

中国普通野生稻和亚洲栽培稻 核基因组的遗传分化^①

孙传清^② 王象坤 才宏伟 吉村 淳 土井一行 岩田伸夫
(植物遗传育种系) (九州大学农学部, 日本 812)

摘 要 通过对来自中国 5 个省(自治区)39 份普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.)和 33 份亚洲栽培稻(*O. sativa* L.)的核 DNA 的 RFLP 分析,探讨了普通野生稻分化及其与栽培稻之间的遗传分化关系。结果表明,在核 DNA 分化上,中国普通野生稻可分为原始野生型、偏籼型和偏粳型。中国普通野生稻因地理分布不同,其遗传分化表现出多态性:江西东乡和湖南茶陵以及部分云南元江普通野生稻既不与籼稻聚在一起,又不与粳稻聚在一起,而独聚一类,其形态上亦比较原始,属于原始祖先型;广东、广西普通野生稻则表现为偏籼或偏粳。本研究认为籼粳演化应该是多途径的。

关键词 中国普通野生稻;栽培稻;核基因组;RFLP

中图分类号 S511.9; S321

Genetic Differentiation of Nuclear DNA in Common Wild Rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and Cultivated Rice (*O. sativa* L.)

Sun Chuanqing Wang Xiangkun Cai Hongwei
(Dept. of Plant Genetics & Breeding)

Atsushi Yoshimura Kazuyuki Doi Nobuo Iwata
(Faculty of Agriculture, Kyushu University, 812 Japan)

Abstract Genetic differentiation of 39 accessions of common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) from China, and 33 varieties of cultivated rice (*O. sativa* L.) were studied by nuclear DNA RFLP analysis. Common wild rice from China could be classified into three types: primitive type, Indica-like type and Japonica-like type. The diversity of the genetic differentiation was found among Chinese wild rice by their geographical distributions. All of the accessions from Dongxiang, Jiangxi Province, Chaling, Hunan Province and partial accessions from Yuanjiang, Yunnan Province are primitive type because they are not clustered into Indica group or Japonica group by nuclear DNA RFLP analysis and the morphological characteristics of them are more primitive. The wild rice from Guangdong and Guangxi are Japonica-like or Indica-like type in nuclear DNA. The differentiation of Indica and Japonica might be of multi-way.

Key words Chinese common wild rice; cultivated rice; nuclear DNA; RFLP

收稿日期: 1996-10-15

①国家自然科学基金资助项目 39330160

②孙传清,北京海淀区圆明园西路 2 号中国农业大学(西校区),100094

目前基本公认亚洲栽培稻起源于普通野生稻(简称普野,下同),普野的籼粳分化是当今国际研究的热点之一。Oka 和 Morishima 的早期(1961,1962)的研究认为,普通野生稻不存在籼粳分化,但潜伏着籼粳分化的可能。周拾禄(1948)^[1]则在其《中国是稻之起源地》中提出,粳稻起源于中国的粳型野生稻(巢湖野稻)、籼稻起源于印度的野生稻。首先提出野生稻已有籼粳之别和籼粳的起源是异源的。Second^[2,3]通过同工酶的研究明确提出普野存在籼粳分化。后来 Morishima^[4]通过同工酶和形态性状的分析,认为大多数普野是介于典型籼稻和典型粳稻之间。中国普野偏粳,印度尼西亚与菲律宾的普野偏籼。

Sano 等^[5]通过 rDNA 的比较研究指出,东乡野生稻偏粳。才宏伟等^[6]通过对 92 份中国纯合普野的同工酶研究表明,江西东乡、湖南茶陵、江永的普野主要为偏粳型。广西的普野籼粳都有,以粳型和偏粳型占多数。国外的则以籼与偏籼型占多数。孙传清等^[7]通过对中国普野与栽培稻的 RAPD 分析表明,中国普野大多数有粳稻特异扩增带,但也发现 2 份广西的普野有籼稻特异扩增带。上述一系列事实说明,现存的普野确实发生了一定程度的籼粳分化,且籼粳分化与地理分布有关。但是普通野生稻的籼粳分化是发生在演化成栽培稻之前还是栽培稻的基因渗入的结果?目前是否还存在没有发生籼粳分化的普通野生稻?籼粳分化的程度与地理分布的遗传关系如何?这些问题有待于进一步探讨。本研究用来自核 DNA 的 48 个探针对中国 5 个省(自治区)39 份普通野生稻和 33 份亚洲栽培稻进行 RFLP 分析,进一步探讨中国普野的籼粳分化及其与地理分布之间的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料 39 份普野和 33 份栽培稻组成。39 份普野中,江西东乡 5 份,湖南 1 份,广西 9 份,广东 5 份,元江 4 份,15 份地点不详。33 份栽培稻中包括 6 份来自中国和 5 份来自孟加拉含有酯酶同工酶普野特异带(Est-10⁴)的栽培稻。每个系统(或品种)取 1 个个体用于 RFLP 分析。

1.2 RFLP 分析

按照 Rogers 和 Bendich(1988)^[8]报道的 CTAB 法(cetyl triethylammonium bromide)提取总 DNA,每个样品取 3 μg DNA 用 *Dra* I 消化后,用 0.8% 琼脂糖凝胶在 20 V 进行过夜电泳。然后将 DNA 转移到 N⁺-尼龙膜上(Boehringer Mannheim)。采用非放射性的 ECL (enhanced chemiluminescence)^[9]探针标记及检测。本研究选用的 48 个探针分别来自 Saito 等^[10]RFLP 图谱上的克隆(以“Npb”开头)、Kurata 等^[11]RFLP 图谱的克隆(以“C”开头)以及九州大学农学部育种学教研室 IR24 用 *Hind* III 消化的基因文库中的克隆(以 Ky 开头)。将所用的探针及所在的染色体列入表 1。

将所观察的每一条带视为一个性状,有此带时赋值为“1”,无此带时赋值为“0”,每两个系统或品种间的遗传距离按下式(Nei,1987)^[12]求标准遗传距离。

$$D = -\ln[2M_{xy}/(M_x + M_y)]$$

式中 M_x 和 M_y 分别为 X 系统和 Y 系统的总片段数, M_{xy} 为两系统的公共片段数。

根据所得的遗传距离,用 UPGMA 法^[13]进行聚类分析,并绘制树状图。

表 1 RFLP 分析所用探针

染色体编号	探 针
1	Npb98,Npb252,Npb343,C955,C970,C1211
2	Npb67,Npb132,Npb227,Npb349,Npb295
3	Npb48,Npb238,Npb249
4	Npb296,Npb331,Ky4
5	Npb81,Npb255,C859
6	Npb12,Npb27,Npb135,Npb342,Ky11
7	Npb20,Npb33,Npb117,Npb152,Npb338
8	Npb41,Npb278,Npb397
9	Npb103,Npb108
10	Npb37,Npb291,Npb333
11	Npb24,Npb202,Npb280,C794,C1003,G1465
12	Npb239,Npb335,Npb336,R496

2 结果与分析

2.1 RFLP 标记

2.1.1 所得片段数 用 48 个探针检测(图 1 是其中一例),每个系统(或品种)的总片段数变异幅度为 51~70,平均为 56.7。33 份栽培稻平均片段数为 55.1,39 份普野平均片段数为 58.0。栽培稻中,具 Est-10⁴ 的 11 个品种(SA1~SA11)平均片段数为 57。

2.1.2 多态性 用 48 个探针对

72 份材料的检测,共得到 178 个特异性片段,每个探针可观察到多态片段数的变异幅度为 2~8,平均为 3.7,该值较 Wang 等^[14]对稻属调查的 11.2 小,但较 Wang 等^[15]对 *O. sativa* 观察均值 3.4 稍大,较 Doi^[16]稻属 AA 基因组的 5.3 小。说明栽培稻和普野之间的多态性大于栽培稻之间的多态性而小于 AA 基因组不同种之间的多态性。

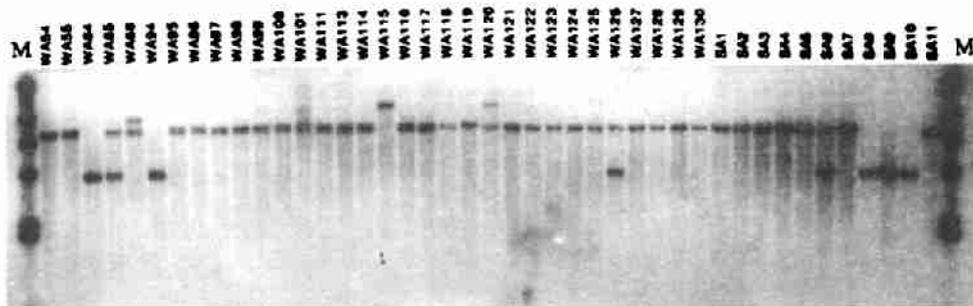


图 1 用探针 Npb33 对部分普野和栽培稻基因组 DNA *Dra* I 酶切后 Southern 杂交自显影图
M 为分子量标记(λ /*Hind* III)

在 178 个多态片段中,只在普野中出现的 69 个,占 40.5%,只在栽培稻中出现的 4 个,仅占 5.1%。因此,野生稻与栽培稻的差异主要来自野生稻。

在所用的 48 个探针中,能检测到野生稻特异性的探针有 37 个,而能检测到栽培稻特异性片段的探针只有 4 个,能检测到籼梗之间差异的探针的有 15 个。

2.2 聚类分析

根据 Nei^[12]对标准遗传距离,用 UPGMA^[13]法对所有材料进行聚类分析,并绘制成树状图(图 2)。所有供试材料可分为 3 大群,即籼稻及偏籼的普野群、梗稻及偏梗的普野群,中国原始普野群,具体分述如下。

第一群: 籼稻及偏籼的普野群 该群包括了 14 个传统分类认为是籼稻的育成种和地方品种及 12 份普野, 共计 28 份材料。12 份普野中, 广西 3 份, 广东 1 份, 有 8 份地点不明。

第二群: 粳稻及偏粳的普野群 该群包括了 19 个粳稻育成种(如秋光、台中 65)和一些粳稻地方品种(如红芒 1 号、易杜), 18 份普野。18 份普野中, 广西 5 份, 广东 4 份, 元江 2 份, 7 份地点不详。3 份孟加拉栽培稻与中国普野亲缘关系较近, 其中 2 份(SA17、SA11)为具 Est-10⁴ 的栽培稻, 另外 1 份(CR147)在 Est-10 上的等位基因尚不清。18 份中国普野中与粳稻的遗传距离(或偏粳程度)又有差异, WA116 与栽培稻很近, 趋于栽培化; WA123(广西)、WA124(广西)、W37(广东)、W38(广东)、WA122(广西)相对与粳稻亲缘关系较近; WA117(元江)、WA125(广东)、WA118(元江)次之; WA95、WA96、WA127(广西)、WA130(广西)又次之; WA98、WA99、WA101、WA97、W32(广东)与粳稻相对较远。

第三群: 中国原始普野群 该群由 8 份普野组成。8 份普野中, 江西东乡 5 份、湖南茶陵 1 份、元江 2 份。并且, 江西 5 份之间遗传关系相对较近。同样, 2 份元江普野之间也较近, 元江的与东乡的遗传距离较远, 湖南茶陵普野介于两者之间。

该群由 8 份普野在形态上亦很有特色, 表现为长花药(5.0~7.0 mm), 柱头紫色外露、紫色叶鞘、红长芒、黑壳、红米以及生长习性均为匍匐, 根据王象坤等^[17]和庞汉华等^[18]对中国普野的形态分类和同工酶分析, 对原始祖先种在形态特点上的描述, 第三群的 8 份普野在形态上可以认为是原始祖先种, 因此称这一类为中国原始普野型。

该群不仅在形态上、并在 DNA 指纹特征上很有特色, 共有 10 个探针能检测中国原始普野型的特异性片段(表 2), 这些探针无疑是研究鉴定中国普野的原始祖先型的重要工具。

通过聚类分析可知, 中国普野可分为三群, 但来自不同地区的普野在各群中的分布又有差异, 江西东乡的 5 份普野都为原始普野型, 湖南茶陵的普野虽然只有 1 份, 但也是原始普野。广东的 5 份普野, 1 份为偏籼型 4 份为偏粳型, 广西的普野 3 份偏籼, 6 份偏粳。因此, 广东、广西的普野以偏粳为主, 但亦有偏籼的, 这一点上与才宏伟等^[6]、孙传清等^[7]结果一致, 云南元江的普野虽然只有 4 份, 但 2 份为偏粳型, 2 份为原始普野。15 份地点不详的普野偏籼偏粳型之比接近 1:1, 由此可见江西东乡和湖南茶陵的普野在核基因组上基本上是比较纯合的原始普野, 其生态环境与栽培稻隔离较好, 栽培稻的基因没有渗入。据生态考察, 云南元江的普野也是一个周围没有栽培稻, 隔离条件好的群体, 但除有原始类型外, 还有偏粳类型, 因此可能推测该群体是一个正处在分化的群体, 其偏粳类型可能由原始型演化而来。

表 2 能检测中国原始普野特异片段的探针

探 针	所在染色体号	具有特异片段的系统
Nbp81	5	WA111, WA113, WA114, WA115, WA128, WA129, W46, W47
C1211	1	WA111, WA113, WA114, W46, WA47
Npb98	1	WA113, WA114, W46, W47
C970	1	WA111, WA128, WA129
Npb48	3	WA111, WA113, W46, W47
C859	5	WA128, WA129
Npb12	6	WA128, WA129
Npb278	8	WA113
Npb397	8	W46, WA47
Npb280	11	WA111, WA113, WA114, W46, W47

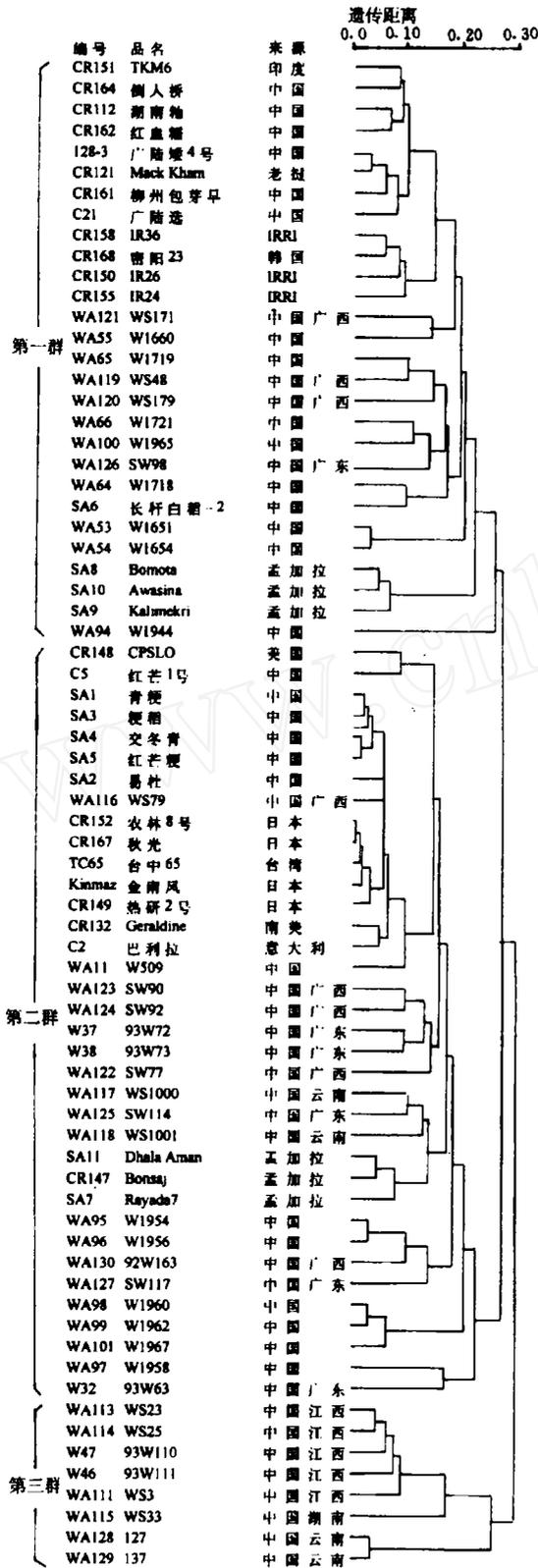


图 2 遗传距离树状分析树状图

3 讨论

3.1 普野的遗传多样性

3.1.1 普野与栽培稻间 Oka 和 Morishima 曾指出(私人交流)从形态上看栽培稻的多态性大于普野、但从 DNA 看普野的多态性大于栽培稻。本研究的结果表明,从聚类图上很清楚的看到普野可分为三类(即偏籼型、偏粳型、中国原始普野型),而栽培稻只有籼粳两类。从所观察到的多态片段来看,仅在普野中出现的片段数为 69 个、占总片段数的 40.5%,而只在栽培稻中出现的片多数为 4,再从所用的探针所检测到多样性来看,在所用的 48 个探针中,仅 4 个检测不到普野之间的多态性,而有 10 个探针不能检测栽培稻之间的多态性,因此核基因组的 RFLP 分析结果来看,普野的多样性大于栽培稻,支持 Oka 和 Morishima 的观点。

3.1.2 中国普野之间 中国普野因来源不同多样性亦有差异,广西、广东、云南元江普野的多样性大于江西东乡普野,具体表现为江西东乡普野全为原始型,而广西、广东普野有偏籼型和偏粳型。云南元江虽然只有 4 份普野,但 2 份偏籼,2 份为原始型。湖南茶陵普野只有 1 份,不便于与其他地区的多样性进行比较。

如何用形态、同工酶、DNA 的标记,从众多的普野中筛选纯合原始型普野一直是起源学上的热点,本研究从所用的 48 个探针中筛选出了能检测中国原始型普野的探针 10 个(表 2)。这些探针为以后对中国普野的分子分类、鉴定提供了良好的工具。

3.2 普野核 DNA RFLP 分类及中国普野的籼粳分化

Second(1985)^[2]和 Wang 等^[14](1992)分别用同工酶和 RFLP 分析不同地区的普野时,将普野分成明显的两大类,一类与籼稻聚在一起,一类与粳稻聚在一起,且南亚和东南亚的普野与籼稻聚在一起,中国的普野与粳稻聚在一起,并由此认为中国普野偏粳。本研究结果表明中国普野既有与籼稻聚在一起的,又有与粳稻聚在一起,即中国普野既有偏籼的,又有偏粳的。造成两者结果不一致的原因可能有:①方法上 Wang 等只用一种内切酶(*Dra* I),25 个拷贝探针,而本研究用了一种内切酶(*Dra* I)、48 个探针;②取材上 Wang 等只用了 17 份普野,中国普野仅 3 份,而本研究用了 39 份中国普野,因此本研究从 RFLP 标记的数目上还是材料的数目和来源都超了前者。才宏伟等^[6]的同工酶研究表明,中国普野偏籼型和偏粳型都有,但没找出没有籼粳分化的原始普野型,而本研究的第三群既不与籼稻聚在一起,又不与粳稻聚在一起,即没有籼粳分化;其不仅在 DNA 上与其他普野有明显不同,而且在形态上为典型的原始普野型,生态环境上与栽培稻隔离条件好。

通过聚类分析发现,籼稻与偏籼普野间亲缘关系以及粳稻与偏粳普野间亲缘关系均较籼粳稻间的亲关系近。这似乎表明栽培稻的籼粳分别由偏籼的普野和偏粳的普野演化而来,这一点上支持了 Second 和 Wang 等的籼粳起源的二元说,但是中国普野中存在一群与栽培稻亲缘关系较远的一群,作者根据其形态特征和 DNA 指纹特征称之为中国原始普野群,原始型的存在,则有可能由原始型普野演化成偏籼普野和偏粳普野,再由偏籼普野和偏粳普野分别演化成籼粳,王象坤等曾提出野生稻引上山演化成粳,引向低洼地则演化成籼,考虑到云南元江普野既有原始型又有偏粳型,作者认为既可能是原始型普野直接演化成籼和粳,

也可能原始型普野先演化成偏粳普野和偏籼普野,再由偏粳普野和偏籼普野分别演化成籼稻和粳稻,即籼粳演化是多途径的。

参 考 文 献

- 1 周拾禄. 中国是稻之原产地. 中国稻作, 1948, 5(5):53~54
- 2 Second G. Evolutionary relationships in the sativa group of *Oryza* based on isozyme data. Genet Sel Evol, 1985, 17(1): 89~114
- 3 Second G. A new insight into the genome differentiation in *Oryza* L. through isozymic studies. In: Sharma A R, Sharma A eds. Advances in Chromosome and Cell Genetics. Oxford & L IBH Pub, New Delhi Bombay Calcutta. 1985b, 75
- 4 Morishima H, Gadrinab L U. Are the Asian common wild rice differentiation into the Indica and Japonica types? In: Hsieh S C ed. Crop exploration and utilization of genetics resources, Taichung District. Changhua Taiwan: Agril Improvement Station, 1987, 11~20
- 5 Sano Y, Sano R. Variation of the intergenic spacer region of ribosomal DNA in cultivated and wild rice species. Genome, 1990, 33: 209~218
- 6 才宏伟, 王象坤, 庞汉华. 中国普通野生稻是否发生籼、粳分化的同工酶研究. 农业科学集刊第1集. 北京: 农业出版社, 1993, 106~110
- 7 孙传清, 毛龙, 王振山等. 中国普通野生稻和栽培稻基因组的随机扩增多态性 DNA (RAPD) 初步分析. 中国水稻科学, 1995, 9(1):1~7
- 8 Rogers O S, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues. Plant Molecular Biology Manual, 1988, A6:1~10
- 9 Pollard D, Read C A, Downes M J, et al. Nonradioactive nucleic acid detection by enhanced chemiluminescence using probes directly labeled with horseradish peroxidase. Analytical Biochemistry, 1990, 185:84~89
- 10 Saito A, Yano M, Kishimoto N, Nakagahra M, et al. Linkage map of restriction fragment length polymorphism loci in rice. Japan J Breed, 1991, 41:665~670
- 11 Kurata N, Nagamura Y, Yamamoto K, et al. A 300 Kilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. Nature Genetics, 1994, 8:365~372
- 12 Nei M. Molecular evolutionary genetic. New York: Columbia University Press, 1987, 190~191
- 13 Sokal R R, Michener C D. A statistic method for evaluating systematic relationships. Univ Kansas Sci Bull, 1958, 28:1 409~1 439
- 14 Wang Z Y, et al. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. Theor Appl Genet, 1992, 83:565~581
- 15 Wang Z Y, Tanksley S D. Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. Genome, 1989, 32:1 113~1 118
- 16 Doi K, Yoshimura A, Nakano M, et al. Phylogenetic study of A genome species of genus *Oryza* using nuclear RFLP. Rice Genetic Newsletter, 1995, 12:160~162
- 17 王象坤, 才宏伟, 孙传清等. 中国普通野生稻的原始型及其是否存在籼粳分化的初探. 中国水稻科学, 1994, 8(4):205~210
- 18 庞汉华, 才宏伟, 王象坤. 中国普通野生稻的形态分类研究. 作物学报, 1995, 21(2):17~24