

# 耐盐碱基因 *OsMYB56* 转化水稻的研究

王晓雪<sup>1</sup>, 邢飞<sup>1</sup>, 杨峰<sup>1</sup>, 王伦<sup>1</sup>, 于志晶<sup>2</sup>, 蔡勤安<sup>2</sup>, 尚丽霞<sup>2</sup>, 马建<sup>1\*</sup>,  
马瑞<sup>2\*</sup>

(1. 吉林农业大学农学院, 长春 130118; 2. 吉林省农业科学院生物技术研究所, 长春 130033)

**摘要:** MYB 转录因子参与植物对外界逆境胁迫反应的调控, 为提高水稻的耐盐性, 本研究对水稻 *OsMYB56* 基因进行了生物信息学分析, 利用 RT-PCR 技术克隆了水稻耐盐碱基因 *OsMYB56*, 构建了植物表达载体 pCAMBIA3300-*OsMYB56*, 并通过农杆菌介导法将 *OsMYB56* 基因导入水稻中, 以进一步研究其功能。对转化植株进行 PCR、RT-PCR、Southern 杂交及 Bar 蛋白试纸条检测, 证明 *OsMYB56* 基因已整合到水稻基因组中。本研究所获得的转基因水稻材料对水稻耐盐碱育种具有重要的意义。

**关键词:** 水稻; *OsMYB56*; 耐盐碱; 农杆菌介导遗传转化

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)00-

## Transformation of Salt Tolerance Gene *OsMYB56* into Rice Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*

WANG Xiaoxue<sup>1</sup>, XING Fei<sup>1</sup>, YANG Feng<sup>1</sup>, WANG Lun<sup>1</sup>, YU Zhijing<sup>2</sup>, CAI Qinan<sup>2</sup>, SHANG Lixia<sup>2</sup>, MA Jian<sup>1\*</sup>, MA Rui<sup>2\*</sup>

(1. College of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118; 2. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** MYB transcription factors are related to salt tolerance of plant. In order to improve salt tolerance of rice, in this study, the *OsMYB56* gene was cloned by RT-PCR technique and the plant expression vector pCAMBIA3300-*OsMYB56* was constructed. *OsMYB56* gene was successfully transformed into super rice 'Jijing 88' mediated with *Agrobacterium*. The transgenic plants were confirmed by PCR, RT-PCR, Southern blot and Bar quick strip. The transgenic plants can be employed as important materials in rice breeding for salt tolerance.

**Key words:** Rice; *OsMYB56*; Salt tolerance; *Agrobacterium*-mediated transformation

土壤盐渍化是农作物生长发育和产量的主要影响因素之一, 全世界大约有 9.5 亿  $\text{hm}^2$  盐碱地, 耕地面积大约有 3.6 亿  $\text{hm}^2$  受到不同程度的盐碱害威胁。我国盐碱地主要分布在西北、东北、华北和滨海地区, 其面积约为 9 900 万  $\text{hm}^2$ <sup>[1]</sup>。东北地区是我国内陆盐碱土(主要盐碱成分为  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  或  $\text{NaHCO}_3$ )分布最为广泛的地区, 盐碱地面积约达 766 万  $\text{hm}^2$ , 西部松嫩平原盐碱地面积就达 373 万  $\text{hm}^2$ , 是世界上三大片苏打盐碱地集中分布地

区之一<sup>[2]</sup>。随着盐碱地日益扩大, 在我国耕地资源已充分挖掘, 常规耕地生产力水平提升空间面临瓶颈的前提下, 利用生物技术提高作物的耐盐性, 不仅可以高效利用盐碱地, 增加有效耕地面积, 提高粮食总产, 还可以改良生态环境, 对促进农业可持续发展具有重大意义<sup>[3]</sup>。

水稻 (*Oryza sativa* L.) 是最重要的粮食作物之一<sup>[4]</sup>, 种植分布广泛, 约有 120 多个国家种植水稻, 且过半的世界人口均以水稻为主食。我国是世界水稻的原产国, 水稻栽培历史悠久<sup>[5]</sup>。但是, 随着人口的增加, 未来对稻米的需求还将不断增长, 盐碱地日益吞噬着有限的种植面积, 因此, 对水稻耐盐碱能力改良的研究意义重大。

MYB 转录因子是最大的植物转录因子家族成员之一, 它参与植物对外界逆境胁迫反应的调控<sup>[6]</sup>。自 Paz-Ares 等<sup>[7]</sup>1987 年首次从单子叶植物

收稿日期: 2016-02-02

基金项目: 吉林省科技厅科技支撑计划(20140204008NY)

作者简介: 王晓雪(1988-), 女, 在读硕士, 从事水稻遗传育种研究工作。

通讯作者: 马建, 男, 博士, 副研究员, E-mail: winter0106@163.com

马瑞, 男, 博士, 研究员, E-mail: ruimaa@126.com

玉米中分离鉴定出 MYB 转录因子以来,大量 MYB 类基因从金鱼草<sup>[8]</sup>、棉花<sup>[9]</sup>、大豆<sup>[10]</sup>、拟南芥<sup>[11]</sup>、苹果<sup>[12]</sup>和白菜<sup>[13]</sup>等多种植物中克隆出来。其中,Dai 等<sup>[14]</sup>从水稻中克隆得到 MYB 转录因子类基因 *OsMYB3R-2*,在拟南芥中过量表达后,转基因植株对干旱和盐胁迫的耐受性显著提高。Vannini、李敏等<sup>[15-16]</sup>分别将 *OsMYB4*、*AtMYB44* 转入水稻中,显著提高转基因水稻对干旱、高盐的耐受性。试验证明,MYB 类基因导入植物后,植物的耐盐性获得了明显的提高。

本试验克隆并构建了 *OsMYB56* 基因植物表达载体 pCAMBIA3300-*OsMYB56*,对水稻进行了遗传转化,获得了转 *OsMYB56* 基因水稻植株,为进一步筛选耐盐碱水稻转基因新材料奠定了基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 供试材料

水稻品种吉粳 88,植物表达载体 pCAMBIA3300 和农杆菌 EHA105 菌株由吉林省农业科学院生物所提供。

### 1.2 方 法

#### 1.2.1 生物信息学分析

应用 NCBI 中的 ORF Finder 在线软件对 *OsMYB56* 基因序列进行分析;应用 SOPMA 在线软件对 *OsMYB56* 蛋白质进行二级结构分析;应用 SWISS-MODEL 在线软件对 *OsMYB56* 蛋白质进行三级结构分析;应用 CLUSTALX 8 和 MEGA 4 软件对 *OsMYB56* 基因和拟南芥中 MYB 转录因子家族中的成员进行系统进化树分析。

#### 1.2.2 植物表达载体 pCAMBIA3300-*OsMYB56* 构建

根据 *OsMYB56* (GenBank 登录号:NM00105209 6.1) 基因序列设计引物,基因两端加 BamHI 和 SacI 酶切位点,上游引物为 5'-cgcgatccATGAGA-AAGGGCCCGTGG-3',下游引物:5'-cgagctcCTATC CCCAGAGAGG TAGCGA-3',利用 RT-PCR 技术克隆水稻耐盐碱基因 *OsMYB56*。将扩增目的片段连接到用 BamHI 和 SacI 双酶切的 pCAMBIA3300 载体上,构建植物表达载体 pCAMBIA3300-*OsMYB56*,经 PCR 和双酶切验证。利用冻融法将 pCAMBIA3300-*OsMYB56* 转入农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞中。

#### 1.2.3 农杆菌介导的水稻遗传转化

将去掉颖壳的水稻种子用 2.5% 次氯酸钠 (NaClO) 溶液灭菌 20 min,用无菌水冲洗 3~5

次。将水稻种子移到已灭菌的滤纸上吸干,接种到诱导培养基上,大约生长 30~45 d;挑选浅黄、颗粒状的愈伤组织接种到预培养培养基上培养 3~5 d;挑出预培养愈伤组织中色泽明亮、质地紧密、表面干燥的愈伤组织用于农杆菌侵染。将带有表达载体 pCAMBIA3300-*OsMYB56* 的农杆菌培养至 OD<sub>600</sub>=0.5 时,离心收集菌体,用液体共培养基将菌体重悬,同时放入愈伤组织,不断摇动,侵染 30 min;之后将侵染的愈伤组织置于含有一层滤纸的共培养固体培养基中 18℃ 暗培养 3 d;侵染的愈伤组织用 250 mg/L 头孢霉素溶液洗 3 次,然后转入含有 30 mg/L 草丁膦的筛选培养基上,经过 2~3 次筛选后获得抗性愈伤组织;抗性愈伤组织接种到预分化培养基上光照培养 7 d 左右,再转到分化培养基上进行光照培养分化成苗。将 2 cm 左右高的幼苗转到生根培养基上光照培养至生根。当苗高至 10 cm 左右时打开瓶口炼苗,7 d 以后进行移栽<sup>[17]</sup>。培养基种类和成分如下:

诱导培养基: N6 大量+MB 铁盐+B5 微量+B5 有机+0.5 g/L 谷氨酸胺+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+0.1 g/L 肌醇+2.0 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶,pH=5.8,常规灭菌。

液体共培养基: N6 大量+MB 铁盐+B5 微量+B5 有机+0.5 g/L 谷氨酸胺+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+0.1 g/L 肌醇+2.0 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖,pH=5.8,常规灭菌后加抽滤灭菌的 100 mmol/L 乙酰丁香酮。

固体共培养基: N6 大量+MS 铁盐+B5 微量+B5 有机+0.5 g/L 谷氨酸胺+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+0.1 g/L 肌醇+2.0 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶,pH=5.8,常规灭菌后加抽滤灭菌的 100 mmol/L 乙酰丁香酮。

筛选培养基: N6 大量+MS 铁盐+B5 微量+B5 有机+0.5 g/L 谷氨酸胺+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+0.1 g/L 肌醇+2 mg/L 2,4-D+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶,pH=5.8,常规灭菌后加抽滤灭菌的 400 mg/L 头孢霉素,20 mg/L PPT。

预分化培养基: N6 大量+MS 铁盐+B5 微量+B5 有机+0.5 g/L 谷氨酸胺+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水解酪蛋白+0.1 g/L 肌醇+2.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+5.0 mg/L ABA+30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶,pH=5.8,常规灭菌后加抽滤灭菌的 300 mg/L 头孢霉素,15 mg/L PPT。

再分化培养基: N6 大量+MS 铁盐+B5 微量+B5 有机+0.5 g/L 谷氨酸胺+0.5 g/L 脯氨酸+0.3 g/L 水

解酪蛋白+0.1 g/L 肌醇+2.0 mg/L KT+0.5 mg/L NAA+1 mg/L 6-BA +30 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶, pH=5.8, 常规灭菌后加抽滤灭菌的 300 mg/L 头孢霉素, 15 mg/L PPT。

生根培养基: 1/2 MS 大量+1/2 MS 铁盐+1/2 B5 微量+10 g/L 蔗糖+3 g/L 植物凝胶, pH=5.8, 常规灭菌。

### 1.2.4 转化植株的 PCR 检测

取抗性植株的叶片, 采用 CTAB 法提取总 DNA<sup>[18]</sup>, 进行 PCR 检测, PCR 引物是由上海生工公司合成, PCR 引物为: 上游引物: 5'-GTGGATTGATGTGATATCTCCACTG-3', 下游引物: 5'-TGAAGGAACAGTTGCTGCTGCTCCT-3'。PCR 反应参数为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 60℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 后延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。

### 1.2.5 转化植株的 Southern 杂交

选择 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交, 采用 CTAB 法大量提取基因组 DNA, 大约 30μg 的基因组 DNA 被限制性内切酶 *HindIII* 完全消化, 消化产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳, 之后进行转膜、探针标记、预杂交、杂交、洗膜和检测, 具体实验步骤采用罗氏公司生产的地高新试剂盒 (Roche DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I)。

### 1.2.6 转化植株的 RT-PCR 检测

采用植物 RNA 提取试剂盒 RNAiso Plus (大连宝生物公司) 提取转基因阳性植株叶片的总 RNA, 反转录成 cDNA (一步法反转录试剂盒, 全式金生物公司), 进行 PCR 检测, PCR 引物为上述引物, PCR 反应参数为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 59℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环; 72℃ 后延伸 5 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。

### 1.2.7 转化植株 Bar 试纸条检测

取少许转基因阳性植株叶片于 1.5 mL 离心管中进行研磨, 加入 500μL 溶解液混匀, 放入 Bar 基因试纸条 (Envirologix Inc 公司), 10 min 以后, 与未转录叶片中的试纸条进行对比, 观察转基因植株中的试纸条的变化。

## 2 结果与分析

### 2.1 生物信息学分析

*OsMYB56* 基因开放阅读框为 666 bp (包括终止密码子), 编码 221 个氨基酸 (图 1A); 二级结构预测表明该蛋白含约 31.67% 的 α-螺旋, 8.6% 的

β-折叠, 50.23% 的不规则卷曲和 9.5% 的延伸链 (图 1B); 三级结构预测表明该蛋白为一个松散的球状蛋白, 该酶含有 6 段 α-螺旋, 不存在二硫键 (图 1C); 对 *OsMYB56* 基因和拟南芥中 MYB 转录因子家族中的成员进行系统进化树分析, 发现 *OsMYB56* 基因与拟南芥中的 *AtMYB118* 转录因子在进化上同源性最高, 因此可以推测二者之间的功能和结构可能存在相似性 (图 1D)。

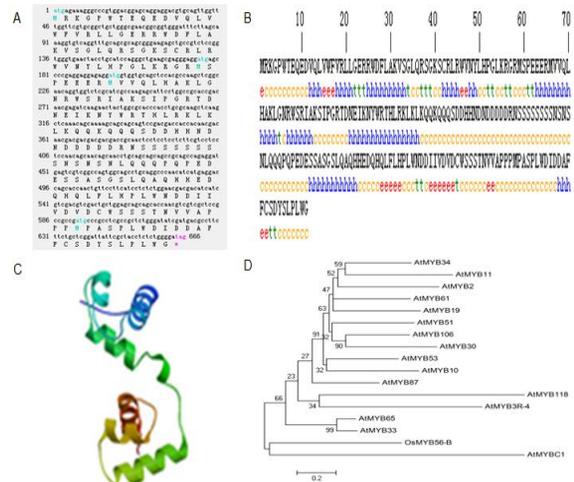


图 1 生物信息学分析示意图

A: *OsMYB56* 基因的开放阅读框分析结果; B: *OsMYB56* 蛋白质的二级结构分析; C: *OsMYB56* 蛋白质三级结构分析; D: *OsMYB56* 蛋白质的系统进化树分析

### 2.2 植物表达载体的构建

以重组质粒为模版, 进行 PCR 扩增, 获得大小约为 666 bp 的片段 (图 2A), PCR 片段大小与发表序列片段的大小相同, 初步证明 *OsMYB56* 基因已成功连接到 pCAMBIA3300 载体上。经 *BamHI* 和

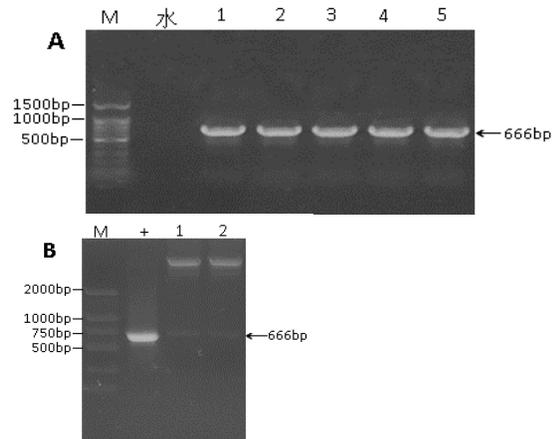


图 2 PCR 扩增 *OsMYB56* 基因和植物表达载体双酶切验证

A: PCR 扩增 *OsMYB56* 基因 (M: DNA Marker DL100, 水: 空白对照, 1~5: PCR 产物); B: 植物表达载体双酶切 (M: DNA Marker DL100, +: 阳性对照, 1~2: 双酶切产物)

*SacI* 双酶切验证(图 2B)以及测序分析结果表明植物表达载体 pCAMBIA3300-OsMYB56 构建成功。其 T-DNA 结构见图 3。

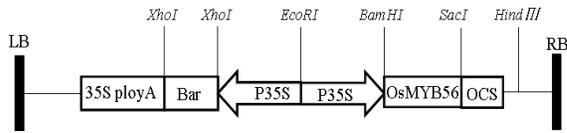


图3 植物表达载体 pCAMBIA3300-OsMYB56 的结构示意图

### 2.3 农杆菌介导法转化水稻及获得再生苗

本试验共接种水稻种子 573 粒, 出愈粒数为 492 粒, 愈伤组织诱导率约为 86%; 共浸染 1 000 块愈伤组织, 转入含 PPT(30 mg/L) 的筛选培养基上进行筛选, 得到抗性愈伤组织 112 块, 愈伤组织抗性率为 11.2%; 获得抗性植株 63 株, 植株分化率为 6.3%; 得到阳性植株 52 株, 转化率为 5.2%; 水稻遗传转化过程见图 4。

### 2.4 转基因植株分子检测

对获得的 PPT 抗性转基因植株进行 PCR 检

测, 转基因阳性植株扩增出特异条带(图 5A), 对 PCR 检测呈阳性的植株进行 Southern blot 分析, 获得单拷贝植株 1 株, 双拷贝植株 1 株, 三拷贝植物 1 株(图 5B), 表明重组 *OsMYB56* 基因已整合到受体材料染色体组中, RT-PCR 检测(图 5C)表明 *OsMYB56* 基因在转基因植株中已经转录; 用 Bar 试纸条对转基因植株进行检测, 阴性材料经检测后只出现一条带, 转基因植株检测均出现了两条带(图 5D), 表明筛选标记 *Bar* 基因表达。

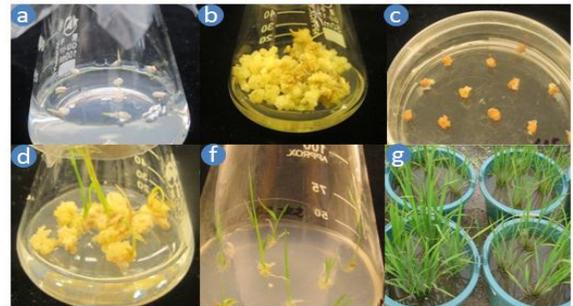


图4 水稻遗传转化示意图

a 成熟种子萌发; b 愈伤组织诱导; c 愈伤组织筛选; d 绿苗再生; e 生根培养; f 转化植株

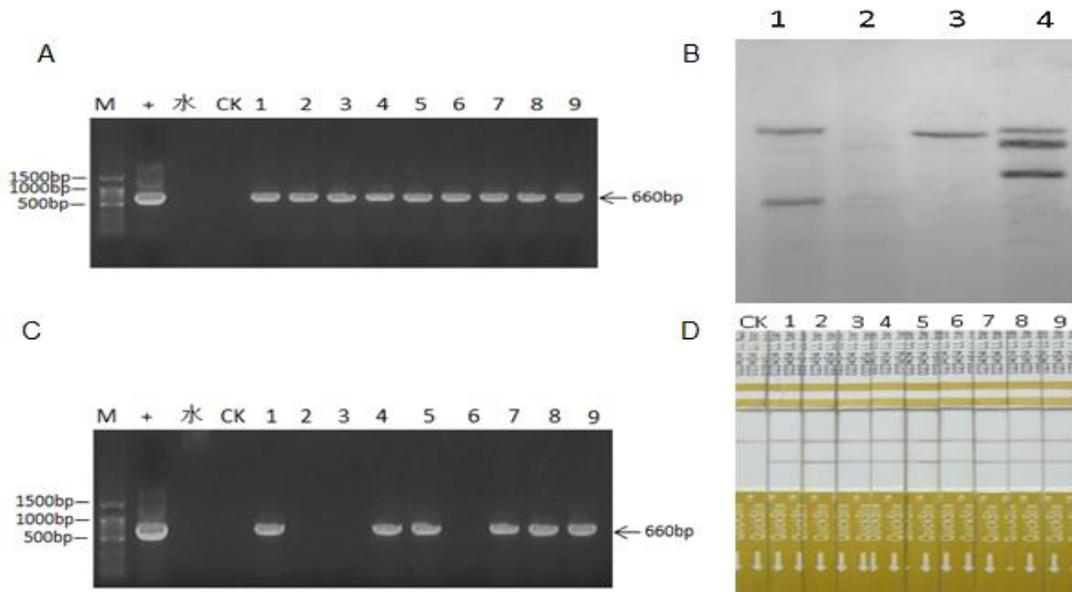


图5 转 *OsMYB56* 基因水稻植株分子检测

A: 转基因水稻 PCR 检测(M: DNA Marker DL100;+: 阳性对照;水: 空白对照;CK: 未转基因材料;1~9: 转基因材料)

B: 转基因水稻 southern 杂交(1~4: 独立转化植株)

C: 转基因水稻 RT-PCR 检测(M、DNA Marker DL100、+、阳性对照, 水、空白对照, CK、未转基因材料, 1~9、转基因材料)

D: 转基因水稻 Bar 试纸条检测(CK: 对照植株, 1~9: 转基因植株)

## 3 讨论

本研究利用 RT-PCR 技术克隆了水稻耐盐碱基因 *OsMYB56*, 并对该基因进行了生物信息学分析。*OsMYB56* 开放阅读框为 666 bp, 编码 221 个氨

基酸, 属于 R2R3-MYB 家族; 对 *OsMYB56* 基因和拟南芥中 MYB 转录因子家族中的成员进行系统进化树分析, 发现 *OsMYB56* 基因与拟南芥中 At-MYBC1 转录因子在进化上同源性最高<sup>[19]</sup>, 因此可以推测二者之间的功能和结构可能相似。

水稻基因型是影响水稻转化效率的主要因素之一,不同水稻品种,其转化效率差异较大。Chan等<sup>[20]</sup>首次采用农杆菌介导法获得了转基因水稻。Hiei等<sup>[21]</sup>以水稻成熟种子诱导的愈伤组织为受体,建立了农杆菌介导的粳稻高效遗传转化体系,使得农杆菌介导法逐渐成为水稻转化最常用的方法。此后,Toki等<sup>[22]</sup>将粳稻的转化方法进一步优化,使粳稻的遗传转化周期大幅缩短。近年来,林秀峰等<sup>[23]</sup>利用农杆菌介导法将转录因子*CBF1*导入北方粳稻沈6014和松粳3号,转化率分别是12.7%和10%。于志晶等<sup>[24]</sup>利用东北地区超级水稻吉粳88进行遗传转化,转基因效率为3.8%。本研究中吉粳88的转化效率为5.2%,与于志晶等的转化效率相近。

在逆境条件下,通过超量表达逆境诱导转录因子可以提高植物的抗逆性<sup>[25-27]</sup>。Zhang等<sup>[28]</sup>从拟南芥中克隆获得*MYB56*基因,属于R2R3-MYB转录因子亚类,证明了该基因参与细胞壁代谢。张立超等<sup>[29]</sup>从小麦中克隆得到*TaMYB56*基因,并将该基因转入拟南芥中,显著提高了转基因植株对冻害和盐胁迫的耐受性。这些研究均表明*MYB56*转录因子能够响应非生物胁迫,提高转基因植株对高盐等胁迫的耐受性。本研究利用转基因技术将*OsMYB56*基因导入水稻品种吉粳88中,使其过表达,从而创制耐盐转基因水稻新种质资源。目前,本研究只获得转基因植株,并完成了分子鉴定。表型鉴定、后代遗传稳定性、生理生化指标的测定等将在后续研究工作中进行,并进一步筛选耐盐碱转基因超级稻新材料。

#### 参考文献:

- [1] 于莹. 利用羊草EST文库克隆耐盐碱相关基因[D]. 长春: 吉林大学, 2011.
- [2] 王奕. 玉米耐盐碱转基因研究进展[J]. 安徽农业科学, 2012, 40(7): 3908-3911.
- [3] 余叔文, 汤章城. 植物生理与分子生物学(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 752-769.
- [4] 盖钧镒. 作物育种学各论(第二版)[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 8-15.
- [5] 闵绍楷. 水稻育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1996: 1-25.
- [6] 刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理[J]. 遗传, 2008, 30(10): 1265-1271.
- [7] Paz-Ares J, Ghosal D, Wienand U, et al. The regulatory C1 locus of *Zea mays* encodes a protein with homology to MYB-related proto-oncogene products and with structural similarities to transcriptional activators[J]. EM-BOJ, 1987, 6(12): 3553-3558.
- [8] Waites R, Selvadurai H R, Oliver I R, et al. The PHANTASTICA gene encodes a MYB transcription factor involved in growth and dorsoventrality of lateral organs in *Antirrhinum*[J]. Cell, 1998, 93(5): 779-789.
- [9] Loguerico L L, Zhang J Q, Wilkins T A. Differential regulation of six novel MYB-domain genes defines two distinct expression patterns in allotetraploid cotton[J]. Mol Gen Genet, 1999, 261(4-5): 660-671.
- [10] Miyake K, Ito T, Senda M, et al. Isolation of a subfamily of genes for R2R3-MYB transcription factors showing up-regulated expression under nitrogen nutrient-limited conditions[J]. Plant Mol Biol, 2003, 53(1-2): 237-245.
- [11] Chen Y H, Yang X Y, He K, et al. The MYB transcription factor superfamily of Arabidopsis: expression analysis and phylogenetic comparison with the rice MYB family[J]. Plant Mol Biol, 2006, 60(1): 107-124.
- [12] Takos A M, Jaffe F W, Jacob S R, et al. Light-induced expression of a MYB gene regulates anthocyanin biosynthesis in red apples[J]. Plant Physiol, 2006, 142(3): 1216-1232.
- [13] 向珣, 曹家树, 叶纨芝, 等. 白菜OguCMS相关MYB家族新基因*BcMYBogu*的克隆与特征分析[J]. 遗传, 2007, 29(5): 621-628.
- [14] Dai X, Xu Y, Ma Q, et al. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2007, 143(4): 1739-1751.
- [15] Vannini C, Locatelli F, Bracale M, et al. Overexpression of the rice *OsmYb4* gene increases chilling and freezing tolerance of *Arabidopsis thaliana* plants[J]. Plant, 2004, 37(1): 115-127.
- [16] 李敏. 拟南芥*AtMYB44*和*LWT1*基因在水稻中的遗传转化及功能验证[D]. 合肥: 安徽农业大学, 2012.
- [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.
- [18] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第二版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744, 776-777.
- [19] 翟红. 拟南芥*AtMYB1*基因在非生物胁迫反应中的功能研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2009.
- [20] Chan M T, Chang H H, Ho S L, et al. Agrobacterium-mediated production of transgenic rice plants expressing a chimeric alpha-amylase promoter/beta-glucuronidase gene[J]. Plant Mol Biol, 1993(22): 491-506.
- [21] Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by Agrobacterium and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. Plant, 1994, 27(6): 271-282.
- [22] Toki S, Hara N, Ono K, et al. Early infection of scutellum tissue with Agrobacterium allows high-speed transformation of rice[J]. Plant, 2006, 39(47): 969-976.
- [23] 林秀峰, 郭喜英, 刘志明, 等. 转*CBF1*基因提高水稻抗寒能力的初步研究[J]. 吉林农业科学, 2008, 33(5): 6-8, 11.
- [24] 于志晶, 蔡勤安, 李淑芳, 等. 利用农杆菌介导法获得转柠檬酸合成酶基因粳稻及其耐低磷的研究[J]. 吉林农业科学, 2012, 37(6): 17-20.

- [25] Flowers T J. Improving crop salt tolerance[J].*Exp Bot*, 2004(55): 307-319.
- [26] Valliyodan B, Nguyen H T. Understanding regulatory networks and engineering for enhanced drought tolerance in plants[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2006(9): 189-195.
- [27] Hussain S S, Kayani M A, Amjad M. Transcription factors as tools to engineer enhanced drought stress tolerance in plants[J]. *Biotechnology Progress*, 2011(27): 297-306.
- [28] Yanjie Zhang, Wanqi Liang, Jianxin Shi, et al. *MYB56* encoding a R2R3 MYB transcription factor regulates seed size in *arabidopsis thaliana*[J].*Journal of Integrative Plant Biology* ,2013, 55 (11): 1166 - 1178.
- [29] 张立超. 小麦MYB转录因子的功能研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2013.

(责任编辑: 范杰英)