

抗旱调控基因 *DREB2A* 转化辽荞 5 号的研究

丰明¹, 陈庆富², 葛维德¹, 薛仁风^{1*}

(1. 辽宁省农业科学院作物研究所, 沈阳 110161; 2. 贵州师范大学荞麦产业技术研究中心, 贵阳 550001)

摘要: 通过农杆菌介导, 将来源于干旱诱导下拟南芥的干旱调控基因 *DREB2A* 导入辽宁甜荞品种辽荞 5 号中, 以提高其耐旱性。通过正交试验分析影响农杆菌转化的相关因素, 建立并优化了转化体系。结果表明: (1) 愈伤组织诱导过程中, 选择子叶作为愈伤组织诱导受体, 诱导愈伤培养基激素的配比为: 2, 4-D 浓度为 2 mg/L; 6-BA 浓度为 1 mg/L; (2) 农杆菌转化过程中, 最适农杆菌 OD₆₀₀ 为 0.5、侵染时间 3 min、共培养 3 d, 乙酰丁香酮浓度 100 mg/L、筛选培养羧苄霉素浓度 50 mg/L, 草丁膦浓度 100 mg/L; (3) 通过对转化植株的 PCR 检测, 印证了 *DREB2A* 基因已转化到辽荞 5 号中; (4) 通过对转化植株的生理检测初步表明转基因荞麦比非转基因荞麦具有更高的抗旱性。

关键词: 荞麦; 农杆菌; 遗传转化; *DREB2A* 基因; 正交设计; 耐旱性

中图分类号: S517

文献标识码: A

文章编号: 2096-5877(2019)04-0029-08

Research on the Drought-Resistant Regulatory Genes *DREB2A* Transforming the 'Liao 5 Buckwheat'

FENG Ming¹, CHEN Qingfu², GE Weide¹, XUE Renfeng^{1*}

(1. Institute of Crop Research, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161; 2. Research Center of Buckwheat Industry Technology of Guizhou Normal University, Guiyang 550001, China)

Abstract: A drought regulatory gene from *Arabidopsis thaliana*, *DREB2A*, was transformed into the 'Liao 5 buckwheat' using agrobacterium-mediated method to improve its drought tolerance. The factors influencing agrobacterium transformation were analyzed by the orthogonal test. The transformation system was established and optimized. The results showed that: 1. The cotyledons were selected as callus induction receptors during callus induction. The ratio of the hormones in the induced callus medium was that the concentration of 2,4-D was 2 mg/L, and the concentration of 6-BA was 1 mg/L. 2. During the transformation of agrobacterium, the optimum agrobacterium OD₆₀₀ was 0.5, the infection time was 3 min, the co-culture time was 3 days, the concentration of acetosyringone was 100 mg/L, the concentration of carbenicillin was 50 mg/L, the concentration of phosphinothricin was 100 mg/L. 3. The PCR results showed that the gene *DREB2A* had been transformed into the 'Liao 5 buckwheat'. 4. The physiological test of the transformed plants showed that the modified buckwheat had higher drought resistance than the non-transgenic.

Key words: Buckwheat; Agrobacterium; Genetic transformation; *DREB2A* gene; Orthogonal experiment; Drought resistance

荞麦是蓼科、荞麦属作物, 分甜荞和苦荞两种。甜荞主要在东北、华北、西北等地种植, 苦荞在西南等地种植^[1]。荞麦具有良好的广适性, 其

生育期错过春小麦等主要农作物, 生育周期短、生产成本低、栽培技术简单、茬口搭配主要农作物灵活。荞麦营养十分丰富, 对人类诸多疾病的预防和治疗具有明显的效果^[2]。

干旱和半干旱是植物常遇到的自然逆境。在干旱胁迫下, 植物体内渗透压会进行调节以维持植物体内水分, 避免或减轻因失水对细胞造成的损害^[3]。干旱应答元件结合蛋白(*DREB*)转录因子, 可以特异地与 *DRE* 顺式作用元件结合, 在非生物逆境胁迫如低温、干旱中激活胁迫诱导基因的表达, 使作物可以耐受水分胁迫的影响^[4]。

收稿日期: 2018-12-26

基金项目: 国家现代农业产业技术体系荞麦育种专项资金(CARS-07-A5); 辽宁省自然科学基金计划重点项目(201700807); 辽宁省科学事业公益研究基金(20180018)

作者简介: 丰明(1982-), 男, 助理研究员, 硕士, 从事荞麦抗逆新品种选育研究。

通讯作者: 薛仁风, 男, 博士, 副研究员, E-mail: xuerf82@163.com

DREB2A 转录因子最先由 Liu 等^[5]利用 *rd29A* 基因启动子的顺式作用元件从干旱处理的拟南芥 cDNA 文库中克隆,它可在干旱及高盐条件下调控一系列相关抗逆功能基因的表达,从整体上提高植物的抗逆性状^[6-7]。在干旱失水的条件下,利用抗旱调控基因 *DREB2A* 改良植物的抗旱性状是一种耗资少,覆盖面广的理想手段。目前利用农杆菌介导的方法已成功将 *DREB* 类转录因子转入水稻^[8]及拟南芥^[9]等模式植物中,极大提高了作物对高盐、低温及干旱的耐受性,但针对荞麦的研究较少,针对辽宁地区的优势荞麦品种更是鲜有报道。

本研究旨在建立起抗旱调控基因 *DREB2A* 转化辽荞 5 号的抗逆转化体系,并对体系进行优化,通过相关生理指标的测定,为辽宁荞麦的抗旱转化研究提供参考和借鉴。

1 材料与方 法

1.1 试验材料

1.1.1 荞麦材料

辽荞 5 号,耐瘠薄、高产、优质、抗病。由辽宁

省农业科学院作物研究所提供。

1.1.2 植物表达载体的构建

目的基因 *DREB2A* 由本实验室从盐处理拟南芥叶片中克隆获得并构建到载体 pCambia3300 上,该质粒含有 *bar* 标记基因。在 35S 启动子和 Nos 终止子之间,利用双酶切构建植物表达载体 pCambia3300-*DREB2A* (图 1)。通过冻融法将该载体导入农杆菌 LBA4404,制备植物工程菌 LBA4404-pCambia3300-*DREB2A*,实验室保存待用。

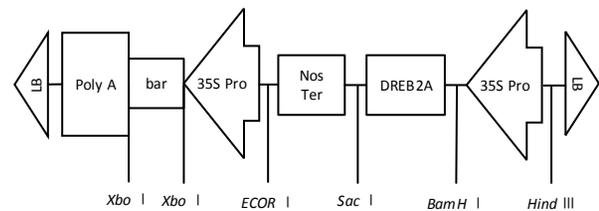


图 1 植物表达载体 pCambia3300-*DREB2A* 的结构图谱

1.1.3 试验用基础培养基配方

本试验按照培养基用途分为 5 种基础培养基,具体配方见表 1。

表 1 荞麦转化基础培养基

培养基用途	培养基成分
种子萌发培养基	1/2MS+3% 蔗糖
愈伤组织诱导培养基	1/2MS+3% 蔗糖+(600 mg/L)CH+(300 mg/L)YE+2,4-D+6-BA
共培养基	1/2MS+3% 蔗糖+(600 mg/L)CH+(300 mg/L)YE+2,4-D+6-BA + 10g/L 葡萄糖+(40 mg/L)AS
筛选培养基	1/2MS+3% 蔗糖+(600 mg/L)CH+(300 mg/L)YE +6-BA+NAA+PPT+Cb
生根培养基	1/4MS+(0.2 g/L)IBA

注:上述培养基 pH 值均在 5.8~6.0 之间。固体培养基凝固剂均采用 4 g/L 植物凝胶。CH:水解酪蛋白;YE:酵母提取物;2,4-D:2,4-二氯苯氧乙酸;6-BA:6-苄氨基腺嘌呤;AS:乙酰丁香酮;PPT:草丁膦;Cb:羧苄青霉素;NAA:萘乙酸;IBA:吲哚乙酸

1.2 试验方法

1.2.1 荞麦愈伤组织诱导

无菌苗依照陈佳等^[10]的方法获取。将无菌苗子叶剪成 0.5 cm×0.5 cm 正方形,下胚轴切成 0.5~1 cm 小段各 100 份,分别接种于含有不同激素组合的愈伤组织诱导培养基中。设计 2,4-D、6-BA 两种激素因素,10 个处理。培养温度 25 °C,光照强度 2 500 lx,每天光照 12 h,暗培养 12 h,诱导 10~15 d,3 次重复,统计诱导频率最高的培养基作为最适诱导愈伤组织培养基,得到新鲜淡黄色愈伤组织备用。

1.2.2 荞麦农杆菌转化

YEB 平板挑取农杆菌工程菌 LBA4404-pCAM-

BIA3300-*DREB2A*,接种到含 100 mg/L 利福平及 50 mg/L 卡那霉素的液体 YEB 培养基中,28 °C,180 r/min,培养过夜至 OD₆₀₀ 0.1~1.0,转化外植体按照陈利红等^[11]的方法进行。根据影响转化的若干要素,分别以 100 粒新鲜的愈伤组织为材料,设计正交试验 L₂₅ 5⁶,以得到荞麦转化苗的多少作为考察转化效率高低的标 准。

1.2.3 转基因荞麦的 PCR 检测

随机选取生根壮苗后生长状况良好的荞麦转化植株,采用 CTAB 法提取叶片 DNA,根据 *bar* 基因设计引物:*bar*-F(5'-CGTGTAGCAGTTGGTGATGTAGCTC-3'); *bar*-R(5'-ACTTCAGGTCGACGGTCTTTGGGTG-3')。

根据 *DREB2A* 基因设计引物: *DREB2A*-F(5'-CCGGTAGCAACTTCTACGGAGACG-3'); *DREB2A*-R(5'-TTAGGTAATGCTAGGAAAGGGAGC-3')。

PCR 反应条件为: 95℃, 3 min; 95℃, 50 s; 60℃, 50 s; 72℃, 75 s; 共进行 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 9 min。

PCR 扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后经凝胶成像仪观察, 出现目的条带的即为阳性荞麦转化植株。

1.2.4 干旱胁迫下转基因荞麦与野生型荞麦表型对比

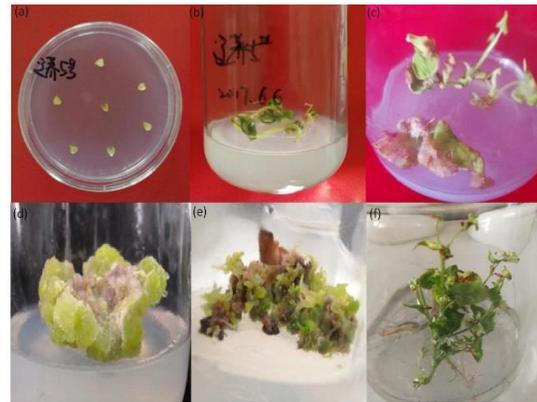
用 30% 聚乙二醇 6000 (PEG-6000) 模拟干旱环境在温室对转基因荞麦及野生荞麦幼苗进行水分胁迫, 干旱模拟试验的控水方法采用 Hsiao T C 提出的水分梯度法^[12], 按照土壤含水量百分比共分 4 个干旱胁迫程度: 对照 (CK) 40% ~ 45%; 轻度干旱胁迫 (LS) 30% ~ 35%; 中度干旱胁迫 (MS) 20% ~ 25%; (4) 重度干旱胁迫 (HS) 10% ~ 15%。设计 6 份转基因荞麦对照 6 份野生型荞麦, 通过每天测定土壤含水量使样品保持各处理土壤水分区间范围内, 观察转基因荞麦和野生型的表型差异及生长状况^[13], 试验重复 3 次。

1.2.5 荞麦生理指标测定

干旱处理后, 参照王晶英等^[14]方法, 叶片相对含水量采用饱和称重法; 丙二醛含量采用硫代巴比妥酸比色法; 叶片相对电导率采用电导率法; 脯氨酸含量采用茚三酮法^[15]。

1.3 数据分析及处理

采用 EXCEL 2007 进行试验数据汇总, 数据均设 3 次重复, 实验所得结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS Statistics 19 进行方差及显著性分析。



(a) 荞麦种子脱皮预培养; (b) 荞麦组培苗; (c) 子叶愈伤组织的诱导; (d) 子叶愈伤组织继代; (e) 愈伤组织的分化; (f) 分化苗的移栽生根

图2 农杆菌转化荞麦过程

2 结果与分析

2.1 抗旱调控基因 *DREB2A* 的遗传转化

通过农杆菌介导法将抗旱调控基因 *DREB2A* 转化到辽荞 5 号中。如图 2, 经预培养、共培养、筛选、分化、生根等阶段, 成功培育出转化苗。

2.2 农杆菌介导抗旱调控基因 *DREB2A* 转化辽荞 5 号体系的优化

2.2.1 不同外植体及激素配比对辽荞 5 号愈伤组织诱导的影响

由表 2 可以看出, 在 2, 4-D 浓度为 2 mg/L, 无 6-BA 添加时, 子叶及下胚轴^[16]的愈伤诱导率均低于 60%。随着 6-BA 浓度的增加, 子叶和下胚轴愈伤诱导率快速升高至 100%。当 6-BA 浓度达到 1 mg/L 时, 子叶边缘卷曲, 愈伤诱导速率和生长速度适中, 愈伤组织呈黄绿色且结构疏松, 这类愈伤组织后期分化效率高^[17], 而下胚轴两端膨大并形成纺锤型, 愈伤诱导较子叶更迅速, 但愈伤过

表 2 不同激素浓度分别对辽荞 5 号子叶、下胚轴外植体诱导愈伤的影响

处理	2,4-D 浓度 (mg/L)	6-BA 浓度 (mg/L)	子叶愈伤诱导率 (%)	下胚轴愈伤诱导 (%)
1	2	0	45±2	52±3
2	2	0.5	71±2	89±4
3	2	1	100±0	100±0
4	2	1.5	100±0	100±0
5	2	2	100±0	100±0
6	4	0.5	88±1	100±0
7	4	1	77±4	100±0
8	4	1.5	69±4	87±1
9	4	2	62±1	76±2
10	6	1	32±2	48±0

注: 受体愈伤组织诱导率=(愈伤组织块数/接种外植体数)×100%

于紧密且呈现红褐色,这类愈伤组织后期分化效率较低。随着2,4-D浓度的提高,子叶和下胚轴形成愈伤组织诱导速率加快,接种一周后就生长出较明显的愈伤组织,但受体愈伤诱导率反而下降,愈伤组织过于紧实,并严重褐化。陈利红等^[18]认为这是由于2,4-D的浓度过高导致愈伤组织分泌大量酚类物质造成,这类愈伤组织在继代培养时分化能力差。

2.2.2 辽荞5号农杆菌转化体系的优化

农杆菌介导转化辽荞5号的正交试验,共25个处理,所得转化荞麦数(株)见表3。

影响农杆菌转化体系的6种因素如表4所示。

农杆菌介导辽荞5号的转化效率受多种因素影响,各试验因素对转化体系的影响均为极显著($F > F_{0.01}$)。故需要进行因素内多水平分析。

表3 农杆菌介导转化辽荞5号正交试验

处理	农杆菌浓度 (OD ₆₀₀)	侵染时间(min)	共培养时间(d)	乙酰丁香酮浓 度(mg/L)	羧苄霉素浓度 (mg/L)	草丁膦浓度 (mg/L)	转化荞麦数 (株)
1	0.1	3	1	0	0	0	0
2	0.1	5	2	50	25	10	3±1
3	0.1	10	3	100	50	30	15±3
4	0.1	15	5	150	100	50	17±3
5	0.1	30	10	200	200	100	22±3
6	0.3	3	2	100	100	100	25±5
7	0.3	5	3	150	200	0	26±3
8	0.3	10	5	200	0	10	34±5
9	0.3	15	10	0	25	30	20±3
10	0.3	30	1	50	50	50	0
11	0.5	3	3	200	25	50	45±4
12	0.5	5	5	0	50	100	29±4
13	0.5	10	10	50	100	0	29±4
14	0.5	15	1	100	200	10	8±3
15	0.5	30	2	150	0	30	0
16	0.7	3	5	50	200	30	41±2
17	0.7	5	10	100	0	50	20±2
18	0.7	10	1	150	25	100	22±7
19	0.7	15	2	200	50	0	0
20	0.7	30	3	0	100	10	2±3
21	1.0	3	10	150	50	10	7±2
22	1.0	5	1	200	100	30	0
23	1.0	10	2	0	200	50	0
24	1.0	15	3	50	0	100	0
25	1.0	30	5	100	25	0	0

表4 农杆菌转化体系各因素方差分析表

影响因素	Ⅲ型平方和	df	均方	F值
农杆菌浓度	6421.787	4	1605.447	95.638**
侵染时间	4837.253	4	1209.313	72.040**
共培养时间	5589.653	4	1397.413	83.245**
乙酰丁香酮浓度	1192.453	4	298.113	17.759**
羧苄霉素浓度	1142.187	4	285.547	17.010**
草丁膦浓度	1711.120	4	427.780	25.483**
误差	839.333	50	16.787	

注: $F_{0.05}=2.78$, $F_{0.01}=4.22$

2.2.3 农杆菌浓度各水平的差异显著性分析

由表 5 可以看出,当 OD_{600} 达到 0.5 时,得到转化苗均值最高,与其他水平差异显著,随着 OD 值升高,转化苗均值数开始下降,这可能是由于农杆菌浓度过高,造成菌体生长过盛,筛选抗生素无法抑制其繁殖,造成大面积染菌的原因。

2.2.4 侵染时间各水平的差异显著性分析

农杆菌侵染时间是影响转化过程的重要因素,由表 5 可知,侵染时间超过 3 min 时得到的转化苗差异不显著,这是由于农杆菌与愈伤组织接触过于充分,细胞内容物被农杆菌过多侵染,转化后期难以抑制菌体生长,造成转化失败,因此选择 3 min 侵染时间足以保证农杆菌的顺利导入。

2.2.5 共培养时间各水平的差异显著性分析

由表 5 可以看出,共培养时间较短的情况下,

得到的抗性苗均值较低,菌体与愈伤组织转化时间较短,造成转化率较低,当共培养超过 3 d 以后,转化效率明显提升,共培养 3 d、5 d、10 d 转化结果差异不显著,为了节省转化时间,提高转化效率,选择 3 d 作为共培养时间。

2.2.6 AS 浓度各水平的差异显著性分析

AS 是一种酚类化合物,可以诱发农杆菌内 Ti 或 Ri 质粒 DNA 上 *Vir* 区域基因的活化和高效表达^[19],被广泛应用在农杆菌介导的遗传转化体系中。AS 浓度处于较低水平下,试验结果差异不显著,当 AS 浓度达到 100 mg/L 时转化效果最佳,与其他水平差异极显著(表 5)。AS 的浓度太高会影响转化效率,愈伤组织褐化现象较重,这可能是由于过高浓度的 AS 对愈伤组织产生了毒性^[20]。

表 5 农杆菌转化体系各因素各水平的差异显著性

影响因素	因素水平	均值	显著性
农杆菌浓度 (OD_{600})	0.1	11.400	
	0.3	21.067	*
	0.5	28.933	**
	0.7	16.933	
	1.0	1.400	
侵染时间 (min)	3	27.200	
	5	18.867	
	10	19.867	*
	15	8.933	
	30	4.867	
共培养时间 (d)	1	5.933	
	2	5.800	*
	3	21.133	*
	5	27.333	*
	10	19.533	
AS 浓度 (mg/L)	0	13.267	
	50	14.533	
	100	23.867	**
	150	14.400	
	200	13.667	
Cb 浓度 (mg/L)	0	11.000	
	25	13.267	
	50	21.533	
	100	14.600	
	200	19.333	
草丁膦浓度 (mg/L)	0	10.933	
	10	10.933	
	30	15.067	*
	50	20.067	
	100	22.733	

2.2.7 Cb浓度各水平的差异显著性分析

由表5可知,筛选培养基Cb浓度各水平梯度之间无明显差异,当Cb浓度为50 mg/L时均值最高。当Cb浓度过低时筛选作用不明显,会造成过多假阳性植株;Cb浓度过高对愈伤组织的抑制作用使其失去了继续分化成苗的能力,并严重褐化。

2.2.8 草丁膦浓度各水平的差异显著性分析

草丁膦(PPT)通过有效抑制植物谷酰胺合成酶的活性,使铵在植物细胞内大量累积,造成植株死亡。含抗性bar基因的植株能编码膦丝菌素乙酰转移酶,使草丁膦的氨基乙酰化,解除植物的毒性^[21]。由表5可以看出,草丁膦浓度达到100 mg/L时均值最高,与其他浓度梯度差异显著。草丁膦浓度过低对愈伤组织的筛选效果不佳,造成假阳性植株过多。

经过比较分析得出,最佳转化体系为农杆菌OD₆₀₀为0.5、侵染时间3 min、共培养3 d、乙酰丁香酮浓度100 mg/L、筛选培养羧苄霉素浓度50 mg/L、草丁膦浓度100 mg/L。

2.3 DREB2A转基因辽养5号的PCR鉴定

通过2对特异性引物对经过最优转化体系得到的拟转基因辽养5号进行PCR鉴定,结果如图3所示,目的条带与预测条带大小一致,证明DREB2A基因已成功导入辽养5号。

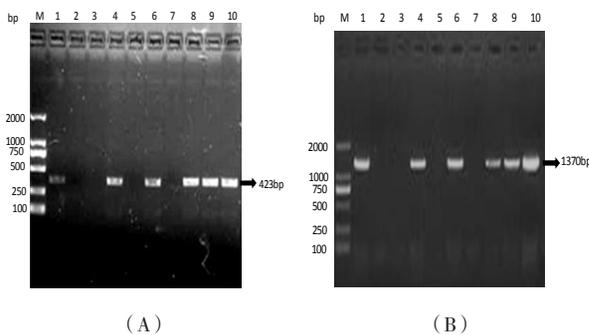


图3 辽养5号转化苗bar基因PCR鉴定(A)
辽养5号转化苗DREB2A基因PCR鉴定(B)

M. DL 2000 Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照
3. H2O模板; 4~10. 辽养5号转化苗

2.4 干旱胁迫对荞麦叶片相对含水量的影响

由图4可以看出,在干旱胁迫前,转基因荞麦(N1、N2、N3)和对照非转基因荞麦(CK)叶片的相对含水量差异不明显($P>0.05$),随着干旱胁迫的进行,转基因荞麦和非转基因荞麦叶片含水量均呈下降趋势,非转基因荞麦下降幅度更大,干旱胁迫5 d和10 d,转基因荞麦叶片相对含水量与对照相比差异极显著($P<0.01$),在第11 d复水后,

转基因荞麦叶片相对含水量有所提高,植物干旱胁迫得到一定缓解,而对照植株则枯死。

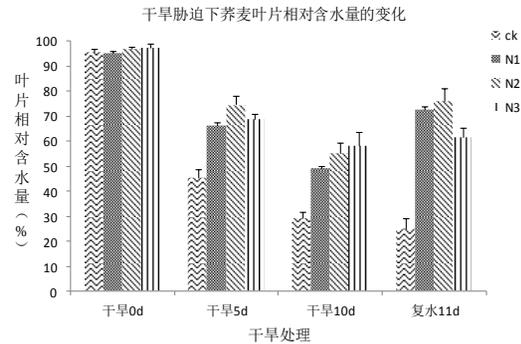


图4 干旱胁迫下荞麦叶片相对含水量(RWC)的变化

2.5 干旱胁迫对荞麦叶片丙二醛(MDA)含量的影响

由图5可以看出,转基因荞麦(N1、N2、N3)和非转基因荞麦(CK)在干旱胁迫前(0 d),叶片丙二醛(MDA)含量维持在一个较低水平,相互间差异不显著($P>0.05$)。随着干旱胁迫的进行,转基因和非转基因荞麦叶片丙二醛含量均显著提高,而MDA量过多会导致细胞质膜的过氧化,破坏其通透性,紊乱细胞代谢功能,加剧植株的凋亡。在干旱10 d时,转基因荞麦MDA含量与对照差异显著($P<0.05$),复水后转基因荞麦比对照组叶片MDA含量下降明显。

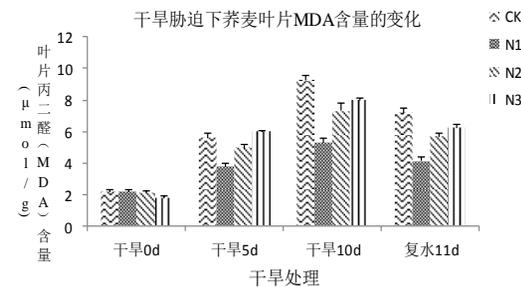


图5 干旱胁迫下荞麦叶片丙二醛(MDA)的变化

2.6 干旱胁迫对荞麦叶片相对电导率的影响

由图6可知,转基因荞麦(N1、N2、N3)和非转基因荞麦(CK)在干旱胁迫前(0 d),叶片相对电导率差异不显著($P>0.05$),经过干旱处理后,对照组叶片相对电导率比转基因植株提升明显,差异极显著($P<0.01$),复水后,对照组叶片相对电导率仍旧保持一个较高水平,而转基因荞麦叶片相对电导率下降明显,互相之间差异极显著($P<0.01$)。转基因荞麦在干旱胁迫下电解质外渗相对较少,生物膜的受伤害程度明显较少,说明转基因株系已具备一定的抵御干旱胁迫的能力。

以非转基因辽荞 5 号为对照,对同一生长期的转 *DREB2A* 基因苗进行盆栽干旱胁迫处理,观察二者表型差异。干旱胁迫开始时二者表型无明显差别,4 d 后对照组叶片皱缩,茎秆发黄,而转基因植株仍表现为正常生长。中度干旱胁迫(6 d)时,对照植株茎秆失水弯曲,萎蔫;转基因植株叶片仍保持绿色。继续干旱处理第 8 天时,对照苗叶片失水卷曲严重,茎秆由粉红色转为锈黄色,转基因部分植株叶片开始失水边缘卷曲。当达到重度干旱胁迫时,对照植株完全匍匐在盆中死亡。转基因苗叶片变黄,有少量枯叶出现但植株整体长势良好,表现出较好的抗旱性(图 7)。

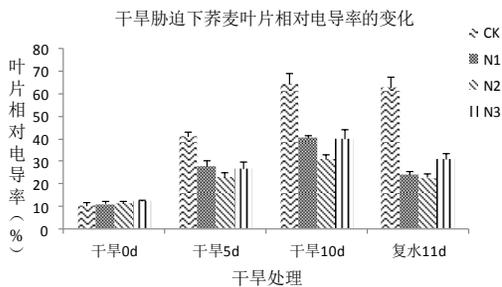
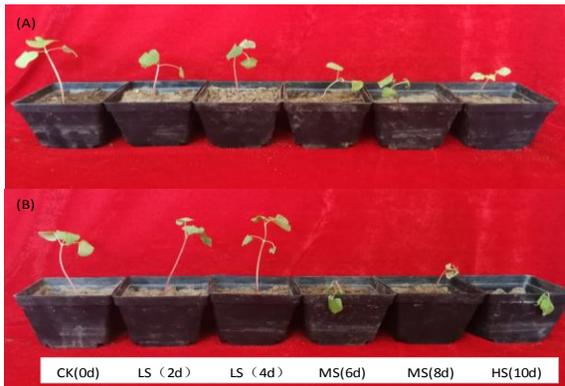


图 6 干旱胁迫下荞麦叶片相对电导率的变化



(A) 转基因荞麦 (B) 野生型荞麦

图 7 干旱胁迫下转基因荞麦与野生型荞麦表型对比

3 讨论与结论

作物抗逆性状是多个基因协同作用的结果,提高作物耐旱性状可以选择导入与耐旱相关的转录因子。*DREB* 转录因子属于逆境适应中关键性调节因子,能和抗逆基因启动子区域的 *DRE* 顺式作用元件特异性结合,具有保守的 *AP2* 结构域,在干旱、低温、高盐环境下调控下游逆境应答基因表达。目前已从拟南芥中分离到 5 个 *DREB* 类转录因子,其中 *DREB1A*、*DREB1B*、*DREB1C* 与植物抗寒性相关,*DREB2A*、*DREB2B* 与植物的耐旱耐盐性相关^[5]。目前 *DREB2A* 已成功导入模式植物

烟草、小麦、苜蓿、水稻中,获得了阳性植株^[22-23]。本研究将 *DREB2A* 成功导入荞麦中,有望选育出抗旱性较强的育种新材料。

影响荞麦基因转化的关键因素之一是基因型,不同基因型荞麦不适用于同一套转化体系,因此针对某一特定品种,筛选出适合该品种的一套高效转化体系十分关键。试验选取影响转化的核心因素,包括外植体类型、诱导愈伤激素浓度、农杆菌浓度、侵染时间、共培养时间、筛选抗生素浓度等等。试验因素较多,各因素水平较多,需要进行多次梯度试验,试验步骤极为繁琐,且各因素间的交互作用无法兼顾,试验结果缺少量化标准^[24]。王爱国等^[25]已将正交试验应用到荞麦组织培养中,但是利用正交试验优化荞麦的遗传转化报道甚少。本研究借助正交试验,有效地减少了试验次数,利用差异显著性分析了各因素间及因素内各水平间的相关性,初步达到了优化转化体系的目的。本研究选取的各因素对转化结果均有极显著影响,各因素水平之间差异显著,但是比如羧苄霉素浓度各水平之间就没有显著性差异,说明所选水平在转化体系中还需完善,有待于进一步验证所选水平的合理区间。

不同外植体类型对农杆菌介导外源基因的转化相应机制不同,所需的受体不同,不同受体之间转化差异明显,甚至个别受体无法顺利完成外源基因的导入。常用的外植体类型有子叶、上胚轴、下胚轴、茎尖、胚性愈伤组织。Yamane^[26]和 Srejovic 等^[27]分别以下胚轴和子叶为外植体成功构建了荞麦再生体系。通过不同激素及外植体类型诱导愈伤组织试验,笔者发现针对辽荞 5 号,在 MS 培养基中添加 2,4-D 及 6-BA,下胚轴和子叶都能有效诱导出胚性愈伤组织,但子叶愈伤诱导率高于下胚轴,效果更好。这可能是由于子叶细胞再生能力强,剪叶处理后微创口更有利于细胞内物质与农杆菌充分接触,进行细胞内外的物质交换,便于外源基因的导入。但针对其他品种下胚轴愈伤诱导率高于子叶也有报道,刘拥海等^[28]认为在含有 4 mg/L 2,4-D 和 0.1 mg/L 6-BA 的 MS 培养基上,荞麦下胚轴外植体诱导愈伤组织效果最佳。

正交试验转化荞麦株数是经过农杆菌介导转化通过 PCR 验证后的阳性植株,将所有的转化苗经 PCR 验证工作量巨大,耗时费力,考虑通过载体改良,加入 *GUS* 基因,通过愈伤组织 *GUS* 染色,更直观分辨假阳性植株,提高转化效率。在验证

外源基因导入时,在今后的工作中将采用 *Southern Blot* 的方法进一步验证转化的可靠性,排除假阳性的干扰,最终确定转入的拷贝数。

辽西地区近年来旱情愈加严重,荞麦作为生育周期短的抗灾补救作物愈加受到重视。为了提高荞麦在干旱胁迫下的产量及品质,除了引水灌溉外,选育耐旱性强的荞麦品种更加经济和现实。目前荞麦的抗逆基因转化报道很少,其中还普遍存在筛选难度较大,转化效率较低等问题。本研究从辽荞5号这一广适优质品种出发,建立并优化了转化体系,提高了抗旱能力,为更多优质荞麦品种分子改良,提高抗旱、抗病等抗逆性状提供了参考和借鉴。

参考文献:

- [1] 冯佰利,姚爱华,高金峰,等.中国荞麦优势区域布局与发展研究[J].中国农学通报,2005,21(3):375-377.
- [2] 张玲,高飞虎,高伦江,等.荞麦营养功能及其利用研究进展[J].南方农业,2011,27(6):74-77.
- [3] Boyer J S. Plant productivity and environment[J].Science, 1982, 218: 443-448.
- [4] 李子东,赵翠珠,周玲君,等.农杆菌介导的 *DREB1A* 基因转化多花黑麦草及其转化体系的优化[J].山东大学学报(理学版),2008(9):11-17.
- [5] 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, respectively, in Arabidopsis[J]. The Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [6] 周森平,余桂红,孙晓波,等.基因枪共转化将拟南芥 *DREB2A* 基因和 *bar* 基因导入小麦[J].江苏农业学报,2009,25(6):1224-1228.
- [7] SAKUMA Y, MARUYAMA K, OSAKABE Y, et al. Functional analysis of an Arabidopsis transcription factor, *DREB2A*, involved in drought-responsive gene expression[J]. The Plant Cell, 2006, 18: 1292-1309.
- [8] CHEN M, WANG Q Y, CHENG X G, et al. GmDREB2, a soybean DRE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2007, 353(2): 299-305.
- [9] ITO Y, KATSURA K, MARUYAMA K. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice[J]. Plant Cell Physiology, 2006, 47(1):141-153.
- [10] 陈佳.荞麦无菌苗培养条件优化及离体再生体系研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2012.
- [11] 陈利红. *AtNHX1* 基因对荞麦的遗传转化及抗盐再生植株的获得[D].西安:西北大学,2007.
- [12] Hsiao T C. Physiological effects of plant in response to water stress[J].Ann Rev Plant Physiol, 1973, 24: 519-570.
- [13] 陈鹏,张德玖,李玉红,等.水分胁迫对苦荞幼苗生理生化特性的影响[J].西北农业学报,2008(5):204-207.
- [14] 王晶英,敖红,张杰,等.植物生理生化实验技术与原理[M].哈尔滨:东北林业大学出版社,2003:132-133.
- [15] 贾婷.干旱胁迫对荞麦种子萌发及苗期生理特性的影响[D].成都:四川农业大学,2012.
- [16] 尚丽霞,于志晶,蔡勤安,等.玉米转基因受体材料的筛选研究[J].吉林农业科学,2015,40(6):34-37.
- [17] 胡延生,姜继发,建德锋.欧李愈伤组织诱导及分化研究[J].吉林农业科学,2015,40(6):98-100.
- [18] 陈利红,徐子勤.荞麦组织培养和高频植株再生体系的建立[J].分子细胞生物学报,2006,39(5):445-452.
- [19] 邓艺,曾炳山,赵思东,等.乙酰丁香酮在农杆菌介导的遗传转化中的作用机制及应用[J].安徽农业科学,2010,38(5):2229-2232.
- [20] 席梦利.杉木转基因受体系统的建立及遗传转化研究[D].南京:南京林业大学,2004.
- [21] 段发平,梁成邨,黎垣庆. *Bar* 基因和转 *Bar* 基因作物的研究进展[J].广西植物,2001,21(2):166-172.
- [22] 曾会明,马挺军,王华芳,等.转录因子 *DREB2A* 植物表达载体构建及烟草转基因研究[J].生物技术通报,2006(2):72-77.
- [23] 刘艳芝,韦正乙,邢少辰,等.逆境相关转录因子 *DREB2A* 转化紫花苜蓿的研究[J].吉林农业科学,2007,32(6):27-29, 49.
- [24] 谢运海,夏德安,姜静,等.利用正交设计优化水曲柳 ISSR-PCR 反应体系[J].分子植物育种,2005,3(3):445-450.
- [25] 王爱国,张以忠,任翠娟,等.普通荞麦愈伤组织诱导及其分化的正交设计试验研究[J].种子,2006,25(1):7-13.
- [26] Yamane Y. Induced differentiation of buckwheat plants from subcultured calluses in vitro[J].Jpn J Genet, 1974, 48:139-146.
- [27] Srejovic V, Neskovic M. Regeneration of plants from cotyledon fragments of buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench.)[J]. ZPflanzenphysiol, 1981, 104: 37-42.
- [28] 刘拥海,俞乐,黄伟华,等.苦荞种子萌发条件和愈伤组织的诱导[J].湖南农业大学学报(自然科学版),2006,32(1):12-14.