

36个水稻骨干系的基因组分析 及其遗传育种学意义*

II 利用不同方法对稻种分类的研究

王松文

(天津农学院, 天津 300381)

摘 要 选取 36个栽培稻、普通野生稻骨干系进行了 RFLP聚类,并对分子标记法、程氏指数法和杂交亲和力法进行了比较分类。结果表明,三种分类方法对水稻材料的分类是基本一致的。采用不同方法进行分类,有利于对水稻材料的深刻理解与认识。通过 RFLP 聚类树状图、籼粳倾向性图及基因型的综合分析,明确了中国普通野生稻可分偏粳型和原始普野型,国外普通野生稻包括偏粳型与原始普野型。中国原始普野型相对倾粳,国外原始普野型相对倾籼,它们是遗传分化显著不同的两种类型。

关键词 水稻 水稻骨干系 限制性片段长度多态性 籼粳分类 籼粳性倾向图

亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L, 简称栽培稻,下同)和亚种分类一直是稻作育种界的热点问题^[1]。在以前的研究中,栽培稻的植物学分类倾向是只分籼粳两个亚种^[2~4],对于普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff, 简称普野)是否存在籼粳分化问题许多学者展开了研究。冈彦一^[5]认为普野存在着潜伏的遗传分化的可能性; Second^[6]认为普野存在籼粳分化;王象坤等^[7]认为除少量的原始型普野外,多数普野存在十分复杂的籼粳分化。近年来,水稻基因组计划进展迅速,新近发展了可用于不同研究用途的分子标记技术,为稻种分类方面的深入研究提供了可能。钱惠荣等^[8]利用 RFLP 标记构建了广亲和品种亲缘关系树状图。孙传清^[9]依据核 DNA、mtDNA、cpDNA 综合研究的结果,将中国普野分为原始普野型、偏籼普野型和偏粳普野型。

本研究应用程氏指数法、分子标记法、杂交亲和力法对不同稻种材料进行了综合分类,以期求得一个最佳分类系统,为不同稻种资源归类和搜集、寻找与利用不同水稻资源提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试水稻材料 36个(普野 17份,栽培稻 19份),其中含广亲和性品种(wide compatibility variety, WCV) 5份, (表 1)。

1996-04-03收稿。

* 本研究受到国家水稻基因项目资助,研究工作主体部分在作物遗传改良国家重点实验室完成。

表 1 供试水稻材料

序号	品 名	备 注	序号	品名	备注	序号	品名	备注	序号	品名	备注
1	矮脚南特	粳	10	夷方糯	云南地方种	19	h11	湖南	28	培矮 64s	W CV
2	广陆矮 4号	灿	11	h12	湖南	20	h15	湖南	29	培迪	W CV
3	农垦 58s	粳	12	W 2T	菲律宾	21	h34	海南	30	轮回 422	W CV
4	八月糯	云南地方种	13	h20	广西	22	h35	海南	31	Du lar	W CV
5	马罗糯谷	云南地方种	14	h10	广西	23	h38	海南	34	02428	W CV
6	竹丫糯	云南地方种	15	h5	广西	24	h42	海南	33	巴利拉	粳
7	勐宋 1号	云南地方种	16	P16	江西(东乡)	25	h9	福建	32	秋光	粳
8	鸡血糯	云南地方种	17	h41	海南	26	h29	越南	35	南京 11	粳
9	矮子乌骚	云南地方种	18	h7	广东	27	h30	泰国	36	IR 36	粳

1 2 RFLP分析

水稻 DNA 的提取,总 DNA 的酶解,电泳, Southern 印迹转移,同位素标记探针制备,杂交和放射自显影参照文献 [10 11]介绍的方法。水稻总 DNA 用 BamH I EcoR I和 H indIII三种限制性内切酶酶解,所选用的分布于 12条染色体的 RFLP 探针分别来源于美国康乃尔大学 Tanksley 博士实验室和日本水稻基因组计划

1 3 数据分析

每条杂交带作为一个信息单位处理,仅考虑多态性带,在同一探针的不同酶切组合中,不同的酶切结果往往相关,这时只取一个酶切结果用于分析,遗传距离计算机系统聚类根据余家林 [1]方法进行,数据统计在联想 586计算机上进行。

2 结果与分析

2 1 36个水稻骨干系的 RFLP聚类

34个 DNA 探针均能在不同材料间检测到多态性,这些探针均匀分布在 12条染色体的不同区段上,共检测到 185条多态性带,所有材料均能分开,均有自己的 DNA 指纹图谱,36个水稻骨干系先形成遗传距离矩阵,后建立了各品系的亲缘关系树状图(图 1)

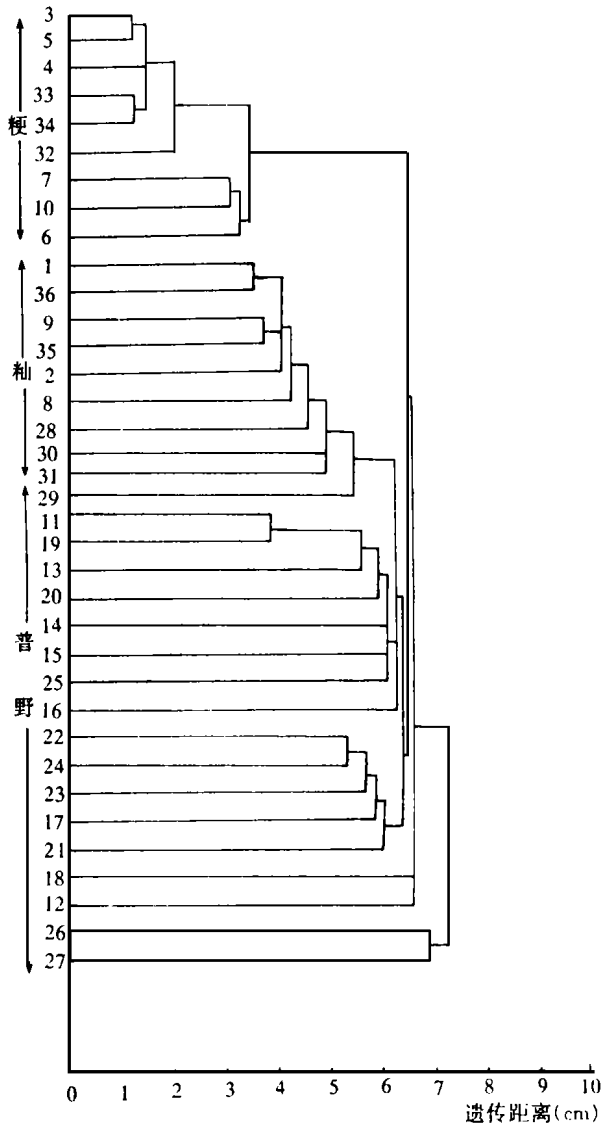


图 1 36个水稻骨干系的 RFLP聚类

在图 1中, 36个材料清楚地分为三组, 9个粳稻材料归入一组(粳稻组); 10个籼稻材料归入一组(籼稻组), 两组间分组明显; 野生稻材料的系统分类比较复杂, 中国普野明显地分为四组: 广东组、海南组、江西(东乡)组及其他组(含湖南、广西、福建普野), 外国普野在 6 63后才陆续和栽培稻或中国野生稻合并为一类, 这说明在分子特征上中国普野不同于外国普野。

普通野生稻(包括中国普野和外国普野)一般都具备相同的部分分子特征。图 2显示所有野生稻与粳稻相同。图 3显示野生稻与籼稻片段相同。



图 2 探针 RZ906/EcoR I RFLP分析
(样品序号同表 1)

图 3 探针 RG462/BamH I RFLP分析
(样品序号同表 1)

34个探针 185项多态性信息的综合分析结果, 使得我们可以以数轴的形式绘制普通野生稻粳倾向性图(图 4)

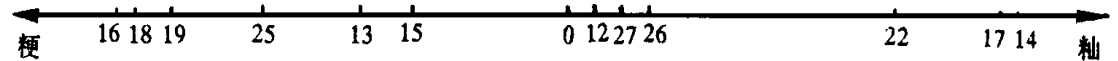


图 4 普通野生稻粳倾向图(样品序号同表 1)

粳倾向图分粳两个方向, 籼倾向性是相对的(见图 4), 籼倾向性值 $V = DI - DJ$, DI 、 DJ 分别代表某材料与籼、粳的平均距离。由图 1 图 4 基因型(未显示)综合分析, 可得出以下结论:

- (1)中国普野相对偏粳, 国外普野相对偏籼。
- (2)中国普野有偏粳型与原始普野型 国外只有原始普野型与偏籼型
- (3)中国原始普野型中有原始普野倾粳型(相对偏粳型, 粳性相对弱化)与原始普野倾籼型(粳性相对国外原始倾籼型更弱化, 以 h15为代表), 国外原始普野型中有原始普野倾籼型(如 h27)。
- (4)h14 h17 h22均为野栽渗交的后代, 这种偏籼性是由于籼稻基因的大量渗入造成的。

表 2 不同水稻材料的籼粳分类

材 料	稈毛	酚反应	第 1 穗轴长	抽穗壳色	叶毛	谷粒长宽比	程氏指数	籼粳分类
马罗糯谷	4	3	4	4	4	4	23	粳
竹丫糯	1	1	4	2	3	3	14	粳
八月糯	2	4	4	4	3	4	21	粳
秋 光	4	4	4	4	4	4	24	粳
巴利拉	3	4	4	4	4	3	22	粳
Du lar	1	3	2	1	0	2	9	籼
广陆矮 4号	1	2	0	2	0	4	9	籼
IR 36	0	0	1	0	1	1	3	籼
矮子乌骚	1	0	0	1	1	1	4	籼
南京 11	1	0	2	0	0	3	6	籼

2 2 程氏指数法

程氏分类以形态特征为主, 其突出特点是简便快捷, 10个栽培稻材料的籼粳分类如表 2

2 3 杂交亲和力法

以表 1中 19个栽培稻为亲本, 按不完全双列杂交配置了 171个杂交组合, 随机区组, 设 3次重复, 单本种植, 常规管理, 单株收获, 每重复取 5个单株, 全株考察平均结实率。不同材料与粳型品种杂交组合 F_1 平均结实率为横坐标 (以 X 表示), 与粳型品种杂交组合 F_1 平均结实率为纵坐标 (以 Y 表示), 作出不同水稻材料的 F_1 育性 X 值、 Y 值双向分布图 (图 5)

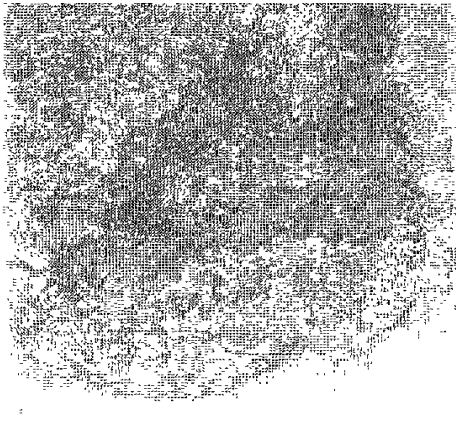


图 5 不同稻种材料的 X 、 Y 值双向分布图

在图中以对角线为界右侧为籼稻区 (I 区), 左侧为粳稻区 (J 区) 我们还分别在 $X = Y = 0.27$ $X = Y = 0.6$ 处围成 G 区和 W 区 (见图 5), 前者可能接近远缘杂交平均结实率的上限, 后者可能在筛选广亲和性材料时更有价值 将 X 与 Y 的比值赋值为 K ($K = X/Y$), 将点到原点的图距定为 L (以图距单位表示, $L = (X^2 + Y^2)^{1/2}$), 这样, 图中任意一点则相应地有一 K 值、 L 值 K 值、 L 值可直观在显示稻种材料的籼粳性和亲和性, K 值越倾向两极 ($0 \rightarrow \infty$), 粳性或籼性越典型 (表 3)

表 3 10个不同水稻材料的 K 值、 L 值

材 料	K 值	L 值	籼粳性	材 料	K 值	L 值	籼粳性
马罗糯谷	0.17	6.49	粳	Du lar	1.09	8.42	籼
竹丫糯	0.28	7.06	粳	广陆矮 4号	1.58	6.24	籼
八月糯	0.51	6.62	粳	IR 36	2.16	7.38	籼
秋光	0.60	7.00	粳	矮子乌骚	2.29	6.99	籼
巴利拉	0.77	7.06	粳	南京 11	2.54	6.56	籼

由图 1图 4表 2表 3可以看出, 分子标记法、程氏指数法和杂交亲和力法对不同稻种材料的分类结果有良好的一致性

3 讨论

分类在生物学上一般是反映群体水平上的差异, 对稻种的准确分类需要宏观和微观多层次的研究^[13]。传统的形态和生理性状为主的分类法, 对栽培稻的亚种分类发挥了重要作用。对于一些复杂难分的中间型材料, 可以通过不同方法间的互补作用来解决^[2]。有研究指出, 分化彻底的籼、粳在许多基因位点 (或性状上) 表现非随机组合现象^[14, 15]。而一些起源中心与多样性中心的稻种 (如云南地方品种) 基因的非随机组合性小, 多样性高, 这是适应进化的另外一种形式, 这些分化不彻底的稻种分类较困难 本研究对云南稻材料的分类结果表明, 对八月糯、马罗糯谷、矮子乌骚采用三种不同方法进行分类, 其结果有良好的一致性; 竹丫糯则不太一致, 用分子标记法和杂交亲和力法分类均属典型粳稻, 在程氏指数分类中, 酚反应、抽穗壳色均表现

为典型的粳性性状,而第 1 2穗轴节长、谷粒长宽比则表现为典型的籼性性状,综合分析,竹丫糯划为粳稻更为合理

由于诸多复杂的原因,迄今为止对普通野生稻粳性(或称粳倾向性)的研究不多。Oka^[5]认为普通野生稻存在着潜伏的遗传分化可能性。森岛等认为中国野生稻偏粳,印尼、菲律宾的野生稻偏粳。孙传清对 34份中国普野的核 DNA、mtDNA、cpDNA 的综合分类,把中国普野分为原始普野型、偏粳普野型和偏籼普野型。该研究表明:核 DNA、线粒体 DNA、叶绿体 DNA 的不同分类多数是不一致的。不一致情形下,以核 DNA 的分子特征分型^[7]。来自孙传清的研究还表明,中国普野可分为原始普野型、偏粳型和偏籼型。国外普野只有原始普野型和偏粳型。有研究指出,粳籼分化程度既与研究材料有关,也与所采用的性状和标记有关^[17]。

在研究材料上,精选了栽培稻和野生稻共 36份(我们称之为骨干系,这些材料代表性好,有我们自己多方面的研究基础)。而对于所采用的标记,钱惠荣^[8]等在 160个 RFLP标记中筛选到 24个粳特异性探针;Zhang等^[11]的研究中粳籼分化程度占 34%;Morishina和 Oka用形态性状和同工酶估算到粳籼分化程度占 50%;李任华^[10]在所使用的 92个探针中,发现有 42个与粳籼特异性有关;本研究选用 34个探针,其中有 23个为粳籼特异性探针,检测到的粳籼分化程度占 67.6%。孙传清^[9]通过聚类分析绘制的树状图将供试材料分为 4大群,即粳稻及偏粳的普野群,籼稻及偏籼的普野群,中国原始普野群、南亚和东南亚原始普野群。而本研究引入了粳籼倾向性值(V),结合全基因组分析,证明普通野生稻中存在两种主要的遗传分化类型,即质的分化和量的分化。中国普野相对偏籼,国外普野相对偏粳,这是质的分化。量的分化主要体现在分化不明显的原始普野型中(如广西普野 h25、泰国普野 h27),h15的粳籼倾向性值 $V_{15} = -0.6$ h27的粳籼倾向值 $V_{27} = 0.2$ h25与 h27这种类型的原始普野具有“中间型”和“偏粳型”的双重性质。首先,在表现型上,它们“偏粳”,而在基因型上,它们属于“中间型”,这种遗传分化上的“中间型”也具有多样化的形式。它们或粳籼位点大约掺半,或相对粳型、籼型而言,或标记性状的相关原因并非能用粳籼基因定位的知识去解释。栽培稻与普通野生稻粳性及其稻种分类一直是众多稻作学者的研究热点,更广泛的取材,旨在提高研究效率和实验精度的标记筛选、开发与应用都是亟待解决的新问题。本研究所得的结果与结论都还有待于进一步验证与完善。

鸣谢:华中农业大学熊立仲、秦鸿德同学参加部分研究工作,天津农学院施利利同志给以大力协助,一并致谢。

参 考 文 献

- 1 王象坤, 李任华, 李自超, 等. 亚洲栽培稻的亚种间杂交稻的认定与分类. 863计划两系杂交水稻专题研讨会暨 1996年海南年会论文汇编, 1996 186~ 193
- 2 程侃声. 云南稻种资源的综合研究与利用II. 亚洲栽培稻分类的再认识. 作物学报, 1984, 10(4): 271~ 280
- 3 Glaszmann JC. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor Appl Genet* 1987, 74(1): 21~ 30
- 4 Morishima H, Oka H I. Phylogenetic differentiation of cultivated rice XX II. Numerical evaluation of the Indica Japonica differentiation. *Japan J Breed* 1981, 31(4): 402~ 413
- 5 Oka H I, Morishima H. Phylogenetic differentiation of cultivated rice 23 Potentiality of wild progenitors to evolve the indica and japonica type of rice cultivars. *Euphytica* 1982, 33: 637~ 650
- 6 Second G. Evolutionary relationships in the *arativa* group of *Oryza* L. based on isozyme data. *Genet Sel Evol* 1985, 17(1): 89~ 114
- 7 王象坤, 孙传清主编. 中国栽培稻起源与演化研究专集. 北京: 中国农业大学出版社, 1996
- 8 钱惠荣, 沈波, 林鸿宣, 等. 水稻籼粳特异性 RFLP 标记及广亲和品种亲缘关系分析. 中国水稻科学, 1994, 8(2): 65~ 71
- 9 孙传清. 普通野生稻和栽培稻核 DNA, mtDNA, cpDNA 的遗传分化: [博士学位论文] 北京: 中国农业大学出版社, 1996
- 10 Kurata N, Nagamura Y, Yanamoto K, et al. A 300 K ilobase interval genetic map of rice including 883 expressed sequences. *Nature Genetics* 1994, 8: 365~ 372
- 11 Zhang Qifa et al. Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis. *Theor Appl Genet* 1992, 83: 495~ 499
- 12 余家林. 农业多元试验统计. 北京: 北京农业大学出版社, 1993
- 13 程侃声. 亚洲栽培稻籼粳亚种的鉴定. 昆明: 云南科技出版社, 1993
- 14 Sano R, Morishima H. *Indica-japonica* differentiation of rice cultivars viewed from variation in key characters and isozymes with special reference to landraces from the Himalayan hilly areas. *Theor Appl Genet* 1992, 84: 266~ 274
- 15 Sato Y, Ishikawa R, Morishima M. Nonrandom association of genes and characters found in indica \times japonica hybrids of rice. *Heredity* 1990, 65: 75~ 79
- 16 Morishima H, Gadrinab LU. Are the Asian common wild-rices differentiated into the indica & japonica type? In: *Proceedings of International Symposium "Crop Exploration & Utilization of Genetic Resources"*, 1987, 11~ 20
- 17 刘克德, 张启发, 张端品, 等. 云南地方稻种的遗传变异和籼粳分化. 植物学报, 1995, 37(9): 718~ 724
- 18 李任华. 水稻亲本遗传分化程度与杂种优势的关系及其分子遗传基础: [博士学位论文] 北京: 中国农业大学出版社, 1997

Genome Analyses of 36 Rice Elite Lines and Their Genetic Breeding Significance

Wang Songwen

(Tianjin Agricultural College, Tianjin 300381)

Abstract RFLP clusters were made in selected rice elite lines including 36 cultivated and common wild rice. Also, comparison and classification were carried on among the three molecular marker method, morphological character index method and cross-compatibility method. The results showed that the classification was basically the same and that it is beneficial to understand and recognize the rice material profoundly when arranging and classifying the rice material by three different ways. According to synthetic analysis of the RFLP cluster map, indica-japonica tendency map and genotype, it was clear that Chinese common wild rice could be classified into two types, i.e., the japonica-like type and the primitive type, and the common wild rice abroad into the indica-like type and the primitive type. The Chinese primitive wild rice was relatively japonica-inclining while the primitive type abroad relatively indica-inclining. They were two types whose genetic differentiation was different remarkably.

Key words Rice; Rice elite line; Restriction fragment length polymorphism (RFLP); Sub-special classification; Indica-japonica tendency map