

✖ ✖

※ 利用基因轉殖技術抑制香蕉乙烯生合成之研究 ※

[illegible]

執行期間：88年6月1日至89年7月31日

共同主持人：

☐ 國際合作研究計畫國外研究報告書一份

中 華 民 國 89 年 8 月 日

行政院國家科學委員會農業生物技術國家型 科技計畫成果報告

利用基因轉殖技術抑制香蕉乙烯生合成之研究

計畫編號：NSC 88-2317-B-002-009

主持人：黃鵬林 國立臺灣大學園藝學系

執行期限：87 年 8 月 1 日至 89 年 7 月 31 日

聯絡電話：23630231 轉 2536 傳真：23627053

E-Mail：pungling@ccms.ntu.edu.tw

中文摘要

本計畫係以香蕉品種北蕉 (*Musa* spp., 'Pei Chiao', AAA group) 及 Robusta 品種 (*Musa* spp., 'Robusta', AAA group) 之雄花序頂端分生組織為培植體，誘導大量的癒傷組織，建立香蕉胚性懸浮培養細胞，以作為運用農桿菌媒介法進行基因轉殖的材料。為了構築 ACC 氧化酶反義基因，首先構築得到含有調控 ACC 氧化酶基因 *MAOI* 之啟動子、*MAOI* 反義 cDNA 及終結子 (NOS-terminator) 之 pBEPM3-c 中間質體，再以 *HindIII* 酶切全長反義基因連接入 pBI121 質體內，得到反義 ACC 氧化酶基因質體 pBEPM121，其上並含有篩選基因 NPTII 與 GUS 報導基因。此質體 DNA 經轉殖入農桿菌後，已得到可供進行香蕉反義 ACC 氧化酶基因轉殖之質體及菌種。再者，在轉殖香蕉反義 ACC 合成酶基因的研究方面，果實後熟生理及基因表達分析的結果顯示，轉殖香蕉果實中可測得報導基因 GUS 的活性，而且反義基因可延緩香蕉果實後熟，降低乙烯高峰之生成量。

關鍵詞：基因轉殖、果實後熟、ACC 合成酶反義基因、ACC 氧化酶

Abstract

Male inflorescence of *Musa* spp. 'Pei Chiao' (AAA group) and *Musa* spp. 'Robusta' (AAA group) were used as explant to induce calli and suspension cells for *Agrobacterium*-mediated transformation. To construct an antisense gene for ACC oxidase, *MAOI* gene promoter isolated from ACC oxidase genomic clone and nopaline synthase terminator (NOS-terminator) isolated from pBI221 were ligated to ACC oxidase *MAOI* cDNA. The intermediate plasmid pBEPM3-c contains the *MAOI* promoter, the antisense cDNA and the NOS-terminator. After the antisense gene was subcloned into pBI121, the formed plasmid pBEPM121 contains the *MAOI* promoter, the antisense *MAOI* cDNA, the nopaline synthase terminator, the kanamycin resistance gene and the GUS reporter gene. This plasmid has been transformed into *Agrobacterium* and used for banana transformation. On the other hand, the antisense ACC synthase transgenic bananas have been employed to study the physiology of fruit ripening and gene expression. The results of ethylene production and respiration rate of transgenic banana fruits indicate that fruit ripening has been delayed by the expression of antisense ACC synthase gene.

Keywords：genetic transformation, fruit ripening, antisense ACC synthase gene, antisense ACC oxidase gene

一、計畫緣起及目的

香蕉屬單子葉植物，是重要的熱帶及亞熱帶經濟果樹，亦是臺灣重要之外銷水果。其果實係典型之更年性水果，果實後熟時，伴隨著呼吸率之增加及乙烯之大量產生，是研究乙烯生合成相關基因表現及其調節機制之良好材料。經以體胚懸浮培養細胞為材料，本研究室先前曾應用報導基因(reporter gene)，利用農桿菌媒介法(*Agrobacterium*-mediated transformation)成功進行香蕉基因轉殖。經處理之細胞與日後發育之體胚，可以測得報導基因之酵素活性表現，這些體胚經由植株再生途徑發育為植株後，經南方氏核酸雜交分析，證實外源基因可以經由此轉殖系統整合進入香蕉染色體內。

乙烯經證實可以控制更年性果實之後熟。在乙烯的生合成途徑中，有兩個主要的關鍵酵素，分別為 ACC 合成酶(ACC synthase)及 ACC 氧化酶(ACC oxidase)。目前已知乙烯之生合成路徑為：methionine → S-adenosylmethionine (SAM) → 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) → ethylene (Yang and Dong, 1993)。若在此路徑中調降其關鍵酵素之活性，可抑制乙烯生成量進而調控更年性果實之後熟。故本研究室乃構築含香蕉反義 ACC 合成酶基因之質體，經由已建立之轉殖系統，進行創造香蕉新品種，育成耐貯運之香蕉果實之研究試驗。目前轉殖反義 ACC 合成酶基因之香蕉擬轉殖植株已陸續抽花穗結果，可進行轉殖香蕉之性狀分析調查，評估反義基因抑制香蕉果實乙烯生合成的效果，同時可利用已經選殖完成果實後熟相關之 ACC 氧化酶 cDNA 及其相對應之基因，配合香蕉農桿菌媒介轉殖系統，改變作物之遺傳組成，除了可以探討果實後熟之調節與控制的基礎研究外，更隨而控制果實後熟及延緩果實後熟，在農業界將有甚大的經濟效益。

二、結果與討論

為誘導大量的香蕉胚性懸浮培養細胞，以作為運用農桿菌媒介法進行基因轉殖的材料，本計畫以香蕉品種北蕉 (*Musa* spp., 'Pei Chiao', AAA group) 及 Robusta 品種 (*Musa* spp., 'Robusta', AAA group) 之雄花序頂端分生組織為培植體誘導產生癒傷組織，並於液體培養基中，以 80 rpm 的轉速震盪培養數個月，得到大量的香蕉胚性懸浮培養細胞。

在構築質體方面，以香蕉果實後熟專一基因之啟動子，構築 ACC 氧化酶反義基因，將已選殖得到之香蕉 ACC 氧化酶 MAOI cDNA，由其相對應之啟動子來驅動，cDNA 末端連接 NOS-terminator 終結其基因之轉錄，並構築於具有篩選基因 NPTII 及報導基因 GUS 之農桿菌感染用質體 pBI121。所得之最終質體全長為 17.5 kb，命名為 pBEPM121。其中含有全長 MAOI 之啟動子為中間質體 pSKHA，再以 pBI221 載體上之 nopaline synthase 終結子(NOS-terminator) 作為插入 DNA，接合進含有全長 MAOI 基因的 pBEPM3-a 質體，得到 pBEPM3-b 中間質體。將上述二基因片段加以連接，得到 pBEPM3-c 中間質體。即 pBEPM3-c 中間質體含有調控 ACC 氧化酶基因之啟動子、MAOI 反義 cDNA 及終結子(NOS-terminator)。經選殖至 pBI121 載體，得到反義 ACC 氧化酶基因質體 pBEPM121，其上含 ACC 氧化酶 MAOI 反義基因，受 MAOI 啟動子所調控，並有 NOS-terminator、篩選基因 NPTII 與 GUS 報導基因。

另一方面，轉殖反義 ACC 合成酶基因之轉殖香蕉之性狀分析調查方面，首先以 GUS 組織化學染色分析香蕉果實組織，以初步篩選具有基因表達功能之轉殖植株，並進一步驗證 ACC 合成酶反義基因是否進入香蕉基因組 DNA，GUS 組織化學染色分析呈藍色反應，顯示外源 DNA 已整合進入植物基因組 DNA 中。染色結果如圖一所示，不同的轉殖品系，在果實組織中表達 GUS 活性的程度依植株與組

織部位之不同而異，R4.9.X 系列的果實 GUS 活性表達程度最高，而 R4.7.X 系列的果實 GUS 活性在果皮表達的程度比果肉多（圖一 A、B、G、H）。

接著調查溫度對轉殖香蕉果實後熟的影響。已知高溫會促進香蕉果實的後熟，降低溫度可以延緩果實的後熟，故分別測定在 25°C、20°C、15°C 下轉殖反義基因的香蕉果實後熟情形，處理後不同天數之果皮變色情形如圖二所示，以 25°C 處理之果實後熟最快，在 15°C 下部分轉殖反義基因的香蕉果實較未轉殖反義基因香蕉晚後熟，其果皮仍維持綠色。同一果齡的果實，果重、飽滿度與肉皮比愈高者，後熟速率愈快；果齡愈大且果重、飽滿度與肉皮比愈高的果實，後熟速率也愈快（圖二）。至於反義基因對香蕉果實在後熟過程乙烯生成率的影響，以 25°C 處理所得調查結果如圖三。在 20°C 下果實乙烯生成率變化的情形與 25°C 處理相似，乙烯高峰出現的天數較 25°C 慢或同時出現（圖四）。在 25、20 與 15°C 下，有表達 ACC 合成酶反義基因的果實乙烯生成率分別是未轉殖此基因果實乙烯生成率之 35.8、54.3 與 77.8%。溫度提高，ACC 合成酶反義基因抑制果實乙烯生成率愈明顯，在 20°C 下以 1000 ppm 乙烯處理香蕉果實一天，果實後熟轉色正常，經一週後皆可黃熟至七級，果實乙烯生成率變化的情形如圖五。

更年性果實在開始後熟之前，會產生微量的乙烯，這微量乙烯是扮演縮短更年期前的角色。由酵素活性與北方雜交分析顯示 ACC 氧化酶基因在果實開始後熟之前已表達，而 ACC 合成酶基因則在果實更年期才表達（Oetiker and Yang, 1995）。目前轉殖 ACC 合成酶反義基因已有減少香蕉果實乙烯生成的效果，若 ACC 氧化酶也被抑制，則更年期前的微量乙烯生成減少，應可明顯地延緩果實的後熟。

三、計畫成果自評

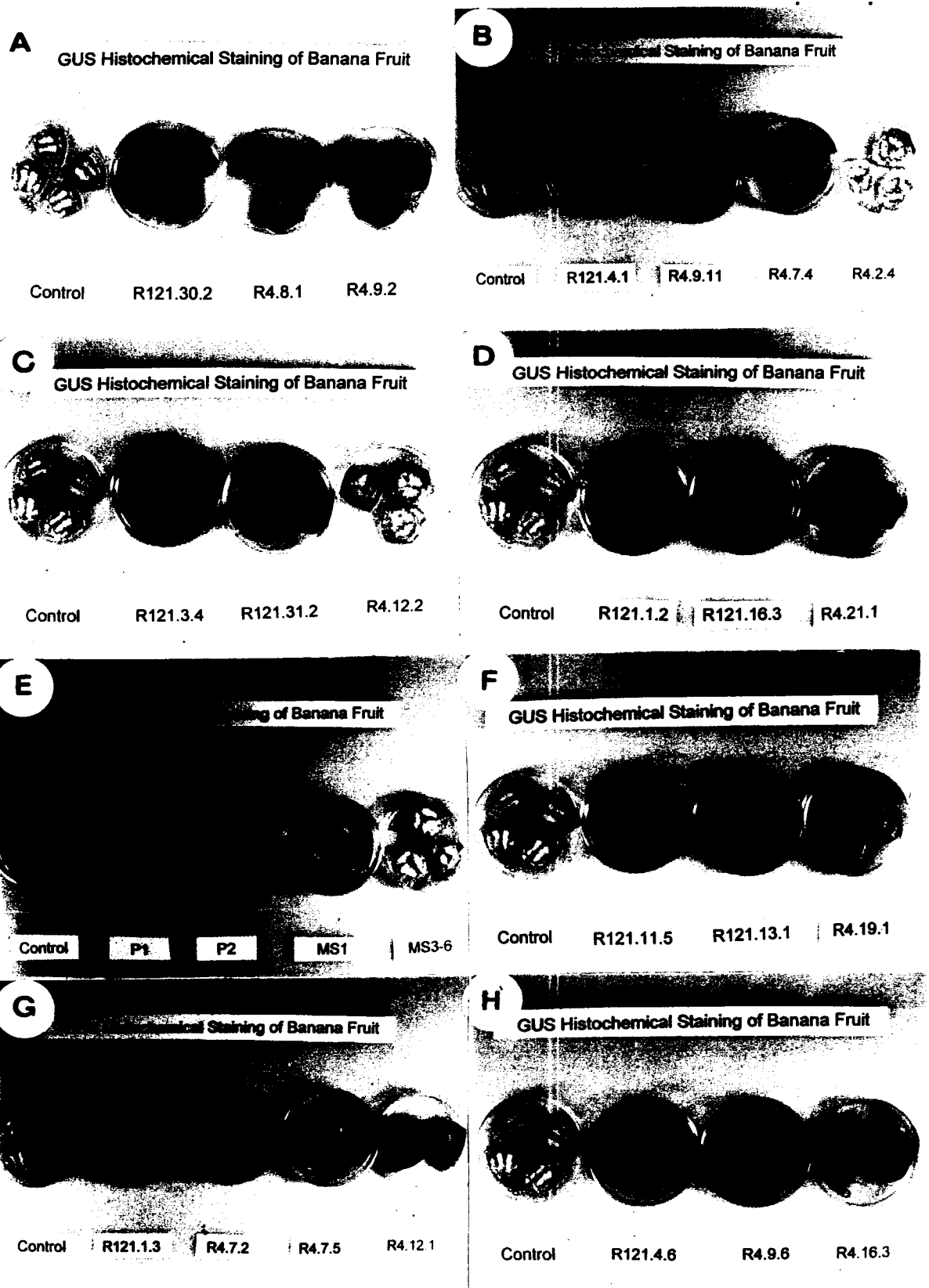
本計畫已順利達成計畫目標與預期效

益，成果將發表於 SCI 學術期刊，目前已分析轉殖植株 23 個品系，其中 9 個品系之乙烯生成速率有明顯降低的現象，若能將這些品系大量繁殖並進行大面積之田間試驗，相信可以育成有商品價值之新品種。經費及人力運用良好，並已於計畫結束前支用全部經費。

四、參考文獻

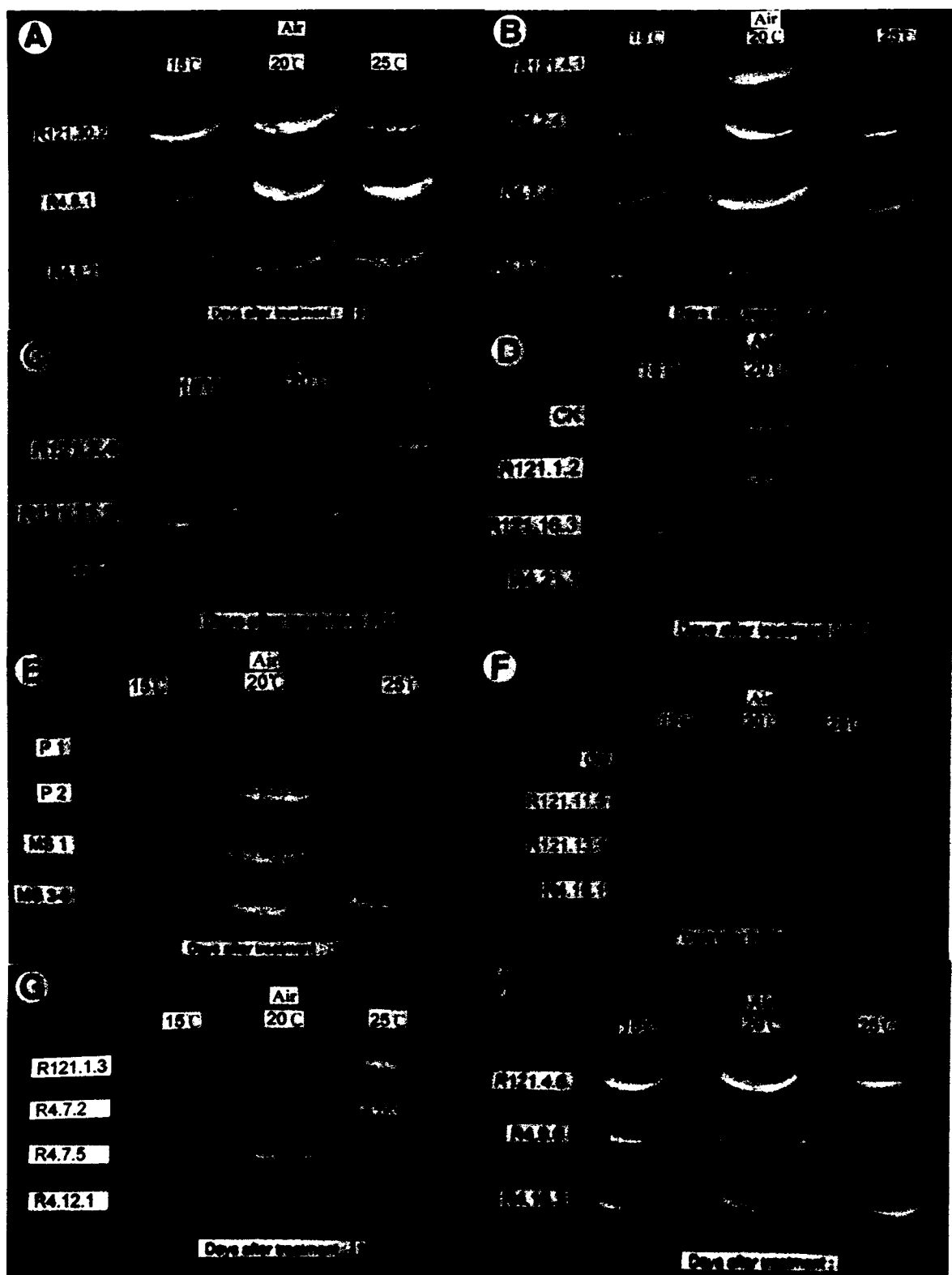
- Bevan, M. W., and M. D. Chilton. 1982. T-DNA of the *Agrobacterium* Ti and Ri plasmids. *Ann. Rev. Genet.* 16: 357-384.
- Day, A. G., E. R. Bejarano, K. W. Buck, M. Burrell, and C. P. Lichtenstein. 1991. Expression of an antisense viral gene in transgenic tobacco confers resistance to the DNA virus tomato golden mosaic virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 6721-6725.
- Hamilton, A. J., M. Bouzayen, and D. Grierson. 1991. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 7434-7437.
- Hamilton, A. J., G. W. Lycett, and D. Grierson. 1990. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.
- Hooykaas-Van Slogteren, G. M. S., P. J. J. Hooykaas, and R. A. Schilperoort. 1984. Expression of Ti plasmid genes in monocotyledonous plants infected with *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 311: 763-764.
- Kramer, M. G., and K. Redenbaugh. 1994. Commercialization of a tomato with an antisense polygalacturonase gene: the FLAVR SAVR™ tomato story. *Euphytica* 79: 293-297.
- Liu, Y. -J., S. -J. Lay, Y. -Y. Do, and P. -L. Huang. 1997. Molecular cloning of a ripening-related cDNA coding for a 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from banana. *Plant Physiol.* 113:664.
- May, G. D., R. Afza, H. S. Mason, A. Wiecko, F. J. Novak, and C. J. Arntzen.

1995. Generation of transgenic banana (*Musa acuminata*) plants via *Agrobacterium*-mediated transformation. *Bio/Technol.* 13: 486-492.
- Oeller, P. W., M. W. Lu., L. P. Taylor., D. A. Pike, and A. Theologis. 1991. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439.
- Oetiker, J. H., and S. F. Yang. 1995. The role of ethylene in fruit ripening. *Acta Hort.* 398: 167-178.
- Sagi, L., B. Panis, S. Remy, H. Schoofs, K. D. Smet, R. Swennen, and B. P. A. Cammue. 1995. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment. *Bio/Technol.* 13: 481-485.
- Sagi, L., S. Remy, B. Panis, R. Swennen, and G. Volckaert. 1994. Transient gene expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenetic cell suspensions. *Plant Cell Rep.* 13: 262-266.
- Schafer, W., A. Gorz, and G. Kahl. 1987. T-DNA integration and expression in a monocot crop plant after induction of *Agrobacterium*. *Nature* 327: 529-532.
- Sheehy, R. D., M. Kramer, and W. R. Hiatt. 1988. Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 8805-8809.
- Tieman, D. M., R. W. Harriman, G. Ramamohan, and A. K. Handa. 1992. An antisense pectin methylesterase gene alters pectin chemistry and soluble solids in tomato fruit. *The Plant Cell* 4: 667-679.
- van der Krol, A. R., P. E. Lenting, J. Veenstra, I. M. van der Meer, R. E. Koes, A. G. M. Gerats, J. N. M. Mol, and A. R. Stuitje. 1988. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. *Nature* 333: 866-869.
- Yang, S. F., and J. G. Dong. 1993. Recent progress in research of ethylene biosynthesis. *Bot. Bull. Acad. Sin.* 34: 89-101.



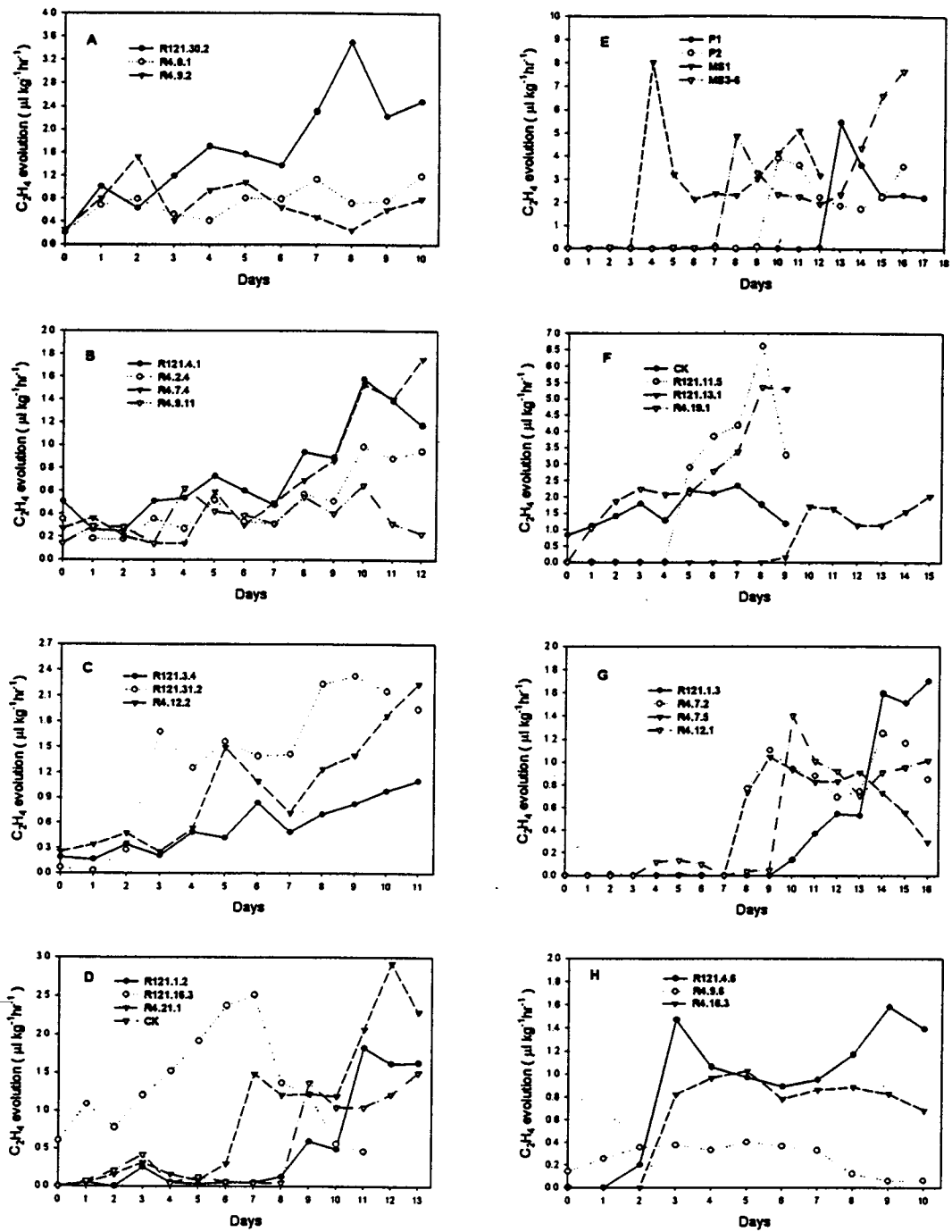
圖一、香蕉果實之 GUS 組織化學染色分析

Fig. 1. GUS histochemical staining of banana fruit



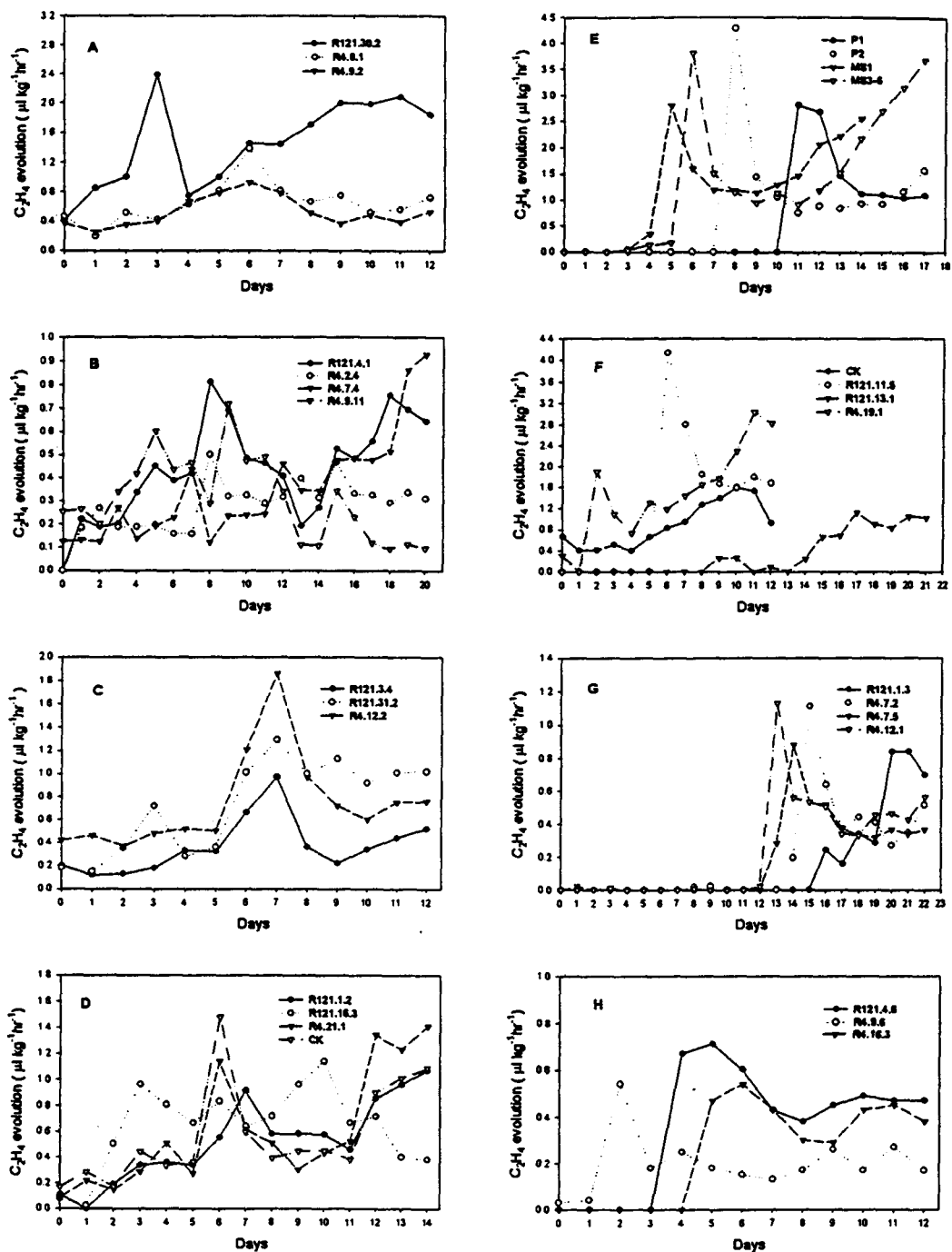
圖二、溫度對香蕉果實後熟的影響

Fig 2. Effect of temperature on fruit ripening of banana



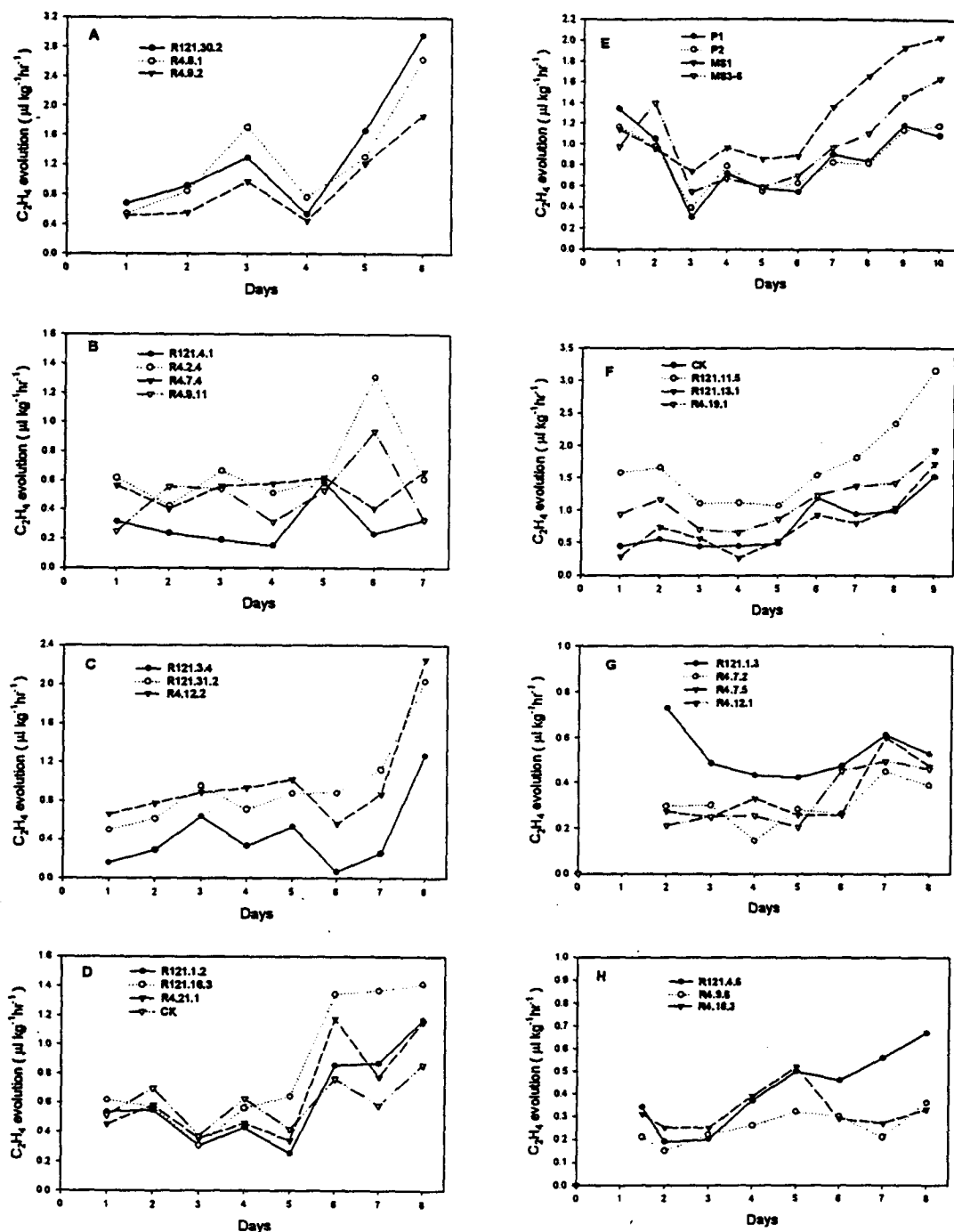
圖三、香蕉果實在 25°C 下的乙烯生成率

Fig.3 Ethylene evolution rate of banana fruits at 25°C



圖四、香蕉果實在 20°C 下的乙烯生成率

Fig.4 Ethylene evolution rate of banana fruits at 20°C



圖五、香蕉果實在 20°C 以 1000 ppm 乙烯催熟後的乙烯生成率

Fig.5 Ethylene evolution rate of banana fruits after 1000 ppm ethylene treatment at 20°C