

调控黄瓜苦味基因 *Bi* 的 AP2/ERF 家族转录因子

张慧敏¹, 张 雷¹, 马永硕², 尚 轶², 王深浩², 杨 清^{1,*}, 黄三文^{2,*}

(¹南京农业大学生命科学学院, 南京 210095; ²中国农业科学院蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘 要: 从华北型黄瓜 ‘9930’ 中克隆了黄瓜苦味形成的关键基因 *Bi* 的启动子序列, 通过酵母单杂交技术对黄瓜叶片 cDNA 文库进行筛选, 寻找可以调控 *Bi* 表达的转录因子。通过对筛选结果的测序及比对, 发现有 7 种转录因子重复出现, 包括 2 个 AP2/ERF 家族、3 个 bZIP 家族、1 个 WRKY 家族转录因子和 1 个 E3 泛素类 COP1 蛋白。其中 AP2/ERF 家族转录因子 CsERF (登录号: Csa7M448110) 重复出现 6 次, 出现概率高于其他转录因子。利用烟草瞬时表达系统, CsERF 对 *Bi* 启动子的结合及激活作用得到了进一步验证。初步证明 CsERF 可以结合到 *Bi* 的启动子并激活其转录, 推测其很可能就是黄瓜叶片中调控苦味形成的关键转录因子。

关键词: 黄瓜; 苦味; 酵母单杂交; 烟草瞬时表达; AP2/ERF 转录因子

中图分类号: S 642.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 04-0672-09

Studies of an AP2/ERF Transcriptional Factor Regulating *Bi* Gene of *Cucumis sativus*

ZHANG Hui-min¹, ZHANG Lei¹, MA Yong-shuo², SHANG Yi², WANG Shen-hao², YANG Qing^{1,*}, and HUANG San-wen^{2,*}

(¹College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; ²Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The cucumber foliage bitterness gene (*Bi*) encodes a cyclase and is responsible for the first committed step in the biosynthesis of cucurbitacin C. We cloned *Bi* gene promoter from North China cucumber ‘9930’. To identify the candidate transcript factor that could regulate its expression in cucumber, we applied yeast one hybrid system using the promoter of *Bi* as bait to screen a cDNA library generated from cucumber leaves. After the sequencing of positive signals and alignment with cucumber genome database, we identified seven TFs (2 AP2/ERF, 3 bZIP, 1 WRKY and 1 E3 ubiquitin class) that were repeatedly detected from the sequencing results. CsERF (Accession number: Csa7M448110), the AP2/ERF family TF, was selected for a further study as repeated six times more than other TFs. In addition to the yeast one-hybrid system, we also observed the similar result using the transient expression system in tobacco. In summary, yeast one-hybrid and tobacco transient expression system showed that the CsERF has the ability to activate the transcription of *Bi*. Thus, this gene was an important candidate regulator that could control the biosynthesis of bitter material in cucumber.

收稿日期: 2013 - 12 - 20; **修回日期:** 2014 - 04 - 08

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973 计划) 项目 (2012CB113900); 国家自然科学基金项目 (31101550)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qyang19@njau.edu.cn, huangsanwen@caas.cn)

Key words: cucumber; bitterness; yeast one hybrid; tobacco transient expression; AP2/ERF transcription factor

关于黄瓜 (*Cucumis sativus* L.) 苦味基因的研究已有较多报道。荷兰育种家已于 1959 年从美国改良 ‘长绿’ 品种中筛选出完全无苦味的黄瓜品系, 并报道它是由一对隐性纯合基因 *bibi* 控制 (Lawrence & Wehner, 1990)。*Bi* 基因控制着黄瓜叶片苦味, 其等位隐性 *bi* 基因可以使叶片不苦, 且阻止外界胁迫使果实变苦 (Wehner et al., 1998)。显性 *Bt* 基因控制着黄瓜果实的苦味, 但是由于 *bi* 基因对 *Bt* 基因具有上位效应 (顾兴芳 等, 2004), 因而推测 *Bi* 基因可能负责黄瓜苦味物质合成。

黄瓜全基因组测序工作的完成 (Huang et al., 2009) 推动了 *Bi* 基因的图位克隆。李曼等 (2010) 以黄瓜营养体无苦味的材料 ‘9110Gt’ (*bibi*) 与有苦味的材料 ‘9930’ (*BiBi*) 为亲本, 对两亲本构建的 148 个株系的 RILs 群体进行 SSR 标记的遗传连锁分析, 利用 F_2 群体和 SSR 分子标记将营养体苦味基因 *Bi* 定位在黄瓜第 6 号染色体的 3.9 cM 的范围内, 双侧翼标记的距离分别为 1.7 和 2.2 cM。

本实验室前期克隆了黄瓜苦味形成的关键基因 *Bi*, 并利用酵母、烟草外源表达系统和转基因恢复试验进行功能验证, 揭示了 *Bi* 基因控制苦味物质合成的第一步关键反应 (黄三文 等, 2014)。

为了进一步从调控的角度揭示黄瓜苦味形成的分子机制, 从华北型黄瓜 ‘9930’ 中克隆了 *Bi* 基因启动子序列, 通过酵母单杂交技术对黄瓜叶片 cDNA 文库进行筛选, 寻找可以调控 *Bi* 表达的转录因子, 并进一步利用烟草瞬时激活系统初步验证其功能, 以期为进一步研究黄瓜叶片苦味合成的分子调控机制打下一定的基础。

1 材料与方法

1.1 材料及黄瓜基因组 DNA 的提取

试验于 2012—2014 年在中国农业科学院蔬菜花卉研究所功能基因课题组进行。华北型黄瓜 ‘9930’、烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 为本实验室提供。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、酵母菌 Y187、根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、酵母单杂系统 pHIS2 和 p53HIS2 报告载体、pGADT7-Rec2 和 pGAD-Rec2-53 文库载体、带 CaMV35S 强启动子的 pCAMBIA1300 载体和带荧光素酶 (luciferase) 报告基因的 pCAMBIA1300 载体均由本实验室保存。

黄瓜 cDNA 文库由英潍捷基 (上海) 贸易有限公司构建, 文库质粒提取试剂盒购自 QIAGEN 公司。质粒提取试剂盒、DNA 凝胶回收试剂盒、RNA 提取试剂盒购自全式金公司。反转录试剂盒购自 TaKaRa 公司。酵母质粒提取试剂盒、pZeroBack 载体购自天根公司。In-Fusion[®] HD Cloning Kit 购自 Clontech 公司。

取华北型黄瓜 ‘9930’ 叶片, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA。

1.2 *Bi* 启动子区的 PCR 扩增及 pHIS2 载体的构建

根据 *Bi* 基因启动子区域 (*BPr*) (2 kb) 的碱基序列, 设计一对引物。(B1) *Bi*-F: 5'-AACATTTTGCCGTTAATAGACCCT-3'; (B2) *Bi*-R: 5'-TTTTACTGTTTTTATATCTATAT-3'。以 20 μ L 反应体系扩增 (10 μ mol \cdot L⁻¹ B1, B2 各 1 μ L, 10 \times buffer 2 μ L, 2 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 2 μ L, MgSO₄ 1 μ L, DNA 模板 1 μ L, KOD-Plus 酶 0.5 μ L, ddH₂O 11.5 μ L)。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 63 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 2 min, 72 $^{\circ}$ C 继续延伸 7 min。

利用 DNA 凝胶回收试剂盒纯化 PCR 产物, 将其与 pZeroBack 载体相连, 转化入大肠杆菌 DH5 α

后提取质粒,然后再设计引物,在上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *EcoR* I 和 *Mlu* I 酶切位点。

(H1) *Bi*-pHIS2-F: 5'-CGGAATTCAACATTTGCCGTTAATAGACCCT-3'; (H2) *Bi*-pHIS2-R: 5'-CGACGCGTTTTTACTGTTTTTATATCTATAT-3'。以之前的 *Bi* 启动子重组质粒为模板进行扩增,经 *EcoR* I 和 *Mlu* I 双酶切后纯化得到目的基因片段,通过 T4 连接酶连接到经同样双酶切后的 pHIS2 报告载体上,转化大肠杆菌感受态 DH5 α 。挑取单克隆摇菌,用质粒小提试剂盒提取质粒,酶切鉴定。将阳性克隆送北京六合华大基因科技股份有限公司测序,测序比对正确后命名为 pHIS2-*BPr*。提取阳性克隆中的质粒 pHIS2-*BPr*,用于下一步酵母单杂交试验。

1.3 酵母单杂交筛选黄瓜 cDNA 文库

首先摸索能够消除报告基因在酵母细胞中的本底表达的最适的 3-氨基-1,2,4-三唑(3-AT)浓度。将此浓度作为后续筛选黄瓜 cDNA 文库的 3-AT 工作浓度。按照 PEG/LiAc 酵母转化法(尚轶,2010)将 pHIS2-*BPr* 转化到营养缺陷型酵母菌株 Y187 (-Trp/-Leu/-His)中。转化后的菌液分别涂在 SD/-Trp 对照固体培养基上及 3-AT 浓度梯度为 0、5、10 及 15 mmol \cdot L⁻¹ 的 SD/-Trp/-His 固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d。

黄瓜 cDNA 文库由英潍捷基(上海)贸易有限公司构建,cDNA 文库总克隆数 CFU 为 6×10^6 cfu \cdot mL⁻¹。扩增 cDNA 文库,按照 QIAGEN 质粒试剂盒操作方法抽提黄瓜 cDNA 文库质粒,检测浓度。

按照 PEG/LiAc 酵母转化法将 cDNA 文库质粒转化到含 pHIS2-*BPr* 的酵母 Y187 菌株中,转化后的菌液涂在 SD/-Trp/-Leu/-His + 15 mmol \cdot L⁻¹ 3-AT 培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 7 d。挑取板上长势较好的单克隆摇菌,提取酵母质粒后再利用大肠杆菌扩增。提取大肠杆菌质粒,以 T7 通用引物测序。获得筛选黄瓜 cDNA 文库得到的信号测序结果后,使用黄瓜基因组数据库(<http://114.255.218.163:15480/>)和植物转录因子数据库(<http://planttfdb.cbi.edu.cn/blast.php>)进行比对分析。

1.4 黄瓜总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成

采用全式金 RNA 提取试剂盒提取‘9930’黄瓜叶片总 RNA,并测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 值判断 RNA 的质量,用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。将提取的总 RNA 按 TaKaRa 公司 Reverse Transcription System 反转录试剂盒合成 cDNA 第一链。

1.5 *CsERF* 基因的克隆及酵母单杂交恢复验证

根据 *CsERF* 基因编码区的参考序列设计引物,在上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *Sma* I 和 *Bam*H I 酶切位点。(E1) *CsERF*-AD-F: 5'-CCCCCGGGTATGTGTGGAGGTGCTATAAT-3'; (E2) *CsERF*-AD-R: 5'-CGGGATCCTTAGAAGACATTGCCAACCA-3'。从黄瓜 cDNA 中扩增基因编码区并构建到文库载体 pGADT7-Rec2 上,载体构建方法同上。酶切鉴定,测序比对正确后命名为 AD-*CsERF*。

按照 PEG/LiAc 酵母转化法,将构建好的 AD-*CsERF* 效应质粒与 pHIS2-*BPr* 报告质粒按照质量比为 2:1 共转化酵母 Y187,转化的菌液涂在(SD/-Trp/-Leu、SD/-Trp/-Leu/-His + 15 mmol \cdot L⁻¹ 3-AT)的固体培养基上,30 $^{\circ}$ C 培养 3~5 d。

1.6 烟草瞬时表达系统验证

设计 *Bi* 引物,在上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *Kpn* I 和 *Sma* I 酶切位点。(I1) *Bi*-Luc-F: 5'-GGAAATTCGAGCTCGGTACCAACATTTGCCGTTAATAGACCCT-3'; (I2) *Bi*-Luc-R: 5'-GCAGATCTCGAGCCCGGGTTTTACTGTTTTTATATCTATAT-3'。以 pHIS2-*BPr* 为模板扩增 *Bi* 基因启动子,

按照 In-Fusion[®] HD Cloning Kit 方法将 *Bi* 启动子构建到 pCAMBIA1300-Luc 报告载体上。PCR 扩增和酶切鉴定, 测序比对正确后命名为 Luc-*BPr*。同样的方法, 设计 *CsERF* 引物, 在上游引物和下游引物的 5'端分别引入 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点。(M1) *CsERF*-1300-F: 5'-CACGGGGGACTCTAGAA TGTGTGGAGGTGCTATAAT-3'; (M2) *CsERF*-1300-R: 5'-GATGGGGAAATTCGAGCTCTTAGAAG ACAT TGCCAACCA-3'。以 pGADT7-Rec2-*CsERF* 为模板扩增 *CsERF* 基因, 按照 In-Fusion[®] HD Cloning Kit 方法将其构建到 pCAMBIA1300 效应载体上。PCR 扩增和酶切鉴定, 测序比对正确后命名为 1300-*CsERF*。

将构建好的 Luc-*BPr* 报告载体和 1300-*CsERF* 效应载体用热激法分别转化农杆菌感受态 GV3101, 涂在 LB 固体培养基 ($50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Rif + $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ Kan)。挑取平板上的单菌落摇菌, 用全式金质粒小提试剂盒提取质粒, 酶切鉴定阳性克隆。

将含 Luc-*BPr* 报告载体的农杆菌和含 1300-*CsERF* 效应载体的农杆菌参考尚轶 (2010) 报道的方法处理, 点注射在 7 周左右的烟草 (*Nicotiana benthamiana*) 叶片上, 同时注射含 Luc-*BPr* 报告载体的农杆菌和含 pCAMBIA1300 空载体的农杆菌作为负对照。避光培养 48 ~ 60 h 后向叶片涂 $1 \times \text{D}$ -荧光素 (Biotium), 用荧光成像系统 (Andor iXon) 观察拍照。

1.7 *CsERF* 转录因子的分析

从黄瓜基因组数据库 (<http://114.255.218.163:15480/>) 中查找 *CsERF* 转录因子的序列。利用 Bio XM 软件进行分析, 推测氨基酸序列, 预测蛋白分子量; 运用 NCBI 数据库的 BLAST 进行保守结构域分析和氨基酸序列的同源性分析。

2 结果与分析

2.1 *Bi* 启动子的克隆

将 *Bi* 启动子从黄瓜基因组 DNA 中扩增出来, 构建到 pHIS2 报告载体上, 以 B1、B2 引物对 pHIS2-*BPr* 质粒进行 PCR 扩增和酶切鉴定, 片段大小为 2 000 bp (图 1)。

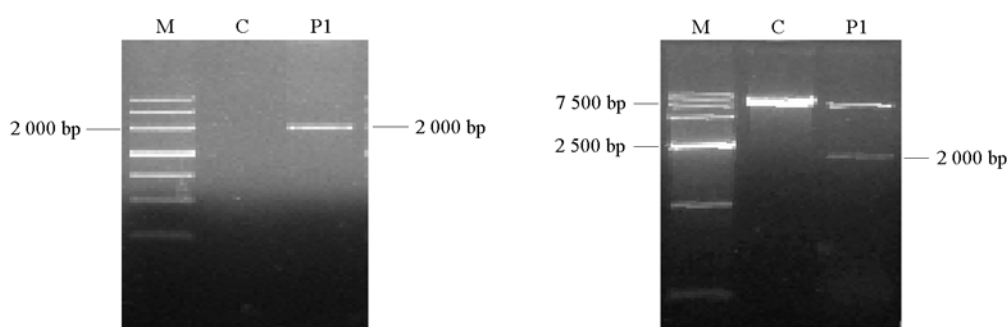


图 1 pHIS2-*BPr* 的 PCR 检测 (左) 和酶切鉴定 (右)

M: 分子量标记; C: pHIS2 空载体对照; P1: pHIS2-*BPr*。

Fig. 1 PCR identification (left) and enzyme digestion identification (right) of pHIS2-*BPr*

M: DNA marker; C: pHIS2 vector control; P1: pHIS2-*BPr*。

2.2 酵母单杂交筛选黄瓜 cDNA 文库

首先摸索能够消除报告基因在酵母细胞中的本底表达的最适 3-AT 浓度。pHIS2-*BPr* 质粒转化酵母菌 Y187, 转化后分别涂在 SD/-Trp 对照固体培养基上及 3-AT 浓度梯度为 0、5、10 及 $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$

的 SD/-Trp/-His 固体培养基上, 30 ℃培养 3 ~ 5 d。结果显示, 最适 3-AT 浓度是 15 mmol · L⁻¹ (图 2), 作为后续筛选黄瓜 cDNA 文库的 3-AT 工作浓度。

使用 QIAGEN 质粒提取试剂盒提取 cDNA 文库质粒, 检测其浓度是 32.6 ng · μL⁻¹。

按照酵母单杂交筛选 cDNA 文库的方法共筛选了 5 次黄瓜 cDNA 文库, 每次筛选 30 个直径为 150 mm 的三缺固体培养基 SD/-Trp/-Leu/-His + 15 mmol · L⁻¹ 3-AT, 30 ℃培养 3 ~ 5 d。挑取共 100 个长势较好的单克隆, 提取酵母质粒后再利用大肠杆菌扩增, 提取大肠杆菌质粒, 以 T7 通用引物测序。所得测序结果去除载体序列后, 使用 NCBI、黄瓜基因组数据库和植物转录因子数据库进行 BLASTX 比对发现, 其中有一半左右是叶绿素合成相关基因, 这与 cDNA 来自叶片组织有很大关系, 是假阳性结果。其余克隆多为转录因子, 其中有 7 个转录因子重复出现, 包括 2 个 AP2/ERF 家族、3 个 bZIP 家族、1 个 WRKY 家族转录因子和 1 个 E3 泛素类 COP1 蛋白 (表 1)。其中一个 AP2/ERF 家族转录因子 (登录号: Csa7G448110.1) 重复出现 6 次, 出现概率高于另外 6 个转录因子。因此, 选择该转录因子进行深入研究, 命名为 CsERF。

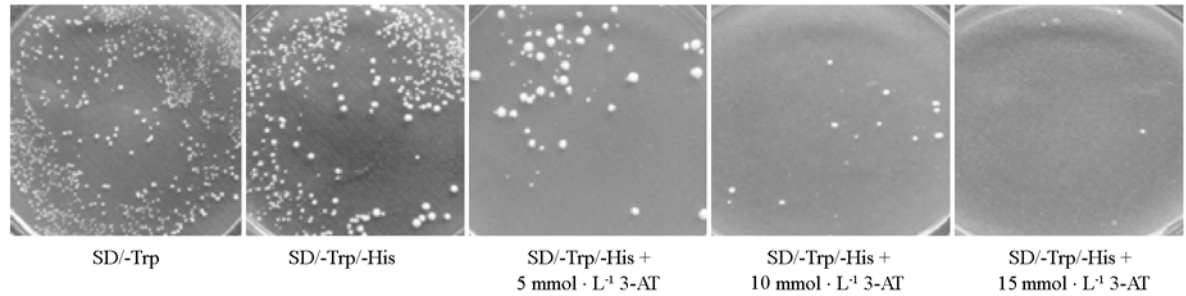


图 2 pHIS2-BPr 的本底组氨酸 (HIS3) 表达
Fig. 2 Background HIS3 expression of pHIS2-BPr

表 1 酵母单杂交筛选出的信号
Table 1 Yeast one-hybrid screening out signals

基因号 Gene accession	家族 Family	出现次数 Occurrences	基因号 Gene accession	家族 Family	出现次数 Occurrences
Csa7G448110.1	AP2/ERF	6	Csa2G279250.1	AP2	2
Csa2G381650.1	bZIP	2	Csa7G073570.1	bZIP	2
Csa4G003660.1	bZIP	2	Csa3G710870.1	WRKY	3
Csa1G699620.1	E3 泛素蛋白 COP1-like	2			

2.3 CsERF 基因的克隆及酵母单杂交恢复验证

将 CsERF 从黄瓜 cDNA 中扩增出来, 构建到 pGADT7-Rec2 载体上, 进行双酶切鉴定, 片段大小为 1 170 bp (图 3)。

将 AD-CsERF 质粒和 pHIS2-BPr 质粒 2 : 1 共转化酵母 Y187 进行恢复验证, 结果证明 CsERF 转录因子在酵母中与 Bi 启动子有明显的互作 (图 4)。

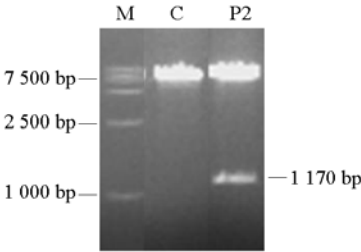


图 3 pGADT7-Rec2-CsERF 的酶切检测
M: 分子量标记; C: pGADT7-Rec2 空载体对照; P2: AD-CsERF。
Fig. 3 Enzyme digestion identification of pGADT7-Rec2-CsERF
M: DNA marker; C: pGADT7-Rec2 vector control; P2: AD-CsERF.

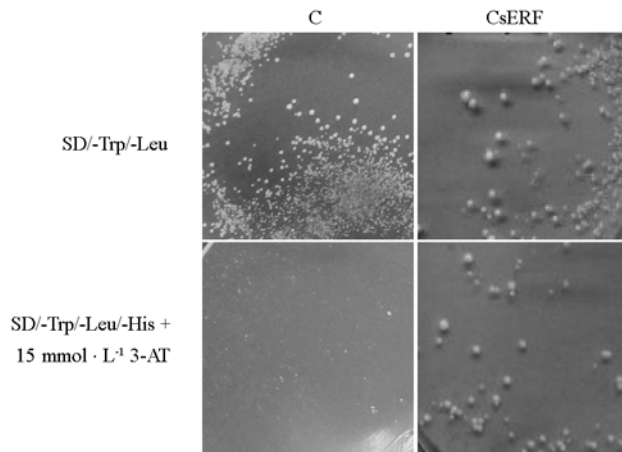


图 4 酵母单杂交验证试验

C: pGADT7-Rec2 空载体与 pHIS2-*BPr* 共转酵母; CsERF: AD-*CsERF* 和 pHIS2-*BPr* 共转酵母。

Fig. 4 Yeast One-hybrid identification experiment

C: Interaction of pHIS2-*BPr* and pGADT7-Rec2 vector in yeast; CsERF: Interaction of AD-*CsERF* and pHIS2-*BPr* in yeast.

将 *Bi* 启动子构建到 pCAMBIA1300-Luc 报告载体上, 以 I1、I2 引物对农杆菌质粒 *Luc-BPr* 进行 PCR 扩增和酶切鉴定, 片段大小为 2 000 bp (图 5)。将 *CsERF* 基因编码区构建到 pCAMBIA1300 效应载体上, 以 M1、M2 引物对农杆菌质粒 1300-*CsERF* 进行 PCR 扩增和酶切鉴定, 片段大小为 1 170 bp (图 6)。

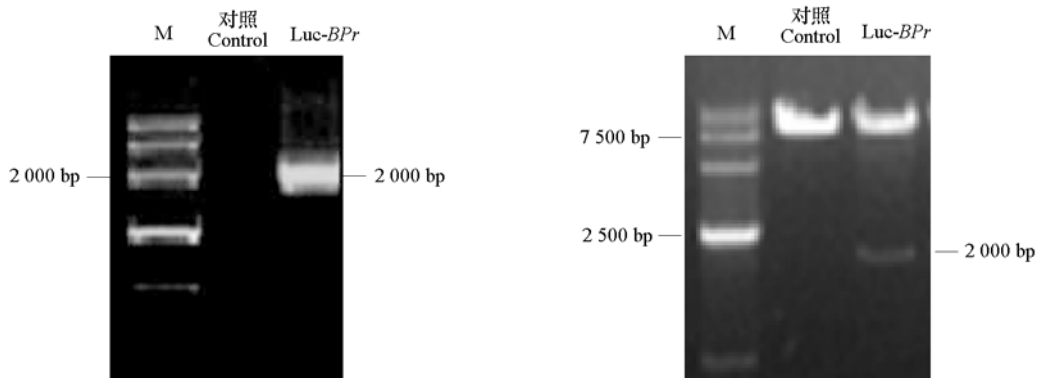


图 5 转化农杆菌中 *Luc-BPr* 报告载体的 PCR 检测 (左) 和酶切检测 (右)

Fig. 5 PCR identification (left) and enzyme digestion identification (right) of *Luc-BPr* in transformed *Agrobacterium tumefaciens*

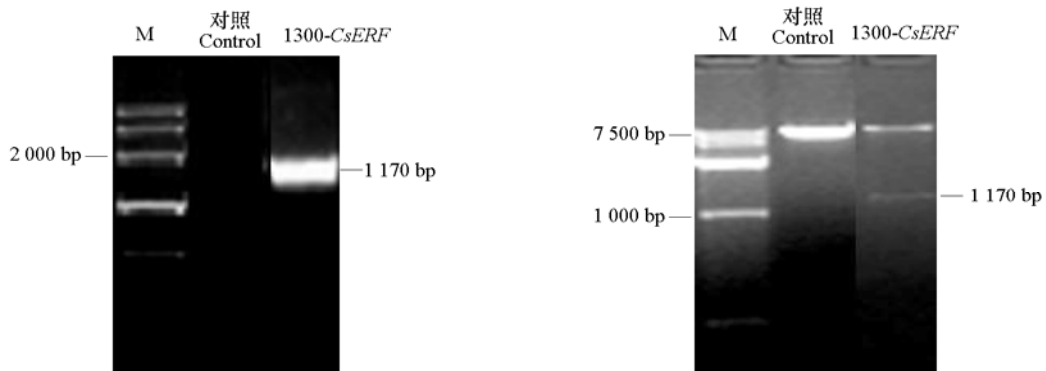


图 6 转化农杆菌中 1300-ERF 效应载体的 PCR 检测 (左) 和酶切检测 (右)

Fig. 6 PCR identification (left) and enzyme digestion identification (right) of 1300-*ERF* in transformed *Agrobacterium tumefaciens*

3 讨论

本实验室前期研究已经证明黄瓜苦味物质——葫芦素 C 是由 *Bi* 基因参与合成的 (黄三文 等, 2014)。为了探究黄瓜苦味物质合成的调控机制, 本研究中克隆了 *Bi* 基因 ATG 上游 2 000 bp 序列作为它的启动子序列, 利用传统鉴定转录因子的方法——酵母单杂交筛选黄瓜 cDNA 文库, 得到 1 个 AP2/ERF 家族转录因子 CsERF (登录号: Csa7M448110)。进一步克隆 CsERF 全长, 利用烟草瞬时表达系统验证, 结果显示 CsERF 在酵母和烟草体内均能够激活 *Bi* 基因启动子, 说明 CsERF 能够特异结合 *Bi* 基因启动子的顺式作用元件, 正调控 *Bi* 基因的表达, 导致黄瓜中葫芦素 C 积累。

NCBI 数据库分析 CsERF 转录因子编码 389 个氨基酸, 分子量为 43.19 kD, 属于 AP2/ERF 家族。AP2/ERF 家族转录因子通常以 AP2 结构域由大约 60 个保守氨基酸组成的 DNA 结合域为特征 (Okumuro et al., 1997), 可分为 3 个亚家族: AP2 家族、ERF 家族、RAV 家族。ERF 家族又可以分为 2 个大的亚家族, 其中 CBF/DREB 亚家族成员可以识别干旱和冷诱导响应元件 (DRE/CRT, A/GCCGAC), 在植物抵抗非生物胁迫过程中起着非常重要的作用 (Yamaguchi-Shinozaki & Shinozaki, 1994; Thomashow, 1999)。在生产中, 黄瓜苦味物质的生成受干旱、低温 (低于 13 °C)、光照不足等条件的影响 (Guseva & Demakova, 1973)。因此, 黄瓜 CsERF 转录因子激活 *Bi* 表达的调控机制很可能与受到干旱、冷诱导等非生物胁迫有关。

黄瓜的苦味物质葫芦素 C 是一类三萜化合物, 萜类是植物中一类重要的次生代谢物, 具有调节植物生长发育、抗逆性等重要的生理作用。AP2/ERF 家族转录因子在多个物种中曾被报道参与植物次生代谢调控。在长春花中, AP2/ERF 转录因子 ORCA3 调控吲哚生物碱的合成途径中多个基因的表达 (van der Fits & Memelink, 2000)。ORCA3 通过直接结合下游基因启动子区域中 JA 激发子诱导的响应元件 (JERE), 激活胡豆合成酶 (STR) 的表达 (van der Fits & Memelink, 2001)。在黄花蒿中, 两个响应 JA 的 AP2/ERF 蛋白, AaERF1 和 AaERF2, 可以通过结合编码紫穗槐-4,11-二烯合成酶 (ADS) 和 *CYP71AV1* 基因启动子中 CRTDREHVCBF2 (CBF2) 和 RAV1AAT (RAA) 的元件, 激活这两个基因的表达, 使得青蒿素和青蒿酸积累增加 (Yu et al., 2012)。在烟草中, 至少包含 7 个 AP2/ERF 基因与尼古丁的生物合成相关, 这些转录因子与尼古丁合成基因启动子中 GCC-box 结合发挥调控作用, 其中 ERF189 和 ERF221 的效率最高 (Shoji et al., 2010)。

综上所述, 本研究找到的 CsERF 对黄瓜苦味基因 *Bi* 的转录调控很可能是黄瓜中次生代谢物响应环境 (干旱、冷诱导等) 条件变化的一种诱导型表达调控机制。但响应条件和响应元件还需要进一步的试验研究, 拟打算一方面采用多种胁迫和激素诱导处理的方法, 判断黄瓜苦味物质的转录因子 CsERF 响应的胁迫或激素类型, 另一方面进行凝胶阻滞实验, 寻找 CsERF 特异结合 *Bi* 启动子区域的顺式作用元件。

除了利用酵母单杂交, 烟草瞬时激活以及凝胶阻滞等方法进行研究, 还需要好的遗传材料即突变体的支持进行遗传试验研究。但目前关于黄瓜苦味合成调控的研究非常有限, 相关的遗传材料暂时也未发现, 同时黄瓜转基因体系不成熟, 不过可以利用瞬时的遗传转化体系或 RNAi 干扰体系, 升高或降低 CsERF 的表达量, 检测黄瓜苦味的表型变化, 使结果更加准确可靠。

研究黄瓜苦味物质的分子调控机制有重要意义, 一方面为以后改良无苦味黄瓜提供了有效的分子育种方法和途径。另一方面, 葫芦素 C 作为一类三萜化合物具有非常重要的商业价值 (Andeweg & De Bruyn, 1959; Rice et al., 1981)。另外, 已有报道葫芦素 C 具有抗癌的功效 (Thoennissen et al., 2009; Dong et al., 2010), 也为开发葫芦素 C 的抗癌新药提供了新的线索。

References

- Andeweg J M, De Bruyn J W. 1959. Breeding of non-bitter cucumbers. *Euphytica*, 8: 1320.
- Dong Y, Lu B, Zhang X, Zhang J, Lai L, Li D, Wu Y, Song Y, Luo J, Pang X F, Yi Z F, Liu M Y. 2010. Cucurbitacin E, a tetracyclic triterpenes compound from Chinese medicine, inhibits tumor angiogenesis through VEGFR2-mediated Jak2-STAT3 signaling pathway. *Carcinogenesis*, 31 (12): 2097 – 2104.
- Gu Xing-fang, Zhang Sheng-ping, Guo Yan-mei, Xu Cai-qing. 2004. Inheritance of bitterness in cucumber. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (5): 613 – 616. (in Chinese)
- 顾兴芳, 张圣平, 国艳梅, 徐彩清. 2004. 黄瓜苦味遗传分析. *园艺学报*, 31 (5): 613 – 616.
- Guseva L I, Demakova T V. 1973. Bitterness in cucumbers in relation to growing conditions. *Selektsiya i Semenovodstvo Ovoshchnykh*. Kishinev, Moldavian SSR, Stiinca: 52 – 59.
- Huang S W, Li R Q, Zhang Z H, Li L, Gu X F, Fan W, Lucas W J, Wang X W, Xie B Y, Ni P X, Ren Y Y, Zhu H M, Li J, Lin K, Jin W W, Fei Z J, Li G C, Staub J, Kilian A, van der Vossen E A, Wu Y, Guo J, He J, Jia Z Q, Ren Y, Tian G, Lu Y, Kim J Y, Xu Y, Heller-Uszynska K, Miao H, Cheng Z C, Zhang S P, Wu J, Yang Y H, Kang H X, Li M, Liang H Q, Ren X L, Shi Z B, Wen M, Jian M, Yang H L, Zhang G J, Yang Z T, Chen R, Liu S F, Li J W, Ma L J, Liu H, Zhou Y, Zhao J, Fang X D, Li G Q, Fang L, Li Y R, Liu D Y, Zheng H K, Zhang Y, Qin N, Li Z, Yang G H, Yang S, Bolund L, Kristiansen K, Zheng H C, Li S C, Zhang X Q, Yang H M, Wang J, Sun R F, Zhang B X, Jiang S Z, Wang J, Du Y C, Li S G. 2009. The genome of the cucumber, *Cucumis sativus* L. *Nature Genetics*, 41 (12): 1275 – 1281.
- Huang San-wen, Shang Yi, Zhang Zhong-hua, Li Ying, Ma Yong-shuo, Qi Jian-jian, Wang Shen-hao, Wang Ye. 2014. SNP markers associated with bitter cucumber characters and its application. China: ZL2012105598559, 2014 – 01 – 07. (in Chinese)
- 黄三文, 尚 轶, 张忠华, 李 颖, 马永硕, 齐建建, 王深浩, 王 烨. 2014. 与黄瓜苦味性状相关的 SNP 标记及其应用. 中国: ZL2012105598559, 2014 – 01 – 07.
- Lawrence K P, Wehner T C. 1990. Review of genes and linkage groups in cucumber. *HortScience*, 25 (6): 605 – 615.
- Li Man, Gong Yi-qin, Miao Han, Wu Jian, Gu Xing-fang, Zhang Sheng-ping, Wang Xiao-wu. 2010. Fine mapping of the foliage bitterness gene (*Bi*) in *Cucumis sativus* L. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (7): 1073 – 1078. (in Chinese)
- 李 曼, 龚义勤, 苗 晗, 武 剑, 顾兴芳, 张圣平, 王晓武. 2010. 黄瓜营养体苦味基因 *Bi* 的定位. *园艺学报*, 37 (7): 1073 – 1078.
- Okumuro J K, Caster B, Villarroel R, Van-Montagu M, Jofuku K D. 1997. The AP2 domain of APETALA2 defines a large new family of DNA binding proteins in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 94: 7076 – 7081.
- Rice C A, Rymal K S, Chambliss O L, Johnson F A. 1981. Chromatographic and cucurbitacins of three *Cucumis sativus* cultivars. *Agric Food Chem*, 29: 194 – 196.
- Shang Yi. 2010. An abscisic acid receptor ABAR/CHLH mediated ABA signaling pathway in *Arabidopsis* [Ph. D. Dissertation]. Beijing: Tsinghua University. (in Chinese)
- 尚 轶. 2010. 拟南芥 ABA 受体 ABAR/CHLH 调控的一个 ABA 信号通路[博士论文]. 北京: 清华大学.
- Shoji T, Kajikawa M, Hashimoto T. 2010. Clustered transcription factor genes regulate nicotine biosynthesis in tobacco. *Plant Cell*, 22: 3390 – 3409.
- Thoenissen N H, Iwanski G B, Doan N B, Okamoto R, Lin P, Abbassi S, Song J H, Yin D, Toh M, Xie W D, Said J W, Koeffler H P. 2009. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer Res*, 69: 5876 – 5884.
- Thomashow M F. 1999. Plant cold acclimation: Freezing tolerance genes and regulatory mechanism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 50: 571 – 599.
- van der Fits L, Memelink J. 2000. ORCA3, a jasmonate responsive transcriptional regulator of plant primary and secondary metabolism. *Science*, 289: 295 – 297.
- van der Fits L, Memelink J. 2001. The jasmonate-inducible AP2/ERF domain transcription factor ORCA3 activates gene expression via interaction with a jasmonate-responsive promoter element. *Plant J*, 25: 43 – 53.
- Wehner T C, Liu J S, Staub J E. 1998. Two-gene interaction and linkage for bitterfree foliage in cucumber. *American Society for Horticultural Science*, 123 (3): 401 – 403.
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. 1994. A novel cis acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. *The Plant Cell*, 6: 251 – 264.
- Yu Z X, Li J X, Yang C Q, Hu W L, Wang L J, Chen X Y. 2012. The jasmonate-responsive AP2/ERF transcription factors AaERF1 and AaERF2 positively regulate artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Mol Plant*, 5: 353 – 365.