

转 *GsGST14* 耐盐碱基因大豆的农艺性状调查

林凡敏, 柏 锡, 樊 超, 赵超越, 才 华, 纪 巍, 朱延明

(东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:对前期获得的转耐盐碱基因 *GsGST14* 的大豆株系 HF55-GST14-1、HF55-GST14-2、HF55-GST14-3、HF55-GST14-4、HF55-GST14-5 的 T₃ 代群体进行抽样 PCR 阳性检测, 结果后代群体中转基因阳性个体比例高于 80%, 说明对这些后代群体的调查能够反映出 *GsGST14* 基因对转基因大豆农艺性状的影响。因此对这 5 个株系的 T₃ 代群体农艺性状进行调查及统计学分析。结果表明, 5 个转基因株系与对照在单株荚数、单株粒数、百粒重、生育期、结荚习性、花色、叶形和蛋白质含量上无显著差异, 转基因株系 HF55-GST14-1、HF55-GST14-3 与 HF55-GST14-4 的株高显著低于对照。油分含量 HF55-GST14-1 显著高于对照, HF55-GST14-2 显著低于对照。因此, 5 个转 *GsGST14* 基因大豆株系并未在农艺性状上产生较大的不良变异, 具有良好的应用前景。

关键词:转基因大豆; *GsGST14* 基因; 耐盐碱; 农艺性状

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2013)01-0056-03

Investigation and Analysis of the Main Agronomic Traits of Different Transgenic Soybean Lines with *GsGST14* Gene

LIN Fan-min, BAI Xi, FAN Chao, ZHAO Chao-yue, CAI Hua, JI Wei, ZHU Yan-ming

(College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: In the previous study, we have transformed salt tolerance gene *GsGST14* into soybean. In the present study, the agronomic traits, including the yield, morphological and quality traits of five transgenic soybean lines, as well as the CK variety Hefeng55, were investigated and analyzed statistically. There were no obvious differences between transgenic soybean and the control in pods per plant, seeds per plant, 100-seed weight, growth duration, podding habits, flower color, leaf shape and protein content, but the plant height of HF55-GST14-1, HF55-GST14-3 and HF55-GST14-4 were obviously shorter than control, and the oil content of HF55-GST14-1 and HF55-GST14-2 were significantly higher and lower than that of the receptor variety, respectively. All the results indicated that five transgenic soybean lines with *GsGST14* gene had no seriously adverse variation in yield, morphological and quality traits, so they would have good utilization prospects.

Key words: Transgenic soybean; *GsGST14* gene; Tolerance to saline and alkaline stress; Agronomic traits

干旱、盐碱、极端温度等非生物胁迫是引起全球粮食作物减产的首要原因。黑龙江省是中国大豆主产区, 其西部地区有盐碱地近 66.7 万 hm^2 , 主要分布在大庆及齐齐哈尔南部地区, 其中含盐量超过 1% 的盐地和盐碱地超过 10 万 hm^2 ^[1]。盐碱胁迫严重影响了黑龙江省大豆的产量, 所以培育耐盐碱大豆新品种, 充分利用盐碱地资源, 已成为亟待解决的重大问题。

基因工程技术为优质农作物选育提供了一种简便、快捷和高效的途径, 目前, 全世界转基因大豆种植面积已达总面积的 81%^[2]。转基因大豆在育种方面弥补了传统育种方法的许多不足^[3], 但转基因大豆在组织培养、转化、筛选、和分化等过程中受到许多因素的影响, 易产生变异。因此对转基因植株的农艺性状进行系统调查, 对其实现产业化有重要意义^[4-6]。

本实验室前期得到转 *GsGST14* 基因大豆, 其耐盐碱性明显提高, 本研究在此基础上对转基因植株进行了遗传稳定性的 PCR 检测及产量、形态及品质等农艺性状的调查及统计学分析, 为转 *GsGST14* 基因大豆的环境安全性评价以及产业化研究提供重要依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2011 年在东北农业大学香坊实验站进行。试验材料为耐盐碱转基因大豆株系 HF55-GST14-1, HF55-GST14-2, HF55-GST14-3, HF55-GST14-4, HF55-GST14-5 的 T₃ 代群体, 对照 (CK) 品种为转基因株系的受体品种合丰 55。田间试验采取人工点播, 4 行区, 行距 0.5 m, 行长 5 m, 播种时

收稿日期: 2012-09-15

基金项目: 转基因生物新品种培育大专项 (2011ZX08004-002); 国家自然科学基金 (31171578); 黑龙江省高校科技创新团队建设计划 (2011TD055)。

第一作者简介: 林凡敏 (1986-), 女, 在读硕士, 研究方向为植物基因工程。E-mail: mutou11@126.com。

通讯作者: 朱延明 (1955-), 男, 教授, 博士生导师, 从事植物基因工程研究。E-mail: ymzhu2001@neau.edu.cn。

施足基肥,田间栽培及管理方法符合《农业转基因生物安全评价管理办法》附件 I。

在苗期对 T_3 代群体进行抽样取材,并以 *bar* 基因为引物进行 PCR 检测。成熟后取样测定产量性状、形态性状和品质性状。

1.2 试验方法

1.2.1 植物总 DNA 的提取 采用 CTAB 法(略有修改):取 100 mg 叶片,加液氮研磨成粉末;立即加入 700 μ L 65 $^{\circ}$ C 预热的 2 \times CTAB 提取缓冲液,充分混匀,65 $^{\circ}$ C 保温 30min,其间不时摇动,取出放至室温;加入 700 μ L 体积的氯仿/异戊醇(24:1),轻缓颠倒离心管混匀,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min;将上清液转入另一个离心管中,加入 700 μ L 体积的氯仿/异戊醇(24:1),轻缓颠倒离心管混匀,12 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min;将上清液转入另一个离心管中,加入 1/10 体积的 3 mol \cdot L $^{-1}$ NaAc 混匀,加入等体积的无水乙醇,室温下放置 15 ~ 30 min,观察沉淀生成,如无沉淀,可适当延长时间;8 000 $r \cdot \min^{-1}$ 离心 10 min,去上清液,用 70% 乙醇洗涤沉淀,吹干;用 20 μ L TE 溶解,电泳观测。

1.2.2 PCR 检测 PCR 扩增 *GST14* 基因的检测引物为:

GST14-S: 5'-GGAAGCGAAGAAGTGAAGCTGTTGA-3'

GST14-AS: 5'-GAAGCCAGTAAGAGATCCATC-CAAGTG-3'

以 *GST14* 基因引物检测 T_3 代群体的抽样材料。PCR 反应条件如下:94 $^{\circ}$ C 预变性 7 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,35 个循环,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min,4 $^{\circ}$ C 终止反应。

1.2.3 农艺性状调查标准 在成熟期进行产量性状和形态性状调查,包括单株荚数、单株粒数、百粒重、株高、结荚习性、花色和叶形;蛋白含量和油分含量由农业部谷物及制品质量监督检测中心(哈尔滨)测得。

2 结果与分析

2.1 转 *GsGST14* 基因大豆 T_3 代植株 PCR 鉴定

抽取部分转基因大豆 T_3 代,采用 PCR 方法鉴定 5 个转基因株系 T_3 代群体中的转基因阳性率。如表 1 所示,5 个株系的 PCR 阳性率分别为 85%、89%、90%、88% 和 91%,说明转基因大豆 T_3 代群体中转基因阳性个体占有很高比例,对这些后代群体进行农艺性状调查能够反映出 *GsGST14* 基因对转基因大豆农艺性状的影响。

表 1 转 *GsGST14* 基因大豆 T_3 代部分植株的 PCR 阳性率
Table 1 PCR positive rate of T_3 plants with *GsGST14* gene

材料 Material	T_3 代单株数 No. of T_3 plants	PCR 阳性株数 No. of PCR positive plants	PCR 阳性率 PCR positive frequency/%
HF55-GST14-1	150	128	85
HF55-GST14-2	200	178	89
HF55-GST14-3	200	180	90
HF55-GST14-4	250	220	88
HF55-GST14-5	250	228	91

2.2 农艺性状调查

2.2.1 产量性状 由表 2 可知,5 个转 *GsGST14* 基因大豆 T_3 代群体与对照在单株荚数、单株粒数和百粒重上差异均不显著。

表 2 转 *GsGST14* 基因大豆不同转化株系的产量性状

Table 2 Yield traits of different transgenic soybean lines with *GsGST14* gene

材料 Material	单株荚数 Pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	百粒重 100-seed weight/g
Hefeng55	96.0	315.0	21.5
HF55-GST14-1	90.2	272.1	22.2
HF55-GST14-2	90.0	271.7	22.7
HF55-GST14-3	90.0	272.9	23.3
HF55-GST14-4	88.5	283.0	22.4
HF55-GST14-5	89.5	281.2	22.4

2.2.2 形态性状 由表 3 可知,5 个转基因株系 T_3 代群体与对照相比,在花色、结荚习性、叶形等方面无明显差异;株系 HF55-GST14-1, HF55-GST14-3, HF55-GST14-4 T_3 代株高显著低于对照 ($P < 0.05$)。

表 3 转 *GsGST14* 基因大豆不同转化株系的形态性状

Table 3 Morphological traits of different transgenic soybean lines with *GsGST14* gene

材料 Material	株高 Plant height/cm	结荚习性 Podding habit	花色 Flower color	叶形 Leafshape
Hefeng55	113.2	S	P	L
HF55-GST14-1	101.6 *	S	P	L
HF55-GST14-2	100.8	S	P	L
HF55-GST14-3	98.9 *	S	P	L
HF55-GST14-4	99.2 *	S	P	L
HF55-GST14-5	102.9	S	P	L

S: 亚有限型; P: 紫色; L: 长叶; * 代表 0.05 水平下显著,下同。

S; Semi-determinate; P; Purple; L; Long leaf; * stand for significant at 5% level, the same below.

2.2.3 品质性状 由表 4 可知,与对照相比,转基因大豆蛋白含量无显著差异。油分含量 HF55-GST14-3、HF55-GST14-4 和 HF55-GST14-5 与对照无

显著差异,而 HF55-GST14-1 株系显著高于对照 1.43%,HF55-GST14-2 株系显著低于对照 1.3%。

表 4 转 *GsGST14* 基因大豆不同转化株系的品质性状

Table 4 Quality traits of different transgenic soybean lines with *GsGST14* gene

材料 Material	蛋白含量 Protein content/%	油分含量 Oil content/%
Hefeng55	40.97	18.65
HF55-GST14-1	37.74	20.08*
HF55-GST14-2	39.90	17.35*
HF55-GST14-3	38.83	18.67
HF55-GST14-4	40.87	18.90
HF55-GST14-5	38.77	18.35

3 结论与讨论

由于基因分离、丢失和遗传不稳定等原因,转基因植物后代会出现一定比例的非转基因植株,这种现象在转基因的早期世代比较明显^[8]。本研究选取 5 个转基因株系的 T₃ 代植株进行调查,首先采用 PCR 方法检测 5 个株系后代群体的转基因植株阳性比例。结果表明 5 个转基因大豆株系 T₃ 代群体中转基因阳性个体占有很高比例,对这些后代群体进行农艺性状调查能够反映出 *GsGST14* 基因对转基因大豆农艺性状的影响。

本研究中,5 个转 *GsGST14* 基因大豆株系在抗盐碱性提高的同时,与对照相比,在产量性状上无明差异,而在形态形状上其中 3 个株系 T₃ 代群体的株高显著低于对照 ($P < 0.05$)。这是由于转基因及筛选和组培过程都影响转基因株系的生长活力,随着繁殖世代的增加,大豆植株不断进行自身修复趋于正常。马炳田等^[9]用基因枪法将雪花莲外源凝集素基因转移到优良粳型杂交稻恢复系蜀恢 527 中,转基因第一代植株在株高和结实率上与相应的组培、种子实生苗植株相比,发生明显的不可遗传的变异。随着繁殖代数的增加,转基因植株恢复到与对照植株一致。

在品质性状上,5 个株系的蛋白含量与对照相比无显著差异,其中 2 个株系的油份含量与对照相比存在显著差异。这一差异的可能原因:一是组织培养过程引起体细胞无性系的变异,转座子的活化、DNA 扩增、点突变、甲基化方式的改变等都可能引起转基因植株及其后代的表现型出现变异;二是外源基因随机插入引起的变异,其插入的位置不同,其表现型也不同(即转基因的位置效应)^[10];三是外源基因拷贝数的不同引起的变异。工程育种

的目的是在保持植物原来的优良性状的同时,获得相应的目的性状。只有保持农艺性状的稳定才能使转基因植物具有良好的应用价值,并实现产业化。本研究中的转基因株系 HF55-GST14-1、HF55-GST14-3、HF55-GST14-4 和 HF55-GST14-5 在产量性状和品质性状上与对照不存在显著差异,而且转基因株系 HF55-GST14-1 油份含量要高于对照,所以这 3 个株系具有良好的应用前景。

参考文献

- [1] 刘功,李锐,王连敏,等. 浅谈黑龙江盐碱地利用[J]. 黑龙江农业科学,2007(2):108-109. (Liu G, Li R, Wang L M, et al. The use of saline and alkaline land in Heilongjiang province[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, 2007(2):108-109.)
- [2] 黄大昉. 2010 年中国转基因农作物产业发展情况分析[M]. 北京:北京理工大学出版社,2011:135-140. (Huang D F. In 2010, China transgenic crops industry development situation analysis [M]. Beijing: Beijing Institute of Technology Press, 2011: 135-140.)
- [3] Clive J. Global review of commercialized transgenic crops[J]. Current Science, 2003, 84(3):303-309.
- [4] Clark E A. Environmental risks of genetic engineering[J]. Euphytica, 2006, 148:47-60.
- [5] 周波,陶波,栾凤霞,等. 抗草甘膦转基因大豆生物安全性综述[J]. 作物杂志,2006(2):7-9. (Zhou B, Tao B, Luan F X, et al. Glyphosate resistance transgenic soybean biological safety review [J]. Crops, 2006(2):7-9.)
- [6] 李瑞峰,王莹,王宇,等. 转基因作物及其生物安全性[J]. 东北农业大学学报,2007,38(3):405-410. (Li R F, Wang Y, Wang Y, et al. Genetically modified crops and their biological safety[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2007, 38(3): 405-410.)
- [7] 王守才,王国英,戴景瑞. 关于高等植物转基因遗传问题的讨论[J]. 生物工程进展,2000,20(4):63-66. (Wang S C, Wang G Y, Dai J R. About higher plant transgenic genetic problem discussion[J]. Progress in Biotechnology, 2000, 20(4):63-66.)
- [8] Ralph A D, Nicholas J T, Daniel J E, et al. The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe grisea* [J]. Nature, 2005, 434:980-986.
- [9] 马炳田,李平,朱祯,等. 转抗虫基因优良粳型恢复系的获得及其外源基因的遗传稳定性研究[J]. 中国水稻科学,2002,16(3):211-215. (Ma B T, Li P, Zhu Z, et al. Turn insect-resistant genes fine indica restorer for exogenous gene and its genetic stability study [J]. Chinese Journal of Rice Science, 2002, 16(3): 211-215.)
- [10] 郭玉双,朱延明,李杰,等. 转双价抗真菌基因大豆主要农艺性状的调查与分析[J]. 东北农业大学学报,2008,39(1):10-12. (Guo Y S, Zhu Y M, Li J, et al. Investigation and analysis of the main agronomic traits of transgenic soybean with two anti-fungal protein genes [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(1):10-12.)