

反义 RNA 技术在培育延熟保鲜蔬菜新品种上应用

郭庆勋¹, 陈柏杰¹, 秦智伟²

(1. 哈尔滨市农业科学院, 150070; 2. 东北农业大学, 哈尔滨 150030)

中图分类号: S603.6 文献标识码: A 文章编号: 1001-0009(2004)03-0088-02

蔬菜生产经营中, 一个重大难题是果实如何延熟保鲜, 如何延长果实的货架寿命。现在广泛采用的气调贮藏或使用保鲜剂等方法所能保鲜的时间有限, 而且成本高。因此, 培育延熟保鲜蔬菜品种是一个非常重要的育种目标。采用生物技术寻找与果实保鲜性能相关的目的基因, 从遗传物质上进行改造, 就能从根本上解决果实延熟保鲜问题。为此, 科学家们在在这方面做了大量工作, 并把重点放在如何阻断果实中乙烯的生物合成上。经过多年的努力, 已经发现了多种与乙烯生物合成相关的酶, 并克隆了编码这些酶的基因。如 ACC 合成酶基因, ACC 氧化酶基因等。反义 RNA 技术的发展和运用, 使利用基因工程技术培育延熟蔬菜和果树新品种成为可能。

1 乙烯与果实成熟

乙烯在果实成熟过程中起着至关重要的作用。乙烯通过控制和协调与成熟有关基因的表达来调控果实成熟, 这些过程包括: 加强呼吸跃迁、乙烯自催化、叶绿素降解、类胡萝卜素合成、淀粉转变成蔗糖和提高细胞壁降解酶活性等。

2 反义 RNA 技术

反义 RNA 最初发现于细菌中, 它们是一些较短的、散布的转录产物, 本身缺乏编码能力, 但可通过碱基配对的方式与靶 RNA 的特定互补区域结合, 从而阻抑基因的正常表达^[2], 因此, 反义 RNA 是高度特异性的基因抑制因子。一些实验结果表明, 在质粒的复制、转座子的转座作用及噬菌体的发育进程中, 反义 RNA 的调控起着至关重要作用。反义 RNA 技术是通过人工将目的基因反向构建在一启动子上, 再转化给植物, 形成转基因植物从而定向地控制某些性状的表达。反义 RNA 技术是近年来迅速发展起来的基因调控技术。它为培育延熟保鲜蔬菜品种开辟了广阔前景。在基因转录时, 双链 DNA 中一条是反义链(正链), 也称模板链(template strand), 能转录成 mRNA; 另一条是有义链(负链), 也称编码链(coding strand), 可转录出反义 RNA。反义 RNA 的核苷酸序列与 mRNA 互补, 当两者结合时, 可阻止 mRNA 转译产生蛋白质。即使基因有活性也不会有蛋白质产物, 从而抑制基因的表达, 实现删除基因的目的。查尔酮合酶(chalcone synthase)基因是第一个利用反义 RNA 技术研究的植物内源基因。反义基因的植物表达载体构建后, 通常由农杆菌介导, 以子叶为受体, 经共培养和选择培养并诱导出再生植株, 再经分子检测确认反义基因的转基因植株, 最后对转基因植株进行田间试验、遗传分析和性状鉴定, 一般情况下转化率能达到 10% 左右。用 ACC 合成酶反义基因转化某种植物时, 最好使用从该植物中直接克隆其 ACC 合成酶基因或 ACC 氧化酶基因, 以提高转化效果。王春霞等^[1]采用番茄 ACC 合成酶反义与正义基因对西瓜的转化结果表明, 反义基因可抑制西瓜

果实中乙烯的释放, 但抑制的程度不如抑制番茄本身高。

3 ACC 合成酶基因在培育延熟保鲜蔬菜新品种上的应用

大量研究工作证实 ACC 合成酶是被一个多基因家族编码。Sato 等从成熟番茄果实中克隆出一个 ACC 合成酶基因(后来被证明是 LE-ACC2); Rottman 等又从成熟番茄果实中克隆了 5 个 ACC 合成酶基因, 它们分别是 LE-ACC1、LE-ACC2、LE-ACC3、LE-ACC4、LE-ACC5; 其中与番茄成熟直接相关的只有: LE-ACC2 和 LE-ACC4, 这两个基因都为果实成熟所诱导, LE-ACC2 被乙烯诱导的速度快于 LE-ACC4。目前已知在番茄中 ACC 合成酶至少有 9 个编码基因; 水稻有 3 个; 拟南芥有 5 个; 西葫芦和笋瓜有 2 个。

科学家们先后从许多植物中分离出 ACC 合成酶 cDNA, 如苹果、桃、香蕉、番茄^[4,6]、甜瓜^[7]、河套密瓜^[8,9]、笋瓜、小西葫芦、猕猴桃^[10]等。研究发现该基因属于多基因家族, 在这一家族中不同成员受不同因子诱导, 但不同来源或同一来源的基因家族不同成员在序列上均存在 8 个保守区, 而且各区域的相对位置也大体相同; 并且与氨基转移酶基因家族具有相当的同源性, 但内含子的数目并不保守。这些保守区至少有 8 个氨基酸残基。在保守区段内, 不同材料间 95% 的氨基酸完全相同。ACC 合成酶的活动需要辅酶吡哆磷酸, 第 5 个保守区段是酶活性部位的中心, 它与吡哆磷酸结合催化反应进行。被克隆的所有 ACC 合成酶基因的编码区都有一定的同源性, 其 DNA 序列同源性约为 60% 以上, 氨基酸序列同源性约为 70% 以上。金勇丰等^[8]克隆了长 1.1 kb 桃 ACC 合成酶基因, 该基因与番茄 ACC 合成酶氨基酸同源性为 72.7%; 与苹果 ACC 合成酶氨基酸同源性为 65.4%; 与小西葫芦、笋瓜、康乃馨氨基酸同源性分别为 71.3%, 71.1%, 69.1%。尹俊等克隆到了河套密瓜 ACC 合成酶的 cDNA 片段, 其核苷酸序列与日本甜瓜及番茄的同源性为 99.3% 和 63.4%; 推导的氨基酸序列同源性分别为 99.6% 和 72.0%。说明 ACC 合成酶基因之间具有一定同源性, 同时也存在很大的差异性, 这有利于形成 ACC 合成酶的多种结构和性质, 以适应各种生理条件。受不同生理条件诱导不同的 ACC 合成酶基因的 5' 和 3' 端非编码区同源性较低, 这说明存在不同的调控机理。

番茄果实成熟期间表达两种 ACC 合成酶, 编码它们的基因分别是 LT-ACC2 和 LT-ACC4 其中 LT-ACC2 既与成熟有关, 又被创伤诱导。利用 LT-ACC2 的 cDNA 构建的反义 RNA, 导入番茄后, 几乎完全抑制上述两个基因 mRNA 的积累。正常番茄果实在授粉后 50 d(天)开始形成乙烯, 并在随后的 10 d(天)中成熟。而转基因植株的果实内乙烯合成被抑制了 99.5%, 叶绿素降解和番茄红素合成也都被抑制。果实成熟启动迟, 果实不能自然成熟, 即没有香味、不变红、不变

软。当用外源乙烯或丙烯处理后,这种抑制过程可以逆转。外源乙烯催熟的果实与自然成熟的果实的色、香、味及抗压性没有显著差异。Oeller 用反义 ACC 合成酶基因转化番茄获得了转基因植株,其果实的乙烯含量减少了 99.5%,在室温或在植株上可保存 120 d(天)左右而不腐烂。美国农业部于 1997 年许可在 22 种蔬菜、果树和花卉植物上利用 ACC 合成酶基因。内蒙古大学的科技人员用农杆菌介导法将克隆的 ACC 合成酶基因转入河套密瓜,抑制了 ACC 合成酶的活性,从而获得大量转基因植株和种子。经多年连续自交和筛选,成功地培育出转基因耐贮藏河套密瓜纯合品系。转基因耐贮藏河套密瓜果实正常成熟期 38 d(天)采摘,比常规对照品种的贮藏期延长了 5 倍以上,与生长 38 d(天)的常规对照品种比较,浓香相同,含糖量提高。刘存德等利用反转录 PCR 技术克隆获得了 ACC 合成酶多基因家族成员之一 LE-ACC2,阅读框架约为 1.7 Kb 的 cDNA,经酶切图谱和序列分析鉴定无误后,反向插入植物表达载体 pBin437 中,构建成组成型表达 ACC 合成酶反义 RNA 二元载体。经农杆菌途径转化番茄获得 60 株抗卡那霉素的再生植株。其中 6 株为转基因植株。转基因植株的果实乙烯释放量仅为对照的 30%。采后在温室保存 60 d(天)仍不变红和软化。表明反义 RNA 在转基因番茄中的表达有效抑制了乙烯的生物合成。对转基因植株子一代分析表明,反义 ACC 合成酶基因以典型的单基因方式传到子代,选到了一个耐储性强的转基因番茄纯合品系。其果实乙烯释放量仅为对照的 16%。在 25℃~30℃中贮存 48 d(天)不变红。表明反义 ACC 合成酶基因及其果实有耐贮性已稳定地遗传到子代。刘传银等^[1]报道,将 ACC 合成酶的反义 RNA 丽春番茄,获得了 6 株转基因植株,转基因番茄果实的乙烯释放量仅为对照的 30%左右,在室温下转基因果实采后保存 60 d(天)以上仍然没有变红、软化。反义 RNA 在转基因番茄中的表达有效地抑制乙烯的生物合成,从而延缓果实成熟,表现出良好的耐贮保鲜特性。对转基因植株子一代(T1)的分析结果进一步表明,反义 ACC 合成酶基因以典型的单基因方式传到子代。通过对 2 代的分析已被初步筛选到一个耐贮藏的转基因番茄纯合品系。并认为反义 ACC 合成酶基因在转录水平上表达是转基因番茄果实完熟过程延缓和耐贮藏的根本原因。这表明通过反义 RNA 技术来抑制 ACC 合成酶活性,可以抑制乙烯的生物合成,从而培育出延熟保鲜的蔬菜新品种。

4 ACC 氧化酶基因在培育延熟保鲜蔬菜新品种上的应用

ACC 氧化酶又称乙烯形成酶(EFE),也是乙烯生成的关键酶之一,直接催化 ACC 氧化成乙烯。可能由于 ACC 氧化酶具有对细胞结构完整性的依赖,较长一段时间内对 ACC 氧化酶的分离一直未能成功,直到发现由 ACC 氧化酶基因 pTOM13 的核苷酸序列,推导出氨基酸序列中具有烷酮-3-羟化酶的同源序列,才用提取该酶类似方法首次从甜瓜中分离到有活性的 ACC 氧化酶。现在也已从鳄梨、苹果、香蕉中分离到了有活性的 ACC 氧化酶。ACC 氧化酶可能是单体。现已证明 ACC 氧化酶也存在同工酶,其编码基因构成多基因家族。ACC 氧化酶基因 pTOM13 最早从番茄 cDNA 文库中克隆出来,在此基础上陆续又在番茄、甜瓜、苹果、猕猴桃、桃、鳄梨、荔枝、哈密瓜等植物中克隆到 ACC 氧化酶基因。

像 ACC 合成酶一样,ACC 氧化酶也为多基因家族所编码。在矮牵牛中分离到 4 个不同的 ACC 氧化酶,其中 3 个能表达,一个有假基因特征。从番茄中已分离到 3 个不同的 ACC 氧化酶基因,用基因专一的探针研究表明,这些基因在成熟果实和伤害叶片里能被差异表达。不同种植物 ACC 氧化酶基因的同源性比 ACC 合成酶高。金勇丰等克隆了 1.3 kb 桃 ACC 氧化酶基因,与桃 ACC 氧化酶基因 cDNA pch313 序列比较,核苷酸序列与氨基酸序列同源性分别为 99.6%和 99.3%,与番茄 ACC 氧化酶基因 eth1,矮牵牛 ACO1、康乃馨 pSR120、苹果 pAP4 氨基酸序列同源性分别为 83.0%、76.8%、74.0%、75.0%;陆璐等克隆了长 1236bp 哈密瓜 ACC 氧化酶基因,该基因与国外从罗马甜瓜(*C. melovar. cantalupensis* Naud.)中获得基因的完全一致。丁晓东克隆了荔枝果实 1.1kb ACC 氧化酶基因,该基因全长有 957bp,编码 319 个氨基酸,与桃、番茄、康乃馨、香蕉、杏等植物的 ACC 氧化酶基因的氨基酸同源性分别为 82.5%、70.4%、73.6%、74.9%、78.5%、75.9%、77.4%。说明 ACC 氧化酶基因也是高度保守的。

Hamiltonetal 采用反义 RNA 技术抑制转基因番茄果实中 ACC 氧化酶活性,实现了对乙烯生成和果实成熟的控制,这是世界上首次获得减少乙烯生成的转基因植株。随后在桃叶片、果实及受伤情况下,研究 ACC 氧化酶基因 pch313RNA 水平和乙烯释放量时,发现 ACC 氧化酶基因在不同品种的不同组织器官、成熟果实和受伤组织中表达水平有所不同,可能与 ACC 氧化酶的表达受多基因家族调控有关。至今采用同一技术也获得了减少乙烯生成的反义 ACC 氧化酶转基因康乃馨、芥菜、甜瓜等植株。叶志彪等也获得了反义 ACC 氧化酶转基因番茄,在常温条件下可贮藏 88 d(天),显著长于原亲本,并保持原亲本的果实硬度和颜色等优良品质,表现出一定的开发和应用价值。

5 展望

目前,在利用控制果实成熟的基因工程技术中,主要是用 ACS 和 ACO 的反义基因对植物进行转化。并且成功地以番茄为材料培育出耐储藏果实,现在已应用于商业生产。如何借鉴和应用番茄的研究成果来培育耐储藏的蔬菜和水果新品种,从而满足南菜北运和北菜南运的需求,是今后研究的重要课题。利用反义 RNA 技术对基因表达部分地抑制不失为产生某些缺失突变的好方法。基因工程技术将 ACC 合成酶或 ACC 氧化酶的反义基因导入正常植株中,获得乙烯合成缺陷型植株,达到控制果实成熟的目的,国外已在番茄、康乃馨实现商业化生产。这一成就为蔬菜、果树和花卉延熟保鲜育种展示了美好的前景。但这一技术将得到进一步的改进,如将反义基因接在可调控的启动子后再转入植物,这样就可以通过改变植物的内外部条件控制反义基因的开和关。当想使果实推迟成熟时,就启动反义基因的表达,阻止乙烯产生;当需要果实成熟时,就改变某种条件,关闭反义基因,于是乙烯合成,果实发育成熟,这样可不用外源乙烯或丙烯处理。虽然对许多植物来源的控制果实成熟的基因的克隆与鉴定已取得很大进展,但在转基因植物中的表达,大多也仍处在研究之中。我国虽然报导了育成了延熟的番茄、河套密瓜新品种,但要实现产业化还需要作许多的工作。总之,反义 RNA 技术为果实成熟的基因表达及其功能调控提供了一种比常规遗传育种更为有效和专一性很强的育种途径。