

⑨ 90-95

第28卷 第3期
2000年6月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 28 No. 3
Jun. 2000

[文章编号]1000-2782(2000)03-0090-06

转基因番茄研究进展

S641.203

高 蓝¹, 傅建熙¹, 王建华² ✓

S188

(1 西北农林科技大学 基础科学系, 陕西 杨凌 712100;

2 西安市 园艺研究所, 西安 临潼 710603)

[摘 要] 综述了转基因技术在培育延熟番茄、抗病虫番茄、抗除草剂番茄、抗逆番茄、改进番茄品质和延缓叶衰老番茄等方面的研究进展。

[关键词] 基因转化; 番茄; 综述 转基因育种 延熟性 抗逆性 抗病性

[中图分类号] S641.260.32 [文献标识码] A

番茄是茄科(Solanaceae)番茄属(*Lycopersicon*)的一年生或多年生植物。现代栽培番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)的育种主要采用3类技术,即常规育种技术、从野生远缘番茄品种确认与渗入基因的技术和基因转化技术。番茄是最早进行基因转化研究的高等植物之一。现在,用基因转化方法已培育出延迟成熟、抗病虫害、抗除草剂、抗逆和高品质的优良番茄品种,如1994年美国Calgene公司开发的延熟番茄Flavr-SaVr™被批准进行商业化生产,这是全球首次批准的可进行商业化生产的转基因植物。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已有成功的先例,黄永芬等^[1]将整合了抗冻蛋白基因的Ti质粒直接注入番茄子房或花粉管中进行转化获得了抗冻番茄。

1 转基因番茄的研究进展

1.1 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,成熟过程快,容易过熟而腐烂变质。目前在用基因转化技术抑制细胞壁的降解和乙烯的合成以延迟番茄的成熟,防止其腐烂方面取得了较好的效果。

1.1.1 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。有两类酶是细胞壁软化过程的主要参与者,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,在果实成熟过程中,PG的mRNA水平可提高100倍;另一类是果胶甲脂酶(PE),可将细胞壁中的果胶去甲基,使细胞壁软化,并减少果实中的可溶性固形物含量。叶志彪等^[2]将PG基因的Hindfi片段反向克隆在植物转化载体Bin19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,PGmRNA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

[收稿日期] 1999-06-17

[作者简介] 高 蓝(1964—),女,副研究员,在读博士。

易损伤和感染。同时,在果实的过熟期明显抑制软化,且果实的颜色、风味和甜度都优于含杂合番茄慢熟基因(*rin*)的番茄^[3]。采用PE反义基因法(反义RNA技术)也可使番茄果实延迟成熟^[4]。

1.1.2 抑制番茄乙烯合成的研究 乙烯是植物的内源激素,它的功能之一是催化植物果实的成熟。如果能降低乙烯的前体ACC(1-氨基丙烷-1-羧酸)合成酶和ACC氧化酶(即乙烯形成酶EFE)在番茄果实中的水平或活性,或增加ACC脱氨酶(ACCd酶)和ACC的前体SAM(S-腺苷甲硫氨酸)水解酶的水平或活性,就能获得延熟番茄。

Oller等^[5]将ACC合成酶的基因LE-ACC₂反向插入载体后转化番茄,使乙烯合成降低了99.5%,延熟的果实用外源乙烯处理可以逆转。仇润祥等^[6]构建了ACC合成酶LE-ACC₂的反义基因——核酶嵌合DNA的重组质粒PREI,从而抑制了ACCmRNA的表达。叶志彪等^[7]用EFE反义基因转化番茄,获得的延熟番茄在13~30℃下可贮藏45d,在1996年被批准为我国第1个商品化生产的农业基因工程产品。Klee等^[8]从以ACC为唯一氮源的土壤细菌中分离了ACCd酶,经转基因后使番茄延熟。Kramer等^[9]将乙烯响应启动子与SAM的基因整合转化番茄,获得延迟成熟番茄。

1.2 转基因抗病虫番茄的研究

1.2.1 转基因抗病毒番茄的研究 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。目前番茄抗病毒基因工程研究主要采用转病毒外壳蛋白(CP)基因的方法。

TMV CP基因转化番茄的工作从1986年即已开始,转基因番茄植株感染发病率降低。Whitham等^[10]将烟草抗TMV的N基因转入番茄,产生抗性反应,表明与N基因抗性表达有关的因子均存在于番茄中。程英豪等^[11]将CMV CP基因转入番茄,转化的番茄植株对CMV侵染有抗性。赵淑珍等^[12]用CMV卫星DNA的cDNA转化番茄,转化的番茄植株抗CMV。Kunik等^[13]以TYLCV CP基因转化番茄,转化的番茄植株的F₁代与TYLCV共培养时,表明有些植株有抗性,同时,这些抗性植株的western印迹检查表明此蛋白有表达。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^[14]。

1.2.2 转基因抗真菌番茄的研究 采用基因转化方法培育出的番茄对晚疫病和枯萎病有良好的防治效果。已知1,2-二苯乙烯是介导植物抵抗病原体的物质,Thomzik等^[15]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——反式白黎芦醇,这种番茄植株能抗晚疫病。Jongdijk等^[16]将烟草I型几丁质酶和I型β-1,3-葡聚糖酶在转基因番茄中同时表达,用枯萎病病原菌镰刀菌感染后,病害比对照减少36%~58%,且受害植株可恢复正常生长。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。

1.2.3 转基因抗细菌番茄的研究 在抗病番茄的转基因研究中,也做了一些抗细菌番茄的研究工作。Tansley等^[17]从秘鲁番茄中克隆出抗细菌斑点病病菌的基因 pto ,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。

1.2.4 转基因抗虫番茄的研究 在抗虫转基因番茄的研究中使用最多的是用从苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)获取的编码 δ -内毒素的毒蛋白基因转化番茄, δ -内毒素可在昆虫体内分解为毒性多肽,对 50 多种鳞翅目害虫有毒杀作用,且对脊椎动物无毒性。经修饰后的毒蛋白毒性更高,用转 δ -内毒素基因的方法在多种作物中均已获得较好的抗虫效果。Vander 等^[18]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。Jansens 等^[19]通过转 CryIA(b)基因得到抗番茄钻心虫的转基因植株,以虫卵感染果实后,果实受伤的数目和面积及幼虫的数目和大小都相对降低,据统计,在感染 24 d 后对照感染率为 72.5%,转基因果实感染率为 37.7%。Rhim 等^[20]将毒蛋白基因和能与内毒素抗体发生交叉反应的一种 74 000 u 蛋白质的基因整合转化番茄,转化植株能抗马铃薯甲虫的幼虫。此外,Williamson 等^[21]将野生番茄品种的抗线虫基因 Mi 转入普通番茄中,转化的植株能抗根结线虫。

1.3 转基因抗除草剂番茄的研究

抗除草剂的基因工程主要有两种策略,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;二是修饰除草剂作用的靶蛋白,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。现已获得抗草丁膦、磺酰脲、草甘膦等除草剂的转基因番茄。De Block 等^[22]用从一种土壤细菌中分离的 bar 基因转化番茄可产生对草丁膦有抗性的番茄植株。bar 基因编码的草丁膦乙酰转移酶 PAT 可使草丁膦自由氨基乙酰化而对草丁膦解毒,目前用 bar 基因转化的作物已有多种。磺酰脲类除草剂的除草作用机理是抑制植物体内的乙酰乳酸合成酶(ALS),以影响支链氨基酸的合成,将突变的不被磺酰脲类除草剂作用的 ALS 基因转入番茄中可使之产生抗性,将烟草突变型 ALS 酶的基因 SURB-Hra 转入番茄,可得到抗磺酰脲类除草剂的番茄植株^[23]。草甘膦的作用机制是抑制植物体内 3-烯醇式丙酮酸-I 磷酸(EPSP)合成酶的活性,从而影响其芳香族氨基酸的合成。Fillatti 等^[24]从沙门氏菌中分离出突变的 EPSP 合成酶(第 101 位脯氨酸被丝氨酸取代)的基因 Aro,用以转化番茄,得到的番茄植株对草甘膦有抗性。

1.4 转基因抗逆番茄的研究

在番茄抗冻和抗盐胁迫方面的转基因研究也有进展。黄永芬等^[1]将美洲拟鲈抗冻蛋白基因 AFP, CaMV 的 19S 启动子,农杆菌胭脂碱合成酶 3'nos 的融合基因整合在有选择标记的 Ti 质粒 PMON237 上做为供体,以 EcoliMI1000 做为受体,用碱裂解法提取质粒 DNA,经子房或花粉管注射进行基因直接转化得到转基因番茄。转基因番茄在平均气温低于 4.4℃的情况下,生长好于对照,并且果实成熟期提前。番茄的致死温度也降低了 1~2℃。一些植物在受到盐胁迫和病原体等侵犯时,体内的草酸氧化酶大量积累,并能通过其催化的反应产物 H₂O₂,诱导促使植物的系统抗性增加。根据这一原理,Dessalegne 等^[25]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。

1.5 改进番茄品质的研究

做为番茄育种的重要目标,改进番茄品质的基因转化研究已取得进展,其中增加番茄甜度、提高番茄固形物和类胡萝卜素含量的研究进行得较多。

1.5.1 提高番茄甜度的转基因研究 增加番茄甜度的转基因工作主要采用两种方法:一种是将酸性转化酶的反义 cDNA 转入番茄中,另一种是将甜味蛋白基因转入番茄中。前者的研究中,Klann 等^[26]将酸性转化酶的反义 cDNA 转入番茄中,酸性转化酶可催化蔗糖分解为葡萄糖和果糖,在蔗糖代谢中起着重要作用,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%。后者的研究中,Penarrubia 等^[27]用果实特异性表达启动子和植物组成型启动子将甜蛋白(monellin)的基因转入番茄中,得到有甜蛋白表达的番茄,甜蛋白与蔗糖摩尔甜度比为 1:100 000,甜度高、热量低,不易为细菌利用,对糖尿病、心血管疾病患者是很好的糖替代品。

1.5.2 增加番茄类胡萝卜素含量的转基因研究 类胡萝卜素的含量是番茄品质和营养价值高低的主要标志之一,Drake 等^[28]将番茄红素合成酶基因的密码子中的第 3 个碱基进行修饰改变后,由 CaMV 的 35S 可控启动子和 NOS 序列等整合在质粒载体 pRD13 上转化番茄,避免了共抑制现象的发生,使番茄红素得到了超量表达。采用从其他高等植物或细菌中得到的类胡萝卜素合成的有关酶基因转化番茄的研究也正在进行^[29]。

1.5.3 增加番茄固形物含量的转基因研究 对加工番茄来说,可溶性固形物含量是一个重要指标,是加工制造浓缩番茄产品的主要参数。当生长中番茄果实的细胞分裂素合成增加时,可使光合产物在果实中的分配增加,从而能提高番茄固形物的含量。Martineau 等^[30]以番茄子房壁调节因子基因与农杆菌的编码异戊烯转移酶基因 ipt 整合,使 ipt 基因在番茄子房中表达,由于异戊烯转移酶参与细胞分裂素的合成过程,所以使细胞分裂素的合成增加,增加了番茄可溶性固形物的含量及总产量。用 PE 反义基因方法也可以增加番茄固形物的含量^[31]。

1.6 延缓叶衰老番茄的转基因研究

延缓叶衰老有利于增加果实中的光合产物的含量,而延缓叶衰老采用的方法是抑制乙烯的合成。John 等^[32]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被延迟 10~14 d,光合作用强,而衰老一旦开始,两者的衰老速率没有差异。

2 番茄基因转化的前景

植物的基因转化研究与生产正在蓬勃开展,截至 1997 年底,全球在 12 种作物、6 类性状上批准了 48 个转基因植物品种进行商业化生产^[33],番茄的基因转化研究也已由单一性状转化向多性状转化,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 X 病毒和抗旱疫病、晚疫病二种真菌病的番茄^[34]。随着植物基因工程的发展,植物体可望用于生产异源蛋白质,如疫苗、酶、单抗、激素等,用这种方法可省去昂贵复杂的细胞培养和发酵等常规生产步骤,且由植物生产的抗原做为食物时引起的人体免疫应答比注射疫苗产生的反应要强,中国农科院生物技术研究中心已将乙肝表面抗原 HBsAg 及其前导序列修饰基因转入番茄中^[35]。

分子标记等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,番茄基因转化工作必将得到飞速地发展。

[参考文献]

- [1] 黄永芬,汪清胤,付桂荣.美洲拟鲷抗冻蛋白基因(afp)导入番茄的研究[J].生物化学杂志,1997,13(4):418—422.
- [2] 叶志彪,李汉震,周国林.番茄多聚半乳糖醛酸反义 cDNA 克隆的遗传转化与转基因植株再生[J].园艺学报,1994,21(3):305—308.
- [3] Sozzi Q G O, Frascina A A. Evaluation of sensory attributes and biochemical parameters in transgenic tomato fruit with reduced polygalacturonase activity[J]. Food Sci Technol Int, 1997, 3(2): 93—102.
- [4] Tucker G, Zhang J. Expression of polygalacturonase and pectinesterase in normal and transgenic tomatoes[J]. Prog Biotechnol, 1996, 14: 347—354.
- [5] Oller P W, Min-wong L, Taylor L P, et al. Reversible inhibition of tomato during fruit senescence by antisense RNA[J]. Science, 1991, 254: 437—439.
- [6] 仇润祥, 扈延茂, 王永胜, 等. 番茄 1-氨基环丙烷羧酸(ACC)合成酶反义 RNA-核酶嵌合 DNA 序列的构建[J]. 遗传, 1999, 1: 1—6.
- [7] 叶志彪, 李汉震, 刘勋年. 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.
- [8] Klee H J, Hayford M B, Kretzmer K A, et al. Control of ethylene synthesis by expression of a bacterial enzyme in transgenic tomato plants[J]. Plant Cell, 1991, 3(11): 1187—1193.
- [9] Kramer M G, Kellogg J, Wagoner W, et al. Reduced ethylene synthesis and ripening control in tomatoes expressing s-adenosylmethionine hydrolase[J]. NATO ASI Ser, 1997, 34: 307—319.
- [10] Whitham S, McCormick S, Baker B. The N gene of tobacco confers resistance to tobacco mosaic virus in transgenic tomato[J]. Proc Natl Acad Sci, USA, 1996, 93(16): 8776—8781.
- [11] 程英豪, 吴光, 王继伟, 等. 表达黄瓜花叶病毒外壳蛋白的转基因番茄抗黄瓜花叶病毒侵染[J]. 植物学报, 1997, 39(1): 16—31.
- [12] 赵淑珍, 王昕, 王革娇, 等. 由卫星互补 DNA 单体和双体基因构建的抗黄瓜花叶病毒的转基因番茄[J]. 中国科学(B 辑), 1990, (7): 706—713.
- [13] Kunik J, Gafni Y, Citovsky W. Transgenic tomato plants expressing TYLCV capsid protein are resistant to the virus. The role of the nuclear localization signal(NLS) in the resistance[J]. Acta Hort, 1997, 447: 387—391.
- [14] Ulfzen T, Gielen J, Venenca F, et al. Resistance to tomato spotted with virus in transgenic tomato hybrids[J]. Euphytica, 1995, 85(1—3): 159—168.
- [15] Thomzik J Z, Stenzel K, Stocker R. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against phytophthora infestans[J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 51(4): 265—270.
- [16] Jongedijk E, Tiglaar H, Roekel J S C, et al. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants[J]. Euphytica, 1995, 85(1—3): 173—180.
- [17] Tansley S D, Martin G B. Gene conferring disease resistance in plants[P]. PCT Int Appl WO 9505, 731 (CI, A01H/04), 1995-03-02. USApl, 111, 078, 1993-08-24, 36.
- [18] Vander S T, Bosch D, Hones 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] Janses S, De Clercq R, Reynaerts A, et al. Greenhouse evaluation of transgenic tomato plants expressing a *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein, for control of *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera Noctuidae)[J]. Meded Fac Landhouwwet Univ Gent, 1992, 57(2b): 515—522.
- [20] Rhim S-L, Cho H J. Development of insect resistance in tomato plants expression the δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis* Subsp *tenebrionis*[J]. Mol Breed, 1995, 1(3): 229—236.
- [21] Williamson V, Kaloshian I. Cloning, sequence and expression of *M1* nematode resistance gene for conferring pest resistance in transgenic plants[P]. PCT Int Appl WO 9815, 171 (CI, A01H5/00), 1998-04-16. USApl, 28191,

- 1996-10-10, 55.
- [22] De Block M, Botterman J, Vandewiele M, et al. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme[J]. EMBO J, 1987, 6(9): 2513-2518.
- [23] Benbrook C. Herbicide resistance: environmental and economic tissues[J]. Proc Bio Expo Butterworth Boston, 1986, (86): 27-34.
- [24] Fillatti J J, Haissig B, McCown B, et al. Development of glyphosate-tolerant populus plants through expression of a mutant *aroA* gene from *salmonella typhimurium*[J]. Basic Life Sci, 1988, 44: 243-249.
- [25] Dessalegne L, Wetten A C, Caligari P D S. Production of transgenic tomatoes expression oxalate oxidase[J]. Acta Hort, 1997, 447: 457-458.
- [26] Klann E M, Hall B, Bennett A B. Antisense acid invertase (TIV1) gene alters soluble sugar composition and size in tomato fruit[J]. Plant Physiol, 1996, 112(3): 1321-1330.
- [27] Penarrubia L, Kim R, James G. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants[J]. Bio/Technology, 1992, 10: 561-564.
- [28] Drake C R, Bird C R, Schuch W W. Overexpression of phytoene synthase transgene in tomato plants for enhanced carotenoid content[P]. PCT Int Appl WO 9746, 690(CI.C12N15/67), 1997-12-11. GBAppl, 96/11, 981, 1996-06-07, 3.
- [29] Bramley P M. The regulation and genetic manipulation of carotenoid biosynthesis in tomato fruit[J]. Pure Appl Chem, 1997, 69(10): 2159-2162.
- [30] Martineau B, Adams D F, Deverna J W. Ovary predominant expression of a cytokinin biosynthetic gene in tomato results in higher total and soluble fruit solids[J]. Proc Plant Growth Regul Soc Am, 1994, 21: 15-24.
- [31] Tieman D M, Kausch K D, Serra D M, et al. Field performance of transgenic tomato with reduced pectin methyl-esterase activity[J]. J Am Soc Hortic Sci, 1995, 120(5): 765-768.
- [32] John I, Drake R, Furrell A. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants: molecular and physiological analysis[J]. Plant J, 1995, 7(3): 483-490.
- [33] 雷茂良, 程金根. 全球转基因植物发展现状[J]. 生物技术通报, 1998, 6: 30-32.
- [34] 唐级忱. 我国首次获得转多基因多抗番茄植株[J]. 种子, 1998, 3: 80.
- [35] 王跃驹, 李刚强, 刘德虎. 利用转基因植物产生乙型肝炎疫苗[J]. 生物技术通报, 1997, 5: 21-25.

The development of applying transgenic technique to tomatoes

GAO Lan¹, FU Jian-xi¹, WANG Jian-hua²

¹ Department of Basic Science, Northwest Science and Technology University
of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

² Horticulture Institute, Lintong, Xi'an 710603, China)

Abstract: This paper reviewed the application of transgenic technique to tomatoes, introduced transgenic tomatoes with characters of delayed fruit and leaf senescence, disease and insect resistance, herbicide resistance, adversity resistance and good fruit quality.

Key words: transgenic; tomato; review