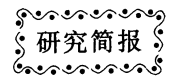


DOI: 10.3724/SP.J.1006.2009.02122



海南普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff.) *Adh2* 基因多态性分析

董轶博¹ 裴新梧² 袁潜华³ 彭于发^{1,*}

¹ 中国农业科学院植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100094; ² 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081;

³ 海南大学生命科学与农学院热带生物资源教育部重点实验室, 海南海口 570228

摘 要: 海南岛的 4 个保护区和 2 个非保护区内普通野生稻与 2 种栽培稻(Nipponbare, 9311)的 *Adh2* 基因序列在编码区共有单现突变 9 个, 信息位点 4 个, 同义突变 8 个, 替代突变 5 个。内含子内有单现突变 21 个, 信息位点 29 个, 插入/缺失位点 161 个。*Adh2* 基因在整个区域的多态性(π_R , θ_R)均为 0.011, 内含子区域的多态性明显高于编码区域。在编码区域, 同义位点多态性明显高于替代位点。中性测试表明虽然 *Adh2* 各区域的净化选择在统计上不具有显著性, 但编码区的净化选择作用明显大于内含子区域。聚类分析表明海南普通野生稻可以划分为 2 大类, 其中一类(QH, LD)与中国大陆普通野生稻和栽培稻更接近, 另一类(WC, WA, WN, DZ)则更接近东南亚普通野生稻。

关键词: 普通野生稻; *Adh2*; 序列多态性

Nucleotide Polymorphism in the *Adh2* Gene of *Oryza rufipogon* Griff. from Hainan Island

DONG Yi-Bo¹, PEI Xin-Wu², Yuan Qin-Hua³, and PENG Yu-Fa^{1,*}

¹ State Key Laboratory for Biology of Plant Disease and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100094, China; ² Institute of Biotechnology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China; ³ College of Life Science and Agriculture, MOE Key Laboratory of Tropic Biological Resources, Hainan University, Haikou 570228, China

Abstract: The sequence polymorphism of *Adh2* in six populations of *Oryza rufipogon* (WN, WA, WC, DZ, QH, and LD) from Hainan and two *Oryza sativa* (Nipponbare, 9311) was analyzed. The result showed that there were nine singleton variable sites, four parsimony informative sites, eight synonymous sites and five replacement sites at coding region. There were 21 singleton variable sites, 29 parsimony informative sites and 161 indels sites at intron region. *Adh2* polymorphism (π_R , θ_R) at entire region was 0.011. The polymorphism at intron was higher than that at coding region. At coding region, the polymorphism of synonymous sites was higher than that at replacement sites. Neutrality tests showed that there was more purified selection at coding region than at intron region, although no significant difference was found. Cluster analysis showed *O. rufipogon* from Hainan could be divided into two groups. One group (QH, LD) was clustered with *O. rufipogon* from China mainland and *O. sativa*. The other group was clustered with some *O. rufipogon* from southeast Asia.

Keywords: *Oryza rufipogon*; *Adh2*; Sequence polymorphism

普通野生稻是亚洲栽培稻的祖先, 广泛分布于中国、东南亚和南亚地区^[1]。由于其与栽培稻间生殖隔离小, 且遗传多样性丰富, 对于栽培稻的品种改良具有重要意义^[2]。中国是普通野生稻的起源地之一, 分布于江西、湖南、福建、广东、广西、云南、海南、台湾 8 个省(区)内^[3]。海南有着丰富的普通野生稻资源, 最近的研究显示海南在普通野生稻起源中心方面可能具有重要地位^[4]。

水稻在厌氧条件下主要使用乙醇发酵进行葡萄糖代谢^[5]。乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, Adh)是乙醇代谢途径的关键酶之一, 在水稻第 11 号染色体上具有两个位点

(*Adh1* 和 *Adh2*), 其中 *Adh1* 主要在叶片中表达, 而 *Adh2* 主要在根部表达^[6]。*Adh* 已经被应用于多种植物属间、种间及种内的系统发育分析。Gaut 等^[7]利用 *Adh1* 基因序列分析了水稻(*Oryza sativa*)、玉米(*Zea mays*)、大麦(*Hordeum vulgare*)和珍珠粟(*Pennisetum glaucum*)间的分子进化关系。Zhu 等^[8]使用 *Adh1* 等多个基因片段分析了栽培稻(*Oryza sativa*)、普通野生稻(*O. rufipogon*)和尼瓦拉野生稻(*O. nivara*)间的遗传多样性和进化关系。Xin 等^[9]使用 *Adh1* 基因序列分析了茭白(*Zizania latifolia*)栽培种及其野生种间的遗传多样性和系统发育模式。Yoshida 等^[10]分析了普

本研究由国家重点基础研究发展计划(973 计划)项目(2007CB109202)和转基因生物新品种培育重大专项课题(2008ZX08011-001)资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 彭于发, E-mail: yfpeng@ippcaas.cn; Tel: 010-62815936

Received(收稿日期): 2009-03-31; Accepted(接受日期): 2009-06-25.

通野生稻间 *Adh2* 基因的核酸多态性。本研究中,我们以海南 6 个自然居群的普通野生稻为研究对象,分析了 *Adh2* 基因的变异以及与其他地区普通野生稻间的系统发育关系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

于海南的 4 个保护区 DZ(儋州和庆)、QH(琼海中原)、WN(万宁东奥)、WA(文昌东路)和 2 个非保护区 LD(乐东黄流)、WC(文昌大致坡)采集普通野生稻样本。这 6 个居群散布于海南岛的不同地理位置,基本可以代表海南岛普通野生稻的分布状况和生态环境。取各居群普通野生稻单株的新鲜叶片,放入塑封袋密封保存,带回实验室进行总 DNA 提取。

1.2 DNA 提取、PCR 扩增和测序

使用改进的 CTAB 法^[11]提取叶片材料的总 DNA,然后对 *Adh2* 区域进行 PCR 扩增。扩增引物(5'-TCCTCCTTG TCTTCACTCTG-3'和 5'-GCCACAATGCTGACAATAAA-3')位于 *Adh2* 的 5'和 3'侧翼序列区域^[10]。*Taq* 和 *Pfu* 的混合物用于 PCR 扩增,以提高扩增产物的保真度。PCR 程序为 94℃ 5 min; 94℃ 30 s, 54℃ 30 s, 72℃ 3 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 5 min。扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳检测,回收目的片段(Axygen 凝胶回收试剂盒),连接于 pEASY-T3 载体(TransGen Biotech),转化感受态细胞,菌液涂板,37℃培养过夜,挑单菌落,鉴定阳性克隆并测序。

1.3 数据分析

使用 DnaSP3.5 分析海南普通野生稻 6 居群的 *Adh2* 序列多态性及其位点,并进行中性测试(Tajima Test, Fu and Li Test)^[12-13]。利用 MEGA2.1 软件,使用 NJ (neighbor-

joining)方法,对海南不同居群普通野生稻的 *Adh2*, 及 EBI (<http://www.ebi.ac.uk/>)、NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)和 GRAMENE (http://www.gramene.org/genome_browser/index.html)数据库中已公布的普通野生稻、栽培稻及其他稻属 A 基因组的 *Adh2* 序列共同进行系统进化分析。数据库中选取的普通野生稻包括中国大陆 2 个材料及东南亚各国的 8 个材料。选取的 3 种栽培稻材料包括目前已经测序的粳稻材料日本晴(Nipponbare)和籼稻材料(9311),以及典型的籼稻材料 IR36。此外,还选择了稻属 A 基因组中与栽培稻亲缘关系较远的短舌野生稻和南方野生稻作为系统进化分析的外类群对照(表 1)。

2 结果与分析

2.1 海南普通野生稻 *Adh2* 基因序列的多态位点

海南 6 居群普通野生稻与 2 种栽培稻(Nipponbare, 9311)的 *Adh2* 基因序列在编码区共有单现突变 (singleton variable sites) 9 个; 信息位点(parsimony informative sites) 4 个; 同义突变(synonymous changes) 8 个, 其中 4 个位点是二变异体信息位点, 4 个位点为单现突变。替代突变(replacement changes) 5 个, 全部为单现突变。内含子内共有单现突变 21 个, 信息位点 29 个, Indels (插入/缺失)位点 161 个。所有的 63 个多态位点除 702 位是三变异体信息位点外, 均为二变异体多态位点。

30 个单现突变位点分为两类, 一类单现突变位点(780, 835, 1 791, 2 590)中所有普通野生稻与 Nipponbare 一致, 而与 9311 不同; 另一类单现突变位点中只有一种普通野生稻与其他所有普通野生稻和栽培稻不同。5 个替代突变和 4 个同义突变都属于后一类。后一类单现突变可能是扩增错误造成的; 也可能是确实存在于普通野生稻种

表 1 数据库中具有 *Adh2* 序列信息的稻属 A 基因植物
Table 1 A-genome species of *Oryza* with information of *Adh2* in database

种 Species	品系 Strain	产地 Origin	登录号 Accession No.
普通野生稻 <i>Oryza rufipogon</i>	CB22	柬埔寨 Cambodia	AB208518(EBI)
	CT51	越南 Vietnam	AB208526(EBI)
	LV27	老挝 Laos	AB208527(EBI)
	SN	泰国 Thailand	AB208525(EBI)
	W108	印度 India	AB208532(EBI)
	W1956	中国 China	AB208519(EBI)
	W1965	中国 China	AB208520(EBI)
	W1972	印度尼西亚 Indonesia	AB208533(EBI)
	W593	马来西亚 Malaysia	AB208521(EBI)
	YG2A	缅甸 Myanmar	AB208523(EBI)
	Nipponbare	日本 Japan	NC008404(NCBI)
栽培稻 <i>O. sativa</i>	9311	中国 China	BG10SIBCE033878(GRAMENE)
	IR36	国际水稻研究所 IRRI	AB208537(EBI)
短舌野稻 <i>O. barthii</i>	W607	几内亚 Guinea	AB208540(EBI)
南方野生稻 <i>O. meridionalis</i>	W1627	澳大利亚 Australia	AB208541(EBI)

内的单碱基突变。

所有 32 个二变异体信息位点(包括 4 个同义突变)上,部分居群普通野生稻与栽培稻相同,另一部分普通野生稻与栽培稻不同。三变异体信息位点(702 位)上普通野生稻具有 3 种变异,其中一种与栽培稻相同。插入/缺失多数位点上普通野生稻变异情况与二变异体信息位点相同。

2.2 海南普通野生稻 *Adh2* 基因序列的多态性

海南 6 居群普通野生稻间 *Adh2* 基因在整个区域的多态性(π_R , θ_R)均为 0.011, 内含子区域(intron)的多态性明显高于编码区域(exon)。在编码区域, 同义位点多态性明显高于替代位点。这些结果表明 *Adh2* 基因在海南普通野生稻不同居群间的多态性主要是由沉默位点导致的。

此外, 海南 6 居群普通野生稻与栽培稻间 *Adh2* 基因在各个区域的多态性均与普通野生稻不同居群间的多态性数值相同或略小。这说明 *Adh2* 基因在海南普通野生稻不同居群间的变异不小于海南普通野生稻和栽培稻间的变异。

中性测试表明虽然 *Adh2* 各区域的净化选择在统计上不具有显著性, 但无论是在海南普通野生稻不同居群间还是在海南普通野生稻与栽培稻间编码区的净化选择(purified selection)作用均明显大于内含子区域(表 2)。

2.3 海南与其他地区普通野生稻的系统发育关系

图 1 显示了稻属 A 基因组 21 个材料的 *Adh2* 系统进化关系。外类群对照短舌野生稻(W607)和南方野生稻(W1627)各自单独聚为一类, 而普通野生稻与栽培稻聚为一大类。正确反映了短舌野生稻、南方野生稻、普通野生稻和栽培稻间亲缘关系的远近。普通野生稻和栽培稻没有各自被划分为两类, 这也反映了普通野生稻与栽培稻间很近的亲缘关系。普通野生稻和栽培稻一起被划分为两大类(置信度 92%), 其中一类完全为普通野生稻组成, 另一类则包括栽培稻和普通野生稻 2 个种。

第 I 类中的普通野生稻分别来自越南、老挝、印度、印度尼西亚(W1972)和中国海南。其中越南(CT51)、老挝(LV27)、印度(W108)和中国海南普通野生稻(WC, WA, WN, DZ)被划分为一类, 而印度尼西亚普通野生稻则单独

为一类(置信度 99%)。

第 II 类中除 3 个栽培稻(Nipponbare, 9311, IR36)外, 普通野生稻分别来自柬埔寨、泰国、马来西亚、缅甸、中国大陆和中国海南。其中泰国普通野生稻(SN)单独为一类, 而柬埔寨(CB22)、马来西亚(W593)、缅甸(YG2A)、中国大陆(W1956, W1965)和中国海南(LD, QH)的普通野生稻与 3 种栽培稻聚为另一类(置信度 85%)。一些普通野生稻表现出与籼稻更接近, 例如 W1965(置信度 69%)和 YG2A(置信度 65%)。另一些普通野生稻虽然与栽培稻聚为一类, 但在进化关系上没有表现出更接近籼稻或粳稻, 例如海南普通野生稻 LD 和 QH。

由图 1 还可发现, 中国海南的普通野生稻表现出了比中国大陆普通野生稻更大的遗传变异, 其中一部分普通野生稻(QH, LD)与栽培稻进化关系接近, 另一部份(WC, WA, WN, DZ)则与东南亚一些普通野生稻亲缘关系更接近。而中国大陆普通野生稻与栽培稻聚为一类这种结果与 *Adh2* 序列多态性分析的结果相一致。

3 讨论

虽对中国普通野生稻的遗传多样性已有大量研究^[14-15], 但未对海南岛普通野生稻的遗传多样性充分重视, 最近的研究显示, 与中国大陆相比, 海南岛的普通野生稻具有最高的遗传多样性^[4]。这与我们的研究结果相似。我们的研究还发现东南亚一部分普通野生稻与中国大陆普通野生稻聚为一类, 而另一部分东南亚普通野生稻单独聚为一类, 说明东南亚普通野生稻遗传多样性大于中国大陆普通野生稻遗传多样性。这似乎暗示普通野生稻可能起源于东南亚。而海南岛由于具有与东南亚普通野生稻相似的遗传多样性结构, 因此我们推测海南岛可能也是普通野生稻的起源中心之一。此外, 栽培稻的籼粳亚种在进化树上没有聚为一类, 而是分别与不同的普通野生稻聚为一类, 说明栽培稻的籼粳亚种可能分别起源于不同的普通野生稻。他人的研究也证实籼稻和粳稻与各自特定普通野生稻的亲缘关系更近于籼粳间的关系^[16-17], 而且分子钟的证据显示籼粳分化时间远远早于水稻驯化时间^[17]。

表 2 海南 6 居群普通野生稻、Nipponbare 和 9311 的 *Adh2* 基因变异情况
Table 2 Variation in *Adh2* of *Oryza rufipogon* of six populations from Hainan Island and *Oryza sativa* (Nipponbare and 9311)

	Sits	Sits _R	S	S _R	π	π_R	θ	θ_R	D ^x	D ^x _R	D	D _R
编码区域 Coding region	1125	1125	13	12	0.004	0.004	0.004	0.005	-0.879	-0.443	-0.627	-0.527
同义位点 Synonymous sites	256.67	256.72	8	7	0.012	0.012	0.012	0.012	—	—	—	—
替代位点 Replacement sites	868.33	868.28	5	5	0.001	0.002	0.002	0.003	—	—	—	—
内含子 Intron	1366	1369	50	50	0.016	0.016	0.014	0.014	0.003	0.003	0.618	0.618
沉默位点 Silent sites	1622.67	1624.72	58	56	0.015	0.016	0.014	0.015	—	—	—	—
整个区域 Entire region	2494	2496	63	60	0.010	0.011	0.010	0.011	-0.192	0.251	0.355	0.307

下标有 R 表示分析序列中不包括栽培稻; 下标无 R 表示分析序列包括所有普通野生稻和栽培稻。Sits 表示位点数; S 表示多态位点数; π 和 θ 表示核酸多态性; D^x 表示 Fu and Li' D^x; D 表示 Tajima'D。

Subscript R: only *Oryza rufipogon* from Hainan Island was analysed; No subscript R: both *O. rufipogon* from Hainan Island and *O. sativa* were analysed. Sits : numbers of sites; S meaned number of polymorphic sites; π and θ : nucleotide diversity; D^x : Fu and Li' D^x; D : Tajima'D.

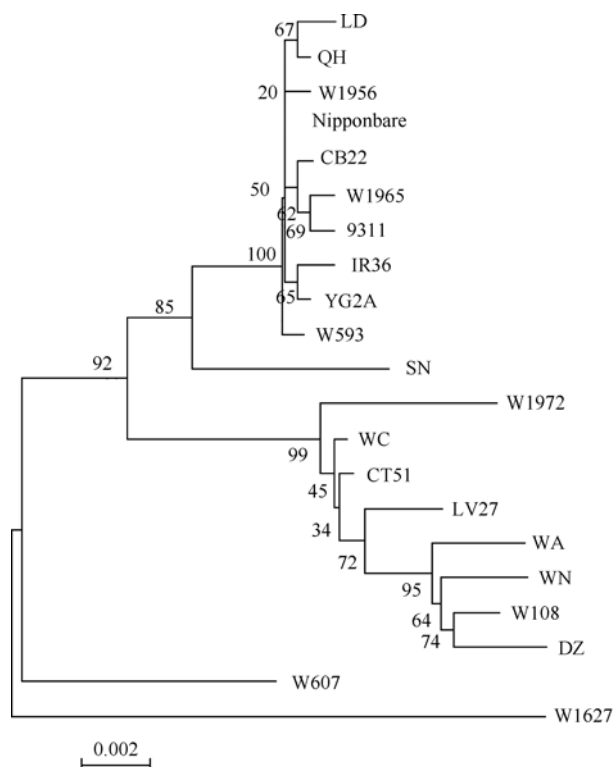


图 1 海南 6 居群普通野生稻与其他 15 个稻属 A 基因组材料的 *Adh2* 基因 NJ 进化树

Fig. 1 *Adh2* NJ tree of 6 *Oryza rufipogon* populations from Hainan and another 15 A-genome species of *Oryza*

在亚洲许多国家和地区, 普通野生稻居群和栽培稻间存在生态重叠区, 而且花期重叠、花时相遇, 再加之它们的生殖隔离较低, 所以从栽培稻到普通野生稻的基因飘移被认为是一种普遍的自然现象^[18-19]。研究显示来自作物的基因流可能确实影响着野生群体的进化^[20]。对于普通野生稻, 来自栽培稻的基因渗入在短期内可能会增加普通野生稻居群的遗传多样性, 而从一个较长的历史时期来看, 则会降低普通野生稻居群的遗传多样性^[19]。因此我们推测图 1 中显示的普通野生稻的进化关系很可能已经受到了栽培稻基因流的影响。但是栽培稻基因流对海南普通野生稻的遗传多样性产生了怎样的影响则有待于进一步研究和分析。

突变是造成基因组差异的主要原因之一, 是生物进化的基础^[21]。核苷酸替代和 Indels (插入/缺失) 是形成突变的两种重要方式^[22]。虽然最近的研究显示 Indels 是物种间的主要分歧形式, 在进化中具有重要作用^[23], 但是在大部分系统发育分析中序列间隙(gaps)通常作为丢失数据被剔除^[24]。原因之一是目前分析 Indels 的方法仍需进一步发展和完善, 另一个原因是序列间隙的位置难以确定, 尤其是分析大量不同物种或高分歧序列时^[24]。在我们的研究中, 海南普通野生稻不同居群及栽培稻间 *Adh2* 区域的 Indels 位点数明显多于核苷酸替代位点数, 而且大多为连续的长短不同的 Indels 片段, 其中最上一段超过 100 bp。

这些 Indels 全部位于内含子区域, 其变异与核酸替代的变异趋势近似, 即依据 Indels 也可以将海南普通野生稻分为两大类。这些现象说明 *Adh2* 中的 Indels 存在进化信息, 它们在系统进化分析中不应该被忽略。

References

- [1] Oka H I. Experimental studies on the origin of cultivated rice. *Genetics*, 1974, 974: 475-486
- [2] Xiao J, Grandillo S, Ahn S N, Mccouch S R, Tanksley S D, Li J, Yuan L. Genes from wild rice improve yield. *Nature*, 1996, 384: 223-224
- [3] Gao L Z, Chen W, Jiang W Z, Ge S, Hong D Y, Wang X K. Genetic erosion in the Northern marginal population of the common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. and its conservation, revealed by the change of population genetic structure. *Heredity*, 2000, 133: 47-53
- [4] Wang M X, Zhang H L, Zhang D L, Qi Y W, Fan Z L, Li D Y, Pan D J, Cao Y S, Qiu Z E, Yu P, Yang Q W, Wang X K, Li Z C. Genetic structure of *Oryza rufipogon* Griff. in China. *Heredity*, 2008, 101: 527-535
- [5] Menegus F, Cattaruzza L, Mattana M, Beffagna N, Ragg E. Response to anoxia in rice and wheat seedlings: Changes in the pH of intracellular compartments, glucose-6-phosphate level, and metabolic rate. *Plant Physiol*, 1991, 95: 760-767
- [6] Xie Y, Wu R. Rice alcohol dehydrogenase genes: Anaerobic induction, organ-specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Mol Biol*, 1989, 13: 53-68
- [7] Gaut B S, Clegg M T. Molecular evolution of alcohol dehydrogenase 1 in members of the grass family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 2060-2064
- [8] Zhu Q, Zheng X, Luo J, Gaut B, Ge S. Multilocus analysis of nucleotide variation of *Oryza sativa* and its wild relatives: Severe bottleneck during domestication of rice. *Mol Biol Evol*, 2007, 24: 875-888
- [9] Xu X, Ke W, Yu X, Wen J, Ge S. A preliminary study on population genetic structure and phylogeography of the wild and cultivated *Zizania latifolia* (Poaceae) based on *Adh1a* sequences. *Theor Appl Genet*, 2008, 116: 835-843
- [10] Yoshida K, Miyashita N T. Nucleotide polymorphism in the *Adh2* region of the wild rice *Oryza rufipogon*. *Theor Appl Genet*, 2005, 111: 1215-1228
- [11] Weising K, Kaemmer D, Weigand F, Epplen J T, Kahl G. Oligonucleotide fingerprinting reveals various prove-dependent levels of informativeness in chickpea (*Cicer arietinum*). *Genome*, 1991, 35: 436-442
- [12] Tajima F. Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics*, 123: 585-595
- [13] Fu Y X, Li W H. Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics*, 1993, 133: 693-709
- [14] Gao L Z, Hong D Y, Ge S. Allozyme variation and population genetic structure of common wild rice *Oryza rufipogon* Griff. in China. *Theor Appl Genet*, 2000, 101: 494-502

- [15] Zhou H F, Xie Z W, Ge S. Microsatellite analysis of genetic diversity and population genetic structure of a wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China. *Theor Appl Genet*, 2003, 107: 332–339
- [16] Londo J P, Chiang Y C, Hung K H, Chiang T Y, Schaal B A. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9578–9583
- [17] Kovach M J, Sweeney M T, McCouch S R. New insights into the history of rice domestication. *Trends Genet*, 2007, 23: 578–587
- [18] Song Z P, Zhu W Y, Rong J, Xu X, Chen J, Lu B R. Evidences of introgression from cultivated rice to *Oryza rufipogon* (Poaceae) populations based on SSR fingerprinting: Implications for wild rice differentiation and conservation. *Evol Ecol*, 2006, 20: 501–522
- [19] Lu B R, Song Z P, Chen J K. Crop to wild gene flow in rice and its ecological consequences. In: Nijs H C M, Bartsch D, Sweet J, eds. *Introgression from Genetically Modified Plants into Wild Relatives*. UK: CAB International, 2004. pp 139–150
- [20] Ellstrand N C, Prentice H C, Hancock J F. Gene flow and introgression from domesticated plants into their wild relatives. *Annu Rev Ecol Syst*, 1999, 30: 539–563
- [21] Chen L-L(陈玲玲), Peng G-Z(彭贵子), Zhang W-L(张伟丽), Tian D-C(田大成). The significance of mutations in genomic evolution. *Hereditas (遗传)*, 2006, 28(5): 631–638 (in Chinese with English abstract)
- [22] Tang P(唐萍), Wang Q(王强), Chen J-Q(陈建群). The patterns and influences of insertions, deletions and nucleotide substitutions in Solanaceae chloroplast genome. *Hereditas (遗传)*, 2008, 30(11): 1506–1512 (in Chinese with English abstract)
- [23] Cartwright R A. Problems and solutions for estimating indel rates and length distributions. *Mol Biol Evol*, 2009, 26: 473–480
- [24] Kawakita A, Sota T, Ascher J, Ito M, Tanaka H, Kato M. Evolution and phylogenetic utility of alignment gaps within intron sequences of three nuclear genes in bumble bees (*Bombus*). *Mol Biol Evol*, 2003, 20: 87–92