

# 乙烯受体基因 *LeETR1* 在番茄突变体 Epi 及其野生型中的表达

郑铁松<sup>1</sup> 应铁进<sup>1\*</sup> 何国庆<sup>1</sup> 曹家树<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学食品科学与营养系, 杭州 310029; <sup>2</sup> 浙江大学园艺系, 杭州 310029)

**摘 要:** 采用核酸酶保护分析 (RPA) 方法对番茄乙烯过表达单基因突变体 Epi 和野生型 VFN8 中 *LeETR1* mRNA 的表达特征进行了研究。结果表明, 在正常番茄中 *LeETR1* mRNA 不受内源乙烯含量的影响, 呈组成性表达。*LeETR1* mRNA 在 Epi 部分组织中的表达强度发生了改变, 并与 Epi 的形态特征变化相吻合, 提示 *LeETR1* 在叶片的形态建成、果实成熟和顶钩发育中可能起着重要的作用。

**关键词:** 番茄; 乙烯受体; *LeETR1*; 核酸酶保护分析; 基因

**中图分类号:** S 641. 2; Q 786 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2001) 02-0128-05

乙烯是调控植物生长发育、成熟衰老的重要激素, 从种子萌发、叶片衰老、根茎伸长到果实成熟与软化等无不为之所调节。随着植物体内乙烯生物合成途径的阐明和分子生物学的深入研究, 通过分子生物学途径调控植物内源乙烯的合成已取得了显著的成绩。但相比而言, 乙烯受体系统的研究则刚刚起步。在拟南芥乙烯受体基因研究的基础上, 最近在番茄上也分别克隆到了与拟南芥乙烯受体基因 *ETR1*、*ERS* 和 *ETR2* 同源的 *LeETR1*、*LeETR2*、*NR*、*LeETR4* 和 *LeERT5* 等 5 个乙烯受体基因<sup>[1~4]</sup>。但目前尚不了解这些基因在整个乙烯受体系统中的确切功能, 因而难以实现乙烯受体基因调控的实际应用。

Epinastic (Epi) 是美国加州大学的 Bradford 于 1984 年在番茄品种 VFN8 群体中发现的一个乙烯过表达的单基因突变体, Epi 的表现型与其野生型亲本有着极大的差异<sup>[5]</sup>。我们拟通过研究 Epi 及其野生型中 *LeETR1* 基因的表达特性, 对该基因在番茄乙烯受体系统中的功能进行初步探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物材料

番茄 (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Epi 和 VFN8 种子由美国加州大学番茄种子中心提供。按常规方法栽培于温室中。记录从花药开放到果实破色 (BK, 即果面出现第一丝转红) 的平均天数 (样本大于 80 个果实)。分别采集处于未成熟期 (I)、绿熟期 (M)、BK 期、BK+ 3 d、BK+ 5 d、BK+ 7 d 和 BK+ 10 d 的果实, 处于幼叶期 (a)、展开期 (e) 和

收稿日期: 2000-07-24; 修回日期: 2000-10-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39870512)

部分工作在浙江大学国家蔬菜重点学科细胞与分子生物学实验室完成, 特此致谢。\* 通讯联系人。

成长期 (m) 的叶片作为代表各发育阶段的样品, 进行指标测定。

## 1.2 果实有效货架寿命和乙烯含量的测定

参照 Jackman<sup>[6]</sup> 的方法, 果实有效货架寿命定义为果肉组织生物屈服点 (bioyield point) 下降 50% 所需要的时间。内源乙烯生成量按文献<sup>[7]</sup> 方法测定。

## 1.3 *LeETR1* cDNA 部分序列的克隆与鉴定

依照 Grierson 等<sup>[8]</sup> 的方法从测试植物中抽提总 RNA。用目的基因的 3' - 端序列为引物, 以 MMLV 反转录酶从组织总 RNA 中反转录合成目的基因的 cDNA 第 1 链, 以此为模板, 用 PCR 法合成目的基因的 cDNA 部分序列, 用 Original TA Cloning 克隆试剂盒 (Invitrogen UK) 将纯化的 cDNA 序列插入 PCR 2.1 克隆载体中, 转化大肠杆菌 TOP10F'。以 LacZα- 互补法筛选阳性菌落, 并以 PCR 2.1 质粒中带有 T 7 启动子序列和目的基因 cDNA 3' - 部分序列为引物, 用 PCR 法筛选正确方向插入的菌落, 然后对克隆的 cDNA 序列进行测序鉴定。

## 1.4 核酸酶保护分析 (RPA)

采用 RPA 分析的方法测定 *LeETR1* mRNA 在植物组织中的表达丰度。采用专用的核酸酶 RNase ONE<sup>TM</sup> 试剂盒 (Promega, USA) 并按其提供的方法<sup>[9]</sup> 进行。以含有目的基因的 cDNA 克隆质粒为模板, 用 T 7 RNA 聚合酶合成的含有  $\alpha^{32}\text{P}$ -UTP 的 RNA 为探针。

# 2 结果与分析

## 2.1 Epi 和 VFN8 植株的形态特征

Epi 是从 VFN8 群体中发现的天然乙烯过表达突变体<sup>[5]</sup>。在正常生长条件下, Epi 的幼苗从子叶展开到第 3 片真叶期与 VFN8 差别不大, 至 4~5 片真叶时开始表现乙烯过表达的形态特征, 叶片发生严重的偏上生长, 导致极为紧凑的植株形态。遮光生长时, Epi 的表现型仍呈严重的部分三重反应: 遮光幼苗上胚轴显著变短变粗, 根系略变短, 但上胚轴顶钩角明显小于 VFN8 (Epi:  $50^\circ \pm 42^\circ$ ; VFN8:  $128^\circ \pm 60^\circ$ )。Epi 和 VFN8 果实生长发育速度无明显差异, 但后熟特性差异较大, 以果实生物屈服点下降 50% 为指标, 在 20℃ 下 Epi 成熟果实的有效货架寿命为 4~5 d, 而 VFN8 则为 10 d 以上。

## 2.2 Epi 和 VFN8 果实中乙烯的合成

Epi 果实中乙烯的生成量始终高于其野生型 VFN8 ( $p \leq 0.01$ ), 在绿熟期为 VFN8 的 4 倍以上, 在 BK+5 d 期为 VFN8 的 1 倍 (图 1)。在营养生长中也有类似现象, 如 Fujino<sup>[5]</sup> 的研究表明, 在 14、19、25、31 日龄的植株中, 组织乙烯含量 Epi 分别比 VFN8 高 250%、80%、172% 和

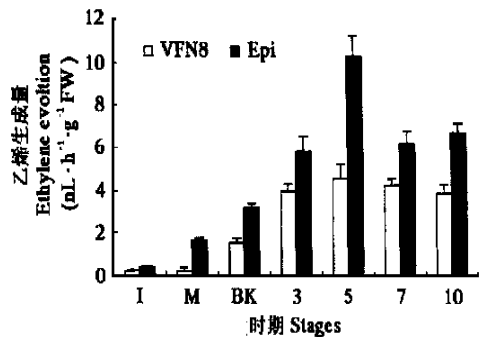


图 1 Epi 和 VFN8 番茄果实中乙烯生成量 ( $n=5$ )

I: 未熟期; M: 绿熟期; BK: 破色期;

3: BK+3 d; 5: BK+5 d; 7: BK+7 d; 10: BK+10 d

Fig. 1 The ethylene production of Epi and VFN8 in their fruit ( $n=5$ )

The endogenous ethylene production of Epi and VFN8 fruits was measured at different growth stages: immature (I); mature (M); breaker (BK); 3, 5, 7, 10 days after breaker (3, 5, 7, 10)

307%。

2.3 Epi 和 VFN8 果实中 *LeETR1* mRNA 的表达特性

采用 RPA 方法对 Epi 和 VFN8 中 *LeETR1* mRNA 的表达丰度检测结果表明, *LeETR1* mRNA 在二者果实发育的各个时期都有一定的表达, 其表达丰度随着果实发育略有增加和波动, 但在表达量上没有明显差别, 即在 Epi 和 VFN8 果实中 *LeETR1* mRNA 基本呈组成性表达模式。将绿熟果用外源乙烯处理 ( $10\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 h) 后, Epi 绿熟果中 *LeETR1* mRNA 的丰度明显高于同批处理的 VFN8 绿熟果, 提示二者对外源乙烯的敏感性可能不同(图 2)。

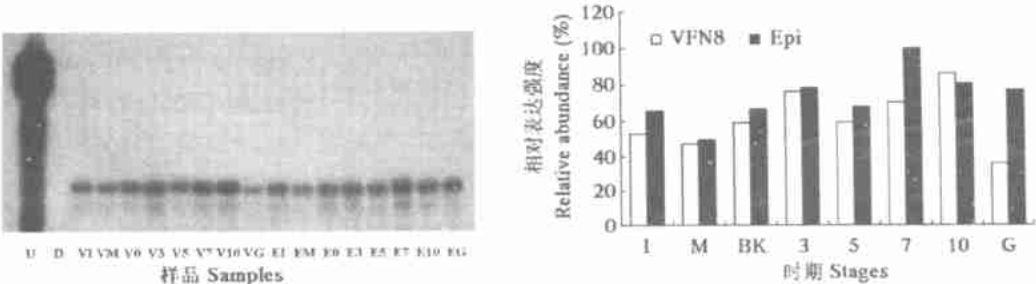


图 2 Epi 和 VFN8 番茄果实中 *LeETR1* mRNA 的积累模式

左图为 *LeETR1* mRNA 的 RPA 分析放射自显影图, 右图为相对表达强度图。  
E: Epi; V: VFN8; I: 未成熟期果实; M: 成熟期果实; BK: 破色期果实; 3、5、7、10 分别表示破色后 3 d、5 d、7 d、10 d 的果实; G: 用外源乙烯处理 ( $10\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 h) 的绿熟果实; D: 用酶水解后的探针; U: 未用酶处理的探针; V1 和 E1 分别表示 Epi 和 VFN8 未成熟期果实, 其余类推。

Fig. 2 *LeETR1* mRNA expression in fruit of Epi and VFN8

The levels of *LeETR1* mRNA were measured by RPA analysis and detected by X-ray radioautograph (left) and compared quantitatively to give the percentage relative expression (right). RPA analysis was performed on total RNA from fruits of Epi (E) and VFN8 (V) at different growth stages: immature (I); mature (M); breaker (BK); 3, 5, 7, 10 days after breaker (3, 5, 7, 10) and mature green fruits treated with ethylene  $10\text{ }\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ , 24 h (G). Digested probe (D); Undigested probe (U).

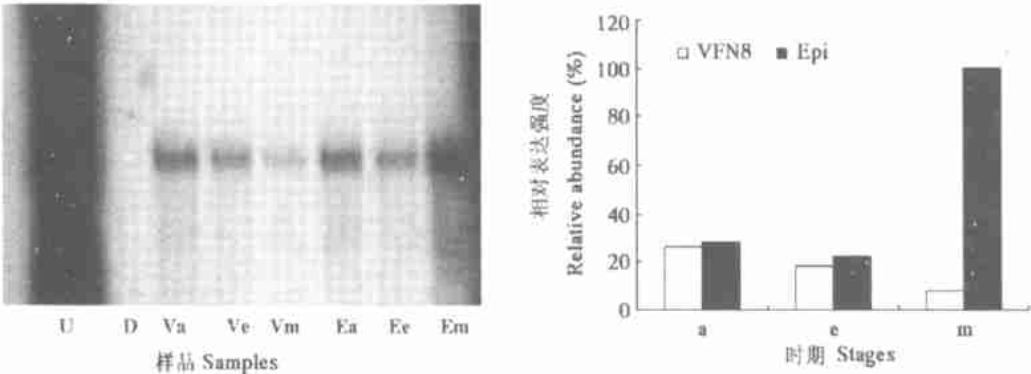


图 3 *LeETR1* mRNA 在 Epi 和 VFN8 叶片中的积累模式

左图为 *LeETR1* mRNA 的 RPA 分析放射自显影图, 右图为相对表达强度图。  
V: VFN8; E: Epi; a: 幼叶期; e: 展开期; m: 成长期; U: 未用酶处理的探针;  
D: 用酶水解后的探针; Va、Ea 分别表示处于幼苗期的 VFN8 和 Epi 叶子, 其余类推。

Fig. 3 *LeETR1* mRNA expression in leaves of Epi and VFN8

The levels of *LeETR1* mRNA were measured by RPA analysis and detected by X-ray radioautograph (left) and compared quantitatively to give the percentage relative expression (right). RPA analysis was performed on total RNA from leaves of Epi (E) and VFN8 (V) at different growth stages: apical (a); expanding (e); mature (m).

## 2.4 Epi 和 VFN8 叶片中 *LeETR1* mRNA 的表达特性

与果实中的表现不同, 在 Epi 和 VFN8 的叶片中 *LeETR1* mRNA 的表达丰度随着叶片的发育表现出明显不同的表达模式。在 VFN8 中 *LeETR1* mRNA 的表达随叶片的成长虽然略有下降, 但基本恒定; 而 Epi 中的表达丰度变化剧烈, 在叶片成长期 *LeETR1* mRNA 表达丰度明显高于叶片展开期 (图 3)。

## 3 讨论

无论在果实还是在叶片的发育中, Epi 中的乙烯合成量均明显高于 VFN8, 但 *LeETR1* mRNA 的表达丰度在所检测的大部分组织样品中, Epi 均与 VFN8 无明显差异, 说明 *LeETR1* mRNA 在正常番茄发育中呈组成性表达模式, 基本不受内源乙烯含量的影响。这与 *NR* 基因的诱导型表达模式<sup>[2]</sup>明显不同, 说明 *LeETR1* 和 *NR* 可能分属不同的乙烯受体系统, 它们在番茄乙烯信号的传导中起着不同的作用。

在生长期的叶片和外源乙烯处理的绿熟期果实中 *LeETR1* mRNA 的表达丰度, 突变体 Epi 明显高于野生型 VFN8。试验结果表明, 在营养生长期, Epi 与 VFN8 的差异主要体现在成熟叶片的形态上; 而在果实发育上, 则主要体现在 Epi 果实成熟的明显加快。发育中的这些异常特征刚好与其 *LeETR1* mRNA 丰度的异常表达相吻合。由此可以推测, 乙烯受体基因 *LeETR1* 可能在番茄的这些形态建成过程起着特殊的作用。这一研究结果为确定 *LeETR1* 的功能提供了新的依据。而 Epi 和 VFN8 绿熟果中 *LeETR1* mRNA 表达丰度在自然状态下基本相当, 但在外源乙烯处理后则明显不同, 提示 Epi 位点的突变可能影响到乙烯对 *LeETR1* 表达的调节作用, 具体原因还有待于进一步探讨。另外部分营养组织中 *LeETR1* 的表达丰度也发生了变化 (图 3), 这可能与 Epi 幼苗顶钩形成上丧失乙烯敏感性有关。

目前在拟南芥和番茄上均已经发现了多达 5 种以上的乙烯受体, 它们在分子结构和表达特性上都具有明显差异<sup>[1~4]</sup>。已有证据表明, 乙烯对植物三重反应、植株发育和果实成熟的影响是通过不同的信号通道实现的<sup>[10]</sup>。如拟南芥突变体只是在顶钩形成时对乙烯失去敏感性, 而其它乙烯反应则正常<sup>[11]</sup>; 番茄 *NR* 突变体则表现为多效性, 除果实成熟受阻外, 还表现为叶柄偏向生长反应下降, 叶片衰老和脱落延迟等<sup>[12]</sup>; *LeETR4* 在番茄果实中表达丰富而 *LeETR5* 则极少表达<sup>[1]</sup>。总之, 植物体内乙烯的感受和传导系统是极其复杂的, 各种乙烯受体在植物发育过程中表达特性不同, 可能起着完全不同的作用。

## 参考文献:

- 1 Tieman D M, Klee H J. Differential expressions of two novel members of the tomato ethylene receptor family. *Plant Physiol.*, 1999, 120: 165~ 172
- 2 Wilkinson J Q, Lanahan M B, Yen H C, et al. An ethylene inducible component of signal transduction encoded by Never ripe. *Science*, 1995, 270: 1807~ 1809
- 3 Zhou D, Kalaitzis P, Mattoo A, et al. The mRNA for an ETR1 homologue in tomato is constitutively expressed in vegetative and reproductive tissues. *Plant Mol. Biol.*, 1996, 30: 1331~ 1338
- 4 Zhou D, Mattoo A, Tucker M. Molecular cloning of a tomato cDNA encoding an ethylene receptor. *Plant Physiol.*, 1996, 110: 1435~ 1436
- 5 Fujiao D W, Burger D W, Yang S F, et al. Characterization of an ethylene overproducing mutant of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Plant Physiol.*, 1994, 105: 1155~ 1162

- lertum* Mill. Cultivar VFN8). *Plant Physiol.*, 1988, 88: 774~ 779
- 6 Jackman R L, Marangoni A G, Stanley D W. Measurement of tomato fruit firmness. *HortiScience*, 1990, 25: 781~ 783
- 7 郑永华, 席 芳, 应铁进. 枇杷果实采后呼吸与乙烯释放规律的研究. *园艺学报*, 1993, 20 (2): 111~ 115
- 8 Grierson D, Slater A. Gene expression in ripening tomato fruits. *CRC Crit Rev. Plant Sci.*, 1985, 3: 113~ 132
- 9 Brewer A B, Mumay G, Stateben M. RNase ONE: Advantages for nuclease protection assay. *Pr omega Notes*, 1992, 38: 1~ 7
- 10 Fluhr R. Ethylene perception from two component signal transducers to gene induction. *Trends Plant Sci.*, 1998, 4(3): 141~ 146
- 11 Lehman A, Black R, Tcker J R. *Hookeless*, an ethylene response gene is required for differential cell elongation in *Arabidopsis*. *Cell*, 1996, 85: 183~ 194
- 12 Lanahan M B, Yen H C, Giovannoni J J, et al. The Never ripe mutation blocks ethylene perception in tomato. *Plant Cell*, 1994, 6: 521~ 530

## Expression of Ethylene Receptor Gene *LeETR1* in Tomato Mutant Epi and Its Wild Type

Zheng Tiesong<sup>1</sup>, Ying Tiejin<sup>1</sup>, He Guoqing<sup>1</sup>, and Cao Jiashu<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Food Science and Nutriology, Zhejiang University, Hangzhou 310029; <sup>2</sup>Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029)

**Abstract:** The expressive characteristics of *LeETR1* mRNA in tomato mutant Epi and its wild type VFN8 have been studied with RNase protect assay (RPA). The results showed that *LeETR1* mRNA expressed constitutionally in VFN8. And its expression was not affected by the endogenous production of ethylene. However, the high expression of *LeETR1* in some tissues of Epi suggested that *LeETR1* gene may have an important role in the morphogenesis of leaves, apical hooks and fruit ripening in tomato.

**Key words:** Tomato; Ethylene receptor; *LeETR1*; RPA; Gene

广 告

### 广西柳州稀土动植宝有限公司系列新产品介绍 (9)

丰棉铃 (稀土植宝棉花助长复合剂)

常年诚征经销商 资料备索

功能: 促进发芽出苗, 快长壮苗, 多发果枝, 促蕾保花, 增加桃数; 提高铃重, 促早熟, 促吐絮, 吐絮集中, 缩短吐絮期, 减少霜后花, 增加衣分、纤维长, 提高纤维品质和等级, 增产 14% ~ 30%; 防治立枯病、黄萎病等。本品属专用复合型增产剂, 集营养、调节、抗病于一体, 兼有植物生理生化激活剂、有机络合微肥、生长调节剂、微量元素肥料、光合促进剂、增效剂、抗逆剂及抗菌剂等多方面优点, 属于我国民族工业具有自主知识产权的技术创新产品。具体使用方法见产品说明书, 欢迎购买使用并来函索取产品技术手册及本产品棉花上试验示范应用技术一书。三证齐全, 质量保证。常年诚征经销商。

专用复合型系列新产品还有: 蔬菜、果树、花卉、烟草、甘蔗、甜菜、食用菌、桑蚕、茶叶、豆类、粮食作物等专用型及拌种剂、种衣剂、着色增甜剂、稀土高能促花保果素、农药残毒降解剂、果蔬保鲜花保鲜剂。

地址: 柳州市屏山大道京港小区内 311 号 邮编: 545005 电话: 0772 3814851 3814663