

芒果乙烯受体基因 *MiETR1b* 的分离与表达分析

李运合^{1,2,*}, 张 智¹, 吴青松^{1,2}

(¹ 中国热带农业科学院南亚热带作物研究所, 广东湛江 524091; ² 农业部热带果树生物学重点实验室, 广东湛江 524091)

摘 要: 以‘紫花杜’芒果 (*Mangifera indica* L. ‘Zihua’) 子叶切段为材料, 采用 RT-PCR 结合 RACE 方法得到乙烯受体基因 *ETR1* 的 cDNA 及基因组 DNA 全长, 命名为 *MiETR1b*。该基因 cDNA 全长 2 530 bp, 开放读码框为 2 220 bp, 编码 739 个氨基酸; 其基因组 DNA 全长 4 116 bp, 其中从起始密码子到终止密码子为 3 305 bp, 含有 6 个外显子和 5 个内含子。氨基酸序列多重比对及系统发育树结果显示 *MiETR1b* 与 *MiETR1* 亲缘关系最近, 与 *CsERS1*、*DIETR1*、*TcERS1*、*PtETR1* 有较高的同源性, 且具有保守的 GAF 域和组氨酸激酶域。这些结果表明, *MiETR1b* 为 *ETR1* 家族同源基因。荧光定量 PCR 结果表明, *MiETR1b* 在芒果子叶切段不定根形成过程中在远轴端和近轴端都有表达, 其中远轴端 0.25 ~ 2 d 的表达量显著上调; 吲哚丁酸 (IBA) 和 2,3,5 - 三碘苯甲酸 (TIBA) 预处理后分别在 1 d 和 6 h 显著下调。另一方面, 在培养的初期, 即 0.5 ~ 1 d, 乙烯释放量相对较高, 4 d 及其以后的乙烯释放量急剧下降, 表明芒果子叶切段不定根形成过程中有较多乙烯生成, 提示 *MiETR1b* 可能参与了不定根的形成。

关键词: 芒果; *MiETR1b*; 表达分析; 不定根

中图分类号: S 667.7

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 06-1021-10

Isolation and Expression Analysis of an Ethylene Receptor Gene *MiETR1b* in Mango

LI Yun-he^{1,2,*}, ZHANG Zhi¹, and WU Qing-song^{1,2}

(¹South Subtropical Crop Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Zhanjiang, Guangdong 524091, China; ²Key Laboratory of Tropical Fruit Biology, Ministry of Agriculture, Zhanjiang, Guangdong 524091, China)

Abstract: A mango *ETHYLENE RESPONSE1* (*ETR1*) gene, designated as *MiETR1b*, was isolated from the cotyledon of mango (*Mangifera indica* L. ‘Zihua’) using RT-PCR and RACE. The full-length cDNA was 2 530 bp with an open reading frame of 2 220 bp, encoding a putative protein of 739 amino acids. The genomic DNA sequence of *MiETR1b* was 4 116 bp long with a sequence of 3 305 bp from start codon to terminator codon containing six exons and five introns. The deduced amino acids possessed conserved domains of GAF and HATPase_c superfamily. Phylogenetic tree analysis indicated that *MiETR1b* had the highest similarity with *MiETR1* from *M. indica*, and had high similarity with *CsERS1*, *DIETR1*, *TcERS1* and *PtETR1*. Quantitative real-time PCR showed that *MiETR1b* expressed in proximal

收稿日期: 2015 - 02 - 03; 修回日期: 2015 - 04 - 17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31372053)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: liyunhe16@163.com)

cut surface or distal cut surface throughout the adventitious root formation period. Meanwhile, the expression of *MiETR1b* in distal cut surface was significantly up-regulated within 0.25 - 2 days. However, pre-treatment with indole-3-butyric acid (IBA) and 2,3,5-triiodobenzoic acid (TIBA) significantly down-regulated *MiETR1b* expression of 1 day and 6 hours, respectively. On the other hand, more ethylene produced within 0.5 - 1 day, while the ethylene production decreased after 4 days of culture. In conclusion, *MiETR1b* might play an important role during the adventitious root formation of mango cotyledon segments, which was related to ethylene production.

Key words: *Mangifera indica*; *MiETR1b*; expression analysis; adventitious root

世界上用于园艺植物工厂化生产的无性繁殖过程超过 70%都是通过外植体生根获得再生植株实现的 (Davies et al., 1994; Rout et al., 2006), 因此不定根的成功诱导是无性繁殖获得成功的一个关键步骤。然而, 很多园艺植物尤其是木本园艺植物, 由于本身生理因素等原因导致不定根形成困难, 目前还很难进行工厂化无性繁殖 (Pijut et al., 2011; Verstraeten et al., 2013)。因此了解不定根的形成机制将对园艺植物工厂化育苗的发展有所帮助。

AUX 和 PIN 载体蛋白在植物侧根形成中扮演着重要角色 (de Smet et al., 2006; Peret et al., 2009; Bellini et al., 2014), 但不定根形成的分子机制尚不明 (Verstraeten et al., 2013; Bellini et al., 2014)。不定根大多起源于植物维管束周围细胞, 但由于缺乏早期的分子标记, 很难精确地判断出哪个 (些) 细胞是起始细胞 (Bellini et al., 2014)。不定根可能形成于除了根之外的任何组织, 如叶片、茎等, 其形成受内源激素和环境刺激所调控。生长素促进不定根形成 (Pacurar et al., 2014b); 而细胞分裂素则对不定根的形成起抑制作用, 外源细胞分裂素抑制茎段不定根的形成, 细胞分裂素合成基因缺陷的突变体增加不定根形成 (Cano et al., 2014)。另一方面, 有关乙烯在植物不定根形成中的作用尚存在争议, 一些研究表明乙烯可以促进不定根形成 (de Klerk et al., 1999; Bellini et al., 2014), 也有些研究则表明乙烯对不定根的形成起抑制作用 (Muday et al., 2015)。推测乙烯可能与生长素相互作用, 协同调控不定根的形成 (Pacurar et al., 2014a)。因此了解乙烯在植物不定根形成中的分子机理, 将可更好地调控不定根形成。

前期研究发现, ‘紫花杧’杧果 (*Mangifera indica* L. ‘Zihua’) 子叶切段在 0.7% 的琼脂培养基上黑暗培养, 4 周后不定根只在近轴端切面 (PCS) 上形成, 这个过程中不需要添加任何外源激素和其它营养元素, 因此这是一个研究不定根形成的良好体系 (Li et al., 2008)。而当植物在受到伤害时会有乙烯产生 (Blakesley, 1994; León et al., 2001), 在本试验的生根体系中需要将杧果子叶切成一个长 2 cm 的切段, 这就有伤口产生, 导致有乙烯释放, 此时乙烯是否参与杧果子叶切段不定根的形成值得探讨。

乙烯信号转导的第一步是乙烯结合到乙烯受体上。在拟南芥中已经克隆到 5 个乙烯受体基因 (Chen et al., 2005; Kendrick & Chang, 2008), 分别是 *ETHYLENE RESPONSE1* (*ETR1*)、*ETR2*、*ETHYLENE RESPONSE SENSOR1* (*ERS1*)、*ERS2* 和 *ETHYLENE INSENSITIVE4* (*EIN4*)。根据序列的不同可以将它们分为两个亚族: 亚族 1 包括 *ETR1* 和 *ERS1*, 亚族 2 包括 *ETR2*, *ERS2* 和 *EIN4* (Chen et al., 2005), 其中亚族 1 在乙烯信号传导方面起着更重要的作用 (Hua & Meyerowitz, 1998; Wang et al., 2003; Qu et al., 2007)。

本试验中以 ‘紫花杧’子叶为材料, 测定了子叶切段不定根形成过程中的乙烯释放量的变化, 克隆获得了编码杧果乙烯受体 ETR1 蛋白的 *MiETR1b* 基因, 并利用实时定量 PCR 技术对其在不同

处理条件下的不同部位的表达进行了研究, 为研究乙烯在植物不定根形成中的作用机制打下一定的理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料及其不定根诱导

‘紫花杧’杧果的果实采于中国热带农业科学院南亚热带作物研究所(广东, 湛江)。于 2013 年 6—8 月选择外观大小均一的成熟果实, 按照 Li 等(2008)的方法进行消毒、不同植物生长调节剂预处理及不定根诱导: 将杧果胚取出, 选择大小一致的子叶, 剥去种皮(成熟的‘紫花杧’子叶约长 6~7 cm, 宽 2~3 cm), 流水冲洗 1 h 左右, 转移到无菌操作台上, 10% 的漂白水消毒 10~15 min, 无菌水冲洗 4 次, 每次 3~5 min, 放置于无菌滤纸上, 吸干。根据试验目的进行不同的预处理和不定根诱导。一共 3 个处理, 分别为 $492.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 吲哚丁酸(IBA)、 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,3,5-三碘苯甲酸(TIBA)预处理和无菌水对照。预处理方法: $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$, $60 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 摇床上黑暗条件下浸泡 1 h。预处理后在无菌条件下, 从子叶靠近胚轴的那端算起 1 cm 处横切, 切取长度为 2 cm 子叶切段, 平放在 0.7% 的琼脂培养基上, 置于 $(28 \pm 2)^\circ\text{C}$ 黑暗条件下培养。

在培养 0、0.25、1、2、4、7 和 10 d 时分别取子叶切段的靠近胚轴一端(近轴端)及远离胚轴一端(远轴端)的 2 mm 长切段, 液氮速冻后存放于 -80°C , 备用于 RNA 的提取。

1.2 *MiETR1b* 基因的克隆

LA Taq 酶、TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.4.0、PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit, PrimeScriptTM RT reagent Kit with gDNA Eraser (Perfect Real Time), dNTP mixture, 感受态细胞 DH5 α , 克隆载体 pMD18-T vector 等都购于宝生物生物工程(大连)有限公司。植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)购于天根生化科技(北京)有限公司。

在 NCBI 数据库中搜索 *ETR1* 基因的氨基酸序列, 选择与杧果亲缘关系相对较近的 10 个序列, 利用 iCODEHOP v1.1 程序设计一对简并引物, 即 MiETRSP1 和 MiETRSP2 (表 1)。

杧果子叶切段在 0.7% 的琼脂培养基上培养 4 d 后, 按照肖洁凝等(2003)的方法提取 RNA, 然后以 Oligo T 为引物, 按照说明书的方法用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 将其反转录成 cDNA, 以此 cDNA 为模板, 以 MiETRSP1 和 MiETRSP2 为引物进行 PCR 扩增。PCR 反应体系及条件同李运合等(2011)的报道。

在获得中间片段后, 用 SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 进行 3'RACE 和 5'RACE 反应, 获得其 3'和 5'末端。反应条件参照试剂盒说明书进行, 所用引物序列见说明书及表 1。

用植物基因组 DNA 提取试剂盒(DP305)提取基因组 DNA。在通过 RACE 方法获得 *MiETR1b* 的全长后, 在其 5'-UTR 和 3'-UTR 分别设计引物, 分别以 cDNA 和基因组 DNA 为模板进行 PCR, 分别进行 *MiETR1b* 基因的 cDNA 全长验证及基因组 DNA 全长获取。反应条件同 Li 等(2012)的报道。

PCR 后, 将获得的条带通过 TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver.4.0 割胶回收纯化, 与 pMD18-T Vector 连接后转化 DH5 α 感受态细胞, 经蓝白斑筛选, 挑取白色菌落进行培养, 由广州 Invitrogen 公司进行序列测定。获得测序结果后通过 GenBank 进行 BLAST 搜索对比。

1.3 生物信息学分析

核苷酸序列, 开放阅读框 (open reading frame, ORF) 以及编码的氨基酸序列通过 NCBI 网站进行在线分析 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)。氨基酸序列在 NCBI 的保守域数据库 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cdd.shtml>) 进行分析以发现保守域。*MiETR1b* 的分子量及等电点通过 pI/MW tool (<http://www.expasy.org/tools/protparam.html>) 计算获得。用 ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/clustalw/>) 进行氨基酸序列对比, 之后用 BOXSHADE 程序 (http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html) 进行格式整理。用 MEGA 4.0 软件构建蛋白系统进化树。

1.4 荧光定量 PCR

利用实时荧光定量 PCR 技术分析 *MiETR1b* 的表达, 以芒果 *Actin* 基因作为内参。分别取不同处理条件下不同时间的近轴端和轴端两端材料, 提取 RNA 后用 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 反转录获得 cDNA, 用 Roche LightCycler® 480 II 对目的基因的表达水平进行检测。在设计荧光定量 PCR 引物时, 为了避免基因组 DNA 的干扰, 采取了两个措施: 一是在得到 *MiETR1b* 基因的 cDNA 及基因组 DNA 全长后, 通过二者结构的对比, 得到内含子和外显子的分布图, 设计跨内含子引物; 二是 PrimeScript™ RT reagent Kit with gDNA Eraser 试剂盒中使用了具有较强 DNA 分解活性的 gDNA Eraser, 通过 42 °C, 2 min 即可除去基因组 DNA。

表 1 引物用途及其序列
Table 1 Primer applications and sequences

用途 Application	引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5' - 3')
<i>MiETR1b</i> 中间片段的扩增 DNA fragment amplification of <i>MiETR1b</i>	MiETRSP1	GCCCTGATGCTGGTGCAATHATHCC
	MiETRSP2	GGTTCATCACGGCCARRAARTCRIT
3'RACE 第 1 轮引物 First round PCR of 3'RACE	MiETRSP3	TCGTGTTCCACTCCTGCATCTCTCAA
3'RACE 第 2 轮引物 Second round PCR of 3'RACE	MiETRSP4	AAACAGCCATTCATGCTCGCAAC
5'RACE 第 1 轮引物 First round PCR of 5'RACE	MiETRSP5	AGGAGTGGAACACGAACGCAACCA
5'RACE 第 2 轮引物 Second round PCR of 5'RACE	MiETRSP6	ATGTCGCCCAGTTCTTCTCTGTGT
<i>MiETR1b</i> cDNA 及 DNA 全长扩增 Amplification of the full-length cDNA and genomic DNA of <i>MiETR1b</i>	MiETRSP7	TGGCAGCTGGCTCATCTGTGCTTAT
	MiETRSP8	GGGTCTCATGAATTGTTACGGGCTTA
荧光定量 PCR 引物 Primers for quantitative real-time PCR	MiETRSP9	TCAGGTGCTGTTGCTCTTT
	MiETRSP10	ATCGTTGCGAGCATGAATGG
荧光定量内参 <i>Actin</i> 基因引物 <i>Actin</i> for quantitative real-time PCR	MiETRSP11	CCACTGCTGAACGGGAAAT
	MiETRSP12	GTGATGGCTGGAAGAGGAC

1.5 乙烯释放速率的测定

将芒果子叶切段置于 250 mL 密封的玻璃罐中, 分别在 25 °C 条件下贮藏 0.5、1、4、7 和 10 d 后取气 1 mL, 用 Agilent7890A 型气相色谱仪测定乙烯释放量。色谱柱: HP-55% (毛细管柱)。气相色谱工作条件为: 火焰离子化检测器 (FID), 柱温 90 °C, 进样器温度 100 °C, 载气为 N₂, 流速 25 mL · min⁻¹, 保留时间为 3.5 min。采用 100 μL · L⁻¹ 标准乙烯外标法定量, 以峰面积计算乙烯释放速率。3 次重复。

1.6 数据分析

采用 SPSS 16.0 进行数据分析, 实时荧光定量 PCR 结果用平均值 ± 标准误 (Means ± S.E.) 表示, 乙烯释放量结果用平均值 ± 标准差 (Means ± S.D.) 表示。

2 结果与分析

2.1 杧果子叶切段不定根的形成

从培养 10 d 开始陆续在杧果子叶切段近轴端切面上观察到有不定根形成 (图 1), 但远轴端切面上无不定根形成。



图 1 杧果子叶切段培养 10 d 后不定根的形成
Fig. 1 Adventitious roots formation in mango cotyledon segments after cultured for 10 d

2.2 *MiETR1b* 的克隆及序列分析

以培养 4 d 的杧果子叶切段近轴端的 RNA 所反转录的 cDNA 为模板, 利用简并引物 MiETRSP1 和 MiETRSP2 通过 PCR 方法得到一个长度为 754 bp 的片段, 经过测序及 BALST 分析表明其为拟南芥 *AtETR1* 的同源基因。之后利用 RACE 方法分别获得了该基因片段的 3' 和 5' cDNA 末端序列。经过序列拼接, 获得了一条长度为 2 530 bp 的 cDNA 全长, 包含一个 2 220 bp 的开放阅读框。NCBI 在线分析其同源性后, 命名为 *MiETR1b* (GenBank 登录号为 KM062062)。

以基因组 DNA 为模板, MiETRSP7 和 MiETRSP8 为扩增引物, 经 PCR 得到 *MiETR1b* 的基因组 DNA 全长 (4 116 bp), 从起始密码子到终止密码子的长度为 3 305 bp (GenBank 登录号为 KM587716)。与 cDNA 全长比较表明 (图 2), *MiETR1b* 含有 6 个外显子 (Exon) 和 5 个内含子 (Intron)。

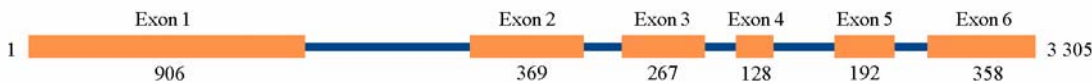


图 2 *MiETR1b* 的基因组 DNA 结构
Fig. 2 The genomic structure of *MiETR1b*

2.3 *MiETR1b* 蛋白结构及序列分析

MiETR1b 编码 739 个氨基酸, 推导 *MiETR1b* 蛋白分子量为 82.5 kD, 等电点 7.11。将推测的氨基酸序列提交到 NCBI 的保守域数据库 (Conserved Domain Database, CDD) 进行搜索, 结果 (图 3) 表明 *MiETR1b* 包含 4 个保守域, 即 GAF、HisKA、HATPase_c、REC 保守域, 分别位于第 158 ~ 307、341 ~ 404、460 ~ 585、615 ~ 730 个氨基酸。

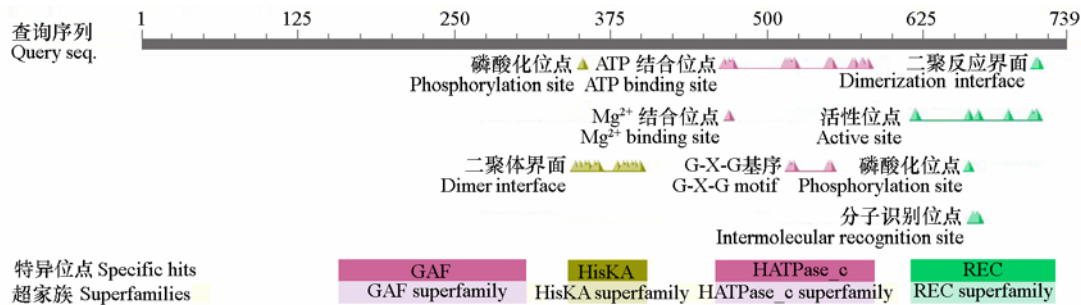


图 3 *MiETR1b* 氨基酸保守域分析
Fig. 3 A search for conserved protein domains of *MiETR1b*

将推导的氨基酸序列在 NCBI 上进行 Blast 分析后发现, *MiETR1b* 与芒果 (*Mangifera indica*) *MiETR1*、柑橘 (*Citrus sinensis*) *CsERS1*、龙眼 (*Dimocarpus longan*) *DIETR1*、可可 (*Theobroma cacao*) *TcERS1*、欧洲大叶杨 (*Populus trichocarpa*) *PtrETR1*、西洋梨 (*Pyrus communis*) *PcETR1* 和桃 (*Prunus persica*) *PpETR1* 相似度较高, 分别为 94%、91%、91%、89%、88%、88%和 88%, 部分结果见图 4。

MiETR1	1	MESCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIALAYFSIPLELIYFVKKS AVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFSMHS
MiETR1b	1	MESCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIALAYFSIPLELIYFVKKS AVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFMHS
DIETR1	1	MESCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIALAYFSIPLELIYFVKKS AVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFSMHS
PtrETR1	1	MESCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIALAYFSIPLELIYFVKKS AVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFSMHS
PcETR1a	1	MESCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIALAYFSIPLELIYFVKKS AVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFMHS
AtETR1	1	MESCNCIEPQWPADELLMKYQYISDFFIALAYFSIPLELIYFVKKS AVFPYRWVLVQFGAFIVLCGATHLINLWTFMHS
MiETR1	81	RTVAIVMTTAKVLTAAVSCATALLMVLHIIIPDLLSVKTRFLFLKNKAAELDREMLIRTQETGRHVRMLTHEIRSTLDRH
MiETR1b	81	RTVAIVMTTAKVLTAAVSCATALLMVLHIIIPDLLSVKTRFLFLKNKAAELDREMLIRTQETGRHVRMLTHEIRSTLDRH
DIETR1	81	RTVAIVMTTAKVLTAAVSCATALLMVLHIIIPDLLSVKTRFLFLKNKAAELDREMLIRTQETGRHVRMLTHEIRSTLDRH
PtrETR1	81	RTVAIVMTTAKVLTAAVSCATALLMVLHIIIPDLLSVKTRFLFLKNKAAELDREMLIRTQETGRHVRMLTHEIRSTLDRH
PcETR1a	81	RTVAIVMTTAKVLTAAVSCATALLMVLHIIIPDLLSVKTRFLFLKNKAAELDREMLIRTQETGRHVRMLTHEIRSTLDRH
AtETR1	81	RTVAIVMTTAKVLTAAVSCATALLMVLHIIIPDLLSVKTRFLFLKNKAAELDREMLIRTQETGRHVRMLTHEIRSTLDRH
MiETR1	161	TILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLHQONPVGYTVPIQLPVISQVETSNHAKVISPNCPVARLRPLAG
MiETR1b	161	TILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLHQONPVGYTVPIQLPVISQVETSNHAKVISPNCPVARLRPLAG
DIETR1	161	TILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLHQONPVGYTVPIQLPVISQVETSNHAKVISPNCPVARLRPLAG
PtrETR1	161	TILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLHQONPVGYTVPIQLPVISQVETSNHAKVISPNCPVARLRPLAG
PcETR1a	161	TILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLHQONPVGYTVPIQLPVISQVETSNHAKVISPNCPVARLRPLAG
AtETR1	161	TILKTTLVELGRTLALAEALWMPTRTGLELQLSYTLHQONPVGYTVPIQLPVISQVETSNHAKVISPNCPVARLRPLAG
MiETR1	241	KYMPGEVAVRVPLHLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRAR
MiETR1b	241	KYMPGEVAVRVPLHLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRAR
DIETR1	241	KYMPGEVAVRVPLHLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRAR
PtrETR1	241	KYMPGEVAVRVPLHLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRAR
PcETR1a	241	KYMPGEVAVRVPLHLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRAR
AtETR1	241	KYMPGEVAVRVPLHLHLSNFQINDWPELSTKRYALMVLMLPDSARQWHVHELELVEVVADQVAVALSHAAILEESMRAR
MiETR1	321	DLLEQNVALDLARREAEATIRARNDFLAVNMHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLINDVL
MiETR1b	321	DLLEQNVALDLARREAEATIRARNDFLAVNMHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLINDVL
DIETR1	321	DLLEQNVALDLARREAEATIRARNDFLAVNMHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLINDVL
PtrETR1	321	DLLEQNVALDLARREAEATIRARNDFLAVNMHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLINDVL
PcETR1a	321	DLLEQNVALDLARREAEATIRARNDFLAVNMHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLINDVL
AtETR1	321	DLLEQNVALDLARREAEATIRARNDFLAVNMHEMRTPMHAI IALSSLLQETELTPEQRLMVETILKSSNLLATLINDVL
MiETR1	401	DLSRLDGSLLQLGTFNLHAFREVLNLIKPIASVKKLEVTNLNAPDLPEYAVGDEKRLMQTLNVLVGNVAVKFSKGGSI
MiETR1b	401	DLSRLDGSLLQLGTFNLHAFREVLNLIKPIASVKKLEVTNLNAPDLPEYAVGDEKRLMQTLNVLVGNVAVKFSKGGSI
DIETR1	401	DLSRLDGSLLQLGTFNLHAFREVLNLIKPIASVKKLEVTNLNAPDLPEYAVGDEKRLMQTLNVLVGNVAVKFSKGGSI
PtrETR1	401	DLSRLDGSLLQLGTFNLHAFREVLNLIKPIASVKKLEVTNLNAPDLPEYAVGDEKRLMQTLNVLVGNVAVKFSKGGSI
PcETR1a	401	DLSRLDGSLLQLGTFNLHAFREVLNLIKPIASVKKLEVTNLNAPDLPEYAVGDEKRLMQTLNVLVGNVAVKFSKGGSI
AtETR1	401	DLSRLDGSLLQLGTFNLHAFREVLNLIKPIASVKKLEVTNLNAPDLPEYAVGDEKRLMQTLNVLVGNVAVKFSKGGSI
MiETR1	481	LITAFVAKSESFLDSRNPFFVPVPSDNHFLRVQVKDSGSGISFQDIPKLFKFAQNSIATRNSGGSLGLAICKRFVN
MiETR1b	481	LITAFVAKSESFLDSRNPFFVPVPSDNHFLRVQVKDSGSGISFQDIPKLFKFAQNSIATRNSGGSLGLAICKRFVN
DIETR1	481	LITAFVAKSESFLDSRNPFFVPVPSDNHFLRVQVKDSGSGISFQDIPKLFKFAQNSIATRNSGGSLGLAICKRFVN
PtrETR1	481	LITAFVAKSESFLDSRNPFFVPVPSDNHFLRVQVKDSGSGISFQDIPKLFKFAQNSIATRNSGGSLGLAICKRFVN
PcETR1a	481	LITAFVAKSESFLDSRNPFFVPVPSDNHFLRVQVKDSGSGISFQDIPKLFKFAQNSIATRNSGGSLGLAICKRFVN
AtETR1	481	LITAFVAKSESFLDSRNPFFVPVPSDNHFLRVQVKDSGSGISFQDIPKLFKFAQNSIATRNSGGSLGLAICKRFVN
MiETR1	561	LMEGHIWIESEGLGKGTAFIVKLGIPENESKESKPFLE--KANHGQTFEGKLVLMDDNGVSRVSTKGLLVHLGCDV
MiETR1b	561	LMEGHIWIESEGLGKGTAFIVKLGIPENESKESKPFLE--KANHGQTFEGKLVLMDDNGVSRVSTKGLLVHLGCDV
DIETR1	561	LMEGHIWIESEGLGKGTAFIVKLGIPENESKESKPFLE--KANHGQTFEGKLVLMDDNGVSRVSTKGLLVHLGCDV
PtrETR1	561	LMEGHIWIESEGLGKGTAFIVKLGIPENESKESKPFLE--KANHGQTFEGKLVLMDDNGVSRVSTKGLLVHLGCDV
PcETR1a	561	LMEGHIWIESEGLGKGTAFIVKLGIPENESKESKPFLE--KANHGQTFEGKLVLMDDNGVSRVSTKGLLVHLGCDV
AtETR1	567	LMEGHIWIESEGLGKGTAFIVKLGIPENESKESKPFLE--KANHGQTFEGKLVLMDDNGVSRVSTKGLLVHLGCDV
MiETR1	639	MTVSSSEECLEHVVSQEHKVVFMVDMGMPGIDGYEVAVIHEKFTK-RHERPLIVALTGNTDKVTKENCMRVGMDGVILKPV
MiETR1b	639	MTVSSSEECLEHVVSQEHKVVFMVDMGMPGIDGYEVAVIHEKFTK-RHERPLIVALTGNTDKVTKENCMRVGMDGVILKPV
DIETR1	640	MTVSSSEECLEHVVSQEHKVVFMVDMGMPGIDGYEVAVIHEKFTK-RHERPLIVALTGNTDKVTKENCMRVGMDGVILKPV
PtrETR1	639	MTVSSSEECLEHVVSQEHKVVFMVDMGMPGIDGYEVAVIHEKFTK-RHERPLIVALTGNTDKVTKENCMRVGMDGVILKPV
PcETR1a	641	MTVSSSEECLEHVVSQEHKVVFMVDMGMPGIDGYEVAVIHEKFTK-RHERPLIVALTGNTDKVTKENCMRVGMDGVILKPV
AtETR1	637	MTVSSSEECLEHVVSQEHKVVFMVDMGMPGIDGYEVAVIHEKFTK-RHERPLIVALTGNTDKVTKENCMRVGMDGVILKPV
MiETR1	718	SLEKMRSVLLGLLEHRLVFEAM
MiETR1b	718	SLEKMRSVLLGLLEHRLVFEAM
DIETR1	719	SLEKMRSVLLGLLEHRLVFEAM
PtrETR1	716	SLEKMRSVLLGLLEHRLVFEAM
PcETR1a	720	SLEKMRSVLLGLLEHRLVFEAM
AtETR1	717	SLEKMRSVLLGLLEHRLVFEAM

图 4 *MiETR1b* 与其它物种 ETR1 蛋白序列对比

MiETR1、MiETR1b: 芒果; DIETR1: 龙眼; PtrETR1: 欧洲大叶杨; PcETR1a: 西洋梨; AtETR1: 拟南芥。

Fig. 4 Multiple alignment of the *MiETR1* with other ETR1s

MiETR1、MiETR1b: *Mangifera indica*; DIETR1: *Dimocarpus longan*; PtrETR1: *Populus trichocarpa*;

PcETR1a: *Pyrus communis*; AtETR1: *Arabidopsis thaliana*.

选取 19 个与 *MiETR1b* 蛋白同源性较高的其它植物的乙烯受体蛋白, 分析其系统进化关系, 用 MEGA4.0 通过 Neighbor joining (NJ) 法构建了系统发育树。结果 (图 5) 显示, *MiETR1b* 与芒果 *MiETR1* 遗传距离最近, 其次是柑橘 (*Citrus sinensis*) *CsERS1* 和可可 (*Theobroma cacao*) *TcERS1*。

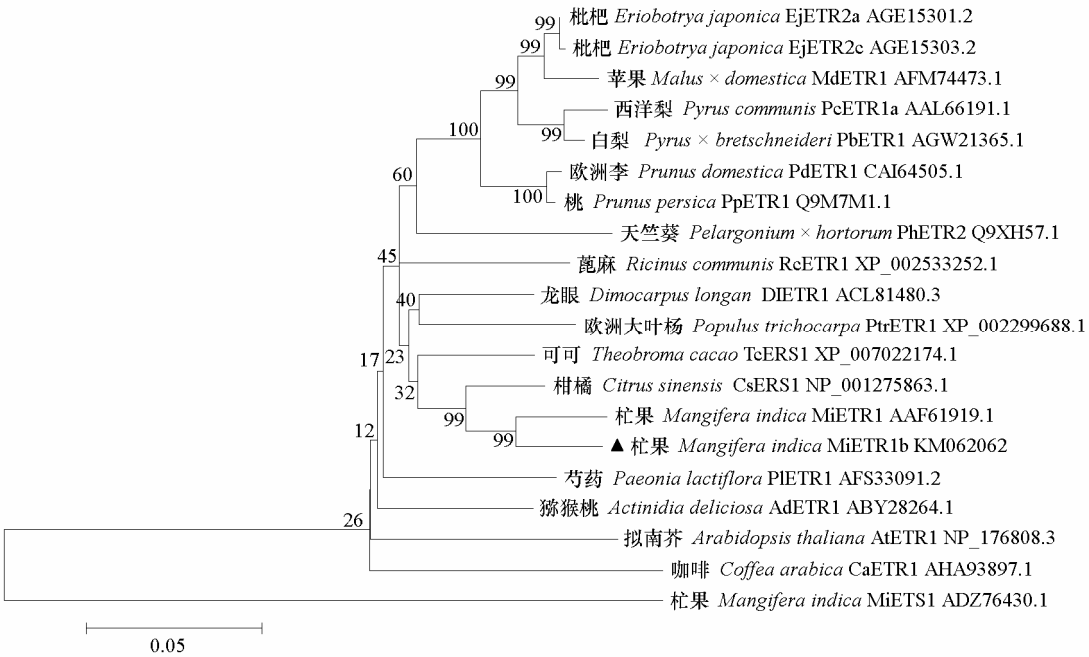


图 5 *MiETR1b* 与其它物种 ETR1 蛋白系统进化树分析

Fig. 5 The phylogenetic tree of *MiETR1* and ETR1 proteins from other species

2.4 不定根形成过程中乙烯释放量的变化

将子叶切成 2 cm 长切段进行培养, 在培养初期, 即 0.5 d 和 1 d 时, 子叶乙烯释放速率相对较高, 分别为 $4.5 \times 10^{-4} \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \text{FW}$ 和 $2.9 \times 10^{-4} \mu\text{L} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{kg}^{-1} \text{FW}$, 之后持续下降, 到 10 d 时已经基本测量不到 (图 6)。

2.5 不定根形成过程中 *MiETR1b* 表达量的变化

开始培养时, 近轴端和远轴端 *MiETR1b* 的表达量比较接近 (图 7, A, B), 无显著差异。

近轴端 (图 7, A): 对照 *MiETR1b* 的表达量在 0.25 和 1 d 有明显的下调 ($P < 0.05$), 2 d 后表达量逐渐缓慢回升, 与对照相比无显著差异, 10 d 时有显著的上调 ($P < 0.05$)。IBA 预处理后, 1 d 的表达有明显的下调表达 ($P < 0.05$), 其它时段的表达量与对照相比则都无明显变化。TIBA 预处理 0.25 d 的表达量有明显下调 ($P < 0.05$), 其它时间与对照相比差异不明显。

远轴端 (图 7, B): 培养 0.25 d, 对照 *MiETR1b* 的表达量显著上升 ($P < 0.05$), 之后维持一个

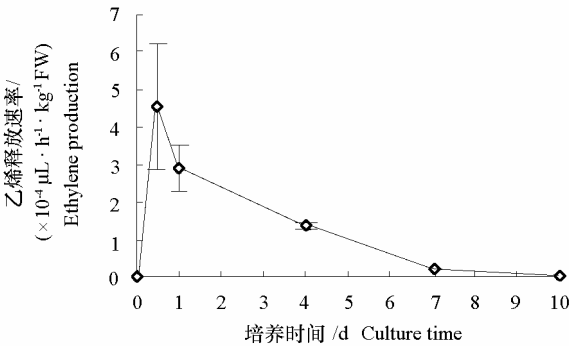


图 6 不定根形成过程中乙烯释放速率的变化

Fig. 6 Changes of ethylene production during mango adventitious root formation

较高的表达量, 4 d 后下降到初始的水平。IBA 预处理后 1 d 时下调表达 ($P < 0.05$), 10 d 时上调表达 ($P < 0.05$)。TIBA 处理后在 0.25 d 的表达量有明显下调 ($P < 0.05$)。

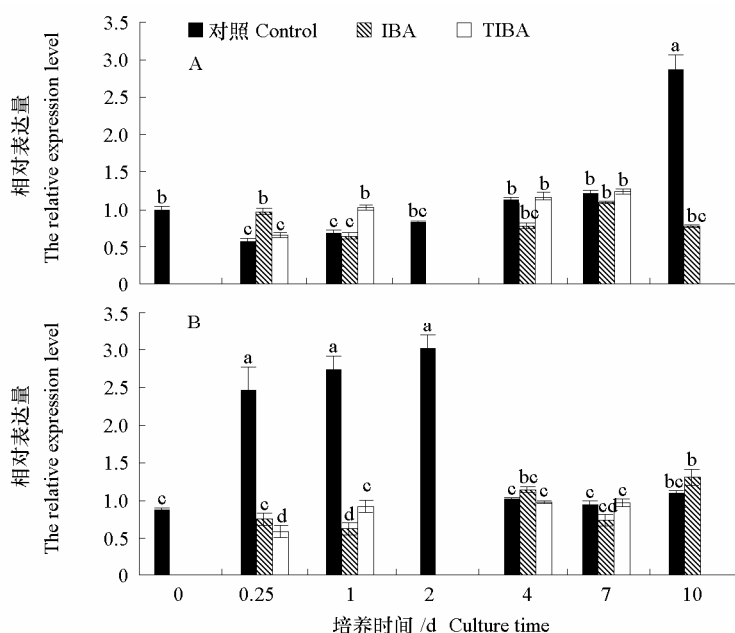


图 7 杧果子叶切段不定根形成过程中 *MiETR1b* 基因表达量的变化

A: 近轴端; B: 远轴端。

Fig. 7 Expression of the *MiETR1b* during adventitious roots formation in mango (*Mangifera indica*) cotyledon segments

A: Proximal cut surface; B: Distal cut surface.

3 讨论

植物不定根的形成受多种因素调控, 如植物激素、光照、伤口、胁迫等 (de Klerk et al., 1999; Verstraeten et al., 2014), 一般认为生长素在植物不定根形成中起着重要作用 (Blakesley, 1994; Pacurar et al., 2014b)。然而, 很多研究也表明乙烯可能参与了不定根的形成, 但其情况比较复杂。乙烯对拟南芥不定根形成起负调控作用 (Muday et al., 2015), 提高内源乙烯或外源施用乙烯均促进番茄不定根的形成 (Negi et al., 2010)。在本试验的生根体系中, 子叶切段不定根形成的初期有较高的乙烯释放量, 这就暗示了乙烯诱导的基因也可能参与了杧果子叶切段不定根的形成。

本研究中从杧果中克隆得到了一个乙烯受体基因 *MiETR1b* 的 cDNA 及基因组 DNA 全长。氨基酸序列多重比对及系统发育树结果显示 *MiETR1b* 与 *MiETR1* 亲缘关系最近, 与 *CsERS1*、*DIETR1*、*TcERS1*、*PtrETR1* 有较高的同源性。且具有保守的组氨酸激酶域, 这些结果表明, *MiETR1b* 为 *ETR1* 家族的同源基因, 可能与其它 *ETR1* 具有相似的结构和功能。

MiETR1b 基因在杧果子叶切段不定根形成的过程中, 近轴端 (即生根端) 和远轴端 (非生根端) 在不同时间及处理条件下表达量差异明显。在培养前, 近轴端和远轴端的表达量并没有明显差别, 这与之前面的结果相吻合: 切取的位置对不定根的形成没有明显影响 (李运合 等, 2011)。在培养的 0.25 到 2 d, 远轴端的 *MiETR1b* 表达量显著上升, 这与前人的研究 (Martinez et al., 2001) 类似: 杧果果实受到伤害时 *MiETR1* 基因的表达量开始明显上升, 之后下降; 但是另一方面, 近轴端的表

达量则在 0.25 d 显著降低, 而不定根是在近轴端生成 (Li et al., 2008), 这暗示着 *MiETR1b* 表达可能与芒果子叶切段的不定根形成呈负相关。即 *MiETR1b* 的上调表达抑制不定根的形成, 这与其在拟南芥不定根中的作用相类似 (Muday et al., 2015)。而另一方面, 培养 10 d 时, *MiETR1b* 基因在近轴端的表达量显著高于远轴端 ($P < 0.05$), 这可能与此时不定根已经在近轴端形成有关 (图 1), 具体原因有待下一步研究。

在拟南芥中共有 5 个乙烯受体基因, 分别为 *ETR1*、*ETR2*、*ERS1*、*ERS2* 和 *EIN4*。因此克隆到芒果中相应的同源基因并研究它们在不同条件下的时空表达模式, 有利于从整体上把握乙烯受体基因与芒果子叶切段不定根形成之间的关系。值得注意的是, 芒果子叶不定根的形成具有明显的极性作用, 因此乙烯很可能是通过具有极性运输的激素, 如生长素相互作用从而影响植物不定根的形成。乙烯与生长素的相互作用比较复杂, 可能是通过调控生长素极性运输从而影响不定根的形成 (Negi et al., 2010), 也可能是通过改变植物对生长素的感知能力进而影响不定根的形成 (Pacurar et al., 2014a), 或者可以通过促进生长素的合成 (Muday et al., 2015)。在芒果子叶切段不定根形成过程中, 乙烯和生长素究竟是通过哪种 (些) 协同方式调控不定根的形成, 是以后研究需要着重进行的一个方向。

References

- Bellini C, Pacurar D I, Perrone I. 2014. Adventitious roots and lateral roots: Similarities and differences. *Annual Review of Plant Biology*, 65: 639 - 666.
- Blakesley D. 1994. Auxin metabolism and adventitious root initiation//Davis T D, Haissig B E. *Biology of adventitious root formation*. New York: Plenum Press: 143 - 154.
- Cano A, Perez-Perez J M, Acosta M. 2014. Adventitious root development in ornamental plants: Insights from carnation stem cuttings//Morte A, Varma A. *Root engineering*. Berlin, Heidelberg: Springer: 423 - 441.
- Chen, Y F, Etheridge N, Schaller, G E. 2005. Ethylene signal transduction. *Annals of Botany*, 95 (6): 901 - 915.
- Davies F T, Davis T D, Kester D E. 1994. Commercial importance of adventitious rooting to horticulture//Davis T D, Haissig B E. *Biology of adventitious root formation*. New York: Plenum Press: 53 - 59.
- de Klerk G J, van der Krieken W, DeJong J C. 1999. The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35 (3): 189 - 199.
- de Smet I, Vanneste S, Inze D, Beeckman T. 2006. Lateral root initiation or the birth of a new meristem. *Plant Molecular Biology*, 60 (6): 871 - 887.
- Hua J, Meyerowitz E M. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94 (2): 261 - 271.
- Kendrick M D, Chang C. 2008. Ethylene signaling: New levels of complexity and regulation. *Current Opinion in Plant Biology*, 11 (5): 479 - 485.
- León J, Rojo E, Sánchez Serrano J J. 2001. Wound signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 52 (354): 1 - 9.
- Li Y H, Chen Q Z, Xiao J N, Chen Y F, Li X J, Staehelin C, Huang X L. 2008. Characteristics of adventitious root formation in cotyledon segments of mango (*Mangifera indica* L. cv. Zihua): Two induction patterns, histological origins and the relationship with polar auxin transport. *Plant Growth Regulation*, 54 (2): 165 - 177.
- Li Y H, Zou M H, Feng B H, Huang X, Zhang, Z, Sun G M. 2012. Molecular cloning and characterization of the genes encoding an auxin efflux carrier and the auxin influx carriers associated with the adventitious root formation in mango (*Mangifera indica* L.) cotyledon segments. *Plant Physiology and Biochemistry*, 55: 33 - 42.
- Li Yun-he, Ma Jie, Wu Yong-jie, Sun Guang-ming. 2011. The factors of influencing adventitious root formation of cotyledon segments in mango

- (*Mangifera indica* L.) . *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 31 (4): 842 – 847. (in Chinese)
- 李运合, 马 杰, 吴永杰, 孙光明. 2011. 芒果子叶切段不定根形成的影响因素分析. *西北植物学报*, 31 (4): 842 – 847.
- Martinez P G, Gomez, R L, Gomez-Lim M A. 2001. Identification of an ETR1-homologue from mango fruit expressing during fruit ripening and wounding. *Journal of Plant Physiology*, 158 (1): 101 – 108.
- Muday G K, Maloney G S, Lewis D R. 2015. Integration of ethylene and auxin signaling and the developmental consequences of their crosstalk//Wen C K. *Ethylene in plants*. Netherlands: Springer: 175 – 204.
- Negi S, Sukumar P, Liu X, Cohen J D, Muday G K. 2010. Genetic dissection of the role of ethylene in regulating auxin – dependent lateral and adventitious root formation in tomato. *The Plant Journal*, 61 (1): 3 – 15.
- Pacurar D I, Pacurar M L, Bussell J D, Schwambach J, Pop T I, Kowalczyk M, Gutierrez L, Cavel E, Chaabouni S, Ljung K, Fett-Neto A G, Pamfil D, Bellini C. 2014a. Identification of new adventitious rooting mutants amongst suppressors of the *Arabidopsis thaliana* *superroot2* mutation. *Journal of Experimental Botany*, 65 (6): 1605 – 1618.
- Pacurar D I, Perrone I, Bellini C. 2014b. Auxin is a central player in the hormone cross – talks that control adventitious rooting. *Physiologia Plantarum*, 151 (1): 83 – 96.
- Peret B, De Rybel B, Casimiro I, Benkova E, Swarup R, Laplace L, Bennett M J. 2009. *Arabidopsis* lateral root development: An emerging story. *Trends in Plant Science*, 14 (7): 399 – 408.
- Pijut P M, Woeste K E, Michler C H. 2011. Promotion of adventitious root formation of difficult-to-root hardwood tree species. *Horticultural Reviews*, 38: 213 – 253.
- Qu X, Hall B P, Gao Z, Schaller G E. 2007. A strong constitutive ethylene response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutations in the ethylene receptors *ETR1* and *ERS1*. *BMC Plant Biology*, 7 (1): 3.
- Rout G R, Mohapatra A, Jain S M. 2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospects. *Biotechnology Advances*, 24 (6): 531 – 560.
- Verstraeten I, Beeckman T, Geelen D. 2013. Adventitious root induction in *Arabidopsis thaliana* as a model for *in vitro* root organogenesis//De Smet I. *Plant organogenesis: Methods and protocols*. New York: Humana Press: 959: 159 – 175.
- Verstraeten I, Schotte S, Geelen D. 2014. Hypocotyl adventitious root organogenesis differs from lateral root development. *Frontiers in Plant Science*, 5: 495.
- Wang W, Hall A E, O'Malley R, Bleecker A B. 2003. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100 (1): 352 – 357.
- Xiao Jie-ning, Huang Xue-lin, Li Yin, Huang Xia, Li Xiao-ju. 2003. RNA Extraction from cotyledon of mango with high levels of secondary substances and carbohydrates. *China Biotechnology*, 23 (11): 83 – 86. (in Chinese)
- 肖洁凝, 黄学林, 黎 茵, 黄 霞, 李筱菊. 2003. 富含多糖和次生物质的芒果子叶总 RNA 的提取. *中国生物工程杂志*, 23 (11): 83 – 86.