

转 *GmGT-2B* 基因大豆的耐盐性分析

李冬梅,周淑莉,李永光,张彬彬,李文滨

(东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:采用盆栽试验方法,苗期在盐胁迫条件下,比较 *GmGT-2B* 转基因大豆与非转基因大豆的损伤程度、超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)、脯氨酸和 K^+ 、 Na^+ 含量以及基因表达量变化差异。结果表明:盐胁迫对转基因大豆叶片的伤害程度明显低于对照;SOD 活性、脯氨酸含量、丙二醛(MDA)含量在盐胁迫 5 d 后均与对照有显著或极显著差异;植株的 Na^+ 含量随盐胁迫时间的增加而升高,在胁迫第 8 天转基因大豆的 Na^+ 含量达到对照约 2 倍;转基因大豆的基因的表达式呈上调趋势,在第 8 天达到表达高峰。基因表达量的变化趋势与生理指标 SOD 活性、脯氨酸含量和 Na^+ 含量表现的一致。结果表明 *GmGT-2B* 基因与盐应答反应有关,其中转 *GmGT-2B* 大豆株系 N11 和 N24 盐害程度较低,该基因和转 *GmGT-2B* 基因大豆具有较大的应用价值。

关键词:转 *GmGT-2B* 基因;抗旱大豆;SOD;MDA;脯氨酸

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.02.0213

Salt Tolerance Analysis of *GmGT-2B* Transgene Soybean

LI Dong-mei, ZHOU Shu-li, LI Yong-guang, ZHANG Bin-bin, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Agricultural Ministry's Northeast Areal Key Laboratory of Soybean Biology and Genetic Breeding, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Using potted experimental method, we treated the *GmGT-2B* transgene soybean and the control with 200 mmol · L⁻¹ salt stress in seedling stage, and then measured their damage degree, superoxide dismutase(SOD) activity, malondialdehyde(MDA), proline, K^+ , Na^+ content and the changes of gene expression. As a result, after treated with salt stress for 5 days, injury of leaves in transgenic soybean were lighter than the control under salt stress, and the SOD activity, proline content and malondialdehyde(MDA) levels were also significantly or extremely different; Na^+ content of soybeans increased as salt stress time increased, the N11, N24 of the Na^+ content reached twice of the control after 8 days under salt stress; *GmGT-2B* gene expression of N11, N22 and N24 were increased and arrived the peak in the 8 day. Gene expression and variation tendency were consistent with physiological indicators, which were SOD activity and proline and K^+ , Na^+ content. The result indicated that *GmGT-2B* gene was related to the responses of salt, the extent of injury of *GmGT-2B* transgene soybean were lower than the control with N11 and N24 salt stress, *GmGT-2B* gene and the transgene soybean both had a large breeding value.

Keywords: *GmGT-2B*; Drought soybean; SOD; MDA; Proline

土壤盐碱是影响植物生长、发育的重要环境限制因素,严重影响作物的产量和品质,培育抗旱、耐盐的大豆新品种,提高作物的抗逆境能力成为农业生产首要解决的问题^[1]。运用基因工程技术从基因水平上提高植物的抗旱、耐盐碱性,将抗旱、耐盐基因导入大豆获得抗旱、耐盐目的性状的同时,还要求保持转基因植株的应用价值^[2]。

Trihelix 转录因子家族是一个植物特有的小家族^[3]。Trihelix 转录因子的 DNA 结合域富含碱性、酸性氨基酸以及脯氨酸/谷氨酸,含 3 个 α -螺旋,呈螺旋-环-螺旋-环-螺旋构象。由于其识别的 DNA 基序称为 GT 元件,所以该家族又称为 GT 因子^[4]。GT 元件也参与植物病害防御,如:水稻的 *rm11*^[5],水稻中编码 GT-1 类型蛋白的 *Shattering1*

(*SHA1*) 基因^[8];大豆的 *SCaM-4* 基因的表达受病害和 NaCl 的诱导,部分的是由其启动子区的 GT-1 元件(GAAAAA)与 GT-1 类似蛋白的相互作用介导的^[6]。拟南芥中的 PETAL LOSS 是一个 GT-2 类的蛋白,它参与叶与花器官的正常发育^[7]。*GmGT-2A* 和 *GmGT-2B* 是从大豆中克隆出来的 Trihelix 转录因子,属于 GT-2 亚家族,它在大豆苗期受到干旱、盐胁迫等逆境,表达量升高,在拟南芥中过量表达可提高植物对干旱和盐胁迫的耐受性^[8]。李雁杰等^[9],从进口转基因大豆中克隆 *GmGT-2A* 基因,以植物表达载体 pBA002 为基础载体,构建了以抗草甘膦 *CP4-EPSPS* 基因为筛选标记基因,而后转化拟南芥,结果表明,过量表达 *GmGT-2A* 基因,能够提高植物的耐逆性。

收稿日期:2016-11-30
基金项目:抗逆转基因大豆新品种培育专项(2014ZX08004-002);黑龙江省教育厅一般项目(10531012)。
第一作者简介:李冬梅(1980-),女,硕士,实验师,主要从事大豆遗传转化、转基因检测等研究。E-mail:yy841026@163.com。
通讯作者:张彬彬(1977-),女,博士,副教授,主要从事大豆基因克隆、功能验证、转基因安全评价等研究。E-mail:bbzhang77@126.com。
李文滨(1958-),男,教授,博导,主要从事大豆生物技术研究。E-mail:wenbinli@yahoo.com。

电导率、SOD 活性,丙二醛、脯氨酸和 K^+ 、 Na^+ 含量这些指标均能在一定程度上反映植物对逆境胁迫的抗性水平。王启明等^[10]研究表明,盐胁迫后植物体内 SOD 活性升高,以此清除盐胁迫的活性氧自由基,进而减少对细胞的伤害。因此,SOD 活性可作为衡量大豆在胁迫下代谢反应的一个重要指标。在干旱和盐渍等逆境下,植物体内产生渗透调节功能的物质,使植物从外界继续吸收水分,脯氨酸是主要的渗透调节物质,在盐胁迫条件下,MDA 含量会逐渐增高,因此,MDA 和脯氨酸含量可作为衡量大豆代谢反应的指标^[10]。本研究测定 *GmGT-2B* 转基因大豆在盐胁迫条件下苗期的耐盐相关生理指标,评估其耐盐性,以期获得具有一定应用价值的耐盐大豆新种质,为筛选具有育种应用价值的材料奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试大豆为转 *GmGT-2B* 基因 T4 代大豆和受体大豆东农 50,由东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室提供,*GmGT-2B* 基因由发育生物学研究所陈受宜研究员惠赠。

1.2 试验设计

试验于 2015 年在东北农业大学转基因抗旱棚进行,选取 3 份转基因阳性植株的 T4 代植株为试验材料,非转基因东农 50 植株作为对照,每份材料分为 4 组,每组 3 个重复,种于盆钵(直径×高:22.5 cm×27.5 cm)中,每盆 1 株。以清水浇灌,待植株长出 3 片复叶,进行盐胁迫处理。氯化钠盐溶液为 200 mM,每天一次连续浇灌以上各组材料。盐胁迫后第 0,5,8 和 10 天采集叶片。

1.3 测定项目与方法

分别测定电导率、SOD 活性、MDA、脯氨酸和 K/Na 含量。测定相对电导率,计算叶片的伤害程度。电导率的测定:将叶片样品放入盛有 20 mL 纯水的三角瓶中,真空处理 10 min,测定叶片电导率(S_1)。然后将叶片放入沸水中处理 10 min,冷却至室温,再测定叶片电导率(S_2)。各样本进行 3 次重复。根据测定的电导率值计算叶片伤害程度(L): $L = S_1 / S_2 \times 100$ 。SOD 活性测定采用 NBT 比色法^[11];采用硫代巴比妥酸(TBA)比色法测定丙二醛(MDA)含量,参照 Gibon 等^[12]的方法;测脯氨酸含量参照 Troll 等^[13]的方法。

1.4 荧光定量 PCR 反应

荧光定量 PCR 使用 SYBR Green I Master Mix (2×),反应体系 10 μ L,上游引物为 5'-TCAGAATC-CCGAGCAAGTAAA-3',下游引物为 5'-AACCAC-TACCAGACCCAC-3',上下游引物各 1 μ L,模板

DNA 1 μ L,加灭菌超纯水至总体积 20 μ L。基因扩增反应程序:95℃,20 s;95℃,10 s;60℃,30 s,共 40 个循环。熔解曲线分析:95℃,15 s;60℃,60 s;每增加 1 个循环,退火温度增加 0.3℃,直至 95℃。

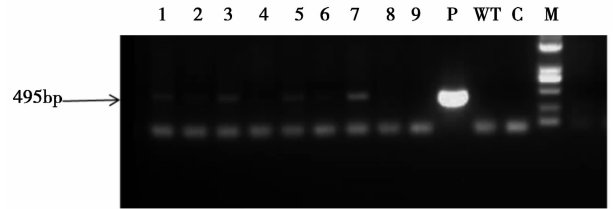
1.5 数据分析

数据处理方法采用 Excel 2003 软件进行原始数据计算,应用 DPS v 10.15 软件对数据平均值进行 5% 和 1% 水平差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 转 *GmGT-2B* 基因植株 PCR 鉴定

对获得的 T3 代转 *GmGT-2B* 基因株系 N11,N22 和 N24 进行 PCR 检测(图 1),结果为 PCR 阳性的植株用于盐胁迫试验。



1~9 为转 *GmGT-2B* 基因 T3 代植株;p 为 *GmGT-2B* 基因质粒;WT 为非转基因大豆;C 为水对照;M:2000Marker。
1-9: Turn *GmGT-2B* gene T3-generation plants; p: *GmGT-2B* gene plasmid; WT: Non-genetically modified soybeans; C: Water control; M: 2000Marker.

图 1 T3 代转基因株系 PCR 检测

Fig. 1 PCR detection of T3 transgenic lines

2.2 转 *GmGT-2B* 基因大豆盆栽盐胁迫效应

盐胁迫处理后,转 *GmGT-2B* 大豆株系仍然生长良好,N22 有轻微萎蔫的叶片。但在恢复浇水后能迅速恢复正常。相比较之下,野生型大豆东农 50 出现了比较严重的萎蔫现象,许多植株出现了不可逆的脱水萎蔫现象,甚至死亡(图 2)。转基因植株表现了很好的耐盐性。表明 *GmGT-2B* 基因可能与盐胁迫应答有关。

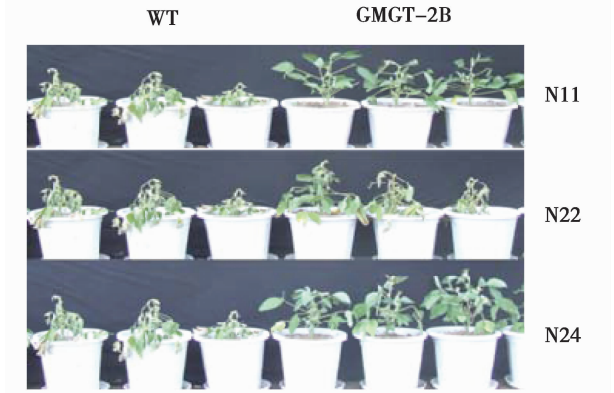
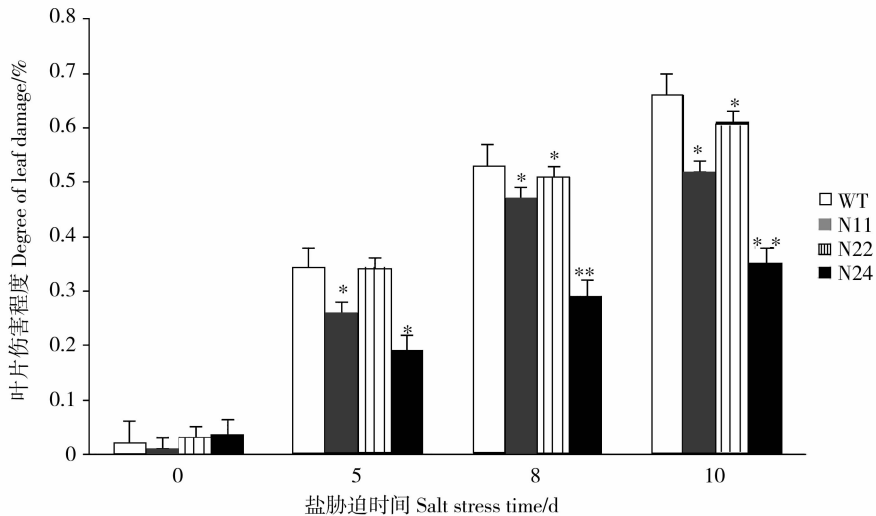


图 2 盐胁迫下转基因和野生型大豆表型差异
Fig. 2 Phenotypic differences of transgenic and wild-type soybean under salt stress

2.3 转 *GmGT-2B* 基因大豆生理指标测定

2.3.1 叶片伤害程度 由图 3 可知,盐胁迫后,转 *GmGT-2B* 基因大豆叶片的伤害程度明显低于野生型大豆东农 50,在盐胁迫 8 d 后,野生型大豆的叶

片伤害程度达到了转基因大豆的两倍。表明 *GmGT-2B* 基因对盐的应答反应能够减轻叶片伤害,提高抗盐性。



* 和 ** 分别表示在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平下差异显著。下同。
* and ** indicate significant difference in $P < 0.05$ and $P < 0.01$ levels, respectively. The same below.

图 3 盐胁迫下转基因和野生型大豆叶片伤害程度
Fig. 3 Degree transgenic and wild-type soybean leaves blade damage degree under salt stress

2.3.2 SOD 活性含量 如图 4 所示,在无盐胁迫下 WT 对照与转基因植株 SOD 活性相差不大,但盐胁迫后,转基因大豆 SOD 逐渐上升,WT 对照变化不大。在盐胁迫 8 d 后,转 *GmGT-2B* 基因大豆 N11、

N24 的 SOD 活性均显著或极显著高于对照。结果表明,在盐胁迫条件下,转基因大豆的细胞膜受到的氧化伤害较小,在一定程度上反映了细胞抗胁迫代谢过程。

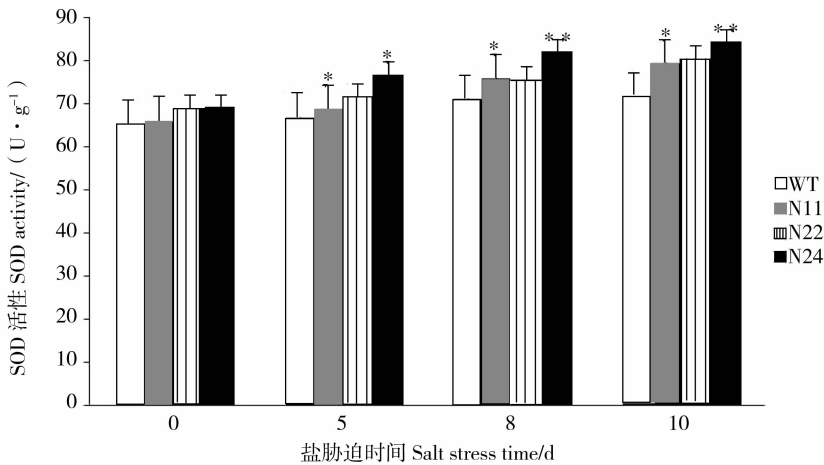


图 4 盐胁迫下转基因和野生型大豆 SOD 活性
Fig. 4 SOD activity in transgenic and wild-type soybean under salt stress

2.3.3 脯氨酸含量 被测植株体内的脯氨酸含量均随盐胁迫的时间的延长而升高,转基因植株的变化趋势较 WT 对照明显,在胁迫 5 d 后 N11 和 N24 的脯氨酸含量均显著或极显著高于对照,N22 的脯

氨酸含量与对照差异不显著(图 5)。说明 *GmGT-2B* 基因的表达促进了脯氨酸的积累,调节细胞渗透压和离子平衡,从而有效提高了转基因植物的耐盐性。

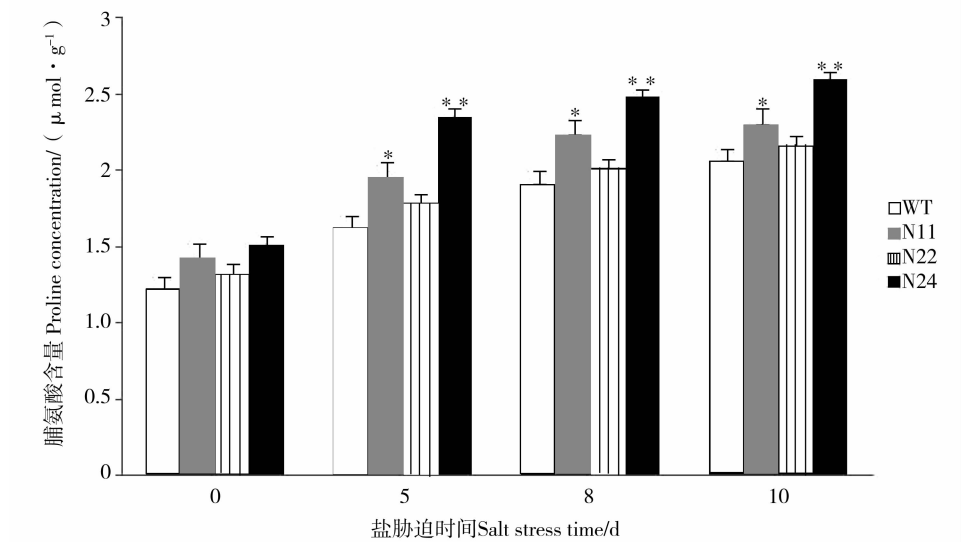


图5 盐胁迫下转基因和野生型大豆脯氨酸含量
Fig.5 Proline content in transgenic and wild-type soybean under salt stress

2.3.4 丙二醛(MDA)含量 如图6所示,植株的丙二醛(MDA)含量随盐胁迫时间的延长而降低。在盐胁迫8 d后,转 *GmGT-2B* 基因大豆 N11、N24 的

丙二醛(MDA)含量均显著或极显著低于对照。N22 的丙二醛(MDA)含量与对照差异不显著。

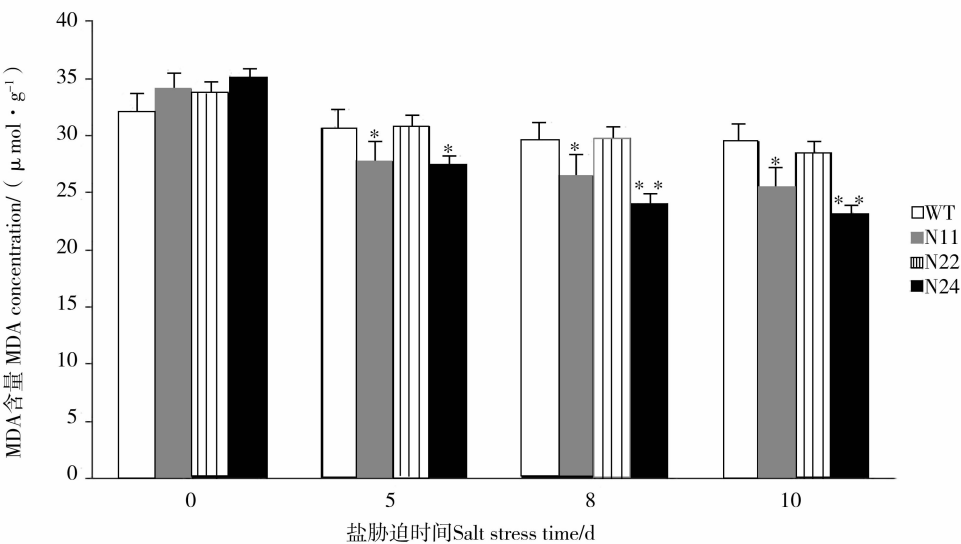


图6 盐胁迫下转基因和野生型大豆丙二醛含量
Fig.6 MDA content in transgenic and wild-type soybean under salt stress

2.3.5 Na^+ 含量 植株的 Na^+ 含量随盐胁迫的时间增加而升高,在胁迫8 d后 N11、N24 的 Na^+ 含量迅速增加,达到对照的2倍, Na^+ 含量均极显著高于对照, K^+ 含量随盐胁迫的时间增加而降低(图7)。说明在外界盐胁迫条件下,*GmGT-2B*能够在提高转基因大豆细胞内较高离子浓度的同时提高胞内 K^+/Na^+ 比值,进而有利于维持细胞的正常代谢过程,并提高大豆的耐盐性。

2.4 盐胁迫下转 *GmGT-2B* 基因相对表达量
如图8所示,随着盐胁迫时间的增长,WT 对照、N11、N22 和 N24 *GmGT-2B* 基因的表达量呈上调趋势,转基因株系的表达量明显高于对照,在盐胁迫第8天达到表达高峰,8 d后表达量趋于稳定。基因表达量的变化趋势与生理指标 SOD 活性、脯氨酸含量和 Na^+ 含量表现出一致的趋势。

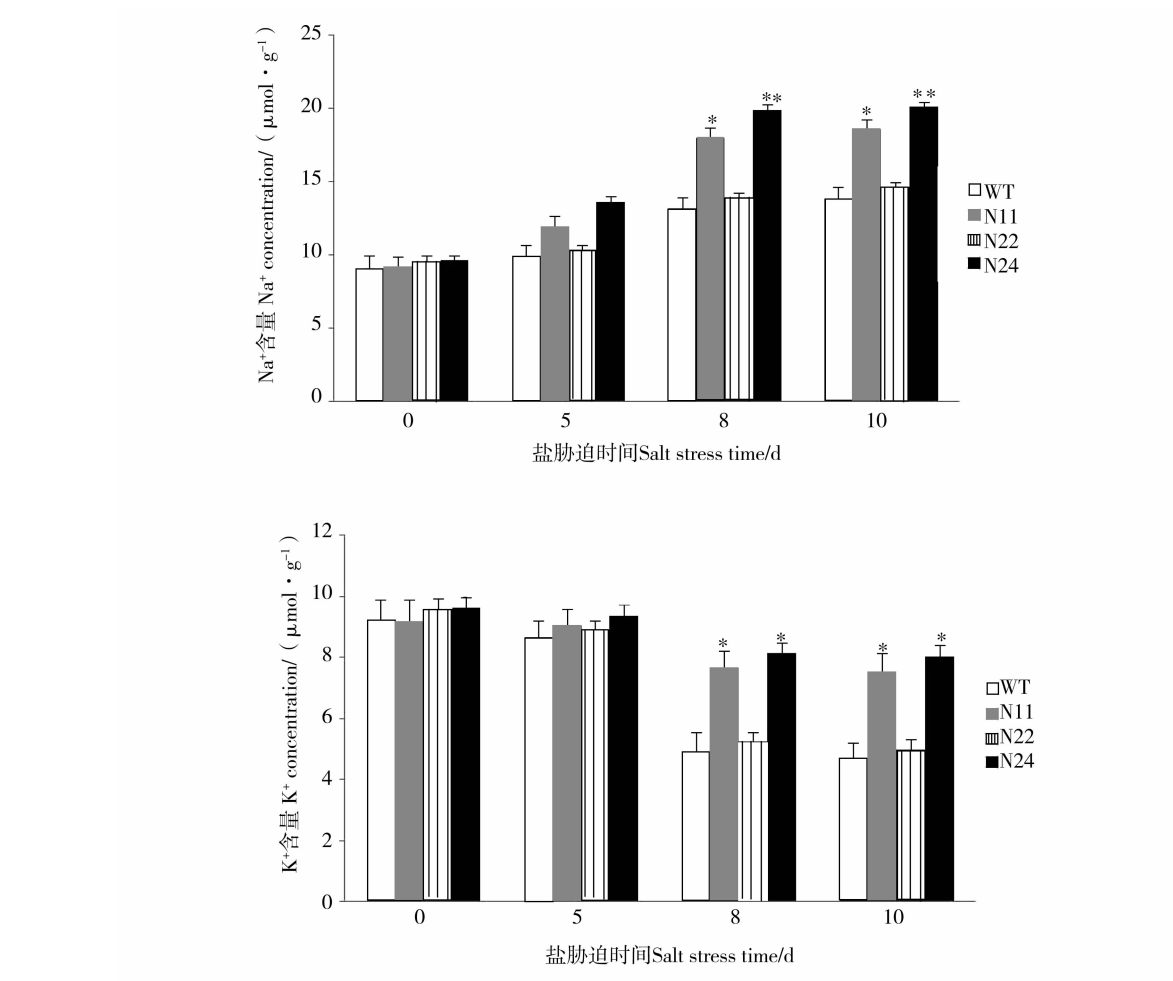


图 7 盐胁迫下转基因和野生型大豆 K⁺ 和 Na⁺ 离子含量

Fig. 7 K⁺ and Na⁺ content in transgenic and wild-type soybean under salt stress

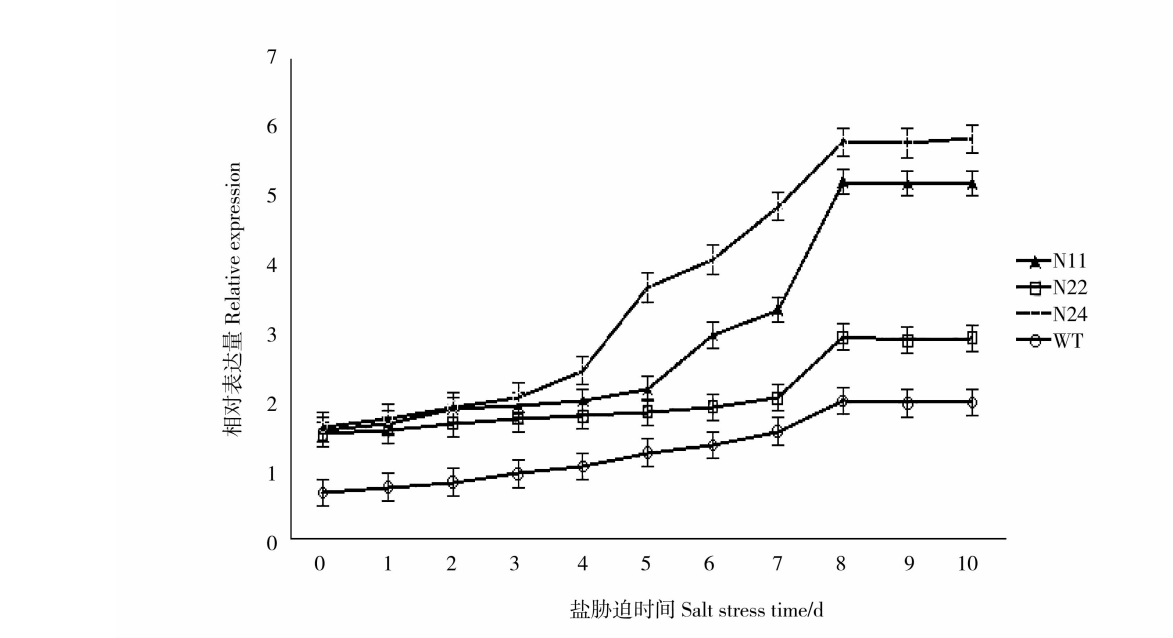


图 8 盐胁迫下转基因和野生型大豆 *GmGT-2B* 基因相对表达量

Fig. 8 *GmGT-2B* gene relative expression in transgenic and wild-type soybean under salt stress

3 结论与讨论

植物的抗逆性与逆境胁迫下膜伤害的程度有着密切的关系^[14]。Gadjev 等^[15]研究表明,通过测定外渗液电导率的变化,就能反应出质膜的伤害程度以及所测材料的抗逆性大小。本研究通过电导率的测定,计算叶片的伤害程度,结果野生型型大豆的叶片伤害程程度达到了转基因大豆的两倍。表明 *GmGT-2B* 基因对盐的应答反应能够减轻叶片伤害,提高抗盐性。

盐胁迫后转 *GmGT-2B* 基因大豆 N11、N24 的 SOD 活性均显著或极显著高于对照。表明在盐胁迫条件下,转基因的大豆膜受到的氧化伤害较小,在一定程度上反映了细胞抗胁迫代谢过程。这些试验结果与 Kasuga 等^[16]的研究结果一致。盐胁迫后转 *GmGT-2B* 基因大豆脯氨酸的含量显著高于对照,促进了脯氨酸的积累,调节细胞渗透压和离子平衡,从而有效提高了转基因植物的耐盐性。

细胞内的 K^+/Na^+ 对于植物进行正常的生命活动具有重要作用。因此,限制 Na^+ 从根部向地上部的转运是植物在高盐胁迫下维持植物叶片细胞最佳离子状态的有效途径之一。本研究测定 $200\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 盐胁迫处理的转基因大豆植株叶片的 K^+ 、 Na^+ 含量,结果显示转基因大豆的叶片内 Na^+ 含量高于野生型对照大豆植株并达到对照的 2 倍。说明, *GmGT-2B* 能够在提高转基因大豆细胞内较高离子浓度的同时提高胞内 K^+/Na^+ 比值,进而有利于维持细胞的正常代谢过程,并提高大豆的耐盐性。本研究中,盐胁迫后转基因大豆的 *GmGT-2B* 基因的表达量呈上调趋势,在第 8 天表达达到高峰。基因表达量的变化趋势与生理指标 SOD 活性、脯氨酸含量和 Na^+ 含量表现出一致的趋势,该表达规律可能与植物在耐盐过程中叶的生理功能相关,具体机制需要进一步研究。

参考文献

[1] 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, 39(3): 118-121. (Zhang S M, Liu L X, Liu Z Z. Research and breeding in rice salt[J]. Northern Rice, 2009, 39(3): 118-121.)

[2] 张冬梅, 魏迎春, 王菊花. 常规育种与生物技术相结合培育优良农作物新品种[J]. 西藏农业科技, 2003, 24(2): 36-38. (Zhang D M, Wei Y C, Wang J H. Conventional breeding and biotechnology to cultivate fine combination of new varieties of crops [J]. Journal of Agricultural Science and Technology, 2003, 24 (2): 36-38.)

[3] Li T X, Zhang Y, Zhang H X, et al. Stable expression of *Arabidopsis* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene *AtNHX1*, and salt tolerance in transgenic soybean for over six generations[J]. Chinese

Science Bulletin, 2010, 55(12): 1127-1134.

[4] Trieu A T, Burleigh S H. Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium* [J]. The Plant Journal, 2000, 22(6): 531-541.

[5] Liu H, Wang Q, Yu M, et al. Transgenic salt-tolerant sugar beet constitutively expressing an *Arabidopsis thaliana* vacuolar Na^+/H^+ antiporter gene, *AtNHX3*, accumulates moresoluble sugar butless salt in storage roots [J]. Plant Cell Environment, 2008, 31 (9): 1325-1334.

[6] Li M, Li Y, Li H Q, et al. Over expression of *AtNHX5* improves tolerance to both salt and drought stress in *Broussonetia papyrifera* (L.) Vent[J]. Tree Physiology, 2011, 31(3): 349-357.

[7] Shu ji Y, Francisco J, Beatriz C, et al. Differential expression and function of *Arabidopsis thaliana* $NHX\ Na^+/H^+$ antiporters in the salt stress response [J]. The Plant Journal, 2002, 30(5): 529-539.

[8] Xie Z M, Zou H F, Lei G, et al. Soybean trihelix transcription factors GmGT-2A and GmGT-2B improve plant tolerance to abiotic stresses in transgenic *Arabidopsis* [J]. PLoS One, 2009, 4 (9): e6898.

[9] Ji W, Zhu Y M, Li Y, et al. Over-expression of a glutathione S-transferase gene, *GsGST*, from wild soybean (*Glycine soja*) enhances drought and salt tolerance in transgenic tobacco[J]. Biotechnol Lett, 2010, 32: 1173-1179.

[9] 李雁杰, 朱丹华, 冯小锋, 等. 含抗草甘膦 *CP4-EPSPS* 基因和耐逆 Trihelix 类转录因子 GmGT-2A 基因的植物表达载体构建及转化验证 [J]. 浙江农业学报, 2015, 27(2): 133-140. (Li Y J, Zhu D H, Feng X F, et al. Construction and functional verification of a plant expression vector containing both herbicide resistant gene *CP4-EPSPS* and stress tolerance related transcription factor GmGT-2A[J]. Acta Agriculturae Zhejiangensis, 2015, 27 (2): 133-140.)

[10] 王启明. 干旱胁迫对大豆苗期叶片保护酶活性和膜脂过氧化作用的影响[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(4): 918-921. (Wang Q M. Drought stress on soybean seedling leaf protective enzyme activities and membrane lipid peroxidation influence[J]. Agro-Environment Science, 2006, 25(4): 918 -921.)

[11] Heath R L, Packer L. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1968, 125: 1892-1981.

[12] Gibon Y, Larher F. Cycling assay for nicotinamide adenine dinucleotides: NaCl precipitation and ethanol solubilization of the reduced tetrazolium [J]. Analytical Biochemistry, 1997, 251: 153-157.

[13] Troll W, Lindsley L. A photometric method for the determination of proline[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1955, 215 (2): 655-660.

[14] Wang C, Zhang D W, Wang Y C. A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39 (2): 1047-1053.

[15] Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev T S, et al. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2006, 141(2): 436-445.

[16] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance bygene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. Nature biotechnology, 1999, 17(3): 287-291.