

# 番茄基因工程的研究进展

张红梅<sup>1</sup>, 智庆文<sup>2</sup>, 张凤英<sup>2</sup>, 于新惠<sup>3</sup>, 刘小红<sup>4</sup>, 李润植<sup>1</sup>

(1. 山西农业大学, 太谷 030801; 2. 中国人民解放军防化指挥工程学院 北京 102205;

3. 山东淄博师范高等专科学校, 255100 4. 西华师范大学 四川南充 637002)

**摘要:** 通过基因工程的方法, 获得了抗虫、抗病、抗逆、延熟等方面的转基因番茄, 作为生物反应器许多有价值的蛋白得已表达。介绍基因工程在这些方面的研究进展。

**关键词:** 番茄; 转基因; 进展

**中图分类号:** A 188; S 641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)06-0054-03

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) 是茄科 (Solanaceae) 番茄属 (*Lycopersicon*) 的一年生或多年生植物, 是最早进行基因转化研究的高等植物之一, 其研究结果常常被借鉴用于其他作物上。番茄的基因转化技术主要采用农杆菌介导的基因转化方法, 此外, 利用花粉管导入法进行番茄的基因转化也曾有报道<sup>[1]</sup>。迄今为止, 已经获得抗病虫害、抗逆、延熟等转基因番茄, 以番茄作为生物反应器的研究也取得了很大的进展。1994 年美国 Calgene 公司开发的第一个商品化的转基因植物——耐贮番茄已进入市场, 这标志着利用基因工程进行蔬菜作物品种改良已进入实用阶段。

## 1 转基因延熟番茄的研究

番茄果实的成熟过程属于呼吸跃变型, 不耐贮藏和运输, 果实成熟后, 极易腐烂变质, 造成大量损失。目前主要通过抑制多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 的活性使果实软化; 另一方面是抑制乙烯的生成, 提高果实耐受“成熟过度”的能力。

### 1.1 抑制番茄细胞壁降解的研究

在果实的成熟过程中, 果实的软化与细胞壁的软化密切相关。有两类酶在细胞壁软化过程中起主要作用, 一类是多聚半乳糖醛酸酶 (PG), 可将细胞壁中的多聚半乳糖苷降解为低聚半乳糖苷; 另一类是果胶甲酯酶 (PE), 可将细胞壁中的果胶去甲基。它们能使细胞壁软化, 并减少果实中的可溶性固形物含量。早在 1990 年 Smith 等<sup>[2]</sup> 构建了 PG 反义基因, 在转基因果实中测得 PG 活性是对照果实的 10%, PG 蛋白含量大为减少, 表明利用反义 RNA 抑制 PG 基因的表达是一可取途径。

**第一作者简介:** 张红梅(1966-), 女, 山西省忻州市人, 副研究员, 在读博士, 研究方向生物技术育种, 承担国际、国家、省、区级研究项目 20 多项, 在国内外学术期刊上发表学术论文 30 余篇, E-mail: zhqw6988@tom.com。

**通讯作者:** 智庆文。

**基金项目:** 省科技攻关资助项目 (051005)。

**收稿日期:** 2007-03-13

叶志彪等<sup>[3]</sup> 通过对转反义 PG 基因的番茄成熟果实中 PG 活性的测定, 发现有些转基因植株 PG 酶活力比对照低 50%, 果实硬度较对照提高 22%~42%, 并且转 PG 反义基因的番茄果实还在贮存中还具有增强抗菌的能力, 运输中的破损率明显下降。

### 1.2 抑制番茄乙烯合成的研究

乙烯是番茄果实成熟的重要激素。其合成途径是 S-腺苷-L-甲硫氨酸 (SAM) 在氨基环丙烷羧酸 (ACC) 合成酶的作用下合成 ACC, 然后在乙烯形成酶 (EFE) 作用下产生乙烯。叶志彪等<sup>[4]</sup> 将乙烯形成酶 (EFE) 反义基因导入到番茄中, 创建了转基因耐贮藏番茄材料, 并结合常规育种选育出耐贮藏杂交番茄——华番 1 号, 又名“百日鲜”, 这是我国第 1 个农作物基因工程品种。Xiong 等<sup>[5]</sup> 通过不同的 RNA 抑制得到了延熟长达 120d 的番茄。Oller 等<sup>[6]</sup> 将 ACC 合成酶的基因 LE-ACC 反向插入载体后转化番茄, 乙烯合成降低了 99.5%, 延熟的果实用外源乙烯处理可以逆转。我国也获得了转 ACC 合成酶反义基因的番茄植株, 罗云波等<sup>[7]</sup> 获得的反义 ACC 转基因乙烯缺陷型番茄, 其果实和叶片中乙烯含量均降低, 呼吸强度受到抑制。仇润祥等<sup>[8]</sup> 构建了 ACC 合成酶 LE-ACC 的反义基因——核酶嵌合 DNA 的重组质粒 PREL, 转基因番茄也表现出了抑制 ACC mRNA 的表达。

## 2 转基因抗病番茄的研究

### 2.1 番茄抗病毒病基因工程

病毒病是番茄的主要病害之一, 可造成番茄的大量减产。危害番茄的病毒主要有烟草花叶病毒 (TMV)、黄瓜花叶病毒 (CMV)、黄化卷叶病毒 (TYLCV)、苜蓿花叶病毒 (AIMV) 和番茄斑萎病毒 (TSWV) 等。目前, 番茄抗病毒病基因工程主要采用转病毒外壳蛋白 (CP) 基因的方法。Abel 等<sup>[9]</sup> 首次将烟草花叶病毒 (TMV) 外壳蛋白 (CP) 基因转入烟草和番茄培育出能稳定遗传的抗病病毒植株。此后人们不断分离来源于病毒的抗性基因, 目前病毒外壳蛋白基因、卫星 RNA 基因、反义 RNA 基因等都是获得抗病番茄的候选基因。Kunik 等<sup>[10]</sup> 以 TYLCV-CP 基因转化番茄, 转化的番茄植株的 F<sub>1</sub> 代与

TYLCV 共培养时,有些植株表现出明显的抗性,western 印迹证明了外源蛋白的表达。另外,通过转 AIMV-CP 基因的番茄对 AIMV 和 CMV 都有抗性,转 TSWV 的核蛋白基因番茄对 TSWV 高抗且可遗传。田波等利用卫星 RNA 能干扰病毒这一特点,研制了卫星 RNA 生物制剂 S52,这使人们思考利用卫星 RNA 进行抗病毒基因工程研究。卫星 RNA 是依赖于病毒才能复制的一类低分子量的 RNA,它能干扰病毒的复制和使症状减轻<sup>[1]</sup>。但是由于卫星 RNA 并不能彻底抑制它的互补病毒的复制,而且减轻症状的卫星 RNA 与增强症状的卫星 RNA 只差几个核苷酸,有可能产生突变造成更严重的症状,因此有人认为利用卫星 RNA 来防治病毒病存在一定的风险,需要对卫星 RNA 进行改造才能更好的利用。此外,人们还利用其它的抗病毒基因获得了转基因番茄,姜国勇等<sup>[12]</sup>利用天然花粉蛋白基因(TCS)和 GUS 基因偶联,构建了双抗表达载体,通过农杆菌介导获得了 TCS-GUS 基因表达的再生番茄植株,转基因植株对 TMV 和 CMV 均表现出较高的抗性。有些学者在提高转基因植株的广谱抗性方面也做了一些尝试,Kaniewski 等<sup>[13]</sup>利用两个外壳蛋白基因获得对 CMV 具有广谱抗性的植株,Gubba 等<sup>[14]</sup>利用杂交的方式将转基因抗性和天然抗性组合在同一植株中,获得了对番茄斑萎病毒(TSWV)的广谱抗性。

## 2.2 番茄抗真菌及细菌病基因工程

几丁质和 $\beta$ -1,3 葡聚糖是许多真菌细胞壁的主要成分,几丁质酶和 $\beta$ -1,3 葡聚糖酶可以分别催化其降解,导致真菌生长受阻。依据上述原理,获得的转基因番茄能显著提高植株对尖镰孢菌的抗性,但仅表达其中一种基因的番茄植株却不抗尖镰孢菌,并且用这种方法培育出的番茄对早疫病和枯萎病也有良好的防治效果。已知 1,2-二苯乙烯是介导植物抵抗病原体的物质,Thomzik 等<sup>[15]</sup>将来源于葡萄的两个合成 1,2-二苯乙烯的酶基因 Vst1 和 Vst2 导入番茄中,之后再与晚疫病真菌共培养,结果在番茄植株体内产生了 1,2-二苯乙烯的后继产物,植保素—反式白梨芦醇,这种番茄植株能抗晚疫病。由于这两种酶可分解真菌的细胞壁而抑制真菌的生长,所以用这种方法在多种植物中对多种真菌病都有防治效果。在抗病番茄基因工程的研究中,也做了一些抗细菌番茄的研究工作。Ronald 等<sup>[16]</sup>克隆出抗细菌斑点病的 pto 基因,该基因编码的产物是色氨酸/苏氨酸激酶型的蛋白质,可与该菌非毒性基因产物作用,转 pto 基因的番茄植株能抗细菌斑点病。

## 3 番茄抗虫基因工程

目前用于提高植物抗虫性的基因主要有两类:一类来源于苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 $\delta$ 内毒素基因,简称 Bt 基因。另一类来源于一些高等植物蛋白酶抑制因子基因,简称 PI 基因。最早是美国 Monsanto 公司的研究人员 1987 年报道的将 Bt, Kurstaki HD2B 缺失的 CryIAd 导入番茄,转基因植株对多种害虫显示出了不同程度的抗性。Perlakt 等<sup>[17]</sup>用改造的 Bt 杀虫蛋

白 PM-CryIAZ (b)基因(减少了野生型 Bt 晶体蛋白基因 A+T 含量,增加了 G+C 含量)转化番茄,结果转 PM-CryIAZ (b)工程番茄比转野生型 CryI2AZ (b)基因的番茄 Bt 晶体蛋白量提高了 10 倍。Vander 等<sup>[18]</sup>将修饰的毒蛋白基因 CryIA (b)和 CryIC 转入番茄中,从而产生对甜菜夜蛾、烟草夜蛾的抗性。Rhim 等<sup>[19]</sup>将毒蛋白基因和能与内毒素抗体发生交叉反应的一种蛋白质的基因整合后转化番茄,转化植株能抗马铃薯甲虫的幼虫。我国学者梁小友<sup>[20]</sup>将抗病毒的 CMV-CP 基因和抗虫的 Bt-toxin 基因依次插入植物表达载体上,以土壤农杆菌介导转化番茄,并得到表达。

以上转化所得到的毒素仅对鳞翅目昆虫有特异性毒害,对其它昆虫效果不明显,且昆虫也能对其产生抗性。因而有些实验室正致力于损伤性 PI 诱导基因的研究,尤其是豇豆胰蛋白酶诱导因子。通过导入植物凝集素基因创造番茄抗同翅目害虫(如蚜虫)育种材料的研究也正在进行之中。由于植物凝集素的主要生理功能及其潜在的抗虫作用仍需进一步证实,因而其应用相对较少。吴昌银等<sup>[21]</sup>通过根癌农杆菌,采用叶盘法将雪花莲外源凝集素基因导入番茄,获得了含 GNA 基因的 43 株转化植株,抗蚜虫试验证明,转基因番茄具有一定的抗蚜虫能力,同时证明了外源基因在后代中可以稳定遗传。

## 4 番茄抗逆基因工程

通过基因工程方法提高番茄对环境适应性的研究也取得了可喜进展。陈礼仁等<sup>[22]</sup>将 ACC 反义基因转入番茄后,转基因番茄植株的耐热性比对照明显增强,在高温的夏季,其挂果率由原来的 31.0% 提高到 67.5%。Hightower<sup>[23]</sup>从北冰洋的比目鱼中分离出的抗冻蛋白基因转入番茄,培育出了耐寒的番茄品种。傅桂荣等<sup>[24]</sup>利用美拟蝶抗冻蛋白(AFP)转化番茄,其转基因番茄当代及子代经低温处理后,发现转基因致死温度与对照比较明显降低 1℃~2℃,说明转 AFP 基因番茄抗寒力增强。Zhang 等<sup>[25]</sup>在番茄植株中超量表达液泡  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  反向转运蛋白,结果转基因番茄能在 200mM 的 NaCl 高盐溶液中生长、开花并结果。Rus 等<sup>[26]</sup>的实验也证实了转 HAL1 基因材料可以减轻高盐对番茄的危害。Moghaieb 等<sup>[27]</sup>将从高粱中分离的 BADH1 基因转入番茄植株,结果表明甜菜碱在转基因根毛中积累有利于维持细胞的渗透势。王淑芳等<sup>[28]</sup>采用 PCR 方法从 *E. coli* TG1 菌株中扩增得到胆碱脱氢酶(choline dehydrogenase, CDH) 基因(betA),转化番茄获得的植株的耐盐性明显高于对照番茄。Hsieh 等<sup>[29]</sup>证实将拟南芥 C 重复/脱氢反应结合因子 1(CBF1)基因转入番茄,结果比野生类型具有更强的抗旱性。在进一步的实验中, Lee 等<sup>[31]</sup>利用 CaMV35S 启动子在番茄中表达拟南芥的 CBF1 基因,在逆境条件下,可提高植株对冷害、干旱及盐胁迫的适应。

## 5 番茄作为生物反应器

利用番茄作为生物反应器生产植物疫苗、医药成分等正成为番茄基因工程研究的一个热点。北京大学陈

溪和林忠平<sup>[31]</sup>利用转基因番茄生产人胰岛素,研究以口服方式摄入胰岛素在抑制自身免疫攻击以及预防I型糖尿病中所起到的作用已经取得了很大的进展。王跃驹等<sup>[32]</sup>将乙型肝炎病毒的表面抗原基因导入番茄,成功获得了转基因抗乙肝番茄,将该转基因番茄饲喂给小白鼠,使小白鼠获得了对乙肝的免疫能力。经过更深入的研究,相信在不久的将来口服一定量的该转基因番茄,人体即可通过免疫反应获得对乙肝病毒的抗体。李轶女等<sup>[33]</sup>采用PCR方法克隆了丙型肝炎病毒非结构蛋白NS3基因片段及核心抗原CE基因片段,构建含有融合抗原基因NS3/CE的植物表达载体,获得表达HCV抗原基因的转基因番茄。王仁厚等<sup>[34]</sup>用转基因番茄表达人酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)获得成功。

## 6 番茄基因工程展望

番茄基因工程研究与生产转化正蓬勃开展,已经创造了许多新的基因型,显示了基因工程在蔬菜品种改良应用中的广阔前景。目前,番茄的基因转化研究已由单一性状向多性状转化,并且向生产医药保健品的方向发展。我国国家基因工程中心已获得高抗TMV、CMV、马铃薯×病毒和抗早疫病、晚疫病二种真菌病害的番茄。随着植物基因工程的发展,番茄可望用于生产异源蛋白,如疫苗、酶、单抗、激素等。分子标记技术的发展促进了多种生物物种基因的定位与克隆工作,为有目的地寻找和发掘番茄内外源基因工作奠定了基础。随着转基因技术的深入发展和转基因植物的安全性进一步得到保障,番茄基因转化必将更好地弥补传统育种方法的不足。

### 参考文献

- [1] 黄永芬,汪清胤,傅桂荣等.美洲拟蝶抗冻蛋白基因(AFP)导入番茄的研究[J].中国生物化学与分子生物学学报,1997,13(4):418-422.
- [2] Smith CJ, Watson CF, Morris PC, et al. Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase gene in transgenic tomatoes[J]. PMB, 1990, 14(3): 369-379.
- [3] 叶志彪,李汉霞,郑用琰等.反义ACC氧化酶基因的导入对番茄乙烯生成的抑制作用[J].华中农业大学学报,1996(4):305-309.
- [4] 叶志彪,李汉霞,刘勋甲.等.利用转基因技术育成耐贮藏番茄——华番1号[J].中国蔬菜,1999,(1):10-14.
- [5] Xiong AS, Yao QH, Peng RH, et al. Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato[J]. Plant Cell Rep, 2005, 23(9): 639-46.
- [6] Oeller PW, Lu MW, Taylor TP, et al. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA[J]. Science, 1991, 254(5030): 437-439.
- [7] 罗云波,生活萍,申琳.番茄中反义ACC合成酶基因的导入与乙烯生物合成的控制[J].农业生物技术学报,1995,3(2):38-44.
- [8] 仇润祥,唐延茂,王永胜等.番茄1-氨基环内烷羧酸(ACC)合成酶的反义RNA-核酶嵌合DNA序列的构建[J].遗传,1999,21(2):1-6.
- [9] Abel PR, Nelson RS, De B, et al. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene[J]. Science, 1986, 232(4751): 738-743.
- [10] Kunik T, Salomon R, Zamir D, et al. Transgenic tomato plants expressing the tomato yellow leaf curl virus capsid protein are resistant to the virus[J]. Biotechnology (N Y), 1994, 12(5): 500-504.
- [11] 王傲雪,李景富.转基因番茄的机理及现状[J].辽宁农业科学,1998,6:37-40.
- [12] 姜国勇,金德敏,翁曼丽等.天花粉蛋白基因转化番茄的研究[J].植物学报,1999,41(3):334-336.

- [13] Kaniewski W, Ilardi V, Tomassoli L, et al. Extreme resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins[J]. Mol. Breeding, 1999, 5(2): 111-119.
- [14] Gubba A, Gorsalves C, Stevens MR, et al. Combining transgenic and natural resistance to obtain broad resistance to tospovirus infection in tomato (Lycopersicon esculentum mill)[J]. Mol Breeding, 2002, 9(1): 13-23.
- [15] Thomzik JZ, Stenzel K, Stocker R. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomato conditions resistance against phytophthora infestans[J]. Physiol Mol. Plant Pathol., 1997, 51(4): 265-270.
- [16] Ronald PG, Salmeron JM, Carland FM, et al. The cloned avirulence gene *avrPto* induces disease resistance in tomato cultivars containing the *Pto* resistance gene[J]. J Bacteriol, 1992, 174(5): 1604-1611.
- [17] Perlak FJ, Fuchs RL, Dean DA, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88(8): 3324-3328.
- [18] Vander ST, Bosch D, Honee G, et al. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* CryIA (b) and CryIC-genes; a resistance management strategy[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(1): 51-59.
- [19] Rhim SL, Cho HJ, Kim BD, et al. Development of insect resistance in tomato plants expression the  $\delta$ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* subsp. *Tenebrionis*. Mol Breed, 1995, 1(3): 229-236.
- [20] 梁小友,米景九,朱玉贤等.双抗(抗病毒及抗虫)植物表达载体的构建及番茄的转化鉴定[J].植物学报,1994,36(11):849-854.
- [21] 吴昌银,叶志彪,李汉霞等.雪花莲外源凝集素基因转化番茄[J].植物学报,2000,7:61-65.
- [22] 陈礼仁,陈惠勤,李道远. ACC反义基因导入番茄引起的性状变异[J].广西农业科学,1999,(3):7-9.
- [23] Hightower RC, Baden C, Penzes E, et al. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants[J]. PMB, 1991, 17(5): 103-1021.
- [24] 傅桂荣,田艳艳,陈瑛.转美洲拟蝶抗冻蛋白基因(AFP)番茄致死温度测定及其在生态学上预测[J].北方园艺,1998(2):5-6.
- [25] Zhang HX, Blumwald E. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(8): 765-768.
- [26] Rus AM, Estan MT, Gisbert C, et al. Expressing the yeast HAL1 gene in tomato increases fruit yield and enhances K<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> selectivity under salt stress[J]. Plant Cell and Environment, 2001, 24(8): 875-880.
- [27] Moghaieb RE, Tanaka N, Saneoka H, et al. Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene in transgenic tomato hairy roots leads to the accumulation of glycine betaine and contributes to the maintenance of the osmotic potential under salt stress[J]. Soil Science Plant Nutrition, 2000, 46(4): 873-883.
- [28] 王淑芳,王峻岭,赵彦修等.胆碱脱氢酶基因的转化及转基因番茄耐盐性的鉴定[J].植物生理学报,2001,27(3):248-252.
- [29] Hsieh TH, Lee JT, Chang YY, et al. Tomato plants ectopically expressing Arabidopsis CBF show enhanced resistance to water deficit stress[J]. Plant Physiology, 2002, 130(2): 618-626.
- [30] Lee JT, Prasad V, Yang PT, et al. Expression of Arabidopsis CBF regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield[J]. Plant Cell and Environment, 2003, 26(7): 1181-1190.
- [31] 陈溪,林忠平.用转基因番茄生产人胰岛素的研究[J].分子植物育种,2003,1(4):81-83.
- [32] 王跃驹,李刚强,刘德虎.利用转基因植物生产新型疫苗[J].高技术通讯,1997,(12):57-60.
- [33] 李轶女,张中林,苏宁等.丙型肝炎病毒融合抗原基因NS3CE对番茄的遗传转化[J].作物学报,2003,29(3):360-363.
- [34] 王仁厚,王兴智.转基因番茄表达人酸性成纤维细胞生长因子(aFGF)[J].分子植物育种,2003,1(3):425-426.