

云南疣粒野生稻的居群遗传结构及其 在原位保护中的意义*

高立志^{①②} 葛 颂^② 洪德元^② 张炯伟^③
罗庆延^③ 陶国达^④ 许再富^④

(①中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081; ②中国科学院植物研究所系统与进化植物学开放研究实验室, 北京 100093; ③思茅地区农业科学研究所, 云南思茅 665000; ④中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666100)

摘要 用 12 种酶系统 17 个等位酶位点对采自云南思茅地区疣粒野生稻 *Oryza meyeriana* (Zoll. et Merr. ex Steud.) Baill. 7 个居群的 164 个个体进行了遗传多样性的研究. 相对于以前报道过的具有相同生活史特性和繁育系统的种子植物和稻属中的其他种类, 疣粒野生稻的遗传多样性水平极低 ($A = 1.1$, $P = 8.0\%$, $H_o = 0.004$ 和 $H_e = 0.015$), 但居群间的遗传分化较大. F_{ST} 高达 0.649, 表明在遗传变异总量中的 64.9% 存在于居群间. 对这样在较小的地理区域内居群间就呈现出剧烈遗传分化的物种来说, 大多居群均有保护的价值. 因此, 进行原位保护时原则上应建立较大的自然保护区, 涉及较多数目的居群. 同时, 提出了在云南进行原位保护时应优先考虑的地点.

关键词 疣粒野生稻 等位酶分析 云南 居群遗传结构 原位保护

野生稻是水稻遗传改良的基础, 是中国和其他大多数发展中国家最重要的植物遗传资源^[1]. 疣粒野生稻 *Oryza meyeriana* (Zoll. et Merr. ex Steud.) Baill. 广泛分布于南亚和东南亚, 在中国则产于云南、海南和台湾^[2]. 由于人口急剧膨胀和热带森林的大量被砍伐, 其天然居群已因生态环境的严重破坏而处于濒危状态^[3~5]. 由于疣粒野生稻中蕴藏着在未来水稻育种中极具潜力的独特基因, 例如, 耐荫、抗旱和抗白叶枯病等, 因此, 对其研究与保护已开始引起国际水稻界的重视^[2, 3]. 然而, 迄今未见有关遗传多样性研究的报道. 研究疣粒野生稻的居群遗传结构, 是制定其原位保护策略的基础. 而且, 中国地处该物种分布的边缘, 研究与保护边缘居群对维持整个物种基因库的完整性无疑具有十分重要的意义.

等位酶分析是目前研究天然居群遗传结构十分有效的方法^[6, 7]. 本研究利用等位酶技术, 对我国人为破坏小、现存面积最大、位于云南省思茅地区的 7 个居群进行了研究, 旨在了解疣粒野生稻的居群遗传结构, 为制定其原位保护策略提供科学依据.

1998-03-26 收稿, 1998-07-20 收修改稿

* 中国科学院“九五”重大项目 B(K195+ B7-102) 和国家自然科学基金资助项目(批准号: 39800013)

1 材料和方法

1.1 材料来源

7 个居群的活植株采于云南省思茅地区(表 1)。由于该物种有很强的无性繁殖能力,野外取样时株间距离至少 5 m,以防止取样重复。于 1994 年 10 月在每个居群中随机取 20 个左右的个体,在野外编号,并用小盆移栽于中国科学院西双版纳热带植物园。由于在孟连县公信居群中仅残存少数个体,所有的个体均已分株取样。于 1995 年 3 月分株采集嫩叶(冰盒保存),乘飞机带回实验室。每个单株中取 0.05 g 的新鲜材料,加入 100 μ L 的 Tris-HCl 提取缓冲液^[8],冰镇研磨,并用 3 mm $\times$ 8 mm 的滤纸沁子吸取提取液,保存于- 70 $^{\circ}$ C 的低温冰箱中备用。

表 1 疣粒野生稻 7 个居群的遗传多样性指标

居群地	样本大小/株	<i>A</i>	<i>P</i>	<i>H</i> _o	<i>H</i> _e
1 思茅竹林	17	1.1	5.6	0.000	0.006
2 孟连公信	8	1.1	5.6	0.000	0.028
3 思茅澜拉	29	1.2	16.7	0.002	0.027
4 澜沧雅口锰矿	19	1.1	5.6	0.003	0.003
5 澜沧雅口热水塘	40	1.1	11.1	0.001	0.014
6 澜沧谦六铜厂	24	1.1	5.6	0.019	0.016
7 澜沧雅口纸厂	19	1.1	5.6	0.000	0.011
平均值	22	1.11	7.97	0.004	0.015

1.2 淀粉凝胶电泳

采用水平式淀粉凝胶电泳技术对 20 种酶系统进行检测,获得谱带清晰且符合遗传分离组合规律的 12 种酶系统共 17 个等位酶位点(表 2)。所用水解淀粉为美国 Sigma 公司产品(S-4501),淀粉胶浓度为 12%。凝胶缓冲液系统均根据 Soltis^[8]和 Glaszmann 等人^[9]方法制作。酶的组织化学染色法,按文献[8]。

表 2 淀粉凝胶电泳酶凭谱带分析

酶系统	缩写名	酶代号	缓冲液系统	位点数目
Aspartate aminotransferase	AAT	EC 2.6.1.1	S6	2
Alcohol dehydrogenase	ADH	EC 1.1.1.1	GI	1
Diaphorase	DIA	EC 1.6.2.2	S6	2
Glutamate dehydrogenase	G3PDH	EC 1.4.1.2	GI	1
Isocitrate dehydrogenase	IDH	EC 1.1.1.42	GI	1
Malate dehydrogenase	MDH	EC 1.1.1.37	S1 [#]	3
Malic enzyme	ME	EC 1.1.1.40	S1 [#]	1
Phosphogluconate dehydrogenase	6PGD	EC 1.1.1.44	S1 [#]	1
Phosphoglucoisomerase	PGI	EC 5.3.1.9	S6	1
Phosphoglucomutase	PCM	EC 2.7.5.1	GI	1
Shikimate dehydrogenase	SKD	EC 1.1.1.25	GI	1
Triosephosphate isomerase	TPI	EC 5.3.1.1	S6	2

1.3 数据分析

电泳数据用 Biosys-1 软件 1.7 版本^[10]在 IBM-PC 机上进行运算。输入全部个体的基因型并运算出等位基因频率,进而计算出遗传多样性参数(包括平均等位基因数目 *A*,多态位点比率 *P*,观察杂合度 *H*_o和期望杂合度 *H*_e), Nei^[11]的遗传一致度(*I*)和 *F*-统计值;用 Wright^[12]的

公式 $F_{ST} = 1 / (1 + 4 N_m)$ 来近似估算基因流动作用值(N_m).

2 结果与讨论

2.1 等位酶位点和等位基因频率

在所用 12 个酶系统检测到的 17 个等位酶位点中, 仅有 5 个为多态位点(表 3). PGM 在二倍体种子植物中通常有 2 个位点^[13], 但在疣粒野生稻中仅检测到 1 个; 在稻属的其他物种中, 通常报道 G3PDH 和 PGD 均有 2 个位点^[14], 但我们仅观察到 1 个; PGI 的谱带式样说明在该酶系统上发生了位点的重复, 但由于分离较差, 本研究仅用位点 Pgi-1.

表 3 疣粒野生稻 7 个居群 17 个位点的等位基因频率

等位基因 位点	居群						
	1	2	3	4	5	6	7
Aat-1a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
-3a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Adh-a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Di-a	0.000	0.000	0.000	0.000	0.013	0.000	0.000
-b	1.000	1.000	1.000	1.000	0.988	0.833	1.000
-c	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.167	0.000
Di-a-2a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Gdh-a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Idh-a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mdh-1a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Mdh-2a	1.000	1.000	0.103	0.000	1.000	1.000	1.000
-2b	0.000	0.000	0.897	1.000	0.000	0.000	0.000
Mdh-3a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Me-a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pgd-a	0.941	1.000	0.966	1.000	0.875	1.000	0.895
-b	0.059	0.000	0.034	0.000	0.125	0.000	0.105
Pgi-1a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Pgm-a	1.000	0.375	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
-b	0.000	0.625	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
Skt-a	0.000	0.000	0.086	0.026	0.000	0.000	0.000
-b	1.000	1.000	0.879	0.974	1.000	1.000	1.000
-c	0.000	0.000	0.034	0.000	0.000	0.000	0.000
Tpi-1a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000
Tpi-2a	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000	1.000

2.2 居群的遗传变异水平

疣粒野生稻在居群内的遗传多样性水平很低(表 1). 远低于以前报道过的多年生草本、靠重力散播种子和风媒植物的遗传变异平均水平($P = 28.0\%$, $H = 0.096$; $P = 29.8\%$, $H = 0.101$ 和 $P = 49.7\%$, $H = 0.148$)^[7]; 就稻属的其他物种而言, Barbier^[15, 16] 报道泰国普通野生稻 *O. rufipogon* Griff. 的多年生居群的遗传多样性水平为 $A = 1.98$ 和 $H = 0.209$, 而一年生居群则为 $A = 1.58$ 和 $H = 0.099$, 明显高于疣粒野生稻; 本文结果也明显低于中国另外 2 种野生稻的遗传变异水平. 例如, 根据我们的初步检测, 普通野生稻 *O. rufipogon* Griff. $A = 1.33$, $P = 22.7\%$ 和 $H = 0.068$; 而药用野生稻 *O. officinalis* Wall. et Watt. $A = 1.16$, $P = 16.2\%$ 和 $H = 0.056$. 也就是说, 疣粒野生稻居群的等位酶变异在中国的 3 种野生稻中最低.

2.3 居群的遗传结构

了解遗传变异在居群间的分布是保护濒危物种和制定作物遗传资源取样策略的重要依据. 我们用 Wright 的 F -统计探查疣粒野生稻遗传变异的分布(表 4), F_{IS} 为 0.754, 表明大多数居群在居群内偏离了哈迪-温伯格平衡; F_{IT} 为 0.914, 表明杂合子在该物种的居群间处于不平衡状态, 并且杂合子过剩; 而 F_{ST} 高达 0.649, 表明在遗传变异总量中 64.9% 的变异存在于居群间, 远高于文献[7]报道的多年生草本、风媒和靠重力散播的种子植物的平均值(分别为 23.3%, 0.99% 和 27.7%), 也高于中国普通野生稻的 F_{ST} 值(31.00%). 等位基因的分布也进一步说明, 由表 3 可见, 等位基因在居群间的分布并不平衡. 例如, 稀有等位基因 $Dia-1a$ 以低频率(0.013)存在于澜沧雅口热水塘居群, 而 $Dia-1c$ (0.167) 分布于与其相距不足 10 km 的澜沧谦六铜厂居群中; $Mdh-2b$ 以 0.897 和 1.000 的频率分布于思茅澜拉居群与澜沧锰矿居群; $Pgm-b$ (0.625) 则仅分布在孟连公信居群中. 因此, 在较小地理区域的居群间就出现明显的遗传分化. 从 Nei 的遗传一致度(I) 看来(表 5), 所研究的居群间的平均值高达 0.969, 这是 7 个居群共享 12 个单态位点和多态位点中的 4 个等位基因所致. 我们的结果表明各对居群间的遗传一致度与地理距离显著地呈负相关, 即相距越近, 居群间的遗传一致度就越高, 因而云南疣粒野生稻的居群遗传结构符合一种“隔离-距离”模型^[17]. 这种遗传结构在图 1 中已得到了反映.

表 4 疣粒野生稻 7 个居群 5 个多态位点上的居群遗传分化指标及显著性检验

位点	F_{IS}	F_{IT}	F_{ST}
$Dia-1$	- 0.185	- 0.025	0.135***
$Mdh-2$	1.000	1.000	0.933***
Pgd	1.000	1.000	0.053*
Pgm	1.000	1.000	0.588***
Skl	0.677	0.699	0.068**
平均值	0.754	0.914	0.649***

* $p < 0.1$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$

表 5 疣粒野生稻 7 个居群间 Nei 非偏差的遗传一致度矩阵

编号	居群地	1	2	3	4	5	6	7
1	思茅竹林		0.979	0.954	0.944	1.000	0.999	1.000
2	孟连公信			0.932	0.922	0.978	0.977	0.978
3	思茅澜拉				0.999	0.954	0.952	0.954
4	澜沧雅口锰矿					0.943	0.943	0.944
5	澜沧雅口热水塘						0.998	1.000
6	澜沧谦六铜厂							0.998
7	澜沧雅口纸厂							

总之, 疣粒野生稻的遗传变异水平较低, 在较小地理区域内的居群间却呈现较高水平的遗传分化. 导致这种居群遗传结构形成的可能原因是: (1) 云南处于疣粒野生稻分布的边缘^[2], 它们可能仅由少量的奠基者从其遗传多样性中心扩散形成, 遗传背景受到“奠基者效应”的强烈影响而较为单一; (2) 该物种是旱生植物, 借水力传播种子的可能性小, 而借助重力散布种子的特点可能不利于居群间甚至居群内的基因流动, 从而导致明显的遗传分化. Wright^[12] 认为居群间的基因流动值若小于 $1(N_m < 1)$, 有限的基因流是促使居群发生遗传分化的主因, 我们

所获的结果($N_m = 0.163$)也表明该物种居群遗传分化的主要原因可能是基因流动受阻所致;
(3) 我们的野外观察表明该物种有克隆生长(即营养繁殖)的特性。通过克隆繁殖会导致有效居群变小, 结果在貌似庞大的居群内发生了严重的近交, 导致遗传多样性丧失。

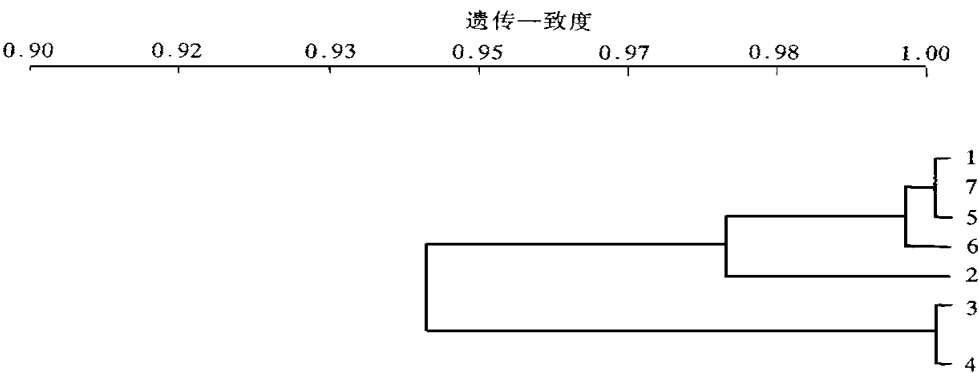


图 1 疣粒野生稻 7 个居群遗传一致度的聚类分析图

2.4 原位保护中的意义

边缘居群的保护是进行疣粒野生稻基因库保护的关键。我们的结果表明有 64.9% 的遗传多样性存在于居群间, 不仅等位基因频率在居群间有差异, 而且有些等位基因在居群间分布不平衡。对这样在较小地理区域内居群间就呈现出较大遗传分化的物种来说, 大多居群均有保护的价值。因此, 进行原位保护时原则上应建立较大的自然保护区, 涉及较多数目的居群。我们的研究进一步表明, 原位保护应优先考虑孟连公信居群和澜沧雅口锰矿居群。它们间的遗传距离最远($I = 0.922$), 说明等位基因频率的差异最为显著, 最具有保护价值。值得一提的是, 孟连公信居群分布于与缅甸相距不足 5 km 的南卡江边次生林下, 与其他居群明显隔离, 不仅居群很小, 而且生态环境所受的威胁也最为严重, 应列为云南地区原位保护的关键地点之一; 同时, 还应优先考虑保护遗传变异相对丰富的居群, 诸如思茅市澜拉和澜沧雅口热水塘居群。然而, 实施原位保护时究竟要选择多少个居群, 每个居群要涉及多大面积才足以维持疣粒野生稻边缘居群的进化, 从而最大限度地保护其遗传多样性? 尚有待于进一步的野外调查和全面的遗传多样性研究。其中要特别注意对其种子在自然居群中的散布机制、休眠的适应意义以及克隆结构对居群遗传结构的影响等方面的探讨。

参 考 文 献

1 Chang T T. Conservation of rice genetic resources: luxury or necessity? *Science*, 1984, 224: 251~ 256
2 Vaughan D A. The wild relatives of rice: a genetic resources handbook. International Rice Research Institute, Los Banos: Philippines, 1994
3 Vaughan D A, Chang T T. *In situ* conservation of rice genetic resources. *Economic Botany*, 1992, 46(4): 368~ 383
4 洪德元. 抢救野生稻种质资源. *中国科学院院报*, 1995, 10(4): 325~ 326
5 高立志, 张寿洲, 周毅, 等. 中国野生稻的濒危现状调查. *生物多样性*, 1996, 4(3): 160~ 166
6 葛颂, 洪德元. 遗传多样性及其检测方法. 中国科学院生物多样性委员会主编. *生物多样性研究原理和方法*, 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 132
7 Hamrick J L, Godt M J. Allozyme diversity in plant species. In: Brown A D H, Clegg M T, Kahler A L, et eds. *Plant Population*

- Genetics, Breeding and Genetic Resources. Sunderland, MA: Sinauer, 1990. 43~ 63
- 8 Soltis. Starch gel electrophoresis of ferns: a compilation of grinding buffers, gel and electrode buffers, and staining schedules. Amer Fern J, 1983, 73: 9~ 27
- 9 Glaszmann J C, de los Reyes B G, Khush G S. Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.): a key to the identification to 76 alleles at 24 loci. IRRI Research Paper Series, 1988, (134): 1~ 14
- 10 Swofford D L, Selander R B. BIOSYS-1. Illinois Natural History Survey, Champaign, IL, Release, 1989. 1. 7
- 11 Nei M. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. Genetics, 1978, 89: 583~ 590
- 12 Wright S. Evolution in Mendelian populations. Genetics, 1931, 16: 97~ 159
- 13 Gottlieb L D. Conservation and duplication of isozymes in plants. Science, 1982, 216: 373~ 380
- 14 Second G. Origin of the genic diversity of cultivated (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. Jpn J Genet, 1982, 57: 25
- 15 Barbier P. Genetic variation and ecotypic differentiation in the wild rice species *Oryza rufipogon*, population differentiation in life-history traits and isozymic loci. Jpn J Genet, 1989, 64: 259~ 271
- 16 Barbier P. Genetic variation and ecotypic differentiation in the wild rice species *Oryza rufipogon*, influence of the mating system and life-history traits on the genetic structure of populations. Jpn J Genet, 1989, 64: 273~ 285
- 17 Wright S. Isolation by distance. Genetics, 1943, 28: 114~ 138