

冬枣两个乙烯受体编码基因的克隆及序列分析

魏绍冲, 彭福田, 束怀瑞*, 孙旭东

(山东省作物生物学重点实验室, 山东农业大学园艺科学与工程学院, 山东泰安 271018)

摘要: 根据植物乙烯受体 ETR1 家族氨基酸和核苷酸的保守区序列设计简并引物, 通过 RT-PCR 从半红期冬枣果实中分离了两个 1 058 bp 的乙烯受体 cDNA 片段。在分析已知序列基础上, 分别通过 3 RACE 及对两个基因上游 5 端编码区的扩增, 得到了两个包含完整开放阅读框 (ORF) 以及 3 端非编码区 (3 UTR) 的乙烯受体编码基因, 即 *ZjETR1* 和 *ZjERS1*。它们分别编码 738 个和 632 个氨基酸。这两个编码基因的氨基酸与其它植物乙烯受体氨基酸高度同源, 分别属于 ETR1 亚类和 ERS1 亚类乙烯受体。

关键词: 枣; 乙烯受体; 果实成熟; 序列分析; 基因克隆

中图分类号: S 665.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0333-06

Cloning and Sequence Analysis of Two Encoding Ethylene Receptor cDNAs in 'Dongzao' Jujube

WEI Shao-chong, PENG Fu-tian, SHU Huai-ru^{*}, and SUN Xu-dong

(Key Laboratory of Crop Biology of Shandong Province, College of Horticulture Science and Engineering, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract: Two cDNA fragments with 1 058 bp were amplified from Chinese jujube (*Zizyphus jujuba* 'Dongzao') fruit at a half-red mature stage through RT-PCR using degenerated primers, and then both 5 encoding region and 3'-end with a UTR (untranslated region) of these two cDNA fragment sequences were obtained. The obtained ethylene receptor genes with two open reading frames, referred to *ZjETR1* and *ZjERS1*, encoded 738 and 632 amino acids, respectively. Sequence analysis indicated that *ZjETR1* and *ZjERS1* shared a high similarity with other ethylene receptors at the polypeptide level, and could be divided into the ETR1 and ERS1 sub-groups.

Key words: Jujube; Ethylene receptor; Fruit ripening; Sequence analysis; Gene cloning

自番茄 *NR* 基因被分离并研究了其在果实中表达模式后 (Wilkinson et al, 1995), 人们对桃 (Bassett et al, 2002; Rasori et al, 2002)、苹果 (Cin et al, 2005)、柑橘 (Katz et al, 2004) 等果实中乙烯受体编码基因进行了克隆及表达分析。通过基因工程的手段调控番茄中乙烯受体基因的表达, 可以改变转基因植株对乙烯的敏感性 (Ciardi et al, 2000; Tieman et al, 2000)。本研究中运用 RT-PCR 技术成功克隆了冬枣乙烯受体基因家族中包括编码区全序列的 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 两个成员, 并对其进行了序列分析, 可为进一步揭示乙烯作用与冬枣果实成熟、衰老的关系打下基础。

1 材料与方 法

试验以半红期 '冬枣' (*Zizyphus jujuba* 'Dongzao') 果实为材料, 切成薄片用液氮速冻后置于 -70 °C 冰箱中备用。DNA 回收纯化试剂盒和 pMD-18T 载体为大连宝生物公司产品。试验所用的感受态细胞为大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 菌株产品。DNA 序列测定委托上海英骏生物技术公司完成。

收稿日期: 2006 - 06 - 12; 修回日期: 2006 - 12 - 28

基金项目: 山东农业大学博士基金资助项目 (23226)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: hrshu@sdau.edu.cn)

根据 GenBank 中登录的拟南芥、番茄、桃等植物 ETR1 类乙烯受体氨基酸和核苷酸保守区序列, 设计简并引物, 上游引物 P1 为: 5' CTT (G/A) T (G/T) CA (G/A) TTTGGTGCCTT 3', 下游引物 P2 为: 5' TCTTC (T/A) A (G/A) CCT (T/G/C/A) GAAAGATC 3'。根据测序结果分析, 设计 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 的 3 RACE 巢式上游共同引物 P3-1: 5' GAAAC (A/T) GG (A/T) (A/C) G (A/G) CATGT (C/T) AG (A/G) ATG 3', 以及 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 第 2 次 PCR 上游引物 P3-2: 5' GCTGAGCAACGCCTGAT 3' 和 P3-3: 5' CATTGCATTGCTTCACTTCTTTT 3'。3 RACE 下游通用引物 B26 序列为: 5' GACTCGAGTCGACA TCGATTTTTTTTTTTTTTTTTT 3'。扩增 5 端编码区上游引物为 P5-1: 5' ATGGAG (G/T) C (A/T/C) TGCAA (C/T) TGTATTG 3' (*ZjETR1*) 和 P5-2: 5' ATGGA (A/G) TC (A/T/C) TGTATTG (C/T) AT 3' (*ZjERS1*)。下游引物根据测序结果设计, 分别为 P4: 5' CTCCGAGCCTTGTTTTT 3' (*ZjETR1*), P6: 5' ACATGCCTTCCAGTTTCTT 3' (*ZjERS1*)。

总 RNA 的提取参照 Salzman 等 (1999) 的方法进行, 按照 MB I 公司说明书合成 cDNA 第 1 链。PCR 反应体系: 2.5 mmol/L dNTP 8 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 5 μ L, 10 \times LA PCR 缓冲液 5 μ L, 上下游引物各 2 μ L (约 10 pmol/L), 逆转录产物 1 μ L, LA Taq 酶 0.5 μ L (5 U/ μ L), 用 dd H₂O 补充至总体积 50 μ L。保守区片段 PCR 反应条件为 94 预变性 5 min 后, 按以下程序进行 PCR 扩增: 94 变性 60 s, 50 退火 60 s, 72 延伸 90 s, 共进行 30 个循环, 最后 72 延伸 10 min 结束反应。3 末端扩增: 采用巢式 PCR 方式。首先用 P3-1 和通用引物 B26 进行, 反应条件为 94 预变性 5 min, 然后 94 变性 60 s, 54 退火 60 s, 72 延伸 90 s, 共 20 个循环。将 PCR 产物稀释 40 倍后, 取 1 μ L 作为模板用 P3-2 或 P3-3 与 B26 进行第 2 次 PCR 扩增, 反应条件与第一次相同, 进行 25 个循环。5 端编码区扩增: 根据测序结果设计下游特异引物 P4 和 P6, 分别与引物 P5-1 或 P5-2 进行 PCR 扩增。反应条件为 94 预变性 5 min, 然后 94 变性 45 s, 52 退火 45 s, 72 延伸 60 s, 共 30 个循环。

测序结果用 ContigExpress 进行序列拼接, 而序列分析则采用 DNASTAR 和 DNAMAN 软件进行。

2 结果与分析

2.1 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 保守区基因片段的克隆

以果实 cDNA 为模板采用引物 P1 和 P2 扩增得到的 PCR 产物长度约为 1.1 kb (图 1)。将其与 pMD-18T 载体连接, 转化 DH5 感受态细胞后获得重组质粒用于进一步的序列测定。根据载体两端双向的 DNA 测序结果, 得到了两个 1 058 bp 大小、均编码 352 个氨基酸的 cDNA 片段。将两个序列的核苷酸和氨基酸序列分别在 NCB I 服务器的 Blast (blastn 和 blastp) 软件中进行检索, 初步推断它们为冬枣乙烯受体成员的保守区序列。

2.2 *ZjETR1* 编码基因的克隆

根据 *ZjETR1* 的保守区序列设计特异引物 P3-2, 以 P3-1 和 B26 的 PCR 产物作为模板, PCR 产物获得一个约 1 100 bp 大小的预期片段。DNA 序列测定表明该 3 RACE 产物大小为 1 106 bp。采用简并引物 P5-1 和特异引物 P4 扩增得到了一个 384 bp 大小的 cDNA 片段, 序列测定结果表明其为 *ZjETR1* 的 5 端上游编码区序列 (图 2)。

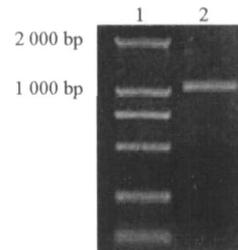


图 1 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 保守区的 RT-PCR 扩增结果
Fig. 1 The RT-PCR results of conserved region of *ZjETR1* and *ZjERS1*

1. DL 2000 marker, 2. cDNA fragment of *ZjETR1* and *ZjERS1*

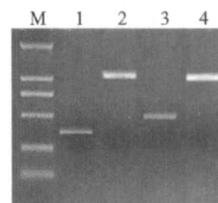


图 2 *ZjETR1* 与 *ZjERS1* 5 端编码区片段和 3 RACE 结果
Fig. 2 The 5' encoding cDNA fragments and 3 RACE products of *ZjETR1* and *ZjERS1*

M. DL 2000; 1. 5' encoding cDNA fragment of *ZjETR1*; 2. 3 RACE product of *ZjETR1*; 3. 5' encoding cDNA fragment of *ZjERS1*; 4. 3 RACE product of *ZjERS1*.

用 ContigExpress 软件将以上 3 个序列进行拼接，ZjETR1 为 2 290 bp，包含一个 2 214 bp 的 ORF (开放阅读框) 及 73 bp 的 3'-UTR (3 端非编码区序列)，该基因编码 738 个氨基酸 (图 3)，推测的分子量为 82.5 kD，等电点 (PI) 为 7.21。

1 ATGGAGTCTCGCAATTGTATTGAGCCACAATGGCCGGCTGATGAATTGTTGATGAAGTAT
1 M E S C N C I E P Q W P A D E L L M K Y
61 CAATACATCTCTGATTTCTTTATTGCTCTCGCATATTTCTCCATCCCTTTGGAAATCATC
21 Q Y I S D F F I A L A Y F S I P L E I I
121 TACTTTGTCAAGAAATCTGCGGTATTTCCATACAGATGGGTTCTGTGCAATTTGGTGCT
41 Y F V K K S A V F P Y R W V L V O F G A
181 TTCATAGTATTGTGGAGCTACTCATCTTATCAATTTGGGACTTTTACTATGCATTC A
61 F I V L C G A T H L I N L W T F T M H S
241 AGAACGGTAGCAGCGTAATGACCACTGCTAAAGTCTAACTGCTGTGGTGCATGTGCA
81 R T V A D V M T T A K V L T A V V S C A
301 ACTGCCCTCATGCTTGTGCATATTTCCGGATTTGTTGAGCGTTAAAAC TAGAGAGCTG
101 L A L V H I I P D L L S V K T R E L
361 TTCTTGAAAAACAAGGCTGCGGAGCTTGATAGAGAGATGGGACTTATTCGTACACAAGAG
121 F L K N K A A E L D R E M G L I R T Q A E
421 GAAACAGGTCGACATGTCAGGATGTTGACCCATGAGATCAGAAGCACCCCTTGATAGACGT
141 E T G R H V R M L T H E I R S T L G A R R
481 ACCATACTCAAACTCACGCTTGTGCAACTGGGGAGGACTTTGGCGCTGGAAGAGTGTGCT
161 T I L K T T L V E L G R T L A L E C A
541 TTGTGGATGCCAACGGAAGTGGTGAAGTGAAGTCTTCTACTCTCCATCAGCAG
181 L W M P T R T G L E L S Y T L H Q Q
601 AATCCAGTTGGATATACTGTGCCCATTCATCTTCTGTGATTAACCAAGTCTTTACTAGT
201 N F V G Y T V P I H L P V I N Q V F T S
661 AACCATGCGATAAAGATCTCTCCAAATCCCCAGTAGCAAGACTACGGTCTCTGCTGGA
221 N H A I K I S P N S P V A R L R S L A A G
721 AAATACATGCTGGAGGTTGTTGCTGTTTCGAGTCCCACCTTCTACATATCTCTAATTC
241 K Y M P G E V V A V R V P L H I S N F
781 CAAATTAACGACTGGCCGGAATTTAGTAAACGCTATGCGTTGATGGTCTGATGCTT
261 Q I N D W P E L S V K R Y A L M V L M L
841 CCCTCAGATAGTCAAGGCAATGGCATGTCATGAGTGAAGTGAAGTGAAGTGGTGTGCT
281 P S D S A R Q W H V H E L E L V E V V A
901 GATCAGGTGGCAGTTGCCCTGCTCATGCTGCTATATTAGAAGAGTCAATGAGGGCAAGG
301 D Q V A V A L S H A A I L E E S M R A R
961 AATCTTCTAATTGAGCAGAATGTTGCCCTTGATCTGGCCAGGAGGGAAGCAGAAACAGCA
321 N L L I E O N V A L D L A R R E A E T A
1021 ATTCGGCTCGCAATGATTTCTTGCTGTTATGAACCACGAGACGAGAATCCTATGCAT
341 I R A R N D F L A V M N H E T R T P M H
1081 GCAATTATTGCATTTCTTCCTTGCTACAAGAAACAGAGCTGACTGCTGAGCAACGCCTG
361 A I I A L S S L L Q E T E L T A E Q R L
1141 ATGGTTGAGACAATTAAGAGTAGCAATCTTTGGCTACACTCAAATGATTAATGATTA
381 M V E T I L K S S N L L A T L I N D V L
1201 GATCTTCCAGGTTGAAGTGGAGCCTTCAACTTGACATAGGCACTTTTAACTTCAT
401 D L S R L E D G S L O L D I G T F N L H
1261 TCTGTATTGAGAGGTCATAACTTAATCAAGCCTGTTGCATCAGTCAAAAAGTTGATG
421 S V F R E V H N L I K P V A S V K L M
1321 GTTATGTTAACTTAGCTCCAGATTTGCCAGTATATGCTGTTGGTGATGAAGAACGCCTT
441 V M L N L A P D L P V Y A V G D E E R C L
1381 ATGCAAATCTTTTAAATGTTGTTGGTAATGCTCAAGTTCTCAAAGAGGGCAGCATC
461 M Q I G L L N V V G N A V K F S K E C G S I
1441 TCAGTGGCTGCTTTGTTGCGAAAGTAGAATCCTTAAGAGATTTTCGAGCTCGGATTTT
481 S V A A F V A K V E S L R D F R A P D F
1501 TTTCCAATGCCAAGTGATGTCACCTTCTATTGCGTGTACAGGTCAAAGATTCGTGATCA
501 F P M P S D C H F Y L R V Q V K D S G S
1561 GGAATTAGCCCCAAGATATCCTAAGTTATCACCAAATTTACTCAAACCTCAACCATTG
521 G I S P Q D I P K L F T K F T Q T Q P L
1621 GCAACTCGAAATCTGGTGGTAGTGGACTGGTCTAGCAATCTGTAAGAGGTTGTAAAT
541 A T R N S S G S G L G L A I C K R F V N
1681 CTTATGGAGGACATATATGATGAGAGTGAAGGCTTGGCAAGGGATGACTGCCAGT
561 L M E G H I W I E S E G L G K G C T A S
1741 TTCATTGTGAACTCGGATTTCTGAGCGATCAAATGAATCGAAGCCGCCTTTTGCACCT
581 F I V K L G F P E R S N E S K P P F A P
1801 AAGGGTCAAGTAATCATGCTCAAACAAATTTCCAGGGCTGAAAGTTATTGTTATGGAT
601 K G Q A N H A Q T N F P G L K V I V M D
1861 GAAAATGGGTTAGCAGGACCGCAACGAAGGGGCTTCTTGTGCACCTTGGATGTGATGCA
621 E N G V S R T A T K G L L V H L G C D A
1921 ACAACTGTAAGCTCAAGTGAATGCTTGCCTGTTGTTTCTCAGGAACACAGGTTAGTT
641 T T V S S S D E C L R V V S O E H R V V
1981 TTCATGGATGTGAACCAATGGTTATGAAGTGCAGTCCGGCTACATGAAAAATTCGCA
661 F M D V N T N G Y E L A V R L H E K F A
2041 AAACGCCATGAAAGACCATTAATAGTAGCGCTTATCAGTACCACAGACAGGCCACCAAG
681 K R H E R P L I V A L I S T T D K A P K
2101 GAGAATGCATGAGGTTGGTATGGATGGATATACTTAAGCCTCTTTTCAGTGTATAAAA
701 E N C M R V G M D G V I L K P L S V D K
2161 ATGAGGAGTGTATTATCTGAATTAAGTACACCCGGGTTCTTTTGGGCCAATGTAAcct
721 M R S V L L E H R V L L G F M
2221 atagcaaaactgactacacgaggcaattctaaagctgaaccraaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa
2281 aaaaaaaaaa

图 3 ZjETR1 的核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列

划线为 N 端 3 个跨膜的结构域位置。

Fig 3 The nudeotide and deduced amino acid sequences of ZjETR1

Three N-terminal hydrophobic transmembrances are underlined



2.3 ZjERS1编码基因的克隆

根据 *ZjERS1* 已知序列设计特异引物 P3-3, 与 B26通过巢式 PCR 获得一个 1 054 bp大小的基因片段, 测序结果分析表明该片段为 *ZjERS1* 的 3端编码区序列和 3 UTR。采用简并引物 P5-2和特异引物 P6扩增得到了 437 bp的 *ZjERS1* 5端编码区序列 (图 2)。

用 ContigExpress软件将以上 3个序列进行拼接, *ZjERS1*为 2 139 bp, 包含一个 1 896 bp的 ORF 及 240 bp的 3 UTR。该基因编码 632个氨基酸 (图 4), 推测的分子量为 70.5 kD, 等电点为 6.68。

```

1 ATGGAGTCATGTGATTGCATTGACACACAATGGCCCCTGATGAACCTTCTGGTGAATAT
1 ME S C D C I D T O W P P D E L L V K Y
61 CAATACATATCCGACATCTTAATCGCCCTTGCATATTTCTCCATTCGCCCTGGAGCTTATA
21 Q Y I S D I L I A L A Y F S I P L E L I
121 TATTTTCGTTCAAAAATCTGCATTCTCCCTACAGATGGGTGCTTGTTCATTTGGTGTCT
41 Y F V Q K S A F F P Y R W V L V Q F G A
181 TTCATTGTCCTTTGTGGAGCAACCCTTCATAAATTTGTGGACGTTCTCTGCAATAT
61 F I V L C G A T H F I N L W T F S M Q Y
241 AAAGCTGTTGCTGTGGTGATGACAGTTGCAAAGATTTTCATGTGCTATAGTTTCGTGTGCA
81 K A V A V V M T V A K I S C A I V S C A
301 ACTGCATTAATGCTTGTTCACATTATACCTGACTTGTAAAGTGTCAAAACCTCGGGAATTG
101 T A L M L V H I I P D L L S V K T R E L
361 TTTCTGAAGAACAAGGCTGAAGAGCTTGACAGGGAGATGGGCATTATTCTGACTCAAGAA
121 F L K N K A E E L D R E M G I I L T Q E
421 GAAACTGGAAGGCATGTTAGAACTGCTGACTCAGCAAATTAGAAGCACACTCAACAGACAT
141 E T G R H V R M L T H E I R S T L N R H
481 ACGATTGTAACCACTCTTGTAGCTTGGTAGGACTTTAGGCCCTGGAGGAATGTGCA
161 T I L N T T L V E L G R T L G L E E C A
541 TTGTGGATGCCATCCGAAACTGGTTCGAATCTACAACCTTCTCATACTTAAATTACCAA
181 L W M P S E T G S N L Q L S H T L N Y Q
601 ATTCAAGTTGGGTGCTGTGCCAATAAACCTTCCCATAGTCAATGAAGTTTTCATAGT
201 I Q V G S V P I N L P I V N E V F N S
661 GCTCAAGCAATGCGTATTCCCTACACTGCCCACTGGCAAGAATCAGACCCTTGTGGGA
221 A Q A M R I P Y T C P L A R I R P L V G
721 AGATACGTGCCACCAGAGGTTGTCGCTGTGCGGGTACCACCTTTAAATCTCTCAAATTC
241 R Y V P P E V V A V R V P L N L S N F
781 CAAATGAATGATTGGCCTGATCTCTGCAAAAAGCTATGCAATCATGGTTTTGATTCTT
261 Q M N D W P D L S A K S Y A I M V L I L
841 CCAACGGATGGTCTAGAAAATGGAGGGACTACGAATTAGAACTTGTGATGTTGTGCA
281 P T D G A R K W R D Y E L E V D V V A
901 GACCAGGTGACAGTTGCTCTTTCACATGCAGCTATTTTGAAGAGTCTATGCGGACCCGT
301 D Q V A V A L S H A A I L E E S M R A R
961 CAGCAGCTCGTGGACCAGAATCTTGCTTTAGATCGAGCTCGACGAGAAGCAGAAACGCA
321 Q Q L V D Q N L A L D R A R R E A E T A
1021 ATCCATGCTCGAATGATTTCCTTTCAGTGCATGAACCATGAAATGAGAATCCCGATGCAT
341 I H A R N D F L S V M N H E M R T P M H
1081 GCAATCATTGCATTGCTTCACTTCTTTAGAGACTGACCTAECTCCAGGCAAAAGGGTT
361 A I I A L S S L L L E T D L T P E Q R V
1141 ATGATAGAGACAGTATTA AAAAGTAGTAACCTTTTGGCAACCCTTATTAATGATGTTTTA
381 M I E T V L K S S N L L A T L I N D V L
1201 GATCTTTCAAGGCTTGAAGATGGAAGCTTGAATTAGATATTGGAACATTTCAACCTTCAT
401 D L S R L E D G S L E L D I G T F N L H
1261 GGAGTTTTTCAGAGAGGTTGTAATTTGATTAACCAAGTTGCATCTGTAAAAAGTTACCA
421 G V F R E V V N L I K P V A S V K K L P
1321 GTGACTCTGATTCTGGCCCCAGATTTACCTTTCTCTGCTATTGGTGATGAGAAAACGACTC
441 V T L I L A P D L P F S A I G D E K R L
1381 ATGCAAATCTCTTAAATATTGTCGTAATGCTGTGAAGTTTACAAAACAGGTTATGTT
461 M Q T L L N I V G N A V K F T K A G Y V
1441 TCAATTATAGCATCTATTGCAAACCAGAATCTATAAGAGAGTGGCGACCTCCTGAATTT
481 S I I A S I A K P E S I R E W R P P E F
1501 TACCAGTATCAAGTGAAGGCCACTTCTATGTTCAAGTTCAGGTTAAGGATTCGGTTGT
501 Y P V S S E G H F Y V O V O V K D S G C
1561 GGAGTTTTCCCATCAAGATATCCAAATCTTTTCAACAAGTTTGCTCTGCCCGGAAGTGA
521 G V S H Q D I P N L F N K F A L P R A S G
1621 TCAAGTAAGATCAATGGCAGTACTGGACTCGGACTTGCCATTTCTAAACGGTTCGTAAT
541 S S K I N G S T G L G L A I S K R F V N
1681 CTCATGGGAGGTCAATATGGATTGAAAGCGAGGGAATTGACAGAGGGAGCACTGCTACG
561 L M G G G H I W I E S E G I D R G S T A T
1741 TTTATTGTGAAACTCGGCATATGCAACAATGAGCAACAGGTAGCAGCACCTAAAGGACGA
581 F I V K L G I C N N E Q V A A P K G R
1801 CCAAATCATGGTAGTGGCGATCTAGTTGGACATAAAGCAATCTTCAGAGATGGTGATGGA
601 P N H G S G D L V G H K A I F R D G D G
1861 TTACGTTTCTCTCATCCAGTTATCAAAGAGTCTTTGAGtgggcaatgaggggtgacatc
621 L R F S H P R Y Q R S L *
1921 atggcaatattagttccatattgggggattttgtgtgtagtaattggggcttctagcaaa
1981 gcactatacgaatcagcagagcctgtacataattttgggatcaaggcaaggcctgcta
2041 accatgcaacaagtgcgttgttgatggtatcttcgacacataataatttttttttctaaa
2101 aaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaaa

```

图 4 *ZjERS1*的核苷酸序列和由此推导的氨基酸序列
划线为 N端 3个跨膜的结构域位置。

Fig. 4 The nucleotide and deduced amino acid sequences of *ZjERS1*
Three N-terminal hydrophobic transmembrances are underlined

2.4 ZjETR1和 ZjERS1序列分析

序列分析表明，ZjETR1和 ZjERS1的氨基酸序列 N端均存在 3个跨膜的结构域（图 3、4），符合 ETR1类乙烯受体的特点。

ZjETR1与苹果、柑橘、桃、草莓等植物的 ETR1亚类乙烯受体均具有 80%以上同源性，其中与桃 PpETR1高达 90.3%；而 ZjERS1则与苹果、桃、草莓等植物已知的 ERS1亚类乙烯受体氨基酸序列具有 80%左右同源性，可以确认它们均为冬枣的乙烯受体。

系统树分析表明，ZjETR1和植物的 ETR1亚类乙烯受体位于一组，而 ZjERS1则位于 ERS1组中（图 5）。

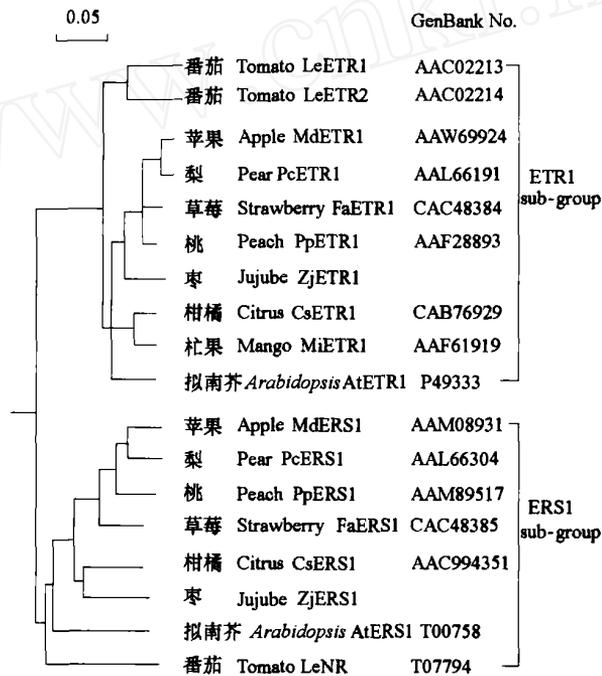


图 5 一些植物 ETR1类乙烯受体蛋白系统树

Fig. 5 Phylogenetic tree of some ETR1-like plant ethylene receptors

3 讨论

植物激素的生理效应最终通过其感受和信号转导过程实现。乙烯受体是乙烯信号转导的初始组分，位于细胞的内质网上，与 CTR1 协同负调控乙烯反应（Guo & Ecker, 2004）。

以往乙烯的研究主要集中于跃变型果实中，但非跃变型果实同样也能产生乙烯。近年来乙烯信号转导研究也开始转向草莓和柑橘等非跃变型果实，相关研究的深入有助于我们正确认识乙烯在果实成熟中作用。

乙烯受体在植物中由多基因家族所编码。根据其编码蛋白结构不同，可分为 ETR1和 ETR2家族两大类。ETR1家族又可分为 ETR1亚类和 ERS1亚类，它们主要区别在于是否存在反应调节器结构域。

各乙烯受体在植物中的表达模式具有明显差异。番茄 *LeETR1*在果实发育进程中组成型表达，基本不受乙烯的诱导，而 *NR*则在成熟果实中表达明显增加，并受乙烯的诱导（Lashbrook et al., 1998）。

草莓中 3 个乙烯受体在不同成熟阶段的果实中的表达模式也明显不同：其中两个 ETR1 类受体 (FaEtr1 和 FaErs1) 表达水平随着果实成熟进程持续增加, 而 ETR2 类受体 (FaEtr2) 则在白熟期果实中达最高水平 (Traninotti et al, 2005)。

我们采用同源基因克隆策略克隆了两个乙烯受体基因保守区 cDNA 片段, 在此基础上, 进一步获得了 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 的乙烯受体编码基因序列。

通过对两个序列进行分析和同源性比较, 表明 *ZjETR1* 和 *ZjERS1* 分别为 ETR1 亚类和 ERS1 亚类受体。此外, 我们还从冬枣中成功分离了一个 ETR2 类的乙烯受体基因 (待发表)。我们将重点分析这几个乙烯受体基因在冬枣果实不同时期的表达特性及其调控规律, 以便为果实成熟、衰老的控制提供更为科学的依据。

References

- Bassett C L, Artlip T S, Callahan A M. 2002. Characterization of the peach homologue of the ethylene receptor, PpETR1, reveals some unusual features regarding transcript processing. *Planta*, 215 (4): 679 - 688.
- Ciardi J A, Tieman D M, Lund S T, Jones J B, Stall R E, Klee H J. 2000. Response to *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* in tomato involves regulation of ethylene receptor gene expression. *Plant Physiology*, 123: 81 - 92.
- Cin V D, Danesin M, Boschetti A, Dorigoni A, Ramina A. 2005. Ethylene biosynthesis and perception in apple fruitlet abscission (*Malus domestica* L. Bork). *Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2995 - 3005.
- Guo H, Ecker J R. 2004. The ethylene signaling pathway: new insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7: 40 - 49.
- Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2995 - 3005.
- Katz E, Laguunes P M, Riv J, Weiss D, Goldschmidt E E. 2004. Molecular and physiological evidence suggests the existence of a system-like pathway of ethylene production in non-climacteric *Citrus* fruit. *Planta*, 219: 243 - 252.
- Lashbrook C C, Tieman D M, Klee H J. 1998. Differential regulation of the tomato *ETR* gene family throughout plant development. *Plant Journal*, 15: 243 - 252.
- Rasori A, Rupert B, Bonghi C, Tonutti P, Ramina A. 2002. Characterization of two putative ethylene receptor genes expressed during peach fruit development and abscission. *Journal of Experimental Botany*, 53: 2333 - 2339.
- Salzman R A, Fujita T, Zhu-Salzman K, Hasegawa P M, Bressan R A. 1999. An improved RNA isolation method for plant tissues containing high levels of phenolic compounds or carbohydrates. *Plant Molecular Biology Reporter*, 17: 11 - 17.
- Tieman D M, Taylor M G, Ciardi J A, Klee H J. 2000. The tomato ethylene receptors NR and LeETR4 are negative regulators of ethylene response and exhibit functional compensation within a multigene family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 5663 - 5668.
- Traninotti L, Pavanello A, Casadoro G. 2005. Different ethylene receptors show an increased expression during the ripening of strawberries: does such an increment imply a role for ethylene in the ripening of these non-climacteric fruits? *Journal of Experimental Botany*, 56 (418): 2037 - 2046.
- Wilkinson J Q, Lanahan M B, Yen H C, Giovannoni J J, Klee H J. 1995. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by Never-ripe. *Science*, 270: 1807 - 1809.