

转 *BADH* 基因水稻幼苗抗旱性研究

杨晓玲^{1,2}, 郭守华², 杨 晴², 东方阳², 王华方¹

(1. 北京林业大学 生物科学与技术学院, 北京 100083; 2 河北科技师范学院 生命科学系, 河北 昌黎 066600)

摘要: 为了研究转 *BADH* 脱氢酶基因水稻的抗旱性, 以受体亲本中花 8 和水稻旱作品种开系 7 及陆稻品种白珍珠作对照, 于塑料营养钵中培养幼苗至五叶期进行干旱胁迫, 测定了转 *BADH* 基因水稻品种 52-7、51-15 幼苗的生理生化变化。结果表明, 干旱胁迫下, 水稻幼苗细胞膜透性增加, 膜脂过氧化产物 MDA 含量以及氨基酸、可溶性糖和游离脯氨酸含量提高, 可溶性蛋白质含量降低, POD 活性提高。但 52-7 和 51-15 细胞膜透性较小, MDA 积累较少, 蛋白质、氨基酸含量的变化幅度较小, 可溶性糖、游离脯氨酸含量的增加幅度较大, POD 和 SOD 活性较高。52-7、51-15 与中花 8 具有相同的 POD 同工酶谱, 与开系 7 和白珍珠有差异。干旱胁迫诱导中花 8 产生 3 条新酶带而与开系 7 和白珍珠相同, 其他各品种酶谱不变。52-7 和 51-15 的抗旱性强于对照品种。

关键词: 水稻; *BADH* 基因; 抗旱性

中图分类号: S511.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)03-0060-05

Study on Anti-drought Ability of Transgenic (*BADH*) Rice Seedlings

YANG Xiao-ling^{1,2}, GUO Shou-hua², YANG Qing², DONGFANG Yang², WANG Hua-fang¹

(1. College of Life Science and Technology, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China;

2. Department of Life Science, Hebei Normal University of Science and Technology, Changli 066600, China)

Abstract: Rice seedlings of the varieties transferred *BADH* gene 52-7 and 51-15 were potted in plastic basins to study their anti-drought ability, when they grew to 5 leaves, they were intimidated in drought, and then some physiological and biological changes of them were tested. The rice seedlings of *BADH* gene receiver Zhonghua 8 and dry planting variety Kaixi 7 and the variety of land rice Baizhenzhu were regarded as contrasts. The result showed that the membrane permeability of rice seedlings increased under drought stress, the contents of MDA and amino acid, soluble sugar and free proline increased as well as the activity of POD, while the content of soluble proteins decreased. But the membrane permeability of 52-7 and 51-15 was smaller than that of the other's, and the accumulation of MDA decreased, the change extents of protein and amino acid contents were smaller, the increasing extents of soluble sugar and free proline were bigger, the activities of POD and SOD were higher than those of the other's. There were the same POD isozyme chart among 52-7, 51-15 and Zhonghua 8, but they had some differences with Kaixi 7 and Baizhenzhu. Zhonghua 8 was induced to synthesize 3 kinds of POD isozymes by the treatment of drought stress, it had the same POD isozyme chart with Kaixi 7 and Baizhenzhu' accordingly, the other varieties had no changes for POD isozymes under drought stress. 52-7 and 51-15 had better traits of drought resistance than the other varieties.

Key words: Rice; *BADH* gene; Anti-drought

水资源短缺是制约我国农业发展的重要因素。灌溉稻田水资源浪费严重, 培育抗旱的栽培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^[1]。

甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*)是甜菜碱合成途径的一种重要酶。甜菜碱是重要的渗透调节物质,其积累有利于提高植物的抗旱、抗盐性。但许多农作物(如水稻、土豆、烟草和番茄等)并不能积累甜菜碱。利用基因工程手段,把*BADH*转入普通作物中使其表达,可达到增强作物抗旱、抗盐性的目的^[2-7]。中国科学院遗传研究所对*BADH*基因进行了研究,并从山菠菜中获得了*BADH*基因,以普通栽培水稻品种中花8(简称中8)为受体亲本,将*BADH*基因转入水稻,获得了转基因水稻^[4]。经筛选,得到了生物学性状和产量、品质等性状较好的转*BADH*基因水稻品系52-7和51-15^[5]。转*BADH*基因水稻的解剖特征和抗旱耐盐性研究已有部分相关报道^[8-11]。本试验以受体亲本中8和水稻旱作品种开系7及陆稻品种白珍珠作对照,对转*BADH*基因水稻品系52-7和51-15幼苗的抗旱性进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料

转*BADH*基因水稻52-7、51-15及其受体亲本中花8号均由中国科学院遗传研究所陈受宜研究员提供;以色列陆稻白珍珠由秦皇岛市抚宁县西河南乡农技站提供;旱作水稻品种开系7购于秦皇岛市昌黎县种子公司。

1.2 方法

先将种子于室温下(20℃左右)催芽5 d,选择萌发一致的种子均匀播种在土和蛭石比例为3:1的塑料营养钵中,每钵15株,适量灌水。幼苗长至5叶

时,分成两组处理:一组为正常浇水,另一组为干旱胁迫,8次重复。胁迫后的第6天,取幼苗地上部分测定各项指标。其具体方法为:

细胞膜透性的测定采用电导仪法,用电解质相对渗出率来表示^[12];丙二醛(MDA)含量的测定采用硫代巴比妥酸法^[12];超氧化物歧化酶(SOD)活性的测定采用NBT光化还原法^[12],活力单位(U)定义为1 g鲜样1 h内抑制NBT还原50%所需的酶量;过氧化物酶(POD)活性的测定采用愈创木酚法^[12],活力单位(U)定义为1 g鲜样1 min内使470 nm处吸光值升高1个单位所需的酶量;脯氨酸含量的测定采用酸性茚三酮比色法^[12];可溶性糖的测定采用蒽酮法^[12];可溶性蛋白质含量的测定采用考马斯亮蓝G250法^[12];氨基酸含量的测定采用茚三酮比色法^[12];POD同工酶分析采用聚丙烯酰胺凝胶电泳法^[12]。

2 结果与分析

2.1 干旱胁迫下水稻幼苗叶片细胞膜透性和MDA含量的变化

表1结果表明,正常浇水的情况下,转*BADH*基因水稻幼苗51-15和52-7的叶片细胞膜透性与其受体亲本相近,高于开系7,而显著低于白珍珠。干旱胁迫下,水稻幼苗叶片的细胞膜透性增大,电解质相对渗出率增加。转基因水稻幼苗的电解质相对渗出率相近,低于其受体亲本和另2个对照品种,差异达极显著水平,其变化幅度也极显著的低于对照品种。这说明51-15和52-7在干旱胁迫下膜结构受伤害较轻,对干旱有较强的抵抗力。

表1 干旱胁迫下水稻幼苗细胞膜透性和MDA含量的变化

品种(系) Variety	电解质相对渗出率/% Relative transuding rate of electrolytes		增加/% Increase	MDA/(μmol/g)		增加/% Increase
	浇水 Watering	干旱 Drought		浇水 Watering	干旱 Drought	
中8 Zhong 8	4.42aA	7.24aA	2.82aA	4.95aA	5.46aA	10.30aA
51-15	4.20aA	6.40bB	2.20bB	4.92aA	5.30aA	7.72bB
52-7	4.00aA	6.28bB	2.28bB	5.07aA	5.30aA	4.54cC
开系7 Kaixi 7	3.12bB	8.10cA	4.98cC	5.19aA	6.19bA	19.27dD
白珍珠 Baizhenzhu	7.66cC	16.08dC	8.42dD	5.23aA	6.31bA	20.65dD

注:小写字母为5%水平差异显著,大写字母为1%水平差异显著,下同
Note: The capital shows significance at 1% level, the lowercase shows significance at 5% level. The same below

MDA是膜脂过氧化的产物。各品种(系)水稻幼苗在正常浇水的条件下,MDA含量(以鲜质量计)相近。干旱胁迫下MDA含量增加,其中51-15和52-7的MDA含量相同,低于受体亲本和对照品种,但与中8差异不显著,而与开系7和白珍珠差异显著。MDA含量变化以52-7最小,其次是51-15,极显著的

低于对照品种。开系7和白珍珠MDA含量增加幅度明显高于其他品种(系)。这说明在干旱胁迫下转基因水稻幼苗膜脂过氧化作用较弱,进一步证明其膜受到的伤害较轻,抗旱性较强。

2.2 干旱胁迫下水稻幼苗SOD,POD活性变化

正常浇水条件下,转基因水稻的SOD活性较低

于中 8 和白珍珠,而与开系 7 差异不明显。干旱胁迫下,51-15、52-7 和中 8 幼苗的 SOD 活性升高,但升高的幅度不同,51-15 和 52-7 升高的幅度较大,与中 8 差异达极显著水平,其中 52-7 升高更明显。开系 7 与白珍珠在干旱胁迫下 SOD 活性下降,均显著低于其他品种(系)。干旱胁迫下,5 个供试品种(系)

的 POD 活性均升高,其中 51-15 和 52-7 的 POD 活性提高得较多,与对照品种差异达极显著水平,52-7 升高得更明显(表 2)。SOD 和 POD 能消除氧自由基,对细胞膜系统和蛋白质、核酸等大分子物质起保护作用,其活性的升高,有利于增强水稻幼苗的抗旱能力。

表 2 干旱胁迫对水稻幼苗 SOD 和 POD 活性的影响

品种(系) Variety	SOD 活性/U SOD activity		增加/ % Increase	POD 活性/U POD activity		增加/ % Increase
	浇水 Watering	干旱 Drought		浇水 Watering	干旱 Drought	
中 8 Zhong 8	2.74aA	2.97aAC	8.39aA	2.32aA	2.60 aAB	12.07aA
51-15	2.47abA	2.80acAC	13.36bB	2.20abA	2.84 aA	29.09bB
52-7	2.42abA	3.03aAC	25.21cC	1.96bA	2.73 aAB	39.29cC
开系 Kaixi 7	2.26bA	2.02bB	- 10.62dD	2.37aA	2.66aAB	12.24aA
白珍珠 Baizhenzhu	2.84cB	2.53cC	- 10.92dD	2.00bA	2.27bB	13.50aA

2.3 干旱胁迫下水稻幼苗 POD 同工酶的变化

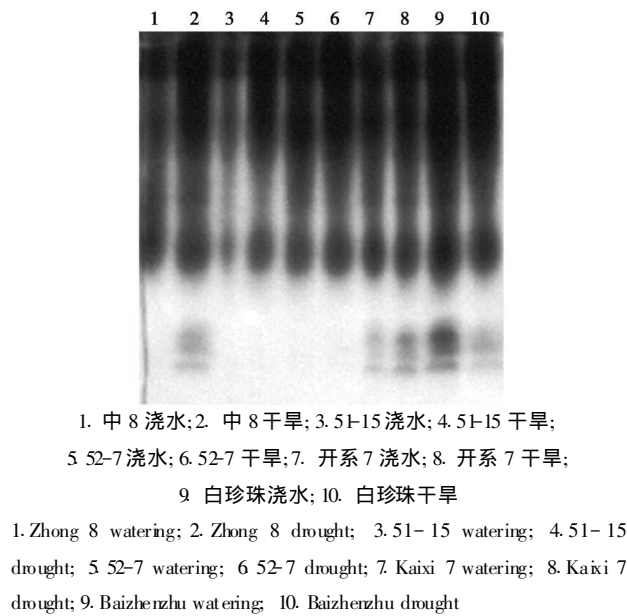


图 1 干旱胁迫对水稻幼苗 POD 同工酶表达的影响

Fig 1 Effect of drought stress on the expression of POD isozyme genes of the rice seedlings

由图 1 可见,供试的 5 个品种水稻幼苗 POD 同工酶谱有差异,共检测出 11 条酶带,Rf 分别是 0.06, 0.10, 0.20, 0.25, 0.28, 0.34, 0.38, 0.49, 0.69, 0.71, 0.75。正常浇水条件下,中 8、52-7 和 51-15 的酶谱一致,只有 1~ 8 号酶带。干旱胁迫下,中 8 出现 9~ 11 号酶带,而 51-15 和 52-7 的 POD 同工酶种类不变。开系 7 和白珍珠含有全部 11 条酶带,干旱胁迫未引起其同工酶种类的变化。表明开系 7 和白珍珠水稻幼苗 POD 同工酶容易表达,而中 8 和转基因水稻幼苗表达较少。干旱胁迫可诱导中 8 合成新的 POD 同工酶,使没表达的同工酶得以表达,而转

基因水稻幼苗 POD 同工酶基因表达未受影响,说明干旱胁迫对其影响较小,其抗旱性较强。

2.4 干旱胁迫下水稻幼苗代谢的变化

2.4.1 干旱胁迫下水稻幼苗脯氨酸和可溶性糖含量的变化 表 3 结果表明,在正常浇水条件下,51-15 和 52-7 幼苗脯氨酸含量(以鲜质量计)低于中 8 和其他 2 个对照品种。干旱胁迫使水稻幼苗体内的脯氨酸含量升高,其中 51-15 和 52-7 的脯氨酸含量增加幅度较大,分别是正常浇水条件下的 4.94 倍和 5.91 倍,极显著的高于中 8 和白珍珠。脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质,干旱条件下其积累有利于增强组织的保水能力,使细胞保持一定的膨压,维持各种正常的生理活动。

正常浇水条件下,51-15 和 52-7 幼苗可溶性糖含量较低,极显著的低于中 8 和白珍珠。干旱胁迫后,5 个品种的水稻幼苗可溶性糖含量均升高,但增加幅度不同。其中 51-15 和 52-7 提高较多,均极显著的高于受体亲本和另 2 个对照品种。52-7 增加更明显,其增加量为中 8 的 6.49 倍,与 51-15 差异达极显著水平。可溶性糖也可作为渗透调节物质增强细胞保水能力,干旱胁迫下,其含量的增加有利于提高植株的抗旱能力。

2.4.2 干旱胁迫下水稻幼苗可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的变化 在正常浇水条件下,51-15、52-7 和中 8 幼苗可溶性蛋白质含量(以鲜质量计)相近且低于其他 2 个对照品种。干旱胁迫下,水稻幼苗可溶性蛋白质含量降低,51-15 和 52-7 的蛋白质含量相同,与中 8 相近。其降低幅度高于中 8,但低于另 2 个对照品种。说明 51-15 和 52-7 在干旱胁迫下蛋白质分解较少。

在正常浇水条件下,中 8 幼苗的游离氨基酸含

量(以鲜质量计)较高, 51-15 和 52-7 的含量相近, 低于中 8, 而显著或极显著的高于开系 7 和白珍珠。干旱胁迫下, 水稻幼苗氨基酸含量增加, 其中中 8 和 51-15 及 52-7 的含量相近, 中 8 的增加幅度较小, 转

基因水稻幼苗的增加幅低于另 2 个对照品种(表 4)。氨基酸是蛋白质分解的产物, 其增加的趋势与蛋白质减少的趋势相符合。这进一步说明 51-15 和 52-7 幼苗在干旱胁迫下蛋白质分解较少。

表 3 干旱胁迫水稻幼苗脯氨酸和可溶性糖含量的变化

Tab 3 Changes of free proline and sduble sugar contents of the rice seedlings under drought stress

品种(系) Variety	脯氨酸/($\mu\text{g/g}$) Proline		增加/ % Increase	可溶性糖/ % Soluble sugar		增加/ % Increase
	浇水 Watering	干旱 Drought		浇水 Watering	干旱 Drought	
中 8 Zhong 8	26.27aA	97.75aA	2.72aA	17.01aA	18.69aA	9.88aA
51-15	21.34cB	105.40aA	3.94bB	10.59bB	15.93bAB	50.42bB
52-7	17.26dC	102.00aA	4.91cC	11.55bB	18.96aA	64.16cC
开系 7 Kaixi 7	28.73abA	142.80bB	3.97bB	12.03bB	14.70bB	22.19dD
白珍珠 Baizhenzhu	30.60bA	100.30aA	2.28dA	21.66cC	26.07cC	20.36dD

表 4 干旱胁迫水稻幼苗可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的变化

Tab. 4 Changes of soluble protein and free amino acid contents of the rice seedlings under drought stress

品种(系) Variety	可溶性蛋白质/(mg/g) Soluble sugar		减少/ % Decrease	氨基态氮/(mg/100g) Amino nitrogen		增加/ % Increase
	浇水 Watering	干旱 Drought		浇水 Watering	干旱 Drought	
中 8 Zhong 8	0.49aA	0.44aA	10.20aA	0.61aA	0.69aA	13.11aA
51-15	0.52aA	0.45aA	13.46bB	0.51bAC	0.62aAC	21.57bB
52-7	0.52aA	0.45aA	13.46bB	0.52bA	0.64aA	23.08bB
开系 7 Kaixi 7	0.69bB	0.55bB	20.29cC	0.25cB	0.34bB	36.00cC
白珍珠 Baizhenzhu	0.58cB	0.50abAB	13.79bB	0.42dC	0.52cC	23.81bB

3 讨论

各种逆境伤害, 往往首先作用在质膜上。大量的研究表明, 在干旱胁迫下细胞内自由基如羟自由基、超氧自由基、单线态氧等会引发膜脂过氧化, 造成细胞膜系统的损伤, 膜透性增加, 使细胞内的大量的无机离子和氨基酸、可溶性糖等小分子外渗^[13, 14]。本试验证明, 转 *BADH* 基因水稻品系 51-15 和 52-7 幼苗在干旱胁迫下膜的结构较稳定, 透性变化较小, MDA 积累较少, 膜脂过氧化程度较低, 受到的伤害较轻, 因而抗旱性较强。

活性氧代谢失调引起的自由基积累及自由基对大分子的破坏作用是需氧生物遭受逆境伤害的重要特征。活性氧在体内的清除需 SOD, POD 等在内的膜抗氧化酶系统控制^[15]。研究表明, 耐旱性强的品种在干旱初期或轻度干旱时比不耐旱性品种能更大幅度的提高其抗氧化酶 SOD, POD 等的活性, 不耐旱品种酶活性提高较少或降低^[16]。另有试验证明, 干旱胁迫初期, 植物组织的 POD 和 SOD 活性均增加, 随着胁迫的加剧, 其活性下降, 但 POD 对胁迫的反应比 SOD 滞后^[17]。转 *BADH* 基因水稻品系 51-15 和 52-7 在干旱胁迫下 SOD 和 POD 活性升高, 而对对照品种中 8 的 SOD 活性低于转基因水稻, 开系 7 和

白珍珠的 SOD 活性则降低, 可能是由于其受伤害较重, 酶活性下降早于转基因水稻。干旱胁迫下对照品种的 POD 活性也低于转基因水稻, 可能是同样的原因。

脯氨酸是植物体内重要的渗透调节物质。干旱胁迫下, 植物体内脯氨酸含量的增加是一种适应和保护性响应, 这有助于提高细胞和组织的持水能力, 防止脱水, 减轻受害的程度。崔国贤等^[18]研究证明, 正常条件下, 抗旱水稻品种游离脯氨酸含量较低, 旱情出现后显著增加。本试验证明, 正常浇水的条件下, 转 *BADH* 基因水稻幼苗脯氨酸含量低于对照品种, 而干旱胁迫下, 其含量增加幅度大于其受体亲本和其他两个对照品种, 这进一步说明其具有较强的抗旱能力。

干旱胁迫下蛋白质等大分子物质分解加速, 而合成作用受到抑制^[13]。转 *BADH* 基因水稻可溶性蛋白质和游离氨基酸含量的变化幅度较小, 说明其在干旱胁迫下蛋白质分解较少, 受干旱影响较小, 抗旱性较强。

参考文献:

[1] 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.

[2] 梁 嶂, 马德钦, 汤 岚, 等. 菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因在烟草中的表达[J]. 生物工程学报, 1997, 13: 2 36 – 240.

[3] 郭学民, 东方阳, 孙耀中, 等. 旱作转 *BADH* 基因水稻茎的解剖结构特征与产量的关系[J]. 华北农学报, 2005, 20(3): 32– 38.

[4] RAZZAQ Abdull, ZHANG Yan-min, YANG Fan, *et al.* In planta transformation of wheat apical meristem: a preliminary study[J]. Acta Agriculturae Boreali-sinica, 2005, 20(1): 17 – 22.

[5] 孙耀中, 东方阳, 陈受宜, 等. 盐胁迫下转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻幼苗耐盐生理的研究[J]. 华北农学报, 2004, 19(3); 38– 42.

[6] 张艳敏, 丁占生, 温之雨, 等. 逆境下转 *BADH* 基因小麦甜菜碱醛脱氢酶活性表达与甜菜碱积累[J]. 华北农学报, 2003, 18〔院庆专辑〕: 36– 39.

[7] 张艳敏. 郭北海. 蒋春志. 转甜菜碱醛脱氢酶(*BADH*) 基因小麦的耐盐耐旱性[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 29– 32.

[8] 郭 岩, 张 莉, 肖 岗. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究[J]. 中国科学(C 辑), 1997, 27(2): 151– 155.

[9] 孙耀中, 东方阳, 郭学民, 等. 转 *BADH* 基因水稻旱作与水作条件下籽粒干物质积累动态的比较研究[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(4): 122– 128.

[10] 郭学民, 刘永军, 东方阳, 等. 转 *BADH* 基因水稻叶片气孔特征的扫描电镜观察研究[J]. 西北植物学报, 2004, 24(7): 1195– 1199.

[11] 郭学民, 东方阳, 孙耀中, 等. 旱作转 *BADH* 基因水稻旗叶、不定根解剖结构的研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(3): 454– 459.

[12] 刘永军, 郭守华, 杨晓玲. 植物生理生化实验[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2002: 64– 156.

[13] 王 忠. 植物生理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001: 434– 455.

[14] 胡颂平, 周清明. 陆稻抗旱性研究进展[J]. 湖南农业大学学报, 2001, 27(3): 240– 244.

[15] 蒋明义, 郭绍川, 张学明. 水分亏缺诱导的氧化胁迫和植物的抗氧化作用[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(2): 144– 150.

[16] 卢少云, 郭振飞, 彭新湘, 等. 干旱条件下水稻幼苗的保护酶活性及其与耐旱性关系[J]. 华南农业大学学报, 1997, 18(4): 21– 25.

[17] 杨晓玲, 鲁玉哲, 杜香华. 干旱胁迫下新红星苹果某些生理生化指标的变化[J]. 河北职业技术师范学院学报, 1996, 3: 26– 29.

[18] 崔国贤, 沈其荣, 崔国清, 等. 水稻旱作及对旱作环境的适应性研究进展[J]. 作物研究, 2001(3): 70– 76.