

果实保鲜的基因工程

张竞秋 武泰存 王景安*

天津师范大学化学与生命科学学院, 天津 300074

Gene Engineering of Fruits Fresh Keeping

ZHANG Jing-Qiu, WU Tai-Cun, WANG Jing-An*

College of Chemistry and Life Science, Tianjin Normal University, Tianjin 300074, China

提要 介绍了近几年来采用转基因或反义RNA技术, 将果实成熟过程中的相关基因转化到植物体内以延长果实保鲜期的研究进展。

关键词 果实; 乙烯; 基因工程

呼吸跃变型的果实, 如番茄、香蕉、苹果、蜜瓜等在储存和运输过程中, 由于成熟过程进展迅速和难以控制, 常常因为过熟而腐烂变质, 引起巨大的经济损失。本文就近几年来采用转基因或反义RNA技术, 将乙烯生物合成与分解过程中所需酶的基因和细胞壁水解酶基因转化到植物体内, 以延长果实成熟和保鲜期的研究进行介绍。

1 乙烯对果实成熟的作用

乙烯(ethylene, ETH)是一种不饱和碳氢化合

物, 其结构式为 $\text{CH}_2 = \text{CH}_2$, 具有显著的催熟作用, 发动呼吸跃变和促进成熟, 被认为是成熟激素。乙烯合成的增加是果实成熟启动最好的分子标记。因此, 内源乙烯的显著变化是跃变型果实成熟的重要调节步骤。1979年Adams和Yang发现1-氨基丙烷-1-羧酸(1-amino-cyclopropane-1-carboxylate, ACC)是乙烯生物合成的直接前体, 并确定了植物体内乙烯合成的生物途径(图1)。

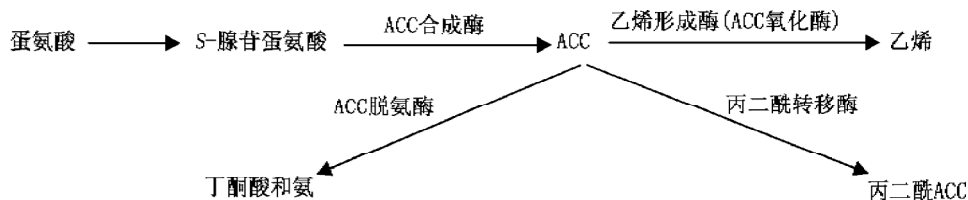


图1 乙烯的生物合成途径

2 与果实成熟相关的调控基因

ACC合成酶(1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase, ACS)、ACC氧化酶(1-amino-cyclopropane-1-carboxylate oxidase, ACO)和ACC脱氨酶(1-amino-cyclopropane-1-carboxylate deaminase, ACCD)均与乙烯合成直接有关。ACS是乙烯形成的关键酶, 由多基因家族编码, 各个基因协同表达, 每个基因都有自己的转录特性, 近年来不断揭示出果实中ACS基因家族中的新成员; ACO是一种与膜结合的酶, 此酶具有结构上的立体专一性, 其内部存在正反馈调控, ACO和ACS基因协同表达影响乙烯的形成, 进而控制着果实的成熟过程。ACCD可将ACC降解为丁酮酸和氨, 从

而降低植物体内乙烯的合成量。

果实成熟过程中, 多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonases, PG)参与果胶的分解, 可将细胞壁中的多聚半乳糖苷降解, 从而在果实软化中起作用。果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PE)可将细胞壁中的果胶去甲基, 使细胞壁软化, 并减少果实中的可溶性固形物的含量。纤维素酶(cellulase, EG)活性与果实早期成熟软化的启动有关。

收稿 2006-01-10 修定 2006-05-15

资助 天津市应用基础研究重点项目(033803711)。

* 通讯作者(E-mail: jingawang899@126.com, Tel: 022-23537629)。

3 果实保鲜中的基因工程

3.1 抑制乙烯合成与乙烯合成相关的酶基因

3.1.1 ACC合成酶基因 Oeller等(1991)将ACS的基因 *LE-ACC2* 反向插入载体并转化番茄后, 乙烯合成降低 99.5%, 果实无呼吸高峰出现, 控制果实成熟已获得成功, 并已投入商业化生产。这种转基因果实在空气中放置不能正常成熟, 不出现呼吸跃变, 番茄红素合成和叶绿素降解受阻, 果实不能正常变红和变软, 只有通过外源乙烯处理, 反义抑制才会改变, 果实也才可正常变红变软, 成熟后的质地、颜色、气味和耐压性与天然番茄没有明显差异。既延长了果实的保鲜期, 又不改变其自然品质。因此, 用反义RNA技术控制ACS基因表达, 从而抑制乙烯合成是一条确实可行而且能快速地培育耐贮藏果实的有效途径。

国内先后也有人用反义基因技术进行这方面的工作。汤福强和刘愚(1994)用ACS基因和反义基因转化番茄得到转基因植株, 含ACS基因的转化植株叶片乙烯释放比未经转化的植株增加37%~300%, 植株生长异常, 离体叶片衰老加速。含ACS反义基因的植株也正常开花, 但其离体叶片乙烯释放量只有未经转化植株的0~18%, 衰老也缓慢得多。

罗云波和申琳(1995)用ACS反义基因转入番茄, 也获得转基因植株。马庆虎和宋艳茹(1997)把从番茄果实中分离得到的ACS的cDNA反向插入和在CaMV 35S启动子的控制下, 转入烟草, 这种异源反义基因能在烟草中表达, 并抑制烟草内源乙烯的合成。王春霞和简志英(1997)将番茄的ACS基因正义和反义转入西瓜, 正义转基因植株的乙烯释放比未转基因的增加80%左右, 两个反义转基因植株的乙烯释放分别为未经转基因的67%和78%。李天然和马庆虎(1999)将番茄ACS反义基因转入河套蜜瓜, 也获得转基因植株。

刘传银(1998)克隆了ACS的cDNA, 并用反义RNA技术在番茄中表达, 从而抑制果实成熟。受克隆的ACS基因插入1个二元载体pbin437中, 反向插入到带有增强子的CaMV35S启动子和3'端转录终止序列之间, 构成一个表达载体pBACC, 转化番茄子叶, 得到了转基因番茄。转基因番茄果实的乙烯释放量比非转基因番茄果实现明显减少

30%。ACS反义RNA抑制果实成熟的作用在转基因植株及其后代T₁中检测到, 在室温条件下转基因番茄果实的保鲜期最少为60d, 硬度和色泽并没有大的改变。用乙烯处理转基因果实15~20d后大部分果实成熟。分析T₁代的结果表明, 反义ACS基因在转基因番茄后代中单基因稳定遗传。转基因纯合体特异反义ACS的RNA在T₂代仍有延长番茄保鲜期的作用。

Wang和Peng(2001)克隆到香蕉果实ACS基因的启动子, 并研究其启动子功能的结果表明, 2.5kb的启动子连到带有GUS的cDNA序列上, 用微弹轰击法分别转入到香蕉叶、根和果实细胞中, 结果获得的启动子片断能引导果实特异基因的表达。

魏绍冲等(2003)研究番茄中乙烯受体基因*LeETR1*和*LeETR4*的克隆和表达, 结果显示, 两受体基因的表达在番茄果实成熟过程中变化不明显, *LeETR4*在同一时期的果实外果皮中表达水平低于其在辐射壁和中柱的表达。转反义ACS番茄果实中*LeETR1*和*LeETR4*的表达水平明显低于野生型番茄果实, 外源乙烯处理转反义ACS番茄果实, 可促进两个受体基因的表达。

3.1.2 ACC氧化酶基因 ACC氧化酶是乙烯生物合成途径中最后一个酶, 催化ACC向乙烯转化, 为乙烯生物合成途径的一种限速酶。

Yub和Guis(1996)用ACO的反义RNA技术转化甜瓜后, 转基因果实中的乙烯含量小于未转化植株的1%, 甜瓜的成熟过程受抑。

Blume和Grierson(1997)将ACO的启动子连接到番茄和白花丹醌烟草中, 该启动子的表达受发育和环境刺激的调节。在番茄中ACO由一个小的多基因家族编码, 包含3个成员, 即*LEACO1*、*LEACO2*和*LEACO3*。ACO基因表达后乙烯量显著增加, 并引起病原微生物的侵染。组织分析衰老的叶片和成熟果实果皮中GUS活性的结果表明: 在叶片中, 开始衰老叶片当中GUS活性是嫩叶中的300倍, 其活性随叶片的发育程度递增; 在果实的果皮中, IM (immature green)时期只能检测到很低的GUS活性, MG (mature green)时期GUS活性开始增加, 当果实颜色开始改变3d后, GUS活性达到峰值, 此时活性为IM时期

果实的50~60倍,随后GUS活性开始下降。比较表明,衰老叶片中的GUS活性值高于成熟果实果皮中GUS活性的峰值。

叶志彪等(1996)将ACO基因的cDNA反义转入番茄,所获得的转基因植株在常温条件下可贮藏88d,显著长于亲本。他们用番茄转基因系与常规品种杂交选育出了耐贮藏的番茄新品种‘华番一号’,这是我国第1个商品化生产的农业基因工程产品。

饶景萍等(2002)在柿果实中用兼并引物扩增出两个ACO的cDNA片段:其中DK-ACO1由834个碱基组成,编码259个氨基酸;DK-ACO2为836个碱基,编码260个氨基酸。它们均具有其它植物ACO中存在的保守区,且在多肽水平上的同源性很高,DK-ACO1与番茄LE-ACO1的同源性是86.2%,与DK-ACO2的同源性是82.5%;DK-ACO1与甜瓜CM-ACO1的同源性是82.6%,与DK-ACO2为81.1%。据了解,有关柿的两个ACO基因与其果实成熟衰老的关系,以及在成熟软化过程中表达调控的特异性的研究尚在进行中。

3.1.3 ACC脱氨酶基因 ACC脱氨酶基因可将ACC降解为丁酮酸和氨,从而降低植物体内乙烯的合成。苏少泉(1992)报道了丁酮酸是乙酰乳酸合成酶的底物,在体内可转化为缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸,氨可为植物体再利用。因此可以认为,转化ACCD基因后不会对果实性状产生不利的影响。Klee和Hayford(1991)从土壤细菌假单孢杆菌中克隆到ACCD基因(其表达产物能够分解ACC),并转化番茄得到转基因植株,成熟过程中有90%~97%的乙烯产量受抑制。将转基因番茄放在室温下贮藏,其果实软化过程明显减慢,4个月仍不变软,除果实成熟特性以外的其它表型均和未经转化番茄的一样。未经转化的番茄果实只能存放2周。

宋俊岐等(1998)应用PCR技术克隆了ACCD基因,并于1998年通过农杆菌介导的方法将ACCD基因导入番茄,获得保鲜期延长的番茄果实。其再生植株经Southern杂交检测证明,ACCD基因已整合到番茄基因组中并稳定遗传表达。其乙烯合成降低80%左右,果实在离体条件下可保鲜75d左右。

张智俊(2002)将ACCD基因转入哈密瓜中,也获得转化植株,其果实的储藏期和供应期均延长。

杨甲定和钟海文(2002)用农杆菌转化白兰瓜子叶,获得转ACCD基因的白兰瓜植株3株,在组织培养过程中,没有观察到白兰瓜转基因再生植株与未转基因植株在形态学上的差异。他们进一步比较3株转基因白兰瓜植株中的酶活性,从植株A中检测的ACC脱氨酶的活性最低,而植株B和D中则比较高。说明虽同为转基因植株,但外源ACC脱氨酶基因的表达水平却有明显差异。

3.2 抑制细胞壁的降解与细胞壁降解有关的酶

3.2.1 多聚半乳糖醛酸酶(PG) 在果实成熟过程中,果实软化和细胞壁降解密切相关。PG是细胞壁降解主要酶类,可将细胞壁中的多聚半乳糖苷降解,引起果实软化。

骆蒙等(1996)研究河套蜜瓜中PG活性的结果表明,PG活性增加与果实软化呈平行相关,而与内源乙烯变化趋势一致;以乙烯利处理后的该酶活性与乙烯生成量呈正相关。

Kalaitzis等(1997)从番茄衰老的叶和花的PG中获得3个cDNA:TAGP1、TAGP2和TAGP4,三者的同源性达76%~93%。未见到它们在果实、茎、叶柄和花药中表达。TAGP4比另外两者转录得早。

马庆虎等(1999)从肥城桃成熟果实的PG基因中克隆到的cDNA长1188bp,包括一个由393个氨基酸组成的开放阅读框架。RT-PCR分析表明,肥城桃叶片中检测不到PG编码的mRNA,但在果实中其表达量却非常丰富,认为肥城桃PG基因的cDNA在果实中是特异表达的。这表明通过反义RNA转基因技术改善肥城桃的采后品质是有前景的。

据李曜东等(2002)报道,不同成熟期和存放前后的转反义PG基因番茄果实,其果皮外面几层细胞厚度比未转基因的厚1~5mm,细胞结构、细胞质和细胞核的状态都有明显区别,尤以贮藏后更为明显,未转基因果实的果皮结构解体、细胞质凝聚、细胞核变模糊程度都比转基因的严重。用外源乙烯处理后,转基因和未转基因果实的细胞结构呈相似的变化。这些结果显示,反义

PG 基因的转入可降低 PG 活性和减弱外源乙烯的作用, 从而延缓果实的衰老和提高耐贮性能, 起到果实保鲜的效果。

Jiménez-Bermúdez等(2002)用反义果胶酸盐裂解酶基因调控草莓果实变软。草莓采后的保鲜期之所以短, 主要是由于短期内坚固结构的丧失。为了调控草莓变软, 他们用 35S 启动子调控, 获得了带有草莓果胶酸盐裂解酶基因反义序列的转基因草莓。获得的 41 个独立的转基因系放在温室中繁殖并进行农艺性状分析的结果表明, 与非转基因的草莓相比, 转基因系发生了改变, 大多数转基因系的果实坚硬。有 6 个转基因系的成熟果实中果胶酸盐裂解酶活性比非转基因的低 30%, 其中有 3 个转基因系的果胶酸盐裂解酶基因完全受到抑制。这说明用果胶酸盐裂解酶基因延缓果实变软也是一个值得考虑的途径。

3.2.2 果胶甲酯酶(PE) PE可将细胞壁中的果胶去甲基, 使细胞壁软化, 并减少果实中的可溶性固形物含量。在许多植物器官和组织中, 包括成熟的果实中都可检测到 PE 活性。PE 的生理意义是为 PG 作用准备底物, 对果胶物质的降解起辅助作用。

Tucker和Zhang (1996)已克隆到PE基因cDNA并构建了 35S 启动子控制下的反义基因。此种反义基因在转基因番茄中表达后果实中的 PE 活性大大降低, 但对叶片或根部的 PE 活性没有抑制作用。转基因果实中 PE 活性为非转基因的 10% 以下, 检测不到 PE 蛋白和 PE mRNA。低 PE 活性的果实与非转基因的果实相比, 其果胶分子量较大, 甲酯化过程和番茄红素堆积不受影响。这些结果表明 PE 在果实细胞壁代谢中可延缓果实的衰老, 因而果实得到保鲜贮藏。

3.2.3 纤维素酶(EG) 薛炳焯和束怀瑞(2002)认为 EG 活性与果实早期成熟软化的启动有关。编码番茄 EG 的 2 个 cDNA 已得到鉴定, 一个与未成熟果实中丰富的 mRNA 相关, 但在成熟果实中则检测不到, 在完全成熟时又急剧积累; 另一个 EG cDNA 与只在完全成熟时表达的 mRNA 相关, 说明番茄在果实发育过程中 EG 的表达不同, 生理功能也不同。

Tucker等(1988)从 2.0 kb 的 EG mRNA 得到了

部分 cDNA 克隆, 之后得到了 1.7 kb 的 cDNA 全序列, 包括含有编码信号肽的 1 485 bp 的开放阅读框, 它的碱基序列和氨基酸序列与成熟鸭梨 EG 的同源性分别为 64% 和 50%。Bonghi 等(1998)用桃叶片的 RNA 克隆到 753 bp 的 EG cDNA, 研究认为 EG 参与果实早期生长和起始软化, 这两个阶段的 EG 由不同的基因编码, 且激素对它们的调节也不相同。目前尚未见到用 EG 基因转化作物获得转基因植物的报道。

起始于上世纪 70 年代的 EG 基因克隆的研究主要集中在酸性纤维素酶方面, 发展非常迅速。到 2003 年胡利勇和钟卫鸿已从里氏木霉 (*Trichoderma reesei*) 克隆到 *ebh I*、*ebh II*、*ebh III*、*ebh IV*、*eg I*、*eg III* 和 *bg 7* 个 EG 基因, 都在大肠杆菌中都可以表达, 这些基因的核苷酸序列也已检测。但是 EG 在大肠杆菌中的分泌表达水平很低, 而且提取有很大困难, 所以人们将目光转向了真核表达系统。

4 结语

综上所述, 应用转基因技术和反义 RNA 技术延长果实保鲜期已取得了显著的成效, 显示出非常诱人的应用前景。但是目的基因的选择至关重要, 也应开展研究, 另外, 以下几方面也值得探讨:

(1) 应选择果实成熟过程中起最关键作用的基因作为目的基因进行转基因研究, 这样才能有效延长果实保鲜期。如呼吸跃变型果实对乙烯敏感, 所以控制乙烯合成有可能有效控制果实的成熟和软化。但对非跃变型果实来说, 控制乙烯合成对延缓果实成熟和软化的效果并不明显。

(2) 由于与果实成熟相关的基因大多属于多基因家族, 它们受不同的因子调控, 用其中成熟软化型成员的反义基因转化可能会更有效, 而用其它成员, 可能不一定有效。

(3) 反义基因可能只作用于相应植物的目的基因, 所以不同种类的果实需用不同的反义基因来达到保鲜的目的, 而 ACC 脱氢酶基因没有种属特异性的限制, 它可在不同的植物体内起作用。因此, 要想有目的地控制果实成熟软化和保鲜, 必需弄清楚与果实成熟软化有关的每个基因的具体功能和它的时空表达模式及其调控因子, 对这类问

题应该从基础工作着手, 开展研究。

参考文献

- 胡利勇, 钟卫鸿(2003). 纤维素酶基因克隆及其功能性氨基酸研究进展. 生物技术, 13 (2): 43~45
- 李天然, 马庆虎(1999). 番茄ACC合成酶反义基因对河套蜜瓜的转化. 植物学报, 41 (2): 142~145
- 李曜东, 顾淑荣, 魏玉凝, 周馥, 赵敬芳(2002). 转反义PG基因番茄果实细胞变化的研究. 植物学通报, 19 (3): 348~353
- 刘传银(1998). 番茄ACC合成酶cDNA克隆及其对果实成熟的反义抑制. 生物工程学报, 14 (2): 139~146
- 骆蒙, 方天祺, 张治中, 李天然(1996). 甜瓜成熟期间多聚半乳糖醛酸酶与乙烯的变化和果实软化的关系. 植物生理学通讯, 32 (5): 338~341
- 罗云波, 申琳(1995). 番茄中ACC合成酶反义基因的导入与乙烯生物合成的控制. 农业生物技术学报, 3: 38~44
- 马庆虎, 宋艳茹(1997). 在转基因烟草中表达番茄ACC合成酶反义基因及其对芽再生的影响. 植物学报, 39 (11): 1047~1052
- 马庆虎, 王莉梅, 宋艳茹, 朱至清(1999). 肥城桃中多聚半乳糖醛酸酶基因的分离及其表达研究. 植物学报, 41 (3): 263~267
- 饶景萍, 杨书珍, 中野隆平, 稻叶昭次(2002). 柿果实ACC氧化酶cDNA的克隆及其序列分析. 中国农业科学, 35 (6): 695~699
- 宋俊岐, 邱并生, 王荣, 贺焰, 赵长生, 田波(1998). 通过表达ACC脱氨酶基因控制番茄果实的成熟. 生物工程学报, 14 (1): 33~38
- 苏少泉(1992). 支链氨基酸生物合成与除草剂品种开发. 农药译丛, 14 (2): 1~6
- 汤福强, 刘愚(1994). ACC合成酶基因及其反义基因转化番茄获得转基因植株. 科学通报, 39 (24): 2280~2283
- 王春霞, 简志英(1997). ACC合成酶基因及反义基因对西瓜的遗传转化. 植物学报, 39 (5): 445~450
- 魏绍冲, 朱本忠, 罗云波, 蔚变云(2003). 乙烯受体基因*LeETR1*和*LeETR4*的克隆及在番茄果实中的表达. 农业生物技术, 11 (2): 127~130
- 薛炳焯, 束怀瑞(2002). 应用基因工程改良果实成熟特性研究进展. 山东农业科学, 4: 49~51
- 杨甲定, 钟海文(2002). ACC脱氨酶基因转化白兰瓜的初步研究. 西北植物学报, 22 (5): 1044~1049
- 叶志彪, 李汉霞, 郑用璉, 刘后利(1996). 反义ACC氧化酶基因的导入对乙烯生成的抑制作用. 华中农业大学学报, 15 (4): 305~307
- 张智俊, 罗淑萍, 廖康, 赵长生(2002). 哈密瓜转ACC脱氨酶基因再生植株的获得. 上海农业学报, 18 (2): 10~14
- Adams DO, Yang SF (1979). Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. Proc Natl Acad Sci USA, 76: 170~174
- Blume B, Grierson D (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. Plant J, 12 (4): 731~746
- Bonghi C, Ferrarese L, Ruperti B, Tonutti P, Ramina A (1998). Endo- β -1, 4-glucanases are involved in peach fruit growth and ripening, and regulated by ethylene. Physiol Plant, 102: 346~352
- Jiménez-Bermúdez S, Redondo-Navado J, Muñoz-Blanco J, Caballero JL, López-Aranda JM, Valpuesta V, Pliego-Alfaro F, Quesada MA, Mercado JA (2002). Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. Plant Physiol, 128: 751~759
- Kalaitzis P, Solomos T, Tucker ML (1997). Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern. Plant Physiol, 113: 1303~1308
- Klee HJ, Hayford MB (1991). Control of ethylene synthesis by expressing of bacterial enzyme in transfer gene in tomato plant. Plant Cell, 3: 1187~1193
- Oeller PW, Lu MW, Taylor LP, Pike DA, Theologis A (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science, 254: 437~439
- Tucker G, Zhang J (1996). Expression of polygalacturonase and pectinesterase in normal and transgenic tomatoes. Prog Biotech, 14: 347~354
- Tucker ML, Sexton R, Campillo E, Lewis LN (1988). Bean abscission cellulase: characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin. Plant Physiol, 88: 1257~1262
- Wang XL, Peng XX (2001). Cloning of promoter of banana fruit-specific ACC synthase gene and primary study on its functions. Chin J Biomed Engineer, 17 (3): 293~296
- Yub RA, Guis M, Amor MB, Gillot L, Roustan JP, Latché A, Bouzayen M, Pech JC (1996). Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits. Nat Biotechnol, 14 (7): 862~866