

转甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因小麦的耐盐耐旱性

张艳敏¹, 郭北海¹, 蒋春志¹, 温之雨¹, 董生¹, 李辉¹,
李洪杰¹, 何锬洁², 陈受宜², 朱至清³

(1 河北省农林科学院粮油作物研究所, 河北 石家庄 050031; 2 中国科学院
遗传发育研究所, 北京 100101; 3 中国科学院植物所, 北京 100091)

摘要: 采用室内模拟盐、旱胁迫, 结合田间实际测定的方法, 对基因枪法获得的转 BADH 基因小麦多个株系的不同世代材料进行了耐盐、耐旱性鉴定。结果表明, 在旱、盐胁迫条件下, 转 BADH 基因小麦在种子萌发、幼苗生长、根系发育以及质膜保护等方面均比受体品种(对照)具有明显的优势; 在田间生长条件下的转基因株系, 其叶片蒸腾强度比对照明显降低, 而离体叶片失水速率与对照没有明显差别。

关键词: 小麦; 转基因; BADH; 耐盐性; 耐旱性

中图分类号: S512.101 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)01-0029-04

Salt and Drought Stress Tolerance in Transgenic Wheat Expressing Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene

ZHANG Yan-min¹, GUO Bei-hai¹, JIANG Chun-zhi¹, WEN Zhi-yu¹, DING Zhan-sheng¹,
LI Hui¹, LI Hong-jie¹, HE Si-jie², CHEN Shou-yi², ZHU Zhi-qing³

(1. Institute of Food and Oil Crops Research, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050031;
2. Institute of Genetic and Developmental Biology Sciences, Chinese Academy of Science, Beijing 100101;
3. Institute of Botany, Chinese Academy of Science, Beijing 100091)

Abstract: Assay for salt tolerance and drought resistance of transgenic wheat expressing betaine aldehyde dehydrogenase, obtained through particle gun method, were conducted under simulated salt/drought stress condition. The results indicated that the transgenic wheat has many obvious advantages over its donor plants, such as the greater germinating ability under osmotic stress up to -0.3 Mpa, the more vigorous development of seedlings, especially the well developed roots under drought stress condition, as well as the improved plasma membrane protection of excised leaf and the lower transpiration rate under field condition. But the water loss rate for excised leaf was not obviously different from its donor control plants.

Key words: Wheat; Transgenic; Transgenic wheat; BADH; Drought Resistance; Salt Tolerance

在我国北方小麦主产区, 干旱和盐碱等逆境是小麦生产面临的最严重问题, 提高小麦耐盐、耐旱性是小麦遗传改良最重要的目标之一。由于缺乏具有突破性的种质资源, 采用常规育种方法来提高小麦品种耐盐、耐旱性效率较低。采用基因工程的方法, 向植物中导入与渗透调节相关的调控基因或功能基因以改进植物耐盐、耐旱性, 是当前国内外正在探索

的一条新途径, 并且取得了较大进展。

甜菜碱是植物体内非常重要的渗透调节化合物。其生物合成是由胆碱经两步脱氢氧化来完成, 其中第二步是在甜菜碱醛脱氢酶的催化下将甜菜碱醛转化为甜菜碱。目前已清楚 BADH 由单一核基因编码, 从菠菜^[1]、甜菜^[2]、山菠菜^[3]、大麦^[4]、高粱^[5]等多种植物和微生物中克隆到 BADH 基因, 其中许多

收稿日期: 2002-11-05

基金项目: 国家 863 计划(2001AA212121-3); 植物转基因及其产业化专项资助课题(J99-B-010)

作者简介: 张艳敏(1963-), 女, 河北盐山人, 副研究员, 硕士, 主要从事组织培养及细胞工程育种工作, 郭北海同志为通讯作者。

BADH 基因已被导入烟草, 获得了 BADH 酶活性及耐盐性显著提高的转基因植株^[6]。郭岩等^[7]将山菠菜的 BADH 基因导入水稻, 得到了能耐 0.5% NaCl 的转基因株系, 已获准环境释放, 郭北海等^[8]则将该 BADH 基因成功地导入小麦, 获得外源 BADH 基因高效表达的转基因小麦。本文研究分析了山菠菜 BADH 基因导入小麦后不同世代株系的耐盐、耐旱性, 以期探讨基因工程在小麦耐盐、耐旱品种选育中的应用前景。

1 材料和方法

1.1 供试材料

转基因植株的受体品种为石 90-4185 和冀 885-443, 这两个品种均为农艺性状优良的推广品种, 特别是石 90-4185, 在品种区试中连续多年作为对照品种。转化所用质粒 pABH9(携带山菠菜 BADH 和 bar 基因, 均由玉米 Ubiquitin1 启动子控制) 由中国科学院遗传发育所构建。供试的转基因株系通过基因枪转化获得^[8], 且经 PCR 检测和 Southern 杂交分析等证明为成功的转 BADH 基因植株后代。

1.2 耐盐、耐旱性鉴定

1.2.1 受体品种的耐盐性鉴定 室内盆栽, 每盆装土壤基质 300 g, 土壤含盐量分别为 0, 0.1%, 0.2%, 0.3% 和 0.4%。品种为石 90-4185 和冀 885-443。调查出苗情况及幼苗发育状况, 确定受体亲本的耐盐性及评价转基因植株的盐浓度阈值。

1.2.2 转基因植株的耐盐性鉴定 供试材料为石 90-4185(对照) 及其转 BADH 基因后代株系, 在室内用发芽皿模拟盐胁迫, 采用砂培方法(砂土比为 1:1) 测定 0.4% 盐浓度下转 BADH 小麦在种子萌发、幼苗及根系发育、叶片电导率等。

1.2.3 转基因植株的耐旱性鉴定 供试材料为石 90-4185(对照) 及其转 BADH 基因后代株系。设有两组试验: 一组选取大小一致、健康饱满的种子 50 粒, 经 70% 酒精消毒 1min 后, 用蒸馏水浸泡过夜, 使种子处于萌动露白状态, 然后摆放到铺有 4 层滤纸的发芽皿内, 每皿浇 5 mL 不同浓度的 PEG-6000 溶液(0, 10%, 18%), 重复 3 次, 7 d 后调查种子发芽和幼苗生长发育情况。另一组不经浸种吸胀, 直接将选取的种子无菌状态下接种在 1/2MS 固体培养基上, 培养基中 PEG-6000 的浓度分别为 0, 5%, 10%, 15%, 20% 和 25%。每品种接种 10 瓶, 每瓶 10 粒, 14 d 后调查种子萌发率。

1.3 田间条件下转基因植株的部分生理特性分析

供试材料为石 90-4185、冀 885-443 及其转 BADH 基因后代株系。于子粒灌浆期测定旗叶的气孔密度、蒸腾强度、离体叶片失水速率。气孔密度采用印记法, 蒸腾强度利用便携式田间蒸腾仪测定, 离体叶片失水速率参照贾秀玲等方法^[1]。

2 结果与分析

2.1 受体亲本的耐盐性

在 0~0.3% NaCl 范围内, 土壤盐浓度每增加一个梯度(0.1%), 石 90-4185 和冀 885-443 出苗期推迟 1~2 d, 而且出苗整齐性变差, 持续时间延长, 幼苗素质变弱, 但不同盐浓度间出苗率没有明显差异, 两个品种趋势一致。土壤含盐量达到 0.4% 时, 石 90-4185 不能萌发出土, 冀 885-443 也只有 50% 的出苗率。因此, 0.4% 土壤盐浓度可以作为苗期鉴定转化植株耐盐性的指标。幼苗出土后, 根据土壤墒情每 14 d 浇 1 次盐水, 使土壤盐浓度逐渐增加, 石 90-4185 和冀 885-443 的各处理均在土壤含盐量达到 1.2% 时出现死苗现象, 1.6% 时死苗率达 100%。

2.2 转基因植株的耐盐性

抗 PPT 愈伤组织分化后, 将部分转基因再生植株(T₀) 转到含盐(0.7% NaCl) 培养基上观察其抗盐性。结果多数再生植株的幼苗生长较为正常, 根系生长健壮, 色泽白嫩, 根数较多, 表现出较强的抗盐性; 但也有部分转基因植株与受体品种表现一样, 根系生长异常, 根系发黑, 根数较少, 根的生长速度相对较慢。结果表明, 本研究中外源 BADH 基因在转化当代可以正常表达, 并在一定程度上提高了转基因植株的耐盐性。并且, 石 90-4185 和冀 885-443 的转基因植株表现一致。

T₂ 以石 90-4185 及其转 BADH 基因后代株系为材料, 在发芽皿内采用砂培方法(砂: 土为 1:1) 模拟盐胁迫, 测定 0.4% 盐浓度下转 BADH 基因小麦的种子萌发、幼苗及根系发育、叶片电导率等。结果表明, 上述指标在不同株系或同一株系的不同株内均存在不同程度的差异, 据此, 鉴定出一些耐盐性较好的植株, 这一结果说明获得的转基因植株在耐盐性上还存在性状分离或者外源 BADH 基因表达不稳定现象, 有必要进行进一步的选择, 以确保耐盐性(耐旱性) 的稳定表达。

在砂培土壤含盐率达到 0.4% 的情况下, 对照石 90-4185 没有萌发出苗, 而转基因植株的后代都

能够萌发出苗, 出苗率达到 8.6% 19.5%。出苗后 7 d, 测定了苗高、鞘长等(表 1)。

表 1 0.4% 盐胁迫下转 BADH 基因植株 (T2) 的生长发育情况

	出苗率 (%)	苗高 (cm)	胚芽鞘长 (cm)	初生根条数 (条)	电导率/ 对照 ^①
99T1	13.3	5.4	1.4	3.5	0.90
99T4	19.5	5.1	1.5	4.2	0.95
99T6	8.6	4.7	1.5	4.2	0.96
99T7	9.6	3.9	1.5	4.0	0.74
石 904185	0	0	0	0	1.00
石 904185 ^②	83.3	10.9	1.8	4.3	

注: ①0 NaCl 砂培至三叶期, 浇盐水使土壤含盐率达 0.4%, 浇后 3d 测定叶片电导率; ②石 904185 在 0 NaCl 条件下的生长情况

由表 1 可见, 转基因植株后代的耐盐性得到明显提高。0.4% 盐浓度下转基因植株的苗高、胚芽鞘长度、根条数等显著高于对照, 其中胚芽鞘长和根条数与 0 盐浓度下的对照差异不明显。叶片电导率均比对照低, 特别是 99T7 的电导率仅为对照的 74%, 表明转基因植株对逆境膜伤害的抵抗能力显著加强。由于所用的砂土基质比土壤基质对盐离子的吸附能力差, 砂土基质中游离的盐离子浓度大于后者, 所以本试验的 0.4% 盐浓度所造成的胁迫强度, 对小麦植株的危害程度也就远远高于受体亲本耐盐性鉴定时所用的土壤基质。

2.3 转基因植株的耐旱性

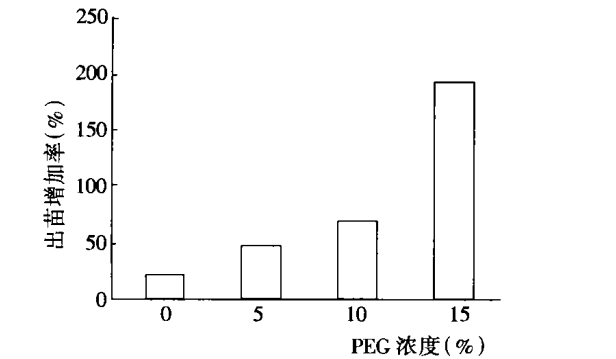


图 1 不同 PEG-6000 浓度下转基因植株出苗率较对照增加百分率

取转基因株系 99T4 的 T4 株系为试验材料, 以其受体石 904185 为对照进行 PEG 胁迫试验。培养基中 PEG-6000 浓度为 0 时, 99T4 与对照的出苗率没有明显区别, 但当 PEG-6000 浓度分别为 5%、10% 和 15% 时, 99T4 的出苗率分别比对照高 47.77%、70.49% 和 191.8% (图 1), 表明转 BADH 基因株系后代能够抗御相对较强的干旱胁迫。PEG-6000 浓度达到 15% 时(-0.3 Mpa), 对照基本不能萌发出苗, 而转基因株系的出苗率仍达 30% 左右, 可以将这一浓度作为筛选转化植株的阈值。

转基因株系在 PEG 胁迫下的根系发育、幼苗生长等方面也表现出明显的生长优势(表 2), 特别是根系。虽然 99T4 的初生根条数与对照没有太大差异, 但根干重明显高于对照, 且较对照增加的百分率随 PEG 浓度的提高而增加。在无胁迫或低胁迫强度(PEG < 10%) 下, 99T4 茎叶的生长优势大于根系的生长优势, 随 PEG 浓度的增加, 其生长优势逐渐从茎叶转到根系, 如: PEG 浓度达 18% 时, 转基因株系的根干重较对照增减百分率从 0 PEG 时的 22.7% 提高到 65.2%, 而叶干重较对照增减百分率从 0 PEG 时的 67.4% 降低为 43.0% (表 2)。

表 2 不同 PEG 浓度胁迫下转基因株系(99T4)幼苗的生长发育情况

	PEG 浓度(%)	99T4	对照	较对照增减(%)
苗干重(g/皿)	0	0.487 4	0.351 8	+ 38.6
	10	0.494 0	0.312 2	+ 58.2
	18	0.490 9	0.314 3	+ 56.2
根干重(g/皿)	0	0.279 1	0.227 4	+ 22.7
	10	0.288 7	0.186 4	+ 54.9
	18	0.308 9	0.187 0	+ 65.2
叶干重(g/皿)	0	0.208 3	0.124 4	+ 67.4
	10	0.205 3	0.125 8	+ 63.2
	18	0.182 1	0.127 4	+ 43.0
根条数(条/株)	0	3.25	3.18	+ 2.2
	10	3.29	2.98	+ 10.4
	18	3.26	3.00	+ 8.7

供试材料	气孔密度(个/视野)			蒸腾强度 ($\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-1}\cdot\text{s}^{-1}\cdot^\circ$)	失水速率($\text{g}/\text{g}\cdot\text{h}$)		
	正面	反面	平均		离体 2 4h	离体 4 6h	平均
石 4185	53.5 _a	41.2 _A	47.4 _A	8.34 _a	0.3438 _a	0.2034 _{ab}	0.2736 _a
99T1	53.2 _a	40.2 _A	46.7 _A	7.31 _{ab}	0.3726 _a	0.2295 _a	0.2966 _a
99T6	52.9 _a	40.4 _A	46.7 _A	6.18 _b	0.3138 _a	0.1505 _b	0.2321 _a
99T7	48.8 _{ab}	35.0 _B	41.9 _B	6.54 _{ab}	0.2940 _a	0.1834 _{ab}	0.2387 _a
99T4	47.0 _b	35.7 _B	41.4 _B	5.24 _b	0.3669 _a	0.286 _a	0.2800 _a
Ji 885-443	41.0 _b	34.3 _{ab}	37.7 _b	5.34 _a	0.3779 _a	0.2349 _a	0.3064 _a
99T8	45.5 _a	36.1 _a	40.8 _a	5.11 _a	0.3253 _b	0.1832 _b	0.2542 _b
99T9	42.3 _b	32.4 _b	37.4 _b	5.77 _a	0.3728 _{ab}	0.2095 _{ab}	0.2912 _{ab}

注: 数字后小写字母表示 5% 水平差异显著, 大写字母表示 1% 水平差异显著。

2.4 田间条件下转基因植株的部分生理特性分析

灌浆期对旗叶气孔密度、蒸腾强度、失水速率等的测定表明, 转 BADH 基因小麦的 T3 株系 99T1, 99T4, 99T6, 99T7 的气孔密度、蒸腾强度比受体对照石 90-4185 低, 有些株系达到显著或极显著差异水平(表 3), 但离体叶片失水速率没有一定的规律可循。冀 885-443 的转基因后代 99T8 的气孔密度比受体亲本显著提高, 蒸腾强度与对照无差异, 而离体叶片失水速率显著低于对照。99T9 的上述各指标与对照没有显著差异。供试的 6 个转基因株系中只有一个(99T8)与其他株系规律不同。说明山菠菜 BADH 基因的导入, 不仅是在胁迫条件下促进甜菜碱的合成, 改善细胞的渗透调节, 而且可能会影响其他生理生化反应, 进一步调节气孔的开张闭合及叶片的蒸腾强度, 以适应干旱环境。而 BADH 基因的导入, 对由叶片角质层失水引起的离体叶片失水速率没有影响或影响很小。

3 讨论

盐碱、干旱是世界范围内许多地区植物生存所面临的两大威胁, 两者在通过细胞失水造成水分胁迫进而对植物造成伤害方面是相似的, 但盐碱还会因盐离子在植物细胞内的积累造成离子毒害。植物在逆境条件下会发生一系列的生理生化反应来适应不良环境, 在遭遇干旱、盐碱胁迫时体内积累各种被称为相容渗透调节剂(compatible osmoprotectants)的小分子有机化合物如甜菜碱、脯氨酸、多羟肌醇等, 以保持细胞质中的渗透平衡、保护细胞膜透性和减轻离子毒害。近几年来, 通过转基因技术向植物导入与渗透调节剂生物合成相关的基因从而改进植物耐盐耐旱性已取得了很大进展。

由于甜菜碱被认为是最有效的渗透剂^[6], 因此, 与甜菜碱合成代谢相关基因便成为倍受关注的焦点。目前已有多例将甜菜碱醛脱氢酶基因(BADH)转入植物后, 植株耐盐性得到提高的报道。这些转基因植株的 BADH 活性明显提高, 并与其耐盐耐旱性呈正相关。郭岩等^[7]将从山菠菜中克隆的 BADH 基因导入水稻, 得到了遗传稳定、能耐 0.5% NaCl 的转基因株系。李银心等^[9]将 BADH 基因导入豆瓣菜, 获得了在盐浓度为 0.5%~0.8% 培养基上正常生长的转化植株。本研究曾以石 90-4185 和冀 885-443 为受体, 转化山菠菜 BADH 基因, 共得到 24 个转基因株系。所检测的 15 个株系与对照相比均有较

高的耐盐、耐旱性^[9]。T0 至 T4 株系的试验表明, BADH 基因表达可以稳定遗传, 转 BADH 基因小麦株系在盐旱胁迫条件下生长发育优于对照, 如 99T4, 99T6 等。最近的田间试验结果表明, 大多数转基因株系均能在含 0.4% 盐的土壤中正常生长和结实, 一些株系耐盐级别达到 1 级和 2 级(对照为 3~4 级), 并维持较高产量。用 PEG-6000 作为渗透胁迫剂, 模拟播种期及苗期干旱, 结果表明, 转 BADH 基因小麦在 15% PEG-6000 的培养基上正常萌发并继续生长发育。换言之, 转 BADH 基因小麦能够耐 0.3 Mpa 的出苗期干旱, 而对照在此逆境下几乎不能出苗。转基因株系在 NaCl 和 PEG 胁迫条件下的叶片相对电导率较低, 预示着渗透功能和抗质膜损伤能力的增强。

综上所述, BADH 基因的导入对增强植物的渗透调节能力, 以适应干旱、寒冷、盐碱等不利环境条件是十分重要的; 以甜菜碱作为靶标性状采用基因工程方法提高植物耐旱耐盐性是可行和必要的; 将甜菜碱合成代谢相关的另一重要酶系基因 CMO, 和 BADH 基因同时导入植物, 会进一步提高转基因植物的抗旱耐盐性。

参考文献:

- [1] 贾秀玲, 马瑞昆, 刘书贞, 等. 冬小麦气孔与非气孔失水特性的基因型差异研究[J]. 河北农业大学学报, 1995, 18: 46-51.
- [2] McCue K F, Hanson A D. Salt-inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression[J]. Plant Mol Biol, 1992, 18: 1-11.
- [3] 肖 岗. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究[J]. 科学通报, 1995, 40: 741-745.
- [4] Ishitani M, Nakamura M, Han S Y, et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress[J]. Plant Mol Biol, 1995, 27: 307-315.
- [5] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum[J]. Plant Physiol, 1996, 110: 1301-1308.
- [6] Holmström K O, Welin B, Mandal A, et al. Production of the *Escherichia coli* betaine-aldehyde dehydrogenase, and enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in transgenic plants[J]. Plant J, 1994, 6: 749-758.
- [7] 郭 岩, 张 莉, 肖 岗, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中表达及转基因植株的耐盐性研究[J]. 中国科学(C), 1997, 27(2): 151-155.
- [8] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达[J]. 植物学报, 2000, 42: 279-283.
- [9] 李银心, 常凤启, 杜立群, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因豆瓣菜的耐盐性[J]. 植物学报, 2000, 42: 480-484.