

文章编号:1000-582X(2007)01-0129-05

环境胁迫和乙烯对番茄 ACO1 基因表达的影响*

胡宗利, 陈国平, 吕丽娟, 陈绪清, 严波

(重庆大学 生物工程学院, 重庆 400030)

摘要:克隆番茄 ACC 氧化酶 1 (*LeACO1*) 基因特异片段, 以此作为探针, 与经过干旱和干旱后复水、淹水、伤害、不同温度等胁迫环境及乙烯处理的番茄总 RNA 进行 Northern 杂交, 杂交结果表明, *LeACO1* 基因的表达被干旱抑制, 被复水、外源乙烯强烈诱导; 淹水处理对叶片中该基因的表达无影响, 而强烈诱导其在茎中的表达; 37 °C 高温处理可以诱导 *LeACO1* 基因在番茄茎中的表达; 伤害对该基因的表达没有明显影响。

关键词:环境胁迫; 乙烯; ACC 氧化酶 1 (ACO1); 番茄

中图分类号:Q786

文献标识码:A

乙烯是一种重要的植物激素, 对植物的调节作用主要通过内源乙烯生物合成的调节来实现^[1-2]. ACC 氧化酶 (ACO) 是乙烯生物合成途径中的一个关键酶, 催化 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC) 氧化生成乙烯. ACO 最早由 Hamilton 等人发现^[3], 并命名为乙烯形成酶 (ethylene-forming enzyme), 之后人们又陆续从桃^[4]、花椰菜^[5]、香蕉^[6]、甘蔗^[7]、美洲黑杨^[8] 等植物中分离出了 ACC 氧化酶基因. 现有研究表明, ACO 由多基因家族编码, 在番茄中至少包括 5 个家族成员^[9-11], 即 *LeACO1*、*LeACO2*、*LeACO3*、*LeACO4*、*LeACO5* 等, 其表达具有明显的组织特异性. Barry 等人^[9]对番茄 *LeACO1*、*LeACO2*、*LeACO3* 基因在果实成熟、叶片衰老、花发育过程中的表达模式做了较为详细的研究, 发现 *LeACO1* 主要在成熟番茄果实中表达, *LeACO2* 主要在与花粉囊有关的组织中表达, *LeACO3* 主要表达于花器官中. Nakatsuka 等^[10]发现 *LeACO4* 与 *LeACO1* 一样, 在果实发育过程中大量表达. 但是到目前为止, 没有关于环境胁迫 (除伤害) 和外源乙烯对番茄 ACO 基因表达影响的研究报道. 为此, 在实验中, 根据 NCBI 上发布的番茄 *LeACO1* 基因序列设计引物, 从野生型番茄基因组 DNA 中 PCR 扩增出 *LeACO1* 基因特异片段, 并以此制备探针, 采用 Northern 杂交技术,

研究乙烯反应突变体番茄 Nr, rin 以及伤害、干旱、复水、淹水、温度等环境胁迫和外源乙烯对其表达的影响, 阐明该基因与乙烯以及环境胁迫之间的关系, 为深入研究番茄 ACO 基因的调控功能提供一定的科学依据.

1 材料和方法

1.1 番茄材料与栽培

野生型番茄品种 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Ailsa Craig, AC⁺); 乙烯生成和果实成熟均受抑制的番茄突变体 (ripening inhibitor, rin); 乙烯不敏感型番茄突变体 (Never-ripening, Nr); 野生型番茄品种 AC⁺ 是突变体 rin 和 Nr 的近等基因系, 均为英国诺丁汉大学 Donald Grierson 教授惠赠. 所有番茄材料均采用营养钵在温室条件下栽培.

1.2 试剂

Taq 酶、PMD18-T 载体、限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I (购自大连宝生物工程有限公司); DNA 凝胶回收试剂盒和 DNA 标准 D2000 (购自天为时代科技有限公司); 放射性同位素 α -P³²-dCTP (购自北京福瑞生物工程公司); Hybond-N⁺ 膜及随机引物标记试剂盒 (购自 Amersham Biosciences 公司); 寡聚核苷酸引物合成和序列测定委托上海英骏生物技术有限公司.

* 收稿日期:2006-08-10

基金项目:教育部留学回国人员启动基金资助项目(教外司留[2005]55号);重庆市自然科学基金资助项目(8045)

作者简介:胡宗利(1971-),重庆大学博士,主要从事分子生物学的研究.陈国平,男,教授,博士生导师, E-mail: chenguoping@cqu.edu.cn.

1.3 方法

1.3.1 果实的采收

按照授粉后的天数计算,分别采收不同时期的果实进行研究.约在20~35 d之间的番茄果实均称为幼果,即 Immature Green 果实(简称 IMG);35 d之后番茄果实已充分膨大,但果皮全是青绿色,称为青熟期果实,即 Mature Green 果实(简称 MG);果实的顶端开始由青绿色变黄白色,称为破色期果实,即 Breaker 果实(简称 B);B+1(B时期后第1 d),B+4(B时期后第4 d,果实由黄色变成红色,已成熟)等.

1.3.2 环境胁迫和乙烯处理番茄植株

1) 伤害处理

收取生长了一个月的 AC⁺,Nr,rin 植株的成熟叶片,用刀片划碎,分别于0 h,2 h,6 h 取样.

2) 干旱与复水

将在温室栽培条件下正常生长一个月的 AC⁺番茄植株连续6 d 断水处理,使整个植株处于严重萎焉状态,分别收集植株的根、茎和叶片为萎焉样品.第7 d 恢复水分供应,浇水后的2 h,4 h,8 h 和24 h 分别收集植株的根、茎和叶片.

3) 淹水处理

正常生长一个月的 AC⁺番茄植株,连同营养钵一起置于敞口容器中,保持根部及根部以下被水淹没,分别于淹水后1 d,3 d,5 d 取样茎和叶片.

4) 不同温度处理

将正常培养1个月的 AC⁺番茄植株放置于4℃,22℃,37℃条件下,分别于放置后的4 h,8 h,24 h 从茎、叶取样.

5) 乙烯处理

使用外源乙烯处理 AC⁺番茄 MG 时期果实样品,处理方法参照寇晓虹等^[12]的描述.

1.3.3 番茄样品基因组 DNA 和总 RNA 的提取

AC⁺幼叶基因组 DNA 的提取和以上各种方法处理过的番茄样品总 RNA 的提取按照参考文献^[13]中的描述进行.

1.3.4 番茄 *LeAC01* 基因特异片段的克隆

根据 NCBI 和 TIGER 上公布的 *LeAC01* (GenBank 登录号: X58273), *LeAC02* (GenBank 登录号: Y00478), *LeAC03* (GenBank 登录号: Z54199), *LeAC04* (GenBank 登录号: AB013101), *LeAC05* (TIGER 登录号: TC158405) 基因序列进行同源性比较,其3'端序列的同源性相对较低,根据 *LeAC01* 基因3'端特异性较高的序列设计一对引物,上游引物:5'-TAA CGG GAA GTA CAA GAG TG-3';下游引物:5'-CTA CCA TAC

ATA AGA AGA GCA A-3';以 AC⁺幼叶基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增.扩增产物经回收、纯化后,连接到 PMD18-T 载体上,然后转化感受态大肠杆菌 JM109,并进行 α-互补筛选.提取转化子质粒 DNA,采用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 进行双酶切验证,挑取阳性转化子菌落进行序列测定.

1.3.5 Northern 杂交

以克隆的 *LeAC01* 基因特异片段为模板,用同位素 α-P³²dCTP 制备探针,将此探针与经甲醛变性胶电泳后的各种番茄样品总 RNA 各20 μg 进行杂交,其操作过程按《分子克隆实验指南》^[14]描述进行.

2 结果与分析

2.1 番茄 *LeAC01* 基因特异片段的克隆

根据 GenBank 上公布的 *LeAC01* 基因序列设计引物,以 AC⁺基因组 DNA 为模板,PCR 扩增出约450 bp 的 *LeAC01* 基因特异片段(如图1所示).该 PCR 产物经克隆、测序后,测序结果表明,所获得的基因片段为正确的 *LeAC01* 目标片段.

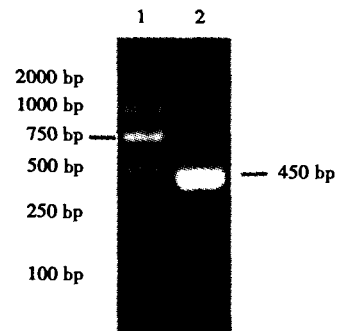


图1 *LeAC01* 基因片段的 PCR 扩增电泳图

2.2 Northern 杂交结果与分析

2.2.1 在 AC⁺番茄果实发育过程中 *LeAC01* 基因的表达

在 AC⁺番茄果实发育过程中,从授粉后第5 d (5dpa)至 MG 时期,*LeAC01* 基因的转录信号几乎检测不到,随着 AC⁺番茄果实成熟度的不断增加,直到 B

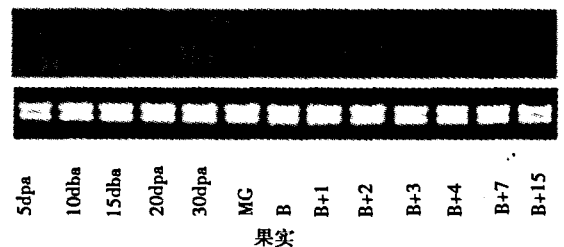


图2 AC⁺番茄果实成熟过程中 *LeAC01* 基因表达量的变化

时期, *LeACO1* 有较强的表达,并于 B + 1 时期达到最强,之后该基因的 mRNA 表达逐渐趋于稳定且无明显差异(见图 2)。

2.2.2 AC⁺⁺、Nr 和 rin 番茄果实中 *LeACO1* 基因的表达

在野生型番茄 (AC⁺⁺) 中,随着果实成熟度的不断增加, *LeACO1* 的表达量也随之逐渐加强;在乙烯不敏感型突变体 (Nr) 果实成熟过程中也有类似的表达趋势,但不同的是 B 时期后,该基因的表达量就基本保持恒定,这可能由 Nr 成熟果实对乙烯不敏感造成的;在乙烯生成和果实成熟均受抑制的番茄突变体 (rin) 果实发育过程中, B + 4 时期表达最强, IMG 时期次之, B 时期最弱,这可能由 rin 果实发育过程中乙烯生成量减少和果实成熟受到抑制引起(见图 3)。

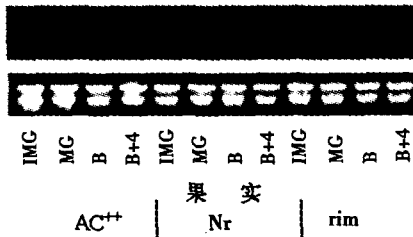


图3 AC⁺⁺、Nr、rin 番茄果实中 *LeACO1* 基因表达的差异

2.2.3 伤害处理对 AC⁺⁺、Nr 和 rin 番茄叶片中 *LeACO1* 基因表达的影响

AC⁺⁺、Nr 和 rin 番茄叶片经过伤害处理后, 6 h 之内 *LeACO1* 基因的表达量没有明显变化,甚至几乎检测不到信号(见图 4),说明伤害处理对 AC⁺⁺、Nr 和 rin 番茄叶片中 *LeACO1* 基因表达无影响。

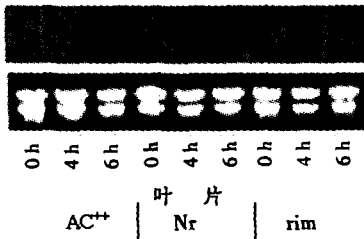
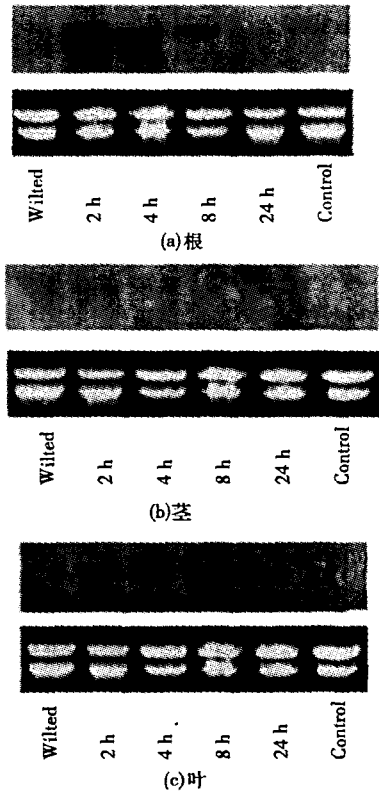


图4 伤害处理对 AC⁺⁺、Nr 和 rin 番茄叶片中 *LeACO1* 基因表达的影响

2.2.4 干旱及复水处理对 AC⁺⁺ 番茄植株各部位 *LeACO1* 基因表达的影响

在萎焉植株中, *LeACO1* 基因在根、茎、叶 3 个部位的表达量均极低;在根部,恢复浇水后 2 h,该基因的表达水平明显增强,并随着复水时间的增加,表达量逐渐降低,直到与对照(正常状态生长的 AC⁺⁺ 番茄植株根部)中的表达量相当;在茎部,复水 2 h 时, *LeACO1* 基因表达量有所加强,但表达量同样随着复水时间的增



Wilted(萎焉植株); Control(正常生长的植株);
2 h, 4 h, 8 h, 24 h (复水处理后 2 h, 4 h, 8 h, 24 h 植株)
Control: 正常 AC⁺⁺ 番茄茎叶

图5 干旱与复水处理分别对番茄 AC⁺⁺ 株系根、茎、叶中 *LeACO1* 基因表达的影响

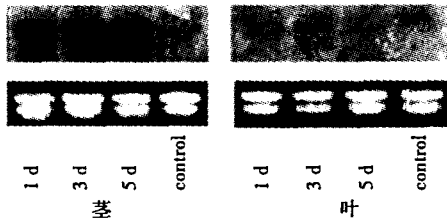
加而降低,复水 24 h 时的表达量与萎焉茎和对照茎相差无几;叶片中,萎焉时和正常生长的植株叶片中该基因的表达量都很低,随着复水时间的增加 *LeACO1* 基因的表达量略有增加。由此可见, *LeACO1* 基因在番茄根、茎、叶中的表达量较低,干旱抑制该基因在这些部位的表达,而复水能强烈诱导其表达。

2.2.5 淹水处理对番茄 AC⁺⁺ 株系茎、叶中 *LeACO1* 基因表达的影响

在正常生长的 AC⁺⁺ 植株茎和叶中, *LeACO1* 基因的表达水平都很低;淹水处理 AC⁺⁺ 植株茎 1 d 后, *LeACO1* 基因表达量急剧增强,其表达强度一直维持到淹水 3 d 和 5 d;淹水处理 AC⁺⁺ 植株叶片 1 d 至 5 d, *LeACO1* 基因的表达几乎不受影响,与正常生长 AC⁺⁺ 植株叶片中的表达差异不大。由此可以推测,淹水处理可以强烈诱导 *LeACO1* 基因在番茄植株茎部的表达,但对叶片中该基因的表达影响不大。

2.2.6 不同温度处理对 AC⁺⁺ 番茄植株 *LeACO1* 基因表达的影响

AC⁺⁺ 番茄茎在 4 °C 和 22 °C 条件下处理 4 h 到 24 h, *LeACO1* 基因的表达量均没有明显变化,在 37 °C



1 d,3 d,5 d:淹水处理后1天,3天,5天的AC++番茄茎或叶;

图6 淹水处理对番茄AC++植株茎、叶中LeACO1基因表达的影响

条件下处理8 h到24 h后,该基因的表达水平大大提高,由此说明高温处理可以诱导LeACO1基因在番茄茎中的表达,不过存在一个滞后效应;AC++番茄叶片在不同的温度下处理不同的时间,LeACO1基因的表达量都很低,几乎没有明显变化。

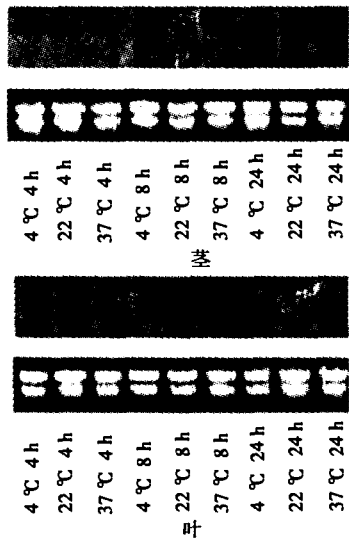
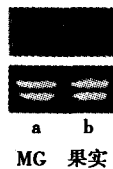


图7 不同温度下AC++番茄茎、叶中LeACO1基因的表达差异

2.2.7 乙烯处理对AC++番茄LeACO1基因表达的影响

经乙烯处理的AC++番茄MG时期果实中,LeACO1基因的表达量迅速增加(见图8),由此可见,外源乙烯能够诱导LeACO1基因在番茄MG时期果实中表达。



a:未经乙烯处理MG时期果实;b:乙烯处理的MG时期果实

图8 外源乙烯对AC++番茄MG果实中LeACO1基因表达的影响

3 讨论

通过对AC++番茄的研究发现,LeACO1基因主要在成熟果实内表达,在根、茎、叶中的表达量极低,该结果与Barry等^[9]的研究结果一致.与AC++番茄相比,由于Nr番茄对乙烯不敏感,rin番茄中能感知到的内源乙烯量很少,该基因在这些果实中的表达明显减弱,此外,外源乙烯对LeACO1基因表达有明显诱导作用.进一步验证了乙烯对番茄LeACO1基因的表达起重要的调控作用。

从一系列环境胁迫对LeACO1基因表达的影响可以看出,伤害对该基因的表达没有明显影响,这与Barry等^[9]的报道相反,这可能与取材不同有关,实验中取成熟叶作为研究对象,而Barry等的研究对象为幼叶;干旱抑制该基因在番茄根、茎、叶的表达,而复水能强烈诱导其表达;淹水处理虽然对叶片中该基因的表达无影响,而强烈诱导了LeACO1基因在番茄茎中的表达;37°C高温处理可以诱导LeACO1基因在番茄茎中的表达,而对叶片中该基因的表达无影响。

目前,人们已克隆了瓜^[15-16]、绿豆^[17]、马铃薯^[18]、烟草^[19]等物种内ACO基因家族各成员,并研究了这些成员在伤害、温度变化、激素等方面的表达模式,不仅各物种间各成员的表达差异很大,而且同一物种内各成员的表达模式各不相同,可能ACO基因家族各成员的表达调控由不同的调控系统影响.实验中研究了LeACO1基因在外源乙烯和各种环境胁迫中的表达模式,而其它番茄ACO基因家族成员的表达模式很可能与之有较大差异,这些差异引起的原因何在,还有待进一步研究。

参考文献:

- [1] YANG S F, HOFFMAN N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35: 155-189.
- [2] KENDE H. Ethylene biosynthesis[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1993,44:283-307.
- [3] HAMILTON A J, BOUZAYEN M, GRIERSON D. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1991, 88 (16): 7434-7437.
- [4] 金勇丰,张耀洲,陈大明,等. 桃ACC氧化酶基因的克隆和植物表达载体的构建[J]. 园艺学报, 1998, 25(1): 37-43.
- [5] 陈银华,张俊红,欧阳波,等. 花椰菜ACC氧化酶基因的克隆及其RNAi对内源基因表达的抑制作用[J]. 遗传学

- 报, 2005, 32(7):764-769.
- [6] DO YY, THAY T S, CHANG T W, et al. Molecular cloning and characterization of a novel 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene involved in ripening of banana fruits[J]. J Agric Food Chem, 2005, 53 (21):8239-8247.
- [7] 王自章, 李杨瑞, 张树珍, 等. 甘蔗 ACC 氧化酶基因片段的克隆与序列分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(1):62-69.
- [8] 李明亮, 韩一凡, 李玲, 等. ACC 氧化酶 cDNA 克隆及其对美洲黑杨体内乙烯产生的反义抑制[J]. 林业科学研究, 1999, 12(3):223-228.
- [9] BARRY C S, BLUME B, BOUZAYEN M, et al. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato[J]. Plant J, 1996, 9: 525-535.
- [10] NAKATSUKA A, MURACHI S, OKUNISHI H, et al. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Oxidase, and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening[J]. Plant Physiol, 1998, 118: 1295-1305.
- [11] SELL S, HEHL R. A fifth member of the tomato 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase gene family harbours a leucine zipper and is anaerobically induced[J]. DNA Seq, 2005, 16 (1): 80-82.
- [12] 寇晓虹, 朱本忠, 罗云波, 等. 番茄果实中乙烯与多聚半乳糖醛酸酶的关系[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30 (6): 675-680.
- [13] CHEN G P, WILSON I D, KIM S H, et al. Inhibiting expression of a tomato ripening-associated membrane protein increases organic acids and reduces sugar level of fruit[J]. Planta, 2001, 212: 799-07.
- [14] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2版. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1992.
- [15] BOUQUIN T, LASSERRE E, PRADIER J, et al. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35 (6): 1029-1035.
- [16] LASSERRE E, BOUQUIN T, HERNANDEZ JA, et al. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (Cucumis melo L.) [J]. Mol Gen Genet, 1996, 251 (1): 81-86.
- [17] YU S J, KIM S, LEE J S, et al. Differential accumulation of transcripts for ACC Synthase and ACC oxidase homologs in etiolated mung bean hypocotyls in response to various stimuli[J]. Mol Cells, 1998, 8 (3): 350-358.
- [18] NIE X, SINGH R P, TAI G C. Molecular characterization and expression analysis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs from potato under abiotic and biotic stresses[J]. Genome, 2002, 45 (5): 905-913.
- [19] KIM Y S, CHOI D, LEE M M, et al. Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in Nicotiana glauca L. [J]. Plant Cell Physiol, 1998, 39 (6): 565-573.

Effect of Environmental Stress and Ethylene on the Expression of *LeACO1* Gene

HU Zong-li, CHEN Guo-ping, LV Li-juan, CHEN Xu-qing, YAN Bo
(College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing, 400030, China)

Abstract: The specific ACC oxidase 1 gene fragment of tomato was cloned and prepared for a probe which was used to hybridize with total RNAs that were extracted from the materials treated with ethylene and different environmental stresses, such as drought, water recovery, flood, wound and temperature, respectively. Northern blot analysis indicated that the expression of *LeACO1* was restrained by drought, while strongly induced by water recovery and exogenous ethylene. After treated by flood stress, the expression level of *LeACO1* in leaves had no distinctively changes, while its expression level in stems was rapidly increased. Moreover, the expression of *LeACO1* in tomato stems could be induced at the temperature of 37 degree. In addition, wounding had no influence on the expression of *LeACO1*.

Key words: environmental stress; ethylene; ACC oxidase 1 (ACO1); tomato