

转反义 PHY A 基因对番茄红素合成的影响

吴峰华, 常银子, 杨虎清*

(浙江林学院农业与食品科学学院, 浙江临安 311300)

摘要: 通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法, 以番茄叶片作外植体, 将番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 反义光敏色素 A (*PHYA*) 基因片段导入番茄。通过 PCR 扩增、Southern blot 检测, 证明反义光敏色素 A 的基因片段已整合到番茄基因组。在转基因番茄材料中, *PHYA* 基因表达受到抑制, 番茄红素的合成显著减少, 果实没有表现出正常的红色果皮; 转基因果实成熟过程中乙烯能够正常合成, 与对照番茄之间没有显著差异。推测在调控番茄红素合成的模式中, 光敏色素可能位于乙烯的下游位点起作用, 二者共同调控番茄红素的合成。

关键词: 番茄; 番茄红素; 光敏色素; 乙烯

中图分类号: S 641.2; Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2009) 05-0679-06

Regulation of Biosynthesis of Lycopene in Tomato by Antisense Transformation with Phytochrome A Gene

WU Feng-hua, Chang Yin-zi, and YANG Hu-qing*

(School of Agriculture and Food Science, Zhejiang Forestry University, Lin'an, Zhejiang 311300, China)

Abstract: Young leaves as explants, the tomato (*Solanum lycopersicum* L.) was transformed with antisense genomic DNA of phytochrome A, which mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. It was shown by PCR analysis and Southern blotting detection that the fragment of *PHYA* was integrated into the tomato genome. Several results were observed from transgenic tomato fruits including inhibition of expression of *PHYA*, significant decrease in biosynthesis of lycopene and the abnormal color of the fruit skin. There were no significant differences between transgenic fruits and the control groups in the production of ethylene. Therefore, we presumed that phytochrome existing in the downstream of ethylene, which along with *PHYA*, played a role in the regulation of biosynthesis of lycopene. However, more studies on how both of them regulate the biosynthesis of lycopene are needed.

Key words: tomato; lycopene; phytochrome A; ethylene

番茄红素是一种很有开发前景的功能性色素, 对于预防多种疾病, 增强机体免疫力和抗衰老等均具有重要作用。番茄和番茄制品是番茄红素的主要来源, 因此提高番茄中番茄红素的含量具有重要意义 (李君明等, 2001; 王晋华等, 2009)。

目前对番茄红素的生物合成途径已经有了比较清楚的了解 (Bartley & Scolnik, 1994; Ronen et al, 1999), 对于其合成的调控研究则刚刚起步。已经发现, 光敏色素 (Phytochrome, 简称 PHY) 对番茄红素的合成具有重要调节作用 (Alba et al, 2000), 但目前还不知道光敏色素参与调控番茄红素合成的作用方式和分子机理。因此, 本研究中构建了反义光敏色素 A (*PHYA*) 基因植物表达载体, 利用农杆菌介导进行遗传转化并获得转基因番茄植株, 对光敏色素调控番茄红素合成的分子机理进行

收稿日期: 2008-12-15; 修回日期: 2009-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30400304)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: yanghq@zjfc.edu.cn)

了初步的研究, 为通过基因工程技术提高番茄红素合成提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验于 2007 年在浙江林学院果蔬采后生理与分子生物学实验室进行。番茄 (*Solanum lycopersicum* L.) 自交纯合系 B1 (大红果), 高抗番茄青枯病, 由浙江大学生物技术研究所提供, 外植体选用苗龄 7~9 d 的无菌子叶。大肠杆菌菌株为 DH5, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 EHA105。

1.2 反义植物表达载体 PB-FYHQ 的构建

植物双元表达载体 pB II21, 含 CaMV35S 启动子调控的 β -葡萄糖苷酸酶 (*GUS*) 报告基因和抗卡那霉素 (Kan) 筛选的新霉素磷酸转移酶 (*NPT*) 基因。含有 *PHYA* cDNA 序列的质粒 pCM-*PHYA* 由本实验室保存。

利用 PCR 从 pCM-*PHYA* 上扩增出约 0.6 kb 的 *PHYA* 序列。上述 PCR 产物与 pB II21 载体分别用内切酶 *Xba* 和 *Sac* 消化 4~8 h 后, 电泳割胶回收大片段。将两个大片段用 *T*₄ DNA 连接酶连接形成反义植物表达载体 PB-FYHQ (图 1)。

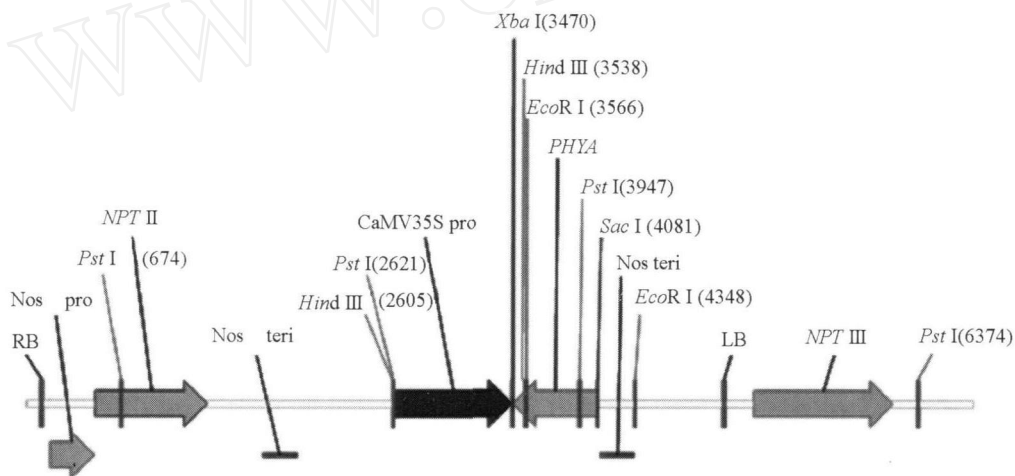


图 1 反义植物表达载体 PB-FYHQ 的构建

Fig. 1 Construction of the antisense *PHYA* gene vector (PB-FYHQ)

1.3 番茄的转化

用三亲交配法将 PB-FYHQ 转入根癌农杆菌菌株 EHA105。用叶盘法 (Horsh et al, 1985) 转化番茄无菌苗的真叶叶盘。

1.4 转基因番茄反义 *PHYA* 序列的 PCR 检测

用改良 CTAB 法提取番茄的基因组 DNA, 利用 PCR 检测外源基因是否已经插入并整合到番茄的基因组中。上游引物 P1: 5'-CCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATT-3', 根据 CaMV35S 启动子的一段序列设计; 下游引物 P2: 5'-CATCTAGAAAGCGGACCA TTTCAGT-3', 根据番茄反义 *PHYA* 的 3 末端序列设计。

PCR 扩增条件为: 94 预变性 3 min; 94 30 s, 55 30 s, 72 40 s, 35 个循环; 最后 72 延伸 10 min。

1.5 转基因番茄的 Southern blot检测

分别对转基因及阴性对照番茄总 DNA 用 *Hind* (TaKaRa) 进行酶切后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳分离。DNA 片段分离后经毛细作用转移到硝酸纤维素膜上。

以 *NPT* (Km) PCR 回收产物作为探针, 用 Promega Primea-Gene Label 试剂盒进行标记, 然后 65 杂交过夜。

1.6 果实采样及样品保存

选择转基因与野生型番茄植株在温室培养, 从花药开放之日挂牌标记花和果实, 当果实绿熟或花蒂出现第一丝红色时 (破色, BK) 采收果实, 然后于室温 (20) 成熟。以 BK 为起点, 分别取处于 0、5、10、15 d 的果实切成 1 cm³ 大小, 立即以液氮速冻, 保存于 -70 供 RNA 提取和番茄红素测定。

1.7 转基因番茄 *PHYA* 基因表达水平的检测

采用异硫氰酸胍法提取番茄果实 RNA, RNA 甲醛变性凝胶电泳及转移至尼龙膜、杂交、洗膜等按 Sambrook 等 (1989) 的方法进行。

以 600 bp 大小的 *PHYA* 基因片段为探针进行 Northern 杂交, 探针标记采用 Promega Primea-Gene Label 试剂盒。

1.8 番茄红素与乙烯测定

参考 Fish 等 (2002) 的方法测定番茄红素, 参考杨虎清等 (2003a) 的方法用 SP6800A 气相色谱仪 (山东鲁南华工仪器厂) 测定乙烯释放量, 重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 转基因番茄植株的获得和对外源 *PHYA* 反义基因片段的检测

经表达载体 PB-FYHQ 转化, 共获得 15 个具有 Kan 抗性的 T₀ 代转基因番茄株系。生根后将其移栽于温室中培养, PCR 检测证明其中 4 株可扩增出 1.7 kb 的特异片段 (图 2), 分别命名为 YHQ1 ~ YHQ4。

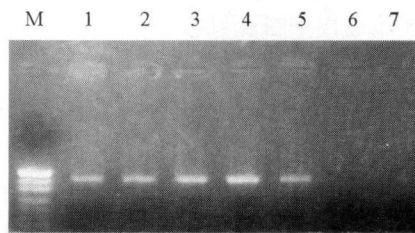


图 2 转基因番茄株系的 PCR 检测

M: DNA 标准分子量; 1: PB-FYHQ (阳性对照); 2~5: 转基因番茄;
6、7: 未转化番茄 (阴性对照)。

Fig. 2 PCR detection of the antisense *PHYA* gene in the tomato genome

M: DNA markers; 1: PB-FYHQ (positive control); 2 - 5: Transformed tomato;
6, 7: Untransformed tomato (negative control).

PCR 结果显示外源 *PHYA* 反义基因片段包括 CaMV 35S 启动子已经整合到转基因株系的基因组中。为了对上述 PCR 的结果做进一步的验证, 以 *NPT* 基因 PCR 的扩增产物为探针和阳性对照, 以未转化的番茄为阴性对照, 对 4 株 PCR 鉴定为阳性的转化植株进行 Southern 杂交, 结果 (图 3) 表明外源 *NPT* 基因已整合到番茄染色体上, 推测反义 *PHYA* 片段也一并整合到番茄基因组中。

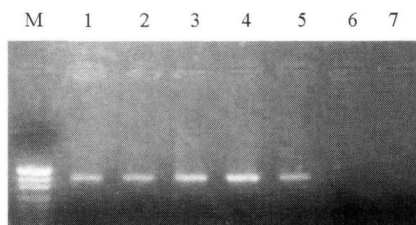


图 3 转基因番茄株系中 NPT 的 Southern blot 分析

1~4: 反义 *PHYA* 转基因番茄; 5: 未转化番茄 (阴性对照); 6: PCR 回收产物 (阳性对照)。

Fig 3 Southern blotting analysis of NPT for transgenic plants

1 - 4: Transformed tomato with antisense *PHYA*; 5: Untransformed tomato (negative control);

6: PCR product of *NPT* (positive control).

2.2 转基因番茄 *PHYA* 基因表达水平的检测

选择转基因植株与野生型植株果实在破色期采收, 提取 mRNA 进行 Northern blot 分析。

如图 4 所示, 转反义 *PHYA* 基因植株的 *PHYA* 表达水平明显低于未转化植株。

说明转入的反义 *PHYA* 基因序列已经得到表达。

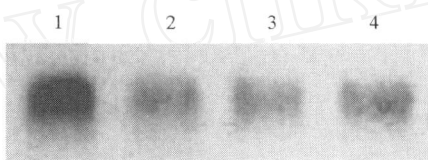


图 4 破色期番茄果实 *PHYA* 基因表达水平

1: 未转化番茄 (阴性对照); 2~4: 转反义 *PHYA* 基因番茄。

Fig 4 Expression of tomato *PHYA* in the broken fruit

1: Untransformed tomato (negative control); 2 - 4: Transformed tomato with antisense *PHYA*.

2.3 转反义 *PHYA* 基因对果实番茄红素合成的影响

由图 5 可以看出, 果实采后成熟过程中番茄红素含量急剧上升, 在采后 0~5 d, 转基因番茄和对照 (Wild-type) 果实番茄红素含量差异不显著; 但在采后 10 d 以后, 对照果实的外表呈现正常的红色, 番茄红素含量急剧上升, 显著高于转基因番茄 ($P < 0.05$), 转反义 *PHYA* 基因对果实番茄红素合成有显著抑制作用, 果实表面未形成正常的色泽。

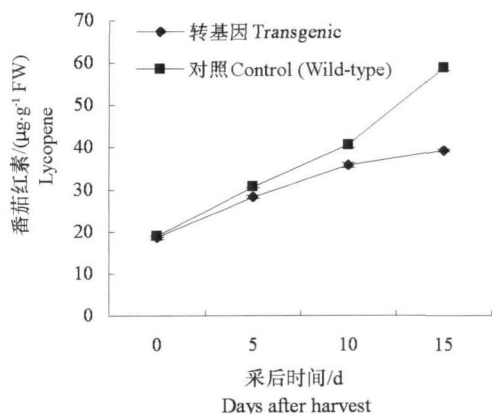


图 5 番茄果实番茄红素的变化

Fig 5 Content of lycopene in tomato fruit

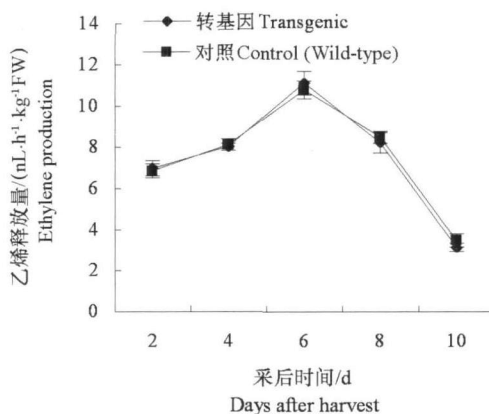


图 6 番茄果实乙烯释放量的变化

Fig 6 Change of fruit ethylene production

2.4 转反义 *PHYA* 基因对果实乙烯合成的影响

如图 6 所示, 转基因番茄与对照番茄采后乙烯合成逐渐升高, 乙烯释放高峰出现在破色后第 6 天, 但二者之间度差异不显著 ($P > 0.05$), 说明转反义 *PHYA* 基因对番茄果实的乙烯合成没有显著影响。

3 讨论

光敏色素是植物体内最重要的光受体, 参与调控植物发育中许多生理过程。目前在番茄中已经克隆到 5 个光敏色素基因, 如 *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* 和 *PHYF* (Hauser et al, 1997; Pratt et al, 1997)。但在果实成熟期间只发现 *PHYA* 的表达 (Alba et al, 2000), 这些结果表明 *PHYA* 可能参与调控番茄果实的成熟过程。

本试验采用反义基因技术对 *PHYA* 实施“基因封闭”, 获得了仅有一个基因差异的反义转基因番茄材料。本研究发现 *PHYA* 被封闭以后果实成熟有如下特点: (1) *PHYA* 的表达水平降低; (2) 番茄红素的合成受到显著抑制, 果皮没有表现出正常的红色; (3) 果实成熟过程中乙烯正常合成, 与对照番茄没有显著差异。

在植物体内番茄红素是通过类异戊二烯途径合成的 (Rongen et al, 1999), 催化该途径的关键酶是番茄红素合成酶 (PSY), 它受到遗传、环境以及内源分子如光敏色素、乙烯等因素的共同调控 (Andrew & Gopinadhan, 2005)。光敏色素对番茄红素的调节机理, 目前有两种假说 (Jen & Watada, 1977; Alba et al, 2000): 光敏色素可以调节番茄红素的积累, 作用于生物合成的下游位点, 乙烯也可调节番茄红素的合成, 光敏色素和乙烯的作用是相互独立的, 光敏色素不影响乙烯的合成, 果实内光敏色素不是番茄果实成熟过程的中心调节物质; 光敏色素调节类胡萝卜素的生物合成与红光诱导乙烯的合成有紧密联系, 果实内光敏色素是番茄果实成熟过程中番茄红素合成的中心调节物质。一般认为, 乙烯调节果实成熟是通过调节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 (Gray et al, 1992)。

研究发现, 阻断乙烯信号传导系统能够抑制果实番茄红素合成 (杨虎清等, 2003b), 而用乙烯处理番茄能够提高 PSY 的表达水平, 促进番茄红素的合成 (Hoeberichts et al, 2002)。转反义 *PHYA* 基因能显著抑制番茄红素的合成, 但对番茄的乙烯合成没有显著影响, 推测在调控番茄红素合成的模式中, 光敏色素可能位于乙烯的下游位点起作用, 二者共同调控番茄红素的合成, 关于乙烯和光敏色素的相互关系, 还需要进一步研究证明。

References

- Alba R, Cordonnier-Pratt M M, Pratt L H. 2000. Fruit-localized phytochromes regulate lycopene accumulation independently of ethylene production in tomato. *Plant Physiology*, 123 (5): 363 - 370.
- Andrew S, Gopinadhan P. 2005. Modulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit ripening through phytochrome regulation of phytoene synthase activity. *Plant Physiology and Biochemistry*, 43 (2): 1052 - 1060.
- Bartley G E, Scolnik P A. 1994. Molecular biology of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Reviews of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45: 287 - 301.
- Fish W W, Perkins-Veazie P, Collins J K. 2002. A quantitative assay for lycopene that utilizes reduced volumes of organic solvents. *Journal of Food Composition and Analysis*, 15: 309 - 317.
- Gray J, Picton S, Shabbeer J, Schuch W, Grierson D. 1992. Molecular biology of fruit ripening and its manipulation with antisense genes. *Plant Molecular Biology*, 19: 69 - 87.
- Hauser B A, Pratt L H, Cordonnier M M. 1997. Absolute quantification of five phytochrome transcripts in seedlings and mature plants of tomato.

- (*Solanum lycopersicum* L.). *Planta*, 201: 379 - 387.
- Hoeberichts F A, van Der Plas L H W, Woltering E J. 2002. Ethylene perception is required for the expression of tomato ripening-related genes and associated physiological changes even at advanced stages of ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 26 (2): 125 - 133.
- Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, Eichholtz D, Rogers S G, Fraley R T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227: 1229 - 1231.
- Jen J J, Watada A E. 1977. Red light advanced respiration and ethylene evolution in ripening tomato. *Hortic Sci*, 12: 459 - 460.
- Li Jun-ming, Xu He-jin, Zhou Yong-jian. 2001. The advance of the research on soluble solid and lycopene in tomato fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 28 (Supplement): 661 - 668. (in Chinese)
- 李君明, 徐和金, 周永健. 2001. 有关番茄果实中可溶性固形物和番茄红素的研究进展. *园艺学报*, 28 (增刊): 661 - 668.
- Pratt L H, Cordonnier-Pratt M M, Kelmenson P M. 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell Environment*, 20: 672 - 677.
- Rongen G, Cohen M, Zamir D. 1999. Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development: Expression of the gene for lycopene epsilon-cyclase is down-regulated during ripening and is elevated in the mutant delta. *Plant J*, 17 (4): 341 - 351.
- Sambrook J, Fritsch E F, Manniatis T. 1989. *Molecular cloning: A laboratory manual* 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press: 31 - 58.
- Wang Jin-hua, Zhao Xiao-bin, Ding Jun-jie, Mi Guo-quan, Cheng Zhi-fang. 2009. A new high lycopene cherry tomato cultivar 'Yinghong 1'. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (2): 307. (in Chinese)
- 王晋华, 赵肖斌, 丁俊杰, 米国全, 程志芳. 2009. 高番茄红素樱桃番茄新品种 '樱红 1号'. *园艺学报*, 36 (2): 307.
- Yang Hu-qing, Ying Tie-jin, Xiang Qing-ning. 2003a. Characters of postharvest physiology of antisense *LeETR1* transgenic tomato fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 30 (4): 404 - 408. (in Chinese)
- 杨虎清, 应铁进, 向庆宁. 2003a. 转反义 *LeETR1* 基因番茄采后生理特性的研究. *园艺学报*, 30 (4): 404 - 408.
- Yang Hu-qing, Ying Tie-jin, Xiang Qing-ning. 2003b. Transformation of *LeETR1* antisense gene into tomato. *Chinese Journal of Cell Biology*, (2): 120 - 124. (in Chinese)
- 杨虎清, 应铁进, 向庆宁. 2003b. *LeETR1* 反义基因对番茄的遗传转化. *细胞生物学杂志*, (2): 120 - 124.

《园艺学报》最新被引频次和影响因子

据中国科学技术信息研究所 2008 年 10 月统计,《园艺学报》总被引频次为 4 213, 影响因子为 1.323。他引率 0.917, 引用期刊数 405。

欢迎订阅 《园艺学报》

《园艺学报》是中国园艺学会主办的学术期刊,创刊于 1962 年,刊载有关果树、蔬菜、观赏植物、茶及药用植物等方面的学术论文、研究简报、专题文献综述、问题与讨论、新技术新品种以及园艺研究动态与信息,适合园艺科研人员、大专院校师生及农业技术推广部门专业技术人员阅读参考。

《园艺学报》是中国科技核心期刊,被中国科学引文数据库 Chinese Science Citation Database 等多家重要数据库收录,2005 年荣获第三届国家期刊奖,2006—2008 年连续 3 年获中国科协精品科技期刊工程项目(B类)资助。2008 年度报告《园艺学报》总被引频次 4 213 次,影响因子 1.323。

《园艺学报》为月刊,每月 25 日出版。每期定价 15.00 元,全年 180.00 元。国内外公开发行,全国各地邮局办理订阅,国内邮发代号 82 - 471,国外发行由中国国际图书贸易总公司承办,代号 M448。漏订者可直接汇款至本编辑部订购。

编辑部地址:北京市海淀区中关村南大街 12 号 中国农业科学院蔬菜花卉研究所《园艺学报》编辑部。

邮政编码:100081; 电话:(010) 82109523. E-mail: yuanxixuebao@126.com; 网址: <http://www.ahs.ac.cn>