

利用 SRAP 标记研究海南野生稻的遗传多样性与遗传分化

齐 兰¹, 王效宁¹, 张吉贞², 唐清杰¹, 孟卫东¹, 严小微¹

(¹海南省农业科学院粮食作物研究所, 海口 571100; ²海南大学, 海口 570228)

摘要: 利用 8 对多态性较好的 SRAP 引物对海南 120 份普通野生稻、55 份疣粒野生稻和 26 份药用野生稻进行扩增, 在检测到的 219 个位点中, 普通野生稻的多态性位点率为 74.89%, 疣粒野生稻为 42.47%, 药用野生稻 25.11%。Shannon 多样性指数以普通野生稻最高为 0.3277, 疣粒野生稻为 0.2044, 药用野生稻最低为 0.1113。UPGMA 聚类分析结果显示供试材料与地理来源相一致, 相关性强, 各居群个体间没有出现任何交叉。普通野生稻总群体基因多样性为 0.2135, 群体内基因多样性显著高于居群间基因多样性, 说明普通野生稻居群遗传分化不显著, 遗传多样性主要来自于居群内。基于 Nei's 基因多样度和 Shannon 多样性指数特点, 认为实施保护策略时, 优先保护遗传多样性最丰富的 WDL 和 WDA 居群。疣粒野生稻居群存在中等程度的遗传分化, 建议原生境保护; 药用野生稻居群数量较少, 建议原生境保护。

关键词: SRAP; 遗传多样性; 普通野生稻; 疣粒野生稻; 药用野生稻

Study on Genetic Diversity and Differentiation of Three Wild Rice Species in Hainan Using SRAP Markers

QI Lan¹, WANG Xiao-ning¹, ZHANG Ji-zhen², TANG Qing-jie¹, MENG Wei-dong¹, YAN Xiao-wei¹

(¹Cereal Crops Research Institute, Hainan Academy of Agricultural Sciences, Haikou 571100; ²Hainan University, Haikou 570228)

Abstract: Using SRAP markers with eight primer combinations, the genetic diversity was assessed within and among seven natural populations of wild rice species in Hainan, a total of 219 alleles were detected in 120 accessions of *Oryza rufipogon*, 55 accessions of *Oryza meyeriana*, and 26 accessions of *Oryza officinalis*, the polymorphic loci were 74.89%, 42.47%, and 25.11% respectively. Values obtained for Shannon's information index (*I*) suggested that *O. rufipogon* were 0.3277 showing the highest genetic diversity, *O. meyeriana* were 0.2204, and *O. officinalis* were 0.1113 showing the lowest diversity. UPGMA cluster analysis showed that all individuals of each population formed a distinct cluster, which according to the geographical origin, the individuals within each population of wild rice with no cross to others. The gene diversity in total set of *O. rufipogon* groups were 0.2135, and its average gene diversity was higher within than among populations, suggesting of genetic differentiation among *O. rufipogon* populations was not significant, meaning most of the genetic diversity was due to differences within populations. Based on the results of Nei's genetic diversity and Shannon's information index analysis, it was suggested that populations in WDL and WDA should be given conservation priority. In addition, *in situ* conservation should be carried out for both *O. meyeriana* and *O. officinalis* because of a moderate genetic differentiation among populations or a small population size.

Key words: SRAP; genetic diversity; *Oryza rufipogon* Griff; *Oryza meyeriana* Bail; *Oryza officinalis* Wall

海南野生稻资源丰富, 拥有我国发现的 3 种野生稻, 即普通野生稻、疣粒野生稻和药用野生稻。海

南普通野生稻最原始, 具有丰富的遗传多样性, 其遗传多样性高于广东高州、云南元江、广西、江西和湖

收稿日期: 2012-06-27 修回日期: 2012-12-07 网络出版日期: 2013-04-02

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130402.1735.010.html>

基金项目: 国家自然科学基金(30860143); 海南省科学事业费项目(10-20407-0007); 公益性行业(农业)科研专项经费(201003021)

作者简介: 齐兰, 硕士, 研究方向为种质资源。E-mail: qilan013@163.com

通信作者: 王效宁, 研究员, 主要从事稻种资源工作。E-mail: wxning2599@163.com

南等地区的普通野生稻,由于其特殊的地理条件,岛内野生稻居群的遗传结构可能有别于其他省份的野生稻居群,具有很高的开发利用价值^[1-3]。但是,近年来人为干扰和生境破坏已导致野生稻居群大量绝灭^[4],开展野生稻的遗传多样性和保护生物学研究具有重要意义,杨庆文等^[5]、L. Z. Gao 等^[6]、谢建坤等^[7]、任民等^[8]、盖红梅等^[9]的研究结果表明,我国野生稻资源的遗传多样性非常丰富。海南是我国野生稻分布密度最大的地区之一^[10],但有关海南野生稻遗传多样性研究的报道较少,而且采用的分子标记技术单一,多采用 SSR 分子标记。

SRAP 标记是 G. Li 等^[11]于 2001 年在芸薹属植物上开发出的新型分子标记技术,其原理是利用特定引物对 ORFs 区域(open reading frames)进行扩增。根据基因外显子中 GC 含量丰富,而内含子、启动子中 AT 含量丰富的特点设计特殊引物进行扩增,因不同个体、不同物种的启动子、内含子及间隔区长度不同而产生多态性。在种质资源评价和遗传多样性分析方面有广泛的应用^[12-14],近 2 年也用于杂草稻^[15]和山栏稻^[16]遗传多样性分析评价,在野生稻种质资源遗传分析中还未见相关报道。

本研究应用 SRAP 标记技术,对海南普通野生稻、药用野生稻和疣粒野生稻的遗传多样性进行系统分析,通过研究海南普通野生稻、疣粒野生稻和药用野生稻的居群内遗传变异水平、居群间的群体遗传结构,以海南 3 种野生稻资源的遗传多样性评价研究为依据,为海南野生稻的保护和开发利用提供指导。

1 材料与方法

1.1 材料

试验材料取样原则是居群面积较大、地理分布和生态类型具有一定的代表性。根据海南现存野生稻自然居群情况,普通野生稻面积较大的自然居群数量较多,而疣粒野生稻只有 2 个居群分布面积较大,药用野生稻只有 1 个居群分布面积较大,其余的为零星分布。因此,本试验最终在海南东部、西部、南部、北部各选 1 个类型差异较大的普通野生稻居群,同时选择分布面积较大的 2 个疣粒野生稻居群和 1 个药用野生稻居群为样本采集点。供试野生稻每个居群取样数量为 26~30 株(表 1),是根据王效宁等^[17]的研究结果,使采集的样本遗传多样性能最大程度地代表居群总遗传多样性,结合各居群实地情况确定的取样份数。具体方法是采取不规则网格线随机取样,各单株间的距离达 12 m 以上,共获得

201 份样本叶片。将采集到的样本叶片放入装有硅胶的自封袋,迅速干燥保存。

表 1 7 个居群取样信息

Table 1 The sampling information of different populations

物种名称 Species	居群代号 Population name	取样数量 Sample size
普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> Griff	WDA	30
	LH	30
	DH	30
	WDL	30
疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i> Baill	LJ	29
	BB	26
药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Wall	BN	26

1.2 DNA 的提取

液氮研磨干燥叶片,尽量磨至叶片粉末发白,采用 CTAB 改良法^[18]提取叶片的基因组 DNA。

1.3 SRAP 程序及 PCR 产物检测

建立和优化了野生稻 SRAP-PCR 反应的体系和条件,从 30 对可用于野生稻 SRAP-PCR 扩增的 SRAP 引物中筛选出 8 对多态性较好的引物对供试群体进行扩增,依次为:em2me2、em3me5、em2me4、em4me5、em5me2、em6me1、em6me2、em6me3。所用引物及序列见表 2。

表 2 SRAP 引物及其序列

Table 2 SRAP primers and their sequences

名称 Name	正向引物(5'-3') Forward primer(5'-3')	名称 Name	反向引物(5'-3') Reverse primer(5'-3')
me1	TGAGTCCAAACCGGATA	em1	GACTGCGTACGAATTAAT
me2	TGAGTCCAAACCGGAGC	em2	GACTGCGTACGAATTTGC
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT	em3	GACTGCGTACGAATTGAC
me4	TGAGTCCAAACCGGACC	em4	GACTGCGTACGAATTTGA
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG	em5	GACTGCGTACGAATTAAC
me6	TGAGTCCAAACCGGTAG	em6	GACTGCGTACGAATTGCA
me7	TGAGTCCAAACCGGTTG	em7	GACTGCGTACGAATTATG
me8	TGAGTCCAAACCGGTGT	em8	GACTGCGTACGAATTAGC
me9	TGAGTCCAAACCGGTCA	em9	GACTGCGTACGAATTACG
me10	TGAGTCCAAACCGGTAC	em10	GACTGCGTACGAATTTAG

扩增反应体系为 25 μL ,含 10 \times Buffer(含 Mg^{2+}) 2.5 μL 、10 mmol/L dNTP 0.2 μL 、ddH₂O 20 μL 、引物(10 μM)各 0.6 μL 、*Taq* 酶 0.1 μL 、模板 DNA(1.2 ng/ μL)1 μL 。扩增程序为 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min;94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 1 min,35 $^{\circ}\text{C}$ 复性 1 min,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min,35 个循环;最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。

PCR 产物每管中加入 2 μL 上样缓冲液(98% 的去离子甲酰胺,10 mmol/L EDTA,0.025% 二甲苯青 FF,0.025% 溴酚兰,25 μL 甘油)混匀,在 95 $^{\circ}\text{C}$

下变性 5 min,取 5 μ L 做 6% 变性的聚丙烯酰胺电泳,电泳后银染分析^[19]。

1.4 数据处理与分析

清晰的 SRAP 条带记为 1,无带记为 0。用生物统计学软件 NTSYS-2.10 计算相似系数,运用 UPGMA(unweighted pair-group method arithmetic average) 聚类分析。根据 Nei-Li 相似系数法求得 i 和 j 之间的相似系数 S_{ij} , $S_{ij} = 2N_{ij} / (N_i + N_j)$, 其中 N_i 表示样本 i 中的条带数目, N_j 表示样本 j 中的条带数目, N_{ij} 表示样本共有的条带数目。然后用类平均法对其进行聚类,生成聚类分析树状图,评价群体的遗传多样性^[20]。利用 Popgen 32 软件分析遗传多样性参数:多态性位点百分率 P 、等位基因数 N_a 、有效等位基因数 N_e 、Nei's 基因多样性 H 、Shannon 多样性指数 I 、居群间基因多样性 D_{st} 、基因分化系数 G_{st} 、基因流 N_m 等。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性相关指标的比较

2.1.1 多态性 利用正反引物随机组合筛选出来 8 对多态性较好的引物,对 201 份材料进行扩增,共扩增出 219 个位点。不同野生稻居群的多态性位点数与多态性位点的比率不同,其中普通野生稻最高,在所检测的 219 个位点中,164 个位点具有多态性,多态性位点率达 74.89%;其次是疣粒野生稻,多态性位点率为 42.47%;药用野生稻最低,多态性位点率仅为 25.11%。

2.1.2 野生稻自然居群的遗传分类 用 NTSYS-2.10 软件计算 201 份野生稻居群材料的遗传相似系数,获得了遗传相似系数矩阵 (GS), GS 值变化范围为 0.554 ~ 1.000。根据遗传相似系数,用 UPGMA 法进行分析,得到聚类分析树状图(图 1)。在

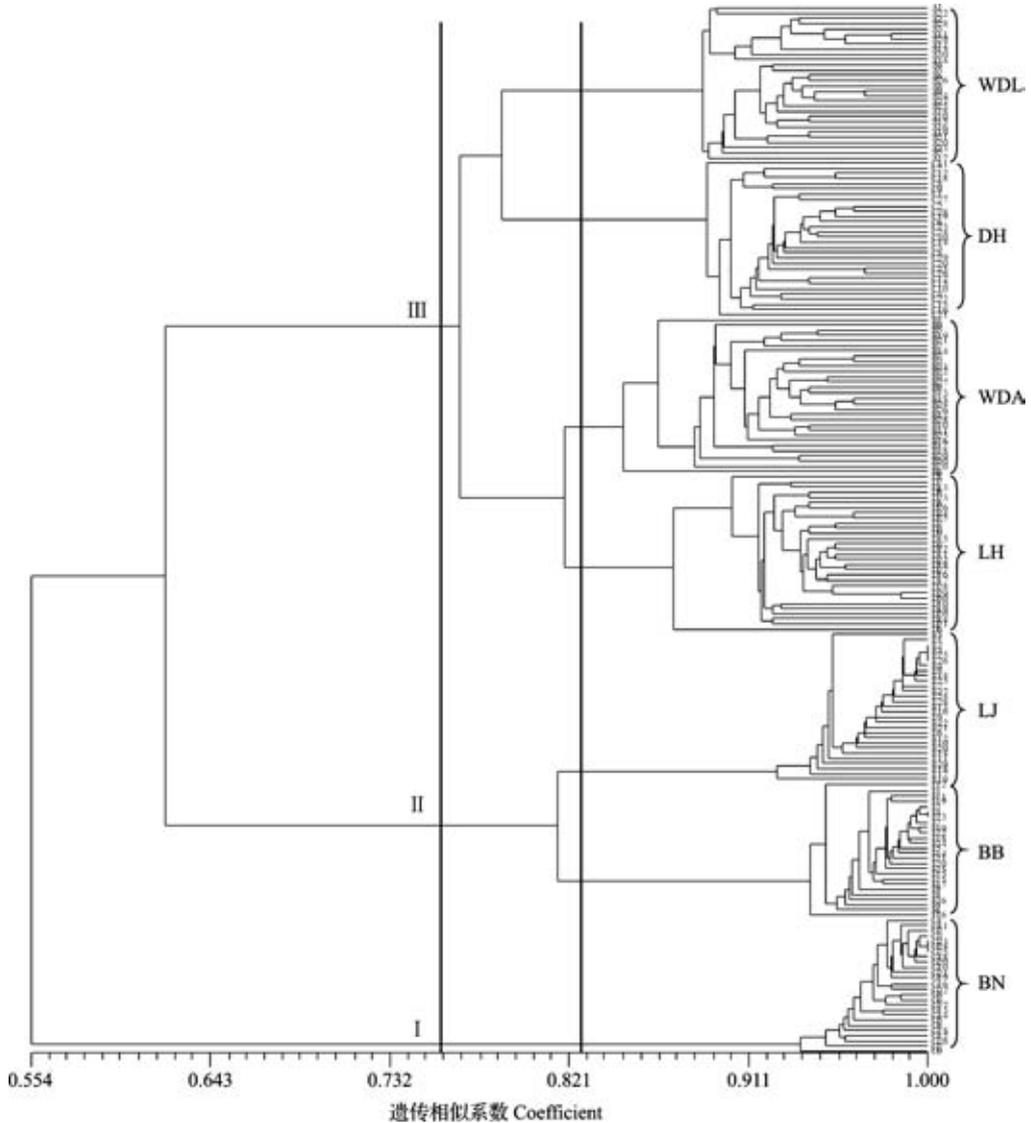


图 1 基于 SRAP 标记对 7 个野生稻居群材料聚类分析树状图

Fig. 1 UPGMA dendrogram based on SRAP showing genetic relationships for seven wild rice populations

相似系数 0.758 处,野生稻分为 3 个类群,分别为普通野生稻、疣粒野生稻和药用野生稻。在相似系数 0.830 处,可将 7 个居群完全区分开,普通野生稻有 4 个分支,其中 WDA 和 LH 居群遗传关系较近,WDL 和 DH 居群亲缘关系较近。疣粒野生稻有 2 个分支,分别来自 LJ 和 BB。药用野生稻独自成为 1 个分支。聚类分析结果与地理来源相关性较强。

2.2 基于 SRAP 标记的遗传多样性参数估计

利用 Popgen 32 软件计算野生稻居群内和整体的遗传多样性指数,详见表 3。

表 3 SRAP 标记估算野生稻居群内的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters within wild rice populations estimated by SRAP

居群 Population	样本数 Sample size	等位基 因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Nei's 基因 多样性 H	Shannon 多 样性指数 I
WDL	30	1.4932	1.2309	0.1491	0.2317
DH	30	1.5068	1.2175	0.1403	0.2206
WDA	30	1.5662	1.227	0.1475	0.2336
LH	30	1.4612	1.1980	0.1300	0.2051
普通野生 稻总居群	120	1.7489	1.3507	0.2135	0.3277
LJ	29	1.3105	1.1267	0.0841	0.1332
BB	26	1.2557	1.1052	0.0684	0.1075
疣粒野生 稻总居群	55	1.4247	1.2366	0.1363	0.2044
BN	26	1.2511	1.1086	0.0710	0.1113
总居群 Overall	201	1.9909	1.4719	0.2874	0.4415

结果表明:野生稻总群体的等位基因数为 1.9909,有效等位基因数为 1.4719,Nei's 基因多样性为 0.2874,Shannon 多样性指数为 0.4415。3 种野生稻的遗传多样性以普通野生稻最高,其 Shannon 多样性指数为 0.3277,其次是疣粒野生稻为 0.2044,药用野生稻最低。野生稻遗传多样性以总群体的 Shannon 多样性指数最高,均高于普通野生稻、疣粒野生稻和药用野生稻,说明任何一种野生稻都不能代表全省野生稻的遗传多样性水平。

2.3 SRAP 标记探测野生稻居群间的遗传分化

运用 Popgen 32 软件计算不同居群间的遗传分化系数及基因流,结果详见表 4。普通野生稻总群体的基因多样性为 0.2135,群体内基因多样性为 0.1417,居群间基因多样性为 0.0718,说明遗传多样性主要来自于居群内;基因分化系数为 0.3361,说明普通野生稻居群遗传分化不显著。疣粒野生稻基因分化系数为 0.4395,大于普通野生稻。野生稻

总居群基因分化系数为 0.6104,表明总的遗传变异中有 61.04% 的变异存在于居群间。基因流为 0.3192,说明总居群间的基因交流程度较小。

表 4 居群间的遗传分化及基因流

Table 4 Coefficient of gene differentiation and gene flow among wild rice populations using SRAP

居群 Population	样本数 Sample size	总群体		群体内		居群间		基因分 化系数	基因流 N_m
		基因多 样性 H_t	基因多 样性 H_s	基因多 样性 D_{st}	基因多 样性 G_{st}				
普通野生稻居群	120	0.2135	0.1417	0.0718	0.3361	0.3361	0.9876		
疣粒野生稻居群	55	0.1360	0.0762	0.0598	0.4395	0.4395	0.6378		
药用野生稻居群	26	0.0710	0.0710						
总居群 Overall	201	0.2898	0.1129	0.1769	0.6104	0.6104	0.3192		

2.4 居群间遗传关系

应用 Popgen 32 软件计算 7 个居群间的遗传一致度和遗传距离参数,详见表 5。由表 5 可知,WDL 和 BN 的遗传距离最大(0.4425),而遗传一致度最小(0.6424);WDL 和 DH 的遗传距离最小(0.1077),而遗传一致度最大(0.8979)。遗传距离反映了居群亲缘关系的远近,遗传一致度和遗传距离分别是相同和相反方面度量群体间遗传关系的指标,遗传距离大,遗传一致度小,材料间的亲缘关系就比较远。

表 5 居群间遗传一致度(右上角)和遗传距离(左下角,Nei (1978))

Table 5 Nei's genetic identity (above diagonal) and genetic distance (below diagonal).

居群 Population	WDL	DH	WDA	LH	LJ	BB	BN
WDL		0.8979	0.8766	0.8769	0.7303	0.6967	0.6424
DH	0.1077		0.8631	0.9058	0.7608	0.7296	0.6811
WDA	0.1317	0.1473		0.9256	0.7623	0.7239	0.6562
LH	0.1313	0.0989	0.0773		0.7960	0.7392	0.6828
LJ	0.3143	0.2734	0.2715	0.2282		0.8720	0.6447
BB	0.3613	0.3153	0.3231	0.3022	0.1370		0.7247
BN	0.4425	0.384	0.4212	0.3816	0.439	0.3220	

3 讨论

3.1 利用 SRAP 标记检测遗传多样性的有效性

目前野生稻遗传多样性研究主要应用 SSR 标记技术,而 SSR 引物主要来自于栽培稻,与普通野生稻同为 AA 基因组;但疣粒野生稻(GG)与药用野生稻(CC)均为非 AA 基因组,简单重复序列可能出现较少,应用 SSR 标记研究疣粒野生稻与药用野生

稻的遗传多样性可能存在一定的难度^[21]。因此应用 SRAP 标记技术比较研究海南 3 种野生稻,是科学评价其遗传多样性水平的关键。

根据本研究所用引物检测到的 219 个位点,普通野生稻最高,多态性位点率达 74.89%;其次是疣粒野生稻,多态性位点率为 42.47%;药用野生稻最低,多态性位点率仅为 25.11%;其中疣粒野生稻和药用野生稻的多态性位点率均远高于 SSR 标记的检测结果^[21],可见 SRAP 标记完全可以应用于野生稻的遗传多样性分析研究,这是 SRAP 分子标记技术首次应用于野生稻的遗传多样性研究中。

3.2 海南 3 种野生稻的遗传多样性比较

根据研究结果,海南 3 种野生稻的遗传多样性指标都是普通野生稻最高,疣粒野生稻和药用野生稻低且接近,与前人的研究结果一致^[22-23]。根据孙希平等^[21]的研究结果:疣粒野生稻和药用野生稻均为严格的自花授粉植物,基本不存在通过花粉传播引起的基因交流,居群间和居群内的遗传变异主要来自基因突变,而普通野生稻存在着较高的异交率,居群内基因交流较频繁,与本次的研究中普通野生稻居群的基因流动最高相一致,所以,普通野生稻的遗传多样性显著高于另外 2 种野生稻。在本研究中,疣粒野生稻和药用野生稻的居群数和样本数都少于普通野生稻,这对于 3 种野生稻遗传多样性比较结果的准确度可能有一定影响。

3.3 海南 3 种野生稻的保护策略

对于 4 个普通野生稻群体,群体内基因多样性为 0.1417,显著高于居群间基因多样性 0.0718,说明普通野生稻居群总的遗传多样性主要来自居群内,基因分化系数为 0.3361,说明居群间的遗传分化并不显著。基于 Nei's 基因多样性和 Shannon 多样性指数等指标衡量的遗传丰富度特点,认为实施保护策略时,优先保护遗传多样性最丰富的 WDL 和 WDA 居群。

疣粒野生稻基因分化系数为 0.4395,表明总的遗传变异中有 43.95% 的变异存在于居群间,居群间遗传分化较高,疣粒野生稻多态性位点率为 42.47%,多态性位点较丰富,建议 2 个疣粒野生稻居群均采取原生境保护。药用野生稻居群内个体间亲缘关系很近,与孙希平等^[21]研究的结果一致,因此,如果开展药用野生稻的异位保存,只需取较少个体就能代表居群的遗传多样性水平,鉴于药用野生稻所发现的居群数量极少,且此居群面积较大,建议开展原生境保护。

参考文献

- [1] 王效宁,韩东飞,云勇,等. 利用 SSR 标记分析海南普通野生稻的遗传多样性[J]. 植物遗传资源学报,2007,8(2): 184-188
- [2] 杨庆文. 中国普通野生稻的遗传多样性及其保护研究[D]. 北京:中国农业大学,2004
- [3] 王美兴,张洪亮,张冬玲,等. 中国普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff)的地理多样性与分化[J]. 科学通报,2008,53(22): 2768-2775
- [4] 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
- [5] 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
- [6] Gao L Z, Schaal B A, Zhang C H. Assessment of population genetic structure in common wild rice(*Oryza rufipogon* Griff) using microsatellite and allozyme markers[J]. Theor Appl Genet,2002, 106:173-180
- [7] 谢建坤,陈庆隆,肖叶青,等. 东乡野生稻核基因组 SLP 分析[J]. 江西农业学报,2002,14(3):1-6
- [8] 任民,陈成斌,荣廷昭,等. 桂东南地区普通野生稻遗传多样性研究[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(6):1-8
- [9] 盖红梅,陈成斌,沈法富,等. 广西北流江流域普通野生稻居群遗传多样性及保护研究[J]. 植物遗传资源学报,2005,6(2):156-162
- [10] 庞汉华,应存山. 中国野生稻的种类、地理分布与研究利用. [M]//应存山. 中国稻种资源. 北京:中国农业出版社,1993:25-26
- [11] Li G, Quiros C F. Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in *Brassica*[J]. Theor Appl Genet,2001,103:455-461
- [12] Wang Z Y, Yuan X J, Zheng Y Q, et al. Molecular identification and genetic analysis for 24 turf-type *Cynodon* cultivars by sequence-related amplified polymorphism markers[J]. Sci Hort, 2009,122:461-467
- [13] Liu L W, Zhao L P, Gong Y Q, et al. DNA fingerprinting and genetic diversity analysis of late-bolting radish cultivars with RAPD, ISSR and SRAP markers[J]. Sci Hort, 2008, 116: 240-247
- [14] 齐兰,王文泉,李开锦,等. 木薯种质资源的遗传多样性分析与评价[J]. 热带作物学报,2010,31(10):1661-1668
- [15] 刘丹,孙健,马殿荣,等. 利用 SRAP 分子标记分析 47 份杂草稻样品遗传多样性[J]. 中国水稻科学,2012,26(1):70-76
- [16] 王英,庄南生,高和琼,等. 海南山栏稻种质 SRAP 标记的遗传多样性分析[C]. 成都:中国作物学会,2011:97
- [17] 王效宁,杨庆文,云勇,等. 普通野生稻居群异位保护取样策略研究[J]. 中国农学通报,2010,26(7):303-306
- [18] Kidwell K K, Osborn T C. Simple plant DNA isolation procedures [M]//Beckman J, Osborn T C. Plant genomes: methods for genetic and physical mapping. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers,1992:1-13
- [19] 张吉贞,马晓磊,王效宁,等. 水稻 SRAP-PCR 体系的建立与优化[J]. 云南大学学报,2008,30(S1):421-425
- [20] Nei M, Li W H. Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases[J]. Proc Natl Acad Sci USA,1979,76:5269-5273
- [21] 孙希平,杨庆文,李润植,等. 海南 3 种野生稻遗传多样性的比较研究[J]. 作物学报,2007,33(7):1100-1107
- [22] 钱韦,葛颀,洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报,2000,42(7):741-750
- [23] Qian W, Ge S, Hang D Y. Genetic variation within and among population of a wild rice *Oryza granulata* from China detected by RAPD and ISSR markers[J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 440-449