

琼海与三亚两地普通野生稻的 SSR 标记分析

陈良兵^{1,2}, 朱美霞³

(1 广西大学 生命科学与技术学院, 广西 南宁 530004; 2 周口师范学院 生命科学系, 河南 周口 466000; 3 河北工程学院 农学院, 河北 邯郸 056038)

[摘要] 用 37 个 SSR 标记分析了新发现的琼海普通野生稻与三亚普通野生稻间的遗传关系。结果表明, SSR 位点在三亚普通野生稻居群中的变异较其在琼海普通野生稻居群中的变异高。对琼海普通野生稻与三亚普通野生稻的聚类分析发现, 两者在 0.638 5 处各聚为 1 类, 由此可知, 琼海普通野生稻和三亚普通野生稻之间具有较大的遗传分化。

[关键词] 普通野生稻; 遗传距离; 遗传分化; SSR 标记

[中图分类号] S511.902.4

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)12-0058-05

普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.) 是栽培稻的近缘祖先, 属国家 II 级保护植物^[1~4]。在野生稻漫长的进化过程中, 由于复杂的地理环境和各种生态因素的作用而形成了丰富的遗传多样性, 其中蕴藏着丰富的优异基因资源, 如抗病虫、抗逆、高效营养和高产优质、雄性不育等优异基因^[5,6]。这些优异基因正是解决目前水稻生产中诸多难题的重要物质基础和“资源宝库”。但令人担忧的是, 随着我国的现代化建设, 曾经相当丰富的普通野生稻资源正以惊人的速度在消减^[7~9]。普通野生稻主要分布在我国南方地区, 其中海南岛是我国普通野生稻的主要分布区之一, 而三亚又是海南岛普通野生稻的主要分布区。“杂交水稻之父”袁隆平和其助手在海南三亚发现了的 1 株花粉败育型普通野生稻(野败), 并将其野败基因成功转入栽培稻, 从而培育出了三系配套杂交水稻, 使我国水稻杂交育种和生产走在了世界前列, 为人类做出了巨大贡献。琼海普通野生稻居群是新近发现的一个原生境普通野生稻居群, 尚不清楚其与三亚野生稻居群有着怎样的遗传关系。近几年, 多用 RAPD 标记和酶标记对普通野生稻进行研究^[10~13], 但 RAPD 标记的稳定性和重复性差, 酶标所检测的等位基因少。SSR 标记是近几年发展较快的一种分子标记技术, 其全称为简单重复序列标记, 又称为微卫星标记(Microsatellite Marker), 具有稳定性高、重复性好及呈共显性等特性, 能揭示较高的多态性, 在种群遗传关系的研究中得到了广泛

应用^[14,15]。本研究试图利用 SSR 标记分析琼海新发现的普通野生稻与三亚普通野生稻间的遗传关系, 以为更好地保护琼海普通野生稻居群提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

随机从海南琼海普通野生稻居群和海南三亚普通野生稻居群中分别采集 11 份普通野生稻作为试验材料, 通过 SSR 位点的多态率、基因杂合性、遗传距离和聚类分析确定两地普通野生稻居群的遗传关系。

1.2 SSR 标记

本试验从水稻遗传连锁图谱上选取 37 个 SSR 标记(表 1), 除 4 号染色体上有 4 个 SSR 标记外, 其余染色体上都是 3 个 SSR 标记。SSR 标记引物由上海生工公司合成。

1.3 试验方法

普通野生稻 DNA 提取采用 CTAB 法^[16]。以普通野生稻的 DNA 为模板, 用分布于 12 条染色体上的 SSR 引物对其进行 PCR 扩增。所采用 15 μ L 的反应体系为: 9.98 μ L 无菌超纯水, 1.5 μ L 10 \times PCR buffer (500 mmol/L KCl, 100 mmol/L Tris-HCl, pH 9.0, 体积分数 1% Triton X-100), 1.0 μ L 20 mmol/L MgCl₂; 0.4 μ L dNTP (dATP, dCTP, dTTP, dGTP 各 25 mmol/L), 0.5 μ L 浓度为 4.5 μ mol/L 的正向引物和反向引物, 0.12 μ L 5 U/ μ L

[收稿日期] 2005-06-22

[作者简介] 陈良兵(1978—), 男, 河南周口人, 硕士, 主要从事野生稻资源的保护和利用研究。

Taqase (Promega 公司出品), 1.5 μL 20 ng/ μL 的模板 DNA。用 MJ Research 公司生产的 PTC-100 PCR 扩增仪对反应体系进行 PCR 扩增, PCR 扩增

程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min, 进行 35 个循环; 最后, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

表 1 试验中所用的 37 对水稻 SSR 引物

Table 1 37 pairs of rice SSR primers used in the experiment

染色体 Chromosome	水稻 SSR 引物号 No. of rice SSR primer	染色体 Chromosome	水稻 SSR 引物号 No. of rice SSR primer
1	RM5, RM140, RM237	7	RM2, RM11, RM295
2	RM18, RM48, RM166	8	RM42, RM80, RM126
3	RM114, RM143, RM293	9	RM160, RM242, RM321
4	RM127, RM131, RM185, RM280	10	RM171, RM222, RM239
5	RM26, RM163, RM169	11	RM202, RM206, RM229
6	RM3, RM111, RM162	12	RM17, RM19, RM20

PCR 扩增完成后, 将 PCR 扩增产物与 3 倍体积的上样缓冲液 (体积分数 15% 聚蔗糖-400, 体积分数 0.03% 溴酚蓝, 体积分数 0.03% 二甲苯青 FF, 体积分数 0.4% Orange G, 200 mmol/L Tris-HCl, 400 mmol/L EDTA, pH 8.0) 混合, 300 V 恒定电压下, 在体积分数 6% 非变性聚丙烯酰胺中凝胶电泳 2~3 h。最后银染显色, 统计扩增产物的带型。

1.4 试验数据的记录与处理

SSR 数据可以反映二倍体普通野生稻的遗传信息。在本试验中, 1 条染色体上的 SSR 引物以该染色体扩增产物在非变性聚丙烯酰胺凝胶上所显示的条带记为 1 个等位基因 (allele), 用 1 个阿拉伯数字表示, 所扩增条带的另外 1 个等位基因用另 1 个阿拉伯数字表示。当用同 1 对 SSR 引物扩增所有的试验材料时, 把在非变性聚丙烯酰胺凝胶上表现出相同迁移速率的 DNA 扩增带作为相同的等位基因, 用同 1 个阿拉伯数字表示。

用遗传学分析软件 TFPGA 分析 SSR 位点在琼海普通野生稻与三亚普通野生稻中的变异分布及

普通野生稻间的遗传距离, 并对普通野生稻进行聚类分析。若 1 个 SSR 位点中共同的等位基因频率不超过 99%, 即可认为此位点具有多态性。SSR 位点的多态率可按下式计算:

$$\text{位点的多态率} = \frac{\text{具有多态的位点数}}{\text{总位点数}}$$

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增结果

在本试验中, 共选用水稻基因组中 12 条染色体上的 37 对 SSR 引物, 平均每条染色体有 3 对 SSR 引物。每对 SSR 引物均可扩增出清晰可见的 DNA 带 (图 1), 其中引物 RM80 所扩增的 DNA 带长 220 bp 左右, 明显地将琼海和三亚两种普通野生稻分开。在这 37 个 SSR 位点中, 不同 SSR 位点所具有的等位基因数不尽相同, 每个 SSR 位点所具有的等位基因数为 2~7 个, 共有等位基因 107 个, 平均每个 SSR 位点有 3 个等位基因。

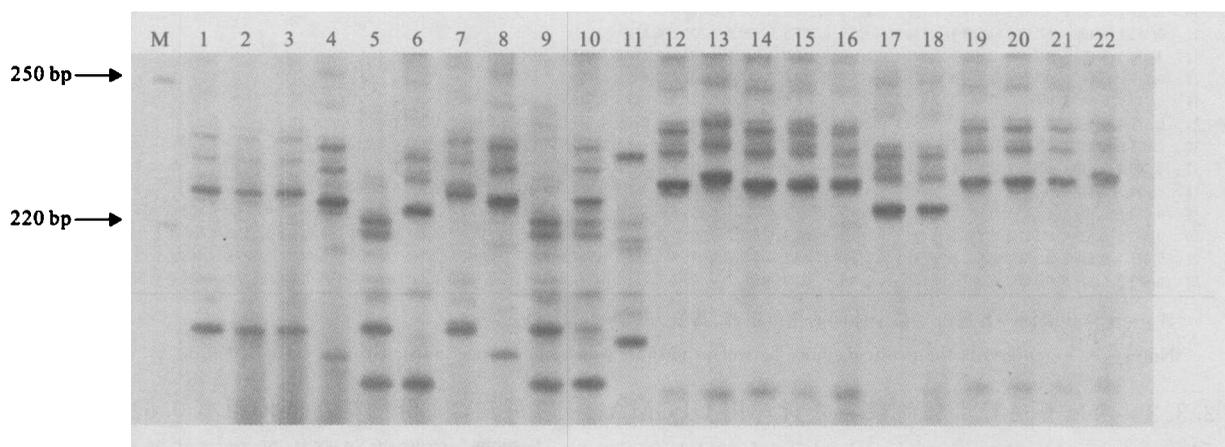


图 1 SSR 引物 RM80 在三亚和琼海普通野生稻居群中的扩增结果

M. Marker; 1~11. 三亚普通野生稻; 12~22. 琼海普通野生稻

Fig. 1 Result of PCR with RM80 in Sanya and Qionghai common wild rice populations

M. Marker; 1-11. Common wild rices from Sanya; 12-22. Common wild rices from Qionghai

2.2 SSR 位点在琼海和三亚两居群中的变异分布分析

2.2.1 SSR 位点的多态率分析 本试验表明,SSR 位点在琼海普通野生稻居群中的多态率为 81.081 1%,而在三亚普通野生稻居群中的多态率为 91.891 9%。

2.2.2 SSR 位点的基因杂合性分析 分别求得每个 SSR 位点在琼海和三亚普通野生稻居群中的观察杂合性(Direct Count Heterozygosity)及其在 Hardy-Weinberg 平衡定律条件下的理论杂合性(Expected Heterozygosity)与非偏性杂合性(Unbiased Heterozygosity)。结果表明,每个 SSR 位点在琼海普通野生稻居群和三亚普通野生稻居群中的观察杂合性、理论杂合性、非偏性杂合性不同。在琼海普通野生稻居群中,SSR 位点的观察杂合性为 0.000 0~1.000 0,其中位点 RM80, RM127 的观察杂合性为 0.000 0,位点 RM293, RM185, RM162, RM19, RM202, RM229, RM295, RM242 的观察杂合性为 1.000 0;而在三亚普通野生稻居群中,SSR 位点的观察杂合性为 0.000 0~1.000 0,其中位点 RM169 的观察杂合性为 0.000 0,位点 RM5,

RM280, RM293 的观察杂合性为 1.000 0。在琼海普通野生稻和三亚普通野生稻居群中,SSR 位点的理论杂合性分别为 0.086 8~0.500 0 和 0.165 3~0.739 7,非偏性杂合性分别为 0.090 9~0.558 4 和 0.173 2~0.774 9。观察杂合性、理论杂合性、非偏性杂合性在三亚普通野生稻居群中的平均值分别为 0.565 1, 0.444 9, 0.466 1, 较琼海普通野生稻居群的相应平均值(0.409 7, 0.205 7, 0.267 0)高。本试验结果显示,SSR 位点在两居群中存在着较高的变异,其在三亚普通野生稻居群中的变异程度较其在琼海普通野生稻居群中的高。

2.3 两地普通野生稻的遗传关系

2.3.1 普通野生稻的遗传距离分析 遗传距离反映了居群与居群之间、个体与个体之间的遗传进化关系,能反映出居群间、个体间的遗传变异程度。根据 Nei^[17]的遗传距离公式,计算出琼海和三亚普通野生稻个体之间的遗传距离如表 2 所示。由表 2 可知,琼海普通野生稻之间的遗传距离为 0.000 0~0.250 0,平均为 0.069 8;三亚普通野生稻之间的遗传距离为 0.039 0~0.630 9,平均为 0.293 4。两居群个体之间的遗传距离为 0.531 8~0.719 0。

表 2 三亚与琼海普通野生稻居群 22 个水稻个体的遗传距离方阵

Table 2 Matrix of genetic distance among 22 individuals from Sanya and Qionghai populations

个体 Individual	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22
1	***																					
2	0.039 0	***																				
3	0.491 4	0.068 9	***																			
4	0.199 2	0.129 5	0.078 3	***																		
5	0.311 2	0.281 5	0.249 9	0.176 4	***																	
6	0.409 0	0.300 5	0.418 8	0.409 9	0.299 4	***																
7	0.081 7	0.079 9	0.091 4	0.153 7	0.278 0	0.315 0	***															
8	0.284 1	0.303 3	0.293 8	0.251 3	0.359 2	0.318 3	0.187 6	***														
9	0.313 5	0.306 7	0.323 2	0.266 1	0.100 0	0.202 3	0.225 4	0.230 1	***													
10	0.326 7	0.346 0	0.336 4	0.278 3	0.199 6	0.191 2	0.249 8	0.161 9	0.109 6	***												
11	0.473 1	0.492 3	0.513 6	0.580 4	0.594 9	0.490 0	0.503 8	0.630 9	0.571 1	0.523 1	***											
12	0.690 5	0.639 5	0.564 4	0.615 5	0.647 1	0.633 7	0.587 0	0.648 9	0.639 5	0.674 0	0.592 4	***										
13	0.719 0	0.665 5	0.588 1	0.640 3	0.673 6	0.625 2	0.578 4	0.640 3	0.631 0	0.665 5	0.616 2	0.043 6	***									
14	0.719 0	0.665 5	0.588 1	0.640 3	0.673 6	0.625 2	0.578 4	0.640 3	0.631 0	0.665 5	0.616 2	0.008 5	0.035 1	***								
15	0.671 4	0.656 2	0.581 1	0.632 2	0.663 8	0.586 9	0.571 4	0.589 9	0.590 6	0.622 9	0.577 9	0.016 7	0.060 3	0.025 2	***							
16	0.698 9	0.614 6	0.541 6	0.591 7	0.621 6	0.642 1	0.563 1	0.657 3	0.647 9	0.682 4	0.600 9	0.025 5	0.052 0	0.017 0	0.042 2	***						
17	0.609 3	0.610 9	0.583 9	0.552 4	0.637 1	0.638 4	0.540 3	0.536 1	0.628 6	0.593 5	0.594 9	0.218 9	0.118 1	0.233 1	0.235 6	0.250 0	***					
18	0.672 5	0.622 7	0.548 7	0.599 3	0.596 7	0.554 9	0.538 9	0.583 3	0.558 2	0.589 9	0.576 7	0.088 6	0.043 6	0.080 0	0.086 9	0.078 6	0.218 9	***				
19	0.680 9	0.631 1	0.557 1	0.607 7	0.655 5	0.609 9	0.547 3	0.607 7	0.614 6	0.647 9	0.539 3	0.034 2	0.061 0	0.025 6	0.033 6	0.025 3	0.238 6	0.060 6	***			
20	0.663 2	0.614 6	0.541 6	0.591 7	0.638 4	0.594 1	0.531 8	0.607 7	0.598 3	0.631 1	0.569 6	0.025 5	0.052 0	0.017 0	0.025 1	0.016 8	0.227 3	0.060 6	0.008 4	***		
21	0.671 4	0.656 2	0.581 1	0.632 2	0.681 2	0.571 6	0.540 1	0.584 2	0.574 8	0.606 6	0.577 9	0.038 8	0.060 3	0.025 2	0.016 5	0.042 2	0.235 6	0.068 9	0.016 6	0.008 3	***	
22	0.663 2	0.614 6	0.541 6	0.591 7	0.638 4	0.594 1	0.531 8	0.607 7	0.598 3	0.631 1	0.569 6	0.025 5	0.052 0	0.017 0	0.025 1	0.016 8	0.227 3	0.060 6	0.008 4	0.000 0	0.008 3	***

注:***代表同一普通野生稻个体间的遗传距离,其值为 0.000 0。

Note:*** represents the genetic distance between the same wild common rice individual with value 0.000 0.

2.3.2 两地普通野生稻的聚类分析 用 UPGMA (Unweighted pair-group method with arithmetic mean, 算术平均非加权配组法)对两地的 22 份普通野生稻材料进行了聚类分析,结果如图 2 所示。由图

2 可知,22 份材料在遗传距离 0.638 5 处分为了两大类群,琼海普通野生稻和三亚普通野生稻各聚为 1 个类群。

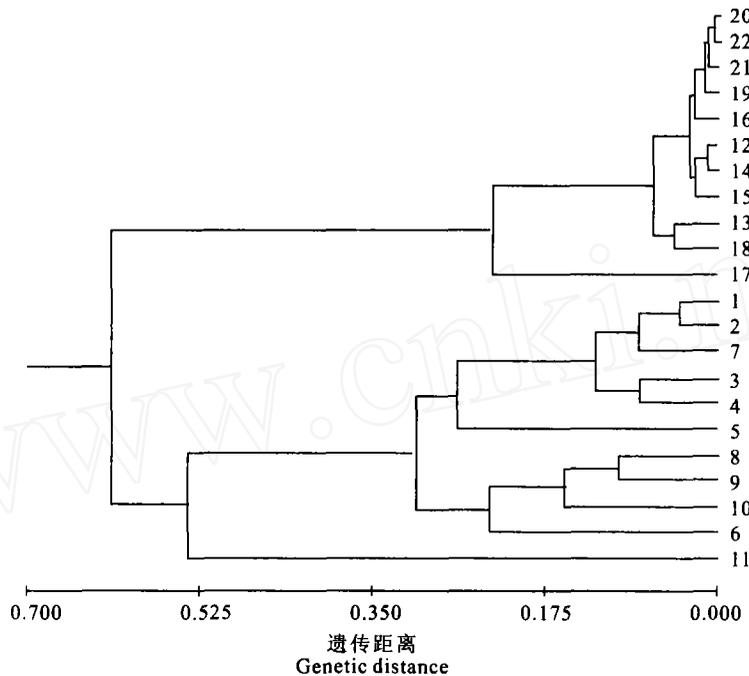


图 2 来自三亚和琼海的 22 份普通野生稻个体的聚类分析
1~11. 三亚普通野生稻; 12~22. 琼海普通野生稻

Fig. 2 Cluster analysis of 22 common wild rice individuals from Sanya and Qionghai populations
1-11. Common wild rices from Sanya; 12-22. Common wild rices from Qionghai

3 讨 论

3.1 两地普通野生稻的遗传变异

本试验利用水稻基因组中 37 个 SSR 标记在两居群中的变异分布, 分析了三亚和琼海普通野生稻居群 SSR 位点的多态率及 SSR 位点在两居群中的 3 种基因杂合性(观察杂合性、理论杂合性、非偏性杂合性)。结果显示, SSR 位点在两地野生稻中存在着较高的变异, 而且其在三亚普通野生稻中的变异程度较其在琼海普通野生稻中高, 从而表明三亚普通野生稻居群的遗传变异较琼海普通野生稻居群高。不过基因座位多态率在描述居群的遗传变异方面并不完美, 其定义带有一定的武断性, 而基因杂合性是以所有等位基因的频率为基础的, 因此, 基因杂合性较多态率更加适合居群的遗传变异评定。本试验中, 琼海与三亚两普通野生稻居群的观察杂合性分别为 0.409 7 和 0.565 1, 非偏性杂合性分别为 0.267 0 和 0.466 1, 高于 Gao 等^[12]利用等位酶所研究的普通野生稻居群的观察杂合性和非偏性杂合性。本试验结果表明, 琼海与三亚两普通野生稻居群的平均观察杂合性为 0.487 4, 平均理论杂合性为 0.325 3, 高于李桂花等^[13]利用等位酶研究的江西东乡县 9 个普通野生稻居群的平均观察杂合性

(0.148 0) 和平均理论杂合性(0.089 0)。这主要是因为 SSR 标记较等位酶标记有更多的可检测等位基因, 能够揭示更高的遗传变异^[18]。但是, 琼海与三亚两普通野生稻居群的平均理论杂合性(0.325 3) 低于杨庆文等^[19]利用 SSR 标记所研究的云南元江县 3 个普通野生稻居群的平均理论杂合性(0.50)。同时, 琼海与三亚两普通野生稻居群的遗传变异也低于余萍等^[20]利用 SSR 标记所研究的广西 32 个县(市)普通野生稻居群的遗传变异。观察杂合性、理论杂合性、非偏性杂合性结果都显示琼海与三亚两普通野生稻居群间存在着遗传分化, 并且三亚居群的遗传变异程度较琼海居群高。

此外, 本试验中所研究的两样本居群的个体数均为 11, 虽然样本居群的个体数较小, 但检测小样本居群的大量基因座位, 仍然可得到可靠的平均杂合性值^[21]。另外, 居群内个体间的遗传距离和两地普通野生稻的聚类分析结果表明, 三亚普通野生稻的遗传变异较琼海普通野生稻高。这主要是因为三亚是海南普通野生稻的主要分布区, 有大量普通野生稻分布, 相互间的影响大; 而琼海普通野生稻由于人为因素与其他普通野生稻相隔离而相对独立, 其遗传特性相对更易于保存。

3.2 两地普通野生稻的遗传分化

由聚类结果(图 2)可知,琼海普通野生稻和三亚普通野生稻各聚为一类,但两者在遗传距离为 0.638 5 处聚在一起,这表明琼海普通野生稻与三亚稻之间存在着较大的遗传分化。

琼海普通野生稻群是最近发现的一处原生境普通野生稻群,虽然其遗传变异低于三亚普通野生稻,

但两者之间存在着较大的遗传分化,并且这两地的普通野生稻居群间存在着较高的遗传变异。所以作为海南岛地区普通野生稻群的一部分,特别是在该地区许多普通野生稻居群遭到破坏、面积日益缩小的情况下,琼海普通野生稻群原生境的发现和保护,将对海南岛地区普通野生稻资源的保护及其较高遗传变异的维持具有重要的现实意义。

[参考文献]

- [1] 丁颖. 中国栽培稻种的起源及其演变[A]. 《丁颖稻作论文选集》编辑组. 丁颖稻作论文选集[C]. 北京: 农业出版社, 1983. 25-39.
- [2] 祁仲夏, 宋文芹, 金 刚, 等. 稻属基因组间相关性的 AFLP 分析[J]. 南开大学学报(自然科学), 2001, 34(3): 74-80.
- [3] 何予卿, 张 宇, 孙 梅, 等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻的亲缘关系[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 123-127.
- [4] 武 波, 韦 东, 秦学毅, 等. 野生稻和栽培稻的随机多态 DNA(RAPD)分析[J]. 广西植物, 2001, 21(4): 339-343.
- [5] 卢宝荣. 稻种遗传资源多样性的开发利用和保护[J]. 生物多样性, 1998, 6(1): 63-72.
- [6] 黄运平, 覃 瑞. 野生稻资源的研究与利用[J]. 湖北农业科学, 2002, (4): 16-19.
- [7] 洪德元. 抢救野生稻种质资源[J]. 中国科学院刊, 1995, 10(4): 325-326.
- [8] 高立志, 张寿洲, 周 毅, 等. 中国野生稻的现状调查[J]. 生物多样性, 1996, 4(3): 160-166.
- [9] 庞汉华. 建立野生稻原产地自然保护点已刻不容缓[J]. 作物品种资源, 1996, (4): 22-24.
- [10] 袁平荣, 才宏伟. 云南元江普通野生稻分化的研究. 1. 形态及酯酶, 过氧化氢同工酶分析[J]. 北京农业大学学报, 1995, 21(2): 133-137.
- [11] 王振山, 陈 洪. 中国普通野生稻遗传分化的 RAPD 研究[J]. 植物学报, 1996, 38(9): 749-752.
- [12] Gao L. Z., Ge S., Hong D. Y. Allozyme variation and population genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. in China[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101: 494-502.
- [13] 李桂花, 黎国喜, 黄英金, 等. 普通野生稻东乡群体等位酶水平的遗传多样性研究[J]. 作物学报, 2004, 30(9): 927-931.
- [14] 李显耀, 曲 鲁, 杨 宁. 利用微卫星标记分析蛋鸡配套系的遗传关系[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1351-1355.
- [15] Cote S. D., Dallas J. F., Marshall F., et al. Microsatellite DNA evidence for genetic drift and philopatry in Svalbard reindeer[J]. Mol Ecol, 2002, 11: 1923-1930.
- [16] 王 珍, 方宜钧. 植物 DNA 分离[J]. 分子植物育种, 2003, 1(2): 281-288.
- [17] Nei M. Genetic distance between populations[J]. The American Naturalist, 1972, 106(949): 283-292.
- [18] 张军丽, 王峰峰, 李鸣光, 等. 植物种群研究中的分子标记及其应用[J]. 应用生态学报, 2000, 11(4): 631-636.
- [19] 杨庆文, 戴陆园, 时津霞, 等. 云南元江普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.) 遗传多样性分析及保护策略研究[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(1): 1-5.
- [20] 余 萍, 李自超, 张洪亮, 等. 广西普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.) 表型性状和 SS 多样性研究[J]. 遗传学报, 2004, 31(9): 934-940.
- [21] Nei M., Roychoudhury A. K. Sampling variances of heterozygosity and genetic distance[J]. Genetics, 1974, 76: 379-390.

Genetic analysis on common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. from Qionghai and Sanya by using SSR marker

CHEN Liang-bing^{1,2}, ZHU Mei-xia³

(1 College of Life Science and Technology, Guangxi University, Nanning 530004, China;

2 Life Science department, Zhoukou Teaching College, Zhoukou 466000, China;

3 Agricultural School, Hebei Engineering College, Handan 056038, China)

Abstract: The genetic relationship between common wild rices from Qionghai and Sanya in Hainan were studied by using 37 SSR markers. The result of the study showed that SSRs had more genetic variability in Sanya population than that in Qionghai. Based on cluster analysis, common wild rices in Qionghai and in Sanya were clustered together respectively at 0.638 5. These results showed that a litter more genetic differentiation existed between common wild rices in Qionghai and Sanya.

Key words: common wild rice; genetic distance; genetic differentiation; SSR marker