

# 广西药用野生稻遗传多样性分析及 SSR 引物数量对遗传多样性结果的影响研究

苏 龙<sup>1,2</sup>, 徐志健<sup>2,3</sup>, 乔卫华<sup>2</sup>, 郑晓明<sup>2</sup>, 梁云涛<sup>3</sup>, 丁膺宾<sup>1,2</sup>, 刘 莎<sup>2</sup>, 齐 兰<sup>2</sup>,  
公婷婷<sup>2</sup>, 梁新霞<sup>2</sup>, 王君瑞<sup>2</sup>, 张丽芳<sup>2</sup>, 程云连<sup>2</sup>, 兰进好<sup>1</sup>, 杨庆文<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学农学院, 青岛 266109; <sup>2</sup>中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>3</sup>广西农业科学院水稻研究所, 南宁 530007)

**摘要:**采用 25 对 SSR 分子标记, 对广西境内采集的 1610 份药用野生稻材料进行遗传多样性和聚类分析, 其中检测到等位变异 181 个, 有效等位基因数  $A_e$  范围为 1.0094(RM240)~2.2674(RM488), 平均值为 1.3568; 期望杂合度  $H_e$  范围为 0.0093(RM240)~0.5591(RM448), 平均值为 0.2112; Shannon 多样性指数  $I$  在 0.0393~0.9296 之间变动, 平均值为 0.3624。数据表明, 广西药用野生稻遗传多样性较为丰富, 12 个药用野生稻地理居群按遗传多样性指数大小排序为: 梧州-3 > 南宁-1 > 梧州-2 > 梧州-1 > 南宁-2 > 玉林-2 > 贵港-2 > 梧州-4 > 玉林-3 > 玉林-1 > 贺州 > 贵港-1, 其中指数高的居群均分布于梧州市和南宁市两地, 因此确定了这两地为广西药用野生稻的遗传多样性中心。通过不同数量的 SSR 引物对药用野生稻材料间相似系数矩阵进行相关性测验, 结果显示当引物按照 PIC 值降序排列时, 10 对引物即达到较好聚类效果, 升序排列时, 21 对引物即达到较好聚类效果。研究表明, 在进行药用野生稻大居群聚类分析时, SSR 引物适宜数量应多于 21 对, 最低不得少于 10 对。

**关键词:**药用野生稻; 遗传多样性中心; 聚类分析; SSR 引物数量

## Study on Genetic Diversity of *Oryza officinalis* in Guangxi Province and the Effect of the Number of SSR Primers on Genetic Diversity Analysis

SU Long<sup>1,2</sup>, XU Zhi-jian<sup>2,3</sup>, QIAO Wei-hua<sup>2</sup>, ZHENG Xiao-ming<sup>2</sup>, LIANG Yun-tao<sup>3</sup>, DING Ying-bin<sup>1,2</sup>,  
LIU Sha<sup>2</sup>, QI Lan<sup>2</sup>, GONG Ting-ting<sup>2</sup>, LIANG Xin-xia<sup>2</sup>, WANG Jun-rui<sup>2</sup>, ZHANG Li-fang<sup>2</sup>,  
CHENG Yun-lian<sup>2</sup>, LAN Jin-hao<sup>1</sup>, YANG Qing-wen<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109; <sup>2</sup>Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; <sup>3</sup>Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007)

**Abstract:** Guangxi province has the most abundant *Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt germplasm resource in China. In this study, 1610 *Oryza officinalis* individuals which collected from all over Guangxi *in situ* sites, were used for genetic diversity analysis with 25 SSR markers. 181 polymorphic bands were detected, and the effective number of alleles ( $A_e$ ) ranged from 1.0094 to 2.2674 and averaged at 1.3568. The expected heterozygosity ( $H_e$ ) ranged from 0.0093 to 0.5591 and averaged at 0.2112. The Shannon-Weaver information index ranged from 0.0393-0.9296 and averaged at 0.3624. We confirmed that Wuzhou and Nanning were the genetic diversity center of *Oryza officinalis*.

收稿日期: 2017-01-22 修回日期: 2017-02-22 网络出版日期: 2017-06-13

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170613.0916.032.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31471471); 国家重点研发计划(2016YFD0100101-01-02); 农业部财政专项(2016NWB036-01-12); 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)

第一作者研究方向为稻种资源及创新利用研究。徐志健为同等贡献作者

通信作者: 兰进好, 研究方向为作物遗传育种研究。E-mail: jinhao2005@163.com

乔卫华, 研究方向为种质资源创新利用研究。E-mail: qiaoweihua@caas.cn

杨庆文, 研究方向为种质资源创新利用研究。E-mail: yangqingwen@caas.cn

lis Wall. ex G. Watt in Guangxi and in China as well. Mantel correlation test was carried out to examine the correlation among cophenetic matrices, the results showed that more than 21 pairs of primer (no less than 10 pairs) would be the appropriate number for genetic diversity analysis of *Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt populations.

**Key words:** *Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt; genetic diversity center; cluster analysis; SSR

药用野生稻 (*Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt) 基因组为 CC 染色体组, 与栽培稻杂交不亲和<sup>[1]</sup>, 研究远没有 AA 染色体组的普通野生稻深入。但药用野生稻对多种水稻主要病虫害具有免疫高抗的能力, 是水稻育种的优异种质资源<sup>[2]</sup>。我国药用野生稻主要分布在海南、云南、广西和广东 4 个省份。1936 年, 王启元在云南景洪的车里河流域附近发现药用野生稻, 是我国首次报道药用野生稻的分布点; 1954 年陈统华在广东罗定县与广西溪县发现了两个药用野生稻的分布点<sup>[3]</sup>。药用野生稻在我国的分布南至海南三亚市, 东至广东英德市, 西至云南临沧市, 其中在广西的分布最为广泛, 广西药用野生稻的遗传多样性也最为丰富<sup>[3-5]</sup>。

近年来随着 DNA 分子标记技术的飞速发展, 微卫星 (Microsatellite, SSR) 分子标记因其稳定性好、多态性高、操作方便等诸多优点, 已被广泛地应用于包括野生稻在内的各种作物遗传结构和遗传多样性分析研究中<sup>[6-10]</sup>。C. Orm 等<sup>[6]</sup>利用 12 对引物对柬埔寨的 448 份多年生和一年生普通野生稻进行遗传多样性分析, 通过聚类分析后将供试材料分为 5 个居群, 发现生态条件远比地理条件对野生稻的影响大。黄娟等<sup>[11]</sup>利用 36 对 SSR 引物对来自广西的 27 个居群, 690 份普通野生稻材料进行遗传多样性分析, 其居群的香农指数  $I$  范围是 0.38 ~ 1.27, 处于较高水平。然而目前为止对于广西药用野生稻遗传多样性的研究并不多, 药用野生稻在广西的遗传多样性中心位置尚未确定。在利用 SSR 引物进行遗传多样性分析时, 当群体材料数量较大时, 采用多少引物标记才能揭示其群体的遗传结构是一个值得重视的问题。不同引物标记反映的基因组区域的 DNA 序列是不同的, 标记数量较少时, 可能无法全部覆盖基因组上产生变异的区域, 因而不能揭示该变异的全部信息, 而数量过多则不仅未必增加信息量还会造成额外的试验成本<sup>[12-14]</sup>。药用野生稻在广西分布广泛且遗传多样性丰富, 因此, 研究引物标记数量对广西药用野生稻遗传参数以及遗传结构的影响具有重要的意义。

本研究选取了 1610 份药用野生稻材料, 来自 20 世纪 70 年代广西野生稻普查记录中所有药用野

生稻分布点, 能够准确反映出广西药用野生稻的遗传多样性信息。筛选出 25 对能够扩增出多态性位点的 SSR 引物对试验材料进行遗传多样性分析和聚类, 旨在分析广西药用野生稻的遗传多样性中心位置; 并阐述了在群体材料数量较大时, SSR 引物数量对药用野生稻遗传多样性分析结果的影响, 希望通过研究发现对大居群药用野生稻进行遗传多样性分析的合适引物数量, 为其他学者研究药用野生稻提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

本试验材料的采集是根据 20 世纪 70 年代广西野生稻普查记录中所有药用野生稻分布点 (图 1) 进行的, 共分为 7 个阶段, 时间跨度为 2002 年 6 月到 2009 年 8 月<sup>[15]</sup>。采集方位依据植物生态学自然群落的理念, 在自然群落中划分采集区域, 分居群记录种质资源的集团号, 野生稻原生地比较庞大的分布点在群落边缘植株相隔 100 m 以上划分为另一采集区域。采集区域内根据形态类型差异进行取样, 每一类型取 5 ~ 8 株; 如果原生地面积较小, 30 株以下的野生稻群体内则取 3 ~ 5 株。采集区域内植株形态表现一致的, 则采取 3 点法每隔 3 ~ 5 m 进行取样, 确保每份种质资源都具有遗传多样性的代表性<sup>[16]</sup>。本研究共采集 12 个居群 (表 1), 共 1610 份药用野生稻材料。将采集到的样本叶片放入装有硅胶的自封袋, 并迅速进行干燥保存, 以免叶片内的 DNA 快速降解。

### 1.2 方法

**1.2.1 DNA 提取** 采集回来的叶片用液氮冷冻后进行研磨, 材料基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法<sup>[17]</sup>, 提取后的 DNA 在 -20 °C 进行保存。

**1.2.2 多态性标记筛选** 从水稻基因组 SSR 图谱中挑选出在水稻 12 条染色体上均匀分布的 SSR 引物, 从中筛选出能够扩增出多态性条带的 25 对引物。SSR 标记引物由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

**1.2.3 PCR 扩增与电泳检测** PCR 体系为 15  $\mu$ L: 10  $\times$  Buffer (含 15 mmol/L  $MgCl_2$ ) 1.5  $\mu$ L, 10 mmol/L

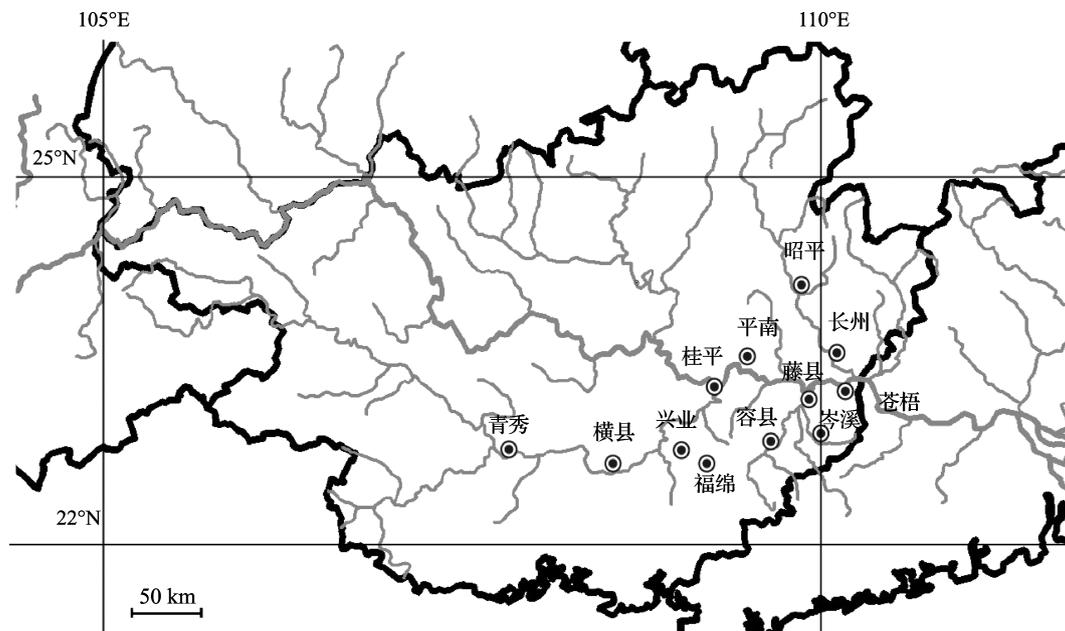


图 1 广西药用野生稻分布点

Fig. 1 The distribution of Guangxi *Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt

表 1 广西各居群材料数量

Table 1 The number of *Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt from different population

居群号 Population no.	居群所在地 Population locality	样品数量 Sample size
1	南宁-2 Nanning-2	73
2	贵港-1 Guigang-1	15
3	贵港-2 Guigang-2	28
4	梧州-1 Wuzhou-1	55
5	梧州-3 Wuzhou-3	384
6	梧州-2 Wuzhou-2	720
7	玉林-1 Yulin-1	41
8	梧州-4 Wuzhou-4	119
9	玉林-2 Yulin-2	106
10	南宁-1 Nanning-1	9
11	贺州 Hezhou	31
12	玉林-3 Yulin-3	29

dNTP 0.3  $\mu\text{L}$ , 15  $\mu\text{mol/L}$  正反引物各 1.0  $\mu\text{L}$ , 5 U/ $\mu\text{L}$  Taq polymerase 0.2  $\mu\text{L}$ , 25 ng/ $\mu\text{L}$  DNA 2  $\mu\text{L}$ , ddH<sub>2</sub>O 10.725  $\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为: 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min, 94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s, 56  $^{\circ}\text{C}$  退火 30 s, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 30 s, 共 33 个循环, 72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 5 min。扩增产物经 DYY-10C 型稳压稳流电泳仪上的 8% 聚丙烯酰胺凝胶检测, 电泳 50 min, 银染观察并拍照, 扩增谱带均以 0 或 1 建立数据库, 扩增带存在时记为 1, 不存在时记为 0, 条带模糊不清时记为 -1, 最后将条带数据转换为基

因型数据。

**1.2.4 遗传多样性分析** 根据每个条带所在位置确定其基因型, 得到 01 数据, 通过 DataFormater 软件将 01 数据转换成 BP 数据和 Popenge, Powermarker, Ntsys, Tassel 等软件的导入数据模式<sup>[18]</sup>。Popenge 软件计算各居群单独以及总体的平均等位基因数 ( $A$ )、有效等位基因数 ( $A_e$ )、Shannon 信息指数 ( $I$ )、期望杂合度 ( $H_e$ )、观测杂合度 ( $H_o$ ) 以及遗传距离和遗传一致度; Powermarker 软件在验证计算上述参数外重点计算各引物的平均多态信息含量 (PIC), 计算公式为: Shannon 指数  $I = -\sum (P_i)(\ln P_i)$ , 多态信息含量  $PIC = 1 - \sum P_i^2$ ,  $P_i$  为第  $i$  个等位基因变异出现的频率<sup>[19-20]</sup>。

使用 NTSYS 数据分析软件, 采用 Jaccard's 相似系数, 非加权组平均法 (UPGMA) 进行聚类, 并得到不同分组下的相似系数矩阵, 用 NTSYS 软件中的 Matrix comp. plot 进行矩阵相关性测验并得到相关系数<sup>[21]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 广西药用野生稻 SSR 标记位点的遗传多样性分析

利用筛选出来的 25 对 SSR 引物对 1610 份药用野生稻材料进行遗传多样性分析, 不同位点的分析结果列于表 2。25 对引物共检测到 181 个等位变异, 总体的平均等位基因数  $A$  的范围为 3 (RM344) ~ 13

(RM515), 平均值为 7.24; 有效等位基因数  $A_e$  范围为 1.0094 (RM240) ~ 2.2674 (RM488), 平均值为 1.3568; 观测杂合度  $H_o$  范围为 0.0019 (RM573) ~ 0.1963 (RM234), 平均值为 0.0391; 期望杂合度  $H_e$  范围为 0.0093 (RM240) ~ 0.5591 (RM448), 平均值为 0.2112。引物的多态信息含量 PIC 范围为

0.009286 (RM240) ~ 0.461075 (RM488), 平均为 0.1765; Shannon 多样性指数在 0.0393 (RM240) ~ 0.9296 (RM488) 之间变动, 平均为 0.3624。上述两个指标 PIC 指数和 Shannon 指数变化幅度均较大, 表明 SSR 引物标记在药用野生稻群体中能够较好地反映出其丰富的遗传多样性信息。

表 2 SSR 引物的遗传多样性指数

Table 2 Genetic diversity parameters based on SSR primers

位点 Locus	染色体 Chromosome	平均等位基因数 $A$	有效等位基因数 $A_e$	Shannon 指数 $I$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	多态信息含量 PIC
RM1167	1	8	1.4325	0.6158	0.0509	0.3020	0.275807
RM488	1	6	2.2674	0.9296	0.0851	0.5591	0.461075
RM240	2	10	1.0094	0.0393	0.0043	0.0093	0.009286
RM573	2	6	1.0150	0.0506	0.0019	0.0148	0.014756
RM251	3	12	1.8051	0.7136	0.0479	0.4462	0.360596
RM282	3	7	1.0125	0.0467	0.0087	0.0124	0.012348
RM60	3	4	1.9503	0.7095	0.1559	0.4874	0.374460
RM6594	3	8	1.8058	0.6768	0.0218	0.4464	0.353555
RM17308	4	5	1.6208	0.5947	0.0497	0.3831	0.312946
RM164	5	5	1.3628	0.4673	0.0044	0.2663	0.238225
RM121	6	6	1.4594	0.5305	0.0460	0.3149	0.269591
RM234	7	10	1.2193	0.3497	0.1963	0.1799	0.165191
RM533	7	4	1.0688	0.1556	0.0559	0.0644	0.062629
RM23586	8	4	1.0531	0.1321	0.0292	0.0504	0.049450
RM344	8	3	1.7663	0.6478	0.0342	0.4340	0.343956
RM515	8	13	1.4861	0.5472	0.0416	0.3272	0.278518
RM215	9	8	1.0291	0.0952	0.0186	0.0283	0.028168
RM242	9	8	1.0743	0.1734	0.0211	0.0692	0.067274
RM321	9	3	1.0558	0.1384	0.0429	0.0528	0.051916
OSR15	10	7	1.0132	0.0500	0.0031	0.0130	0.012972
RM258	10	7	1.3822	0.4694	0.0273	0.2766	0.240159
RM496	10	9	1.0132	0.0524	0.0044	0.0130	0.014215
RM224	11	12	1.9862	0.7585	0.0186	0.4967	0.385166
RM287	11	8	1.0170	0.0615	0.0031	0.0167	0.016640
RM277	12	8	1.0151	0.0536	0.0050	0.0148	0.014782
平均 Mean		7.24	1.3568	0.3624	0.0391	0.2112	0.1765

$A$ : Mean number of alleles per locus,  $A_e$ : Effective number of alleles,  $I$ : Shannon-Weaver information index,  $H_o$ : Observed heterozygosity,  $H_e$ : Expected heterozygosity. The same as below

由表 2 可以看出, RM488 和 RM224 引物的 Shannon 指数最高, 分别为 0.9296 和 0.7585, 并且这两对引物扩增出的有效等位基因数 2.2674 和 1.9862 也高于其他引物, 说明这两对引物对总体的试验材料具有很强的区分能力。分别计算每个引物在各个居群中的遗传多样性指标时发现, 不同引物

表现出较大的差异, 例如, 在梧州-2 群体中, 引物 RM344 的 Shannon 指数最高 (0.6575), 区分能力最强; 而在梧州-1 群体中, 引物 RM251 的 Shannon 指数最高 (0.6930), 表明相同引物在不同群体中的区分能力不同 (表 3)。

表 3 各居群遗传多样性指数比较

Table 3 The comparison of different population's genetic diversity index

市 City	居群 Population	位点多态性 比率 $P_a$ (%)	平均等位 基因数 $A$	有效等位 基因数 $A_e$	观测杂合度 $H_o$	期望杂合度 $H_e$	居群 Shannon 指数 $I$	居群最高 Shannon $I$ 指数引物	
梧州市 Wuzhou	梧州-1 Wuzhou-1	44	1.44	1.1950	0.0160	0.1240	0.1914	RM224(0.6930)	
	梧州-2 Wuzhou-2	52	1.52	1.2041	0.0194	0.1343	0.2154	RM344(0.6575)	
	梧州-3 Wuzhou-3	52	1.52	1.3030	0.0490	0.1713	0.2522	RM251(0.6740)	
	梧州-4 Wuzhou-4	40	1.40	1.1533	0.0276	0.0966	0.1529	RM6594(0.6709)	
	均值 Mean		1.47	1.2139	0.0280	0.1316	0.2032		
	玉林市 Yulin	玉林-1 Yulin-1	36	1.36	1.1055	0.0323	0.0743	0.1242	RM488(0.5816)
	玉林-2 Yulin-2	48	1.48	1.1756	0.0265	0.1150	0.1829	RM60(0.6870)	
玉林-3 Yulin-3	36	1.36	1.1147	0.0317	0.0791	0.1267	RM121(0.6325)		
均值 Mean			1.40	1.1319	0.0302	0.0895	0.1446		
南宁市 Nanning	南宁-1 Nanning-1	36	1.36	1.2618	0.0356	0.1574	0.2163	RM164(0.5196)	
	南宁-2 Nanning-2	48	1.48	1.1959	0.0390	0.1181	0.1844	RM224(0.6885)	
	均值 Mean		1.42	1.2289	0.0373	0.1378	0.2002		
贺州市 Hezhou	均值 Mean	20	1.20	1.1351	0.0039	0.0757	0.1084	RM6594(0.4293)	
贵港市 Guigang	贵港-1 Guigang-1	12	1.12	1.0259	0.0057	0.0215	0.0373	RM488(0.6931)	
	贵港-2 Guigang-2	40	1.40	1.1471	0.0171	0.1027	0.1616	RM6594(0.5623)	
	均值 Mean		1.26	1.0865	0.0114	0.0621	0.0995		
	总体平均 Mean		1.39	1.1681	0.0253	0.1058	0.1628		

## 2.2 广西药用野生稻不同居群间遗传多样性分析

本研究中的 12 个广西药用野生稻居群全部分布于珠江流域,其中群居 4、5、6、8 属于梧州市,居群 7、9、12 属于玉林市,居群 1、10 属于南宁市,居群 2、3 属于贵港市,居群 11 属于贺州市。从图 2 广西药用野生稻聚类图中可以看到,12 个居群的材料聚类结果是符合地理分布的,可以按照地理居群进行划分。

通过对 12 个居群各项参数的比较可以比较直

观地分析出其遗传多样性的差异(表 3),平均等位基因数  $A$  为 1.12 ~ 1.52,有效等位基因数  $A_e$  为 1.0259 ~ 1.3030,观测杂合度  $H_o$  为 0.0039 ~ 0.049,期望杂合度  $H_e$  为 0.0215 ~ 0.1713,居群 Shannon 指数  $I$  为 0.0373 ~ 0.2522。数据表明,不同居群之间遗传多样性存在较大差异。12 个药用野生稻居群的遗传多样性指数按大小排序为:梧州-3 > 南宁-1 > 梧州-2 > 梧州-1 > 南宁-2 > 玉林-2 > 贵港-2 > 梧州-4 > 玉林-3 > 玉林-1 > 贺州 > 贵港-1。

梧州市和南宁市居群的平均 Shannon 指数  $I$  (0.2032, 0.2002)、有效等位基因数  $A_e$  (1.2139, 1.2289)、观测杂合度  $H_o$  (0.0280, 0.0373) 和期望杂合度  $H_e$  (0.1316, 0.1378) 都是最高的, 表明梧州市和南宁市为广西药用野生稻的遗传多样性中心。

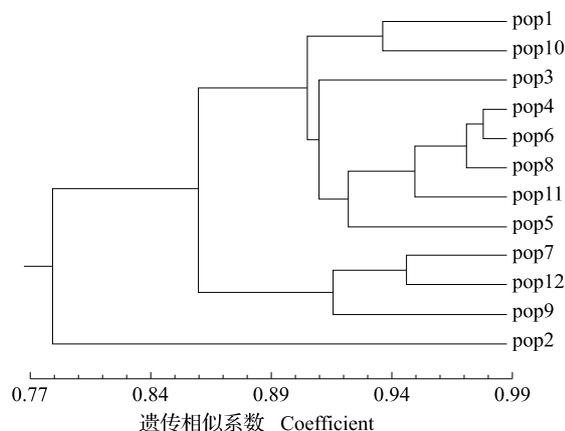


图2 广西药用野生稻居群聚类图

Fig. 2 Clustering figures of Guangxi *Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt populations

### 2.3 引物数量变化对聚类结果的影响

将 25 对引物按 PIC 值降序排列进行聚类所得的聚类图作为母图, 同时得到的遗传相似系数矩阵作为母阵, 以 5 为单位逐步减少引物, 得到 4 个遗传相似系数矩阵和聚类图; 同理按照 PIC 值升序重排后得到另外 4 个遗传相似系数矩阵和聚类图。将上述 8 个遗传相似系数矩阵分别与母阵进行相关性测验, 发现无论哪种引物排列方式, 随着引物增加, 相关系数均呈上升趋势。当引物按照 PIC 值升序排序时, 5 对引物、10 对引物和 15 对引物的遗传相似系数矩阵与母阵的相关系数 ( $r$ ) 分别为 0.4396, 0.4460, 0.5977 ( $r < 0.7$ ), 相关性低; 20 对引物的遗传相似系数矩阵与母阵的相关系数为 0.8866 ( $0.7 < r < 0.9$ ), 相关性较高, 然而并没有高于 0.9。根据 M. Nei<sup>[20]</sup> 的结论, 当相关系数大于 0.9, 那么这两个遗传相似系数矩阵才达到极显著相关。在 20~25 对引物之间增加 4 个分组, 分别为 21 对、22 对、23 对、24 对, 相似性系数矩阵与母阵进行相关性测验发现 (表 4 和图 3), 当引物多于 21 对时, 相关性均大于 0.9, 说明 21 对引物获得的聚类结果与 25 对引物获得的聚类结果相当。当引物按照 PIC 值降序排列时, 10 对引物时, 相关性系数达到 0.9246 ( $r > 0.9$ ), 说明降序排列时, 仅用 10 对引物聚类即可达到 25 对引物的精度。引物在上述分组情况下进一步进行聚类分析得到图

4 和图 5, 经过与总聚类图 (图 2) 对比发现, 其结果进一步验证上述观点。

表 4 不同数量引物在两种排列方式下的相关系数

Table 4 Correlation coefficients of different primer numbers in two permutations

引物数 No. of primers	引物按照 PIC 值升序 排列 Primers sorted in ascending order	引物按照 PIC 值降序 排列 Primers sorted in descending order
5	0.4396	0.7984
10	0.4460	0.9246
15	0.5977	0.9765
20	0.8866	0.9957
21	0.9295	0.9975
22	0.9524	0.9987
23	0.9671	0.9994
24	0.9865	0.9998

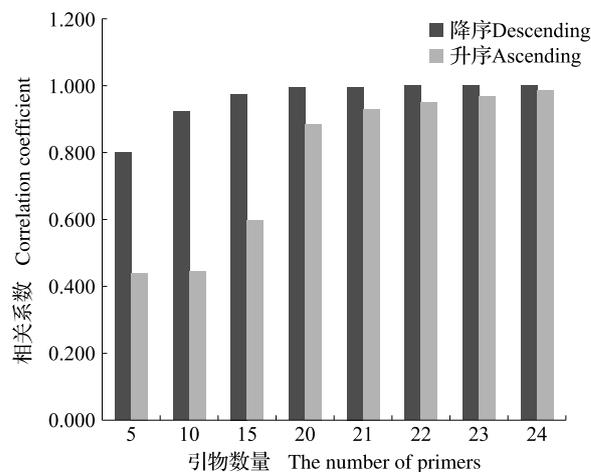
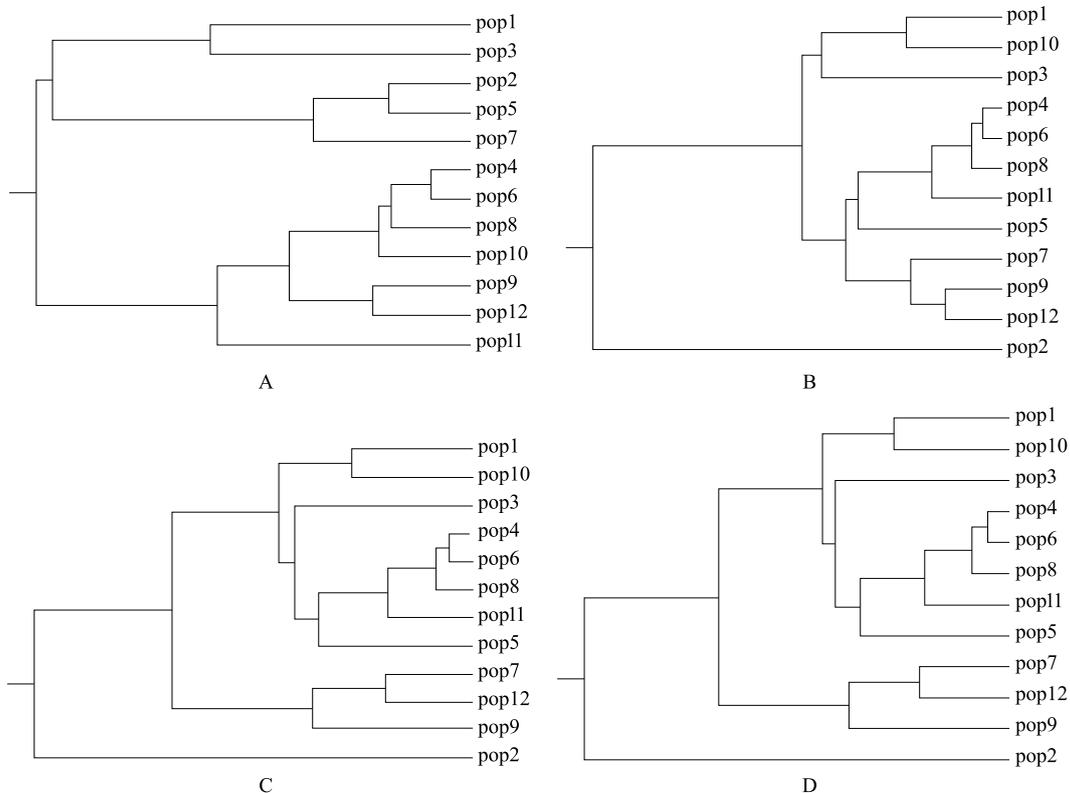


图3 引物数量对矩阵相关性的影响

Fig. 3 The relationship between correlation coefficient and the number of primers

## 3 讨论

遗传多样性是生物多样性研究和生物保护的核心之一, 由于物种居群的遗传多样性高低是生物在长期进化中生存适应和发展的结果, 因此居群的遗传多样性越高或遗传变异越丰富, 整个居群对环境变化给予刺激的适应能力就越强。如果不了解居群遗传多样性高低以及其遗传结构的情况, 就无法采取科学有效的保护措施挽救濒于灭绝的物种。比如采样策略、迁地或就地保护等一些对于珍稀濒危物种保护方针和措施的制定, 都有赖于对物种居群遗传多样性的研究认识。



A、B、C、D 分别指代引物数量为 5 对、10 对、15 对、20 对,下同

A, B, C and D four maps was the number of 5 pairs, 10 pairs, 15 pairs, 20 pairs, respectively. The same as below

图 4 12 个居群基于 PIC 指数降序排列下不同引物数量的聚类图

Fig. 4 Clustering figures of 12 populations based on different primer numbers sorted in PIC descending order

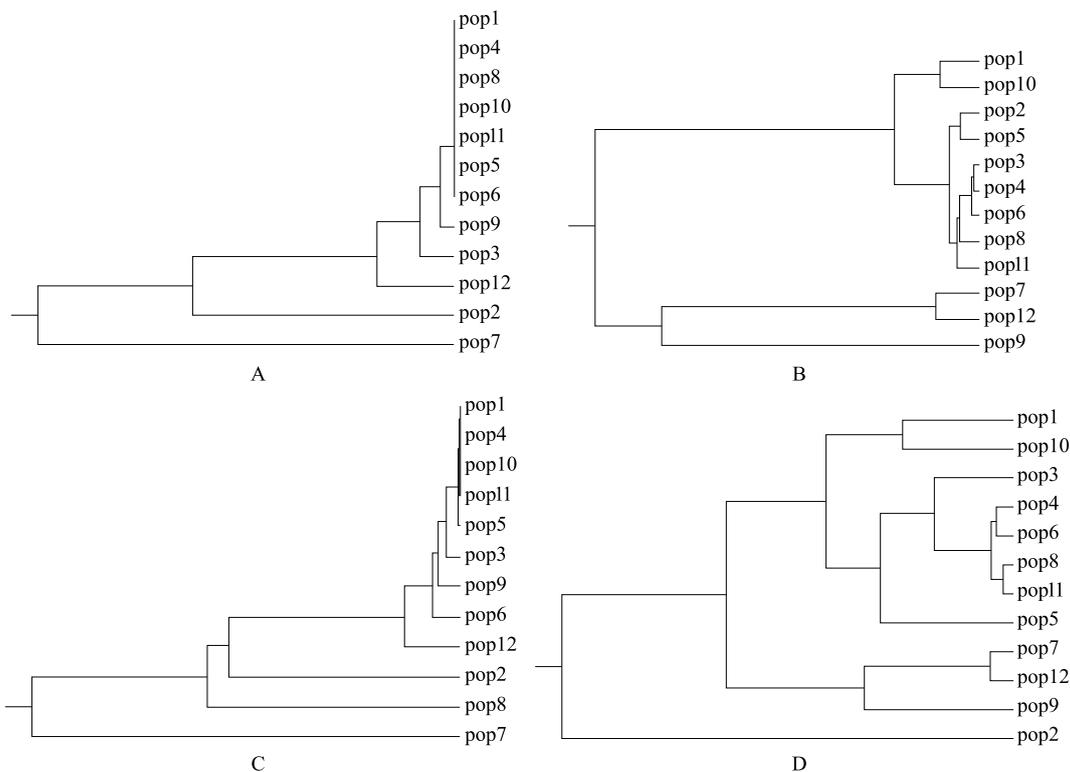


图 5 12 个居群基于 PIC 指数升序排列下不同引物数量的聚类图

Fig. 5 Clustering figures of 12 populations based on different primer numbers sorted in PIC ascending order

目前已有许多研究人员使用 SSR 标记进行野生稻遗传多样性分析,但对广西药用野生稻遗传多样性分析的研究仍是阙如,更没有研究提出广西药用野生稻遗传多样性的中心位置。本研究的全部药用野生稻分布点,在遗传多样性方面具有高度代表性。在本研究中,利用平均等位基因数  $A$ 、有效等位基因数  $A_e$ 、Shannon 指数  $I$ 、观测杂合度  $H_o$ 、期望杂合度  $H_e$  等遗传多样性指标进行分析,得出广西药用野生稻遗传多样性中心为梧州和南宁两个地区的结论,具体位置为梧州市的梧州-1、梧州-2 和梧州-3 形成的三角区域以及南宁市的南宁-1、南宁-2 一带。可为后续研究广西药用野生稻的重点保护居群以及建立原生境保护点提供科学依据。

在使用 SSR 引物研究物种的遗传多样性时,需要使用一定数量的引物来提供足够的有效信息,用以区分供试材料的差异,从而进行遗传多样性分析和聚类分析。但研究大群体供试材料时,使用过多引物不仅增加试验成本,也降低了整个试验的效率。引物的数量、种类、在基因组中的分布位置以及在群体中的多态性信息含量对遗传多样性分析都具有不同程度的影响。按照理论分析,引物数量的增加使得检测到的基因位点在整个基因组中的比例提高,分析结果的准确性也会提高,本研究发现随着引物数量的增加,结果准确度并非呈绝对正比关系,尤其对于多态性信息量 PIC 较低的引物尤为明显。为保证本研究的客观可信性,充分考虑了引物的多态性信息含量 PIC 的影响,将试验数据分成两组,分别根据引物的多态性信息含量 PIC 升序和降序进行分组排序,利用遗传相似系数矩阵的相关性测验进行比较,分析引物数量对聚类结果的影响。矩阵相关性测验显示,当引物按照 PIC 值降序排列时,使用 10 对引物所得到的结果具有较高准确性;当引物按照 PIC 值升序排列时,使用 21 对引物所得结果具有较高准确性。

当引物较少时降序排列所得矩阵与母阵的相关性明显高于升序排列,说明在引物数量较少时,多态性信息含量 (PIC) 较高的引物能提供的信息量更大,使用这些引物扩增出来的数据进行聚类结果的准确性会明显提高,但这种差距随着引物数量的增加而逐渐缩小。因此,在进行大居群药用野生稻聚类分析时,适当增加引物数量可以忽略引物本身的多态性信息含量 (PIC) 的高低。

综上所述,(1) 验证了广西药用野生稻具有丰富的遗传多样性,并确定梧州市内梧州-1、梧州-2 和梧州-3 形成的三角区域以及南宁市内南宁-1、南宁-2 一带为广西药用野生稻遗传多样性中心;(2) 提供在分析大群体药用野生稻材料的遗传多样性时,为了能够较好地反映出群体的遗传结构和聚类关系,最适宜的 SSR 引物数量应多于 21 对,最低不得少于 10 对。

#### 参考文献

- [1] 陈成斌,黄娟,徐志健,等. 广西药用野生稻遗传多样性的分子评价[J]. 中国农学通报,2002,18(3):13-16
- [2] Gao L Z. Microsatellite variation within and among populations of *Oryza officinalis* (Poaceae), an endangered wild rice from China [J]. Mol Ecol,2005,14(14):4287-4297
- [3] 范树国,张再君,刘林,等. 中国野生稻的种类,地理分布及其特征特性综述[J]. 武汉植物学研究,2000,18(5):417-425
- [4] 广东农林学院农学系. 我国野生稻的种类及其地理分布[J]. 遗传学报,1975,2(1):31-36
- [5] 吴妙桑. 浅谈广西野生稻的分布[J]. 遗传,1981,3(3):36-37
- [6] Orm C, Shishido R, Akimoto M, et al. Evaluation of genetic variation among wild rice populations in Cambodia [J]. Breeding Sci, 2015,65(5):430-437
- [7] 杨庆文,陈成斌,张万霞,等. SSR 等位变异数对普通野生稻居群遗传结构分析的影响[J]. 中国水稻科学,2005,19(4):297-302
- [8] 高帆,张宗文,吴斌. 中国苦荞 SSR 分子标记体系构建及其在遗传多样性分析中的应用[J]. 中国农业科学,2011,45(6):1042-1053
- [9] 王风格,田红丽,赵久然,等. 中国 328 个玉米品种(组合) SSR 标记遗传多样性分析[J]. 中国农业科学,2013,47(5):856-864
- [10] 徐小颖,金银根,刘巧泉. 云南哈尼梯田当前栽培水稻遗传多样性及群体结构分析[J]. 中国水稻科学,2015,29(1):28-34
- [11] 黄娟,梁云涛,陈成斌,等. 普通野生稻遗传分化及水稻起源关系研究进展[J]. 南方农业学报,2015,46(10):1756-1760
- [12] 高伟,王坤波,刘方,等. SSR 引物及多态性位点数对陆地棉野生种系聚类结果的影响[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(2):237-242
- [13] 胡佳磊,邵雪玲,刘思阳. RAPD 引物数量对施式巴鲩遗传多样性评估结果的影响[J]. 氨基酸和生物资源,2005,27(1):27-31
- [14] 赵双菁,刘莹莹,魏敏静,等. 标记引物数量对白桦遗传多样性的影响[J]. 防护林科技,2016(4):6-10
- [15] 梁世春,陈成斌,梁云涛,等. 广西药用野生稻资源调查收集与保护建议[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(6):991-995
- [16] 赖群珍. 农业野生植物种质资源野外采样标准研究[J]. 安徽农业科学,2007,35(35):11468-11469
- [17] Chen D H, Ronald P C. A rapid DNA minipreparation method suitable for AFLP and other PCR applications [J]. Plant Physiol Biochem,1999,17(1):53-57
- [18] 盖红梅,杨爱国,张忠锋,等. SSR 数据格式转换软件 DataFormer [J]. 分子植物育种,2016,14(1):265-270
- [19] Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals [J]. Genetics,1978,89(3):583-590
- [20] Nei M. Genetic distance between populations [J]. Am N at,1972:283-292
- [21] Mantel N. The detection of disease clustering and a generalized regression approach [J]. Appl Microbiol Biotechnol,2002,59(2-3):377-381