

## 栽培大豆和野生大豆及其回交后代苗期耐盐性分析

李发院, 田芳, 张晓可, 於丙军

(南京农业大学 生命科学院, 江苏 南京 210095)

**摘要:**以逐代人工耐盐性筛选的栽培和野生大豆杂交组合( Lee68 × N23227)  $F_3$  代株系 3060 为父本, 以耐盐栽培大豆 Lee68 品种为母本或轮回亲本, 配置回交组合( Lee68 × 3060, 编号 C) 得到的不同单株后代株系(  $BC_1F_2$ ) 为试验材料, 采用苗期耐盐系数、相对生长速率、干物质积累量等指标, 对它们的耐盐性进行了分析和评价, 并采用相对电解质渗漏率、硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含量、叶片净光合速率( $P_n$ )和PS II最大光化学效率( $F_v/F_m$ )对其中优良株系耐盐的生理机制进行了分析和探讨。结果表明:在盐胁迫下, 该组合回交后代中 C3、C10 等株系的苗期耐盐性系数、相对生长速率和干物质积累量等指标均明显高于母本 Lee68, 接近或超过父本 3060, 其中 C10 株系尤为突出。与双亲相比, 盐胁迫使 C10 株系幼苗根和叶中相对电解质渗漏率和 TBARS 含量的上升幅度, 及叶片  $P_n$  和  $F_v/F_m$  值的降低幅度明显较低, 且盐胁迫下的相对电解质渗漏率和 TBARS 含量与其对照相比, 差异均未达显著水平。可认为 C10 株系是一种新的优良耐盐大豆种质材料。

**关键词:**栽培大豆;野生大豆;回交后代;耐盐性

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2012)04-0593-05

## Analysis of Seedlings Salt Tolerance of Backcross Hybrids of *Glycine max* and *Glycine soja*

LI Fa-yuan, TIAN Fang, ZHANG Xiao-ke, YU Bing-jun

(College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

**Abstract:** In this study, the hybrid strain(  $F_3$  ) 3060 selected for salt tolerance generation by generation from the cross combination ( *Glycine max*, Lee68 cultivar × *Glycine soja*, N23227 population) was used as the male parent, the Lee68 was used as the female parent or recurrent parent, the backcross combination( Lee68 × 3060, named as C) was configured, and several single hybrid strains(  $BC_1F_2$  ) were obtained. Using these soybean materials, their salt tolerance was evaluated with parameters including the salt tolerance coefficient, relative growth rate and dry matter accumulation. On that basis, the salt tolerance mechanism of one fine strain was investigated with parameters, such as the relative electrolytic leakage, thiobarbituric acid reactive substances(TBARS) content,  $P_n$  and the maximum photochemical efficiency of photosystem II (  $F_v/F_m$  ). The results showed that, under salt stress, the salt tolerance coefficient, relative growth rate and dry matter accumulation in C3 and C10 hybrid strains were obviously higher than those in their female parent Lee68, and almost be equal to or more than those in the male parent 3060 strain, especially the C10 strain displayed the most. When compared with their two parents, the increase of the relative electrolytic leakage and TBARS content in roots and leaves, and the decrease of  $P_n$  and  $F_v/F_m$  in leaves of C10 seedlings under salt stress were distinctly lower. Moreover, the relative electrolytic leakage and TBARS content in roots and leaves of C10 seedlings under salt stress were not significantly different compared to its control. So, the C10 hybrid strain could be considered as one excellent salt tolerant soybean germplasm for future study.

**Key words:** *Glycine max*; *Glycine soja*; Backcross hybrids; Salt tolerance

土壤盐渍化已成为导致全球可利用耕地日益减少、限制作物产量和品质提高的几种主要非生物逆境之一<sup>[1]</sup>。据报道,全世界盐渍土约占地球陆地总面积的6%,约22%的农业耕地正遭到日益加剧的盐害影响<sup>[2-3]</sup>。我国盐渍土地面积约3 600万 $hm^2$ ,且随着国民经济的发展、城市面积的扩大和人口的不断增长,呈逐年增加的趋势<sup>[4]</sup>。因此,作物耐盐性的种质创新和遗传改良已成为未来农业发展的重要方向。

大豆是我国主要农作物之一,也是全世界广泛种植的油料作物,是食用油和蛋白质的主要植物来源,栽培大豆( *Glycine max* )属于中度耐盐植物<sup>[5]</sup>。野生大豆( *Glycine soja* )作为栽培大豆的近缘祖先种,耐盐性较栽培大豆强。栽培大豆由于其遗传基础已越来越窄,耐盐性相对有限,局限在栽培大豆品种范围内的育种工作难以取得大的突破,而野生大豆的产量和经济价值都较低。通过配制栽培大

收稿日期:2012-05-10

基金项目:国家自然科学基金项目(30871462);国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08004-008B)。

第一作者简介:李发院(1986-),男,硕士,研究方向为作物耐逆生理及其遗传改良研究。E-mail:2009116120@njau.edu.cn。

通讯作者:於丙军(1970-),男,教授,博士生导师,主要从事植物逆境生理生态与分子遗传改良研究。E-mail:bjiu@njau.edu.cn。

豆与野生大豆杂交组合和逐代耐盐性筛选,利用野生大豆的耐盐性来改良栽培大豆的盐敏感性,被认为是进行大豆耐盐种质创新和新品种选育的有效途径之一<sup>[6-7]</sup>。结合回交育种过程,可进一步改良后代的某些不良农艺性状,形成具有更加优良、稳定性状的农业生产应用品种<sup>[8]</sup>。3060株系( $F_5$ )是本课题组利用栽培大豆和滩涂野大豆杂交组合Lee68品种 $\times$ N23227种群,经逐代人工耐盐性筛选得到的比较理想的杂交后代<sup>[9]</sup>。本文以 $F_5$ 代株系3060为父本,以耐盐的栽培大豆Lee68品种为母本或轮回亲本,配置组合(Lee68 $\times$ 3060,编号C),以其不同后代株系( $BC_1F_2$ )为试验材料,采用苗期耐盐系数、相对生长速率、干物质积累量等指标对它们的耐盐性进行了分析和评价,并对其中优良株系从硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含量、相对电解质渗漏率和净光合速率( $P_n$ )等指标对其耐盐的生理机制进行了分析和探讨,以期今后深入研究利用野生大豆改良栽培大豆耐盐性的分子遗传机制和培育耐盐栽培大豆新品种(系)提供优良大豆种质材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及其培养

以逐代人工耐盐性筛选的栽培和野生大豆杂交组合(Lee68 $\times$ N23227) $F_5$ 代株系3060为父本,以耐盐的栽培大豆Lee68品种为母本或轮回亲本,配置回交组合(Lee68 $\times$ 3060,编号C)得到的7个单株后代株系( $BC_1F_2$ )(C2、C3、C9、C10、C12、C13、C14)为试验材料。分别取适量种子用 $1.0\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}\text{HgCl}_2$ 消毒5 min,用去离子水漂洗干净后,在恒温箱( $25^\circ\text{C}$ )内浸种8 h,然后置于发芽床上避光催芽,选取发芽一致者播于盛有石英砂的具孔塑料杯中。覆盖石英砂后,置于盛有1/2 Hoagland 营养液的周转箱中于培养室中培养,光照周期昼夜14 h/10 h,温度分别为 $25\pm 2^\circ\text{C}$ 和 $18\pm 2^\circ\text{C}$ 。除耐盐系数测定材料(方法见下1.2.1)外,当各大豆幼苗长至第1片复叶展开时,设对照(1/2 Hoagland 营养液)和处理(用1/2 Hoagland 营养液配制的 $120\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 溶液)2组,营养液或处理液每2 d更换1次,处理10 d后取样测定。

### 1.2 方法

1.2.1 耐盐系数测定 参照王洪新等<sup>[10]</sup>耐盐系数(salt tolerant coefficient)指标法,待上述回交后代和亲本幼苗长至第1片复叶展开时进行处理: $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 浓度处理5 d,以后每5 d递增 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaCl}$ 浓度的营养液,每2 d更换1次

营养液,当 $\text{NaCl}$ 浓度达到 $150\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,盐浓度不再增加,每日记录叶片出现青枯斑的植株数,直至全部出现为止。分别按第1株,50%植株,100%植株出现青枯斑的时间计算耐盐系数。

1.2.2 相对生长速率和干物质积累量测定 参照杜莉莉和於丙军<sup>[6]</sup>的方法,当各材料幼苗处理10 d后,随机选取12株,测量处理前后株高,按公式计算:相对生长速率 $=[(\text{处理后株高}-\text{处理前株高})/\text{处理时间}(\text{d})]/\text{处理前株高}$ 。然后将各材料用去离子水洗净、吸干, $105^\circ\text{C}$ 杀青10 min后于 $80^\circ\text{C}$ 烘干至恒重称量,得干物质积累量。

1.2.3 根和叶片相对电解质渗漏率的测定 参照Vannini等<sup>[11]</sup>的方法稍作修改。取根或叶片1.5 g用去离子水冲洗3次,用滤纸吸干水分。剪成小片(去掉中脉),置20 mL试管内,加入15 mL去离子水,真空抽气。室温( $25^\circ\text{C}$ )保温1 h(其间不断振荡),用SY-2型电导率仪测定电导率(处理电导率),然后将样品煮沸15 min,冷却后测定其电导率(煮沸电导率)。按公式计算:相对电解质渗漏率( $\%$ ) $=\text{处理电导率}/\text{煮沸电导率}\times 100$ 。

1.2.4 根和叶片硫代巴比妥酸反应物(TBARS)含量的测定 采用赵世杰等<sup>[12]</sup>的方法。取0.5 g新鲜根或同位叶片,加入少量石英砂和5%三氯乙酸5 mL,研磨至匀浆,以5 000 g离心10 min,其上清液为TBARS提取液。取上清液2 mL,然后加入2 mL 0.67% (W:V)的TBA溶液,在混合仪上混匀后在沸水浴中反应30 min,冷却后再离心。取上清液分别在532、600、450 nm波长下测定吸光度。按公式计算:TBARS含量( $\text{nmol}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$ ) $=[(6.45\times(A_{532}-A_{600})-0.56\times A_{450})]\times 20$ ,其中 $A_{532}$ 、 $A_{600}$ 、 $A_{450}$ 分别代表532、600、450 nm波长下的吸光度。

1.2.5 叶片净光合速率( $P_n$ )和PS II最大光化学效率( $F_v/F_m$ )的测定 于实验前2 d将培养的大豆材料由培养室移至室外,使大豆叶片经自然光照充分诱导后,于上午10:00~12:00采用LI-6400便携式光合仪(LI-COR Inc., USA)测量叶片净光合速率( $P_n$ )。内置光源强度为 $1\,200\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ,温度为 $32^\circ\text{C}$ ,大气 $\text{CO}_2$ 浓度约 $390\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。使用植物效率仪(Handy-PEA, Fluorometer, Hansatech Instruments, UK)测定 $F_v/F_m$ ,叶片经暗适应30 min后进行测量,直接从机器读数。

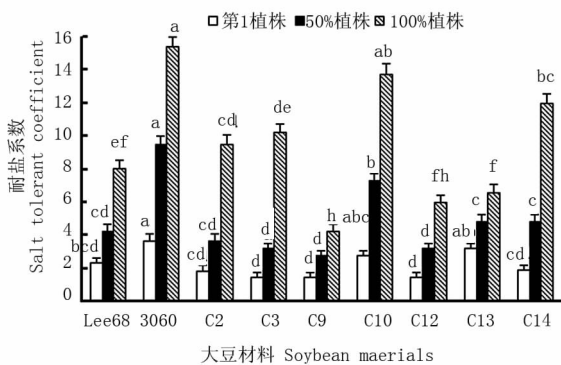
### 1.3 数据分析

以上各实验均为3次重复。应用SPSS13.0对实验数据进行均值、标准差和差异显著性分析,不同字母表示数据间的差异显著性( $P<0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 回交后代及其亲本苗期耐盐系数比较

供试的 7 个后代 (C2、C3、C9、C10、C12、C13、C14) 及其亲本 (Lee68、3060) 幼苗在第 1 植株、50% 植株和 100% 植株表现出盐害症状时, 其中后代株系 C2、C3、C10、C14 的耐盐系数明显高于其它后代株系, 特别是 C10 株系, 其耐盐系数已明显超过母本 Lee68 品种, 并且与耐盐性较强的父本 3060 株系基本相当 (图 1)。



第 1 植株、50% 植株和 100% 植株分别表示第 1 植株、50% 植株和 100% 植株真叶出现青枯斑时计算的耐盐系数。不同小写字母代表不同材料间在同一状态 (第 1 植株或 50% 植株或 100% 植株) 下的差异达显著水平 ( $P < 0.05$ )。下图同。

The 1st plant, the 50% plants and the 100% plants mean that the salt tolerant coefficient were calculated when the leaf salt injury symptom appeared on the 1st, 50% and 100% plant seedlings, respectively. The different lower case letters indicate significance ( $P < 0.05$ ) for each state (the 1st plant, 50% plants or 100% plants). The same as below.

图 1 C 回交组合后代株系及其亲本耐盐系数比较

Fig. 1 Comparison of salt tolerant coefficient in the hybrid strains and their parents of C backcross combination

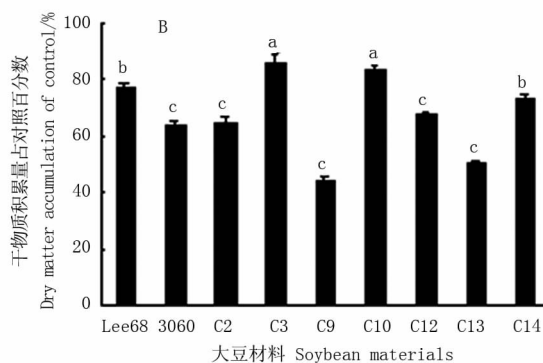
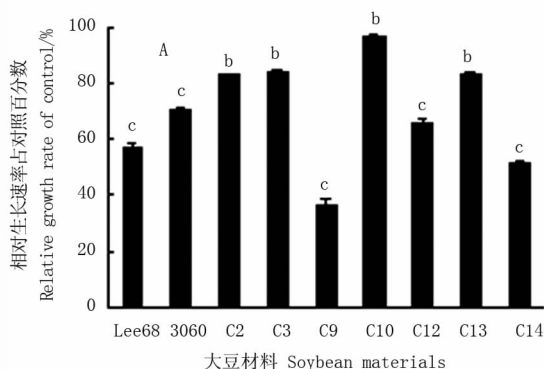


图 2 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 10 d 后 C 回交组合后代株系及其亲本幼苗相对生长速率 (A) 和干物质积累量 (B) (占对照的百分数) 的变化

Fig. 2 Changes in the relative growth rate (A) and dry matter accumulation (B) (percentages of the control) of seedlings of the hybrid strains and their parents of C backcross combination under 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 10 d

### 2.2 盐胁迫对回交后代及其亲本幼苗生长的影响

供试大豆幼苗经 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液处理 10 d 后, 与对照相比, 其相对生长速率占对照的百分数均小于 1, 这表示盐胁迫下各材料生长速率均表现下降, 其中 C10 株系降幅最小 (仅为 3.2%), 与双亲 Lee68 和 3060 (分别为 42.5% 和 29.6%) 间差异均达到显著水平, 后代 C2、C3、C13 株系的降幅 (分别为 17.6%、16.3%、16.7%) 也均显著小于双亲 (图 2A)。干物质积累量占对照的百分数也均下降, C3、C10 株系降幅 (分别为 13.6%、16.2%) 最小, 与双亲 Lee68 和 3060 (分别为 22.6% 和 35.8%) 间差异均达到显著水平, 其次是 C14 株系, 降幅与母本 Lee68 相当 (图 2B)。

### 2.3 盐胁迫对回交后代及亲本幼苗膜透性的影响

经 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液处理 10 d 后, 与对照相比, 各供试材料幼苗根和叶中相对电解质渗漏率和硫代巴比妥酸反应物 (TBARS) 含量均有不同程度的上升。其中, 在母本 Lee68 根、叶中上升幅度明显, 多数达到差异显著水平; 对父本 3060 株系而言, 仅根中相对电解质渗漏率和 TBARS 含量较对照显著增加, 叶中 2 个指标虽都有提高, 但未达到差异显著水平。不过, 对后代 C10 株系来说, 盐胁迫下上述各指标在根、叶中的上升较其对照均未达到差异显著水平 (图 3、图 4)。

### 2.4 盐胁迫对回交后代及其亲本幼苗叶片 $P_n$ 和 $F_v/F_m$ 值的影响

在 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 溶液处理 10 d 后, 与对照相比, 亲本 Lee68、3060 和后代 C10 株系幼苗叶片  $P_n$  和  $F_v/F_m$  值均显著下降, 其中后代 C10 株系降幅都是最小的, 分别仅为 5.51% 和 10.15%, 而母本 Lee68 降幅分别为 29.54% 和 27.41%, 父本 3060 降幅分别为 16.58% 和 44.67% (图 5)。

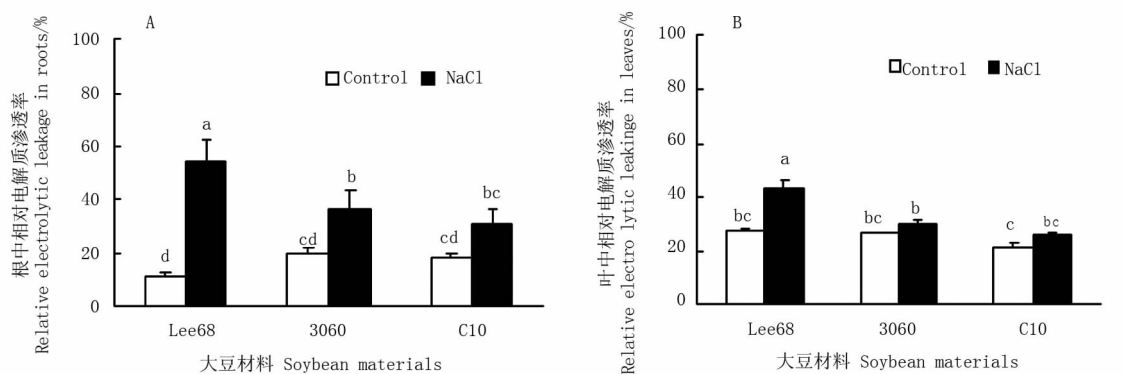


图3 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫10 d后C回交组合后代株系及其亲本幼苗根(A)和叶(B)中相对电解质渗透率的变化

Fig. 3 Changes in the relative electrolytic leakage in seedlings roots(A) and leaves(B) of the hybrid strains and their parents of C backcross combination under 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 10 d

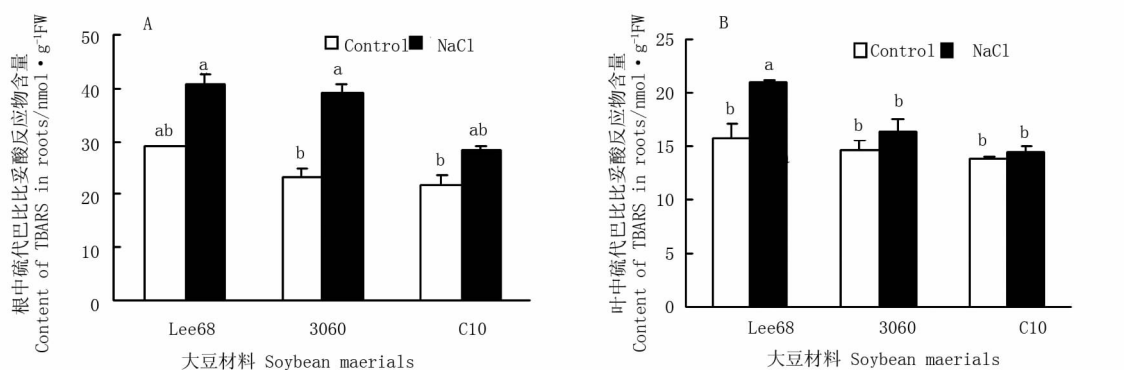


图4 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫10 d后C回交组合后代株系及其亲本幼苗根(A)和叶(B)中TBARS的变化

Fig. 4 Changes in TBARS contents in seedlings roots(A) and leaves(B) of the hybrid strains and their parents of C backcross combination under 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 10 d

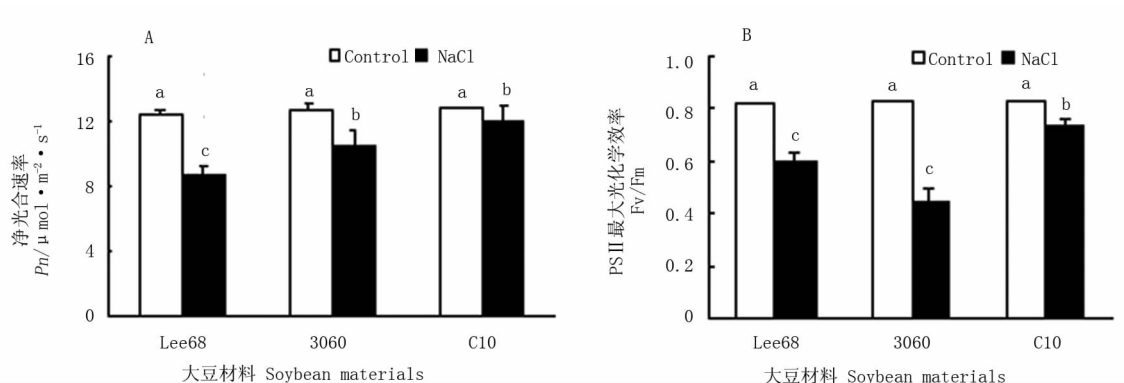


图5 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl胁迫10 d后C回交组合后代株系及其亲本幼苗叶片Pn(A)和Fv/Fm值(B)的变化

Fig. 5 Changes in Pn and Fv/Fm in seedlings leaves of the hybrid strains and their parents of C backcross combination under 120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl for 10 d

### 3 讨论

在作物新种质材料创新和培育实践过程中,回交是指2个亲本杂交后,杂种后代与亲本之一再次进行的杂交,它是改进现有杂种后代个别不良性状

的一种常用方法<sup>[13]</sup>。3060株系是本课题组以国际上公认的耐盐栽培大豆Lee68品种与野生大豆N23227种群(采集于江苏大丰)杂交,通过逐代耐盐性筛选得到的耐盐性超双亲的杂交后代株系。在农艺性状和籽粒品质方面,该株系在粒色上与母本栽培大豆Lee68相似,黄色有光泽,但百粒重和蛋

白含量偏低,亚麻酸含量偏高,植株直立性有待改善<sup>[9]</sup>。以栽培大豆 Lee68 品种为轮回亲本或母本,配置回交组合(Lee68 × 3060,编号 C),对其 19 个不同后代株系(BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub>)采用筛选到的亲本互补、多态性 SSR 标记鉴定(资料未列出),获得 7 个真实后代株系(C2、C3、C9、C10、C12、C13、C14),作为本研究的供试材料。在对不同大豆材料耐盐性进行分析、评价和鉴定过程中,苗期耐盐系数是常用的重要形态学指标之一,耐盐系数值越大,表示耐盐性越强<sup>[6]</sup>。本文研究结果显示:在盐胁迫下,C3、C10 等后代株系的苗期耐盐性系数、相对生长速率和干物质积累量等指标均明显高于母本 Lee68,接近或超过父本 3060,C10 株系尤为突出(图 1,2)。在此基础上,从盐胁迫下植株细胞膜伤害和叶片光合作用的角度,对其优良耐盐后代 C10 株系耐盐的生理机制进行了分析和探讨。与其双亲(Lee68、3060)相比,120 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 胁迫 10 d 后 C10 株系幼苗根和叶中相对电解质渗漏率和硫代巴比妥酸反应物含量的上升幅度,及叶片 *Pn* 和 *Fv/Fm* 值的降低幅度均明显较低,且盐胁迫下的相对电解质渗漏率和硫化巴比妥酸反应物含量与其对照相比,差异均未达显著水平(图 3,4,5)。这进一步从生理水平上验证了通过形态学指标进行耐盐性比较鉴定的结果,C10 株系可用于进一步深入研究利用野生大豆改良栽培大豆耐盐性的分子遗传机制和选育耐盐栽培大豆新品种(系)的优良大豆种质材料。这也表明通过 SSR 分子标记技术和简易耐盐性形态和生理评价指标相结合,进行栽培、野生大豆真假杂种后代和大豆耐盐种质鉴定与评价的方法是有效的。大田种植后考种资料显示:C10 株系的株高显著高于双亲,百粒重介于双亲之间,但分枝数、单株荚数和籽粒数等农艺性状尚需进一步改良,今后拟通过对其增加回交或自交次数而尝试实现。

## 参考文献

- [1] Ashraf M, Foolad M R. Roles of glycine betaine and proline in improving plant abiotic stress resistance[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2007, 59: 206-216.
- [2] Bhatnagar-Mathur P, Vadez V, Sharma K. Transgenic approaches for abiotic stress tolerance in plants: retrospect and prospects[J]. *Plant Cell Report*, 2008, 27: 411-424.
- [3] Munns R, Tester M. Mechanisms of salinity tolerance[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2008, 59: 651-681.
- [4] 杨劲松. 中国盐渍土研究的发展历程与展望[J]. *土壤学报*, 2008, 45(5): 837-845. (Yang J S. Development and prospect of the research on salt-affected soils in China[J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2008, 45(5): 837-845.)
- [5] Phang T H, Shao G H, Lam H M. Salt tolerance in soybean[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2008, 50: 1196-1212.
- [6] 杜莉莉, 於丙军. 栽培大豆和滩涂野大豆及其杂交后代耐盐性、农艺性状与籽粒品质分析[J]. *中国油料作物学报*, 2010, 32(1): 77-82. (Du L L, Yu B J. Analysis of salt tolerance, agronomic traits and seed quality of *Glycine max*, salt-born *Glycine soja* and their hybrids[J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2010, 32(1): 77-82.)
- [7] Zhang X K, Zhou Q H, Cao J H, et al. Differential Cl<sup>-</sup>/salt tolerance and NaCl-induced alternations of tissue and cellular ion fluxes in *Glycine max*, *Glycine soja* and their hybrid seedlings[J]. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 2011, 197: 329-339.
- [8] 周红菊, 穆俊祥, 赵胜杰, 等. 水稻高世代回交导入系耐盐性的遗传研究[J]. *分子植物育种*, 2005, 3(5): 716-720. (Zhou H J, Mu J X, Zhao S J, et al. Genetic analyses of salt tolerance in an advanced backcross population of rice[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2005, 3(5): 716-720.)
- [9] 张艳. 栽培大豆(*Glycine max*)与野生大豆(*Glycine soja*)杂交后代耐盐生理机制与籽粒品质的研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2005. (Zhang Y. Salt-tolerant mechanism and seed quality of offspring gained by crossing *Glycine max* with *Glycine soja* [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2005.)
- [10] 王洪新, 胡志昂, 钟敏, 等. 盐渍条件下野大豆群体的遗传分析和生理适应: 同工酶和随机扩增多态 DNA 研究[J]. *植物学报*, 1997, 39(1): 34-42. (Wang H X, Hu Z A, Zhong M, et al. Genetic differentiation and physiological adaptation of wild soybean (*Glycine Soja*) populations under saline conditions: isozymatic and random amplified polymorphic DNA study[J]. *Acta Botanica Sinica*, 1997, 39(1): 34-42.)
- [11] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, et al. Overexpression of the rice *Osmyb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants[J]. *Plant Journal*, 2004, 37: 115-127.
- [12] 赵世杰, 许长成, 邹琦, 等. 植物组织丙二醛测定方法的改进[J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(3): 207-210. (Zhao S J, Xu C C, Zou Q, et al. Improvement of method for measurement of malondialdehyde in plant[J]. *Plant Physiology Communications*, 1994, 30(3): 207-210.)
- [13] 李珍, 李造哲, 于卓. 披碱草和野大麦及其 BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> 代不同株系苗期耐盐性研究[J]. *中国草地学报*, 2006, 28(2): 17-22. (Li Z, Li Z, Yu Z. Studies on the salt tolerance of *Elymus dahuricus* *Hordeum brevisubulatum* and their BC<sub>1</sub>F<sub>2</sub> lines at seedling stage[J]. *Chinese Journal of Grassland*, 2006, 28(2): 17-22.)