

中图分类号: S63; S603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2004)01-0004-03

蔬菜转基因研究进展

熊¹ 先¹ 军¹, 杨¹ 丽¹ 梅¹, 刘¹ 明¹ 月¹, 方¹ 智¹ 远¹

自 1984 年报道获得第一例完整转基因植株以来^[1], 随着分子生物学技术的不断完善, 植物的转基因研究发展很快, 特别是蔬菜的转基因研究, 为蔬菜的育种、病虫害防治及品种改良做出了巨大的贡献。除了美国的转基因番茄 Flavr Savr 外, 国外已经批准上市的转基因蔬菜还有延熟番茄、抗甲虫马铃薯、抗病毒病的南瓜和西葫芦等^[2], 我国也于 1996 年批准了第一个转基因延熟番茄商品化^[3], 后来还有北京大学的转基因抗黄瓜花叶病毒的番茄和甜椒也被批准在辽宁省进行商业化生产^[4]。到目前为止已进行转基因研究的蔬菜有番茄、茄子、辣椒、马铃薯、黄瓜、南瓜、西瓜、甜瓜、西葫芦、胡萝卜、甘蓝、花椰菜、大白菜、生菜、菠菜、茴香、豌豆、石刁柏、芥菜、洋葱、小白菜等。本文就近几年来蔬菜转基因研究所取得的成果做一综述。

1 蔬菜转基因研究及应用的新进展

1.1 蔬菜抗病转基因研究

1.1.1 转抗病毒病基因 病毒病是蔬菜的主要病害之一, 严重影响蔬菜作物的产量和品质, 目前生产上尚无有效的防治方法, 因此这也是蔬菜转基因研究最多的领域之一。目前能使植物产生抗病性的基因有很多, 在蔬菜上用的最多的是病毒的外壳蛋白(CP)基因^[5]。美国

1995 年批准上市的转基因抗病毒南瓜“Freedom II”和北京大学研究成功的转基因抗黄瓜花叶病毒(CMV)的番茄“8805R”和甜椒“双丰 R”都是通过转入 CP 基因获得的^[6]。近几年来, 在蔬菜上通过转入 CP 基因获得抗病毒病植株的例子很多, 如朱常香等^[6]利用农杆菌介导法将芜菁花叶病毒的 CP 基因(TuMV-CP)导入大白菜栽培品种“福山大包头”, 获得的转基因植株具有明显的抗病毒侵染能力, 且能保持其原有的优良品质。王慧中等^[7]利用西瓜组织培养和农杆菌转化技术把西瓜花叶病毒一号(WMV-I) CP 基因导入西瓜, 获得转基因植株。毕玉平等^[8]构建了 TMV CP 和 CMV CP 双价质粒载体, 通过农杆菌介导的转化法转化辣椒栽培品种农大 40 及湘研 1 号, 获得了对 TMV 和 CMV 同时表现免疫的辣椒植株。

此外, 利用反义 RNA 基因、卫星 RNA 及一些其他来源的抗病毒基因也得到了较快的发展, 如姜国勇等^[9,13]利用天花粉蛋白基因(TCS)和 GUS 基因偶联通过农杆菌介导导入番茄, 获得了 TCS-GUS 基因双表达的再生植株, 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变化及其后代的抗性还有待研究。

1.1.2 转抗真菌病基因 植物本身对病原的侵染能够主动形成一种过敏反应, 这被认为是自然界中植物抵抗病原侵染的最有效的形式, 而通过基因工程手段探索利用过敏反应防治植物病害的途径是一种新的尝试。李汝刚等^[10]利用农杆菌介导法将从苹果火疫病细菌(*Erwinia amylovora*)中发现的一个能诱导细胞过敏性坏死的膜蛋白(Harpin)的基因 hrpH 转入马铃薯中, 获得了高抗晚疫病的转基因植株, 证明了遗传操作植物过敏反应是一个良好的抗病途径。

1.1.3 转抗细菌病基因 目前, 在抗细菌病害的转基因研究中, 主要是通过转入抗菌肽来抑制细菌的活动。田长恩等^[11]利用花粉管通道法将柞蚕抗菌肽 D 基因导入番茄, 获得的部分转基因植株的子一代具有较强的抗青枯病能力。

1.2 蔬菜抗虫转基因研究

在蔬菜抗虫基因工程中应用的较多的主要有来源于细菌的 Bt 杀虫晶体蛋白基因和来源于植物的蛋白酶抑制剂(PI)基因以及植物凝集素基因等。目前, 这些抗虫基因已被转入到多种蔬菜作物中表达(见表)。

1.2.1 转 Bt 杀虫晶体蛋白基因 Bt 基因编码的杀虫晶体蛋白对鳞翅目昆虫具有很强的毒杀能力, 也是在基因工程应用中最多的一类抗虫基因, 目前已商品化的转基因抗虫作物如棉花、玉米和马铃薯都是通过转 Bt 基因获得的。在蔬菜上已经获得转 Bt 基因抗虫植株的例子也有很多, 除了上述的马铃薯外还有番茄、茄子、辣椒、甘蓝等十几种蔬菜作物^[12]。转 Bt 基因蔬菜在生产上已经展现出了良好的应用前景, 但也还存在一些问题, 如 Bt 杀虫晶体蛋白在转基因植株中的表达量过低, 不能对害虫产生有效的毒杀作用, 针对这一问题我们可通过对 Bt 杀虫晶体蛋白编码基因进行修饰以提高其在植物中的表达量, 如 Perlak 等^[13]将野生型和修饰过的 Bt 基因转入马铃薯, 转化植株对红斑卡属马铃薯甲虫各期虫态均有抗性, 而且他们还证实了修饰过的 Bt 基因表达及抗性均高于野生型基因。Vander 等^[14]将经过修饰的毒蛋白基因 CryIA(b)和 CryIC 转入番茄中, 从而产生对甜菜夜蛾、烟芽夜蛾和烟草天蛾的抗性。此外, Bt 杀虫晶体蛋白的杀虫谱窄, 通常是一种杀虫晶体蛋白只抗一种或两种害虫, 我们可采用两个以上不同的对昆虫无交互性的 Bt 杀虫晶体蛋白基因转化植物, 或与抗虫谱广的杀虫蛋白(如蛋白酶抑制剂)等组合, 同时或分别导入同一受体植物内以扩大其抗虫的范围^[12]。

已获得转基因抗虫植株的蔬菜表

抗虫基因	蔬菜种类
Bt 基因	番茄 ¹ 、茄子 ¹ 、辣椒、芹菜、芥菜、莴苣、白菜 ¹ 、花椰菜 ¹ 、卷心菜、茼蒿、胡萝卜、豌豆、豇豆、鹰嘴豆、石刁柏、黄瓜、甜瓜、马铃薯 ²
蛋白酶抑制剂基因	马铃薯、番茄、甘蓝、花椰菜、小白菜、甘薯、甜椒、龙葵、莴苣
植物凝集素基因	番茄、马铃薯、莴苣、小白菜

注: 1. 已进入田间实验阶段; 2. 已商品化

1.2.2 转蛋白酶抑制剂基因 目前适用于基因工程的除 Bt 杀虫晶体蛋白基因外, 首选的一种就是蛋白酶抑制剂基因。蛋白酶抑制剂之所以在抗虫研究中占有突出地位, 原因有几点: 首先, 它作用于昆虫消化酶的活性部位, 而此处是酶的最保守部位, 产生突变的可能性小, 基本排除了昆虫通过突变产

* 国家自然科学基金项目(30370938)

收稿日期: 2003-10-22

生抗性的可能。第二,蛋白酶抑制剂的抗虫谱广泛。第三,蛋白酶抑制剂大多来源于植物,对人及哺乳动物无害。第四,蛋白酶抑制剂是单基因决定的,易于对其进行基因克隆^[19]。基于此,近年来蔬菜抗虫基因工程的研究主要集中在蛋白酶抑制剂基因的转化上,如杨广东等^[17]将修饰的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(sck)导入甜椒杂交种“中椒5号”和常规种“茄门”中获得的转基因植株对棉铃虫有一定的抗性。余建民等^[18]应用农杆菌介导法将含有豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(CPTI)和新霉素磷酸转移酶基因(NPTII)的重组质粒导入结球甘蓝,获得了抗虫性的转基因植株,之后余建民等^[19]又将该重组质粒导入不结球白菜,获得具有卡那霉素抗性的再生植株,而且其抗虫基因通过有性繁殖遗传给后代。此外,通过转蛋白酶抑制剂获得转基因植株的还有转慈姑蛋白酶抑制剂基因的小白菜^[20],转豇豆胰蛋白酶抑制剂CPTI的马铃薯、番茄、油菜、花椰菜和茼蒿,转大豆丝氨酸蛋白酶抑制剂C-II的马铃薯、番茄以及转马铃薯蛋白酶抑制剂PI-II的茼蒿等^[16]。但遗憾的是,目前还没有一例通过转蛋白酶抑制剂基因获得的转基因抗虫作物获得商业化生产。这可能与蛋白酶抑制剂在植物体内的表达量和害虫对它的适应性有关^[21]。今后研究的重点应放在不断利用更新更强以及更专一的启动子调节基因的表达,同时努力解决环境因素和植物体自身生长代谢对蛋白酶抑制剂基因表达的影响。

1.2.3 转植物凝集素基因 植物凝集素是指含有至少一个非催化结构并能可逆结合到特异单糖或寡糖上的所有植物蛋白。它通过与昆虫消化道上皮细胞糖蛋白结合来影响昆虫对营养物质的吸收,同时在消化道内引发病灶,从而抑制害虫的生长发育繁殖,甚至杀死害虫^[22]。目前在蔬菜上应用较多的是雪花莲凝集素(GNA)基因,如吴昌银等^[23]将雪花莲外源基因导入番茄,获得抗蚜虫的植株。Gatehouse等发现表达GNA基因的马铃薯对桃蚜具有很好的抗性。Fitch等发现人工喂养表达GNA的番茄叶片给孵化后21 d(天)的幼虫,可使番茄夜蛾(*Lacanobia oleracea*)幼虫的生物量减少23%。另外,郭文俊等也将GNA基因成功地导入茼蒿,并得到表达。

1.3 蔬菜抗除草剂转基因研究

抗除草剂的基因转化主要有两种途径:一是转入能降解除草剂的酶基因来消除除草剂对作物的危害作用,目前应用较多的是来源于潮湿链霉菌bar基因,此基因编码的蛋白可将除草剂膦丝菌素(PPT)乙酰化使其失去毒力。二是对除草剂作用的靶蛋白进行修饰,使其对除草剂不敏感,或者促使这种靶蛋白过量表达,使植物在吸收除草剂后仍能进行正常代谢。蔬菜的转基因耐除草剂研究开展得较早。Deblock等将编码谷氨酰胺合成酶抑制剂pat的bar基因通过农杆菌介导转入番茄,该基因的表达产物pat可使有毒的除草剂PPT乙酰化而变成无毒物质,从而使转基因植株能有效抵抗除草剂PPT。Tsafaris等通过农杆菌LBA4404将带有pat基因的质粒PKB16.41导入甜椒,使转化后的甜椒对PPT的耐受力得到了极大的提高。此外,还有将突变的不被磺酰脲类除草剂作用的ALS(乙酰乳酸合成蛋白)基因转入番茄中使转基因植株产生抗性以及将烟草突变型ALS酶基因SVRB-Hra转入番茄,得到抗磺酰脲类除草剂的转基因番茄植株的报道。

1.4 蔬菜抗逆境转基因研究

1.4.1 耐盐转基因 目前通过基因工程技术提高植物的耐盐性有两种策略,一种是目前研究较多的利用小分子渗透调节物质的代谢以及过量表达可清除活性氧自由基的基因工程

策略,也称间接保护机制策略。植物体内的这些渗透保护物质主要是多元醇、脯氨酸、季胺类化合物及数硫类化合物(Yancy等1982)。目前,与这些渗透物质积累相关的一些酶类基因已经得到了克隆和鉴定,如脯氨酸合成酶(proA)基因、菠菜碱脱氢酶(BADH)基因、磷酸甘露脱氢酶(mtlD)基因以及甘氨酸甜菜碱生物合成相关的酶类基因^[13]。王淑芳等将参与独立催化胆碱生成甘氨酸甜菜碱的胆碱脱氢酶基因(betA)通过农杆菌介导法转入番茄,获得了耐盐性高于对照的转基因番茄植株。Dessaigne等将草酸氧化酶基因转入番茄中,得到的转基因番茄在盐胁迫情况下,其产量大于对照。植物耐盐基因工程的第二种策略是降低由于盐胁迫植物细胞离子均衡受到破坏而产生的高Na⁺的毒害,调节细胞的K⁺/Na⁺比率,维持其高K⁺低Na⁺的离子平衡,也称直接保护机制策略。张荃等将从啤酒酵母中扩增得到的可调节植物细胞离子均衡的HAL1基因转入番茄,获得的转基因番茄植株耐盐性明显提高。另外,除了以上两种策略外采用将耐盐植物的总DNA直接导入不耐盐植物,也能提高耐盐性,如林栖凤等利用自花授粉后形成的花粉管通道法将海岸耐盐植物红树的总DNA导入辣椒,其后代的耐盐性明显增强,在海滩上试种,用海水直接浇灌,约55%的转化株能开花、结果,而对照株全部死亡。

1.4.2 抗冻转基因 在蔬菜的抗冻转基因方面,利用的较多的是来自于北极深海鱼类的抗冻基因(AFPS),美国的Hightower等(1991)将鳕鱼科的抗冻基因转入番茄,发现其具有抑制冰块重新结晶的能力,从而使蔬菜免遭冻害。我国在这方面的研究也取得了一些进展,如黄永芬等将美洲拟鲈抗冻蛋白基因AFP,用子房或花粉管注射进行基因直接转化番茄,得到的转基因植株在平均气温低于4.4℃的情况下,生长好于对照,并且果实成熟提前,番茄的致死温度也降低了1℃~2℃。人工化学合成的比目鱼抗冻蛋白基因也已成功的导入玉米原生质体,并得到表达。但目前对于转基因抗冻植株的后续报道还很少。

1.5 利用基因工程创造蔬菜雄性不育

随着生物技术的发展及其在植物遗传育种中的应用,Mariani等1990年开创了一个创造植物雄性不育的新途径——遗传工程雄性不育。利用遗传工程创造作物雄性不育有多种途径,包括通过绒毡层和花粉特异表达细胞毒素获得雄性不育;提早降解四分体间的胼胝质壁,破坏花药的发育引起雄性不育;通过反义RNA技术创造雄性不育;基因的共抑制导致雄性不育;干扰核基因和线粒体基因之间的通讯,造成雄性不育;导入细菌组成型基因,引起植物器官发育异常以及条件雄性不育等。

近年来,遗传工程雄性不育研究在蔬菜上也取得了一定的进展。张宏等构建人工雄性不育基因TA29:Barnase,用农杆菌介导法转化番茄子叶,获得了具有雄性不育特征的转化株,转化株在株高、叶片、叶型及大小方面均与未转化株相同,但在花的形状上有明显区别:一部分转化株在花瓣未展开时雄蕊即凋萎,花器里只剩下花萼和柱头。此种转基因雄性不育是用绒毡层和花粉特异表达细胞毒素,获得雄性不育。此外,在蔬菜作物上应用较多的方法还有利用反义基因技术创造雄性不育,如李艳红等人构建了反义肌动蛋白基因和花药特异启动子TA29组成的嵌合雄性不育基因,通过农杆菌介导途径,将该基因转入番茄,转化株和对照株在花器形态上有明显区别,转化植株表现为花丝较短、花药瘦瘪,转化株自交

不结实但用作母本进行杂交结实正常。这也是第一例中国具有独立知识产权的转基因雄性不育。

1.6 蔬菜增强品质的转基因研究

作为蔬菜育种的重要目标,改进蔬菜品质的基因转化研究主要在番茄和马铃薯上进行的较多,而且成功的例子不少,其中又以用基因转化技术延迟番茄的成熟方面取得的效果较好。通过转基因延迟主要有两条途径:抑制细胞壁的降解和抑制乙烯的合成。前者主要是通过控制参与细胞壁软化过程的多聚半乳糖醛酸酶(PG)在果实成熟阶段的表达来实现的,如叶志彪等将多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因的 HindIII 片段反向克隆在植物转化载体 Bin9 的花椰菜病毒(CaMV)的 35S 启动子和 3' 端非翻译区(nos)终止子之间,经农杆菌与番茄无菌苗子叶外植体共培养,获得转化植株,这种转反义 PG 基因的番茄果实中,PG 的 mRNA 水平及 PG 酶活性在果实成熟阶段明显降低,果实贮存期延长,不易损伤和感染。后者主要是通过通过对乙烯合成过程中的 ACC 合成酶的克隆并将该基因转入植物中来调节植物体内乙烯的合成,控制果实的成熟时间,达到延迟成熟,延长保鲜期,提高耐贮性。叶志彪等^[3]用 EFE(乙烯形成酶)反义基因转化番茄,获得的延迟番茄在 13℃~30℃下可贮藏 45 d(天),在 1996 年被批准为我国第一个商品化生产的农业基因工程产品。

此外,通过转基因改良的品质还包括提高糖含量,增加固形物含量和类胡萝卜素含量、延缓叶衰老等。如 Klann 等^[4]将酸性转化酶的反义 cDNA 转入番茄中,获得的转基因番茄生长情况与普通番茄相同,但蔗糖的含量增加,富含蔗糖的果实比对照果实小 30%。Drake 等将番茄红素合成酶基因进行修饰后转化番茄,使番茄红素得到了超量表达。John 等以 ACC 反义基因转化番茄,与对照相比,在衰老前 ACC 含量少,在衰老过程中两者的乙烯含量均增加,但在转基因番茄中的含量略低,叶色由绿转黄的过程延迟 10 d~14 d(天),光合作用强,但衰老一旦开始,两者的衰老速率没有差异。

2 蔬菜基因转化研究的前景

植物的基因转化研究与应用正在蓬勃的展开,1996 年世界转基因作物种植面积仅为 170 万 hm^2 (公顷),而到 2000 年就迅速增长至 4420 万 hm^2 (公顷)占世界耕地面积的 2%。蔬菜的基因转化研究在蔬菜遗传育种、品质改良上的应用前景是十分乐观的,目前被批准上市的转基因蔬菜越来越多,如番茄、马铃薯、南瓜、西葫芦等,转化的性状也由单一性状向多性状转化,如布宜诺斯艾利斯的遗传与分子生物研究所利用农杆菌介导创建了 16 个转基因马铃薯新品系,每个新品系均具有两个不同的抗病毒、抗真菌或抗细菌病的基因。另外,一个由南美洲和欧洲国家的 13 个实验室共同组成的研究小组正致力于将 6 个抗病毒、抗真菌、抗细菌、抗除草剂和 Bt 基因转育到同一马铃薯品种中去。此外,随着植物转基因技术的日益成熟,利用转基因植物作为反应器,把外源基因引入植物体内以生产医用多肽和医用疫苗正成为继转基因动物以后又一新兴的研究领域。大量的转基因蔬菜获得成功,为利用蔬菜作为表达载体开发生产食用疫苗打下了坚实的基础。最近,Takeuchi 等(1998)利用表达肠产毒性大肠杆菌热不稳定性毒素(LT)的转基因马铃薯进行了人体免疫试验,结果表明这种转基因马铃薯在人体中也具有预期的免疫作用。我国科学家也已经成功地在马铃薯和番茄中表达了乙型肝炎病毒外壳蛋白抗原。

随着生物技术的飞速发展,尤其是分子标记技术的发展

将促进多种生物物种的基因定位与克隆,为有目的地寻找和发掘生物的内外源基因工作奠定了基础。基因工程技术对培育优质、抗逆的蔬菜品种及蔬菜的产业化将会做出越来越大的贡献。当然,在考虑到基因工程技术带来明显的经济效益的同时,也不能忽视有可能产生的一些潜在的负面影响,如转基因产品的食用安全性以及可能带来的生态破坏等^[13]。但只要在现有的相关法律和条例的基础上,加强管理和监督,相信转基因蔬菜的前景将更加广阔。

参考文献:

- [1] 周延清.转基因油菜研究进展[J].生物学通报,1994,29(5):3~5.
- [2] 孟令波,车永强,李淑敏.转基因技术在蔬菜育种中的应用[J].黑龙江农业科学,2001,(5):27~29.
- [3] 叶志彪,李汉霞,刘勋甲.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):6~10.
- [4] 周北雁,李毅,陈章良.北京大学的抗病毒转基因作物[J].生物技术通报,1999,(3):42~45.
- [5] 赵开军.蔬菜转基因育种[J].中国蔬菜,1999(2):4~5.
- [6] 朱常香,宋云枝,张松.抗芜菁花叶病毒转基因大白菜的培育[J].植物病理学报,2001,31(3):258~264.
- [7] 王慧中,赵培洁,周晓云.农杆菌法转化获得转基因西瓜植株[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(1):111~113.
- [8] 毕玉平,单蕾,王兴军.双抗 TMV+CMV 辣椒转基因工程植株再生及抗病毒鉴定[J].华北农学报,1999,14(3):103~108.
- [9] 黄锡志,寿森炎,廖乾生.转基因番茄研究进展[J].北方园艺,2001,138(3):29~31.
- [10] 李汝刚,范云六.表达 Harpin 蛋白的转基因马铃薯降低晚疫病斑生长期[J].中国科学(C 辑),1999,29(1):56~61.
- [11] 田长恩,王正诤,陈韬.抗菌肽 D 基因导入番茄及转基因植株的鉴定[J].遗传,2000,22(2):86~89.
- [12] 吴刚,崔海瑞,舒尧尧等.ε 杀虫晶体蛋白基因及其转基因育种研究进展[J].生物工程进展,2000,25(2):45~48.
- [13] 杨瑞环,刘殿林,哈玉洁.蔬菜转基因研究的现状与展望[J].天津农业科学,2001,7(3):12~15.
- [14] Vander ST, Bosch D, Hones Get al. Insect resietar of transgenic plants that express modified Bacillus thuringiensis Cry IA(b) and CryIC genes a resistance management styategy[J]. plant Mol Biol, 1994, 26(1): 51~59.
- [15] 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.
- [16] 柳武革,薛庆中.蛋白酶抑制剂及其在抗虫基因工程中的应用[J].生物技术通报,2000,(1):20~25.
- [17] 杨广东,朱祯,李燕娥等.修饰豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(sek)抗虫甜椒植株的获得[J].应用与环境生物学报,2002,8(3):239~244.
- [18] 余建民,蔡小宁,朱卫民等.结球甘蓝抗虫转基因植株及其后代的抗性表现[J].江苏农业学报,2001,17(2):73~76.
- [19] 余建民,蔡小宁,朱卫民等.外源基因在不结球白菜转基因植株后代中的表达[J].江苏农业学报,2002,18(1):33~36.
- [20] 张智奇,周音,钟维瑾.慈姑蛋白酶抑制剂基因转化小白菜获得转基因植株[J].上海农业学报,1999,15(4):4~9.
- [21] Maarten Ajongsma, Caroline bolter. The Adaptation of Insects to Plant Protease Inhibitors[J]. Insect Physiol 1997, 43(10): 885~895.
- [22] 张扬勇.雪花莲凝集素基因转化小白菜和菜心的研究[D].武汉,华中农业大学,2002.
- [23] 吴昌银,叶志彪,李汉霞.雪花莲外源凝集素基因转化番茄[J].植物学报,1999,18(1):80~82.

(1.中国农业科学院蔬菜花卉研究所,北京 100081;
2.湖南农业大学园艺学院蔬菜园艺系,湖南 长沙 410128)