

转反义 *LeEIL2* 基因番茄果实采后部分生理特性

何琳 朱本忠 罗云波

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院, 北京 100083)

摘要 普通番茄和转反义 *LeEIL2* 基因番茄不同成熟度果实研究表明, 转反义 *LeEIL2* 基因番茄有效抑制了 *LeEIL2* 基因的表达, 其果实和叶片表现出与普通番茄不同的生理特性: 采后果实的呼吸强度和乙烯释放量受到抑制, 离体叶片的伤乙烯释放量明显降低; 果实中 ACC 合成酶与 ACC 氧化酶活性以及 ACC 含量明显下降, 从而抑制了乙烯的生物合成途径, 延缓了果实的成熟衰老进程。

关键词 转基因; 番茄; 乙烯; 生理特性

中图分类号 S 601; S 641.2

文章编号 1007-4333(2006)01-0057-04

文献标识码 A

Some characters of post harvest physiology of antisense *LeEIL2* transgenic tomato fruit

He Lin, Zhu Benzong, Luo Yunbo

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083, China)

Abstract Fruits and leaf of anti-sense *LeEIL2* tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Zhong Shu 4th) shown differences in ethylene biosynthesis and fruit ripening. Compared with CK, respiration rate and ethylene production rate in anti-sense *LeEIL2* tomato fruit were inhibited; leaf wound ethylene from anti-sense tomato decreased to 41%. Further research confirmed that ACS and ACO activities in anti-sense *LeEIL2* tomato fruit decreased dramatically, which resulted in ACC content decrease, ethylene biosynthesis inhibition and eventual fruit ripening delay.

Key words transgenic; tomato; ethylene; ACC

乙烯的生物合成途径早在 20 世纪 70 年代末就阐明并得到广泛研究^[1], 90 年代建立了拟南芥乙烯信号转导途径模型: C_2H_2 ETR CTR EIN2 EIN3 ERF 乙烯反应^[2-4]。 *LeEIL2* 是 *EIN3* 的同源基因。转反义 *LeEIL2* 基因番茄果实成熟过程 *LeEIL2* 基因表达受到抑制, 从而延缓了其成熟衰老进程^[5], 但 *LeEIL2* 基因在转反义 *LeEIL2* 基因番茄中的生理功能尚未被认识。笔者克隆得到 *LeEIL2* 基因特异序列, 构建了反义 *LeEIL2* 植物表达载体, 利用农杆菌介导法进行遗传转化获得了转反义 *LeEIL2* 基因番茄植株^[6]。研究 *LeEIL2* 基因表达受到抑制后番茄果实的生理性状变化, 将有助于认识 *LeEIL2* 基因在番茄果实成熟衰老过程及乙烯信号转导途径中的作用和生理功能, 以便进一步

阐明果蔬成熟衰老机制和乙烯作用机制。

1 材料与方法

1.1 植物材料

中蔬 4 号番茄种子 (*Lycopersicon esculentum* cv. zhongshu 4) 购自中国农业科学院蔬菜花卉研究所; 转反义 *LeEIL2* 基因番茄由中国农业大学食品科学与营养工程学院采后生物技术实验室培育。

普通番茄、转反义 *LeEIL2* 基因番茄在正常栽培条件下种植于中国农业大学温室。花期挂牌, 于盛花后不同天数采摘不同成熟度的番茄果实进行分析研究。

1.2 番茄果实成熟度划分

未熟期: 花后 25 ~ 35 d, 果实呈白色, 果形过小;

收稿日期: 2005-03-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270934, 30371004, 30430490)

作者简介: 何琳, 硕士研究生; 罗云波, 教授, 博士生导师, 通讯作者, 主要从事食品生物技术研究, E-mail: lyb@cau.edu.cn

绿熟期:花后 34 ~ 40 d,全果浅绿或深绿,已成熟;

破色期:花后 40 ~ 45 d,外观开始微显黄色,显色 < 10 %;

转色期:花后 40 ~ 45 d,果顶呈粉色,显色 60 % ~ 90 %;

粉红色期:花后 45 ~ 50 d,果实近红色,显色近 100 %;

全红期:花后 50 ~ 55 d,整个果实呈现红色,果实略发软。

1.3 番茄果实及叶片采后部分生理指标的测定

1)呼吸速率测定。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,室温(16)贮藏,用远红外二氧化碳分析仪测定果实呼吸强度^[7]。实验重复 3 次。

2)乙烯释放量测定^[8]。取不同成熟期番茄果实,分别密封于容器中,1 h 后从各容器中取 1 mL 气样用导津 GC-14C 型气相色谱仪测定乙烯释放量。(导津 GC-14C 型气相色谱仪:HP-5 毛细管柱,柱长 30 m,氢火焰离子探测器检测,载气 N₂,压力 0.6 kg/cm²,燃气 H₂,流量 30 mL/min;检测器温度 160 ,柱温 80 ,进样口温度 120)。实验重复 3 次。

3)番茄植株离体叶片伤乙烯测定。取功能期叶片,用打孔器(直径 5 mm)取 90 片叶盘,于玻璃瓶中密闭 4 和 24 h 后抽取气样,用气相色谱测定乙烯浓度,测定条件同 2)。

4)离体 ACC 氧化酶活性测定^[9]。称取果肉组织,用液氮研磨后,取 0.5 g 样品粉末置于 1.5 mL 的 eppendorf 管中,加入 1.0 mL 样品提取液(含 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5) 100 mmol/L、10 % (体积分数)甘油、抗坏血酸钠 30 mmol/L、5 % PVP、FeSO₄ 0.1 mmol/L、DTT 5.0 mmol/L),摇匀,4 、12 000 r/min 离心 2 次(0.5 和 10 min);立即将 0.2 mL 上清液注入盛有 1.8 mL 酶反应液(含 Tris-HCl 缓冲液(pH7.5) 100 mmol/L、10 % 甘油、抗坏血酸钠 30 mmol/L、NaHCO₃ 30 mmol/L、ACC 1.9 mmol/L、FeSO₄ 0.1 mmol/L)的玻璃瓶中,密闭,37 温浴 30 min,然后抽气测定乙烯释放量。实验重复 3 次。

5)番茄果实 ACC 合成酶活性测定^[10]。所有实验操作过程均在 4 下进行,果肉组织用 5 mL 提取缓冲液匀浆(提取缓冲液含 400 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH8.5)、1 mmol/L EDTA、0.5 % (体积分数)

- 巯基乙醇、10 μmol/L 磷酸吡哆醛),匀浆缓冲液通过 4 层纱布过滤,然后 3 000 r/min 离心 30 min,沉淀,用溶解缓冲液悬浮(溶解缓冲液(pH8.5)含 20 mmol/L 磷酸钾、1 mmol/L EDTA、1 mmol/L - 巯基乙醇、10 μmol/L 磷酸吡哆醛、0.1 % (体积分数) TritonX-100),悬浮液于 4 震荡 30 min,4 000 r/min 离心 10 min,上清液用于 ACC 合成酶活性的测定。在青霉素小瓶中加入 0.8 mL 反应液(含 50 μmol/L SAM、10 μmol/L 磷酸吡哆醛、50 mmol/L hepes-KOH,pH8.5)及 0.1 mL 上清液,32 反应 1 h,加入 0.1 mL 50 mmol/L HgCl₂ 中止反应,以后步骤同 6)。实验重复 3 次。

6)番茄果实 ACC 含量测定^[11]。果肉组织中加入 5 mL 80 % 乙醇匀浆后 4 000 r/min 离心 15 min,40 旋转蒸干,5.0 mL 蒸馏水定容。在青霉素小瓶中加入 0.8 mL ACC 提取液及 0.1 mL 50 mmol/L HgCl₂,盖塞,冰浴中冷却,注入预冷的 NaClO 和 NaOH 混合液(体积比 2:1),剧烈振荡混匀,冰浴中放置 2 min,从冰浴中取出小瓶,剧烈振荡数秒,取 1 mL 气体测定乙烯含量。实验重复 3 次。

用 Excell 和 SAS 软件进行数据处理、制图和统计分析,图中数据点上的误差线为标准差,采用 ANOVA 进行邓肯式多重差异分析, $P=0.01$ 和 $P=0.05$ 表示差异显著程度。

2 结果与分析

2.1 番茄果实呼吸速率及乙烯释放量的变化

破色期转反义 *LeEIL2* 基因番茄呼吸速率明显低于普通番茄,且未出现呼吸高峰,呼吸速率在 2 ~ 6 mg/(kg·h)之间波动;普通番茄出现了呼吸高峰,此时呼吸速率高达 21.35 mg/(kg·h)(图 1)。转反义 *LeEIL2* 基因番茄和普通番茄采后乙烯释放量均

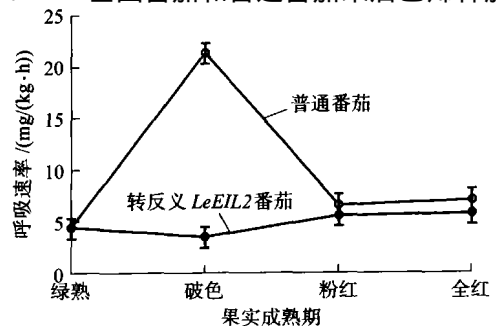


图 1 不同成熟期番茄果实呼吸速率的变化

Fig. 1 Changes of respiratory in tomato fruit at different stages

呈上升趋势,都在粉红期达到最高值,分别为 10.06 和 15.38 $\mu\text{L}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 。转反义 *LeEIL2* 基因番茄乙烯释放量自绿熟期后始终低于普通番茄(图 2),二者存在显著差异 ($P < 0.05$)。

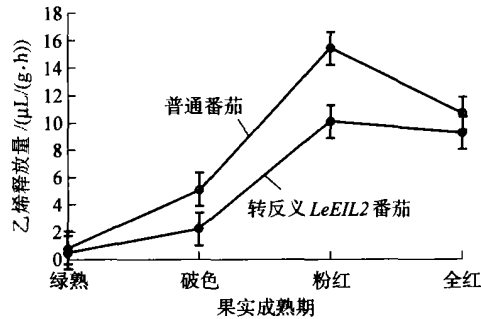


图 2 不同成熟期番茄果实乙烯释放量的变化

Fig. 2 Changes of ethylene production in fruit at different stages

2.2 番茄叶片乙烯释放量的变化

随着密闭时间的延长,在衰老和失水条件下,转反义 *LeEIL2* 基因番茄叶片乙烯释放量低于普通番茄叶片(表 1),二者之间差异显著 ($P < 0.05$),由此可以看出,转反义 *LeEIL2* 基因番茄有效抑制了叶片伤乙烯的释放,从而延缓了叶片的衰老。

表 1 叶片采后不同时间乙烯释放强度的表化

Table 1 Changes of ethylene production in leaves at different times

采后密闭时间/h	实验材料	乙烯释放量/ ($\mu\text{L}/(\text{g}\cdot\text{h})$)
4	转反义 <i>LeEIL2</i> 基因番茄叶片	118.68
	普通番茄叶片	100.74
24	转反义 <i>LeEIL2</i> 基因番茄叶片	1 209.76
	普通番茄叶片	2 923.51

2.3 ACC 氧化酶和 ACC 合成酶活性及 ACC 含量的变化

ACC 合成酶和 ACC 氧化酶是乙烯生物合成过程中的关键酶,分别催化 S-腺苷蛋氨酸(SAM)向 ACC 的转化和 ACC 向乙烯的转化。除能够形成乙烯外,ACC 的另一条转化途径是形成丙二酰基 ACC(MACC)。分子生物学的研究表明,在番茄中,ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因是由多基因家族编码的,分别受不同的外界环境因子和果实生理发育因子调控表达,催化乙烯的生成。ACC 是乙烯生物合成过程重要的代谢产物,由 SAM 转化而成,并能够被转化为乙烯^[12]。

转反义 *LeEIL2* 基因番茄果实未熟期到转色期 ACC 氧化酶活性变化不大,在 2~3 $\text{nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 之间波动;转色期后,普通番茄 ACC 氧化酶活性显著上升,粉红期时高达 10.03 $\text{nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$,而转反义 *LeEIL2* 番茄 ACC 氧化酶活性始终趋于平缓(图 3(a)),二者存在显著性差异 ($P < 0.05$)。转反义 *LeEIL2* 基因番茄 ACC 合成酶活性始终在 1~4 $\text{nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ 之间小幅波动(图 3(b)),并且不同成熟时期 ACC 含量始终低于普通番茄(图 3(c)),与其存在显著差异 ($P < 0.05$)。普通番茄采后从未熟到破色期,ACC 合成酶活性保持平稳,破色期后呈上升状态,尤其是转色期后上升幅度加大,全红时高达 18.50 $\text{nmol}/(\text{g}\cdot\text{h})$ (图 3(b)),与转反义 *LeEIL2* 基因番茄存在极显著差异 ($P < 0.05$)。可见,通过转反义 *LeEIL2* 基因番茄果实中 *LeEIL2* 基因表达的抑制,番茄果实中 ACC 合成酶、ACC 氧化酶活性和 ACC 含量降低。

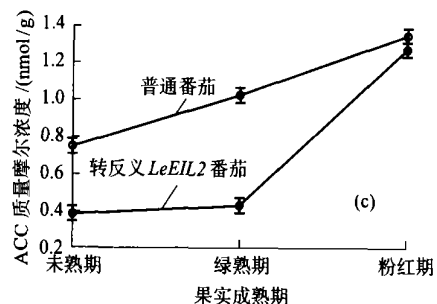
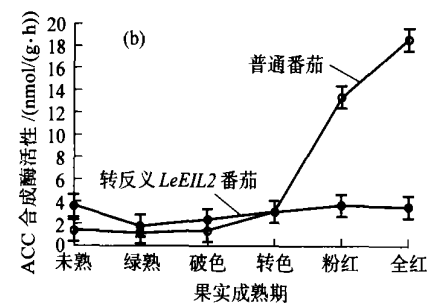
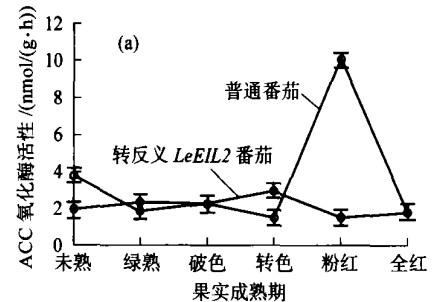


图 3 不同成熟期番茄果实 ACC 氧化酶活性、ACC 合成酶活性及果实(FW) ACC 含量的变化

Fig. 3 Changes of ACO, ACS activity and ACC content in tomato fruit at different stages

3 讨论

EIN3 是乙烯信号转导途经中的下游因子,用于 CTR 的下游,位于核内,编码转录因子。番茄中得到的 *LeEIL2* 基因是 *EIN3* 的同源基因。Tieman 等的研究表明,*LeEIL2* 基因与果实的成熟衰老密切相关,反义 *LeEIL2* 番茄能够抑制各个时期该基因的表达,果实成熟 30 d 后也不全红。本研究发现,反义 *LeEIL2* 基因番茄与普通番茄有不同生理特性:1)呼吸强度和乙烯释放量低于普通番茄,没有出现呼吸高峰;2)在衰老和失水条件下,植株叶片伤乙烯明显低于普通番茄;3)果实中 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶活性以及 ACC 含量低于普通番茄。可以推断,转反义 *LeEIL2* 基因番茄果实不同成熟期这 2 种酶受到了抑制,从而进一步抑制了果实呼吸强度和乙烯释放量以及叶片伤乙烯的释放,并且降低了果实中 ACC 合成酶、ACC 氧化酶的活性及 ACC 含量,使乙烯的生物合成途径受到影响,延缓了果实成熟衰老的进程。

参 考 文 献

- [1] Adams D O, Yang S F. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene[J]. *Plant Physiol*, 1977, 70:117-123
- [2] Schaller G E, Bledcker A B. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the Arabidopsis *ETR1* gene [J]. *Science*, 1995, 270:1809-1811
- [3] Sakai H, Hua J, Chen Q G, et al. *ETR2* is an *ETR1-like* gene involved in ethylene signaling in Arabidopsis [J]. *PNAS*, 1998, 95(10):5812-5817
- [4] Hua J, Meyerowitz E M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in Arabidopsis Thaliana [J]. *Cell*, 1998, 94(2):261-271
- [5] Tieman D M, Ciardi J A, Taylor M G, et al. Members of the tomato *LeEIL* (*EIN3-like*) gene family are functionally redundant and regulate ethylene responses throughout plant development [J]. *Plant J*, 2001, 26(1):47-58
- [6] 薛印革,朱本忠,薛萍,等. 反义 *LeEIL2* 基因表达载体的构建及在番茄中的转化 [J]. *河南农业科学*, 2003, 10:47-51
- [7] 宋钧,于梁. 利用红外线 CO₂ 分析仪测定果蔬中呼吸强度的技术 [J]. *植物生理学通讯*, 1987, 6:60-62
- [8] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导 [M]. 北京:北京农业大学出版社, 1993
- [9] Barry C S, Blume B, Bouzayen M, et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato [J]. *Plant J*, 1996, 9:525-535
- [10] Fan X T, Matheis J P, Fellman J K. A role for jasmonates in climacteric fruit ripening [J]. *Planta*, 1998, 204:444-449
- [11] Lizada M C C, Yang S F. A simple and sensitive assay for ACC. *Anal Biochem*, 1979, 100:140-145
- [12] 汤福强,刘愚. 植物乙烯生物合成研究进展 [J]. *植物生理学通讯*, 1994, 30(1):3-10