

水稻功能性插入缺失标记 (InDel) 的筛选与应用

王钰 马卉 许学 秦瑞英 杨剑波 汪秀峰

(安徽省农业科学院水稻研究所, 230031, 安徽合肥)

摘要 开展水稻品种纯度和真实性鉴定对水稻遗传育种和种子生产有着重要的意义。以 245 个长江中下游主推水稻品种为研究材料, 从 643 个插入缺失 (InDel) 位点中筛选出 124 个功能性多态性位点, 建立了 InDel 高效检测体系。进一步利用 InDel 标记 vf0121641804 和 SSR 标记 RM7120 分析水稻样品的纯度, 同时选用覆盖 12 条染色体的 24 对 InDel 引物和 48 对 SSR 标准引物分析水稻品种真实性, 结果表明, 采用 InDel 标记检测水稻品种纯度和真实性的结果与采用 SSR 标记检测结果一致, 说明水稻功能性 InDel 标记也可用于水稻品种纯度和品种真实性的鉴定。在此基础上, 鉴定了 245 个水稻品种 124 个 InDel 标记的基因型遗传多样性并进行了聚类分析, 结果表明, 水稻材料间存在明显的群体结构, 基本反映了不同品种间的亲缘关系。水稻功能性 InDel 标记的筛选与应用, 不仅为品种纯度和真实性鉴定、遗传多样性分析提供了新方法; 而且可用于分子辅助育种, 提高强优势组合的预见性。

关键词 水稻; InDel; 多态性位点; 品种纯度; 品种真实性; 遗传多样性

水稻是我国重要的粮食作物, 杂交水稻更是以其显著的产量优势为我国乃至世界粮食安全做出了巨大贡献。新品种的推广和使用对保障我国粮食供应、满足人们多元化需求发挥了极其重要的作用。2001–2015 年, 全国各地通过省级以上审定的水稻品种就达 6 310 个 (<http://www.ricedata.cn/variety/index.htm>)。有效鉴定这些品种材料, 对水稻品种选育、试验、质量和市场管理以及产权保护具有重要的现实意义^[1–2]。

基因的差异导致品种形态差异和特征特性的不同。目前区别水稻品种较为有效、快捷的方法是利用 DNA 分子标记鉴别不同品种基因型的差异^[3–4]。Moore 等在 1991 年创立了 SSR 标记技术, 在水稻基因组中, 平均每 157kb 才有一个 SSR 位点^[5], 因此 SSR 分子标记密度还远远达不到要求。另外, 它与水稻品种农艺性状关联性较差, 难以区分近等基因系或功能代换系^[6]。InDel (Insertion–Deletion) 标记即插入缺失标记^[7–9], 指的是两种基因型在全基因组中的差异, 相对于其中一个基因型而言, 另一个基因型的基因组中有一定数量的核苷酸插入或缺失。根据基因组中插入缺失位点, 设计一些特

异扩增识别这些插入缺失位点的 PCR 引物, 这就是 InDel 标记, 是一类共显性标记^[10–11]。InDel 在基因组中分布广泛、密度大、数目多。就分布密度而言, 平均每 953bp 就有一个 InDel 位点, 仅次于每 268bp 就有一个 SNP 位点, 但远高于 SSR 标记位点^[12–13]。SNP 标记在理论上潜力很大, 但由于目前检测方法和成本的限制, 并没有进行广泛的应用^[14–15]。InDel 标记准确性高、变异稳定, 避免了由于特异性和复杂性导致的后续分析模糊^[16–17]。本研究从 InDel 标记的特点出发, 下载并设计大量有关 InDel 标记引物, 对水稻材料进行分析, 根据其在种内和种间都有多态性、通用性较强的特点来筛选功能性 InDel 位点, 为实现 InDel 标记在生物的遗传多样性分析、品种鉴定、亲子分析等方面的广泛应用打下基础。

1 材料与方法

试验于 2015 年 7 月–2018 年 9 月进行, 室内试验于安徽省农业科学院水稻研究所生物技术实验室完成, 田间种植在合肥岗集试验基地完成。

1.1 试验材料

收集长江中下游地区主推水稻品种 245 个 (表 1), 其中, 常规种/亲本 157 个, 两系杂交种 38 个, 三系杂交种 50 个。对部分纯度存在疑问的品种进行田间种植去杂, 统一编号后备用。

作者简介: 王钰, 硕士, 研究方向为种子分子检测; 马卉为共同第一作者, 副研究员, 研究方向为农作物分子检测
汪秀峰为通信作者, 研究员, 主要从事转基因分子检测方面的研究

基金项目: 国家科技支撑计划 (2015BAD02B02); 青年科学基金 (31601289); 院长青年创新基金 (17B0102)

收稿日期: 2019–03–13; 修回日期: 2019–04–18

表 1 供试水稻品种的名称、类型及类群
Table 1 Name, type and group of rice varieties for testing

编号 Number	品种 Variety	类型 Type	类群 Group	编号 Number	品种 Variety	类型 Type	类群 Group	编号 Number	品种 Variety	类型 Type	类群 Group
1	绍糯 9714	常规种/亲本	II A	50	恢 52	常规种/亲本	I A	99	沪恢 6 号	常规种/亲本	I A
2	高科 1 号	常规种/亲本	I A	51	密阳 46	常规种/亲本	I B	100	cp120	常规种/亲本	I A
3	泸香 658	常规种/亲本	I A	52	9311	常规种/亲本	I A	101	恢 527	常规种/亲本	I A
4	德香 4103	常规种/亲本	I A	53	RH003	常规种/亲本	I A	102	898	常规种/亲本	I A
5	浙农 34	常规种/亲本	I A	54	ZH128	常规种/亲本	I A	103	盐 559	常规种/亲本	I A
6	中嘉早 17	常规种/亲本	I A	55	红 98	常规种/亲本	I A	104	零 57	常规种/亲本	I A
7	嘉兴 8 号	常规种/亲本	I A	56	R6547	常规种/亲本	I A	105	明 63	常规种/亲本	I A
8	镇稻 15	常规种/亲本	I A	57	R118	常规种/亲本	I A	106	IR50 迟穗	常规种/亲本	I A
9	淮稻 12	常规种/亲本	I A	58	安香 2 号	常规种/亲本	I A	107	杨 6 无芒	常规种/亲本	I A
10	皖稻 68	常规种/亲本	I A	59	川香 6 号	常规种/亲本	I A	108	特青	常规种/亲本	II A
11	黄糯 2 号	常规种/亲本	I A	60	明恢 100	常规种/亲本	I A	109	成恢 448	常规种/亲本	I A
12	皖垦糯 1 号	常规种/亲本	I A	61	明恢 77	常规种/亲本	I A	110	镇江 084	常规种/亲本	I A
13	中优 838	常规种/亲本	I A	62	黟香恢 788	常规种/亲本	I A	111	培矮 64	常规种/亲本	I A
14	皖稻 197	常规种/亲本	I A	63	测 64	常规种/亲本	I A	112	Li7954	常规种/亲本	I A
15	嘉育 253	常规种/亲本	I A	64	创丰占	常规种/亲本	I A	113	万恢 88	常规种/亲本	I A
16	新强 8 号	常规种/亲本	I A	65	奉化占	常规种/亲本	I A	114	R602	常规种/亲本	I A
17	五山丝苗	常规种/亲本	I A	66	丰美占	常规种/亲本	I A	115	Liu3149	常规种/亲本	I A
18	梗糯 4921	常规种/亲本	I A	67	广香粳	常规种/亲本	I A	116	明恢 1273	常规种/亲本	I A
19	竹舟 5 号	常规种/亲本	I A	68	黄华占	常规种/亲本	I A	117	m125	常规种/亲本	I A
20	早粳 65	常规种/亲本	I A	69	皖粳 316	常规种/亲本	I A	118	R-725	常规种/亲本	I A
21	绿稻 24	常规种/亲本	II A	70	早粳 14	常规种/亲本	I A	119	南京 16	常规种/亲本	I A
22	金奉 19	常规种/亲本	II A	71	皖稻 89	常规种/亲本	I A	120	中香 1 号	常规种/亲本	I A
23	皖稻 113	常规种/亲本	I A	72	中粳 898	常规种/亲本	I A	121	粤航 1 号	常规种/亲本	I A
24	安选 6 号	常规种/亲本	I A	73	中粳 352	常规种/亲本	I A	122	R1846	常规种/亲本	I A
25	早粳 15	常规种/亲本	I A	74	盐稻 8 号	常规种/亲本	I A	123	N456	常规种/亲本	I A
26	皖稻 141	常规种/亲本	I A	75	泰国粳	常规种/亲本	II A	124	R-11	常规种/亲本	I A
27	丰优 58	常规种/亲本	I A	76	中香 6 号	常规种/亲本	I A	125	海南常规稻	常规种/亲本	I A
28	皖稻 173	常规种/亲本	I A	77	3263	常规种/亲本	I A	126	肖 37878	常规种/亲本	I A
29	W262	常规种/亲本	I A	78	镇粳 96	常规种/亲本	I A	127	KL90 (童)	常规种/亲本	I A
30	皖稻 84	常规种/亲本	I A	79	C4115	常规种/亲本	I A	128	Liu 矮	常规种/亲本	I A
31	绿早 1 号	常规种/亲本	I A	80	NIJR05	常规种/亲本	II A	129	创优 2 号	常规种/亲本	I A
32	滁 9507	常规种/亲本	I A	81	武运梗 14	常规种/亲本	II A	130	IR24 (尹)	常规种/亲本	I A
33	川农 1 号	常规种/亲本	I A	82	凡 7	常规种/亲本	II A	131	CO39 (尹)	常规种/亲本	I A
34	协优 009	常规种/亲本	I A	83	R18	常规种/亲本	II A	132	明 86 (夏)	常规种/亲本	I A
35	R96-2	常规种/亲本	I A	84	C418	常规种/亲本	I A	133	丰华占	常规种/亲本	I A
36	丰优 188	常规种/亲本	I A	85	HP121	常规种/亲本	I A	134	明恢 86	常规种/亲本	I A
37	中早 33	常规种/亲本	I A	86	皖恢 9 号	常规种/亲本	I A	135	五色黑米	常规种/亲本	I A
38	安育早 1 号	常规种/亲本	I A	87	7NP285	常规种/亲本	II A	136	五色红米	常规种/亲本	I A
39	早粳 2430	常规种/亲本	II A	88	XH022	常规种/亲本	II A	137	红香米	常规种/亲本	I A
40	中粳 2503	常规种/亲本	I A	89	M1148	常规种/亲本	II A	138	红米	常规种/亲本	I A
41	天香 58	常规种/亲本	I A	90	粤 B	常规种/亲本	II A	139	红米早粳	常规种/亲本	I A
42	天协 13	常规种/亲本	I A	91	R18 选	常规种/亲本	II A	140	镇粳 122	常规种/亲本	I A
43	晚粳 22	常规种/亲本	I A	92	52	常规种/亲本	I B	141	4M92	常规种/亲本	I A
44	宁粳 3 号	常规种/亲本	I A	93	2428	常规种/亲本	I A	142	8019	常规种/亲本	I A
45	早粳 788	常规种/亲本	I A	94	贵 9B	常规种/亲本	I A	143	四丰 43	常规种/亲本	I A
46	川农 2 号	常规种/亲本	I A	95	SR54	常规种/亲本	II A	144	青元矮	常规种/亲本	I A
47	糯稻 N-2	常规种/亲本	I A	96	中 9B	常规种/亲本	I A	145	春江 06	常规种/亲本	I A
48	早粳 18	常规种/亲本	I A	97	NIJR09	常规种/亲本	I A	146	8077s	常规种/亲本	I A
49	838	常规种/亲本	I A	98	II-32B	常规种/亲本	I A	147	HL514	常规种/亲本	II A

续表 1 Table 1 (continued)

编号 Number	品种 Variety	类型 Type	类群 Group	编号 Number	品种 Variety	类型 Type	类群 Group	编号 Number	品种 Variety	类型 Type	类群 Group
148	IR26	常规种/亲本	I A	181	扬两优 6 号	两系杂交稻	I A	214	天优华占	三系杂交稻	I A
149	南粳 15	常规种/亲本	I A	182	丰两优 1 号	两系杂交稻	I A	215	K 优 52	三系杂交稻	I A
150	紫稻	常规种/亲本	I A	183	广两优 76	两系杂交稻	I A	216	丰优 126	三系杂交稻	I A
151	ZH199	常规种/亲本	I A	184	徽两优 996	两系杂交稻	I A	217	丰源优 272	三系杂交稻	I A
152	GP15	常规种/亲本	I A	185	新两优香 4	两系杂交稻	I A	218	荃香优 512	三系杂交稻	I A
153	IR8	常规种/亲本	I A	186	淮两优 3 号	两系杂交稻	I A	219	广籼优 4 号	三系杂交稻	I A
154	黑米	常规种/亲本	I A	187	两优 036	两系杂交稻	II B	220	科优 16	三系杂交稻	I A
155	IR64	常规种/亲本	II A	188	两优 100	两系杂交稻	I A	221	农华优 808	三系杂交稻	I A
156	B5	常规种/亲本	I A	189	两优华 6	两系杂交稻	I A	222	冈优 1577	三系杂交稻	I A
157	五常香	常规种/亲本	I A	190	广两优 100	两系杂交稻	I A	223	新优 188	三系杂交稻	I A
158	两优 631	两系杂交稻	I A	191	丰两优 3 号	两系杂交稻	II A	224	金优 88	三系杂交稻	I A
159	广两优香 66	两系杂交稻	I A	192	新两优 98	两系杂交稻	I B	225	中优 1671	三系杂交稻	I A
160	Y 两优 1 号	两系杂交稻	I A	193	安两优 821	两系杂交稻	I A	226	协优 63	三系杂交稻	I A
161	Y 两优 9918	两系杂交稻	I A	194	常两优 2 号	两系杂交稻	I B	227	80 优 121	三系杂交稻	I A
162	深两优 865	两系杂交稻	I A	195	丰两优 80	两系杂交稻	I A	228	Ⅲ 优 98	三系杂交稻	I A
163	新华两优 9 号	两系杂交稻	I A	196	中浙优 8 号	三系杂交稻	I A	229	协优 9019	三系杂交稻	I A
164	华两优 1206	两系杂交稻	I A	197	甬优 10 号	三系杂交稻	II A	230	协优 58	三系杂交稻	I A
165	C 两优 608	两系杂交稻	I A	198	春优 84	三系杂交稻	II A	231	丰优 293	三系杂交稻	II A
166	两优 363	两系杂交稻	I A	199	浙优 18	三系杂交稻	II A	232	Ⅱ 优 107	三系杂交稻	I A
167	丰两优晚三	两系杂交稻	I A	200	钱优 0508	三系杂交稻	I A	233	庐优 855	三系杂交稻	I A
168	广两优 1128	两系杂交稻	I A	201	扬籼优 418	三系杂交稻	I A	234	怀优 4 号	三系杂交稻	I B
169	Ⅱ 优 98	两系杂交稻	I A	202	甬优 538	三系杂交稻	II A	235	新隆优 1	三系杂交稻	I A
170	科两优 889	两系杂交稻	I A	203	科优 8377	三系杂交稻	I A	236	丰晚籼优 1 号	三系杂交稻	I A
171	徽两优 5 号	两系杂交稻	I A	204	川香优 2 号	三系杂交稻	I A	237	辐优 138	三系杂交稻	I A
172	隆两优 6 号	两系杂交稻	I A	205	甬优 1540	三系杂交稻	II A	238	天优 81	三系杂交稻	I A
173	丰两优 9 号	两系杂交稻	I A	206	T 优 15	三系杂交稻	I A	239	开优 8 号	三系杂交稻	I A
174	Ⅱ 优 1256	两系杂交稻	I A	207	丰优 9 号	三系杂交稻	I A	240	中 2 优 1286	三系杂交稻	I B
175	深两优 862	两系杂交稻	I A	208	浙糯优 1 号	三系杂交稻	II A	241	新隆梗 3 号	三系杂交稻	I A
176	两优 6326	两系杂交稻	I A	209	宜优 673	三系杂交稻	I A	242	Ⅱ 优 8 号	三系杂交稻	I A
177	C 两优华占	两系杂交稻	I A	210	天优 998	三系杂交稻	I A	243	辐优 155	三系杂交稻	I A
178	丰两优香 1 号	两系杂交稻	I A	211	五优 308	三系杂交稻	I A	244	丰优 512	三系杂交稻	II A
179	徽两优 6 号	两系杂交稻	I A	212	嘉禾优 555	三系杂交稻	II A	245	辐优 136	三系杂交稻	I A
180	两优 688	两系杂交稻	I A	213	欣荣优华占	三系杂交稻	I A				

1.2 水稻功能性 InDel 标记位点的筛选

从决定水稻品种特征的性状和特点出发，选择与水稻主要农艺性状密切相关的已知重要功能基因。通过中国水稻数据中心网站（<http://www.ricedata.cn/gene/index.htm>），结合相关文献，下载整理与水稻主要农艺性状紧密连锁的功能基因（261 个）的座位（Locus）号、基因符号、相关性状、基因功能等相关数据。

1.3 InDel 位点引物设计

在 InDel 位点的上、下游各 100bp 范围内，利用 Primer 5 软件设计 PCR 扩增引物，引物对的参数要求：长度最适 20bp、最大 25bp、最小 18bp，退火温度最适 59℃、最大 62℃、最小 57℃，GC 含量最适 50%、最大 80%、最小 20%，最大自我互

补 45%，最大 3′ 自我互补 35%，最大引物对互补 45%，最大 3′ 引物对互补 35%。

1.4 纯度和真实性的试验方法

纯度和真实性的具体试验方法参考国家标准《三系杂交水稻及亲本真实性和品种纯度鉴定 DNA 分析方法（GB/T20396-2006）》^[18] 和出入境行业标准《两系水稻品种真实性和纯度鉴定 DNA 分析法》^[19]。DNA 的提取采用 CTAB 法^[20-21]，在田间种植的品种，选取抽穗期典型单株幼嫩叶片，其余品种进行室内发苗（单株提取，每品种 12 个单株），用超微量核酸蛋白检测仪测定 DNA 浓度，用 10% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳（polyacrylamide gel electrophoresis, PAGE）检测 DNA 质量，-20℃ 保存。PCR 扩增体系为 1×PCR 缓冲液，2.5mmol/L Mg²⁺，

0.25mmol/L dNTPs, 0.2μmol/L 上游引物、0.2μmol/L 下游引物, 1.0U *Taq* DNA 聚合酶, 20~40ng DNA 模板, 总体积 10μL。反应程序为 94℃ 5min, 94℃ 45s, 55℃ 45s, 72℃ 1min, 循环 30 次, 72℃ 5min, 4℃保存。

1.5 数据处理

根据 PAGE 电泳图来整理数据, 每对 InDel 引物检测 1 个位点, 所得的每一条多态性条带为 1 个等位变异, 根据每个 InDel 标记检测出的等位变异的有无进行标记, 有记为“1”, 无记为“0”。用 NTSYS 2.1 软件计算群体间的遗传相似系数^[22-23], 根据所得到的相似系数, 用非加权配对算术平均法进行聚类分析, 并绘制树状聚类图。

2 结果与分析

2.1 水稻功能性 InDel 标记位点的筛选

通过网站 <http://ricevarmap.ncpgr.cn/> 下载整理

上述功能基因内的 InDel 位点 4 670 个。然后在国家水稻数据中心网站 (<http://www.ricedata.cn/gene/>) 上进行筛选, 剔除位置或效应为内含子 (INTRON) 的非功能性位点, 保留位置或效应为上游 (UPSTREAM)、下游 (DOWNSTREAM), 非编码区 5' 端 (UTR_5_PRIME), 非编码区 3' 端 (UTR_3_PRIME), 密码子插入 (CODON-INSERTION), 密码子缺失 (CODON-DELETION), 新剪切位点 (SPLICE-SITE-ACCEPTOR), 移框 (FRAME SHIFT) 等, 且插入缺失大于 3bp 的位点, 最终获得功能性 InDel 位点 643 个, 合成相应的 InDel 引物 643 对。

从征集的水稻品种中随机选取 96 个品种的 DNA 为模板, 对 643 对 InDel 引物进行 PCR 扩增, 利用 PAGE 银染显色, 根据扩增条带的有无、可读性、清晰度和多态性, 剔除多态性低或无多态性的位点, 保留多态性高的位点, 最终筛选出扩增稳定、多态性高的 InDel 标记位点 124 个 (表 2)。

表 2 InDel 标记位点及对应的引物序列
Table 2 InDel markers and corresponding primer sequences

序号 Number	基因座位 Gene locus	InDel 位点 InDel point	性状 Character	基因 Gene	上游引物 Upstream primer (5' -3')	下游引物 Downstream primer (5' -3')
1	LOC_Os01g02890	vf0101045823	穗型	<i>sui1</i>	TCTGCCATTGACGGTTACCT	TCAGTCAAAACCAACGAGGA
2	LOC_Os01g02890	vf0101045824	穗型	<i>sui1</i>	TCTGCCATTGACGGTTACCT	TCAGTCAAAACCAACGAGGA
3	LOC_Os01g02890	vf0101046394	穗型	<i>sui1</i>	CCCCCAAAAAATATTGCAAAATGG	CAAAGAAGGGTGCTGTGCTG
4	LOC_Os01g02890	vf0101046400	穗型	<i>sui1</i>	CCCCCAAAAAATATTGCAAAATGG	CAAAGAAGGGTGCTGTGCTG
5	LOC_Os01g02890	vf0101046696	穗型	<i>sui1</i>	CGCAGGTCAAATCCTCGAAT	GTGGACAACATGAAATGGTCCA
6	LOC_Os01g02890	vf0101047729	穗型	<i>sui1</i>	AAGGATTCCTTTTGTGTATATGTCA	AGAAGGTGCTGAAGAAATGAATAA
7	LOC_Os01g08700	vf0104337406	抽穗期	<i>OsGI</i>	TTCAACCAATCCGGACCTCA	TTTCTCGCCTCTCCTTCCTC
8	LOC_Os01g08700	vf0104337480	抽穗期	<i>OsGI</i>	GGAGGAGAGAGAGAGGGAGA	GGAAATAGCGCGGCCACT
9	LOC_Os01g10110	vf0105274528	每穗实粒数	<i>Gn1a; OsCKX2</i>	ATCCTGACCTGCTCTTGCTT	ATAGGCCACCTTGTCCCTTC
10	LOC_Os01g38530	vf0121638848	抽穗期、千粒重	<i>OsEF3</i>	CGAGCTCGCTTAAATCCTTGG	TCTTTCTAGCCTTGTTCCTGCA
11	LOC_Os01g38530	vf0121641804	抽穗期、千粒重	<i>OsEF3</i>	CATCACCTTCGCCCTCTCC	TCTTCTCTTCTCGGACCTG
12	LOC_Os01g38530	vf0121641930	抽穗期、千粒重	<i>OsEF3</i>	CAGGTCGAGGAAAGGAAGGA	CCTTCGCCTTCCATTCCATG
13	LOC_Os01g39630	vf0122357349	雌性不育、雄性不育	<i>RAD51C</i>	ACTTGGGAGGTTGAGGATGG	CAACGTGCCTCATCACTCTG
14	LOC_Os01g39680	vf0122381968	花粉败育	<i>Sa; SaM2; SaF</i>	GGGATTGAAGATGCCTGCAT	TGGGTAGACGGGGAGATAA
15	LOC_Os01g39680	vf0122381972	花粉败育	<i>Sa; SaM2; SaF</i>	GTCATGCTCTTGTTCCTGTA	TGGGTAGACGGGGAGATAA
16	LOC_Os01g40630	vf0122956069	株型	<i>LOG</i>	CCTACGTAATGCAGTGGTCA	ATCGCATTTCGCTTGCCTTC
17	LOC_Os01g40630	vf0122956073	株型	<i>LOG</i>	CCTACGTAATGCAGTGGTCA	ATCGCATTTCGCTTGCCTTC
18	LOC_Os01g40630	vf0122956997	株型	<i>LOG</i>	GGCCCCAGATGCATTCAAAA	AGATTGGGGTAGGAGGAGT
19	LOC_Os01g40630	vf0122957399	株型	<i>LOG</i>	CCAAAAGCTGGGGGAGAGA	ATCATGATGTGTCGCGAGC
20	LOC_Os01g47710	vf0127287637	穗型	<i>DWT1</i>	TGCAAGATATATTAGAACCTAGCT	GCTGTACTAGTTAAGTGGCCC
21	LOC_Os01g62920	vf0136444446	落粒性	<i>qSH1</i>	TCAATCTCTATAGCCCGCA	GCGACATGGCTTGATGATCA
22	LOC_Os01g65900	vf0138261366	株高	<i>OsPH1</i>	TTTGGGAGTTTGCAGTTGTG	AAGGTCCTGATCCTGTGGAG
23	LOC_Os01g65900	vf0138264444	株高	<i>OsPH1</i>	ACGGAATGGGAAGGAGAGG	CCACTCGCTATCCCCAACCC
24	LOC_Os01g65900	vf0138264465	株高	<i>OsPH1</i>	ACGGAATGGGAAGGAGAGG	CCACTCGCTATCCCCAACCC
25	LOC_Os01g66100	vf0138384219	株高	<i>sd1; GA20ox-2</i>	GGAACGAACAGAAGCCGATT	AGCGGTAGGGTCCAAAATTG
26	LOC_Os01g70220	vf0140362882	抽穗期	<i>SDG714</i>	GGGAGTAGGAGCAGAGCAAA	TGCACTGCCAAACTTATGCA
27	LOC_Os01g72090	vf0141823973	抽穗期	<i>Se13; OsHY2</i>	CGAAGCTGACGAACCTGTGG	ACACAATACTACTTGGCACTG
28	LOC_Os01g72090	vf0141824002	抽穗期	<i>Se13; OsHY2</i>	CGAAGCTGACGAACCTGTGG	GCAGGACAGATGTGGCTAA
29	LOC_Os02g05840	vf0202882064	叶角度、抽穗期	<i>LC2; OsVIL3</i>	GTGGATCCATGGCGAATTGG	GAAGAGGAGGGGAGAGTCCA
30	LOC_Os02g07430	vf0203833298	子粒形状	<i>OsMADS29</i>	CCAGTTCACTAGTTTCAACACC	TCAATTGTTTATCGTTCTGGACA
31	LOC_Os02g10900	vf0205785307	叶色	<i>RLS1</i>	GGCGCCATCAGGTTCTACT	TAGTTGCCTCTGTGGAAGCT
32	LOC_Os02g15950	vf0209042087	穗型	<i>EP3; LP</i>	TGAGCATAAGAAGCTGAAAAGAAA	GGAGCTGAGAGGGAAGAGC

续表2 Table 2 (continued)

序号 Number	基因座位 Gene locus	InDel 位点 InDel point	性状 Character	基因 Gene	上游引物 Upstream primer (5' -3')	下游引物 Downstream primer (5' -3')
33	LOC_Os02g15950	vf0209042088	穗型	<i>EP3; LP</i>	TGAGCATAAGAAGCTGAAAAGAAA	GGAGCTGAGAGGCAAAGAGC
34	LOC_Os02g17380	vf0209993979	育性恢复基因	<i>Rf2; Rf</i>	CCACAGATCGCTGAAGGACT	ATGGGAGAGAGGAGGAAAGC
35	LOC_Os02g36974	vf0222330733	株高	<i>GID2</i>	ACTGATCAAGTCCGAGCATCA	ACAGAACAACTGCTAGGCCCT
36	LOC_Os02g39710	vf0223985186	抽穗期	<i>OsCOL4</i>	TTCTGAGGAAGGACGTACGC	TTATTCAATGTCACACGGGGC
37	LOC_Os02g49230	vf0230092882	抽穗期	<i>DTH2</i>	GGCAAGCATGATCACTGGAG	TGAGCTTCTCCGATCTTTGC
38	LOC_Os02g49230	vf0230093556	抽穗期	<i>DTH2</i>	GTAATCTAGCGCGAGGTGC	GTCGGGAGCTCAGAGTCC
39	LOC_Os02g50240	vf0230668947	株高、抽穗期、 子粒灌浆程度	<i>OsGSI; GSI; OsGSI;1; OsGLN1;1; OsGS28</i>	TAACGCAAAAGCCACGGC	CGGTACTTGTCCCATCCTGT
40	LOC_Os02g50240	vf0230669103	株高、抽穗期、 子粒灌浆程度	<i>OsGSI; GSI; OsGSI;1; OsGLN1;1; OsGS28</i>	TACACAAGAGCACCCAAACG	TGGTTGCATGCTACCACTAC
41	LOC_Os02g52710	vf0232242495	种子萌发	<i>RAmy1A</i>	CCAGTACAATCGAACCAAGCA	CCACGAAGTACTTCTCCCT
42	LOC_Os02g53690	vf0232835334	抽穗期	<i>OsGRF1; rhd1</i>	AAGAAGTGGCGGAGAGGTTT	GCCCTAGCCATTGATCTTT
43	LOC_Os02g56100	vf0234327302	叶色	<i>RNRL2</i>	AGCCATATAATTATATGACAAAATCCA	AGACGATACTACCTCCATCCCTAAAA
44	LOC_Os03g02160	vf0300718538	抽穗期	<i>Ehd4</i>	GAAGCAACTGTCAACCATGG	TACCTGCTCAACCAATCCCC
45	LOC_Os03g07510	vf0303822183	粒型、千粒重	<i>PCL1</i>	TGAGAAGGAGAAGGAGCAGC	CCGTGAAATTCCGTTGGATT
46	LOC_Os03g07530	vf0303833269	每穗粒数、子粒大小	<i>OsFBK12</i>	GGGGCAGAAGCATTAGAAGC	CGAGAAAAATCCCAACCAACC
47	LOC_Os03g12660	vf0306742028	叶角度	<i>OsDWARF4; CYP90B2</i>	GAAGGTCATCAAGGACGTGC	TAACACCGGCAGCATCTTCC
48	LOC_Os03g13370	vf0307210547	株高、穗长、 子粒大小	<i>OsAPC6</i>	CAACCGTGCATCTACCAAG	GGTGCAGAGGTAGCAGATGT
49	LOC_Os03g22510	vf0312928893	株高	<i>OsSIN</i>	CTAGTCCGGCCGTACATGAA	AGTTTCTTGTGTACGCGTG
50	LOC_Os03g44500	vf0325040498	粒型	<i>qGL3</i>	TCAATTCCGAGCCAAACAAGA	GCTGGCCAAATGGAGTTTGAT
51	LOC_Os03g57940	vf0332993034	抽穗期	<i>CKI; ELI; Hd16</i>	ATCGGCTGATGGAGATGCTC	CTGAGGCATTCATCCGCATC
52	LOC_Os04g46470	vf0427385522	株高	<i>OsCCD7; hdl1; sd-t; dit1</i>	CCATGATCTTAACCATTCGACA	TGGCTCGCAATTAAGTGTATGC
53	LOC_Os04g52479	vf0431018471	叶型	<i>Nal1; qFLW4</i>	GTGTAGTTGGTGTTCCTCCG	GAGAGTGTGGGAATCTGGGA
54	LOC_Os04g52479	vf0431018961	叶型	<i>Nal1; qFLW4</i>	GGTGCAGGACAGGTGCTATC	CAAAACAACCTACGCCCAT
55	LOC_Os04g52479	vf0431019024	叶型	<i>Nal1; qFLW4</i>	GGTGTATCTTGTGCCGTCT	AAACAAACAACCTACGCCCC
56	LOC_Os04g55560	vf0432886736	落粒性	<i>SHAT1</i>	ACTTGCCATAGCCCAACAAGG	GTCTTGGACTCTTGGCACTG
57	LOC_Os05g05240	vf0502572700	粒型、千粒重	<i>OsPPKL2</i>	TGACCGTTCACTGTTCAGTG	CTGTAGATGAGAGGCACCGG
58	LOC_Os05g06660	vf0503443553	千粒重、结实率、 粒型	<i>GS5</i>	CATTGACGAGCTGAAGCACA	GCGCAACACTGAGCTATAGC
59	LOC_Os05g09520	vf0505366461	粒型	<i>qSW5/ GW5</i>	GCCCGAACTACATGTCCAAC	CTCCACCACCACCACTC
60	LOC_Os05g50270	vf0528755831	叶型、茎秆节数	<i>NL1</i>	GATGCGGCTTCATCACCG	CGGTGGGACGACCTTGAG
61	LOC_Os06g03710	vf0601465089	株高	<i>DLT; OsGRAS-32;D62</i>	GTACAGCGGCTGGTCCAG	CATGATCGCGAGCATGTTCC
62	LOC_Os06g03710	vf0601466875	株高	<i>DLT; OsGRAS-32;D62</i>	GTGCCAAGAAGACCTCTCT	AGCCTTAGCCAGATACCAACA
63	LOC_Os06g03710	vf0601467535	株高	<i>DLT; OsGRAS-32;D62</i>	GGAGATGGAGATGCAGCCTA	TTCTTCCCTTCCCTTCCACC
64	LOC_Os06g03710	vf0601467561	株高	<i>DLT; OsGRAS-32;D62</i>	TGTTGCCCTCACCATTAACAC	TTCTTCCCTTCCCTTCCACC
65	LOC_Os06g04200	vf0601764669	淀粉	<i>wx; qGC-6; Wx-mq; Wx-op</i>	CAAATAGCCACCCACACGAC	ACAACAGAACAACAAGCAGA
66	LOC_Os06g04200	vf0601764698	淀粉	<i>wx; qGC-6; Wx-mq; Wx-op</i>	CACCCCTCTCTCACCATTC	ACAACAGAACAACAAGCAGA
67	LOC_Os06g06050	vf0602779752	株型、株高	<i>D3</i>	TATCACTTCGCTGTGTGGCT	CCATGGGCGACCTTACTC
68	LOC_Os06g06050	vf0602779803	株型、株高	<i>D3</i>	CACCTCGCTTCAACCCAAATC	CGTCAGGAAGCTCAGGATGT
69	LOC_Os06g06050	vf0602779807	株型、株高	<i>D3</i>	CACCTCGCTTCAACCCAAATC	CGTCAGGAAGCTCAGGATGT
70	LOC_Os06g06050	vf0602779824	株型、株高	<i>D3</i>	GAGTAGACGTGCGCCATGG	CGTCAGGAAGCTCAGGATGT
71	LOC_Os06g06050	vf0602780108	株型、株高	<i>D3</i>	CTGGAACACCTCGACCTCTC	GATGAAGGCGTTCTGCTCG
72	LOC_Os06g06560	vf0603085679	糊化温度	<i>OsSSI; SSSI</i>	GTGCGCATGATCCCCCT	CTCAGCCCACTCTCTCTCT
73	LOC_Os06g06560	vf0603085750	糊化温度	<i>OsSSI; SSSI</i>	AGAGAGAGGAGTGGGCTGAG	AGCGAACCAAGCTCATCCAC
74	LOC_Os06g16370	vf0609336003	抽穗期	<i>Hdl1</i>	GACGAGGAGGTGGACTCTTG	ACATGCCGTTGTTGCTGC
75	LOC_Os06g16370	vf0609336027	抽穗期	<i>Hdl1</i>	GACGAGGAGGTGGACTCTTG	ACATGCCGTTGTTGCTGC
76	LOC_Os06g16370	vf0609336033	抽穗期	<i>Hdl1</i>	GACGAGGAGGTGGACTCTTG	GATGCGGTTGCTGAGTACG
77	LOC_Os06g40780	vf0624311155	株高	<i>OsPNH1</i>	GACATTCCATCCAAGGCTGC	AGAGAGGGCAGTGAACACTC
78	LOC_Os06g40780	vf0624311160	株型	<i>MOC1</i>	GACATTCCATCCAAGGCTGC	AGAGAGGGCAGTGAACACTC
79	LOC_Os06g44034	vf0626555168	株高、分蘖数	<i>sd1; OsmiR156h</i>	CCATTGTGCTGTGTCCCTT	TGCAGAGACTTGCAGCTAGT
80	LOC_Os06g44100	vf0626592286	株高、分蘖数	<i>sd1; OsmiR156h</i>	GCTCGACGCAGAGACAT	GTTACAGACCACGCCGAC
81	LOC_Os07g11020	vf0706067072	株高、分蘖数	<i>OsTRXh1</i>	GCATCTGATGATTGTTCCCA	TCTTTCAGCACATGGTTGGC
82	LOC_Os07g11020	vf0706068130	种皮、果皮红	<i>Rc; qSD7-1;qPC7</i>	AGGTGTCCATCATCGAGAGC	GAGCTCTGCATCGCCTG
83	LOC_Os07g41200	vf0724668239	粒型	<i>GL7; GW7</i>	CTCAGGCACATCCAACTGC	CACATCTCATCTCACGCGTC
84	LOC_Os07g41200	vf0724668280	粒型	<i>GL7; GW7</i>	GAAAGCCAAGGAGCAAGCAG	CTCTCCCTCTCTCACGACA
85	LOC_Os07g41370	vf0724787521	穗型	<i>OsMADS18</i>	CCTCCCCCATTTCCATCTT	ATCTTGTTCGATCCGCCG
86	LOC_Os07g41370	vf0724787522	穗型	<i>OsMADS18</i>	CCTCCCCCATTTCCATCTT	ATCTTGTTCGATCCGCCG

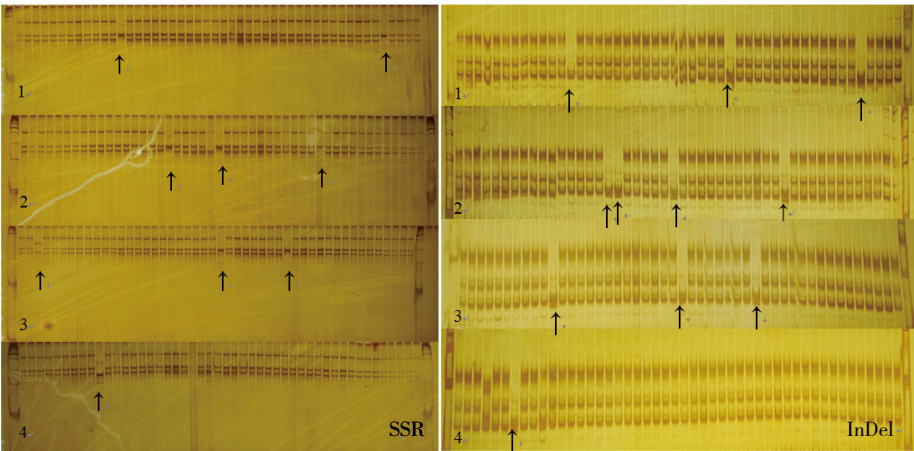
续表 2 Table 2 (continued)

序号 Number	基因座位 Gene locus	InDel 位点 InDel point	性状 Character	基因 Gene	上游引物 Upstream primer (5' -3')	下游引物 Downstream primer (5' -3')
87	LOC_Os07g41370	vf0724787544	穗型	<i>OsMADS18</i>	CCTCCCCCATTTCCATCTT	AGAAGGTCACCTGCCTGTTT
88	LOC_Os07g49460	vf0729615794	抽穗期	<i>DTH7; Ghd7.1; OsPRR37</i>	CCGCCCTCCCAATATCTAG	AAGTTACCTGCGGTTGTTG
89	LOC_Os07g49460	vf0729626365	抽穗期	<i>DTH7; Ghd7.1; OsPRR37</i>	CAAACTCAGATGCTGCACCA	GCTGTGCAGGATGAAATGCT
90	LOC_Os08g07740	vf0804332913	子粒产量、 株高和抽穗期	<i>Ghd8</i>	GTCTAAACCAATTGCACGCCA	TGATGGAGTTCCAGGGCATC
91	LOC_Os08g07740	vf0804332925	子粒产量、 株高和抽穗期	<i>Ghd8</i>	GTCTAAACCAATTGCACGCCA	TGATGGAGTTCCAGGGCATC
92	LOC_Os08g07740	vf0804334115	子粒产量、 株高和抽穗期	<i>Ghd8</i>	ACCTATGCAAAGTGAGTAGAGATT	ATCGCTGCACACATGTAAT
93	LOC_Os08g07740	vf0804334118	子粒产量、 株高和抽穗期	<i>Ghd8</i>	ACCTATGCAAAGTGAGTAGAGATT	ATCGCTGCACACATGTAAT
94	LOC_Os08g07740	vf0804334120	子粒产量、 株高和抽穗期	<i>Ghd8</i>	ACCTATGCAAAGTGAGTAGAGATT	ATCGCTGCACACATGTAAT
95	LOC_Os08g07740	vf0804334201	子粒产量、 株高和抽穗期	<i>Ghd8</i>	AACTTGTTGTTTGCATTACATGTG	TGATCATCACCTAAGATTTTTAGTCTT
96	LOC_Os08g08840	vf0805138735	淀粉合成	<i>OsGPT</i>	CTTGGGGCTCTCTACGATC	CCGCGGAAACAACAACAGAA
97	LOC_Os08g30910	vf0819086011	抽穗期	<i>SDG710</i>	CAGGCCCTGTCATAGCTGAT	CTGAGCAATCGCAACCATGA
98	LOC_Os08g31470	vf0819461558	株型	<i>PAY1</i>	CAGGTACCGTTCTCCCG	GCGAGCTTCTGGATCTGTG
99	LOC_Os08g31470	vf0819461562	株型	<i>PAY1</i>	CAGGTACCGTTCTCCCG	GCGAGCTTCTGGATCTGTG
100	LOC_Os08g31470	vf0819461571	株型	<i>PAY1</i>	CAGGTACCGTTCTCCCG	GCGAGCTTCTGGATCTGTG
101	LOC_Os08g31470	vf0819462009	株型	<i>PAY1</i>	GCTCTTCTCGTGCTTGATG	CCAGCGGAAGCAGAATCAAT
102	LOC_Os08g41940	vf0826498477	千粒重	<i>qGW8; OsSPL16</i>	CACGGAATCGAGAGTGAGGA	CGGCATCTTGAGATCCCACT
103	LOC_Os08g41940	vf0826502759	千粒重	<i>qGW8; OsSPL16</i>	AGCCACTTCTGAAGACGGTA	GAGCACTTGTGTCAACCCAC
104	LOC_Os09g02650	vf0901157494	茎秆强度、株高	<i>BC12</i>	GCATCAGTAGCACTAGCAGC	CGGAGCCAATAAGGAGGATTC
105	LOC_Os09g02650	vf0901157501	茎秆强度、株高	<i>BC12</i>	GCATCAGTAGCACTAGCAGC	CGGAGCCAATAAGGAGGATTC
106	LOC_Os09g27620	vf0916785562	不育	<i>tms9-1</i>	CCTGTGCTTCGCGATCAAC	GTGTAGCAGGTGGCCTCTG
107	LOC_Os09g27620	vf0916785573	不育	<i>tms9-1</i>	CCTGTGCTTCGCGATCAAC	GTGTAGCAGGTGGCCTCTG
108	LOC_Os09g35980	vf0920731230	分蘖角度	<i>TAC1</i>	CATCACTGGCGAGCGAATAG	CCATGCATATCCTGCACAGC
109	LOC_Os10g28330	vf1014668336	抽穗期	<i>Ehd2</i>	ACTGGTCATTGAGTTGCTGC	GCACATTGACACCTGCAGAG
110	LOC_Os10g28330	vf1014668338	抽穗期	<i>Ehd2</i>	ACTGGTCATTGAGTTGCTGC	GCACATTGACACCTGCAGAG
111	LOC_Os11g05850	vf1102731154	粒型、千粒重	<i>CycT1;3</i>	CCACAAAGTAGTGCACTTG	TGCCATTGACCCAACCTAGT
112	LOC_Os11g12740	vf1107189229	穗型	<i>SP1</i>	AACTACTACCTTTTGACTTGACCT	TGGATGTATATGAGTCCCCACC
113	LOC_Os11g12740	vf1107189401	穗型	<i>SP1</i>	ACATCCACCCTTACTAATATTTTCCA	GAGCAGCAGGAGGAGAAGG
114	LOC_Os11g12740	vf1107189651	穗型	<i>SP1</i>	CGAGGAGCCAGTAGAAGAGG	TTCTACCTCAGCTCCCTCCT
115	LOC_Os11g12740	vf1107189878	穗型	<i>SP1</i>	GTGAACATCTCGGACACGC	CGCTACCTTCTCCATGGT
116	LOC_Os11g12740	vf1107190696	穗型	<i>SP1</i>	TTTGTGATGCGGTGCACAG	GGCGGTAACCAAGAGGAAAC
117	LOC_Os11g12740	vf1107192768	穗型	<i>SP1</i>	GCGTTGAAGTAGCTCGACAG	CCTCAAGCCCAACATCATCG
118	LOC_Os11g29840	vf1116855382	株型	<i>LA1</i>	AGCGGCTTCTCACCATC	GTCTCGACGGTGAAGCC
119	LOC_Os11g29840	vf1116855390	株型	<i>LA1</i>	AGCGGCTTCTCACCATC	GTCTCGACGGTGAAGCC
120	LOC_Os11g29840	vf1116857535	株型	<i>LA1</i>	CACAGGAAAGTCTACCCCGA	CCTCATGGGATGCTCCTTCC
121	LOC_Os11g29840	vf1116857536	株型	<i>LA1</i>	CACAGGAAAGTCTACCCCGA	CCTCATGGGATGCTCCTTCC
122	LOC_Os11g29840	vf1116857537	株型	<i>LA1</i>	CACAGGAAAGTCTACCCCGA	CCTCATGGGATGCTCCTTCC
123	LOC_Os12g36030	vf1222017077	不育	<i>pms3; p/tms12-1; IncRNA; LDM</i>	GTTCATGTTGCTTCTAACC GA	AGGCTACGTACACTGCACAA
124	LOC_Os12g36890	vf1222573212	叶型、穗型	<i>OsCD1</i>	GGTGAATATCGTCCCGAGA	CCGAGTTCTGCATACAC

2.2 InDel 标记在杂交水稻种子纯度鉴定中的应用

选用 SSR 引物 RM7120 (来源于 SN/T 3402–2012), 上游引物序列为 5'–TGCCCCAAAATATATGAA ACC–3', 下游引物序列为 5'–TTTTCTTGTGAATGGG AAC–3'; 选用 InDel 标记引物 vf0121641804, 上游引物序列为 CATCACCTTCCCCCTCTCC, 下游引物序列为 TCCTTCCTTTTCTCGACCTG。先用 SSR 引物 RM7120 对样品两优 688 进行扩增, 共扩增 192 个单株, 检出 9 株生物学混杂, 纯度为 95.3%; 再利

用筛选出的 InDel 标记引物 vf0121641804 对上述品种相同单株进行 PCR 扩增分析, 共扩增 192 个单株, 检出 11 株生物学混杂 (图 1), 纯度为 94.3%。根据标准 SN/T 3402–2012 结果判读总杂株数 >4% 视为纯度不达标, 因此通过两种方法的检测均说明该品种种子纯度不达标, 而且 InDel 标记检测出来的差异位点除了 9 个与 SSR 检测结果相同以外, 还多检测出了 2 个差异位点, 说明 InDel 可以用于品种的纯度检测。



“↑”表示差异位点，下同
"↑" Indicate the difference locus, the same below

图 1 利用 SSR 标记 RM7120 和 InDel 标记 vf0121641804 检测水稻品种两优 688 的纯度
Fig.1 Detection of furification of Liangyou 688 rice variety by SSR marker RM7120 and InDel marker vf0121641804

2.3 功能性 InDel 标记在水稻品种真实性上的应用

首先用 48 对 SSR 引物进行扩增（来源于 SN/T 3402-2012），20 粒水稻种子混样提取样品 DNA，每个样品做 2 个平行，如图 2 中 SSR 所示，共 4 张图，每张图 12 个标记，每个标记 4 个单株，前 2 个单株为样品 A，后 2 个单株为样品 B。再利用筛选出的 InDel 标记中的 24 对引物，对上述样品进行单株扩增，每个标记 4 个单株，如图 2 中 InDel 所示，共 4 张图，每张图 6 个标记，每个标记 8 个单株，前 4 个单株为样品 A，后 4 个单株为样品 B。

根据样品间电泳谱带的异同，判定受检品种的真实性。SSR 标记检测结果显示，样品 A 与样品 B 间检出 12 个位点差异，品种间相似度为 75%，品种间相似度<90% 判定样品 A 与样品 B 为不同品种；InDel 标记检测结果显示，样品 A 与样品 B 之间检出 12 个位点差异，品种间相似度为 50%，品种间相似度<90% 判定样品 A 与样品 B 为不同品种，InDel 检测结果与 SSR 检测结果完全一致，说明水稻功能性 InDel 标记完全可用于水稻品种真实性鉴定。

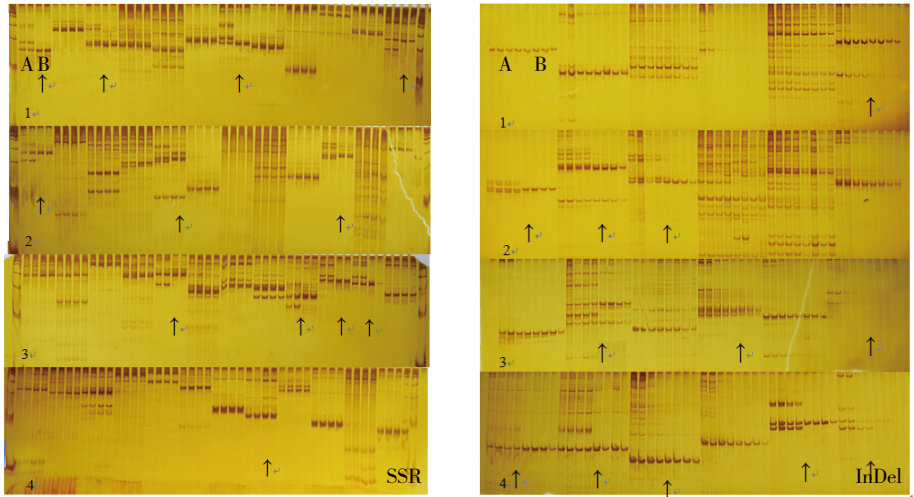


图 2 利用 SSR 标记和 InDel 标记检测水稻品种的真实性
Fig.2 Detection of authenticity of rice varieties by SSR and InDel markers

2.4 功能性 InDel 标记在水稻遗传多样性上的应用

全部 124 个 InDel 标记在 245 个品种间均检测到多态性，检测效率达 100%。为明确 245 个水稻品种的遗传组成和遗传多态性，利用 NTSYS 对供

试水稻品种进行聚类分析，结果（图 3）表明，品种间遗传相似系数为 0.53~0.95，遗传变异较小，表明供试水稻品种遗传相似性较高，遗传基础比较狭窄。以相似系数 0.53 为阈值，245 个水稻品种分为



图 3 245 个水稻品种聚类分析
Fig.3 UPGMA clustering analysis for 245 rice varieties

2个类群(I和II)。类群I包括215个品种,以杂交种为主;类群II包括30个品种,以常规种为主。类群I在遗传相似系数为0.64处可分为亚群IA和IB,亚群IB包括6个品种,主要是两系杂交种,亚群IA包含209个品种;类群II在遗传相似系数为0.65处分为亚群IIA和IIB。亚群IIB只有1个品种两优036,亚群IIA包含29个品种。聚类分析可以将这245个品种按照遗传距离的远近分成不同类群,群体结构分析表明这245个品种存在明显的群体结构,能精确区分待测品种的基因型以及品种间的遗传差异。

3 讨论

水稻是世界重要的粮食作物之一,同时也是基因组研究的模式植物。选育优良品种是保证水稻增产的物质基础,因此品种保护权的维护很关键。随着分子标记的种类和数目的不断增加,分子标记的应用领域也在不断扩大^[24-25]。目前分子标记技术除了用于水稻的基因定位以外,还广泛用在小麦^[26]、玉米^[27]、棉花^[28]以及一些蔬菜花卉的基因定位,同时也用于这些作物的分子育种以及遗传关系分析。SSR标记的开发已经成熟,在分子生物学上的应用也比较多^[29]。与SSR标记相比,InDel标记是基于基因测序基础上的新型标记^[30-31],现代测序技术的发展以及基因组数据信息的公布为InDel标记的开发提供了很好的基础。从试验结果上来看,InDel标记的扩增效果要明显好于SSR标记,其稳定性高,扩增产物的带型简单,分离效果好,用到基因诊断和遗传分析上可以大大提高其分辨率、准确性和稳定性。由于我国是水稻种植大国,水稻品种繁多,混杂现象严重,因此,鉴别供试材料的纯度和真实性是育种单位面临的一个主要问题。通过室内试验的方法鉴别之后,有必要作进一步的田间表型鉴定,才能最终确定是否为同一品种。

基因型的改变导致了物种的遗传多样性,InDel是动植物以及微生物基因变异的重要来源,在基因变异中等位基因的变异大部分是由于InDel的插入或缺失造成的,很多逆转录因子的形成与InDel有关^[32-33]。目前,大部分农作物的SSR指纹图谱已经构建,实现了分子标记的数字化,国外以及国内一些重点实验室使用毛细管电泳来构建指纹图谱,但是由于仪器设备和试剂耗材的昂贵也限制了其发展

的范围。

本试验中用到的48对SSR核心引物,是参照标准GB/T20396-2006推荐的。所以用它来作为试验的对照具有可行性。试验结果表明,筛选出的InDel引物完全可以在水稻品种纯度和真实性的鉴定上,而且其中24对核心InDel引物即可检测水稻品种的真实性,判断品种间的亲缘关系,比SSR的48对标准核心引物数量减少了一半,可以有效控制试验成本,操作上更加简便快捷,大大提高了效率。在水稻品种的纯度检测上由于扩增出来的单条带在判读杂交种上会有一些干扰,需要进一步改进优化。本试验收集的长江中下游的245个水稻品种之间的亲缘关系较近,遗传基础狭窄,原因可能是长期的人工选择和育种实践导致的,InDel可以有效检测不同品种间遗传变异,说明InDel检测方法可行,结果可靠。

4 结论

利用245个水稻品种,成功筛选出124个功能性InDel位点,利用这些位点不但可以有效地检测水稻品种纯度和真实性,还可以分析水稻品种的遗传多样性,为今后利用InDel标记及其他分子标记应用于水稻的种性鉴定提供了新的思路和方法。

参考文献

- [1]丁效华,陈跃进,杨长寿,等.水稻梗型亲籼系梗型性的判别.中国水稻科学,2003(1):22-25.
- [2]陆徐忠,从夕汉,刘海珍,等.杂交水稻亲本分子身份证及SSR指纹数据库的建立.核农学报,2012,26(6):853-861.
- [3]范方军,杨杰,王军,等.水稻条纹叶枯病的抗性与籼粳分化的相关性.中国水稻科学,2013,27(5):553-558.
- [4]黎裕,王建康,邱丽娟,等.中国作物分子育种现状与发展前景.作物学报,2010,36(9):1425-1430.
- [5]McCouch S R, Chen X, Panaud O, et al. Microsatellite marker development, mapping, and applications in rice genetics and breeding. Plant Molecular Biology, 1997, 89(35): 89-99.
- [6]郭奕生,陆俊,郭奕南.利用SSR分子标记鉴定水稻品种真实性.种子,2014,33(6):115-118.
- [7]刘丹,孙玉友,魏才强,等. InDel分子标记及其在水稻研究中的应用.种子,2017,36(9):47-52,59.
- [8]初志战,郭海滨,曾栋昌,等. 籼粳稻基因组295个InDel标记的开发.作物学报,2016,42(6):932-941.
- [9]王林友,张礼霞,勾晓霞,等. 利用InDel标记鉴定浙优系列杂交稻籼粳属性和预测杂种优势.中国农业科学,2014,47(7):1243-1255.
- [10]赵小燕,叶胜海,李小花,等. InDel标记鉴定水稻籼粳属性及预测杂种优势.浙江农业学报,2015,27(8):1309-1316.
- [11]姚国新,盛继群,李长春,等. 利用InDel标记量化中国栽培水稻微核心种质的籼粳成分.湖北农业科学,2014,53(16):3741-3745.

- [12]李亚莉,马继武,杨晓曦,等. 利用SSR分析滇型杂交稻亲本籼粳分化与杂种优势的关系. 西南农业学报, 2012, 25(2): 347–353.
- [13]李欧静,张桂华,兰青阔,等. 基于SNP标记的种子纯度高效检测分析模型的建立. 湖南农业科学, 2012(19): 9–11, 14.
- [14]闫双勇,谭振波,刘学军,等. 水稻抽穗期控制候选基因的SNP/InDel多态性分析. 分子植物育种, 2005, 3(3): 335–341.
- [15]顾渝娟,郭建英,程红梅. 单核苷酸多态性的检测及应用. 中国农学通报, 2007, 23(4): 38–41.
- [16]Lu B R, Cai X X, Jin X. Efficient indica and japonica rice identification based on the InDel molecular method; Its implication in rice breeding and evolutionary research. Progress in Natural Science, 2009, 19(10): 1241–1252.
- [17]张丹丹,周延清,杨珂. 基因特异性分子标记在植物育种中的研究进展. 湖北农业科学, 2014, 53(16): 3741–3745.
- [18]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. GB/T20396–2006, 三系杂交水稻及亲本真实性和品种纯度鉴定DNA分析方法.
- [19]中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. SN/T 3402–2012, 两系水稻品种真实性和纯度鉴定DNA分析法.
- [20]Tung C W, Zhao K Y, Wright M H, et al. Development of a research platform for dissecting phenotype–genotype associations in rice (*Oryza SPP.*). Rice, 2010, 3(4): 205–217.
- [21]陈吉宝,景蕊莲,员海燕,等. 等位基因特异PCR技术的研究与应用. 植物遗传资源学报, 2005, 6(4): 469–473.
- [22]蔡健. 应用AFLP技术检测水稻遗传多样性的研究. 中国农学通报, 2002, 18(4): 1–3, 6.
- [23]杨旺兴,许旭明,祁建民,等. 应用表型系统聚类法和SSR分子标记研究水稻亲本及籼粳衍生系遗传多样性. 福建农业学报, 2013, 28(3): 211–216.
- [24]熊发前,蒋菁,钟瑞春,等. 分子标记技术的两种新分类思路及目标分子标记技术的提出. 中国农学通报, 2010, 26(10): 60–64.
- [25]Lee Y G, Jeong N, Kim J H, et al. Development, validation and genetic analysis of a large soybean SNP genotyping array. The Plant Journal, 2015, 15(4): 625–636.
- [26]秦瑞英,许学,张立平,等. 小麦SSR指纹图谱及品种身份证的构建——基于毛细管电泳分析. 中国农学通报, 2017, 33(34): 46–55.
- [27]赵文明,王森,陈艳萍,等. 基于60个核心SSR标记的糯玉米自交系遗传多样性分析. 江西农业学报, 2018, 30(12): 1–8.
- [28]冯艳芳,曲延英,耿洪伟,等. 20份棉花品种DNA指纹图谱的构建. 作物杂志, 2015(3): 64–69.
- [29]Ramesh V K, Mauricio L R, David E, et al. Data mining for simple sequence repeats in expressed sequence tags from barley, maize, rice, sorghum and wheat. Plant Molecular Biology, 2002, 48(5–6): 501–510.
- [30]姚国新,黄文超. 利用水稻籼粳分化InDel标记鉴定育种材料的籼粳属性. 杂交水稻, 2013, 28(3): 53–57.
- [31]冯芳君,罗利军,李炎,等. 水稻InDel和SSR标记多态性的比较分析. 分子植物育种, 2005, 3(5): 725–730.
- [32]杨洁,赫佳,王丹碧,等. InDel标记的研究和应用进展. 生物多样性, 2016, 24(2): 237–243.
- [33]孙惠敏,夏米,陈清玲,等. 基于InDel分子标记的20个水稻品种的籼粳属性分析. 井冈山大学学报 (自然科学版), 2016, 37(6): 100–106.

Screening and Application of Functional Insertion-Deletion Markers (InDel) in Rice

Wang Yu, Ma Hui, Xu Xue, Qin Ruiying, Yang Jianbo, Wang Xiufeng

(Rice Research Institute, Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, Anhui, China)

Abstract The identification of the purity and authenticity of rice varieties has important significance for rice improvement and breeding. In this study, we identified 124 highly polymorphic functional insertion-deletion (InDel) loci from 643 InDel loci in rice genome using 245 rice varieties which were main pushed in the Yangtze River. We also developed an efficient detection system of InDel genotypes. We detected the purity of rice variety using InDel marker *vf0121641804* and SSR marker *RM7120* and analyzed the authenticity of rice varieties using 24 InDel markers and 48 standard SSR marker disturbing rice 12 chromosomes. Results showed that rice purity and authenticity detected using InDel marker were similar to those using SSR markers. At the same time, we analyzed the genotypes of 245 rice varieties using 124 InDel markers. The results showed that there was a distinct group structure between all surveyed samples, reflecting to the kinship between different varieties. The development of functional InDel markers provides new methods for the identification of the purity and authenticity of rice varieties and for the analysis of genetic diversity, which is also helpful to the prediction of hybrid rice with strong heterosis in molecular breeding in the future.

Key words Rice; InDel; Polymorphism site; Purity of variety; Authenticity of variety; Genetic diversity