

BrDREB 转录因子对东北早粳稻的遗传转化研究

刘建新¹, 刘文萍^{1,2}, 王冠³, 李柱刚^{1,2}

(1. 黑龙江省农业科学院生物技术研究所, 哈尔滨 150086; 2. 黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室, 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院信息中心, 哈尔滨 150086)

摘要: 低温冷害是造成水稻减产的主要因素之一。CBF-DREB 转录因子家族是近年来发现的对植物抗逆反应起重要作用的一类基因。将来源于大白菜中的抗冷相关的转录因子 *BrDREB* 基因与 *Bar* 基因选择标记构建于 pGreen0229 表达载体上, 用农杆菌介导法将其转入东北早粳稻的几个品种中, 获得带有 *Bar* 基因选择标记的转 *BrDREB* 基因的早粳稻植株。通过 PCR 扩增、Southern 杂交检测分析表明, *BrDREB* 基因已被转入水稻中。

关键词: 水稻; 农杆菌介导; *BrDREB* 基因

中图分类号: S511 文献标识码: A 文章编号: 1002-2767(2008)02-0001-03

Agrobacterium Tumefaciens-mediated Transformation of Rice for *BrDREB* Gene

LIU Jian-xin¹, LIU Wen-ping^{1,2}, WANG Guan³, LI Zhu-gang^{1,2}

(1. Biotechnological Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences Harbin 150086; 2. Heilongjiang Key Laboratory of Molecular Breeding of Crop and Livestock, Harbin 150086; 3. Information Center of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086)

Abstract: Cold stress is one of the most important factors to decrease the productivity of rice severely. The gene *BrDREB* belong to the CBF-DREB gene family, which plays an important role in resisting abiotic stress, and is designed on vector PGreen0229. The gene was transferred into the rice calli by the way of Agrobacterium mediated, and the transgenic plants gained were detected by PCR and dot plot hybridization.

Key words: rice; agrobacterium-mediated; *BrDREB* gene

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 它为人类提供了 1/3 以上的食物和能量。然而, 水稻在芽期、苗期、孕穗期和抽穗期都是低温敏感期, 低温对其生长和产量都有较大的影响。每年由于低温冷害, 全世界大约损失 30 亿 ~ 50 亿 kg 稻谷。因此, 改造水稻的耐冷性状, 增强水稻的耐冷能力, 降低由于低温冷害造成的水稻减产, 具有十分重要的意义。

然而, 由于耐冷性状是属于数量性状, 是多基因作用的结果, 单纯的一个抗冷基因并不能明显改善植物的抗冷性状。近年来的研究表明, CBF-DREB (C-repeat/DRE Binding Factor) 转录因子能够激活很多冷响应基因, 转录出相应的蛋白质, 加强植株的

耐冷性^[1]。DREB 转录因子对一系列抗逆功能基因的转录以及对脯氨酸和糖含量的促进作用, 说明 DREB 因子在植物抗逆反应中起着重要作用^[2]。与导入或改良个别功能基因来提高某种抗性的传统方法相比, 在提高作物对环境胁迫抗性的分子育种中, 改良或增加一个关键的转录因子的调控能力可以提高植株多方面的抗逆性(抗旱、抗冻及抗盐)^[1,3]。

根据拟南芥中已经报道的对冷害起作用的转录因子, 借助拟南芥和芸薹属亲缘关系较近的优势, 针对拟南芥中抗冷转录因子的保守区设计简并引物, 利用 RACE 法 (Rapid Amplification of cDNA Ends, cDNA 末端迅速扩增) 从大白菜中克隆编码抗冷相关的转录因子 *BrDREB* 基因, 然后设计合适的酶切位点, 以 pGreen0229-RD29A-CBF4-DHA 为框架, 构建成具有携带抗冷转录因子并且具有除草剂抗性的植物表达载体 pGreen0229-CaMV35S-BrDREB-DHA。本试验先从若干东北早粳稻品种中筛选出适合进行遗传转化的品种, 然后将该表达载体用农杆菌介导法转入这些品种的愈伤组织中,

收稿日期: 2007-10-10
基金项目: 黑龙江省攻关重点项目 (GB05B104); 黑龙江省农业科学院创新工程资助项目
第一作者简介: 刘建新 (1976-), 女, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 硕士, 研究, 从事生物化学与分子生物学研究。Tel: 13836112240; E-mail: wendyliujx@163.com.
通讯作者: 李柱刚, lizhugang@163.com.

以期获得带有 *Bar* 基因选择标记的转 *BrDREB* 基因的早粳稻转化株。

1 材料与方法

1.1 供试材料

进行遗传转化的早粳稻品种由黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所提供, 包括松粳 3 号、松粳 98-122、松粳 98-133、龙稻 99-88、龙稻 99-85、垦鉴稻 7 号、合江 19、普优 17、龙粳 14 和龙育 390 等品种(系)。

农杆菌菌株 GV3101 和表达载体 pGreen0229-CaMV35S-*BrDREB*-DHA 均由北京市农林科学院提供。

培养基配方参见全东兴的方法^[4]。

1.2 试验方法

1.2.1 农杆菌介导的水稻愈伤组织的转化 取水稻成熟种子, 脱壳, 挑选饱满光洁无菌斑的种子消毒, 将种子放在无菌滤纸上吸干, 置入诱导培养基中, 每瓶 30 颗, 在 28℃培养箱培养 21 d 后, 挑取自然分裂的胚性愈伤组织(淡黄色, 致密呈球状), 去掉芽和盾片, 置入继代培养基中, 在 28℃培养箱, 继代培养。将载有表达载体 pGreen0229-CaMV35S-*BrDREB*-DHA 的农杆菌 GV3101 菌液 1 mL 于 20 mL YEP(含 50 mg·L⁻¹ Kan)培养液中, 28℃, 200 r·min⁻¹ 振荡培养过夜, 再取 1 mL 菌液于 20 mL YEP 培养液中, 28℃, 200 r·min⁻¹ 振荡培养 4~6 h 至菌液 OD₆₀₀ 为 0.6~0.8。将培养好的菌液于 30 mL 离心管中, 4℃, 5 000 r·min⁻¹, 离心 8 min, 去上清。用含 200 μmol·L⁻¹ As(乙酰丁香酮)的 100 mL AAM 菌液制成悬浮液, 使菌液 OD₆₀₀ 的终浓度为 0.1; 将长到一定大小的水稻愈伤组织挑出, 放入农杆菌悬浮液侵染 15 min; 将愈伤组织取出, 置于无菌的滤纸上沥干 30~40 min; 将愈伤组织置于共培养基(覆盖一层滤纸)上, 25℃暗培养 2.5 d。将愈伤组织取出, 用无菌水清洗 5~6 次, 其间需不停的振荡, 直至水清澈不见杂物。再用含 500 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠的无菌水清洗 1~2 遍。最后置于无菌滤纸上沥干 2 h; 将晾干的愈伤转入含 500 mg·L⁻¹ 头孢噻肟钠和 2 mg·L⁻¹ PPT 的选择培养基上进行第一轮选择, 28℃, 暗培养 14 d; 将长有抗性愈伤的初始愈伤转到含 300 mg·L⁻¹ 或头孢噻肟钠和 2 mg·L⁻¹ 的培养基上进行第二轮选择, 28℃, 暗培养, 直到颗粒性的抗性愈伤组织长出(见图 1)。

1.2.2 抗性愈伤组织的预分化和分化 将新长出的抗性愈伤组织转入预分化培养基中, 25℃, 光照培养 7 d。挑取从同一愈伤来的颜色鲜黄的抗性愈伤, 移入装有分化培养基的培养皿中, 放入恒温培养室中, 等待分化成苗(15~30 d)。待苗长至 1 cm 左右, 放入生根培养基中壮苗(见图 2, 图 3)。

1.2.3 再生植株的分子检测 (1)PCR 检测: 引物是根据 *BrDREB* 的序列设计的特异性引物。序列为

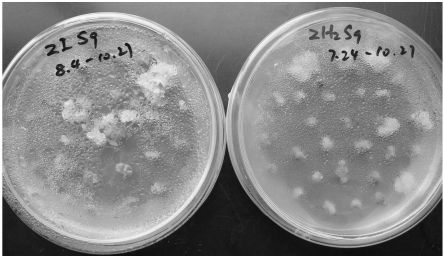


图1 新生的水稻抗性愈伤组织



图2 分化培养-绿芽点

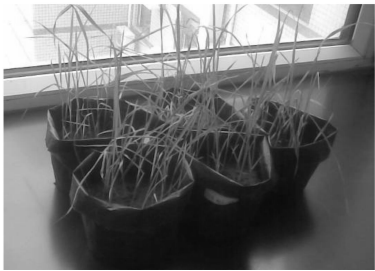


图3 转基因植株

5'-TCTAGAACTCTACATTCCCA GACTCG -3' 和 5'-GAGCTCTAAAA CACACCA CCATTC -3', 扩增产物大小为 489 bp。PCR 扩增体系 30 μL, 含 3 μL 10× Buffer(含 MgCl₂), dNTPs 3 μL (2.5 mM), Taq 0.2 μL (5U·μL⁻¹), 引物各 1 μL, 总 DNA 1 μg。反应程序为 94℃ 5 min, (94℃ 1 min, 60℃ 1 min, 72℃ 1 min) 35 循环, 72℃ 10 min, 4℃ 保存。(2)转 *BrDREB* 水稻转化株 Southern 斑点杂交检测: 将质粒 DNA 进行 PCR 扩增, 电泳后回收 DNA 片段做探针, 与转 *BrDREB* 的阳性植株 DNA 进行杂交。按照 Roche DIG High Prime DNA Detection Starter Kit II 试剂盒上的方法进行 Southern 斑点杂交。

2 结果与分析

2.1 同种培养基上不同水稻品种的诱导率

采用 MS 培养基作为基本培养基, 以 10 个水稻品种作为供试材料, 进行水稻愈伤组织的诱导, 得到水稻愈伤组织的出愈率和愈伤状态(见图 4)。由图 4 可见, 在 10 个供试的黑龙江栽培水稻品种(系)中, 出愈率由高到低依次是龙育 390、龙粳 14、合江 19、普优 17、龙稻 99-85、龙稻 99-88、松粳 98-133、松粳 3 号、垦鉴稻 7 号和松粳 98-122; 愈伤组织的致密率由高到低次序为合江 19、龙育 390、龙粳 14、普优 17、松粳 98-133、龙稻 99-88、龙稻 99-85、松粳 3 号、

垦鉴稻 7 号和松粳 98-122。品种间出愈率和致密率相关系数 $r=0.947$ ($r_{0.01}=0.765$), 达极显著水平, 出愈率越高的品种, 其愈伤也越好。出愈率最高的品种(系)龙育 390、龙粳 14、普优 17 和合江 19 的愈伤状态比较好, 生长速度快, 结构致密, 色泽嫩黄, 质地脆硬, 继代培养几次后仍能保持旺盛的生命力, 并形成具有分化能力的胚性愈伤。而松粳 98-122 和

垦鉴稻 7 号出愈率最低, 愈伤组织颜色发白, 结构松软, 水分大, 生长缓慢, 愈伤状态最差, 继代培养几次后数量越来越少, 愈伤组织不能形成胚性愈伤, 而且褐化比较严重。这表明, 不同水稻基因型组织培养效果不同。使用合江 19、龙育 390、普优 17 和龙粳 14 在组织培养中表现较好的品种(系)进行遗传转化比较有利。

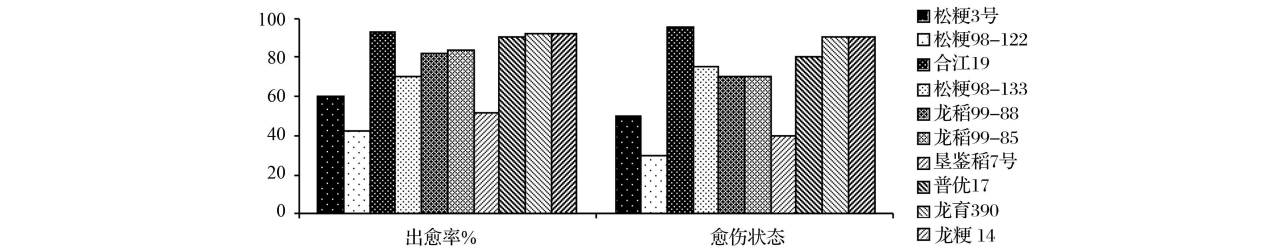


图 4 同种培养基上不同水稻品种的诱导率和愈伤状态

2.2 PCR 检测结果

利用优化的农杆菌介导的粳稻遗传转化体系, 以合江 19 和龙梗 14 为受体品种, 从 20 个独立的 PPT 抗性愈伤中获得了 24 株转 *BrDREB* 基因的植株。提取转基因水稻植株叶片的 DNA, PCR 鉴定外源基因 *BrDREB* 是否转入水稻中(见图 5)。由图 5 看出, pGreen0229-CaM V35S-BrDREB-DHA 质粒 DNA 和 *BrDREB* 基因遗传转化株 DNA 为模板 PCR 产物均在 529 bp 左右有特异扩增条带, 而以合江 19 DNA 为模板的 PCR 反应体系中未发现这一特异扩增条带。说明所有的 24 株转 *BrDREB* 基因的水稻 PCR 鉴定均为阳性, *BrDREB* 基因已经整合进合江 19 的染色体组中。

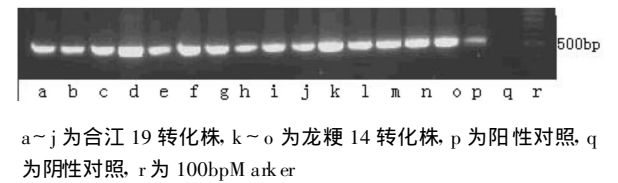
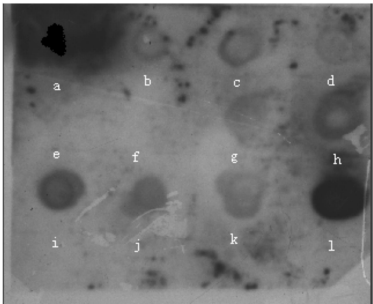


图 5 转 *BrDREB* 基因水稻的 PCR 鉴定

2.3 Southern 斑点杂交结果

选择在 PCR 检测中信号较强的 10 个植株进行 Southern 斑点杂交(见图 6)。



a 为探针对照; b~k 为转基因水稻植株; l 为质粒 DNA

图 6 转基因水稻 DNA 和 *BrDREB* 探针斑点杂交结果

b、c、d、g、h、i、j 和 k 可见免疫检测信号, 而对于植株 e 和 f 杂交信号为阴性。根据 Southern 斑点杂交结果, PCR 检测阳性转基因水稻中仍然有 20% 左右是未转化植株。这说明农杆菌介导水稻遗传转化体系产生的转化植株, 在用 PCR 初步检测外源基因整合后, 有必要进一步利用 Southern 杂交进行整合检测。

3 尚待研究的问题

本研究已经获得了转耐冷相关基因 *BrDREB* 的旱粳稻植株, 但还有很多工作需要进一步深入开展。首先, 对于得到的转基因植株的外源基因整合情况有待于进一步验证, 如进行 Southern 印迹杂交。其次, 对外源基因在转基因植株的表达情况加以检测, 包括 RNA 水平和蛋白质水平的检测。还有, *BrDREB* 基因的具体功能和转基因水稻的耐冷性需要验证。

植物耐冷性是一种涉及众多微效基因的数量性状, 因此, 对于水稻的耐冷性育种工作也必须从多方面入手^[5]。可以考虑将多个耐冷相关基因同时转入水稻中, 并开展分子标记辅助选择育种工作, 以提高水稻耐冷性育种的效率。

参考文献:

[1] 刘强, 赵南明. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用 [J]. 科学通报, 2000, 4(1): 10-16.
[2] 李杰, 朱延明 吴迪, 等. *DREB2A* 基因的克隆、序列分析及其植物表达载体的构建 [J]. 东北农业大学学报 2005, 36(1): 36-40.
[3] Thomashow M F. Plant cold tolerance-freezing tolerance genes and regulatory mechanisms [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant MolBiol, 1999, 50: 571-599.
[4] 全东兴. 吉林省主栽水稻品种组织培养体系的优化及抗除草剂基因转化研究 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学硕士论文, 2002.
[5] 韩龙植, 高熙宗, 朴钟泽. 水稻耐冷性遗传及基因定位研究概况与展望 [J]. 中国水稻科学, 2002, 16(2): 193-198.