

文章编号:1003-8701(2007)06-0027-03

逆境相关转录因子 *DREB2A* 转化紫花苜蓿的研究

刘艳芝, 韦正乙, 邢少辰, 谭 化, 王中伟, 董英山 *

(吉林省农业科学院生物技术中心, 长春 130033)

摘 要:以逆境性相关转录因子 *DREB2A* 为目的基因、除草剂抗性的 *bar* 基因为标记, 构建了植物表达载体 pCD2A, 并通过农杆菌介导法以无菌苗子叶为外植体转化公农 1 号苜蓿。经过共培养、抑菌和筛选培养, 在含有 2 mg/L Basta 的培养基获得 71 株抗性再生植株。用 1 mg/L 的 Basta 对抗性植株叶片进行进一步筛选, 并经 PCR 检测, 获得 11 株阳性植株, 表明 *DREB2A* 已整合到植株的基因组中。

关键词:苜蓿; 转录因子; *DREB2A*; 农杆菌介导转化法

中图分类号:S551+.7

文献标识码:B

苜蓿是我国栽培历史悠久的优良牧草, 素以“牧草之王”著称, 不仅产量高, 而且草质优良, 各种畜禽均喜食。苜蓿根系发达, 主根粗大, 有较强的耐寒、抗旱和再生能力, 也是豆科牧草中比较耐盐的一类, 如果再进一步提高其抗逆性, 不但可以增加饲草产量, 缓解我国蛋白饲料不足的矛盾, 同时也可以扩大苜蓿的栽培范围, 提高利用率。

转录因子是指那些专一性地结合于 DNA 特定序列上的, 能激活或 / 和抑制其他基因转录的蛋白质。植物中存在的转录因子, 有相当一部分与抗逆性有关。转录因子 DREB 的发现是近年来植物抗逆研究方面最具突破性的进展。Liu 等^[1]从拟南芥中分离到 5 个 AP2/EREBP 类转录因子基因, 分别命名为 *DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C* 和 *DREB2A*、*DREB2B*, 后又证明了 *DREB2A* 的表达被脱水或高盐胁迫诱导, 产生的 DREB 转录因子可激活具有 DRE 顺式作用元件的一系列目的基因, 如 *rd29A*、*cor15a*、*rd17* 和 *kin1* 等, 这些基因表达的产物在植物抗逆反应中发挥着不同的功能, 从而使得植株的抗逆性提高。

DREB 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。这也给人们一个启示: 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)^[2]。Liu 等^[3]利用 *DREB1A* 基因转化拟南芥发现, 转基因拟南芥植株对干旱、高盐及低温的耐性得到全面的显著增强。刘录祥等^[4]将 *DREB1A* 基因导入小麦, 也获得了转基因植株, 其抗逆性鉴定正在进行。本研究主要目的是将 *DREB2A* 基因导入苜蓿, 期望该基因在苜蓿中也获得同样的表达, 最终获得抗逆性综合改良的转基因材料。

1 材料与方 法

1.1 植物材料及菌株

公农 1 号紫花苜蓿(*Medicago sativa*)品种。

农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株。

收稿日期: 2007-06-19

作者简介: 刘艳芝(1964-), 女, 副研究员, 主要从事牧草及草坪草转基因研究。

通讯作者: 董英山

1.2 植物表达载体构建

以 pCambia3301 质粒为基础构建转化表达载体。该质粒携带 *bar* 标记基因和 *Gus* 报道基因,均由 35S 启动子启动。用 *Bgl*III 和 *Bst*EII 将 pCambia3301 质粒上的 *Gus* 基因切除,连接上 *DREB2A* 基因,即获得植物表达载体 pCD2A。用冻融法将 pCD2A 导入农杆菌 EHA105 中,用于紫花苜蓿的转化。

1.3 农杆菌介导的紫花苜蓿转化

1.3.1 外植体准备

挑选饱满的公农 1 号苜蓿种子,用 70%乙醇浸泡 2 min,0.1%的 HgCl_2 溶液灭菌 1h,无菌水冲洗 4 次,之后用无菌水浸泡种子,24 h 后取出置于加有无菌湿润滤纸的培养皿中,待种子发芽接种于 MS_0 培养基(MS 不附加任何激素,蔗糖 3%,pH5.8)上。6~7 d 子叶展开,切去顶端 1/3,接种于 LM_1 培养基(MS 附加 2,4-D 2.0 mg/L、KT 0.25 mg/L、CH 2 000 mg/L,蔗糖 3%,pH5.8)预培养,25℃、14 h/10 h 光照,2~3 d 后用于农杆菌介导转化。

1.3.2 菌液的准备

取 100 μL 甘油冷冻保存的农杆菌菌种,加入 5 mL 不含抗生素的 YEB 液体培养基,26~28℃下摇动(100~150 rpm)培养 24 h,待菌液混浊,取 1 mL 活化菌液,加入 15 mL YEB 培养基,连续扩增 3 次,离心收集农杆菌,用 MS_0 培养基稀释到 OD_{600} 0.4~0.6,置于冰箱中备用。

1.3.3 紫花苜蓿的转化

将预培养的子叶在制备的菌液中浸泡 20 min,转移到 LM_1 培养基上黑暗条件下共培养 1 d,再转入 LM_{1t} 培养基(LM_1 + 头孢霉素 500 mg/L)上抑菌培养,每 2 周继代 1 次。当诱导的愈伤组织上出现胚状体后,将胚状体转移到 LM_{30} 培养基(MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.5 mg/L + 头孢霉素 500 mg/L + Basta 2 mg/L,蔗糖 3%,pH5.8)上筛选。经由筛选的再生植株移至 MS_0 培养基壮苗,最后将有 3~5 条根系的植株炼苗移栽。

1.4 再生植株叶片筛选

筛选得到的抗性植株在移栽之前,取叶片接种于附加 Basta 1mg/L 的 MS_0 培养基上再次筛选,非转化植株叶片作为对照。

1.5 抗性植株 PCR 检测

剪取通过叶片筛选的抗性植株叶片,采用 CTAB 法提取总 DNA^[5]。PCR 引物由博雅公司合成。序列如下:上游引物 5'-TTTAGTTACCTTATCCAGT-3';下游引物 5'-TGACTCTTTGCTCACATT-3'。PCR 反应体系为 10 μL ,反应条件为 94℃预变性 5 min;94℃变性 50s,41℃复性 40 s,72℃延伸 1 min,循环 35 次;72℃延伸 5 min,4℃保存。

2 结 果

2.1 载体构建

利用基因替换法,构建了植物表达载体 pCD2A。该载体以 35S 启动子驱动目标基因 *DREB2A* 和标记基因 *bar*,其 T-DNA 结构见图 1。

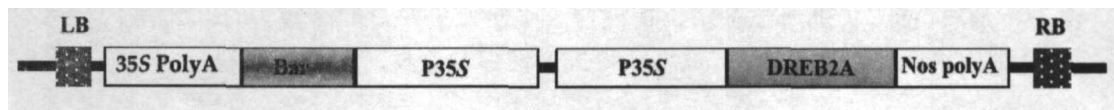


图 1 载体 pCD2A 的 T-DNA 结构

2.2 愈伤组织及再生植株的抗性筛选

苜蓿无菌苗子叶培养 2 周可诱导出愈伤组织,3 周左右出现胚状体,第 4 周时统计胚状体诱导率(出胚状体子叶数/接种子叶数)为 92.3%,诱导出胚状体的子叶,最多每块可诱导出 22 个胚状体。本试验 3 次重复,共转化 122 块子叶,4 周左右农杆菌侵染的子叶都诱导出了愈伤组织,6 周时将出现大量胚状体的愈伤组织转移到筛选培养基上筛选,大部分愈伤组织褐化死亡。培养 8 周时存活愈伤组织上的胚状体已经发育成子叶胚,将发育正常的子叶胚转移到附加 Basta 1mg/L 的 MS 培养基上筛选,2

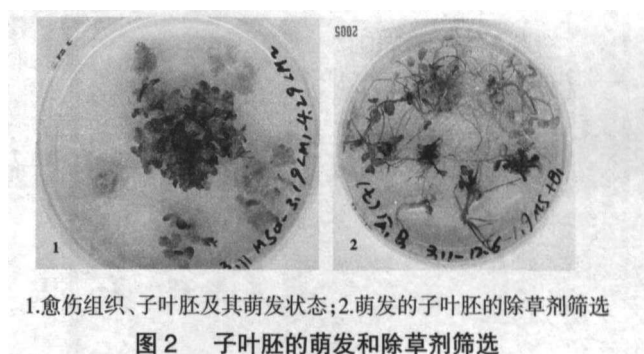
周后一部分胚状体变褐,干枯死亡,一部分子叶胚正常生长再生植株(图2)。共获得71株经Basta初步筛选的抗性植株。

2.3 再生植株叶片 Basta 筛选

取初步筛选的71株抗性植株的叶片,置于附加Basta 1mg/L的MS培养基上再次筛选。非转基因植株叶片接种后1周干黄死亡,一部分抗性植株叶片接种后逐渐发黄,4周后大部分逐渐死亡,有11株植株的叶片依然保持绿色(图3)。由于子叶被农杆菌侵染之后有一段时间的恢复培养,所以会获得非转化植株或嵌合体植株,经过叶片筛选过程,则会将其大部分剔除。

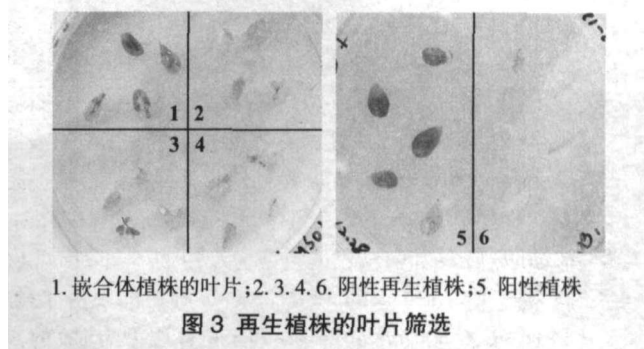
2.4 抗性植株的 PCR 检测

少量提取抗性再生植株的基因组的DNA作为模板,扩增目标基因 *DREB2A*,获得11株PCR阳性植株,且这11株阳性植株均来自叶片筛选后获得的抗性植株(图4)。



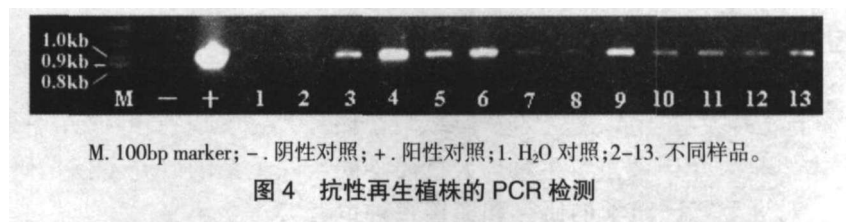
1.愈伤组织、子叶胚及其萌发状态;2.萌发的子叶胚的除草剂筛选

图2 子叶胚的萌发和除草剂筛选



1.嵌合体植株的叶片;2.3.4.6. 阴性再生植株;5. 阳性植株

图3 再生植株的叶片筛选



M. 100bp marker; -. 阴性对照; +. 阳性对照; 1. H₂O 对照; 2-13. 不同样品。

图4 抗性再生植株的 PCR 检测

3 讨 论

苜蓿无菌苗子叶接种 LM₁ 培养基,培养2周可诱导出愈伤组织,3周左右出现胚状体,诱导率为92.3%。经过农杆菌侵染的无菌苗子叶,接种于附加抑菌剂的 LM₁ 培养基,4周左右才出现愈伤组织,并且愈伤组织颜色发白,生长速度较慢,诱导率80.9%。实验结果表明,经过农杆菌侵染的子叶愈伤组织诱导率略有下降,分析是农杆菌菌液对幼嫩子叶有一定的伤害所致。如果在诱导培养基中直接加入筛选剂,则会加重子叶的受伤害程度,影响愈伤组织形成及体细胞胚发生率,因此我们在子叶侵染后,诱导培养基中只加入抑菌剂,不加筛选剂,使子叶有一段时间恢复培养,从而得到较高的愈伤组织诱导率和体细胞胚发生率,提高转化率。王晓春等^[6]在大豆农杆菌介导转化过程中也采用了1周的恢复培养,得到了较高转化率。

本研究利用农杆菌介导法将逆境诱导转录因子 *DREB2A* 基因导入公农1号苜蓿,获得了转基因植株,已经移栽成活,后代材料对高盐和干旱等逆境胁迫的田间抗性鉴定,以及该基因对其他农艺性状的效应研究正在进行之中。

参考文献:

- [1] Liu Q, Kasuga M, Sakuma Y et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression in Arabidopsis [J]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [2] 刘 强,赵南明,Yamaguchi Shinozaki K,等. DREB 转录因子在提高植物抗逆中的作用[J]. 科学通报,2000, 45(1): 11-16.
- [3] Kasuga M, Liu Q, Miura S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 287-292.

(下转第49页)

的有关任务^[4]。如也能确定为吉林省牧草资源保存中心,可使东北地区的牧草资源工作与吉林省的相关工作紧密结合,可以相互促进。

3.2 培训专业队伍,实施牧草资源第二次调查

近年来,不论西部草原或东部山地,植被发生了较大的变化,多数是走向逆向演替,牧草资源不断减少,甚至个别资源濒临灭绝。但在封原育草和封山育林的地方,不仅植被保留完好,很可能有过去未发现的资源,所以再一次进行调查很有必要。建议在省草原总站的领导下,以每个市(州)为一组,由各县草原饲料站派专人参加,经过专业技术培训后,按照统一调查方案分别进行,争取在2~3年内全面完成本地区牧草资源调查。

3.3 建立牧草资源种子库及牧草资源圃,按照科学方法保存

本省可建一座牧草资源短期库,种子保存年限为1~5年,根据不同类别种子特性,每隔1~5年进行一次种子活力检测,当发芽率低于75%时,即进行扩繁。牧草繁殖圃应有充足的水源作保证。上述工作要有经过专业培训的技术人员操作,并按技术操作规程,建立科学的保存秩序。

3.4 采用微机管理与国家牧草资源数据库联网

牧草资源的收集与保存,目的在于研究和利用,还要不断从国内外引入新的资源,同时还要对外交换牧草资源,这些数量巨大的工作,必须采用微机管理,同时应与国家牧草资源数据库联网,健全信息网络系统化,才能更好地研究与利用这些宝贵资源,培育出不同特性的优良新品种,为农牧业生产和生态环境建设作出应有的贡献。

参考文献:

- [1] 李建东,等. 吉林植被[M]. 长春:吉林科学技术出版社,2001:10.
- [2] 吉林省畜牧区划办公室. 分区论述部分吉林省畜牧业综合区划[M]. 长春:吉林科学技术出版社,1986.
- [3] 王志峰,等. 牧草种质资源保护意义及其方法[J]. 吉林畜牧兽医,2004(8):19.
- [4] 徐 柱,等. 我国牧草种质资源数据库及其信息网络发展构想[J]. 中国草地,2002(5):78.

(上接第29页)

- [4] 刘录祥,赵林姝,等. 基因枪法获得逆境诱导转录因子 DREB1A 转基因小麦的研究[J]. 中国生物工程杂志,2003,23(11):53-56.
- [5] 王关林,方宏筠. 植物基因工程.第2版[M]. 北京:科学出版社,2002.
- [6] 王晓春,王 罡,等. 农杆菌介导的大豆体细胞胚遗传转化影响因子的研究[J]. 大豆科学,2005,24(1):21-25.

Studies on Transformation of Alfalfa with Stress Related Transcriptional Factor DREB2A

LIU Yan-zhi, WEI Zheng-yi, XING Shao-chen, TAN hua, WANG Zhong-wei, DONG Ying-shan*

(Biotechnology Research Center, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province,
Changchun 130033, China)

Abstract: Using the stress related transcriptional factor gene, DREB2A, as the target gene, and the herbicide tolerance resistant gene, bar, as the selective marker, a plant expression vector, pCD2A, was constructed. Transformation was performed via the Agrobacterium-mediated method on the alfalfa cultivar 'Gongnong No.1' using the cotyledons for explants. After co-culture, bacteria restraining and selective culture, 71 resistant regenerated plants were obtained on the medium with 2mg/L Basta. A further selection on leaves of the resistant plants, 11 positive plants were obtained by PCR, which indicated that the gene DREB2A has inserted into the genome of the plant.

Key words: Alfalfa; Transcriptional factor; DREB2A; Agrobacterium-mediated transformation.