

白三叶转基因研究进展

李志亮^{1,2,3}, 邢浩春¹, 杨清², 吴忠义³, 张秀海³, 黄丛林³

(1. 邯郸学院 生物科学系 河北 邯郸 056005; 2. 南京农业大学 生命科学学院 江苏 南京 210095; 3. 北京农业生物技术研究中心 北京 100097)

摘要:综述了白三叶植株再生体系的建立及转抗病毒、抗虫、抗逆、品质改良、植物疫苗、矿质营养吸收、植物激素合成等基因方面的研究进展。此外,还对转基因白三叶的发展前景作了简要展望。

关键词:白三叶;植株再生;遗传转化;转基因白三叶

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)07-0149-04

白三叶(*Trifolium repens* L.)属于豆科(Fabaceae, Papilionaceae)车轴草属植物,又称白车轴草、白花苜蓿、荷兰翹摇。原产欧洲,广泛分布于温带及亚热带高海拔地区^[1],是许多温带混播草地的重要组成部分,在新西兰、英国、澳大利亚、丹麦、美国及爱尔兰等地白三叶一般与禾本科牧草混播,为家畜提供优质廉价的饲草。但白三叶苗期生长缓慢,易受杂草侵害,不耐干旱,不耐盐碱,严重影响草坪的成坪及观赏性^[2]。尤其是它的耐旱性不是很理想,干旱易发病,这可能成为限制其发展的重要因素^[3],因此培育适应性广的优质白三叶新品种尤为重要和迫切。

一般认为,运用育种技术培育新品种是解决农作物品质问题的最佳途径,但传统的作物育种技术在作物品质改良研究中具有很多缺点,如杂交不育、基因资源有限等。随着植物分子生物学和植物转化技术的发展和改进,利用基因工程技术进行白三叶品种的遗传改良成为可能。白三叶不仅是重要的饲料作物,还在土壤改良、水土保持以及生态环境保护方面发挥着积极作用。同时,在众多的草种中白三叶以其独有的优势,脱颖而出,倍受人们的喜爱,成为我国重要的观赏草坪之一。因此,通过基因工程技术改良白三叶,培育优质、高产白三叶新品种,具有极强的理论和实际意义^[4]。现对白三叶植株再生体系的建立及转抗病毒、抗虫、抗逆、品质改良、植物疫苗、矿质营养吸收、植物激素合成等基因方面

的研究进展进行简要综述,并对转基因白三叶的发展前景作了简要展望。

1 白三叶植株再生体系的建立

长期以来,人们试图通过基因工程的方法提高白三叶的适应性,但其组织的有效再生一直是白三叶基因工程研究中无法克服的困难。在离体培养中,建立一个胚胎高频率和同步发生的实验系统,无论在理论上还是实际应用上都是很重要的^[5]。

1.1 经过愈伤组织阶段的体细胞胚胎发生

白三叶的多种外植体在组织培养条件下,都可经过愈伤组织阶段,最终分化出胚状体,如离体胚、根、叶柄、下胚轴、悬浮培养的细胞、枝的节间切段、原生质体、叶片、未成熟胚等。早在1980年,Gresshoff用白三叶成熟胚,通过原生质体诱导愈伤组织,由愈伤组织分化出完整植株^[6]。Mohapatra等(1982)研究表明,不同生态型(基因型)和外植体类型(根、叶柄)的白三叶的愈伤诱导和植株再生能力显著不同^[7]。Bhojwani等(1984)研究表明,白三叶幼苗在形态、由下胚轴诱导的愈伤组织生长及在体外分化芽的能力方面存在相当大的变异,并选择出一种适于再生的基因型TR-20^[8]。同年,White用白三叶长期悬浮培养的细胞培养物,持续高频率再生出植株,也选择出一种适于再生的基因型WR8^[9]。White等(1987)用枝的节间切段作外植体诱导愈伤组织,再生出完整植株^[10]。Yamada(1989)选择出了一种能高度再生原生质体的新的白三叶基因型,Swedish variety 'Undrom'^[11]。张德炎等(1998)的试验结果表明,用白三叶叶片诱导愈伤组织^[12]。张德炎等(1999)以白三叶叶片为外植体获得胚性细胞悬浮系^[13]。周建明(1996)成功地用来自白三叶未成熟胚诱导的愈伤组织,建立了细胞悬浮培养系^[14]。

1.2 不经过愈伤组织阶段的体细胞胚直接发生

与愈伤组织诱导植株再生的方法相比,不经过愈伤组织阶段的体细胞胚直接发生,获得再生植株的途径具

第一作者简介:李志亮(1966-),男,在读博士,副教授,现主要从事植物生理、植物细胞工程和分子生物学研究工作。E-mail: lizhi-liang666@126.com。

通讯作者:黄丛林(1969-),男,四川仁寿县人,博士,副研究员,现从事植物抗旱、抗寒、耐盐分子生物学及基因工程改良方向研究工作。E-mail: huangconglin@hotmail.com。

基金项目:河北省教育厅自然科学研究资助项目(Z2006409)。

收稿日期:2009-02-10

有许多优点。①组培技术和解剖方法简单, 植株再生率高; ②打破了白三叶再生种对基因型依赖的限制, 能够对白三叶的多个品种进行转化; ③快速; ④通过芽的直接器官发生, 极大地避免了从愈伤组织再生白三叶时产生的体细胞克隆异常^[15-16]。

1994年, White等用3 d龄白三叶幼苗的子叶直接再生出植株^[16]。Voisey等利用白三叶幼苗的芽尖(2个子叶和顶芽)直接再生出小植株^[15]。周建明从胚成熟白三叶胚上直接再生出不定芽, 提高了植株的再生性^[17]。陈传芳等用白三叶的子叶再生出芽, 成功再生出植株^[3]。赵桂琴等用吸胀种子的子叶再生出白三叶植株^[18]。赵志文等用白三叶的嫩芽为外植体, 建立了白三叶的高频再生系统^[19]。谷俊涛等利用白三叶子叶下胚轴为外植体, 建立了白三叶草高效遗传转化再生体系^[20]。

2 白三叶的遗传转化

白三叶草转基因研究开始较早, 早在1987年White就建立了其转化体系, 用农杆菌介导法获得首例转基因白三叶植株^[10]。目前, 白三叶的转基因研究取得了许多成就, 涉及抗病毒、抗虫、抗逆、品质改良、植物疫苗、矿质营养吸收、植物激素合成等方面。

2.1 抗病毒

苜蓿花叶病毒(AMV), 白三叶花叶病毒(WCMV), 三叶草黄脉病毒(CYVV)分别属于 *Bromoviridae*, 马铃薯X病毒组(Potexvirus group)和 *Potyviridae*, 病毒导致植物病害给白三叶的生产造成极大的损失, 如AMV会引起白三叶干物质产量及持久性的急剧减小^[21]。

研究表明, 病毒外壳蛋白的积累水平与植株对病毒的抗性呈正相关^[22], 植物细胞中积累高水平的外壳蛋白, 干扰了病毒的生活周期, 使植物具有病毒抗性^[21]。Chu等将AMV外壳蛋白(*AMV-CP*)基因转入白三叶, 所得的转基因植株具有抗病性^[4]。Emmerling等检测了转基因白三叶表达 *AMV-CP* 基因及对AMV感染的免疫性, 发现有2个转化体表现出由蚜虫介导的AMV感染的田间免疫, 转基因白三叶表达了 *AMV-CP* 基因^[21]。赵桂琴等以白三叶的子叶为转化体, 将外源的 *AMV-CP* 基因转入白三叶, 得到了转 *AMV4* 基因植株^[23]。赵桂琴等以子叶为转化体, 将外源的 *WCMV4* 外壳蛋白基因转入白三叶, 得到转 *WCMV4* 基因植株^[18]。Voisey等将CYVV外壳蛋白(*CYVV-CP*)基因分别转入白三叶草, 得到具有抗病性转基因植株^[4]。

2.2 抗虫

抗虫基因主要有: 从苏云金杆菌中分离出的杀虫结晶蛋白基因-Bt基因、植物凝集素基因等。

Voisey等将Bt *Cry1Ba* 和蛋白酶抑制剂(Pis)基因转入白三叶, 抗虫试验证实杀虫蛋白积累显著^[4]。

2.3 抗逆

生长在自然环境中的植物常受到多种逆境条件的危害, 其中由干旱和盐渍引起的渗透胁迫对白三叶的影响很大, 因此, 培育具有渗透胁迫抗性的白三叶具有重要意义。Lepage等将来自微生物的果聚糖转移酶基因 *SacB* 转入白三叶草, 发现转基因植株的抗干旱能力增强^[4]。陈传芳等通过农杆菌介导法将耐盐植物山菠菜甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因成功地转化了白三叶, 转基因白三叶的耐盐性得以提高^[3]。赵志文等用根癌农杆菌介导法将反义磷脂酶 *DY* 基因(*PLDY*)转入白三叶, 获得了转 *PLDY* 基因植株, 用于选育耐盐性、抗逆性提高的白三叶^[19]。赵桂琴等用根癌农杆菌介导法拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)液胞膜 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 *AtNHX1* 转入白三叶, 获得了转基因植株, 白三叶的耐盐性得到提高^[24]。

铝毒害是世界范围内对农业生产最主要的限制因素。全球大约有40%的耕地酸化, 当土壤 $\text{pH} < 5$ 时, Al^{3+} 可溶于土壤中, 对植物造成毒害。白三叶对铝毒害非常敏感, 培育具有较高的铝耐性的白三叶非常重要。研究表明, 可以通过白三叶根尖分泌有机酸, 如苹果酸、柠檬酸、草酸抑制白三叶根尖对 Al^{3+} 的吸收来提高其对 Al^{3+} 的耐性^[25]。Spangenberg等人将细菌的柠檬酸合成酶基因(*CS*)转入白三叶, 在其根部分泌更多的柠檬酸来提高其对酸性环境的适应性, 收到了良好的效果^[26]。Labandera等从白三叶中克隆出有机酸合成关键酶的相应物, *TrneMDH*、*TrPEPC*、*TrCS*, 并将这些基因转入白三叶中, 转基因白三叶在高浓度 Al^{3+} 存在的条件下, 比野生型表现出较快的根的生长^[25]。

2.4 改良品质

提高动物生产力一直是人类改良牧草品质的最终目的。牧草体内的果聚糖含量增加, 有利于提高水溶性碳水化合物含量, 可以增加牧草的消化率和营养价值。Lepage等用果聚糖转移酶基因 *SacB* 转化白三叶草, 发现转基因植株茎中可溶性碳水化合物积累增加^[4]。

提高牧草体内含硫氨基酸含量能增加羊毛生长。Ealing等将富含硫的豌豆(*Pisum sativum* L.)清蛋白(PA1)基因和向日葵(*Helianthus annuus* L.)种子清蛋白(SSA)基因转入白三叶, 检测到转基因白三叶细胞内SSA蛋白积累占总蛋白的0.01%, 且延长叶片寿命^[27]。为增加白三叶中用于增强瘤胃保护水平的含硫氨基酸半胱氨酸和甲硫氨酸, Christiansen等用农杆菌将向日葵种子清蛋白基因(*sf a8KDEL*)转入白三叶, 定位在内质网的编码蛋白SSA在叶中积累, 最高可占叶可提取总蛋白质的0.1%^[28]。

Sharma等用农杆菌将编码富硫玉米种子蛋白基因, δzein (玉米蛋白), 转入白三叶。 δzein 蛋白质的累积

随叶龄增大而增加, 且相当稳定, 提高了白三叶的品质^[29]。

2.5 植物疫苗

研究表明, 细菌或病毒等病原体的抗原基因可在转基因植物表达系统中表达, 且表达的抗原仍较好地保留了天然的免疫原性^[30], 这为转基因植物作为疫苗生产系统提供了良好的理论基础。

Manneimia haemolytica 是一种导致牛巴斯德氏菌病(出血性败血病)的主要微生物, Lee 等将 *Lk50* (白细胞毒素 50) 基因转化白三叶, 获得转基因植株^[31]。Lee 等利用收获后的处理和贮藏的转 *Lk50-GFP* 基因白三叶开发用于治疗牛肺巴斯德氏菌病的可食用疫苗^[32]。

2.6 矿质营养吸收

2.6.1 土壤中难溶性磷的利用 土壤中磷素易被吸附固定, 降低作物对其吸收和利用的有效性。在酸性土壤中, 无机磷与 Al^{3+} 形成复合物, 导致植物从肥料中获得磷的能力急剧下降。为获得具有较高磷吸收效率的白三叶植株, Labandera 等用来自编码磷酸转运蛋白(*TrPT1*)基因的根尖特异性启动子将有机酸合成关键酶基因转入白三叶中并得到表达, 转基因植物对磷的吸收效率增加^[23]。韩胜芳等建立了高效表达黑曲霉 *PhyA* 基因的白三叶草转基因系。外源转化黑曲霉 *PhyA* 基因能显著增强白三叶草利用有机态磷的能力^[33]。谷俊涛等建立了异源表达白羽扇豆 (*Lupinus albus*) APase (酸性磷酸酶) 基因的白三叶草转基因系, 改善了白三叶草吸收有机态磷的能力^[34]。

2.6.2 固氮能力 Diaz 等将豌豆凝聚素 (PSL) 基因引入白三叶, 转基因白三叶对根瘤菌 rhizobial 的感染敏感, 增强了植株的固氮效果^[35]。

2.7 植物激素合成

Larkin 等将含有生长素响应的启动子 GH₃ 与 *GUS* 基因融合, 成功地转化了白三叶^[36]。Ludlow 等将调节细胞分裂素生物合成的异戊烯转移酶 (IPT) 基因用农杆菌介导法转入白三叶, 发现再生转基因植株叶片的衰老期明显滞后^[4]。Chen 等从白三叶中克隆了白三叶 *ACC* (1-氨基-环丙烷-1-羧酸) 氧化酶基因家族的 4 个旁侧序列, 用农杆菌转化获得转 *ACO* 基因的白三叶植株^[37]。

3 展望

白三叶的转基因研究至今已有 20 多年, 在抗病毒、抗虫、抗逆、品质改良、植物疫苗、矿质营养吸收、植物激素合成等方面取得了一定的成就, 但与实际应用还有一定距离。在今后白三叶的转基因研究中, 一方面, 针对我国的干旱缺水状况以及尚未利用的大面积盐碱滩涂, 培育耐干旱和盐碱的白三叶新品系。另一方面, 可以向白三叶体内导入抗草丁膦的 *bar* 基因, 培育抗除草剂白三叶, 应用除草剂来防除杂草, 减轻草坪管理中的杂草

防除工作量, 降低管理成本, 具有干旱、盐碱及除草剂耐性的白三叶具有广阔的市场空间和应用前景。

与其它主要作物相比, 作为草坪草的白三叶既不是人类的食品, 也不作为动物的饲料, 因而不存在营养品质问题, 这是白三叶得天独厚的优势。可以预言, 随着分子生物学、植物基因工程等相关学科的迅速发展, 白三叶转基因的研究将会取得更进一步的进展。

参考文献

[1] 马淑玲, 刘桂芬. 白三叶的栽培及观赏应用[J]. 吉林蔬菜, 2003(4): 32.

[2] 樊会敏, 张宝军. 冀南地区白三叶草坪杂草的防除技术[J]. 邯郸农业高等专科学校学报, 2002, 19(1): 21.

[3] 陈传芳, 李义文, 陈豫, 等. 通过农杆菌介导法获得耐盐甜菜碱醛脱氢酶基因白三叶草[J]. 遗传学报, 2004, 31(1): 97-101.

[4] 张振鑫, 符义坤, 储成才. 豆科牧草基因工程研究进展[J]. 遗传, 2002, 24(5): 607-612.

[5] 韩碧文, 刘淑兰. 植物离体体细胞胚胎发生[J]. 植物生理学通讯, 1988(1): 9-15.

[6] Gresshoff P M. In vitro culture of white clover: callus suspension protoplast culture and plant regeneration[J]. Botanical Gazette, 1980, 141(2): 157-164.

[7] Mohapatra S S, Gresshoff P M. Ecotypic variation of in vitro plantlet formation in white clover (*Trifolium repens*) [J]. Plant Cell Reports, 1982(5): 189-192.

[8] Bhojwari S S, Mullins K, Cohen D. Intra-varietal variation for in vitro plant regeneration in the genus *Trifolium* [J]. Euphytica, 1984, 33(3): 915-921.

[9] White D W R. Plant regeneration from long-term suspension cultures of white clover[J]. Planta, 1984, 162(1): 1-7.

[10] White D W R, Grenwood D. Transformation of the forage legume *Trifolium repens* L. using binary agrobacterium vectors[J]. Plant Molecular Biology, 1987, 8(6): 461-469.

[11] Yamada T. Selection of a highly-regenerative genotype of white clover (*Trifolium repens* L.) and plant regeneration from protoplasts derived from this genotype[J]. Euphytica, 1989, 44(3): 181-186.

[12] 张德炎, 李喜文, 李建民, 等. 正交设计法在白三叶组织培养中的应用[J]. 东北师大学报(自然科学版), 1998(1): 40-45.

[13] 张德炎, 李建民, 李喜文, 等. 红三叶和白三叶愈伤组织的诱导和胚性细胞悬浮系的建立[J]. 中国草地, 1999(1): 15-18.

[14] 周建明. 以农杆菌 (*A. tumefaciens*) 为载体向白三叶 (*Trifolium repens* L.) 细胞转导外源基因的研究[J]. 草食家畜(季刊), 1996(1): 44-45.

[15] Voisey C R, White D W R, Dudas B, et al. Agrobacterium-mediated transformation of white clover using direct shoot organogenesis[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(6): 309-314.

[16] White D W R, Voisey C. Prolific direct plant regeneration from cotyledons of white clover[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13(6): 303-308.

[17] 周建明. 从白三叶 (*Trifolium repens* L.) 成熟的胚再生不定芽的初步研究[J]. 草食家畜(季刊), 1995(1): 52-53.

[18] 赵桂琴, Chu P. 用农杆菌介导将 WCMV 基因导入白三叶的研究[J]. 华南农业大学学报, 2004, 25(增刊II): 1-4.

[19] 赵志文, 赵强, 崔德才. 反义磷脂酶 D γ 基因白三叶草的获得[J]. 生物技术通报, 2005(1): 47-51.

- [20] 谷俊涛, 赵红梅, 刘祝玲, 等. 农杆菌介导白三叶草高效遗传转化和转基因植株再生[J]. 草业学报, 2007, 16(2): 84-89.
- [21] Emmerling M, Smith K, Chu P, et al. Field evaluation of transgenic white clover with AMV immunity and development of elite transgenic gem-plasm[C]// Hopkins A, Wang Z-Y, Mian R, et al. Molecular Breeding of Forage and Turf, Developments in Plant Breeding series. Springer Netherlands, 2004; 359-366.
- [22] 赵福宽, 张鹤岭, 哈斯阿古拉, 等. 马铃薯薯 CP 基因育种研究进展[J]. 北方园艺, 1999(4): 40-41.
- [23] 赵桂琴, 慕平, Chu P. 苜蓿花叶病毒外壳蛋白基因在白三叶中的表达及转基因植株的抗病性分析[J]. 农业生物技术学报, 2005, 13(2): 230-234.
- [24] 赵桂琴, 慕平, 王锁民, 等. 转液胞膜 AtNHX1 基因的白三叶耐盐性研究[J]. 农业生物技术学报, 2008, 16(5): 847-852.
- [25] Mouradov A, Panter S, Emmerling M, et al. Clover[C]// PUA E-C, DAVEY M R. Transgenic Crops VI. Biotechnology in Agriculture and Forestry series Springer Berlin Heidelberg, 2007; 337-356.
- [26] 赵桂琴, 王锁民, 任继周. 白三叶转基因及其生态适应性研究进展[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 592-598.
- [27] Ealing P M, Hancock K R, White D W R. Expression of the pea albumin I gene in transgenic white clover and tobacco[J]. Transgenic Research, 1994(6): 344-354.
- [28] Christiansen P, Gibson J M, Moore A, et al. Transgenic Trifolium repens with foliage accumulating the high sulphur protein, sunflower seed albumin[J]. Transgenic Research, 2000, 9: 103-113.
- [29] Sharma S B, Hancock K R, Ealing P M, et al. Expression of a sulfur

- rich maize seed storage protein, δ -zein, in white clover (*Trifolium repens*) to improve forage quality[J]. Molecular Breeding, 1998, 4(5): 435-448.
- [30] Ma J K-C. Genes, greens and vaccines[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18(11): 1141-1142.
- [31] Lee R W, Strommer J, Hodgins D, et al. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin 50 fusion protein[J]. Infection and Immunity, 2001, 69(9): 5786-5793.
- [32] Lee R W H, Pool A N, Ziauddin A, et al. Edible vaccine development: stability of Mannheimia haemolytica A1 leukotoxin 50 during post-harvest processing and storage of field-grown transgenic white clover[J]. Molecular Breeding, 2003, 11(4): 259-266.
- [33] 韩胜芳, 谷俊涛, 肖凯. 高效表达黑曲霉 PhyA 基因改善白三叶草对有机态磷的利用[J]. 作物学报, 2007, 33(2): 250-255.
- [34] 谷俊涛, 李金才, 韩胜芳, 等. 异源表达白羽扇豆酸性磷酸酶基因对白三叶草磷吸收的影响[J]. 草业学报, 2007, 16(4): 69-75.
- [35] Diaz C L, Logman T, Stam H C, et al. Sugar-binding activity of pea lectin expressed in white clover hairy roots[J]. Plant Physiology, 1995, 109(4): 1167-1177.
- [36] Larkin P J, Gibson J M, Mathesius U, et al. Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development[J]. Transgenic Research, 1996, 5(5): 325-335.
- [37] Chen B C, Mcmanus M T. Expression of L-aminocyclopropane-L-carboxylate (ACC) oxidase genes during the development of vegetative tissues in white clover (*Trifolium repens* L.) is regulated by ontological cues[J]. Plant Molecular Biology, 2006, 60(3): 451-467.

Advancement of the Research on Transgenic White Clover

LI Zhi-liang^{1,2,3}, XING Hao-chun¹, YANG Qing², WU Zhong-yi³, ZHANG Xiu-hai³, HUANG Cong-lin³

(1. Department of Biology Science, Handan College, Handan, Hebei 056005, China; 2. College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu, 210095, China; 3. Beijing Research Center of Agro-Biotechnology, Beijing 100097, China)

Abstract: As an important forage crop, white clover can play an important role in improving natural environment, maintains water and soil. The establishment of regeneration systems of white clover was summarized, meanwhile, the advancement of genetic transformation of white clover, including resistant to virus and insect, enhancement of abiotic stress resistance, improvement of nutrient quality, development of edible plant vaccine, enhancement of the assimilation and efficient absorb of nutrient element, and the biosynthesis of phytohormone was reviewed in this paper. Moreover, the future development of transgenic white clover has forecasted.

Key words: White clover; Plant regeneration; Genetic transformation; Transgenic white clover