

‘南通小方柿’乙醇脱氢酶基因 *DkADH1* 的克隆及表达分析

陈小云, 张仕杰, 屠煦童, 李宁宁, 章 镇, 渠慎春*

(南京农业大学园艺学院, 南京 210095)

摘 要: 以‘南通小方柿’果实为材料, 采用同源克隆的方法, 获得了柿乙醇脱氢酶基因 *DkADH1*, 其全长为 1 377 bp, 开放阅读框为 1 137 个核苷酸, 编码 379 个氨基酸, 具有 ADH 基因典型的结构域和功能域, 与番茄、苹果等双子叶植物亲缘性较近。以‘南通小方柿’不同组织为材料, 采用 qRT-PCR 方法对 *DkADH1* 及单宁生物合成途径中的相关基因的表达进行分析, 同时测定了不同时期果实的单宁含量, 结果表明在果实发育过程中, 可溶性单宁含量逐渐降低, 而不溶性单宁含量不断升高; *DkADH1* 基因在茎、叶、花、果实等器官中均有表达, 在果皮中表达量最高。随着果实的成熟, *DkADH1* 表达量总体呈上升趋势。柿果实中单宁合成途径中的相关基因 *DkF3'5'H* 和 *DkMYB4* 随着乙醇处理果实时间的延长表达量呈下降趋势, 推测‘南通小方柿’*DkADH1* 能够抑制单宁合成相关基因的表达, 从而降低果实可溶性单宁含量。

关键词: 柿; *DkADH1*; 克隆; 基因表达

中图分类号: S 665.2

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2014) 10-2001-11

Isolation and Expression Analysis of *DkADH1* Gene from ‘Nantong Xiaofangshi’ Persimmon

CHEN Xiao-yun, ZHANG Shi-jie, TU Xu-tong, LI Ning-ning, ZHANG Zhen, and QU Shen-chun*

(College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: An alcohol dehydrogenase 1 (*ADH1*) gene named *DkADH1* was cloned from ‘Nantong Xiaofangshi’ persimmon fruit using homology gene clone method. The results showed that the full-length of *DkADH1* gene was 1 377 bp and the open reading frame (ORF) of *DkADH1* was 1 137 nucleotides which encoded 379 amino acids. It has structure domain and function domain of the typical *ADH* gene. The phylogenetic tree analysis of the evolutionary relationship of ADH between different species indicated that *DkADH1* was gathered dicotyledonous plants, which closed to *Solanum lycopersicum* and *Malus × domestica*. qRT-PCR was used to analyze the expression patterns of *DkADH1* gene and tannin biosynthesis related genes in fruits and various tissues at different developmental stages. The tannin content at different period was also measured which suggested that soluble tannin was gradually decline, but insoluble tannin was gradually rising in the fruit development. *DkADH1* expressed in different tissue including stem,

收稿日期: 2014-06-16; 修回日期: 2014-08-18

基金项目: 国家公益性行业(农业)科研专项经费项目(201203047)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: qsenj@njau.edu.cn)

leaf, fruit and other organs. It had the highest expression level in peel. The expression was upregulated during the ripening stage of the fruit. Tannin biosynthesis pathway related genes *DkF3'5'H* and *DkMYB4* expression were downregulated in fruits during the ethanol treated, we speculated that *DkADH1* could inhibit the expression of tannin biosynthesis pathway genes to reduce the fruit soluble tannin content.

Key words: persimmon; *DkADH1*; clone; gene expression

柿 (*Diospyros kaki*) 原产于中国, 但传统产区大多数为涩柿, 甜柿分布较少。根据果实能否自然脱涩与种子有无及其数量、褐斑形成的关系, 柿品种被分为完全甜柿 (PCNA)、不完全甜柿 (PVNA)、不完全涩柿 (PVA) 和完全涩柿 (PCA) 等 4 类 (Kajiura, 1964)。涩柿具有丰产、抗性强、品质优、耐贮运、果实个大等特点, 是世界栽培面积最大的柿类型。‘南通小方柿’ (当地俗称小方柿) 为江苏省南通市的地方品种, 具有树体矮小、早果性好、丰产稳产、无核、质优等特点, 是宝贵的矮生型、易脱涩的种质资源, 部分果实树上即可以自然脱涩, 一般成熟果实采后自然放置 7 d 左右就可以脱涩 (蒋德新 等, 1992)。

可溶性单宁是柿果实呈现涩感的主要原因, 涩柿果实中可溶性单宁含量高, 必须通过脱涩处理后才可食用, 目前采用较多的是二氧化碳和乙醇脱涩方法 (Yonemori, 1997)。Matsuo 和 Ito (1982) 的研究表明, 乙醛可直接与涩柿中的可溶性单宁发生缩合反应, 使柿果脱涩 (Taira et al., 1992), 脱涩的难易程度与乙醛形成的能力直接相关。乙醇脱氢酶 (Alcohol dehydrogenase, ADH) 是催化乙醇形成乙醛的关键酶之一 (Yamada et al., 2002), 可以催化可溶性单宁与乙醛聚合, 进而达到柿果脱涩的效果 (Pesis & Ben-Aire, 1984; Matsuo et al., 1991; Taira et al., 1997)。据报道, ADH 在植物中存在两个同工酶, 即 ADH1 和 ADH2。在玉米、马铃薯、水稻和葡萄等植物中都已经成功地克隆出了编码 ADH 两个同工酶的基因, 但是在百脉根和拟南芥中只克隆出 ADH1 基因。ADH 是无氧条件下乙醇代谢的关键酶之一, 目前研究较多集中在有关 ADH1 在厌氧条件下的调控机理, 对 ADH1 启动子序列及有关转录调控因子与厌氧响应元件 (ARE) 结合的机制也有较详细的阐明。ARE 含有低氧诱导序列, 如果将其连接到另一基因上, 该基因同样会受低氧胁迫的诱导 (Dennis et al., 2000)。Dolferus 等 (1994) 研究证明, 拟南芥 ADH1 启动子序列上的 GT 和 GC 结构是其厌氧诱导表达的关键。一些其它厌氧应答基因也存在相似的结构。从拟南芥中得到的启动子片段, 可以在干旱、冷害和低氧胁迫下调节 ADH1 基因的表达。

单宁生物合成是由 4 个代谢途径构成的一个复合途径, 分别为公共苯丙烷途径、核心类黄酮—花青素途径、PA 特异途径、莽草酸途径 (Dixon, 2005; Lepiniec et al., 2006; Akagi et al., 2009)。单宁生物合成由结构基因和调节基因共同作用, *PAL*、*C4H*、*4CL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*DFR*、*F3'H*、*F3'5'H*、*LAR* 和 *ANR* 在不完全甜柿整个果实发育时期都能检测到表达活性, 表达水平随果实发育逐渐降低 (Ikegami et al., 2005)。Akagi 等 (2009) 对柿单宁合成途径的类黄酮途径和莽草酸途径的研究获得了较大进展, 通过对 *F3'5'H* 相对表达水平分析确定 *F3'5'H* 在单宁合成上起着重要的作用。Akagi 等 (2009) 分离到柿 *MYB* 转录因子基因家族 5 个成员, 并发现日本甜柿中 *DkMyb4* 的下调表达与类黄酮代谢途径结构基因 *DkF3'5'H* 和 *DkANR* 的表达一致, 在猕猴桃和柿愈伤组织中异位表达 *DkMyb4* 引起单宁累积。

本研究中以‘南通小方柿’果实为材料, 克隆了果实脱涩相关基因 *ADH1*, 通过生物信息学、组织表达分析和乙醇诱导脱涩研究, 初步分析了该基因的表达特性和功能, 旨在探索‘南通小方柿’容易自然脱涩的分子机理, 为进一步研究柿脱涩机理提供参考依据, 同时也为该基因的应用提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

‘南通小方柿’ 采自江苏省南通市海安县。

果实分别于 2013 年 6 月 12 日、7 月 12 日、8 月 12 日、9 月 12 日、10 月 12 日采收, 去皮并将果肉切碎, 立即放入液氮后速冻并于 -70°C 保存备用。

分别采集不同发育时期的茎、叶片、花、叶柄、枝皮、果皮、果肉等组织材料, 采后立即放入液氮速冻并于 -70°C 保存备用。

9 月 12 日采收的果实用 30%乙醇分别处理 1、2、3 和 4 d, 处理后立即用液氮速冻并于 -70°C 保存备用。

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α 和 pYH4215 载体均由南京农业大学果树生物技术实验室保存。反转录酶购自 ToYoBo 公司, rTaq 酶、pMD19-T 载体、dNTP 和 DNA marker 购自 TaKaRa 公司, 凝胶回收试剂盒购于 Genscript 公司。

1.2 *DkADH1* 的克隆

果实的 RNA 提取采用 CTAB 法 (蔡斌华 等, 2008), 并按照 ToYoBo 公司反转录酶使用方法合成 cDNA。

根据 GenBank 中柿 *ADH1* (登录号 JF357957) 基因序列设计上游引物 *DkADH1* F: ACCCCACGC AAACCAACTGCG; 下游引物 *DkADH1* R: CAGTTTGCAGACGATGCAACTCCA。以 cDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 其反应体系为 25 μL : 模板 cDNA 1 μL 、上下游引物各 1 μL 、10 \times PCR buffer 2.5 μL 、dNTP 2.0 μL 、MgCl₂ 1.5 μL 、Taq 酶 0.15 μL 、ddH₂O 为 15.85 μL 。扩增程序为: 94°C 预变性 4 min; 94°C 30 s、 61°C 30 s、 72°C 1 min, 35 个循环; 72°C 延伸 10 min。

回收目的片段后与 pMD19-T 载体连接, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 经蓝白斑筛选, 菌液 PCR 鉴定阳性克隆后进行测序。以 R11466 为接头引物反转录得到 cDNA, 根据所测定的基因片段, 分别设计两条基因特异性引物, 3-RW: 5'-ATGCACCGGAAACGTCGAT-3' 和 3-RN: 5'-GGCCGTTTT CAAGACACACC-3', 分别与 3'端接头引物通过 RACE 方法扩增目的基因的未知 3'端序列, 将第 2 轮扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳, 将得到的片段回收、连接、转化, 进行测序。

1.3 *ADH1* 生物信息学分析

将测序得到的核苷酸和推导的氨基酸序列分别在 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>) 上进行同源性分析。

用 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/orfig.cgi> 查找开放阅读框。

采用软件 ClustalX 1.83 对基因序列进行多重比对后, 使用 MEGA5.05 对分子系统进化树进行构建, 完成进化树绘制。

蛋白质的结构域分析利用 SMART 在线工具完成。

1.4 柿单宁含量测定

根据 Oshida 等 (1996) 报道的方法测定柿果实可溶性单宁和不溶性单宁的含量。

1.5 荧光定量 PCR 表达分析

采用荧光定量 PCR 对‘南通小方柿’*DkADH1* 基因和单宁合成相关基因进行表达模式的分析, 每个基因每个处理重复 3 次。反应体系为 20 μ L, 扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 180 s; 然后 95 $^{\circ}$ C 20 s, 60 $^{\circ}$ C 15 s, 72 $^{\circ}$ C 43 s, 40 个循环。

数据分析采用 7300 system 软件和 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法。

2 结果与分析

2.1 *DkADH1* 的克隆及序列分析

以‘南通小方柿’果肉 cDNA 为材料, 克隆出了一条长为 1 275 bp 的目的片段序列 (图 1), 经过 3'RACE 两轮扩增, 得到 163 bp 片段, 利用 DNAMAN 6.0 软件将测序结果与已知序列进行拼接, 获得了全长序列 (1 377 bp), 经序列分析, 其编码区长度为 1 137 bp, 编码 379 个氨基酸, 具有完整的 ORF 阅读框, 将其命名为 *DkADH1*。

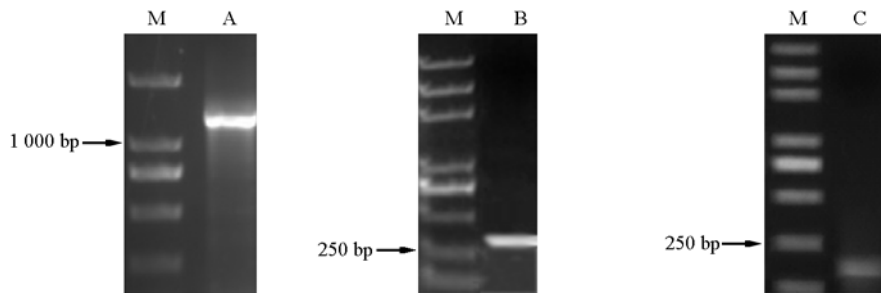


图 1 ‘南通小方柿’ *DkADH1* 的 PCR 扩增

M: DL2000 marker; A: *DkADH1* cDNA 保守片段的扩增; B: *DkADH1* cDNA 的 3'端第 1 轮扩增;
C: *DkADH1* cDNA 的 3'端第 2 轮扩增。

Fig. 1 Amplified of *DkADH1* by PCR from ‘Nantong Xiaofangshi’ persimmon

M: DL2000 marker; A: The conserved sequences of *DkADH1* amplified by PCR;
B: 3'RACE primary amplification of *DkADH1*; C: 3'RACE secondary amplification of *DkADH1*.

2.2 *DkADH1* 编码氨基酸的同源性比对分析

利用 ClustalX 1.83 对获得的‘南通小方柿’*DkADH1* 与其它物种上克隆的 ADH 基因编码的氨基酸序列进行比对, *DkADH1* 与番茄 (*Solanum lycopersicum*)、马铃薯 (*Solanum tuberosum*)、新疆梨 (*Pyrus sinkiangensis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*) 和玉米 (*Zea mays*) 等的同源性分别达到 88%、87%、86%、86%和 84% (图 2), 这表明所克隆的 *DkADH1* 与其他物种中的 ADH 基因有很高的同源性。

从 MEGA5.05 构建的系统进化树 (图 3) 可以看到: 南通小方柿、苹果、新疆梨、番茄等双子叶植物聚为一类, 而水稻和玉米等单子叶植物的 ADH 聚为一类, 从进化的角度上讲, 单、双子叶植物各分成一支, 这也表明在 ADH 基因的亲缘关系上, 可以按照单子叶植物和双子叶植物的进化关系进行划分。

SIADH2 AAA34133	1	MSITTVGQVI RCKAAVAWEAGKPL VMEEVDVAPPQKMEVRLKI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
StADH2 AAA33807	1	MSITTVGQVI RCKAAVAWEAGKPL VMEEVDVAPPQKMEVRLKI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
SmADH ACZ48689	1	MSATAGQVI KCKAAVAWEAGKPL VI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
DkADH1	1	MAATAGQVI VCKAAVAWEAGKPL VI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
PsADH AEL75217	1	MSINTAGQVI RCKAAVAWEAGKPL VI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
DIADH ABF61806	1	MSSTTVGQVI RCKAAVAWEAGKPL VI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
VvADFH1 ADF80914	1	MSGTAGQVI CCKAAVAWEAGKPL VI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSLCHTDVYF WEAKGQ
ZmADH2 ACG28464	1	- MATAGKVI KCKAAVAWEAGKPL SI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSALCHTDVYF WEAKGQ
OsADH BAE00045	1	- MATAGKVI KCKAAVAWEAGKPL SI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSALCHTDVYF WEAKGQ
ZmADH1 AAC34295	1	- MATAGKVI KCKAAVAWEAGKPL SI EEVEVAPPQKMEVRL KI LYTSALCHTDVYF WEAKGQ
SIADH2 AAA34133	61	NPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
StADH2 AAA33807	61	NPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
SmADH ACZ48689	61	DSVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
DkADH1	61	NPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
PsADH AEL75217	61	NPLFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
DIADH ABF61806	61	TPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
VvADFH1 ADF80914	61	TPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
ZmADH2 ACG28464	60	TPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
OsADH BAE00045	60	TPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
ZmADH1 AAC34295	60	TPVFPRI LGHEAAGI VESVGEVGTDLAPGDHVL P VFTGECKE CAHCKSEESNMCS LLRI N
SIADH2 AAA34133	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
StADH2 AAA33807	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
SmADH ACZ48689	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
DkADH1	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
PsADH AEL75217	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
DIADH ABF61806	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
VvADFH1 ADF80914	121	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
ZmADH2 ACG28464	120	VDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
OsADH BAE00045	120	VDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
ZmADH1 AAC34295	120	TDRGVMLNDGKSRFSI NGKPI YHFVGTSTFSEYT VHVGCVAKI NPLAPLDKVCVLSGCI
SIADH2 AAA34133	181	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARI AGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
StADH2 AAA33807	181	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARI AGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
SmADH ACZ48689	181	SAGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARI AGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
DkADH1	181	CTGFATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARVSGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
PsADH AEL75217	181	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARVSGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
DIADH ABF61806	181	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARI AGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
VvADFH1 ADF80914	181	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARI AGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
ZmADH2 ACG28464	180	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARVSGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
OsADH BAE00045	180	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARVSGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
ZmADH1 AAC34295	180	STGLGATLNVAKPKKGSTVAI FGLGAVGLAAAEGARI AGASRI I GVDLNPARKFEQAKKF
SIADH2 AAA34133	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
StADH2 AAA33807	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
SmADH ACZ48689	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
DkADH1	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
PsADH AEL75217	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
DIADH ABF61806	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
VvADFH1 ADF80914	241	VTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
ZmADH2 ACG28464	240	CTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
OsADH BAE00045	240	CTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
ZmADH1 AAC34295	240	CTEFVNP KDYSKPQVEVI AEVTGGVDRS VECTGNI NAM SAFECVHDXGAVL VGVP
SIADH2 AAA34133	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
StADH2 AAA33807	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
SmADH ACZ48689	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
DkADH1	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
PsADH AEL75217	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
DIADH ABF61806	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
VvADFH1 ADF80914	301	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
ZmADH2 ACG28464	300	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
OsADH BAE00045	300	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N
ZmADH1 AAC34295	300	KDAVF KTHPMNVLNERTLKGTFFGNYKPRSDI PSVVEKYMKELELEKFI THLPFAEI N

图2 ‘南通小方柿’ *DkADH1* 编码区氨基酸序列与其他植物 ADH 编码氨基酸序列的比对

Sl: 番茄; St: 马铃薯; Sm: 丹参; Ps: 新疆梨; Dl: 龙眼;
Vv: 葡萄; Zm: 玉米; Os: 水稻。

Fig. 2 Alignment of the amino acid sequence of *DkADH1* and ADH amino acid sequences of other plants

Sl: *Solanum lycopersicum*; St: *Solanum tuberosum*; Sm: *Salvia miltiorrhiza*;
Ps: *Pyrus sinkiangensis*; Dl: *Dimocarpus longan*; Vv: *Vitis vinifera*;
Zm: *Zea mays*; Os: *Oryza sativa* Indica Group.

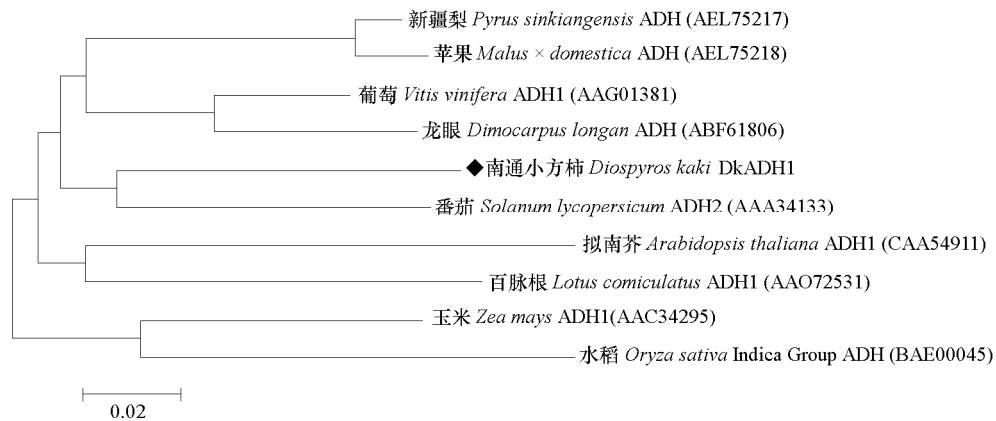


图 3 *DkADH1* 编码氨基酸序列与其它植物 ADH 编码氨基酸序列进化树分析

Fig. 3 Phylogenetic tree of amino acid sequences of *DkADH1* and ADH from other plants

2.3 *DkADH1* 二级结构的预测与分析

蛋白质二级结构预测不仅是联系其一级结构和三级空间的桥梁和纽带，而且也是从一级结构预测其三级空间结构的关键步骤（王志新，1988）。利用 SMART 软件分析 *DkADH1* 蛋白的结构域，结果显示 *DkADH1* 的一个结构域为 ADH_N，序列从位于 35 位氨基酸残基开始，到 164 位氨基酸残基为止，含有 GroES 结构域，它是酶促反应的结合位点；另一个结构域为 ADH_zinc_N，从 206 位氨基酸残基开始到 341 位氨基酸残基为止，含有 Rossmann 折叠 NAD(P)(+) 结合蛋白，它是与 Zn 结合的脱氢酶位点，这些结构域具有乙醇脱氢酶结构域的特征。

2.4 *DkADH1* 在不同组织中的表达

为了解 *DkADH1* 在‘南通小方柿’不同组织器官中的时空表达特性，本研究中以不同组织在不同发育阶段的 cDNA 为模板，利用荧光定量 qRT-PCR 技术对基因的表达情况进行分析研究，其中内参基因为柿 *Actin*（GenBank 登录号 AB219402），上游引物为：5'-GCCATCATTAATTGGAA TGGAAGC-3'；下游引物为：5'-GTGCCACAACCTTGATCTTCA-3'。从（图 4 可以看出，‘南通小方柿’*DkADH1* 在植株茎、叶、花、果皮、果肉均有表达，在叶片、果皮、果肉中的表达较多，尤其在果皮中的表达量最高。

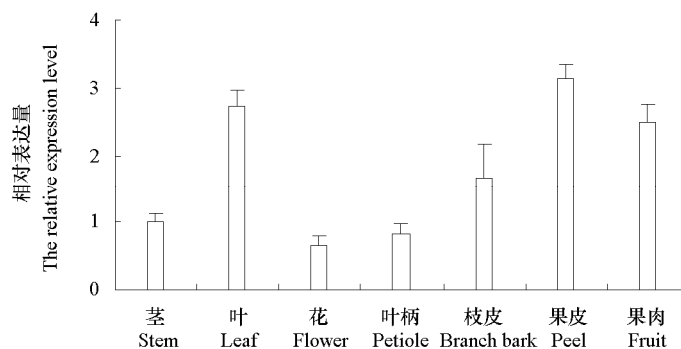


图 4 *DkADH1* 在不同组织中的表达

Fig. 4 *DkADH1* gene expression in different tissues

2.5 不同发育时期果实单宁含量和 *DkADH1* 表达量的变化

从图 5 可以看出,在不同时期,在果实发育初期(7月12日)可溶性单宁含量最高,而后随着果实的发育成熟开始下降,到10月12日果实成熟时减少到最低值,只有 $2.294 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在果实生长发育初期果实中不溶性单宁含量较低,为 $0.535 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,到果实成熟时达到最高,为 $1.826 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ 。总体上,在‘南通小方柿’果实发育过程中可溶性单宁向不溶性单宁转化。

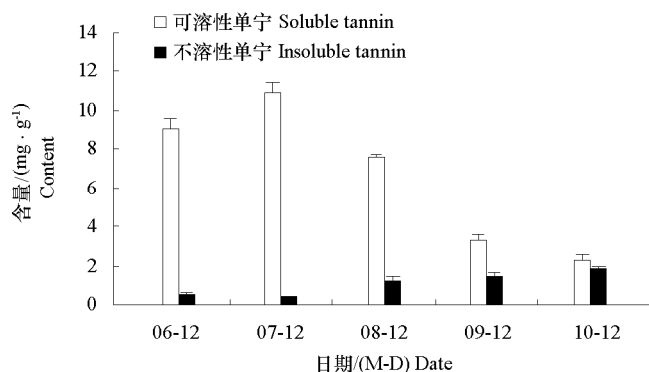


图 5 ‘南通小方柿’ 不同发育时期单宁含量的变化

Fig. 5 Changes of tannin content of different developmental stages in ‘Nantong Xiaofangshi’ persimmon

DkADH1 在不同生长发育时期果实的表达量也有所差异(图 6),随着果实的生长发育,其表达量呈逐渐增加的趋势。6月12日后该基因的表达量开始逐渐增加,到8月表达量略有下降,但是很快又急剧上升,在果实发育后期其表达成直线上升,在果实成熟期(10月12日)表达量最高,推测 *DkADH1* 在果实成熟脱涩阶段具有重要作用,该基因在果实中的表达一方面促进可溶性单宁转化成不溶性单宁,另一方面可能也在一定程度上抑制了单宁的合成。

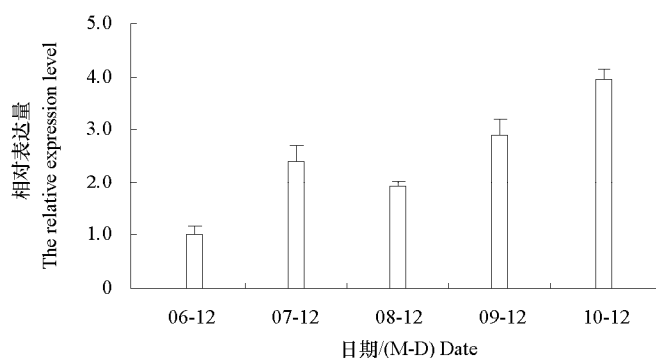


图 6 果实发育不同时期 *DkADH1* 的表达分析

Fig. 6 Expression analysis of *DkADH1* gene in different periods of fruit development

2.6 乙醇处理的果实中单宁含量和相关基因的表达

如图 7 所示,与对照相比,乙醇处理果实可溶性单宁含量下降较快,不溶性单宁含量上升较快,处理 3 d 时可溶性单宁含量为 $0.369 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$,下降到涩味阈值(低于 $1.0 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。在整个处理中,可溶性单宁含量降低与不溶性单宁含量增加变化趋势刚好相反,说明‘南通小方柿’果实在乙醇处理条件下可溶性单宁向不溶性单宁转化。

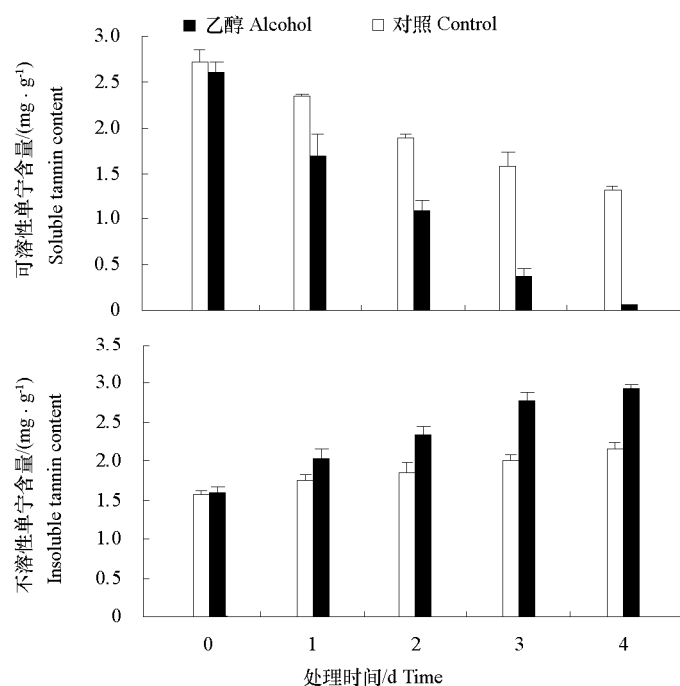
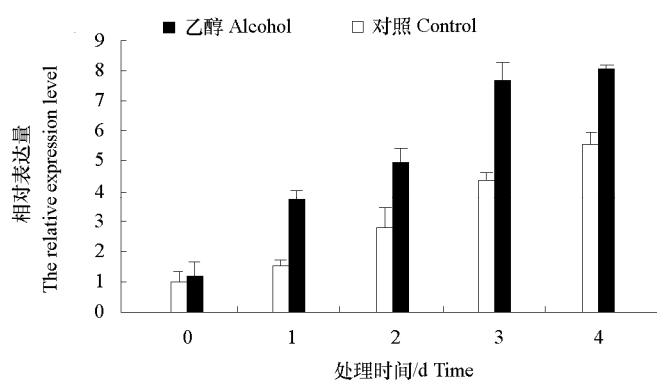


图 7 乙醇处理后果实单宁含量的变化

Fig. 7 Changes in tannin content after treatment with alcohol in fruits of 'Nantong Xiaofangshi' persimmon

如图 8 所示, 相对于对照, 乙醇处理后的 *DkADH1* 表达均有明显的增加, 随着处理时间的增加其表达量也相应升高, 虽然对照中的 *DkADH1* 表达量也升高了, 但是乙醇处理升高的速度较对照速度快, 乙醇处理 3 d 后其表达量迅速升高。

图 8 乙醇处理对 *DkADH1* 表达的影响Fig. 8 Effect of *DkADH1* gene expression with alcohol treatment

为进一步研究乙醇处理影响单宁合成的分子机理, 分析了参与单宁合成途径相关基因 *DkF3'5'* 和 *HDkMYB4* 的表达情况。与对照相比, 乙醇处理的果实中 *DkF3'5'H* 和 *DkMYB4* 的表达量降低较快, 表达趋势大致相同 (图 9), 推测乙醇处理是通过抑制单宁合成途径相关基因的表达, 从而抑制单宁合成的。

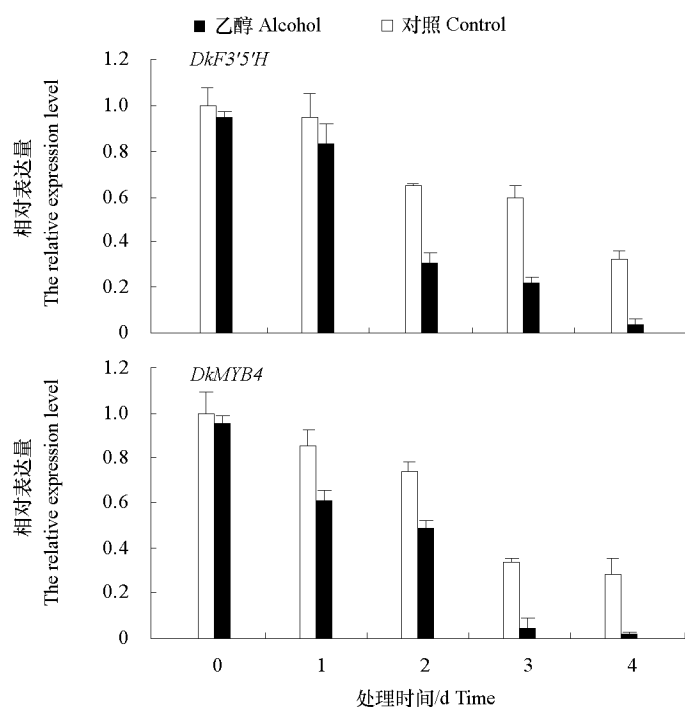


图9 乙醇处理对柿 *DkF3'5'H* 和 *DkMYB4* 表达的影响

Fig. 9 Effects of *DkF3'5'H* and *DkMYB4* expression with alcohol treatment

3 讨论

ADH 广泛分布于各种植物器官组织中, 并起着重要作用。它不仅与果实风味和芳香物质的合成以及种子的发育等相关 (Bellincontro et al., 2005), 而且在果实采后成熟过程中也有着重要作用。Shiesh 和 Lin (2000) 研究发现柿果在脱涩之后 ADH 的活性有所增加, 有研究认为在果实发育过程中 ADH 基因的转录主要在成熟的果实中进行 (Sarni-Manchado et al., 1997)。Torregrosa 等 (2008) 报道 *DkADH1* 在转基因葡萄中超表达, 能够降低果肉中多酚的含量和多酚聚合度, 推测可能是受 ADH 活性增加的影响。

本研究中从‘南通小方柿’果实中克隆了 *DkADH1* 基因全长序列, 并进行了生物信息学分析。在分析保守结构和二级结构方面发现‘南通小方柿’ *DkADH1* 与其他物种的 ADH 结构域是相当保守的。但是在 ADH 典型的结构中, *DkADH1* 的 ADH_N 结构域位于第 35 ~ 164 位氨基酸的位置上, 在第 206 ~ 341 位有一个 Zn 结合的脱氢酶位点; 而拟南芥 *ADH1* (登录号 NP_177837.1) ADH_N 结构域则在第 35 ~ 163 位的位置, ADH_zinc_N 结构域在第 215 ~ 336 位氨基酸的位置上。因此, ‘南通小方柿’ *DkADH1* 与其它物种在 ADH 结构域的氨基酸残基位置方面来说是具有一定的差异性。由此推测柿在漫长进化过程中演化出了一段不同于其他物种 ADH 的特异序列。

ADH 在柿果脱涩过程中具有重要作用。有研究认为不完全甜柿、不完全涩柿和完全涩柿类型果实脱涩与乙醛或乙醇有关, 且不完全涩柿和完全涩柿果实产生极少量乙醇脱氢酶, 因此需要采后人工处理来诱导其产生 (Sugiura, 1983)。植物细胞中均存在两套 ADH 基因, 一套为组成型 *ADH2*, 另一套为厌氧诱导表达型 *ADH1* (Xie & Wu, 1989)。王燕 (2010) 报道柿 *ADH1* 基因为厌氧诱导型表达。从本试验中‘南通小方柿’ *DkADH1* 在不同组织和不同发育时期果实中表达差异分析来看,

它能在茎、叶、花和果中均有表达,但表达量不同,这与 ADH 基因具有组织和发育特异性表达的报道 (Ingersoll et al., 1994; Tadege & Kuhlemeier, 1997) 相一致。

在果实发育时期,‘南通小方柿’ *DkADH1* 的表达模式不同于完全甜柿 ‘罗田甜柿’ (宿福园, 2012), 完全甜柿在 8 月 *DkADH1* 表达量最高, 随后表达量下降, 即使到果实发育后期, 即脱涩主要时期仍然下降。‘南通小方柿’ 的 *DkADH1* 表达量到 9 月后期呈直线上升趋势, 其可溶性单宁含量逐渐下降, 推测 ‘南通小方柿’ 易脱涩的特性也许与其果实发育后期 *DkADH1* 表达量升高有关。

用 CO₂ 或乙醇对不同柿品种果实进行脱涩处理, 脱涩效率与脱涩前果实可溶性单宁含量无关, 而与 ADH 活性相关 (Yamada et al., 2002)。用乙醇处理 ‘南通小方柿’ 果实, 发现可以促进可溶性单宁向不溶性单宁转化, 并且在此过程中, *DkADH1* 表达量也随着处理时间的延长有所增加。乙醇处理 ‘罗田甜柿’ 和 ‘小果甜柿’, *ADH1* 在种子部位能够高效表达 (王燕, 2010)。本研究中 ‘南通小方柿’ 经过乙醇处理 *DkADH1* 基因表达量也能升高, 虽然 ‘南通小方柿’ 果实内没有种子, 但是用乙醇处理也能使其脱涩, 其脱涩的原理与 ‘罗田甜柿’ 和 ‘小果甜柿’ 是否相同, 需要进一步研究。用乙醇处理 ‘南通小方柿’ 果实, 发现单宁合成途径相关基因 *DkMYB4* 和 *DkF3'5'H* 的表达量均有所下降, 推测由于 *DkADH1* 表达量的增加, 抑制了单宁合成相关基因的表达, 从而减少了单宁的合成。

References

- Akagi T, Ikegami A, Suzuki Y, Yoshida J, Yamada M, Sato A, Yonemori K. 2009. Expression balances of structural genes in shikimate and flavonoid biosynthesis cause a difference in proanthocyanidin accumulation in persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) fruit. *Planta*, 230 (5): 899 – 915.
- Bellincontro A, Morganti F, DeSant is D. 2005. Inhibition of ethylene via different ways affects LOX and ADH activities, and related volatile compounds in peach (cv. Royal Gem). *Acta Horticulturae*, 682: 445 – 452.
- Cai Bin-hua, Zhang Ji-yu, Gao Zhi-hong, Qu Shen-chun, Qiao Yu-shan, Zhang Zhen. 2008. A kind of improved extraction *Fragaria* blade total RNA method. *Jiangsu Journal of Agricultural Sciences*, 24 (6): 875 – 877. (in Chinese)
- 蔡斌华, 张计育, 高志红, 渠慎春, 乔玉山, 章 镇. 2008. 一种改良的提取草莓属叶片总 RNA 的方法. *江苏农业学报*, 24 (6): 875 – 877.
- Dennis E S, Dolferus R, Ellis M. 2000. Molecular strategies for improving waterlogging tolerance in plants. *J Exp Bot*, 51 (342): 89 – 97.
- Dixon R A. 2005. Engineering of plant natural product pathways. *Current Opinion in Plant Biology*, 8 (3): 329 – 336.
- Dolferus R, Jacobs M, Peacock W J. 1994. Differential interactions of promoter elements in stress responses of the *Arabidopsis Adh* gene. *Plant Physiology*, 105: 1075 – 1087.
- Ingersoll J C, Rothenberg M, Liedl B E, Folkerts K, Garvin D, Hanson M R, Doyle J J, Mutschler M A. 1994. A novel anther-expressed Adh-homologous gene in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Molecular Biology*, 26: 1875 – 1891.
- Ikegami A, Sato A, Yamada M, Kitajima A, Yonemori K. 2005. Molecular size profiles of tannins in persimmon fruits of Japanese and Chinese pollination-constant non-astringent (PCNA) -type cultivars and their offspring revealed by size-exclusion chromatography. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 74 (6): 437 – 443.
- Jiang De-xin, Xue Xiao-hui, Sheng Bing-cheng, Zhang Zhen, Dai Wen-hao, Xu Chang-bao. 1992. Rare dwarf persimmon variety – Nantong Xiaofangshi. *Agricultural Sciences*, 8 (1): 49 – 50. (in Chinese)
- 蒋德新, 薛晓晖, 盛炳成, 章 镇, 戴文浩, 徐长宝. 1992. 珍稀矮生型柿品种——南通小方柿. *江苏农业科学*, 8 (1): 49 – 50.
- Kajiura M. 1946. Persimmon cultivars and their improvement. *Breeding Horticultural*, (1): 175 – 182. (in Japanese)
- Lepiniec L, Debeaujon I, Routaboul J M, Baudry A, Pourcel L, Nesi N, Caboche M. 2006. Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu Rev Plant Biol*, 57: 405 – 430.
- Matsuo T, Ito S. 1982. A model experiment for deastringency of persimmon fruit with high CO₂ treatment *in vitro* gelation of kaki-tannin by reacting with acetaldehyde. *Agricultural Biological Chemistry*, 46 (3): 683 – 689.

- Matsuo T, Itoo S, Ben-Aire R A. 1991. Model experiment for elucidating the mechanism of astringency removal in persimmon fruit using respiration inhibitors. *Japan Soc Hort Sci*, 60: 437 – 442.
- Oshida M, Yonemori K, Sugiura A. 1996. On the nature coagulated tannins in astringent-type persimmon fruit after an artificial treatment of astringency removal. *Postharvest Biol Technol*, 8: 317 – 327.
- Pesis E, Ben-Aire R. 1984. Involvement of acetaldehyde and ethanol accumulation during induced astringency of persimmon fruits. *Journal of Food Science*, 49: 896 – 899.
- Sarni-Manchado P, Verries C, Tesniere C. 1997. Molecular characterization and structural analysis of an alcohol dehydrogenase gene (*GV-Adh1*) expressed during ripening of grapevine (*Vitis vinifera* L.) berry. *Plant Science (Limerick)*, 125 (2): 177 – 187.
- Shiesh C C, Lin H L. 2000. Studies on the possible mechanism of ripening process induced deastringency in ‘Syh Jou’ persimmon (*Diospyros kaki* L.) fruit. *Journal of the Chinese Society for Horticultural Science*, 46 (4): 399 – 416.
- Su Fu-yuan. 2012. Involved and characterization of MYB, basic helix-loop-helix and WD40 transcription factors genes involved in persimmon proanthocyanidin metabolism [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 宿福园. 2012. 参与柿单宁代谢的 MYB、bHLH 及 WD40 转录因子基因的克隆及分析 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Sugiura A. 1983. Relationships of ethanol production by seeds of different types of Japanese persimmon and their tannin content. *HortScience*, 18: 319 – 321.
- Tadege M, Kuhlemeier C. 1997. Aerobic fermentation during tobacco pollen development. *Plant Molecular Biology*, 35: 343 – 354.
- Taira S, Ono M, Matsumoto N. 1997. Reduction of persimmon astringency by complex formation between pectin and tannins. *Postharvest Biology and Technology*, 12: 265 – 271.
- Taira S, Satoh I, Watanabe S. 1992. Relationship between differences in the ease of removal of astringency among fruits of Japanese persimmon (*Diospyros kaki* Thunb.) and their ability to accumulate ethanol and acetaldehyde. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 60 (4): 1003 – 1009.
- Torregrosa L, Pradal M, Souquet J M, Rambert M, Gunata Z, Tesniere C. 2008. Manipulation of VvAdh to investigate its function in grape berry development. *Plant Science*, 174: 149 – 155.
- Wang Yan. 2010. The mechanism of natural astringency-loss in Chinese pollination-constant and non-astringency persimmons [Ph. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University. (in Chinese)
- 王 燕. 2010. 中国原产完全甜柿自然脱涩机理研究 [博士论文]. 武汉: 华中农业大学.
- Wang Zhi-xin. 1998. The current situation and prospect of protein structure prediction. *Chemistry of Life*, 18 (6): 19 – 22. (in Chinese)
- 王志新. 1998. 蛋白质结构预测的现状与展望. *生命与化学*, 18 (6): 19 – 22.
- Xie Y, Wu R. 1989. Rice alcohol dehydrogenase genes: Anaerobic induction, organ specific expression and characterization of cDNA clones. *Plant Mol Biol*, 130: 53 – 58.
- Yamada M, Taira S, Ohtsuki M, Sato A, Iwanami H, Yakushiji H, Wang R, Yang Y, Li G. 2002. Varietal differences in the ease of astringency removal by carbon dioxide gas and ethanol vapor treatments among oriental astringent persimmons of Japanese and Chinese origin. *Scientia Horticulturae*, 94: 63 – 72.
- Yonemori K. 1997. Persimmon industry and research activities in Japan. *Acta Horticulturae*, 436: 21 – 32.