

中国普通野生稻初级核心种质取样策略

余萍¹ 李自超¹ 张洪亮¹ 曹永生² 李道远³ 王象坤¹

(1. 中国农业大学 农业部作物基因组学与遗传改良重点开放实验室,北京市作物遗传改良重点实验室,北京 100094;
2. 中国农科院 品资所,北京 100081; 3. 广西农科院 水稻所,南宁,530007)

摘要 以国家品种资源库编目入库的中国普通野生稻种质 5 571 份为材料,19 个分类和形态性状的数据比较研究了中国普通野生稻的核心种质总体取样比例和取样策略,以获得最佳初级核心种质。设 3 个总体取样比例 5%、15%和 25%,取样方案分 3 个层次即分组原则、组内取样比例和组内取样方法。分组原则为省、纬度、生长习性和单一性状及不分组的大随机;组内取样比例为对数法、平方根法、遗传多样性指数和简单比例法;组内取样采用随机和聚类 2 种方法。结果表明,当总体取样比例从 5%增加到 15%时,所取得核心种质的表型保留比例有比较大的增幅,而比例由 15%增加到 25%时,表型保留比例变化不大,因此认为 15%的取样比例较为合适;取样方案以采集省份分组,组内以对数比例法聚类取样效果最好。最终根据这一方案在计算机上编程取样 860 份,其多样性指数为 1.101 5,变异系数为 16.87,表型方差为 0.854 6。3 个检测参数值比原始种质库都有明显的提高。此外,根据国家种质资源库表型数据人工定向取样 60 份,建立了 920 份材料的中国普通野生稻初级核心种质。

关键词 普通野生稻;初级核心种质;取样策略

中图分类号 S 511.9

文章编号 1007-4333(2003)05-0037-05

文献标识码 A

Sampling strategy of primary core collection of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) in China

Yu Ping¹, Li Zichao¹, Zhang Hongliang¹, Cao Yongsheng², Li Daoyuan³, Wang Xiangkun¹

(1. Key Laboratory of Crop Genomics and Genetic Improvement, Ministry of Agriculture; Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Beijing Municipality, China Agricultural University, Beijing 100094, China;

2. Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS, Beijing 100081, China;

3. Institute of Rice Research, Guangxian Academy of Agricultural Science, Nanning 530007, China)

Abstract Tactics of three level of overall sampling ratios (5%, 15% and 25%) from the whole collection is adopted in order to acquire optimal primary core collection of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) were studied, using 5 571 accessions from the national genebank, Which are classified as 19 types based on agronomic and morphological characters. The three levels are grouping principle, sampling proportion within group and sampling method from each group. Grouping principles included the consideration of different provinces, latitudes, growth habits, single character and completely random sampling without grouping. Method of sampling proportion in each group are square root, logarithm, index of genetic diversity and fixed proportion. Clustered and random samplings are carried out in each group. The result showed that retained ratio of phenotypic retained had a notable increase when the overall sampling ratio increased from 5% to 15%, whereas, the ratio of phenotypic core collections has considerably has a little increase when the overall sampling ratio increased from 15% to 25%. It is concluded that 15% should be the appropriate overall sampling ratio for primary core collection of common wild rice in China. The best sampling strategies should be based on a principle grouped by provinces, as well as sampling proportion within group based on logarithm and cluster sampling method. Based on this scheme, 860 accessions of common wild rice are sampled by computer as primary core collection. The index of genetic diversity, coefficient of variation, variance of phenotypic value are 1.101 5, 16.87, 0.854 6, respectively. Compared with the counterparts of national genebank, these parameters of primary core collections are all increased significantly. Furthermore, based on phenotypic data from national genebank, 60 accessions are also supplemented for application oriented. Finally, total 920 accessions of primary core collection are set up.

Key words *Oryza rufipogon* Griff.; primary core collection; sampling strategy

收稿日期: 2003-06-30

基金项目: 国家重点基础研究发展计划资助项目(1998010201)

作者简介: 余萍, 硕士研究生; 李自超, 教授, 博士生导师, 联系作者, 主要从事稻种资源和功能基因组学、抗旱分子机理和分子育种研究, E-mail: lizichao@cau.edu.cn

建立核心种质 (core collection) 有利于种质库尤其是数量庞大的种质库的管理, 有利于保存种质的研究和利用, 所以自 1984 年 Frankel 提出“核心种质”的概念^[1]之后在全世界迅速响应, 现在国外有苜蓿^[2]、多年生黑麦草^[3]、硬粒小麦^[4]、大豆^[5]、花生^[6]等诸多植物上的研究; 我国于 1994 年起步, 现已在水稻^[7,8]、大豆、小麦等 5 种作物上正式立项研究。

构建核心种质要求以最小的资源样本数代表该物种最大地遗传多样性, 因此核心种质研究的 2 个基本内容是取样策略与遗传多样性的检测方法。Brown 提出核心种质一般占整个种质资源的 5% ~ 10%, 或总量不超过 3 000 份^[9]; 取样比例应根据不同物种、不同群体规模及遗传结构而有所不同^[10]。李自超^[7,8]在研究云南和中国地方稻种资源取样方案时提出 5% ~ 6% 的总体取样比例可保留全部种质资源的 96% 以上的变异。在取样策略上, 许多研究都表明系统分组取样可达到以最小的重复代表最大的遗传多样性。Spagnetti 等提出在构建核心种质时分层取样明显由于优于完全随机的取样方法^[4]。李自超等研究表明, 通过分类系统分组, 以对数或平方根比例在组内聚类取样的系统取样明显优于不分组的完全随机取样^[7]。

普通野生稻在我国稻种资源库中占有较大的份额, 总份数为 5 771。由于它是栽培稻的近缘祖先, 有效利用这些资源对解决当前生产上的栽培稻品种遗传基础狭窄, 发掘重要抗逆等优良基因有重要意义^[11], 但由于农业生产体系的现代化, 人口的膨胀和迅速的都市化, 野生稻自然生境正处于濒危毁灭之中, 野生稻数量急剧减少, 合理保护利用野生稻资源已成为急需解决的问题^[12-15]。本研究的目的是通过设计不同的取样比例对核心种质进行比较以确定最适取样比例, 并构建普通野生稻核心种质的取样策略, 选取最佳方案及最适合的遗传多样性检测参数用于构建野生稻的初级核心种质。

1 材料与方法

1.1 材料与数据

本研究所用普通野生稻来自广东 (2 145 份)、广西 (2 591 份)、湖南 (317 份)、海南 (211 份)、云南 (14 份)、江西 (201 份)、福建 (92 份) 8 个省共 5 571 份, 其基础数据来自 1991 年版的《中国稻种资源目录》(野生稻种)^[16]和 1996 年的增补资料。所用性状有生长习性、叶鞘色、叶舌形状、芒性、柱头色、花药长

度、谷粒长、谷粒宽、长宽比、内外颖色、种皮颜色、百粒重, 及是否感染苗瘟、白叶枯、白背飞虱、褐稻虱、纹枯病、细条病、稻瘰蚊, 共 19 项。以上数量性状质量量化时以 0.5 个标准差为间距分级。

1.2 研究方法

整个取样方案的研究分 3 个层次即分组原则、组内取样比例的确定、组内取样方法。分组原则有 4 个, 包括省、生长习性、纬度、单一性状, 另外有全部材料不分组的大随机, 在分组后确定组内取样比例时采用了按组内个体数量的简单比例 (P)、平方根比例 (S)、对数比例 (L)、和多样性比例 (G) 4 种方法^[7], 组内取样方法采用聚类和随机 2 种方法 (图 1)。

为了考察不同取样比例对核心种质质量的影响, 设 3 个总体取样比例即 5%、15% 和 25%。将 3 个层次组合形成 28 个取样方案, 其中组内随机取样的 16 种方案作了 3 次重复以减少随机误差; 聚类采用欧氏距离和类平均法, 在以 VB 自编的软件 Cluster 中完成人工挑选聚类结果, 其他操作均结合数据库管理在 Foxpro 系统下编程实现。

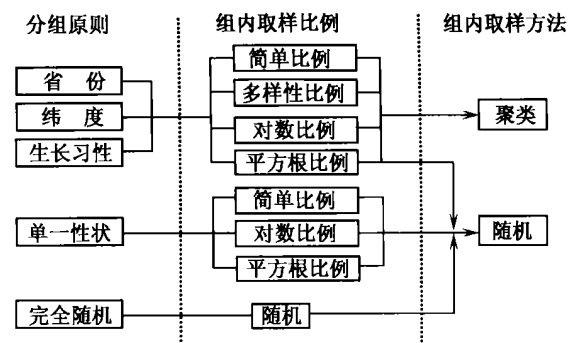


图 1 普通野生稻的取样方案

Fig. 1 Sampling scheme of common wild rice

根据参考文献 [7, 17], 选用 shannon 多样性指数、表型方差、变异系数、表型保留比例、最大值离差及最小值离差这 6 个参数作检验 28 个取样方案的初选指标。

2 结果与分析

2.1 取样比例的确定

在普通野生稻的总体取样比例上设定 3 个量即 5%、15% 和 25%, 得到 180 个候选初级核心种质。将这 180 个候选核心种质的表型保留比例进行比较 (表 1)。当总体取样比例为 5% 时, 随机选取的核心种质平均表型保留比例为 76.2%, 聚类选取的为

81.9%；当取样比例达到 15% 时，随机选取的平均表型保留比例为 86.0%，聚类所得的核心种质为 90.2%；而当取样比例增加到 25% 时，随机选取的种质库为 89.4%，聚类选取的种质库为 93.0%，表型保留比例增加甚微。核心种质的最高原则是以最

小的量最大限度地代表该物种的多样性，基于这个考虑，我们认为 15% 的总体取样比例较为合适。另外从表 1 还可以看出，相同的取样比例下，不同的取样方案间表型保留比例差异很大。

表 1 普通野生稻初级核心种质不同总体取样比例下的表型保留比例比较(符合度)

Table 1 Comparison of ratio of phenotypic retained in different overall sampling ratio in primary core collections

| 取样比例 | 随机取样 | | | 聚类取样 | | |
|------|----------|--------|-------------|----------|--------|-------------|
| | 初级核心种质个数 | 平均值/ % | 变幅/ % | 初级核心种质个数 | 平均值/ % | 变幅/ % |
| 5 % | 48 | 76.2 | 68.0 ~ 80.3 | 12 | 81.9 | 78.7 ~ 83.6 |
| 15 % | 48 | 86.0 | 82.8 ~ 89.3 | 12 | 90.2 | 88.5 ~ 92.6 |
| 25 % | 48 | 89.4 | 87.7 ~ 90.2 | 12 | 93.0 | 91.0 ~ 95.0 |

2.2 检验指标的筛选

对 15% 比例下的 16 个随机取样方案在 SAS 系统下进行差异显著性分析表明，各候选核心样品在分组间只有变异系数差异达极显著，表型方差和多样性指数在分组原则间差异不显著(表 2)。在 4 种取样比例间变异系数、表型方差、多样性指数这 3 个参数差异均达极显著水平。最大和最小离差值在所有层次中均不显著，因此选择变异系数、表型方差、多样性指数这 3 个参数作为检验各取样方案优劣的指标。

2.3 分组原则的比较

3 个层次组合成 28 个取样方案，将这 28 个方案在变异系数、表型方差、多样性指数这 3 个检验参数

中的排序号(秩数)平均(表 3)。16 种随机方案中的优劣顺序为单一性状 > 生长习性 > 省 > 纬度 > 不分组；12 种聚类方案的优劣顺序为省 > 生长习性 > 纬度；将结果总平均最终得到省 > 生长习性 > 纬度 > 单一性状 > 不分组，省与生长习性差异不明显。不论是随机还是聚类，分组的方案都优于不分组的方案，这与许多前人的结论都是一致的^[2~7]。

2.4 组内取样比例的确

从 28 种取样方案综合比较来看，无论是组内随机还是聚类，无论是哪一个分组原则，L 始终表现最优，而且多重比较分析的结果也表明 L 与另 3 种方法差异显著，这可能是因为普通野生稻种质库中存在大量重复所致。

表 2 随机取得的 16 个候选核心种质 3 种检验参数的差异显著性分析

Table 2 ANOV of 16 non-clustered core samples

| 检验参数 | 变异来源 | 自由度 | 平方和 | 均方 | F 值 |
|-------|------|-----|----------|----------|----------|
| 变异系数 | 分组原则 | 2 | 6.918 57 | 3.459 29 | 32.18 ** |
| | 取样比例 | 3 | 2.715 26 | 0.905 09 | 8.42 ** |
| | 互作 | 6 | 8.502 75 | 1.417 13 | 13.18 ** |
| | 误差 | 24 | 2.580 29 | 0.107 51 | |
| 表型方差 | 分组原则 | 2 | 0.357 84 | 0.178 92 | 3.1 |
| | 取样比例 | 3 | 3.915 15 | 1.305 05 | 22.58 ** |
| | 互作 | 6 | 0.462 37 | 0.077 06 | 1.33 |
| | 误差 | 24 | 1.387 37 | 0.057 81 | |
| 多样性指数 | 分组原则 | 2 | 0.000 41 | 0.000 20 | 1.92 |
| | 取样比例 | 3 | 0.012 12 | 0.004 04 | 38.29 ** |
| | 互作 | 6 | 0.001 63 | 0.000 27 | 2.58 * |
| | 误差 | 24 | 0.002 53 | 0.000 11 | |

注：**表示在 1% 水平上差异显著；*表示在 5% 水平上差异显著

表 3 用 3 个检验参数对 28 个取样方案优劣排序(秩数)汇总

Table 3 Rank of 3 testing criteria for 28 sampling schemes

| 项目 | 方法 | 省地 | 生长习性 | 纬度 | 单一性状 | 不分组 | 平均 |
|------|----|------|------|------|------|------|------|
| 组内随机 | S | 20.7 | 20.3 | 19 | 17.7 | | 19.4 |
| | L | 15.3 | 11.7 | 14.3 | 14 | | 13.8 |
| | G | 28 | 25.7 | 23.3 | | | 25.7 |
| | P | 26 | 23.7 | 17.7 | 21.7 | 25 | 22.8 |
| | 平均 | 22.5 | 20.4 | 24.8 | 17.8 | 25.0 | 22.1 |
| 组内聚类 | S | 2.3 | 6 | 6 | | | 4.8 |
| | L | 2 | 2.7 | 4.3 | | | 3 |
| | G | 6.3 | 9.7 | 13.7 | | | 9.9 |
| | P | 6.3 | 10 | 12.3 | | | 9.5 |
| | 平均 | 4.2 | 7.1 | 9.1 | | | 6.8 |
| 总平均 | | 13.4 | 13.8 | 17.0 | 17.8 | 25.0 | 14.5 |

2.5 组内取样方法

从表 1 可以看出,随机选取的核心种质其表型保留比例变幅均大于聚类方法而平均值却都小于后者,表 3 表明不管是在相同的分组原则下,还是相同的确定组内取样比例方法下,在组内取样的方法上聚类法均明显优于随机法。因此,在分组原则和组内取样比例一定的前提下,组内采用聚类的方法取样具有较好的效果。本文在这一点上得到了同前文同样的结果^[7]。

2.6 初级核心种质的确定

综合以上分析,提出中国普通野生稻核心种质最佳取样比例为 15%,最佳取样方案是按省分组,组内按对数比例聚类取样。根据这一原则在计算机上编程取样,选取了 860 份材料作为中国普通野生稻的初级核心种质重要部分,在表型上代表了原始资源库的 90.2%。原始库和核心库的 shannon 多样性指数分别是 1.010 5 和 1.101 5,变异系数分别是 13.09 和 16.87,表型方差分别是 0.543 3 和 0.854 6。3 个检测参数值都有明显的提高,所得到的核心库较大程度地消除了原始库中的遗传重复,符合最初设定的核心种质构建目标。考虑到育种工作的需要,根据普通野生稻的形态和农艺性状鉴定结果,人工定向添加计算机取样中漏掉的极值材料、抗病及抗逆材料共 60 份。最终建立了 920 份材料的普通野生稻初级核心种质。

3 讨论

3.1 分组原则

在中国普通野生稻的研究中尚无一个大家公认

的生态区划和分类体系,考虑到普通野生稻只在 8 个省(区)有分布,而且彼此并不连续,可以将省看作是一个大的生态区;分布范围在北纬 18°~28°之间,野生稻从南到北变化比较明显,将纬度作为一个分组原则是可行的;另外野生稻的生长习性是其区别于栽培稻的一个重要性状,也可以将它作为一个分组原则。居群是物种的存在形式和进化单位,可能是一个较好的分组方式,但由于中国普通野生稻国家数据库缺乏分布于全国 8 个省区的居群信息,无法采用这一分组方法。

3.2 最佳取样比例

据 Brown 统计,以种子繁殖的作物中已构建核心种质的有 37 种,取样规模主要在 5%~20%之间^[18]。魏兴华等在构建浙江地方籼型稻种资源核心样品时以 12.5%的取样比例代表了原种质库 90%以上的遗传变异^[19],李自超等在云南 6 125 份地方稻种资源核心种质取样方案的研究中,认为 16%、10%和 5%的初级样品可在表型上分别达到 97.8%、97%和 96%以上的保留比例,最后确定 5%的取样比例^[7]。核心种质的取样比例与原种质库材料的数量是有关系的。普通野生稻比栽培稻有较大的遗传变异,核心种质取样比例也应该适当增大。本研究初始种质库有种质 5 571 份,最终总体取样 15%,表型保留比例为 90.16%,与云南地方稻种资源 5%的取样比例,具有 97.8%表型保留比例相比,有明显差异。因此,从表型上看,要保留一定的遗传变异目标,普通野生稻需要的取样比例高于栽培稻种。

3.3 核心种质检验参数的选择

表型保留比例在有些文献中也称为符合系数,在检验核心种质质量的参数中,在以表型性状数据构建的核心种质时表型保留比例是一个很直观地表现所选核心库质量的参数。在一定取样比例下由各个取样方案所得的核心种质经差异显著性分析,发现该参数在分组间和组内各取样比例间均不显著,所以认为它在确定取样比例时是一个非常关键的参数,但当取样比例一定时用来检验各种取样方案的优劣并不适合。这与张洪亮等的结果是一致的^[17]。可以认为本文所选的几个参数中,表型保留比例和其他5个参数是不同层次的检验参数,它们从不同的方面检验和评价核心种质的质量,核心种质质量的检验由任何一个参数单独完成都有局限性,所以应该用多个参数同时进行检验,以达到对核心种质综合评判的目的。

参 考 文 献

- [1] Frankel O H. Genetic perspectives of germplasm conservation [A]. In: Arber W, Llinmeasee K, Peacock W J, et al, eds. Genetic Manipulation: Impact on Man and Society [C]. London: Cambridge University Press, 1984. 161 ~ 170
- [2] Diwan, Bauchan G R, Mcintosh M S. A core collection for the United States annual Medicago [J]. Crop Sci, 1994, 34: 279 ~ 285
- [3] Charmet G, Balfourier F, Ravel C, Benis J B. Genotype × environment interactions in a core collection of French perennial ryegrass populations [J]. Theor Appl Genet, 1993, 86: 731 ~ 736
- [4] Spagonletti Zeul P L, Quaslet C O. Evaluation of five strategies for obtaining a core subset from a large genetic resources collection of durum wheat [J]. Theor Appl Genet, 1991, 87:295 ~ 304
- [5] Perry M C, Mcintosh M S, Stoner A K. Geographical Patterns of Variation in the USDA Soybean Germplasm Collection: Allozyme Faaarequonlies [J]. Crop Sci, 1991, 31: 1356 ~ 1360
- [6] Corley Holbrook C, William F Anderson. Evaluation of a core collection to identify resistance to late leafspot in peanut [J]. Corp Sci, 1995, 35: 1700 ~ 1702
- [7] 李自超,张洪亮,曾亚文,等. 云南地方稻种核心种质取样方案研究 [J]. 中国农业科学, 2000, 33(5): 1 ~ 7
- [8] 李自超,张洪亮,曹永生,等. 中国地方稻种资源初级核心种质取样策略研究 [J]. 作物学报, 2003, 29(1): 20 ~ 24
- [9] Brown A H D. The case for core collection [A]. In: Brown A H D, Frankel O H, Marshall R D, et al, eds. The Use of Plant Genetic Resources [C]. London: Cambridge Univ Press, 1989. 136 ~ 156
- [10] Yonezawa K, Nomura T, Morishima H. Sampling strategies for use in stratified germplasm collections [A]. In: Hodekin T, Brown A H D, Hintum van T H L, Morales E A V, eds. Core Collections of Plant Genetic Resources. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI): A Wiley-Sayce Publication, 1995, 35 ~ 54
- [11] Sun C Q, Wang X K, Li Z C, et al, Comparison on the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L) using RFLP markers [J]. Theor Appl Genet, 2001, 102: 157 ~ 162
- [12] 庞汉华. 中国普通野生稻种资源若干特性分析 [J]. 作物品种资源, 1992, (4): 6 ~ 8
- [13] 庞汉华. 建立野生稻原地自然保护点已刻不容缓 [J]. 作物品种资源, 1996, (4): 22 ~ 24
- [14] 高立志,周毅,葛颂,等. 广西普通野生稻 (*Oryza rufipogon* Griff.) 的遗传资源现状及其保护对策 [J]. 中国农业科学, 1998, 31(1): 32 ~ 39
- [15] 高立志. 中国野生稻的现状调查. 生物多样性, 1996, 4(3): 160 ~ 166
- [16] 中国农业科学院作物品种资源研究所稻类室. 中国稻种资源目录(1998 ~ 1993) [M]. 北京: 中国农业出版社, 1996
- [17] 张洪亮,李自超,曹永生,等. 表型水平上检验水稻核心种质的参数比较 [J]. 作物学报, 2003, 29(2): 252 ~ 257
- [18] Brown A H D, Spillane C. Implementing core collection principles, procedures, progress, problems and promise [A]. In: Johnson R C, Hodgkin. Core Collection for Today and Tomorrow [C]. Roma Italy: IPGRI, 1999. 1 ~ 9
- [19] 魏兴华,颜启传,应存山,等. 建立浙江地方籼型稻种资源的核心样品的研究 [J]. 中国水稻科学, 1999, 13(2): 81 ~ 85