

基于ISSR标记的稻李氏禾遗传多样性与入侵源、扩散途径的分析

王艺凝, 刘雨佳, 吴明根*

延边大学农学院, 吉林 延吉

Email: *5minggen@163.com

收稿日期: 2021年4月1日; 录用日期: 2021年5月19日; 发布日期: 2021年5月27日

摘要

稻李氏禾已成为东北稻区新的问题杂草。本文为揭示东北部分稻区稻李氏禾的迁入来源及内部扩散途径, 利用ISSR分子标记技术和形态特征差异对来自江西南昌县、湖北荆州、黑龙江、吉林和延边稻区的24份稻李氏禾种质资源进行了遗传多样性和形态差异分析。试验用12条引物进行扩增, 共扩增出122个ISSR条带, 其中多态性条带113个, 多态性百分率为92.62%, 平均每条引物扩增出10.2个条带。遗传相似系数为0.3114~1.0000, 说明不同稻李氏禾间存在较大差异。在遗传相似系数为0.90时, 可分为三大类, 既吉黑两省东部稻区稻李氏禾归一大类, 南方稻区江西南昌县和湖北荆州各一类。在形态特征差异上, 南方稻区采样的稻李氏禾与东北稻区稻李氏禾之间表现出极大差异性, 两者属于不同生态型; 而东北稻区内部不同地点采集的稻李氏禾之间表现出极大相似性, 是属于相同生态型。

关键词

稻李氏禾, 遗传多样性, ISSR标记, 入侵源, 扩散途径

Analysis of Genetic Diversity and Intrusion Source, Diffusion Path of *Leersia oryzoides* (L.) Sw by Using ISSR Markers

Yining Wang, Yujia Liu, Minggen Wu*

College of Agriculture, Yanbian University, Yanji Jilin

Email: *5minggen@163.com

Received: Apr. 1st, 2021; accepted: May 19th, 2021; published: May 27th, 2021

*通讯作者。

文章引用: 王艺凝, 刘雨佳, 吴明根. 基于 ISSR 标记的稻李氏禾遗传多样性与入侵源、扩散途径的分析[J]. 植物学研究, 2021, 10(3): 372-378. DOI: 10.12677/br.2021.103050

Abstract

Leersia oryzoides (L.) Sw has become a new problem weed in northeast rice area. This paper aims to reveal the intrusion source and internal diffusion of *Leersia oryzoides* (L.) in parts of northeast rice area. The genetic diversity and morphological differences of 24 *Leersia oryzoides* (L.) Germplasm from Nanchang County in Jiangxi, Jingzhou in Hubei, Heilongjiang, Jilin and Yanbian were analyzed by ISSR molecular marker technique and morphological differences. 12 primers were selected, a total of 122 bands were amplified, including 113 polymorphic bands, the percentage of polymorphism was 92.62%, and an average of 10.2 bands were amplified for each primer. The genetic similarity coefficient is 0.3114~1.0000, which indicates that there is a big difference between different *Leersia oryzoides* (L.) varieties. When the genetic similarity coefficient is 0.90, it can be divided into three categories: *Leersia oryzoides* (L.) belonging to the same category in east rice area of Jilin province and Heilongjiang province, *Leersia oryzoides* (L.) from Nanchang County in Jiangxi and Jingzhou in Hubei belonging to the other two categories respectively. In terms of morphological characteristics, there was a great difference between the *Leersia oryzoides* (L.) sampling in southern paddy and the rice sampling in northeastern paddy. They belong to different ecotypes, but the *Leersia oryzoides* (L.) showed great similarity sampling in different places in the northeast paddy; it's the same ecotype.

Keywords

Leersia oryzoides (L.) Sw, Genetic Diversity, ISSR Marker, Intrusion Source, Diffusion Path

Copyright © 2021 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

稻李氏禾 [*Leersia oryzoides* (L.) Sw] 为多年生禾本科假稻属水生或湿生杂草 [1] [2] [3]。稻李氏禾具有地下横走根茎和地上匍匐茎 [4]，繁殖力很强 [5] [6]，种子和根茎都可繁殖 [7]。稻李氏禾幼苗形态与水稻相似，叶片边缘和茎秆生有钩状刺 [8]。稻李氏禾幼苗拔节后生长迅速，很快超过水稻株高，危害严重，除了与水稻争夺养分以外，更重要的是稻李氏禾在植株高于水稻后会由于茎基部纤细而倒伏，在稻李氏禾密度达到 50~80 株/m² 以上时，可使未成熟水稻倒伏而造成严重减产，同时增加阻力严重影响联合收割机的作业效率。稻李氏禾有根系发达、生命力强、繁殖快等特点 [1]、扩散多途径特点、与栽培稻相似伴生特点，造成了防除稻李氏禾投入成本高、防治难、草害重的问题 [9]。

在稻李氏禾资源的利用上，杨长桃等采用幼胚培养和延续授粉法克服属间杂交不可交配性，首次获得水稻 × 李氏禾属间远缘杂交的成功 (1985~1989 年)，并在杂交后代中获得一些有利用价值的特殊材料 [10]。国外也有利用稻李氏禾资源减少水渠、湖泊生态系统的养分输出、氮素污染等研究进展报道 [11] [12] [13]。

目前，还没发现 ISSR 技术应用于稻李氏禾遗传资源多样性的相关研究报道。宋志平等利用 ISSR 标记技术对中国湖南地区及其他地区来源的李氏禾进行了遗传多样性分析 [14]。本文通过 ISSR 分子标记技术和形态特征差异分析，为揭示延边稻区乃至东北稻区各地发生的稻李氏禾的发生源、迁入源、扩散途径，安全有效、综合持续防控稻李氏禾提供重要基础依据。

2. 材料与方法

2.1. 试验材料

供试的 24 份稻李氏禾样本采集于吉林省中、东部稻区、黑龙江东北部稻区、江西、湖北等不同地区。2020 年 8 月收集后, 移栽在农学院玻璃温室水池中, 温室有自动控温系统, 夏季温度保持在 20℃~35℃, 冬季温度保持在 10℃~25℃。材料来源及采集地见表 1。

Table 1. The tested materials
表 1. 供试稻李氏禾材料

序号 Number	采集地点 Place	纬度 Latitude°	经度 Longitude°
1	湖北省荆州市	30.276	112.261
2	江西省南昌市南昌县	28.520	115.887
3	延吉市朝阳川镇太兴村	42.919	129.346
4	延吉市朝阳川镇九水河	42.936	129.334
5	龙井市铜佛寺乡	42.884	129.217
6	和龙市头道镇振兴村	42.748	129.199
7	和龙市头道镇新进村	42.750	129.131
8	和龙市东城镇明新村	42.749	129.273
9	和龙市东城镇	42.756	129.325
10	龙井市海兰村	42.800	129.440
11	图们市凉水镇庆荣村	43.022	129.941
12	珲春市八二村	42.875	130.298
13	珲春市大榆树村	42.855	130.316
14	敦化红石乡临江村	43.308	128.167
15	安图明月镇	43.124	128.953
16	百草沟镇新城镇	43.248	129.603
17	龙井市智新镇龙池村	42.771	129.393
18	吉林市永吉经济开发区	43.688	126.515
19	哈尔滨市依兰县迎兰朝鲜族乡	46.328	129.518
20	鸡西市鸡东县鸡东镇明俊村	45.256	131.158
21	密山市兴凯湖农场	45.282	132.799
22	吉林市二道甸子镇帽山村	43.187	127.359
23	磐石市红旗岭镇	42.971	126.343
24	梅河口市双泉乡	42.811	125.996

2.2. 总 DNA 的提取及检测

取新鲜的稻李氏禾叶片约 1 g 在液氮冷冻下研磨成粉末, 利用天根公司 Plant Genomic DNA Kit (DP305-02)试剂盒提取基因组 DNA。经 1%琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度计检测其质量和浓度后, 用 TE 缓冲液稀释提取的 DNA 至 20 ng/ μ L, 放入-20 $^{\circ}$ C冰箱储存备用。

2.3. 引物筛选及 PCR 扩增

采用宋志平等人对李氏禾 issr 分析中所用的 12 条引物(2005), 由深圳华大基因科技服务有限公司合成。引物退火温度(表 2)。经过优化和比较, 确定 ISSR 扩增反应体系为(20 μ L): ddH₂O 6 μ L, ISSR 引物 1.5 μ L, DNA 模板 2.5 μ L, GoTaq[®] Green Master Mix 10 μ L (由美国普洛麦洛公司合成, 含有 Taq-DNA 聚合酶、dNTPs、MgCl₂ 和反应缓冲液)。PCR 反应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 复性退火温度随引物而定 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 45 s, 40 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 7 min, 4 $^{\circ}$ C 下保存。

Table 2. Twelve tested ISSR primers
表 2. 12 条供试 ISSR 引物

引物序号与代号 Primer No.	序列 Sequence (5'-3')	退火温度($^{\circ}$ C) Anneal temperature ($^{\circ}$ C)
1 814	CTCTCTCTCTCTCTA	50
2 816	CACACACACACACAT	52
3 829	TGTGTGTGTGTGTGC	51
4 836	AGAGAGAGAGAGAGCTA	52
5 840	GAGAGAGAGAGAGACTA	52
6 851	GTGTGTGTGTGTGTCTG	52
7 855	ACACACACACACACCTT	54
8 857	ACACACACACACACCTG	50
9 886	ACGAGTACGCTCTCTCTCTCT	50
10 887	AGTACGAGTCTCTCTCTCTCT	50
11 889	AGTCGTAGTACACACACACAC	51
12 890	ACGAGTACGGTGTGTGTGTGT	53

2.4. 数据处理及分析方法

将实验中所做出来的琼脂糖凝胶胶板拍照, 对胶板中的电泳条数进行判读。按照电泳图谱中同一位置上 DNA 条带的有无进行统计, 有条带的记为“1”, 无条带的记为“0”, 以较为清晰的记为 1 不清晰的记为 0, 模糊条带记为 0 的原则, 在 EXCEL 中记录成 0/1 矩阵形式。用 NTSYS2.10 对 ISSR 分子标记统计好的 01 矩阵数据做 UPGMA 聚类分析。

3. 结果与分析

3.1. 引物扩增结果分析

12 个扩增条带清晰、多态性高、重复性好的 ISSR 引物对 24 份稻李氏禾种质资源进行 ISSR 分析,

结果(表 3)表明, 每条引物扩增产生的条带数在 8~14 条, 平均为 10.2 条, 12 条引物扩增共获得条带 122 条, 其中多态性条带为 113 条, 引物平均多态性比率达 92.62%, ISSR 扩增结果表明稻李氏禾种质资源具有较为丰富的遗传多样性。图 1 为部分引物对供试样品的扩增结果。

Table 3. Amplified results of 12 effective ISSR primers

表 3. 12 条有效 ISSR 引物的扩增结果

引物 Primer	条带数(条) Number of bands	多态性条带(条) Number. of polymorphic bands	多态性比率(%) Polymorphic band ratio
814	9	6	66.67
816	8	8	100.00
829	9	9	100.00
836	10	10	100.00
840	12	12	100.00
851	9	9	100.00
855	9	9	100.00
857	9	5	55.56
886	12	12	100.00
887	13	13	100.00
889	8	6	75.00
890	14	14	100.00
平均 Average			92.62
总计 Total	122	113	

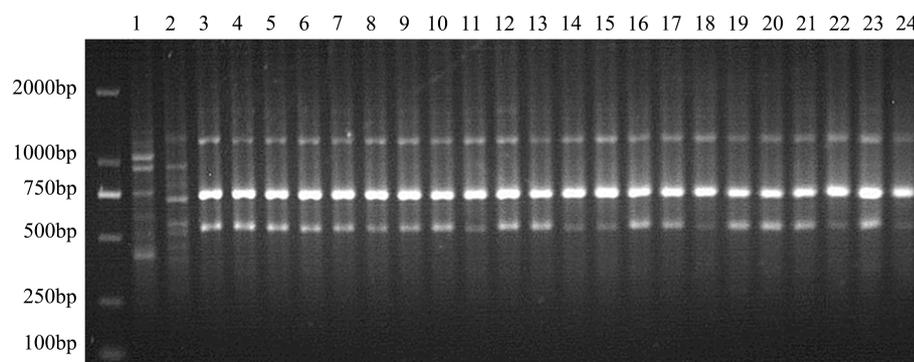


Figure 1. The electrophoresis of amplification products of primer 890

图 1. 引物 890 扩增产物的电泳结果

3.2. 稻李氏禾种质资源间遗传相似性分析

利用 12 条 ISSR 引物产生的标记信息, 经 NTSYS2.10 计算 24 份稻李氏禾种质资源的遗传相似系数, 24 份稻李氏禾种质资源的遗传相似系数为 0.3114~1.0000。其中, 遗传相似系数最小的是 2 (江西省南昌县)和 17 (龙井市智新镇龙池村), 2 (江西省南昌县)和 21 (密山市兴凯湖农场), 说明二者的亲缘关系最远,

遗传差异相对较大;遗传相似系数最大的为3(延吉市朝阳川镇太兴村)和4(延吉市朝阳川镇九水河),6(和龙市头道镇振兴村)和7(和龙市头道镇新进村)说明二者的亲缘关系最近。在遗传相似系数等于0.90时,可分为三大类,既吉黑两省东部稻区稻李氏禾归一大类,南方稻区江西南昌县和湖北荆州各一类(图2)。由于南方稻区样本数很少,在ISSR分析中,江西、湖北稻区取样的稻李氏禾DNA差异性大。

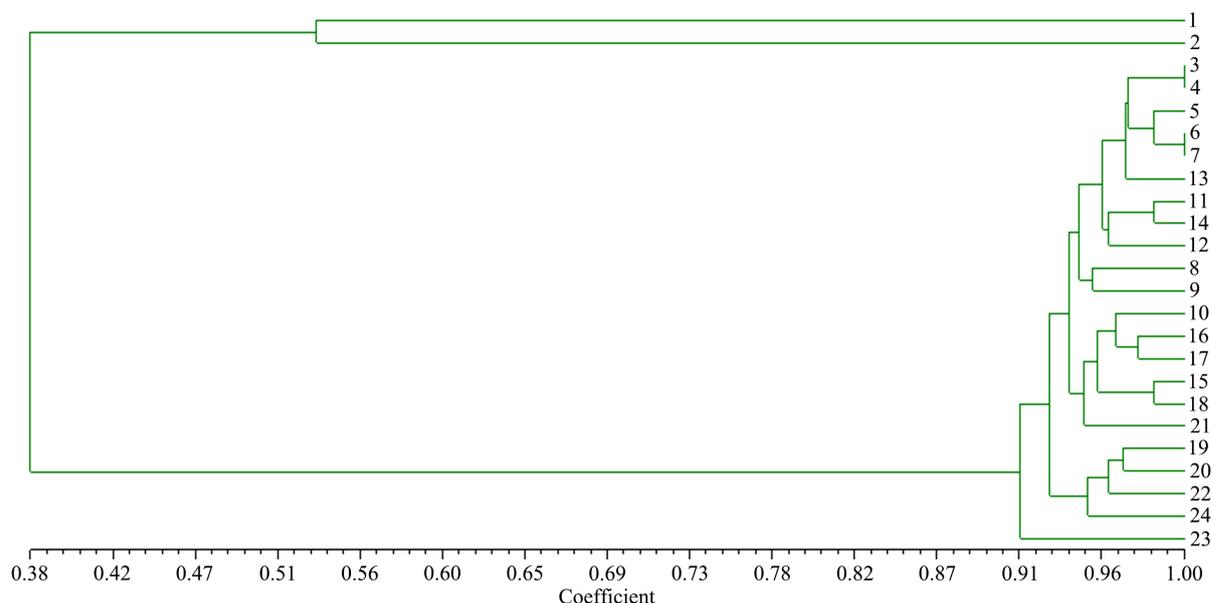


Figure 2. Cluster analysis of ISSR molecular markers in 24 *Leersia oryzoides* (L.) Sw

图2. 不同稻区稻李氏禾样本ISSR分子标记聚类分析

3.3. 不同地方采集的稻李氏禾种质资源形态特征

吉黑两省稻区稻李氏禾根茎繁殖个体出土期为5月中旬,种子出土期为6月上旬,相差20天左右。茎节(叶片)数为8~10个,株高120~200 cm,平均发生3~7个分蘖,地上茎可横向匍匐生长,出2~3叶开始拔茎,叶茎上有朝下方向的硬刺,易损伤皮肤,接触地表的茎节可生根张出新芽,地下有多条横向伸长的地下根茎,根茎节上产生很多营养繁殖的新根新芽,成为独立的个体。抽穗开花期根茎个体为8月上旬,种子个体为8月中旬,成熟期为抽穗后15~20天左右,边成熟边开始落粒。一穗粒数大约100~300个,结实率为40%~60%左右,千粒重为1.9~2 g。值得进一步研究的是高纬度的黑龙江省鸡西、虎林、佳木斯、依兰等稻区发生的稻李氏禾的抽穗期比低纬度的吉林省东部稻区早10天左右,而江西、湖北地区采集的稻李氏禾在延边地区温室条件下到了11月末还没出穗(5月当地取根茎,5天后温室移栽)。另外,南方稻区采集的稻李氏禾与东北稻区采集的稻李氏禾相比,具有南方稻区采集的稻李氏禾总的出叶片数多2~4片、叶片短而窄型,茎节数多,株高高的特点。

4. 讨论与结论

1983年在黑龙江省桦南县水田首次发现稻李氏禾以来,东北三省各主要稻区陆续发现稻李氏禾的发生[9] [15],并继续扩散,成为东北稻区新的问题杂草种之一[16],亟待于研发安全有效、综合持续防控稻李氏禾的防除技术体系。

南方稻区采集的稻李氏禾与东北稻区采集的稻李氏禾相比,除具有地下横走根茎和地上匍匐茎、种子和根茎繁殖、叶片边缘和茎秆生有朝下钩状刺等同种共性特征以外,还具有生育期、叶片数及茎节数、

叶片形态等不同的特征。ISSR 分子标记分类结果也证明南方稻区采集的稻李氏禾与东北稻区采集的稻李氏禾之间的亲缘关系甚远。针对东北稻区稻李氏禾的起源、迁入源,在稻李氏禾分布普查中吉林省桦甸市腰甸子村村民(李军,1961年出生、张学清,1956年出生、陈文安,1954年出生)证实在82年实施联产承包责任制之前本地稻田就有稻李氏禾(该农田是1935年日本军方开拓团开垦的供粮基地之一),并该地区稻田一直发生稻李氏禾。

综合上述,本文认为东北稻区生长的稻李氏禾在短时间尺度上(20年左右)并不是南方稻区迁入的,既江西南昌、湖南荆州采集的稻李氏禾不是东北稻区稻李氏禾的迁入源,而对于南方稻区是否存在与东北稻区稻李氏禾同类种植资源和长时间尺度上(50年以上)南方稻区稻李氏禾迁入东北稻区后发生适应性突变等相关问题,则有待于进一步验证;东北稻区稻李氏禾相似性极高,认为是存在同一或相近的东北地区起源地;近期东北稻区稻李氏禾的快速扩散和大发生与跨地区稻种流通多、跨区域收割机作业多等因素相关。

基金项目

国家自然科学基金(编号:31760521)。

参考文献

- [1] 余露. 稻李氏禾防除技术[J]. 农药市场信息, 2011(23): 38.
- [2] 徐凤, 杨德亮, 杨杰, 等. 延边稻区外来入侵杂草稻李氏禾的发生及防除措施[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(10): 106-107.
- [3] 单国侠, 李俭, 李海粟, 等. 吉林省稻田抗药、耐药性禾本科杂草分布特征及防控对策[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(10): 164-167.
- [4] 黄元炬, 朴德万, 黄春艳, 等. 应用双草醚防除水稻直播田稻李氏禾[C]//中国植物保护学会杂草学分会. 第十一届全国杂草科学大会论文摘要集. 长沙, 2013: 16.
- [5] 董蛟龙, 王艳梅, 刘洪贵, 等. 水田杂草稻李氏禾的防除[J]. 现代化农业, 1996(6): 14.
- [6] 曹立耘. 稻田几种难治杂草的防除方法[J]. 农药市场信息, 2019(9): 52-53.
- [7] 邓秀成, 姜贵生, 潘永亮, 等. 稻李氏禾的发生及防治[J]. 现代化农业, 2005(7): 7-8.
- [8] 王晓艳. 黑龙江省水稻田主要杂草种类及其发生规律[J]. 植物医生, 2017, 30(5): 50-51.
- [9] 田基植, 韩崇文. 稻田新型恶性杂草——稻李氏禾发生情况与防除[J]. 黑龙江农业科学, 1992(2): 52.
- [10] 杨长桃, 詹石, 马彬林, 等. 水稻与李氏禾属间杂交的研究[J]. 福建稻麦科技, 1992(3): 67-71.
- [11] Moore, M.T., Tyler, H.L. and Locke, M.A. (2013) Aqueous Pesticide Mitigation Efficiency of *Typha latifolia* (L.), *Leersia oryzoides* (L.) Sw., and *Sparganium americanum* Nutt. *Chemosphere*, **92**, 1307-1313. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2013.04.099>
- [12] Taylor, J.M., Moore, M.T. and Scott, J.T. (2015) Contrasting Nutrient Mitigation and Denitrification Potential of Agricultural Drainage Environments with Different Emergent Aquatic Macrophytes. *Journal of Environmental Quality*, **44**, 1304-1314. <https://doi.org/10.2134/jeq2014.10.0448>
- [13] Speir, S.L., Taylor, J.M. and Scott, J.T. (2017) Seasonal Differences in Relationships between Nitrate Concentration and Denitrification Rates in Ditch Sediments Vegetated with Rice Cutgrass. *Journal of Environmental Quality*, **46**, 1500-1509. <https://doi.org/10.2134/jeq2016.11.0450>
- [14] Song, Z.P., Guan, Y., Rong, J., Xu, X. and Lu, B.-R. (2005) Inter-Simple Sequence Repeat (ISSR) Variation in Populations of the Cutgrass *Leersia hexandra*. *Aquatic Botany*, **84**, 359-362. <https://doi.org/10.1016/j.aquabot.2005.11.009>
- [15] 司振峰. 水田稻李氏禾杂草的识别、危害及防除技术[J]. 中国农技推广, 2000(3): 41.
- [16] 付玉. 水田恶性杂草的识别、危害与防治[J]. 农民致富之友, 2011(18): 57.