

# 行政院國家科學委員會農業生物技術國家型計畫 成果報告

## 植物有用基因之利用— 轉殖反義基因改善苦瓜果實品質之研究

計畫編號：NSC 90-2317-B-002-014

國立臺灣大學園藝學系

杜宜殷 助理教授

TEL: 02-23630231 轉 2535 FAX: 02-23627053

E-mail: yiyindo@ccms.ntu.edu.tw

### 中文摘要

先前分離得到之苦瓜果實專一 ACC 合成酶 (ACC synthase, ACS) cDNA，構築為順義及反義基因之轉殖載體，經由霧峰農業試驗所張有明博士以花粉電穿孔法進行月華及綠人苦瓜之基因轉殖，取得之轉殖種子共分為順義或反義 ACS 基因之綠人與具順義或反義 ACS 基因之月華轉殖苦瓜種子四組。接著以 100 mg/l kanamycin 篩選轉殖植株幼苗 787 株，其中轉殖順義基因之綠人苦瓜幼苗在發芽後二週的存活率為 76.8%、月華為 61.8%，轉殖反義基因之綠人苦瓜幼苗存活率為 74.3%、月華為 65.8%。確定存活的轉植株繼續進行 GUS 活性組織染色分析，並分別抽取其基因組 DNA，進行聚合連鎖酶反應檢測，結果部分綠人順義 ACS 基因轉殖植株葉片經 GUS 活性組織化學染色呈現藍色反應，且聚合連鎖酶反應分析出現預期片段，再以 ACS cDNA、GUS 及 NPT II 基因片段為探針，進行基因組 DNA 南方

氏雜交分析後，得到 3.0 kb 和 6.2 kb 之雜交條帶，顯示外來基因已經由轉殖進入苦瓜基因組中。

關鍵詞：基因轉殖、果實後熟、ACC 合成酶反義基因、聚合酶連鎖反應、南方氏雜交分析

### 一、計畫緣起及目的

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 為葫蘆科 (Cucurbitaceae) 果菜類，一年生蔓性草本植物，原產於熱帶亞洲，世界主要栽培地區分布於南非、印度、東南亞、中國大陸和台灣等熱帶地區，為典型的東方蔬菜。苦瓜之販售單價於夏季高居本省第一位，是重要夏季蔬菜之一。苦瓜屬更年性 (climacteric) 果實 (郭等, 1987)，綠熟的苦瓜對於乙烯十分敏感，在後熟的過程中，其乙烯釋放量與呼吸率會在果實黃化前上

升，大量釋出的乙烯造成果實過熟現象 (over-ripening)；尤其在運輸與銷售過程中，常因微量乙烯存在而提前後熟，使果肉變黃，假種皮變紅，肉質酥軟易碰傷，且因失水嚴重致果皮皺縮而降低商品價值 (黃, 1985)。苦瓜兼具食用、藥用與觀賞價值，若能生產熱帶亞洲特產、高品質、耐貯運的苦瓜，將可進軍國外市場，具有發展潛力。故本計畫著手選殖與苦瓜後熟相關之乙烯合成途徑中的關鍵酵素 -- ACC 合成酶基因，利用反義 RNA 技術 (antisense RNA technology)，將與內生基因反向的基因，藉由有效的基因轉殖系統，導入植物體內，使其轉錄出與內生訊息 RNA 互補的產物，進而阻隔基因轉譯為蛋白質的步驟 (Inouye, 1988)，或利用順義基因共同抑制 (cosuppression) 的效果，達到抑制乙烯合成的目的。

## 二、執行成果

### A、轉殖植株之抗生素篩選

先前所構築之順義及反義 ACS 基因轉殖質體中，係以 NPTII 基因為篩選基因，故轉殖植株可利用 Kanamycin 進行篩選。篩選時係將轉殖後收穫得到之種子經溫湯浸種後播種，每天以 100 mg/l kanamycin 澆灌，共篩選轉殖植株幼苗 787 株，其中轉殖順義基因之綠人苦瓜幼苗在發芽後二週的存活率為 76.8%、月華為 61.8%，轉殖反義基因之綠人苦瓜幼苗存活率為 74.3%、月華為 65.8%。經 Kanamycin 篩選的植株生長勢明顯被抑制 (圖一 A)，具抗性存活之轉殖植株葉片不會出現白化現象 (圖一 B、C、D、E)。

### B、報導基因於轉殖植株之表現

順義及反義 ACS 基因轉殖質體中，係以 GUS 基因為報導基因，故轉殖植株可利用組織染色進行檢測。剪取苦瓜葉片面積約 0.5-1 平方公分，先以前處理緩衝液於 37°C 下浸泡 0.5 小時後，再加入含有 X-Gluc 的緩衝液中，置於 37°C 下反應數天，接著以 70% 酒精脫色，於顯微鏡下觀察組織中 GUS 活性呈色情形，結果部分綠人順義 ACS 基因轉殖植株葉片於葉片基部及葉脈呈現藍色反應 (圖二 A、B)，未轉殖植株之葉片沒有呈色反應 (圖二 C)。

### C、轉殖植株之分子驗證

分別抽取經 Kanamycin 篩選存活轉殖植株的基因組 DNA，進行聚合酶連鎖反應及南方氏雜交分析，以取得外來基因嵌入染色體於分子層次的證據。經以 CaMV 35S 啟動子及 ACS cDNA 專一性引子、GUS 專一性引子對進行反應，得到預期的合成片段。再分別以 ACS cDNA (圖三 A)、GUS (圖三 B) 及 NPT II (圖三 C) 基因片段為探針，進行基因組 DNA 南方氏雜交分析後，上述 GUS 染色呈藍色反應的轉殖植株之基因組 DNA 產生 3.0 kb 和 6.2 kb 之雜交條帶，顯示外來基因已經由轉殖進入苦瓜基因組中 (圖三)。

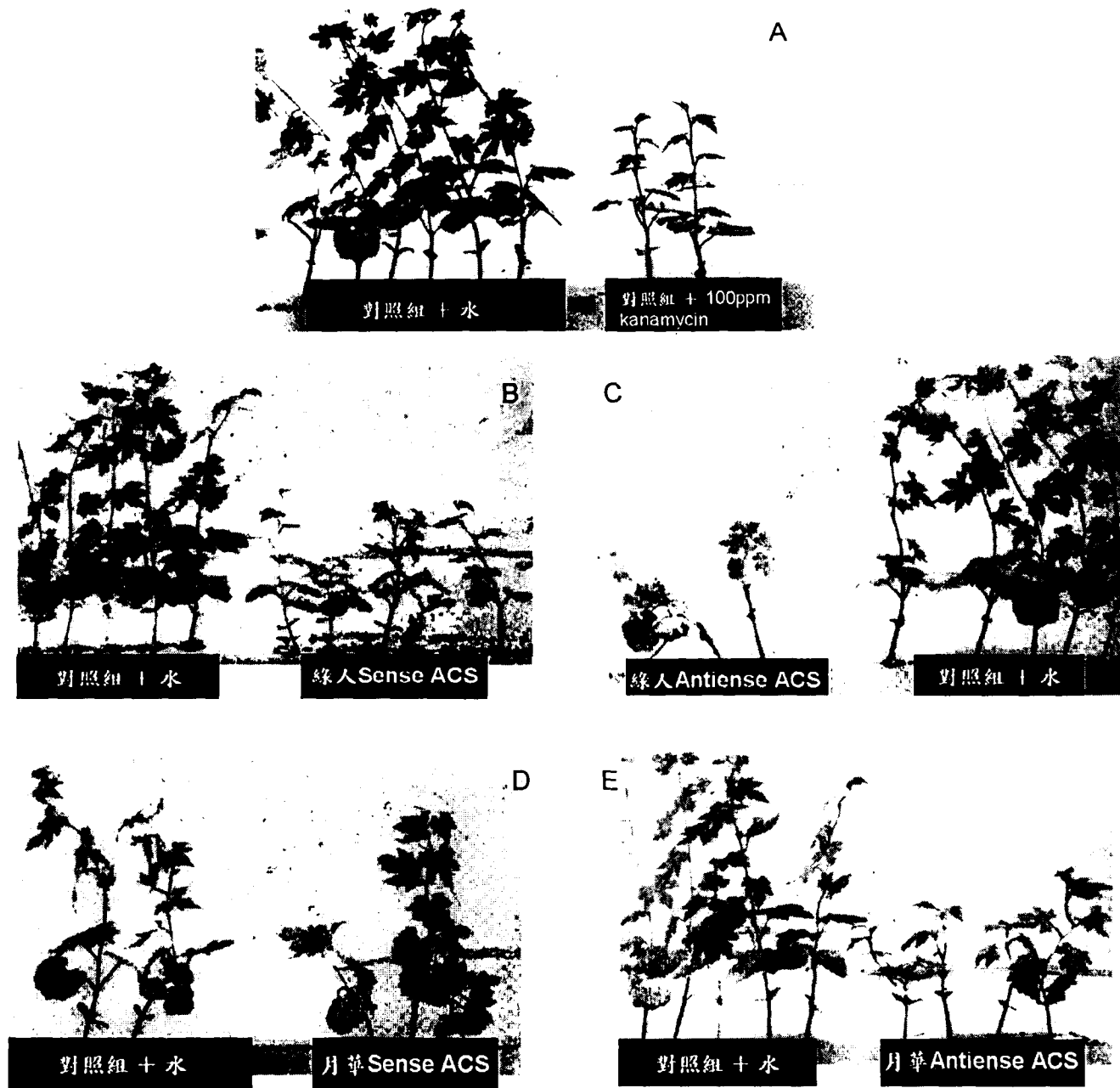
### D、轉殖植株之維持與繁殖

篩選得到之苦瓜擬轉殖植株經扦插繁殖至長大結果，除自交留取種子外，並由農業試驗所張有明博士以組織培養的方式，無

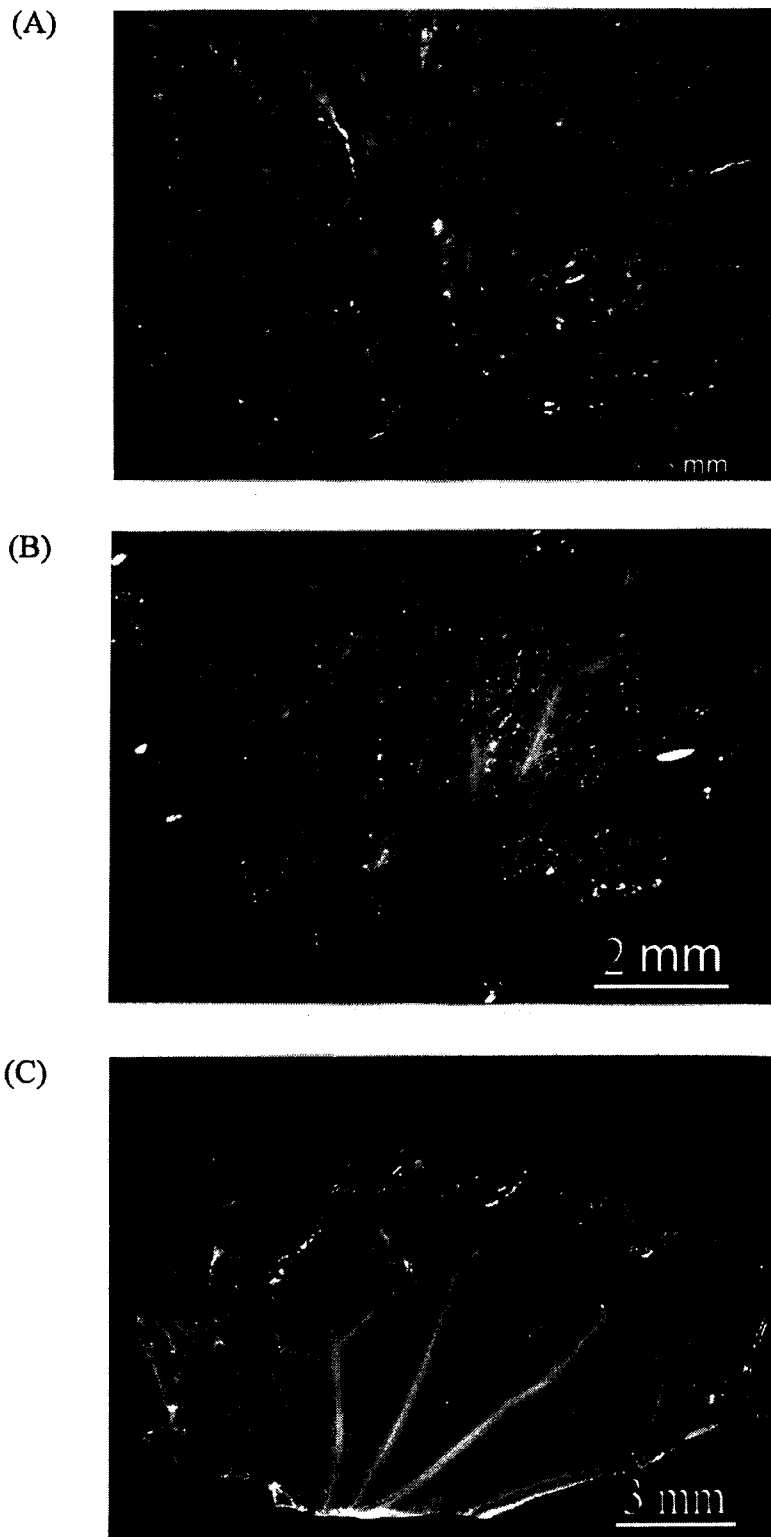
性繁殖維持且繁殖許多後代，以進行田間試驗。

### 三、參考文獻

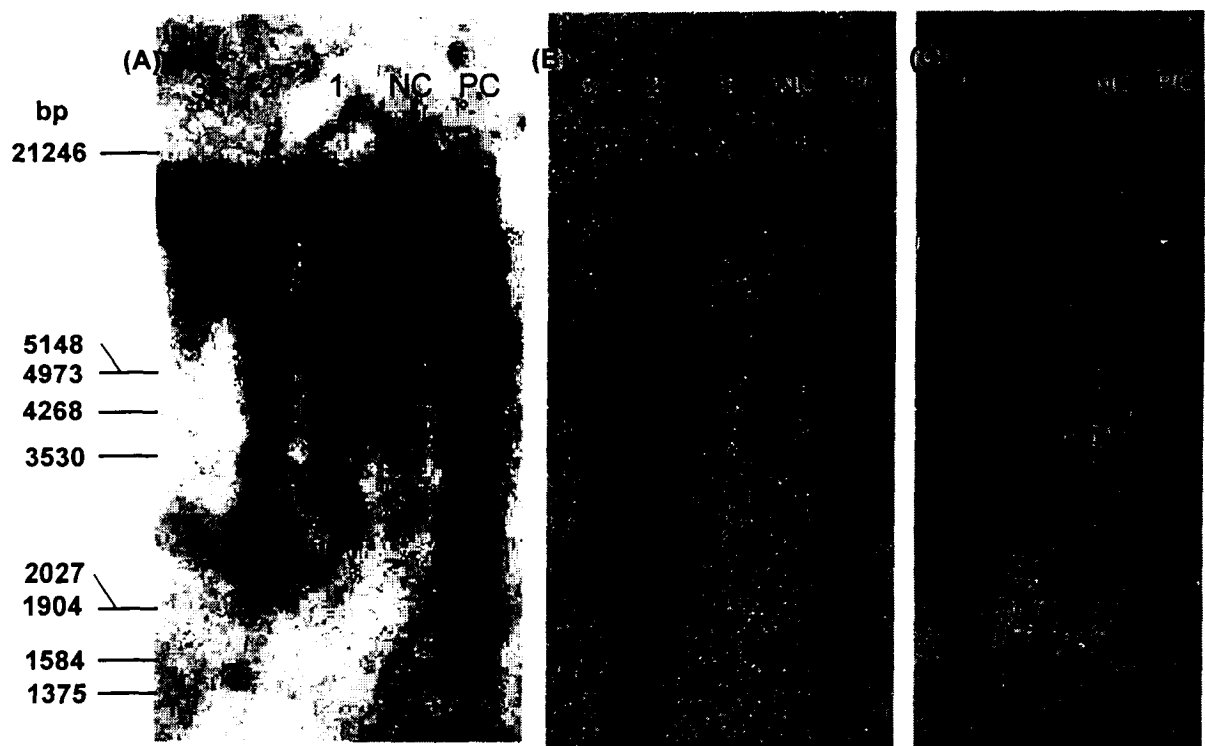
1. 郭純德、蔡平里、林宗賢. 1987. 採收後苦瓜果實之呼吸型式及乙烯自動催化生成. 中國園藝 33(3):161-171.
2. 黃鵬. 1985. 溫度、塑膠袋包裝及乙烯吸收劑對採收後苦瓜品質之影響. 中國園藝 31(4):226-231.
3. Destefano-Beltran, L. J. C., W. V. Caeneghem, J. Gielen, L. Richard, M. van Montagu, and D. van der Straeten. 1995. Characterization of three members of the ACC synthase gene family in *Solanum tuberosum* L. Mol. Gen. Genet. 246:496-508.
4. Dong, J. G., W. T. Kim, W. K. Yip, G. A. Thompson, L. Li, A. B. Bennett, and S. F. Yang. 1991. Cloning of a cDNA encoding 1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. Planta 185:38-45.
5. Huang, P. L., J. E. Parks, W. H. Rottmann and A. Theologis. 1991. Two genes encoding of 1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase in Zucchini (*Cucurbita pepo*) are clustered and similar but differentially regulated. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:7021-7025.
6. Inouye, M. 1988. Antisense RNA: its functions and applications in gene regulation - a review. Gene 72:25-34.
7. John, I. R. D., A. F. W. Cooper, P. Lee, P. Horton, and D. Grierson. 1995. Delayed leaf senescence in ethylene-deficient ACC-oxidase antisense tomato plants; molecular and physiological analysis. Plant J. 7:483-490.
8. Oeller, P. W., L. Min-Wong, L. P. Taylor, D. A. Pike, and A. Theologis. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. Science 254:437-439.
9. Olson, D.C., J. A. White, L. Edelman, R. N. Harkins, and H. Kende. 1991. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase in tomato fruits. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5340-5344.
10. Van Der Straeten, D., L. V. Wiemeersch, H. M. Goodman, and M. Van Montagu. 1990. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase in tomato. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:4859-4863.
11. Yang, S.F. and N. E. Hoffman. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Ann. Rev. Plant Physiol. 35:155-189.
12. Yip, W. K., T. Moore, and S. F. Yang. 1992. Differential accumulation of transcripts for tomato 1 - aminocyclopropane - 1 - carboxylate synthase homologous under various conditions. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:2475-2477.



圖一、未轉殖植株 (A) 及轉殖植株 (B、C、D、E) 以Kanamycin篩選之情形



圖二、順義 ACC 合成酶基因綠人苦瓜轉殖植株 (A、B) 及綠人未轉殖植株 (C) 葉片之 GUS 活性組織染色分析



圖三、苦瓜基因組DNA分別以苦瓜ACC合成酶cDNA (A)、GUS (B)、NPTII (C) 基因片段為探針進行之南方氏雜交分析

1、2、3為轉殖植株；NC為未轉殖植株；PC為轉殖質體