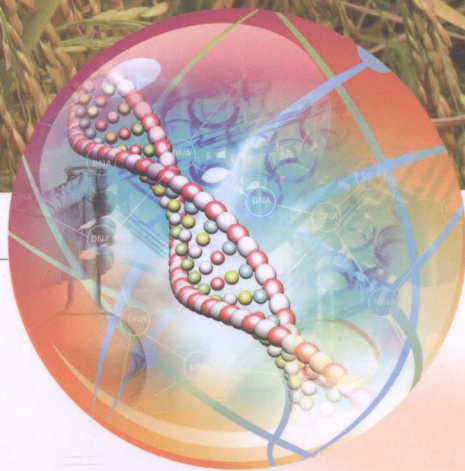


菰属植物 研究现状及其功能基因筛选

GUSHU ZHIWU YANJIU XIANZHUANG
JIQI GONGNENG JIYIN SHAIXUAN



江绍玫 著



032

中国环境科学出版社

菰属植物研究现状及其功能基因筛选

江绍玫 著

551.032
J374

中国环境科学出版社·北京

图书在版编目(CIP)数据

菰属植物研究现状及其功能基因筛选/江绍玫著. —北京:
中国环境科学出版社, 2009.12

ISBN 978-7-5111-0148-8

I. 菰… II. 江… III. 水稻—遗传育种 IV. S511.032

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2009) 第 232785 号

责任编辑 张维平
封面设计 龙文视觉

出版发行 中国环境科学出版社
(100062 北京崇文区广渠门内大街 16 号)
网 址: <http://www.cesp.com.cn>
联系电话: 010-67112765 (总编室)
发行热线: 010-67125803

印 刷	北京市联华印刷厂
经 销	各地新华书店
版 次	2009 年 12 月第 1 版
印 次	2009 年 12 月第 1 次印刷
开 本	787×960 1/16
印 张	7.25
字 数	125 千字
定 价	22.00 元

【版权所有。未经许可请勿翻印、转载, 侵权必究】

如有缺页、破损、倒装等印装质量问题, 请寄回本社更换

目 录

1 菰属植物研究进展	1
1.1 菰属植物分类及其生物学特性.....	1
1.2 菰属植物与水稻育种应用研究现状.....	8
1.3 菰属植物分子水平研究状况.....	11
2 植物抗病基因研究进展	17
2.1 植物病害的种类及相关概念.....	17
2.2 植物抗病反应	19
2.3 植物抗病基因种类	19
2.4 NBS-LRR 类抗病基因.....	20
2.5 植物抗病基因作用机理	23
2.6 植物抗病基因的克隆	25
3 基因组文库	28
3.1 基因组文库概述	28
3.2 人工染色体的种类及特征	29
3.2.1 酵母人工染色体 (YAC)	29
3.2.2 细菌人工染色体 (BAC)	30
3.2.3 源于 P1 的人工染色体 (PAC)	31
3.2.4 双元细菌人工染色体 (BIBAC)	31
3.2.5 可转化人工染色体 (TAC)	33
4 菰基因组 TAC 文库的构建及筛选.....	36
4.1 材料	37
4.1.1 主要材料	37
4.1.2 主要试剂	38

4.1.3 主要仪器	38
4.2 方法	38
4.2.1 菰 HMW DNA 的制备	39
4.2.2 TAC 克隆载体的制备	40
4.2.3 感受态细胞的制备	41
4.2.4 连接转化	41
4.2.5 收集与保存	42
4.2.6 菰基因组 TAC 文库的鉴定	42
4.2.7 菰基因组 TAC 文库的筛选	43
4.3 结果与分析	44
4.3.1 菰 HMW DNA 的制备	44
4.3.2 预酶切条件的确定	45
4.3.3 大量酶切后分离基因组 DNA	45
4.3.4 连接转化	46
4.3.5 菰基因组 TAC 文库克隆保存	46
4.3.6 菰基因组 TAC 文库的鉴定	47
4.3.7 菰基因组 TAC 文库的筛选	51
4.4 讨论	55
4.4.1 构建 TAC 文库的优势	55
4.4.2 构建菰基因组 TAC 文库条件的优化	55
4.4.3 菰基因组 TAC 文库的鉴定	56
4.4.4 菰基因组 TAC 文库的保存和筛选	57
4.4.5 菰基因组 TAC 文库的应用	57
4.5 结论	58
参考文献	59
附录 GenBank 已公布的菰 (<i>Zizania latifolia</i>) 基因序列	69
缩略语	111
致 谢	112

菰属植物研究进展

1.1 菰属植物分类及其生物学特性

菰[*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz.]为须根性多年生沼泽植物, 属禾本科, 稻亚科, 稻族, 菰亚族菰属。目前, 菰属有 4 种, 分别是水生菰(*Z. aquatica* L.), 沼生菰(*Z. palustris* L.), 得克萨斯菰(或流水菰)(*Z. texana* Hitchc)及菰[*Zizania latifolia* (Griseb.)] (中国高等植物科属检索表, 2002)。其中, 前 3 种菰属植物分布于北美洲。从加拿大南部到墨西哥湾, 从大西洋到落基山脉范围内的浅湖、缓溪、小河和沼泽中, 特别是美国和加拿大五大湖地区, 广泛生长着北美菰。菰是菰属中最原始的种, 原产中国, 由它分别向水生菰与得克萨斯菰演化, 再由水生菰演化至沼生菰(陈守良等, 1990, 1991, 1991, 1993, 1994; 舒璞等, 1990)。

水生菰和沼生菰是除得克萨斯菰外北美的另外两个种, 主要分布于北美洲的东部和中北部, 两种均为一年生。水生菰又称南部野生稻, 从墨西哥湾到南部的大湖, 在该种的几个变种中, *Z. aquatica* var. *aquatica* L.分布最为普遍(Frohn, 2001)。

沼生菰, 也称北部野生稻, 有两个变种 *Z. palustris* var. *palustris* (Fassett) Dore 和 *Z. palustris* var. *interior* L., 或者两个亚种(陈守良等, 1994)。只有 *Z. palustris* var. *palustris* 具有重要的经济价值, 呈补丁状分布于加拿大沿海省份和北部的新英格兰, 穿过大湖与大草原交叉。*Z. palustris* var. *palustris* 在当地作为传统食物已经好几个世纪, 近年来已经被作为特别的经济作物栽培而得到广泛食用, 在超市和餐馆里随处可见。目前在美国主要栽培于明尼苏达州和加利福尼亚州, 与水稻栽培一样管理。正因为该品种具有较高的经济效益, 因而在北美的 3 种菰中是研究最多的一种。

得克萨斯菰分布于美国得克萨斯州的圣马克斯河岸,呈狭长形分布,有 10 km 长,目前已被美国联邦立为濒危物种。

菰 [*Z. latifolia* (Griseb.) Trucz] 主要分布于东亚,原产中国,现在中国(含台湾)、俄罗斯(东部西伯利亚和远东地区)、日本、韩国以及中南半岛各国的湖泊、池塘、水溪、河岸、沼泽中均有广泛分布。

菰属 4 种植物在形态、生长周期等方面存在一定的差异(表 1.1)。

我国菰资源非常丰富,除西藏、新疆尚未发现以外,菰在全国各地湖泊、池塘、水溪、河岸和沼泽中广泛生长,主要分布于东部平原的湖泊沿岸地带,尤以长江中、下游和淮河流域的一些湖泊处更为集中(Zhai *et al.*, 1994; 翟成凯等, 2000)。翟成凯等曾对我国一些重要湖泊的菰资源进行过统计与估算(表 1.2)。

表 1.1 中国与北美菰植物的比较(翟成凯等, 2000)

Table 1.1 Comparison of wild rice in China and North America

观察指标	北美菰			中国菰
	水生菰	沼生菰	流水菰	
幼苗外胚叶形状	披针形	披针形	线状披针形	披针形
幼苗中胚轴长度/mm	10~16	10~15	0.6	8
第一真叶	披针形	披针或卵状披针	钻形	披针形
第二真叶	披针形	线状披针形	披针形	披针形
第三真叶	披针形	线状披针形	披针形	披针形
生长周期	1 年生	1 年生	多年生	多年生
生长环境	静水、沼生	静水、沼生	流水中	静水、缓流
每粒菰米平均重量/mg	47 左右	47 左右		15 左右
菰米颜色	黑色或深棕	黑色或深棕		墨绿或浅棕
菰米长度/mm	15~20	15~20		10 左右
菰米颖径/mm	1.5~2.0	1.5~2.0		1.2 左右
生长茭白	无	无	无	有

表 1.2 中国一些湖泊的野生菰资源(翟成凯等, 2000)

Table 1.2 Plant resource of wild rice in Chinese lake

湖泊	菰草面积/km ²	菰草产量/(t/a)	菰米产量/(t/a)
南四湖	133.3	150 000	5 000
洪湖	127.0	143 000	4 762.5
洪泽湖	80.0	90 000	3 000
太湖	40.0	45 000	1 500

湖泊	菰草面积/km ²	菰草产量/(t/a)	菰米产量/(t/a)
巢湖	33.3	37 500	1 250
白马湖	12.0	13 500	450
高邮湖	26.7	30 000	1 000
骆马湖	20.0	22 500	750
石臼湖	13.3	15 000	500
宝应湖	2.6	2 900	97.5
合计	488.2	550 000	18 000

菰一般生长在水深 1.0~1.5 m 的沿岸带,耐水性较强,能在比较寒冷的水中生长。其群落多以菰为建群种,呈片状分布;也有与芦苇、蒲草等挺水植物混生(颜素珠,1997)。菰具肥厚的根状茎,雌雄同株异位,基部节上有繁殖力很强的不定根,在底质富含腐殖质的地区生长较好。因此,菰可用种子和不定根两种方式繁殖。

由于营养丰富和风味宜人,茭白成为我国居民自古以来就食用的传统蔬菜。其实,茭白是菰的嫩茎基部经黑粉菌寄生后,形成的膨大肉质茎。因其质嫩色白宛如小儿手臂,又称茭手或菰首,古称“出隧”、“绿节”。当菰拔节抽穗时,如果接触到黑粉菌(*Ustilago esculenta* P. Henn.),黑粉菌菌丝就会入侵到花茎薄壁组织内,从茎组织获得营养,菌丝的新陈代谢产生一种生长素类的分泌物,刺激薄壁组织的生长,使茎部膨大形成可食用的茭白,植株也就不开花结籽。茭株体内如无黑粉菌寄生,花茎则不膨大,正常抽穗开花甚至结实,这种茭株称为“雄茭”,食用价值较低。有的茭株体内黑粉菌寄生后,在花茎内迅速形成厚垣孢子,使茭肉变成一包黑灰,这被称作“灰茭”,也不能食用(李云善等,2000)。

生长茭白的菰已被人工驯化,而非野生的菰,因其花轴不发育,不能抽穗开花,因此不能结果实。野生菰一般能抵抗黑粉菌侵入,从而开花结实。

我国古代称菰颖果为菰米或雕胡、雁膳、安胡、菰粱、雕菰,不仅供帝王食用,而且也是主要粮食作物六谷之一。我国祖先食用菰米的记载始于 3 000 多年前的周朝,其后历代均有记述(表 1.3)。唐代以后开始栽培食用茭白,菰米逐渐作为中药。而菰根在梁朝就已收入《本草纪集注》。菰首、菰菜在宋代收入《证类本草》。由于历史上的习惯,现代文献已将中国菰米定位于中药,先后收入《江苏省药材志》、《中药大辞典》、《全国中草药汇编》、《食物中药与便方》和《江苏省中药材标准》。因为菰米产量较低,特别是收获脱壳加工困难,加之对菰米的营养价值缺乏研究和了解,菰米现在已经鲜为人知,无人采收食用(翟成凯等,2000)。

表 1.3 中国菰米应用历史记录 (翟成凯等, 2000)

Table 1.3 Record on utilization history of Chinese wild rice

时间 (朝代)	记述	作者与史料
前 11 世纪—前 221 年 (周朝)	凡王子饌, 食用六谷。凡会膳之宜, 鱼宜菰 (六谷: 稌、黍、稷、粱、麦、菰)	周公 ((周礼》 《周礼·天官·膳夫》
前 465 年—前 50 年 (周和西汉)	饭之品有黄黍、稷稻、白粱、白黍、黄粱, 此诸侯之饭, 天子又有麦与菰。食蜗醢而菰	戴圣《礼记》
前 465 年—前 50 年 (周和西汉)	五殖之状甚泽以疏离坼以臞瘠, 其种雁膳 (菰) 黑实	管子《管子》
前 300 年 (战国)	五谷六仞, 设菰粱只	屈原《楚辞·大招》
前 11 世纪—前 206 年 (周朝)	啍雕蓬。雕蓬即茭米, 古人以为五饭之一	《尔雅》
前 278 年 (战国)	为臣炊雕胡之饭, 烹露葵之羹	宋玉《讽赋》
前 140 年 (西汉)	安胡 (菰米) 之饭, 博之不解, 一啜而散	枚乘《七发》
公元 193 年—232 年 (三国)	芳菰精稗, 霜蓄露葵	曹植《七启》
281—341 年 (晋朝)	汉太液池边皆是雕胡。菰之有米者, 长安人 谓元雕胡。菰之有首者, 谓之绿节是也	葛洪《西安杂记》
492—500 年 (梁朝)	陶弘景曰“菰米——名雕胡, 可作饼食”, 并 把菰根收入《本草经集注》	陶弘景《本草经集 注》
739 年 (唐朝)	跪进雕胡饭, 月光照素盘	李白《宿五松山下 荀媪家》
766—769 年 (唐朝)	波漂菰米沉云黑	杜甫《秋兴八首》
1061 年 (北宋)	菰蒋草至秋结实, 乃雕胡米也, 古人以为美 饌	苏颂《本草衍义》
1161 年 (南宋)	雕胡, 菰蒋米也。菰曰蓬, 今人谓之茭。雕 蓬者米茭也, 其米谓之雕胡, 可做饭	郑樵《通志》
1194 年 (南宋)	二升菰米晨炊饭, 一碗松灯夜读书	陆游《题斋壁·又》
1217 年 (元朝)	菰米——名茭米。菰生水中, 至秋结实乃雕菰 米也	李杲《食物本草》
1406 年 (明朝)	采茭菰笋热油盐调食或采子舂米合粟煮粥	朱橚《救荒本草》
1578 年 (明朝)	雕胡 9 月抽茎, 结实长寸许, 霜后采之。皮 黑褐色, 其米甚多滑腻, 做饭香脆	李时珍《本草纲目》
1758 年 (清朝)	菰米——名茭米, 救荒, 可疗饥	吴仪洛《本草从新》
1921 年 (民国)	菰米可充饥救荒、俭岁以为煮饭食, 为六谷 之一	谢观《中国医学大 辞典》

在北美, 菰颖果被称作“wildrice”。数百年前, 美国和加拿大的印第安人便有收割 wildrice 食用的习惯。几个世纪前, 探险者首次进入美国北部大湖区时, 曾把 wildrice 描绘成能提供丰富可口又具丰富营养的天然作物, 而且无需播种和耕作。随着时间推移, wildrice (主要为水生菰米) 已不再是印第安人的主食, 但却因其独特色泽和风味而成了北美白人的精粮, 成为制作营养汤、食物填充剂、饭后甜点以及肉类菜肴等上好材料。20 世纪 70 年代, 美国已实现 wildrice 的商业化生产。从那时起, 美国和加拿大超市的货架上便有了 wildrice 的踪影, 且价格远高于其他谷物产品 (Lorenz, 1981)。

北美学者很早便对 wildrice 的营养成分进行过详尽的分析 (Fassett *et al.*, 1924; Steeves *et al.*, 1952; Anderson *et al.*, 1976; Watts *et al.*, 1981; Aiken *et al.*, 1988)。据研究, 水生菰米中含蛋白质 12.4%~15.0%, 远超过栽培稻 (*Oryza sativa* L.) 6.7% 的蛋白质含量; 脂类化合物含量 0.5%~0.8%, 其中人体必需脂肪酸亚麻酸约占 30% (Anderson, 1976)。

我国直至 20 世纪 90 年代才有菰米营养成分及食品安全性的相关报道。食品安全性和毒理学研究表明, 被列为中药的中国菰米, 在产地的渔民中都有食用历史, 未见不良反应; 体内和体外试验, 生殖细胞、体细胞和急性试验都无毒、致突变性和致癌性 (翟成凯等, 2000)。营养学研究则表明, 在我国菰米中, 无机盐、维生素和膳食纤维的含量都远远高于大米、小麦、大麦等禾谷类作物; 蛋白质及其必需氨基酸 (尤其是大部分谷物食品中的第一限制性氨基酸——赖氨酸) 含量是大米和其他谷类的 2 倍, 而且氨基酸构成比例合理, 评分达 84, 蛋白质功效比值为 2.75, 显著高于大米、面粉和大豆, 堪属优质蛋白质 (翟成凯等, 1992, 2000) (表 1.4, 表 1.5)。中国菰米和北美 wildrice 营养成分比对分析还表明, 二者蛋白质含量无显著差异, 但中国菰米的维生素 B₁、维生素 E 含量及氨基酸评分、蛋白质功效比值均高于北美 wildrice (Zhai *et al.*, 1994; Zhai *et al.*, 2001)。可见, 中国菰米具有的营养品质又是水稻优质育种长期以来追求的目标 (江良荣, 2004; 许世卫, 2004)。

菰米不仅是优质蛋白质的来源, 而且由于含有较多叶绿素, 日本已经把菰米列为叶绿素类的健康食品, 可治疗糖尿病, 预防中风, 增强免疫功能; 对高血压、糖尿病、肝炎、胃病等也卓有成效 (张永青等, 2001)。

茭白是我国特有蔬菜, 品质柔嫩, 营养丰富。据分析, 100 g 茭白中含蛋白质 1.5 g, 脂肪 0.1 g, 碳水化合物 4 g, 热量 96.1 kJ, 钙 4 mg, 磷 43 mg, 铁 0.3 mg, 胡萝卜素微量, 维生素 B₁ 0.04 mg, 维生素 B₂ 0.05 mg, 维生素 B₃ 0.6 mg, 维生素 C 2 mg。除食用外, 茭白亦可入药。根据《食疗本草》记载, 茭白利五脏邪气、酒

后面赤、目赤、卒心痛、大便不畅、心胸烦热。目前茭白栽培面积较广，从我国台湾到北京，从舟山群岛西至四川盆地都有种植，以江浙的太湖流域栽培最多。茭白是目前浙江省种植面积最大的水生蔬菜，面积达2万亩左右（郭宏波，2008）。

表 1.4 蕺米的营养成分及其比较（翟成凯等，2000）

Table 1.4 Comparison of nutrient composition of Chinese wild rice and other cereals (g/100 g)

成分	蕺米	大米	玉米（黄）	高粱（红）	全小麦粉
水分	9.51	11.52	12.33	11.48	12.20
蛋白质	13.22	7.60	7.50	7.20	10.65
脂肪	1.07	0.41	4.27	3.18	1.85
灰分	1.30	0.31	1.47	1.50	1.50
粗纤维	1.70	0.10	1.33	0.75	1.95
碳水化合物	73.20	80.15	73.10	75.90	73.30
钙/（mg/100 g）	23.81	19.25	28.00	26.75	41.00
磷/（mg/100 g）	289.78	95.95	220.33	276.75	284.00
铁/（mg/100 g）	2.69	1.02	2.97	5.13	4.90
铜/（mg/100 g）	0.19	0.10	0.19	0.43	0.55
锌/（mg/100 g）	1.61	0.38	1.87	2.08	2.98
硫胺素（VB ₁ ）	0.59	0.10	0.37	0.28	0.30
核黄素（VB ₂ ）	0.11	0.10	0.10	0.08	0.09
尼克酸	1.50	1.78	2.20	1.40	4.00
钾	203.89	65.18	270.00	254	127.00
钠	3.85	2.38		1.4	1.30
镁	114.42	47.44	60.00	53.80	30.50
锰	1.27	0.61	3.67	0.59	2.55
镍	0.03	0.01	0.02		
钴	0.06	0.02	0.001	0.001	0.002
铬	0.12	0.03			

表 1.5 蕺草粉的主要营养成分（翟成凯等，2000）

Table 1.5 Nutrient composition in powder of wild rice grass (g/100 g)

水分	蛋白质	脂肪	粗纤维	灰分	钙	磷
13.7	7.4	2.3	26.9	10.2	0.49	0.12

日本学者还从茭白（被黑粉菌感染的蕺）中分离到两种抑制破骨细胞形成的化学物质，其中1种为以前未曾报道的新物质（Kawagishi *et al.*, 2006）。

为了检验蕺米代替大米与小麦淀粉（中国现代城市居民膳食结构）为主食，

对高脂肪和高胆固醇膳食的模型动物血脂和抗氧化状况影响是否具有令人满意的结果,研究者用菰米(*Zizania latifolia* (Griseb) Turcz)作为碳水化合物来源喂养模型大鼠作为实验1组,以大米和小麦淀粉为主食喂养为实验2组,而以葡萄糖与玉米淀粉作为碳水化合物主要来源为对照组,分别测定血脂各项指标。结果表明,与对照组相比,实验1组大鼠血清甘油三酯和总胆固醇显著降低,高密度脂蛋白胆固醇浓度升高;而实验2组血脂水平与实验组相当。而且菰米膳食能提高实验鼠血清和肝脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性与降低其丙二醛的浓度,从而改善大鼠的抗氧化能力,有效抑制内建的氧化胁迫。这一研究表明,即使采用高脂肪和高胆固醇膳食,菰米仍能有效抑制高脂血症和氧化胁迫的发生(Zhang *et al.*, 2009)。

化学成分分析还证明,菰草是优质饲料(王业勤等,1989;潘福生等,1993;翟成凯等,2000)。

由于菰米和菰草的营养价值较高,不少国家在菰属植物的栽培、加工和药用方面都已申请了国际专利,如世界德温特创新专利索引(Derwent Innovations Index)。据查证,国际上自1998年后申请的有关菰属植物的专利共有10个,其中1个为美国所有,3个为日本所有,6个为韩国所有;申请时间主要集中在2002年以后;专利内容围绕具有预防和治疗某些疾病作用的菰叶茶、功能食物、化妆品和药物等产品的开发。

菰不仅拥有籽粒品质好、茎叶营养成分高、茎秆粗壮、分蘖力强,耐低温和深水、灌浆成熟快、生物产量高等特点,还具有一些水稻普遍缺乏的优点,如抗病虫害能力极强。菰几乎不感染水稻的各种病虫害(如不感稻瘟病、纹枯病、白叶枯病)(王晓丽等,2006)。菰的这些特性对于水稻的种质改良具有实际应用价值,是扩大和丰富水稻基因库理想的野生资源。

综上所述,中国菰资源极为丰富,其根、茎、叶、果都有多种用途,具有很高的经济价值。对此一方面我们应该对菰建立一系列的开发措施,并且加强对菰根、菰叶、茭白、菰米的植物化学,药理和生理作用的研究,提高我国菰资源开发利用的科技水平。另一方面,菰是一种能为水稻分子育种提供优质基因的理想野生植物,并且经过育种学家多年的努力已经获得了一系列转菰基因的水稻突变体。然而现有的转菰基因的水稻突变体均为将外源DNA直接导入到水稻基因组中获得的,被导入DNA由于缺乏标记基因,所以同时存在着导入效率低、导入效果鉴定难度大及控制机制缺乏、目的性较差等问题。因此,为了加快菰基因的利用研究,有必要引入一种方便、快捷,效率高、目的性又较强的基因克隆与转化系统,以此获得菰中特有的基因(如抗病,抗虫等),并将其转入水稻以及其

他农作物中,获得更多的优良品种。

1.2 菰属植物与水稻育种应用研究现状

菰属植物茎秆粗壮、分蘖力强,耐低温和深水,灌浆成熟快,生物产量高,籽粒品质好,抗病虫害能力极强,几乎不感染水稻的各种病虫害(如不感稻瘟病、纹枯病、白叶枯病)。菰的这些特性对于水稻的种质改良具有实际应用价值,是扩大和丰富水稻基因库理想的野生资源。

鉴于菰米丰富的营养价值和广阔的市场前景,美国 20 世纪 70 年代开始,便投入了大量的人力物力致力于 wildrice 的育种研究。他们已将 wildrice 驯化为水田栽培,并进行大面积种植(Oelke *et al.*, 1982; Grombacher, 1997)。目前,在美国 wildrice 的主要产地——Minnesota, Wisconsin 和 California 三大州的种植面积达 11 000 hm²。据统计,1997 年 wildrice 为美国的农业经济增加了 2 100 万美元收入(Kennard *et al.*, 1999)。然而,由于落粒性等一直得不到很好的解决,这些年来, wildrice 的产量一直呈下降趋势,这极大地延缓了它的驯化进程。

野生品种向驯化品种的转变,主要是其种子落粒性状的丧失(DeWett, 1978)。因而,美国明尼苏达大学 1972 年启动的 wildrice 育种工程主要着重于非落粒性品种的选育。虽然近年来获得了一些不落粒品种,但种子落粒性一直是 wildrice 减产的主要原因。这是由于随着栽培轮回的增长,水田中由落粒性植株散落的种子不断积累,比例逐年增加。据报道, wildrice 由种子落粒性造成的减产比例由 1977 年的 26% 增加到 1994 年的 40% 以上(Schetz, 1977; Porter, 1994)。

我国自 1960 年起就有人开始进行菰与水稻有性杂交的尝试,以期选育适宜低洼地区种植的耐沤、耐涝性强的优良水稻品种。但由于菰与水稻在分类上为不同属,亲缘关系较远,有性杂交不亲和,使这些努力未能成功(富威力等, 1992)。

鉴于菰属植物驯化上和传统杂交育种上的重重障碍,我国部分学者另辟蹊径,尝试着通过传统育种和生物技术等手段,将中国菰的基因组 DNA 直接导入水稻,并育成了一些具有菰部分性状的水稻突变体。

虽然传统遗传学认为水稻和菰不能杂交,但吉林省通化农科院的朴亨茂于 1976 年采用一种特殊的杂交方法即“复态授粉法”,成功地将紫花菰(*Zizania latifolia* (Griseb.) Turcz. Ex Stapf)的部分优良性状导入到水稻中,并选育出了通 35、通 31 等大面积推广的优良水稻品种;赵基洪等通过花粉管通道法也实现了水稻松前与菰间的性状转移,获得了可遗传的转基因水稻种子,所获得的转菰基因后代性状变异深刻、类型丰富,多种数量性状改良明显,得到了部分形态、

生育及经济性状方面有价值的材料；刘宝等还通过体细胞融合方法获得菰—中华 8 号水稻体细胞杂种 (SH6) (富威力, 1992; 朴亨茂等, 2000; 赵基洪等, 2000; 李云善等, 2000; 李云善等, 2001; Dong *et al.*, 2004)。

湖南农科院不仅成功地将菰核 DNA 转入水稻, 而且获得了一个对纹枯病菌 *R. solani* 有很强抗性的转基因水稻品种 4011 (Zhan *et al.*, 2001)。纹枯病是水稻三大病害之一, 目前还未找到相应抗源。近年来, 纹枯病已经上升为水稻最主要病害, 并呈现四大特点: 一是发生面广 (在美国、南美的巴西、委内瑞拉、欧洲和非洲等地区的主要稻区均有发生, 但东南亚稻区受害更重; 我国的华南、华中和华东稻区发生较重, 华北、东北和云南稻区有发生, 局部地区也为害较重); 二是抗纹枯病品种极少 (现在种植推广的品种都有不同程度发生); 三是危害程度日益严重 (造成大量危害, 甚至穿顶倒伏; 染病的田块一般减产 5%~10%, 严重的可达 50%~70%); 四是先由稻株下部隐蔽发生 (容易忽视而错过防治有利时机)。因此, 抗纹枯病转基因水稻品种 4011 的获得, 无疑为关注纹枯病者提供了另一条可以借鉴的有效途径。

“复态授粉法”获得菰渐渗系水稻 RZ1、RZ2、RZ35 的具体过程如下: 在水稻日本品种松前 (Matsumae) 开花期, 早晨四点将其去雄后用育种袋将花序包好。第二天早上用菰的花粉给去雄后的松前授粉。40~50 个小时后, 用松前的花粉进行第二次授粉。通过这种方法得到一株具有菰特征的 F_1 代杂种植株, 细胞学观察, 该植株的染色体数目与母本水稻完全相同。该 F_1 代杂种保持严格自交, 最后得到能够稳定遗传的渐渗系 (Liu *et al.*, 1999)。

体细胞融合方法获得菰—中华 8 号水稻体细胞杂种 (SH6) 具体过程如下: 取中华 8 号水稻的成熟种子, 接种于含 2 mg/L 2,4-D、0.2 mg/L 玉米素、7 g/L 琼脂的 MS 固体培养基上诱导愈伤组织。选取有胚性的碎小的愈伤转入同成分的液体培养基进行培养。六周后, 挑选高胚性、长势快且悬浮生长的愈伤, 从中分离出原生质体。从生长 14 d 的无菌的菰的叶肉中分离原生质体, 用 ^{60}Co γ 射线以 50 Gy/min 的速率照射菰的原生质体, 将菰的基因组 DNA 打成小片段。通过电融合的方式将得到的两种原生质体融合, 将中华 8 号未进行融合处理的原生质体与融合后的一起在改良的 MS 培养基上培养, 当愈伤长至直径 2~3 cm 时, 转移到 N6 培养基上进行分化, 将分化出的再生植株, 移栽到土中生长, 即获得体细胞杂种与中华 8 号再生苗。细胞学观察, 体细胞杂种的染色体数 ($2n=24$) 与母本水稻 (中华 8 号) 完全相同 (Liu *et al.*, 1999)。

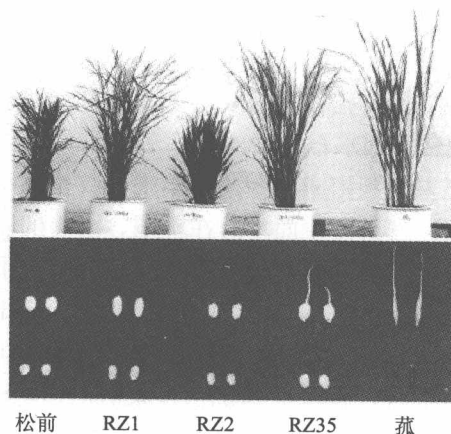


图 1.1 松前、渐渗杂交系 RZ1、RZ2、RZ35 与菰抽穗期植株及种子形态
(引自 Liu *et al.* 1999. Journal of Genetics and Breeding 53: 279-284)

Fig.1.1 Variations in plant stature and seed morphology of the three RILs compared with *Matsumae* and *Z. latifolia*

(From Liu *et al.* 1999. Journal of Genetics and Breeding 53: 279-284)

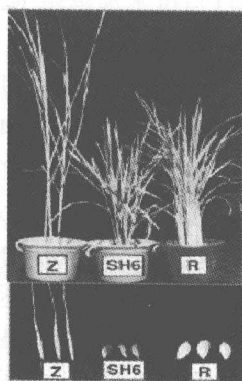


图 1.2 中华 8 号、体细胞杂种 (SH6) 与菰抽穗期植株及种子形态
(引自 Liu *et al.* 1999. Theoretical and Applied Genetics 98: 1099-1103)

Fig.1.2 Variations in plant stature and seed morphology of the asymmetric somatic nuclear hybrid (SH6) compared with *Matsumae* and *Z. latifolia*

(From Liu *et al.* 1999. Theoretical and Applied Genetics 98: 1099-1103)

1.3 菰属植物分子水平研究状况

对于菰属植物育种外的研究,北美学者主要侧重于生理领域,诸如花发育、种质保存、抗性生理等,所用材料大部分为沼生菰(*Zizania palustris*),少数用水生菰(*Z. aquatica* L.)或得克萨斯菰(或流水菰)(*Z. texana* Hitchc.)。

酸性生长条件对菰属植物的影响(Boland *et al.*, 1992)、脱水期沼生菰和水稻胚与幼苗中脱水类蛋白的表达(Bradford *et al.*, 1992)、水稻和沼生菰胚胎发生期耐干性发育(脱水蛋白表达、脱落酸浓度和蔗糖的积累)(Still *et al.*, 1994)、决定沼生菰性别的小花发育事件和关键时期(Han *et al.*, 1999)、水生菰花组织学和发育形态学特征(Zaitchik *et al.*, 2000)、短期干燥阶段菰种子水分流失与发育能力研究(Horne *et al.*, 2000)、液氮处理后沼生菰胚的再生(Touchell *et al.*, 2000)、濒临灭绝种——流水菰胚的冷冻保存方案(Walters *et al.*, 2002)、再生水和天然水中,过量铜对沼生菰幼苗生长的影响(Nimmo *et al.*, 2003)等研究揭示了北美菰独特的生理性状,对菰传统育种具有一定的指导意义。

对两种沼生菰(*Zizania palustris* cv. Franklin and *Zizania palustris* cv. K-2Pi)决定性别的小花发育事件和关键时期研究表明,双性小花在雄花和雌花发育前形成;通过测定小花和圆锥花序长度建立发育指示物,则该指示物暗示,性别决定的关键时期是小花和圆锥花序长度分别为1~2 mm和3 cm时,而且被调查的两个菰群体有着相同的决定性别的小花发育阶段;双性小花阶段的器官抑制是单性花形成时期性别决定的必要步骤;对菰单性花中被抑制的雄蕊或雌蕊组织学观察结果显示,性别决定时期并未出现细胞死亡;此外,当比较雄性小穗中的雄性小花和雌性小穗中的雌性小花时,双性花中花药和雌蕊长度显示过度区域花发育是正常的(Han *et al.*, 1999)。

对6个品种水生菰种子淀粉的结构与理化性质研究发现,与栽培稻相比,野生稻种子长链淀粉具更高的膨胀力、水溶性、较低的 β -淀粉分解限制和黏性,水生菰种子中直链淀粉含量和支链淀粉结构的差异会造成加工以及品质上的差异(Wang *et al.*, 2002)。利用HPLC技术不仅测定了野生水生菰种子膳食纤维中酯键石碳酸的含量,还分离出寡聚淀粉羟基肉桂酸,探明了后者与细胞壁中多聚体的关联(Bunzel, 2002)。DFRC方法确证野生水生菰中存在木质素,并且木质素的组成会因菰种类而异(Bunzel, 2004)。

用沼生菰米喂食老鼠研究肝脏胆固醇含量,结果显示,栽培的沼生菰米能有效降低胆固醇浓度90%(Gallaher *et al.*, 2004)。对美国威斯康星州沼生菰的17

个居群采用同工酶对居群变异、生境、居群特性和植株生长、繁殖等表型变异的, 研究表明, 野生沼生菰拥有中等水平的遗传多样性, 居群大小与遗传变异呈正相关, 而居群隔离程度正好相反, 居群中植株的表型变异与遗传变异也呈正相关 (Lu *et al.*, 2005)。

研究发现, 水流速对得克萨斯菰的营养分配有着明显的影响, 高流速能使植株有更高的生物量, 良好的根系 (Power, 2005)。因菰属植物的种子都是顽拗型的, 因此不论是在成熟期还是在贮藏过程中对脱水都相当敏感。将得克萨斯菰种子在高浓度的糖水预培养, 然后以低温保护剂清洗后干燥至含水 0.6 g/g, 即可将低温保存后种子的存活率从 5% 升至 75% (Walters *et al.*, 2002)。2004 年 Richards 等发现通过以上保存法对遗传多样性没有造成明显的降低, 并认为此法适合该物种的迁地保护 (Richards *et al.*, 2004)。

目前, 有关菰属植物的分子水平研究尚处于起步阶段, 而且主要集中于比较遗传学 (Grombacher *et al.*, 1997; Hass *et al.*, 2003; Dong *et al.*, 2004)。

沼生菰比较图谱研究表明, 菰属植物染色体数为 $2n = 30$, 基因组大小为 850 Mb, 近似水稻基因组大小 (430 Mb) 的两倍 (Kennard *et al.*, 2000)。利用菰属植物与水稻等基因组的共线性关系, 已建立起北美菰 (*Zizania palustris* var. Interior L) 的第一个遗传比较图谱, 探明沼生菰种子落粒、农艺性状和颜色性状存在遗传分离现象, 并将控制主要农艺性状 (落粒性, 株高, 分蘖数, 花序和种子长度) 的基因进行了 QTL 定位, (Kennard *et al.*, 2002), 但对这些基因的其他信息以及菰的其他基因却知之甚少。

利用带有完整沼生菰基因组 DNA 和抗潮霉素 (Hygromycin) 基因的钴元素轰击栽培稻的愈伤组织, 能够将相当数量的菰 DNA 转移入栽培稻 (Abedinia *et al.*, 2000)。利用 RFLP 分子标记技术构建出沼生稻的遗传指纹图谱, 并与栽培稻进行了对比 (Kennard *et al.*, 2000)。以沼生菰为参照, 进一步研究了栽培稻在染色体水平上的遗传进化、重复序列以及各种基因特征等 (Hass *et al.*, 2003)。

我国学者在菰基因组进化、表观遗传学和利用生物技术及远缘杂交进行作物改良方面取得了丰硕成果。其中, 主要研究成果来自东北师范大学刘宝教授实验室。以下是该实验室各阶段有关菰分子研究具代表性论文的主要内容, 较充分反映了他们在菰研究领域的成就。

最初从分子水平上证明了“水稻-菰”杂种后代的确含有菰物种专化 DNA 序列 (Liu *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000; 朴亨茂, 2000)。

Tos17 是水稻 *copia*-like 类内源反转录转座子, 可被组织培养和外源 DNA 渐渗等各种胁迫激活。为证实由渐渗引起的转座因子迁移, 研究 Tos17 插入靶序列