

# 番茄乙烯受体基因反义表达对果实成熟的影响

王中凤<sup>1,2</sup> 应铁进<sup>1\*</sup> 张英<sup>2</sup> 鲍碧丽<sup>1</sup> 黄晓丹<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学食品科学与营养系, 浙江杭州 310029; <sup>2</sup> 广西工学院生物与化学工程系, 广西柳州 545006)

**摘要:** 以乙烯受体基因 *LeETR1* 和 *LeETR2* 的反义基因株系 *ale1* 和 *ale2* 为材料, 对果实成熟特性进行了研究。转基因番茄果实与对照相比, 呼吸速率下降, 但乙烯释放速率增加 1~4 倍, 呼吸高峰和乙烯跃变高峰出现的时间没有改变, 表明果实成熟起始时间没有改变。*ale1* 果实成熟后期着色速度减慢, 红熟果色泽 *a* 值、番茄红素和类胡萝卜素含量都显著低于对照; 但果实多聚半乳糖醛酸酶活性上升和硬度下降速度都显著高于对照。这说明 *LeETR1* 基因与果实成熟品质特征的形成可能存在比较复杂的关系。

**关键词:** 番茄; 乙烯受体基因; 果实成熟

**中图分类号:** S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 03-0518-05

## Effect of Ethylene Receptor Genes Antisense Transformation on Fruit Ripening

Wang Zhongfeng<sup>1,2</sup>, Ying Tiejin<sup>1\*</sup>, Zhang Ying<sup>2</sup>, Bao Bilil<sup>1</sup>, and Huang Xiaodan<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Department of Food Science and Nutrition, Zhejiang University, Hangzhou, Zhejiang 310029, China; <sup>2</sup> Department of Biological and Chemical Engineering, Guangxi Institute of Technology, Liuzhou, Guangxi 545006, China)

**Abstract:** Fruit ripening characteristics of antisense transgenic lines *ale1* and *ale2* respectively from ethylene receptor genes *LeETR1* and *LeETR2* were studied. Compared to the wild type, transgenic lines displayed that respiration rate decreased, whereas ethylene production increased 1 - 4 folds, which suggest that starting time of fruit ripening were not affected. At later stage of *ale1* fruit ripening, *a*-value, carotenoid and lycopene contents was lower than that in wild type fruit. Although the speed of fruit coloring slow down in *ale1*, the polygalacturonase increasing and firmness decreasing were sped up. The results suggest that there is some intricate relation between *LeETR1* and fruit ripening.

**Key words:** Tomato; Ethylene receptor gene; Fruit ripening

番茄属于跃变型果实, 果实的成熟受乙烯调控。乙烯对果实成熟的调控从乙烯合成开始, 经过乙烯信号转导, 诱导成熟相关基因表达, 各种成熟品质特性形成。在这个过程中任一环节发生改变都可能影响果实成熟或者某些成熟特性的改变。ACC 合成酶<sup>[1]</sup>和 ACC 氧化酶<sup>[2]</sup>在番茄中的反义表达抑制内源乙烯合成, 从而使果实成熟软化明显延迟。

已经发现的番茄乙烯受体基因家族有 6 个成员, 即 *LeETR1* ~ *LeETR6*, 其中 *LeETR3* (*NR*) ~ *LeETR6* 的表达水平受发育调控<sup>[3]</sup>。*NR* 和 *LeETR4* 受果实成熟的调控, 随果实成熟表达量增加, 降低 *NR* 表达水平对乙烯信号转导和果实成熟没有明显效果, 但使 *LeETR4* mRNA 水平升高, 表明 *LeETR4* 可能在转录水平上对 *NR* 有补充作用<sup>[3]</sup>。降低 *LeETR4* 表达水平产生超敏感乙烯反应表现型, 加速果实成熟, 提示 *LeETR4* 在果实成熟过程中起重要作用<sup>[3]</sup>。*NR* 基因第 411 位碱基 C 突变成 T, 导致其编码的蛋白质第 36 号氨基酸由脯氨酸变成了亮氨酸, *NR* 突变体则表现强烈乙烯不敏感性, 果实不能正常成熟<sup>[4]</sup>。在 *NR* 突变体中反义表达 *NR* 基因则使果实成熟恢复正常。说明 *NR* 基因并不是果实正常成熟所必须, 从而也证实了乙烯信号转导的受体抑制模型<sup>[5]</sup>。在拟南芥乙烯受体家族中, 仅有 *ETR1* 功

收稿日期: 2005 - 07 - 29; 修回日期: 2006 - 01 - 06

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371001)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: tjying@hznc.com)

能缺失突变产生明显增强的乙烯反应, 其它受体单一缺失突变体没有如此反应<sup>[6]</sup>, 提示 *ETR1* 在拟南芥乙烯受体家族中可能具有特别重要的功能地位。对拟南芥乙烯受体的研究主要针对营养器官或组织的乙烯反应, 由于材料的特殊性, 不利于研究其在果实成熟方面的调控作用。*LeETR1* 和 *LeETR2* 与拟南芥 *ETR1* 具有高度同源性, 在番茄中各发育时期和各组织中组成性表达, 不随果实发育而改变表达丰度<sup>[7]</sup>。降低了 *LeETR1* 表达水平的反义株系表现节间缩短, 推迟脱落等性状, 未见在果实成熟性状上有明显变化<sup>[8]</sup>。为了进一步探索 *LeETR1* 和 *LeETR2* 与果实成熟的关系, 本研究对 *LeETR1* 和 *LeETR2* 基因进行了反义表达, 对所获得的反义表达株系 *ale1* 和 *ale2* 果实成熟过程色泽、硬度及其相关的生物化学特性进行了分析。

## 1 材料与方法

以大棚内春季种植的 *ale1* (*LeETR1* 反义表达株系)、*ale2* (*LeETR2* 反义表达株系) 和 B1 (野生型对照株系) 为材料。果实成熟期间, 采集相应成熟期果实进行如下各项测定。

### 1.1 果实呼吸速率和乙烯释放速率的测定

采摘绿熟期果实室温下自然贮藏, 定期检测  $\text{CO}_2$  释放量。参照薛应龙<sup>[9]</sup>的方法, 取 5~8 个 (质量 500~1 000 g) 果实, 放入真空干燥器中, 在一个平皿中加入  $0.4\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 20 mL, 并将平皿置于果实之上, 密封 1 h。取 1 mL 顶隙空气检测乙烯浓度。取出平皿, 参照薛应龙<sup>[9]</sup>的方法测定平皿吸收的  $\text{CO}_2$  量。采收当天标记为第 0 天, 之后每 2 d 检测 1 次。重复 3 次。

乙烯测定: 采用 SP-6 800A (山东鲁南瑞虹化工仪器有限公司) 气相色谱仪, 氧化铝柱, 检测室温度 120, 柱温 80<sup>[10]</sup>。

### 1.2 果实色泽的测定

参照 Klee<sup>[10]</sup>的方法, 采用 WSC-S 测色色差计 (上海精密科学仪器有限公司), 采用 L、a、b 色泽系统, 测定色泽 a 值, 每个果实沿赤道测定 4 个对称点, 每株系测定 10 个果实, 取其平均值。

### 1.3 色素含量的测定

分别采收各株系绿熟期、转色期、红熟初期和红熟期的果实, 参照 Brown 等<sup>[11]</sup>、Adsule 等<sup>[12]</sup>、Sandmann<sup>[13]</sup>的方法, 以己烷 丙酮 (60:40) 混合溶剂提取果实组织混合样品中的色素, 于可见分光光度计读取  $\text{OD}_{450}$ 、 $\text{OD}_{502}$ 、 $\text{OD}_{645}$  和  $\text{OD}_{663}$  值, 以空白溶剂作对照。0.5 g 样品在液氮中研磨成粉, 转入 10 mL 离心管中, 加 3 mL 己烷 丙酮 (60:40) 混合液充分振荡, 静置片刻, 将上部有机相转入另一试管。重复该步骤 2 次, 合并 3 次有机相, 定量提取液体积, 充分混匀, 用于测定。计算各种色素含量: 叶绿素 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) =  $(20.2 \times \text{OD}_{645} + 8.2 \times \text{OD}_{663}) \times \text{样液体积} / \text{样品质量}$ ; 类胡萝卜素 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) =  $4 \times \text{OD}_{450} \times \text{样液体积} / \text{样品质量}$ ; 番茄红素 ( $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ) =  $3.12 \times \text{OD}_{502} \times \text{样液体积} / \text{样品质量}$ 。

### 1.4 多聚半乳糖醛酸酶和果胶酯酶活性的测定

参照周培根等<sup>[14]</sup>的方法, 提取各成熟期果实粗酶液。参照李忠福等<sup>[15]</sup>的方法, 吸取 2 mL 粗酶液与 2 mL 0.4% 果胶溶液混合, 在 45℃ 恒温水浴中反应 30 min, 然后加入 1.5 mL DNS 试剂进行显色反应, 测定  $\text{OD}_{520}$ , 计算多聚半乳糖醛酸酶活性活力。

取 2 mL 粗酶液调 pH 7.0, 加入 5 mL pH 7.0 的果胶溶液中, 加两滴中性红指示剂, 摇匀, 定时 30 min, 待溶液显示红色用  $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  NaOH 滴定至红色消失, 如此重复操作 30 min, 记录消耗的 NaOH 总体积, 计算果胶酯酶活力<sup>[9]</sup>。

### 1.5 果实硬度的测定

参照 Jackman 等<sup>[16]</sup>的方法, 从田间采集转色面积小于 10% 的果实, 室温 (24~28℃) 自然贮存。以 TAX2i 质构仪 (UK) 测定, 每果测顶点、赤道上对称 4 点, 共 5 个点, 每点取果皮约  $1\text{cm}^2$ , 表皮向下, 以直径 5 mm 柱形探头测定刺破 1 mm 果皮时探头所移动的距离和消耗的力。结果表示为  $\text{N} \cdot \text{min}^{-1}$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 呼吸速率和乙烯释放速率

转基因株系和野生型株系采摘当天呼吸速率都较高 (图 1), 这可能是由于田间生长状态代谢活跃, 采收伤害刺激下, 造成短时呼吸代谢紊乱所致。采后从较高的呼吸速率迅速下降, 采收 4 d 后又开始上升。反义株系 *ale1* 和 *ale2* 高峰值比对照 B1 略有下降 ( $P = 0.05$ ), 采后呼吸速率的变化幅度也比对照小, 这提示乙烯受体 *LeETR1* 和 *LeETR2* 可能与果实的呼吸代谢有某种关系, 或者基因转移过程可能对呼吸系统产生了某种伤害。

与呼吸速率相反, 绿熟期采收的果实乙烯释放速率很低, 2 d 后转基因株系检查到极低浓度乙烯,  $0.57 \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1}$ , 随后才开始稳定上升, 均在采后 6 天出现乙烯释放速率合成高峰, 株系间乙烯释放速率峰值差异显著 ( $P = 0.01$ , 图 2)。其中 *ale2* 是 B1 的 5 倍左右, *ale1* 接近 B1 的 3 倍。对照株系果实乙烯释放速率远远低于转基因株系。乙烯受体通过结合乙烯传递乙烯信号, 受体数量越少, 乙烯被结合的数量减少, 检测到的乙烯释放速率可能有所提高。另一方面也提示反义 *LeETR1* 和 *LeETR2* 基因转入可能对果实乙烯合成系统产生了影响, 导致乙烯产量增加。

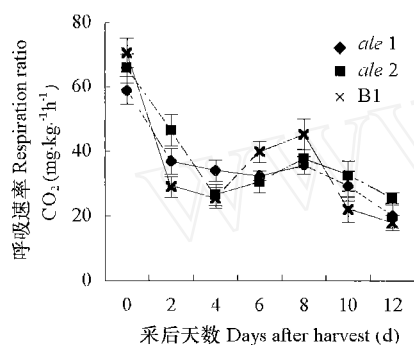


图 1 果实后熟过程中呼吸速率的变化

Fig. 1 The respiration rate of fruit during ripening

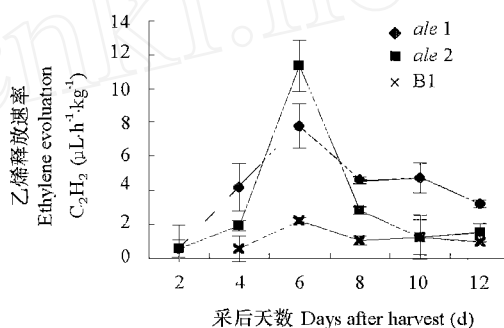


图 2 果实成熟过程中乙烯释放速率的变化

Fig. 2 The ethylene evolution from fruit during ripening

乙烯对果实成熟的启动必须在生理成熟基础上, 不能启动未达到生理成熟期的果实后熟。尽管在高峰期各株系间乙烯释放速率差异显著, 但乙烯高峰和呼吸高峰到来的时间却是一致的, 说明反义乙烯受体基因 *LeETR1* 和 *LeETR2* 的表达没有改变果实成熟的起始时间, 或者 *LeETR1* 和 *LeETR2* 对果实膨大生长阶段没有直接的调控作用。

### 2.2 果实成熟过程中色泽和色素含量的变化

绿熟期果实在室温下自然成熟, 各株系从采摘到转色起始的时间相同, 这与呼吸高峰和乙烯跃变高峰没有改变的结果一致, 进一步说明了 *LeETR1* 和 *LeETR2* 对果实膨大生长阶段没有直接的调控作用。转色后转基因果实色泽 *a* 值上升比对照缓慢, *ale1* 着色速度比 *ale2* 更慢 ( $P = 0.05$ ) (图 3)。

随着果实成熟度提高, 番茄红素和类胡萝卜素含量都呈快速上升趋势。转基因果实番茄红素 (图 4, A) 和类胡萝卜素 (图 4, B) 在果实红熟前变化趋势与对照没有明显差异, 红熟后期增

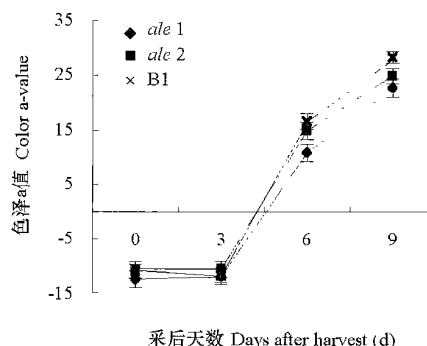


图 3 果实成熟过程中色泽 *a* 值的变化趋势

Fig. 3 The *a*-value of fruit during ripening

加缓慢，在红熟果中的含量显著低于对照果实 ( $P = 0.01$ )。

### 2.3 果实成熟过程中硬度及其相关酶活性的变化

绿熟期多聚半乳糖醛酸酶活性 (PG) 较低，株系间无显著差异。随着成熟度提高各株系 PG 升高，其中 *ale2* 和 B1 增加缓慢，*ale1* 增加速度明显更快。到红熟期 *ale1* PG 比 B1 高 58% ( $P = 0.01$ ) (图 5, A)。果胶酯酶活性 (PE) 增加更缓慢，株系间差异不显著 (图 5, B)。这表明 *LeETR1* 反义表达也增强了多聚半乳糖醛酸酶活性，但对果胶酯酶活性没有影响。

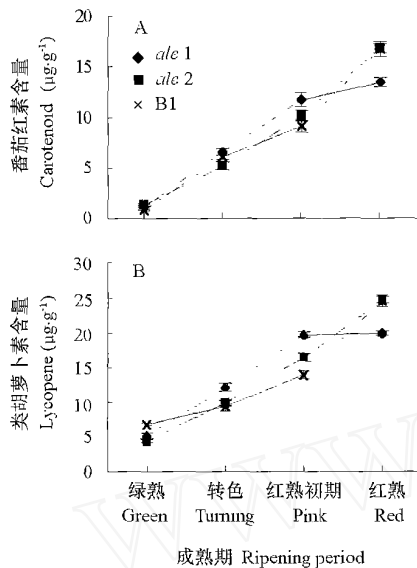


图4 果实成熟过程中色素含量的变化

Fig. 4 Pigments content during fruit ripening

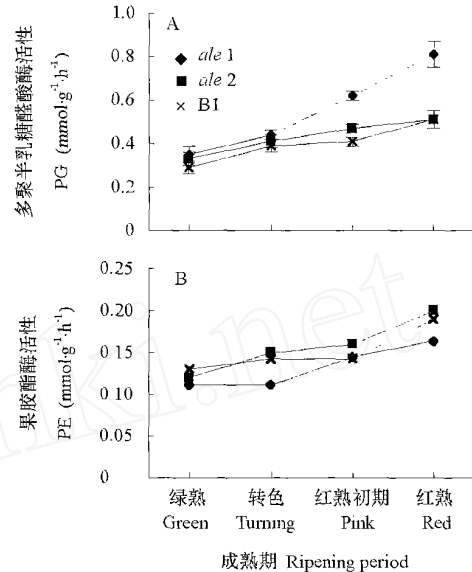


图5 各成熟期多聚半乳糖醛酸酶和果胶酯酶活性的变化

Fig. 5 Activities of PG and PE of fruit during ripening

随着果实成熟到一定阶段，果肉组织迅速软化，果实货架期和品质都会迅速下降。转色初期采收的果实硬度较高，采后都呈一致的下降趋势，株系间差异不大。采收 12 d 后果实充分红熟，*ale1* 采后硬度下降最快，处于最低硬度水平，与对照果实差异显著 ( $P = 0.01$ , 图 6)，表示乙烯受体 *LeETR1* 可能对调控果实硬度变化起着一定作用。

*ale1* 果胶酶活性上升可能是果实硬度快速下降的重要原因。

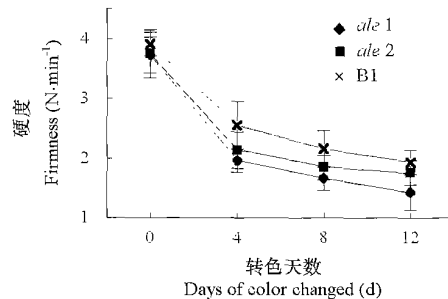


图6 采后果实硬度的变化

Fig. 6 The firmness of fruit during ripening

## 3 讨论

呼吸跃变是跃变型果实成熟和衰老起始的重要特征，色泽和硬度的变化是果实成熟的主要品质指标，硬度是决定果实货架寿命的关键因素。转基因株系 *ale1* 和 *ale2* 与对照株系 B1 比较，呼吸跃变既没有提前也没有峰值的提高；尽管乙烯释放速率增加数倍，乙烯高峰到达的时间没有改变。这说明反义基因表达并没有改变果实成熟起始时间。但是，转基因株系乙烯产量成数倍增加，而呼吸高峰却有所下降，说明乙烯跃变与呼吸速率没有直接的因果关系，它们分别由不同的代谢系统所调控。

根据负调控模型原理，乙烯受体功能缺失可能导致乙烯反应增强，相应地果实成熟可能提前或者加速。但自然状态后熟的 *ale1* 果实颜色转变速度比对照株系 B1 慢，提示乙烯受体基因 *LeETR1* 与果实色素合成系统有一定关系，但并不符合乙烯受体作用的负调控模型。Tiemann 等<sup>[3]</sup>对 *LeETR4* 和 *NR*

都进行了反义抑制研究,反义 *LeETR4*果实着色速度显著加快,反义 *NR*果实则推迟着色或者着色特性没有改变。说明乙烯受体家族各成员对果实成熟色素合成的调控各具分工,其中的机理相对复杂,还有待深入研究。从果实成熟的另一主要特征硬度下降来看, *ale1*果实硬度下降,并且多聚半乳糖醛酶活性上升速度加快,说明 *LeETR1*对果实成熟过程硬度变化有负调控作用。*LeETR1*超表达可能推迟果实成熟、延长采后寿命,这是值得进一步研究的课题。

#### 参考文献:

- Oeller P W, Lu M W, Taylor L P, Pike D A. Theologis a reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science*, 1991, 18, 254 (5030): 437 ~ 439
- Picton S B. Altered fruit ripening and leaf senescence in tomatoes expressing an antisense ethylene-forming enzyme transgene. *Plant J.*, 1993, 3: 469 ~ 481
- Tiemann D M, Taylor M G, Ciardelli A, Klee H J. The tomato ethylene receptors *NR* and *LeETR4* are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97: 5663 ~ 5668
- Lanahan M B, Yen H C, Giovannoni J J, Klee H J. The never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, 1994, 6: 521 ~ 530
- Hackett R M, Ho C W, Lin Z F, Foote H C C, Fray R G, Grierson D. Antisense inhibition of the *Nr* gene restores normal ripening to the tomato never-ripe mutant, consistent with the ethylene receptor-inhibition model. *Plant Physiology*, 2000, 124: 1079 ~ 1085
- Hua J, Meyerowitz E M. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 1998, 94: 261 ~ 271
- Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo A K, Tucker M L. The mRNA for an *ETR1* homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Molec. Biol.*, 1996, 30: 1331 ~ 1338
- Whitelaw C A, Lyssenko N N, Chen L, Zhou D, Mattoo A K, Tucker M L. Delayed abscission and internodes correlate with a reduction in the ethylene receptor *LeETR1* transcript in transgenic tomato. *Plant Physiol.*, 2002, 128: 978 ~ 987
- 薛应龙. 植物生理学实验手册. 上海: 上海科学技术出版社, 1983. 129 ~ 131
- Xue Y L. Plant physiological experiment handbook. Shanghai: Shanghai Science and Technique Publishing Company, 1983. 129 ~ 131 (in Chinese)
- Klee H J. Ripening physiology of fruit from transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum*) plants with reduced ethylene synthesis. *Plant Physiol.*, 1993, 102: 911 ~ 916
- Brown J M A, Dromgool F I, Guest P M. The effects of spectrophotometer characteristics on the measurement of chlorophylls. *Aquat. Bot.*, 1980, 9: 173 ~ 178
- Adsule P G, Dan A. Simplified extraction procedure in the rapid spectrophotometric method for lycopene estimation in tomato. *J. Food Sci. Technol.*, 1979, 16: 216 ~ 216
- Sandmann G. Carotenoid biosynthesis in microorganisms and plants. *Eur. J. Biochem.*, 1994, 223: 7 ~ 24
- 周培根, 罗祖友, 戚晓玉, 吴邦良. 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
- Zhou P G, Luo Z Y, Qi X Y, Wu B L. The relationship between fruit softening and changes in pectin and relative enzymes during ripening of peaches. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 1991, 14 (2): 33 ~ 37 (in Chinese)
- 李忠福, 徐建国. 分光光度法测定果胶酶活性方法的研究. *黑龙江医药*, 2002, 15 (6): 428 ~ 430
- Li Z F, Xu J G. Determination of pectinase activity by spectrophotometry. *Heilongjiang Medical Journal*, 2002, 15 (6): 428 ~ 430 (in Chinese)
- Jackman R L, Marangoni A G, Stanley D W. Measurement of tomato fruit firmness. *HortScience*, 1990, 25 (7): 781 ~ 783