

对复盐筛选水稻体细胞变异体的研究

吕晓波 陈 力 刘丽艳 南相日 葛乃盛

(黑龙江省农科院生物技术中心)

摘要 经复合盐($\text{NaCl} + \text{NaHCO}_3$)压力选择获得的水稻体细胞无性系变异体 647-4, 其种胚出愈率随 pH 升高而下降, 但变幅较小, 在 pH 7.5 时仅下降 11 个百分点; 脯氨酸含量随 pH 上升增加的不迅速。复合盐对愈伤相对生长量和分化率的影响较单盐(NaCl)重, 不同品种愈伤受羟脯氨酸的抑制程度不同, 其中, 647-4 较轻。

关键词 水稻 耐盐碱变异体 pH

中图分类号 S511.1

水稻的耐盐性绝不是水稻的某一单独性状所决定, 它是由多种基因(这些因单独作用时并无抗盐效应)累加综合作用的结果, 各种特性的综合效应决定了植物的抗盐能力^[1]。根据其耐盐机制, 应用常规育种方法筛选耐盐品种是相当困难的, 组织和细胞培养为筛选耐盐抗碱变异体提供了新途径^[2,8]。

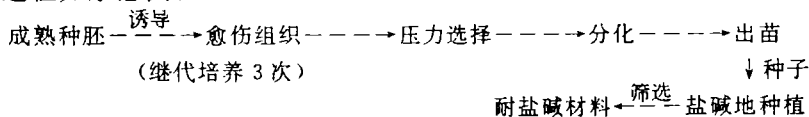
植物组织和细胞培养技术有筛选群体大, 可控程度高和选择周期短等优点。国内外在烟草和水稻的耐盐性筛选上已有许多报道^[5], 国际水稻所休纳盖等人获得了可遗传的耐盐水稻突变系, 其产量比原来的品种增产 20%^[6]。但所见成功的报道只是在试验水平, 能应用于生产的尚未查到, 且所加的压力选择均为单盐(NaCl)^[7,9]。

黑龙江省苏达盐渍土面积 6 500 万亩, 盐分组成主要为 NaCO_3 和 NaHCO_3 , pH 在 7~8, 甚至更高, 多数旱田作物难以正常生长。改造和开发盐渍土资源的最好方法就是种植水稻。我省为苏达盐渍土种稻提供了理论和模式, 但现有的品种耐盐性差, 急需选育耐盐抗碱新品种。为此, 我们结合前人的经验及我省苏达盐渍土的特点, 选用体细胞筛选耐盐突变体, 以复合盐($\text{NaCl} + \text{NaHCO}_3$)作为选择压力, 适当提高培养基的 pH, 以便迅速选出适宜苏达盐渍土的水稻耐盐新品种。

本文对复合盐筛选的体细胞变异体进行研究, 试验了耐盐变异体 647-4 在不同的 pH 盐(NaCl)、复合盐($\text{NaCl} + \text{NaHCO}_3$)条件下的出愈和分化情况, 及脯氨酸含量的变化和对羟脯氨酸的抗性, 以明确应用复合盐作选择压力, 离体筛选耐盐抗碱变异体的可行性。

1 材料和方法

1.1 供试材料 粳型水稻寒九, 辽盐 2 号, 东 91-5221, 160-4, 647-4。后两份为寒九的组培后代。筛选过程如示意图:



注: 东北农业大学 92 届张森同学, 在本室实习时, 曾参加部分研究工作, 借此表示感谢。

选各品种的成熟种胚,经酒精和升汞消毒后,按常规接种,每瓶接六粒。

1.2 培养条件 基本培养基成分为 MS,诱导培养基为 MS+2,4-D2 毫克/升,分化培养基为 MS+水解酪蛋白3克/升+酵母膏3克/升+KT2毫克/升+NAA0.25毫克/升+IAA0.25毫克/升+蔗糖60克/升。诱导和继代为暗培养,光照下分化,光源为40w日光灯2只,距培养物40厘米,光照12小时,培养温度为 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。

1.3 测试内容

1.3.1 pH测定的培养基要灭菌前,用pH计调测pH,pH计为日本产携带式HM-1K型pH计。

1.3.2 盐浓度测定所加的NaCl和 NaHCO_3 为分析纯,哈尔滨市化工试剂厂生产,浓度处理见表。

1.3.3 羟脯氨酸(Hyp)测定,L-羟脯氨酸为层析纯,中国科学院上海生物化学研究所。培养基的羟脯氨酸浓度为0.3mM。附加药品在配制培养基时溶入,然后调pH、高压灭菌。

1.3.4 脯氨酸含量用碘基水杨酸钠提取,采用水合茚三酮显色,国产721分光光度计于520nm处比色。

2 结果与分析

2.1 变异体647-4种胚愈伤对选择压pH的反应

2.1.1 pH对出愈率的影响

647-4是寒九成熟胚盐选得到的体细胞变异体,现已进入生产试验。直接将R₇成熟的种胚接种在pH梯度处理(见表1)的选择培养基上,每个处理接15瓶。

表1 pH对647-4成熟种胚出愈率的影响

pH	6.0	6.2	6.5	6.8	7.0	7.2	7.5
出愈率(%)	92.3	90.9	89.1	88.3	82.0	87.3	81.3

由表1可见,pH6.0以上,出愈率随pH升高而降低,但降低的并不很快,在pH7.5时仅下降了11个百分点。

2.1.2 pH对愈伤组织脯氨酸含量的影响

从pH6.0的培养基诱导出的647-4的愈伤中,选出生长较一致的愈伤,接种在不同pH处理的培养基上,继代培养28天,测定愈伤的脯氨酸含量。其结果是脯氨酸含量随pH增高而增加(见表2),但增加的并不十分迅速,这可能是由于筛选,使变异体对pH的胁迫不再敏感。

表2 pH对647-4愈伤脯氨酸含量的影响

pH	6.0	6.5	6.8	7.0	7.2	7.5
脯氨酸含量($\mu\text{g/ml}$)	9.99	10.28	10.36	10.48	10.61	12.44

2.1.3 pH对647-4分化的影响

由表3可看出,pH在7.0以上时,分化受到抑制,7.5时明显抑制分化,但在7.2时,两组的分化率都有回升,明显高于7.0。在诱导时提高pH,产生的愈伤对pH已有一定的耐受性,因此,B组的分化率变化较A组平缓。

表 3 pH 对 647-4 种胚伤分化率的影响

pH	6.0	7.0	7.2	7.5
分化率 { A 组	31.3	13.0	32.0	0
B 组	31.3	23.3	28.5	2.5

分化率: A 组为种胚在 pH6.0 培养基诱导愈伤, 再转到上述不同 pH 处理的培养基上继代(一次)分化。B 组为种胚的愈伤诱导, 继代(一次), 分化均在上述 pH 处理条件下进行。

伤水平对单盐的耐受力比东 91-5221 高, 这说明离体筛选可以提高其耐盐性。经 1.5% 的 NaCl 继代 647-4 的分化率为 23.4%, 东 91-5221 的分化率为 17.5%。

表 4 同 NaCl 含量对愈伤相对生长量的影响

材 料	NaCl%				
	0.0	0.5	1.0	1.5	2.0
647-4	720	410	300	180	70
东 91-5221	960	180	40	10	0

注: $RG = \frac{W - W_0}{W_0} \times 100$, RG 代表相对生长量, W 为培养 28 天后的愈伤量, W_0 为接入的愈伤重量, (以下表 5 和图 1 的 RG 计算方法与此相同, 不再加注。)

伤转到含 3.0mM Hyp 的继代培养基上, 30 天测其相对生长量。从图 1 可见, 寒九生长明显受抑制, 160-4 和辽盐 2 号略有抑制, 647-4 在 3.0mM Hyp 时, 未表现出受抑制。

表 5 复合盐对愈伤相对生长量的影响

材 料	NaHCO ₃				
	0.0+0.0	0.3+0.2	0.4+0.3	1.0+0.5	1.0+0.7
647-4	720	290	180	80	50
东 91-5221	960	150	60	50	0

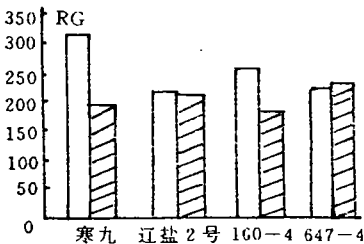


图 羟脯氨酸对不同品种愈伤的抑制
注: “□”代表对照, “▨”代表 3.0mM 的相对生长量(RG)。

2.2 变异体对单盐和复合盐的耐受力

2.2.1 单盐对愈伤相对生长量的影响

培养基中 NaCl 含量增加, 愈伤组织相对生长量明显下降(见表 4), 但不同材料下降的程度不同, 在 0.5%NaCl 时 647-4 的相对生长量下降了 31.0, 而 91-5221 材料, 相对生长量下降了 78.0; 在 2.0 时, 东 91-5221 停止生长, 647-4 仍有 70 的相对生长量, 647-4 在愈

2.2.2 复合盐对愈伤相对生长量的影响

复合盐对愈伤相对生产量的抑制强于单盐, 但 647-4 的耐受力仍强于东 91-5221。在 1.0%(NaCl)+0.5%(NaHCO₃)处理中 647-4 和东 91-5221 的分化率分别为 17.6% 和 14.5%, 均比单盐处理的低。

2.3 羟脯氨酸(Hyp)对不同品种愈伤的抑制

曾有人利用 Hyp 作选择压力得到过水稻耐盐变异体突变系, 提出 Hyp 可作为耐盐选择压力^[7]。不同品种愈伤继代二次, 选生长好的愈

3 讨论

3.1 利用体细胞无性系筛选得到的耐盐碱突变体 647-4, 经田间生长几代后, 其种胚愈伤对高 pH、复合盐仍有较强的耐受力, 这说明离体筛选获得的性状已被一定程度的保持下来。

3.2 耐盐材料愈伤受 3.0mM Hyp 的抑制程度很低, 进一步说明 Hyp 作为耐盐选择压力的可行性。

3.3 在单盐、复合盐试验中发现, 在 Na⁺ 浓度相同时, 复合盐处理分化率均低于单盐, 其分化率降低可能与 HCO₃⁻ 有关。另在 pH7.2 时, 647-4 的出愈率和两种处理的分化率都出现一个小峰值, 这是离体盐碱选择的结果, 还是品

种自身的特点或其它原因,有待查明。

参 考 文 献

- 1 唐建军等.作物耐盐机制的研究.盐碱地利用,1988,(1):51~53
- 2 李瑞云等.植物耐盐性研究现状与展望.盐碱地利用,1989,(1):38~41
- 3 周荣仁等.利用组织培养研究植物耐盐机理与筛选耐盐突变体的进展.植物生理通讯,1989,(5):11~19
- 4 李洪建.水稻耐盐变异体筛选的研究.沈阳农业大学学报,1990,21(1):53~59
- 5 大野清春.组织培养用于水稻改良.国外农学—水稻,1986,(1):7~10
- 6 K. Suennagc, et al., 国外农学—水稻,1983,(6):11~14
- 7 Larkin PJ, et al., Theor, Appl Genet, 1981, 60:197~214
- 8 Maliga P. Ann. Rev. of plant physiology, 1984,35:519~542
- 9 Vairabhaya M et al., plant Cell Rep. 1989,8:411~414

Study on Somaclonal Variant of Rice Selected on Saline-Soda Stress Media

Lu Xiaobo et al.

(Biotechnology Research Center, Heilongjiang
Academy of Agricultural Sciences)

Abstract 647-4 is a somatic variant of rice with salinity-tolerance obtained by selecting in compound salts ($\text{NaCl} + \text{NaHCO}_3$) in vitro. The frequency of callus induction of 647-4 seeds had a slight reduction and the free proline content of callus increased a little when the pH rose from 6.0 to 7.5.

Key words Rice, Somatic variant with salinity-tolerance, pH

欢 迎 订 阅

“黑龙江农业科学”是黑龙江省农业科学院主办的唯一综合性农业科技期刊,本刊设“科研报告、生产技术、国外科技动态、科技简讯”等栏目,内容丰富,既有较高水平的学术论文,又有指导生产的技术性文章,是广大科技工作者的良师益友。本刊为双月刊,每期定价 1.30 元,邮发代号:14-61。欢迎广大读者踊跃订阅 1995 年黑龙江农业科学。