

转 *GmHSFA1* 基因大豆的耐热性评价

吴广锡^{1,2}, 刘丽君¹, 杨德光², 唐晓飞¹, 魏 峡¹, 王鹏飞², 王兴宇²

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:在高温胁迫条件下对 11 个转 *GmHSFA1* 基因的大豆品系及其受体的 *GmHSFA1* 及靶基因 *GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 的表达和生理生化、光合特性及产量性状变化进行了研究, 并采用胁迫系数与灰色关联分析相结合方法, 对转基因大豆材料耐高温能力进行综合评价。结果表明: 多数转基因大豆品系在常温和热诱导条件下 *GmHSFA1* 及靶基因 *GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 表达水平明显高于非转基因受体; 高温处理后, 绝大多数转基因材料的脯氨酸含量增幅都要明显高于非转基因受体, 丙二醛含量除 HTH-4 以外增幅均小于非转基因受体, 可溶性糖含量增幅全部高于非转基因受体材料。多数转基因材料的光合性状与产量性状降幅均小于非转基因受体。关联度分析表明与非转基因受体相比, 有 9 个转 *GmHSFA1* 基因品系的耐热能力得到明显提高。

关键词:大豆; 转基因; 热激转录因子; 热激蛋白; 热胁迫

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)03-0341-06

Heat Resistance Evaluation of *GmHSFA1* Transgenic Soybean

WU Guang-xi^{1,2}, LIU Li-jun¹, YANG De-guang², TANG Xiao-fei¹, WEI Lai¹, WANG Peng-fei², WANG Xing-yu²

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: In this study, the expression of *GmHSFA1*, *GmHSP70*, *GmHSP22* and *GmHSP17.9* in 11 *GmHSFA1* transgenic soybean lines and their receptor were evaluated and researched the change in physiological indices (Pro, MDA, Wss), photosynthetic characteristics (*Pn*, *Cond*, *Ci*, *Tr*) and yield after high temperature treatment. In most of the transgenic soybean lines, the expression of *GmHSFA1*, *GmHSP70*, *GmHSP22* and *GmHSP17.9* were higher than non-transgenic receptor at 28°C and 48°C. After heat treatment, the increment of proline content and soluble sugar in most transgenic soybean lines were clearly higher than non-transgenic receptor, increment of MDA content were lower than receptor except HTH-4, the decrement of photosynthetic traits and yield in most of the transgenic materials were less than non-transgenic receptor. Through gray relation analysis, we concluded that the heat resistance of 9 *GmHSFA1* transgenic lines were improved significantly than non-transgenic receptor.

Key words: Soybean; Transgenic; Heat shock transcription factors; Heat shock protein; Heat stress

大豆是世界上重要的粮食、油料作物,也是人类主要的植物蛋白来源。大豆单产水平的提高依赖于大豆品种对不良生长环境抗性的提高及对养分的有效利用。但随着温室效应的加剧,高温胁迫严重影响了大豆的生长和发育,因此,提高大豆的抗高温能力是提高单产和品质的保证。

目前,转基因技术日趋成熟,转基因作物的抗逆研究也不断深入。热激转录因子(HSF)是生物体在热激和其它胁迫条件下基因转录激活信号传导通路中最后的成员。主要功能是在热激转录因子基因的表达过程中与相应热激元件结合,启动基因的转录过程,最终促进热激蛋白(HSP)基因的表达,而热激蛋白基因的高效表达可提高植物的抗逆

性^[1-6]。在拟南芥中,热激转录因子 *AtHSFA2* 可以调节胁迫反应基因的表达并且参与抗热和抗氧化胁迫^[7]。同时,在拟南芥中 *HSFA2* 也可通过调节 *HSP101*、*HSP70*、*sHSP* 和 *Apx* 的表达来提高作物耐胁迫能力,并严格地受热激诱导表达,其 Knockout 突变体热敏感性提高,过表达 *HSFA2* 的植株则表现出较强的耐热和耐渗透胁迫能力^[8-9]。HSF 除在转录水平上调节 HSP 的表达外,*HSFa1* 和 *HSFa2* 还在蛋白水平上相互作用,通过形成复合体共同来行使基因的激活功能。*HSP17.9*、*HSP22*、*HSP23* 均属于小分子的 HSP,15~25 kD 的小分子 HSP 在热胁迫条件下可以通过形成复合体的方式来提高植物细胞的抗热能力^[10]。研究表明转 *GmHSFA1* 大豆 *Gm*-

收稿日期: 2012-03-05

基金项目: 国家转基因重大专项资助项目(2008ZX08004-002); 大豆产业技术体系资助项目(CARS04-ps05)。

第一作者简介: 吴广锡(1987-),男,在读硕士,研究方向为作物栽培学与耕作学。E-mail: wugx54@163.com。

通讯作者: 刘丽君(1958-),女,研究员,从事大豆遗传育种研究。E-mail: nkyssbd@126.com。

杨德光(1967-),男,教授,从事作物栽培学与耕作学研究。E-mail: ydgl@tom.com。

HSFA1 的过表达激活了下游热激蛋白 *GmHSP70* 和一些小分子 *HSP* 的表达,并且明显提高了转基因大豆的耐热能力^[1]。

该试验利用实验室研究获得的转热激转录因子基因 *GmHSFA1* 的 11 个大豆品系,研究高温胁迫条件下,转基因品系的基因表达和生理生化指标光合特性及产量性状的变化,揭示转 *GmHSFA1* 基因大豆的耐热性特点,为大豆品种改良奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

转基因 T_0 代大豆材料 HTH-1、HTH-3、HTH-4、HTH-5、HTH-6、HTH-7、HTH-9、HTH-10、HTH-13、HTH-14 和 HTH-15。以上转基因大豆前期的载体构建及转化由本实验室完成^[11], *GmHSFA1* 基因由中国科学院遗传与发育生物学研究所朱保葛研究员提供。非转基因受体材料为哈交 5337。

选用材料中的 11 个转基因品系,在塑料薄膜棚内进行试验,棚内透光度与空气流通条件良好,每个品系种 6 盆,每盆 4 株。称重法控制土壤水分,定量浇水,保持土壤含水量在 17%~18%。在大豆花期利用德国 MMM 恒温恒湿箱对转基因大豆及对照进行高温处理,在处理前取各植株相同位置叶片冷冻保存,高温处理程序为:42℃ 处理 40 min,48℃ 处理 40 min,52℃ 处理 40 min,然后在 48℃ 处理后再次取各植株相同位置叶片冷冻保存。对 12 个材料进行 *GmHSFA1* 的 PCR 检测,观察转基因材料与对照在高温下的热损伤程度,分析 *GmHSFA1* 与热激蛋白基因的表达量,测定生理指标、光合指标和产量性状,并对材料的耐高温能力进行鉴定。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 Real-time PCR 表达量检测 对取样叶片

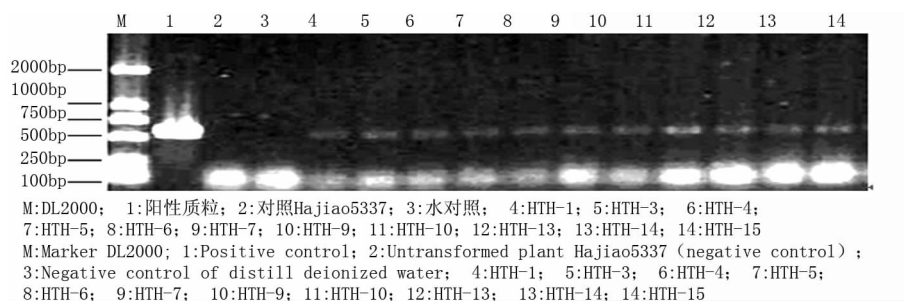


图1 转基因大豆 PCR 检测

Fig. 1 The PCR analysis of genomic DNA in putative transgenic soybean plants

转基因大豆及非转基因受体 Hajiao5337,在 42℃ 处理 40 min 后,形态上未发生明显的变化。经 48℃ 处理 40 min 后发现,非转基因受体哈交 5337

提取 RNA,然后反转录成 cDNA,以 Tubulin 为内参分别对 *GmHSFA1*、*GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 表达量检测,Real-Time PCR 反应在 Mx3000pTM 实时荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件:95℃ 预变性 10 min;95℃ 变性 30 s,60℃ 复性 1 min,40 个循环。

1.2.2 生理指标测定 脯氨酸测定采用酸性茚三酮显色法、丙二醛和可溶性糖采用 TBA 显色法^[12]。

1.2.3 光合指标测定 采用便携式光合测定仪 LI-6400XT(LI-COR Lincoln, USA) 对高温处理后的 12 个品系进行光合速率、气孔导度、细胞间 CO_2 浓度和蒸腾速率测定。

1.2.4 产量性状调查 高温处理后的 12 个品系,恢复常温后,在相同环境下培养至收获,均采用常规方法测定单株总重、单株荚数、单株粒数和百粒重。

1.2.5 材料间耐高温鉴定 采用胁迫系数与灰色关联度分析法综合评价各个材料间的耐高温能力。抗逆系数计算公式为:

耐高温系数 = 高温胁迫下的指标值/常温下的指标值

1.3 数据分析

采用 SPSS 17.0 和 DPS 7.05 进行数据处理。

2 结果与分析

2.1 转 *GmHSFA1* 基因大豆的 PCR 检测及高温下形态变化

分别对转 *GmHSFA1* 基因大豆的 T_0 、 T_1 和 T_2 代进行 PCR 检测,所得后代的检测结果均为阳性,图 1 为 11 个转 *GmHSFA1* 基因大豆的 PCR 检测结果。

植株顶端弯曲,开始萎蔫,而转基因大豆均没有表现出萎蔫现象。52℃ 处理 40 min 后,非转基因大豆哈交 5337 顶端弯曲,叶片下垂,转基因大豆 HTH-1、

HTH-3、HTH-4、HTH-6、HTH-9 和 HTH-15 形态上未出现明显的变化,其余转基因大豆植株顶端略有弯曲,其中 HTH-14 较为明显。

2.2 转基因材料目的基因表达分析

2.2.1 转基因材料目的基因表达分析 在常温下多数转 *GmHSFA1* 基因品系的 *GmHSFA1* 表达量均增加。在高温胁迫条件下,转基因大豆 *GmHSFA1* 表达量的提高更为明显,表达量最高的 HTH-5 为哈交 5337 的 9 倍(图 2)。说明在热诱导条件下转基因株系 *GmHSFA1* 的过表达能够提高品种的耐热性。

2.2.2 转基因材料靶基因 *GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 表达分析 在高温诱导条件下,多数转基因品系 *GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 的表达量较非转基因受体哈交 5337 明显增加(图 3)。*GmHSP70*、*GmHSP17.9* 和 *GmHSP22* 表达量最高的分别是 HTH-3、HTH-1 和 HTH-5,且表达量分别为对照的 8、5 和 15 倍。这说明转基因大豆 *GmHSFA1* 的过表达可以激活下游热激蛋白 *GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 的表达。

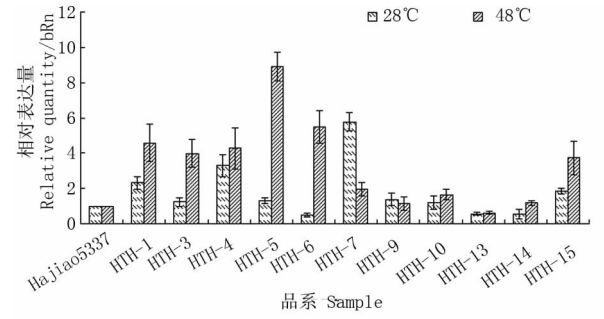


图 2 转基因大豆在 28℃和 48℃温度下 *GmHSFA1* 表达分析

Fig.2 Real-time PCR analyses of *GmHSFA1* expressions in different transgenic soybean lines at 28℃ and 48℃

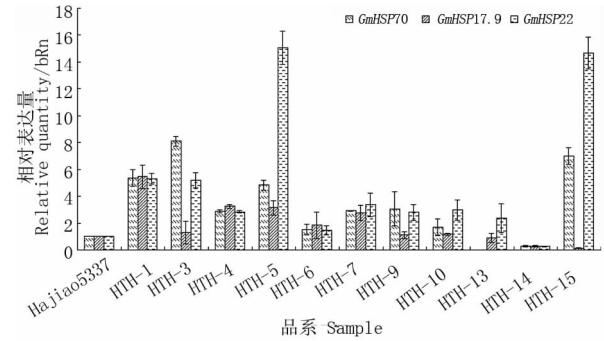


图 3 高温 48℃胁迫下转基因大豆 *GmHSP70*, *GmHSP17.9* 和 *GmHSP22* 表达分析

Fig.3 Real-time PCR analyses of *GmHSP70*, *GmHSP17.9* and *GmHSP22* expressions in different transgenic soybean lines at 48℃

2.3 高温胁迫对转基因大豆生理指标的影响

2.3.1 脯氨酸含量 脯氨酸能够反映作物在逆境下的自我调节能力,在逆境下脯氨酸的含量都会有不同程度的提高。从表 1 可以看出所有转基因材料在高温处理后的脯氨酸含量都有增加,其中增幅最高的为 HTH-14(433%),增幅最低的为 HTH-7(23%)。

2.3.2 丙二醛含量 丙二醛是作物膜损伤时的代谢产物,表明作物在逆境下的损伤程度,增幅越大说明损伤越大。如图 4 所示,高温处理使非转基因受体哈交 5337 和 HTH-4 的丙二醛含量增幅较大,HTH-4 增加 78%,哈交 5337 增加 40%,其余品系的增幅都小于非转基因材料。

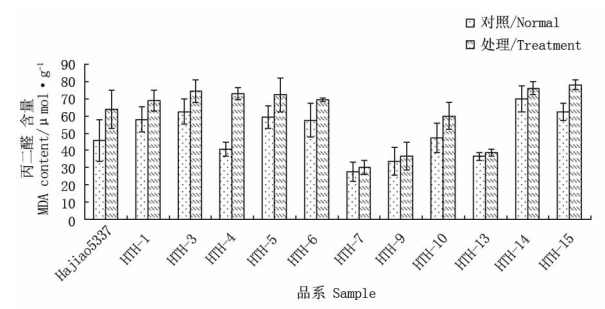


图 4 高温胁迫对转基因大豆丙二醛含量的影响

Fig.4 Effects of heat stress on MDA content in transgenic soybean

2.3.3 可溶性糖含量 可溶性糖是作物逆境条件下渗透调节物质,反映了作物在逆境条件下的自我调节能力。如图 5 所示,高温胁迫下转基因大豆的可溶性糖含量的增幅都要高于非转基因材料哈交 5337,最高的是 HTH-4(65%)。

表 1 高温胁迫对转基因大豆脯氨酸含量的影响

Table 1 Effects of heat stress on proline content intransgenic soybean

品系 Lines	脯氨酸含量 Proline content/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FW}$		
	常温 NT	高温 HT	增幅 Increment/%
Hajiao5337	12.68ab	21.615	70
HTH-1	6.35cd	19.03cde	200
HTH-3	11.40abc	24.72bc	117
HTH-4	13.22a	21.23cd	61
HTH-5	8.87abcd	14.09de	59
HTH-6	7.88bcd	24.37bc	209
HTH-7	9.61abcd	11.86e	23
HTH-9	5.94d	15.70de	164
HTH-10	11.23abc	37.88a	237
HTH-13	7.17cd	19.01cde	165
HTH-14	5.79d	30.86ab	433
HTH-15	5.16d	15.09de	192

同列数值后不同小写字母代表 0.05 水平差异显著;下同。

NT:Normal temperature;HT:High temperature;Values in the same column followed by different lowercase letters are significantly different at 0.05 probability level;the same below.

2.4 高温胁迫对转基因大豆光合特性的影响

光合指标可以反映高温处理对作物新陈代谢的影响程度。净光合速率(*Pn*)、气孔导度(*Cond*)、胞间 CO₂浓度(*Ci*)、蒸腾速率(*Tr*)的降幅越小表明环境胁迫对植株的影响越小。如表 2 所示,高温胁迫下,大豆叶片中的净光合速率,气孔导度,胞间 CO₂浓度和蒸腾速率都有不同程度的降低。其中有 8 个转基因品系的净光合速率降幅小于对照,降幅最小的为 HTH-1 (54%),其次为 HTH-5 (57%),降幅最高为 HTH-13 (77%);各品系间气孔导度差异显著,降幅最低的为 HTH-5 (24%)、其次为 HTH-15 (31%),降幅最高为 HTH-13 (91%);所有转基因品系胞间 CO₂浓度的降幅均低于哈交 5337;蒸腾速率

除 HTH-3、HTH-4、HTH-13 和 HTH-14 外降幅均低于哈交 5337,降幅最低的为 HTH-5 (43%),降幅最高的为 HTH-4 (86%)。

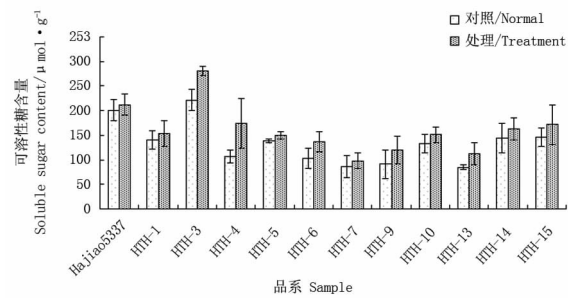


图 5 高温胁迫对转基因大豆可溶性糖含量的影响

Fig.5 Effects of heat stress on soluble sugar content in transgenic soybean

表 2 高温对转基因大豆的光合生理指标的影响

Table 2 Effects of heat stress on photosynthetic physiological characters intransgenic soybean

品系 Lines	净光合速率 <i>Pn</i> /μmolCO ₂ ·m ⁻² ·s ⁻¹			气孔导度 <i>Cond</i> /mmol·m ⁻² ·mol ⁻¹			胞间 CO ₂ 浓度 <i>Ci</i> /mmolCO ₂ ·mol ⁻¹			蒸腾速率 <i>Tr</i> /mmolH ₂ O·m ⁻²		
	常温 NT	高温 HT	降幅 Decrement/%	常温 NT	高温 HT	降幅 Decrement/%	常温 NT	高温 HT	降幅 Decrement/%	常温 NT	高温 HT	降幅 (N-T)/N/%
Hajiao5337	32.02de	10.05g	69	0.548g	0.082gh	85	63.68e	14.61gh	77	9.16f	1.70fgh	81
HTH-1	32.96abc	15.26a	54	0.774a	0.433b	44	85.46a	31.44efgh	63	11.12bc	5.76a	48
HTH-3	31.22ef	7.84h	75	0.676bcd	0.058gh	91	81.71a	45.80cde	44	11.20ab	2.15efg	81
HTH-4	33.59a	9.85g	71	0.633def	0.073gh	89	64.38e	22.11fgh	66	11.39ab	1.63gh	86
HTH-5	32.39bcd	14.08ab	57	0.651cdef	0.498a	24	73.62bcd	35.00efg	52	11.03bc	6.25a	43
HTH-6	32.04cde	12.32cde	62	0.601efg	0.132ef	78	68.68cde	38.98def	43	10.07d	2.66de	74
HTH-7	33.58a	10.80fg	68	0.686bcd	0.101fg	85	74.33bc	42.03cdef	43	11.13bc	2.21ef	80
HTH-9	31.03fg	11.99def	61	0.542g	0.200d	63	64.59e	87.41a	-35	9.37ef	3.57bc	62
HTH-10	32.33bcd	13.69bc	58	0.700bc	0.376c	46	79.24ab	35.11efg	56	11.24ab	5.77a	49
HTH-13	31.92def	7.21h	77	0.625def	0.053h	91	71.56cd	58.62bcd	18	11.6a	2.15efg	81
HTH-14	30.27g	9.54g	68	0.297h	0.058gh	80	20.80f	63.1bc	-203	8.33g	1.42h	83
HTH-15	32.98ab	13.31bcd	60	0.647cdef	0.448b	31	69.48cde	43.44cdef	37	10.74c	5.96a	45

2.5 高温胁迫对转基因大豆产量性状的影响

如表 3 所示,高温处理后,除 HTH-5、HTH-10 和 HTH-13 外,其余转基因大豆的单株荚数降幅均小于对照,降幅最低的为 HTH-3 (14%),降幅最高的为 HTH-5 (83%);单株粒数降幅除 HTH-5、HTH-13 和 HTH-14 外,其余转基因品系降幅均低于对照,最低的为 HTH-7 (3%),降幅最高的为 HTH-5 (82%);单株总重降幅最大的是 HTH-5 (87%),其次为 HTH-13 (83%)、HTH-4 (79%) 和 HTH-14 (78%),其余品系降幅均小于对照,最小的为 HTH-3 (10%);百粒重除 HTH-4、HTH-5、HTH-7、HTH-14 和 HTH-15 外,其余品系的降幅小于对照。

2.6 高温胁迫下相关性状的胁迫系数与灰色关联分析

胁迫系数反映了作物在逆境条件下各指标的变化程度,同时胁迫系数的大小可以体现作物抗逆

性的强弱,在该研究中脯氨酸、可溶性糖、光合指标和产量性状的胁迫系数越大体现植株的耐高温能力越强,而丙二醛则反之。如表 4 所示,所有转基因大豆品系可溶性糖的胁迫系数都要高于对照哈交 5337,说明单一从可溶性糖指标来看所有转基因大豆的耐高温能力都高于对照;除 HTH-4 以外的转基因大豆 MDA 胁迫系数都要低于非转基因受体哈交 5337,表明除 HTH-4 以外的所有转基因大豆的耐高温能力都要高于对照。

一个抗逆植株不是所有的耐高温指标上都表现突出,因此用单一指标评价大豆耐高温具有片面性,应利用多个指标进行综合评价,所以实验选取所有品系在胁迫下的每个指标最优值构建一个较为理想的参考数列 X_0 ,以各个参考品系的性状指标构成比较数列 $X_i = (i = 1, 2, 3, \dots)$,通过灰色关联分析进行关联比较,分辨系数为 0.5 (表 4)。

各品系与 X_0 关联度越大表明耐高温能力越强,

如表 5 所示,关联序 1~12 依次表示关联度由大到小,其中耐热性最强的为 HTH-15。有 2 个转基因材料耐热性没有提高。

表 3 高温胁迫对转基因大豆产量的影响

Table 3 Effects of heat stress on agronomic traits in transgenic soybean												
品系 Lines	单株荚数 Pods per plant			单株粒数 Seeds per plant			单株总重 Weight per plant/g			百粒重 100-seed weight		
	常温 NT	高温 HT	降幅 Decrement/%	常温 NT	高温 HT	降幅 Decrement/%	常温 NT	高温 HT	降幅 Decrement/%	常温 NT	高温 HT	降幅 (N-T)/N/%
Hajiao5337	13.33def	5.00abc	62	22.00bcdef	7.70ab	65	3.41bcd	0.92abc	73	15.46b	12.89a	17
HTH-1	17.33gh	10.67de	38	34.00g	19.70f	42	4.38def	2.52fg	43	12.88a	12.77a	1
HTH-3	7.33a	6.33bc	14	12.30a	9.30abcd	24	1.89a	1.71cde	10	15.36b	18.23b	-19
HTH-4	11.33bcd	5.67abc	50	19.70bcd	8.00abc	59	5.54f	1.14abcd	79	28.17i	14.16a	50
HTH-5	15.33efg	2.67a	83	26.00ef	4.70a	82	4.77ef	0.62a	87	18.27e	13.32a	27
HTH-6	9.67abcd	6.00abc	38	17.30abc	9.30abcd	46	2.64abc	1.18abcd	55	15.18b	12.63a	17
HTH-7	8.67abc	7.33bc	15	13.00a	12.70cde	3	3.02abc	2.16efg	29	23.22h	17.25b	26
HTH-9	9.33abc	5.33abc	43	16.70ab	8.00abc	52	2.69abc	1.08abcd	60	16.08bc	13.45a	16
HTH-10	16.33fg	4.00ab	76	25.70ef	9.30abcd	64	5.02ef	1.79def	64	19.55f	19.58bc	0
HTH-13	13.33def	4.00ab	70	27.00f	6.70a	75	5.58f	0.97abc	83	21.28fg	21.56c	-1
HTH-14	12.33cde	5.67abc	54	23.00cdef	6.70a	71	3.89cde	0.86ab	78	20.67cd	14.49a	30
HTH-15	10.33abcd	8.00cd	23	20.30bcde	13.00de	36	2.65abc	2.31efg	13	16.85a	12.99a	a

表 4 转基因大豆耐高温相关性状的胁迫系数

Table 4 Coefficient of several traits related to Heat stress in transgenic soybean											
品系 Sample	可溶性糖 Soluble sugar	丙二醛 MDA	脯氨酸 Pro	净光合速率 <i>P_n</i>	气孔导度 <i>Cond</i>	胞间 CO ₂ 浓度 <i>C_i</i>	蒸腾速率 <i>Tr</i>	单株荚数 Pods per plant	单株粒数 Seeds per plant	单株总重 Weight per plant	百粒重 100-seed weight
HTH-1	1.09	1.19	3.00	0.46	0.56	0.37	0.52	0.62	0.58	0.58	0.99
HTH-3	1.27	1.19	2.17	0.25	0.09	0.56	0.19	0.86	0.76	0.90	1.19
HTH-4	1.65	1.78	1.61	0.29	0.11	0.34	0.14	0.5	0.41	0.21	0.5
HTH-5	1.09	1.22	1.59	0.43	0.76	0.48	0.57	0.17	0.18	0.13	0.73
HTH-6	1.33	1.21	3.09	0.38	0.22	0.57	0.26	0.62	0.54	0.45	0.83
HTH-7	1.14	1.09	1.23	0.32	0.15	0.57	0.20	0.85	0.98	0.72	0.74
HTH-9	1.32	1.09	2.64	0.39	0.37	1.35	0.38	0.57	0.48	0.4	0.84
HTH-10	1.13	1.26	3.37	0.42	0.54	0.44	0.51	0.24	0.36	0.36	1.00
HTH-13	1.23	1.06	2.65	0.23	0.09	0.82	0.19	0.30	0.25	0.17	1.01
HTH-14	1.12	1.09	5.33	0.32	0.20	3.03	0.17	0.46	0.29	0.22	0.70
HTH-15	1.18	1.25	2.92	0.40	0.69	0.63	0.55	0.77	0.64	0.87	0.77
Hajiao5337	1.06	1.40	1.70	0.31	0.15	0.23	0.19	0.38	0.35	0.27	0.83
X ₀	1.65	1.06	5.33	0.46	0.76	3.03	0.57	0.86	0.98	0.90	1.36

表 5 转基因大豆在高温胁迫下的关联度及耐热能力排序

Table 5 Grey correlative degree analysis and comparison of heat resistance intrantransgenic soybean under heat stress												
	Hajiao5337	HTH-1	HTH-3	HTH-4	HTH-5	HTH-6	HTH-7	HTH-9	HTH-10	HTH-13	HTH-14	HTH-15
关联系数 Correlation coefficient	0.4855	0.6339	0.6583	0.5896	0.589	0.5493	0.6265	0.5558	0.5827	0.4711	0.4692	0.7067
关联序 Order	10	3	2	5	6	9	4	8	7	11	12	1

综合目的基因 *GmHSFA1* 及靶基因 *GmHSP70*、*GmHSP17.9* 和 *GmHSP22* 的表达(图 3)和灰色关联分析结果来分析 *GmHSFA1* 基因与植物耐热性之间的关系,不难看出,在高温诱导条件下,灰色关联度分析得出耐热能力较强的 9 个品系中有 8 个 *GmHSFA1* 过表达的转基因材料的 *GmHSP70* 和 *GmHSP22* 的表达量明显高于非转基因受体,其中有 7 个品系的 *GmHSP17.9* 的表达量得到提高,并且高温胁迫下的形态变化与哈交 5337 相比耐性有所提高;而 *GmHSFA1* 没有过表达的转基因大豆 HTH-13 和 HTH-14 的耐热能力没有得到提高,其中 HTH-14 的

GmHSP70、*GmHSP17.9* 和 *GmHSP22* 的表达量几乎为 0,高温 52℃ 处理萎蔫程度较明显。HTH-13 中除 *GmHSP22* 有表达外,其余 HSP 都没有提高。

3 讨 论

高温胁迫已逐渐成为植物正常生长发育的限制因子,它通过影响植物的基因表达、生理特性而影响植物的外观形态、花粉育性,进而导致植物的产量品质下降。该研究中,对转基因大豆与非转基因大豆受体在高温胁迫处理后 1~3 d,非转基因受体叶片干枯,出现死斑,叶片掉落,叶色变褐、变黄

有时甚至整个植株死亡等状况。相关研究^[13]表明高温胁迫对植物生殖的危害尤为明显,花粉发育对高温十分敏感,开花前7~9 d夜间温度过高会导致雄性不育、花序或子房脱落等异常现象。

高温胁迫能导致转基因大豆叶片的净光合速率、气孔导度、胞间CO₂浓度和蒸腾速率普遍降低。但也有例外,如HTH-9和HTH-14的胞间CO₂浓度在高温胁迫下增加,并且HTH-9在胁迫下以及HTH-14在常温下的胞间CO₂浓度与相同条件下其它转基因大豆差异较大,这可能是由于基因插入位点不同而引起的基因表达上的差异,还可能是环境与基因互作所导致。

热激蛋白基因的转录受热激转录因子的调控^[14]。张伟等^[15]研究发现HSFs在热激反应中的主要功能是在热休克基因表达过程中与相应启动子结合,启动热休克基因的转录最终促使HSPs表达。朱保葛等^[16]将*GmHSFA1*基因转入到大豆中,证明了该基因的导入提高了大豆的耐热能力。该研究也进一步的证明了这一点,转*GmHSFA1*基因大豆的内源基因*GmHSP22*在高温48℃条件下得到了较高的表达。在相同长势下转基因材料在高温处理中表现出较强的耐热性,可以在52℃下持续处理接近3 h而没有出现萎蔫现象,多数*GmHSFA1*过表达的转基因大豆在耐高温生理检测中表现出较为明显的耐高温性,例如脯氨酸、可溶性糖含量增幅高,丙二醛增幅低,光合生理指标和产量性状受热处理影响较小等。这表明*GmHSFA1*的导入已经影响到了作物的热敏感度,热激转录因子对作物耐高温能力起到很大的作用,*GmHSFA1*表达量的提高,会进一步激活下游热激蛋白基因的表达,多数转基因材料热激蛋白的表达量与*GmHSFA1*的表达呈正相关,也有个别材料的热激蛋白表达不受*GmHSFA1*所调控,可能是由于*GmHSFA1*插入到不同的非特异性位点所造成的基因的未表达或者表达的差异。

参考文献

- [1] 陈晓军,叶春江,吕慧颖,等. *GmHSFA1* 克隆及其过量表达提高转基因大豆的耐热性[J]. 遗传,2006,28(11):1411-1420. (Chen X J, Ye C J, Lü H Y, et al. Cloning of *GmHSFA1* gene and its overexpression leading to enhancement of heat tolerance in transgenic soybean[J]. Hereditas, 2006, 28(11): 1411-1420.)
- [2] Morimoto R I. Regulation of the heat stress transcriptional response: cross talk between family of heat stress factors, molecular chaperones, and negative regulators[J]. Genes & Development, 1998, 12(24): 3788-3796.
- [3] Nakai A. New aspects in the vertebrate heat stress factor system: HSFA3 and HSFA4[J]. Cell Stress and Chaperones, 1999, 4: 86-93.
- [4] Nover L, Bharti K, Döring P, et al. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? [J]. Cell Stress and Chaperones, 2001, 6(3): 177-189.
- [5] Schöffl F, Prändl R, Reindl A. Regulation of the heat-shock response[J]. Plant Physiologists, 1998, 117(4): 1135-1141.
- [6] Wu C. Heat shock transcription factors: structure and regulation[J]. Annual Review of Cell Developmental Biology, 1995, 11: 441-469.
- [7] 李春光, 陈其军, 高新起, 等. 拟南芥热激转录因子 *AtHSFA2* 调节胁迫反应基因的表达并提高热和氧化胁迫耐受性[J]. 中国科学(C: 生命科学), 2005, 35(5): 398-407. (Li C G, Chen Q J, Gao X Q, et al. The role of heat shock transcription factor *AtHSFA2* on heat and oxidative stress response in *Arabidopsis* [J]. Science in China (Series C: Life Sciences), 2005, 35(5): 398-407.)
- [8] Chang Y Y, Liu H C, Liu N Y, et al. A heat-inducible transcription factor, *HSFA2*, is required for extension of acquired thermotolerance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 143(1): 251-262.
- [9] Li C, Chen Q, Gao X, et al. *AtHSFA2* modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in *Arabidopsis* [J]. China Science: Life Sciences in English, 2005, 48(6): 540-550.
- [10] 邵玲, 陈向荣. 热激蛋白与植物的抗逆性[J]. 北方园艺, 2005(3): 73-74. (Shao L, Chen X R. Study of the heat shock protein and the plant stress resistance physiology [J]. Northern Horticulture, 2005(3): 73-74.)
- [11] 唐晓飞, 刘丽君, 高明杰, 等. 农杆菌介导热激转录因子8基因转化大豆[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 444-450. (Tang X F, Liu L J, Gao M J, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of *hsp8* into soybean [J]. Molecular Plant Breeding, 2009, 7(3): 444-450.)
- [12] 王晶英, 敖红, 张杰, 等. 植物生理生化实验技术与原理[M]. 哈尔滨: 东北林业大学出版社, 2003: 133-136. (Wang J Y, Ao H, Zhang J, et al. Plant physiological and biochemical technology and principle [M]. Harbin: Northeast Forestry University Press, 2003: 133-136.)
- [13] 杨柳, 张振乾, 宋继金, 等. 植物抗逆基因研究进展[J]. 作物研究, 2010, 24(2): 126-129. (Liu Y, Zhen Q Z, Song J J, et al. Research progress of plant stress-resistant genes [J]. Crop Research, 2010, 24(2): 126-129.)
- [14] 翁锦周, 洪月云. 植物热激转录因子在非生物逆境中的作用[J]. 分子植物育种, 2006, 4(1): 88-94. (Weng J Z, Hong Y Y. The roles of plant shock transcription factors in abiotic stress [J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(1): 88-94.)
- [15] 张伟. 热休克基因转录的调节: 热休克转录因子(HSF)的结构与功能[J]. 第三军医大学学报, 2000, 22(2): 198-200. (Zhang W. Regulation of heat shock gene transcription: the structure and function of heat shock transcription factor [J]. Acta Academiae Medicinae Militari Tertiae, 2000, 22(2): 198-200.)
- [16] Zhu B G, Ye C J, Lü H Y, et al. Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, *GmHsfA1*, in soybeans (*Glycine max*) [J]. Journal of Plant Research, 2006, 119: 247-256.