

‘金二十世纪’梨果实 ABA 代谢酶基因克隆及其表达分析

李平¹ 陈佩¹ 郝艳宾² 齐建勋² 张国军¹ 冷平^{1*}

(1. 中国农业大学 农学与生物技术学院, 北京 100193;

2. 北京市农林科学院 林业果树研究所, 北京 100093)

摘要 为了解 ABA 对‘金二十世纪’梨果实成熟的调控作用, 本研究采用高效液相色谱法(HPLC)分析测定了果实成熟过程中果皮、果肉和种子内源 ABA 含量变化, 采用 RT-PCR 和 RACE 技术从该梨果实中克隆得到了 2 个 ABA 关键合成酶(NCED)和 1 个关键降解酶(CYP707A)基因, 分别命名为 *PpNCED1*、*PpNCED2* 和 *PpCYP707A1*, 并对其进行了表达分析。结果显示: 随着果实成熟, 果皮中 ABA 含量持续增加, 果肉和种子中 ABA 含量于采收前 10 d 达到峰值后下降。果皮和果肉中, *PpNCED2* 表达量显著高于 *PpNCED1*, 且与 ABA 含量变化趋势一致, 是果皮和果肉中 ABA 生物合成的主效基因。种子中, *PpNCED1* 和 *PpNCED2* 表达量均很高, 是种子中 ABA 生物合成的主效基因。果皮、果肉和种子中 *PpCYP707A1* 表达模式与 ABA 含量变化趋势相反, 是 ABA 含量变化的主要负调控基因。综上, ABA 可能调控‘金二十世纪’梨果实成熟进程, 而 ABA 含量水平是由合成酶和降解酶基因共同调控的, 且不同组织中 ABA 生物合成的主效基因存在差异。

关键词 梨; ABA; HPLC; 基因克隆; 基因表达; 成熟

中图分类号 S 661.2

文章编号 1007-4333(2012)03-0057-06

文献标志码 A

Cloning and tissue expression of ABA metabolism enzyme genes of ‘Gold Nijisseiki’ pear fruit

LI Ping¹, CHEN Pei¹, HAO Yan-bin², QI Jian-xun², ZHANG Guo-jun¹, LENG Ping^{1*}

(1. College of Agronomy and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100193, China;

2. Research Institute of Pomology, Forestry Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract To investigate the effect of endogenous hormone abscisic acid (ABA) on the maturation of ‘Gold Nijisseiki’ pear fruit, we determined the content of ABA in the peel, pulp and seed with HPLC. The ABA content in the peel was continuously accumulated with fruit maturation, while the ABA content in pulp and seed reached to peak at 10 days before harvest and then declined. Two synthetase genes (*PpNCED1*, *PpNCED2*) and one catabolic enzyme gene (*PpCYP707A1*) were isolated from the pear fruits. Real time RT-PCR analysis revealed that *PpNCED2* in the peel and pulp was the major gene for ABA synthesis, whereas both *PpNCED1* and *PpNCED2* which were the major genes in the seed had high expression. The *PpCYP707A1* was the negative regulation gene for ABA content. Our results thus suggested that the peel, pulp and seed all could synthesize the endogenous ABA which might regulate the maturation of ‘Gold Nijisseiki’ pear fruit.

Key words pear; ABA; HPLC; gene cloning; maturation; gene expression

‘金二十世纪’梨是日本于 1962 年利用 γ 射线漫照射‘二十世纪’梨枝条获得的诱发突变体^[1], 因比“二十世纪”抗黑心病能力强、果实甜脆可口而被

广泛种植, 是重要的商业经济果品之一。‘金二十世纪’梨引入我国以后受到消费者的青睐, 栽培面积逐渐扩大。该品种梨果实在成熟过程中只释放微量乙

收稿日期: 2011-12-26

基金项目: 北京市科委重大资助项目(D0706002000091); 中央高校基本科研业务费专项资金资助项目

第一作者: 李平, 硕士研究生, E-mail: hbliping2006@163.com

通讯作者: 冷平, 教授, 主要从事果品采后生理与分子生物学研究, E-mail: pleng@cau.edu.cn

烯(少于 $0.5 \mu\text{L}/(\text{kg} \cdot \text{h})$),在园艺上被划分为呼吸非跃变型果实^[2],而目前内源植物激素对该品种梨果实成熟的分子调控机理尚不清楚。

近年的研究发现,不论是非跃变型果实如樱桃^[3]和葡萄^[4],还是跃变型果实如苹果^[5]和番茄^[6]的成熟都与内源 ABA 的调控有关^[7-9]。植物内源 ABA 水平由合成和代谢共同决定。现在生物化学和遗传学已经证明,9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)是高等植物脱落酸生物合成途径的关键酶。目前已在葡萄^[10]、柑橘^[11]和樱桃^[3]等果实中克隆得到了 NCED 基因,并发现它是由多基因构成的一个小的基因家族。另一方面,ABA 的 8'位甲基羟基化途径是高等植物 ABA 分解代谢的主要途径,近年来,果实中 8'-羟化酶基因克隆,在番茄^[12]和樱桃^[3]上有相关报道。一般来讲,跃变型果实的成熟是由乙烯调控,而非跃变型果实的成熟大多与内源 ABA 调控相关。因此推测‘金二十世纪’梨果实的成熟可能与由内源 ABA 调控有关。

本研究从生理和分子水平上探索内源 ABA 对‘金二十世纪’梨果实成熟的调控作用,旨在为进一步阐明内源植物激素调控‘金二十世纪’梨果实成熟的分子机理提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

以 8 年生‘金二十世纪’(*Pyrus pyrifolia* Nakai)梨为试材,种植在中国农业大学科学园。试验于 2011 年完成,盛花期为 4 月 20—25 日,最佳商业采收期为 9 月 3 日。从采收前 2 个月(7 月 15 日)开始,每隔 10 d 取样 1 次,每次随机取 15 个长势中等的果实。采后立即带回实验室,用手术刀片迅速分离果皮、果肉和种子,液氮速冻后 -80°C 保存备用。

1.2 方法

1.2.1 内源激素 ABA 提取与测定

ABA 提取:称取 5 g 样品,液氮研磨,分次加入 40 mL 体积分数为 80%的甲醇,洗涤干净并转入离心管中,再加入 4 mg 的 2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚防褐化,超声仪中超声 20 min 破碎细胞, -20°C 避光静置 18 h。 4°C ,10 000g 离心 20 min 取上清,再用

40 mL 80%甲醇洗涤沉淀并超声 20 min, -20°C 避光静置 2 h,重复离心洗涤沉淀静置一次,收集所有上清液, 40°C 旋转蒸干。10 mL 石油醚洗涤蒸馏瓶(脱色)并收集,再用 10 mL 浓度为 0.02 mol/L (pH 8.0)的磷酸缓冲液洗涤蒸馏瓶合并前步收集的石油醚,充分混匀 5 min, 4°C 静置。待溶液分层后,除去上层石油醚保留下层乙酸乙酯溶液,再用干净的石油醚脱色 3 次。加入 0.2 g 水不溶性 PVPP, 0°C 搅拌 15 min,真空抽滤仪过滤,除去 PVPP,用 10 mL 浓度为 0.02 mol/L (pH 8.0)的磷酸缓冲液洗涤 PVPP,收集液体并调整 pH 至 3.0。用乙酸乙酯萃取收集液中的 ABA 共 3 次,收集上层乙酸乙酯, 40°C 旋转蒸干,1.5 mL 体积分数为 50%色谱级甲醇溶解蒸馏瓶中的 ABA。

ABA 测定:采用高效液相色谱法测定,色谱仪为美国 Agilent 1100I;Supeldean 小柱。甲醇为 Fisher Chemical 公司色谱纯;其他试剂均为分析纯;试验用水为超纯水。色谱条件:色谱柱为 Hypersil ODS C18 柱($250 \text{ mm} \times 4.8 \text{ mm}$);流动相为:甲醇(A)和体积分数为 0.8%的冰乙酸(B),梯度洗脱条件是 0~4 min 45%的 B,4~5 min 50%的 B,5~17 min 60%的 B,17~18 min 60%的 B,18~9 min 45%的 B;柱温为 27°C ;进样量 $20 \mu\text{L}$;流速为 1 mL/min ;检测波长:254 nm。定量方法:外标法。将待测样品与标准样品比较计算出 ABA 鲜质量,ng/g。试验重复 3 次。

ABA 标准曲线:称取 10 mg ABA 标准品(Sigma,A1049),用 50%的色谱级甲醇溶解,1 000 mL 容量瓶定容,配置浓度为 $10 \mu\text{g/mL}$ 的 ABA 标准液。梯度稀释,得到质量浓度分别为 1 、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 $10^{-3} \mu\text{g/mL}$ (ABA)标准液,HPLC 测定它们的峰面积,制作峰面积与浓度关系的标准曲线。

1.2.2 NCED 和 CYP707A 基因克隆序列分析

取果实混合样 2 g,热硼酸法^[13]提取总 RNA,利用 MarathonTM cDNA 扩增试剂盒进行 cDNA 第一链的合成。根据 GenBank 已发表的相关同源基因的氨基酸保守序列和核苷酸序列设计简并引物(NCED:上游 5'-TTYGAYGGNGAYGGNATGG-TNCA-3',下游 5'-TCCCANGCRTTCCANARR-TGRAA-3'; CYP:上游 5'-YTRGCWTGTCCW-

TGTGTRATG-3′, 下游 5′-TCRAATCTNGA-NGGATCRAATTT-3′)。PCR 反应程序:94 ℃ 预变性 3 min;94 ℃ 变性 30 s,52 ℃ 退火 30 s,72 ℃ 延伸 1 min,扩增 35 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。利用 RACE-PCR 技术扩增 *PpNCEDs* 基因 3′ 末端。目的片段回收按天根生化科技(北京)公司琼脂糖凝胶回收试剂盒说明书进行。回收产物连接到 pMD18-T 载体(TaKaRa)上,转化大肠杆菌 DH5α 后筛选阳性克隆送上海英骏公司测序。NCBI 进行序列比对,核苷酸序列分析由 DNAMAN 软件完成。

1.2.3 *PpNCEDs* 和 *PpCYP707As* 实时定量 RT-PCR 分析

分别提取果皮、果肉和种子总 RNA,采用 PrimeScript™ RT reagent kit(TaKaRa)反转录成单链 cDNA。根据扩增的 *PpNCEDs* 和 *PpCYP707As* 序列采用 Primer 5 分别设计特异性引物(*PpNCED1* 上游 5′-GAGACCCCAACT-CGGAGAACGAG-3′, 下游 5′-CGTTCCATG-AAAACCGTACGGAAC-3′; *PpNCED2* 上游 5′-GATGAGGTCGTCGTGATCGGCT-3′, 下游 5′-GGCAATTGCGAGGTAAGCGAA-3′; *PpCYP707A1* 上游 5′-CAGGCACGCTGTTTCACAAATCA-3′, 下游 5′-GTCACGGGCAGCGAAGATGAC),利用 Corbett Research 公司 Rotor-Gene 3000 Two-filter

Real-time。β-actin (上游 5′-TTGTTTCACAGG-AAATGCTTCTAATCG-3′, 下游 5′-ATGTCCCGTCATAACAAACACAGAGA-3′) 作为内参以校正上样量。

实时定量 PCR 采用 SYBR Premix Ex Taq™ kit(TaKaRa)。反应体系包括:1 μL 特异性引物(包括 5 μmol/L 上下游引物),2 μL cDNA,12.5 μL SYBR Premix Ex Taq™(2×)mix 和 9.5 μL 水。反应条件为:95 ℃ 30 s(1 个循环);95 ℃ 15 s,60 ℃ 20 s,72 ℃ 15 s,(40 个循环)。*PpNCEDs* 和 *PpCYP707As* 基因绝对表达量通过 Rotor-Gene 6.1.81 软件进行计算。生物学重复 3 次。试验所有数据用 Origin 软件进行计算和作图分析。

2 结果与分析

2.1 ‘金二十世纪’梨果实成熟期观察

‘金二十世纪’属于中熟品种的梨,在日本一般于 9 月中上旬成熟采收。2011 年间种植在北京的‘金二十世纪’梨果实 9 月上旬成熟,比原产地提早了 10 d 左右,可能是由于生长环境差异引起的。本试验观察到,8 月 14 日前后‘金二十世纪’梨果实果面开始褪绿,逐渐变为淡黄色,果实完全成熟后呈金黄色。种子在果实未成熟前为乳白色,随着果实成熟种皮颜色逐渐加深,完熟时变为深棕色(图 1)。



图 1 ‘金二十世纪’梨果实成熟期观察

Fig. 1 Observation of the maturation of ‘Gold Nijisseiki’ pear

2.2 果实成熟过程中内源脱落酸含量变化

如图 2(a),果皮中,ABA 含量从 7 月 15 日逐渐上升,于 7 月 25 日出现峰值后显著下降,至 8 月 14 降到最低值,随后至果实成熟采收时呈持续升高趋

势。如图 2(b)和(c),8 月 24 日以前,果肉和种子中 ABA 含量变化趋势与果皮相似,不同的是,果肉和种子中 ABA 含量在 8 月 24 号达到最大值后呈显著下降。三者相比,种子中 ABA 含量最高,其次是果

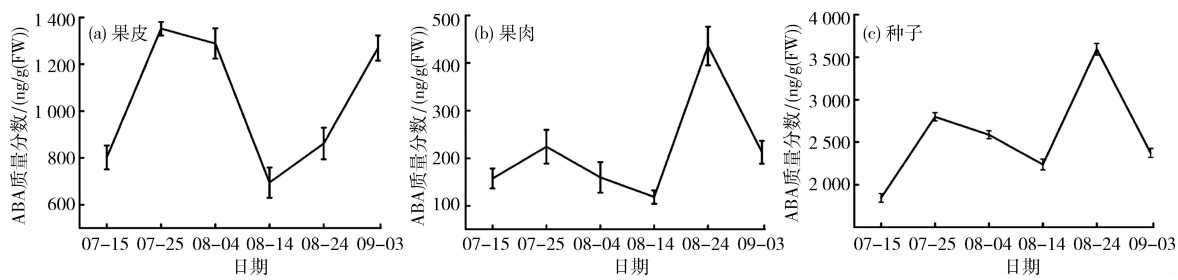


图2 ‘金二十世纪’梨果实成熟过程中,果皮、果肉和种子中 ABA 含量变化

Fig. 2 Changes of ABA content in peel, pulp and seed of ‘Gold Nijisseiki’ pear during fruit maturation

皮,果肉中 ABA 含量最低。

2.3 ‘金二十世纪’梨果实 NCED 和 CYP707A 基因克隆

利用 RT-PCR 和 RACE-PCR 技术,从果实中克隆到了长度为 1 588 和 1 316 bp 的 2 个 NCED 基因,包含保守和 3' 末端序列,分别命名为 *PpNCED1* (No. JN602255)、*PpNCED2* (No. JN006964),开放阅读框编码 450 和 429 个氨基酸。BLAST 比对和同源性分析表明,‘金二十世纪’梨果实 *PpNCED1* 基因碱基序列与 *PpNCED2* 基因碱基序列同源性为 75%,与“红灯”樱桃 *PavNCED1* (GQ913652) 基因碱基序列同源性为 86%,与草莓 *FaNCED3* (HQ008771) 基因碱基序列同源性为 83%。‘金二十世纪’梨果实 *PpNCED2* 基因碱基序列与海棠 *MhNCED1* (EU716329) 和小果野蕉 *MaNCED3* (EU925815) 基因碱基序列同源性均高达 90% 以上。

同样,利用 RT-PCR 技术,从果实中克隆得到了长度为 954 bp 的 CYP 基因,命名为

PpCYP707A1 (No. JF825450No.), 开放阅读框编码 311 个氨基酸。所克隆片段与其他物种 *CYP707As* 基因具有很高的同源性,BLAST 比对结果显示:*PpCYP707A1* 与甜樱桃 *PaCYP707A1* (7~315 氨基酸之间) 相似度高达 88%,与马铃薯 *StCYP707A1* (83~384 氨基酸之间) 相似度为 81%。

2.4 NCED 基因在果实发育与成熟过程中的表达

Real time RT-PCR 分析了果实成熟过程中 *PpNCED1*、*PpNCED2* 在果皮、果肉和种子中的表达模式。果皮中(图 3(a)),*PpNCED1* 总体表达水平较低,在 7 月 25 日出现一次小峰,*PpNCED2* 表达量显著高于 *PpNCED1*,随着果实成熟缓慢升高,尤其在成熟后期呈持续上升趋势。果肉中(图 3(b)),*PpNCED1* 表达量在 7 月 25 日出现峰值,随后逐渐降低,*PpNCED2* 表达量于采收前 10 d 左右达到最大值,随后呈逐渐下降。种子中(图 3(c)),随着果实成熟,*PpNCED1* 和 *PpNCED2* 表达量持续升高,至采时达到最大值。

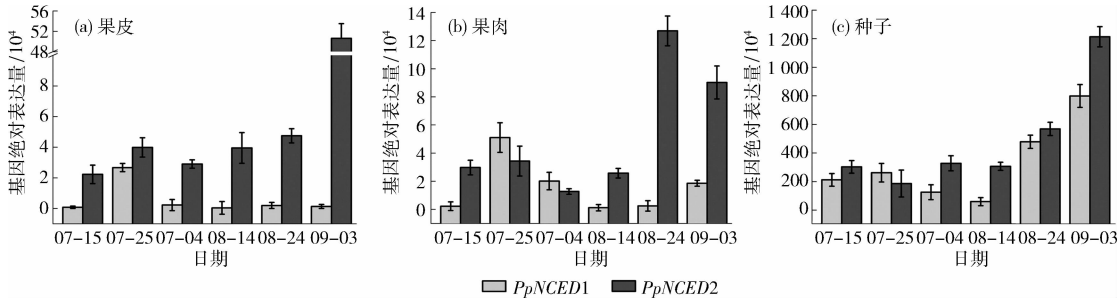


图3 果实成熟过程中 *PpNCED1* 和 *PpNCED2* 基因在果皮、果肉和种子中的表达

Fig. 3 The expression of *PpNCED1* and *PpNCED2* in the peel, pulp and seed during fruit maturation

2.5 CYP 基因在果实发育与成熟过程中的表达

果皮中(图 4(a)),随着果实成熟,*PpCYP707A1*

表达量从 8 月 4 日逐渐降低,至完熟采收时降到最低。果肉中(图 4(b)),随着果实成熟,*PpCYP707A1*

表达量缓慢上升,至完熟时达到较高值。2011 年种子中 *PpCYP707A1* 表达量(图 4(c))与果肉相似,

果实成熟期前较低,果实成熟后期显著升高,至采收前达到最大值。

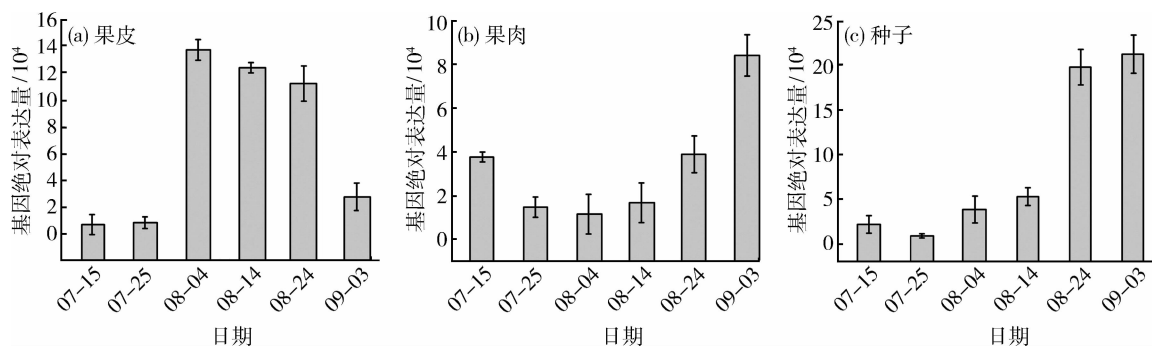


图 4 果实成熟过程中 *PpCYP707A1* 基因在果皮、果肉和种子中的表达

Fig. 4 The expression of *PpCYP707A1* in the peel, pulp and seed during fruit ripening

3 讨论

3.1 内源植物激素 ABA 与‘金二十世纪’梨果实成熟的关系

在‘金二十世纪’梨果实成熟过程中,每隔 3 d 进行乙烯监测,但始终未检测到乙烯的显著释放,所测数值均低于 $0.5 \mu\text{L}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ (数据未展示)。推测乙烯并不是该果实成熟的调控激素。8 月 14 日前后‘金二十世纪’梨果实果面开始褪绿,逐渐变为淡黄色,种子也由乳白色逐渐变为深棕色,果实开始表现出成熟的外部特征。与此同时,果皮、果肉和种子中内源 ABA 含量也逐渐增加,说明 ABA 积累可能与‘金二十世纪’梨果实成熟进程相关。

有趣的是,在果实接近成熟采收时,果肉和种子中内源 ABA 含量在达到峰值后显著下降,而果皮中 ABA 含量仍呈持续升高趋势,推测可能是果皮作为果实外部组织,直接与外部环境接触,响应非生物胁迫^[14-15]的原因,也可能是 ABA 在调控果皮褪绿变黄过程中发挥着重要作用,此推断在今后的试验中有待进一步验证。

3.2 *PpNCEDs* 和 *PpCYP707As* 表达与 ABA 含量变化的相关性

ABA 的 2 个合成酶基因都对 ABA 含量积累做出了贡献。果皮和果肉中, *PpNCED1* 基因在果实成熟前期表达量稍高,其峰值的出现与前期 ABA 积累相一致,而 *PpNCED2* 主要在果实成熟期高表达,其最高峰的出现与成熟期果实 ABA 含量积累

相关性更加密切,说明 *PpNCED2* 是成熟期果皮和果肉中 ABA 生物合成的主效基因。种子中,随着果实成熟, *PpNCED1* 和 *PpNCED2* 基因表达量均显著升高,说明种子 *PpNCED1* 和 *PpNCED2* 都是 ABA 生物合成的主效基因,在成熟期发挥着重要作用。成熟采收前,虽然种子中 *PpNCED1* 和 *PpNCED2* 基因表达量持续升高(图 3(c)),但 ABA 含量却显著下降(图 2(c)),而此阶段 *PpCYP707A1* 表达量很高(图 4(c)),推测可能是 *PpCYP707A1* 作为负调控基因显著降解了 ABA。

本研究结果表明: *PpNCED1* 和 *PpNCED2* 均是果实 ABA 生物合成的关键酶基因,它们的产物 ABA 遍及果实的生长、成熟和衰老全过程并遍及全部的组织,是梨果实成熟的重要调控因素。梨果实中 ABA 的含量水平除受合成酶(NCED)基因调控外,还受 ABA 降解酶(CYP)基因转录水平的影响。综上,梨果实成熟过程中细胞内源 ABA 水平是由其合成酶(NCED)基因和降解酶(CYP)基因共同调控的,它们构成一个动态平衡,贯穿果实发育成熟的全过程。

参 考 文 献

- [1] Yoshioka T, Masuda T, Kotobuki K, et al. Gamma-ray-induced mutation breeding in fruit trees: breeding of mutant cultivars resistant to black spot disease in Japanese pear [J]. Japan Agricultural Research Quarterly, 1999, 33: 227-234
- [2] Itai A, Kawata T, Tanabe K, et al. Identification of 1a-

- minocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai) [J]. Molecular and General Genetics, 1999, 262:42-49
- [3] Ren Jie, Sun L, Wu J F, et al. Cloning and expression analysis of cDNAs for ABA 8-hydroxylase during sweet cherry fruit maturation and under stress conditions [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167:1486-1493
- [4] Zhang M, Yuan B, Leng P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60:1579-1588
- [5] Vendrell M, Buesa C. Relationship between abscisic acid content and ripening of apples [J]. Acta Horticulture, 1988, 258:389-396
- [6] Zhang M, Leng P, Zhang G L, et al. Cloning and functional analysis of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits [J]. Plant Physiology, 2009, 166:1241-1252
- [7] Giovannoni J. Molecular biology of fruit maturation and ripening [J]. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 2001, 52:725-749
- [8] Giovannoni J. Genetic regulation of fruit development and ripening [J]. The Plant Cell, 2004, 16:S170-S180
- [9] Rodrigo M J, Marcos J F, Fernando A, et al. Characterization of pinalate, a novel citrus sinensis mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content [J]. Journal of Experimental Botany, 2003, 54:727-738
- [10] Soar C J, Speirs J, Maffei S M, et al. Gradients in stomatal conductance, xylem sap ABA and bulk leaf ABA along canes of *Vitis vinifera* cv. shiraz: molecular and physiological studies investigating their source [J]. Functional Plant Biology, 2003, 31:659-669
- [11] Rodrigo M J, Berta A, Lorenzo Z. Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulate during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. osbeck) [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57:633-643
- [12] Nitsch L M C, Oplaat C, Feron R, et al. Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1* [J]. Planta, 2009, 229:1335-1346
- [13] Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. Analytical Biochemistry, 1994, 223:7-12
- [14] Çakir B, Agasse A, Gaillard C, et al. A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling [J]. The Plant Cell, 2003, 15:2165-2180
- [15] Deluc L G, Quilici D R, Decendit A, et al. Water deficit alters differentially metabolic pathways affecting important flavor and quality traits in grape berries of cabernet sauvignon and chardonnay [J]. BioMed Central Genomics, 2009, 86:1471-2164

责任编辑:王燕华