

不同基因型水稻在组织培养条件下对 NaCl 耐性的研究

王萍¹, 王罡², 季静²

(1. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005; 2. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072)

摘要:以13个水稻基因型为材料,以愈伤组织生长状况、水稻种子在组织培养条件下的发芽率和苗高等为指标,研究了水稻对NaCl的耐受性。结果表明:水稻的不同基因型对NaCl的耐受性在这3个指标上均存在较大差异,在进行水稻遗传转化的筛选时,应注意到水稻不同基因型和受体类型对NaCl的耐受性。同时发现同一基因型的不同组织或发育时期对NaCl的耐受性具有相似性。

关键词:水稻;愈伤组织;发芽率;NaCl

中图分类号: S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1000-5684(2006)06-0601-05

NaCl Tolerance of Different Genotypes in Rice under Tissue Culture

WANG Ping¹, WANG Gang², JI Jing²

(1. School of Technology and Aquiculture, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005, China; 2 College of Agriculture & Bioengineering, Tianjin University, Tianjin 300072, China)

Abstract: NaCl tolerance was studied by observing callus growth state, germination rate and seedling height under solid medium with thirteen genotypes in rice. The results showed that NaCl tolerance was different among different genotypes of rice. Differences of NaCl tolerance among different genotypes of rice and different types of receptors should be noticed when transferred rice plants were selected. Meanwhile it was found that NaCl tolerance among different tissues and different development phases of rice was similar in the same genotype.

Key words: rice; callus; germination rate; NaCl

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上近1/2人口的主食。尽管当今农业技术已经有了较大的发展,但干旱和土壤盐渍化仍然是制约水稻生产最严重的因素之一。我国受盐侵害的稻田约占栽培面积的1/5,并且有日益扩大和加剧的趋势,造成的产量损失难以估计。随着分子生物学与基因工程技术的发展,把抗逆基因转入水稻中将是提高水稻抗逆性的有效途径之一。目前,在进行水稻抗逆基因的遗传转化及对转化后代的筛选时,常在构建载体时带有1个抗性选择基因,对转化体用抗生素进行筛选。卢德赵等人^[1]利用农杆菌介导法和基因枪法将来源于山菠菜的甜菜碱醛脱氢酶基

因(BADH)转入了水稻基因组,用G418筛选得到具有较高耐盐性的转基因水稻植株。吴亮其等人^[2]采用基因枪法将拟南芥 δ -OAT基因导入粳稻品种“中作321”,经潮霉素筛选获得了抗盐抗旱的基因工程水稻。随着人们对转基因产品安全性越来越关注,在进行遗传转化时无抗生素筛选体系的利用显得越来越重要。本试验选用水稻13个基因型,研究水稻愈伤组织对不同浓度NaCl的敏感性和耐受性,以及不同浓度NaCl对水稻种子发芽率和苗高的影响,以期水稻抗逆(耐盐)基因遗传转化的直接选择提供依据。

• 基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项基金资助项目(JY03-B-17)

作者简介: 王萍(1957-),女,博士,教授,主要从事生物技术与植物转基因的研究。

收稿日期: 2006-04-13 修回日期: 2006-07-26

1 材料与方法

供试水稻材料为 13 个基因型,种子由吉林省农业科学院水稻所和黑龙江省农业科学院水稻所馈赠。

试验为完全随机设计,3~5 次重复。NaCl 设 6 个浓度:0, 30, 65, 100, 135, 170 mmol/L, 以不加 NaCl 为对照。

水稻愈伤组织由水稻种子脱壳后在 MS + 2,4-D 2 mg/L 诱导培养基上获得,加入 NaCl 培养 2 周后调查愈伤的大小;水稻发芽率和苗高试验在固体培养基中进行^[3],1 周调查发芽率,2 周调查苗高。所有试验结果用 SPSS 软件进行方差分析(发芽率分析前数据做反正弦转换)。

2 结果与分析

2.1 NaCl 对水稻愈伤组织生长的影响

在进行水稻遗传转化时,常以愈伤组织作为受体,经农杆菌或基因枪轰击后,对转化体愈伤组织进行抗性筛选。在转化耐盐基因时,除在转化目的基因的同时转化抗性筛选基因,如 *npt II* 基因、*Bt* 基因等用卡那霉素或 PPT 筛选外,还可以用 NaCl 作为筛选剂进行直接选择。为此,对 10 个基因型水稻愈伤组织耐受 NaCl 的能力进行了研究。不同浓度 NaCl 处理水稻愈伤组织后愈伤组织大小的方差分析结果见表 1。

表 2 水稻不同基因型经 NaCl 处理的愈伤组织的大小

Table 2. Callus size under NaCl treatment in different genotypes of rice

cm

c(NaCl)/ (mmol·L ⁻¹)	吉丰 3	吉丰 10	吉丰 20	丰优 207	丰优 307	丰优 320	吉优 3	95-74	龙稻 1 号	粳稻 80
0	0.35 ^a	0.33 ^a	0.26 ^a	0.35 ^a	0.35 ^a	0.31 ^a	0.31 ^a	0.30 ^a	0.35 ^a	0.35 ^a
30	0.30 ^a	0.29 ^b	0.21 ^b	0.29 ^b	0.28 ^b	0.30 ^a	0.33 ^a	0.26 ^b	0.24 ^b	0.33 ^a
65	0.25 ^b	0.29 ^b	0.20 ^b	0.25 ^b	0.25 ^b	0.21 ^b	0.26 ^b	0.21 ^c	0.25 ^b	0.30 ^b
100	0.20 ^c	0.25 ^c	0.15 ^c	0.18 ^c	0.25 ^b	0.20 ^b	0.16 ^c	0.20 ^c	0.18 ^c	0.23 ^c
135	0.15 ^d	0.20 ^d	0.10 ^d	0.10 ^d	0.20 ^c	0.20 ^b	0.16 ^c	0.08 ^d	0.20 ^c	0.20 ^c
170	0.10 ^e	0.10 ^e	0.10 ^d	0.03 ^e	0.08 ^d	0.10 ^c	0.10 ^d	0.00 ^e	0.10 ^d	0.13 ^d

以愈伤生长指数(NaCl 处理的愈伤大小/对照愈伤大小)为指标,分析了 10 个水稻基因型在增加 NaCl 浓度时对愈伤组织生长变化的影响(图 1)。

由图 1 可以看出,随着 NaCl 浓度的增加,愈

表 1 水稻不同基因型经 NaCl 处理愈伤组织大小的方差分析

Table 1. Variance analysis of callus size under NaCl treatment in different genotypes of rice

基因型 Genotype	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F-value
吉丰 3	0.18	5	0.036	63.00**
吉丰 10	0.13	5	0.026	73.15**
吉丰 20	0.09	5	0.018	77.25**
丰优 207	0.30	5	0.060	67.02**
丰优 307	0.17	5	0.033	55.09**
丰优 320	0.12	5	0.024	108.75**
吉优 3	0.17	5	0.034	58.14**
95-74	0.26	5	0.052	99.95**
龙稻 1 号	0.14	5	0.028	63.86**
粳稻 80	0.15	5	0.030	55.74**

由表 1 可见,水稻 10 个基因型在用不同浓度 NaCl 处理后,愈伤组织的大小均达极显著水平。多重比较结果(表 2)表明,水稻愈伤组织的大小随 NaCl 浓度的增高而降低,当浓度为 30 mmol/L 时“吉丰 10”、“吉丰 20”、“丰优 207”、“丰优 307”、“95-74”和“龙稻 1 号”6 个基因型的愈伤组织大小都显著地低于对照,其他 4 个基因型在 65 mmol/L 时愈伤的生长也受到明显的抑制,说明水稻的愈伤组织在培养过程中对 NaCl 很敏感。

伤组织生长指数呈下降的趋势,并且 10 个基因型水稻对 NaCl 的耐受性存在差异。例如,“95-74”对 NaCl 的耐受性最差,当浓度为 170 mmol/L 时愈伤组织几乎停止生长。

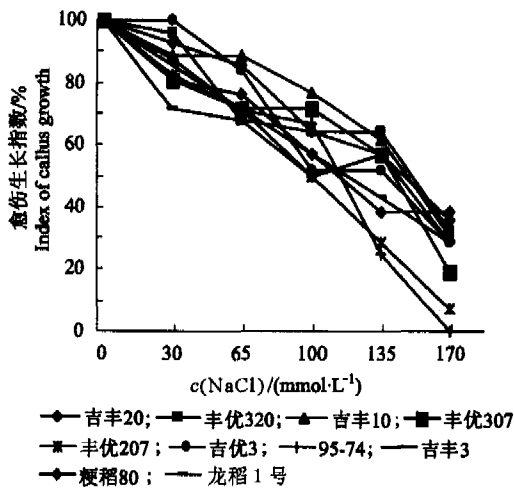


图 1 NaCl 对水稻愈伤组织生长的影响

Fig. 1. Effect of NaCl on growth of callus of rice

2.2 NaCl 对水稻发芽率的影响

水稻 9 个基因型的种子分别在 MS 培养基中培养, 1 周调查发芽率, 对其进行方差分析, 结果见表 3。

9 个基因型水稻种子的发芽率在 6 个 NaCl 浓度间的差异均达极显著水平。从多重比较结果

(表 4) 可以看出, 随着 NaCl 浓度的升高, 发芽率下降, 说明 NaCl 对水稻种子的发芽有一定的抑制作用。同时发现, 不同基因型水稻对 NaCl 的敏感程度不同, “吉丰 32” 对 NaCl 最敏感, 在 NaCl 浓度为 65 mmol/L 时与对照差异显著, “吉丰 10” 对 NaCl 不太敏感, 在 NaCl 浓度为 135 mmol/L 时与对照差异仍不显著, 其他基因型在 NaCl 浓度为 100 ~ 135 mmol/L 浓度时发芽率显著低于对照。

表 3 水稻不同基因型发芽率的方差分析

Table 3. Variance analysis of germination rate in different genotypes of rice

基因型 Genotype	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F-value
吉丰 10	11 170.83	5	2 234.166	187.05**
吉丰 20	7 120.83	5	1 424.166	49.78**
吉丰 32	24 387.50	5	4 877.500	37.28**
吉 01-124	32 200.00	5	6 440.000	64.69**
吉利 518	26 070.83	5	5 214.166	79.88**
丰优 207	21 000.00	5	4 200.000	49.74**
丰优 307	15 170.83	5	3 034.166	20.89**
丰优 320	29 781.88	5	5 956.376	96.87**
95-74	19 337.50	5	3 867.500	53.76**

表 4 水稻不同基因型发芽率的差异显著性

Table 4. Difference significance of germination rate in different genotypes of rice %

c(NaCl)/ (mmol·L ⁻¹)	吉丰 10	吉丰 20	吉丰 32	吉 01-124	吉利 518	丰优 207	丰优 307	丰优 320	95-74
0	100.0 ^a	100.0 ^a	90.0 ^a	92.5 ^a	97.5 ^a	97.5 ^a	97.5 ^a	93.25 ^a	97.5 ^a
30	100.0 ^a	100.0 ^a	90.0 ^a	92.5 ^a	92.5 ^a	97.5 ^a	100.0 ^a	93.25 ^a	95.0 ^b
65	97.5 ^a	100.0 ^a	60.0 ^b	90.0 ^a	90.0 ^a	97.5 ^a	87.5 ^a	83.25 ^a	90.0 ^a
100	97.5 ^a	97.5 ^a	40.0 ^c	60.0 ^b	65.0 ^b	62.5 ^b	67.5 ^b	63.25 ^b	77.5 ^b
135	92.5 ^a	75.0 ^b	20.0 ^d	20.0 ^c	32.5 ^c	40.0 ^c	45.0 ^c	10.00 ^c	47.5 ^c
170	40.0 ^b	55.0 ^c	7.5 ^d	5.0 ^d	10.0 ^d	25.0 ^d	35.0 ^c	13.50 ^b	20.0 ^c

不同基因型水稻在不同 NaCl 浓度下的相对发芽率(NaCl 处理发芽率/对照发芽率)见图 2。

从图 2 中可以看出, NaCl 在低浓度(小于 30 mmol/L)时对水稻各基因型的发芽率影响都不大, 基本与对照的发芽率相同。随着 NaCl 浓度的增加, 对水稻发芽率的抑制作用加大。当 NaCl 浓度为 135 mmol/L 时, 多数基因型的相对发芽率在 50% 以下, 只有“吉丰 10”和“吉丰 20”表现出对 NaCl 较强的耐性, 相对发芽率为 92.5% 和 75.0%。可见, 水稻不同基因型在种子萌发时对 NaCl 浓度的反应是有差异的。

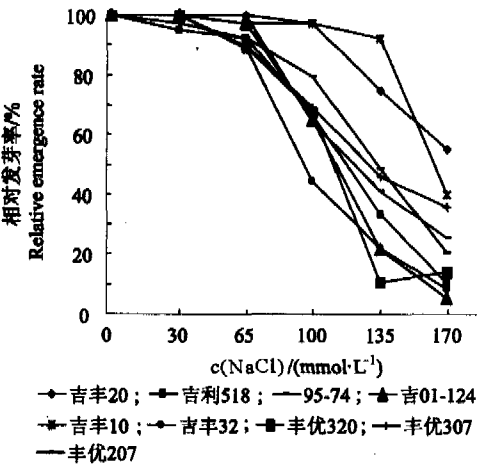


图 2 NaCl 对水稻发芽率的影响

Fig. 2. Effect of NaCl on germination rate of rice

2.3 NaCl 对水稻苗高的影响

水稻种子萌发后 2 周时测定了 9 个基因型水稻在 6 种 NaCl 浓度下的苗高,方差分析结果见表 5。

9 个基因型水稻经 NaCl 处理后,除“吉丰 32”的苗高仅为差异显著外,其他 8 个基因型在 6 个 NaCl 浓度间的苗高差异均极显著,说明 NaCl 对水稻幼苗的生长有一定的抑制作用。差异显著性测验结果见表 6,不同基因型对 NaCl 的耐性存在差异,“吉丰 10”、“吉丰 20”和“吉丰 32”对 NaCl 有较强的耐性,当 NaCl 浓度在 65 mmol/L 以上时苗高才显著地降低,而其他基因型 NaCl 浓度在 30 mmol/L 时显著地抑制水稻苗的生长。

表 5 水稻不同基因型苗高的方差分析

Table 5. Variance analysis of seedling height in different genotypes of rice

基因型 Genotype	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F-value
吉丰 10	178.89	5	35.778	13.01**
吉丰 20	349.90	5	69.980	104.42**
吉丰 32	2.77	5	0.554	3.89*
吉 01-124	23.12	5	4.624	8.84**
吉利 518	6.71	5	1.342	10.01**
丰优 207	97.55	5	19.510	24.33**
丰优 307	12.88	5	2.576	9.54**
丰优 320	3.21	5	0.642	18.06**
95-74	53.65	5	10.730	20.32**

表 6 水稻不同基因型苗高的差异显著性

Table 6. Difference significance of seedling height in different genotypes of rice

c(NaCl)/ (mmol·L ⁻¹)	吉丰 10	吉丰 20	吉丰 32	吉 01-124	吉利 518	丰优 207	丰优 307	丰优 320	95-74
0	7.36 ^a	10.31 ^a	0.73 ^a	2.77 ^a	1.58 ^a	5.82 ^a	2.36 ^a	1.28 ^a	4.54 ^a
30	6.51 ^a	9.36 ^a	0.61 ^{ab}	1.64 ^b	0.60 ^b	3.14 ^b	1.11 ^b	0.61 ^b	1.62 ^b
65	6.15 ^a	7.11 ^b	0.61 ^{ab}	0.96 ^{bc}	0.83 ^b	3.04 ^b	0.95 ^b	0.40 ^{bc}	1.12 ^{bc}
100	2.87 ^b	4.06 ^c	0.20 ^{ab}	0.27 ^c	0.28 ^c	0.63 ^c	0.97 ^b	0.32 ^{bc}	0.69 ^{bc}
135	1.42 ^b	1.21 ^d	0.06 ^b	0.11 ^c	0.12 ^c	0.48 ^c	0.22 ^{bc}	0.03 ^c	0.26 ^c
170	0.17 ^c	0.35 ^d	0.02 ^b	0.03 ^c	0.02 ^c	0.14 ^c	0.12 ^c	0.06 ^c	0.12 ^c

图 3 给出了 9 个基因型在不同 NaCl 浓度下的相对苗高。从图中可以看出,NaCl 对稻苗生长的影响在基因型间存在较大的差异,“吉丰 10”、“吉丰 20”、“吉丰 32”和“丰优 307”在较高 NaCl

(100 mmol/L)时的苗高为对照苗高的 35.22% ~ 41.19%,此时其他 5 个基因型的苗高仅为对照的 10.04% ~ 24.72%。

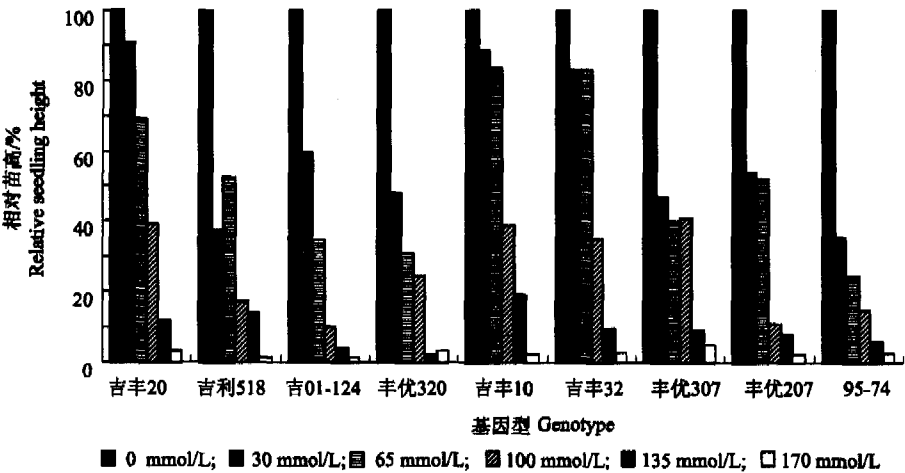


图 3 NaCl 对水稻苗高的影响

Fig.3. Effect of NaCl on seedling height of rice

3 讨论

3.1 水稻不同基因型对 NaCl 的耐受性

近年来,关于 NaCl 对水稻苗期生长的影响已

有一些研究报道^[4-6],认为水稻对 NaCl 的胁迫反应在基因型(品种)间存在差异,但这些研究主要关注筛选耐盐的水稻品种。本研究以 13 个水稻基因型为材料,旨在探讨水稻对 NaCl 的敏感性,

为水稻耐盐性遗传转化直接筛选提供依据。当以愈伤组织生长状况、水稻种子在组织培养条件下的发芽率和苗高等为指标研究水稻不同基因型对 NaCl 的耐受性时发现,水稻不同基因型对 NaCl 的耐受性在这 3 个指标上均存在较大差异。因此,在以不同的组织作为外植体进行水稻遗传转化用 NaCl 进行直接筛选时,在试验前都应对不同基因型的受体组织进行 NaCl 的耐受性试验,以确定一个较为合理的选择压力。

3.2 水稻不同组织或发育阶段对 NaCl 的耐受性

同种植物不同基因型对 NaCl 的耐受性不同,但同一基因型的不同组织或发育时期对 NaCl 的耐受性具有相对一致性。在本试验中“吉丰 10”和“吉丰 20”的愈伤组织生长状况、种子的发芽率和苗高都表现出对 NaCl 有较好的耐性。因此,在水稻的遗传转化研究中进行筛选时可借鉴某一组

织对 NaCl 耐受性的研究结果,此研究结果为水稻遗传转化的抗性筛选提供了理论依据。

参考文献:

- [1] 卢德赵,王慧中,华志华,等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻的获得及其耐盐性研究[J]. 科技通报 B, 2003, 19(3): 179-182.
- [2] 吴亮其,范战民,郭蕾,等. 通过转 δ -OAT 基因获得抗盐抗旱水稻[J]. 科学通报, 2003, 48(19): 2050-2056.
- [3] 柯玉琴,潘廷国. 鉴定水稻发芽种子成苗过程中耐盐性的 NaCl 琼脂固定法[J]. 植物生理学通讯, 2001, 37(5): 432-434.
- [4] 于泉林. NaCl 对水稻不同品种发芽和幼苗生长的影响[J]. 种子, 2003(3): 41-42.
- [5] 郭望模,傅亚萍,孙宗修. 水稻芽期和苗期耐盐指标的选择研究[J]. 浙江农业研究, 2004(1): 30-33.
- [6] 郭望模,傅亚萍,孙宗修,等. 盐胁迫下不同水稻种质形态指标与耐盐性的相关分析[J]. 植物遗传资源学报, 2003, 4(3): 245-251.
- [7] 曾翔,李阳生,谢小立,等. 不同灌溉模式对杂交水稻生育后期根系生理特性和剑叶光合特性的影响[J]. 中国水稻科学, 2003, 17(4): 355-359.
- [8] 许哲鹤. “三早栽培”水稻的生长特点及高产栽培技术[J]. 吉林农业科学, 1988(1): 32-36.
- [9] 张治安,张美善,蔚荣海. 植物生理学实验指导[M]. 北京:中国农业出版社, 2004.
- [10] 林振武. 硝酸还原酶活力与作物耐肥性的研究[J]. 作物学报, 1986(1): 9-14.
- [11] 余记才,李明启. 高等植物硝酸还原酶的光调控[J]. 植物生理通讯, 1997, 33(1): 61-65.
- [12] 周元宝. 水稻高产优质高效栽培的基础生理研究[J]. 安徽农业科学, 1992, 20(20): 109-113.
- [13] 卢向阳,唐湘如,彭丽莎,等. 早稻早育秧形态、组织结构和生理特征[J]. 作物学报, 1997, 23(3): 360-368.
- [14] 杨建昌. 早种水稻灌浆特性与灌浆期子粒中激素含量的变化[J]. 作物学报, 2002, 28(5): 615-621.
- [15] 黄锦文,梁义元,林文雄,等. 超级稻籽粒灌浆特性及其生理生化基础[J]. 福建农业学报, 2002, 17(3): 143-147.
- [16] 陈温福,徐正进,张步龙,等. 不同穗型水稻群体光分布和物质生产差异的比较研究[M]//高佩文,谈松. 水稻高产理论与实践. 北京:中国农业出版社, 1994: 59-63.
- [17] 方展森,关丽君,王枫林,等. 北方水稻旱育稀植技术的研究[J]. 吉林农业科学, 1991(3): 1-4.
- [18] Ku M S B, Cho D, Ranade U, et al. Photosynthetic performance of transgenic rice plants overexpressing maize C_4 photosynthesis enzymes[M]. Sheehy Redesign Rice Photosynthesis. Philippines: IRRI, 2000: 193-204.
- [19] Pere C M, Joliano B O, Liboon S P, et al. Effects of late nitrogen fertilizer application on head rice yield, protein content, and grain quality of rice[J]. Cereal Chemistry, 1996, 73(5): 556-560.
- [20] 石德成,殷立娟. 盐(NaCl)与碱(Na_2CO_3)对星星草胁迫作用的差异[J]. 植物学报, 1993, 35(2): 144-149.
- [21] 石德成,赵可夫. 不同盐浓度的混合盐对羊草苗的胁迫效应[J]. 植物学报, 1998, 40(12): 1136-1142.
- [22] Shi De-Cheng, Sheng Yan-min, Zhao Ke-fu. A simulation of complex Alkali-saline conditions and their effects on the growth of A. Chinese seedlings [J]. Acta Pratacul Sin, 1998, 7(1): 36-41.
- [23] EI S H M A, Shaddad M A K. Comparative effect of sodium carbonate, sodium soleplate, and sodium chloride on the growth and related metabolic activities of pea plants[J]. Plant Nutrition, 1996, 19(5): 717-728.
- [24] 王伯伦. 水稻优化栽培[M]. 北京:农业出版社, 1993: 125-130.
- [25] 史书仁. 水稻生产实用技术问答[M]. 辽宁:科学技术出版社, 1992: 20-21.
- [26] 杨守仁. 水稻高产栽培及高产育种论丛[M]. 北京:农业出版社, 1990: 62-66.

(上接第 596 页)

(上接第 600 页)