

# 云南野生稻资源及其保护

肖素勤<sup>1</sup>, 殷富有<sup>1</sup>, 张绍松<sup>1</sup>, 余腾琼<sup>1</sup>, 陈玲<sup>1</sup>, 柯学<sup>1</sup>, 付坚<sup>1</sup>, 张敦宇<sup>1</sup>,  
钟巧芳<sup>1</sup>, 李定琴<sup>1</sup>, 陈越<sup>1</sup>, 孙治旭<sup>2</sup>, 岳英<sup>2</sup>, 郭顺云<sup>3</sup>, 王玲仙<sup>1</sup>,  
黄兴奇<sup>1</sup>, 杨雅云<sup>1</sup>, 王波<sup>1</sup>, 曾民<sup>1</sup>, 李娥贤<sup>1</sup>, 程在全<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所/云南省农业生物技术重点实验室/农业部西南作物基因资源与种质创制重点实验室, 昆明 650223; <sup>2</sup>云南省农业环境保护监测站, 昆明 650203; <sup>3</sup>云南省景洪市农环站, 景洪 666100)

**摘要:**云南野生稻生态类型丰富, 且具有抗白叶枯病、抗稻瘟病、耐旱、耐寒等栽培稻不具有或已经消失的遗传基因, 是水稻品种改良的优良基因库。然而, 随着人类社会经济活动对生态环境影响的加剧, 这一宝贵的战略性生物资源正面临着快速消失的危险。为了加强云南野生稻资源的保护, 近年来, 我们对云南野生稻资源开展了原生境保护(物理隔离方式和主流化方式)及非原生境保护(种质库、种质圃、细胞库和 DNA 库)等保护技术研究, 明确了各种保护方法的优缺点和适用性, 保护了云南野生稻的多样性和丰富度, 为改良栽培稻储备了丰富的基因源。

**关键词:**野生稻资源; 居群; 原生境保护; 非原生境保护

## Genetic Resources and Conservation of Yunnan Wild Rice Species

XIAO Su-qin<sup>1</sup>, YIN Fu-you<sup>1</sup>, ZHANG Shao-song<sup>1</sup>, YU Teng-qiong<sup>1</sup>, CHEN Ling<sup>1</sup>, KE Xue<sup>1</sup>, FU Jian<sup>1</sup>,  
ZHANG Dun-yu<sup>1</sup>, ZHONG Qiao-fang<sup>1</sup>, LI Ding-qin<sup>1</sup>, CHEN Yue<sup>1</sup>, SUN Zhi-xu<sup>2</sup>, YUE Ying<sup>2</sup>, GUO Shun-yun<sup>3</sup>,  
WANG Ling-xian<sup>1</sup>, HUANG Xing-qi<sup>1</sup>, YANG Ya-yun<sup>1</sup>, WANG Bo<sup>1</sup>, ZENG Min<sup>1</sup>, LI E-xian<sup>1</sup>, CHENG Zai-quan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology & Genetic Germplasm Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences/Yunnan Provincial Key Lab of Agricultural Biotechnology/Key Lab of Southwestern Crop Gene Resources and Germplasm Innovation, Ministry of Agriculture, Kunming 650223; <sup>2</sup>Yunnan Agricultural Environment Protection Station, Kunming 650203;

<sup>3</sup>Agricultural Environment Protection Station of Jinghong City, Jinghong 666100)

**Abstract:** Yunnan wild rice species have a lot of ecological types. The wild rice species have many good characteristics such as strong resistances to white blight disease, blast, insects, drought, coldness etc. They have many elite genes that rice cultivars do not have or already lost. Therefore wild rice is an excellent genetic germplasm library for rice breeding. However, in recent years, due to the intensive human activities, the important strategic biological resources-wild rice species are facing the danger of extinction. We have tried different approaches to enhance the conservation and protection of Yunnan wild rice resources. These approaches include *in-situ* conservation (physical isolation, mainstreaming approaches) and *ex-situ* conservation (genebank, field genebank, DNA bank, cDNA library and BAC library). Each conservation approach has its advantages as well as disadvantages, and has special application purpose. In general, we have preserved the diversity and abundance of Yunnan wild rice resources which would be important gene resources for improving cultivated rice in future.

**Key words:** wild rice resources; population; *in-situ* conservation; *ex-situ* conservation

收稿日期: 2016-08-17 修回日期: 2016-10-13 网络出版日期: 2017-04-17

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170417.0903.022.html>

基金项目: 国家自然科学基金( U1302265, 31401707, 31460054 ); 云南省科技计划项目( 2012HA002, 2015FB159, 2016RA002 )

第一作者研究方向为作物遗传育种。E-mail: xiaosuqin227@126.com

通信作者: 程在全, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: czquan-99@163.com

野生稻是水稻的原始祖先,蕴藏着十分丰富的优良基因<sup>[1]</sup>,研究和利用价值巨大。近年来,许多研究者一直致力于挖掘和利用野生稻中的优良基因,并利用分子标记、转基因和测序技术对野生稻中的优良基因进行了深入挖掘,取得了较好的成果,如在已鉴定的 35 个水稻抗白叶枯病基因中有 5 个基因(*Xa21*、*Xa23*、*Xa27(t)*、*Xa29(t)*、*WBB2*)是从野生稻中获得的<sup>[2]</sup>;在已克隆的抗褐飞虱基因中,*Bph14* 基因是从药用野生稻中克隆出来的,该基因编码的蛋白质能识别害虫入侵信号并激活防御机制<sup>[3]</sup>。在育种利用上,科学家们利用远缘杂交结合胚挽救,再结合回交、自交手段,将野生稻中的优良基因导入栽培稻中,不断提高栽培水稻的抗病虫、抗逆、品质和产量。比如,国际水稻所从 1969 年开始利用尼瓦拉野生稻与栽培稻杂交,将抗草状矮缩病的基因转入到栽培稻中,连续育成抗草状矮缩病的 IR28、IR29、IR30、IR32、IR34、IR38、IR40 等系列品种<sup>[4]</sup>,将长雄野生稻中含有的高抗白叶枯病显性基因 *Xa21* 转入到栽培稻中,获得了高抗白叶枯病的新品种<sup>[5]</sup>。这些研究对水稻生产产生了巨大影响。

中国野生稻在云南分布较广,云南野生稻具有许多抗白叶枯病、抗稻瘟病、抗纹枯病、抗稻飞虱、耐旱、耐寒、高光效、高产潜力大<sup>[6]</sup>等优良遗传特性和基因,是水稻品种改良的宝贵基因库<sup>[7]</sup>。从 20 世纪

20 年代首次在云南发现野生稻开始,先后有多次的野生稻资源普查和专项调查,迄今先后发现并有记载的云南野生稻的居群计为 161 个,其中普通野生稻 25 个、药用野生稻 14 个、疣粒野生稻 122 个<sup>[8]</sup>。然而,这一宝贵的战略性资源目前却面临着快速消失的危险<sup>[9]</sup>。近些年针对野生稻资源的专项调查表明随着人类社会经济活动的加剧及资源保护意识的薄弱,云南的野生稻和全国的野生稻一样,其减少和消失的速度之快,令人吃惊<sup>[10]</sup>,野生稻遗传资源的消失和灭绝引起的后果是难以估量的<sup>[11]</sup>。因此,如何安全、有效保护面临濒危的珍稀野生稻遗传资源是值得探索的,在探索基础上采取措施保护野生稻具有重大的现实意义和历史意义。近年来,根据不同目的、不同野生稻种特点、不同野生稻居群所处地理生态环境,我们对开展的云南野生稻原生境和非原生境保护进行综述,旨在安全有效地保护云南野生稻多样性和丰富度。

## 1 云南野生稻资源原生境居群变化情况

世界上目前共有 20 种野生稻种,其中中国有 3 种,即药用野生稻(*Oryza officinalis* Wall. ex G. Watt, CC 基因组 = 630 Mb)、普通野生稻(*Oryza rufipogon* Griff., A'A' 基因组 = 480 Mb)和疣粒野生稻(*Oryza meyeriana* (Zoll. & Moritzi) Baill., GG 基因组 = 1030 Mb)<sup>[12]</sup>(图 1)。

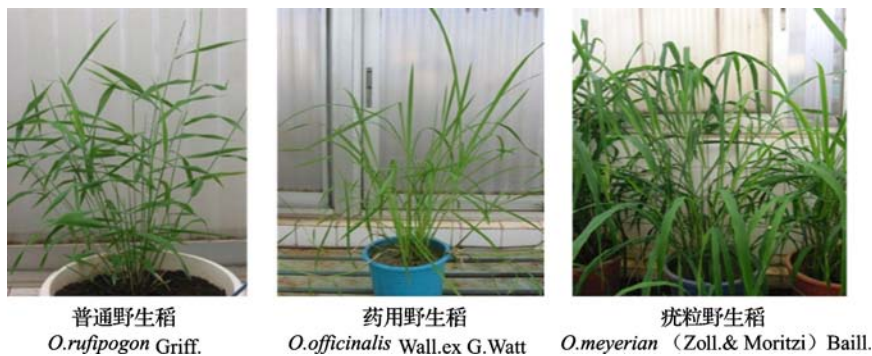


图 1 云南 3 种野生稻

Fig. 1 The three wild rice species of Yunnan

云南是我国 3 种野生稻的重要分布区,生态类型多。但已发现的云南野生稻原生境居群多处于有人类活动的区域或近缘区域<sup>[13]</sup>。从云南的实际看,20 世纪 80 年代以前,普通野生稻在西双版纳坝子几乎随处可见,疣粒野生稻在适宜区荒山林缘成片生长;80 年代以后,人类为了区域经济发展,加大了区域的开发强度,最典型的是农田垦殖范围逐渐扩

大,已发现的云南野生稻日趋濒危,3 种云南野生稻资源原生境居群变化巨大。

### 1.1 云南普通野生稻资源原生境居群变化情况

据记载,曾在云南 2 个州市 2 个县共发现普通野生稻原生境居群 25 个<sup>[14]</sup>。经核查,目前已经消失 23 个,消失率为 92%。目前自然状态下保存的云南普通野生稻居群为 2 个,其中,西双版纳州原生

境居群的景洪普通野生稻仅存红芒居群,而景洪普通野生稻白芒居群和直立型居群已经全部消失。仅在元江县保留有元江普通野生稻原生境居群(图2)。该居群由分布于不同水塘的4个亚居群组

成,4个亚居群中3个彼此距离较近约在100 m左右,另一个距离较远约有300 m。水塘周围植被主要是紫茎泽兰和热带灌木。现存的云南普通野生稻原生境居群、生态环境和濒危状况统计结果见表1。



图2 云南3种野生稻的原生境居群

Fig. 2 The three wild rice species populations of Yunnan *in situ* distribution points

表1 云南3种野生稻居群、生态环境和濒危状况

Table 1 The distribution, ecological environment and end angered status of Yunnan wild rice species

野生稻种类 Species	居群 Distribution	海拔(m) Elevation	居群面积 (m <sup>2</sup> ) Area	生态环境 Environment	濒危状况 End angered status
普通野生稻 <i>O. rufipogon</i>	元江县	780	66	朝阳水塘,周边紫茎泽兰和热带灌木	中度破坏,仅存4个亚群
	景洪市	650	200	沼泽地	严重破坏,仅存十几丛
	景洪市	550	150	沼泽地	严重破坏,仅存十几丛
药用野生稻 <i>O. officinalis</i>	耿马县景洪市	550	30	热带灌木林	严重破坏,仅存十几丛
	西双版纳	650	500	沼泽地	破坏重,仅存约50丛
		800	100	水塘	严重破坏,仅存十几丛
疣粒野生稻 <i>O. meyerian</i>	景洪市	630	1000	橡胶林下	中度破坏,约有50多丛
	景洪市	640	1500	橡胶林下	中度破坏
	景洪市	580	300	橡胶林下	严重破坏
	双江县	800	1000	阔叶灌木林	植被严重破坏
	耿马县	620	1200	杂草	轻微破坏
	耿马县	600	200	铁刀木林	严重破坏
	耿马县	700	500	竹林	将要灭绝
	耿马县	600	3000	铁刀木林	中度破坏
	耿马县	540	150	竹林	严重破坏
	沧源县	700	200	竹林	中度破坏
	镇康县	300	900	阔叶灌木林	灌木已被砍伐
	永德县	1000	100	阔叶杂树林	灭绝边缘
	镇康县	650	200	竹林	严重破坏
	盈江县	420	50	竹林灌木	尚未受到干扰
	盈江县	550	30	竹林灌木	中度破坏
	盈江县	1010	60	竹林灌木	轻微破坏
	龙陵县	570	50	灌木	严重破坏
龙陵县	620	100	竹林灌木	中度破坏	
思茅市	780	300000	竹林灌木	尚未受到干扰	
思茅市	700	25000	竹林	轻微干扰	
思茅市	580	30	橡胶林下	濒危	
思茅市	660	50	橡胶林下	严重破坏	
思茅竹市	600	1000	橡胶林下	严重破坏	

表 1(续)

野生稻种类 Species	居群 Distribution	海拔(m) Elevation	居群面积 (m <sup>2</sup> ) Area	生态环境 Environment	濒危状况 End angered status
	思茅市	650	100	橡胶林下	濒危
	澜沧县	550	8000	香蕉林下	严重破坏
	澜沧县	600	20	杂草竹林	濒危
	澜沧县	700	100	竹林	濒危
	澜沧县	750	50	竹林	濒危
	澜沧县	710	50	灌木林	濒危
	墨江县	1000	500	灌木林	轻微破坏
	江城县	1100	300	灌木林	轻微破坏
	澜沧县	700	50	竹林	严重破坏
	思茅市	780	60	灌木林	轻微破坏
	绿春县	630	80	灌木林	中度破坏
	思茅市	780	5000	竹林灌木	轻微破坏
	墨江县	800	100	灌木林	严重破坏
	墨江县	900	30	灌木林	濒危

### 1.2 云南药用野生稻资源原生境居群变化情况

据记载,曾在云南 3 个州市 5 个县共发现药用野生稻原生境居群 14 个。经核查,目前已消失 11 个,消失率近 78.5%。仅存的 3 个药用野生稻原生境居群分别位于临沧市和西双版纳州(图 2),现存的云南药用野生稻原生境居群、生态环境和濒危状况统计结果见表 1。

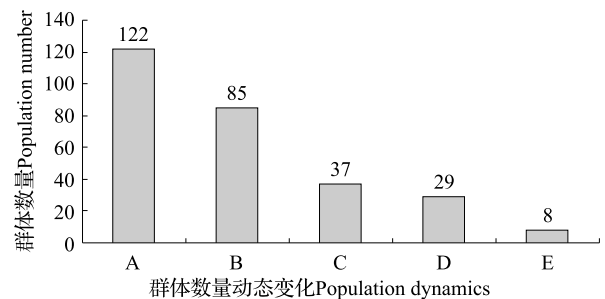
### 1.3 云南疣粒野生稻资源原生境居群变化情况

疣粒野生稻是云南 3 种野生稻中分布最为广泛的野生稻。据调查和统计,曾在 7 个州市 19 个县境内发现过 122 个居群。经核查,已消失 85 个,消失率近 70%。目前尚在 5 个州市 14 个县保留有 37 个原生境居群(图 3)。但大多数居群(29 个居群)原生境受到不同程度的破坏,仅有 8 个居群因地理分布远离村庄而得以较完整地保存。现存的云南疣粒野生稻原生境居群、生态环境和濒危状况统计结果见表 1。

由上述统计数据可知,近 30 年,已发现的云南 3 种野生稻原生境居群消失率已高达 70%~92%,处于极度濒危状态。尤其是在稻作演化中占有重要地位的景洪普通野生稻,其消失程度尤其严重。因此,加强野生稻遗传资源保护,尤其是人类频繁活动区域的近缘野生稻资源保护,是一个十分迫切和必须认真对待的问题。

## 2 云南野生稻资源保护研究

为了加强新时期云南野生稻资源多样性和丰富度的保护,多年来,我们对云南野生稻资源开展了原生境保护(物理隔离方式和主流化方式)及非原生境保护(种质库、种质圃和 DNA 库)的研究,现分述于下。



A:曾经发现记录的居群数量(1970-2010年);B:已经消失的居群数量(30年内);C:现存的居群数量;  
D:目前自然分布但其生态环境受到破坏的居群数量;  
E:目前自然分布其生态环境未受到影响的居群数量  
A:The populations have been recorded (1970-2010s),B:The populations have disappeared (in 30 years),C:The existing populations,  
D:The populations of natural distribution where the ecological environment has already been destroyed,E:The populations of natural distribution where the ecological environment is not affected

图 3 云南疣粒野生稻居群数量过去 30 年的变化情况  
Fig. 3 The change of *O. meyeriana* (Zoll. & Moritzi Baill.) population number in the past 30 years

### 2.1 云南野生稻原生境保护

原生境保护(*in-situ* conservation)(物理隔离方式和主流化方式)是野生生物资源保护最基本,也是最佳的保护方式之一<sup>[15]</sup>。在云南野生稻原生环境不断遭到人为干扰和破坏的条件下,积极探索原生境保护的可能方式意义重大。

**2.1.1 物理隔离方式建立的原生境保护区** 在对云南野生稻资源现状进行详细调研的基础上,根据 3 种野生稻的濒危状况、生态环境、居群遗传多样性分布等特点,在农业部“云南野生稻种质资源原生

境保护区建设”项目支持下,我们与当地政府和农业科技部门合作,在云南4个县(乡)等地分别建立了7个普通野生稻、药用野生稻和疣粒野生稻自然居群原生境保护区。其中,普通野生稻原生境保护区1个、药用野生稻原生境保护区2个、疣粒野生稻原生境保护区4个。保护区由核心区和缓冲区构成。核心区面积根据原居群大小,从10亩到100亩不等。核心区与外界采用物理隔离法隔离,即在核心区划定范围边缘,用铁丝网围栏加植物围栏(带刺植物,如蔷薇、剑麻等)隔离。这样既可以达到防止外人或动物进入的目的,又可以尽量在其自然状态下对其进行保护。同时,也克服了单纯铁丝网围栏因使用年限过久需要不断更新的问题。核心区内禁止一切耕种、放牧等农事活动,禁止任何建设项目,以保障野生稻在不受任何干扰情况下生长繁衍,逐渐恢复野生稻种群数量。核心区外围,设立缓冲区。缓冲区内,不得种植野生稻的近缘植物;所进行的人为活动应当不影响野生稻周边微生态条件。根据建设后续的一些跟踪调查发现,原生境保护区的建立使区内野生稻居群数量得到一定程度的恢复和增加,达到了在特殊条件下保护重要野生稻居群的目的。这种保护方式的不足在于,第一,截断了野生稻与农业生产协同进化的途径;第二,需要持续投入一定经费用于地方上请工对保护区进行必要的除杂草和灌溉。这种方式适用于特别重要的野生稻代表居群的保护。

**2.1.2 主流化保护方式** 主流化保护,即由全球环境基金和联合国开发计划署资助,在中国开展了“作物野生近缘植物保护与可持续利用(CWRC)”项目,采取与当地农业生产发展相结合的保护方式对野生稻资源进行保护。到目前为止,云南已将主流化保护方式应用于西双版纳傣族自治州景洪市和勐海县的2个药用野生稻和1个疣粒野生稻的原生境所在村庄。主流化保护区建设主要包括政策激励机制建设、生计替代激励机制建设、资金激励机制建设等3个方面共9项内容。野生稻保护纳入《村规民约》激励机制建设内容。通过科普教育提高了当地农民的野生稻保护意识,人畜不干扰破坏野生稻及其自然生长环境,使野生稻在自然状态下得到繁衍。在主流化保护方式中,还建立了野生稻资源监测预警系统,该系统建设以县级农业环境保护监测站为基础,管理人员使用该系统查看、采集保护点监测信息、预警信息,并录入上报,以便及时掌握已建立的保护点野生稻变化情况。CWRC项目在云南

实施取得的成果,对建立农业近缘野生资源保护区,消除野生稻资源保护威胁因素,推进地方农业野生稻资源保护政策法规的建立发挥了积极作用,对野生稻保护也较为有效。应该说,这种保护方式尽管投资大、操作相对复杂,但其避免了资源的碎片化,是作物珍稀野生近缘植物保护的最理想方式之一。

## 2.2 云南野生稻非原生境保护

非原生境保护,也叫异地保护(*ex-situ conservation*)是原生境保护的重要补充,具有保护效率高、成本低等特点。

**2.2.1 云南野生稻种质圃、种质库的保护** 鉴于野生稻有性繁殖和无性繁殖并存,异地种子萌发率极低的特性,为有效保护处于濒危状态的云南野生稻物种,我们选择在曾发现同时分布有3种野生稻的西双版纳州景洪市建立云南野生稻种质圃(周围数公里内无水稻种植),并从各个云南主要野生稻资源居群采集了野生稻植株移栽到该种质圃进行集中保存。该基地保存的普通野生稻有元江普通野生稻、景洪普通野生稻(红芒型、白芒型、直立型);保存的药用野生稻有耿马居群、孟定遮甸居群和宽叶居群;除此之外,还有疣粒野生稻,小粒野生稻(来自IRRI),长雄野生稻(来自非洲),东乡普通野生稻(来自江西东乡)等共计6种野生稻,20多个居群。野生稻种植面积达4亩(图4A)。同时,在昆明建立了200 m<sup>2</sup>温室,作为室内保存圃(图4B),保存重要的野生稻复份材料,以便研究取材之用。除此之外,在野生稻成熟期,我们还收集了6种野生稻的种子,保存于云南省农业科学院生物技术与种质资源研究所农作物生物资源保存与研究中心的种质库中。



A: 景哈基地野生稻种质圃; B: 昆明温室野生稻种质圃  
A: Germplasm collection of Yunnan wild rice in Jingha,  
B: Germplasm collection of Yunnan wild rice in Kunming

图4 云南野生稻资源种质圃

Fig. 4 Germplasm collection of Yunnan wild rice

**2.2.2 云南野生稻资源细胞库的保护** 由于植物细胞的全能性,理论上采取保存细胞和组织的方式可保护植物遗传种质。若采用细胞水平保存野生稻

遗传种质,就必须建立完整的细胞和组织培养再生体系,至少包括:愈伤组织诱导、继代培养、分化再生和低温保存。此类研究,国内外都进行过有益的探索,但以云南野生稻为研究材料的相关报道并不多见。几年来,我们结合相关研究进行过一些云南野生稻资源细胞库保护有益的尝试,现归纳总结于下。

**2.2.2.1 云南野生稻愈伤组织诱导** 研究以云南元江普通野生稻、景洪普通野生稻、疣粒野生稻和药用野生稻为材料,先后进行了花药培养、茎叶培养、成熟胚(种子)培养诱导愈伤组织的实验<sup>[16]</sup>。结果发现:(1)云南3种野生稻愈伤组织诱导(脱分化)的难易程度在本实验条件下(以下类同)为:疣粒野生稻>普通野生稻>药用野生稻。(2)外植体取材以成熟胚表现最佳。具体表现在:在诱导培养基上,伴随着种子发芽,成熟胚的种胚部位很快能长出愈伤组

织,待其长到2~3 mm时即可转入继代培养。其次为茎叶。花药培养仅景洪普通野生稻诱导出少量愈伤。部分实验结果见表2、表3、表4。此外,相关文献报道,以幼穗为外植体可获得较高愈伤诱导率<sup>[17]</sup>。因此,野生稻愈伤组织诱导以幼穗和成熟胚为佳,外植体材料(包括种子)新鲜程度对愈伤组织诱导影响极大,就同类外植体而言,不同的野生稻其愈伤组织诱导率也存在差异。如疣粒野生稻幼茎的诱导率为25.0%,高于药用野生稻的14.3%,而药用野生稻嫩叶的诱导率为18.8%,则高于疣粒野生稻的12.0%。(3)从愈伤诱导培养基来看,MS和N6均能诱导出愈伤。对疣粒野生稻而言,N6培养基的诱导率(33.3%)略高于MS培养基(29.1%)<sup>[18]</sup>。此外,激素2,4-D 4 mg/L和BA 0.2 mg/L的组合愈伤诱导率最高,KT在愈伤诱导中的作用不明显(表3)<sup>[19]</sup>。

表2 不同类型云南野生稻花药培养结果

Table 2 The results of anthers culture in different type of Yunnan wild rice species

野生稻类型 Wild rice species	低温处理 Low temperature treatment	接种花药数 Anther number of induction	出愈花药数 Anther number of callus	诱导率(%) Induction rate	生长速度 Growth rate
景洪普通野生稻 <i>O. rufipogon</i> Griff.	5 °C 处理 5 d	155	1	0.65	慢
药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Wall. ex G. Watt	5 °C 处理 5 d	4000	0	0	-
疣粒野生稻 <i>O. meyerian</i> (Zoll. & Moritzi) Baill.	5 °C 处理 5 d	250	0	0	-

表3 云南野生稻种胚诱导愈伤

Table 3 The embryo callus induction of Yunnan wild rice species

野生稻类型 Wild rice species	培养基(mg/L) Medium	接种数 Induction numbers	出愈数 Callus numbers	褐化愈数 Numbers of callus browning	生长速度 Growth rate	出愈率(%) Induction rate
疣粒野生稻 <i>O. meyerian</i> (Zoll. & Moritzi) Baill.	MS + 2,4 - D2.5 + BA0.2	55	16	3	快	29.1
	N6 + 2,4D2.5 + BA0.2	60	20	0	快	33.3
药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Wall. ex G. Watt	MS + 2,4 - D2 + KT1	50	9	6	极慢	18.0
	N6 + 2,4 - D3 + KT1	50	16	4	极慢	32.0
	MS + 2,4 - D4 + BA0.2	51	18	8	极慢	35.2
	N6 + 2,4 - D4 + KT1	56	13	8	极慢	23.2

表4 云南野生稻幼茎及嫩叶培养

Table 4 The young stems and leaves culture of Yunnan wild rice species

野生稻类型 Wild rice species	外植体 Explant	接种数 Induction numbers	出愈数 Callus numbers	出愈率(%) Induction rate	生长速度 Growth rate	胶状物 Jelly
疣粒野生稻 <i>O. meyerian</i> (Zoll. & Moritzi) Baill.	幼茎	10	4	25.0	快	有
	嫩叶	25	3	12.0	快	有
药用野生稻 <i>O. officinalis</i> Wall. ex G. Watt	幼茎	14	2	14.3	慢	极少
	嫩叶	16	3	18.8	慢	极少

### 2.2.2.2 云南野生稻愈伤组织继代培养与再生

研究表明:(1)在传统培养条件下,不同野生稻愈伤组织继代培养与再生的难度差异极大。疣粒野生稻表现最好,其次为普通野生稻,药用野生稻表现最差。疣粒野生稻愈伤组织继代培养中,能较好地保持愈伤细胞的胚性,继代培养 10 个月后,仍能保持较高的分化再生能力。普通野生稻愈伤组织继代培养 5 个月内能保持较高的分化再生能力,此后随继代培养时间延长,再生能力逐步下降。继代培养 8 个月后,愈伤组织虽仍能继代生长,但已难分化成绿苗。药用野生稻愈伤组织继代培养生长速度极慢,褐变严重,至今仍未找到较好的继代方法,自然也无从开展分化再生研究。(2)疣粒野生稻和普通野生稻愈伤组织在液体和固体培养基上均能正常继代生长,但在液体培养基中悬浮培养生长更快,继代周期要求

更短,通常每周需继代 1 次,比固体培养继代周期缩短 2 周<sup>[20]</sup>。一般认为,愈伤组织继代生长中的次生代谢物质积累会抑制其进一步生长,导致褐变。因此,两种继代方式可用于不同的实验目的。(3)从继代培养基来看,使用 MS 培养基继代时愈伤颜色较深且会逐渐褐变,而使用 N6 培养基继代,愈伤生长良好,呈淡米黄色,细胞排列紧密,呈现较好的胚性愈伤组织状态(表 3)。这表明 N6 对愈伤组织褐变现象的抑制效果好于 MS。(4)一般认为愈伤组织的生长状态是其分化再生的基础,生长较快的愈伤组织更容易再生成苗。云南普通野生稻和疣粒野生稻愈伤组织诱导分化再生情况见表 5。分化培养基中的激素配比和浓度,对野生稻愈伤组织分化再生影响极大。在一定范围内 BA 浓度增加,分化再生率会有所提高。

表 5 云南两种野生稻愈伤组织诱导分化情况

Table 5 The callus redifferentiation of two different Yunnan wild rice

野生稻类型	外植体	培养基 (mg/L)	分化率 (%)	分化苗数
Wild rice species	Explant	Medium	Differentiation rate	Differentiation numbers
元江普通野生稻	种子	N6 + BA3	11	89
<i>O. rufipogon</i> Griff.		N6 + BA0.1 + NAA0.01	9	93
疣粒野生稻	种子	MS + KT2 + BA0.5 + NAA0.5	100	130
<i>O. meyerian</i> (Zoll. & Moritzi) Baill.		N6 + KT2 + BA0.5 + NAA0.5	100	170

此外,来自不同植株的同类外植体(包括种子),其愈伤组织的生长速度均可能各不相同,不应作为同一株系混合培养,这也反映了野生稻种质的遗传多样性。

### 2.2.2.3 云南野生稻愈伤组织低温保存与再生

将早期继代培养生长良好的疣粒野生稻和普通野生稻愈伤组织,加入防冻剂(PEG10% + 葡萄糖 8% + DMS%)后,直接放入 -70 °C 冰箱中保存,或液氮速冻后放入 -70 °C 冰箱中保存。保存 2 个月、3 个月和 6 个月的愈伤组织,分别取出经化冻与洗涤(用 MS + 3% 蔗糖溶液洗涤 3 次)后,再放至继代培养基中进行恢复生长培养,两种愈伤组织均能快速恢复生长繁殖。转入分化培养基后,普通野生稻愈伤组织能正常再生成苗,疣粒野生稻愈伤组织表现不够稳定。

总之,普通野生稻和疣粒野生稻遗传物质可以通过建立细胞库进行保护,理论上讲,在有液体冷冻保护剂 + 低温保护下,愈伤组织细胞可以保存 1 ~ 2 年,然后再取出进行活化培养后,再保存细胞。但是就目前掌握的方法,还不能建立细胞库的方法对药用野生稻遗传物质进行保护。

### 2.2.3 云南野生稻遗传物质 DNA 库的保护

#### 2.2.3.1 云南野生稻 BAC 文库的构建

首先制备克隆材料,即以野生稻幼嫩叶片或愈伤组织为材料,有效提取野生稻核基因组大片段 DNA;将提取的野生稻核基因组 Mb 级大片段 DNA 包埋在低熔点琼脂糖制备的 plug 中进行脉冲电泳检测(图 5);用预先筛选确定的浓度和时间进行 *EcoR* I 限制性酶部分酶切、脉冲电泳、切胶检测;收集 100 ~ 400 kb 之间的胶条,电透析制备适合连接的 DNA 大片段(图 6),并用 λDNA 标准样品比对测定其浓度。其次是连接转化克隆材料,即将所获得的大片段 DNA,根据预先优化的连接转化条件,与 BAC 载体(pCC1BACTM Vector)连接,电激法转化到大肠杆菌(EP1300 感受态细胞)受体中,涂布到 15 cm 培养皿中 LB 固体培养基上进行培养;检测转化质量,白色重组克隆(含有野生稻 DNA 插入片段的克隆)的数量应大于 95% (BAC 文库构建转化标准);检测克隆质量,用限制性内切酶 *Not* I 随机检测转化所获克隆子,每个克隆子均应含有大于 50 kb 的插入片段(图 7)。再者是构建文库,即将所获克隆分别收集于

384 孔板中,保存液为 LB 液体培养基加冰冻保护剂,在 -70 °C 低温冰箱保存(1~2 年复制拷贝 1 次)。最后是文库质量检验,即用限制性内切酶 *Not* I 随机检测文库 60~200 个克隆子,确定插入片段大小分布范围和平均长度,据此计算所建文库的容量和基因组覆盖率。同时,检验其稳定度。从每个文库随机挑取 3 个克隆,连续继代培养 100 代后,用限制酶 *Not* I 酶切分析插入片段,发现所插入的 DNA 片段均未丢失,而且大小一样(图 8、图 9),表明所建云南野生稻 BAC 文库非常稳定,在理论上能够长久保存。

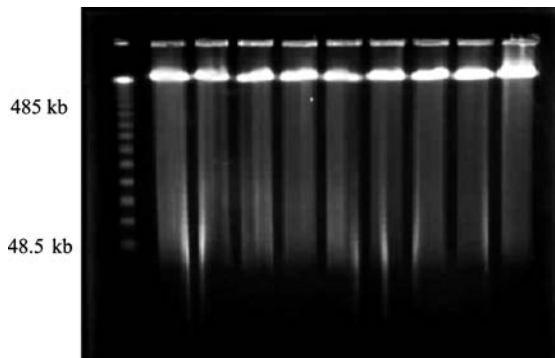
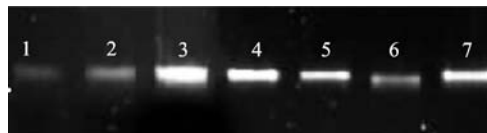


图 5 野生稻核基因组 Mb 级大片段 DNA

Fig. 5 Isolation of Mega base DNA from wild rice species



1,2,3:10 ng,20 ng,50 ng λDNA;4,5,6,7:制备的浓度和大小不同的 DNA 大片段  
1,2,3:10 ng,20 ng and 50 ng λDNA,4,5,6,7:The DNA fragments of different concentration and size

图 6 电透析制备的 DNA 大片段检测

Fig. 6 The detection of DNA fragments by electroporation dialysis

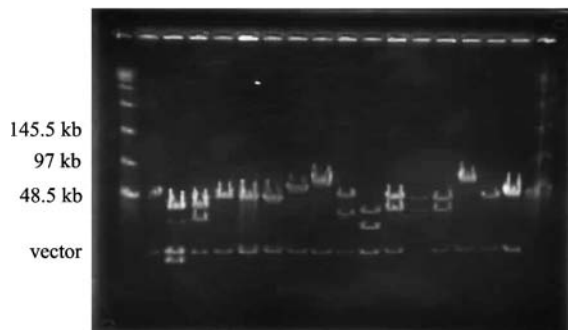


图 7 云南疣粒野生稻 BAC 文库 DNA 插入片段大小检测

Fig. 7 The BAC library detection of inserted DNA fragment size of *O. meyeriana*(Zoll. & Moritzi) Baill.

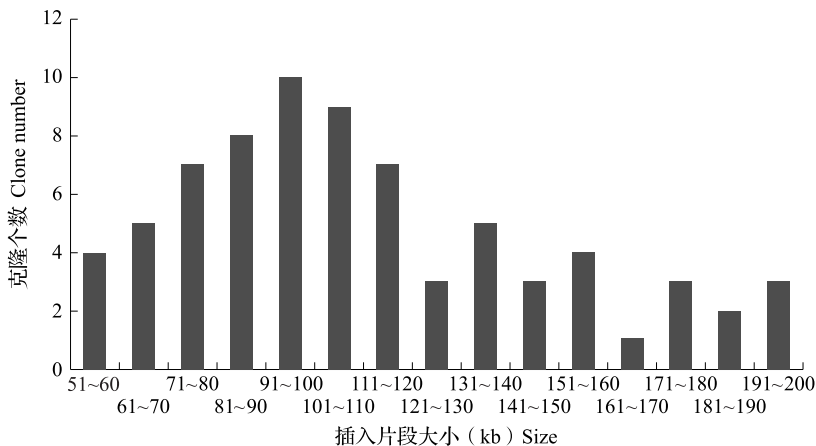


图 8 云南药用野生稻 BAC 文库 DNA 插入片段大小检测统计图(80 个克隆)

Fig. 8 The statistical graph of DNA inserted fragments size of *O. officinal* Wall. ex G. Watt BAC library (80 clones)

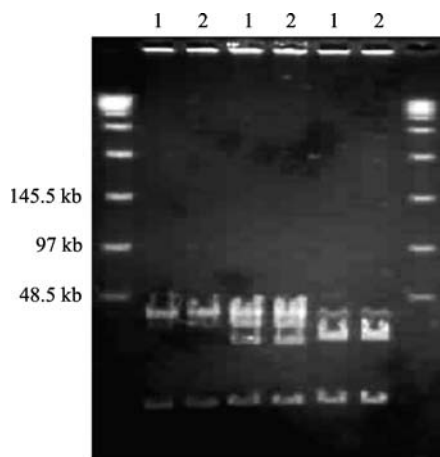
据此,我们建立了云南 3 种野生稻 BAC 文库。文库构建插入转化率大于 99% (载体自连率少于 1%);插入片段分布范围在 50~200 kb 之间,平均插入长度约为 80 kb;每种野生稻 BAC 文库约含 2.5 万~3 万个克隆,容量约为各野生稻基因组的 4~5 倍(图 5、图 9)。

**2.2.3.2 云南野生稻部分重要功能基因 cDNA 文库保存** cDNA (complementary DNA) 文库是一类 mRNA 反转录 DNA 文库,其遗传信息主要是表达

(编码)基因或功能基因(无内含子)。由于其源自 mRNA,因此,具有细胞、组织和生长过程(条件)的特异性。cDNA 文库的建立,可用于特异表达基因(功能基因)发掘与分析,同时也可将其遗传信息部分或全部保存于文库中,对于资源保存也是有帮助的。

结合相关研究,我们先后建立了元江普通野生稻生长旺盛期(6~7 叶期)叶片;元江普通野生稻重金属处理诱导;疣粒野生稻、药用野生稻白叶枯病菌





1:第1代菌株; 2:第100代菌株

1:The first generation strains, 2:The one hundredth generation strains

图9 云南野生稻 BAC 文库的稳定性检测

Fig.9 The stability detection of BAC library of Yunnan wild rice species

和稻瘟病菌诱导等 cDNA 文库。文库滴度达 100 万 pfu/mL 以上,插入片段分布在 400 ~ 5000 bp 之间。在筛选分离相关基因的同时,保存了大量野生稻特异表达基因遗传信息<sup>[21]</sup>。

**2.2.3.3 云南野生稻基因组 DNA 直接保存** 多次考察表明,云南野生稻不同居群的表型和遗传性状差异较大,居群间遗传多样性水平较高,每个居群各有一些特殊的性状和遗传变异。为了在分子水平上尽可能多的保存野生稻遗传多样性,我们筛选收集了部分地理分布间隔较远,表型差异较大,且又处于濒危状态的不同野生稻居群材料 48 份,分别提取其基因组大片段 DNA,直接于 -20 °C 中期保存和 -70 °C 长期保存,建立了云南野生稻总 DNA 保存库。所保存的野生稻基因组 DNA 可以用于构建 DNA 文库、分离克隆基因和 DNA 分子标记等研究。

### 3 结论

通过对云南野生稻资源开展了原生境保护(物理隔离方式和主流化方式)及非原生境保护(种质圃、种质库、细胞库和 DAN 库)等保护技术的研究,不仅明确了各种保护方法的优缺点和使用性,而且还安全有效的保护了云南野生稻资源的多样性和丰富度。所保护的云南野生稻基因源的利用不但可以推动稻种科学研究,而且可为水稻品种改良和良种

选育源源不断地提供特异基因源,为水稻育种带来革命性的突破提供了物质基础。本文信息量大,综述了探索出的用于野生稻的多种保存保护资源方法,为其他作物近缘野生种的保存保护提供了重要参考。

### 参考文献

- [1] 庞汉华,陈成斌. 中国野生稻资源[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2002
- [2] 潘英华,陈成斌,梁世春,等. 野生稻优异基因挖掘及其在水稻育种中的利用研究进展[J]. 安徽农业科学,2013, 41(24):9908-9910
- [3] Yang L, Li R B, Li Y R, et al. Genetic mapping of *bph20(t)* and *bph21(t)* loci conferring brown planthopper resistance to *Nilaparvata lugens* Stal in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. Euphytica, 2012, 183(2):161-171
- [4] Khush G S. Disease and insect resistance in rice[J]. Adv Agron, 1997, 29:265-341
- [5] Khush G S, Bscalango E, Ogawa T. A new gene *resis* lance to bacterial blight from *O. Longistaminata*[J]. Rice Genetics News Letter, 1990, 7:221-222
- [6] 章清杞,梁康迳,杨蜀岚,等. IRRI 野生稻渗入基因系稻瘟病、白叶枯病、褐飞虱抗性鉴定[J]. 种子, 2001, 4(30):17-23
- [7] 云勇,韩义胜. 我国野生稻资源的抗病性鉴定与利用研究进展[J]. 植物遗传资源学报, 2014, 15(3):427-476
- [8] 戴陆园,黄兴奇,张金渝,等. 云南省野生稻资源保存保护现状[J]. 植物遗传资源科学, 2001, 2(3):45-48
- [9] 张万霞,杨庆文. 中国野生稻收集、鉴定和保存现状[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(4):369-373
- [10] 王述民,李立会,黎裕,等. 中国粮食和农业植物遗传资源状况报告(I)[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1):1-12
- [11] 陈娟,张再君,刘林,等. 野生稻种质资源多样性保护现状及其完善对策[C]. 中国环境科学学会 2009 年学术年会论文集, 2009:687-691
- [12] 郑殿升,高爱农,李立会,等. 云南及周边地区农作物野生近缘植物[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(2):193-201
- [13] 杨庆文,秦文斌,张万霞,等. 中国农业野生植物原生境保护实践与未来研究方向[J]. 植物遗传资源学报, 2013, 14(1):1-7
- [14] 程在全,黄兴奇,钱君,等. 珍稀濒危植物——云南药用野生稻自然生态群的新发现及其特性[J]. 云南植物研究, 2004, 26(3):267-274
- [15] 杨庆文,张万霞,贺丹霞,等. 中国野生稻原生境保护方法研究[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(1):63-67
- [16] 丁玉梅,殷富有,王玲仙,等. 云南 3 种野生稻的花药离体培养研究[J]. 西南农业学报, 2006, 19(6):1023-1027
- [17] 殷富有,丁玉梅,王玲仙,等. 云南疣粒野生稻幼穗一步成苗培养与植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(6):1147-1148
- [18] 丁玉梅,程在全,黄兴奇,等. 云南野生稻不同染色体组型和外植体材料的离体培养研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(11):1922-1926
- [19] 张尧忠,宋令荣,赵永昌,等. 云南普通野生稻和疣粒野生稻组织培养的研究[J]. 西南农业学报, 2001, 14(4):17-19
- [20] 蔺忠龙,白现广,吕广磊,等. 疣粒野生稻胚性悬浮细胞系的建立及其原生质体的培养和植株再生[J]. 植物生理学通讯, 2008, (6):1181-1184
- [21] 晏慧君,黄兴奇,程在全. cDNA 文库构建策略及其分析研究进展[J]. 云南农业大学学报, 2006, 21(1):1-6