

分子生物学新技术在 林木育种中的应用进展

主编 孟凡娟 副主编 李 炜



科学出版社

分子生物学新技术在 林木育种中的应用进展

主 编 孟凡娟

副主编 李 炜

本书由国家自然科学基金项目(J1210053)资助出版

科 学 出 版 社

北 京

内 容 简 介

应用分子生物学技术对林木进行遗传改良一直是科研工作者的重要目标。本书以目前较为常用的和先进的分子生物学技术在林木主要研究领域中的研究进展情况为主要论述对象,对基因工程技术、体细胞胚培养技术、基因组学技术、蛋白质组学技术、转录组学技术、代谢组学技术在林木遗传育种中的应用情况进行了系统的分析和综述,从而说明了这些技术在林木育种中的应用范围、重要性、发展趋势及存在的问题。

本书主要供林学与分子生物学研究领域的相关科研院所人员和大专院校师生参考。

图书在版编目(CIP)数据

分子生物学新技术在林木育种中的应用进展 / 孟凡娟主编. —北京:科学出版社, 2014. 4

ISBN 978-7-03-049376-6

I. ①分… II. 孟… III. ①分子生物学—应用—林木—植物育种—研究
IV. ①S722.8

中国版本图书馆CIP数据核字(2014)第067899号

责任编辑: 梁 颖 / 责任校对: 桂伟利
责任印制: 赵德静 / 封面设计: 耕者设计工作室

科学出版社 出版

北京东黄城根北街16号

邮政编码: 100717

<http://www.sciencep.com>

新科印刷有限公司 印刷

科学出版社发行 各地新华书店经销

*

2014年4月第 一 版 开本: 787×1092 1/16

2014年4月第一次印刷 印张: 16 1/4

字数: 372 000

定价: 85.00 元

(如有印装质量问题, 我社负责调换)

编写人员名单

主 编 孟凡娟(东北林业大学)

副主编 李 炜(黑龙江省农业科学院)

主 审 王秋玉(东北林业大学)

前 言

联合国最近公布的一项数据表明,20世纪90年代,全球的森林采伐面积大约为1400万公顷,但是新造林和自然生长的森林增加面积只有520万公顷,同时每年净损失的森林面积已经达到880万公顷。造成这种情况主要原因一方面是为人为因素,另一方面是由于环境造成的林木生长条件的限制,例如,干旱、盐渍、高温、水淹等恶劣的环境条件抑制了林木的生长或直接造成了林木的死亡。由于林木生长周期长、遗传杂合性高、遗传机理不明、许多重要经济性状属于多基因控制的数量性状,尤其是森林树木高大、山坡陡峭、面积较大,采用化学方法进行林木遗传改良成本较高且极不方便,因此运用现代分子生物学技术进行林木遗传改良研究具有重要的现实意义。

本书综述了当前林木遗传改良中分子生物学的最新研究进展和分子生物学策略在林木育种中的应用,并就林木分子生物学研究中亟需解决的问题和应用前景进行了讨论,分析并讨论了基因工程技术、体细胞胚培养技术、基因组学技术、蛋白质组学技术、转录组学技术、代谢组学技术在林木遗传育种中的应用情况及存在的问题。希望可以为进一步深入开展林木遗传改良研究提供新思路。

本书第一章、第二章、第三章、第四章由孟凡娟编写,第五章、第六章由李炜编写。同时在本书的编写过程中得到王秋玉教授的指导和支持并担任本书的主审,在此表示衷心的感谢。

编 者

2014年2月20日

目 录

前言

第一章 基因工程技术在林木抗性遗传育种中的应用进展	(1)
第一节 抗病基因工程	(4)
第二节 抗虫基因工程	(12)
第三节 抗逆基因工程	(23)
第四节 抗除草剂基因工程	(39)
第五节 育性基因工程研究进展	(40)
第六节 木材品质改良基因工程	(48)
第七节 林木基因工程存在的问题	(61)
第二章 体细胞胚培养技术在林木育种中的应用进展	(67)
第一节 林木体胚发生的研究进展	(68)
第二节 体细胞胚作为遗传转化体系的研究进展	(83)
第三节 林木体胚发育的分子机制研究进展	(89)
第三章 基因组学技术在林木遗传育种中的应用进展	(103)
林木基因组学	(104)
第四章 蛋白质组学在林木遗传育种中的应用进展	(171)
第一节 杨属	(173)
第二节 松属	(184)
第三节 云杉属	(191)
第四节 桉树	(194)
第五节 山毛榉属	(196)
第六节 其他物种	(197)
第五章 转录组学在林木遗传育种中的应用进展	(203)
第一节 林木发育转录组分析	(210)
第六章 代谢组学在林木遗传育种中的应用进展	(222)
第一节 林木的代谢指纹分析	(223)
第二节 代谢途径分析	(230)
第三节 对环境的响应	(237)
第四节 胚培养过程的代谢组学研究	(242)
第五节 木材形成	(246)

第一章 基因工程技术在林木抗性遗传育种中的应用进展

森林是一个复杂的生态系统,对人类的经济、社会和环境具有重要意义。此外,还是人类食品和药物的主要来源。目前,从世界范围来看,联合国最近公布的一项数据表明:20 世纪 90 年代,全球的森林采伐面积大约为 1400 万 hm^2 ,但是新造林和自然生长的森林增加面积只有 520 万 hm^2 ,同时每年净损失的森林面积已经达到 880 万 hm^2 ,如图 1-1 所示。造成这种情况发生的主要原因:一方面是人为因素造成的;另一方面,是由于环境造成的林木生长条件的限制,例如,干旱、盐渍、高温、水淹等恶劣的环境条件抑制了林木的生长或者直接造成了林木的死亡。同时森林树木高大,山坡陡峭,面积较大,采用化学的方法进行林木抗病和抗逆防治成本较高且极不方便,因此,最有效的措施还是采用基因工程的方式进行林木抗病及抗逆育种,从而开辟新的途径。

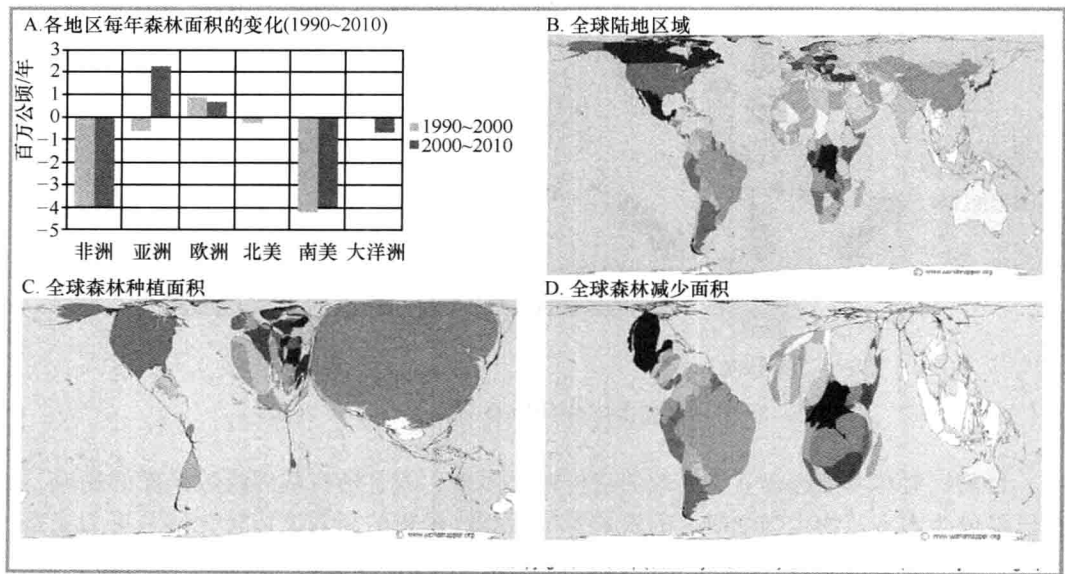


图 1-1 世界森林产量的动态分布(Castellanos et al. , 2010)

目前,人类对森林的需求已经远远超过了森林本身所能提供的,同时林木生长周期长,是林木抗性育种工作中一个最大的障碍,而植物基因工程的诞生和发展给林木抗性育种带来了新的、突破性的方法。林木抗性基因工程就是利用重组 DNA 技术,将相应的抗性外源基因导入林木染色体,从而产生具有外源基因表达的转基因林木。20 世纪 80 年代以来,随着对基因分离、表达载体构建、植物遗传转化和外源基因在高等植物细胞中的表达等方面的深入研究,特别是利用真核基因启动子构建融合基因的工作解决了外源基因在植物转化细胞中的表达问题,加速了林木基因

工程的进展。图 1-2 表示林木基因工程的基本方法,即林木基因工程就是通过适合的基因转移技术,导入有用的外源基因,获得转基因植株,从而进行林木遗传改良或相关研究。

1986~1997 年,全世界有 45 个国家在 60 多种植物上进行了 25 000 例转基因植物的田间试验,仅 1996~1997 年就有 10 000 例左右的报道,约占 40%。1997 年底,全球已有 12 种作物的 48 种转基因作物产品获准进入商品化生产,转基因植物种植面积达 1280 万 hm^2 ,仅美国就占 60%。据估计全球转基因植物产品的市场销售额从 1996 年的不足 5 亿美元,到 2000 年已增加到 70 亿~100 亿美元,可见转基因工程是目前国际竞争最激烈的生命科学领域之一。林木基因工程主要集中在抗病基因工程、抗虫基因工程、抗除草剂基因工程、抗逆基因工程、品质改良基因工程等方面,如图 1-2 所示。

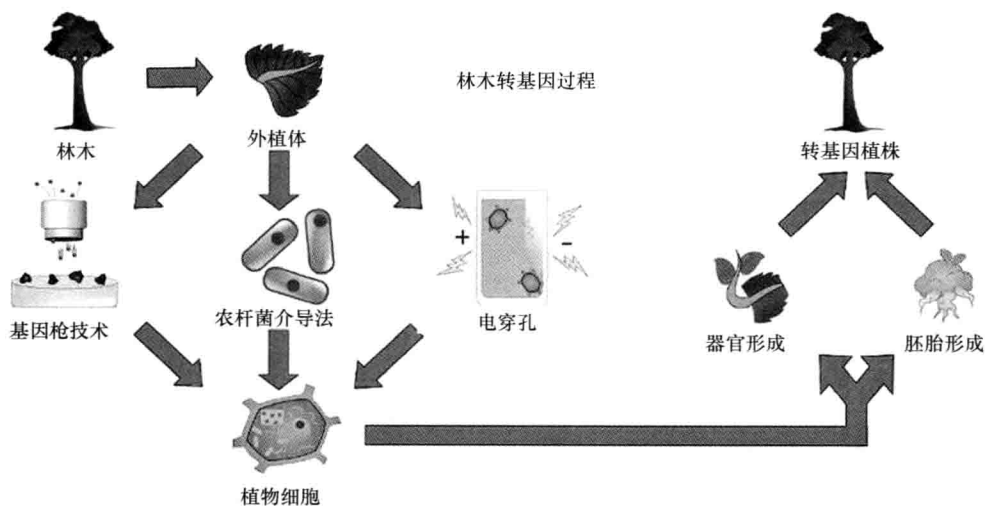


图 1-2 林木转基因技术图解 (Castellanos et al., 2010)

目前针对林木已经建立了高效的遗传转化体系。随着杨树基因组数据库的完成,杨树已经成为木本植物生物学的模式系统,因此,杨树的高效遗传转化体系更为完备。目前,主要利用根癌农杆菌或发根农杆菌进行遗传转化,已经建立了适于高通量基因的遗传转化体系。例如, Cseke 等 (2007) 利用农杆菌侵染毛白杨并利用苯基噻二唑脲 (TDZ) 进行选择筛选,通过 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 报告基因的表达,对各组织进行筛选,并利用 PCR 和 Northern 印迹进行转基因苗的选择,如图 1-3 所示。同时毛状根的诱导和遗传转化也同样利用和根癌农杆菌相同的操作程序,也使用 GUS 报告基因和抗生素的选择,如图 1-4 所示。这些操作程序简单且有效,转基因树(或毛状根)的获得只需要 3~4 个月就可完成,与传统意义的 6~12 个月的遗传转化方法相比,时间大大地缩短,因此,更适合高通量遗传转化操作的完成。

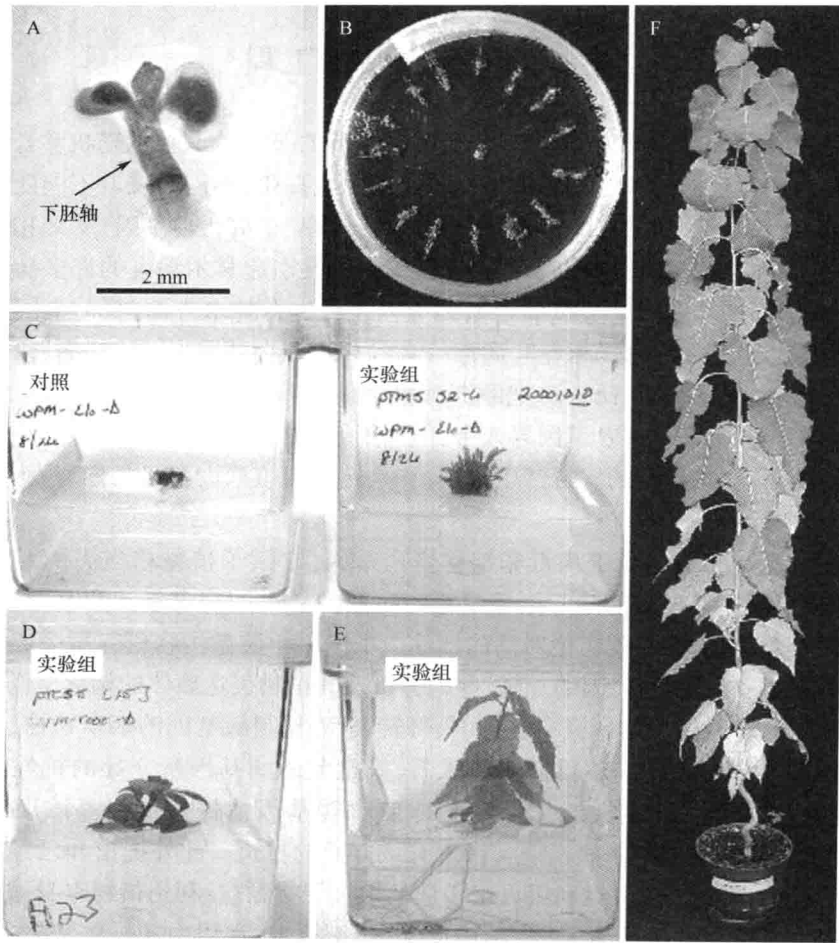


图 1-3 利用农杆菌介导的杨树遗传转化过程 (Cseke et al., 2007)

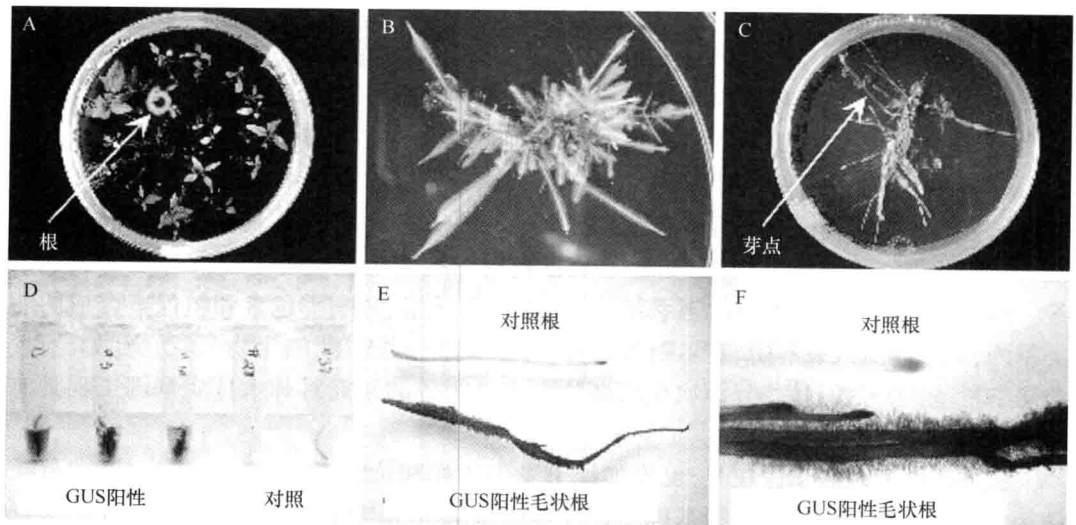


图 1-4 利用农杆菌诱导的杨树毛状根 (Cseke et al., 2007)

第一节 抗病基因工程

迄今为止,植物抗病基因工程大多是利用农杆菌 Ti 质粒为载体的随机整合策略。树木的抗病基因工程根据树木感染的病害(病毒、细菌或真菌)不同而采取不同的策略。抗病毒病害基因工程所选用的目的基因,主要有卫星 RNA、外壳蛋白基因、反义 RNA、PR 蛋白基因、中和抗体基因、弱毒株系、干扰素基因等。但是引起林木病害的许多病毒基因尚未克隆出来,因而严重地限制了抗病毒基因导入工作。在林木方面,目前英国牛津大学病毒所的研究小组正在克隆杨树花叶病毒(PMV)外壳蛋白基因来转化杨树,以育成抗性无性系。奥地利农林大学科研人员把欧洲和整个地中海地区的核果类果树中最重要的病毒 PPV(洋李痘病毒)的 CP 基因导入杏,但利用转 CP 基因仍有一些问题:一是抗性局限于一定程度,只对特异性的病毒产生抗性;二是转基因植株大多只是推迟发病,而不能彻底根治。

其中病毒复制酶基因属于病毒非结构蛋白基因,它赋予植物相当高的对病毒的抗性,但其作用机制还不十分清楚。把烟草花叶病毒(TMV)的病毒复制酶基因导入烟草,结果转基因烟草对 TMV 表现出绝对高的抗性。中国科学院微生物研究所完成了马铃薯 Y 病毒组中 PRV 的复制酶基因的克隆、序列分析及其植物表达载体的构建工作。沈阳农业大学和中国科学院微生物研究所合作,获得转 PVY 复制酶基因的烟草植株,温室接种表明转基因植物具有抗性。从目前实验来看,病毒复制酶基因所介导的抗性远远强于 CP 基因介导的抗性。其最大的优点在于即使对转基因植株使用很高浓度的病毒或 RNA,抗性仍然明显。但林木病毒病害尚未有该方面的报道。此外提出和已经应用的途径还有:利用病毒的卫星 RNA;利用人工构建的缺损干扰颗粒;利用植物本身编码的抗病毒基因和利用动物中的干扰素基因;利用反义 RNA 技术;利用中和抗体法技术;设计核酶剪切病毒 RNA 等,在以上技术途径中,导入 CP 基因是目前较为成功的一种,而利用病毒的复制酶基因是一种很有前途的方法。

抗真菌性病害的目的基因来自植物内、外源的病原菌的拮抗蛋白和毒蛋白基因,病原菌特异激发子的编码基因,病菌蛋白酶抑制剂基因,以及病原和寄主过敏反应中的控制基因等。细菌性病害的基因工程主要采取对病原细菌有解毒作用的解毒活性基因和 T4 溶菌酶基因等。抗林木病毒性病害的基因尚未有很好的研究和克隆,而抗真菌性和细菌性病害的基因研究已有一定的进展。抗真菌性的病害研究方面,目前克隆出的基因有几丁质酶基因和角质酶基因,已构建了能在杨树细胞中表达的几丁质酶基因的表达系统。对诱导或激发树木本身防卫系统启动,涉及木质素、黄酮类色素和植保素合成的酶类基因,如苯丙氨酸裂解酶、查尔酮合成酶、水杨酸合成酶基因,微生物源、动物(如昆虫、兔防御素基因)异源、植物异源次生代谢物合成基因等的研究对林木抗病基因工程具有重要意义。

抗菌基因工程起步比较晚,也不如抗虫基因工程和抗病毒基因工程进展快,主要是植物与病原菌相互作用的分子基础和抗性基因跟踪分析与分离等一系列工作还不够深入,尤其是树木病害。近些年,可见到一些较成功的报道。日本率先从烟草野火病菌中

分离出分解该菌产生毒素的解毒基因,并导入烟草,所获重组植物能降解该菌分泌的毒素,不形成病斑。几丁质酶基因和角质酶基因是目前克隆的抗树木真菌病的两种基因。几丁质酶具有降解几丁质的作用,由于许多病原真菌的细胞壁主要成分之一是几丁质,而植物中还未发现几丁质酶的底物,所以几丁质酶在防御病原真菌侵害中具有重要的作用。同时,目前国内外转基因的抗杨树叶锈病、抗杨树叶枯病、抗日本山杨肿瘤病、抗栗疫病、南方松梭形锈病、抗桉树青枯病等转基因树木正在试验中。此外,植保素和木质素在细胞内的积累或在细胞壁上的沉积直接表现为抗病效应,而它们的生物合成和沉积过程是受多基因控制的,弄清其生物合成途径,找出协调多个相互独立的防卫基因的调控基因,是调控多基因防卫系统,提高抗病效果的关键,也将是树木抗菌基因工程的重要途径。

PAL(phenylalanine ammonialyase)是合成木质素单位及某些植保素的关键酶,对其基因分析和转移是非常有意义的。研究者从葡萄中分离出三羟芪合成酶基因(合成植保素的基因),并通过农杆菌介导,首次将外源植保素基因转移到烟草中,并获得抗性转基因植株。一般来说,树木病害大多是多基因抗性,这给基因工程带来一定难度。其次是大多数树木病害的分子遗传学机制不是十分清楚,使该项工作难度加大。无论如何,只要加强这方面的工作,特别是寻找抗菌基因,不仅从植物和病原菌中找,还可从其他生物中找,如昆虫体内的杀菌肽基因、牛的溶菌酶基因等。

杨树是第一个用来进行遗传转化的林木物种,具有高效的遗传转化效率。但是人工大规模种植的杨树林品种单一,病虫害的发生越来越严重,因此,杨树的抗病育种显得非常迫切。单宁(tannins)是植物体内含量很高的一类多酚类黄酮化合物,其含量仅次于纤维素、半纤维素和木质素。在多年生林木中,单宁在其根、叶片和树皮中大量积累。大量研究证实,植物单宁具有多方面的生物学功能,例如,树木叶片中单宁积累可以提高抗病虫害效果;蔬菜水果中的单宁可抗氧化、抗癌、保护心血管;而牧草中适量的单宁能够防治食草动物胃发酵所致的膨胀病,此外,单宁也可提高植物适应逆境的能力。另外,植物叶片中缩合单宁可与某些蛋白质结合,通过阻止硝化作用来阻碍落叶中有机质的降解,进而影响树木的生长速率。因此,弄清植物中单宁生物合成途径及其调控机制对于有效控制植物体中单宁的成分和含量具有十分重要的意义。一直以来,杨树受到真菌病害如杨叶锈病、溃疡病等的威胁,每年给国民经济造成巨大的损失,而给生态环境造成的巨大破坏更是无法弥补,因此,对杨树抗病基因进行遗传转化,提高其抗性具有重要意义。

在杨树抗病工程的研究中,Harvey 研究小组(1987)对创伤反应基因在毛果杨×美洲黑杨无性系中的表达进行了研究,结果发现杨树创伤反应产生了3种新的转录物 mRNA,其中转录物 *win 6* 和 *win 8* 所编码的几丁质酶可以降解感染杨树的真菌或细菌的细胞壁,*win 3* 转录物所编码的多肽与豆科种子的蛋白酶抑制剂相似,具有抑制昆虫的功能。他们已将 *win 6* 基因与 GUS 报告基因融合,构建了能在杨树细胞中表达的几丁质酶基因表达系统,用于杨树抗病基因的遗传转化,但尚未有抗真菌基因转化成功的报道。1990 年,Bradshaw 从杨树中克隆出了类似于大豆膜蛋白酶抑制剂和几丁质酶的损伤激活基因的 cDNA,并进行了转化研究。另外,Cooper 研究小组(1993)成功克隆到杨树花叶病毒的外壳蛋白基因(*PMV-CP*)并导入杨树,在杨树体内所产生的 CP 蛋白,对杨树 PMV 的侵染起

到一种类似于免疫学的交叉保护效应。

Yuan 等(2012)对毛白杨进行了 *PtrLAR3* 基因转化,采用黑斑病菌 (*Marssonina brunnea*) 处理杨树叶片,数字基因表达谱 (DGE) 分析发现,杨树单宁合成途径中关键酶基因的表达均明显上调,表明这些基因参与了杨树病害的防御反应。通过克隆单宁合成途径中关键酶基因 *PtrLAR3*,利用实时荧光定量 PCR 分析发现:该基因主要在根中大量表达;在毛白杨中超量表达,发现 *PtrLAR3* 产物可催化儿茶素合成。抗病试验显示,转 35S::*PtrLAR3* 杨树对黑斑病的抗性显著提高。该工作为将来利用类黄酮物质(如单宁)提高杨树抗病性等分子育种工作奠定了基础,如图 1-5 和图 1-6 所示。

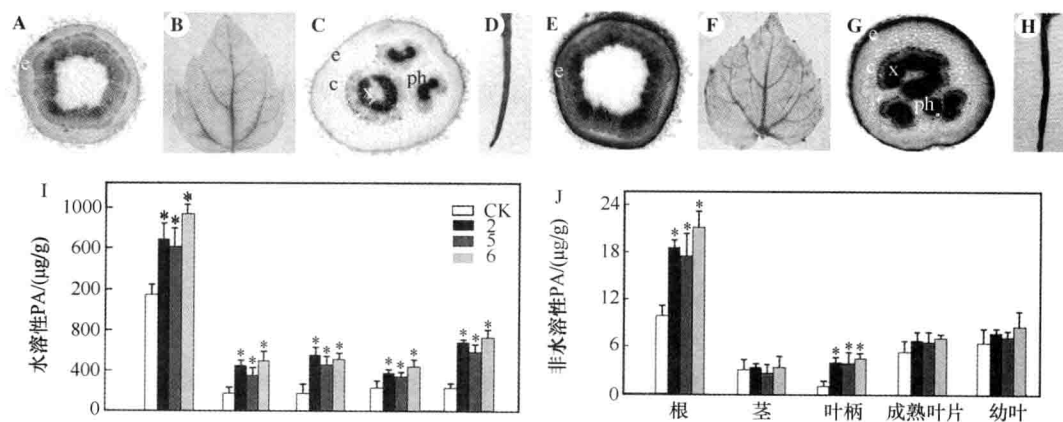


图 1-5 转 *PtrLAR3* 基因杨树不同组织内单宁的累积情况 (Yuan et al., 2011)

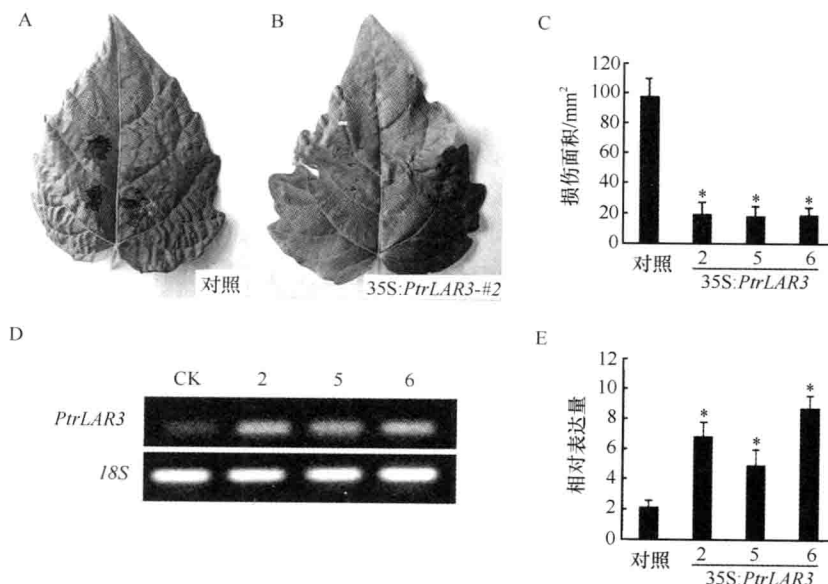


图 1-6 转 *PtrLAR3* 基因杨树对黑斑病的抗性情况 (Yuan et al., 2011)

Liang 等(2001)克隆了小麦发芽相关基因——草酸氧化酶基因 (*OxO*), 并采用 CaMV

35S 启动子对杨(*Ogy*)进行遗传转化,在先前的研究中发现 *OxO* 基因在植物发育、防御压力和真菌方面具有重要的作用。为了解这个基因在木本植物中的防御作用,进而进行了遗传转化。经检测在转基因的 *Ogy* 中,叶片对草酸具有明显的抗性,同时将叶片进行壳针菌孢子接种时,转基因植株表现出明显抗性,如图 1-7 所示。

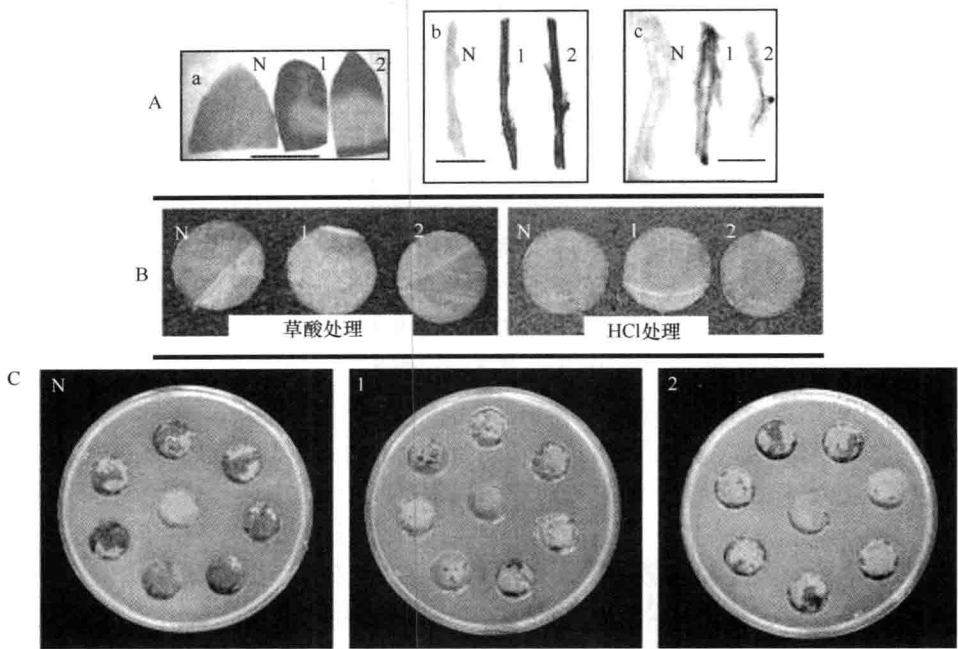


图 1-7 转基因杨叶片经草酸真菌处理后的结果 (Liang et al., 2001)

Liang 等(2002)利用携带抗微生物肽基因(*Ac-AMP1.2* 和 *ESF12*)的质粒(*pCA1* 和 *pCWEA1*)转移杂种杨(*Ogy* 和 *NM6*),其中 *Ac-AMP1.2* 肽是 *Ac-AMP1*(甲壳素凝结蛋白)的类似物,*ESF12* 为亲和性的螺旋肽。经过检测发现在转基因植株中检测到 mRNA,通过对转基因的叶片进行真菌(*Septoria musiva*)接种,其中转基因杨(*Ogy*)表现出明显抗性,如图 1-8 所示。

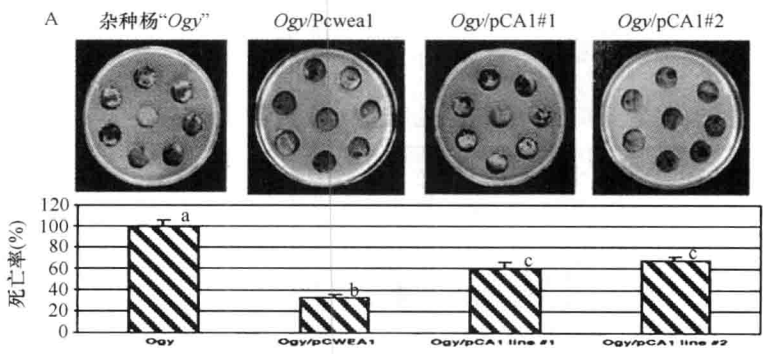


图 1-8 对转基因苗进行真菌抗性筛选 (Liang et al., 2001)

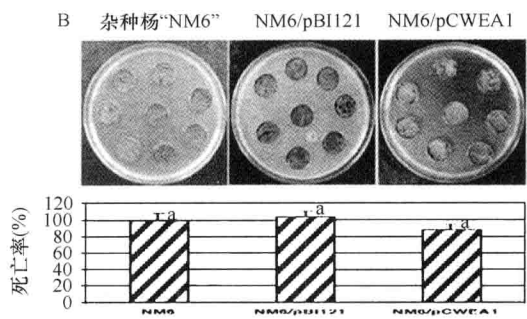


图 1-8 对转基因苗进行真菌抗性筛选(Liang et al. , 2001)(续)

小黑杨(*Populus simonii*×*P. nigra*)具有生长快、材质好、适应性强等优点,是林业生产上推广应用的优良品种之一。张福丽(2006)以小黑杨作为转基因的受体材料,研究了不同预培养时间、不同工程菌液浓度、不同侵染时间、不同共培养时间及不同筛选方法对其遗传转化效率的影响。利用几丁质酶是植物在受到病原菌侵染时所表达出的一组蛋白质,可以水解构成真菌(除卵菌外)细胞壁的主要成分——几丁质,从而抑制真菌的生长这一基本原理,以外源的几丁质酶基因为目的基因,进行了小黑杨的遗传转化研究,通过农杆菌介导法将外源几丁质酶基因导入到小黑杨中,为小黑杨的遗传

转化及抗性育种提供了理论基础。其中一部分转化苗通过 PCR 分子检测,有 13 株出现了特异性扩增条带,而阴性对照没有特异性条带产生。通过 PCR-Southern 印迹的进一步分子检测,出现了特异性的杂交条带,阳性率为 100%,说明外源基因已经整合到小黑杨基因组中,小黑杨叶片的遗传转化最高转化率达 4.12%。

Noël 等(2005)利用农杆菌介导将哈茨木霉的内切几丁质酶转化云杉和杂种杨,获得了 15 株转基因云杉和 6 株转基因杂种杨。经检测:转基因植株的内切几丁质酶活性是非转基因植株的 55 ~ 115 倍,并对离体叶片进行圆盘接种,发现转基因杨对叶锈病真菌表现明显抗性,而云杉的转基因幼苗的根部对褐腐病具有明显抗性,这些结果说明可以通过转 *ech42* 基因提高对林木的真菌抗性,如图 1-9 和图 1-10 所示。

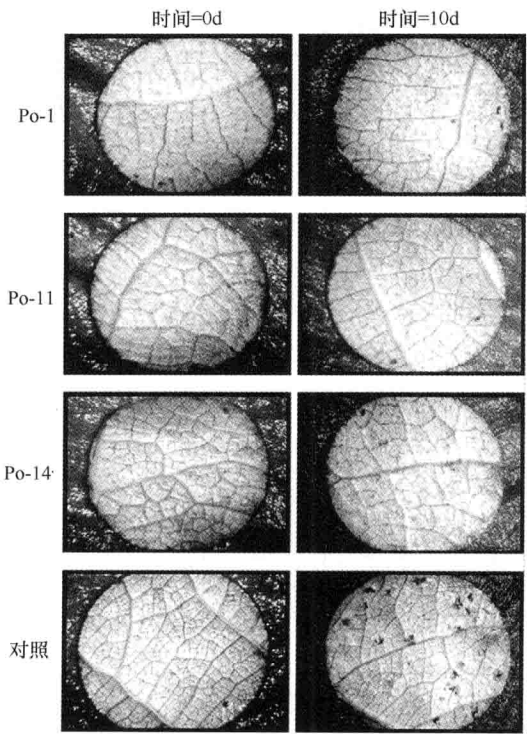


图 1-9 转基因杨树叶片对叶锈病的抗性
(Noël et al. , 2005)

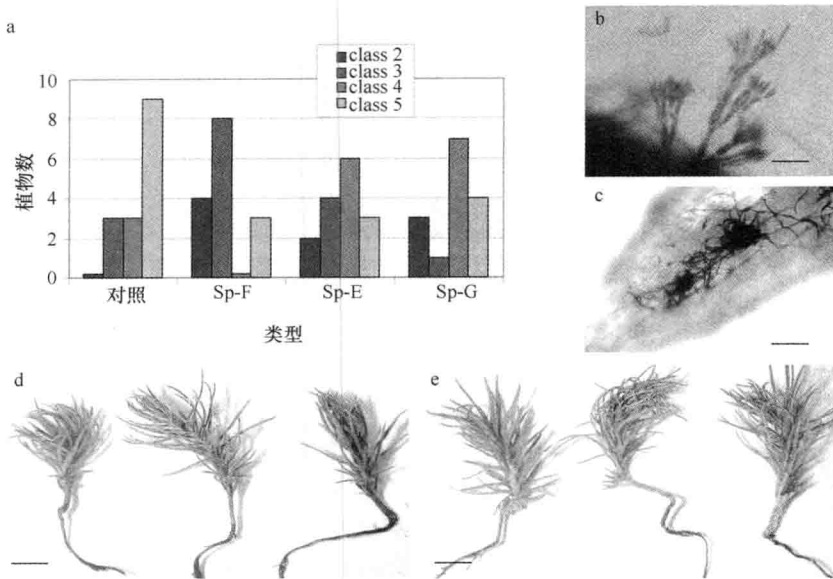


图 1-10 转基因云杉根部对褐腐病的抗性 (Noël et al., 2005)

Mangtan 等 (2003) 克隆了 *D4E1* 基因, 该基因编码一个由 17 个氨基酸组成的多肽。该基因被转化进杨 (*Populus tremula* L. × *Populus alba* L.) 中, 经检测发现, 阳性植株中出现 *D4E1* 转录的积累。对转基因植株进行黄杆菌接种, 发现转基因植株 Tr23 被真菌感染后症状明显较轻, 如图 1-11 所示。



图 1-11 转基因杨的病害症状 (Mangtan et al., 2003)

抗菌基因 *LJAMP2* 编码非特异性脂质转移蛋白, Jia 等 (2010) 将该基因转入中国白杨中, 获得 16 株转基因杨, 对转基因植株进行支链孢霉和刺盘孢属的接种鉴定, 转基因植株表现明显抗性, 与对照相比, 病斑减少, 因此, 这些结果暗示通过转基因 *LJAMP2* 可以改良杨的植株抗性, 如图 1-12 所示。

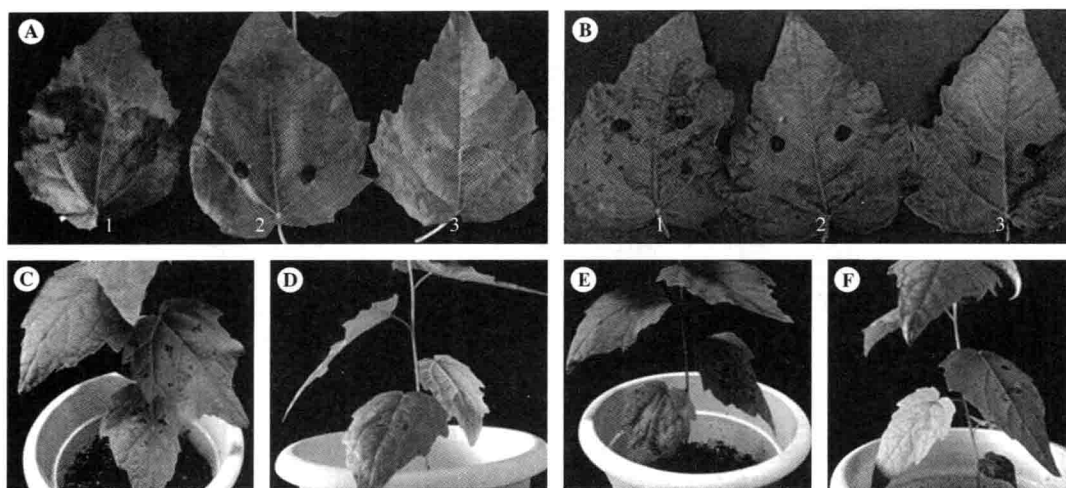


图 1-12 接种真菌杨的转基因植株(Jia et al., 2010)

王占斌(2007)以小黑杨作为转基因的受体材料,研究了不同预培养时间、不同工程菌液浓度、不同侵染时间、不同共培养时间及其不同筛选方法对其遗传转化效率的影响。通过不同浓度头孢对小黑杨叶片产生愈伤组织及分化的影响实验,筛选培养基中加入 700~800mg/L 的头孢唑啉钠浓度不会影响小黑杨叶片产生愈伤组织和分化;加入 700mg/L 的头孢唑啉钠抑菌浓度不会影响小黑杨的诱导生根。通过卡那霉素对小黑杨叶片分化和诱导生根所能忍受的临界浓度实验,确定 40mg/L 的卡那霉素作为叶片转化筛选的临界浓度,以 20mg/L 的卡那霉素作为生根筛选的临界浓度。在进行小黑杨遗传转化时,预培养的时间以 3~4d 为最好,预培养时间少于 3d,抗性芽率较低,3d 时的抗性芽率为 1.92%,增加到 4d 时达到 2.08%,5d 以后抗性芽率下降。小黑杨转化率并没随着分化率的增加而增加。菌液浓度直接影响转化效果,适宜于小黑杨转化的菌液浓度为 $OD_{600} = 0.3 \sim 0.4$ 。对于小黑杨叶片的遗传转化,共培养时间在 2~4d 时比较合适,以 3d 最好。侵染时间在 6~15min 比较适合小黑杨叶片的遗传转化。实验过程中经分子检测共获得 13 株转基因的阳性植株,占到经抗生素筛选所得到的植株数的 4.9%。RT-PCR 检测表明有 5 株未正常表达,有可能产生基因沉默现象,有待于今后更进一步的实验验证。对转基因植株在分子检测的同时进行了几丁质酶活力的测定,绝大多数转基因植株叶片几丁质酶活力明显高于对照植株,其中 11 号植株酶活力比对照高 3.093 倍;但在检测中发现有的转基因植株几丁质酶活力比较低,有的甚至低于对照,可能是外源基因在受体发生了基因沉默(失活)现象。

贾之春(2011)以毛白杨为转基因受体材料,利用根癌农杆菌介导法转化来源于益母草的阳离子抗菌肽基因 *LJAMP2*。经卡那霉素筛选,共获得 50 株抗性植株,GUS 组织染色和 PCR 检测显示有 30 株抗性植株呈阳性,初步证明外源目的基因已整合到毛白杨基因组中,RT-PCR 证实抗菌肽基因 *LJAMP2* 在转基因植株中能大量表达。离体抗病性实验表明:转基因毛白杨细胞粗提液的抑菌能力明显强于非转基因植株。进一步将溃疡病菌接种在转基因和野生型毛白杨茎段上培养 30d,转基因植株的病级指数均低于非转化

植株。上述抗性实验结果表明:在毛白杨中超量表达的益母草抗菌肽基因 *LJAMP2* 能显著提高其溃疡病抗病性。

以上的研究大多利用单一抗性基因进行转移,然而也可以利用多个抗性基因进行转化,以提高植株的抗性。Huang 等(2012)利用转基因技术将多种抗病基因同时转入毛白杨中以提高其抗性,通过根癌农杆菌介导的二次遗传转化,将来源于球孢白僵菌几丁质酶基因 *Bbchit1* 及编码益母草脂质转移蛋白基因 *LJAMP2* 转入毛白杨中,实时荧光定量 PCR 显示 *Bbchit1* 与 *LJAMP2* 均能有效表达,离体抗病试验显示 *Bbchit1*+*LJAMP2* 共表达转基因毛白杨细胞粗提液对杨树叶枯病菌具有明显抑制作用,其中转单基因的发病指数为 65%~89%,而转两个基因的发病指数为 82%~95%。上述抗病试验结果表明:*LJAMP2* 和 *Bbchit1* 在杨树中共表达可提高其对叶枯病的抗性,如图 1-13 所示。

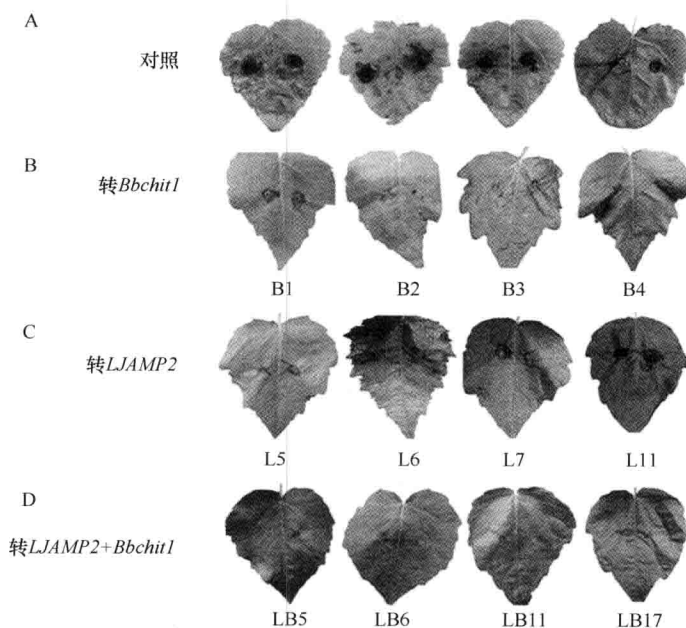


图 1-13 接种叶枯真菌的转基因杨的表现型(Huang et al., 2012)

除了以杨树为研究材料进行抗病基因的转化外,在桉树上也有大量报道。例如,王水琦等(2007)利用农杆菌介导法将甜椒抗菌基因(*hrap*)转入巨尾桉中,经 PCR-Southern 印迹检测证实 *hrap* 基因转入桉树植株的基因组中的转化率达 10%,但目的基因在转基因苗中的表达情况还未见后续报道。为了增强粗皮桉的抗病性,北京大学陈坚等(2007)从黑曲霉中克隆了具有广谱抗病性的 *GO* 基因,将其置于病原诱导性启动子的调控下,通过农杆菌介导的方法转化到其愈伤组织中,并使其在抗性培养基上分化出小苗。通过分子检测证实基因已整合到桉树基因组中,进一步在田间进行了接种病原菌的田间试验,初步证明转基因苗具有抗病性。1995 年,张景宁等报道,柞蚕杀菌肽 D 对桉树青枯假单胞杆菌有杀灭作用。邵志芳等(2002)将携带外源目的基因的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)与尾叶桉 U6 无性系叶盘共培养,经愈伤组织诱导、卡那霉素筛选和植株再生,获得 20 株转基因植株,转化苗叶片胭脂碱合成酶活性检测呈阳性;探针点杂交及