

DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201903033

基于水稻线粒体 *atp6* 基因的稻属 *CMS* 基因起源 及 DNA 条形码的研究*

李 平¹, 刘雅婷², 赵自仙¹, 娄红波¹, 张雪梅^{1**}

(1. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学 教务处, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】探讨亚洲栽培稻 *CMS* 基因起源及水稻线粒体 *atp6* 特异性引物作为稻属 DNA 条形码标记的应用。【方法】用水稻 *atp6* 特异性引物通过 PCR 检测产于中国的 4 种水稻, 共 720 个个体, 并对 111 个个体测序。【结果】普通野生稻和亚洲栽培稻中均检测到 *atp6* 保守序列。药用野生稻中没检测到扩增产物。疣粒野生稻中检测到的 5 个单倍型间共计 17 个变异位点。澜沧、普洱、勐海居群共同拥有 H1, 单倍型 H2、H3、H4 和 H5 分别为新平、墨江、保亭和崖城居群特有。云南组和海南组, 组内平均遗传距离为 0, 组间为 0.02; 组间遗传分化系数 F_{st} 为 92.08%; 变异位点数 (S)、单倍型数 (h)、核苷酸多样性 (P) 均显示: 云南组 (4、3、0.002 01) 遗传多样性大于海南组 (1、2、0.001 31); 云南组单倍型多样性 H_d 为 0.6, 海南组为 1。5 个单倍型与水稻 *atp6* 保守序列的相似度最高为 45.19%。最大似然法 ML 进化树显示: 澜沧、普洱及勐海一带可能是疣粒野生稻的起源地, 海南疣粒野生稻可能源自大陆。【结论】水稻 *atp6* 特异性引物可作为疣粒野生稻种内条形码标记, 该标记也可区分普通野生稻、药用野生稻和疣粒野生稻。从线粒体 DNA 角度证实亚洲栽培稻 *CMS* 基因源自普通野生稻。

关键词: *atp6* 基因; 水稻; 序列分析; 起源; DNA 条形码

中图分类号: S 511.032

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2019) 04-0555-09

Study on the Origin of *CMS* Gene and DNA Barcode for *Oryza* Based on Rice Mitochondrial *atp6* Gene

LI Ping¹, LIU Yating², ZHAO Zixian¹, LOU Hongbo¹, ZHANG Xuemei¹

(1. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Academic Affairs Office, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] To explore the origin of *CMS* gene in *Oryza sativa* and the application of the rice mitochondrial rice *atp6* specific primer as *Oryza* DNA barcode markers. [Method] The *atp6* specific primer were used to detect 4 kinds of rice produced in China by PCR, a total of 720 individuals, and 111 individuals were sequenced. [Result] Conserved sequence of *atp6* was detected in *O. rufipogon* and *O. sativa*. No amplification products were detected in *O. officinalis*. A total of 17 variation locus between the five haplotypes were detected in *O. meyeriana*. Lancang, Pu'er, Menghai population shared H1. Haplotype H2, H3, H4 and H5 were unique to Xinping, Mojiang, Baoting and Yacheng population respectively. Yunnan group and Hainan group, average genetic distance within

收稿日期: 2019-03-14

修回日期: 2019-04-14

网络首发时间: 2019-07-19 10:38:59

*基金项目: 国家自然科学基金 (31200908)。

作者简介: 李平 (1992—), 女, 山西吕梁人, 在读硕士研究生, 主要从事遗传学研究。

E-mail: lp612000@126.com

**通信作者 Corresponding author: 张雪梅 (1973—), 女, 云南蒙自人, 博士, 副教授, 主要从事遗传学研究。E-mail: zhangxuemeirj@163.com

网络首发地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20190717.1606.071.html>



the group were all 0, and between groups was 0.02. The genetic differentiation coefficient F_{st} of between groups was 92.08%. Number of variant sites (S), number of haplotypes (h) and nucleotide diversity (P_i) showed that the genetic diversity of Yunnan group (4, 3, 0.002 01) was greater than that in Hainan group (1, 2, 0.001 31). The haplotype diversity H_d of the Yunnan group was 0.6, and that in Hainan was 1. The similarity between 5 haplotypes and the rice *atp6* conserved sequence was up to 45.19%. Maximum likelihood (ML) evolutionary tree displayed: the Lancang, Pu'er, Menghai area might be the origin of the *O. meyeriana* and Hainan *O. meyeriana* might originate from the mainland. [Conclusion] Rice *atp6* specific primers can be used as barcode markers within *O. meyeriana* species. The marker can also distinguish between *O. rufipogon*, *O. officinalis*, and *O. meyeriana*. *O. sativa* CMS gene is derived from *O. rufipogon* from the perspective of mitochondrial DNA.

Keywords: *atp6* gene; rice; sequence analysis; origin; DNA barcode

植物细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 基因为人类粮食产量提供了重要的支撑, 其研究一直以来备受重视。雄性不育是指植株雌性表现正常, 雄性只有接受具有恢复基因的花粉才能受精结实产生杂种的现象。此杂种在生长性和适应性方面具有强大的优势, 利用这一优势可极大提高农作物的产量、品质和抗性。目前已报道的水稻 CMS 类型有 60 多种, 其中野败型(WA-CMS)、红莲型(HL-CMS)和包台型(BT-CMS)是应用广泛的主要水稻 CMS 类型^[1]。大量研究表明: 水稻 CMS 与其线粒体基因组异常嵌合基因的形成密切相关^[2-5]。

研究较为深入的水稻细胞质雄性不育配子体不育基因 *orf79*、*orfH79*、*L-orf79* 及孢子体不育基因 *orf352* 均为嵌合基因, 均与 *atp6* 基因有关, *orf79*、*orfH79* 及 *L-orf79* 基因为线粒体基因组中异常 *atp6* 基因 (*Batp6* 基因) 下游特异嵌合片段, 且与 *Batp6* 基因共转录, 而 *orf352* 基因中嵌合有 *atp6* 基因部分序列^[1, 6-11]。另一方面, 线粒体基因为母性遗传, 能育成不育系、保持系用于三系杂交, 而线粒体基因频繁发生嵌合导致细胞质雄性不育的机制仍没有定论, 不育基因的起源也不明晰。

中国是杂交水稻的发祥地, 也是细胞质雄性不育类型最丰富的国家, 产 4 种水稻: 亚洲栽培稻 (*Oryza sativa* L)、普通野生稻 (*O. rufipogon* Griff)、疣粒野生稻 (*O. meyeriana* Baill)、药用野生稻 (*O. officinalis* Wall et Watt)^[12]。其中普通野生稻主要分布在广东、广西、云南、湖南、江西、福建和海南 7 个省份^[13]。药用野生稻主要分布在海南、云南、广西和广东 4 个省份^[14]。疣粒野生稻仅分布于云南、海南 2 个省份^[15]。云南省由于具有立

体的生态气候类型及民族多样性而具有丰富多样的地方水稻老品种。

亚洲栽培稻起源于普通野生稻已经被世界所公认, 但亚洲栽培稻的起源地、驯化时间、起源次数 (单起源还是多起源) 一直存在争议^[16]。尼瓦拉野生稻 (*O. navara* Sharma) 与普通野生稻是同一物种不同生态型还是分属两个不同物种是目前稻属分类的争议点之一, 稻属的亲缘关系及分化方式也不明晰^[17-19]。补充来自线粒体基因的证据有助于解决上述问题。

DNA 条形码是利用 DNA 单一片段或其组合片段, 对所有物种进行区分和鉴定^[20]。可以促进物种的鉴定分类和保护生物学的发展, 对新物种的发现及珍稀濒危物种的保护具有重要意义。

本研究广泛采集分布于中国的普通野生稻、药用野生稻、疣粒野生稻、分布于云南不同海拔及地区的亚洲栽培稻地方老品种和亚洲栽培稻三系杂交稻丰优香占, 采用水稻线粒体 *atp6* 基因特异性引物对所采集的每一个个体进行扩增, 随机选取每个居群/品种 2 个个体的扩增产物进行测序, 借此探讨亚洲栽培稻不育基因的起源及水稻线粒体 *atp6* 基因特异性引物作为稻属 DNA 条形码标记的应用。

1 材料与方法

1.1 植物材料

12 个普通野生稻居群采自云南、广西、广东和江西省的不同地区, 每个居群有 5~30 个个体, 共 311 个个体。根据群体遗传学原理, 原则上每个居群随机采集 30 个个体, 个体与个体之间的距离为 5 m, 居群不足 30 个个体时, 则全部

采集(疣粒野生稻及药用野生稻采样原理与此相同)。采自海南、云南省不同地区的 8 个疣粒野生稻居群, 各居群间的个体为 8~25 个, 共 155 个个体; 采自海南、广西、广东省不同地区的 4 个药用野生稻居群, 各居群分别有 9~30 个个体, 共 84 个个体。野生稻详细信息见表 1, 地理分布见图 1。采集后立即用硅胶保存 4~6 片健康幼嫩的叶片用于 DNA 提取。采自云南、海南不同地区的 33 个亚洲栽培稻地方老品种, 每个品种分

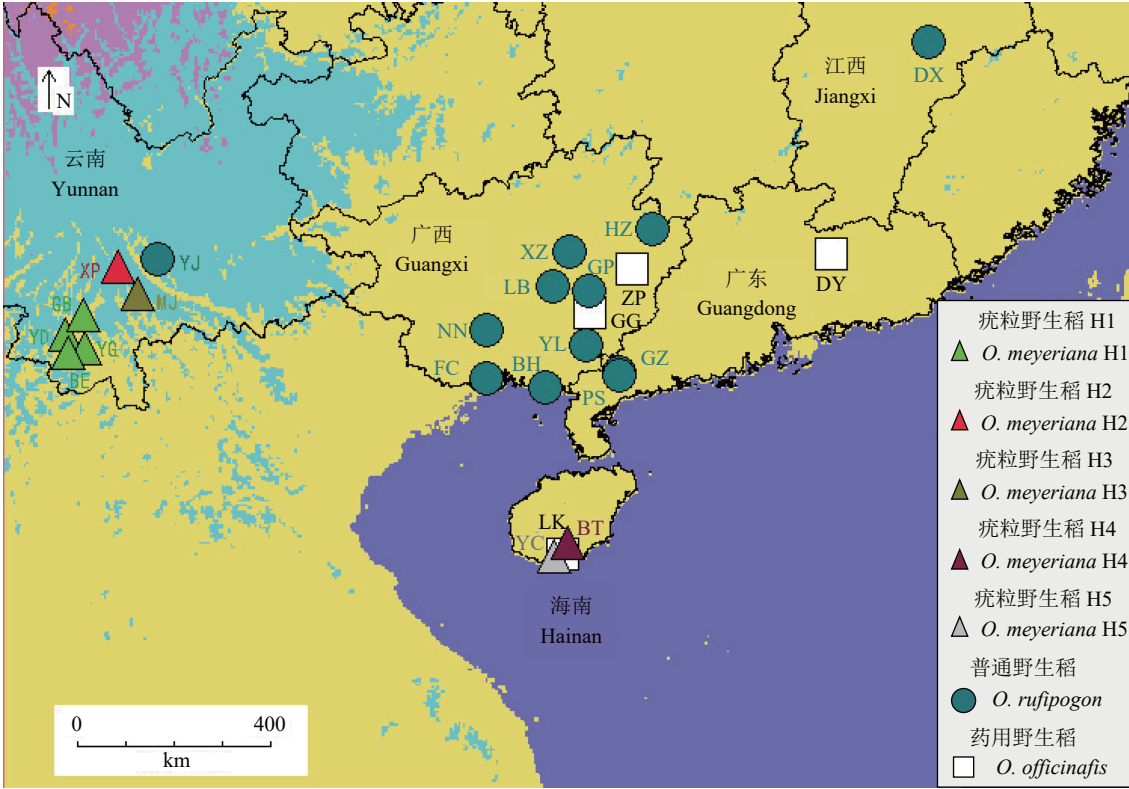
别随机选择 5 个个体, 共 165 个个体; 亚洲栽培稻三系杂交稻丰优香占共 5 个个体。亚洲栽培稻的详细信息见表 2, 亚洲栽培稻地方老品种的地理分布见图 2。所有材料存放在云南农业大学作物种质创新及可持续利用重点实验室。

1.2 总 DNA 的提取

使用改良的 CTAB 法^[21]从叶片中提取总 DNA, 产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进行检测, 母液保存于-20 ℃ 冰箱。

表 1 3 种野生稻 24 个居群材料来源
Tab. 1 Sources of 24 population materials of three wild rice species

居群原生地 population localities	居群简称 population code	物种 species	样本数 sample number	海拔/m altitude	经度 (E) longitude	纬度 (N) latitude	植株形态 plant morphology
云南, 元江 Yuanjiang, Yunnan	YJ	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	5	700	102	23.983 3	直立 erect
广西, 龙岗 Longgan, Guangxi	NN	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	20	98	108.2	22.666 7	直立 erect
广西, 来宾 Laibing, Guangxi	LB	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	133	109.45	23.466 7	半直立 semi-erect
广西, 象州 Xiangzhou, Guangxi	XZ	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	336	109.766 7	24.116 7	匍匐/直立 stolon/erect
广西, 钟山 Zhongshan, Guangxi	HZ	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	438	111.316 7	24.566 7	半直立 semi-erect
广西, 桂平 Guiping, Guangxi	GP	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	113	110.133 3	23.4	匍匐 stolon
广西, 玉林 Yulin, Guangxi	YL	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	237	110.066 7	22.383 3	半直立 semi-erect
广西, 防城 Fangcheng, Guangxi	FC	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	71	108.183 3	21.75	匍匐 stolon
广西, 北海 Beihai, Guangxi	BH	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	27	54	109.3	21.583 3	匍匐/半直立 stolon/semi-erect
广东, 高州 Gaozhou, Guangdong	GZ	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	30	91	110.7	21.85	匍匐 stolon
广东, 高州 Gaozhou, Guangdong	PS	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	25	-57	110.7	21.8	匍匐/半直立 stolon/semi-erect
江西, 东乡 Dongxiang, Jiangxi	DX	普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	24	276	116.516 7	28.083 3	半直立 semi-erect
海南, 保亭 Baoting, Hainan	BT	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	25	418	109.716 7	18.666 7	半直立 semi-erect
海南, 崖城 Yacheng, Hainan	YC	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	8	39	109.483 3	18.4	半直立 semi-erect
云南, 新平 Xinping, Yunnan	XP	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	24	700	101.266 7	23.833 3	半直立 semi-erect
云南, 墨江 Mojiang, Yunnan	MJ	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	18	800	101.65	23.35	半直立 semi-erect
云南, 澜沧, 盐店 Yandian, Lancang, Yunnan	YD	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	20	750	100.277 1	22.583 8	半直立 semi-erect
云南, 普洱, 干坝 Ganba, Pu'er, Yunnan	GB	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	20	920	100.617 4	22.948 2	半直立 semi-erect
云南, 勐海, 野谷 Yegu, Menghai, Yunnan	YG	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	20	910	100.643	22.318 8	半直立 semi-erect
云南, 勐海, 蚌俄 Bang'e, Menghai, Yunnan	BE	疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	20	733	100.324 5	22.243 3	半直立 semi-erect
海南, 保亭, 罗葵 Luokui, Baoting, Hainan	LK	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	25	586	109.633 3	18.433 3	半直立 semi-erect
广西, 桂平, 中沙 Zhongsha, Guiping, Guangxi	GG	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	20	840	110.15	22.966 7	直立 erect
广西, 昭平 Zhaoping, Guangxi	ZP	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	30	75	110.95	23.783 3	直立 erect
广东, 东源 Dongyuan, Guangdong	DY	药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	9	449	114.7	24.083 3	直立 erect



注：每个圆代表 1 个普通野生稻居群，同种颜色的圆代表同种单倍型。每个正方形代表 1 个药用野生稻居群，白色正方形表示没有扩增产物。每个三角形代表一个疣粒野生稻居群，绿色、红色、深黄绿色、深砖红色和灰色 5 种不同颜色的三角形分别代表不同的单倍型 H1、H2、H3、H4 和 H5。每个居群与居群简称相对应，详细信息见表 1。地图比例尺为 1 : 117 519 13，地理方向指向北。

Note: Each circle represents a *O. rufipogon* population and circles of the same color represent the same haplotype. Each square represents a *O. officinalis* population and white squares represent no amplification product. Each triangle represents a *O. meyeriana* population and the green, red, dark yellow green, dark brick red and gray five different color triangles represent respectively different haplotypes H1, H2, H3, H4 and H5. Each population corresponds to the abbreviated name of the group, and see Tab. 1 for details. The map scale is 1 : 117 519 13. The geographic direction of the map points to the north.

图 1 线粒体单倍型在各居群中的分布图

Fig. 1 Distribution map of mitochondrial haplotypes in various populations

1.3 PCR 扩增

扩增 *atp6* 基因保守序列的引物^[22]为 *atp6* F: 5'-CTGAATGGAGGAACGGCGAT-3'; *atp6* R:5'-AGCATAGTCCAAGCGAACCC-3'。PCR 反应体系为 20 μL: 其中包括上下游引物各 0.3 μL (10 mol/μL), Mix 9.3 μL, DNA 模板 1 μL, ddH₂O 9.1 μL。测序反应体系为 30 μL: 其中包括上下游引物各 1 μL (1×10⁻⁵ mol/L), Mix 10.5 μL, DNA 模板 1.5 μL, ddH₂O 16 μL。PCR 反应在塞默飞世尔科技公司 (型号: model#9902) 的 PCR 仪中完成, 程序设定为: 94 ℃ 预变性 2 min; 然后 35 个循环: 每个循环 94 ℃ 变性 30 s, 52.4 退火 30 s, 72 ℃ 延伸 45 s; 最后 72 ℃ 延伸 5 min, 并永久保存在 4 ℃ 冰箱。

1.4 PCR 产物的检测

PCR 产物通过 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测其

扩增质量。

1.5 测序

根据琼脂糖凝胶电泳检测结果, 每个居群/品种随机选取 2 个个体送上海生物工程股份有限公司进行测序。除亚洲栽培稻三系杂交稻丰优香占品种送测 5 个个体。

1.6 数据分析

测序后的序列用 Genestar 中的 Seq man 拼接, 手动进行修改。拼接后的序列用 ClastalX (1.83) 比对后, 用 DNAsp (5.10) 计算遗传多样性和遗传分化系数, 用 MEGA 计算遗传距离, 用 PHYML (3.0) 构建 ML (maximum likelihood, 最大似然法) 进化树, 采用 bootstrap method 重复 100 次测试系统进化树。用 DIVA-GIS (7.5.0) 显示居群、单倍型的地理分布。在 NCBI 中进行 BLAST 检索验证结果。

表 2 亚洲栽培稻地方老品种来源及三系杂交稻

Tab. 2 Sources of Asian cultivated rice local old varieties and three line hybrid rice

品种原产地 variety localities	样本数 sample number	品种简称 variety code	经度 (E) longitude	纬度 (N) latitude	亚种类型 subspecies type
维西, 二区 Erqu, Weixi	5	WXH	99.256 8	27.265 8	粳稻 <i>japonica</i>
丽江 Lijiang	5	LJH	100.231	26.860 9	籼稻 <i>indica</i>
剑川, 金华 Jinhua, Jianchuan	5	JCH	99.917 9	26.535 6	粳稻 <i>japonica</i>
宾川, 平川 Pingchuan, Binchuan	5	DLB	100.790 3	26.031 2	粳稻 <i>japonica</i>
墨江, 连珠 Lianzhu, Mojiang	5	MGZM	101.613 2	23.440 5	粳稻 <i>japonica</i>
泸西, 旧城 Jiucheng, Luxi	5	QLS	100.777 3	23.658 1	粳稻 <i>japonica</i>
彝良 Yiliang	5	YL	104.054 4	27.631 4	籼稻 <i>indica</i>
威信, 高田乡 Gaotianxiang, Weixin	5	WXL	105.175 5	27.949 5	籼稻 <i>indica</i>
元阳, 沙拉托 Shalatuo, Yuanyang	5	YYF	102.580 3	23.106 4	籼稻 <i>indica</i>
元阳, 沙拉托 Shalatuo, Yuanyang	5	YYSN	102.579 7	23.107 3	籼稻 <i>indica</i>
元阳 Yuanyang	5	YY	102.843 7	23.224 9	籼稻 <i>indica</i>
元阳, 新街 Xinjie, Yuanyang	5	YYB	102.752 3	23.161 9	籼稻 <i>indica</i>
元阳 Yuanyang	5	YYL	102.829 9	23.230 2	籼稻 <i>indica</i>
元阳 Yuanyang	5	YYN	102.853 5	23.223 8	籼稻 <i>indica</i>
元阳 Yuanyang	5	YYH	102.842	23.223 3	籼稻 <i>indica</i>
红河, 阿扎河 Azhahe, Honghe	5	HHF	102.480 3	23.192 7	籼稻 <i>indica</i>
红河, 阿扎河 Azhahe, Honghe	5	HHN	102.483 3	23.191 4	籼稻 <i>indica</i>
大关, 翠华 Cuihua, Daguan	5	DJ	103.898 4	27.760 2	籼稻 <i>indica</i>
普洱 Pu'er	5	PEB	104.170 9	28.248 9	籼稻 <i>indica</i>
景洪, 勐腊 Mengla, Jinghong	5	MLB	100.802 2	22.006 3	籼稻 <i>indica</i>
景洪, 勐腊 Mengla, Jinghong	5	MLH	100.795 9	22.004	籼稻 <i>indica</i>
新平 Xinping	5	XPXN	101.995 3	24.077 8	籼稻 <i>indica</i>
越南 Yuenan	5	YNH	101.583	24.057 6	籼稻 <i>indica</i>
阿扎河, 大田村 Datian Village, Azhahe	5	G	102.495 9	23.183 9	籼稻 <i>indica</i>
阿扎河, 大田村 Datian Village, Azhahe	5	H	102.531	23.215 5	籼稻 <i>indica</i>
乐育, 尼美村 Nimei Village, Leyu	5	J	102.331 1	23.334 1	籼稻 <i>indica</i>
乐育, 尼美村 Nimei Village, Leyu	5	K	102.333 3	23.333 6	籼稻 <i>indica</i>
腾冲, 团田 Tuantian, Tengchong	5	HK	98.653 6	24.688 3	粳稻 <i>japonica</i>
腾冲, 团田 Tuantian, Tengchong	5	DY	98.656	24.686 6	粳稻 <i>japonica</i>
文山 Wenshan	5	BBM	104.222 6	23.409 2	籼稻 <i>indica</i>
通海 Tonghai	5	TH	102.731	24.119 5	籼稻 <i>indica</i>
西盟 Ximeng	5	XM	102.005 5	23.605 2	籼稻 <i>indica</i>
三亚 Sanya	5	HN	109.518 7	18.259 3	籼稻 <i>indica</i>
丰优香占 Fengyouxiangzhan	5	A	—	—	籼型杂交稻 <i>indica</i> hybrid rice

2 结果与分析

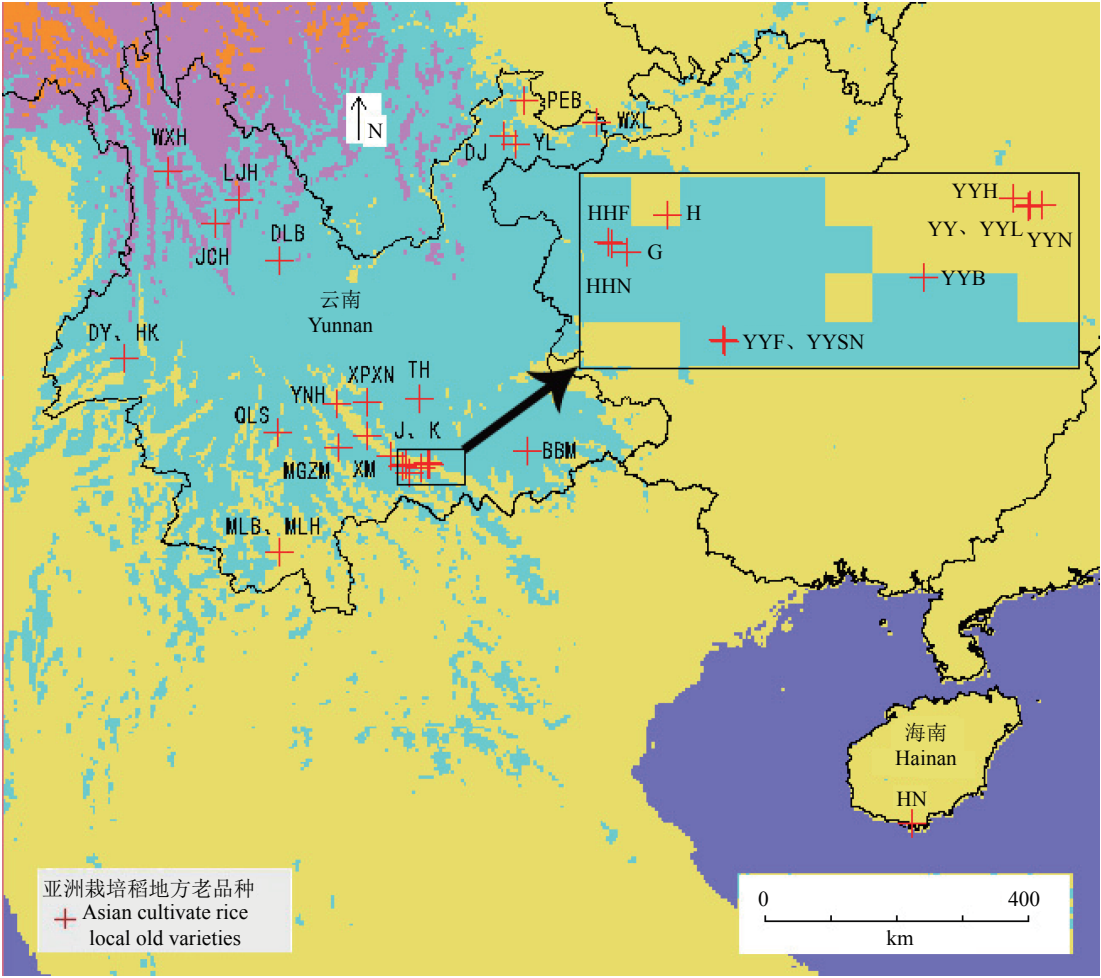
2.1 *atp6* 基因特异性引物在稻属中的检测结果

PCR 产物通过琼脂糖凝胶电泳检测, 结果显示 (表 3): 在普通野生稻 12 个居群 (311 个个体)、疣粒野生稻 8 个居群 (155 个个体)、亚洲栽培稻地方老品种 33 个品种 (165 个个体) 及杂交稻丰优香占 (5 个个体) 中均检测到扩增产物, 药用野生稻 4 个居群 (84 个个体) 均无扩增产物。

2.2 测序结果与分析

共完成 111 个个体 *atp6* 基因特异性引物扩增序列的测序 (表 3), 其中普通野生稻测序 24 个个体, 疣粒野生稻测序 16 个个体, 亚洲栽培稻地方老品种测序 66 个个体, 三系杂交稻丰优香占测序 5 个个体。

普通野生稻 24 个个体、地方老品种 66 个个体及丰优香占 5 个个体的测序序列均与水稻 *atp6* 基因保守序列一致, 均不存在差异, 序列长 649 bp。



注：每个红色十字代表 1 个亚洲栽培稻地方老品种，每个品种与品种简称相对应，详细信息见表 2。对图中长方形圈起的密集红十字部分进行放大处理，黑色箭头指向放大部分。地图比例尺为 1:964 259 5，地理方向指向北。

Note: Each red cross represents an Asian cultivated rice local old varieties. Each variety corresponds to the short name of the variety, and see Tab. 2 for details. Magnify the dense red cross that is circled in the figure, and black arrow is pointing to the enlarged part. The map scale is 1:964 259 5. The geographic direction of the map points to the north.

图 2 亚洲栽培稻地方老品种来源分布

Fig. 2 Source distribution of Asian cultivated rice local old varieties

表 3 *atp6* 基因特异性引物在稻属中的检测结果

Tab. 3 Test results of *atp6* gene specific primers in *Oryza* sp.

稻属 <i>Oryza</i> sp.	居群/品种个数 populations/ varieties number	总个体数 total individuals number	被标记的个体数 individuals marked number	未被标记的居群/品种个数 unmarked number of population varieties	未被标记的个体数 individuals unmarked number	测序个体数 individuals sequenced number
普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	12	311	311	0	0	24
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	4	84	0	4	84	0
疣粒野生稻 <i>O. meyeriana</i>	8	155	155	0	0	16
亚洲栽培稻地方老品种 Asian cultivated rice local old varieties	33	165	165	0	0	66
亚洲栽培稻三系杂交稻丰优香占 Asian cultivated rice three line hybrid rice Fengyouxiangzhan	1	5	5	0	0	5
总数 total	58	720	636	4	84	111

8 个疣粒野生稻居群, 每个居群随机抽取 2 个个体测序。共检测到 5 个单倍型, 即 H1、H2、H3、H4 和 H5, 地理分布见图 1。5 个单倍型共计 17 个变异位点(表 4), 无插入缺失。云南省澜沧、普洱、勐海野谷、勐海蚌俄居群共同拥有 H1、H2 与 H3 分别为云南省新平及墨江居群特有, H4 及 H5 分别为海南省保亭和崖城居群特有。分布在云南省的 3 个单倍型: H1、H2 及 H3 中, H2 仅在 678 位点由 H1 的 T 转换为 C, H3 在 74、454、472 及 678 位点的 T、G、C、C 分别由 H1 的 C、A、A、T 代替。分布在海南省的单倍型 H4、H5, 仅在位点 678 处由 H5 的 C 转换为 H4 的 T。在其他 16 个变异位点, H4、H5 均与 H1、H2 存在差异。

将云南、海南省的疣粒野生稻居群划分为云南组和海南组: 两组组内平均遗传距离均为 0, 组间平均遗传距离为 0.02; 组间遗传分化系数 F_{st} 为 92.08%, 基因流 N_m 为 0.04, 遗传分化较大, 组间基本不存在基因交流。

变异位点数 (S)、单倍型数 (h)、核苷酸多样性 (P_i) 均显示(表 5): 云南组疣粒野生稻居群的遗传多样性 (4、3、0.002 01) 大于海南组 (1、2、0.001 31)。云南组疣粒野生稻居群的单倍型多样性 (H_d) 为 0.6, 海南组为 1。

疣粒野生稻 5 个单倍型与普通野生稻、亚洲栽培稻地方老品种及杂交稻丰优香占的 *atp6* 基因保守序列的比对显示: 两两序列相似度低, 平均值为 43.95%, 最高为 45.19%, 最低为 42.33%。

表 4 疣粒野生稻 5 种单倍型间的序列区别及代表居群

Tab. 4 Sequence differences and representative populations of five haplotypes in *O. meyeriana*

单倍型 haplotype	代表居群 representative population	个体数 individuals number	核苷酸位点 nucleotide site																	
			51	74	209	230	312	322	359	387	407	412	417	454	472	474	516	547	678	
H1	YG、GB、YD、BE	8	C	C	G	G	G	C	C	A	C	G	G	A	A	G	G	G	T	
H2	XP	2	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	C	
H3	MJ	2	.	T	.	.	.	.	.	.	.	.	.	G	C	.	.	.	C	
H4	BT	2	G	T	A	T	A	T	T	G	T	A	A	G	C	T	T	A	.	
H5	YC	2	G	T	A	T	A	T	T	G	T	A	A	G	C	T	T	A	C	

注: “.” 代表与单倍型H1相同的碱基。H1 的代表居群是来自云南省的澜沧 (YD)、普洱 (GB)、勐海野谷 (YG)、勐海蚌俄 (BE), H2 的代表居群是云南新平 (XP), H3 的代表居群是云南墨江 (MJ), H4 的代表居群是海南保亭 (BT), H5 的代表居群是海南崖城 (YC)。
Note: “.” represents the same base as the haplotype H1. The representative populations of H1 are Lancang (YD), Pu'er (GB), Menghai Yegu (YG), Menghai Bang'e (BE) from Yunnan Province. The representative population of H2 is Xinping (XP), Yunnan. The representative population of H3 is Mojiang (MJ), Yunnan. The representative population of H4 is Baoting (BT), Hainan. The representative population of H5 are Yacheng (YC), Hainan.

表 5 疣粒野生稻 8 个居群的遗传多样性分析

Tab. 5 Genetic diversity analysis of 8 populations of *O. meyeriana*

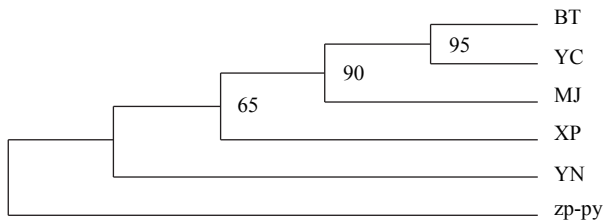
居群 population	居群个数 population number	序列数 sequences number	变异位点数 (S) number of variant sites	单倍型数 (h) haplotype number	单倍型多样性 (H_d) haplotype diversity	核苷酸多样性 (P_i) nucleotide diversity
云南 Yunnan	6	6	4	3	0.6	0.002 01
海南 Hainan	2	2	1	2	1	0.001 31
所有居群 all populations	8	8	17	5	0.785 71	0.010 1

2.3 进化分析

以疣粒野生稻的 5 个单倍型构建进化树 (zpp 为外类群)(图 3) 可知: 5 个单倍型所对应的不同居群分属不同分枝。云南省的澜沧、普洱、勐海野谷和勐海蚌俄 4 个居群居于树根, 且与新平居群亲缘关系最近, 墨江居群次之, 与海南省的崖城和保亭居群亲缘关系最远; 海南省保亭和崖城居群亲缘关系较近, 居于树梢。澜沧、普洱及勐海一带可能是疣粒野生稻的起源地, 海南疣粒野生稻可能源自大陆。

3 讨论

水稻线粒体 *atp6* 基因特异性引物在普通野生稻、亚洲栽培稻地方老品种及杂交稻丰优香占中均检测到扩增产物, 随机测序的 95 个个体序列完全一致, 均为水稻线粒体 *atp6* 基因保守序列, 且与 NOTSU 等^[22] 和 SAJJAD 等^[23] 注释的水稻 *atp6* 基因对应序列完全一致。在药用野生稻中没有检测到扩增产物, 可能是标记位点发生了突变。在疣粒野生稻中共检测到 5 个单倍型, 5 个



注: YN 代表云南省的澜沧 (YD)、普洱 (GB)、勐海野谷 (YG)、勐海蚌俄 (BE) 疣粒野生稻居群, 这些居群共同特有单倍型 H1, XP (云南新平疣粒野生稻居群) 特有 H2, MJ (云南墨江疣粒野生稻居群) 特有 H3, BT (海南保亭疣粒野生稻居群) 特有 H4, YC (海南崖城疣粒野生稻居群) 特有 H5。zp-py 代表普通野生稻、亚洲栽培稻地方老品种及杂交稻丰优香占的 *atp6* 基因保守序列。

Note: YN stands for the *O. meyeriana* population of the Langcang (YD), Pu'er (GB), Menghai Yegu (YG), Menghai Bang'e (BE) from Yunnan Province. And these populations share haplotype H1. XP (Yunnan Xinning *O. meyeriana* population) has H2 in particular. MJ (Yunnan Mojiang *O. meyeriana* population) has H3 in particular. BT (Hainan Baoting *O. meyeriana* population) has H4 in particular. YC (Hainan Yacheng *O. meyeriana* population) has H5 in particular. zp-py represents the *atp6* gene conserved sequence of *O. rufipogon*, Asian cultivated rice local old varieties and hybrid rice Fengyouxiangzhan.

图 3 疣粒野生稻 5 个单倍型的进化树

Fig. 3 The phylogenetic tree of five haplotypes of *O. meyeriana*

单倍型与水稻 *atp6* 基因保守序列的相似度低, 平均值为 43.95%, 最高为 45.19%, 最低为 42.33%。5 个单倍型在 NCBI 中没有检测到疣粒野生稻的同源氨基酸序列, 它的功能有待进一步探究。该标记在普通野生稻、亚洲栽培稻地方老品种及杂交稻丰优香占中无变异位点, 从线粒体 DNA 角度证实水稻细胞质雄性不育基因源自普通野生稻, 也验证了亚洲栽培稻源自普通野生稻^[16, 24-28]。

水稻 *atp6* 基因特异性引物在疣粒野生稻中检测到 5 个单倍型, 5 个单倍型间共计 17 个变异位点, 变异位点丰富, 甚至可区分不同居群间的变异, 可作为疣粒野生稻种内条形码标记^[29-32]。该标记也可鉴别普通野生稻、疣粒野生稻及药用野生稻, 对于是否还可鉴别稻属的其他种, 有待进一步研究。

疣粒野生稻一般长在河边和山谷 (山坡上) 潮湿竹林或竹林与乔木或灌木的混生林中, 受水系和乔灌木分布的影响, 对湿度和光照要求严苛。它是中国二级濒危保护植物, 仅分布于云南、海南两省, 在两省分化明显^[33]。从 1978 年起野生稻资源考察均发现: 澜沧江、怒江、红河和李仙江、南汀河等几条河流下游地段 (澜沧、普洱和勐海等) 为云南疣粒野生稻主要分布区^[34-36]。本研究采集的云南居群 (除 XP 居群外) 几乎都位于大江大河及支流附近的密林中, 共同拥有 H1 单倍型的几个居群分布地属于澜沧江水系, MJ 居群

和 XP 居群分布地属于李仙江水系, 但 XP 居群较为特殊, 并没有位于密林中, 而分布在灌木中, 甚至在无灌木遮挡地。可能由于水系影响, 所以推测澜沧、普洱和勐海一带可能是疣粒野生稻的起源地。

海南岛位于中国大陆附近, 岛上植物可能源自大陆, 岛上的疣粒野生稻面积、密度都远小于云南。保亭居群 (418 m) 和崖城居群 (39 m) 海拔差异可能是导致这两个居群形成不同分支的原因。海南与云南疣粒野生稻居群两个组遗传分化系数 F_{st} 为 92.08%, 居群间几乎无基因交流, 而进化分析显示海南居群源自云南居群, 可能由于居群的分化源自海南岛屿与大陆的分离。

本研究所采集的龙岗、来宾居群为一年生, 而北海居群为一年生与多年生混杂, 这些居群的测序结果与其他普通野生稻居群的测序结果完全一致。支持二者为同一物种的不同生态类型。但防城居群同一年生与多年生野生稻确实存在生殖隔离, 二者之间的关系有待进一步研究。

[参考文献]

- [1] HU J, HUANG W C, HUANG Q, et al. Mitochondria and cytoplasmic male sterility in plants[J]. Mitochondrion, 2014, 19: 282. DOI: 10.1016/j.mito.2014.02.008.
- [2] LEVINGS C S, PRING D R. Restriction endonuclease analysis of mitochondrial DNA from normal and texas cytoplasmic male-sterile maize[J]. Science, 1976, 193 (4248): 158. DOI: 10.1126/science.193.4248.158.
- [3] LUO D P, XU H, LIU Z L, et al. A detrimental mitochondrial-nuclear interaction causes cytoplasmic male sterility in rice[J]. Nature Genetics, 2013, 45(5): 573. DOI: 10.1038/ng.2570.
- [4] LINKE B, BÖRNER T. Mitochondrial effects on flower and pollen development[J]. Mitochondrion, 2005, 5(6): 389. DOI: 10.1016/j.mito.2005.10.001.
- [5] 易平, 汪莉, 孙清萍, 等. 红莲型细胞质雄性不育水稻线粒体 *atp6* 基因转录本的编辑位点研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5): 729. DOI: 10.3321/j.issn: 1000-3282.2002.05.014.
- [6] HANSON M R, BENTOLILA S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development[J]. The Plant Cell, 2004, 16(suppl.1): S154. DOI: 10.1105/tpc.015966.
- [7] CHEN L, LIU Y G. Male sterility and fertility restoration in crops[J]. Annual Review of Plant Biology, 2014, 65(1): 579. DOI: 10.1146/annurev-arplant-050213-040119.
- [8] TANG H W, ZHENG X M, LI C L, et al. Multi-step formation, evolution, and functionalization of new cytoplasmic male sterility genes in the plant mitochondrial genomes[J]. Cell Research, 2016, 27: 130. DOI: 10.1038/cr.2016.115.
- [9] IWABUCHI M, KYOZUKA J, SHIMAMOTO K. Pro-

- cessing followed by complete editing of an altered mitochondrial *atp6* RNA restores fertility of cytoplasmic male-sterile rice[J]. The EMBO Journal, 1993, 12: 1437. DOI: [10.1002/j.1460-2075.1993.tb05787.x](https://doi.org/10.1002/j.1460-2075.1993.tb05787.x).
- [10] KADOWAKI K I, SUZUKI T, KAZAMA S. A chimeric gene containing the 5' portion of *atp6* is associated with cytoplasmic male-sterility of rice[J]. Molecular and General Genetics, 1990, 224(1): 10. DOI: [10.1007/BF00259445](https://doi.org/10.1007/BF00259445).
- [11] AKAGI H, SAKAMOTO M, SHINJYD C. A unique sequence located downstream from the rice mitochondrial *atp6* may cause male sterility[J]. Current Genetics, 1994, 25(1): 52. DOI: [10.1007/BF00712968](https://doi.org/10.1007/BF00712968).
- [12] 高立志, 洪德元. 中国稻属研究的主要进展[J]. 中国农业科学, 1999, 32(6): 40. DOI: [10.3321/j.issn:0578-1752.1999.06.007](https://doi.org/10.3321/j.issn:0578-1752.1999.06.007).
- [13] 柯学, 陈越, 殷富有, 等. 普通野生稻在稻属中的分类进化及资源研究[J]. 分子植物育种, 2018, 16(4): 1363. DOI: [10.13271/j.mpb.016.001363](https://doi.org/10.13271/j.mpb.016.001363).
- [14] 苏龙, 徐志健, 乔卫华, 等. 广西药用野生稻遗传多样性分析及 SSR 引物数量对遗传多样性结果的影响研究[J]. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 603. DOI: [10.13430/j.cnki.jpgr.2017.04.001](https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.2017.04.001).
- [15] 钱韦, 谢中稳, 葛颂, 等. 中国疣粒野生稻的分布、濒危现状和保护前景[J]. 植物学报, 2001, 43(12): 1279. DOI: [10.3321/j.issn:1672-9072.2001.12.014](https://doi.org/10.3321/j.issn:1672-9072.2001.12.014).
- [16] HUANG X H, KURATA N, WEI X H, et al. A map of rice genome variation reveals the origin of cultivated rice[J]. Nature, 2012, 490(7421): 497. DOI: [10.1038/nature11532](https://doi.org/10.1038/nature11532).
- [17] LONDO J P, CHIANG Y C, HUNG K H, et al. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(25): 9578. DOI: [10.1073/pnas.0603152103](https://doi.org/10.1073/pnas.0603152103).
- [18] ZHU Q H, ZHENG X M, LUO J C, et al. Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: severe bottleneck during domestication of rice[J]. Molecular Biology and Evolution, 2007, 24(3): 875. DOI: [10.1093/molbev/msm005](https://doi.org/10.1093/molbev/msm005).
- [19] FULLER D Q. Pathways to asian civilizations: tracing the origins and spread of rice and rice cultures[J]. Rice, 2011, 4(3/4): 78. DOI: [10.1007/s12284-011-9078-7](https://doi.org/10.1007/s12284-011-9078-7).
- [20] HOLLINGSWORTH P M, GRAHAM S W, LITTLE D P. Choosing and using a plant DNA barcode[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19254. DOI: [10.1371/journal.pone.0019254](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019254).
- [21] 代翠红, 李杰, 朱延明, 等. 不同 DNA 提取方法对 4 种重要作物 DNA 提取效率的比较[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(3): 329. DOI: [10.3969/j.issn.1005-9369.2005.03.018](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-9369.2005.03.018).
- [22] NOTSU Y, MASOOD S, NISHIKAWA T, et al. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2002, 268(4): 434. DOI: [10.1007/s00438-002-0767-1](https://doi.org/10.1007/s00438-002-0767-1).
- [23] SAJJAD A, LATIF K A, RAHIM K A, et al. Mitochondrial genome analysis of wild rice (*Oryza minuta*) and its comparison with other related species[J]. PLoS One, 2016, 11(4): e0152937. DOI: [10.1371/journal.pone.0152937](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152937).
- [24] KHUSH G S. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35(1/2): 25. DOI: [10.1023/a:1005810616885](https://doi.org/10.1023/a:1005810616885).
- [25] SUN Q, WANG 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.)[J]. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 104(8): 1335. DOI: [10.1007/s00122-002-0878-4](https://doi.org/10.1007/s00122-002-0878-4).
- [26] SUN C Q, WANG X K, YOSHIMURA A, et al. A study of the genetic diversity of common wild rice (*O. rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) by RFLP analysis[J]. Journal of Genetics and Genomics, 2000, 27(3): 227.
- [27] WANG F, YUAN Q H, SHI L, et al. A large-scale field study of transgene flow from cultivated rice (*Oryza sativa*) to common wild rice (*O. rufipogon*) and barnyard grass (*Echinochloa crusgalli*)[J]. Plant Biotechnology Journal, 2006, 4(6): 667. DOI: [10.1111/j.1467-7652.2006.00210.x](https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2006.00210.x).
- [28] DUAN S H, LI S Q, LI S B, et al. Genetic diversity of wild rice and cultivated rice[J]. Acta Agronomica Sinica, 2009, 35(3): 467. DOI: [10.3724/SP.J.1006.2009.00467](https://doi.org/10.3724/SP.J.1006.2009.00467).
- [29] HOGG I D, HEBERT P D N. Biological identification of springtails (Hexapoda: Collembola) from the Canadian Arctic, using mitochondrial DNA barcodes[J]. Canadian Journal of Zoology, 2004, 82(5): 749. DOI: [10.1139/Z04-041](https://doi.org/10.1139/Z04-041).
- [30] MEYER C P, PAULAY G. DNA barcoding: error rates based on comprehensive sampling[J]. PLoS Biology, 2005, 3(12): e422. DOI: [10.1371/journal.pbio.0030422](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0030422).
- [31] KRESS W J. Use of DNA barcodes to identify flowering plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2005, 102(23): 8369. DOI: [10.1073/pnas.0503123102](https://doi.org/10.1073/pnas.0503123102).
- [32] CHASE M W, SALAMIN N, WILKINSON M, et al. Land plants and DNA barcodes: short-term and long-term goals[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences, 2005, 360(1462): 1889. DOI: [10.1098/rstb.2005.1720](https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1720).
- [33] 钱韦, 葛颂, 洪德元. 采用 RAPD 和 ISSR 标记探讨中国疣粒野生稻的遗传多样性[J]. 植物学报, 2000, 42(7): 741. DOI: [10.3321/j.issn:1672-9072.2000.07.017](https://doi.org/10.3321/j.issn:1672-9072.2000.07.017).
- [34] 万亚涛, 阿新祥, 樊传章, 等. 云南疣粒野生稻 34 个居群遗传多样性的 ISSR 分析[J]. 中国水稻科学, 2006, 20(6): 596. DOI: [10.3321/j.issn:1001-7216.2006.06.006](https://doi.org/10.3321/j.issn:1001-7216.2006.06.006).
- [35] 高立志, 张寿洲, 周毅, 等. 中国野生稻的现状调查[J]. 生物多样性, 1996, 4(3): 160. DOI: [10.3321/j.issn:1005-0094.1996.03.007](https://doi.org/10.3321/j.issn:1005-0094.1996.03.007).
- [36] 全国野生稻资源考察协作组. 我国野生稻资源的普查与考察[J]. 中国农业科学, 1984(6): 27.

责任编辑: 何承刚