

转反义 *LeETR1* 基因番茄采后生理特性的研究

杨虎清¹ 应铁进^{1*} 向庆宁² 杜荣茂¹(¹浙江大学食品科学与营养系, 杭州 310029; ²浙江大学园艺系, 杭州 310029)

摘 要: 转反义 *LeETR1* 乙烯受体基因番茄的采后生理性状与普通番茄不同。转基因番茄的呼吸作用受到抑制, 呼吸高峰只有对照的 52%, 乙烯释放高峰的出现比对照果实推迟 10 d。转基因番茄的叶绿素降解和番茄红素的合成受到显著抑制, 果实不能形成正常的红色。在成熟过程中, 转基因番茄的纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶活性显著低于对照, 延缓了果肉的软化。推测 *LeETR1* 和番茄的成熟有着密切的关系。

关键词: 番茄; 转基因; 乙烯; 成熟; 色素

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0404-05

乙烯是植物调控自身生长发育、成熟衰老的激素, 在水果蔬菜的成熟衰老过程中起着重要的作用。乙烯的生理作用是通过它的感受和信号转导来实现的, 其作用机理一直是采后生理学研究的热点。20 世纪 70 年代末, 杨祥发等阐明了植物体内乙烯的生物合成途径^[1], 其生物合成机理得到广泛深入的研究^[2,3]。90 年代以来, 乙烯信号转导研究取得了进展^[4,5], 在模式植物拟南芥建立了 $C_2H_2 \rightarrow ETR \rightarrow CTR \rightarrow EIN2 \rightarrow EIN3 \rightarrow ERF \rightarrow$ 生化反应的模型^[6~8]。但在果实成熟衰老研究的模式材料番茄中, 乙烯信号转导的研究还不够深入, 到目前为止只分离出了乙烯受体基因 *LeETR* (1-5) 及负调节因子 *CTR*^[9~12], 其生理功能还远远没有被人们所认识。我们在研究 *LeETR1* 基因序列^[9]的基础上, 克隆 *LeETR1* 基因部分特异序列, 构建反义 *LeETR1* 植物表达载体, 利用农杆菌介导法进行遗传转化并获得了反义转基因植株。研究 *LeETR1* 的表达受到抑制后番茄果实的采后生理表现, 将有助于认识 *LeETR1* 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, 以便阐明果蔬成熟衰老机制和乙烯作用机制。

1 材料与方法

转反义番茄乙烯受体基因 *LeETR1* (GeneBank access No. U41103) 的番茄纯合体株系, 由浙江大学食品科学系采后生物技术实验室提供。所用植株均使用灭菌的商品腐殖质在标准人工气候室中盆栽。

呼吸速率测定: 从花开放之日起挂牌标记, 在果实绿熟时选花期相同、位置相同的果实采收, 在室温 (20℃) 下后熟。采用 GXH-305 型红外线 CO_2 分析仪测定果实呼吸速率, 结果以 $CO_2 \text{ mL} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \text{FM}$ 表示, 重复 3 次。

乙烯释放量测定: 采果取样同上。果实在 20℃ 密闭 1 h 后抽取 1 mL 气样, 用 SP6800 气相色谱仪 (山东鲁南华工仪器厂) 测定乙烯含量, 重复 3 次。气谱条件: 氢焰离子化检测器, GDX502 填充柱, 载气、燃气、助燃气分别为 N_2 、 H_2 和空气, 柱温 100℃, 检测温度 100℃, 进样温度 120℃。

果实硬度测定: 各个成熟期的番茄果实每次测定分别取 3 个, 用 TA-XT2i 型质构仪测定果实赤道线上相对 4 个部位的硬度。探头直径 5 mm, 测试深度 6 mm, 贯入速度 1 mm/s, 读取最大值。取平均值, 单位为牛 (N)。

果实色素测定: 各个成熟期的果实每次测定分别取 3 个, 将果壁切成豌豆大的小块, 立即以液氮

收稿日期: 2002-09-02; 修回日期: 2003-01-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870512)

* 通讯作者, E-mail: tjying@hzncn.com

速冻, 保存于 -70°C 冰箱。检测时取 5 g 研磨, 取 1 g 匀浆。参照 Kirk^[13] 的方法, 以己烷丙酮混合试剂 (60:40) 提取匀浆中的色素, 以空白溶液做对照, 用扫描分光光度计测定消光曲线, 读取 OD_{450} 、 OD_{502} 、 OD_{645} 和 OD_{663} , 计算提取液中的有关色素含量。

纤维素酶 (Cellulase) 活性测定^[14]: 取 5 g 果壁组织研磨, 以 1.3% 羧甲基纤维素 (Sigma) 为底物, 30°C 下保温 60 min, 以煮沸的酶液做对照, 一个酶活力单位为每克果肉每分钟内测试体系粘度下降 1%, 以 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$ 表示。多聚半乳糖醛酸酶 (PG) 活性测定^[15]: 取 5 g 果壁组织研磨。以 1% 柑橘果胶 (Sigma) 为底物, 30°C 下保温 60 min, 以煮沸的酶液做对照, 一个酶活力单位为每克果肉每分钟内测试体系粘度下降 1%, 以 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$ 表示。果胶甲酯酶 (PME) 活性测定^[16]: 取 5 g 果壁组织研磨, 以 0.5% 柑橘果胶 (Sigma) 为底物, 用 $0.01\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{NaOH}$ 滴定, 30 min 内维持 pH 7.0, 一个酶活力单位为每克果肉每分钟底物释放 $\text{H}^{+} 1\text{ }\mu\text{mol}$, 以 $\text{U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$ 表示。

2 结果与分析

2.1 番茄果实呼吸速率和乙烯释放量的变化

从图 1 可看出, 对照番茄在破色 (指果实花萼端出现第 1 丝红色) 后 5 d 出现呼吸高峰, 此时的呼吸速率高达 $8.59\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FM}$; 转基因番茄在破色后 15 d 达到呼吸高峰, 峰值仅相当于对照的

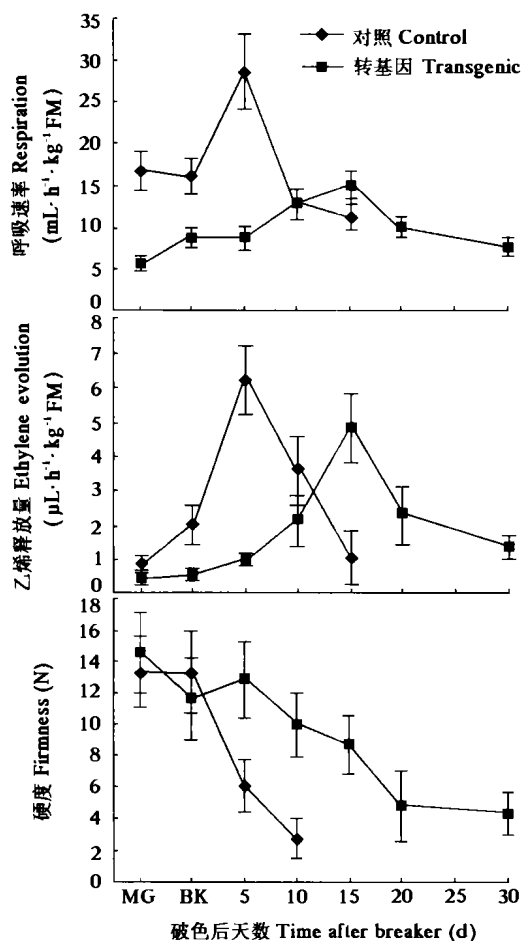


图 1 番茄果实呼吸速率、乙烯释放量和硬度的变化
MG: 绿熟期; BK: 破色期。

Fig. 1 Change of fruit respiratory rate, ethylene production and firmness

MG: Mature green; BK: Breaker stage.

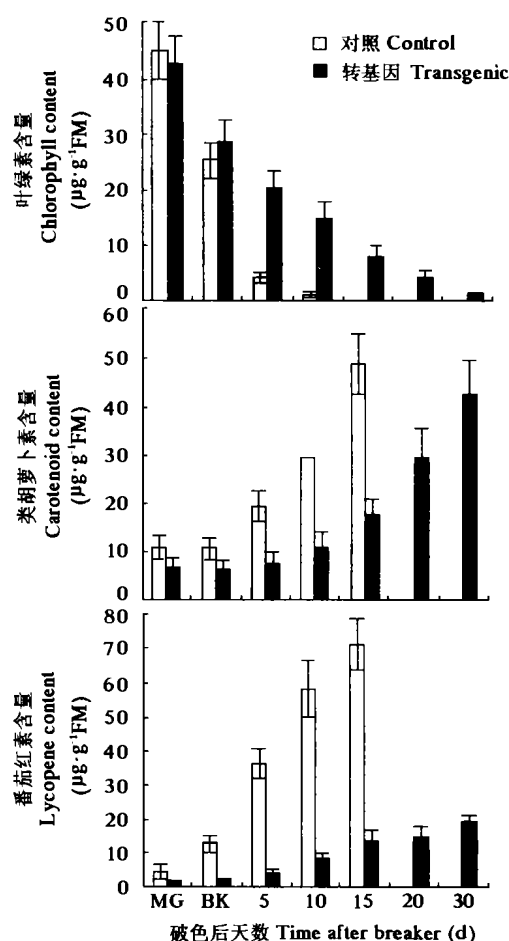


图 2 番茄果实色素物质变化

MG: 绿熟期; BK: 破色期。

Fig. 2 Pigment content of tomato fruit

MG: Mature green; BK: Breaker stage.

52%。对照番茄的乙烯释放量在采后迅速上升,破色后 5 d 达到最大,之后又迅速降低;转基因番茄的乙烯释放变化较为缓慢,乙烯释放高峰在破色后 15 d 出现,为 $4.82 \mu\text{L}\cdot\text{h}^{-1}\cdot\text{kg}^{-1}\text{FM}$,相当于对照果实的 77%。

2.2 番茄果实色素物质变化

从图 2 可以看出,对照未成熟果实的叶绿素含量为 $45.14 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$,转基因未成熟果实的叶绿素含量为 $42.68 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$,两者无显著差异。但在成熟过程中,对照果实的叶绿素含量在破色后迅速下降,到破色后 5 d 仅有 $4.22 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$;而转基因番茄的叶绿素降解十分缓慢,在破色后 21 d 仍然有 $4.12 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$ 。对照番茄在破色后番茄红素和类胡萝卜素的含量急剧上升,在破色后 15 d 达到最大值,外表呈现正常的红色;转基因果实在破色后 30 d,番茄红素的含量只相当于对照的 27.2%,外表呈现桔黄色,番茄红素的合成受到显著抑制。

2.3 番茄果实硬度变化

从图 1 可见,对照果实在破色后果肉硬度均迅速下降,到破色后 10 d,果肉硬度只有绿熟期的 20.8%;转基因果实的硬度下降比对照缓慢,到破色后 30 d 其硬度仍达 4.30 N,二者之间的差异达显著水平 ($P < 0.05$)。可见,转基因果实的软化受到抑制。

2.4 番茄果实纤维素酶、PME 和 PG 活性的变化

纤维素和果胶等物质为植物细胞壁的主要成分,它与果蔬质地有密切关系。通常在果蔬成熟期间,纤维素酶、PME、PG 等活性上升,从而导致纤维素、原果胶等物质逐步水解,水溶性果胶增加,致使果蔬组织软化^[17]。从图 3 可知,采后番茄果实纤维素酶活性均呈先升后降的趋势,对照果实在破色后 10 d 时纤维素酶活性达最高值,为 $46.14 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$;转基因果实纤维素酶活性在破色后 21 d 才达到最高值,且高度低于对照,二者之间差异达显著水平 ($P < 0.05$)。对照番茄和转基因番茄的 PG 酶在采后都呈上升趋势,转基因果实 PG 酶活性低于对照,上升速度也较对照慢,二者之间差异显著 ($P < 0.05$)。对照番茄和转基因番茄 PME 活性一直在 $1.5 \sim 3.0 \text{ U}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\text{FM}$ 之间波动,二者酶活性之间无显著差异。

3 讨论

LeETR1 是用拟南芥 *ETR1* 的 cDNA 为探针,从番茄叶片离层 cDNA 文库中筛选得到的一个 *ETR1* 的同源基因^[9]。*LeETR1* 编码产物的氨基酸序列与 *ETR1* 有 81% 的同源性。它同 *ETR1* 一样有 3 个功能结构域:乙烯结合/感受域 (sensor)、组氨酸激酶域 (histidine kinase) 和反应调节域 (response regulator)。资料表明, *LeETR1* 在番茄组织呈组成性表达^[6]。

我们应用反义基因技术对 *LeETR1* 实施“基因封闭”,获得了 *LeETR1* 表达受到抑制的转基因番茄

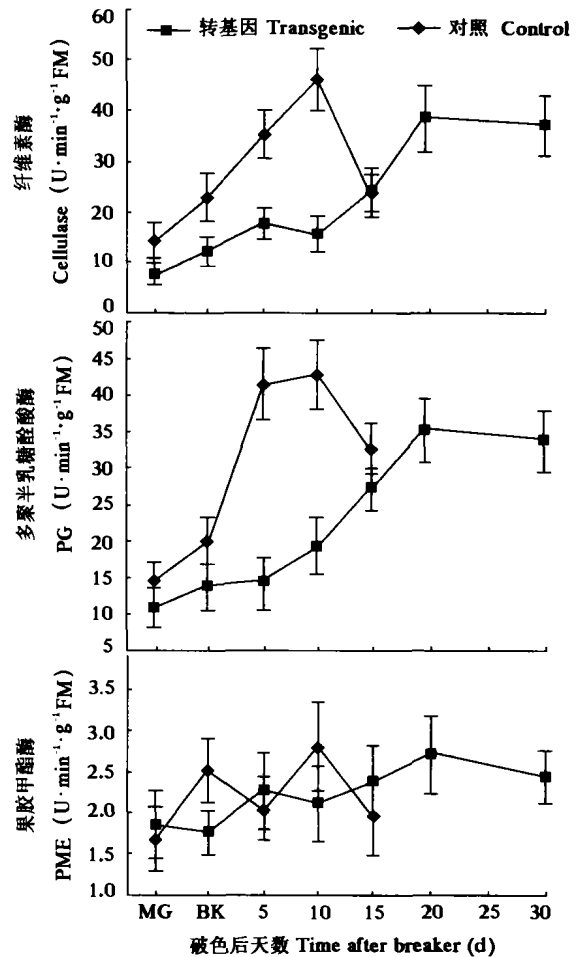


图 3 果实纤维素酶、PME 和 PG 活性的变化

MG: 绿熟期; BK: 破色期。

Fig. 3 Change of cellulase, PME and PG activity

MG: Mature green; BK: Breaker stage.

材料, 研究它们的采后生理表现, 将有助于认识 *LeETR1* 在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。本研究发现 *LeETR1* 被封闭以后与对照番茄有明显的不同: (1) 成熟推迟; (2) 番茄红素的合成受到显著抑制, 果实没有表现出正常的红色果皮; (3) 果实推迟软化。而 Catherine 等^[18]报道, 转入反义 *LeETR1* 基因以后番茄的着色和软化未受影响。不一致的结果可能是因为转入反义 *LeETR1* 基因的片段不同或者外源片段插入的位点不同造成的。一般认为乙烯调节果实成熟是通过协同成熟过程中相关基因的表达实现的, 如提高呼吸速率与乙烯自动催化产量, 加快叶绿素分解, 促进类胡萝卜素合成, 增强细胞壁水解酶活性等^[19]。本研究中, 转基因番茄的乙烯生物合成途径并没有受到阻断, 它的最高乙烯释放强度相当于对照番茄的 77%, 但乙烯释放高峰却比对照果实推迟了 10 d。因此, 转基因果实推迟成熟可能是由于对乙烯信号的感知受到损害, 降低了果实对乙烯的敏感性, 进而延缓了一系列与成熟有关基因的正常表达。据此, 可以推测 *LeETR1* 在番茄成熟过程中起着重要的作用。

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. *Plant Physiol.*, 1977, 70: 117 ~ 123
- 2 Olson D C, White J A, Edelman L, et al. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 1991, 88: 5340 ~ 5344
- 3 Theologis A. One rotten apple spoils the whole bushel: the role of ethylene in fruit ripening. *Cell*, 1992, 70: 181 ~ 184
- 4 Chang C, Kwock S F, Bleecker A B, et al. Arabidopsis ethylene response gene *ETR1*: similarity of product to two-component regulator. *Science*, 1993, 262: 539
- 5 Kieber J J, Rothenberg M, Roman G, et al. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinase. *Cell*, 1993, 72: 427
- 6 Schaller G E, Bledcker A B. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis ETR1* gene. *Science*, 1995, 270: 1809 ~ 1811
- 7 Sakai H, Hua J, Chen Q G, et al. *ETR2* is an *ETR1*-like gene involved in ethylene signaling in *Arabidopsis*. *PNAS*, 1998, 95 (10): 5812 ~ 5817
- 8 Hua J, Meyerowitz E M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis Thaliana*. *Cell*, 1998, 94 (2): 261 ~ 271
- 9 Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo A K, et al. The mRNA for an *ETR1* homologue in tomato is constitutionally expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol. Biol.*, 1996, 30: 1331 ~ 1338
- 10 Zhou D, Mattoo A K, Tucker M L. Molecular cloning of a tomato cDNA encoding an ethylene receptor. *Plant Physiol.*, 1996, 110: 1435
- 11 Lashbrook C C, Tieman D M, Klee H J. Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant J.*, 1998, 15: 243 ~ 252
- 12 Tieman D M, Klee H J. Differential expression of two novel members of the tomato ethylene-receptor family. *Plant Physiol.*, 1999, 120: 165 ~ 172
- 13 Davis B H. Chemistry and biochemistry of plant pigments. In: Goodwin T W ed. London: Academic Press, 1976. 38 ~ 165
- 14 Elena D C, Alan B B. Pedicel break-strength and cellulase gene expression during tomato flower abscission. *Plant Physiol.*, 1996, 111: 813 ~ 820
- 15 Taylor M A, Rabe E, Dodd M C. Effect of storage of regimes on pectolytic enzymes, pectic substances, internal conductivity and gel breakdown in cold stored Songold plum. *J. Hort. Sci.*, 1994, 69 (3): 527 ~ 534
- 16 Artes F, Cano A, Fern T. Pectolytic enzyme activity during intermittent warming storage of peaches. *J. Food Sci.*, 1996, 61 (2): 311 ~ 313
- 17 Fuscger R L, Bennett A B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1991, 42: 675 ~ 703
- 18 Catherine A W, Nicholas N L, Chen L W, et al. Delayed abscission and shorter internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor *LeETR1* transcript in transgenic tomato. *Plant physiol.*, 2002, 128: 978 ~ 987
- 19 Ray J, Pieton S, Shabberly J. Molecular biology of fruit ripening and it's manipulation with antisense genes. *Plant Mol. Biol.*, 1992, 19: 49 ~ 87

Characters of Postharvest Physiology of Antisense *LeETR1* Transgenic Tomato Fruits

Yang Huqing¹, Ying Tiejun¹, Xiang Qingning², and Du Rongmao¹

(¹ Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; ² Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In this paper we studied the post-harvest physiology of antisense *LeETR1* transgenic tomato fruits. Respiratory rate of transgenic fruits was significantly lower than control. Ethylene production peak of transgenic fruits appeared 10 d after control. Chlorophyll degradation and lycopene biosynthesis was inhibited in transgenic fruits. After 30 days in normal room, transgenic tomatoes eventually developed an orange colour but never turned red. During the course of ripening, cellulase and polygalacturonase activity of transgenic fruits were significantly lower than control and the firmness of transgenic fruits declined more slowly. These data suggest that *LeETR1* was closely correlated with the ripening of tomato fruits.

Key words: Tomato; Transgenic; Ethylene; Ripening; Pigment

五味子的净光合速率及其日变化

李爱民 王玉兰 李昌禹 (中国农业科学院特产研究所, 吉林 132109)

Net Photosynthetic Rate and Its Diurnal Variation of *Schisandra chinensis* Baill

Li Aimin, Wang Yulan, and Li Changyu (The Institute of Special Economic Animal and Plant, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Jilin 132109, China)

关键词: 五味子; 净光合速率

中图分类号: S 66 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0408-01

五味子 (*Schisandra chinensis* Baill) 是天然分布于我国东北的野生木质藤本果树, 现已引入栽培, 其果实既可入药又可加工成果酒和果汁。本试验于 2002 年 8 月 19~20 日在中国农业科学院特产研究所五味子人工栽培园进行。材料为 4~5 年生无性系结果树, 株行距 1 m×2 m, 篱架栽培。在 1.5 m 高度架面上选择 4 个侧枝, 利用美国 LI-COR 公司产的 LI-6400 型便携式光合作用测定系统, 从当日 6 时到 18 时每小时对 6~7 节位叶片测定 1 次光合速率 (P_n); 在同一时间内, 对新梢不同节位、不同类型枝蔓、不同种质叶片进行 P_n 测定比较。

测定结果表明, 从新梢基部起 1~13 节位叶片的 P_n 由 4.35 ($\text{CO}_2 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 单位下同) 依次递增至 6.50, 15~19 节位由 5.90 依次递减到 4.56。分析其原因是, 1~13 节位叶片属于成龄叶片, 叶龄由下至上依次减小, 而生理活性依次增强, 所以 P_n 呈递增趋势; 15~19 节位叶片尚处发育期, 叶龄由下至上依次减小, 而生理活性也依次减弱, 所以 P_n 呈递减趋势。

五味子叶片 P_n 的日变化呈双峰曲线。6~11 时随着气温和光照的增强, P_n 由 2.50 增加到 8.25; 11~14 时依次递减到 5.40, 到 15 时出现次高峰 (6.52), 以后随气温和光照的减低, P_n 呈下降趋势, 18 时为 2.60。

多年的栽培实践证明, 五味子 1 年生枝随长度的增加其结果性能也明显增强。测试结果表明, 同一节位叶片的营养枝 P_n (4.78) 比结果枝 (3.84) 高, 长枝 (4.82) 比短枝 (2.97) 高。

五味子是耐阴喜光植物, 大多数种质在高温和强光条件下叶片发黄, 但有少数种质在高温和强光下叶片呈绿色至浓绿色, P_n 为 10.16~13.67。抗光性强弱与其 P_n 密切相关, 直接影响栽培产量的稳定性, 在今后的育种工作中应注重抗光性状的选择。

收稿日期: 2003-01-23; 修回日期: 2003-05-16

基金项目: 吉林省科学研究计划项目 (2000-12)