

转 *ThIPK2* 基因大豆的农艺性状及光合生理研究

刘 淼^{1,2}, 李冬梅¹, 王志坤¹, 孟凡立¹, 李永光¹, 武小霞¹, 张洪霞³, 李文滨¹

(1. 大豆生物学教育部重点实验室, 农业部大豆生物学与遗传育种北方区域重点实验室, 东北农业大学 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 中国科学院 上海生命科学研究院 植物生理生态研究所, 上海 200032)

摘要: 将抗逆基因 *ThIPK2* 转入东农 50, 得到稳定遗传株系, 将 T_4 代株系种子正常播种, 将转基因植株与对照东农 50 的生育期、株高、主茎节数、分枝数、主茎荚数、分枝荚数、单株粒数等性状进行比较, 研究 *ThIPK2* 基因对大豆农艺性状方面的影响。结果表明, 在正常条件下, 转基因株系和对照植株相比, 生育期并没有改变, 而株高、主茎荚数、分枝荚数、分枝数和单株粒数农艺性状呈显著或极显著提高, 这表明 *ThIPK2* 基因对提高大豆产量有利。干旱胁迫导致大豆叶片各项光合生理指标下降; 但转 *ThIPK2* 基因大豆的各项光合生理指标高于非转基因对照。经干旱胁迫后, 转基因植株与对照相比积累了更多的干物质。

关键词: *ThIPK2*; 转基因大豆; 抗逆; 生育期; 农艺性状

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)05-0775-03

Agronomic Traits and Photosynthetic Traits of Transgenic Soybean Overexpressing *ThIPK2*

LIU Miao^{1,2}, LI Dong-mei¹, WANG Zhi-kun¹, MENG Fan-li¹, LI Yong-guang¹, WU Xiao-xia¹, ZHANG Hong-xia³, LI Wen-bin¹

(1. Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Education Ministry, Key Laboratory of Biology and Genetics & Breeding for Soybean in Northeast China, Ministry of Agriculture, Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang; 2. Crop Tillage and Cultivation Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang; 3. National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Shanghai Institute of Plant Physiology and Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China)

Abstract: Dongnong50 was transformed with *ThIPK2*, a stress-tolerance gene, and transgenic progenies with *ThIPK2* with stable heredity characters were obtained in this study. The seeds of T_4 generation were planted on transgenic experimental base, investigated agronomic traits and compared to control plants Dongnong50. For the transgenic plants, the growth duration remained stable, while significant increase were observed for plant height, pods on main stem, pods on branch, and seeds per plant. Hence, the *ThIPK2* gene is beneficial to improve soybean yields. Drought stress declined all indicators of photosynthetic physiology. But indicators of transgenic soybean were higher than non-transgenic soybean under drought stress. In addition, transgenic plants accumulated more dry matter than controls under drought condition.

Key words: *ThIPK2*; Transgenic soybean; Stress-tolerance; Growth and development period; Agronomic trait

植物和环境之间的信息交流通常被称为信号传导。在众多信号传导过程中, 有两类信号途径是紧密联系在一起的, 即 IP 和 Ca^{2+} 信号途径。肌醇磷脂信使系统是植物细胞信号转导中的一种重要的胞内信使系统。肌醇磷酸激酶作为该途径中的关键酶, 参与肌醇代谢及其信号途径、钙信号传导、脑发育、胁迫反应和基因转录等生理生化过程。在植物中, 研究最多的是拟南芥的 2 个肌醇多磷酸 6-/3-激酶基因 *AtIPK2 β* 和 *AtIPK2 α* 。*AtIPK2 β* 和 *AtIPK2 α* 均可以恢复酵母 IPK2 突变体的表型^[1-2]。前人研究表明 *AtIPK2 β* 可以提高转基因烟草的抗逆性^[3]。在酵母 IPK2 突变体中表达 *ThIPK2* 能够恢复其在高温、高盐和高渗透胁迫下的生长, *ThIPK2*

提高了转基因油菜的抗旱、耐盐及抗氧化性^[4]。

本研究对 T_5 代转 *ThIPK2* 基因大豆植株的农艺性状进行调查, 并考察了干旱胁迫条件下转基因植株光合指标和生物量的变化, 旨在为转 *ThIPK2* 基因大豆的应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于 2011 年在东北农业大学转基因试验基地进行。试验田土壤各成分含量为: 碱解氮 $158 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 有效磷 $98.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 速效钾 $168.0 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 有机质 4.471% ; pH7.12。 T_4 代转 *ThIPK2* 基因大豆和受体东农 50 种子由东北农业大学大豆

收稿日期: 2012-03-27

基金项目: 国家转基因重大专项(2011ZX08004-002); 农业部大豆产业技术体系项目(CARS-04-PS04)。

第一作者简介: 刘淼(1983-), 女, 在读博士, 研究方向为大豆基因工程。E-mail: 185661659@qq.com。

通讯作者: 李文滨(1958-), 男, 教授, 博士生导师, 主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@neau.edu.cn。

研究所提供。转基因大豆 3 个株系和非转基因对照东农 50 间隔种植,1 行区,行长 2 m,行距 0.65 m。每个株系 3 次重复。试验地周围种植 10 m 的大豆保护行。转基因大豆种子在转基因专用的种子袋中,外用塑料袋包裹,加热封口,并在袋外加明显标记。由专人带到试验地。常规田间管理,人工收获。在未完全成熟时逐株收获避免散失,收获的转基因大豆种子挂牌后用塑料编制袋包裹、封口,由专人负责运回东北农业大学大豆科学研究所,脱粒登记后装入种子袋中,再用塑料袋包裹,热封口,并在袋外加明显标记,保护行的大豆也一同收回、标记,由东北农业大学大豆研究所保存。

干旱胁迫试验在抗旱棚内进行,每盆(盆直径 23 cm,高 25 cm)装土量一致,充分灌水,放置 24 h 之后将转 *ThIPK2* 基因 T₄ 种子与非转基因对照东农 50 种子播种,每盆播 1 粒种子,定量浇水以保证植株正常生长。当苗长至第 4 片复叶完全展开时,选取长势一致的 30 株进行干旱胁迫。分别在胁迫前和胁迫 7 d 时测定光合生理指标。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 生育期 按文献[5]中的方法调查生育期。

1.2.2 农艺性状 对转 *ThIPK2* 基因大豆及东农 50(对照)每行分别取 5 株进行考种,调查株高、主茎节数、分枝数、单株荚数、单株粒数等农艺性状。

表 1 转 *ThIPK2* 基因大豆与东农 50 生育时期比较

Table 1 Comparison on the growth period between transgenic plant and Dongnong50

材料 Material	播种 Sowing	VE	R1	R3	R8	生育期 Growth duration/d
东农 50	5 月 29 日	6 月 7 日	7 月 10 日	7 月 27 日	9 月 20 日	106
<i>ThIPK2</i>	5 月 29 日	6 月 9 日	7 月 9 日	7 月 27 日	9 月 22 日	106

2.2 农艺性状

由表 2 可知,3 个转 *ThIPK2* 基因株系的平均株

表 2 转 *ThIPK2* 基因大豆与东农 50 农艺性状比较

Table 2 Comparison of agronomic traits between transgenic plant and Dongnong50

农艺性状 Agronomic traits	东农 50 Dongnong50	<i>ThIPK2</i>
株高 Plant height/cm	51.0	59.3 *
主茎节数 Node number on main stem	16.0	17.1
分枝数 Number of branches	3.8	5.9 **
主茎荚数 Number of pod on main stem	35.8	46.7 *
分枝荚数 Number of pod on branch	20.2	46.4 *
单株粒数 Number of seed per plant	110.8	151.9 *

* 和 ** 分别表示同一性状在 0.05 和 0.01 水平差异显著,下同。

* and ** indicate significant difference in same trait at 0.05 and 0.01 level, the same below.

1.2.3 光合生理指标 采用便携式光合系统测定仪 LI-6400(LI-COR Lincoln, USA),设定光强的光量子数为 $1\ 500\ \mu\text{mol CO}_2 \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$,叶室温度为 25℃,CO₂浓度为 $350\ \mu\text{mol} \cdot \text{mol}^{-1}$,测定叶片净光合速率(*Pn*)、蒸腾速率(*Tr*)、胞间 CO₂浓度(*Ci*)以及气孔导度(*Cond*),对照及每个转基因株系均取 5 片叶进行测定,取 3 个转基因株系的平均值,并计算水分利用率(叶片瞬时水分利用率 = 叶片光合速率/叶片蒸腾速率)。

1.2.4 生物量测定 干旱胁迫后取地上和地下部分分别冲洗,用细纱网滤过细小的须根,110℃杀青,90℃烘干至恒重,分别称重并计算总干重,取 3 个转基因株系的平均值。

1.3 数据分析

采用 Excel 2003 进行数据整理与分析。

2 结果与分析

2.1 生育时期

由表 1 可知,转 *ThIPK2* 基因大豆出苗和完熟期均比东农 50 延迟 2 d,二者生育期均是 106 d。这说明抗逆基因 *ThIPK2* 的导入并没有改变大豆原有的生育规律。但是,转 *ThIPK2* 基因大豆的始花期比非转基因对照提前 1 d,说明转 *ThIPK2* 基因大豆的花期比对照略长。

高、主茎荚数、分枝荚数和单株粒数与非转基因对照东农 50 呈显著差异,分枝数与对照呈极显著差异,主茎节数差异不显著。

2.3 光合生理特性

如表 3 所示,正常条件下,转基因大豆 *Pn*、*Cond*、*Ci* 和瞬时水分利用率均高于东农 50, *Tr* 低于东农 50,但差异均不明显;干旱胁迫 7 d 后, *Pn*、*Tr*、*Cond*、*Ci* 和瞬时水分利用率均有所下降,但是下降的幅度不同,除 *Ci* 外,东农 50 降幅均大于转 *ThIPK2* 基因大豆。

2.4 生物量

由表 4 所知,无论是地上部分还是地下部分,转基因大豆均比对照植株积累了更多的干物质,说明转 *ThIPK2* 基因植株可以在干旱条件下积累更多的干物质,有利于植株抗旱。

表 3 干旱胁迫对大豆光合生理的影响

Table 3 Effects of drought stress on photosynthetic physiological characters of soybean

光合指标	材料 Material	正常条件 Normal	干旱 Drought	降幅 Decline/%
净光合速率	东农 50	11.87 ± 0.42	7.43 ± 1.25	37.41
<i>Pn</i> /μmolCO ₂ ·m ⁻² ·s ⁻¹	<i>ThIPK2</i>	11.97 ± 0.87	9.40 ± 1.59	21.47
蒸腾速率	东农 50	4.73 ± 0.20	3.20 ± 0.42	32.35
<i>Tr</i> /mmolH ₂ O·m ⁻² ·s ⁻¹	<i>ThIPK2</i>	4.66 ± 0.29	3.82 ± 0.82	18.03
气孔导度	东农 50	0.338 ± 0.028	0.046 ± 0.008	86.39
<i>Cond</i> /mmol·m ⁻² ·mol ⁻¹	<i>ThIPK2</i>	0.370 ± 0.052	0.059 ± 0.014	84.05
胞间二氧化碳浓度	东农 50	147.31 ± 2.17	140.01 ± 6.73	5.96
<i>Ci</i> /mmolCO ₂ ·mol ⁻¹	<i>ThIPK2</i>	152.84 ± 3.24	138.80 ± 4.08	9.19
瞬时水分利用率	东农 50	2.511 ± 0.086	2.339 ± 0.404	6.85
<i>Pn</i> / <i>Tr</i>	<i>ThIPK2</i>	2.572 ± 0.339	2.510 ± 0.570	2.40

表 4 干旱胁迫下植株生物量

Table 4 Biomass weight under drought stress (g)

材料 Material	地上部分 Shoot	地下部分 Root	总重 Total weight
东农 50	17.73 ± 1.78	1.44 ± 0.38	19.17 ± 1.82
<i>ThIPK2</i>	20.41 ± 3.65	3.79 ± 1.25	24.19 ± 3.92

3 结论与讨论

正常条件下,转 *ThIPK2* 基因大豆和对照东农 50 相比生育期几乎没有差别,这说明 *ThIPK2* 基因并没有改变大豆的固有的生育期。转 *ThIPK2* 基因大豆的株高、主茎荚数、分枝荚数和单株粒数显著高于对照,分枝数极显著高于对照。而主茎节数、单株荚数、分枝数又是影响大豆产量的主要因素^[5-6],研究表明大豆产量与单株粒数、每荚粒数、主茎节数、生育期、单株荚数呈极显著正相关^[7]。因此,转 *ThIPK2* 基因大豆在农艺性状上发生的这些变化对提高大豆产量是有益的。

水分胁迫下,植物气孔关闭,使二氧化碳摄入量减少,光合作用下降,同时呼吸作用下降,甚至代谢机能受到破坏。抗旱性较强的品种能够维持较高的光合速率和较高的呼吸强度^[8]。因此可以通过光合速率和呼吸强度来评估植株的抗旱性。在该研究中,干旱胁迫后,大豆的光合速率和呼吸强度都有所下降,但与对照相比,转 *ThIPK2* 基因大豆光合速率和呼吸强度的降幅都比较小,从而保证植株的正常生长代谢。抗旱品种的水分利用率高于不抗旱品种^[8]。本试验中,干旱使大豆的水分利用率下降,转 *ThIPK2* 基因大豆水分利用率下降幅度比对照小。这有助于转 *ThIPK2* 基因大豆在干旱条件下积累干物质,提高产量。而干旱胁迫下,转 *ThIPK2* 基因大豆生物量高于对照,也恰恰证明了这一点。

参考文献

[1] Xia H J, Brearley C, Elge S, et al. *Arabidopsis* inositol polyphosphate 6-/3-kinase is a nuclear protein that complements a yeast mutant lacking a functional ArgR-Mcm1 transcription complex [J]. *Plant Cell*, 2003 15:449-463.

[2] Xu J, Brearley C A, Lin W H, et al. A role of *Arabidopsis* inositol polyphosphate kinase AtIpk2α, in pollen germination and root growth[J]. *Plant Physiology*, 2005, 137:94-103.

[3] Yang L, Tang R J, Zhu J Q, et al. Enhancement of stress tolerance in transgenic tobacco plants constitutively expressing AtIpk2β, an inositol polyphosphate 6-/3-kinase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66:329-343.

[4] Hu X Y, Sullivan-Gilbert M, Gupa M, et al. Mapping of the loci controlling oleic and linolenic acid contents and development of fad2 and fad3 allele-specific markers in canola (*Brassica napus* L.) [J]. *Theoretical Applied Genetics*, 2006, 113:497-507.

[5] 王连铮, 王金陵. 大豆遗传育种学 [M]. 北京: 科学出版社, 1992:86-88. (Wang L Z, Wang J L. Soybean genetics and breeding [M]. Beijing: Science Press, 1992:86-88.)

[6] Sukhija P S, Palmquist D L. Rapid method for determination of total fatty acid content and composition of feedstuffs and feces [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1988, 36:1202-1206.

[7] Thomas S, Brake B, Luzio J P, et al. Isolation and sequence of a full length cDNA encoding a novel rat inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1994, 1220(2):219-222.

[8] 林汉明, 常汝镇, 邵桂花, 等. 中国大豆耐逆研究 [M]. 北京: 中国农业出版社, 2009:27-28. (Lin H M, Chang R Z, Shao G H, et al. Research on tolerance to stresses in Chinese soybean [M]. Beijing: Agricultural Press, 2009:27-28.)