

果树抗真菌病害基因工程研究进展

李伟阳¹, 曾 斌¹, 田 嘉¹, 李 疆¹, 李秀根², 王苏珂²

(1. 新疆农业大学 林学与园艺学院, 果树学新疆特色果树研究中心, 新疆 乌鲁木齐 830052;

2. 中国农业科学院 郑州果树研究所, 河南 郑州 450009)

摘 要:果树真菌病害对果品生产造成严重危害, 长期以来科技工作者们致力于植物抗病机制研究并利用育种方法进行品种改良, 以提高果树抗真菌病害能力。现就果树抗病的分子机制、抗真菌病害基因资源的挖掘思路、果树外源遗传物质转化的方法、转基因技术在果树抗真菌病害育种中的应用及存在的问题进行了论述, 以期今后果树抗真菌病害育种研究提供参考。

关键词:果树; 真菌病害; 转基因; 抗病

中图分类号:S 66 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)09-0176-06

果树是经济价值很高的作物, 但其自身对病菌的抵抗力相对较弱, 造成果树减产情况严重, 其中真菌病害占绝大多数。通过化学防治效果差且费工费时, 因此, 抗性育种成为果树学家们十分关注的问题。果树为多年生木本或草本植物, 童期较长, 且高度杂合, 利用常规方法对其杂种后代进行形态鉴定至少要经过 5~10 年^[1], 如进行抗病鉴定可能需要的时间会更长, 从而迫切要求果树育种学家通过各种途径进行早期选择, 以提高育种效率。在这种情况下, 利用基因工程在分子水平上对基因进行操作, 可以克服物种之间的杂交障碍, 缩短育种周期, 提高育种效率, 为果树育种提供了一条新途径。近年来, 随着植物遗传理论和现代分子生物学技术的发展, 果树抗病的分子机制、抗病基因定位、抗病相关基因克隆及其功能研究取得了突破性的进展。

1 果树抗病的分子机制

果树抗病的分子机制与其它植物一样, 其中被广泛接受的植物抗病分子机理是基因对基因假说。该假说是 Flor^[2]根据对亚麻抗锈病的研究于 1971 年提出的, 认为病原含毒性基因(virulence gene, *vir*)和无毒基因(avirulence gene, *avr*), 感病和抗病寄主分别含感病基因(S)和抗病基因(R), 植物和病原的关系可分为相容性和

不相容性 2 种情况, 只有当植物的 R 基因与对应的病原 *avr* 基因相互作用时才产生不相容的抗病反应; 反之, 寄主感病(图 1-a)^[3]。Keen^[4]提出了激发子-受体模型(图 1-b), 用来解释基因对基因理论的分子机制, 即果树的 R 基因编码感受病原信号的分子称做受体(Receptor), 而病原物的无毒基因产生直接或间接产物, 作为病原信号分子, 命名为激发子(Elicitor), 受体与激发子特异性识别, 激活某种形式的次级信号传导级联网络, 使植物产生一系列的防卫反应, 寄主表现为抗病; 如果病原物没有无毒基因的表达或植物没有抗病基因表达时, 这种识别作用不能完成, 寄主表现为感病。

对有些情况基因对基因假说并不能较好地解释, van der Biezen 等^[5]提出了卫兵假说(图 1-c): 在病原体侵染植物时, 病原体会改变植物体内的一种蛋白——卫兵(guard cell), 当植物抗病基因蛋白发现其卫兵受到攻击时, 产生抗病反应。除此之外, 还有其它一些分子作用机理, 例如毒素和解毒素作用方式等。

2 果树的抗病反应

过敏反应(Hypersensitive response, HR)和系统获得抗性(SAR)是果树最常见的抗病反应。

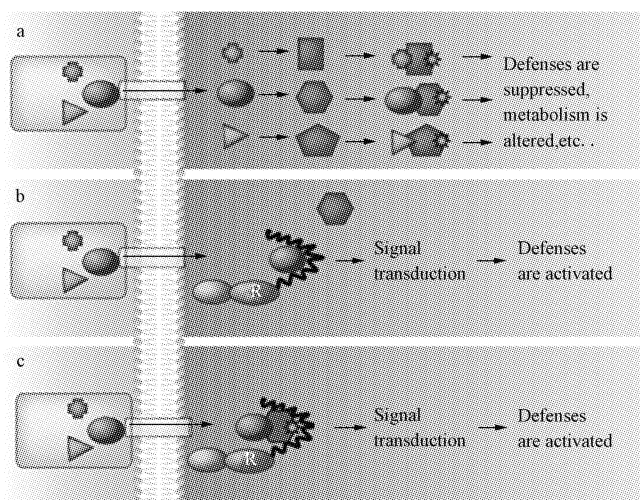
HR 是果树受到病原菌的侵染后, 启动了细胞程序性死亡的基因, 导致局部植物细胞快速死亡, 被侵染的部位形成枯斑, 使得病原菌被限制在侵染处周围的坏死组织中, 并因缺少营养物质而死亡。SAR 是指果树发生过敏反应之后获得的对病原物的广谱抗性, 在时间上落后于过敏反应, 执行二者之间信息传递的信号分子可能包括水杨酸、茉莉酸类、乙烯、脱落酸等^[7]。SAR 是果树防卫反应基因被系统诱导表达的结果, 其分子基础主要是病程相关蛋白(pathogenesis-related protein, PR)的合成。

第一作者简介:李伟阳(1990-), 女, 河北邢台人, 硕士研究生, 研究方向为果树生物技术。E-mail:1046897050@qq.com.

责任作者:曾斌(1969-), 男, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事果树种质资源及生物技术等教学与科研工作。E-mail:zbxd@163.com.

基金项目:国家高技术研究发展(“863”)计划子课题资助项目(2011AA10020604); 新疆维吾尔自治区果树学重点学科资助项目(201007)。

收稿日期:2014-11-28



注:a:病原物的有毒蛋白与寄主靶蛋白结合,使得靶蛋白结构功能改变,寄主感病;b:受体-激发子模型,植物 R 蛋白与病原物无毒蛋白特异结合,寄主抗病;c:卫兵假说,植物的 R 蛋白检测到体内另一种蛋白-卫兵(guardee)受到攻击时,寄主抗病。

Note:a;Disease results from the collective action of the virulence proteins which change the host target protein structure and function;b; This panel depicts the classic receptor-elicitor hypothesis,in which an R protein directly binds a virulence protein. This recognition event triggers defense responses;c; This panel depicts the guard hypothesis,in which an R protein detects a modified host protein (guardee). This recognition event triggers defense responses.

图 1 病原物的无毒蛋白与植物的 R 蛋白的相互作用^[6]

Fig. 1 Interactions between pathogen Avr proteins and plant R proteins

表 1 植物中已克隆的抗真菌病害基因

Cloned plant antifungal genes					
抗病基因 R gene	植物 Plant	病原菌 Pathogen	无毒基因 Avr	结构 Structure	方法 Method
<i>Pad4</i>	拟南芥 Arabidopsis	<i>Erysiphe orontii</i> ; <i>Peronospora parasitica</i>			
<i>RPW8</i>	拟南芥 Arabidopsis	<i>Erysiphe cichoracearum</i>		LZ-NBS-LRR	
<i>RPP1</i>	拟南芥 Arabidopsis	<i>Peronospora parasitica</i>			定位克隆 Positional cloning
<i>RPP5</i>	拟南芥 Arabidopsis	<i>Peronospora parasitica</i>	<i>avrPp5</i>	TIR-NBS-LRR	定位克隆 Positional cloning
<i>RPP8</i>	拟南芥 Arabidopsis	<i>Peronospora parasitica</i>		LZ-NBS-LRR	定位克隆 Positional cloning
<i>RPP13</i>	拟南芥 Arabidopsis	<i>Peronospora parasitica</i>		LZ-NBS-LRR	
<i>Cf-2</i>	番茄 Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr2</i>	LRR-TM	定位克隆 Positional cloning
<i>Cf-4</i>	番茄 Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr4</i>	LRR-TM	定位克隆 Positional cloning
<i>Cf-5</i>	番茄 Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr5</i>	LRR-TM	定位克隆 Positional cloning
<i>Cf-9</i>	番茄 Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr9</i>	LRR-TM	转座子 Transposon tagging
<i>Cf-ECP2</i>	番茄 Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>			转座子 Transposon tagging
<i>Hcr9-4E</i>	番茄 Tomato	<i>Cladosporium fulvum</i>	<i>avr4E</i>	LRR-TM	定位克隆 Positional cloning
<i>I2</i>	番茄 Tomato	<i>Fusarium oxysporum</i>		NBS-LRR	定位克隆 Positional cloning
<i>Asc</i>	番茄 Tomato	<i>Alternaria alternata</i> f. sp. <i>lycopersici</i>			
<i>Hm1</i>	玉米 Maize	<i>Colchliobolus carbonum</i> race 1			转座子 Transposon tagging
<i>Hm2</i>	玉米 Maize	<i>Colchliobolus carbonum</i>			转座子 Transposon tagging
<i>Pib</i>	水稻 Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>		NBS-LRR	定位克隆 Positional cloning
<i>pi-ta</i>	水稻 Rice	<i>Magnaporthe grisea</i>	<i>Avr-pita</i>	NBS-LRR	定位克隆 Positional cloning
<i>Lr10</i>	小麦 Wheat	<i>Puccinia recondita</i> var <i>tritici</i>		PK	
<i>Rh2</i>	大麦 Barley	<i>Rhynchosporium secalis</i>			
<i>mlo</i>	大麦 Barley	<i>Erysiphe graminis</i> f1sp1hordei		TM-TM-TM-TM-TM-TM	定位克隆 Positional cloning
<i>L6</i>	亚麻 Flax	<i>Melampsora lini</i>	<i>AL6</i>	TIR-NBS-LRR	转座子 Transposon tagging
<i>L11</i>	亚麻 Flax	<i>Melampsora lini</i>	<i>AL11</i>	TIR-NBS-LRR	
<i>M</i>	亚麻 Flax	<i>Melampsora lini</i>	<i>AM</i>	TIR-NBS-LRR	转座子 Transposon tagging

根据抗病反应中基因的作用性质,可把抗病反应过程中起作用的基因分为 2 类:抗病基因和防卫反应基因。抗病基因是寄主植物对病原菌专一性识别的基因,并激发一系列的抗病防卫反应,其产物是抗病反应信号传导链的起始组分,即信息链的前端,当它与病原菌的无毒基因直接或间接的编码产物特异结合后,经信号传导产生植物的抗病反应。防卫反应基因是一类在抗病机制中最终起作用的基因,它们的编码产物直接或间接地作用于病原。

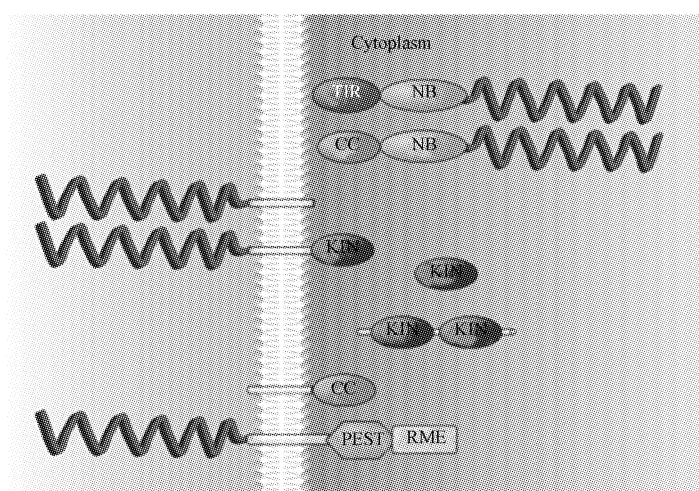
2.1 抗病基因(R 基因)

自 1992 年 Johal 等^[8]在玉米中克隆到第 1 个抗病基因 *HM1* 以来,抗病基因的相关研究取得了很大的进展。到目前为止,成功克隆出的 R 基因将近 60 个,已发表的抗真菌病害基因见表 1。

2.1.1 抗真菌病害基因的研究方法 抗真菌病害基因的研究主要是利用分子标记进行基因标记、定位,基因克隆以及转基因鉴定。分子标记与基因定位的方法主要有:RAPD、SSR、SRAP、ISSR、SNP 等 DNA 分子标记技术,如 Fischer 等^[9]通过 RAPD、AFLP、SCAR 和 SSR 标记对葡萄白粉病、霜霉病基因标记及定位进行了研究,针对抗病品种“Regent”和感病品种“Lemberger”及其杂交后代构建遗传连锁图谱,并进行了抗白粉病与霜霉病 QTL 定位;Liu 等^[10]获得了苹果抗腐烂病的 SSR 标记 CH02a04-450 和 2 个 AFLP 标记 E-AG/M-GAC-280、E-AGG/M-CTT-110。克隆方法主要有转座子标签技术

(transposon tagging),如玉米 *Hm1* 基因、番茄抗叶霉病基因 *Cf-9*^[11] 和 *Cf-4*^[12]、亚麻抗叶锈病基因 *L6*^[13] 和 *M*^[14] 等;定位克隆(positional cloning),如大麦的抗白粉病基因 *Mlo*^[15]、番茄的抗叶霉病基因 *Cf-2*^[16]、拟南芥抗霜霉病基因 *RPP5*^[17]、水稻抗稻瘟病基因 *Pib*^[18] 等;基于同源序列的候选基因法;差异显示 PCR(differential display reverse transcription PCR, DDRT-PCR);抑制消减杂交(suppression subtractive hybridization,SSH);cDNA 代表性差异分析(cDNA representative diferential analysis,cDNA-RDA);cDNA 扩增片段长度多态性(cDNA amplified fragment length polymorphism,cDNA-AFLP)等。

2.1.2 抗病基因的结构特点 通过对已克隆的植物抗病基因的编码产物进行广泛的比较,发现它们具有一些共同的结构域:核酸结合位点(Nucleotide binding site, NBS),亮氨酸富集区(Leucine-rich repeat, LRR),跨膜结构域(Transmembrane domain, TM),卷曲螺旋结构域(CC, Coiled-coil domain),丝氨酸-苏氨酸蛋白激酶结构(Serine/Threonine protein kinase, KIN),果蝇 Toll 蛋白及哺乳动物白细胞介素-1 受体(Toll and interleukin-1 receptor, TIR)等。这些结构域在细胞内的主要存在形式见图 2。



注:蓝色曲线:LRR,富含亮氨酸重复单位;灰色圆柱形:TM,跨膜域;KIN:丝氨酸苏氨酸蛋白激酶;NB:核苷酸结合位点;TIR:果蝇 Toll 蛋白及哺乳动物白细胞介素-1 受体;CC:卷曲螺旋结构域;PEST:有关蛋白质降解的氨基酸序列;RME:受体介导的内吞作用蛋白。

Note: Blue curve: LRR, Leucine-rich repeat; Gray cylindrical: TM, Trans-membrane domain; KIN: Serine/Threonine protein kinase; NB: Nucleotide binding site; TIR: Toll and interleukin-1 receptor; CC: Coiled-coil domain; PEST: The amino acid sequence of protein degradation; RME: Receptor-mediated endocytosis.

图 2 抗病基因表达产物的主要存在形式^[6]

Fig. 2 Major existent form of R proteins

2.2 防卫基因

依据基因对基因学说,植物的防卫基因的表达依赖于寄主植物与病原菌之间的相互作用,非亲和病原感染植株后,寄主的抗病基因产物识别相应的病原物的无毒基因产物,从而诱导防卫基因的表达。感病植株也有防卫基因的表达,但一般情况下,较抗病植株而言防卫基因表达的速度慢且强度低。

2.2.1 防卫基因的诱导 最初将能诱导植物产生植保素的物质称为激发子(elicitor),后来则把能诱导植物产生一些防卫反应各类生物型和非生物型激发子统称为激发子。①生物型激发子:生物型激发子是指来自病原和植物的诱发植物各种防卫反应的信号物质。早期,研究植物防卫反应时是直接病原(或孢子)、寄主细胞间隙分离到的病原分泌物^[19]、病原培养滤过液、病原或植物细胞壁人工降解物^[20]、病原或植物细胞壁经病原和植物分泌的水解酶作用后得到的混合物作为激发子。

后期,通过人工降解或病原和植物分泌的水解酶作用可得到激发子,其有效成分如脱乙酰几丁质^[21]、植物细胞壁的寡聚半乳糖醛酸等。②非生物型激发子:一些有机物如水杨酸(SA)^[22]、Benzothiadiazole(BTH)^[23]、乙烯、脱乙酰几丁质,以及紫外线,机械性损伤等均能引起相关防卫基因的表达。

2.2.2 防卫基因的分类 已克隆的防卫反应基因按功能可分为以下几类:①降解病原菌细胞壁的酶类基因,如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶基因等;②抑制病原菌生长的酶类基因,如过氧化物酶、超氧化物歧化酶、脂氧化酶基因等;③与植保素合成相关的基因,如苯丙氨酸裂解酶、脂氧合酶等基因等;④与结构抗性相关的基因,如富含羟脯氨酸的糖蛋白、离子通道调节泵、木质素合成有关的酶基因;⑤病程相关蛋白(pathogenesis-related, PR)基因,在系统获得性抗性反应中,寄主会产生被称为病程相关蛋白的重要抗病物质。其中的 5 类 PR 蛋白已被

证明参与了防卫反应,PR1、PR2、PR3、PR4 或 PR5^[24-26];⑥解除致病因子的酶基因,抑制病原果胶酶、病原毒素脱毒酶基因等;⑦核糖体失活蛋白基因(RIP),它可以损伤原核生物的核糖体,从腺嘌呤位点切开 28SrRNA,并使核糖体无法与延长因子结合,从而阻止蛋白合成的延长。Logemann 等^[27]利用马铃薯 *wun1* 基因的创伤诱导启动子,将大麦的 RIP 导入烟草,提高了对丝核菌的抵

抗能力。

3 转基因研究

3.1 果树转基因研究成果

自 1988 年 Mc Granahan 等^[28]获得转 *GUS* 基因核桃以来,果树转基因迅速发展,抗真菌病害的转基因研究也取得了突破性进展(表 2)。

表 2 果树抗真菌病害的转基因研究

Table 2 Antifungal transgenic research of fruit tree

树种 Tree species	品种 Breed	基因 Gene	表型抗性 Resistance	参考文献 Reference
甜橙 Sweet orange	凤梨 Pineapple	PR-5	柑橘褐腐疫霉 <i>Phytophthora citrophthora</i>	[29]
苹果 Apple		内切几丁质酶基因 Endochitinase gene	黑星病 Scab	[30]
苹果 Apple		抗菌肽基因 Antimicrobial peptide gene	黑星病 Scab	[31]
苹果 Apple	Galaxy	<i>ech42, nag70</i>	黑星病 Scab	[32]
苹果 Apple	Ariane	<i>pinB</i>	黑星病 Scab	[33]
苹果 Apple	Gala	<i>HcrVf2</i>	黑星病 Scab	[34]
苹果 Apple	Holsteiner Cox	<i>Lc</i>	黑星病 Scab	[35]
葡萄 Grape	Thompson and Chardonnay	<i>PGIP</i>	灰葡萄孢真菌 <i>Botrytis cinerea</i>	[36]
葡萄 Grape	Chardonnay	抗菌肽基因 Antimicrobial peptide gene	白粉病 Powdery mildew	[37]
葡萄 Grape	Chardonnay	<i>VvNPR1</i>	白粉病 Powdery mildew	[38]
草莓 Strawberry		<i>RCC2</i>	白粉病 Powdery mildew	[39]
草莓 Strawberry	Joliette	<i>pcht28</i>	黄萎病菌 <i>Verticillium dahliae</i>	[40]
草莓 Strawberry		<i>ch5B</i>	灰霉菌 <i>Botrytis cinerea</i>	[41]
草莓 Strawberry		葡萄糖氧化酶基因 Glucose oxidase gene	草莓灰霉病 Strawberry gray mould	[42]
草莓 Strawberry		<i>Chit42</i>	提高抗病能力 Improve disease resistance	[43]
香蕉 Banana	Grand Nain	<i>Ther-42 and StSy</i>	叶斑病 Leaf spot	[44]

3.2 果树抗病基因转化方法

在植物基因转化的研究中已建立了多种转化系统,如载体转化系统、原生质体 DNA 直接导入转化系统、基因枪 DNA 导入转化系统及利用生物种质细胞如花粉粒等介质转化系统等。以下简单介绍几种在果树中常用的转化方法。

3.2.1 农杆菌介导法 农杆菌介导法(Agrobacterium-mediated transformation)是通过农杆菌介导将质粒载体 T-DNA 区携带的目的基因导入植物细胞,整合到植物细胞 DNA 上,利用植物细胞的全能性获得再生植株,使目的基因在受体植物中表达。该转化方法成功率高、技术成熟、应用广泛。另外,可利用其它辅助手段提高转化效率,如超声波、真空渗透等。自 1983 年农杆菌用于植物转基因以来,通过其转化成功的植物达 100 多种,其中果树方面,已经在苹果、核桃、柑橘、葡萄、樱桃等树种中得到了成功的应用。

3.2.2 基因枪法 基因枪法(particle gun)又称微弹轰击法(microprojectile bombardment;particle-bombardment;biolisties)。最早是美国康奈尔大学 Sanford 等^[45]于 1987 年发明的一种 DNA 直接导入植物细胞或组织的方法。该方法是采用一种微粒加速装置,使裹着外源基因的金粒或钨粒获得足够高的能量,打入受体细胞或组织,释放出外源 DNA,使 DNA 整合到植物细胞中,从而

实现植物细胞的转化。目前已有多种果树采用此技术获得了转基因植株,如番木瓜^[46-47]、葡萄^[48]、香蕉^[49]等。

3.2.3 花粉管通道法 花粉管通道法(pollen-tubepathway)是授粉后使外源 DNA 能沿花粉管渗入,经过珠心通道进入胚囊,转化尚不具备正常细胞壁的卵、合成或早期胚胎细胞的一门技术。该技术可广泛应用于任何开花植物,且不依赖于组织培养再生植株,技术简单,耗材少,在草本植物中进行了较深入的研究,但在木本果树中,仅在葡萄^[50]、桃^[51]上有报道。

3.2.4 电激法 电激法是利用高压电脉冲作用在原生质体膜上“电激穿孔”(electroporation),形成可逆的瞬间通道,从而促进外源 DNA 的摄取。此法对植物细胞不产生毒性,但是转化效率较低,除成功应用于烟草、胡萝卜和禾谷类作物外,在草莓^[52]、柑橘^[53]、苹果^[54]等果树树种上有少量成功的报道。

4 果树抗病转基因育种存在的问题

4.1 转基因果树的安全性

转基因植物的安全性一直是社会公众比较关注的问题之一。目前,关于转基因果品是否会影响到人体健康等问题的研究尚鲜见报道。那么,转基因植物是否对人类和生态环境存在潜在危害,就需要人们进一步对转基因果树的食品安全性及生态安全性进行分析和评价。

4.2 转基因亲本植株的选择

单个基因的转入并不能同时改善植株的多个性状,如果树抗病(虫)、抗逆性、果实的品质等。因此,加强对核心种质的挖掘与评价^[56]是果树转基因中重要的一环。通过对原产中国的核心种质进行评价,能对其更清楚、更深入和更全面的了解,以利于育种亲本的选择。

4.3 高效遗传转化体系

木本果树的遗传转化效率低,且目前大多数果树树种及品种的再生体系还未建立,严重制约了果树基因工程的发展。需要进一步摸索和建立高效的遗传转化体系。

4.4 商业化应用

目前获得的转基因果树中,仅有番木瓜商品化。其中很大一部分原因是转基因果树的安全性备受争议,导致转基因材料在生产实践中的应用较少,有待解决。

参考文献

- [1] 李秀根,杨健,王龙. 优质、晚熟、耐贮梨新品种-中华玉梨的选育[J]. 果树学报,2005,22(4):432-433.
- [2] Flor H H. Current status of the gene for gene concept[J]. Annu Rev Phytopathol,1971,9:275-296.
- [3] 许丽,李玥莹,林凤. 植物抗病的分子基础与研究进展[J]. 杂粮作物,2006,26(6):428-432.
- [4] Keen N T. Gene-for-gene complementarity in plant-pathogen interactions[J]. Annual Review of Genetics,1990,24:447-463.
- [5] van der Binezen E A, Jones J D G. Plant disease-resistance proteins and the gene-for-gene concept[J]. Trends Biochem Sci,1998,23:454-456.
- [6] Mcdowell J M, Woffenden B J. Plant disease resistance genes: recent insights and potential applications[J]. Trends in Biotechnology,2003,21:178-183.
- [7] 王忠. 植物生理学[M]. 北京:中国农业出版社,2000:459-463.
- [8] Johal G S, Briggs S P. Reductase activity encoded by the *HMI* disease resistance gene in maize[J]. Science,1992,258(5084):985-987.
- [9] Fischer B M, Salakhutdinov I, Akkurt M, et al. Quantitative trait locus analysis of fungal disease resistance factors on a molecular map of grapevine[J]. Theor Appl Genet,2004,108:501-515.
- [10] Liu H T, Li C L, Zhang Y J, et al. Inheritance of molecular marker of resistance to bot canker in *Malus domestica*[J]. Agricultural Sciences in China,2011,10(2):175-184.
- [11] Jones D A, Thomas C M, Hammond-Kosack K E, et al. Isolation of the tomato *Cf-9* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* by transposon tagging[J]. Science,1994,266:789-793.
- [12] Thomas C M, Jones J D G, Parniske M, et al. Characterization of the tomato *Cf-4* gene for resistance to *Cladosporium fulvum* identifies sequences that determine recognition specificity in *Cf-4* and *Cf-9*[J]. Plant Cell,1997,9:2209-2224.
- [13] Lawrence G J, Finnegan E J, Ayliffe M A, et al. The *L6* gene for flax rust resistance is related to the *Arabidopsis* bacterial resistance gene *RPS2* and the tobacco viral resistance gene *N*[J]. Plant Cell,1995,7:1195-1206.
- [14] Anderson P A, Lawrence G J, Morrish B C, et al. Inactivation of the flax rust resistance gene *M* associated with the loss of a repeated unit within the leucine-rich repeat coding region[J]. Plant Cell,1997,9:641-651.
- [15] Buschges R, Hollricher K, Panstruga R, et al. The barley *mlo* gene: A novel control element of plant pathogen resistance[J]. Cell,1997,88:695-705.
- [16] Dixon M S, Jones D A, Keddie J S, et al. The tomato *Cf-2* disease resistance locus comprises two functional genes encoding leucine-rich repeat proteins[J]. Cell,1996,84:451-459.
- [17] Parker J E, Coleman M J, Szabo V, et al. The *Arabidopsis* downy mildew resistance gene *RPP5* shares similarity to the Toll and interleukin-1 receptors with *N* and *L6*[J]. Plant Cell,1997,9:879-894.
- [18] Wang Z X, Yano M, Yamanouchi U, et al. The *Pib* gene for rice blast resistance belongs to the nucleotide binding and leucine-rich repeat class of plant disease resistance genes[J]. The Plant Journal,1999,19(1):55-64.
- [19] 宋从凤,潘小玫,杨悦,等. 水稻白叶枯病菌及其毒素引起烟草叶片组织坏死机制的研究[J]. 植物病理学报,1999,29(1):57-62.
- [20] Doke N, Chai H B, Kawaguchi A. Molecular Determinants of Plant Diseases[M]. Berlin: Springer-Verlag,1987:235-251.
- [21] Cordero M J, Rarentos D, San S B. Differential expression and induction of chitinases and β -1,3-galactanases in response to fungal infection during germination of maize seeds[J]. The American Phytopathological Society,1994,7(1):23-31.
- [22] 蔡新忠,郑重. 水杨酸诱导水稻幼苗抗瘟性的生化机制[J]. 植物病理学报,1997,27(3):231-236.
- [23] Benhamou N, Belanger R. Benzothiadiazole-mediated induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicislycopersici* in tomato[J]. Plant Physiol,1998,118:1203-1212.
- [24] Neale A D, Wahleithner J A, Lund M, et al. Chitinase, beta-1,3-glucanase, osmotin, and extensin are expressed in tobacco explants during flower formation[J]. Plant Cell,1990,2:673-684.
- [25] Kan J A L, Joosten M H A J, Wagemakers C A M, et al. Differential accumulation of mRNAs encoding extracellular and intracellular PR proteins in tomato induced by virulent and avirulent races of *Cladosporium fulvum*[J]. Plant Mol Biol,1992,20:513-527.
- [26] van Lgon L C, Strien E A. The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins[J]. Phys Mol Plant Path,1999,55:85-97.
- [27] Logemann J, Jach G, Tommerup H. Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plant[J]. Bio/Technology,1992,10:305-308.
- [28] Mc Granahan G H, Leslie C A, Uratsu S L, et al. Improved efficiency of the walnut somatic embryo gene transfer system[J]. Plant Cell Rep,1990,8:512-516.
- [29] Fagoaga C, Rodrigo I, Conejero V, et al. Increased tolerance to *Phytophthora citrophthora* in transgenic orange plants constitutively expressing a tomato pathogenesis related protein PR-5[J]. Molecular Breeding,2001,7(2):175-185.
- [30] Bolar J P, Norelli J L, Wong K W, et al. Expression of endochitinase from *Trichoderma harzianum* in transgenic apple increases resistance to apple scab and reduces vigor[J]. Phytopathology,2000,90:72-77.
- [31] de Cubber K, Broothaerts W, Lenaerts T, et al. Progress on genetic transformation as a tool for increased disease resistance in apple[J]. Acta Hort,2000,525:309-316.
- [32] Faize M, Malnoy M, Dupuis F, et al. Chitinases of *Trichoderma atroviride* induce scab resistance and some metabolic changes in two cultivars of apple[J]. Phytopathology,2003,93:1496-1504.
- [33] Faize M, Sourice S, Dupuis F, et al. Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus domestica* Borkh.)[J]. Plant Sci,2004,167:347-354.
- [34] Belfanti E, Silberberg-Dilworth E, et al. The *HcrVf2* gene from a wild

apple confers scab resistance to a transgenic cultivated variety[J]. Proc Natl Sci USA, 2004, 101(3): 886-890.

[35] Flachowsky H, Szankowski I, Fischer T C, et al. Transgenic apple plants overexpressing the *Lc* gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight[J]. Planta, 2010, 231: 623-630.

[36] Agüero C B, Uratsu S L, Greve C, et al. Evaluation of tolerance to Pierce's disease and *Botrytis* in transgenic plants of *Vitis vinifera* L. expressing the pear PGIP gene[J]. Molecular Plant Pathology, 2005, 6(1): 43-51.

[37] Vidal J R, Kikkert J R, Malnoy M A, et al. Evaluation of transgenic 'Chardonnay' (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew[J]. Transgenic Res, 2006, 15: 79-82.

[38] Henanff G L, Farine S, Kieffer - Mazet F, et al. *Vitis vinifera* VvNPR1.1 is the functional ortholog of AtNPR1 and its overexpression in grapevine triggers constitutive activation of PR genes and enhanced resistance to powdery mildew[J]. Planta, 2011, 234(2): 405-417.

[39] Asao H, Nishizawa Y, Arai S, et al. Enhanced resistance against a fungal pathogen *Sphaerotheca fulmi* in transgenic strawberry expressing a rice chitinase gene[J]. Plant Biotech, 1997, 14(3): 145-149.

[40] Chalavi V, Tabaeizadeh Z, Thibodeau P. Enhanced resistance to *Verticillium dahliae* in transgenic strawberry plants expressing a *Lycopersicon chilense* chitinase gene[J]. Amer Soc Hort Sci, 2003, 128(5): 747-753.

[41] Vellicce G R, Ricci J C, Hernandez L, et al. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry[J]. Transgenic Res, 2006, 15(1): 57-68.

[42] 金万梅, 尹淑萍, 鲁韧强, 等. GO 基因对草莓遗传转化及抗病性鉴定[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 797-800.

[43] 谢志兵. 草莓再生体系的建立及导入 *chit42* 基因获得抗病种质的研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2007.

[44] Vishnevetsky J, White T L, Palmateer A J, et al. Improved tolerance toward fungal diseases in transgenic *Cavendish banana* (*Musa* spp. AAA group) cv.

Grand Nain[J]. Transgenic Res, 2011, 20: 61-72.

[45] Sanford J C, Klein T M, Wolf E D, et al. Delivery of substances into cells and tissues using a particle bombardment process[J]. Journal of Particulate Science and Technology, 1987, 5: 27-37.

[46] Fitch M M M, Manshardt R M, Gonsalves D, et al. Stable transformation of papaya via microprojectile bombardment[J]. Plant Cell Reports, 1990, 9: 189-194.

[47] Fitch M M M, Manshardt R M, Gonsalves D, et al. Virus resistant papaya plants derived from tissues bomarded with the coat protein gene of papaya ringspot virus[J]. Bio Technology, 1992, 10: 1466-1472.

[48] Kikkert J R, Ali G S, Striem M J, et al. Genetic engineering of grapevine (*Vitis* sp.) for enhancement of disease resistance[J]. Acta Hort, 1997, 447: 273-279.

[49] Remy S, Buyens A, Cammue B P A, et al. Production of transgenic banana plants expressing antifungal proteins[J]. Acta Hort, 1998, 490: 433-436.

[50] 刘艳红, 房经贵, 陶建敏, 等. 果树基因转化技术的选用和转基因植株的鉴定与性状分析[J]. 中国农学通报, 2008, 24(8): 43-49.

[51] 万春雁, 韩明玉, 赵彩平, 等. 桃花粉管通道法转基因技术的初步研究[J]. 中国农学通报, 2009, 25(5): 38-42.

[52] Nyman M, Wallin A. Transient gene expression in strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) protoplasts and the recovery of transgenic plants[J]. Plant Cell Rep, 1992, 11: 105-108.

[53] Yao J L, Wu J H, Gleave A P, et al. Transformation of citrus embryogenic cells using particle bombardment and production of transgenic embryos[J]. Plant Sci, 1996, 113: 175-183.

[54] Hyung N L, Lee C H, Kim S B. Foreign gene transfer using electroporation and transient expressing in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Acta Hort, 1995, 392: 179-185.

[55] 李秀根, 杨健, 王龙, 等. 我国近 30a 梨育种研究进展与今后工作建议[J]. 果树学报, 2010, 27(6): 987-994.

Recent Progress of Genetic Engineering in Antifungal Fruit Trees

LI Wei-yang¹, ZENG Bin¹, TIAN Jia¹, LI Jiang¹, LI Xiu-gen², WANG Su-ke²

(1. College of Forestry and Horticultural, Xinjiang Agricultural University, The Characteristics Fruit Tree Research Center, Urumqi, Xinjiang 830052; 2. Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agriculture Sciences, Zhengzhou, Henan 450009)

Abstract: The affection of fungal diseases was a serious problem in the fruit production. In order to increase the ability of the fungal disease resistance in fruit trees, the scientists had been working on the understanding of the mechanism of disease resistance and the breeding program for a long time. This paper reviewed molecular mechanisms of fungal disease resistance in fruit trees, the idea of anti-fungal disease gene resource mining, the methods of genetic transformation and the application as well as some problem of gene transformation in fruit trees, which could be a reference to the further study of the breeding of fungal disease resistance in fruit trees.

Keywords: fruit tree; fungal disease; transgene; resistance to disease