

番茄果实成熟相关转录因子的研究进展

汪莹, 孔俊花, 陈微微, 周婷*, 赖童飞*

(杭州师范大学生命与环境科学学院植物 RNA 信号传导中心, 杭州 310036)

摘要: 对近年来通过高通量测序、基因结构预测、成熟突变体筛选、比较组学分析等手段获得的番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill.) 果实成熟相关转录因子的研究进展进行了综述, 为进一步阐明果实成熟相关转录调控网络作用机制的研究提供参考。

关键词: 番茄; 果实成熟; 转录因子; 调控网络

中图分类号: S 641.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 09-1811-10

Fruit Ripening-related Transcription Factors in Tomato

WANG Ying, KONG Jun-hua, CHEN Wei-wei, ZHOU Ting*, and LAI Tong-fei*

(Research Centre for Plant RNA Signaling, School of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: In this paper, the latest research progresses about ripening-related transcription factors of *Solanum lycopersicum* Mill. acquiring from high-throughput sequencing, gene structure prediction, mutant screening and comparative omics were reviewed. It will provide the theoretical underpinnings for further illustrating the mechanism of transcriptional regulatory networks on tomato fruit ripening.

Key words: *Solanum lycopersicum*; fruit ripening; transcription factors; regulation network

番茄 (*Solanum lycopersicum* Mill.) 栽培历史悠久, 因其基因组小 (950 Mb), 生长周期短 (坐果到成熟约 60 d), 且与拟南芥、水稻、玉米等模式植物亲缘关系较远而成为了研究肉质果实发育和成熟的模式植物。现已获得大量番茄种质资源、突变体库 (<http://zamir.sgn.cornell.edu/mutants/>)、高密度遗传图谱、EST 资源 (<http://www.sgn.cornell.edu/>), 且瞬时表达和稳定转化技术成熟。此外, 2012 年 5 月完成的栽培番茄全基因组精细序列分析 (The Tomato Genome Consortium, 2012), 极大地推动了番茄功能基因组学及分子遗传学研究。果实成熟过程涉及到大量代谢途径的调节以及生理生化属性的显著改变, 需要对一系列基因的时序性表达进行精密转录调控, 因此番茄成熟相关转录因子的功能研究成为植物学领域的研究热点之一。通过生物信息学预测, 番茄中至少存在着 62 个转录因子家族, 在植物激素合成、组织细胞膨胀、细胞壁物质代谢、调节果实成熟及色素积累等多个方面发挥着重要调控作用 (Zhang et al., 2010)。探讨这些转录因子的功能及相互关系, 是系统研究番茄果实成熟衰老及其调控机制的基础, 也可为定向改善番茄果实品质提供理论依据。

收稿日期: 2014-06-03; 修回日期: 2014-08-08

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (LQ12C02005; LQ13C020004; LQ14C200004)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: laitongfei@163.com; zt20100061@163.com)

1 乙烯介导的番茄果实成熟

果实的发育起始于子房中细胞的膨大,其发育成熟涉及一系列基因的时序性表达,最终决定果实的形态、色泽、风味和质地 (Giovannoni, 2004)。该过程受内在和外在多种因素的调控,包括植物激素、转录因子、光照、温度、水分和营养物质等。番茄为呼吸跃变型果实,对其成熟的分子遗传机制研究早期主要关注于成熟过程中乙烯合成和乙烯受体介导的信号转导调控 (图 1)。乙烯的前体为甲硫氨酸 (Methionine),其在腺苷甲硫氨酸合成酶 (Adomet synthetase) 作用下转化成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-adenosyl methionine, SAM); 随后在 1-氨基环丙烷-1-羧酸 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC) 合成酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic synthase, ACS) 的催化下转化成 ACC; 最后在 ACC 氧化酶 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic oxidase, ACO) 的作用下形成乙烯。

在番茄基因组中至少存在着 12 个 ACS 和 7 个 ACO 基因,其中 *LeACS2*、*LeACS4* 和 *LeACO1* 在番茄果实成熟过程中发挥着主要作用 (Yokotani et al., 2009; Klee & Giovannoni, 2011)。番茄中存在 7 个乙烯受体 (Ethylene receptors, ETRs), 其中 *LeETR3/Nr*、*LeETR4* 和 *LeETR6* 主要在成熟果实中表达,这些双组份系统中的组氨酸激酶位于内质网,发挥着负调控因子的作用; 在 ETRs 的下游是由 4 个成员组成的 *LeCTRs* (Constitutive triple responses) 家族,其中 *LeCTR1* 在果实中表达量最高,通过促分裂素原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联反应,负向调节下游的 EIN2 (Ethylene insensitive 2); EIN2 位于多种植物激素传导通路的交叉点,对于激素的网络调控具有重要的作用; EIN2 下游是一个位于细胞核的反式作用因子家族 EILs (EIN3-like), 番茄中由 *LeEIL1* ~ 4 组成,能够识别多个成熟衰老相关基因以及 ERFs (Ethylene response factors) 基因启动子区域的 EREs (Ethylene response element); 乙烯信号传导的末端是 ERFs 家族,番茄中 5 种 *LeERFs* (*LeERF1* ~ 4, 3b) 通过与目标基因启动子区域的 GCC-Box 结合完成对成熟相关基因的调控 (Cara & Giovannoni, 2008; Bapat et al., 2010; Gapper et al., 2013)。

2 转录因子在番茄不同组织及发育阶段的特异表达

转录因子 (Transcription factors) 是一群能与基因 5' 端上游特定序列 (启动子区域) 专一性结合,从而保证目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子,通过对目标基因转录水平的调节,进而影响细胞的生物学行为。在番茄生长发育及成熟过程中,至少存在着 998 个预测的转录因子,分属 62 个家族,约占番茄基因组 34 727 个基因中的 2.87% (Zhang et al., 2010)。通过转录组深度测序、实时定量 RT-PCR (Real-time RT-PCR) 和基因芯片等技术的检测,发现这些转录因子在番茄的不同组织及发育时期存在着明显差异 (图 2)。在番茄早期发育过程中 (坐果至果实破色), AP2-EREBP、AUX/IAA、GBP、bHLH、HB、ARF、LIM、SPB、HSF、FHA 和 PBF-2-Like 等 11 个转录因子家族表现活跃; 在果实成熟期 (果实破色至完全成熟) VBI3-VP1、MADS、C2H2、CCAAT、HMG、G2-Like 和 MYB-related 等 7 个转录因子家族表达量较高; 在果实发育至成熟过程中 GRAS、MBF1、MYB、bZIP 和 WRKY 等 5 个转录因子家族均稳定表达。其中 WRKY 家族具有两种表达模式,一种是部分家族成员在果实破色后显著升高,另一种模式则是在果实破色前逐渐下降,而在成熟过程中逐渐升高 (Rohrmann et al., 2011, 2012; Mori et al., 2013)。C3H、PHD、SET 及 Trihelix 等转录因子家族在番茄果实中表达量很低,可能对果实的发育及成熟没有影响。此外,ABI3-VP1、bZIP、bHLH 和 C2C2-Dof 等多个转录因子家族在叶、茎、花等非果实组织中表达 (Rohrmann et al., 2012)。

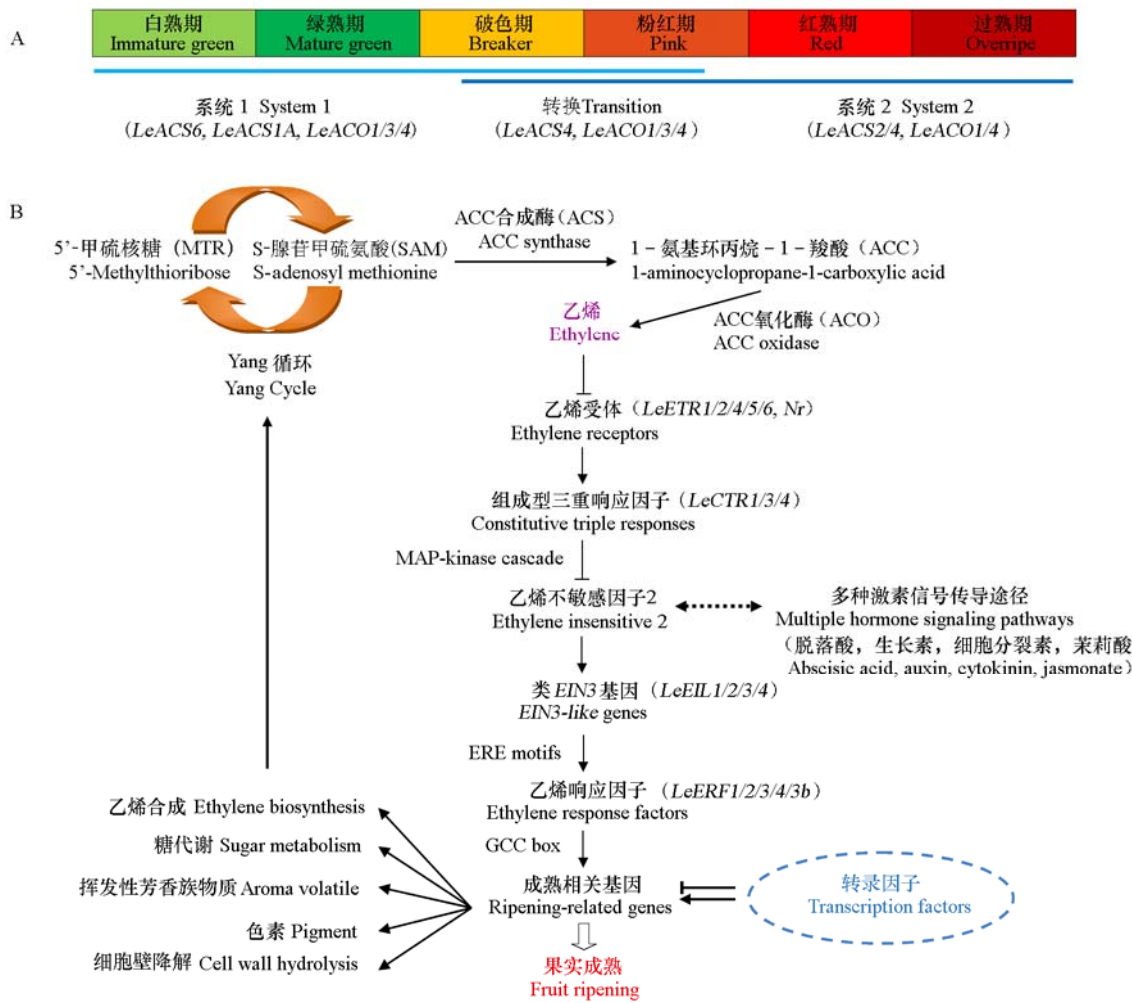


图 1 番茄果实发育成熟过程中乙烯合成的调控 (A) 及乙烯介导的信号传导途径 (B)

箭头代表正向调节, 钝箭头代表负向调节, 虚线双向箭头代表猜测的相互作用。

Fig. 1 Regulation of ethylene biosynthesis in tomato development and fruit ripening (A) and putative ethylene signaling transduction pathway in tomato (B)

Arrows indicate positive regulation, blunt arrows indicate negative regulation, and double arrows with broken line indicate putative multiple interactions.

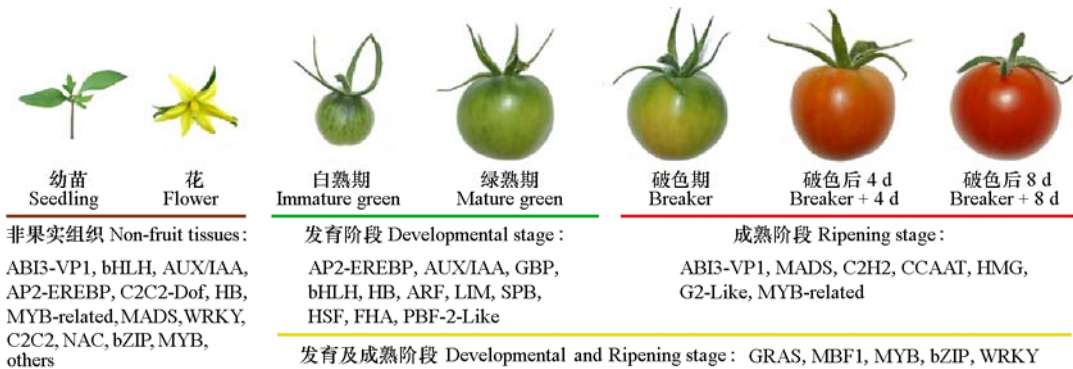


图 2 转录因子在番茄不同组织及发育阶段的特异表达

Fig. 2 Specific expression of transcription factors in different tissues and developmental stages of tomato

3 番茄成熟相关转录因子的功能

近年来,番茄成熟相关转录因子的功能研究成为植物学领域的研究热点之一。在高通量筛选番茄果实成熟相关转录因子并分析其表达图谱的同时,研究人员借助基因结构预测、成熟突变体筛选和比较组学分析等技术手段,在分析果实成熟相关转录因子功能方面也取得了很多成果(表1)。

表 1 已知功能的番茄果实成熟相关转录因子
Table 1 Transcription factors with known functions related to tomato fruit ripening

名称 Name	检索号 Accession number	长度/aa Length	家族 Family	调控方式 Regulation mode	参考文献 Reference
LeMADS-RIN	NM_001247741	242	MADS	正向 Positive	Ito et al., 2008; Martel et al., 2011; Osorio et al., 2011; Qin et al., 2012; Fujisawa et al., 2013
SIFUL1	NM_001247244	245	MADS	正向 Positive	Bemer et al., 2012; Shima et al., 2013, 2014;
SIFUL2	Solyc03g114830.2.1	248	MADS	正向 Positive	Fujisawa et al., 2014; Wang et al., 2014
SITAGL1	NM_001247258	269	MADS	正向 Positive	Itkin et al., 2009; Vrebalov et al., 2009; Pan et al., 2010; Giménez et al., 2010
SIMYB12	NM_001247472	338	R2R3MYB	正向 Positive	Adato et al., 2009; Ballester et al., 2010
LeHB1	NM_001247367	285	HD-Zip	正向 Positive	Lin et al., 2008
LeSPL-CNR	XM_004232852	136	SPL	正向 Positive	Manning et al., 2006
SIMADS1	NM_001247451	246	MADS	反向 Negative	Dong et al., 2013
SIAP2a	NM_001247523	401	AP2/ERF	反向 Negative	Chung et al., 2010; Karlova et al., 2011
SIERF6	JN616265	254	ERF/EREBP	反向 Negative	Lee et al., 2012

3.1 LeMADS-RIN

LeMADS-RIN 属于 MADS 转录因子家族 SEPALLATA 亚家族,是目前番茄中研究最为深入的转录因子。该转录因子定位于细胞核,在番茄成熟过程中高度表达,能够在体外形成稳定的同源二聚体,转录活性区域位于C末端,C末端的27个氨基酸为转录活性所必需。CArG-box 是 LeMADS-RIN 典型的识别基序,包括 C(C/T)(A/T)₆(A/G)G、C(A/T)₈G、C(C/T)(A/T)G(A/T)₄(A/G)G 等几种形式。大约 60%的 LeMADS-RIN 识别位点含有 1 个或多个 CArG-box,对于其他不含 CArG-box 的识别位点,LeMADS-RIN 可能与某些 DNA 结合因子形成复合物后再进行识别(Ito et al., 2008; Fujisawa et al., 2011)。*rin* (*Ripening inhibitor*) 突变体由于部分 *RIN* 及与其毗邻 *MACROCALYX* 间隔序列的缺失,导致大量成熟相关基因的表达被抑制,出现花序延长、萼片肥大和果实无法成熟的表型(Vrebalov et al., 2002)。LeMADS-RIN 能够与乙烯合成的主要基因 *ACS2*、*ACS4*、*ACO1* 的启动子区域结合,从而控制乙烯合成(Fujisawa et al., 2012)。Qin 等(2012)的研究表明,LeMADS-RIN 能够调控 LOX (Lipid oxidation of polyunsaturated fatty acids) 途径中的 *TomloxC*、*ADH2* 及 *HPL*,影响芳香族化合物的合成。Yang 等(2012)发现 LeMADS-RIN 介导的调控网络影响钙/钙调蛋白(Calcium/calmodulin)对 *SISR/CAMTA* 的调节。利用染色质免疫共沉淀结合基因芯片技术(Chromatin Immunoprecipitation-chip, ChIP-chip)以及生物信息学技术分析发现,LeMADS-RIN 的直接靶标至少包含 241 个基因,参与到 67 个代谢途径中,涉及乙烯合成及其介导的信号转导、呼吸作用、植物激素合成、细胞壁修饰、色素积累、芳香族化合物合成和逆境胁迫应答等多个方面(Ito et al., 2008; Martel et al., 2011; Fujisawa et al., 2012; Kumar et al., 2012; Fujisawa et al., 2013)。

3.2 SIFUL1/SIFUL2

SIFUL1/SIFUL2(过去也被称为 SITDR4/SIMBP7)属于 MADS 转录因子家族的 SQUAMOSA/AP1 分支,与拟南芥 *AtFUL* 同源(氨基酸序列相似度分别为 75%和 77%)。*SIFUL1* 和 *SIFUL2* 两者序列

相似性较高, 功能有重合 (Hileman et al., 2006)。SIFUL1 在果实发育早期表达量较低, 从绿熟期开始迅速升高, 在红熟期达到最高, 且集中表达在外果皮; SIFUL2 在果实中稳定表达, 仅在成熟期略有升高。利用 RNA 干扰 (RNA interference, RNAi) 技术在番茄栽培品种 ‘Micro-Tom’ 中抑制 SIFUL1/SIFUL2 的表达, 导致成熟果实中番茄红素 (lycopene) 及顺式 - 八氢番茄红素 (cis-phytoene) 含量下降, 表皮呈橙色, 果实失水速率升高; 利用基因芯片分析发现 SIFUL1/SIFUL2 在乙烯信号传导途径下游或独立发挥作用, 对类胡萝卜素 (carotenoid) 合成、细胞壁修饰蛋白合成、脂代谢、葡萄糖代谢均有显著影响 (Bemer et al., 2012)。Wang 等 (2014) 在 ‘Ailsa Craig’ 番茄中过表达 SIFUL2, 发现花的脱落模式改变, 茎枝发育受阻, 同时番茄果实底部出现尖头表型, 果皮变薄。Shima 等 (2014) 发现沉默 SIFUL1/SIFUL2, 影响番茄坐果及种子的形成, 并通过抑制 ACS 的活性降低乙烯的合成, 同时转基因株系的果实角质层厚度变薄, 硬度降低。Fujisawa 等 (2014) 利用转录本测序技术 (RNA-sequencing) 研究发现, SIFUL1/SIFUL2 对番茄果实成熟相关基因的调控范围比 LeMADS-RIN 更为广泛, 利用 ChIP-chip 研究表明, SIFUL1/SIFUL2 在全基因组范围内, 有 1 145 和 1 134 个结合位点与 LeMADS-RIN 重叠, 还分别具有 435 及 604 个特异结合位点, 这些结合位点对应着 860 及 878 个直接调控基因, 能够协同 LeMADS-RIN 或独立行使其生物学功能。

3.3 SITAGL1

SITAGL1 (Tomato AGAMOUS-LIKE 1) 位于番茄第 7 条染色体, 属于 MADS 转录因子家族, 与拟南芥中 SHATTERPROOF 1 直系同源, 氨基酸匹配率为 71% (Busi et al., 2003)。SITAGL1 在番茄根、幼苗、叶以及种子中均有表达, 最早出现在花的雄蕊及心皮原基, 在花期到达第 1 个表达高峰 (Brukhin et al., 2003), 在破色至红熟期到达第 2 个表达高峰。利用 35S 启动子在番茄 ‘MoneyMaker’ 中过表达 SITAGL1, 导致花萼变短、花瓣变厚变红并与果实同时扩展伸长, 最终融合在一起, 但果实可以正常成熟。利用 RNAi 技术沉默 SITAGL1, 对花的发育没有影响, 但果实中叶绿素 (chlorophyll) 含量升高, 果实表面粗糙, 外果皮变薄, 厚角细胞的体积及数量显著降低, 后期果实展现橙色或黄色的表型, 无转红软化过程 (Giménez et al., 2010)。在转录水平上则表现为 ACS2、ACS4、PSY1、PG、PE2 及 E4 表达下降, 但 RIN、NOR 及 CNR 的表达不受影响 (Vrebalov et al., 2009)。此外, 在 rin 和 nor 突变体中过表达 SITAGL1, 能够使突变体恢复成熟表型。因此, SITAGL1 可能通过依赖或不依赖乙烯信号传导途径两种方式对果实成熟进行正向调控 (Itkin et al., 2009; Pan et al., 2010)。

3.4 LeHB1

LeHB1 包含保守的 Homeodomain leucine zipper (HD-Zip) 结构域, 其 HD-Zip domain 的氨基酸序列与拟南芥中 AtHB-1 的相似性为 92%。通过 GST::HD-Zip/DNA 结合试验发现 LeHB1 HD-Zip 能够识别 LeACO1 启动子区域 AATA(AA)TATT 或 CAAT(A)ATGG 的反向重复序列, 通过调节 ACO1 的表达参与番茄果实成熟的调控。Northern-blot 检测表明, LeHB1 在花蕾及子房发育期的花瓣及叶片中均有表达, 对机械损伤不敏感, 果实发育初期和绿熟期高度表达, 破色后表达逐渐下降。利用病毒诱导的基因沉默 (Virus-induced gene silence, VIGS) 在 ‘Ailsa Craig’ 番茄果实上沉默 LeHB1 (mRNA 表达下降 60%~90%), 果实成熟延缓, 部分延熟果实果皮呈现黄色或橙色, LeACO1 表达下降, 与 ACO1 沉默的转基因番茄表型一致。而通过病毒载体过表达 LeHB1 则产生多重花序、萼片与花瓣融合、萼片基部膨大等现象, 同时诱导 LeACO1 表达水平升高 (Lin et al., 2008)。

3.5 SIMYB12

植物中类黄酮 (Flavonoids) 的合成由 R2R3MYB 家族的转录因子调控, 其中部分转录因子由

MYB、bHLH 和 WD40 重复蛋白复合而成 (Ramsay & Glover, 2005)。Ballester 等 (2010) 利用生物信息学工具筛选出 17 个编码 R2R3MYB 和 9 个编码 bHLH 的转录因子。通过对类黄酮合成相关基因表达分析发现, *SIMYB12* 与粉色番茄 IL1b 株系的表型相关性最高, 同时通过 VIGS 降低 *SIMYB12* 表达, 致使 ‘MoneyMaker’ 番茄成熟果实中柚皮苷查尔酮 (Naringenin chalcone) 含量降低, 产生粉色表型。*SIMYB12* 位于番茄第 1 染色体, 包含 3 个内含子, 第 2 个内含子表现出较高的多态性, 约 80% 的氨基酸序列与拟南芥 *AtMYB12* 一致, 缺乏与 bHLH 蛋白互作的保守序列, 主要功能为调节类黄酮的生物合成。在 ‘Micro-Tom’ 番茄中过表达 *AtMYB12*, 导致果实中类黄酮及其衍生物含量升高 (Luo et al., 2008)。此外, *SIMYB12* 同源基因 *SIMYB111* 在部分番茄品种中也与其功能相似 (Adato et al., 2009)。

3.6 LeSPL-CNR

LeSPL-CNR 位于番茄第 2 条染色体的长臂上, 编码 SQUAMOSA SBP-box (Squamosa promoter binding-like protein) 蛋白, 包含一段高度保守的 DNA 结合区域 (约 80 个氨基酸), 属于 SPL 基因家族, 与拟南芥 *AtSPL3* 相似度最高 (Salinas et al., 2012)。番茄 *cnr* (Colorless non-ripening) 突变体发现于 1993 年, 其表型与其他已知的多个突变均明显不同, 开花 40 ~ 50 d 后果实仍保持较高的硬度, 果皮呈现黄色, 果肉为无色或白色, 乙烯合成减少, 用外源乙烯处理仍不能完全恢复野生型表型; 此外, 突变体成熟时期的果实果皮细胞不能膨大, 胞间距增加, 以同型半乳糖醛酸聚糖和钙为基础的细胞粘连下降, 质感改变 (Orfila et al., 2001)。通过生化试验及基因芯片分析发现, 在整个果实发育期间, *cnr* 突变体中大量成熟相关基因的表达发生变化, 其中 *RIN* 的表达显著上升, *FUL1* 的表达显著下降, 表明 *CNR*、*RIN*、*NOR* 及 *FUL1* 至少部分存在于同一转录调控途径中 (Eriksson et al., 2004)。Manning 等 (2006) 研究发现, *cnr* 突变体是由于 *LeSPL-CNR* 启动子自发表观遗传变异, 即 DNA 甲基化改变引起的。突变体中 *LeSPL-CNR* 启动子上游存在 286 bp DNA 超甲基化区域, 可能抑制了 *LeSPL-CNR* 表达。同时病毒诱导的 *LeSPL-CNR* 沉默能够抑制番茄果实的成熟, 表明 *LeSPL-CNR* 在控制番茄果实成熟过程中起着关键作用。

3.7 SIMADS1

SIMADS1 属于 MADS 转录因子家族 SEPSLLATA 亚家族, 在番茄幼芽、茎、叶片及花的雄蕊中含量较低, 根中几乎不表达, 但在花萼及未成熟的果实中高度表达 (Gaffe et al., 2011)。利用 RNAi 技术在 ‘Ailsa Craig’ 番茄中沉默 *SIMADS1*, 果实成熟期提前 3 ~ 6 d, 果实中类胡萝卜素含量显著升高, *ACS2*、*ACO1*、*ACO3*、*E4* 以及 *E8* 基因表达上升, 两个参与胁迫应答的 *ERF1* 和 *Pti4* 基因表达下降, 表明 *SIMADS1* 在番茄果实成熟过程中起着负调控作用 (Dong et al., 2013)。

3.8 SIAP2a

AP2 (APETALA2) 是植物特有的一类转录因子, 在拟南芥中被认定为花发育 ABC 模型中 A 类功能基因的同源异构体, 与 EREBP (Ethylene-responsive element binding protein) 以及 RAV 亚家族组成 AP2/ERF 超家族, 在种子萌发、花器官形成、果实发育、乙烯响应、抗病等过程中发挥着重要的作用 (Kim et al., 2006)。AP2 蛋白含有一段高度保守的区域, 由 68 个氨基酸组成, 其中 18 个氨基酸形成两性 α -螺旋 (amphipathic α -helix) 结构的核心元件。目前在番茄中共找到 5 种 AP2-like 蛋白, 其中 *LeAP2a* 在花及未成熟果实中表达量较低, 在果实绿熟及破色期表达上调, 并在红熟期维持较高的水平。Karlova 等 (2011) 利用 RNAi 技术在 ‘MoneyMaker’ 番茄中沉默 *SIAP2a*, 其花及果实发育发生了显著改变, 主要包括果实体积变小, 形状畸变, 颜色分布不均以及不能完全转红

等, 果实中多糖及腐胺 (Putrescine) 含量升高, 自由氨基酸含量下降, 种子形状、大小、种皮及种皮毛形态也有变化; 同时抑制 *SlAP2a* 的表达引起果实中乙烯合成增加, 表明该转录因子能够通过负反馈作用影响乙烯的合成。通过基因芯片分析发现, 沉默株系中共有 527 和 523 个基因表达发生了上调或下调, 涉及细胞壁、类胡萝卜素、苯丙素 (phenylpropanoid)、类黄酮、植物激素合成以及色质体分化等多个方面。Chung 等 (2010) 利用 RNAi 技术在 ‘Ailsa Craig’ 番茄中沉默 *SlAP2a* 的表达, 其果实颜色改变早于对照 (7 d 左右), 软化提前, 成熟果皮呈现深橙色, 果实体积变小, 种子数量及活力与对照相比没有变化。通过高效液相色谱检测及相关基因表达分析发现, 抑制 *SlAP2a* 表达将显著降低番茄红素合成, 提高 β -胡萝卜素 (β -carotene) 及叶绿素的含量, 并促进了成熟相关基因 (*ACS2*、*ACS4*、*ACO1*、*E4*、*E8*、*RIN* 以及 *PG2A*) 的表达。

3.9 SIERF6

SIERF6 属于 ERF/EREBP 家族, 定位于细胞核, 能够与 GCC-box 结合, 在番茄果实成熟期高度表达 (Nakano et al., 2006)。Lee 等 (2012) 以潘那利番茄 *Solanum pennellii* 渐渗系为材料, 整合了成熟果实代谢组及转录组结果, 预测出 38 个转录因子与类胡萝卜素合成密切相关, 并构建了转录因子与类胡萝卜素合成相关性网络。其中, *SIERF6* 表达与反式-番茄红素 (*trans*-lycopene) 和 β -胡萝卜素含量呈负相关。利用 RNAi 技术抑制 *SIERF6* 表达, 果实中类胡萝卜素含量显著升高, *DXS*、*HSP21*、*ACS2*、*ACO1* 以及 *ACO3* 表达升高, 表明 SIERF6 能够通过直接或间接的方式, 反向调控类胡萝卜素的积累及乙烯的合成, 但确切的调控方式尚不明确。

4 转录因子之间的调控网络

在番茄果实发育成熟过程中存在着一系列精密的转录调控, 许多具有重要生物学功能的基因通常被多个转录因子调节或逐级调节, 同时转录因子在转录水平上还存在着自我调节或相互调节 (图 3)。

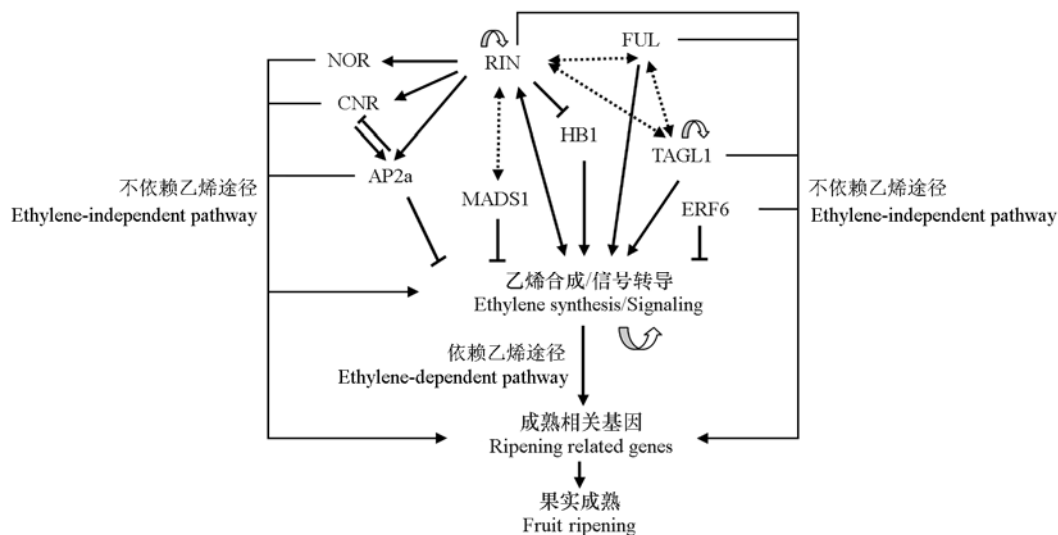


图 3 番茄成熟相关转录因子之间的调控网络

箭头代表正向调节, 钝箭头代表负向调节, 虚线双向箭头代表蛋白的相互作用, 弧形箭头代表自我调节。

Fig. 3 A schematic representation of the proposed regulation network of ripening-related transcription factors in tomato fruit

Arrows indicate positive regulation, blunt arrows indicate negative regulation, double arrows with broken line indicate interaction between proteins, and arc arrows indicate self-regulation.

Rohrmann 等 (2012) 利用 qRT-PCR 对果实中 134 个转录因子进行了表达相关性分析 (Tomato-*Arabidopsis* cross species coexpression analysis), 通过 Pearson's correlation 分析发现其中 91 个转录因子之间存在着复杂的网络关系。Martel 等 (2011) 发现 LeMADS-RIN 与靶标位点的结合需要 LeSPL-CNR 或其调节基因产物的存在; Karlova 等 (2011) 研究表明, *SIAP2a* 位于 *LeNAC-NOR*、*LeMADS-RIN* 及 *LeSPL-CNR* 的下游, LeSPL-CNR 能够直接与 *SIAP2a* 的启动子结合, 同时 *SIAP2a* 能够反向调控 *LeSPL-CNR* 的表达; MADS 转录因子间的互作对于行使其功能具有重要的作用, Leserberg 等 (2008) 和 Dong 等 (2013) 分别利用酵母双杂交技术检测发现 SIFUL2 与 LeMADS-RIN 存在着相互作用, SIMADS1 能够与 LeMADS-RIN 互作; Bemmer 等 (2012) 及 Shima 等 (2013) 分别利用双分子荧光试验及酵母双杂交筛库的方法, 验证了 SIFUL1 和 SIFUL2 二者均能与 LeMADS-RIN 互作, 但它们之间不存在相互作用; Fujisawa 等 (2014) 利用凝胶阻滞试验发现 SIFUL2、LeMADS-RIN、SITAGL1 能够形成四聚体复合物, 同时 SIFUL1 和 SIFUL2 还分别能够与 SITAGL1 形成复合物, 其中 SIFUL2-TAGL2 为主要形式。这些直接的证据为揭示番茄果实成熟相关转录因子之间的网络互作机制, 在转录转译、蛋白结构与功能相关性水平上阐明与成熟相关的酶、受体蛋白等下游结构基因的调控提供了契机。

5 结束语

番茄果实成熟涉及表型变化、生理生化改变等复杂的遗传过程, 通过该过程中乙烯合成及其介导的信号传导途径的分子生物学分析, 已初步了解该过程的遗传基础 (图 1)。已知的成熟突变体如 *rin*、*nor* 和 *cnr*, 其果实大小及种子发育正常, 但均不能成熟, 无明显的呼吸跃变, 外源乙烯亦不能使其恢复野生型表型, 意味着突变体果实的成熟调控体系存在着缺陷, 而这 3 个对应突变基因的编码蛋白均为转录因子, 表明转录因子代表着一类重要的成熟调节因子, 能够与植物激素分别或协作发挥功能。转录因子的调控作用非常保守, 例如 *RIN*-like MADS-box 基因是已知的花发育及果实成熟调控因子, 在进化水平上甚至早于单、双子叶植物的分化 (Klee & Giovannoni, 2011)。通过转录谱分析发现, 大量的转录因子在果实发育成熟过程中差异表达 (Osorio et al., 2011; Rohrmann et al., 2012), 通过正向或反向调控的方式发挥作用 (图 2, 表 1), 功能涉及植物激素合成、组织细胞膨胀、细胞壁物质代谢、果实成熟调节及色素积累等多个方面。但现有的成果还不足以真正阐明转录因子网络调控机制及转录因子间的互作模式 (图 3), 如 *LeMADS-RIN*、*LeNAC-NOR* 以及 *SITAGL1* 均在乙烯调控通路的上游发挥作用, 外源表达 *SITAGL1* 能够回复 *rin* 及 *nor* 突变体的表型 (Giménez et al., 2010), 但在 *rin* 和 *nor* 突变体果实中内源 *SITAGL1* 却能够正常表达 (Vrebalov et al., 2009), 这一矛盾的现象暂时还无法解释。因此, 转录因子参与的调控网络中尚有许多未知因素有待进一步的发掘。未来的研究应着眼于: (1) 继续发掘鉴定番茄成熟相关转录因子, 确定其下游靶标及作用机制, 进而发掘出完整的转录调控网络, 并在其他农作物果实上进行验证比较; (2) 探索转录调控对番茄果实代谢过程及品质的影响, 利用分子遗传育种途径定向培育高品质番茄及其他果实类农作物新品种; (3) 寻找其他表观遗传修饰调控番茄果实成熟的证据; (4) 探索果实成熟与衰老的关系。

References

- Adato A, Mandel T, Mintz-Oron S, Venger I, Levy D, Yativ M, Dominguez E, Wang Z, DeVos R C H, Jetter R, Schreiber L, Heredia A, Rogachev I, Aharoni A. 2009. Fruit-surface flavonoid accumulation in tomato is controlled by a SIMYB12-regulated transcriptional network. *PLoS Genetics*, 5: e1000777.
- Ballester A, Molthoff J, Vos R, Hekkert B L, Orzaez D, Fernández-Moreno J P, Tripodi P, Grandillo S, Martin C, Heldens J, Ykema M,

- Granell A, Bovy A. 2010. Biochemical and molecular analysis of pink tomatoes: Deregulated expression of the gene encoding transcription factor SIMYB12 leads to pink tomato fruit color. *Plant Physiology*, 152: 71 – 84.
- Bapat V A, Trivedi P K, Ghosh A, Sane V A, Ganapathi T R, Nath P. 2010. Ripening of fleshy fruit: Molecular insight and the role of ethylene. *Biotechnology Advances*, 28: 94 – 107.
- Bemer M, Karlova R, Ballester A R, Tikunov Y M, Bovy A G, Wolters-Arts M, Rossetto P B, Angenent G C, Maagd R A. 2012. The tomato FRUITFULL homologs TDR4/FUL1 and MBP7/FUL2 regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening. *The Plant Cell*, 24: 4437 – 4451.
- Brukhin V, Hernould, Gonzalez N, Chevalier C, Mouras A. 2003. Flower development schedule in tomato *Lycopersicon esculentum* cv. Sweet Cherry. *Sex Plant Reprod*, 15: 311 – 320.
- Busi M V, Bustamante C, D'Angelo C, Hidalgo-Cuevas M, Boggio S B, Valle E M, Zabaleta E. 2003. MADS-box genes expressed during tomato seed and fruit development. *Plant Molecular Biology*, 52: 801 – 815.
- Cara B, Giovannoni J J. 2008. Molecular biology of ethylene during tomato fruit development and maturation. *Plant Science*, 175: 106 – 113.
- Chung M Y, Vrebalov J, Alba R, Lee J M, McQuinn R, Chung J D, Klein P, Giovannoni J. 2010. A tomato (*Solanum lycopersicum*) *APETALA2/ERF* gene, *SlAP2a*, is a negative regulator of fruit ripening. *The Plant Journal*, 64: 936 – 947.
- Dong T, Hu Z, Deng L, Wang Y, Zhu M, Zhang J, Chen G. 2013. A tomato MADS-Box transcription factor, SIMADS1, acts as a negative regulator of fruit ripening. *Plant Physiology*, 163: 1026 – 1036.
- Eriksson E M, Bovy A, Manning K, Harrison L, Andrews J, Silva J D, Tucker G A, Seymour G B. 2004. Effect of the colorless non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening. *Plant Physiology*, 136: 4184 – 4197.
- Fujisawa M, Nakano T, Ito Y. 2011. Identification of potential target genes for the tomato fruit-ripening regulator RIN by chromatin immunoprecipitation. *BMC Plant Biology*, 11: 26.
- Fujisawa M, Nakano T, Shima Y, Ito Y. 2013. A larger-scale identification of direct targets of the tomato MADS Box transcription factor ripening inhibitor reveals the regulation of fruit ripening. *The Plant Cell*, 25: 371 – 386.
- Fujisawa M, Shima Y, Higuchi N, Nakano T, Koyama Y, Kasumi T, Ito Y. 2012. Direct targets of the tomato-ripening regulator RIN identified by transcriptome and chromatin immunoprecipitation analyses. *Planta*, 235: 1107 – 1122.
- Fujisawa M, Shima Y, Nakagawa H, Kitagawa M, Kimbara J, Nakano T, Kasumi T, Ito Y. 2014. Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato FRUITFULL homologs and associated MADS box proteins. *The Plant Cell*, 26: 89 – 101.
- Gaffe J, Lemerrier C, Alcaraz J P, Kuntz M. 2011. Identification of three tomato flower and fruit MADS-box proteins with a putative histone deacetylase binding domain. *Gene*, 471: 19 – 26.
- Gapper N E, McQuinn R P, Giovannoni J J. 2013. Molecular and genetic regulation of fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 82: 575 – 591.
- Giménez E, Pineda B, Cape J, Antón M T, Atarés A, Pérez-Martín F, García-Sogo B, Angosto T, Moreno V, Lozano R. 2010. Functional analysis of the arlequin mutant corroborates the essential role of the *ARLEQUIN/TAGL1* gene during reproductive development of tomato. *PLoS One*, 5: 12 e14427.
- Giovannoni J J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *The Plant Cell*, 16: 170 – 180.
- Hileman L C, Sundstrom J F, Litt A, Chen M, Shumba T, Irish V F. 2006. Molecular and phylogenetic analyses of the MADS-box gene family in tomato. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 2245 – 2258.
- Itkin M, Seybold H, Breitel D, Rogachev I, Meir S, Aharoni A. 2009. TOMATO AGAMOUS-LIKE 1 is a component of the fruit ripening regulatory network. *The Plant Journal*, 60: 1081 – 1095.
- Ito Y, Kitagawa M, Ihashi N, Yabe K, Kimbara J, Yasuda J, Ito H, Inakuma T, Hiroi S, Kasumi T. 2008. DNA-binding specificity, transcriptional activation potential, and the *rin* mutation effect for the tomato fruit-ripening regulator RIN. *The Plant Journal*, 55: 212 – 223.
- Karlova R, Rosin F M, Busscher-Lange J, Parapunova V, Do P T, Fernie A R, Fraser P D, Baxter C, Angenent G C, De Maagd R. 2011. Transcriptome and metabolite profiling show that *APETALA2a* is a major regulator of tomato fruit ripening. *The Plant Cell*, 23: 923 – 941.
- Kim S, Soltis P S, Wall K, Soltis D E. 2006. Phylogeny and domain evolution in the *APETALA2-like* gene family. *Molecular Biology and Evolution*, 23: 107 – 120.
- Klee H J, Giovannoni J J. 2011. Genetics and control of tomato fruit ripening and quality attributes. *Annual Review of Genetics*, 45: 41 – 59.
- Kumar R, Sharma M K, Kapoor S, Tyagi A K, Sharma A K. 2012. Transcriptome analysis of *rin* mutant fruit and in silico analysis of promoters of differentially regulated genes provides insight into LeMADS-RIN regulated ethylene-dependent as well as ethylene-independent aspects of ripening in tomato. *Molecular Genetics and Genomics*, 287: 189 – 203.
- Leseberg C H, Eissler C L, Wang X, Johns M A, Duvall M R, Mao L. 2008. Interaction study of MADS-domain proteins in tomato. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2253 – 2265.
- Lee J M, Joung J G, McQuinn R, Chung M Y, Fei Z, Tieman D, Klee H, Giovannoni J. 2012. Combined transcriptome, genetic diversity and

- metabolite profiling in tomato fruit reveals that the ethylene response factor SIERF6 plays an important role in ripening and carotenoid accumulation. *The Plant Journal*, 70: 191 – 204.
- Lin Z, Hong Y, Yin M, Li C, Zhang K, Grierson D. 2008. A tomato HD-Zip homeobox protein, LeHB-1, plays an important role in floral organogenesis and ripening. *The Plant Journal*, 55: 301 – 310.
- Luo J, Butelli E, Hill L, Parr A, Niggeweg R, Bailey P, Weisshaar B, Martin C. 2008. AtMYB12 regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: Expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol. *The Plant Journal*, 56: 316 – 326.
- Manning K, Tör M, Poole M, Hong Y, Thompson A J, King G J, Giovannoni J J, Seymour G B. 2006. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nature Genetics*, 38: 948 – 952.
- Martel C, Vrebalov J, Giovannoni J J. 2011. The tomato (*Solanum lycopersicum*) MADS-box transcription factor RIN interacts with promoters involved in numerous ripening processes in a CNR dependent manner. *Plant Physiology*, 157: 1568 – 1579.
- Mori K, Lemaire-Chamley M, Asamizu E, Mizoguchi T, Ezura H, Rothan C. 2013. Comparative analysis of common genes involved in early fruit development in tomato and grape. *Plant Biotechnology*, 30: 295 – 300.
- Nakano T, Suzuki K, Fujimura T, Shinshi H. 2006. Genome-wide analysis of the ERF gene family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Physiology*, 140: 411 – 432.
- Orfila C, Seymour G B, Willats W G T, Huxham I M, Jarvis M C, Dover C J, Thompson A J, Knox J P. 2001. Altered middle lamella homogalacturonan and disrupted deposition of (1-5)- α -L-Arabinan in the pericarp of *Cnr*, a ripening mutant of tomato. *Plant Physiology*, 126: 210 – 221.
- Osorio S, Alba R, Damasceno C M B, Lopez-Casado G, Lohse M, Zanol M I, Tohge T, Usadel B, Rose J K C, Fei Z, Giovannoni J J, Fernie A R. 2011. Systems biology of tomato fruit development: Combined transcript, protein, and metabolite analysis of tomato transcription factor (*nor*, *rin*) and ethylene receptor (*Nr*) mutants reveals novel regulatory interactions. *Plant Physiology*, 157: 405 – 425.
- Pan I L, McQuinn R, Giovannoni J J, Irish V F. 2010. Functional diversification of *AGAMOUS* lineage genes in regulating tomato flower and fruit development. *Journal of Experimental Botany*, 61: 1795 – 1806.
- Qin G, Wang Y, Cao B, Wang W, Tian S. 2012. Unraveling the regulatory network of the MADS box transcription factor RIN in fruit ripening. *The Plant Journal*, 70: 243 – 255.
- Ramsay N A, Glover B J. 2005. MYB-bHLH-WD40 protein complex and the evolution of cellular diversity. *Trends in Plant Science*, 10: 63 – 70.
- Rohrmann J, McQuinn R, Giovannoni J J, Fernie A R, Tohge T. 2012. Tissue specificity and differential expression of transcription factors in tomato provide hints of unique regulatory networks during fruit ripening. *Plant Signaling and Behavior*, 7: 1639 – 1647.
- Rohrmann J, Tohge T, Alba R, Osorio S, Caldana C, McQuinn R, Arvidsson S, Merwe M J V, Riaño-Pachón D M, Mueller-Roeber B, Fei Z, Nesi A N, Giovannoni J J, Fernie A R. 2011. Combined transcription factor profiling, microarray analysis and metabolite profiling reveals the transcriptional control of metabolic shifts occurring during tomato fruit development. *The Plant Journal*, 68: 999 – 1013.
- Salinas M, Xing S, Höhmann S, Berndtgen R, Huijser P. 2012. Genomic organization, phylogenetic comparison and differential expression of the SBP-box family of transcription factors in tomato. *Planta*, 235: 1171 – 1184.
- Shima Y, Kitagawa M, Fujisawa M, Nakano T, Kato H, Kimbara J, Kasumi T, Ito Y. 2013. Tomato FRUITFULL homologues act in fruit ripening via forming MADS-box transcription factor complexes with RIN. *Plant Molecular Biology*, 82: 427 – 438.
- Shima Y, Fujisawa M, Kitagawa M, Nakano T, Kimbara J, Nakamura N, Shiina T, Sugiyama J, Nakamura T, Kasumi T, Ito Y. 2014. Tomato FRUITFULL homologs regulate fruit ripening via ethylene biosynthesis. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, DOI: 10.1080/09168451.2014.878221.
- Vrebalov J, Pan I L, Arroyo A J M, Quinn R M, Chung M Y, Poole M, Rose J, Seymour G, Grandillo S, Giovannoni J, Irish V F. 2009. Fleshy fruit expansion and ripening are regulated by the tomato *SHATTERPROOF* gene *TAGL1*. *The Plant Cell*, 21: 3041 – 3062.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. 2002. A MADS-Box gene necessary for fruit ripening at the tomato Ripening-inhibitor (*Rin*) locus. *Science*, 296: 343 – 346.
- Wang S, Lu G, Hou Z, Luo Z, Wang T, Li H, Zhang J, Ye Z. 2014. Members of the tomato FRUITFULL MADS-box family regulate style abscission and fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 65: 3005 – 3014.
- Yang T, Peng H, Whitaker B D, Conway W S. 2012. Characterization of a calcium/calmodulin-regulated *SR/CAMTA* gene family during tomato fruit development and ripening. *BMC Plant Biology*, 12: 19.
- Yokotani N, Nakano R, Imanishi S, Nagata M, Inaba A, Kubo Y. 2009. Ripening-associated ethylene biosynthesis in tomato fruit is autocatalytically and developmentally regulated. *Journal of Experimental Botany*, 60: 433 – 442.
- Zhang H, Jin J, Tang L, Zhao Y, Gu X, Gao G, Luo J. 2010. PlantTFDB 2.0: Update and improvement of the comprehensive plant transcription factor database. *Nucleic Acids Research*, 39: D1114 – D1117.