

苜蓿 *MsDREB1* 基因的诱导表达增强大豆的耐盐性

李大红, 蒋炳伸, 邬海燕, 李鸿雁

(黄淮学院 生物与食品工程学院, 河南 驻马店 463000)

摘要: 基因转录调节是植物对非生物胁迫适应机制的一个重要方面, 转录调节因子在胁迫信号转导途径中调节下游基因的表达, 在建立植物对胁迫适应性过程中起到重要作用。DREB 是功能多样的转录调节因子蛋白家族, 家族成员在植物响应非生物胁迫方面扮演着重要角色。本研究以苜蓿 *MsDREB1* 基因为目的基因, 分别把 *MsDREB1* 克隆到 35S 启动子与 rd29A 启动子之后, 并把两种载体用农杆菌介导转入大豆基因组中, 通过 Southern 检测转基因植株。15 d龄的幼苗在 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫条件下, 用 RT-PCR 分析基因不同时间的表达差异; 并测定叶绿素、丙二醛、H₂O₂、SOD、相对根长及相对地上部分长度。结果表明: 转 *MsDREB1* 基因在两种启动子驱动下均有一定耐盐能力, 但存在差异。在非胁迫下 35S 启动子调控的 *MsDREB1* 为超量表达, 而 rd29A 启动子调控 *MsDREB1* 表达量较低; 在盐胁迫下, rd29A;*MsDREB1* 表达量高于 35S;*MsDREB1* 的表达量; *MsDREB1* 超量表达抑制植株正常生长。*MsDREB1* 诱导表达耐盐性效果更明显, 其植株脯氨酸含量、SOD 活性均显著高于 *MsDREB1* 超量表达, 而 H₂O₂ 和 MDA 含量则显著低于 *MsDREB1* 超量表达。结果说明 *MsDREB1* 作为转录调节因子参与了植物的渗透调节, 对植物的耐盐性具有贡献。该试验研究两种启动子调控的转 *MsDREB1* 基因大豆耐盐效果, 为 *MsDREB1* 基因在大豆耐盐基因工程中的应用提供参考。

关键词: 大豆; *MsDREB1*; rd29A 启动子; 耐盐性

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2017.01.0017

MsDREB1 Overexpression Improves Tolerance to Salt Stress in Transgenic *Glycine max* L.

LI Da-hong, JIANG Bing-shen, WU Hai-yan, LI Hong-yan

(College of Biology and Food Engineering, Huanghuai University, Zhumadian 463000, China)

Abstract: Transcriptional regulation is one of the important factors in plant adaption to abiotic stress. Transcription factors play a critical role in regulating downstream genes expression in stress signaling pathway and the plant acclimation to adverse environments. Among transcription factors involved in abiotic stress response, DREB represents a large protein family which displays diverse roles in various biological processes. In this study, *MsDREB1* was cloned into the 35S promoter and the rd29A promoter. The two vectors were transferred into soybean genome by *Agrobacterium* mediated. The transgenic plants were detected by Southern blot. Difference in gene expression of 15- day-old seedlings under 200 mmol·L⁻¹ NaCl stress conditions was analyzed by RT-PCR in different time, and the content of chlorophyll, MDA content, SOD, H₂O₂, relative root length and relative length of the above-ground parts of plants were determined. The results showed that there were significant differences in the regulation of *MsDREB1* expression between the two promoters. *MsDREB1* gene was overexpressed under the regulation of CaMV-35S promoter, but the expression was lower under the regulation of rd29A promoter under non stress. Under salt stress, the expression level of rd29A;*MsDREB1* was higher than that of 35S;*MsDREB1*. Overexpression of *MsDREB1* inhibited the normal growth of plant. Both of the two transgenic lines had a certain ability to salt tolerance, but there were some differences. The effect of salt resistance of rd29A; *MsDREB1* was more obvious. The chlorophyll content, proline content, SOD activity of rd29A;*MsDREB1* were significantly higher than those of 35S; *MsDREB1*, while H₂O₂ and MDA content were significantly lower than that of 35S;*MsDREB1* overexpression. Therefore, *MsDREB1* functioned as a transcript regulator contributing to osmotic regulation in soybean plant under NaCl stress.

Keywords: Soybean; *MsDREB1*; rd29A promoter; Salt tolerance

据统计, 目前约 2% 的世界耕地受盐的影响, 旱地和灌溉农业受盐影响达 20%^[1]。非生物胁迫 (如干旱、高盐和低温) 是降低植物生长和产量的主要环境因素, 有时能造成 50% 以上的减产^[2]。大豆是世界上主要的油料作物, 它是世界上最大的植物油和蛋白质饲料来源。盐胁迫使大豆的生长和发育明显减缓, 产量下降^[3]。在大豆生产中实践中, 盐胁迫导致产量减少可高达 50%^[4]。因此, 探寻能够缓解或改善盐对大豆的影响的方法至关重要。在与传统育种和标记辅助选择程序的比较中, 通过基因

收稿日期: 2016-11-30
基金项目: 河南省科技发展计划 (112300410042)。
第一作者简介: 李大红 (1969-), 男, 博士, 副教授, 主要从事植物逆境生理研究工作。E-mail: lidahong27@163.com。
通讯作者: 蒋炳伸 (1975-), 女, 博士, 副教授, 主要从事植物生态学研究。E-mail: 574618863@qq.com。

工程直接引入一个基因来提高大豆的非生物胁迫耐受性是一个更有效和快速的方法。

DREB 转录因子属于 AP2/EREBP 类转录因子,DREB 转录因子可以通过与 DRE/CRT 顺式作用元件特异结合激活大量下游基因表达,使植物较好应对逆境胁迫的危害。Liu 等通过试验验证在 35S: DREB 转基因拟南芥中有 12 个基因的表达量较对照增加至少一倍^[5]。这些基因产物都可能在植物抗逆中发挥作用。因此可将 *DREB* 基因作为植物抗逆基因工程的一个工具,综合改善植物抗逆性。大量转基因试验证明了这一设想。例如,在拟南芥中过表达酵母 *DREB* 基因或 *OsDREB1A* 基因,提高了转基因植株的抗冻和抗旱能力^[5-6];在烟草中过表达 *OjDREB* 或 *AhDREB1* 基因提高了转基因植株的抗旱及耐盐能力^[7-8];在西红柿中过表达 *AtCBF1*^[9] 基因提高了转基因植株的抗冻能力。大量试验表明转化一个 *DREB* 基因因子与转化其它单一基因如脯氨酸合成酶基因、甜菜碱合成酶基因相比能收到更好的抗逆效果且往往可以改善植株对几种逆境胁迫的耐受力。

在 CaMV35S 启动子控制下(花椰菜花叶病毒),转基因拟南芥过表达 *AtDREB1D* 具有较强的耐旱、耐冻性^[10]。基因植株的 Northern 分析表明,在正常和冷胁迫下,*AtDREB1D* mRNA 水平平均比野生型(WT)植物大很多,这表明 *AtDREB1D* 对拟南芥植物适应干旱胁迫信号转导中有重要作用^[10]。然而,在正常生长条件下,*AtDREB1D* 结构性过表达造成植物严重生长迟缓。同时,人们发现组成型启动子 35S 启动子驱动 *DREB* 基因过表达往往会导致转基因植株矮化现象的发生^[6,11]。为避免这一不利因素,Kasuga 等^[12-13] 利用 rd29A 启动子替代 35S 启动子驱动 *DREB* 基因在拟南芥和烟草中表达,有效地解决了植株矮化的问题。也有人认为这样做没有必要,因为最近在水稻中组成型过表达 *CBF3* 和 *ABF3* 基因,既提高了转基因水稻的抗旱、耐盐能力,又没有发现转基因植株任何矮化或表型异常现象^[14]。其中的原因还需进一步研究。近年来,过表达葡萄 *VrCBF1* 和 *VrCBF4* 基因表现出降低株高和不利于生长的现象,虽然这些转基因株系转入的目的基因表达量很高,过表达的转基因株系耐冷性增加^[15]。为了克服这些对植物生长的负面影响,由诱导表达的转基因植物显得特别重要,其只有在胁迫条件下才是高度表达。有研究报道,使用不同的启动子如脱落酸或非生物胁迫诱导的启动子^[16-18]去诱导水稻、烟草的 *DREB* 基因使花生、大豆和小麦的耐逆性提高^[13,19-21]。因此,这些基因可能用于提高

作物抗逆性的研究与应用。

本试验将 *MsDREB1* 转录因子转入大豆基因组,通过 rd29A 诱导型启动子和 35S 组成型启动子驱动 *MsDREB1* 基因表达,用浓度 200 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 处理来研究转基因植物耐盐性,对其进行生理和基因表达测定,试图通过分析由不同启动子 rd29A、(CaMV) 35S 调控的 *MsDREB1* 转基因大豆耐盐性,获得应用价值较高的耐盐性转基因大豆,为 *MsDREB1* 在大豆耐盐基因工程中的应用提供应用参考。

1 材料与方法

1.1 材料

所用大豆材料中黄 13 由驻马店市农科院提供,使用 Cl₂ 消毒 16 h,并在 B₅ 培养基中无菌培养。

1.2 质粒构建与转化

根据 GenBank 中拟南芥 rd29A 启动子序列(D13044)设计引物 P1 和 P2(表 1)。以拟南芥基因组 DNA 为模板,采用特异引物 P1 和 P2,进行 PCR 扩增反应,扩增所得片段连接到 T 载体上。测序后,与 GenBank 序列进行同源性比对。将载有目的基因 rd29A 启动子序列的 T 载体和表达载体 pCambia1301 分别用限制性核酸内切酶 *Bam*H I, *Kpn* I 双酶切,0.8% 琼脂糖电泳检测酶切结果。使用 DNA 回收试剂盒回收目的片段和载体片段,1.0% 琼脂糖电泳检测回收效果,把目的片段与载体以 3:1 的比例在缓冲液中,用连接酶 4℃ 过夜。转化后用 PCR 与酶切检测质粒。同理,以苜蓿基因组为模板,用 P3 和 P4 作为引物,克隆 *MsDREB1* 基因(EU233782)。把该目的基因插入到 35S 启动子和新合成的 rd29A 启动子之后(图 1)。用冻融法把两种载体分别转入农杆菌中。

1.3 转基因大豆扩繁

采用农杆菌介导的子叶节转化法转化大豆^[22]。利用潮霉素进行转基因植株筛选。抗性植株经练苗后转土移栽。大豆种植在黄淮学院试验基地,按常规水肥病虫害管理。

1.4 转基因大豆 Southern 和定量表达分析

1.4.1 Southern blot 检测 参照 Murray 和 Thompson^[23] 的 CTAB 法提取大豆基因组 DNA。*MsDREB1* 基因分析以 P3、P4 为引物(表 1),大豆基因组 DNA 为模板,复性温度为 55℃。基因组 DNA 用 *Eco*R I 内切酶 37℃ 酶解后以地高辛随机标记 *MsDREB1* 基因全长作为探针、化学发光信号的 Southern 杂交检测技术参考萨姆布鲁克等^[24] 方法及罗氏地高辛说明书(DIG DNA Labeling and Detection Kit, Roche, 德国)进行。

表 1 引物序列
Table 1 Primer sequences

名称 Name	引物序列 Primer sequence(5'-3')
rd29A (F) -P1	CGGATCCGCCATAGATGCAATTCAATCAAAC
rd29A (R) -P2	GGGTACCCCAAAGATTTTTTCTTTTCCAATAGAAG
MsDREB1 (F) -P3	CGGTACCACACCATTTTCCACTCTATCC
MsDREB1 (R) -P4	GCTGCAGTTCCTATTCTACGATCCAAA
RT-qPCR MsDREB1 (F) -P5	CCCTTTGACGCATCATCACC
RT-qPCR MsDREB1 (R) -P6	TTCCTCCCTGCTCGCTTCTT
RT-qPCR ACTIN2 (F) -P7	TGATGCTGTGACTCACACTGTACC
RT-qPCR ACTIN2 (R) -P8	GGACAATGGATGGGCCAGACTC

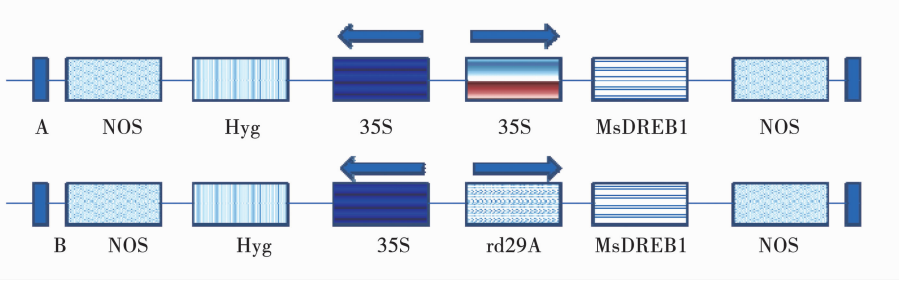


图 1 重组表达载体结构简图

Fig. 1 Construction of transgenic plant expression vector

1.4.2 转基因 *MsDREB1* mRNA RT-qPCR 分析检测 对扩繁后 PCR 与 Southern blot 显示阳性植株 (处理后) 作外源基因表达量分析。以 T₂ 代纯合体 4 个转基因株系 (rd- 1/rd- 2、35S- 1/35S-2) 及对照苗叶片为检测材料,每个株系检测 3 株苗。用 Trizol 试剂 (Invitrogen 公司) 提取转基因大豆的叶样品 RNA。用紫外分光光度计测定 260 nm / 280 nm, 计算 RNA 的浓度。参照 SMART cDNA synthesis Kit 说明书合成 cDNA 第一链。qPCR 在 ABI 7300 实时检测系统进行检测。使用试剂为 Power Sybr Green PCR 试剂 (ABI)。用 P5、P6 和 P7、P8 (表 1) 荧光定量 PCR 引物。反应体系参考文献进行^[25]。各反应均 3 次重复,采用相同条件。基因拷贝数的定量方法采用双标准曲线法^[25]。

1.4 转基因大豆耐盐性分析

选取转基因及对照种子,26℃ 萌发,水培至“两叶一心”时期,转移入 200 mmol·L⁻¹ NaCl 处理 6, 12, 24 h 后用清水洗净植株,提取 RNA 并通过反转录反应获得 cDNA。qRT-PCR 测定基因的表达量。

将小苗转移到水培营养液中继续培养约 7 d。将转基因和野生型大豆分成 2 组。一组在新鲜的水培营养液中继续培养,另一组则在含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 的水培营养液中进行盐胁迫处理。3 d 后,分别记录两组大豆在盐处理前后的地上部分和根的长度 (相对长度 = 处理后的长度 - 处理前的长

度),并测定其在盐胁迫下相关生理变化。脯氨酸含量的测定采用茚三酮法,叶绿素含量的测定用分光光度法;过氧化氢 (H₂O₂) 含量测定采用二甲酚橙法,MDA 含量测定采用硫代巴比妥酸法,具体均参照文献进行^[26]。每组试验每个株系 8 株。

转基因大豆离体叶片耐盐能力检测,取 14 d 龄大豆幼苗,用大豆同一部位叶片,放于含有 200 mmol·L⁻¹ NaCl 溶液的培养皿中,使用 Parafilm 封口膜密封后,连续光照培养 5 d 后,观察叶片颜色变化并拍照。每个群体测定 15 株苗,重复 3 次。

1.5 数据分析

使用 Excel 2013 及 SPSS 17.0 进行数据统计分析。

2 结果与分析

2.1 转基因植株分子检测

通过子叶节转化再生途径获得了大量转基因植株。分别以 rd-29 基因和 35S 启动子驱动 *MsDREB* 基因,用特异引物对再生苗进行 PCR 检测 (数据未显示),对检测阳性的植株分别选择 2 株进行 Southern blot 检测,以 *MsDREB1* 基因 (EU233782) 的全长作为探针,该基因为 651 bp。对 rd-1、rd-3、35S-1 和 35S-2 这 4 个 T₂ 代转基因纯合株系进行 Southern 杂交验证,4 个转基因纯合株系均有 1 个拷贝的 *MsDREB1* 基因整合到大豆基因组中 (图 2)。

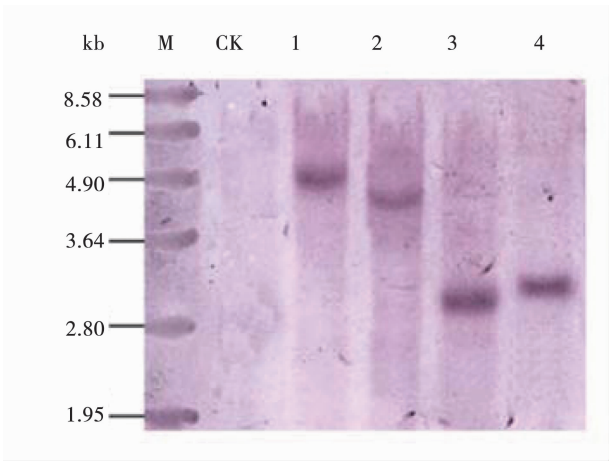


图2 大豆转 *MsDREB1* 基因 Southern 杂交分析
Fig.2 Southern blot analysis from transgenic lines with expression *MsDREB1* genes in soybean

2.2 转基因各株系 *MsDREB1* 表达量分析

为比较启动子调控目的基因效果,在不同程度的盐胁迫下,对4个转基因株系 (rd- 1/ rd- 2、35S- 1/ 35S- 2) PCR 及 Southern blot 阳性 (图2) 苗 Real-time PCR 检测(图3)。转 *MsDREB1* 株系外源基因均能表达,但由于启动子不同,基因表达量存在较大差异。未经胁迫诱导,35S 启动子调控的 *MsDREB1* 为超表达,相对表达量显著高于 rd29A 启动子调控的 *MsDREB1* 表达量。经不同浓度盐胁迫处理后,*MsDREB1* 表达量均增加,但 rd29A 启动子调控的 *MsDREB1* 表达量增加明显高于 35S 启动子调控表达量。由此表明,rd29A 诱导启动子比 35S 组

成型启动子更有利于在盐胁迫下调控基因表达。

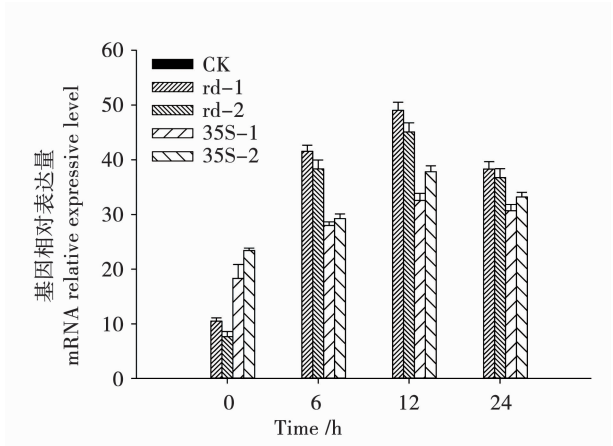
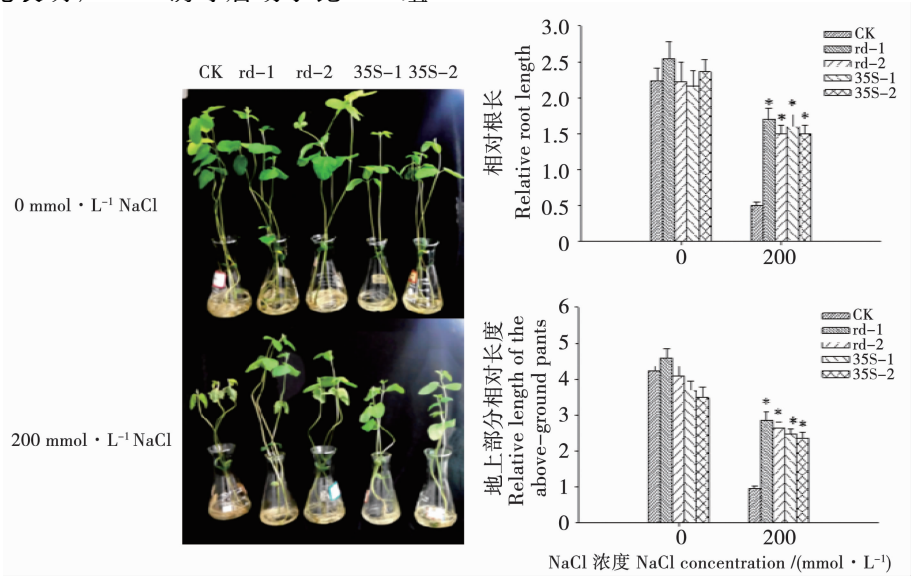


图3 转基因大豆各株系 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫处理下不同时间 *MsDREB1* 表达变化

Fig.3 Change of *MsDREB1* genes expression in wild type (WT), 35S-, rd- lines under salt stress treatment

2.3 不同启动子转基因大豆耐盐性差异分析

选取 PCR 阳性植株,经盐胁迫处理。rd29A 启动子调控的转基因大豆长势明显好于 35S,主要表现在生根较快,地上部分生长迅速(图4)。推测 CaMV-35S 调控的外源基因持续超量表达抑制植株生长,与 Chen 等^[27]在大豆中研究结果相似^[27]。转录因子在组成型强启动子驱动下异源超表达,即使在正常生长条件下,也会启动基因表达。这种错误基因表达常造成转基因植株在正常生长条件下株型变异和植株矮小^[8]。



* 表示相同处理条件下不同转基因株系与对照差异显著 ($P < 0.05$)。下同。
* indicate the significant difference at 0.05 level of transgenic plant with wild type in the same condition. The same below.

图4 转基因植物与对照在盐胁迫条件下表型、相对根长和地上部分相对长度比较
Fig.4 Comparison on the phenotype, relative root length and relative length of the above-ground of transgenic plants and its wild type under salt stress

为了比较大豆转基因植株和野生型植株的耐盐性,15 日龄的转基因植物盆栽经盐胁迫处理 3 d 后,测定转基因大豆各株系叶绿素、丙二醛、过氧化氢、脯氨酸(图 5)、根相对长度以及地上部分相对长度(图 4)。结果表明,各株系与对照差异显著。盐胁迫处理条件下,*MsDREB1* 的诱导表达使植株膜脂过氧化程度与过氧化氢低于 *MsDREB1* 超量表达,

而叶绿素含量、脯氨酸含量、根相对长度及植株地上部分相对长度高于 *MsDREB1* 超量表达。这些结果表明 *MsDREB1* 过表达导致转基因植物的耐盐性提高。相比于野生型对照,*MsDREB1* 的诱导表达更有利于转基因大豆耐盐性提高,并不影响植株正常生长。

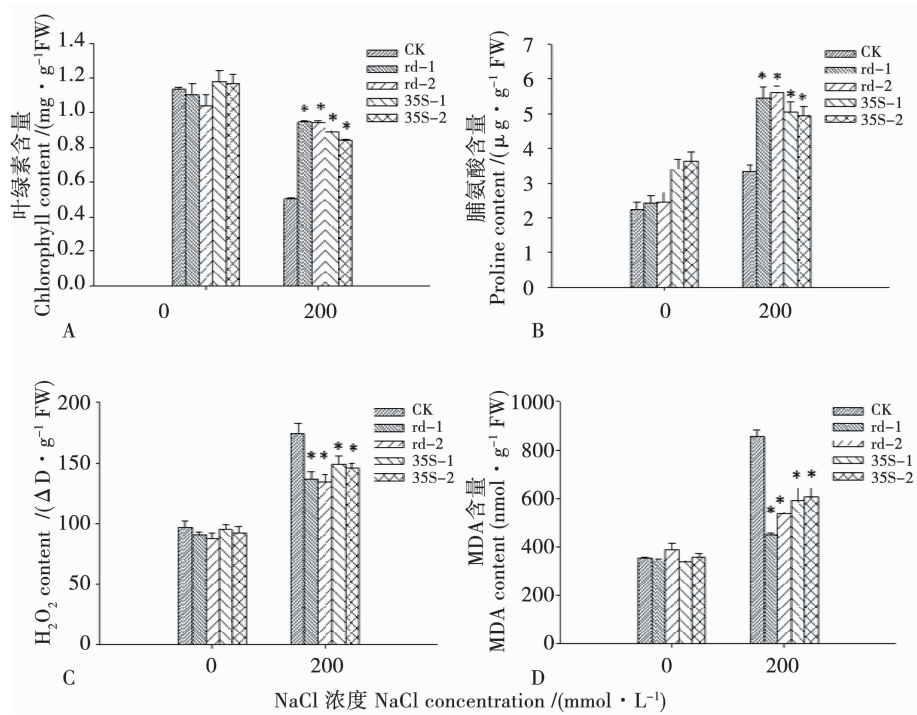


图 5 盐胁迫处理 3 d 后转基因大豆苗叶绿素含量、脯氨酸、H₂O₂ 及丙二醛含量变化

Fig. 5 Changes of the chlorophyll content, proline, H₂O₂ and malondialdehyde content in seedlings of transgenic soybean in salt stress treatment for 3 days

在 25℃ 连续光照条件下,用 0 mmol · L⁻¹ NaCl 处理野生型和转基因大豆叶片 5 d,转基因大豆和野生型大豆叶片的叶绿素含量无明显变化,且基本相同。当用 200 mmol · L⁻¹ NaCl 处理 5 d 后,野生型大

豆叶片出现失绿现象而转基因大豆叶片仅出现部分黄化现象。转基因大豆叶片的叶绿素含量显著高于野生型(图 6)。

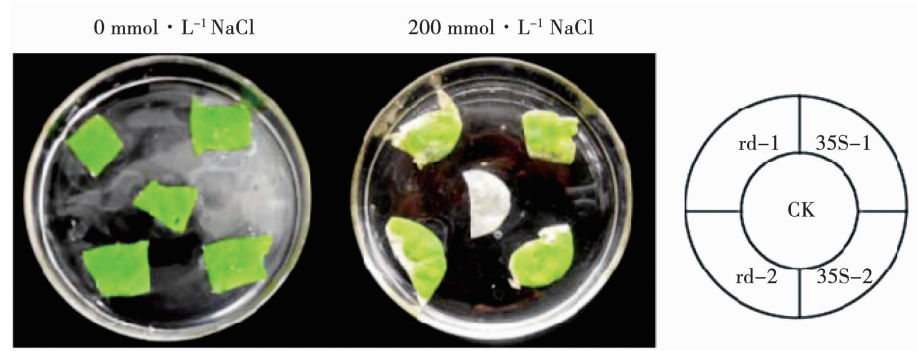


图 6 NaCl 胁迫下对大豆叶片失绿状况的影响

Fig. 6 Effects of NaCl stress on the leaf disc bleaching in soybean leaves

3 讨论

DREB1 类基因在转基因植株内的过量表达或诱导表达,能够相应地提高植物对低温、高盐和干

旱等环境胁迫的耐受能力^[28-30]。在早期的研究认为,*DREB1* 的表达主要被低温诱导,而不被干旱和盐胁迫诱导,*DREB2* 主要被干旱和盐胁迫诱导而不被低温诱导^[31]。近年来越来越多的研究指出,

DREB 家族的基因在不同物种中发挥的功能具有一定差异,往往参与多个逆境因子的响应,即 *DREB1* 基因并不局限于被低温诱导,可能同时与干旱和盐胁迫相关;而 *DREB2* 基因也可能与低温相关。本研究把 *MsDREB1* 基因分别用 rd-29A 和 35S 启动子驱动,转入大豆基因组中,结果发现,*MsDREB1* 强烈地受盐胁迫诱导。同样的结果在蒺藜状苜蓿^[32]、海榄雌^[33]、桐花树^[34]等植物的 *CBF/DREB1* 基因的相关研究中发现。

在干旱、高盐、低温条件下,植物会积累大量的游离脯氨酸等物质来对抗外界环境胁迫^[35-37]。植物在盐胁迫下能产生超氧阴离子,它是生物体内氧化代谢产生的具有毒性的自由基之一,它能转变为羟基自由基进一步损伤细胞。SOD 处于抵御活性氧伤害细胞的第一道防线,它能催化超氧阴离子歧化生成毒性较小的 H₂O₂,H₂O₂ 进一步被其它相关酶转化为对细胞无害的水和氧气。本试验中,转基因植株抗氧化相关酶活性(SOD)、游离脯氨酸含量显著高于对照植株,转基因植株中的 H₂O₂ 浓度显著低于对照(图 5)。表明在盐胁迫下,转基因大豆维持较好的生长状况(图 4)和较高叶绿素含量(图 4,图 6)得益于不断增加的抗氧化剂量和不断降低的活性氧水平。这些结果说明在转 *MsDREB1* 基因大豆可促进 SOD 和游离脯氨酸的积累,以提高其抵御逆境的能力。

脂质过氧化反应常用来检测 ROS 损伤程度,MDA 是脂质过氧化产物,因而 MDA 含量高低反映了植株遭受 ROS 损伤的程度大小。本研究表明,转基因植株 MDA 含量显著低于对照,显示转基因植株遭受 ROS 损伤的程度要显著小于对照植株。

但是,在植物中,外源基因的表达受多种因素的影响,而启动子起着决定性的作用。转基因植物使用组成型启动子(CaMV)35S 启动子驱动的下游靶基因的表达,常导致靶基因在植物器官以及各个发育阶段的持续表达,植物生命中能量消耗巨大,影响植物的正常代谢,从而使转基因植物生长缓慢,植株矮小,主要农艺性状及产量下降等。刘强等^[38]研究结果表明,在组成型启动子 CaMV35S 调控 *DREB1A*,转基因拟南芥出现阻碍生长、发育延缓等不良特性。有研究者提出采用逆境诱导型启动子如 rd29A 启动子去驱动 *DREB* 基因表达,可有效降低上述由 *DREB* 基因持续过表达导致的对植物不良影响^[11,17,35-36]。本研究中,*MsDREB1* 基因过表达的组成型 CaMV35S 启动子表达和胁迫诱导型启动子的 rd29A 诱导型表达。两个独立的 T2 纯系被选择为进一步的分子和生理分析。15 日龄的 35S:*MsDREB1* 和 rd29A:*MsDREB1* 转基因植物被进行 200 mmol·L⁻¹ NaCl 胁迫试验。35S 启动子的转基因植物 *MsDREB1* 的表达在正常状态类似。而 rd29A:*MsDREB1* 显示在正常条件下表达较低,随着盐胁迫

浓度增加,*MsDREB1* 表达量增加 4.3 倍(图 3)。有人用 rd29A 启动子驱动 GUS 在烟草中在干旱或盐胁迫下超量表达而在非胁迫下表达较弱^[39]。同样的研究还在 rd29A-IPT 引入烟草中在胁迫下叶片叶绿素的保留时间明显增加^[40]。在研究转基因马铃薯植株时,rd29A 启动子驱动 *AtCDPK1* 基因表达的转基因马铃薯各个株系中 *AtCDPK1* 基因表达量明显增强,而在无胁迫的条件下,植株中 *AtCDPK1* 基因基本不表达;同时发现 35S 控制 *AtCDPK1* 转基因植株在 PEG 胁迫前后,基因转录未见明显差异^[41]。本研究结果与这些研究一致。在本研究中还发现 rd29A:*MsDREB1* 转基因植物在非胁迫条件下表达仍然有部分的表达,这可能主要是由于叶片中内源 ABA 的存在。当植物在盐胁迫条件下,植物体内 ABA 积累较高可能导致更强的诱导基因的启动子的影响下游 rd29A。如许多研究表明在干旱胁迫下,植物地上部和根系 ABA 积累比正常条件下多^[42-43]。

4 结 论

本研究中,转 *MsDREB1* 基因大豆显著增加植物的耐盐能力,且转基因株系 rd-n 在生长和盐的耐受性均优于 35S-n。因此,rd29A 启动子和调控基因 *MsDREB1* 基因的使用,可以有效提高大豆的耐盐性,为大豆遗传育种提供新途径,rd29A 启动子与 *MsDREB1* 可共同应用于植物耐盐性研究。

参考文献

- [1] Zhou L, Wang C, Liu R, et al. Constitutive overexpression of soybean plasma membrane intrinsic protein GmPIP1;6 confers salt tolerance[J]. BMC Plant Biology, 2014, 14(1):1-13.
- [2] Boyer J S. Plant productivity and environment[J]. Science, 1982, 218(4571):443-448.
- [3] Maas E V, Hoffman G J. Crop salt tolerance current assessment[J]. Journal of the Irrigation and Drainage Division, 1977, 103(2):115-134.
- [4] Pathan M S, Lee J D, Shannon J G, et al. Recent advances in breeding for drought and salt stress tolerance in soybean[M]//Advances in molecular breeding toward drought and salt tolerant crops. Springer Netherlands, 2007: 739-773.
- [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]. Plant Cell, 1998, 10: 1391-1406.
- [6] Srivasta A, Mehta S, Lindlof A, et al. Over-represented promoter motifs in abiotic stress-induced *DREB* genes of rice and sorghum and their probable role in regulation of gene expression[J]. Plant Signaling & Behavior, 2010, 5(7):775-784.
- [7] Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. *OsDREB* genes in rice, *Oryza sativa* L., encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression[J]. Plant Journal, 2003, 33:751-763.
- [8] Cong L I, Guo M Y, Han L B. Overexpression of *OjDREB* gene increases tolerance to salt in transgenic tobacco[J]. Acta Tabacaria

- Sinica, 2012(4):72-76.
- [9] Shen Y G, Zhang W K, Yan D Q, et al. Characterization of a DRE-binding transcription factor from a halophyte *Atriplex hortensis* [J]. Theoretical Applied Genetics, 2003, 107: 155-161.
- [10] Oh S J, Song S I, Kim Y S, et al. *Arabidopsis* CBF3/DREB1A and ABF3 in transgenic rice increased tolerance to abiotic stress without stunting growth [J]. Plant Physiology, 2005, 138: 341-351.
- [11] Hsieh T H, Lee J T, Chang Y Y, et al. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 618-626.
- [12] Ito Y, Katsura K, Maruyama K, et al. Functional analysis of rice DREB1/CBF-type transcription factors involved in cold-responsive gene expression in transgenic rice [J]. Plant Cell Physiology, 2006, 47: 141-153.
- [13] 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: 287-291.
- [14] Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, et al. Stressed-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions [J]. Genome, 2004, 47: 493-500.
- [15] Haake V, Cook D, Riechmann J L, et al. Transcription factor CBF4 is a regulator of drought adaptation in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2002, 130(2):639-648.
- [16] Siddiqua M, Nassuth A. Vitis CBF1 and Vitis CBF4 differ in their effect on *Arabidopsis* abiotic stress tolerance, development and gene expression [J]. Plant Cell Environment, 2011, 34: 1345-1359.
- [17] Lyu Z Y, Zhao C M, Xue Y G. Cloning and expression analysis of grape's stress inducible promoter [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica. 2016, 31(1): 77-82.
- [18] Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, et al. A combination of the *Arabidopsis* DREB1A gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer [J]. Plant Cell Physiology, 2004, 45(3):346-350.
- [19] Fu D L, Huang B R, Xiao Y M, et al. Overexpression of barley hva1 gene in creeping bentgrass for improving drought tolerance [J]. Plant Cell Report, 2007, 26(4):467-477.
- [20] Chen J Q, Meng X P, Zhang Y, et al. Over-expression of *OsDREB* genes lead to enhanced drought tolerance in rice [J]. Biotechnology Letters, 2008, 30(12):2191-2198.
- [21] Bhatnagar-Mathur P, Devi M J, Vadez V, et al. Differential antioxidative responses in transgenic peanut bear no relationship to their superior transpiration efficiency under drought stress [J]. Journal of Plant Physiology, 2009, 166(11):1207-1217.
- [22] Westgate M E, Peterson C M. Flower and pod development in water-deficient soybeans (*Glycine max* L. Merr) [J]. Journal of Experimental Botany, 1993, 44(258):109-117.
- [23] Murray G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acids Research, 1980, 8: 4321-4325.
- [24] Sombrook J, Russell D W. Molecular cloning a laboratory manual [M]. Huang P T, Translated. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002, 487-513.
- [25] Li D H, Liu H, Yang Y L, et al. Down-regulated expression of *RACK1* gene by RNA interference enhances drought tolerance in rice [J]. Rice Science, 2009, 16(1):14-20.
- [26] Gao J F. Experimental instruction of plant physiology [M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 211 - 213, 217.
- [27] Chen M, Xu Z S, Ma Y Z. Cold-induced modulation and functional analyses of the DRE-binding transcription factor gene, *Gm-DREB3*, in soybean (*Glycine max* L.) [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(1): 121-135.
- [28] Mallikarjuna G, Mallikarjuna K, Reddy M K, et al. Expression of OsDREB2A transcription factor confers enhanced dehydration and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Biotechnology Letters, 2011, 33(8):1689-1697.
- [29] Zandkarimi H, Ebadi A, Salami S A, et al. Analyzing the expression profile of, AREB/ABF, and DREB/CBF, genes under drought and salinity stresses in grape (*Vitis vinifera* L.) [J]. Plos One, 2015, 10(7): e0134288.
- [30] Zhou M L, Ma J T, Pang J F, et al. Regulation of plant stress response by dehydration responsive element binding (DREB) transcription factors [J]. African Journal of Biotechnology, 2010, 9(54):9255-9269.
- [31] Li Z, Wurtzel E T. The ltk gene family encodes novel receptor-like kinases with temporal expression in developing maize endosperm [J]. Plant Molecular Biology 1998, 37: 749-761.
- [32] Li D F, Zhang Y Q, Hu X N, et al. Transcriptional profiling of *Medicago truncatula* under salt stress identified a novel CBF transcription factor MtCBF4 that plays an important role in abiotic stress responses [J]. BMC Plant Biology, 2011, 11(1):1-19.
- [33] Peng Y L, Wang Y S, Cheng H, et al. Characterization and expression analysis of three CBF/DREB1 transcriptional factor genes from mangrove *Avicennia marina* [J]. Aquatic Toxicology, 2013, 141:68-76.
- [34] Peng Y L, Wang Y S, Cheng H, et al. Characterization and expression analysis of a gene encoding CBF/DREB1 transcription factor from mangrove *Aegiceras corniculatum* [J]. Ecotoxicology, 2015, 24(7):1-11.
- [35] Zhu J K. Salt and drought stress signal transduction in plants [J]. Annual Review of Plant Biology, 2002, 53(53):247-273.
- [36] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought, and salt stress [J]. The Plant Cell, 2002, 14(S 1): 165-183.
- [37] Krasensky J, Jonak C. Drought, salt and temperature stress-induced metabolic rearrangements and regulatory networks [J]. Journal of Experimental Botany, 2012, 63(4): 1593-1608.
- [38] 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(8): 1391-1406.
- [39] Tao Y, Wang Y G, Li H J, et al. Upstream Messengers of abscisic acid signaling pathway in plant [J]. Journal of Nuclear Agricultural Sciences, 2016(9):9.
- [40] Li X L, Yang C P, Qu M, et al. Study on cloning of rd29A promoter and enhancing stress tolerance of tobacco [J]. Molecular Plant Breeding, 2007, 5(1): 37-42.
- [41] Qiu W, Liu M, Qiao G, et al. An isopentyl transferase gene driven by the stress-inducible rd29a promoter improves salinity stress tolerance in transgenic tobacco [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2012, 30(3): 1-10.
- [42] Nie L Z, Yu X X, Li G J, et al. Study on transgenic potato contained *AtCDPK1* gene driven by Rd29A Promoter [J]. China Biotechnology, 2015, 35(11):13-22.
- [43] Zhao P, Li M, Ji Z F, et al. Counter-measures of drought physiology response in plant [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2016, 32(15):86-92.