

根癌农杆菌介导 *IFS* 基因对岷山红三叶遗传转化研究

胡 焕 焕, 李 卫 东, 姬 国 杰, 丰 慧 根

(新乡医学院 生命科学技术系, 河南 新乡 453000)

摘 要:以岷山红三叶草为试材, 以其子叶和叶柄的愈伤组织为受体, 采用根癌农杆菌介导法, 研究其遗传转化的条件, 以期建立根癌农杆菌介导的异黄酮合酶 *IFS* 基因遗传转化体系。结果表明: 利用该转化体系, 获得的抗性愈伤组织, 通过提取其基因组进行 PCR 扩增鉴定, 证实为转化子。提示根癌农杆菌介导转化岷山红三叶愈伤组织是完全可行的, 为利用基因工程方法改良红三叶的品种并获得高产异黄酮品系奠定了基础。

关键词:岷山红三叶; 愈伤组织; 根癌农杆菌; 异黄酮合酶 *IFS*; 遗传转化

中图分类号:S 541⁺.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)21-0110-03

红三叶(*Trifolium pratense* L.)属豆科三叶草属多年生草本植物, 广泛分布于温带及亚热带地区, 是集饲用和药用价值于一体的牧草新秀^[1]。营养价值仅次于苜蓿, 含有大量异黄酮和黄酮类物质^[2]。作为我国重要的豆科牧草, 三叶草不仅是重要的饲料作物, 在土壤改良、水土保持以及生态环境保护方面也发挥着积极作用^[3]。

岷山红三叶产于甘肃省岷县, 也称红车轴草, 是著名珍稀的高产优质牧草, 被誉为中国第一草^[4-5]。组织培养是育种和遗传多样性等研究的基础^[6], 该研究在对岷山红三叶组织培养研究的基础上, 以愈伤组织为受体, 采用根癌农杆菌介导法^[6]探讨其遗传转化条件, 以期为其基因工程育种提供依据和提高红三叶的药用价值创造条件。

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物材料:岷山红三叶草(*Trifolium pratense* L. Minshan)。菌株和质粒: 根癌农杆菌 LBA4404(河南农业大学提供), 该菌株含有 PRI101-AN-IFS 质粒, 该载体携带 *npt-II* 基因和红三叶异黄酮合酶 *IFS* 基因。质粒的物理图谱如图 1 所示。

1.2 试验方法

1.2.1 岷山红三叶外植体准备及预培养 选择无病斑,

第一作者简介:胡焕焕(1987-), 女, 硕士, 研究方向为生物制药。E-mail:huhuanhuan1987@163.com。

责任作者:丰慧根(1963-), 男, 硕士, 教授, 现主要从事细胞生物学及生物制药等研究工作。

基金项目:河南省科技攻关资助项目(102102310189); 河南省教育厅科技攻关资助项目(2009A180014); 新乡医学院研究生科研创新资助项目(YJSCX201116Y)。

收稿日期:2012-06-18

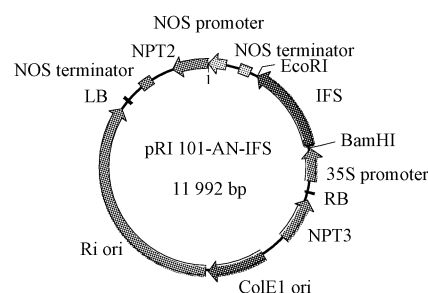


图 1 质粒 pRI 101-AN-IFS 物理图谱

籽粒饱满, 颜色均一的红三叶种子, 种子在自来水下冲洗 20 min, 75% 的乙醇浸泡 5 min, 5% 有效氯浓度次氯酸震荡清洗 20~30 min, 无菌水冲洗 3 次, 每次不少于 2 min, 滤纸吸干水分, 播种在不添加激素的 MS + 10 g/L 蔗糖 + 0.6% 琼脂的培养基上^[7]。16 h 光照, 8 h 黑暗, 25℃, 培养 7~14 d。待幼苗的幼叶叶柄生长至合适长度, 用无菌剪刀将子叶, 幼叶叶柄和下胚轴分离。子叶分成 2 瓣, 叶柄剪成 5 mm 小段。分别接种于 B₅ + 乙酰丁香酮诱导预培养培养基上, 16 h 光照, 8 h 黑暗, 25℃, 预培养 3 d。

1.2.2 农杆菌 LBA4404 侵染液的准备 农杆菌 LBA4404 在含有 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan YEB 固体培养基划线 28℃ 培养, 挑取单菌落接种于 50 mL 液含有 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan 液体 YEB 中, 过夜培养, 4 000 r/min 离心 20 min 收获农杆菌, 无菌水重悬, 至 OD₆₀₀ 为 1.5。

1.2.3 农杆菌 LBA4404 侵染和共培养 用无菌枪头在外植体上滴 1 滴准备好的侵染用农杆菌。每种外植体保留 4 个培养皿不做侵染作为对照, 微孔胶带密封, 暗培养 48 h。

1.2.4 抗性愈伤组织的制备 共培养后从培养皿中移

出组织,用无菌水冲洗3次。重新接种于 $B_5+2\text{ mg/L}$ 2,4-D+2 mg/L NAA+2 mg/L KIN+75 mg/L Kan 和不含 Kan 的培养基。未侵染的外植体一半接种于 $B_5+2\text{ mg/L}$ 2,4-D+2 mg/L NAA+2 mg/L KIN+75 mg/L Kan,另一半接种于不含 Kan 的培养基。每种培养基另外添加 250 mg/L 头孢霉素,以抑制多余农杆菌生长。16 h 光照,8 h 黑暗,25℃ 培养。每 2 周继代 1 次。

1.2.5 抗性愈伤组织检测 经过 4~6 周的筛选,去除死亡的愈伤组织,从获得的抗性愈伤组织中随机抽取一部分,提取基因组 DNA,进行 *npt-II* 基因 PCR 检测^[8]。引物 *npt II*-F: AGCGGCGATACCGTAAAGCACGA; *npt II*-R: AAGGGACTGGCTGCTATTGGGC。PCR 扩增程序为:94℃ 2 min;94℃ 15 s,61℃ 30 s,72℃ 30 s,共 30 个循环;12℃ forever;以 25 μL 为反应体系进行扩增反应,产物在质量分数为 1% 的琼脂糖凝胶上电泳展开检测。

2 结果与分析

2.1 岷山红三叶愈伤组织的诱导

由图 2 可知,红三叶叶片接种后 4 d 无明显变化,叶柄和下胚轴切口处出现少量愈伤组织。2 周后叶片开始卷曲膨大,形成大量愈伤组织,叶柄和下胚轴完全出愈。外植体诱导的抗性愈伤组织都呈淡绿色,质地均匀,生长良好。而没有获得抗性的外植体则褐化死亡。

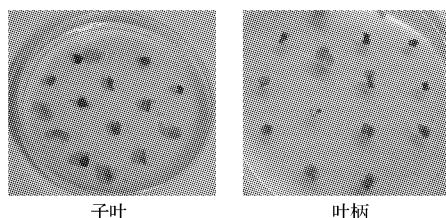


图 2 抗性愈伤组织的筛选

2.2 抗性愈伤组织的筛选

由图 3 可知,在筛选培养基上,每 2 周继代 1 次,去除褐化死亡的组织块。未经转化的外植体不能出愈,经过第 1 次筛选全部褐化死亡;将第 1 次筛选存活下来的愈伤组织进行第 2 次筛选,存活量大大增加;经过 3 次筛选获得的抗性愈伤组织长势良好,颜色青黄,结构致密。

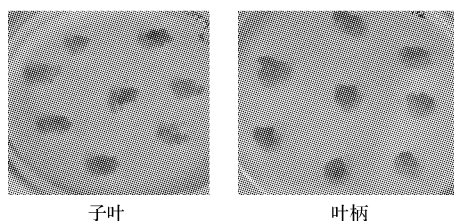


图 3 第 3 次筛选获得的愈伤组织

2.3 抗性愈伤组织的检测

由图 4 可知,从获得的抗性愈伤组织中随机抽取,提取基因组 DNA,进行 PCR 检测。得到约 500 bp 的

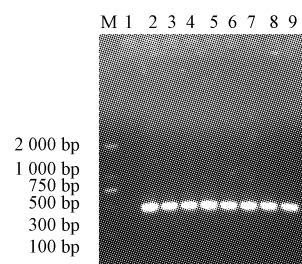


图 4 抗性愈伤组织的 PCR 检测

注:M:DL 2000;1:未转化的愈伤组织;2~9:随机挑选的抗性愈伤组织。

PCR 产物,与预期 *npt II*(481 bp)大小符合。

3 结论与讨论

根瘤菌介导的豆科植物转基因体系是效率较高、操作简单的转基因方法^[9],而利用异黄酮合成酶基因调控异黄酮生物合成途径成为豆科苯丙素生物合成途径的研究热点^[10]。但是目前大部分研究都集中在不产生异黄酮的植物中利用转基因使其产生异黄酮,而鉴于红三叶异黄酮的药用价值以及豆科植物是产生异黄酮的主要植物来源,该研究利用成熟的根瘤菌侵染体系,选取红三叶子叶和叶柄愈伤组织为研究对象进行侵染转化,期望对红三叶品质改良及利用次级产物代谢调控开发药用红三叶异黄酮提供参考。结果表明,利用 OD_{600} 值为 1.5 的根瘤农杆菌 LBA4404(pRI101-AN-IFS)菌液侵染预培养 3 d 的外植体,共培养 48 h。可实现 *npt-II* 基因的有效转化,证明异黄酮合酶 *IFS* 基因也整合入红三叶基因组。将经过与农杆菌共培养的外植体在筛选培养基上连续进行 3 次筛选后得到抗性愈伤组织。对抗性愈伤组织进行随机抽取 PCR 检测,证实均是转化子。成功的实现了岷山红三叶草的遗传转化,为今后通过基因工程手段改良岷山红三叶奠定了基础。

参考文献

- [1] 王志明,岳民勤,杜文华,等. 集饲用和药用价值于一体的牧草新秀—岷山红三叶[J]. 草业科学,2005,22(4):33-35.
- [2] Phillips G C, Collins G B. *In vitro* tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover[J]. Crop Science, 1979, 19:59-64.
- [3] 梁哲,姜三杰,未丽,等. 三叶草基因工程研究进展[J]. 草业学报, 2009,18(2):205-211.
- [4] 贾学辉,李保财. 岷山红三叶小草大产业[EB/OL]. <http://www.gsei.com.cn/>. 2010.
- [5] 李福林. 试论岷县特色高效草业发展现状及前景[J]. 内蒙古草业, 2011,23(1):31-34.
- [6] Khanlou K M, Karimi M, Maroufi M, et al. Improvement of plant regeneration and Agrobacterium-mediated Genetic Transformation Efficiency in Red Clover (*Trifolium pratense* L.)[J]. Research Journal of Biotechnology, 2011,6(3):13-21.
- [7] 厚彦明,师尚礼,杜文华,等. 岷山红三叶愈伤组织诱导和植株再生研究[J]. 草地学报,2008,16(4):359-363.

蔡氏胡杨个木虱生物学特性及综合防治

孙红艳^{1,2}, 张炳坤³, 周黎³, 李春⁴, 蒋世铨⁵, 王佩玲¹

(1. 石河子大学农学院, 新疆石河子 832003; 2. 巴音郭楞职业技术学院, 新疆库尔勒 841000; 3. 新疆农业职业技术学院, 新疆昌吉 831100; 4. 库尔勒城乡防护林管理处, 新疆库尔勒 841000; 5. 巴音郭楞州农科所, 新疆库尔勒 841000)

摘要: 2009年3月至2012年4月, 以库尔勒东山防护林和石河子147团胡人工杨林为主要调查地点, 对蔡氏胡杨个木虱的形态特征、生活习性、年生活史进行了系统观察研究, 并根据其生物学特性和生活史, 提出了综合防治措施。

关键词: 蔡氏胡杨个木虱; 形态特征; 年生活史; 生活习性; 综合防治

中图分类号: S 792.119 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2012)21-0112-03

蔡氏胡杨个木虱(*Egeirotrioza ceardi* Bergevin)属半翅目胸喙亚目木虱总科个木虱科胡杨个木虱属。分布于哈萨克斯坦、格鲁吉亚、土库曼斯坦、塔吉克斯坦、亚美尼亚、吉尔吉斯斯坦、阿塞拜疆、乌兹别克斯坦、阿富汗、印度、伊拉克、巴基斯坦和突尼斯, 我国仅分布于新疆, 寄主植物仅为胡杨。胡杨是荒漠环境中重要的森林资源之一, 由于社会经济的发展和生态环境的重要作用, 野生胡杨的保护越来越受到重视, 人工胡杨林的种植面积也逐年增加, 尤其随着新疆人工胡杨林种植面积的扩大, 蔡氏胡杨个木虱种群数量激增, 自2009年以来

在库尔勒东山防护林近2 000 hm²胡杨人工林区已局部成灾, 严重影响胡杨生长发育和其生态效益的发挥。

自2009年3月至2012年4月, 以库尔勒东山防护林和石河子147团胡人工杨林为主要调查地点, 对蔡氏胡杨个木虱的形态特征、生活习性、年生活史进行了系统的观察研究, 掌握了该虫的生物学特性, 并在其越冬成虫出蛰活动期、卵期、一龄若虫期进行了综合防治研究, 取得了良好的防治效果。现将研究结果报道如下。

1 为害特点

蔡氏胡杨个木虱为害杨柳科胡杨, 以1龄若虫在叶面上取食刺激植物组织形成凹陷虫瘿。若虫位于凹陷底部取食不移动, 1瘿1虫, 随着若虫的生长发育凹陷加大加深, 最终形成直径约3 mm左右的球形虫瘿。虫口数量大时, 叶片正反两面布满虫瘿。危害严重时叶片提前枯黄, 导致树势衰弱, 树体生长缓慢。

第一作者简介: 孙红艳(1974-), 女, 硕士, 讲师, 研究方向为林果病虫害防治。

责任作者: 王佩玲(1969-), 女, 在读博士, 副教授, 现主要从事昆虫的教学与研究工作。

收稿日期: 2012-06-11

[8] 姜楠, 王东, 崔征, 等. 异黄酮合成酶基因高表达的大豆转基因愈伤组织的研究[J]. 沈阳药科大学学报, 2009, 26(1): 63-68.

[9] 卢雄斌, 龚祖坝. 植物转基因方法及进展[J]. 生命科学, 1998, 10(3): 125-131.

[10] Liu R R, Hu Y L, Li J L, et al. Production of soybean isoflavone genistein in non-legume plants via genetically modified secondary metabolism pathway[J]. Metab Eng, 2007, 9(1): 1-7.

Genetic Transformation Isoflavones Synthase Gene from *Trifolium pratense* Minshan Callus Mediated by *Agrobacterium Tumefaciens*

HU Huan-huan, LI Wei-dong, JI Guo-jie, FENG Hui-gen

(Department of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453000)

Abstract: The callus was induced from the cotyledons and petioles of *Trifolium pratense* Minshan, and the callus was used for the receptor of genetic transformation mediated by *agrobacterium tumefaciens*. The resistant callus was screened and confirmed to be transformants by PCR. The results showed that genetic transformation of *Trifolium pratense* Minshan callus mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was entirely feasible.

Key words: *Trifolium pratense* Minshan; callus; *agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation