

含耐贮基因蕃茄的贮藏生理特性及在育种上的应用

陆春贵 徐鹤林 杨荣昌 余文贵

摘 要

测定、分析成熟过程中的番茄成熟突变体 *alc*、*nor*、*rin* 材料与正常成熟番茄品种及其杂种一代果实的呼吸强度、乙烯释放量及多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 活性。结果表明:*alc*、*nor*、*rin* 材料果实呼吸强度和乙烯含量都很低,且无呼吸跃变;其硬度降低慢,果实中 PG 活性较低,一般可贮藏 2—3 个月,贮藏指数是正常番茄的 3 倍左右,杂种果实 *nor*/+、*alc*/+、*rin*/+ 均有呼吸、乙烯跃变现象,但跃变期比正常番茄推迟 5—7 天,达跃变时,果实释放的 CO₂ 和乙烯量是正常番茄的 40%—65%,PG 活性和硬度变化介于双亲之间,果色与正常成熟番茄相近,果实的耐贮藏性略高于正常番茄。

经过对 *nor* 基因材料的改造及转育已培育出园艺性状优良、耐贮性强、抗病、丰产的优良一代杂种。

关键词: 番茄;成熟突变体;贮藏特性;育种

番茄果实成熟后,很快变软,难以保鲜和贮运。据 Ceponis 等报道,每年番茄采后损耗量占总产量 15%—20%^[6]。采收绿熟果实虽可提高耐贮、耐运性,但果实风味较差,着色不匀,品质下降^[10]。长期以来,人们一直盼望能培育出一种既能延长贮藏时间,又可保持其优良品质的番茄新品种。

近些年,番茄遗传育种专家先后发现了多种番茄成熟突变体,如 *Nr* (never-ripe), *rin* (ripening inhibitor) 及 *nor* (non-ripening), 其共同特性是只产生很少茄红素,果实硬度大,不产生或产生微量果实软化酶—多聚半乳糖醛酸酶 (PG),成熟过程无呼吸跃变,果实可贮藏较长时间。但这一特性常与果实品质下降相关联^[9],而 *alc* (Alcobaca) 突

变体除具有较强的耐贮性外,其品质与正常番茄相近,最终果实转红或淡红,在育种中利用价值较高。

本试验以 *nor*、*alc*、*rin* 材料为亲本与我国普通番茄品种杂交,研究番茄成熟突变体及其 F₁ 果实贮藏生理特性的变化,为耐贮性育种提供理论依据

1 材料与方法

1.1 供试材料

选用从美国引进的 3 种具有成熟突变体基因型的耐贮材料和我国普通番茄品种(正常成熟)及其杂交组合:*rin* (IS08 89-53)、*rin* × *ck*₁ (*rin*/+), *nor* (LA1793 89-32)、*nor* × *ck*₁ (*nor*/+), *alc* (LA2833 89-59) 薯叶型、*alc* × *ck*₁ (*alc*/+), *ck*₁ (524 大红)、*ck*₂ (苏抗 5 号 F₁)。

1.2 测定项目和方法

1.2.1 果实呼吸强度测定 进行田间定株,花期挂牌,在绿熟期采下成熟度相同(以挂牌日期为准)的果实,贮于 20℃ 下,按宋钧等介绍的方法^[3],用红外线 CO₂ 气体分析仪 (QGD-7 型 CO₂ 分析仪,北分厂)测定果实的呼吸强度,采收至贮藏 30 天内,每日测 1 次,每个样品采收 1 kg (约 6 个果)。1991 年春、秋两次测定,其结果相近(1991 年秋测定数值未列出)。

1.2.2 果实乙烯测定 按王坤范密闭法进行^[1]。取 1 ml 样品气体注入气相色谱仪 (G、C-9A 型,日本)。载气为 N₂,流速 40 ml/min;空气 400 ml/min;H₂ 45 ml/min,柱温 90℃,氢火焰离子化探测器检测。每样品设 3 次重复,每重复取 2 次气体,按平均值计,果实采收后的前 20 天每天测 1 次,后 10 天隔天测

1次。

1.2.3 PG活性测定 在南京农业大学生化实验室进行。参照周培根、Zainon部分方法^[4,14],按果实不同成熟度采果测定,分4个时期:(MG)绿熟期;(B)发白期(开始成熟,果实表面发白并开始转色,转色面积不超过10%);(T)转色期(果实表面10%—60%转为淡黄或红色);(R)成熟期(果实表面60%以上转色为全红或黄)。

1.2.3.1 提取 将待测样品在-30℃下冷冻(每个品种取6个果),取5.0g果皮组织快速研碎,加入1.0mol/l NaCl(内含4mol/l MPB-巯基乙醇)20ml,搅匀;调整pH至6.0;匀浆液在4℃下提取2小时,离心(10000×g 20min),上清液在0℃冰浴中用75%(NH₄)₂SO₄沉淀,静置1小时(4℃);离心(12000×g 20min),沉淀在10ml 0.15mol/l pH为6.0 NaAc, HAC中悬浮,并透析,得到PG粗酶液。

1.2.3.2 PG活性分析 取0.1ml酶提取液加入0.5ml 1.0%底物多聚半乳糖醛酸(PGA)(Sigma产品),在37℃下保温30分钟,对照用热失活的酶液进行,反应结束后,沸水浴中加热30分钟终止反应,用Nelson方法测定还原基团的含量。

1.2.4 果实硬度测定 与PG测定取同一样品(先测硬度),沿果赤道线,随机对着心室腔二点,用硬度计(日产Cal, NO166型)测定,重复3次,每样品测6个果实,取平均值。

1.3 贮藏试验 绿熟期每材料选无病、整齐一致的果实20个,经0.3%次氯酸钠消毒后,放入消毒过的塑料箱内(20个果为一箱),重复4次,贮藏于16℃室内,隔5天检查一次,去除烂果,统计好果率,计算贮藏指数^[12]:

$$\text{贮藏指数(ASI)} = \frac{\text{好果率}(\%) \times \text{贮藏天数}}{100}$$

ASI越大,表示耐贮性越强。

2 结果与分析

2.1 番茄果实采收后呼吸强度和乙烯含量变化

2.1.1 呼吸强度变化 从图1中看出,正常成熟的品种果实采收后有呼吸跃变现象,呼吸峰在采后第七或第八天出现,而成熟突变体材料,在果实成熟过程中均无呼吸跃变。*alc*呼吸作用介于正常成熟品种与*rin*、*nor*之间。

成熟突变体的材料与正常成熟品种杂交后呼吸作用发生较大变化,*rin*×*ck*₁、*nor*×*ck*₁、*alc*×*ck*₁的各F₁虽均有呼吸跃变峰,但比正常成熟品种跃变峰推迟5—7天出现,且峰值仅是正常成熟品种的40%—60%。

2.1.2 乙烯释放量变化 1990—1991年两次测定了乙烯释放量变化,结果一致:正常成熟蕃茄*ck*₁在贮后第七天出现高峰,峰值为13.5 μl/kg hr;而*nor*、*rin*均不出现跃变峰,且在成熟过程中含量一直很低;*alc*介于正常成熟品种和*rin*之间,为“半跃变型”,其在贮藏后第十天出现1次小高峰,峰值是正常成熟蕃茄品种的32%(图2a)。

成熟突变体材料与正常成熟*ck*₁杂交后,各F₁的乙烯释放量变化与双亲存在明显差异,均出现跃变峰,但比正常成熟的苏抗5号推迟5—7天,而峰值为正常成熟品种的45%—65%,其中*alc*×*ck*₁高峰比*rin*×*ck*₁、*nor*×*ck*₁提早1—3天(图2b)。

2.2 果实硬度的变化

正常成熟的番茄品种在开花后55天左右(果实绿熟期)的果实硬度为6.7 kg/cm²,但随着果实的成熟,硬度逐渐下降,到果实转红时(开花后60—68天),硬度迅速降低,果实很快变软。而几种突变体材料的果实在发育过程中,硬度值较高,变化较小,尤其是*rin*、*nor*(图3)。

杂合体的果实在转色前硬度变化与正常成熟番茄相近,转色后,正常成熟番茄迅速下

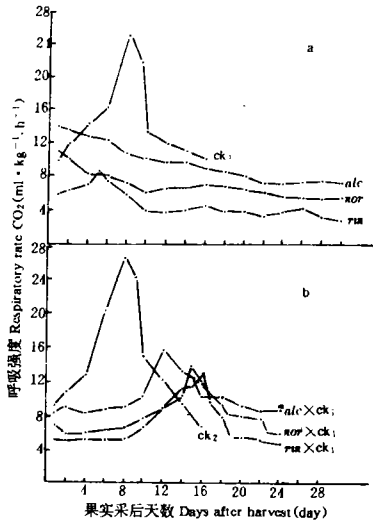


图 1 正常成熟番茄(524)、*rin*、*nor*、*alc*、*nor* × *ck*₁、*rin* × *ck*₁、*alc* × *ck*₁ 果实呼吸强度(果实绿熟期采下)
 Fig. 1. Respiration rates of tomato fruits of the normal ripening cultivar (524), mutants *rin*, *nor*, *alc* and hybrids *nor* × *ck*₁, *rin* × *ck*₁, *alc* × *ck*₁, harvested at mature green.

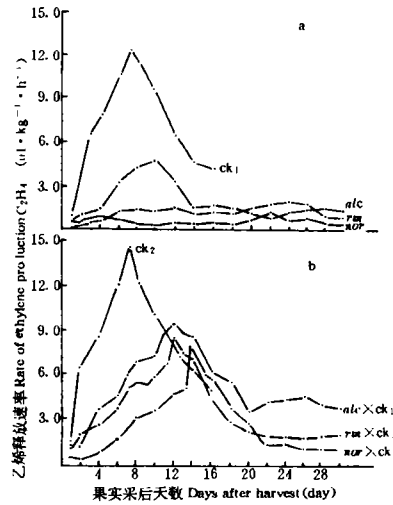


图 2 正常成熟番茄(524)、*rin*、*nor*、*alc* 和 *nor* × *ck*₁、*rin* × *ck*₁、*alc* × *ck*₁ 果实乙烯释放速率
 Fig. 2. Ethylene production of tomato fruits of the normal ripening cultivar (524), mutants *rin*, *nor*, *alc* and hybrids *nor* × *ck*₁, *rin* × *ck*₁, *alc* × *ck*₁, harvested at mature green.

降,而杂合体果实下降较为缓慢,至成熟期果实也软化,最终硬度维持 3.5—4.76 kg/cm²,其中 *alc* × *ck*₁ 硬度较 *nor* × *ck*₁、*rin* × *ck*₁ 低。

2.3 PG 活性变化

正常成熟的番茄品种,果实在绿熟期采下时 PG 活性几乎为零,但随着果实发育,PG 活性以直线上升,当果实全红时,PG 最高。*rin* 的 PG 活性从采下到贮藏后 1—2 个月一直很低,前期测不出(图 3)。*nor* 较 *rin* 略高,*alc* 居正常品种和 *nor* 之间,到果实转红时 PG 活性是正常番茄转红时的 36%。

杂合体 F₁ 表现有所不同,*alc*、*rin*、*nor* 与

*ck*₁ 杂交后 F₁ 的 PG 活性均比突变体显著提高,至成熟期,PG 活性分别是突变体亲本的 2—7 倍,但比正常成熟的亲本品种低(图 4)。

从图 3、4 还看出,PG 含量越高,果实硬度越小,果实软化程度越高。

2.4 果实耐贮性

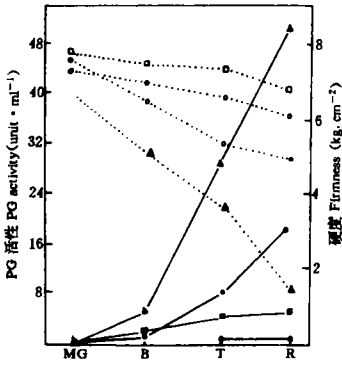
rin 番茄果实贮藏指数最高,其次是 *nor* 和 *alc*。正常成熟品种 524 大红,一般仅能贮藏一周左右,而 *rin*、*nor* 和 *alc* 可贮藏 2—3 个月。含耐贮基因的品种与正常品种杂交后其贮藏性显著下降,但比正常成熟品种的贮藏期长 10—15 天(表 1)。

2.5 成熟突变体在番茄育种中的应用

表 1 番茄成熟突变体及其 F₁ 贮藏指数和贮期

Table 1. Accumulative storage index(ASI) and storage life of tomato fruit of genotypes *alc*, *nor*, *rin*, normal and their F₁.

基因型 Genotype	贮藏指数 ASI	贮藏期 Storage life(d)	杂交组合 Cross combination	贮藏指数 ASI	贮藏期 Storage life(d)
<i>rin</i>	142.3	108.0	<i>rin</i> × <i>ck</i> ₁	58.6	17.5
<i>nor</i>	110.8	92.5	<i>nor</i> × <i>ck</i> ₁	54.8	16.0
<i>alc</i>	98.2	60.0	<i>alc</i> × <i>ck</i> ₁	60.2	18.0
<i>ck</i> ₁ (524 大红)	40.7	7.0	<i>ck</i> ₂ (苏抗 5 号 F ₁)	38.9	5.5

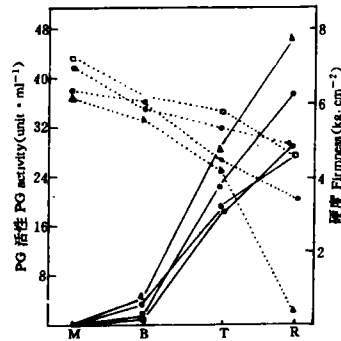


MG:绿熟期 Mature-green T:转色期 Turn colour
 B:发白期 Breaker stage R:成熟期 Ripe stage
硬度 Firmness ——多聚半乳糖醛酸酶 PG
 ● *alc* ○ *rin* □ *nor* ▲ *ck₁*(524 大红) 524 Dahong
图 3 正常番茄、*rin*、*nor*、*alc* 果实在不同成熟期多聚半乳糖醛酸酶(PG)活性和硬度

Fig. 3. Polygalacturonase (PG) activity and firmness of normal, *rin*, *nor* and *alc* tomato fruits at different stages of ripening.

番茄成熟突变体基因型已发现多年,但很少直接在生产上应用,主要原因是这类基因型材料的园艺性状普遍较差:植株徒长,节间长,座果率低,果型小,抗性弱,易感病,果实转色慢,成熟时茄红素显著不足,果实品质和商品性欠佳,所以在育种中应首先从改善耐贮基因材料本身的园艺性状着手,把成熟突变体基因型耐贮性与正常成熟品种的优良园艺性状相结合,培育出耐贮、抗病性强且增产、品质优良的新品种。

2.5.1 *nor* 耐贮基因的利用 经过对多种成熟突变体特性的分析、鉴定,发现 *nor* 突变体基因型材料(Long keeper)在室温下可贮藏 2 个多月,果实在转色期采下贮藏,最终果实颜色呈橙红色,且品质与正常番茄相近。1983 年在美国密执安大学以半高类型、果大、质优、单株结果数多的优良选系 M、S、U82-142 为母本,与 Long Keeper(*nor*)材料杂交,1984 年在本所种植 F₁ 代(编号为 139),F₁ 果实均表现正常成熟。1985 年春种植 F₂,分离出多种性状,从中选园艺性状优良(大果、抗性强、座果率高)且果实耐贮性优



MG:绿熟期 Mature-green T:转色期 Turn colour
 B:发白期 Breaker stage R:成熟期 Ripe stage
硬度(Firmness) ——多聚半乳糖醛酸酶 PG
 ● *alc* × *ck₁* ○ *rin* × *ck₁* □ *nor* × *ck₁*
 ▲ *ck₂* 苏抗 5 号 Sukang No. 5
图 4 正常番茄(苏抗 5 号)、*rin* × *ck₁*、*nor* × *ck₁*、*alc* × *ck₁* F₁ 果实 PG 活性和硬度

Fig. 4. Polygalacturonase (PG) activity and firmness of tomato fruits of normal cultivar (Sukang No. 5), and F₁ hybrids of *rin* × Normal, *nor* × Normal, *alc* × Normal at different stages of ripening.

良的单株留种。1985 年秋至 1986 年秋经过 4 代系统选择,选出 9 个园艺性状优良的耐贮性稳定的 9 个株系,1987 年春筛选出果型大、结果多、耐贮性强,但株型不同(高、中、矮)的 3 个株系;139F₂₋₉₋₂₋₁₋₀₋₁₋₁、139F₂₋₈₋₁₋₇₋₀₋₄、139F₂₋₃₋₂₋₁₋₄。此外,1986 年春,用 139F₂₋₈₋₁₋₇₋₀与矮黄(高抗 TMV、早熟)杂交,然后在分离的 F₂ 中选出黄苗、橙红果,且其它园艺性状优良的单株留种,再分离,至 1987 年秋,经 4 个世代选择,性状基本稳定,定名“双黄”,1989 年春用“双黄”的 3 个株系与 139 的 3 个株系杂交,1989 年秋种植 F₁,其中以双黄 5 号 × 139F₂₋₉₋₂₋₁₋₀₋₁ F₁ 组合表现最佳,长势强,抗病性好,果实大且园整,产量高,耐贮性强,定名为“长龄”。

“长龄”番茄主要表现:1989 年秋—1990 年秋进行了 3 次品比试验;1989—1991 年在全国布点区试,均表现优良。产量平均 72255 kg/ha,单果重平均 158.7 g,单株结果数 10—15 个。抗病性:经几年的田间病害调查及温室苗期人工接种,均表现高抗烟草花叶病毒病(TMV),早疫病发病率及病指显著低

于对照早粉 2 号,为对照 1/4,对 CMV 有一定耐病性。耐贮性:1989—1991 年春秋进行了 5 次贮藏试验,长龄番茄耐贮性远远高于对照品种,“长龄”的贮藏指数为 128.6,是对照苏抗 5 号的 3 倍多。贮藏 2 个月后“长龄”的好果率为 60%以上,而对照苏抗 5 号果实贮藏 10 天左右便失去了商品性。品质:“长龄”番茄果实高园形,果面光滑,无青肩,无棱沟,不裂果,成熟果呈橙红色,果实可溶性固形物含量为 4.2%,维生素 C 为 22 mg/100 g 鲜重,与对照品种相近。

2.5.2 *alc* 耐贮基因利用 *alc* 来自葡萄牙 Alcobaca 地区,是非正常成熟突变体,除具有较好的耐贮性外,果实品质也与正常成熟番茄相近,尤其是果色最终能转红,这对鲜食番茄育种有较高的利用价值。*alc* 与正常成熟品种或其它突变体基因型材料杂交后,杂种 F₁ 果实颜色表现正常,但果实贮藏期明显延长。*alc* 材料座果率低、果型小、不抗病,所以目前我们从改善 *alc* 园艺性状着手,用大果型、抗病性好、产量高、座果率强、品质佳的正常成熟番茄品种与 *alc* 杂交,从后代中选育出稳定的耐贮性强、园艺性状优良的 *alc* 材料,再用改良后的 *alc* 与双黄或 139F₆ 杂交,便可选育出品质好,耐贮性强,其它园艺性状也优良的新品种。

3 讨论

3.1 呼吸跃变和骤升是果实成熟的早期标志^[6],因为它可提供能量以驱动参与成熟的各种生化反应。乙烯在果实成熟时促进呼吸上升且可诱导 ACC 合成,从而导致乙烯大量生成,促进果实成熟^[2,13]。番茄成熟突变体 *rin*、*nor* 的果实均属于无呼吸跃变型,主要表现在从绿熟期采收到贮藏 1 个多月,乙烯含量和呼吸强度均很低。*alc* 是一个特殊的成熟突变体,无呼吸跃变,但有一小乙烯峰出现,称之为“半跃变型”^[12],由于它们的呼吸作用和乙烯合成受到抑制,导致成熟延缓。

3.2 1979 年 Poovaiah 等人在研究突变体 *rin* 时指出,*rin* 之所以很难成熟,产生极少乙烯,可能是由于不能形成 PG 的缘故^[8];1989 年 Pressey 和 Baldwin 用外源 *exo*-PG 处理跃变前的绿色果实,诱导产生了大量乙烯^[7]。乙烯调节产生 PG,PG 又能诱导产生乙烯,总之突变体果实耐贮性强是与 PG 和乙烯作用减弱紧密相关的。当然影响果实成熟的因素很多,也很复杂,抑制果实成熟的机理有待进一步探讨。

3.3 多聚半乳糖醛酸酶在番茄果实成熟中也起到决定作用^[8],它能催化富含多聚半乳糖醛酸的果胶质水解,使解离的水溶性细胞壁结构遭受不同程度的降解,导致果实软化,硬度下降。PG 在正常成熟果实的绿果期测不出来;在成熟期便大量累积。成熟突变体果实内 PG 含量很低或无,果实变软很慢或不能变软,因此果实软化与 PG 活性密切相关。

3.4 成熟突变体 *rin*、*nor*、*alc* 材料与正常成熟番茄品种杂交后,F₁ 跃变期较正常品种推迟一周左右,达跃变峰时 CO₂ 和乙烯的含量是正常品种的一半左右,PG 含量也较正常成熟品种低,贮藏期略有提高。

3.5 今后在耐贮性番茄育种中,要充分利用 *alc* 和 *nor* 果实突变体材料,改良其转色差、座果少、果型小等缺点,采用杂交育种和优势选种相结合的方法,选育出耐贮、园艺性状优良的番茄新品种。另外采用基因工程技术,将反义 PG、ACC、EFE 基因导入正常番茄之中,使之表达,形成既耐贮,果实品质又优良的番茄,目前正在开展这方面的研究工作。

4 参考文献

- [1]王坤范.几种测定果实组织乙烯浓度的取样方法.植物生理学通讯.1982,2:48-49
- [2]刘恩等.植物体内乙烯生物学作用及其调节控制.植物学报.1987,4(2):203-220
- [3]宋钧等.利用红外线 CO₂ 分析仪测定果蔬贮藏中呼吸强度的技术.植物生理学通讯.1987,6:60-62

- [4]周培根等. 桃成熟期间果实软化与果胶及有关酶的关系. 南京农业大学学报. 1991,14(2):33-37
- [5]梁玉法等. 多聚半乳糖醛酸酶(PG)在苹果成熟过程中之作用. 植物学报. 1982,24:143-145
- [6]Atherton JG, Rudich J. 郑光华等译. 番茄. 北京:北京农业大学出版社. 1989. P268
- [7]Elizabeth AB Baldwin. Exopolygalacturonase elicits ethylene production in tomato. Hort Science. 1990,15(7):779-780
- [8]Tigchelaar EC. Tomato ripening mutants. Hort Science. 1987,13(5):502
- [9]Tigchelaar EC, McGlasson WB. Genetic regulation of tomato fruit ripening. Hort Science. 1978,13(5):508-513
- [10]Kopeliovitch E, Mizrahi Y. Effect of the fruit ripening mutant genes *rin* and *nor* on the flavor of tomato fruit. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1982,107(3):361-364
- [11]Kopeliovitch E, Rabin witch HD, Mizrahi Y. Mode of inheritance of *alcobaca*, a tomato fruit ripening mutant. Euphytica. 1981,30:233-235
- [12]Lobo M, Basset HJ. and Harrah LC. Inheritance and characterization of the fruit ripening mutation in 'Alcobaca' tomato. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 1984,109(5):741-745
- [13]Herner RC and Sink KC. Ethylene production and respiratory behavior of the *rin* tomato mutant. Plant Physiol. 1973,52:38-42
- [14]Zainon Mohd Ali and C-J Brady. Purification and characterization of the polygalacturonase of tomato fruits. Aust. J. Plant Physiol. 1982,9:155-169

Storage-linked Physiological Characters of Tomato Carrying Fruit Ripening Mutant Genes and Their Implications in Breeding

LU Chungui, XU Helin, YANG Rongchang and YU Wengui

Abstract

Respiration rate, ethylene production, polygalacturonase (PG) activity and firmness of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) fruits were analysed with 3 fruit ripening mutants (*alc*, *nor*, *rin*), a normal tomato cultivar "524 Dahong" and their hybrids (F_1). In fruits of the mutants ethylene and CO_2 production were very low and no respiratory or ethylene climacteric was observed and their firmness declined very slowly with only traces of PG in mature fruits. They showed a 300% increase in storability compared to 524 Dahong, with a mean storage life of 60-90 days.

Fruits of the heterozygotes ($alc \times ck_1$, $nor \times ck_1$, $rin \times ck_1$) had insignificant respiratory and ethylene climacterics, which were delayed for about 5-7 days compared to that of "Su Kang No. 5". Their peak ethylene production and respiratory climacteric from harvesting at mature green to red colour was 40%-65% of that in normal ripe fruits. Their PG activity and firmness levels came between those of two parents. The F_1 hybrid fruits had a slightly increased storage life compared to that of normal cultivar (Sukang No. 5). Their fruits colour were qualitatively similar to those of cultivar "Sukang No. 5" fruit.

Changline, an outstanding F_1 hybrid with long shelf-life, high disease resistance and high yield, has been derived with the *nor* mutant as one of its parents. Efforts are also being made to use the *alc* mutant in tomato breeding.

Key words: *Lycopersicon esculentum* Mill; ripening mutant; storage characters; breeding