

## 野生稻基因组随机扩增多态性DNA(RAPD)分析

吴 强 廖兰杰 杨代常 何光存 舒理慧

(武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

**摘要** 用18个随机引物对2份栽培稻、12份包含有六个基因组型的野生稻DNA进行了扩增,共获得147个多态性DNA片断,把这些多态性DNA片断作为遗传位点用UPGMA法计算出各材料间的遗传相似性系数,并作了聚类分析。主要结果如下:1.普通野生稻同栽培稻的亲缘关系很近,其中江永普通野生稻更接近于粳稻。2.CCDD组的*Oryza latifolia*和EE组的*O. australiensis*遗传多态性相似。3.B、C、D、E组的遗传多态性相似,组成一个复合体,此复合体与A组的遗传多态性也相似,而F组则相距较远。4.*O. meyeriana*和*Rhynchoryza sabulata*尚未确定组型,RAPD测定结果表明,前者与其它组型的种亲缘关系较远,后者则与A-C复合体的种较近。

**关键词** 野生稻;随机扩增多态性DNA分析;基因组

**中图分类号** Q782

## RAPD ANALYSIS OF WILD RICE GENOMES

Wu Qiang Liao Lanjie Yang Daichang He Guangcun Shu Lihui

(College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072)

**Abstract** Fourteen DNA samples, of which 2 cultivated and 12 wild rices, were amplified for random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis with 18 random primers, and 147 polymorphic bands were obtained. The genetic similarity coefficient was calculated by UPGMA cluster analysis. Results showed that (1) *Oryza rufipogon* had close relation to cultivated rice, and Jiangyong wild rice was more closely related to *Japonica*, (2) The polymorphism of *O. latifolia* with CCDD genome was similar to that of *O. australiensis* with EE genome, (3) Genomes B, C, D and E had similar polymorphism, and formed a complexity that the polymorphism of which was also similar to genome A, but was different from genome F, and (4) *Rhynchoryza sabulata* was more closely related to A-C complexity than *O. meyeriana*, although the genomes of both of them were uncertain.

**Key words** Wild rice; RAPD analysis; Genome

稻属有22个种,其基因组分析的细胞遗传学工作已有不少报道<sup>[1-4]</sup>。目前,除少数种外,稻属所含基因组已确定有A、B、C、D、E、F六个。其中A、C是基本基因组,B、C、D组之间有某种程度的亲近,E组和F组与其它基因组之间的关系尚不清楚。由于远缘杂交困难的障碍,利用细胞遗传学方法进行基因组分析存在着局限性:一方面难于获得杂交种子,使得基于F<sub>1</sub>

植株减数分裂时染色体行为分析的工作难以进行; 另一方面, 在中期 I, 许多未配对杂种中能观察到的细胞学差异与在种间和基因组间发现的生理学和形态学差异并不吻合。RAPD(random amplified polymorphic DNA) 技术由于具有不需要已知遗传学信息、操作容易、高度灵敏性和便于自动化等优点<sup>[5]</sup>, 被广泛地用于遗传学研究, 包括种属进化和各种目的的遗传学分析。本研究通过对 12 份野生稻和 2 份栽培稻进行 RAPD 分析, 以探讨野生稻各基因组间及野生稻和栽培稻在进化上的关系。

## 1 材料和方法

**供试材料** 实验材料包括 12 份野生稻(其中普通野生稻 3 份)和 2 份栽培稻(表 1)。

表 1 供试材料一览表  
Table 1 Rice materials used for RAPD analysis

编号 No.	名称 Species	基因组型 Genome	染色体数目 Chromosome number	来源或产地 Origin
1	籼稻* <i>Oryza sativa indica</i> (Nanjing 11)	AA	24	中国江苏 Jiangsu,China
2	粳稻* <i>O. sativa japonica</i> (Qiuguang)	AA	24	日本 Japan
3	江永野生稻 <i>O. rufipogon</i> (Jiangyong)	AA	24	中国湖南 Hunan,China
4	东乡野生稻 <i>O. rufipogon</i> (Dongxiang)	AA	24	中国江西 Jiangxi,China
5	三亚野生稻 <i>O. rufipogon</i> (Sanya)	AA	24	中国海南 Hainan,China
6	斑点野生稻 <i>O. punctata</i>	BBCC	48	菲律宾 Philippines
7	斑点野生稻 <i>O. punctata</i>	BB	24	菲律宾 Philippines
8	小粒野生稻 <i>O. minuta</i>	BBCC	48	菲律宾 Philippines
9	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	CC	24	中国广西 Guangxi,China
10	宽叶野生稻 <i>O. latifolia</i>	CCDD	48	墨西哥 Mexico
11	澳洲野生稻 <i>O. australiensis</i>	EE	24	澳大利亚 Australia
12	短护颖野生稻 <i>O. brachyantha</i>	FF	24	非洲 Africa
13	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	?	24	中国广西 Guangxi,China
14	<i>Rhynchoryza sabulata</i>	?	24	非洲 Africa

\* 粳稻为秋光; 籼稻为南京 11 号。 No. 3 to 14 are wild rices.

**引物(Primer)** 所用 18 个引物均购于 Opron 公司, 引物长度均为 10 bp, 18 个引物分别为 OPAA04、OPAA07、OPC03、OPC05、OPC06、OPC08、OPC12、OPC13、OPC15、OPC16、OPC18、OPC20、OPU06、OPU08、OPU12、OPU14、OPU16 和 OPU18。

**DNA 提取及纯化** 从新鲜幼叶提取和纯化 DNA 按常规方法。纯化的 DNA, 一部分沉淀后 -20 ℃ 保存备用, 另一部分稀释到 10 ng  $\mu$ L 供 RAPD 反应应用。

**RAPD 反应条件和程序** 在 25  $\mu$ L 反应体系中, 含有 10 mmol/L Tris HCl (pH8.3), 50 mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.001% gelatin, 100  $\mu$ mol/L dNTP 混合物, 0.001% Triton x-100, 模板 DNA 50-100 ng, 1 单位 Taq 酶, 用 20  $\mu$ L 石蜡油覆盖, PCR 扩增在 Perkin Elmer 公司的 DNA Thermocycler 480 上进行。PCR 程序为: 5 min 的预变性后, 94 ℃ 下变性 1 min, 36 ℃ 下复性 1 min, 72 ℃ 延伸 2 min, 循环 40 次, 最后一次循环延长 7 min。扩增产物用 2% 琼脂糖凝胶进行电泳分析。

**数据处理和分析** 将每个清晰可重复的 DNA 电泳带记录下来并将其作为一个位点, 若某

个扩增产物(带)在一个样品中出现,记作“1”,未出现则记作“0”,按钟扬等<sup>[6]</sup>的UPGMA程序,在微机上计算出各样品间的遗传相似性系数,并由此画出分子进化图。

## 2 结果和分析

用18个引物对14份供试材料进行随机扩增,共获得147个多态性DNA片段,图1和图2分别为引物OPU06和引物OPU16对供试材料的电泳图谱,实验的主要结果及分析如下:

### 2.1 栽培稻和野生稻的系统进化关系

根据统计结果,在5份AA型普通野生稻和栽培稻中共扩增出62个DNA片段,其中6个片段为5个材料共有,约占总片段数的10%;10个片段为4个材料共有,约占总片段数的16%;5个片段为3个材料共有,约占总片段数的8%;18个片段为2个材料共有,约占总片段数的29%;其余23个片段为5个材料的特征带,约占总片段数的37%。由此表明AA型普通野生稻同栽培稻的亲缘关系是很近的。

从材料间平均多态性数目(表2)和遗传相似性(表3)来看,江永普通野生稻同粳稻的平均多态性数目为1.05个,遗传相似性为0.72,而同籼稻的平均多态性数目为1.44个,遗传相似性为0.59,这表明江永普通野生稻更接近于粳稻,而三亚普通野生稻和东乡普通野生稻则介于籼粳稻类型的中间型。

### 2.2 CCDD型与EE型野生稻的亲缘关系

CCDD型的*O. latifolia*和EE型的*O. australiensis*共扩增出53条带,其中两者共同的扩增DNA片段数为29,占54.7%,平均多态性数目为1.22,遗传相似性为0.71,说明CCDD型和EE型的亲缘关系相近,这同Katayama<sup>[4]</sup>的结论一致。

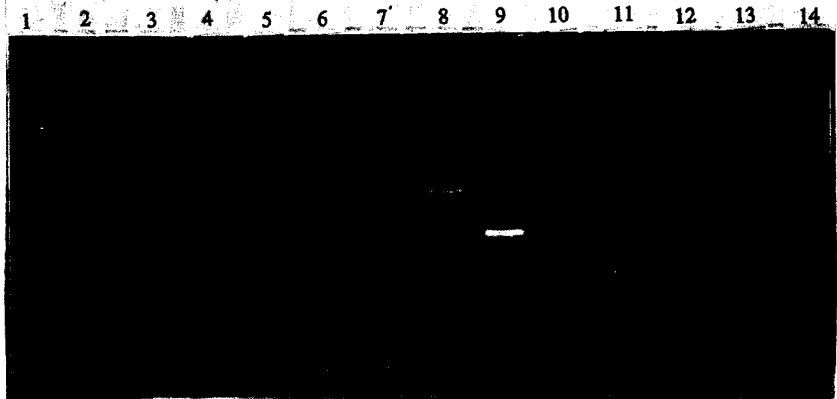


图1 引物OPU06的扩增结果

Fig. 1 Amplified products of primer OPU06

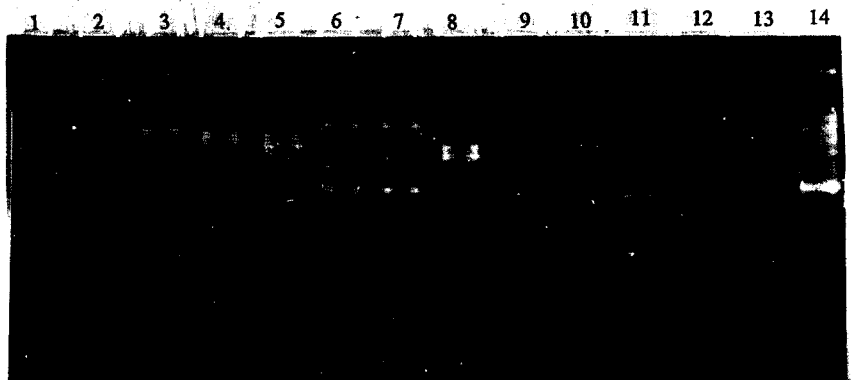


图2 引物OPU16的扩增结果

Fig. 2 Amplified products of primer OPU16

表2 栽培稻和野生稻之间平均多态性数目  
Table 2 Average polymorphisms between cultivated and wild rices

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	0	1.61	1.44	1.72	1.69	2.50	2.90	3.56	2.91	2.88	2.56	2.33	2.45	3.44
2		0	1.05	1.60	1.69	1.92	2.94	3.56	2.72	3.55	3.89	2.50	2.11	3.00
3			0	1.44	1.22	2.72	3.00	3.56	2.56	3.55	2.89	2.33	2.11	3.44
4				0	1.60	2.00	2.88	2.88	2.72	2.00	2.00	2.72	2.90	2.56
5					0	2.11	2.94	3.00	2.89	3.89	2.94	2.50	2.88	3.00
6						0	2.39	2.89	2.72	2.78	2.78	2.00	2.39	2.28
7							0	2.61	2.56	3.61	3.50	2.17	2.39	3.67
8								0	2.22	2.67	2.95	2.44	2.83	3.22
9									0	2.17	2.17	2.22	2.06	3.11
10										0	1.22	2.50	2.89	2.78
11											0	1.39	2.28	2.56
12												0	1.01	3.00
13													0	2.89
14														0

表3 野生稻和栽培稻的遗传相似性矩阵  
Table 3 Genetic similarity matrix of wild and cultivated rices

编号 No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	1.00	0.54	0.59	0.42	0.57	0.38	0.24	0.21	0.21	0.40	0.35	0.18	0.04	0.24
2		1.00	0.72	0.36	0.51	0.33	0.18	0.23	0.23	0.28	0.27	0.04	0.00	0.29
3			1.00	0.48	0.66	0.28	0.20	0.27	0.19	0.13	0.28	0.12	0.05	0.25
4				1.00	0.52	0.24	0.04	0.11	0.15	0.23	0.29	0.13	0.00	0.20
5					1.00	0.41	0.22	0.21	0.24	0.40	0.35	0.14	0.00	0.19
6						1.00	0.40	0.30	0.30	0.37	0.29	0.16	0.00	0.28
7							1.00	0.38	0.25	0.22	0.11	0.20	0.00	0.18
8								1.00	0.47	0.42	0.30	0.18	0.60	0.33
9									1.00	0.54	0.41	0.26	0.13	0.29
10										1.00	0.71	0.29	0.04	0.20
11											1.00	0.27	0.00	0.18
12												1.00	0.17	0.13
13													1.00	0.00
14														1.00

### 2.3 B、C、D型野生稻间的关系

纳耶<sup>[7]</sup>、渡边<sup>[8]</sup>在总结稻属基因组分析工作时指出, 稻属 A、B、C、D、E、F 六个基因组中, A 和 C 是基本基因组, B、C、D 组有某种程度的亲近。本研究结果表明: BB 型的 *O. punctata*, BBCC 型的 *O. punctata*, *O. minuta*, CC 型的 *O. officinalis* 及 CCDD 型的 *O. latifolia* 五个材料共扩增出 106 个 DNA 片段, 但由单材料扩增的特异 DNA 片段只有 40 个, 约占 38%, 其它均是至少两材料共有的带, 说明 B、C、D 组有一定程度的亲近, 但它们之间的遗传相似性程度还存在一定的趋异性。

### 2.4 FF 型同其它型野生稻的关系

FF 型的 *O. brachyantha* 同其它型野生稻之间平均多态性数目 (除个别外, 都在 2.00 以

上)都较大,遗传相似性较小(相似性系数 0.04-0.29),说明 FF 型同其它组型亲缘关系相距较远,这同经典的细胞遗传学工作结果是相符的。

## 2.5 栽培稻和野生稻的分子进化图

通过各材料间遗传相似性系数的聚类分析,绘出了分子进化图(图 3)。结果表明,首先是 AA 型的普通野生稻和栽培稻在相似性等于 0.44 的水平上聚成一类;然后是 BB 型的 *O. punctata*, BBCC 型的 *O. punctata* 和 *O. minuta*, CC 型的 *O. officinalis*, CCDD 型的 *O. latifolia*, EE 型的 *O. australiensis* 在相似性等于 0.28 的水平上聚成一类;AA 型复合体和 CC 型复合体则在 0.26 的水平上聚成一大类;最后是 *Rhynchoryza sabulata*, *O. brachyantha* 和 *O. meyeriana* 先后聚类。

系统关系聚类的第一次等级划分在  $D=0.11$  水平上,结合线  $L_1$  将 14 份材料划分为两类:一类为 *O. meyeriana*, 另一类为其它 13 份材料,  $L_1$  的划分突出了 *O. meyeriana* 同其它供试材料的亲缘关系很远;第二次划分在  $D=0.375$  水平上,结合线  $L_2$  将 14 份材料划分为四类:*O. meyeriana* 类, *O. brachyantha* 类, *Rhynchoryza sabulata* 类及 A-C 复合体类,第二次划分突出了普通栽培稻复合体同宽叶野生稻复合体与其它组型的差异;第三次划分在  $D=0.645$  水平上,其突出了江永普通野生稻同粳稻以及澳洲野生稻和宽叶野生稻的遗传相似性。

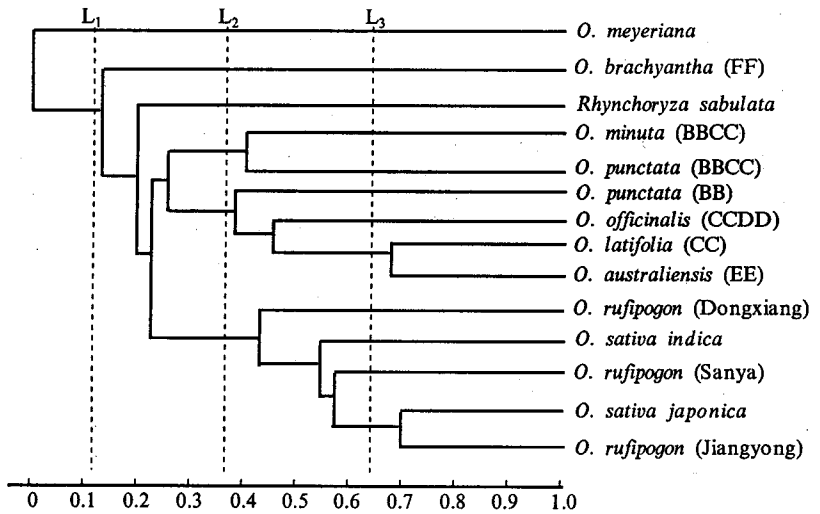


图 3 栽培稻和野生稻的分子进化图  
Fig. 3 Molecular evolution map of cultivated and wild rices

## 3 讨论

### 3.1 *O. meyeriana* 和 *Rhynchoryza sabulata* 的分类学地位

本实验中,疣粒野生稻只在三个引物中扩增出总共 7 个片段,从遗传相似性来看,它同其它种和亚种的遗传相似性极小,亲缘关系远,分子进化图中单独聚成一族, RAPD 分析亦难确定它与已知染色体组的亲缘关系,因此其组型很可能是一种新的组型。

来自非洲的 *Rhynchoryza sabulata* 则表现出丰富的多态性,但从图 3 来看,它比 FF 组的 *O. brachyantha* 更接近于 A-C 复合体,也没有同 FF 组先聚类,推测它可能也属于一种新的基因组型,其细胞遗传学工作目前未见报道。我们在物候期的观察中,表明它具有很强的耐寒性,可以忍受夜间 5-8℃ 的低温,耐寒性育种可能是一个有价值的研究材料。

### 3.2 关于籼粳分化途径的探讨

丁颖<sup>[9]</sup>认为籼稻由普通野生稻进化而来,由籼稻再演变为粳稻。本研究表明,粳稻同江永

野生稻的亲缘关系比同籼稻的亲缘关系更近, 由籼转化为粳的方式可能性较小。

Second<sup>[10]</sup>认为普通野生稻中就有了籼粳分化, 粳稻由中国普通野生稻演化而成, 籼稻则由印度普通野生稻演化而成, 提示由籼型普通野生稻演化成籼稻, 粳型普通野生稻演化成粳稻, 其根据是具有粳稻特征的过氧化物酶等位基因, 是在中国的野生品系中发现的, 而不是在其它品系中发现。但因观察的材料太少, 且在其它酶中没能发现这类等位基因的地域性分布, 因而未能被大家所接受。

Oka<sup>[11]</sup>、汤圣祥<sup>[12]</sup>等认为普通野生稻有单独进化为籼或粳的潜在趋势; 粳稻可以由普通野生稻直接演化而来, 但他们忽略了半野及栽培稻不分籼稻的漫长阶段, 因为非洲栽培稻至今没有籼粳分化<sup>[7]</sup>。

我们在不同基因组型材料的 RAPD 分析中证明了在普通野生稻中就具有籼粳分化的趋势, 因而导致栽培稻的籼粳分化。

### 3.3 RAPD 技术在稻属基因组型分析工作中的作用

稻属基因组型的分析一直以细胞遗传学上关于杂交 F<sub>1</sub> 代的染色体行为为主要根据, 主要研究中期 I 同源染色体配对过程中所形成二价体和三价体的频率。然而对于远缘杂交困难而不能得到 F<sub>1</sub> 的材料, 传统的细胞遗传学工作将难以进行。RAPD 技术克服了这一点, 它可以在对个体没有任何分子生物学的了解的情况下直接对基因组进行分析, 而且不受生物发育时期和环境条件的影响。RAPD 技术应用于分类研究中, 则比在形态学和染色体水平上进行分类更加可靠, 因为它是对遗传物质本身而不是对基因表达产物进行分析。

本研究中, 多态性分析足以将不同基因组型区分开, 而且具有相同基因组型的 AA 组五个材料聚成一族, BBCC 组的两个材料也聚成一族, 遗传相似性分析也同前人细胞遗传学的研究相印证, 这说明应用 RAPD 技术可以预测基因组型之间的关系, 并在此基础上探讨未知组型, 是一种有效可行的方法。

一个不容忽视的问题是本研究由于条件所限, 所用材料又不能包括稻属所有种及亚种, 而且引物数量远不能达到覆盖整个基因组的程度, 因此更深入全面的工作有待今后进一步的研究。

### 参考文献

- 1 Morinaga T. Cytogenetical studies on *Oryza sativa* L. VI. The cytogenetics of F<sub>1</sub> hybrid of *O. minuta* Presl. and *O. latifolia* Desv. Jap J Bot, 1943, 12:347-357
- 2 Katayama T. Cytogenetical studies on genus *Oryza*. 3. Chromosome pairing in the interspecific hybrid with the ACD genomes. Jap J Genet, 1966, 41(4):317-324
- 3 Katayama T, Onizuka W. Dihaploid-BC plants produced in F<sub>1</sub> plants between synthesized amphiploid (BBCC) and diploid (BB)- or tetraploid (BBCC)- *Oryza punctata* Kotschy ex Steud. Jap J Genet, 1978, 53(1):67-70
- 4 Katayama T. Cytogenetical studies on the genus *Oryza*, VIII. Relationship between the genomes E and D. Jap J Genet, 1982, 57:613-621
- 5 卢江. 随机放大多态性 DNA(RAPD)—一种新的分子遗传标记技术. 植物学报, 1993, 35(增刊):119-127
- 6 钟杨, 陈家宽, 黄德世编. 数量分类的方法和程序. 武汉: 武汉大学出版社, 1990

- 7 纳耶. 顾铭洪译. 水稻的起源和细胞遗传. 北京: 农业出版社, 1971, 68-104
- 8 渡边好郎. 陆新兆译. 稻的起源和细胞遗传学. 水稻文摘, 1982, No.11-1983, No.7
- 9 丁颖. 中国稻作之起源. 丁颖稻作论文集. 北京: 农业出版社, 1949, 11-18
- 10 Second G. Origin of the genetic diversity of cultivated rice: study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jap J Genet*, 1982, 57:25-27
- 11 Oka H I. Origin of cultivated rice. Japan Scientific Societies Press. Tokyo/Elsevier, 1988
- 12 汤圣祥. 中国梗稻起源的探讨. *中国水稻科学*, 1993, 7(3):129-136