

文章编号: 1003-8701(2008)05-0006-03

# 转 CBF1 基因提高水稻抗寒能力的初步研究

林秀锋, 郭喜英, 刘志明, 韦正乙, 邢少辰\*

(吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033)

**摘要:** 本研究利用农杆菌介导法将转录调控因子 CBF1 导入北方粳稻沈 6014 和松粳 3 号中, 经过多轮抗性筛选, 获得了抗除草剂草丁膦的材料。PCR 分子检测表明, 外源基因已经插入到水稻基因组中。转基因植株后代种子在含除草剂的培养基上比对照具有更高的发芽率; 4℃ 低温试验表明, 转基因植株比对照的抗寒能力提高。

**关键词:** 水稻; CBF1; 转基因; 抗寒

中图分类号: S511

文献标识码: A

## Transformation of Rice with CBF1 Gene Maybe Confer Resistance to Cold

LIN Xiu-feng, GUO Xi-ying, LIU Zhi-ming, WEI Zheng-yi, XING Shao-chen\*

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

**Abstract:** Transcriptional factor CBF1 was transformed into rice varieties 'Shen6014' and 'Songjing No.3' by means of agrobacterium-mediated method, and the herbicide resistance transformants were obtained after multiple selections. PCR assay revealed that the CBF1 gene was integrated in the rice genome. Compared with the control plants, seeds from T1 transgenic plants showed high germination ratio and better growth at low temperature condition.

**Key words:** Rice; CBF1; Gene transformation; Cold resistance

作为最重要的粮食作物之一, 如何增强水稻的抵抗逆境的能力, 提高它的适应性, 从而提高水稻的产量和品质显得非常关键。北方粳稻由于其优良的蒸煮品质和适口性, 越来越被广大的消费者所认可, 在北方粳稻生产区, 低温冷害已成为影响水稻生产的重要因素之一。据统计, 全国每年因低温冷害损失的稻谷达 30 亿 ~ 50 亿 kg<sup>[1-3]</sup>。利用生物技术手段提高水稻的抗寒能力具有重要的实践意义。

大量的研究表明, CBF(CRT/DRE-binding factor) 是受低温、干旱等因素诱导, 从而激活下游一系列抗逆基因的一类转录调控因子, 有多个类似基因,

属于一个基因家族<sup>[4-5]</sup>。此因子首先在拟南芥中发现, 目前已经在许多生物中发现了类似因子, 如橡胶树、小盐芥<sup>[6-7]</sup>等。利用 CBF1 转化不同植物也有不少报道, 如水稻<sup>[8-9]</sup>、黑麦草<sup>[10]</sup>、草莓<sup>[11]</sup>、油菜和烟草<sup>[12]</sup>、狼尾草<sup>[13]</sup>、地被石竹<sup>[14]</sup>、松南结缕草<sup>[15]</sup>和番茄<sup>[16]</sup>等, 都开展了 CBF1 基因的转化工作, 并获得了抗逆水平不同程度提高的转化材料。

本研究通过农杆菌介导法将 CBF1 基因导入水稻品种沈 6014 和松粳 3 号中, 以期获得耐低温的转基因水稻材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试品种为沈 6014 和松粳 3 号, 由吉林省农科院水稻所提供。利用幼胚诱导愈伤组织。根癌农杆菌菌株为 EHA105, 采用农杆菌介导方法转化。目的基因 CBF1 来自拟南芥基因组, 插入到表达载

收稿日期: 2008-06-18

基金项目: 吉林省科技发展计划重大项目 20065008

作者简介: 林秀锋 (1964-), 女, 研究员, 主要从事水稻分子生物学研究。

通讯作者: 邢少辰, 男, 研究员, E-mail: xingsc64@yahoo.com.cn

体 pCAMBIA3300 上, 由 CaMV35S 启动子(P35S)启动, 终止子为章鱼碱合酶基因的聚腺苷酸(ocs), 筛选标记基因为 Phosphinothricin (PPT), 以除草剂草丁膦为筛选剂。转化表达载体图谱见图 1。

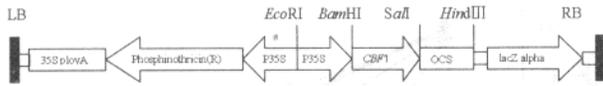


图 1 pCAMBIA3300-CBF1 植物表达载体图谱

## 1.2 培养基

基本培养基 NB: N6 培养基的大量元素, 加 B5 培养基的微量元素和有机附加物, 另外添加水解酪蛋白 300 mg/L、脯氨酸 500 mg/L、谷氨酰胺 500 mg/L、琼脂粉 6.5g/L, pH5.8。

诱导与继代培养基: NB+2 mg/L 2, 4- D。

共培养培养基: NB+2 mg/L 2, 4- D+19.62 mg/L AS(乙酰丁香酮)。

继代筛选培养基: NB+2 mg/L 2, 4- D+20 mg/L PPT+400 mg/L cef(头孢霉素)。

预分化培养基: NB+2 mg/L 6- BA+1 mg/L NAA+5 mg/L ABA+15 mg/L PPT+300 mg/L cef。

分化培养基: NB+2 mg/L KT+1 mg/L 6- BA+0.5 mg/L NAA+15 mg/L PPT+300 mg/L cef。

壮苗培养基: 1/2MS+0.5 mg/L NAA+10 mg/L PPT+250 mg/L cef。

## 1.3 遗传转化

农杆菌浸染采用林秀峰方法<sup>[17]</sup>。浸染后, 愈伤组织经 3~5 次选择继代培养, 将获得的抗性愈伤组织接种到预分化培养基上弱光培养 10 d 左右, 再转到分化培养基上进行光照培养约 30~60 d 分化成苗。将幼苗转到生根培养基上进行生根培养 10~15 d, 打开瓶口炼苗 7 d 左右, 用含 200 mg/L PPT 溶液喷施植株叶片, 5 d 后观察其抗性表现。

## 1.4 转基因植株的 PCR 分子检测

DNA 的提取与纯化, 参照王关林等方法<sup>[7]</sup>。

CBF1 基因的扩增引物:

上游引物: 5' - GGATCCTGAAACAGAGTAC TCTGATCA- 3'

下游引物: 5' - GTCGACGACTATCGAATATT AGTAACTCCA- 3'

PCR 扩增条件为:

94 预变性 5 min, 然后进入循环。94 变性 1 min, 52 复性 1 min, 72 延伸 1 min, 循环 30 次, 72 下延伸 10 min。扩增产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶成像仪观察照相。

## 1.5 转基因 F<sub>1</sub> 代种子对 PPT 的抗性及其苗期抗寒鉴定

收取对照沈 6014(编号: S6)、松粳 3 号(编号: J3) 和各自的转化后代植株的种子, 其中沈 6014 后代 3 个株系, 松粳 3 号后代 5 个株系, 进行抗除草剂和抗寒性试验。具体做法是: 取对照和转基因植株种子各 36 粒分别接种在两种 1/2 MS 培养基上, 一种不含 PPT, 另外一种含 15 mg/L 的 PPT, 均在 25 条件下培养 4 d, 然后全部移到 4 培养箱中培养 10 d, 再移至 25 培养室进行培养 7 d, 分别在生长 4 d、14 d 和 21 d 时, 统计对照和转基因材料正常生长植株占总株数的百分数, 进行分析。

## 2 结果与讨论

### 2.1 转基因植株的获得

表 1 农杆菌介导法转化水稻愈伤组织获得 PPT 抗性转基因植株

品种	愈伤块数	抗性愈伤块数	转化率(%)	抗性植株数
沈 6014	165	21	12.7	3
松粳 3 号	170	17	10.0	5

农杆菌感染的愈伤组织转入继代培养基上筛选培养, 非转化细胞逐渐褐化死亡, 4~6 周后, 将转化细胞形成的抗性愈伤组织进行分化培养及再生, 获得沈 6014 的转化植株 7 株, 松粳 3 号的转化植株 9 株。喷施 200mg/L 的 PPT 溶液, 5d 后对照植株的叶片全部出现褐点, 说明不抗 PPT, 沈阳 6014 的转化植株有 4 株叶片上有褐斑, 3 株表现为抗性, 分别编号为 S6- 1、S6- 2 和 S6- 3; 松粳 3 号的转化植株有 4 株叶片上出现褐斑, 5 株表现为抗性, 分别编号为 J3- 1、J3- 2、J3- 3、J3- 4 和 J3- 5(表 1)。通过持续多轮的严格筛选, 有效降低了假阳性现象, 减轻了后期分子检测的工作量。

### 2.2 转基因植株的 PCR 检测

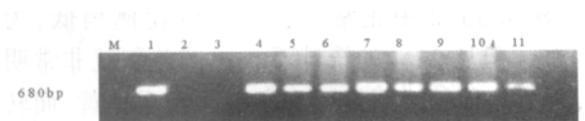


图 2 转 CBF1 基因植株的 PCR 检测结果

M: 标准分子量; 1. 阳性对照; 2. 沈 6014 非转基因株; 3. 松粳 3 号非转基因株; 4-6. 沈 6014 转基因株; 7-11. 松粳 3 号转基因株

提取上述 9 株 PPT 抗性植株和对照沈 6014 和松粳 3 号的 DNA 进行 PCR 扩增, 质粒及 9 株抗性植株均扩增出 687bp 长度的片段(图 2), 表明 CBF1 基因已整合到水稻基因组中。

### 2.3 F<sub>1</sub> 转基因植株对单一寒冷因素的抗性表现

沈 6014 和松粳 3 号两个品种当代获得 8 株转化株, 收获后代种子并和对照植株种子各 36 粒接种在不含 PPT 的 1/2MS 培养基上, 4 的低温处理 10 d 后, 抗性材料表现正常生长, 而非抗性材料包括对照在内, 表现为叶片边缘出现枯黄, 生长迟缓。统计生长受阻植株的比例为指标, 分析后代的抗性表现。沈 6014 和松粳 3 号两个品种对寒冷处理的抗性反应结果如图 3 和图 4 所示。

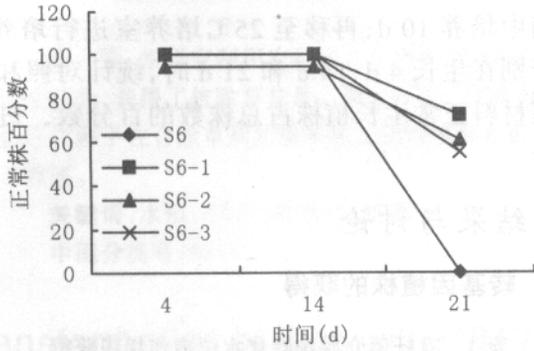


图 3 沈 6014 品种转基因后代抗寒性试验

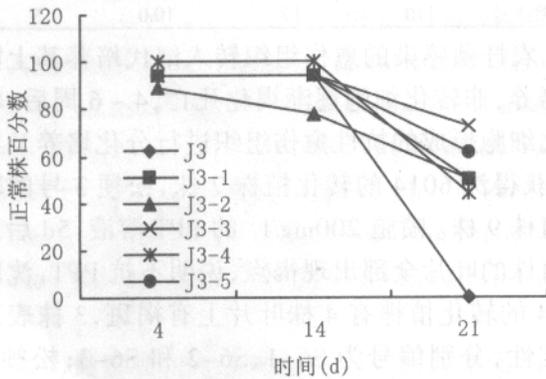


图 4 松粳 3 号品种转基因后代抗寒性试验

从上图可以清楚地看出, 在 4 d 统计的发芽率方面, 两个品种的对照和转基因株系之间没有明显的差别。到 14 d 统计的比例看, 差别也不大, 只是株系 J3-2 中正常生长植株的比例稍低, 为 77.8%, 但从 21 d 的统计看, 比例差别就非常明显, 两个品种的对照均因为寒冷而表现枯黄, 而转基因株系则有比例不同的正常生长的植株, 最低为 J3-4 株系的 44.4%, 最高为 S6-1 株系, 达到 72.2%, 此结果表明, 寒冷对植物生长的影响有一个过程, 也说明转基因株系对寒冷的抗性明显好于对照植株。

2.4 F<sub>1</sub> 代转基因植株对 PPT 和寒冷两个因素的抗性表现

将对照和转基因后代种子种植在含有 PPT

的培养基上, 按照前述同样的方法进行处理, 即转基因后代在 PPT 和寒冷两个因素影响下的统计如图 5 和图 6 所示。

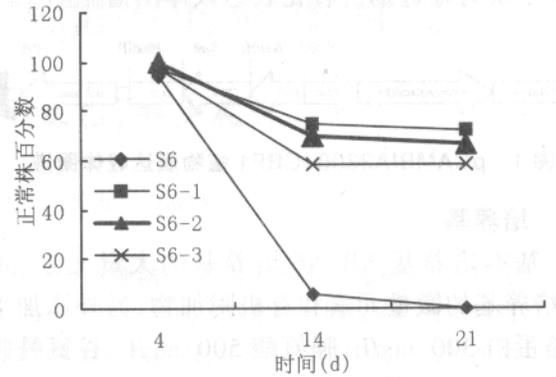


图 5 沈 6014 品种转基因后代抗 PPT 和耐冷试验

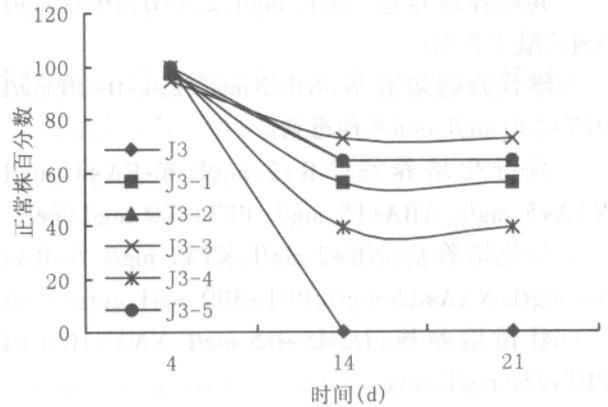


图 6 松粳 3 号转基因后代的抗 PPT 和耐冷试验

从图 5 和图 6 中可以看出, 当播种在含有 PPT 的培养基上时, 在种子的发芽阶段, 两个品种的对照和转基因株系之间并没有明显的差别, 基本上都可以正常发芽生长, 但是经过了 10 d 的冷处理之后, 即 14 d 之后, 两个对照的生长下降明显, 而转基因材料虽然下降, 但比对照明显具有优势。21 d 后两种对照植株叶片均表现枯萎发黄, 不能正常生长, 而转基因植株的正常株所占比例虽有下降, 但比对照明显提高。图 5 中, 最高的 S6-1 为 72.2%, 最低的 S6-3 为 58.3%; 图 6 中最高 J3-3 达到 72.2%, 最低的 J3-4 也有 38.9%。这和用单一寒冷处理得到的图 3 和图 4 中的表现基本一致。

从单个寒冷因素处理和 PPT 加上寒冷两个因素处理的曲线结果看, 发现两者之间的差别表现在 14 d 的正常株比例上。当用单一的寒冷因素处理时, 从 4 d 到 14 d 期间, 这个比例变化很小, 曲线平缓, 只是 7 d 后, 即 21 d 时, (下转第 11 页)

[3] 付春杰, 孙立英. 玉米新品种的上市推广[J]. 中国种业, 2006 (1): 25.

[4] 金明华, 苏义臣, 苏桂华. 吉林省玉米品种评价与思考[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(5): 11- 12, 30.

(上接第5页)其中, 热能或机械能自给率达 100%, 电力自给率 95%。利用生物质能源对环境也非常有益处, 乙醇汽油对环境的污染程度仅为传统汽油的 30%, 可减少汽车一氧化碳、二氧化碳排放的 25%左右, 还可降低碳氢、氮氧化物等有害物质的排放。生物柴油是一种清洁和高效的新型燃料。在普通柴油中掺加一定比例的生物柴油, 不但可降低普通柴油的消耗量, 还可减少二氧化碳、硫化物和其他有害物质的排放。巴西的生物质能

源发展经验尤其值得我国参考与借鉴, 我国农村能源的开发与利用已成为新农村建设和发展现代农业的重要而紧迫的任务。

#### 参考文献:

- [1] Ministry of Agriculture, Livestock and Food Supply, Secretariat for Production and Agroenergy. Brazilian agroenergy plan 2006- 2011[M]. Brasilia, DF: Embrapa Publishing House, 2006.  
[2] 蒋和平, 宋莉莉. 巴西现代农业建设模式及其借鉴和启示[J]. 科技与经济, 2007, 20(4): 40- 43.

(上接第8页)由于寒冷开始作用于植株, 此比例才表现出明显的降低趋势。反之, 两因素处理的表现正好相反, 从 4 d 到 14 d 期间, 正常株比例就明显下降, 之后 7 d 没有明显下降, 维持原来的生长状态。从这个现象, 我们是否可以推测, 在 14 d 之前, 正常株比例的下降是由于 PPT 的筛选造成的, 而 14 d 之后则是由于寒冷作用的影响, 当然这需要更深入的研究去证明。本研究只是有 PCR 分子检测的阳性结果, 还需要分子杂交的证据, 确定插入的拷贝数及其 CBF1 基因的表达效果, 而且抗性的提高是否能够稳定遗传给下一代, 也需要进一步的跟踪。同时, 前人的研究表明, 转 CBF1 基因的水稻中脯氨酸含量和抵抗逆境的能力明显提高<sup>[8, 9]</sup>, 本研究也可以开展类似的工作, 进一步补充有关证据, 为今后培育遗传稳定、效果明确的转基因产品奠定坚实基础。

#### 参考文献:

- [1] 韩龙植, 朴钟泽, 高熙宗, 等. 水稻耐冷性对稻米品质冷水反应的影响[J]. 中国农业科学, 2003, 36(7): 757- 763.  
[2] 刘建丰, 陈立云. 水稻耐冷性研究现状与展望 [J]. 作物研究, 1996, 10(2): 22- 25.  
[3] 戴陆园, 工藤悟. 中日合作稻耐冷性研究十五年进展概述[J]. 作物品种资源, 1998(4): 40- 42.  
[4] Shinwari Z.K. et al. An Arabidopsis gene family encoding DRE/CRT binding proteins involved in low- temperature- responsive gene expression [J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1998, 250(1): 161- 170.

- [5] Haake V. et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in Arabidopsis [J]. Plant Physiol., 2002, 130(10): 639- 648.  
[6] 程 汉, 安泽伟, 黄华孙, 等. 巴西橡胶树 CBF1 基因的克隆和序列分析[J]. 热带作物学报, 2005, 26(3): 50- 55.  
[7] 高峰, 高强, 岳桂东, 等. 小盐芥(Thellungiella salsa) CBF1 基因的克隆[J]. 山东大学学报(理学版), 2005, 40(5): 113- 118.  
[8] 金建凤, 高强, 陈 勇, 等. 转移拟南芥 CBF1 基因引起水稻植株脯氨酸含量提高[J]. 细胞生物学杂志, 2005, 27(1): 73- 76.  
[9] 吴关庭, 郎春秀, 陈锦清, 等. 转 CBF1 基因增强水稻的耐逆性[J]. 核农学报, 2006, 20(3): 169- 173.  
[10] 杨风萍, 梁荣奇, 张立全, 等. 抗逆调节转录因子 CBF1 基因提高多年生黑麦草的抗旱能力[J]. 华北农学报, 2006, 21(1): 14- 18.  
[11] 金万梅, 董 静, 尹淑萍, 等. 冷诱导转录因子 CBF1 转化草莓及其抗寒性鉴定[J]. 西北植物学报, 2007, 27(2): 223- 227.  
[12] 甄 伟, 陈 溪. 冷诱导基因的转录因子 CBF1 转化油菜和烟草及抗寒性鉴定[J]. 自然科学进展, 2000, 10(12): 1104- 1108.  
[13] 王凭青, 李志中, 晁跃辉, 等. 拟南芥转录因子 CBF1 基因杂交狼尾草的转化 [J]. 重庆大学学报 (自然科学版), 2007, 30(10): 134- 137.  
[14] 吴 琰, 董 静, 郭宝林, 等. 转 CBF1 基因地被石竹的抗寒性评价[J]. 中国农学通报, 2007, 23(5): 59- 62.  
[15] 王霄霞, 朱廷桓, 胡张华, 等. 农杆菌介导的 CBF1 基因对松南结缕草的遗传转化[J]. 园艺学报, 2005(5): 953.  
[16] Tsai- Hung Hsieh, et al. Tomato Plants Ectopically Expressing Arabidopsis CBF1 Show Enhanced Resistance to Water Deficit Stress[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2): 618- 626.  
[17] 林秀峰, 刘志铭. 转甜菜碱醛脱氢酶基因水稻的获得[J]. 吉林农业科学, 2005, 30(2): 7- 9.