

旱稻(*Oryza sativa* L.)转 *Ac* 基因后代的筛选与农艺性状变异分析

郝建琴¹ 方标¹ 黄敏¹ 王腊梅¹ 钟辰¹ 许语辉¹ 赵鹏珂² 王向东³ 王化琪^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院,北京 100193;

2. 浙江省绍兴市农业科学研究院,浙江 绍兴 312003;

3. 唐山市农业科学研究院,河北 唐山 063001)

摘要 本研究采用抗生素筛选种子的方法对 126 份旱稻 297 的 *Ac* 转基因材料 T₂ 代种子做抗性筛选,经 T₃、T₄、T₅ 逐代筛选得到 64 份纯合材料和 23 份非纯合材料,共 87 个转化事件(94 个株系)。分析了后代株系与产量相关的 11 个农艺性状变异特点,通过方差分析、相关性分析、主成份分析以及系统聚类分析,结果表明:1)转 *Ac* 基因株系间多数农艺性状围绕对照旱稻 297 均值发生了较大幅度的变异;2)各性状间存在复杂的相关性,尤其株高越高主茎穗总粒数相对较多,主茎结实率较大,千粒重相对较大,是可用作提高产量潜力的有利相关变异;3)11 个农艺性状的大部分信息可以由前 6 个主成份解释,主成份 1 和主成份 2 累积贡献率近 50%,显示转基因优良株系应选株高较高、主茎穗总粒数较多、主茎穗结实率较高、粒长宽比较大、而且单株有效穗数较少、粒宽和粒厚较小的变异类型;4)聚类分析表明,全部转 *Ac* 株系所有农艺性状的变异为 6 大类型,其中第四、第一两类型的变异更有利于提高产量潜力,并从中选出 2 个综合性状变异表现突出优良的转 *Ac* 株系。这一结果可为转基因水旱稻育种研究的种质创新理论与实践提供借鉴。

关键词 旱稻;*Ac* 转基因;后代筛选;农艺性状;变异

中图分类号 S 511.6

文章编号 1007-4333(2014)06-0001-09

文献标志码 A

Progeny screening and variation of agronomic traits in *Ac* transgenic lines of upland rice(*Oryza sativa* L.)

HAO Jian-qin¹, FANG Biao¹, HUANG Min¹, WANG La-mei¹, ZHONG Chen¹,
XU Yu-hui¹, ZHAO Peng-ke², WANG Xiang-dong³, WANG Hua-qi^{1*}

(1. College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Shaoxing Academy of Agricultural Science, Shaoxing 312003, China;

3. Tangshan Academy of Agricultural Science, Tangshan 063001, China)

Abstract Progeny screening and character mutation research are important circle and terminal purpose for transgenic technology. Mutant library with drought resistance could be obtained by transformation of *Ac/Ds* to upland rice HD297. Seeds were treated with antibiotic G418 for 126 *Ac* HD297 transgenic lines from T₂ to T₅ generationally and finally 64 homozygous lines and 23 heterozygous lines were obtained, totally 87 transgenic cases with 94 different lines. Variation characters of 11 agronomic traits related to rice yield were analyzed by ANOVA, correlation analysis, PCA and hierarchical cluster analysis. Results were as follows: 1) Compared to wild type HD297, most agronomic traits of *Ac* lines had a wide variation. 2) There were complex correlation among different traits especially synergistic effect between plant height, spikelets, seed set and 1 000-grain weight which was favorable covariation for rice yield improvement. 3) 6 principle components revealed most information of 11 traits, and PC1 and PC2 covered 50% of the accumulative contribution rate. The data showed excellent lines should be selected from higher plants with more

收稿日期: 2014-03-17

基金项目: 国家重大转基因专项(21152314)

第一作者: 郝建琴, 博士研究生, E-mail: haojianqin1985@163.com

通讯作者: 王化琪, 教授, 主要从事旱稻遗传育种的研究, E-mail: wanghuaqi@cau.edu.cn

spikelets, larger seed set, larger seed length width ratio but fewer tillers, smaller seed width and seed thickness. 4) Ac lines were divided into six types based on cluster analysis, Type 4 and Type 1 had better yield potential from which two particularly outstanding lines were selected. Above all, this study can provide theoretical and practical references of germplasm innovation for transgenic rice breeding.

Key words upland rice; Ac transgenic lines; progeny screening; agronomic traits; variation

水稻(*Oryza sativa* L.)是世界上重要的粮食作物之一^[1],是耗水量最大的作物,在目前世界淡水资源普遍缺乏的情况下,减少农业用水,特别是减少水稻用水早已成为农业专家的共识,因此研究水稻的抗旱性具有重要意义^[2]。旱稻^[3]是稻作的一种特殊生态类型,其生长不需要水层覆盖,在一些干旱地区仅靠雨水或者少量灌溉就能得到产量,它具有特殊的抗旱机制,所以比水稻更容易克隆到抗旱基因。栽培稻抗旱性属于复杂数量性状,用传统图位克隆的方法难以定位基因,而采用 T-DNA^[4]或者 Ac/Ds 系统^[5]容易克隆基因,因为一旦得到抗旱或者敏旱的突变体,利用载体上的特定序列即可克隆到控制性状的基因。本实验室首次以具有抗旱背景的旱稻 297 为材料,将 Ac/Ds 转座子系统导入其中,以期构建转座子插入突变体库,筛选比对照更抗旱或敏旱的突变体,进而克隆基因。这对深入研究栽培稻抗旱机理、挖掘抗旱相关基因并应用于抗旱育种具有重要意义。本研究主要对 Ac 转基因后代的筛选与农艺性状变异进行分析。

在转基因后代阳性筛选中,随着群体的扩大,对所有单株进行分子检测工作量大,利用与转基因抗性标记相对应的抗生素筛选阳性转基因水稻得到广泛的研究和应用。李阳等^[6]发明了一种基于抗生素筛选转基因水稻种子的方法:先确定所用抗生素(卡那霉素和潮霉素)处理非转基因水稻种子的临界浓度,之后在临界浓度下处理转基因水稻种子确定筛选效果为 100%。另外他们还发明了判定转基因材料是否纯合的方法:用非转基因材料加抗生素和不加抗生素做对照,对转基因材料做加抗生素和不加抗生素的处理,比较各种处理的发芽情况来确定基因型。王紫萱等^[7]分别利用不同浓度的 G418 处理中花 9 号叶片、种子、幼胚和幼苗,对不同组织分别找到合适的 G418 临界浓度来处理转基因材料,结果不同组织的阳性筛选效率都很高。

转基因作物后代会产生目标性状以外的各种变异^[8-9],目前对转基因株系非目标农艺性状进行系统研究的报道较少^[10-11],对转 Ac 株系农艺性状相关

研究还尚未涉及。以主成分分析为基础的聚类分析是依据遗传距离来研究分类问题的一种多元统计分析方法^[12],已经越来越多地被应用于育种工作中^[13-14]。本研究首次采用多元统计的方法分析 Ac 转基因株系间的遗传变异,旨在对转基因水稻育种提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

126 份旱稻 297 转 Ac^[15]基因 T₂ 代株系(T₁ 代所结种子);非转基因亲本旱稻 297 为对照。部分株系的 PCR 和 Southern 点杂交已证明 Ac 整合到了旱稻 297 核基因组中^[16]。

1.2 方法

1.2.1 转 Ac 株系的筛选与纯合

由于 Ac 基因载体上含有抗 G418 的新霉素磷酸转移酶基因,因此选择抗生素 G418 筛选。从 T₂ 代种子开始,每代采用相同的抗生素筛选种子的方法^[6]选择阳性植株,直到 Ac 转基因材料达到阳性纯合。具体操作如下:

1)首先确定 G418 筛选的最佳临界浓度,次氯酸钠消毒过的旱稻 297 种子用清水萌发破肚后,分装在含有 0、100、200、300 和 400 mg/L 的 G418 溶液中,5 d 后观察种子的发芽情况。

2)消毒过的转基因种子用清水萌发破肚后,用最佳浓度的 G418 处理 3~6 d,统计发芽率,与用清水未加抗生素的处理(对照)做比较,鉴定转基因材料是否纯合,把抗 G418 正常发芽(芽长大于 5 mm)的种子转移到 PCR 板(底部剪掉,置于培养盘内)中继续培养,定时添加营养液,等苗长大一些,部分材料选择 3~4 个芽长和根长测量值低的小苗提取 DNA,做 PCR 扩增,方法和引物见文献^[16]。

3)T₂ 代每份材料选 1~3 个株系,每个株系选 30~50 粒种子,用上述方法进行抗性筛选,20 d 后,把抗性苗全部插秧至水田,定期管理和观察性状,对性状相同并且抗性纯合的株系混收,对抗性分离的

株系单株收种, T₃、T₄、T₅代采用同样的方法, 直到筛选到纯合的转基因材料。

1.2.2 T₃~T₅代转Ac株系种植与性状调查

T₃~T₅代转Ac株系于2012年5月17日育秧, 6月22日移栽, 行长为1.25 m, 行距为0.3 m, 单本栽插, 株距为0.1 m, 每株系10行约100~160株, 株系间随机区组排列。田间管理同国家水稻区域试验。

记录各株系的抽穗期, 完全成熟后, 选择株高、单株有效穗数、主茎穗长、主茎穗总粒数、主茎穗结实率(饱粒数/总粒数×100%)、千粒重、粒长、粒宽、粒厚和粒长宽比这10个农艺性状进行测量考查, 每份材料前5个性状随机测量10株, 千粒重测量2~3个重复, 随机挑选10粒种子用游标卡尺测量粒长、粒宽和粒厚。

1.2.3 试验数据的统计分析

用EXCEL软件进行统计分析, 用SAS9.1.3软件进行方差、相关性、主成份和聚类分析, 其中, 方

差分析采用GLM广义线性模型, 聚类分析采用欧式距离WARD离差平方和系谱聚类法。

2 结果

2.1 转Ac株系的早代筛选

2.1.1 抗生素G418种子发芽筛选的最佳临界浓度和适宜时间

用不同浓度的G418处理亲本早稻297种子, 从表1可以看出, 随着G418浓度的升高, 芽和根的生长明显受到抑制, 尤其是根, G418浓度升至200 mg/L时, 非转基因种子近乎失去抗性, 发芽率急剧降低, 且出现白化苗, 根停止生长, 此时对照的根长已长达5 cm, 且芽长与根长相近。从第6天开始, 将抗生素溶液倒尽, 换成清水培养2 d, 对照种子根和芽都继续生长, 而抗生素该浓度及其以上处理则无变化。因此确定, 可用浓度为200 mg/L G418水溶液通过对转基因种子的发芽鉴定来筛选早稻297转Ac阳性株系或个体。

表1 不同G418浓度对早稻297种子发芽的影响

Table 1 Seed germination of HD297 treated with different concentration of G418

G418 质量浓度/(mg/L) Concentration	种子数 Seeds	发芽数 Germinated	白化苗数 Albinos	绿芽率/% Green shoots rate	芽长/cm Shoot length	根长/cm Root length
0	20	20	0	100	5.0	5.0
100	20	19	0	95	2.0~3.0	0~0.5
200	20	3	1	10	0~0.5	0
300	20	0	0	0	0	0
400	20	0	0	0	0	0

对G418处理3~6 d的转基因材料的芽长和根长进行测量, 同时测量对照(清水处理)的芽长和根长, 并做t检验, 如表2, 抗生素处理3~6 d的芽长和根长都和对照差异极显著, 尤其是根长, 随着处理天数的增加, 和对照的差值呈增大趋势。由于抗生

素处理3 d已经有明显的表型, 所以在大量试验时只处理3 d, 就把发芽的种子立即转移到不含抗生素的溶液中, 既可以高效筛选到阳性种子, 又可以减少抗生素对种子的抑制作用。

表2 G418处理对转基因材料芽长和根长的影响

Table 2 Shoot and root length of transgenic seeds treated with G418

处理时间/d Days	芽长/cm Shoot length			根长/cm Root length		
	处理 Treatment	对照 Control	处理-对照 Treatment-control	处理 Treatment	对照 Control	处理-对照 Treatment-control
3	8.89±2.48	13.04±5.54	-4.15**	0.69±0.87	1.79±2.28	-1.10**
4	12.10±1.70	19.58±3.47	-7.48**	0.41±0.50	15.85±7.73	-15.44**
5	11.60±2.19	15.31±5.33	-3.71**	0.23±0.42	12.46±7.13	-12.23**
6	20.11±4.97	23.85±8.27	-3.74**	0.64±0.68	22.85±12.02	-22.21**

注: **代表差异极显著(P<0.01)。

Note: ** indicates significant difference at 0.01 level.

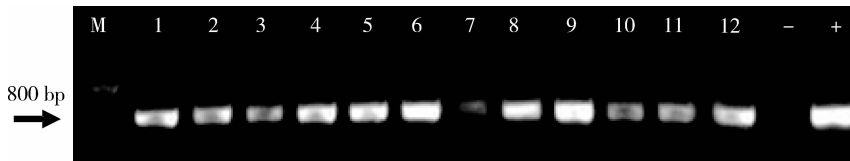
2.1.2 G418 种子发芽筛选效率

用上述方法从 $T_2 \sim T_3$ 两轮 G418 抗性鉴定筛选获得的 T_4 代进行的筛选效率检验试验结果见表 3。表 3 为部分 T_4 代 Ac 株系 G418(200 mg/L) 与对照(清水)处理的种子发芽率。和对照相比, G418 处理

的大多株系发芽率达 85% 以上的正常水平, 半数为或接近 100% 即已基本阳性纯合。对其每个株系随机挑选 3~4 个抗生素处理过发芽的单株提取 DNA, 做 PCR, 分子验证结果全部呈阳性(图 1), 说明用抗生素 G418 筛选种子的方法是十分有效的。

表 3 部分 T_4 代 Ac 株系 G418 处理的种子发芽率
Table 3 Seed germination rate of T_4 Ac lines treated with G418

株系编号 Line No.	G418 处理 G418			对照(清水处理) Control(Water)		
	发芽数 Germinated	未发芽数 Not germinated	发芽率/% Germination rate	发芽数 Germinated	未发芽数 Not germinated	发芽率/% Germination rate
14	35	5	87.5	24	1	96.0
47	29	0	100.0	33	0	100.0
129	25	4	86.2	32	0	100.0
163	32	0	100.0	23	1	95.8
13	33	0	100.0	33	1	97.1
42	31	8	79.5	22	1	95.7
26	32	3	91.4	28	0	100.0
31	38	1	97.4	23	0	100.0
33	39	1	97.5	15	0	100.0
44	31	9	77.5	24	0	100.0
早稻 297	0	35	0.0	25	0	100.0



M: Marker III; -: 早稻 297; +: 质粒阳性对照; 1~12: 各检测单株
M: Marker III; -: HD297; +: Positive control; 1-12: Tested lines

图 1 部分检测单株的 PCR 结果

Fig. 1 PCR results of transgenic plants

2.1.3 转 Ac 株系 $T_3 \sim T_5$ 代的建立

对 126 份转 Ac 材料(按照材料编号分为非 A 系列和 A 系列)从 T_2 代种子开始每代采用相同的抗生素种子发芽筛选方法进行阳性纯合株系筛选。对于全部抗 G418 的株系, 说明 Ac 基因已经达到纯合, 下一代不再进行种子筛选。对于仍有抗感分离的 T_2 或 T_3 、 T_4 代材料需要继续筛选, 直至得到纯合的株系。共得到 64 份纯合株系, 23 份未纯合株系, 总计 87 份 $T_3 \sim T_5$ 代转 Ac 株系(部分材料被淘汰或丢失), 其中纯合株系数占 73.6%, 各世代 Ac 转基因材料的纯合情况见表 4。

2.2 Ac 材料的农艺性状变异性分析

对上述 87 个转化事件的转 Ac 株系的农艺性

状观测结果是, 大部分株系性状的遗传达到稳定纯合, 少部分株系仍有生育期、株高、穗型、粒型、育性等性状的分离。对 94 份 Ac 株系(85 个 Ac 转化事件)和野生型早稻 297 的株高、单株有效穗数、主茎穗长、主茎穗总粒数、主茎穗结实率、千粒重、粒长、粒宽、粒厚和粒长宽比这 10 个农艺性状观测值变异性分析表明(表 5): 发现前 5 个性状变异范围都较大, 变异系数由大到小顺序是: 单株有效穗数 > 主茎穗结实率 > 主茎穗总粒数 > 株高 > 主茎穗长。其他有关粒型和粒重的性状变异系数较小。株系各性状均值与早稻 297 相比, 主茎穗总粒数增加 9.2 个, 株高降低 3.3 cm, 千粒重减少 0.72 g, 其他性状有增加或减少, 但差异不明显。

表 4 各世代 *Ac* 转基因材料的纯合情况

Table 4 List of homozygous lines for different generations

年份 Year	非 A 系列 Not A lines					A 系列 A lines				
	种子 代数 Gene- ration	纯合 株系数 Homo- zygous	株系 编号 Line No.	未纯合 株系数 Not homozygous	株系 编号 Line No.	种子 代数 Gene- ration	纯合 株系数 Homo- zygous	株系 编号 Line No.	未纯合 株系数 Not homozygous	株系 编号 Line No.
2009	T2	2	55,163							
2010	T3	10	1,2,14,24, 26,27,31, 32,52,57							
2011	T4	15	13,20,25, 33,37,39, 45,46,47, 54,56,59, 63,81,129			T2	0			
2012	T5	16	19,22,29, 35,38,40, 42,44,51, 58,62,68, 72,73,75, 101	7	3,21,34, 43,48,76, 117	T3	21	A1,A3,A5, A8,A9,A15, A19,A24, A25,A26, A42,A46, A49,A70, A72,A79, A86,A92, A100,A107, A109	16	A7,A22, A27,A37, A50,A61, A77,A84, A94,A105, A112,A114, A118,A119, A126,AP

方差分析结果表明(表 5),各性状株系间差异都达到极显著水平,显著大于对照的株系比例在 1.1%(主茎穗长)~12.8%(主茎穗总粒数),显著小于对照的株系比例在 0%(粒宽、粒厚)~50.5%(千粒重),其中千粒重显著小于和大于对照的比例分别为 50.5%和 12.1%,说明千粒重性状是双向变异的,大部分株系偏向千粒重减小、同时小部分株系千粒重增大;株高、主茎穗长、主茎穗结实率向减弱的方向变异,特别是株高显著小于对照比例达到 30.9%;少部分材料主茎穗总粒数向减少的方向变异;其他性状相对于对照早稻 297 变异不大。

2.3 *Ac* 株系各农艺性状的遗传相关分析

转基因材料往往不会产生单个性状的突变,其

中一个性状变异会级联到其他性状发生改变。从相关性分析结果可以看出(表 6),株系各农艺性状间存在复杂的相关性,大多数性状之间存在显著正相关,少数性状之间存在显著负相关。值得注意的是,株高与主茎穗长、主茎穗总粒数和主茎穗结实率的相关系数相对较大,分别为 0.60、0.46 和 0.39,均达到极显著水平;单株有效穗数与大部分性状呈现负相关,且与主茎穗结实率极显著负相关,相关系数为-0.36。说明,单株有效穗数的增加会显著降低与产量密切相关农艺性状的表现,同时,株高越高主茎穗总粒数相对较多,主茎结实率较大,千粒重相对较大,使产量构成因子得到正向协同改善,这是一类值得利用的可提高产量的关联变异类型,且可通过选择株高相对较高的株系获得。

表5 Ac材料各性状变异性简单统计和方差分析

Table 5 Simple statistics and anova analysis among agronomic traits of Ac lines

性状 Traits	株系 Lines	均值 ($\bar{x} \pm s$)	变异系 数/% C. V.	最大 值 Max	最小 值 Min	F 值 F value	显著大于 对照比例/% Proportion* ^a	显著小于 对照比例/% Proportion* ^b	旱稻 297 HD297	离差 Disper- sion
株高/mm Plant height	94	88.7±6.9	7.8	107.1	67.1	23.29**	7.4	30.9	92.0	-3.3
单株有效穗数 Panicles	94	4.5±1.0	23.0	8.5	3.2	8.10**	5.3	5.3	5.1	-0.6
主茎穗长/cm Panicle length	94	21.5±1.2	5.4	24.5	17.1	10.42**	1.1	12.8	21.9	-0.4
主茎穗总粒数 Spikelets	94	128.5±15.1	11.7	174.8	92.5	7.81**	12.8	1.1	119.3	9.2
主茎穗结实率/% Seed set	94	77.3±14.0	18.1	96.9	24.5	21.38**	4.3	10.6	76.6	0.7
千粒重/g 1 000-grain weight	91	31.8±1.4	4.4	35.1	28.7	75.67**	12.1	50.5	32.5	-0.7
粒长/mm Grain length	89	8.3±0.2	2.7	8.9	7.7	8.69**	7.9	2.2	8.2	0.1
粒宽/mm Grain width	89	3.8±0.1	3.1	4.2	3.5	2.39**	3.4	0	3.7	0.1
粒厚/mm Grain thickness	89	2.2±0.1	4.6	2.8	1.9	1.72**	2.2	0	2.1	0.1
粒长宽比 Length width ratio	89	2.2±0.1	3.8	2.5	1.9	6.05**	2.2	2.2	2.2	0

注:**表示株系间差异极显著($P < 0.01$)。Proportion * a表示显著大于对照比例($P < 0.05$),Proportion * b表示显著小于对照比例($P < 0.05$)。

Note:** indicates differences at 0.01 level. Proportion * a indicates proportion significantly larger than CK at 0.05 level. Proportion * b indicates proportion significantly smaller than CK at 0.05 level.

表6 Ac株系各农艺性状间的相关系数

Table 6 Coefficients of correlation among agronomic traits of Ac lines

性状	单株有效 穗数 x1	株高 x2	主茎穗长 x3	主茎穗总 粒数 x4	主茎穗 结实率 x5	粒长 x6	粒宽 x7	粒厚 x8	粒长宽比 x9	抽穗期 x10	千粒重 x11
x1	1.00										
x2	-0.18	1.00									
x3	-0.21*	0.60**	1.00								
x4	-0.06	0.46**	0.46**	1.00							
x5	-0.36**	0.39**	0.33**	0.29**	1.00						
x6	0.12	0.13	0.30**	-0.26*	0.13	1.00					
x7	0.24*	0.02	-0.08	0.03	-0.27*	-0.02	1.00				
x8	0.07	0.00	-0.05	0.10	-0.17	-0.10	0.33**	1.00			
x9	-0.07	0.10	0.26*	-0.22*	0.26*	0.71**	-0.68**	-0.38**	1.00		
x10	-0.02	0.12	0.04	0.17	-0.04	-0.31**	0.24*	0.18	-0.38**	1.00	
x11	-0.06	0.18**	0.27**	-0.02	0.19	0.37**	0.43**	0.41**	-0.10	-0.03	1.00

注:x1:单株有效穗数;x2:株高;x3:主茎穗长;x4:主茎穗总粒数;x5:主茎穗结实率;x6:粒长;x7:粒宽;x8:粒厚;x9:粒长宽比;x10:抽穗期;x11:千粒重。*代表相关性达到0.05显著水平($P < 0.05$),**代表相关性达到0.01极显著水平($P < 0.01$)。

Note:x1:Panicles;x2:Plant height;x3:Panicle length;x4:Spikelets;x5:Seed set;x6:Grain length;x7:Grain width;x8:Grain thickness;x9:Length width ratio;x10>Date to heading;x11:1 000-grain weight. * indicates correlation at 0.05 level. ** indicates correlation at 0.01 level.

2.4 Ac株系各农艺性状的主成份分析

对上述株系中所有数据完整的79个转Ac株系(含对照旱稻297)进行的主成份分析表明(表7),包括生育期在内的11个农艺性状中,前6个特征值的累积贡献率达86.41%,说明11个农

艺性状的绝大部分相关信息可由这6个特征值来概括。其中主成份1和主成份2贡献率大致相当,分别为26.01%和20.93%,累积贡献率达46.94%,对主成份1影响较大的因子是粒长宽比和主茎穗结实率,对主成份2影响较大的因子是

主茎穗总粒数和株高,其他 4 个主成份贡献率较小,累积贡献率只占近 50%,故其内部影响因子作用较小,不作为分析重点。那么从前 2 个主成份

可以看出,选择材料时应选择株高较高,主茎穗总粒数较多,主茎穗结实率较高,粒长宽比较大的株系。

表 7 前 6 个主成份对应的特征向量

Table 7 Eigenvector of the former six principal components

分量来源 Resources	第一主成份 PC1	第二主成份 PC2	第三主成份 PC3	第四主成份 PC4	第五主成份 PC5	第六主成份 PC6	特征根及 累积贡献率 Cumulative
	2.861	2.303	1.716	1.072	0.836	0.718	
	26.01%	46.94%	62.54%	72.28%	79.88%	86.41%	
单株有效穗数 Panicles	-0.240	-0.139	0.049	0.739	0.257	0.123	
株高 Plant height	0.336	0.407	-0.004	0.203	-0.100	0.046	
主茎穗长 Panicle length	0.370	0.370	0.086	0.204	-0.091	-0.101	
主茎穗总粒数 Spikelets	0.108	0.453	-0.319	0.320	-0.252	0.004	
主茎穗结实率 Seed set	0.405	0.115	0.048	-0.329	0.155	-0.005	
粒长 Grain length	0.335	-0.224	0.482	0.262	0.117	0.027	特征向量 Eigenvector
粒宽 Grain width	-0.349	0.262	0.400	0.143	0.004	-0.397	
粒厚 Grain thickness	-0.258	0.243	0.244	-0.090	-0.221	0.841	
粒长宽比 Length width ratio	0.464	-0.343	0.087	0.143	0.061	0.272	
抽穗期 Date to heading	-0.033	0.336	-0.161	-0.078	0.871	0.158	
千粒重 1 000-grain weight	-0.013	0.226	0.633	-0.192	0.059	-0.084	

2.5 *Ac* 株系各农艺性状的聚类分析

用上述 6 个主成份为指标,采用 WARD 离差平方和法对 79 个转 *Ac* 株系进行系统聚类分析,可以划为 6 大类型(图 2)。其中 1、3、25 等包含野生型早稻 297 在内的 23 个株系为第一类,2、13、38 等 16 个株系为第二类,第三类包含 22、40、52

等 13 个株系,第四类包含 27、29、33 等 20 个株系,第五类包含 3 个株系是 62、A118、A8,第六类包含 4 个株系是 A107、A15、A15-9、72。可以看出,不含野生型早稻 297 的类型内株系数占总数的 71%,说明,转 *Ac* 的株系在性状上基本都发生了变异。

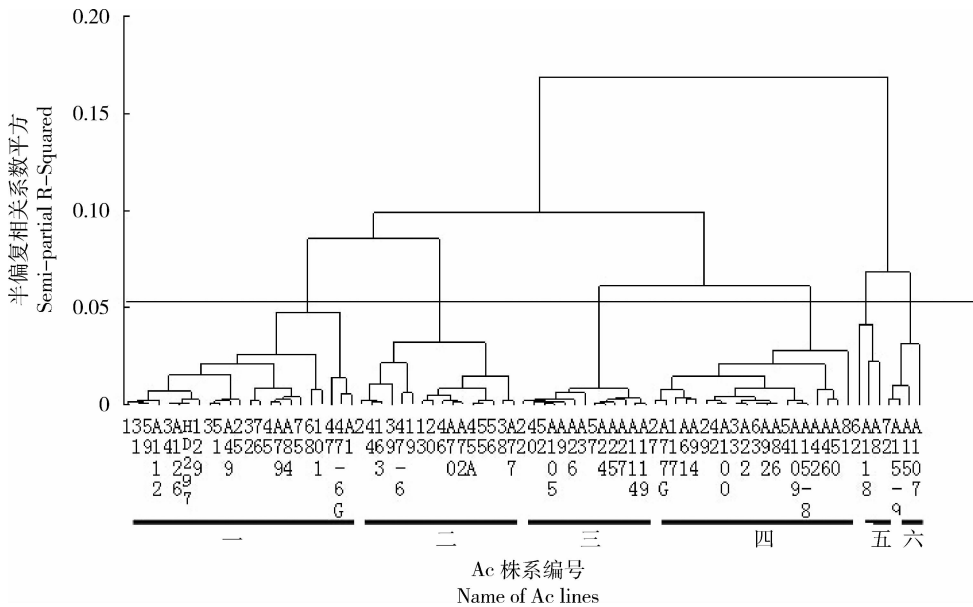


图 2 79 个转 *Ac* 株系的聚类分析图

Fig. 2 Cluster analysis of 79 *Ac* lines

分析各个类型农艺性状可以看出(表8),单株产量潜力第四类最高(15.6 g),比对照增加2.3%,其突出特点是结实率比对照明显增高,而其他性状与对照未发生明显变化,是有利的变异类型,这类株系宜多保留并继续选优。其次是第一类(15.3 g)比

对照略增,主要是在其他性状与对照未发生明显变化的状况下穗粒数明显增多,对其中突出株系宜进一步筛选观察和升级,其余三类或因育性(结实率)、株高、穗数等发生严重下降的变异而导致单株产量潜力明显劣于对照,多数宜淘汰。

表8 6个类型转Ac株系11个农艺性状的平均值
Table 8 Average value of 11 agronomic traits in the 6 types of Ac lines

类群 Type	单株有效穗数 Panicles	株高/ cm Plant height	主茎 穗长/cm Panicle length	主茎穗 总粒数 Spikelets	主茎穗 结实率/ % Seed set	粒长/ mm Grain length	粒宽/ mm Grain width	粒厚/ mm Grain thickness	粒长宽比 Length width ratio	抽穗期/ d Date to heading	千粒重/ g 1 000-grain weight	单株产量 潜力/g Yield
一	4.7	91.7	22.0	136.2	75.4	8.16	3.76	2.21	2.17	85.2	31.7	15.3
二	4.0	83.0	20.5	119.0	75.8	8.14	3.69	2.19	2.21	83.3	31.0	11.3
三	3.9	89.5	21.7	123.0	83.8	8.44	3.79	2.24	2.23	82.8	33.3	13.2
四	4.4	92.9	22.2	132.4	86.0	8.41	3.68	2.19	2.29	83.6	31.3	15.6
五	5.3	84.2	20.9	130.2	52.8	8.12	3.98	2.56	2.07	84.0	32.8	13.8
六	7.6	72.3	18.6	110.9	62.0	8.21	3.77	2.24	2.18	84.3	30.9	13.5
HD297	5.1	92.0	21.9	119.3	76.6	8.20	3.72	2.14	2.20	83.0	32.5	15.2

依据上述分析,筛选出2个发生综合性状优良变异的突出转Ac株系,它们是第四类的A77G(T₃代),单株产量潜力达到19.2 g,单株有效穗4.4个,株高100.8 cm,主茎穗长21.8 cm,主茎穗总粒数136.1,主茎穗结实率96.9%,粒长8.33 mm,粒宽3.71 mm,粒厚2.3 mm,粒长宽比2.25,抽穗期85 d,千粒重32.86 g。另一个是第一类的A1(T₃代),单株产量潜力达到21.1 g,单株有效穗5.6个,株高107.1 cm,主茎穗长21.8 cm,主茎穗总粒数152.7,主茎穗结实率75.1%,粒长8.14 mm,粒宽3.85 mm,粒厚2.34 mm,粒长宽比2.11,抽穗期84 d,千粒重32.78 g。说明从转基因材料后代株系中可以选出综合性状超越亲本的优良变异株系。

3 结论与讨论

转基因作物后代会产生目标性状以外的各种变异,本研究成功采用G418筛选阳性种子的方法,从126份转Ac T₂代种子开始,经T₃、T₄、T₅逐代筛选得到64份纯合材料,占总材料数的73.6%,后代性状分析表明Ac转基因株系在各个农艺性状上存在丰富的变异,农艺性状之间也存在复杂的相关性,株高、结实率和穗粒数等因子对前2个主成份作用

最大,并主要依据它们的信息将后代株系划分为6个类型,第四和第一类型中株系表现较为优秀。

G418筛选阳性转基因水稻材料的研究较多^[7,17],本研究在参考前人研究的基础上选出最佳G418浓度200 mg/L和筛选天数3 d应用在早稻转Ac材料中,此应用体系比前人的筛选天数(5~7 d)短,并且100%阳性,效率更高。

转基因引起的性状变异往往是有害的,在我们研究的94份转Ac株系中,有害变异千粒重降低,株高变矮,主茎穗长变短,主茎穗结实率变低分别达到显著性的株系数较多。但一些有利变异主茎穗总粒数变多,千粒重增大达到显著性的株系数也占一定的比例。通过聚类分析,选出一些综合性状优于早稻297的材料,说明通过早稻转Ac基因,得到丰富变异的同时,也能选出优于亲本表现的株系,日后加大转基因群体,构建早稻突变体库必定能够筛选到更多具有优良性状的材料。

在转基因中,农艺性状变异除了受基因本身的影响,还有可能是由于T-DNA插入或者组织培养过程中逆转座子的激活^[18]插入或体细胞无性系变异引起,本研究中Ac基因的表达(编码使Ds发生转座的酶,本身不会转座)与农艺性状方面相关不

大,各株系的变异原因主要来自后者。另外本研究材料的遗传背景为旱稻 297,单一简单,所以性状上的变异有可能只由 1 个基因或几个基因的突变产生,这样会产生两方面的有利结果,一方面是对优良的变异容易克隆基因(若由转基因 T-DNA 插入引起,可以通过载体结构序列信息采用 Tail-PCR 或者 IPCR 定位插入位点^[19];若由非转基因原因引起,可以采用图位克隆),对于非转基因引起的突变,可以和旱稻 297 进行杂交,在后代中选择具有优良性状但不含有 T-DNA 的材料进而在育种中直接或间接应用。另一方面是相比前人的遗传背景较大的各非转基因材料农艺性状相关性研究,本研究对各农艺性状之间的相关性会有更准确的把握。

目前笔者只研究了在水田即非干旱胁迫环境下的转基因后代的性状变异,上述变异及其呈现的规律与抗旱性及其相关性状的内在关联有待进一步研究与探讨。

致谢 感谢李自超老师、王洁老师和袁文业老师对本论文提出宝贵的修改意见,本论文除共同作者外,张伟漫、刘伟利、徐浩源、闫林楠、王程景、杨阳、杨韦、刘颖等同学在阳性筛选和考种工作中给予很大的帮助,在此一并感谢。

参 考 文 献

[1] 陈浩,林拥军,张启发. 转基因水稻研究的回顾与展望[J]. 科学通报,2009,54(18):2699-2717

[2] Kumar A, Bernier J, Verulkar S, et al. Breeding for drought tolerance: Direct selection for yield, response to selection and use of drought-tolerant donors in upland and lowland-adapted populations[J]. Field Crop Res, 2008, 107(3): 221-231

[3] Bernier J, Atlin G N, Serraj R, et al. Breeding upland rice for drought resistance[J]. J Sci Food Agr, 2008, 88(6): 927-939

[4] Sallaud C, Meynard D, Van Boxtel J, et al. Highly efficient

production and characterization of T-DNA plants for rice (*Oryza sativa* L.) functional genomics[J]. Theor Appl Genet, 2003, 106(8): 1396-1408

[5] Kolesnik T, Szevevényi I, Bachmann D, et al. Establishing an efficient *Ac/Ds* tagging system in rice: Large-scale analysis of *Ds* flanking sequences[J]. Plant J, 2004, 37(2): 301-314

[6] 李阳, 李阳生. 一种基于抗生素筛选转基因水稻种子的方法[R]. CN101241123, 2008-08-13

[7] 王紫萱, 易自力, 王志成, 等. 带 *npt-Ⅱ* 基因转基因水稻快速检测技术的建立[J]. 遗传, 2007, 29(4): 499-507

[8] 孙岩, 张宏纪, 王广金, 等. 转优质 *HMW-GS* 基因春小麦品系品质特性与农艺性状的研究[J]. 核农学报, 2009, 23(6): 923-927

[9] 俞朝, 冯英, 薛庆中. 转基因抗虫水稻后代农艺性状变异的比较研究[J]. 中国农学通报, 2006, 22(10): 75-79

[10] 郭建夫, 黄永相, 彭贤力, 等. 基因枪法转化水稻 E32 后代非目标农艺性状变异的研究[J]. 热带亚热带植物学报, 2007, 15(4): 284-289

[11] 唐祚舜, 李良材, 田文忠. 基因枪法转基因水稻后代农艺性状的表现[J]. 中国农业科学, 2001, 34(6): 581-586

[12] 阮桂海. SAS 统计分析实用大全[M]. 北京: 清华大学出版社, 2003

[13] 李培富, 杨淑琴, 马宏伟. 宁夏水稻主要农艺性状的主成分及聚类分析[J]. 中国农学通报, 2006, 22(12): 162-166

[14] Murphy J P, Cox T S, Rodgers D M. Cluster analysis of red winter wheat cultivars based upon coefficients of parentage[J]. Crop Sci, 1986, 26(4): 672-676

[15] 杜春芳, 李润植, 刘惠民, 等. 转基因植物的表型变异, 分子检测与遗传分析[J]. 生物技术通讯, 2004, 14(5): 422-427

[16] 王振南. *Ac/Ds* 转座子系统导入旱稻的研究[D]. 北京: 中国农业大学, 2008

[17] 许明辉, 唐祚舜, 赵丰萍, 等. 抗生素 G418 胁迫条件下转基因水稻种子发芽特性及应用[J]. 遗传, 2003, 25(1): 45-48

[18] Piffanelli P, Droc G, Mieulet D, et al. Large-scale characterization of *Tos17* insertion sites in a rice T-DNA mutant library[J]. Plant Mol Biol, 2007, 65(5): 587-601

[19] An S, Park S, Jeong D H, et al. Generation and analysis of end sequence database for T-DNA tagging lines in rice[J]. Plant physiol, 2003, 133(4): 2040-2047

责任编辑: 袁文业