

元阳 3 个长期连续栽培水稻地方品种 内部遗传异质性分析

高东 杨木青 李锐 潘磊 何霞红

(云南农业大学/农业生物多样性应用技术国家工程中心/教育部农作物多样性与病害控制重点实验室/植物病理重点实验室, 昆明 650201)

摘要: 水稻地方品种是稻种资源的重要组成部分, 遗传多样性十分丰富, 具有推广改良品种所缺少或没有的优质种质, 是水稻育种和稻种起源、进化研究不可缺少的过渡材料。目前, 对水稻地方品种间遗传多样性研究较多, 而对其内部异质性研究甚微。本研究用 24 对微卫星 (SSR) 引物对云南元阳梯田 3 个栽种历史悠久的水稻地方品种的内部遗传异质性进行了分析。共检测出 117 个等位基因, 香农指数为红脚老粳居群 (0.5911) > 白脚老粳 A 居群 (0.4875) > 月亮谷居群 (0.3070)。结果显示: 3 个地方品种的内部遗传异质性丰富, 且遗传异质性主要得益于个体间, 而非居群间。

关键词: 水稻; 微卫星标记; 遗传异质性; 梯田; 地方品种

Intra-variatal Genetic Heterogeneity of 3 Rice Landraces in Yuanyang

GAO Dong, YANG Mu-qing, LI Rui, PAN Lei, HE Xia-hong

(The National Center for Agricultural Biodiversity / Ministry of Education Key Laboratory of Agricultural Biodiversity for Plant Disease Management / Key Laboratory of Plant Pathology / Yunnan Agricultural University, Kunming 650201)

Abstract: Rice landrace is the main part of resources in rice (*Oryza sativa* L.). It has abundant genetic diversity and excellent characters that the current widely-planted variety has not. It is the indispensable resources to breed and study the origin and evolution of rice species. Inter-variatal genetic diversity were attended; however, intra-variatal genetic heterogeneity were not. Twenty-four SSR markers were used to evaluate the intra-variatal heterogeneity of 3 rice landraces that has been continuously planted generation to generation in Yuanyang terraces of Yunnan Province, China. A total of 117 SSR alleles were revealed, and the Shannon's information index of 3 populations were Hongjiaolaojing (0.5911) > Baijiaolaojing (0.4875) > Yuelianggu (0.3070). The results of this study showed that they have abundant intra-variatal heterogeneity in 3 rice landraces. The contribution rate of genetic heterogeneity among plants individual is higher than among populations.

Key words: *Oryza sativa* L.; SSR; Genetic heterogeneity; Terrace; Landrace

遗传基础狭窄是近年来水稻育种徘徊不前的主要原因之一^[1-2], 大面积推广遗传单一化的育成品种加速了地方品种以及土著知识的严重流失^[3], 导致育种和稻种起源研究缺乏过渡材料, 其连锁效应无法估量。云南是世界上最大的稻种遗传和生态多样性中心之一^[4-5], 其中不乏产量性状优良^[6]和抗性稳定持久^[7-8]的稻种资源。元阳梯田稻作系统保护较好的生态多样性

培育了大量连续栽种历史悠久的地方品种^[9]。本研究以元阳梯田稻作系统中历史悠久、栽培面积大的 3 个优良地方品种 (白脚老粳、红脚老粳和月亮谷) 为研究对象, 采取两种取样方式 (完全随机法 A 和地域析出法 B), 利用 24 对微卫星 (SSR) 引物对其内部遗传异质性进行了研究, 以期相对精确地解析元阳水稻地方品种的内部遗传异质性。

收稿日期: 2011-05-30 修回日期: 2011-09-11

基金项目: 国家“973”计划 (2006CB100200, 2011CB100400)

作者简介: 高东, 博士, 讲师, 从事作物遗传多样性与病虫害持续控制研究。E-mail: gaodong521@yahoo.com.cn

1 材料与方法

1.1 供试材料

本研究所用水稻材料共计 55 份,均由 2005 年在元阳县广泛收集的 60 份白脚老粳、60 份红脚老粳和 60 份月亮谷析出。采用两种取样方式: A,各品种随机抽取 5 份,每份 50 个单株,代表 3 个居群,记为月亮谷居群(YL Pop)、红脚老粳居群(HJ Pop)和白脚老粳居群 A(BJ Pop A); B,对白脚老粳按 4 个收集地,每收集地随机抽取 10 份(户),每份 10 个单株,代表 4 个居群,记为土戈寨居群(TGZ Pop)、小水井居群(XSJ Pop)、三家寨居群(SJZ Pop)和大新寨居群(DXZ Pop),整体记为白脚老粳居群 B(BJ Pop B)。抽取的每份材料,温室育苗,3 叶 1 心期,单株剪取新鲜嫩叶,即刻提取基因组总 DNA, -20℃ 保存备用,共计 1150 份 DNA 样品。

1.2 DNA 抽提及 PCR 检测

采用 CTAB 法抽提基因组 DNA^[10],筛选 24 对 SSR 引物用于评估遗传多样性(表 1),PCR 反应和产物检测参考高东等^[11]的方法。

1.3 数据处理

参照 Marker(DL2000),按基因型统计条带,纯合记为 AA、BB、CC……,杂合记为 AB、AC、BC……。遗传多样性参数用 POPGENE^[12-13]进行分析。

1.4 遗传多样性评价

遗传多样性主要参数及其表示方法如下。

多态位点比率 P , $P = (\text{多态位点数} / \text{检测位点数}) \times 100\%$ 。

平均等位基因数 A , $A = \sum_{i=1}^n \frac{A_i}{N}$ 。式中 A_i 为第 i 个多态位点的等位基因数, N 为所检测的位点总数。

期望杂合度 H_e , $H_e = \sum_{i=1}^n \frac{H_i}{N}$, $H_i = 1 - \sum_j p_{ij}^2$ 。

其中 p_{ij} 表示第 i 位点上第 j 个等位基因的频率, N 为检测位点的总数。

居群内的遗传多样性 H_s , $H_s = 1 - \sum_{i=1}^n p_{ij}^2$ 。

总居群的遗传多样性 H_T , $H_T = 1 - \sum_{j=1}^m r_j^2$ 。式

中 m 表示该位点上的等位基因数, r_j 表示该位点上第 j 个等位基因在总居群中的平均频率。

遗传分化系数 G_{ST} , $G_{ST} = (H_T - H_s) / H_T$ 。

Shannon's 指数 I , $I = \sum_{i=1}^s \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N}$ 。 n_i 为第 i 个

种的个体数, N 为种群中总的个体数而 n 则为样地内总的个体数。

2 结果与分析

2.1 遗传多样性

供试 24 对引物在各位点和各居群中检测到的等位基因数不尽相同,在月亮谷居群、红脚老粳居群、白脚老粳居群 A 和白脚老粳居群 B 以及白脚老粳 4 个收集地土戈寨、小水井、三家寨和大新寨居群中分别检测到 83、76、73、98、76、65、68、71 个等位基因,平均每对引物检测到的等位基因数对应为 3.4583、3.1667、3.0417、4.0833、3.1667、2.7083、2.8333、2.9583; Shannon's 指数对应为 0.3070、0.5911、0.4875、0.4719、0.4127、0.3152、0.3980、0.4437(表 1~表 3)。结果显示:元阳梯田稻作系统地方品种遗传多样性丰富,供试品种遗传多样性红脚老粳居群 > 白脚老粳居群 A > 白脚老粳居群 B > 月亮谷居群(表 2~3);各收集地居群遗传多样性不尽相同,大新寨居群 > 土戈寨居群 > 三家寨居群 > 小水井居群(表 3)。研究还发现:杂合位点红脚老粳居群(8 个) > 白脚老粳居群 B(5 个) > 月亮谷居群(3 个) > 白脚老粳居群 A(0 个)(表 2),结合多态性位点百分率(表 2~表 3),说明对元阳地方品种遗传多样性贡献较高的是多态性位点百分率,而非杂合位点的多少。

对白脚老粳地方品种来说,取样策略 A 和 B 检测到的等位基因数分别为 3.4583 和 4.0833, Shannon's 指数分别为 0.4875 和 0.4719,可见加大居群数可以提高等位基因数的检出概率,但并不一定提高香农指数;相对缩小取样居群数,尽量加大居群内个体数,也能保证遗传多样性评价的可靠性。

2.2 遗传变异

总居群的遗传多样性(H_T)红脚老粳居群 > 白脚老粳居群 A > 白脚老粳居群 B > 月亮谷居群(表 4)。遗传分化系数(G_{ST})显示,月亮谷有 90% 的变异来自居群内,10% 的变异来自居群间;红脚老粳有 69% 的变异来自居群内,31% 的变异来自居群间;白脚老粳居群 A 有 34% 的变异来自居群内,66% 的变异来自居群间;白脚老粳居群 B 有 53% 的变异来自居群内,47% 的变异来自居群间(表 4)。结果显示月亮谷和红脚老粳的变异主要来自各户内个体间,而白脚老粳居群 A 的变异主要来自各户间,广泛收集材料,加大群体可保证遗传多样性评价的真实性。

表 1 供试引物在各居群检测到的等位基因数

Table 1 The alleles detected in tested populations by SSR primer pairs

位点 Loci	月亮谷居群 YL Pop	红脚老粳居群 HJ Pop	白脚老粳居群 A BJ Pop A	白脚老粳居群 B BJ Pop B	合计 Total
RM11	2	3	4	1	4
RM14	3	3	3	2	3
RM16	4	1	2	5	5
RM17	3*	2	2	4	4*
RM19	3	2	3	5*	5*
RM25	6*	3	3	4*	6**
RM84	2	3	6	3	6
RM164	3	3*	3	4	4*
RM206	6*	11**	6	13	13***
RM208	5	3*	3	2	5*
RM210	5	5*	4	4	5*
RM211	2	1	2	2*	3*
RM215	4	2	2	3	4
RM219	3	5*	3	5	5*
RM222	4	3	3	3	4
RM224	3	2	2	4	4
RM225	4	1	1	3	4
RM228	1	3	2	2	3
RM231	3	3	2	3	3
RM234	5	3**	3	4*	5***
RM253	2	2	2	4	4
RM280	4	5	6	6	6
RM289	2	2	1	3*	3*
RM335	4	5	5	9	9
合计 Total	83	76	73	98	117

* : 存在一个杂合等位基因

* : One heterozygous allele exists

表 2 取样方式 A 中 3 个水稻地方品种的遗传多样性

Table 2 Genetic diversity of 3 rice landraces by A sampling

品种 Variety	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>N_a</i>	<i>K</i>	<i>P</i> (%)	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>I</i>
月亮谷居群 YL Pop	3.4583	1.2319	83	23	95.83	0.0007	0.1465	0.3070
红脚老粳居群 HJ Pop	3.1667	1.7616	76	21	87.50	0.0013	0.3610	0.5911
白脚老粳居群 BJ Pop	3.0417	1.5275	73	22	91.67	0	0.2716	0.4875

A、*A_e*、*N_a*、*K*、*P*、*H_o*、*H_e* 和 *I* 分别代表平均等位基因数、有效平均等位基因数、总等位基因数、多态性位点数、多态性位点数百分率、观察杂合度、期望杂合度、Shannon's 指数

A、*A_e*、*N_a*、*K*、*P*、*H_o*、*H_e* and *I* refer to average number of alleles, effective number of alleles, total number of alleles, number of polymorphic loci, the percentage of polymorphic loci, observed heterozygosity, expected heterozygosity and Shannon's information index, respectively

表 3 取样方式 B 中白脚老粳地方品种的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity of Baijiaolaojing rice landraces by B sampling

品种 Variety	<i>A</i>	<i>A_e</i>	<i>N_a</i>	<i>K</i>	<i>P</i> (%)	<i>H_o</i>	<i>H_e</i>	<i>I</i>
土戈寨居群 TGZ Pop	3.1667	1.3251	76	22	91.67	0.0012	0.2072	0.4127
小水井居群 XSJ Pop	2.7083	1.2810	65	20	83.33	0.0008	0.1648	0.3152
三家寨居群 SJZ Pop	2.8333	1.3841	68	20	83.33	0.0004	0.2144	0.3980
大新寨居群 DXZ Pop	2.9583	1.4737	71	20	83.33	0.0004	0.2390	0.4437
白脚老粳居群 BBJ Pop B	4.0833	1.4735	98	23	95.83	0.0007	0.2394	0.4719

A、*A_e*、*N_a*、*K*、*P*、*H_o*、*H_e* 和 *I* 分别代表平均等位基因数、有效平均等位基因数、总等位基因数、多态性位点数、多态性位点数百分率、观察杂合度、期望杂合度、香农指数

A、*A_e*、*N_a*、*K*、*P*、*H_o*、*H_e* and *I* refer to average number of alleles, effective number of alleles, total number of alleles, number of polymorphic loci, the percentage of polymorphic loci, observed heterozygosity, expected heterozygosity, and Shannon's information index, respectively

表 4 供试水稻品种的遗传变异

Table 4 Genetic differentiation of rice varieties used for analysis

品种 Variety	总遗传多样性 H_T	居群内遗传多样性 H_S	基因分化系数 G_{ST}
月亮谷居群 YL Pop	0.1462	0.1311	0.103283
红脚老粳居群 HJ Pop	0.3603	0.2458	0.317791
白脚老粳居群 BJ Pop A	0.2710	0.0911	0.663838
白脚老粳居群 BJ Pop B	0.2391	0.1264	0.471351

3 讨论

云南水稻遗传资源丰富,特别是地方品种,有许多品种具有珍贵性状,如小秀谷、麻谷、花糯等,耐寒性很强;三旁斗七十罗、公居 73、班利 1 号等,每穗粒数超过 300 粒,高者可达 500 粒^[6];月亮谷、红脚老粳、白脚老粳等栽培历史悠久^[9,14]。本研究揭示:元阳地方品种内部遗传异质性丰富,特别是居群内部个体间遗传异质性对其遗传多样性的贡献相对较高,这为杂种优势的利用提供了更广阔的选择空间。同时,这种内部遗传异质性很可能是其具有良好适应性和持续性、悠久栽培的内因。

目前由于某些遗传材料在改良某一性状方面的独特作用,以这些亲本育成的新品种(跨区域)大幅度增加,造成了生产上同一作物的遗传基础趋于单一化,导致农作物大量基因的丢失和遗传多样性的降低^[15-18]。一方面杂交水稻产量、品质和抗性难以大幅度提高^[19],另一方面许多优良地方品种不但没有好好利用,而且迅速被取代,主要原因是认识不够、研究薄弱。应加强对地方品种的保护和研究。对遗传多样性的保护涉及到取样策略^[20],本研究对扩大居群内个体数和扩大取样居群数两种策略进行了比较研究,二者在评估遗传异质性的真实性和可靠性方面差异不大,这是由于农作物地方品种在一定范围内交换频繁^[21],极大地抵消了地理隔离现象,导致居群间遗传多样性差异降低,居群内部遗传异质性丰富的现象。所以,本研究认为,在农作物地方品种取样方面没有必要花费很大的精力收集尽可能多的居群,可以用加大居群内个体数量的策略来保证遗传多样性评估的真实性;在野生自然居群的取样中,由于地理隔离和自交现象严重,取样应尽量扩大居群量,而非居群内个体的数量。

参考文献

- [1] 龙萍,杨华,余四斌,等. 水稻导入系群体的构建与保存[J]. 植物遗传资源学报, 2009, 10(1): 51-54
- [2] 齐永文,张冬玲,张洪亮,等. 中国水稻选育品种遗传多样性及其近 50 年变化趋势[J]. 科学通报, 2006, 51(6): 693-699
- [3] 王述民,李立会,黎裕,等. 中国粮食和农业植物遗传资源状况报告: I [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 1-12
- [4] 黄燕红,孙新立,王象坤. 中国栽培稻遗传多样性中心和起源研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 125-129
- [5] Zeng Y W, Zhang H L, Wang L X, et al. Genotypic variation in element concentrations in brown rice from Yunnan landraces in China [J]. Environ Geochem Hlth, 2009, 32(3): 165-177
- [6] Porceddu E, Ceoloni C, Lafiandra D, et al. Genetic resources and plant breeding: problems and prospects [M]//Mille T E, Koebner R M D. Cambridge, UK: Wheat genetics, Institute of Plant Science Research, 1988: 7-22
- [7] 肖放华,彭绍裘,陈勇,等. 云南地方稻种持久抗瘟性的研究[J]. 植物遗传资源科学, 2001, 2(3): 1-7
- [8] 肖放华,陈勇,彭绍裘,等. 应用系统聚类方法筛选持久抗瘟性水稻品种[J]. 中国水稻科学, 2001, 15(3): 225-228
- [9] 高东,王云月,何霞红,等. 元阳白脚老粳水稻地方品种内遗传异质性及意义[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 283-291
- [10] Song Z P, Xu X, Wang B, et al. Genetic diversity in the north-ermmost *Oryza rufipogon* populations estimated by SSR markers [J]. Theor Appl Genet, 2003, 107(8): 1492-1499
- [11] 高东,杜飞,朱有勇. 低背景、高分辨率 PAGE 简易银染法[J]. 遗传, 2009, 31(6): 668-673
- [12] Yeh F C, Yang R C, Boyle T. POPGENE version 1.31 [M]. Edmonton, Canada: University of Alberta Press, 1999: 1-28
- [13] Rohlf F J. NTSYS: numerical taxonomy and multi-variate analysis system, version 2.02a [M]. New York: Exeter Software Press, 1997: 33
- [14] 吕广磊,简忠龙,白现广,等. 云南栽培稻种 SSR 遗传多样性比较[J]. 植物学报, 2009, 44(4): 457-463
- [15] Donini P, Law J R, Koebner R M D, et al. Temporal trends in the diversity of UK wheat [J]. Theor Appl Genet, 2000, 100: 912-917
- [16] Normile D. Variety spices up Chinese rice yield [J]. Science, 2000, 289(5482): 1119-1120
- [17] Tian Q Z, Zhou R H, Jia J Z. Genetic diversity trend of common wheat (*Triticum aestivum* L.) in China revealed with AFLP markers [J]. Genet Resour Crop Evol, 2005, 52(3): 325-331
- [18] Zhu Y Y, Chen H R, Fan J H, et al. Genetic diversity and disease control in rice [J]. Nature, 2000, 406(6797): 718-722
- [19] 张涛,郑家奎,徐建第,等. 香稻品种的遗传多样性研究[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 625-635
- [20] 金燕,卢宝荣. 遗传多样性的取样策略[J]. 生物多样性, 2003, 11(2): 155-161
- [21] 高东,何霞红,朱有勇. 元阳水稻地方品种多样性变化及换种规律研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(2): 311-313