

协同抑制番茄 *ACO1* 对果实成熟及病程相关蛋白基因表达的影响

胡宗利¹, 陈国平¹, 吕丽娟¹, 陈绪清¹, GRIERSON Donald²

(¹重庆大学生物工程学院, 重庆 400030; ²Plant Sciences Division, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, UK)

摘要: 【目的】探讨协同抑制番茄 *ACO1* 基因对果实成熟和病程相关蛋白基因表达、内源乙烯生物合成及果实耐贮性的影响。【方法】采用 PCR 或 RT-PCR 方法克隆了番茄 ACC 氧化酶 1、ACC 氧化酶 3、EBF1、PR1、PR5 以及 NP24 基因片段, 并以此制备探针, 以协同抑制 *ACO1* 的转基因番茄和野生型番茄为研究对象, 进行 Northern 杂交, 同时测定了伤害叶片和果实的乙烯释放量, 并进行了果实贮藏试验等。【结果】Northern 杂交结果表明, 番茄 *ACO1* 基因表达被抑制后, 与果实成熟相关基因 *LeACO3* 和 *LeEBF1*, 以及病程相关蛋白基因 *LePR1*、*LePR5* 和 *LeNP24* 的表达量急剧降低。乙烯释放量测定试验和果实贮藏试验结果表明, 协同抑制 *LeACO1* 番茄完整和受伤叶片以及完整果实内源乙烯释放量相对于野生型番茄大大减少, 成熟果实贮藏时间延长。【结论】协同抑制番茄 *ACO1* 基因表达的同时, 与果实成熟相关基因和病程相关蛋白基因的表达也不同程度地受到抑制, 而且其内源乙烯生物合成减少, 果实耐贮性增强。

关键词: 协同抑制; 番茄 *ACO1*; 果实成熟; 病程相关蛋白基因

The Influence of Co-suppressing Tomato 1-Aminocyclopropane-1-Carboxylic Acid Oxidase I on the Expression of Fruit Ripening-Related and Pathogenesis-Related Protein Genes

HU Zong-li¹, CHEN Guo-ping¹, Lü Li-juan¹, CHEN Xu-qing¹, GRIERSON Donald²

(¹ College of Bioengineering, Chongqing University, Chongqing 400030; ² Plant Sciences Division, School of Biosciences, University of Nottingham, Sutton Bonington Campus, Loughborough, Leicestershire LE12 5RD, UK)

Abstract: 【Objective】The purpose of this study is to explore the influence of co-suppressing tomato ACC oxidase I on the expression of fruit ripening-related and pathogenesis-related protein genes and on the biosynthesis of endogenous ethylene and storage ability of fruits. 【Method】Specific fragments of several fruit ripening-related and pathogenesis-related protein genes from tomato (*Lycopersicon esculentum*) were cloned, such as the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase I gene (*LeACO1*), 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase III gene (*LeACO3*), EIN3-binding F-box 1 gene (*LeEBF1*), pathogenesis-related protein 1 gene (*LePR1*), pathogenesis-related protein 5 gene (*LePR5*) and pathogenesis-related protein osmotin precursor gene (*LeNP24*) by PCR or RT-PCR. Then these specific DNA fragments were used as probes to hybridize with the total RNAs extracted from the wild type tomato (AC⁺) and the *LeACO1* co-suppression tomatoes (*VII187* and *T4B*), respectively. At the same time, ethylene production measurement and storage experiment of tomato fruits were carried out. 【Result】The hybridization results indicated that the expression of fruit ripening-related genes, such as *LeACO3* and *LeEBF1*, and pathogenesis-related protein genes, such as *LePR1*, *LePR5* and *LeNP24*, were reduced sharply. The ethylene production in the fruits and wounded leaves decreased.

收稿日期: 2006-06-01; 接受日期: 2006-11-07

基金项目: 教育部“留学回国基金”项目(教外司留[2005]55号); 教育部“春晖计划”项目(教外司留[2003]589号)

作者简介: 胡宗利(1971-), 女, 重庆江津人, 讲师, 博士, 研究方向为分子生物学。E-mail: huzongli71@yahoo.com.cn。通讯作者陈国平(1959-), 男, 湖北大冶人, 教授, 研究方向为分子生物学与基因工程。E-mail: chenguoping@cqu.edu.cn

The storage time of ripening fruits was prolonged, when the expression of *LeACO1* gene in the transgenic tomato was suppressed.

【Conclusion】In the co-suppression tomatoes, the expression of fruit ripening-related and pathogenesis-related protein genes were restrained at the different degrees, the biosynthesis of endogenous ethylene decreased and the storage ability of tomato fruits increased.

Key words: Co-suppression; *LeACO1*; Fruit ripening; Pathogenesis-related protein genes

0 引言

【研究意义】乙烯是一种气体植物激素, 是调控果实成熟的关键因子, 对植物的种子萌芽、生长发育、衰老等均有重要的调控作用。目前, 已经明确了高等植物的乙烯合成途径^[1,2], 即 S-腺苷甲硫氨酸 (SAM) 在 ACC 合成酶 (ACS) 的催化作用下生成 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (ACC), 再经 ACC 氧化酶 (ACO) 氧化合成乙烯。其中, ACC 氧化酶是乙烯生物合成途径中的一个关键酶, 最早由 Hamilton 等^[3]发现, 后来人们又从许多植物中分离出了 ACC 氧化酶基因^[4-8]。【前人研究进展】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。Barry 等^[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。Nakatsuka 等^[10]研究了 *LeACO4* 在果实发育过程中的表达。这些研究结果表明, 番茄 ACO 基因家族各成员的表达具有明显的组织特异性, 其中 *LeACO1* 主要在成熟番茄果实中表达。【本研究切入点】本试验以 NCBI 上发布的番茄 *LeACO1*、*LeACO3*、*LeEBF1* (EIN3-binding F-box 1)、*LePR1* (pathogenesis-related protein 1)、*LePR5* (pathogenesis-related protein 5) 以及 *LeNP24* 基因序列为依据, 设计引物, 从野生型番茄中通过 PCR 或 RT-PCR 扩增出相应的基因片段, 并以之制备探针, 以协同抑制 *ACO1* 的转基因番茄和野生型番茄为研究材料, 进行 Northern 杂交, 同时测定了伤害叶片和果实的乙烯释放量, 进行了果实贮藏试验等。【拟解决的关键问题】检测并探讨协同抑制番茄 *ACO1* 对果实成熟和病程相关蛋白基因表达的影响, 以及对内源乙烯合成和耐贮性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型番茄植株 (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv Ailsa Craig, AC⁺⁺) 和 *ACO1* 协同抑制的转基因番

茄植株 *V1187*、*T4B* 均来自于英国诺丁汉大学 Donald Grierson 教授实验室, 野生型番茄 AC⁺⁺为转基因番茄 *V1187*、*T4B* 的转基因出发株系, 卡那霉素抗性基因-新霉素磷酸转移酶 (neomycin phosphotransferase II, npt II) 基因片段为本实验室克隆并保存。

1.2 试剂

Taq 酶、PMD18-T 载体、限制性内切酶 *Hind*III 和 *Xba* I (大连宝生物工程有限公司); DNA 凝胶回收试剂盒和 DNA 标准 D2000、Marker III (天为时代科技有限公司); 放射性同位素 α -³²P-dCTP (北京福瑞生物工程公司), Hybond-N⁺ 膜及随机引物标记试剂盒 (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。

1.3 方法

1.3.1 果实的收取 按照授粉后的天数计算, 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); 授粉 35 d 之后番茄果实体积大小不再变化且颜色完全呈青色, 称为青果时期, 即 Mature Green 果实 (简称 MG); 随着果实的不断成熟, 青果上出现第一抹黄色, 称为破色期果实, 即 Breaker 果实 (简称 B); 破色期过后的第 4 天已基本呈全红, 视为成熟果实 (简称 B+4)。

分别收取野生型番茄植株 AC⁺⁺、转基因番茄植株 *V1187* 和 *T4B* 的 IMG、MG、B、B+4 这 4 个时期的果实作为样品。

1.3.2 番茄基因组 DNA 与 RNA 的提取 提取野生型番茄植株 AC⁺⁺及转基因株系 *T4B* 和 *V1187* 的幼叶总 DNA 以及 4 个不同发育时期的果实, 即 IMG、MG、B、B+4 总 RNA, 提取方法均按 Chen 等^[12]描述的方法进行。

1.3.3 番茄 ACO1、ACO3、EBF1、PR1、PR5 以及 NP24 基因片段的获得 以 NCBI 公布的番茄 ACO1 基因序列 (GenBank 登录号: X58273), ACO3 基因序列 (GenBank 登录号: Z54199)、EBF1 基因序列 (GenBank 登录号: DQ307488)、PR1 基因序

列 (GenBank 登录号: X71592)、PR5 基因序列 (GenBank 登录号: AJ277064) 和 NP24 基因序列 (GenBank 登录号: AF093743) 为依据, 分别设计特异引物, 以 AC⁺⁺幼叶总 DNA 或 B 时期果实总 RNA 为模板, 进行 PCR 或 RT-PCR 扩增。特异引物序列如下:

LeACO1 Primers: 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'。

LeACO3 Primers: 上游引物: 5'-AAC AGA TGG GAC TCG GAT GTC ACT A-3'; 下游引物: 5'-CAC AAC AAT CAC ACA CAC ATA CAC C-3'。

LeEBF1 Primers: 上游引物: 5'-GGC AAT TAC AGA AGC AAA C-3'; 下游引物: 5'-CAG GCA CCA CAA CAA CAG-3'。

LePR1 Primer: 上游引物: 5'-TAC GCC AAT CAA AGA GC-3'; 下游引物: 5'-TTC CCA AGT CAC ATA AGC A-3'。

LePR5 Primers: 上游引物: 5'-TGT GAC TTA CAC TTA TGG TTC CG-3'; 下游引物: 5'-GTT GTT TCA TTG TGA GTA GAG CC-3'。

LeNP24 Primers: 上游引物: 5'-GCT CCG AGG GGA ACT AAG A-3'; 下游引物: 5'-ACC AGG GCA AGT AAA TGT G-3'。

用凝胶回收试剂盒回收、纯化目的片段, 将回收产物连接到 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。

1.3.4 Southern 杂交分析 以 1.9 kb *nptII* 基因片段为模板, 按照随机引物标记试剂盒的操作说明, 利用同位素 α -P³²dCTP 制备探针, 以此探针与经限制性内切酶 *Xba*I 完全酶切的 10 μ g 番茄植株 AC⁺⁺、*T4B* 和 *V1187* 幼叶总 DNA 做 Southern 杂交, 其操作过程按《Molecular Cloning》^[13]描述进行。

1.3.5 Northern 杂交分析 以克隆的 *LeACO1*、*LeACO3*、*LeEBF1*、*LeNP24*、*LePR1* 和 *LePR5* 基因片段为模板, 用同位素 α -P³²dCTP 制备探针, 将这些探针与经甲醛变性胶电泳后的番茄株系 AC⁺⁺、*T4B* 和 *V1187* 4 个时期的果实, 即 IMG、MG、Breaker 和 Breaker+4 总 RNA 20 μ g 杂交, 其操作过程按《Molecular Cloning》^[13]描述进行。

1.3.6 乙烯释放量的测定 用 CP-3800 气象色谱仪

(VARIAN) 的 FID 检测器 (VARIAN) 进行检测。测试条件为: 温度: T_J=T_D=150℃; T_c=100℃; 载气: 氮气; 流速: 50ml·min⁻¹; 分流比: 30:1; 尾吹: 30ml⁻¹·min⁻¹。

1.3.6.1 番茄叶片伤害后乙烯释放量的测定 分别取 *V1187*、*T4B* 和野生型番茄植株的成熟叶片, 用刀片划成小碎片, 密封于下置湿润滤纸的瓶中。每隔 24 h, 取 1 ml 气体, 进行检测。

1.3.6.2 番茄果实乙烯释放量的测定 取 *V1187*、*T4B* 和野生型番茄 B 时期的果实, 密封于小烧杯中。每隔 24 h, 抽取 1 ml 气体, 进行检测。

1.3.7 番茄果实的贮藏试验 分别取 B+4 时期 *V1187*、*T4B* 和野生型番茄果实, 置于下置湿润滤纸的盒内, 敞口室温放置, 比较这 3 种果实的耐贮性。

2 结果与分析

2.1 番茄 *ACO1*、*ACO3*、*EBF1*、*PR1*、*PR5* 以及 *NP24* 基因片段的克隆

根据 GenBank 上公布的 *LeACO1* 和 *LeACO3* 基因序列, 比较其同源性, 选择差异较大的区域, 分别设计特异引物, 以 AC⁺⁺总 DNA 为模板, PCR 扩增出相应的基因片段。

拟南芥中研究表明, *EBF1* 是一种 F-BOX 蛋白, 其表达降低了 *EIN3* 的积累, *EIN3* 为乙烯信号传导途径中一个重要的转录调控因子, 从而 *EBF1* 在乙烯信号传导途径中起着负调控的作用^[14]。本课题组首次克隆了番茄 *EBF1* 基因, 并登录 GenBank。本研究中克隆了番茄 *EBF1* 基因的一段编码区。

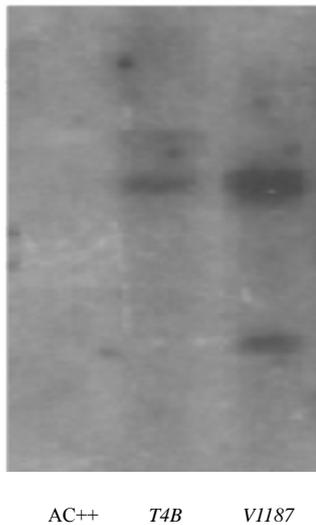
PR 蛋白是与病程相关的一系列蛋白, 如 *PR1*、*PR2*、*PR3*、*PR4*、*PR5* 等。*NP24* 是番茄中与烟草 *PR5* 蛋白同源的一种碱性蛋白质, 主要在果实中表达。笔者根据 GenBank 上已公布的序列, 从番茄 AC⁺⁺ 的 B 时期果实总 RNA 中分别克隆出 *LePR1*、*LePR5* 和 *LeNP24* 基因片段。

以上所得 PCR 产物经回收、纯化、克隆、测序, 结果表明, 这几个基因片段为正确的目标片段。

2.2 Southern blot 检测

取野生型番茄 AC⁺⁺ 以及 *ACO1* 协同抑制的转基因番茄植株 *T4B* 和 *V1187* 的幼叶, 分别提取基因组 DNA, 以同位素标记的 *nptII* 基因片段为探针, 进行 Southern 杂交检测, 杂交结果如图 1 所示, AC⁺⁺ 基因组中无卡那霉素抗性基因—*nptII* 基因存在, 而 *T4B* 和 *V1187* 中均有 2 条杂交带出现。由此说明, 本试验中

所采用的 ACO1 协同抑制转基因番茄植株 *T4B* 和 *V1187* 经过继代栽培后没有发生变异, 仍然具有 ACO1 协同抑制转基因番茄的特征。



AC⁺⁺、*T4B*、*V1187* 番茄基因组 DNA 经 *Xba*I 酶切消化后与放射性标记的 *nptII* 基因片段杂交
Genomic DNA of the AC⁺⁺, *T4B* and *V1187* tomatoes digested with *Xba*I restriction enzyme was hybridized with the radiolabelled *nptII* fragment

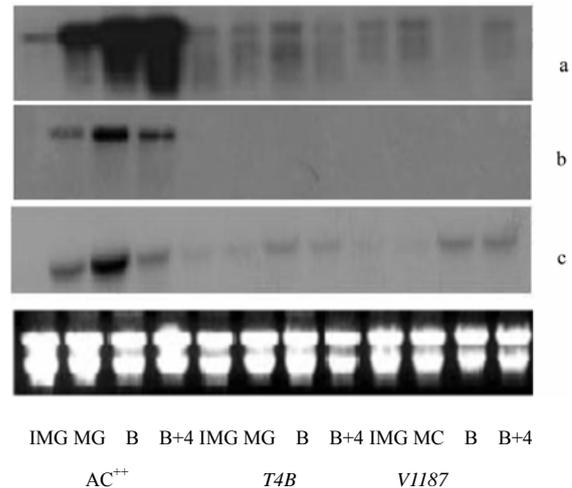
图 1 AC⁺⁺, *T4B*, *V1187* 番茄基因组 DNA Southern blot 检测

Fig. 1 Southern blot analysis of the genomic DNA from the AC⁺⁺, *T4B* and *V1187* tomatoes

2.3 协同抑制 *LeACO1* 对果实成熟相关基因表达的影响

分别以同位素标记的 *LeACO1*、*LeACO3* 和 *LeEBF1* 为探针, 与 AC⁺⁺ 和两个协同抑制 ACO1 番茄株系 *T4B*、*V1187* 的 4 个果实不同发育时期 (IMG、MG、B、B+4) 的总 RNA 进行杂交, Northern 杂交结果如图 2 所示。从图 2-a 可以看出, *LeACO1* 基因在野生型番茄中的表达随着果实的不断成熟而积累, 但在两个协同抑制 ACO1 转基因番茄 *T4B* 和 *V1187* 的果实发育过程中, *LeACO1* 基因的表达量基本保持不变, 与 AC⁺⁺ 中的表达比较, 强度相对较弱, 这说明 *LeACO1* 在这两个转基因株系中已被充分抑制。图 2-b 显示, *LeACO3* 基因在野生型番茄果实 B 时期表达最强, 随着果实成熟度的增加, 其表达反而减弱, 然而在两个转基因株系 *T4B* 和 *V1187* 的果实成熟过程中, *LeACO3* 基因完全不表达。图 2-c 显示, 无论是在野生型番茄果实还是协同抑制 ACO1 的番茄果实中,

LeEBF1 基因的表达趋势均相同, 即在 IMG 时期表达最弱, 随着果实的成熟, 表达量不断增加, B 时期表达量达到最高, 随后表达开始降低, 但是 *LeEBF1* 基因在两个转基因番茄株系果实中的表达与野生型番茄果实中的表达相比, 大大减弱。根据图 2 显示的杂交结果, 可以推论协同抑制番茄 ACO1 基因的表达后, 与果实成熟相关基因 ACO3 和 EBF1 的表达也同时被抑制。



a. *LeACO1* 基因在 AC⁺⁺、*T4B*、*V1187* 果实中的表达; b. *LeACO3* 基因在 AC⁺⁺、*T4B*、*V1187* 果实中的表达; c. *LeEBF1* 基因在 AC⁺⁺、*T4B*、*V1187* 果实中的表达
a. Expression of *LeACO1* gene in the wild type (AC⁺⁺), *T4B* and *V1187* tomato fruits; b. Expression of *LeACO3* gene in the wild type (AC⁺⁺), *T4B* and *V1187* tomato fruits; c. Expression of *LeEBF1* gene in the wild type (AC⁺⁺), *T4B* and *V1187* tomato fruits

图 2 *LeACO1*、*LeACO3*、*LeEBF1* 在野生型番茄和协同抑制 ACO1 番茄 (*T4B*、*V1187*) 的不同成熟度果实中的表达
Fig. 2 Expression of *LeACO1*, *LeACO3* and *LeEBF1* during the development of fruits in the wild type tomato and co-suppression *LeACO1* tomatoes (*T4B* and *V1187*)

2.4 协同抑制 *LeACO1* 对病程相关基因表达的影响

从图 3 可知, *LePR1* 基因在 AC⁺⁺ 的 B 时期有非常强的表达, 但在 AC⁺⁺ 果实的其它 3 个发育时期和 *T4B* 果实的 4 个发育时期, 该基因的表达完全被抑制。*LeNP24* 基因在 AC⁺⁺ 果实的 B 时期表达最强, IMG 时期次之, MG 时期最弱, 但在 *T4B* 果实中却是 MG 时期最强, B 时期次之, IMG 时期和 B+4 时期几乎不表达; *LePR5* 基因在 AC⁺⁺ 和 *T4B* 果实中的表达趋势类似, 均为 B 时期最强, IMG 时期的表达强度次之, 不同的是在 AC⁺⁺ 果实中 *LePR5* 表达最弱的为 B+4 时

期, 在 *T4B* 果实中却是 MG 时期。从图 3 可以看出, 野生型番茄中内源乙烯的大量增加促进了 PR 蛋白的积累, 但在协同抑制 *ACO1* 的转基因番茄果实中, PR 基因的表达明显减弱, 表明抑制内源乙烯的产生对 PR 基因表达同样有一定抑制作用, 其中以 PR1 最为典型, 其表达甚至被完全抑制。由此可见, PR 基因表达受到内源乙烯的诱导调控。

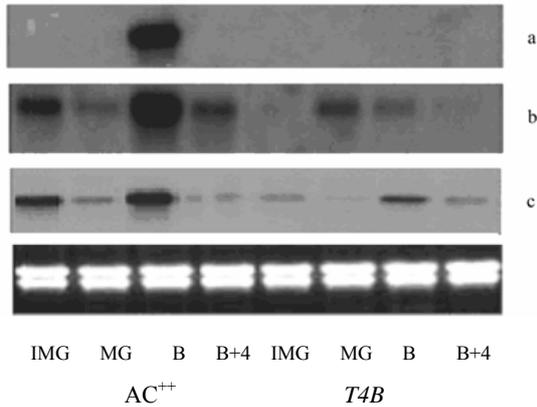


图 3 LePR1, LeNP24 和 LePR5 基因在野生型番茄及协同抑制 *ACO1* 番茄 *T4B* 果实不同发育时期的表达
 Fig. 3 Expression of *LePR1*, *LeNP24* and *LePR5* during the development of fruits in the wild type tomato and co-suppression *LeACO1* tomato (*T4B*)

2.5 乙烯释放量的测定结果

2.5.1 番茄叶片伤害后乙烯释放量的测定 野生型番茄完整叶片离体后 72 h 之内有少量乙烯释放, 而两个协同抑制 *ACO1* 转基因番茄完整叶片离体后, 检测不到乙烯信号, 说明这两个转基因番茄植株中乙烯的合成受到充分抑制; 然而这 3 种植株离体叶片经伤害处理后 72 h 之内, 乙烯释放量相应有所增加, 其中野生型番茄的增加量最大, 是无伤害离体完整叶片乙烯释放量的 5~7 倍, 而两个协同抑制 *ACO1* 转基因番茄的乙烯释放量虽然有所增加, 但最高也只能达到野生型番茄无伤害离体完整叶片的乙烯释放量 (图 4)。由此可见, 伤害可以强烈刺激野生型番茄叶片中乙烯的合成, 但对于乙烯合成途径中 *ACO1* 表达受到抑制的番茄叶片, 该刺激作用不明显, 该实验结果与熊爱生等^[15]的研究结果一致。

2.5.2 番茄果实乙烯释放量的测定 *AC++* 番茄 B 时期完整果实在离体 72 h 之内有乙烯释放。*T4B* 和 *V1187* 同时期果实乙烯释放量极低, 密封处理 72 h, 几乎检测不到乙烯信号, 这进一步说明协同抑制番茄 *ACO1* 基因可以有效地抑制乙烯的产生 (图 5)。

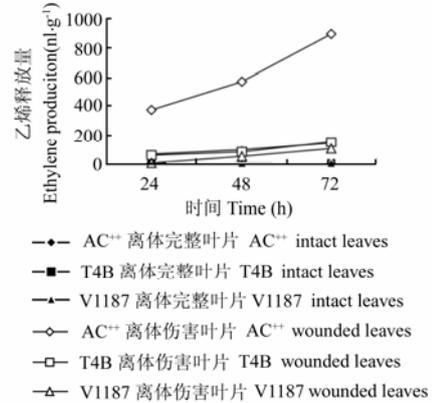


图 4 离体完整叶片和离体伤害叶片乙烯释放量测定
 Fig. 4 The ethylene production of the intact leaves and wounded leaves

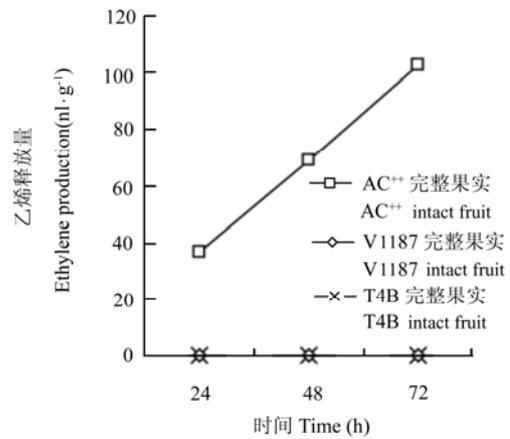


图 5 *AC++*、*T4B* 和 *V1187* 的 B 时期果实乙烯释放量测定
 Fig.5 The ethylene production of the fruits at the breaker stage from the wild type, *T4B* and *V1187* tomatoes

2.6 *AC++*、*T4B* 和 *V1187* 番茄果实的耐贮性分析

经观察 B+4 时期 *AC++* 和 *T4B*、*V1187* 番茄果实贮藏情况发现, *AC++* 果实贮藏 9 d 后就完全腐烂; *T4B* 果实贮藏 9 d 后除了有部分失水的现象, 基本看不到腐烂的迹象; *V1187* 果实贮藏 17 d 后仅有部分失水现

象; 贮藏 60 d 后, 部分转基因番茄开始出现腐烂且失水严重。由此可见, 在相同的贮藏条件下, 协同抑制 *LeACO1* 的番茄果实耐贮性比野生型番茄果实的耐贮性强, 延长其 B+4 果实货架期 50 d 左右。

3 讨论

本研究表明, *LeACO1* 基因在野生型番茄成熟果实中大量表达, *LeACO3* 基因在野生型番茄果实 B 时期表达最强, 随着果实成熟度的增加, 其表达反而减弱, 并且其表达强度远远低于 *LeACO1* 的表达强度, 该结果与 Barry 等^[9]的研究结果一致。但是在协同抑制 ACO1 番茄株系的果实发育过程中, *LeACO1* 的表达急剧下降, *LeACO3* 也几乎不表达 (图 2-a, b)。*LeACO1* 基因是番茄果实成熟过程中的主要调节因子, *LeACO1* 基因被抑制的同时, 也同样阻断了与果实成熟有一定相关性的 *LeACO3* 的表达。

EBF 是最早从拟南芥中分离出来能与 EIN3 相互作用的 F 框蛋白, 共有两大类, 即 EBF1 和 EBF2^[16]。Guo 等^[14] 和 Gagne 等^[17] 研究表明拟南芥 EIN3 蛋白是一个乙烯调控有关基因表达和形态反应过程中的关键转录因子, 乙烯可以快速地提高拟南芥 EIN3 蛋白水平, 在没有乙烯存在的情况下, EIN3 蛋白可以快速地通过 EBF1 和 EBF2 所介导的 ubiquitin/proteasome 途径而降解。这表明 ubiquitin/proteasome 途径通过降解 EIN3 蛋白而淬灭乙烯信号, 从而表现出对乙烯信号的负调节。番茄同源基因 EBF1 是否具有与拟南芥 EBF1 相似的功能? 对番茄果实成熟相关基因表达是否具有调控作用? 目前还未见相关的报道。本研究表明, 无论是在 AC⁺果实, 还是在 *T4B* 和 *V1187* 果实中, EBF1 基因在 B 时期都有表达, 不过在协同抑制 *LeACO1* 番茄果实中的表达强度与野生型番茄相比, 大大减弱 (图 2-c)。由此可以推测, 协同抑制 *LeACO1*, 番茄果实中乙烯的生物合成受阻, 内源乙烯减少 (图 5), 可能导致番茄 EIN3 蛋白水平降低, 那么在其体内对降解 LeEIN3 蛋白的需求减少, 从而 *LeEBF1* 的表达水平降低。但 *LeEBF1* 的功能和对乙烯信号转导的调控机理还有待进一步研究。

PRs (pathogenesis-related proteins) 是一类病程相关蛋白, 它是一类只有在病理或病理相关的环境下才被诱导表达的蛋白, 最早从烟草花叶病毒 (TMV) 感染的烟草叶片中发现^[18], 至今已从 30 多种植物中分离出各种 PRs^[19], 在众多 PRs 中以烟草 PRs 研究得最清楚, 相比之下, 人们对番茄的 PRs 研究得较少。目

前从番茄中分离了 *PR1*^[20]、*PR5*、*NP24*^[21]、*PR-P23*^[22]、*PR-P69*^[23]、*PR-P2*^[24] 等 PR 蛋白基因, 本研究选择了番茄 *PR1*、*PR5*、*NP24* 基因来研究协同抑制 *LeACO1* 对病程的影响。研究结果表明, 协同抑制 *LeACO1* 表达的同时, 也使 PR 基因的表达明显减弱, 其原因可以从两个方面理解。一方面, 已有研究表明许多病程相关基因 (PR 基因) 的启动子具有 GCC 框, 乙烯信号转导途径中的下游信号转导组分—乙烯反应因子 ERFs (ethylene-response factors) 可以特异性的结合于该 GCC 框上, 从而启动 PR 基因的表达^[25,26]。在协同抑制 *LeACO1* 转基因植株 *T4B* 中, 因乙烯生物合成受到抑制, 乙烯信号转导途径中可以与 GCC 框结合的 ERFs 的表达降低, 进而导致 PR 基因的表达降低。另一方面, *LeACO1* 受到抑制后, *T4B* 和 *V1187* 果实的耐贮性增强, 使其不易受病原菌的侵染, 而病原菌的侵染是 PR 基因表达的诱导因素, 在诱因缺乏的情况下, PR 基因的表达较低。

基因沉默 (gene silencing) 是转基因植物中特定基因由于种种原因不表达或表达量很低的遗传现象。根据基因沉默发生的时期, 基因沉默分为转录水平的基因沉默 (transcriptional gene silencing, TGS) 和转录后水平的基因沉默 (post-transcriptional gene silencing, PTGS)。前者通常与 DNA 甲基化有关, 表现为 mRNA 不能正常合成, 造成基因失活。后者虽能合成 mRNA, 但随后被降解而不能积累, 并同时诱导与外源基因同源的內源性基因沉默。近年来, 随着转录后基因沉默机制的深入探讨, 使人们能够利用它有针对性地使特定基因降低表达或不表达, PTGS 技术在功能基因组学和植物改良中显示出巨大的应用潜力。在植物的功能基因组研究及作物改良中, 常用的 PTGS 或 RNAi 技术, 按介导方法包括正义 RNA 介导的协同抑制、反义 RNA 介导的基因抑制、病毒介导的基因沉默 (VIGS) 和 hpRNA (hairpin RNA) 介导的基因沉默。协同抑制现象 (co-suppression) 首先由 Napoli 等^[27] 在研究转基因矮牵牛时发现的, 当时他们将这种现象称为协同抑制, 也叫正义抑制 (sense suppression, 相对于导入反义 RNA 的反义抑制)。

Waterhouse 等^[28] 首次明确了 dsRNA 在植物基因沉默中的关键作用, 他们后来又以靶基因反向重复序列构建一种发卡结构, 将带此结构的 hpRNA 载体导入植物体后, 在转录过程中产生 mRNA 发卡结构, 发卡茎部形成稳定的 dsRNA, 诱导同源的內源性基因沉默^[29]。关于 *LeACO1* 基因的沉默已有一些报道,

叶志彪等^[30]及熊爱生等^[15]采用反义基因技术转化番茄, 获得果实乙烯释放量降低、贮藏期延长的转基因番茄植株; Xiong A S 等^[31]后来又采用构建 hpRNA 载体转录后形成 dsRNA 和直接转入 siRNA 的方法抑制 *LeACO1* 基因的表达, 获得不同抑制程度的番茄植株, 而且其贮藏期延长到 120 d。Han 等^[32]以 *LeACO1* 正义基因抑制, 反义基因抑制和 hpRNA 介导抑制的转基因番茄为材料, 比较了这 3 种转基因番茄的抑制效率, 探讨了 RNAi 的抑制机理, 研究表明由 hpRNA 介导的基因沉默方法比单独采用正义或反义基因片段转化能更有效地抑制基因表达。本研究表明, 协同抑制 *LeACO1* 转基因番茄株系 *T4B* 和 *V1187* 中, 外源和内源 *LeACO1* 基因的表达受到了强烈的抑制, 进而强烈地抑制了乙烯的生物合成, 乙烯释放量极低, 密封处理 72 h, 几乎检测不到乙烯信号。因为番茄贮藏过程中, 释放到空气中的乙烯达到一定浓度时, 将进一步促进果实成熟, 导致果实很快腐烂, 转基因番茄株系 *T4B* 和 *V1187* 乙烯释放量极低, 将有利于果实耐贮性的提高。

ACC 氧化酶基因是一个多基因家族, 本文着重探讨了协同抑制 *LeACO1* 对果实成熟相关基因和病程相关基因表达的影响, 以及对内源乙烯合成和果实耐贮性的影响, 而对于这一多基因家族中其他成员进行基因沉默, 其影响如何, 有待进一步的研究。

4 结 论

协同抑制番茄 *ACO1* 基因表达的同时, 与果实成熟相关基因和病程相关蛋白基因的表达也不同程度地受到抑制, 而且其内源乙烯生物合成减少, 成熟果实耐贮性增强。

References

- [1] Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(1): 170-174.
- [2] Baur A H, Yang S F, Pratt H K. Ethylene biosynthesis in fruit tissues. *Plant Physiology*, 1971, 47: 696-699.
- [3] Hamilton A J, Bouzayen M, Grierson D. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991, 88: 7434-7437.
- [4] Bouquin T, Lasserre E, Pradier J, Pech J C, Balague C. Wound and ethylene induction of the ACC oxidase melon gene CM-ACO1 occurs via two direct and independent transduction pathways. *Plant Molecular Biology*, 1997, 35: 1029-1035.
- [5] Lasserre E, Bouquin T, Hernandez J A, Bull J, Pech J C, Balague C. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.). *Molecular General and Genetics*, 1996, 251(1):81-90.
- [6] Yu S J, Kim S, Lee J S, Lee D H. Differential accumulation of transcripts for ACC synthase and ACC oxidase homologs in etiolated mung bean hypocotyls in response to various stimuli. *Molecules and Cells*, 1998, 8: 350-358.
- [7] 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. *Genome*, 2002, 45: 905-913.
- [8] Kim Y S, Choi D, Lee M M, Lee S H, Kim W T. Biotic and abiotic stress-related expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family in *Nicotiana glutinosa* L. *Plant and Cell Physiology*, 1998, 39: 565-573.
- [9] Barry C S, Blume B, Bouzayen M, Cooper W, Hamilton A J, Grierson D. Differential expression of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene family of tomato. *The Plant Journal*, 1996, 9: 525-535.
- [10] Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A. 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. *Plant Physiology*, 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. *DNA Sequence*, 2005, 16(1): 80-82.
- [12] Chen G P, Wilson I D, Kim S H, Grierson D. Inhibiting expression of a tomato ripening-associated membrane protein increases organic acids and reduces sugar levels of fruit. *Planta*, 2001, 212: 799-807.
- [13] J 萨姆布鲁克, D W 拉塞尔. 黄培堂等译. 分子克隆实验指南. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002. Sambrook J, Russell D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [14] Guo H W, Ecker J R. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF EBF1/EBF2-dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 2003, 115: 667-677.

- [15] 熊爱生, 姚泉洪, 李 贤, 范惠琴, 彭日荷. ACC 氧化酶和 ACC 合成酶反义 RNA 融合基因导入番茄和乙烯合成的抑制. 实验生物学报, 2003, 36: 428-434.
- Xiong A S, Yao Q H, Li X, Fan H Q, Peng R H, Double-antisense ACC oxidase and ACC synthase fusion gene introduced into tomato by Agrobacterium-mediated transformation and analysis the ethylene production of transgenic plants. *Acta Biologica Experimentalis Sinica*, 2003, 36: 428-434.(in Chinese)
- [16] Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two arabidopsis F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 2003, 115: 679-689.
- [17] Gagne J M, Smalle J, Gingerich D J, Walker J M, Yoo S D, Yanagisawa S, Vierstra R D. Arabidopsis EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2004, 101: 6803-6808.
- [18] Van Lon L C, Van Kammen A. Polyacrylamide disc electrophoresis of the soluble leaf proteins from *Nicotiana tabacum* var. "Samsun" and "Samsun NN". II. Changes in protein constitution after infection with tobacco mosaic virus. *Virology*, 1970, 40 (2):190-211.
- [19] Sehgal O P. Pathogenesis-related proteins in lima bean leaves infected with tobacco ringspot virus and their distribution within and around local lesions. *Plant Cell Reports*, 1992, 12(1):55-59.
- [20] Tornero P, Conejero V, Vera P. A gene encoding a novel isoform of the PR-1 protein family from tomato is induced upon viroid infection. *Molecular and General Genetics*, 1994, 243(1):47-53.
- [21] Jia Y, Martin G B. Rapid transcript accumulation of pathogenesis-related genes during an incompatible interaction in bacterial speck disease-resistant tomato plants. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 455-465.
- [22] Rodrigo I, Vera P, Tornero P, Hernandez-Yago J, Conejero V. cDNA cloning of viroid-induced tomato pathogenesis-related protein P23. *Plant Physiology*, 1993, 102: 939-945.
- [23] Tornero P, Conejero V, Vera P. Primary structure and expression of a pathogen-induced protease (PR-P69) in tomato plants: Similarity of functional domains to subtilisin-like endoproteases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1996, 93: 6332-6337.
- [24] Linthorst H J, Danhash N, Brederode F T, Van Kan J A, De Wit P J, Bol J F. Tobacco and tomato PR proteins homologous to win and pro-hevein lack the "hevein" domain. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1991, 4: 586-592.
- [25] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Structure and expression of a tobacco beta-1,3-glucanase gene. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15: 941-946.
- [26] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *The Plant Cell*, 1995, 7: 173-182.
- [27] Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell*, 1990, 2(4): 279-289.
- [28] Waterhouse P M, Graham M W, Wang M B. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1998, 95: 13959-13964.
- [29] Wesley S V, Helliwell C A, Smith N A, Wang M B, Rouse D T, Liu Q, Gooding P S, Singh S P, Abbott D, Stoutjesdijk P A, Robinson S P, Gleave A P, Green A G, Waterhouse P M. Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 2001, 27: 581-590.
- [30] 叶志彪, 李汉霞, 郑用琏, 刘后利. 反义 ACC 氧化酶基因的导入对番茄乙烯生成的抑制作用. 华中农业大学学报, 1996, 15: 305-309.
- Ye Z B, Li H X, Zheng Y L, Liu H L. Inhabitation of introducing antisense ACC oxidase gene into tomato genome on expression of its endogenous gene. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1996, 15: 305-309.(in Chinese)
- [31] Xiong A S, Yao Q H, Peng R H, Li X, Han P L, Fan H Q. Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato. *Plant Cell Reports*, 2005, 23: 639-646.
- [32] Han Y, Grierson D. The influence of inverted repeats on the production of small antisense RNAs involved in gene silencing. *Molecular Genetics and Genomics*, 2002, 267: 629-635.