

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：NSC89-2317-B-002-012

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

利用已知 ACC 合成 胺基酸序列演化保留區設計為寡核 酸引子，進行聚合 連鎖反應，得到四個苦瓜 ACC 合成 基因片段作為篩選互補 DNA 庫的探針。苦瓜 cDNA 庫共篩選一百四十萬個溶斑形成單位 (plaque-forming unit, p.f.u.)，得到 89 個具雜交反應的溶斑，純化後得到 39 個 cDNA 選殖系。選取 cDNA 選殖系 pMACS1 pMACS7 及 pMACS15 進行全長的核酸定序分析，結果顯示 cDNA 長度分別為 2,012 bp 2,403 bp 及 2,011 bp，開放解讀框架分別解碼、及個胺基酸，分子量為 54.2、54.9 及 54.1kD。選殖得到的 ACC 合成 cDNA 分別以正向及反向連接於 CaMV 35S 啟動子後方，並於基因末端加上終結子 (terminator)，構築於含報導基因 GUS 及篩選基因 NPTII 的 pRT99gus 質體中，形成苦瓜之順義及反義 ACC 合成 基因，目前正在進行中。

關鍵詞：基因轉殖、果實後熟、ACC 合成
反義基因

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生合成途徑中的關鍵酵素 -- ACC 合成 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

(一) 初步成果

A、苦瓜 cDNA 庫之構築

抽取苦瓜授粉後十六天果實組織之總 RNA, 經由 oligo dT 親和層析管柱 (affinity column) 分離 poly(A)+ RNA, 再利用反轉錄 (reverse transcriptase) 與 oligo dT 引子, 合成互補 DNA, 以 RNase H 除去 mRNA, 再利用 DNA polymerase I Klenow fragment 合成第二股 cDNA, 所得之雙股 DNA 將接上 *EcoRI* linker, 選殖於 λ ZapII 載體 (Stratagene) 內, 所使用的寄主為 XL1-Blue MRF'。

B、苦瓜後熟相關基因之選殖

(1) 探針之合成

利用已知 ACC 合成 胺基酸序列演化保留區設計為寡核 酸引子, 抽取苦瓜基因組 DNA 作為模版, 進行聚合 連鎖反應, 所得的產物將作為篩選互補 DNA 庫的探針。順利選殖得到四個苦瓜 ACC 合成 基因片段, 分別命名為 MAC11、MAC16、MAC17 及 MAC19, 長度約為 250 bp, 經核 酸定序分析確定為 ACC 合成 基因片段。

(2) ACC 合成 cDNA 之選殖

以合成之四個基因片段為探針, 利用溶斑雜交法 (plaque hybridization) 篩選苦瓜的 cDNA 庫, 共篩選一百四十萬個溶斑形成單位 (plaque-forming unit, p.f.u.), 得到 89 個具雜交反應的溶斑, 挑選其中 39 個溶斑進一步純化, 最後得到 39 個 cDNA 選殖系。根據區分選殖系的雜交結果得知, 其中 29 個選殖系相對應於基因片段 MAC11, 另 12

個選殖系則相對應於 MAC19。挑選 pMACS1、pMACS7 及 pMACS15 進行全長的核酸定序分析, 結果顯示 cDNA 長度分別為 2,012 bp、2,403 bp 及 2,011 bp。其中 pMACS1 及 pMACS15 的核酸及胺基酸序列十分相近。將 pMACS1 cDNA 相對應基因命名為 *MCm-ACS1*, pMACS7 cDNA 相對應基因命名為 *MCm-ACS2*。

C、苦瓜 ACC 合成 基因之南方氏雜交分析

抽取苦瓜基因組 DNA, 分別以 *Bam*HI、*Eco*RI、*Hind*III、*Sal*I 組合進行單切或雙 切後, 以電泳分離後轉印至轉漬膜, 以 ACC 合成 cDNA pMACS1 為探針, 進行南方氏雜交分析, 結果顯示此基因於苦瓜基因組中為單一拷貝。

D、反義基因之構築

將選殖得到的 ACC 合成 cDNA pMACS1 之正向及反向, 分別連接於 CaMV 35S 啟動子 (promoter) 後方, 並於基因末端加上終結子 (terminator), 構築於含報導基因 GUS 及篩選基因 NPTII 的 pRT99gus 質體中, 形成苦瓜之順義及反義 ACC 合成 基因。構築完成的質體將抽取大量純化之質體 DNA, 供農業試驗所園藝系張有明博士, 運用其建立之苦瓜轉殖系統進行基因轉殖。

E、苦瓜採收後生理之探討

1. 收取授粉後十四至十六天之未轉殖苦瓜果實, 置於流通式呼吸缸內, 於 20°C 測定 0、0.1、1、10、100 μ L/L 乙烯濃度處理 24 小時後, 苦瓜果實呼吸率及乙烯生成量的變化。

a. 以早夏作苦瓜為材料的結果顯示, 未處理乙烯的苦瓜果實於第十一天完全後熟; 處理 0.1 μ L/L 乙烯

的果實始終未出現明顯的乙烯生成高峰，遲至處理後九天才完全黃化腐爛，此乙烯濃度太低，促進果實後熟的效果不大，不適合作為轉殖果實分析用；1 $\mu\text{L/L}$ 、10 $\mu\text{L/L}$ 、100 $\mu\text{L/L}$ 乙烯處理的果實則於三天後即黃化腐爛， CO_2 生成高峰均較對照組高。

- b. 以晚夏作苦瓜為材料的結果顯示，未處理乙烯的苦瓜果實於第十三天完全後熟；1、10、100 $\mu\text{L/L}$ 乙烯處理的果實則於第八天出現乙烯生成高峰，以 100 $\mu\text{L/L}$ 乙烯處理的果實有最高的乙烯生成量，並於第十一天完全黃化腐爛。處理較高濃度乙烯的果實呼吸率較大。轉殖苦瓜果實將可以 10 $\mu\text{L/L}$ 乙烯處理分析果實對乙烯之敏感度。
2. 為比較乙烯類似物丙烯對苦瓜果實的影響，並避免處理之乙烯殘留於呼吸缸，影響果實乙烯生成之測定，以晚夏作苦瓜為材料，分別處理 100、1000 $\mu\text{L/L}$ 丙烯，未處理乙烯的苦瓜果實於第十三天完全後熟；處理 100 $\mu\text{L/L}$ 丙烯的果實於第六天出現乙烯生成高峰，以 1000 $\mu\text{L/L}$ 丙烯處理的果實則於第五天即進入乙烯生成期，並於第九天有最高的乙烯生成量，約為 100 $\mu\text{L/L}$ 丙烯處理之兩倍，並於第十一天完全黃化腐爛。處理較高濃度乙烯的果實呼吸率較大。
3. 收取授粉後十六天之未轉殖苦瓜果實，置於流通式呼吸缸內，於 15、20、25°C 使自然後熟，分別測定苦瓜果實呼吸率及乙烯生成量的變化。結果顯示苦瓜於 25°C 溫度下放置 4 天即出現乙烯生成高峰，且很快腐爛；於 20°C 則遲至第 8 天才出現乙烯生成高峰，但乙烯生成量較於

25°C 多；於 15°C 下，乙烯高峰並不明顯，約於第 13 天始出現小幅度上升。貯存溫度越高，苦瓜後熟速度越快，轉殖苦瓜果實將可以 20°C 貯存分析果實自然後熟的情形。

F、苦瓜採收後基因表現情形

分別抽取於 20°C 下，以 0、0.1、1、10、100 $\mu\text{L/l}$ 乙烯、100、1000 $\mu\text{L/l}$ 丙烯處理 24 小時之授粉後十四至十六天未轉殖苦瓜果實的 poly(A)⁺ RNA 20 μg ，以苦瓜 ACC 合成 cDNA pMACS1 及 pMACS7 為探針，進行北方雜交分析，結果顯示 0.1 $\mu\text{L/l}$ 乙烯處理 24 小時的苦瓜果實中 ACC 合成基因之 mRNA 累積量最高，概其他乙烯濃度處理的果實中 mRNA 累積高峰短於 24 小時，且高峰後逐漸降解，故累積量較低。MCm-ACS1 在授粉後 3 天即有表現，並在第 6 天達到高峰，隨後逐漸減少其表現量，至第 21 天的 mRNA 累積量些微提高；而 MCm-ACS2 在果實發育前期的表現量與 MCm-ACS1 的表現情形一致，但表現量極少，並在果實發育後期無法偵測到其 mRNA 的累積。苦瓜果實貯存在 15°C 下於第 18 天達到乙烯生成高峰，並於第 23 天後熟；而 MCm-ACS1 在貯藏前期並無基因表現，但在第 9 天可偵測到 mRNA 的累積，並持續表現至果實完全後熟；MCm-ACS2 同時在第 9 天有基因表現，相較於其他溫度的結果顯示，會受到低溫的誘導而在後熟階段中表現。果實貯存在 20°C 下，在第 8 天有乙烯高峰出現，並於 12 天黃化腐爛；在 25°C 下貯存苦瓜果實則在第 4 天有乙烯高峰，於第 8 天完全後熟。比較 MCm-ACS1 基因表現與果實乙烯生成量的結果可知，兩者在時間上具有相關性。而 MCm-ACS2 在 20°C 及 25°C 下的表現量極少。若以 10 $\mu\text{L/l}$ 乙烯於 20°C 下分別處理苦瓜果實 1、2、4、8、12、24 小時，由結果可知，隨著乙烯處理時間的增加，會使果實後熟的時間提早，並使乙烯生

成量提高, *MCm-ACS1* 基因經乙烯處理 1 小時即有表現, 並在第 8 個小時達到乙烯高峰, 並隨後逐漸減少 mRNA 的累積。而 *MCm-ACS2* 的表現亦會受到乙烯誘導, 但 mRNA 的累積量仍舊稀少。

G、反義基因之轉殖

將構築好的順反義基因交由農業試驗所張有明博士, 運用已建立之花粉電穿孔轉殖法導入苦瓜, 收穫轉殖後代種子。目前收得轉殖種子約一千多粒, 已播種於穴盤使其發芽長葉, 將分別抽取轉殖植株之基因組 DNA, 以聚合連鎖反應進行篩選。

(二) 達到預定進度

(三) 預算已完全執行

一、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 89:2475-2479.