

贾海锋,赵密珍,王庆莲,等. 生长素和脱落酸在草莓果实发育过程中的作用[J]. 江苏农业科学,2016,44(11):173-176.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.11.051

生长素和脱落酸在草莓果实发育过程中的作用

贾海锋¹, 赵密珍², 王庆莲², 房经贵¹, 赵鹏程¹, 刘众杰¹, 张成¹, 纠松涛¹

(1. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 2. 江苏省农业科学院园艺研究所, 江苏南京 210014)

摘要:草莓果实是非呼吸跃变型果实,关于其发育成熟的机理研究较少。以八倍体草莓甜查理为试材,分析了果实发育过程中脱落酸 ABA 和生长素 IAA 的含量,同时用 ABA 和 IAA 处理转色期的草莓果实,发现 ABA 能加速果实着色软化,抑制 IAA 的积累;相反 IAA 抑制果实着色软化,抑制 ABA 的积累。进一步分析表明 ABA 能降低 IAA 合成代谢路径中基因的表达水平,而 IAA 能降低 ABA 合成代谢路径中基因的表达水平。ABA 能促进果实成熟相关基因的表达,包括与果实上色有关的基因如查尔酮合酶等,和与果实软化有关的基因如伸展蛋白基因等;但 IAA 表现为抑制。果实上色与软化直接影响草莓成熟进程。这些结果说明 ABA 和 IAA 协同调控了草莓果实的发育进程,为以后草莓果实品质的改善和育种提供了思路。

关键词:草莓果实;脱落酸;生长素;基因表达

中图分类号:S668.404;S482.8

文献标志码:A

文章编号:1002-1302(2016)11-0173-04

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是一种重要的鲜食和加工水果,具有可口的风味和丰富的营养成分^[1]。草莓在成熟过程中无特定的呼吸峰和乙烯峰,由于其有体积小、易于传代、营养生长期短和果实生长迅速(果实成熟只需要 1 个月左右)的特点,草莓因此成为研究非呼吸跃变型果实成熟机理的模式植物^[2-3],也是大规模的番茄成熟机理研究之后把大量有关成熟基因用于基因功能分析和转基因研究的又一重要的水果种类^[4-5]。目前大多数研究认为,草莓属于典型的非呼吸跃变型果实^[6-7]。植物激素脱落酸(abscisic acid, ABA)不仅能促进草莓果实对糖的吸收^[8-9],而且在草莓果实成熟调控过程中发挥重要的作用^[6,10-12]。ABA 在其他非呼吸跃变型果实中也起着核心作用,比如在樱桃果实成熟过程中,ABA 参与了果实的生长发育与成熟;柑橘成熟过程中积累了大量的 ABA;并且越来越多的研究也表明,ABA 参与果实发育和成熟过程的调控^[13]。与大量的关于 ABA 对果实成熟调控的报道不同,作为一个经典的植物激素——生长素(auxin, IAA)的作用并未在果实发育过程中有过多的研究。IAA 与 ABA 作用相反,能延迟植物的衰老死亡。很多的证据表明,在果实的后熟过程中,果实全熟前 IAA 的含量持续下降直到最低水平为止。陈昆松等分析认为猕猴桃果实中内源 IAA 的含量随着果实的成熟呈下降趋势,随着 IAA 含量的下降,开始出现乙烯跃变峰^[14]。用 IAA 处理猕猴桃果实能促进内源 IAA 的积累,使 ABA 水平下降,推迟 ABA 峰值出现,最后延迟果实的软化成熟。在许多果实中,成熟总是伴随着 IAA 含量的下降。田建文等研究柿子中激素含量的变化也得

出了同样的结果^[15]。因此,他们认为果实在完全成熟前,IAA 必须先经过氧化以降低在果实中的含量,果实才能成熟。周丽萍等的研究也认为 IAA 水平的下降可以导致细胞对乙烯更为敏感^[16];IAA 可使呼吸跃变型果实延迟成熟,果实开始全熟是由于 IAA 失去了激素的作用所致,但其机理并不清楚。

本研究通过对甜查理草莓果实成熟过程中内源 ABA 和 IAA 含量的动态变化,外源 ABA 和 IAA 处理对草莓果实成熟的影响,对 ABA 和 IAA 与草莓果实成熟的关系进行了探讨。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为杜克拉草莓(*Fragaria × ananassa* ‘sweet charlie’),于 2014 年取自江苏省农业科学院试验基地。采集花后 7~28 d 的果实,参照文献[17],将果实划分为 7 个时期:小绿(幼果期,花后 7 d)、大绿(大果期,花后 14 d)、浅绿(绿熟期,花后 18 d)、纯白(白熟期,花后 21 d)、始红(始熟期,花后 23 d)、片红(转色期,花后 25 d)、全红(成熟期,花后 28 d)。每个时期样品设置 3 个重复。摘取鲜样后立即用刀片将果肉与种子分离,收集果肉液氮冷冻,贮存于 -80 ℃ 超低温冰箱中待用。

1.2 总 RNA 的提取及 cDNA 第一链的合成

用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒(北京博迈德科技发展有限公司)提取草莓果实中的总 RNA。以提取的总 RNA 为模板,利用 Clontech SMARTTM Library 试剂盒(美国 Clontech 公司)合成 cDNA 第一链用于扩增基因片段。

1.3 草莓果肉中 ABA 含量和 IAA 含量的测定

用酶联免疫法测定果肉中 ABA 和 IAA 含量。从冰箱中取各时期果肉,称取 0.5~1.0 g 样品,加入提取液,于冰浴中研磨匀浆,转入 10 mL 试管中,分次用 2 mL 提取液冲洗研钵,一并转入试管中,摇匀置于 4 ℃ 冰箱中浸提 4 h 后 1 000 g 离心 15 min,收集上清,沉淀中加入 1 mL 提取液摇匀,4 ℃ 浸提 1 h 后 1 000 g 离心 15 min,合并上清并记录体积,弃去残渣,

收稿日期:2015-09-05

基金项目:国家自然科学基金(编号:31401847);国家博士后基金(编号:2014M561663);中央高校特别资助(编号:KJQN201541);江苏省自然科学基金(编号:BK20140707)。

作者简介:贾海锋(1984—),男,河南安阳人,博士,讲师,主要从事果实发育分子生物学研究。E-mail:jiahaifeng@njau.edu.cn。

将上清转入 5 mL 塑料离心管中,氮气吹干,除去甲醇,用样品稀释液定容待测样品。具体测定程序按照中国农业大学出售试剂盒操作说明进行。ABA 和 IAA 含量通过美国 BioTek 公司生产的 ELx800TM 通用酶标仪测定,试验重复 3 次。

1.4 实时荧光定量 PCR 分析

对 7 个时期样品分别提取总 RNA,并加入 DNase I 酶去

除 DNA 污染,体系为 2 μ L DNA 酶、45 μ L 总 RNA 和 5 μ L DNase I 酶 buffer。37 $^{\circ}$ C 放置 12 ~ 15 min,然后用 RNA 清洁试剂盒纯化 RNA(北京博迈德科技发展有限公司),并使用 MMLV First cDNA Synthesis Kit(上海生物工程技术服务有限公司)合成第一链 cDNA,利用软件 Primer 5 设计荧光引物。引物序列见表 1。

表 1 试验所用引物

引物	序列	NCBI 登录号
<i>FaCHS</i>	F:5'-GCTGTCAAGGCCATTAAGGA-3';R:5'-GAGCAAACAACGAGAACACG-3'	XM_004306495
<i>FaCHI</i>	F:5'-GTTAAGTGAAGGGCAAGA-3';R:5'-CCCCTCAGCGGTAGTATCA-3'	AB201755
<i>FaF3H</i>	F:5'-TTTTCTGAGCAATGGGAGG-3';R:5'-CTGGGTTCTGGAATGTCG-3'	AB201760
<i>FaDFR</i>	F:5'-ACGAAGTGATAAAGCCAACA-3';R:5'-AAACACCAACCTCCGAAC-3'	AF029685
<i>FaUFGT</i>	F:5'-GGTAAGCCACAGGAGGACA-3';R:5'-TATGAGCACCGAACCAAA-3'	AY575056
<i>FaPG</i>	F:5'-CGACAGACTGAAAAATTCCTTAG-3';R:5'-AGGACTGGGTAGCAAAATTATTC-3'	EF441274
<i>FaPL</i>	F:5'-TGACTCCCTTGCTGCTTCTT-3';R:5'-TCTACTGCGTGCATTC-3'	EF441273
<i>FaEXPI</i>	F:5'-GCACTGCCGGAAGCCCTCCATT-3';R:5'-TCCGGCTTTGACTCGGCGATCTTG-3'	AF163812
<i>EG</i>	F:5'-AACGAGTTTGGTTGGGATA-3';R:5'-CGTGGCTTAGATAGTTGGAAT-3'	XM_004297411
<i>FaPIN</i>	F:5'-GCCATACTATCAGACGCA-3';R:5'-AACAGACCATCACCAG-3'	XM_004299482
<i>FaYUCCA</i>	F:5'-CACTCGTTGTCAGAGATACAGTGTG-3';R:5'-TAATCTCTTGATTGCCGGACGTAC-3'	JF898837
<i>FaNCED</i>	F:5'-CCCAAACGGCACCAGAAAT-3';R:5'-GCATCGCTCGCATTCTT-3'	HQ290318
<i>FaBG</i>	F:5'-ACGCACCCACGTAGTTAAAGTCGT-3';R:5'-AAACTCATCAACGCCATTCTCTGTG-3'	JX244263.1
<i>ACTIN</i>	F:5'-TGGGTTTGCTGGAGATGAT-3';R:5'-CAGTTAGGAGAACTGGGCTGC-3'	AB116565.1

以 *ACTIN* 为内参基因,按照 SYBR Premix Ex Taq™ 试剂盒(宝生物工程有限公司)操作指导,采用实时荧光定量 PCR(real-time quantitative PCR,RT-qPCR)的方法,检测基因的相对表达量。

对反转录所得的 cDNA 分别进行 5 个梯度稀释(10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4}),实施荧光定量 PCR 反应,然后绘制相对标准曲线。相关基因和内参 *ACTIN* 基因 RT-qPCR 扩增的总反应体系为 20 μ L,包括 10 μ L SYBR Premix Ex Taq 混合液、2 μ L cDNA、0.4 μ L 上游引物(10 μ mol/L)、0.4 μ L 下游引物(10 μ mol/L)、7.2 μ L 无核酸污染的灭菌水。反应程序为 94 $^{\circ}$ C 2 min;94 $^{\circ}$ C 20 s,55 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。每次循环第 3 步进行荧光采集。最后从 60 $^{\circ}$ C 升温至 95 $^{\circ}$ C,每隔 30 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C,总共 71 个循环。检测其荧光值,绘制熔点曲线。3 次重复。

1.5 数据分析

试验数据利用 Excel 2000 和 DPS 6.50 软件进行分析,用

DPS 程序中的 Duncan's 新复极差测验进行差异显著性分析。

2 结果与分析

2.1 草莓果实发育过程中 ABA 和 IAA 含量的变化

为了检测 IAA 和 ABA 含量在甜查理草莓果实发育中的变化,本试验将草莓果实划分为 7 个时期。从图 1 可以看出,果肉中 ABA 含量在整个草莓果实发育过程中出现 2 个上升阶段,即从幼果期至白熟期和始熟期至成熟期;二者之间变化不大的是白熟期至始熟期。揭示了 ABA 含量快速积累不仅伴随着果实的膨大和褪绿,而且伴随着果实的着色,说明 ABA 含量与草莓果实发育和成熟有密切的关系。与 ABA 含量变化趋势相反,IAA 含量从小绿果到大绿果急剧上升,但是大绿果到纯白果含量急速下降,纯白果到始红果 IAA 含量变化不大,随后到红果又出现了下降,IAA 含量变化趋势与果实成熟进程相反,说明 IAA 含量与草莓果实发育呈现负相关。

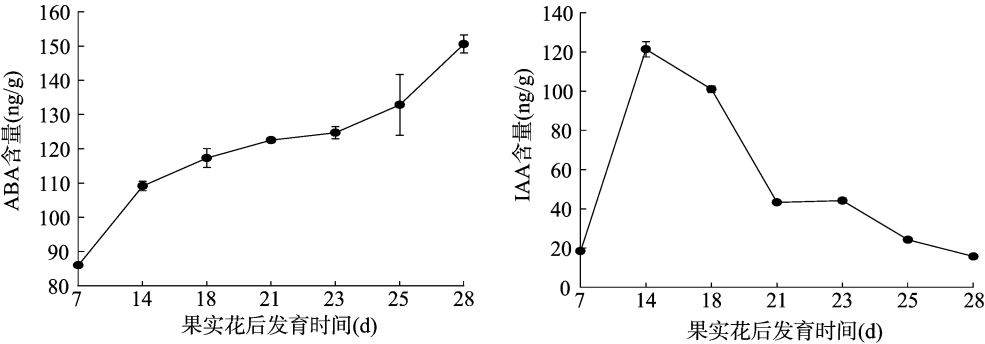


图 1 草莓果实发育过程中 ABA 和 IAA 含量的分析

2.2 ABA 和 IAA 处理对果实的影响

为了进一步证明 ABA 和 IAA 在草莓果实中的作用,利用 50 μ mol/L 的 ABA 和 IAA 处理大绿果时期的草莓果实,结果(图 2)表明,与水处理的果实相比(对照),ABA 能促进草莓

果实的着色软化,使花色苷含量上升和果实硬度下降,果实内 IAA 的含量也出现了下降;相反,IAA 抑制了果实花色苷的积累和果实的软化,并且降低了 ABA 的含量,延迟了果实的成熟进程(图 3)。

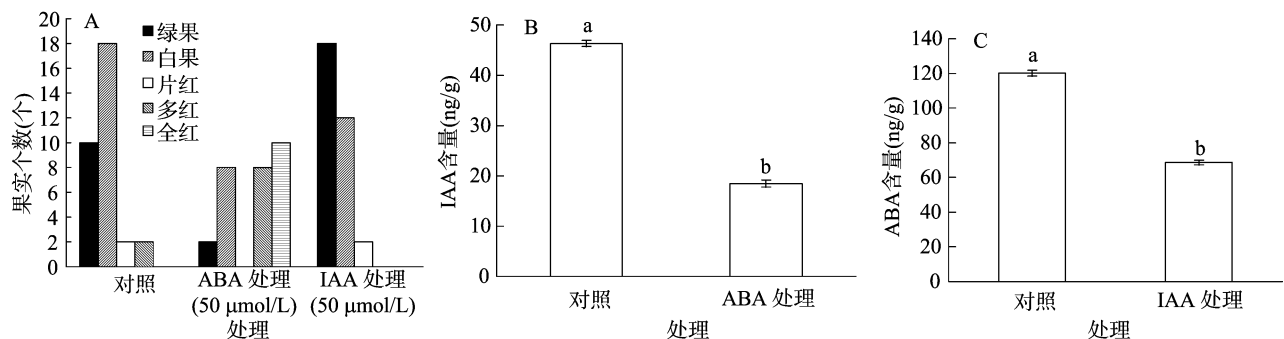


图2 ABA 和 IAA 处理对果实发育及对果实 IAA 和 ABA 含量的影响

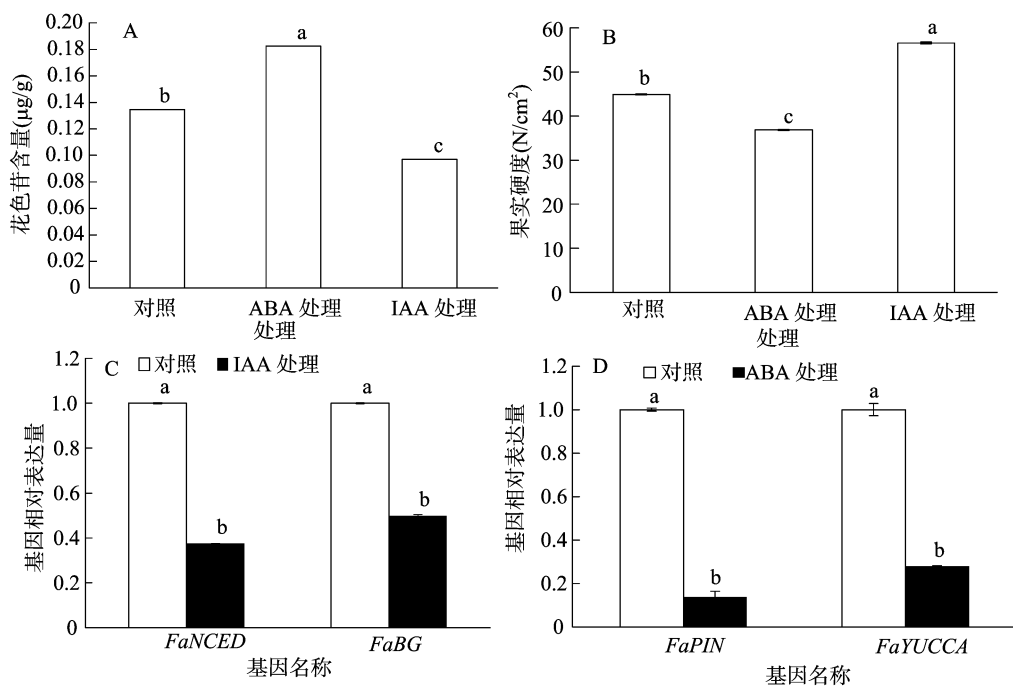


图3 ABA 和 IAA 处理对果实花色苷和硬度及对果实 ABA 和 IAA 合成代谢基因的影响

2.3 ABA 和 IAA 的相互作用对成熟相关基因的影响

ABA 能通过降低 IAA 合成路径中基因的表达量进而阻止 IAA 的积累,比如 IAA 转运基因 *FaPIN* (auxin transporter gene) 和合成基因 *FaYUCCA* (flavin monooxygenase gene)。IAA 也能使 ABA 合成路径中基因的表达量降低进而使 ABA 含量下降,比如 *FaNCED* 和 *FaBG* (图 3)。ABA 和 IAA 还能诱导或阻止果实成熟相关基因的表达,比如与花色苷合成相关的基因,查尔酮合酶基因 *CHS* (chalcone synthase)、查尔酮异构酶基因 *CHI* (chalcone isomerase)、黄酮 3-羟化酶基因 *F3H* (flavanone 3-hydroxylase)、UDP 葡萄糖-类黄酮-3-O-葡萄糖基转移酶基因 *UFGT* (UDP-glycosyltransferase)、二氢黄酮醇还原酶基因 *DFR* (dihydroflavonol-4-reductase) 和与果实软化有关的基因,伸展蛋白基因 *EXPI* (expansion)、聚半乳糖醛酸酶基因 *PG* (polygalacturonase)、果胶裂解酶基因 *PL* (pectate lyase)、葡聚糖酶基因 *EG* (endo-1,4- β -glucanase) (图 4)。

3 结论与讨论

根据果实成熟的特点,果树果实可分为 2 个基本类型,即

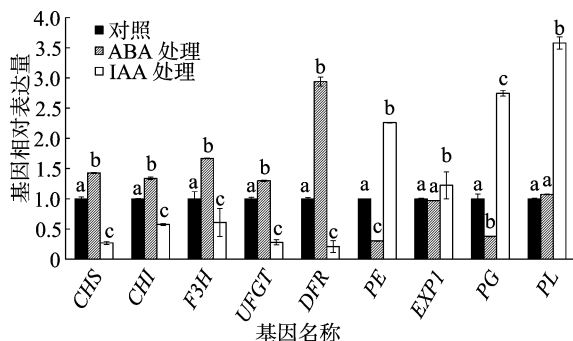


图4 ABA 和 IAA 处理对果实花色苷和硬度相关基因的影响

呼吸跃变型果实和非呼吸跃变型果实^[18-20]。呼吸跃变型果实成熟的“调控因素”就是植物激素乙烯,如番茄、香蕉、苹果。非呼吸跃变型果实的成熟主要受植物激素 ABA 的调控,在非呼吸跃变型果实的成熟过程中只有少量的乙烯产生,而且乙烯的峰值一般是在激素 ABA 的峰值之后,如葡萄、柑橘和草莓。迄今为止人们对乙烯对果实成熟机理的调控研究已取得了很大的进展,但是关于非呼吸跃变型果实的成熟机制仍未阐明。ABA 作为一种植物激素,已证实不仅在调控植物

休眠衰老和抗逆境胁迫等过程中起着重要的作用,而且是调控果实尤其是非呼吸跃变型果实发育的关键因素^[7,21]。本研究发现在甜查理草莓果实中 ABA 含量是随着果实发育上升的,有 2 个明显的上升期,第 1 个是果实褪绿变白期,第 2 个是果实上色期。果实的生长发育是指从开花到果实衰老的全过程,在这一过程中除受到乙烯和 ABA 的调控外,还受到其他激素的调控,如 IAA、赤霉素(GA)、细胞分裂素(CTK)等激素的影响。IAA 是第一种被确认的植物激素,在某些非呼吸跃变型果实的成熟过程中起抑制作用^[22~23]。在草莓中,由瘦果(种子)分泌的 IAA 会抑制肉质花托的成熟^[8,24]。随着植株的发育,瘦果和花托的 IAA 水平会逐渐低于临界水平从而使果实成熟。因此去除瘦果可以促进成熟,而施用外源 IAA 则会使草莓延迟成熟。本研究也表明,随着果实的发育,IAA 含量在小绿果时期很高,但是与 ABA 含量变化进程相反,在果实褪绿时期,IAA 含量急剧下降,在红果时期,含量降到最低点。这说明 IAA 含量的变化与草莓果实发育呈负相关(图 1)。并且本研究结果也表明,在大绿果时期用 IAA 处理草莓果实,会延迟果实上色,花色苷积累减缓,内源 ABA 含量降低。而 ABA 处理后的草莓果实,与对照相比,能提前着色,促进花色苷积累,同时也降低了 IAA 含量。这说明 ABA 和 IAA 互相影响,产生拮抗(图 2)。草莓果实成熟是 ABA 含量升高导致的结果,还是 IAA 含量降低导致的结果,是因为正的调控因子 ABA 还是负的调控因子 IAA 起主要作用,还需要深入研究。

ABA 和 IAA 的拮抗作用是因为二者能互相抑制对方的生物合成代谢途径。草莓果实实施外源 ABA 能抑制果实内 IAA 合成路径中基因的表达,比如 IAA 合成酶的 *FaYUCCA* 基因和 IAA 转运酶的 *FaPIN* 基因。同样 IAA 也能抑制 ABA 合成路径中基因的表达,比如 *FaBG* 和 *FaNCED*。ABA 和 IAA 除了能互相影响外(图 3),它们还能调控与果实成熟相关基因的表达,比如 ABA 和 IAA 能促进或抑制与花色苷合成相关基因、与果实软化相关基因的表达(图 4)。这说明 ABA 和 IAA 能协同调控果实的发育,含量高的 ABA 能促进果实成熟进程,使果实衰老得更快,但是高的 IAA 含量能延迟果实衰老,使果实保持新鲜的状态。因此,ABA 和 IAA 含量的调控为果实品质的形成和果实保鲜的研究提供了一个方向。

参考文献:

- [1] Zhang J J, Wang X, Yu O, et al. Metabolic profiling of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.) during fruit development and maturation[J]. J Exp Bot, 2011, 62(3): 1103–1118.
- [2] Perkins – Veazie P. Growth and ripening of strawberry fruit[J]. Hort Rev, 2010, 17: 267–297.
- [3] Chai Y M, Jia H F, Li C L, et al. *FaPYRI* is involved in strawberry fruit ripening[J]. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(14): 5079–5089.
- [4] Jenks M A, Bebeli P J. Fruit shelf life and potential for its genetic improvement[M]//Mercado J A, Pliego – Alfaro F, Quesada M A. Breeding for fruit quality. New York: John Wiley and Sons, 2011: 81–104.
- [5] Posé S, García – Gago J A, Santiago – Doménech N, et al. Strawberry

fruit softening: role of cell wall disassembly and its manipulation in transgenic plants[J]. Gen Genom Genom, 2011, 5(1): 40–48.

- [6] 钟晓红, 马定渭, 黄远飞. 草莓果实发育过程中内源激素水平的变化[J]. 江西农业大学学报, 2004, 26(1): 107–121.
- [7] Coombe B G. The development of fleshy fruits[J]. Ann Rev Plant Physiol, 1976, 27(1): 507–528.
- [8] Manning K. Changes in gene expression during strawberry fruit ripening and their regulation by auxin[J]. Planta, 1994, 194(1): 62–68.
- [9] Ofosu – Anim J, Kanayama Y, Yamaki S. Sugar uptake into strawberry fruit is stimulated by abscisic acid and indoleacetic acid[J]. Physiol Plant, 1996, 97(1): 169–174.
- [10] Kano Y, Asahira T. Roles of cytokinin and abscisic acid in the maturing of strawberry fruits[J]. J Japan Soc Hort Sci, 1981, 50(1): 31–36.
- [11] John O A, Yamaki S. Sugar content, compartmentation and efflux in strawberry tissue[J]. J Am Soc Hort Sci, 1994, 199(5): 1024–1028.
- [12] Jiang Y M, Joyce D C. ABA effects on ethylene production, PAL activity, anthocyanin and phenolic contents of strawberry fruit[J]. Plant Growth Regulation, 2003, 39(2): 171–174.
- [13] Zhang M, Yuan B, Leng P. The role of ABA in triggering ethylene biosynthesis and ripening of tomato fruit[J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60(6): 1579–1588.
- [14] 陈昆松, 李 方. ABA 和 IAA 对猕猴桃果实成熟进程的调控[J]. 园艺学报, 1999, 26(2): 81–86.
- [15] 田建文, 贺普超. 植物激素与柿子后熟的关系[J]. 天津农业科学, 1994(3): 30–32.
- [16] 周丽萍, 张维一. 外源激素和病原侵染对采后葡萄呼吸速率及组织内源激素的影响[J]. 植物生理学报, 1997, 23(4): 353–356.
- [17] Fait A, Hanhineva K, Beleggia R, et al. Reconfiguration of the achene and receptacle metabolic networks during strawberry fruit development[J]. Plant Physiology, 2008, 148(2): 730–750.
- [18] Brady C J. Fruit ripening[J]. Annu Rev Plant Physiol, 1987, 38: 155–178.
- [19] White P J. Recent advances in fruit development and ripening: an overview[J]. J Exp Bot, 2002, 53(377): 1995–2000.
- [20] Chaves A L S, Farias P C M. Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries[J]. Genet Mol Biol, 2006, 29(3): 508–515.
- [21] Yu X C, Li M J, Gao G F, et al. Absciscic acid stimulates a calcium – dependent protein kinase in grape berry[J]. Plant Physiology, 2006, 140(2): 558–579.
- [22] Davis C, Wolf T, Robinson S P. Three putative sucrose transporters are differentially expressed in grapevine tissues[J]. Plant Science, 1999, 147(2): 93–100.
- [23] Trainotti L, Tadiello A, Casadoro G. The involvement of auxin in the ripening of climacteric fruits comes of age: the hormone plays a role of its own and has an intense interplay with ethylene in ripening peaches[J]. Journal of Experimental Botany, 2007, 58(12): 3299–3308.
- [24] Given N K, Venis M A, Grierson D. Hormonal – regulation of ripening in the strawberry, a non – climacteric fruit[J]. Planta, 1988, 174(3): 402–406.