

桉树胚状体再生与遗传转化的研究进展

沙月娥^{1,2}, 欧阳乐军^{1,2}, 彭舒^{1,2}, 黄真池¹, 陈信波², 曾富华^{1,*}

¹湛江师范学院生命科学与技术学院, 广东湛江524048; ²湖南农业大学生物科学技术学院, 长沙410128

摘要: 文章综述了桉树胚状体发生过程中基因型、外植体材料、培养基、光照、植物生长调节剂种类与配比以及其他添加物对外植体胚性愈伤组织诱导以及胚状体发生的影响, 探讨了影响桉树遗传转化体系建立的因素, 并对近年来桉树胚状体再生和转基因研究进展进行了介绍。

关键词: 桉树; 胚状体; 遗传转化; 植株再生

Research Progress in Plantlet Regeneration of Somatic Embryos and Genetic Transformation in *Eucalyptus*

SHA Yue-E^{1,2}, OUYANG Le-Jun^{1,2}, PENG Shu^{1,2}, HUANG Zhen-Chi¹, CHEN Xin-Bo², ZENG Fu-Hua^{1,*}

¹School of Life Science and Technology, Zhanjiang Normal University, Zhanjiang, Guangdong 524048, China; ²College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: An overview is made on somatic embryogenesis and genetic transformation of *Eucalyptus* in the paper. The impact of the genotype, explant material, media, light, plant growth regulators and other additives on embryogenic callus inducing and somatic embryogenesis of *Eucalyptus* is discussed. A few of the factors which affect the establishment of genetic transformation system of *Eucalyptus* are studied. Researches of somatic embryogenesis and genetic transformation of *Eucalyptus* in recent years are also introduced.

Key words: *Eucalyptus*; somatic embryos; genetic transformation; plantlet regeneration

桉树是桃金娘科(Myrtaceae)杯果木属(*Angophora*)、伞房属(*Corymbia*)和桉属(*Eucalyptus*)植物的统称, 是世界上三大经济树种和三大速生树种之一。据统计, 全球范围内桉树覆盖的耕地面积为2 000万hm² (GIT Forestry 2008)。从18世纪以来, 不少国家和地区就开始引种驯化, 我国华南、西南和华东南地区也广泛引种栽培。近年来, 桉树种植已在广东、广西、海南、四川、云南等省形成一定规模, 产生了巨大的生态和经济效益。随着纸浆需求量的增加, 短轮伐期经营的桉树将进一步扩大栽培面积, 以满足市场的需求, 但病虫害、冻害等问题严重影响了桉树人工林的进一步发展。为了增加林木产量、缩短生产周期和促进高质量人造林的发展, 桉树基因工程研究受到越来越多的重视, 并取得了一些进展。建立桉树高效稳定的离体再生体系, 是利用转基因手段改良桉树抗性和质量的基础。建立胚状体再生体系, 能突破目前桉树基因工程育种中遗传转化率低的瓶颈障碍, 推进桉树转基因育种的实际应用。

1 桉树胚性愈伤组织以及胚状体诱导

组织培养是与遗传转化相关联的关键技术, 有效的植株再生方法是进行该植物遗传转化的基本要求。由于微芽繁殖体系转化效率低下或有嵌合体大量发生, 而遗传转化需要通过单细胞分化再生, 因此转基因可利用胚性愈伤组织和胚状体途径实现。尽管胚状体诱导比其他组织培养途径的技术更复杂, 诱导成功率低, 但因胚性细胞的特殊用途, 仍然成为桉树组织培养中具有发展潜力的途径。通过胚性愈伤组织和胚状体诱导成苗并建立组培快繁的技术体系, 进一步提高繁殖系数, 应是今后桉树苗组培快繁的发展方向。目前, 有不少研究报道从桉树外植体中诱导出胚状体, 包括蓝桉(*Eucalyptus globulus*)、赤桉

收稿 2011-12-16 修定 2012-02-29

资助 国家星火计划项目(2011GA780067)、广东省自然科学基金(10152404801000005和10452404801004328)、广东省科技攻关项目(2010B020301011)和湛江市科技攻关项目(2011C3104010)。

* 通讯作者(E-mail: zengfuhua@gmail.com; Tel: 0759-3183622)。

(*E. camaldulensis*)、柠檬桉(*E. citriodora*)、邓恩桉(*E. dunnii*)、尾叶桉(*E. urophylla*)等(表1)。桉树胚性愈伤组织的诱导和胚状体的发生影响因素有基因型、外植体材料、培养基、植物生长调节剂及其他添加物、培养条件等。

1.1 基因型

根据研究报道,基因型是影响桉树胚状体诱导率的重要因素,因此不同桉树品种会影响到桉树胚状体的再生。Pinto等(2008a)以蓝桉13个天然授粉株系的成熟合子胚为外植体,研究了不同基因型外植体对胚状体诱导的影响,根据观察数据进行方差分析,结果显示不同天然授粉株系的胚

状体诱导率存在显著差异。Andrade等(2011)以不同基因型蓝桉合子胚为外植体,检验已报道胚状体诱导方法的可重复性,结果表明,在其研究条件下,对于胚状体的诱导,基因型相对培养条件而言影响更大。

1.2 外植体材料

外植体的来源部位以及外植体的幼嫩程度均对桉树愈伤组织和胚状体诱导有影响。Pinto等(2002; 2008a, b, c; 2010)以蓝桉成熟合子胚、子叶、下胚轴、叶子和茎段为外植体,研究蓝桉的胚状体诱导,发现以成熟合子胚为外植体更有利于胚状体的诱导。Dibax等(2010b)以子叶为外

表1 桉树胚状体发生的研究进展
Table 1 List of somatic embryogenesis in *Eucalyptus*

序号	树种	外植体	研究进展	参考文献
1	雷林1号桉	茎段、种子	诱导得到胚状体并实现植株再生	欧阳权等1981
2	柠檬桉	合子胚、子叶	获得柠檬桉的胚状体	Muralidharan等 1989, 1987
3	邓恩桉	幼苗	研究NAA和2,4-D对胚性愈伤的诱导; 添加椰子汁和水解酪蛋白诱导得到胚状体	Termignoni等 1996
4	蓝桉	子叶、下胚轴	研究不同植物生长调节剂组合对胚性愈伤组织以及胚状体诱导的影响	Nugent等2001
5	蓝桉	成熟合子胚、子叶、叶片、茎段	研究不同浓度NAA和2,4-D对胚状体诱导的影响; 发现在培养基中添加水解酪蛋白和谷氨酰胺, 诱导得到畸形胚状体	Pinto等2002
6	蓝桉	成熟合子胚、叶片	通过细胞计数法分析蓝桉胚状体的遗传稳定性	Pinto等2004
7	蓝桉	成熟合子胚	研究不同基本培养基对蓝桉胚状体诱导的影响	Pinto等2007
8	蓝桉	成熟合子胚	研究蓝桉胚状体形成的遗传调控, 发现不同基因型的胚状体诱导率不同, 且胚状体诱导受到加性遗传效应调控	Pinto等2008a
9	蓝桉	成熟合子胚	研究影响继代胚状体增殖和萌芽的因子, 例如植物生长调节剂、培养基以及光照等, 选出最佳培养条件	Pinto等2008b
10	蓝桉	成熟合子胚	研究不同基本培养基以及抗氧化剂对胚状体诱导的影响	Pinto等2008c
11	蓝桉	成熟合子胚	分析蓝桉胚状体发生的组织细胞学变化以及内容物积累	Pinto等2010
12	蓝桉	成熟合子胚	蓝桉胚状体分化苗的驯化	Pinto等2011
13	蓝桉	成熟合子胚	研究蓝桉胚状体的最佳诱导条件, 发现基因型比培养条件对胚状体诱导的影响更大	Andrade等2011
14	细叶桉	成熟合子胚	研究培养基B5、MS和NAA、2,4-D、6-BA对细叶桉胚状体诱导的影响	Prakash和 Gurumurthi 2005
15	巨尾桉	茎段	研究TDZ对巨尾桉胚性愈伤组织诱导和再生的影响	裘珍飞等2009
16	赤桉	成熟合子胚、子叶	研究外植体种类、幼嫩程度、植物生长调节剂和基本培养基对赤桉胚状体诱导和植株再生的影响	Prakash和 Gurumurthi 2010

植体研究了赤桉的再生, 为了测定芽的起源, 还研究了赤桉器官发生各个环节中组织的解剖学结构, 组织学研究显示愈伤组织在栅栏薄壁细胞中发生, 接着胚性愈伤组织形成不定芽。Prakash和Gurumurthi (2010)以赤桉成熟合子胚和从10、15、25 d的幼苗上收集的子叶为外植体, 培养在添加不同浓度NAA的MS培养基中, 结果显示从10 d子叶形成的愈伤组织胚状体诱导率最高。

1.3 植物生长调节剂的种类及其配比

裘珍飞等(2009)研究了不同浓度TDZ以及TDZ与不同生长素组合对巨尾桉(*E. grandis*×*E. urophylla*)胚性愈伤组织诱导的影响, 发现TDZ单独使用(浓度为0.02~0.05 mg·L⁻¹)时, 愈伤组织诱导率大于92.9%; 0.02 mg·L⁻¹ TDZ与0.1 mg·L⁻¹ NAA组合使用时, 获得最佳胚性愈伤组织诱导率(20±13.3)%。Pinto等(2002)将蓝桉的外植体分别培养在含不同浓度的2,4-D、NAA、麦草畏、2,4-D与NAA组合、2,4-D与6-BA组合、2,4-D与玉米素组合、麦草畏与玉米素组合的培养基中, 只有在NAA单独使用或与2,4-D混合处理组产生胚状体。当NAA浓度为3~5 mg·L⁻¹时, 胚状体发生率最高(接近30%); NAA浓度高达15 mg·L⁻¹时, 抑制胚状体的发生。Pinto等(2008b)研究了蓝桉胚状体发生的影响因子, 发现在MS培养基中降低NAA浓度, 有利于球形胚的增殖; 在MS培养基中添加6-BA和激动素(KT)两种分裂素, 不能提高球形胚的增殖率, 但在体胚发生的后阶段, 如芽分化等阶段这两种细胞分裂素却是不可或缺的。Prakash和Gurumurthi (2005)在通过细叶桉(*E. tereticornis*)的成熟合子胚产生胚性愈伤组织途径诱导胚状体的研究中, 比较了添加不同浓度NAA和2,4-D的MS和B5培养基对细叶桉愈伤组织诱导的影响, 同时也研究了不同浓度6-BA对细叶桉胚状体发生的影响, 结果发现添加了10.74 μmol·L⁻¹ NAA的MS培养基中获得最高的胚性愈伤组织诱导率, 接着将胚性愈伤组织转移到含6-BA的培养基中, 含2.22 μmol·L⁻¹ 6-BA的MS培养基中获得最高胚状体发生率(54%)。Prakash和Gurumurthi (2010)研究发现, 赤桉成熟合子胚在添加1 mg·L⁻¹ NAA的MS培养基中获得最高胚性愈伤组织诱导率, 胚性愈伤组织培养在含0.5 mg·L⁻¹ 6-BA和0.1 mg·L⁻¹ NAA的

MS基本培养基中的胚状体发生率最高; 赤桉下胚轴外植体在含0.5 mg·L⁻¹ 6-BA的MS培养基中不经过愈伤组织阶段直接形成胚状体; 通过在含2 mg·L⁻¹ NAA培养基中诱导的胚性愈伤组织, 转移到含1 mg·L⁻¹ 6-BA和0.1 mg·L⁻¹ NAA培养基的外植体获得最高胚状体发生率。

本实验室以尾巨桉(*E. urophylla*×*E. grandis*)无菌苗茎段为外植体, 使用噻唑基脲类新型分裂素(*N*-phenyl-*N'*-[6-(2-chlorobenzothiazol-yl)] urea, PBU)等多种不同浓度生长调节剂的组合对胚性愈伤组织诱导及再生进行了研究, 结果显示, 添加2 mg·L⁻¹ PBU和0.05 mg·L⁻¹ IAA的改良MS培养基上, 愈伤组织诱导率达96% (欧阳乐军等2011)。我们构建的尾叶桉再生体系中, 添加6.6 μmol·L⁻¹ PBU和0.57 μmol·L⁻¹ IAA的改良MS培养基上愈伤组织诱导率为100%, 添加PBU的培养基上愈伤组织的不定芽形成率为57% (Huang等2010)。本实验室还使用PBU构建了广州1号桉的再生体系(谭刻勤等2011)。以上这些研究都表明植物生长调节剂的种类和浓度对胚性愈伤组织和胚状体诱导的影响极为重要。

1.4 不同基本培养基及其组分

Pinto等(2007)将蓝桉成熟合子胚分别培养在含有3 mg·L⁻¹ NAA的MS、1/2MS、B5、DKW、WPM、JADS等基本培养基中, 接着将胚性愈伤组织培养在不含植物生长调节剂的MS、1/2MS、B5、DKW、WPM、JADS等分化培养基中, 12周后愈伤组织上不同程度地产生胚状体, MS培养基中获得最高胚状体发生率(30%), B5培养基中胚状体发生率为26%, 1/2MS培养基中的为10%, JADS中的为8%, DKW中的为6%, 而WPM培养基中的外植体不产生胚状体。Pinto等(2008b)发现不含植物生长调节剂的B5培养基能有效地促进蓝桉球形胚的增殖, 却不适合胚状体后阶段的生长, 而不含植物生长调节剂的MS培养基对球形胚、子叶形胚发生以及芽的萌发都有较好的促进作用, 可见胚状体发育不同阶段需要的盐含量不同。在细叶桉胚状体的研究中发现, MS培养基中外植体的胚性愈伤组织诱导率和胚状体发生率均比B5培养基中的要高(Prakash和Gurumurthi 2005)。Degenhardt-Goldbach等(2011)发现, B5培养基不适合桉树芽

的诱导,虽然在B5培养基中的外植体形成了很小的胚性愈伤组织,但所有的外植体均有褐化现象;在WPM和MS氮减半培养基中,均有6%外植体产生不定芽,WPM表现出褐化现象较少。培养基中蔗糖含量同样会对桉树胚性愈伤组织的形成、胚状体的成熟和萌芽造成影响。蓝桉外植体在含蔗糖的培养基中形成胚性愈伤组织,但是在用甘露醇($36.44 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$)代替蔗糖的培养基中外植体不形成胚性愈伤组织;增加蔗糖含量会降低胚性愈伤组织的形成率,并导致外植体褐化(Pinto等2007)。赤桉外植体的胚状体培养基中蔗糖浓度为1%~3%时,球形胚和心形胚明显增加;在蔗糖含量较高(4%)的MS培养基中胚状体发生率较低;当蔗糖浓度为2%~4%时,胚状体的萌芽率也较低(Prakash等2010)。

1.5 其他添加物

已知添加椰子汁、酪蛋白水解产物和酵母提取液等物质,有利于桉树的组织培养。Pinto等(2002)在蓝桉胚状体诱导的培养基中添加 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的酪蛋白水解物和 $500 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 谷氨酰胺,外植体上产生的胚状体有所增加,但是这些胚状体多为畸形。Arruda等(2000)发现钙浓度达 $6.12 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时可刺激器官发生,这可能是培养基中钙浓度增加,使桉树愈伤组织的总蛋白和糖含量增加所致。活性炭在培养基中主要起吸附剂的作用,可吸附培养物在培养过程中产生和分泌的物质,包括有毒的物质如引起褐变的酚类物质等,因此添加适量活性炭($40 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右)可降低褐化率,减轻褐化程度,并且对桉树的壮苗有促进作用。抗坏血酸作为抗氧化剂加入培养基中,对培养物基部的褐变有抑制作用,但过多则容易引起pH值难以调节、培养基不易凝固等问题。Pinto等(2008c)研究了不同抗氧化剂对蓝桉胚状体诱导的影响,在培养基中添加抗坏血酸、活性炭、二硫赤藓醇(dithioerythritol, DTE)、二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)、聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)和硝酸银来减少外植体的褐化现象,但结果显示,以上几种抗氧化剂均降低了胚状体发生率,而且只有DTE、活性炭和硝酸银起到抑制褐化的作用;根据数据显示抗氧化剂对胚状体发生潜能的抑制,推测是酚类化合

物在胚状体发生早期起到未知的作用,首次提出了抗氧化剂对桉树胚状体发生抑制作用。Deepika等(2011)在研究桉树植株再生的最佳培养配方过程中,发现光照条件下,不添加抗氧化剂培养基中的愈伤组织褐化和枯死现象严重,发芽率较低,而往培养基中添加PVP后,愈伤组织褐化现象减少,发芽率增加。在巨尾桉中使用TDZ与高浓度 CoCl_2 ($0.125 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)组合的效果最好,巨尾桉胚状体直接再生率13.39%,间接再生率达16.5%,说明 CoCl_2 在桉树愈伤组织再生中具有解除TDZ的再生抑制和恢复胚性的意义(裘珍飞2009)。

1.6 光照

Pinto等(2008b)发现,尽管暗培养不能增加蓝桉胚状体诱导率和增殖率,但有利于胚状体质量的提高,因此子叶形胚阶段之前外植体应该维持在黑暗中培养,然后再转移到光照下。Prakash和Gurumurthi (2005)研究了光照条件对赤桉胚状体诱导的影响,结果显示,在不同光照条件下,胚状体发生率有明显差异,当光照强度为 $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、光照时间为 $16 \text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 时胚状体诱导率最高,而暗培养时胚状体发生率较低。由以上两则报道可推测,光照对桉树胚状体诱导的影响与桉树品种有密切关系。

2 桉树遗传转化体系的建立

2.1 抗生素的种类和浓度对植株再生的影响

邵志芳等(2002)研究发现不同浓度的卡那霉素(kanamycin, Kan)和头孢氨苄(cephalexin)均对桉树叶盘分化为愈伤组织有影响。da Silva等(2011)以柳桉(*E. saligna*)茎尖和子叶为遗传转化的外植体,研究柳桉遗传转化适合的Kan浓度,结果表明,当以子叶为外植体时,筛选转化子的最适Kan浓度为低于 $12.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,筛选茎尖的则为 $50 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,并发现 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮可提高柳桉茎尖在共培养过程中*uidA*基因的瞬时表达,同时可抑制Kan对外植体的毒害作用。Dibax等(2010a)利用农杆菌转化法将*P5CSF129A*转化柳桉时,将柳桉的叶片浸泡在 $A_{600}=0.5$ 的菌液中30 min,于CI培养基(硝酸钾和硝酸铵为原来一半,并添加 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA和 $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TDZ的MS培养基)中共培养5 d,然后在含抗生素

的培养基中进行筛选, 结果发现转基因的柳桉愈伤组织诱导率为8%, 出芽率0.5%; 而未转基因的柳桉愈伤组织诱导率为56%, 愈伤组织出芽率为28%。Prakash和Gurumurthi (2009)用含0.5 mg·L⁻¹ BAP和0.1 mg·L⁻¹ NAA的MS培养基中分别加0、20、30、40和50 mg·L⁻¹ Kan, 研究细叶桉对Kan的敏感性, 发现加入30 mg·L⁻¹ Kan时, 细叶桉材料萎黄, 最后枯死; 加入高于40 mg·L⁻¹ Kan时, 完全抑制了细叶桉的再生。因此, 细叶桉进行转化时, Kan筛选浓度为40 mg·L⁻¹较适宜。Aggarwal等(2010)研究了头孢噻肟(cefotaxime)对细叶桉芽器官发生的影响, 结果显示, 培养基中头孢噻肟在一定范围内的浓度越高, 芽器官发生频率越高, 每个外植体获得芽的数量越多, 当头孢噻肟增加到500 mg·L⁻¹时, 获得最大芽器官发生率(44.6%), 而不添加头孢噻肟的培养基中外植体的芽器官发生率仅为29.6%; 添加羧苄西林(carbenicillin)和头孢氨苄会抑制芽的器官发生, 当培养基中头孢氨苄浓度为500 mg·L⁻¹时, 芽器官发生完全被抑制。

2.2 农杆菌侵染对植株再生的影响

王水琦等(2007)研究了农杆菌侵染对不同浓度2,4-D和IAA诱导桉树叶盘外植体愈伤组织及植株再生的影响, 发现农杆菌侵染对愈伤诱导率没有明显影响, 但愈伤组织产生的启动时间和愈伤组织的生长高峰期明显推迟, 而且转化过程显著抑制桉树不定芽的再生, 由于2,4-D诱导的愈伤组织本身再生率就低, 因此转化后得到再生植株的比率更低, 限制了桉树转基因的应用效果。

3 桉树转基因研究进展

迄今已有多种桉树遗传转化的研究报道, 如冈尼桉(*E. gunnii*)、柠檬桉、蓝桉、赤桉、巨桉(*E. grandis*)、小套桉(*E. microtheca*)及边缘桉(*E. marginata*)等。与其他木本植物一样, 转入的基因也有报告基因和目的基因, 其中转化报告基因最为成功, 转化目的基因并得到植株的较少。在已有转基因成功的研究中, 涉及桉树抗性(抗虫、抗除草剂、抗寒、抗旱等)和品种性状(木质素含量)等多个方面(表2)。

3.1 桉树的抗病虫害转基因育种

根据调查统计资料记载, 在国外已知的桉树

病虫害种类达300多种, 我国发生的桉树病虫害有200余种, 其中青枯病是危害桉树生长的主要病害, 近年来桉树青枯病的发生和流行给我国南方桉树产业带来很大的经济损失。

Harcourt等(2000)获得了抗虫和抗除草剂转基因桉树植株, 转抗虫基因的蓝桉和亮果桉还在进一步的研究之中。邵志芳等(2002)首次应用人工合成柞蚕抗菌肽D基因通过根瘤农杆菌介导, 获得抗青枯病的尾叶桉转基因植株。王水琦等(2007)将甜椒抗菌蛋白基因(*harp*)转化桉树, 以期得到抗青枯病植株。

3.2 桉树的抗逆性转基因育种

随着华南地区桉树种植面积的扩大, 低温冻害是桉树引种、扩大栽培与速生丰产的主要影响因素。因此, 目前桉树抗逆性育种的目标主要是培育抗寒能力强的优良品种。现在应用的抗寒基因主要有鱼的抗寒蛋白基因、来自细菌的冰核形成基因等。Dibax等(2010a)将来源于乌头叶豇豆(*Vigna aconitifolia*)的*P5CSF129A*基因转化柳桉, 以提高柳桉的抗寒性。*P5CSF129A*基因编码 Δ^1 -吡咯啉-5-羧化酶的合成, 该酶是脯氨酸生物合成的关键酶。Navarro等(2011)从冈尼桉中分离出两个低温诱导转录因子EguCBF1a/b, 并进行了遗传转化, 使这两个转录因子在低温缺陷型桉树中过表达, 结果发现桉树表现为气孔密度降低和大量的花青苷类堆积, 与野生型植株比较, 在寒冷逆境下, 转基因植株表面有蜡质沉积, 叶片面积变小, 细胞也变小, 生长缓慢, 保水能力增强。另外, 与渗透压调节分子(脯氨酸、甘露醇、甜菜碱、肌醇等)合成相关的基因(脯氨酸合成酶基因、甜菜碱合成酶基因、乙醇脱氢酶基因、胆碱脱氢酶基因等)也已被应用于桉树的抗旱、耐盐的性状改良(欧阳乐军和曾富华2008)。

3.3 桉树的材性改良转基因育种

桉树是造纸工业的重要原料之一, 但制浆造纸废液对环境造成的污染极其严重, 其源头物质是造纸原料中的木质素。有研究表明, 木质素生物合成是经由苯丙烷途径进行的, 由苯丙氨酸(或酪氨酸)脱氨形成肉桂酸起始, 在一系列酶的作用下经过羟基化、甲基化与还原反应, 生成3种主要单体——香豆醇、松柏醇和芥子醇, 再进一步聚

表2 桉树转基因研究报道
Table 2 List of genetic transformation studies on *Eucalyptus*

序号	树种	转化技术	转化基因	转化结果	参考文献
1	赤桉	农杆菌转化法	<i>gus</i>	获得赤桉转化植株	Mullins等1997
2	赤桉	根癌土壤杆菌转化法	<i>uidA</i>	在植物全部组织中表现出GUS表达	Ho等1998
3	赤桉	农杆菌转化法	<i>cry3A</i> 和 <i>bar</i>	得到抗甲虫和除草剂草胺磷的转基因植株	Harcourt等2000
4	赤桉	根癌土壤杆菌转化法	冈尼桉的反义 <i>cad</i>	结果不理想	Valerio等2003
5	赤桉	根癌土壤杆菌转化法	反义 <i>Ntlim1</i> 、 <i>uidA</i> 、 <i>nptII</i> 和 <i>hpt</i>	得到木质素含量降低20%~29%的转化植株	Kawaoka等2006
6	巨尾桉	根癌土壤杆菌和毛根农杆菌转化法	<i>nos</i> 及Ti和Ri质粒上的序列	土壤杆菌胭脂碱菌株(巨尾桉对其敏感性最强)为目的基因的最佳载体	Machado等1997
7	巨尾桉	农杆菌转化与超声波处理相结合	<i>gus</i> 和来源于豌豆的 <i>Lhcb12</i>	通过杂交技术检验转基因成功	Gonzalez等2002
8	巨尾桉	钨粒子轰击法	<i>uidA</i> 和 <i>nptII</i>	GUS表达的愈伤组织不能再生成转基因植株	Sartoretto等2002
9	巨尾桉	超声波辅助农杆菌介导法和真空侵入法	冈尼桉反义 <i>cad</i> 、 <i>nptII</i> 和 <i>uidA</i>	得到9棵表达CAD活性降低69%~78%的植株	Tournier等2003
10	巨尾桉	根癌农杆菌转化法	甜椒抗菌蛋白基因(<i>harp</i>)	经过PCR和杂交检测证实转基因成功	王水琦等2007
11	巨尾桉	根癌土壤杆菌转化法	<i>uidA</i>	得到 <i>uidA</i> 表达的最佳条件	de Alcantara等2011
12	蓝桉	农杆菌转化法	<i>na</i>	获得转化植株	Moralejo等1998
13	蓝桉	根癌土壤杆菌转化法	<i>uidA</i>	转基因组织中存在稳定转化区域	Spokevicius等2005
14	蓝桉	农杆菌转化法	<i>uidA</i>		Van Beveren等2006
15	蓝桉和亮果桉	根癌农杆菌转化法	<i>uidA</i> 和 <i>nptII</i>	在共培养组织中有β-葡糖醛酸糖苷酶表达	Bandyopadhyay等1999
16	巨桉	根癌土壤杆菌转化法	<i>uidA</i> 和 <i>nptII</i>	得到再生植株	Yao和Lin-Wang 2005
17	巨桉和柳桉	农杆菌转化法	<i>GUS</i> + <i>ALS</i> 和 <i>ASA2</i>	研究了两种桉树外植体转化以及选择的方法	Chang等2006
18	柳桉	根癌农杆菌转化法	<i>P5CSF129A</i> 、 <i>uidA</i> 和 <i>nptII</i>	脯氨酸含量增加4倍	Dibax等2010a
19	尾叶桉	根癌农杆菌转化法	柞蚕抗菌肽D基因	提高了对青枯病的抗性	邵志芳等2002
20	细叶桉	根癌土壤杆菌转化法	<i>nptII</i> 和 <i>uidA</i>	获得8棵转基因植株	Prakash和Gurumurthi 2009
21	低温敏感桉树	根癌土壤杆菌转化法	冈尼桉的 <i>EguCBF1a/b</i>	提高了桉树的耐寒性,降低桉树气孔密度和花青素的积累	Navarro等2011

合形成木质素。目前林木木质素改良基因工程所用的相关酶基因主要有: *4cl*、*cad*、*c4h*和*pal*等。苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是木质素生物合成途径中的第一个限速酶,其表达直接影响木质素的生物合成;肉桂酸-4-羟化酶(cinnamate acid-4-hydroxylase, C4H)催化肉桂酸羟化作用产生4-香豆酸盐,是苯丙烷途径中继PAL之后的第二个关键酶;肉桂醇脱氢酶(cinnamyl alcohol dehydrogenase, CAD)是催化木质素前体合成最后一步的酶;4-香豆酰-CoA连接酶(4-coumarate: coenzyme A ligase, 4CL)也是木质素合成途径

的调控酶。

Tournier等(2003)从冈尼桉中提取编码CAD的反义DNA序列,然后通过根癌土壤杆菌转化巨尾桉,发现120个转化外植体中有58%表现出CAD活性被显著抑制。将两种CAD活性抑制效果较好的品系在温室条件下培育,初步数据显示,残余CAD活性分别为26%和22%。Valerio等(2003)用该反义DNA序列转化赤桉,44个转化品系中有32%表现出CAD活性降低,最高降低达到83%;但在温室中培育10个月后,用作检测的5个转化品系与野生型对照比较,并没有表现出木质素或者CAD活性的

变化。这些研究结果为造纸资源植物的材性改良提供了重要依据。

4 展望

桉树转基因过程中存在的转化效率低等问题,极大地制约了桉树基因工程育种的开展。体细胞胚发生再现了合子胚形态发生的过程,深入探讨桉树体胚发生和调控机制,对揭示桉树胚胎发生过程中的分子遗传机制、建立高效胚性细胞悬浮再生体系和遗传转化体系有重要意义,能有效解决桉树基因工程育种中遗传转化率低的瓶颈障碍,在桉树离体快繁、组培苗脱毒以及体细胞杂交等许多方面也有广阔的应用前景。我们以尾巨桉为研究对象,研究培养基、植物生长调节剂的种类及其配比等因子对桉树体细胞胚诱导的影响,建立尾巨桉胚状体再生体系,试图探讨尾巨桉胚状体发生的机制,并建立尾巨桉胚性细胞悬浮再生体系,以期建立尾巨桉胚性细胞遗传转化体系,为通过基因工程技术培育桉树新品种奠定基础。

参考文献

- 欧阳乐军, 黄真池, 沙月娥, 张美萍, 曾富华, 卢向阳(2011). 新型分裂素PBU对尾巨桉胚性愈伤组织诱导及植株再生的影响. 植物生理学报, 47 (8): 785~791
- 欧阳乐军, 曾富华(2008). 桉树分子育种研究进展. 分子植物育种, 6 (6): 1146~1152
- 欧阳权, 彭海钟, 李启泉(1981). 桉树愈伤组织发生胚状体的研究. 林业科学, (1): 1~7
- 裘珍飞, 曾炳山, 李湘阳, 刘英(2009). TDZ对尾巨桉(GL9)胚性愈伤组织诱导和再生的影响. 林业科学研究, 22 (5): 740~743
- 邵志芳, 陈伟元, 罗焕亮, 叶新丰, 张景宁(2002). 柞蚕抗菌肽D基因转化桉树培育抗青枯病株系的研究. 林业科学, 38 (2): 92~97
- 谭刻勤, 欧阳乐军, 李佩华, 谭丽丽, 鲍雁林, 曾少玲, 曾富华, 陈信波(2011). 新型植物活性剂对桉树愈伤诱导及芽分化的影响. 广东农业科学, (11): 53~55
- 王水琦, 陈坚, 甘勇辉(2007). 甜椒抗菌蛋白基因(*harp*)转化桉树的研究. 中国林业科技大学学报, 27 (6): 115~118
- Aggarwal D, Kumar A, Reddy MS (2010). Shoot organogenesis in elite clones of *Eucalyptus tereticornis*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 102: 45~52
- Andrade G, Shah R, Johansson S, Pinto G, Egertsdotter U (2011). Somatic embryogenesis as a tool for forest tree improvement: a case-study in *Eucalyptus globulus*. BMC Proc, 5 (Suppl 7): 128~129
- Arruda SCC, Souza GM, Almeida M, Gonçalves AN (2000). Anatomical and biochemical characterization of the calcium effect on *Eucalyptus urophylla* callus morphogenesis *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 63: 143~154
- Bandyopadhyay S, Cane K, Rasmussen G, Hamill JD (1999). Efficient plant regeneration from seedling explants of two commercially important temperate eucalyptus species—*Eucalyptus nitens* and *E. globulus*. Plant Sci, 140 (2): 189~198
- Chang S, Thomas RD, Handley LW, Connett MB, Hamilton RL (2006). *Eucalyptus urophylla* transformation and regeneration. United States Patent, 20060101536A1
- da Silva ALL, de Oliveira Y, da Luz Costa J, de Mudry Souza C, Procopiuk M, Scheidt GN, Brondani GE (2011). Preliminary results for genetic transformation of shoot tip of *Eucalyptus saligna* Sm. via *Agrobacterium tumefaciens*. J Biotech Biodivers, 2 (1): 1~6
- de Alcantara GB, Bespalhok Filho JC, Quoirin M (2011). Organogenesis and transient genetic transformation of the hybrid *Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*. Sci Agric, 68 (2): 246~251
- Deepika R, Veale A, Ma C, Strauss SH, Myburg AA (2011). Optimization of a plant regeneration and genetic transformation protocol for *Eucalyptus* clonal genotypes. BMC Proc, 5 (Suppl 7): 132~134
- Degenhardt-Goldbach J, Quoirin M, Buss S, de Oliveira Y, Franciscon L, Gerhardt I (2011). *In vitro* shoot organogenesis from *Eucalyptus* sp. leaf explants. BMC Proc, 5 (Suppl 7): 134~135
- Dibax R, Deschamps C, Bespalhok Filho JC, Vieira LGE, Molinari HBC, De Campos MKF, Quoirin M (2010a). Organogenesis and *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus saligna* with *P5CS* gene. Biol Plantarum, 54 (1): 6~12
- Dibax R, Quisen RC, Bona C, Quoirin M (2010b). Plant regeneration from cotyledonary explants of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn and histological study of organogenesis *in vitro*. Braz Arch Biol Technol, 53 (2): 311~318
- GIT Forestry (2008). Cultivated eucalyptus global map. <http://www.git-forestry.com>
- Gonzalez ER, de Andrade A, Bertolo AL, Lacerda GC, Carneiro RT, Prado Defavari VAP, Labate MTV, Labate CA (2002). Production of transgenic *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* using the sonication-assisted *Agrobacterium* transformation (SAAT) system. Funct Plant Biol, 29: 97~102
- Harcourt RL, Kyozuka J, Floyd RB, Bateman KS, Tanaka H, Decroocq V, Llevellyn DJ, Zhu X, Peacock WJ, Dennis ES (2000). Insect- and herbicide-resistant transgenic eucalyptus. Mol Breed, 6: 307~315
- Ho CK, Chang SH, Tsay JY, Tsai CJ, Chiang VL, Chen ZZ (1998). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Eucalyptus camaldulensis* and production of transgenic plants. Plant Cell Rep, 17: 675~680
- Huang ZC, Zeng FH, Lu XY (2010). Efficient regeneration of *Eucalyptus urophylla* from seedling-derived hypocotyls. Biol Plant, 54 (1): 131~134
- Kawaoka A, Nanto K, Ishii K, Ebinuma H (2006). Reduction of lignin content by suppression of expression of the LIM domain transcription factor in *Eucalyptus camaldulensis*. Silvae Genet, 55 (6): 269~277
- Machado LOR, de Andrade GM, Cid LPB, Penchel RM, Brasileiro ACM (1997). *Agrobacterium* strain specificity and shooty tumour formation in eucalypt (*Eucalyptus grandis* × *E. urophylla*).

- Plant Cell Rep, 16: 299~303
- Moralejo M, Rochange F, Boudet AM, Teulieres C (1998). Generation of transgenic *Eucalyptus globulus* plantlets through *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Aust J Plant Physiol, 25: 207~212
- Mullins KV, Llewellyn DJ, Hartneyet VJ, Strauss S, Dennis ES (1997). Regeneration and transformation of *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Rep, 16: 787~791
- Muralidharan EM, Gupta PK, Mascarenhas AF (1989). Plantlet production through high frequency somatic embryogenesis in long term cultures of *Eucalyptus citriodora*. Plant Cell Rep, 8: 41~43
- Muralidharan EM, Mascarenhas AF (1987). *In vitro* plantlet formation by organogenesis in *E. camaldulensis* and by somatic embryogenesis in *Eucalyptus citriodora*. Plant Cell Rep, 6: 256~259
- Navarro M, Ayax C, Martinez Y, Laur J, Kayal WEI, Marque C, Teulieres C (2011). Two EguCBF1 genes overexpressed in *Eucalyptus* display a different impact on stress tolerance and plant development. Plant Biotech J, 9: 50~63
- Nugent G, Chandler SF, Whiteman P, Stevenson TW (2001). Somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 67: 85~88
- Pinto G, Coutinho J, Araujo C, Neves L, Santos C (2007). Importance of media mineral composition on the induction of somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus* Labill. Bol Inf CIDEU, 3: 83~90
- Pinto G, Loureiro J, Lopes L, Santos C (2004). Analysis of the genetic stability of *Eucalyptus globulus* Labill. somatic embryos by flow cytometry. Theor Appl Genet, 109: 580~587
- Pinto G, Park YS, Neves L, Araujo C, Santos C (2008a). Genetic control of somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Rep, 27: 1093~1101
- Pinto G, Park YS, Silva S, Neves L, Araujo C, Santos C (2008b). Factors affecting maintenance, proliferation and germination of secondary somatic embryos of *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Tiss Organ Cult, 95: 69~78
- Pinto G, Santos C, Neves L, Araujo C (2002). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus globulus* Labill. Plant Cell Rep, 21: 208~213
- Pinto G, Silva S, Loureiro J, Costa A, Dias MC, Araujo C, Neves L, Santos C (2011). Acclimatization of secondary somatic embryos derived plants of *Eucalyptus globulus* Labill.: an ultrastructural approach. Trees, 25: 383~392
- Pinto G, Silva S, Neves L, Araujo C, Santos C (2010). Histocytological changes and reserve accumulation during somatic embryogenesis in *Eucalyptus globulus*. Trees, 24: 763~769
- Pinto G, Silva S, Park YS, Neves L, Araujo C, Santos C (2008c). Factors influencing somatic embryogenesis induction in *Eucalyptus globulus* Labill.: basal medium and anti-browning agents. Plant Cell Tiss Organ Cult, 95: 79~88
- Prakash MG, Gurumurthi K (2005). Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus tereticornis* Sm. Curr Sci, 88: 1311~1316
- Prakash MG, Gurumurthi K (2009). Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. using *Agrobacterium tumefaciens*. In vitro Cell Dev Biol Plant, 45 (4): 429~434
- Prakash MG, Gurumurthi K (2010). Effects of type of explant and age, plant growth regulators and medium strength on somatic embryogenesis and plant regeneration in *Eucalyptus camaldulensis*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 100: 13~20
- Sartoretto LM, Cid LPB, Brasileiro ACM (2002). Biolistic transformation of *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* callus. Funct Plant Biol, 29: 917~924
- Spokevicius AV, Van Beveren K, Leitch MA, Bossinger G (2005). *Agrobacterium*-mediated *in vitro* transformation of wood-producing stem segments in eucalypts. Plant Cell Rep, 23 (9): 617~624
- Termignoni RR, Wang PJ, Hu CY (1996). Somatic embryo induction in *Eucalyptus dunnii*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 45: 129~132
- Tournier V, Grat S, Marque C, El Kayal W, Penchel R, de Andrade G, Boudet AM, Teulieres C (2003). An efficient procedure to stably introduce genes into an economically important pulp tree (*Eucalyptus grandis* × *Eucalyptus urophylla*). Trans Res, 12: 403~411
- Valerio L, Carter D, Rodrigues JC, Tournier V, Gominho J, Marque C, Boudet AM, Maunders M, Pereira H, Teulieres C (2003). Down regulation of cinnamyl alcohol dehydrogenase, a lignification enzyme, in *Eucalyptus camaldulensis*. Mol Breed, 12: 157~167
- Van Beveren KS, Spokevicius AV, Tibbits J, Wang Q, Bossinger G (2006). Transformation of cambial tissue *in vivo* provides an efficient means for induced somatic sector analysis and gene testing in stems of woody plants species. Funct Plant Biol, 33: 629~638
- Yao JL, Lin-Wang K (2005). *Eucalyptus* transformation method. United States Patent, US 2005/0086714 A1