

文章编号: 1007-7847(2000) 01-0053-07

## 导入小麦 DNA 的水稻变异系抗逆生理研究

姜孝成, 梁满中, 艾银东, 袁宪宇, 孙朝晖  
(湖南师范大学 生命科学学院, 中国湖南 长沙 410081)

**摘要:** 导入小麦 DNA 的水稻品种洛伊的三个 $F_4$ 代变异系 MD11-2、MD20-4 和 MD18-4, 其寒、旱抗性的相关生理性状有明显差异, 且与 DNA 供体和受体(亲本)的明显不同。在 4 °C 低温时, MD11-2 和 MD18-4 和亲本细胞膜透性没明显变化, MD20-4 的细胞膜透性则增大; 在脱水过程中, 三个变异系的电导率曲线的转折变化与洛伊相似, 但其值均比它高。在低温下, MD20-4 和 MD18-4 的游离氨基酸和可溶性糖含量的变化模式基本相似, 而与 MD11-2 的变化有些不同; 但在脱水条件下, 三者的游离氨基酸含量变化均有差别; MD20-4 和 MD18-4 的可溶性糖含量变化相似, 且均比 MD11-2 的高。在低温下, 三个变异系的脯氨酸含量的升降变化差别较大; 在脱水条件下的差别较小。结果表明, 用导入外源 DNA 改良水稻的抗寒性和抗旱性有一定效果, 但要注意变异系之间的差异。

**关键词:** 小麦; DNA; 水稻; 变异系; 抗逆性

**中图分类号:** Q945.78; S511 **文献标识码:** A

## Studies on Physiological Characters Related with Cold and Drought Resistance of 3 Rice Variation Lines with Introduced Wheat DNA

JIANG Xiao-cheng, LIANG Man-zhong,

AI Yin-dong, YUAN Xian-yu, SUN Zhao-hui

(College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, Hunan, China)

**Abstract:** By introducing DNA of *T. aestivum* L. Yangmai-5 into rice Luoyi, 3 variation lines were screened. The results in this experiment showed that their physiological characters relating to cold and drought resistance had distinct differences with one another and with their parents (DNA donor and receptor) and under different conditions of stress, low temperature or drought. With low temperature of 4 °C, the permeability of

收稿日期: 1999-10-25; 修订日期: 1999-11-01

基金项目: 湖南省教委“九五”重点资助项目; 湖南省重大基础理论研究项目

作者简介: 姜孝成(1964-), 男, 湖南新化人, 湖南师范大学副教授, 博士, 从事植物生理与植物分子生物学研究, Tel: 0731-8871555, E-mail: jxclc@sparc2.hunnu.edu.cn; 梁满中(1962-), 男, 湖南溆浦人, 湖南师范大学高级农艺师, 从事作物育种研究, Tel: 0731-8880256; 艾银东, 袁宪宇, 孙朝晖: 湖南师范大学生物系九五级学生。

cell membrane of MD11-2, MD 18-4 and their parents had no evident changes, but that of MD20-4 increased; during drought stress the values of electrical conductivity of 3 lines were all higher than that of DNA receptor Luoyi, but also turned from abrupt rising to slow climbing at 2 d of treatment. With low temperature, the contents of free amino acids (FAA) and soluble sugars of MD20-4 and MD18-4 showed the same changes in the main and somewhat different with that of MD 11-2; while with drought the changes of contents of FAA were different among 3 lines, the changes of soluble sugars of MD20-4 and MD18-4 were alike with each other but obviously higher than that of MD11-2. The up-down changes of proline contents were clearly distinct among 3 lines under low temperature but slightly different under drought stress. The results above suggested introducing exogenous DNA will be effective to improve cold and drought resistance of rice.

**Key words:** wheat; DNA; rice; variations; stress resistance

水稻是世界上约40%人口的主要粮食来源.在我国,水稻的地位仅次于小麦;但其产量一直受到干旱和寒冷等自然因素的制约.据估计,干旱是仅次于病虫害的限制水稻产量的重大自然灾害因子<sup>[1]</sup>.在干旱频发稻区,水稻整个生育期间均可能遭受干旱而大幅度减产甚至失收.低温也是影响水稻生长发育的重要灾害因子;水稻有3个生长发育时期对低温极为敏感:秧苗期,孕穗期和开花灌浆期.如我国长江以南的双季稻作区,早、晚稻栽培都可能受到低温的影响而导致减产<sup>[2]</sup>.因此,如何提高水稻的抗寒性和抗旱性,一直是育种家和其他农业科研学者们十分关心的问题.

一般来说,品种改良有两条途径,即传统的育种方法和结合生物技术的育种方法.后者具有周期短、见效快、适用对象广的特点,并随着生物科学的不断发展而日益显出优势<sup>[3]</sup>.近10年来,人们采用这种方法,已获得许多作物的转基因植株;比如利用基因枪法将外源DNA导入水稻悬浮细胞,已获得转基因水稻植株<sup>[4]</sup>.自90年代初期以来,我们就致力于应用基因枪法,将小麦DNA导入水稻,试图改良水稻的抗寒性和抗旱性.目前已成功地将小麦DNA导入一个优质籼稻品种洛伊的幼胚悬浮细胞并获得了较高的植株再生频率<sup>[5,6]</sup>.在随后几个世代的变异株系中,我们选育出了几个具有较好的产量和品质性状的后代株系.为检测小麦的抗寒、抗旱特性是否已转入水稻,在本试验中我们作了一些相关的生理测试和分析.

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

外源DNA供体小麦品种是扬麦5号,来自湖南省农科院作物研究所;外源DNA受体是我室从美国引入试种的一个优质稻品种洛伊.变异系为MD11-2、MD18-4和MD20-4,它们是从导入小麦DNA后的水稻变异株中选育出的第4代株系,表现出较好的高产和优质农艺性状,株形整齐,生育期比亲本水稻洛伊长3~4 d.

## 1.2 方法

### 1.2.1 种子萌发

按常规方法浸种, 然后在恒温培养箱中28 ℃ 萌发处理. 幼苗生长一周以后, 每个材料分为5等份, 分别进行干旱和低温处理.

### 1.2.2 干旱处理

在25 ℃ 的人工气候箱中, 让材料根系裸露于空气中; 对照材料则进行正常的供水栽培.

### 1.2.3 低温处理

将材料放在冰箱冷藏室中4 ℃ 供水栽培, 补充人工光照. 对照材料与干旱处理的相同.

自处理之日开始, 每天取样进行以下指标的测定:

1) 含水量测定: 参见文献[7].

2) 电导率的测定: 取幼苗10根, 用镊子除去幼苗上残留的胚乳(尽量不要伤害根系), 称量后用蒸馏水漂洗数次, 以洗去伤口上的渗漏物质. 用吸水纸吸干表面水分后, 放入盛有20 mL 蒸馏水的小烧杯中, 使根系完全浸入蒸馏水中. 1 h 后用 DSS-12A 型电导仪测量浸泡液的电导率, 继续浸泡1 h 后进行第2次电导率测定. 求前后2次测定结果的平均值.

3) 游离氨基酸总量的测定: 按上述方法取样; 称量后, 剪碎, 放入研钵中, 用5 mL 10%的乙酸研磨成匀浆, 倒入容量瓶中, 用蒸馏水稀释至100 mL, 摇匀后, 用滤纸过滤, 滤液于三角瓶中. 吸取1 mL 滤液放入10 mL 具塞刻度试管中, 加入无氨蒸馏水1 mL, 其它步骤参见[8]. 用亮氨酸按同样方法制作标准曲线. 以氨基态氮量/干物质( $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ )表示游离氨基酸的含量.

4) 脯氨酸含量测定: 按上述方法取样. 称量后, 剪碎装入一支具塞大试管中, 加入5 mL 3%的磺基水杨酸, 加塞并沸水浴10 min 后取出, 冷却至室温摇匀, 用移液管吸出2 mL 于10 mL 具塞刻度试管中加入2 mL 冰醋酸与2 mL 酸性茚三酮, 加塞后沸水浴30 min. 冷却至室温, 加入甲苯4 mL, 充分振荡0.5 min, 静置待分层后, 取出上清液于比色皿中, 在520 nm 下测消光值. 用脯氨酸按同样方法制作标准曲线. 以每克干物质中脯氨酸的微克数表示脯氨酸含量.

5) 可溶性糖含量测定参见[8]中的蒽酮比色法.

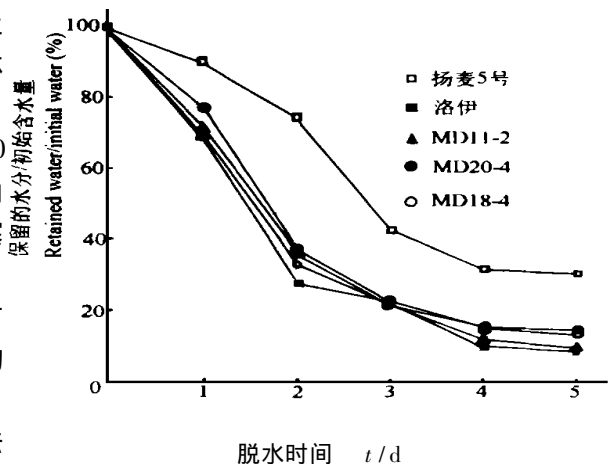


图1 变异株系和亲本幼苗在脱水过程中持水量的变化

Fig. 1 Changes of retained water contents of seedlings of the variation lines and their parents during dehydration

## 2 结果与讨论

### 2.1 变异株系与亲本幼苗的抗旱性和抗寒性的比较

图1结果表明,在脱水过程中扬麦5号的保水能力远大于水稻洛伊,三个变异株系持水量的变化与亲本水稻洛伊相似,其下降速率在脱水2 d后明显变缓;而扬麦5号的这种转折变化是在脱水3 d以后.变异株系的持水能力有所提高.因此,其抗旱能力应有所改善.

供水栽培时,各供试材料的根系浸泡液的电导率均较低(图2A),低温处理时,扬麦5号的电导率下降,洛伊、MD18-4、MD11-2的电导率变化不明显,MD20-4的电导率则有较大的上升(图2B).同时,水稻洛伊和各变异系的电导率变化在栽培3 d时有一明显的转折点.干旱能引起各供试材料的电导率急剧上升,并表现出明显的阶段性变化,水稻材料脱水干旱2 d,扬麦5号脱水干旱3 d时,电导率由急剧上升转变为平缓上升(图2C).

电导率的大小可反映细胞内电解质渗漏出细胞膜的多少以及细胞膜结构的变化.在常温供水栽培时,扬麦5号的电导率最大,这可能与生态习性有关;低温可能诱导其细胞膜透性下降,因此电导率相应降低,这与小麦苗期的高抗寒性是密切相关的.除MD20-4外,低温对其它供试水稻幼苗的细胞膜可能并不造成伤害,因此电导率的变化不明显.干旱对供试材料电导率变化的影响,与苗期的生长发育需要较多的水分有关,因此图2C中电导率的变化与图1中各材料的持水量变化是相适应的;无论小麦或水稻,苗期缺水对细胞膜结构都会造成伤害;小麦电导率的变化还可能与其主动排出电解质以维持细胞内正常代谢有关.复水实验表明,扬麦5号幼苗脱水3 d、水稻幼苗脱水2 d,即已不能恢复生长.

### 2.2 低温和干旱对变异株系和亲本幼苗体内游离氨基酸含量变化的影响

25 供水栽培时,几乎所有样本体内游离氨基酸含量随时间进程而呈现高低交替变化(图3A),这可能与幼苗生长初期种子胚乳中蛋白质分解、运输和参与新的形态建成有关.低温处理4 d以前,扬麦5号、洛伊和MD20-4幼苗体内游离氨基酸含量下降,4 d以后则显著上升;MD18-4在处理3 d时游离氨基酸含量上升,MD11-2则在整个低温处理过程中体内游离氨基酸含量均呈上升趋势,与亲本和其它变异株系形成明显差异(图3B).干旱对样本体内游离氨基酸含量的影响因材料不同而与低温的影响有较大的差异,亲本扬

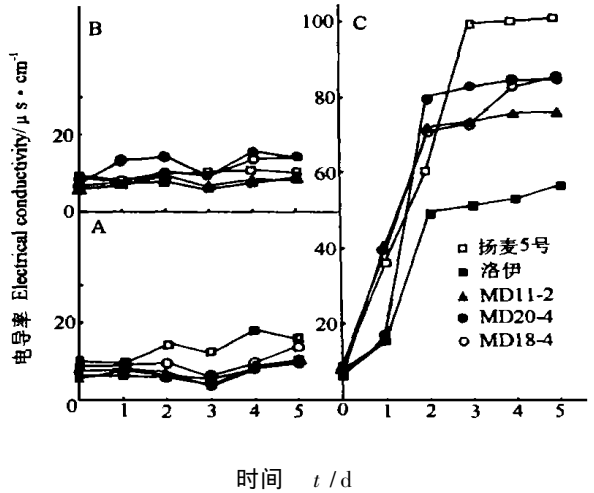


图2 变异株系和亲本幼苗的电导率变化

A. 25 °C, 供水栽培; B. 4 °C, 供水栽培;

C. 25 °C, 脱水处理.

Fig. 2 Changes of electrical conductivity of seedlings of the variation lines and their parents

A. 25 °C, in water; B. 4 °C, in water;

C. 25 °C, dehydration.

麦5号在干旱5 d时游离氨基酸含量仍在下降; 亲本洛伊体内游离氨基酸含量变化趋势则与低温处理的相似, 但干旱5 d时其含量几乎是低温处理条件下的2倍。3个变异株系则在干旱4 d后其体内游离氨基酸含量均明显下降, 变化趋势与低温处理时完全不同; 它们对干旱的反应也各不相同

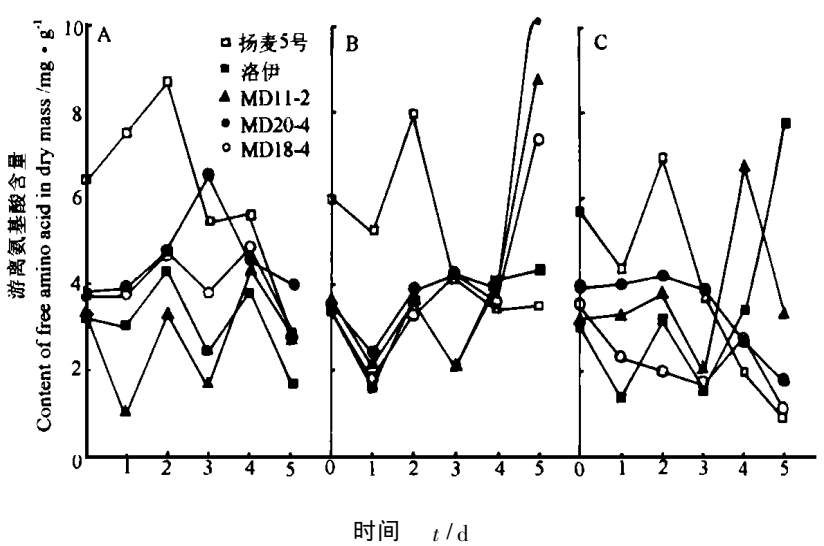


图3 变异株系与亲本幼苗体内游离氨基酸含量的变化  
A. 25 °C, 供水栽培; B. 4 °C, 供水栽培; C. 25 °C, 脱水处理。

Fig. 3 Changes of free amino acid contents in variation lines and their parents  
A. 25 °C, in water; B. 4 °C, in water; C. 25 °C, dehydration.

### 2.3 低温和干旱对变异株系和亲本幼苗体内脯氨酸含量变化的影响

低温对变异株系和亲本幼苗体内脯氨酸含量的影响, 主要是在处理起始阶段和处理2 d以后。在起始阶段(1 d)时, MD18-4幼苗体内脯氨酸含量下降, 其它材料的脯氨酸含量上升; 低温处理2 d以后, 所有材料体内的脯氨酸含量从一相似的低值过渡到不同程度上升, 其最高值出现的时期因材料的遗传背景不同而异(图4B)。

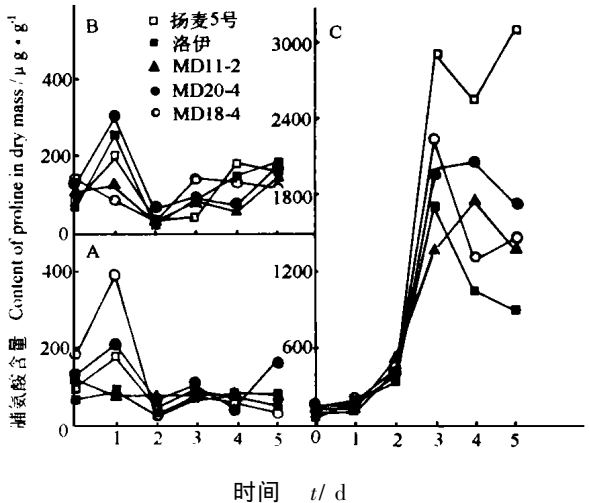


图4 变异株系和亲本幼苗体内的脯氨酸含量变化  
A. 25°C, 供水栽培; B. 4°C, 供水栽培; C. 25°C, 脱水处理。

Fig. 4 Changes of contents of proline in variation lines and their parents  
A. 25°C, in water; B. 4°C, in water; C. 25°C, dehydration.

干旱引起幼苗体内脯氨酸含量的急剧上升, 干旱3~4 d时达到最大值。脯氨酸值的大小及最大值以后的变化过程因材料不同而有明显差异, 扬麦5号在干旱5 d时还在进一步上升, 洛伊的脯氨酸值下降的幅度最大(图4C)。

### 2.4 低温和干旱对变异株系和亲本幼苗体内可溶性糖含量变化的影响

25 °C 供水栽培时, 所有材料的幼苗体内可溶性糖含量变化均较平稳, 波动范围在1 µg · g<sup>-1</sup>干物质以内, 到各自最高值的1/10(图5A); 低温和干旱均导致所有材料的幼苗体

内可溶性糖含量持续上升. 变异株系 MD20-4和 MD18-4有相似的变化; MD1-2则差异较大, 似乎更接近于亲本洛伊(图5B, C).

### 3 讨论

植物体内的水分可分为自由水和束缚水两种状态, 前者容易失去, 与植物组织代谢强度密切相关, 后者与细胞结构物质或胶体颗粒牢固结合而不易失去, 与植物组织的抗逆性有关; 但两者之间没有严格界限, 在一定条件下可以相互转化. 图1结果表明, 水稻洛伊和三个变异系在脱水处理2 d, 扬麦5号脱水3 d时, 失水速率最快, 以后则趋于平缓 and 稳定, 这可以反映其各自的水分状态变化和差异. 扬麦5号是典型的旱土作物, 抗旱性较强, 因而束缚水含量较高, 三个变异株系幼苗体内束缚水含量较亲本洛伊高, 虽然 MD11-2的增值并不明显. 脱水处理时, 扬麦5号比水稻洛伊有更高的电导率值, 这可能与小麦的生态习性有关, 因为它是适应旱土栽培的, 脱水处理后将根系浸泡于水中测电导率的突然变化可能导致其不良代谢反应; 水稻则正相反. 此外, 小麦较高的电导率值还可能与其主动排出电解质有关; 但图2C 同时表明, 小麦的电导率出现最高值的时间较水稻(包括变异株系)延迟1 d, 因此认为小麦维持细胞膜结构完整性的能力比水稻强. 4 低温并不导致小麦、水稻洛伊和变异株系 MD11-2、MD18-4电导率的上升, 因此它们可能有较高的抗寒性; 但变异株系 MD20-4似乎对低温敏感(图2B).

生理指标分析结果表明, 低温和干旱处理时, 变异株系幼苗体内游离氨基酸含量(图3)、脯氨酸含量(图4)和可溶性糖含量(图5)的变化, 随处理时间长短不同而表现出扬麦5号或洛伊的特征, 或介于两亲本的含量之间. 这三类物质被认为与植物的抗寒性和抗旱性密切相关, 其积累可作为渗透调节物质和防脱水剂而起作用, 因为它们可以降低细胞水势, 增强持水能力<sup>[9, 10]</sup>. 在本试验中, 我们得到了类似的结果. 特别是三个变异株系在低温和脱水条件下体内可溶性糖含量的变化, 脱水过程中脯氨酸含量的变化, 皆通过导入扬麦5号 DNA 而在洛伊的基础上得到了改良; 但在低温条件下变异株系的脯氨酸含量变化与亲本的关系比较复杂, 因此将外源 DNA 导入水稻并不是一个遗传物质简

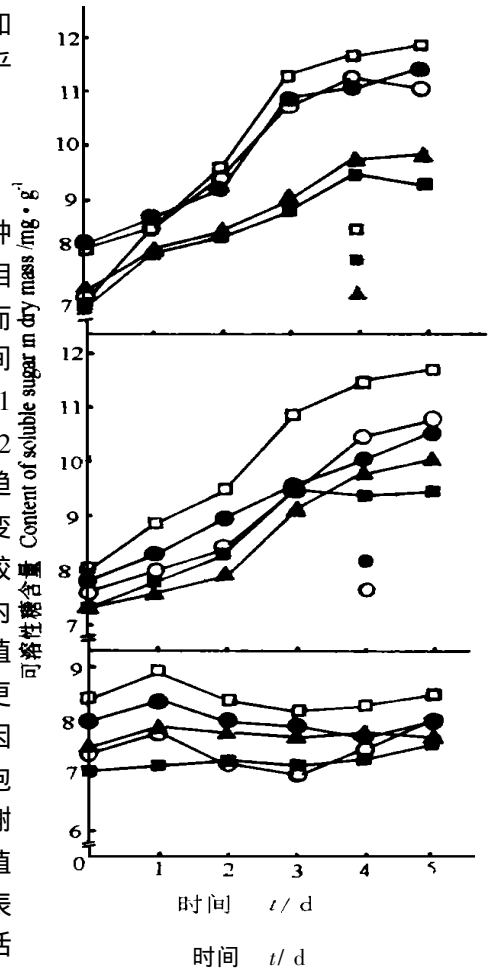


图5 变异株系和亲本幼苗体内可溶性糖的含量变化

A. 25 °C, 供水栽培; B. 4 °C, 供水栽培; C. 25 °C, 脱水处理.

Fig. 5 Changes of contents of soluble sugars in variation lines and their parents

A. 25 °C, in water; B. 4 °C, in water;

C. 25 °C, dehydration.

单积累的过程。本试验结果表明, 通过导入小麦 DNA 改良水稻的抗寒性和抗旱性完全是可能的, 虽然有关的水稻遗传基础的变化及其相应的生理代谢有待进一步研究。

致谢: 本试验前期的小麦 DNA 导入水稻的工作主要由黄亮群副教授完成, 周广洽和陈良碧两位教授在本试验中给予了指导和帮助, 一并表示衷心感谢!

### 参考文献:

- [1] 杨建昌, 朱应森, 王志琴. 土壤水分对水稻产量与生理特性的影响[J]. 作物学报, 1995, 21(1): 110-114.
- [2] 汤圣祥, 闵绍楷. 水稻品种改良技术讲座- 耐逆境育种[J]. 中国稻米, 1993, 3: 38-39.
- [3] 高振宇, 黄大年. 影响籼稻愈伤组织形成和植物再生能力和因素[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(3): 227-230.
- [4] CAO J, DUAN X, McELORY D, *et al.* Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 586-591.
- [5] 黄亮群, 李训贞, 姜孝成, 等. 影响籼稻愈伤组织再生频率的几个因素[J]. 激光生物学报, 1998, 7(4): 293-296.
- [6] 黄亮群, 李训贞. 小麦异交结实特性的研究[J]. 生命科学研究, 1997, 1(1): 72-76.
- [7] 张志良. 植物生理学实验指导, 第2版[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 1-3.
- [8] 西北农业大学. 基础生物化学实验指导[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1986. 16, 108.
- [9] 黎裕. 植物的渗透调节与其它生理过程的关系及其在作物改良中的应用[J]. 植物生理学通讯, 1994, 30(5): 377-385.
- [10] 王毅, 杨宏福, 李树德. 园艺植物冷害与抗冷性的研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(3): 239-244.

### 本刊新任编委简介

## 湖南师范大学特聘教授——张 健

张 健, 特聘教授, 男, 1963年5月出生, 湖南长沙人, 1992年在美国迈阿密大学医学院生物化学及分子生物学系获博士学位, 1993~1994年在美国迈阿密大学医学院医学系从事博士后研究工作, 1994~1999年在美国耶鲁大学分子、细胞及发育生物学系从事博士后研究工作。1989~1992在攻读博士学位期间, 从牛的组织 and 人的细胞中分别克隆了 DNA 聚合酶  $\delta$  催化亚基及小亚基, 并用计算机软件(Intelligenetics, Genepro 等)对 DNA 及蛋白质序列进行了分析, 结果发表在《Biochemistry》、《NAS》及《Genomics》上。在随后一年的博士后研究期间, 在细菌和昆虫细胞中表达了人的 DNA 聚合酶。1994~1999年在耶鲁大学做博士后研究期间主要承担“转录因子 AP-2在发育与疾病中的作用”项目(美国 NIH 课题), 敲除了 AP-2 $\alpha$  基因, 并对表现型进行了分析, 此结果于1996年发表在《Nature》上(张健为第一作者), 已被同行引用了107次。随后探讨了 AP-2 $\alpha$  对眼睛发育的影响, 此结果1999年在《Developmental Biology》上发表, 此外, 还探讨了 AP-2 $\alpha$  基因家族对乳腺发育及乳腺癌发生中的作用。有一篇论文1998年在《Cancer Research》上发表。在耶鲁大学工作期间, 三次荣获带奖励性质的研究基金。1999年应聘为湖南师范大学特聘教授, 目前已回国开展基因敲除及转基因动物的研究。