

番茄 ACC 合成酶反义 cDNA 转化及转基因番茄果实贮藏生理特性研究

¹陆春贵 ¹徐鹤林 ¹余文贵 ¹杨荣昌 ²曹晓凤 ²朱玉贤 ²陈章良

(¹江苏省农业科学院蔬菜研究所,南京 210014; ²北京大学生命科学学院,北京 100871)

摘要 ACC 合成酶 cDNA 被反向插入载体 PMON316,通过三亲交配,将表达质粒转移到农杆菌中,采用叶盘法转化番茄子叶。经卡那霉素筛选及分子杂交检测,表明,反义 ACC 合成酶基因已在 mRNA 水平表达。对转基因番茄果实的成熟生理指标测定结果说明,转基因番茄果实成熟受到严重抑制,乙烯的峰值仅为正常番茄的 25%~30%,PG 活性有所下降,果实在室温下可贮藏 1 个多月,品质和其他性状与正常番茄相近。

关键词 乙烯;反义 ACC 合成酶 cDNA;转基因工程植株;番茄

Genetic Transformation of Antisense cDNA of ACC Synthetase in Tomato and Physiological Characters Regarding Storage Property of Transgenic Tomato Fruit

¹LU Chungui, ¹XU Helin, ¹YU Wengui, ¹YANG Rongchang, ²CAO Xiaofeng, ²ZHU Yuxian and ²CHEN Zhangliang

(¹Institute of Vegetable Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014; ²College of Life Sciences, Peking University, Beijing 100871)

Abstract 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase (ACC synthetase) is a key regulatory enzyme in the biosynthetic pathway of the plant hormone ethylene. A full length cDNA encoding this enzyme was cloned from tomato fruits. Two copies of this gene were ligated head-to-tail and inserted into the plant transformation vector PEACC18 in an antisense orientation. The antisense ACC gene with the 35S promoter was transferred into leaf discs of *Lycopersicon esculentum* cultivar FA7 and FA8 using *Agrobacterium tumefaciens*. These leaf discs were placed on MS medium containing kanamycin and carbenicillin for callus induction. They were transferred step by step to different differentiation media, and numerous plants regenerated eventually. Leaves of these transgenic tomato plants were used for assaying the gene expression. Results of Southern blot showed that the antisense ACC gene was stably integrated into the genome of transgenic plants. Physiological analyses showed that the expression of the antisense ACC gene inhibited fruit ripening significantly. The peak of ethylene production was 30%—25% that of normal fruits, and the climacteric was delayed by a week with a mean storage life of 30—50 days. The shelf-life of the transgenic fruit was doubled compared with that of the parental line.

Key Words 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthetase (ACC synthetase); transgenic plant; antisense cDNA; *Lycopersicon esculentum*

近年来植物基因工程的迅速发展为品种改良提供了广阔的前景,通过基因工程途径

本研究为国家“八五”攻关项目

收稿日期:1995-03-27

在分子水平上调节乙烯的生物合成以控制果实成熟、延长架存时间、提高商品价值,已经取得了令人瞩目的成就。美国率先把表达反义 RNA 的番茄产品投放市场,取得十分可观的经济效益^[3,5]

乙烯是植物体内的成熟激素,它在果实成熟过程中起着决定性作用^[2,9]。乙烯的生物合成途径已经被论证。首先,通过 ACC 合成酶将 S-腺苷蛋氨酸(SAM)转化为氨基环丙烷羧酸(ACC),然后在 ACC 氧化酶(也称乙烯形成酶 EFE)催化下,将 ACC 转化为乙烯。ACC 合成酶在乙烯的生物合成中起着重要作用。通过反义 RNA 技术抑制 ACC 合成酶基因的表达,以阻断或抑制 ACC 的形成,使得乙烯的生物合成大大降低,从而延长果实架存时间^[3,12]。Oeller 等把 LE-ACC₂ 基因的 cDNA 反义系统成功地导入番茄^[11],几乎完全抑制了两个负责果实成熟的 ACC 合成酶基因的表达。虽然番茄成熟突变体(*nor.rin. Nr*)也能表现为阻止番茄果实的成熟,我们也培育出“耐贮”、“丰产”、“抗病”的含 *nor* 基因的“长龄”番茄^[7],但是这些突变体材料或品种,果实品质一般,果实颜色呈橙黄色,很难转成红色,因此商品性不高。本试验利用反义克隆的 ACC 合成酶 cDNA 载体转化番茄,产生反义转基因番茄植株,并测定分析果实的乙烯含量,PG 活性及硬度等,鉴定其耐贮性,筛选耐贮藏、耐运输、园艺性状优良的转基因番茄新品种(系),为转基因保鲜番茄走向市场打下理论基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

用于转化的番茄品种为苏抗 7 号、苏抗 8 号亲本之一,编号为 FA7、FA8。

1.2 植物表达载体的构建

含有完整的 ACC 合成酶 cDNA 重组,质粒 PCX₁₈,用 ClaI 和 SmaI 双切,分离后回收小片段,克隆到载体 PMON316,载体

PMON316 先前经过 EcoRI 酶切,加入 Klenow 补平,再用 ClaI 酶切消化。将 ACC 合成酶 cDNA 反向插入多克隆位点的 PMON316 即 CaMV35S 启动子和 Eg-3' 终止子之间,由此构建含有反义 ACC 基因的植物表达载体 PEACC18,采用限制性内切核酸酶酶切进行鉴定、分析,通过三亲交配,将上述表达载体 PEACC18 转移到农杆菌 GV3111SE 菌株中(图 1)。

1.3 基因转化及植株再生

将 FA₇、FA₈ 番茄种子用 HgCl₂ 消毒 15 分钟,无菌水冲洗 4 次,播种到 MS 培养基上,在 25℃光照 16 h/d 条件下培养。10 天后取幼苗子叶作为转化用的外植体材料。将含有 PEACC18 农杆菌 GV3111SE 菌液过夜培养(28℃),离心,悬浮,取番茄子叶浸入农杆菌中 15 分钟,吸去残液共培养 48 小时,再转入筛选培养基培养(羧苄青霉素 500 mg/L 和 Km50 mg/L),每 15 天转化 1 次,3~4 周长出愈伤组织和芽,继代培养,芽不断长到 1cm 左右,从愈伤组织上切下芽并转入生根培养基上培养,经过 1 个月左右,即可长出根系,再移栽到温室。

1.4 Southern blot 分析

使用 CTAB 从叶片组织中分离出 DNA^[8],经 BamHI 消化的 15 mg DNA 在 0.8%琼脂糖凝胶电泳,凝胶被浸于 0.5 mol/L NaCl,1.5 mol/L 45 分钟,在 1 mol/L Tris-HCl(pH8.0),1.5 mol/L NaCl 里中和 1 小时,进行消化,80℃焙干 2 小时,按照 Maniatis 方法杂交^[8,10],用 232-p-dcTP 标记的 PCX₁₈ 的 1.6 kb SmaI-ClaI I 片段作为探针。

1.5 Northern blot 分析

使用同样的方法从叶组织中分离总 RNAs,20 μg 的总 RNA 用 1%甲醛琼脂糖打碎,然后通过毛细作用转移到尼龙膜上,焙干(80℃)2 小时,采用特殊的反义 RNA 作为探针进行杂交,探针是从 PCX₁₈ 中用 T₇RNA 聚合酶进行标记的。

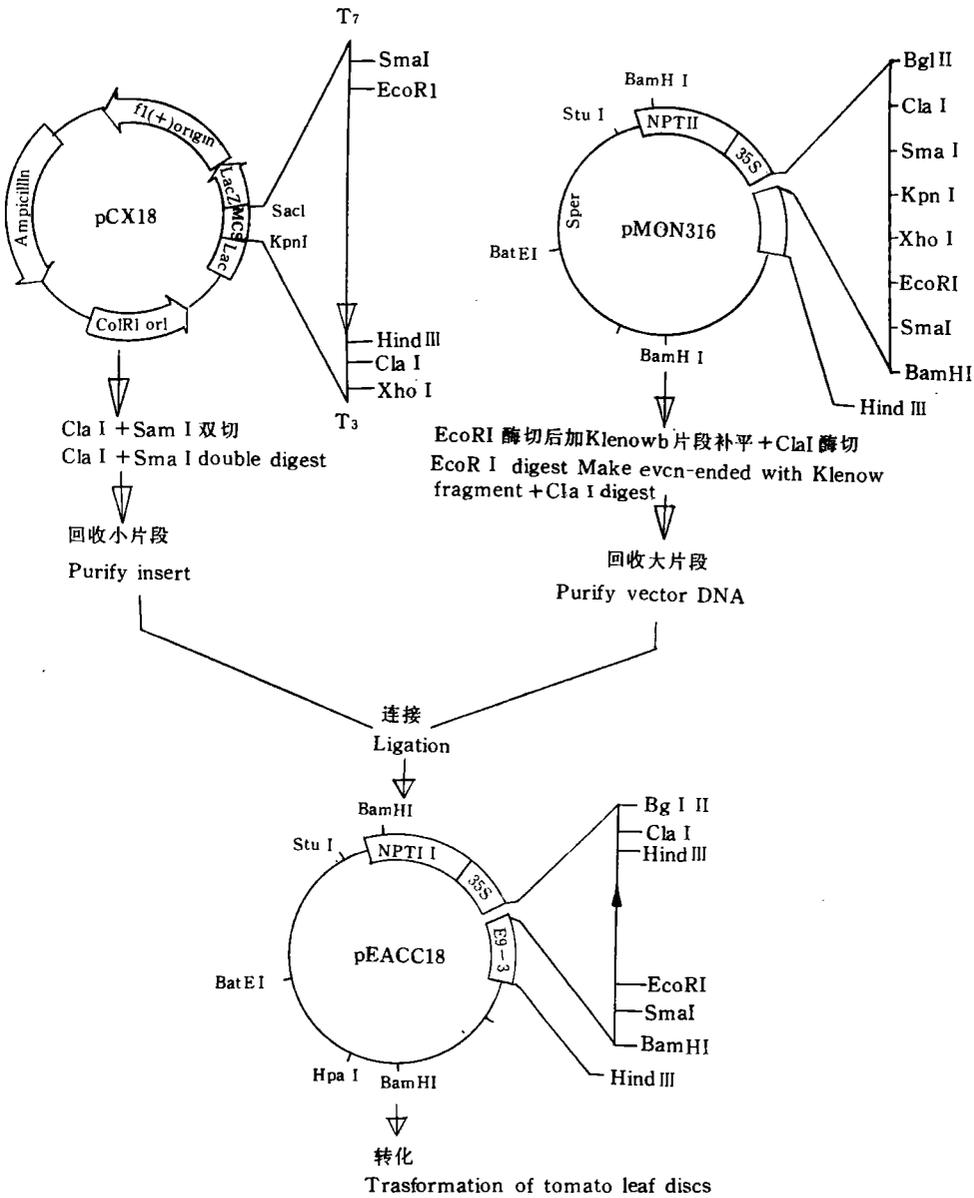


图1 反义 ACC 植物表达载体的构建

Fig. 1. Construction of plant expression vector with anti-sense ACC synthetase.

1.6 果实成熟生理指标测定

1.6.1 供试材料 共分3种类型:一是已通过分子杂交检测,结果确证反义 ACC 合成酶基因存在于植株中的转基因番茄,通过扦插获得 FA₇ 转基因植株 65 株,FA₈52 株;二是成熟突变体(*nor*)“长龄”;三是对照品种苏

抗 5 号(正常成熟番茄)。1994 年春秋两季将 3 种类型材料种植于塑料大棚中,分别进行田间定株、花期挂牌,在绿熟期采下成熟度一致的果实进行各项测定。

1.6.2 果实乙烯释放量测定 按王坤范的密闭法进行^[1]。果实贮于 22℃ 室内,标准乙

烯气体为 100 ppm,取 1 ml 样品和标样气体注入气相色谱仪中(G. C-9A 日本产),载气为 N_2 ,流速 25 ml/min,空气 500 ml/min,氢气 60 ml/min,柱温 40℃,汽化室温度 120℃,检测器 120℃,氢火焰离子化探测器检测(FID),每样品重复 3 次,每重复取气 2 次,取平均值,贮藏期前 20 天每天测 1 次,后 10 天隔天测 1 次。

1.6.3 PG 活性测定 参照周培根的方法^[6]。在 4 个不同成熟期采果测定:绿熟期(G);破色期(B),即果实表面开始发白并转色,转色面积不超过 10%;转色期(T),即果实表面 10%~60%转色;成熟期(R),即果实表面 60%以上转为全红或黄色。

1.6.4 果实硬度测定 硬度与 PG 活性测定采用同一样品,沿着果赤道线随机对着心室腔打四点,硬度计为日产 Cal. No. 166 型,每样品测 12 个果,取平均值。

1.6.5 果实贮藏试验 分别在绿熟期、破色期、成熟期采果,选无病斑,整齐一致果 45 个(3 箱/每份材料),用 0.3%次氯酸钠消毒,放入消毒过的塑料箱内(每箱 15 个果),重复 3 次,贮于白天 25℃,晚上 20℃的温室内,隔 5 天检查 1 次,去除烂果,统计好果率,计算贮藏指数(ASI)^[4]。

2 结果

2.1 基因转化与再生株的获得

将剪下的番茄子叶用含有 PEACC18 的农杆菌 GV3111SE 进行侵染,共培养 48 小时,然后转移到含有羧苄青霉素和卡那霉素的培养基上,经过 4~6 周的诱导,筛选,去除发白、无愈伤组织、芽未被转化的子叶,获得 268 个芽,将它们转移到生根培养基上,其中有 105 个长出根(图 2),移栽后共获得 41 株生长正常的转基因植株(图 3),其中 FA7 23

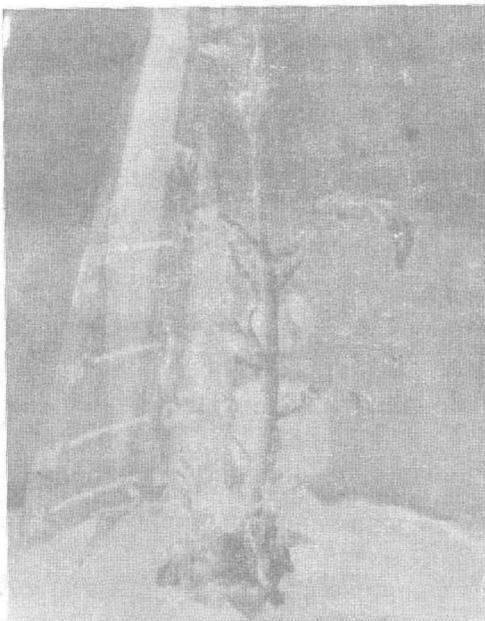


图 2 含有卡那霉素 50 mg/l 培养基上生长的转基因番茄幼苗

Fig. 2. The transgenic shoots cultured in a medium containing kanamycin 50 mg/l.

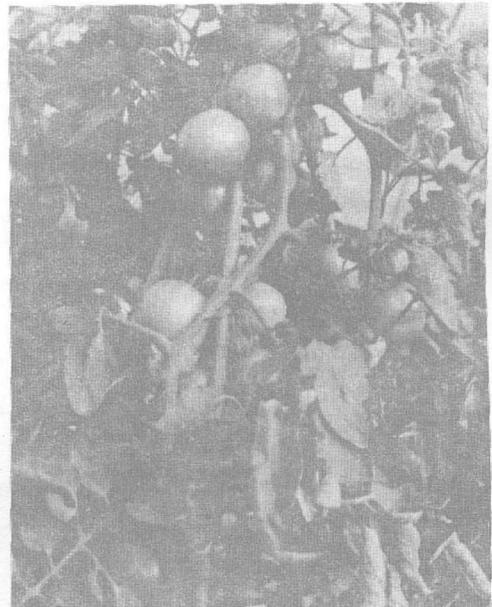


图 3 转基因植株

Fig. 3. The transgenic plants.

株,FA8 18 株。

2.2 分子杂交检测

2.2.1 Southern 印迹法杂交分析 BamHI 酶切基因组 DNA 进一步证实,外源基因 ACC 合成酶已整合到基因组中,它的杂交带分别是 6.6 kb 和 2.0 kb(Jo),反义基因是 3.6 kb(J1-3),同时也证明存在反义基因的不同插入片段,例如 J₁ 有大多数反义基因的拷贝。

2.2.2 Northern 印迹法分析 使用特定的探针探测叶片 RNA,Northern 印迹杂交测定反义转录物,反义 RNA 在 PCX18 转基因中得到表达,未被转化的植株不能表达。

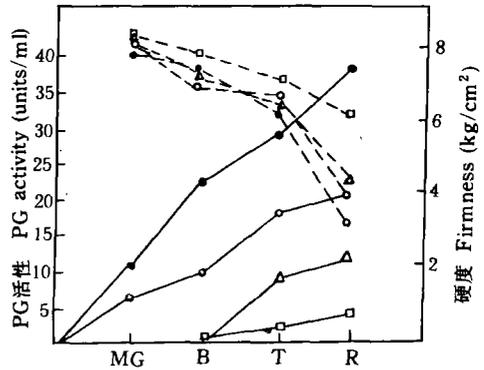
2.3 果实的乙烯释放量变化

正常番茄(苏抗 5 号)在果实贮藏后第八天出现高峰,峰值 15.2 $\mu\text{l}/\text{kg hr}$,成熟突变体(*nor*)“长龄”番茄在成熟过程中乙烯释放量一直很低,不出现明显的高峰。而转基因番茄乙烯释放量比正常成熟番茄少得多,FA7 的最高量仅为对照的 33.7%,FA8 为对照的 13.3%,仅比长龄略高,它们的乙烯合成受到严重的抑制(图 4)。

2.4 PG 活性的变化

两种类型转基因番茄(FA7、FA8)中,FA7 的 PG 活性显著低于正常番茄(苏抗 5

号),成熟期 FA7 的 PG 活性是苏抗 5 号的 30%左右,FA8 在果实绿熟期和破色期均不能测出,转色期和成熟期,其含量达到 FA7 的一半,显示反义 ACC 合成酶基因对内源 PG 活性起到间接的抑制作用(图 5)。



MG=绿熟期;B=破色期;T=转色期;R=成熟期。
—PG;.....硬度;●苏抗 5 号;○FA7;△FA8;□长龄
MG=mature green;B=breaker stage;T=turn colour,R=ripe stage.
—PG;..... Firmness;● normal (Sukang No. 5);
○transgenic fruit FA7;△transgenic fruit FA8;□ripening mutant Changling nor.

图 5 在果实成熟阶段转基因番茄、正常成熟番茄及 *nor* 番茄 PG 活性及硬度变化
Fig. 5. Polygalacturonase (PG) activity and firmness of transgenic, normal and *nor* fruits during ripening.

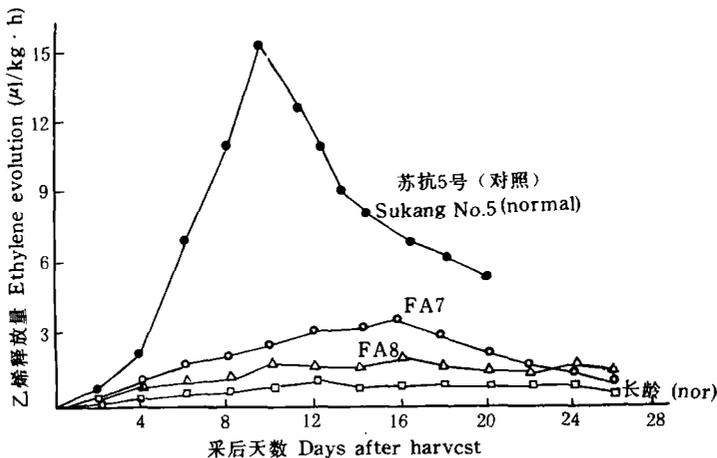


图 4 反义 ACC 转基因番茄、正常成熟番茄及突变体番茄果实乙烯释放量
Fig. 4. Ethylene evolution rate of fruit from normal and transgenic lines.

2.5 果实硬度

果实硬度检测结果表明,转基因番茄果实硬度略高于对照品种,至成熟期其硬度比对照高 30%左右,但最终果实均能软化,与普通番茄相近。

2.6 果实贮藏指数和贮藏天数

绿熟期采果时,转基因番茄比对照苏抗 5 号贮期长 32 天,转色期采果比对照品种长 24 天,成熟期采果后贮藏,贮期与对照相近,仅比对照多 2 天。但转基因番茄果实的贮期均不如“长龄”(nor)长。贮藏指数以“长龄”最

高,其次是转基因番茄,对照品种最低(表 1)。

2.7 品质与其他性状

转基因番茄品质与正常成熟番茄相似,从可溶性固形物来看,均为 4.9%~5.1%,果色也相同,只是转基因番茄果实在绿熟期采下时转色缓慢,而最终仍能转红,如果用乙烯利处理绿熟期转基因番茄果实,果实转色加快。转基因番茄果实的口感,品味,酸、甜度等与正常的粉果番茄品种相似,无明显差异。

表 1 转基因番茄、正常成熟番茄和 *nor* 突变体番茄果实贮藏指数及贮期

Table 1. Accumulation storage index and storage life of transgenic, normal and mutant(*nor*)tomato fruits.

基因型 Genotype	绿熟期采果 Harvested at mature green		破色期采果 Harvested at breaker		成熟期采果 Harvested at ripe stage	
	贮藏指数 ASI	贮期(天) Storage life(d)	贮藏指数 ASI	贮期(天) Storage life(d)	贮藏指数 ASI	贮期(天) Storage life(d)
	长龄 Changling(<i>nor</i>)	136.3	95	98.8	70	67.4
反义 ACC 基因 Antisense gene(FA7)	78.8	42	63.1	29	28.7	6
(苏抗 5 号) Sukang No. 5	38.9	10	29.4	6	19.2	4

3 结论与讨论

3.1 以上结果表明,反义 ACC 合成酶转基因番茄果实的乙烯合成严重受阻,该反义基因对番茄果实成熟起到抑制作用。这种果实在绿熟期采下时,成熟缓慢,不出现果实跃变,番茄红素合成也受到影响,最终果色呈橙红色;若用乙烯利处理可以转成红色,果实可贮藏 1 个多月。

3.2 ACC 合成酶是由 1 个被变化的多基因家族所编码,在番茄中至少有 6 个 ACC 合成酶基因^[3,5],其中两个(LEACC₂ 和 LEACC₄)直接调控果实成熟,但是利用 ACC 合成酶的反义 RNA 抑制乙烯生物合成并不能达到 100%效果,仍存在乙烯合成的“遗漏”现象^[3],这种遗漏现象直接影响到反义基因高

效表达。决定成熟的每个基因具体功能及相互间的联系有待进一步研究。忽视基因间的协同与制约,将会给反义 RNA 技术的应用带来麻烦。

3.3 本试验结果还表明,反义 ACC 合成酶基因的转基因番茄果实,其 PG 活性有所下降,这可能是由于果实 ACC 合成酶对果实 PG 基因表达存在直接或间接的影响。Theologis 等提出了信号传递途径的理论^[13],即伴随果实成熟的各种生理变化与果实成熟存在因果关系和相互促进,相辅相成的关系。认为果实成熟中至少有两条信号传递途径,一是不依赖乙烯途径,二是依赖乙烯途径。从本试验结果还可以看出,PG 不是唯一决定果实软化的因子,还有其它一些因子可起主导作用。

3.4 成熟突变体(*nor*、*rin alc* 等)材料果实成熟与转基因番茄果实成熟,在成熟机理上尚有较大差异,耐贮性也不同,其成熟机制有待更进一步研究。

3.5 我们正在对 R 后代全面分析,进行纯合子筛选及遗传效应观察鉴定工作,从目前的结果看,其 R₂ 代分离严重,出现了 4 种不同成熟类型的材料,即正常成熟类型,不成熟类型和两种迟熟类型,今后打算继续筛选并结合杂交育种和优势育种,希望培育出耐贮性强,品质好,其他园艺性状也优良的转基因番茄新品系(种)。

4 参考文献

- 1 王坤范等. 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 刘愚等. 植物体内乙烯生物学作用及其调节控制. 植物学报. 1978, 4(2): 203~220
- 3 宋艳茹等. 乙烯生物合成与果实成熟的调节. 植物学报. 1994, 35: 1~13
- 4 陆春贵等. 含耐贮基因番茄的贮藏生理特性及在育种上应用. 江苏农业学报. 1994, 10(3): 5~10
- 5 陈章良编著. 植物基因工程研究. 北京: 北京大学出版社. 1993.
- 6 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
- 7 徐鹤林等. 耐贮抗病丰产“长龄”番茄选育及栽培技术. 中国蔬菜. 1992, 3: 21~23
- 8 Doyle JJ *et al.* Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus, 1990, 12: 13-15
- 9 Hamilton AJ, Lycett GW and Grieron D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. Nature. 1990, 346: 284-287
- 10 Maniatis T *et al.* Molecular cloning. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1982
- 11 Oeller PW *et al.* Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science. 1991, 254: 437-439
- 12 Olson DC *et al.* Differential expression of two genes 1-aminocyclo-propane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. Proc Natl. Acad. Sci. USA. 1991
- 13 Theologis A *et al.* Modification of fruit ripening by suppressing gene expression. Plant Physiol. 1992, 100: 549-551