

盐胁迫对转 *TaNHX2* 基因玉米幼苗生长的影响

王小丽¹, 赵欣梅¹, 张欢欢², 董艳辉², 孙毅^{1,2,3}

(1. 山西大学 生物工程学院, 山西 太原 030006; 2. 山西省农业科学院 生物技术研究中心, 山西 太原 030031;

3. 农业部黄土高原作物基因资源与种质创制重点实验室, 山西 太原 030031)

摘要:采用 Hoagland 营养液水培方法,研究了不同浓度 NaCl 胁迫条件下,转 *TaNHX2* 基因玉米自交系昌 7-2 和非转基因对照的幼苗生长情况、植株形态和生理指标的差异。结果显示,转基因玉米植株表现出一定的抗逆性,生长状况明显优于对照;随着盐胁迫浓度的增加,转基因和非转基因玉米植株株高、根长、鲜质量、干质量和叶绿素含量逐渐下降,丙二醛含量逐渐上升,但是转基因玉米的变化幅度较小;在几乎所有胁迫浓度下,转基因玉米植株的株高、根长、鲜质量、干质量、叶绿素含量均显著高于非转基因植株,丙二醛含量均比非转基因植株低。以上结果说明,转 *TaNHX2* 基因玉米幼苗的耐盐性明显优于非转基因对照。

关键词:转基因玉米; *TaNHX2* 基因; 盐胁迫; 幼苗生长; 生理指标

中图分类号: S513.01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2014)02-0165-05

Influence of Salt Stress on Growth of Transgenic Maize Seedlings with *TaNHX2* Gene

WANG Xiao-li¹, ZHAO Xin-mei¹, ZHANG Huan-huan², DONG Yan-hui², SUN Yi^{1,2,3}

(1. College of Biological Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006, China;

2. Research Center of Biotechnology, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Taiyuan 030031, China;

3. Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement on Loess Plateau, Ministry of Agriculture, Taiyuan 030031, China)

Abstract: The growth performance, morphological traits and physiology indices between transgenic and non-transgenic maize seedlings (cv. Chang 7-2) under various concentrations of NaCl stress were investigated by Hoagland solution culture. The results showed that transgenic maize seedlings exhibited resistance to salt, and their growth performance was superior compared to the non-transgenic seedlings. With the increase of salt concentration, the seedling height, root length, fresh weight, dry weight and chlorophyll content of both transgenic maize seedlings and non-transgenic controls decreased, and MDA content increased. But the changing ranges of transgenic maize seedlings were relatively narrower. Under almost all stress concentrations, the seedling height, root length, fresh weight, dry weight and chlorophyll content of transgenic maize seedlings were significantly higher than those of non-transgenic ones, and MDA contents were lower. Therefore, transgenic maize seedlings were apparently more tolerant to salt stress than the non-transgenic ones.

Key words: Transgenic maize; *TaNHX2* gene; Salt stress; Seedling growth; Physiology index

玉米(*Zea mays* L.)作为最重要的粮食与饲料作物之一,在世界上分布广泛。目前,我国的玉米种植面积已经超过水稻,成为我国第一大粮食作物^[1]。因此,提高玉米产量对于国民经济发展具有

重要意义。然而,玉米是盐敏感作物,耐盐能力较差^[2]。土壤盐渍化是制约农业生产的一大非生物胁迫因素^[3-4]。而盐渍化土壤占我国耕地面积的10%,并且有不断扩大的趋势^[5],考虑到我国人口

收稿日期:2013-12-11

基金项目:国家自然科学基金项目(31240081);国家转基因生物新品种培育重大专项(2013ZX08003001);山西省科技攻关项目(20110311009)

作者简介:王小丽(1988-),女,山西吕梁人,在读硕士,主要从事作物遗传育种研究。

通讯作者:孙毅(1953-),男,黑龙江哈尔滨人,研究员,博士,主要从事植物基因工程和分子生物学研究。

日益增多和耕地日趋减少的状况,选育抗盐性强、高产稳产的玉米新品种就显得尤为重要和迫切。

随着生物技术的快速发展,植物基因工程为作物育种提供了新的途径^[6]。由山西省农业科学院农业生物技术研究团队发明的花粉介导植物转基因方法以花粉为载体,可以将外源基因导入植株基因组中,直接得到转基因种子,从而实现对植物非离体状态下的转化,避免了组织培养及转化再生困难等问题,是一条简便、快捷的遗传转化途径^[7]。

本试验以前期通过花粉介导法获得的转 *TaNHX2* 基因玉米种子为材料^[8],研究了在不同浓度 NaCl 胁迫条件下,转基因玉米植株的生长情况以及株高、根长、鲜质量、干质量、叶绿素含量、丙二醛含量的变化,分析了这些农艺性状、生理指标的变化趋势与盐胁迫浓度之间的关系,及其与非转基因玉米植株进行了比较,旨在探究转 *TaNHX2* 基因玉米株系的耐盐性以及为其在生产中的推广种植提供一些参考依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料由山西省农业科学院农业生物技术研究团队提供,品种为转 *TaNHX2* 基因的玉米自交系昌 7-2 和非转基因的对照。

1.2 玉米幼苗盐胁迫处理

挑选籽粒大小一致的非转基因和转 *TaNHX2* 基因的供试材料种子,于 0.1% 次氯酸钠中消毒 20 min,清水冲洗后室温浸种 6 h,然后将其置于铺有 2 层滤纸的培养皿中,于 28 °C 培养箱催芽。萌发后挑选生长状况良好、芽长一致的种子播种在装有等量蛭石的塑料花盆中,每天浇灌适量的 Hoagland 营养液,于温室中培养(温度 25 °C)。幼苗长至一叶一心期时,选取生长一致的健壮幼苗移栽到装有等量 Hoagland 营养液的大小一致的泡沫箱中培养(泡沫箱上面用泡沫作支持,苗基部用海绵固定,整个泡沫箱内外用双层黑色塑料膜包裹以遮光)。待幼苗长至三叶一心期时,进行盐胁迫处理,设 4 个水平,分别为 CK、Hoagland 营养液;Hoagland + 150

mmol/L NaCl;Hoagland + 200 mmol/L NaCl;Hoagland + 250 mmol/L NaCl。为保持处理浓度一致,每 3 d 更换一次相应浓度的 NaCl 溶液(用 Hoagland 营养液配制而成),试验过程中使用小型空气泵往营养液中连续通气。各个处理浓度下转基因植株和非转基因对照均保留 6 株,3 次重复。每天观察记录植株的生长情况,处理 10 d 后,测定各个浓度下植株的形态性状和生理指标。

1.3 植株形态性状测定

将玉米植株全部取出,测定株高(cm)、根长(cm),用去离子水冲洗干净植株根部,吸水纸吸干残留的去离子水后称量所得即为鲜质量(g),然后将植株放入烘箱以 105 °C 杀青 10 min,80 °C 烘干至恒重,称干质量(g)。

1.4 生理指标测定

叶绿素含量测定采用丙酮浸提法^[9],丙二醛(MDA)含量测定采用硫代巴比妥酸法^[10]。

1.5 数据统计

用 Excel 2003 和 SPSS 软件进行数据处理、t 检验和作图。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下转基因玉米植株的苗情观察

从外部形态(图 1)来看,未加 NaCl 的 Hoagland 营养液培养中的转基因和非转基因玉米植株生长的均很健壮,叶色浓绿,根系长且粗壮。随着盐浓度的增加,玉米幼苗生长受到的抑制越来越严重,盐害症状越来越明显。其中,150 mmol/L NaCl 溶液胁迫下,非转基因玉米幼苗的生长受到轻微抑制,部分叶片微黄,转基因玉米幼苗与未受到胁迫的对照相比差别不大;200 mmol/L NaCl 溶液胁迫时,非转基因玉米幼苗叶色淡、发黄、开始卷曲,茎瘦弱,转基因玉米植株叶片也开始发黄,叶缘开始卷曲,生长缓慢,但是较非转基因玉米幼苗症状要轻;250 mmol/L NaCl 溶液胁迫下,非转基因玉米幼苗叶片枯黄的比例增多,且萎蔫,根系伤害严重,且开始枯死,转基因玉米幼苗的叶片也大量枯黄、萎蔫,根系细弱,但仍能够继续生长。

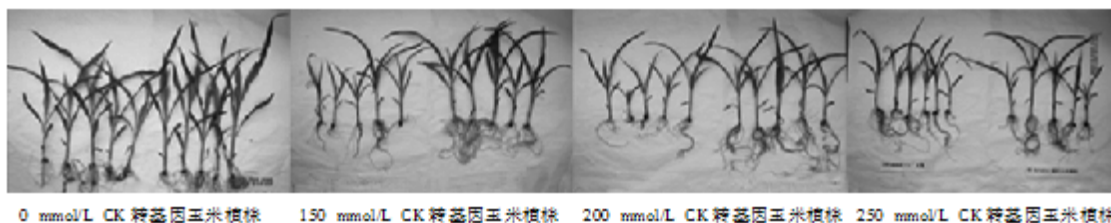
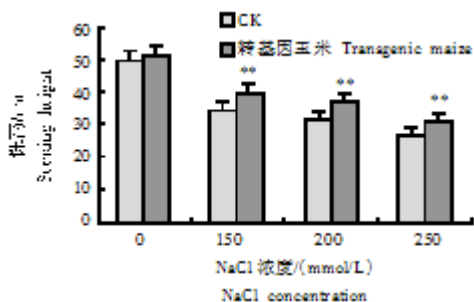


图 1 转 *TaNHX2* 基因玉米植株和非转基因对照在不同浓度 NaCl 溶液胁迫 10 d 后的生长状态

Fig.1 The growth status of transgenic and non-transgenic maize seedlings under various concentrations of NaCl stress for 10 days

2.2 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株株高和根长的影响

从图 2,3 可以看出,盐胁迫对转基因和非转基因玉米幼苗的生长都产生了不同程度的抑制,导致幼苗的株高、根长均呈现明显的下降趋势。但在同一盐胁迫浓度下,转基因玉米植株的株高、根长均大于非转基因植株,这说明盐胁迫对转基因玉米幼苗生长的抑制作用小于非转基因幼苗。在 0 mmol/L NaCl 处理下,转基因玉米植株平均株高、根长分别为 51.4,47 cm,非转基因玉米植株平均株高、根长分别为 50,47.1 cm,差异均不显著。当盐浓度为 150,200,250 mmol/L 时,转基因玉米和非转基因玉米植株株高之间的差异达到极显著水平,根长之间差异达到显著水平。此外,与 0 mmol/L NaCl 处理下的植株相比,非转基因玉米植株株高下降的幅度分别为 31.4%,36.6% 和 46.4%,根长下降的幅度分别为 23.78%,43.95% 和 60.51%,转基因玉米植株株高下降的幅度分别为 22.37%,27.24% 和 38.13%,根长下降的幅度分别为 15.11%,36.38% 和 54.68%。因此,转基因玉米植株株高和根长下降的幅度较小,说明其耐盐性较强。



*. 表示 *t* 检验差异显著 ($P < 0.05$); *. 表示差异极显著 ($P < 0.01$)。图 3~7 同。

*. Means significant difference in comparison to the controls at $P < 0.05$ according to *t* test; *. Means significant difference at $P < 0.01$. The same as Fig. 3~7.

图 2 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株株高的影响

Fig. 2 Effects of various concentrations of NaCl stress on seedling height of transgenic maize seedlings

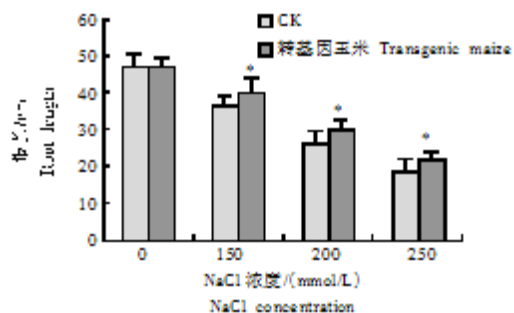


图 3 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株根长的影响

Fig. 3 Effects of various concentrations of NaCl stress on root length of transgenic maize seedlings

2.3 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株鲜质量和干质量的影响

由图 4,5 可知,在不同浓度 NaCl 溶液胁迫条件下,转基因和非转基因玉米植株鲜质量和干质量的变化规律与其株高和根长的变化规律相似,即随着 NaCl 浓度的增加,鲜质量和干质量呈逐渐减小的趋势。当盐浓度为 0 mmol/L 时,转基因和非转基因玉米植株鲜质量和干质量之间的差异均不显著;当盐浓度为 150,200,250 mmol/L 时,转基因玉米植株的鲜质量和干质量均大于非转基因对照,并且鲜质量的差异均达到显著水平;当盐浓度为 200 mmol/L 时,干质量差异显著;当盐浓度为 150,250 mmol/L 时,干质量差异不显著;非转基因玉米幼苗鲜质量减小的幅度分别为 27.31%,46.62% 和 57.93%,干质量减小的幅度分别为 19.75%,49.97% 和 67.46%,转基因玉米幼苗鲜质量减小的幅度分别为 17.06%,36.78% 和 50.36%,干质量减小的幅度分别为 15.45%,42.72% 和 64.29%,转基因玉米幼苗变化的幅度较小;当盐浓度为 250 mmol/L 时,转基因玉米幼苗和非转基因玉米幼苗的生物量均很低,与此时它们的生长情况(受到严重抑制)表现一致。说明盐胁迫对转基因玉米幼苗鲜质量和干质量的影响小于非转基因对照。

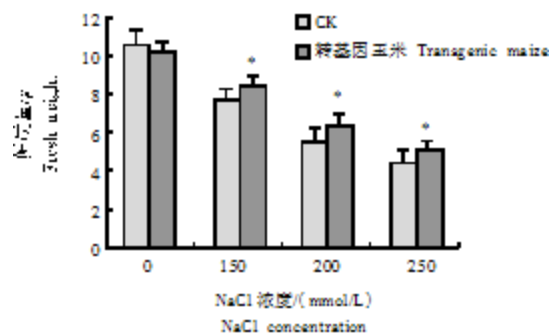


图 4 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株鲜质量的影响

Fig. 4 Effects of various concentrations of NaCl stress on fresh weight of transgenic maize seedlings

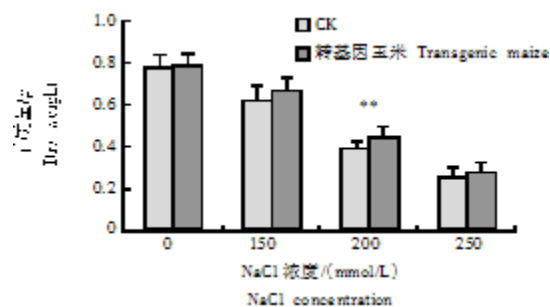


图 5 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株干质量的影响

Fig. 5 Effects of various concentrations of NaCl stress on dry weight of transgenic maize seedlings

2.4 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株叶绿素和丙二醛含量的影响

叶绿素是光合作用的关键色素,植物体内叶绿素含量的多少,在很大程度上决定着光合作用的强弱,并与植物生长和生理状况紧密相关,因此,叶绿素含量是衡量受盐胁迫影响程度的一个重要指标^[11-12]。从图6可以看出,随着盐浓度的增加,转基因玉米植株和对照的叶绿素含量均呈下降趋势,当盐浓度为0,150 mmol/L时,转基因玉米植株中的叶绿素含量略高于对照,但差异不显著;当盐浓度为200,250 mmol/L时,转基因玉米植株中的叶绿素含量分别为1.371,1.165 mg/g,非转基因玉米植株中的叶绿素含量分别为1.318,1.077 mg/g,转基因玉米植株明显高于对照,差异达到了显著水平。这说明盐胁迫下,转基因和非转基因玉米幼苗的叶绿素都受到了一定程度的破坏,但转基因玉米幼苗受破坏的程度较低,因而生长情况较好。

丙二醛(MDA)是膜脂氧化的主要产物之一,其含量的多少可以反映膜脂过氧化和膜系统受伤害的程度^[13]。由图7可知,随着盐胁迫浓度的增加,转基因和非转基因玉米植株中MDA含量逐渐上升。当盐浓度为0,150,200 mmol/L时,转基因玉米植株中MDA含量与对照相似,差异不显著;当盐浓度为250 mmol/L时,转基因玉米植株的MDA含量

比对照低4.85%,且差异达到显著水平,说明盐胁迫下,非转基因玉米幼苗膜系统受损伤程度大,转基因玉米幼苗受损伤程度较小,即转基因玉米幼苗的耐盐性较强。

3 讨论与结论

Na^+/H^+ 逆向转运蛋白普遍存在于盐生植物和耐盐植物的质膜及液泡膜上。当植物遭到盐胁迫时, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白的运转活性被驱动,逆 Na^+ 浓度梯度将胞内过多的 Na^+ 运出细胞或区隔化到液泡中^[14],这既维持了细胞质 Na^+ 浓度和 Na^+/H^+ 比的相对稳定,减少了 Na^+ 对细胞器的毒害^[15],又降低了细胞的渗透势,促进细胞从外界胁迫环境中吸水以继续维持渗透平衡,以进一步调节细胞质内pH值和 Na^+ 浓度^[16]。因此, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白可以提高植物的耐盐性。近年来,随着分子生物学研究的不断深入, Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因(Vacuolar Na^+/H^+ exchanger or antiporter,简称NHX,NHE或NHA)已被从多种植物中克隆并导入盐敏感性作物中,提高了其耐盐能力^[17]。

盐分对非盐生植物最普遍、最显著的影响就是生长抑制。生长是植物对盐胁迫的综合体现和综合适应,也是植物耐盐性的最优评价指标^[18]。玉米苗期是对盐胁迫反映的敏感时期,植株株高、根长、鲜质量、干质量作为植株形态的主要性状,能直接反映作物的生长状况及受盐害程度^[19]。本研究结果表明,随着NaCl浓度的增加,转基因玉米植株和对照的株高、根长、鲜质量、干质量均呈下降趋势;在同一浓度盐胁迫下,转基因玉米植株的株高、根长、鲜质量、干质量均高于对照;在3个不同浓度的盐胁迫下,转基因玉米植株和对照的株高差异均达到极显著水平($P < 0.01$),根长、鲜质量差异达显著水平($P < 0.05$);干质量在盐浓度为200 mmol/L时差异极显著,在盐浓度为150,250 mmol/L时,差异不显著。综上所述,在盐胁迫条件下,转TaNHX2基因玉米幼苗受盐害程度较低,生长状况明显优于对照。

叶绿素含量的多少直接反映了植物的光合效率及同化能力。盐分对植物色素及其蛋白复合体的合成和代谢具有抑制作用,高盐胁迫下,叶绿素的形成遭到破坏,造成植物缺绿和叶片发黄,抑制了植株的生长发育^[20]。MDA是膜脂过氧化产物之一。在一定盐胁迫强度内,细胞的各种保护机制使得MDA含量维持在一定水平,但盐胁迫强度超过特定阈值后,细胞内代谢失调,自由基积累,膜质过氧化作用加大,丙二醛含量升高^[21],细胞膜发生渗漏,引起连

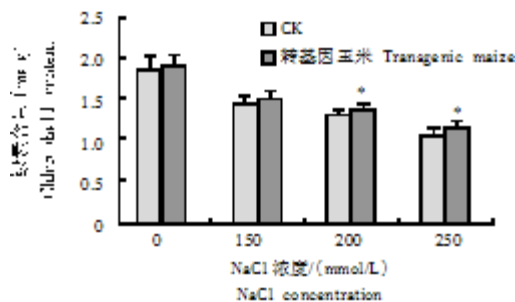


图6 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株叶绿素含量的影响

Fig.6 Effects of various concentrations of NaCl stress on chlorophyll content of transgenic maize seedlings

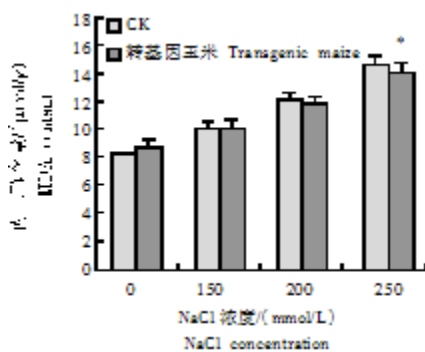


图7 不同浓度盐胁迫对转基因玉米植株丙二醛含量的影响

Fig.7 Effects of various concentrations of NaCl stress on MDA content of transgenic maize seedlings

锁反应,导致磷脂降解,细胞膜分解^[22]。本试验结果表明,在各个浓度的盐胁迫条件下,转基因玉米幼苗的叶绿素含量均高于对照,丙二醛含量均低于对照,并且在盐浓度较高时,差异达到显著水平,说明转基因玉米植株的光合系统受到伤害较轻,膜脂过氧化程度较低。综上所述,导入 *TaNHX2* 基因提高了转基因玉米的耐盐性。

参考文献:

- [1] 陈志辉,李立,黄虎兰. 玉米品种抗旱性鉴定方法与指标研究[J]. 农业现代化研究,2011,32(1):120-124.
- [2] 姚正培,孟君,李冠. 玉米自交系芽苗期耐盐性的鉴定与筛选[J]. 华北农学报,2007,22(5):27-30.
- [3] Zhang J H, Jia W S, Yang J C, *et al.* Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses[J]. Field Crops Research, 2006,97(1):111-119.
- [4] 姚秋菊,张晓伟,赵小忠,等. 硅对盐胁迫下黄瓜叶片膜脂过氧化和活性氧清除系统的影响[J]. 华北农学报,2008,23(1):109-113.
- [5] 柳斌辉,张文英,栗雨勤. 玉米耐盐性的鉴定评价[J]. 华北农学报,2012,27(增刊):101-105.
- [6] 王念,王军辉,张建国,等. 转基因植物发展状况及外源基因在后代中遗传分离研究进展[J]. 生物技术通报,2004(1):13-17.
- [7] 张婷婷,王铭,杜建中,等. 花粉介导法将水稻 *Os-SIK1* 基因导入玉米自交系的研究[J]. 山西农业科学,2011,39(5):395-399.
- [8] 张丽君. 普那菊苣、玉米和高粱导入抗逆基因及其转基因方法研究[D]. 太谷:山西农业大学,2011.
- [9] 任小燕,杜建中,孙毅. 转 *AhCMO* 基因玉米后代的获得及耐盐性鉴定[J]. 分子植物育种,2013,11(3):332-338.
- [10] 张志良,瞿伟菁,李小方. 植物生理学实验指导[M]. 4版. 北京:高等教育出版社,2009.
- [11] 高英,同延安,赵营,等. 盐胁迫对玉米发芽和苗期生长的影响[J]. 中国土壤与肥料,2007(2):30-34.
- [12] Munns R. Physiological processes limiting plant growth in saline soils: some dogmas and hypotheses[J]. Plant Cell Environ, 1993,16(1):15-24.
- [13] 康建宏,吴宏亮,黄灵丹. 干旱预处理的玉米幼苗对逆境的交叉适应研究[J]. 干旱地区农业研究,2008,26(6):143-148.
- [14] 陈利红,张波,徐子勤. *AtNHX1* 基因对荞麦的遗传转化及抗盐再生植株获得[J]. 生物工程学报,2007,23(1):51-60.
- [15] 陈观平,王慧中,施农农,等. Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性关系研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2006,26(5):101-106.
- [16] Maris P Apse, Gilad S Aharon, Wayne A Snedden, *et al.* Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiport in *Arabidopsis* [J]. Science, 1999, 285(5431):1256-1258.
- [17] 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.
- [18] 常红军,马灿玲. 盐胁迫对4个玉米品种的萌发及生长的影响[J]. 安徽农业科学,2006,34(17):4273-4274.
- [19] 姚启伦,范淑萍. NaCl 胁迫对玉米地方品种苗期植株形态的影响[J]. 湖北农业科学,2010,49(5):1065-1067.
- [20] Soussi M, Lluch C, Ocana A. Comparative study of nitrogen fixation and carbon metabolism in two chick-pea (*Cicer arietinum* L.) cultivars under salt stress[J]. Experimental Botany, 1999,50(340):1701-1708.
- [21] 张弢. NaCl 胁迫对玉米幼苗几项生理指标的影响[J]. 吉林农业科学,2012,37(1):12-14.
- [22] 李永生,邹丽婷,王芳,等. NaCl 胁迫对“富农1号”玉米品种幼苗生长及生理特性的影响[J]. 玉米科学,2012,20(4):82-85.