

基于 NYT 1433—2014 中 48 对 SSR 引物的 94 份杂交稻亲本 DNA 分子数字指纹库研究

林亦霞 王梓辛 刘欢 王征 梁满中 戴小军* 陈良碧*

(湖南师范大学 生命科学学院, 长沙 410081; * 通讯联系人, E-mail: hello_dxj@163.com, chenliangbi@126.com)

Research on DNA Molecular Digital Fingerprint Database Based on 48 Pairs of SSR Primers for 94 Hybrid Rice Parents in NYT 1433—2014

LIN Yi-xia, WANG Zi-xin, LIU Huan, WANG Zheng, LIANG Man-zhong, DAI Xiao-jun*, CHEN Liang-bi*

(College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410081, China; * Corresponding author, E-mail: hello_dxj@163.com, chenliangbi@126.com)

LIN Yixia, WANG Zixin, LIU Huan, et al. Research on DNA molecular digital fingerprint database based on 48 pairs of SSR primers for 94 hybrid rice parents in NYT 1433—2014. *Chin J Rice Sci*, 2016, 30(6): 593-602.

Abstract: It is of great significance to establish the simple molecular fingerprinting technique with high resolution for identification of the genetic polymorphism and the authenticity of different rice varieties, so as to guide rice breeding and regulate its seed market. The new standards of technical regulation on identification of the rice varieties with SSR markers, formulated by the Ministry of Agriculture of P.R. China, recommended the use of 35 control standard reference samples with different genetic characteristics for identification of rice varieties. The genetic polymorphism and specificity of 94 hybrid rice parents were compared based on the standard method. The results indicated that the tested varieties differed at least three pairs of mutated loci or the genetic differences between the parents of hybrid rice could be well distinguished. By comparing the polymorphism of the 48 recommended primers of the new standard, 46 primers showed higher polymorphism except RM176 and RM551. Thus, higher polymorphic alternative molecular markers would be identified in other loci of the same chromosome. 16 new allelic variation sites were found and could be used as supplementary of standard fingerprint database and enrich genetic variation sites information. By analyzing molecular fingerprint of 94 hybrid parental materials, 23 have specific molecular markers and can be used in authenticity analysis of hybrid combination and purity identification of hybrid seeds. According to the digital molecular fingerprint of the tested rice parent, we constructed a virtual digital molecular fingerprint database including 87 female sterile lines and 7 male parents, and specific digital molecular marker of virtual hybridized combination authenticity and rapid seed purity identification.

Key words: hybrid rice; SSR primer; digital fingerprint

林亦霞, 王梓辛, 刘欢, 等. 基于 NYT 1433—2014 中 48 对 SSR 引物的 94 份杂交稻亲本 DNA 分子数字指纹库研究. *中国水稻科学*, 2016, 30(6): 593-602.

摘要: 建立方法简便、分辨率高的水稻品种遗传多态性和真实性鉴定的分子指纹技术对于指导水稻育种和规范种子市场都具有重要意义。农业部颁布的水稻品种鉴定技术规程行业新标准是基于 35 个不同遗传特点的代表性水稻品种建立的 SSR 分子标记技术规程。本研究根据该标准方法, 对 94 份杂交水稻亲本材料的遗传多态性和特异性进行了比较分析, 结果表明, 供试品种间至少具有 3 对以上引物扩增的 DNA 片段差异, 即利用该标准能很好地区分供试杂交水稻亲本的遗传差异。对新标准中 48 对推荐引物的比较与分析表明, 46 对引物扩增的 DNA 片段多态性较高, 而 RM176 和 RM551 两对引物扩增带多态性较低, 因此在其染色体的其他位点可进一步研究多态性更高的分子标记。与标准中 35 个水稻品种的指纹库进行比较, 发现了 16 个新的等位变异, 这些位点可作为标准指纹库的信息补充, 丰富标准库中的遗传信息。对 94 个杂交水稻亲本的分子指纹比较分析, 发现 23 个亲本材料具有特异性分子标记, 这些特异分子标记可应用于杂交组合的真实性以及杂交种子纯度的分子鉴定。根据供试亲本的数字分子指纹, 构建了 87 个不育系与 7 个父本杂交的虚拟组合数字分子指纹库以及虚拟组合的真实性和纯度快速鉴定的特异数字分子标记。

关键词: 杂交稻; SSR 引物; 数字指纹

中图分类号: Q755; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2016)06-0593-10

收稿日期: 2015-12-29; 修改稿收到日期: 2016-03-12。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31471430); 生态学重点学科资助项目(0713)。

SSR分子标记是共显性标记,多态性丰富,具有操作简便快捷和稳定性好等特点^[1],已广泛应用于遗传图谱的构建和遗传多样性分析等^[2-3]。越来越多的研究表明SSR分子标记技术在水稻品种真伪及纯度鉴定上显示出了巨大的作用,具有无可比拟的优势^[4-10]。

2007年以前,利用SSR标记建立水稻分子指纹库已有大量研究,但没有得到行业普遍认可的标准。2007年农业部颁发了水稻真实性鉴定标准“水稻品种鉴定DNA指纹方法(NY/T1433—2007)”,但该标准所用SSR标记仅24对,且部分标记多态性不高,在鉴定品种真实性中存在局限性。2014年农业部重新发布了新修订的行业新标准“水稻品种鉴定技术规程SSR标记法(NY/T1433—2014)”,该标准利用35个不同遗传特点的代表性水稻品种筛选出了多态性较高的48对引物作为SSR核心标记,并对每对SSR标记标注了其常见等位变异和每个等位变异的bp值,弥补了旧标准的不足,为建立水稻数字分子指纹库奠定基础,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重要的技术支持。

杂交水稻的大面积推广应用为提高我国粮食产量做出了重大贡献。杂交水稻亲本的遗传多态性是培育不同杂交组合的遗传基础,根据农业部水稻品种鉴定技术规程行业新标准,申请审定的杂交水稻新组合在以48对SSR引物构建的DNA分子指纹图谱中,必须与其他已有品种具有不少于2个标记差异。因此,开展杂交水稻亲本以及亲本选育材料的分子遗传多态性分析,对于杂交水稻育种具有重要指导作用。另外,以48对引物为基础,开发更多的特异DNA片段,对于丰富水稻分子指纹数据库以及开展杂交种子纯度的快速分子鉴定都有重要意义。本研究以两系和三系杂交稻亲本为研究材料,构建数字分子指纹库,分析其遗传多态性和特异性,以期杂交水稻选育和种子质量评价等提供技术支持^[11-15]。

1 材料与方法

1.1 水稻材料

94个杂交水稻亲本中包括籼稻温敏不育系54个,来源于光敏不育系农垦58S不育基因源的粳稻不育系2个,籼稻不育系3个,三系野败型不育系17个,印尼型不育系3个,冈型不育系1个,辽型

不育系2个,马协型不育系1个,红莲型不育系2个,BT型不育系2个,父本材料7个(表1)。

1.2 实验方法

1.2.1 水稻DNA的提取

水稻叶片(或种子)按照CTAB法提取幼苗叶片DNA。

1.2.2 PCR扩增和凝胶电泳

根据农业行业标准(NY/T1433—2014)推荐的48对SSR核心标记物序列,由上海生工公司合成PCR引物。SSR反应在10 μ L的反应体系中进行,其中包括2 \times Taq PCR Mix 5 μ L,ddH₂O 3 μ L,引物(20 μ mol/L)各0.5 μ L,模板DNA(50 ng/ μ L) 1 μ L。扩增条件为94 $^{\circ}$ C下预变性4 min;94 $^{\circ}$ C下变性45 s,55 $^{\circ}$ C下退火45 s,72 $^{\circ}$ C下延伸1 min,35个循环;最终72 $^{\circ}$ C下延伸8 min。PCR扩增产物和参照品种一起在8%聚丙烯酰胺凝胶电泳,然后进行观察记录分析。

1.2.3 数据赋值及数据库建立

根据各标记的标准样品,对各水稻材料的电泳条带结果进行赋值:纯合位点的基因型数据记录为X/X,X为该位点等位变异的大小;杂合位点的基因型数据记录为X/Y,其中X、Y为该位点上两个不同的等位变异,小片段数据在前,大片段数据在后。缺失位点等位变异数据记录为0/0。根据以上数据重复性验证后对水稻各品种建立分子指纹数据库。

1.2.4 新片段克隆测序

对扩增出的农业部标准提供的指纹库中不存在的新带型的片段重复验证后进行切胶回收,回收产物连接到载体PMD-18T,转化后对菌落进行PCR检测并测序。

2 结果与分析

2.1 杂交水稻亲本数字分子指纹库与遗传多样性分析

根据农业行业标准(NY/T1433—2014)的48对SSR引物和35个代表性品种作为参照品种,构建供试杂交水稻亲本材料数字分子指纹库。图1为水稻不育系品种“准S”的扩增结果,图1-A为引物RM85扩增图谱,参照品种齐粒丝苗(104 bp)、安育早1号(95 bp)、紫香糯(80 bp)各有1条带,准S扩增出的条带与参照品种齐粒丝苗扩增带一致,准S该位点的数字分子赋值为104/104。图1-B为引

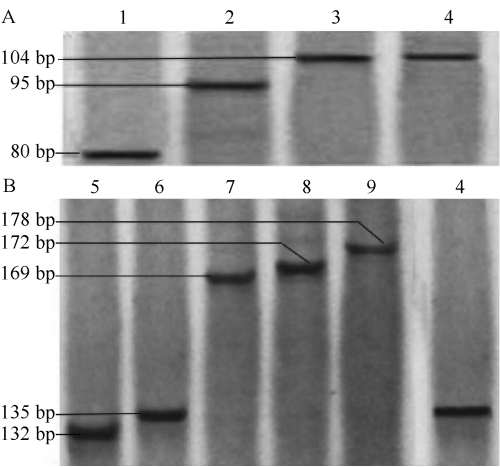
表 1 供试的 94 个杂交稻亲本的名称与代号

Table 1. Name and code of 94 tested hybrid rice parents.

代号	材料	类型	代号	材料	类型
Code	Material	Type	Code	Material	Type
1	陆 18S Lu 18S	T	48	BYXX1	T
2	长选 3S Changxuan 3S	PT	49	BYXX2	T
3	农垦 58S Nongken 58S	P	50	BYXX3	T
4	广占 63S Guangzhan 63S	T	51	BYXX4	T
5	淮 S Zhun S	T	52	BYXX5	T
6	安农 S-1 Annong S-1	T	53	BYXX6	T
7	901S	T	54	BYXX7	T
8	湘陵 628S Xiangling 628S	T	55	BYXX8	T
9	B101S	T	56	BYXX9	T
10	广湘 24S Guangxiang 24S	T	57	7001S	P
11	株 1S Zhu 1S	T	58	N5088S	P
12	1103S	T	59	PA64S	PT
13	BY58S	T	60	V20A	WA
14	T91S-选 T91S-chosen	T	61	丰源 A Fengyuan A	WA
15	D40S	T	62	T98A	WA
16	GS6	T	63	五丰 A Wufeng A	WA
17	荆 18S Jing 18S	T	64	634A	WA
18	隆 605S Long 605S	T	65	天丰 A Tianfeng A	WA
19	永早 3S Yongzao 3S	T	66	D62A	WA
20	香 125S Xiang 125S	T	67	川香 29A Chuanxiang A	WA
21	贺 1S He 1S	T	68	宜香 A Yixiang A	WA
22	N111S	T	69	优 ZA You ZA	WA
23	标 810S Biao 810S	T	70	炳 1A Bing 1A	WA
24	T91S	T	71	岳 4A Yue 4A	WA
25	恒 59S Heng 59S	T	72	贺 11A He 11A	WA
26	早 S Zao S	T	73	隆 398A Long 398A	WA
27	810S	T	74	吉天 A Jitian A	WA
28	N118S	T	75	隆晶 4302A Longjing 4302A	WA
29	YOS	T	76	深 95A Shen 95A	WA
30	H638S	T	77	Ⅱ 32A	IA
31	88S	T	78	优 1A You 1A	IA
32	710S	T	79	中九 A Zhongjiu A	IA
33	安湘 S Anxiang S	T	80	冈 46A Gang 46A	GA
34	750S	T	81	24-64A	L
35	株 25S Zhu 25S	T	82	H13A	L
36	H629S	T	83	武香 A Wuxiang A	M
37	Y58S	T	84	粤泰 A Yuetai A	HL
38	明 S Ming S	T	85	超泰 A Chaotai A	HL
39	隆 74S Long 74S	T	86	T1A	BT
40	KT27S	T	87	199A	BT
41	华煜 4127S Huayu 4127S	T	88	9311	F
42	锦 4128S Jin 4128S	T	89	9311-选 9311-chosen	F
43	云峰 S Yunfeng S	T	90	R527	F
44	天安 S Tianan S	T	91	R111	F
45	N2S	T	92	R58	F
46	衡农 S Hengnong S	T	93	R624	F
47	W6154S	PT	94	R217	F

T—温敏不育系；P—来源于农垦 58S 的梗稻光敏不育系；PT—来源于农垦 58S 的籼稻温敏不育系；WA—野败型不育系；IA—印水型不育系；GA—冈型不育系；HL—红莲型不育系；L—辽型不育系；M—马协型不育系；F—父本材料。9311—有芒 9311；9311-选一无芒 9311；BYXX1~BYXX9 为新选育未审定的两用核不育系。

T, Thermo-sensitive genetic male sterile line; P, *japonica* male sterile line derived from Nongken 58S; PT, *indica* male sterile line derived from Nongken 58S; WA, Wild abortion type sterile line; IA, Cytoplasmic male sterile line; GA, Type-G CMS line; HL, HL-type CMS line; L, Liao-type CMS line; M, Maxie-type CMS line; F, Male parent. 9311, Awned 9311. 9311-chosen, Awnless 9311; BYXX1-BYXX9, New genic male sterile lines before examination.



1—紫香糯；2—安育早1号；3—齐粒丝苗；4—天安S；5—竹云糯；6—Dasanbyeo；7—红壳老来青；8—旱轮稻；9—合江18。A—SSR引物RM85；B—SSR引物OSR28。
1, Zixiangnuo; 2, Anyuzao 1; 3, Qilisimiao; 4, Tian'an S; 5, Zhuyunnuo; 6, Dasanbyeo; 7, Hongkelaolaiqing; 8, Hanlundao; 9, Hejiang 18. A, SSR primer RM85; B, SSR primer OSR28.

图1 准S上SSR标记RM85和OSR28扩增电泳结果
Fig.1. Electrophoretogram amplified with RM85 and OSR28 in Zhun S.

物OSR28扩增图谱,5个参照品种分别是合江18(178 bp)、旱轮稻(172 bp)、红壳老来青(169 bp)、Dasanbyeo(135 bp)、竹云糯(132 bp),准S扩增的

条带与参照品种Dasanbyeo一致,即准S该位点的数字分子赋值为135/135。

将48对引物的准S扩增片段大小进行统计和赋值,该品种的数字分子指纹结果见表2。对94个杂交稻亲本按照此种方式进行赋值,建立数字分子指纹库。

利用软件NTSYS-PC对94个杂交水稻亲本的遗传相似系数进行分析(表3),各品种间遗传相似系数变幅0.54~0.97,其中遗传相似系数最高的两个品种是标810S和810S,标810S是810S的自然突变体,其遗传相似系数高达0.97,这两个品种有3对引物的差异,其中2对引物的差异为扩增条带有或无,1对引物为扩增条带迁移率不同。遗传相似系数最低的是陆18S和H13A,仅为0.54。两个品种间有40对引物的差异,陆18S是早粳型温敏核不育系,H13A是粳稻辽型细胞质雄性不育系,亲缘关系远,遗传差异大。根据品种间差异的引物数不少于2对判定为“不同品种”的标准,94个杂交水稻亲本都为不同品种。该研究结果表明新标准的48对SSR标记具较强的核DNA多态性区分功能。

2.2 48对SSR分子标记的多态性比较

DNA分子标记的多态性是衡量该标记有效性的重要标志。供试的48对SSR引物在94个杂交水稻亲本中共检测到197个等位变异。每对引物扩

表2 准S核DNA数字分子指纹
Table 2. Results of digital molecular fingerprint of Zhun S nuclear DNA.

序号 No.	引物 Primer	基因型 Genotype /bp	序号 No.	引物 Primer	基因型 Genotype /bp	序号 No.	引物 Primer	基因型 Genotype /bp
1	RM583	189/189	17	RM267	156/156	33	OSR28	135/135
2	RM71	148/148	18	RM253	142/142	34	RM590	139/139
3	RM85	104/104	19	RM481	162/162	35	RM21	160/160
4	RM471	104/104	20	RM339	146/146	36	RM3331	120/120
5	RM274	162/162	21	RM278	142/142	37	RM443	119/119
6	RM190	109/109	22	RM258	128/128	38	RM490	92/92
7	RM336	154/154	23	RM224	155/155	39	RM424	263/263
8	RM72	163/163	24	RM17	185/185	40	RM423	268/268
9	RM219	222/222	25	RM493	237/237	41	RM571	179/179
10	RM311	170/170	26	RM561	185/185	42	RM231	180/180
11	RM209	132/132	27	RM8277	165/165	43	RM567	248/248
12	RM19	216/216	28	RM551	184/184	44	RM289	106/106
13	RM1195	146/146	29	RM598	156/156	45	RM542	89/89
14	RM208	180/180	30	RM176	136/136	46	RM316	196/196
15	RM232	141/141	31	RM432	168/168	47	RM332	167/167
16	RM119	169/169	32	RM331	171/171	48	RM7102	173/173

表 3 供试 94 个杂交水稻亲本的遗传相似系数比较

Table 3. Genetic similarity coefficient comparison of the tested 94 hybrid rice parents.

遗传相似系数			遗传相似系数		
材料	Genetic similarity coefficient		材料	Genetic similarity coefficient	
	区间	平均值		区间	平均值
Material	Range	Mean	Material	Range	Mean
陆 18S Lu18S	0.54—0.89	0.71	BYXX1	0.65—0.81	0.68
长选 3S Changxuan 3S	0.61—0.82	0.69	BYXX2	0.64—0.81	0.72
农垦 58S Nongken 58S	0.55—0.88	0.62	BYXX3	0.59—0.83	0.79
广占 63S Guangzhan 63S	0.56—0.83	0.69	BYXX4	0.59—0.84	0.71
准 S Zhun S	0.55—0.82	0.73	BYXX5	0.57—0.84	0.70
安农 S-1 Annong S-1	0.60—0.77	0.69	BYXX6	0.60—0.84	0.69
901S	0.60—0.96	0.72	BYXX7	0.61—0.80	0.70
湘陵 628S Xiangling 628S	0.60—0.96	0.68	BYXX8	0.58—0.84	0.70
B101S	0.61—0.79	0.69	BYXX9	0.59—0.80	0.71
广湘 24S Guangxiang 24S	0.56—0.79	0.68	7001S	0.58—0.88	0.63
株 1S Zhu 1S	0.55—0.80	0.70	N5088S	0.57—0.86	0.64
1103S	0.63—0.80	0.72	PA64S	0.58—0.77	0.69
BY58S	0.60—0.75	0.68	V20A	0.62—0.84	0.71
T91S-选 T91S-chosen	0.61—0.80	0.69	丰源 A Fengyuan A	0.61—0.85	0.72
D40S	0.57—0.89	0.70	T98A	0.62—0.82	0.71
GS6	0.56—0.89	0.69	五丰 A Wufeng A	0.61—0.93	0.73
荆 18S Jing 18S	0.56—0.93	0.69	634A	0.63—0.88	0.72
隆 605S Long 605S	0.58—0.93	0.70	天丰 A Tianfeng A	0.61—0.88	0.72
永早 3S Yongzao 3S	0.55—0.90	0.70	D62A	0.60—0.84	0.71
香 125S Xiang 125S	0.56—0.90	0.70	川香 29A Chuanxiang A	0.55—0.82	0.72
贺 1S He 1S	0.59—0.83	0.70	宜香 A Yixiang A	0.66—0.85	0.72
N111S	0.64—0.76	0.69	优 ZA You ZA	0.65—0.89	0.73
标 810S Biao 810S	0.62—0.97	0.71	炳 1A Bing 1A	0.57—0.89	0.72
T91S	0.55—0.82	0.71	岳 4A Yue 4A	0.60—0.85	0.72
恒 59S Heng 59S	0.63—0.77	0.70	贺 11A He 11A	0.54—0.77	0.68
早 S Zao S	0.59—0.83	0.71	隆 398A Long 398A	0.59—0.79	0.70
810S	0.61—0.97	0.70	吉天 A Jitian A	0.58—0.80	0.69
N118S	0.59—0.86	0.70	隆晶 4302A Longjing 4302A	0.56—0.82	0.70
YOS	0.61—0.80	0.70	深 95A Shen 95A	0.65—0.82	0.73
H638S	0.64—0.91	0.71	Ⅱ 32A	0.60—0.89	0.73
88S	0.63—0.83	0.70	优 1A You 1A	0.61—0.84	0.71
710S	0.61—0.86	0.71	中九 A Zhongjiu A	0.61—0.80	0.70
安湘 S Anxiang S	0.61—0.85	0.71	冈 46A Gang 46A	0.60—0.89	0.73
750S	0.59—0.86	0.72	24-64A	0.57—0.82	0.64
株 25S Zhu 25S	0.60—0.86	0.70	H13A	0.54—0.80	0.63
H629S	0.59—0.91	0.71	武香 A Wuxiang A	0.62—0.77	0.68
Y58S	0.60—0.79	0.68	粤泰 A Yuetai A	0.62—0.85	0.73
明 S Ming S	0.58—0.82	0.70	超泰 A Chaotai A	0.58—0.75	0.69
隆 74S Long74S	0.59—0.75	0.68	T1A	0.55—0.80	0.63
KT27S	0.57—0.76	0.68	199A	0.56—0.80	0.63
华煜 4127S Huayu 4127S	0.62—0.93	0.69	9311	0.61—0.82	0.73
锦 4128S Jin 4128S	0.56—0.92	0.71	9311-选 9311-chosen	0.61—0.82	0.69
云峰 S Yunfeng S	0.57—0.85	0.71	R527	0.62—0.81	0.70
天安 S Tianan S	0.58—0.85	0.70	R111	0.60—0.83	0.66
N2S	0.59—0.78	0.71	R58	0.62—0.87	0.69
衡农 S Hengnong S	0.59—0.79	0.72	R624	0.61—0.82	0.69
W6154S	0.58—0.79	0.71	R217	0.61—0.87	0.69

表 5 杂交水稻亲本新增等位变异位点及片段大小

Table 5. New allelic variants point and fragment size of hybrid rice parents.

序号 No.	引物 Primer	参照品种等位变异点 Common allelic variation point/bp	新增等位变异点 New allelic variation point	材料名称 Material
1	RM583	180, 189, 192, 195	158	9311, 9311-选
2	RM85	80, 95, 104	93	荆 18S, 隆 605S, 广占 63S, 天安 S
3	RM190	109, 120, 122	128	YOS
4	RM190	109, 120, 122	107	B101S, BY58S, T91S-选
5	RM72	163, 175, 178, 190, 193	152	长选 3S, PA64S, 明 S, N111S, YOS, H638S, H629S
6	RM72	163, 175, 178, 190, 193	165	华煜 4127S, R527, R111, R58, R624, R217, 恒 59S, 901S
7	RM219	194, 200, 202, 215, 222	186	安农 S, 明 S, N118S, 标 810S, 安湘 S, 株 25S
8	RM19	216, 247, 250, 253	221	贺 1S, N111S
9	RM253	133, 135, 142	119	隆 74S, BYXX6, 超泰 A
10	RM481	146, 162, 165	182	云峰 S, 荆 18S, R111, D40S
11	RM481	146, 162, 165	156	隆 74S
12	RM432	168, 172, 188	180	云峰 S, 天安 S, 华煜 4127S, 锦 4128S, KT27S, 隆 398A, 陆 18S, 广占 63S, 贺 11A, GS6, 隆 605S, N111S, 标 810S, 810S, N118S, H638S, 88S, 750S, H629S, 9311
13	RM490	92, 97, 99	108	陆 18S, GS6, 永早 3S
14	RM231	186, 192, 194	180	锦 4128S, KT27S, 准 S, 安农 S, BYXX7, 永早 3S, 标 810S, 810S, H638S, H629S, 岳 4A, 901S
15	RM332	162, 164, 167	184	陆 18S, GS6, T91S, W6154S, 株 25S
16	RM336	151, 154, 160, 163, 166, 193	144	宜香 A, 24-64A

GCAACCCATATCCCTTAGTTAGGACCGATG
CA。在长选 3S、明 S 等 7 个材料中扩增出的新条带为 152 bp,全序列为 GCATCGGTCCTAACTAA
GGGATATGGGTTGCAAGTTATTTATGCTTT
TATTATTACTATTACTATTATTATTACTAT
TATTATTATTATTATTATTATTATTATTA
CTATTATTATTATTATGTACCTAATTTCTC
ATTGTTTTATCGCCGG。

另外 RM190、RM481 等 8 对引物扩增出的新条带只出现在 1~3 份材料中(表 4),例如引物 RM190 在不育系 YOS 中扩增出了 1 条 128 bp 特异带。引物 RM481 在隆 74S 中扩增出了 1 条 156 bp 特异带。引物 RM583 在父本 9311 和 9311-选中扩增出了 1 条 158 bp 特异带。这种特异位点可用于杂交水稻亲本以及组合的真实性和纯度的快速分子检测。

2.4 虚拟杂交组合数字分子指纹库及特异分子标记

杂交组合包含了双亲的全部遗传信息,杂交组合核 DNA 的数字分子指纹即父母本的互补数字分子指纹,根据已知的杂交水稻亲本的数字分子指纹,可虚拟出杂交组合的数字分子指纹。

例如,根据 YOS 和 9311 的数字分子指纹,虚拟出了 YOS/9311 的杂交组合数字分子指纹(表 5)。该数字分子指纹与另外 86 个不育系杂 9311 的组合以及 YOS 杂另 6 个父本的组合的数字分子指纹都具有 3 对以上的差异位点,故该虚拟组合符合新品种遗传审定标准。在该虚拟组合生产应用中,引物 RM583 扩增出的 158 bp/189 bp 可作为杂交组合真实性和纯度分子快速检测标记,即杂交组合种子中只有 189 bp 条带的为混杂种子,混杂来源于不育系自交种子;只有 158 bp 条带的也为混杂种子,混杂来源于父本的机械混杂;具有 xxx bp/189 bp 或 189 bp/xxx bp 条带为串粉混杂种子;不含 158 bp 和 189 bp 条带的种子为稻田落粒谷混杂或其他机械混杂种子。

3 讨论

目前中国在杂交稻品种选育方面正快速形成育繁推一体化的品种创新体系,杂交稻亲本选育必将进入快速发展时期,但现代分子生物学技术在杂交育种中的贡献率仍较低,加强分子技术与传统育种技术的紧密结合已成为杂交水稻育种的迫切需求^[16-19]。开展杂交水稻亲本选育过程中核DNA数

表 6 YOS /9311 杂交组合数字分子指纹

Table 6. Results of digital molecular fingerprint of YOS /9311 hybrids.

序号 No.	引物 Primer	基因型 Genotype /bp	序号 No.	引物 Primer	基因型 Genotype /bp	序号 No.	引物 Primer	基因型 Genotype /bp
1	RM583	189/189	17	RM267	156/156	33	OSR28	135/135
2	RM71	139/148	18	RM253	142/142	34	RM590	139/146
3	RM85	104/104	19	RM481	162/165	35	RM21	128/138
4	RM471	102/104	20	RM339	146/146	36	RM3331	110/110
5	RM274	149/162	21	RM278	128/138	37	RM443	119/123
6	RM190	122/128	22	RM258	128/132	38	RM490	92/92
7	RM336	154/154	23	RM224	153/153	39	RM424	280/280
8	RM72	152/152	24	RM17	159/185	40	RM423	268/271
9	RM219	202/215	25	RM493	237/240	41	RM571	179/185
10	RM311	170/170	26	RM561	185/187	42	RM231	192/192
11	RM209	132/132	27	RM8277	165/165	43	RM567	248/248
12	RM19	247/247	28	RM551	184/190	44	RM289	87/106
13	RM1195	142/146	29	RM598	153/156	45	RM542	89/89
14	RM208	167/182	30	RM176	136/136	46	RM316	200/200
15	RM232	150/161	31	RM432	168/188	47	RM332	164/164
16	RM119	169/169	32	RM331	151/171	48	RM7102	170/190

字分子指纹分析,是加速新品种选育的有效途径,即对新选育材料进行 DNA 数字分子指纹分析,并将数字信息提交到数据库进行比对,以具 2 对以上变异位点作为筛选标准,只有达到该标准的亲本材料应用于杂种优势测配,这样有利于减少杂交稻亲本选育的盲目性和大量无效测配劳动,提高杂交育种效率^[20-23]。

目前,杂交水稻市场的品种套牌、冒牌等侵权事件时有发生,建立不同品种的数字分子指纹库是解决这一问题的有效手段^[24-25]。前期许多研究建立的水稻品种分子指纹图谱,主要依据条带的多少进行比对,不能数字化,加之没有参照品种作对照,不同实验条件下其电泳带的迁移率不尽相同,导致分子指纹图谱的相似性分析易出现偏差,另外前期的 24 对标准引物信息量偏少,部分引物多态性不高,导致水稻品种的数字分子指纹特异性不高^[26-29]。利用农业部行业新标准(NY/T 1433—2014)易于构建杂交水稻亲本以及组合特异的数字分子指纹,更有利于水稻品种的产权保护。

本研究也发现新标准中标记引物 RM176 和 RM551 作为分子标记的多态性不高,对不同品种的分辨力较弱,有必要在其染色体上开发新的分子标记。本研究同时筛选到 16 个新的等位变异位,这些位点可作为标准指纹库的信息补充,丰富标准库中的遗传信息。

SSR 标记在单个座位上检测到的多态性远高于其他几种分子标记,且广泛随机均匀地分布于整个基因组,能准确高效地鉴别大量等位基因,利用父母本特异互补带可作为快速鉴定品种真实性和纯度的理想分子标记^[30-35]。本研究在杂交水稻亲本材料中筛选出 23 份材料的特异分子标记,这些特异分子标记可作为杂交水稻亲本以及组合中是否混杂其他品种的分子检测标记,对于还未筛选出特异分子标记的材料,可以进一步增加 SSR 标记筛选数,开发出特异性强的快速鉴定品种真实性和纯度的理想分子标记。

根据目前我国在生产上应用的主要不育系、父本以及近 10 年的杂交组合,构建我国杂交水稻数字分子指纹信息库,并建立网络化公共服务平台,让所有杂交水稻育种工作者能利用该平台开展杂交水稻亲本资源创新和虚拟配组,以评价其新材料的遗传多态性以及所配组合的遗传类型,这可能对杂交水稻育种产生重大促进作用。

4 结论

本研究建立了 94 份杂交水稻亲本的数字分子指纹库,供试材料间具有 3 个以上的遗传差异位点。筛选出 23 个材料的特异数字分子标记,这些特异数字分子标记可应用于种子真实性或纯度的快速分子鉴定。根据供试的不育系和父本的数字分子指纹建

立了虚拟杂交水稻 F₁ 代的数字分子指纹库和虚拟组合的特异数字分子标记。

参考文献:

- [1] 蒋和平, 孙炜琳, 陈曦. 中国种业发展的现状与对策. 农业科技管理, 2004(2): 23-28.
Jiang H P, Sun W L, Chen X. Current situation and counter-measures of China seed industry. *Manag Agric Sci Technol*, 2004(2): 23-28. (in Chinese)
- [2] 杨瑞芳, 白建江, 方军, 等. 分子标记辅助选择选育高抗性淀粉水稻新品种. 核农学报, 2015, 29(12): 2259-2267.
Yang R F, Bai J J, Fang J, et al. Establishment of marker-assisted selection for breeding rice varieties with high resistant starch content. *J Nucl Agric Sci*, 2015, 29(12): 2259-2267. (in Chinese with English abstract)
- [3] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol Breeding*, 1996, 2: 225-238.
- [4] Lv X G, Shi Y F, Xu X, et al. *Oryza sativa* chloroplast signal recognition particle 43 (OscpSRP43) is required for chloroplast development and photosynthesis. *PLoS One*, 2015, 10(11): 143-149.
- [5] Liu J P, Zhang C C, Wei C C, et al. RING finger ubiquitin E3 ligase OsHTAS enhances heat tolerance by promoting H₂O₂-induced stomatal closure in rice. *Plant Physiol*, 2016, 170: 429-443.
- [6] 程本义, 夏俊辉, 沈伟峰, 等. 微卫星标记分析我国南方常规水稻品种的遗传差异. 核农学报, 2009, 23(1): 7-11.
Cheng B Y, Xia J H, Shen W F, et al. Microsatellite marker analysis of genetic differences between conventional rice varieties in South China. *J Nucl Agric Sci*, 2009, 23(1): 7-11. (in Chinese with English abstract)
- [7] 李红宇, 张林海, 刘梦红, 等. 东北地区水稻品种与日本引进东北地区水稻品种遗传多样性比较. 核农学报, 2011, 25(6): 1082-1087.
Li H Y, Zhang L H, Liu M H, et al. Comparison study of genetic diversity between rice varieties from Northeast China and Japan. *J Nucl Agric Sci*, 2011, 25(6): 1082-1087. (in Chinese with English abstract)
- [8] Cai Z J, Wang B R, Xu M G, et al. Intensified soil acidification from chemical N fertilization and prevention by manure in an 18-year field experiment in the red soil of southern China. *J Soils Sed*, 2015, 15(2): 260-270.
- [9] 宣云, 赵伟, 宋丰顺, 等. 利用 SSR 标记分析部分梗稻品种的遗传多样性. 核农学报, 2007, 21(3): 217-220.
Xuan Y, Zhao W, Song F S, et al. Genetic diversity analysis of some japonica rice varieties with SSR markers. *J Nucl Agric Sci*, 2007, 21(3): 217-220. (in Chinese with English abstract)
- [10] 赵中秋, 郑海雷, 张春光. 分子标记的发展及其在植物研究中的应用. 福建热作科技, 2000(4): 68-72.
- [11] Zhao Z Q, Zheng H L, Zhang C G. Development and application of molecular markers in plant research. *Fujian Sci & Technol Trop Crops*, 2000(4): 68-72. (in Chinese)
- [12] 罗世友, 陈红萍, 吴小燕, 等. 应用分子标记辅助选育抗褐飞虱水稻恢复. 分子植物育种, 2015, 13(11): 2404-2415.
Luo S Y, Chen H P, Wu X Y, et al. Breeding restorer lines with resistance to brown planthopper by marker-assisted selection. *Mol Plant Breeding*, 2015, 13(11): 2404-2415. (in Chinese with English abstract)
- [13] 从夕汉, 李莉, 滕斌, 等. 56 个杂交水稻骨干亲本 SSR 指纹图谱的构建及遗传相似性分析. 生物学杂志, 2010, 27(1): 87-91.
Cong X H, Li L, Teng B, et al. Establishment of SSR fingerprintmap and analysis of genetic similarity among 56 backbone parental lines in hybrid rice. *J Biol*, 2010, 27(1): 87-91. (in Chinese with English abstract)
- [14] NY/T 1433—2014. 水稻品种真实性鉴定 SSR 标记法. 北京: 中国农业出版社.
NY/T 1433—2014. Rice variety genuineness verification with SSR markers. Beijing: China Agriculture Press. (in Chinese)
- [15] 高方远, 陆贤军, 周良强, 等. 香优 1 号 DNA 指纹分析及种子纯度鉴定. 西南农业学报, 2002, 15(4): 22-25.
Gao F Y, Lu X J, Zhou L Q, et al. Xiangyou 1 DNA fingerprinting and seed quality identification. *Southwest China J Agric Sci*, 2002, 15(4): 22-25. (in Chinese with English abstract)
- [16] 肖小余, 王玉平, 张建勇, 等. 四川主要杂交稻亲本的 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.
Xiao X Y, Wang Y P, Zhang J Y, et al. Construction and application of hybrid rice in Sichuan mainly of SSR polymorphism analysis and fingerprinting. *Chin J Rice Sci*, 2006, 20(1): 1-7. (in Chinese with English abstract)
- [17] 张彦, 郭士伟, 何冰, 等. 利用 SSR 标记建立杂交水稻分子指纹图谱数据库. 江苏农业学报, 2006, 22(2): 181-183.
Zhang Y, Guo S W, He B, Gao D Y. Hybrid rice with SSR molecular markers to establish fingerprint database. *Jiangsu J Agric Sci*, 2006, 22(2): 181-183. (in Chinese with English abstract)
- [18] 颜静宛, 田大刚, 许彦, 等. 杂交稻主要亲本的 SSR 分子身份证数据库的构建. 福建农业学报, 2011, 26(2): 148-152.
Yan J W, Tian D G, Xu Y, et al. Construction of hybrid rice parents SSR molecular identification database. *Fujian J Agric Sci*, 2011, 26(2): 148-152. (in Chinese with English abstract)
- [19] 辛业芸, 张展, 熊易平, 等. 应用 SSR 分子标记鉴定超级杂交水稻组合及其纯度. 中国水稻科学, 2005, 19(2): 95-100.
Xin Y Y, Zhang Z, Xiong Y P, et al. Identification and purity test of super hybrid rice with SSR molecular markers. *Chin J Rice Sci*, 2005, 19(2): 95-100. (in Chinese with English abstract)

- [19] 李进波, 方宣均, 杨国才, 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.
- Li J B, Fang X J, Yang G C, et al. The establishment of two-line hybrid rice parents SSR Fingerprinting and its application in purity identification. *Hybrid Rice*, 2005, 20(2): 50-53. (in Chinese with English abstract)
- [20] 程本义, 吴伟, 夏俊辉, 等. 浙江省水稻品种 DNA 指纹数据库的初步构建及其应用. *浙江农业学报*, 2009, 21(6): 555-560.
- Chen B Y, Wu W, Xia J H, et al. Preliminary construction of Zhejiang rice DNA fingerprinting database and its application. *Acta Agric Zhejiang*, 2009, 21(6): 555-560. (in Chinese with English abstract)
- [21] 庄杰云, 施勇烽, 应杰政, 等. 中国主栽水稻品种微卫星标记数据库的初步构建. *中国水稻科学*, 2006, 20(3): 460-468.
- Zhuang J Y, Shi Y F, Ying J Z, et al. Preliminary Construction of Chinese major rice varieties microsatellite marker database. *Chin J Rice Sci*, 2006, 20(3): 460-468. (in Chinese with English abstract)
- [22] 李召华, 朱克永, 陈祖武, 等. 分子标记技术在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用. *杂交水稻*, 2006, 21(4): 11-14.
- Li Z H, Zhu K Y, Chen Z W, et al. Molecular marker technology in hybrid rice seed purity identification. *Hybrid Rice*, 2013, 21(4): 1295-1301. (in Chinese)
- [23] 黄成志, 黄文章, 严明建, 等. 利用 SSR 分子标记鉴定杂交水稻真伪与纯度. *安徽农业科学*, 2009, 37(8): 3437-3438.
- Huang C Z, Huang W Z, Yan M J, et al. Identification of true or false and purity of hybrid rice with SSR molecular marker. *J Anhui Agric Sci*, 2009, 37(8): 3437-3438. (in Chinese with English abstract)
- [24] 彭锁堂, 庄杰云, 颜启传, 等. 我国主要杂交水稻组合及其亲本 SSR 标记和纯度鉴定. *中国水稻科学*, 2003, 17(1): 1-5.
- Peng S T, Zhuang J Y, Yan Q C, et al. SSR markers selection and purity detection of major hybrid rice combinations and their parents in china. *Chin J Rice Sci*, 2003, 17(1): 1-5. (in Chinese with English abstract)
- [25] 王风格, 赵久然, 孙世贤, 等. 我国玉米 DNA 指纹数据库管理系统的建立. *玉米科学*, 2010, 18(2): 41-44, 49.
- Wang F G, Zhao J R, Sun S X, et al. Construction of maize DNA fingerprint database system in China. *J Maize Sci*, 2010, 18(2): 41-44, 49. (in Chinese with English abstract)
- [26] Bredemeijer G, Cooke R, Ganai M, et al. Construction and testing of microsatellite database containing more than 500 tomato varieties. *Theor Appl Genet*, 2012, 105: 1019-1026.
- [27] Verburg P H, Neumann K, Nol L. Challenges in using land use and land cover data for global change studies. *Global Change Biol*, 2011, 17: 974-989.
- [28] Biradar C M, Thenkabail P S, Noojipady P et al. A global map of rainfed cropland areas (GMRCA) at the end of last millennium using remote sensing. *Int J Appl Earth Observ Geoinform*, 2009, 11: 114-129.
- [29] Thenkabail P S, Biradar C M, Noojipady P, et al. Global irrigated area map (GIAM) derived from remote sensing, for the end of the last millennium. *Int J Remote Sens*, 2009, 30: 3679-3733.
- [30] Lobell D B, Schlenker W, Costa-Roberts J. Climate trends and global crop production since 1980. *Science*, 2011, 333: 616-620.
- [31] 王风格, 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. *分子植物育种*, 2007, 5(1): 128-132.
- Wang F G, Zhao J R, Dai J R, et al. Criteria for the construction of maize DNA fingerprint database. *Mol Plant Breeding*, 2007, 5(1): 128-132. (in Chinese with English abstract)
- [32] Cantini C, Iezzoni A F, Lamboy W F, et al. DNA fingerprinting of tetraploid cherry germplasm using simple sequence repeats. *J Am Soc Hort Sci*, 2001, 126: 205-209.
- [33] Case C, Kandola K, Chui L, et al. Examining DNA fingerprinting as an epidemiology tool in the tuberculosis program in the Northwest Territories, Canada. *Intl J Circumpolar Health*, 2013, 9: 72.
- [34] Ashkenazi V, Chani E, Lavi U. Development of microsatellite markers in potato and their use in phylogenetic and fingerprinting analyses. *Genome*, 2001, 44: 50-62.
- [35] Miura K, Ikeda M, Matsubara A, et al. OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat Genet*, 2010, 42(6): 545-549.