

转反义 ACC 合成酶基因番茄与普通番茄果实 植物内源激素含量的变化

生吉萍, 罗云波, 申琳

(中国农业大学食品学院, 北京 100094)

摘要: 转反义 ACS(ACC 合成酶基因)番茄与普通番茄果实激素平衡方式不同。普通丽春番茄果实采前 IAA、Z+ZR(玉米素+玉米素核苷)逐渐下降, GA 在花后 40d 出现高峰, 之后逐渐下降; ABA 呈递增趋势; IAA/ABA 花后 20d 最高, 花后 40d 至果实变色期变化不显著, 但果实粉红色期至红色期 IAA/ABA 显著下降。转反义 ACS 番茄表现了与丽春番茄不同的变化趋势, 其 IAA/ABA 从花后 20d 至绿熟期呈上升趋势, 而绿熟期至腐败期缓慢下降。转反义 ACS 番茄生长类激素的含量在果实生长发育时期(绿熟期之前)与普通番茄没有显著差异, 但在成熟衰老时期显著地高于普通番茄。

关键词: 转基因番茄; IAA; GA; ABA; 玉米素+玉米素核苷; 乙烯

中图分类号: S641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0578-1752(2000)03-0043-06

果实的发育过程受多种植物内源激素的调控, 其中乙烯是公认的植物成熟衰老激素^[5]。番茄为呼吸跃变型果实^[6,7], 它复杂的发育及成熟衰老过程亦受多种激素平衡作用的影响, 另外, 由于番茄成熟衰老阶段明显、经济价值高、自花授粉、生长周期短、基因组结构相对简单等特点, 使其成为研究果实生理的一种经典材料^[1]。将反义 ACS 基因转入番茄子叶, 得到了乙烯合成受抑制的转基因番茄, 在没有乙烯合成的情况下, 番茄果实的成熟衰老受抑制, 果实不变红, 硬度较大, 耐失水, 在室温下可贮藏 2 至 3 个月^[2]。但目前对转基因番茄的采后生理方面的研究报道不多。转反义 ACS 番茄和普通番茄的比较研究, 尤其是激素间的协调和作用, 将能对进一步认识果实成熟衰老机制以及激素的作用有重要的理论意义。

1 材料与方法

1.1 材料

试验于 1997 年春至 1999 年在中国农业大学进行。转反义 ACS 基因(丽春)番茄纯合体, 由中国农业大学食品学院采后生物技术实验室培育^[2]。丽春番茄和转反义 ACS 番茄于 1997 和 1998 年在中国农业大学西区科学园种植。花期标记, 采摘开花后一定成熟时期的番茄果实进行分析研究。本研究生理指标的测定采用完全随机试验设计, 设 3 次重复。

1.2 方法

1.2.1 番茄果实成熟期的划分 参考美国番茄成熟度分级国家标准^[3], 绿熟期(MG), 已达到商业成熟, 全果深绿; 转色期(BR), 外观开始微显红色, 显色 < 10%; 变色期(TU), 果实淡红色, 显色 60% ~ 90%; 粉红期(PINK), 果实近红色, 显色近 100%; 红熟期(RED), 果实

收稿日期: 1999-08-11

基金项目: 国家自然科学基金, 国家杰出青年基金(39825118)和农业部“九五”重点资助项目

作者简介: 生吉萍(1967-), 女, 山东莱阳人, 讲师, 博士, 从事果蔬采后生理研究与教学工作。

深红色,果实略发软。转基因番茄采后 15d 后开始转黄,以采后 30d 取样测定作为黄色期 (YELLOW) 代表;腐败期 (ROT) 为采后 90d 取样作代表值。

1.2.2 IAA、GA、Z+ ZT 和 ABA 含量的测定 采用 ELISA 法^[4],稍加改动。精确称取 1g 果实材料,加 2m l 样品提取液,在冰浴下研磨成匀浆(一定要磨细),转入 Eppendorf 管,再用 2m l 提取液分次冲洗研钵,并转入试管中,摇匀。然后过 C18 柱,杂交测定。激素含量单位为: $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$

1.2.3 果实乙烯释放量的测定 用打孔器取果实组织圆片,置于青霉素小瓶中,密闭 1h 抽取气样。果实乙烯释放量的测定将果实在容器中密闭 1h 后取样。用 GC-9A Shim adzu 气相色谱仪测定乙烯浓度。气谱条件为:载气 N_2 ,压力 $1.2 \text{kg}/\text{cm}^2$;氢气 $0.7 \text{kg}/\text{cm}^2$,柱温 80°C ,检测温度 120°C ,氢火焰离子检测器 (FID) 检测。

组织切片培养液的配制: 0.6Mol/L 山梨醇和 0.5Mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.8)。

2 结果与分析

2.1 丽春番茄果实不同发育阶段 5 种激素含量的变化

普通番茄果实中存在 5 种内源激素,它们在果实生长发育及成熟衰老的不同时期含量不同(图 1)。

IAA(吲哚乙酸)在果实发育早期含量相对较高,20d 时为 $152.5 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。随着果实的长大,含量逐渐下降,但第 30 天至绿熟期,IAA 含量变化不大,此时维持较高水平的 IAA 含量,有利于果实的发育。果实绿熟期之后,随着成熟的到来,IAA 含量逐渐降低,至红熟期降至最低点,为 $7.4 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

GA(赤霉素)在果实的生长前期含量较低,随着果实发育天数的延长和果实的膨大,GA 含量逐渐增加,至花后 40d 出现 GA 高峰,峰值为 $68.3 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,随后果实膨大期完成,进入成熟阶段,GA 含量也逐渐下降,至红熟期为最低。

Z+ ZR 为番茄果实细胞分裂素之一,果实发育初期,果实主要是进行细胞分化,细胞数目增加很大,但果实体积变化不大,此时果实中的 Z+ ZR 呈整个发育过程中的最高值,如花后 20d 果实中的 Z+ ZR 含量为 $80.4 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。随着细胞分化的完成,Z+ ZR 含量亦呈逐渐下降,到红熟期呈最低水平。

ABA(脱落酸)也是促进果实成熟衰老的重要激素,ABA 的含量影响着果实的生理年龄。由图 1 可见,幼龄期果实的 ABA 含量很低,随着果实的长大与成熟,ABA 含量呈上升趋势,并且在果实的转色期至红色期,ABA 大幅度上升,至红熟期达最高为 $79.9 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

乙烯为最重要的果实衰老激素,采后番茄果实绿熟期乙烯释放量最低,仅为 $0.2 \text{nl} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$,随着果实的成熟,乙烯含量增加,在粉红色期达乙烯释放高峰,为 $98.0 \text{nl} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW} \cdot \text{h}^{-1}$,随后下降。

2.2 转 ACS 番茄果实 4 种内源激素含量的变化

转 ACS 番茄果实由于其自身没有乙烯的生物合成,激素之间的原有平衡关系被打破,果实在另外一种状态,各种激素达成了新的平衡,如图 2。

IAA 在果实发育过程上下波动,在 40d 时出现第一个高峰,为 $188.0 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。在果实绿熟期又下降至 $112.2 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。随着叶绿素的降解,果实转色期 IAA 出现第二个高峰,且此时 IAA 的浓度达 $252.9 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$,比生长发育时期的平均值 $169.8 \text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$

还高 $83.1 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

促进果实细胞分裂的 Z+ZR 在花后 30d 出现高峰, 随后下降。促使果实细胞膨大的 GA 在 40d 出现高峰, 为 $30.3 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 但为什么果实在黄色期又出现一个 GA 高峰, 为 $32.9 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 还有待于深入研究。

ABA 为转 ACS 番茄中的唯一的成熟衰老激素, 它的含量较普通丽春番茄高, 有显著差异, 特别是在采后的各个时期, ABA 含量上升较快, 在转色期达到最高峰 $212.7 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 在黄色期有所下降, 但腐败期又迅速上升, 达 $206.5 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 。

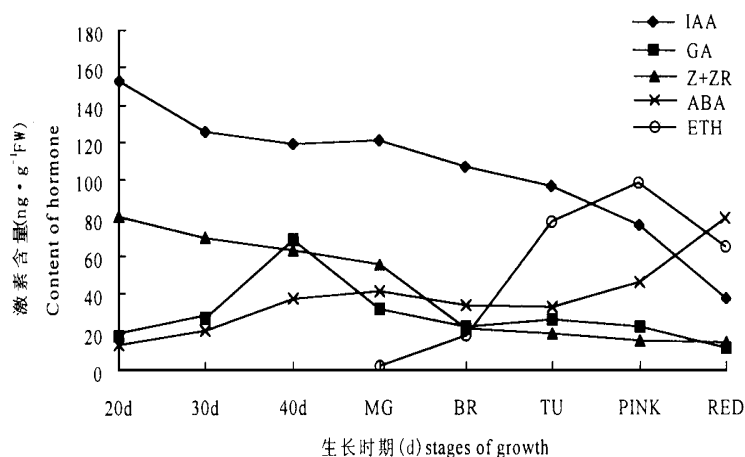


图 1 丽春果实不同生长时期内源激素的含量

Fig. 1 Content of hormone at different stages of Lichun

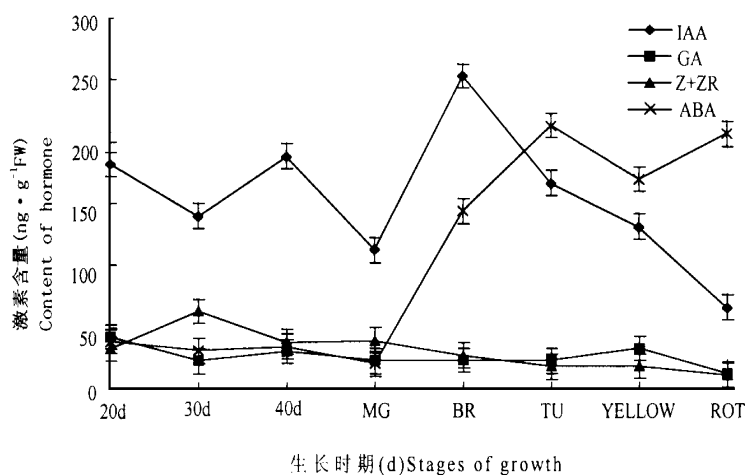


图 2 转 ACS 番茄果实不同生长时期内源激素的含量

Fig. 2 Content of hormone at different stages of transgenic tomato fruits

2.3 两类番茄生长类激素含量的变化

图 3 可见, 转反义番茄生长类激素含量, 即 IAA、GA、Z+ ZR 的含量总和在花后 20d、30d 和 40d 分别为 256.7、225.1 和 256.2 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 而普通番茄生长类激素含量此期分别为 250.4、222.4 和 250.7 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 没有显著差异。可见, 转反义 ACS 番茄果实的大小和发育维持正常状态, 与生长类激素含量有关。果实的绿熟期(MG)转反义番茄和普通番茄的生长类激素含量分别为 173.6 和 208.2 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$, 普通番茄较高。从转色期(BR)之后, 果实逐渐走向衰老, 转反义 ACS 番茄的生长类激素含量逐渐下降, 由转色期的 302.8 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$ 降至黄色期的 88.3 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1} \text{FW}$; 普通番茄显示了同样的变化趋势, 但生长类激素含量转反义 ACS 番茄显著高于普通番茄, 这可能是转反义 ACS 番茄抗衰老耐贮藏的重要原因。

2.4 转反义 ACS 番茄果实 IAA/ABA

果实的发育过程是多种激素平衡地起着调节作用, 单单某一种激素的含量有时难以反应问题的实质。IAA/ABA 的比值, 通常用来表示激素对生长的作用是促进还是抑制。试验表明, 丽春番茄的 IAA/ABA 随着果实的成熟下降(图 4)。丽春番茄花后 20d 至 40d IAA/ABA 近乎直线下降, 到花后 40d 时比值为 3.18。幼果期 IAA/ABA 最高, 20d 时为 11.38; 40d 至果实转色期, IAA/ABA 维持在 2.97~ 3.18 之间, 各时期无显著差异。但到果实粉红色和红熟期, IAA/ABA 又显著下降, 到红熟期(RED)期最低为 0.468。

转 ACS 番茄幼果期 IAA/ABA 变化, IAA/ABA 为 4.68~ 4.51, 到花后 40d 时, IAA/ABA 有所上升, 变为 5.53, 此水平一直维持到 MG 而没有显著差异。转色期和变色期的 IAA/ABA 显著下降, 之后变化平缓, 至红熟期降至 0.319。

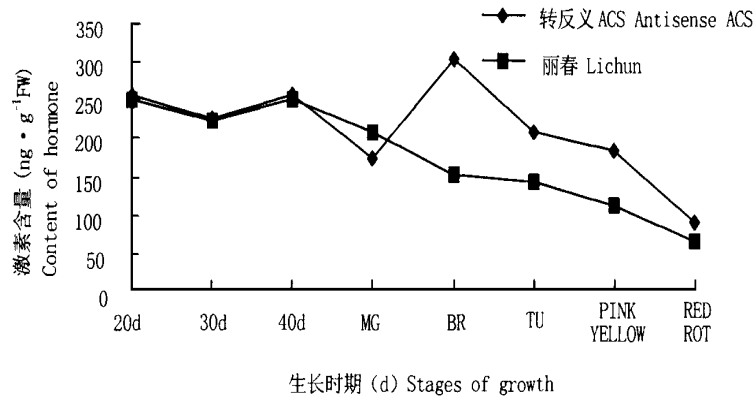


图 3 转反义 ACS 番茄和丽春番茄生长类激素含量

Fig. 3 Content of growth hormone in antisense ACS and Lichun tomato

2.5 外源乙烯对转 ACS 番茄内源激素的影响

2000 $\mu\text{l/L}$ 乙烯利处理采后 45d 的处于黄色期的转 ACS 番茄, 7d 后果实变红, 出现与普通丽春番茄相同的成熟性状。图 5 表明, 乙烯利处理之后, 红熟番茄的 4 种内源激素含量都有所变化。果实 IAA 含量下降, 但差异不显著; GA 和 Z+ ZR 含量呈显著下降, 而 ABA 含量显著上升。可见, 红熟期的转 ACS 番茄, 促进生长发育的激素都因乙烯处理而降低, 而促进成熟衰老的 ABA 上升, 起到与乙烯相同的促成熟作用。

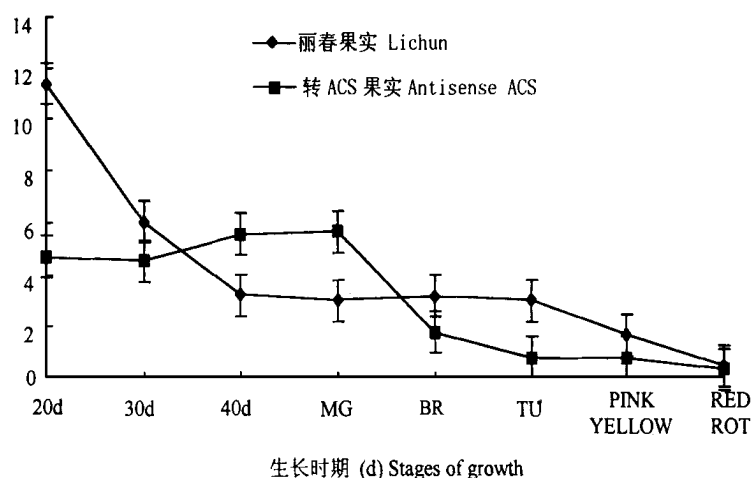


图 4 两类番茄果实不同生长时期 IAA/ABA 的变化

Fig. 4 Changes of IAA/ABA at different stages of Lichun and transgenic tomato fruits

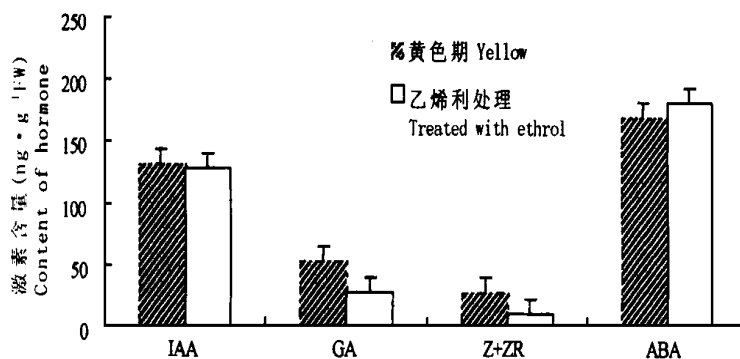


图 5 转 ACS 番茄采后 45d 乙烯利处理后内源激素的变化

Fig. 5 Changes of hormone in transgenic tomato after treatment by ethrol at postharvest 45 days

3 讨论

普通番茄果实生长发育阶段, 生长类激素 IAA、GA、Z+ZR 呈现较高水平, 而衰老类激素 ABA 水平较低, 有利于细胞分裂和增大。成熟衰老阶段, 生长类激素继续下降, 衰老类激素逐渐上升, 并逐步占据主导地位, 这与前人的研究结果相似^[3]。可见, 各种激素在果实的整个生长发育及成熟衰老时期起着各自不同的作用, 但彼此之间又相互协调, 彼此制约, 共同调节果实的每个发育阶段, 为果实的良好发育和种子的形成作适宜的安排^[8]。

转 ACS 番茄在生长发育阶段生长素类激素仍然占据主导地位, 但它们之间变化趋势不一致, IAA 水平较高, 成为这一时期的主导激素。成熟衰老阶段, GA 和 Z+ZR 变化平缓, 水平较低, IAA 在转色期达到高峰, 之后迅速下降, 而 ABA 在绿熟期之后迅速增加, 保持较高水平, 成为这一时期影响生理变化的主导因子。与普通番茄相比, ACS 番茄果实中的 4 种激素之间维持另外一种平衡, 以使果实没有乙烯存在的情况下继续完成生长发育, 并缓慢进

入成熟衰老阶段。

据报道^[9], IAA 有双重作用, 在低浓度时有促进生长的作用, 在高浓度时, 又有抑制生长的作用。转 ACS 番茄果实转色期高含量的 IAA 可能起到了抑制生长的作用, 这还有待于进一步探讨。

参考文献:

- [1] 罗云波. 番茄采后生物技术研究进展[J]. 园艺学年评. 1995, 1: 39~ 56.
- [2] 罗云波, 生吉萍, 申琳. 番茄中反义 ACC 合成酶基因的导入和乙烯生物合成的控制[J]. 农业生物技术学报. 1995, 3(2): 38~ 44.
- [3] 郑光华, 沈征言译, J. G. Atherton and J. Rudich 编著. 番茄[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1989: 256.
- [4] 何钟佩. 农作物化学控制实验指导[M]. 北京: 北京农业大学出版社, 1993.
- [5] Coombe B G. The development of flesh fruits[J]. Ann. Rev. Plant Physiol. 1976, 27: 508~ 518.
- [6] Riou J, Dagan E, Goren R, et al. Characterization of abscisic acid induced ethylene production in citrus leaf and tomato fruit tissues[J]. Plant Physiol. 1990, 92: 48~ 53.
- [7] McMurchie E J, McGlasson W B, Eaks I L. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene[J]. Nature. 1972, 237: 235~ 236.
- [8] Black M. Involvement of ABA in the physiology of developing and mature seeds. In: Dacys W J, Jones H G, eds. Abscisic acid: physiology and biochemistry[M]. United Kingdom: BIOS Scientific Publishers Limited, 1991: 99~ 124.
- [9] Aharani N. Interrelationship between ethylene and growth regulators in senescence of lettuce leaf disks[J]. Plant Growth Regul. 1979, 8: 309.

The Content of Hormones in Antisense ACS Tomato as Compared with Tomato cv. Lichun

Sheng Jiping, Luo Yunbo, Shen Lin

(College of Food Science, China Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract: The study showed that hormone balance was quite important for fruit development. The contents of IAA, GA, Z+ ZT were at high level at early stage of Lichun before harvest, then declined with fruit ripening, whilst ABA and ethylene increased. Because of no ethylene formation, ACS tomato reflected different situation of the content of IAA, ABA, GA, and Z+ ZR, but there was no significant difference in the content of growth hormone (the total content of IAA, ABA, GA, and Z+ ZR) at growth period between the two varieties of tomato, while there was a significant difference at ripening stage. The ratio of IAA/ABA in Lichun declined at growth stage and from TU to RED stage, and if kept the same level from 40d to TU. But the ratio of IAA/ABA in ACS tomato increased at growth stage and then decreased after harvest. Treated with 0.02 ethrel, the content of GA and Z+ ZR in antisense ACS tomato fruit declined significantly, but the content of ABA increased significantly and the content of IAA did not change much.

Key words: Transgenic tomato; IAA; GA; ABA; Z+ ZR; Ethylene