

黄锡志¹, 寿森炎², 廖乾生

转基因番茄研究进展

摘要:概述基因工程在番茄抗病毒、抗病虫害、抗除草剂、提高耐贮藏性、抗寒性、改善风味品质和育性等遗传改良的应用。展示利用基因工程进行番茄品种改良的广阔前景。

关键词:番茄; 基因工程; 遗传改良

中图分类号: S641. 203. 6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2001)03—0029—03

番茄作为一种蔬菜作物, 在基因工程拓宽种质资源上得到了极大的发展。一方面是因为它栽培广泛, 另一方面是它在遗传理论上研究较为深入, 为基因工程的拓宽研究打下坚实的基础。迄今为止, 利用基因工程进行番茄品种特性改良的研究取得了很大进展, 已经获得抗病毒、抗病虫害、抗除草剂、抗冻、延长贮藏期、改善风味和雄性不育转基因番茄, 而且第一个商品化的转基因植物——耐贮存番茄进入消费者家庭。这标志着利用基因工程进行蔬菜作物品种改良已经进入实用阶段。

1 抗病毒转基因番茄

病毒是番茄的主要病害之一, 每年造成番茄的大量减产。现在防病毒主要有以下几种方法: (1)通过栽培管理方法防治病毒, 但农药价格高, 而且危害生态环境, 另外要创造病毒不能发病的条件不仅困难, 而且对植物不利; (2)通过常规育种育成抗病毒品种。根据基因对基因学说, 病毒要不断分化出新的株系, 又要育成新的品种来抗病毒, 而且周期长, 难度大; (3)通过病毒交叉保护原理来得到植株, 即基因工程创造新种质^[1]。

1986年 powell 通过植物基因工程技术, 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毒植株。其 CP 表达量为叶片总蛋白量的 0.02%~0.05%, 大田试验保护效果显著。对照番茄减产 26%~35%, 而转基因番茄基本上不受影响。此后人们不断分离出来源于病毒的抗性基因, 寻找其他方法获得抗病毒基因工程植株。目前在番茄上主要采用外壳蛋白 CP 基因、卫星 RNA、反义 RNA 抗病毒的基因工程番茄。1988年 Nelson 将 TMV 基因的 CP 基因连于 p^{TM-3196}载体上转入根癌农杆菌中, 转化番茄品种 VF36 的子叶和叶片, 获得的转基因番茄中 CP 含量占叶片可提取蛋白量的 0.05%。大田试验接种 TMV 后呈系统感染的植株不到 5%。而对照达 99%。1995年杨荣昌等^[2]用农杆菌介导法获得了 42 株转 CMV—CP 基因工程植株。通过对转基因番茄 R₁—R₄ 代苗期人工接种 CMV 鉴定, 表现出对该病毒有一定的抗性, 发病率和病情指数明显降低。1994年徐香玲^[3]等人用农杆菌介导法获得双抗 CMV、TMV—CP 基因工程植株, 进行攻毒实验, 其转基因植株发病率明显低于对照植株。1994年 kim 等^[4]通过农杆菌介导转移番茄斑萎病毒(TSMV)核壳衣壳 N 蛋白基因技术获得了对该病毒抗性水平达中抗到高抗的转基因植株。1987年 Nilgun 将苜蓿花叶病毒外壳蛋白(AMV—CP)基因导入番茄, 其转基因植株接种 AMV 后发病推迟, 病情减轻, 叶片中 CP 含量占叶片可提取蛋白总量的 0.1%~0.8%, 并对 TMV 也有一定的抗性。

卫星 RNA 是一类依赖于病毒才能复制的一类低分子量, RNA 它的碱基序列与病毒无同源性, 但却能干扰病毒的复制和使症状减轻。1983年田波^[4]等从卫星 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。1990年赵淑珍^[4]利用 CMV 卫星 RNA 的 cDNA 单体基因转化番茄症状减轻, 田间试验也表现对 CMV 的抗性。此外, 人们还利用其他抗病毒基因获得了转基因番茄。1998年姜国勇等^[5]利用天花粉蛋白基因(TCS)和 GUS 基因偶联通过农杆菌介导, 获得了 TCS—GUS 基因双双表达的再生植株, 转基因植株对 TMV 和 CMV 均表现出较高的抗性, 但实际上, 转基因植株的抗性随着时间的推移会发生什么反应及其后代的抗性表现还有待研究。

2 番茄的抗虫基因工程

目前发现并应用于提高植物抗虫性的基因有以下几类: 一类来源于苏云金芽孢

收稿日期: 2001—02—12

杆菌的 Bt 毒素蛋白基因和豇豆胰蛋白酶抑制基因 (Cowpea Trypsin Inhibitor, CPTI), 雪莲花的凝集素 (Lectin) 基因也有报道。Bt 基因是一种特异性杀虫基因, 其主要杀鳞翅目昆虫。而 CPTI 基因则是一种广谱性杀虫基因, 其清蛋白具有杀虫能力^[6]。

1987 年美国 Monsanto 公司 Fishhoff 等将 Bt. var karstaki 的 CryIA(b)3' 一端切去, 将 Bt 基因导入番茄 VF36 获得转基因植株, 并且对鳞翅目幼虫有抗性, 且属于孟德尔基因显性遗传。梁小友^[7]将抗病毒的 CMV-CP 基因和抗虫的 Bt-toxin 基因依次插入到植物的表达载体上, 以土壤农杆菌介导转化番茄, 并证明得到表达。为进行抗病、抗虫等综合抗性植物基因工程及其他多功能植物基因工程展开美好前景。

3 番茄的抗除草工程

近年来, 除草剂的广泛应用, 抗除草剂转基因农作物转基因作物逐步活跃起来, 但是很多除草剂, 如草甘膦 (Glyphosate)、绿黄隆 (Chlorsulfuron)、普斯特 (Imazapyr)、草丁膦 (Phosphinothricin)、溴苯腈 (Bromoxynil) 和阿特拉津 (Atrazine), 属于广谱性除草剂, 除草剂只能在苗前使用, 除了研究选择性除草剂及应用方法外, 抗除草剂品种无疑是一个有效手段^[8]。

5-烯醇丙酮酸莽草酸-3-磷酸合成酶是莽草酸代谢途径的关键酶, 草甘膦能特异抑制该酶的特性, 抑制光合作用, 阻断芳香族氨基酸的合成, 并最终导致植株的死亡。Fillatti 等将 aroA 突变基因(为鼠伤寒沙门氏菌的基因, 编码 EPSP)经农杆菌转入番茄, 获得了抗草甘膦的转基因植株。实验结果表明转基因植株及后代可耐受浓度为 0.84kg/hm² (公斤/公顷) 的草甘膦。1987 年 De Block 等将源于潮湿链霉菌, 编码谷氨酰氨合成酶抑制 PAT (Phosphinothricin acetyltransferase, PPT 乙酰转移酶) 的基因 bar 由农杆菌转入番茄。由于 PAT 可以将有毒的除草剂 PPT 转化为非毒性的乙酰化形式, 使转基因植株能有效地抗除草剂 PPT。实验证明, 对照植株用 2L/hm² (升/公顷) 的 PPT 喷洒后 10d (天) 即死亡, 而转基因植株使用浓度达到 20L/hm² (升/公顷) 仍能正常生长。

4 延迟成熟与贮藏的转基因番茄

植物激素乙烯对衰老起重要作用。在生化过程中, 乙烯按以下途径合成。首先由 SAM (S-腺苷-L-甲硫氨酸) 在 ACC 合成酶的作用下合成 ACC, 然后 ACC 在氧化酶的作用下分解出乙烯。而这两种酶被大的基因家族所编码。这样如果用 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的反义 RNA 表达就会延迟成熟。1991 年 Paul 等将氨基环丙烷羧酸 (ACC) 合成酶的一个 cDNA 反义系统导入番茄, 转基因植株乙烯合成严重受阻。在表达反义 RNA 的纯合果实中乙烯被抑制达 99%, 这种果实在空气中放置不能正常成熟, 不出现呼吸跃变高峰, 番茄红素的积累也受抑制, 果实不变软。只有在通过外源乙烯或丙烯处理, 果

实才能成熟变软, 表现出正常果实的颜色和风味。但由于来源不同植物体 ACC 基因合成酶基因核苷酸序列的差异, 番茄来源的 ACC 合成酶反义基因能否在其他植物体内起作用, 目前还不能得出肯定的结论。叶志彪等^[9]用 ACC 氧化酶反义基因转化番茄, 育成了一个名为华番一号的耐贮藏番茄杂交种, 并通过国家性评估。

另外, 细胞壁水解酶对果实成熟有促进作用, 成熟的番茄果实中 PG 受发育调节重新合成。阻止细胞壁水解酶的活性, 可抑制果实的成熟与衰老。1988 年 Smith 构建了 PG 反义基因, 以 CaMV 35S 为启动子, Nos 为终止子, 组装到双元载体 Bin19 上后, 经农杆菌导入番茄, 在转基因果实中测得 PG 活性为对照果实的 10%, PG 蛋白含量很少, 表明反义 RNA 在抑制 PG 活性上是很成功的。在基因番茄自交子代的果实中测得 PG 活性被抑制达 99%, PG 活性的下降有效地阻止了细胞壁上果胶的降解。而且反义 RAN 只能专一地抑制 PG 活性, 对番茄果实成熟的其他指标如乙烯产生、番茄红素积累, 软化酶活性都没有影响。

据报道, 1994 年 4 月美国加利福尼亚基因公司将反义 PG cDNA 导入番茄中, 育成了名为 Flavr Savr 的耐贮藏番茄已通过美国食品和药物管理局的安全检测, 并开始在美国加州和伊利诺斯州的超级市场出售, 成为转基因植株商品化的首例。

5 抗霜冻转基因番茄

受冻组织死亡往往是由于霜冻条件下受冻部位体内产生冰晶, 冰晶不断增大, 撕裂液泡膜, 挤压伤害其他细胞器及其膜系统和细胞膜, 最终导致细胞的死亡。研究发现某些极地生物体内含有一些特殊蛋白, 在含量很低的条件能抑制冰晶的增长, 使生物体免遭致病的伤害。1991 年 Hightower 通过农杆菌介导将比目鱼体内的抗冻蛋白 (AFP) 基因转入番茄, 不但稳定转录 AFP 的 mRNA, 还能产生一种新的蛋白质, 这种转基因番茄的组织提取液在冰冻条件下能有效阻止冰晶的增长。转基因植株经温室鉴定, 抗冻能力明显提高。这是首例由基因工程提高番茄抗逆性的成功报道。傅桂荣^[10]利用美拟鲈抗冻蛋白 (AFP) 转入番茄, 其转基因番茄及子代番茄与对照经低温处理后, 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, 为北方提早育苗、定植、提早上市提供条件, 具有明显的经济效益。

6 番茄品质改良基因工程

过去, 许多育种家希望通过传统方法提高果实含糖量, 但是由于碳代谢的复杂性和缺少基因型的多样性, 使该方法很难取得突破。Penarrubia 从锡兰莓 (Discorea phyllum Cumminsill) 提取了一种特殊甜蛋白 Monellin, 比蔗糖甜 100000 倍 (摩尔数比)。至于这种甜蛋白的甜味机理还不十分清楚。这种蛋白质在自然条件下以二聚体形式存在, 极易变性, 变性后甜味消失。Penarrubia 根据

其氨基酸顺序、空间构象构建了具有同样生物效能但很稳定的甜蛋白基因,置于结构基因和控制成熟的特异性启动子 E8 之间,经农杆菌导入番茄。实验证明只有成熟度在 50% 以上的果实中才可检测到 Monellin 的 mRNA,而在不成熟果实、番茄叶片和未转基因果实中检测不到,外源乙烯的施用会增强 Monellin 的表达。研究表明只有 Monellin 含量占番茄果实蛋白质含量的 1%,其增加甜味的作用才明显。

1995 年 Chetelat 等^[13]利用分子标记辅助选择将在 *L. chmielewskii* 中发现的一种酸性蔗糖缺失基因(sucr)导入到普通的番茄中,明显提高了果实中可溶性固形物含量、可滴定酸度和番茄酱的产出率。1996 年 Klann 将 T₁V₁(Antisense acid invertase)基因经农杆菌导入番茄后,发现转基因植株中可溶性糖含量比未转化的增加,但是其果实大小有所下降。

7 雄性不育性转基因番茄

对于自花授粉作物,利用雄性不育系配制杂种种子是最为有效的方法。但自然发现的不育系和恢复系的选育和转育都十分困难,且周期长,效率低。近年来,随着雄性不育学和细胞学研究的不断深入,发现绒毡层发育异常可导致花粉败育,Mcclure 的实验,发现绒毡层核酸酶(RNase)基因的启动和表达可使 RNA 降解,花粉不能正常发育。据此,Mariani 将 P^{TA29}特异启动子与 Rnasea 基因 barnase 连接导入番茄,培育出雄性不育的工程植株,为番茄杂交制种提供了方便。

8 其他方面进展

最近通过转基因创造抗真菌病害的番茄材料的研究引起人们的注意。Jongedijk 等将烟草的几丁质和葡聚糖酶(β -1, 3-glucanase)基因同时转入番茄中,发现这两个具有较强的协同抑制枯萎病的作用,其病情指数较对照降低了 36%~58%。Thomzik 等则将两个葡萄的 1, 2-苯乙烯基因转入番茄中,提高了番茄的抗晚疫病的能力。另外,人们利用基因工程也创造出了一些单性结实材料,其在低温下具有较强的座果能力,如 Carmi 等将 rolB 基因连接在子房特异性表达的启动子 TPRP-F1 上,得到了营养生长和果实大小都很正常的单性结实材料 MPB12 和 MPB13。此外在番茄耐盐转基因研究上也取得了一些进展,Dessalegene 等将草酸氧化酶基因导入番茄中,经过耐盐筛选后得到的转基因番茄在盐逆境条件下产量明显高于对照。1999 年张赛群等^[1]通过根癌农杆菌将特异启动子 P_{SAG12}与异戊烯基转移酶(Isoentenyltransferase, ipt)基因构建的嵌合基因 P_{SAG12}-ipt 对 5 个番茄品种进行遗传转化获得的植株在田间表现出生长旺盛及抗叶片衰老的特性。

综上所述,番茄基因工程的发展,创造了许多基因型,显示了基因工程在蔬菜品种改良应用的广阔前景。但是目前进行基因转移研究主要集中在单基因控制的质量性状上,而对产量有关的多基因数量性状无能为力,且

提供的基因不多,植物再生技术也存在许多难关都局限着转基因技术的推广应用。虽然目前人们对崭新的基因工程技术还存有疑虑,但是随着分子生物学各个领域的研究发展,基因工程植株的商品化,转基因工程会越来越显示其超凡潜力,并预示着其美好前景。

参考文献

- [1] 李平. 植物病毒株系间交互和遗传工程保护[J]. 生物技术进展, 1995, 15(6): 28~32.
 - [2] 杨荣昌. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄及其对 CMV 的抗性[J]. 江苏农业学报, 1995, 11(1): 40~44.
 - [3] 徐香玲. 利用发根农杆菌介导二元载体向番茄导入 TMV、CMV 外壳蛋白的研究[J]. 植物研究, 1994, 14(4): 416~423.
 - [4] 康俊根. 植物抗病毒基因工程研究进展[J]. 生物技术, 1997, 7(2): 4~7.
 - [5] 姜国勇. 天花粉蛋白转化番茄的研究[J]. 植物学报, 1994, 41(3): 334~336.
 - [6] 周长久. 现代蔬菜育种学[M]. 科学技术文献出版社, 1996.
 - [7] 梁小友. 双抗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.
 - [8] 黄大年. 农作物除草剂工程研究进展[J]. 生物工程进展, 1997, 17(5): 14~17.
 - [9] 叶志彪. ACC 氧化酶反义基因对番茄乙烯的抑制作用.[J] 华中农业学报, 1996, 15(4): 384~388.
 - [10] 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.
 - [11] 张赛群. 异戊烯基转移酶基因导入番茄及转基因植株再生[J]. 园艺学报, 1999, 26(6): 376~379.
 - [12] Nelson, Rse et al Virus tolerance, plant growth, and field performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tomato mosaic virus. Biotechnology, 1998(6): 403~409.
 - [13] Chetelat RT, DevemaJw, Bennett AB, et al. chmielewskii sucrose accumulator gene (sucr) on fruit yield and quality parameters following introgression into tomato. Theor. Appl. Genet. 1995, 91: 334~339.
- (1. 浙江大学园艺系; 2. 浙江大学生物技术研究所, 310029)



第一作者简介: 黄锺志 1975 年生, 浙江大学园艺系 99 级硕士研究生, 研究方向为蔬菜生理生化。目前正参加“异地芦笋栽培品种品质研究”课题研究。参与过“生物肥料在蔬菜作物上的应用”、“高效园艺设施栽培”等课题的研究。