



柿果萼 ABA 生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及 ABA 对柿离体幼果乙烯的调节

冷平^①, 张光连^②, 李祥欣^②, 王良合^③, 郑仲明^③

① 中国农业大学农学与生物技术学院, 北京 100193;

② 北京市科学技术委员会, 北京 100035;

③ 北京市房山区林业局, 北京 102400

* 联系人, E-mail: pleng@cau.edu.cn

2009-02-02 收稿, 2009-05-05 接受

北京市科学技术委员会重大项目(编号: D0706002000091)及北京市自然科学基金(批准号: 6052013)资助

摘要 柿子通常被归类为呼吸跃变型果实。然而, 与典型的跃变型果实不同, 它表现出独特的跃变特性, 即越早期采下的果实, 乙烯产生量越大。为了弄清柿离体幼果的乙烯生成及诱导机制, 从果萼中克隆了 1 个编码 ABA 生物合成关键酶基因(*DK-NCED1*)的 cDNA 片段, 并分析其在离体幼果中的表达及其产物 ABA 对乙烯生成的影响。结果显示, 幼果采后置于室温下, 萼片首先失水, 其 *DK-NCED1* 基因于采后第 1 天开始表达, 并伴随着 ABA 的快速积累, ABA 在采后第 2 天达到峰值, 然后下降。果萼中 *DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因从采后第 2 天开始表达, 乙烯随即诱导产生, 并于第 3 天达到峰值。果实中也存在上述变化模式, 但各项指标均比果萼晚 1 d, 且果肉硬度从采后第 4 天急速下降, 并于第 6 天完全软化。外源 ABA 或 NDGA (一种 *NCED* 酶抑制剂)对离体幼果 *DK-NCED1* 基因的表达无影响, 但却促进或抑制了果实中乙烯合成酶基因 *DK-ACS2* 及氧化酶基因 *DK-ACO1* 的表达及其乙烯的生成, 促进或延迟了幼果的软化。结果表明, 柿幼果采后, 失水胁迫诱导了果萼中 *DK-NCED1* 基因的表达, 并诱导 ABA 的快速积累; ABA 达到一定值后触发乙烯生物合成酶基因 *DK-ACS2* 和氧化酶基因 *DK-ACO1* 基因的表达, 乙烯随即生成并扩散至果肉, 作为二级信号刺激果肉中乙烯的合成, 并引发乙烯的跃变, 使果实软化。

关键词

柿
DK-NCED1 基因
ABA
乙烯
失水
萼片

根据果实在成熟及后熟过程中呼吸速率和乙烯生成量的变化, 可将果实分为跃变型和非跃变型两种类型^[1]。柿果(*Diospyros kaki* Thunb.)为呼吸跃变型果实^[2~4], 其在成熟时有乙烯高峰出现, 且能被外源乙烯诱导发生乙烯的自我催化, 从而促进果实成熟。但与典型的呼吸跃变型果实不同, 它的幼果采后可产生大量的乙烯^[5]。例如, “磨盘柿”在花后 70 d 的幼果期采下后室温下放置 3 d 能产生多于 $10 \text{ nL} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 的乙烯, 并伴随着果实的软化和柿蒂的脱落。但是采

收期的果实室温下放置 8 d 才产生乙烯, 且乙烯的量不足幼果期的 1/10。近期研究表明, 离体柿幼果乙烯的生物合成起始于果萼, 果实失水诱导了萼片中 *DK-ACS2* 基因的转录表达^[6]。萼片中产生的乙烯扩散到其他部位组织中, 并且作为二级信号刺激这些部位中乙烯的生物合成, 从而引发乙烯高峰的出现。然而, 幼果中萼片失水与果实乙烯产成之间的内在联系和调节机制尚不十分清楚。

近年来的研究结果显示, 生物的和非生物的因素都

引用格式: 冷平, 张光连, 李祥欣, 等. 柿果萼 ABA 生物合成关键酶基因 *NCED* 的克隆及 ABA 对柿离体幼果乙烯的调节. 科学通报, 2009, 54: 2082~2088
Leng P, Zhang G L, Li X X, et al. Cloning of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) gene encoding a key enzyme during abscisic acid (ABA) biosynthesis and ABA-regulated ethylene production in detached young persimmon calyx. Chinese Sci Bull, 2009, 54, doi: 10.1007/s11434-009-0486-7

能导致乙烯的产生,生物因素如果实成熟、衰老、种子萌发等,而非生物因素包括植物激素、机械伤害、重金属、水分胁迫、冷害、高二氧化碳浓度等^[7,8]。树上的果实可以源源不断地从树体获取水分,而果实一旦离体,就不能补充由于呼吸导致的水分散失。所以离体幼果会受到失水胁迫,并诱导产生乙烯^[6]。由于ABA参与植物生长过程中的诸多生理活动,尤其在植物对逆境胁迫如干旱、盐碱和低温的响应中起作用,推测在上述离体幼果产生乙烯过程中,应有ABA的积极参与。目前,ABA的生物合成途径、ABA的生理功能及其信号传导途径等项研究均已取得了很大进展。生化与遗传研究已经证明,9-顺式-环氧类胡萝卜素双加氧酶(9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, NCED)是高等植物ABA生物合成途径的关键酶^[9~11]。自NCED基因从玉米的vp14突变体中分离出来后,已有若干NCED基因cDNA从豌豆^[12]、豇豆^[13]、鳄梨^[14]、拟南芥^[9]、柑橘^[15]等植物上克隆并鉴定,形成了NCED基因家族。目前,关于该基因的研究主要集中在植物对干旱等逆境的抗性机制和信号传导上^[11,16]。而NCED基因在果实中的表达只在鳄梨、柑橘、番茄和桃^[17~21]上有报道。目前,NCED基因在果实中对ABA生物合成的调控及其对果实发育与成熟的作用尚不清楚。

本研究从柿果萼中克隆NCED基因片段,并分析NCED基因在离体幼果中表达及其对ABA合成的调节,ABA对幼果乙烯生成的影响,为探讨离体幼柿的软化机理提供依据。

1 材料与方法

() 材料。供试品种为栽种于中国农业大学柿子种质资源圃中8年生“大核无”品种。花期挂牌,于盛花后60~80 d期间采摘成熟度和大小一致、无病虫害和损伤的果实为试材。克隆载体pGEM-T Easy试剂盒、Oligo(dT)₃₀、Taq酶和反转录试剂盒(MarathonTM cDNA Amplification Kit)均购自TaKaRa生物工程有限公司。胶回收试剂盒、感受态大肠杆菌DH5α购自北京天根公司。

() 柿果萼NCED基因克隆、测序。采用Hot Borate方法^[22],从花后60 d(2008年7月10日)幼柿果萼中提取总RNA,再用Oligo(dT)₃₀(按使用说明)从总RNA中纯化出poly(A)⁺ RNA。按试剂盒(MarathonTM cDNA Amplification Kit)的使用说明书进行反

转录,生成cDNA,扩增目的基因。NCED基因扩增引物根据基因库中登录的其他植物的NCED基因保守区设计,上游引物为5'-TCGACGGCGACGGATGGTT-CA-3',下游引物是5'-TCCCAAGCATTCCAGAGGTGGAAA-3'。DK-ACS(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase)基因扩增上游引物为5'-ATGGGIYYIG-CIGARAAYCAGYTI-3',下游引物是5'-AAAIACICKR-AAACCAICCGGYTC-3',DK-ACO1上游引物为5'-TCA-TGAAGGATTTTGCTGAAAGGTT-3',下游引物是5'-TTCAGGGCAGCATACAGCTT CATG-3',引物由上海英俊生物技术有限公司合成。

取分离得到的poly(A)⁺ RNA 2 μg,使用反转录试剂盒在37 ℃ 60 min合成cDNA第一链。以此产物为模板,进行PCR扩增。反应总体积50 μL,其中Taq DNA聚合酶(5 U/μL) 0.25 μL, dNTP混合物(2.5 mmol/L) 4 μL。反应条件:94 ℃, 3 min; 94 ℃, 1 min, 50 ℃, 2 min, 72 ℃, 3 min, 35循环;最后延伸10 min。将PCR产物用纯化回收试剂盒(GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit, Amersham)回收后,连接到pGEM-T载体上,转化大肠杆菌DH5α,并涂布在含有50 mg/mL Amp, IPTG和X-gal的LB平板上,筛选出阳性克隆。按照试剂盒(Wizard[®] Plus SV Minipreps DNA Purification System)(Promega)的使用说明书进行质粒提取与纯化。用EcoR酶切质粒,电泳鉴定,选择插入片段大小正确的质粒送上海英俊生物技术有限公司进行测序。利用DNAMAN等软件将克隆所得序列与GenBank库上已发表的番茄、柑橘和鄂梨等序列进行同源性比较分析。

() 离体幼果室温下失水途径和失水率调查。2008年7月15日(花后65 d),随机采下“大核无”柿子100个,运回实验室后立即单果标号并按标号称出每个果重。然后分成10组,每组10个果,放在实验室内(约20 ℃,相对湿度40%~55%)。先取一组,分别称出果实和果萼(萼片和萼托)部分重量。然后每天使用一组果实,先按标号称整个果重,再将果实分成果实和果萼两部分,分别称重。最后分别取果肉和萼片,切成0.5~0.8 cm³的小块,液氮速冻后-80 ℃保存备用。

另取果实进行果实表面、萼片和萼托表面气孔观察并计算密度。采用徒手切片法,用刀片在果实的不同部位(果颊、果顶、果肩、缝合线处等)划约0.5 cm×0.5 cm左右大小的面积,撕取表皮在400倍普通光学显微镜下观察气孔的个数。气孔密度=气孔个数/表皮面积。

() 离体幼果室温下自然软化过程中果实硬度、ABA 和乙烯生成以及相关基因表达. 2008年7月20日(花后70 d), 随机采下“大核无”柿子70个, 运回实验室后, 然后分成7组, 每组10个果(其中5个为对照), 摆放在实验室内(约20℃, 相对湿度40%~55%). 每天使用一组果实, 先测乙烯, 然后将果实分成果实和果萼(萼片和萼托)两部分, 分别测定果实和果萼部分的乙烯. 之后, 测果肉硬度, 再分别取果肉和萼片, 液氮速冻后-80℃保存, 用于测 ABA 含量和提取 RNA. 对照果实同样放在室温下, 但用透气保鲜膜单果包装, 以防止果实失水.

() 外源 ABA, NDGA 处理对离体幼果 ABA, 乙烯生成及相关基因 *NCED*, *ACS* 和 *ACO* 表达的影响. 2008年7月27日(花后77 d), 随机取“大核无”柿子105个果, 分成3组, 放在实验室内(约20℃, 相对湿度40%~55%). 第1和第2组分别用100 μmol/L ABA 或100 μmol/L NDGA 溶液浸泡30 min, 第3组用蒸馏水浸泡30 min, 作为对照. 自28号开始, 每天取样, 先用气相色谱法测乙烯的释放量. 然后将果实分成果肉和果萼两部分, 分别测定乙烯. 然后再测果肉硬度, 并取样放入液氮中速冻后, 立即放入-80℃超低温冰箱内保存, 用于测定 ABA 含量和提取 RNA.

() Northern 分析. 按地高辛探针合成试剂盒(Boeringer Mannheim, Germany)的使用说明书, 通过 PCR 方法, 分别将本研究克隆到的 *DKNCED1*, *DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因片段作成探针. 按前述方法提取总 RNA. 每个处理取5 μg 总 RNA, 经含2.5%(体积比)甲醛的1%琼脂糖凝胶电泳分离后转移至尼龙膜(Biodyne B Membrane, Pall, USA)上. 上述探针的杂交温度为43℃, 过夜杂交后, 尼龙膜先用2×SSC溶液37℃洗2次, 每次10 min; 再用0.1×SSC溶液洗2次, 每次30 min. 荧光显色反应采用 CDP-StarTM 做显色剂, 依照试剂说明书进行. 最后在暗匣中用 FUJI 医用 X 光片曝光(日本富士胶片).

() 脱落酸的提取与测定. 样品中 ABA 含量测定采用高效液相色谱(Agilent 19091J-413)法. 称取果肉1 g, 加入8倍量80%甲醇(4℃)浸泡、匀浆、4℃过夜. 然后4℃下18800×g离心10 min, 得上清液, 残渣用甲醇(1:5)重复提取2次, 离心得上清液. 上清液合并后加入PVPP(0.2 g/g), 离心, 上清液过C₁₈柱, 流出液浓缩干燥后加入1 mL磷酸缓冲液pH 3.0溶解, 用

乙酸乙酯等体积萃取3次, 真空浓缩机除去乙酸乙酯后用无水乙醇将其溶解, 0.4 μm 微孔滤膜过滤后置暗处备用. 色谱柱为 Eclipse XDB-C18 (Agilent, USA), 6.0 mm × 150 mm; 流动相为无水乙醇, 流速为1.0 mL/min, 波长210 nm. 进样量为10 μL. 外标法定量.

() 乙烯释放量测定. 将5个柿幼果密封在3.8 L的容器中, 20℃下放置1 h; 或将果萼密封在500 mL广口瓶中, 20℃下放置15 min. 从容器中抽取1 mL气体注入气相色谱仪(Agilent, 6890N, USA)中测定. 乙烯释放量的单位为 nL·g⁻¹FW·h⁻¹. 气相色谱柱为 Agilent 19091J-413, HP-5 毛细管柱, 柱长30 m. 氢火焰离子探测器检测, 载气 N₂, 压力0.6 kg/cm², 燃气 H₂, 流量40 mL/min; 检测器温度150℃, 柱温80℃, 进口样温度120℃. 实验重复3次.

() 果肉硬度的测定. 果肉硬度用日本产果实硬度计(Fujihara Co)在果实赤道处去皮测定(探头直径11 mm, 测定深度8 mm). 每个处理3个重复, 每个重复10个果实, 每个果实测两点(平均值±标准误).

2 结果

2.1 果萼 *NCED* 基因的克隆和测序

从花后60 d左右的果萼中获得一条 *NCED* 的 cDNA 片段. 将 PCR 产物纯化后克隆到 pGEM-T 载体上, 委托上海英俊生物技术有限公司测序, 得到一条740 bp的核苷酸序列(图1). 经 Blast 比对结果显示, 所得 DNA 序列与番茄的同源性为72.57% (位于番茄 *LeNCED1* 的540~1280 bp, GenBank 登录号为: Z97215), 与 *VvNCED1* 为71.08%同源(位于葡萄 *VvNCED1* 的623~1363 bp, GenBank 登录号为: AY337613), 与柑橘、鄂梨等的序列同源性均在70%以上, 证明所克隆片段为 *NCED* 基因的一部分, 定名为 *DK-NCED1*, 登录号: EU925812. 另外, 克隆了1个 ACC 合成酶基因(*DK-ACS2-like*)和1个 ACC 氧化酶基因(*DK-ACO1-like*)的 cDNA 片段. 经测序得知, *DK-ACS2-like* 为983 bp, 与 *DK-ACS2* (登录号: AB073006) 99%同源(位于 *DK-ACS2* 的283~1270 bp). *DK-ACO1-like* 为520 bp, 与 *DK-ACO1* (登录号: AB073008) 98%同源(位于 *DK-ACO1* 的400~920 bp). 将上述3个基因片段制备成 DNA 探针, 为后面的 Northern blot 做准备.

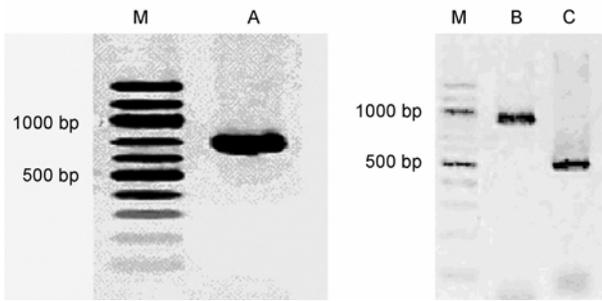


图1 柿果萼 *DK-NCED1*, *DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因片段的克隆

M, DNA 标记; A, *DK-NCED1*; B, *DK-ACS2*; C, *DK-ACO1*

2.2 离体幼果室温下失水途径和失水率调查

调查发现, 柿子果实表面有较厚的角质层和蜡质层, 没有气孔. 萼片上有气孔, 同叶片上的气孔相似, 萼片背面和正面的气孔密度有很大差异, 背面的气孔密度为 5.62 个/mm², 正面为 1.70 个/mm². 萼托表面未发现气孔, 但有绒毛存在. 观察结果表明, 柿果主要通过萼片上的气孔向外散失水分. 我们将果实萼片蜡封后, 柿果实失水减缓, 摘除萼片则失水加快, 证明萼片是柿果采后蒸腾失水的主要途径.

如图 2 所示, 幼果采下后放在室温下果萼迅速失水. 将刚采下萼片的含水率作为 100%, 则采后第 1 天失水率 16.7%, 第 2 天为 35.7%, 第 3 天为 36.9%, 第 4 天为 45.1%, 第 5 天为 48.5%, 萼片萎蔫. 而果实部分在采下的前 5 D 失水很少. 结果说明, 柿果采后萼片蒸腾失水早于果实, 是整体果实失水的最初部位.

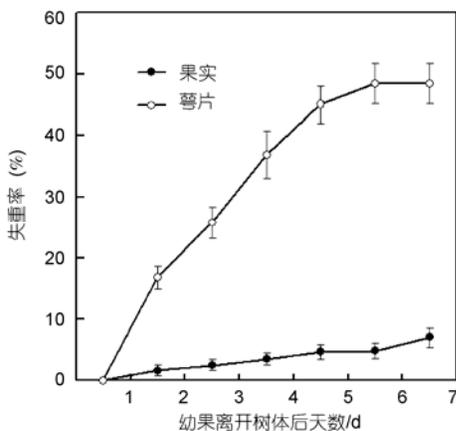


图2 离体幼果室内自然呼吸失水率及蒸腾失水率的变化

2.3 离体幼果室温下自然失水过程中 ABA, 乙烯生成及相关基因表达的变化

柿幼果采后室内放置自然脱水 1 d 即能在柿萼检

测到 *DK-NCED1* 的表达和 ABA 积聚, 第 2 天 ABA 的量达到峰值, 然后下降. *DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因于采后第 2 天开始表达, 乙烯随即合成并于次日达到峰值. 果肉组织也发生了同果萼相同的变化, 但是其 *DK-NCED1* 表达及其产物 ABA 积累、*DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因表达及其产物乙烯的峰值均比果萼滞后 1 d. 果实硬度于采后第 4 天迅速下降(图 3), 萼片在第 5 天脱落, 果实软化. *DK-ACS2* 被认为是诱导型乙烯生物合成酶基因, 本结果显示, 失水胁迫可诱导 ABA 合成酶基因 *DK-NCED1* 的表达, 并触发果实 ABA 的生物合成, 而 ABA 又诱导了乙烯生物合成酶基因 *DK-ACS2* 的表达, 启动了乙烯的生物合成, 致使果实软化.

2.4 外源 ABA 或 NDGA 处理对离体幼果 ABA 和乙烯生成的影响

NDGA 是 ABA 合成关键酶 NCED 的特异阻断剂. 预备实验显示, 柿离体幼果中 ABA 的积累对 NDGA 非常敏感, 失水胁迫可诱导 ABA 的急剧积累, 但随着 NDGA 处理浓度的增加, ABA 积累下降, 100 μmol/L NDGA 可完全阻断 ABA 的积累. 对花后 65 d 的离体果实分别进行外源 ABA 或 NDGA 处理. 结果如图 4 所示, 对照果实在离体后 1 d, 果萼中产生的 ABA 已超过 1000 ng/g 鲜重; 在采后第 2 天开始产生乙烯, 果肉乙烯第 3 天达到高峰. 与对照相比, 施用外源 ABA 或 NDGA 处理, 促进或抑制了果实 ABA 和乙烯的产生, 硬度的下降及萼片的脱落. 结果说明外源 ABA 能够诱导离体幼果中乙烯的生物合成, 促使果实软化.

2.5 外源 ABA 或 NDGA 处理对离体幼柿萼 *DK-NCED1*, *DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因表达的影响

利用 *DK-NCED1*, *DK-ACS2* 和 *DK-ACO1* 基因片段探针, 与失水胁迫下各柿萼样品的总 RNA 进行分子杂交. Northern blot 结果表明, 外源 ABA 或 NDGA 处理对果萼 *DK-NCED1* 基因的表达无显著影响, 但能明显促进(提前 1 d)或抑制(延迟 1 d)果萼中 ACC 合成酶基因 *DK-ACS2* 和 ACC 氧化酶基因 *DK-ACO1* 的表达水平. 结果说明, 失水胁迫下柿萼产生的 ABA 能够通过调节 ACC 合成酶基因 *DK-ACS2* 和 ACC 氧化酶基因 *DK-ACO1* 的表达来触发乙烯的生物合成, 使果实迅速软化.

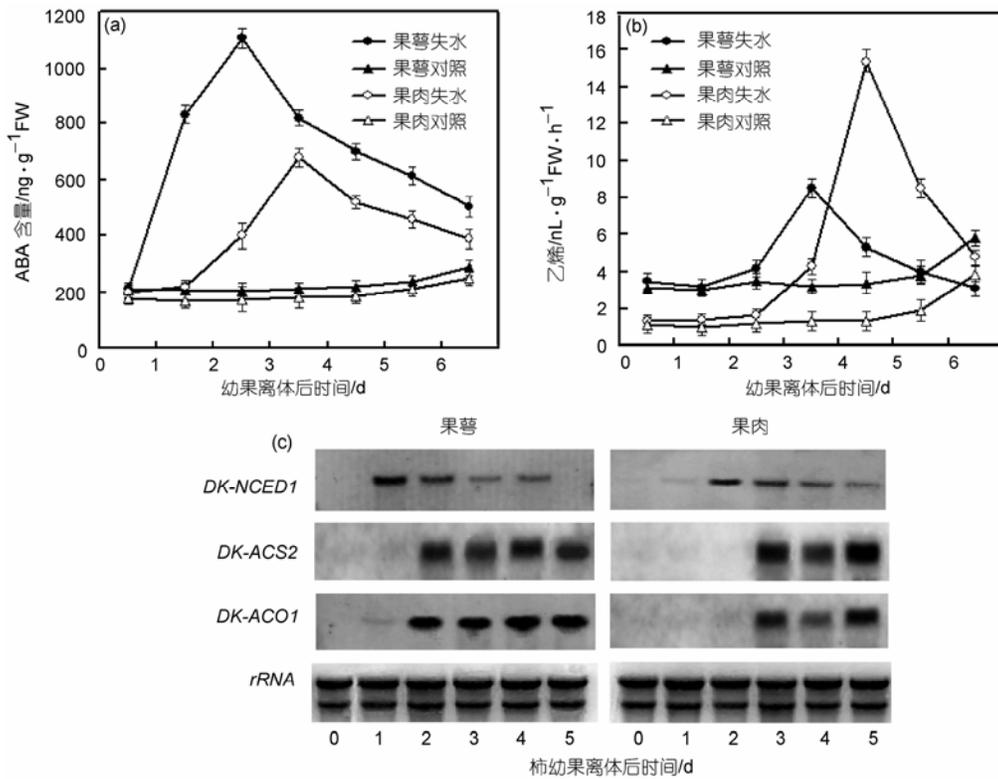


图3 离体柿幼果室温下自然失水过程中 ABA 积累(a)、乙烯生成(b)及相关基因的表达(c) 对照果实同样放在室温下, 但用透气保鲜膜单果包装, 以防止果实失水. (c)为柿离体幼果室内自然脱水不同时间后进行 Northern blot 的分析结果. 各样品上样量为 $5 \mu\text{g}$ 总 RNA, rRNA 的转录水平为内参

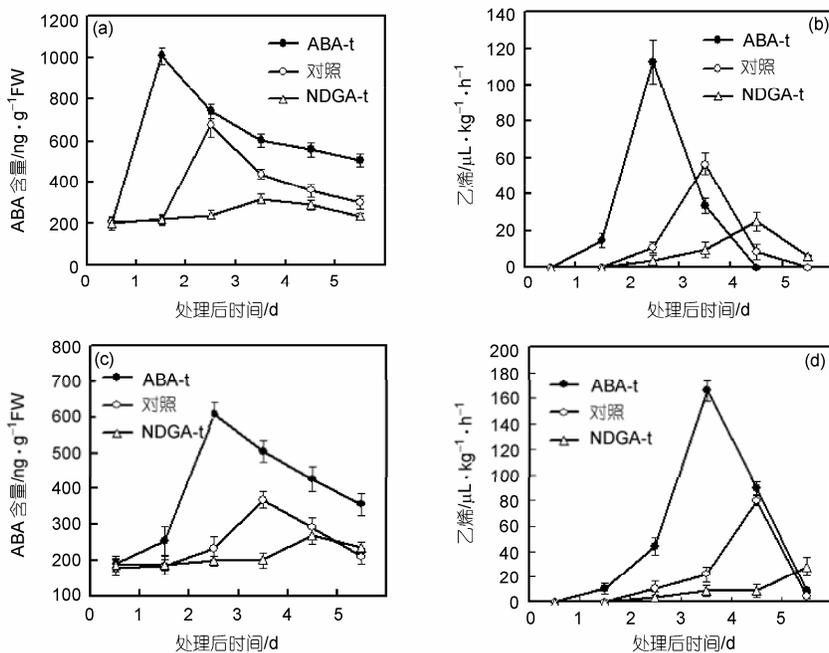


图4 外源 ABA 和 NDGA 处理对离体幼果 ABA 积累和乙烯生成的影响 (a)和(b) 果萼; (c)和(d) 果肉. (a)和(c) ABA 含量; (b)和(d) 乙烯生成量

3 讨论

本研究从柿幼果果萼中分别克隆得到 1 个 *DK-NCED1*, 1 个 *DK-ACS2* 和 1 个 *DK-ACO1* 的 cDNA 片段, 将这 3 个基因片段分别制成 DNA 探针, 通过 Northern blot 分析, 研究了柿幼果离体后内源 ABA 积累与乙烯生成及果实软化之间的内在关系。

结果发现, 柿子果实表面有较厚的角质层和蜡质层, 没有气孔, 但萼片上有大量气孔, 萼托表面未发现气孔, 但有绒毛存在。将萼片蜡封后, 则柿果实失水明显减缓, 证明萼片是柿果采后蒸腾失水的主要途径, 这点与前人的研究结果^[6]一致。失水胁迫诱导了 ABA 合成酶基因 *DK-NCED1* 的表达, 而 *DK-NCED1* 的表达又启动了 ABA 的生物合成(图 3)。离体幼果果萼中 ABA 的积累特点为, ABA 含量达到峰值后, 并不能维持在一个稳定水平而是迅速下降。理论上分析, 失水胁迫下 ABA 的积累达到峰值后, 只要 ABA 合成关键酶基因 *NCED* 能持续表达, ABA 含量即可继续维持较高水平。此外, ABA 生物合成途径中其他合成酶基因的持续表达和相关酶促反应步骤的同步进行, 也是 ABA 积累所必需的。所以 ABA 的持续积累必然依赖于前体库的充足供应。由于树上果实和离体果实 ABA 前体的合成是不同的, 所以受到失水胁迫后其 ABA 积累的特点也就不尽相同了。树上的果实能够源源不断地从母体得到合成 ABA 所需的前体物质, 而离体果实的前体库只能因缺少供应而逐渐衰竭, 因而也就不能长时间维持 ABA 前体的合成。所以离体幼果由失水胁迫诱导的 ABA 一达到峰值就会迅速降下来。研究表明, 葡萄果实内源 ABA 的绝对含量不是启动果实成熟的关键因素, 它还和激素信号受体的数量和活性有关, 少量 ABA 的积累就足以引起生理反应^[23]。本研究结果显示, 柿果萼中由失水胁迫所诱导的 ABA 足以启动离体幼果软化生理生化程序, 使果实迅速软化。ABA 对柿果发育过程的影响是多方面的, 涉及后期发育与成熟的整个过程, 影响时间长, 调控环节多。

柿子的呼吸跃变具有特殊性。与其他果实相比, 柿的萼片相对较大, 而且叶绿素含量高, 光合能力也强于叶片。此外, 萼片上有许多气孔, 是柿果实的气体交换器官。除去柿果实的萼片, 并用凡士林封住伤口, 则能显著降低果实 CO_2 的交换速率, 从而抑制果实的发育。此外, 本研究发现, 萼片还是环境胁迫的感知器官, 它比果实其他部分对胁迫因素更加敏

感, 如对高浓度 CO_2 及盐胁迫等(数据未显示)。

本研究应用 NDGA 特异阻断 ABA 合成关键酶 *NCED*。结果证明, 柿离体幼果中 ABA 的积累对 NDGA 非常敏感, NDGA 是研究柿果发育与成熟过程中 ABA 生理功能的一种良好的 ABA 阻断剂。ABA 合成酶基因的 RT-PCR 分析结果(图 3)显示, 与对照相比, NDGA 处理对 *DK-NCED1* 基因的表达几乎没有影响, 证明在柿果中 NDGA 阻断 ABA 积累是直接抑制了酶的活性。

因为 NDGA 有效地截断了 ABA 生物合成, 也就抑制了植物组织中以 ABA 介导的生理效应, 这为研究 ABA 对果实成熟与衰老的调节过程提供了一个有用的工具。NDGA 处理显著抑制了 ABA 生物合成, 并通过抑制 ACC 合成酶基因的表达来抑制乙烯的产生(图 5), 说明离体柿幼果失水胁迫下组织中乙烯的生物合成是受 ABA 调节的, 乙烯合成酶基因的表达受 ABA 的正向调控。据报道, 萼片中 *DK-ACS2* 基因的表达及其乙烯的产生, 不能被 1-MCP 所抑制。但在本文中, NDGA 处理减弱并延迟了 *DK-ACS2* 基因的表达及其乙烯的产生^[6](图 5)。这些结果表明, 失水胁迫下萼片中乙烯生物合成的诱导不受乙烯调节, 而是受 ABA 调控。ABA 对柿幼果离体后成熟或衰老的调控可能存在两个途径: () ABA 可能参与乙烯上游代谢, 并且这些乙烯上游代谢活动会抑制或激活系统 2 乙烯的合成, 引发成熟或衰老的某些代谢活动, 从而启动果实成熟或衰老过程; () 诱导非乙烯依赖型成熟或衰老基因的表达, 引发果实成熟或衰老过程。本研究结果显示, 离体柿幼果中 ABA 和乙烯这两种调节机制之间存在着互作和交感, 它们共同调节了乙烯生物合成相关酶基因的表达和乙烯的产生, 使果实软化。ABA 与乙烯在柿幼果离体后软化过程中的交感互作及其信号转导关系还有待进一步深究。

此外, 我们用聚乙烯薄膜包装果实来延迟 ABA

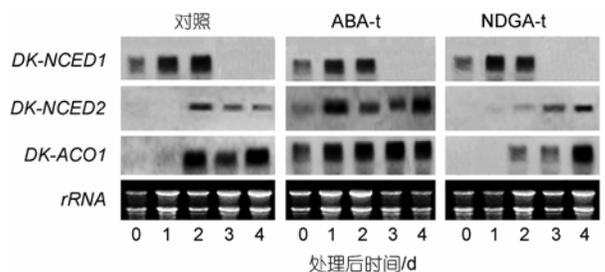


图 5 外源 ABA 或 NDGA 处理对离体柿幼果室内自然失水条件下 *DK-NCED1*, *DK-ACS2* 及 *DK-ACO1* 表达的影响

和乙烯的产生, 延迟果实软化, 发现聚乙烯薄膜包装后的柿幼果, 室温下3周末软(对照5 d已软化), 但是发生了非正常硬化, 原因是否由缺氧引起, 其生理机制是什么等问题还有待进一步调查. 多数柿品种比如磨盘柿, 即使是在最适成熟度采收, 果实依然保持了幼果的上述一些特性, 即在失水条件下会产生乙烯而引起果实的迅速软化. 这也是目前中国果品市场上柿市场占有率低的主要原因之一. 我们现在正在研究利用适当通气又保湿的材料来包装柿子, 延

长其货架期.

柿幼果离体后由于呼吸作用而失水, 失水至某一关键点时, 即产生水分胁迫, 而这一胁迫信号诱导了萼片中 *DK-NCED1* 基因的表达, 并诱导产生 ABA. ABA 进而诱导了乙烯生物合成酶基因 *DK-ACS2* 和乙烯生物合成氧化酶基因 *DK-ACO1* 的表达, 乙烯随即产生. 萼片中产生的乙烯扩散至果肉组织中, 并作为次级信号激活了乙烯自我催化, 产生大量乙烯, 促使果实软化.

参考文献

- Biale J B, Young R E. Respiration and ripening in fruits: Retrospect and prospect. In: Friend J, Rhodes M J C, eds. Recent Advances in the Biochemistry of Fruits and Vegetables. London: Academic Press, 1981. 1—39
- Abeles F B, Morgan P W, Saltveit Jr M E. Ethylene in Plant Biology. San Diego: Academic Press, 1992
- Wills R, McGlasson B, Graham D, et al. Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit, Vegetables and Ornamentals. New York: CAB International, 1998
- Kubo Y, Nakano R, Inaba A, et al. Cloning of genes encoding cell wall modifying enzymes and their expression in persimmon fruit. Acta Hort, 2003, 601: II International Persimmon Symposium
- Takata M. Respiration, ethylene production and ripening of Japanese persimmon fruit harvested at various stages of development. J Jpan Soc Hortic Sci, 1983, 52: 78—84[doi]
- Nakano R, Ogura E, Kubo Y, et al. Ethylene biosynthesis in detached young persimmon fruit is initiated in calyx and modulated by water loss from the fruit. Plant Physiol, 2003, 131: 276—286
- Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. Annu Rev Plant Physiol, 1984, 35: 155—189[doi]
- Morgan P W, Drew C M. Ethylene and plant responses to stress. Physiol Plant, 1997, 100: 620—630[doi]
- Tan B C, Schwartz S H, Zeevaert J A D, et al. Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. Proc Natl Acad Sci USA, 1997, 94: 12235—12240[doi]
- Burbidge A, Grieve T M, Jackson A, et al. Characterization of the ABA-deficient tomato mutant notabilis and its relationship with maize Vp14. Plant J, 1999, 17: 427—431[doi]
- Iuchi, S, Kobayashi M, Taji T, et al. Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant J, 2001, 27: 325—333[doi]
- Qin X, Zeevaert J A D. The 9-*cis*-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 15354—15361[doi]
- Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi K, et al. A stress-inducible gene for 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. Plant Physiol, 2000, 123: 553—562[doi]
- Chernys J T., Zeevaert J A D. Characterization of the 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase gene family and the regulation of abscisic acid biosynthesis in avocado. Plant Physiol, 2000, 124: 343—353[doi]
- Rodrigo M J, Alquezar B, Zacarias L. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). J Exp Bot, 2006, 57: 633—643[doi]
- Thompson A J, Jackson A C, Parker R A, et al. Abscisic acid bio-synthesis in tomato: Regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. Plant Mol Biol, 2000, 42: 833—845[doi]
- Goldschmidt E, Goren R, Even-Chen Z, et al. Increase in free and bound abscisic acid during natural and ethylene induced senescence of citrus fruit peel. Plant Physiol, 1973, 51: 879—882[doi]
- Lafuente M T, Martinez T, Zacarias L. Abscisic acid in the response of fortune mandarins to chilling: Effect of maturity and high-temperature conditioning. J Sci Food Agric, 1997, 73: 494—502[doi]
- Rodrigo M J, Marcos J F, Alferes F, et al. Characterization of pinalate, a novel citrus sinensis mutant with a fruit-specific alteration that results in yellow pigmentation and decreased ABA content. J Exp Bot, 2003, 54: 727—738[doi]
- Zhang M, Yuan B, Leng P. The role of ABA in triggering the ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit. J Exp Bot, 2009, 60: 1579—1588[doi]
- Zhang M, Leng P, Zhang G L, et al. Cloning and functional analysis of 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) genes encoding a key enzyme during abscisic acid biosynthesis from peach and grape fruits. J Plant Physiol, 2009,[doi]
- Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). Anal Biochem, 1994, 223: 7—12[doi]
- 张大鹏, 徐雪峰, 张子连, 等. 葡萄始熟机理的研究: 缓慢生长期外施激素和环剥的效应. 园艺学报, 1997, 24: 1—7