

研究报告

A Letter

农杆菌介法将耐盐基因 *HAL1* 转入玉米自交系 H99 的研究

孙传波[✉], 郭嘉[✉], 陶蕊[✉], 李海华[✉], 孟凡梅[✉], 曲文利[✉], 韦正乙[✉], 刘文国[✉], 袁英[✉]

吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春, 130033

✉ 通讯作者: chuanbosun@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 22 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0022

收稿日期: 2010 年 12 月 22 日

接受日期: 2011 年 02 月 18 日

发表日期: 2011 年 02 月 28 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

孙传波等, 2011, 农杆菌介法将耐盐基因 *HAL1* 转入玉米自交系 H99 的研究, 分子植物育种 Vol.9 No.22 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0022)

摘要 通过农杆菌介导法将耐盐基因 *HAL1* 转入玉米自交系 H99 中, 同时研究了愈伤组织状态、农杆菌浓度、侵染时间和真空压力等因素对转化频率的影响。结果表明: 继代 5 d 的愈伤组织、菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0.6 和 0.05 Mpa 真空压力侵染时间 15 min 为最佳转化条件。通过该优化体系获得的转基因植株 18 株, 经 PCR 分析鉴定, 其中 9 株表现阳性, 初步证明外源基因已经整合到玉米基因组中。

关键词 农杆菌介导; *HAL1*; 抗性愈伤; 转化体系

Study on *Agrobacterium Tumefaciens* Mediated Transformation of Salt-Tolerance Gene *HAL1* into Maize Inbred Line H99

Sun Chuanbo[✉], Guo Jia[✉], Tao Rui[✉], Li Haihua[✉], Meng Fanmei[✉], Qu Wenli[✉], Wei Zhengyi[✉], Liu Wenguo[✉], Yuan Ying[✉]

Center of Agri-Biotechnology, Jilin Academy of Agriculture Sciences, Changchun, 130033, P.R. China

✉ Corresponding author, chuanbosun@163.com; ✉ Authors

Abstract The *HAL1* gene was transferred into maize inbred line H99 by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Factors influencing transformation efficiency were studied: including callus state, bacterial concentration, infection time and vacuum pressure. Results show that callus subculture for 5 days, bacterium concentration (OD₆₀₀ = 0.6), 0.05 Mpa vacuum pressure and 15 minutes infection time were the optimal conditions. 18 transgenic plants were obtained by the optimal system. The result of PCR amplification indicated that 9 of them were positive and the target gene was integrated into maize genome.

Keywords *Agrobacterium tumefaciens* mediated; *HAL1*; Resistant calli; Transformation system

研究背景

玉米(*Zea mays* L.)是三大粮食作物之一, 在我国农业生产中占有重要地位, 转基因玉米的研究也因此受到普遍重视。自从首次获得玉米转基因完整植株以来(Rhodes., 1988), 玉米遗传转化技术得到了较大的发展, 利用现代生物技术进行玉米品种改良的研究已日趋深入。目前玉米的遗传转化方法主要有基因枪法和农杆菌转化法(袁英等, 2006), 农杆菌作为一种天然的植物基因转化系统, 具有转化的外源DNA结构完整、转化机理清楚、整合位点较稳定、拷贝数低、遗传稳定性好等优点。在国外通过农杆菌转化法获得了很多稳定的转基因玉米(Gould

et al., 1991; Ishida et al., 1996; Huang et al., 2004), 在国内也建立了农杆菌介导的玉米遗传转化体系(黄璐等, 1999)。

干旱、盐碱等逆境条件严重影响玉米的生产, 利用转基因技术来改善玉米的抗逆性一直是生物学家的重要研究内容。*HAL1*为细胞离子平衡调节因子, 其过表达使细胞内K⁺浓度提高Na⁺浓度降低, 提高细胞对盐的耐受性((Rios et al., 1997; Yang et al., 2001)。国外率先将*HAL1*基因导入甜瓜(Bordas et al., 1997), 提高了转基因植株在组织培养条件下的耐盐性, 随后*HAL1*基因在番茄、烟草和水稻等植物中也得到了表达(田吉林等, 2003; Rohila et al., 2002), 耐

盐检测表明, 转*HALI*基因植株的耐盐性比野生型有明显提高。这表明, 通过*HALI*基因改良生物的耐盐性是有效的。本文研究愈伤组织状态、农杆菌浓度、侵染时间及真空压力等因素对玉米农杆菌遗传转化的影响, 建立适宜自交系H99的农杆菌转化体系, 通过体系将耐盐基因*HALI*转入玉米自交系H99, 获得抗旱耐盐的优良玉米种质资源。

1 结果与分析

1.1 愈伤组织状态对遗传转化的影响

以继代不同时间的胚性愈伤组织为外植体进行农杆菌转化, 经 3 次筛选后, 所得到的抗性愈伤组织率不同。由表 1 的实验结果可以发现, 胚性愈伤组织状态明显的影响着抗性愈伤率, 继代 5 d 后转化的胚性愈伤组织其抗性愈率最高为 38.46%, 而继代 0 d 和继代 12 d 的胚性愈伤组织转化后抗性愈伤率分别为 5.61% 和 10.26%, 明显低于继代 5 d 的胚性愈伤组织, 由此可见选择继代 5 d 后的胚性愈伤组织最适宜农杆菌转化。

表 1 继代天数对玉米遗传转化的影响

Table 1 Effect of subculture days on maize transformation

继代天数 Subculture days	侵染愈伤数 No. of Infection calli	抗性愈伤数 No. of Resistant calli	抗性愈伤率(%) Frequency of resistant calli (%)
0	107	6	5.61
2	106	9	8.49
3	115	37	32.17
5	104	40	38.46
6	150	42	28
10	121	22	18.18
12	117	12	10.26

1.2 农杆菌浓度(OD₆₀₀)对遗传转化的影响

菌液浓度是影响遗传转化效率的关键因素之一, 以继代 5 d 的愈伤组织为外植体, 用不同 OD₆₀₀ 值的菌液转化胚性愈伤组织, 经过 3 次抗性筛选后, 统计抗性愈伤组织率。由图 1 结果可以明显发现, 当 OD₆₀₀=0.6 时抗性愈伤率最高为 35.33%, OD₆₀₀=0.2 时最低位 8.33%, 当 OD₆₀₀ 小于 0.6 时随着菌液浓度增大, 抗性愈伤率不断提高; 当 OD₆₀₀ 大于 0.6 时随着菌液浓度增大, 抗性愈伤率反而降低, 这可能是由于高浓度菌体对愈伤组织的伤害大

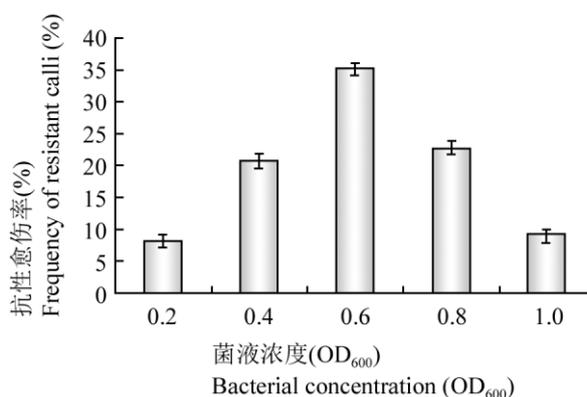


图 1 农杆菌浓度对遗传转化的影响

Figure 1 Effect of bacterial concentration on maize transformation

和共培养后难抑制菌造成的。

1.3 真空压力和侵染时间对遗传转化的影响

在菌液 OD₆₀₀=0.6 条件下, 以继代 5 d 的胚性愈伤组织为外植体, 研究真空压力和侵染时间对转化率的影响。由表 2 可以看出在 0.05 Mpa 和 0.07 Mpa 真空压力条件下, 侵染 15 min 和 20 min 的抗性愈伤率几乎相同, 20 min 比 15 min 的稍高, 但是在实验中我们发现, 同等压力条件下, 愈伤侵染 20 min 比 15 min 的难抑制菌, 而且状态不好; 相同侵染时间时, 0.07 Mpa 比 0.05 Mpa 的愈伤难抑制菌, 而且状态不好; 综合考虑选择 0.05 Mpa 真空压力, 侵染 15 min 的转化条件。

1.4 转基因植株的分子生物学检测

通过该优化体系转化 1260 块 H99 胚性愈伤组织, 共获得转化植株 18 株, 经过 PCR 初步鉴定, 其中 9 株呈阳性, 抗性植株阳性率为 50%, 图 2 结果显示, 转基因植株扩增出 375 bp 的目的条带, 和阳性对照一致, 可以初步证明外源基因已经整合到玉米基因组中。

2 讨论

为了建立完善的农杆菌介导的玉米遗传转化体系, 本实验以 H99 胚性愈伤组织为外植体, 研究了胚性愈伤组织状态、农杆菌浓度、侵染时间和真空压力等因素对转化效率的影响, 并应用该体系将耐盐基因 *HALI* 转入自交系 H99 中。试验中发现, 胚性愈伤组织状态对转化效率影响非常明显, 当以继代 5 d 的胚性愈伤组织为外植体, 抗性愈伤获得

表 2 真空压力和侵染时间对玉米遗传转化的影响

Table 2 Effect of vacuum pressure and infection time on maize transformation

真空压力(Mpa)	抗性愈伤率(%)					
Vacuum pressure (Mpa)	Frequency of resistant calli (%)					
	5 min	10 min	15 min	20 min	40 min	
0	1.5	4.08	13.48	11.34	8.91	
0.03	2.97	8.55	14.29	15.31	13.33	
0.05	7.27	14.95	29.12	30.65	9.17	
0.07	8.91	22	30.4	31.11	10.45	
0.1	11.93	16.96	16.98	16.27	7.2	

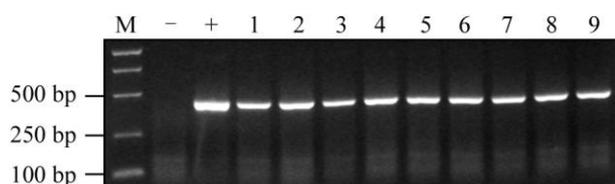


图 2 转基因植株 PCR 分析

Figure 2 PCR analysis on transgenic plants

注: M: DL2000; -: 阴性对照; +: 阳性对照; 1-9: 转基因植株
Notes: M: DNA marker; -: Negative control; +: Positive control; 1-9: Transgenic plants

率高于其他条件, 这说明此状态的愈伤组织刚好处于对数生长期, 比较利于转化。菌液浓度对转化频率有着直接影响, 当 $OD_{600}=0.6$ 时抗性愈伤率最高为 35.33%, 但是当浓度过高时($OD_{600}>0.6$), 由于吸附得菌液过多, 对愈伤组织的伤害增大, 后期的抑制菌难度增加, 转化率反而降低。在本实验中还尝试了真空压力对遗传转化的影响, 在 0.05 Mpa 和 0.07 Mpa 真空压力条件下, 侵染 15 min 和 20 min 的抗性愈伤率几乎相同, 但是发现同等压力条件下, 侵染时间长的难抑制菌, 而且状态不好; 相同侵染时间时, 真空压力越大越难抑制菌; 综合考虑选择 0.05 Mpa 真空压力, 侵染 15 min 的转化条件。因此选择继代 5 d 的愈伤组织、菌液浓度 $OD_{600}=0.6$ 和 0.05 Mpa 真空压力侵染时间 15 min 为目前本实验室的玉米农杆菌转化的转化条件, 要建立一套转化效率高的完善体系, 还需要研究影响遗传转化效率的其他因素, 我们将在以后的试验中继续优化。

通过该优化体系将耐盐基因 *HAL1* 转入玉米自交系 H99 的愈伤组织(1 260 块)中, 经过 3 d 共培养, 4 d 恢复培养, 三次除草剂(Bar 3.0 mg/L)筛选后, 获得转基因玉米材料 18 株, 经过 PCR 初步鉴定, 其中 9

株呈阳性, 抗性植株阳性率为 50%, 初步证明外源基因 *HAL1* 已经整合到玉米基因组中。转 *HAL1* 植株的获得将为玉米抗旱耐盐的新品系玉米品种培育奠定良好的基础。

3 材料与方法

3.1 材料

3.1.1 植物材料

玉米自交系 H99。

3.1.2 植物表达载体

植物载体为 pC3301-*HAL1*, 含有目的基因 *HAL* 和筛选标记基因 *Bar* (图 3)。



图 3 pC3301-*HAL1* 载体结构简图

Figure 3 Schematic representation of pC3301-*HAL1* vector

3.1.3 培养基

实验中所用到的培养基如下: YEP 培养基: 酵母提取物 10 g/L+蛋白胨 10 g/L+NaCl 5 g/L, pH=7.0; 侵染培养基: 1/2 MS 大量, 1/2 MS 微量, 1/2 MS 维生素, 100 mg/L 肌醇, 水解酪蛋白 500 mg/L, 2,4-D 1.5 mg/L AS100 mg/L+3.6%蔗糖+6.8%葡萄糖, pH=5.2; 愈伤组织诱导培养基: MS 大量, MS 微量, MS 维生素, 100 mg/L 肌醇, 水解酪蛋白 500 mg/L, L-脯氨酸 500 mg/L, L-天门冬酰胺 200 mg/L, 泛酸钙 0.5 mg/L, 生物素 0.05 mg/L, 2,4-D 1.5 mg/L, 蔗糖 4% (w/v) pH=6.0; 继代培养基: MS 大量, MS 微量, MS 维生素, 100 mg/L 肌醇, 水解酪蛋白 500 mg/L, 2,4-D 2.0mg/L, 蔗糖 3% (w/v) pH=6.0;

共培养培养基: 1/2 MS 大量, 1/2 MS 微量, 1/2 MS 维生素, 2,4-D 1.5 mg/L AS100 mg/L AgNO₃ 850 mg/L + 半光氨酸 100 mg/L + 3% 蔗糖 pH=6.0; 恢复培养基: 1/2 MS 大量, 1/2 MS 微量, 1/2 MS 维生素, 2,4-D 1.5 mg/L + MES 0.5 g + AS100 mg/L + Cef 500 mg/L + 3% 蔗糖 pH=6.0; 筛选培养基: 1/2 MSZ + 2,4-D 1.5 mg/L + MES 0.5 g + Cef 500 mg/L + 除草剂(Bar 3.0 mg/L) + 3% 蔗糖 pH=6.0; 分化培养基: 继代培养基 + KT 0.5 mg/L + Cef 500 mg/L 代培养基 + KT 0.5 mg/L + Cef 500 mg/L pH=5.8; 生根培养基: 继代培养基 + IBA 0.5 mg/L + Cef 500 mg/L + 活性炭 5 g/L pH=6.0。

3.2 方法

3.2.1 外植体的获取

取授粉 9~13d, 1 mm 左右的幼胚接种在诱导培养基上, 每 14 d 继代一次, 继代 3 次后得到胚性愈伤组织。

3.2.2 农杆菌转化

3.2.2.1 工程菌的制备

将含有质粒 pC3301-*HAL1* 的农杆菌 EHA105 在含相应抗生素的 YEP 液体培养基中 28°C, 180 rpm 培养至 OD₆₀₀ 值在 0.8 左右, 离心 5 min 收集菌体, 然后用侵染培养基重悬菌体, 加入乙酰丁香酮(AS) 100 μmol/L, 调整重悬液浓度至 OD₆₀₀=0.6。

3.2.2.2 外植体的侵染

将继代 0~12 d 的愈伤组织分别集中于小三角瓶中, 用 OD 值为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0 的重悬菌液在不同真空压力条件下侵染 5 min、10 min、15 min、20 min、30 min, 侵染结束后将愈伤组织置于带滤纸的培养皿中, 吸去多余菌液后放在共培养基上, 21°C 共培养 3 d。

3.2.3 转化植株的获得

3.2.3.1 抗性愈伤组织的筛选

共培养 3 d 后的愈伤组织转移至恢复培养基中, 恢复培养 4 d 后转移至筛选培养基中筛选抗性愈伤组织。每 14 d 筛选一次, 3 次筛选后得到抗性愈伤组织。

3.2.3.2 抗性愈伤组织的分化

筛选得到的抗性愈伤组织置于分化培养基中,

在 27°C, 2000Lx 光强, 每天光照 16 h 的条件下分化生长, 直至得到幼苗。

3.2.3.3 壮苗培养和移栽

将幼苗放在生根培养基中生长, 待根系发达后, 敞开瓶口炼苗, 1 周后移栽于温室。

3.2.4 转化植株的 PCR 检测

3.2.4.1 DNA 的提取

当转化植株处于 4 叶期时取玉米幼嫩的叶片, 用 CTAB 法提取转基因玉米的基因组 DNA。

3.2.4.2 PCR 检测抗性植株

根据 *HAL1* 的基因序列设计引物 PCR 引物: PR: 5'CCAGAAACCCACGTCATGCC3' PF: 5'CAGGAACCGCAGGAGTGG3'; 反应体系为 20 μl。PCR 扩增序为: (1)95°C, 预变性 5 min; (2)95°C, 变性 1 min; (3)56°C, 退火 30 s; (4)72°C, 延伸 30 s; (5)重复步骤(2)~(4)40 次; (6)72°C 延伸 10 min。PCR 产物大约 375 bp。

作者贡献

孙传波是本研究的实验设计和论文初稿的写作, 孙传波、郭嘉、陶蕊、孟凡梅和曲文利参与实验研究的执行和数据分析; 韦正乙提供植物表达载体, 李海华负责转化植株在温室的生长, 刘文国和袁英是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2009ZX08003-018B)资助。

参考文献

- Bordas M., Montesinos C., Dabauza M., Salvador A., Roig LA., Serrano R., and Moreno V., 1997, Transfer of the yeast salt tolerance gene *HAL1* to *Cucumis melo* L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance, *Transgenic Res.*, 6: 41-50
- Gould J., Devey M., Hasegawa O., Ulian E.C., Peterson G., and Smith R.H., 1991, Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex, *Plant Physiol.*, 95: 426-434
- Huang L., and Wei Z.M., 1999, *Agrobacterium tumefaciens* mediated maize transformation, *Shiyan Shengwu Xuebao*

(Acta Biologiae Experimentalis Sinica), 32(4): 381-387
(黄璐, 卫志明, 农杆菌介导的玉米遗传转化, 实验生物学报, 1999, 32(4): 381-387)

的研究, 分子植物育种, 4(2): 228-232)

Huang S., Gilbertson L.A., Adams T.H., Malloy K.P., Reisenbigler E.K., Birr D.H., Snyder M.W., Zhang Q., and Luethy M.H., 2004, Generation of marker free transgenic maize by regular two2border *Agrobacterium transformation* vectors, *Transgenic Res.*, 13(5): 451-461

Ishida Y., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., and Kumashiro T., 1996, High efficiency transformation of *Zea mays* L. mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Nature Biotechnology*, 14(6): 745-750

Rhodes C.A., Pierce D.A., Mettler I.J., Mascarenhs D., and Detmer J.J., 1988, Genetically transformed maize plants from protoplasts, *Science*, 240: 204-207

Rios G., Ferrando A., and Serrano R., 1997, Mechanisms of salt tolerance conferred by over expression of the *HAL1* gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Yeast*, 13: 515-528

Rohila J.S., Jain G.K., and Wu R., 2002, Genetic improvement of basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley *HAL1* cDNA, *Plant Sci.*, 163(3): 525-532

Tian J.L., Yang Y.A., He Y.K., 2003, Salt tolerance of transgenic tomato with *HAL1* gene, *Zhiwu Shengli Yu Fenzi Shengwu Xuebao* (Journal of Plant Physiology and Molecular Biology), 29(5): 409-414 (田吉林, 杨玉爱, 何玉科, 2003, 转 *HAL1* 基因番茄的耐盐性, 植物生理与分子生物学学报, 29(5): 409-414)

Yang S.X., Zhao Y.X., Zhang Q., He Y.K., Zhang H., and Luo D., 2001, *HAL1* mediate salt adaptation in *Arabidopsis thaliana*, *Cell Res*, 11 (2): 142-148

Yuan Y., Li Q.Y., Hao W.Y., Tan H., Kong X.M., Zhang G.D., and Liu D.P., 2006, Studies on influencing factors of *agrobacterium tumefaciens* mediated maize transformation, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 4(2): 228-232 (袁鹰等, 李启云, 郝文媛, 谭化, 孔祥梅, 张光弟, 刘德璞, 2006, 农杆菌介导的玉米遗传转化影响因子

 **5thPublisher**是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>