

酵母 *HAL1* 基因转化水稻及其耐碱性研究

于志晶¹, 王 岭², 金永梅¹, 林秀峰^{1*}, 马 瑞^{1*}

(1. 吉林省农业科学院生物所, 长春 130033; 2. 吉林农业大学, 长春 130118)

摘 要: 利用农杆菌介导的遗传转化法, 将从啤酒酵母中克隆出能调节细胞 K^+/Na^+ 的基因 *HAL1* 导入吉林省主栽粳稻品种吉粳 88 和吉粳 83 中, 经 PCR、Southern 杂交检测, 获得 246 株转基因阳性植株。转基因水稻在 pH 值为 11.0 的 NaOH 和 Na_2CO_3 碱性胁迫下, 吉粳 83 的转基因植株耐盐碱性为 1 级的有 7 株, 3 级的有 29 株; 吉粳 88 的转基因植株耐盐碱性为 1 级的有 6 株, 3 级的有 8 株。

关键词: *HAL1* 基因; 水稻; 耐盐碱

中图分类号: S511.035.3

文献标识码: A

Studies on Transgenic Rice with *HAL1* Gene and Its Tolerance to Alkali

YU Zhi-jing¹, WANG Ling², JIN Yong-mei¹, LIN Xiu-feng^{1*}, MA Rui^{1*}

(1. Agro-Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033;

2. Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: *HAL1* gene from yeast was transformed into main cultivars Jijing 88 and Jijing 83 of Jilin province mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Total 246 transgenic plants were validated by PCR and southern blot. In alkali tolerance experiments with pH 11, NaOH and Na_2CO_3 , 7 transgenic plants of Jijing 83 falling in class 1 for alkali tolerance and 29 transgenic plants of Jijing 83 falling in class 3 were obtained. Three transgenic plants of Jijing 88 falling in class 1 for alkali tolerance and 8 transgenic plants of Jijing 88 falling in class 3 were obtained.

Key words: *HAL1* gene; Rice; Alkali tolerance

土壤的盐碱化严重地影响了农业的生产与生态环境。对盐碱地的绿化, 不但可以扩大耕地的种植面积, 进一步发展农业生产, 还可以改善生态环境。利用转基因技术培育能在盐碱地上种植的抗盐碱植物, 是对盐碱地充分利用的一条经济有效的途径。据推测, 能够协调离子的跨膜吸收和液泡的分隔作用, 是对盐碱胁迫最佳的基因型。因此, 对与离子的跨膜转运和离子分隔相关的关键基因进行分离, 并进一步研究其功能尤为必要。离子选择性吸收、质膜 K^+ 、 Na^+ 交换和液泡膜 Na^+ 、 H^+ 交换是植物体内维持离子的平衡、盐分的运输和盐分的区域化的主要机制^[1]。在耐盐碱品种的叶片中, 钾、钠离子的总量较低, 而 K^+/Na^+ 较高, 这主要是因为盐分离子被根系的选择吸收、

质膜 K^+ 、 Na^+ 交换和液泡膜 Na^+ 、 H^+ 交换造成的^[2]。*HAL1*^[3-4]、*SOS1*^[5]、*AtNHX1*^[6]和 *KAT1*^[7-8]等基因是目前已知的涉及盐分离子跨膜吸收运输的主要基因。经过转基因分析, 通过基因植物耐盐碱性可以被不同程度地提高。其中 Zhang^[9]、Osbert 等^[10]报导的被转入 *AtNHX1* 基因的番茄可耐 200 mmol/L 的氯化钠盐, 吸收的钠盐在叶片中被积累, 并且不影响果实的品质。从这些研究中可以看出, 离子的选择吸收和跨膜运输的基因工程对提高植物的耐盐性是有效的改良途径。

在酿酒酵母中, *HAL1* 基因是重要耐盐因子, 其被用来表达参与调节细胞内离子的浓度^[11]。该基因在盐胁迫下能够被表达, 产物为定位于细胞质中的 32 kd 的蛋白, 具有调节 Na^+/K^+ 的特性。尽管 *HAL1* 不是转运蛋白, 但被盐胁迫的情况下, 可以与 *ENA1* 基因进行协同作用, 促进 Na^+ 被排出, 并与其他转运系统进行协同作用, 增加 K^+ 的吸收, 保持细胞内低的 Na^+/K^+ , 从而减轻 Na^+ 毒害^[12], 因此在植物耐盐基因工程方面具有很大的应用潜

收稿日期: 2014-06-23

作者简介: 于志晶(1977-), 女, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物分子生物学、遗传转化与代谢工程研究。

通讯作者: 林秀峰, 女, 研究员, E-mail: linxiufeng8581@163.com

马 瑞, 男, 博士, 研究员, E-mail: ruimaa@yahoo.com

力。1991年,Gaxiola等人发现具有盐诱导的特异蛋白存在酵母中,HAL1被从中分离出来,证明其在酵母的耐盐性方面,具有重要的作用。该基因被先后转入甜瓜^[13]、番茄^[14-15]、燕麦^[16]和水稻^[17]等。通过耐盐检测看出,被转入HAL1基因的植株在耐盐性方面,比野生型的耐盐性有不同程度提高,但HAL1基因的确切功能还需要被进一步的研究证实。

1 材料与方法

1.1 植物材料与目的基因

粳稻品种吉粳83和吉粳88,由吉林省农业科学院水稻所提供。本研究使用的目的基因是来自酵母中能调节细胞K⁺/Na⁺的基因HAL1,由吉林省农业科学院生物技术研究所邢少辰研究员提供。

1.2 植物表达载体构建

本研究使用的农杆菌Ti双元载体为pCAMBIA3300,目的基因的启动子为CaMV35S(P35S),终止子nos,筛选标记为Bar,其T-DNA区结构见图1。

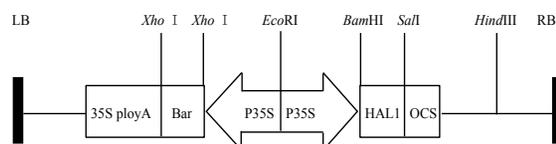


图1 重组质粒pCAMBIA3300-HAL1的T-DNA示意图

1.3 农杆菌介导的遗传转化

水稻种子用升汞消毒后接种在培养基1(表1)上暗培养7~10d,当胚乳稍微变软,盾片变大时,拔掉芽鞘,转到培养基2上,20~30d后挑选呈浅黄色颗粒状且排列紧密的愈伤组织进行继代培养。

表1 农杆菌介导转化所用培养基成分

mg/L

培养基	成分
1	N6大量,Bs微量,MB铁盐,Bs有机,谷氨酸胺0.5g/L,脯氨酸0.5g/L,水解酪蛋白0.3g/L,肌醇0.1g/L,2,4-D 2.0mg/L,蔗糖30g/L
2	N6大量,MB铁盐,Bs微量,Bs有机,谷氨酸胺0.5g/L,脯氨酸0.5g/L,水解酪蛋白0.3g/L,肌醇0.1g/L,2,4-D 2.0mg/L,蔗糖30g/L
3	N6大量,MS铁盐,Bs微量,Bs有机,谷氨酸胺0.5g/L,脯氨酸0.5g/L,水解酪蛋白0.3g/L,肌醇0.1g/L,6-BA 2mg/L,NAA 1mg/L,ABA 5mg/L,蔗糖30g/L,植物凝胶2.6g/L,pH 5.8。常规灭菌后加抽滤灭菌的头孢霉素300mg/L,PPT 15mg/L
4	N6大量,MS铁盐,Bs微量,Bs有机,谷氨酸胺0.5g/L,脯氨酸0.5g/L,水解酪蛋白0.3g/L,肌醇0.1g/L,KT 2mg/L,NAA 0.5mg/L,6-BA 1mg/L,蔗糖30g/L,植物凝胶2.6g/L,pH 5.8。常规灭菌后加抽滤灭菌的头孢霉素300mg/L,PPT 15mg/L
5	1/2 MS大量,1/2 MS铁盐,1/2 Bs微量,蔗糖10g/L,10mg/L PPT,植物凝胶2.5g/L,pH 5.8。常规灭菌

从预培养3~5d的愈伤组织中挑选色泽好、排列紧密、含水少的愈伤组织与携带有表达载体pCHAL1的农杆菌EHA105共培养3d后,转入含有20mg/L草丁膦的筛选培养基上,经过2~3次筛选后,选取生长状态正常,黄色有光泽的抗性愈伤组织接种到培养基3上,弱光培养7d左右,再转到培养基4上进行光照培养20~40d,分化成苗。当苗高2cm左右时,转到培养基5上进行生根。当苗高达8~10cm时,进行炼苗,7d左右进行移栽,单个样本插秧,每桶插5株。

1.4 转基因水稻的PCR检测

采用CTAB法提取水稻叶片总DNA,用碱裂解法提取质粒DNA。以pCHAL1质粒上的目的基因片段为阳性的对照,以未经转化水稻的总DNA为阴性的对照,对转化水稻的DNA样品进行PCR检验。用于扩增的引物是:上游引物F:5'-

GGATCCATGCATTTCAAAGATTTAGG-3',下游引物R:5'-GGTACCGGTGACCTCAACTATTTCTGTGTTGA-3',DNA模板100ng,2×PCR supermix 12.5μL,10μmol/L引物(F/R)各1.0μL,加灭菌ddH₂O至25μL。PCR扩增反应程序为:94℃ 5min;94℃ 50s,53℃ 55s,72℃ 1min,30循环;72℃ 10min。扩增产物在1.0%的琼脂糖凝胶上进行检测。

1.5 转基因植株总DNA的提取及Southern杂交

利用CTAB法提取水稻叶片总DNA,取50μg DNA用HindIII进行过夜酶切,电泳后转膜,然后用罗氏地高辛标记的HAL1基因片段为探针进行杂交。杂交完毕后用1×SSC和0.1%SDS在室温下漂洗1次,再用65℃的1×SSC和0.2%SDS洗涤2次,晾干,用保鲜膜包平,放入暗夹,然后在暗室中将膜压在X-光片上,在暗处显色1h,观察Southern杂交结果。

1.6 当代转基因水稻的耐盐碱筛选

试验用桶的直径为 32 cm、高为 25.5 cm,桶内装高约 22 cm 的普通土。转化苗炼苗 7 d 后移栽,单个样本进行插秧。桶中施入适量的 N、P、K 肥料。28 d 后,向桶内加 pH 为 11.0 的 NaOH 和 NaHCO₃ 的缓冲液,直到土壤的 pH 值为 8.9,11 d 后进行调查,苗期耐盐碱的评价指标是死叶率。

死叶(或黄叶)率(%)=(供试植株死叶数/供试植株叶片总数)×100%

以水稻死叶率(或黄叶率,以下相同)作为耐碱性鉴定的指标,具体评价标准如下。1 级:死叶率≤20%,耐碱性极强;3 级:死叶率在 20%~40%,耐碱性强;5 级:死叶率是 40%~60%,耐碱性中等;7 级:死叶率是 60%~80%,耐碱性弱;9 级:死叶率是 80%~100%,耐碱性极弱。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的获得

吉粳 88 品种共转化了 400 块愈伤组织,获得 76 块抗性的愈伤组织,抗性比率是 19%,获得了抗性植株 65 株,转化效率是 16.3%;吉粳 83 品种共转化了 1200 块愈伤组织,共获得了 219 块抗性的愈伤组织,抗性率是 18.3%,获得抗性的植株 181 株,转化效率是 15.1%。本研究所用的两个品种中,吉粳 88 的转化效率比吉粳 83 的转化效率低,说明品种差异是影响遗传转化效率的因素之一。

2.2 转基因植株的 PCR 鉴定

提取对照吉粳 83 和吉粳 88 及其抗 PPT 植株的 DNA 进行 PCR 扩增,上述抗 PPT 植株的 181 株吉粳 83 和 65 株吉粳 88 均是 PCR 阳性植株,阳性植株与质粒扩增片段大小一致,约 900 bp(图 2),

初步证明 HAL1 基因已整合到水稻基因组中。

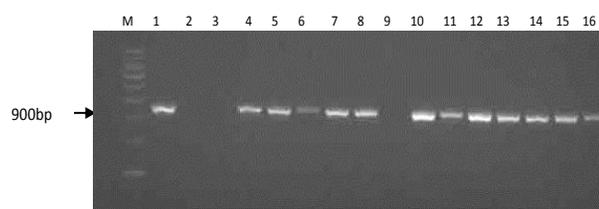


图 2 转 HAL1 基因植株的 PCR 检测结果

M:标准分子量;1:阳性对照;2:吉粳 83 非转基因株;
3:吉粳 88 非转基因株;4~8:吉粳 83 转基因株;
9:空格;10~16:吉粳 88 转基因株

2.3 转基因植株 Southern 杂交结果

选择部分 PCR 阳性植株进行 Southern blot 分析,结果显示,这几个样品都是单拷贝的(图 3),证明外源基因是以单拷贝进入水稻基因组的。



图 3 转 HAL1 基因植株的 southern 杂交结果

1:非转基因植株;2:阳性对照;3~5:独立转化植株

2.4 转 HAL1 基因的当代耐盐碱植株获得

插秧 28 d 非转化植株和转基因植株都正常生长,向桶中加 pH 值为 11.0 的 NaOH 和 Na₂CO₃ 缓冲液浇灌 11 d 后,部分植株的叶片开始变黄甚至枯死。其中,吉粳 83 的转基因当代植株,耐盐碱性为 1 级的有 7 株,3 级的有 29 株;吉粳 88 的转基因当代植株,耐盐碱性为 1 级的有 6 株,3 级的有 8 株(表 2)。

表 2 pH 值为 8.9 的碱胁迫下转基因当代植株抗性

材料	鉴定植株总数 (株)	植株数(株)				
		1 级	3 级	5 级	7 级	9 级
吉粳 83(CK)	10	-	-	2	4	4
转 HAL1 的吉粳 83	181	7	29	52	71	22
吉粳 88(CK)	10	-	-	2	5	3
转 HAL1 的吉粳 88	65	6	8	14	25	12

本研究筛选出耐盐碱性强的转基因当代植株 50 株,其中吉粳 83 的转化植株为 36 株,吉粳 88 的转化植株为 14 株。

3 讨论

近年来,植物耐盐碱基因工程得到飞速发展。代谢工程策略是用来提高植物体内渗透保护物质的,转基因植物的耐盐碱性在不同程度上被提高了;同时一些新的基因工程策略也出现了;然而,这些基因工程策略均未能着眼于消除盐碱

迫下细胞内过多 Na^+ 的毒害^[18]。Apse 等在拟南芥中逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 过量表达,该基因负责 Na^+ 区隔化,用来使 Na^+ 毒害被消除,显著提高了转基因植株的耐盐性^[19]。

本实验应用 *HAL1* 基因转化水稻,转基因植株的分子检测以及耐碱性分析表明,*HAL1* 基因已整合到一些转基因水稻的基因组中,且转基因植株的耐碱性提高。

转基因植株耐盐性鉴定表明,因为转化子存在的不同,在耐盐碱能力上也存在着很大的差别。可能是以下原因造成的:一是因为经过除草剂筛选后,存在着纯合转化植株、嵌合体、未经转化植株 3 种可能情况。因为嵌合体的快繁所形成的无性系出现了分离的情况,有些植株中存在转入的基因,有些植株中基因发生了丢失,有些植株仍然是嵌合体。二是外源基因被插入的位点、拷贝数和基因的表达量不同,基因的丢失和沉默现象还存在于有些植株中。三是多种耐盐碱机制存在于植物体中,植物的耐盐碱性状被普遍认为是数量性状^[20],受多基因控制,其耐盐碱性并不会因为一个外来耐盐碱基因的导入而发生较大的提高。所以可以使用以下措施,显著改善植物的耐盐性状。第一,反复对抗性芽进行筛选,并逐步提高筛选试剂的浓度,使生长良好的转化纯合体得到保留,并淘汰非转化植株,筛选出真正的转化植株。第二,要进一步加强植物耐盐碱机制研究,尤其是盐碱胁迫情况下的耐受机制,在基因组水平上要进行整体性的研究。目前主要采用复合基因转化策略^[20-21],即将多个耐盐碱基因同时转入到同一受体植物中,以增强转录因子的基因策略^[22]来提高植物耐盐碱性。

参考文献:

- [1] Xu X M, Ye H C, Li G F. Progress in research of plant tolerance to saline stress[J]. Chin J Appl Environ Biol, 2000, 6(4): 379-387.
- [2] Baker D A, Hall J L. Solute Transport in Plant Cells and Tissues [M]. New York: John Wiley and Sons Inc, 1988.
- [3] Bordas M, Montesinos C, Dabauza 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(1): 41-50.
- [4] Gaxiola R, Rao R, Sherman A, et al. The Arabidopsis thaliana proton transporters, AtNhx1 and Avp1, can function in cation detoxification in yeast[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1999(96): 1480-1485.
- [5] Shi H, Ishitani M, Kim C, et al. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene *SOS1* encodes a putative Na^+/H^+ antiporter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2000(97): 6896-6901.
- [6] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt tolerance conferred by over expression of avacuolar Na^+/H^+ antiport in Arabidopsis[J]. Science, 1999, 285(5431): 1256-1258.
- [7] Kim E, Kwak J M, Uozumi N. A tKUP 1: A rabadopsis gene encoding high-affinity potassium transport activity[J]. Plant Cell, 1998(10): 51-62.
- [8] Fu H H, Luan S. AtK UP1: a dual affinity K^+ transporter from Arabidopsis[J]. Plant Cell, 1998(10): 63-73.
- [9] Zhang H X, Blumwald E. Transgenic salt tolerant tomato plants accumulate salt in the foliage but not in the fruits[J]. Nat Biotechnol, 2001(19): 765-768.
- [10] Osbert C, Rus A M, Bolatin C, et al. The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato[J]. Plant Physiol, 2000, 123(5): 393-402.
- [11] Maruquez J A, Pascual-Ahuir A, Prof M, et al. The Ssn6-TuPI repressor complex of *Saccharomyces cerevisiae* is involved in the osmotic induction of HOG-dependent and independent genes[J]. EMBO, 1998, 17(9): 2543-2553.
- [12] Bordas M, Montesinos C, Dabauza 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(1): 41-50.
- [13] Gisbert C, Rus A M, Bolarin M C, et al. The yeast *HAL1* gene improves salt tolerance of transgenic tomato[J]. Plant Physiol, 2000(123): 393-402.
- [14] Zhang Q, Wang S F, Zhao Y X, et al. Cloning of *HAL1* gene and characterization for salt tolerance tomato[J]. Chin J Biotech, 2001(17): 658-662.
- [15] Maqbool B, Zhong H, E-I 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.
- [16] Rohila J S, Jain G K, 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.
- [17] Yeo A. Molecular biology of salt tolerance in the context of whole plant physiology[J]. J Experi Botany, 1998, 49: 915-929.
- [18] Apse M P, Aharon G S, Snedden W A, et al. Salt Tolerance Conferred by Overexpression of avacuolar Na^+/H^+ antiporter in Arabidopsis[J]. Science, 1999(285): 1256-1258.
- [19] Foodlda M R, Jones R A. Mapping salt-tolerance genes in tomato using trait-based marker analysis[J]. Theor APPI Genet, 1993(87): 184-192.
- [20] Holmbegr I H, Buofw L. Improving stress tolerance in plants by gene transfer trends[J]. Plant Sci, 1998, 3(2): 61-66.
- [21] Bolmert H J, Jensen R G. Metabolic engineering for increased salt tolerance the next step[J]. Aust J Plant Physiol, 1996(23): 661-667.
- [22] Winicov L. New molecular approaches to improving salt tolerance in crop plants[J]. Ann Bot, 1998(82): 703-710.