

肉果发育和成熟的转录调控机制

周 峰

(南京晓庄学院 食品科学学院,江苏 南京 211171)

摘 要:肉果是人类饮食中必不可少的一部分,研究肉果成熟和发育的转录调控机制具有重要意义,将为果实品质改良奠定基础。文章首先介绍了肉果早期发育阶段和成熟过程的转录调控,以及乙烯作为一种重要激素在肉果成熟转录调控中的作用。番茄作为研究肉果成熟转录调控的模式植物具有很多优点,重点概述了番茄成熟的转录调控网络和转录因子的作用目标分子,指出 MADS(MCM1 AGAMOUS DEFICIENS SRF)域蛋白 FUL(FRUITFULL)、RIN(RIPENING INHIBITOR)、AP2a(APETALA2a)和 TAGL1(TOMATO AGAMOUS-LIKE1)等转录因子在番茄果实发育和成熟转录调控中的重要作用。

关键词:肉果;发育;成熟;转录调控

中图分类号:S 603.6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2016)07-0194-04

肉果在生物进化中更能吸引食果动物,从而促进种子的传播。它也是人类饮食中必不可少的一部分,研究肉果成熟和发育的转录调控机制具有重要意义。目前,关于果实发育和成熟的研究主要集中在某些基因的功能或某些激素的作用方面。该研究对肉果早期发育阶段和成熟过程的转录调控,以及乙烯作为一种重要激素在肉果成熟转录调控中的作用进行了概述。番茄(*Solanum lycopersicum*)作为研究肉果成熟转录调控的模式植物具有很多优点。文章重点讨论了番茄成熟的转录调控网络、番茄品质的转录调控及转录因子的作用目标分子,这将为果实品质改良奠定基础^[1]。

作者简介:周峰(1978-),男,山东淄博人,博士,副教授,现主要从事植物生理生化等研究工作。E-mail:zfibcas@163.com.

基金项目:国家高技术研究发展 863 计划资助项目(2012AA021701);江苏省自然科学基金青年基金资助项目(BK2012073);江苏省生态学重点学科建设资助项目(2012);南京晓庄学院农产品质量与安全重点实验室资助项目(2015)。

收稿日期:2016-01-04

1 肉果早期发育的转录调控

子房的特性和大小与早期发育阶段的转录因子调控密切相关,而这又决定了最终果实的大小及发育后期和果实成熟的调控。番茄驯化中决定果实大小的主要途径就是增加子房室的数量,驯化使得番茄从野生型的 2~4 个子房室到栽培品种的 8 个或更多子房室。有 2 个基因相关数量性状位点(quantitative trait loci, QTLs)编码转录因子,这些转录因子通过增加心皮的数量形成子房,从而增加子房室的数量。效果最强的基因是在心皮原基中表达的 FAS(FASCIATED)基因,编码 YABBY 转录因子。YABBY 转录因子的主要功能是通过 CRC(CRABS CLAW)基因完成,它参与心皮和蜜腺的发育。另一个 QTL 是室数(*locule number, lc*)基因,由 2 个单核苷酸多态性共同决定^[2]。

花器官特性是由 MADS-box (MCM1 AGAMOUS DEFICIENS SRF)基因转录因子决定的。花器官形成中四轮的特性由 MADS-box 基因协同表达及它们产物的相互作用共同决定。番茄果实的图案、特性和早期发育是由 SQUAMOSA 启动子结合蛋白基因家族

Abstract: Blueberry anthocyanins is the main function factors of blueberry, and it also is a functional food additive in nutrition and coloring. However, the blueberry anthocyanins extremely easily degraded during storage and processing, directly influenced the nutritional value and quality of the products. To provide reference for rational utilization of blueberry anthocyanins, the effects of blueberry processing toward product, including storage, heat treatment, heat treatment, machining method, product type, environment system and food additives, on the stability of blueberry anthocyanins were reviewed from the perspective of the most recent advances on storage and processing.

Keywords: blueberry; anthocyanins; stability

(SQUAMOSA promoter binding protein-like, SPL/SBP) 转录因子调控的。与番茄不同,拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 SPL 基因下调表达对雌蕊决定和心皮数目没有明显影响,这说明番茄中存在特殊的调控机制。由于转化试验及缺少适合的突变体,除了番茄外其它肉质果实早期发育的转录调控研究受到限制。这些基因的功能信息不全或者是只能从在其它物种异源表达获得。例如,桃(*Prunus persica*)的 SHP(SHATTER-PROOF)同源基因 *PpPLE*,能诱导转基因番茄形成类似心皮的萼片。在番茄中异源表达葡萄(*Vitis vinifera*)的 AG (AGAMOUS)同源基因 *VviAG1*,能导致番茄形成肉质萼片^[3]。

2 肉果成熟过程的转录调控

番茄的成熟受由转录因子和乙烯共同组成的复杂网络调控,并且与成熟相关的转录因子调控乙烯的生物合成。MADS 域蛋白 RIN(RIPENING INHIBITOR)、CNR(COLORLESS NON-RIPENING)和 SBP(SQUAMOSA promoter Binding Protein)3 个转录因子在激活果实成熟过程级联效应早期起重要作用。*rin* 和 *Cnr* 突变体能有效阻止成熟过程,并导致果实内不能产生乙烯且对外源施加乙烯不响应^[4]。乙烯自我催化基因 *SlACS2* 和 *SlACS4* 的表达在 *rin* 突变体中受到抑制。番茄 CNR 基因在对与成熟相关的番茄红素合成酶基因 1(*phytoene synthase*, *PSY1*)、脂氧合酶基因 (*LIPOXYGENASE*, *LOX*)和乙烯氧化酶基因 1(*ACC oxidase1*, *ACO1*)起正调控作用。*Cnr* 突变体中番茄红素和其它类胡萝卜素前体的缺失验证了类胡萝卜素合成的消失。通过系统生物学对不成熟突变体 *nor*(*non-ripening*)和 *rin* 位点的作用进行了研究,结果表明 *nor* 比 *rin* 对乙烯介导的成熟过程基因表达具有更全面的作用,其作用位点可能在转录网络调控因子 RIN 的上游。此外,苹果(*Malus domestica*)的 *FRUITFULL*(*FUL*)同源基因 *MdMADS2.1* 与果实成熟过程中的硬度有关。苹果的 *MADS9* 基因是乙烯合成酶基因 1(*ACC synthase1*, *ACS1*)的转录激活子,同时它能转录激活 *ACO1* 的启动子^[4-5]。

3 乙烯对肉果成熟的转录调控

呼吸跃变肉果成熟前的一个特征就是呼吸作用和乙烯合成增强。乙烯信号转导可在多个水平上进行调控。细胞膜上感受乙烯信号的受体如乙烯响应基因 (*ETHYLENE RESPONSE*, *ETR*),能抑制下游的组成型三重反应因子 1(CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE 1, *CTR1*),激活乙烯不敏感 2 正调控因子(*ETHYLENE INSENSITIVE 2*, *EIN2*),进而激活初级转录因子基因 *EIL*(*EIN3/EIN3-like*),促进次级转录因子乙烯响应因

子(*ETHYLENE RESPONSE FACTOR*, *ERF*),最终导致乙烯相关目标基因的表达。*ERF* 在植物发育和果实成熟调控中起重要作用,*LeERF1* 基因正调控番茄幼苗和果实中的乙烯信号转导途径,对 *ERF1* 基因进行 RNA 干涉会延长果实保存期^[6]。*ERFs* 家族的另外一个成员 *Sl-ERF. B3* 转录因子是具有 GCC-box 启动子的转录激活子,调控多个果实成熟相关基因。通过 RNA 干涉抑制另外一个 *ERF* 基因番茄类胡萝卜素调节基因 *SlERF6*,能提高果实成熟过程中的类胡萝卜素和乙烯含量。尽管对番茄 *ERF* 转录因子的目标基因研究较为清楚,但关于它们的乙烯直接响应基因研究较少,未来通过体内染色质免疫沉淀技术及高通量测序等,将逐步揭示 *ERF* 的目标基因^[7]。

4 番茄成熟过程的转录调控网络

番茄作为研究肉果成熟转录调控的模式植物具有很多优点。它是二倍体,已鉴定出一系列的番茄单基因突变体,其重组自交系、遗传作图群体、遗传转化体系已建立起来,且其基因组序列已经破译。此外,一些转录因子只在番茄果实发育中高效和特异表达并调控成熟过程,如 MADS 域蛋白 *TAGL1*(*TOMATO AGAMOUS-LIKE1*)、*MADS1*、*FUL1*、*FUL2* 和 HD-ZIP 同源异形盒亮氨酸拉链蛋白 *LeHB-1*、*AP2/ERF* 蛋白 *AP2a*(*APETALA2a*)。此外,*SlAP2a* 和 *SlMADS1* 是果实成熟的负调控转录因子,其中 *SlAP2a* 负调控乙烯的生物合成和信号转导途径,通过 RNA 干涉抑制 *SlAP2* 基因能改变果实的形状和类胡萝卜素含量,使果实变成橙黄色,加快果实的衰老和乙烯的产生。转录因子 *AP2a* 能调控番茄果实发育和成熟过程的初生和次生代谢、乙烯合成及其信号转导途径和有色体的分化。成熟调控转录因子 RIN 和 CNR 在 *SlAP2* 基因的上游起作用并调控其正表达^[3,8]。

MADS-box 基因 *SlMADS1* 是果实成熟的负调控因子主要在绿色果实中高表达,随着果实成熟其表达逐渐降低。在 RNA 干涉的 *SlMADS1* 基因植株中,果实成熟提早、乙烯含量增加。通过酵母双杂交发现 RIN 蛋白和 *SlMADS1* 蛋白存在交互作用,这表明果实成熟过程中 *SlMADS1* 蛋白通过与 RIN 蛋白的直接或间接作用,抑制乙烯的生物合成。转录因子 *TAGL1* 是果实成熟过程中的正调控因子,也是与 RIN 蛋白交互作用在果实成熟过程中高表达。*TAGL1* 基因敲除的植株,果实变橙黄色、果皮薄、类胡萝卜素含量降低。由于转录因子 RIN 的目标基因 *ACS2* 降低表达,其乙烯产量降低^[9]。另外 2 个与 RIN 相互作用的 MADS 域蛋白是 *FUL1* 和 *FUL2*,但 *FUL1* 和 *FUL2* 基因的沉默表达只引起果实颜色轻微的变化。*FUL1* 和 *FUL2* 蛋白可能在植株中存在

冗余功能,因为对这些基因同时沉默表达会引起番茄红素含量的明显降低导致果实变黄。此外,*FUL*基因的表达还参与细胞壁修饰、角质层挥发型物质的产生及谷氨酸积累等,但 *FUL1* 和 *FUL2* 基因不参与调控乙烯的生物合成^[10]。

番茄中另外 1 个高表达的转录因子正调控基因是 *LeHB-1*,编码同源异形框蛋白与乙烯生物合成基因 *LeACO1* 的启动子结合。*LeHB-1* 的沉默表达会降低 *LeACO1* 的 mRNA 含量,抑制果实成熟。最新发现的 NAC 域蛋白基因 *SlNAC4* 在萼片和果实刚成熟时表达,对 *SlNAC4* 基因 RNA 干涉导致果实成熟延迟,乙烯合成降低,类胡萝卜素含量降低,叶绿素降解受抑制^[11]。

5 番茄果实其它品性的转录调控

研究表明 MYB(MYELOBLASTOSIS)转录因子 MYB12 在调控番茄果实类黄酮代谢中起重要作用,其表达减少会导致果皮中类黄酮含量降低,果实呈粉色。其它肉果如葡萄、苹果、桃和樱桃的类黄酮和花青素部分代谢途径是由各种同源的 R2R3 MYB 转录因子调控。这些功能是通过形成螺旋-环-螺旋(basic helix-loop-helix, bHLH)结构和 WD40 结构域完成。转录因子 FaMYB9/FaMYB11、FabHLH3 和 FaTTG1 调控草莓的花色素原的生物合成,转录因子 FaMYB10 调控花托中花色素苷的早期和晚期合成^[12]。此外,在番茄和橘中,*FUL*基因的降低表达会导致果皮中柚皮素查尔酮含量的减少。番茄成熟过程的叶绿体会分化形成有色体积累和合成番茄红素,而转录因子 *SlGLK2* 能调控有色体形成和发育。*SlGLK2* 基因转录本通常积累在绿色果实区域并与叶绿素分布一致。另外一个转录因子 APRR2-like 也参与调控成熟果实的叶绿体数量。生长素响应因子 4(AUXIN RESPONSE FACTOR 4, ARF4)的下调表达会通过增加淀粉含量形成具有暗绿色和斑点的成熟果实^[3,13]。

6 番茄转录因子的作用目标

关于转录因子基因 *RIN*、*FUL*、*SHP*、*CNR* 和 *NOR* 与下游效应物之间的关系,目前研究还较少。拟南芥转录因子 *SHP* 激活 bHLH 编码的基因 *INDEHISCENT* (*IND*)和 *ALCATRAZ* (*ALC*)分别调控木质层和分离层的形成。但在番茄中尚未发现与 *IND* 和 *ALC* 直接同源的基因。染色质免疫共沉淀试验表明,*RIN* 因子的作用目标分子包括 *RIN* 基因本身、*FUL1*、*FUL2*、*NOR*、*CNR* 和 *HB1* 基因。酵母双杂交试验表明,转录因子 *RIN* 与 *FUL1*、*AGL1*、*TAG1* 和 *FUL2* 转录因子存在相互作用,而且转录因子 *RIN* 的作用目标基因 *CNR* 反过来也会与 *FUL* 基因相互作用。*FUL* 和 *TAG1* 因子对番

茄成熟的调控存在依赖于 *RIN* 因子的重叠功能^[14]。

转录因子 *RIN* 至少结合 241 个作用目标分子,通过正、负调控果实的发育和成熟。花发育阶段的很多基因在 MADS 域蛋白作用下,参与激素的合成和信号转导途径。番茄的 *RIN* 因子直接与乙烯的合成基因 *ACS2* 和 *ACS4* 相互作用。这表明 *RIN* 因子与乙烯调控的果实成熟之间存在关联。同时乙烯也参与果实成熟过程的 *RIN* 基因上调表达。此外,*RIN* 因子与参与细胞壁重建相关的 *PG2a* 基因和类胡萝卜素合成相关的 *PSY1* 基因也存在相互作用。*FUL* 基因编码的转录因子直接作用目标分子超过 850 多个,关于 *FUL1* 和 *FUL2* 因子分别和共同与 *RIN* 因子的相互作用更为复杂,尚需进一步研究^[15]。

7 番茄转录调控的其它因素

7.1 miRNAs

miRNAs 是一类内源性的具有调控功能的非编码 RNA,大小约在 20~25 个核苷酸。很多转录因子的 mRNA 是 miRNAs 的作用目标。通过高通量降解组文库测序对番茄 miRNA-mRNA 的交互作用进行研究,鉴定出发现约 30% miRNAs 的作用目标编码转录因子,其中很多目标作用分子是 *ARF* 基因,这说明 miRNAs 是通过调控 *ARF* 基因影响果实坐果的起始和生长。此外,*miR156* 的作用目标是 *CNR* 基因,*miR172* 的作用目标是 *AP2a* 基因,而 *CNR* 和 *AP2a* 基因能延长果实成熟起始阶段的发白期^[16]。

7.2 DNA 表观遗传修饰

DNA 胞嘧啶甲基化和组氨酸修饰等表观遗传修饰可通过影响转录因子的结合和活性调控果实成熟基因的表达。反之,转录因子在染色质重塑中也起重要作用。番茄 *CNR* 基因上游可甲基化,但番茄果皮成熟过程中的 DNA 胞嘧啶甲基化会降低尤其是在 *CNR* 基因的调控区。随着果实的成熟,启动子某些位点的甲基化水平降低。最近的研究表明,诱导基因组胞嘧啶甲基化可导致果实早熟,其甲基化位点位于 *RIN* 因子结合区,其具体机制尚需进一步研究^[17]。

8 展望

近年来,植物基因组学和表观遗传学的发展为果实品质改良奠定了基础。对肉果模式植物番茄的研究提供了果实发育和成熟的代谢调控网络基础,尤其是通过体内全基因组转录因子结合染色质免疫共沉淀技术为研究转录因子调控网络的相互作用和拓扑结构提供了可能。但这些研究技术需结合转录组数据,因为转录因子结合及其作用目标基因调控存在直接联系,而且转录因子结合可能远远超过目前预期的作用目标分子。未

来,高通量测序技术将筛查更多的作物果实基因组,发现更多影响肉果表型的表观遗传变异。这将为果实品质改良提供广阔的应用前景^[1,18]。

参考文献

- [1] SEYMOUR G B, ØSTERGAARD L, CHAPMAN N H, et al. Fruit development and ripening[J]. Annu Rev Plant Biol, 2013, 64: 219-241.
- [2] HUANG Z, van HOUTEN J, GONZALEZ G, et al. Genome-wide identification, phylogeny and expression analysis of *SUN*, *OPF* and *YABBY* gene family in tomato[J]. Mol Genet Genomics, 2013, 288(3-4): 111-129.
- [3] KARLOVA R, CHAPMAN N, DAVID K, et al. Transcriptional control of fleshy fruit development and ripening[J]. J Exp Bot, 2014, 65(16): 4527-4534.
- [4] GAPPER N E, MCQUINN R P, GIOVANNONI J J. Molecular and genetic regulation of fruit ripening[J]. Plant Mol Biol, 2013, 82(6): 575-591.
- [5] IRELAND H S, YAO J L, TOMES S, et al. Apple *SEPALLATA 1/2-like* genes control fruit flesh development and ripening[J]. Plant J, 2013, 73(6): 1044-1056.
- [6] 牟望舒, 应铁. 植物乙烯信号转导研究进展[J]. 园艺学报, 2014, 41(9): 1895-1912.
- [7] LEE J M, JOUNG J G, MCQUINN R, et al. 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[J]. Plant J, 2012, 70(2): 191-204.
- [8] DONG T, HU Z, DENG L, et al. A tomato MADS-box transcription factor, SIMADS1, acts as a negative regulator of fruit ripening[J]. Plant Physiol, 2013, 163(2): 1026-1036.
- [9] ITKIN M, SEYBOLD H, BREITEL D, et al. *TOMATO AGAMOUS-LIKE 1* is a component of the fruit ripening regulatory network[J]. Plant J, 2009, 60(6): 1081-1095.
- [10] BEMER M, KARLOVA R, BALLESTER A R, et al. The tomato *FRUITFULL* homologs *TDR4/FUL1* and *MBP7/FUL2* regulate ethylene-independent aspects of fruit ripening[J]. Plant Cell, 2012, 24(11): 4437-4451.
- [11] ZHU M, CHEN G, ZHOU S, et al. A new tomato NAC (NAM/ATF1/2/CUC2) transcription factor, SINAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation[J]. Plant Cell Physiol, 2014, 55(1): 119-135.
- [12] MEDINA-PUCHE L, CUMPLIDO-LASO G, AMIL-RUIZ F, et al. MYB10 plays a major role in the regulation of flavonoid/phenylpropanoid metabolism during ripening of *Fragaria* × *ananas* fruits[J]. J Exp Bot, 2014, 65(2): 401-417.
- [13] PAN Y, BRADLEY G, PYKE K, et al. Network inference analysis identifies an *APRR2-like* gene linked to pigment accumulation in tomato and pepper fruits[J]. Plant Physiol, 2013, 161(3): 1476-1485.
- [14] SEYMOUR G B, CHAPMAN N H, CHEW B L, et al. Regulation of ripening and opportunities for control in tomato and other fruits[J]. Plant Biotechnol J, 2013, 11(3): 269-278.
- [15] FUJISAWA M, SHIMA Y, NAKAGAWA H, et al. Transcriptional regulation of fruit ripening by tomato *FRUITFULL* homologs and associated MADS box proteins[J]. Plant Cell, 2014, 26(1): 89-101.
- [16] ZUO J, WANG Y, LIU H, et al. MicroRNAs in tomato plants[J]. Sci China Life Sci, 2011, 54(7): 599-605.
- [17] KAUFMANN K, PAJORO A, ANGENENT G C. Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches[J]. Nat Rev Genet, 2010, 11(12): 830-842.
- [18] 周峰. 果实发育和成熟的调控机制[J]. 北方园艺, 2015(2): 175-178.

Transcriptional Regulation Mechanism of Flesh Fruits Development and Ripening Process

ZHOU Feng

(School of Food Science, Nanjing Xiaozhuang University, Nanjing, Jiangsu 211171)

Abstract: The flesh fruit is an essential part of human diet. It is important to study transcriptional regulation mechanism of flesh fruit development and ripening, which is the base of improving fruit quality. The transcriptional regulation of fleshy fruit was introduced early development stage and ripening process, as well as the function of ethylene, which was an important hormone, in the fleshy fruit transcriptional regulation were introduced firstly in this paper. As a model plant, tomato had many advantages to study the transcriptional regulation of fruit ripening process. The transcriptional regulatory networks and the targets molecules of transcriptional factors in the tomato ripening process were summarized present. It was pointed out that transcriptional factors such as MADS, *FUL*, *RIN*, *AP2a* and *TAGL1* played an important role in the transcriptional regulation mechanism of flesh fruits development and ripening process.

Keywords: flesh fruits; development; ripening; transcriptional regulation