

## 参 考 文 献

- [1] Nagata S. ,1997, *Cell* ,**88**(3):355-365.
- [2] Green DR. et al. ,1995, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*,**2**(12):917-924.
- [3] Smyth MJ. et al. ,1995, *Immunology Today* ,**16**(4):202-206.
- [4] Griffith TS. et al. ,1995, *Science* ,**270**:1189-1192.
- [5] Stuart PM. et al. ,1997, *Journal of Clinical Investigation* ,**99**(3):396-402.
- [6] Bellgrau D. et al. ,1995, *Nature* ,**377**:630-632.
- [7] Li XK. et al. ,1998, *Transplantation* ,**66**(11):1416-1423.
- [8] Swenson KM. et al. ,1998, *Transplantation* ,**65**(2):155-160.
- [9] Ke B. et al. ,2000, *Transplantation* ,**69**(8):1690-1694.
- [10] Schmid RA. et al. ,2000, *Transplant International* ,**13** S1:S324-328.
- [11] Sata M. et al. ,2001, *J. Immunol.* ,**166**:6964-6971.
- [12] Tourneur L. et al. ,2001, *Journal of Immunology* ,**167**(3):1338-1346.
- [13] Henry T. et al. ,1996, *Science* ,**273**:109-112.
- [14] Hahne M. et al. ,1996, *Science* ,**274**(5291):1363-1366.
- [15] Saas P. et al. ,1997, *Journal of Clinical Investigation* ,**99**(6):1173-1178.
- [16] Seino K. et al. ,1998, *J. Immunol.* ,**161**:4484-4488.
- [17] Khar A. et al. ,1998, *Cell. Immunol.* ,**189**:85-91.
- [18] Arai H. et al. ,1997, *Nature Med.* ,**3**:843-848.
- [19] Kang SM. et al. ,1997, *Nature Medicine* ,**3**(7):738-743.
- [20] Allison J. et al. ,1997, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* ,**94**:3943-3947.
- [21] Takeuchi T. et al. ,1999, *Journal of Immunology* ,**162**(1):518-522.
- [22] Seino K. et al. ,1997, *Nature Medicine* ,**3**(2):165-170.
- [23] Buonocore S. et al. ,2002, *Transplantation* ,**73**(S1):S27-30.
- [24] Shimizu M. et al. ,2001, *Cellular Immunology* ,**207**(1):41-48.
- [25] Tada Y. et al. ,2002, *International Journal of Molecular Medicine* ,**9**(3):281-285.
- [26] Schaub FJ. et al. ,2000, *Nature Medicine* ,**6**(7):790-796.
- [27] Chio CC. et al. ,2001, *British Journal of Cancer* ,**85**(8):1185-1192.
- [28] Kurooka M. et al. ,2002, *Cancer Research* ,**62**(5):1261-1265.
- [29] David P. et al. ,2000, *Journal of Clinical Investigation* ,**105**:1199-1208.
- [30] O'Connell J. et al. ,2001, *Nature Med.* ,**7**:271-274.
- [31] Chen JJ. et al. ,1998, *Science* ,**282**:1714-1717.
- [32] Ferguson TA. et al. , (Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia, 2001), in *Samter's Immunologic Diseases* Vol. II(eds Austen, A. & Cantor, H. )673-676.

## 葫芦科作物转基因研究进展

于天祥 张明方

(浙江大学园艺系 杭州 310029)

葫芦科作物是重要的世界性经济作物,品种丰富,种类繁多,在蔬菜作物中占有极重要位置。其果实中含有丰富的碳水化合物、矿物质和抗坏血酸。葫芦科作物中的西瓜、甜瓜果实中还富含脲化酶,能帮助分解食物中的蛋白质,深受人们喜爱。西瓜、甜瓜均被列入世界十大水果之列,我国的栽培面积和总产量均占世界的1/2左右。葫芦科作物的遗传改良被世界各国所重视。迄今为止,利用转基因技术已经培育出抗病、抗逆、延迟成熟和高品质的葫芦科作物品种,本文就转基因葫芦科作物的研究进展及

其发展方向作一简要综述。

## 一、转基因体系的建立

通过有效的方法将外源基因导入植株是转基因技术的关键。葫芦科作物的子叶外植体具有高效的转化再生频率,广泛用于转基因再生体系。常用的外源基因导入方法主要有农杆菌介导法<sup>[1]</sup>、花粉管通道法<sup>[2]</sup>、DNA浸胚法<sup>[3]</sup>和基因枪法<sup>[4]</sup>,其中农杆

菌介导法是葫芦科作物最常用的基因导入方法。

在葫芦科作物转基因植株的筛选中,新霉素转磷酸酶(NPTII)基因和 $\beta$ -葡萄糖苷酸酶(GUS)分别为常用的选择基因和报告基因,相继用农杆菌介导法建立了甜瓜<sup>[5]</sup>、西瓜<sup>[6]</sup>和黄瓜<sup>[7]</sup>等的高效转化体系。萤火虫荧光素可以在光照下发出荧光,将荧光素酶基因作为报告基因导入植株可对转基因植株进行监测。1996年,Sapountzakis等<sup>[8]</sup>将萤火虫荧光素酶基因转入黄瓜,代替常规的GUS基因进行转化植株的筛选。

## 二、抗病转基因研究

### 1. 抗病毒转基因研究

葫芦科作物病毒病是世界性的病害,凡种植地区几乎都有发生,严重影响了葫芦科作物的产量和品质。常见病害有黄瓜花叶病毒(*Cucumber Mosaic Virus*, CMV),西瓜花叶病毒(*Watermelon Mosaic Virus*, WMV),南瓜花叶病毒(*Squash Mosaic Virus*, SqMV),西葫芦花叶病毒(*Zucchini Yellow Mosaic Virus*, ZYMV)等。其中最严重的是CMV, SqMV和CMV-2。他们单独或者混合侵染给葫芦科作物生产带来严重威胁。传统的育种方式对抗病基因的筛选监测非常困难,同时通过常规育种育成的抗病品种,根据基因对基因假说,病毒又要不断分化出新的株系,要不断育出新的品种增加对病毒的抗性;并且常规育种周期长,难度大,获得的性状不易稳定<sup>[9]</sup>。通过基因工程育种创造新种质为这些问题的解决提供了一条新的途径,成为葫芦科作物品种改良的前沿生物技术。目前,人们已将许多种来自病毒本身的基因导入植物,获得了抗病毒的工程植物。如外壳蛋白(CP)基因,病毒RNA基因和病毒核酸等。

利用病毒本身的一些基因或经过改造的基因导入植物,可获得抗病毒的转基因植株。最早获得成功的例子是使用病毒外壳蛋白(CP)基因<sup>[10]</sup>,又称为外壳蛋白介导保护(coat protein-mediated protectin, CPMP)。病毒RNA进行复制要脱去本身的外壳蛋白,通过导入的CP基因在植株内表达,干扰病毒的正常增殖而达到抗病目的<sup>[11]</sup>。将病毒CP的cDNA片段导入植物基因组成为基因工程产生病毒抗性品种的常用方法。

1990年,Slightom等<sup>[12]</sup>将CMV CP编码基因导入黄瓜,转化的黄瓜植株对CMV高抗,并可遗传。导入病毒CP编码基因的黄瓜<sup>[4,13]</sup>、南瓜<sup>[4,17,18]</sup>、西瓜<sup>[4]</sup>、

甜瓜<sup>[4,15,16]</sup>植株,在相应病毒侵染下都表现出不同程度的抗性。1995年,George等<sup>[19]</sup>将WMV和ZYMV的CP基因整合到一个质粒载体,分别导入南瓜和甜瓜,转化的南瓜和甜瓜植株对相应的病毒都有抗性,经济产量显著高于对照。1995年,Tricoli等<sup>[17]</sup>获得了抗ZYMV、CMV和WMV三种病毒的南瓜品种;1997年,Fuchs等<sup>[20]</sup>获得了抗ZYMV、CMV和WMV三种病毒的甜瓜品种。

导入核酸酶基因可以将入侵的病毒核酸降解,从而达到抗病毒效果。将核酸酶基因导入植物获得对病毒抗性的品种为瓜类作物抗病毒基因工程提供了一条新的选择途径。1999年,Huttner等<sup>[21]</sup>分别将ZYMV和WMV-2多聚核酶基因导入甜瓜,转化植株分别对ZYMV和WMV-2病毒产生高抗性。大田试验结果表明,抗WMV-2甜瓜植株的后代在大田试验中对WMV-2表现为免疫<sup>[22]</sup>。

### 2. 抗真菌转基因研究

西瓜枯萎病是由尖孢镰刀菌西瓜专化型(*Fusarium oxysporum f. sp. niveum* (E. f. Smith) Snyder et Hansen)引起的土传毁灭性病害,世界各地均有发生。瓠瓜适应性广,对西瓜枯萎病免疫。将瓠瓜的DNA导入西瓜,有可能获得高抗西瓜枯萎病或具特异性状的新材料,1997年,肖光辉等<sup>[3]</sup>采用DNA浸胚法,将外源瓠瓜DNA导入西瓜,变异株的生长势明显增强,主要表现为叶片增大,叶色加深,叶柄增长,主蔓增长,节间长度增加。D2植株叶部病害较轻,无枯萎病;而对照西瓜叶部病害较重。

1998年,Chen-Shaw Chen等<sup>[2]</sup>通过花粉管途径将抗镰刀枯萎病基因导入西瓜。从南瓜叶子中提取了对枯萎病抗性的总DNA,携同花椰菜花叶病毒CaMV35S启动子与GUS基因注射导入西瓜F1代杂种的胚珠,通过人工授粉获得转基因杂种。转化植株表现出枯萎病抗性,用RAPD分析,检测出和南瓜相同的特异扩增条带。

几丁质酶(Chitinase)可以有效的保护作物免受真菌性病害侵染。灰霉病是黄瓜栽培中的主要病害,1996年,Racharjo等<sup>[23]</sup>用农杆菌介导法将水稻几丁质酶cDNA(RCC2)转入黄瓜。Northern杂交试验表明,rcc2基因可以在黄瓜中正常表达,转化植株对灰霉病表现出高抗性。对抗性黄瓜株系进行杂交试验,在后代中呈现出3:1的分离比例,表明灰霉病抗性性状受一对显性基因控制,可以在黄瓜后代中稳定遗传<sup>[24]</sup>。

1999年, Szwacka等<sup>[25]</sup>用农杆菌介导法将甜蛋白基因 *thaumatin II* cDNA 导入黄瓜, 蛋白质杂交结果表明, *thaumatin II* 可以在黄瓜叶子和果实中正常转录, 霜霉病接种试验结果显示转化黄瓜植株能够抑制霉菌在植株体内的扩散, 对霜霉病表现出较高的抗性<sup>[26]</sup>。

### 三、耐逆境转基因研究

酵母菌 *hlaI* 基因具有较高的盐抗性, 可以在高浓度 NaCl 下生长。1992, Serrano等<sup>[27]</sup>用农杆菌介导法将 *hlaI* 基因转入甜瓜。Southern 杂交和 northern 杂交试验结果表明, *hlaI* 基因转入甜瓜基因组, 并能正常转录。在  $10\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$  NaCl 培养基下, 转入 *hlaI* 基因甜瓜在离体培养状态有 15% - 20% 的茎尖端可以正常生根, 而未转入对照只有 2% 可以正常生根, 导入的 *hlaI* 基因对 NaCl 产生较高抗性。转入 *hlaI* 基因的西瓜<sup>[28]</sup>在离体培养状态也对 NaCl 产生较高抗性。

1993年, Kodama等<sup>[29]</sup>用基因枪法将发根基因 *rol* 导入黄瓜, southern 杂交结果表明 *rol* 基因整合到黄瓜的基因组, 转化的黄瓜植株生根能力明显增强, 在离体培养状态, 不使用激素就可以正常生根, 提高了黄瓜逆境生存能力。

细胞膜是冷冻伤害的原初部位, 而冷冻低温引起的氧自由基积累引发膜脂过氧化是导致细胞膜伤害的主要原因, 植物本身也有分解氧自由基的解毒体系——抗氧化酶系统, 因而植物抗冻力与其对氧自由基的清除力密切相关<sup>[30]</sup>。1994年, Ohkawa等<sup>[31]</sup>通过基因枪法将抗坏血酸氧化酶基因导入黄瓜, GUS 监测结果显示抗坏血酸氧化酶基因导入黄瓜, 转化黄瓜植株抗寒能力显著增强。

### 四、延熟转基因研究

葫芦科作物果实的成熟过程属于呼吸跃变型, 成熟过程快, 容易过熟而变质。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瓜类的成熟, 防止其腐烂方面取得较好的效果, 反义 mRNA 技术在抑制乙烯合成, 延长果实的储藏和保鲜研究中取得了成功。用农杆菌将反义 ACC 氧化酶基因导入植株, 表达反义 ACC 氧化酶的西瓜<sup>[32]</sup>、甜瓜<sup>[33]</sup>等, 果皮色素含量、细胞壁降解酶的活性明显降低, 在空气中放置不能正常成熟, 不出现呼吸高峰, 只有经过乙烯或丙烯处理才能表现出正常果实的颜色、风味。

## 五、品质转基因研究

### 1. 果实特异调控基因工程

外源基因在转化植物中的定向、高效特异表达, 一直是基因工程研究的热点和难点。随着分子生物学研究的深入, 利用基因工程手段定向控制果实的发育、改良果实的品质成为可能。1997年, Shetty等<sup>[34]</sup>将烟草发病机理相关基因 *prla* 的启动子序列融合 *gus* 基因导入甜瓜, *gus* 基因在甜瓜果实中正常表达, 并且水杨酸处理可以增强 *prla* 启动子的表达。在环境胁迫条件下或者用水杨酸处理可以利用 *prla* 启动子序列驱动目的基因在甜瓜果实中特异表达。为通过基因工程改良甜瓜食品加工相关的性状和用甜瓜生产食品工业相关的特异蛋白提供了潜在的可能。

### 2. 果实甜味品质基因工程

目前人们对食品饮料中低热量的甜味剂的要求不断提高。甜蛋白是一种高甜度、低热量, 又不易为细菌所利用的特殊蛋白质, 并且还是一种味觉增进剂, 因此是一种很有发展前途的食品添加剂, 具有很高的经济价值。

1999年, Sawacka等<sup>[25]</sup>通过农杆菌介导法将甜蛋白 *thaumatin II* 基因 cDNA 导入黄瓜, 在转化黄瓜植株的果实中 *thaumatin* 基因得到表达, 并且可以品尝出甜味。

## 六、葫芦科作物基因转化的前景

转基因作物存在着潜在的安全性问题。抗病毒转基因植物的风险来源于病毒的基因与侵染转基因植物的另一病毒基因组可能相互作用, 主要包括重组、异源包壳和共生作用<sup>[35]</sup>。转基因植物还存在着食品安全性问题, 包括毒性、过敏性以及抗生素标记的安全性等问题。2001年, Reed-J等<sup>[36]</sup>用甘露糖-6-磷酸异构酶 (PMI) 基因取代常规的 *nptII* 作为一种有效的选择标记。PMI 可以促进果糖-6-磷酸和甘露糖-6-磷酸的可逆转换。不含有这种酶的植物细胞在用甘露糖作为碳源的培养基上不能生存。表达的 PMI 蛋白可以完全为哺育动物的胃液和肠液消化, 完全没有毒性。PMI 作为一种新型的选择标记, 在瓜类的基因转化中将有广泛的应用前景。

抗病毒基因工程在植物基因工程中一枝独秀, 其应用前景十分引人注目。运用 CPMP 策略成功得到不同程度的抗病毒葫芦科作物品种, 但是随着本领域研究的深入, 多项数据表明, 转基因植物的抗

性主要取决于RNA的表达程度,而不是CP基因在植物体内的积累<sup>[37,38]</sup>。CP高表达的植株并不一定对该病毒高抗,但是CP低表达的植株一定低抗<sup>[37]</sup>,RNA介导的保护而非CPMP的机理更有说服力。与CPMP相比,RNA介导的抗性具有高抗或免疫、抗病持久和生物安全性高的特点<sup>[11]</sup>,而在葫芦科作物中却鲜见报道。RNA介导的抗性作为一种新的抗病策略,具有潜在的应用价值。葫芦科作物枯萎病是一种毁灭性的病害,而相应的抗源却非常稀少,在生产上造成了巨大的经济损失。通过基因工程产生抗枯萎病的品种将成为今后葫芦科作物转基因研究的热点。

葫芦科作物的基因转化研究与生产正在蓬勃发展,1994年,美国转基因抗病南瓜通过了农业部食品安全性检验<sup>[39]</sup>;同年日本的一个转CMV-CP的甜瓜通过了日本农林部和渔业部的安全性检验<sup>[40]</sup>,并用于商业化生产。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,葫芦科作物基因转化工作必将得到飞速的发展。

### 参 考 文 献

- [1] R. B. Horsch et al., 1984, *Science*, **223**:496.
- [2] Wen-Shaw Chen et al., 1998, *Biochemistry and Molecular Biology International*, **6**:1201 - 1206.
- [3] 肖光辉、郑素秋, 1997, *园艺学报*, **24**(3):295 - 297.
- [4] Amit Gal-On et al., 2000, *Acta Hort.*, **510**:343 - 347.
- [5] Fang-GW and Grumet - R., 1990, *Plant Cell Reports*, **9**(3):160 - 164.
- [6] Pil S Choi et al., 1994, *Plant Cell Reports*, **13**:344 - 348.
- [7] Chee-PP et al., 1990, *Plant Cell Reports*, **9**:245 - 248.
- [8] Sapountzakis-G and Tsafaris-AS., 1996, *Report Cucurbit Fenetics Cooperative*, **19**:38 - 41.
- [9] 李平, 1995, *生物技术进展*, **L5**(6):28 - 32.
- [10] Powell-Abel et al., 1990, *Science*, **232**:738 - 743.
- [11] 郭兴启、温孚江, 2000, *生命科学*, **4**:166 - 169.
- [12] Slightom-JL et al., 1991, *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, **9**:201 - 206.
- [13] Gonsalves-C. et al., 1992, *Bio/Technology*, **10**:1562 - 1570.
- [14] Nishibayashi-S. et al., 1996, *Theoretical and Applied Genetics*, **93**:672 - 678.
- [15] Gonsalves-C. et al., 1994, *J. AM. Soc. Hortic. Sci.*, **119**:345 - 355.
- [16] Keiko Yoshioka et al., 1992, *Japan. J. Breed.*, **42**:277 - 285.
- [17] Tricoli-DM. et al., 1995, *Bio/Technology*, **13**:1458 - 1465.
- [18] Pang-shengzhi et al., 2000, *Molecular Breeding*, **6**:1:87 - 93.
- [19] George H Clough and Philip B Hamm, 1995, *Plant disease*, **79**:1107 - 1109.
- [20] Marc Fuchs. et al., 1997, *Molecular-Breeding*, **3**(4):279 - 290.
- [21] Huttner-E, Tucker-W., 1999, *Intracellular ribozyme application*, 271 - 283.
- [22] Huttner-E and Tucker-W., 2001, *Current Issues in Molecular Biology*, **3**:27 - 34.
- [23] S. H. T. Raharjo et al., 1996, *Plant Cell Reports*, **15**:591 - 596.
- [24] Y. Tabei S. et al., 1998, *Plant Cell Reports*, **17**:159 - 164.
- [25] Szwacka-M. et al., 1999, *Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture*, **36**:609 - 612.
- [26] Malepszy-S. et al., 2000, *Use of agriculturally important genes in biotechnology*, 131 - 134.
- [27] Ramon Serrano et al., 1999, *Scientia Horticulturae*, **78**:261 - 269.
- [28] Mireia Bordas et al., 1997, *Transgenic Research*, **6**:41 - 50.
- [29] Kodama-H. et al., 1993, *Transgenic-Research*, **2**:147 - 152.
- [30] 周瑞莲, 2001, *生态学报*, **6**:865 - 870.
- [31] Ohkawa-J. et al., 1994, *Plant Cell Reports*, **13**:481 - 488.
- [32] Wang Chunxia et al., 1997, *Acta Botanica Sinica*, **39**(5):445 - 450.
- [33] Guis-M. et al., 2000, *Scientia Horticultrae*, **84**:91 - 99.
- [34] Shetty-K. et al., 1997, *Food Biotechnology*, **11**:111 - 128.
- [35] 周雪平等, 2000, *农业生物技术学报*, **8**:71 - 75.
- [36] Reed-J. et al., 2001, *In Virto Cellular and Developmental Biology Plant*, **37**(2):127 - 132.
- [37] Haan, P. et al., 1992, *Bio/Technology*, **10**:1133 - 1137.
- [38] Fnnelli, I. and Malnoe, 1993, *P. Plant Microbe Interact*, **6**:284 - 292.
- [39] Krattiger-AF. et al., 1994, *Biosafety for sustainable agriculture: sharing biotechnology regulatory experience of the Western Hemisphere*, 247 - 266.
- [40] Hino-A and Lones-DD., 1994, *The modified plants and microorganisms, biosafety results of field tests of genetically* 177 - 182.