

果树生物技术育种进展

马海军, 冯学梅, 马金平

(宁夏农林科学院 种质资源所, 宁夏 银川 750002)

摘要:本文从胚培育种、花药和花粉培养育种、原生质体培养与细胞融合、基因工程育种四个方面综述了生物技术在果树育种上的运用,并对其未来的发展作了展望。

关键词:果树;生物技术育种;基因技术

中图分类号:S603.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-7461(2006)04-0093-03

Advances of Biotechnology Breeding of Fruit Tree

MA Hai-jun, FENG Xue-mei, MA Jin-ping

(Institute of Germplasm Resources, Ningxia Academy of Agriculture and Forestry Science, Yinchuan, Ningxia 750002, China)

Abstract: This article summarized the application of biotechnology breeding in fruit trees from embryo culture, anther and pollen culture, protoplast culture and cell fusion, gene engineering breeding. The direction which needs further investigation was also discussed.

Key words: fruit trees; biotechnology breeding; gene engineering

果树栽培历史悠久,长期以来,人们靠营养繁殖来保持遗传的相对稳定,靠引种、选优、实生选种、杂交选种、芽变等手段来改良树种,但果树的生命周期长,遗传性高度杂合,自交大多不孕,给育种工作造成了许多困难,现代生物技术的兴起,给果树育种开辟了全新的道路,人们利用体细胞变异的诱导和利用、花粉和花药培养、植物的遗传转化及与植物遗传育种相关的其他分子生物学技术。近年来取得了较大进展,已在优良树种的快速繁殖、种质保存、品种选育等许多领域得到广泛利用,显示出巨大的潜力。总的来看,生物技术与植物常规育种相比有很大的优越性。改变传统的育种技术程序,缩短育种周期^[1],例如用花药和花粉培养能在一年之内产生纯合的植株和等位基因系,而常规育种法可能要花4~6 a^[2]。克服植物种间、属间杂交不亲和性^[3]可以广泛重组植物界优良基因,创造新种。

1 生物技术在果树育种上的运用

1.1 胚培育种

胚培是果树组织培养中开展最早、应用最广泛的一项技术。胚抢救技术解决了远缘杂交中胚的败育问题,给核果类早熟品种的选育提供了有效途径,在解决其育种周期长、树种品种育种效率低等障碍

而造成的品种改良难等方面显示了巨大的潜力,已成为果树育种改良的重要手段之一。最早将胚胎技术应用于育种研究的是 Black,随后国内外学者相继开展了多树种、多品种胚培技术研究,已在杏、桃、樱桃、葡萄、苹果、柿等树种上获得成功^[4,6]。我国从上世纪70年代开展此项研究,在核果类特早熟品种的选育方面成绩最突出。姚强(1990)、殷桂琴(1992)和刘用生(1993)等人在极早熟桃的胚培养方面做了一些研究,对幼胚的愈伤组织诱导和植

株再生的影响因素进行了分析和试验,取得了一定的结果,建立了相应的胚培养技术程序^[8-10]。上海市农业科学院园艺研究所、西北农业大学等单位,分别选育出许多特早熟桃优良新品种、品系,已经命名用广的新品种有:上海的春蕾、春花,江苏的早花露,浙江的早霞露、玫瑰露,山东青岛的春艳,山西的端玉,北京的京早3号、早美等。此外,在樱桃、杏、葡萄、猕猴桃等果树胚培养方面也取得了很大的进展。如中国科学院植物研究所和北京植物园1995年对美味猕猴桃(六倍体)与软枣猕猴桃(四倍体)种间杂种采用幼胚培养,得到五倍体新种质,从中选出了果大、绿皮、无毛的杂种植株

1.2 花药和花粉培养育种

花粉和花药培养主要用于获得单倍体,经染色

体组加倍以后得到纯系,可以缩短获得纯系的时间,便于研究遗传规律,提高选育效率,解决多年生杂合果树育种中存在的难题。同时还可用于制造缺体和其非整倍体,扩大遗传种质。先后有苹果、葡萄、梨等树种成功的报道^[11-14]。例如在苹果方面,其花药培养工作国外从 20 世纪 60 年代开始,我国从 70 年代开始进行苹果花药培养技术研究。费开韦、薛光荣于 1980 年在元帅苹果花药培养上获得植株,是国内首次获得大苹果单倍体植株^[15]。1981 年吴绎云在小苹果黄太平品种上获得单倍体植株^[16]。中国农业科学院果树研究所 80 年代初首先得到元帅品种的花培植株。以后又相继得到国光、赤阳、金帅、祝、富士、新红星、红玉等共 8 个品种的花培植株:其中元帅花培植株已结果。形态特征与原品种有明显差异,不同花培植株之间形态也不相同。中国农业科学院果树研究所得锦丰梨花培植株。

1.3 原生质体培养与细胞融合

自 1960 年 Cocking 用酶法分离出高等植物原生质体后,原生质体的研究得到了深入的发展。原生质体技术不仅是细胞工程的重要组成部分,也是基因工程研究的重要基础,原生质体因除去了坚硬的细胞壁而成为易于接受载有外源基因的理想材料,并有可能在培养成再生植株后,外源基因所控制的性状得到表达^[18]。从 1986 年 3 个苹果基因型的叶肉原生质体经培养获再生植株至今,已有 12 种苹果基因型原生质体再生植株。葡萄、桃、银杏等树种的原生质体培养也已再生出愈伤组织或胚状体^[19,20]。国内学者从 20 世纪 80 年代开始研究,丁爱萍等利用新红星等苹果胚珠诱导愈伤组织,并建立悬浮细胞系进行原生质体培养,获得了原生质再生植株^[21,22]。潘增光等以悬浮培养细胞及叶片作为分离原生质体的起始材料,对影响苹果原生质体分离和培养的因素进行了系统研究,获得了平邑甜茶、M26、嘎拉 3 种基因型原生质体再生植株^[23]。于向荣等将酿酒葡萄品种白诗南、梅郁的花丝接种在诱导培养基上,诱导产生胚性愈伤组织,从胚性细胞团分离得到原生质体,进行原生质体培养,获得了再生植株。此外我国研究者还获得了中华猕猴桃和美味猕猴桃、山杏及葡萄酿酒品种白诗南、梅鹿瓠的原生质体再生植株^[4]。

1.4 基因工程育种

基因工程又称重组 DNA 技术,是指将应用 DNA 克隆技术获得的目的基因插入病毒、质粒或其他载体分子,在构建遗传物质新组合后,将其导入原来没有这类分子的寄主细胞或个体,并能持续稳定地表达,从而产生出人类所需的新个体^[5]。自 1983

年首次获得转基因烟草、马铃薯后,果树转基因技术的研究,已成为果树生物技术的热点研究课题之一。果树的基因型多为杂合,杂交后代会产生复杂多样的分离,因此把许多优良性状集中在一个果树品种上非常困难。果树基因工程为果树育种开辟了新的途径,有着重要的理论与实践意义,果树一旦获得转基因品种,而且目的基因如人们所期望的那样表达,就可以通过组织培养、嫁接或扦插等无性繁殖方式来大量繁殖。由于不通过有性繁殖,后代性状保持一致,其遗传稳定性较好。

1.4.1 转化果树中难生根种类,获得易繁殖的的转化植物 核果类中有许多品种或砧木因生根困难,使其繁殖受到很大限制。现已通过利用野生型发根农杆菌或带有发根农杆菌 *rol* 基因的致瘤农杆菌等转化而得到解决。首例成功转化的木本植物是扁桃品种 Ferragnes。已在几种不同的砧木和品种 (T110no, SupremovalFaScionello) 获得了嵌合植物。

1.4.2 果树基因工程可以提高抗病、抗虫性 果树病害主要由病毒及类病毒、真菌和细菌引起。对于病毒病,通常的做法是导入病毒外壳蛋白基因,细菌病和真菌病则通常通过导入几丁质酶基因等分别控制。来自苏云金杆菌的 Bt 蛋白基因等则成为果树抗虫转基因的目的基因。已获得的转 Bt 基因果树种类有苹果、梨、甜橙、柑梅、葡萄、越桔、洋梨、胡桃、草莓、山楂、悬钩子、番木瓜、花椒果、板栗等。此外,也有应用番木瓜环斑病毒 (PRV) 外壳蛋白基因提高杏对 PPV 的抗性的报道^[24]。

1.4.3 改良生长特性 通过转基因手段改良品种或砧木生长特性。目的在于使树形缩小和改变叶幕结构,培育紧密型的、短枝的、矮化半矮化的和垂枝的新品种,以适应高密度栽培的需要。通过发根农杆菌感染将 *rolA*, *rolB* 或 *rolC* 基因导入果树,既可促进树体矮化和分枝,还可促进生根,这种策略已经在苹果、枳、梨和猕猴桃上获得成功^[22]。近年来,相关研究主要集中在樱桃等树型较大的树种上。已获得含有发根农杆菌全长 T-DNA 的转基因樱桃砧木 Colt 的茎培养物与体细胞胚。与对照相比,所有的转基因的克隆植株株高、节间、叶面积和叶柄长度都显著降低,这些植株在秋季保持更多的绿叶和更好的长势。已在光敏素家族中发现其他一些基因,它们在转化的草本植物中表达时可赋予植株矮化性状,如水稻的 *PhyA*,当它被引入樱桃砧木 Colt,在离体培养条件下转化植物的茎表现出光质与其基因组背景间的相互作用。在远红光条件下,转化植物的茎的顶端优势、节间长度和分支量明显降低^[25]。

1.4.4 调节果实的成熟及其品质 多数核果类的

果实贮藏期都比较短,果实成熟时快速软化,因而通过基因工程手段对其进行遗传改良,干扰纤维素酶和多聚半乳糖醛酸酶基因的表达,调节果实的成熟软化,有利于采收及采后的贮运和销售。金勇峰等已先后从桃品种‘五露’克隆了 ACC 氧化酶和 ACC 合酶的基因,且已构建前者的反义植物表达体系,若转化桃获得成功,可望阻抑果实软化期该基因的表达,从而提高果实的耐贮性。苹果果实切开后容易褐变是酚类氧化所致,多酚氧化酶在此过程中起着重要作用,为此,Murata 等反义导入该基因,获得了抗褐变的苹果愈伤组织,后续研究仍在进行。提高糖含量的转基因葡萄及草莓现已获得。澳大利亚研究者分别把酸性转化酶基因和黄烷酮还原酶基因转入葡萄中,前者果实风味得到改善利于鲜食,后者褐色素积累减少,提高葡萄酒的品质^[26]。

1.4.5 提高抗霜冻性 对于北方果树,冬季低温为主要限制因子。某些冬季休眠期较短的品种开花较早,易受晚霜的危害,因此应注意增强植物的抗冻性。通过抗冻基因 AFP 就可能改变果树的抗冻性。这方面的研究工作较少,目前只有 Dolgov 等报道获得 7 个含抗冻基因的酸樱桃转化系,目的是为了阻止春季霜冻时细胞内冰晶的形成,但唯一的缺憾是至今未在转化物中表达出相应的蛋白质。

综上,运用先进有效的分子生物学手段,结合我国丰富的特有的遗传资源,分离、克隆有自主知识产权、有重要经济价值的新基因,是我国基因工程发展的当务之急。而生物技术育种在果树方面的应用已具有相当广泛性和雄厚的基础,其发展前景是十分乐观的。随着研究手段的不断更新和改进,以及细胞生物学和分子生物学等理论与技术的发展,将基因克隆及基因工程等高新技术与细胞培养、原生质体培养以及组织、器官的培养方法有效地结合起来,形成一个复杂的组织培养操作系统,并将该系统与常规育种有机地结合起来,将在果树抗病、抗虫和改良农艺性状等方面发挥更大的作用,并且必将把果树生物技术育种推向新的水平,为 21 世纪的生物技术革命做出突出的贡献。

参考文献:

- [1] 俞俊堂,唐孝宣. 生物工艺学[M]. 华东化工学院出版社,1991
- [2] 刘国瑞. 生物技术的现代概念[J]. 生物学通报,1997,(1)
- [3] 伊华林等. 胚抢救技术在果树上的应用[J]. 果树学报,2001,18(4),224-229.
- [4] 石荫坪,王强生. 中国落叶果育种 50 年[J]. 落叶果树,2000,

- (3):1-5.
- [5] 陈正华主编. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:北京高等教育出版社,1986. 290-314.
- [6] Sugiura A, Qhkuma T. Production of nonaploid ($2n = 9x$) Japanese persimmons (*Diospyros kaki*) by pollination with unreduced pollen and embryo rescue culture [J]. J Amer Soc Hort Sci, 2000, (5): 609-614.
- [7] 左覃元,朱更瑞,王力荣. 我国桃果产业的现状 & 展望[J]. 果树科学,1997,14(1):61.
- [8] 姚强,王德春,吴任良,等. 桃、油桃和蟠桃幼胚愈伤组织诱导和植株再生[J]. 上海农业学报,1990,6(3):23.
- [9] 段桂琴,刘用生,姚连芳,等. 极早熟桃胚培养技术研究初报[J]. 河南职业技术学院学报,1992,20(4):56.
- [10] 刘用生,李秀菊. 桃胚胎培养及其应用[J]. 北方果树,1993,(2):3.
- [11] 许定发译. 杂种葡萄花药培养产生了胚和小植株[J]. 国外农学-果树,1992,(3):27-29.
- [12] 邹昌杰,李佩芬. 葡萄花粉植株的诱导[J]. 植物学报,1981,23:79-81.
- [13] 牛健哲,薛光荣,丛佩华,等. 应用花药培养技术培育苹果新类型[J]. 果树科学,1994,11(1):14.
- [14] Xue Guangrong, Yang zhengying, Shi Yangzhong. The plantlets induced by anther culture in vitro in pear (*Jing Feng*) [J]. Acta Horticulturae, 1995, 403:311-314.
- [15] 费开韦,薛光荣. 元帅苹果花药培养诱导单倍体植株[J]. 中国农业科学,1981,(4):41
- [16] 吴绎云. 苹果花药培养获得单倍体植株[J]. 园艺学报,1981,8(4):36
- [17] 牛健哲,薛光荣,丛佩华,等. 应用花药培养技术培育苹果新类型[J]. 果树科学,1994,11(1):1
- [18] 陈正华. 木本植物组织培养及其应用[M]. 北京:高等教育出版社 1986.
- [19] Palat EM, Ochatt SJ, Power JB. Plant regeneration from Protoplasts of apple rootstocks and scion varieties (*Malus domestica* Borkh) [J]. Plant Physiol, 1998, 133:460-465.
- [20] 潘增光,邓秀新,章文才. 苹果原生质体研究进展[J]. 园艺学报,1997,24(3):239-243.
- [21] 丁爱萍,王洪范,曹玉芬. 苹果原生质体培养及植株再生[J]. 植物学报,1994,36(4):271.
- [22] Holefors A, Xue ZT, Welander M. Transformation of the apple root-stock M26 with rolA gene and its influence on growth[J]. Plant Sci, 1998, 136:69-78.
- [23] Rugini E, Marioli D. Agrobacterium rhizogenes T-DNA genes and rooting in woody species[J]. Acta Hort, 1992, 300:301-308.
- [24] Quemada H, L. Hostis B, Gonsalves D, et al. The nucleotide sequence of the terminal regions of papaya ringspot virus strains W and P [J]. J Gen Virol, 1990, 71:203-210.
- [25] 阎国华,周宇,张开春. 核果类果树转基因研究进展[J]. 果树学报,2001,18(6):358-364.
- [26] 杨莉,徐昌杰,陈昆松. 果树转基因研究进展与产业化展望[J]. 果树学报,2003,20(5):331-337.