(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109828005 A
(43)申请公布日 2019.05.31

(21)申请号 201910132714.0

(22)申请日 2019.02.22

(66)本国优先权数据
201910016046.5 2019.01.08 CN

(71)申请人 中国科学院南京土壤研究所
地址 210008 江苏省南京市玄武区北京东路71号

(72)发明人 陆海龙 徐仁扣

(74)专利代理机构 南京经纬专利商标代理有限公司 32200
代理人 唐循文

(51)Int.Cl.
G01N 27/26(2006.01)

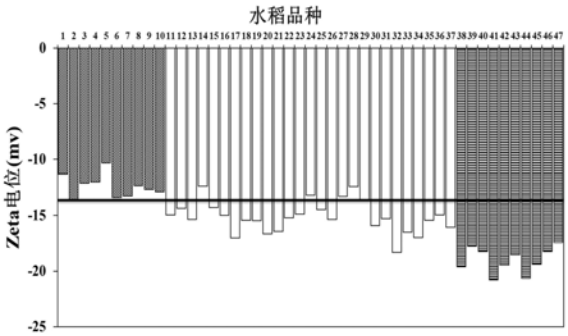
权利要求书1页 说明书4页 附图3页

(54)发明名称

一种鉴别水稻品种耐铝毒性能的方法

(57)摘要

一种鉴别水稻品种耐铝毒性能的方法。所述水稻根系电荷特征是通过流动电位装置测定水稻根系的zeta电位来表征。所述水稻耐铝毒特性根据不同基因型水稻在含铝和不含铝的营养液中生长后根系长度的差异大小来判别，并根据不同品种水稻根系对铝吸附的差异进行进一步确认。建立水稻根系zeta电位与水稻耐铝毒特性之间的线性关系，确定耐铝毒水稻品种的zeta电位范围，作为选择耐铝毒水稻品种的指标。



CN 109828005 A

1.通过检测水稻根系的zeta电位在鉴别水稻品种耐铝毒性能中的应用。

2.通过检测水稻根系的zeta电位在比较水稻品种耐铝毒性能中的应用。

3.根据权利要求1所述的应用，其特征在于所述根系的zeta电位的测定步骤为：将水稻根系用去离子水冲洗并浸泡，然后自然风干；取水稻风干根系放于样品池中，用流动电位方法测定流动电位、液压差和电导率，根据所获参数通过公式$\zeta=\frac{\Delta E}{\Delta P}\frac{\mu}{\varepsilon\varepsilon_0}\kappa$，计算水稻根系的zeta电位，其中ζ是zeta电位(mV)；ΔE是流动电位(mV)；ΔP是液体压力差(Pa)；μ是溶液的粘滞系数(Pa·S)；ε是电解质溶液的介电常数(F/m)；ε_0是真空介质的介电常数(F/m)；κ是溶液电导(S/m)。

4.根据权利要求1所述的应用，其特征在于耐铝毒籼稻根系在pH7.6的0.65mmol/L的NaCl溶液中zeta电位范围为-10.3～-13.7mV。

5.根据权利要求1所述的应用，其特征在于水稻根系用去离子水冲洗3次并浸泡6小时。

6.根据权利要求1所述的应用，其特征在于水稻风干根系的长度为2cm。

7.根据权利要求2所述的应用，其特征在于步骤为：将3天大的水稻幼苗分别在含铝和不含铝的0.5mmol/L的$CaCl_2$溶液中生长48小时，测量并获取相对根伸长率，建立根系的zeta电位与水稻根系相对伸长率之间的线性相关关系；其中根系的相对根伸长率大、对铝吸附量小的水稻品种为耐铝毒水稻品种。

一种鉴别水稻品种耐铝毒性能的方法

技术领域

[0001] 本发明属于农业科学中耐铝毒作物品种筛选技术领域，涉及流动电位法测定水稻根系zeta电位、根伸长实验和铝吸附实验确定水稻耐铝毒能力、水稻根系zeta电位与相对根伸长率之间的线性相关分析等技术方法。

背景技术

[0002] 水稻是世界上重要的粮食作物之一，稻米是我国人民的主要口粮，其在我国南方酸性土壤地区、长江中下游地区和东北地区均有大面积种植，水稻的高产和稳产对保障我国的粮食安全具有极其重要实际意义。铝是地壳中最丰富的金属元素，通常条件下土壤铝主要存在于土壤固相部分，活性很低。但在酸性土壤中，铝会活化，并进入土壤溶液中，特别当土壤pH小于5时，土壤溶液中毒性强的Al^{3+}会显著增加，并对植物产生毒害作用，抑制植物生长，导致作物减产，并使农产品品质下降。铝离子主要通过抑制根系的生长和功能，从而抑制作物地上部分的生长，最终导致作物减产。水稻是我国南方酸性土壤地区的主要粮食作物，酸性土壤中水稻生长易受铝毒危害。因此，在酸性土壤地区筛选和种植耐铝毒的水稻品种，可以保障水稻的高产和稳产。

[0003] 目前，耐铝毒水稻品种的筛选主要通过田间试验，在酸性土壤铝胁迫的田间条件下比较不同品种水稻的生长情况和产量，确定耐铝毒的水稻品种。这种方法比较费时和费力，特别是从大批量的水稻品种中筛选少数耐铝品种，其难度很大。如能研发简便、快速的耐铝毒水稻品种的筛选方法，不仅能节省时间和劳动力，而且可以扩大筛选的规模，获取更多的耐铝毒水稻品种资源。植物根系是植物吸收养分的主要部位，其表面带有丰富的官能团，这些官能团经过解离以后使得根表带有负电荷。同样，水稻根系也带有负电荷，而且不同基因型的水稻根系电荷性质不同。水稻根系的电荷性质影响根表对铝的吸附量，因此水稻根系的电荷性质应该会影响铝对根系的毒害，因为铝与水稻根系结合后更容易对水稻产生毒害。近期我们研究发现流动电位方法可以测定完整植物根系的zeta电位，测得的zeta电位可以表征根系的电荷特征。由于流动电位方法不需对根系做任何处理，能在近似原位条件下方便、快速地测定根系的表面电荷特性，这为快速、简便的耐铝毒水稻品种的初选方法的建立创造了条件。在初筛基础上再进行田间试验，进一步确定品种的耐铝毒性、产量及品质，可以大大降低人力和物力，节省时间。

发明内容

[0004] 解决的技术问题：本发明针对我国南方酸性土壤中的水稻受铝毒害较重的问题，基于流动电位法表征水稻根系表面的电荷特征，依据根系的电荷性质初选耐铝毒的水稻品种，提供一种鉴别水稻品种耐铝毒性能的方法。

[0005] 技术方案：通过检测水稻根系的zeta电位在鉴别水稻品种耐铝毒性能中的应用。

[0006] 通过检测水稻根系的zeta电位在比较水稻品种耐铝毒性能中的应用。

[0007] 上述根系的zeta电位的测定步骤为：将水稻根系用去离子水冲洗并浸泡，然后自

然风干;取水稻风干根系放于样品池中,用流动电位方法测定流动电位、液压差和电导率,根据所获参数通过公式$\zeta=\frac{\Delta E}{\Delta P}\frac{\mu}{\varepsilon\varepsilon_0}\kappa$,计算水稻根系的zeta电位,其中ζ是zeta电位(mV);ΔE是流动电位(mV);ΔP是液体压力差(Pa);μ是溶液的粘滞系数(Pa·S);ε是电解质溶液的介电常数(F/m);ε_0是真空介质的介电常数(F/m);κ是溶液电导(S/m)。

[0008] 耐铝毒籼稻根系在pH7.6的0.65mmol/L的NaCl溶液中zeta电位范围为-10.3～-13.7mV。

[0009] 优选的,水稻根系用去离子水冲洗3次并浸泡6小时。

[0010] 优选的,水稻风干根系的长度为2cm。

[0011] 上述应用的具体步骤为:将3天大的水稻幼苗分别在含铝和不含铝的0.5mmol/L的$CaCl_2$溶液中生长48小时,测量并获取相对根伸长率,建立根系的zeta电位与水稻根系相对伸长率之间的线性相关关系;其中根系的相对根伸长率大、对铝吸附量小的水稻品种为耐铝毒水稻品种。

[0012] 有益效果:用流动电位法测定水稻根系的zeta电位时,无需对根系进行复杂的前处理,只需将水培得到的完整根系经自然风干后直接测定,再经过一个简便的公式,即可计算根系的zeta电位。我们发现流动电位法测定的zeta电位与通过根伸长实验获得的相对根伸长率存在极显著的相关性,因此可以采用流动电位法来表征水稻对铝毒的耐受性。这种方法不仅操作简便,而且可以在不破损根系的情况下对水稻根系进行原位地测定,测定的结果也更加接近实际水稻根系的电荷特征。与田间试验从大量水稻品种中筛选耐铝毒水稻品种的方法相比,本发明研发的方法具有简便、快速的特点,不仅能节省时间和劳动力,而且可以扩大筛选的规模,获取更多的耐铝毒水稻品种资源。

附图说明

[0013] 图1为不同基因型水稻根系表面zeta电位的比较图;

[0014] 图2为不同基因型水稻根系相对根伸长率的比较图;

[0015] 图3为流动电位法测定的zeta电位与相对根伸长率的相关关系图;

[0016] 图4为不同基因型水稻根系对铝吸附量的比较图;

[0017] 图5为流动电位法测定的zeta电位与根系对铝吸附量的相关关系图;

[0018] 图6为相对根伸长率与根系对铝吸附量的相关关系图。

具体实施方式

[0019] 实施例1

[0020] 不同基因型水稻根系zeta电位的测定与比较。

[0021] 根系是由47个不同基因型的籼稻经过30天水培生长而获得。具体步骤如下:选择饱满一致的种子,首先用10wt.%的双氧水消毒15分钟,用蒸馏水清洗干净后,在蒸馏水中浸泡6小时,移于放有纱布的周转箱中避光培养。当水稻幼苗生长至2cm高时,将其移至人工生长室(14小时光照,28℃,10小时黑暗,20℃;光照强度375μmol photon $m^{-2}s^{-1}$;相对湿度70%)中继续培养。当水稻幼苗长至5cm高时,移至按国际水稻研究所建议的营养液(pH5.5)中培养。营养液配方如下:(mmol/L)0.75$(NH_4)_2SO_4$,1.5$NaNO_3$,0.32$NaH_2PO_4\cdot 2H_2O$,0.5K_2SO_4,

1.7$MgSO_4 \cdot 7H_2O$,1.0 $CaCl_2$;(μmol/L)9.1$MnCl_2 \cdot 4H_2O$,0.16$CuSO_4 \cdot 5H_2O$,0.15$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$,0.07$(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$,18$H_3BO_3$和40$FeSO_4 \cdot 7H_2O$-EDTA。每隔2天换一次营养液,自开始催芽算起,30天后收获水稻,将水稻根系与地上部分离,用去离子水洗涤根系3次并浸泡6小时后自然风干。

[0022] 用流动电位法测定水稻根系zeta电位,其步骤为:将风干的完整根剪成长度为2cm并混合均匀填满样品池,向电解质溶液箱中加入1.5L电导率为80μS cm^{-1}NaCl溶液,平衡1.5小时后弃去电解质溶液并更换1.5L新鲜的同样浓度的电解质溶液,再平衡10分钟。通过一对固定于样品池两端的Ag/AgCl电极测定样品的流动电势(ΔE),而通过一对固定于样品池两端的Pt金电极测定整个样品池总电导(K)。通过恒流泵将电解质溶液泵入样品池,并通过阀门改变驱动力获得不同液压差(ΔP)时的流动电位。根据Helmholtz-Smoluchowski方程由测定的流动电位计算根系的zeta电位。

[0023] $$\zeta = \frac{\Delta E}{\Delta P}\frac{\mu}{\varepsilon\varepsilon_0}\kappa \qquad (1)$$

[0024] 式中:ζ是zeta电位(mV);ΔE是流动电位(mV);ΔP是液体压力差(Pa);μ是溶液的粘滞系数(Pa S);ε是电解质溶液的介电常数(F/m);ε_0是真空介质的介电常数(F/m);κ是溶液电导(S/m)。

[0025] 图1是不同基因型水稻根系表面的zeta电位随溶液pH的变化关系。总的来说,在所测定的pH4-7.5范围内,水稻根系表面带有负电荷,并且随着溶液pH的升高,水稻根系的zeta电位均逐渐变的更负,表明随着溶液pH的升高,水稻根系带有的负电荷越多。不同基因型水稻根系表面的zeta电位存在差异。38-47品种水稻根系带有更多的负电荷,其次是11-37品种水稻,1-10品种水稻根系带的负电荷最少。

[0026] 实施例2

[0027] 为不同基因型水稻根系相对根伸长率的测定与比较。

[0028] 用相对根伸长率判定水稻对铝毒的耐受性。其步骤为:取3天大的水稻幼苗将其根系分别置于含有或不含50μmol/L Al(Ⅲ)的0.5mmol/L的$CaCl_2$(pH4.5)溶液中生长48小时。用尺子测量处理前后每个幼苗根的长度。两次测量值之差即为水稻幼苗根的伸长量。每个品种测量4株幼苗。根的相对伸长率按以下公式计算:

[0029] 相对根伸长率＝(RLT2-RLT1)/(RLC2-RLC1)×100%

[0030] RLC1:对照处理前的根长;RLC2:对照处理48小时后的根长;RLT1:铝处理前的根长;RLT2:铝处理48小时后的根长。

[0031] 图2为水稻根系相对根伸长率的结果,我们将水稻在50μmol/L Al(Ⅲ)处理下的抗铝性分为3个等级:相对伸长率>45%的为耐铝品种,45%>相对伸长率>30%的为中等耐铝品种,相对伸长率<30%的为铝敏感品种。其中耐铝品种水稻有10个(1-10品种),中等耐铝品种水稻有27个(11-37品种),铝敏感品种水稻有10个(38-47品种)。图3为测定的zeta电位与相对根伸长率进行相关性分析的结果。图中显示,它们之间存在极显著正相关性(R2＝0.58,P<0.001)。表明水稻根系带有的负电荷越少,其根系对铝毒的耐受性就越强。因此,可以用更为方便的流动电位法测定的根系zeta电位,根据根系zeta电位的大小对耐铝毒水稻品种进行快速、高效的初选。

[0032] 实施例3

[0033] 不同基因型水稻根系对铝吸附量的比较。

[0034] 水稻根系对铝的吸附和解吸实验，其具体步骤：将带有根上部分的新鲜水稻根放置于去离子水中浸泡12小时以清除根表多余的营养离子。然后，用去离子水冲洗水稻根三次，小心吸干表面水分后分别浸入500mL浓度为50μmol/L的Al(Ⅲ)溶液中，在磁力搅拌条件下反应2小时。吸附完成后，水稻根从溶液中取出并用去离子水冲洗三次。用滤纸轻轻擦去根表多余的水。然后依次放入200mL 0.1mol/L KNO_3、200mL 0.05mol/L EDTA-2Na和200mL 0.01mol/L HCl进行解吸实验，根与解吸剂反应0.5小时来提取根表吸附的交换态、络合态和沉淀态Al(Ⅲ)。提取完成后，剪去根上部分，在55℃下烘干，称重。提取液中交换态和沉淀态Al(Ⅲ)的浓度用液相色谱-电感耦合等离子体质谱仪(HPLC-ICP-MS)测定。用8-羟基喹啉(pH8.3)分光光度法测定络合态Al(Ⅲ)。将三种形态的Al(Ⅲ)加和作为根表吸附的总Al(Ⅲ)。

[0035] 图4是不同品种水稻对Al(Ⅲ)吸附量的结果。不同基因型水稻根系对铝的吸附量也存在差异。水稻品种10对铝的吸附量最小，约为172mg/Kg干根；而水稻品种38对铝的吸附量最大，约为481mg/Kg干根。38-47品种水稻、11-37品种水稻和1-10品种水稻根系对铝吸附量的平均值分别为373、291和235mg/Kg干根；也就是说，铝敏感品种(38-47品种)水稻根系对铝的吸附量最大，其次为中等耐铝水稻品种(11-37品种)，耐铝水稻品种(1-10品种)对铝的吸附量最低。这与它们根系zeta电位的结果相一致。将流动电位法测定的zeta电位与根系对Al(Ⅲ)的吸附量进行相关性分析，结果如图5所示。可以看出流动电位法测定的zeta电位与根系对Al(Ⅲ)的吸附量成极显著负相关性($R2=0.53$，$P<0.001$)。说明水稻根系带有的负电荷越多，其根系对铝的吸附量越多。同时，将相对根伸长率与根系对Al(Ⅲ)的吸附量也进行了相关性分析，如图6所示。图中显示它们之间也存在极显著负相关性($R2=0.49$，$P<0.001$)。表明水稻越耐铝，其根系对铝的吸附量越少。因此，耐铝毒能力越强的水稻，其根系表面带有的负电荷越少，相应地，对铝的吸附量也越少。

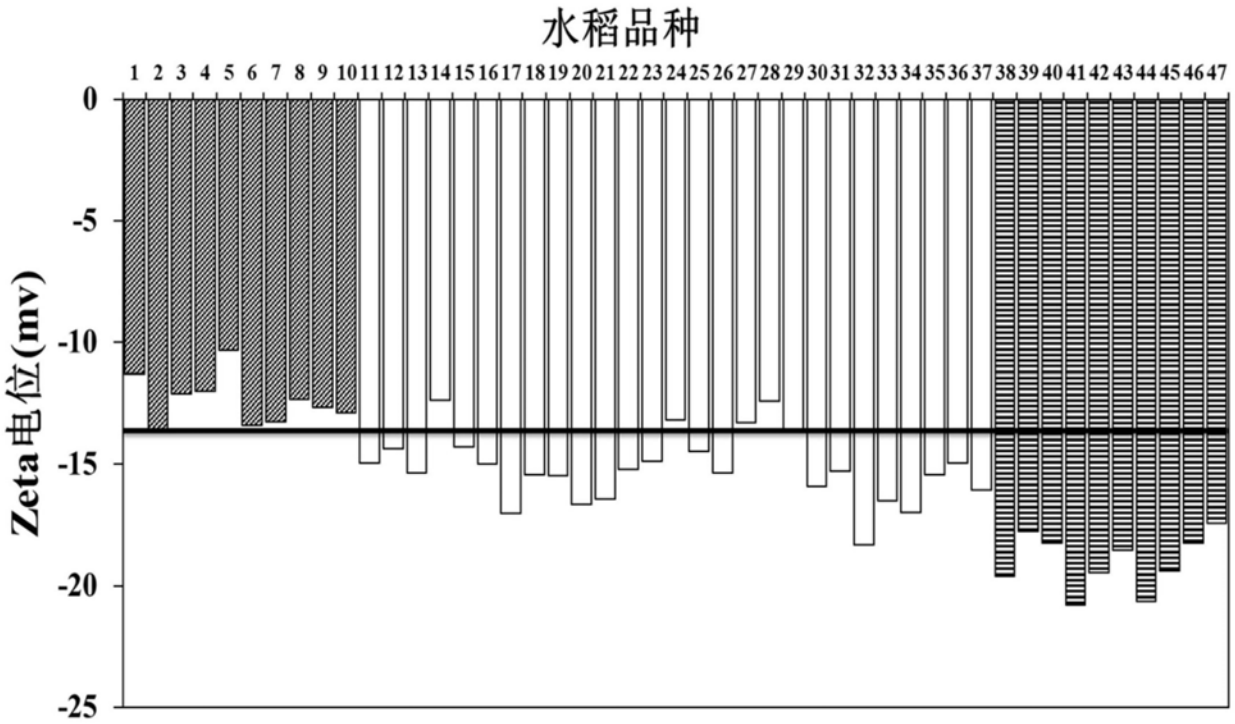


图1

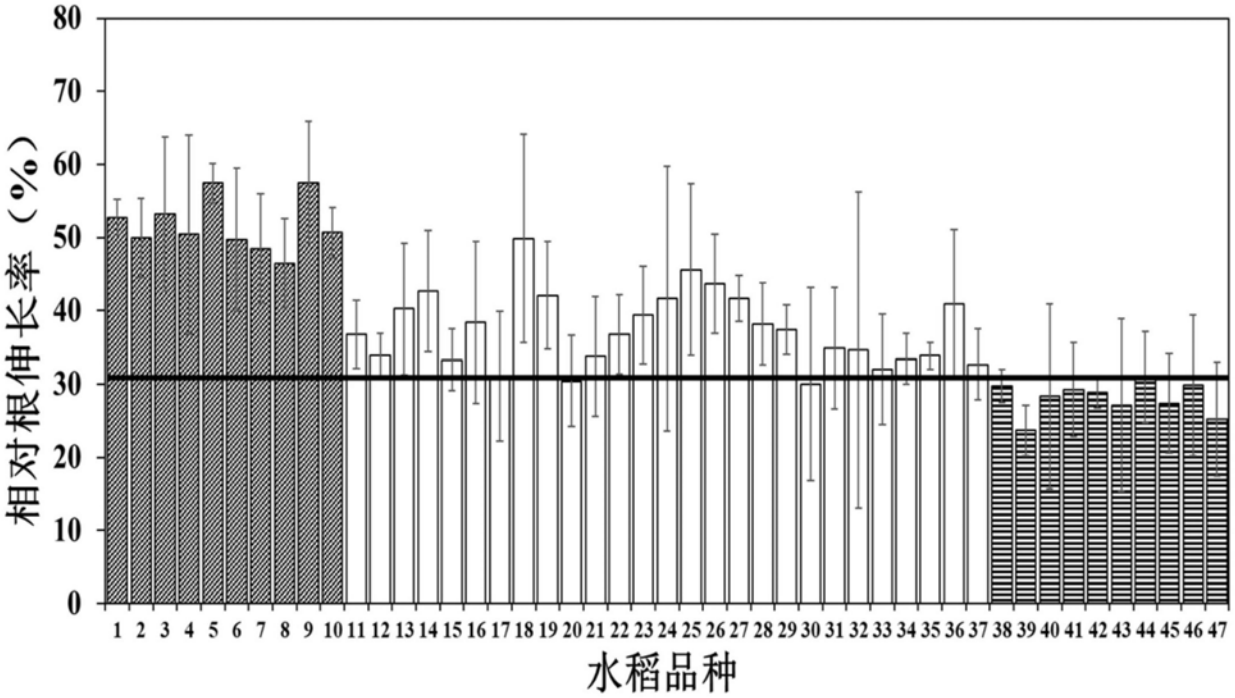


图2

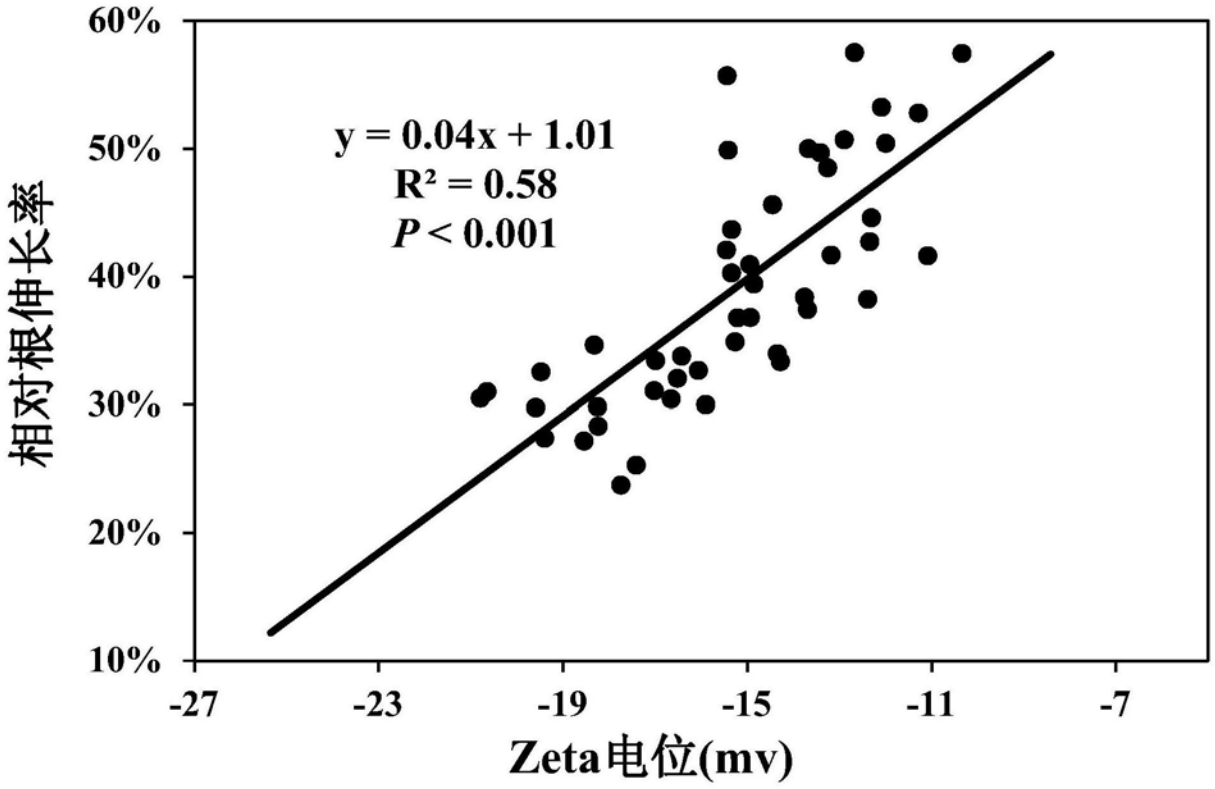

60%
50%
40%
30%
20%
10%
y = 0.04x + 1.01
R² = 0.58
P < 0.001
相对根伸长率
-27
-23
-19
-15
-11
-7
Zeta电位(mv)

图3

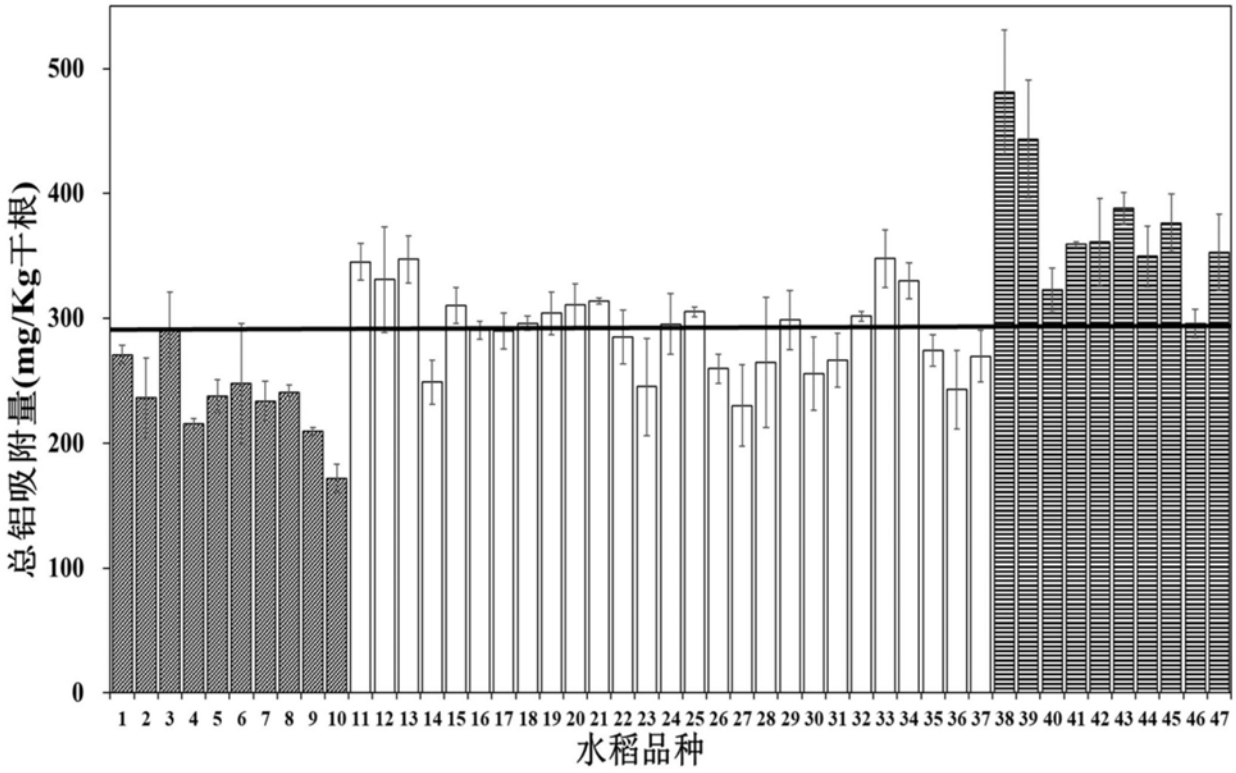

500
400
300
200
100
0
总铝吸附量(mg/Kg干根)
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43 44 45 46 47
水稻品种

图4

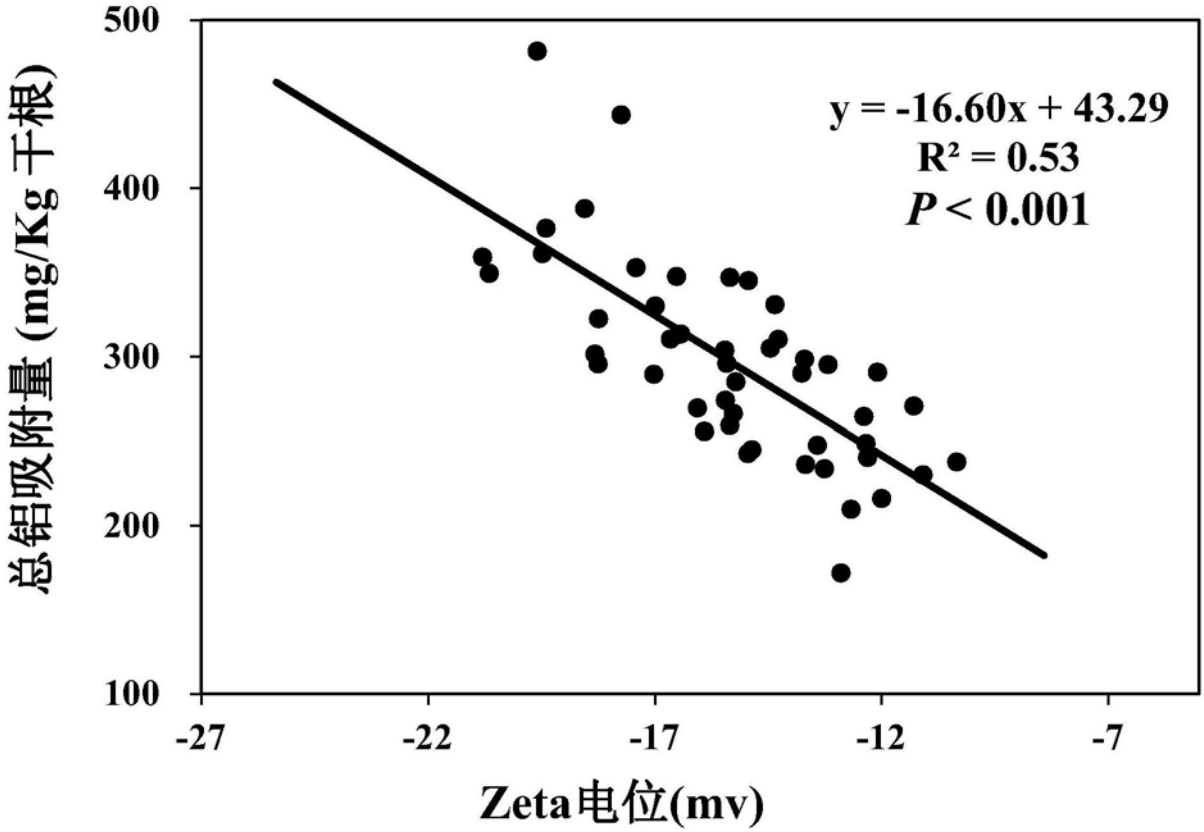

500
400
300
200
100
-27
-22
-17
-12
-7
总铝吸附量 (mg/Kg 干根)
Zeta电位(mv)
y = -16.60x + 43.29
R² = 0.53
P < 0.001

图5

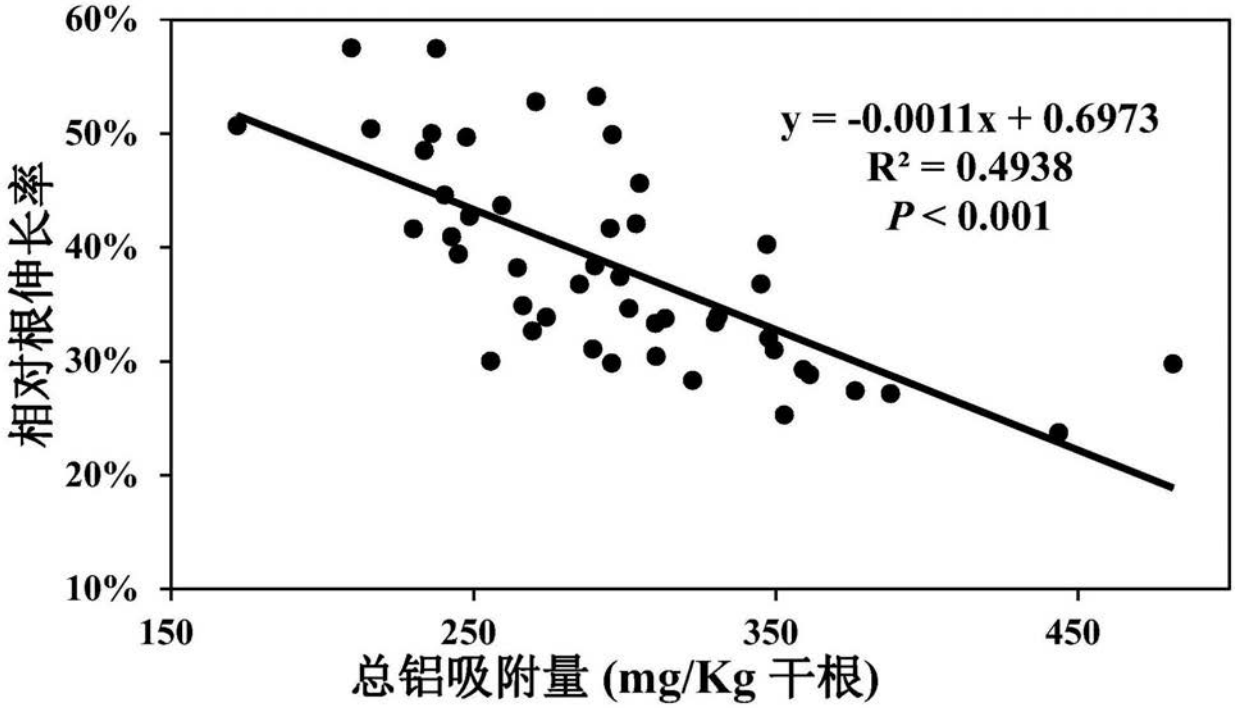

60%
50%
40%
30%
20%
10%
150
250
350
450
相对根伸长率
总铝吸附量 (mg/Kg 干根)
y = -0.0011x + 0.6973
R² = 0.4938
P < 0.001

图6