

# 热激诱导表达 Hd3a 的水稻转基因研究

黄涛,郭辉,崔玉超,王维娜,  
朱学艺,周涵韬

(厦门大学生命科学学院,福建 厦门 361005)

**摘要:** Hd3a (*Heading date 3a*) 基因是光周期诱导水稻开花过程中的一个关键调控基因,它在短日条件下表达并促进水稻开花.通过根癌农杆菌介导的方法将热激诱导表达的 Hd3a 基因转化到水稻品种日本晴中.热激处理转基因植株后,检测结果表明,叶片中转基因 Hd3a 的表达水平比热激前显著提高,随后又下降到热激前的水平,说明转基因 Hd3a 在水稻中可以被热激诱导瞬间的表达.长日条件下热激转基因水稻可成功诱导其抽穗,而同样处理的野生型植株不能抽穗,表明 Hd3a 的瞬间表达可诱导水稻开花,且其开花的早晚与热激处理的强度有关.

**关键词:** Hd3a;热激诱导;水稻;转化;开花

**中图分类号:** Q 356.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0438-0479(2009)05-0733-05

高等植物的开花受到多种内在因素和外界环境条件的影响,光周期是影响植物开花时间最重要的环境因素.植物叶片在感受到外界特定的光周期信号后,将其转换为体内的信号物质并运输到茎尖,进一步诱导茎尖分生组织分化花原基,从而完成从营养生长向生殖生长的转变.根据植物开花所需日长条件的不同,可将其分为长日植物、短日植物和日中性植物<sup>[1]</sup>.

近年来,利用模式植物拟南芥研究高等植物开花机理已经取得许多长足进展.通过对这种长日植物的研究,光周期诱导开花信号途径中的一些重要调控基因相继被发现,如 CO (*CONSTANS*) 和 FT (*FLOWERING LOCUS T*)<sup>[2-3]</sup>. CO 编码一个锌指转录激活因子,并作用于 FT 的上游. FT 编码一个磷脂酰乙醇胺结合蛋白的类似蛋白,是拟南芥光周期诱导开花途径中的关键调控基因,它在长日条件下被 CO 诱导表达并促进拟南芥开花<sup>[4-5]</sup>.在短日植物水稻中,CO 的同源基因 Hd1 (*Heading date 1*) 在长日条件下抑制水稻开花,在短日条件下却促进水稻开花<sup>[6-7]</sup>. FT 的同源基因 Hd3a (*Heading date 3a*) 是水稻开花过程中的关键基因,位于 Hd1 下游并受其调控, Hd3a 在短日条件下表达并诱导水稻开花<sup>[8]</sup>. FT 和 Hd3a 的表达产物分别被认为是拟南芥和水稻中从叶片运输到茎尖的开花信号物质<sup>[9-10]</sup>.但对于 Hd3a 在水稻中如何

进一步诱导哪些具体的下游基因并不清楚.进一步研究 Hd3a 的功能和作用机理不仅可以揭示水稻开花的信号转导机理,并且可以将其研究结果与拟南芥相比较,从而揭示短日植物和长日植物在开花分子机理上的异同.

本研究用来源于大豆 (*Glycine max*) 的热激诱导启动子 pHS6871<sup>[11]</sup>, 构建了热激诱导表达的 Hd3a (*HSP Hd3a*) 载体,并用农杆菌介导的方法将 *HSP Hd3a* 表达载体转化到水稻日本晴中.我们研究了 Hd3a 在转基因水稻中能否被诱导表达及 Hd3a 的诱导性表达对水稻开花的影响.本实验的结果为进一步利用 Microarray 技术寻找和研究 Hd3a 的下游基因奠定了必要的基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 水稻材料及农杆菌

水稻日本晴 (*Oryza sativa* ssp. *japonica* cv. Nipponbare) 成熟胚.

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105.

### 1.2 表达载体构建

Hd3a 基因克隆自水稻的 cDNA 文库,利用 Gateway<sup>TM</sup> 克隆系统 (Invitrogen, USA), 将 Hd3a 重组到 pDONR207 载体中,然后进一步将其重组到 pH2GW7-*HSP* 中,得到表达载体 pH2GW7-*HSP Hd3a* (图 1). pH2GW7-*HSP* 是将 pH2GW7 中的

收稿日期:2008-11-20

基金项目:福建省青年人才项目(2006F3123),霍英东教育基金(111026)资助

Email: huangtao @xmu. edu. cn

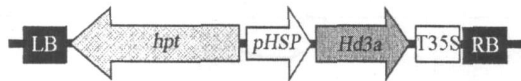


图1 表达载体 pH2GW7-*HSP* *Hd3a* 的 T-DNA 结构示意图

Fig. 1 T-DNA region of expression vector pH2GW7-*HSP* *Hd3a*

*p35S* 启动子用大豆热激启动子 *pHS6871* 替换得到的。*pHS6871* 启动子长 466 bp, 自 pK2GW7-*HSP* 中用 *Xba* 和 *Spe* 酶切获得<sup>[12]</sup>。

### 1.3 水稻基因转化

取水稻籽粒成熟胚,经 75%乙醇和 1%次氯酸钠表面灭菌处理后,接种于诱导培养基 NB-I [2,4-二氯苯氧乙酸(以下简称“2,4-D” 2 mg/L,脱落酸(ABA) 3 mg/L,水解酪蛋白(Casein hydrolysate, CH) 300 mg/L,脯氨酸(Proline, Pro) 300 mg/L], 28℃暗培养约 7 d。诱导出的愈伤组织转移至继代培养基 NB-S(2,4-D 2 mg/L, CH 300 mg/L, Pro 300 mg/L), 28℃暗培养约 5 d。

将继代培养的水稻愈伤组织置于  $OD_{600}$  0.5 的农杆菌悬浮液[含葡萄糖(Glucose) 50 g/L,乙酰丁香酮(Acetosyringone, AS) 100  $\mu$ mol/L]中,室温震荡共培养 20 min,表面干燥处理后置于共培养培养基 NB-co(10 g/L Glucose, 100  $\mu$ mol/L AS), 28℃暗培养 2 d。

用含羧苄青霉素(Carbenicillin, Cb) 250 ~ 500 mg/L 的无菌水漂洗共培养后的愈伤组织 3 ~ 5 次,经 3 d 干燥处理后,接种于筛选培养基 NB-SE1(2,4-D 2 mg/L, CH 300 mg/L, Pro 500 mg/L, Cb 400 mg/L, Hyg(潮霉素) 30 mg/L)上, 28℃暗培养约 30 d。待白色的抗性愈伤组织生出后,将抗性愈伤组织继代于筛选培养基 NB-SE2(2,4-D 2 mg/L, CH 500 mg/L, Pro 500 mg/L, Cb 300 mg/L, Hyg 50 mg/L)上, 28℃暗培养约 20 d。再次继代于筛选培养基 NB-SE3(2,4-D 2 mg/L, CH 500 mg/L, Pro 500 mg/L, Cb 250 mg/L, Hyg 30 mg/L)上, 28℃暗培养约 10 d。用新的 NB-SE3 活化培养 4 d,再干燥处理 3 d。

干燥处理后的抗性愈伤组织置于分化培养基 NB-R(6-BA 5 mg/L, NAA 0.2 mg/L, CH 500 mg/L, Pro 1 000 mg/L, Cb 250 mg/L, Hyg 20 mg/L)上,先于 25℃暗培养 4 d,再转移至 25℃光照培养约 30 d。待分化出苗后,将小苗移至生根培养基 1/2 MS 中培养至生根。得到完整植株后,炼苗 5 ~ 7 d,移至土中培养。转基因植株置于室外条件下培养至结实。

### 1.4 转基因植株的鉴定与表达水平检测

水稻叶片基因组 DNA 的提取按照 Edwards 等人的方法进行<sup>[13]</sup>。水稻叶片总 RNA 的提取利用 Bio-Rad 公司的试剂盒进行,反转录成 cDNA 第一链,利用 Toyobo 公司的试剂盒进行。

利用 PCR 技术进行转基因植株鉴定以及 *HSP* *Hd3a* 单拷贝株系筛选,以叶片基因组总 DNA 为模板;正向引物 HSP\_FOR: 5'-TCA TTTGTA-CAAA GCCCACCA TAA-3';反向引物 Hd3a\_REV: 5'-GGTTA GGGTCACT TGGGCTTG-3';使用 *Taq* 聚合酶。按照以下程序进行反应:预变性 95℃ 5 min;变性 95℃ 40 s,退火 55℃ 45 s,延伸 72℃ 1 min,重复 30 个循环;最后 72℃ 延伸 5 min;4℃保存。PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶中以 5 V/cm 进行电泳检测。

利用荧光定量 PCR 技术筛选 *HSP* *Hd3a* 高水平表达株系以及检测热激处理后 *Hd3a* 基因表达水平变化时,以热激处理后叶片总 RNA 经反转录得到的 cDNA 第一链为模板;正向引物 HSP\_RT\_FOR: 5'-CA GAA GAA GTGAA GGCA TCGT-3',反向引物 Hd3a\_RT\_REV: 5'-TCCCTGTCCCTGCCACT-TC-3';同时以样品中的 18S rRNA 作内参,使用正向引物 18S\_RT\_FOR: 5'-TCAACTTTCGATGGTAG-GA TAGTG-3',反向引物 18S\_RT\_REV: 5'-CCGTGTCA GGA TTGGGTAATTT-3';用 ABI 公司的 SYBR Supermix 荧光染料,按照以下程序在 Applied Biosystems 7300 Real Time PCR System 上进行反应:50℃ 2 min; 95℃ 10 min; 95℃ 15 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 40 个循环。实验数据导出后经 Excel 分析作图。

### 1.5 热激处理和取样

将 *HSP* *Hd3a* 转基因植株放置于人工气候箱中,在 25℃,相对湿度 60%,光照强度 200 ~ 250  $\mu$ mol/( $m^2 \cdot s$ ),每天 14 h 光照的长日条件下培养。在进行不同的实验时我们对转基因水稻采用不同的热激处理方法。

在鉴定 *HSP* *Hd3a* 高水平表达株系时,我们采用了热板热激法,即用经水浴加热、表面温度保持在 42℃的铜板热激植株叶片 1 h,分别在热激前(0 h)及热激开始后 1 h 取样。

在检测转基因水稻经热激处理后 *HSP* *Hd3a* 表达水平变化时,同样采用了热板热激法热激叶片 1 h,分别在热激前(0 h)及热激开始后 1, 3, 6 h 取样,每时间点取 4 个重复的样品。

在进行热激处理诱导转基因水稻开花的实验时,

我们采取了全株热激法,即将植株放入温度 42 ℃、湿度 90% 的人工气候箱中热激全株 1 h。将 *HSP Hd3a1* 植株分 3 组进行全株热激处理:A 组植株仅热激 1 h;B 组植株每天热激 1 h,连续处理 1 周;C 组植株每天热激 1 h,连续处理 2 周;3 组热激同时开始进行,每组里都有野生型水稻作为对照。每次热激处理完成后立即移回到原长日条件下培养并每日观察抽穗情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 水稻转基因体系的建立和转基因植株的获得

通过实验,我们建立了合适的水稻转基因体系。以 NB 培养基为基本培养基,在实验的各个环节进行了优化。经过愈伤组织诱导及继代、农杆菌侵染及共培养、抗性愈伤组织筛选、抗性愈伤组织再分化及生根等步骤,最终获得了 100 个转基因株系(图 2)。提取再生植株叶片 DNA,进行 PCR 鉴定,正向引物设计结合在 *pHS6871* 启动子的非翻译区,反向引物结合在 *Hd3a* 外显子区,扩增产物的长度为 585 bp。结果显示在被鉴定的 100 个株系中有 86 个株系为阳性,阳性率为 86%。

### 2.2 *HSP Hd3a* 高水平表达株系的鉴定

在转基因植株中随机挑选 30 个阳性株系,42 ℃ 热激叶片 1 h,用荧光定量 PCR 检测热激前和热激开始后 1 h 的叶片样品中 *Hd3a* 的表达水平。由于是较大范围内的随机筛选,所以每个株系都没有取重复样品。结果显示其中的 5 个株系,即 1,8,14,17 和 21 号株系,叶片中 *Hd3a* 的表达水平在热激后显著提高,大约分别比热激前分别提高了 115,395,125,199,125 倍。其余株系中 *Hd3a* 的表达水平相对较低或没有表达,这可能是由于转基因插入染色体的位置不同而导致表达效率不同。图 3 为这 5 个 *HSP Hd3a* 高水平表达株系的荧光定量 PCR 结果(其余 25 个株系的结果未列出)。

进一步取 *HSP Hd3a* 高水平表达株系 T2 分离群体的植株叶片,提取叶片基因组总 DNA,以其为模板进行 PCR 检测。结果显示 1 号株系(*HSP Hd3a1*)为转基因单拷贝株系,在该株系被测定的 73 株 T2 代群体中有 16 株为野生型植株,其余为转基因植株,野生型植株占被测定植株总数的 22%,接近 25% 的理论值。

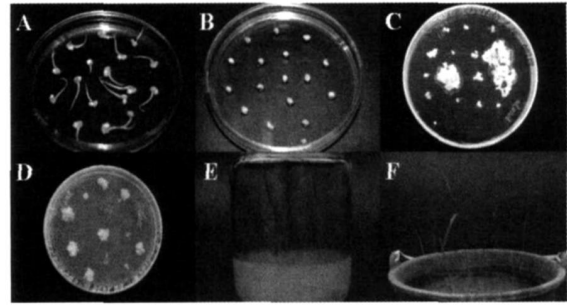


图 2 热激诱导表达的 *Hd3a* 基因转化水稻

A. 水稻成熟胚愈伤组织的诱导;B. 愈伤组织的继代;C. 抗性愈伤组织的筛选;D. 抗性愈伤组织再分化;E. 植株生根;F. 转基因植株移栽

Fig. 2 Transformation of heat-inducible *Hd3a* gene into rice

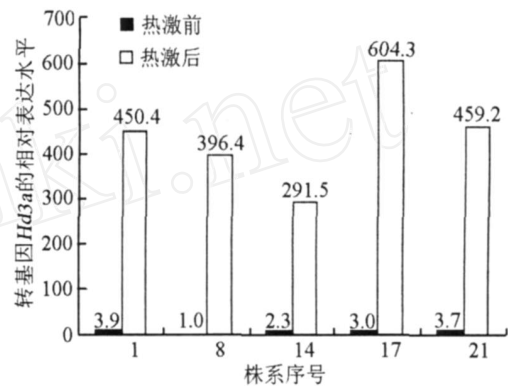


图 3 荧光定量 PCR 检测不同 *HSP :: Hd3a* 转基因株系中转基因 *Hd3a* 的表达水平

Fig. 3 Expression level of *Hd3a* in various transgenic *HSP :: Hd3a* lines analyzed by Real-Time PCR

### 2.3 热激后 *HSP Hd3a* 的表达模式

为了进一步地研究 *Hd3a* 基因在热激处理后表达水平的变化模式,我们用 42 ℃ 热激处理 *HSP Hd3a1* 植株叶片 1 h,然后用荧光定量 PCR 检测热激前后叶片样品中 *Hd3a* 的表达水平。结果显示,热激后 1 h 时 *Hd3a* 表达水平明显提高,为热激前的 174 倍,3 h 时下降为 12 倍,6 h 时下降为 4 倍(图 4)。可以看出,经热激处理后 *pHS6871* 启动子被激活并诱导 *Hd3a* 基因得以瞬间高水平表达。

### 2.4 热激处理诱导 *HSP Hd3a* 植株开花

为了进一步研究 *Hd3a* 的瞬间表达能否诱导水稻开花,我们在长日条件下培养 *HSP Hd3a1* 植株,在株龄 66 DAG(Days after germination)时,对 A、B、C 组植株分别进行 1 h、每天 1 h 共持续 1 周、每天 1 h 共持续 2 周的 42 ℃ 全株热激处理,每次热激结束后植株立即转移到原生长环境中培养。结果发现,

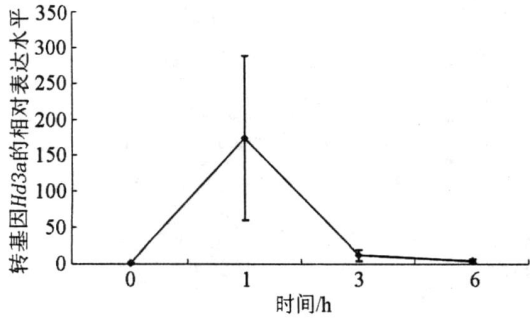


图4 荧光定量 PCR 检测热激后 HSP Hd3a 植株中转基因 Hd3a 表达水平的变化

Fig. 4 Time course of Hd3a expression level in HSP Hd3a plants after heat shock treatment analyzed by Real-Time PCR

到 88 DAG 时, C 组转基因植株已经抽穗; B 组转基因植株茎端膨大已经孕穗, 到 95 DAG 时也同样抽穗; A 组转基因植株以及每组中的野生型对照植株直到 120 DAG 实验结束时均无任何开花迹象(图 5)。可以看出, 在长日条件下整株热激处理能诱导 HSP Hd3a 转基因水稻开花, 并且热激 2 周比热激 1 周能诱导转基因植株更早开花, 而仅热激 1 h 不能诱导转基因水稻开花。这说明 HSP Hd3a 转基因水稻开花时间的早晚与热激处理的强度有关, 在一定范围内热激处理次数越多则 Hd3a 的表达量越多, 水稻抽穗越早。

### 3 讨论

热激反应是在不同物种中普遍存在的生理现象。当外界温度高于最适生长温度 10~15 时, 植物体内会启动热激反应, 快速合成热激蛋白以保护细胞免受高温伤害。由于真核生物热激基因的启动子具有结构的严格保守性, 使得一种植物的热激启动子可以在其它物种的植物中诱导基因表达<sup>[14-15]</sup>。大豆热激启动子是目前研究较为广泛的热激启动子, 包括 pHS6871、pHS6834、pGmhsp17,6-L 等<sup>[11]</sup>。Baumann 等首次证明 pHS6871 启动子在转基因烟草中可以正常工作<sup>[16]</sup>。Catherine M Smart 等又将其成功应用于转 tmr 基因的烟草研究中<sup>[17]</sup>。在我们所知的范围内, 还没有发现将包括 pHS6871 在内的热激启动子用于水稻转基因研究的报道。我们通过热激处理 HSP Hd3a 水稻叶片, 发现热激后叶片中转基因 Hd3a 的表达水平显著提高(图 3, 4), 说明 pHS6871 在水稻中能正常工作, 使得转基因 Hd3a 在热激后可以瞬间高水平地表达。这与前人用组成型启动子(如 CaMV 35S)超表达 Hd3a 有明显不同<sup>[8]</sup>, 由于 Hd3a 在水稻中诱导性

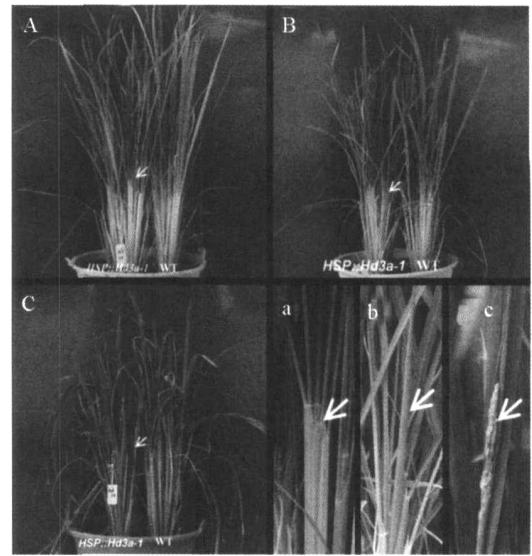


图5 热激处理诱导 HSP Hd3a 水稻开花  
66 DAG 时对 3 组 HSP Hd3a-1 水稻进行 42 全株热激处理, 在 88 DAG 时的结果如图所示  
A. 热激 1 h, 不能开花, a. 该组 HSP Hd3a-1 植株茎端; B. 每天热激 1 h, 持续处理 1 周, b. 该组 HSP Hd3a-1 植株膨大的茎端; C. 每天热激 1 h, 持续处理 2 周, c. 该组 HSP Hd3a-1 植株的抽穗。每组都以野生型水稻为对照, 每盆中左边为 HSP Hd3a-1 植株, 右边为野生型植株。图 a、b、c 分别是图 A、B、C 中用箭头标示部分的放大

Fig. 5 Flowering of HSP Hd3a transgenic rice induced by heat treatment

的瞬间表达, 就可以利用这个材料来研究 Hd3a 诱导表达前后转录组学水平的变化, 从而可以寻找 Hd3a 的下游响应基因并为进一步研究其调控机理提供条件。

不同植物的开花习性有很大的区别, 但过去的研究表明不同植物中的 FT 及其同源类似基因诱导开花的功能却非常保守, 这也反映了不同植物控制该类基因表达的机理或响应机制可能有很大区别。由本文的实验结果得知, 一定程度的热激处理可以诱导 HSP Hd3a 水稻开花, 并且开花时间的早晚与热激处理的强度有关。长日条件下连续 1 周或 2 周的热激处理(每天热激 1 h)都能够诱导 HSP Hd3a 转基因水稻抽穗, 而仅热激 1 h 不能诱导抽穗(图 5)。这可能是因为多次的热激处理能诱导更多的 Hd3a 表达产物, 使其积累到一定阈值而启动开花程序, 而仅热激 1 h 不能诱导足够多的 Hd3a 表达产物, 所以不能诱导水稻开花。FT 是拟南芥中与水稻 Hd3a 相对应的同源基因, 在以往对 HSP FT 转基因拟南芥的研究发现, 热激 1 h 就足以诱导其在短日下开花<sup>[12]</sup>; 而 HSP

*FT* 转基因杨树需要每天 42 全株热激处理 1 h, 连续处理 45 d 才能诱导开花(结果未发表)。这表明不同植物对同一基因的反应确实存在差异,这同时也与植物的生长发育特性有关。

### 参考文献:

- [1] Thomas B, Vince-prue D. Photoperiodism in plants[M]. London: Academic Press, 1997.
- [2] Araki T. Transition from vegetative to reproductive phase [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4:63 - 68.
- [3] Reeves P H, Coupland G. Response of plant development to environment control of flowering by daylength and temperature[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2000, 3:37 - 42.
- [4] Kobayashi Y, Kaya H, Goto K, et al. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals[J]. *Science*, 1999, 286:1960 - 1962.
- [5] Kardailsky I, Shukla V K, Ahn J H, et al. Activation tagging of the floral inducer *FT*[J]. *Science*, 1999, 286:1962 - 1965.
- [6] Izawa T, Oikawa T, Sugiyama N, et al. Phytochrome mediates the external light signal to repress *FT* orthologs in photoperiodic flowering of rice [J]. *Genes & Dev*, 2002, 16:2006 - 2020.
- [7] Yano M, Katayose Y, Ashikari M, et al. *Hd1*, a major photoperiod sensitivity quantitative trait locus in rice, is closely related to the arabidopsis flowering time gene *CONSTANS*[J]. *The Plant Cell*, 2000, 12:2473 - 2483.
- [8] Kojima S, Takahashi Y, Kobayashi Y, et al. *Hd3a*, a rice ortholog of the arabidopsis *FT* gene, promotes transition to flowering downstream of *Hd1* under short-day conditions[J]. *Plant Cell Physiol*, 2002, 43(10):1096 - 1105.
- [9] Corbesier L, Vincent C, Jang S, et al. *FT* protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis* [J]. *Science*, 2007, 316: 1031 - 1033.
- [10] Tamaki S, Matsuo S, Wong H L, et al. *Hd3a* protein is a mobile flowering signal in rice [J]. *Science*, 2007, 316: 1033 - 1036.
- [11] Schöffl F, Raschke E, Nagao R T. The DNA sequence analysis of soybean heat-shock genes and identification of possible regulatory promoter elements [J]. *The EMBO Journal*, 1984, 3(11):2491 - 2497.
- [12] Huang T, Bonhelenius H, Eriksson S, et al. The mRNA of the arabidopsis gene *FT* moves from leaf to shoot apex and induces flowering [J]. *Science*, 2005, 309: 1694 - 1696.
- [13] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis [J]. *Nucleic Acids Reseach*, 1991, 19(6):1394.
- [14] Schöffl F, Baumann G, Raschke E, et al. The expression of heat shock genes in higher plants [J]. *Phil Trans R Soc Lond*, 1986, B314:453 - 468.
- [15] Severin K, Schöffl F. Heat-inducible hygromycin resistance in transgenic tobacco [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15:827 - 833.
- [16] Baumann G, Raschke E, Bevan M, et al. Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6(5):1161 - 1166.
- [17] Smart C M, Scofield S R, Bevan M W, et al. Delayed leaf senescence in tobacco plants transformed with *tmr*, a gene for cytokinin production in *A. grobacterium* [J]. *The Plant Cell*, 1991, 3:647 - 656.

## Studies on Transgenic Rice with Heat-shock Inducible Expression of *Hd3a* Gene

HUANG Tao, GUO Hui, CUI Yu-chao, WANG Wei-na,  
ZHU Xue-yi, ZHOU Han-tao

(School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** *Hd3a* (*Heading date 3a*) plays a key regulatory role in the photoperiod flowering pathway of rice (*Oryza sativa*). In this study, a heat-shock inducible *Hd3a* gene was transformed into wild-type rice mediated by *A. grobacterium tumifaciens*. The result of real-time PCR analysis showed that the expression level of transgene *Hd3a* increased significantly after heating treatment, and soon decreased to the background level, which suggested that *Hd3a* expression can be induced transiently to a very high level. In the long-day condition, the flowering of transgenic rice can be induced by heating treatment, while wild type plants can not flower with the same treatment. It proved that a transient expression of *Hd3a* could induce transgenic rice to flower. There was a positive correlation between flowering time and heating treatment times.

**Key words:** *Hd3a*; heat-induction; rice; transformation; flowering