

# 空心莲子草 DNA 溶液浸胚处理水稻的 变异系分子检测及耐旱性评价

赵芳明<sup>1</sup>, 罗远章<sup>1</sup>, 杨正林<sup>1</sup>, 凌英华<sup>1</sup>, 桑贤春<sup>1</sup>, 杨前进<sup>2</sup>, 何光华<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>西南大学水稻研究所/农业部西南作物遗传改良与育种重点开放实验室, 重庆 400716;

<sup>2</sup>安徽省农业科学院绿色食品工程研究所, 合肥 230031)

**摘要:** 通过 SSR 标记检测了以空心莲子草 DNA 溶液浸胚处理获得的 10 个农艺性状稳定遗传的水稻变异系, 结果表明, 10 个水稻变异系均整合了供体空心莲子草 DNA 的部分片段。在此基础上, 以 8 个水稻变异系及 2 个对照为试验材料, 采用二因素裂区设计, 并以主成分分析、逐步回归分析等多种统计方法分析了变异系的耐旱性。结果表明, 以综合评价指标与耐旱指数相结合的复合评价体系, 可增强水稻耐旱评价的可靠性。导入系 H8 最耐旱, H6 和 H7 较耐旱, 均优于巴西陆稻。本研究结果对水稻的耐旱性评价与耐旱品种选育具有重要意义。

**关键词:** 水稻; 空心莲子草 DNA; SSR 分子检测; 耐旱; 综合指标

## Molecular Detection of Rice Variant Lines Treated by Embryo-soaking of *Alternanthera philoxeroides* DNA Solution and Their Drought Resistance Evaluation

ZHAO Fang-ming<sup>1</sup>, LUO Yuan-zhang<sup>1</sup>, YANG Zheng-lin<sup>1</sup>, LING Ying-hua<sup>1</sup>,

SANG Xian-chun<sup>1</sup>, YANG Qian-jin<sup>2</sup>, HE Guang-hua<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Breeding of Southwestern China/Rice Research Institute,  
Southwest University, Ministry of Agriculture, Chongqing 400715;

<sup>2</sup>Organic Foods Institute of Anhui Agriculture Science Faculty, Hefei 230031)

**Abstract:** Molecular detection was performed by SSR technique for 10 rice variant lines treated by embryo-soaking of *Alternanthera philoxeroides* DNA solution. The results showed that partial DNA segments of *Alternanthera philoxeroides* have been transferred into 10 rice variant lines. Based on the molecular evidence, Drought resistance evaluation were further studied using 8 rice variant lines and 2 control varieties in the study, designed by split-plot and analyzed by many statistic methods such as principal component analysis and regression analysis step by step. The results showed that combination the comprehensive evaluation index with drought resistance index could improve the reliability of evaluation for drought tolerance in rice. Cluster analysis based on the two indexes indicated that variant line H8 was the most drought-resistant while H6 and H7 were more drought-resistant than IAPAR9. These results will be important for breeding drought-resistant rice varieties and evaluating drought resistance.

**Key words:** Rice; *Alternanthera philoxeroides* DNA; SSR molecular detection; Drought resistance; Composite evaluation index

水稻是我国的重要粮食作物之一, 耗水量相当大。干旱是我国粮食生产的重要灾害之一, 尤其我

收稿日期: 2011-04-02 修回日期: 2011-12-06

基金项目: 重庆市科技攻关计划项目( CSTC2007AC1051, CSTC2010AA1033)

作者简介: 赵芳明, 博士, 副研究员, 研究方向: 水稻遗传育种。E-mail: Zhaofangming2004@163.com

通讯作者: 何光华, 教授, 博士生导师, 研究方向: 水稻遗传育种与生物技术。E-mail: hegh@swu.edu.cn

国西南稻区常发生严重的季节性干旱,高温伏旱严重,严重影响了水稻等主要粮食作物的高产稳产<sup>[1-3]</sup>。针对气候变暖、淡水资源贫乏的现状,开展耐旱水稻种质创新,发掘抗旱基因资源,加快旱稻品种的遗传改良,发展旱稻生产,对于缓解水资源短缺、充分利用土地资源、改善日益恶化的生态环境和保障全球粮食安全具有特殊的意义。随着育种研究的发展,物种内有利基因已得到较好挖掘和利用,而从作物的野生近源种或远缘物种中引进有利基因显得越来越重要。由于远缘亲本间的染色体结构从整体上说是不亲和的,但从进化的角度来讲,部分基因间的结构可能保持一定的亲和性,因此可通过将远缘植物的外源总 DNA 导入到受体细胞,使子代出现变异,开创种质创新的分子育种的新途径<sup>[4]</sup>。利用外源 DNA 直接导入技术是以植物为受体,带有目的性状的外源遗传物质(总 DNA)或目的基因为供体,进行直接导入,既不同于载体转化的基因工程技术,也有别于通过有性杂交实现植物间基因交流的传统育种方式<sup>[5]</sup>。浸胚法是外源 DNA 导入技术中的一种无需特殊设备、可行、简便、易操作的有效方法,以供体的 DNA 溶液浸泡受体干种子的胚或萌动的种子,将外源 DNA 导入受体细胞,达到改良受体的目的。空心莲子草(*Alternanthera philoxeroides*)是极耐旱的恶性杂草,本研究采用浸胚法用空心莲子草 DNA 溶液浸胚处理水稻 6527,经过多代旱地定向选育,育成了性状稳定遗传的 10 个水稻变异系,现已达到 F<sub>23</sub>。对这些以空心莲子草 DNA 溶液浸胚处理的水稻变异系的分子鉴定及耐旱性评价对于耐旱品种培育具有重要的现实意义。

关于耐旱性的评价是一个较复杂的问题,多年来,不同学者从生理生化、形态学、遗传学等方面开展了大量研究,并取得了一些进展,提出了有关耐旱性鉴定的方法和指标<sup>[6-12]</sup>。由于所用材料的不同,评价耐旱的指标尚没有统一的标准。对育种家而言,主要是选育耐旱、高产、稳产的水稻品种,因而鉴定指标应与干旱胁迫下最终形成产量有最直接和密切的关系,鉴定方法简便易行,可操作性强<sup>[12]</sup>。本研究对 8 个证实整合了空心莲子草 DNA 片段的水稻变异系及 2 个对照品种为材料,采用二因素裂区设计,对农艺性状进行主成分分析、隶属函数综合评价分析、逐步回归分析及聚类分析,综合分析了水稻变异系的耐旱性,研究结果对水稻耐旱性品种的选育及耐旱性评价有着重要的参考价值。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试材料

用于分子检测的材料为:以空心莲子草 DNA 溶液浸胚后经多代旱地定向选育育成的农艺性状稳定遗传的 10 个水稻变异系(H1-H10)。用于耐旱评价的材料为其中的 8 个变异系,分别为 H1、H2、H3、H5、H6、H7、H8 和 H9(2008 年 H4 和 H10 苗数不足未参与田间试验)及 2 个对照品种:受体水稻 6527(CK<sub>1</sub>)和巴西陆稻 IAPAR-9(CK<sub>2</sub>)。

### 1.2 分子检测方法

本研究用 SSR 标记分析是否整合了空心莲子草 DNA 片段。供体亲本空心莲子草的 DNA 提取采用 CTAB 法<sup>[13]</sup>,水稻 DNA 提取用碱煮法<sup>[14]</sup>。SSR 引物序列参照 <http://www.gramene.org/microsat/>,由上海生工生物技术公司合成。PCR 反应总体积为 25 μl,包括 2.5 μl 的 10 × PCR buffer,1.3 μl 的 25mmol/L MgCl<sub>2</sub>,1.0 μl 的 2.5mmol/L dNTPs,16.0 μl 的 ddH<sub>2</sub>O,2.0 μl 的 10 μmol/L 引物,2.0 μl 的模板 DNA,0.2 μl 的 Taq 酶。PCR 反应程序为:94℃ 预变性 5min;94℃ 变性 30s,55℃ 退火 30s,72℃ 复性 1min,35 个循环;72℃ 延伸 10min。PCR 产物在 10% 的非变性聚丙烯酰胺凝胶上电泳,快速银染法染色分析扩增产物<sup>[15]</sup>。

### 1.3 试验设计

本试验于 2008 年在西南大学试验基地水泥槽内进行。旱棚内的水泥槽棚顶用硬有机透明材料建造。采用二因素裂区设计,主处理为 A,分 A1(旱处理)和 A2(正常水栽)两个水平,B 因素为 8 个水稻变异系和 2 个对照品种,重复 3 次。每小区栽 5 行,每行栽 8 株。通过分期播种使各变异系和对照品种的开花成熟期一致。按各变异系和对照品种的生育期长短,分 3 期播种,3 月 18 日播受体 6527,3 月 23 日播 H2、H7、H8、H9、巴西陆稻(CK<sub>2</sub>),3 月 30 日播变异系 H1、H3、H5、H6。分别于 4 月 21 日和 5 月 13 日栽秧,水作播于无顶水泥槽,旱作播于有顶水泥槽。单株插,栽插密度为 26.4cm × 16cm(行距 × 株距)。各小区肥力条件一致,水、旱区除灌水处理外其他栽培措施相同,皆为常规管理。旱区苗期正常灌水,拔节后放水,进行耐旱处理。成熟期测定株高,收获时分单株收中间 2 行的 10 株考查单株有效穗、穗长、每穗总粒数、每穗实粒数、结实率和千粒重,最后各小区全部收获进行测产,然后换算为每公顷产量。

## 1.4 数据处理与统计分析

上述指标的平均数值用 DPS3.01 进行方差分析,然后以各性状的干旱反应指数(旱/水相对值)为基数,采用 DPS3.01 统计软件进行主成分分析、逐步回归分析和聚类分析,用 Excel 参照以下公式计算耐旱指数、隶属函数值、综合指标权重值和耐旱性综合评价值。

耐旱指数的计算<sup>[12]</sup>:  $DI = y_a^2 / y_m \times y_{ckm} / y_{cka}^2$ , 其中  $y_a$  为材料旱作子粒产量,  $y_m$  为材料水作子粒产量,  $y_{ckm}$  为对照品种水作子粒产量,  $y_{cka}$  为对照品种旱作子粒产量。

隶属函数( $\mu(x)$ )的计算<sup>[16]</sup>: 每一材料的隶属函数值  $\mu(x_j) = (x_j - x_{\min}) / (x_{\max} - x_{\min})$  ( $j=1, 2, 3, \dots, n$ ); 式中  $x_j$  表示第  $j$  个综合指标,  $x_{\min}$  表示第  $j$  个综合指标的最小值,  $x_{\max}$  表示第  $j$  个综合指标的最大值<sup>[11]</sup>。

综合指标权重( $W_j$ )<sup>[16]</sup>: 据主成分分析所得的综合指标的贡献率大小用以下公式求得各综合指标的权重,  $w_j = \frac{P_j}{\sum_{j=1}^n P_j}$  ( $j=1, 2, 3, \dots, n$ ); 式中  $w_j$  表示第  $j$

个综合指标在所有综合指标中的重要程度,  $P_j$  为各材料第  $j$  个综合指标的贡献率。

耐旱性综合评价值( $D_j$ )的计算<sup>[16]</sup>:  $D_j = \sum_{j=1}^n [\mu(x_j) \cdot w_j]$  ( $j=1, 2, 3, \dots, n$ ); 式中  $D$  值为各材料在干旱条件下用综合指标评价所得的耐旱性综合评价值。

## 2 结果与分析

### 2.1 空心莲子草 DNA 溶液浸胚处理水稻的 10 个稳定变异系的分子检测

从水稻 12 条染色体上选取了 51 对 SSR 标记进

行供体空心莲子草与受体 6527 水稻的多态性筛选,共选出 25 对多态性标记,多态率为 49.02%。以 25 对多态性标记检测了 10 个农艺性状稳定遗传的水稻变异系(H1~H10)结果表明 4 个来自于空心莲子草的 DNA 片段可能整合到了变异系中(图 1)。从图 1 可看出,位于第 1 染色体的标记 RM259 除变异系 H3 和 H4 外,其他 8 个变异系均扩增出完全相同于供体空心莲子草的 DNA 带型(图 1-A),说明除 H3 和 H4 外的其他 8 个变异系均在第 1 染色体可能整合了空心莲子草的部分 DNA 片段。位于第 7 染色体的标记 RM172 变异系 H1、H4、H5、H6、H7 的带型与空心莲子草的特征带完全一致(图 1-B),表明这 5 个变异系可能在第 7 染色体整合了空心莲子草的部分 DNA 片段。位于第 8 染色体的标记 RM281 变异系 H1、H4、H5、H6、H8 与空心莲子草的特征带完全一致(图 1-C),表明这 5 个变异系在第 8 染色体也可能整合了供体的部分 DNA 片段。位于第 8 染色体的标记 RM6542 变异系 H1、H3、H4、H5、H6 也可能整合了供体空心莲子草的部分 DNA 片段(图 1-D)。综合以上结果,变异系 H1、H5 和 H6 在第 1、7、8 染色体上可能整合了空心莲子草的 4 个 DNA 片段; H4 在第 7 和 8 染色体上可能整合了空心莲子草的 3 个 DNA 片段; H7 和 H8 可能在第 1 和第 7 及第 1 和第 8 染色体整合了空心莲子草的 2 个 DNA 片段; H2、H9 和 H10 在第 1 染色体可能整合了空心莲子草的 1 个 DNA 片段; H3 在第 8 染色体整合了空心莲子草的 1 个 DNA 片段。这说明了 10 个变异系均可能整合了至少 1 个供体的 DNA 片段,有些还接受了多个空心莲子草的 DNA 片段,这些片段整合进了受体基因组,并能在变异系世代间稳定遗传。

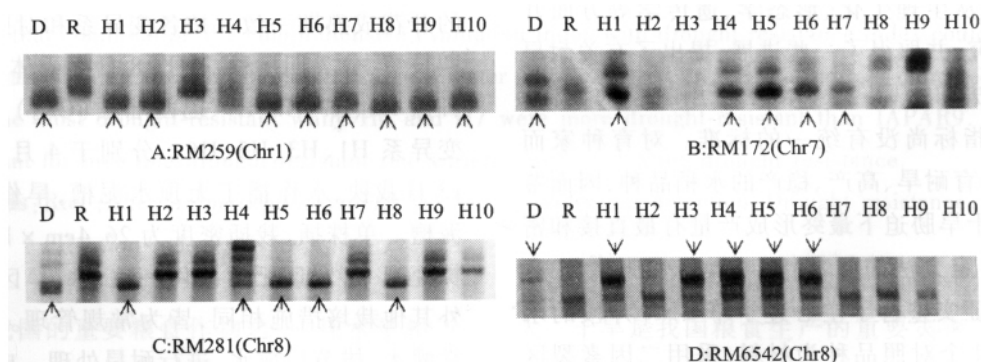


图 1 10 个水稻变异系的 SSR 标记检测

Fig. 1 SSR marker detection of 10 rice variant lines

D: 供体空心莲子草; R: 受体水稻 6527; H1-H10: 水稻变异系; 箭头: 空心莲子草的 DNA 特征带

D: The donor *Alternanthera philoxeroides*; R: The receptor 6527, H1-H10:

The rice variant lines; arrows: the DNA lanes of *Alternanthera philoxeroides*

## 2.2 抽穗期土壤相对含水量

本试验在抽穗开花期,测定了旱棚内各小区 25cm 土层的土壤相对含水量(图 2)。结果表明,各材料在试验田的土壤相对含水量都小于 10%。F 测验显示,所有材料间的土壤含水量均没有显著差异,说明本试验参试材料在较均匀的土壤水分条件下进行。

## 2.3 农艺性状方差分析

从表 1 可看出,除实粒数外,各农艺性状在区组间均无显著差异。材料间的农艺性状均存在显著差异。干旱处理对株高、结实率、有效穗、总粒数、实粒数和产量有显著影响,而对穗长和千粒重无显著影响。

表 1 各农艺性状的方差分析

Table 1 Analysis of variance on various agronomic traits

变异来源	自由度	株高	结实率	穗长	千粒重	有效穗	总粒数	实粒数	产量
Source of variation	df	PH	SSR	PL	GW	PN	SP	FGP	GY
区组间 Blocks	2	6.78	1.86	2.16	1.02	1.43	6.78	48.15*	1.07
A 因素间 A factor	1	110.23**	20.93*	8.03	15.77	44.12**	110.23**	795.43**	71.00*
B 因素间 B factor	9	2.36*	2.45*	43.74**	43.10**	2.33*	2.37*	18.87**	5.6**
A × B	9	1.23	1.08	0.19	0.86	1.05	1.23	0.54	0.54

A 因素为干旱处理; B 因素为材料; PH: 株高; SSR: 结实率; PL: 穗长; GW: 千粒重; PN: 有效穗; SP: 总粒数; FGP: 实粒数; GY: 产量; 下同  
A factor indicated drought treat; B factor indicated material, PH: plant height, SSR: seedsetting rate, PL: panicle length, GW: grain weight, PN: Panicle number, SP: Spikelets per panicle, FGP: Filled grains per panicle, GY: grain yield the same as below

## 2.4 农艺性状干旱反应指数及耐旱指数

耐旱指数是从产量上综合反应材料耐旱特性的指标。各项农艺性状的干旱反应指数使各材料的耐旱性得以量化,增加可比性。表 2 列出了 8 个变异系及对照的各农艺性状干旱反应指数(旱/水)及耐旱指数 DI1 和 DI2。各材料的 DI1 和 DI2 变化趋势一致,反应了对照品种的不同仅影响耐旱指数值的大

表 2 各单项指标的干旱反应指数及耐旱指数

Table 2 The drought resistance index and the drought resistance index of varioussingle index( drought/water )

材料	株高	结实率	穗长	千粒重	有效穗	总粒数	实粒数	产量	DI1	DI2
Materials	PH	SSR	PL	GW	PN	SP	FGP	GY	DI1	DI2
H1	0.84	0.84	0.97	0.93	0.75	0.87	0.73	0.70	1.17	0.79
H2	0.89	0.87	0.97	0.85	0.82	0.92	0.8	0.61	1.29	0.87
H3	0.92	0.79	0.98	0.94	0.78	0.9	0.71	0.60	0.90	0.61
H5	0.93	0.9	0.97	0.99	0.83	0.91	0.82	0.67	1.21	0.81
H6	0.96	0.93	1.00	0.93	0.82	0.92	0.85	0.84	1.86	1.25
H7	0.90	0.92	0.98	0.94	0.85	0.93	0.86	0.69	1.65	1.11
H8	0.95	0.94	0.99	0.96	0.87	0.98	0.92	0.85	2.22	1.49
H9	0.87	0.89	0.96	0.93	0.77	0.88	0.78	0.63	1.35	0.91
6527(受体)	0.85	0.83	0.96	0.90	0.82	0.81	0.67	0.55	1.00	0.67
巴西陆稻 IAPAR9	0.94	0.85	0.99	0.89	0.86	0.85	0.72	0.71	1.48	1.00

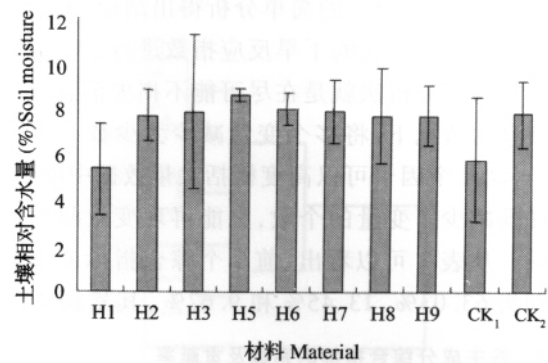


图 2 抽穗开花期各材料田间土壤相对含水量

Fig. 2 The soil moisture of the experimental field for various materials

小不影响耐旱性的排序,因而用 DI1 或 DI2 均可反映各变异系及对照的相对耐旱性。此外,在干旱胁迫下所有农艺性状基本均下降(干旱反应指数小于 1),但各材料下降的幅度存在明显差异,因此,仅根据单一指标的干旱反应指数难以直接判断其耐旱性。

## 2.5 主成分分析

由于各农艺性状提供信息的相互重叠及贡献各

异,难以从各项指标的简单分析得出结论,因而进一步对各项农艺性状的干旱反应指数进行了主成分分析。主成分分析法就是在尽可能不损失信息或少损失信息的情况下,将多个变量减少为少数几个潜在因子,这几个因子可以高度概括大量数据中的信息,这样既减少了变量的个数,又能再现变量间的内在联系。从表3可以看出,前3个综合指标的贡献率分别为63.03%、13.45%和9.67%,其累积贡献率

为86.15%。这样把原来的9个单项指标转换为3个新的相互独立的综合指标,这3个新的综合指标代表了原来9个单项指标的86.15%的信息。其中第一主成分中耐旱指数及实粒数、产量、结实率、总粒数的干旱反应指数较大,可称为产量构成因子;第二主成分中千粒重的干旱反应指数较大,可称为粒重因子;第三主成分为千粒重、株高和穗长的干旱反应指数较大,可称为株型因子。

表3 各主成分综合指标的系数及贡献率

Table 3 Coefficients of comprehensive index in principal component and proportion

综合指标系数 Comprehensive Index	株高 PH	结实率 SSR	穗长 PL	千粒重 GW	有效穗 PN	总粒数 SP	实粒数 FGP	产量 GY	DII	贡献率(%) Contribution
CI(1)	0.33	0.36	0.32	0.16	0.27	0.34	0.38	0.38	0.39	63.03
CI(2)	-0.32	0.25	-0.43	0.58	-0.40	0.26	0.28	-0.03	-0.04	13.45
CI(3)	0.39	-0.37	0.37	0.60	-0.26	-0.04	-0.24	0.16	-0.24	9.67

## 2.6 耐旱性的综合评价

每一变异系及对照品种的前3个主成分的综合指标可由各指标的干旱反应指数及主成分综合指标的系数求出。然后据每一变异系和对照品种的主成

分综合指标计算出隶属函数值 $\mu(x_j)$ ,据综合指标的贡献率大小计算各综合指标的权重 $W_j$ ,最后据隶属函数值和权重计算出各材料的耐旱综合评价值 $D_j$ (表4)。

表4 各材料主成分综合指标、隶属函数值、权重、综合耐旱力指数和预测值

Table 4 The value of comprehensive index in principal component, subordinate function, index weight, comprehensive drought resistance index and prediction value of different materials

材料 materials	CI(1)	CI(2)	CI(3)	$\mu(1)$	$\mu(2)$	$\mu(3)$	$D_j$	VP
H1	-2.15	1.00	0.37	0.17	0.89	0.58	0.33	0.35
H2	-0.85	-0.69	-1.68	0.34	0.45	0.00	0.32	0.32
H3	-1.90	-0.25	1.85	0.21	0.57	1.00	0.35	0.32
H5	0.61	1.28	0.78	0.51	0.97	0.70	0.61	0.60
H6	3.09	-0.63	0.57	0.82	0.47	0.64	0.74	0.71
H7	1.57	0.49	-0.74	0.63	0.76	0.27	0.61	0.60
H8	4.55	0.36	-0.26	1.00	0.73	0.40	0.89	0.91
H9	-1.39	1.41	-0.58	0.27	1.00	0.31	0.39	0.36
受体 6527 Receptor 6527	-3.57	-0.53	-0.62	0.00	0.49	0.30	0.11	0.11
巴西陆稻 IAPAR9	0.04	-2.43	0.31	0.44	0.00	0.56	0.39	0.36
权重 $W_j$				0.73	0.16	0.11		

CI: 综合指标;  $\mu(x_j)$ : 隶属函数值; D: 综合耐旱力指数; VP: 预测值

CI: comprehensive index  $\mu(x_j)$ : subordinate function, D: comprehensive drought resistance index, VP: prediction

综合评价值可反映不同材料间的耐旱性强弱,根据各材料的耐旱综合评价值大小,可对其耐旱性进行分级。从表4看出,变异系H6、H7和H8的D值均大于巴西陆稻,有兴趣的是其DII也大于巴西陆稻(表2)。为了更直观地评价各材料的耐旱性,进一步分别以D值和DII值进行类平均距离的系统聚类(图3)。从图3可看出,以D值为标准可分为3大类,第1类为耐旱类,包括2个亚类分别为H8(最耐旱)及H6、H7和H5(耐旱)。第2类为不耐旱类,为受体6527。第3类为中等耐旱类,为巴

西陆稻、H9及变异系H1、H2、H3。以DII值为标准,可将8个变异系及2个对照品种也分为3类,第1类为耐旱类,为变异系H8;第2类为中等耐旱类,变异系H6、H7和巴西陆稻,第3类为不耐旱类:可分为两个亚类,变异系H1、H5、H2、H9为一类;H3和受体6527为最不耐旱一类,可见在2个聚类分析中,最耐旱品种不受评价方法不同的影响,而中间类,由于评价标准的不同,则易引起偏差。由此可看出,以综合评价指标与耐旱指数相结合的复合评价体系,可增强水稻耐旱评价的可靠性。

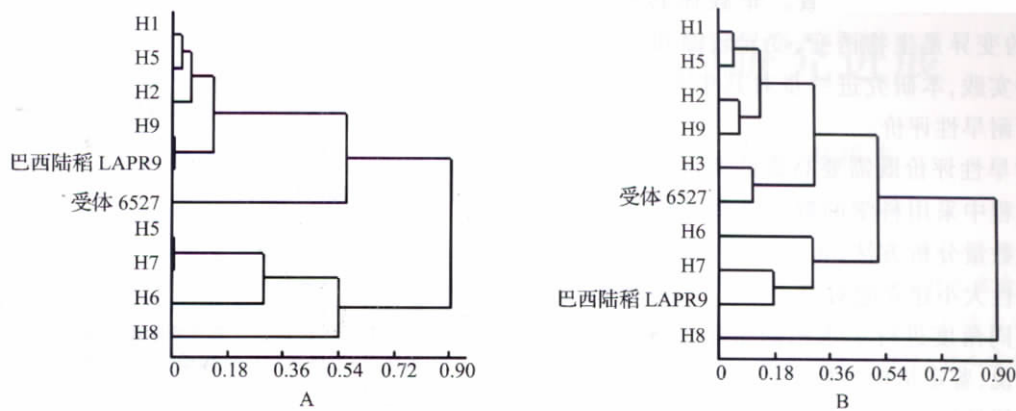


图 3 水稻变异系及对照品种的聚类图

Fig. 3 Dendrogram by cluster analysis for rice introgression lines and control varieties

A: 以 D 为标准的类平均法聚类; B: 以 DII 为标准的类平均法聚类

A: cluster analysis by D value, B: cluster analysis by DII value



图 4 2008 年较耐旱水稻变异系及对照品种田间图片

Fig. 4 Field picture of drought resistance variety lines and control varieties in 2008

### 2.7 耐旱农艺性状筛选

由于耐旱性综合评价值(D 值)能在一定程度上较好地反映材料的耐旱性。本研究进一步以 D 值作为因变量,其他各单项指标的干旱反映指数作自变量,通过逐步回归分析建立最优回归方程,获得方程如下:

$$D = -4.42 + 0.74X_2 + 1.51X_4 + 0.79X_5 + 1.72X_6 + 0.95X_8$$

式中  $X_2$ 、 $X_4$ 、 $X_5$ 、 $X_6$ 、 $X_8$  分别代表结实率、千粒重、有效穗、总粒数及产量干旱反应指数,方程决定系数  $R^2 = 0.996$ 。由方程可知,在 8 个单项指标中,上述 5 个指标对水稻耐旱性有显著影响,而且在主成分分析中也是系数最大的因子,二者一致,故在鉴定中可有选择地测定这些指标,使工作简单化。而且综合评价指标与耐旱指数也显著相关( $r = 0.86$ ),10 个材料的耐旱性预测值与耐旱性综合评价值极显著相关( $r = 0.996$ ),说明用此方程对品种的耐旱性进行预测,效果好,准确性高。

### 3 讨论

气候变暖、淡水资源贫乏已成为现实,开展耐旱

水稻种质创新,对于培育耐旱水稻新品种具有重要意义。目前,物种内有利基因已得到较好挖掘和利用,从作物的野生近源种或远缘物种中引进有利基因显得越来越重要。但远缘杂交不亲和和限制了远缘杂交的广泛应用。非载体转移外源 DNA 技术的利用突破了这一难关,它既不同于载体转化的基因工程技术,也有别于通过有性杂交实现植物间基因交流的传统育种方式,具有可行、简便、易操作的特点<sup>[5]</sup>。浸胚法<sup>[5]</sup>和花粉管通道法<sup>[4,17-18]</sup>是该技术最具代表性的方法已被广泛应用并取得成功,已培育出了一些新品种。本研究利用浸胚法以空心莲子草 DNA 溶液浸渍水稻胚,并经过多代旱地定向选育,获得了 10 个农艺性状稳定遗传的变异系,现已达到  $F_{23}$ ,通过 SSR 标记分析表明,10 个变异系均可能整合了至少 1 个空心莲子草 DNA 片段,并能在后代中稳定遗传。有些变异系如 H1、H5 和 H6 在第 1、7 和第 8 染色体整合了空心莲子草的多个 DNA 片段。也出现了同一 DNA 片段转移到不同变异系中的现象,如 RM281 同时整合到了变异系 H1、H4、H5、H6、H8 中。这一研究结果再次印证了利用非载体转移外源总 DNA 技术转移的是外源 DNA 的一些小片

段,与前人<sup>[18]</sup>研究结果一致。非载体转移外源 DNA 引起的变异是生物诱变,变异较温和,可直接应用于育种实践,本研究进一步对其中 8 个水稻变异系进行了耐旱性评价。

作物耐旱性评价既需要高效的评价指标,也需要在分析过程中采用科学的数量分析方法,选用正确的耐旱性数量分析方法,可将试验测得的数量化指标与耐旱性大小建立起对应关系<sup>[19]</sup>。多年来,研究者们从不同角度进行了水稻的耐旱性评价<sup>[6-12]</sup>。对育种家来说,鉴定指标与最终产量形成关系密切,鉴定方法简便易行,可操作性强尤为重要<sup>[12]</sup>。已有一些研究从与产量密切相关的形态指标进行了评价<sup>[12, 20-22]</sup>。胡运高等<sup>[22]</sup>研究表明以株高、播抽期和单穗重构成的综合耐旱指数可作为水稻品种的耐旱性评价指标。张灿军等<sup>[23]</sup>提倡以耐旱指数或水稻耐旱力指数评价旱稻品种的耐旱性。王贺正等<sup>[6]</sup>采用综合评价法对 10 个水稻品种进行了评价,认为综合评价指标可较好地评价品种的耐旱性。鲁雪林等<sup>[12]</sup>研究表明,耐旱指数 > 耐旱系数 > 相对株高 > 综合耐旱力指数 > 相对结实率。鉴于耐旱性评价的复杂性,为了使评价结果更加可靠,本试验以综合评价指标(D)与耐旱指数(DI)相结合的方法对其中 8 个水稻变异系及 2 个对照品种进行了耐旱性评价。结果表明,不同变异系的耐旱性不同,最耐旱变异系如 H8,在两个鉴定体系中结果一致。耐旱的 H6 和 H7,以 D 值聚类优于巴西陆稻,以 DI 聚类,与巴西陆稻为一类。表明不同评价方法对中等耐旱类品种会产生一定的偏差。但总体上综合评价指标 D 值与耐旱指数 DI 基本吻合,其相关性(0.86)达极显著水平。以两个指标进行双重鉴定,互相补充、互相印证,使结果更为可靠。

综上所述,本研究以 SSR 标记证实了以空心莲子草 DNA 溶液浸胚处理获得的 10 个农艺性状稳定遗传的变异系均已整合了至少 1 个空心莲子草 DNA 片段,且能够在后代中稳定遗传。并对其中 8 个水稻变异系的耐旱性进行了综合评价指标和耐旱指数相结合的双重鉴定。结果表明,以综合评价指标与耐旱指数相结合的复合评价体系,可增强水稻耐旱评价的可靠性。变异系 H8 最耐旱, H6 和 H7 耐旱,均优于巴西陆稻。研究结果对于培育耐旱新

品种、提高农业水资源利用率具有重要的意义。

#### 参考文献

- [1] 刘文. 我国农业水资源问题分析[J]. 生态经济, 2007(1): 62-66
- [2] 陈风波, 陈传波, 土军. 中国南方水稻干旱的解决途径探讨—对政府部门、科研机构和农户的调查报告[J]. 水利经济, 2004, 22(1): 49-53
- [3] 陈凤梅, 程建峰, 潘晓云, 等. 籼稻抗旱性状的筛选及其育种应用[J]. 江西农业大学学报, 2000, 22(2): 169-173
- [4] 陈启锋, 陈璋, 林学健, 等. 水稻花粉管通道法导入高粱 DNA 的 SSR 分子验证[J]. 福建农学院学报, 1993, 22(1): 1-11
- [5] 杨前进. 用浸胚法将外源 DNA 导入水稻的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(24): 6452-6454
- [6] 王贺正, 马均, 李旭毅, 等. 水稻开花期抗旱性鉴定指标的筛选[J]. 作物学报, 2005, 31(11): 1485-1489
- [7] 戴高兴, 邓国富, 周萌. 干旱胁迫对水稻生理生化的影响[J]. 广西农业科学, 2006, 37(1): 4-6
- [8] 陈凤梅, 程建峰, 潘晓云, 等. 杂交稻抗旱性状的筛选研究[J]. 杂交水稻, 2001, 16(4): 51-54
- [9] 徐孟亮, 陈良碧. 4 个水稻高产品种与巴西陆稻的耐旱性比较研究[J]. 作物学报, 2003, 29(6): 903-907
- [10] 安永平, 强爱玲, 张媛媛, 等. 渗透胁迫下水稻种子萌发特性及抗旱性鉴定指标研究[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(4): 421-426
- [11] 张小祥, 张忠林, 红云, 等. 水稻披垂叶突变体及其杂交后代的耐旱性与保护酶活性分析[J]. 植物遗传资源学报, 2006, 7(2): 197-203
- [12] 鲁雪林, 王秀萍, 张国新. 旱稻抗旱性评价指标研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(1): 124-126
- [13] Rogers S O, Bendich A J. Extraction of DNA from plant tissues [J]. Plant Mol Biol Manual, 1988, 6: 1-10
- [14] 桑贤春, 何光华, 张毅, 等. 水稻 PCR 扩增模板的快速制备[J]. 遗传, 2003, 25(6): 705-707
- [15] Panaud O, Chen X, McCouch S R. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLPs) in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 252: 597-607
- [16] 周广生, 梅方竹, 周竹青, 等. 小麦不同品种耐湿性生理指标综合评价及其预测[J]. 中国农业科学, 2003, 36(11): 1378-1382
- [17] 王丰, 柳武革, 李金华, 等. 水稻外源 DNA 变异系的创建及主要性状分析[J]. 分子植物育种, 2004, 2(4): 489-494
- [18] 罗洪发, 钟秉强, 杨正林, 等. 水稻花粉管通道法导入高粱 DNA 的 SSR 分子验证[J]. 分子植物育种, 2004, 2(4): 501-505
- [19] 翟伟, 胡小荣, 周红立, 等. 旱稻的抗旱性及遗传改良研究现状[J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(4): 394-398
- [20] 罗群昌, 陈传华, 陈远孟, 等. 耐旱水稻新品种筛选试验[J]. 广西农业科学, 2009, 40(1): 15-18
- [21] 郑成木, 黄东益, 莫饶. “热大”序列旱稻新品系农艺特征与抗旱特性的研究[J]. 热带作物学报, 2000, 21(4): 52-58
- [22] 胡运高, 王志, 黄廷友. 水稻品种耐旱性鉴定的形态学评价指标研究[J]. 西南科技大学学报, 2006, 21(1): 102-108
- [23] 张灿军, 姚宇卿, 王育红, 等. 旱稻抗旱性鉴定方法与指标研究 I 鉴定方法与评价指标[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(3): 33-36