

草莓基因工程研究进展

金晓磊¹, 沈元月¹, 胡新玲², 滕文静², 董清华^{1*}, 邱德有^{2*}

(¹北京农学院植物科学技术系, 北京 102206; ²中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

摘要: 综述了近 20 年来国内外在草莓抗病虫、耐盐碱、抗冻、品质特性、耐贮运性、抗除草剂基因工程的研究概况与进展, 对当前草莓基因工程育种工作中存在的问题进行了探讨, 对其发展前景进行了展望, 指出了多基因转化和利用转录因子、小 RNA 等调控基因进行转化这 2 个发展方向并提出了把草莓作为果树基因组学研究的模式植物之一的观点。决定草莓品质(风味、香气和颜色)的物质多是萜类和黄酮类次生代谢物质, 这说明今后我国开展草莓次生代谢基因工程对其品质改良的重要性。

关键词: 草莓; 基因工程; 多基因转化; 小 RNA 基因; 次生代谢工程

中图分类号: S668.4 文献标识码: A 文章编号: 1009-9980(2007)04-506-07

Advances in research on strawberry genetic engineering

JIN Xiao-lei¹, SHEN Yuan-yue¹, HU Xin-ling², TENG Wen-jing², DONG Qing-hua^{1*}, QIU De-you^{2*}

(¹Department of Plant Science and Technology, Beijing Agricultural College, Beijing 102206 China; ²Institute of Forestry, Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091 China)

Abstract: The advances in research on strawberry genetic engineerings, including pests and diseases resistance, salt tolerance, herbicide resistance, hardiness, fruit quality and storability are reviewed. The problems and future perspectives for strawberry genetic engineering are discussed. Opinions such as multigene transformation and genetic engineering with transcription factors and microRNA genes are put forward for strawberry molecular breeding. Suggestion about using strawberry as a model plant for genomics research in fruit crops is also given. Because the flavour, fragrance and colour of strawberry are mostly determined by terpenoids and flavonoids, it is very important to work on quality improvement of strawberry by genetic engineering of its secondary metabolism.

Key words: Strawberry; Genetic engineering; Multigene transformation; MicroRNA gene; Secondary metabolite engineering

草莓(*Fragaria xananassa* Duch.)属蔷薇科草莓属多年生草本植物, 同时亦是一种经济价值较高的园艺作物。草莓的栽培品种和类型繁多, 目前全世界有 2 000 多个品种, 已成为世界广泛栽培的经济作物之一。我国对草莓育种工作的研究起步较晚, 过去草莓的改良多采用常规杂交技术, 取得了一定的效果, 产量和品质得到了一定的提高和改善, 但培育抗病菌、耐贮运、抗除草剂、风味好的草莓新品种, 常规的育种手段仍然很难实现。当前生产上应用的草莓栽培品种的遗传背景狭窄, 类型较单一, 造成对病虫害和逆境抗性的减弱。由于大多草莓具高杂合性和多倍性的特点, 种间或种内杂交难以获得杂种。即使获得杂种, 种子往往败育, 生活力低, 导致育种工作量大、效率较低。借助基因工程手段可以改良草莓品种, 缩短育种周期, 提高育种效率; 通过转入优良

植物源目的基因, 可克服远缘杂交不亲和性, 实现草莓遗传性状的定向改良, 提高育种效率, 缩短育种年限; 转基因技术还可在分子水平上将微生物甚至动物的基因转移至草莓中, 打破物种间的障碍, 丰富性状基因资源, 扩展遗传改良范围。自 1988 年 Mc-Granahan 等^[1]首次利用核桃体胚成功获得抗卡那霉素的转基因植株以来, 人们相继在苹果、草莓、桃、杏、香蕉、葡萄、树莓、柑橘、樱桃、猕猴桃等果树上获得了转基因植株, 其中草莓是第 3 个获得转基因植株的果树。草莓是无性繁殖的, 一旦目的基因如所期望在转基因植株中表达, 就可以通过组织培养、匍匐茎等无性繁殖方式来大量扩繁。可以说, 基因工程为草莓育种开辟了新的途径, 有着重要的理论和实践意义。近 20 年来, 国内外在草莓抗病虫、耐盐碱、抗冻、改善品质、耐贮运、抗除草剂等基因工程研究取

收稿日期: 2007-03-22 接受日期: 2007-05-31

基金项目: 北京市教委科技发展计划项目(KM200710020012)

作者简介: 金晓磊, 男, 在读硕士生。Tel: 13810575612, E-mail: jxl198378@126.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 010-80799136, E-mail: dongbac@126.com, qiudy@caf.ac.cn

得了一些进展。本文简要综述草莓基因工程的这些研究进展,指出了当前草莓基因工程育种工作中存在的问题和发展方向,并对其发展前景进行展望,供我国进一步开展草莓基因工程研究的科学工作者参考。

1 草莓基因工程研究进展

草莓的基因工程遗传转化研究始于 20 世纪 80 年代末。随着离体再生技术的日益成熟和克隆外源目的基因数量的增多,用转基因技术来快速改良现有草莓品种就成为可能。1989 年, Nehra 等^[2]建立了草莓叶片直接高频率诱导不定芽的再生体系。随后, James 等^[3]和 Nehra 等^[4-5]于 1990 年利用草莓的叶片或愈伤组织为材料,成功获得了农杆菌介导的草莓基因转化植株。迄今,人们已将多种有价值的外源目的基因导入到草莓植株中。

1.1 草莓抗病虫基因工程

草莓抗病、抗虫等生物逆境胁迫的基因工程主要包括抗病毒、真菌和害虫这 3 个方面。在草莓产区,主要存在有草莓斑驳病毒(SMV)、草莓镶脉病毒(SVBV)、草莓皱缩病毒(SCV)、草莓轻型黄边病毒(SMYEV)这 4 种专一性病毒。他们在我国草莓产区都有发生,可使草莓产量的损失超过 30%。Tzanetakakis 等^[6]在草莓中首次发现了环斑病毒。目前通常采用昆虫防治、切断病毒传播途径或采用栽培脱毒苗等方式来减轻病毒对草莓的危害。利用基因工程技术,培育抗病毒的新品种,是解决草莓病毒危害的有效措施。抗病毒基因有外壳蛋白(CP)基因、复制酶基因、卫星 RNA、反义 RNA 等,其中比较成熟的途径是利用病毒 CP 基因。Finsta 等^[7]将草莓轻型黄边伴随病毒外壳蛋白导入到草莓中,获得了病毒抗性较强的植株。草莓抗真菌基因主要有 -1,3- 葡聚糖酶、多聚半乳糖醛酸酶、几丁质酶和蛋白酶抑制剂基因 Cyf1 等^[8]。Khan 等^[9]发现编码 -1,3- 葡聚糖酶基因是一个多基因家族,RT-PCR 分析发现 -1,3- 葡聚糖酶在草莓叶片中表达。Shi 等^[10]发现草莓 -1,3- 葡聚糖酶基因 FaBG2-3 和 FaBG2-1 存在表达差异的现象,前者比后者至少高 100 倍。Mehli 等^[11]发现草莓多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因受真菌的诱导。Martinelli 等^[12]对利用基因工程技术来获得抗真菌的草莓植株进行了研究。Vellicce 等^[13]发现转几丁质酶基因 ch5B 的草莓对灰霉菌表现出很强的抗性,但炭疽病菌的抗性没有增强。因此,有关草莓抗真菌病基因工程方面的研究有待于今后继续深

入。

抗虫基因在草莓上的转化研究主要集中在蛋白酶抑制剂(PI)和苏云金杀虫晶体蛋白(ICPs)的基因上。Graham 等^[14]将豇豆蛋白酶抑制剂(CpTI)基因导入草莓中,成功地获得了转基因植株。

1.2 草莓抗低温和耐盐碱的基因工程

草莓与低温和盐碱等非生物逆境胁迫有关的基因主要有磷酸酯酶基因、蛋白激酶基因、14-3-3 蛋白基因^[15]、脱水基因、胚胎晚期丰富蛋白基因和一些转录因子。Houde 等^[16]人将小麦酸性脱水基因 Wcor410 导入到草莓中,发现 Wcor410 可以阻止草莓膜的损伤,提高叶片的冷冻耐受能力,使得经过寒冷驯化的转基因草莓的冷冻耐受能力提高了 5%。Owens 等^[17]将从草莓中分离出的转录因子 CBF1 基因导入草莓,获得了抗冷性提高的转基因植株。与对照比,转 CBF1 基因的草莓在田间试验中表现出更强的抗冻能力。刘凤华等^[18]将甜菜碱脱氢酶(BADH)基因导入草莓,通过促进甜菜碱或山梨醇的积累,获得了抗盐的转基因烟草和草莓植株。王俊丽等^[19]利用基因枪法将来自大麦的胚胎晚期丰富蛋白基因 LEA 导入草莓品种“达赛莱克特”的花药愈伤细胞中,经过除草剂的筛选,获得了抗性愈伤组织和再生植株,为今后盐分胁迫试验奠定了基础。

1.3 草莓品质基因工程

草莓育种中,品质是最重要的经济性状之一。草莓品质包括果实的大小、风味、甜酸度、维生素 C 含量、香气和色泽等内容。目前我国草莓的一些主栽品种存在果实含糖量较低、风味不够浓、气味不够芳香的缺点。克隆控制果实品质的基因并进行有效调控是草莓分子育种的重要内容。近年来,国内外学者在提高草莓品质基因工程方面做了不少工作。果实的大小与果实的生长发育密切相关。与草莓果实生长发育有关的基因主要有生长素诱导基因^[20]、生长素结合蛋白基因^[21]、钙依赖蛋白激酶^[22]和 FaGAST 基因等。de la Fuente 等^[23]发现草莓 FaGAST 基因可以通过抑制细胞伸长因子来影响草莓细胞的生长,使植株生长变慢、果实变小。Mezzetti 等^[24]利用 DefH9-iaaM 基因获得了单性结实的草莓转基因植株,他们发现 DefH9-iaaM 基因可以通过增加植株的花序数量,花序中果的数量和果实重量的方式使野生草莓、栽培草莓的产量得到提高,而且产量的增加并不会使果实的糖含量减少。Wawrzynczak 等^[25]利用玉米生长素葡萄糖合成酶基因对草莓进行了遗传转化,旨在研究该基因对草莓吲哚乙酸代谢以及生长发育的

影响。

果实风味与成熟度有很大的关系。与草莓成熟有关的基因主要有肉桂酸葡萄糖基转移酶基因^[26]、胞质醛缩酶基因^[27]、内多聚半乳糖醛酸酶基因^[28]、HyPRP 基因^[29]、脂肪加氧酶基因^[30]。Wilkinson 等^[31]利用 PCR 差异显示技术(PCR differential display)检测到 3 个与草莓成熟相关的 mRNA。

Bachelier 等^[32]利用来自马铃薯的蔗糖酶基因对草莓进行了转化,发现该基因能调控蔗糖的降解。Dolgov 等^[33]用含超甜蛋白 Thaumatin 的编码区的二元载体转化草莓,并在草莓植株中成功的检测到该基因的表达。Taldio 等^[34]发现转 6-磷酸果糖-2-激酶/果糖-2,6-二磷酸酶(6PF2K/F2, 6P2ase)的草莓植株中,2,6-二磷酸果糖含量高时有利于同化物向淀粉合成方向分配,反之则有利于蔗糖合成,且发现在蔗糖过量合成的植株中,氨基酸含量有所增加。Iannetta 等^[35]分别从草莓未成熟和成熟果实的细胞壁中抽提出 7 种盐溶性蛋白,并克隆了其中线粒体苹果酸脱氢酶和线粒体柠檬酸合成酶的 cDNA,分析后认为线粒体苹果酸脱氢酶和线粒体柠檬酸合成酶很可能是调节果实风味和糖/酸平衡中的决定因子。控制草莓维生素 C 含量的为 D-半乳糖醛酸还原酶基因 GalUR,将该基因转入烟草后,使烟草中维生素 C 含量提高了 2~3 倍^[36]。

控制草莓香气的基因主要有 O-甲基转移酶基因^[37-38]、醇酰基转移酶基因 SAAT^[39]、烯酮氧化还原酶基因 FaQR^[40]、橙花叔醇合成酶和蒾烯基化酶基因^[41]。O-甲基转移酶负责草莓香草醛和 2,5-二甲基-4-甲氧基-3(2H)-呋喃酮(DMMF)的合成,SAAT 负责挥发性酯类生物合成的最后步骤,FaQR 蛋白含 322 个氨基酸,负责 4-羟基-2,5-二甲基-3(2H)呋喃酮(HDMF)的合成。Beekwilder 等^[42]将草莓 SAAT 基因转入矮牵牛后,能够检测 SAAT 蛋白的活性,但挥发性物质没有变化,喂饲异戊醇后发现转基因植株可以释放出乙酰基酯类。Lunkenbein 等^[43]发现在反义 O-甲基转移酶基因转基因草莓中 DMMF 几乎彻底丧失,阿魏酰 1-O-β-D-葡萄糖与咖啡酰基 1-O-β-D-葡萄糖的比例发生改变,而其它的挥发性物质不受影响。

控制草莓色泽的基因主要有查耳酮合成酶(CHS)基因和二氢黄酮醇 4-还原酶基因。二氢黄酮醇 4-还原酶负责草莓花青素的合成^[44]。Lunkenbein 等^[45]研究了草莓中稳定态反义查耳酮合成酶基因表现型,发现查耳酮合成酶基因的表达被抑制后类黄

酮生物合成途径中的前体转向苯丙烷类途径,看来 CHS 基因是类黄酮生物合成途径和苯丙烷类途径之间底物流向的一个重要调节点。

1.4 草莓耐贮运性基因工程

草莓育种中,果实耐贮运性也是重要的经济性状。贮运性主要与硬度的高低和褐变的快慢有关。草莓果实成熟后迅速变软和褐化,导致果实不耐贮藏、运输,果汁易褐化,栽培草莓的效益大为降低。克隆控制果实成熟软化、褐化等性状相关的基因并进行有效地调控是草莓分子育种的重要研究内容。近年来,国内外学者在改善草莓的耐贮运性方面也做了许多工作。

控制草莓果实硬度和成熟软化的基因主要有 -半乳糖苷酶^[46]、果胶酸裂解酶^[47-48]、果胶酯酶^[49]、伸展蛋白基因^[50]、-木糖苷酶^[51]、内-β-1,4-葡聚糖酶基因^[52]等。Medina-Escobar 等^[53]从草莓中克隆了成熟相关基因 njjs4 的 cDNA,该基因与高等植物 I 型低分子量热休克蛋白基因有同源性。Woolley 等^[54]发现在转反义内-β-1,4-葡聚糖酶(endo-beta-1,4-glucoanase, EG)基因 cel1 的草莓果实中,cel1 的 mRNA 降低很多,但 EG 酶的活性和果实硬度与非转基因的对照相比没有什么区别。转反义 cel1 基因的植株中,另 1 个编码内-β-1,4-葡聚糖酶(EG)的基因 cel2 发生表达,使得 cel1 在果实软化中所起的作用不易被揭示。Spolaore 等^[55]以草莓果实为材料,分离了 2 个编码内-β-1,4-葡聚糖酶的基因 FaEG1 和 FaEG3。对这 2 个基因的检测表明,FaEG3 mRNA 的水平低于 FaEG1 mRNA。Salentijn 等^[56]利用含 1701cDNA 克隆的 DNA 芯片对 2 种不同的硬度的栽培草莓的基因表达进行了分析,结果发现 61 个差异表达的克隆,其中有 10 个克隆与细胞壁相关基因同源。有意思的是,羟基肉桂酰辅酶 A 还原酶(CCR)和羟基肉桂醇脱氢酶(CAD)这 2 个与木质素合成有关基因的表达差异最大。王关林等^[57]克隆了草莓膜联蛋白(annexin)基因全序列的 cDNA,并且将其基因命名为 annfaf。那杰等^[58]对草莓 annfaf 基因反义融合载体进行构建并获得了转基因植株。Bustamante 等^[59]从草莓 cDNA 文库中获得了编码 -木糖苷酶(FaXy11)的全长基因,他们发现 FaXy11 的 mRNA 在最软的丰香品种中,果实成熟时很早就积累,而且其蛋白水平也很高,由此推测 -木糖苷酶(FaXy11)很可能与草莓果实的软化有关。Jimenez-Bermudez 等^[60]在 41 个转反义果胶裂解酶基因的草莓株系(Apel lines)中,发现有 33 个株系的产量明显降低。

在完熟期, 转反义果胶裂解酶基因的果实在颜色、大小、形状和质量方面与对照没有差别。大多数转反义果胶裂解酶基因的成熟果实中离子结合果胶的含量比对照的成熟果实中低, 其果实也要比对照硬。转基因果实中果胶裂解酶基因的表达水平要比对照至少低 30%, 有 3 株甚至降为 0。通过对转基因果实青、白和红 3 个发育阶段的分析, 发现由白到红这一阶段, 果实软化程度降低最多, 而且转基因果实采后变软的现象也消失。因此, 果胶裂解酶基因是分子改良果实硬度、阻止果实软化的优秀候选基因。

1.5 草莓抗除草剂基因工程

杂草是草莓在栽培中面临的一大难题。于冬梅等^[61]已将抗草丁膦的 *bar* 基因转入草莓栽培品种“索菲亚”中, 转基因植株在离体培养和田间栽培试验条件下, 均对 PPT 表现出良好的抗性。张志宏等^[62]建立了草莓高效、稳定的离体再生和转化体系, 并进行了 GUS 基因和 *bar* 基因转化试验, 发现将 *bar* 基因导入“弗吉尼亚”草莓品种中后, 转 *bar* 基因的植株在附加除草剂草丁膦的培养基上能够正常分化, 转基因植株在田间开花、结果正常, 对草丁膦表现出强烈抗性, 获得了抗草甘膦的转基因植株。

2 问题与展望

基因工程技术给草莓育种带来了巨大的变革, 但当前草莓基因工程育种工作中也还存在一些问题^[63-64]: 首先, 安全问题已经成为人们普遍关注的社会问题。草莓作为一种果品, 外源基因的导入及其产物的表达可能会产生安全性问题。通过对外源基因表达的检测、无标记技术的应用及其田间试验的实时监测有望解决这个问题。其次, 目前的草莓遗传转化效率不高, 因此仍需进一步优化草莓遗传转化体系, 提高效率。再次, 基因工程可以培育出抗病毒、耐贮藏、抗除草剂的草莓新品种, 但集这些优点于一体的品种还很少, 多基因转化是今后一个值得尝试的方向。

迄今, 草莓的基因工程大多是单个结构基因的操作, 利用调控基因的例子还不多。转录因子是重要的调节因子。笔者认为除了应继续关注 CBF1 和 LEA 等转录因子外, 还应关注另外一种重要的调控因子—小 RNA (microRNA, miRNA)。小 RNA 是 1 种内生的、长度为 21~22 nt、不编码蛋白质的单链小分子 RNA, 由具发夹结构的 70~90 个碱基的单链 RNA 前体 (pre-miRNA) 经过 Dicer 酶加工后生成 5' 端具磷酸基和 3' 端具羟基。自 1993 年在秀丽线虫

中发现第 1 个 miRNA *lin-4* 以来, 研究人员在水稻、拟南芥、线虫、果蝇、家鼠、人和病毒中发现了很多 miRNA。迄今 miRBase 数据库中 miRNA 数量已达 4 274 个, 其中植物的 miRNA 有 916 个。大量的研究表明, miRNA 代表了新层次上的生物基因表达调控方式, 是调节基因表达的一种重要策略^[65]。笔者已经预测到了一些与草莓结构基因 (如控制果实褐化的多酚氧化酶基因等) 起相互作用的小 RNA 分子。可以预计, 利用小 RNA 等调控基因对草莓进行转化将有望得到很好的结果。

由于草莓结果周期短, 容易进行遗传操作, 所以草莓应该可以作为果树作物基因组学研究的一个模式植物。众所周知, 决定草莓品质 (风味、香气和颜色) 的物质多是萜类和黄酮类次生代谢物质, 所以, 今后我国开展草莓次生代谢基因工程对其品质改良也将具有十分重要的意义。

我国在草莓单倍体培育及离体培养植株的再生的研究中占有一席之地, 但在草莓优良目的基因克隆和调控方面与国际同行相比还有一定差距^[66-68]。因此, 我国草莓基因工程育种的研究需要更多的人力、物力和财力的投入, 受到更多的重视, 以便为我国草莓业的快速、稳定发展提供更好的技术支撑和物质保障。

参考文献 References:

- [1] MCGRANAHAN G H, LESLIE C A, URATSU S L, MARTIN L A, DANDEKAR A M. Agrobacterium-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants[J]. *Biotechnology*, 1988 (6): 800-804.
- [2] NEHRA N S, STASHNOFF C. Direct shoot regeneration from strawberry leaf disks[J]. *Amer Soc Hort Sci*, 1989, 114 (6): 1 014-1 018.
- [3] JAMES D J, PASSEY A J, PRARBARA D J. Agrobacterium mediated transformation of the cultivated strawberry (*Fragaria xanannassa* Duch.) using disarmed binary vectors[J]. *Plant Science*, 1990, 69: 79-94.
- [4] NEHRA N S, CHIBBAR R N, KARTHA K K, DATLA R S S, CROSBY W L, STUSHNOFF C. Genetic transformation of strawberry by agrobacterium tumefaciens using a leaf disk regeneration system [J]. *Plant Cell Reports*, 1990a (9): 293-298.
- [5] NEHRA N S, CHIBBAR R N, KARTHA K, DATLA R S S, CROSBY W L, STUSHNOFF C. Agrobacterium mediated transformation of strawberry calli and recovery of transgenic plants[J]. *Plant Cell Reports*, 1990b (9): 10-13.
- [6] TZANETAKISI E, POSTMAN J D, GERGERICH R C, MARTIN R R. A virus between families: nucleotide sequence and evolution of strawberry latent ringspot virus[J]. *Virus Res*, 2006, 121 (2): 199-204.
- [7] FINSTA D K, MARTIN R R. Transformation of strawberry for virus

- resistance[J]. *Acta Hort*, 1995, 385: 86-90.
- [8] MARTINEZ M, ABRAHAM Z, GAMBARDILLA M, ECHAIDE M, CARBONERO P, DIAZ I. The strawberry gene *Cyf1* encodes a phytoalexin with antifungal properties[J]. *J Exp Bot*, 2005, 56 (417): 1 821- 1 829.
- [9] KHAN A A, SHI Y L, SHIH D S. Cloning and partial characterization of a α -1, 3- glucanase gene from strawberry[J]. *DNA Seq*, 2003, 14 (6): 406- 412.
- [10] SHI Y, ZHANG Y, SHIH D S. Cloning and expression analysis of two β -1, 3- glucanase genes from strawberry[J]. *Plant Physiol*, 2006, 163 (9): 956- 967.
- [11] MEHLI L, SCHAART J G, KJELSEN T D, TRAN D H, SALENTIEN E M J, SCHOUTEN H J, IVERSEN T H. A gene encoding a polygalacturonase-inhibiting protein shows developmental regulation and pathogen-induced expression in strawberry[J]. *New Phytologist*, 2004 (163): 99- 100.
- [12] MARTINELLI L, RUGINI E, SACCADO F. Genetic transformation for biotic stress resistance in horticultural plants, in vitro cell [J]. *Dev Bio Plant*, 1996, 32 (3): 69- 70.
- [13] VELLICCE G R, RICCI J C, HERNANDEZ L, CASTAGNARO A P. Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene *ch5B* in strawberry[J]. *Transgenic Res*, 2006, 15 (1): 57- 68.
- [14] GRAHAM J, MCNICOL R J, GREIG K. Toward genetic based insect resistance in strawberry using the cowpea traps in inhibitor gene[J]. *Ann Appl Biol*, 1995, 127(1): 163- 173.
- [15] AHARONI A, O'CONNELL A P. Gene expression analysis of strawberry achene and receptacle maturation using DNA microarrays[J]. *Exp Bot*, 2002, 53 (377): 2 073- 2 087.
- [16] HOUDE M, DALLAIRE S, N'DONG D, SARHAN F. Overexpression of the acidic dehydrin *WCOR410* improves freezing tolerance in transgenic strawberry leaves[J]. *Plant Biotechnol*, 2004, 2(5): 381- 387.
- [17] OWENS C L, THOMAS M F, HANCOCK J F, IEZZONI A F. CBF1 orthologs in sour cherry and strawberry and the heterologous expression of CBF1 in strawberry[J]. *Am Soc Hortic Sci*, 2002, 127 (4): 489- 494.
- [18] LIU F H, GUO Y, GU D M, XIAO G, CHEN Z H, CHEN S Y. Salt tolerance of transgenic plants with *BADH* cDNA[J]. *Acta Genetica Sinica*, 1997, 24(1): 54- 58. (in Chinese)
刘风华, 郭岩, 谷冬梅, 肖岗, 陈正华, 陈受宜. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J]. *遗传学报*, 1997, 24(1): 54- 58.
- [19] WANG J L, GE H B, PENG S Q, ZHANG H M, XU J R. *LEA3* gene transferred into strawberry[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2003, 30(3): 322- 324. (in Chinese)
王俊丽, 葛会波, 彭士琪, 张红梅, 续九如. 草莓外源 *LEA3* 基因的导入[J]. *园艺学报*, 2003, 30(3): 322- 324.
- [20] REDDY A S, POOVAIAH B W. Molecular cloning and sequencing of a cDNA for an auxin-repressed mRNA: correlation between fruit growth and repression of the auxin-regulated gene [J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 14(2): 127- 136.
- [21] LAZARUS C M, MACDONALD H. Characterization of a strawberry gene for auxin-binding protein, and its expression in insect cells[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31(2): 267- 277.
- [22] LLOP-TOUS I, DOMINGUEZ-PUIGJANER E, VENDRELL M. Characterization of a strawberry cDNA clone homologous to calcium-dependent protein kinases that is expressed during fruit ripening and affected by low temperature[J]. *Exp Bot*, 2002, 53(378): 2 283- 2 285.
- [23] DE LA FUENTE J I, AMAYA I, CASTILLEJO C, SANCHEZ-SEVILLA J F, QUESADA M A, BOTELLA M A, VALPUESTA V. The strawberry gene *FaGAST* affects plant growth through inhibition of cell elongation[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(10): 2 401- 2 411.
- [24] MEZZETTI B, COSTANTINIE E, CHIONCHITTI F, LANDI L. Genetic transformation in strawberry and raspberry for improving plant productivity and fruit quality[J]. *Acta Hort*, 2004, 649: 107- 110.
- [25] WAWRAZYNCZAK D, MICHALCZUK L, SOWIK I. Modification in indole-3-acetic acid metabolism, growth and development of strawberry through transformation with maize IAA-glucose synthetase gene [J]. *Acta Physiologica Plantarum*, 2005, 27(1): 19- 27.
- [26] LUNKENBEIN S, BELLIDO M, AHARONI A, SALENTIEN E M, KALDENHOFF R, COINER H A, MUNOZ-BLANCO J, SCHWAB W. Cinnamate metabolism in ripening fruit. Characterization of a UDP-glucose: cinnamate glucosyltransferase from strawberry[J]. *Plant Physiol*, 2006a, 140(3): 1 047- 1 058.
- [27] SCHWAB W, AHARONI A, RAAB T, PEREZ A G, SANZ C. Cytosolic aldolase is a ripening related enzyme in strawberry fruits (*Fragaria x ananassa*) [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56(5): 407- 415.
- [28] REDONDO-NEVADO J, MOYANO E, MEDINA-ESCOBAR N, CABALLERO J L, MUNOZ-BLANCO J A. Fruit-specific and developmentally regulated endopolygalacturonase gene from strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) [J]. *Exp Bot*, 2001, 52(362): 1 941- 1 945.
- [29] BLANCO-PORTALES R, LOPEZ-RAEZ J A, BELLIDO M L, MOYANO E, DORADO G, GONZALEZ-REYES J A, CABALLERO J L, MUNOZ-BLANCO J. A strawberry fruit-specific and ripening-related gene codes for a HyPRP protein involved in polyphenol anchoring[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 55(6): 763- 780.
- [30] LEONE A, BLEVE-ZACHEO T, GERARDI C, MELILLO M T, LEO L, ZACHEO G. Lipoxigenase involvement in ripening strawberry[J]. *Agric, Food Chem*, 2006, 54(18): 6 835- 6 844.
- [31] WILKINSON J Q, LANAHAHAN M B, CONNER T W, KLEE H J. Identification of mRNAs with enhanced expression in ripening strawberry fruit using polymerase chain reaction differential display[J]. *Plant Mol Biol*, 1995, 27(6): 1 097- 1 108.
- [32] BACHELIER C, GRAHAM J, MACHRAY G, MANOIR J D, ROUCOU J F, MCNICOL R J, DAVIES H. Integration of an invertase gene to control sucrose metabolism in strawberry cultivars[J]. *Acta Hort*, 1997, 439: 161- 163.
- [33] DOLGOV S V, LEBEDEV V G, FISVOA P, TARAN S A, TJUKAVIN G B. Expression of traumatic gene in horticultural crops[C]//In: Mugnoz G T S, Porceddu E, Pagnotta M A (ed). *Genetics and breeding for crop quality and resistance. Proc of the XVth EUCARPIA Congress 20- 25, 1999: 165- 172.*

- [34] TOLDIO O, KOVACS G, KISS G, SORVARI S, SCOTT P. Altered fructose-2, 6- biphosphatase levels cause phenotypic changes and shift development in plant[J]. *Acta Biol Szegediensis*, 2002, 46(3-4): 15- 16.
- [35] IANNETTA P P M, ESCOBAR N M, ROSS H A, SOULEYRE E J F, HANCOCK R D, WITTE C P, DAVIES H V. Identification, cloning and expression analysis of strawberry (*Fragaria xananassa*) mitochondrial citrate synthase and mitochondrial malate dehydrogenase[J]. *Physiol Plant*, 2004(121): 15- 26.
- [36] AGIUS F, GONZALEZ- LAMOTHE R, CABALLERO J L, MUNOZ- BLANCO J, BOTELLA M A, VALPUESTA V. Engineering increased vitamin C levels in plants by overexpression of a D- galacturonic acid reductase[J]. *Nat Biotechnol*, 2003, 21(2): 177- 181.
- [37] WEIN M, LAVID N, LUNKENBEIN S, LEWINSOHN E, SCHWAB W, KALDENHOFF R. Isolation, cloning and expression of a multi- functional O- methyltransferase capable of forming 2, 5- dimethyl- 4- methoxy- 3 (2H)- furanone, one of the key aroma compounds in strawberry fruits[J]. *Plant J*, 2002, 31(6): 755- 765.
- [38] COINER H, SCHRÖDER G, WEHINGER E, LIU C J, NOEL J P, SCHWAB W, SCHRÖDER J. Methylation of sulfhydryl groups: a new function for a family of small molecule plant O- methyltransferases[J]. *The Plant Journal*, 2006, 46 (2): 193- 205.
- [39] AHARONI A, KEIZER L C, BOUWMEESTER H J, SUN Z, ALVAREZ- HUERTA M, VERHOEVEN H A, BLAAS J, Van HOUWELINGEN A M, DE VOS R C, VAN DER VOET H, JANSEN R C, GUISEM, MOL J, DAVIS R W, SCHENA M, VAN TUNEN A J, O'CONNELL A P. Identification of the SAAT gene involved in strawberry flavor biogenesis by use of DNA microarrays[J]. *Plant Cell*, 2000, 12(5): 647- 662.
- [40] RAAB T, LOPEZ- RAEZ J A, KLEIN D, CABALLERO J L, MOYANO E, SCHWAB W, MUNOZ- BLANCO J. FaQR, required for the biosynthesis of the strawberry flavor compound 4- hydroxy- 2, 5- dimethyl - 3 (2H)- furanone, encodes an enone oxidoreductase[J]. *Plant Cell*, 2006, 18(4): 1 023- 1 037.
- [41] AHARONI A, GIRI A P, VERSTAPPEN F W, BERTEA C M, SEVENIER R, SUN Z, JONGSMA M A, SCHWAB W, BOUWMEESTER H J. Gain and loss of fruit flavor compounds produced by wild and cultivated strawberry species[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(11): 3 110- 3 131.
- [42] BEEKWILDER J, ALVAREZ- HUERTA M, NEEF E, VERSTAPPEN F W, BOUWMEESTER H J, AHARONI A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 1 865- 1 878.
- [43] LUNKENBEIN S, SALENTIJN E M, COINER H A, BOONE M J, KRENS F A, SCHWAB W. Up- and down- regulation of *Fragaria x ananassa* O- methyltransferase: impacts on furanone and phenylpropanoid metabolism[J]. *Exp Bot*, 2006c, 57(10): 2 445- 2 453.
- [44] MOYANO E, PORTERO - ROBLES I, MEDINA - ESCOBAR N, VALPUESTA V, MUNOZ - BLANCO J, CABALLERO J L. A fruit - specific putative dihydroflavonol 4- reductase gene is differentially expressed in strawberry during the ripening process[J]. *Plant Physiol*, 1998, 117(2): 711- 716.
- [45] LUNKENBEIN S, COINER H, DE VOS C H, SCHAART J G, BOONE M J, KRENS F A, SCHWAB W, SALENTIJN E M. Molecular characterization of a stable antisense chalcone synthase phenotype in strawberry (*Fragaria x ananassa*) [J]. *Agric Food Chem*, 2006b, 54(6): 2 145- 2 153.
- [46] TRAINOTTI L, SPINELLO R, PIOVANA, SPOLAORES, CASADORO G. Beta- Galactosidases with a lectin- like domain are expressed in strawberry[J]. *Exp Bot*, 2001, 52(361): 1 635- 1 645.
- [47] MEDINA- ESCOBAR N, CARDENAS J, MOYANO E, CABALLERO J L, MUNOZ- BLANCO J. Cloning, molecular characterization and expression pattern of a strawberry ripening- specific cDNA with sequence homology to pectate lyase from higher plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(6): 867- 877.
- [48] BENITEZ- BURRACO A, BLANCO- PORTALES R, REDONDO- NEVADO J, BELLIDOM L, MOYANO E, CABALLERO J L, MUNOZ- BLANCO J. Cloning and characterization of two ripening- related strawberry (*Fragaria x ananassa* cv. Chandler) pectate lyase genes[J]. *Exp Bot*, 2003, 54(383): 633- 645.
- [49] CASTILLEJO C, DE LA FUENTE J I, IANNETTA P, BOTELLA M A, VALPUESTA V. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPE1, a ripening- specific isoform[J]. *J Exp Bot*, 2004, 55 (398): 909- 918.
- [50] DOTTO M C, MARTINEZ G A, CIVELLO P M. Expression of expansin genes in strawberry varieties with contrasting fruit firmness [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2006, 44(5- 6): 301- 307.
- [51] MEZZETTI B, COSTANTINIE E, CHIONCHITTI F, LANDI L, PANDOLFINI T, SPENA A. Genetic transformation in strawberry and raspberry for improving plant productivity and fruit quality[C]. *Acta Hort*, 2004, 649:107- 110.
- [52] HARPSTER M H, BRUMMELL D A, DUNSMUIR P. Expression analysis of a ripening- specific, auxin- repressed endo- 1, 4- beta- glucanase gene in strawberry[J]. *Plant Physiol*, 1998, 118 (4):1 307- 1 316.
- [53] MEDINA - ESCOBAR N, CARDENAS J, MUNOZ - BLANCO J, CABALLERO J L. Cloning and molecular characterization of a strawberry fruit ripening- related cDNA corresponding a mRNA for a low- molecular- weight heat- shock protein[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 36(1): 33- 42.
- [54] WOOLLEY L C, JAMES D J, MANNING K. Purification and properties of an endo- beta- 1, 4- glucanase from strawberry and down- regulation of the corresponding gene cel1[J]. *Planta*. 2001, 214(1): 11- 21.
- [55] SPOLAORE S, TRAINOTTI L, PAVANELLO A, CASADORO G. Isolation and promoter analysis of two genes encoding different endo- 1, 4- glucanase in the non- climacteric strawberry[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54(381): 271- 277.
- [56] SALENTIJN E M J, AHARONI A, SCHAART J G, BOONE M J, KRENS F A. Differential gene expression analysis of strawberry cultivars that differ in fruit- firmness[J]. *Physiologia Plantarum*, 2003, 118 (4): 571- 578.
- [57] WANG G L, YANG H Y, XIA R, FANG H J, JING S X. Cloning and sequencing the full - length cDNA of annexin from strawberry fruit

- [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43(8): 874- 876. (in Chinese)
- 王关林, 杨怀义, 夏然, 方宏筠, 景士西. 草莓果实膜联蛋白基因 (annfaf) 全长 cDNA 克隆及序列分析[J]. *植物学报*, 2001, 43(8): 874- 876.
- [58] NA J, WANG G L, XIA R, YANG H Y. Construction of anti- sense gene of annfaf and genetic transformation of strawberry[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2006, 39(3): 582- 586. (in Chinese)
- 那杰, 王关林, 夏然, 杨怀义. 草莓 annfaf 基因反义融合表达载体构建及转基因植株的获得[J]. *中国农业科学*, 2006, 39(3): 582- 586.
- [59] BUSTAMANTE C A, ROSLI H G, ANON M C, CIVELLO P M, MARTINEZ G A. Beta- xylosidase in strawberry fruit: Isolation of a full- length gene and analysis of its expression and enzymatic activity in cultivars with contrasting firmness[J]. *Plant Science*, 2006, 171 (4):497- 504.
- [60] JIMENEZ- BERMUDEZ S, REDONDO- NEVADO J, MUNOZ- BLANCO J, CABALLERO J L, LOPEZ- ARANDA J M, VALPUESTA V, PLIEGO- ALFARO F, QUESADA M A, MERCADO J A. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene[J]. *Plant Physiol*, 2002, 128(2): 751- 759.
- [61] YU D M, HU W Y, WANG G L. Current situation and prospects of biotechnique application in strawberry genetic improvements[J]. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 1999, 30 (5): 544- 547. (in Chinese)
- 于冬梅, 胡文玉, 王关林. 生物技术在草莓遗传改良上的应用前景[J]. *沈阳农业大学学报*, 1999, 30(5): 544- 547.
- [62] ZHANG Z H, WU L P, DAI H Y, WANG G Y, ZHAO T Y, BI X Y, DU G D. Regeneration and transformation in vitro of the strawberry varieties[J]. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28(3): 189- 193. (in Chinese)
- 张志宏, 吴禄平, 代红艳, 王国英, 赵天永, 毕晓颖, 杜国栋. 草莓主栽品种再生和转化的研究[J]. *园艺学报*, 2001, 28(3): 189- 193.
- [63] GAO Q H, YIE Z W, ZHANG X Y, ZHENG H Q. Advances in research on biotechnology breeding of strawberry[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2006, 4(3): 123- 129. (in Chinese)
- 高清华, 叶正文, 张学英, 郑宏清. 草莓生物技术育种研究进展[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3): 123- 129.
- [64] KANG H X, JIANG F, YANG G S. Progress in transgene of strawberry[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2006, 12. (in Chinese)
- 康厚祥, 姜丰, 杨国顺. 草莓转基因研究进展[J]. *生物技术通报*, 2006, 12.
- [65] ZHANG B, WANG Q, PAN X. MicroRNAs and their regulatory roles in animals and plants [J]. *Journal of Cellular Physiology*, 2007, 210 (2): 279- 289.
- [66] ZHOU H C, LUO J, ZHAO X, WANG Y Q. Effects of different cultural conditions on regeneration from leaves of strawberry cultivar Sachinoka[J]. *Journal of Fruit Science*, 2007, 24 (1): 105- 108. (in Chinese)
- 周厚成, 罗静, 赵霞, 王永清. 不同培养条件对幸香草莓离体叶片再生的影响[J]. *果树学报*, 2007, 24(1): 105- 108.
- [67] LI Q F. Study on the detoxification seedling of the anther cultivation of strawberry[J]. *Journal of Qinghai University (Nature Science)*, 2007, 25(1): 1- 4. (in Chinese)
- 李强峰. 草莓花药组培脱毒育苗技术研究[J]. *青海大学学报(自然科学版)*, 2007, 25(1): 1- 4.
- [68] QIN Y H, ZHANG S L. Recent advances in strawberry transgenic research[J]. *Hereditas*, 2007, 29(2): 150- 156. (in Chinese)
- 秦永华, 张上隆. 草莓转基因研究进展[J]. *遗传*, 2007, 29(2): 150- 156.