

## 非 AA 型野生稻叶绿体 DNA 籼粳特性研究

张武汉<sup>1,2</sup>, 邓华凤<sup>1,2,3</sup>, 陈良碧<sup>4</sup>, 何强<sup>1</sup>, 舒服<sup>1,2</sup>, 陈觉梁<sup>4</sup>, 袁隆平<sup>1</sup>

(1. 国家杂交水稻工程技术研究中心, 长沙 410125; 2. 湖南农业大学, 长沙 410128;  
3. 天津市水稻工程技术中心, 天津 300457; 4. 湖南师范大学, 长沙 410081)

**摘要:** 籼粳分化现象广泛存在于亚洲栽培稻 (*O. sativa*) 中。大量研究表明, 普通野生稻 (*O. rufipogon*) 的叶绿体 DNA 也存在籼粳分化。为进一步探明非 AA 型野生稻的叶绿体 DNA 是否存在籼粳分化现象, 利用 2 个长度多态性籼粳分型标记 (ORF100 和 ORF29-TrnCGCA) 对 12 个非 AA 型野生稻种的叶绿体 DNA 进行籼粳特性分析。研究发现, 非 AA 型野生稻叶绿体 DNA 都呈现偏粳趋势。对叶绿体 DNA 碱基多态性最丰富的 2 个区域 (rps16 基因内含子和 TrnT<sup>UGU</sup>-TrnL<sup>UAA</sup> 间区) 进行测序比较, 在 4 个位点的籼粳分型标记中, 非 AA 型野生稻有 3 个位点与粳型标记一致, 1 个位点与籼型标记一致, 但另有多位点的碱基与栽培稻不同。研究结果表明, 非 AA 型野生稻叶绿体 DNA 总体偏粳, 但与典型粳稻存在一定遗传差异。推测粳型叶绿体可能为稻属原始类型。

**关键词:** 非 AA 型野生稻; 叶绿体 DNA; 分子标记; 籼粳特性

## Study on Indica-japonica Character of Non-AA Wild Rice Chloroplast DNA

ZHANG Wu-han<sup>1,2</sup>, DENG Hua-feng<sup>1,2,3</sup>, CHEN Liang-bi<sup>4</sup>, HE Qiang<sup>1</sup>, SHU Fu<sup>1,2</sup>,  
CHEN Jue-liang<sup>4</sup>, YUAN Long-ping<sup>1</sup>

(1. National Hybrid Rice R&D Center, Changsha 410125; 2. Hunan Agricultural University, Changsha 410128;  
3. Tianjing Rice R&D Center, Tianjing 300457; 4. Hunan Normal University, Changsha 410081, China)

**Abstract:** Differentiation of indica-japonica character in *O. sativa* commonly exists. A great deal of research showed the chloroplast DNA of *O. rufipogon* also exhibit diversity of indica-japonica character. In order to prove whether the chloroplast DNA of non-AA wild rice shows differentiation of indica-japonica character, this study analyzed the chloroplast DNA of non-AA wild rice using molecular markers for separating indica-japonica traits. The chloroplast DNA of non-AA wild rice was japonica-type using two length diversity markers (ORF100 and ORF29-TrnCGCA). Utilizing four sequence markers existed in intron of rps16 gene and TrnT<sup>UGU</sup>-TrnL<sup>UAA</sup> spacer, the result of three markers showed that the chloroplast DNA of non-AA wild rice were japonica-type and the result of one marker showed that they were indica-type. It also showed that differentiation existed between the sequence of tested material and the markers, and some mutation has happened. The result show japonica-type may be the original type of rice chloroplast DNA.

**Key words:** non-AA wild rice; chloroplast DNA; molecular marker; indica-japonica character

籼粳分化现象广泛存在于亚洲栽培稻中, 在杂种优势利用和亲缘关系研究上具有重要意义, 前人在水稻叶绿体 DNA 的籼粳特性研究上做了大量工作。由于叶绿体 DNA 本身的保守性<sup>[1]</sup>, 分析叶绿体 DNA 的籼粳特性还特别有利于研究水稻的起源和进化。如孙传清等<sup>[2]</sup>用 ORF100 标记对 151 份普通野生稻进行分析, 发现无论是中国普通野生稻还是南亚、东南亚普通野生稻, 其叶绿体 DNA 均已发生籼粳分化, 认为这一事实有利于支持亚洲栽培

稻起源的“二元说”, 即具籼型叶绿体 DNA 的普通野生稻演化成具籼型叶绿体 DNA 的栽培稻, 具粳型叶绿体 DNA 的普通野生稻演化成具粳型叶绿体 DNA 的栽培稻。一般较为公认的稻属有 22 个种, 包括 A、B、C、D、E、F、G、H、J 和 K 共 10 大基因组<sup>[3]</sup>。研究较多的亚洲栽培稻和普通野生稻只是其中 2 个种, 均为 A 基因组型, 染色体组不为 A 基因组型的野生稻 (简称非 AA 型野生稻) 共 16 个种。大量研究表明, 普通野生稻的叶绿体 DNA 存

接收日期: 2007-05-08

基金项目: 湖南省自然科学基金“非 AA 型重颖野生稻有利基因的利用研究”(06C0347) 资助。

作者简介: 张武汉 (1980-), 男, 湖南祁东人, 硕士研究生, 研究方向为水稻遗传育种。通讯作者邓华凤 (1963-), 研究员, 主要从事水稻遗传育种工作。Tel: 0731-2872959; E-mail: denghuafeng@sohu.com

在籼粳分化现象<sup>[2,4,5]</sup>,那么,非AA型野生稻的叶绿体DNA是否也存在籼粳分化的现象呢?

本试验应用长度多态性籼粳分型标记(ORF100和ORF29-TrnC<sup>GCA</sup>片段)以及序列多态性籼粳分型标记(rps16基因内含子和TrnT<sup>UGU</sup>-TrnL<sup>UAA</sup>间区)对12个非AA型野生稻(表1)叶绿体DNA的籼粳特性进行研究,以期为水稻起源、分类、亲缘关系以及演化规律等研究提供分子生物学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料包括非AA野生稻和2个栽培稻对照。非AA野生稻涵盖12个种,共24份材料,每个种1~3份材料;对照为9311(典型籼稻)和日本晴(典型粳稻)(见表1)。对照由湖南师范大学植物生理研究室提供,非AA型野生稻由国家种质南宁野生稻圃提供。

表1 供试材料

Table 1 Various types of rice tested in this study

序号 Order No.	稻种 Species	基因型 Genotype	备注 Remark	序号 Order No.	稻种 Species	基因型 Genotype	备注 Remark
1	亚洲栽培稻 <i>O. sativa</i>	AA	9311	14	高秆野生稻 <i>O. alta</i>	CCDD	南美洲 South America
2	亚洲栽培稻 <i>O. sativa</i>	AA	日本晴 Nipponbare	15	重颖野生稻 <i>O. grandiglumis</i>	CCDD	南美洲 South America
3	斑点野生稻 <i>O. punctata</i>	BB	非洲 Africa	16	重颖野生稻 <i>O. grandiglumis</i>	CCDD	南美洲 South America
4	小粒野生稻 <i>O. minuta</i>	BBCC	东南亚 East-south Asia	17	重颖野生稻 <i>O. grandiglumis</i>	CCDD	南美洲 South America
5	小粒野生稻 <i>O. minuta</i>	BBCC	东南亚 East-south Asia	18	阔叶野生稻 <i>O. latifolia</i>	CCDD	南美洲 South America
6	根茎野生稻 <i>O. rhizomatis</i>	CC	斯里兰卡 Sri Lanka	19	阔叶野生稻 <i>O. latifolia</i>	CCDD	南美洲 South America
7	根茎野生稻 <i>O. rhizomatis</i>	CC	斯里兰卡 Sri Lanka	20	澳洲野生稻 <i>O. australiensis</i>	EE	澳洲 Australia
8	根茎野生稻 <i>O. rhizomatis</i>	CC	斯里兰卡 Sri Lanka	21	澳洲野生稻 <i>O. australiensis</i>	EE	澳洲 Australia
9	紧穗野生稻 <i>O. eichingeri</i>	CC	东南亚 East-south Asia	22	澳洲野生稻 <i>O. australiensis</i>	EE	澳洲 Australia
10	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	CC	中国 China	23	短药野生稻 <i>O. brachyantha</i>	FF	非洲 Africa
11	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	CC	中国 China	24	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	GG	中国 China
12	高秆野生稻 <i>O. alta</i>	CCDD	南美洲 South America	25	马来野生稻 <i>O. ridleyi</i>	HHJJ	东南亚 East-south Asia
13	高秆野生稻 <i>O. alta</i>	CCDD	南美洲 South America	26	马来野生稻 <i>O. ridleyi</i>	HHJJ	东南亚 East-south Asia

### 1.2 叶绿体DNA的提取

CTAB法提取的总DNA即可<sup>[6]</sup>。取0.5g左右幼嫩叶片,剪碎放入研钵中,在液氮条件下磨成粉末。将粉末转移至1.5mL离心管,加600μL CTAB提取液、5μL β-巯基乙醇,振荡混匀,60℃水浴30min,中间摇匀若干次。加等体积预热氯仿/异戊醇(体积比24:1)混合液,混匀后1000rpm离心5min,取上清液加等体积氯仿/异戊醇(体积比24:1)

混合液,重复1次。加2倍体积预冷无水乙醇形成DNA沉淀。离心1000rpm 5min,70%预冷酒精洗2次,抽真空干燥后加预热TE溶解。紫外分光光度计检测DNA含量和纯度。

### 1.3 引物设计

以发表的9311和培矮64S叶绿体基因组全序列为引物设计模板,用Primer Premier5.0软件程序进行设计<sup>[7]</sup>。引物序列和扩增目的片段见表2。

表 2 叶绿体 DNA 扩增引物

Table 2 Primers used in the amplification of chloroplast DNA

引物 Primer	正向序列 Forward sequence	反向序列 Reverse sequence	扩增目的片段 Target fragment
cp1	GTGGACCTGACTCCTTGAA	AGCCGAGGTCGTGGTAA	ORF100
cp2	GCAGCCCAAGCGAGACT	AAGGCTCGGCGATACTG	ORF29-TrnC <sup>GCA</sup>
cp3	AGTGGGCTTACATAACAGAAA	ACCAAGGCTCAATACAATCA	rps16 gene intron
cp4	TTTTCTCCTCATACGGCT	TAGTCTGTCTATTTCGTCCC	TrnT <sup>UGU</sup> -TrnL <sup>UAA</sup>

#### 1.4 PCR 扩增与检测

PCR 反应体系为: 1×Buffer, 2 mmol·L<sup>-1</sup> MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mmol·L<sup>-1</sup> dNTPs, 10 pmol 引物, DNA 模板 60~100 ng, Tag DNA 聚合酶 2U (Ferments, USA), 总体积 50 μl。扩增程序为: 94℃ 预变性 5 min, 接着以 94℃ 40 s、50℃ 40 s、72℃ 1 min 循环 35 次, 最后 72℃ 延伸 10 min。扩增产物在含 0.5 μg·mL<sup>-1</sup> EB 的 2% 琼脂糖凝胶上恒压电泳后紫外凝胶成像。

#### 1.5 DNA 测序

从上述电泳后的胶中用上海生工胶回收试剂盒回收和纯化目的片段 (方法按说明进行), 送上海英骏用 ABI 3770 测序仪直接测序, 直接测序困难的再用北京天为生产的克隆试剂盒中的 pBS-T 载体将目的片段克隆进 TOP10 大肠杆菌 (方法按说明

进行)。挑取单菌落划线扩大培养后, 用相应 PCR 引物进行菌体 PCR 检测, 选阳性克隆摇菌, 将菌液送上海英骏用 M13 正反向引物双向测序。

#### 1.6 序列分析

用 DNAMAN 软件 3.0 版和 Clustal 程序对所测序列进行多重序列比对。

## 2 结果与分析

### 2.1 cp1 的扩增结果

粳稻叶绿体 DNA 在该片段有 1 个 69 bp 碱基重复, 而籼稻叶绿体 DNA 缺失此重复序列, 因此粳稻日本晴扩增的 ORF100 片段电泳带滞后于籼稻 9311 (图 1)。所有非 AA 型野生稻所扩增的 ORF100 片段均表现出同日本晴相似的粳稻特征带。

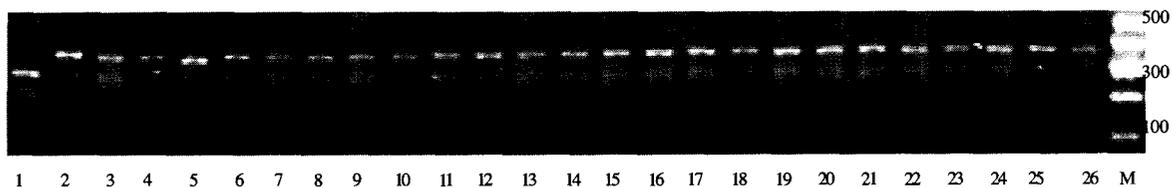


图 1 ORF100 在水稻中的分布 (序号与表 1 对应)

Fig. 1 Distribution of the ORF100 in rice (The order No. corresponding with Table 1)

### 2.2 cp2 的扩增结果

籼稻叶绿体 DNA 中在该片段存在 32 bp 重复插入序列, 而粳稻叶绿体 DNA 中没有, 因此籼稻 9311 的 cp2 扩增电泳带滞后于粳稻日本晴 (图 2)。小粒野生稻 (4) 和药用野生稻 (11) 一个株系的泳带位于典型籼稻和典型粳稻的泳带之间, 表明这两种野生稻的该 DNA 片段长度比籼稻短, 比粳稻长。疣粒野生稻 (24) 和马来野生稻 (25、26) 的泳带远远落后于典型籼稻和典型粳稻的泳带, 其他非 AA 型野生稻的泳带表现出典型粳稻的特征。

### 2.3 cp3 扩增片段序列分析

研究发现 9311 在 rps16 基因内含子 274 位点有

1 个 CTTTATC 标记序列 (表 3), 粳稻日本晴没有该序列, 其他非 AA 型野生稻全部缺失该序列, 表现出和典型粳稻一样的特征。

### 2.4 cp4 扩增片段序列分析

在 9311 和日本晴的 TrnT<sup>UGU</sup>-TrnL<sup>UAA</sup> 间区序列中有 3 个籼粳分型位点 (表 3 中的 340~344、440 和 802~814), 对比其他非 AA 型野生稻, 340~344 区段的序列同粳稻相比均缺失 ATAT, 但比籼稻多 1 个 A 或 T; 440 位点上偏粳的占多数, 仅澳洲野生稻、疣粒野生稻、马来野生稻和小粒野生稻的 1 个株系偏籼; 802~814 位点表现总体偏粳, 仅小粒野生稻的 1 个株系偏籼, 重颖野生稻的 1 个株系该区

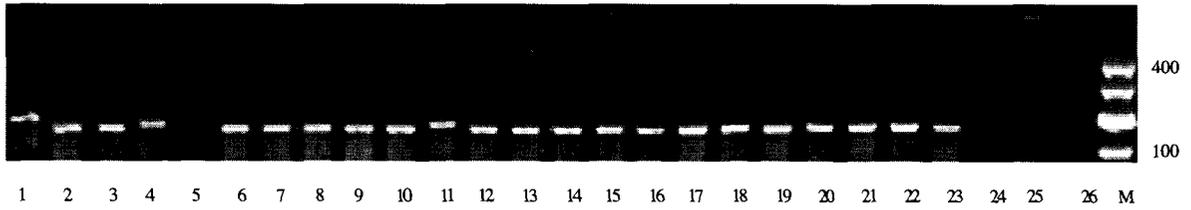


图 2 ORF29-TrnC<sup>GCA</sup> 在水稻中的分布 (序号与表 1 对应)

Fig. 2 Distribution of the ORF29-TrnC<sup>GCA</sup> in rice (The order No. corresponding with Table 1)

域缺失。但偏粳类型中也存在差异,如重颖野生稻有 2 个株系 814 位点碱基为 T、澳洲野生稻 3 个株系的 814 位点碱基全部为 G。

除了表 3 碱基差异外,非 AA 型野生稻与 9311 和日本晴之间还存在许多单碱基差异位点,非 AA 型野生稻之间也有较多的差异位点(另文报道)。

表 3 非 AA 型野生稻籼粳分型标记位点序列结果

Table 3 The result of marker sites for separating indica-japonica character of rice chloroplast DNA

材料 Material	cp3		cp4	
	274-280	340-344	440	802-814
9311 (CK)	CTTTATC	-----	-	AGAAAA-----
日本晴 Nipponbare (CK)	-----	TATAT	T	AGAAAA-GAAAA
斑点野生稻 <i>O.punctata</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
小粒野生稻 <i>O.minuta</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
小粒野生稻 <i>O.minuta</i>	-----	A----	-	AGAAAA-----
根茎野生稻 <i>O.rhizomatis</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
根茎野生稻 <i>O.rhizomatis</i>	-----	A----	T	AGAAAA-AAAAA
根茎野生稻 <i>O.rhizomatis</i>	-----	A----	T	AAGAAAA-GAAAA
紫穗野生稻 <i>O.eichingeri</i>	-----	T----	T	AGAAAA-GAAAA
药用野生稻 <i>O.officinalis</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
药用野生稻 <i>O.officinalis</i>	-----	A----	T	AGAAAAAGAAAA
高秆野生稻 <i>O.alta</i>	-----	A----	T	AAAAAA--AAAA
高秆野生稻 <i>O.alta</i>	-----	A----	T	AAAAAA-AAAAA
高秆野生稻 <i>O.alta</i>	-----	T----	T	AGAAAA-GAAAA
重颖野生稻 <i>O.grandiglumis</i>	-----	A----	T	-----
重颖野生稻 <i>O.grandiglumis</i>	-----	A----	T	AAAAAA-GAAAT
重颖野生稻 <i>O.grandiglumis</i>	-----	A----	T	AAAAAA-GAAAT
阔叶野生稻 <i>O.latifolia</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
阔叶野生稻 <i>O.latifolia</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
澳洲野生稻 <i>O.australiensis</i>	-----	A----	-	AGAAAA-GAAAG
澳洲野生稻 <i>O.australiensis</i>	-----	A----	-	AGAAAA--GAAAG
澳洲野生稻 <i>O.australiensis</i>	-----	A----	-	AGAAAA-GAAAG
短花药野生稻 <i>O.brachyantha</i>	-----	A----	T	AGAAAA-GAAAA
疣粒野生稻 <i>O.meyeriana</i>	-----	A----	-	AGAAAA--GAAAA
马来野生稻 <i>O.ridleyi</i>	-----	A----	-	AGAAAA-GAAAA
马来野生稻 <i>O.ridleyi</i>	-----	A----	-	AGAAAA--GAAAA

### 3 讨论

#### 3.1 水稻粳分型的分子标记

筛选出可靠的粳分型标记是准确、简便判别水稻叶绿体 DNA 粳特性的前提条件, 前人在这方面做了大量工作。Ishii 等<sup>[8]</sup>从叶绿体 DNA 限制性内切酶模型的结果发现粳稻和籼稻叶绿体 DNA 的差异在于 0.1 kb 长度的突变, 粳稻较籼稻少了 0.1 kb 的片段, 这种差异也发现于野生稻。Kanno 等<sup>[9]</sup>根据 Ishii<sup>[8]</sup>的结果, 将粳型叶绿体 DNA (III 型) *Pst*I 限制性片段 P12 的缺失的确切位置和精确长度进行了分析, 结果表明, 该缺失位于 ORF100 内, 缺失的长度为 69 bp, 通过对缺失两端的序列进行分析, 发现缺失两端存在 12 bp 的直接重复序列, 认为 69 bp 的缺失是由这个重复序列的重组引起的。这一特征可作为鉴别叶绿体 DNA 粳特性的一个标记, 因为多数粳稻品种的叶绿体 DNA 有 69 bp 缺失, 而籼稻没有。Chen 等<sup>[10, 11]</sup>根据这一特性对云南陆稻及野生稻进行了分析, 发现根据 ORF100 内 69 bp 缺失和根据粳籼判别函数及同工酶对栽培稻的分类结果基本一致。此后 ORF100 标记被广泛采用作为水稻叶绿体 DNA 粳分型的标记。典型粳稻的 ORF29-TmC<sup>GCA</sup> 泳带落后于典型籼稻的泳带, 前者的序列比后者多了 1 个 32 bp 的插入, Tang 等<sup>[7]</sup>提出 ORF29-TmC<sup>GCA</sup> 片段可作为水稻叶绿体 DNA 粳分型的一个标记, 该观点得到了一些研究者的证实。9311 等典型粳稻的叶绿体 DNA rps16 基因内含子在扩增片段的 258 位比典型籼稻多了 1 个 “ATCCTTT” 重复, Tang 等<sup>[12]</sup>认为此片段可作为叶绿体 DNA 粳分型的标记。黄光文<sup>[7]</sup>的研究结果表明, 典型籼稻叶绿体 DNA 的 TmT<sup>UGU</sup>-TmL<sup>UAA</sup> 间区在扩增片段的 314 位、410 位和 769 位分别比典型粳稻的多 1 个 “TATAT” 重复、单碱基 T 重复和 “AGAAAA” 重复。本研究结果表明, 除 TmT<sup>UGU</sup>-TmL<sup>UAA</sup> 间区在扩增片段的 340~344 (314~318) 位点外, 其他粳籼分型标记的判别结果基本一致, 可以初步认为这些判别结果基本一致的粳籼分型标记可以由鉴别亚洲栽培稻、普通野生稻的粳籼特性扩展应用到整个稻属。

#### 3.2 稻属叶绿体 DNA 的起源推测

本研究应用水稻叶绿体 DNA 的 2 个长度多态性粳籼分型标记 (ORF100 和 ORF29-TmCGCA) 对

非 AA 型野生稻叶绿体 DNA 进行的粳籼特性分析表明, 非 AA 型野生稻叶绿体 DNA 基本上都表现粳型特性。对 2 个多变区域 (rps16 基因内含子和 TmT<sup>UGU</sup>-TmL<sup>UAA</sup> 间区) 进行 PCR 扩增并测序, 利用这 2 个多变区域具有粳籼分型标记作用的 4 个位点对非 AA 型野生稻叶绿体 DNA 的粳籼特性进行了进一步研究, 其中 3 个表现粳型特性、1 个表现部分粳型特性, 但其与典型粳稻已不完全相同。曾有研究认为, 在叶绿体 DNA 的模型上粳稻是由籼稻演化而来<sup>[13, 14]</sup>。根据本研究结果推测, 粳型叶绿体有可能是稻属较原始和普遍的类型, 该推测还有待于进一步研究证实。

#### 参 考 文 献

- [1] 燕安, 朱登云. 叶绿体基因组在系统发育学及基因工程领域的应用. 细胞生物学杂志, 2004, 26(2): 153-156.
- [2] Sun C Q, Wang X K, Yoshimura A, et al. Genetic differentiation for nuclear, mitochondrial and chloroplast genomes in common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 2002, 104: 1335-1345.
- [3] 张乃群, 李运贤, 祝莉莉, 等. 稻属分类研究综述. 中国水稻科学, 2003, 17(4): 393-397.
- [4] 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 的粳籼分化. 农业生物技术学报, 1997, 5(4): 319-324.
- [5] 肖晗, 应存山, 黄大年. 中国栽培稻及其近缘野生种叶绿体 DNA 的限制性片段长度多态性分析. 中国水稻科学, 1996, 10(2): 121-124.
- [6] 李树华, 何军, 杨淑琴, 等. 野生稻、野燕麦、枸杞 DNA 的提取方法. 干旱地区农业研究, 2005, 23(3): 166-169.
- [7] 黄光文. 运用分子标记技术研究水稻的遗传多样性. 长沙: 湖南师范大学, 2006.
- [8] Ishii T, Tsunewaki K. Chloroplast genome differentiation in Asian cultivated rice. *Genome*, 1991, 34: 818-826.
- [9] Kanno A, Watanabe N, Nakamura I, et al. Variation in chloroplast DNA from rice (*Oryza sativa*): Differences between deletions mediated by short direct-repeat sequences within a single species. *Theor Appl Genet*, 1993, 86: 57-584.
- [10] Chen W B, Sato Y I, Nakamura I, et al. Distribution of deletion types in cpDNA of cultivated and wild rice. *Jpn J Genet*, 1993, 68: 597-603.
- [11] Chen W B, Sato Y I, Nakamura I, et al. Indica-Japonica differentiation in Chinese rice landraces. *Euphytica*, 1994, 74: 195-201.
- [12] Tang J B, Xia H A, Gao M L, et al. A comparison of rice chloroplast genomes. *Plant Physiol*, 2004, 135: 412-420.
- [13] Ishii T, Terachi T, Tsunewaki K. Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA from cultivated rice species, *Oryza sativa* and *O. glaberrima*. *Jpn J Genet*, 1986, 61: 537-541.
- [14] Ishii T, Terachi T, Tsunewaki K. Restriction endonuclease analysis of chloroplast DNA from A-genome diploid species of rice. *Jpn J Genet*, 1988, 63: 523-536.