

# 基于 SSR 和 ISSR 的鄱阳湖流域 野生菘资源的遗传多样性分析

王惠梅<sup>1</sup>, 吴国林<sup>2,3</sup>, 江绍琳<sup>3</sup>, 黄奇娜<sup>1</sup>, 奉保华<sup>1</sup>, 黄长干<sup>3</sup>, 江绍玫<sup>2</sup>, 吴建利<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>中国水稻研究所, 杭州 310006; <sup>2</sup>江西财经大学, 南昌 330045; <sup>3</sup>江西农业大学, 南昌 330045)

**摘要:**用 SSR 和 ISSR 标记对鄱阳湖流域 30 个野生菘居群的遗传多样性与遗传结构进行了分析。筛选出的 19 对 SSR 引物共扩增出多态性条带 253 条, 平均多态性条带比率(PPB)为 91.67%, Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )和平均 Shannon 信息指数( $I$ )分别为 0.2712 和 0.4144, 遗传相似性系数(GS)为 0.5590~0.8368, 遗传距离(GD)的变化范围为 0.1632~0.4410; 筛选出的 14 个 ISSR 标记引物共扩增出 83 条条带, 平均多态性条带比率(PPB)为 78.29%, Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )和平均 Shannon 信息指数( $I$ )分别为 0.2386 和 0.4174, 遗传相似性系数(GS)为 0.5132~0.9342, 遗传距离(GD)变化范围为 0.0658~0.4868。根据 SSR 和 ISSR 基因型数据, 采用 UPGMA 法分别在阈值为 0.698 和 0.728 时可将 30 个野生菘居群聚为 3 类。可能受人为、水流、动物活动、风等多种因素的影响, 居群间的亲缘关系与地理分布无明显相关性。本研究表明, 鄱阳湖流域野生菘居群间 SSR 和 ISSR 基因型的多样性丰富, 居群间的这种遗传差异或变异, 对该地区乃至更大范围内野生菘的遗传进化、基因资源的开发利用和种质资源的保护有着重要意义。

**关键词:**菘; 居群; 遗传多样性; SSR 标记; ISSR 标记

## Genetic Diversity of *Zizania latifolia* Griseb. from Poyang Lake Basin Based on SSR and ISSR Analysis

WANG Hui-mei<sup>1</sup>, WU Guo-lin<sup>2,3</sup>, JIANG Shao-lin<sup>3</sup>, HUANG Qi-na<sup>1</sup>,  
FENG Bao-hua<sup>1</sup>, HUANG Chang-gan<sup>3</sup>, JIANG Shao-mei<sup>2</sup>, WU Jian-li<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>China National Rice Research Institute, Hangzhou 310006; <sup>2</sup>Jiangxi Financial University, Nanchang 330045;

<sup>3</sup>Jiangxi Agricultural University, Nanchang 330045)

**Abstract:** Genetic diversity of 30 local wild rice populations of *Zizania latifolia* collected from the Poyang Lake valley was investigated using SSR (simple sequence repeat) and ISSR (inter-simple sequence repeat) markers. 253 bands were generated from 19 pairs of informative SSR primers with an average polymorphism percentage bands (PPB) of 91.67%. The average index of Nei's genetic diversity ( $H_e$ ) and Shannon's information ( $I$ ) were 0.2712 and 0.4144, respectively. The genetic similarity index (GS) and genetic distance (GD) ranged from 0.5590–0.8368 and 0.1632–0.4410, respectively. In comparison, with 14 informative ISSR primers, 83 bands were amplified with an average PPB of 78.29%. The average of  $H_e$  and  $I$  were 0.2386 and 0.4174, respectively. The GS and GD ranged from 0.5132–0.9342 and 0.0658–0.4868, respectively. Cluster analysis showed that 30 wild populations of *Z. latifolia* could be classified into three groups respectively at the threshold of 0.698 and 0.728 based on SSR and ISSR genotypes using the UPGMA analysis. There was no significant association between the phylogenetic relationship and the geographic locations in the *Z. latifolia* populations which might be due to human activity, water flow, animal

收稿日期: 2014-03-09 修回日期: 2014-05-23 网络出版日期: 2014-12-11

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20141211.2217.013.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31160271); 江西省科技支撑项目(20133BBF6005)

第一作者从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: wangyingkai2006@126.com

通信作者: 江绍玫, 从事水稻分子遗传研究。E-mail: shmjiang111@aliyun.com

吴建利, 从事生物化学与分子生物学研究。E-mail: beishangd@163.com

activity, wind, etc. The results indicated that the wild populations of *Z. latifolia* from the Poyang Lake valley had a rich genetic diversity in SSR and ISSR genotype and thus it was of great importance to explore genetic evolution and gene resources and to preserve the local *Z. latifolia* populations in this area and expanded area.

**Key words:** *Zizania latifolia*; populations; genetic diversity; SSR marker; ISSR marker

菰属 (*Zizania* Linnaeus) 植物共有 4 个种<sup>[1]</sup>, 分别为水生菰 (*Z. aquatic*)、沼生菰 (*Z. palustris*)、流水菰 (*Z. texana*)<sup>[2]</sup> 和菰 (*Z. latifolia*)<sup>[2-3]</sup>。我国仅有菰一个种, 主要在湖边、池塘、沼泽等浅水地区成簇或成片生长<sup>[4]</sup>。从周朝开始我国就把菰当作粮食和药用植物, 民间又将菰称为茭草、蒿草、菰蔺草、神草、扁担草和鞭子草<sup>[5-6]</sup>。菰是水稻的近缘属, 具有生物量大、抗病虫、耐寒等许多优良性状, 近年来被许多研究学者作为水稻育种优良基因资源库的重要来源<sup>[7-8]</sup>。鄱阳湖是我国最大的淡水湖, 生长着许多宝贵的生物资源, 已被列入国际重要湿地名录<sup>[9]</sup>。菰是鄱阳湖流域生长丰富的典型水生植物之一, 在整个流域地区都有着广泛分布<sup>[10]</sup>。

理想的遗传标记应具有对基因组取样无偏离、共显性、对变异的检测分辨率高以及不受环境条件直接影响等特点<sup>[11]</sup>。简单重复序列 (SSR, simple sequence repeat), 又称微卫星 (microsatellites), 在基因组中分布广泛, 呈孟德尔遗传, 具有共显性、多态性丰富、信息量大等优点, 已被作为一种理想的分子标记<sup>[12]</sup>。随着不同物种 SSR 标记的开发, 该技术在多种作物亲缘关系鉴定、遗传多样性分析及评价中得到广泛应用, 在此过程中也有学者就不同标记在具体研究中的适用性进行了比较。陈坚等<sup>[13]</sup>开发了紫云英 (*Astragalus sinicus* L.) SSR 标记并在品种指纹鉴定中证实了其适用性; 赵冬兰等<sup>[14]</sup>利用 20 对 SSR 引物对国家甘薯种质徐州保存库的 24 份材料进行了遗传多样性分析; 岳文娣等<sup>[15]</sup>利用 SSR 标记进行了芝麻 (*Sesamum indicum* L.) 种质资源遗传多样性与群体结构分析; 邱显欣等<sup>[16]</sup>利用 SSR 分子标记探讨了云南长尖叶蔷薇自然居群内及居群间的遗传变异度与遗传多样性; Z. Y. Wang 等<sup>[17]</sup>利用 SSR 和 ISSR 标记就不同国家来源狗牙根 (*Cynodon dactylon*) 进行了遗传多样性分析。简单序列重复区间 (ISSR, inter-simple sequence repeat) 是由 E. Zietkiewicz 等<sup>[18]</sup>于 1994 年在 SSR 基础上开发创建的新型分子标记技术, 该技术克服了 RFLP (restriction fragment length polymorphism)、RAPD (random amplified polymorphic DNA)、AFLP (amplified fragment length polymorphic) 和 SSR 等分子标记技术的局限

性, 具有无需预知基因组背景信息、DNA 样品用量少、信息量丰富、重复性好、操作简单等优点, 现已被广泛应用于植物品种鉴定、遗传作图、基因定位、遗传多样性、系统发育进化等领域研究中<sup>[7,11,17,19]</sup>。

本研究分别利用 SSR 和 ISSR 两种标记技术对分布于鄱阳湖流域的 30 个野生菰居群的遗传多样性和遗传结构进行研究, 旨在探讨鄱阳湖流域菰的遗传变异度, 了解我国菰资源的丰富度和遗传进化情况, 同时对我国菰种质资源的保护、多样性评估和基因库的开发利用提供相应的理论基础和参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

2013 年 4 月从江西省鄱阳湖流域周围的 10 个市县 (南昌县、进贤县、余干县、鄱阳县、都昌县、湖口县、星子县、永修县、新建县、共青城市), 距离鄱阳湖湖区约 1~6 km 的范围内分布采样 (图 1), 共采集 30 个野生菰居群样本, 居群编号见吴国林等<sup>[20]</sup>。

### 1.2 方法

**1.2.1 基因组 DNA 的提取** 菰叶片基因组 DNA 采用简易提取法<sup>[21]</sup>, 经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳和分光光度计检测所提 DNA 的质量和浓度后, 用 ddH<sub>2</sub>O 稀释其终浓度至 20 ng/μL, 于 -20℃ 保存备用。

**1.2.2 SSR-PCR 扩增和检测** 采用基本随机分布的 1113 对水稻 SSR 引物 (引物来源于 Gramene 网站, 由上海 Sunny 生物科技有限公司合成) 对来自不同居群的随机 3 份菰混合样品进行扩增筛选, 从中筛选出 19 对条带较丰富、带型稳定、背景清晰的标记引物 (表 1) 用于所有居群的分析。在 10 μL PCR 反应体系中含: 5.0 μL 2 × Specific™ Taq Master Mix (购自近岸蛋白科技有限公司), 1.0 μL 模板 DNA, 正反向引物 (10 μmol/L) 各 1.0 μL, ddH<sub>2</sub>O 2 μL。PCR 反应程序为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 45 s, 55~57℃ (根据不同引物而定) 退火 45 s, 72℃ 延伸 45 s, 35 个循环; 72℃ 后延伸 6 min。取 2.5 μL PCR 扩增产物, 在 120 V 恒定电压下用 6.0% 非变性聚



**1.2.3 ISSR-PCR 扩增和检测** 从加拿大哥伦比亚大学 (<http://www.msl.ubc.ca/>) 开发的 100 条 ISSR 引物中筛选出扩增条带稳定、多态性丰富的 14 条引物(表 2),参照吴国林等<sup>[20]</sup>方法对 30 个野生菘居群的 80 个个体样本进行 ISSR-PCR 扩增。扩增产物中加入 3  $\mu$ L 2  $\times$  Loading Buffer 混匀后,用含有

1/10000 核酸染料 ExRed(北京庄盟国际生物科技有限公司)的 1.0% 琼脂糖凝胶在 5 V/cm 条件下电泳分离 1.0 h,用 DL2000 DNA Ladder(购自宝生物工程(大连)有限公司)作为分子量对照。电泳结束后在紫外凝胶成像系统(BIO-RED)下观察并拍照记录。

表 2 ISSR-PCR 扩增信息

Table 2 The information of ISSR-PCR amplification

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence	退火温度(°C) Annealing temperature	总条带数 No. of total bands	多态性条带数 No. of polymorphic bands	多态率(%) Polymorphism
Z9	(AG) <sub>8</sub> G	55.0	9	9	100.00
Z25	(AC) <sub>8</sub> T	52.0	3	3	100.00
Z26	(AC) <sub>8</sub> T	53.3	7	5	71.43
Z35	(AG) <sub>8</sub> YC	47.0	5	4	80.00
Z40	(GA) <sub>8</sub> YT	50.7	5	5	100.00
Z41	(GA) <sub>8</sub> YC	53.3	8	2	25.00
Z42	(GA) <sub>8</sub> YG	52.0	7	3	42.86
Z44	(CT) <sub>8</sub> RC	47.6	6	5	83.33
Z53	(TC) <sub>8</sub> RT	50.0	4	4	100.00
Z57	(AC) <sub>8</sub> YG	53.3	5	3	60.00
Z68	(GAA) <sub>6</sub>	50.7	5	5	100.00
Z73	(GACA) <sub>4</sub>	45.6	5	5	100.00
Z89	DBD(AC) <sub>7</sub>	54.0	7	5	71.43
Z88	BDB(CA) <sub>7</sub>	54.0	7	7	100.00
平均 Mean			5.93	4.64	78.29
总数 Total			83	65	

R = (A,G), Y = (C,T), B = (C,G,T), D = (A,G,T)

### 1.3 数据统计与分析

以清晰稳定的扩增条带在相同电泳迁移位置出现的有无记数,有带记为“1”,无带记为“0”,构建二元数值矩阵统计数据库。利用 PopGene 1.32 软件统计计算 SSR 数据和 ISSR 数据的遗传相似系数(GS)、Shannon 信息指数(*I*)、Nei's 基因多样性指数(*He*)。利用 NTSYS-pc 2.1 软件采用算术平均非加权配组法(UPGMA, unweighted pair group method with arithmetic mean)进行遗传相似性聚类分析,并绘制遗传亲缘关系树状聚类图。

## 2 结果与分析

### 2.1 菘 SSR、ISSR 基因型的多态性分析

1113 对水稻 SSR 引物中,有 341 对(30.64%)能在菘中扩增出产物,说明菘和水稻确实具有较近的亲缘关系。许多引物虽然能从菘基因组中扩增出产物,但扩增条带数量较少,多态性不够丰富,因此仅使用筛选出的 19 对能扩增出相对较丰富、稳定清

晰条带的引物进行本次试验。利用这 19 对引物对 30 个野生菘居群进行扩增,共得到 276 个片段条带,其中有多态性的片段条带 253 个,平均每个标记引物扩增出 13.32 个有多态性的片段条带,最少的能扩增出 10 个条带(RM175、RM350、RM20236),最多的能扩增出 24 个条带(RM179、RM14233)。扩增结果多态性丰富,多态性条带比率平均为 91.67%,不同标记引物扩增结果的多态性存在一定的差异,每个标记引物扩增的多态性片段的百分率介于 60.00% ~ 100%。

在植物中,SSR 重复序列以二碱基和三碱基重复序列较多,四碱基以上的重复序列较少,所以在初始筛选合成 ISSR 引物时,主要选择的是二碱基和三碱基重复序列引物(表 2)。筛选出的 14 个 ISSR 引物对 30 个野生菘居群的 ISSR-PCR 扩增结果稳定,重复性好,条带清晰,共扩增产生片段条带 83 条,平均每个引物扩增出 5.93 条,条带的分子量范围在 100 ~ 2000 bp,其中多态性条带有 65 条,平均多态

率为 78.29%, 平均每个引物扩增出 4.64 个多态座位。扩增条带数最少的引物是 Z25 (3 条), 最多的是 Z9 (9 条)。多态率幅度 25.00% ~ 100%, 差异度较大。

Shannon 信息指数 ( $I$ )、Nei's 基因多样性指数 ( $He$ ) 既可以反映条带的丰富度, 又可以反映均匀度, 而丰富度和均匀度是衡量多样性的两个重要指标<sup>[22]</sup>。基于 SSR 数据居群间的 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 为 0.4144, Nei's 基因多样性指数 ( $He$ ) 为 0.2712; 基于 ISSR 数据居群间的 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 为 0.4174, Nei's 基因多样性指数 ( $He$ ) 为 0.2386。两种标记各自所得的两个参数大小虽然稍有微小偏差, 但两者结果反映出两种标记在菘种质资源遗传多样性上的研究结果基本一致, 表明鄱阳湖流域地区各地的野生菘资源在一定程度上发生了遗传变异, 有着相对丰富的遗传多样性。

## 2.2 遗传相似性分析

根据 19 对 SSR 引物扩增产生的 276 条 DNA 片段, 计算了鄱阳湖流域 30 个野生菘居群间的遗传相似性系数 ( $GS$ )。结果表明, 供试材料居群间  $GS$  值的变化范围在 0.5590 ~ 0.8368 之间。最小的  $GS$  值 (0.5590) 来自于共青城市江益镇罗家村的菘居群 (LJ) 和余干县三塘乡下潭村的菘居群 (XT), 说明这 2 个菘居群之间遗传距离最远, 遗传相似度最低; 最大的  $GS$  值 (0.8368) 来自于永修县恒丰镇牛头山村的菘居群 (NTS) 和都昌县三叉港镇的菘居群 (SCG), 表明这两地的菘居群间的遗传距离最近, 遗传相似度最高。

ISSR 数据分析结果表明, 利用 14 个 ISSR 标记引物 PCR 扩增产生的 83 条 DNA 片段计算出的鄱阳湖流域 30 个野生菘居群间的遗传相似性系数 ( $GS$ ) 变化范围在 0.5132 ~ 0.9342 之间。ISSR 数据分析结果: 遗传相似性系数 ( $GS$ ) 最小的是来自进贤县三里乡池尾村的菘居群 (CW) 跟共青城市江益镇罗家村的菘居群 (LJ) 和湖口县高垄乡的菘居群 (GL) 之间 (0.5132), 遗传距离最远, 遗传相似度最低; 最大的是来自新建县昌邑乡的菘居群 (CY) 与星子县蓼花镇胜利村的菘居群 (SL) 之间 (0.9342), 说明这 2 个地方的菘居群间的遗传距离最近, 遗传相似度最高。两种标记所得结果稍有差异。

## 2.3 聚类分析

**2.3.1 基于 SSR 数据的聚类结果** 根据以上对各居群间遗传相似系数的计算结果, 得到供试材料间的遗传距离 ( $GD, GD = 1 - GS$ ), 采用 UPGMA 法进

行聚类分析, 阈值在 0.698 时可将 30 个居群划分为 3 类 (图 2)。第 I 类包含 19 个居群, 分别来自南昌县泾口乡山头村 (ST)、南昌县泾口乡东湖村 (DH)、进贤县三里乡六圩村 (LX)、余干县瑞洪镇 (RH)、都昌县三叉港镇 (SCG)、永修县恒丰镇牛头山村 (NTS)、共青城市 (GQC)、永修县马口镇陈新村 (CX)、新建县大塘坪乡大塘村 (DT)、新建县昌邑乡 (CY)、余干县石口镇石口村 (SK)、鄱阳县白沙洲乡车门村 (CM)、都昌县大树乡大树下村 (DSX)、星子县蓼花镇胜利村 (SL)、星子县蓼南乡樟树曹村 (ZSC)、星子县蛟塘乡畈上村 (FS)、共青城市江益镇罗家村 (LJ)、新建县联圩乡下万村 (XW) 以及湖口县高垄乡 (GL), 其中 GL 居群与另外 18 个居群的遗传距离较远; 第 II 类仅含 1 个居群, 即南昌县南新乡的居群 (NX); 第 III 类包含 10 个居群, 分别来自进贤县三阳集乡孟后村 (MH)、进贤县三里乡池尾村 (CW)、余干县三塘乡下潭村 (XT)、都昌县西源乡蛟塘村 (JT)、都昌县多宝乡老爷庙 (LYM)、鄱阳县双港镇乐亭村 (LT)、共青城市苏家垵乡膏良周村 (GLZ)、永修县九和乡杨柳村 (YL)、鄱阳县双港镇绕山村 (RS) 以及新建县铁河乡 (TH), 其中 TH 居群与另外 9 个居群的遗传距离较远。

**2.3.2 基于 ISSR 数据的聚类结果** 根据 ISSR 所得条带数据, 利用 UPGMA 法聚类, 在阈值为 0.728 时可将 30 个居群划分为 3 类 (图 3)。第 I 类包含 13 个居群, 分别来自南昌县泾口乡山头村 (ST)、永修县恒丰镇牛头山村 (NTS)、鄱阳县白沙洲乡车门村 (CM)、都昌县大树乡大树下村 (DSX)、新建县联圩乡下万村 (XW)、星子县蓼南乡樟树曹村 (ZSC)、共青城市 (GQC)、共青城市江益镇罗家村 (LJ)、永修县马口镇陈新村 (CX)、余干县瑞洪镇 (RH)、新建县铁河乡 (TH)、南昌县南新乡 (NX) 和湖口县高垄乡 (GL)。第 II 类包含 9 个居群, 来自南昌县泾口乡东湖村 (DH)、进贤县三里乡池尾村 (CW)、永修县九和乡杨柳村 (YL)、余干县石口镇石口村 (SK)、星子县蓼花镇胜利村 (SL)、新建县昌邑乡 (CY)、星子县蛟塘乡畈上村 (FS)、共青城市苏家垵乡膏良周村 (GLZ)、新建县大塘坪乡大塘村 (DT)。第 III 类包含 8 个居群, 来自进贤县三阳集乡孟后村居群 (MH)、鄱阳县双港镇绕山村 (RS)、都昌县西源乡蛟塘村 (JT)、都昌县三叉港镇 (SCG)、都昌县多宝乡老爷庙 (LYM)、余干县三塘乡下潭村 (XT)、进贤县三里乡六圩村 (LX) 以及鄱阳县双港镇乐亭村 (LT)。

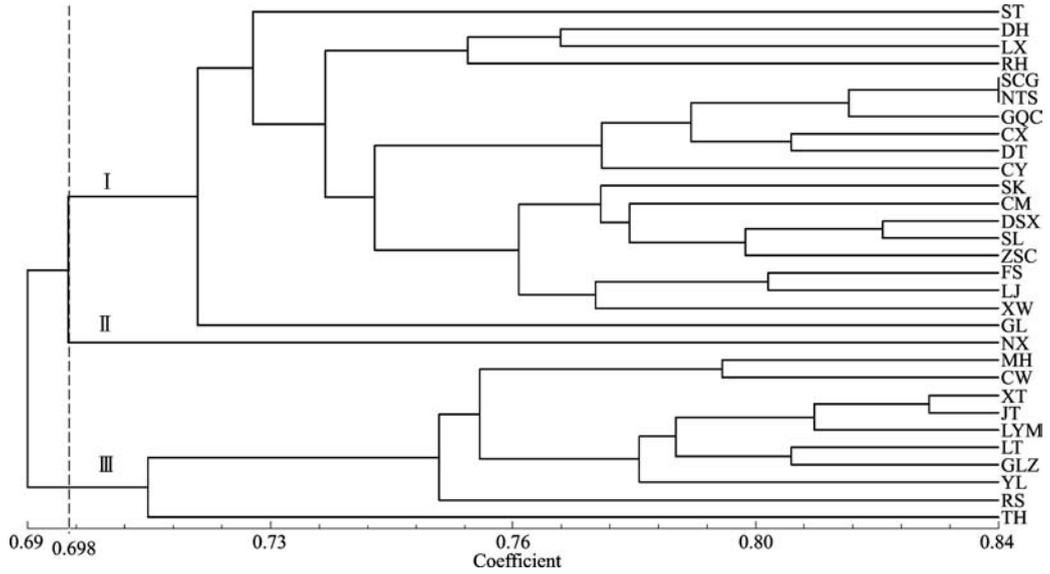


图 2 基于 SSR 分子标记的 30 个野生菰居群的 UPGMA 聚类分析

Fig. 2 UPGMA clustering for 30 *Z. latifolia* populations based on SSR marker

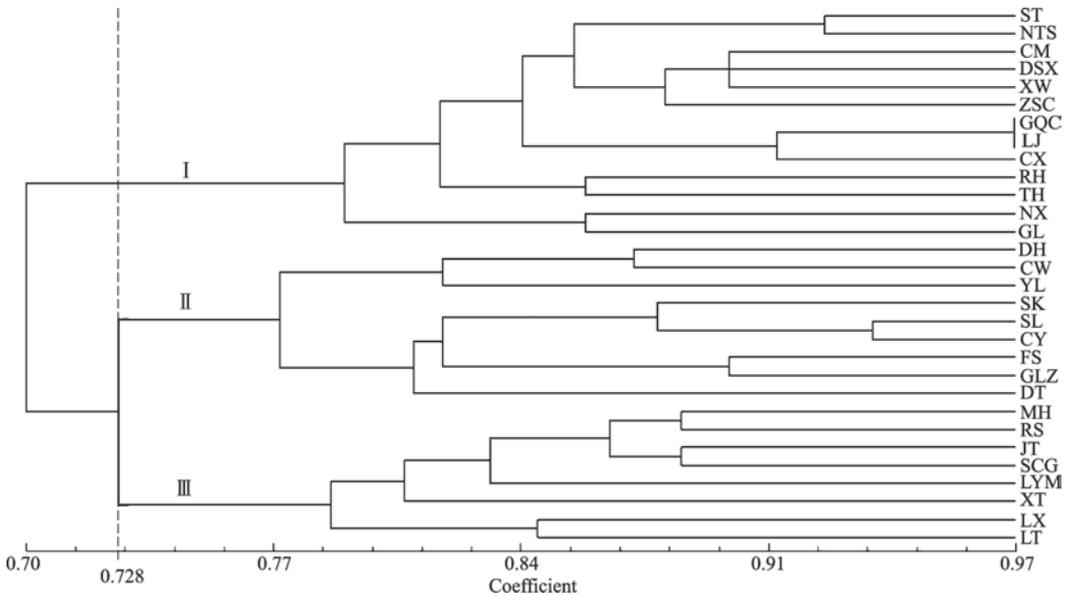


图 3 基于 ISSR 分子标记的 30 个野生菰居群的 UPGMA 聚类分析

Fig. 3 UPGMA clustering for 30 *Z. latifolia* populations based on ISSR marker

**2.3.3 两种分子标记 UPGMA 聚类结果分析** 从两种标记的聚类结果来看(图 2、图 3),鄱阳湖流域野生菰居群的分布并没有如预期的按鄱阳湖东西两岸分布,也没有按相近地理县市分布,而是各地的居群混合分布,遗传关系与地理位置无显著相关性。基于 SSR 数据的 UPGMA 法聚类结果显示,在阈值 0.698 时将 30 个居群聚为 3 类,但来自南昌县南新乡的居群(NX)单独聚为一类(图 2),表明这一地区的菰居群在遗传进化过程中发生显著变异。基于 ISSR 数据的 UPGMA 法聚类结果显示,当阈值为 0.728 时将 30 个居群聚为 3 类,与 SSR 数据聚类相比居群 NX 并没有单独聚为一类(图 3)。两种标记聚类结果表明,从野生菰种质资源这一整体来看,单

鄱阳湖流域这一地区还是相对狭小的,野生菰居群间的亲缘关系也较近,差异较小,整体的遗传相似性较高,遗传距离较小。但就鄱阳湖流域而言,该地区野生菰资源的遗传变异度和均衡度还是很丰富的,这一点可以由两种标记的 Shannon 信息指数( $I$ )和 Nei's 基因多样性指数( $He$ )得以说明。不同分子标记技术所能检测到的多态性比率不同,对物种遗传多样性检测的能力也就不同,本研究中,所用 SSR 标记的数目和扩增检测到的位点数都较 ISSR 标记要多,这也是导致聚类结果差异的一个因素。在遗传多样性检测中增加所使用标记的种类和数目,对于更为准确的结果获得具有重要意义。为了更为准确地了解和分析菰的遗传变异情况,采用不同的遗

传标记并增加标记数目是非常必要的。

## 3 讨论

### 3.1 SSR 和 ISSR 分子标记

分子标记的应用性评价是开展物种遗传多样性分析的基础工作之一,因所采用的标记技术和材料的不同,得出的结论不尽相同<sup>[23]</sup>。P. Thenmozhi 等<sup>[24]</sup>、F. S. Akfirat 等<sup>[25]</sup>、W. Powell 等<sup>[26]</sup> 利用 AFLP、RFLP、RAPD、SSR 分子标记分别在水稻、小麦、大豆、玉米的遗传多样性分析中做了比较,认为 SSR 是研究植物种质资源遗传多样性和谱系遗传关系的一种较为理想的分子标记技术。曾兵等<sup>[27]</sup> 利用筛选出的 20 对小麦 (*Triticum aestivum*) SSR 引物对鸭茅 (*Dactylis glomerata*) 种质资源遗传多样性进行了研究,结果表明,20 对小麦 SSR 引物共扩增出 295 个基因位点,多态性位点有 187 个,多态率为 61.15%。说明近缘物种间 SSR 引物具有一定通用性和可行性。目前,尚未见有研究学者对菘 SSR 引物的设计开发,本研究选用与菘同为稻亚科的近缘属——水稻 (*Oryza sativa*) 的 19 对 SSR 标记引物对来自鄱阳湖流域的 30 个野生菘居群的遗传多样性进行研究,PCR 共扩增出 276 个基因位点,其中多态性位点有 253 个,平均每对引物扩增出 14.53 个位点,多态性位点有 13.32 个,多态率 (PPB) 为 91.67%,结果表明选用的 SSR 标记引物扩增条带丰富,信息量大,多态性较好,能够适用于菘种质资源各居群间的遗传结构和变化规律的研究。

由于 ISSR 分子标记无需预知物种基因组信息,信息量丰富,重复性好,呈显性标记,操作简单等优点,因而被广泛应用于植物的遗传多样性研究之中。王海飞等<sup>[19]</sup> 在对中国蚕豆 (*Vicia faba* L.) 种质资源遗传多样性的 ISSR 研究中表明,11 个 ISSR 引物共扩增出 278 条清晰的条带,其中多态性条带 268 条占 96%,其数据聚类结果表明供试材料呈现一定地域性分布规律。冯亮亮等<sup>[28]</sup> 在甘肃红砂 (*Reaumuria soongorica*) 不同种群遗传多样性的 ISSR 分析中,12 个 ISSR 引物对供试的 5 个种群共检测到 69 个条带,多态性条带比率 (PPB) 为 86.96%,其聚类结果揭示了甘肃红砂遗传多样性与其本身特性和所处不同种群有关。刘欢等<sup>[29]</sup> 对燕麦 (*Avena*) 种质资源遗传多样性 ISSR 研究表明,8 个 ISSR 引物对 48 份供试材料共扩增出 144 条带,多态性条带比率为 86.1%,其数据聚类结果揭示了品种间的遗传关系与品种实际来源基本一致。李飞飞等<sup>[30]</sup> 对中国新疆紫苜蓿 (*Medicago*) 复合体 3 个种的遗传多样性及

亲缘关系研究表明,10 个 ISSR 引物共扩增获得 74 个位点,多态性位点百分比达到 100%。对各物种的研究结果表明,ISSR 分子标记技术是揭示品种间亲缘遗传关系的一种有效手段。目前,尚未见有研究学者应用 ISSR 分子标记技术在菘种质资源的遗传多样性上的应用。本研究从 80 条 ISSR 引物中筛选出 14 条重复性和多态性较好的 ISSR 标记引物对供试的 30 个野生菘居群遗传多样性进行分析,结果共扩增出 83 条带,多态性条带有 65 条,平均每个标记引物扩增出 5.93 条带,多态性条带 4.64 条,多态性条带比率 (PPB) 为 78.29%。结果表明,ISSR 分子标记技术在菘的研究中有较高扩增效率,能够检测出不同居群间的遗传多样性。

有研究表明,所分析的位点数与所能提供信息的可靠性之间具有明显的关系,当位点数超过 70 个时,所提供信息的可靠性趋于稳定<sup>[31]</sup>。本研究中,筛选出的 19 对 SSR 引物对 30 个菘居群共扩增出 276 个位点,多态性位点有 253 个;筛选出的 14 个 ISSR 引物对供试的 30 个菘居群共扩增出 83 个位点,多态性位点有 65 个。两种标记的平均多态性信息含量都达到一定的多态性水平 (91.32%、78.29%),表明两种标记对供试菘居群的遗传多样性分析所得出的数据结论是可靠的。结果显示,SSR 的多态性比率较 ISSR 标记结果的要高,SSR 多态性的产生主要是由于 DNA 复制和修复过程中碱基的滑动、错配或减数分裂过程中姐妹染色单体的不均等交换,故多态性产生的机率较高<sup>[25]</sup>。且 SSR 为共显性遗传,每个位点的等位基因数较显性标记 ISSR 要多,张俊卫<sup>[32]</sup> 基于 SSR、SRAP、ISSR 标记的梅 (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) 种质资源的研究中证实了这一点,其筛选出的 14 对 SSR 引物共扩增到 177 条带谱,平均多态性比率为 94.4%,而筛选出的 13 条 ISSR 引物共扩增出 144 条带谱,平均多态性比率为 91.0%。

### 3.2 鄱阳湖流域野生菘的遗传多样性

本研究利用 SSR 和 ISSR 两种分子标记对分布在江西省鄱阳湖流域的 30 个野生菘自然居群进行遗传多样性分析,两种标记检测到的多态性位点几率 (PPB) 都相对较高 (91.32%、78.29%),表现出丰富的多态性。居群间的 Shannon 信息指数 ( $I$ ) 分别为 0.4144 (SSR) 和 0.4174 (ISSR), Nei's 基因多样性指数 ( $H_e$ ) 分别为 0.2712 (SSR) 和 0.2386 (ISSR)。检测到居群间的遗传相似性系数 (GS) 范围分别在 0.5590 ~ 0.8368 (SSR) 和 0.5132 ~ 0.9342 (ISSR) 之间。虽然本研究的 30 个野生菘居群在地

理分布上相对较近,但两种标记所得的 Shannon 信息指数( $I$ )和 Nei's 基因多样性指数( $H_e$ )2个参数表现出一定水平的丰富度和均衡度,遗传距离(GD)反映出鄱阳湖流域地区各地的野生菰资源在一定程度上发生了遗传变异,居群间存在较广的变异范围,有着相对丰富的遗传多样性。

通过两种标记数据的聚类结果(图2、图3)显示,鄱阳湖流域野生菰居群间的亲缘关系与地理位置分布间并没有明显的相关性。例如,来自余干县下潭村的居群(XT)与来自地理距离较远的都昌县蛟塘村的居群(JT)聚为一类,而来自同一地区南昌县的居群ST与居群NX却没有聚在同一类之中。从遗传距离(GD)上更可以直观地表现出来( $GD = 1 - GS$ )。例如,来自南昌县泾口乡山头村的菰居群(ST)和余干县三塘乡下潭村的菰居群(XT)之间的遗传距离(GD)为0.2187( $GD = 1 - 0.6042$ ),而菰居群ST和共青城市江益镇罗家村的菰居群(LJ)之间的遗传距离为0.2187( $GD = 1 - 0.7813$ ),表明居群ST与XT之间的亲缘关系较ST与LJ之间要远,而南昌县泾口乡山头村与余干县三塘乡下潭村两地的地理距离明显较南昌县泾口乡山头村与共青城市江益镇罗家村两地的地理距离要近。Y. Y. Chen等<sup>[33]</sup>在对我国华中地区长江中游流域7个野生菰居群遗传多样性研究时也发现各居群间的遗传多样性与地理位置间没有相关性。X. W. Xu等<sup>[34]</sup>在研究我国从黑龙江到云贵地区野生菰遗传结构中也得到了证实。菰居群间的遗传多样性与地理位置呈不显著相关性主要原因可能归结于以下几点:(1)人类活动,在人们进行生产劳动过程中常把野生菰当作杂草作物除去,被去除野生菰的根和种子会随着水流漂流至其他地方,在适宜的环境下重新生长起来。本研究所涉及地区为江西省鄱阳湖流域,是我国水稻主产区之一。近年来,随着农业生产用地的不断减少,许多湿地被迫开发为农业生产用地,生长在其环境条件下的野生物种(包括野生菰)随之被人人为地去除;(2)水流因素,野生菰常年生长在河边、浅水湖区、沼泽等浅水区,每当遇到洪水季节时,其也会被流水带至其他地区生长。鄱阳湖作为长江水系的蓄水和泄洪的天然水库,每年夏季雨季时将作为长江主要的泄洪水库,到了长江枯水期时,也将作为长江的主要水源供给之一。且赣江作为鄱阳湖主要水源,与鄱阳湖同为由南向北流向,是湖区野生植被种子传播的主要因素之一;(3)动物活动,许多野生植物种子的传播离不开野生动物的活动,例如采集觅食、筑巢、迁徙等。鄱阳湖是每年候鸟南北迁徙中

转地,候鸟迁徙时常会把其他地方的物种带到此地,也会把此地的物种带到其他地方去,是物种间基因漂流的因素之一;(4)风等自然因素,菰在开花季节,花粉会受到风等自然因素的影响,来扩大个体间或居群间的基因交流,丰富了菰遗传多样性。

### 3.3 鄱阳湖流域野生菰遗传多样性分析对全国范围内野生菰资源遗传分析的启示

栽培稻近缘属植物因其是水稻育种重要遗传资源而备受关注,其中菰属植物野生资源的遗传分析及其地理亲缘关系正成为一些科学家感兴趣的研究方向<sup>[33-34]</sup>。本研究分别采用19对SSR标记和14条ISSR标记,对鄱阳湖流域野生菰资源遗传多样性进行了较全面的分析,所用标记数目及种类均较现有研究报道丰富。例如,Y. Y. Chen等<sup>[33]</sup>在对我国华中地区长江中游流域7个野生菰居群遗传多样性研究时只采用了10对SSR标记;X. W. Xu等<sup>[34]</sup>在研究我国从黑龙江到云贵地区21个野生菰居群遗传结构及地理亲缘关系时,仅依据*Adh1a*基因的序列变异。目前,我国学者对野生菰资源遗传研究走在世界的前列,但因所选择的标记代表的遗传位点数目较少,且在菰基因组上的分布情况不明;或因取样范围狭小,选用材料资源数目少,而导致这些研究结果存在较大局限性。全国范围内的野生菰资源生境踏查及其种质资源的遗传多样性和遗传分析尚不见报道,这对我国野生菰资源的有效保护和利用极其不利,而本研究所积累的经验 and 筛选出的分子标记,对启动和完成上述研究工作奠定了较好的基础。

本研究采用SSR和ISSR2种分子标记技术,从基因水平上分析了鄱阳湖流域野生菰居群间的遗传多样性,虽然调查研究的地域范围相对较为狭小,居群间地理分布相对较近,但研究分析表明鄱阳湖流域野生菰在不同地区的环境条件下表现出较丰富的多样性,在种群结构上发生一定范围的遗传变异,这对野生菰的遗传进化、菰基因资源库的开发利用和菰种质资源的保护有着重要意义,同时也为保护和开发利用我国野生菰种质资源提供了有力参考和依据。

### 参考文献

- [1] Li J H. Flora of China[J]. Harvard Papers in Botany, 2008, 13 (2): 301-302
- [2] Terrell E E, Peterson P M, Reveal J L, et al. Taxonomy of north american species of *Zizania* (poaceae) [J]. Sida Contrib Bot, 1997, 17(3): 533-549
- [3] 翟成凯, 孙桂菊, 陆琮明, 等. 中国菰资源及其应用价值的研究[J]. 资源科学, 2000(6): 22-26
- [4] 沈玮玮. 菰抗病候选基因筛选及其转基因水稻白叶枯病抗性分析[D]. 南昌: 江西师范大学, 2010
- [5] Terrell E E, Batra L R. *Zizania latifolia* and *Stilago esculenta*, a

- grass-fungus association[J]. *Econo Bot*, 1982, 36(3):274-285
- [6] Guo H B, Li S M, Peng J, et al. *Zizania latifolia* Turcz. cultivated in China[J]. *Genet Resour Crop Evol*, 2007, 54(6):1211-1217
- [7] 王晓丽, 马建, 孙长占, 等. 菰在水稻育种中的研究进展[J]. *吉林农业科学*, 2006, 31(1):35-36, 49
- [8] 沈玮玮, 宋成丽, 陈洁, 等. 转菰候选基因克隆获得抗白叶枯病水稻植株[J]. *中国水稻科学*, 2010, 24(5):447-452
- [9] 李仁东, 刘纪远. 应用 landsat tm 数据估算鄱阳湖水生植被生物量[J]. *地理学报*, 2001(5):531-539
- [10] 官少飞, 郎青, 张本. 鄱阳湖水生植被[J]. *水生生物学报*, 1987, 11(1):9-21
- [11] Ma X, Zhang X Q, Zhou Y H, et al. Assessing genetic diversity of *Elymus sibiricus* (poaceae; Triticeae) populations from qinghai-tibet plateau by ISSR markers[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2008, 36(7):514-522
- [12] Morgante M, Olivieri A M. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics[J]. *Plant J*, 1993, 3(1):175-182
- [13] 陈坚, 张辉, 朱炳耀, 等. SSR 分子标记的开发及在品种鉴别中的应用[J]. *作物学报*, 2011, 37(9):1592-1596
- [14] 赵冬兰, 郑立涛, 唐君, 等. 甘薯种质资源遗传稳定性及遗传多样性 SSR 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(3):389-395
- [15] 岳文娣, 魏利斌, 张体德, 等. 芝麻种质资源 SSR 标记遗传多样性与群体结构分析[J]. *作物学报*, 2012, 38(12):2286-2296
- [16] 邱显钦, 唐开学, 王其刚, 等. 云南长尖叶蔷薇自然居群遗传多样性分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(1):85-90
- [17] Wang Z Y, Liao L, Yuan X J, et al. Genetic diversity analysis of *Cynodon dactylon* (bermudagrass) accessions and cultivars from different countries based on ISSR and SSR markers[J]. *Biochem Syst Ecol*, 2013, 46:108-115
- [18] Zietkiewicz E, Rafalski A, Labuda D. Genome fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification[J]. *Genomics*, 1994, 20(2):176-183
- [19] 龚榜初, 刘国彬. 锥栗自然居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(4):581-587
- [20] 吴国林, 王惠梅, 黄奇娜, 等. 菰 (*Zizania latifolia*) ISSR 反应体系的建立及优化[J]. *植物遗传资源学报*, 2014, 15(6):1395-1400
- [21] 奉保华. 水稻淡褐斑叶突变体 *lbs1* 的鉴定、遗传分析与基因定位[D]. 北京:中国农业科学院, 2012
- [22] Pires-dos-Santos T, Bisgaard M, Christensen H. Genetic diversity and virulence profiles of *Escherichia coli* causing salpingitis and peritonitis in Broiler breeders[J]. *Vet Microbiol*, 2013, 162(2-4):873-880
- [23] 李鸿雁, 李志勇, 师文贵, 等. 3 种生态型野生扁蓿豆种质资源 ISSR 与 SSR 遗传多样性分析[J]. *草业学报*, 2012, 21(5):107-113
- [24] Thenmozhi P, Rajasekaran C. Genetic diversity and relationship among 40 rice accessions from northeastern zone of tamil nadu using morphological and SSR markers[J]. *Res J Biotechnol*, 2013, 8(9):32-41
- [25] Akfirat F S, Uncuoglu A A. Genetic diversity of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) revealed by SSR markers[J]. *Biochem Genet*, 2013, 51(3-4):223-229
- [26] Powell W, Morgante M, Andre C, et al. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis[J]. *Mol Breeding*, 1996, 2(3):225-238
- [27] 曾兵, 左福元, 张新全, 等. 利用小麦 SSR 标记分析鸭茅种质资源的遗传多样性[J]. *农业生物技术学报*, 2009, 17(4):677-683
- [28] 冯亮亮, 唐红, 李毅, 等. 甘肃红砂不同种群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. *草业学报*, 2011, 20(1):125-130
- [29] 刘欢, 慕平, 赵桂琴. 燕麦种质资源遗传多样性 ISSR 研究[J]. *草业学报*, 2012, 21(4):116-124
- [30] 李飞飞, 崔大方, 羊海军, 等. 中国新疆紫花苜蓿复合体 3 个种的遗传多样性及亲缘关系研究[J]. *草业学报*, 2012, 21(1):190-198
- [31] 周泽扬, 夏庆友, 鲁成, 等. 分子系统学研究中分子位点数与遗传差异信息可靠性的关系[J]. *遗传*, 1998, 20(5):12-15
- [32] 张俊卫. 基于 ISSR、SRAP 和 SSR 标记的梅种质资源遗传多样性研究[D]. 武汉:华中农业大学, 2010
- [33] Chen Y Y, Chu H J, Liu H, et al. Abundant genetic diversity of the wild rice *Zizania latifolia* in central China revealed by microsatellites[J]. *Ann Appl Biol*, 2012, 161(2):192-201
- [34] Xu X W, Ke W D, Yu X P, et al. A preliminary study on population genetic structure and phylogeography of the wild and cultivated *Zizania latifolia* (poaceae) based on *adh1a* sequences[J]. *Theor Appl Genet*, 2008, 116(6):835-843

(上接第 132 页)

- [47] Suzuki N, Rizhsky L, Liang H, et al. Enhanced tolerance to environmental stress in transgenic plants expressing the transcriptional coactivator multiprotein bridging factor1c[J]. *Plant Physiol*, 2005, 139(3):1313-1322
- [48] Myouga F, Motohashi R, Kuromori T, et al. An *Arabidopsis* chloroplast-targeted Hsp101 homologue, APG6, has an essential role in chloroplast development as well as heat-stress response[J]. *Plant J*, 2006, 48(2):249-260
- [49] Larkindale J, Hall J D, Knight M R, et al. Heat stress phenotypes of *Arabidopsis* mutants implicate multiple signaling pathways in the acquisition of thermotolerance[J]. *Plant Physiol*, 2005, 138(2):882-897
- [50] Li G L, Chang H, Li B, et al. The roles of the atDjA2 and atDjA3 molecular chaperone proteins in improving thermotolerance of *Arabidopsis thaliana* seedlings[J]. *Plant Sci*, 2007, 173(4):408-416
- [51] Sohn S O, Back K. Transgenic rice tolerant to high temperature with elevated contents of dienoic fatty acids[J]. *Biol Plant*, 2007, 51(2):340-342
- [52] Chen J, Burke J J, Velten J, et al. FtsH11 protease plays a critical role in *Arabidopsis* thermotolerance[J]. *Plant J*, 2006, 48(1):73-84
- [53] Block M D, Verduyn C, Brouwer D D, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance[J]. *Plant J*, 2004, 41(1):95-106
- [54] de Ronde J A, Cress W A, van Staden J. Interaction of osmotic and temperature stress on transgenic soybean[J]. *S Afr J Bot*, 2001, 67(4):655-660
- [55] Wang P, Duan W, Takabayashi A, et al. Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress[J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(2):465-474
- [56] Shi W M, Muramoto Y, Ueda A, et al. Cloning of peroxisomal ascorbate peroxidase gene from barley and enhanced thermotolerance by overexpressing in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 2001, 273(1):23-27
- [57] Sasaki K, Saito T, Lamsa M, et al. Plants utilize isoprene emission as a thermotolerance mechanism[J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(9):1254-1262
- [58] Turóczy Z, Kis P, Török K, et al. Overproduction of a rice aldo-keto reductase increases oxidative and heat stress tolerance by malondialdehyde and methylglyoxal detoxification[J]. *Plant Mol Biol*, 2011, 75(4-5):399-412
- [59] Wang L C, Wu J R, Chang W L, et al. *Arabidopsis* HIT4 encodes a novel chromocentre-localized protein involved in the heat reactivation of transcriptionally silent loci and is essential for heat tolerance in plants[J]. *J Exp Bot*, 2013, 64(6):1689-1701