

研究报告

Research Report

大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 对高温和干旱信号的表达反应

吴广锡¹, 魏崑¹, 唐晓飞¹, 王伟威², 王鹏飞¹, 王兴宇¹, 刘丽君¹

1 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨, 150086

2 黑龙江省农业科学院农产品质量安全研究所, 哈尔滨, 150086

✉ 通讯作者, nkyssbd@126.com ✉ 作者

豆科基因组学与遗传学, 2014年, 第5卷, 第1篇 doi: 10.5376/lgg.cn.2014.05.0001

收稿日期: 2014年01月18日 接受日期: 2014年01月18日 发表日期: 2014年01月18日

© 2014 BioPublisher 生命科学中文期刊出版平台

本文首次发表在《分子植物育种》2013年, 第11卷, 第1期上。现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 [Creative Commons Attribution License](#), 协议对其进行授权, 再次发表与传播。只要对原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

摘要

本研究将热激转录因子 *GmHsFA1* 基因构建在植物表达载体 pCAMBIA3300 中, 以大豆子叶节作为受体, 通过农杆菌介导法将热激转录因子 *GmHsFA1* 基因导入到高产品种黑农 53 中, 获得一批转基因株系。采用 Real-time PCR 的方法对各代株系 *GmHsFA1* 基因的转录水平进行相对定量分析, 确定转基因大豆中热激转录因子 *GmHsFA1* 的表达量明显提高。利用转热激转录因子 *GmHsFA1* 大豆研究了高温和干旱胁迫下, 大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 应对高温和干旱信号的基因表达, 生理生化特性, 光合特性及产量性状的变化反应, 采用胁迫系数与灰色关联分析相结合方法, 对转 *GmHsFA1* 基因大豆的耐热性和抗旱性进行综合鉴定和评价。结果表明: 转热激转录因子 *GmHsFA1* 大豆品系在高温和干旱诱导条件下, 大豆叶片中 *GmHsFA1*、*GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 基因的表达量明显高于非转基因受体黑农 53, 叶肉细胞中的脯氨酸含量和可溶性糖含量明显高于受体, 丙二醛含量增幅较小, 叶片的光合特性受胁迫变化较小, 光合特性能力和产量性状表现高于受体, 表明过量表达的热激转录因子 *GmHsFA1* 大豆植株的耐热能力和抗旱能力得到明显的提高。

关键词

大豆; 热激转录因子; 农杆菌介导; 转基因; 耐热性; 抗旱性

The Expression Response in Transgenic *GmHsFA1* Soybean to the Signals of Heat and Drought Stress

Wu Guangxi¹, Wei Lai¹, Tang Xiaofei¹, Wang Weiwei², Wang Pengfei¹, Wang Xingyu¹, Liu Lijun¹

1 Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086; 2 Safety and Quality Institute of Agricultural Products, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086

✉ Corresponding author, nkyssbd@126.com; ✉ Authors

Abstract In this study, we inserted *GmHsFA1* gene to dicotyledon expression vector pCAMBIA3300 that contains the selection marker gene *bar*, and pCAMBIA3300-*GmHsFA1* has been transferred into new soybean lines Heinong5337 by *Agrobacterium tumefaciens*. The expression of *GmHsFA1* have been analyzed in each generations of transgenic soybean by Real-time PCR, and overexpressing *GmHsFA1* gene was demonstrated in transgenic plant. Photosynthetic characteristics (Pn, Cond, Ci, Tr), Physiological, biochemical (Pro, MDA, Wss) and yield traits of the *GmHsFA1* and *GmHSP70*, *GmHSP22*, *GmHSP17.9* were tested in transgenic soybean under the high temperature stress and drought stress. Stress coefficient analysis and grey related correlation analysis were introduced into this experiment, which provided comprehensive evaluation on heat tolerance and drought resistance of soybean materials. The results showed that the expression levels of *GmHsFA1*, *GmHSP17.9*, *GmHSP22* and *GmHSP70* in leaf blade of transgenic plants were notably higher than that in Heinong53 that is non-transgenic plant growing under normal condition or heat and drought introduction. Under the condition of stress, the content of soluble sugar (wss) and free proline (pro) of the transgenic lines were significant higher than those growing in the normal conditions, while the increment of malondialdehyde (MDA) appeared. The transgenic lines also had little change in photosynthetic characteristics and yield traits, Whereas the heat tolerance and drought

resistance were remarkably enhanced in transgenic plants.m.

Keywords Soybean, Heat shock transcription factor, *GmHsFA1*, *Agrobacterium tumefaciens*, Transgene, Heat tolerance, Drought resistance

黑龙江省大豆生产区近几年各地气温变化是逐年增高,最低增幅为 0.16°C/10 年,最高增幅为 0.73°C/10 年。十年九旱,有效积温增加了 200°C,季节性的高温干旱天气时常发生,严重的影响了大豆的生长和发育,使大豆产量常因干旱,特别是结荚鼓粒期高温干旱而降低,因此培育抗旱耐逆境胁迫的大豆品种,是实现大豆高产稳产的重要途径。

已有研究表明热休克蛋白的合成与生物体的耐热性是正相关的(Nover et al., 2001; Schöffl et al., 1998; Wu, 1995)。热休克蛋白的合成及积累对植物的应激能力的提高起到重要的作用(Morimoto, 1998; 翁锦周和洪月云, 2006)。人们从热激反应,蛋白质功能,细胞定位和遗传学等诸方面进行了研究(邹杰等, 2007; Li et al., 2005, Cao et al., 2012; Gao et al., 2012; 唐晓飞等, 2009; 陈晓军等, 2006; Zhu et al., 2006)。

然而,这种适应逆境信号的热休克蛋白,还与植物体的抗旱性和耐冷性存在着关系,有研究证实植物的热休克蛋白在防御不同逆境胁迫过程中存在着交叉性。为此,本研究利用基因转移技术,将热激转录因子 *GmHsFA1* 基因转入大豆黑农 53 中,用 RtPCR 的方法确定各世代转基因植株和 *GmHsFA1* 的表达量以及靶基因 HSP70 等的表达水平;同时利用转热激转录因子 *GmHsFA1* 大豆株系,研究了高温和干旱胁迫下, *GmHsFA1* 过量表达株系的靶基因表达,生理生化表现特性,光合特性与产量性状的表现特点,提高大豆抗逆性,为大豆抗逆品种的培育提供技术支持和种质资源。

1 结果与分析

1.1 *GmHsFA1* 基因转化大豆

将质粒 pBI121-HsFA1 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,回收 2.8 kb 的质粒,载体质粒 PCAMBIA3300 用双酶切回收的 8.5 kb 的质粒,连接酶回收质粒,转化到大肠杆菌中,筛选重组子酶切得到 PCAMBIA3300-HsFA1 质粒,以草铵膦为筛选标记,以质粒 PCAMBIA3300-HsFA1 为阳性对照,以黑农 53 为受体,利用农杆菌介导的方式将 *HsFA1* 基因转化到黑农 53 大豆中,用检测 35s-bar 的引物进行 PCR 扩增,得到 17 株呈现 PCR 阳性植株(图 1)。

1.2 *GmHsFA1* 基因在大豆组织中的表达特点

大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 在叶组织中的表达量较高,转化植株在 T₁ 代测定中,叶组织中的 *GmHsFA1* 含量明显高于受体,最高种质材料是受体的 5 倍以上,当受到高

温和干旱胁迫后转 *GmHsFA1* 的表达量明显增高,不同株系间差异不同,最高的材料是受体的 9 倍,而干旱胁迫叶组织中 *GmHsFA1* 的表达量增加,表达量最高的材料是受体的 6 倍以上,但与高温胁迫相比,表达量低于高温胁迫的反应(图 2)。



图 1 转基因大豆的 PCR 检测

注: M: DL2000 marker; 1: 阳性对照(阳性质粒); 2: 阴性对照黑农 53; 3: 空白对照(双蒸水); 4-18: 为 HTH-1 至 HTH-15
Figure 1 Transgenic soybean plants detected by PCR analysis
Note: M: DL2000 marker; 1: Positive plasmid (positive control); 2: Untransformed plant Haojiao5337 (negative control); 3: Blank control (distill deionized water); 4-18: Refer to from HTH-1 to HTH 18, respectively

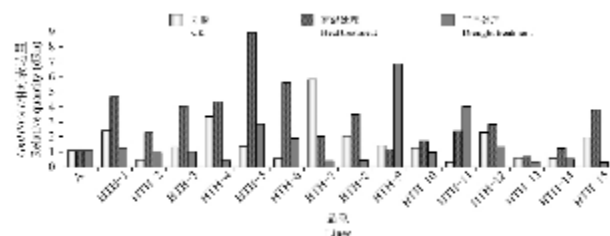


图 2 高温干旱胁迫下大豆 *GmHsFA1* 基因的表达

Figure 2 The *GmHsFA1* expressed in transgenic soybean plants under the treatment of drought and heat stress

1.3 与抗高温相关的靶基因在大豆叶组织的表达

热激蛋白 *HSP70*、*HSP22* 与 *HSP17.9* 是与抗热性相关的基因,已在许多研究证实,因此在研究 *GmHsFA1* 基因大豆对高温和干旱胁迫信号的反应中通过对这些靶基因的表达来证实转基因材料的抗性,通过对不同株系叶组织中 *HSP70*、*HSP22* 和 *HSP17.9* 基因测定和分析,我们看到,转基因植株中 *HSP70*、*HSP22* 和 *HSP17.9* 基因的表达量明显高于受体黑农 53,株系之间有差异。在高温胁迫下,*HSP70* 和 *HSP22* 的表达量明显增高,*HSP17.9* 的表达量也增高但不如 *HSP70* 和 *HSP22* 增幅较大(图 3; 图 4; 图 5)。而干旱胁迫下,*HSP70*、*HSP22* 和 *HSP17.9* 都有增加,但株系间差异特别大,如

HTH-9 水分胁迫下, *HSP70* 增加了 34 倍, 而 HTH-6 株系中 *HSP17.9* 增加 17 倍, *HSP22* 增加 34 倍。而 HTH-13 株系干旱胁迫后, 靶基因 *HSP70*、*HSP22*、*HSP17.9* 并没有变化, 而对高温的反应变化也不明显, 由此也可以看出品种的热激靶基因对不同胁迫的反应是不同的。

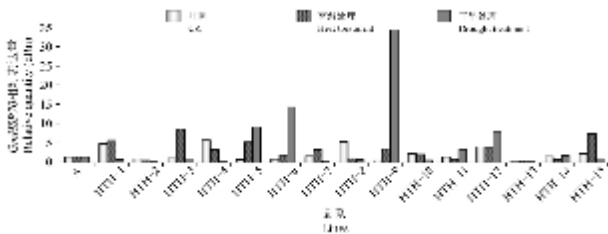


图 3 高温、干旱胁迫下, 大豆 HSP70 基因的表达

Figure 3 The HSP70 expressed in transgenic soybean plants under the treatment of drought and heat stress

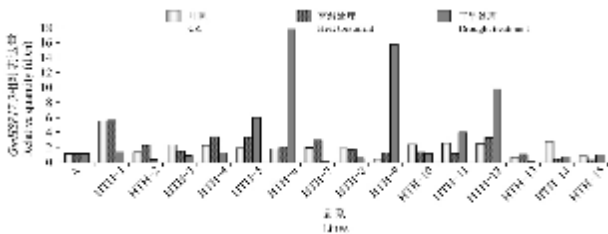


图 4 高温、干旱胁迫下, 大豆 HSP17.9 基因的表达

Figure 4 The HSP17.9 expressed in transgenic soybean plants under the treatment of drought and heat stress

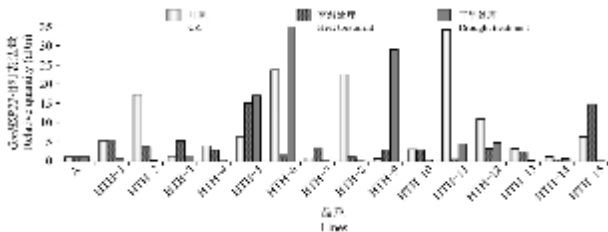


图 5 高温、干旱胁迫下, 大豆 HSP22 基因的表达

Figure 5 The HSP22 expressed in transgenic soybean plants under the treatment of drought and heat stress

1.4 热激转录因子大豆在高温、干旱条件下的生理变化

大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 在逆境胁迫下, 叶肉组织中脯氨酸含量, 丙二醛含量可溶性糖含量明显高于自身 CK, 但转基因株系间存在差异。高温胁迫下, 脯氨酸积累最多的株系是 HTH-14, 可溶性糖含量增加最多的是 HTH-4, 而大部分转基因材料丙二醛含量增加的幅度都明显低于受体, 只有 HTH-14 高于受体, 表明了转基因材料对高温胁迫是有抵御反应的(脯氨酸, 可溶性糖, 丙二醛)(表 1)。

干旱胁迫条件下, 转基因材料叶组织中脯氨酸积累超过受体的有 7 个株系, 其中 HTH-9 积累量最高, 是受体 3 倍

以上。可溶性糖的含量在干旱胁迫下与自身对照相比都有增加, 但与受体相比, 多数株系的可溶性糖含量低于受体, 有两个株系 HTH-6、HTH-5 略高于受体, 可溶性糖是作物逆境条件下的渗透势调节物质, 它反映品种的自我调解能力。而干旱胁迫条件下, 转基因大豆叶组织的丙二醛含量低于受体, 当干旱胁迫时, 各转基因株系的丙二醛含量与自身 ck 相比都有增加, 株系间各异, 丙二醛是作物膜损伤的代谢产物, 说明干旱条件下, 转基因株系的膜损伤比非转基因小。

1.5 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片光合特性的变化

转 *GmHsFA1* 大豆在高温和干旱胁迫下, 叶片的净光合速率降低, 气孔导度变小, 细胞间 CO_2 浓度减少, 叶片的蒸腾速率, 瞬时水分利用率降低, 株系间有差异。高温条件下光合特性降低幅度较大。但干旱胁迫下, 降低幅度较小。转基因株系光和特性降低幅度小于非转基因黑农 53 的降幅(图 6; 图 7; 图 8; 图 9; 图 10)。

经过高温、干旱和高温加干旱处理均使 *GmHsFA1* 过量表达大豆的产量高于受体, 单株荚数小于受体, 单株粒数高于受体, 单株总重量高于受体(表 2)。个别品系与对照相近。

1.6 大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 株系的耐热抗旱性的评价

采用胁迫系数与灰色关联分析相结合的方法, 对转 *GmHsFA1* 基因大豆的耐热性和抗旱性进行综合评价。从表 3 中可以看出: 转基因材料中, 有 9 个材料耐高温能力得到提高, 耐热性最强的为 HTH-15; 有 7 个材料抗旱能力得到提高, 其耐旱性最强为 HTH-5 和 HTH-9; 有 5 个材料的耐热和抗旱能力都得到了提高。表明热激转录因子 *GmHsFA1* 的过量表达能够提高大豆的耐热性和抗旱能力。

2 讨论

大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 的过量表达能够提高大豆对干旱、高温逆境胁迫的抵御能力; 转热激转录因子 *GmHsFA1* 大豆品系在高温和干旱信号的诱导下, 目的基因和靶基因的表达量都明显高于受体; 脯氨酸、可溶性糖含量明显增高, 光合能力和产量性状表现高于受体植株。通过胁迫系数与灰色关联分析得方法, 鉴定评价其耐旱性和耐高温能力明显高于受体。由此证实大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 的过量表达能够提高大豆的抗旱性和耐高温的能力(吴广锡等, 2012)。干旱信号对大豆热激蛋白基因诱导和表达在株系中存在差异, 从图 3 到图 5 中可以看出, 干旱胁迫下, 转基因大豆中的热激转录因子 *HSP17.9*、*HSP22* 和 *HSP70* 基因的表达有的高于受体, 有的低于受体。我们认为这些基因是对高温反应敏感基因, 是热激的靶基因, 而干旱胁迫对这些基因的

表1 大豆热激转录因子 *GmHsFA1* 对高温和干旱信号的生理反应

Table 1 Physiological reaction of the heat shock transcription factor *GmHsFA1* response to heat and drought signals

| 品系 Lines | 脯氨酸含量(μg/g FW) Proline content(μg/g FW) | | | | | | 脯氨酸含量(μg/g FW) Proline content(μg/g FW) | | | | | | 脯氨酸含量(μg/g FW) Proline content (μg/g FW) | | | | | |
|-------------------|--|-------|---------------|-----------------|--------|---------------|--|--------|---------------|-----------------|--------|---------------|---|-------|---------------|-----------------|-------|---------------|
| | 高温实验 High temperature | | | 干旱实验 Drought | | | 高温实验 High temperature | | | 干旱实验 Drought | | | 高温实验 High temperature | | | 干旱实验 Drought | | |
| | 对照 | 高温 | 增幅(%) | 对照 | 干旱 | 增幅(%) | 对照 | 高温 | 增幅(%) | 对照 | 干旱 | 增幅(%) | 对照 | 高温 | 增幅(%) | 对照 | 干旱 | 增幅(%) |
| | CK | HT | Increases (%) | CK | DT | Increases (%) | CK | HT | Increases (%) | CK | DT | Increases (%) | CK | HT | Increases (%) | CK | DT | Increases (%) |
| 黑农53 Heimong53 | 12.68 | 21.61 | 70 | 10.04 | 85.22 | 749 | 200.40 | 212.31 | 6 | 121.97 | 183.35 | 50 | 45.77 | 63.88 | 40 | 60.90 | 82.92 | 36 |
| HTH-1 | 6.35 | 19.03 | 200 | 6.55 | 95.67 | 1361 | 141.04 | 153.62 | 9 | 113.06 | 126.97 | 12 | 57.85 | 68.81 | 19 | | | |
| HTH-2 | 22.79 | 50.80 | 123 | 17.20 | 21.52 | 25 | 143.16 | 174.21 | 22 | 97.99 | 147.23 | 50 | 55.68 | 72.12 | 30 | 42.54 | 65.01 | 53 |
| HTH-3 | 11.40 | 24.72 | 117 | 4.44 | 122.78 | 2663 | 221.79 | 280.85 | 27 | 110.06 | 162.07 | 47 | 62.52 | 74.35 | 19 | 44.48 | 66.28 | 49 |
| HTH-4 | 13.22 | 21.23 | 61 | 16.18 | 37.18 | 68 | 106.09 | 174.57 | 65 | 85.51 | 119.60 | 40 | 40.83 | 72.82 | 78 | 42.92 | 53.12 | 24 |
| HTH-5 | 8.87 | 14.09 | 59 | 7.17 | 389.78 | 5334 | 137.69 | 149.81 | 9 | 131.04 | 217.90 | 66 | 59.39 | 72.19 | 22 | 55.27 | 74.47 | 35 |
| HTH-6 | 7.88 | 24.37 | 209 | 5.83 | 205.29 | 3424 | 102.41 | 136.55 | 33 | 95.80 | 187.31 | 96 | 57.48 | 69.36 | 21 | 39.56 | 87.43 | 121 |
| HTH-7 | 9.61 | 11.86 | 23 | 10.84 | 49.12 | 353 | 85.78 | 97.54 | 14 | 115.65 | 113.15 | -2 | 27.61 | 30.05 | 9 | 50.76 | 58.74 | 16 |
| HTH-8 | 10.83 | 25.71 | 137 | 13.72 | 17.02 | 24 | 172.12 | 197.65 | 15 | 107.33 | 131.48 | 23 | 77.74 | 94.12 | 21 | 47.31 | 52.68 | 11 |
| HTH-9 | 5.94 | 15.70 | 164 | 6.85 | 282.47 | 4025 | 90.81 | 119.79 | 32 | 89.17 | 182.21 | 104 | 33.73 | 36.77 | 9 | 50.00 | 79.57 | 59 |
| HTH-10 | 11.23 | 37.88 | 237 | 3.82 | 24.80 | 549 | 133.34 | 150.93 | 13 | 99.80 | 143.39 | 43 | 47.42 | 59.92 | 26 | 32.24 | 77.05 | 139 |
| HTH-11 | 10.68 | 28.56 | 167 | 7.80 | 150.16 | 1824 | 97.30 | 123.53 | 27 | 92.49 | 169.47 | 83 | 70.22 | 79.04 | 13 | 48.78 | 78.81 | 62 |
| HTH-12 | 7.83 | 21.36 | 173 | 8.82 | 213.95 | 2327 | 103.19 | 116.58 | 13 | 126.84 | 170.28 | 34 | 43.35 | 51.00 | 18 | 58.63 | 69.54 | 19 |
| HTH-13 | 7.17 | 19.01 | 165 | 7.91 | 77.18 | 876 | 84.97 | 111.81 | 32 | 81.28 | 119.22 | 47 | 36.47 | 38.56 | 6 | 34.8 | 60.24 | 89 |
| HTH-14 | 5.79 | 30.86 | 433 | 18.89 | 36.67 | 94 | 144.45 | 162.36 | 12 | 112.13 | 127.61 | 14 | 69.86 | 75.99 | 9 | 52.03 | 63.57 | 22 |
| HTH-15 | 5.16 | 15.09 | 192 | 8.50 | 19.89 | 134 | 145.98 | 171.87 | 18 | 114.95 | 135.80 | 18 | 62.27 | 78.07 | 25 | 43.51 | 44.84 | 3 |

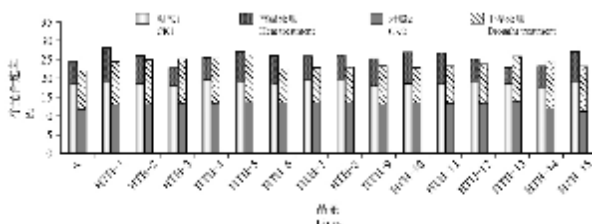


图 6 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片净光合速率的变化

Figure 6 Effects of heat and drought stress on net photosynthetic rate of transgenic soybean

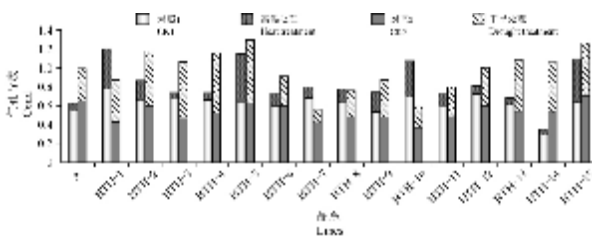


图 7 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片气孔导度的变化

Figure 7 Effects of heat and drought stress on stomatal conductance of transgenic soybean

表达有影响但并不是干旱的靶基因,可利用这些材料深入研究干旱胁迫下,干旱诱导基因如调节蛋白的转录因子(DREB)、蛋白激酶(MaDK CDPK)和功能蛋白中 GST 的表达,可进一步解释 *GmHsFA1* 的过量表达对调解干旱的作用。

表2 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片净光合速率的下降范围

Table 2 Minimum decrease rate of net photosynthetic rate of transgenic soybean under heat and drought stress

| 品系 Lines | 下降范围(%) Decreasing range of Pn (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) | 下降范围(%) Decreasing range of g _s (mol H ₂ O m ⁻² s ⁻¹) | 下降范围(%) Decreasing range of g _s /Pn (μmol CO ₂ m ⁻² s ⁻¹) |
|-------------------|--|--|--|
| 黑农53 Heimong53 | 62 | 62 | 73 |
| HTH-1 | 10 | 19 | 15 |
| HTH-2 | 14 | 14 | 10 |
| HTH-3 | 40 | 19 | 19 |
| HTH-4 | 40 | 17 | 17 |
| HTH-5 | 10 | 16 | 15 |
| HTH-6 | 12 | 3 | 20 |
| HTH-7 | 48 | 12 | 60 |
| HTH-8 | 20 | 14 | 14 |
| HTH-9 | 20 | 12 | 12 |
| HTH-10 | 24 | 11 | 16 |
| HTH-11 | 21 | 16 | 15 |

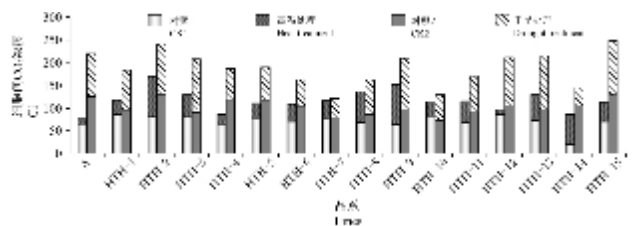


图 8 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片细胞间 CO₂ 浓度的变化

Figure 8 Effects of heat and drought stress on intercellular CO₂ concentration (Ci) of transgenic soybean

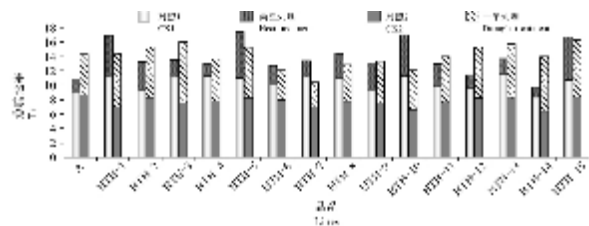


图 9 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片蒸腾速率的变化

Figure 9 Effects of heat and drought stress on leaf transpiration rate of transgenic soybean

表 10 转基因大豆在不同胁迫条件下叶片瞬时水分利用率的变化
Table 10 Effects of heat and drought stress on efficiency of instantaneous water of transgenic soybean

| 胁迫 | 叶片水分利用率 | 叶片水分利用率 | 叶片水分利用率 | 叶片水分利用率 |
|--------|--------------------|----------------|--------------------|----------------|
| Stress | Transgenic soybean | Non-transgenic | Transgenic soybean | Non-transgenic |
| 对照 | 0.2706 | 0 | 0.3022 | 0 |
| HT1 | 0.2777 | 0 | 0.3110 | 0 |
| HT2 | 0.2402 | 20 | 0.2870 | 0 |
| HT3 | 0.2780 | 4 | 0.3087 | 0 |
| HT4 | 0.2274 | 21 | 0.2870 | 0 |
| HT5 | 0.2431 | 1 | 0.2870 | 0 |
| HT6 | 0.2119 | 4 | 0.3022 | 0 |
| HT7 | 0.2220 | 22 | 0.3022 | 0 |
| HT8 | 0.2193 | 15 | 0.3022 | 0 |
| HT9 | 0.2424 | 4 | 0.3022 | 0 |
| HT10 | 0.2413 | 10 | 0.3022 | 0 |
| HT11 | 0.2258 | 0 | 0.3022 | 0 |
| HT12 | 0.2187 | 4 | 0.3022 | 0 |
| HT13 | 0.2118 | 0 | 0.3022 | 0 |
| HT14 | 0.2202 | 22 | 0.3022 | 0 |
| HT15 | 0.2193 | 15 | 0.3022 | 0 |

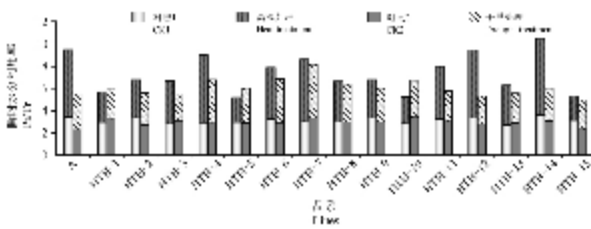


图 10 转基因大豆在高温、干旱条件下叶片瞬时水分利用率的变化
Figure 10 Effects of heat and drought stress on efficiency of instantaneous water of transgenic soybean

3 材料与方法

3.1 试验材料

在本研究中所用的大豆转化受体材料为本实验室育成品种黑农 53。

3.2 载体构建

质粒 pBI121-Hsf1 (包含 *GmHsFA1* 基因)以及表达载体 PCAMBIA3300 均由中国科学院遗传与发展研究所朱保葛老师惠赠。

利用 LB 培养基对 PCAMBIA3300 和 pBI121Hsf1 菌落进行培养, 设置温度 37°C, 转速 200 rpm/min。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 分别对质粒 pBI121-Hsf1 和载体 PCAMBIA3300 进行双酶切, 回收分别得到包含 35s+*GmHsFA1*+NOS 的完整结构约 2.8 kb 的片段以及约 8.5 kb 的载体片段。使用 T4 连接酶将以上两个回收片段进行连接, 22°C 连接过夜。

将连接产物用热激法转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中, 利用 100 mg/L 卡那霉素进行重组子的筛选。选取阳性菌落挑出后转化至农杆菌感受态细胞中, 在固体 YEB 培养基中暗培养 48 h, 至出现大小 2 mm 左右的菌斑。

3.3 遗传转化

采用子叶节的农杆菌介导的遗传转化方法, 以草铵膦作为筛选标记, 经过预培养, 伸长和生根培养获得转化植株。

3.4 转基因植株的 PCR 检测

大豆植株总 DNA 的提取选用 CTAB 法, 根据 *bar* 基因和 CaMV35 启动子的碱基序列设计并合成引物。PCR 扩增产物 594 bp。

3.5 T₁-T₉ 代抗性转基因大豆植株的 Rt-PCR 检测

将 T₁-T₉ 代转基因大豆植株与受体黑农 53 分别在常温下种植, 分别提取各个大豆叶片的总 RNA, 并反转录成 cDNA, 选用的内参为大豆 *Tubulin* 基因, 以目的基因 *GmHsFA1* 和内参 *Tubulin* 基因序列各设计并合成引物。引物 1 (*GmHsFA1* 基因): R: 5'-TTGCTGTCGTTGCTCCAT-3'; F: 5'-ATAACTCGGCGGAAACCT-3', 内参(*Tubulin* 基因)的引物: R: 5'-GACAGCATCAGCCATGTTCA-3'; F: 5'-AACCTCCCCTCATCGTACT-3', 并设置看家基因。用 MX3000pTM 实时荧光定量 PCR 进行 Rt-PCR 反应, 反应条件为 95°C 预变性 10 min, 95°C 变性 30 s, 60°C 复性 1 min, 40 个循环, 实验重复 3 次, 将含有相对定量结果放置一个坐标图上, 数据为 3 次重复的平均值, 绘制扩增曲线, 溶解曲线, 采用比较 G 法($\Delta\Delta C_T$)记录相对表达量。

3.6 靶基因的检测

以 *Tubulin* 为内参分别对靶基因 *GmHSP70*、*GmHSP22* 和 *GmHSP17.9* 进行表达量检测, Real-Time PCR 反应在 Mx3000pTM 实时荧光定量 PCR 仪上进行。Primer1: 检测 *GmHSP70* 基因的引物: P1: 5'-AACGACCAAGGCAACCGAAC-3'; P2: 5'-TCCCTCATCTTGACCAACACC-3'。Primer2: 检测 *GmHSP22* 基因的引物: P1: 5'-CTGGAAGAAACATAGGAGGAGGG-3'; R1: 5'-ACTCTGCCTTAACCTTGCCCTTCT-3'。Primer3: 检测 *GmHsp17.9* 基因的引物: P1: 5'-TGGATTCAGAGTGATGGGTTTGG-3'; R1: 5'-TCTCTTCGTCCTCTTTCGTTCCC-3'。

3.7 生理指标的测定

脯氨酸测定采用酸性茚三酮显色法, 丙二醛和可溶性糖测定均采用 TBA 显色法(王晶英等, 2003, 东北林业大学出版社, pp.133-136), 光合指标测定采用便携式光合测定仪 LI-6400XT (Li-COR Aincoln, OSA)对高温、干旱胁迫后的品系进行光合速率, 气孔导度, 细胞间 CO₂ 浓度和蒸腾速率进行测定。

3.8 产量性状调查

采用常规方法测定单株产量, 单株荚数, 粒数和百粒重。

3.9 品系的抗逆性评价

采用胁迫系数与灰色关联度分析法综合评价各品系之间的抗旱(耐高温)能力。

计算公式: 抗逆系数=逆境胁迫下的指标值/正常水分下的指标值

温度处理: CK 为常温 28℃, 高温为 48℃。

水分胁迫: CK 为土壤水分 18%~20%, 干旱处理为土壤水分 8%~9%。

3.10 数据分析

灰色关联分析法和差异显著方法分析等数据计算均采用 SPSS17.0 和 DPS7.0 分析软件处理。

作者贡献

吴广锡、魏崃和唐晓飞是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 刘丽君和吴广锡完成数据分析; 王伟威、王鹏飞和王兴宇参与实验设计, 试验结果分析; 刘丽君和吴广锡是项目的构思者和负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家转基因重大专项(2013ZX0800-4002)、现代农业产业技术体系(CAR-04-PS05)和十二五国家科技支撑计划(2011BAD351306-1-4)资助。作者感谢中国科学院遗传与发展研究所朱保葛老师对本实验的帮助。

参考文献

Cao F., Cheng H., Cheng S., Li L.L., Xu F., Yu W.W., and Yuan H.H., 2012, Expression of selected *Ginkgo Biloba* heat shock protein genes after cold treatment could be induced by other abiotic stress, *Int. J. Mol. Sci.*, 13(5): 5768-5788

Chen X.J., Ye C.J., Lv H.Y., Xu M.X., Li W., Zhang L.M., Wang C., Luo S.P., and Zhu B.G., 2006, Cloning of *GmHsFAI* gene and its overexpression leading to enhancement of heat tolerance in transgenic soybean, *Yichuan (Hereditas)*, 28(11): 1411-1420 (陈晓军, 叶春江, 吕慧颖, 徐民新, 李葳, 张利明, 王超, 罗淑萍, 朱保葛, 2006, *GmHsFAI* 基因克隆及其过量表达提高转基因大豆的耐热性, *遗传*, 28(11): 1411-1420)

Gao C., Jiang B., Wang Y., Liu G., and Yang C., 2012, Overexpression of a heat shock protein (ThHSP18.3) from *Tamarix hispida* confers stress tolerance to yeast, *Mol. Biol. Rep.*, 39(4): 4889-4897

Li C., Chen Q., Gao X., Qi B., Chen N., Xu S., Chen J., and Wang X., 2005, AtHSFA2 modulates expression of stress responsive genes and enhances tolerance to heat and oxidative stress in *Arabidopsis*, *Sci. China C Life Sci.*, 48(6): 540-55

Morimoto R.I., 1998, Regulation of the heat shock transcriptional response: cross talk between a family of heat shock factors, molecular chaperones, and negative regulators, *Genes Dev.*, 12(24): 3788-3796

Nover L., Bharti K., Döring P., Mishra S.K., Ganguli A., and Scharf K.D., 2001, *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor world: How many heat stress transcription factors do we need? *Cell Stress Chaperones*, 6(3): 177-189

Schöfl F., Prändl R., and Reindl A., 1998, Regulation of the heat-shock response, *Plant Physiologists*, 117(4): 1135-1141

Tang X.F., Liu L.J., Gao M.J., Yang Z., Pu G.F., Zhang L., and Wei L., 2009, *Agrobacterium-mediated* transformation of *hsf8* into soybean, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 7(3): 444-450 (唐晓飞, 刘丽君, 高明杰, 杨喆, 蒲国锋, 张雷, 魏崃, 2009, 农杆菌介导热激转录因子 8 基因转化大豆, *分子植物育种*, 7(3): 444-450)

Weng J.Z., and Hong Y.Y., 2006, The roles of plant shock transcription factors in abiotic stress, *Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 4(1): 88-94 (翁锦周, 洪月云, 2006, 植物热激转录因子在非生物逆境中的作用, *分子植物育种*, 4(1): 88-94)

Wu C., 1995, Heat shock transcription factors: structure and regulation, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 11: 441-469

Wu G.X., Liu L.J., Yang D.G., Tang X.F., Wei L., Wang P.F., and Wang X.Y., 2012, Heat resistance evaluation of *GmHsFAI* transgenic soybean, *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 31(3): 341-346 (吴广锡, 刘丽君, 杨德光, 唐晓飞, 魏崃, 王鹏飞, 王兴宇, 2012, 转 *GmHsFAI* 基因大豆的耐热性评价, *大豆科学*, 31(3): 341-346)

Zhu B.G., Ye C.J., Lv H.Y., Chen X., Chai G., Chen J., and Wang C., 2006, Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, *GmHsFAI*, in soybeans (*Glycine max*), *J. Plant Res.*, 119(3): 247-256

Zhou J., Chen X.B., Liu A.L., Gao G.F., and Zhu M.L., 2007, Plant heat shock proteins and crop abiotic stress tolerance improvement, *Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications)*, 43(5): 981-985 (邹杰, 陈信波, 刘爱玲, 高国赋, 朱木兰, 2007, 植物热激蛋白与作物非生物抗逆性的改良, *植物生理学通讯*, 43(5): 981-985)