

## 农杆菌介导的针叶树基因工程

唐 巍 郭仲琛 桂耀林

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

与传统的杂交育种相比, 针叶树基因工程为在更短的时间内将具有特殊性状的基因引入有重要价值的森林树种提供了机会。基因工程在许多农作物中已获得成功, 可是, 这些方法在森林树种特别是在针叶树种中的应用, 由于缺乏良好的转化方法和再生系统而受到严重限制。挪威云杉(*Picea abies*)体细胞胚胎发生体系的完善<sup>[10]</sup>和火炬松(*Pinus taeda*)<sup>[8]</sup>、白云杉(*Picea glauca*)<sup>[2]</sup>胚性培养原生质体植株再生体系的建立为针叶树的再生提供了可实用的方法。对转基因针叶树的生产来说, 和这些再生系统相适应的 DNA 导入方法是必不可少的。农杆菌介导的转化是外源 DNA 进入植物细胞的最成功和应用最为广泛的方法, 并且已经成功地应用到木本植物上<sup>[7, 14]</sup>。长期以来, 人们认为根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)的宿主范围主要限于双子叶植物。但自从 1976 年 D. Cleene 和 D. Ley<sup>[6]</sup>首次报道根癌农杆菌菌株 B<sub>6</sub>(LMG187)也能感染裸子植物受伤组织并产生冠瘿瘤(Crown gall)后, 许多学者开始利用根癌农杆菌进行裸子植物尤其是针叶树的基因转移。并且通过生化分析和分子标记技术等方法已经证明外源基因在部分针叶树如白云杉<sup>[5]</sup>、挪威云杉<sup>[11]</sup>、火炬松<sup>[17]</sup>及北美黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)<sup>[9]</sup>等的细胞组织中得到表达, 其前景令人乐观。本文就近年来针叶树基因工程研究所取得的一些进展作一综述。

### 一、农杆菌介导的针叶树基因工程进展

针叶树基因工程研究在林业生产、生态环境及针叶树品种改良等方面有重要价值。目前, 美国、加拿大、瑞士等国在这方面的研究十分活跃并取得了一定进展。农杆菌是可使受其侵染的植物宿主细胞组织产生冠瘿瘤的革兰氏阴性细菌, 其致瘤能力由存在于农杆菌中的一类大的 Ti 质粒或 Ri 质粒所决定<sup>[8, 18]</sup>。农杆菌感染植物后, 其质粒转化并整合进入植物宿主细胞, 诱导合成冠瘿碱(Opine)。农杆菌转化包括受伤植物器官的直接感染如茎叶与农杆菌的感染<sup>[12]</sup>、原生质体与农杆菌的共培养<sup>[13]</sup>、快速生长小细胞团及愈伤组织的感染<sup>[1]</sup>和植物原生质体与农杆菌原生质球状体的融合等<sup>[16]</sup>。

R. Sederoff 等<sup>[17]</sup>在火炬松(*Pinus taeda*)的研究中, 用 *A. tumefaciens* U<sub>3</sub> 菌株感染 12 个月龄的火炬松小植株, 6 个月后将形成了冠瘿瘤(Crown gall)。用冠瘿瘤培养获得的愈伤组织及原来冠瘿瘤中都测出有农杆菌碱(Agropine)及甘露碱(Mannopine)的合成, 说明细菌基因组中的 Opine 合成基因在火炬松转化组织中得到了表达。

A. M. Dandekar 等<sup>[4]</sup>成功地将含有 Kanamycin 抗性基因的 pCGN562 及 pCGN167 片段引入 pTiA6 质粒, 感染北美黄杉(*Pseudotsuga menziesii*)的不定芽及实生苗, 转化细胞组织在缺乏植物激素的培养基上生长正常并能合

成章鱼碱(Octopine),外源基因在北美重要针叶树北美黄杉中得到表达。后来,P. Gupta等<sup>[9]</sup>又成功地将荧光素酶基因(Luciferase gene)转入北美黄杉及火炬松原生质体中,对培养过程中存活的原生质体及再生细胞进行测定,证实了转入的 Luciferase gene 得到了表达。同时还证明聚乙二醇(PEG)能促进基因表达。

D.Ellis 等<sup>[5]</sup>用 36 个 *A. tumefaciens* 和 1 个 *A. rhizogenes* 菌株对 6 个月龄的白云杉(*Picea glauca*)实生菌进行了试验,结果是 9 个 *A. tumefaciens* 菌株的冠瘿瘤转化率达 50%,但转化率最高的是含 pTiB<sub>0542</sub>质粒的 A<sub>281</sub>菌株。实验还证实了冠瘿碱合成基因、Kanamycin 抗

性基因及萤火虫的 Luciferase gene 都在白云杉细胞中得到了表达。

E.H.Hood 等<sup>[11]</sup>用挪威云杉(*picea abies*)进行的转基因试验证明,*A. tumefaciens* 菌株 A<sub>281</sub>感染 3 个月龄的挪威云杉幼菌,冠瘿瘤转化率达 31%,并用分子杂交试验证实 Ti 质粒的 T-DNA 整合进入了挪威云杉细胞。经酸性 pH 纸电泳鉴定,挪威云杉细胞产生了农杆菌(Agropine)。同时也证实 *A. tumefaciens* 是适用于挪威云杉基因转移的媒介物。目前,已经进行过基因工程研究并且外源基因的转化获得成功的针叶树包括松科的 6 个属 13 个种<sup>[3]</sup>,其中的云杉属和松属植物有 8 种(表 1)。

表 1 农杆菌转化成功的针叶树种

植物种名	中文译名	冠瘿碱合成	参考文献
1 <i>Abies nordmanniana</i>	高加索冷杉	+	[11]
2 <i>Abies procera</i>	高大冷杉	+	[14]
3 <i>Larix decidua</i>	欧洲落叶松	+	[7]
4 <i>Picea abies</i>	挪威云杉	+	[11]
5 <i>Picea glauca</i>	白云杉	+	[11]
6 <i>Picea engelmanni</i>	恩氏云杉	+	[9]
7 <i>Picea sitchensis</i>	北美云杉	+	[5]
8 <i>Pinus lambertiana</i>	糖松	+	[11]
9 <i>Pinus tweda</i>	火炬松	-	[17]
10 <i>Pinus pinaster</i>	南欧海松	+	[3]
11 <i>Pinus sylvestris</i>	欧洲赤松	+	[3]
12 <i>Pseudotsuga menziesii</i>	北美黄杉	+	[9]
13 <i>Tsuga heterophylla</i>	异叶铁杉	+	[5]

二、针叶树基因工程的特点及存在的问题

从已有的研究报道看,针叶树基因工程的研究具有以下特点:(1)针叶树基因工程研究在具有重要经济价值的云杉属及松属中尤为突出,这对促进有商业价值的针叶树基因工程产品的生产有重要意义;(2)农杆菌的转化组织已

经从实生菌受伤组织、愈伤组织、培养细胞发展到了原生质体;(3)外源基因包括细菌基因如 Kanamycin 抗性基因及动物基因如萤火虫的 Luciferase gene 等在针叶树受体细胞中已成功地得到表达;(4)转化组织的分子鉴定技术日益完善,已普遍采用分子杂交、Southern 分析及电

泳分析等作为基因转化的检测手段。尽管针叶树基因工程取得了一定进展,但研究中尚存在一些问题,具体包括:(1)各转化系统相对独立,目前尚没有研究出一种能够被普遍接受的针叶树基因工程模式系统,因此对不同树种,转化起始材料及农杆菌菌株都需要进行优化筛选,以得到优良转化体系;(2)和其他植物的基因转化相比,针叶树在原生质体水平上尚未得到再生转化植株;(3)转化效率较低而且不稳定,转化的基因多为细胞基因。总之,要想借助基因工程进行针叶树品种改良,在基础研究上尚需作大量的工作。

### 三、展望

针叶树的转化本身比较困难,再生更属不易。目前,针叶树基因工程的研究仅仅是个开端,但对植物的基因表达调控研究、基因工程育种等有重要的意义。随着研究的继续和深入,有可能建立起能够被普遍接受的针叶树基因工程模式转化系统,一旦建立起这种系统,就可以比较容易地利用聚乙二醇法、电激导入法、基因枪法、脂质体法及超声波法等直接进行基因导入,使转化工作变得简单易行,获得更高的转化效率。外源特殊性状基因在针叶树细胞内的转

录和表达对改善针叶树代谢、光合、抗性及结构,使其更多的造福于人类有积极作用。

### 参考文献

- [ 1 ] An, G. et al. 1985, EMBO. J., 4:277-284
- [ 2 ] Attress, S. et al., 1987, Plant Cell Reports, 6:480-483
- [ 3 ] Chilton, W. S. et al., 1985, Phytochemistry, 24:2945-2948
- [ 4 ] Dandekar, A. et al. 1987, Bio/Technology, 5:587-590
- [ 5 ] David, E. et al., 1989, Plant Cell Reports, 8:16-20
- [ 6 ] De Cleene, M. et al., 1976, Bot. Rev., 42:389-466
- [ 7 ] Fillatti, J. et al., 1987, Plant Cell Reports, 6:192-199
- [ 8 ] Gupta, P. et al., 1987, Bio/Technology, 5:710-712
- [ 9 ] Gupta, P. et al., 1988, Plant Science, 58:85-92
- [10] Hakman, I. et al., 1985, J. Plant Physiol., 121:149-158
- [11] Hood, E. E. et al., 1990, Plant Molecular Biology, 14:111-117
- [12] Horsch, R. B. et al., 1985, Science, 227:1229-1231
- [13] Marton, L. et al., 1979, Nature, 277:129-131
- [14] Mc Granana, G. et al., 1988, Bio/Technology, 6:800-804
- [15] Moore, L. W. et al., 1979, Plasmid, 2:617-628
- [16] Okada, K. et al., 1985, Plant Cell Reports, 1985, 4:133-136
- [17] Ronald, S. et al., 1986, Bio/Technology, 4:647-649
- [18] Watson, B. et al., 1975, J. Bacteriol, 126:255-264

# Oligosaccharins Enhance Ability of Disease-Resistant of Wheat and Were Applied Studies Against *Fusarium Graminearum* Schwabe

Yu Lu Li Wei Tan Jian Xie HuiPing

(Chengdu Institute of Biology, Academia Sinica)

Zhao Yinhuai Wang ShuWen Zhou WenChun

(Naijing Institute of Crops Breeding, Jiangsu Provincial Academy of Agricultural Sciences)

## ABSTRACT

The accumulation of Wheat phytoalexins elicited by oligosaccharins from *Gibberella zeae*(Schw.) Petch mycelial walls was efficient in Wheat etiolated seedling. Wheat phytoalexins produced by oligosaccharins have shown inhibitory ability against *Gibberella zeae*(Schw.) Petch. Ears and leaves of Wheat was treated by same oligosaccharins of different concentration. Finally, we present the results of determining on the bioactivity of oligosaccharins. Percentages of diseased ears of species Ning Mai 6 and Mian Yang 11 treated by 20  $\mu\text{g/ml}$  oligosaccharins have significantly decreased by 44.9 and 26.9 percent.

Wheat were treated by oligosaccharins elicitor isolated from Wheat cell wall. The elicitors have shown similar inhibitory ability. Oligosaccharins at a concentration of 20  $\mu\text{g/ml}$  significantly increased the ability of disease-resistant of Wheat. The defensive efficiency of Ning Mai 6, Yang Mai 6, Chuan Yu 12 against *Gibberella zeae*(Schw.) Petch are 90.1, 81.0, and 88.9 percent respectively. The accumulation of Wheat phytoalexins of resistant varieties are higher than susceptible ones.

**KEY WORDS:** Oligosaccharins; disease-resistant; Wheat Scab.

注: 全文请参看 95 年第六期第 36 页