

转基因水稻抗旱性的筛选与观察

张 舜, 廖子荣, 黄东益
(海南大学农学院, 儋州 571737)

摘要: 为了研究转 *NCED* 基因水稻的抗旱性, 对转基因 T_1 代和对照种子进行 PEG 处理, 观测发芽率; 发现转 *NCED* 基因水稻的发芽率比对照的高。选其中发芽率较高的 NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 种子种植并进行干旱胁迫, 测定转基因水稻 NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 的部分农艺性状, 结果表明, 转基因水稻 NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 的抗旱性比对照强。

关键词: 水稻; 转基因; *NCED*; 抗旱性

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)06-0005-02

Advances of Tiller Angle in *Oryza sativa*

ZHANG Shun, LIAO Zi-rong, HUANG Dong-yi
(Agronomy College of Hainan University, Danzhou 571737)

Abstract: Tiller angle is one of important characters that constitute plant type with great significance in breeding. The type of tiller angle, dynamic change of tiller angle under different cultivation conditions and genetic analysis of tiller angle in rice were reviewed in this article.

Key words: *Oryza sativa*; transgenes; 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase; drought resistance

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界最重要的粮食作物之一。随着全球性气温升高, 水资源贫乏问题日趋严重, 干旱缺水给水稻生产造成严重威胁。而我国水资源十分贫乏, 干旱、半干旱面积约占耕地面积的 51%^[1]。因此, 培育抗旱水稻品种并实现水稻旱作, 不但可节水, 而且有利于增产、稳产。但由于品种选育周期较长、抗性亲本缺乏等原因, 通过常规育种手段获得抗性品种相当困难。20 世纪 80 年代以来, 由于生物工程技术的兴起和发展, 特别是基因工程技术在改良作物抗性上的广泛应用, 为培育抗性品种提供了新的手段, 从而也开辟了水稻抗性育种的新时代。随着抗旱分子生物学的研究, 人们逐渐确定了与抗旱性有关的重要基因, 并进行了基因定位研究, 取得了一定的进展^[2]。通过基因工程技术培育抗旱水稻品种, 并进行筛选应用和抗旱性研究, 对我国的水稻生产具有极其重要的意义。

NCED 基因调控 ABA 的合成来适应干旱胁迫, 在植物抗旱性方面具有重要的作用。本文以转入 *NCED* 基因的水稻为研究对象, 对其抗旱性进行

收稿日期: 2008-04-18
第一作者简介: 张舜(1981-), 男, 福建省龙岩市新罗区人, 主要从事水稻育种研究。Tel: 0898-23304254 E-mail: zslongwww@163.com。
通讯作者: 黄东益, E-mail: hdongyi123@tom.com。

观察和筛选, 为培育出新的抗旱水稻做基础性研究。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料为转 *NCED* 基因水稻 T_1 代 50 个株系的种子和对照 Kitaake 的种子及转 *NCED* 基因水稻 NCED3-6-1 株系、NCED3-7-6 株系和对照 Kitaake 植株。药品为国产聚乙二醇(PEG, WM 6000)。

1.2 试验方法

1.2.1 种子发芽率的观测

试验于 2006 年 9 月 14 日在海南大学儋州校区农学院育种学实验室进行。每株系取成熟的种子 20 粒, 分别放入网袋在 42℃温水中处理 10 min, 滤干后置于培养皿中加入 10 mL 25% PEG 水溶液浸种催芽 7 d, 并以清水浸种作为对照。第 7 天调查并计算相对发芽率。

1.2.2 田间试验

试验在华南热带农业大学农学院实验基地网棚实验田进行。于 2006 年 11 月 20 日浸种, 露白后播种于育秧盘中, 对幼苗株高进行观测。12 月 9 日移栽, 单株种植, 株行距 10 cm×20 cm, 小区种植面积 10 m², 随机区组种植, 3 次重复, 每 2 行为一株系, 每行 15 株。当 85% 水稻植株产生 3 个分蘖时, 进行断水处理, 当植株叶片显示脱水卷曲时复水。如此, 在整个生育期内进行 3 次断水、2 次复水处理。断水前, 测量水稻株高, 断水后, 对

水稻叶色、株高和分蘖进行观测与记录。第 3 次断水后不再复水直至水稻成熟。成熟后按单株收种,干燥后在实验室内称量穗重和稻草重。

2 结果与分析

2.1 转基因水稻 T₁ 代种子抗旱性筛选

筛选结果发现,各株系在 PEG 胁迫下的发芽率均下降,且发芽率的相对值差异较大。相对值的大小反映了不同品种对 PEG 的敏感程度不同,在 PEG 胁迫下,抗旱性强的品种其相对发芽率高,反之,相对发芽率低。与 Ki 和其他株系相比,NCED3-6-1、NCED3-7-6 有更高的相对发芽率,说明在水分胁迫下,NCED3-6-1、NCED3-7-6 的种子具有较强的抗旱性。水稻种子抗旱性筛选及观察结果表明:转 *NCED* 基因植株比对照 Ki 植株具有更强的抗旱性。该方法简便易行,周期短,可同时处理大量样品,因而可用作鉴定不同转基因水稻株系的抗旱性。

2.2 转基因水稻 T₁ 代抗旱性观察

2.2.1 幼苗株高的观察 结果表明,Ki 的芽长在浸种的不同时期均高于 NCED3-6-1 和 NCED3-7-6,且 NCED3-6-1 的芽长与 Ki 接近。而 NCED3-7-6 的芽长在浸种后 12 d 明显短于 Ki 和 NCED3-6-1,说明在种子萌发生长初期,NCED3-7-6 的萌发速度较 Ki 和 NCED3-6-1 慢。

2.2.2 断水前株高、分蘖的观察 由表 1 可看出,断水前,Ki、NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 的株高相差不大。分蘖数均为 3 个。说明 NCED3-7-6 在幼苗期至分蘖初期高生长速度加快,此时三者基本处于同一个生育时期。

表 1 断水前 3 种水稻平均株高

| 株系 | 平均株高/cm |
|-----------|---------|
| Ki | 20.0 |
| NCED3-6-1 | 19.6 |
| NCED3-7-6 | 19.2 |

2.2.3 断水处理对水稻分蘖、株高、叶色的影响

从表 2 可以看出,Ki 的分蘖数比断水前平均增加了 2.3 个,NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 则分别增加了 4.2 个和 4 个。断水处理使 Ki、NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 的分蘖数增加,且转 *NCED* 基因株系的分蘖数增加更多,说明干旱胁迫下,转 *NCED* 基因株系利用水分使分蘖增加,以增强自身的抗旱能力的能力比 Ki 更强。

不仅如此,NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 的株高分别比 Ki 高出 3.1 cm 和 5.3 cm。说明干旱胁迫对转 *NCED* 基因株系的生长抑制小于对照 Ki。断水后,Ki 的叶色微黄,NCED3-6-1 的叶色淡绿,NCED3-7-6 的叶色仍然保持浓绿,说明断水处理对

3 种水稻的光合器官色素体造成的损伤不同,即抗旱性表现 $Ki < CED3-6-1 < NCED3-7-6$ 。

表 2 断水后 3 种水稻的株高、分蘖、叶色

| 株系 | 株高/cm | 分蘖 | 叶色 |
|-----------|-------|-----|----|
| Ki | 33.2 | 5.3 | 黄绿 |
| NCED3-6-1 | 36.3 | 7.2 | 淡绿 |
| NCED3-7-6 | 38.5 | 7.0 | 浓绿 |

2.2.4 断水处理对水稻生物产量的影响 表 3 结果表明,转 *NCED* 基因水稻株系的稻草重与对照 Ki 的稻草重有显著差异。其中,小区 1 中稻草重最高的是 NCED3-7-6,其次是 NCED3-6-1,对照 Ki 的稻草重最低;小区 2 中,NCED3-7-6 的稻草重明显高出其他两个株系,其重量为 3.635 g,其次是 NCED3-6-1,对照 Ki 的稻草重最低;小区 3 中,NCED3-6-1 的稻草重最高,其重量为 3.578 g,其次是 NCED3-7-6,Ki 最低。3 个小区都说明,转 *NCED* 基因水稻株系的稻草重比对照 Ki 的稻草重高。

表 3 单株稻草重 $g \cdot 株^{-1}$

| 株系 | 1 区 | 2 区 | 3 区 | 平均值 | DUNCAN 多重比较(Alpha=0.05) | |
|-----------|-------|-------|-------|-------|-------------------------|---|
| | | | | | | |
| Ki | 1.931 | 1.493 | 3.002 | 2.142 | 2.142 | B |
| NCED3-6-1 | 2.954 | 2.922 | 3.578 | 3.151 | 3.151 | A |
| NCED3-7-6 | 3.438 | 3.635 | 3.261 | 3.445 | 3.445 | A |

以上结果说明,转 *NCED* 基因水稻比对照 Ki 抗旱性强。

3 讨论

3.1 相对发芽率与抗旱性

1979 年首次以 PEG 为诱导剂和筛选剂筛选出抗旱的烟草细胞系^[3];1980 年 Blum 等^[4]的研究表明,PEG 对筛选小麦苗期抗旱性是适用的;以后相继出现了利用 PEG 筛选到了小麦、花生等作物苗期抗旱性较好的品种,以及耐旱性的甘薯突变体等研究成果^[5-7]。

在水分胁迫下,水稻种子发芽率降低已被许多试验所证实。但是,在水分胁迫下发芽率能否作为抗旱性鉴定指标仍然存有争议。但王贺正等^[8]研究表明,用相对发芽率能消除因遗传特性对种子本身萌发的影响。因此,可以用相对发芽率作为品种抗旱性鉴定指标之一。

试验结果表明,转 *NCED* 基因水稻 NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 在相对发芽率上有明显的优势,说明 NCED3-6-1 和 NCED3-7-6 的种子对水分胁迫的敏感度较对照株系低。但由于水稻的生长是受多因素的综合作用,相对发芽率只能作为筛选水稻芽期抗旱性的指标之一,因此还需要对转 *NCED* 基因

(下转第 9 页)

| 表 3 无机离子对毛栓菌木聚糖酶活力的影响 | | | |
|---|---------|---------------------------------------|---------|
| 试剂/ 1.0 mg · mL ⁻¹ | 相对酶活/ % | 试剂/ 1.0 mg · mL ⁻¹ | 相对酶活/ % |
| H ₂ O | 100 | ZnCl ₂ | 103.45 |
| NaCl | 113.69 | 乙酸铅 | 95.86 |
| CuSO ₄ · 5H ₂ O | 21.33 | KCl | 103.11 |
| Fe ₂ (SO ₄) ₃ | 60.89 | MgSO ₄ · 7H ₂ O | 103.91 |
| CaSO ₄ · 2H ₂ O | 84.59 | MnCl ₂ · 4H ₂ O | 153.03 |

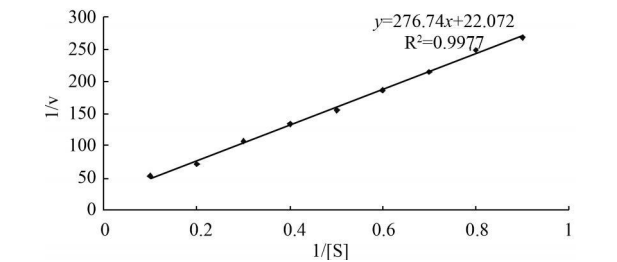


图 4 毛栓菌木聚糖酶的表现 Km 值

3 讨论

对毛栓菌木聚糖酶特性的研究结果表明,在 pH 为 6.81 左右酶活性最高, pH 在 5.60~9.18 范围内有较好的耐碱性。剩余酶活均保持在 90% 以上,这与朱启忠^[7]报道的链霉菌的木聚糖酶较为一致,但不同于王在贵^[8]木霉的木聚糖酶最适 pH 为 5.5;最适酶解温度为 40℃,酶液在 50℃ 以下有较好

的热稳定性,相比耐热性较好;Na⁺、Mn²⁺对木聚糖酶有激活作用,而 Cu²⁺、Fe³⁺、Ca²⁺则抑制木聚糖酶活性,所以对于毛栓菌木聚糖酶应注意金属离子的影响;表观 Km 值为 1.25×10⁻²g · L⁻¹,与底物的亲和力较高,因而可以在较广的温度和酸碱范围内有较高的活性,有着巨大的潜力。

参考文献:

[1] Bedford M R I C mechanism of action and potential environmental benefits from the use of feed enzymes[J] . Animal Feed Sci. Tech. , 1995 , 53: 145-155.

[2] Jeroch H , Danicic S , Bnfau J . The influence of enzyme preparations on the nutritional value of cereals for poultry[J] . J . Animal Feed Sci. , 1995 , 4: 263-285.

[3] Mqrquardt R R , Boros P , Guenter W , et al . The nutritive value of barley , rye , wheat and corn for young chicks as affected by use of a Trichoderma reese enzyme preparation[J] . Animal Feed Sci. Tech. , 1994 , 45: 363-378.

[4] 汪傲 , Tapio Juokslahti . 木聚糖酶制剂对生长肥育猪次粉日粮饲养效果的影响[J] . 中国饲料, 1997(3): 17-19.

[5] 怀文辉 , 何秀萍 . 微生物木聚糖酶研究进展及应用前景[J] . 微生物学报, 2007 , 27(2): 137.

[6] 董国强 , 张猛白 , 林开江 . 半纤维素酶的 DNS 液显色法测定[J] . 浙农业科学, 1989(2): 88-89.

[7] 朱启忠 , 张法忠 , 韩晓弟 , 等 . 链霉菌 Str S-2 产木聚糖酶的条件及部分性质研究[J] . 生物技术, 2004 , 14(3): 51-52.

[8] 王在贵 , 万赛罗 , 李绚丽 , 等 . 木霉木聚糖酶的酶学性质研究[J] . 中国林副特产, 2007 , 86.

(上接第 6 页)

水稻进行苗期、全生育期抗旱性的观察。

3.2 NCED 基因对水稻抗旱性

9-顺式环氧化类胡萝卜素过氧化物酶(9-cis-epoxy carotenoid dioxygenase, NCED)催化的氧化裂解是 ABA 合成途径中的关键调控步骤^[9]。植物中的 NCED 是个多基因家族,并且它的表达具有组织特异性。水分亏缺能诱导 NCED 的表达,调控 ABA 的合成^[10]。在水分胁迫下, NCED 基因的表达、NCED 蛋白水平与脱水的根和叶中的 ABA 含量水平相关,说明在水分胁迫下 NCED 对 ABA 的合成具有调控作用^[11]。由以上可以看出 NCED 基因调控 ABA 的合成来适应干旱胁迫, NCED 在植物抗旱性方面具有重要的作用。

本试验结果表明,转 NCED 基因水稻与对照 Kitaake 相比较,具有更强的抗旱性。因此,可以对 NCED 基因做更深入的研究,使抗旱性与现有品种的优良性状结合起来,培育出适应不同地区的抗旱性强、产量高、米质优、熟期多样化的新品种。

参考文献:

[1] 康绍忠 . 新的农业科技革命与 21 世纪我国节水农业的发展[J] . 干旱地区农业研究, 1998 , 16(1): 11-17.

[2] 张正斌 , 山仑 . 作物抗旱生理性状的遗传研究进展[J] . 科学通报, 1998 , 43(17): 1812-1817.

[3] 李自超 , 刘文欣 , 赵笃乐 . PEG 胁迫下水、陆稻幼苗生长势比较研究[J] . 中国农业大学学报, 2001 , 6(3): 16-20.

[4] Blum A . An evaluation of seed and seedling drought tolerance screening tests in wheat[J] . Euphytica 1980 , 29: 727-736

[5] 薛慧勤 , 甘信民 , 顾淑媛 , 等 . 花生种子萌发特性和抗旱性关系的高渗溶液法[J] . 中国油料作物学报, 1997 , 19 (3): 30-331.

[6] 惠红霞 , 李树华 , 许兴 . 高渗溶液鉴定小麦抗旱性的方法[J] . 宁夏农学院学报, 2000 , 21(3): 28-321.

[7] 王玉萍 , 刘庆昌 , 李爱贤 . 甘薯耐旱突变体的离体筛选与鉴定[J] . 中国农业科学, 2003 , 36(9): 1000-1051.

[8] 王贺正 , 马均 , 李旭毅 , 等 . 水稻种质芽期抗旱性和抗旱性鉴定指标的筛选研究[J] . 西南农业学报, 2004 , 17(5): 594-599.

[9] Zeevaart JAD , Creelman RA . Metabolism and physiology of abscisic acid[J] . Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1988 , 39: 439-473.

[10] Seo M , Koshiba T . Complex regulation of ABA biosynthesis in plants[J] . Trends Plant Sci. , 2002 , 7: 41-48.

[11] Qin X , Zeevaart JAD . The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water stressed bean[J] . Proc Natl Acad Sci USA , 1999 , 96: 15354-15361.