

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.00962

转基因番茄的研究现状及其产业化

王傲雪^{1,2}, 陈秀玲¹

1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030;
2. 东北农业大学生命科学学院, 哈尔滨 150030

摘要: 文章综述了近年来国内外番茄转基因研究的进展, 主要包括抗病虫害、抗逆、抗除草剂、耐储运、品质改良、雄性不育等方面的转基因番茄所获得的成果, 并且阐述了利用转基因番茄生产异源蛋白的研究进展。同时对番茄的产业化现状及存在的问题进行了分析, 并就现状对我国今后转基因番茄研究和产业化的前景进行了展望。

关键词: 转基因番茄; 研究现状; 产业化

Current status and industrialization of transgenic tomatoes

WANG Ao-Xue^{1,2}, CHEN Xiu-Ling¹

1. Northeast Agricultural University, College of Horticulture, Harbin 150030, China;
2. Northeast Agricultural University, College of Life Sciences, Harbin 150030, China

Abstract: In this review, the progress in transgenic tomato research, including disease and insect resistance, herbicide resistance, stress tolerance, long-term storage, quality improvement, and male sterility, were described. The recent researches on producing heterologous proteins using transgenic tomatoes were also reviewed. Furthermore, the industrialization status and problems of transgenic tomatoes were analyzed and the prospects of both research and industrialization in transgenic tomatoes were discussed.

Keywords: transgenic tomatoes; research status; industrialization

番茄(*Solanum lycopersicum*)是一种世界性蔬菜, 在蔬菜生产中占有举足轻重的地位, 也是基础生物学研究中的重要对象和模式植物, 在所有蔬菜作物中番茄的研究文献居于首位。由于番茄研究深入, 而且易于转化, 转基因番茄研究与应用得到了迅速的发展。

随着转基因技术的成熟与发展, 越来越多的转基因番茄已被研制成功, 并逐步走向产业化阶段。

本文就目前转基因番茄的研究以及产业化情况进行概述, 为进一步进行转基因番茄研究工作提供重要的基础信息, 同时也为进行转基因番茄的管理和研究提供理论基础。

1 转基因番茄的研究现状

目前, 在抗病虫害、抗除草剂、抗逆、延迟成熟、雄性不育等方面已经获得了转基因番茄植株,

收稿日期: 2010-11-16; 修回日期: 2011-06-16

基金项目: 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(编号: 20092325110001)和教育部科学技术研究重点项目(编号: 211043)资助

作者简介: 王傲雪, 博士, 教授, 研究方向: 植物生物技术。E-mail: wangaoxue@yahoo.com

网络出版时间: 2011-7-18 8:55:14

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20110718.0855.007.html>

同时利用番茄作为植物反应器生产医药蛋白的基因工程研究也取得了长足的进展。

1.1 抗病转基因番茄

抗病育种一直是育种工作者的主要育种目标,转基因番茄可以弥补常规抗病育种工作的不足,从而获得常规育种不能获得或很难获得的抗病番茄种质资源,因此引起了科研人员的极大兴趣。目前抗病的转基因番茄主要包括抗病毒、抗真菌及抗细菌病害等3个方面的研究内容。

1.1.1 抗病毒转基因番茄

烟草花叶病毒(TMV)、黄瓜花叶病毒(CMV)、苜蓿花叶病毒(AMV)和番茄黄花卷叶病毒(TYLCV)等是引起番茄病毒病的主要病原。在番茄转基因抗病毒育种中,主要利用病毒的外壳蛋白(Coat protein, CP)基因、复制相关蛋白(Replication-associated protein, REP)基因、卫星 RNA 基因和病毒片段的反义 RNA 基因等。外壳蛋白(CP)在转基因植物中的积累可以干扰病毒脱衣壳,抑制病毒在植物体中的复制、转运和积累从而使转基因植株获得了病毒抗性。1986年, Powell 等^[1]首次将烟草花叶病毒外壳蛋白基因(*TMV-CP*)转入番茄,这是第一例有成功报道的转基因番茄。我国首例批准商品化的抗病毒的转基因番茄也是利用 CP 蛋白实现的^[2],此后, CP 蛋白和 REP 蛋白多次用于番茄的抗病毒基因工程中^[3, 4]。利用反义 RNA 技术,通过设计病毒复制原点区域序列的反义 RNA 或反转录病毒模板的反义 RNA,最终阻断病毒的增殖,达到抑制病毒的作用也是番茄抗病毒研究的一个策略。朱秋菊^[6]利用反义 RNA 技术,构建了反义 *CMV-CP* 的植物表达载体,进行番茄转基因研究,得到具有 CMV 抗性的转基因植株。RNA 干扰(RNAi)技术在番茄的抗病毒研究中也起到了重要作用, Tamariz 等^[5]利用 RNAi 技术将 TYLCV 病毒的截短型复制相关蛋白基因正义/反义构建到 RNAi 表达载体上进行番茄转化,转基因植物可抑制 TYLCV 的复制,得到高抗 TYLCV 感染的转基因植株。MicroRNA 具有重要的调节功能,包括生长发育、形态建成、逆境应答、激素反应和病毒诱导等,因此 microRNA 基因的挖掘与利用是这几年的研究热点^[7~9]。Zhang 等^[10]构建了两个含有 2a、2b 基因和病毒 CMV 的 3'UTR 的 microRNA 载体并进行了

番茄转化,转基因后代对 CMV、TMV 及 TYLCV 产生了抗性。

1.1.2 抗真菌病害转基因番茄

能引起番茄真菌病害的病原菌种类多、范围广,受到广大育种工作者的重视。在番茄的抗真菌病害基因工程中,目前研究较多的是几丁质酶基因、葡聚糖酶基因、番茄自身的抗病基因、植保素基因等。几丁质酶和葡聚糖酶可以降解病原菌的细胞壁,从而破坏病原菌,降低真菌的侵染性。1995年, Jongedijk 等^[11]将烟草 I 型几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶转入番茄中,成功表达这两种酶的转基因番茄植株在接种枯萎病镰刀菌(*Fusarium Oxysporici* f.sp. *lycopersici*)后表现出一定抗性。Chen 等^[12]将水稻的几丁质酶基因和苜蓿的防御素基因同时转化到番茄中,经接种灰霉病病原菌 *Botrytis cinerea* 鉴定,同时含这两种基因的转基因植株表现出对灰霉病的高抗性。植物的植保素和抗菌蛋白在植物受到病原菌侵染时可以调动自身的防御反应,加强抗病性。Thomzik 等^[13]将葡萄的 *Vst1* 和 *Vst2* 两个基因(植保素合成的前导基因)转入到番茄中后,转基因番茄植株可产生反式白梨芦醇(植保素的一种),使番茄植株表现出对番茄晚疫病的高抗病性。多年来,大量的研究使转基因抗真菌病害取得了长足的进展(表1),但同时抗多种病害的转基因番茄还鲜有报道。Khan 等^[14]将山萮菜的芥末防卫素基因(*WD*)利用多元自主转化载体转入到番茄中,转基因植株对 *B. cinerea* (灰霉病病原菌)、*Alternaria solani* (早疫病病原菌)、*F. oxysporum* (枯萎病病原菌)和 *Erysiphe lycopersici* (白粉病病原菌)均产生抗性。

1.1.3 抗细菌病害转基因番茄

番茄的细菌病害主要有细菌性斑点病、青枯病及溃疡病等。Tai 等^[15]利用转基因技术将来源于辣椒的 *Bs2* 基因(细菌性斑点病抗性基因)转入番茄中,获得的转基因植物对由黄单孢菌(*Xanthomonas campestris*)引起的细菌性斑点病的抗病性明显提高。转化学合成的巨大蚕蛾的阳离子溶菌肽 B 的番茄植株,接种细菌性青枯病(*Ralstonia solanacearum*)和细菌性斑点病(*X. campestris* pv. *vesicatoria*)病原菌后,转基因植株对两种病害均表现出高抗病性^[16]。乙烯在番茄植株抗溃疡病(*Clavibacter michiganensis* subsp. *mi-*

chiganensis)中起到重要作用, Balaji 等^[17]将细菌 ACC 脱氨酶基因 *ACD*(Bacteriac ACC deaminase)转入到番茄中, *ACD* 基因超量表达阻碍了乙烯的合成, 转基因植株中溃疡病的病症发生推迟。

1.2 抗虫转基因番茄

在抗虫转基因番茄研究方面, 主要应用的是来自苏云金芽孢杆菌(*Bacillus thuringiensis*)的 *Bt* 基因。1987 年, Fischhoff 等^[25]首次用 Ti 质粒将 *Bt* 毒素蛋白基因 *CryIA(b)*转入番茄, 在 CaMV 35s 启动子的控制下, 转基因植株大大地提高了对烟草天蛾的抗性能力, 同时转 *CryIA(b)*和 *CryIC* 基因的番茄植株可对甜菜夜蛾、烟草夜蛾产生抗性^[26]。植物中的抗性基因也有应用报道, 如利用雪花莲外源凝集素基因

(*GNA*)产生抗蚜虫的转基因番茄^[27], 利用白杨的几丁质酶基因(*WIN6*)可降低马铃薯甲虫对转基因番茄的侵染^[28]。此外, Chen 等^[29]将从普通番茄抗根结线虫品系中克隆得到的根结线虫抗性基因(*Mi* 基因)转入到易感番茄品系中, 转化植株的抗根结线虫能力显著提高。2010 年, Chan 等^[30]将芋头的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 *CeCP1* 基因转入到番茄中, 获得了对根结线虫的侵染和繁殖均有抑制作用的转基因番茄。

1.3 抗逆转基因番茄

国内外对番茄抗逆的转基因研究主要集中在耐盐、耐寒、耐旱、耐热等方面, 其中耐盐、耐寒的研究尤为深入(表 2)。自 1991 年 Hightower 等^[31]将比目鱼体内的抗冻蛋白(AFP)基因转入番茄、1997

表 1 抗病转基因番茄研究现状(2005 年以后)

分类	基因及来源	产生的作用	参考文献
抗病 毒	TYLCV 病毒重叠区 C1/C2	将 TYLCV 病毒重叠区 C1/C2 区正向/反向导入到番茄中, 启动 RNA 干扰机制, 抑制了病毒的表达, 获得抗 TYLCV 病毒的番茄植株。	[18]
	TYLCV 的 CP 蛋白编码基因 (<i>vI</i>)	将靶标为 <i>vI</i> 基因的间隔区内的一段发夹 RNA(ihpRNA), 利用 RNA 干扰技术构建了载体, 转基因植株对 TYLCV 病毒具有抗性。	[4]
	TYLCV 病毒的截短型复制相关蛋白(Rep) 基因	将 <i>TYLCV-REP</i> 基因正义/反义构建到 RNAi 表达载体上进行番茄转化, 转基因植物可抑制 TYLCV 的复制, 得到高抗 TYLCV 感染的转基因植株。	[6]
	人工的锌指蛋白(AZP)	阻止 TYLCV 复制蛋白(Rep)与复制起始位点的结合, 人工的 AZP 对复制起始位点的亲和性比 Rep 高, 可有效阻止 Rep 的结合。	[19]
	马铃薯棱状块茎病毒	利用马铃薯棱状病毒(PSTVd)侵染序列的发夹 RNA(hpRNA), 构建了小 RNA 干扰 (siRNAs)载体, 并转化番茄, 可以产生对 PSTVd 的抗性, 并且抗性的大小与来源于 hpRNA 的 siRNAs 的高水平积累有关。虽然 PSTVd 的 siRNA 不能使病毒的 RNAs 沉默, 但是来源于 hpRNA 的 siRNAs 可以有效的与成熟的病毒 RNA 结合。	[20]
	人工 microRNA	人工 MicroRNA 可以降解入侵的病毒 RNA, 最终产生病毒抗性。表达人工 MicroRNA 的转基因番茄产生了对 CMV、TMV 及 TYLCV 的高抗性。	[10]
抗 真 菌 病 害	玉米的 β -葡聚糖酶(M-GLU) 或 α -紫茉莉抗菌肽(Mj-AMP1)	转基因植株具有番茄早疫病抗性。	[21]
	Endo- β -1,4- 葡聚糖酶基因 <i>Cell</i> 和 <i>Cel2</i>	构建反义 <i>Cel1-Cel2</i> 载体并转化番茄, 转基因植株具有对 <i>B. cinerea</i> 的抗性。反义 <i>Cel1-Cel2</i> 可以加速胼胝质的积累, 胼胝质的积累与对 <i>B.cinerea</i> 的抗性具有相关性, 但反义 <i>Cel1-Cel2</i> 降低了番茄对 <i>Pseudomonas syringae</i> 的抗性。	[22]
	水稻几丁质酶基因和苜蓿防卫素基因	T ₁ 代转基因植株表现出对 <i>B. cinerea</i> 的抗性, 并且抗性大小与基因的表达水平相关, 双价表达的转基因番茄呈现的抗性最高。	[13]
	病毒复制抑制子 <i>IVR</i> 基因	可以产生对 <i>B. cinerea</i> 的部分抗性, 并且抗性与 IVR 的转录有关。	[23]
	山嵛菜的芥末防卫素基因 (<i>WD</i>)	利用多元自主转化载体将 <i>WD</i> 基因转入到番茄中, 转基因植株对番茄灰霉病、早疫病、枯萎病和白粉病均产生抗性。	[14]
抗 细 菌 病 害	甜椒的铁氧还原蛋白 I(PFLP)	在根际高表达 PFLP, 可增加对青枯病抗性。	[24]
	化学合成的阳离子溶菌肽 B 基因(<i>CB</i>)	将化学合成的 <i>CB</i> 基因与大麦的 α -淀粉酶分泌型信号肽构建成为 pBI121-spCB 载体, 转基因番茄对细菌性枯萎病和细菌性斑点病具有显著抗性。	[16]

年黄永芬等^[32]将美洲拟蝶鱼的 *AFP* 基因导入番茄获得了抗冷性提高的转基因番茄植株, 拉开了抗冷转基因番茄的帷幕。随后, 赵春梅等^[33]将由 *CaMV 35S* 启动子驱动的内质网小分子热激蛋白(*ER2sHSP*)基因导入番茄, 在冷胁迫下, 转基因番茄的冷害症状减轻, 叶绿素含量损失少, 体内积累的丙二醛(MDA)含量少, 电解质外渗程度低, 具有较高的净光合速率和最大光化学效率, 具有较强的冷胁迫耐性。Singh 等^[34]采用 *Rd29A* 启动子, 将 *At-CBF1* 转化到番茄中, 转基因 T_1 代植株在形态学和农艺学性状上与非转基因植株无差别, 但耐冷性提高了 40%(4℃处理 3 d), 转基因植株 SOD、NPQ 增高, MDA 含量降低。

此外, 番茄耐热及耐旱基因工程也进行了大量研究。将拟南芥 *C* 重复/脱氢反应结合因子 1(*CBF1*) 基因转入番茄, 在逆境条件下, 可提高植株对冷害、干旱及盐胁迫的适应^[35,36]。Cheng 等^[37]将酵母 *SAMDC*(*S*-adenosyl-*I*-methionine decarboxylase, *S*-腺苷甲硫氨酸脱羧酶)基因通过叶盘法转入到番茄中,

转基因植株可经受 38℃ 高温。Pan 等^[38]研究表明, 在番茄中表达缺失 *EAR* 域的 *ERF* II 型蛋白可提高植株的整体抗逆性。Li 等^[39]将草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)的细胞凋亡抑制基因 *SfIAP* 转入到番茄后, 转基因番茄对热胁迫、盐胁迫、付马菌素(FB1)及早疫(*Alternaria alternata*)病抗性均比对照提高。

microRNA 在番茄的抗逆中也有应用, *Sly-miR169c* 负调控番茄干旱反应的气孔运动, 过量表达 *Sly-miR169c* 可以降低气孔打开、减少蒸腾速率、降低叶片失水度、提高抗旱性^[40], 而转 *ath-miR399d* 番茄可以增加根部对 P 的吸收^[41]。

1.4 抗除草剂转基因番茄

作物中除草剂的解毒或降解主要利用来源于植物或微生物的解毒酶的作用, 主要包括: (1)针对莠去津的谷胱甘肽 *S*-转移酶或谷胱甘肽转移酶; (2)针对溴草腈的腈水解酶(由 *bxn* 基因编码); (3)针对草丁膦的草丁膦乙酰转移酶 *PAT*(由 *Bar* 基因编码); (4)针对有机磷农药的水解酶 *OPH*(*Organophosphorus*

表 2 抗逆转基因番茄研究现状(2005 年以后)

分类	基因及来源	产生的作用	参考文献
耐冷	过量表达转录因子 <i>TERF2/LeERF2</i>	过表达番茄 <i>TERF2/LeERF2</i> 转录因子的转基因番茄增加了耐冷性。	[42, 43]
	拟南芥 <i>AtIpk2b</i> 基因	利用 <i>Cre/loxP</i> DNA 重组体系, 得到含 <i>AtIpk2b</i> 基因的无选择标记番茄植株, 转基因番茄具有高度的耐旱、耐冷及氧化应激能力。	[44]
	ω -3 脂肪酸脱饱和酶 <i>FAD3</i> 和 <i>FAD7</i>	ω -3 脂肪酸脱饱和酶 <i>FAD3</i> 和 <i>FAD7</i> 可以将亚油酸变为亚麻酸, 超量表达 <i>OE-FAD</i> 改变了脂肪酸的构成, 最终导致芳香味的改变, 并增加了耐冷性。	[45,46]
	拟南芥 <i>CBF1</i> 基因 (<i>At-CBF1</i>)	采用 <i>Rd29A</i> 启动子, 将 <i>At-CBF1</i> 转化到番茄中, 转基因 T_1 代植株在形态学和农艺学性状上与非转基因植株无差别, 但耐冷性提高 40%(4℃处理 3 d), 转基因植株 SOD、NPQ 增高, MDA 含量降低。	[34]
	番茄甘油-3-磷酸酰基转移酶(<i>LeGPAT</i>)	过表达 <i>LeGPAT</i> 基因可以增加类囊体膜中 PG 的顺式非饱和脂肪酸水平, 加快冷胁迫后 <i>PSI</i> 光抑制的恢复。	[47]
耐盐	甜椒 <i>CaKR1</i> 基因	在番茄中过量表达甜椒 <i>CaKR1</i> 基因, 可以提高对番茄晚疫病(<i>Phytophthora infestans</i>)的抗性, 提高耐盐性及对氧化的应激能力。	[48]
	渗透蛋白基因	过表达渗透蛋白基因的转基因番茄耐盐性和耐旱性增加。	[49]
	转录因子 <i>SIAREB1</i>	过表达转录因子 <i>SIAREB1</i> 可以增加番茄的耐盐性和耐涝性。	[50]
	GDP-甘露糖 3',5'-异构酶 (<i>SIGMEs</i>)	过表达 <i>SIGMEs</i> 基因可以导致抗坏血酸积累, 并增加植株的耐冷、耐盐和氧化应激能力。	[51]
	细菌胆碱氧化酶基因(<i>codA</i>)	转基因番茄植株对盐胁迫和水分胁迫耐性增强。	[52]
抗旱	<i>microRNA169</i> (<i>Sly-miR169c</i>)	<i>Sly-miR169c</i> 负调控番茄干旱反应的气孔运动。过表达 <i>Sly-miR169c</i> 可以降低气孔打开、减少蒸腾速率、降低叶片失水度、提高抗旱性。	[40]
耐高温	酵母 <i>S</i> -腺苷甲硫氨酸脱羧酶基因(<i>SAMDC</i>)	将酵母 <i>SAMDC</i> 基因通过叶盘法转入到番茄中, 转基因植株可经受 38℃ 高温。	[37]

hydrolase)的编码基因 *opd* (Organophosphorus pesticide degrading)。转基因番茄的抗除草剂性能主要通过修饰或过量表达除草剂作用的靶蛋白或转入解毒酶的手段来实现。*Bar* 基因可乙酰化草丁膦的自由氨基使草丁膦失去作物毒性; EPSP 合成酶(5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthetase)是草甘膦作用的靶标, 通过 EPSP 合成酶突变基因, 可以使作物对草甘膦的亲和力下降, 从而得到抗草甘膦植株。现已获得抗草丁膦的转 *Bar* 基因番茄^[53]和抗草甘膦的转突变的 EPSP 合成酶基因番茄等^[54]。此外, 利用 *opd* 基因得到的转基因番茄具有水解有机磷农药毒磷的活性, 最大酶活约 11.59 U/mg 可溶性蛋白^[55]。

1.5 耐贮及延熟的转基因番茄

耐贮及延熟的转基因番茄主要通过抑制细胞壁降解或抑制乙烯合成来实现。乙烯的最初前体是甲硫氨酸, 首先甲硫氨酸经腺苷甲硫氨酸水解酶(S-adenosylmethionine hydrolase, SAMase)作用合成 SAM (S-腺苷-L-甲硫氨酸), SAM 在 ACC 合成酶的作用下合成 ACC, 然后 ACC 在 ACC 氧化酶(EFE)的作用下分解出乙烯, 而这两种酶被大的基因家族

所编码。如果在植物体内表达 ACC 合成酶或 ACC 氧化酶的反义 RNA, 就会延迟成熟。我国第一个商品化的转基因番茄就是通过转反义的 EFE 基因实现的, Kramer 等^[56]也利用编码 SAMase 的基因获得了转基因成熟延迟的番茄植株。

另外, 细胞壁水解酶与果实的成熟也有密切关系, 世界上首例商品化的转基因番茄 Flavr SavrTM 是通过转反义的多聚半乳糖醛酸酶 *PG* 基因, 使细胞壁的果胶降解而得到的耐贮番茄的例子, 转反义 *PG* 基因降低了转基因番茄的 *PG* 酶活性, 改良了果实风味、颜色及甜度, 最重要的是延长了果实的货架寿命^[57]。随后, Wang 等^[58]将脱氧辅蛋白酶(Deoxyhypusine synthase)基因分别转入番茄, 也获得延迟成熟的番茄植株。

1.6 品质及风味改良的转基因番茄

目前改良番茄品质的研究主要有增加番茄甜度、提高番茄可溶性固形物和番茄红素含量(表 3)。Bartoszewski 等^[59]将非洲竹芋(*Thaumatococcus daniellii* Benth)中的奇异果甜蛋白基因转入番茄中, 经感官测试, 转基因番茄的甜度显著高于对照。

表 3 品质及风味改良转基因番茄研究现状(2005 年以后)

基因及来源	产生的作用	参考文献
<i>LTPG1</i> 或 <i>LTPG2</i>	构建 <i>LTPG1</i> -或 <i>LTPG2</i> -特异的双链 RNA 干扰(dsRNAi) 载体, 并进行番茄转化, 转基因植株的 <i>Lyce 3</i> 基因沉默, 阻止其积累, 降低番茄的过敏反应。	[64]
酵母肌动蛋白	利用 RNAi 技术, 沉默了肌动蛋白基因, 产生了 <i>Lyce1</i> 减弱的番茄果实, 降低了番茄的过敏原。	[65]
鼠的金属硫蛋白基因(<i>MT-1</i>)	高表达 <i>MT-1</i> 基因的转基因番茄具有高锌含量(32.7 mg/100 g FW 鲜重)和高 SOD 酶活性(68.6 U/g FW)。	[66]
乙烯受体基因 <i>LeETR1</i> 和 <i>LeETR2</i>	利用 RNAi 的方法, 沉默了乙烯受体基因 <i>LeETR1</i> 和 <i>LeETR2</i> , 转基因后代果实中增加了可溶性固形物含量、酸度及电解质积累, 果实硬度、粘度及弹性下降, 货架期缩短。	[67]
内源的光形态建成调节基因(<i>DET1</i>)	通过 RNAi 介导的方法, 沉默了 <i>DET1</i> 基因, 胡萝卜素和类黄酮素含量得到了显著提高。	[68]
线粒体苹果酸酶或延胡索酸酶	通过反义 RNA 技术, 降低了番茄的线粒体苹果酸酶或延胡索酸酶活性, 可以对果实的货架期及细菌病害的侵染发生变化。	[69]
苹果的亚精胺合成酶基因(<i>Md-SPDS1</i>)	转基因番茄番茄红素的合成酶酶系表达量升高, 降解酶酶系表达量下降, 使转基因番茄中番茄红素量增加。	[60]
苹果的 <i>HPT</i> 基因(<i>Md HPT1</i>)	<i>HPT</i> 是天然维生素 E(tocopherol)合成的重要酶, 过量表达 <i>Md HPT1</i> 基因的转基因番茄, 果实中的 α -tocopherol 增加了 1.7 倍。	[70]
非洲奇异果蛋白基因(<i>MIR</i>)	利用 <i>MIR</i> 自身的终止子, 并对 <i>MIR</i> 根据密码子偏爱性进行人工改造, 获得的转基因番茄中 <i>MIR</i> 蛋白的浓度达到 287 $\mu\text{g/g}$, 比单转 <i>MIR</i> 基因对照提高了 2.2 倍。	[71,72]

Neily 等^[60]将苹果中的亚精胺合成酶基因(*Md-SPDS1*)转入到番茄中,番茄红素的合成酶系表达量升高,降解酶系表达量下降,使转基因番茄中番茄红素量增加。Carmi 等^[61]在番茄子房中特异表达发根农杆菌 *rolB* 基因,得到单性结实番茄,转 *rolB* 基因的植株具有植物生长素的特性,该转基因番茄在早产性、丰产性及可溶性固形物均有所提高。风味也是影响番茄销量的重要品质,1996 年, Wang 等^[62]在番茄中表达了酵母 *D-9* 脱饱和酶基因,使番茄中影响风味的化合物顺式-3-乙烯醇、1-己醇、乙醛和顺式-3-乙烯醛含量发生变化。Davidovich-Rikanati 等^[63]将罗勒(*Ocimum basilicum*)中的香叶醇合酶基因在番茄中表达,改善了番茄的口感和芳香味。

1.7 雄性不育的转基因番茄

对于自花授粉作物,利用雄性不育系制种可以简化育种步骤,省时省力,而且能提高制种质量。因此,自 Mariani 等^[73]利用花粉绒毡层特异启动子启

动核糖核酸酶基因在番茄中表达,引起花粉败育,得到雄性不育的转基因番茄后,利用雄性不育系的转基因番茄研究也有一些文献报道。Sandhu 等^[74]利用 RNAi 技术将核基因 *Msh1* 的表达抑制后,使线粒体 DNA 重排,得到细胞质雄性不育植株;宋洪元等^[75]利用 *Cre/lox* 重组技术,得到了雄性不育恢复系的番茄基因工程植株,这些都推动了番茄雄性不育基因工程研究,为雄性不育制种的利用及简化杂交制种技术提供了材料基础。

1.8 表达医药蛋白的转基因番茄

利用番茄作为生物反应器生产疫苗、医药蛋白等研究正成为番茄基因工程研究的一个热点(表 4)。目前主要用番茄作为生物反应器生产抗原,从而使人体获得抗体,另外就是直接生产有功能的医药蛋白。在抗原方面,主要获得了含狂犬病病毒 G 蛋白的转基因番茄^[76]、含有乙型肝炎病毒表面抗原基因(HBsAg)的转基因番茄^[77~81]、含有呼吸道合包体病

表 4 表达医药蛋白的转基因番茄研究现状(2005 年以后)

基因及来源	产生的作用	参考文献
肠病毒 71(EV71)的 VP1 衣壳蛋白	在转基因番茄中 vp1 含量为 27 μg/g FW, 在喂食转基因番茄的 BALB/c 小鼠中可检测到 VP1 特异性降解物 IgA 和 IgG 血清, 并且该血清可以中和 EV71 对横纹肌细胞的侵染, 表明喂食 VP1 转基因番茄的小鼠获得了免疫。	[93]
乙型肝炎病毒(HBV)、S 基因、preS2-S 基因	含乙型肝炎表面抗原(HBsAg)的转基因番茄, 瞬时 S 蛋白的表达量可达到 489.5 ng/g DW(干重)。稳定的 M 蛋白可达到 33.2~72.5 ng/mg TSP(总可溶性蛋白)	[77~81]
霍乱 TCPA(pilus subunit A)和 CTB(cholera toxin B)基因	将编码 TCPA 的 P4 或 P6 抗原的序列和 CTB 基因共表达达到番茄中, 在转基因番茄果实中, CTB-P4 和 CTB-P6 蛋白量分别占总可溶性蛋白的 0.17%和 0.096%。	[85,86]
sDPT 多肽	表达 sDPT 多肽的转基因番茄可以作为防治白喉、百日咳和破伤风的可食疫苗。	[94,95]
人的表皮生长因子 ((hEGF))	通过 RIA 方法测定重组蛋白含量为 3.48 ± 1.01 ng/g, 喂食小鼠试验表明, 转基因番茄汁可以预防酒精引起的溃疡, 并降低胃损伤。	[96]
白介素(IL)-12	小鼠喂食转基因番茄可以增加对 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv 或 MDR(multi-drug-resistant clinical isolate)抗性及其带来的肺组织损伤。	[90]
人的凝血因子 IX(hFIX)	构建了含 hFIX 的双价载体 PG-pRD12-hFIX 并进行了番茄转化, hFIX 蛋白表达量达 15.84 ng/g FW, 凝血实验表明, 转基因番茄具有凝血作用。	[91]
人 α-胰凝乳蛋白酶蛋白基因(AAT)	AAT 基因经改造后转入到番茄中, 重组蛋白可以适当的糖基化, 并具有胰蛋白酶活性的抑制作用。	[92]
人的 β-淀粉体(AB)	喂食小鼠实验表明, 可使小鼠产生免疫反应, 有可能用来防治老年痴呆症。	[97]
串联的人胸腺素 α1 基因	根据植物偏爱密码子对 <i>Tal</i> 基因进行优化, 并将其顺式串联成四联体, 同时在单体基因间插入肠激酶剪切位点基因序列, 以便表达的融合蛋白可以被肠激酶切割成单体。 <i>Tal</i> 表达量最高相当于 20.2 μg/g FW, 高于单体基因的表达量。	[98,99]

毒(RSV)F 蛋白基因的转基因番茄^[82]、含 Norwalk 病毒衣壳蛋白转基因番茄^[83]、可产生 SARS 冠状病毒(SARS-CoV)S 蛋白特异抗体 IgA 的转基因番茄^[84]及可产生抗霍乱疫苗的番茄等^[85,86]。在功能蛋白方面, Mor 等^[87]将人乙酰胆碱酯酶转入到番茄中, 转基因番茄果实中可检测到高量表达的乙酰胆碱酯酶活性, 可用来预防和治疗有机磷引起的中毒。陈溪等^[88]利用植物偏爱密码子人工合成了人胰岛素基因, 转化番茄后, 为口服方式摄入胰岛素达到预防 I 型糖尿病的成功奠定了基础。此外, 小鼠的白细胞介素 IL-12 蛋白^[89,90]、人凝血 IX 因子蛋白^[91]、 α -1-抗胰蛋白酶蛋白^[92]等都在番茄中得到了成功表达。

2 转基因番茄产业化现状

转基因植物自诞生之日起, 发展非常迅猛, 已经创造了巨大的经济、社会和环境效益, 种植转基因作物已经成为农业经济增长的重要生长点。据 ISAAA (International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, 国际农业生物技术应用服务组织)报道, 2009 年, 25 个国家的 1 400 万农民种植了 1.34 亿公顷转基因作物, 相比 2008 年, 种植面积上升了 7%。

转基因番茄的商品化及产业化也引起了人们的广泛关注。在 1985~2010 年间, 共有 652 个番茄品种进行了田间试验, 并且于 1994 年美国 Calgene 公司开发出的转基因耐贮番茄 Flavr SavrTM 在世界上被首次批准商业化, 该产品的商业化标志着转基因技术改良品种进入产业化阶段。目前在美国已经有 6 个番茄品种被批准上市, 这些转基因番茄包括耐贮、抗病、多功能保健番茄等。我国也有 1 个转基因番茄品种进入了产业化阶段, 即华中农业大学的转基因耐贮番茄“华番一号”(商品名“百日鲜”), 1997 年农业部基因工程安全委员会已批准这种耐储存番茄进行商业化生产。墨西哥、日本均有一个番茄品种被批准种植(引自 GMO compass)。

由于转基因产品的上游研究与下游的成果转化、产业化严重脱节, 虽然进行田间试验的转基因番茄品种很多, 但真正推广产业化生产的并不多。随着转基因技术的日趋成熟、消费者对转基因产品认识的提高, 相信番茄转基因商品化、产业化不久将会得到极大的发展。

3 目前转基因番茄产业化应关注的问题

转基因作物由于其产生巨大的经济、社会、环境效应, 其产业化势在必行。面对国际上竞争日益激烈的转基因市场, 我们应该充分认识到转基因作物产业化的趋势, 正确评价转基因产业化面临的问题, 并应充分利用转基因新技术培育环境友好、资源节约、营养保健、高产优质的转基因作物新种质。

3.1 转基因技术平台的研究

虽然番茄转基因技术比较成熟, 但不是一蹴而就的技术, 番茄转基因技术中的技巧和大量基因表达技术都需要丰富的经验、材料和理论基础。就我国现有文献看, 虽然都获得了转基因植株, 但是获得的转基因植株进入产业化阶段的少之又少, 这除了基因本身的功能外, 很大程度上就是基因表达水平怎样和目的基因的遗传是否稳定, 而这依靠技术研究的不断完善。但我国在转化技术方面的研究较少, 基本都是参考国外文献进行的。在转基因技术方面, 从国外文献中可以看出不断有新的转基因技术报道或专利^[100~107]。因此, 在我国还应该加强技术研究的工作, 以完善转基因番茄的技术体系, 做到目的基因不仅可以转化, 而且转化效率高、表达水平高、遗传稳定。

3.2 转基因技术与常规育种的结合

转基因技术只是育种中的一项技术, 不能将其与常规育种分离开来。转基因育种除了直接产生生产可用的番茄新品种以外, 很大程度上就是为育种上提供新的番茄种质资源, 而这些优异基因和常规的性状育种相结合, 就可以培育出适应市场需要的番茄新品种, 满足市场对番茄品种的需求。另外, 有些育种目标通过常规育种可以解决, 就不一定需要通过基因工程来创造, 免去基因工程的繁琐程序, 例如有些抗病的转基因番茄其实完全可以通过常规育种来完成。目前, 我国的研究小组还存在着转基因技术与常规育种结合不紧密问题, 常规育种研究不进行转基因研究, 转基因研究没有很好地结合到常规育种中去, 在一定程度上阻碍了转基因种质资源或品种的产业化过程, 或者是没有充分发挥转基因种质资源或品种的作用。

3.3 转基因生物安全性的考虑

转基因安全问题仍然是人们要考虑的重要问题,由于转基因是一门新技术,因此引发了大众对其安全性问题的思考,目前人们对其安全性的疑虑主要集中在以下几个方面:1)由于转基因植株具有的抗虫抗病等超级功能,这些基因能否转入到野生种中,使野生种变成超级杂草,导致难于防治;2)标记基因及抗生素抗性基因能否和有害病原菌重组,导致超级病原菌的产生;3)目的基因的安全性问题。对于转基因番茄,生态性问题并不是很大的问题,因为番茄属于严格的自花授粉作物,很难传播,而且番茄即使和其近缘种也很难杂交,而且番茄起源于南美,在我国的近缘野生种几乎没有。加之,由于番茄易于转化,采用无标记基因的转基因技术较为成熟,标记基因去除也容易达到;关键是目的基因要进行严格筛选,避免使用人体过敏或对人体有害的基因,这是番茄转基因之前要考虑的重要因素。目前使用的目的基因还没有发现有害,从理论上说也不会有害,推广的转基因番茄品种还没有出现对人体有害的现象。尽管如此,转基因番茄的产业化进度还应该谨慎推广、严格审批,充分考虑产业化中可能存在的安全性问题。

3.4 对转基因植物的认识

尽管人们还没有发现转基因植物对人体有害,尤其已产业化的转基因植物,但是人们对转基因的认识程度还有待进一步加深。一部分人认为转基因植物普遍存在对人体有害的物质,这是不科学的。转基因番茄是否对人体有害,主要是转入的目的基因是什么,如果目的基因无害,甚至本身就来自于作物本身,目的基因就不存在问题,即使来源于其他物种,基因的功能已经明确,是否有害可以做理论上的推断和实验上的事先验证。而且标记基因现在在转基因技术方面也可以得到解决。从科学理论本身,就是加强转基因植物的监控,避免不必要的风险,把一切对人体可能发生的危害避免。随着转基因作物产业化进程的加速,越来越多的问题将会迎刃而解,安全性问题也越来越被科学所阐明,转基因植物的安全性越来越会被人们所理解和接受,当然,这需要时间的验证和人们对转基因植物知识的认识。

4 展望

番茄由于转基因技术成熟,所以创造转基因番茄新种质有着其它作物无法比拟的优势。因此,转基因番茄可以作为基因功能鉴定的工具,很多发现的基因可以用番茄作为鉴定的受体。由于番茄的这一特点,番茄可以由单一性状的定向改变向多性状的定向改变过渡,即有单一基因的转化也有多基因的转化,这样可以使番茄同时获得多个优异性状,从而创造优异的番茄种质资源。但这里要说明的是,转基因技术必须和常规育种相结合,转基因技术创造的优异种质资源才能快速进入到品种流通领域,也才能最大发挥其效能,从而为农业生产服务。同时,由于番茄可以鲜食,所以更多的口服疫苗可以通过转基因番茄来实现。另外,由于植物具有细胞壁等保护作用,部分蛋白在消化道中可以被降解从而被人体吸收一部分,因此,一部分功能蛋白也可以在番茄中表达而被人体吸收,从而创造越来越多的集保健、营养和生长良好于一体的番茄新种质。此外,随着基因敲除技术和基因表达抑制技术的发展,对番茄中生长发育不利基因的抑制或敲除也会越来越受到科学家的重视,通过基因敲除或抑制从而间接创造易于生长或具有优良性状的转基因番茄,由于技术本身是对植物的操作,安全性问题容易被非专业人士所理解和接受,所以更容易产业化和推广。随着更多基因的分离以及功能的阐明,更多的转基因番茄将被创造出来,越来越多的转基因番茄品种和种质资源也势必推动转基因番茄的产业化进程,从而促进蔬菜产业的发展。

参考文献(References):

- [1] Powell AP, Nelson RS, De B, Hoffmann N, Rogers SG, Fraley RT, Beachy RN. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science*, 1986, 232(4751): 738-743.
- [2] 周北雁, 李毅, 陈章良. 北京大学的抗病毒转基因作物. *生物技术通报*, 1999, (3): 42-45.
- [3] Kaniewski W, Ilardi V, Tomassoli L, Mitsky T, Layton J, Barba M. Extreme resistance to cucumber mosaic virus (CMV) in transgenic tomato expressing one or two viral coat proteins. *Mol Breed*, 1999, 5(2): 111-119.
- [4] Zrachya A, Kumar PP, Ramakrishnan U, Levy Y, Loyter A, Arazi T, Lapidot M, Gafni Y. Production of siRNA

- targeted against TYLCV coat protein transcripts leads to silencing of its expression and resistance to the virus. *Transgenic Res*, 2007, 16(3): 385–398.
- [5] Tamarzizt HB, Chouchane SG, Lengliz R, Maxwell DP, Marrakchi M, Fakhfakh H, Gorsane F. Use of tomato leaf curl virus (TYLCV) truncated *Rep* gene sequence to engineer TYLCV resistance in tomato plants. *Acta Virol*, 2009, 53(2): 99–104.
 - [6] 朱秋菊. 转核酶基因、反义和正义 CMV-CP 基因番茄的抗黄瓜花叶病毒(CMV)研究[学位论文]. 北京: 中国科学院研究生院(植物研究所), 2005.
 - [7] Itaya A, Bundschuh R, Archual AJ, Joung JG, Fei ZJ, Dai XB, Zhao PX, Tang YH, Nelson RS, Ding B. Small RNAs in tomato fruit and leaf development. *Biochim Biophys Acta*, 2008, 1779(2): 99–107.
 - [8] Yin ZJ, Li CH, Han XL, Shen FF. Identification of conserved microRNAs and their target genes in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Gene*, 2008, 414(1–2): 60–66.
 - [9] Bazzini AA, Asís R, González V, Bassi S, Conte M, Soria M, Fernie AR, Asurmendi S, Carrari F. miSolRNA: A tomato micro RNA relational database. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 1–7.
 - [10] Zhang XH, Li HX, Zhang JH, Zhang CJ, Gong PJ, Ziaf K, Xiao FM, Ye ZB. Expression of artificial microRNAs in tomato confers efficient and stable virus resistance in a cell-autonomous manner. *Transgenic Res*, 2011, 20(3): 569–581.
 - [11] Jongedijk E, Tigelaar H, Vanroekel JSC, Bresvloemans SA, Dekker I. Synergistic activity of chitinases and β -1,3-glucanases enhances fungal resistance in transgenic tomato plants. *Euphytica*, 1995, 85(1–3): 173–180.
 - [12] Chen SC, Liu AR, Wang F H, Ahammed G J. Combined overexpression of chitinase and defensin genes in transgenic tomato enhances resistance to *Botrytis cinerea*. *Afr J Biotechnol*, 2009, 8(20): 5182–5188.
 - [13] Thomzik JE, Stenzel K, Stöcker R, Schreier PH, Hain R, Stahl DJ. Synthesis of a grapevine phytoalexin in transgenic tomatoes (*Lycopersicon esculentum* Mill.) conditions resistance against *Phytophthora infestans*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1997, 51(4): 265–278.
 - [14] Khan RS, Nakamura I, Mii M. Development of disease-resistant marker-free tomato by R/RS site-specific recombination. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(6): 1041–1053.
 - [15] Tai TH, Dahlbeck D, Clark ET, Gajiwala P, Pasion R, Whalen MC, Stall RE, Staskawicz BJ. Expression of the *Bs2* pepper gene confers resistance to bacterial spot disease in tomato. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(24): 14153–14158.
 - [16] Jan PS, Huang HY, Chen HM. Expression of a synthesized gene encoding cationic peptide cecropin B in transgenic tomato plants protects against bacterial diseases. *Appl Environ Microbiol*, 2010, 76(3): 769–775.
 - [17] Balaji V, Mayrose M, Sherf O, Jacob-Hirsch J, Eichenlaub R, Iraki N, Manulis-Sasson S, Rechavi G, Barash I, Sessa G. Tomato transcriptional changes in response to *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* reveal a role for ethylene in disease development. *Plant Physiol*, 2008, 146(4): 1797–1809.
 - [18] Rezk AAS, Abdallah NA, Abdel AM, Nakhla MK, Mazyad HM, Maxwell DP. Transgene-mediated RNA silencing of TYLCV genes affecting the accumulation of viral DNA in plants. *Arab J Biotech*, 2006, 9(1): 143–158.
 - [19] Koshino-Kimura Y, Takenaka K, Domoto F, Ohashi M, Miyazaki T, Aoyama Y, Sera T. Construction of plants resistant to TYLCV by using artificial zinc-finger proteins. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*, 2009, 53(1): 281–282.
 - [20] Schwind N, Zwiebel M, Itaya A, Ding B, Wang MB, Krczal G, Wassenegger M. RNAi-mediated resistance to *Potato spindle tuber viroid* in transgenic tomato expressing a viroid hairpin RNA construct. *Mol Plant Pathol*, 2009, 10(4): 459–469.
 - [21] Schaefer SC, Gasic K, Cammue B, Broekaert W, van Damme EJM, Peumans WJ, Korban SS. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes. *Planta*, 2005, 222(5): 858–866.
 - [22] Flors V, Leyva MO, Vicedo B, Finiti I, Real MD, García-Agustín P, Bennett AB, González-Bosch C. Absence of the endo- β -1,4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato. *Plant J*, 2007, 52(6): 1027–1040.
 - [23] Loebenstein G, David DR, Leibman D, Gal-On A, Vunsh R, Czosnek H, Elad Y. Tomato plants transformed with the inhibitor-of-virus-replication gene are partially resistant to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 2010, 100(3): 225–229.
 - [24] Huang HE, Liu CA, Lee MJ, Kuo CG, Chen HM, Ger MJ, Tsai YC, Chen YR, Lin MK, Feng TY. Resistance enhancement of transgenic tomato to bacterial pathogens by the heterologous expression of sweet pepper ferredoxin-I protein. *Phytopathology*, 2007, 97(8): 900–906.
 - [25] Fischhoff DA, Bowditch KS, Perlak FJ, Marrone PG, McCormick SM, Niedermeyer JG, Dean DA, Kusano-Kretzmer K, Mayer EJ, Rochester DE, Rogers SG, Fraley RT. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Nat Biotechnol*, 1987, 5(8): 807–813.

- [26] Salm T, Bosch D, Honée G, Feng LX, Munsterman E, Bakker P, Stiekema WJ, Visser B. Insect resistance of transgenic plants that express modified *Bacillus thuringiensis* cryIA(b) and cryIC genes: a resistance management strategy. *Plant Mol Biol*, 1994, 26(1): 51–59.
- [27] 吴昌银, 叶志彪, 李汉霞, 唐克轩. 雪花莲外源凝集素基因转化番茄. *植物学报*, 2000, 42(7): 719–723.
- [28] Lawrence SD, Novak NG. Expression of poplar chitinase in tomato leads to inhibition of development in Colorado potato beetle. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(8): 593–599.
- [29] Chen RG, Zhang LY, Zhang JH, Zhang W, Wang X, Ouyang B, Li HX, Ye ZB. Functional characterization of *Mi*, a root-knot nematode resistance gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *J Integr Plant Biol*, 2006, 48(12): 1458–1465.
- [30] Chan YL, Yang AH, Chen JT, Yeh KW, Chan MT. Heterologous expression of taro cystatin protects transgenic tomato against *Meloidogyne incognita* infection by means of interfering sex determination and suppressing gall formation. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(3): 231–238.
- [31] Hightower R, Baden C, Penzes E, Lund P, Dunsmuir P. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(5): 1013–1021.
- [32] 黄永芬, 汪清胤, 傅桂荣, 赵晓祥, 杨志兴. 美洲拟蝶抗冻蛋白基因(AFP)导入番茄的研究. *中国生物化学与分子生物学报*, 1997, 13(4): 418–422.
- [33] 赵春梅, 王丽, 伊淑莹, 刘箭. 番茄转 *ER-sHSP* 基因植株构建及其抗冷性研究. *园艺学报*, 2006, 33(5): 989–994.
- [34] Singh S, Rathore M, Goyary D, Singh RK, Anandhan S, Sharma DK, Ahmed Z. Induced ectopic expression of *At-CBF1* in marker-free transgenic tomatoes confers enhanced chilling tolerance. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(6): 1019–1028.
- [35] Hsieh TH, Lee JT, Yang PT, Chiu LH, Charng YY, Wang YC, Chan MT. Heterology expression of the *Arabidopsis* C-Repeat/Dehydration response element binding factor 1 gene confers elevated tolerance to chilling and oxidative stresses in transgenic tomato. *Plant Physiol*, 2002, 129(3): 1086–1094.
- [36] Lee JT, Prasad V, Yang PT, Wu JF, David Ho TH, Charng YY, Chan MT. Expression of *Arabidopsis* CBF1 regulated by an ABA/stress inducible promoter in transgenic tomato confers stress tolerance without affecting yield. *Plant Cell Environ*, 2003, 26(7): 1181–1190.
- [37] Cheng L, Zou YJ, Ding SL, Zhang JJ, Yu XL, Cao JS, Lu G. Polyamine accumulation in transgenic tomato enhances the tolerance to high temperature stress. *J Integr Plant Biol*, 2009, 51(5): 489–499.
- [38] Pan IC, Li CW, Su RC, Cheng CP, Lin CS, Chan MT. Ectopic expression of an EAR motif deletion mutant of *SIERF3* enhances tolerance to salt stress and *Ralstonia solanacearum* in tomato. *Planta*, 2010, 232(5): 1075–1086.
- [39] Li W, Kabbage M, Dickman MB. Transgenic expression of an insect inhibitor of apoptosis gene, SflAP, confers abiotic and biotic stress tolerance and delays tomato fruit ripening. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2010, 74(5–6): 363–375.
- [40] Zhang XH, Zou Z, Gong PJ, Zhang JH, Ziaf K, Li HX, Xiao FM, Ye ZB. Over-expression of microRNA169 confers enhanced drought tolerance to tomato. *Biotechnol Lett*, 2011, 33(2): 403–409.
- [41] Gao N, Su YH, Min J, Shen WS, Shi WM. Transgenic tomato overexpressing ath-miR399d has enhanced phosphorus accumulation through increased acid phosphatase and proton secretion as well as phosphate transporters. *Plant Soil*, 2010, 334(1–2): 123–136.
- [42] Zhang ZJ, Zhang HW, Quan RD, Wang XC, Huang RF. Transcriptional regulation of the ethylene response factor *LeERF2* in the expression of ethylene biosynthesis genes controls ethylene production in tomato and tobacco. *Plant Physiol*, 2009, 150(1): 365–377.
- [43] Zhang ZJ, Huang RF. Enhanced tolerance to freezing in tobacco and tomato overexpressing transcription factor *TERF2/LeERF2* is modulated by ethylene biosynthesis. *Plant Mol Biol*, 2010, 73(3): 241–249.
- [44] Zhang Y, Liu H, Li B, Zhang JT, Li YZ, Zhang HX. Generation of selectable marker-free transgenic tomato resistant to drought, cold and oxidative stress using the *Cre/loxP* DNA excision system. *Transgenic Res*, 2009, 18(4): 607–619.
- [45] Yu C, Wang HS, Yang S, Tang XF, Duan M, Meng QW. Overexpression of endoplasmic reticulum omega-3 fatty acid desaturase gene improves chilling tolerance in tomato. *Plant Physiol Biochem*, 2009, 47(11–12): 1102–1112.
- [46] Domínguez T, Hernández ML, Pennycooke JC, Jiménez P, Martínez-Rivas JM, Sanz C, Stockinger EJ, Sánchez-Serrano JJ, Sanmartín M. Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant Physiol*, 2010, 153(2): 655–665.
- [47] Sui N, Li M, Zhao SJ, Li F, Liang H, Meng QW. Overexpression of glycerol-3-phosphate acyltransferase gene improves chilling tolerance in tomato. *Planta*, 2007, 226(5): 1097–1108.

- [48] Seong ES, Cho HS, Choi D, Joung YH, Lim CK, Hur JH, Wang MH. Tomato plants overexpressing CaKR1 enhanced tolerance to salt and oxidative stress. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 363(4): 983–988.
- [49] Goel D, Singh AK, Yadav V, Babbar SB, Bansal K. Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma*, 2010, 245(1–4): 133–141.
- [50] Orellana S, Yañez M, Espinoza A, Verdugo I, González E, Ruiz-Lara S, Casaretto JA. The transcription factor SIAREB1 confers drought, salt stress tolerance and regulates biotic and abiotic stress-related genes in tomato. *Plant Cell Environ*, 2010, 33(12): 2191–2208.
- [51] Zhang CJ, Liu JX, Zhang YY, Cai XF, Gong PJ, Zhang JH, Wang TT, Li HX, Ye ZB. Overexpression of *SIGMEs* leads to ascorbate accumulation with enhanced oxidative stress, cold, and salt tolerance in tomato. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(3): 389–398.
- [52] Goel D, Singh A, Yadav V, Babbar SB, Murata N, Bansala KC. Transformation of tomato with a bacterial *coda* gene enhances tolerance to salt and water stresses. *J Plant Physiol*, 2011, 168(11): 1286–1294.
- [53] De Block M, Botterman J, Vandewiele M, Dockx J, Thoen C, Gosselé V, Rao Movva N, Thompson C, van Montagu M, Leemans J. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J*, 1987, 6(9): 2513–2518.
- [54] Redenbaugh K, Hiatt WR, Martineau B, Kramer M, Sheehy R, Sanders R, Houck C, Emlay D. Safety assessment of genetically engineered fruits and vegetables: A case study of the Flavr Savr tomato. Boca Raton: CRC Press, 1992: 288.
- [55] Zhao JH, Zhao DG. Transient expression of organophosphorus hydrolase to enhance the degrading activity of tomato fruit on coumaphos. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2009, 10(2): 142–146.
- [56] Kramer MG, Kellogg J, Wagoner W, Matsumura W, Good X, Peters S, Clough G, Bestwick RK. Reduced ethylene synthesis and ripening control in tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase. In: Kanelis AK, Chang C, Klee H, Bleeker AB, Pech JC, Grierson D, eds. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Kluwer Acad Pub Dordrecht, 1997, 307–319.
- [57] Fillatti JJ, Kiser J, Rose R, Comai L. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *agrobacterium tumefaciens* vector. *Nat Biotechnol*, 1987, 5(7): 726–730.
- [58] Wang TW, Zhang CG, Wu W, Nowack LM, Madey E, Thompson JE. Antisense suppression of deoxyhypusine synthase in tomato delays fruit softening and alters growth and development. *Plant Physiol*, 2005, 138(3): 1372–1382.
- [59] Bartoszewski G, Niedziela A, Szewacka M, Niemirowicz-Szczytt K. Modification of tomato taste in transgenic plants carrying a thaumatin gene from *Thaumatococcus daniellii* Benth. *Plant Breed*, 2003, 122(4): 347–351.
- [60] Neily MH, Matsukura C, Maucourt M, Bernillon S, Deborde C, Moing A, Yin YG, Saito T, Mori K, Asamizu E, Rolin D, Moriguchi T, Ezura H. Enhanced polyamine accumulation alters carotenoid metabolism at the transcriptional level in tomato fruit over-expressing spermidine synthase. *J Plant Physiol*, 2011, 168(3): 242–252.
- [61] Carmi N, Salts Y, Dedicova B, Shabtai S, Barg R. Induction of parthenocarp in tomato via specific expression of the *rolB* gene in the ovary. *Planta*, 2003, 217(5): 726–735.
- [62] Wang CL, Chin CK, Ho CT, Hwang CF, Polashock JJ, Martin CE. Changes of fatty acids and fatty acid derived flavor compounds by expressing the yeast Delta-9 desaturase gene in tomato. *J Agric Food Chem*, 1996, 44(10): 3399–3402.
- [63] Davidovich-Rikanati R, Sitrit Y, Tadmor Y, Iijima Y, Bilenko N, Bar E, Carmona B, Fallik E, Dudai N, Simon JE, Pichersky E, Lewinsohn E. Enrichment of tomato flavor by diversion of the early plastidial terpenoid pathway. *Nat Biotechnol*, 2007, 25(8): 899–901.
- [64] Le LQ, Lorenz Y, Scheurer S, Fötisch K, Enrique E, Bartra J, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U. Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnol J*, 2006, 4(2): 231–242.
- [65] Le LQ, Mahler V, Lorenz Y, Scheurer S, Biemelt S, Vieths S, Sonnewald U. Reduced allergenicity of tomato fruits harvested from Lyc e 1-silenced transgenic tomato plants. *J Allergy Clin Immun*, 2006, 118(5): 1176–1183.
- [66] Sheng JP, Liu KL, Fan B, Yuan Y, Shen L, Ru BG. Improving zinc content and antioxidant activity in transgenic tomato plants with expression of mouse metallothionein-I by *mt-I* gene. *J Agric Food Chem*, 2007, 55(24): 9846–9849.
- [67] Bao BL, Ke LQ, Jiang JM, Ying TJ. Fruit quality of transgenic tomatoes with suppressed expression of LeETR1 and LeETR2 genes. *Asia Pac J Clin Nutr*, 2007, 16(Suppl. 1): 122–126.
- [68] Wang SH, Liu JK, Feng YY, Niu XL, Giovannoni J, Liu YS. Altered plastid levels and potential for improved fruit nutrient content by downregulation of the tomato

- DDB1-interacting protein CUL4. *Plant J*, 2008, 55(1): 89–103.
- [69] Centeno DC, Osorio S, Nunes-Nesi A, Bertolo ALF, Carneiro RT, Araújo WL, Steinhauser MC, Michalska J, Rohrmann J, Geigenberger P, Oliver SN, Stitt M, Carrari F, Rose JKC, Fernie AR. Malate plays a crucial role in starch metabolism, ripening, and soluble solid content of tomato fruit and affects postharvest softening. *Plant Cell*, 2011, 23(1): 162–184.
- [70] Seo YS, Kim SJ, Harn CH, Kim WT. Ectopic expression of apple fruit homogentisate phytyltransferase gene (MdHPT1) increases tocopherol in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* cv. Micro-Tom) leaves and fruits. *Phytochemistry*, 2011, 72(4–5): 321–329.
- [71] Hiwasa-Tanase K, Nyarubona M, Hirai T, Kato K, Ichikawa T, Ezura H. High-level accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomatoes expressing a synthetic *miraculin* gene with optimized codon usage terminated by the native miraculin terminator. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(1): 113–124.
- [72] Hirai T, Kim YW, Kato K, Hiwasa-Tanase K, Ezura H. Uniform accumulation of recombinant miraculin protein in transgenic tomato fruit using a fruit-ripening-specific E8 promoter. *Transgenic Res*, 2011 (Online First).
- [73] Mariani C, Gossele V, De Beuckeleer M, De Block M, Goldberg RB, Greef WD, Leemans J. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, 1992, 357(6377): 384–387.
- [74] Sandhu APS, Abdelnoor RV, Mackenzie SA. Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104(6): 1766–1770.
- [75] 宋洪元, 任雪松, 司军, 李成琼, 宋明, 雷建军. 利用 *Cre/lox* 重组系统建立番茄基因工程雄性不育恢复系. *中国农业科学*, 2009, 42(10): 3581–3591.
- [76] McGarvey PB, Hammond J, Dienelt MM, Hooper DC, Fu ZF, Dietzschold B, Koprowski H, Michaels FH. Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Nat Biotechnol*, 1995, 13(12): 1484–1487.
- [77] Lou XM, Yao QH, Zhang Z, Peng RH, Xiong AS, Wang HK. Expression of the human hepatitis B virus large surface antigen gene in transgenic tomato plants. *Clin Vaccine Immunol*, 2007, 14(4): 464–469.
- [78] Salyaev RK, Rekoslavskaya NI, Stolbikov AS, Hammond RW, Shchelkunov SN. Synthesis of hepatitis B virus surface antigen in tomato plants transgenic for the *preS2–S* gene. *Dokl Biochem Biophys*, 2007, 416(1): 290–293.
- [79] Hao HY, Wei YH, Zhu JG, Sun J, Wang YN, Jing EY, Zhang BL, Xue K. Expression of oral hepatitis B vaccine in transgenic tomato. *Food Sci*, 2007, 28(6): 201–204.
- [80] Wang YQ, Li T. Transformation of HBsAg gene into tomato and production of transgenic tomato plants. *J Southwest Univ (Nat Sci Ed)*, 2008, 30(7): 78–83.
- [81] Srinivas L, Sunil-Kumar GB, Ganapathi TR, Revathi CJ, Bapat VA. Transient and stable expression of hepatitis B surface antigen in tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Biotechnol Rep*, 2008, 2(1): 1–6.
- [82] Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL, Korban SS, Osadjan MD, Buetow DE. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res*, 2000, 9(2): 127–135.
- [83] Huang Z, Elkin G, Maloney BJ, Beuhner N, Arntzen CJ, Thanavala Y, Mason HS. Virus-like particle expression and assembly in plants: hepatitis B and Norwalk viruses. *Vaccine*, 2005, 23(15): 1851–1858.
- [84] Pogrebnyak N, Golovkin M, Andrianov V, Spitsin S, Smirnov Y, Egolf R, Koprowski H. Severe acute respiratory syndrome (SARS) S protein production in plants: Development of recombinant vaccine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 102(25): 9062–9067.
- [85] Sharma MK, Singh NK, Jani D, Sisodia R, Thungapathra M, Gautam JK, Meena LS, Singh Y, Ghosh A, Tyagi AK, Sharma AK. Expression of toxin co-regulated pilus subunit A (TCPA) of *Vibrio cholerae* and its immunogenic epitopes fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant Cell Rep*, 2008, 27(2): 307–318.
- [86] Sharma MK, Jani D, Thungapathra M, Gautam JK, Meena LS, Singh Y, Ghosh A, Tyagi AK, Sharma AK. Expression of accessory colonization factor subunit A (ACFA) of *Vibrio cholerae* and ACFA fused to cholera toxin B subunit in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*). *J Biotechnol*, 2008, 135(1): 22–27.
- [87] Mor TS, Sternfeld M, Soreq H, Arntzen CJ, Mason HS. Expression of recombinant human acetylcholinesterase in transgenic tomato plants. *Biotechnol Bioeng*, 2001, 75(3): 259–266.
- [88] 陈溪, 林忠平. 利用转基因番茄生产人胰岛素的研究. *分子植物育种*, 2003, 1(4): 81–83.
- [89] Gutiérrez-Ortega A, Sandoval-Montes C, de Olivera-Flores TJ, Santos-Argumedo L, Gómez-Lim MA. Expression of functional interleukin-12 from mouse in transgenic tomato plants. *Transgenic Res*, 2005, 14(6): 877–885.
- [90] Elías-López AL, Marquina B, Gutiérrez-Ortega A, Aguilar D, Gomez-Lim M, Hernández-Pando R. Transgenic to-

- mato expressing interleukin-12 has a therapeutic effect in a murine model of progressive pulmonary tuberculosis. *Clin Exp Immunol*, 2008, 154(1): 123–133.
- [91] Zhang H, Zhao LX, Chen YH, Cui LJ, Ren WW, Tang KX. Expression of human coagulation Factor IX in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Biotechnol Appl Biochem*, 2007, 48(2): 101–107.
- [92] Agarwal S, Singh R, Sanyal I, Amla DV. Expression of modified gene encoding functional human α -1-antitrypsin protein in transgenic tomato plants. *Transgenic Res*, 2008, 17(5): 881–896.
- [93] Chen HF, Chang MH, Chiang BL, Jeng ST. Oral immunization of mice using transgenic tomato fruit expressing VP1 protein from enterovirus 71. *Vaccine*, 2006, 24(15): 2944–2951.
- [94] Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Márquez-Mercado C, López-Revilla R, Castillo-Collazo R, Alpuche-Solís ÁG. Transgenic tomatoes express an antigenic polypeptide containing epitopes of the diphtheria, pertussis and tetanus exotoxins, encoded by a synthetic gene. *Plant Cell Rep*, 2007, 26(7): 961–968.
- [95] Soria-Guerra RE, Rosales-Mendoza S, Moreno-Fierros L, López-Revilla R, Alpuche-Solís ÁG. Oral immunogenicity of tomato-derived sDPT polypeptide containing *Corynebacterium diphtheriae*, *Bordetella pertussis* and *Clostridium tetani* exotoxin epitopes. *Plant Cell Rep*, 2011, 30(3): 417–424.
- [96] Zhi QW, Wang SH, Chai M, Zhang FY, Li Q, Li SG, Sun MJ. Transgenic Mini-tomato and protection against Alcohol-induced gastric Injury. *J Genet Genomics*, 2007, 34(8): 756–763.
- [97] Youm JW, Jeon JH, Kim H, Kim YH, Ko K, Joung H, Kim HS. Transgenic tomatoes expressing human beta-amyloid for use as a vaccine against Alzheimer's disease. *Biotechnol Lett*, 2008, 30(10): 1839–1845.
- [98] Chen YH, Wang A, Zhao LX, Shen GA, Cui LJ, Tang KX. Expression of thymosin α 1 concatemer in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum*) fruits. *Biotechnol Appl Biochem*, 2009, 52(4): 303–312.
- [99] 曹慧颖, 张锐, 郭三堆. 串联的人胸腺素 α 1 基因在番茄中的高效表达. *中国农业科学*, 2009, 42(7): 2291–2296.
- [100] DellaPenna D. Transgenic tomato plants with altered polylacturonase isoforms. *United States Patent*. 1996, US005569831A.
- [101] Atkinson HJ, Koritsas VM, Lee DL, Macgregor AN, Smith JE. Control of parasites. *United States Patent*. 1999, WO95/23229.
- [102] Fluhr R, Eshed Y, Ori N, Paran I, Zamir D. Transgenic tomato plants containing a *Fusarium* resistance gene. *United States Patent*, 2000, WO96/32007.
- [103] 林忠平, 倪挺, 陈溪, 胡鸢雷. 利用转基因番茄生产人胰岛素的方法. 2003, 公开号, CN1295129.
- [104] Gabriel DW, Reddy JD. Use of esterase genes as selectable markers for transforming plant cells. *United States Patent*, 2008, US20080235824A1.
- [105] De Vetten NCMH, Visser RGF, Jacobsen E, van der Vossen EAG, Wolters AMA. Use of R-genes as a selection marker in plant transformation and use of cisgenes in plant transformation. 2008, WO2008091154A1. (Source: USPTO)
- [106] Polston JE, Hiebert E. Materials and methods for producing tomato yellow leaf curl virus resistance in plants. 2009, US7531716. (Source: SIPO)
- [107] Wang K, Ryu CM, Mysore K. Modification of plant disease resistance. 2009, WO2009015079. (Source: USPTO)