

陕西省有色稻资源的 SSR 多态性分析

张 羽¹, 李新生¹, 冯志峰², 王胜宝²

(¹陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中 723000; ²陕西省水稻研究所, 汉中 723000)

摘要:从水稻 12 条染色体上筛选出 22 对有效引物, 对陕西省 17 个有色稻品种的遗传多样性进行分析, 共检测到 128 个等位基因, 平均每个标记检测到 5.8 个等位基因, 每个 SSR 位点的遗传多态性信息含量在 0.49~0.89 之间, 平均值为 0.73。SSR 聚类分析表明, 陕西省 17 个有色稻品种的遗传相似系数在相似系数 0.24 处可以分为 2 类, 其中绿稻单独聚为一类。用 11 个农艺性状聚类分析, 在欧式距离为 7.22 处绿稻和其他品种聚为两类。

关键词:色稻; SSR 标记; 多态性

SSR Marker-based Polymorphism of Pigmented Rice in Shaanxi

ZHANG Yu¹, LI Xin-sheng¹, FENG Zhi-feng², WANG Sheng-bao²

(¹School of Biological Sciences and Engineering, Shaanxi University of Technology, Hanzhong 723000;

²Shaanxi Institute of Rice, Hanzhong 723000)

Abstract: The genetic diversity of 17 pigmented rice varieties in Shaanxi Province was investigated with the technique of SSR. Using 22 effective primers from 12 rice chromosomes, 128 alleles were detected. The average number of alleles per SSR locus was 5.8. The average number of polymorphic information content per SSR primer was 0.73 with a range from 0.49 to 0.89. The 17 pigmented rice varieties were divided into two classes in 0.24 of genetic similarities coefficient. Green rice was classified into a single category. Clustering analysis by 11 agronomic characters indicated that green rice and other varieties were divided into two classes in 7.22 of euclidean distance.

Key words: Pigmented rice; SSR; Polymorphism

色稻(Pigmented rice)是特种稻家族中的主要成员, 稻米的颜色取决于不同的果皮层、种皮和米粒外层的花青素色素含量。关于水稻花色素苷的合成已经进行了大量的遗传研究^[1-2], 其中控制种皮着色的 *Pb* 基因位于水稻第 4 染色体上, 紫色种皮对白色种皮呈显性^[3]。有色糙米按带色程度的差异, 可分为乌黑、紫黑、红黑、红、褐、黄、绿等 8 个类型。我国是世界上色稻资源最丰富的国家, 其中黑稻资源量占世界黑稻种质资源总量的 61.6%, 居世界首位^[4]。色稻因其富含微量元素、维生素与花青苷类物质, 成为我国稻种资源中极具特色而又名贵的一族。如红米和褐米富含铁和锌, 紫米和黑米富含天

然花青苷类色素。色米含有较多的蛋白质和氨基酸, 较多的微量元素, 具有较高的营养价值和营养价值^[5]。

SSR 分子标记以可靠性强、重复性高且品种间多态性丰富等特点已经被广泛应用于水稻遗传多样性分析、种质资源鉴定、遗传图谱构建及分子标记辅助选择等研究领域。李宇歌等^[6]利用编码区和非编码区 SSR 标记对水稻类群的比较研究表明, SSR 标记具有良好的多态性, 可以用于分析水稻的亲缘关系。罗小金等^[7]利用 SSR 标记对水稻亲本间遗传距离与杂种优势的关系进行分析, 得出不同材料、不同遗传距离范围之间, 遗传距离与超亲优势的相

收稿日期: 2010-09-23 修回日期: 2011-03-09

基金项目: 陕西省自然科学基金研究计划项目(SJ08ZT03-4); 陕西省教育厅专项科研项目(08JK252)

作者简介: 张羽, 硕士, 副教授, 研究方向: 遗传学理论与实践等方面的教学和科研工作。E-mail: zy68169@sina.com

关性有很大差别。王金花等^[8]利用 SSR 和 ISSR, 分析了 33 份来源于亚洲 10 个国家的香稻品种的遗传多样性, 分别获得 93 条和 181 条多态性片段。陈远孟等^[9]利用 SSR 分子标记分析 78 份外引香稻品种、18 份在广西种植的香稻品种以及 24 份具有代表性的非香的广西地方栽培稻种质资源的遗传多样性, 检测到 100 条多态性片段。2007 年崔海丽等^[10]利用 24 对 SSR 引物比较了来自中国 6 个省市的 29 个黑稻品种的遗传多样性, 共检测到 76 个多态性位点, 利用聚类分析把 29 个品种分为 3 个类群, 其中涉及到了陕西省的 2 个黑稻品种, 并印证云、贵、陕是中国最重要的黑米产地之一和遗传多样性丰富的事实。陕西有色稻的种植和研究历史悠久, 有许多地方品种资源, 如洋县黑糯、汉中红香寸等知名品种, 以陕西洋县黑米为代表的特种稻享誉省内外, 种植时间约千年以上, 民间自古传有补血功效, 作为馈赠珍品。但目前对陕西省色稻遗传基础的研究还不深入, 特别是从分子水平上对其遗传多态性的研究鲜见报道。本研究从水稻 12 条染色体上的 SSR 标记中筛选出 22 对有效引物, 并结合 11 个农艺性状, 对陕西省 17 个色稻品种进行了遗传多样性及遗传关系分析, 旨在对陕西省有色稻品种的遗传多样性进行全面准确的评估, 系统地分析材料间的亲缘关系, 从分子水平上为陕西省现有色稻品种鉴定、新品种选育、种子生产提供信息和指导。

1 材料与方法

1.1 材料

陕西省 17 个有色稻品种由陕西省水稻研究所提供, 为黑宝(紫黑)、黑优粘(紫黑)、云黑(乌黑)、培 811 黑(紫黑)、黑丰糯(紫黑)、汉中黑糯(红黑)、黑糯 B(乌黑)、黑寸谷(紫黑)、黑帅(乌黑)、双亚黑(乌黑)、双亚紫(红黑)、双亚红(红)、双亚绿(浅绿)、秦稻 1 号(红黑)、乌贡 1 号(紫黑)、本墨糯(紫黑)和 PC(褐)。SSR 引物 RM1、RM297、RM10、RM13、RM85、RM225、RM341、RM274、RM16、RM219、RM258、RM339、RM335、RM254、RM224、RM277、RM294、RM 172、RM253、RM242、RM280 和 RM17 序列来自 <http://www.gramene.org/>。

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 用 SDS 法提取水稻基因组 DNA^[11]。

1.2.2 DNA 检测 0.8% 的琼脂糖凝胶检测水稻基因组 DNA。

1.2.3 PCR 扩增 PCR 反应体系为 10 × Buffer 1.5 μl, 25mmol/L MgCl₂ 1.5 μl, 2.5mmol/L dNTP 1.2 μl, 10 μmol 引物各 0.5 μl, 50ng/μl DNA 模板 1.0 μl, 1U/μl Taq 酶 1.0 μl, 反应总体积 15 μl。反应程序为 95℃ 预变性 5min, 94℃ 变性 60s, 55℃ 退火 90s, 72℃ 延伸 90s, 72℃ 延伸 10min, 4℃ 保存, 32 个循环。

1.2.4 凝胶电泳 应用 8% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离。

1.2.5 染色 将凝胶用蒸馏水漂洗两次; 加入染色液银染, 约 5 ~ 8min, 然后用蒸馏水漂洗两次, 加入显影液进行显色, 一般约 5min, 可根据成色效果而定^[12]。

2 结果与分析

2.1 等位基因数

电泳图谱中每条扩增带代表引物的 1 对结合位点, 且被视为有效的分子标记。同一引物的扩增产物中电泳迁移率一致的条带被认为具有同源性。选择分布于水稻 12 条染色体上的 22 对 SSR 引物, 对陕西省 17 个有色稻品种材料共检测出了 128 个等位基因, 平均每对 SSR 引物检测到 5.8 个等位基因, 每个 SSR 引物可检测到的等位基因数目为 4 ~ 8 个不等(表 1)。其中引物 RM294 在 17 份色稻品种中共扩增出了 8 个等位基因(图 1)。

表 1 22 对引物及其遗传多态性信息含量

Table 1 Polymorphism information content of 22 SSR loci

引物 Primer	等位位点 Allele	多态性信 息量 PIC	引物 Primer	等位位点 Allele	多态性信 息量 PIC
RM1	5	0.75	RM339	6	0.71
RM297	7	0.89	RM335	6	0.87
RM10	6	0.72	RM254	5	0.79
RM13	4	0.69	RM224	8	0.89
RM85	4	0.49	RM277	6	0.63
RM225	4	0.60	RM294	8	0.71
RM341	7	0.85	RM172	7	0.86
RM274	8	0.54	RM253	6	0.75
RM16	6	0.74	RM242	4	0.66
RM219	6	0.66	RM280	5	0.78
RM258	6	0.77	RM17	4	0.65

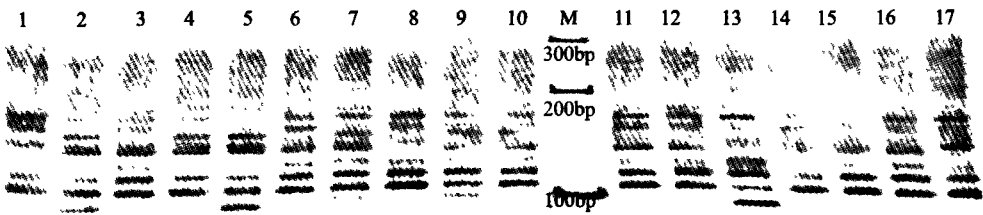


图 1 引物 RM 294 在 17 份色稻品种的扩增结果

Fig. 1 Amplification results of 17 pigmented rice varieties with primer RM294

2.2 扩增片段多态性分析

每个 SSR 位点的 *PIC* 值变化在 0.49 ~ 0.89 之间,平均值为 0.73。Botstein 等^[13]提出了衡量基因变异程度高低的多态性含量指标,当 *PIC* > 0.5 时,该基因座为高度多态基因座,0.25 < *PIC* < 0.5 时为中度多态基因座,*PIC* < 0.25 时为低度多态基因

座^[13]。据此,本研究中的 17 个有色稻品种的遗传多样性处于多态水平,说明陕西省有色稻品种中存在丰富的遗传变异(表 1)。其中引物 RM224 和 RM297 位点的遗传多样性大,达到 0.89(图 2)。而 RM85 位点遗传多样性小,RM85 位点 *PIC* 只有 0.49(图 3)。

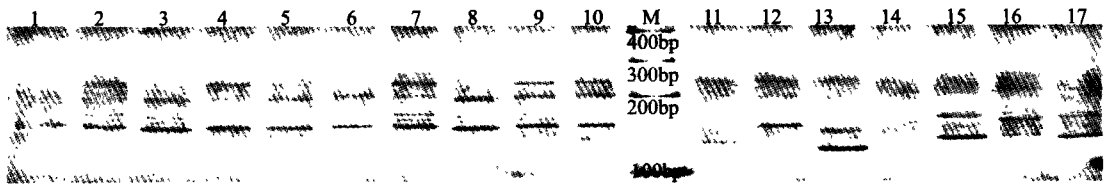


图 2 引物 224 在 17 份色稻品种的扩增结果

Fig. 2 Amplification results of 17 pigmented rice varieties with primer RM224

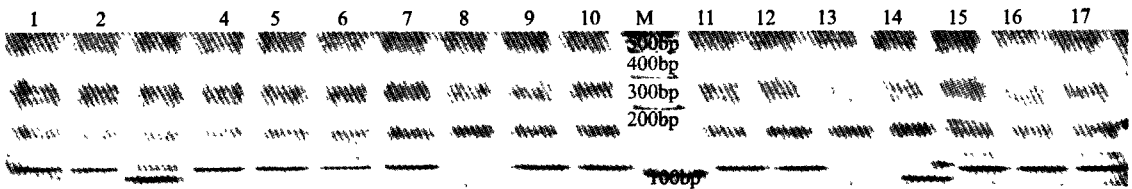


图 3 引物 85 在 17 份色稻品种的扩增结果

Fig. 3 Amplification results of 17 pigmented rice varieties with primer RM85

2.3 陕西省有色稻资源 SSR 位点的特异等位位点

在所研究的材料中只出现 1 次的等位位点称为品种的特异等位位点,品种的特异等位位点可能反映了相应材料 DNA 分子水平的某种遗传特性,这些遗传特性是否具有相应的生化表现或表型特征,值得进一步分析和研究。在 17 个材料中,共有 16 个材料具有 1 个或 1 个以上的特异等位位点。其中,双亚绿含有的特异等位位点最多,为 9 个,有 RM10、RM341、RM274、RM294、RM16、RM339、RM224、RM172 和 RM253。双亚红的特异等位位点为 RM16 和 RM277,双亚紫为 RM172,PC 为 RM294,黑宝为 RM1,乌贡 1 号为 RM224,汉中黑糯为 RM341。

2.4 利用 SSR 标记进行聚类分析

每对 SSR 引物检测到的每条多态性带视为 1 个等位基因,将电泳图谱中清晰的条带赋值为 1,无带时赋值为 0,缺失时为 9。利用 NTSYS-pc2.10e 系统软件中 Dice 法计算遗传相似系数,用 UPGMA 进行聚类分析。用 NTSYS 程序绘制树状图,如图 4 所示,相似系数在 0.24 处将陕西省有色稻品种聚为 2 类。第 1 类包含 16 个品种,此组又可以进一步分为 2 个亚组。第 1 亚组包括黑宝、汉中黑糯等 13 个品种,其中的黑优粘和黑丰糯遗传相似系数最高,达 0.88。第 2 亚组包含秦稻 1 号、本墨糯和 PC 3 个品种。第 2 类只有双亚绿 1 个品种(图 4)。

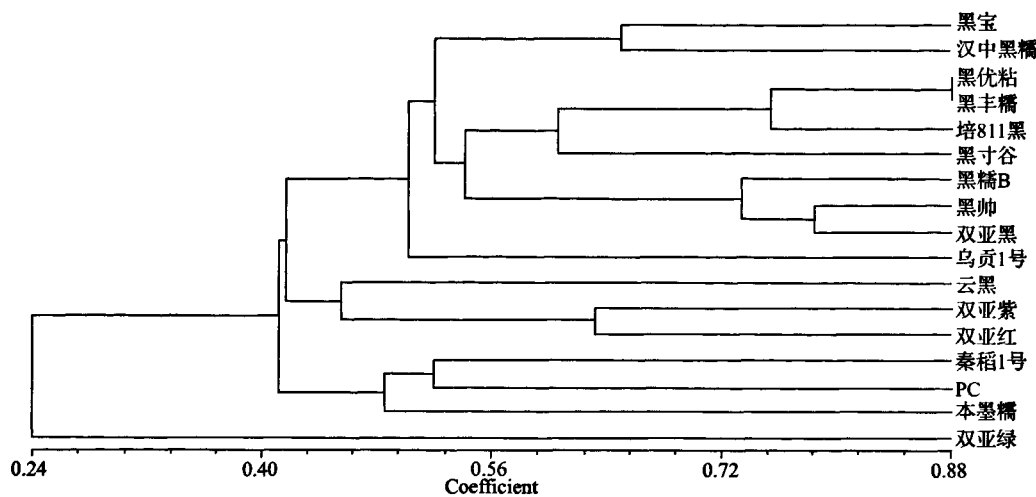


图 4 根据 SSR 分析的遗传相似系数数据构建的 17 份有色稻品种的聚类分析
Fig. 4 Dendrogram of genetic similarity among 17 pigmented rice varieties with based on SSR data

2.5 农艺性状聚类分析

根据播抽历期、株高、有效穗、千粒重、实粒数、结实率、生育期、粒长、粒宽、粒型、色价等 11 个农艺性状采用 Ward 法进行分层聚类。由聚类图可以看出,所有供试材料在欧氏距离为 7.22 处聚为 2 类。由于绿稻是在种子没有完全成熟的情况下,与同等

成熟程度的一般水稻相比,种皮明显呈绿色,但完全成熟时,种皮呈浅绿色或与一般水稻没有区别,绿色表现不稳定,因而无论从农艺性状上聚类还是 SSR 标记聚类,均揭示了双亚绿独立成一类,与其他有色稻有着明显的遗传差异,即子粒颜色与类别有关。

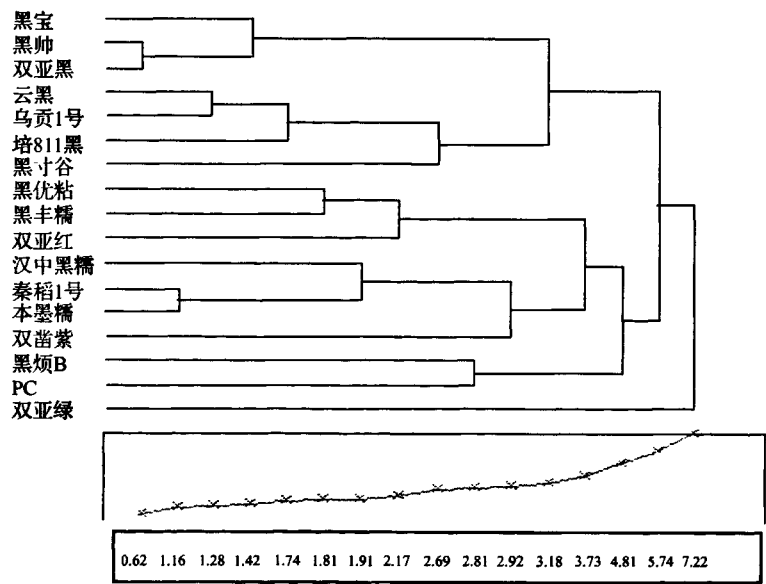


图 5 根据农艺性状构建的 17 份有色稻品种的聚类分析
Fig. 5 Dendrogram of agronomic trait among 17 pigmented rice varieties

3 讨论

本研究从水稻 12 条染色体上的 30 个 SSR 标记中筛选出 14 对有效引物对陕西省 20 个主要种植的万方数据

水稻品种的遗传多样性进行分析,结果表明 20 个水稻品种的遗传相似系数集中在 0.55 ~ 0.94 之间,遗传相似度较高,亲缘关系较近,而 17 个陕西省有色稻资源的遗传相似系数集中在 0.24 ~ 0.88 之间,和

陕西省普通稻资源相比,具有较丰富的遗传基础,有色稻育种具有较大潜力。

SSR 聚类结果显示,除个别材料外,聚类结果基本符合其系谱来源,能够较准确鉴定种质的遗传基础。农艺性状易受环境影响,用农艺性状聚类与用 SSR 聚类虽然存在一些差异,但系谱来源表明黑丰糯为从黑优粘中选育而成,这两种方法聚类结果基本是一致的,与前人研究结果不同^[14],这可能与农艺性状的选择上不同有关。单从种皮颜色深浅上分析,用于供试材料较少,22 对 SSR 有效引物虽然不能完全区别文中所提到的 8 种类型,但可大致分类。

由于花青苷类色素的种类和含量不同,造成了色稻种皮颜色深浅不等,今后将围绕有色稻种资源收集、保存、评价、发掘、创制,集成生物学、农学、营养学等多学科的理论及新技术,建立陕西省有色稻种资源的 DNA 指纹图谱,研究色素合成途径,为不同用途的色稻育种服务。

参考文献

- [1] Hu J P, Reddy V S, Wessler S R. The rice R gene family: Two distinct subfamilies containing several miniature inverted-repeat-transposable elements [J]. *Plant Mol Biol*, 2000, 42: 667-678
- [2] Sakamoto W, Ohmori T, Kageyama K, et al. The purple leaf (Pl) locus of rice: *Plw* allele has a complex organization and include two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis [J]. *Plant Cell Physiol*, 2001, 42: 982-991
- [3] 王彩霞,舒庆尧. 水稻紫色种皮基因 *Pb* 的精细定位与候选基因分析[J]. *科学通报*, 2007, 52(21): 2517-2523
- [4] 赵则胜,赖来展,郑金贵. 中国特种稻[M]. 上海:上海科学技术出版社,1994
- [5] 马挺军,任贵兴. 色稻功能成分研究进展[J]. *中国农学通报*, 2010, 26(11): 61-66
- [6] 李宇歌,罗文永,李晓方,等. 编码区和非编码区 SSR 标记对水稻类群的比较研究[J]. *西北植物学报*, 2007, 27(11): 2181-2187
- [7] 罗小金,贺浩华,彭小松,等. 利用 SSR 标记分析水稻亲本间遗传距离与杂种优势的关系[J]. *植物遗传资源学报*, 2006, 7(2): 201-214
- [8] 王金花,罗文永,陈建伟,等. 应用 SSR 和 ISSR 标记分析栽培香稻品种的遗传多样性[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(1): 37-42
- [9] 陈远孟,张向军,陈传华,等. 香稻品种遗传多样性研究[J]. *安徽农业科学*, 2006, 34(22): 5794-5797
- [10] 崔海丽,夏春鑫,赵则胜,等. 黑稻资源遗传多样性的 SSR 分析[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(1): 63-67
- [11] 郭慧,李树杏,徐建第,等. 24 份水稻细胞质雄性不育系的 SSR 多态性分析[J]. *杂交水稻*, 2007, 22(3): 56-61
- [12] 梁宏伟,王长忠,李忠,等. 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立[J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1379-1382
- [13] Botstein D, White R L, Skolnick M, et al. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms[J]. *Am J Hum Genet*, 1980, 32: 314-331
- [14] 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

(上接第 827 页)

- [2] Quélet L. *Enchiridion fungorum in Europa media et praesertim in Gallia Vigentium* [M]. Paris, 1886: 148
- [3] Venturella G, Zervakis G, Rocca S L. *Pleurotus eryngii* var. *elaeoselinii* var. nov. from Sicily [J]. *Mycotaxon*, 2000, 76: 419-427
- [4] Moser M. Keys to Agarics and Boleti (Polyporales, Boletales, Agaricales, Russulales) [M]. London: Roger Phillips, 1983
- [5] Candusso M, Basso M T. Comparative analysis of *Pleurotus eryngii* and *P. nebrodensis* [J]. *Docu Myco*, 1995, 100: 119-128
- [6] 牟川静,曹玉清,马金莲. 阿魏侧耳一新变种及其培养特性[J]. *真菌学报*, 1987, 6(3): 153-156
- [7] 邓叔群. 中国的真菌[M]. 北京:科学出版社,1963: 580
- [8] 黄年来. 18 种珍稀美味食用菌栽培[M]. 北京:中国农业出版社,1996
- [9] 贾身茂,秦森. 我国白阿魏侧耳的驯化与栽培[J]. *中国食用菌*, 2006, 25(3): 3-7
- [10] 刘洲君,王卓仁,肖美丽,等. 白灵菇与阿魏侧耳杂交 F_1 代培养性状观察[C]//中国(广水)食用菌标准化生产研讨会暨珍稀菇品(白灵菇)交易会论文集, 2005
- [11] Kawai G, Babasaki K, Neda H. Taxonomic position of a Chinese *Pleurotus* "Bai-Ling-Gu": it belongs to *Pleurotus eryngii* (DC.: Fr.) Quél. and evolved independently in China [J]. *Mycoscience*, 2008, 49: 75-87
- [12] 黄晨阳,陈强,高山,等. 侧耳属主要种类 ITS 序列分析[J]. *菌物学报*, 2010, 29: 365-372
- [13] Tamura K, Dudley J, Nei M, et al. MECA4: molecular evolutionary genetics analysis (MECA) software version 4.0 [J]. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 1596-1599
- [14] 卯晓岚. 中国大型真菌[M]. 郑州:河南科技出版社,2000
- [15] 戴玉成,周丽伟,杨祝良,等. 中国食用菌名录[J]. *菌物学报*, 2010, 29: 1-21

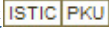
欢迎订阅 2012 年《烟台果树》

《烟台果树》是烟台市农科院果树科学研究所主办的果树专业性季刊。立足北方水果的主产区山东烟台,面向全国。经过 32 年的发展,《烟台果树》已成为我国广大果树业者新观点、新品种、新技术的交流平台,也是苗木、农药、肥料及各种生产机具等信息发布的平台。定价 4 元,全年仅需 16 元。每季度首月 15 日发行。全国各地邮局均可订阅,邮发代号为 24-107。

地址:(264008)山东省烟台市环山路 145 号 《烟台果树》编辑部

联系人:梁志清 电话:0535-6236524 6615052(传真)

E-mail: ytgabjb@163.com ytgsgg@163.com

作者: 张羽, 李新生, 冯志峰, 王胜宝, ZHANG Yu, LI Xin-sheng, FENG Zhi-feng, WANG Sheng-bao
作者单位: 张羽, 李新生, ZHANG Yu, LI Xin-sheng(陕西理工学院生物科学与工程学院, 汉中, 723000), 冯志峰, 王胜宝, FENG Zhi-feng, WANG Sheng-bao(陕西省水稻研究所, 汉中, 723000)
刊名: 植物遗传资源学报 
英文刊名: Journal of Plant Genetic Resources
年, 卷(期): 2011(5)

参考文献(14条)

1. 肖小余;王玉平;张建勇 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 2006(01)
2. Botstein D;White R L;Skolnick M Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms 1980
3. 梁宏伟;王长忠;李忠 聚丙烯酰胺凝胶快速、高效银染方法的建立 2008(10)
4. 郭慧;李树杏;徐建第 24份水稻细胞质雄性不育系的SSR多态性分析 2007(03)
5. 崔海丽;夏春镗;赵则胜 黑稻资源遗传多样性的SSR分析 2007(01)
6. 陈远孟;张向军;陈传华 香稻品种遗传多样性研究 2006(22)
7. 王金花;罗文永;陈建伟 应用SSR和ISSR标记分析栽培香稻品种的遗传多样性 2005(01)
8. 罗小金;贺浩华;彭小松 利用SSR标记分析水稻亲本间遗传距离与杂种优势的关系 2006(02)
9. 李宇歌;罗文永;李晓方 编码区和非编码区SSR标记对水稻类群的比较研究 2007(11)
10. 马挺军;任贵兴 色稻功能成分研究进展 2010(11)
11. 赵则胜;赖来展;郑金贵 中国特种稻 1994
12. 王彩霞;舒庆尧 水稻紫色种皮基因Pb的精细定位与候选基因分析 2007(21)
13. Sakamoto W;Ohmori T;Kageyama K The purple leaf (P1) locus of rice:Plw allele has a complex organization and include two genes encoding basic helix-loop-helix proteins involved in anthocyanin biosynthesis[外文期刊] 2001
14. Hu J P;Reddy V S;Wessler S R The rice R gene family:Two distinct subfamilies containing several miniature inverted-repeat transposable elements[外文期刊] 2000

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201105028.aspx