

纤毛鹅观草 DREB 类基因 *RcDREB1* 的克隆及其蛋白结合干旱应答元件 DRE 的功能验证

赵艳红¹, 郎明林^{1,2}, 王小龙¹, 温淑敏¹, 刘桂茹¹

(¹河北农业大学农学院, 保定 071000; ²清华大学生命科学学院, 北京 100084)

摘要:以纤毛鹅观草为材料, 通过 RT-PCR 和 RACE 技术, 首次克隆了一个纤毛鹅观草 DREB 类基因的全长 cDNA 序列, 命名为 *RcDREB1*。该基因编码蛋白含有一个保守的 AP2 结构域, 表明该基因是 AP2 大家族的一个新成员。种系发生树分析表明, *RcDREB1* 与小麦 AP2 家族 DREB 类基因高度同源。酵母单杂交试验表明, *RcDREB1* 表达的蛋白具有特异结合干旱应答 DRE 元件的功能; 通过实时定量 PCR 分析发现, 高盐、干旱、重金属镉和低温胁迫均可诱导 *RcDREB1* 表达, 但其对高盐反应较为显著。本研究表明, *RcDREB1* 是 DREB 类转录因子基因, 在介导植物响应逆境信号方面可能发挥着重要生物学功能, 为进一步分析小麦族的进化和转基因应用奠定了基础。

关键词:纤毛鹅观草; DREB; RACE; 种系发生树; 酵母单杂交; 实时定量

Cloning of a DREB-like Gene *RcDREB1* in *Roegneria ciliaris* and Functional Identification of its Protein Binding Specificity to the Dehydration-responsive Element DRE

ZHAO Yan-hong¹, LANG Ming-lin^{1,2}, WANG Xiao-long¹, WEN Shu-min¹, LIU Gui-ru¹

(¹College of Agronomy, Agricultural University of Hebei, Baoding 071000;

²College of Life Science, Tsinghua University, Beijing 100084)

Abstract: In this paper, a full-length cDNA of a DREB-like gene was cloned firstly from *Roegneria ciliaris* through RT-PCR and RACE technologies, and named as *RcDREB1*. *RcDREB1* contained a conserved AP2 domain, suggesting that this gene was a new transcription factor member in the AP2 superfamily. Phylogenetic tree analysis showed that *RcDREB1* shared a high similarity with the DREB-like genes in *Triticum aestivum*. Through yeast one-hybrid experiment, *RcDREB1* was verified to possess an ability to specifically bind the drought-responsive DRE element. Using real-time quantitative PCR, we found that all of the stresses of high salt, drought, heavy metal (CdCl₂), and low temperature could up-regulate *RcDREB1* expression, but only high salt showed more strong induction of *RcDREB1*. These results suggested that *RcDREB1* was a novel DREB type transcription factor gene and might play important roles in mediating the transduction of distinct signaling cues initiated by those of adverse environmental factors. This DREB-like gene could be useful in elucidating the evolution pathway of *Triticeae* and in the application of transgenic wheat breeding.

Key words: *Roegneria ciliaris* (Trin.) Nevski; DREB; RACE; phylogenetic tree; yeast one-hybrid; real-time

干旱、高盐和低温等非生物胁迫是影响植物生长发育的主要限制因子, 是造成我国农业生产减产

的主要因素^[1]。在长期进化过程中, 植物形成了一套严密而复杂的分子机制以减少或避免环境胁迫带

收稿日期: 2013-01-30 修回日期: 2013-03-21 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1212.009.html>

基金项目: 转基因生物新品种培育重大科研专项基金(2009ZX08002-012B); 中国博士后科学基金(20060390479)

第一作者主要从事植物功能基因研究。E-mail: zhaoyanhong0602@126.com

通信作者: 刘桂茹, 主要从事小麦遗传与育种研究。E-mail: nxlgr@163.com

来的危害。研究表明,在逆境条件下,植物能感知、传递逆境胁迫信号,诱导相关功能基因的表达,进而在生理生化水平上作出适应性响应。DREB (dehydration responsive element binding) 类转录因子通过与一些下游逆境诱导基因启动子区域存在的核心序列结合,调控其下游基因表达,增加植物抵御干旱等非生物逆境胁迫的能力^[2-15]。克隆、鉴定和遗传转化植物 DREB 类转录因子基因,调节多个功能基因表达,是提高作物综合抗性的有效途径^[16]。

纤毛鹅观草 (*Roegneria ciliaris* (Trin.) Nevski, 2n = 4X = 28)^[17-18] 是禾本科 (Poaceae) 小麦族 (*Triticeae Dumort*) 鹅观草属 (*Roegneria* C. Koch) 的多年生草本植物。在分布于中国的小麦族植物中,鹅观草属是最大和遗传组成最复杂的一个属。作为小麦野生近缘植物,在长期的自然选择过程中,纤毛鹅观草保留了栽培小麦不具备的许多优良特性,具有丰富的遗传多样性和许多优异基因,是小麦耐湿、高抗赤霉病、黄矮病和条纹花叶病等的重要基因资源^[19-20]。迄今,有关纤毛鹅观草的研究多集中在分类、形态解剖、种质资源的评价与利用及抗赤霉病等方面^[21-22]。本文针对目前有关该种属中重要抗逆功能基因研究尚少的现状,克隆和鉴定了 1 个 DREB 类基因 *RcDREB1*, 为进一步开展小麦族 DREB 类基因的功能演化以及抗病、抗逆转基因研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂

纤毛鹅观草种子收自河北农业大学小麦育种基地。Trizol 裂解液购自天根生物公司, BL21 (DE3) pLysS 菌株购自全式金公司, T 载体、PrimeScript[®] 1st strand cDNA 合成 kit、SMARTer[™] RACE cDNA Amplification Kit 购自 TaKaRa, 引物合成、测序由上海生工完成。酵母菌株 YM4271 株系受赠于清华大学张贵友教授实验室。

1.2 植物材料总 RNA 提取

将鹅观草种子剥皮后用清水冲洗,浸泡,蒸馏水冲洗,滤纸上低温催芽,待苗长至 1~2 cm 播种于含蛭石的花盆中,置于光照培养室。24 °C, 16 h 光照/8 h 黑暗培养。30~35 d 后,将幼苗浸泡于 250 mmol/L NaCl 溶液中,高盐处理 4 h 以诱导相关基因的表达。将处理后的植物材料速冻于液氮中,于 -80 °C 保存或直接进行 RNA 的提取。采用 Trizol 裂解法提取高盐处理材料的总 RNA。

1.3 目的基因保守区 cDNA 片段扩增

根据已报道的相关近缘植物中 DREB 类转录因子保守区序列,设计扩增保守区的简并引物^[23]。正向引物为 AP2a (5'-ARTGGGTRGCTGAGATCCGTG-3', R = A/G), 反向引物为 AP2b (5'-GCGCCATACATTGCCCTTGC-3')。

RT 反应参照 PrimeScript cDNA 第 1 链合成试剂盒说明书进行,以试剂盒提供的 oligo dT 为反转录引物,合成纤毛鹅观草 cDNA 第 1 链。

以纤毛鹅观草 cDNA 第 1 链为模板,进一步用 AP2a/AP2b 引物扩增鹅观草 DREB 基因。

反应体系 20 μL, 含模板 cDNA 1 μL, 正向引物 AP2a/反向引物 AP2b (10 μmol/L/μL) 各 1 μL, 2 μL 10 × PCR Buffer (含 MgCl₂), 1.6 μL dNTP (200 μmol/L), 0.2 μL *Taq* DNA 聚合酶 (1 U), ddH₂O 13.2 uL。PCR 扩增产物连接后测序。

1.4 3'-RACE 扩增

根据已克隆的纤毛鹅观草 DREB 基因部分序列,设计用于扩增基因 3' 端的引物 R3-1 (5'-TGTGGCTTGTTTCATTCC-3') 和 R3-2 (5'-GCAAGGGCAATGTATGGC-3')。扩增 3' 端的锚定引物为 T₇dT₁₈ (5'-ACGACTCACTATAGGGCTTTTTdT18-3') 和 T₇ (5'-ACGACTCATATAGGGCTTTTT-3')。

参照 PrimeScript cDNA 第 1 链合成试剂盒以 T₇ dT₁₈ 引物代替试剂盒中的 oligo dT 反转录合成第 1 链 cDNA, 以此为模板应用 R3-1/T₇, R3-2/T₇ 引物对进行巢式 PCR, 扩增基因的 3' 端序列。扩增产物连接后测序。

1.5 5'-RACE 扩增

以克隆的纤毛鹅观草 DREB 基因 3' 端部分序列为基础,按照 RACE 试剂盒要求设计用于获得基因 5' 端未知序列。嵌套 GSP 反向引物为 R5-F1 (5'-CTTTGGTTGGGATACTTCCAGGGTCTTG-3') 和 R5-F2 (5'-CGCCCATTTGCTCACTTCTGTTTTACCT-3')。扩增时以提取的纤毛鹅观草总 RNA 为模板,用 Clontech RACE 试剂盒提供的 2 种兼并引物 UPM (10x)、NUP (10 μmmol/L) 为上游引物,嵌套 GSP 引物为下游引物。反应体系和 PCR 参数均参照试剂盒提供的说明书进行。

第 2 轮 PCR 扩增后,进行产物与 T 载体连接,测序。

1.6 cDNA 全长及 ORF 框的获得

将测序得到的基因序列用 DNASTar 软件进行序列拼接和分析。在拼接的全序列内,用 Primer 5 软

件设计扩增基因完整开放读码框。所有的引物为 Q-F (5'-TCTCTCTCTTCCTCTTCTCGC-3') 和 Q-R (5'-GAACTCAACGCACAGGACAAC-3')。以 oligo dT 引物反转录获得的第 1 链 cDNA 为模板,用 Q-F/Q-R 引物扩增基因的开放读码框,PCR 扩增产物与 T 载体连接及测序验证,用于以后基因的功能研究。

1.7 基因组 DNA 序列的获得

以纤毛鹅观草叶片为材料,采用 CTAB 法提取基因组 DNA^[24]。以该 DNA 为模板,用 QF/QR 为引物进行 PCR 扩增。产物经琼脂糖检测后,回收目的片段、连接和测序。测序结果进一步与完整的 cDNA 序列开放读码框比对分析。

1.8 种系发生分析

将克隆基因测序结果进行 BLAST 检索(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>),确认 DREB 基因同源序列后。用 MEGA 软件对检索到的小麦 (*Triticum aestivum*)、水稻 (*Oryza sativa*)、玉米 (*Zea mays*)、大麦 (*Hordeum vulgare*)、大豆 (*Glycine max*) 等主要农作物以及模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 的 AP2 基因家族序列进行同源性比较,并绘制系统进化树。

1.9 *RcDREB1* 基因的原核表达载体的构建与表达

依据克隆得到的完整 ORF 序列,设计构建 pET-30a 原核表达载体的引物。正反向引物为 Y-F (cccGGTACCATGGAGACCGGGGTTAGCAA) 和 Y-R (cggAAGCTTCTAATATGAGAAAAGACTAA), 分别含 *Kpn* I 和 *Hind* III 酶切位点。

以得到的完整 ORF cDNA 为模板,扩增,纯化,进而与表达载体 pET-30a 连接。将重组质粒、空载体分别转入到感受态 BL21 (DE3) pLysS 中,涂板,分别挑取不含质粒的空菌株 BL21 (DE3) pLysS、含空载体质粒和重组质粒的菌落,加入 LB 液体培养基 (含相应抗生素),37 °C,过夜摇菌。将菌液按 1:50 稀释,加入终浓度为 2% 的葡萄糖,37 °C,继续培养 2~3 h 至 OD₆₀₀ 达 0.5~0.7。然后收集菌液,加入终浓度为 1.0 mmol/L 的 IPTG,28 °C 诱导表达,收集菌液。菌液离心后加入上样缓冲液振荡,煮沸 10 min,12% 的分离胶,5% 的浓缩胶,进行电泳检测。0.25% 考马斯亮蓝染色,脱色,进行条带分析。

1.10 酵母单杂交

设计含酶切位点 *Sal*I 和 *Bg*III 的上下游引物,扩增目的基因 ORF 区,构建酵母表达载体 pGAD-*RcDREB1*。分别以重组质粒、空载体转化含 DRE 元件的酵母菌株感受态 WD,利用 SD 选择培养基,28 °C 倒置培养 2~7 d。挑取单菌落进行 PCR 鉴

定,初步鉴定为阳性克隆的单菌落在含 3-AT 的 SD/His-Ura-Leu 培养基上筛选、检测。

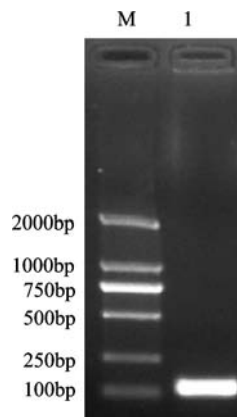
1.11 实时定量 PCR 分析

将生长 4 周的纤毛鹅观草苗,移至营养液中培养驯化 3 d,然后分别进行高盐 (250 mmol/L NaCl)、重金属氯化镉 (1.0 mmol/L)、PEG (25%) 模拟干旱及低温 (4 °C) 胁迫处理 4 h 和 12 h,收集处理材料,提取各样品的总 RNA,用 Real-Time 专用试剂盒 PrimeScript® RT reagent Kit With gDNA Eraser,反转录合成 cDNA。依据 *RcDREB1* 基因 cDNA 全长序列设计基因正向引物 RT-1F 5'-TGTGGCTTGGTTCAT-TCC-3' 和反向引物 RT-1R 5'-CTGCTCTGAGAAGTT-GAC-3'。qPCR 用 SYBR GreenI 染料,罗氏荧光定量 PCR 仪 LightCycler2.0 进行 PCR 扩增,LightCycler2.0 中的 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算基因相对表达量。以小麦 *Actin* 基因序列为唯一标准参照,设计正向引物 A1 5'-GCTATGAGATGCCTGATGG-3' 和反向引物 A2 5'-GGAATTGTATGTCGCTT CGT-3'。

2 结果与分析

2.1 *RcDREB1* 基因全长的获得

2.1.1 *RcDREB1* 基因保守区的扩增结果 提取高盐处理的纤毛鹅观草总 RNA,反转录为 cDNA。以第 1 链 cDNA 为模板,利用 AP2a/AP2b 引物对扩增,扩增产物经琼脂糖凝胶电泳检测显示得到一条长约 120 bp 的片段 (图 1),测序结果显示目标片段长为 118 bp。



M:DNA 分子量标记 DL-2000;

1:使用 AP2a/AP2b 引物对扩增的 PCR 产物

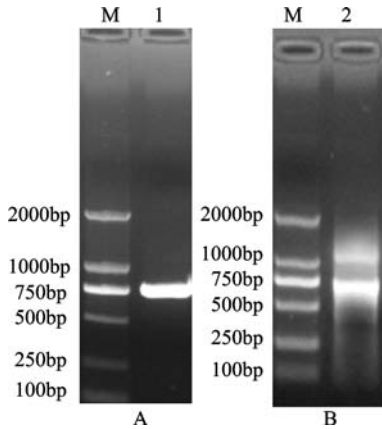
M:DNA marker DL-2000,1:PCR product amplified using AP2a and AP2b primers

图 1 纤毛鹅观草保守区序列片段扩增结果

Fig. 1 PCR products of conserved cDNA fragment from *Roegneria. ciliaris* (Trin.) Nevski

2.1.2 *RcDREB1* 序列全长的获得 首先利用 3'-RACE 技术,以 T₇dT₁₈ 引物反转录合成的第 1 链 cDNA 为模板进行巢式 PCR,扩增目的基因的 3'端序列。第 2 轮扩增后,得到一条特异条带长度约为 750 bp(图 2A)。测序分析,该片段长 740 bp,包含 PolyA 尾。

参照 RACE 试剂盒说明书,以 2 对嵌套引物 R5-F1 /UPM 和 R5-F2/ NUP,进行巢式扩增,获得目的基因长度为 670 bp 的 5'端序列。扩增产物的凝胶电泳检测结果如图 2B 所示。



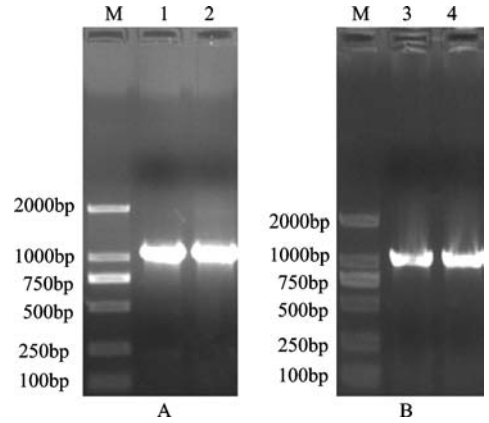
M: DNA 分子量标记 DL-2000; A-1: 使用 R3-2 和 T7 引物扩增的 3'-RACE 产物;
B-2: 使用 R5-F2 和 NUP 引物扩增的 5'-RACE 产物
M: marker DL-2000, A-1; 3'-RACE product amplified with R3-2 and T7 primers,
B-2: 5'-RACE product amplified with R5-F2 and NUP primer pair

图 2 目的基因的 3'和 5'-RACE 扩增结果
Fig. 2 PCR products of 3' and 5'-RACE

将 RT-PCR、3'-RACE 及 5'-RACE 测序结果用 DNASTar 软件进行电子拼接。以 oligo dT 引物反转录获得的第 1 链 cDNA 为模板, Q-F/Q-R 引物对进行 PCR 扩增后获得了长度为 837 bp 的片段(图 3A)。利用基因组 DNA 为模板,扩增目的基因的长度与以 cDNA 为模板扩增后的结果一致(图 3B)。测序结果比对后发现,该基因不含有内含子。由于前人对该基因尚未进行克隆和功能分析,本研究将其命名为 *RcDREB1*。

2.2 种系发生树 *RcDREB1* 基因同源性比对分析

系统进化分析发现,*RcDREB1* 与 4 个禾本科小麦族的植物 DREB 基因高度同源(在氨基酸水平上的一致性为 99%)。此外,*RcDREB1* 与高羊茅 *FaDREB2A* (CAG30547.1)、草地早熟禾 (AAS59530.1)、长穗偃麦草 *EeAP2.2* (AEI98920.1)、两芒山羊草 *AbDREB2* (CBX87024.1) 也具有较高的同源性(在氨基酸水平上的一致性在 88%~96%之间)(图 4)。因此,



M: DNA 分子量标记 DL-2000; A-1, 2: 使用 Q-F/Q-R 引物对扩增的基因 *RcDREB1* ORF 框 PCR 产物;
B-3, 4: 使用 Q-F/Q-R 引物对扩增的 DNA 基因 PCR 产物
M: marker DL-2000, A-1, 2: The *RcDREB1* ORF region PCR products amplified by using Q-F/Q-R primer pair,
B-3, 4: DNA PCR products amplified with genome DNA by using Q-F/Q-R primer pair

图 3 ORF 框 PCR 扩增结果

Fig. 3 PCR products of amplifying ORF region

该基因可能与小麦部分 AP2 家族基因具有相同的起源祖先。

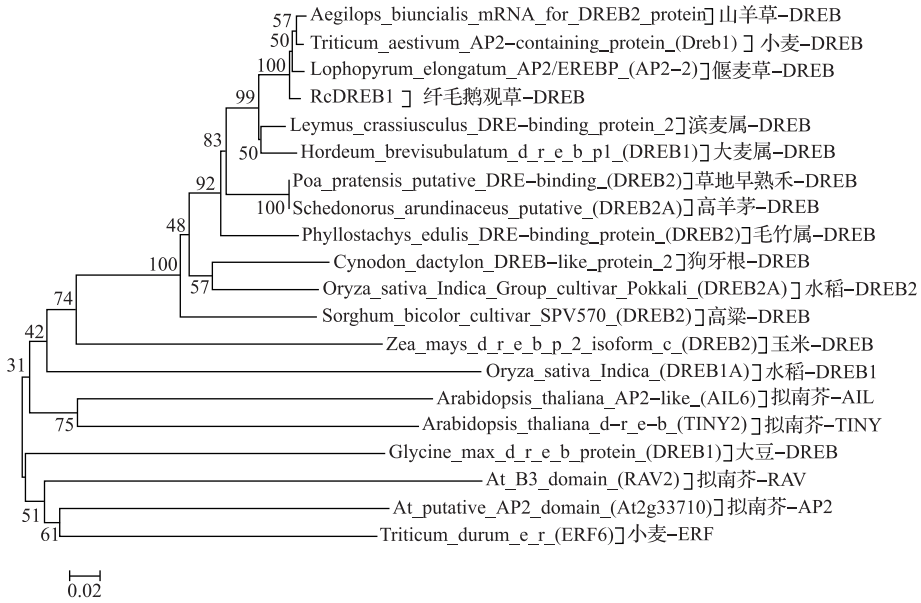
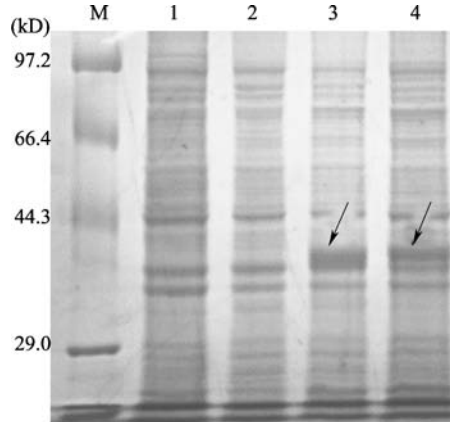
2.3 目的基因的重组子外源诱导表达分析

利用原核表达系统,对供试基因的蛋白质进行了表达。聚丙烯酰胺凝胶电泳检测表明,目标基因 *RcDREB1* 在大肠杆菌中得到了大量表达(图 5)。根据氨基酸序列推算,其蛋白分子量为 30 kD 左右,加上表达载体 pET 30a 中的标签蛋白 S-Tag,表达的融合蛋白分子量约为 34.6 kD 左右,与 SDS-PAGE 检测的结果一致。

2.4 *RcDREB1* 转录因子在酵母中的功能验证

将构建的酵母表达载体 pGAD-*RcDREB1* 转化含 DRE 元件的酵母菌株感受态 WD,以空菌株和含有空载体的菌株为对照,在 SD/Leu⁻选择培养基上 28 °C 培养 3 d,菌落长势情况如图 6 所示。结果表明,与野生酵母菌株 WD 在选择性培养基中不能生长相比,转化融合表达载体和重组子的菌株生长良好。

将鉴定的重组子阳性菌落和空载体转化酵母菌株单菌落分别选取 3 个涂在 60 mmol/L 3-AT 的 SD/Leu⁻Ura⁻His⁻选择培养基上。28 °C 下倒置培养后发现,仅表达 *RcDREB1* 的阳性菌落能正常生长,而空载体转化的菌落不能生长(图 7)。证实了该基因表达蛋白能与顺式作用元件 DRE 特异性结合。此外转化含元件 MDRE 突变型酵母菌株 MD 为对照,在三缺培养基上空载体和重组子均不能生长(资料未列出)。证明了该基因与顺式作用元件 DRE 的特异性结合。

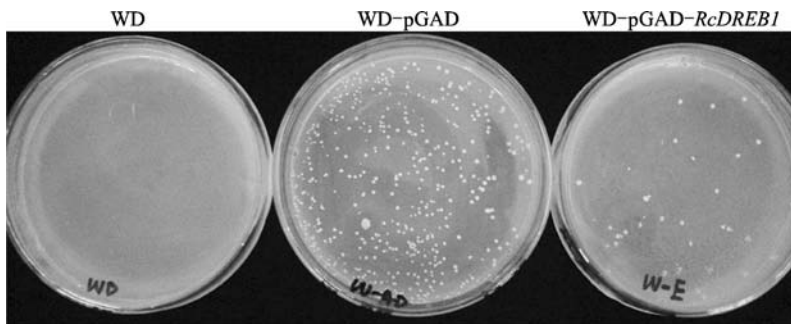
图 4 *RcDREB1* 的系统进化树分析Fig. 4 Phylogenetic tree analysis of *RcDREB1*

M: DNA 分子量标记 DL-2000;1:BL21 菌株;

2:PET30a 空质粒;3,4:目的基因

M: marker DL-2000, 1: BL21 bacterial strain, 2:

PET30a plasmid, 3, 4: Target gene

图 5 *RcDREB1* 在大肠杆菌中的外源诱导表达结果Fig. 5 Results of exogenous induced expression of *RcDREB1* in *E. coli*图 6 *RcDREB1* 转化 WD 酵母后在 SD/Leu⁻ 培养基上的菌落长势Fig. 6 The growth of *RcDREB1* transformed WD yeast colonies on SD/Leu⁻ medium

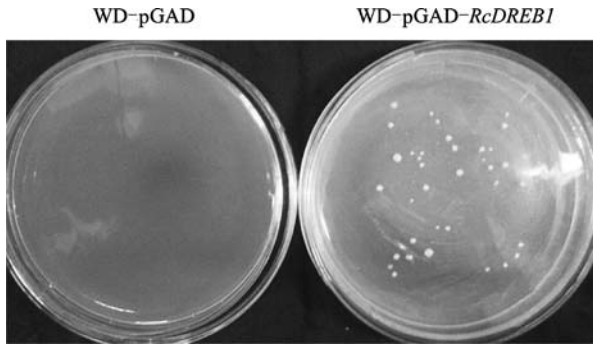
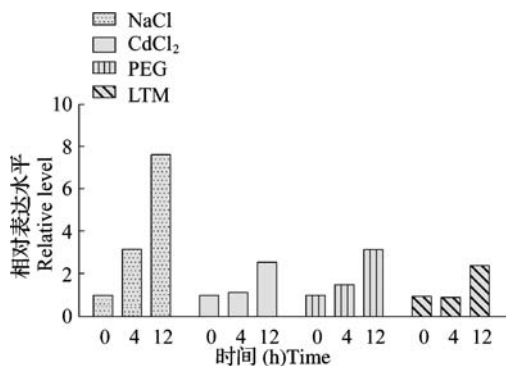


图7 *RcDREB1* WD 阳性克隆在 $SD/Leu^+, Ura^+, His^+$ 培养基上的菌落长势

Fig. 7 The growth of *RcDREB1* WD positive colonies on $SD/Leu^+, Ura^+, His^+$ medium

2.5 *RcDREB1* 基因在不同胁迫下的表达模式分析

使用 NaCl、PEG、CdCl₂ 和低温处理的材料, *RcDREB1* 基因响应胁迫表达的实时定量 PCR 结果显示(图 8):该基因在 4 种胁迫处理下均表现为表达量上调。而 NaCl 和 PEG 胁迫下的不同时期表达量均较对照有显著提高。在盐处理 4 h 后, *RcDREB1* 表达量提高到未处理前的 3 倍多, 12 h 后约达到未处理前的 8 倍;其他胁迫处理 PEG、CdCl₂ 和低温,均是在 12 h 处理后 *RcDREB1* 转录水平有较大的提高,约达到未处理前的 2~3 倍,其中模拟干旱 PEG 条件提高最大;低温和 CdCl₂ 胁迫处理下,该基因在 4 h 时表达微弱,较对照没有差异。这些结果表明, *RcDREB1* 可能主要响应高盐或干旱诱导。



NaCl: 高盐胁迫; CdCl₂: 重金属镉胁迫; PEG: 模拟干旱胁迫; LTM: 低温胁迫 NaCl: High salt stress, CdCl₂: Cd stress, PEG: Simulated drought stress, LTM: Low temperature stress

图8 *RcDREB1* 基因在不同胁迫下不同时间点的表达情况
Fig. 8 Time course expression analysis of *RcDREB1* under different stresses

3 讨论

培育抗逆性优良品种, 分离并转移近缘野生植

物抗逆的相关基因,使其能够在转基因植物中顺利表达进而提高植物的抗逆性,已成为改良植物抗性的新途径。研究发现,植物中特有的 DREB 类转录因子基因可以被干旱、高盐等逆境胁迫诱导,启动下游一系列抗逆功能基因的表达^[13]。将 DREB 类基因转入拟南芥^[25]、烟草^[26] 等模式植物中可以显著提高植物对逆境的综合抗性,表明了 DREB 类基因在作物抗逆改良应用上有着巨大潜力。开发植物优良的 DREB 类转录因子基因,为作物转基因研究提供优质候选基因是当前功能基因组研究的重要任务^[27]。

鹅观草是含有大量优良抗逆基因的小麦近缘植物种属,但迄今有关该植物的分子生物学研究报道尚少。其中,在增强植物抵御干旱等非生物逆境中发挥重要作用的转录因子 AP2 家族 DREB 类基因克隆及分子特征尚不明确。本研究以高盐胁迫的纤毛鹅观草幼苗为材料,采用 RT-PCR 和 RACE 相结合的方法克隆得到了 *RcDREB1* 基因,通过 NCBI-Blast 序列分析,该基因表达的蛋白含有一个保守的 AP2 结构域,其中第 14 和 19 位为缬氨酸(V)和谷氨酸(E),证明该基因属于 DREB 类转录因子。通过种系发生树分析也表明该基因属于 EREBP 亚族的 A 类转录因子。因此,推测该基因可能主要参与高盐、干旱和低温等环境胁迫的应答。其与小麦中 DREB 类基因的高序列相似性说明该基因在小麦抗性育种中具有重要价值。

通过将 *RcDREB1* 基因的完整开放阅读框重组到 pGAD 载体中 *GAL4* 基因的转录激活域下游,本研究构建了融合 *RcDREB1* 的酵母单杂交系统。利用携带的 DRE/CRT 顺式元件的酵母单杂交系统对 *RcDREB1* 蛋白特异结合 DRE/CRT 顺式元件的功能研究表明,重组载体 pGAD-*RcDREB1* 转入酵母报道子菌株后,表达的 DREB 蛋白能够特异识别 DRE 元件,激活启动子,促使 *HIS* 和 *URA* 基因转录表达,从而使转化后的酵母能在缺少组氨酸和尿嘧啶并加入 10 mmol/L 3-AT(组氨酸的竞争抑制剂)的 SD 筛选培养基上生长,从而验证了 *RcDREB1* 具有结合 DRE 元件的功能,是植物 DREB 类转录因子家族的一个新成员。

研究表明,同一转录因子可以通过顺式作用元件同时调控多个基因的表达^[28],本研究检测了 *RcDREB1* 基因在不同胁迫下的表达情况,结果表明 *RcDREB1* 基因对高盐、干旱和重金属产生明显应答。说明其可能在植株的抗旱、高盐的调控反应中

有重要作用,推测该基因可能在逆境信号传导及植物抗逆过程中发挥重要作用。但本研究推测 *ReDREB1* 不被低温胁迫所诱导。

有关该基因应答干旱等渗透胁迫逆境特征及遗传转化对植株抵御各种非生物逆境中的生物学功能有待进一步探讨。

在前期工作基础上,作者已经构建了融合 *ReDREB1* 的真核表达载体 *PBI121-ReDREB1*,采用农杆菌介导的方法进行了烟草的遗传转化,并将愈伤分化的抗性苗转接至生根培养基上生长。为进一步鉴定该基因调控植株的耐逆功能奠定了基础。

参考文献

- [1] Bray E A. Plant responses to water deficit[J]. Trends Plant Sci, 1997, 2:48-54
- [2] Boyer J S. Plant productivity and environment[J]. Science, 1982, 218 (4571):443-448
- [3] Chen W J, Zhu T. Networks of transcription factors with roles in environmental stress response [J]. Trends Plant Sci, 2004, 9 (12):591-596
- [4] Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Transcriptional regulatory networks in cellular responses and tolerance to dehydration and cold stresses[J]. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57:781-803
- [5] Riechmann J L, Meyerowitz E M. The AP2/EREBP family of plant transcription factors [J]. Biol Chem, 1998, 379 (6):633-646
- [6] Wilson K, Long D, Swinburne J, et al. A dissociation insertion causes a semidominant mutation that increases expression of TINY, an *Arabidopsis* gene related to *APETELA2* [J]. Plant Cell, 1996, 8:659-671
- [7] Shinozaki K, Dennis E. Cell signaling and gene regulation global analyses of signal transduction and gene expression profiles[J]. Curr Opin Plant Biol, 2003, 6:405-409
- [8] Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular response to drought and cold stress[J]. Curr Opin Biotech, 1996, 7:161-167
- [9] Sakuma Y, Liu Q, Dubouzet J G, et al. DNA-binding specificity of the ERF/AP2 domain of *Arabidopsis* DREBs, transcription factors involved in dehydration and cold-inducible gene expression [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2002, 290:998-1009
- [10] Shen Y G, Zhang W K, He S J, et al. An EREBP/AP2-type protein in *Triticum aestivum* was a DRE-binding transcription factor induced by cold, dehydration and ABA stress [J]. Theor Appl Genet, 2003, 106 (5):923-930
- [11] Oh S J, Kim Y S, Kwon C W, et al. Over expression of the transcription factor *AP37* in rice improves grain yield under drought conditions[J]. Plant Physiol, 2009, 150:1368-1379
- [12] Ban Q Y, Liu G F, Wang Y C. A DREB gene from *Limonium bicolor* mediates molecular and physiological responses to copper stress in transgenic tobacco[J]. J Plant Physiol, 2010, 168 (5):449-458
- [13] 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 (8):1391-1406
- [14] 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 J, 2003, 33 (4):751-763
- [15] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, et al. Regulation and functional analysis of *ZmDREB2A* in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. [J]. Plant J, 2007, 50:54-69
- [16] 刘强, 张勇, 陈受宜. 植物转录因子的结构与调控作用[J]. 科学通报, 2000, 45 (6):561-566
- [17] 蔡联炳, 冯海生. 鹅观草属 5 个类群的核型与进化[J]. 广西植物, 1998, 18 (1):35-40
- [18] 卢宝荣, 颜济, 杨俊良. 鹅观草属三个种的形态变异与核型的研究[J]. 云南植物研究, 1988, 10 (2):139-146
- [19] 董玉琛. 生物多样性及作物遗传多样性检测[J]. 作物品种资源, 1995(3):1-5
- [20] 肖海峻, 翟利剑. 小麦族鹅观草属植物研究进展[J]. 草业科学, 2007(4):41-46
- [21] 蔡联炳. 鹅观草属部分种的叶表皮微形态特征及其分类学意义[J]. 植物研究, 2000, 20 (4):372-378
- [22] 闫伟红. 冰草属和鹅观草属部分植物种质资源遗传分析[D]. 北京:中国农业科学院, 2010
- [23] 默詔京, 刘桂茹, 郎明林. 长穗偃麦草 DREB 类基因 *EeAP2. 2* 的克隆与序列分析[J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12 (5):764-769
- [24] Saghai-Maroo M A, Sollinan K M, Jorgensen R A, et al. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1984, 81:8014-8018
- [25] Wang Q, Guan Y, Wu Y, et al. Over expression of a rice *OsDREB1F* gene increases salt, drought, and low temperature tolerance in both *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67 (6):589-602
- [26] Linga R G, Arjula R R. Rice *DREB1B* promoter shows distinct stress-specific responses, and the over-expression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance [J]. Plant Mol Biol, 2008, 68:533-555
- [27] 刘强, 越南明, Yamaguchi-Shinozaki K, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45 (1):11-16
- [28] Seki M, Narusaka M, Ishida J, et al. Monitoring the expression profiles of 7000 *Arabidopsis* genes under drought, cold and high-salinity stresses using a full-length DNA microarray[J]. Plant J, 2002, 31:279-292