

## 反义 ACS 转基因乙烯缺陷型番茄的生理特性

罗云波 郝四平 生吉萍

(中国农业大学食品学院)

**摘要** 反义 ACC 合成酶 (ACS) 基因番茄的采后生理性状与普通番茄不同, 该番茄的果实和叶片乙烯以及果实呼吸强度受到抑制, 果实乙烯释放量为 0, 没有出现呼吸高峰, 呼吸强度在  $10\sim 14\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$  之间波动, 极显著低于对照 (高峰时为  $24.55\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ )。反义番茄的叶绿素降解和番茄红素的合成亦受阻, 果实采后和贮藏期间逐渐变为黄色或桔黄色而番茄红素的合成很少, 到采后 30 d 仅有  $0.04\text{ A}\cdot\text{g}^{-1}(\text{fw})$ 。乙烯催熟采后 30 d 的反义番茄, 番茄红素增加 60 倍。反义番茄 PG 酶活性在采后缓慢上升, 到采收后的第 45 天达到最高为  $45.16\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ , 但其活性也仅为普通番茄的一半。乙烯利催熟前后, 反义番茄的 PG 酶活性没有显著性变化。

**关键词** 转基因番茄; ACC 合成酶; PG; 成熟

**分类号** Q 945.65; Q 945.48; S641.2

## Characters of Postharvest Physiology of Antisense ACS Transgenic Tomato Fruits

Luo Yunbo Hao Siping Sheng Jiping

(College of Food Sciences, CAU)

**Abstract** This paper showed the studies on the post-harvest physiology of transgenic tomato. Ethylene either from transgenic tomato fruit or tomato leaf disk was significantly lower than control. Chlorophyll degradation and lycopene biosynthesis was inhibited in transgenic tomatoes. After 63 days in normal room condition, transgenic tomato eventually developed an orange color but never turned red. During ripening of the control tomato, the level of sugar and titrated acid and the ratio of sugar to titrated acid of transgenic tomato was similar to the control, but level of ascorbic acid was lower than the control. Meanwhile, the firmness of transgenic tomato declined more slowly. After one month of storage, level of sugar and titrated acid and the ratio of sugar to titrated acid of transgenic tomato declined greatly. In addition, PG activity of transgenic tomato showed to be reduced significantly at early stage of ripening, and the maximum level PG activity of transgenic tomato appeared 45 days after breaker, but it was just half as much as that of control. Furthermore, transgenic tomato fruit treated by ethylene failed to show any increase of PG activity.

**Key words** tomato transgene; ACC synthase; PG; ripening

收稿日期: 1999-09-07

国家自然科学基金 (39570500) 和国家杰出青年科学基金资助项目 (39825118)

生吉萍, 北京圆明园西路 2 号中国农业大学 (西校区), 100094

以番茄为模式材料研究果蔬采后生理一直受到人们的重视。这是因,番茄具有染色体结构简单,遗传性状稳定和采后的各个成熟衰老阶段明显等优点;另外,番茄具有较高的经济价值,在各国都有栽培。但番茄成熟后又极易腐烂。因此,研究番茄的采后生理对认识果蔬成熟衰老机制和解决番茄的采后损失具有较大的理论和现实意义。

近年来,以番茄为材料研究乙烯生物合成的调控及其机理,已取得了突破性的进展,其中最引人注目的是,美国、英国和中国等<sup>[1-4]</sup>利用反义基因技术获得了乙烯合成受到抑制的新品种,使番茄果实的成熟衰老得到控制,在美国和英国这类番茄已得到商业化应用。但是,至今仍然很少发现这类番茄采后的生理变化的报道<sup>[5]</sup>。乙烯作为最重要的促进果实成熟衰老的激素,深刻影响着果实采后生理的各个方面。研究乙烯合成受阻后番茄果实的采后生理表现,将有助于认识乙烯对果实成熟衰老的作用机理,同时对正确认识、公正评价、安全利用转基因番茄,使该转基因番茄果实在我国商业化提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

转反义ACC合成酶(ACS)基因番茄材料纯和体,由中国农业大学果蔬采后生物技术实验室提供。栽培番茄品种为丽春,购自中国农科院蔬菜花卉研究所。

### 1.2 方法

1.2.1 果实呼吸强度的测定 种植的番茄花期挂牌,在果实绿熟时挑选花期相同,成熟期一致,位置相同的果实采收,贮藏在16℃室温,用远红外二氧化碳分析仪测定果实呼吸强度<sup>[6]</sup>。设重复3次。

1.2.2 果实乙烯释放量的测定<sup>[7]</sup> 采果取样同上,果实密闭1h后取气样,用气相色谱测定乙烯浓度,重复3次。气谱条件为:载气为氮气,压力 $1.2\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;空气 $0.6\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ;氢气 $0.7\text{ kg}\cdot\text{cm}^{-2}$ ,柱温 $80^\circ\text{C}$ ,检测温度 $120^\circ\text{C}$ ,氢火焰离子化检测器检测。

1.2.3 叶片伤乙烯的测定 取功能期叶片,用打孔器取40片叶盘,密闭4h后抽取气样,用气相色谱测定乙烯浓度,测定条件同1.2.2。

1.2.4 番茄果实色素的测定<sup>[8]</sup> 各个成熟期的番茄果实分别取3个,将果壁切成豌豆粒大小的小块,液氮速冻并保存于 $-30^\circ\text{C}$ 下,检测时取5g研磨,取1g匀浆,用环己烷丙酮混合液提取24h,离心取上清液,分别在502nm和652nm检测番茄红素和叶绿素的吸光值A,用每克样品在特征吸收波长产生的吸光值表示色素的含量( $\text{A}\cdot\text{g}^{-1}$ )。

1.2.5 PG酶活性的测定<sup>[9]</sup> 取5g果壁组织研磨,离心 $8000\text{ g}$ ,10min,弃上清,加pH3.0的缓冲液振荡,离心,重复3次。沉淀加pH6.5的NaCl溶液( $1.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )4℃下提取30min,离心( $1\times 10^4\text{ g}$ ),10min,上清液即为PG粗提液。PG酶活性的分析:1mL $0.2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl 0.5%多聚半乳糖醛酸(pH4.5)加入1份PG酶液,对照煮沸5min使酶失活,37℃水浴30min,生成的还原性单糖用3,5-二硝基水杨酸法测定<sup>[10]</sup>。

## 2 结果与分析

### 2.1 番茄果实呼吸强度和乙烯释放强度的变化

从图 1 可看出, 对照番茄的呼吸强度显著高于反义番茄, 并且在破色期出现呼吸高峰, 此时的呼吸强度可高达  $24.55 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 。反义番茄果实的呼吸强度在  $10 \sim 14 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  之间波动, 未能表现出呼吸高峰。普通番茄的乙烯释放强度在采后一直显示上升的趋势, 破色后第 8 天达最高, 为  $13.15 \mu\text{L} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ; 反义番茄乙烯合成严重受阻, 没有检测到乙烯的产生。

果实采后乙烯和呼吸高峰的出现, 是果实成熟衰老的重要特征。反义番茄果实没有检测到乙烯的释放, 并且呼吸强度显著下降, 说明果实的成熟衰老进程得到延缓, 这是反义番茄果实耐贮藏的基础。

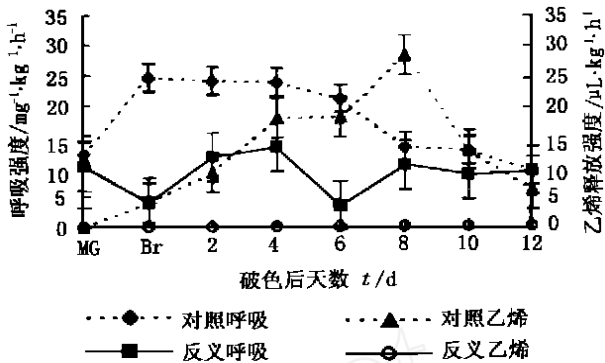


图 1 果实呼吸强度和乙烯释放强度

### 2.2 番茄果实色素变化

从图 2 可以看出, 对照果实的叶绿素含量在破色后迅速下降, 到破色后 4 d 只能检测到微量叶绿素存在, 而反义果实的叶绿素含量从绿熟期到破色期下降, 但在破色期之后叶绿素的降解十分缓慢, 基本维持在  $0.54 \text{ A} \cdot \text{g}^{-1}$  水平以上。从图 3 看出, 对照番茄破色期以后番茄红素含量急剧上升, 到破色后第 12 天, 其番茄红素含量约是破色期的 100 倍, 而反义番茄保持绿色, 其番茄红素在绿熟期到破色后第 12 天期间含量几乎检测不到, 但从破色后第 30~75 天, 番茄红素含量缓慢上升, 到破色第 75 天番茄红素含量可达到  $0.17 \text{ A} \cdot \text{g}^{-1}$ 。用乙烯利催熟的采后第 30 天的反义 ACS 番茄果实, 番茄红素含量比未催熟前增加约 60 倍, 但仅为对照番茄完熟时(破色后第 12 天)的 50% 左右(图 4)。可见, 反义番茄的叶绿素降解和番茄红素的合成都受到抑制。

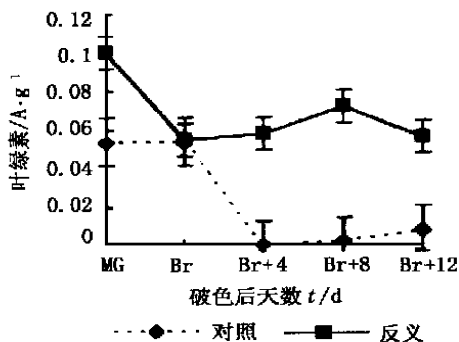


图 2 反义番茄叶绿素含量变化

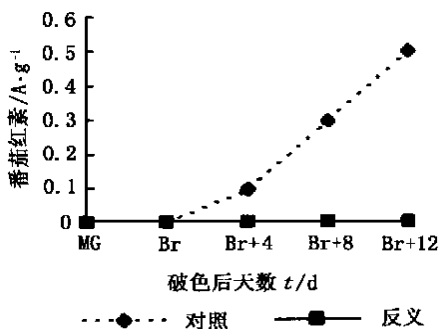


图 3 反义番茄叶绿素含量变化

反义番茄果实催熟后果实的颜色仍不及对照果实的原因, 可能有以下 2 点: 果实番茄红素的形成与催熟乙烯的浓度有关, 适宜的乙烯浓度可使反义番茄得到较好的成熟形状。催熟

的时机对番茄的转红也有影响,越是年轻的果实番茄红素合成能力恢复得越强。

### 2.3 反义番茄的PG酶活性变化

由图4得知,在绿熟期,对照番茄和反义番茄的PG酶活性均未检测到。到破色期对照PG酶活开始上升,高于反义番茄。此后,对照PG酶活急剧增加,到破色12 d后已高达 $106.85 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$  (fw);而反义番茄的PG酶活上升缓慢,破色后12 d的酶活仅为对照的15%;破色后45 d,反义番茄PG酶活为 $45.16 \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ,达到其最高值。破色后30 d和45 d的反义番茄用乙烯利催熟后,PG酶活并无明显提高(图5)。

多聚半乳糖醛酸酶PG是重要的果胶酶,它能促进细胞壁中果胶酸的分解,使果实的硬度下降。因此,PG被认为是促进果实软化的重要酶,但不是惟一的酶。乙烯被公认为促进果实衰老的重要激素,乙烯能够导致与成熟衰老有关的一系列酶合成或者活化,但是本试验没有发现,在反义番茄中乙烯并没有诱导PG活性的增加。由此可见,PG与乙烯的关系以及果实的软化机制还有待于进一步研究。

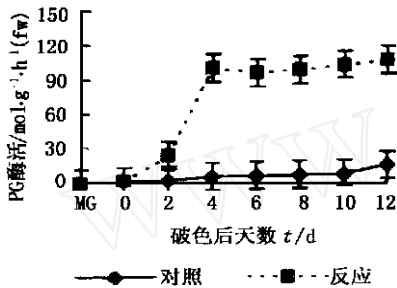


图4 反义番茄PG酶活变化

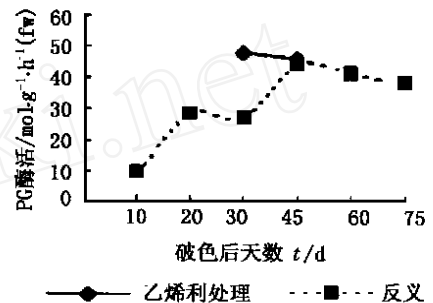


图5 反义番茄用乙烯利催熟前后PG酶活含量变化

### 2.4 叶片乙烯

由表1可知,反义番茄叶片处理1的乙烯释放量和对照之间没有明显差异,处理2与对照相比下降了约50%,差异极显著。可以推测,在衰老和失水条件下,反义番茄叶片释放的乙烯比对照的量少,因此,反义番茄的叶片的衰老有可能得到了延缓。

## 3 讨论

反义ACC合成酶基因番茄乙烯合成受阻以后呼吸强度降低,由此使糖的分解和水分散失的减缓,果实的自然损耗率也下降。

番茄中ACC合成酶基因以基因家族的形式存在,它们的DNA序列以及所编码的氨基酸序列都有一定的同源性。在本次实验中发现,针对果实成熟衰老采用的反义RNA(反义ACSmRNA)技术对叶片衰老亦起作用。采后1 h的反义番茄的叶片,乙烯生成和对照无明显

表1 反义番茄植株叶片采后不同时间的乙烯释放强度  $\text{nL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$

处理	材料	乙烯释放强度
采后1 h 密封测定	反义	0.12 a
	对照	0.15 a
采后48 h 密封测定	反义	1.6 b
	对照	3.23 c

抑制, 但采后 48 h 的叶片乙烯释放量差异极显著。说明反义 ACS 基因对叶片伤乙烯抑制效率低, 而叶片衰老乙烯的抑制效率较高。那么, 与叶片衰老相关的 ACC 合成酶基因是否与果实成熟相关的 ACC 合成酶基因有较高的同源性, 或者根本就是同一种 ACC 合成酶, 还有待进一步研究。

研究者<sup>[1, 11]</sup>发现在反义 ACS 番茄果实中, 即使转录大量的 PG mRNA, PG 多肽也不积累。在本次实验中观测到, 虽然乙烯合成受到严重抑制, 但 PG 酶活仍缓慢上升。Theologis<sup>[7]</sup>提出的假设较好地解释以上现象。这种假设认为: 乙烯对于成熟, 与其说是一个开关, 倒不如说是一个变阻器。在番茄果实成熟过程中至少有 2 条信号途径在运行, 一是不依赖于乙烯的途径, 负责一些酶如 PG、ACC 氧化酶和叶绿素酶的转录激活; 二是依赖乙烯的途径, 负责另外一些基因的转录和(或者)转录后调节, 如番茄红素和芳香物质的生物合成、呼吸代谢 ACC 合成酶基因促成的表达以及 PG mRNA 的翻译。可以设想乙烯对 PG mRNA 翻译的调节也可能不是惟一的决定因素, 而是和其他因素协同起作用, 所以即使在极低水平的乙烯条件下, PG 酶活仍可缓慢增加(图 5)。同样, 反义番茄的番茄红素在采后积累缓慢也是如此。

虽然在利用反义基因技术控制果蔬生理性状的研究中做了大量的工作<sup>[1, 2, 11, 12]</sup>, 但对反义基因果实的生理研究报道不多<sup>[5]</sup>。该类果实是果蔬采后生理以至植物生理研究的极好材料, 对该类材料本身以及对它的利用还有大量的工作需要进一步研究。

## 参 考 文 献

- 1 Oeller P W, Wong L M, Taylor L P, Pike D A, Theologis A. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 1991, 254: 437~ 439
- 2 Theologis A, Zarembinski J I, Oeller P W, et al. Modification of fruit ripening by suppressing gene expression. *Plant Physiol*, 1992, 100: 549
- 3 罗云波, 生吉萍, 申琳. 番茄中反义 ACC 合成酶基因的导入和乙烯生物合成的控制. *农业生物技术学报*, 1995, 3(2): 38~ 44
- 4 Hamilton A J, Kycettm G W, Grierson D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature*, 1990, 346: 284
- 5 生吉萍, 罗云波. 转 ACS 番茄采后脂质过氧化相关酶研究初报. *中国农业大学学报*, 1999, 4(1): 64
- 6 宋钧, 于梁. 利用红外线 CO<sub>2</sub> 分析仪测定果蔬中呼吸强度的技术. *植物生理学通讯*, 1987, 6: 60~ 62
- 7 何钟佩. *农作物化学控制实验指导*. 北京: 北京农业大学出版社, 1993
- 8 华东师大植物生理系主编. *植物生理学实验指导*. 北京: 高等教育出版社, 1986
- 9 Russel P. Extraction and assay of tomato polygalacturonase. *Hortscience*, 1986, 21(3): 490~ 492
- 10 贾淑颖, 穆国平, 任树林. 果蔬中还原糖、蔗糖和淀粉的快速测定——3, 5-二硝基水杨酸分光光度法. *食品与发酵工业*, 1983, (2): 30~ 48
- 11 Russel P. Extraction and assay of tomato polygalacturonase. *Hortscience*, 1986, 21(3): 490~ 492
- 12 Steve P, Sarah L B, Mondher B, Andrew J H, Grierson D. A ltered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene forming enzyme transgene. *The Plant Journal*, 1993, 3(3): 469~ 481
- 13 Sheey R E, Grammer M, Haitt W R. Reduction of PG activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 8805~ 8809