中多数不育系是 1976 - 2005

年间我国杂交稻年推广面积在 $6.7 \times 10^4 \text{ hm}^2$ 以上的组合,能够反映我国 30 年内生产上主要使用不育系的多样性变化趋势。杂交水稻育种的关键是杂交亲本的选择,虽然我国不育系资源比较丰富,但是生产中应用面积较大的不育系数数量不多,类型少,多数含有野败型的珍汕血缘。同样,在我们所选用的 28 份不育系材料中,野败型最多,占 64.3%。野败型不育系在“三系”和“超级杂交稻”阶段应用较多,而在“两系”阶段相对较少。

已有研究表明^[8,17],我国生产上广泛使用的不育系遗传多样性较低。本研究中,28 份不育系在 41 个多态性位点上共发现 143 个等位基因,平均每 1 个位点可检测到 3.5 个,明显低于我国常规稻主栽品种^[18],同样也略低于热带地区杂交稻保持系^[19]。以每 10 年作为不育系发展的一个时期组,与杂交水稻发展的三个阶段相对应,研究表明不同时期选育的不育系的遗传多样性变化不明显。AMOVA 对各时期不同位点的遗传分化统计显示,92.7%多态性位点在时期间遗传分化不显著,说明我国在杂交水稻三个重要发展阶段育成的不育系有很大的相似性,整体遗传水平没有太大的变化;不育系在时期内的遗传变异远大于时期间,表明造成不同时期不育系的遗传变异主要来源是不育系材料本身的差异,而不同时期在选育不育系材料和方

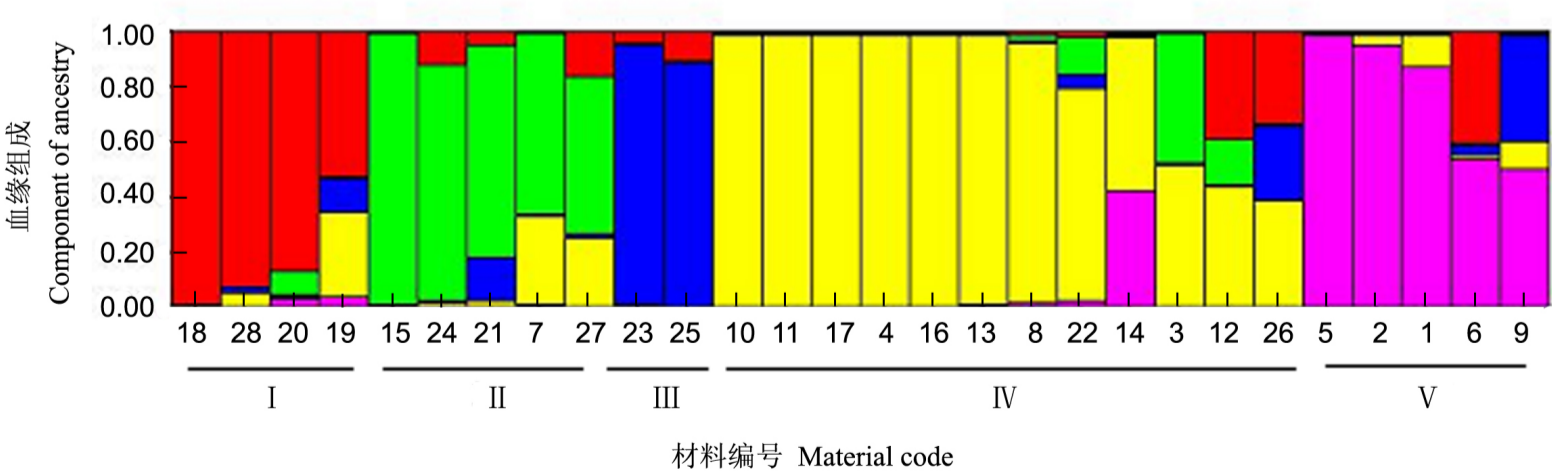


图 1 基于模型的 28 份不育系遗传结构分析

Fig.1 . Model-based ancestry for the 28 rice male sterile lines .

图中材料编号与表 1 对应。

The numbers of the materials in the figure are corresponding to those in Table 1 .

法上都没有大的改变。

在我们的研究中,遗传结构的分析采用了基于模型的方法。前人对不育系遗传结构的研究大都采用基于遗传距离的分析,聚类结果的确定过多地依赖距离计算和聚类方法的选择。基于模型的聚类方法能够将个体的信息包含到类群的划分中,在不育系遗传结构的认识中更为有效。由于我们提取的是基因组 DNA,在遗传结构的划分上没有表现出与不育系细胞质类型的相关性。目前,我国生产上大面积使用的不育系多以杂交转育的方式选育,细胞质和细胞核单一。不育系遗传结构的单一对杂交水稻在抗病、品质、高产等方面的育种有一定影响。因此,我们可以通过远缘杂交来创造新的不育质源,扩大不育系资源的遗传背景;同时也可以通过籼稻与粳稻间杂交来丰富不育系的遗传基础。

参考文献：

[1] 袁隆平.我国两系杂交水稻研究的形势、任务和发展前景.农业现代化研究,1997,18:1-3.

[2] 袁隆平,唐传道.杂交水稻选育的回顾、现状与展望.中国稻米,1999(4):3-6.

[3] 曾千春,周开达,朱 祯,等.中国水稻杂种优势利用现状.中国水稻科学,2000,14(4):243-246.

[4] 卢宝荣,朱有勇,王云月.农作物遗传多样性农家保护的现状及前景.生物多样性,2002,10:409-415.

[5] Garris A J, Tai T H, Coburn J, et al. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. *Genetics*, 2005, 169:1631-1638.

[6] Stephen R M, Marlon C, Marilyn G B, et al. Natural hazards and genetic diversity in rice. *Agric Human Values*, 2002, 19:133-149.

[7] 王胜军,陆作楣.中国杂交籼稻遗传多样性演变及其分析.江

苏农业学报,2006,22:192-198.

[8] 李云海,钱 前,曾大力,等.我国主要杂交水稻亲本的 RAPD 鉴定及遗传关系研究.作物学报,2000,26(2):171-176.

[9] 何光华,裴 炎,杨光伟,等.我国中籼杂交稻亲本的 DNA 变异性研究.作物学报,2000,26(4):449-454.

[10] 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.中国水稻科学,2006,20(1):1-7.

[11] 卢扬江,郑康乐.提取水稻 DNA 的一种简易方法.中国水稻科学,1992,6(1):47-48.

[12] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism(SSLP) in rice(*O. sativa* L.). *Mol Gen Genet*, 1996, 252:597-607.

[13] Liu K J, Muse S V. PowerMarker: Integrated analysis environment for genetic marker data. *Bioinformatics*, 2005, 21:2121-2129.

[14] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P J. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 2000, 155:945-959.

[15] Excoffier L, Laval G, Schneider S. Arlequin ver3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evol Bioinform Online*, 2005, 1:47-50.

[16] 张富民,葛 颂.群体遗传学研究中的数据处理方法: RAPD 数据的 AMOVA 分析.生物多样性,2002,10:438-444.

[17] 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.作物学报,2006,32(2):169-175.

[18] 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.中国水稻科学,2007,21(2):150-154.

[19] Xu W J, Virmani S S, Hernandez J E, et al. Genetic diversity in the parental lines and heterosis of the tropical rice hybrids. *Euphytica*, 2002, 127:139-148.