

## 拟南芥抗逆基因 *DREB2A* 转化大豆的研究

于志晶, 蔡勤安, 刘艳芝, 齐广勋, 马 瑞

(吉林省农业科学院 农业生物技术研究所, 吉林 长春 130033)

**摘要:**为提高大豆的耐旱耐盐碱性,将拟南芥转录因子 *DREB2A* 序列优化后,构建了植物表达载体 pCAMBIA3300-*DREB2A*,利用农杆菌介导法将 *DREB2A* 基因导入大豆品种 Willimas 82 和 Bert 中,转化率分别为 0.8% 和 3.2%。对抗性转基因植株进行 PCR 检测,2 个品种分别获得阳性植株 28 和 63 株,表明 *DREB2A* 已整合到大豆基因组中。

**关键词:**大豆; *DREB2A*; 耐盐耐旱; 农杆菌介导遗传转化

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2013)05-0606-03

## Transformation of Soybean with Stress Related Gene *DREB2A* from *Arabidopsis*

YU Zhi-jing, CAI Qin-an, LIU Yan-zhi, QI Guang-xun, MA Rui

(Institute of Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

**Abstract:** To improve the salt and drought tolerance of soybean, a vector of pCAMBIA3300-*DREB2A* with stress related gene *DREB2A* from *Arabidopsis thaliana* was constructed. *DREB2A* gene was introduced into soybean varieties Williams 82 and Bert by *Agrobacterium*-mediated transformation. The average transformation frequencies were 0.8% and 3.2%, respectively. Twenty-eight and 63 positive plants respectively were obtained by PCR identification. The results indicated that the gene *DREB2A* had been integrated into the genome of soybean.

**Key words:** Soybean; *DREB2A*; Salt and drought tolerance; *Agrobacterium*-mediated transformation

干旱、盐渍化是限制作物生长的主要因素,是目前生产上亟需解决的问题之一。虽然科研工作者试图用常规育种方法来提高作物的抗旱耐盐能力,但效果并不理想<sup>[1]</sup>。目前,国内外学者通过基因工程改良作物,来提高作物的耐盐性。

自 1988 年 Hinchey 等<sup>[2]</sup>和 McCabe 等<sup>[3]</sup>率先获得转基因大豆植株以来,转基因技术已经成为大豆分子育种和基因功能研究的重要手段。目前大豆遗传转化方法有农杆菌介导法、基因枪转化法、PEG 法、花粉管通道法等,但最常用的方法主要是农杆菌介导法和基因枪法<sup>[4]</sup>。大豆农杆菌介导遗传转化常用的外植体有子叶节、体细胞胚、胚尖、器官愈伤组织以及幼嫩种子、下胚轴、初生叶基等。其中子叶节是在以器官再生途径为基础的大豆转化体系中最常用的外植体<sup>[5]</sup>。子叶节转化体系具有操作简便、外植体获得不受时间限制、操作周期短等特点,是目前应用最为广泛的转化方法。

DREB 是一种转录因子,在逆境胁迫基因表达调控过程中起重要作用。Liu 等<sup>[6]</sup>从拟南芥中分离到 5 个 AP2/EREBP 类转录因子,分别命名为 DREB1A、DREB1B、DREB1C、DREB2A、DREB2B,其中 DREB1 类转录因子与植物耐寒性有关;DREB2 类转录因子与植物抗旱耐盐性有关。本试

验用成熟大豆子叶节为受体,将 *DREB2A* 基因导入大豆,以期获得抗逆转基因大豆新材料。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

大豆品种 Willimas 82 和 Bert 由中国农业科学院作物科学研究所提供;农杆菌 EHA105 菌株,本实验室保存。

#### 1.2 植物表达载体构建

以 pCAMBIA3300 质粒为载体构建植物表达载体,该质粒有 *bar* 标记基因,由 35S 启动子启动。将 *DREB2A* 基因两端加上 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点,连接到用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双切的 pCAMBIA3300 载体上,即获得植物表达载体 pCAMBIA3300-*DREB2A*。用冻融法将该载体导入农杆菌 EHA105 中,用来转化大豆。

#### 1.3 农杆菌介导的大豆转化

1.3.1 外植体准备 取表面光滑无痕的大豆成熟种子,用 50 mL NaClO + 2 mL HCl 反应生成的氯气在干燥器中进行大豆种子表面消毒 24 h。将其放到超净台上吹风 2 h 至种子无明显氯气味,接种在萌发培养基 GM(B5 无机物 + B5 有机物 + 2% 蔗糖 + 1 mg · L<sup>-1</sup> 6-BA + 0.2% 凝胶, pH 5.8) 上,温度

收稿日期: 2013-03-28

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-002)。

第一作者简介: 于志晶(1977-),女,硕士,主要从事植物分子生物学、遗传转化与代谢工程研究。

通讯作者: 马瑞(1966-),男,博士,研究员,主要从事植物生物技术研究。E-mail: ruimaa@126.com。

23℃,萌发 24 h 后用于农杆菌介导转化。

1.3.2 菌液的准备 从新鲜的固体 YEP 平板挑取含有 pCambia3300-DREB2A 载体的根癌农杆菌 *EHA105* 单菌落,接种到含有 50 g·L<sup>-1</sup> 卡那霉素(kan)和 25 g·L<sup>-1</sup> 利福平(Rif)浓度的 YEP 培养基上,28℃,200 r·min<sup>-1</sup> 震荡培养至 OD<sub>600</sub> = 0.5,在 4℃,4 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min,去除上清液,再用重悬培养基(1/10 B5 无机物 + B5 有机物 + 3% 蔗糖 + 20 mmol·L<sup>-1</sup> MES + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 1.67 mg·L<sup>-1</sup> 6-BAP + 200 μmol·L<sup>-1</sup> AS + 1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, pH5.2)重悬至 OD<sub>600</sub> = 0.5,备用。

1.3.3 大豆的遗传转化 将萌发后种子去掉种皮,保留子叶及下方的下胚轴,用解剖刀将 2 片子叶沿下胚轴的方向平行切开,去除叶芽,分别在子叶节有效分化部位划 3~4 刀,放入菌体重悬培养基 REM(1/10 B5 无机物 + B5 有机物 + 3% 蔗糖 + 20 mmol·L<sup>-1</sup> MES + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 1.67 mg·L<sup>-1</sup> 6-BAP + 200 μmol·L<sup>-1</sup> AS + 1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT, pH 5.2)30 min,期间不断摇晃,进行浸染。浸染后,将子叶节外植体近轴面向下放入带有一层滤纸的共培养基(1/10B5 无机物 + B5 有机物 + 3% 蔗糖 + 20 mmol·L<sup>-1</sup> MES + 0.25 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 1.67 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 200 μmol·L<sup>-1</sup> AS + 400 mg·L<sup>-1</sup> Cys + 1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT + 0.5% 琼脂, pH5.2)中 24℃ 黑暗培养 3 d 后,将外植体的子叶节和大约 2 cm 的下胚轴部分插入不定芽诱导培养基(B5 无机物 + B5 有机物 + 3% 蔗糖 + 3 mmol·L<sup>-1</sup> MES + 0.2% 凝胶 + 1.67 mg·L<sup>-1</sup> BAP + 250 mg·L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠 + 100 mg·L<sup>-1</sup> 阿莫西林, pH 5.7)。14 d 后,取出外植体,将下胚轴与培养基接触部分切出新的伤口,转入含有 5 mg·L<sup>-1</sup> 筛选剂草丁膦的芽诱导培养基培养 14 d。然后转入不定芽伸长培养基(MS 无机物 + B5 有机物 + 3 mmol·L<sup>-1</sup> MES + 3% 蔗糖 + 50 mg·L<sup>-1</sup> 天冬氨酸 + 100 mg·L<sup>-1</sup> L-焦谷氨酸 + 0.1 mg·L<sup>-1</sup> IAA + 0.5 mg·L<sup>-1</sup> GA<sub>3</sub> + 1 mg·L<sup>-1</sup> 玉米素核苷 + 250 mg·L<sup>-1</sup> 头孢噻肟钠 + 100 mg·L<sup>-1</sup> 阿莫西林 + 0.2% 凝胶, pH5.7)中,每 14 d 继代 1 次。当不定芽伸长到 3~5 cm 时,将其从基部切下,在 1 mg·mL<sup>-1</sup> IBA 中蘸 1~2 min 后,转入生根培养基(MS 无机物 + B5 有机物 + 2% 蔗糖 + 3 mmol·L<sup>-1</sup> MES + 0.7% 琼脂粉, pH5.6)中生根。在生根培养基中培养 14 d 左右,待根系发育完好,经炼苗后移入盆中栽培。

#### 1.4 抗性植株 PCR 检测

取抗性植株的叶片,采用 CTAB 法提取总 DNA<sup>[7]</sup> 进行 *bar* 基因和 *DREB2A* 基因 PCR 检测。PCR 引物由上海生工公司合成。*bar* 基因引物如下:上游引物 5'-GCACAATCGTCAACCACTA-CATCGAG-3';下游引物 5'-TGAAGTCCAGCTGC-CAGAAACCCAC-3'。*DREB2A* 基因引物如下:上游

引物 5'-GGCCATCGTTGAAGATGCCTCTGC-3';下游引物 5'-AATCCATTACCATCCTTTCCCTCG-3'。PCR 反应程序:94℃ 5 min;94℃ 50 s,58℃ (*bar* 基因)或 60℃ 50 s (*DREB2A* 基因),72℃ 1 min 15 s,40 个循环,72℃ 10 min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 载体构建

载体的目的基因 *DREB2A* 和标记基因 *bar* 都由 35S 启动子启动,其 T-DNA 结构见图 1。

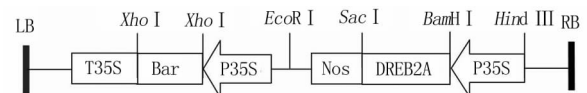
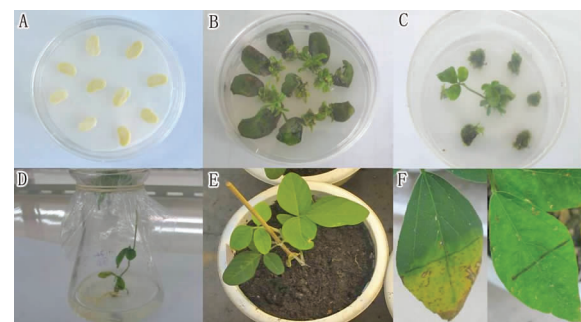


图 1 植物表达载体 pCambia3300-DREB2A 的结构示意图

Fig. 1 Binary vector pCambia3300-DREB2A

### 2.2 不同大豆品种子叶节遗传转化

对 Willimas 82 和 Bert 大豆子叶节遗传转化效果进行比较,统计抗性外植体数和抗性再生植株。2 650 个 Willimas 82 浸染外植体和 1 910 个 Bert 浸染外植分别获得抗性外植体 1 300 和 920 个,抗性再生植株分别为 28 和 63 株。转化过程如图 2。结果表明,无论是抗性外植体数,还是抗性再生植株,Bert 都优于 Willimas 82,Bert 和 Willimas 82 初转化效率分别为 3.2% 和 0.8%。大豆品种 Bert 更适合 *DREB2A* 基因的子叶节遗传转化。

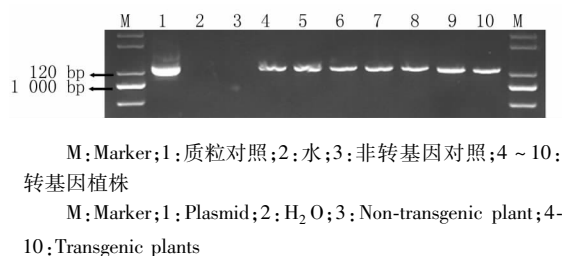


A: 共培养; B: 芽诱导; C: 芽伸长; D: 生根; E: 移栽; F: PPT 抗性筛选  
A: Co-culture; B: Shoot induction; C: Elongation; D: Rooting; E: Potting; F: PPT selection

图 2 大豆子叶节遗传转化过程

Fig. 2 Genetic transformation of soybean mediated with *Agrobacterium* by employing cotyledon nodes as explants

对抗性大豆植株及对照进行 *bar* 基因和 *DREB2A* 基因 PCR 检测,除对照植株以外,其他转基因大豆均扩增特异条带,如图 3 (*DREB2A* 基因)和图 4 (*bar* 基因)所示,初步证明 *DREB2A* 基因已整合到大豆中。

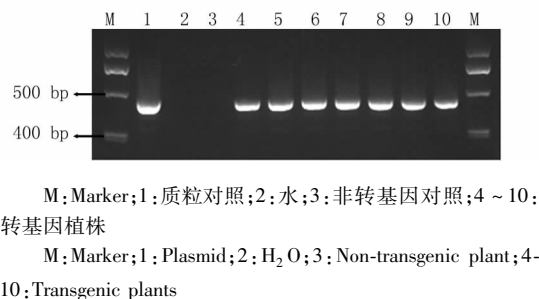


M: Marker; 1: 质粒对照; 2: 水; 3: 非转基因对照; 4~10: 转基因植株

M: Marker; 1: Plasmid; 2: H<sub>2</sub>O; 3: Non-transgenic plant; 4-10: Transgenic plants

图3 DREB2A 转基因植株 PCR

Fig. 3 PCR of transgenic plants for DREB2A



M: Marker; 1: 质粒对照; 2: 水; 3: 非转基因对照; 4~10: 转基因植株

M: Marker; 1: Plasmid; 2: H<sub>2</sub>O; 3: Non-transgenic plant; 4-10: Transgenic plants

图4 转基因植株 bar 基因 PCR

Fig. 4 PCR of transgenic plants for bar gene

### 3 讨论

影响大豆转化效率的重要因素之一是大豆基因型<sup>[8]</sup>,不同大豆品种的转化效率相差很大。Hinchee等<sup>[9]</sup>选择了100多个大豆基因型,研究其对农杆菌的易感性,结果表明,对农杆菌反应较为敏感只有基因型‘Peking’。Donaldson等<sup>[10]</sup>对12个大豆品种进行了遗传转化,结果获得了遗传稳定的转基因植株只有品种‘Accolibri’。造成这一现象的原因是多方面的,其中一个原因就是不同大豆基因型对组培再生的反应程度存在明显差异,并最终影响转化细胞的再生率。研究表明,大豆再生率在一定程度上表现为基因型特异性,不同基因型之间再生频率存在显著差异<sup>[11]</sup>。本研究所用的2个易于转化的大豆品种Willimas 82和Bert,在其他条件都相同的情况下,转化效率相差2.4%。

植物的抗逆性,如干旱、盐碱和低温等,往往是多个基因相互作用的结果<sup>[12-13]</sup>。DREB转录因子可以调控多个与失水胁迫有关基因的表达,因此,要提高植物的抗逆性,选择一些关键的转录因子将更有可能获得抗逆性强的转基因植株。近年来,利用农杆菌介导和基因枪等转化方法,成功将DREB类转录因子转入拟南芥、水稻等模式植物和玉米、小麦等作物中,显著提高了作物对低温、干旱和高盐的耐受性。周森平等<sup>[14]</sup>将从拟南芥克隆出的DREB2A基因导入小麦,获得了PCR阳性植株。曾会明等<sup>[15]</sup>将转录因子DREB2A转入烟草,经过抗生素卡那霉素抗性筛选-PCR鉴定-Southern杂交检测,表明目的基因已经整合到烟草基因组DNA中。刘艳芝等<sup>[16]</sup>将耐逆相关基因DREB2A导入苜蓿,获得了PCR阳性植株。本研究将逆境诱导转录因子DREB2A基因转入大豆,有望选育出抗逆性较强的转基因大豆新材料。

### 参考文献

- [1] Flowers T J. Improving crop salt tolerance[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55: 307-319.
- [2] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [3] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 923-926.
- [4] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 126-134 (Liu H K, Wei Z M. Research advances in genetic transformation of soybean[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 126-134.)
- [5] Cho H J, Widholm J M. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the legume *Astragalus sinicus* using kanamycin resistance selection and green fluorescent protein expression[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2002, 69: 251-258.
- [6] 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]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002. (Wang G L, Fang H Q. Plant gene engineering[M]. 2nd ed. Beijing: Science Press, 2002.)
- [8] Bailey M A, Boerma H R, Parrott W A. Genotype effects on proliferative embryogenesis and plant regeneration of soybean [J]. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 1993, 29: 102-108.
- [9] Hinchee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 915-922.
- [10] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean [J]. Plant Cell Reports, 2000, 19: 478-484.
- [11] Dan Y, Reichert N A. Soybean transformation and regeneration methods; US Patents, 5968830[P]. 1999-10-19.
- [12] Ramanjulu S, Dorothea B, Hans H K. Overexpression of a stress-inducible aldehyde dehydrogenase gene from *Arabidopsis thaliana* in transgenic plants improves stress tolerance[J]. The Plant Journal, 2003, 35: 452-464.
- [13] 余光辉, 李玲, 曾福华. 水分胁迫的基因表达和信号转导[J]. 亚热带植物科学, 2002, 31(1): 57-62. (Yu G H, Li L, Zeng F H. Gene expression and signal transduction under water stress[J]. Subtropical Plant Science, 2002, 31(1): 57-62.)
- [14] 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. (Zhou M P, Yu G H, Sun X B, et al. Co-transferring of AaDREB2A gene and bar gene into wheat through microprojectile bombardment[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2009, 25(6): 1224-1228.)
- [15] 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. (Zeng H M, Ma T J, Wang H F, et al. Expression vector constructing of transcription factor gene DREB2A and its transformed tobacco growing analysis [J]. Biotechnology Bulletin, 2006(2): 72-77.)
- [16] 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. (Liu Y Z, Wei Z Y, Xing S C, et al. Studies on transformation of alfalfa with stress related transcriptional factor DREB2A[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2007, 32(6): 27-29, 49.)