

江永普通野生稻遗传多样性和籼粳基因频率监测分析

李小湘^{1,2,3}, 赵文锦², 黎用朝^{1,2,3}, 潘孝武^{1,3}, 刘文强^{1,3}, 熊海波^{1,3}, 蒋善才⁴,
彭永光⁴, 魏秀彩², 刘利成^{1,3}, 刘三雄^{1,3}, 闵军^{1,3}, 段永红^{1,3}, 盛新年^{1,3}

(¹湖南省农业科学院水稻研究所, 长沙 410125; ²湖南大学研究生院隆平分院, 长沙 410125;

³农业部长江中下游水稻遗传育种重点实验室, 长沙 410125; ⁴江永县农委, 湖南江永 525400)

摘要:以栽培稻的 8 个籼-粳测验种为对照, 采用 39 对 SSR 引物检测了江永野生稻居群在 1982 年、2008 年、2017 年的遗传多样性, 采用 38 对 InDel 引物检测了江永野生稻居群在 1982 年、2008 年、2017 年的籼-粳基因频率。结果表明: 在 1982 年取样保存在异位圃的 40 份样本的遗传多样性稍高于 2008 年、2017 年原位保护区样本的遗传多样性; 2008 年取的样本数虽然比 2017 年多, 但两次取的样本之间遗传多样性几乎没差异。不同年份取的样本之间的遗传分化系数 F_{st} 都很小, 基因流 N_m 都较大, 分化不明显。通过聚类分析和主坐标分析 (PCoA), 发现野生稻居群与 4 份栽培粳稻聚为一类, 4 份栽培籼稻单独聚成一类, 显示江永野生稻与粳稻的血缘近于籼稻; 籼-粳基因频率的分析表明, 野生稻样本多属粳稻型, 少数属偏粳稻型, 原位保护区的偏粳稻类型单株数占取样单株总数的比例, 2008 年比 1982 年的增加了 10.0%, 2017 年比 2008 年的增加了 1.6%, 显示江永野生稻原位保护区生境条件有利野生稻从粳稻型向偏粳稻型变异, 随着野生稻产生环境适应性变异, 籼型基因频率在提高。

关键词: 江永普通野生稻; 遗传多样性; 籼-粳基因频率; 监测

Monitoring on the Genetic Diversity and Gene Frequencies of *Indica-Japonica* of *Oryza Rufipogon* Griff. in Jiangyong

LI Xiao-xiang^{1,2,3}, ZHAO Wen-jin², LI Yong-chao^{1,2,3}, PAN Xiao-wu^{1,3}, LIU Wen-qiang^{1,3},
XIONG Hai-bo^{1,3}, JIANG Shan-cai⁴, PENG Yong-guang⁴, WEI Xiu-cai², LIU Li-cheng^{1,3},
LIU San-xiong^{1,3}, MIN Jun^{1,3}, DUAN Yong-hong^{1,3}, SHENG Xin-nian^{1,3}

(¹Hunan Rice Research Institute, Hunan Academy of Agriculture Science, Changsha 410125; ²Long Ping Branch, Graduate School of Hunan University, Changsha 410125; ³Key Laboratory of Indica Rice Genetics and Breeding in the Middle and

Lower Reaches of Yangtze River Valley, Ministry of Agriculture, Changsha 410125;

⁴Jiangyong County Agricultural Committee, Jiangyong Hunan 525400)

Abstract: This study analyzed the genetic diversity and *indica-japonica* gene frequencies of Jiangyong wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) populations, which were sampled in 1982, 2008 and 2017, using 39 SSR markers and 38 Indel markers respectively. The results showed that the genetic diversity of 40 accessions sampled and conserved in *ex-situ* in 1982 was higher than that *in-situ* conservation sampled in 2008 and 2017. No significant difference was observed in genetic diversity between the samples in 2008 and 2017. In addition, samples collected in different years displayed unobvious differentiation, with low genetic differentiation coefficient (F_{st}) and high gene flow (N_m). According to cluster analysis and principal coordinate analysis, we found that the genetic relationship between wild rice and *japonica* rice is closer than that between wild rice and *indica* rice. Most of the wild rice plants were grouped to *japonica* class, and a few belong to *japonica*clinous class. In 2008, the percentage

收稿日期: 2018-09-24 修回日期: 2018-12-10 网络出版日期: 2018-12-28

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181228.0953.001.html>

第一作者研究方向为水稻种质资源评价, E-mail: xiaoxiang66196@126.com; 赵文锦为共同第一作者

通信作者: 黎用朝, 研究方向为水稻遗传育种, E-mail: yongchaoli66363@126.com

基金项目: 国家重点研发计划课题 (2016YFD0100101-12); 国家水稻产业技术体系专项 (CARS-01-14)

Foundation project: China National Key Research and Development Project (2016YFD0100101-12), China Agriculture Research System (CARS-01-14)

of japonicaclinous individuals increased by 10.0% compared with 1982, and in 2017, the percentage increased by 1.6% compared with 2008. These results implied that the *indica* gene frequency of wild rice increased with the environmental changes of *in-situ* conservation.

Key words: *Oryza rufipogon* Griff. in Jiangyong; genetic diversity; gene frequency of *indica-japonica*; monitoring

普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 遗传多样性高于亚洲栽培稻^[1-3],它是极其重要的种质资源。随着栽培稻品种遗传背景狭窄、抗病耐逆性基因资源缺少的问题凸显,发掘利用普通野生稻中具有栽培稻种质中目前尚不具有的有益基因倍受重视。

由于开垦农田、挖深荒塘改鱼塘、过度放牧、修道路和建房屋,导致中国普通野生稻生存受到严重威胁,大量自然居群灭绝^[4-5]。有效保护野生稻是持久发掘和利用其有益基因的前提。在过去近20年中,我国普通野生稻保护技术在逐步完善,保护效果明显^[6]。建立保护区初期,有的保护区因急剧禁止一切耕种和放牧等农事活动,缓冲区抛荒而水源截断,杂草茂盛而普通野生稻繁衍生长受抑制。针对这些问题,随后的研究在比较小居群间、多年度间遗传多样性,调查单株数变化的前提下,提出了原位保护的优化措施,包括对单株数有减少趋势的居群进行人工除草,限量限时放牧以干预伴生杂草繁殖,就地引水灌溉等措施,但这些措施实施是否达到保护遗传多样性的目的? 监测原位保护居群的籼-粳频率及遗传多样性,可以为原位保护效果及保护措施的评价、优化完善提供依据。

普通野生稻属 AA 基因组,是亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 的最近缘祖先,中国普通野生稻存在籼-粳分化,利用 SSR 引物检测海南、广东高州的普通野生稻,都表明偏粳型多于偏籼型^[7-8]。随着高通量基因组测序技术应用于栽培稻的起源演化研究,结果支持粳稻从我国的普通野生稻驯化而来^[9-10]。但蔡星星等^[11]认为含 AA 基因组野生稻与籼稻品种存在较近的亲缘关系,所用材料包括 7 个种 16 份 AA 基因

组野生稻,其中普通野生稻 5 份。

江永普通野生稻遗传多样性丰富,与地理临近、气候相似的广西武宣野生稻遗传多样性水平接近,然而遗传结构上却存在明显遗传分化^[12]。2005 年农业部设立了江永野生稻原位保护区,但至今其保护区籼-粳分化频率及遗传多样性的变化还未见报道。

本研究以栽培稻的 8 个籼-粳测验种为对照,采用 SSR 标记技术检测江永野生稻居群在 1982 年、2008 年、2017 年的遗传多样性;采用 InDel 标记检测江永野生稻居群在 1982 年、2008 年的籼-粳频率,以此监测江永野生稻居群的遗传多样性和籼-粳频率变化,期望为其原位保护措施的评价、优化、完善提供有价值的依据。

1 材料与方法

1.1 样本采集

1982 年从江永野生稻原位点取样后保存在广东野生稻保存圃,根据表型从 145 份样本中抽取 40 份代表样本。2008 年 40 份、2017 年 21 份样本分别是在 2008 年、2017 年从江永野生稻原位保护区取成熟种子(表 1)。对少于 10 个单株的亚居群,每个单株取种子 10~15 粒,多于 10 个单株的(亚)居群,则每隔 2~10 m 随机取 1 个单株上的种子 10~15 粒,取样点之间距离根据采集地面积决定。2008 年采集种子烘干后保存在 2 ± 1 °C 的湖南省水稻研究所种质库。8 个栽培稻对照品种包括 4 个粳稻(早沙粳、秋光、巴利拉、日本晴)、4 个籼稻(9311、南特号、IR36、南京 11),其种子由中国水稻研究所国家水稻种质资源中期库提供。

表 1 样品来源

Table 1 Sources of samples

编号 No.	样品数 Number of samples	样品部位 Parts of samples	样品来源 Sources of samples
1~4	4	种子	1- 早沙粳, 2- 秋光, 3- 巴利拉, 4- 日本晴
5~8	4	种子	5-9311, 6- 南特号, 7-IR36, 8- 南京 11
82-9~82-48	40	叶	1982 年取样后保存在广东野生稻保存圃
08-9~08-48	40	种子	2008 年江永野生稻原位保护区
17-9~17-29	21	种子	2017 年江永野生稻原位保护区

1.2 方法

1.2.1 DNA 提取 1982 年 40 份样本是从异位保存圃植株上取叶片提 DNA; 2008 年 40 份、2017 年 21 份样本是从原位保护区收获种子, 发芽成苗取叶提 DNA, 原位保护区的同单株上的种子为一个样品, 在幼苗 2 叶期每样品取其 3 株苗叶混合提 DNA。

DNA 的提取采用 SDS 方法^[13]并略加改进。利用 Implen NanoPhotometer 微量核酸蛋白分析仪检测 DNA 的浓度和质量, 将 DNA 浓度稀释为 150 ng/ μ L, -20 °C 保存备用。

1.2.2 多态性标记引物筛选及籼 - 粳型基因频率分析引物的选择 从水稻基因组 SSR 图谱中挑选出在水稻 12 条染色体上均匀分布的 SSR 引物, 用 8 个栽培稻对照和 4 个普通野生稻样本的 DNA, 从中筛选条带清晰且多态性明显的 39 对引物用于遗传多样性分析。籼 - 粳型基因频率分析用 38 对籼 - 粳鉴别 InDel 引物, 序列由卢宝荣教授提供^[8]。所有引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.3 PCR 扩增与电泳检测 PCR 体系为 10 μ L, 含模板 DNA 1 μ L, 5 μ mol/L 正、反向引物各 2 μ L, 2 \times Tap Plus Master Mix II 为 5 μ L。扩增程序为 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 45 s, 55 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 45 s, 30 个循环; 72 °C 延伸 8 min, 4 °C 保存。采用 6% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳分离, 银染观察并拍照。

1.2.4 统计方法 根据 SSR 引物扩增产物电泳结果, 在相同迁移位置上, 扩增谱带有记为 1, 无带记

为 0, 建立 0-1 矩阵; 将条带数据转换为基因型数据。采用 Popgene 32 软件计算各年单独以及总体的观测等位基因数 (N_a)、有效等位基因数 (N_e)、Shannon 信息指数 (I)、期望杂合度 (H_e)、观测杂合度 (H_o)、Nei's 基因多样性指数 (N_e)、多态信息含量 (PIC)、遗传分化系数 (F_{st}) 以及遗传相似系数。采用 NTSYSpc 2.10e 软件, 计算 DICE 遗传相似系数, 非加权平均法 (UPGMA, unweighted pair-group method with arithmetic means) 进行聚类分析和主坐标分析 (PCoA, Principal coordinate analysis)。

根据 InDel 引物扩增产物电泳结果, 以日本晴和 9311 中扩增出的条带位置为标准, 按照同一位点上条带与日本晴带型一致的记为 “jj”, 与 9311 带型一致的记为 “ii”, 杂合带型记为 “ij”, 其他条带依次记为 C、D、E 等。根据所有位点 (N) 上各样品的基因型数据 (jj、ii、ij 和其他) 对栽培稻品种和野生稻进行籼 - 粳类型的确定, 计算所有标记位点的籼型基因频率 (F_i) 或粳型基因频率 (F_j)^[14]。

$$F_i = \frac{2 \sum_i^N X_{ii} + \sum_i^N X_{ij}}{2N}$$

$$F_j = \frac{2 \sum_i^N X_{ji} + \sum_i^N X_{ij}}{2N}$$

式中 X_{ii} 为纯合籼稻基因型 (ii), X_{jj} 为纯合粳稻基因型 (jj), X_{ij} 为籼 - 粳稻杂合基因型 (ij), N 为籼 - 粳特异 InDel 引物对数目。根据被检测样品在多个 InDel 位点上的籼型或粳型基因频率, 根据表 2 的籼 - 粳属性分类标准对研究材料进行籼 - 粳判定^[14]。

表 2 按照籼型或粳型等位基因频率鉴定籼 - 粳类型的 InDel 分类标准

Table 2 InDel classification standards based on *indica* gene frequencies or *japonica* gene frequencies

籼 - 粳类型 <i>Indica-japonica</i> type	籼型等位基因频率 Gene frequencies of <i>indica</i> type	粳型等位基因频率 Gene frequencies of <i>japonica</i> type
典型粳稻 Typical <i>japonica</i>	≥ 0.10	≤ 0.90
粳稻 <i>Japonica</i>	0.11~0.25	0.75~0.89
偏粳 Japonicaclinous	0.26~0.39	0.61~0.74
中间类型 Intermediate type	0.40~0.60	0.40~0.60
偏籼 Indicaclinous	0.61~0.74	0.26~0.39
籼稻 <i>Indica</i>	0.75~0.89	0.11~0.25
典型籼稻 Typical <i>indica</i>	≤ 0.90	≥ 0.10

2 结果与分析

2.1 供试材料 SSR 标记位点的遗传多样性分析

利用筛选出来的 39 对 SSR 引物对 3 次共取的 101 份江永野生稻材料和 8 份栽培稻对照进行遗传

多样性分析, 不同位点的分析结果列于表 3。39 对引物共检测到 167 个等位变异, 多态位点率 100%; 从野生稻检测到 150 个等位变异, 多态位点率 92.31%; 观测等位基因数 N_a 的范围为 2 (RM311、RM130) ~ 8 (RM18), 平均值为 4.282; 有效等位基

因数 N_e 范围为 1.210(RM130)~5.690(RM18), 平均值为 2.460; 观测杂合度 H_o 范围为 0(RM85、RM130 等 8 个)~0.368(RM408), 平均值为 0.125; 期望杂合度 H_e 范围为 0.174(RM130)~0.828(RM18), 平均值为 0.530; 引物的多态信息含量 PIC 范围为 0.174(RM130)~0.824(RM18), 平均为 0.528; Shannon 多样性指数 I 变化范围 0.316(RM130)~1.849(RM18), 平均为 0.997; 2008 年样品比 1982 年样品减少的有效等位基因数大于 1 的

引物有 RM18、RM249、RM250、RM278; 增加的有效等位基因数大于 0.8 的引物有 RM258、RM311、RM455、RM3826。2017 年样品比 2008 年样品减少有效等位基因数大于 1 的引物有 RM25、RM258、RM455、RM3826; 增加的有效等位基因数大于 0.8 的引物有 RM18、RM249、RM250、RM590。上述遗传多样性评价指标变化幅度均较大, 表明选择的 SSR 引物标记在供试的材料中能够较好地反映出其丰富的遗传多样性信息。

表 3 SSR 标记扩增产物的遗传多样性

Table 3 Genetic diversity by using SSR markers

位点 Locus	染色体 Chr.	观测等位 基因数 N_a	有效等位 基因数 N_e	Shannon 信息指数 I	观测 杂合度 H_o	期望 杂合度 H_e	Nei's 基因 多样性指数 Nei	多态信息 含量 PIC
RM4	12	3	1.524	0.638	0.144	0.345	0.344	0.344
RM13	5	3	1.323	0.491	0.008	0.245	0.244	0.244
RM16	3	4	2.325	0.979	0.256	0.572	0.570	0.570
RM18	7	8	5.690	1.849	0.104	0.828	0.824	0.824
RM23	1	3	1.380	0.494	0.097	0.276	0.275	0.275
RM25	8	4	2.489	1.033	0.080	0.601	0.598	0.598
RM71	2	4	1.577	0.730	0.112	0.367	0.366	0.366
RM85	3	3	1.215	0.370	0	0.178	0.177	0.177
RM130	3	2	1.210	0.316	0	0.174	0.174	0.174
RM208	2	5	2.118	0.987	0	0.530	0.528	0.528
RM209	11	4	1.502	0.696	0.144	0.336	0.334	0.334
RM217	6	5	2.272	1.044	0.232	0.562	0.560	0.560
RM219	9	5	3.969	1.443	0.155	0.751	0.748	0.748
RM223	8	5	2.624	1.238	0.072	0.621	0.619	0.619
RM224	11	6	1.353	0.606	0.016	0.262	0.261	0.261
RM225	6	4	2.412	1.090	0.216	0.588	0.585	0.585
RM229	11	4	1.932	0.909	0	0.484	0.482	0.482
RM234	7	6	4.538	1.592	0.104	0.783	0.780	0.780
RM240	2	5	2.523	1.131	0.040	0.606	0.604	0.604
RM242	9	3	1.215	0.370	0	0.178	0.177	0.177
RM247	12	5	2.488	1.162	0	0.600	0.598	0.598
RM248	7	4	2.317	1.044	0.210	0.571	0.568	0.569
RM249	5	7	4.365	1.691	0.120	0.774	0.771	0.771
RM250	2	5	2.289	1.119	0.137	0.565	0.563	0.563
RM253	6	5	3.133	1.288	0.272	0.684	0.681	0.681
RM258	10	4	3.301	1.249	0.218	0.700	0.697	0.697
RM264	8	6	2.698	1.179	0.360	0.632	0.629	0.629
RM267	5	4	3.431	1.303	0.168	0.711	0.709	0.709
RM278	9	4	1.920	0.891	0.200	0.481	0.479	0.479
RM297	1	7	3.252	1.433	0.016	0.695	0.693	0.693
RM311	10	2	1.734	0.614	0.048	0.425	0.423	0.423
RM337	8	3	1.721	0.693	0	0.421	0.419	0.419
RM348	4	3	1.649	0.717	0.016	0.395	0.394	0.394

表 3(续)

位点 Locus	染色体 Chr.	观测等位 基因数 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	Shannon 信息指数 <i>I</i>	观测 杂合度 <i>Ho</i>	期望 杂合度 <i>He</i>	Nei's 基因 多样性指数 Nei	多态信息 含量 <i>PIC</i>
RM3826	7	4	3.525	1.321	0.296	0.719	0.716	0.716
RM408	8	3	2.328	0.917	0.368	0.573	0.570	0.570
RM455	7	3	2.467	0.993	0	0.597	0.595	0.595
RM471	4	5	3.052	1.207	0.208	0.675	0.672	0.672
RM5414	4	4	3.213	1.257	0.336	0.692	0.689	0.689
RM590	10	3	1.850	0.809	0.128	0.461	0.459	0.459
平均值 Mean		4.282	2.460	0.997	0.125	0.530	0.528	0.528
标准偏差 St.Dev		1.356	1.018	0.368	0.112	0.181	0.180	

Na: Observed number of alleles, *Ne*: Effective number of alleles, *I*: Shannon's Information index, *Ho*: Observed heterozygosity, *He*: Expected heterozygosity, Nei: Nei's expected heterozygosity, *PIC*: Polymorphism information content. The same as below

2.2 江永野生稻遗传多样性的年份间比较

比较 1982 年、2008 年、2017 年 3 次取样样本的遗传多样性的差异(表 4), 数据表明, 在 1982 年取样保存在异位圃的 40 份样本的遗传多样性稍高于 2008 年、2017 年在原位保存圃取样样本的遗传多样性, 2008 年与 2017 年样本数虽然不同, 但之间的遗传多样性无显著性差异 ($P > 0.05$)。1982 年样

本与 2008 年、2017 年样本的遗传相似系数分别为 0.93、0.95, 2008 年与 2017 年样本间的遗传相似系数为 0.93, 差异很小; 3 次取样的遗传分化系数 *Fst* 都很小, 基因流 *Nm* 都较大, 分化不明显; 1982 年与 2008 年、2017 年, 2008 年与 2017 年 *Fst* 为 0.060、0.058、0.078, *Nm* 为 3.895、4.076、2.950; 说明江永野生稻遗传多样性的异位保存和原位保护的效果都好。

表 4 江永野生稻群体 3 年的遗传多样性比较

Table 4 The genetic diversity index of Jiangyong wild rice populations in 1982, 2008 and 2017

年份 Year	参数 Parameter	观测等位 基因数 <i>Na</i>	有效等位 基因数 <i>Ne</i>	Shannon 信息 指数 <i>I</i>	观测杂合度 <i>Ho</i>	期望杂合度 <i>He</i>	Nei's 基因 多样性指数 Nei	多态信息含量 <i>PIC</i>
1982	平均	3.692	2.145	0.807	0.154	0.442	0.436	0.436
	范围	1.000~9.000	1.000~5.178	0~1.818	0~0.450	0~0.817	0~0.807	0~0.807
2008	平均	2.590	1.927	0.658	0.150	0.398	0.393	0.393
	范围	1.000~5.000	1.000~3.600	0~1.363	0~0.500	0~0.732	0~0.722	0~0.722
2017	平均	2.821	1.914	0.685	0.150	0.410	0.400	0.400
	范围	1.000~6.000	1.000~4.345	0~1.579	0~0.524	0~0.789	0~0.770	0~0.770

2.3 江永野生稻籼 - 粳分化

根据聚类分析图(图 1), 供试 101 份江永野生稻样本和 8 个籼 - 粳测验种在遗传相似系数 0.50 时可分 4 类。第 I 类是 4 份栽培粳稻和野生稻 82-47; 第 II 类包含最多样本, 包括 36 份 1982 年样本、40 份 2008 年样本、20 份 2017 年样本, 共计 96 份野生稻, 其中 82-20、82-31、82-34、82-40 相聚; 第 III 类仅 4 份样本, 82-39、82-41、82-42、17-28; 第 IV 类是栽培籼稻 4 份。第 I 类先与包含 96 份野生稻样本的第 II 类相聚, 再与包含 4 份野生稻样本的第 III

类相聚, 最后才与 4 份栽培籼稻相聚。第 III 类 4 个野生稻样本与第 I 类的 4 个粳稻遗传相似系数大于第 IV 类的 4 个籼稻; 第 III 类的 4 个野生稻与第 IV 类的 4 份籼稻间, 82-39 与籼稻南京 11 遗传相似系数最大(0.29), 小于 82-39 与 4 个粳稻的遗传相似系数(表 5); 101 份野生稻与籼稻遗传相似系数最大 0.32(08-20 与南特号), 小于 08-20 与 4 个粳稻的遗传相似系数。根据主坐标分析(PCoA)可知(图 2), 其第一贡献率、第二贡献率和第三贡献率分别为 8.55%、6.96% 和 5.88%。1982 年、2008 年、2017 年

3年的野生稻居群以及4份栽培粳稻集中分布在一起,3年3个居群的部分个体混合,4份栽培籼稻单

独聚成一类,结果与聚类分析基本吻合。以上结果说明江永野生稻与粳稻的血缘近于籼稻。

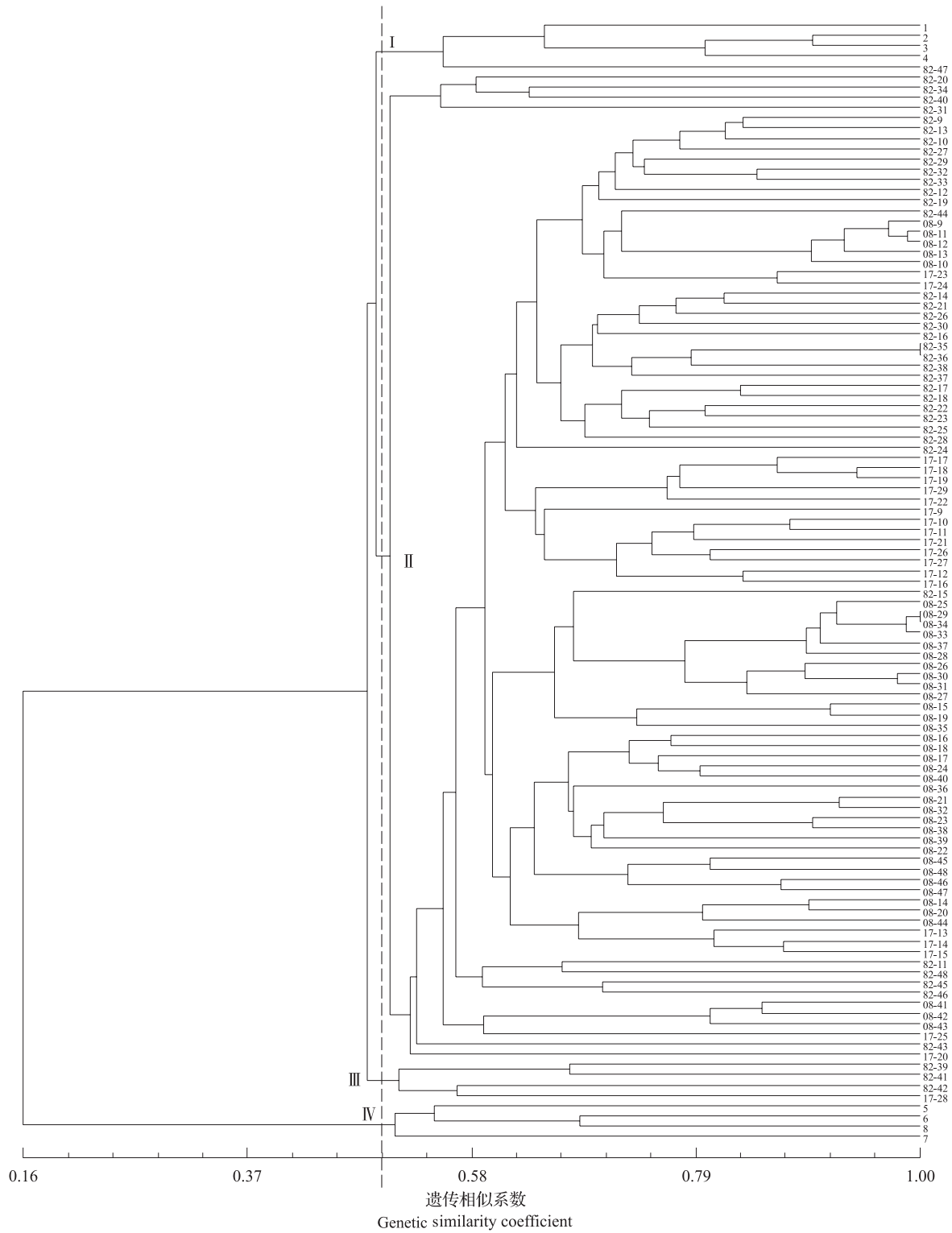


图1 基于 SSR 标记结果的 101 份江永普通野生稻与 8 份栽培稻聚类分析
 Fig.1 Dendrogram of 101 accessions of *Oryza rufipogon* Griff. and 8 varieties of cultivated rice (*Oryza sativa* L.) using SSR markers

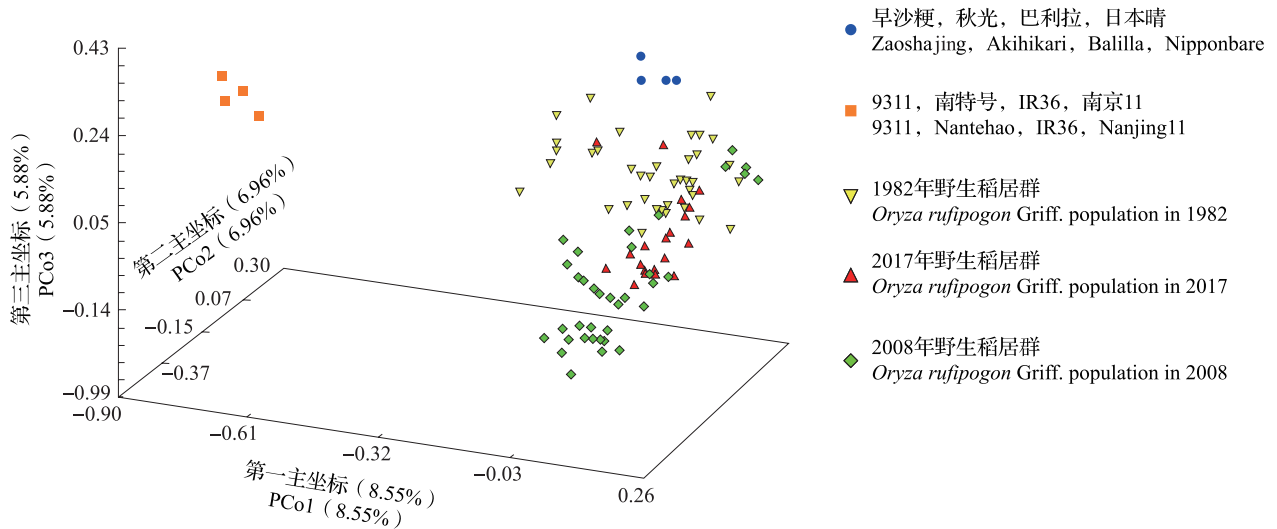


图 2 101 份江永普通野生稻与 8 份栽培稻的主坐标分析 (PCoA)
 Fig.2 Principal coordinate analysis of 101 accessions of *Oryza rufipogon* Griff. in Jiangyong and 8 varieties of cultivated rice (*Oryza sativa* L.)

表 5 第 3 类野生稻与栽培稻的遗传相似系数

Table 5 Similarity coefficient between the third type of *Oryza rufipogon* Griff. and cultivated rice

野生稻编号 <i>Oryza rufipogon</i> Griff. No.	栽培稻名称 Cultivated rice							
	早沙粳 Zaoshajing	秋光 Akihikari	巴利拉 Balilla	日本晴 Nipponbare	9311	南特号 Nantehao	IR36	南京 11 Nanjing11
82-47	0.49	0.55	0.57	0.62	0.24	0.20	0.22	0.24
82-20	0.36	0.45	0.40	0.38	0.29	0.19	0.21	0.21
82-34	0.51	0.58	0.53	0.53	0.15	0.15	0.13	0.15
82-40	0.48	0.48	0.50	0.50	0.21	0.23	0.16	0.21
82-31	0.47	0.44	0.41	0.39	0.21	0.21	0.19	0.21
82-39	0.31	0.38	0.38	0.40	0.17	0.24	0.14	0.29
82-41	0.41	0.45	0.48	0.41	0.25	0.16	0.16	0.28
82-42	0.34	0.48	0.43	0.45	0.21	0.20	0.14	0.23
17-28	0.51	0.50	0.52	0.50	0.19	0.17	0.17	0.17

2.4 江永野生稻籼 - 粳型基因频率变化

从各样本的籼 - 粳基因频率看(表 6), 江永野生稻多属粳稻型, 少属偏粳稻型。1982 年保存异位圃的 40 份样本, 粳型基因频率平均为 0.82, 变幅为 0.65~0.86, 粳型基因频率最高值比典型粳稻基因频率最低值 0.9 仅少 0.04; 籼型基因频率平均为 0.16, 变幅为 0.15~0.33。40 份供试样本中 37 份属粳稻类型, 基因频率变幅 0.75~0.86; 3 份属偏粳稻类型, 基因频率变幅 0.65~0.72; 19 份具有非栽培稻带型, 特异引物为 R4M13、R9M42。

2008 年原位保护的 40 份样本, 粳型基因频率平均为 0.77, 变幅为 0.72~0.82, 粳型基因频率最高值比典型粳稻基因频率最低值 0.9 仅少 0.08; 籼型基因频率平均为 0.21, 变幅为 0.17~0.25。40 份供试样本中 33 份属粳稻类型, 基因频率变幅为 0.75~0.82; 7 份属偏粳稻类型, 基因频率变幅为 0.72~0.74; 38 份都具有非栽培稻带型, 特异引物为 R4M13、R9M42。

2017 年原位保护的 21 份样本, 粳型基因频率平均为 0.77, 变幅为 0.71~0.80, 粳型基因频率最

高值比典型粳稻基因频率最低值 0.9 仅少 0.10; 籼型基因频率平均为 0.21, 变幅为 0.20~0.26。21 份供试样本中 17 份属粳稻类型, 基因频率变幅 0.75~0.80; 4 份偏粳稻类型, 基因频率变幅为 0.71~0.74; 12 份都具有非栽培稻带型, 特异引物为 R4M13、R9M42。比较 3 次取样检测结果发现 2008 年的偏粳稻类型单株占分析样品比例 (17.5%) 比 1982 年的 (7.5%) 增加了 10.0%, 说明从 1982 年到 2008 年间, 江永野生稻有部分单株从粳型转向偏粳

型, 可能由于建立保护点之前周围籼型栽培稻基因的渗入或 1982 年以来因生态适应产生变异。2017 年的偏粳稻类型单株占分析样品比例 (19.1%) 比 2008 年的 (17.5%) 也增加了 1.6%, 说明 2004 年设立隔离带和缓冲区, 开始原位保护以后因生态适应产生变异而籼型基因频率增加。2008 年至 1982 年, 比 2017 年至 2008 年的偏粳稻类型单株占分析样品比例增加值高 8.4%, 说明原位保护效果好。

表 6 江永野生稻籼-粳基因频率比较

Table 6 *Indica* gene frequencies or *japonica* gene frequencies of *Oryza rufipogon* Griff. accessions from Jiangyong

年份 Year	份数 Number	粳型基因频率 Gene frequencies of <i>japonica</i> type		籼型基因频率 Gene frequencies of <i>indica</i> type		粳型样本份数 Number of <i>japonica</i> type	偏粳型样本份数 Number of <i>japonica</i> clinous type	非 8 个栽培稻条带 样本份数 Number of non- 8 cultivated rice bands
		最低值 Min.	最高值 Max.	最低值 Min.	最高值 Max.			
		1982	40	0.65	0.86			
2008	40	0.72	0.82	0.17	0.25	33	7	38
2017	21	0.71	0.80	0.20	0.26	17	4	12

3 讨论

在湖南省道县寿雁镇玉蟾岩遗址发现了水稻化石, 检测结果表明水稻驯化时间大约在 138000 年至 21000 年前^[15]; 1982 年在邻近道县的江永县发现有普通野生稻; 至今越来越多的研究证明了栽培粳稻起源于我国长江流域, 我们的研究表明, 江永野生稻多属粳型, 少属偏粳型, 由此推测湖南的道县、江永一带与栽培粳稻的起源中心不远, 或就在起源中心。因此对原生境的江永野生稻进行重点保护和监测意义重大。

本研究采用同一套引物, 同样的 8 个栽培稻对照, 比较分析 3 次取样的遗传多样性, 监测遗传多样性变化的准确性和可比性强; 与李小湘等^[12, 16] 2006 年、2007 年研究报道的结果有差异, 2008 年取样分析的有效等位基因数 1.927、Nei's 基因多样性指数 0.393, 比 2006 年结果 (1.508、0.304) 高, 但比 2007 年报道结果 (2.504、0.549) 低。2006 年遗传多样性指标都低于其他检测年的主要原因是扩增产物的电泳分离方法不同, 2006 年用琼脂糖, 其他年用聚丙烯酰胺。2007 年报道结果最高的可能原因有: (1) 取样的亚居群数不同, 2006 年、2007 年材料是 2005 年从江永的 4 个亚居群中取样, 包括了保护的 3 个亚居群和未保护的 1 个亚居群; 本研究 2008 年、2017 年样本是从保护的 3 个亚居群中取样。

(2) 取材不同, 2006 年、2007 年从原生境取叶片, 其他年是取种子而纯合度高; (3) 所用引物不同。

3 次取样间 (年度间) 的单株没有相似系数 0.95 以上样本的原因可能有: (1) 没有从相同单株取叶取种子; (2) 相同单株上不同种子基因型不同 (杂合植株); (3) 1982 年原位取样后放广东异位保存, 它们在广东的气候环境下也可能进化, 同时江永原位生存株从 1982 年至 2008 年, 2008 年至 2017 年都在随着高温和干旱胁迫、杂草竞争等环境加剧而产生适应性进化。

3 次取样的单株共计 101 份, 遗传相似系数 0.95 以上样本主要是 2008 年样本, 有 08-9、08-11、08-12 两两之间, 08-30 与 08-31, 08-29、08-33、08-34 之间, 82-35 与 82-36, 其中 08-29 与 08-34, 82-35 与 82-36 的遗传相似系数为 1, 没有 2017 年的样本, 说明 2008 年原位单株数虽多于 2017 年, 但“克隆”株多; 即使 2017 年原位江永野生稻保存单株不多, 但同一单株的地下茎扩繁的克隆株很少。

2008 年与 2017 年比 1982 年与 2008 年、1982 年与 2017 年间的 *Fst* 稍高, *Nm* 稍少, 可能原因是在 1982 年取的单株包括了 2008 年、2017 年取样株, 但 2008 年、2017 年在同居群取有不同单株或同单株的不同杂合种子, 2017 年的原位单株数及取样单株数都少于 2008 年; 2017 年的观察杂合度比 2008

年稍高,证明期间杂合子保留,纯合子丢失了部分而导致 2008 年与 2017 年间的 *Fst* 稍高, *Nm* 稍少;此外在 2017 年样本中发现有 1982 年、2008 年都没有的稀有等位基因 (RM224、RM234),这很可能是适应高温、干旱等产生的生态适应性变异。

根据评价遗传多样的重要指标,江永原位保护野生稻遗传多样性在 2008 年、2017 年取样分析的遗传多样性指标几乎没有差异,说明即使原位保护点的单株数有减少,但从 2005 年开始保护至今的遗传多样性没有降低。1982 年原地取样后异位保存至今的样本遗传多样性指标稍高于现江永原位保护样本,说明建立原位保护点之前的 20 余年内 (1983-2004 年) 因面积和单株数大大减少而遗传多样性有丧失,但异位保护已将其保存至今,证明异位保存是必要而有意义。为了江永野生稻的进化和遗传多样性的有效保护及可持续利用,需加强落实原位保护措施实施。建议:(1) 对周围从没有种植过栽培稻的小居群,人工适时干预杂草生长,让野生稻植株扩繁;(2) 在单株数极少、与其他小居群有山隔离且水不相连的山塘移栽 1982 年采集后异位保存的样本,并保障水源和适时人工管理;(3) 维护已设立的隔离带和缓冲区,避免由于栽培稻-野生稻基因渐渗而导致的遗传湮灭效应,保护野生稻群体的遗传完整性。

参考文献

- [1] 张晓丽,郭辉,王海岗,吕建珍,袁筱萍,彭锁堂,魏兴华. 中国普通野生稻与栽培稻种 SSR 多样性的比较分析. 作物学报, 2008, 34(4): 591-597
Zhang X L, Guo H, Wang H G, Lü J Z, Yuan X P, Peng S T, Wei X H. Comparative assessment of SSR allelic diversity in wild and cultivated rice in China. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(4): 591-597
- [2] 王黎明,李战胜,高旭华,沈雪峰,方越,陈勇. 杂草稻、栽培稻及野生稻的遗传多样性比较. 华中农业大学学报, 2012, 31(3): 275-280
Wang L M, Li Z S, Gao X H, Shen X F, Fang Y, Chen Y. Genetic diversities among weedy rice, cultivated rice and wild rice. Journal of Huazhong Agricultural University, 2012, 31(3): 275-280
- [3] 王荣升,魏鑫,曹立荣,乔卫华,张万霞,杨庆文. 基于叶绿体基因多样性的中国水稻起源进化研究. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 686-693
Wang R S, Wei X, Cao L R, Qiao W H, Zhang W X, Yang Q W. Origin and evolution of cultivated rice (*O. sativa* L.) in China based on gene diversity of chloroplast genome. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(5): 686-693
- [4] 杨庆文,张万霞,贺丹霞,陈大洲,戴陆元,陈成斌,黄坤德. 中国野生稻原生境保护方法研究. 植物遗传资源学报, 2003, 4(1): 63-67
Yang Q W, Zhang W X, He D X, Chen D Z, Dai L Y, Chen C B, Huang K D. Studies on *in-situ* conservation methods of wild rice in China. Journal of Plant Genetic Resources, 2003, 4(1): 63-67
- [5] 王琳,戴陆园,吴丽华,杨庆文,徐福荣,余腾琼,汤翠凤. 云南三种野生稻原生境植物种群的调查及比较分析. 中国水稻科学, 2006, 20(1): 47-52
Wang L, Dai L Y, Wu L H, Yang Q W, Xu F R, Yu T Q, Tang C F. Comparative analysis and investigation on plants growing in *in-situ* environments of three wild rice species in Yunnan Province, China. Chinese Journal of Rice Science, 2006, 20(1): 47-52
- [6] 王家祥,陈友桃,黄娟,乔卫华,张万霞,杨庆文. 中国普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 原生境保护与未保护居群的遗传多样性比较. 作物学报, 2009, 35(8): 1474-1482
Wang J X, Chen Y T, Huang J, Qiao W H, Zhang W X, Yang Q W. Comparison of genetic diversity between *in-situ* conserved and non-conserved *Oryza rufipogon* populations in China. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(8): 1474-1482
- [7] 陈雨,杨庆文,潘大建,曲延英,范芝兰,陈建酉,李晨. 用 SSR 标记初步分析高州普通野生稻的籼粳分化. 分子植物育种, 2008, 6(2): 263-267
Chen Y, Yang Q W, Pan D J, Qu Y Y, Fan Z L, Chen J Y, Li C. Preliminary analysis of the *indica-japonica* differentiation among natural wild rice populations in Gaozhou by SSR markers. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(2): 263-267
- [8] 崔莹莹,郭安平,王晓玲,郭运玲,孔华,贺立卡. 海南普通野生稻籼粳分化的 SSR 分析. 江苏农业科学, 2009(4): 56-58
Cui Y Y, Guo A P, Wang X L, Guo Y L, Kong H, He L K. SSR analysis of *indica-japonica* differentiation of *Oryza rufipogon* Griff. in Hainan Province, China. Jiangsu Agricultural Sciences, 2009(4): 56-58
- [9] Xu X, Liu X, Ge S, Jensen J D, Hu F Y, Li X, Dong Y, Gutenkunst R N, Fang L, Huang L, Li J X, He W M, Zhang G J, Zheng X M, Zhang F M, Li Y R, Yu C, Kristiansen K, Zhang X Q, Wang J, Wright M, McCouch S, Nielsen R, Wang J, Wang W. Resequencing 50 accessions of cultivated and wild rice yields markers for identifying agronomically important genes. Nature Biotechnology, 2012, 30(1): 105-111
- [10] Huang X H, Kurata N, Wei X H, Wang Z X, Wang A H, Zhao Q, Zhao Y, Liu K Y, Lu H Y, Li W J, Guo Y L, Lu Y Q, Zhou C C, Fan D L, Weng Q J, Zhu C R, Huang T, Zhang L, Wang Y C, Feng L, Furuumi H, Kubo T, Miyabayashi T, Yuan X P, Xu Q, Dong G J, Zhan Q L, Li C Y, Fujiiyama A, Toyoda A, Lu T T, Feng Q, Qian Q, Li J Y, Han B. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice. Nature, 2012, 490(7421): 497-501
- [11] 蔡星星,刘晶,仇吟秋,赵伟,宋志平,卢宝荣. 籼稻 93-11 和粳稻日本晴 DNA 插入缺失差异片段揭示的水稻籼-粳分化. 复旦学报: 自然科学版, 2006, 45(3): 309-315
Cai X X, Liu J, Qiu Y Q, Zhao W, Song Z P, Lu B R. Differentiation of *indica-japonica* rice revealed by insertion/deletion fragments obtained from comparative genomic study of DNA sequences between 93-11 (*indica*) and Nipponbare (*japonica*). Journal of Fudan University: Natural Science Edition, 2006, 45(3): 309-315

- [12] 李小湘,王淑红,段永红,余丽琴,黄海明,李卫红,孙桂华,刘勇.普通野生稻保护和未保护居群遗传多样性的比较.植物遗传资源学报,2007,8(4):379-386
Li X X, Wang S H, Duan Y H, Yu L Q, Huang H M, Li W H, Sun G H, Liu Y. Comparative studies on the genetic diversity between conserved and non-conserved *Oryza rufipogon* populations. Journal of Plant Genetic Resources, 2007, 8(4): 379-386
- [13] 卢扬江,郑康乐.提取水稻 DNA 的一种简易方法.中国水稻科学,1992,6(1):47-48
Lu Y J, Zheng K L. A simple method for isolation of rice DNA. Chinese Journal of Rice Science, 1992, 6(1): 47-48
- [14] 卢宝荣,蔡星星,金鑫援.籼稻和粳稻的高效分子鉴定方法及其在水稻育种和进化研究中的意义.自然科学进展,2009,19(6):628-638
Lu B R, Cai X X, Jin X Y. An efficient molecular method for the identification of *indica* and *japonica* rice and its significance in rice breeding and evolution. Progress in Natural Science, 2009, 19(6): 628-638
- [15] Boaretto E, Wu X H, Yuan J R, Bar-Yosef O, Chu V, Pan Y, Liu K X, Cohen D, Jiao T L, Li S C, Gu H B, Goldberg P, Weiner S. Radiocarbon dating of charcoal and bone collagen associated with early pottery at Yuchanyan Cave, Hunan Province, China. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2009, 106(24): 9595-9600
- [16] 李小湘,詹庆才,魏兴华,段永红,陈祖武,刘勇.湖南江永普通野生稻原位和异位保存种质的 SSR 多样性差异.中国水稻科学,2006,20(4):361-366
Li X X, Zhan Q C, Wei X H, Duan Y H, Chen Z W, Liu Y. SSR diversity of *in-situ* and *ex-situ* conserved *Oryza rufipogon* populations in Jiangyong County of Hunan Province. Chinese Journal of Rice Science, 2006, 20(4): 361-366