

# 转 *GmHAP3-17* 基因大豆的抗旱性分析

王鼎慧<sup>1,2</sup>, 李永光<sup>1</sup>, 李 真<sup>1</sup>, 李文滨<sup>1</sup>

(1. 辽宁师范大学 生命科学院, 辽宁 大连 116029; 2. 东北农业大学大豆生物学教育部重点实验室/东北农业大学农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘 要:** *GmHAP3-17* 基因是一个与 *AtHAP3-1* 同源的转录因子, 本研究利用超表达 *GmHAP3-17* 大豆, 在模拟干旱条件下以及田间干旱试验下进行了转基因大豆的抗旱性分析。结果显示: 在大棚盆栽模拟干旱胁迫条件下, 转基因大豆 H16、H18、H26 比野生型大豆 WT 根系发达, 主根长且侧根较多, 植株生长状态比对照好, 叶片枯萎发生较迟、程度较轻。转基因大豆与野生型相比, MDA 含量低, 叶片伤害度较轻, 叶片含水量较高。进一步研究表明, 在田间自然干旱胁迫下, 转基因大豆同样表现出较好的生长状况, 较低的叶片伤害度和较高的叶片含水量。在自然干旱条件下, 与野生型大豆相比, 转 *GmHAP3-17* 基因大豆表现为根系发达、扎根深、侧根多, 增加了株高、主茎节数、有效分枝数。H26 株系的有效荚数、单株粒数、单株粒重、百粒重均比野生型提高明显, 表现出了显著的产量优势。上述结果表明: *GmHAP3-17* 基因具有正调控干旱的功能, 因而该基因将成为培育抗旱转基因作物的一个有效的基因资源。

**关键词:** *GmHAP3-17*; 大豆; 抗旱性; 基因功能分析

中图分类号: S565. 1      文献标识码: A      DOI: 10. 11861/j. issn. 1000-9841. 2015. 02. 0249

## Aanalysis of Drought Tolerance in Transgenic Soybean with *GmHAP3-17*

WANG Ding-hui<sup>1,2</sup>, LI Yong-guang<sup>1</sup>, LI Zhen<sup>1</sup>, LI Wen-bin<sup>1</sup>

(1. College of Life Sciences, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China; 2. Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Key Laboratory of Soybean Biology and Breeding/Genetics of Chinese Agriculture Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

**Abstract:** The present research work was mainly aim at analysing the morphological and physiological response under drought stress in transgenic soybean with *GmHAP3-17*. The results showed that under water-limited conditions of greenhouse, comparing with wild-type, the H16, H18 and H26 lines of transgenic soybean appeared better growth status, wilting later and milder, longer taproot, more lateral roots, lower degree of leaf damage, lower concentration of MDA and higher content of leaf relative water. Future experiment proved that under natural drought conditions of dry regions, comparing with wild-type, the root system of transgenic soybeans developed well, grew rapidly, and showed longer taproot, more lateral roots. The plants of transgenic soybean were higher in plant height, more in the number of branch and main stem node, more in pods and kernels, larger in seed size and hundred-grain weight. These consequences indicated that the *GmHAP3-17* gene functions were positive regulation after drought stress treatment and thus, it could be useful in molecular breeding as effective genetic sources of transgenic crops.

**Keywords:** *GmHAP3-17*; Soybean; Drought tolerance; Gene function analysis

在多种多样的生物和非生物胁迫下, 提高作物的产量是全球农业面临的重大挑战<sup>[1]</sup>。干旱、盐等非生物逆境胁迫是植物生长发育的主要限制因子, 严重影响着作物品质及产量<sup>[2]</sup>。植物体内存在一类转录因子通过和调控因子的相互作用调控下游基因表达, 从而提高植物的抗逆性<sup>[3]</sup>。核因子-Y 是一种普遍存在的转录因子, 被称为 HAP, 由 HAP2、HAP3 和 HAP5 三个不同的亚基组成, 识别核心序列为 CCAAT 的顺式作用元件<sup>[4-5]</sup>, 调控基因特异性表达。模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 中有 36 个 HAP 转录因子亚基, 包括 10 个 HAP2, 13 个 HAP3 和 13 个 HAP5, 理论上能结合形成 1 690 个独

特的复合物<sup>[6]</sup>。在干旱胁迫下, *AtHAP* 基因能够提高植株的耐旱性, 转基因拟南芥还表现出对高盐和外源 ABA 的敏感性的提高<sup>[7]</sup>。

目前, 利用抗逆相关的转录因子改良作物, 有效的提高植物抗逆性进而产量的报道, 不仅限于模式植物拟南芥, 已经扩展到烟草、水稻和玉米等重要的农作物。然而, 关于重要油料作物大豆 (*Glycine max*) 的研究报道较少。大豆基因组中已发现 29 个 *HAP3* 基因, 其中 *GmHAP3-17* 基因是一个与 *AtHAP3-1* 同源的转录因子。本研究利用超表达 *GmHAP3-17* 大豆, 在模拟干旱条件下以及田间干旱试验下进行抗旱性分析, 进而明确该基因的功能, 为

收稿日期: 2014-05-19  
基金项目: 中国博士后科学基金(2014M551205); 国家自然科学基金(31201228)。  
第一作者简介: 王鼎慧(1986-), 女, 硕士, 主要从事植物遗传与育种研究。E-mail: 13125926318@163.com。  
通讯作者: 李文滨(1958-), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

培育抗旱转基因作物提供有效的基因资源。

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用3个转 *GmHAP3-17* 基因大豆 H16、H18 及 H26 株系的 T<sub>3</sub> 代群体为试验材料,以转基因受体品种“东农 50”(WT)作为对照。

1.2 试验设计

1.2.1 日光大棚盆栽试验 将3份转基因大豆及对照播种于花盆中,每盆土壤 2.5 kg,每份材料 50 株,重复3次。花盆置于抗旱防雨棚内,定量浇水。第2片三出复叶展开后停止浇水,自然干旱处理。干旱胁迫处理 21 d 后,再恢复浇水。

在经过 21 d 干旱胁迫处理和恢复浇水 7 d 后,观察记录根系及地上部表型;于干旱胁迫 6,8,12 和 21 d 后分别测定叶片丙二醛(MDA)含量;于干旱胁迫 8,12,16 和 20 d 后分别测定叶片电导率;于干旱胁迫 8,14,18 和 20 d 后分别测定叶片相对含水量。

1.2.2 田间干旱试验 试验在新疆沙湾县乌兰乌苏镇进行,该地区主要为灌溉农业,常年干燥少雨,属于典型的干旱气候地区,平均年降水量为 145 mm,是全国平均值的 23%。2012 年 4 月 28 日播种,小区面积 4.2 m<sup>2</sup>,垄宽 70 cm,6 m 垄长,双条播种间距 12 cm,株距 10 cm。试验重复 3 次,随机区组排列。处理为靠自然降雨不灌溉,播种后第 7 周测定土壤相对含水量为 10%,膜下滴灌处理为对照。

播种后第 7 周,调查记录干旱胁迫下根系及地上部表型,测定叶片电导率和相对含水量;播种后 105 d,进入成熟期,5 d 后收获,调查 H26 与野生型的大豆农艺性状进行比较分析。

1.3 测定项目与方法

丙二醛含量:采用硫代巴比妥酸(TAB)比色法测定。

相对电导率的测定:将采集叶片样品置入盛有 20 mL 纯水的三角瓶中,真空处理 10 min 后,测定叶片电导率(S1)。然后将叶片置入沸水中处理 10 min,冷却至室温,再测定叶片电导率(S2)。各样本进行 3 次重复。根据测定的电导率值计算叶片伤害程度(L): $L = S1/S2 \times 100$ 。

大豆叶片相对含水量测定:采用饱和称重法。  
相对含水量(RWC) = (自然鲜质量-干质量) / (饱和鲜质量-干质量) × 100 %。

1.4 数据分析

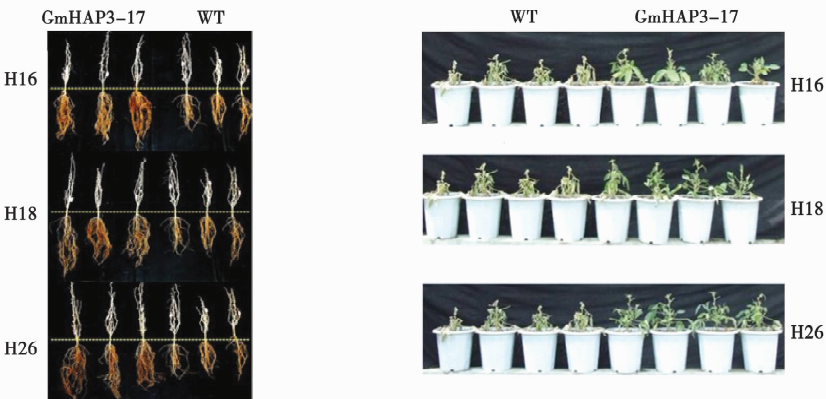
采用 SPSS 13.0 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 转 *GmHAP3-17* 基因大豆盆栽干旱胁迫效应

2.1.1 表型观察 转 *GmHAP3-17* 基因大豆 H16、H18、H26 和野生型大豆东农 50(WT)在塑料大棚中生长至第 2 片三出复叶展开时,停止浇水进行干旱胁迫处理,转经过 3 周干旱胁迫后,转基因植株与对照之间,根系生长发生了明显的差异。转基因大豆 H16、H18、H26 植株的根系比对照 WT 发达,表现为主根长且侧根较多(图 1-A)。

干旱处理后,转 *GmHAP3-17* 大豆株系仍然生长良好,偶有轻微萎蔫的叶片。但在恢复浇水后能迅速恢复正常。相比较之下,野生型大豆东农 50 出现了比较严重的萎蔫现象,个别植株出现了不可逆的脱水萎蔫现象,甚至死亡(图 1-B)。表明 *GmHAP3-17* 基因可能与干旱胁迫应答有关。



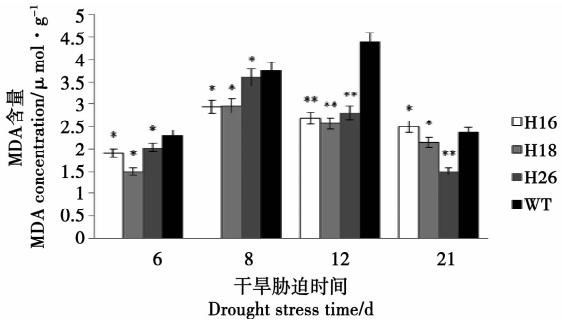
A: 干旱胁迫 21 d 后;B: 复水后 7 d。

A: 21 days after drought stress treatment;B: 7 days after re-water.

图 1 抗旱棚干旱试验下转基因和野生型大豆的表型差异

Fig. 1 The morphological differences of transgenic and wild-typeSoybean under drought simulation experiments

2.1.2 生理指标 (1) 丙二醛(MDA)含量:胁迫 6,8 和 12 d 后,转基因大豆 H16、H18、H26 的 MDA 含量均显著或极显著低于对照 WT。干旱胁迫 21 d 后,除 H16 的 MDA 含量显著高于对照外,H18 和 H26 分别显著和极显著低于对照。



\* 和 \*\* 分别表示在 0.05 和 0.01 水平差异显著,下同。  
\* and \*\* indicate significant difference at 0.05 and 0.01 level respectively, the same below.

图 2 抗旱棚干旱试验下转基因和野生型大豆的 MDA 含量  
Fig. 2 The MDA concentration of three transgenic strains (H16, H18 and H26) and non-transgenic control (WT) under drought simulation experiments

(2) 叶片相对电导率:如图 3 所示,干旱胁迫后,转基因大豆叶片的伤害度明显轻于对照,在干旱胁迫 20 d 后,野生型大豆叶片的伤害度达到了转

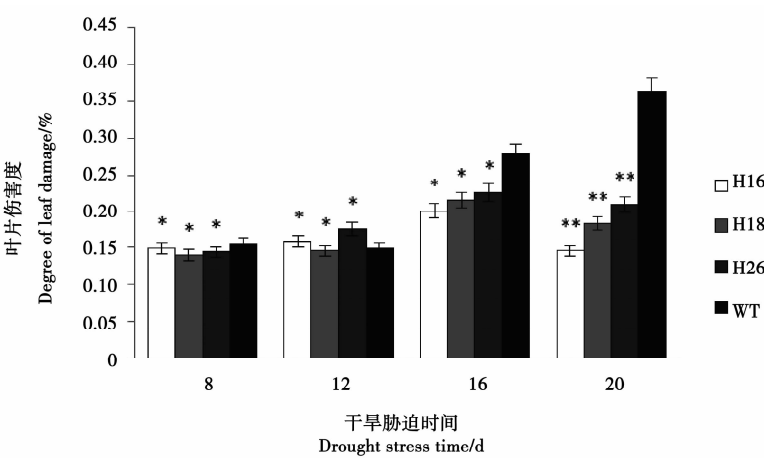


图 3 抗旱棚干旱试验下转基因和野生型大豆的叶片伤害度  
Fig. 3 The leaf damage of three transgenic strains (H16, H18 and H26) and non-transgenic control (WT) under drought simulation experiments

(3)叶片相对含水量:如图 4 所示,干旱胁迫 8 和 14 d 后,转基因大豆与对照间差异不明显。干旱胁迫 18 和 20 d 后,3 个转 *GmHAP3-17* 基因大豆植株叶片的叶片含水量分别极显著和显著高于对照。上述结果表明,*GmHAP3-17* 环境干旱应答可能促使植株形成保水机制,从而提高抗旱性。

*HAP3-17* 基因大豆 H16、H18、H26 和野生型大豆东农 50(WT)进行田间抗旱试验,测定叶片相对电导率,计算其伤害度。结果表明:转 *GmHAP3-17* 基因大豆 H16、H18、H26 叶片的伤害度均显著轻于对照(图 6)。说明 *GmHAP3-17* 基因对环境干旱的应答反应能够减轻叶片伤害。

2.2 转 *GmHAP3-17* 基因大豆田间干旱试验

2.2.1 表型观察 图 5 显示,在干旱胁迫处理下转 *GmHAP3-17* 基因植株与野生型相比,转基因植物的生长状态好,植物叶片较绿,叶片较繁茂,株高高高于对照,根系显著长于野生型的根系。野生型大豆植株较矮,叶片呈现出萎蔫、黄化现象。

2.2.2 生理指标分析 (1)叶片伤害度:转 *Gm-*

(2)叶片相对含水量:转 *GmHAP3-17* 基因大豆 H16、H18、H26 和野生型大豆东农 50(WT)进行田间抗旱试验,测定叶片相对含水量。结果表明:转 *GmHAP3-17* 基因大豆 H16、H18 和 H26 叶片含水量均明显高于对照(图 7)。表明 *GmHAP3-17* 环境干旱应答可以提高抗旱性。

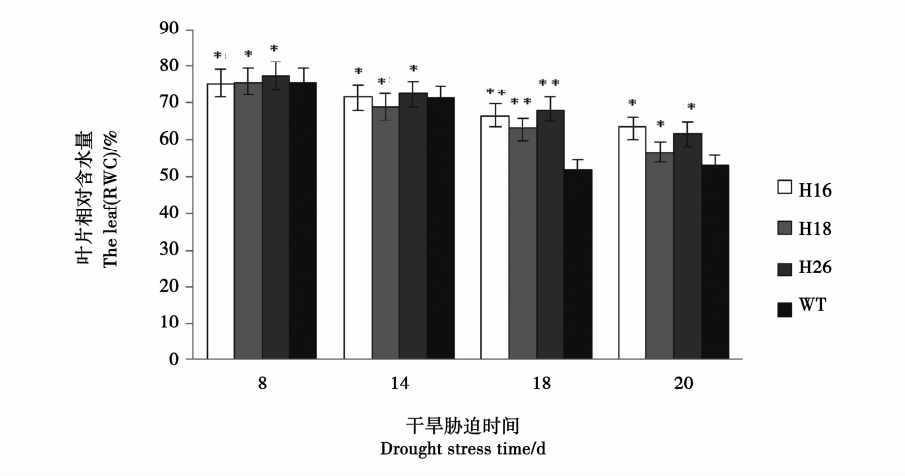


图 4 抗旱棚干旱试验下转基因和野生型大豆的叶片相对含水量

Fig. 4 The leaf relative water content (RWC) of three transgenic strains (H16, H18 and H26) and non-transgenic control (WT) under drought simulation experiments

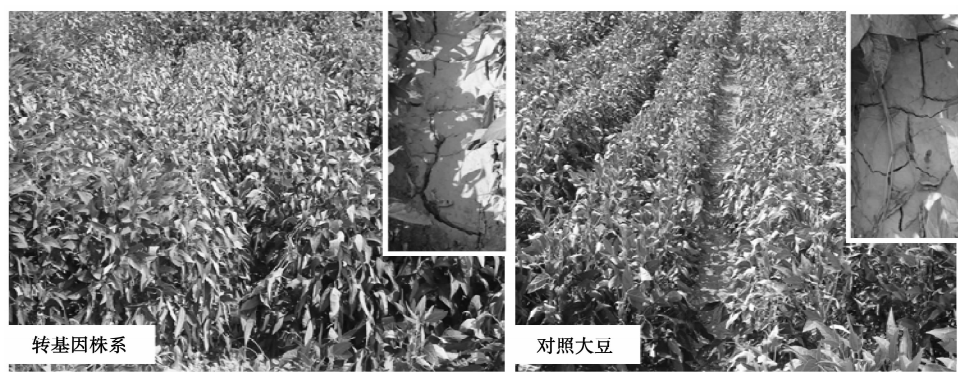


图 5 转 *GmHAP3-17* 基因大豆在干旱地区田间干旱

Fig. 5 The morphological compare between transgenic and non-transgenic soybeans in dry regions

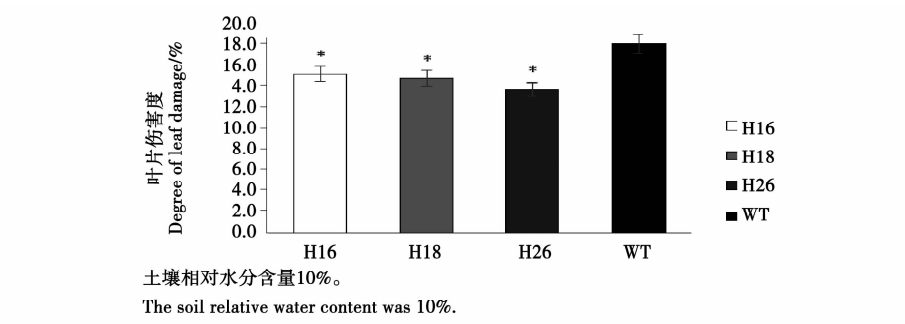


图 6 转 *GmHAP3-17* 基因大豆在旱区的叶片伤害度

Fig. 6 The leaf damage of three transgenic strains (H16, H18 and H26) and non-transgenic control (WT) in dry regions

2. 2. 3 农艺性状分析 农艺性状调查结果如图 8 和图 9 所示,在自然干旱条件下,与野生型大豆东农 50 (WT)相比,转 *GmHAP3-17* 基因大豆 (H26) 表现为根系发达、扎根深、侧根多,增加了株高、主茎节数、有效分枝数。H26 株系的有效荚数、单株粒数、

单株粒重、百粒重均值分别为 78 个荚、210 粒、14. 2 g、6. 8 g,较对照分别增加 50. 0%、53. 3%、57. 8% 和 3. 0%。在自然干旱条件下,转 *GmHAP3-17* 大豆表现出了显著的产量优势。

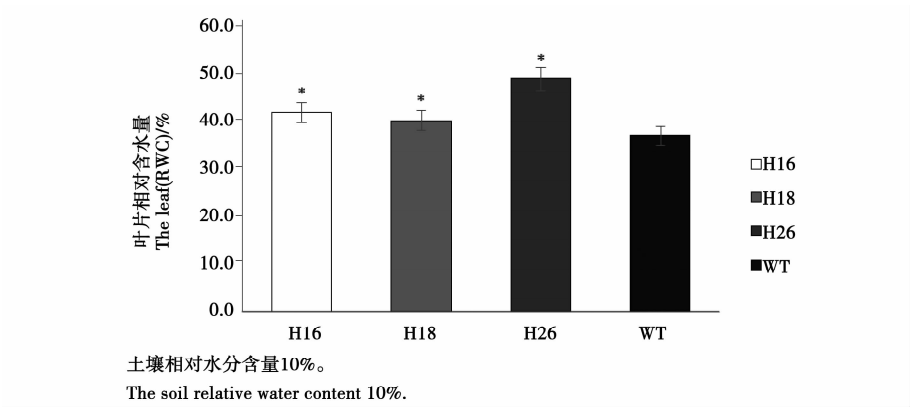


图 7 转 *GmHAP3-17* 基因大豆在旱区的叶片相对含水量

Fig. 7 The leaf relative water content (RWC) of three transgenic strains (H16, H18 and H26) and non-transgenic control (WT) in dry regions

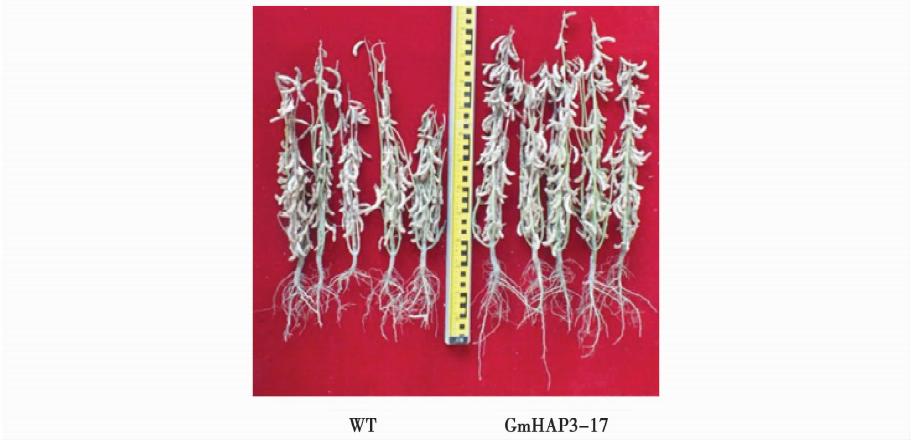


图 8 转 *GmHAP3-17* 基因大豆在旱区的根系生长比较

Fig. 8 Root morphology of transgenic strain and non-transgenic control (WT) in dry regions

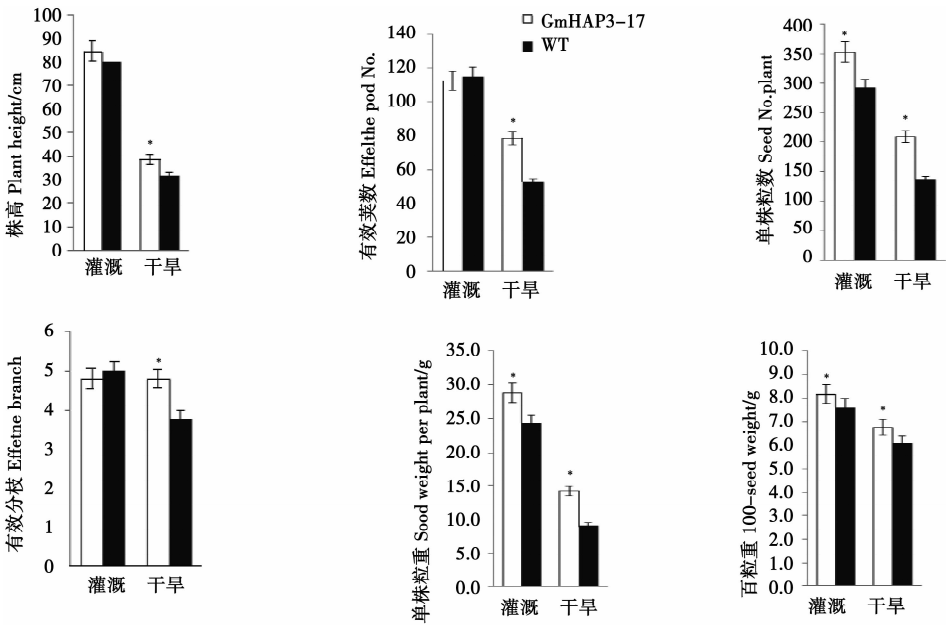


图 9 转 *GmHAP3-17* 基因大豆在旱区的植物学和农艺性状

Fig. 9 Agronomic traits of transgenic strain and non-transgenic control (WT) in dry regions

3 结论与讨论

植物地下部分吸收水分的主要器官是根系,在干旱条件胁迫件下,根系的吸水能力与其对胁迫的适应性的调节能力相关<sup>[8]</sup>,因此通过对植物根系的比较可以判断其抗逆性强弱。研究证实,在干旱胁迫条件下,大豆的根系与地上部分相比较,具有优先发展的倾向。地上部分高达的植株都具有强大的根系,因此其具有较强的适应力以及耐旱性<sup>[9]</sup>。植物抗旱性强弱与根系有着密切关系,具有强大的根系是作物抗旱性的重要特征。根系发育越好,受干旱胁迫的危害程度就越小。

植物进行水分蒸腾与光合作用的主要器官是叶片,其对环境因子的变化敏感,当植物受到逆境胁迫时,叶片首先表现出相应的症状<sup>[10]</sup>。一般来说,植物受到逆境伤害后,会出现叶片萎蔫、枯黄甚至脱落等现象。因此叶片相对含水量指标的测定可以作为判断植株受伤害程度的重要指标。此外,植物叶片形态结构的变化也能反映植株对环境因子的敏感性<sup>[11]</sup>。本研究中,在干旱胁迫过程中,转基因植株叶片相对含水量明显高于对照,有着较强的耐旱能力。

植物的抗逆性与逆境胁迫下膜伤害的程度有着密切的关系<sup>[12]</sup>。逆境胁迫能促使植物渗透性增加,选择性遭到破坏,细胞内的大量离子以及某些有机质会有不同程度的渗出,此时,外界有毒盐离子进入,致使细胞代谢紊乱,结果使细胞内的一系列生理生化过程都受到干扰<sup>[13]</sup>。胞内离子以及有机物的外渗,会引起组织浸泡液电导率发生变化,因此,通过测定外渗液电导率的变化,就能反应出质膜的伤害程度以及所测材料的抗逆性大小。伤害越重,外渗越多,电导率增加越大,从而叶片伤害度越大。本研究结果表明,在干旱的胁迫下,转基因植株都具有较强的抗逆性,其叶片伤害度明显低于对照植株。

本研究中,过表达 *GmHAP3-17* 大豆同对照植株相比表现出主根长,侧根数目多,根冠比值高,根系较发达。转基因大豆与野生型相比,MDA 含量低,叶片伤害度较轻,叶片含水量较高。在干旱胁迫下,转 *GmHAP3-17* 基因大豆比野生型大豆表现出较好的生长状况,较低的叶片伤害度和较高的叶片含水量;根系发达、扎根深、侧根多;增加了株高、主茎节数、有效分枝数。H26 株系的有效荚数、单株粒

数、单株粒重、百粒重均比野生型提高明显,表现出了显著的产量优势。

上述结果表明, *GmNF-YB17* 参与逆境胁迫反应,能够促进植物的根系发育,提高植物抗旱性。

参考文献

[1] Bruce W B, Edmeades G O, Barker T C. Molecular and physiological approaches to maize improvement for drought tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2002, 53:13-25.

[2] 刘强,赵南明,Yamaguchi-Shinozaki K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报,2000, 45(1): 11-16. (Li Q, Zhao N M, Yamaguchi-Shinozaki K, et al. Function of DREB transcription factors in improving the plant resistance[J], Science Bulletin, 2000, 45(1): 11-16.

[3] Yamaguchi-Shinozaki K, Kasuga M, Liu Q. Biological mechanisms of drought stress response[J]. JIRCAS Working Report, 2002, 9: 1-8.

[4] Donald E N, Peter P R, Tom R A. Plant nuclear factor Y (NF-Y) B subunits confer drought tolerance and lead to improved corn yields on water-limited acres[J]. Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America, 2007, 104(42):16450-16455.

[5] Mantovani R. The molecular biology of the CCAAT-binding factor NF-Y[J]. Gene, 1999, 239:15-27.

[6] Siefers N, Dang K K, Kumimoto R W. Tissue-specific expression patterns of *Arabidopsis* NF-Y transcription factors suggest potential for extensive combinatorial complexity [J]. Plant Physiology. 2009, 149(2):625-641.

[7] Ni Z, Hu Z, Jiang Q, et al. GmNFYA3, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress [J]. Plant Molecular Biology, 2013, 82(1-2):113-29.

[8] Pennisi E. Plant genetics Getting to the root of drought responses [J]. Science, 2008, 11:171-173.

[9] Huang C Y, Kuchel H, Edwards J. A DNA-based method for studying root responses to drought in field-grown wheat genotypes [J]. Scientific Reports, 2013, 3:3194.

[10] LeRudulier D, Strom A R, Dandekar A M. Molecular biology of osmoregulation[J]. Science, 1989, 224:1064-1068.

[11] Ni Z, Hu Z, Jiang Q, et al. *GmNFYA3*, a target gene of miR169, is a positive regulator of plant tolerance to drought stress[J]. Plant Molecular Biology, 2013,82(1-2):113-129.

[12] Wang C, Zhang D W, Wang Y C. A glycine-rich RNA-binding protein can mediate physiological responses in transgenic plants under salt stress[J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(2): 1047-1053.

[13] Gadjev I, Vanderauwera S, Gechev T S, et al. Transcriptomic footprints disclose specificity of reactive oxygen species signaling in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiology, 2006, 141(2):436-445.