

邵宏波
初立业
姜恩来

转基因技术在果树抗性育种中的应用

果树是经济价值很高的作物。每年果树由于其自身抵抗力弱,遭到病虫害和其它逆境干扰造成的损失达到总产量的30%左右(Tumer等1987),因而探讨果树抗性育种一直是果树学家关注的重要问题之一。由于果树的继代繁殖周期长,高度的杂合性以及需要进行大量的回交才能除去不需要的特性,所以利用传统的抗性育种杂交法改良果树就需要很长的时间。近十几年来,国内外迅速发展的转基因技术(transgenic techniques)已经在果树抗性育种中得到了应用,并且已经取得了长足进展。转基因技术已经成为果树改良的最有前途的技术方法之一(刘丽艳等1991、Ver等1981)。本文主要综述应用转基因技术进行果树抗性育种并达到植物保护目的研究进展及有关问题。

一、转基因技术为果树抗性育种研究带来全新的方法。抗性增强的实例已经说明了外源基因得到了转化,例如,可从病毒的基因中得到不同的特定序列。应用基因工程和组织培养技术,单个基因可直接成功地转化到一个选择好的栽培品系中,而不改良其商业特性。

转基因技术主要分为直接的与间接的两种方法。对大多数直接转基因方法来说(除显微注射外),原生质体的分离是必须首先具备的。利用PEG修饰植物原生质体的细胞膜可使细胞质膜有一短暂的通透性,并使存在于周围悬浮液中的外源DNA进入了细胞。电穿孔诱导法是通过一短暂的电磁脉冲,使细胞质膜产生与上述方法相似的通透性而达到转化目的。显微注射法是将DNA悬浮物或不同的细胞器直接注射进细胞。在微弹注射轰击法中,粒子枪中包被钨或金的DNA粒子可在高压下直接进入果树的完整组织中。

间接的果树转基因方法则包括了应用不同质粒载体的农杆菌方法。Ti或Ri质粒可将它们所携带的外源基因引入并整合至果树的基因组中。一般来讲,这种方法方便可靠,唯一不利因素是其寄主范围有限。尽管如此,外源基因还是可以稳定地整合到果树基因组中,而且以孟德尔的遗传规律进行遗传,这样为分析也带来了方便。

对于果树来说,除了在选择转基因方法方面需要严格筛选外,还要对果树的外植体选择把好关。果树转化的主要障碍是难以获得再生的转化植株。愈伤组织主要是指一群细胞的聚合体,它可以用农杆菌法进行转化,但该系统的局限性在于:a.不是每一品种都能从脱分化状态下再生植株的;b.从该系统中再生的植株易发生体细胞变异。叶和茎的切段是复杂的外植体,从它们的再生中便减少了体细胞变异的危险,尤其是木本果树

植物。从小叶柄外植体再生出植株对某些果树是可行的。Ma等(1989,1992)利用上述方法获得了洋李(*Prunus domestica*)的转基因嵌合转化植株。Colby等(1991)也利用叶柄作外植体,获得了葡萄的转基因嵌合植株,并且观察到了表皮层和次表皮层细胞也参与了原分生组织的形成。我们的经验表明在进行果树转化实验之前,检查一下组织对所选择试剂的敏感性是十分重要

的。再生能力差的外植体如果一开始就经历一系列的高选择压力,那么已经转化的细胞可能由于分离作用的影响而死亡。卡那霉素抗性可以用来筛选转化子(transformants),但是仅用这一项指标还是不够的,还必须考查分析多项指标才行。

二、转基因技术在果树抗病毒研究中的有关事例。Hamilton(1980)指出病毒基因组中有关顺序的表达(如

果同时也在转化植株中表达)则可能使植株产生抗病毒能力。Sequeira(1984)指出病毒的外壳蛋白也可能发挥这种防疫任务。Beachy等(1985)又提出利用反义基因(antigene)这一概念。至今,已有多种不同的病毒基因顺序被导入植物基因组中并用于测试其抗性。反义RNA在植物中表达的报道表明可以获得对黄瓜花叶病毒、马铃薯X病毒及TMV的抗性。另外,研究者利用其它基因顺序也获得了抗性,例如:卫星DNA;非结构基因;核糖酶基因;缺陷性干扰基因。在所有方法中,最有希望的是:以外壳蛋白基因为介质的抗性方法。从1986年来,用外壳蛋白基因为介质的抗性方法已经在多种不同植物病毒家族中获得了成功,其中果树有李子树梅毒病毒(potyvirus),葡萄藤花叶病毒(Nepovirus)等。尽管上述病毒在形态、基因组成及复制方式上存在着很大的不同,但是都观察到了如下的结果:①在1—50um/ml(CMV除外)的浓度范围内都可获得抗性;②抗性与表达水平有关(PPV、PVY除外);③与病毒RNA共培养可增强抗性(PVX除外);④异源抗性决定于外壳蛋白基因顺序的同源性程度。例如,对马铃薯Y病毒,仅需50—60%的同源性便足以提供抗性了;在葡萄藤花叶病毒中,对番茄黑环病毒的抗性只需55%的同源性即可。

1. 李子树梅毒病毒和核果类果树抗性。马铃薯Y类病毒对重要的粮食作物具有严重的危害,PPV是该家族中的一个成员,并被认为是李子树、桃树和杏树的最主要的病毒菌。保加利亚对此作了最早的叙述,他们认为在欧洲中部和南部以及其它地中海沿岸国家中,Sharka病会导致核果类品种产量的大幅度下降。虽然该病在北美地区还未有报道,但是无疑在美国核果类作物中它是一个危害(Powell等1990),必定引起美国检疫机构的足够重视。目前对已感染病毒病的植株还没有有效的治疗方法,而且,通过蚜虫传播PPV给控制病毒的扩散带来了更大的困难,所以,挑选抗性品系显然十分重要。

PPV的基因组长9.6kb,含有一条以3'多聚腺苷酸为开头的RNA正义链,它可以翻译成一条单聚蛋白并由病毒特异蛋白酶进行翻译后加工。外壳蛋白基因位于3'端,在植物表达启动子指示诱变位点后,并且它可用于植物转化实验中的双载体系统中。Ma Lamer等(1989, 1992)用携带有PBin PPV的农杆菌LBA4404进行转化烟草茎切段,并应用免疫的Western blot法确定外壳蛋白基因表达的植株,积累了许多有关交叉保护(Cross protection)及病毒抗性方面信息。

2. 转基因杏和李子树的再生。在杏合子胚的发育期间存在着一个关键时期,在此期间内,外植体可以被诱

导进行脱分化并紧接着进行新的分化,从而直接再生茎。再生率最高期在完全成熟后的第68和89天之间,这不仅仅涉及形成苗子叶的数量,还涉及每片子叶再生茎的数量,利用洋李得到了相似结果(邵宏波等1993)。对杏而言,第57天最有利。我们的实验结果已说明了这点。利用 β -葡萄糖苷酸酶基因(GUS)对杏进行转化可以指导PPV外壳蛋白基因转化果树的有关实验。GUS基因转化三天后进行第一次测定,就显示出令人满意的转化效果。蓝色染料均匀地点状分布在整个子叶的表面。21天后的观察显示转化率为每片子叶1—3个芽原基,而余下多数(18—20个)并未被转化。可以肯定非转化细胞的数量大于转化的组织数。Ma Lamer(1989)和我们的实验结果还显示李属果树对卡那霉素具有高度的敏感性。若开始就加入卡那霉素,那么即使在很低的浓度下,也能抑制再生。因而,从18—21天后的植物发芽阶段起,加入较低浓度的卡那霉素,便可筛选到转化的李属组织和细胞,进而再生出转基因的李属果树。

3. 应用PPV外壳蛋白基因对杏进行转化研究。Ma Lamer等对已转化了PPV外壳蛋白基因的李属果树进行了严格的筛选,在7个月,从254个再生苗中分离了41株植株并认为它们都携带了PPV外壳蛋白基因。

在果树再生实验中,困难除了再生方面,还存在建立一种有效的检测转化子方法方面的困难,特别是转化后可供分析的组织量很少,相对草本植物而言,再生率也太低。目前世界各国主要都采用了PCR方法(Polymerase Chain Reaction)作为主要测试法以证实相关病毒外壳蛋白基因是否进入杏植株或其它李属果树。这种方法简便、灵敏、准确,进一步推动了果树抗性育种的研究。Van der Milk等(1991)对已转化的杏进行检测,发现一个与外壳蛋白基因相对应的带,后来再应用PCR法测定,结果并未检测出病毒DNA的存在,从而说明传统的蛋白方法并不可靠,需要结合现代方法综合考查才能得到满意结果。

三、结束语。目前,虽然利用生物技术在果树抗性育种研究中取得了一些成绩,如抗性基因的引入,检测方法的更新,病毒鉴定等,但是还有许多问题需要研究和重视,如果树再生问题(原生质体,愈伤组织,细胞),优良目标基因的寻找,鉴定与克隆,转基因方法的筛选与优化,传统方法与现代方法的结合等问题。可以深信,随着对果树抗性及病理的分子生物学研究的日益深入和转基因技术的迅速发展,果树抗性育种的研究必将在21世纪有新的突破,并且将给人类生活带来较大的改观。(参考文献略 吉林四平师范学院生物工程研究室)