

环境胁迫和激素诱导甘蔗 ACC 合成酶基因家族三个成员的表达

王爱勤¹ 杨丽涛¹ 王自章² 韦宇拓³ 何龙飞¹ 李杨瑞^{1,4,*}

(¹ 广西大学农学院, 广西南宁 530005; ² 中国科学院植物研究所, 北京 100093; ³ 广西大学生命科学与技术学院, 广西南宁 530005; ⁴ 广西农业科学院广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007)

摘要: ACC合成酶(ACS)是高等植物乙烯生物合成途径中的限速酶。在克隆到甘蔗 ACC合成酶基因家族3个成员 Sc-ACS1、Sc-ACS2 和 Sc-ACS3 的基础上, 分别以它们作为探针, 检测了激素诱导和环境胁迫对甘蔗苗期该3成员表达的影响。结果表明, 乙烯利诱导 Sc-ACS1 在叶中表达, 在根中不表达; Sc-ACS2 在根、叶中表达; Sc-ACS3 主要在根部表达, 在叶中不表达。在甘蔗叶片中, Sc-ACS1 对冷胁迫、暗培养和 LiCl 胁迫均有应答, 并受植物生长激素 IAA 诱导而表达; Sc-ACS2 无论是在生长激素诱导还是环境胁迫下, 其 mRNA 均维持较低水平。

关键词: 甘蔗; ACC合成酶; 基因家族; 表达
中图分类号: S566

Expression of Three Members of ACC Synthase Gene Family in Sugarcane Induced by Hormones and Environmental Stress

WANG Ai-Qin¹, YANG Li-Tao¹, WANG Zi-Zhang², WEI Yu-Tuo³, HE Long-Fei¹ and LI Yang-Rui^{1,4,*}

(¹ Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530005, Guangxi; ² Institutes of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093; ³ College of Life Science and Biotechnology, Guangxi University, Nanning 530005, Guangxi; ⁴ Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, Guangxi, China)

Abstract: 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase is one of the key rate-limiting enzymes for ethylene biosynthesis in higher plants. Based on the cloning of Sc-ACS1, Sc-ACS2 and Sc-ACS3 of ACS gene families, their expressions were tested in the roots and leaves of sugarcane with Sc-ACS1, Sc-ACS2 and Sc-ACS3 as the probes, respectively. The results of Northern blotting analysis showed that the expression of Sc-ACS1 was induced by ethephon in leaves, but not in roots; that of Sc-ACS2 in leaves and roots; and that of Sc-ACS3 in roots, while not in leaves. Under the environmental stresses (cold stress, dark-growing condition and LiCl stress) and hormone inducement (IAA), the mRNA of Sc-ACS1 showed a higher expression while that of Sc-ACS2 maintained low expression level in leaves.

Key words: *Saccharum officinarum* L. Hybrid; 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase; Gene family; Expression

乙烯对植物生长具有广泛的调节作用。生理生化研究表明, 乙烯利对甘蔗的增产、增糖具有重要的调节作用。在甘蔗分蘖初期用 200~400 mg/L 的乙烯利叶面喷施, 对甘蔗生长有明显的抑制作用, 80~100 mg/L 浓度的乙烯利处理则叶面积、株高、有效茎数都比对照增加。在甘蔗生长后期, 高浓度的乙烯利处理则可提高甘蔗糖分、蔗汁锤度、蔗汁糖分、蔗汁重力纯度, 降低蔗汁还原糖含量^[1], 抑制甘蔗开花^[2]。关于乙烯利调节甘蔗增产、增糖的机理, 目前

形成^[3,4]; 另一种观点认为外源乙烯利不影响 ACC 和 ACC 合成的水平, 因此与体内乙烯的形成无关^[5]。越来越多研究证据支持第一种观点。姚瑞亮等发现乙烯利处理后乙烯释放有一共同特点, 即在乙烯释放下降过程中有一个小的回升过程, 出现一个次高峰, 认为可能是乙烯利诱发甘蔗内源乙烯释放的结果, 而乙烯利对甘蔗生长和催熟的调控效应, 是通过影响茎尖的激素平衡, 降低茎尖生长素、细胞分裂素和赤霉素含量, 提高乙烯和脱落酸含量, 从而抑

基金项目: 国家自然科学基金(39860039)资助项目。

作者简介: 王爱勤(1966-), 女, 广西大学农学院副教授, 博士, 主要从事植物解剖生理及分子生物学研究。E-mail: lfhe@gxu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author): 李杨瑞。E-mail: liyr@gxu.edu.cn

Received(收稿日期): 2005-04-16; Accepted(接受日期): 2005-10-01.

制生长和促进成熟^[6]。然而,缺乏分子水平的证据。

ACC 合成酶(ACS)和 ACC 氧化酶(ACO)是乙烯合成途径的 2 个关键酶,内源乙烯的生物合成和释放量与这 2 个酶的活性、酶基因的表达有关。为了阐明乙烯利调控甘蔗增产和增糖的分子机理,在克隆到甘蔗 ACC 合成酶基因家族 3 个成员 Sc-ACS1、Sc-ACS2 和 Sc-ACS3 的基础上,分别以它们为探针,检测了激素诱导和环境胁迫对甘蔗苗期它们表达的影响。

1 材料和方法

1.1 供试材料及诱导处理

甘蔗(*Saccharum officinarum* L. Hybrid ROC 20)由广西大学农学院教学科研基地提供。甘蔗育苗在(30±2)℃的温室大棚中进行,以 1 芽/节、6 芽/桶种植于 50 cm×50 cm 塑料桶沙壤土中,每天定时喷雾淋水。选取 4~5 叶期甘蔗健壮幼苗,6 株一组,在(30±2)℃温室大棚中,以喷施自来水和自然光照作为对照,对叶面进行 0.5 mmol/L IAA 处理 2 h 和 6 h; 0.05 mmol/L 6-BA 处理 6 h; 100 mg/L、200 mg/L 和 400 mg/L 乙烯利分别处理 2 h、6 h 和 10 h; 暗处理 14 d; 75 mmol/L LiCl 处理 6 h; 4℃处理 6 h、12 h、24 h 和 72 h。处理后,剥取幼嫩叶片(心叶 3 cm),剪取根尖(5 cm 长),迅速加液氮冷冻,于 -80℃保存。

1.2 总 RNA 的提取

将待试样品在液氮中迅速研磨成粉末,加入异硫氰酸胍提取液(4 mol/L 的异硫氰酸胍; 2 mol/L NaAc, pH 4.2),用酸性苯酚和氯仿抽提后,异丙醇沉淀总 RNA,70%的乙醇洗涤沉淀 3 次,去掉盐分,用适量 DEPC 处理过的 ddH₂O 溶解 RNA,紫外分光光

度法检测总 RNA 纯度,1% 琼脂糖凝胶电泳检验 RNA 样品的完整性。

1.3 Northern 杂交

7 μg 样品总 RNA 经甲醛变性胶电泳后,将 RNA 转移到尼龙膜上^[13];采用的 Hybond-N' 膜是由 Amersham 公司提供。杂交膜于 80℃下烘干 2 h 以固定 RNA。以 Sc-ACS1、Sc-ACS2 和 Sc-ACS3 DNA 为探针,根据 Promega 公司提供的 Random Labeling Systems 反应盒用³²P 同位素进行 DNA 标记,标记反应的体积为 50 μL。用北京博大泰克高效液相杂交液,杂交膜在 65℃杂交过夜。2×SSC,0.1%SDS 洗液 65℃洗膜 2 次,每次 20 min,再用 0.1×SSC,0.1%SDS 的洗液洗膜 2 次,每次 20 min。所得的膜用保鲜袋包好,放置在加有增感屏的压片夹内,将一张磷屏放置在压片夹内的保鲜袋上,夹紧并将盒子盖紧,室温放置 5 d 时间,然后取出磷屏,用 9410-TYPHOON 型 Variable Mode Imager 扫描仪扫描并保存图像。

2 结果与分析

2.1 激素和环境胁迫诱导甘蔗 ACS 基因家族三成员在叶片中的表达

在甘蔗苗期,分别用激素和环境胁迫诱导甘蔗,然后提取叶片总 RNA 进行 Northern 杂交。从图 1-A 和 B 可以看出,以 Sc-ACS1 为探针,对照(CK)、6-BA 处理未见杂交信号,而 IAA、乙烯利、暗培养(KC)、LiCl 和冷胁迫下,Sc-ACS1 均可诱导表达。冷胁迫 12 h(C2)后信号明显增强,并长时间 Sc-ACS1 表达量维持较高水平。乙烯利处理以浓度 100 mg/L 诱

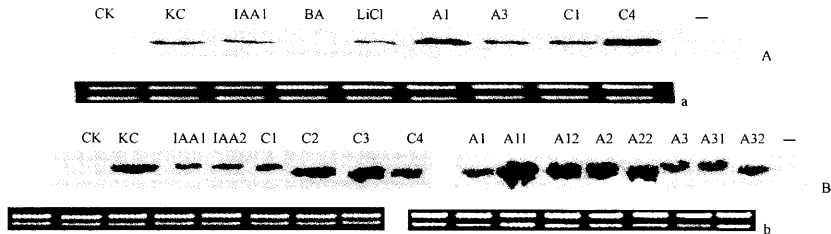


图 1 以 Sc-ACS1 为探针用甘蔗苗期叶片总 RNA 进行 Northern 杂交的结果(A 和 B)
Fig. 1 Northern analysis of the general RNA from sugarcane leaves at young plant stage with Sc-ACS1 as the probe(A and B)

CK 为光照条件下,水处理对照;KC 为暗培养处理;IAA1 和 IAA2 分别为 0.5 mmol/L IAA 处理 2 h 和 6 h;BA 为 6-BA 处理 6 h; A1、A11 和 A12 分别为 100 mg/L 浓度乙烯利处理 2 h、6 h 和 10 h;A2 和 A22 分别为 200 mg/L 浓度处理 2 h 和 10 h;A3、A31 和 A32 分别为 400 mg/L 浓度处理 2 h、6 h 和 10 h。LiCl 为 75 mmol/L LiCl 处理 6 h;C1、C2、C3 和 C4 分别为 4℃冷胁迫处理 6 h、12 h、24 h 和 72 h。a 和 b 分别表示相应样品叶片总 RNA 相同的上样量(1 μg)。下同。

CK: The control with water under light-growing condition; KC: dark-growing condition; IAA1 and IAA2: 0.5 mmol/L IAA inducement for 2 h and 6 h, respectively; BA: 0.05 mmol/L 6-BA for 6 h; A1, A11 and A12: 100 mg/L ethephon inducement for 2 h, 6 h and 10 h, respectively; A2 and A22: 200 mg/L ethephon inducement for 2 h and 10 h, respectively; A3, A31 and A32: 400 mg/L ethephon inducement for 2 h, 6 h and 10 h, respectively; LiCl: 75 mmol/L LiCl stress for 6 h; C1, C2, C3 and C4: cold stress at 4℃ for 6 h, 12 h, 24 h and 72 h, respectively. The letters a and b show the same amount of RNA samples (1 μg) added for the electrophoresis on 1.2% agarose gel. The same below.

导时间 6 h(A11)最强,并随时间延长而维持较高水平;200 mg/L 浓度诱导时间 2 h(A2)和 10 h(A22)杂交信号也较强,而 400 mg/L 浓度杂交信号较弱,并长时间维持较低水平(A3、A31 和 A32)。

由图 2 可以看出,除了乙烯利处理有较强杂交信号外,其余处理的诱导 Sc-ACS2 的 mRNA 均维持在较低水平。乙烯利 2 h 的处理中,以 100 mg/L 浓度(A1)比 400 mg/L 浓度(A3)诱导的杂交信号强。

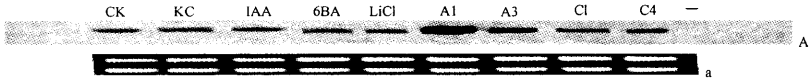


图 2 以 Sc-ACS2 为探针用甘蔗苗期叶片总 RNA 进行 Northern 杂交的结果(A)
Fig.2 Northern analysis of the general RNA from sugarcane leaves at young plant stage with Sc-ACS2 as the probe(A)

从图 3 可以看出,所有处理均无任何的杂交信号带。推测甘蔗 Sc-ACS3 基因在叶片中不表达。

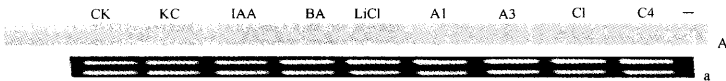


图 3 以 Sc-ACS3 为探针用甘蔗苗期叶片总 RNA 进行 Northern 杂交的结果(A)
Fig.3 Northern analysis of the general RNA from sugarcane leaves at young plant stage with Sc-ACS3 as the probe(A)

2.2 甘蔗苗期乙烯利诱导 ACS 基因家族在根中的表达

Sc-ACS1 基因在根中不表达。

由图 4 可以看出,在甘蔗苗期,用乙烯利处理,

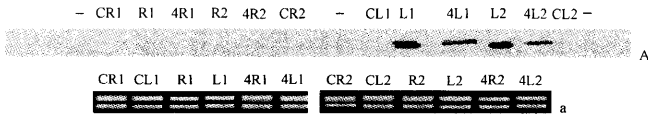


图 4 甘蔗苗期乙烯利诱导 Sc-ACS1 基因在根、叶中的表达(A)
Fig.4 Northern analysis of Sc-ACS1 in leaves and roots of sugarcane treated with ethephon (A)

对照为光照条件下水处理 2 h(CR1 为根,CL1 为叶)和 10 h(CR2 为根,CL2 为叶);乙烯利处理:100 mg/L 处理 2 h(R1 为根,L1 为叶)和 10 h(R2 为根,L2 为叶);400 mg/L 处理 2 h(4R1 为根,4L1 为叶)和 10 h(4R2 为根,4L2 为叶);“-”为空白对照,a 相应样品叶片总 RNA 相同的上样量(1 μg)。下同。

The respective treatments were as follows: the control with water under light-growing condition for 2 h (CR1 for roots and CL1 for leaves) and 10 h (CR2 for roots and CL2 for leaves), treatments with 100 mg/L ethephon for 2 h (R1 for roots and L1 for leaves) and 10 h (R2 for roots and L2 for leaves), 400 mg/L ethephon for 2 h (4R1 for roots and 4L1 for leaves) and 10 h (4R2 for roots and 4L2 for leaves). The letter a shows the same amount (1 μg) of RNA samples added for electrophoresis on 1.2% agarose gel. The same below.

从图 5 可以看出,在甘蔗苗期,用乙烯利处理,无论是对照还是处理,Sc-ACS2 基因在根、叶中都表达。随着时间延长,处理 10 h 时,对照的根、叶表达

量始终维持较低水平,而乙烯利处理在根、叶的表达量均明显提高,叶的表达量高于根部,100 mg/L 浓度的表达量略高于 400 mg/L。



图 5 以 Sc-ACS2 为探针进行 Northern 杂交的结果(A)
Fig.5 Northern blotting analysis with Sc-ACS2 as the probe (A)

从图 6 可以看出,在甘蔗苗期,用乙烯利处理 2 h 或 10 h,Sc-ACS3 基因在根中表达量均低于对照,

10 h 处理低于 2 h 处理,说明乙烯利对 Sc-ACS3 基因在根中的表达有抑制作用。

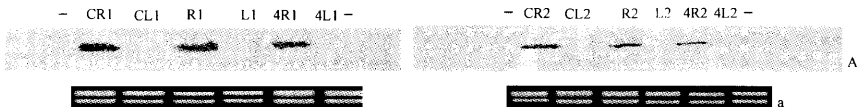


图 6 以 Sc-ACS3 为探针进行 Northern 杂交的结果(A)
Fig.6 Northern blotting analysis with Sc-ACS3 as the probe (A)

3 讨论

玉米 Zm-ACS2 和 Zm-ACS7 在氨基酸水平上有 95% 的同源性,但 Zm-ACS2 在胚乳发育过程中表达,并在胚的发育过程中高效表达,而 Zm-ACS7 在胚乳发育过程中不表达,在胚的发育过程中低水平表达^[9]。小麦 TA-ACS1 和 TA-ACS2 在氨基酸水平上只有 49% 的同源性,光照可诱导 TA-ACS1 基因在根和叶片中表达,但不能诱导 TA-ACS2 在叶片中表达,尽管 TA-ACS2 是从叶片中分离出来的,但它只在根部表达。小麦整个开花期,TA-ACS2 的表达始终低于 TA-ACS1 基因^[10]。已报道的 22 个拟南芥 ACS 基因家族中,至少有两个是不表达的基因^[11-15]。水稻 OS-ACS2 和 OS-ACS5 在氨基酸水平上只有 56% 的同源性,它们在水涝条件下分别调控水稻的短期和长期效应^[16]。这些研究结果说明 ACS 基因多基因家族的表达具有组织特异性,还有不表达基因。笔者的研究结果表明,甘蔗 Sc-ACS1 与水稻 OS-ACS2 在氨基酸水平上有 73% 的同源性,对冷害、离子胁迫和暗培养等环境胁迫有应答,对乙烯的诱导也表现为短期效应。Sc-ACS2 与水稻 OS-ACS5 在氨基酸水平上有 79% 的同源性,对乙烯的诱导也表现出长期效应。甘蔗 ACS 基因在甘蔗营养生长过程中的表达也具有器官特异性。Sc-ACS1 只在叶片中表达,Sc-ACS2 在根、叶中表达,Sc-ACS3 只在根中表达。

生长素是调节植物营养器官发育不可缺少的内部因子,其调控机理的基因表达学说认为,生长素可以使细胞伸长所需要的一些基因脱阻遏,从而表达^[17]。IAA 通过提高 ACS 基因的 mRNA 水平,促进腺苷氨酸向 ACC 转化,诱导乙烯产生,调节植物营养器官的生长和发育^[18]。而乙烯水平长期持续的提高,是深水水稻茎节间持续伸长的主要原因^[19]。本研究结果表明,生长素可以诱导甘蔗 Sc-ACS1 基因的表达,对 Sc-ACS2 基因没有明显影响,Sc-ACS3 则不表达,推测 IAA 可能使 Sc-ACS1 基因脱阻遏得到表达,加速甘蔗体内乙烯的形成,促进了甘蔗营养器官的发育^[1]。

综上所述,推测 ACS 基因家族不同成员在甘蔗生长发育过程中的表达,对甘蔗的生长起重要的调节作用。在正常发育下,Sc-ACS2 和 Sc-ACS3 在甘蔗根、叶中持续表达,维持营养器官正常生长所需的乙烯水平,是甘蔗生长发育的基础。乙烯利在甘蔗生长初期的作用,可能是加速甘蔗 Sc-ACS1 和 Sc-ACS2 基因的脱阻遏,增加 Sc-ACS1 在叶器官、Sc-ACS2 基

因在根、叶器官的表达,阻遏 Sc-ACS3 基因在根中的表达,从而增加叶片形成乙烯的速度和释放量,由此调控甘蔗不同器官中内源激素的平衡^[6],进而调控甘蔗的分蘖和生长^[1]。这是乙烯利促进甘蔗分蘖、生长、加速糖分积累进程,实现增产增糖,并抑制甘蔗开花等作用的重要分子基础。

References

- [1] Li Y-R, Solomon S. Ethephon: a versatile growth regulator for sugarcane industry. *Sugar Technol*, 2003, 5(4): 213-223
- [2] Moore P H, Osgood R V. Translated by Ou S-Y(欧仕益). Spraying ethephon inhibits flowering and improves sugar yield in sugarcane. *Oversea Agronomy - Sugarcane* (国外农学——甘蔗), 1990, 35(2): 31-33 (in Chinese)
- [3] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35: 155-189
- [4] Woltering E J, Somhorst D, Van der Veer P. The role of ethylene in interorgan signaling during flower senescence. *Plant Physiol*, 1995, 109: 1219-1225
- [5] Foster K R, Reid D M, Pharis R P. Ethylene biosynthesis and ethephon metabolism and transport in barley. *Crop Sci*, 1992, 32: 1345-1352
- [6] Yao R-L (姚瑞亮). The physiological bases of hormones and enzymes for ethephon regulation on growth and sugar accumulation in sugarcane. PhD dissertation of Fujian Agricultural University, 2001 (in Chinese with English abstract)
- [7] Wang Z-Z(王自章), Li Y-R(李杨瑞), Zhang S-Z(张树珍), Lin J-F(林俊芳), Guo L-Q(郭丽琼). Cloning and sequencing of ACC oxidase gene from sugarcane. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 2003, 30(1): 62-69 (in Chinese with English abstract)
- [8] Clark M S. Translated by Gu H-Y(顾红雅), Qu L-J(瞿礼嘉). *Plant Molecular Biology—A Laboratory Manual* (植物分子生物学——实验手册). Beijing: China Higher Education Press, 1998 (in Chinese)
- [9] Gallie D R, Yang T E. The ethylene biosynthetic and perception machinery is differentially expressed during endosperm and embryo development in maize. *Mol Gen Genomics*, 2004, 271: 267-281
- [10] Subramaniam K, Shahal A, Peter P U. Isolation of two differentially expressed wheat ACC synthase cDNAs and the characterization of one of their genes with root-predominant expression. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 1009-1020
- [11] Liang X, Abel S, Keller J A, Shen N F, Theologis A. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 11046-11050
- [12] Van der Straeten D, Rodrigues-Pousada R A, Villarreal R, Hanly S, Goodman H M, Montagu M V. Cloning genetic mapping and expression analysis of an *Arabidopsis thaliana* gene that encodes 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, 89: 9969-9973
- [13] Chae H S, Faure F, Kieber J J. The *eto1*, *eto2*, and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*, 2003, 15: 545-559
- [14] Liang X, Oono Y, Shen N F, Kohler C, Li K, Scolnik P A, Theologis A. Characterization of two members of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 1995, 167: 17-24
- [15] Vahala J, Schlagnhauser C D, Pell E J. Induction of an ACC synthase cDNAs by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol Plant*, 1998, 103: 45-50
- [16] Zarembinski T I, Theologis A. Anaerobiosis and plant growth hormones induce two genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Biol Cell*, 1993, 4: 363-370
- [17] Liang X, Shen N F, Theologis A. Li⁺-regulated 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1996, 10: 1027-1036
- [18] Kim W T, Silverstone A, Yip W K, Dong J G, Yang S F. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol*, 1992, 98: 465-471
- [19] Dominique V D S, Zhongyi Z, Eis P, Harry A, Van O, Marc C V M. A comparative molecular-physiological study of submergence response in lowland and deepwater rice. *Plant Physiol*, 2001, 125: 955-968