

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 F₂ 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, 以期深入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'-AACATTT TGCCGTTAATAGACCCT-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'-CGACGCGTTTTACTGTTTTTATATCTATAT-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 文库由英滩捷基 (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://plantfdb.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'-CCCCGGGTATGTGTGGAGGTGCTATAAT-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 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)。

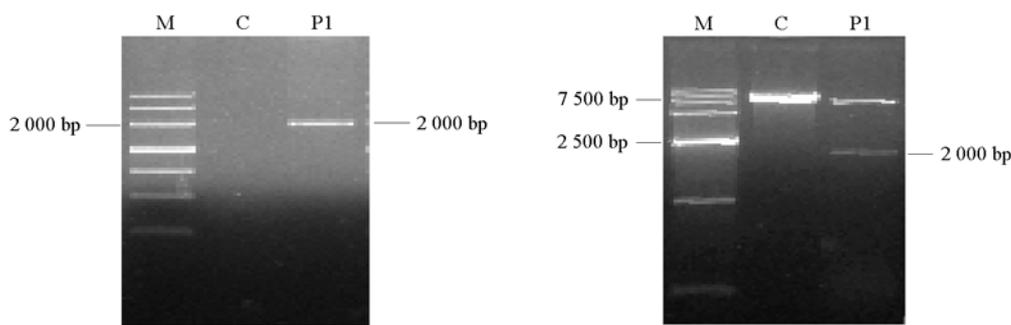


图 1 pHIS2-*BPr* 的 PCR 检测 (左) 和酶切鉴定 (右)

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 °C 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 °C 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。

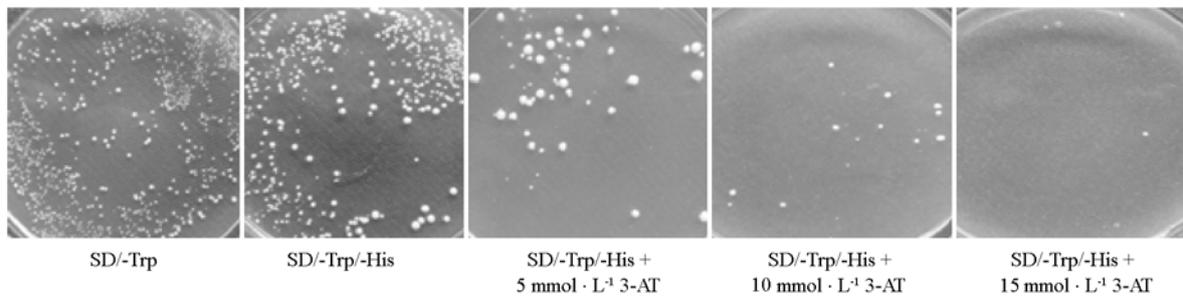


图 2 pHIS2-BPr 的本底组氨酸 (HIS3) 表达

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)。

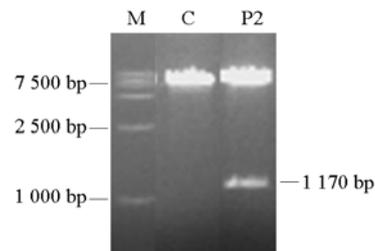


图 3 pGADT7-Rec2-CsERF 的酶切检测

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.

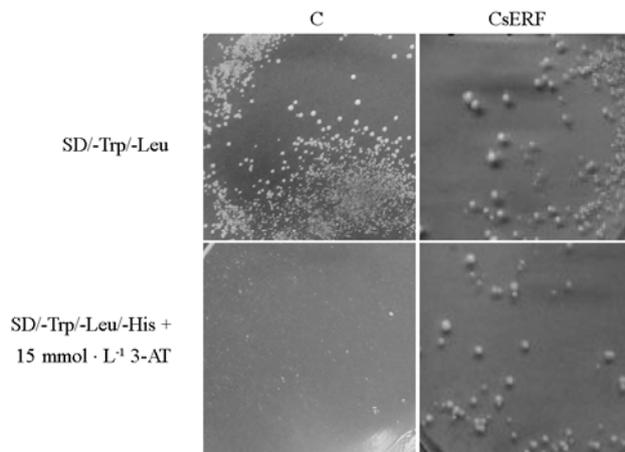


图 4 酵母单杂交验证试验

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)。

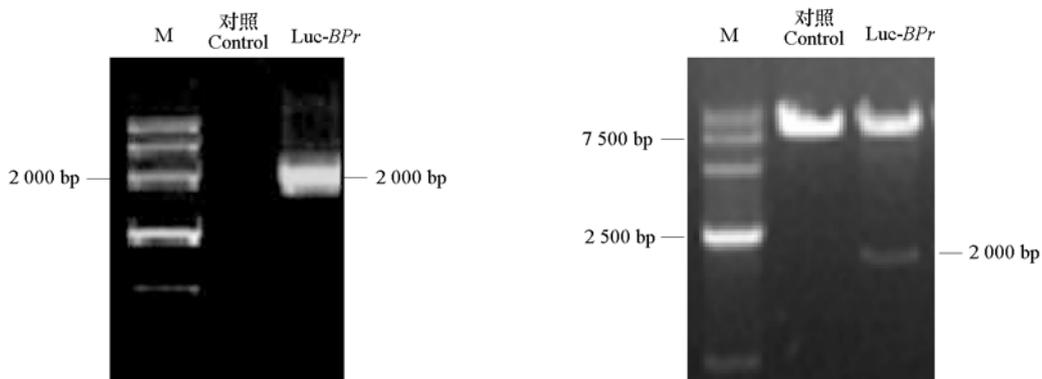


图 5 转化农杆菌中 *Luc-BPr* 报告载体的 PCR 检测 (左) 和酶切检测 (右)

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

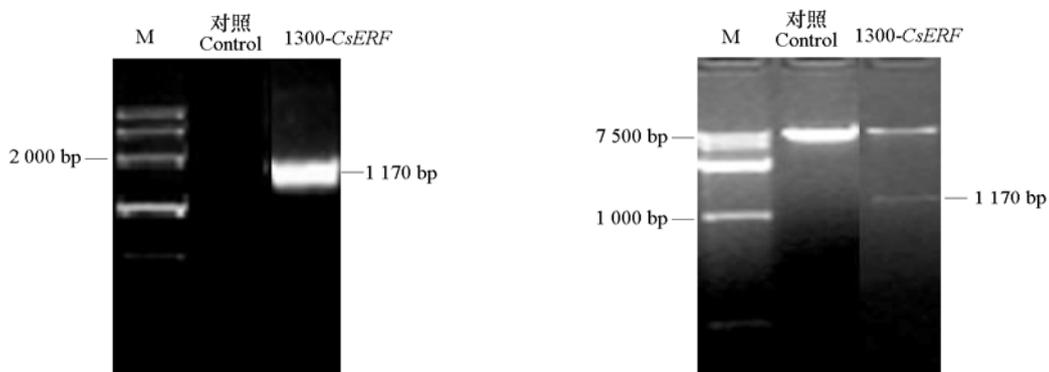


图 6 转化农杆菌中 1300-ERF 效应载体的 PCR 检测 (左) 和酶切检测 (右)

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.
- Okamoto 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.
- Thoennissen 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.