

广西普通野生稻群体结构解析与核心种质构建

潘英华^{1,2}, 徐志健^{1,2}, 梁云涛^{1,2}

(¹广西壮族自冶区农业科学院水稻研究所, 南宁 530007; ²广西水稻遗传育种重点实验室, 南宁 530007)

摘要: 利用覆盖水稻 12 条染色体的 64 个分子标记, 对广西境内已发现的 283 个野生稻自然居群按居群取样原则采集 4173 份代表性样本进行遗传结构分析并构建核心种质。结果显示, 64 个标记位点共检测出 1180 个等位变异, 平均等位变异数为 18.4375, Shannon 指数为 1.7367, Nei's 多样性指数 0.7182, 表明广西普通野生稻资源遗传多样性十分丰富。同时, 基于广西普通野生稻群体结构, 构建了包含 351 份种质的广西普通野生稻核心种质, 占原样本数的 8.41%。广西普通野生稻核心种质, 代表广西普通野生稻的多样性和特异性, 为野生稻遗传资源的深入研究提供基础, 从而为水稻育种提供应用信息。

关键词: 广西普通野生稻; 分子标记; 遗传多样性; 核心种质

Genetic Structure and Core Collection of Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Guangxi

PAN Ying-hua^{1,2}, XU Zhi-jian^{1,2}, LIANG Yun-tao^{1,2}

(¹Rice Research Institute of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007;

²Guangxi Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding, Nanning 530007)

Abstract: To explore genetic diversity and population structure of common wild rice in Guangxi Autonomous Region in China, we investigated the genetic diversity of 4173 common wild rice germplasms that were collected from 14 cities in Guangxi, by using 64 molecular markers on 12 chromosomes. A total of 1180 alleles was detected (mean of Alleles Per Locus of 18.4375, mean of Shannon index of 1.7367, and mean of Nei's diversity index of 0.7182). With that, the result indicated the higher genetic diversity of common wild rice in Guangxi. We suggested a core collection of 351 germplasms (8.41% in total collection) using priority preservation-stepwise cluster method. This core collection of common wild rice could represent the diversity and specificity of common wild rice in Guangxi, and thus this resource becomes valuable in in-depth study in the wild rice genetic resources and hence utilization of variation in rice breeding.

Key words: common wild rice; molecular marker; genetic diversity; core collection

普通野生稻是亚洲栽培稻的祖先, 中国作为亚洲栽培稻的起源地之一, 拥有丰富的野生稻资源^[1]。许多研究表明, 我国普通野生稻资源遗传多样性十分丰富, 并且多样性大于栽培稻^[2-6]。朱世华等^[7]、X. Huang 等^[8]研究认为广西是我国普通野生稻遗传多样性中心和栽培稻的起源中心。因此, 广西普通野生稻资源对我国水稻育种改良和基础研究具有重要意义。然而, 庞大的资源数量也给研究利

用带来了不小的困难^[9-10], 如何从众多资源中快速发掘出优异的种质材料, 提高资源的利用效率, 成为野生稻资源研究利用优先需要解决的重大课题^[11]。

1984 年, O. H. Frankel 等^[12]率先提出核心种质的概念, 即以最小的资源份数最大限度地代表该物种的遗传多样性, 为解决庞大种质资源的研究与利用矛盾开辟了新的途径, 并在很多植物资源中广泛的应用。建立核心种质既保证了种质资源的遗传多

收稿日期: 2017-12-24 修回日期: 2018-01-22 网络出版日期: 2018-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20180417.1259.028.html>.

基金项目: 国家科技基础条件平台项目 (NICGR2017-039); 广西壮族自治区主席科技资金项目 (1517-03); 广西农业科学院基本科研业务专项 (2015YT14, 桂农科 2017YZ08, 2015JZ12403, 桂农科 2016YM48); 广西农业科学院科技发展基金 (2015JZ24)

第一作者研究方向为水稻分子生物学, E-mail: panyinghua2008@163.com。徐志健为共同第一作者

通信作者: 梁云涛, 研究方向为种质资源研究。E-mail: Liangyt@sina.com

样性,又减少了资源样本的数量,有利于资源研究和利用效率的提高。其中,合理的取样策略是构建核心种质的关键。研究表明,不同作物构建核心种质的取样比例不同,为 5%~30%,核心种质的遗传代表性在 70% 以上,能达到较好的效果^[13-15]。在野生稻核心种质研究方面,余萍等^[16]建立了 920 份材料的中国普通野生稻初级核心种质。陈雨等^[17]以 217 份高州野生稻为研究对象,结合居群分类和系统聚类选择的方法,从中筛选出了 43 份材料作为应用核心种质。

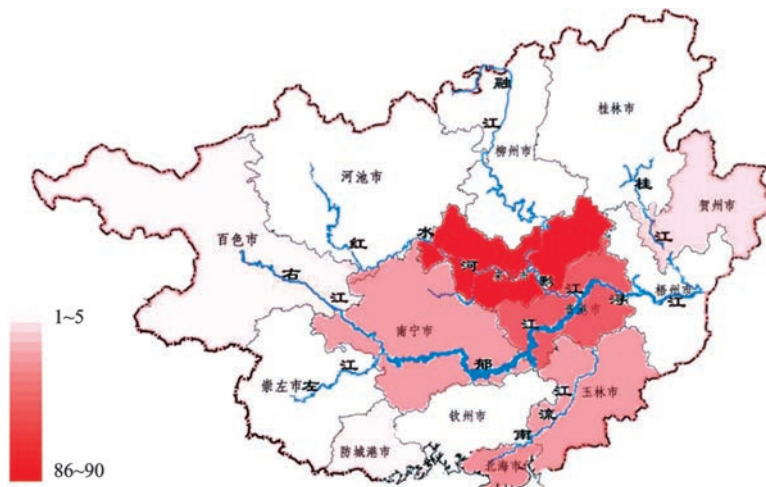
广西是中国野生稻资源最丰富的省区。根据最新的野生稻资源调查结果,目前广西普通野生稻的自然居群现存有 283 个,数量和分布面积均居全国首位。因此,全面、系统研究广西普通野生稻遗传资源具有重大的科学和应用价值。至今,前人已经开展了一些关于广西普通野生稻遗传多样性和核心种质的研究。但由于条件限制,此前的相关研究均只利用了广西部分普通野生稻分布点的资源开展遗传多样性分析,从而导致对广西普通野生稻遗传多样性的评价和核心种质的研究结果各有不同,只能部分了解广西普通野生稻资源的遗传背景。为了全

面、系统掌握广西普通野生稻的遗传结构,建立覆盖全广西普通野生稻遗传多样性的核心种质库,在全面调查广西普通野生稻资源原生地分布情况的基础上,本研究首次对广西已发现的 283 个普通野生稻自然居群按居群取样原则选取 4173 份代表性样本,利用分子标记进行遗传多样性与群体结构分析,并建立广西普通野生稻核心种质,为今后高效发掘和利用广西普通野生稻种质资源提供材料基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

经过前期对广西野生稻原生地进行全面系统调查,在广西 14 个市共发现了 283 个自然居群的普通野生稻资源,具体分布情况见图 1。本研究分别从上述 283 个居群中按居群取样原则采集了代表性样本 4173 份,其中,河池市和钦州市分别只有 1 份资源,百色市有 100 份,北海市有 824 份,防城港市有 298 份,贵港市有 660 份,贺州市有 113 份,来宾市有 550 份,南宁市有 716 份,玉林市有 615 份,柳州市 5 份,桂林市 19 份,崇左市 246 份,梧州市 25 份。上述野生稻资源现保存在国家种质南宁野生稻圃内。



图中数字为居群数,1~5 为该市野生稻居群数在 1~5 之间,色块以 5 居群数递增,86~90 为该市野生稻居群数在 86~90 之间
Number is number of population for common wild rice, 1~5 means the number of population is between 1 to 5. The color block means that the number of population increases with the number of 5 from top to bottom. 86~90 means the number of population is between 86 to 90

图 1 广西普通野生稻资源的地理分布

Fig. 1 The geographical distribution of common wild rice in Guangxi

1.2 DNA 的提取

采集的野生稻叶片用液氮进行低温处理后进行研磨,DNA 的提取采用 CTAB 法^[18],并在此基础上进行优化改进,提取后的 DNA 在 -20℃ 条件下进行保存。

1.3 分子标记引物的筛选及 PCR 扩增

利用 S. R. McCouch 等^[19]与水稻基因组 SSR 图

谱公布的 SSR 分子标记,以及根据水稻籼粳亚种基因组差异开发的 Indel 标记,从中筛选出 64 个分布于水稻 12 条染色体并且在野生稻资源中表现多态的分子标记用于遗传多样性分析(表 1)。分子标记引物均由北京华大生物技术服务有限公司合成。

表 1 64 个分子标记的引物信息

Table 1 Information of 64 molecular markers

标记 Marker	染色体 Chromosome	正向序列 Forward primer	反向序列 Reverse primer
RM443	1	GATGGTTTTTCATCGGCTACG	AGTCCCAGAATGTCGTTTCG
RM212	1	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCCATTGTCTCTCATTATG
RM220	1	GGAAGGTAACGTGTTCCAAC	GAAATGCTTCCACATGTCT
RM499	1	TACCAAACACCAACTGCG	ACCTGCAGTATCCAAGTGTACG
MM0014	1	GCCCATGTATGTGAGGTACTCC	GCCTAATCCAGGACAAGCTACGG
MM1154	1	ACTTACACACTTGATCCGTTG	CCAGGATTTATTCGACAAGC
MM0366	1	TGGTTACGTTGTGGCAGTGT	TAATCGCCGCATCCTTTAGT
MM1044	1	TCTCTCTCTGCTCTGCTCTGC	TCAACTCCTCCTATTCCATTCC
1-2	1	GCAAGCAACCAGAACATGAA	TCATATGGGTTGCAAATTGGT
1-1	1	AGGGGAAGAAAAACCTGACC	CCGCGTGCAGATAAAGTACA
RM499	1	TACCAAACACCAACTGCG	ACCTGCAGTATCCAAGTGTACG
1-4	1	CAGCATACAGTACGCATCATCA	GCTCGTATCTCGATGAGTCCA
1-3	1	GGGAAATTTGGGAGGAAGAC	CGAGCAAGCTACCCGAATTA
1-8	1	CATTGGGAGCAAGATTCCAG	AGAGGACCTCATCCTCCACA
1-15	1	CAACCCCTCCAAATACCTGA	ACCGTGTTTCATGCCTTTAC
1-14	1	GGCCCATTTCTCCACGAATC	GGGCATCGGGATGGTAATA
RM7288	2	TTTCTCAACTGAAACAACAT	AGTTTAAGAGCGTTTCTAGG
2-1	2	CACGGAAGGAAACCTCAGAA	GCATCATGGAGCACAGCAC
RM1694	2	CCCTATCTTTAGATCCCAATGTA	CATGGAGCACCAAAACAAAT
RM485	2	CACACTTTCAGTCTCTCC	CATCTTCTCTCTTCGGCAC
MM2229	2	ACCGTTAGATGACACAAGCAACG	GGTTAGCAAGACTGGAGGAGACG
RM279	2	CCTCTCACTCAGCTGGACTCTCC	CCTCACCCCTAGGCTTTGATATGC
MM2011	2	TACCTCGACCAAGAGATGCTTCC	GCCACGAAATGCAATCATAGTAGC
2-4	2	AGTGTCCCAAGCGAGAAAAC	ATGCACGAGTGAGTGTGAGC
3-3	3	CTGCACCGGAGAAATTTGAT	CGCATGCAGATGAATAGGTG
RM218	3	TGGTCAAACCAAGTCTTTC	GACATACATTCTACCCCCGG
RM168	3	TGCTGCTTGCTGCTTCTTT	GAAACGAATCAATCCACGGC
RM2326	3	CCTGTGTTCTATATGAGGAGAGTCC	CATTGTACATGTGCAGCGATGG
RM135	3	CTCTGTCTCTCCCCGCGTCG	TCAGCTTCTGGCCGGCCTCCTC
RM3131	3	CTCTGCACCGTGTTCACATG	CCCAATGGAATATCAGGTGG
RM218	3	TGGTCAAACCAAGTCTTTC	GACATACATTCTACCCCCGG
RM3042	4	CAAAAAGGAATCAATGTGAA	GGCTGTTGAGAGGTAGAGAA
RM551	4	GCCTTCTGGCTCATTATATGC	CTAGGCCTGCCAGATTGAAC
RM131	4	TCCTCCCTCCCTTCGCCACTG	CGATGTTGCCATGGCTGCTCC
4-2	4	AGAAACTGTGCGAGGGGATT	AGTTGAAGTTCTTGAGCAGTCG
RM26	5	GAGTCGACGAGCGGCAGA	CTGCGAGCGACGGTAACA
RM5796	5	GCGATGGAACATGAAGTGTG	TGGATGTTCTGATGCAGAGC
RM5796	5	GCGATGGAACATGAAGTGTG	TGGATGTTCTGATGCAGAGC

表 1(续)

标记 Marker	染色体 Chromosome	正向序列 Forward primer	反向序列 Reverse primer
RM459	5	CCTCCAGTATCGATCACCAAAGC	CGAAAGAAAGTCATAGCACGATGG
RM528	6	GGCATCCAATTTTACCCCTC	AAATGGAGCATGGAGGTAC
RM508	6	GGATAGATCATGTGTGGGG	ACCCGTGAACCACAAAGAAC
RM549	6	ACGAACTGATCATATCCGCC	CTGTGGTTGATCCCTGAACC
RM5531	6	TTTGTGTGGTAAAGTTGCTTC	TTAAGGAGACTGTTTTCTTTCTC
RM6872	7	GGATGAACACTGATGATGGC	ACCTCCACCACGATATCCAC
RM429	7	TCCCTCCAGCAATGTCTTTC	CCTTCATCTTGCTTTCCACC
7-2	7	GCGAGACAAATGCGATTGAT	AGACCAGACGAAGCCATCC
RM447	8	ACGGGCTTCTTCTCTCTCTCC	TCCCTTGTGCTGTCTCTCTCC
RM1235	8	AGCAGAGGAGGAGATGATGG	GGACCAAAACGAAGCTATCC
RM6028	8	GAACGACAGCCGCTTCTTC	AACTACATGGCGGCGACG
RM408	8	CAACGAGCTAACTTCGGTCC	ACTGCTACTTGGGTAGCTGACC
RM1896	9	GGACAGGGTAAAGTGTTAGA	CCTAAGACCTATCAACTCCA
RM257	9	CCGTGCAACTTAAATCCAAACAGG	GGAATCCTATATGAGCCAGTGATGG
RM6475	9	AGATCAAAGCAACGGCTAGC	GAACAGAGAGGGGACCTGTC
9-1	9	CCATGCCAAAAATGAAAC	GCCAGCTAGCGACGTGTG
RM215	9	GAGCAGCAAGAGCAGCAGAGG	CATGCTCGACTTCAGAAGCTTGG
RM6144	10	AAGCCCACGAATTCGGATCAGC	GGGAGTAGCAGGATCCCGAAGG
RM590	10	GAGATCGAGGAGGAGGTGAGG	AGTACTGCCGATCATATGGAAGC
RM311	10	TGCTAGTATAGGTACTAAACAT	TCCTATACATACAAAACATAC
RM147	10	TACGGCTTCGGCGGCTGATTCC	CCCCCGAATCCCATCGAAACCC
RM206	11	CCCATGCGTTTAACTATTCT	CGTTCCATCGATCCGTATGG
11-2	11	ATGAAATGCGTGGTAGAGAT	GCTGACCACAAAGTCTAAGG
RM102	12	AACTTTCCACCACCACCGCGG	AGCAGCAGCAAGCCAGCAAGCG
RM27793	12	CCTTTGGAAGGGTGTGTTATCTGG	ACTGATGGCACACAACAAGATGC
RM7003	12	GGCAGACATACAGCTTATAGGC	TGCAAAATGAACCCCTCTAGC

PCR 反应使用东胜龙 ETC-811PCR 仪进行扩增。采用 10 μ L 反应体系:2 μ L 模板 DNA,3 μ L 2 \times EasyTaq PCR SuperMix,2 μ L primer(10 μ mol/L),3 μ L ddH₂O。反应程序为 95 $^{\circ}$ C 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。采用 8% 的聚丙烯酰胺变性凝胶进行电泳分析,经过银染及显影后,记录扩增条带数据。

1.4 数据分析

根据每份材料扩增的条带位置确定基因型,并建立相应的数据库。以 0、1 统计分子标记扩增带型,在相同迁移率位置上,有带记为 1,无带记为 0。数据经转化后用 Excel 和 POPGENE3.2 软件进行 Nei'遗传距离和遗传相似性分析,计算分子标记座位的等位基因数、有效等位基因数以及基因杂合度

等。利用 NTSYSpc V2.0、MEGA6.0 进行 UPGMA 聚类分析。使用 Structure 2.2 软件分析野生稻资源的群体结构。

1.5 核心种质取样策略与方法

参照杨庆文等^[20-21]、J. Hu 等^[22]和黎毛毛等^[23]的方法,采取居群优先的双重聚类策略构建广西普通野生稻核心种质。取样步骤如下:(1)首先,根据普通野生稻的地理分布情况进行分组,将来自同一自然居群的野生稻种质划分为同一个组。(2)组内唯一的野生稻资源将直接入选核心种质。(3)利用分子标记分别对每个组内的野生稻种质进行遗传多样性和聚类分析,根据分析结果确定各组的遗传相似性阈值,然后按 10% 左右的取样比例从各组选取代表性种质组成初级聚类核心样本。(4)对初级聚类核心样本进行第 2 次聚类分析,遗传距离相同或

极相近的同类材料只选 1 份代表性种质,并保证包含每个组的代表性样本,最终构建出广西普通野生稻核心种质。

2 结果与分析

2.1 广西普通野生稻遗传多样性

利用 64 个分子标记对 4173 份广西普通野生稻进行基因型检测。结果显示,所有分子标记均表现出多态,多态位点数达到 100%,共检测出 1180 个等位变异。各标记检测到的等位基因数最低为 4 (4-2),最高为 26 (MM1154, 1-8, 1-15, MM2011, RM135, RM5796, RM508, RM5531, RM6872, RM429, RM1235, RM257, 9-1),平均 18.4375 个。有效等位

变异数变化为 1.1639 (RM206) ~ 13.5239 (RM508、1-8),平均值为 4.7299。Shannon 指数变化为 0.3547 (RM206) ~ 2.7770 (RM508、1-8),平均值为 1.7367。Nei's 指数变化为 0.1408 (RM206) ~ 0.9263 (RM508、1-8),平均值为 0.7182。期望纯合度变化为 0.0737 (1-8, RM508) ~ 0.8592 (RM206),平均值 0.2815。实际纯合度变化为 0.0732 (RM499) ~ 0.9808 (1-1),平均值为 0.4910。期望杂合度变化为 0.1408 (RM206) ~ 0.9263 (RM508、1-8),平均值为 0.7185。实际杂合度变化为 0.0192 (1-1) ~ 0.9268 (RM499),平均值为 0.5090。详细信息见表 2。分析结果表明广西普通野生稻资源的遗传多样性十分丰富。

表 2 64 个分子标记的遗传多样性参数

Table 2 Genetic diversity parameters of 64 molecular markers

标记 Mark	观测的 等位基 因数 N_a	有效等 位基因 数 N_e	Shannon 指数 I	Nei's 多样性指数 N_{ei}	期望纯合度 Exp_Hom	实际纯合度 Obs_Hom	期望杂合度 Exp_Het	实际杂合度 Obs_Het
RM443	23	4.3752	1.9650	0.7714	0.7715	0.6136	0.7714	0.2285
RM212	21	7.0992	2.2303	0.8593	0.1407	0.3011	0.8593	0.6989
RM220	13	2.7677	1.5957	0.6388	0.3612	0.4568	0.6388	0.5432
RM499	13	3.9803	1.5026	0.7489	0.2511	0.4505	0.7489	0.5495
MM0014	15	7.4346	2.1659	0.8656	0.1344	0.1567	0.8656	0.8433
MM1154	26	9.3269	2.4377	0.8930	0.1070	0.4167	0.8930	0.5833
MM0366	25	2.6685	1.5363	0.6253	0.3747	0.6422	0.6253	0.3578
MM1044	16	4.6931	1.7618	0.7870	0.2130	0.2229	0.7870	0.7771
1-2	25	2.8766	1.6134	0.6525	0.3475	0.6710	0.6525	0.3290
1-1	7	1.4588	0.5391	0.3145	0.6855	0.9808	0.3145	0.0192
RM499	8	2.5160	1.1256	0.6026	0.3974	0.0732	0.6026	0.9268
1-4	18	4.3653	1.7306	0.7710	0.229	0.3406	0.7710	0.6594
1-3	19	8.1277	2.2981	0.8771	0.1229	0.2296	0.8771	0.7704
1-8	26	13.5239	2.7770	0.9263	0.0737	0.5242	0.9263	0.4758
1-15	26	2.6766	1.6316	0.6266	0.3734	0.6088	0.6266	0.3912
1-14	20	1.9085	1.1853	0.4761	0.5239	0.7687	0.4761	0.2313
RM7288	20	2.8384	1.3356	0.6478	0.3522	0.6317	0.6478	0.3683
2-1	20	6.5076	2.1532	0.8464	0.1536	0.4444	0.8464	0.5556
RM1694	14	4.0502	1.5892	0.7532	0.2468	0.4232	0.7532	0.5768
RM485	23	2.3208	1.3397	0.5692	0.4308	0.7608	0.5692	0.2392
MM2229	25	8.0370	2.2533	0.8757	0.1243	0.5507	0.8757	0.4493
RM279	21	5.5009	1.9770	0.8184	0.1816	0.1614	0.8184	0.8386
MM2011	26	2.6969	1.4272	0.6293	0.3707	0.2851	0.6293	0.7149
2-4	17	3.2148	1.6199	0.6890	0.3110	0.5720	0.6890	0.4280
3-3	19	3.9304	1.7601	0.7457	0.2543	0.6218	0.7457	0.3782
RM218	15	1.5716	0.9567	0.3638	0.6362	0.7685	0.3638	0.2315

表 2(续)

标记 Mark	观测的 等位基 因数 N_a	有效等 位基因 数 N_e	Shannon 指数 I	Nei's 多样性指数 N_{ei}	期望纯合度 Exp_Hom	实际纯合度 Obs_Hom	期望杂合度 Exp_Het	实际杂合度 Obs_Het
RM168	21	4.7375	1.9414	0.7890	0.2110	0.7389	0.7890	0.2611
RM2326	15	4.7898	1.7886	0.7913	0.2087	0.3292	0.7913	0.6708
RM135	26	1.3142	0.6841	0.2391	0.7609	0.8476	0.2391	0.1524
RM3131	15	3.9517	1.7007	0.7470	0.2530	0.3779	0.7470	0.6221
RM218	19	7.9577	2.2676	0.8745	0.1255	0.3915	0.8745	0.6085
RM3042	24	4.9965	1.9934	0.8000	0.2000	0.5642	0.8000	0.4358
RM551	18	4.0583	1.7041	0.7537	0.2463	0.6990	0.7537	0.3010
RM131	25	4.9714	2.0380	0.7990	0.2010	0.6164	0.7990	0.3836
4-2	4	2.3786	0.9907	0.5888	0.4112	0.5938	0.5888	0.4062
RM26	18	5.0033	2.0086	0.8012	0.1988	0.2857	0.8012	0.7143
RM5796	13	1.6943	0.9620	0.4098	0.5902	0.6843	0.4098	0.3157
RM5796	26	5.3147	2.2283	0.8120	0.1880	0.4797	0.8120	0.5203
RM459	11	4.2369	1.6268	0.7662	0.2338	0.0966	0.7662	0.9034
RM528	15	6.6273	2.1236	0.8497	0.1503	0.6195	0.8497	0.3805
RM508	26	13.5239	2.7770	0.9263	0.0737	0.5242	0.9263	0.4758
RM549	10	3.6823	1.5445	0.7285	0.2715	0.4448	0.7285	0.5552
RM5531	26	7.5214	2.2462	0.8674	0.1326	0.7315	0.8674	0.2685
RM6872	26	8.3852	2.4104	0.8809	0.1191	0.5545	0.8809	0.4455
RM429	26	3.8153	1.7260	0.7380	0.262	0.2208	0.7380	0.7792
7-2	25	4.6717	1.9169	0.7861	0.2139	0.4445	0.7861	0.5555
RM447	14	4.0829	1.7363	0.7552	0.2448	0.2668	0.7552	0.7332
RM1235	26	4.4065	1.8953	0.7732	0.2268	0.4861	0.7732	0.5139
RM6028	24	3.5289	1.7652	0.7168	0.2832	0.5509	0.7168	0.4491
RM408	14	4.0829	1.7363	0.7552	0.2448	0.2668	0.7552	0.7332
RM1896	15	4.9087	1.9069	0.7966	0.2034	0.2236	0.7966	0.7764
RM257	26	6.268	2.2477	0.8406	0.1594	0.3466	0.8406	0.6534
RM6475	14	4.1651	1.6676	0.7601	0.2399	0.3711	0.7601	0.6289
9-1	26	9.3136	2.5172	0.8928	0.1072	0.2554	0.8928	0.7446
RM215	15	4.3055	1.6576	0.7678	0.2322	0.7195	0.7678	0.2805
RM6144	15	1.6709	0.9734	0.4016	0.5984	0.8246	0.4016	0.1754
RM590	11	3.9857	1.6102	0.7492	0.2508	0.1123	0.7492	0.8877
RM311	16	3.8354	1.6246	0.7394	0.2606	0.5592	0.7394	0.4408
RM147	21	8.2673	2.3227	0.8792	0.1208	0.2780	0.8792	0.7220
RM206	10	1.1639	0.3547	0.1408	0.8592	0.9635	0.1408	0.0365
11-2	17	7.9199	2.2795	0.8737	0.1251	0.2842	0.8737	0.7158
RM102	5	2.1597	0.9632	0.5385	0.4615	0.7543	0.5385	0.2457
RM27793	18	3.2750	1.7728	0.6948	0.3052	0.3777	0.6948	0.6223
RM7003	15	6.6273	2.1236	0.8497	0.1503	0.6195	0.8497	0.3805
Mean	18.4375	4.7299	1.7367	0.7182	0.2815	0.4910	0.7185	0.5090

N_a : Observed number of alleles, N_e : Effective number of alleles, I : Shannon-Weaver index, Obs_Hom : Observed homozygosity, Exp_Het : Expected homozygosity, Obs_Het : Observed heterozygosity, Exp_Het : Expected heterozygosity, N_{ei} : Nei diversity index, The same as below

2.2 广西普通野生稻的群体结构

根据 64 个标记对 283 个居群的 4173 份普通野生稻检测的分子信息,采用 Structure2.2 软件进行群体结构分析,将群体数目(K)设定为 2~8,发现 ΔK 在 $K=3$ 时出现拐点,取得最大值,结果表明 4173 份普通野生稻资源材料可以划分为 3 个类群(图 2、3、4)。第 I 亚群包括 592 份普通野生稻资源,分别来源于百色、北海、崇左、防城港、贵港、桂林、贺州、来宾、南宁、钦州、梧州和玉林等 12 个市。第 II 亚群

包括 1356 份资源,分别来源于百色、北海、防城港、贵港、桂林、来宾、南宁、钦州、梧州和玉林等 10 个市。其余 2225 份野生稻组成第 III 亚群,分别来源于百色、北海、防城港、贵港、桂林、柳州、崇左、来宾、南宁、钦州、梧州、玉林、河池等 13 个市(图 3)。根据对野生稻资源的地理来源分析,发现 3 个不同类群的种质资源之间在地理来源上存在相互渗透的现象。部分地理来源不同的材料亲缘关系较为接近,说明群体结构已趋向多样化,遗传基础广阔。

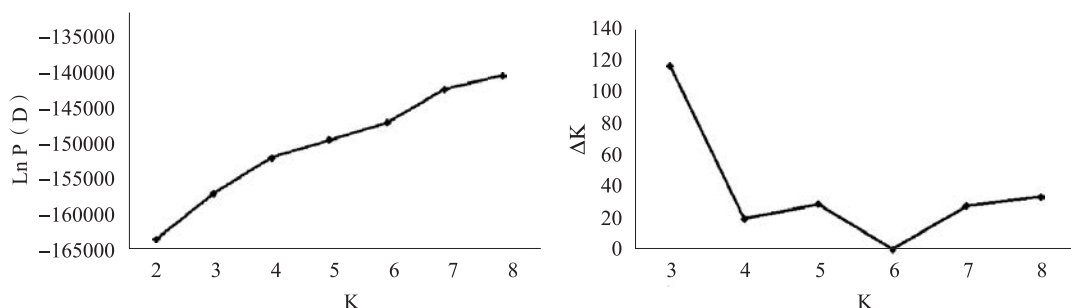
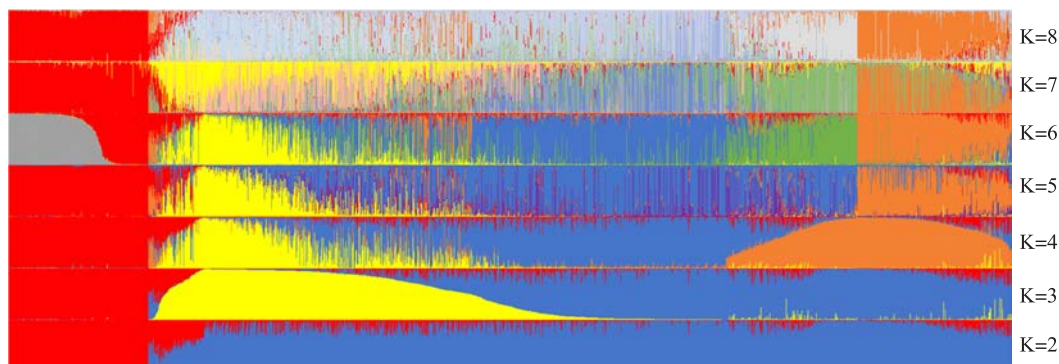


图 2 K 值曲线图

Fig. 2 Curve diagram of K value



红色:第 I 亚群;黄色:第 II 亚群;蓝色:第 III 亚群;横坐标每条竖线代表 1 份种质

Red: group I, Yellow: group II, Blue: group III, Vertical lines on the X-axis refer to each variety

图 3 4173 份广西普通野生稻资源群体结构图

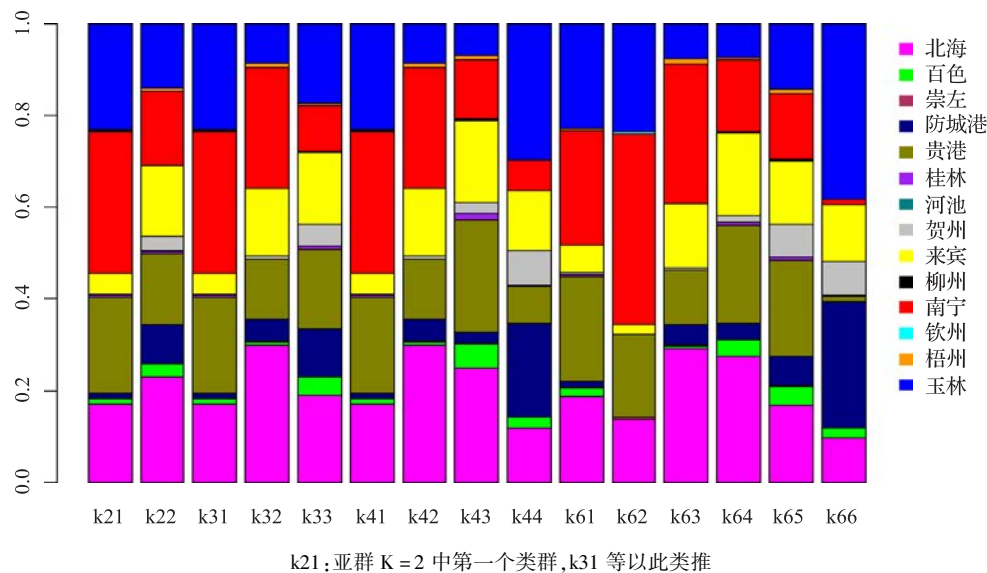
Fig. 3 Population structure diagram of 4173 common wild rice in Guangxi

从图 3 来看,该群体在 $K=2,3,4,6$ 时具有明显的类型划分,第一类群 k21、k31、k41、k61,主要来自北海、贵港、来宾、柳州、玉林,且不随这类群数增加而改变(图 4)。在分析中可以得出,来自防城港和贺州的群体属于比较独特的类型;玉林与北海虽然地理上相邻,但是有着明显的分化。

2.3 广西不同区域普通野生稻遗传多样性的比较和聚类分析

首先,以市为单位,将广西普通野生稻资源分布地划分为 14 个区域。然后,根据对采集到的 4173 份广西普通野生稻进行遗传多样性分析(表 3),发

现钦州市普通野生稻的多态性位点最少,仅有 12 个,多态性位点百分比为 18.75%;北海市、南宁市和玉林市普通野生稻的多态性位点最多,有 64 个,多态性位点百分比为 100%。而且,所有 14 个市都检测出等位变异,等位变异数变化为 1.0781(河池)~13.9219(北海)。Shannon 指数变化为 0.0497(河池)~1.6600(玉林)。Nei's 多样性指数变化为 0.1875(钦州)~0.7127(玉林)。实际杂合度的变化范围为 0.3750(钦州)~0.5625(柳州)。平均杂合度的变化范围为 0.1875(钦州)~0.7127(玉林)之间。不同区域的平均杂合度大小排序为:玉林市 > 北海市 > 来宾



k21:亚群 K = 2 中第一个类群, k31 等以此类推

k21: the first subpopulation of population structure when K = 2 and so on

图 4 群体结构各个类群中不同地市来源材料所占的比例

Fig. 4 The proportion of different source materials of different cities in group structure

市>贵港市>南宁市>贺州市>防城港市>百色市>桂林市>梧州市>柳州市>河池市>崇左市>钦州市。具体信息见表3。分析结果表明,14个市的观测等位基因数在1.0781~13.9219之间,变异位点存在较大差异。各区域内的普通野生稻资源遗传

多样性十分丰富。野生稻数量较多的地区,如北海市、贵港市、南宁市的遗传多样性指数(Shannon指数分别是1.6414、1.6280、1.6246)大于野生稻数量较少的地区,如河池市、钦州市(Shannon指数分别为0.0497、0.2599)。

表 3 14个市普通野生稻的遗传多样性参数

Table 3 Genetic diversity parameters of common wild rice in 14 cites

采集点 Cs	多态性 位点数 Np	多态性位 点百分比 (%) Pp	观测的 等位基 因数 Na	有效等位 基因数 Ne	Shannon 指数 I	期望 纯合度 Exp_Hom	实际 纯合度 Obs_Hom	期望 杂合度 Exp_Het	实际 杂合度 Obs_Het	平均 杂合度 Ave_Het	Nei's 多样性 指数 Nei's
百色	62	96.88	8.2581	3.7556	1.4479	0.3247	0.4392	0.6753	0.5608	0.6666	0.6666
北海	64	100.00	13.9219	4.2977	1.6414	0.2986	0.4446	0.7014	0.5554	0.6999	0.6999
崇左	43	67.19	1.2500	1.1687	0.1467	0.5180	0.5093	0.4820	0.4907	0.4077	0.4077
防城港	62	96.88	10.1429	4.1804	1.5383	0.3156	0.4791	0.6844	0.5209	0.6813	0.6813
贵港	62	96.88	13.7937	4.3137	1.6280	0.3122	0.5337	0.6878	0.4663	0.6865	0.6865
桂林	56	87.50	4.7288	2.9176	1.1280	0.3959	0.5184	0.6041	0.4816	0.5755	0.5755
河池	45	70.31	1.0781	1.0625	0.0497	0.4768	0.4464	0.5232	0.5536	0.4328	0.4328
贺州	61	95.31	8.9180	4.1355	1.5272	0.3123	0.4745	0.6877	0.5255	0.6816	0.6816
来宾	63	98.44	13.1746	4.4986	1.6421	0.3054	0.5124	0.6946	0.4876	0.6931	0.6931
柳州	48	75.00	2.8750	2.3315	0.8322	0.4628	0.4375	0.5372	0.5625	0.4807	0.4807
南宁	64	100.00	13.3651	4.2631	1.6246	0.3113	0.5471	0.6887	0.4529	0.6864	0.6864
钦州	12	18.75	1.3750	1.3750	0.2599	0.6250	0.6250	0.3750	0.3750	0.1875	0.1875
梧州	54	84.38	4.8070	2.9138	1.1087	0.4178	0.5259	0.5822	0.4741	0.5657	0.5657
玉林	64	100.00	13.3281	4.4393	1.6600	0.2856	0.4904	0.7144	0.5096	0.7127	0.7127

Cs: Collection site, Np: Number of polymorphic loci, Pp: The percentage of polymorphic loci, Ave_Het: Average heterozygosity

根据 UPGMA 计算的遗传相似度,利用 NTSYS 软件对广西普通野生稻以 14 个市为基础进行遗传聚类(图 5)。在遗传相似系数为 0.74 时,野生稻资源分为两类,其中钦州市普通野生稻单独为一类。遗传相似系数为 0.90 时,普通野生稻资源则分为 3 类,钦州市的普通野生稻单独分为一类,河池、柳州和桂林 3 个市的野生稻聚为一大类,其余 10 个市聚为另一大类。当遗传相似系数为 0.96 时,广西普通野生稻可以分为 7 类,除钦州、河池、崇左、梧州、百色的普通野生稻资源各自单独成类之外,桂林市和柳州市的普通野生稻聚为一类,北海、贵港、来宾、南宁、防城港、玉林、梧州这 7 个市的普通野生稻聚为另一大类。聚类分析表明,地理位置相距较近的野生稻资源常聚为一类,亲缘关系较近,例如柳州市、桂林市的普通野生稻聚为一类,而北海市、贵港市、南宁市、防城港市和玉林市的普通野生稻聚为一大类。

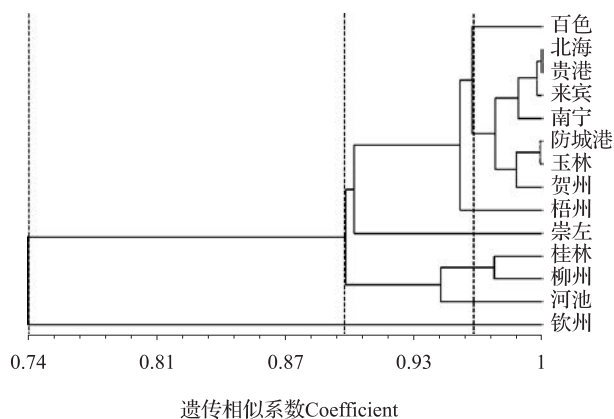


图 5 广西普通野生稻遗传相似度 UPGMA 法聚类图

Fig. 5 Dendrogram of common wild rice in Guangxi using UPGMA method

2.4 广西普通野生稻核心种质的构建

利用普通野生稻资源的地理分布和标记基因型信息,按照普通野生稻资源的自然居群进行分组,采取按居群分类和逐步聚类相结合的取样策略,最终构建了包含 351 份种质的广西普通野生稻核心种质库,占原保存普通野生稻资源数的 8.41%。核心种质分别来自于广西的百色、北海、防城港、贵港、桂林、柳州、贺州、来宾、南宁、梧州、钦州、玉林、崇左和河池等 14 市的 283 个普通野生稻自然居群。其中,来源于河池、钦州等市的普通野生稻种质分别只占全部核心种质的 0.28%,而来源于来宾市的种质所占比率最高,占有核心种质的 27.63%。详细信息见表 4。

表 4 广西普通野生稻核心种质来源信息

Table 4 The origin of corn collection of common wild rice in Guangxi

市	居群数	核心种质数量
Collection site	Number of populations	Number of corn collection
百色	8	12
北海	35	58
崇左	4	4
防城港	8	22
贵港	55	61
桂林	5	5
河池	1	1
贺州	11	20
来宾	87	97
柳州	3	3
南宁	30	32
钦州	1	1
梧州	5	5
玉林	30	30
合计 Total	283	351

2.5 核心种质的遗传多样性和聚类分析

核心种质的等位基因数保留了 74.32%,有效的等位基因数保留 99.88%。Shannon 指数、实际杂合度、平均杂合度、Nei's 多样性指数分别保留了原种质的 80.87%、97.09%、91.07%、91.07%。数据表明,核心种质材料间遗传位点重复性小,核心种质数量虽然只占原种质资源不到 10%,但仍能极大保留原样本的遗传多样性(表 5)。

运用 POPGENE、NTSYS 软件对广西普通野生稻核心种质进行了遗传相似度分析。在遗传相似度为 0.48 时,14 个市的普通野生稻可以聚为 2 大类。北海市(102)、防城港市(1050)和来宾市(3545)的普通野生稻聚为一类,其余 348 份野生稻聚为一类。以遗传相似度 0.675 为阈值,14 个市的普通野生稻可以分为 4 大类。除了第 I 类为北海市(102)、防城港市(1050)和来宾市(3545)的普通野生稻;第 II 类为崇左市(3398)与玉林市(505)各 1 份野生稻聚为一类;第 III 类包含 30 份材料,分别来自于北海、来宾、玉林、百色、贵港、贺州、防城港、南宁等 8 个市。8 个市处在河流交错的红水河-浔江-南流江流域。第 IV 类材料包含了 315 份材料,分别来源于广西的 14 个市。聚类情况见图 6。

表 5 核心种质与总居群的遗传多样性参数比较

Table 5 Genetic diversity parameters of core collection and initial collection

类型 Type	样本 数量 Number	多态性 位点数 Np	多态性 位点百 分比 (%) P_p	观测到 的等位 基因数 N_a	有效的 等位基 因数 N_e	Shannon 指数 I	期望 纯合度 Exp_Hom	实际 纯合度 Obs_Hom	期望 杂合度 Exp_Het	实际 杂合度 Obs_Het	平均 杂合度 Ave_Het	Nei's 多样性 指数 Nei
核心种质 Core germplasm	351	64	100	13.7031	4.7242	1.4045	0.5058	0.4796	0.6718	0.4942	0.6541	0.6541
原种质 Total sample	4173	64	100	18.4375	4.7299	1.7367	0.2815	0.491	0.7185	0.509	0.7182	0.7182
占比(%) Proportion of core germplasm	8.41	100	100	74.32	99.88	80.87	179.68	97.68	93.50	97.09	91.07	91.07

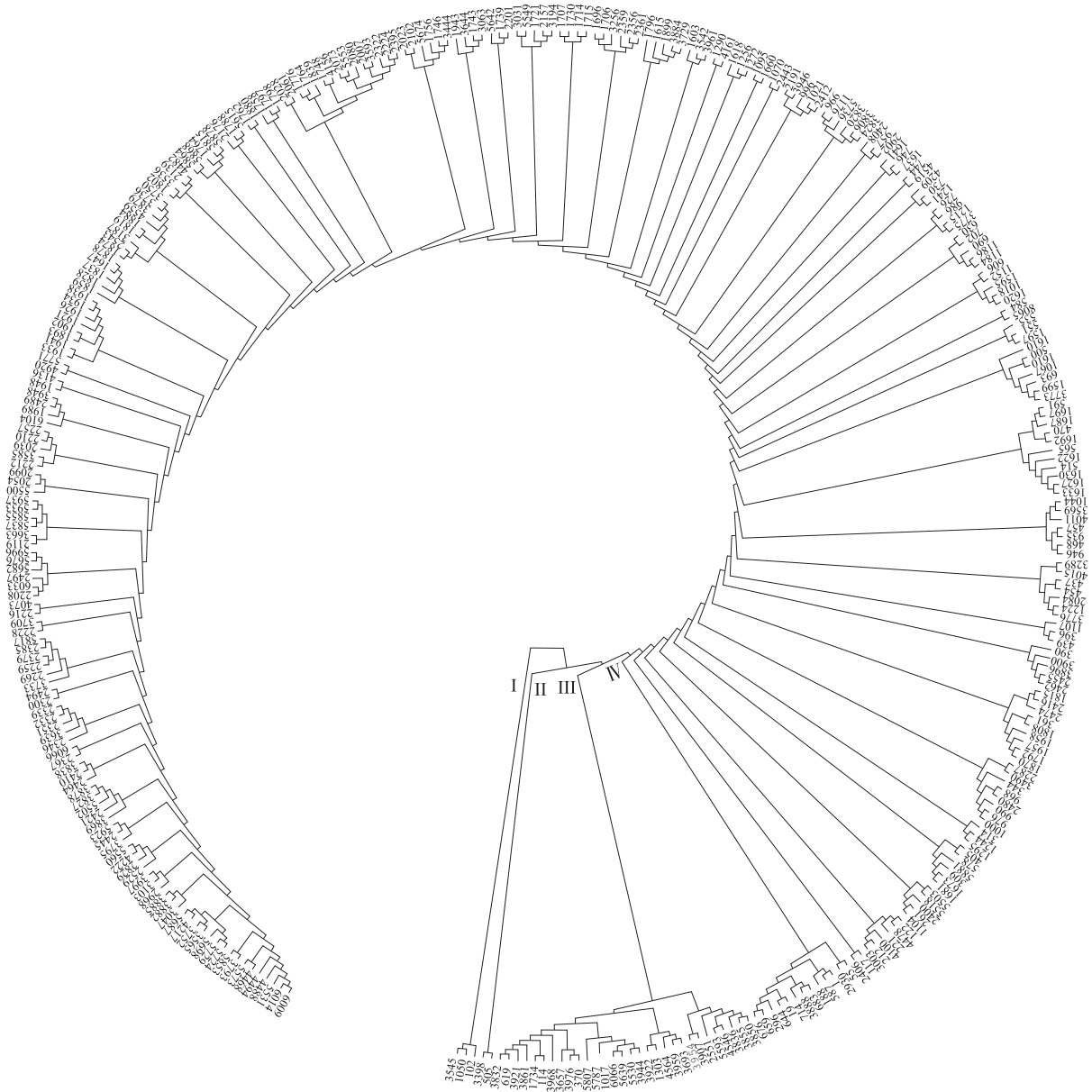


图 6 广西普通野生稻核心种质遗传相似度 UPGMA 法聚类图

Fig. 6 Dendrogram of core collection of common wild rice in Guangxi using UPGMA method

3 讨论

3.1 广西普通野生稻的遗传多样性研究

普通野生稻是现代水稻育种的重要遗传资源。广西是我国普通野生稻的重要分布地区,是保存野生稻数量最多的省份。由于工业化进程的发展和农业生产活动的扩张,导致野生稻原生境受到破坏,分布地面积大量减少。对野生稻资源的遗传多样性进行深入研究具有非常迫切的必要性。

孙传清等^[24]利用野生稻和栽培稻作为研究材料,使用 RFLP 标记的多态性为资料,研究了野生稻和栽培稻的遗传多样性,表明检验核心种质遗传多样性的首选参数是等位基因数。王一平等^[25]采用 48 个 SSR 标记分析了海南 11 个普通野生稻自然居群的遗传多样性,表明海南普通野生稻自然居群具有较丰富的遗传变异。黄金艳等^[26]利用广西中部西江流域的来宾市五里塘 285 份普通野生稻样本为材料,利用平均分布于水稻 12 条染色体上的 24 个微卫星标记进行遗传多样性分析。结果显示普通野生稻材料中有丰富的遗传多样性,从中选取了 30 份材料作为核心种质。核心种质包含了标记能检测到的基因突变位点,代表了该居群的遗传多样性。

本研究利用分布于水稻 12 条染色体上的 64 对分子标记,对广西已发现的 14 个市的 283 个普通野生稻自然居群的 4173 份材料进行检测,发现 64 个位点共检测出 1180 个等位变异,平均检测的 Shannon 指数在 0.3547 ~ 2.777 之间,Nei's 多样性指数在 0.7371 ~ 0.8592 之间。说明广西普通野生稻群体遗传多样性丰富,群体中各变异分布广泛。各材料之间,检测的 Shannon 指数在 0.2599 ~ 1.6600 之间,Nei's 多样性指数在 0.1875 ~ 0.7127 之间。数据显示,不同市的普通野生稻检测到的变异位点有很大差别,其主要原因可能是由于地理环境差异造成了不同区域普通野生稻遗传背景的不同。红水河-郁江-浔江流域河流纵横,贵港、南宁和来宾等市普通野生稻的 Shannon 指数较高,分别为 1.6280、1.6246、1.6421,说明这些地区的普通野生稻遗传多样性更丰富。

根据各市的遗传相似度进行聚类,地理位置相距较近的居群常常聚为一类,亲缘关系较近;说明普通野生稻各分布地之间的遗传关系与地理位置密切相关,这与 J. Huang 等^[5]、薛艳霞等^[27]的研究结果一致。在 14 个市中,多居群的 8 个市居群内的遗传分化大于居群间的分化。与前人研究相比,本研究

的材料众多,来源广泛,反映了广西普通野生稻的整体性,揭示了广西普通野生稻的遗传多样性的丰富性与规律。与其他省份的野生稻遗传多样性比较,广西普通野生稻遗传多样性高于其他省份的普通野生稻^[28]。

普通野生稻资源材料在 $K=2,3,4,6$ 时具有明显的类型划分,发现主要来自北海、贵港、来宾、柳州、玉林,且不随这类群数增加而改变,发现类群的种质资源之间在地理来源上存在相互渗透的现象。

研究结果也为广西普通野生稻资源的原生境保护提供了科学依据。广西普通野生稻资源分布在 14 个市 283 个分布点,分布范围广,保护困难。因此,保护工作应根据普通野生稻遗传多样性的地理分布特征,优先考虑在遗传多样性较高、资源数量较多的玉林、贵港、南宁、来宾等市建立野生稻原生境保护区;然后分别在广西东部、西部、南部、北部、中部挑选出资源(居群)数量较多的野生稻分布点建立原生境保护区。从而,在广西建立起较为完善的普通野生稻原生境保护体系。同时,还应通过建立异位资源保存圃,抢救性收集和保存珍稀的野生稻资源,防止因自然灾害或人为因素导致资源永久消失。根据本研究的结果,为了最大限度地涵盖野生稻资源的遗传多样性,在异位保存以及核心种质构建时,采集的野生稻资源样本应包含每个居群的材料。

3.2 广西普通野生稻的核心种质

构建作物的核心种质有多种策略。余萍等^[16]用 5571 份中国普通野生稻种质,10 项分类和形态性状的数据研究核心种质的取样比例和策略,结果表明 15% 的取样比例较为合适,取样方案以采集省份分组,组内以对数比例法聚类取样效果最好,最终根据最佳方案构建了 920 份中国普通野生稻的初级核心种质库。陈雨等^[17]以 217 份高野保存材料为对象,结合按居群分类和系统聚类选择的方法,对表型保留比例、表型方差等指标进行分析,筛选出了 43 份材料作为应用核心种质,利用 34 对 SSR 引物对核心种质进行分析,结果发现平均等位基因数、多样性指数、基因杂合度等指标说明 76.7% 的材料遗传背景不同,居群材料相对独立。薛艳霞等^[27]用 24 对微卫星标记分析来自郁江流域、红水河流域、南流江流域和桂北山区的 623 份普通野生稻的遗传多样性;采用逐步聚类法构建 10% 和 5% 的广西普通野生稻核心种质。

本研究核心种质采集于广西全区所有普通野生稻分布点,包括百色市、北海市、崇左市、防城港市、

贵港市、桂林市、柳州市、贺州市、河池市、来宾市、南宁市、梧州市、钦州市、玉林市等市的普通野生稻原生地。本研究采用自然居群分组,依据相似性系数使用居群优先的双重聚类取样法构建广西普通野生稻核心种质库。建立了含有 351 份种质的核心种质。结果证明,核心种质保留了 8.41% 的原种质,多态性位点数和多态性位点百分比均保留了原种质的 100%,观测到的等位基因数保留了 74.32%,有效的等位基因数保留 99.88%。核心种质的遗传多样性参数说明核心种质极大地保留了原种质的遗传多样性,能够代表广西普通野生稻的多样性和特异性。

核心种质是整个种质资源中最有代表性的样本,因而可以更加高效地对种质资源进行利用。核心种质的应用主要有两个方面,一是优先利用核心种质对植物遗传资源进行评价,二是优先利用核心种质筛选有用的基因进行遗传育种研究。本研究构建的核心种质以原收集材料的 8.41% (351 份) 代表了广西普通野生稻的遗传多样性,可以极大促进广西普通野生稻资源的研究和利用。以该核心种质为重点,开展抗病虫性、抗逆性等鉴定评价,可以高效发掘出各种优异的基因源,促进野生稻资源在育种上的利用。

参考文献

- [1] 丁颖. 中国栽培稻起源和进化[J]. 农业学报, 1957, 8(3): 243-260
- [2] 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
- [3] Zhu Z F, Sun C Q, Fu Y C, et al. Comparison of the genetic diversity of common wild rice and cultivated rice using SSR markers[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2002, 35(12): 1437-1441
- [4] 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
- [5] Huang J, Yang Q W, Chen C B, et al. Genetic diversity and the geographical characteristics of wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in Guangxi [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2009, 42(8): 2633-2642
- [6] 张晓丽, 郭辉, 王海岗, 等. 中国普通野生稻与栽培稻种 SSR 多样性的比较分析[J]. 作物学报, 2008, 34(4): 591-597
- [7] 朱世华, 张启发, 王明全. 中国普通野生稻核糖体 RNA 基因限制性片段长度多态性[J]. 遗传学报, 1998, 25(6): 531-537
- [8] Huang X, Kurata N, Wei X, et al. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice[J]. Nature, 2012, 490(7421): 497-501
- [9] 张春雨. 新疆野苹果 (*Malus sieversii*) 群体遗传结构与核心种质构建方法[D]. 泰安: 山东农业大学, 2008
- [10] 马玉敏. 中国野生板栗 (*Castanea mollissima* Blume) 群体遗传结构与核心种质构建方法[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009
- [11] Tanksley S D, McCouch S R. Seed bank and molecular maps: Unlocking genetic potential from the wild[J]. Science, 1997, 277: 1063-1066
- [12] Frankel O H, Brown A H D. Plant genetic resources today: a critical appraisal[M]// Holden J H W, Williams J T. Crop Genetic Resources: Conservation and Evaluation. London: George Allen and Unwin, 1984: 249-257
- [13] Brown A H D, Grace J P, Speer S S. Designation of a "core" collection of perennial Glycine[J]. Soybean Genetics Newsletter, 1987, 14: 59-70
- [14] Van Hintum T J L. Comparison of marker systems and construction of a core collection in a pedigree of European spring barley[J]. Theor Appl Genet, 1994, 89: 991-997
- [15] 李自超, 张洪亮, 曾亚文, 等. 云南地方稻种资源核心种质取样方案研究[J]. 中国农业科学, 2000, 33(5): 1-7
- [16] 余萍, 李自超, 张洪亮, 等. 中国普通野生稻初级核心种质取样策略[J]. 中国农业大学学报, 2003, 8(5): 37-41
- [17] 陈雨, 潘大建, 杨庆文, 等. 广东高州野生稻应用核心种质取样策略[J]. 作物学报, 2009, 35(3): 459-466
- [18] Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA miniprep method suitable for AFLP and other PCR applications[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1999, 17(1): 53-57
- [19] McCouch S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Molecular mapping of rice chromosomes [J]. Theor Appl Genet, 1988, 76: 815-829
- [20] 杨庆文, 余丽琴, 张万霞, 等. 东乡普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 原位保存群体的遗传分化和保护策略研究[J]. 中国农业科学, 2007, 40(6): 1085-1093
- [21] 杨庆文, 张万霞, 时津霞, 等. 广东高州普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 的遗传多样性和居群遗传分化研究[J]. 植物遗传资源学报, 2004, 5(4): 315-319
- [22] Hu J, Zhu J, Xu H M. Methods of constructing core collections by stepwise clustering with three sampling strategies based on the genotypic values of crops[J]. Theor Appl Genet, 2000, 101(1/2): 264-268
- [23] 黎毛毛, 黄永兰, 余丽琴, 等. 利用 SSR 标记构建江西稻种资源核心种质库的研究[J]. 植物遗传资源学报, 2012, 13(6): 952-957
- [24] 孙传清, 李自超, 王象坤. 普通野生稻和亚洲栽培稻核心种质遗传多样性的检测研究[J]. 作物学报, 2001, 27(3): 313-319
- [25] 王一平, 魏兴华, 袁筱萍, 等. 海南普通野生稻自然居群间遗传多样性的微卫星分析[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(6): 573-578
- [26] 黄金艳, 陈森, 梁燕理, 等. 广西来宾市五里塘普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 居群遗传多样性与核心种质研究[J]. 西南农业学报, 2008, 21(2): 245-250
- [27] 薛艳霞, 梁燕理, 冯璇, 等. 广西普通野生稻遗传多样性中心的确定与核心种质构建[J]. 华南农业大学学报, 2016, 37(5): 24-30