

文章编号:1003-8701(2008)06-0021-04

HAL1 基因转化苜蓿再生植株及其耐盐性

刘艳芝,韦正乙,邢少辰,谭化,高明,董英山*

(吉林省农业科学院生物技术中心,长春 130033)

摘要:用根癌农杆菌介导法将克隆于酵母的 *HAL1* 基因转化龙牧 803 苜蓿胚性愈伤组织,经 2 mg/L 的 Basta 抗性筛选及 PCR 检测,该基因已整合到受体基因组中,共获得了 11 株转基因植株。培养基耐盐性实验结果:在添加 NaCl 的 MS₀ 培养基上,非转基因植株在 NaCl 浓度高于 0.6% 时不能生根,逐渐死亡;转基因植株在 NaCl 浓度 0.6%~1.0% 范围内仍能生根并正常生长。由此初步证明 *HAL1* 基因已在龙牧 803 苜蓿中表达,并且提高了耐盐性。

关键词: *HAL1* 基因;遗传转化;耐盐性;苜蓿

中图分类号: S511+.7

文献标识码: A

Transgenic Alfalfa with HAL1 Gene and Its Salt Tolerance

LIU Yan-zhi, WEI Zheng-yi, XING Shao-chen, TAN Hua, GAO Ming, DONG Ying-shan*

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

Abstract: The *HAL1* gene cloned from yeast was introduced into alfalfa cultivar 'Longmu 803' embryo cellus. After screened by 2 mg/L of Basta and PCR, the *HAL1* gene was proved inserted into the host genome and 11 transgenic plantlets were obtained. A salt-tolerance evaluation was carried out and the result showed that the untransgenic plants could not root on the medium MS₀ with a concentration of NaCl higher than 0.6% and died gradually. Contrasted with the untransgenic plants, the transgenic plants could root in the medium with a concentration around 0.6% to 1.2% of NaCl and grew normally. This indicated that the *HAL1* expressed in alfalfa and improved the salt-tolerance of alfalfa.

Key words: *HAL1* gene; Transformation; Salt tolerance; Alfalfa

紫花苜蓿 (*Medicago sativa*) 为豆科多年生优质牧草,具有适应性广、产量高、品质好、营养丰富、抗旱、固氮改土等优点,而且质地柔软,适口性好,是畜禽最为理想的青绿饲料。如果能够提高苜蓿的耐盐碱性,就可以达到改良盐碱地,提高盐碱地利用率的目的,并且可以增加优质蛋白质饲料。一般土壤中含量较高的是 Na⁺ 和 Cl⁻,因此苜蓿耐盐性的研究主要是针对耐 NaCl。侯振安^[1]等人发现,土壤中过量的 NaCl 会抑制苜蓿的光合作用和蒸腾活动,而盐分离子的积累和必需营养元素吸

收量的减少又会导致苜蓿营养失调,造成苜蓿株高和干物质量的下降,且随盐度水平增加,下降幅度也在增加;Na⁺ 浓度增加,苜蓿对 N、P、K 的吸收受到抑制,尤其是 K 的含量迅速降低。我国主要是从品种的耐盐筛选、耐盐性混合选择等角度进行了提高苜蓿耐盐性的研究。

近年来,一些与植物耐盐机制有关的基因相继被克隆并用于转基因研究中,这些基因的表达不同程度地提高了转基因植物的耐盐能力。*HAL1* 基因直接的保护性机制是能够调节细胞内的离子平衡,提高细胞内 K⁺ 的浓度,降低细胞内 Na⁺ 的过度积累,使细胞内保持较低的 Na⁺/K⁺ 比例,从而减轻 Na⁺ 对细胞的毒害作用^[2-4]。目前已经获得拟南芥、番茄、烟草、百脉根、甜瓜、西瓜、燕麦和水稻的转 *HAL1* 基因植株,植株的耐盐性均有所

收稿日期:2008-06-05

作者简介:刘艳芝(1964-),女,副研究员,主要从事牧草及草坪草转基因研究。

通讯作者:董英山,研究员 E-mail:ysdong@cjaas.com

提高,一些植物的抗旱能力也有提高^[5-12]。本试验利用含 *HAL1* 基因的植物表达载体 pCHAL1 转化苜蓿,获得了耐盐性提高的转基因植株。

1 材料与方法

1.1 植物材料及菌株

龙牧 803 苜蓿 (*Medicago sativa*), 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 菌株。

1.2 植物表达载体构建

以 pCAMBIA3301 质粒为基础构建转化表达载体^[8]。该质粒携带 *Bar* 标记基因和 *Gus* 报告基因,均由 35S 启动子启动。用 *Bgl*II 和 *Bst*EII 将 pCAMBIA3301 质粒上的 *Gus* 基因切除,连接 *HAL1* 基因,即获得植物表达载体 pCHAL1。用冻融法将 pCHAL1 导入农杆菌 EHA105 中备用。

1.3 农杆菌介导胚性愈伤组织转化

1.3.1 胚性愈伤组织诱导

挑选饱满的龙牧 803 苜蓿种子,用 70%乙醇浸泡 2 min,0.1%的 $HgCl_2$ 溶液灭菌 1 h,无菌水冲洗 4 次,之后用无菌水浸泡种子,24 h 后取出置于加有无菌湿润滤纸的培养皿中,待种子发芽接种于 MS₀ 培养基 (MS 不附加任何激素,蔗糖 3%,pH5.8)上。6~7 d 子叶展开,切去顶端 1/3,接种于 LM₁ 培养基 (MS 附加 2,4-D 2.0 mg/L、KT 0.25 mg/L、CH 2 000 mg/L,蔗糖 3%,pH5.8)诱导胚性愈伤组织,25℃、14 h/10 h 光照。

1.3.2 工程菌液的准备

取 100 μL 甘油冷冻保存农杆菌菌种,加入 5 mL 不含抗生素的 YEB 液体培养基,26~28℃下摇动(100~150 r/min)培养 24 h,待菌液混浊,取 1 mL 活化菌液,加入 15 mL YEB(附加 kan50 mg/L)培养基,连续扩增 3 次,离心收集农杆菌,用 MS₀ 培养基稀释到 OD₆₀₀ 0.4~0.6,置于冰箱中备用。

1.3.3 农杆菌介导转化

取诱导 3 周左右的胚性愈伤组织,用已制备的工程菌液浸泡 1 min,转移到 LM₃ (MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.5 mg/L、蔗糖 3%,pH5.8)培养基上,黑暗条件下共培养 1 d,再转入 LM_{3i} 培养基 (LM₃ + 头孢霉素 500 mg/L)上抑菌培养,每 2 周继代 1 次。当胚性愈伤组织上出现胚状体后,将胚状体转移到 LM_{3iB} 培养基(MS+NAA 0.05 mg/L+6-BA 0.5 mg/L + 头孢霉素 500 mg/L + Basta 2 mg/L,蔗糖 3%,pH5.8)上筛选。筛选存活的胚状体萌发,再生植株移至 MS₀ 培养基壮苗,最后将有 3~5

条根系的植株炼苗移栽。

1.4 抗性植株 PCR 检测

剪取抗性植株叶片,采用 CTAB 法提取总 DNA^[13]用作 PCR 检测的模板。PCR 引物为:上游引物 5'-GGATCCATGCATTTCAAAGATTTAGG-3',下游引物 5'-GGTACCGGTGACCTCAACTATTC TGTGTTGA-3'。PCR 参数为 94℃ 5 min,94℃ 50 s,53℃ 50 s,72℃ 1 min15 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。

1.5 转基因植株耐盐性试验

野生型龙牧 803 苜蓿植株耐盐性试验:将组培苗顶部以下的第 3 个节间处切断,取顶部接种于附加 NaCl 浓度为 0%、0.2%、0.4%、0.6%的 MS₀ 培养基上,4 周后观察试管苗生根情况。

PCR 阳性的抗性植株即为转基因植株,将每个转基因植株在 MS₀ 培养基上扩繁若干株备用。在 NaCl 浓度分别为 0%、0.8%、1.0%、1.2%的 MS₀ 培养基上,接种转化苗(苗顶部以下的第 3 个节间处切断,取顶部接种),然后在培养室中光照培养,观察生长状况,4 周后根据试管苗的生根情况初步确定耐盐性。

2 试验结果

2.1 载体构建

利用基因替换法,我们构建了植物表达载体 pCHAL1^[8]。该载体以 35 S 启动子驱动目标基因 *HAL1* 和标记基因 *bar*,其 T-DNA 结构见图 1。

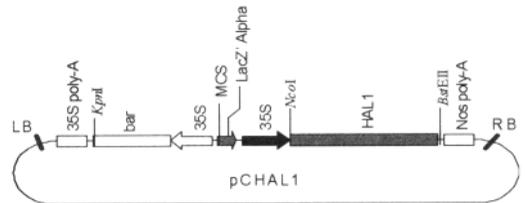


图 1 载体 pCHAL1 的 T-DNA 结构

2.2 胚性愈伤组织诱导及抗性植株再生

苜蓿无菌苗子叶培养 2 周可诱导出愈伤组织,3 周左右可见胚状体,第 4 周时统计胚状体诱导率(出胚状体子叶数/接种子叶数)为 92.3%,诱导出胚状体的子叶,最多每块可诱导出 22 个胚状体。

诱导 3 周左右的愈伤组织,经农杆菌浸染及共培养后,转移到抑菌培养基上,2 周后大部分愈伤组织由于农杆菌侵染导致褐化死亡,8 周时存活愈伤组织上的胚状体已经发育成子叶胚。将发育正常的子叶胚转移到附加 Basta 2 mg/L 的 MS

培养基上筛选,2 周后大部分胚状体变褐,干枯死亡,一部分子叶胚正常生长再生植株(图 2)。共获得 15 株经 Basta 初步筛选的抗性植株。



图 2 萌发的子叶胚除草剂筛选

2.3 抗性植株的 PCR 检测

少量提取抗性再生植株的基因组的 DNA 作为模板,扩增目标基因 *HAL1*,获得 11 株 PCR 阳性植株(图 3)。



图 3 抗性再生植株的 PCR 检测

M,100bp marker; -,阴性对照;+,阳性对照;H₂O,H₂O 对照;1-9,不同样品。

2.4 耐盐性试验



百分数为 NaCl 的浓度(W/V)

图 4 野生型龙牧 803 苜蓿植株在含 NaCl 的培养基上的生长情况

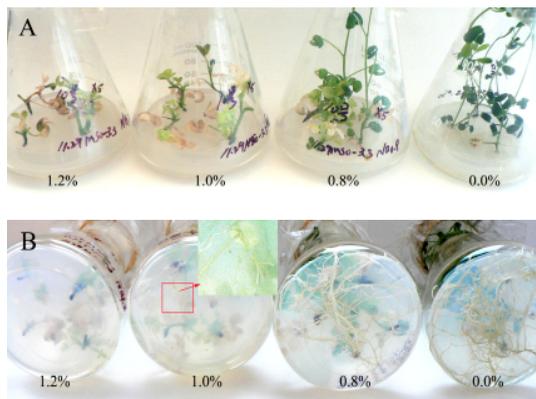


图 5 转基因植株在含 NaCl 培养基上的生长情况

- A. 茎和叶的生长状态;
- B. 根的生长状态。百分数为 NaCl 的浓度(W/V)

野生型龙牧 803 苜蓿植株耐盐性试验结果:4 周观察生根情况(图 4),可见附加 NaCl 浓度为

0.6%培养基上的试管苗根部褐死,无新根生长,因此以 0.6%NaCl 浓度为耐盐性标准。

转基因植株在含不同 NaCl 浓度的 MS₀ 培养基上进行耐盐性试验。在 NaCl 浓度为 1.2%的处理中,试管苗黄化根部褐死;NaCl 浓度为 1.0%的处理中部分试管苗根部褐化,不生根,但是苗仍然呈绿色,少部分苗生根,苗呈绿色,但生长缓慢;NaCl 浓度为 0.8%的处理中试管苗叶色黄绿,全部生根,生长旺盛,与对照植株的生根及生长状况基本一致(图 5)。耐盐性提高的转基因植株全部移栽成活,正在进行盐水灌溉试验。

3 讨论

利用胚性愈伤组织作为农杆菌介导转化受体,转化率较高。本试验初步统计转化率(PCR 阳性植株/抗性植株)高达 73.33%(Basta 2 mg/L 筛选浓度),而以无菌苗子叶为农杆菌介导转化受体,转化率为 15.49%(Basta 2 mg/L 筛选浓度)^[14]。分析胚性愈伤组织作为转化受体转化率高的原因,可能是脱分化的细胞更容易接受 T-DNA,使外源基因较容易插入到受体细胞的染色体上。但是胚性愈伤组织经农杆菌侵染之后,除菌过程十分困难,因此导致大量受体材料死亡,而无菌苗叶片农杆菌侵染后容易除菌,大部分外植体能够继续培养,直至获得再生植株。因此如何解决受体材料除菌及转化率的问题也是苜蓿转基因产业化需要注意的一个问题。

龙牧 803 苜蓿是以四倍体肇东苜蓿作母本,野生二倍体扁蓿豆作父本,进行有性杂交选育而成,可在 pH8.16~8.4 的盐碱地上种植,但是对 NaCl 的耐受能力较差。我们的初步试验结果是 NaCl 浓度为 0.6% (pH6.0)时,试管苗不能生根正常生长,但是 NaCl 浓度为 0.4%、NaCl 浓度为 0.2% 时,试管苗却较不加 NaCl 培养基上的试管苗根系多,生长旺盛,其机理尚需深入研究。

参考文献:

- [1] 侯振安,李品芳.盐渍条件下苜蓿和羊草生长与营养吸收的比较研究[J].草业学报,2000,9(4):68-73.
- [2] Haro R, Banuelos M, Quintero F J, et al. Genetic basis of sodium exclusion and sodium tolerance in yeast [J]. Plant Physiol, 1993(89): 868-874.
- [3] Rubio F, Gassmann W, Shroeder J. Sodium driven potassium uptake by the plant potassium transporter HKT1 and mutations conferring salt tolerance. Science[J],1995(270):1660-1663.
- [4] Flowers TJ, Garcia M, Koyama M, et al. Breeding for salt tolerance in crop plants - the role of molecular biology [J]. Acta Physiologiae Plantarum,1997(19):427-433.

- [5] Yang SX., Zhao XY, Zhang Q., et al. HAL1 mediates salt adaptation in *A. rabidopsis thaliana*[J]. *Cell Res*, 2001,11 (2):142-148.
- [6] Gisbert C., Rus AM., Bolarin MC., et al. The yeast HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato[J]. *Plant Physiol*, 2000,123 :393-402.
- [7] Li Shujuan, Yang Chuanping, Liu Guifeng, et al. Transgenic Tobacco of HAL1 Gene and Its Ability of Salt Tolerance [J]. *Journal of Northeast Forestry University*. Jul,2004,32 (4): 47-49.
- [8] 韦正乙,刘艳芝,王兴智,等. HAL1 基因转化百脉根(*Lotus corniculatus*)的初步研究[J].*吉林农业科学*,2007,32(1):17-18,25.
- [9] Bordas M, Montesinos, C, Debauza, M, et al. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance [J]. *Transgenic Res*. 1997,6, 41-50.

含量与米饭外观、黏性、平衡度及食味呈极显著负相关,与米饭的硬度呈极显著的正相关,而直链淀粉含量与食味有微弱的相关性。在吉林省东部稻区,除蛋白质含量与米饭外观、黏性、平衡度及食味呈极显著负相关,与米饭的硬度呈显著的正相关外,直链淀粉含量与米饭外观、黏性、平衡度及食味呈显著负相关,与米饭的硬度呈显著的正相关。由此可见,在吉林省中部、西部蛋白质含量高低直接影响到稻米的食味,而直链淀粉含量对食味影响不大,而东部稻区稻米中蛋白质含量和直链淀粉含量对稻米食味影响显著。

3 结论与讨论

评价稻米品质不仅需要具有商品品质、碾米品质、蒸煮品质、营养品质等优良指标,食味好坏直接关系到消费者能否接受和更能客观评价稻米品质优劣。因此,稻米食味已引起育种、栽培、加工、流通领域研究人员重视。通过对吉林省优质米品种和推广品种在中部、西部、东部不同产地品质差异,影响食味因子的相关分析结果表明:

(1)吉林平原稻区品质优于通化稻区,其碾米品质中精米率、整精米率平均值高于通化地区。蛋白质含量和直链淀粉含量低于通化稻区,这种差异主要来源于通化稻区栽培技术中采用的稀植栽培和施肥技术有直接关系。

(2)通过米饭的外观、硬度、黏性、平衡度及食味测试,通化稻区平均分为 6.6 分、6.6 分、6.8 分、6.6 分和 69.8 分,而吉林平原稻区平均分为 7.6 分、6.0 分、7.7 分、7.6 分和 76.5 分,其中除米饭硬度分低于通化地区外,其他分值高于通化稻区。米饭硬度直接影响米饭的好坏,硬度分值越高,其他 3 项分值越低,硬度与黏性、外观、食味呈极显著的负相关(平均

- [10]P Ellul, G Rios,A.Atares, et al. The expression of the *Saccharomyces cerevisiae* HAL1 gene increases salt tolerance in transgenic watermelon [*Citrullus lanatus* (Thunb.) Matsun. & Nakai.][J]. *Theor Appl Genet*(2003)107 :462-469.
- [11]Maqbool B, Zhong H, El-Maghraby Y, et al. Competence of oat shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression, and osmotic tolerance of transgenic lines containing HAL1[J]. *Theor Appl Gen*, 2002(105): 201-208.
- [12]Rohila J S, Jain GK, Wu R. Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley HAL1 cDNA[J]. *Plant Sci*, 2002,163 (3): 525-532.
- [13]王关林,方宏筠.《植物基因工程》(第二版)[M].北京:科学出版社,2002:776-777,744.
- [14]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.

$R^2=0.88$ 以上),吉林稻区食味明显优于通化地区。

(3)影响食味值的因子主要是蛋白质含量,直链淀粉含量在 17.2%~19.5% 之间品种。在中部稻区和西部稻区影响食味主要因子是蛋白质含量,在东部稻区影响食味主要因子为蛋白质含量和直链淀粉含量。

稻米食味是一个比较复杂的指标,对食味影响因子也比较多。因此,对稻米品质评价不仅需要常规 12 项指标来决定品质优劣,而且应随着消费者观念的改变,更应该注重稻米食味品质。目前吉林省水稻新育成品种在常规 12 项指标中达到国标一级数量较多,并且在各项指标中超过日本优质品种。但在食味品质上与国内产日本品种秋田小町和日本产一目惚食味相比差距较大,很难形成吉林省优质大米品牌产品。因此,加强对优质食味米新品种选育研究的同时,重点进行优质食味米的区划和栽培技术研究,科学施用氮肥,控制蛋白质含量的提高,尤其是后期科学施肥,是提升吉林省优质食味米生产的关键技术。

参考文献:

- [1] 王丹英,章秀福,朱智伟,等.食用稻米品质性状的相关性分析[J].*作物学报*,2005,31(8):1086-1091.
- [2] 李再贵,刘洛宁.三上隆司我国稻米食味评定方法分析与思考[J].*北方水稻*,2007(3):5-8.
- [3] 张三元,张俊国,金京德,等.有机栽培环境对水稻产量构成及稻米品质的影响[J].*吉林农业科学*,2005,30(2):13-16.
- [4] 万靓军,张洪程,霍中洋,等.氮肥运筹对超级杂交粳稻产量、品质及氮素利用率的影响[J].*作物学报*,2007,33(2):175-182.
- [5] 李彦利,严光彬,贾玉敏,等.栽培因素对北方粳稻产量及米质影响第 12 报.氮肥施用量对产量及米质的影响[J].*北方水稻*,2008(2):37-39.
- [6] 徐正进,邵国军,韩勇,等.东北三省水稻产量和品质及与穗部性状关系的初步研究[J].*作物学报*,2006,32(12):1878-1883.