

文章编号: 1003-8701(2005)05-0033-02

盐胁迫对转 BADH 基因水稻 R₁ 的影响

林秀峰¹, 邢少辰¹, 刘志铭¹, 王 艳²

(1. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 吉林 公主岭 136100;

2. 吉林省前郭县农业技术推广中心, 吉林 前郭 138000)

摘 要:以转 BADH 基因水稻 R₁ 和常规对照品种为材料, 采用 3 种不同浓度 NaCl 在苗期和孕穗期进行盐胁迫处理, 分析了 R₁ 和对照之间的株高、BADH 活性、叶片相对电导率和植物大分子渗漏值等指标, 并进行 PCR 分子检测。结果表明, PCR 阳性与阴性植株个数分离比不完全符合简单的孟德尔遗传规律; 相对电导率和植物大分子渗漏值低, 而 BADH 活性高的转基因植株耐盐性比对照增强。此结果说明转基因水稻 R₁ 耐盐性明显高于对照, 目的基因正常表达, 此结果对今后培育新的抗性品种奠定了基础。

关键词:水稻; 转甜菜碱醛脱氢酶; 转基因; 耐盐

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

在转基因水稻中超量合成并积累小分子化合物, 能够维持细胞的正常膨压, 使许多代谢中的重要酶类在渗透胁迫下保持其活性, 增强植物对包括盐渍在内的非生物逆境的抗性。这些小分子化合物包括甜菜碱、甘露醇、果聚糖和山梨醇等。甜菜碱对呼吸酶和其他酶有很好的保护效应^[1]。而甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH)是合成甜菜碱的关键酶^[2]。本课题组已通过农杆菌介导法将含有 BADH 基因的植物双元表达载体转到吉林主推粳稻品种丰优 516 中^[3]。为了明确转基因水稻耐盐性的表现, 本试验在不同浓度 NaCl 下对转 BADH 基因水稻 R₁ 进行胁迫培养, 做 PCR 检测, 并对植株的 BADH 活性、叶片相对电导率以及植物大分子渗漏值进行了测定和分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转 BADH 基因水稻 R₁ 4 个株系, 分别为 FYB-1、FYB-12、FYB-25 和 FYB-34, 对照为非转基因常规粳稻品种丰优 516。

1.2 试验方法

1.2.1 耐盐性鉴定和 PCR 检测

将对照和转基因水稻 FYB-1、FYB-12、FYB-25 和 FYB-34 株系的种子用 75% 酒精灭菌 1~3 min, 再用 0.1% 升汞灭菌 10~15 min, 然后用无菌水冲洗 3 遍, 在 26~28℃ 下催芽, 待种子露白后分别接种在 3 种不同 NaCl 浓度处理的 1/2 MS 培养基上, 处理 I 为 0 g/L NaCl、处理 II 为 5 g/L NaCl、处理 III 为 8 g/L NaCl。14 d 后调查株高。

在处理 II 的植株上分别取少量叶片提取 DNA。DNA 的提取与纯化参照王关林等方法^[4], PCR 扩增反应参照肖岗等方法进行^[5], BADH 的 PCR 扩增引物为:

P1 AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTC

P2 TTCAAGGAGACTTGTACCATCCCCA

收稿日期: 2005-03-22

基金项目: 国家转基因植物研究与产业化开发专项(J99-B-001)资助

作者简介: 林秀峰(1964-), 女, 吉林省农科院副研究员, 主要从事水稻遗传转化及分子育种研究。

选取对照品种和在处理 II 培养基上生长状态良好的且 PCR 为阳性的转基因水稻幼苗移栽至两个试验池(长 6.5 m、宽 3.2 m、深 0.6 m)中,在孕穗期,其中一个池中正常持续灌水,另一个池中注入 5 g/L NaCl 溶液,盐池中溶液电导率为 9 dS/m。两池水层深度均为 2 cm。孕穗期处理 14 d 后从 4 个转基因 R₁ 株系中随机各选 5 株作为以下各项分析测定的材料,取其平均值。

1.2.2 BADH 活性检测、叶片相对电导率和植物大分子渗漏值的测定

BADH 活性检测和叶片相对电导率测定参照刘凤华等方法^[6];植物大分子渗漏值的测定参照 Leopold 方法^[7],将 3 cm 长的新鲜叶片等分 6 段,加入超纯水 2 mL,室温下 40 rpm 振荡 4 h,利用紫外比色方法测定 OD₂₅₄ 吸收值,得到总渗漏值。

2 结果与讨论

2.1 转基因水稻 R₁ 的耐盐性鉴定

对在 3 种不同浓度 NaCl 处理的 1/2 MS 培养基上生长的 4 个株系和对照进行株高测量,结果见表 1。

表 1 不同浓度 NaCl 的 1/2 MS 培养基上生长的幼苗

株系	处理 I			处理 II			处理 III		
	分析株数	平均株高 (cm)	高于对照株数	分析株数	平均株高 (cm)	高于对照株数	分析株数	平均株高 (cm)	高于对照株数
ck	45	19.6	24	45	12.1	23	45	8.2	21
FYB-1	50	19.3	24	50	14.8	26	49	10.2	25
FYB-12	48	20.2	26	48	16.8	34	48	12.1	34
FYB-25	45	19.2	23	45	16.2	34	45	11.7	33
FYB-34	50	19.9	27	50	17.0	37	50	12.5	35

从表 1 结果可以看出,刚露白的种子在 1/2 MS 培养基上培养 14 d 后,在处理 I 培养基上生长的幼苗,对照和 4 个株系的株高基本一致,平均株高与对照最多相差 0.6 cm;而处理 II 和处理 III 培养基上生长的幼苗,株高不一致,对对照明显受到抑制,转基因水稻株高出现分离。处理 II 比对照高的转基因植株大部正常生长,其余的植株(包括对照)叶片逐渐变黄,4 个转基因株系的平均株高都比对照高;处理 III 中对照和转基因植株均明显受到抑制,但转基因株系受抑制程度比对照低,平均株高仍明显高于对照,对照和耐盐能力差的植株叶片逐渐枯死。表明在苗期转基因株系耐盐性比对照增强。

孕穗期没有进行盐胁迫处理的转基因水稻和对照品种生长发育上未见差异,而处理 II 胁迫 14 d 后,各株系均出现盐害症状。但转基因株系和对照比其绿叶数较多,转基因株系盐害症状出现迟,并且程度轻,表明 BADH 基因可提高水稻孕穗开花期的耐盐性。

2.2 R₁ 株系的 PCR 检测

将处理 II 培养基上生长的 4 个株系幼苗和随机选取的 10 株对照进行 PCR 分子检测,以 PCR 扩增产物有无 BADH 基因的特异性片段为抗性基因的分选指标,结果见表 2。

表 2 转 BADH 基因水稻的 R₁PCR 检测

株系	分析株数	PCR 阳性株数	PCR 阴性株数	分离比(PCR ⁺ :PCR ⁻)
ck	10	0	10	
FYB-1	50	27	23	1:1
FYB-12	48	35	13	3:1
FYB-25	45	33	12	3:1
FYB-34	50	36	14	3:1

从表 2 结果分析可以得出,4 个转基因自交子一代株系,有 3 个株系的分离比符合简单的孟德尔式遗传分离规律,即 3:1,为单基因显性遗传,结果与多数的报道相一致^[8]。1 个株系的分离比为 1:1,不符合简单的孟德尔式遗传分离规律,这一结果与黄大年的报道一致^[9]。

2.3 R₁ 株系的 BADH 活性、相对电导率和大分子渗漏值的测定

孕穗期处理 14 d 后,从 4 个转基因 R₁ 株系和对照中随机各选 5 株,做 BADH 活性、(下转第 39 页)

of xylem sap increased by 3.6% to 9.4% compared with the control. The transpiration rate of maize decreased by 26.0% to 39.7% and water use efficient were improved by the application of silicon. The morphology and structure of cells in maize leaves was changed and osmosis of water in plant tissues inhibited. So the application of silicon significantly improved water conditions in maize plants and created a better basis for the increase of maize crop yield.

Key words: Silicon; Maize; Water physiology

(上接第 34 页)

叶片相对电导率和大分子渗漏值测定,取其平均值,结果见表 3。

表 3 5 g/L NaCl 胁迫下 R₁ BADH 活性、相对电导率和大分子渗漏值的平均值

测试项目	株 系				
	对照	FYB-1	FYB-12	FYB-25	FYB-34
BADH 活性	0	2.54	4.23	3.76	5.31
电导率	0.46	0.39	0.31	0.34	0.26
渗漏值	0.43	0.38	0.33	0.35	0.29

从表 3 结果可以看出,不同转基因株系之间 BADH 活性差异很大,FYB-34 株系 BADH 活性较高,FYB-1 株系 BADH 活性较低,高低相差近 2 倍,对照植株未测出 BADH 活性,表明 BADH 基因能在转基因植株中正常表达。另外,不同转基因株系之间的电导率和大分子渗漏值差异也很大,FYB-1 株系电导率和大分子渗漏值都高,FYB-34 株系的电导率和大分子渗漏值均低。

水稻的苗期和抽穗开花期是两个对盐较敏感时期。本研究中转 BADH 基因水稻在苗期和孕穗期的耐盐性均有所增强,表明 BADH 基因可提高水稻孕穗开花期的耐盐性,而且不同转基因植株之间,相对电导率和大分子渗漏值越低,植物细胞受盐损伤程度就越小,表现在 BADH 酶活性高,抗盐性就越强。这一结果与刘凤华报道相一致^[6]。

参考文献:

[1] 骆爱玲,等.甜菜碱醛脱氢酶在菠菜叶细胞中的定位[J].植物生理学报,1995,21(2):117-1221.

[2] 梁 峥,等.干旱和盐胁迫诱导甜菜叶中的甜菜碱醛脱氢酶的积累[J].植物生理学报,1996,22(2):161-164.

[3] 林秀峰,等.转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻的获得[J].吉林农业科学,2005,30(2):7-9.

[4] 王关林,等.植物基因工程(2版)[M].北京:科学出版社,2002,742-744.

[5] 肖 岗,等.山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究[J].科学通报,1995,40(8):741-745.

[6] 刘凤华,等.转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J].遗传学报,1997,24(1):54-58.

[7] Lepold A C, et al. Salinity Tolerance in Plants[M]. New York: Wiley, 1984, 67.

[8] Zhang S P, et al. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 465-469.

[9] Huang D N, et al. Introduction of cecropin B gene into rice (*Oryza sativa* L.) by particle bombardment and analysis of transgenic plants[J]. Sci in china (Series C)(中国科学)(C 辑), 1996, 39(6): 652-661.

Effect of Salt Stress on R₁ Generation of Transgenic Rice

LIN Xiu-feng, XING Shao-chen, LIU Zhi-ming, et al.

(Bio-Technology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: Four R₁ lines of transgenic rice and check variety “Fengyou 516” were treated under different salt stress. Four indexes and PCR detection were determined and analyzed. The results showed that 1) the ratio of negative numbers to positive ones of PCR detection was not completely conform to the first Mendelian law; 2) The plant height of transgenic R₁ generation was higher than non-transgenic plants under salt stress; 3) The activity of BADH of transgenic R₁ plants increased greatly while that of non-transgenic plants was undetectable and 4) Relative electronic conductivity and leakage rate of macromolecules of transgenic R₁ plants was lower than non-transgenic plants. This indicated that the BADH gene already expressed in the transgenic R₁ generation. These results can contribute to the rice breeding in the future.

Key words: Rice; BADH; Transgenic; Salt stress