

文章编号 :1003-8701(2013)06-0014-05

盐胁迫对转基因大豆发芽势和发芽率的影响

李秀英¹,王丕武^{2*}

(1. 吉林农业大学信息化教学与管理中心,长春 130118; 2. 吉林农业大学农学院,长春 130118)

摘要:本研究以 5 份转基因大豆株系和 2 份非转基因大豆株系的种子为试验材料,设置 4 种盐浓度,采用砂培的方法在实验室进行标准发芽试验,观察不同株系在不同盐浓度条件下萌发和苗期的生长情况,鉴定不同株系耐盐性差异,筛选耐盐株系;取转基因植株幼嫩叶片进行基因组 DNA 的提取,然后利用 PCR 技术检测转化的耐盐目的基因是否存在。本研究取得如下研究结果:在相同温度条件下,转基因株系的发芽率均高于未转入目的基因的对照品种,其中 BADH-14、BADH-17、CMO-5 的耐盐性明显高于对照吉农 17。

关键词:转基因大豆;耐盐;基因组 DNA;PCR

中图分类号:S565.104.1

文献标识码:A

Effect of Salt Stress on Germinating Energy and Germination Rate of Genetically Modified Soybean

LI Xiu-ying¹, WANG Pi-wu^{2*}

(1. *Information Teaching and Management Center, Jilin Agricultural University, Changchun 130118;*

2. Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: In this study, five transgenic soybean lines and two non-transgenic soybean lines were used as materials to conduct a standard germination examination under four salt concentrations using the method of sand culture. The germination ability and seedling growth were tested and salt tolerance of different transgenic lines was screened. The genomic DNA of transgenic plant lines was extracted from young leaves to detect the target gene by using PCR technology. The results showed that at same temperature conditions, the germination rates of transgenic plant lines under salt condition were higher than that of non-transgenic lines. Lines of 'BADH-14', 'BADH-17' and 'CMO-5' show better salt tolerance than their recipient 'Jinong 17'.

Keywords: Genetically modified soybean; Salt tolerance; Genomic DNA; PCR

土壤盐碱化是影响农业生产稳定性的重要因素^[1],严重影响着大豆的产量、品质和效益,直接影响着当地的农业生产和经济发展,并对我国大豆产业造成较大冲击。提高盐碱土地利用效率的有效措施之一是筛选、培育耐盐的作物品种^[2]。由于缺乏可用的抗旱、耐盐育种材料,采用常规育种技术培育抗旱、耐盐、高产大豆品种进程极为缓慢,至今尚未能取得明显突破^[3]。生物技术和常规

育种相结合为选育抗旱、耐盐作物新品种带来了新的机遇^[4]。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

本试验于 2011 年在吉林农业大学生物技术实验室进行,选择本实验室培育的转基因大豆株系 5 个,分别为 BADH-14、BADH-17、CMO-5、KHT-4 和 KHT-5,以未转化的受体品种吉农 17 和吉农 18 为对照。

1.2 试验方法

本研究以 5 份转基因大豆株系和 2 份非转基因大豆株系的种子为试验材料,设置 4 种盐浓度,

收稿日期:2013-05-21

基金项目:高产优质抗旱大豆种质资源创新及新品种选育(2009-1)

作者简介:李秀英(1977-),女,助理研究员,研究方向:作物育种、教育教学管理。

通讯作者:王丕武,男,博士,教授, E-mail: zqs19741030@126.com

采用砂培的方法在实验室进行标准发芽试验,观察不同株系在不同盐浓度条件下萌发和苗期的生长情况,筛选耐盐株系,取转基因植株幼嫩叶片进行基因组 DNA 的提取,然后利用 PCR、Southern 杂交等技术检测转化的耐盐目的基因是否存在;通过对初选获得的抗旱、耐盐转基因株系进行分子生物学耐盐性复检,鉴定功能性状的有效性,以期为中选转基因株系的环境释放积累材料。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫对大豆种子发芽势的影响

将 7 个供试大豆株系 (吉农 17、BADH-14、BADH-17、CMO-5、吉农 18、KHT-4、KHT-5) 在不同 NaCl 盐浓度下 (0.2%、0.4%、0.6%、0.8%) 进行处理,对第四天的发芽情况进行统计,统计结果见图 1。

对照吉农 17 和吉农 18 的发芽势在各盐浓度

梯度下均明显低于转基因株系。

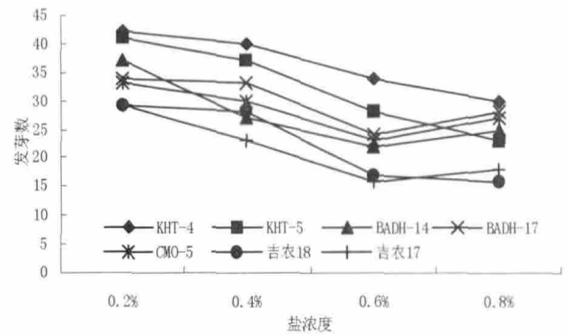


图 1 不同盐浓度下的发芽势比较

2.1.1 试验结果的方差分析

7 个株系处理间差异极为显著,4 个盐浓度处理间的差异也极为显著,株系与盐浓度交互差异不显著。表明不同基因型的大豆种子之间对盐浓度的耐性有极显著差异,不同盐浓度处理间的差异极为显著,基因型与盐浓度交互差异不显著,有

表 1 试验数据的方差分析

变异来源	平方和	自由度	均方	F 值	F _{0.05}	F _{0.01}
区组	43.45	2	21.73			
基因型	1 792.12	6	298.69	6.24**	3.00	4.82
Ea	574.38	12	47.87			
盐浓度	2 128.32	3	709.44	20.65**	2.83	4.29
基因型 × 盐浓度	373.60	18	20.76	0.60	1.86	2.41
Eb	1 442.83	42	34.35			
总变异	6 354.70	83				

必要进行不同处理间的差异显著性分析。

2.1.2 试验处理的差异显著性测定

2.1.2.1 不同株系间发芽势的差异显著性测定

不同株系间发芽势的差异显著性测定见表 2,其中 $LSD_{0.05}=6.15$, $LSD_{0.01}=8.63$ 。

表 2 7 个株系处理间的新复极差测验

基因型	均值	5%显著水平	1%极显著水平
KHT-4	35.75	a	A
KHT-5	31.50	ab	AB
BADH-17	29.84	ab	ABC
CMO-5	27.67	bc	ABC
BADH-14	26.83	bc	BC
吉农 18	22.33	c	C
吉农 17	21.67	c	C

在 $\alpha=0.05$ 水平, KHT-4 与 CMO-5、BADH-14、吉农 18、吉农 17 有显著差异,与 KHT-5、BADH-17 无显著差异;KHT-5、BADH-17 与吉

农 18、吉农 17 有显著差异,与 KHT-4、CMO-5、BADH-14 无显著差异;CMO-5、BADH-14 与吉农 18、吉农 17 有显著差异,吉农 18、CMO-5 与 KHT-4、KHT-5、BADH-17 有显著差异。在 $\alpha=0.01$ 水平, KHT-4 与 BADH-14、吉农 18、吉农 17 有极显著差异,与 KHT-5、BADH-17、CMO-5 无极显著差异;吉农 18、吉农 17 与 KHT-4、KHT-5 有极显著差异,与 BADH-17、CMO-5、BADH-14 无极显著差异。结果表明,转基因株系种子萌发耐盐能力得到显著提高,转基因株系种子萌发耐盐性显著高于受体未转化的受体品种,其中转基因株系 KHT-4 的发芽势最高,其次是 KHT-5 和 BADH-17,未转化的受体植株吉农 17 的发芽势最低。

2.1.2.2 不同 NaCl 盐浓度处理的发芽势差异显著性测定

不同 NaCl 盐浓度处理的发芽势差异显著性测定见表 3,其中 $LSD_{0.05}=3.65$, $LSD_{0.01}=4.88$ 。

在 $\alpha=0.05$ 水平, 0.2%与 0.4%、0.6%、0.8%有

显著差异,0.4%与0.8%、0.6%有显著差异,0.6%与0.8%无显著差异。在 $\alpha=0.01$ 水平,0.2%与0.4%、0.6%与0.8%无显著差异,0.2%与0.6%、0.8%有极显著差异。结果表明,不同浓度盐胁迫对大豆种子萌发有显著影响。随着盐浓度的增加,大豆种子萌发受到抑制,盐浓度到达一定程度差异不显著,应继续上调盐浓度,进一步进行试验。

表3 4种盐浓度处理的新复极差测验

盐浓度(%)	均值	5%显著水平	1%极显著水平
0.2	34.71	a	A
0.4	30.76	b	A
0.8	24.00	c	B
0.6	22.29	c	B

第四天的发芽情况照片如图2所示。

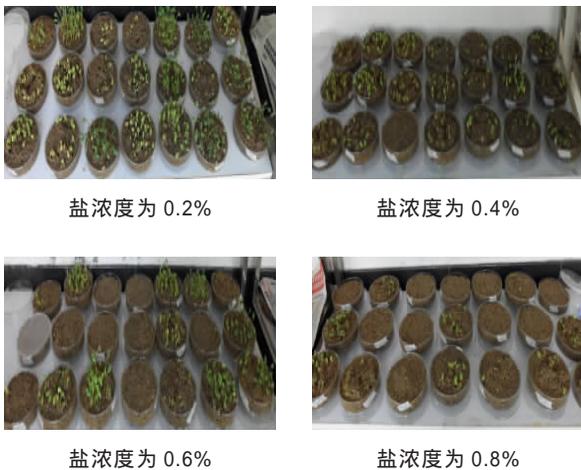


图2 4个盐浓度的发芽势比较

随着盐浓度的增高发芽势呈下降趋势,盐浓度为0.2%的发芽情况显著好于盐浓度为0.8%时

的发芽情况,说明盐胁迫对大豆萌发有显著影响。

2.2 盐胁迫对大豆种子发芽率的影响

本试验将7个供试大豆株系(吉农17、BADH-14、BADH-17、CMO-5、吉农18、KHT-4、KHT-5)在不同盐浓度下(0.2%、0.4%、0.6%、0.8%)进行处理,对第七天的发芽情况进行统计,统计结果见图3。

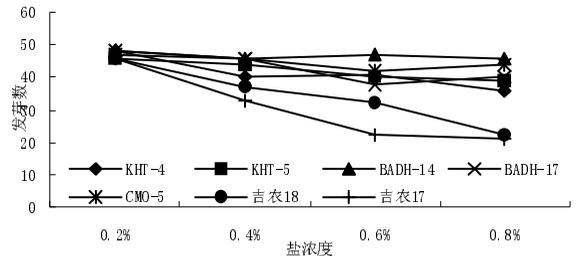


图3 25°C条件下各株系的发芽率

7个大豆株系的发芽率总体呈下降趋势。在最适温度25°C,同一胁迫条件下,不同株系对NaCl盐胁迫的敏感性不同。0.2%NaCl盐胁迫下,各株系的发芽率几乎不受影响,基因型间无显著差异;0.8%NaCl盐胁迫下,转基因株系BADH-14、BADH-17、CMO-5的发芽率明显高于对照吉农17;KHT-4、KHT-5的发芽率明显高于对照吉农18。

2.2.1 试验结果的方差分析

由表4可知,7个株系处理间的差异极为显著,4个盐浓度处理间的差异极为显著,株系与盐浓度互作处理间的差异也极为显著。表明不同基因型的大豆种子之间对盐浓度的耐性有极显著差异,不同盐浓度处理间的差异极为显著,基因型与盐浓度互作差异极为显著,有必要进行不同处理

表4 试验数据的方差分析表

变异来源	平方和	自由度	均方	F值	F _{0.05}	F _{0.01}
区组	12.50	2	6.25			
基因型	2164.90	6	360.82	14.87**	3.00	4.82
Ea	291.17	12	24.26			
盐浓度	2309.65	3	769.88	84.43**	2.83	4.29
基因型×盐浓度	649.10	18	36.06	3.95**	1.86	2.41
Eb	383.00	42	9.12			
总变异	5810.32	83				

间的差异显著性分析。

2.2.2 试验处理的差异显著性测定

2.2.2.1 不同株系间发芽率的差异显著性测定

不同株系间发芽率的差异显著性测定见表5,其中 $LSD_{0.05}=4.38$, $LSD_{0.01}=6.14$ 。

在 $\alpha=0.05$ 水平,BADH-14与KHT-4、吉农17、吉农18有显著差异,与CMO-5、BADH-17、KHT-5无显著差异;CMO-5、BADH-17、KHT-5间无显著差异。在 $\alpha=0.01$ 水平,BADH-14与吉农17、吉农18有极显著差异;BADH-14、CMO-5、

BADH-17、KHT-5、KHT-4 间无极显著差异。结果表明,转基因株系种子萌发耐盐能力得到显著提高,转基因株系种子萌发耐盐性显著高于受体未转化的受体品种,其中转基因株系 BADH-14 的耐盐性最高,其次是 COM-5 和 BADH-17,未转化的受体植株吉农 17 和吉农 18 的耐盐性最低。

表 5 7 个株系处理间的新复极差测验

基因型	均值	5%显著水平	1%极显著水平
BADH-14	44.25	a	A
CMO-5	43.00	ab	A
BADH-17	41.75	ab	A
KHT-5	40.17	ab	A
KHT-4	39.42	b	A
吉农 17	32.33	c	B
吉农 18	29.83	c	B

第七天的发芽情况照片如图 4 所示。



图 4 3 个基因型发芽率的比较

由图 4 可知,转基因株系的发芽率在各盐浓度的盐胁迫下的表现均好于对照。盐浓度为 0.2% 和 0.4% 时,虽然在发芽的数量上相差不多,但发芽的情况有很大区别,转基因株系的发芽情况比未转化的受体植株要好很多,长的较快,发芽较早,长势较好。

2.2.2.2 不同 NaCl 盐浓度处理的发芽率差异显著性测定

不同 NaCl 盐浓度处理的发芽率差异显著性测定见表 6,其中 $LSD_{0.05}=1.88$, $LSD_{0.01}=2.51$ 。

表 6 4 种盐浓度处理的新复极差测验

盐浓度	均值	5%显著水平	1%极显著水平
0.2%	46.90	a	A
0.4%	39.52	b	B
0.6%	34.62	c	C
0.8%	33.67	c	C

在 $\alpha=0.05$ 水平,0.2% 与 0.4%、0.6%、0.8% 有显著差异,0.6% 与 0.8% 无显著差异。在 $\alpha=0.01$ 水平,0.2% 与 0.4%、0.6%、0.8% 有极显著差异,0.6% 与 0.8% 无极显著差异。结果表明,不同浓度盐胁迫对大豆种子萌发有显著影响,随着盐浓度的增加,大豆种子萌发受到抑制,盐浓度到达一定

程度差异不显著,应继续上调盐浓度,进一步进行试验。

2.3 PCR 检测结果

大豆发芽 8~10 d 后,将豆苗移到大棚继续浇 0.6% 的盐水进行盐筛,待长出 3~5 片叶时,取幼嫩叶片提取基因组 DNA,进行 PCR 检测。转基因株系 BADH-14 的生长情况明显好于对照。



图 5 苗期生长情况

2.3.1 大豆基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法提取大豆基因组 DNA^[5],取 5 μ L 基因组 DNA 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 6 所示。所提取的基因组 DNA 电泳条带清晰、完整,没有 RNA 等其他物质,可用于下一步的 PCR 检测。

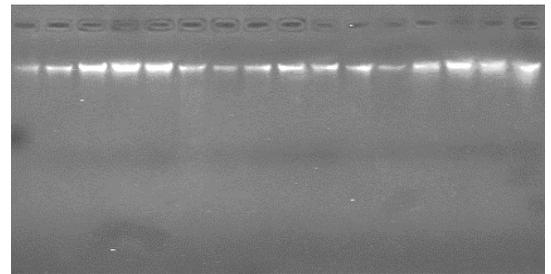


图 6 基因组 DNA 电泳结果

2.3.2 PCR 检测结果

利用转基因大豆和非转基因大豆样品,按照优化的 PCR 反应条件进行 PCR 特异性检测,结果如图 7 所示。其中 1- 非转基因植株(阴性对照),2- 质粒(阳性对照),3-11 转基因大豆。



图 7 BADH 植株 PCR 检测的鉴定

由图 7 可知,部分转基因大豆可扩增出 1506bp 特异性片段,而非转基因大豆无此条带,均显示阴性。初步表明外源 BADH 基因已转入到大豆中,获得了转基因大豆株系。

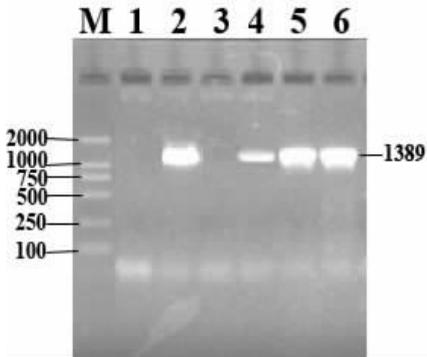


图 8 转基因大豆品系 STB17-17、STB17-21 的 T4 代 PCR 检测结果

M:DL2000Marker;1:水对照;2:阳性质粒对照;
3:非转基因植株对照;4:STB17-17(1)转基因植株;
5:STB17-17 转基因品系;6:STB17-21 转基因品系

转基因大豆品系 STB17-17、STB17-21、T4、T5 代 PCR 检测结果显示 BADH 基因在转基因品系中能够稳定遗传,结果见图 8 及图 9。

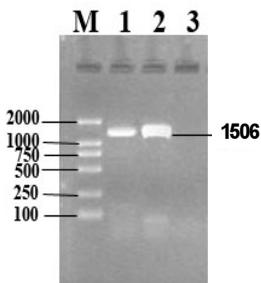


图 9 转基因大豆品系 STB17-17、STB17-21 的 T5 代 PCR 检测结果

M:DL2000Marker;1:STB17-17 转基因品系;
2:STB17-21 转基因品系;3:非转基因植株对照

3 结 论

结果表明,盐胁迫对大豆种子萌发期的影响较大,在 25℃ 条件下,同一株系的发芽率随盐浓度的提高而降低。在盐浓度为 0.2% 时,各株系间的发芽率几乎不受影响,差异表现不明显;当盐浓度为 0.4% 以上时,转基因株系的发芽率明显高于对照。转基因株系种子萌发耐盐能力得到显著提高,转基因株系种子萌发耐盐性显著高于未转化的受体品种,其中转基因株系 BADH-14 的耐盐性最高,发芽率达到 88%;其次是 COM-5 和 BADH-17,发芽率分别为 86% 和 82%;未转化的受体植株吉农 17 和吉农 18 的耐盐性最低,吉农 17 的发芽率为 64%,吉农 18 的发芽率为 58%。BADH-14 的发芽率比对照吉农 17 高出 24%。在苗期时,继续浇相应浓度梯度的盐水,进行进一步的盐筛,筛选出的耐盐性状较好的转基因植株进行基因组 DNA 的提取,并进行 PCR 检测。检测结果与盐筛的结果相符,在盐筛过程中,表现良好的植株经检测已转入 BADH 基因。

本试验所得到的只是一个初步的结果,仅根据萌发特性的不同还不能确定某一株系是否耐盐,需要结合整个生命周期进行综合分析,做更多的观察和试验。

参考文献:

- [1] 李 彬,王志春,孙志高,等.中国盐碱地资源与可持续利用研究[J].干旱地区农业研究,2005(2):154-158.
- [2] 张素红,刘立新,刘忠卓.水稻耐盐研究与育种进展[J].北方水稻,2009(3):118-121.
- [3] 张海燕,罗淑萍.大豆耐盐基因标记的开发[J].新疆农业大学学报,2005(2):22-24.
- [4] 余永亮,梁慧珍,王树峰,等.中国转基因大豆的研究进展及其产业化[J].大豆科学,2010(2):143-150.
- [5] 李春霞,李宏飞.CTAB 法高效提取苹果叶片 DNA 的研究[J].北方园艺,2009(2):49-52.