植物学通报 2002，19（3）：348～353
Chinese Bulletin of Botany

转反义 PG 基因番茄果实细胞结构变化的研究①

李曜东 顾淑荣 魏玉凝 周 馥 赵敬芳
（中国科学院植物研究所 北京 100093）

摘要 经细胞学观察发现，转反义 PG 基因番茄果实在不同成熟期及存放前后，其果皮外面几层细胞的厚度都比未转基因的厚 1～5 μm，细胞结构、细胞质和细胞核等的状态都有明显区别。尤以贮存后更为明显，未转基因果实的果皮细胞结构解体、细胞质凝聚、细胞核变的模糊程度都比转基因的严重。经外源乙烯处理后，转基因和未转基因果实的细胞结构也有相似的变化。结果表明：反义 PG 基因的转入降低了 PG 活性，并且减弱了外源乙烯的作用，延缓了果实的衰老，提高了耐贮性能，从而起到果实保鲜作用。

关键词 转基因番茄果实，反义 PG 基因，乙烯，细胞结构

A Study on Changes in Cell Structure of Antisense PG Transgenic Tomato Fruit

LI Yao-Dong GU Shu-Rong WEI Yu-Ning ZHOU Fu ZHAO Jing-Fang
（*Institute of Botany*, *The Chinese Academy of Sciences*, Beijing 100093）

Abstract It was observed that the outer-layer cells of the pericarp of antisense PG transgenic tomato were 1～5 μm thicker than those of nontransgenic tomato, and clear differences existed in cell structure and cytoplasm and nucleus status between the fruits of the transgenic and nontransgenic tomatoe at different stages of fruit ripening and storage, especially at the end of storage. The fruit of nontransgenic tomato showed a serious collapse of pericarp cell structure, condensation of cytoplasm and blurring of nucleus, compared with that of the transgenic tomato. Exogenous ethylene treatment caused similar changes in cell structure of the fruits of transgenic and nontransgenic tomatoes. These results demonstrated that the expression of the antisense PG gene in tomato fruit effectively inhibited the activity of endogenous PG, reduced the effect of ethylene and prolonged the time of fruit storage.

Key words Transgenic tomato fruit, Antisense PG gene, Ethylene, Cell structure

番茄（*Lycopersicon esculentum*）具有丰富的营养，广泛的用途，既是蔬菜又可作水果。但番茄的果实不耐贮藏和运输，人们使用了如齐学礼和蒋如生（1991）所概述的各种保鲜技术。结果不是很理想。20 世纪 70～80 年代科学工作者对番茄贮藏中软化的原因进行了研究，认为 PG（多聚半乳糖醛酸酶）是使番茄软化的关键酶之一（Hobson，1965；Speirs *et al*，1989；Giovanuoni *et al*，1989；Della *et al*，1986）。20 世纪 80 年代后期成功地构建 PG 反义 RNA 系统并得到 PG 活性降低的番茄果实（Grierson *et al*，1986；Bird *et al*，1988）。90 年代以来相继又有将反义 PG 基因转入番茄并得到转基因植株再生的报道（Schuch *et al*，1991 鄯戎等，1994 叶志彪，1994 魏玉凝等，1996）。但在转基因植株后代细胞组织化学方

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t21-030

① 国家自然科学基金资助项目（批准号：39770532）。
作者简介 李曜东，1948 年生，副研究员，主要从事植物细胞生物学研究。
收稿日期：2001-04-03 接受日期：2002-02-25 责任编辑 刘 晖

面的研究尚未见报道。本研究利用组织化学方法，观察和研究转基因与未转基因果实细胞结构的变化与果实软化之间的关系及外源乙烯对它们的影响，为基因工程果实的鉴定和开发利用提供依据。

1　材料和方法

以番茄 1995 年转反义 PG 基因的纯合子果实为材料（魏玉凝等，1996）。品种为‘丽春’和‘强丰’。以未转基因的果实为对照。取‘丽春’不同发育期刚采摘的和室温下存放一周的果实赤道区果皮，用卡诺液固定，石蜡切片，切片厚度为 8 μm，用高碘酸-锡夫反应和卡马斯兰染色，进行细胞学观察。

乙烯利处理：采收粉顶期‘强丰’转反义 PG 基因与未转基因果，用 1 mg/L 的乙烯利溶液浸泡 30 min 后晾干，对照果用水浸泡 30 min，晾干。两者均在室温 28 ~ 30 ℃下放一周后取样。然后按上述法固定、切片、染色及观察照相。

果皮厚度是按照每个材料用测微尺测量 5 个视野的平均数，再根据放大倍数换算得出。

2　实验结果

番茄的果实是由果皮、胎座和种子组成。果皮是由外果皮、中果皮及内果皮组成。果皮里面中央部分是中轴胎座，胎座外围有一层充满胶状物质和种子的种子腔，凡是果皮愈厚，种子腔所占相对比例愈小的，品质愈好（Herman，1948；赵荣琛，1958）。据此，我们除观察细胞内含物的变化外，也把果皮的厚度作为一个指标进行观察比较。

2.1　转反义 PG 基因果实细胞结构与对照果实的比较

1、白顶期：采摘‘丽春’品种白顶期果实，其果皮外边几层细胞的厚度，转基因的比未转基因的（对照）稍厚。前者的厚度为 23.81 μm，后者为 22.83 μm。两者的细胞壁、细胞膜、细胞核都清晰可见，细胞质分布均匀。此期果实 PG 活性不高。

2、粉顶期：如图 1、2 所示。图 1 是对照，其果皮外边几层细胞的厚度为 21.83 μm，图 2 为转基因的，其厚度为 26.79 μm。转基因的果皮细胞中，细胞核及核仁都十分清晰，而对照的细胞核及核仁虽可见到，但界面较模糊。说明细胞内物质开始降解。

3、粉红期：图 4 为转基因的，果皮外边几层细胞的厚度为 25.79 μm，其细胞壁、细胞膜均可分辨。而对照如图 3 所示，其厚度为 22.32 μm，细胞壁、细胞膜已不易分清，细胞质凝聚。

4、粉红期果实存放一个星期后的情况：图 6 所示，转基因果皮外边几层细胞的厚度为 24.80 μm，各层细胞仍保持原来结构，但细胞之间出现空隙。对照如图 5，其厚度只有 19.84 μm，细胞解体。

2.2　外源乙烯利处理对转基因果及对照果的影响

图 7、8 为刚采摘的材料。图 7 为转基因果，未经乙烯处理的。果皮外边几层细胞的厚度为 27.78 μm，细胞壁、细胞膜及核清晰可见，细胞之间紧密相连。未转基因果未经乙烯处理的见图 8，其厚度为 22.82 μm，细胞有收缩，细胞之间出现小的空隙。而两者的细胞核较清楚。



图 1～6 转基因和未转基因(对照)番茄果实细胞结构的变化 品种:丽春图 1,粉顶期对照。图 2,转基因番茄果实粉顶期的果皮细胞。图 3,粉红期对照。图 4,转基因番茄果实粉红期的果皮细胞。图 5,粉红期贮藏 7 天的对照。图 6,转基因番茄果实粉红期贮藏 7 天的果皮细胞。(×756 倍)

Fig.1～6 Changes of cell structure of transgenic and nontransgenic (CK) tomato fruites

Cultivar: Lichun. **Fig.1**. CK at pink-top stage. **Fig.2**. The pericarp cell of transgenic tomato fruit at pink-top stage. **Fig.3**. CK at pink stage. **Fig.4**. The pericarp cells of transgenic tomato fruit at pink stage. **Fig.5**. CK fruit was stored for 7 days at pink stage. **Fig.6**. The pericarp cells of transgenic tomato fruit at pink stage. The fruit was stored for 7 days. ×756

图 9、10 均是转基因果实。图 9 经乙烯处理,存放一个星期的结果。其细胞形态变异较大,尤以中层细胞变化较明显,细胞收缩、变形,细胞核解体。果皮外边几层细胞的厚度为 26.29 μm。未经乙烯处理的图 10,存放一周,其果皮外边几层细胞的厚度为 29.76 μm,几层细胞还较清楚。

图 11、12 都是未转基因的,图 11 是采摘后经乙烯处理,存放一个星期的。果皮外边

几层细胞的厚度为 19.84 μm，细胞解体，细胞质凝聚。而未经乙烯处理的（图 12），存放一周，其厚度为 22.82 μm，比经乙烯处理的要厚。细胞解体及细胞质凝聚情况都不象乙烯处理的那么严重。果皮外边几层细胞的厚度两者都不如转基因的厚。

图 7～12　乙烯对转基因和未转基因番茄粉顶期果实细胞结构的影响。品种 :强丰。图 7，转基因果实的果皮细胞。图 8，未转基因果实的果皮细胞。图 9，转基因果实乙烯处理后贮藏 7 天的果皮细胞。图 10，转基因果实未用乙烯处理贮藏 7 天的果皮细胞。图 11，未转基因果实用乙烯处理贮藏 7 天的果皮细胞。图 12，未转基因果实未用乙烯处理贮藏 7 天的果皮细胞。

Fig.7～12　Effect of ethylene on cell structure of transgenenic and nontransgenic tomato fruites at turning stage. Species : Qiangfeng. **Fig.7**. The pericarp cells of transgenic fruit. **Fig.8**. The pericarp cells of nontransgenic fruit. **Fig.9**. The pericarp cells of transgenic fruit. The fruit was treated with ethylene and was stored for 7 days. **Fig.10**. The pericarp cells of transgenic fruit. The fruit was not treated with ethylene and was stored for 7 days. **Fig.11**. The pericarp cells of nontransgenic fruit. The fruit was treated with ethylene and was stored for 7 days. **Fig.2**. The pericarp cells of nontransgenic fruit. The fruit was not treated with ethylene and was stored for 7 days. ×756

http://www.cnki.net

从图 7、9、10 可以看出，三个都是转基因的。图 7 是刚采摘时的，图 10 是存放一个星期的，图 9 是经乙烯处理后，存放一个星期的。其细胞形态结构呈明显的梯度变化，即细胞逐渐解体，细胞核渐模糊。

未转基因的一组，如图 8 是刚采摘的，图 12 是采后存放一个星期的，图 11 是乙烯处理后存放一个星期的。果皮外边几层细胞形态结构也有一个与上述相似的梯度变化。

我们还观察了淀粉粒在番茄果实中分布的情况。白顶期果实中未发现淀粉粒存在，粉顶期发现淀粉粒，粉红期有较多的淀粉粒。淀粉粒多分布在果实的中部，靠近中轴胎座几层细胞的细胞壁附近。淀粉粒的出现，随着果实的成熟不断增多，与转基因及乙烯处理没有直接关系。

3 讨论

细胞学观察发现，在番茄各不同成熟期，转反义 PG 基因果的果皮外边几层细胞的厚度都比未转基因的厚 1 ~ 5 μm，表明反义 PG 基因的转入增加了果皮的厚度，推迟了细胞质的凝聚及细胞结构的解体，延缓了果实的衰老，提高了耐贮性能。但转基因番茄果实粉红期的细胞之间同样出现空隙，并没能阻止果实的软化。Smith 等人(1988)的报道支持了这一观点。可见 PG 不是细胞壁降解使果实软化的唯一作用因子，并不像 Crook 和 Grierson(1983)所论述的 PG 在果实成熟过程中水解细胞壁，从而导致果实软化。刘愚在 1986 年曾指出，乙烯作为植物激素在果实成熟过程中起着重要作用，卢春彬等(1990)曾报道外源乙烯可明显提高番茄果实中 PG 的活性，通过我们的实验也发现，用外源乙烯处理转反义 PG 基因和未转基因果实，细胞结构发生变化。与未经乙烯处理的比较，加速了细胞结构及细胞核的解体和细胞质的凝聚，果皮变薄，但从转基因与未转基因果实比较，转基因果实的细胞结构和细胞形态的变化比较缓慢，说明反义 PG 基因与乙烯的作用是相反的。它减弱了外源乙烯的作用，抑制了 PG 活性，起到延缓果实衰老的效果，但并不能阻止果实的软化。我们认为果实的软化是多个因子作用的结果，尚需进一步研究。

参 考 文 献

叶志彪，李汉霞，周国林，1994. 番茄多聚半乳糖醛酸酶反义 CDNA 克隆的遗传转化与转基因植株再生。园艺学报，**21**：305 ~ 307

齐学礼，蒋如生，1991. 蔬菜贮藏保鲜技术. 天津科技出版社，25 ~ 33

卢春彬，刘存德，沈全光，梁厚果，1990. PG 在番茄果实成熟中的作用及二价金属离子与乙烯对 PG 活性的影响。植物学报，**32**(5)：337 ~ 342

刘愚，1986. 果实成熟过程中乙烯的生成和应用. 大自然探索，**5**：127 ~ 132

赵荣琛，1958. 蔬菜栽培学. 高等教育出版社，820

鞠戎，田颖川，沈全光，刘存德，莽克强，1994. 番茄多聚半乳糖醛酸酶 CDNA 的克隆及其对番茄中 PG 表达的反义抑制. 生物工程学报，**10**：96 ~ 102

魏玉凝，李曜东，马庆虎，宋艳茹，1996. 表达多聚半乳糖醛酸酶反义 RNA 的转基因番茄分析。植物学报，**38**(3)：245 ~ 248

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t21-030

Bird C R, Smith C J S, Ray J A, Moureau P, Bevan M W, Bir A S, Hughes S, 1988. The tomato polygalacturonase gene and ripening specific expression in trangenic plant. *Plant Mol Biol*, **11**: 651 ~ 662

Crook P R, Grierson D, 1983. Ultrasturcture of tomato fruit ripening and role of polygalacturonase isoenzymes. *Plant Physiol*, **72**:

1088 ~ 1093

Della P D, Alexander D C, Bennett A B, 1986. Molecular cloning of tomato fruit polygala cturonase analysis of polygalacturonase mRNA level during ripening. *Proc Natl Acad Sci USA*, **83**:6420 ~ 6424

Giovanuoni J J, Dellapenna D, Bennett A B, Fischer R L, 1989. Experesion of achieric polygalacturonase in transgenic *rin* (Ripening lnhilitos) tomato fruit results in polyuronide degradation but not fruit softening. *Plant Cell*, **1**:53 ~ 63

Grierson D, Tucker G A, Keen J, Ray J, Bird C R, Schuch W, 1986. Sequencing and identification of a cDNA clone for tomato polygalacturonase. *Nucl Acids*, **14**:8595 ~ 8603

Herman E H, 1948. The structure of economic plants. New York: The Macmillan Company, 551 ~ 579

Hobson G E, 1965. The firmness of tomato fruit in relation to polygalacturonase activity. *J Hort Sci*, **40**:66 ~ 72

Schuch W, Kanczler J, Robertson D, Hobson G, Tucker G, Grierson D, Bright S, Bird C, 1991. Fruit quality characteristics of transgenic tomato fruit with altered polygalaturonase activity. *Hortscience*, **26**:1517 ~ 1520

Speirs J, Lee B, Brady C, Robertson J, Mcglasson W B, 1989. Endopolygacturonase messen RNA enzyme and softening in the ripening fruit of arange of tomato genotypes. *J Plant Physiol*, **135**:576 ~ 582

Smith C J S, Watson C F, Morris P C, Bird C R, Seymour G B, 1990. Inhibitance and effect on ripening of antisense polygalacturonase gene in transgenic tomatoes. *Plant Mol Biol*, **14**: 369 ~ 379

Smith C J S, Watson C F, Ray J, Bird C R, Morris P C, Schuch W, Grierson D, 1988. Anti-sense RNA inhibition of polygalacturonase gene expression in transgenic tomatoes. *Nature*, **334**:724 ~ 726

（上接 358 页）

孟祥红，王建波，利容千，2000. **光周期对光敏胞质不育小麦花药发育过程中** Ca^{2+} **分布的影响. 植物学报**，**42**(1)：15 ~ 22

宋佩伦，蒋仲良，彭文冲，1978. **花药体细胞组织对花粉发育的作用及其控制. 花药培养学术讨论会文集，北京：科学出版社**，133 ~ 135

吴军霞，景健康，张玉华，胡含，1997. **禾谷类花器官机械游离小孢子培养研究. 实验生物学报**，**30**(3)：323 ~ 333

杨军，秦跟基，杨琴，陈佩度，周燮，1999. **表油菜素内酯和水杨酸对小麦花药培养的影响. 植物生理学通讯**，**35**(4)：288 ~ 289

欧阳俊闻，贾双娥，张驰，1989. **一个新的小麦花药培养基——**W14 **培养基. 中国科学院遗传研究所工作年报**(1987 ~ 1988)，**北京：科学出版社**，102

钟华鑫，方国伟，梁海曼，1987. **低温预处理影响籼稻花药培养效率的研究. 植物生理学报**，**13**(2)：144 ~ 153

徐星明，胡适全，于飞，1992. **小麦花药培养力的遗传研究概况. 遗传**，**14**(3)：43 ~ 46

夏镇澳，1995. **植物组织培养与农业. 植物生理学通讯**，**31**(1)：62 ~ 64

梁辉，贾双娥，欧阳俊闻，贾旭，1997. **多效唑在小麦花药培养中应用的研究. 作物学报**，**23**(2)：220 ~ 225

章建新，赵明，王美云，苏宝林，2000. **小麦花药超微结构对短时期高温的敏感性，华北农学报**，**15**(2)：48 ~ 52

葛台明，余毓君，1996. **小麦花药培养的基因型和培养基效应研究. 华中农业大学学报**，**15**(5)：411 ~ 413

蒋宁，章静娟，沈晓蓉，马秀君，周淼平，陆维忠，1997. **植物生长调节剂** 4PU-30 **对小麦花药培养效果的影响. 江苏农业学报**，**13**(3)：149 ~ 153

温书敏，郎明林，陈荣敏，梁凤山，1999. **小麦幼穗提取液对小麦花药培养的影响. 河北农业大学学报**，**22**(3)：5 ~ 7

潘建伟，董爱华，朱睦元，2000. **高等植物的** PCD **研究进展**(**一**). **遗传**，**22**(30)：189 ~ 192

Misiura M, Zenkteler M, 1973. **颠茄花药培养中单雄生殖的研究. 单倍体育种资料集**(**三**)，**北京：科学出版社**，162 ~ 168

Szakacs E, kovacs G, Pauk J, 1988. Substitution analysis of callus induction and plant regeneration from anther culture in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Reports*, (7):127 ~ 129

https://www.sciengine.com/doi/10.3724/CBB-t21-030