

转 *TaNHX2* 基因大豆的抗旱性鉴定

张小明¹, 薛永国^{1,2}, 王 萍^{1,3}, 于希森¹, 王 珣⁴, 孟凡立¹

(1. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 信息中心, 黑龙江 哈尔滨 150086; 4. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:本研究利用转 *TaNHX2* 基因大豆 T₃ 代株系, 研究其在干旱胁迫情况下表型、生理特性、生物量与光合作用等方面的变化。结果表明: 随着干旱时间的不断延长, 对照表现出明显的萎蔫, 且转基因植株能够持续地保持绿色状态。转基因植株叶片中含水量高于对照, 但株系间叶绿素和可溶性糖含量差异不大, 转基因植株中的脯氨酸和丙二醛含量明显低于对照, SOD 的活性高于对照。综合评价表明转 *TaNHX2* 基因大豆 T₃ 代株系比对照具有更强的耐旱性。

关键词: 大豆; *TaNHX2*; 农杆菌介导法; 转基因; 耐旱性

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.04.0519

Identification of Drought Resistance to *TaNHX2* Transgenic Soybean

ZHANG Xiao-ming¹, XUE Yong-guo^{1,2}, WANG Ping^{1,3}, YU Xi-sen¹, WANG Xun⁴, MENG Fan-li¹

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China; 2. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 3. Information Center, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China; 4. Biotechnology Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, China)

Abstract: The *TaNHX2* transgenic soybean T₃ generation plants were used to study the phenotypic, physiological characteristics, photosynthesis, biomass and other changes under drought stress. The results showed that with the prolongation of drought time, the control was wilting, the transgenic plants kept green, and the water content in the leaves of the transgenic plants was higher than that of the control. However, there was no significant difference of chlorophyll content and soluble sugar in the transgenic plants. Proline and malondialdehyde content of transgenic plants were significantly lower than the control, SOD activity was higher than the control. The comprehensive evaluation showed that the transgenic soybean plants with *TaNHX2* gene had obvious drought tolerance compared with the control.

Keywords: Soybean; *TaNHX2*; Agrobacterium-mediated method; Transgenic; Drought tolerance

大豆(*Glycine max* L.)起源于中国,属于豆科、蝶形花亚科植物。大豆的种子中约含 40% 的蛋白质和 20% 的油分,大豆是重要的油料作物和经济作物,同时也是重要的工业原料和食品原料^[1]。我国的旱区面积占全国耕地面积的 1/3 以上,区域性干旱发生频率增加,干旱面积有进一步扩大的趋势^[2-4]。在大豆生产中,大豆品种的抗旱性亟待提高。因此,研究和克隆大豆中的耐旱基因,培育耐旱大豆,具有重要的意义。

植物 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白 NHX 家族是一类定位于细胞液泡膜或内囊体状结构上的植物盐胁迫应答相关蛋白^[5],利用 H⁺-ATPase 建立的跨膜质子梯度作为驱动力,驱动 Na⁺ 运出细胞或区域化在液泡内。特别是在高盐生境下, NHX 蛋白维持细胞

质 Na⁺ 稳态和 Na⁺/K⁺ 相对稳定,减少细胞质中细胞器受到 Na⁺ 毒害。同时,区隔化在液泡内的 Na⁺ 降低了细胞的渗透势,促使细胞从外界胁迫环境中吸水以维持渗透衡。因此, NHX 蛋白家族具有增强植物适应盐胁迫的功能^[6]。*TaNHX2* 是小麦的 Na⁺/H⁺ 逆向转运蛋白编码基因^[7], *TaNHX2* 在苜蓿^[8] 和大豆^[5] 中过表达均能提高转基因植株的耐盐性。近年来,越来越研究表明,过表达耐盐基因在提高转基因植株耐盐性的同时,还可以提高植物的抗旱能力。Zhang 等^[9] 将 *PtNDPK2* 转化杨树,转基因植物耐盐性和抗旱性都显著提高。Gao 等^[10] 将苦荞麦的转录因子 FtMYB9 转化拟南芥,同时提高了转基因拟南芥的耐盐和抗旱能力。

本研究利用转 *TaNHX2* 获得的稳定大豆 T₃ 代

收稿日期: 2016-02-06
基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31201229); 黑龙江省普通高等学校青年学术骨干支持计划(1253G008); 黑龙江省科技厅国际科技合作项目(WC05B10)。
第一作者简介: 张小明(1982-), 女, 硕士, 实验师, 主要从事作物栽培与育种研究。E-mail: xiaomingzhang1982@126.com。
通讯简介: 孟凡立(1978-), 女, 博士, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: mengfanli@neau.edu.cn。

株系,在干旱胁迫下研究其外观表型、生理特性、光合作用、生物量等方面的变化,以揭示转 *TaNHX2* 基因的抗旱性特点,为进一步培育选择转基因耐旱和耐盐大豆奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转 *TaNHX2* 基因 T_3 代 14 株系和受体品种东农 50,转基因株系采用农杆菌转化东农 50 子叶节方法获得,并自然自交授粉传代到 T_3 代,且每代都为 PCR 检测阳性植株。

1.2 试验方法

1.2.1 试验设计 将转 *TaNHX2* 基因 T_3 种子与非转基因的对照东农 50 种子,在抗旱棚进行播种,定量浇水,当苗长至第四复叶完全展开时(V4 期),选取长势一致的进行干旱胁迫试验,采取自然干旱方法,自然蒸发 21 d,让土壤含水量由饱和状态逐渐降低到 5% 以下,在干旱胁迫时期测定 15 cm 深的土壤含水量,保持各株系之间土壤含水量基本一致。抗旱处理鉴定方法采用北京地方标准 DB11T 720-2010。在此过程中观察植株表型变化,同时取材进行生理指标的测定。取材后复水,并计算存活率。土壤含水量测定仪器为 WET1 型土壤三参数仪。

1.2.2 目的基因的 PCR 检测 提取转基因株系叶

片的 DNA 进行 PCR 检测。采用预变性 94℃ 5 min,变性 94℃ 30 s,退火 58℃,延伸 72℃ 30 s,30 个循环,循环结束后,再 72℃ 7min 延伸。

1.2.3 测定项目与方法 叶片相对含水量、电导率、叶面积均用常规方法^[11]的测定。叶绿素和光合指标的测定采用 SPAD-502 型叶绿素含量测定仪和便携式光合系统测定仪 LI-6400 测定。脯氨酸、丙二醛超氧化物歧化酶(SOD)、活性氧化物酶(POD)活性、可溶性糖按照 TBA 显色^[12]方法测定。

生物量测定:取地上部分,冲洗干净后置于烘箱,110℃ 杀青,90℃ 烘干至恒重,称取重量 W1。取地下部分小心冲洗,用细纱网滤过细小的须根,110℃ 杀青,90℃ 烘干至恒重,称取重量 W2。并计算总干重 W^[13]。

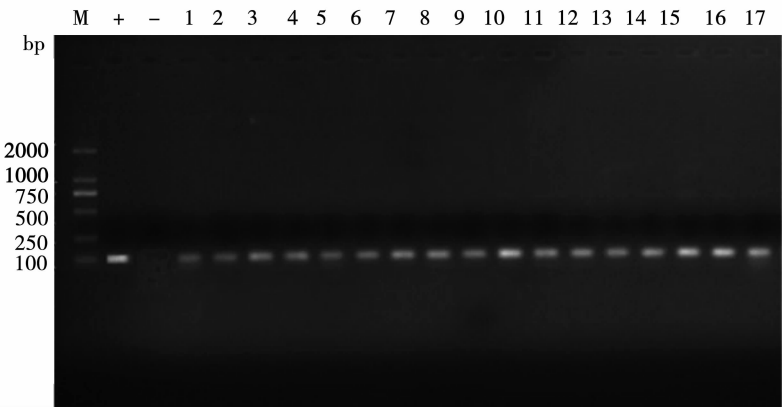
1.3 数据分析

采用 SPSS 18.0 和 Excel 2007 进行数据比较和趋势图划分,并进行分析。

2 结果与分析

2.1 转基因植物的 PCR 鉴定

以含目的基因的质粒为阳性对照,水为阴性对照, T_3 代 17 个株系目的片段的 PCR 鉴定结果均为阳性(图 1)。



M: DL2000 marker; +: 阳性对照质粒; -: 阴性对照东农 50; 1 ~ 17: T_3 代转 *TaNHX2* 基因植株。

M: DL2000 marker; +: Positive plasmid (positive control); -: Untransformed plant Dongnon 50 (negative control); 1 - 17: PCR analysis of *TaNHX2* in transgenic plants.

图 1 转基因材料中 *TaNHX2* 基因片段检测

Fig. 1 Transgenic soybean plants detected by PCR analysis of *TaNHX2*

2.2 表型性状比较

在干旱胁迫的过程中, *TaNHX2* 后代植株抗旱效果较好,存活率高。如图 2 所示,前 7 d *TaNHX2* 转基因后代与对照之间均无明显差异。随着干旱

时间的延长,对照植株生长明显减慢,表现出矮化。干旱 15 d 后,转基因后代均长势良好,株高(17.6 cm)明显高于对照(12.3 cm),同时对照叶片出现枯黄、萎蔫。当干旱持续至 21 d 时,转基因植株也相

继出现叶片萎焉的现象,萎焉现象相对较低,而对对照植株则出现叶片严重干枯甚至死亡。干旱胁迫结束后进行复水, *TaNHX2* 后代植株的存活率为 76.7%,对照存活率为 11.8%;从表型上看 *TaNHX2*

后代植株抗旱效果较好,存活率高。通过对根系的观察发现:转基因后代与对照相比有明显发达的根系,主要表现为主根长,侧根多(图 3)。

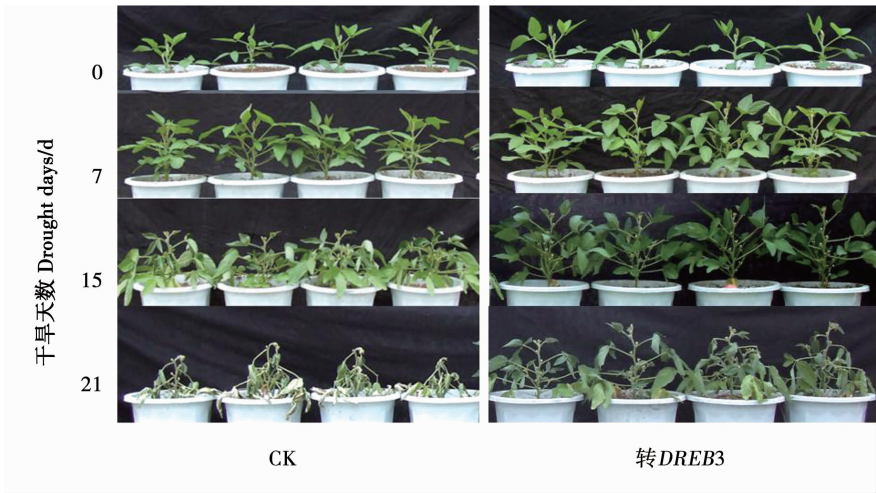


图 2 干旱胁迫后表型比较
Fig. 2 Phenotype characters comparison after drought stress



图 3 干旱胁迫后根的比较
Fig. 3 Root comparison after drought stress

2.3 叶片含水量、持水力和叶绿素含量的比较

在干旱胁迫过程中伴随着干旱时间的不断延长,叶片中的含水量持续下降。对照植株的叶片含水量由胁迫前的 60% 降至 18.6%。转入 *TaNHX2* 基因植株的叶片含水量由胁迫前的 61.73% 降至 30.89%;同时,在胁迫过程中,转基因植株叶片含水量水平平均高于对照。在干旱 21 d 时,转基因植株叶片的含水量约是对照的 1.5 倍。这说明转基因植株对干旱的耐受力高于对照。

持水力是评定植物耐旱性的一个至关重要的指标,通过此指标也能反映大豆品种的耐旱性。本研究结果表明,随着干旱的持续,叶片的持水力不断下降。当干旱胁迫 21 d 时,由于对照叶片严重萎焉,几乎已经丧失了持水能力。虽然转基因植株叶片的持水力也在胁迫过程中大幅度下降,但在胁迫全程,转基因植株叶片的持水力均高于对照。

转基因植株和对照叶绿素含量无论是在正常

条件下还是干旱条件下,都随着苗的生长呈现上升趋势(图 4)。干旱胁迫时叶绿素含量比正常条件下有所降低,说明水分对大豆叶绿素含量是有影响的。但转基因和对照之间的叶绿素含量均处于平均水平,差异不明显。

2.4 生理性状比较

2.4.1 脯氨酸和可溶性糖 脯氨酸和可溶性糖作为有机渗透调节物质,可以防止原生质的水分散失,增加渗透压,同时可以增强蛋白质的水合作用。在干旱胁迫过程中,脯氨酸随着干旱程度的加大,呈不断积累的趋势,其中干旱胁迫前 10 d 增长缓慢。在干旱胁迫全程,转 *TaNHX2* 基因植株的脯氨酸含量始终高于对照。可溶性糖含量在干旱胁迫过程中呈现逐渐上升趋势,且转基因后代植株与对照株系间差异不大,直到干旱胁迫 15 d,转 *TaNHX2* 基因植株的可溶性糖含量才明显高于对照(图 5)。

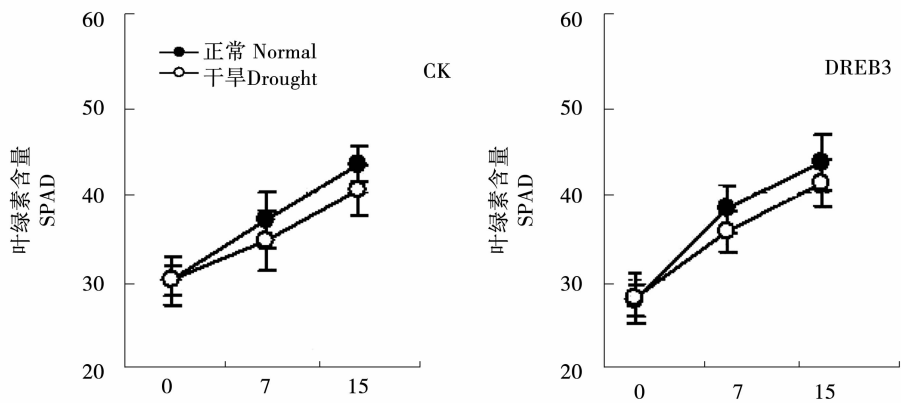


图 4 叶绿素含量比较
Fig. 4 Comparison on chlorophyll content

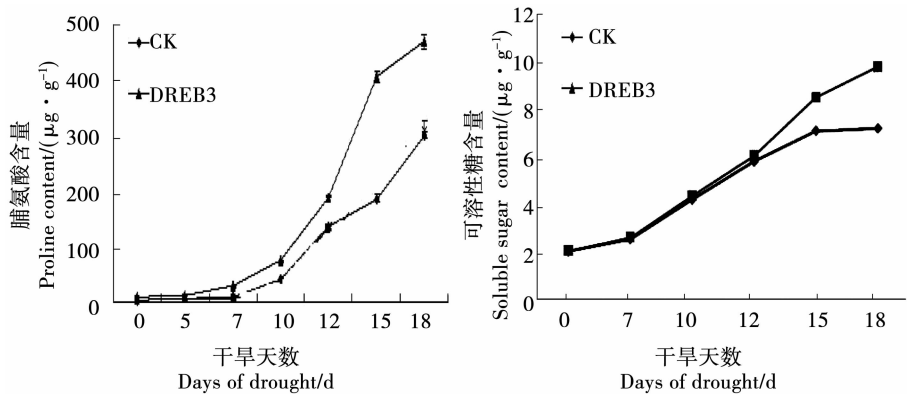


图 5 干旱胁迫下脯氨酸和可溶性糖含量比较

Fig. 5 Comparison on praline content and soluble sugar in drought stress

2.4.2 超氧化物歧化酶(SOD)活性 干旱使植株中的 SOD 活性升高。如图 6 所示,在干旱胁迫过程中,各株系的 SOD 活性变化趋势是相同的,均是在胁迫前 15 d 上升缓慢,15 d 后出现快速上升。在干旱胁迫的前 10 d,各株系间的 SOD 活性差异不大。随着干旱的持续,转基因植株的 SOD 活性明显高于对照。

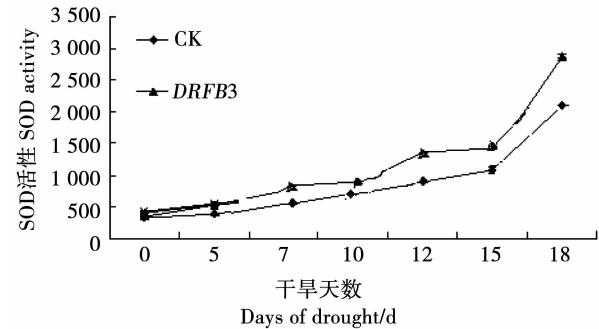


图 6 干旱胁迫下 SOD 活性比较

Fig. 6 Comparison on SOD activity in drought stress

2.4.3 过氧化物酶(POD)活性 在干旱胁迫条件下,叶片的 POD 活性均高于对照。随着干旱时间的延长,酶活性呈逐渐上升趋势。转基因株系和对照 POD 活性在干旱胁迫前 5 d 上升很慢;对照植株在

第 5 至第 10 天,POD 活性增加较快,随后在平稳后略有上升;TaNHX2 后代的 POD 活性在胁迫过程中呈现上升—平稳—上升的趋势,在干旱胁迫 18 d 时,POD 活性明显高于对照(图 7)。

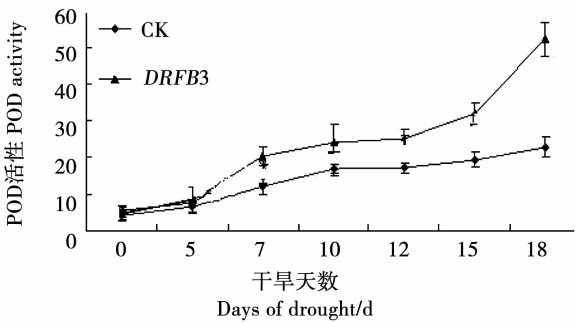


图 7 干旱胁迫 POD 活性

Fig. 7 Activity of POD in drought stress

2.4.4 丙二醛含量 丙二醛是膜脂过氧化的产物,含量的 高低可以反映叶片膜脂被氧化的程度。在干旱胁迫过程中,丙二醛含量随干旱时间延长而增加(图 8)。在干旱前 10 d,转基因株系的丙二醛含量与对照处于同一水平。随后,对照植株的丙二醛含量上升迅速,其含量明显高于转基因株系。

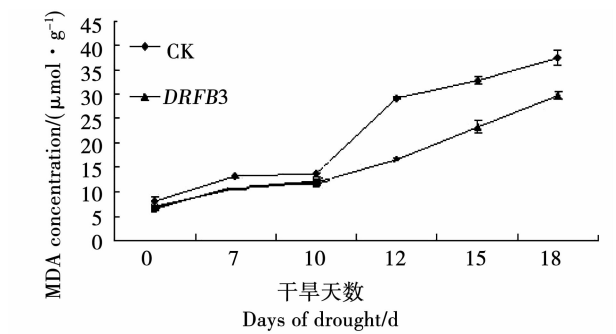


图 8 干旱胁迫下丙二醛含量比较

Fig. 8 Comparison on praline content in drought stress

2.5 干物质

由表 1 可知,转 *TaNHX2* 基因后代地上、地下干物质积累都明显多于对照植株。说明转 *TaNHX2* 基因植株可以在干旱条件下积累更多的干物质,有利于植株抗旱。

表 1 干旱胁迫下的生物量比较

Table 1 Comparison on biomass in drought stress			
品种	地上干物重	地下干物重	总干物重
Cultivar	Dry matter weight of shoot	Dry weight of root	Total dry matter weight
CK	17.73 ± 1.78	1.44 ± 0.38	19.17 ± 1.82
TaNHX2	21.03 ± 3.15	4.07 ± 1.01	25.10 ± 3.38

3 结论与讨论

叶片作为植物光合作用与水分蒸腾的重要器官,对环境因子的变化非常敏感,因此植物受到逆境伤害后,最先有的症状表现的部位就是叶片。一般情况下,植物受到逆境伤害后会表现出叶片萎蔫、枯黄等现象。除了叶片伤害度、叶片相对含水量等可以作为判断植株受伤害程度的指标,植物叶片持水力也是植物耐旱性的一个重要指标^[14]。本研究的结果表明,在干旱胁迫过程中,转基因品种叶片的持水力明显高于对照,有着较强的抗旱能力。而干旱处理结束复水后,76.7%转基因株系逐渐恢复,说明不同的转基因品种间叶片持水力存在差异,这与前人耐旱性不同的植物其持水力也存在差异的研究结果^[15]一致。

在地下,根系作为植株吸收水分的重要器官。干旱胁迫状况下根系的吸水能力在很大程度上取决于根系对胁迫的适应性生长调节的变化能力^[16-18],因此,通过对根系的比较也可以判断植物的抗逆性。干旱条件下大豆根系有较地上部分优先发展的倾向。本研究中关于逆境胁迫后的根系形态的结果也证明了这一点,即抗逆性强的品中具有较发达的根系。

渗透调节是植物低水势抗旱的一种重要方式。在本研究中,逆境使大豆的渗透调节物质含量增加。本研究中转基因株系与对照中脯氨酸含量差异相对比较明显,而可溶性糖含量的差异相对较小,脯氨酸作为抗逆指标可能更合适,但是也有研究认为脯氨酸的积累是植物受到伤害的结果,不宜作为抗性筛选的指标^[19-20]。另外,关于脯氨酸的表现也一直存在争议。SOD 和 POD 与植物抗逆性之间有着密切的关系。在本研究中,干旱胁迫条件下,转基因株系中 SOD 和 POD 活性明显高于对照,这与前人的研究一致^[21-23]。

丙二醛是膜脂氧化的最终分解产物之一,其含量的高低可以作为膜脂氧化的指标。在本研究中,转入抗逆基因的大豆品种在经历逆境的过程中,膜脂过氧化水平明显低于对照,丙二醛含量较低,与前人^[21-22]的研究结果相同。

参考文献

[1] 王萍,高世庆,郭永来,等. 利用农杆菌介导将抗逆相关基因 GmDREB 导入大豆的研究[J]. 大豆科学,2008,27(1):47-51. (Wang P, Gao S Q, Guo Y L, et al. Transformation of stress resistance related gene *GmDREB* into soybean via *Agrobacterium*-mediation[J]. Soybean Science, 2008,27(1):47-51.)

[2] 李世奎. 试论旱区的干旱及其防御[J]. 干旱区资源与环境, 1987(1):6-15. (Li S K. A trial discussion on the drought and its prevention in the arid region [J]. Journal of Arid Land Resources and Environment[J]. 1987(1):6-15.)

[3] 王维,吴超,刘梅,等. 转中国对虾抗菌肽基因水稻抗白叶枯病效应初析[J]. 中国水稻科学,2010,24(4):335-340. (Wang W, Wu C, Liu M. Resistance of antimicrobial peptide genes transgenic rice to bacterial blight[J]. Chinese Journal Rice Science, 2010, 24(4): 335-340.)

[4] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 287-291.

[5] 林抗雪,刘修杰,孙石,等. 转 *TaNHX2* 大豆的耐盐性分析[J]. 中国农业科学,2015,48(20):3998-4007. (Lin K X, Liu X J, Sun S H, et al. Salt tolerance analysis of *TaNHX2* over-expression transgenic soybean [J]. Scientia Agricultura Sinica, 2015,48(20):3998-4007.)

[6] 张丽君,程林梅,杜建中,等. 导入 *TaNHX2* 基因提高了转基因普那菊苣的耐盐性[J]. 生态学报,2011, 31(18): 5264-5272. (Zhang L J, Cheng L M, Du J Z, et al. Introduction of *TaNHX2* gene enhanced salt tolerance of transgenic puna chicory plants[J]. Acta Ecologica Sinica, 2011, 31(18):5264-5272.)

[7] Wang Z N, Zhang J S, Guo B H, et al. Cloning and characterization of the Na⁺/H⁺ antiport genes from triticum aestivum[J]. Acta Botanica Sinica, 2002, 44(10): 1203-1208.

[8] Zhang Y M, Zhang H M, Liu Z H, et al. Thewheat NHX antiporter gene *TaNHX2* confers salt tolerance intraspecific alfalfa by in-

creasing the retention capacity of intracellularpotassium[J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(3): 317-327.

[9] Zhang J, Movahedi A, Sang M, et al. Functional analyses of *NDPK2* in *Populus trichocarpa* and overexpression of *PtNDPK2* enhances growth and tolerance to abiotic stresses in transgenic poplar [J]. Plant Physiology Biochemical, 2017, 117:61-74.

[10] Gao F, Zhou J, Deng R Y, et al. Overexpression of a tartary buckwheat R2R3-MYB transcription factor gene, *FtMYB9*, enhances tolerance to drought and salt stresses in transgenic *Arabidopsis*[J]. Journal of Plant Physiology, 2017, 214: 81-90.

[11] 王兴宇,魏峡,王伟威,等. 转 *AtCBF4* 基因大豆株系的抗旱性评价[J]. 大豆科学,2014,33(3):365-369. (Wang X Y, Wei L, Wang W, et al. Drought resistance evaluation of *AtCBF4* transgenic soybean[J]. Soybean Science, 2014,33(3):365-369.)

[12] 吴广锡,刘丽君,杨德光,等. 转 *Gm Hs FA1* 基因大豆的耐热性评价[J]. 大豆科学,2012,31(3):341-346. (Wu G X, Liu L J, Yang D G, et al. Heat resistance evaluation of *GmHsFA1* [J]. Soybean Science, 2012, 31(3):341-346.)

[13] 晁毛妮,郝德荣,印志同,等. 大豆生物量与产量组分间的相关及关联分析[J]. 作物学报,2014,40(1):7-16. (Zhao M N, Hao D R, Yin Z T, et al. Correlation and association analysis between biomass and yield components in soybean [J]. Crop Science, 2014,40(1):7-16.)

[14] 买买提依明,殷工,徐立,等. 新疆沙漠桑树品种持水力研究初报[J]. 蚕学通讯,2007(4):1-4. (Mai M T Y M, Yin G, Xu L, et al. A preliminary study of water-retaining capability of desert mulberry in Xinjiang[J]. Newsletter of Sericultural Science, 2007 (4): 1-4.)

[15] 何明珠,王辉,陈智平. 荒漠植物持水力研究[J]. 中国沙漠, 2006, 26(3): 403-408. (He M Z, Wang H, Chen Z P. Water-retaining capability of desert plants [J]. Journal of Desert Research, 2006, 26(3): 403-408.)

[16] 王敏,杨万明,杜维俊. 苗期大豆根系及地上部性状与耐旱性的关系[J]. 大豆科学, 2012, 31(3): 399-405. (Wang M, Yang W M, Du W J. Root and aboveground characteristics at seedling and their relationship with drought tolerance in soybean [J]. Soybean Science, 2012,31(3):399-405.)

[17] 刘莹,盖钧镒,吕慧能,等. 大豆耐旱种质鉴定和相关根系性状的遗传与 QTL 定位[J]. 遗传学报,2005(8):855-863. (Liu Y, Gai J Y, Lyu H N, et al. Identification of drought tolerant germplasm and inheritance and QTL mapping of related root traits in soybean[*Glycine max*(L.) Merr.] [J]. Acta Gentica Sinica, 2005(8):855-863.)

[18] 朱维琴,吴良欢,陶勤南. 作物根系对干旱胁迫逆境的适应性研究进展[J]. 土壤与环境,2002(4):430-433. (Zhu W Q, Wu L H, Tao Q N. Advances in the studies on crop root against drought stress[J]. Soil and Environmental Sciences, 2002(4): 430-433.)

[19] Moftah A E, Michel B E. The effect of sodium chloride on solute potential and proline accumulation in soybean leaves[J]. Physiology Plant,1987,83:238-240.

[20] 刘娥娥,宗会,郭振飞,等. 干旱、盐和低温胁迫对水稻幼苗脯氨酸含量的影响[J]. 热带亚热带植物学报,2000,8(3):235-238. (Liu E E, Zong H, Guo Z F, et al. Effects of drought, salt and chilling stresses on proline accumulation in shoot of rice seedlings[J]. Journal for Tropical and Subtropical Botany, 2000,8 (3):235-238.)

[21] 秦迪,赵翠兰,郑成忠,等. 转 *BADH* 基因大豆耐旱性分析[J]. 中国油料作物学报,2015,37(6):752-758. (Qin D,Zhao C L, Zheng C Z, et al. Drought tolerance of transgenic soybean with *BADH* gene[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2015,37 (6):752-758.)

[22] 魏峡,吴广锡,唐晓飞,等. 过表达 *GmHSFA1* 大豆在干旱条件下对高温的响应[J]. 大豆科学,2016,35(2):257-261. (Wei L. Wu G X, Tang X F, et al. Soybean responses to high temperatures under drought stress in the presence of an over-expressed *GmHSFA1* Gene[J]. Soybean Science,2016,35(2):257-261.)

[23] 于志晶,尚丽霞,蔡勤安,等. 水稻热激蛋白基因 *HSP90* 转化大豆的研究[J]. 大豆科学,2016,35(2):222-227. (Yu Z J, Shang L X, Cai Q An, et al. Transformation of heat shock protein Gene *HSP90* of rice into soybean[J], Soybean Science,2016,35 (2):222-227.)