

# 基于线粒体基因片段核苷酸多态性的 亚洲栽培稻起源进化研究

曹立荣<sup>1</sup>, 魏鑫<sup>2</sup>, 黄娟<sup>3</sup>, 乔卫华<sup>1</sup>, 张万霞<sup>1</sup>, 杨庆文<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; <sup>2</sup> 华中农业大学植物科学技术学院, 武汉 430070; <sup>3</sup> 广西农业科学院水稻研究所, 南宁 530007)

**摘要:** 亚洲栽培稻的祖先是普通野生稻, 已成为世界公认的观点, 然而亚洲栽培稻的 2 个亚种: 粳稻和籼稻是一次起源还是二次起源仍存在很大争议, 它们的起源地是国内还是国外依然是国际学者间争论的焦点。本文通过对 184 份亚洲栽培稻和 203 份普通野生稻 3 段基因序列 *cox3*、*cox1*、*orf 224* 和 2 段基因间序列 *ssv-39/178*、*rps2-trnfM* 的多样性研究, 验证了以下观点: 1、粳稻起源于中国, 籼稻起源于中国和国外; 2、亚洲栽培稻的起源为二次起源, 即普通野生稻存在偏籼和偏粳 2 种类型, 亚洲栽培稻的两个亚种籼稻和粳稻在进化过程中分别由偏籼型的普通野生稻和偏粳型的普通野生稻进化而来。

**关键词:** 线粒体基因组; 基因多样性; 起源; 籼粳分化

## Study on the Origin and Evolution of Asian Cultivated Rice Based on Gene Fragment Nucleotides Diversity of Mitochondrial Genome

CAO Li-rong<sup>1</sup>, WEI Xin<sup>2</sup>, HUANG Juan<sup>3</sup>, QIAO Wei-hua<sup>1</sup>, ZHANG Wan-xia<sup>1</sup>, YANG Qing-wen

(<sup>1</sup> Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;

<sup>2</sup> College of Plant Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070;

<sup>3</sup> Rice Research Institute, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007)

**Abstract:** Wild rice (*Oryza rufipogon*) has been recognized as the ancestor of Asian cultivated rice (*Oryza sativa*). However, where and how cultivated rice originated from wild rice has been debated for a long time in the World. Moreover, whether the two subspecies of Asian cultivated rice, indica and japonica, were domesticated with the ways of single origin or multiple origins was still considerably controversial, and whether they originated from China or abroad was still the focus of debate among international scholars. In this study, 184 accessions of Asian cultivated rice and 203 accessions of *Oryza rufipogon* were sequenced with 3 gene fragments (*cox3*, *cox1*, *orf 224*) and two inter gene regions (*ssv-39/178*, *rps2-trnfM*) in mitochondrial genome of rice were collected. Through the study of gene diversity of the five fragments, the following propositions were verified. First, the origin of japonica is in China, and the origin of indica is not only in China but also in foreign countries. Second, the subspecies of Asian cultivated rice were domesticated with two origins. In other words, common wild rice contains the indica-like and japonica-like types, and the two subspecies were evolved from the indica-like wild rice and the japonica-like wild rice respectively.

**Key words:** mitochondrial genome; gene diversity; origin; Indica-japonica differentiation

水稻是世界上重要的粮食作物, 特别是在发展中国家的营养和食品安全方面起着重要的作用<sup>[1]</sup>。稻属的 22 个种分布在亚洲、非洲、澳洲、中美和南美

洲国家, 是世界上种植面积最广的禾本科作物<sup>[2]</sup>。由于稻属的分布极其广阔, 所以稻属种内的变异也非常广泛, 并且稻属种内亚种间的分类一直是育

收稿日期: 2012-03-07 修回日期: 2012-05-31 网络出版日期:

URL:

基金项目: 农业野生植物资源保护利用技术与示范 (201003021); 转基因水稻环境安全评价技术 (20082x08011-001)

作者简介: 曹立荣, 硕士研究生, 野生稻保护生物学。E-mail: 394019670@qq.com

通信作者: 杨庆文, 博士, 研究员。E-mail: qwyang@mail.caas.net.cn

种学家和遗传学家关注的焦点<sup>[3]</sup>。

尽管水稻的野生近缘种主要分布在热带和亚热带地区,但是现今的水稻已由它的热带原始祖先进化成可以适应各种不同生态环境的栽培型<sup>[4]</sup>。虽然籼稻、粳稻以及野生稻均已完成了测序,然而挖掘野生稻中的优异基因,研究栽培稻的起源和进化以及籼稻和粳稻间的分化仍然是世界各国学者研究的热点。

籼稻和粳稻分别代表了栽培稻中 2 个具有一定生殖隔离的基因库,它们之间在形态性状、农艺性状和生理生化反应等方面存在着明显的差异<sup>[5]</sup>。目前关于水稻进化和亚洲栽培稻的 2 个亚种分化的报道已有很多,然而这些报道多以核基因或叶绿体基因为研究对象,关于线粒体基因,特别是通过 SNPs 对水稻线粒体基因进行研究,揭示水稻进化和分化的报道基本没有。本研究以普通野生稻和亚洲栽培稻的地方品种为研究对象,通过对线粒体 DNA 的多样性分布状况,对亚洲栽培稻的起源和进化进行了探讨。本研究试图在线粒体基因的水平上明确亚洲栽培稻的起源和进化关系,以对今后从水稻线粒体基因的角度揭示水稻起源和进化研究提供有价值的参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

供试材料由 184 份亚洲栽培稻和 203 份普通野生稻组成。92 份国外亚洲栽培稻材料由中国农业科学院作物科学研究所提供,73 份国外普通野生稻材料由国际水稻研究所提供,92 份中国亚洲栽培稻材料和 130 份中国普通野生稻材料均根据我国微核心种质资源名录选取,其中亚洲栽培稻材料种植于中国农业科学院试验田内,普通野生稻材料从南宁和广州 2 个国家野生稻种质圃中采集根茎,盆栽于中国农业科学院试验田内。

本实验所研究的目的基因片段包括:3 段基因序列(*cox1*、*orf 224* 和 *cox3*),2 段基因间隔区序列(*rps2-trnfM*、*ssv-39/178*)<sup>[6]</sup>。

### 1.2 实验方法

根据涂珺等<sup>[7]</sup>和 Mignouna 等<sup>[8]</sup>的报道,对本研究的实验材料进行了线粒体 DNA 的提取。以 NCBI 上已公布的 93-11 (GenBank: DQ167399<sup>[6]</sup>) 的线粒体基因组序列为模板,结合 Primer 5.0 和 Oligo 6 软件,进行引物设计。

实验中 PCR 反应体系为 25  $\mu\text{l}$ ,其中 10  $\times$  Buffer (含  $\text{Mg}^{2+}$ ) 2.5  $\mu\text{l}$ ;正、反向引物各 0.25  $\mu\text{l}$ ;dNTP (2.5 mMol/L) 2  $\mu\text{l}$ ;HiFi *Taq* DNA polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ) 0.25  $\mu\text{l}$ ;DNA 模板 (50 ng/ $\mu\text{l}$ ) 1  $\mu\text{l}$ ;ddH<sub>2</sub>O 18.75  $\mu\text{l}$ 。PCR 反应条件为 95  $^{\circ}\text{C}$  预变性 5 min,94  $^{\circ}\text{C}$  变性 30 s,45 ~ 55  $^{\circ}\text{C}$  (不同的目的片段对温度的要求不同) 变性 30 s,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 1 min,35 个循环,72  $^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行检测,检测条带清晰的样品直接送样测序。

### 1.3 数据分析

用 Chromas 2.23 查看测序结果的峰值图,用 Seqman 5.0 对测序结果进行拼接,用 ClustalX (1.81) 对全部材料的测序结果进行序列比对,用 Dnasp 5.10 计算实验材料的单倍型,并计算遗传多样性和遗传分化的值等,用 Network 4.6 作聚类图,用 MEGA 4.1 作系统进化树,用 PAUP 4.0b10 对 MEGA 系统建树的结果进行验证,最终对结果进行分析。

## 2 结果与分析

通过对 184 份亚洲栽培稻材料和 203 份普通野生稻材料的线粒体 5 段目的基因片段测序后,每份材料的测序结果按照 *cox3*、*cox1*、*orf 224*、*ssv-39/178*、*rps2-trnfM* 的顺序连接到一起形成一条序列进行综合分析,其中获得的最长序列为 4508 bp,最短序列为 4342 bp。

### 2.1 序列多样性分析

通过对 387 份材料的分析,共得到 36 个单倍型,单倍型多样性指数 Hd 为 0.780,核苷酸多样性指数  $\pi$  为 0.00192,其中单倍型频率最高的是单倍型 33 (图 4 中每个圆圈代表一个单倍型。圆圈的大小反映每个单倍型所包含的材料数量),拥有 128 份材料。

针对不同的分组方法,分别对亚洲栽培稻、普通野生稻、籼稻、粳稻、国内普通野生稻及国外普通野生稻的单倍型多样性指数 (Hd)、 $\pi$  值、Tajima's (D) 值进行了计算 (表 1)。 $\pi$  值是衡量不同序列相同位点之间核苷酸平均差异的指标,Tajima's (D) 为中性检验,检验的目的是鉴定目标 DNA 序列在进化过程中是否遵循中性进化模型,即如果 2 个值在统计上被认为差异显著,则说明目标序列的进化不符合中性模型,如果差异不显著,则说明目标序列的进化符合中性模型<sup>[9]</sup>。

表 1 供试材料按不同分组方式获得的序列分析结果

Table 1 Parameters analyzed by sequences in different groups of test materials

材料类型 Group	所含材料份数 No. of accessions	单倍型多样性指数 Hd	不同序列相同位点之间核苷酸的平均差异 $\pi$	中性检验值 Tajima's (D)
粳稻 Japonica	64	0.233	0.00092	-1.03241
籼稻 Indica	120	0.550	0.00171	2.09113 *
亚洲栽培稻 Oryza sativa	184	0.596	0.00212	1.75966
国内野生稻 Domestic wild rice	130	0.709	0.00075	-1.38333
国外野生稻 Foreign wild rice	73	0.749	0.00152	-2.77448 **
野生稻材料 Wild rice	203	0.774	0.00105	-2.70578 **
全部材料 All test materials	387	0.780	0.00192	-2.15571 **

不显著, Not significance,  $0.05 < P$ ; \*, 显著, Significance,  $0.01 < P < 0.05$ ; \*\*, 极显著, Very significant difference,  $P < 0.01$

比较亚洲栽培稻和普通野生稻的多样性指数可以发现(图 1),除了在约 3270 ~ 3670 bp(以下称高变区, hyper variable region, HVR)间的序列。普通野生稻在整条序列上较亚洲栽培稻的遗传多样性要高,之所以出现这样的情况可能与所选的目的基因有关,植物线粒体基因的突变率非常低,此段序列是实验筛选的 HVR 区序列,此 HVR 序列主要集中在 orf 224 和 ssv-39/178 之间,然而这 2 段序列是区分籼稻和粳稻的基因间序列<sup>[6]</sup>,所以亚洲栽培稻在此段

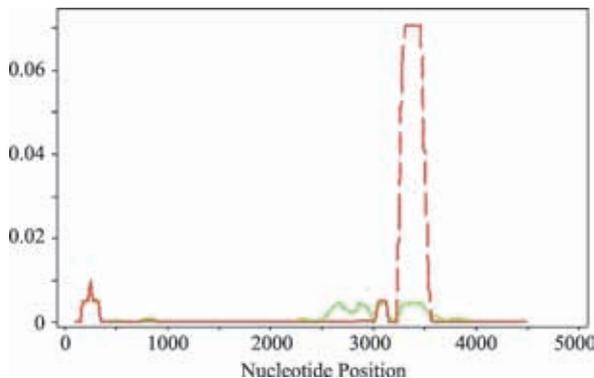


图 1 亚洲栽培稻和普通野生稻之间的基因多样性的比较

Fig. 1 Comparison of gene diversity between Asian cultivated rice and *Oryza rufipogon*

X 轴,多样性指数 X Axis, Diversity index;

Y 轴,核苷酸位置 Y Axis, Nucleotide position

红色,亚洲栽培稻 Red, Asian cultivated rice;

绿色,普通野生稻 Green, *Oryza rufipogon*

HVR 序列间的多态性较普通野生稻高很多。对 120 个籼稻个体和 64 个粳稻个体的 DNA 序列的多样性进行  $\chi^2$  检验,其  $P$  值小于 0.01 ( $\chi^2 = 77.765$ ),说明籼稻和粳稻的 DNA 序列多样性差异呈极其显著,籼稻的 Hd 和  $\pi$  值均大于粳稻,说明籼稻的遗传多样性高于粳稻,此结论已被前人的相关报道所证实<sup>[10]</sup>。从 Tajima's (D) 的变化可以看出,粳稻的 Tajima's (D) 值为负值(-1.03241),籼稻的 Tajima's (D) 为正值(2.09113\*),说明粳稻在进化过程中受到了一些负向的选择压力,而籼稻在进化过程中,不仅多样性更为丰富,同时受到了显著的正向选择压力。

由表 1 可以发现普通野生稻的 Hd 大于亚洲栽培稻,说明普通野生稻比亚洲栽培稻具有更高的遗传多样性<sup>[11]</sup>。但是亚洲栽培稻的  $\pi$  值大于普通野生稻,说明亚洲栽培稻不同序列相同位点之间核苷酸的平均差异较大。通过中性检验可以看出普通野生稻在进化并驯化为亚洲栽培稻的过程中受到了严重的负向选择压力(Tajima's (D) = -2.70578\*\*),而亚洲栽培稻的进化方式为平衡选择,由于遗传漂变的影响,形成了一些不同的单倍型。在全部材料中,对目标线粒体 DNA (mtDNA) 序列进行失配分析,得到了多峰曲线。失配分析的多峰曲线说明,所取水稻的群体处于动态平衡,种群是稳定的,没有经历快速扩张过程,只是在长期进化过程中产生的生殖隔离增加了居群间的分歧<sup>[12]</sup>。由表 1 同时可以看出,籼稻的遗传多样性指数要高于粳稻的遗传多样性指数。通过对平均核苷酸多样性指数的比较可以发现籼稻的核苷酸多样性指数( $\pi = 7.398$ )显著的高于粳稻的平均核苷酸多样性指数( $\pi = 0.00092$ )。

以上结果可以看出水稻线粒体基因组的基因多样性分布情况。首先,籼稻线粒体基因组的基因多样性要高于粳稻;其次,水稻线粒体基因组功能基因的多样性情况相对较低,这可能与功能基因要保持线粒体的特有功能有关。

## 2.2 基因序列的单倍型分析

系统发生分析是对过去已经发生的进化时间的模拟分析,任何软件都不能保证所得到的结论一定是真实的进化历史过程,因此在进化系统的发生分析中就往往需要采用不同的分析方法同时进行分析<sup>[13]</sup>。

**2.2.1 亚洲栽培稻单倍型分析** 用 Dnasp 5.10 分析亚洲栽培稻,共得到 10 个单倍型,单倍型多样性指数为 0.596,将分析后的单倍型数据利用 Network

软件作图(图2)。由图2可以看出,10个单倍型大致可以分为3类:hap1、hap2聚为一类(类群I), hap3、hap8、hap9、hap10聚为一类(类群II), hap4、hap5、hap6、hap7聚为一类(类群III)。类群I主要以粳类型为主,类群III主要以籼类型为主,而类群II则含有3个粳稻个体和11个籼稻个体,且类群II和类群III的亲缘关系较近。由此可见籼粳的分化不仅在核基因组和叶绿体基因组中存在,同时在线粒体基因组中也存在。

由图2可以看出,在聚类过程中,一些籼粳类型的个体并没能区分开,而是混为一个类群,出现这种

现象的原因可能是:籼稻和粳稻在长期的进化过程中,发生了基因交流,也可能是因为在根据程氏指数法判定生理生态标准时,存在着一些误差。然而必须指出的是,根据程氏指数法对水稻籼粳判定的性状均由核基因所决定,然而水稻3套基因组(核基因组、叶绿体基因组、线粒体基因组)之间,籼粳分类的判定具有不一致性<sup>[14]</sup>。由于本研究中籼稻个体有120个,粳稻个体有64个,所以在整个Network图中,籼稻所占的比例要比粳稻大约2倍,进而使得类群I中,籼稻所占的比例也显得比较大,但是类群I中仍然以粳稻为主。

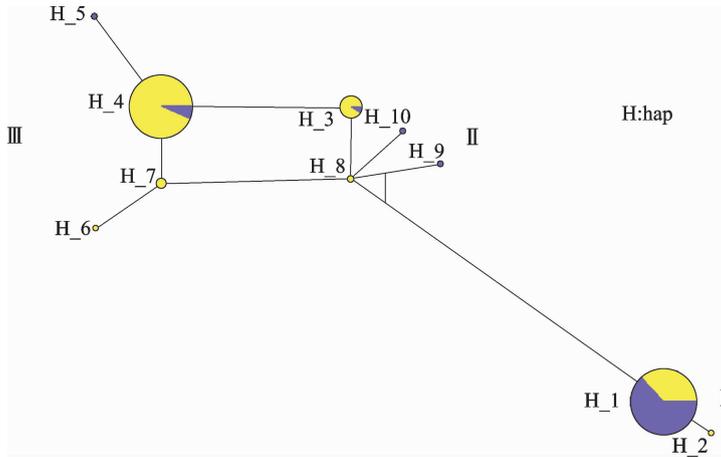


图2 64份粳稻和120份籼稻单倍型Network图

Fig. 2 Haplotype clustering scheme is drawn by Network for 64 indica and 120 japonica materials

黄色表示籼稻类型,蓝色表示粳稻 Yellow represents indica, and blue represents japonica

用MEGA软件中的neighbor-joining法对10个单倍型构建系统发育树(图3),可以看出聚类结果与Network作图结果一致,也是分为了3类:hap1、hap2聚为一类(类群I), hap3、hap8、hap9、hap10聚为一类(类群II), hap4、hap5、hap6、hap7聚为一类(类群III)。由图3可以看出,在进化树中,各进化分支间的估算值都很高(除类群II中2个分支的估算

值小于70,之所以出现这样的结果,可能是因为取样过程中,覆盖的基因型不全;也可能是因为在进化过程中基因的丢失,或是在保护过程中,保护不全面,发生了单倍型的丢失),说明聚类的结果可信度较高。

用PAUP软件对Network软件作图的结果进行验证,发现Network、MEGA、PAUP三者作图结果一致。因此本研究通过水稻线粒体基因的多样性研究,对这10个单倍型的聚类结果和类群的划分基本稳定、可靠。所以通过对Network、MEGA和PAUP软件作图结果的综合分析,可以对籼稻和粳稻的分化进行探讨。

目前,籼稻和粳稻的起源和进化,是一次起源还是二次起源仍然存在着争议,从本研究的结果可以看出,籼稻和粳稻很明显的分为2个不同的群体,所以本研究支持二次起源学说,即籼稻和粳稻的祖先种来自2个不同的普通野生稻群体,此结果也得到了前人一些实验的证实<sup>[15]</sup>。

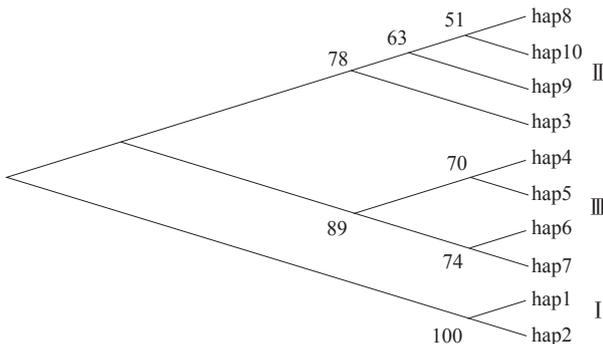


图3 10个单倍型用MEGA所作进化树

Fig. 3 10 haplotypes evolutionary tree made by MEGA

**2.2.2 全部材料的单倍型分析** 用 Dnasp 对全部材料分析,共得到 36 个单倍型,单倍型多样性指数为 0.78,将分析后的单倍型数据利用 Network 软件作图(图 4),从图 4 可以看出,36 个单倍型可以大致分为 3 类。hap30、hap31、hap32 聚为一

类(类群 I), hap1、hap2、hap3、hap4、hap5、hap6、hap7、hap33、hap34、hap35、hap36 聚为一类(类群 III),其余的几个单倍型聚为一类。其中类群 I 以粳稻类型为主,其余 2 个类群以籼稻类型为主。

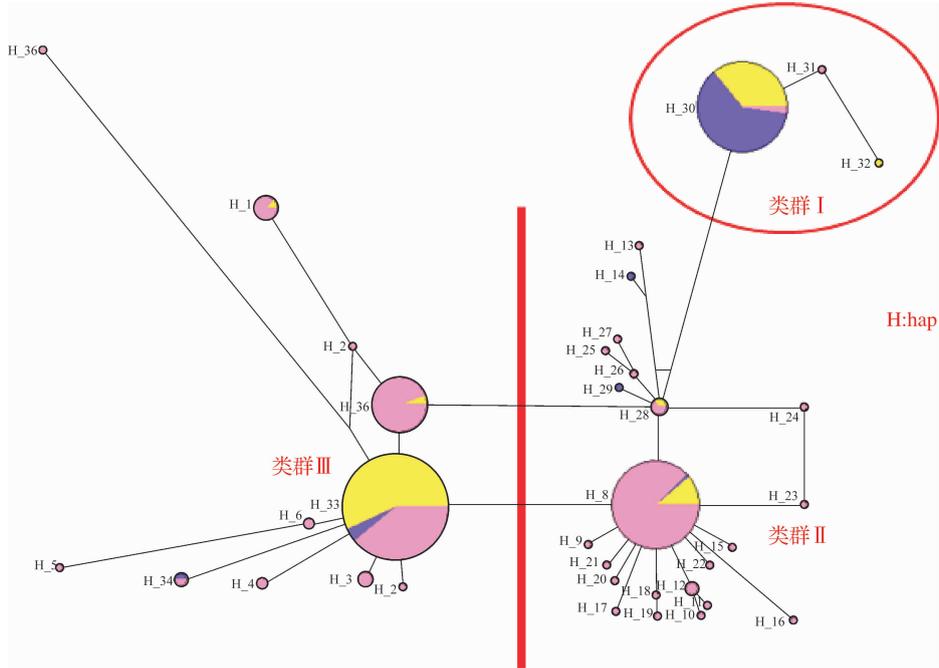


图 4 全部材料的单倍型的 Network 分析图

Fig. 4 Haplotype analysis of all plant materials by Network

黄色,籼稻 Yellow, indica;蓝色,粳稻 Blue,japonica;粉色,野生稻 Pink,*Oryza rufipogon*

用 MEGA 软件中的 neighboring-joining 法对全部材料的 36 个单倍型构建系统发育树(图 5),从图 5 可以看出,36 个单倍型可以分为 4 个类群,与 Network 作图结果进行比较可以发现,在 Network 作图结果中,类群 I 和类群 III 聚在一起的个体均没有发

生变化,其 2 个群组分别对应于 MEGA 作图结果中的类群 I 和类群 IV。唯一的变化是 Network 作图结果中的类群 II,类群 II 在 MEGA 构建系统发育树时被分为了 2 个类群。

用 PAUP 软件对 Network 软件作图结果进行验证,发现 36 个单倍型也被分为了 4 个类群,但是与 MEGA 不同的是在类群 II 和类群 III 的划分上存在一些不一致,在 MEGA 中 hap10、hap11、hap12 与类群 II 中的材料聚在一起,然而,在 PAUP 中 hap10、hap11、hap12 与类群 III 中的 hap13、hap14 的亲缘关系更近,故在 PAUP 中 hap10、hap11、hap12 同 hap13、hap14 聚在类群 III 中。

由上述分析可以看出,类群 I 和类群 IV 的划分相对比较稳定。而 MEGA 软件作图结果中的类群 II 和类群 III 均为籼稻类群,可以聚为一大类;类群 I 为粳稻类群,类群 IV 中的材料可能是籼型水稻和粳型水稻的过渡类型。

本研究以 3 个类群——籼类群、粳类群、籼粳类群为基准,可以得到如下结论:类群 I 中的野生稻为粳稻的直接祖先,或是类群 I 中的普通野生稻和粳

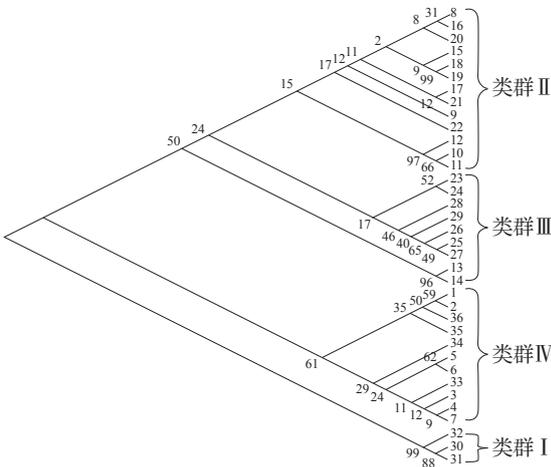


图 5 全部材料的单倍型用 MEGA 所作进化树

Fig. 5 Haplotype evolutionary tree of all plant materials by MEGA

稻的亲缘关系较近。类群Ⅱ和类群Ⅲ中的普通野生稻为籼稻的祖先种,类群Ⅳ中的普通野生稻为类群Ⅳ的直接祖先或是与类群Ⅳ亲缘关系较近的祖先种类群。其中类群Ⅰ为粳型类群,然而类群Ⅰ中的普通野生稻均来自中国,所以本研究认为亚洲栽培稻的粳亚种起源于中国。大量研究报道已经证实,亚洲栽培稻的粳亚种的起源地是中国<sup>[16]</sup>。由以上结果可以看出,中国不仅是亚洲栽培稻粳亚种的起源地,同时也是籼亚种的起源地之一。

### 3 讨论

随着分子技术的发展,越来越多的学者对植物遗传机制的研究不再是仅停留在核 DNA 水平上,而是更多的综合细胞质 DNA 进行分析,进而有大量的实验对 mtDNA 和叶绿体 DNA (cpDNA) 进行了研究。Plamer 等<sup>[17]</sup>通过对十字花科 2 个属的 6 个种的线粒体进化速度和进化模式的研究指出,植物线粒体的基因突变率比叶绿体慢约 4 倍,然而 mtDNA 的重排速率却比 cpDNA 的重排速率要高很多。虽然 cpDNA 和 mtDNA 存在平行进化关系<sup>[18]</sup>,但是植物叶绿体和线粒体无论是在形体上还是在进化模式上都有很大的不同<sup>[19]</sup>,并且叶绿体基因组在大小和重排上变化较小,相对比较保守,而线粒体基因组却变化极大,但是叶绿体的基因突变率却远高于线粒体基因。

通过对日本晴的线粒体基因组的研究发现,水稻线粒体基因组长约 490520 bp,其中 G + C 的平均含量为 43.8%,水稻线粒体基因组含有 35 个已知蛋白的基因、3 个核糖体 RNA 基因、2 个假核糖体蛋白基因、17 类 tRNA 基因以及 5 个假 tRNA 基因<sup>[20]</sup>。本文以 *cox3*、*cox1*、*orf 224*、*ssv-39/178* 以及 *rps2-trn-fM 5* 段序列为研究对象,对水稻线粒体基因组的遗传多样性进行了研究,进而对亚洲栽培稻的起源和进化进行了探讨。通过将 5 段序列连接到一起进行的综合分析发现:1、亚洲栽培稻的 2 个亚种——籼稻和粳稻为二次起源;2、亚洲栽培稻的粳亚种起源于中国,籼亚种起源于中国和国外地区。

从表 1 可以看出,亚洲栽培稻籼亚种的遗传多样性较粳亚种要高,Zhang 等<sup>[21]</sup>研究贵州 *Oryza sativa* L. 的遗传多样性时发现,粳稻形态上的多样性要高于籼稻,但是在分子水平上,籼稻的遗传多样性要高于粳稻。籼稻和粳稻的起源和分化,始终是各国学者争论的焦点,籼稻和粳稻是一次起源还是二次起源,仍存在很大的争议。本研究对籼稻和粳稻进行了聚类分析,结果表明:粳稻类群和籼稻类群在聚类时,为 2 个相互

独立的类群,此结论支持籼粳二次起源学说。目前,籼粳二次起源学说也已得到了很多研究的支持<sup>[22-25]</sup>。

普通野生稻是亚洲栽培稻的祖先,其遗传多样性高于亚洲栽培稻。由于漫长的进化过程,野生稻形成了十分丰富的遗传多样性,并具有栽培稻不具有的或是栽培稻已经消失的优异基因,是栽培稻育种中宝贵的遗传资源,同时也是研究稻种起源、衍化和分化不可缺少的实验材料<sup>[26]</sup>。普通野生稻向栽培稻的演化过程中,丢失了很大一部分等位基因,并且普通野生稻中尚有未被利用的基因<sup>[27]</sup>。因为人类生产活动对普通野生稻生长环境造成了严重的破坏,所以普通野生稻的生存条件面临着极大的挑战。尽管国家对现有的普通野生稻采取了一些保护措施,也取得了一定的成绩,但是普通野生稻仍然有大量基因的丢失。本研究可以看出,对栽培稻进行聚类时,聚类各分支的估计值都比较高,但是当栽培稻和野生稻一起聚类时,聚类各分支的估计值却都很小。普通野生稻是亚洲栽培稻的祖先已得到公认,所以在栽培稻和野生稻一起聚类分析时,聚类的估计值理应有连续的变化,且估计值应该都比较高,然而本研究之所以出现如此大的差异,是因为普通野生稻有大量的基因丢失且非常严重,甚至普通野生稻有大量单倍型的丢失,因此对普通野生稻的保护工作应该受到更高的重视,以防止基因的丢失。

用 MEGA 软件对 387 份材料构建系统发育树,用 PAUP 软件对构建的系统发育树进行验证,发现籼稻、粳稻的分类相对比较稳定,类群Ⅰ为粳稻类型,类群Ⅳ可能为籼稻和粳稻的过渡类群,类群Ⅱ和类群Ⅲ都为籼稻类群,此结论与 Network 作图分类的结果相一致。由以上结果可以得出如下结论:中国是栽培稻起源演化的原始中心之一,粳稻起源于中国,籼稻起源于中国和国外,此结论在前人的实验中也得到了证实<sup>[28-29]</sup>。籼粳起源问题一直是世界各国学者关注的问题,籼粳的起源不仅在国际上存在很大的争论——粳稻起源于中国已得到世界各国学者的认可,然而籼粳起源争论的焦点主要是围绕籼稻的起源,到底是起源于中国还是起源于印度,从本研究的结果可以看出,中国为不仅为粳稻的起源地,同时也是籼稻的起源地之一。同时籼稻的起源在国内也存在着很大的争论——丁颖老先生<sup>[30-31]</sup>曾经根据我国稻作的历史以及通过对普通野生稻和亚洲栽培稻的比较分析最早提出了华南起源学说;随后柳子明<sup>[32]</sup>根据云南独特而丰富的气候类型,以及普通野生稻不仅存在于云南而且遗传多样性十分丰富,而提

出了云南起源学说;严文明<sup>[33]</sup>通过对浙江省出土的栽培稻的古稻种的鉴定,提出了长江中下游起源学说;20世纪90年代,张居中<sup>[34-35]</sup>则提出了包括长江流域、淮河流域,及华南地区在内的南中国的起源学说,但是随着南中国起源学说的提出,不同的学者通过不同的研究,一一进行了排除,将南中国的范围进一步缩小到了淮河上游-长江中游<sup>[36-38]</sup>。尽管各种学说都有相应的实验支持,但是始终无法对籼粳的起源地达到共识,因此籼粳问题仍有待进一步的研究。

在亚洲栽培稻中,籼稻和粳稻的比例接近1:1。本研究的结果可以看出,普通野生稻中,线粒体基因组的偏粳型却很少,之所以出现这样的情况,不仅与水稻核基因、叶绿体基因组的籼粳型与线粒体基因组的籼粳型不一致<sup>[14]</sup>之外,还可能与粳型 mtDNA 进化突变有关<sup>[28,39]</sup>。

本研究仅选取了5个基因片段约4.5 kb,对水稻线粒体基因的多样性进行了研究,相对于水稻线粒体基因组庞大的体系来说,说服力度显得小了很多,但是本研究通过对水稻线粒体基因组基因多样性的研究,进而对水稻起源和进化进行的探讨仍然存在一定的说服作用。水稻线粒体基因组有特有的性质,因此,要通过水稻线粒体基因组基因的遗传多样性分布来研究水稻的起源和进化情况,应加大研究的力度,扩大研究的目标片段,使得研究更加地精确,说服力也更加地有力。

## 参考文献

- [1] Xiong Z Y, Zhang S J, Wang Y Y, et al. Differentiation and distribution of indica and japonica rice varieties along the altitude gradients in Yunnan Province of China as revealed by InDel molecular markers[J]. Genet resour crop evol, 2010, 57: 891-902
- [2] Hisako O, Chaoyang C, Isaku O, et al. Rice retroposon *p-SINE1* and origin of cultivated rice[J]. Jpn Soc Breed, 2004, 54: 1-11
- [3] Glaszmann J C. Isozymes and classification of Asian rice varieties[J]. Theor Appl Genet, 1987, 74: 21-30
- [4] Chang T T, Oka H I. Genetic variousness in the climatic adaption of rice cultivars[M]. Proceeding of the symposium on climate and rice, 1976: 87-111
- [5] 蔡星星, 刘星, 仇吟秋, 等. 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[J]. 复旦学报, 2006, 45(3): 309-315
- [6] Tian X J, Zheng J, Hu S N, et al. The rice mitochondrial genomes and their variations[J]. Plant physiol, 2006, 140: 401-410
- [7] 涂琚, 朱英国. 水稻线粒体 DNA 的提取和分析[J]. 氨基酸和生物资源, 1997, 19(3): 4-7
- [8] Mignouna H, Virmani S S, Briquet M. Mitochondrial DNA modifications associated with cytoplasmic male sterility in rice[J]. Theor Appl Genet, 1987, 74: 666-669
- [9] 陈友桃. 中国稻种资源 *Waxy* 基因多样性研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2010
- [10] Zhang Q F, Saghari M A, Lu T Y. Genetic diversity and differentiation of indica and japonica rice detected by RFLP analysis[J].

- Theor Appl Genet, 1992, 83: 495-499
- [11] 段世华, 李绍清, 李绍波, 等. 野生稻与亚洲栽培稻的遗传多样性[J]. 作物学报, 2009, 35(3): 457-474
- [12] Rogers A R, Harpending H. Population growth makes waves in the distribution of pairwise differences[J]. Mol Biol Evol, 1992, 9: 552-569
- [13] 王勇, 陈克平, 姚勤. 系统发生分析软件 PAUP 和 TreePuzzle 使用方法介绍[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(2): 818-821, 829
- [14] 孙传清, 袁平荣, 吉村淳. 亚洲栽培稻的核 DNA、线粒体 DNA 和叶绿体 DNA 籼粳分化的比较研究[J]. 作物学报, 1998, 24(6): 677-686
- [15] Gurdev S K. Origin, dispersal, cultivation and variation of rice[J]. Plant Mol Biol, 1997, 35: 25-34
- [16] Hiroshi I. Why are there Indica type and Japonica type in rice? -- history of the studies and a view for origin of two types[J]. Rice Sci, 2009, 16(1): 1-13
- [17] Palmer J D, Herbon L A. Plant Mitochondrial DNA Evolves Rapidly in structure, but Slowly in sequence[J]. J Mol Evol, 1988, 28: 87-97
- [18] Second G, Wang Z Y. Mitochondrial DNA RFLP in genus *Oryza* and cultivated rice[J]. Genet Resour Crop Evol, 1992, 39: 125-140
- [19] Palmer J D. Contrasting modes and tempo land plant organelles[J]. Trends Genet, 1990, 6: 115-120
- [20] Notsu Y, Masood S, Nishikawa T. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa*) mitochondrial genome; frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants[J]. Mol Genet Genomic, 2002, 268: 434-445
- [21] Zhang D L, Zhang H L, Wei X H, et al. Genetic structure and diversity of *Oryza Sativa* L. in Guizhou, China[J]. Chin Sci Bull, 2007, 52: 343-351
- [22] Chen C Y, Motohashi R, Tsuchimoto S. Polyphyletic Origin of Cultivated Rice; Based on the Interspersion pattern of *SINEs*[J]. Mol Biol Evol, 2003, 20(1): 67-75
- [23] 庄杰云, 钱惠荣, 林鸿宣, 等. 应用 RFLP 标记研究亚洲栽培稻的起源与分化[J]. 中国水稻科学, 1995, 9(3): 135-140
- [24] 孙传清, 王象坤, 吉村淳, 等. 普通野生稻和亚洲栽培稻核基因组的 RFLP 分析[J]. 中国农业科学, 1997, 30(4): 37-44
- [25] 孙传清, 吉村淳. 普通野生稻和亚洲栽培稻叶绿体 DNA 的籼粳分化[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(4): 319-324
- [26] 何予卿, 张宇, 孙梅, 等. 利用 ISSR 分子标记研究栽培稻和野生稻起源关系[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(2): 123-127
- [27] 张晓丽, 郭辉, 王海岗, 等. 中国普通野生稻与栽培稻种 SSR 多样性的比较分析[J]. 作物学报, 2008, 3(4): 591-597
- [28] 孙传清, 王象坤, 李自超. 从普通野生稻 DNA 籼粳分化看亚洲栽培稻的起源与进化[J]. 农业考古, 1998 1(1): 21-29
- [29] 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]. PNAS, 2006, 103(25): 9578-9583
- [30] 丁颖. 中国栽培稻种的起源及其演化[J]. 中山大学农学院农艺专刊, 1949(7): 1-2
- [31] 丁颖. 中国栽培稻种的起源问题[J]. 农业学报, 1957, 8(3): 1-2
- [32] 柳子明. 中国栽培稻的起源及其发展[J]. 遗传学报, 1975, 2(1): 21-29
- [33] 严文明. 中国稻作农业的起源[J]. 农业考古, 1982(1): 1-2
- [34] 张居中. 贾湖史前稻作遗存与黄淮地区史前农业[J]. 农业考古, 1994(1): 68-75
- [35] 张居中. 也论中国栽培稻的起源于东传[J]. 农业考古, 1996(1): 85-93
- [36] 王象坤, 孙传清. 中国栽培稻起源与演化专集[M]. 北京: 中国农业大学出版社, 1996: 8-14
- [37] 汤圣祥, 魏兴华, 李自超, 等. 中国栽培稻同工酶的遗传多样性[J]. 中国农业科学, 2002, 28(2): 203-207
- [38] 黄燕红, 孙新立, 王象坤. 中国栽培稻遗传多样性中心和起源研究[J]. 植物遗传资源学报, 2005, 6(2): 125-129
- [39] 王荣升, 魏鑫, 曹立荣, 等. 基于叶绿体基因多样性的中国水稻起源进化研究[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(5): 686-693