

抗逆相关基因 *GmAREB* 转基因小麦的获得与鉴定

陈红敏^{1,2,3}, 陈明², 魏安智¹, 徐兆师², 李连城², 徐惠君², 杜丽璞², 马有志²

(¹西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌 712100; ²中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物遗传改良与育种重点开放实验室, 北京 100081; ³河南省濮阳市种子管理站, 濮阳 457000)

摘要: 从大豆中克隆一个抗逆相关的 bZIP 类转录因子基因 *GmAREB*, 功能分析表明: *GmAREB* 基因的过表达可以显著提高转基因拟南芥和烟草的抗旱、耐盐和耐寒性。为了获得抗逆转基因小麦, 本研究利用玉米的 Ubiquitin 启动子控制 *GmAREB* 基因表达, 构建了用于小麦转化的载体 pSK-*GmAREB*。采用基因枪共转化法转化小麦品种郑 147 和济麦 22。通过 PCR 检测共获得 T₀ 代的阳性植株 70 株, 转化率为 1.37%。其中, 郑 147 阳性植株共 31 株, 转化率为 2.14%; 济麦 22 阳性植株 39 株, 转化率为 1.08%。目前, 已经获得 T₁ 代转基因株系 18 个, 其中以郑 147 为受体的株系 4 个, 以济麦 22 为受体的株系 14 个。对部分株系进行 Southern blotting 分析, 进一步证实 *GmAREB* 基因已经整合到小麦基因组中。在低温胁迫条件下, 3 个以济麦 22 为受体的转基因株系体内脯氨酸的积累与受体小麦相比有显著增加, 初步证明在小麦中过表达 *GmAREB* 基因, 可以促进渗透调节物质脯氨酸的积累, 可能有助于转基因小麦抗逆性的提高。本研究为进一步筛选抗逆转基因小麦新材料奠定了基础。

关键词: 小麦; 基因枪法转化; 转录因子; *GmAREB* 基因; 脯氨酸

Molecular and Functional Analysis of Transgenic Wheat Transformed with Stress-related Gene *GmAREB*

CHEN Hong-min^{1,2,3}, CHEN Ming², WEI An-zhi¹, XU Zhao-shi²,

LI Lian-cheng², XU Hui-jun², DU Li-pu², MA You-zhi²

(¹ College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100; ² National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement/ Key Laboratory of Crop Genetics and Breeding of Ministry of Agriculture/Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; ³ Seed Management Station Puyang City, Puyang 457000)

Abstract: We isolated stress-related bZIP transcription factor gene, *GmAREB* from soybean previously. The functional analysis indicated that overexpression of *GmAREB* can significantly improve the stress resistance of transgenic plants. In this study, *GmAREB* was inserted in downstream of maize Ubiquitin promoter to construct vector, pSK-*GmAREB* for wheat transformation. The vectors were transformed into wheat varieties Zheng 147 and Jimai 22 by using biolistic method. After transformation, 70 T₀ transgenic plants were identified using PCR and the transformational efficiency was 1.37%. Among transgenic plants, 31 plants came from host Zheng 147 and the transformational efficiency was 2.14%. 39 plants came from host Jimai 22 and the transformational efficiency was 1.08%. At present, 18 T₁ generation of transgenic line had been identified, and 4 and 14 transgenic plants came from Zheng 147 and Jimai 22, respectively. The southern blot proved that *GmAREB* was inserted into wheat genome. The stress-tolerance analysis showed that under low temperature stress condition, proline accumulation in three transgenic plants host in Jimai 22 were higher than that of wild type wheat plants, which suggested that overexpression of *GmAREB* increased accumulation of proline in transgenic wheat. This higher level of proline content might be contributed for stress-tolerance of transgenic wheat plants. We hope that our study can pave the way for selecting stress-tolerance transgenic wheat lines in the future.

Key words: Wheat; Biolistic; Transcription factor; *GmAREB* gene; Proline

收稿日期: 2010-04-26 修回日期: 2010-09-08

基金项目: 国家高技术研究发展计划 (863 计划) 项目 (2008AA10Z124); 国家自然科学基金项目 (30700508)

作者简介: 陈红敏, 硕士, 研究方向为生物技术。E-mail: hm-chen88@163.com

通讯作者: 陈明, 博士, 副研究员, 研究方向为分子生物学。E-mail: chenming@mail.caas.net.cn

碱性亮氨酸拉链(bZIP)类转录因子蛋白是真核生物中分布最广泛、最保守的一类蛋白。bZIP类转录因子的共同特点是:含有与特异DNA序列相结合的碱性结构域;参与寡聚化作用的亮氨酸拉链区与碱性区紧密相连;转录因子的N-末端含有酸性激活区;以二聚体的形式结合DNA,肽链的碱性区与DNA直接结合^[1]。根据植物中bZIP转录因子的结构差异,bZIP转录因子被分为A、B、C、D、E、F、G、H、I和S共10个亚族^[2]。研究发现,植物中的bZIP蛋白不仅参与种子贮藏基因的表达、光形态的发生以及器官建成的控制^[3-4],而且参与植物对ABA(脱落酸)、逆境胁迫、光和发育中各种信号的反应^[5]。Choi等^[6]首次克隆到了拟南芥的ABF/AREB bZIP类转录因子,其成员分别为:ABF1、ABF2/AREB1、ABF3、ABF4/AREB2。其中,ABF1主要参与低温、ABA应答反应,ABF3主要参与ABA、高盐、低温、热、氧化胁迫应答反应,ABF2/AREB1、ABF4/AREB2主要参与ABA、干旱、高盐、热、氧化胁迫应答反应^[7]。此外,在其他植物中也发现了功能类似的AREB bZIP类转录因子,如烟草的TAF-1^[8]、水稻的OsBZ8^[9]、TRAB1^[10]、玉米的ABP9^[11]、大麦的HvABI5和HvVP1等^[12]。

干旱、盐碱等非生物逆境是影响植物生长发育和作物产量的重要限制因子之一。小麦是我国第二大粮食作物,在国民经济中有非常重要的地位。由于农作物的干旱、盐碱等胁迫耐性大多属于数量性状,采用常规育种技术改良作物的抗逆性周期较长。通过发现重要的抗逆基因,并利用转基因技术转化小麦,将为小麦品种的抗逆性改良提供新的有效途径。

利用基因工程技术导入抗逆相关的功能基因,提高作物的抗逆性已有许多成功的例子,如利用大麦的LEA蛋白基因HVA1提高了转基因水稻的耐旱性^[13];转甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因提高了转基因小麦的耐盐碱胁迫能力^[14];利用甘露醇1-磷酸脱氢酶(mltD)基因转化拟南芥增强了拟南芥的耐盐性^[15]。转小麦果聚糖合成酶基因6-SF7烟草植株表现出较强的抗旱、耐盐和耐低温能力^[16]。

近年来,转录因子在提高植物抗逆性方面取得了重大进展,发现通过增强一些关键调节因子的作用可使植物的抗逆性得到综合改良^[17-18]。Chen等^[9]在拟南芥和烟草过表达大豆*GmDREB2*基因中研究,发现在干旱胁迫下转基因植株体内的游离脯氨酸含量比野生型拟南芥和烟草显著提高,增强了

转基因植株的抗旱、耐盐和耐低温能力。鲁燕等^[20]把来自普通小麦地方品种小白麦的ERF类转录因子*W6*基因,通过农杆菌介导法将其转入烟草新华1号,*W6*基因的过表达提高了转基因烟草的耐盐性。

本研究前期工作从耐盐大豆品种铁丰八号中克隆到一个新的抗逆相关的bZIP类转录因子基因*GmAREB*。基因功能分析证明:转*GmAREB*基因拟南芥和烟草增强了对干旱、盐、低温及氧化胁迫耐性。本试验采用基因枪共转化法将*GmAREB*基因转化高代小麦材料郑147、大面积推广小麦品种济麦22,分子鉴定证明*GmAREB*基因已经整合到小麦基因组中,转基因小麦的渗透调节物质脯氨酸含量比受体小麦明显提高。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

转基因受体为山东省农科院提供的小麦品种济麦22和河南省农科院提供的高代材料郑州147。质粒*GmAREB*、载体质粒pKS、pAHC25、pAHC20均由本实验室保存。pAHC25是含*bar*基因的中间载体。此载体含有*gus*基因,目的基因*GmAREB*可以取代*gus*基因,构建成pAHC25-*GmAREB*。

胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒购自TaKaRa公司,DNA快速提取试剂盒购自TianGen公司,各种内切酶购自Promega公司,引物由北京奥科生物技术公司合成。

1.2 外植体和靶材料

取授粉后14d左右的幼胚为外植体,接种于SD2培养基,24℃培养箱中诱导愈伤,培养7d左右的愈伤组织经高渗处理后基因枪轰击。

1.3 基因枪法共转化

基因枪法遗传转化参照徐惠君等^[21]方法。将质粒PSK-*GmAREB*和pAHC20按1:1体积充分混合,包裹在直径1.0 μm金粉微粒上,用BIO-RAD公司的PDS-1000/He基因枪进行轰击,轰击后的愈伤组织在原渗透压培养基上处理16~18h。然后转移到SD2培养基,黑暗条件(26℃)恢复培养2周。

1.4 转化体筛选和植株再生

恢复培养14d的愈伤组织进行分化和2次筛选,第1次分化筛选培养基为1/2MS附加5mg/L玉米素+2mg/L Bailaphos,26℃光照培养28d,第2次筛选培养基为1/2MS附加4mg/L Bailaphos,26℃光照培养28d。经过筛选的转基因小苗移入1/2MS附加

0.2mg/L IAA + 0.5mg/L MET 的壮苗培养基, 26℃ 光照培养 30 ~ 40d。

1.5 转基因小麦植株的分子检测

GmAREB 引物的设计: 5-TAATGTTACTGGCAC-TACTCTG-3 和 5-CAACTCCAATCAACCCTC-3。PCR 检测体系及程序: 按下列组成加入反应液: 10 × PCR buffer, 2.5 μl; dNTP (2.5mm), 2.0 μl; Primer-F (10 μm), 1.0 μl; Primer-R (10 μm), 1.0 μl; rTaq (5U/μl), 0.2 μl; 模板 (DNA), 1.0 μl; ddH₂O 补至 25 μl。扩增程序为: 94℃ 10min, 35 × (94℃ 1min, 54℃ 45s, 72℃ 1min), 72℃ 10min, 16℃ 保存。PCR 反应产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上 90 ~ 120 V 电压电泳检测。

1.6 转基因小麦 T₁ 代的 RT-PCR 检测

取三叶期的小麦叶片, 提取总 RNA。取 2 g 总 RNA, Olig (dT) 为引物, M-MLV 反转录酶进行反转录, 反转录体系为 25 μl, 反转录过程参照 Promega 公司 M-MLV 反转录酶说明书。以小麦肌动蛋白 B-Actin 为内参照基因, 设计内参引物, 其上游引物: 5-CTCCCTCACAACAACCGC-3; 下游引物: 5-TACCAGGAAGTCCATACCAAC-3。扩增 *GmAREB* 基因的引物同 1.5。取 1 μl 的反转录产物 cDNA 进行 PCR 扩增, 反应体系为 25 μl, 其循环扩增程序为: 94℃ 预变性 5min; 94℃ 1min, 58℃ 1min, 72℃ 1min, 30 个循环; 72℃ 10min; 16℃ 保存; 目的基因循环扩增程序同 1.5 扩增程序。取相同量的 PCR 产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上 90 ~ 120V 电压电泳检测。

1.7 转基因小麦 T₁ 代的 Southern blotting

基因组 DNA 35ng 经 *Hind* III 酶切, 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后, 转至尼龙膜上 (Hybond2N+, Amersham), 采用碱变性法吸印。根据 *GmAREB* 基因序列设计扩增基因片段作为探针, 探针长度为 815bp, 用 α-³²P-dCTP 标记探针进行杂交。

1.8 脯氨酸含量的测定

脯氨酸含量的测定参照 Zhang 等^[22] 方法。于 2009 年 10 月 5 日大田播种, 11 月中下旬日最低气温均在 0℃ 以下, 最低气温 -9℃。12 月 4 日取样, 磺基水杨酸提取植物样品时, 脯氨酸便游离于磺基水杨酸的溶液中, 然后用酸性茚三酮加热处理后, 溶液即成红色, 再用甲苯处理, 则色素全部转移至甲苯中, 色素的深浅即表示脯氨酸含量的高低。在 520nm 波长下比色, 从标准曲线上查出 (或用回归方程计算) 脯氨酸的含量。

2 结果与分析

2.1 转基因表达载体的构建

设计引物从大豆 cDNA 中扩增出 *GmAREB* 基因, 该基因片段一端为 *Sma*I 酶切位点, 另一端为 *Sac*I 酶切位点。利用限制内切酶 *Sma*I 和 *Sac*I 酶切中间载体质粒 pAHC25, 回收载体片段 7.8kb; 将载体质粒 pAHC25 片段和 *Sma*I、*Sac*I 酶切扩增的 *GmAREB* 基因片段连接, 构建了中间载体 pAHC25-*GmAREB* (图 1), 目的基因上游为 *Ubiquitin* 启动子; 用 *Hind* III 分别酶切载体 pKS 和中间载体 pAHC25-*GmAREB*, 将切下的带有启动子、*GmAREB* 和终止子的片断与 pKS 连接, 构建了用于小麦转化的表达载体 pKS-*GmAREB* (图 2)。

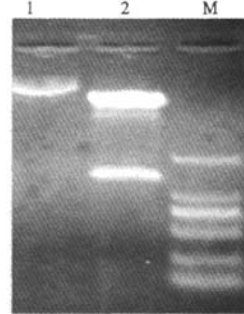


图 1 pAHC25-*GmAREB* 重组质粒酶切分析

Fig.1 Restriction digestion analysis of recombinant plasmid

1: 重组质粒; 2: 重组质粒 pAHC25-*GmAREB* *Sma* I, *Sac* I 酶切; M: DL2000
1: Recombinant plasmid; 2: Recombinant plasmid pAHC25-*GmAREB* digested by *Sma* I, *Sac* I; M: DL2000

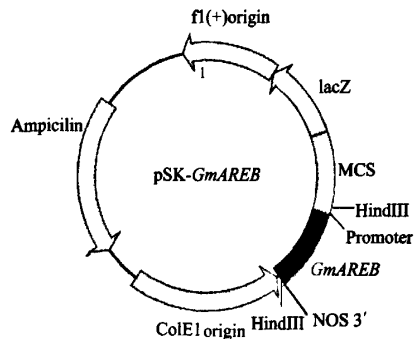


图 2 用于小麦转化的表达载体

Fig.2 Structure of expression vector for wheat transformation

2.2 转 *GmAREB* 基因植株的获得

以郑州 147、济麦 22 为受体, 基因枪轰击小麦幼胚的愈伤组织, 经筛选培养基筛选, 待愈伤组织分

化出绿芽以后,转入无激素培养基(1/2 MS + Bi-alaphos 3mg/L)上,当再生植株伸长到1~2cm时,移入壮苗培养基(1/2MS + IAA 15mg/L)上壮苗,在15~18℃、相对湿度70%,光照18h的可控温室

缓苗后,再生植株伸长到7~8cm时,将根系发达的转化苗移栽到花盆(图3),共移栽509株。在可控温室生长发育,三叶期每株取叶片提取基因组DNA,进行T₀代植株的PCR鉴定。

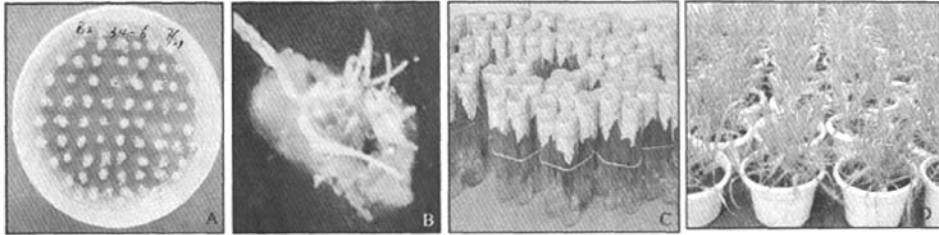


图3 转基因植株的筛选再生及移栽

Fig. 3 Selection, regeneration and transplantation of transgenic plants

A: 筛选培养基上的再生抗性苗; B: 愈伤组织的分化; C: 再生苗在试管中生根培养; D: 再生苗的移栽成株

A: Resistant callus on selective medium; B: Differentiation of embryogenic callus;

C: Regeneration of resistant callus; D: Transplantation of transgenic plants

2.3 转基因小麦 T₀代的 PCR 检测

以郑州 147 为转化受体,共轰击 1800 个幼胚,获得再生植株 133 株,移栽成活 107 株。以济麦 22 为转化受体,共轰击 5085 个幼胚,获得 272 株再生植株,移栽成活 193 株。对成活再生植株进行分子

检测,通过检测共获得 T₀代的阳性转基因植株 70 株,转化率为 1.37%,阳性率为 23.3%。其中郑州 147 阳性植株共 31 株,转化率为 2.14%,阳性率为 29.0%;济麦 22 阳性植株 39 株,转化率为 1.08%,阳性率为 20.2% (图 4,表 1)。

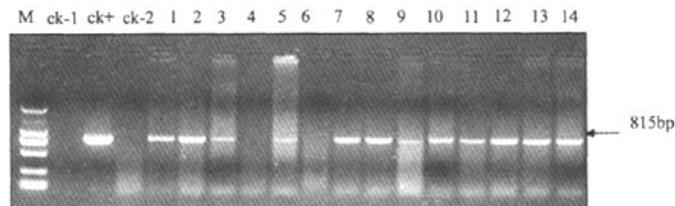


图4 部分 T₀代植株的 PCR 检测

Fig. 4 PCR identification of some T₀ regenerated plants

M: DL2000; CK+: *GmAREB* 质粒; CK-1: 未转基因植株; CK-2: 水; 1~14: T₀代转 *GmAREB* 基因植株

M: DL2000; CK+: *GmAREB* plasmid (positive control); CK-1: wild type plant;

CK-2: H₂O; 1~14: T₀*GmAREB* transgenic plants

表1 小麦幼胚愈伤组织基因枪轰击结果

Table 1 Transformation result of wheat cellus tissue

受体 Material	轰击胚数 Embryos bombarded	移栽数 Plants transformed	检测数 Plants detected	PCR 阳性植株 PCR positive plants	PCR 阳性率(%) PCR positive efficiency	转化率(%) Transformation rate
郑 147	1800	133	107	31	29.0	2.14
济麦 22	5085	272	193	39	20.2	1.08
总计 Total	6885	405	300	70	23.3	1.37

转化率 = PCR 阳性植株 / (检测数 / 移栽数) / 轰击胚数 × 100%; PCR 阳性率 = (PCR 阳性植株 / 检测数) × 100%

Transformation efficiency = (PCR positive plants / Embryos bombarded) / (Plants detected / Plants transformed) × 100%; PCR positive efficiency = (PCR positive plants / Plants detected) × 100%

对 T₁代转基因株系进行检测,已获得 17 个株系。其中来自郑州 147 的转基因株系 3 个,来自济麦 22 的转基因株系 14 个。

2.4 转基因植株 RT-PCR 分析

挑选受体为济麦 22 的 5 个 T₁代转基因株系,利用 *GmAREB* 的特异引物进行 RT-PCR 鉴定,检测

GmAREB 在转基因小麦中的表达。结果表明:*GmAREB* 基因在转基因小麦中都有一定量的表达。其中,1824、1823、1815 株系的表达量较高,1817 和 1821 株系的表达量较低;而对照中没有发现 *GmAREB* 基因的表达。这表明 *GmAREB* 基因在转基因小麦中可以表达(图 5、图 6)。

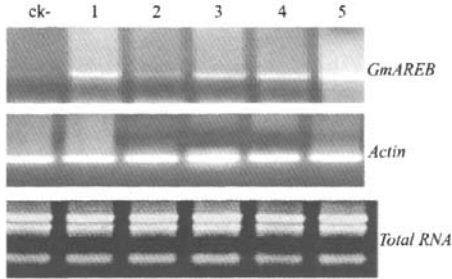


图 5 转基因小麦中 *GmAREB* 基因的表达

Fig.5 The expression of *GmAREB* gene in transgenic wheat

CK-:受体济麦 22;1~5:1815、1817、1821、1823、1824 株系
CK-:Jimai 22; lane 1:1815 line; lane 2:1817 line;
lane 3:1821 line; lane 4:1823 line; lane 5:1824 line

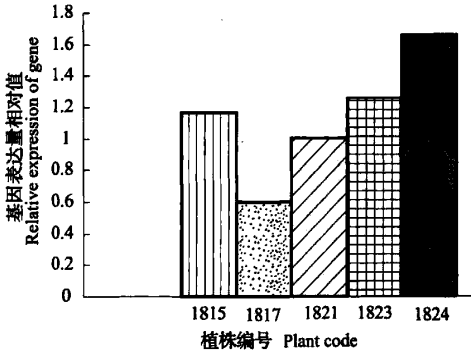


图 6 转基因小麦中 *GmAREB* 基因的相对表达量

Fig.6 Relative expression of transgenic *GmAREB* wheat

2.5 转基因植株的 Southern blotting 分析

为了进一步证实 PCR 检测结果及功能基因是否已经整合到小麦基因组中,选取 PCR 与 RT-PCR 呈阳性的 4 个植株,1813、1814、1816、1817 株系进行 Southern blotting 分析。结果显示,PCR 检测呈阳性的株系 Southern blotting 均表现阳性,而阴性对照无杂交信号(图 7),进一步证实功能基因已整合到小麦基因组中。在表达载体中,*GmAREB* 的启动子前和终止子后各有 1 个 *Hind* III 位点(图 2),因此, Southern blotting 结果显示杂交带分子量大小一致,证明 *GmAREB* 已经整合到小麦基因组中。鉴定转基因小麦的准确拷贝数需要选择其他酶进一步鉴定。

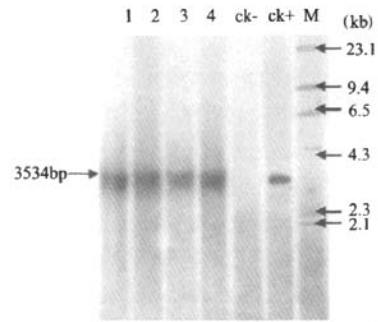


图 7 T₁转基因植株的 Southern 杂交结果

Fig. 7 Southern blotting analysis of T₁ transgenic plants

1~4:转基因植株;CK-:济麦 22(阴性对照)用 *Hind* III 酶切小麦 DNA,酶切后的 DNA 经转膜后与 *GmAREB* 的 DNA 探针杂交;CK+:*GmAREB* 质粒(阳性对照);

M:*Hind* III 酶切 λDNA 分子标准

1~4: Transgenic plants;

CK-: Negative control, (Jimai 22) Plants DNA were cut using *Hind* III, then cut DNA were transformed on member and hybridized with *GmAREB* probes;CK+: *GmAREB* transformed vector (positive control); M: λDNA/*Hind* III marker

2.6 转基因植株各株系脯氨酸含量分析

在低温、干旱和高盐等非生物胁迫下,许多植物体内游离脯氨酸含量增加^[23]。由于脯氨酸亲水性极强,能稳定原生质胶体及组织内的代谢过程,具有防止细胞脱水的作用。图 8 显示,1815、1821、1824 3 个转基因株系的脯氨酸含量相对于受体小麦显著提高,1824、1815、1821 株系脯氨酸含量比对照分别增加 10.7%、4.2%、3.5%。从图 6 显示,在 1824、1815、1821 3 个株系中 *GmAREB* 基因的表达量也较高,这一结果与图 8 显示的脯氨酸含量的测定结果基本一致,证明转基因小麦脯氨酸含量的提高是由于 *GmAREB* 基因的过表达引起的。

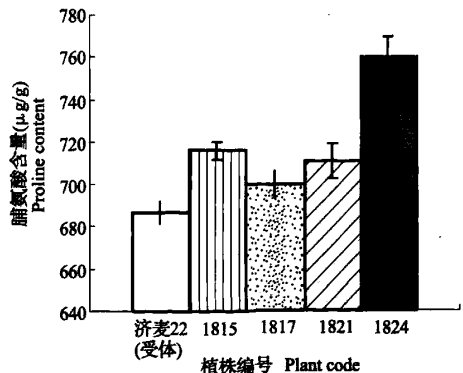


图 8 转基因小麦脯氨酸含量测定结果

Fig. 8 Proline content analysis of transgenic wheat

3 讨论

小麦基因枪转化已发展成小麦最主要的转化方法^[24]。基因枪共转化方法简单易行,目的基因与标记基因在减数分裂过程中分离,使得选择标记基因得以剔除^[25]。本研究利用基因枪共转化法将 *GmAREB* 基因导入普通小麦品种中,转化效率为 1.08% ~ 2.14%, 获得了较多的转基因植株。本文的经验是转化受体要选择再生能力强的品种。此外,在基因枪轰击后没有采取传统的方法在含有抗生素的培养基上筛选,而是用没有加抗生素的培养基再生植株,这种直接再生的方法减弱了筛选压力,增加了再生植株数量,用 PCR 方法检测可以获得更多转化植株,提高了转化效率。

脯氨酸含量的增加是植物对逆境胁迫的一种生理生化反应,首先是细胞结构和功能遭受伤害的反应,这一点已被许多研究证实^[26-27]。另外是植物在逆境下的防护反应,可作为鉴定植物相对抗性的指标。Vendruscolo 等^[28]证明在干旱、高渗等逆境因素条件下,会导致小麦体内脯氨酸浓度的迅速增加,从而增强小麦的抗逆性。与脯氨酸相关的抗寒基因工程技术已有许多报道,如 Kishor 等^[29]将从乌头叶豇豆中克隆的 P5CS 基因与 CaMV 35S 启动子连接后转入烟草中,发现转基因烟草的脯氨酸含量比对照高 10 ~ 18 倍,在抗盐和抗旱性比对照明显提高。Nanjo 等^[30]把脯氨酸脱氢酶(脯氨酸降解关键酶)反义基因 *At-proDH* 的 cDNA 转到拟南芥中,提高了细胞内脯氨酸水平,显著提高了转基因植株对低温和高温的耐受性。Gilmour 等^[31]将 *CBF3* 基因转入拟南芥,发现 *CBF3* 基因的超表达不仅调控下游靶基因(*CRT/DRE* 基因)的表达,还影响到脯氨酸和糖的代谢,寒冷驯化使转 *CBF3* 基因拟南芥中脯氨酸的含量比经过相同寒冷驯化的野生型中的脯氨酸含量高 2 ~ 3 倍。

本研究获得的转 *GmAREB* 基因小麦各株系中的表达量与相应株系的脯氨酸含量变化趋势基本一致,推测可能由于转基因小麦中 *GmAREB* 转录因子的过表达,增强了其下游控制参与脯氨酸合成的基因表达活性,从而提高了转基因小麦中的脯氨酸含量。在逆境胁迫条件下,*GmAREB* 转基因小麦脯氨酸含量的提高对增强转基因小麦的抗逆性有重要作用。本文将进一步证实转基因小麦体内的脯氨酸含量与其抗逆性的关系,并通过基因芯片的分析明确 *GmAREB* 控制的下游靶基因,进一步分析 *GmAREB* 基因的抗逆分子机制,为获得抗逆性转基因小麦奠定基础。

参考文献

- [1] Landschulz W H, Johnson P F, McKnight S L. The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins[J]. *Science*, 1998, 240: 1759-1764
- [2] Riechmann J L, Heard J, Martin G, et al. Arabidopsis Transcription Factors: Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes[J]. *Science*, 2000, 290: 2105-2110
- [3] Finkelstein R R, Lynch T J. The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene *ABI5* Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12: 599-609
- [4] Finkelstein R R, Campala S S, Rock C D. Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings[J]. *The Plant Cell*, 2002, 14 (Supplement): 14-45
- [5] Jakoby M, Weishaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in Arabidopsis[J]. *Trends Plant Science*, 2002, 7: 106-111
- [6] Choi H, Hong J, Kang J, et al. ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors[J]. *The Journal of biological Chemistry*, 2000, 275: 1723-1730
- [7] Uno Y, Furihata T, Abe H, et al. Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences in USA*, 2000, 97: 11632-11637
- [8] Oeda K, Salinas J, Chua N H. A tobacco bZip transcription activator (TAF-1) binds to a G-box-like motif conserved in plant genes[J]. *EMBO*, 1991, 10(7): 1793-1802
- [9] Nakagawa H, Ohmiya K, Hattori T. A rice bZIP protein, designated OSBZB, is rapidly induced by abscisic acid[J]. *Plant*, 1996, 9: 217-227
- [10] Hobo T, Asada M, Koyama Y, et al. A bZIP factor, TRABI, interacts with VPI and mediates abscisic acid-induced transcription[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences in USA*, 1999, 26: 15348-15353
- [11] 王磊,赵军,范云六. 玉米 *Car1* 基因顺式元件 ABRE2 结合蛋白 ABP9 的基因克隆及功能分析[J]. *科学通报*, 2002, 15: 1167-1171
- [12] Casaretto J, Ho T H. The transcription factors *HvABIS* and *HvVPI* are required for the abscisic acid induction of gene expression in Barley Aleurone cells[J]. *The Plant Cell*, 2003, 15 (1): 271-284
- [13] Xu D, Duan X, Wang B, et al. Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, *HVA1*, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice[J]. *Plant Physiology*, 1996, 10: 249-257
- [14] Guo B H, Zhang Y M, Li H J, et al. Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH)[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2000, 42(3): 279-283
- [15] Thomas J C, Sepahi M, Arendall B, et al. Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in Arabidopsis thaliana[J]. *Plant Cell Environ*, 1995, 18: 801-810
- [16] 高翔,余茂云,殷桂香,等. 小麦果聚糖合成酶基因 *6-SFT* 克隆和功能验证[J]. *科技导报*, 2009, 27(2): 70-75
- [17] Fooled M R, Zhang L P, Lin G Y. Identification and validation of QTLs for tolerance during vegetative growth in tomato by selective genotyping[J]. *Genome*, 2001, 44(3): 444-454
- [18] 刘宝业,张增艳,梁国鲁. 作物抗病基因工程研究进展. *植物遗传资源学报*, 2008, 9(2): 253-257
- [19] 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: 299-305

(下转第 759 页)

差。可在其对应的区段开发相应的基因标记,为大豆倒伏性 QTL 的精细定位奠定了基础。

参考文献

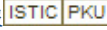
- [1] Andrew H P, Eric S L, John D H, et al. Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms[J]. *Nature*, 1988, 335:721-726
- [2] 黄中文,赵团结,喻德跃,等.大豆抗倒伏性的评价指标及其 QTL 分析. *作物学报*, 2008, 34(4):605-611
- [3] 周蓉,王贤智,陈海峰,等.大豆倒伏性及其相关性状的 QTL 分析. *作物学报*, 2009, 35(1):57-65
- [4] Lander E, Kruglyak L. Genetic dissection of complex traits: Guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics*, 1995, 11:241-247
- [5] Chardon F, Virlon B, Moreau L, et al. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome[J]. *Genetics*, 2004, 168:2169-2185
- [6] Arcade A, Labourdette A, Falque M, et al. Integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes[J]. *Bioinformatics*, 2004, 20:2324-2326
- [7] Darvasi A, Weinreb A, Minke V, et al. Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map[J]. *Genetics*, 1993, 134: 943-951
- [8] Darvasi A, Soller M. A simple method to calculate resolving power and confidence interval of QTL map location[J]. *Behavior Genetics*, 1997, 27(2):125-132
- [9] Song Q J, Marek L F, Shoemaker R C, et al. A new integrated genetic linkage map of the soybean[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 109:122-128.
- [10] Yamanaka N, Ninomiya S, Hoshi M, et al. An informative linkage map of soybean reveals QTLs for flowering time, leaflet morphology and regions of segregation distortion[J]. *DNA Res*, 2001, 8:61-72
- [11] Goffinet B, Gerber S. Quantitative trait loci: A meta-analysis[J]. *Genetics*, 2000, 155:463473
- [12] 王珍,方宜钧.大豆 SSR 遗传图谱构建及重要农艺性状 QTL 分析[D]. 南宁:广西大学, 2004
- [13] Guzman P S, Diers B W, Neece D J, et al. QTL Associated with Yield in Three Backcross-Derived Populations of Soybean[J]. *Crop Sci*, 2007, 47:111-122
- [14] Dandan Li, Pfeiffer T W, Cornelius P L. Soybean QTL for Yield and Yield Components Associated with Glycine soja Alleles[J]. *Crop Sci*, 2008, 48:571-581
- [15] Zhang W K, Wang Y J, Luo C Z, et al. QTL mapping of ten agronomic traits on the soybean (*Glycine max* L. Merr.) genetic map and their association with EST markers[J]. *Theor Appl Genet*, 2004, 108:1131-1139
- [16] Kassem M A, Shultz J, Meksem K, et al. An updated 'Essex' by 'Forrest' linkage map and first composite interval map of QTL underlying six soybean traits[J]. *Theor Appl Genet*, 2006, 113: 1015-1026
- [17] Wang D, Graef G L, Procopiuk A M, et al. Identification of putative QTL that underlie yield in interspecific soybean backcross populations[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 108(3): 458-467
- [18] Lee S H, Bailey M A, Mian R, et al. Molecular markers associated with soybean plant height, lodging, and maturity across locations[J]. *Crop Sci*, 1996, 36(3):728-735
- [19] Orf J H, Chase K, Jarvik T, et al. Genetics of soybean agronomic traits: I. Comparison of three related recombinant inbred[J]. *Crop Sci*, 1999, 39(6):1642-1651
- [20] Chase K, Chung J, Germann M, et al. Soybean Response to Water: A QTL Analysis of Drought Tolerance[J]. *Crop Sci*, 2001, 41:493-509
- [21] Mansur L M, Orf J H, Chase K, et al. Genetic mapping of agronomic traits using recombinant inbred lines of soybean[J]. *Crop Sci*, 1996, 36(5):1327-1336
- [22] Kabelka E A, Diers B W, Fehr W R, et al. Putative Alleles for Increased Yield from Soybean Plant Introduction[J]. *Crop Sci*, 2004, 44:784-791
- [23] Wang D, Graef G L, Procopiuk A M, et al. Identification of putative QTL that underlie yield in interspecific soybean backcross populations[J]. *Theor Appl Genet*, 2003, 108:458-467
- [24] Lee S H, Bailey M A, Mian M A R, et al. Identification of quantitative trait loci for plant height, lodging, and maturity in a soybean population segregating for growth habit[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92:516-523
- [25] Mansur L M, Orf J H, Lark K G. Determining the linkage of quantitative trait loci to RFLP markers using extreme phenotypes of recombinant inbreds of soybean (*Glycine max* L. Merr.)[J]. *Theor appl genet*, 1993, 86: 914-918
- [26] Guo B, Slepner D A, Lu P, et al. QTLs associated with resistance to soybean cyst nematode in soybean; Meta-analysis of QTL location[J]. *Crop Sci*, 2006, 46:595-602
- [27] Bian Y M, Chen S Y, Liu M Y. Effects of HF on proline of some plants[J]. *Plant Physiology Communications*, 1988(6):19-21
- [28] Vendruscolo E C G, Schuster I, Pileggi M, et al. Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2007, 64(10): 1367-1376
- [29] Kishor P B K, Hong Z, Miao G H, et al. Overexpression of Δ^1 -Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases Proline Production and Confers Osmotolerance in Transgenic Plants[J]. *Plant Physiology*, 1995, 108:1387-1394
- [30] Nanjo T, Kobayashi M, Yoshida Y, et al. Antisense suppression of proline degradation improves tolerance to freezing and salinity in *Arabidopsis thaliana*[J]. *FEBS Letters*, 1999, 461:205-210
- [31] Gilmour S J, Sebolt A M, Salazar M P, et al. Overexpression of the *Arabidopsis* CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation[J]. *Plant Physiology*, 2000, 124: 1854-1865
- [20] 鲁燕,徐兆师,张瑞越,等. W6 基因的过表达提高转基因烟草的耐盐性[J]. *作物学报*, 2008, 34(6): 984-990
- [21] 徐惠君,庞俊兰,叶兴闯,等. 基因枪介导法向小麦导入黄花叶病毒复制酶基因的研究[J]. *作物学报*, 2001, 27(6): 688-693
- [22] Zhang D Z, Wang P H, Zhao H X. Determination of the content of free proline in wheat leaves[J]. *Physiology Communications*, 1990, 4: 62-65
- [23] Hare P D, Cress W A, Van Staden J. Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress[J]. *Plant Cell Environ*, 1998, 21: 535-553
- [24] 徐琼芳,李连城,陈孝,等. 基因枪法获得 GNA 转基因小麦植株的研究[J]. *中国农业科学*, 2001, 34(1): 5-8
- [25] 张新梅,徐惠君,杜丽璞,等. 共转化法剔除转基因小麦中的 bar 基因[J]. *作物学报*, 2004, 30(1):26-30
- [26] 汤章诚. 逆境条件下植物 Pro 积累及其可能的意义[J]. *植物生理学通讯*, 1984, 10(1):15-21

(上接第 754 页)

抗逆相关基因GmAREB转基因小麦的获得与鉴定

作者: [陈红敏](#), [陈明](#), [魏安智](#), [徐兆师](#), [李连城](#), [徐惠君](#), [杜丽璞](#), [马有志](#), [CHEN Hong-min](#), [CHEN Ming](#), [WEI An-zhi](#), [XU Zhao-shi](#), [LI Lian-cheng](#), [XU Hui-jun](#), [DU Li-pu](#), [MA You-zhi](#)

作者单位: [陈红敏, CHEN Hong-min\(西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌712100; 中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物遗传改良与育种重点开放实验室, 北京100081; 河南省濮阳市种子管理站, 濮阳457000\)](#), [陈明, 徐兆师, 李连城, 徐惠君, 杜丽璞, 马有志, CHEN Ming, XU Zhao-shi, LI Lian-cheng, XU Hui-jun, DU Li-pu, MA You-zhi\(中国农业科学院作物科学研究所/国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程/农业部作物遗传改良与育种重点开放实验室, 北京, 100081\)](#), [魏安智, WEI An-zhi\(西北农林科技大学林学院, 陕西杨凌, 712100\)](#)

刊名: [植物遗传资源学报](#) 

英文刊名: [JOURNAL OF PLANT GENETIC RESOURCES](#)

年, 卷(期): 2010, 11(6)

参考文献(31条)

1. [Jakoby M;Weisshaar B;Droge-Laser W bZIP transcription factors in Arabidopsis](#)[外文期刊] 2002(3)
2. [Finkelstein R R;Gampala S S;Rock C D Abscisic Acid Signaling in Seeds and Seedlings](#) 2002(Supplement)
3. [Finkelstein R R;Lynch T J The Arabidopsis Abscisic Acid Response Gene ABI5 Encodes a Basic Leucine Zipper Transcription Factor](#)[外文期刊] 2000
4. [刘宝业;张增艳;梁国鲁 作物抗病基因工程研究进展](#)[期刊论文]-[植物遗传资源学报](#) 2008(02)
5. [Fooled M R;Zhang L P;Lin G Y Identification and validation of QTLs for tolerance during vegetative growth in tomato by selective genotyping](#) 2001(03)
6. [高翔;余茂云;殷桂香 小麦果聚糖合成酶基因6-SFT克隆和功能验证](#)[期刊论文]-[科技导报](#) 2009(02)
7. [Landschulz W H;Johnson P F;McKnight S L The leucine zipper:a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins](#) 1998
8. [Gilmour S J;Sebolt A M;Salazar M P Overexpression of the arabidopsis CBF3 transcriptional activator mimics multiple biochemical changes associated with cold acclimation](#)[外文期刊] 2000(4)
9. [Nanjo T;Kobayashi M;Yoshida Y Antisense suppression of praline degradation improves tolerance to freezing and salinity in Arabidopsis thaliana](#)[外文期刊] 1999(3)
10. [Nakagawa H;Ohmiya K;Hattori T A rice bZIP protein, designated OSBZB, is rapidly induced by abscisic acid](#) 1996
11. [Oeda K;Salinas J;Chua N H A tobacco bZip transcription activator\(TAF-1\)binds to a G-box-like motif conserved in plant genes](#) 1991(07)
12. [Uno Y;Furihata T;Abe H Arabidopsis basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions](#)[外文期刊] 2000(21)
13. [Choi H;Hong J;Kang J ABFs, a family of ABA-responsive element binding factors](#) 2000
14. [Riechmann J L;Heard J;Martin G Arabidopsis Transcription Factors:Genome-Wide Comparative Analysis Among Eukaryotes](#)[外文期刊] 2000
15. [Kishor P B K;Hong Z;Miao G H Overexpression of \$\Delta 1\$ Pyrroline-5-Carboxylate Synthetase Increases](#)

16. Vendruscolo E C G;Schuster I;Pileggi M Stress-induced synthesis of proline confers tolerance to water deficit in transgenic wheat[外文期刊] 2007(10)
17. Bian Y M;Chen S Y;Liu M Y Effects of HF on proline of some plants 1988(06)
18. 汤章诚 逆境条件下植物Pro积累及其可能的意义 1984(01)
19. 张新梅;徐惠君;杜丽璞 共转化法剔除转基因小麦中的bar基因[期刊论文]-作物学报 2004(01)
20. 徐琼芳;李连城;陈孝 基因枪法获得GNA转基因小麦植株的研究[期刊论文]-中国农业科学 2001(01)
21. Hare P D;Cress W A;Van Staden J Dissecting the roles of osmolyte accumulation during stress[外文期刊] 1998(6)
22. Zhang D Z;Wang P H;Zhao H X Deteminatinn of the content of free proline in wheat leaves 1990
23. 徐惠君;庞俊兰;叶兴国 基因枪介导法向小麦导入黄花叶病毒复制酶基因的研究[期刊论文]-作物学报 2001(06)
24. 鲁燕;徐兆师;张瑞越 W6基因的过表达提高转基因烟草的耐盐性[期刊论文]-作物学报 2008(06)
25. Chen M;Wang Q Y;Cheng X G;el al GmDREB2, a soybean DBE-binding transcription factor, conferred drought and high-salt tolerance in transgenic plants 2007
26. Thomas J C;Sepahi M;Arendall B Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in Arabidopsis thaliana[外文期刊] 1995(7)
27. Guo B H;Zhang Y M;Li H J Transformation of wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) 2000(03)
28. Xu D;Duan X;Wang B Expression of a late embryogenesis abundant protein gene, HVA1, from barley confers tolerance to water deficit and salt stress in transgenic rice 1996
29. Casaretto J;Ho T H The transcription factors HvABI5 and HvVP1 are require for the abscisic acid induction of gene expression in Barley Aleurone cells[外文期刊] 2003(01)
30. 王磊;赵军;范云六 玉米Call基因顺式元件ABRE2结合蛋白ABP9的基因克隆及功能分析 2002
31. Hobo T;Asada M;Kowyama Y A bZIP factor, TRABI, interacts with VP1 and mediates abseisic acid-induced transcription 1999

本文读者也读过(1条)

1. 刘录祥. 赵林姝. 梁欣欣. 郑企成. 刘强. 王晶. 郭会君. 赵世荣. 陈文华 基因枪法获得逆境诱导转录因子DREB1A转基因小麦的研究[期刊论文]-中国生物工程杂志2003, 23(11)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_zwyczyxb201006015.aspx