

转 *BcWRKY I* 基因玉米杂交组合苗期耐盐性分析

曹士亮¹, 史桂荣¹, 王成波¹, 贺 强¹, 蔡 泉¹, 卢翠华², 林忠平³

(1. 黑龙江省农业科学院 玉米研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 3. 北京大学 生命科学学院, 北京 100083)

摘要:为了明确外源基因提高玉米耐盐性的效果,以 6 份转 *BcWRKY I* 基因的玉米杂交组合及其对应的 6 份非转基因对照组合为试材,对其发芽率、耐盐级别、株高、干重、脯氨酸含量等 7 个指标进行分析。结果表明:耐盐级别、发芽率、干重、叶绿素含量和相对电导率的变化均达到显著水平,株高的变化达到极显著水平,脯氨酸含量转基因与非转基因组合间差异不显著。

关键词:转基因玉米;苗期;耐盐性

中图分类号:S513.035.3

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2012)04-0023-05

随着经济的快速发展和人民生活水平的迅速提高,玉米消费总量持续增加,供求矛盾加剧。我国具有农业利用潜力的盐碱荒地和盐碱障碍耕地面积近 0.13 亿 hm^2 ,加强盐碱地的利用,潜力巨大^[1]。利用盐碱地最经济、有效的措施是选育具有抗盐碱、耐干旱等性状的新品种。近年来人们纷纷开展将耐盐碱相关基因导入玉米以提高其抗

逆性的研究。吴畏等将转甜菜碱醛脱氢酶基因转入玉米获得了稳定的耐盐后代材料^[2]。程艳松等利用农杆菌介导法将拟南芥 3 个耐盐基因 *SOS1*、*SOS2* 和 *SOS3* 一起转入玉米基因组中。经耐盐性比较表明,抗性愈伤比非转基因对照愈伤耐盐性明显增强^[3]。*BcWRKY I* 基因是来自具有复苏植物特点的厚叶旋蒴苣苔的转录因子,是 *WRKY* 基因家族的新成员,受干旱、低温和高盐等非生物胁迫诱导后表达^[4]。该研究以 6 个转 *BcWRKY I* 基因的玉米杂交组合与其非转基因组合为试材,通过苗情观察和苗期耐盐性相关指标检测对其耐盐性进行鉴定,旨在为玉米耐盐品

收稿日期:2012-02-06

基金项目:农业部转基因重大专项资助项目(2009ZX08003-015B)

第一作者简介:曹士亮(1980-),男,黑龙江省哈尔滨市人,硕士,助理研究员,从事玉米生物技术与遗传育种研究。E-mail:caoshiliang2003@126.com。

参考文献:

- [1] 郭泰,刘忠堂,齐宁,等.大豆高产品种合丰 25 的选育及利用[J].大豆科学,1997,16(1):85-87.
- [2] 郭泰,刘忠堂,齐宁,等.合丰 25 在大豆育种中的应用[J].作物品种资源,1998(2):19-20.
- [3] 刘忠堂.合丰 25 大豆迅速大面积推广的原因分析[J].黑龙江农业科学,1993(1):24-27.

- [4] 刘长海,于晓春,邱长久,等.合丰 25 作亲本在北部大豆育种中的应用[J].大豆通报,2001(3):22.
- [5] 邱丽娟,王曙明.中国大豆品种志(1993-2004)[M].北京:中国农业出版社,2008.
- [6] 关荣霞,常汝镇,邱丽娟,等.优良大豆品种合丰 25 的遗传组成[J].作物学报,2009,35(9):1590-1596.

Indirect Utilization of Hefeng 25 and Breeding of 'Hefeng' Soybean Varieties

WU Xiu-hong

(Jiamusi Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: In order to research the good germplasm resources use means, seven 'Hefeng' soybean varieties, which Hefeng40, Hefeng42 Hefeng43, Hefeng55, Hefeng56, Henong60 and Henong62, were bred through the crossing of lines(bred from Hefeng 25)as female parents and soybean varieties with different growth habits as male parents. These varieties played important roles for promotion and application of 'Hefeng' soybean varieties. And the indirect utilization of Hefeng 25 was significantly.

Key words: Hefeng25; indirect utilization; 'Hefeng' soybean varieties

种选育提供一定参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试玉米材料为 6 个转基因杂交组合及其非转基因对照组合。各组合全部为母本转基因组合,其编号为:1. K10(WRKYI)×HR10, 2. 郑 58(WRKYI)×444, 3. 吉 846(WRKYI)×444, 4. 合 344(WRKYI)×熊掌, 5. 7884(WRKYI)×P8112 和 6. HR30(WRKYI)×K10。由黑龙江省农业科学院玉米研究所高产育种研究室提供。

1.2 方法

1.2.1 NaCl 胁迫下玉米发芽试验 选取饱满度一致的转基因组合和非转基因组合共 12 份材料的种子,用 0.1%的 HgCl₂ 消毒 10 min,蒸馏水清洗 3 次,在浓度为 100 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液胁迫下室温浸种 20 h,浸种后,将种子移至装有细沙的塑料钵中,同样以 100 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 溶液浇灌,在光照培养箱中进行种子萌发试验,3 次重复。每重复 20 粒,昼夜温度为(25±2)℃/(20±2)℃,每天光照 16 h, 光强为 2 500~3 000 lx,

相对湿度 60%~80%。萌发 7 d 后测定种子的发芽率。

1.2.2 玉米苗期盐胁迫处理 另取一批种子同样消毒处理,蒸馏水清洗后放在铺有 2 层滤纸的发芽盒中,室温清水浸种 20 h,吸去多余的水置于 28℃培养箱中发芽,其间及时补充清水。萌发后,选取芽期生长状况良好且长势较一致的种子播种于装有蛭石的塑料花盆内(直径 20 cm、高 22 cm),各盆装有等量的蛭石,同时浇灌适量的 1/2Hoagland 营养液(每盆营养液用量相同),于植物生长室中培养。温度、湿度和光照条件同 1.2.1,待长出第二片真叶时,每盆保留 5 株生长一致的健壮幼苗。幼苗长至三叶一心期时,用 300 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 的 1/2Hoagland 溶液处理,并每天以此浓度的处理液浇灌,浇灌量为蛭石持水量的 2 倍,从而将以前的积余盐冲洗掉,以保持各个处理液浓度的恒定,共处理 7 d。

1.2.3 耐盐性分级 参考付艳等研究,根据苗情对 12 份玉米杂交组合进行苗期耐盐性的评价,比较转基因组合及其对照耐盐级别的变化(见表 1)。

表 1 耐盐级别评价指标

Table 1 Evaluation index of salt tolerance level

级别 Level of salt tolerance	盐胁迫症状 Symptoms of salt stress	耐盐性 Salt tolerance
1	生长基本正常,无明显受害症状,有 3~4 片绿叶	高耐
2	生长基本正常,有 3 片绿叶,第 1 片真叶的叶片变黄或叶尖青枯	耐盐
3	生长受抑制,有 2 片绿叶,第 1、2 片真叶的叶片变黄或叶尖青枯	中耐
4	严重受害,仅有 1 片绿叶或仅心叶存活	敏感
5	整个植株枯死或接近死亡	高感

1.2.4 NaCl 胁迫下玉米各生理指标的测定

(1)株高的测定:盐处理后测量玉米幼苗的株高,以苗地上部分最高点的拉直高度为准,每处理 3 次重复。(2)干重的测定:盐胁迫处理后,取出完整植株,用去离子水快速冲洗掉蛭石和灰尘,然后将植株放入烘箱以 105℃杀青 10 min,80℃烘干至恒重后称重即为干重。(3)脯氨酸含量的测定:脯氨酸含量的测定利用脯氨酸与茚三酮反应生成稳定的红色缩合物,用甲苯萃取后,此缩合物在波长 520 nm 处有一最大吸收峰。脯氨酸浓度的高低在一定范围内与其消光度呈正比,采用分光光

度法测定,具体方法参考郝再彬等编写的《植物生理实验》^[5]。(4)相对电导率的测定:NaCl 胁迫后叶片真空处理,室温放置 1 h 测其电导率(S₁),沸水浴 10 min 测其电导率(S₂),相对电导率=S₁/S₂,具体方法参考郝再彬等编写的《植物生理实验》。(5)叶绿素含量的测定:叶绿素含量的测定采用叶绿素含量测定仪 SPAD502。

1.2.5 统计分析 数据处理采用 Excel 软件,统计分析采用 DPS 软件,采用成对数据比较的 t 测验方法对转基因组合耐盐级别及相关性状差异进行显著性检验。

2 结果与分析

2.1 转基因组合苗期耐盐级别的变化

转基因组合及其非转基因对照组合苗情观察的耐盐级别见表 2。为了便于观察,将耐盐级别变化绘制成图(见图 1)。可以看出,4 个组合耐盐

性提高了 1 个级别,1 个组合即组合 6 提高了 2 个级别,1 个组合即组合 4 耐盐性未发生变化。说明 *BcWRKYI* 基因的转化对多数玉米组合的耐盐性提高具有一定的作用。

表 2 转基因组合及其非转基因耐盐性评价
Table 2 The assessment of salt tolerance of genetically modified crosses and the non-genetically modified crosses

组合编号 No. of crosses	母本 Female parent	父本 Male parent	基因 Gene	原组合耐盐级别 Salt tolerance level of original crosses	转基因组合耐盐级别 Salt tolerance level of genetically modified crosses
1	K10	HR10	<i>WRKYI</i>	2	1
2	郑 58	444	<i>WRKYI</i>	3	2
3	吉 846	444	<i>WRKYI</i>	3	2
4	合 344	熊掌	<i>WRKYI</i>	3	3
5	7884	P8112	<i>WRKYI</i>	4	3
6	HR30	K10	<i>WRKYI</i>	5	3

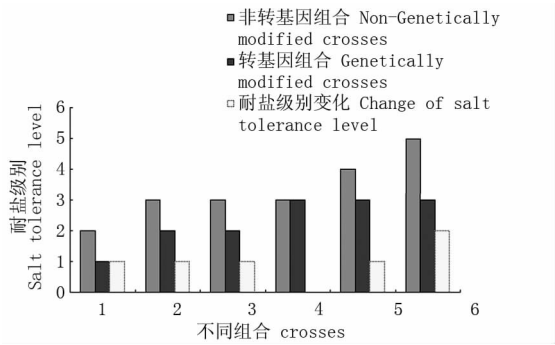


图 1 不同组合耐盐级别的变化
Fig. 1 Change of salt tolerance level of different crosses

2.2 玉米转基因组合苗期生理指标的变化

由于转基因组合与非转基因组合采用相同的 NaCl 胁迫条件,只是在是否为转基因这一性状上存在差别,因此采用成对数据的 t 检验对各性状进行分析,从表 3 可以看出,通过外源基因的转化,所有 7 个指标中,耐盐级别、发芽率、干重、叶绿素含量、相对电导率的变化均达到显著水平,株高的变化达到极显著水平,脯氨酸含量转基因与非转基因组合间差异不显著。说明 *BcWRKYI* 基因的转化对玉米苗期生理指标起到了较大的影响。

表 3 转基因杂交组合与非转基因杂交组合不同指标变化
Table 3 Change of different criteria between genetically modified crosses and the non-genetically modified crosses

性状 Traits	耐盐级别 Level of salt tolerance	发芽率 Germination percentage	株高 Plant height	干重 Dry weight	叶绿素含量 Chlorophyll content	相对电导率 Relative electric conductivity	脯氨酸含量 Proline content
t 值	3.873 *	3.038 *	4.247 **	3.202 *	3.294 *	3.067 *	1.478
P	0.012	0.029	0.008	0.024	0.022	0.028	0.199

注: * 表示差异显著; ** 表示差异极显著。
Note: * means significant difference; ** means extremely significant difference.

2.3 转基因组合发芽率的变化

对 6 个转基因玉米杂交组合与相应的非转基因对照组合在 100 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下比较发

芽率变化(见图 2)。由图 2 可知,全部组合 NaCl 胁迫下发芽率都有所提高,但提高的幅度相差很大,其中组合 6 盐胁迫下发芽率提高的幅度最大。

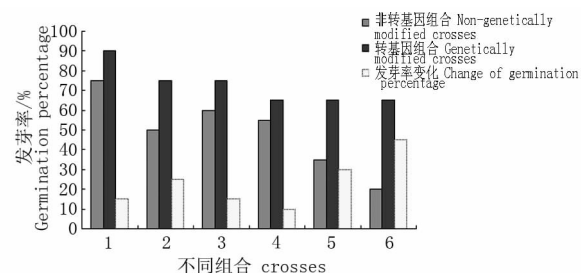


图 2 不同转基因组合 100 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫下发芽率变化

Fig. 2 Change of germination percentage of different crosses under 100 mmol·L⁻¹ NaCl

2.4 转基因组合生理指标的变化

在耐盐级别评价的基础上,对苗期转基因玉米杂交组合与其对照的株高、干重、脯氨酸含量、叶绿素含量、相对电导率指标的变化分别进行分析。

2.4.1 转基因组合株高的变化 由图 3 可以看出,6 个组合的株高都有所提高,其中提高最大的是组合 6,提高最小的是组合 4,几乎未发生变化。

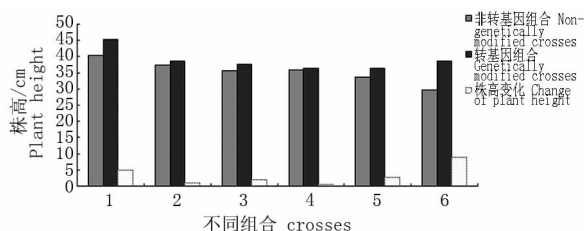


图 3 不同组合株高的变化

Fig. 3 Change of plant height of different crosses

2.4.2 转基因组合干重的变化 由图 4 可以看出,转基因组合的干重均呈现出增加的趋势,同样增加最大的是组合 6,增加最小的是组合 4。

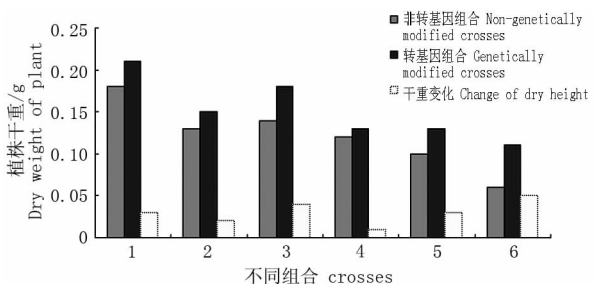


图 4 不同组合干重的变化

Fig. 4 Change of dry weight of different crosses

2.4.3 转基因组合脯氨酸含量的变化 由图 5 可知,不同转基因组合脯氨酸含量的变化较为复杂。组合 2、3、5 和 6 的脯氨酸含量呈现出增加的

趋势,而组合 1 和 4 的脯氨酸含量却下降了。

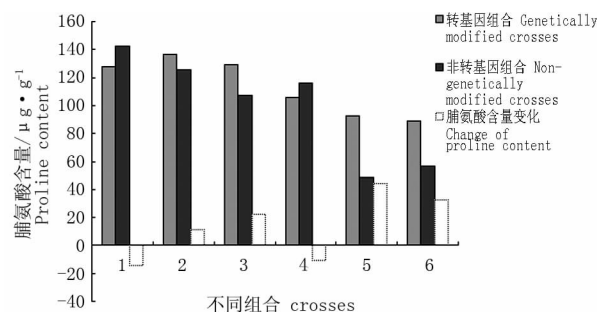


图 5 不同组合脯氨酸含量的变化

Fig. 5 Change of proline content of different crosses

2.4.4 转基因组合叶绿素含量的变化 由图 6 可知,除组合 4 外其它 5 个组合的叶绿素相对含量都有所增加。其中组合 6 叶绿素含量增加的最大。

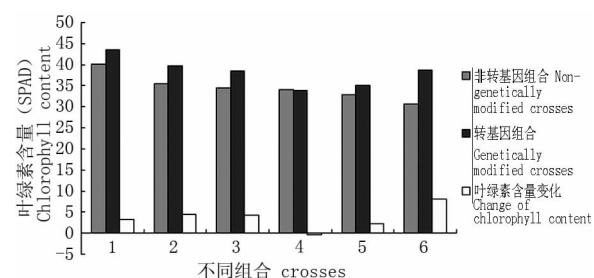


图 6 不同组合叶绿素含量的变化

Fig. 6 Change of chlorophyll content of different crosses

2.4.5 转基因组合相对电导率的变化 由图 7 可知,组合 4 的相对电导率增加,而其它 5 个组合的相对电导率都有所下降,特别是组合 6 的相对电导率下降幅度最大,这与其耐盐级别提高最大相一致。

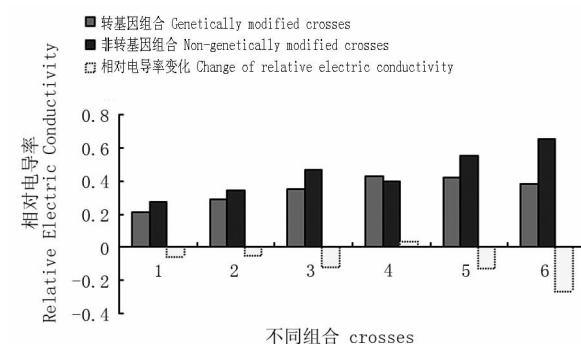


图 7 不同组合相对电导率的变化

Fig. 7 Change of relative electric conductivity of different crosses

3 结论与讨论

3.1 苗期耐盐性评价 NaCl 浓度的选择

不同苗期耐盐性评价试验对 NaCl 浓度的选择不尽相同,刘芳等研究认为 NaCl 溶液浓度为 $250 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 可作为玉米苗期耐盐性鉴定的理想浓度^[6]。而张春宵等认为 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 NaCl 溶液胁迫下,种子发芽率、叶片相对电导率等指标与对照组差异均达到显著,可以用来进行苗期耐盐性筛选^[7]。NaCl 浓度的选择要根据试验的目的进行,如果进行现有玉米种质资源耐盐性鉴定,建议使用较低浓度,因为浓度过高对玉米种质资源的区分鉴别能力减弱,如果进行耐盐资源选育特别是在进行耐盐品种选育时应尽量选择较高的 NaCl 浓度。该研究中苗期鉴定的 NaCl 浓度为 $300 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$,鉴定结果表明转基因杂交组合与非转基因杂交组合的耐盐级别呈显著性差异,已经达到筛选鉴定的目的。

3.2 苗期耐盐性评价指标的选择

植物的耐盐性是一个极其复杂的性状,Ashraf 认为正是由这种耐盐生理上的复杂性以及植物物种上存在的重大差异,很难选取一个单一的指标用来评价植物的耐盐性^[6]。付艳等对玉米耐盐系和盐敏感系在不同浓度盐胁迫下生理变化进行了研究,结果表明,与盐敏感系相比,玉米耐盐系叶绿素含量高,脯氨酸、MDA 含量及组织外渗液的相对电导率低,且变化幅度小^[7]。该研

究采用了成对数据的 t 测验,选取了发芽率、耐盐级别、株高、干重、脯氨酸含量等 7 个指标进行差异显著性分析,其中有 6 个性状在转基因杂交组合与其对照之间达到显著或极显著差异。说明这些指标确实与耐盐性存在重要的关系。同时也说明通过 *BcWRKY I* 基因的转化能够一定程度上提高玉米苗期的耐盐性。

参考文献:

- [1] 刘永信,王玉珍. 盐碱地区域化种植耐盐植物可行性研究[J]. 宁夏农林科技,2011,52(5):49-50.
- [2] 吴畏,苏乔,刘建凤,等. 转甜菜碱脱氢酶基因玉米的田间筛选及生理分析[J]. 沈阳农业大学学报,2007,38(4):612-614.
- [3] 程艳松,杨会,侯丽宏,等. 三个拟南芥抗盐基因在玉米基因组中整合、表达及抗盐性能的研究[J]. 中国农学通报,2008,24(2):211-218.
- [4] 刘戈宇. 厚叶旋蒴苣苔转录因子 *BcWRKY I* 基因克隆及初步功能分析[D]. 石河子:石河子大学,2006.
- [5] 郝再彬,苍晶,徐仲,等. 植物生理学实验[M]. 哈尔滨:哈尔滨工业大学出版社,2004.
- [6] 刘芳,付艳,高树仁. 玉米幼苗的盐胁迫反应及玉米耐盐性的鉴定[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2007,19(6):22-26.
- [7] 张春宵,袁英,刘文国,等. 玉米杂交种苗期耐盐碱筛选与大田鉴定的比较分析[J]. 玉米科学,2010,18(5):14-18.
- [8] Ashraf M, Harris P J C. Potential biochemical indicators of salinity tolerance in plants[J]. Plant Science, 2004, 166 : 3-16.
- [9] 付艳,高树仁,杨克军,等. 盐胁迫对玉米耐盐系与盐敏感系苗期几个生理生化指标的影响[J]. 植物生理学报,2011,47(5):459-462.

Analysis on Salt Tolerance of Transgenic Maize(*Zea mays* L.) Crosses with *BcWRKY I* Gene in Seedling Stage

CAO Shi-liang¹, SHI Gui-rong¹, WANG Cheng-bo¹, HE Qiang¹, CAI Quan¹, LU Cui-hua², LIN Zhong-ping³

(1. Maize Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086; 2. Agronomy College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 3. Life Science College of Beijing University, Beijing 100083)

Abstract: In order to analyze the effect of salt tolerance improvement by exogenous gene transformation, six transgenic maize crosses with *BcWRKY I* gene and six respective non-transgenic control of them were used to identify salt tolerance in seedling stage. Seven indicators such as the germination rate, salt resistance level, plant height, dry weight, proline content and so on were analyzed to evaluate the effect of the transformation of *BcWRKY I* gene on improving the salt resistance. The results indicated that salt resistance level, germination rate, dry weight, chlorophyll content, relative electric conductivity appeared significant differences, plant height appeared extremely significant differences, however, the difference of proline content was not significant.

Key words: transgenic maize; seedling stage; salt resistance