

# 应用微卫星标记分析东乡野生稻遗传多样性初探

谢建坤<sup>1</sup>, 陈大洲<sup>1</sup>, 肖叶青<sup>1</sup>, 罗世友<sup>1</sup>, 郑康乐<sup>2</sup>, 庄杰云<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 江西省农业科学院水稻研究所, 南昌 330200; <sup>2</sup> 中国水稻研究所国家水稻改良中心, 杭州 310006)

**摘要:** 利用 SSLP 标记对东乡野生稻进行多样性分析。结果表明, 在 14 对 SSLP 标记引物中, 12 对引物扩增的产物呈现多态, 多态性探针百分率为 85.71%, 共扩增出 70 条多态性带, 平均每对引物扩增出多态性带 5.83 条, 表明东乡野生稻具有较丰富的遗传多样性。聚类分析结果表明, 东乡野生稻 9 个居群内及居群间存在一些差异较大的材料, 同时也存在一些相同或遗传距离很小的材料, 居群内平均遗传距离为 0.23 ~ 0.47, 居群间平均遗传距离为 0.40 ~ 0.55, 居群间的遗传距离略大于居群内的遗传距离, 为此, 必须对东乡野生稻现有居群进行严格的保护。

**关键词:** 东乡野生稻, 遗传多样性, 微卫星标记

## Genetic Diversity of Dongxiang Wild Rice Detected by SSLP Markers

XIE Jian-kun<sup>1</sup>, CHEN Da-zhou<sup>1</sup>, XIAO Ye-qing<sup>1</sup>, LUO Shi-you<sup>1</sup>, ZHENG Kang-le<sup>2</sup>, ZHUANG Jie-yun<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> Rice Research Institute, Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang 330200;

<sup>2</sup> National Center for Rice Improvement, China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006)

**Abstract:** Genetic diversity of Dongxiang wild rice was evaluated by using 14 SSR primer pairs. Twelve of the 14 SSR primer pairs amplified polymorphic bands. A total of 70 polymorphic DNA bands were generated with average polymorphic bands per primer pair of 5.83, indicating that the genetic diversity of Dongxiang wild rice was high. Clustering analysis showed that there were highly variant individuals within populations and among populations, while some others were highly similar with each other. Genetic distances of intrinsic-populations were 0.23 - 0.47, being smaller than the values of inter-populations which were 0.40 - 0.55. Strict measurements must be taken for the preservation of Dongxiang wild rice.

**Key words:** Dongxiang wild rice; Genetic diversity; SSLP

东乡野生稻(以下简称东野)是迄今在我国乃至全球发现的分布最北的普通野生稻,位于北纬 28°14', 东经 116°30', 属亚热带湿润气候, 分布在低丘、沼泽水沟和水塘的四周<sup>[1]</sup>。东野具有丰富的抗逆特性, 是宝贵的稻种资源。我国已将东野列为国家二级保护野生植物。研究东野遗传多样性, 有利于阐明栽培稻的起源与演变, 对保护和开发东野种质资源、改良和拓宽栽培稻的种质也具有重要意义。

微卫星标记亦称简单序列长度多态性(SSLP), 由 2~4 个核苷酸串联重复的程度差异引起。使用特异的引物对, 经 PCR 扩增和凝胶电泳可以检测到 SSLP。与依据形态性状和同工酶的标记法相比, 它能直接检测到 DNA 分子结构上的变异, 反映研究材料本质上的差异, 灵敏度高; 与其它 DNA 标记相比,

它不仅具有 RFLP 的优点, 即呈共显性、结果稳定, 而且操作简单。因此, 它在生物起源、进化和遗传变异性研究中得到了广泛的应用<sup>[2~5]</sup>。本研究应用 SSLP 对东野 9 个居群的 222 份材料进行分析, 目的是探讨东野的遗传多样性, 为东野的保护及利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1978~1982 年先后在江西东乡县发现野生稻 9 个居群的天然小群体。从这 9 个群体中按株间距离至少 5 m 随机取样, 共采集 252 株样株, 移栽于江西省农业科学院水稻研究所, 建立了东野的异位保存圃, 各样株每年均自然越冬、无性繁殖。本试验从该

异位保存圃中取样 222 份,于 2000 年种植于中国水稻研究所富阳基地。

### 1.2 SSLP 标记分析

分蘖盛期取各单株叶片分别提取水稻总 DNA<sup>[6]</sup> 稀释 20 倍作 PCR 模版。微卫星引物 MAP-PAIR SSR 购自 Research Genetics Inc。从每条水稻染色体上挑选 1 对引物,因其中 2 对引物未检测到多态性,又在相应的染色体上各挑选 1 对引物。反应体系参照厂商提供的方法,使用的扩增仪为 Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600,扩增产物在 3% 的 Metaphor 琼脂糖凝胶(FMC)上电泳。

### 1.3 数据分析

将观察到的每一条带视为 1 个性状,有带的赋

值为“1”,无带的赋值为“0”,计算每 2 份材料间的共有片段比值,按 Nei 介绍的平均距离法进行聚类分析,并绘制树状图<sup>[7,8]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 东野 SSLP 多态性

在选用的 14 对微卫星引物中,有 12 对(85.7%)在东野材料间检测到多态性,共扩增出 70 条多态性带(表 1)。各对多态性引物扩增出的多态性带数为 3~8,平均为 5.83。在东野 222 个材料中,各对多态性引物产生的带型数变幅为 3~13,平均为 8.6。

表 1 12 对 SSLP 引物扩增出的多态性带数

Table 1 Number of polymorphic bands from 12 SSLP primer

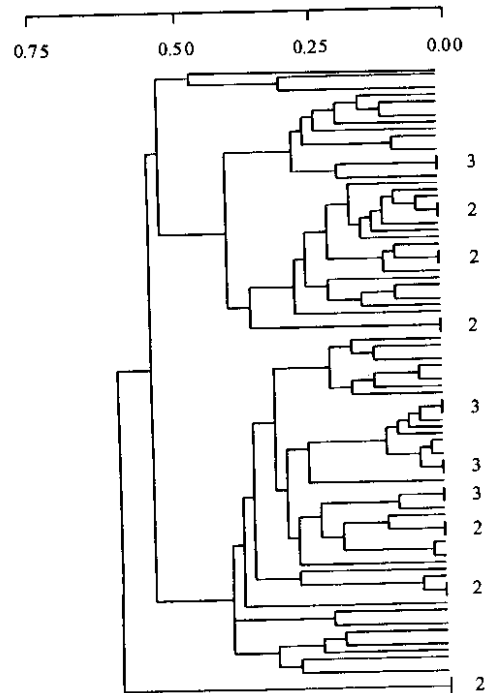
引物 Primer	多态性带数 Number of polymorphic bands	带型数 Number of band-types	引物 Primer	多态性带数 Number of polymorphic bands	带型数 Number of band-types
RM1	6	11	RM219	5	8
RM10	3	3	RM225	4	7
RM17	4	7	RM228	7	9
RM22	7	10	RM241	8	13
RM38	4	4	RM249	8	10
RM206	8	10	RM250	6	12

### 2.2 东野各居群内的遗传变异性

根据 12 对引物所检测出的多态性带,分别对东野 9 个居群(庵家山、樟塘、东塘上、东塘下、东塘、东塘西、水桃树下、林场、坝下垅)的材料进行了聚类分析。

**2.2.1 庵家山居群** 庵家山为 9 个居群中的最大居群,共含 76 份材料(图 1)。该居群材料间的平均遗传距离为 0.43,说明该居群内遗传距离较大,即多样性程度较高。不过,不同材料之间的遗传距离差异较大,其中 24 份材料分别与 1 或 2 份的遗传距离为 0,即不表现差异。该居群可分为 4 组,各组之间的遗传距离在 0.46 以上。其中,第一组(图 1 上部)和第四组(图 1 下部)仅分别包含 3 份和 2 份材料,第二和第三组则分别含 30 份和 43 份材料。第一组 3 份材料之间的遗传距离均超过 0.25,第四组的 2 份材料则不表现差异。第二、三组组内材料之间的遗传距离呈连续分布,部分材料之间遗传距离很小,甚至为 0。

**2.2.2 樟塘居群** 樟塘居群共有材料 41 份(图 2),为 9 个居群中的第二大居群。该居群材料间的平均遗传距离为 0.23,在 9 个居群中最小,说明其多样性程度不高。其中,25 份材料聚为遗传距离小于



图中的数字表示相同材料的份数。下同

Figure in dendrogram represent the same accessions. The same as below

图 1 庵家山材料聚类树状图

Fig. 1 Dendrogram of 76 accessions of Yanjiashan



图2 樟塘材料聚类树状图

Fig.2 Dendrogram of 41 accessions of Zhangtang

0.02的一组(图2中部),而其所含的4个小类别分别由遗传距离为0的2~12份材料组成。其余材料间的差异则变幅较大。

2.2.3 东塘上居群 东塘上居群共有材料40份(图3),与樟塘居群相近。其遗传多样性高于樟塘居群,而与庵家山居群相似,平均遗传距离为0.43,



图3 东塘上材料聚类树状图

Fig.3 Dendrogram of 40 accessions of Dongtangshang

具有较高多样性。同样,该居群不同材料之间的遗传距离差异较大,其中18份材料分别与1份以上材料不表现差异。该居群基本可分为2组,分别包含材料24和16份材料,组内基本呈连续分布。

2.2.4 水桃树下居群 水桃树下居群共有材料27份(图4),各材料间的平均遗传距离为0.40,且各个体间差异较大,仅有2份材料完全相同。如果以遗传距离0.50为界,可以分为3组。第一组包含材料19份(图4上部),不同材料之间遗传距离相对较小;第二、三组分别包含6和2份材料,但组内不同个体的遗传距离普遍较大。

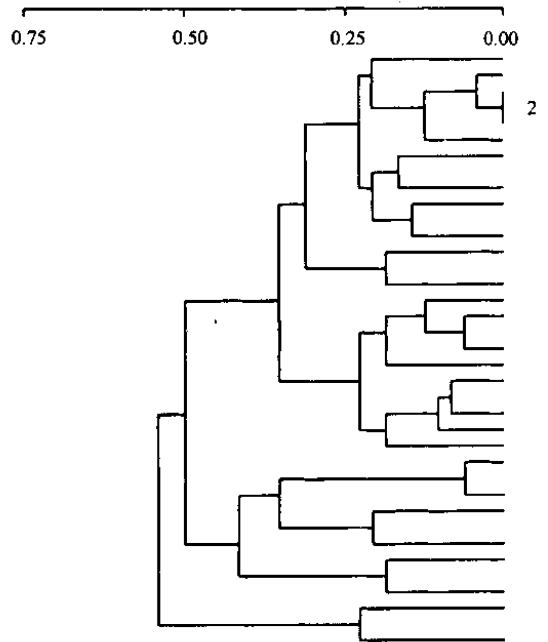


图4 水桃树下材料聚类树状图

Fig.4 Dendrogram of 27 accessions of Shuitaoshuxia

2.2.5 其余居群聚类分析 坝下垅、东塘、林场、东塘西、东塘下5个居群的材料个体数较少,分别为16、7、6、5、4份(图5)。

其中,坝下垅和东塘居群树状图呈连续分布,未发现表现一致的材料,居群内平均遗传距离各为0.43;东塘西居群的5份材料中,2份材料相同,2份材料差异较小,另1份材料独立于该两组之外,居群内平均遗传距离为0.47;林场居群的6份材料的平均遗传距离为0.25,有5份材料极为相似,但与另1份材料差异很大,遗传距离高达0.67;东塘下居群的4份材料之间的遗传距离相近,平均为0.34。从上述分析可知,在材料数较少的居群中,仍可能存在极大的遗传变异性。

2.3 东野各居群间的遗传距离分析

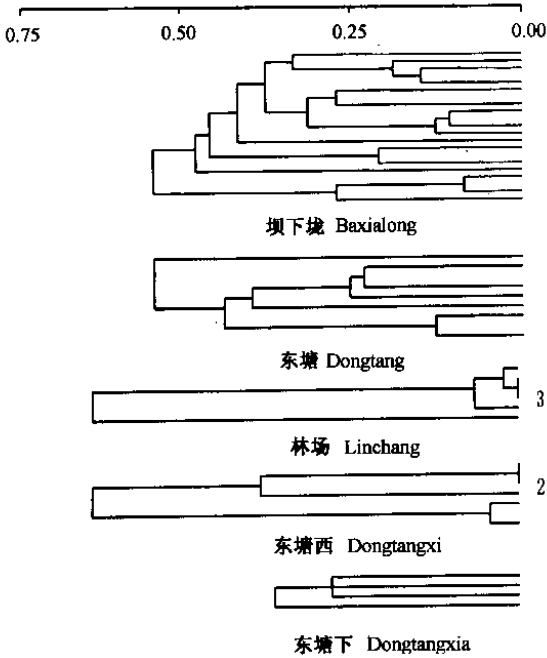


图 5 其余居群材料聚类树状图

Fig.5 Dendrogram of accessions of the other colonies

东野各居群内及居群间的遗传距离的平均值、最大值和最小值见表 2。

在各居群内,最大遗传距离为 0.43~0.88,最小遗传距离为 0~0.29,平均遗传距离为 0.23~0.47。即,同一居群的不同材料之间,遗传差异变化很大,既存在遗传差异很小、甚至完全一致的材料,也存在遗传差异较大的材料。从平均遗传距离上看,樟塘与林场居群的遗传距离明显小于其它居群的,但其最大遗传距离分别为 0.73 和 0.82,说明个别材料间的遗传差异仍然很大。

比较不同居群之间的材料,其平均遗传距离为 0.40~0.55,最大距离为 0.65~0.89,最小距离为 0~0.41。从总体上来看,居群间的遗传距离略大于居群内的遗传距离,但各居群间同样存在一些相同和遗传距离很小的材料,如东塘上与庵家山居群间存在遗传距离为 0 的材料。林场、东塘西居群虽然材料数较少,但与其它居群间的平均遗传距离相对较大(表 2),说明这 2 个居群与其它居群的差异相对较大。

表 2 各居群内及居群间的遗传距离<sup>1)</sup>

Table 2 Genetic distance of individuals in colonies and between colonies

居群 Colony		庵家山 YJS	坝下垅 BXL	东塘 DT	东塘上 DTS	东塘西 DTXi	东塘下 DTXia	林场 LC	水桃树 STS	樟塘 ZT
樟塘 ZT	平均值 Mean	0.42	0.40	0.50	0.42	0.44	0.45	0.57	0.41	0.23
	最大值 Max	0.86	0.85	0.80	0.77	0.76	0.82	0.74	0.75	0.73
	最小值 Min	0.09	0.05	0.14	0.09	0.16	0.02	0.32	0.06	0.00
水桃树 STS	平均值 Mean	0.43	0.43	0.45	0.41	0.46	0.48	0.54	0.40	
	最大值 Max	0.89	0.82	0.83	0.80	0.78	0.73	0.79	0.82	
	最小值 Min	0.07	0.05	0.06	0.08	0.24	0.07	0.29	0.00	
林场 LC	平均值 Mean	0.52	0.54	0.48	0.49	0.53	0.43	0.25		
	最大值 Max	0.79	0.76	0.83	0.80	0.82	0.84	0.68		
	最小值 Min	0.18	0.26	0.28	0.21	0.35	0.30	0.00		
东塘下 DTXia	平均值 Mean	0.47	0.45	0.43	0.43	0.55	0.34			
	最大值 Max	0.84	0.82	0.65	0.70	0.66	0.43			
	最小值 Min	0.10	0.11	0.14	0.08	0.410.29				
东塘西 DTXi	平均值 Mean	0.49	0.49	0.49	0.48	0.47				
	最大值 Max	0.76	0.68	0.73	0.67	0.68				
	最小值 Min	0.16	0.21	0.19	0.02	0.00				
东塘上 DTS	平均值 Mean	0.42	0.41	0.43	0.37					
	最大值 Max	0.79	0.83	0.66	0.71					
	最小值 Min	0.00	0.09	0.06	0.00					
东塘 DT	平均值 Mean	0.47	0.46	0.43						
	最大值 Max	0.82	0.76	0.72						
	最小值 Min	0.16	0.20	0.11						
坝下垅 BXL	平均值 Mean	0.43	0.43							
	最大值 Max	0.87	0.74							
	最小值 Min	0.07	0.07							
庵家山 YJS	平均值 Mean	0.43								
	最大值 Max	0.88								
	最小值 Min	0.00								

<sup>1)</sup> ZT :Zhangtang ;STS :Shuitaoshu ;LC :Linchang ;DTXia :Dongtangxia ;DTXi :Dongtangxi ;DTS :Dongtangshang ;DT :Dongtang ;BXL :Baxialong ;YJS :Yanjiashan

### 3 讨论

东野遗传多样性的研究已有少量报道,才宏伟等<sup>[9]</sup>用 15 个 RFLP 探针分析了来自中国 3 个普通野生稻自然群体与来自泰国、印度、印度尼西亚普通野生稻自然群体的遗传多样性,在 3 个来自中国普通野生稻自然群体中,东野就是其中之一。孙传清等<sup>[10]</sup>采用 RFLP 探针对普通野生稻和亚洲栽培稻基因组进行了研究,认为东野和湖南茶陵以及部分云南元江普通野生稻既不与籼稻聚在一起,又不与粳稻聚在一起,而独聚为一类,其形态上比较原始,属于原始祖先。黄英金等应用等位酶分析方法对东野异位保存圃材料进行多样性分析,并与云南疣粒野生稻、药用野生稻等进行多样性比较,认为东野等位酶水平的遗传多样性在稻属植物中属于较高水平<sup>[11,12]</sup>。这些研究提示了对东野全部居群的材料开展多样性分析具有重要意义。

SSLP 标记法已广泛应用于水稻遗传差异的检测分析<sup>[2,13]</sup>,笔者利用 SSLP 检测东野各个居群的遗传多样性,在使用的 14 对 SSLP 引物中,12 对的扩增产物存在多态现象,多态性频率为 85.71%,共扩增出 70 条多态性带。其中一些 SSR 引物,在东野的一些个体上扩增出 3 条以上的多态性带。对这些能在同一个体上扩增出多条带的引物,笔者试用不同的退火温度进行重复扩增,结果仍然一致,说明东野某些个体对于某些 SSR 引物具有多个结合位点。这既表明东野具有较高遗传多样性,也说明了 SSLP 是检测水稻遗传多样性的有效手段。

笔者采用多态性带数、带型数、遗传距离等资料分析东野不同居群材料的遗传多样性,并进行聚类分析。虽然从总体上看,居群间的遗传距离大于居群内的遗传距离,不同居群之间仍存在一些遗传差异很小的材料,而同一居群的部分材料则差异较小(表 2);对 222 份材料统一聚类分析,则不同居群有较大的交叉(图未列)。这些结果似乎说明东野 9 个居群的自然小群体可能是由一个大的群落逐渐通过不同的传播途径形成。这一观点有待对东野各居群进行更多的分子标记位点分析,加以佐证。

一些研究表明,许多物种正在迅速减小它们的基因库,并降低了其对环境及灾难的适应能力,从而使整个物种逐渐走向灭绝<sup>[14]</sup>。在东野 9 个居群中,有 5 个居群的材料数很少,目前形势严峻,但这些居群材料间及与其它居群间仍存在较大的变异,应该加强对东野等材料数极少的居群的保护,以免多样

性丧失。

水稻育种进展缓慢的主要原因之一是遗传基础狭窄。推广品种大多是由几个骨干亲本间的基因组合,存在着生产脆弱性的潜在危机。为实现水稻育种的突破,有赖于从野生稻中发掘有利基因。可喜的是对野生稻有利基因的研究已经取得一些进展,如产量基因<sup>[15]</sup>、抗白叶枯病基因<sup>[16,17]</sup>。笔者研究结果表明,东野具有较丰富的遗传多样性,可为改良现有栽培稻提供物质基础。在保护东野的同时,有必要加大投入,加强利用研究,应当对东野原生地居群的多样性及异位保存圃材料的多样性进行更加全面的分析研究,考察东野原生地居群多样性丢失状况,研究比较东野与栽培稻的遗传分化特征差异,制定出合理、经济的保护方案并对东野有利基因的利用提供依据。

### References

- [1] 吴妙燊主编. 中国稻种资源. 北京:中国科学技术出版社, 1990:51-55.  
Wu M S. *China Rice Germplasm*. Beijing:China Science and Technology Press, 1990:51-55. (in Chinese)
- [2] Yang G P, Saghai-Marooof M A, Xu C G, Zhang Q, Biyashev R M. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Molecular and General Genetics*, 1994:245:187-194.
- [3] Saghai Marooof M A, Biyashev R M, Yang G P, Zhang Q, Allard R W. Extraordinarily polymorphic microsatellite DNA in barley: species diversity, chromosomal location and population dynamics. *Proceeding of the National Academic Sciences, USA*, 1994:91:5:466-5:470.
- [4] 樊叶杨, 庄杰云, 吴建利, 孙宝龙, 郑康乐. 应用微卫星标记鉴别水稻籼粳亚种. 遗传, 2000:22(6):392-394.  
Fan Y Y, Zhuang J Y, Wu J L, Sun B L, Zheng K L. SSLP-based identification of subspecies in rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas*, 2000:22(6):392-394. (in Chinese)
- [5] Chen X, Tennykh S, Xu Y, Cho Y G, McCouch S R. Development of a microsatellite framework map providing genome-wide coverage in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 1997:5:553-567.
- [6] 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,(1):47-48.  
Lu Y J, Zheng K L. A simple method for isolation of rice DNA. *Chinese Journal of Rice Science*, 1992,(1):47-48. (in Chinese)
- [7] Nei M. *Molecular Evolutionary Genetics*. Columbia University Press, New York. 1987:190-191.
- [8] Sokal R R, Michener C D. A statistic method for evaluating systematic relationships. *Science Bulletin of University of Kansas*, 1958:28:1:409-1:439.
- [9] Cai H W, Wang X K, Morishima H. Genetic diversity of Chinese wild populations. 王象坤, 孙传清主编, 中国栽培稻起源与演化

研究专集. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 154 - 156.

Cai H W, Wang X K, H Morishima. Genetic diversity of Chinese wild populations. In: Wang X K, Sun C Q (ed). *Proceeding of Origin and Evolution of Chinese Cultivated Rice*. Beijing: China Agricultural University Press, 1996: 154 - 156.

- [ 10 ] 孙传清, 王象坤, 吉村 淳, 土井一行, 岩田伸夫. 普通野生稻和亚洲栽培稻核基因组的 RFLP 分析. 中国农业科学, 1997, 30(4): 37 - 44.

Sun C Q, Wang X K, Atsushi Yoshimura, Kazuyuki Doi, Nobuo Iwata. RFLP analysis of nuclear DNA common wild rice (*O. rufipogon* Griff) and cultivated rice (*O. sativa* L.). *Scientia Agricultura Sinica*, 1997, 30(4): 37 - 44. (in Chinese)

- [ 11 ] 黄英金, 李桂花, 陈大洲, 石庆华, 肖玉峰, 王锋尖, 余丽琴, 肖叶青. 东乡野生稻等位酶位点遗传多样性的初步研究. 江西农业学报, 2002, 24(1): 1 - 5.

Huang Y J, Li G H, Chen D Z, Shi Q H, Xiao Y F, Wang F J, Yu L Q, Xiao Y Q. A preliminary study on the genetic diversity of allozymic loci of Dongxiang wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.). *Acta Agriculturae Universitatis Jiangxiensis*, 2002, 24(1): 1 - 5. (in Chinese)

- [ 12 ] 高立志, 葛 颂, 洪德元, 张炯伟, 罗庆延, 陶国达, 许再富. 云南疣粒野生稻的居群遗传结构及其在原位保护中的意义. 中国科学(C 辑), 1999, 29(3): 297 - 302.

Gao L Z, Ge S, Hong D Y, Zhang J W, Luo Q Y, Tao G D, Xu Z F. Genetic structure of Yunnan wild rice (*O. meyeriana*) and its application in situ conversation. *Science in China (series C)*, 1999, 29

(3): 297 - 302. (in Chinese)

- [ 13 ] 段世华, 毛加宁, 朱英国. 用微卫星 DNA 标记对我国杂交水稻主要恢复系遗传差异的检测分析. 遗传学报, 2002, 29(3): 250 - 254.

Duan S H, Mao J N, Zhu Y G. Genetic variation of main restorer lines of hybrid rice in china was revealed by microsatellite markers. *Acta Genetica Sinica*, 2002, 29(3): 250 - 254. (in Chinese)

- [ 14 ] 王振山, 朱立煌, 刘志勇, 王象坤. 野生稻天然群体限制性酶切片段长度(RFLP)多态性研究. 农业生物技术学报, 1996, 4(2): 111 - 117.

Wang Z S, Zhu L H, Liu Z Y, Wang X K. Gene diversity of natural wild rice populations detected by RFLP markers. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 1996, 4(2): 111 - 117. (in Chinese)

- [ 15 ] Xiao J H, Grandillo S, Ahn S N, McCouch S R, Tanksley S D, Li J, Yuan L. Genes from wild rice improve yield. *Nature*, 1996, 384: 223 - 224.

- [ 16 ] Khush G S, Bacalangco E, Ogawa T. A new gene for resistance to bacterial blight from *O. longistaminata*. *Rice Genetics Newsletter*, 1990, 7: 121 - 122.

- [ 17 ] Song W Y, Wang G L, Chen L L, Kim H S, Pi L Y, Holsten T, Gardner J, Wang B, Zhai W X, Zhu L H, Fauquet C, Ronald P. The rice disease resistance gene, *Xa21*, encodes a receptor kinase-like protein. *Science*, 1995, 270: 1 804 - 1 806.

(责任编辑 孙雷心)

## 欢迎订阅 2004 年《植物遗传资源学报》

《植物遗传资源学报》是中国农业科学院作物品种资源研究所和中国农学会遗传资源分会联合主办的学术期刊, 由中国工程院院士董玉琛研究员担任主编, 2000 年创刊, 2003 年公开发行。国内刊号 CN11-4996/S, 国际标准刊号 ISSN1672-1810。报道内容: 大田作物、园艺作物、观赏植物、林用植物、草类植物、药用植物及其它一切经济植物的有关遗传资源研究结果和高水平综述或评论。诸如种质资源的考察、收集、保存、评价、利用、创新、信息学、管理学等, 以及起源、演化、分类等系统学, 基因发掘、鉴定、克隆、基因文库建立、遗传多样性研究等。介绍研究成果和学科进展, 进行学术交流, 提供可供遗传育种和农业生产利用的优异资源以及国外有关研究信息。读者对象为从事植物遗传资源科学研究以及相关学科的科技人员, 各有关大专院校的师生, 农业行政和推广人员。季刊。大 16 开, 96 页。每期定价 10.00 元, 全年 40.00 元。各地邮局均可订阅, 邮发代号 82-643。

本刊编辑部常年办理订阅手续, 如需邮挂每期另加 2 元。

地址: 100081 北京中关村南大街 12 号中国农业科学院作物科学研究所《植物遗传资源学报》编辑部。

联系电话: 010-62186657 62180279(传真)