

一组水稻种质资源的遗传相似性及群体结构分析

肖宇龙¹, 雷建国¹, 余传元¹, Quirino D. Dela Cruz²,
Jonalyn M. Cstillo³, Dindo A. Tabanao³

(1. 江西省农业科学院 水稻研究所, 江西 南昌 330200; 2. Central Luzon State University (CLSU), Philippines; 3. Philippine Rice Research Institute (PhilRice), Philippines)

摘要: 育种的成功基于试验材料中具有可利用的遗传变异, 了解种质资源的群体机构及遗传变异范围是作物遗传改良的先决条件。本试验通过利用每 3 Mb bin 均匀分布于水稻染色体的 156 个 SSR 标记子, 分析了一组 (184 个) 用于干旱适应性研究的水稻种质资源的遗传相似性及群体结构。结果显示, 水稻中确实存在着可供利用的遗传多样性, 但也存在着普遍的遗传相似性, 如国际水稻所的 IR 品种及菲律宾国家水稻所的 PR 及 BP 水稻品种。通过利用 Structure 中的混合模型对该 184 个水稻品种在 $K=3$ 和 $K=7$ 时的分析表明, 群体结构普遍存在于相同类型或亚种的水稻品种中, 籼稻及粳稻品种具有相对明显的群体结构, 同一亲本的衍生后代具有显著的遗传相似性和群体结构, 不同的群体均存在一定程度的遗传混合。对该组干旱适应性水稻种质资源的遗传相似性及群体结构的研究为今后的抗旱性基因的联合作图, 也为合理选择亲本进行水稻抗旱性改良提供了有价值的遗传信息。

关键词: 水稻; 种质资源; 遗传相似性; 群体结构

中图分类号: S511.032 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2012)05-0886-07

Genetic Similarity and Population Structure in a Rice Drought Stress Adaptation Panel

XIAO Yu-long¹, LEI Jian-guo¹, YU Chuan-yuan¹,
Quirino D. Dela Cruz², Jonalyn M. Cstillo³, Dindo A. Tabanao³

(1. Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Science, Nanchang 330200, China; 2. Central Luzon State University (CLSU), Philippines; 3. Philippine Rice Research Institute (PhilRice), Philippines)

Abstract: The success of plant breeding is based on the availability of genetic variation. Understanding the population structure and range of diversity in available germplasm is fundamental for genetic improvement in all crop species. In this study, the authors analyzed the genetic diversity and the population structure of a drought stress adaptation panel (184 rice genotypes) through 156 SSR markers nearly evenly distributed across the rice genome at every 3 Mb bin. The results indicated that large range of genetic diversity existed among rice germplasms, while some accessions exhibited comparatively higher genetic similarity, such as IR designated varieties from IRRI and BP and PR designated varieties from PhilRice. The results of population structure

收稿日期: 2012-04-18 修回日期: 2012-06-22

基金项目: 中菲合作杂交水稻育种项目 (HBP-004-002)

作者简介: 肖宇龙 (1974-) 男, 研究员, 博士, 主要从事水稻常规及分子育种工作, E-mail: ylxiao2005@yahoo.com。

of the 184 rice genotypes analyzed when $K=3$ and $K=7$ through the mixed model of STRUCTURE indicated: population generally existed in the same type or rice subspecies; indica and japonica had relatively distinguishable population structure; derivatives of the same parents had significantly higher genetic similarity and were generally clustered into the same subpopulation and to various extents, genetic admixture existed within all the subpopulations. The study on the genetic similarity and population structure of this rice drought stress adaptation panel provides valuable genetic information for further association mapping for drought tolerance and selecting parental lines for crop improvement.

Key words: drought stress adaptation; rice germplasm; genetic similarity; population structure

育种的成功基于试验材料中具有可利用的遗传变异,对于所需性状的了解及合理的选育策略^[1],了解可用种质资源的群体机构及遗传变异范围是作物遗传改良的先决条件。遗传距离的估计对于选择具有相当遗传差异的亲本进行配组^[2],及在作物杂交育种中将种质资源区分为杂种优势组群都具有重要的指导意义^[3]。传统的遗传多样性是通过系谱或者通过农艺性状的表型来预测的,通过系谱的预测结果往往会因扩大而不真实^[4-6],通过表现型的预测,如果观测的样本群体足够大且所观测的性状在群体间具有显著的差异,则观测结果具有一定的代表性^[7],然而,品种的表现型容易受环境影响而改变,性状的观察需要种植该品种到成熟。分子标记子(molecular markers)与形态标记比较,不受外部环境的影响,能显示品种在DNA水平上的差异,为品种识别提供了更直接,可靠及有效的工具^[8],已经被证明是用来评估遗传多样性及阐述物种间遗传关系的有效工具。

目前,不同的分子标记子已经大量被利用于评估作物的遗传多样性^[9],如限制性片段长度多态性标记子(restriction fragment length polymorphism, RFLP)^[10-11],随机扩增多态DNA标记子(random amplified polymorphic DNA, RAPD)^[12-13],扩增片段长度多态性标记子^[14-17],简单序列重复标记子(simple sequence repeats, SSR)^[18],内部简单序列重复标记子(inter-simple sequence repeats; ISSRs)^[9, 19],及单核苷酸多态性标记子(single nucleotide polymorphism, SNP)^[20]等。相比于其它类型的标记子,SSR标记子具有丰富性,共显性,多位点性,高多态性及染色体特异性等特点^[21-23],SSR标记子高程度的位点多态性使得它比同样数目的其它标记子如RFLP, RAPD, AFLP及SNP等在检测多态性的精细结构时候更有效^[24-26],被广泛应用于包括水稻在内的作物种质资源的遗传多态性及群体结构研究^[23, 27-30],且特别适用于鉴定遗传关系相近的水稻栽培种之间的遗传多态性^[31]。

本试验利用均匀分布于水稻12条染色体的SSR标记子对184份鉴定苗期耐旱性水稻材料进行分析,评估该批材料的遗传相似性及群体结构,为今后利用连锁不平衡遗传标记苗期抗旱性基因及合理选择亲本进行配组,提高水稻苗期抗旱性提供可靠的遗传依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

184份用来鉴定水稻苗期抗旱性的水稻品种资源,其中包含了籼、粳两个亚种的各类水稻品种资源,如三系亲本珍汕97B,明恢63等,审定的品种NSIC Rc9, PSB Rc18, PSB Rc82等,地方品种丽江新田黑谷, Azucena等,籼粳交的中间材料WAB 878-6-20-1-4-P1-HB, WAB 880-1-32-1-1-P2-HB, WAB 891SG33等,深水稻Aswina及Rayada等及香稻品种如Basmati 370等。

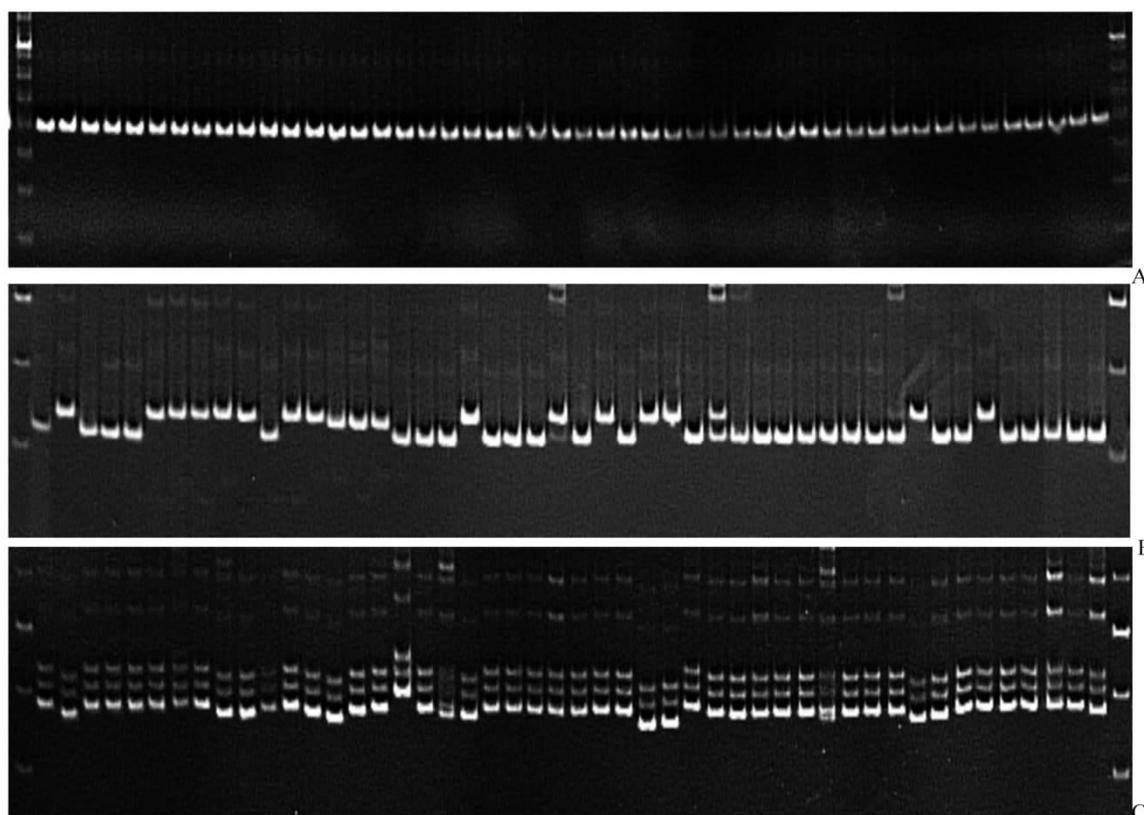
均匀分布于水稻12条染色体的SSR标记子,每3 Mb一个SSR标记子,共156个标记子。

1.2 基因型标记

1.2.1 位点多态性分析 利用选定的156个SSR标记子对这184份苗期抗旱性水稻材料进行标记,根据各标记子在试验材料中的多态性,淘汰只有单态性(monomorphic)的标记子,具有多态性(polymorphic)的标记子用来进行遗传相似性及群体结构分析。

1.2.2 遗传相似性分析 根据SSR标记子的多态性结果,利用PowerMarker version 3.23^[32]软件分析各位点的等位基因数,多态性信息值及遗传相似性分析。

1.2.3 群体结构分析 群体结构分析根据SSR标记子的多态性结果,利用“Structure 2.3”软件^[33]中



A: RM192; B: RM112; C: RM595.

图 1 不同 SSR 标记子的扩增图谱

Fig. 1 Bands produced by SSR markers

的独立位点频率 (independent allele frequency) 及混合模型 (admixture model) 进行分析, 其中参数 K (固定的亚组数) 设置为从 1 到 10, MCMC (markov chain monte carlo) 开始时的不作数迭代 (Length of burn-in period) 为 10 000 次, 不作数迭代后的 MCMC 设置为 100 000 次, 根据似然值最大原则选取 K 值。

2 结果与分析

2.1 SSR 标记子多态性分析

在近乎均匀分布于水稻染色体的 156 个 SSR 标记子中, 两个产生模糊带, 13 个显示只有单态性, 剩余的 141 个 SSR 标记子显示至少存在 2 个位点以上的差异 (图 1), 每位点存在 2 至 7 个等位基因, 平均为 2.73 个, 该 141 个 SSR 标记子的多态性结果被用来评估该组苗期抗旱性水稻资源的遗传相似性及群体结构。

2.2 遗传相似性分析

根据 141 个多态 SSR 标记对 184 份水稻苗期抗旱性水稻品种的遗传相似性进行分析, 系统树图首先把该 184 份材料区分为群体 (图 2), 较小的群体 (群体 1) 包含了 21 个水稻品种, 其中主要是粳稻品种; 较大的群体 (群体 2) 包含了以籼稻为主的品种, 各群体又包含不同的亚群体。Tainung 67, Java 和 Nanjing70272 在很多试验中被认为是粳稻品种的, 并没被归纳在群体 1 中, 最明显的证据是三个籼粳交的中间材料 WAB878-6-20-1-P1-HB, WAB880-1-32-1-1-P2-HB 及 WAB891SG33 都包含在群体 1 中, 表明该群体的水稻品种在遗传关系上更接近于粳稻类型。群体 2 中主要包含了以籼稻为主的水稻品种, 大部分的 IR (国际水稻所品种), BP 及 PR 品种 (菲律宾国家水稻所的品种) 被归在同一个或者临近的亚群体中, 表明这些品种的遗传关系相对比较近。这个群体最明显的一个证据就是由国际水稻所 (IRRI) 选育的 3 个品种 PSB Rc82, PSB Rc68 和 NSIC Rc9 被归于同一个亚群里, PSB Rc82 与 NSIC Rc9 的遗传相似性高达 89%, 这两个品种与 PSB Rc68 的遗传相似性也高达 81%。

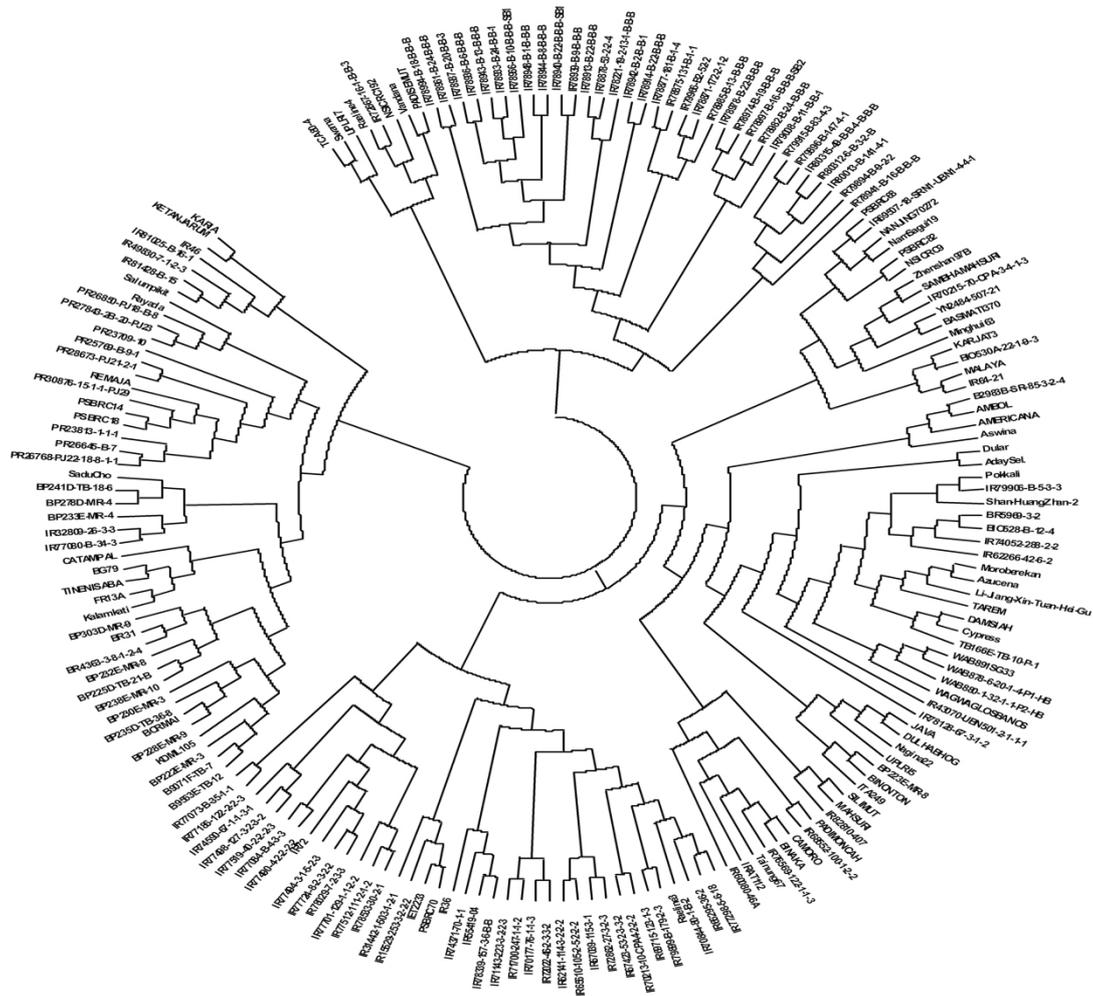


图 2 根据 141 个 SSR 标记子分析的 184 个水稻品种的环型拓扑图

Fig. 2 Circle topology of 184 rice genotypes based on allelic diversity data of 141 SSR markers

2.3 群体结构分析

该 184 个水稻苗期抗旱性鉴定水稻品种的群体结构是根据 141 个 SSR 多态性标记子的结果,利用软件 STRUCTURE 中的混合模型及独立基因频率进行分析,分析结果的相似值见图 3。

根据图 3 可以看出,相似值的高峰出现在当 $K=7$ 的时候。最显著的变化是当 $K=1$ 和 2,当 $K=3$ 时,上升的趋势趋于平缓,因此对 $K=3$ 及 $K=7$ 两种情况下的群体结构进行了分析。

当 $K=3$ 时,26 个水稻品种被归于第 1 组,包括了大部分的温带和热带粳稻品种,比如 Azucena, cypress, Java, 丽江西田黑谷, Moroberekan 及 3 个籼粳交的中间材料 WAB78-6-20-1-P1-HB, WAB880-1-32-1-1-P2-HB 和 WAB891SG33。一些以前被认为是籼稻品种的也包含在这一组,表明存在一定程度的基因混合。第 2 组包括 116 个水稻品种,包括了所有的 PR, PSB 及 NSIC 品种及一些 IR 品种。AUS 及香

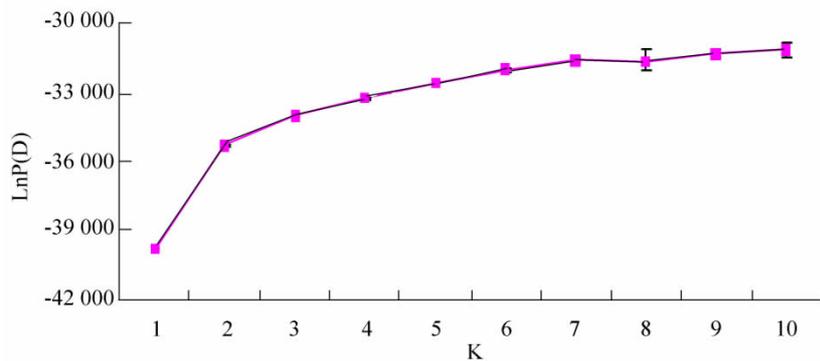
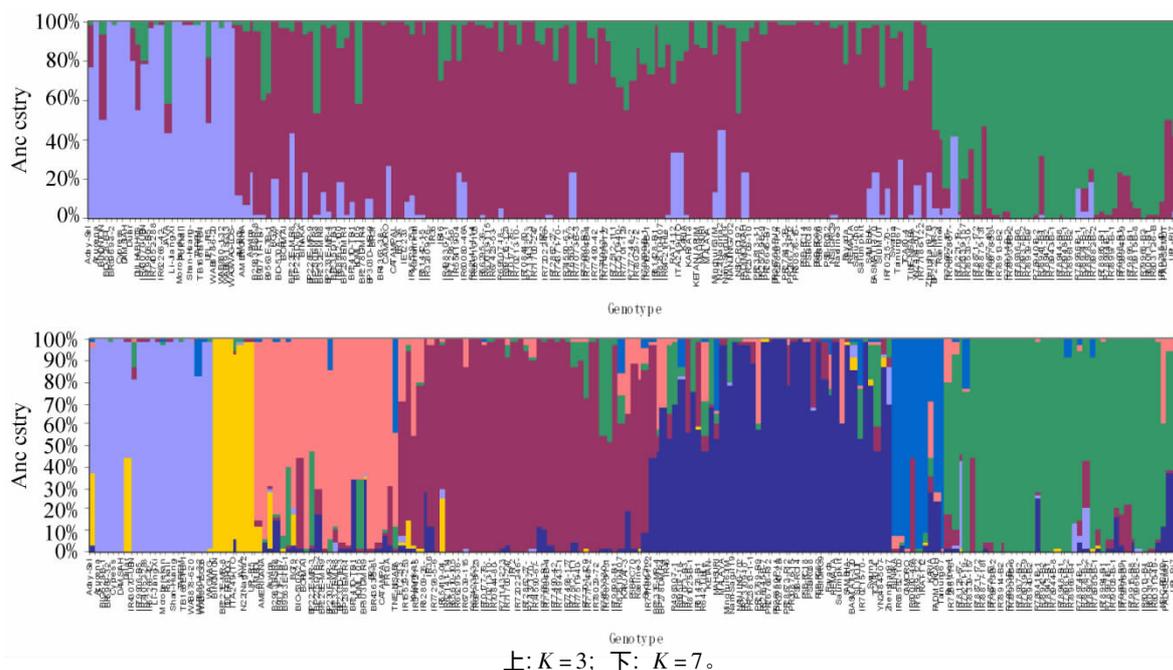


图 3 基于 141 个 SSR 标记子的 184 个水稻品种的 K 值估计

Fig. 3 Log probability of data (Ln P(D)) as a function of K (number of subpopulations) for 184 rice germplasm accessions based on 141 SSR markers



Upper: subpopulations K = 3; Lower: subpopulations K = 7.

图 4 利用 141 个 SSR 标记子通过 Structure 软件中的混合模型分析的 184 个水稻种质资源的群体机构

Fig. 4 Ancestry probabilities of 184 rice germplasm accessions estimated from 141 SSR markers based on an admixture model with independent allele frequencies among populations implemented using STRUCTURE (Pritchard et al. 2000). 稻(aromatic rice) 类型的水稻也包含在这一组 同时包括 Tiannung 67 ,一个推广了的温带粳稻品种。第 3 组包括 42 个水稻品种 其中有 37 个是 IR 品种。所有的 3 个组中都存在一定程度的基因型混合(图 4) 。

当 $K = 7$ 时 ,第 1 组包含了 21 个品种 ,绝大多数是粳稻品种; 第 2 组包含了 7 个品种; 第 3 组有 24 个品种 ,大多数是 BP 品种 ,第 5 组包含了 40 个品种 ,主要是 BP ,PR 及 PSB 品种; 第 6 组包含了 9 个水稻品种; 第 4 组包含了 43 个品种 ,第 7 组 40 个品种 ,这两组合包括了大部分的 IR 品种(图 4) ,各组中 都有一些品种存在不同程度的遗传混合(图 4) 。

3 讨 论

对遗传多样性的研究长久以来就是进化生物学的一个主要内容 ,了解作物品种的遗传差异对合理使用遗传资源非常必要 ,分析优良育种材料间的遗传差异对育种者来说极为重要 ,育种者通过遗传差异可以预测后代材料中的遗传获得(genetic gain) 及更好地利用遗传资源^[34] 。

水稻中存在着大范围的遗传变异。水稻可以被归类于种 ,亚群及不同的生态类型 ,亚洲栽培稻可以分为两个主要大类: 籼稻和粳稻 ,及五个明显区别的亚群。籼稻包含了籼稻品种(indica) ,AUS 及香稻(aromatic) 品种 ,粳稻包含了热带粳稻品种及温带粳稻品种(<http://www.ricediversity.org/outreach/gen/>) 。根据 SSR 标记子的遗传信息 ,本试验中的 184 份水稻抗旱性种质大体可以分为籼稻和粳稻品种两组(图 2) ,然而 ,一些被认为粳稻的品种 ,如 Tainung 67 ,Java 和 NanJing 70272 等被归于籼稻组 ,一些被认为是籼稻的品种如 Aday Sel. DAMSIAH 等被归于粳稻组 ,作者认为 ,就本试验所用的 SSR 标记子所在的位点上 ,这些品种可能表现出与同组的籼稻或者粳稻更大的遗传相似性。

群体结构指在群体中存在明显的亚分类 ,群体结构(population structure) 及群体混杂(population admixture) 是造成不连锁位点间存在连锁不平衡的主要因素^[35] 。就连锁不平衡分析而言 ,群体混杂是造成标记子与表现性状间出现假相关的主要原因之一^[36] 。本试验中当 $K = 3$ 时 ,群体结构分析结构和遗传相似性的分析结构大致相同 ,当 $K = 7$ 时 ,原来的籼稻组被细分为不同的五个亚群(图 3) ,源自国际水稻所的 IR 品种 ,及菲律宾国家水稻所选育的 BP ,PR 等品种被分别归于不同的亚群 ,表明这些品种具有相对高的遗传相似性。在遗传种质中通常存在不同的品种他们经历了不同的选择周期 ,一些品种比另一些品种更为古老 ,因此 ,该遗传种质应当被视为新旧亚群的混合群体 ,当中的一些品种比另一些品种经历了更少的选择过程^[37] 。就如本试验中的 184 份水稻种质资源 ,其中一些地方品种 ,一些是常用

的水稻亲本,一些是早期审定的水稻品种,另外一些是利用地方品种及常用水稻亲本新近改良的水稻新品种,他们之间不可避免地存在一定的遗传相似性及群体混杂。

本试验中通过群体结构分析清晰观察到大多数亚群间存在着遗传混杂,一些品种的染色体片段存在与其它亚群染色体片段不同程度的相似性(图3)。McKeigue^[38]指出,不同亚群之间的基因漂流(gene flow)会使得本亚群品种祖先的染色体部分组成片段来自另外的亚群。此外,现代品种改良通常包括利用具有需要性状的不同亲本,通过目标选择包含优良选择性状的染色体片段替换了原来的染色体片段,当少量优秀亲本或种质资源被重复利用的时候,后代必然具有一定程度的遗传相似性及群体结构。

作物改良需要作物具有广泛的遗传多样性提供如抗旱性及其它重要农艺性状的变异来源,了解试验材料的遗传多样性及群体结构可以更好地帮助育种者选择亲本材料,为扩大基因池(gene pool)及验证携带具有遗传改良价值的试验材料提供了理论依据^[39]。本试验中对一组干旱适应性水稻种质资源的遗传相似性及群体结构的研究将为今后的抗旱性基因的联合作图,也为合理选择亲本进行水稻抗旱性改良提供价值的遗传信息。

参考文献:

- [1] Liakat A M, McClung A M, Jia M H, et al. A rice diversity panel evaluated for genetic and agro-morphological diversity between subpopulations and its geographic distribution [J]. *Crop Science*, 2011: 51.
- [2] Becelaere G V, Edward L L, Paterson A H, et al. Pedigree - vs. DNA marker - based genetic similarity estimates in cotton [J]. *Crop Sci*, 2005, 45: 2281-2287.
- [3] Menz M A, Klein R R, Unruh N C, et al. Genetic diversity of public inbreds of sorghum determined by mapped AFLP and SSR markers [J]. *Crop Sci*, 2004, 44: 1236-1244.
- [4] Souza E, Sorrells M E. Pedigree analysis of North American oat cultivars released from 1951 to 1985 [J]. *Crop Sci*, 1989, 29: 595 - 601.
- [5] Almanza-Pinzon M I, Khairullah M, Fox P N, et al. Comparison of molecular markers and coefficients of parentage for the analysis of genetic diversity among spring bread wheat accessions [J]. *Euphytica*, 2003, 130: 77-86.
- [6] Fufa H, Baenziger P S, Beecher B S, et al. Comparison of phenotypic and molecular marker - based classifications of hard red winter wheat cultivars [J]. *Euphytica*, 2005, 145: 133 - 146.
- [7] Humphreys M O. A genetic approach to the multivariate differentiation of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) cultivars [J]. *Heredity*, 1991, 66: 437 - 443.
- [8] Rafalski J A, Tingey A V. Genetic diagnostic in plant - breeding - RADPs, microsatellites and machines [J]. *Trends Genet*, 1993, 9: 275 - 280.
- [9] Joshi S P, Gupta V S, Aggarwal R K, et al. Genetic diversity and phylogenetic relationship as revealed by inter simple sequence repeat polymorphism in the genus *Oryza* [J]. *Theor Appl Genet*, 2000, 100: 1311 - 1320.
- [10] Becker J, Vos P, Kuiper M, et al. Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley [J]. *Mol Gen Genet*, 1995, 249: 65 - 73.
- [11] Paran I, Michelmore R W. Development of reliable PCR based markers to downy mildew resistance genes in Lettuce [J]. *Theor Appl Genet*, 1993, 85: 985 - 993.
- [12] Tingey S V, Deltufo J P. Genetic analysis with random amplified polymorphic DNA [J]. *Plant Physiol*, 1993, 101: 349 - 352.
- [13] Williams J G K, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531 - 6535.
- [14] Mackill D J, Zhang Z, Redona E D, et al. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice [J]. *Genome*, 1996, 39: 969 - 977.
- [15] Thomas C M, Vos P, Zabeau M, et al. Identification of amplified restriction fragment polymorphism (AFLP) markers tightly linked to the tomato Cf-9 gene for resistance to *Cladosporium fluvum* [J]. *Plant J*, 1995, 8: 785 - 794.
- [16] Vos P, Hogers R, Bleeker M, et al. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting [J]. *Nucleic Acids Res*, 1995, 23: 4407 - 4414.
- [17] Zhu J, Gale M D, Quarries M T. AFLP markers for the study of rice biodiversity [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 602 - 611.
- [18] Levinson G, Gutman G A. Slipped-strand Mis-pairing: A major Mechanism of DNA sequence Evolution [J]. *Mol Biol Evol*, 1987, 4: 203 - 221.
- [19] Albani M C, Wilkinson M J. Inter simple sequence repeat polymerase chain reaction for the detection of somaclonal varia-

- tion [J]. *Plant Breeding*, 1998, 117: 573 – 575.
- [20] Vieux E F, Kwok P Y, Miller R D. Primer design for PCR and sequencing in high – throughput analysis of SNPs [J]. *Biotechniques*, 2002, 32: 28 – 30.
- [21] Ahmed M. Assessment of genomic diversity among wheat genotypes as determined by simple sequence repeats [J]. *Genome*, 2002, 45: 646 – 651.
- [22] Huang H Q, Borner A, Roder M S, et al. Assessing genetic diversity of wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm using microsatellite markers [J]. *Theor Appl Genet*, 2002, 105: 699 – 707.
- [23] Thomson M J, Septiningsih E M, Suwardjo F, et al. Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite marker [J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 114: 559 – 568.
- [24] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison on RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis [J]. *Mol Breed*, 1996, 2: 225 – 238.
- [25] Lorz H, Wenzel G. Molecular marker systems in plant breeding and crop improvement [M]. Springer: Heidelberg, Germany, 2005.
- [26] Varshney R K, Chabane K, Hendre P S, et al. Comparative assessment of EST – SSR, ESTSNP and AFLP markers for evaluation of genetic diversity and conservation of genetic resources using wild, cultivated and elite barleys [J]. *Plant Sci*, 2007, 173: 638 – 649.
- [27] Ni J, Colowit P M, Mackill D J. Evaluation of genetic diversity in rice subspecies using microsatellite markers [J]. *Crop Sci*, 2002, 42: 601 – 607.
- [28] Garris A J, Tai T H, Coburn J R, et al. Genetic structure and diversity in *Oryza sativa* L. [J]. *Genetics*, 2005, 169: 1931 – 1638.
- [29] Lu H, Redus M A, Coburn J R, et al. Population structure and breeding patterns of 145 US rice cultivars based on SSR marker analysis [J]. *Crop Sci*, 2005, 45: 66 – 76.
- [30] Eizenga G C, Agrama H A, Lee F N, et al. Identifying novel resistance genes in newly introduced blast resistant rice germplasm [J]. *Crop Sci*, 2006, 46: 1870 – 1878.
- [31] Akagi H, Yokozeki Y, Inagaki A, et al. Highly polymorphic microsatellites of rice consists of AT repeats, and a classification of closely related cultivars with these microsatellite loci [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 94: 61 – 67.
- [32] Liu, K J, Muse S V. PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis [J]. *Bioinformatics*, 2005, 21: 2128 – 2129.
- [33] Pritchard J K, Stephens M, Donnelly P. Inference of population structure using multilocus genotype data [J]. *Genetics*, 2000, 155: 945 – 959.
- [34] Chakravarthi B K, Naravaneni R. SSR marker based DNA fingerprinting and diversity study in rice (*Oryza Sativa* L.) [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(9): 684 – 688.
- [35] Flint-Garcia S A, Thornsberry J M, Buckler E S. Structure of linkage disequilibrium in plants [J]. *Annu Rev Plant Biol*, 2003, 54: 357 – 374.
- [36] Beer S C, Siripoonwiwat W, O’Donoghue L S, et al. Association between molecular markers and quantitative traits in an oat germplasm pool: can we infer linkage [J/OL]. *J Agric genome* 3, 1997.
- [37] Souza E, Sorrells M E. Relationships among 70 North American oat germplasms: I: Cluster analysis using quantitative characters [J]. *Crop Sci*, 1991, 31: 599 – 605.
- [38] McKeigue P M. Prospects for admixture mapping of complex traits [J]. *Am J Hum Genet*, 2005, 76: 1 – 7.
- [39] Soller M, Bechmann J S. Genetic polymorphism in varietal identification and genetic improvement [J]. *Theor Appl Genet*, 1983, 82: 233 – 241.