

· 研究报告 ·

转*BADH*基因紫花苜蓿山苜2号品种的抗盐性鉴定及系统选育

燕丽萍^{1,2}, 夏阳^{1,2*}, 毛秀红^{1,2}, 刘翠兰^{1,2}, 梁慧敏³

¹山东省林业科学研究院, 济南 250014; ²山东省林木遗传改良重点实验室, 济南 250014; ³江苏农林职业技术学院, 句容 212400

摘要 利用转基因技术创造苜蓿新种质已成为牧草新技术育种的重要组成部分。为了有效地从苜蓿转基因植株及其后代中选育出优良品种, 深入研究转基因苜蓿的植物学性状及其产量十分重要。以通过农杆菌介导技术获得的T₀代转*BADH*基因苜蓿为试材, 利用分子生物学方法对其自交株系的世代群体连续进行抗盐性鉴定筛选和系统选育, 首次获得了具有抗盐碱能力的转基因苜蓿稳定株系。同时, 通过品种比较实验、区域实验和生产实验, 表明在不同盐碱地条件下, 转*BADH*基因的苜蓿植株产草量明显高于对照(未转基因的中苜1号), 生产实验的干草增产率介于13.11%–24.98%之间。上述结果表明, 外源目的基因主要特性的遗传稳定, 进而从实践上验证了转*BADH*基因工程操作的实用性。

关键词 紫花苜蓿, *BADH*基因, 耐盐, 选育, 山苜2号, 转化

燕丽萍, 夏阳, 毛秀红, 刘翠兰, 梁慧敏 (2011). 转*BADH*基因紫花苜蓿山苜2号品种的抗盐性鉴定及系统选育. 植物学报 46, 293–301.

紫花苜蓿(*Medicago sativa*)蛋白质含量高(含有10多种维生素), 是一种优良的豆科牧草, 全球种植面积约 3.5×10^7 hm², 我国现有种植面积达 1.4×10^6 hm²。然而, 土壤盐碱荒漠化是我国北方尤其是西北干旱地区苜蓿栽培的主要限制因子。鉴于紫花苜蓿多数属盐碱敏感型(Osborn et al., 1997), 培育耐盐且抗旱性较强的紫花苜蓿新品种, 是提高干旱地区紫花苜蓿人工草地产量及利用大面积盐碱荒地的根本途径之一。目前, 生产实践中多采用传统的杂交育种手段选育苜蓿抗盐新品种, 但该方法不仅耗时、费力, 而且收效甚微。因此, 利用转基因技术培育苜蓿新种质已成为牧草育种的重要组成部分。国内外已有关于紫花苜蓿转基因植株再生及其后代分析的报道(Desgagnés et al., 1995; Weeks et al., 2008; Bao et al., 2009)。一些工作表明, 外源基因导入植物细胞后随机整合到植物基因组中, 转基因整合位点及其在细胞中的拷贝数量影响着转基因植株的性状及其遗传稳定性(Fromm et al., 1990; 王关林和方宏筠, 2002)。有效地从苜蓿转基因植株及其后代中选育出遗传稳定的优良品种十分必要。但该方面的研究尚未见报道,

多数研究仅停留在实验室阶段, 无法在生产实践中加以应用。本课题组从2000年开始, 采用农杆菌介导技术将山菠菜(*Atriplex hortensis*)甜菜碱醛脱氢酶基因(*BADH*) (李银心等, 2000)导入苜蓿受体材料中苜1号的外植体中, 获得了PCR阳性植株(梁慧敏等, 2005)。耐盐及抗旱实验结果表明, 转基因植株(T₁代)具有较强的抗逆性(燕丽萍等, 2009a, 2009b; 刘媛等, 2009)。本文在上述研究的基础上, 对转*BADH*基因的苜蓿后代(T₁–T₃代)植株进行PCR检测、耐盐性鉴定并对其进行遗传分离筛选, 通过自交和杂交选育出遗传稳定、综合性状优良且耐盐碱强的转基因苜蓿新品种。同时对其主要生物学性状、产量及遗传稳定性进行跟踪调查, 以期利用基因工程技术获得可应用于育种实践的抗盐碱苜蓿提供研究基础, 为在盐碱干旱地区及黄河三角洲大面积种植苜蓿提供新的种质资源。

1 材料与方法

1.1 材料

在对T₀代转基因植株进行耐盐实验和分子生物学检

收稿日期: 2010-10-05; 接受日期: 2011-02-07

基金项目: 山东省良种工程项目(No.2006lz12-02)

* 通讯作者。E-mail: xiayang0506@126.com

测的基础上,选择8个抗性较强且符合育种目标的植株应用于转基因苜蓿(*Medicago sativa* L.)后代抗盐性鉴定和株系的系统选育研究。受体材料中苜1号为本研究的对照材料。

1.2 选育过程

从T₀代筛选出8个转基因植株分别单株自交产生T₁代种子,在田间播种,按株系种植,淘汰不良株系,通过自交、PCR检测、转基因分离比例确定及耐盐碱性鉴定选育出3个基因型纯合株系的T₂代植株。对入选的3个无性系的T₂代植株采用扦插方式建立多元杂交圃。株距40 cm,行距60 cm,行长8 m,每株系移栽4行,每行20株。3个株系移栽12行,共240株,以优选的1个株系为母本,其余2个为父本,采用开放式授粉,种子成熟后收种育成新品系山苜2号,之后进行品系比较实验、区域实验和生产实验。由于筛选期间严格实行单株罩网自交,T₃代株系(山苜2号)遗传稳定。每一世代单株的选择均以其当代抗盐性筛选鉴定和PCR检测结果为依据,PCR检测呈阳性且抗盐性强的单株进入下一代株系。

1.3 PCR检测

当T₁-T₃代植株生长至4-5枚叶片时,摘取植株上部的幼嫩叶片,用CTAB法提取植物的DNA,非转化植株为阴性对照,进行PCR扩增检测。扩增产物用1%琼脂糖凝胶电泳分离,通过观察特异条带的有无,判断目的基因是否存在。PCR检测体系为15 μL,引物序列为: F, 5'-AGAATGGCGTTCCCAATTCCTGCTC-3'; R, 5'-TTCAAGGAGACTTGTACCATCCCCA-3',引物由上海生工生物工程公司合成。扩增反应程序为: 94°C 5分钟; 94°C 30秒, 52°C 45秒, 72°C 45秒30个循环; 72°C 10分钟。电泳Marker为TAKARA公司生产的DL2000,扩增片段的大小为1.5 kb。

1.4 转基因植株的耐盐性鉴定

将拟为纯合系的3个转基因株系SLM01、SLM05和SLM07的T₂代种子播入砂盆中,按照每盆土样干重的0.3%、0.6%和0.9%添加化学纯的NaCl进行盐处理。每盆播种30粒种子,每个株系重复3次。15天后统计出苗率。

1.5 总RNA的提取和Northern杂交分析

按照冷酚法(Sambrook et al., 1989)提取总RNA。参照Chen等(2000)改良的PCR法用地高辛(DIG)标记DNA探针。Northern杂交分析时,吸取5-10 μg总RNA,经55°C变性20分钟后用1.0%的琼脂糖/甲醛凝胶分离。按照Sambrook等(1989)的方法将RNA原位转移至尼龙膜(Hybond N⁺, Amersham)上,在紫外光联仪(Bio-Red)上于254 nm处将RNA固定到膜上。在丘奇(Church)缓冲液(7%SDS, 50%formaldehyde, 5×SSC, 2% blocking reagent, 50 mmol·L⁻¹ sodium phosphate, pH7.0, 0.1% N-lauroylsarcosine)中50°C预杂交2-4小时,之后弃去预杂交缓冲液,加入含20 ng·mL⁻¹DIG标记的反义DNA探针的丘奇缓冲液杂交过夜(16小时以上)。然后,分别用2×SSC、0.1% SDS(室温)和0.5×SSC、0.1% SDS(68°C)各冲洗2次,每次20分钟;再按照DIG Luminescent Detection Kit (Roche)推荐的程序进行检测。

1.6 实验地自然条件概况

山东省林业科学院东营分院实验点位于北纬37°24',东经118°40'。气候属暖温带半湿润大陆性季风气候,全年平均气温12.2°C,极端最高气温为44.9°C,极端最低气温为-23.3°C。全年无霜期211天,初霜起于10月中旬,终霜止于4月初。年平均降水量601 mm,年最大降水量991 mm,最小降水量325 mm,年内降水主要集中在7-8月,占全年降水的60%左右。年蒸发量1 900 mm,以5-6月最高。由于春秋降水量小,蒸发量大,形成了一年两度的返盐高峰。实验地的土壤类型包括潮土和盐化潮土,其土壤盐分以NaCl为主。土壤为潮土和盐土,其含盐量介于3‰-5‰之间。

山东省林业科学院盐碱地造林实验站位于寿光市北部,莱州湾西岸北纬37°11',东经118°40'。全年平均气温13°C,年均降水量600 mm,年均蒸发量2 200 mm,地下水位2-3 m,全年无霜期195天。土壤为潮土和盐土,其含盐量介于2‰-4‰之间。

济南科技园实验点位于北纬36°02'-37°31',东经116°11'-117°44',年平均气温14.9°C,年降水量665.7 mm。全年无霜期190-240天,气候属暖温带大陆性季风气候。实验地的土壤为潮土,其含盐量介于1‰-1.5‰之间。

济南苗圃实验点位于北纬 $36^{\circ}02'$ – $37^{\circ}31'$, 东经 $116^{\circ}11'$ – $117^{\circ}44'$, 年平均气温 14.9°C , 年降水量 665.7 mm 。全年无霜期 190 – 240 天, 年平均日照时数 $2\ 710$ 小时, 光照充足, 热量充沛, 气候属暖温带大陆性季风气候。实验地的土壤为褐土, 偏酸性, $\text{pH}6.3$ – 7.1 , 为中等肥力水平, 土壤含盐量介于 0.2% – 0.5% 之间。

1.7 品系比较实验

2006年8月24日在山东省林业科学院东营分院实验基地播种(新品种山苜2号 and 对照品种中苜1号)。小区面积为 32 m^2 ($8\text{ m}\times 4\text{ m}$), 行距 25 cm 。实验采用完全随机区组设计, 设3次重复。实验地四周设 1.5 m 的保护行。播种量为 $12.0\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 播种前平整土地, 覆土 2 cm , 播种后镇压。

1.8 区域实验

选择山东省具有代表性的4个实验点(东营、寿光、济南科技园和济南苗圃)进行区域实验。东营和寿光地区于2006年8月4日播种, 小区面积为 32 m^2 ($8\text{ m}\times 4\text{ m}$); 济南科技园实验基地和苗圃实验基地分别于2008年3月24日和4月1日播种, 小区面积为 32 m^2 ($16\text{ m}\times 2\text{ m}$)。

1.9 生产实验

2008–2009年, 在东营、寿光和济南3个实验点进行生产实验。分别于2008年3月22日(东营实验基地)、3月23日(寿光实验点)和4月1日(济南科技园实验点)播种。各实验点新品种山苜2号的种植面积为 0.33 hm^2 , 对照品种中苜1号为 0.07 hm^2 。区域实验和生产实验的种植方式与品系比较实验相同。

1.10 产量测定

每个小区随机选取 $2\text{ m}\times 2\text{ m}$ (非边行)的样方, 于初花期(5月上旬)进行第1次刈割, 3周后(6月初)进行第2次刈割, 6周后(7月中旬)进行第3次刈割, 8周后(9月下旬)进行第4次刈割。先称取鲜草重量, 烘干后称得干草产量, 折算单位面积的干鲜草产量。

2 结果与讨论

2.1 转基因植株的分子检测和耐盐性测定

选择来自8个转化体的外源基因转基因植株进行自

交, 产生 T_1 代种子, 在田间播种, 通过PCR检测选择含有转基因的植株罩上网罩, 人工授粉或在网罩内放入蜜蜂辅助授粉自交获得 T_2 代种子。对 T_2 代小苗进行PCR检测(图1), 每株系取样30株, 取样植株均为100%阳性, 此30株拟为转基因纯合系。

在国家林业局转基因安全评估报告中将图2中获得的3个 T_2 代株系14、41和105分别命名为SLM01、SLM05和SLM07。将拟为转基因纯合系的3个株系

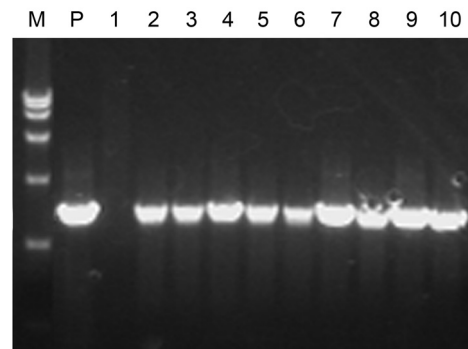


图1 山苜2号 T_2 代植株的PCR检测

M: DNA marker DL15000; P: 质粒DNA; 1: 非转基因植株; 2–10: 转基因株系

Figure 1 PCR assay of Shanmu 2 T_2 transgenic plants

M: DL15000 DNA ladder; P: Plasmid DNA; 1: Non-transformed plant; 2–10: Transgenic lines

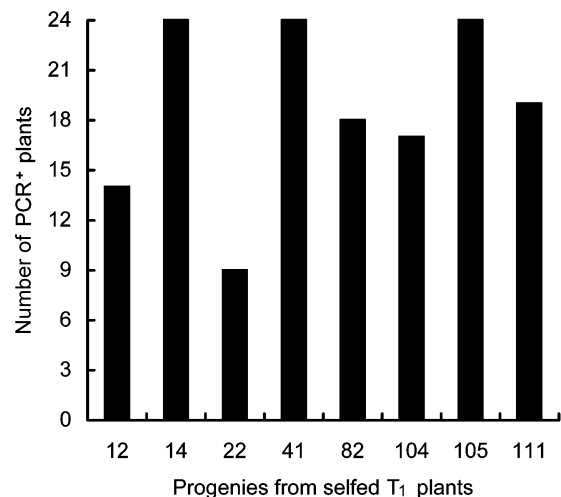


图2 山苜2号 T_2 代转基因植株的分离

Figure 2 Segregation of Shanmu 2 T_2 transgenic plants

表1 山苜2号T₂代转基因植株的耐盐性测定Table 1 Assay for salt-tolerance of Shanmu 2 T₂ transgenic plants

Lines	0.3%NaCl		0.6%NaCl		0.9%NaCl	
	Mean germination rate (%)	Salt damage	Mean germination rate (%)	Salt damage	Mean germination rate (%)	Salt damage
SLM01	100	+	82.9	+	52.1	++
SLM05	100	+	78.8	+	44.3	+++
SLM07	100	+	79.2	+	46.6	+++
CK	100	+	35.0	+++	23.3	++++

盐害程度分为4级。+：轻(生长基本正常)；++：较轻(30%的植株上部叶片干尖，下部叶片发黄)；+++：较重(50%的植株接近死亡)；++++：重(70%的植株接近死亡)

Salt damage was divided into four levels. +: Light (normal growth); ++: Less (upside leaf tips turned dry and underside leaves turned yellow of thirty percent plants); +++: Less heavier (fifty percent plants died); ++++: Heavy (seventy percent plants died)

的T₂代种子播种在砂盆中，以未转基因的中苜1号(CK)为对照(表1)。在0.3%NaCl的鉴定中，所有植株均生长旺盛，出苗率为100%。在0.6%NaCl的鉴定中，3个转基因株系的出苗率介于78.8%–82.9%之间，生长基本正常，而中苜1号对照植株的出苗率则为35%，生长明显受阻，并且只有50%的植株存活。在0.9%NaCl的鉴定中，转基因植株的出苗率高于44.3%，最高达52.1%。但不同株系间盐害程度出现明显差异，转基因株系SLM01生长受阻，有70%的植株存活；转基因株系SLM05和SLM07生长明显受阻，只有50%的植株存活；而对照植株的出苗率则仅为23.3%，且小苗出苗后多数死亡，仅有30%的植株存活，生长严重受阻。由此可见，3个转基因株系的耐盐能力均优于对照品种中苜1号，不同株系的耐盐能力不同，株系SLM01的耐盐能力最强。

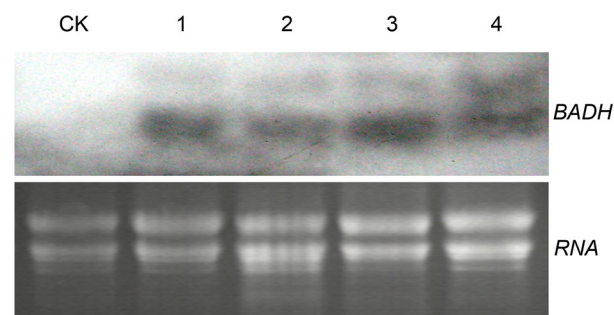
2.2 转BADH基因苜蓿新品种山苜2号的系统选育及营养成分检测

在对转基因苜蓿后代进行抗盐性鉴定及分子生物学检测的基础上，按照育种目标对各株系进行系统选育。首先，选择抗盐性强的8个T₀代转基因株系。然后，经连续2代的自交选育、PCR检测、耐盐性鉴定及对其遗传分离情况的观察筛选，得到SLM01、SLM05和SLM07三个疑似纯合系。3个株系间开放授粉，杂交组合，最终获得综合性状表现优异的转基因苜蓿新品种山苜2号(T₃)。该品种在申报安全性评价后，于2008年11月经国家林业局批准进行环境释放和生产实验。山苜2号经Northern杂交证明，BADH基因能够稳定地

遗传给后代(图3)。之后，由农业部食品质量监督检验测试中心测定转基因苜蓿新品种山苜2号的营养成分。从表2可以看出，初花期山苜2号品种的营养成分与对照品种相比存在一定的差异，山苜2号的粗蛋白含量比对照提高了7.1%，粗脂肪含量比对照提高了18.5%，磷含量比对照提高了36.4%。从营养成分的分析中可以看出，山苜2号新品种营养成分含量高，是理想的饲料作物。

2.3 山苜2号的物候期

由表3可以看出，山苜2号与对照品种(中苜1号)的生长发育规律基本相同。返青后35–40天开始分枝，现蕾后25–30天达到盛花期，结荚后1个月左右进入成熟期。不同品种间生育天数不同，同一品种不同年份

图3 山苜2号T₃代转基因植株的Northern杂交

CK: 非转基因植株; 1–4: 转基因植株

Figure 3 Northern blot of Shanmu 2 T₃ transgenic plants

CK: Non-transformed plant; 1–4: Transgenic plants

表2 山苜2号与中苜1号营养成分含量的比较**Table 2** The comparison of nutrition contents of Shanmu 2 with Zhongmu 1

Cultivar	Crude protein (%)	Crude fat (%)	Nitrogen free extract (%)	Crude fiber (%)	Crude ash (%)	Phosphor (%)	Calcium (%)
Zhongmu 1	16.84	2.7	30.7	35.4	8.59	0.22	1.16
Shanmu 2	18.04	3.2	28.3	35.4	9.62	0.30	1.34

表3 山苜2号(SLM05)和中苜1号的物候期(月-日)**Table 3** The phenology of Shanmu 2 (SLM05) and Zhongmu 1(month-day)

Year	Cultivar	Returning greening stage	Branching stage	Squaring stage	Flowering beginning stage	Flowering stage	Podding stage	Maturing stage	Bearing days (d)	Scorch stage	Growth days (d)
2007	Shanmu 2	03-12	04-20	04-28	05-04	05-24	06-14	07-13	124	12-07	271
	Zhongmu 1	03-16	04-23	05-01	05-08	05-27	06-17	07-18	125	12-09	269
2008	Shanmu 2	03-18	04-25	05-03	05-12	06-04	06-17	07-18	123	12-13	271
	Zhongmu 1	03-21	04-25	05-06	05-15	06-07	06-19	07-18	120	12-11	266
2009	Shanmu 2	03-13	04-17	04-27	05-08	05-25	06-11	07-12	125	12-07	272
	Zhongmu 1	03-15	04-19	04-30	05-09	05-26	06-12	07-14	125	12-09	272

生育天数也有差异。

2.4 山苜2号的特异性、一致性和稳定性性状特征

观测的3年中,从一致性和稳定性上看,山苜2号的质量性状(如生长习性为半直立、花色深紫色、荚果螺旋形且具绒毛、叶形为披针形、叶柄和茎上有绒毛)和数量性状(如叶长、叶宽和株高等)差异较小,以上性状均保持了良好的一致性和稳定性。从特异性上看,2个品种的差异主要表现在习性和分枝数上,特别是山苜2号的分枝数明显高于对照(中苜1号),这可能是其高产的主要原因。由于盐碱地常常会造成苜蓿品种出苗率低且出苗不均匀,产量下降,而分枝数高,则可弥补出苗不足的影响。山苜2号的株高虽在3年的观测中均高于对照(中苜1号),但差异不显著(表4)。

2.5 山苜2号的生物学特性

山苜2号植株株型为半直立,初花期株高84.5 cm,分枝期根茎分枝76个,叶片淡绿色(RHS 137C),披针形,三出羽状复叶,叶长2.8 cm,叶宽0.8 cm,叶被有茸毛,叶面光滑无绒毛。花为总状花序(叶腋生),花序长2.1 cm,由12–18个淡紫色(RHS 85A)小花组成,花长10 mm,花瓣宽4 mm,花粉量大(与对照相比)。花萼钟状,长5 mm,淡绿色,有5个锯齿,锯齿间距2.0 mm,锯齿长3 mm,上面生有白色茸毛。荚果螺

旋形1–2回,每花序果荚16个,2回的占34.4%,1回的占65.6%。种子成熟时,果皮呈褐色或黑色,1–2回的螺旋形果荚内含有种子2粒或3–4粒,种子肾形,黄褐色,千粒重为2.27 g。在含盐量为3‰–5‰的土壤中,干草产量介于15 655.2–16 595.2 kg·hm⁻²之间,比对照(中苜1号)增产13.11%–24.98%,单株产量183.6 g,比对照(中苜1号)增加1.5%,茎叶比为1.35:1。该品种抗盐碱能力强,再生速度快,一年可刈割3–4次。

2.6 品种比较实验

从2007–2009年连续3年的品种比较实验可以看出,山苜2号的产量与对照(中苜1号)相比存在显著或极显著差异。由表5可知,2008年山苜2号与对照(中苜1号)间产量存在极显著差异,鲜草和干草产量分别比对照(中苜1号)提高了24.38%和25.31%。2007年和2009年,山苜2号的鲜草、干草产量与对照(中苜1号)相比存在显著差异,鲜草产量比对照分别提高了14.47%和16.43%;干草产量比对照分别提高了19.07%和20.78%。

2.7 区域实验

山苜2号在东营、寿光、济南科技园和济南苗圃4个实验点种植时均表现出良好的适应性。整个生育期间生长旺盛、再生性好且抗盐碱能力强。由表6可知,山

表4 山苜2号与中苜1号植株形态的比较**Table 4** The comparison of the plant configuration features of Shanmu 2 with Zhongmu 1

	2007		2008		2009	
	Shanmu 2	Zhongmu 1	Shanmu 2	Zhongmu 1	Shanmu 2	Zhongmu 1
Habit	Half endlong	Middling	Half endlong	Middling	Half endlong	Middling
Plant height in autumn (cm)	37.7	32.3	41.2	31.2	40.7	31.9
Plant height in spring (cm)	53.7	48.2	55.1	50.0	53.9	47.9
Leaf length (cm)	3.1	3.1	3.3	3.2	3.2	3.1
Leaf width (cm)	1.2	1.3	1.3	1.4	1.5	1.2
Leaf color	RHS137A	RHS137A	RHS137A	RHS137A	RHS137A	RHS137A
Flower color	Modena	Shallow purple	Modena	Shallow purple	Modena	Shallow purple
Leaf shape	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate	Lanceolate
Petiole lanugo	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist
Stem lanugo	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist
The length of the longest stem (cm)	83	69	104	90	101	93
The first branch numbers	7.2*	5.0	58.1*	39.1	57.2**	41.4
The plant height of the first mowing (cm)	97.2	88.8	98.4	93.8	97.6	89.7
The plant height of the second mowing (cm)	75.3	66.6	80.7	71.6	77.8	60.4
The plant height of the third mowing (cm)	77.6	69.1	76.9	69.7	78.4	63.9
Pod shape	Spiral	Spiral	Spiral	Spiral	Spiral	Spiral
Pod pubescence	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist	Exist

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD测验) * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD test)**表5** 山苜2号与中苜1号产量的比较**Table 5** The output comparison of Shanmu 2 with Zhongmu 1

Year	Grass type	Grass output ($\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$)		Production increase rate (%)	Test notability
		Shanmu 2	Zhongmu 1		
2007	Fresh grass	66 769.5	58 329.8	14.47	*
	Dry grass	16 776.3	14 089.3	19.07	*
2008	Fresh grass	74 475.8	59 875.3	24.38	**
	Dry grass	18 434.6	14 711.4	25.31	**
2009	Fresh grass	65 962.4	56 652.1	16.43	*
	Dry grass	16 408.6	13 585.5	20.78	*

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD测验) * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD test)

苜2号在东营和寿光实验点3年的平均干草产量分别为14 986.3和18 700.1 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 比对照(中苜1号)平均增产25.13%和21.88%, 与对照相比, 差异极显著; 在济南科技园和济南苗圃实验点2年的平均干草产量分别为14 880.3和15 068.0 $\text{kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 比对照(中苜1号)平均增产13.94%和11.19%, 与对照相比差异达显著水平。

2.8 生产实验

东营、寿光和济南连续两年(2008–2009年)的大田生

产实验产量结果见表7。从表7可以看出, 山苜2号的饲草产量明显高于对照(中苜1号)。在东营实验基地, 山苜2号的鲜草和干草平均产量分别比对照提高了17.48%和22.32%; 在寿光实验基地, 山苜2号鲜草和干草平均产量分别比对照提高了11.30%和17.31%; 在济南科技园实验基地, 山苜2号鲜草和干草平均产量分别比对照提高了7.94%和13.78%。

2.9 讨论

本研究以转甜菜碱醛脱氢酶基因BADH的紫花苜蓿植

表6 不同区域山苜2号与中苜1号产量的比较

Table 6 The grass output comparison of Shanmu 2 with Zhongmu 1 in district experiments

Experiment spot	Year	Grass type	Grass output (kg·hm ⁻²)		Production increase rate (%)	Test notability	
			Shanmu 2	Zhongmu 1			
Dongying spot	2007	Fresh grass	54 326.8	43 013.2	26.30	*	
		Dry grass	13 615.7	10 646.8	27.89	*	
	2008	Fresh grass	62 174.6	51 804.7	20.02	*	
		Dry grass	15 901.4	12 823.0	24.01	**	
	2009	Fresh grass	61 458.1	50 765.9	21.06	*	
		Dry grass	15 441.7	12 504.0	23.50	*	
Shouguang spot	2007	Fresh grass	65 670.7	59 467.3	10.43	*	
		Dry grass	17 748.8	15 248.0	16.40	**	
	2008	Fresh grass	72 869.0	60 341.6	20.76	**	
		Dry grass	19 694.3	15 472.2	27.29	**	
	2009	Fresh grass	69 031.6	59 672.8	15.68	*	
		Dry grass	18 657.2	15 300.7	21.94	**	
	Jinan science and technology garden spot	2008	Fresh grass	45 132.5	40 128.7	9.32	*
			Dry grass	11 753.3	10 289.4	12.47	*
2009		Fresh grass	68 427.4	60 853.9	14.23	*	
		Dry grass	18 007.2	15 603.6	15.40	*	
Jinan nursery	2008	Fresh grass	47 135.7	44 943.8	4.88		
		Dry grass	12 086.1	11 024.1	9.63	*	
	2009	Fresh grass	71 954.2	6 575.9	9.60	*	
		Dry grass	18 049.8	16 009.2	12.75	*	

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD测验) * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD test)

表7 不同区域山苜2号与中苜1号生产实验产量的比较

Table 7 The grass output comparison of Shanmu 2 with Zhongmu 1 in production experiments

Experiment spot	Year	Grass type	Grass output (kg·hm ⁻²)		Production increase rate (%)	Test notability
			Shanmu 2	Zhongmu 1		
Dongying spot	2008	Fresh grass	57 923.4	51 023.3	13.52	*
		Dry grass	15 655.0	13 082.9	19.66	*
	2009	Fresh grass	62 895.8	51 785.9	21.45	**
		Dry grass	16 595.2	13 278.4	24.98	**
Shouguang spot	2008	Fresh grass	71 354.8	64 218.9	11.11	*
		Dry grass	19 285.1	16 466.4	17.12	*
	2009	Fresh grass	74 215.7	66 572.3	11.48	*
		Dry grass	20 058.3	17 069.8	17.51	*
Jinan science and technology garden spot	2008	Fresh grass	73 254.2	68 264.9	7.31	*
		Dry grass	19 798.4	17 503.8	13.11	*
	2009	Fresh grass	74 875.6	68 967.3	8.57	*
		Dry grass	20 363.7	17 683.9	14.44	*

* $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD测验) * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$ (LSD test)

株为材料, 从其后代(T₂代)中选育出耐盐基因型纯合自交系, 并通过3个株系多元杂交组配出耐盐、高产的杂交新品系山苜2号(T₃代)。之后, 通过分子生物学检测及盐碱地草产量抗盐性鉴定, 证明目的基因

*BADH*在山苜2号中可以稳定地遗传和表达。表明采用基因工程技术结合自交和杂交等常规育种方法培育符合市场需求的苜蓿耐盐新品种是一条有效且简捷的途径。

从本研究结果可以看出,来自不同自交系的转化体后代在耐盐性上有明显差异(表1),除受到体细胞无性系变异的影响外,可能还与外源基因整合位点的不同有关(Scott et al., 1998; Liu and Wang, 2003; Yin et al., 2004)。转基因植株的目标性状抗盐碱得到表达的同时,还伴随着其它植物生物学性状的变化,如获得的转基因苜蓿(山苜2号)生长习性为半直立(对照中苜1号生长习性中等)(表4),叶面与对照(中苜1号)相比光滑且无茸毛等。国内外许多学者的研究(Bao et al., 1996; Bregitzer et al., 1998; Cai et al., 2003)均发现了类似的现象,造成转基因植物后代在植物生物学性状上产生一系列变化的主要原因是外源基因导入、选择剂筛选和外源基因插入位点引起的位置效应等(Altman et al., 1991; van Lijsebettens et al., 1991; Benedict et al., 1996; Zhang et al., 1996)。此外,由于被导入的目的基因*BADH*来自山菠菜,因而对人畜无害;并且基因工程中采用的载体pBin-438、启动子35S、终止子NOS、标记基因*NPTII*和报告基因*GUS*亦未见对植物和人类有毒害作用,因此转*BADH*基因苜蓿是安全的。经国家林业局生物基因工程安全委员会审查、批复,同意转*BADH*基因苜蓿株系进行环境释放和生产实验。转*BADH*基因苜蓿除表现出抗盐碱外,其主要营养成分也发生了变化,粗蛋白和粗脂肪含量比对照(中苜1号)明显增加,是理想的饲料作物。导致营养成分发生变化的机理目前尚不清楚,有待进一步研究。

总之,从上述品种比较实验、区域实验和生产实验的结果可以看出,选育的耐盐抗旱新品种山苜2号株型为半直立,分枝较多,产草量高且再生能力强,适宜在干旱和盐碱土壤中大面积种植。该品种的成功选育和推广种植不仅能大幅度提高盐碱、干旱地区农牧业的可持续发展能力,为畜牧业提供优质高产的饲草饲料,促进当地养殖业的发展;还可增加植被覆盖率,有效缓解水土流失和土壤沙化,并可满足盐碱地生态工程建设的迫切需求,因此具有良好的经济、生态和社会效益。

参考文献

李银心,常凤启,杜立群,郭北海,李洪杰,张劲松,陈受宜,朱至清(2000). 转甜菜碱醛脱氢酶基因豆瓣菜的耐盐性. 植物学报 42, 480-484.

- 梁慧敏,夏阳,孙仲序,王太明,刘德玺,王国良,黄剑,陈受宜(2005). 根瘤农杆菌介导苜蓿遗传转化体系的建立. 农业生物技术学报 13, 152-156.
- 刘媛,夏阳,杨克强,李双云,李丽,庞彩虹,燕丽萍(2009). 渗透胁迫下转*BADH*基因苜蓿组培苗的抗性响应. 中国农学通报 25, 133-136.
- 王关林,方宏筠(2002). 植物基因工程(第2版). 北京:科学出版社. pp. 638-661.
- 燕丽萍,夏阳,梁慧敏,王友平,刘翠兰,王振猛,李丽(2009a). 卡那霉素叶片涂抹法田间筛选转基因苜蓿的研究. 中国农学通报 14(25), 22-26.
- 燕丽萍,夏阳,梁慧敏,王珍珍,李双云,刘翠兰,庞彩虹(2009b). 转*BADH*基因苜蓿T₁代遗传稳定性和抗盐性研究. 草业学报 6(18), 65-71.
- Altman DW, Stelly DM, Mitten DM (1991). Quantitative trait variation in phenotypically normal regenerants of cotton. *In Vitro Cell Dev Biol* 27, 132-138.
- Bao AK, Wang SM, Wu GQ, Xi JJ, Zhang JL, Wang CM (2009). Overexpression of the Arabidopsis H⁺-PPase enhanced resistance to salt and drought stress in transgenic alfalfa (*Medicago sativa* L.). *Plant Sci* 176, 232-240.
- Bao PH, Granata S, Castiglione S, Wang GJ, Giordani C, Cuzzoni E, Damiani G, Bandi C, Datta SK, Datta K, Potrykus I, Callegarin A, Sala F (1996). Evidence for genomic changes in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) recovered from protoplasts. *Transgenic Res* 5, 97-103.
- Benedict JH, Sachs ES, Altman DW, Deaton WR, Kohel RJ, Ring DR, Berberich SA (1996). Field performance of cottons expressing transgenic CryIA insecticidal proteins for resistance to *Heliothis virescens* and *Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 89, 230-238.
- Bregitzer P, Halbert SE, Lemaux PG (1998). Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. *Theor Appl Genet* 96, 421-425.
- Cai WQ, Fang RX, Shang HS, Wang X, Zhang FL, Li YR, Zhang JC, Cheng XY, Wang GL, Mang KQ (2003). Development of CMV- and TMV-resistant chili pepper: field performance and biosafety assessment. *Mol Breed* 11, 25-35.
- Chen JJ, Rowley JD, Wang SM (2000). Generation of longer cDNA fragments from serial analysis of gene expression tags for gene identification. *Proc Natl Acad Sci USA* 97, 349-353.
- Desgagnés R, Laberge S, Allard G, Khoudi H, Castonguay Y, Lapointe J, Michaud R, Vézina LP (1995). Genetic transformation of commercial breeding lines of

- alfalfa (*Medicago sativa*). *Plant Cell Tissue Organ Cult* **42**, 129–140.
- Fromm ME, Morrish F, Armstrong C, Williams R, Thomas J, Klein TM** (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biotechnology* **8**, 833–839.
- Liu YJ, Wang GY** (2003). The inheritance and expression of *cry1A* gene in transgenic maize. *Acta Bot Sin* **45**, 253–256.
- Osborn TC, Brouwer D, McCoy TJ** (1997). Molecular marker analysis of alfalfa. In: McKersie B, Brown D, eds. *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. Wallingford: CABI Publishing. pp. 91–109.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T** (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd edn. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 845–849.
- Scott A, Woodfield D, White DWR** (1998). Allelic composition and genetic background effects on transgene expression and inheritance in white clover. *Mol Breed* **4**, 479–490.
- van Lijsebettens M, Vanderhaeghen R, van Montagu M** (1991). Insertional mutagenesis in *Arabidopsis thaliana*: isolation of a T-DNA-linked mutation that alters leaf morphology. *Theor Appl Genet* **81**, 277–284.
- Weeks JT, Ye JS, Rommens CM** (2008). Development of an *in planta* method for transformation of alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Res* **17**, 587–597.
- Yin XY, Yang AF, Zhang KW, Zhang JR** (2004). Production and analysis of transgenic maize with improved salt tolerance by the introduction of *AtNHX1* gene. *Acta Bot Sin* **46**, 854–861.
- Zhang S, Warkentin D, Sun B, Zhong H, Sticklen M** (1996). Variation in the inheritance of expression among subclones for unselected (*uidA*) and selected (*bar*) transgenes in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* **92**, 752–761.

Breeding and Salt Resistance Evaluation of *BADH* Transgenic Alfalfa Cultivar Shanmu 2

Liping Yan^{1,2}, Yang Xia^{1,2*}, Xiuhong Mao^{1,2}, Cuilan Liu^{1,2}, Huimin Liang³

¹Shandong Provincial Academy of Forestry, Jinan 250014, China; ²Shandong Provincial Key Laboratory of Forest Tree Genetic Improvement, Jinan 250014, China; ³Jiangsu Polytechnic College of Agriculture and Forestry, Jurong 212400, China

Abstract Generating new germplasm of alfalfa by transgenic technology has become important in forage breeding. Using a T₀ generation of transgenic plants with betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) gene as testing material, we tested the resistance to salt. The transgenic grass biomass was higher than that of the non-transgenic control in different salt soils. Dry grass production was higher by 13.11% to 24.98% in the transgenic cultivar than in the control. The betaine aldehyde dehydrogenase gene was stably expressed and inherited, suggesting that this transgenic line can be used for further breeding.

Key words alfalfa, betaine aldehyde dehydrogenase gene, salt-tolerance, selection breeding, shanmu 2 cultivar, transformation

Yan LP, Xia Y, Mao XH, Liu CL, Liang HM (2011). Breeding and salt resistance evaluation of *BADH* transgenic alfalfa cultivar Shanmu 2. *Chin Bull Bot* **46**, 293–301.

* Author for correspondence. E-mail: xiayang0506@126.com