

转 $GsCa^{2+}$ -ATPase 基因大豆主要农艺性状调查与分析

赵超越, 柏锡, 樊超, 林凡敏, 才华, 纪巍, 朱延明

(东北农业大学 生命科学院 植物生物工程研究室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 为对转基因大豆新株系的主要农艺性状进行科学评价, 对已获得耐盐碱性状显著的转 $GsCa^{2+}$ -ATPase 基因大豆的 3 个株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 的 T_3 植株进行种子萌发率、种子落粒性、产量性状、品质性状和形态性状的调查与分析。结果表明: 在种子萌发率、种子落粒性、形态性状和产量性状上, 3 个转基因大豆株系与对照相比无显著差异。在品质性状上, 3 个转基因株系的蛋白含量与对照差异不显著。表明没有因导入耐盐碱基因而导致上述性状产生不良变化。油分含量与对照相比, 株系 HF50-CA-1 和 HF55-CA-1 分别显著下降 1.01% 和 0.56%, 而 HF55-CA-2 株系则差异不显著。

关键词: 转基因大豆; 耐盐碱; $GsCa^{2+}$ -ATPase 基因; 农艺性状

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)06-0903-04

Investigation and Analysis of Main Agronomic Traits of Transgenic Soybean with $GsCa^{2+}$ -ATPase Gene

ZHAO Chao-yue, BAI Xi, FAN Chao, LIN Fan-min, CAI Hua, JI Wei, ZHU Yan-ming

(Plant Bioengineering Laboratory, College of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: In order to evaluate the variation of the main agronomic traits between transgenic soybean and the control, the seed germination, seed shattering, yield traits, morphological and quality traits of three T_3 transgenic soybean lines HF50-CA-1, HF55-CA-1 and HF55-CA-2 were investigated and analyzed. No obvious differences in seed germination, seed shattering, yield traits, morphological traits and protein content were found for transgenic soybeans. The oil content of HF50-CA-1, HF55-CA-1 were decreased by 1.01% and 0.56% compared with the control, while HF55-CA-2 had no obvious differences. This study provides an important genetic resource for the industrialization of alkali tolerant transgenic soybeans.

Key words: Transgenic soybean; Tolerant to saline and alkaline stress; $GsCa^{2+}$ -ATPase gene; Agronomic traits

盐碱地在中国分布广泛, 现有盐碱地面积约 0.4 亿 hm^2 。随着我国人口增加, 耕地减少, 盐碱地资源的开发利用有着极其重要的现实意义^[1]。随着分子生物学与基因工程技术的日趋成熟和迅猛发展, 植物抗盐碱基因工程研究已取得了长足的发展, 已有较多研究将耐盐碱基因克隆后整合到具有较高经济和生态价值的植物中, 开辟了选育耐盐碱植物品种的新途径^[2-5]。迫于进口大豆的压力, 在 2010 年, 东北三省一区(黑龙江、吉林、辽宁、内蒙古)大豆播种面积同比减少 10%。作为大豆主产省, 黑龙江大豆种植面积减少 37 万 hm^2 。而培育耐盐碱的转基因大豆, 充分利用盐碱地, 扩大大豆的适宜种植面积以提高大豆产量, 对中国大豆产业的发展尤为重要。

本实验室之前通过遗传转化获得的转 $GsCa^{2+}$ -ATPase 基因 3 个株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 已通过分子生物学检测及耐盐抗性试

验, 外源基因在此 3 个株系中获得了稳定遗传, 且 3 个株系的耐盐碱性显著提高(数据另文发表)。

植物遗传转化在获得目标性状的同时还应保留转基因植物的应用价值, 因此必须对转基因株系的农艺性状进行调查^[6]。本研究在已确定此 3 个株系耐盐碱性显著提高的基础上, 对转基因大豆新株系进行种子萌发率、种子落粒性、产量性状、形态性状和品质性状进行调查分析, 为其产业化研究提供重要依据, 为大豆新品种的培育提供重要种质资源。

1 材料与方法

1.1 植物材料

耐盐碱转基因大豆株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 及其受体对照品种合丰 50、合丰 55。

收稿日期: 2012-06-14

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-002); 国家自然科学基金项目(31171578); 黑龙江省高校科技创新团队建设计划项目(2011TD055)。

第一作者简介: 赵超越(1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为植物基因工程与分子生物学。E-mail: zhaofei0805@126.com。

通讯作者: 朱延明(1955-), 男, 教授, 博士生导师, 从事植物基因工程与分子生物学研究。E-mail: ymzhu2001@yahoo.com.cn。

1.2 栽培方法

试验于 2011 年在东北农业大学香坊实验站进行。将 3 个转基因株系及 2 个对照品种分别种在 5 个小区,每个小区 4 行,行长 5 m,行距 0.5 m,播种时施足基肥,人工点播,田间栽培及管理方法符合《农业转基因生物安全评价管理办法》附件 1 的要求。

1.3 调查标准

1.3.1 种子萌发率 待大豆幼苗出土后,每天记录出苗的种子数,10 d 后扒开土壤记录已发芽而未出土的种子数,二者合为萌发种子数。

发芽率 = 规定发芽率测定天数内正常发芽的种子粒数/播种数 × 100

1.3.2 种子落粒性 随机选择不同株系的 10 个植株,在大豆生理成熟后开始观察供试材料在自然条件下的落粒数。每 7 d 观察 1 次,共观察 3 次。记录植株总粒数、已落粒数。

1.3.3 产量性状 单株荚数:统计单株全部正常结实的荚数,每个株系调查 10 株。

单株粒数:统计单株全部正常结实的籽粒数,每个株系调查 10 株。

百粒重:从单株正常结实粒中随机选取 100 粒称重,3 次重复,计算均值(g)。

1.3.4 形态性状 株高:测量成熟时大豆植株从子叶节到主茎顶端生长点的长度(cm),每株系调查 10 株。

结荚习性:在盛花期调查,结荚习性指植株开花结荚状况,分无限型(I)、亚有限型(S)、有限型(D)三类。

花色:指花瓣的颜色,分紫色(P)、白色(W)两类。

叶形:指盛花期植株中上部第 8~10 节的复叶中间小叶的形状,分长叶(L)、圆叶(R)两类。

1.3.5 品质性状 蛋白质含量:株系混合脱粒后,取 5 g 样品由农业部谷物及制品质量监督检测中心(哈尔滨)测得,3 次重复,用百分数表示(%)。

油分含量:株系混合脱粒后,取 5 g 样品由农业部谷物及制品质量监督检测中心(哈尔滨)测得,3 次重复,用百分数表示(%)。

1.4 数据分析

采用新复极差法进行多重比较,使用 matlab 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 种子萌发率

转基因大豆株系种子萌发率调查结果见表 1。

表 1 转基因大豆种子萌发率

Table 1 Germination rate of transgenic soybean

| 品种/株系 Cultivar/line | 播种数 No. of sowing | 出芽数 No. of germination | 发芽率 Germination rate% |
|------------------------|----------------------|---------------------------|--------------------------|
| 合丰 50 Hefeng50 | 100 | 89 | 89.0 |
| 合丰 55 Hefeng55 | 105 | 85 | 81.0 |
| HF50-CA-1 | 30 | 26 | 87.0 |
| HF55-CA-1 | 30 | 24 | 80.0 |
| HF55-CA-2 | 30 | 30 | 100.0 |

试验材料在 5 月 3 日同时播种,均在 5 月 16 日开始出苗,5 月 25 日统计最终萌发种子数。由表 1 可以看出,转基因株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 的种子萌发率和对照品种相比无显著差异,说明转基因植株没有因为外源基因的导入而影响其种子萌发率。

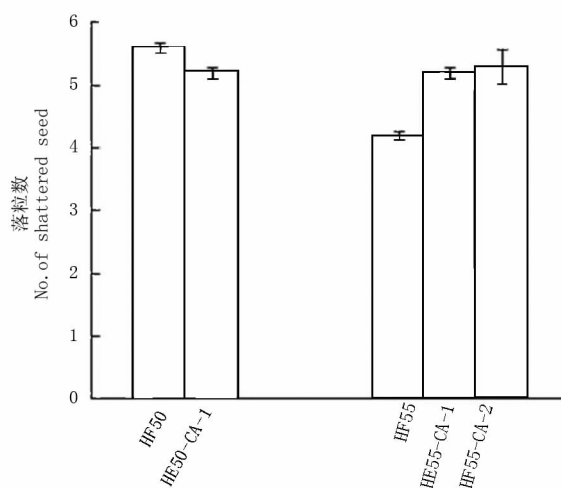


图 1 转基因大豆种子落粒性

Fig. 1 Seed shattering of transgenic soybean

2.2 种子落粒性

经 3 次调查统计,合丰 50 和合丰 55 的平均落粒数分别为 5.6 和 4.2 个,转基因大豆株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1 和 HF55-CA-2 的落粒性分别为 5.2、5.3 和 5.2 个,且与对照品种差异不显著。种子落粒会减少收获产量,进行育种工作时应尽量选取落粒性适中的材料。本数据统计自无碰撞落粒的植株,调查数据表明转基因植株没有因为外源基因的导入而导致种子落粒性的改变。

2.3 产量性状

转基因大豆及其对照产量性状调查结果见表 2。

表 2 转基因大豆产量性状表现
Table 2 Yield performance of transgenic soybean

| 品种/株系 Cultivar/line | 单株荚数 Pods per plant | 单株粒数 Seeds per plant | 百粒重 100-seed weight/g |
|------------------------|---------------------------|----------------------------|-----------------------------|
| 合丰 50 Hefeng50 | 91.8a | 249.4a | 22.86a |
| HF50-CA-1 | 94.4a | 245.1a | 21.74a |
| 合丰 55 Hefeng55 | 95.2a | 256.0a | 22.57a |
| HF55-CA-1 | 93.1a | 242.1a | 21.70a |
| HF55-CA-2 | 97.0a | 245.5a | 21.95a |

同列数值后不同小写字母表示在 0.05 水平上差异显著。下同。
Values within a column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 probability level. The same bellow.

表 3 转基因大豆形态性状
Table 3 Morphological traits of transgenic soybean

| 品种/株系 Cultivar/line | 株高 Plant height/cm | 结荚习性 Podding habit | 花色 Flower color | 叶形 Leaf shape |
|------------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|------------------|
| 合丰 50 Hefeng50 | 95.8a | S | P | L |
| HF50-CA-1 | 98.3a | S | P | L |
| 合丰 55 Hefeng55 | 97.7a | S | P | L |
| HF55-CA-1 | 96.7a | S | P | L |
| HF55-CA-2 | 95.3a | S | P | L |

2.5 品质性状

由表 4 可知,转基因大豆与对照相比,株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 蛋白含量均与对照相比无显著差异。株系 HF50-CA-1 和 HF55-CA-1 油分含量显著低于对照,分别下降了 1.01% 和 0.56%。

表 4 转基因大豆品质性状
Table 4 Quality traits of transgenic soybean

| 品种/株系 Cultivar/line | 蛋白含量 Protein content/% | 油分含量 Oil content/% |
|------------------------|---------------------------|-----------------------|
| 合丰 50 Hefeng50 | 38.71a | 19.96a |
| HF50-CA-1 | 40.86a | 18.95b |
| 合丰 55 Hefeng55 | 40.97a | 18.65a |
| HF55-CA-1 | 40.65a | 18.09b |
| HF55-CA-2 | 39.77a | 18.81a |

3 讨 论

由试验调查结果可以看出,转基因大豆在整合外源基因使其耐盐碱性提高的同时,并未在种子萌发率、种子落粒性、产量性状和形态性状等农艺性状上产生不良变异,蛋白含量水平也未产生变化,只是 HF50-CA-1 和 HF55-CA-1 在油脂含量上有所下降,但降幅不大,不会影响它作为油料作物的应用价值。说明外源 *Ca²⁺-ATPase* 基因在受体中的表达和它的插入位点没有对新株系的农艺性状造成显著的影响,转基因大豆新株系较好的保留了它的

由表 2 可知,株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 与对照相比,单株荚数、单株粒数、百粒重均不存在显著差异。供试材料和对照品种以相同时间,地点和方法种植,说明转基因大豆与对照相比,在产量性状上无显著差异。

2.4 形态性状

由表 3 可知,株系 HF50-CA-1、HF55-CA-1、HF55-CA-2 与对照品种相比,在株高、花色、结荚习性、叶形等方面无明显差异,说明转基因大豆与对照品种相比,在形态性状上亦无显著差异。

应用价值,保证了它的应用前景。
本试验所用材料中的 *Ca²⁺-ATPase* 基因是由本实验室从野生大豆盐碱胁迫表达谱芯片中分析所得。*Ca²⁺-ATPase* 是植物体中广泛存在的一种响应 *Ca²⁺* 调节渗透胁迫的主要 ATP 酶,研究发现植物 *Ca²⁺-ATPase* 主要参与植物的盐胁迫反应。拟南芥中 *Ca²⁺-ATPase* 的同源基因 *AtACA4* 在植物响应盐胁迫的过程中起重要作用,*AtACA4* 编码的蛋白质若被修饰,会通过影响盐胁迫应答的钙信号传递过程提高拟南芥对盐胁迫敏感性^[7]。苔藓植物中 *Ca²⁺-ATPase* 的同源基因 *PCA1* 在干旱、盐胁迫和脱落酸处理时上调表达。在盐处理下,酵母 *pca1* 的突变体降低了 *Ca²⁺* 外排的能力^[8]。说明 *Ca²⁺-ATPase* 是通过维持细胞内钙离子浓度的稳定来提高植物的耐盐能力,但是 *Ca²⁺-ATPase* 对植物生长发育的影响尚未见报道。

本研究中,油分含量有显著性下降的 HF 50-CA-1 和 HF55-CA-1 正是之前的耐盐抗性实验中耐盐能力较强的 2 个株系,可能是 *Ca²⁺-ATPase* 基因的超表达使这 2 个株系耐盐能力显著提高的同时,在一定程度上降低了其油分含量。*Ca²⁺-ATPase* 合成及其在行使功能时会消耗大量 ATP,这样便在一定程度上不利于能量向脂肪的转化而贮存起来^[9-10]。其他原因也可能造成这一现象,如:组织培养过程的无性突变或是外源基因的随机位点插入导致的某个基因的功能丧失。

参考文献

- [1] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京:科学出版社,1999. (Zhao K F, Li F Z. China halophyte [M]. Beijing: Science Press,1999.)
- [2] 蔡一荣,李望丰,刘立侠,等. 大豆品质改良的基因工程育种概况[J]. 大豆科学,2006,25(1):62-66. (Cai Y R, Li W F, Liu L X, et al. Genetic engineering on improving soybean quality traits in breeding[J]. Soybean Science,2006,25(1):62-66.)
- [3] 江香梅,黄敏仁,王明麻. 植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展[J]. 南京林业大学学报(自然科学版),2006,25(5):57-61. (Jiang X M, Huang M R, Wang M X. A review on salt and drought resistance gene engineering in plants[J]. Journal of Nanjing Forestry University(Natural Sciences Edition),2006,25(5):57-61.)
- [4] 化焯,才华,朱延明,等. 植物耐盐基因工程研究进展[J]. 东北农业大学学报,2010,41(10):150-156. (Hua Y, Cai H, Zhu Y M. Research progress on plant salt stress tolerance genetic engineering[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2010,41(10):150-156.)
- [5] 周延清,王娜,苑保军,等. 大豆遗传转化研究进展[J]. 武汉植物学研究,2004,22(2):163-170. (Zhou Y Q, Wang N, Yuan B J, et al. Current review on genetic transformation of soybean[J]. Journal of Wuhan Botanical Research,2004,22(2):163-170.)
- [6] 张家榕,李贵全. 大豆农艺性状与抗旱性研究[J]. 山西农业大学学报,2006,26(2):143-145. (Zhang J R, Li G Q. Studies on agricultural property and drought resistance of soybean[J]. Journal of Shanxi Agricultural University,2006,26(2):143-145.)
- [7] Geisler M, Erangne N, Gomès E, et al. The ACA4 gene of *Arabidopsis* encodes a vacuolar membrane calcium pump that improves salt tolerance in yeast[J]. Plant Physiology,2000,124(4):1814-27.
- [8] Qudeimat E, Faltusz A M C, Wheeler G, et al. A PIIB-type Ca^{2+} -ATPase is essential for stress adaptation in *Physcomitrella patens* [J]. PNAS,2008,105(49):19555-19560.
- [9] 武维华. 植物生理学[M]. 北京:科学出版社,2003. (Wu W H. Plant physiology[M]. Beijing: Science Press,2003)
- [10] 范玲玲,陈刚,戴绍军,等. NaHCO_3 胁迫下星星草根中 Ca^{2+} 与 Ca^{2+} -ATPase 的超微细胞化学定位[J]. 植物学报,2010,45(3):337-344. (Fan L L, Chen G, Dai S J, et al. Ultracy to chemical Localization of Ca^{2+} and Ca^{2+} -ATPase in the root of *Puccinellia tenuiflora* under NaHCO_3 stress[J]. Chinese Bulletin of Botany,2010,45(3):337-344.)
- (上接第902页)
- [7] 蒲定福,周俊儒,李邦发,等. 根倒伏小麦抗倒性评价方法研究[J]. 西北农业学报,2000,9(1):58-61. (Pu D F, Zhou J R, Li B F, et al. Evaluation method of root lodging resistance in wheat [J]. Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica,2000,9(1):58-61.)
- [8] 傅志强,黄璜,李小平. 水稻抗倒伏模型研究进展[J]. 作物研究,2009,23(1):60-62. (Fu Z Q, Huang H, Li X P. Research progress of model lodging resistance in rice[J]. Crop Research,2009,23(1):60-62.)
- [9] 田保明,杨光圣. 农作物倒伏及其评价方法[J]. 中国农学通报,2005,21(7):111-114. (Tian B M, Yang G S. The performance of lodging and developing standard test for lodging resistance in crops [J]. Chinese Agronomical Bulletin,2005,21(7):111-114.)
- [10] 郭玉明,袁红梅,阴妍,等. 茎秆作物抗倒伏生物力学评价研究及关联分析[J]. 农业工程学报,2007,23(7):14-18. (Guo Y M, Yuan H M, Yin Y, et al. Biomechanical evaluation and grey relational analysis of lodging resistance of stalk crops[J]. Transactions of the CSAE,2007,23(7):14-18.)
- [11] 勾玲,赵明,黄建军,等. 玉米茎秆弯曲性能与抗倒能力的研究[J]. 作物学报,2008,34(4):653-661. (Gou L, Zhao M, Huang J J, et al. Bending mechanical properties of stalk and lodging-resistance of maize [J]. Acta Agronomica Sinica,2008,34(4):653-661.)
- [12] 李永忠. 玉米根茎倒伏的调查研究[J]. 国外农学-玉米,1990(2):5-9. (Li Y Z. The survey of study on stem and root system of maize[J]. Agronomy Overseas-Maize,1990(2):5-9.)
- [13] 孙世贤,戴俊英,顾慰连. 密度对玉米倒伏及其产量的影响[J]. 沈阳农业大学学报,1989,20(4):413-416. (Sun S X, Dai J Y, Gu W L. Effects of plant density on stalk lodging and yield in maize[J]. Journal of Shenyang Agricultural University,1989,20(4):413-416.)
- [14] 贾志森,白永新. 玉米自交系抗倒伏鉴定研究[J]. 作物品种资源,1992(3):30-32. (Jia Z S, Bai Y X. Identification of lodging resistance in inbred lines corn[J]. Crop Genetic Resources,1992(3):30-32.)
- [15] 董学会,段留生,孟繁林,等. 30%已·乙水剂对玉米产量和茎秆质量的影响[J]. 玉米科学,2006,14(1):138-140,143. (Dong X H, Duan L S, Meng F L, et al. Effects of spraying 30% DTA-6 ethephon solution on yield and straw quality of maize[J]. Journal of Maize Science,2006,14(1):138-140,143.)
- [16] Goodman A M, Ennos A R. The responses of field-grown sunflower and maize to mechanical support[J]. Annual Botany,1997,79:703-711.