

引文格式: 杨钺戈, 李跃, 张慧, 等. 农杆菌介导法获得辣木 PKM-1 转双价抗虫基因 (*sck+CryI-Ac*) 愈伤组织[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2023, 38(1): 27-33. DOI: [10.12101/j.issn.1004-390X\(n\).202205056](https://doi.org/10.12101/j.issn.1004-390X(n).202205056)

农杆菌介导法获得辣木 PKM-1 转双价抗虫基因 (*sck+CryI-Ac*) 愈伤组织*

杨钺戈, 李 跃, 张 慧, 阮明菊, 马丽宣, 曾千春**
(云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要:【目的】辣木生产中鳞翅目害虫辣木蛱蝶危害日益严重, 为提高辣木抗虫性, 使用农杆菌介导法将抗虫基因导入辣木, 以期获得抗虫转基因转化子。【方法】利用内质网定位修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*sck*)和苏云金芽孢杆菌基因(*CryI-Ac*)筛选标记基因 *npt II*; 利用农杆菌 EHA105 介导遗传转化辣木 PKM-1 的叶片和茎段, 以卡那霉素筛选获得抗性植株; 采用 PCR 和 NPT II ImmunoStrip 检测确定 *npt II* 基因的整合与表达。【结果】辣木叶片和茎段无需预培养可直接进行农杆菌转化, 最佳转化条件为: 工程菌液 OD₆₀₀ 值为 0.2, 侵染时间为 2 min, 共培养时间为 2 d; 乙酰丁香酮添加与否对获得抗性愈伤率的影响不明显; 200 mg/L 提门叮可有效抑制农杆菌生长; 卡那霉素抗性愈伤组织 PCR 检测表明: 标记基因 *npt II* 已成功整合到辣木 PKM-1 基因组中; NPT II ImmunoStrip 检测表明 NPT II 蛋白水平得以表达。【结论】获得了辣木 PKM-1 卡那霉素抗性愈伤组织, 为辣木抗虫分子育种提供了材料。

关键词: 辣木; 抗虫转基因; 农杆菌; 愈伤组织

中图分类号: S794 文献标志码: A 文章编号: 1004-390X (2023) 01-0027-07

Obtaining Transgenic-callus of *Moringa oleifera* PKM-1 with Insect-resistant Gene (*sck+CryI-Ac*) via *Agrobacterium*-mediated Transformation

YANG Yuege, LI Yue, ZHANG Hui, RUAN Mingju, MA Lixuan, ZENG Qianchun
(College of Agronomy and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

Abstract: [Purpose] The Lepidopteran pest, *Noorda blitealis*, has become increasingly harmful in the production of *Moringa oleifera*. In order to improve the insect resistance of *M. oleifera*, the present study was performed to introduce insect-resistant genes into *M. oleifera* by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation method, so as to obtain transformants. [Methods] The marker gene *npt II* was screened by using the modified cowpea trypsin inhibitor-derived gene signal-CpTI-KDEL (*sck*) and *CryI-Ac* gene from *Bacillus thuringiensis*, which used by endoplasmic reticulum localization. The leaves and stems of *M. oleifera* PKM-1 were subject to genetic transformation mediated by EHA105. Resistant plants were obtained by kanamycin-resistant selection. Meanwhile, PCR and

收稿日期: 2022-05-27

修回日期: 2023-02-04

网络首发日期: 2023-03-14

*基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860414); 国家现代农业产业技术体系岗位科学家 (CARS-11-YN-ZQC); 云南省院士专家工作站 (2019IC007); 云南省基础研究面上项目 (202101AT070214)。

作者简介: 杨钺戈 (1997—), 男, 四川成都人, 在读硕士研究生, 主要从事辣木基因资源挖掘与利用研究。E-mail: 253185486@qq.com

**通信作者 Corresponding author: 曾千春 (1964—), 男, 湖南祁阳人, 博士, 教授, 主要从事作物种质创新与育种研究。E-mail: zengqianchun@qq.com

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20230313.0931.002.html>



NPT II ImmunoStrip detection were used to confirm the integration and expression of the *npt II* gene.

[**Result**] The leaves and stems of *M. oleifera* could be directly transformed through mediation using *A. tumefaciens* without pre-culture, the optimal transformation condition was: the OD₆₀₀ value of the fermentation broth of genetically engineered bacteria was 0.2, with two minutes infection time and two days appropriate co-culture time. The addition of acetosyringone or not had no obvious effect on the resistant callus rate, and the use of 200 mg/L Timentin could effectively inhibit the growth of *A. tumefaciens*. PCR detection of kanamycin-resistant callus showed that the marker gene *npt II* had been successfully integrated into the genome of *M. oleifera* PKM-1; the NPT II ImmunoStrip test showed that NPT II protein was expressed. [**Conclusions**] *M. oleifera* PKM-1 kanamycin-resistant callus is obtained in this study, which provides reference material for the molecular breeding of *M. oleifera*.

Keywords: *Moringa oleifera*; insect-resistant transgenic; *Agrobacterium*; callus

辣木 (*Moringa oleifera*) 为辣木科 (Moringaceae) 辣木属 (*Moringa*) 多年生速生树种, 因其根具有辣味又称辣根树, 共有 13 个种^[1], 主要分布于亚洲和非洲^[2]。中国主要引种了印度传统辣木、非洲辣木和印度改良辣木 (PKM-1 和 PKM-2), 改良品种均由印度泰米尔纳都农业大学园艺学院研究所培育^[3]。辣木整株均有价值, 其种子是优质的植物食用油原料^[4], 榨油所剩残渣还可用于制作净水剂^[5], 嫩梢可作蔬菜^[6]; 辣木还可辅助治疗和缓解多种疾病, 如糖尿病^[7]、高血脂^[8]和癌症^[9]等。辣木具有较高的经济价值, 但其生产受虫害影响较大, 其中以鳞翅目 (Lepidoptera) 草螟科 (Crambidae) 害虫辣木璐螟 (*Noorda blitealis*) 危害尤为严重^[10], 可将叶片全部取食。

从苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*) 中分离出的 *Bt* 基因, 其表达产物 BT 杀虫蛋白对辣木璐螟等鳞翅目昆虫具有特异性杀虫活性^[11], 目前研究较多的 BT 蛋白是 CRY 蛋白。经过几十年的发展, *Bt* 基因中的 *CryI-Ac* 和 *Cry2A* 等基因已经在玉米^[12]和棉花^[13]等植物的抗虫转基因中发挥了重要作用。修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂 (cowpea trypsin inhibitor, CpTi) 基因 (signal peptide-CpTi-KDEL, *sck*) 来自豇豆的可食用部分, 抗虫谱广, 且对人畜无害^[14], 将该基因导入辣木可提高其抗虫性。将外源基因导入植物的方法很多, 如农杆菌介导法、电击法和基因枪法等, 其中农杆菌介导法具有成本低、转化效率高和重复性好等优点^[15]。

目前对辣木的研究多是关于其种质资源、栽培技术和药用价值等方面, 也有研究者使用带有

芽或是原基芽的外植体 (如顶芽和茎节) 来建立快繁体系^[16-17], 但关于辣木抗虫转基因方面的研究报道甚少。本研究以携带双价抗虫基因 *sck+CryI-Ac* 的工程菌 EHA105 为供体, 利用农杆菌介导遗传转化 PKM-1 的叶片和茎段, 以期辣木抗虫分子育种提供材料。

1 材料与方法

1.1 供试材料、农杆菌菌株和质粒

以来源于云南省玉溪市元江县依江辣木产业开发有限公司、云南省红河州红河县红河谷辣木公司万年青基地、云南省农业科学院热区生态农业研究所元谋试验基地和云南农业大学温室多油辣木栽培种 PKM-1 为试验材料; 供试农杆菌菌株 EHA105 以及质粒 pRPBCK-35SBt 均由中国科学院遗传与发育生物学研究所朱祯研究员提供, 质粒含利用内质网定位修饰的 *sck* 基因、密码子优化过的苏云金芽孢杆菌基因 (*CryI-Ac*) 和 *npt II* 基因, 且具有卡那霉素抗性。

1.2 供试试剂

供试萘乙酸 (NAA)、6-苄氨基嘌呤 (6-BA)、吲哚丁酸 (IBA)、吲哚乙酸 (IAA)、卡那霉素、利福平和提门叮均购自源叶生物; DNA 分子量标准 DL5000 和 *npt II* 引物购自上海生工生物工程公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京天根生化科技有限公司。

1.3 外植体的获取

采收当年的辣木种子进行无菌苗诱导。选取无菌苗叶片或温室中种植辣木的叶片备用; 其

中, 采自温室的叶片于流水下冲洗 20 min 后, 使用 75% 酒精和 NaClO 消毒, 无菌水清洗后使用灭菌手术刀切割为 0.5 cm×0.5 cm 的叶盘; 茎段取自无菌苗, 将无菌苗从培养瓶中取出, 使用灭菌后的刀将茎切为约 0.5 cm 的茎段。

1.4 农杆菌菌液的制备

1.4.1 农杆菌的活化

取-80℃保存的农杆菌工程菌株于冰上解冻, 在固体 LB 培养基上进行划线活化。LB 培养基中加入 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平, 划线后将培养皿倒置, 于 28℃ 恒温培养箱培养过夜。

1.4.2 农杆菌的摇菌

待农杆菌长出单菌落后, 使用移液枪枪头挑取单菌落, 连带枪头一起放入液体 LB 培养基中, 加入 50 mg/L 利福平和 50 mg/L 卡那霉素, 28℃、200 r/min 摇菌过夜。摇菌至对数生长期后取出。

1.4.3 农杆菌的重悬和稀释

使用分光光度计测定农杆菌菌液的 OD₆₀₀ 值, 之后在 4℃、8000 r/min 条件下离心 5 min, 弃上清液, 使用含有乙酰丁香酮的液体 MS 培养基重悬并分别稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.2、0.3、0.4 和 0.5, 冰上放置 1 h 后备用。

1.5 提门叮抑制农杆菌浓度的确定

为确定筛选培养过程中农杆菌抑制剂提门叮的浓度, 将农杆菌菌液 OD₆₀₀ 值调整至 0.5, 将叶片于菌液中浸泡 4 min, 无菌滤纸吸干多余菌液后将叶片分别接种于含 50、100、150、200 和 250 mg/L 提门叮的愈伤组织诱导培养基 (MS+0.5 mg/L IBA+1.5 mg/L 6-BA+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂) 中, 观察不同质量浓度提门叮对农杆菌的抑制情况, 并计算染菌率。染菌率=染菌的培养物数量/接种外植体数量×100%。每组接种 10 片叶片, 重复 3 次。

1.6 外植体的预培养、共培养及筛选培养

1.6.1 预培养

侵染前, 将辣木叶片和茎段外植体在 28℃ 于愈伤组织诱导培养基上进行预培养, 其中, 叶片培养基为 MS+0.5 mg/L IBA+1.5 mg/L 6-BA+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂, 茎段培养基为 MS+0.5 mg/L IBA+2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IAA+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂。

1.6.2 侵染及共培养

将经过 0、1、2 和 3 d 预培养的外植体于超净工作台中取出, 分别放入稀释至 OD₆₀₀ 值为 0.2、0.3、0.4 和 0.5 的农杆菌菌液中, 分别浸泡 2、3 和 4 min, 浸泡过程中轻轻摇晃使外植体与菌液充分接触; 使用无菌滤纸吸干外植体表面多余菌液, 接种于共培养培养基 (配方同 1.6.1 节) 中。于 28℃ 下避光共培养 0、1、2 和 3 d, 观察农杆菌生长情况。

1.6.3 筛选培养

将共培养结束的外植体取出, 使用含有 500 mg/L 提门叮的无菌水冲洗, 无菌滤纸吸干多余水分, 接种于筛选培养基上, 其中, 叶片培养基为 MS+0.5 mg/L IBA+1.5 mg/L 6-BA+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂+50.0 mg/L 卡那霉素+200.0 mg/L 提门叮, 茎段培养基为 MS+0.5 mg/L IBA+2.0 mg/L NAA+0.5 mg/L IAA+30.0 g/L 蔗糖+8.0 g/L 琼脂+50.0 mg/L 卡那霉素+200.0 mg/L 提门叮, 筛选培养基中卡那霉素的质量浓度参照张慧等^[18]的研究。每隔 15 d 继代培养 1 次, 防止培养基中抗生素失效。

1.7 转化条件的优化

设置不同预培养时间、菌液浓度、侵染时间、共培养时间和乙酰丁香酮浓度的对比试验。其中预培养时间设置为 0、1、2 和 3 d, 菌液 OD₆₀₀ 值设置为 0.2、0.3、0.4 和 0.5, 侵染时间设置为 2、3 和 4 min, 共培养时间设置为 0、1、2 和 3 d, 乙酰丁香酮浓度设置为 0、50 和 100 μmol/L, 观察不同处理对出愈率的影响。出愈率=形成愈伤的培养物数量/接种外植体数量×100%。每个处理接种 40 片叶片和 20 个茎段, 均重复 3 次。

1.8 抗性愈伤组织的 PCR 鉴定及 NPT II Immun-oStrip 检测

取辣木叶片和茎段来源的愈伤组织约 100 mg 于液氮预冷的研钵中磨碎, 研磨过程中持续添加液氮, 直至研磨为细粉末。使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取 DNA, 使用 PCR 检测 *npt II* 基因, 目标片段约为 700 bp。引物序列为: F1: 5'-GAGGCTATCGGCTATGACTG-3', R1: 5'-ATCGGGAGCGGCGATAACCGTA-3'。PCR 反应体系为 50 μL, 其中模板 1 μL, 上、下游引物各 1 μL, 10×PCR buffer 5 μL, 2.5 mmol/L dNTPs 4 μL, DNA

聚合酶 1 μL ，去离子水补足至 50 μL 。PCR 反应程序为：94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min，94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s，56 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 1 min，35 个循环，72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min。

NPT II 蛋白检测采用 NPT II ImmunoStrip 试纸条，参照说明书并略有改动。称取愈伤组织 20 mg，置于 1.5 mL Eppendorf 管中，加入 PEB1 缓冲液 400 μL ，用塑料棒捣碎愈伤组织；采用台式离心机以 10000 r/min 离心 2 min，取上清液 300 μL 至 1.5 mL Eppendorf 管中，将检测试剂条标有“sample”的一端插入上清液中，静置 15 min，阳性愈伤组织将会出现 2 条带。

1.9 数据统计与分析

采用 Excel 2007 和 SPSS 进行数据统计和分析。

2 结果与分析

2.1 抑制农杆菌的提门叮质量浓度

由表 1 可知：50、100 和 150 mg/L 提门叮不能完全抑制农杆菌生长，而 200 和 250 mg/L 提门叮可以完全抑制农杆菌生长。考虑到抗生素的加入可能会影响外植体的生长，最终选定 200 mg/L 为筛选培养基中提门叮的工作质量浓度。

表 1 不同质量浓度提门叮对农杆菌的抑制
Tab. 1 Inhibition of *Agrobacterium tumefaciens* by different mass concentrations of Timentin

$c/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	染菌率/% infection rate of bacteria
50	92.80±6.46 a
100	46.63±2.96 b
150	13.89±2.40 c
200	0±0 d
250	0±0 d

注：同列不同小写字母表示差异达显著水平 ($P<0.05$)；下同。
Note: Lowercase letters in the same row indicate significant differences ($P<0.05$); the same as below.

2.2 不同预培养时间对农杆菌转化的影响

由表 2 可知：不经预培养的叶片在后续筛选中具有最高的出愈伤 (10.84%)；预培养 1 d 时后续没有得到愈伤组织；预培养 2 d 时出愈率也较低 (1.67%)，且叶片接种于筛选培养基后第 17 天首次观察到伤口处出现愈伤组织；预培养 3 d 时没有得到愈伤组织。此外，随着预培养时间的增加，茎段出愈率呈下降趋势，由预培养 0 d 的 18.37% 降低至预培养 3 d 的 3.34%，且当预培养

时间为 3 d 时，侵染前仅在 1 个茎段外植体的切口处观察到极少淡黄色愈伤组织，而不进行预培养的外植体后续愈伤长势较好，愈伤组织紧实，为淡黄色。

表 2 不同预培养时间对农杆菌转化的影响
Tab. 2 Effects of different preculture times on the *Agrobacterium*-mediated transformation

外植体 explants	预培养时间/d preculture time	出愈率/% callus induction rate
叶片 leaves	0	10.84±1.45 a
	1	0±0 b
	2	1.67±1.44 b
	3	0±0 b
茎段 stems	0	18.37±0.32 a
	1	16.67±2.88 a
	2	6.26±0.39 b
	3	3.34±2.90 b

2.3 不同菌液 OD₆₀₀ 值对农杆菌转化的影响

由表 3 可知：随着侵染农杆菌菌液 OD₆₀₀ 值的增大，叶片出愈率逐渐降低，由 OD₆₀₀ 值为 0.2 时的 8.30% 降低至 OD₆₀₀ 值为 0.5 时的 0，且当侵染菌液 OD₆₀₀ 值为 0.2 时，叶片在接种于筛选培养基后 15 d 首次观察到叶片愈伤组织；随着侵染农杆菌菌液 OD₆₀₀ 值的增大，茎段出愈率逐渐降低，由 OD₆₀₀ 值为 0.2 时的 14.77% 降低至 OD₆₀₀ 值为 0.5 时的 0，且当 OD₆₀₀ 值为 0.2 时，茎段在接种于筛选培养基后 10 d 首次观察到愈伤组织，愈伤组织为淡黄色，质地紧实。

2.4 不同侵染时间对农杆菌转化的影响

由表 4 可知：当侵染时间为 2 min 时，叶片出愈率最高，为 14.17%；随着侵染时间的增加，

表 3 不同菌液 OD₆₀₀ 值对农杆菌转化的影响
Tab. 3 Effects of different OD₆₀₀ value for bacterial on the *Agrobacterium*-mediated transformation

外植体 explants	OD ₆₀₀ 值 OD ₆₀₀ value	出愈率/% callus induction rate
叶片 leaves	0.2	8.30±1.05 a
	0.3	5.78±0.77 b
	0.4	2.50±0.00 c
	0.5	0±0 d
茎段 stems	0.2	14.77±1.34 a
	0.3	11.67±2.88 a
	0.4	8.15±1.29 b
	0.5	0±0 b

茎段出愈率逐渐降低, 当侵染时间为 2 min 时出愈率最高 (13.26%), 当侵染时间为 4 min 时出愈率最低 (8.33%)。

表 4 不同侵染时间对农杆菌转化的影响
Tab. 4 Effects of different infiltration time on the *Agrobacterium*-mediated transformation

外植体 explants	侵染时间/min infiltration time	出愈率/% callus induction rate
叶片 leaves	2	14.17±1.44 a
	3	11.67±1.44 a
	4	12.50±2.50 a
茎段 stems	2	13.26±2.40 a
	3	9.55±2.22 a
	4	8.33±2.88 a

2.5 不同共培养时间对农杆菌转化的影响

由表 5 可知: 不进行共培养时, 叶片出愈率为 0; 共培养 1 d 时, 叶片出愈率较低; 共培养 2 d 时, 叶片出愈率为 11.67%; 共培养 3 d 时, 农杆菌数量增加, 叶片周围菌液变得浑浊且黏稠, 在清洗除菌时需使用镊子将叶片表面农杆菌菌体剥下。此外, 不进行共培养时, 没有获得茎段愈伤组织; 共培养 1 d 时, 茎段出愈率较低 (3.33%); 共培养 2 d 时, 茎段出愈率最高 (16.17%), 茎段周围开始出现透明水渍状的农杆菌菌落, 但面积较小; 共培养 3 d 时, 茎段与培养基接触面周围已经出现浑浊且黏稠的农杆菌菌液, 远离培养基的茎段表面也能观察到少量农杆菌。

2.6 不同乙酰丁香酮浓度对农杆菌转化的影响

乙酰丁香酮浓度为 0、50 和 100 μmol/L 时, 叶片出愈率分别为 (9.15±0.75)%、(10.80±0.98)% 和

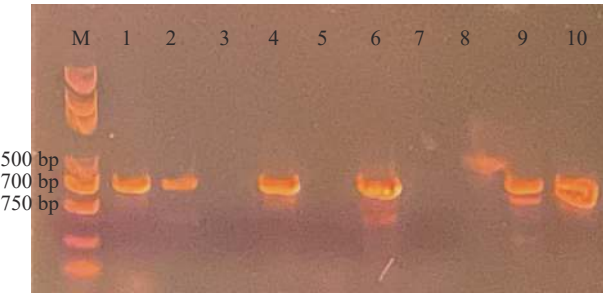
表 5 不同共培养时间对农杆菌转化的影响
Tab. 5 Effects of different coculture time on the *Agrobacterium*-mediated transformation

外植体 explants	共培养时间/d coculture time	出愈率/% callus induction rate
叶片 leaves	0	0±0 d
	1	4.82±1.79 b
	2	11.67±1.44 a
	3	2.5±0.00 c
茎段 stems	0	0±0 b
	1	3.33±2.88 b
	2	16.17±3.58 a
	3	13.33±2.88 a

(9.98±2.18)%, 三者间无显著差异, 说明乙酰丁香酮添加与否以及添加浓度不同都可以获得一定的出愈率。

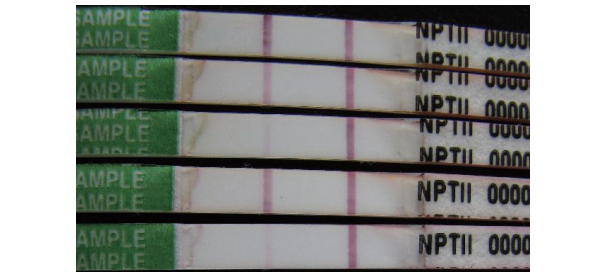
2.7 抗性愈伤组织的 PCR 鉴定及 NPT II ImmunoStrip 检测

以 *npt II* 基因序列为模板设计引物, PCR 检测愈伤组织中 *npt II* 基因, 结果 (图 1) 显示: 目标片段约为 700 bp, 3 个叶片愈伤组织中有 2 个检测出 *npt II* 基因, 5 个茎段愈伤组织中有 3 个检测出 *npt II* 基因, 即 PCR 检测呈阳性。由图 2 可知: PCR 检测呈阳性的愈伤组织蛋白水平均表达正常, 可初步判定 *sck+CryI-Ac* 基因已经导入辣木叶片和茎段的愈伤组织中。由图 3 可知: 含有 *npt II* 基因的抗性愈伤组织能够在含一定浓度卡那霉素的培养基上正常生长, 而不含有 *npt II* 基因的非抗性愈伤组织接种于含一定浓度卡那霉素的培养基上一段时间后会死亡。



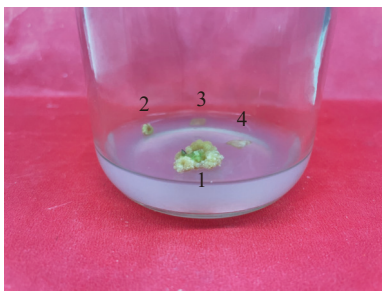
注: M. DNA marker; 1. 阳性对照, 含 *npt II* 的质粒 DNA; 2~4. 叶片愈伤组织; 5. 空白对照, 未进行侵染的愈伤组织; 6~10. 茎段愈伤组织。
Note: M. DNA marker; 1. positive control, plasmid DNA containing *npt II*; 2-4. leaf callus; 5. CK, callus without infection; 6-10. stem segment callus.

图 1 标记基因 *npt II* 的 PCR 检测
Fig. 1 PCR detection of the marker gene *npt II*



注: 出现 1 条带表示试剂检测正常但无 NPT II 蛋白, 出现 2 条带表示 NPT II 蛋白检测为阳性。
Note: The one band indicates the test kit works but without NPT II protein, two bands indicates NPT II protein is positive.

图 2 NPT II 蛋白检测
Fig. 2 NPT II ImmunoStrip test



注: 1 和 2 为抗性愈伤组织, 3 和 4 为非抗性愈伤组织。

Note: 1 and 2 are resistant callus, 3 and 4 are non-resistant callus.

图 3 部分辣木叶片愈伤组织

Fig. 3 PKM-1 leaf and stem segment callus

3 讨论

要建立高效的遗传转化体系, 抗生素浓度、预培养时间、侵染菌液浓度、侵染时间和共培养时间等的选择尤为重要。由于辣木抗虫转基因方面的研究报道甚少, 故目前只能对比参考其他植物的研究结果。提门叮是由提卡霉素和 β -内酰胺酶抑制剂形成的抗生素, 适合的质量浓度能够有效抑制农杆菌生长, 同时对外植体的生长以及愈伤组织的诱导和分化影响较小。本研究最终确定提门叮的工作质量浓度为 200 mg/L, 该质量浓度的提门叮能够完全抑制农杆菌的生长, 农杆菌过度繁殖可对外植体产生毒害最终导致外植体死亡, 这与王芳等^[19]对紫雨桦的研究结果相同, 也证明了适宜抗生素浓度对于遗传转化的重要性。对外植体进行造伤处理是影响遗传转化的重要因素, 常用方法有负压、超声波和切割等, 伤口的存在可以使外植体处于代谢活跃的状态, 促进细胞分裂, 该状态下的细胞更易于整合外源基因^[20]。本研究所得较适预培养时间为 0 d, 即不进行预培养, 其原因可能是预培养过程中外植体伤口发生了愈合, 对后续农杆菌的侵染和 T-DNA 区段的整合产生影响, 这与人对大白菜^[21]和菊苣^[22]的研究结果相同。较低的侵染菌液浓度可以保证后续顺利除菌, 但可能不利于 T-DNA 区整合; 而过高的侵染菌液浓度则会导致后续除菌困难, 且不同植物对农杆菌的耐受能力不同。由于本研究所使用的辣木幼嫩叶片较薄, 侵染时菌液浓度过高可能会导致外植体受到不可逆损伤或是后续筛选培养过程中除菌困难, 因此本研究最终确定菌液较适 OD₆₀₀ 值为 0.2, 这与江帅菲等^[23]对枫香的研究结果相同。

本研究中, 不同侵染时间对叶片和茎段的愈合率影响不显著, 推测可能是因为设置的时间梯度较小, 在后续的试验中应增加时间梯度或是增加梯度数量。农杆菌介导的外源基因导入并不能在一瞬间完成, 共培养的目的是为农杆菌 T-DNA 的整合提供时间, 若共培养时间过短, 农杆菌 T-DNA 区的转移过程不能完成; 若共培养时间过长, 培养基上过度繁殖的农杆菌可能会对外植体产生毒害作用。此外, 共培养的温度和光照等也会对外植体产生影响, 本研究仅探究了共培养时间对农杆菌介导的遗传转化的影响, 其余条件还需后续进行研究。本研究所得的较适共培养时间为 2 d, 与苏振华等^[24]对甜椒的研究结果相同。由农杆菌介导的 T-DNA 加工和输出到植物细胞的过程在很大程度上受 Ti 质粒携带的毒力基因 (*Vir* 基因) 活性所影响, *Vir* 基因可以激活 T-DNA 区的转移^[25]。植物受到创伤后, 受创细胞释放出的酚类化合物 (如乙酰丁香酮) 和糖类信号分子会诱导农杆菌 *Vir* 基因的表达, 因此, 在遗传转化过程中加入乙酰丁香酮可以在一定程度上提高转化效率。在遗传转化试验中, 是否加入乙酰丁香酮都可以获得一定的转化率, 需要根据受体材料和菌株种类所决定^[26]。本研究所使用的菌株为 EHA105, 该菌株所合成的冠瘿碱分解产物为糖类物质, 转化过程中加入乙酰丁香酮可以提高转化效率, 但最终结果表明不同乙酰丁香酮浓度对出愈率的影响不显著, 这与郭利军等^[27]对菠萝的研究结果相同, 推测原因是辣木本身含有乙酰丁香酮, 所以乙酰丁香酮加入与否以及加入浓度不同对农杆菌转化均无明显影响。

4 结论

本研究以携带双价抗虫基因 *sck*+*CryI-Ac* 的工程菌 EHA105 为供体, 利用农杆菌介导转化 PKM-1 叶片和茎段并获得转化后的愈伤组织; PCR 和 NPT II ImmunoStrip 检测结果表明: *npt II* 基因已整合至愈伤组织, 且蛋白表达水平正常。研究结果可为辣木抗虫分子育种提供材料。

[参考文献]

- [1] 盛军. 现代辣木生物学[M]. 昆明: 云南科技出版社, 2014.
- [2] 刘昌芬, 杨焱, 龙继明, 等. 多油辣木植物学性状和农艺

- 性状观测[J]. 热带农业科技, 2006, 29(4): 4. DOI: 10.3969/j.issn.1672-450X.2006.04.002.
- [3] 魏静. 多油辣木的遗传多样性研究[D]. 北京: 中国林业科学研究院, 2013.
- [4] 矫健, 陈伟忠, 穆钰, 等. 国内外辣木产业发展现状及思考[J]. 世界农业, 2015(5): 126. DOI: 10.13856/j.cn11-1097/s.2015.05.027.
- [5] RECK I M, BAPTISTA A T A, PAIXÃO R M, et al. Application of magnetic coagulant based on fractionated protein of *Moringa oleifera* Lam. seeds for aqueous solutions treatment containing synthetic dyes[J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2020, 27(11): 12192. DOI: 10.1007/s11356-020-07638-2.
- [6] 沙子珺, 黎彩凤, 唐仕欢, 等. 新资源药材辣木叶抗高血脂症的药效与作用机制探析[J]. 中国中药杂志, 2021, 46(14): 3465. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcmm.20210309.401.
- [7] 孙杨, 赵灿, 刘媛媛, 等. 辣木叶对糖尿病大鼠认知功能及海马神经细胞凋亡的影响[J]. 中国应用生理学杂志, 2021, 37(6): 638. DOI: 10.12047/j.cjap.6123.2021.070.
- [8] 王小安, 潘少霖, 高敏霞, 等. 辣木嫩梢营养成分测定与分析[J]. 东南园艺, 2016, 4(4): 11. DOI: 10.3969/j.issn.1004-6089.2016.04.004.
- [9] 杨茗茸, 杨扬, 彭麟杰, 等. 辣木籽异硫氰酸酯衍生物抑制结肠癌HCT-116细胞的生长和迁移[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 46. DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0067.
- [10] 李召波, 夏涛, 王应清, 等. 辣木蛱蝶幼虫的空间分布型及抽样技术研究[J]. 云南农业大学学报(自然科学), 2019, 34(4): 597. DOI: 10.12101/j.issn.1004-390X(n).201804.020.
- [11] DHANIA N K, CHAUHAN V K, CHAITANYA R K, et al. Midgut *de novo* transcriptome analysis and gene expression profiling of *Achaea janata* larvae exposed with *Bacillus thuringiensis* (Bt)-based biopesticide formulation[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part D: Genomics and Proteomics, 2019, 30(10): 81. DOI: 10.1016/j.cbd.2019.02.005.
- [12] MEISSE M, ZÜND J, WALDBURGER M, et al. Development of *Chrysoperla carnea* (Stephens) (Neuroptera: Chrysopidae) on pollen from Bt-transgenic and conventional maize[J]. Scientific Reports, 2014, 4(1): 5900. DOI: 10.1038/srep05900.
- [13] ZUBAIR M, LATIF A, RAO A Q, et al. A combination approach of enhanced methanol production and double *Bt* genes for broad spectrum insect resistance in transgenic cotton[J]. Molecular Biotechnology, 2019, 61(9): 663. DOI: 10.1007/s12033-019-00192-4.
- [14] ZHOU J, MA C F, XU H L, et al. Metabolic profiling of transgenic rice with *cryIac* and *sck* genes: an evaluation of unintended effects at metabolic level by using GC-FID and GC-MS[J]. Journal of Chromatography B, 2009, 877(8/9): 725. DOI: 10.1016/j.jchromb.2009.01.040.
- [15] 李姝璇. 农杆菌介导的大豆遗传转化方法优化及 *KN1* 和 *GIDI* 基因对大豆再生和遗传转化效率的影响[D]. 南京: 南京农业大学, 2018.
- [16] 黎国运, 李大周, 徐佩玲, 等. 辣木组培育苗技术研究总结[J]. 热带林业, 2006, 34(1): 31. DOI: 10.3969/j.issn.1672-0938.2006.01.010.
- [17] 马秋月, 黄海泉, 黄蔚霞, 等. 辣木组织培养技术研究[J]. 黑龙江农业科学, 2015(12): 18. DOI: 10.11942/j.issn1002-2767.2015.12.0018.
- [18] 张慧, 黄苏南, 杜建武, 等. 多油辣木PKM-1卡那霉素耐受性研究[J]. 西南农业学报, 2021, 34(4): 727. DOI: 10.16213/j.cnki.scjas.2021.4.007.
- [19] 王芳, 姜静. 不同抗生素对紫雨桦离体叶片愈伤组织诱导的影响[J]. 西南林业大学学报, 2014, 34(3): 27. DOI: 10.3969/j.issn.2095-1914.2014.03.005.
- [20] 张敏, 杨承香, 蒋子凡, 等. 农杆菌介导法获得桃叶卫矛转 *Bt* 基因植株[J]. 分子植物育种, 2021, 19(19): 6406. DOI: 10.13271/j.mpb.019.006406.
- [21] 赵玉竹. 农杆菌介导的大白菜遗传转化体系的建立[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2017.
- [22] 李小冬, 蔡璐, 李世歌, 等. 免预培养高效菊苣遗传转化方法[J]. 草业学报, 2016, 25(10): 124. DOI: 10.11686/cyxb2016097.
- [23] 江帅菲, 崔莹, 赵瑞瑞, 等. 杂交枫香胚性愈伤组织遗传转化体系研究[J]. 北京林业大学学报, 2021, 43(8): 9. DOI: 10.12171/j.1000-1522.20210032.
- [24] 苏振华, 张俊华, 张泽鑫, 等. 农杆菌介导的甜椒遗传转化体系的建立[J]. 江西农业学报, 2019, 31(6): 9. DOI: 10.19386/j.cnki.jxnyxb.2019.06.02.
- [25] GELVIN S B. Agrobacterium-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool[J]. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 2003, 67(1): 16. DOI: 10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003.
- [26] 胡同华, 陈达伟, 王钰, 等. 毫菊EDT1抗旱基因遗传转化体系建立与耐旱性初步评价[J]. 中药材, 2017, 40(1): 1. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2017.01.001.
- [27] 郭利军, 梁其干, 范春节, 等. 农杆菌介导台农17号菠萝遗传转化相关因素优化[J]. 安徽农学通报, 2021, 27(21): 22. DOI: 10.16377/j.cnki.issn1007-7731.2021.21.009.

责任编辑: 何馨成