

## 通过表达 ACC 脱氨酶基因控制番茄果实的成熟

宋俊岐 邱并生 王 荣 贺 焰 赵长生 田 波\*

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

**摘 要** 乙烯在跃变型果实的成熟过程中起着触发呼吸跃变和促进果实成熟的作用。细菌来源的 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)脱氨酶能降解乙烯的直接前体 ACC,从而抑制植物体内乙烯的合成。我们用 PCR 方法从假单胞杆菌中克隆到 ACC 脱氨酶基因并通过农杆菌介导的方法将其转入番茄(*Lycopersicon esculentum*)中。再生植株经 Southern blot 检测证明,ACC 脱氨酶基因已整合到番茄基因组中并稳定表达。转基因番茄果实成熟期的推迟时间与体内乙烯的抑制程度有相关性。转基因番茄植株乙烯的合成降低 80%左右,果实在离体条件下可保鲜 75d 左右。研究 ACC 脱氨酶基因在植物体内的作用可阐明高等植物体内乙烯的作用机理并为培育耐贮藏果蔬品种打下基础。

**关键词** 番茄, ACC 脱氨酶, 跃变型果实, 乙烯

学科分类号 Q789

乙烯是高等植物体内五大内源激素之一,广泛参与调节高等植物的许多生理过程<sup>[1,2]</sup>。在跃变型果实的成熟过程中,乙烯起着触发呼吸跃变和促进果实成熟的作用<sup>[3]</sup>,被称作成熟激素。番茄属于呼吸跃变型果实,在储存和运输的过程中,由于成熟过程进展迅速和不可控制,造成果实过熟而引起巨大的经济损失。有效地调控乙烯的生物合成,是解决果蔬贮藏、保鲜的关键。1979 年 Yang 和 Admans 发现 ACC 是乙烯生物合成的直接前体,并确定了植物体内乙烯生物合成的途径。ACC 脱氨酶可将 ACC 降解为丁酮酸和氨,从而降低植物体内乙烯的合成<sup>[4]</sup>。Mansanto 公司的 Klee 等人<sup>[5-8]</sup>从假单胞杆菌中克隆到了 ACC 脱氨酶基因并转化番茄品种 UC82B,得到了果实成熟过程变慢,而其它表型正常的转基因番茄植株。1994 年我们应用 PCR 技术克隆了 ACC 脱氨酶基因<sup>[4]</sup>,本文报道了通过农杆菌介导的方法将该基因导入番茄植株,获得了保鲜期延长的番茄果实。这不仅对研究乙烯的作用机理有重要的理论意义,同时为利用基因工程技术培育我国耐贮藏果蔬品种奠定了基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 番茄品种:丽春,购自中国农业科学院。

1.1.2 工具酶和生化试剂:限制酶其他修饰酶和 PCR 扩增试剂盒购自 Boehringer 公

国家自然科学基金资助项目。

\* 联系人。

收稿日期:1997-01-23,修回日期:1997-08-23。

司。随机引物标记试剂盒购自 Promega 公司, DNA 纯化试剂盒购自 United states biochemical 公司,  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP 为 Amersham 公司产品。MS 培养基及激素购自 Sigma 公司, 其余购自华美公司。

**1.1.3 菌种:** 大肠杆菌 DH5 $\alpha$  为受体菌, 克隆质粒为 pUC19, 植物表达载体为 pROK II, 土壤农杆菌为 LBA4404。

## 1.2 方法

**1.2.1 植物表达质粒的构建和农杆菌转化:** 将含有 ACC 脱氢酶基因的载体用 KpnI 和 BamHI 双酶切, 电泳回收插入片段, 将其克隆到 KpnI 和 BamHI 双切的 pROK II 中(图 1)。通过利福平和卡那霉素筛选, 用 DNA 直接转移法将表达载体导入土壤农杆菌 LBA4404 中。

**1.2.2 叶盘法转化番茄及其再生:** 番茄种子经 10% NaClO 溶液消毒 30min, 无菌水清洗后点播于有灭菌的湿润滤纸的培养皿中, 25 $^{\circ}$ C 暗培养 3d 后转移到 1/2MS 培养基上, 7d 后取出用于转化。在含卡那霉素(50 $\mu$ g/ml)和利福平(100 $\mu$ g/ml)的 YEP 培养基上扩繁带目的基因的农杆菌, 侵染番茄无菌苗子叶 3~5min, 将外植体放置于 MS + ZT(2 $\mu$ g/ml)的培养基上, 25 $^{\circ}$ C 暗培养 48h 后, 转入生芽培养基(MS + ZT 2 $\mu$ g/ml + IAA 2 $\mu$ g/ml + Km 50 $\mu$ g/ml + Cb 500 $\mu$ g/ml)。2 周后, 即可长出愈伤组织, 3~4 周后, 在愈伤组织上长出小芽, 待小芽长出 2~3 个叶片时切下移入生根培养基(1/2 MS + Km 50 $\mu$ g/ml)中。根系发达后移栽到温室。

**1.2.3 转基因植株的 Southern blot 检测:** 用改进的 CTAB 法(Drape J. 等, 1988)<sup>[9]</sup>提取植物叶片总 DNA, 经 KpnI 和 BamHI 完全酶解后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳, 然后将 DNA 转移到 Zeta-Probe 尼龙膜上, 以  $\alpha$ - $^{32}$ P-dCTP 标记的 ACC 脱氢酶编码区序列为探针进行 Southern 杂交。

**1.2.4 子代抗性鉴定:** 转基因植株自交的种子, 经表面灭菌后在 100 $\mu$ g/ml Km 的 1/2 MS 培养基上发芽, 观察幼苗生长情况, 以鉴别植株中是否有 NPT II 基因, 并计算其比率。

**1.2.5 叶片乙烯生成量:** 用打孔器取功能期叶片 10 片, 置青霉素小瓶中, 每隔 0.5h 测定一次乙烯释放量, 连续测定 3h, 每个样品设置 3 次重复。从青霉素小瓶中抽取 100 $\mu$ l 气体, 用岛津 GC-7AG 气相色谱仪分析, 使用 3mm $\times$ 1000mm GDX-401 柱, 氢离子火焰检测器和岛津 C-R3A 记录仪。

## 2 结 果

### 2.1 植物表达质粒的构建

图 2 的结果显示经 KpnI 和 BamHI 双酶切鉴定, 1.0kb 长的 ACC 脱氢酶基因已经整合到植物表达载体 pROK II 中。

### 2.2 转基因植株的 Southern blot 检测

图 3 的结果显示, 转化材料在 1.0kb 处有一条杂交带出现, 未转化材料没有出现任何条带, 说明 ACC 脱氢酶基因已整合到番茄染色体组中。

### 2.3 子代抗性分离

三个转基因植株自交子代在 Km 选择压力下生长的幼苗有抗性分离现象, 不含抗性

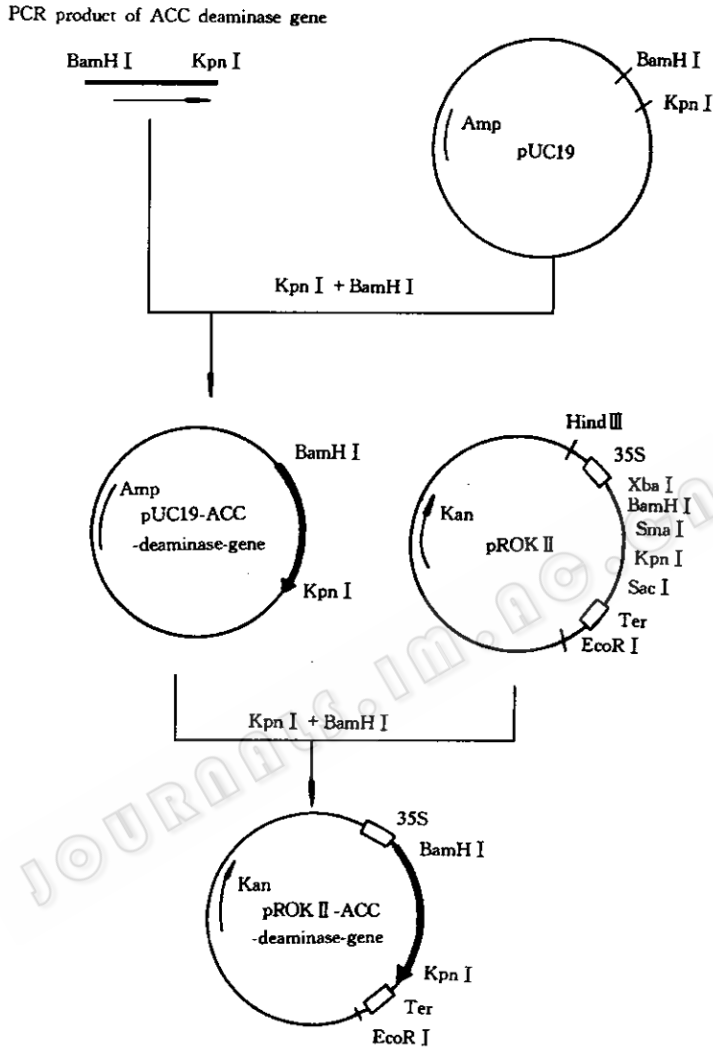


图 1 含 ACC 脱氨酶基因的植物表达载体的构建

Fig. 1 Construction map of plant expression plasmid containing ACC deaminase gene

基因的幼苗,种子发芽后主根短,无须根,下胚轴变黑,随着培养时间的延长,幼苗生长瘦弱甚至死亡。对照苗无抗性分离情况。转基因植株的标记基因在当代( $T_0$ )为显性遗传,在自交后, $T_1$ 出现分离(Table 1),经卡方( $X^2$ )适合性检验表明,在 $T_1$ 代是3:1分离,基本上符合孟德尔遗传规律,说明3个转基因植株基因组中都插入有一个NPT II片段,并能遗传给后代。

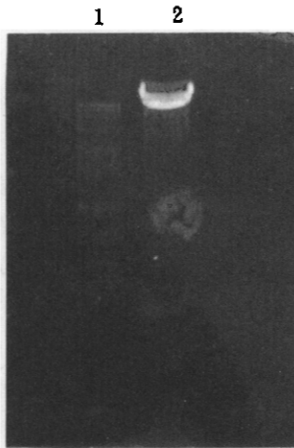


图 2 pROK II-ACC脱氨酶基因酶切鉴定

Fig. 2 Identification of plant expression plasmid pROK II-ACC-deaminase gene  
Lane 1: SppI markers  
Lane 2: pROK II-ACC-deaminase gene digested with KpnI and BamHI

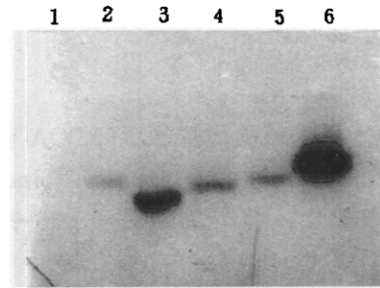


图 3 转基因番茄的 Southern blot 检测

Fig. 3 Southern blot hybridization of transgenic tomato plants

Genomic DNA were digested with KpnI and BamHI, followed by hybridization with ACC deaminase gene probe.  
Lane1, untransformed plant; Lane2 ~ 5, transgenic plants; Lane6, positive control(ACC deaminase gene fragment)

表 1 两种转基因植株子代的抗性分离

Table 1 The segregation of the progenies of two transgenic plants resistant to kanamycin(Km)

Transgenic lines	Km <sup>+</sup>	Km <sup>-</sup>	X <sup>2</sup> (3:1)
C-3	113	30	1.4104 < P0.01
C-25	149	42	0.9232 < P0.01
Total	262	72	2.1118 < P0.01

## 2.4 叶片乙烯生成量的测定

番茄叶片受伤后乙烯释放量的测定结果见图 4。未转基因的番茄植株叶片受伤后, 乙烯释放速率较快, 在 0.5h 内就达到  $0.0076\mu\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ , 1h 时, 乙烯释放量达最大值 ( $0.0094\mu\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ), 然后急剧下降, 到 3h 时, 乙烯释放量降低到  $0.0036\mu\text{g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。两个转基因植株叶片受伤后, 乙烯释放较小, 没有乙烯生成高峰, 表明转基因植株叶片中乙烯的生成受到显著抑制。在乙烯生成高峰期, C-3 和 C-25 转基因植株叶片的乙烯生成仅为对照的 22.7% 和 17.9%。

## 2.5 转基因果实采后生理行为和贮存效果

实验中共获得 14 株转基因植株, 大部分转基因果实在授粉后 57~60d 变红, T<sub>2</sub> 代 C-3 和 C-25 转基因番茄在授粉后 65d 才开始变红, 以“丽春”品种为对照的番茄果实在授粉后 50d 变红。果实在转色期采摘后, 对照样品 2 周后明显软化, T<sub>2</sub> 代 C-25 转基因番茄可保存 75d 左右。

### 3 讨 论

McMurine 等<sup>[10]</sup>提出,植物体内乙烯的合成由两套系统调控,系统 I 存在于非跃变型果实和未成熟跃变型果实中,负责调节基础水平的乙烯合成和创伤诱导的乙烯合成,不能自我催化,系统 II 负责跃变型果实成熟期乙烯的自我催化合成,实验过程中发现,部分转基因植株很难结果,推测可能是外源基因插入植物基因组中的不同位置,影响了植物基础水平的乙烯合成,从而给植物的生长发育带来一定影响,而 Klee<sup>[6]</sup>等报道,转基因番茄除果实成熟外其它的表型和对照一样。

大部分转基因果实比对照推迟 7~10d 变红, T<sub>2</sub> 代 C-25 在授粉后 65d 才开始变红,转色期采摘后可保存 75d 左右,而对照样品采摘 2 周后明显软化,实验中发现,不同的转基因植株所表现的抑制果实成熟的程度是不同的,这是由于基因插入的位置效应和拷贝数的不同造成的,这与 Sheehy 和 Smith 等<sup>[11,8]</sup>的报道是一致的。所以在实验中选择理想的转化个体是获得理想材料的关键环节。目前,我们对转基因植株后代的遗传稳定性、果实的生理生化性状测定及耐贮藏实验的研究正在进行中。

ACC 脱氨酶在转基因植物体内可使 ACC 生成丁酮酸和氨,这些都是植物体内的正常代谢物,丁酮酸是乙酰乳酸合成酶的底物,在体内可转化为分支氨基酸,氨可被植物体再利用,因此可以认为转化 ACC 脱氨酶基因后不会对果实性状产生不利的影 响。Reed 等<sup>[12]</sup>报道,ACC 脱氨酶在成熟期延迟的转基因番茄果实中的含量很低,约占果实鲜重的 0.002%~0.005%,因此很难从番茄组织中提取足够量的 ACC 脱氨酶进行安全性评估。1996 年 Finn 等<sup>[13]</sup>利用疏水作用和离子交换层析的方法分别从大肠杆菌和转化 ACC 脱氨酶基因的番茄植株体内分离纯化 ACC 脱氨酶,并对其进行结构和功能上的分析,结果表明两种来源的蛋白质的分子量、基本氨基酸序列、免疫学活性和酶活性都基本一致,而且都没有糖基化,从而证明可以用从大肠杆菌中纯化得到的 ACC 脱氨酶来评价 ACC 脱氨酶在番茄中的安全性。Reed 等<sup>[7]</sup>所进行的小鼠饲喂试验表明,ACC 脱氨酶可以很快降解。反义基因可能只作用于相应植物的目的基因,因而不同种类的果实需要不同的反义基因才能达到保鲜的目的,而应用 ACC 脱氨酶基因则没有种属特异性的限制,它可以在不同的植物体内发挥作用。

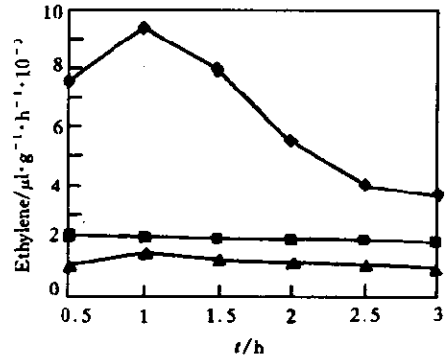


图 4 转基因植株叶片受伤后乙烯释放量的测定  
Fig. 4 Ethylene generation of wounded leaves by C-25 and C-3 transgenic and control tomato plant

—◆— Control; —■— C-3; —▲— C-25

## 参 考 文 献

- 1 Abeles F B. Ethylene in Plant Biology Academic, New York, 1973, 1~302
- 2 Lieberman M. Plant Physiol, 1979, 30:533~591
- 3 James L. E. Developmental Biology, Pro Natl Acad Sci, 1987, 84:2793~2797
- 4 邱并生, 王晋芳, 田 波等, 微生物学通报, 1994, 21(3):162
- 5 Honma M. Agric Biol Chem. 1983, 47(3):617~618
- 6 Klee H J. The Plant Cell, 1991, 3:1187~1193
- 7 Reed A J. J Agric Food Chem, 1996, 44:388~394
- 8 Smith C J S. Nature, 1988, 334:724~726
- 9 Drape J. Plant Genetic Transformation and Gene Expression (A Laboratory Manual), The Alden Press, 1988, 01~236
- 10 McMurrine E J. Nature, 1972, 287:235~236
- 11 Sheehy R E. Mol Gen Genet, 1987, 208:30~36
- 12 Reed A J. J Agric Food Chem, 1995, 43:1954~1962
- 13 Finn R F. J Agric Food Chem. 1996, 44:381~387

## The Manipulation and Modification of Fruit Ripening by Expression of ACC Deaminase Gene in Tomato

Song Junqi Qiu Bingsheng Wang Rong He Yan Zhao Changsheng Tian Po

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

**Abstract** The gene encoding ACC deaminase was cloned by PCR and introduced into tomato plants by *Agrobacterium*-mediated transformation. The Southern and Western blot analysis demonstrated that the gene has been integrated into tomato genome and expressed. There's a correlation between the degree of ethylene inhibition and delay in the process of fruit ripening in transgenic tomato fruits. Fruits from these plants exhibited significant delays in ripening and keep fresh for at least 2 months *in vitro*. In the line best expressing ACC deaminase gene, synthesis of ethylene in plants was reduced by 80%.

**Key words** Tomato, ACC deaminase, climacteric fruit, ethylene