

云南元江普通野生稻 (*Oryza rufipogon*) 群体籼粳分化的 SSR 分析

李亚莉¹ 杨晓曦² 赵丰萍³ 许明辉^{3,*}

(¹ 中国科学院昆明植物研究所, 云南昆明 650204; ² 云南省环境保护局珍稀植物引种繁育中心, 云南昆明 650032; ³ 云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所, 云南昆明 650223; * 通讯联系人, E-mail: xuminhui@sohu.com)

SSR Markers on indica japonica Differentiation of Natural Population of *Oryza rufipogon* in Yuanjiang, Yunnan Province

LI Ya li¹, YANG Xiao xi², ZHAO Feng ping³, XU Ming hui^{3,*}

(¹ Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650204, China; ² Yunnan Rare and Endangered Plant Species Conservation Center, Kunming 650032, China; ³ Biotechnology and Genetic Resource Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223, China; * Corresponding author, E-mail: xuminhui@sohu.com)

Abstract: By using 19 pairs of SSR primers which could identify indica and japonica types of cultivated rice (*Oryza sativa*), the indica japonica differentiation of 56 individuals from the natural population of common wild rice (*Oryza rufipogon*) in Yuanjiang was analyzed. Of the 19 pairs of primers, 17 pairs (89.47%) could amplify only one kind of band type among all the individuals, but primers RM251 and RM18 could amplify polymorphic band types. The bands amplified by 16 pairs of primers (84.21%) were similar with the indica japonica identified bands of relevant locus in cultivated rice including 11 japonica like loci and 4 indica like loci, while the bands amplified by other 3 pairs of primers (RM18, RM202, RM205) were different from indica or japonica identified bands of cultivated rice. Among the 19 loci analyzed, 84.21% of them in genomic DNA of common wild rice in Yuanjiang showed indica japonica differentiation and 13.79% of them still kept primitive, and the natural population was homogenetic in most of the detected loci.

Key words: *Oryza rufipogon*; indica japonica differentiation; simple sequence repeat; population

摘要: 利用经测验可区分籼粳品种的 19 对 SSR 特异引物对来自云南元江普通野生稻自然居群的 56 个个体进行了 SSR 分析。19 对引物中, 有 17 对 (占 89.47%) 在所有参试个体中仅能扩增出一种带型, 而 RM18 和 RM251 能扩增出多态带型。RM4 等 16 对 (84.21%) 引物扩增出的带与籼稻或粳稻特征带相同, 其中 11 个位点偏粳而 4 个位点偏籼; RM18、RM202、RM205 等 3 对引物扩增出的带型不同于籼稻或粳稻带型。结果表明, 云南元江普通野生稻基因组 DNA 在所检测的 19 个位点上, 多数位点 (89.47%) 上个体间无差异, 84.21% 的位点已有籼粳分化, 13.79% 的位点仍具有原始性。说明云南元江普通野生稻主体比较纯而原始, 但已开始了籼粳的分化。

关键词: 普通野生稻; 籼粳分化; 微卫星标记; 群体

中图分类号: Q311+2; Q943; S511.022

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2006)02-0137-04

目前基本公认亚洲栽培稻起源于普通野生稻, 并且普通野生稻在驯化成栽培稻之前已经发生了籼粳分化^[1-8]。孙传清等^[9-11]通过对普通野生稻和亚洲栽培稻叶绿体 DNA、线粒体 DNA 及核 DNA 的分析以及同工酶的研究表明, 中国普通野生稻的 cpDNA 已发生籼粳分化, 其籼粳之比接近 1:1; RFLP 分析认为普通野生稻 mtDNA 以籼型为主, 籼粳分化是亚洲栽培稻线粒体基因组的分化主流; 在核 DNA 分化上, 中国普通野生稻可分为原始普野型、偏籼型和偏粳型。

云南元江普通野生稻生长在海拔 780 m 的山坡上, 周围几千米之内未种植水稻, 自然隔离较好, 其籼粳分化和分化倾向至今尚未作定论。Morishima 等^[12]对云南元江普通野生稻的考察认为: 元江

普通野生稻是比较纯而原始的普通野生稻之一。孙传清等^[13]对 4 份云南元江普通野生稻材料的 RFLP 分析结果表明, 这些材料部分偏粳, 部分既不与籼稻聚在一起, 又不与粳稻聚在一起, 而独聚为一类, 其形态上亦比较原始, 属于原始祖先型。袁平荣等^[14]通过对形态和酯酶、过氧化氢酶同工酶以及与籼粳亲和性的分析研究表明, 元江普通野生稻栖生地远离栽培稻, 生活周期属多年生野生稻, 套袋自交后代不分离, 酯酶同工酶 EST-X 位点分析显示为纯合型普通野生稻。多数形态特征分析属典型普通野生稻, 在籽粒、1~2 穗节长度等形态上虽然偏籼, 但

收稿日期: 2005-03-11; 修改稿收到日期: 2005-05-26。

第一作者简介: 李亚莉 (1976-), 女, 博士研究生。

也有一定的分化,如 1~2 穗节长度,有的已偏向粳型。同工酶分析结果则不同,酯酶上偏粳,过氧化氢酶上则偏籼。两种同工酶上表现不一致似乎表明,元江普通野生稻具有粳籼分化的可能性。元江普通野生稻在酯酶上接近南亚与东南亚普通野生稻,其过氧化氢酶又类似中国其他各省的普通野生稻,使它在追溯中国栽培稻的起源与演化上具有重要意义。说明元江普通野生稻在隔离较好的环境下,虽然主体比较纯而原始,但已开始了粳籼的初步分化。从亲和特性来看,元江普通野生稻粳籼分化不明显,属中间型,也表明其原始性。研究认为元江普通野生稻在形态、同工酶和亲和性上的表现不一致,是不同类型的性状分化进程不一的结果。在 mtDNA 上,云南元江普通野生稻与印度、缅甸等南亚普通野生稻关系较近,与中国其他地区(如广东、广西、江西东乡、湖南茶陵)普通野生稻关系较远^[9]。

本研究以云南元江普通野生稻群体为材料,利用 SSR 分子标记探讨其粳籼分化,对进一步研究元江普通野生稻在中国栽培稻的起源与演化上的地位具有重要意义,同时也为进一步发掘优良的野生稻种质资源,培育超高产、优质和多抗的优良品种提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

普通野生稻:采集于云南省元江县红光农场分布点的 3 个主要居群,各个居群随机采集,1 个单株采 1 叶,共采集 56 个样品。

SSR 粳籼特异引物:根据朱作峰等^[15]、樊叶杨等^[16]提供的信息,合成可以区分粳籼品种的 SSR 特异引物 RM4、RM13、RM16、RM18、RM20、RM23、RM25、RM50、RM202、RM205、RM217、RM228、RM234、RM240、RM242、RM250、RM251、RM258、RM259,共 19 对。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取方法

以单株新鲜叶片提取 DNA,方法参考许明辉等^[17]改进的 CTAB 法,试剂均为国产分析纯。

1.2.2 SSR 粳籼特异引物的测验

以 IR36 等 14 个粳稻和巴利拉等 13 个籼稻品种对所用 SSR 引物进行测验分析,进一步筛选 SSR 粳籼引物。首先以粳籼稻标准品种对引物进行一一测验,对每个扩增位点进行粳、籼符合度的计算。某个位点上,如果 85% 以上的粳稻品种都能扩增出条

带而仅有个别籼稻品种能扩增出条带,则称该位点为籼性位点,反之则称粳性位点,所用的引物则为粳籼特异引物。

1.2.3 PCR 扩增条件

PCR 扩增的条件为:反应体积 20 μ L,其中 10 \times PCR buffer 2 μ L,25 mmol/L MgCl₂ 2 μ L,10 mmol/L dNTPs 1 μ L,20 μ mol/L 引物 1 μ L,总 DNA 1 μ L,Taq 酶 1 U (5 U/ μ L),加水补足 20 μ L。

反应程序为:94 $^{\circ}$ C 下预变性 5 min 后,94 $^{\circ}$ C 下模板 DNA 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 下引物与模板靶位点结合 30 s,72 $^{\circ}$ C 下引物沿模板延伸 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 下延伸 5 min,扩增产物在 0.5 \times TBE 缓冲系统下用 3% 琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 SSR 粳籼特异引物的测验

用粳稻品种 IR36 和籼稻品种巴利拉等对本研究所用的 19 对 SSR 引物进行 PCR 测验分析。经 3% 琼脂糖凝胶电泳检测,每对引物均可在粳籼稻品种间扩增出粳稻品种特异带(85% 以上的粳稻品种都能扩增出带)或籼稻品种特异带(85% 以上的籼稻品种都能扩增出带),且重复性较好,扩增出的片段大小与朱作峰等^[15]、樊叶杨等^[16]所提供的信息一致(图 1,样品 9~12),表明 19 对 SSR 引物可以区分粳稻及籼稻品种,并可用于水稻粳籼分化的研究。

2.2 元江普通野生稻粳籼分化

56 个参试个体的基因组 DNA 经 19 对 SSR 引物检测分析,每一对引物对所有参试个体均能扩增出与粳稻或籼稻特征带相同或相似的带,结果见表 1。有 17 对引物(占 89.47%)在所有参试个体中只能扩增出一种带型,个体间无差异,仅 RM18 和 RM251 在参试个体间能扩增出多态性带型,说明云南元江普通野生稻群体遗传上较为一致,较为纯合。

RM4 等 16 对引物(占 84.21%)扩增出的带型可在栽培稻中找到,表明野生稻在这些位点已发生了粳籼分化,而 RM18、RM202、RM205 三对引物扩增出的带型不同于粳稻或籼稻带型(表 1),RM202、RM205 仅能扩增出一种不同于栽培稻的带型,RM18 可扩增出两种带型,但分子量与粳籼特征带的大小相似,这种带型为野生稻独有,应该更原始一些。结果表明在所检测的 19 个 SSR 位点上,云南元江普通野生稻基因组 DNA 在 84.21% 的位点上已存在粳籼分化,而 13.79% 的位点仍具原始性。

表 1 元江普通野生稻在 19 个 SSR 位点上的籼粳分化

Table 1 .Indica japonica differentiation of Yuanjiang common wild rice population in 19 SSR loci .

引物 Primer	带型数 Number of band types	偏籼带型个体数 Number of individuals with indica like band	偏粳带型个体数 Number of individuals with japonica like band	籼 粳混合带型个体数 Number of individuals with indica japonica mixed band	特殊带型个体数 Number of individuals with specific band
RM4	1	0	56	0	0
RM13	1	0	56	0	0
RM16	1	0	56	0	0
RM18	2	0	0	0	56
RM20	1	0	56	0	0
RM23	1	56	0	0	0
RM25	1	0	56	0	0
RM50	1	0	56	0	0
RM202	1	0	0	0	56
RM205	1	0	0	0	56
RM217	1	0	56	0	0
RM228	1	0	56	0	0
RM234	1	56	0	0	0
RM240	1	0	56	0	0
RM242	1	0	56	0	0
RM250	1	0	56	0	0
RM251	3	40	6	10	0
RM258	1	56	0	0	0
RM259	1	56	0	0	0

在已发生籼粳分化的 16 个位点中 ,15 个位点 (占所用引物的 78.9%) 仅扩增出一条或与籼稻或与粳稻特征带相同的带 ,参试个体间均无差异 ,11 个位点出现粳稻特征带 (偏粳 ,图 1) 4 个位点出现籼稻特征带 (偏籼 ,图 1)。RM251 位点是一个特殊的位点 ,扩增产物有 3 种多态带型 ,即粳稻特征带型、籼稻特征带型和不同于栽培稻的特殊带型。在采样的 3 个居群中 ,其中两个居群的 34 个个体都表现籼稻特征带 ,个体间无差异 ;另一个居群的 22 个个体出现 3 种带型 ,其中 6 个个体出现偏粳稻特征带 (图 1 样品 1 4) ,6 个个体出现偏籼稻特征带 (图 1 ,样品 2、3、5、8、13) ,10 个个体出现不同于栽培稻

的特殊带型 (图 1 ,样品 14 ~ 16) ;3 个居群合计 40 个个体出现偏籼特征带 ,所以此位点应归于偏籼。

综上所述 ,云南元江普通野生稻已发生籼粳分化 ,群体总体上偏粳 ,且比较纯而原始。

3 讨论

现有的研究认为 ,普通野生稻在演化为栽培稻前各类性状即存在籼粳分化。根据本研究结果 ,元江普通野生稻群体基因组 DNA 在所检测的 19 个位点上 ,84.21% 的 SSR 位点上已经存在籼粳分化 ,而 13.79% 的位点不同于栽培稻 ,仍然保留有原始性。正如大多数的中国普通野生稻一样 ,元江普通

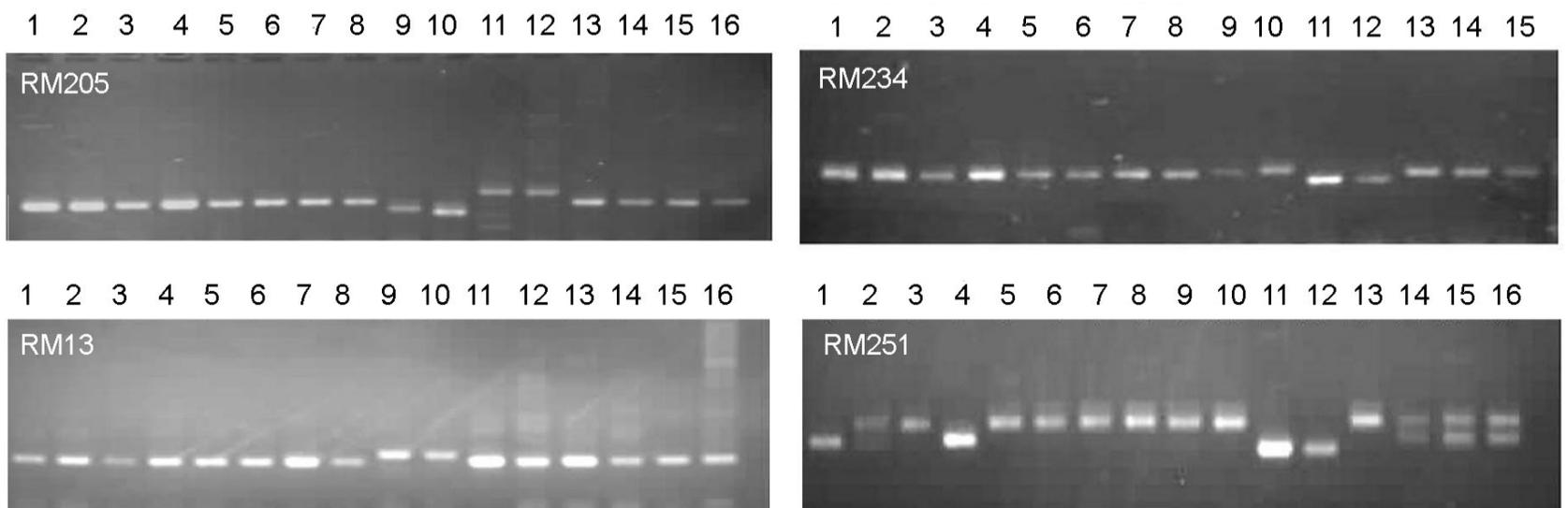


图 1 引物 RM205、RM13、RM234、RM251 对部分野生稻基因组 DNA 的扩增产物

Fig.1 . Amplified products of genomic DNA of some common wild rice individuals with SSR primers RM205 ,RM13 ,RM234 ,RM251 . 9 - IR36 (籼稻标准品种) ;10 - 南京 11 (籼稻标准品种) ;11 - 巴利拉 (粳稻标准品种) ;12 - 合系 30 (粳稻标准品种) ;其余均为普通野生稻。 Lane 9 ,IR36 (indica control) ; Lane 10 ,Nanjing 11 (indica control) ; Lane 11 ,Ballila (japonica control) ; Lane 12 ,Hexi 30 (japonica control) ; Other lanes are wild rice individuals .

野生稻在核 DNA 上属于偏粳型。

Oka^[18] 和 Cheng^[19] 都认为没有和栽培稻发生渗交的野生稻很少见了,这对野生稻的分类和栽培稻的起源演化研究都是一大障碍。因此,要弄清野生稻向栽培稻的演化及籼粳分化问题,首先要找出真正没有和栽培稻渗交过的原始型野生稻以研究这种野生稻本身有无分化及其分化过程。Morishima^[12] 对云南元江普通野生稻进行考察后认为,元江普通野生稻是比较纯而原始的普通野生稻之一。本实验结果同样表明,元江普通野生稻在所检测的大多数位点上(89.47%)个体间无差异,有力地支持了 Morishima 的结论。孙传清等^[9] 以 RFLP 对 4 份云南元江普通野生稻的研究结果表明,2 份偏粳,2 份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。袁平荣等^[14] 对元江普通野生稻的形态特征进行了初步观察,并对其同工酶和杂交亲和力进行研究分析,认为元江普通野生稻在隔离较好的环境下,虽然主体比较纯而原始,但已开始了籼粳的初步分化。本研究中利用 SSR 分子标记,以籼粳特异 SSR 引物对云南元江普通野生稻群体的籼粳分化进行了初步的研究。结果表明,云南元江普通野生稻已有了籼粳分化,总体偏粳。该结果与上述研究的结论基本一致。

在两个多态性位点中,引物 RM18 所检测的位点是一个原始位点,可扩增出不同于栽培稻的 2 种带型。RM251 是一个发生了籼粳分化的位点,可扩增出 3 种多态带型,即偏籼型、偏粳型及不同于两者的籼粳混合型。这 3 种多态带型中,有两种带型与栽培稻相同(偏籼和偏粳),第三种带型(籼粳混合带型)可能是偏籼型和偏粳型野生稻杂交的产物,也可能是一种原始的籼粳混合类型。研究结果可以排除野生稻与栽培稻杂交的可能性,因为该野生稻所生长的山坡远离栽培稻的种植区,自然隔离较好。如果是偏籼型和偏粳型野生稻杂交的产物,则其自交后代将发生分离。若为原始的籼粳混合类型,则偏籼型和偏粳型都应起源于此。我们将通过增加样品的数量及分析籼粳混合类型的自交后代来进一步证实这一疑点。

参考文献:

[1] Second G. Evolutionary relationships in the *Sativa* group of *Oryza* based on isozyme data. *Genet Sel Eval*, 1985, 17(1): 89-114.

- [2] Second G. A new insight into the genome differentiation in *Oryza sativa* L. through isozymic studies//Sharma A R, Sharma A. *Advances in Chromosome and Cell Genetics*. New Delhi: Oxford & BH Pub, 1985: 75.
- [3] Morishima H, Gadrinab L U. Are the Asian common wild rice differentiation into the indica and japonica types//Hsieh S C. *Crop Exploration and Utilization of Genetics Resources*. Changhua: Taichung District Agricultural Improvement Station, 1987: 11-20.
- [4] Sano Y R. Variation of the intergenic spacer region of ribosomal DNA in cultivated and wild rice species. *Genome*, 1990, 33: 209-218.
- [5] Wang Z Y. Polymorphism and phylogenetic relationships among species in the genus *Oryza* as determined by analysis of nuclear RFLPs. *Theor Appl Genet*, 1992, 83: 565-581.
- [6] Nakano M, Yoshimura A, Iwata N. Phylogenetic study of cultivated rice and its wild relatives by RFLP. *Rice Genet NewsL*, 1992, 9: 132-134.
- [7] 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.
- [8] 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(第一集). 北京: 农业出版社, 1996: 106-110.
- [9] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻叶绿体 DNA 的籼粳分化. *农业生物技术学报*, 1997, 5(4): 319-324.
- [10] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻线粒体 DNA 的 RFLP 分析. *遗传学报*, 1998, 25(1): 40-45.
- [11] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻核基因组的 RFLP 分析. *中国农业科学*, 1997, 30(4): 37-44.
- [12] Morishima H. An observation of wild rice population in Hainan and Yuanjiang, China//Report of the National Institute of Genetics(NIG). Mishima: NIG, 1992.
- [13] 孙传清, 王象坤, 才宏伟, 等. 中国普通野生稻和亚洲栽培稻核基因组的遗传分化. *中国农业大学学报*, 1997, 2(5): 65-71.
- [14] 袁平荣, 杨从党, 周能, 等. 云南元江普通野生稻分化的研究——普通野生稻与籼粳亲和性的初步研究. *农业考古*, 1998(1): 38-40.
- [15] 朱作峰, 孙传清, 李自超, 等. SSR 标记对水稻品种的分类研究. *农业生物技术学报*, 2001, 9(1): 58-61.
- [16] 樊叶杨, 庄杰云. 应用微卫星标记鉴别水稻籼粳亚种. *遗传*, 2000, 22(6): 392-394.
- [17] 许明辉, 郑明慧, 刘彦中. 烟草品种 RAPD 分子标记多态性与品种鉴定. *种子*, 1998(5): 23-25.
- [18] Oka H I. *Origin of Cultivation Rice*. Tokyo: Japan Science Press, 1998.
- [19] Chang T T. The origin, evolution, dissemination and diversification of Asian and African rice. *Euphytica*, 1976, 25: 425-441.