

番木瓜生物技术育种研究进展

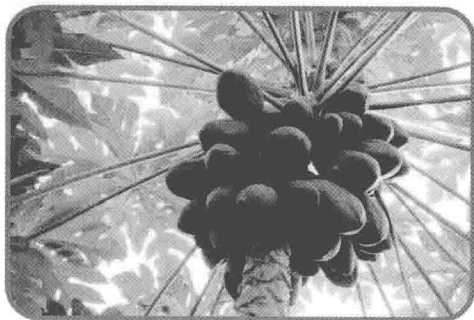
寇建平 贾瑞宗 赵辉 主编



中国农业科学技术出版社

番木瓜生物技术育种研究进展

寇建平 贾瑞宗 赵辉 主编



中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

番木瓜生物技术育种研究进展 / 寇建平, 贾瑞宗, 赵辉主编. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2016. 12

ISBN 978 - 7 - 5116 - 2897 - 8

I. ①番… II. ①寇…②贾…③赵… III. ①生物工程 - 应用 - 番木瓜 - 作物育种
IV. ①S667.903

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2016) 第 295573 号

责任编辑 徐定娜

责任校对 李向荣

出 版 者 中国农业科学技术出版社
北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82105169 (编辑室)
(010) 82109702 (发行部) (010) 82109709 (读者服务部)

传 真 (010) 82109707

网 址 <http://www.castp.cn>

经 销 者 各地新华书店

印 刷 者 北京科信印刷有限公司

开 本 787mm × 1 092mm 1/16

印 张 23

字 数 552 千字

版 次 2016 年 12 月第 1 版 2016 年 12 月第 1 次印刷

定 价 98.00 元

《番木瓜生物技术育种研究进展》

编 委 会

主 编：寇建平 贾瑞宗 赵 辉

副主编：黄启星 张雨良

编 委：（排名不分先后）

孔 华 王绪朋 左 娇 张丽丽

张雨良 李美英 杨小亮 郭运玲

郭静远 周 霞 贺萍萍 赵 辉

夏启玉 贾瑞宗 曹 扬 黄启星

寇建平 黄 静 赖丁王 窦良军

谭燕华 黎耀平 霍姗姗

本书部分工作得到农业部引进国际先进农业科学技术“948项目”（项目编号 2014 - Z17, 2015 - Z23）的支持。

本书部分工作得到海南省重点研发计划（项目编号：ZDYF2016027）和海南省自然科学基金（项目编号：20153145）的支持。

序 一

番木瓜 (*Carica papaya* L.), 双子叶植物纲, 番木瓜属, 为热带、亚热带常绿多年生草本植物。果实长于树上, 外形像瓜, 又原产美洲, 引进中国, 所以叫做番木瓜。花单性或两性, 植株有雄株、雌株和雌雄同株 (两性株)。喜高温多湿, 全年可结果。鲜食助消化, 为餐后瓜果良品; 熟食味甜美, 为宴席之珍馐。可惜这样一款深受大众喜爱的水果, 以往却饱受病毒之害, 尤其是番木瓜环斑病毒, 一旦染病, 借助虫媒迅速传播, 轻则欠收, 重则毁园。随着生物技术的发展, 人们利用该病毒外衣的一部分基因序列移植到番木瓜基因组中, 培育的转基因品种成功地控制了病毒危害, 果园连年丰收。这种“以菌治菌, 以毒攻毒”的方法既是植物病虫害生物防治的经典之作, 也是生物技术抗病育种最成功的范例。利用该病毒的复制酶基因, 通过 RNA (核糖核酸) 沉默途径, 同样获得了有效控制该病毒的生物技术新品种。1998 年美国批准商业化生产种植转基因番木瓜, 2016 年该国种植比例 85% 以上。2010 年中国批准转基因番木瓜商业化种植, 2016 年转基因品种的种植比例 65% 以上。人们在享受美味番木瓜之余, 也常常会好奇问一问, 食用转基因番木瓜到底安全不安全? 抗病毒的效果持久不持久? 会不会引发新的病毒?

为帮助大家了解番木瓜的生产种植, 了解番木瓜育种技术, 了解转基因番木瓜的生物安全性, 深入热带农作物生产第一线的农业生产管理人员寇建平先生和具有国内外转基因番木瓜培育与安全评价经验的科技研究人员贾瑞宗博士及其同事们, 共同翻译编著了《番木瓜生物技术育种研究进展》一书, 可谓及时雨。该书共分四个部分: 第一部分番木瓜概述, 主要介绍了番木瓜的起源、驯化和生产, 生物学特性, 表型和遗传多样性; 第二部分番木瓜生物技术育种技术和方法, 包括番木瓜快繁生根技术等; 第三部分番木瓜生物技术育种研究进展, 包括美国已广泛种植的世界第一例转基因番木瓜, 中国 (除台湾外) 和中国台湾研制的转基因番木瓜等; 第四部分转基因番木瓜生物安全评价案例, 包括转基因番木瓜的营养成分, 毒性和致敏性评价, 环境安全风险评估, 以及种植转基因番木瓜对农民的影响等。该书收集了大量试验研究数据和资料, 广征博引, 内容翔实。本书可作为大众闲时的阅读书籍, 也可作为科技教育工作者的参考资料。本人爱吃番木瓜, 也乐见番木瓜育种和生产技术的进步。应邀为本书写几句话, 深感荣幸, 是为序。

彭于发

2016 年 10 月 31 日

序 二

自从 1985 年转基因番木瓜在美国农业部立项，再到 1998 年成功获得世界上第一例允许商业化生产的转基因番木瓜，到 2016 年转基因番木瓜在各个种植区内广泛种植 (85%)，近 20 年时间里，关于转基因番木瓜的生物安全问题常常被挤到聚光灯下，然后随着一个又一个顾虑的消除而又慢慢淡出民众的视野。本书回顾了转基因番木瓜的研究历史，并对转基因番木瓜的争议和争议的合理解答进行系统回顾；重点分析以科学为前提的生物安全问题，诸如：异壳体化病毒，重组，合成，基因飘移，对非靶标生物的影响，食品安全以及各种可能的致敏性问题。本书同时也集中归纳和讨论人们关于转基因番木瓜对环境 and 人类健康的顾虑和此类问题的逐一解答的过程。为我国发展自主知识产权的转基因番木瓜提供理论支持。

本书共分四个部分：第一部分番木瓜概述，主要介绍了番木瓜的起源、驯化和生产，番木瓜的生物学特性和番木瓜的表型和遗传多样性。第二部分介绍了番木瓜生物技术育种技术和方法，包括番木瓜转化体系、转基因番木瓜的 PMI/MAN 筛选系统、番木瓜转化绿色荧光蛋白可视化筛选标记和番木瓜快繁生根技术。第三部分介绍了番木瓜生物技术育种研究进展，介绍了世界第一个商业化转基因番木瓜、台湾转基因番木瓜、佛罗里达番木瓜新品种的选育、番木瓜超强病毒株解决方案，控制番木瓜环斑病毒病的基因技术以及番木瓜根腐病生物技术育种。第四部分转基因番木瓜生物安全评价案例分析，将集中回顾转基因番木瓜的营养成分、转基因番木瓜生物安全评估、转基因番木瓜致敏组学、转基因番木瓜田间评价、转基因番木瓜食品安全性评价和环境释放许可证申请案例分析，并在最后举例介绍了转基因番木瓜对于农民的影响。

转基因番木瓜商业化之后的争论持续近 20 年。随着一个个问题和顾虑的提出和最终完美的解答，让许许多多的科学工作者、社会工作者、政策制定者和消费者获得了理性的科学知识。过去 20 年的争论里最主要集中在抗病毒转基因植物环境风险问题。将一个不能正确表达的病毒外壳蛋白基因转入番木瓜中赋予了夏威夷番木瓜的抗病毒性，被人们将话题转为“植物表达病毒基因所带来的风险问题”。转基因番木瓜抗病原理在美国许多作物上已经广泛采用，如：南瓜，番木瓜，李子，葡萄和甜菜等。当然人们并不了解这些抗病毒的机理是通过组成性表达病毒一部分序列而启动了抗病毒 RNA 沉默途径使得入侵的病毒不能够复制而使得病毒的群体下降。实际上在没有转基因番木瓜之前，人们一直食用含有番木瓜环斑病毒的番木瓜，而且是事实表明市场上销售的传统番木瓜中的 PRSV 含量远远高于转基因番木瓜中的 CP 蛋白的含量。

抗病毒植物的生物安全——异壳体化 (Heteroencapsidation)。所谓的异壳体化就是

一个病毒的基因组 DNA 被另外一个病毒的外壳蛋白包被组装成病毒粒子。这一现象经常发生在自然界中同时被多个病毒侵染的植物组织上。转基因植物异壳体化的可能性就转变成为了植物表达的病毒外壳蛋白而不是另外一个病毒的外壳蛋白。通常来讲病毒的外壳蛋白决定侵染力、致病性、传播媒介特异性等信息,也就是说病毒的属性可能发生变化。例如,原本不能有某种传播媒介传播的病毒通过异壳体化后变的能够通过某种传播媒介传播,或者一个病毒由于异壳体化导致可以侵染原来不是它的宿主的植物。这些科学的思考其实早就被科学家一一的解答,并最终证明自然中存在的这一现象是安全的。简单来讲,无论病毒被何种外壳蛋白所包被,其病毒基因组 DNA/RNA 并没有改变,而异源外壳蛋白不能遗传:由异壳体化形成的病毒颗粒的后代会变成原始的病毒颗粒。通过对病毒的外壳蛋白或者依赖于 RNA 的 RNA 复制酶(RdRp)等不同元件在植物内表达的研究表明异壳体化并不能发生。另外,番木瓜商业化种植以来没有非预料的新病毒爆发。

抗病毒植物的生物安全——重组(Recombination)。重组来源于两个有显著区别的病毒的遗传物质在病毒复制时发生交换。病毒的重组也可能发生在转基因目的片段的转录和入侵病毒的复制期间。根据这一假设重组的新病毒将含有转基因片段和入侵病毒的其他部分。这样的病毒可能具有遗传性并能够传到子代中。重组的病毒可能具有区别父母本的其他特性诸如改变传播媒介的特异性,扩大宿主范围,增强致病性等。关于病毒重组的话题也被广大病毒学家进行深入讨论。严格的筛选压力强重组病毒可以发生恢复的重要因素。较高的筛选压力也会增加病毒的重组几率,但是相反低、或者没有筛选压力的条件下很难发生重组。到目前为止还没有发现转 CP 基因的植物存在重组现象。在法国一个葡萄庄园连续三年的实验证明转基因植物不能够促进或者有助于提高葡萄扇叶病毒的分子多样性。总之,在自然条件下转目的基因和病毒之间很难发生显著重组。

抗病毒植物的生物安全——伴随着花粉飘移的基因飘移。生物安全中的另外一个重要的事件就是基因飘移,对转基因抗病毒的作物而言,野生近缘种可以通过花粉漂移来获得宿主的基因或者转目的基因,而且在他们的后代表达转目标基因。对这个问题大家通常有两个顾虑:①基因飘移可能导致杂草化的野生种进化并发展到难以控制并最终破坏自然生态系统;②影响野生种群体的遗传多样性和增加野生种灭绝的风险。花粉漂移在主要农作物中都有详细的描述。然而在对多个商业化的作物(转 CP 的番木瓜,转 CP 的南瓜,转 CP 的甜菜)的分析发现:病毒和抗病毒的特性并没有影响野生种的多样性,也没有使得获得转 CP 的野生种具有更强的竞争性和入侵性。

抗病毒植物的生物安全——协同效应(Synergism)。协同效应在这里特指转基因作物表达的病毒蛋白和其他入侵的病毒互作导致更为严重的症状和增加病毒的毒力。根据这一理论人们推测转基因抗病植物可以抵御同源病毒但是对于能够形成协同效应的异源病毒无能为力,使得入侵病毒更具毒力和甚至影响传播范围。但是随着下一代的传播这种协同效应自然就不存在了。同时协同效应并没有改变现有的病毒或者产生新的病毒,所以说这种产生生物安全的风险也是很小的。

抗病毒植物的生物安全——对非靶标生物的影响。转基因抗病毒作物会潜在地影响如昆虫媒介等非靶标生物的多样性。同时转基因植物病毒基因也可以通过基因的水平转

移让土壤微生物获得选择优势。然而许多的实验证据表明这种影响也是有限的。转基因李树（含有 PPV CP 基因）对节肢动物和蚜虫均没有明显的影响，转基因番木瓜对土层里面的放线菌也没有显著影响。总之，还没有关于转基因抗病毒植物对非靶标生物产生危害的报道。

抗病毒植物的生物安全——食品安全和致敏性。生物安全的最后一个问题也是人们讨论最多的问题——食品安全和致敏性。致敏性对人的健康而言就是转基因植物表达病毒蛋白而产生潜在的致敏性的风险。由病毒序列衍生出来的转基因蛋白如果其氨基酸序列与已知致敏原的序列一致，就有可能 IgE 产生免疫反应。这样就会使转基因作物作为新食物，通过接触或吸入过敏等形式影响健康。诸多实验表明转病毒蛋白植物并没有产生致敏性风险。在转基因番木瓜商品化之前，人们消费的传统番木瓜里面就含有大量的病毒蛋白也从来没有致敏性的报道；甚至通过传统的抗病毒管理措施——交叉保护（向番木瓜上接种弱化的 PRSV 达到抗病的效果）也没有致敏性案例的报告。

通过本书总结转基因番木瓜问世以来的各种思考和争论，我们可以理性的思考并逐个验证使得每一个问题得到有效的解答，这种理性的讨论将有助于我们的转基因作物的理解。总结起来有以下几点：①转基因抗病毒番木瓜产生多方面的效益如经济效益，园艺效益，病毒流行控制效益，环境效益，农业效益和社会效益。②人们提出很多有关转基因抗病毒番木瓜的生物安全问题。③通过将近 20 年广泛的生物安全评估，人们逐渐地认识到这个转基因抗病毒作物真是本质，并为大家展示了一个关于诸如：异壳体化，重组，协同，非靶标，食品安全，过敏性等话题讨论的平台，并最终确定一致的认可。④风险评估是有必要的。以单个事件逐一评估的原则而产生的评估数据将为政策制定者提供最重要理论支撑。

本书的成稿得到了中国热带农业科学院热带生物技术研究室的鼎力资助，也获得众多番木瓜生产企业合一线生产技术人也大力支持。在此，一并致以诚挚的感谢！由于成稿的时间较短，作者的水平有限，难免有错漏之处，恳请广大读者朋友批评指正。

编者 寇建平 贾瑞宗 赵 辉

2016 年 10 月 31 日

目 录

第一篇 番木瓜概述

第一章 番木瓜的起源、驯化和生产	(3)
第二章 番木瓜的生物学特性	(14)
第三章 番木瓜的表型和遗传多样性	(29)

第二篇 番木瓜生物技术育种技术和方法

第四章 番木瓜转化体系	(41)
第五章 金刚砂创伤法高效转化番木瓜	(48)
第六章 转基因番木瓜的 PMI/Man 筛选系统	(58)
第七章 绿色荧光蛋白可视化筛选在番木瓜转化中的应用	(70)
第八章 番木瓜快繁生根技术	(83)

第三篇 番木瓜生物技术育种

第九章 世界第一个商业化转基因番木瓜	(95)
第十章 台湾转基因番木瓜	(113)
第十一章 对 PRSV 地理株系具有广谱抗性的转基因番木瓜研究	(131)
第十二章 番木瓜超强病毒株解决方案	(147)
第十三章 佛罗里达番木瓜新品种的选育	(163)
第十四章 控制番木瓜环斑病毒病的基因技术	(169)
第十五章 番木瓜根腐病生物技术育种	(186)

第四篇 转基因番木瓜生物安全评价案例分析

第十六章	夏威夷控制番木瓜环斑病毒的希望变成现实	(203)
第十七章	转基因番木瓜的营养成分	(213)
第十八章	夏威夷转基因番木瓜生物安全评估	(224)
第十九章	转基因番木瓜致敏组学	(256)
第二十章	台湾转基因番木瓜田间评价	(269)
第二十一章	台湾转基因番木瓜食品安全性评价	(279)
第二十二章	环境释放许可证申请案例分析	(299)
第二十三章	抗病毒转基因番木瓜对于泰国农民的影响	(345)

第一篇

番木瓜概述

第一章 番木瓜的起源、驯化和生产^①

起源

由于没有化石方面的记录可以作为直接考证的依据，人们很难精确推断番木瓜的起源。不过通过分析一系列间接证据人们推测番木瓜起源于墨西哥南部（或中美洲地区）。本文运用植物地理学的分析方法，以墨西哥南部和中美洲地区现有的番木瓜野生种群作为证据对番木瓜的起源进行探讨。

通过西班牙人的广泛传播以及番木瓜本身对热带和亚热带环境的高度适应性，几乎在全球所有热带和亚热带地区都可以见到番木瓜的身影，这为确定番木瓜的起源地带来了困难。尽管如此 Vavilov (1987) 提出了主要番木瓜物种起源的三个的中心地区：美索不达米亚（亦称“两河流域”）地区、中美洲地区和中国北部地区。由于中美洲地区是主要热带作物的发源地，推断认为番木瓜也很有可能起源于该地区 (Harlan, 1971)。瑞典植物学家 Linnaeus 于 1753 年最早为番木瓜定名，它所属的番木瓜纲 *Caricaceae* 包括为 6 个属共 35 个物种。根据 Badillo (1971, 1993, 2000) 的分类，可分为 *Carica* 属 (1 个种)，*Jarilla* 属 (3 个种)，*Horovitzia* 属 (1 个种)，*Jacaratia* 属 (7 个种)，*Vasconcellea* 属 (21 个种) 和 *Cylicomorpha* 属 (2 个种)。除 *Cylicomorpha* 属外，其余五个属都起源于美洲地区 (Scheldeman et al, 2011)。部分研究者认为番木瓜起源于南美洲的北部地区 (Badillo, 1971; Prance, 1984)。对于番木瓜科的其他成员（如 *Vasconcellea*）来说，它们的起源确似如上所述，然而越来越多的证据表明番木瓜起源于墨西哥南部和中美洲地区。例如，早在 1833 年，De Candolle 和 Solms-Laubach 就提出番木瓜起源于墨西哥的学说。此外，番木瓜科中的两个属被认为是墨西哥的地方种，包括一个墨西哥本地种 *Horovitzia* (Lorence and Colin, 1988; Badilo, 1993) 和一个墨西哥与危地马拉的本地种 *Jarilla* (McVaugh, 2001)。

调查全世界番木瓜植物标本会发现：绝大部分植物标本都来源于中美洲地区或墨西哥。举例来说，密苏里植物标本馆收藏了来自世界各地的 339 例番木瓜植物标本（图 1-1b），其中超过 60%（208 例）来源于墨西哥和中美洲地区（主要是尼加拉瓜）（图 1-1b）。此外，在全球生物多样性信息博物馆 (GBIF) 收藏的 1297 例番木瓜标本（图 1-2a）中，有超过 50%（659 例）来源于墨西哥和中美洲地区（图 1-2b）。

① 参考：Gabriela Fuentes, Jorge M. Santamaría. 2014. Papaya (*Carica papaya* L.): Origin, Domestication, and Production//Genetics and Genomics of Papaya [M]. New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer. 3-15.

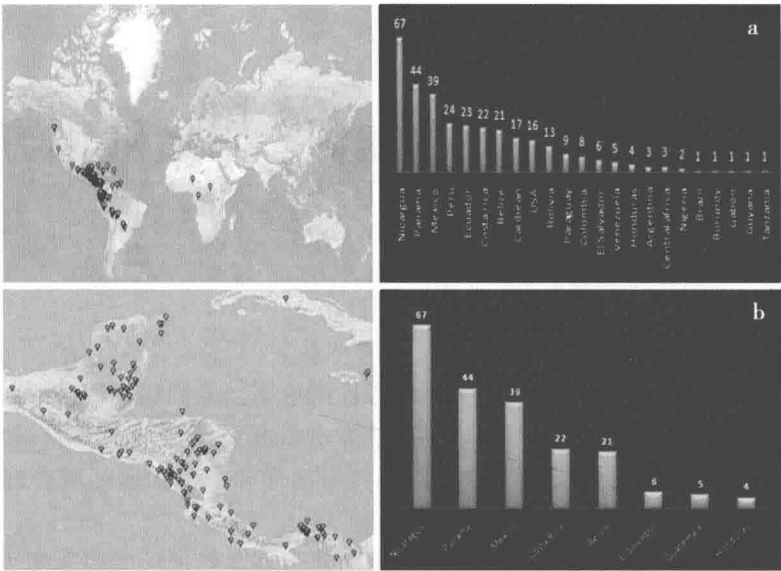


图 1-1 根据密苏里植物园蜡叶标本数据库 (2011) 中番木瓜标本所绘制的番木瓜地理分布图

(a) 番木瓜的世界分布 (339 例标本); (b) 中美洲地区 (主要为尼加拉瓜) 和墨西哥南部番木瓜的分布 (208 例标本), 包括了 Tropicos 数据库 (<http://www.tropicos.org/>) 中 61% 的番木瓜记录。

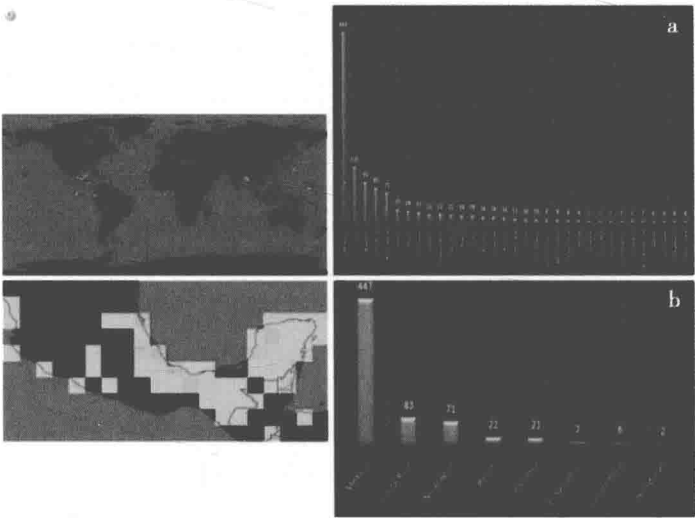


图 1-2 根据全球生物多样性信息博物馆 (GBIF) 收录的 1297 例番木瓜标本绘制的番木瓜标本来源地区分布图

黄色为番木瓜标本来源地 (a)。占 51% (659 例) 的标本来源于墨西哥和中美洲地区 (b)。数据来源: data.gbif.org。

支持番木瓜起源于泛中美洲地区的另一方面证据是迄今还可以从墨西哥和中美洲的

一些地区找到番木瓜的自然野生种群。Manshardt 和 Zee (1994) 在墨西哥南部沿海地区和洪都拉斯北部的加勒比海沿岸低海拔地区发现有番木瓜野生种群。另一方面, 从 1978 年至 2003 年间, 墨西哥尤卡坦研究中心 (CICY) 从尤卡坦盆地 (Peninsula) 周边的 Quintana Roo, 尤卡坦和 Campeche 三个州收集植物标本。CICY 植物标本馆共收集获得来自该区域的 58 个有确切地理信息记录的野生番木瓜种群标本。

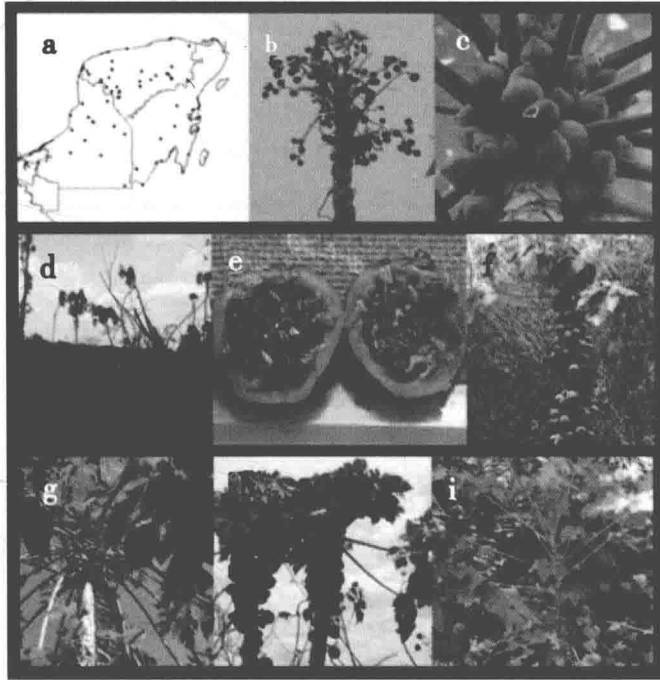


图 1-3 从尤卡坦盆地新发现的番木瓜野生种群

(a) 尤卡坦盆地番木瓜野生种群地理位置分布示意图。(b~i) 2006 年 5 月和 2011 年 9 月至 11 月期间, 在尤卡坦州南部不同地区拍摄的番木瓜 (当地名为 Ch'ich'put) 的照片: (b) 在 Motila 附近区域发现的番木瓜野生种群雄性植株; (c) 在 Xocchel 附近区域发现的番木瓜野生种群雌性植株; (d) 在 Libre Union 附近区域发现的番木瓜野生种群雌性植株; (e) 番木瓜野生种群雌性植株上结的果实; (f) 在 Nenela 附近区域发现的番木瓜野生种群雌性植株; (g) 在 Tixcaltuyub 附近区域发现的 6m 高的番木瓜野生种群雌性植株; (h) 在 Mopila 附近区域发现的番木瓜野生种群雌性植株; (i) 在 Mopila 附近区域发现的番木瓜野生种群雄性植株。

近年来, 从尤卡坦州南部地区的一些偏远、隔离的地区又发现了多个不同的番木瓜野生种群 (图 1-3b~i)。这些在尤卡坦州南部地区新发现的现存野生种群与主要种植于尤卡坦州北部地区的商业化番木瓜有极其明显的差异。与墨西哥大部分番木瓜种植区域一样, 在尤卡坦州主要种植的商业化番木瓜品种为 Mardol (从古巴进口), 它在形态学特征上与本地野生种存在极其明显的区别。对两者的形态学进行比较。从 20 个野生种群中各选 5 株番木瓜与 5 株 Mardol 番木瓜进行比较, 比较果实长度、宽度、鲜重等

方面的差异。图 1-4 表明, 20 个野生番木瓜种群具有更大的相关度, 虽然来自于 Xocchel 和 Tixcacaltuyub 两个地区的样本各自聚集为一个明显的分支, 商业化种植的 Maradol 番木瓜品种仍然很清楚地分为另一个支系。

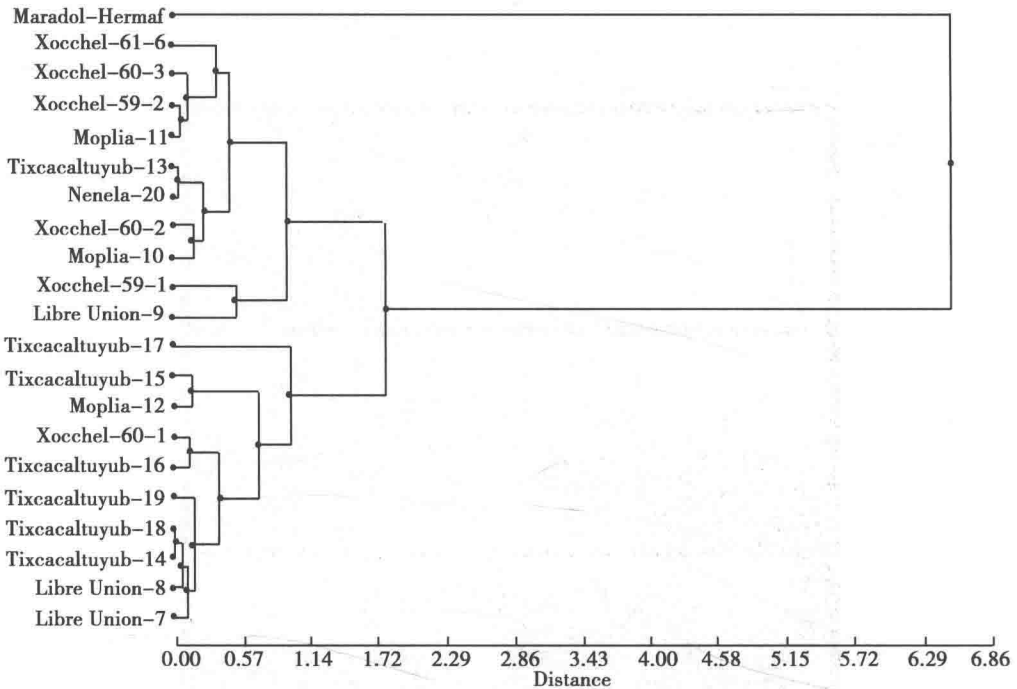


图 1-4 根据果实长度、宽度和重量的形态学特征构建的进化分类树

从 2006 年 5 月和 2011 年 9 月在尤卡坦州南部区域发现的 20 个野生番木瓜种群中各取 5 株进行形态学比较分析。同时, 取 5 株商业化种植的 Maradol 雌雄两性 (Hermaphrodite) 番木瓜进行比较分析。

番木瓜的驯化和分布

如同探究番木瓜的起源地一样, 要明确番木瓜被驯化的准确时间和地点也是一件很有困难的事情。不同于一些物种的驯化历史有明确的考古证据支持 (如 Aztecs 人和玛雅人对玉米的驯化), 在西班牙殖民者到来以前的文明中鲜有关于番木瓜的文字记录。因此, 人们只能用不同的方法对番木瓜在墨西哥和中美洲地区被人类驯化的过程进行间接的推测。

在著名的 pre-Columbian (Aztecs 和玛雅) codices、Badiano 和 Florentino 文明中都没有关于番木瓜的直接记录 (Emmart, 1940; Galarza, 1997)。尽管如此, 在众多对玛雅人高度发达的农业系统中可能使用的各种农作物的研究表明, 早在西班牙人到来以前, 墨西哥人和 Belize 人已种植番木瓜 (玛雅语称为 "put" 或 "puut") (de Oviedo, 1959; Dunning et al, 1998; Terán and Asmussen, 1995; Colunga-GarcíaMarín and Zizumbo-Villarreal, 2004)。研究证实, 居住于低地 (Lowland) 的玛雅人在公元前 1300 年已经建立了发达的农业文明社会 (Pope et al, 2001)。玛雅人建立了发达的农业系统, 关于使用玉米为食物