

黑莓 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶基因 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的克隆及功能鉴定

李 洁¹, 董金彦¹, 闫连飞¹, 吴文龙¹, 李维林^{2a,2b}, 张春红^{1,①}

[1. 江苏省中国科学院植物研究所(南京中山植物园) 江苏省植物资源研究与利用重点实验室, 江苏 南京 210014;

2. 南京林业大学林草学院、水土保持学院: a. 林木遗传育种全国重点实验室, b. 南方现代林业协同创新中心, 江苏 南京 210037]

摘要: 基于前期黑莓(*Rubus* spp.) 品种‘Navaho’果实转录组测序结果,通过反转录 PCR 克隆获得 2 个 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO) 基因,命名为 *RuACO1a* 和 *RuACO1b*。结果表明:*RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的开放阅读框(ORF)长度分别为 939 和 918 bp,分别含有 4 和 3 个外显子。系统进化分析结果显示 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 与月季(*Rosa chinensis* Jacq.)、蕨麻[*Argentina anserina* (Linn.) Rydb.]和野草莓(*Fragaria vesca* Linn.) ACO1 蛋白的亲缘关系均较近,且分别属于蔷薇科(Rosaceae)植物中 2 类 ACO1 蛋白。*RuACO1a* 在果实着色后 28 d 响应乙烯利诱导,其相对表达量急剧升高,而 *RuACO1b* 在果实着色后 21 d 响应乙烯利诱导,早于 *RuACO1a*。脱落酸处理后,*RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的相对表达量在果实着色后 14 和 28 d 较高。*RuACO1a* 和 *RuACO1b* 具有组织表达特异性,*RuACO1a* 在幼果、花蕾和花中的相对表达量较高,*RuACO1b* 在幼果和幼根中的相对表达量较高。与野生型相比,*RuACO1a* 和 *RuACO1b* 过量表达转基因拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.]植株均表现为叶片中叶绿素相对含量和氮含量升高、开花和角果成熟提前、ACO 含量升高。综上所述,黑莓 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 基因均促进拟南芥角果提前成熟。

关键词: 黑莓; 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO); 果实成熟; 乙烯; 脱落酸; 克隆; 功能鉴定

中图分类号: Q785; Q943.2; S663.2 文献标志码: A 文章编号: 1674-7895(2024)03-0014-13

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7895.2024.03.02

Cloning and functional identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes *RuACO1a* and *RuACO1b* from blackberry (*Rubus* spp.) LI Jie¹, DONG Jinyan¹, LYU Lianfei¹, WU Wenlong¹, LI Weilin^{2a,2b}, ZHANG Chunhong^{1,①} [1. Jiangsu Key Laboratory for the Research and Utilization of Plant Resources, Institute of Botany, Jiangsu Province and Chinese Academy of Sciences (Nanjing Botanical Garden Mem. Sun Yat-Sen), Nanjing 210014, China; 2. College of Forestry and Grassland, College of Soil and Water Conservation, Nanjing Forestry University; a. State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, b. Co-Innovation Center for the Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing 210037, China], *J. Plant Resour. & Environ.*, 2024, 33(3): 14-26

Abstract: Based on the previous transcriptome sequencing results of cultivar ‘Navaho’ of blackberry (*Rubus* spp.) fruits, two 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO) genes were cloned via reverse transcription PCR and named as *RuACO1a* and *RuACO1b*. The results show that the open reading frames (ORFs) of *RuACO1a* and *RuACO1b* are 939 and 918 bp, respectively, and contain 4 and 3 exons, respectively. The phylogenetic analysis result shows that *RuACO1a* and *RuACO1b* both have close relationships with ACO1 proteins from *Rosa chinensis* Jacq., *Argentina anserina* (Linn.) Rydb., and

收稿日期: 2024-01-03

基金项目: 江苏省种业振兴揭榜挂帅项目(JBGS[2021]021); 江苏省农业科技自主创新项目(CX(22)2014)

作者简介: 李 洁(1998—),女,江苏南京人,硕士研究生,主要从事黑莓果实品质及利用方面的研究。

①通信作者 E-mail: chzhang@cnbg.net

引用格式: 李 洁, 董金彦, 闫连飞, 等. 黑莓 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶基因 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的克隆及功能鉴定[J]. 植物资源与环境学报, 2024, 33(3): 14-26.

Fragaria vesca Linn., and they belong to two categories of ACO1 proteins of Rosaceae plants. *RuACO1a* responds to ethephon induction at 28 d after fruit coloring, its relative expression increases sharply, while *RuACO1b* responds to ethephon induction at 21 d after fruit coloring, which is earlier than *RuACO1a*. After abscisic acid treatment, the relative expression of *RuACO1a* and *RuACO1b* is higher at 14 and 28 d after fruit coloring. *RuACO1a* and *RuACO1b* exhibit tissue-specific expression patterns, and the relative expression of *RuACO1a* is relatively high in young fruits, flower buds, and flowers, while those of *RuACO1b* are relatively high in young fruits and young roots. Compared with the wild type, transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. plants overexpressing *RuACO1a* and *RuACO1b* exhibit increased chlorophyll relative content and nitrogen content in leaves, flowering and silique maturation in advance, and increased ACO content. In conclusion, both *RuACO1a* and *RuACO1b* genes from blackberry promote the early maturation of *A. thaliana* siliques.

Key words: blackberry (*Rubus* spp.); 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (ACO); fruit ripening; ethylene; abscisic acid; cloning; functional identification

黑莓(*Rubus* spp.)为蔷薇科(Rosaceae)悬钩子属(*Rubus* Linn.)小浆果类经济植物,因其综合抗氧化活性高且富含有益于人体的生物活性物质而备受重视^[1],在联合国粮食及农业组织推荐的人类五大健康食品中占据一席。黑莓果实果皮极薄且柔软多汁,成熟果实采后极易腐烂,导致果实采后处理成本大幅增加及货架期极短^[2-3]。果实硬度低是当前制约国内黑莓生产及产业发展的关键因子之一,培育高硬度果实品种成为黑莓育种研究和品质改良的首要目标^[4]。果实成熟软化涉及大量生理生化变化^[5],酶促降解和激素调节是决定果实硬度的重要因子^[6]。非呼吸跃变类型果实成熟过程中,脱落酸(ABA)含量从转色期开始增加,在成熟前期达高峰,而在采后前期下降,表明其在果实成熟中起重要调控作用^[7]。在黑莓^[8]、葡萄(*Vitis vinifera* Linn.)^[9]和草莓[*Fragaria* × *ananassa* (Weston) Duchesne ex Rozier]^[10]中均已发现脱落酸参与调控浆果果实的成熟软化过程,但其与乙烯的相互作用仍不明确。

植物激素乙烯参与植物的营养生长、生殖生长及衰老等生长发育过程^[11]。黑莓果实成熟和老化速度的快慢决定了黑莓果实采后贮藏期的长短,在这个过程中乙烯起着重要作用。乙烯与悬钩子属植物果实采后品质关系密切,在采后贮藏过程中乙烯含量不断上升^[12-13]。Perkins-Veazie等^[14]对黑莓转色至成熟过程中的乙烯含量进行测定,认为黑莓成熟可能不依赖乙烯,乙烯通过调控果实从花梗上脱落来控制收获时间。Lipe^[15]认为黑莓果实属于非呼吸跃变类型。Burdon等^[16]认为黑莓成熟果实乙烯释放速率因品种而异,部分品种的乙烯释放速率在着色期显著升高。近年来,有研究利用含植物精油的包装材料包装黑

莓,使果实乙烯合成酶活性降低50%,从而达到减少乙烯释放和延长货架期的目的^[17]。黑莓果实采后品质及乙烯作用于黑莓果实成熟软化的机制开始成为育种学家和生物学家关注的课题^[18]。

1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO)是调控植物体内产生乙烯的关键酶,催化1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)转化成乙烯^[19],ACO基因的克隆与鉴定在模式园艺植物上已取得诸多进展。ACO基因最早克隆自番茄(*Solanum lycopersicum* Linn.)果实^[20],番茄中有7个ACO基因成员^[21],*SlACO1*基因是调控果实成熟的关键成员,通过沉默ACO基因延迟番茄成熟和延长番茄货架期已有报道^[22-24]。在花卉育种中也多利用反义技术调控ACO基因来抑制乙烯产生,达到延长花期的目的^[25-27]。月季(*Rosa chinensis* Jacq.)*Rh-ACO1*的表达受乙烯诱导,且与花瓣中乙烯生物合成关键酶在转录水平上的诱导有关^[28]。观赏海棠[*Malus spectabilis* (Aiton) Borkh.]和荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)中ACO1基因的表达可能与果实脱落有关^[29-30]。苹果(*Malus pumila* Mill.)中不同的ACO基因具有不同的表达模式,其中,*MpACO1*主要在成熟果实中表达,且受外源乙烯诱导;*MpACO2*在幼嫩果实和叶片中均有表达^[31-32]。目前果树ACO基因的功能研究多集中于表达分析,而其遗传转化功能验证仍需进一步研究。

果实硬度是重要的育种目标之一。黑莓因遗传杂合度大、基因组较大,利用常规育种进行目标性状遗传改良具有很大局限性。江苏省中国科学院植物研究所黑莓研究团队多年来开展黑莓硬度研究,比较了黑莓高硬度和低硬度果实的形态结构特征^[33],发现高硬度果实成熟过程中果实生长量持续增加^[34],

脱落酸为不同硬度黑莓果实启动成熟的信号物质^[8]。对黑莓着色期果实喷施脱落酸可促进果实提早成熟,果实成熟软化基因在成熟果实中受脱落酸诱导上调表达明显,如 *ACO* 基因、内切- β -1,4-葡聚糖酶基因 *EG* 和多聚半乳糖醛酸酶基因 *PG*^[35]。植物中 *ACO* 基因家族不同成员的组织表达特异性和时空表达特性存在明显差异^[36]。迄今,乙烯合成相关基因在黑莓果实成熟软化中的作用及其与脱落酸的关系尚不明晰。基于此,本研究在前期对黑莓品种‘Navaho’果实转录组测序的基础上,对其中2个响应脱落酸诱导且上调表达明显的 *ACO* 基因进行克隆和功能鉴定,用反转录 PCR 方法首次从黑莓中克隆获得2个 *ACO* 基因的全长序列,对2个 *ACO* 基因编码蛋白进行了氨基酸序列比对、理化性质、结构特征、系统进化关系等分析,比较了2个 *ACO* 基因的表达模式,并通过在拟南芥 [*Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.] 中的遗传转化揭示其功能,为后续研究 *ACO* 基因参与黑莓果实乙烯生成及果实成熟软化调控机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

供试黑莓品种‘Navaho’植株(株龄3a)种植于江苏省中国科学院植物研究所溧水白马科学基地。于黑莓果实初始着色期对果实进行挂牌标记,然后对果实分别喷施200 mL的200 mg·L⁻¹乙烯利(ETH)和200 mg·L⁻¹脱落酸,对照组为正常田间管理植株,每处理3株。于处理0(初始着色期)、7(青果期)、14(转色期)、21(红果期)和28(成熟期)d采集形态、大小基本一致的果实各20个,液氮速冻后带回实验室贮存于-80℃冰箱,备用。在果实初始着色期采集幼果、花蕾、花、幼根、分枝茎和嫩叶各50g,备用。拟南芥生态型Col-0种子由作者所在实验室保存。大肠杆菌DH5 α 菌株和农杆菌GV3101感受态细胞购自北京金沙生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 基因克隆及序列结构分析 利用新型快速植物基因组DNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取黑莓成熟果实基因组DNA(gDNA),用于基因克隆。利用植物总RNA提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)提取黑莓各组织和各发育

期果实的RNA,然后使用UnionScript First-strand cDNA Synthesis Mix for qPCR试剂盒(北京金沙生物科技有限公司)反转录合成cDNA,用于基因克隆和实时荧光定量PCR(qRT-PCR)。

作者所在项目组前期对黑莓品种‘Navaho’果实转录组进行了数据分析和qRT-PCR分析,筛选出2个在成熟期优势表达的乙烯合成途径基因*ACO1*^[35]。基于基因编码序列,利用Primer 6.0软件设计这2个基因的cDNA和gDNA全长扩增引物(表1),利用高保真PCR酶PrimeSTAR[®] Max DNA Polymerase[宝日医生物技术(北京)有限公司],分别以这2个基因的cDNA和gDNA为模板进行cDNA和gDNA全长克隆。PCR反应体系总体积50 μ L,包含Primer Star Max 25 μ L、上游和下游引物各1 μ L、cDNA模板1 μ L、ddH₂O 22 μ L。反应程序:98℃预热3 min;98℃变性10 s、55℃退火5 s、72℃延伸15 s,35次循环;72℃延伸3 min。PCR扩增产物经质量体积分数1.0%琼脂糖凝胶电泳检测,用快捷型琼脂糖凝胶DNA回收试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司)回收目的基因条带,按照pClone007 Blunt Vector Kit试剂盒(南京擎科生物科技有限公司)说明书将纯化产物与载体连接并转化至大肠杆菌DH5 α 菌株,复苏后涂布于氨苄抗性培养基上,过夜培养后挑取阳性单菌落,交由南京擎科生物科技有限公司测序验证。

利用Gene Structure Display Server 2.0软件分析基因组结构。利用ClustalX和GenDoc软件进行黑莓ACO1蛋白与蔷薇科的梅(*Prunus mume* Siebold et Zucc.)、扁桃[*Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb]、欧洲甜樱桃[*Prunus avium* (Linn.) Linn.]、野草莓(*Fragaria vesca* Linn.)、蕨麻[*Argentina anserina* (Linn.) Rydb.]和月季ACO1蛋白的多重序列比对。

1.2.2 生物信息学分析 使用NCBI在线工具ORFfinder(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>)查找基因的开放阅读框(ORF)序列。利用NCBI网站中blastp和tblastn(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)进行基因及蛋白质序列同源性搜索。利用BioXM 2.7软件进行蛋白质翻译。利用NCBI网站中的CD-Search(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>)分析蛋白质的保守结构域。使用Expasy-ProtParam在线工具(<https://www.expasy.org/resources/protparam>)进行蛋白质理化性质的预测分析。利用SOPMA在线工具(

表 1 用于黑莓 *ACO1* 基因克隆及功能鉴定的引物序列Table 1 Primer sequences used for cloning and functional identification of *ACO1* genes from blackberry (*Rubus* spp.)

引物 Primer	序列(5'→3') ¹⁾ Sequence (5'→3') ¹⁾	用途 Application
<i>RuACO1a</i> -F	ATGGAGAATTTC CCGGTT GTGA	cDNA 和 gDNA 全长扩增 Full-length amplification of cDNA and gDNA
<i>RuACO1a</i> -R	AACAGTTGCAATGGATTCCATG	
<i>RuACO1b</i> -F	ATGGAGATCCCTGTGATCGACTTT	
<i>RuACO1b</i> -R	GGTAAGGAAACCATTGTTCCCACT	
<i>RuACO1a</i> -qF	ATCTGTCCAGCACCAGCAATG	实时荧光定量 PCR Real-time fluorescence quantitative PCR
<i>RuACO1a</i> -qR	CCTCGGCTCCTTGCTTGAA	
<i>RuACO1b</i> -qF	TGTGAGAGGACTTCGAGAGCAT	
<i>RuACO1b</i> -qR	GGTGTGTTCTTGGATGGTGA	
<i>Actin</i> -qF	AGGCCGTTCTTTCGCTGT	
<i>Actin</i> -qR	GCCAGGTCCAAACGAAGGA	
<i>AtUBC</i> -F	CTCGGACTCAGGAATCTTCTAA	载体构建 Vector construction
<i>AtUBC</i> -R	TTGTGCCATTGAATTGAACCC	
<i>RuACO1a</i> -ZF	CATTTCATTGGAGAGGACAGGGTACCATTGGAGAATTTC CCGGTT GTGA	
<i>RuACO1a</i> -ZR	CGCATATCTCATTAAAGCAGGGAATTCAACAGTTGCAATGGATTCCATG	
<i>RuACO1b</i> -ZF	CATTTCATTGGAGAGGACAG CCCGG GATGGAGATCCCTGTGATCGACTTT	
<i>RuACO1b</i> -ZR	CGCATATCTCATTAAAGCAGGACTAGTGGTAAGGAAACCATTGTTCCCACT	

¹⁾ 下划线示酶切位点 The underlines indicate restriction enzyme cutting sites.

pbil.ibcp.fr/cgi-bin/npsa_automat.pl?page=npsa_sopma.html) 预测蛋白质二级结构, 利用 SWISS-MODEL 在线工具 (<https://swissmodel.expasy.org>) 构建蛋白质三维模型。利用 MEGA 7.0 软件, 采用邻接法构建植物 ACO 蛋白系统进化树, Bootstrap 自检验 1 000 次。

1.2.3 基因表达分析 利用 qRT-PCR 引物 *RuACO1a*-qF、*RuACO1a*-qR、*RuACO1b*-qF 和 *RuACO1a*-qR (表 1), 将反转录得到的 cDNA 使用 GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix (Universal) (北京金沙生物科技有限公司) 进行 qRT-PCR。反应体系总体积 20.0 μ L, 包含 2 \times GS AntiQ qPCR SYBR Green Fast Mix (Universal) 10.0 μ L、上游和下游引物各 0.4 μ L、cDNA 模板 1.0 μ L、ddH₂O 8.2 μ L。反应程序: 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s、95 $^{\circ}$ C 退火 10 s、60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 45 个循环。每个样品 3 次重复。采用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法^[37] 计算基因相对表达量, 内参基因为 *Actin* (GenBank 登录号 HQ439556)^[35]。

1.2.4 基因过表达载体构建及拟南芥遗传转化 根据 *RuACO1a* 基因 ORF 区域设计含有酶切位点 *Kpn* I 和 *Eco*R I 的过量表达同源重组引物 *RuACO1a*-ZF 和 *RuACO1a*-ZR (表 1), 根据 *RuACO1b* 基因 ORF 区域设计含有酶切位点 *Sma* I 和 *Spe* I 的过量表达同源重组引物 *RuACO1b*-ZF 和 *RuACO1b*-ZR (表 1), 根据 ORF 两端设计上、下游引物, 并在引物的 5' 端分别

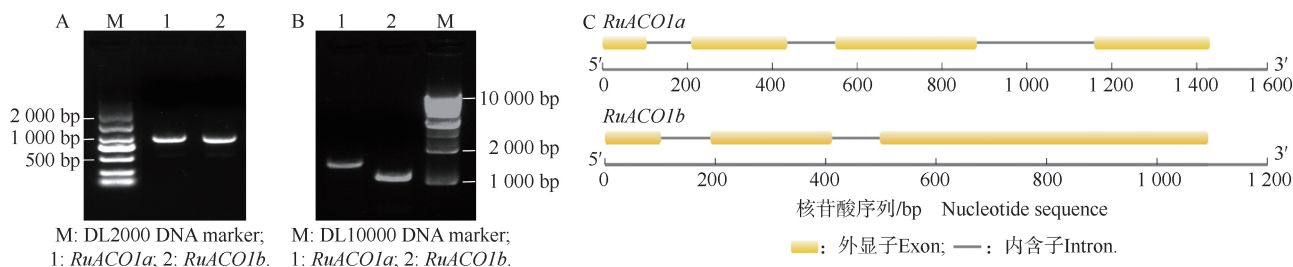
加上与线性化载体末端相同的长度 21 bp 的序列。通过 PCR 扩增克隆得到含有黑莓 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 基因 ORF 区域的片段, 通过双酶切及连接反应, 分别正向接入到 p35SGK 双元表达载体中。在载体构建完成后进行双酶切鉴定和目的基因 PCR 检测。PCR 的反应体系和反应程序同“1.2.1”。挑取阳性克隆测序。引物合成和重组子测序均由南京擎科生物科技有限公司完成。

将阳性菌液 (OD 值 1.0) 接种于 50 mL 含 50 mg \cdot L⁻¹ 卡那霉素和 100 mg \cdot L⁻¹ 利福平的 LB 液体培养基中, 于 4 $^{\circ}$ C、6 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min, 去除上清后加入 50 mL 质量体积分数 5% 蔗糖溶液重悬菌液, 然后加入 40 μ L 体积分数 0.02% Silwet L-77 侵染拟南芥花序, 待种子成熟后收取种子。

1.2.5 转基因拟南芥的验证及表型检测分析 将灭菌后拟南芥种子播种于含 35 mg \cdot L⁻¹ 卡那霉素的 MS 培养基, 每培养皿播种约 500 粒种子, 统计阳性苗转化率 [阳性苗转化率 = (阳性苗植株数/播种数) \times 100%]。共播种 3 个培养皿, 即为 3 次重复。筛选得到 T₀ 代阳性植株, 3 周后移栽至泥炭土-蛭石 (体积比 2 : 1) 混合基质中生长至成熟, 收获种子。对 T₁ 代各株系的目的基因进行 qRT-PCR 验证, 内参基因为 *AtUBC* (GenBank 登录号 AT5g25760)^[38]。qRT-PCR 的反应体系、反应程序和计算方法同“1.2.3”。每个基因筛选获得表达量较高的 3 个株系进行 T₂ 代

培养,每个株系选择9个植株,每天观察并记录花期和角果成熟期。选取大小基本一致的莲座叶片6枚,使用TYS-A叶绿素含量测定仪(杭州绿博仪器有限公司)测定叶片的叶绿素相对含量和氮含量,每枚叶片测定1次,结果取平均值。将表达量最高的 T_1 代株系种子播种在MS培养基上,观察植株和根系生长情况,使用直尺(精度1 mm)测量6株植株的最长根长,结果取平均值。 T_2 代转基因株系植株的1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶含量和脱落酸含量分别使用植物1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO)ELISA试剂盒(上海禹绍生物科技有限公司)和植物激素脱落酸(ABA)ELISA检测试剂盒(上海研尊生物科技有限公司)测定,每个指标重复测定3次。

1.2.6 激素处理转基因植株的基因表达分析 对 T_2 代转基因株系,在结荚初期分别选取3株长势基本一致的植株,每株分别喷施50 mL 200 mg · L⁻¹乙烯利和200 mg · L⁻¹脱落酸,野生型和转基因株系的对照不进行任何处理,处理15 d后比较角果成熟情况,对目的基因表达情况进行qRT-PCR分析。qRT-PCR的反应体系、反应程序和计算方法同“1.2.3”。



A, B. PCR 扩增产物的电泳结果 Electrophoresis results of PCR amplification products; A. cDNA; B. 基因组 DNA Genomic DNA. C. 基因组 DNA 结构 Genomic DNA structure.

图1 黑莓 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的克隆和基因组 DNA 结构
Fig. 1 Cloning and genomic DNA structure of *RuACO1a* and *RuACO1b* from blackberry (*Rubus* spp.)

将 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 开放阅读框翻译成氨基酸序列,与蔷薇科其他6种植物 ACO1 蛋白的氨基酸序列进行同源序列比对,结果(图2)显示:*RuACO1a* 和 *RuACO1b* 与蔷薇科其他6种植物 ACO1 蛋白具有较高的同源性,其中 *RuACO1a* 与月季 *RcACO1-1*(GenBank 登录号 XP_024198834.1)的一致性达 94.23%,*RuACO1b* 与月季 *RcACO1-2*(GenBank 登录号 XP_024178305.1)的一致性达 93.77%。*RuACO1a* 和 *RuACO1b* 均存在8个 ACO 蛋白活性位点,均为二价铁离子/抗坏血酸依赖型双加

1.3 数据分析

利用 EXCEL 2010 和 SPSS 25.0 软件统计和处理实验数据,通过单因素方差分析(one-way ANOVA)和 Duncan's 新复极差法对数据进行显著性分析,利用 Origin 2022 软件绘图。

2 结果和分析

2.1 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 克隆和序列分析

以黑莓‘Navaho’果实 cDNA 为模板进行 PCR 扩增,得到2条目的基因条带与预期片段大小一致(图1-A),将这2个基因分别命名为 *RuACO1a* (GenBank 登录号 PP234671) 和 *RuACO1b* (GenBank 登录号 PP234673)。*RuACO1a* 开放阅读框长度为 939 bp,编码 312 个氨基酸;*RuACO1b* 开放阅读框长度为 918 bp,编码 305 个氨基酸。以基因组 DNA (gDNA) 为模板扩增得到对应的 gDNA 全长序列(图1-B),扩增得到的 *RuACO1a* gDNA 序列长度为 1 431 bp,含有 4 个外显子和 3 个内含子;*RuACO1b* 的 gDNA 序列长度为 1 093 bp,含有 3 个外显子和 2 个内含子(图1-C)。

氧酶家族成员中存在的保守氨基酸残基。

利用 NCBI 在线工具对蛋白质结构域进行分析,结果显示 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 均含有 1 个保守结构域,分别为 PLN02299 和 PLN02403。

2.2 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的理化性质及结构分析

蛋白质理化性质预测结果表明:*RuACO1a* 的理论相对分子质量为 35 470.64,理论等电点为 pI 5.23,由 20 种氨基酸组成,分子式为 C₁₅₈₄H₂₄₆₆N₄₁₄O₄₇₂S₁₉,是稳定亲水性蛋白。*RuACO1b* 的理论相对分子质量

PmACO1-1 (XP_008224728.1)	—MEAFVVDLSIINGEKREATMEKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVQSEIHLDWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
PdACO1-1 (XP_034211743.1)	—METFVVDLSIINGEKREATMEKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVQSEIHLDWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
PaACO1-1 (XP_021823230.1)	—MEAFVVDLSIINGEKREATMEKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVQSEIHLDWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
FvACO1-1 (XP_004293334.1)	—MENFVVMELNGEKRAATMEKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVNSEIEDLWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
AaACO1-1 (XP_050367363.1)	—MENFVVMELNGEKRAATMEKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVNSEIEDLWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
RcACO1-1 (XP_024198834.1)	—MENFVVMELNGEKRAATMEKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVNSEIEDLWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
RuACO1a (WVR21820.1)	—MENFVVMELNGEKRAATMDKINDAGEWGFFELVNHSHSLMDIYKLTKEHKKQKERRKEMVASGLEAVNSEIEDLWESTFFLRHLVPSNISQIPDL	106
FvACO1-2 (XP_004287539.1)	—MEIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—KDDTSQKOWETTFVWHRPTSNIEAIPNI	103
AaACO1-2 (XP_050372212.1)	—MEIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—KDDTSQKOWETTFVWHRPTSNIEAIPNI	103
RcACO1-2 (XP_024198834.1)	—MEIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—KDDTSQKOWETTFVWHRPTSNIEAIPNI	103
RuACO1b (WVR21822.1)	—MEIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—KDDTSQKOWETTFVWHRPTSNIEAIPNI	103
PmACO1-2 (XP_008242414.1)	MKEMGIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—QDITSEKOWESSFFIHRPTSNIEDIPNL	106
PaACO1-2 (XP_021807092.1)	MKEMGIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—QDITSEKOWESSFFIHRPTSNIEDIPNL	106
PdACO1-2 (XP_034226304.1)	MKEMGIPVVDGELINGEERKTMALHAGEWGFFQLENHIDKRLMDKYKLVNAYEENKESYSEIAESLE—QDITSEKOWESSFFIHRPTSNIEDIPNL	106

PmACO1-1 (XP_008224728.1)	DEYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
PdACO1-1 (XP_034211743.1)	DEYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
PaACO1-1 (XP_021823230.1)	DEYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
FvACO1-1 (XP_004293334.1)	DEYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
AaACO1-1 (XP_050367363.1)	DEYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
RcACO1-1 (XP_024198834.1)	DEYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
RuACO1a (WVR21820.1)	DRYRKMKEFAVELEKLAEOQLDLCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	213
FvACO1-2 (XP_004287539.1)	SEDLCKTMNEYIAQLINLAELSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	211
AaACO1-2 (XP_050372212.1)	SEDLCKTMNEYIAQLINLAELSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	211
RcACO1-2 (XP_024198834.1)	SEDLCKTMNEYIAQLINLAELSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	214
RuACO1b (WVR21822.1)	SEDLCKTMNEYIAQLINLAELSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	214
PmACO1-2 (XP_008242414.1)	SDLRITMNEYIPOLIKMAEKSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	214
PaACO1-2 (XP_021807092.1)	SDLRITMNEYIPOLIKMAEKSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	214
PdACO1-2 (XP_034226304.1)	SDLRITMNEYIPOLIKMAEKSELMCENGLKQVLRKAFYSGKGNFGTKVSNYPPOKPOLIKGLRAHIDAGGIILLFDDQVYSLGLQLKDGWIVDPP—MHHSI	214

PmACO1-1 (XP_008224728.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	318
PdACO1-1 (XP_034211743.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	318
PaACO1-1 (XP_021823230.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	318
FvACO1-1 (XP_004293334.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	318
AaACO1-1 (XP_050367363.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	312
RcACO1-1 (XP_024198834.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	312
RuACO1a (WVR21820.1)	VINGDQLEVIINGKYSVHRVIAQPDGGR/S/ASFYNPDDDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	312
FvACO1-2 (XP_004287539.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	305
AaACO1-2 (XP_050372212.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	305
RcACO1-2 (XP_024198834.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	308
RuACO1b (WVR21822.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	305
PmACO1-2 (XP_008242414.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	300
PaACO1-2 (XP_021807092.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	301
PdACO1-2 (XP_034226304.1)	FVNIHQDQLEVLNNGRYKSTLHRVLTQDNGSR/S/ATFYNPAGDAFIOPAPALLEKETEKISAYPKVFDQYMKLYSGLKFOAKERFBEANKMESTVNLDPVATV	300

Pm: 梅 *Prunus mume* Siebold et Zucc.; Pd: 扁桃 *Prunus dulcis* (Mill.) D. A. Webb; Pa: 欧洲甜樱桃 *Prunus avium* (Linn.) Linn.; Fv: 野草莓 *Fragaria vesca* Linn.; Aa: 蕨麻 *Argentina anserina* (Linn.) Rydb.; Rc: 月季 *Rosa chinensis* Jacq.; Ru: 黑莓 *Rubus* spp. 括号中编号为 GenBank 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in GenBank. 红色框示 ACO 蛋白活性位点 The red boxes indicate the active sites of ACO proteins.

图 2 黑莓 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 与蔷薇科其他 6 种植物 ACO1 蛋白的氨基酸序列比对
 Fig. 2 Amino acid sequence alignment between *RuACO1a* and *RuACO1b* from blackberry (*Rubus* spp.) and ACO1 proteins from other six plants in Rosaceae

为 34 578.18, 理论等电点为 pI 5.40, 由 20 种氨基酸组成, 分子式为 $C_{1544}H_{2401}N_{411}O_{469}S_{11}$, 是稳定亲水性蛋白。

二级结构预测结果 (图 3-A) 显示: *RuACO1a* 中 α 螺旋占 42.95%, β 转角占 6.09%, 无规卷曲占 32.69%, 延伸链占 18.27%; *RuACO1b* 中 α 螺旋占 39.02%, β 转角占 6.23%, 无规卷曲占 35.41%, 延伸链占 19.34%。

采用 SWISS-MODEL 同源建模分别对 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 蛋白序列相似性进行分析, 结果显示: *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 与拟南芥 ACO2 (5gja.1.A) 模型的同源性最高, 以该模型为模板, 分别构建 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的三维模型 (图 3-B)。*RuACO1a* 与拟南芥 ACO2 (5gja.1.A) 模型的覆盖率为 96%, 一致性为 54%, 全球性模型质量估测值 (GMQE) 为 0.88, 模型质量较高; *RuACO1b* 与拟南芥 ACO2 (5gja.1.A) 模型的覆盖率为 96%, 一致性为 45%, GMQE 值为 0.83, 模型质量较高。*RuACO1a* 和

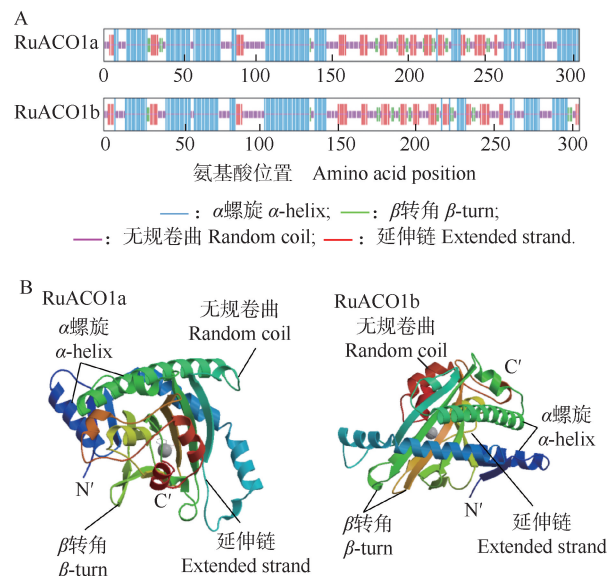


图 3 黑莓 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的二级结构预测 (A) 和三维模型构建 (B)
 Fig. 3 Secondary structure prediction (A) and three-dimensional model construction (B) of *RuACO1a* and *RuACO1b* from blackberry (*Rubus* spp.)

RuACO1b 的三维模型以 α 螺旋和无规卷曲为主。

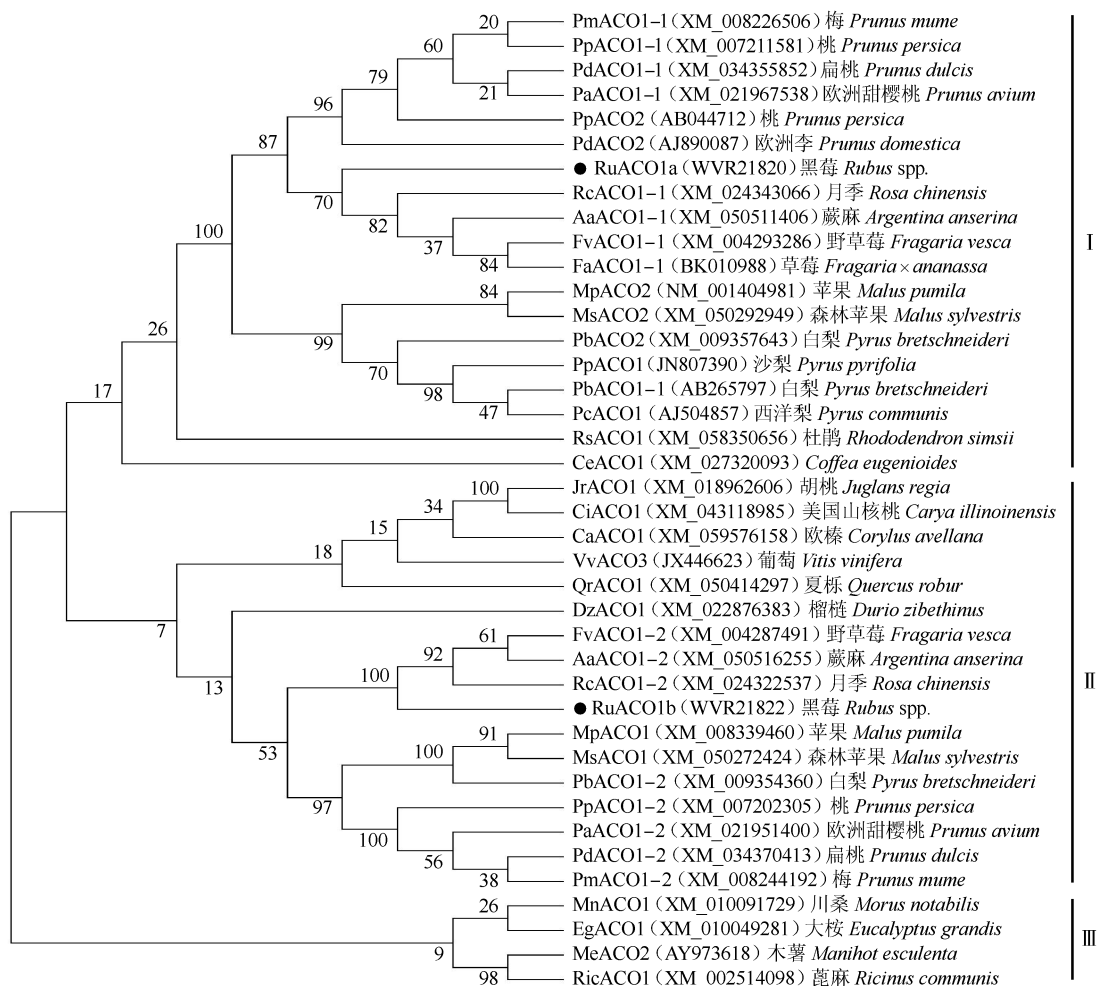
2.3 RuACO1a 和 RuACO1b 系统进化分析

系统进化树分析结果(图4)表明:黑莓 RuACO1a 与月季 RcACO1-1(GenBank 登录号 XM_024343066)、蕨麻 AaACO1-1(GenBank 登录号 XM_050511406)、野草莓 FvACO1-1(GenBank 登录号 XM_004293286)、草莓 FaACO1-1(GenBank 登录号 BK010988)亲缘关系较近,RuACO1b 与月季 RcACO1-2(GenBank 登录号 XM_024322537)、蕨麻 AaACO1-2(GenBank 登录号 XM_050516255)、野草莓 FvACO1-2(GenBank 登录号 XM_004287491)亲缘关系较近。蔷薇科植物 ACO 蛋白分别聚在 I 和 II 类,RuACO1a 和 RuACO1b 也分别属于 I 和 II 类,推测蔷薇科植物具有 2 种类型 ACO1 基因,其在分类上

相距较远。

2.4 果实发育过程及不同组织中 RuACO1a 和 RuACO1b 表达分析

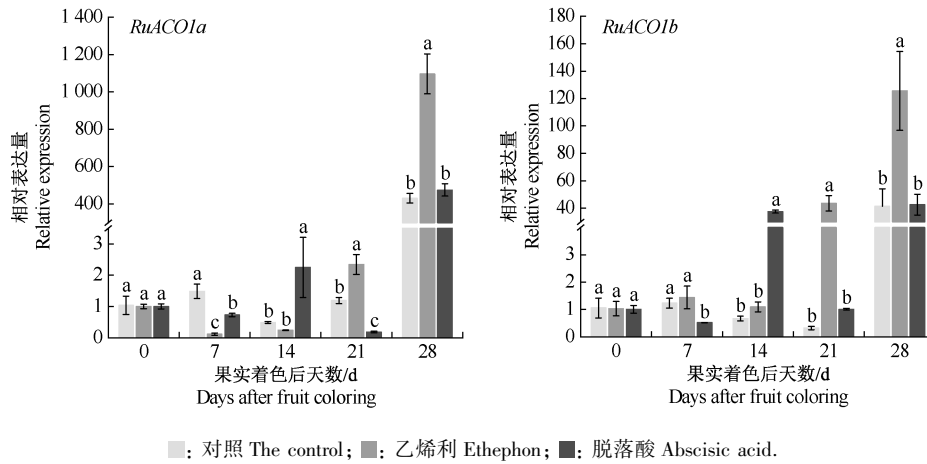
乙烯利和脱落酸处理后黑莓果实发育过程中 RuACO1a 和 RuACO1b 的表达模式见图5。结果显示:随着果实着色后时间的延长,对照的 RuACO1a 和 RuACO1b 相对表达量总体呈先降低后升高的变化趋势,且均于果实着色后 28 d 最高,但 RuACO1a 的相对表达量于果实着色后 21 d 开始升高,响应时间早于 RuACO1b。乙烯利处理后,RuACO1a 的相对表达量随着果实着色后时间的延长呈先降低后升高的变化趋势,RuACO1b 的相对表达量总体呈先平稳后升高的变化趋势,2 个基因均于果实着色后 21 d 开始升高,并于果实着色后 28 d 达到最高。脱落酸处理



分支上数值代表自展支持率 The values on the branches represent the bootstrap value. 括号中编号为 GenBank 登录号 Nos. in the brackets are accession numbers in GenBank.

图4 黑莓 RuACO1a 和 RuACO1b 与其他 26 种植物 ACO1 蛋白的系统进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of RuACO1a and RuACO1b from blackberry (*Rubus* spp.) and ACO1 proteins from other 26 plants



同一柱形图中不同小写字母表示在同一果实发育过程不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same bar graph indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different treatments in the same fruit developmental process.

图 5 乙烯利和脱落酸处理后黑莓果实发育过程中 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的表达模式
Fig. 5 Expression patterns of *RuACO1a* and *RuACO1b* during fruit developmental process of blackberry (*Rubus* spp.) after ethephon and abscisic acid treatments

后, *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的相对表达量随着果实着色后时间的延长呈“降低—升高—降低—升高”的变化趋势, 均在果实着色后 14 和 28 d 出现峰值。从果实着色后同一时间来看, 果实着色后 14 d, 脱落酸处理后 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的相对表达量显著 ($P < 0.05$) 高于对照和乙烯利处理; 果实着色后 21 和 28 d, 乙烯利处理后 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的相对表达量显著高于对照和脱落酸处理。

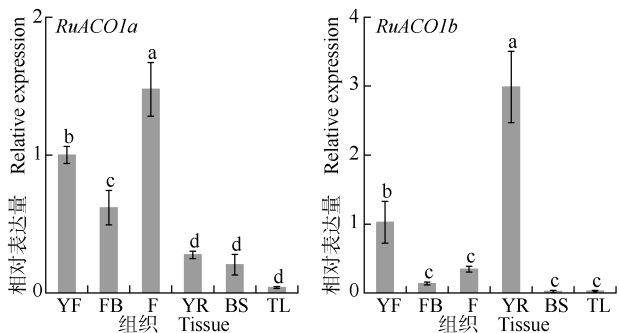
黑莓不同组织中 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的表达模式见图 6。结果显示: *RuACO1a* 在生殖器官(幼果、

花蕾和花)中的相对表达量较高, 显著高于营养器官(幼根、分枝茎和嫩叶), 其中, *RuACO1a* 在花中的相对表达量最高, 其次是幼果, 在花蕾中的相对表达量位居第 3, 在幼根、分枝茎和嫩叶中的相对表达量均较低且无显著差异; *RuACO1b* 在幼根中相对表达量最高, 其次是幼果, 在花蕾、花、分枝茎和嫩叶中的表达量均较低且无显著差异。

2.5 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥的鉴定和表型分析

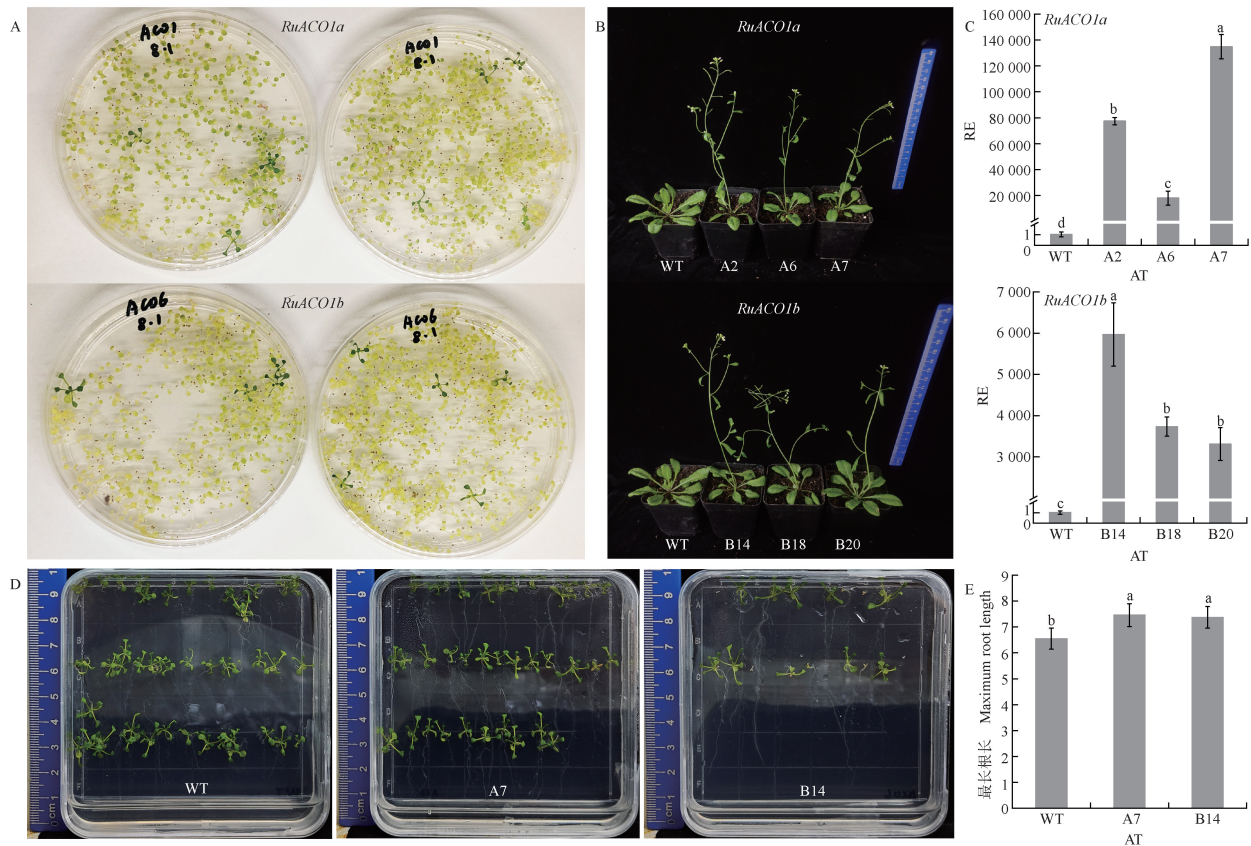
RuACO1a 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥阳性苗的鉴定及生长情况见图 7。统计和筛选 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T_0 代阳性苗, *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的转化率分别达到 0.9% 和 1.0%。对 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T_1 代阳性苗进一步筛选, 分别得到 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 相对表达量较高的 3 个株系, 分别为 A2、A6、A7 株系及 B14、B18、B20 株系。对 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 相对表达量最高的 A7 和 B14 株系的种子进行培养, 结果显示: A7 和 B14 2 个株系 T_2 代幼苗地上部与野生型无明显差异, 而最长根长显著 ($P < 0.05$) 高于野生型。

A2、A6、A7、B14、B18、B20 6 个株系的部分生长和生理指标见表 2。这 6 个株系叶片中叶绿素相对含量和氮含量均高于野生型, 其中 A2、A6、B14 和 B18 株系叶片的叶绿素相对含量和氮含量显著高于野生型。与野生型相比较, A2、A6 和 A7 株系的花期提前 5~6 d, 角果成熟期提前 10~11 d; B14、B18 和



YF: 幼果 Young fruit; FB: 花蕾 Flower bud; F: 花 Flower; YR: 幼根 Young root; BS: 分枝茎 Branching stem; TL: 嫩叶 Tender leaf. 同一柱形图中不同小写字母表示不同组织间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same bar graph indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different tissues.

图 6 黑莓不同组织中 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 的表达模式
Fig. 6 Expression patterns of *RuACO1a* and *RuACO1b* in different tissues of blackberry (*Rubus* spp.)



WT: 野生型 Wild type; A2, A6, A7: *RuACO1a* 转基因拟南芥 (AT) 株系 *RuACO1a*-transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. (AT); B14, B18, B20: *RuACO1b* 转基因拟南芥株系 *RuACO1b*-transgenic lines of *A. thaliana*. RE: 相对表达量 Relative expression. 同一柱形图中不同小写字母表示不同拟南芥材料间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same bar graph indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different materials of *A. thaliana*.

A: *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T₀ 代阳性苗筛选 Screening of T₀ generation positive seedlings of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *A. thaliana*; B: *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T₁ 代阳性苗生长情况 Growth status of T₁ generation positive seedlings of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *A. thaliana*; C: *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T₁ 代阳性苗基因表达分析 Analysis on gene expression of T₁ generation positive seedlings of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *A. thaliana*; D: *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T₂ 代株系幼苗期生长情况 Growth status of T₂ generation lines of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *A. thaliana* at seedling stage; E: *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T₂ 代株系幼苗期最长根长比较 Comparison on maximum root length of T₂ generation lines of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *A. thaliana* at seedling stage.

图7 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥阳性苗的鉴定及生长情况

Fig. 7 Identification and growth status of positive seedlings of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.

表2 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥的部分生长和生理指标¹⁾

Table 2 Some growth and physiological indexes of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.¹⁾

株系 ²⁾ Line ²⁾	叶片叶绿素相对含量 Chlorophyll relative content in leaf	叶片氮含量/(mg·g ⁻¹) Nitrogen content in leaf	花期提前天数/d Days in advance of flowering period	角果成熟期提前天数/d Days in advance of silique mature stage	C _{ACO} /(ng·g ⁻¹)	C _{ABA} /(ng·g ⁻¹)
WT	28.98±1.52b	8.94±0.54b			119.97±1.30e	565.87±23.44c
A2	31.42±1.36a	10.10±0.36a	6	10	162.29±3.28d	439.44±11.66d
A6	31.70±1.28a	10.14±0.19a	5	10	125.62±4.92e	305.78±13.24e
A7	29.38±1.41b	9.38±0.44b	6	11	194.40±8.49c	588.77±4.93bc
B14	36.34±1.12a	11.42±0.40a	7	9	177.65±4.30cd	740.55±37.62a
B18	33.78±0.43a	10.70±0.13a	5	8	218.38±6.59b	635.37±15.07b
B20	30.42±3.69b	9.74±1.06b	5	8	250.29±9.62a	734.73±23.25a

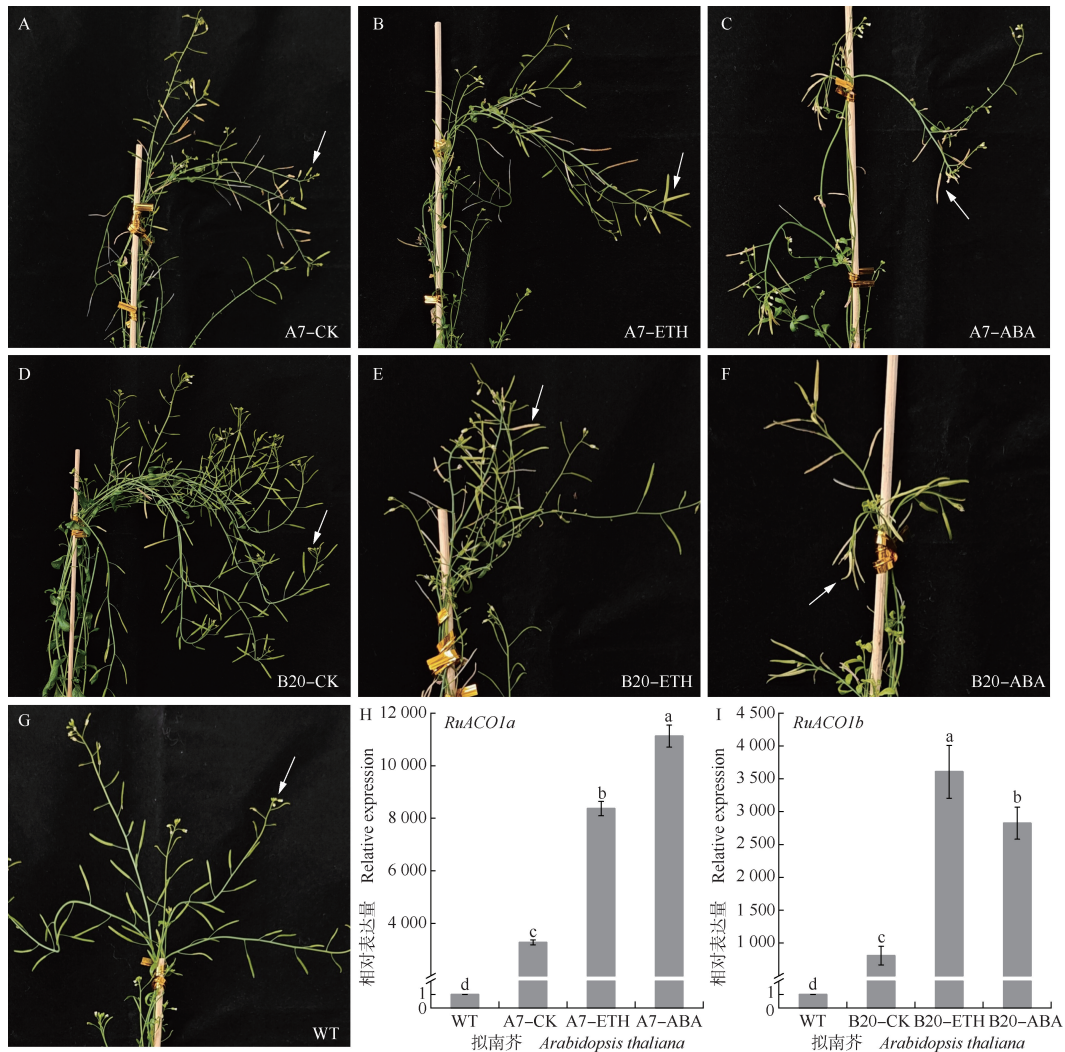
¹⁾ C_{ACO}: 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶含量 Content of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase; C_{ABA}: 脱落酸含量 Content of abscisic acid. 同一列中不同小写字母表示不同株系间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same column indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different lines.

²⁾ WT: 野生型 Wild type; A2, A6, A7: *RuACO1a* 转基因拟南芥株系 *RuACO1a*-transgenic lines of *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh.; B14, B18, B20: *RuACO1b* 转基因拟南芥株系 *RuACO1b*-transgenic lines of *A. thaliana*.

B20 株系的花期提前 5~7 d, 角果成熟期提前 8~9 d。除 A6 株系外, A2、A7、B14、B18 和 B20 株系植株的 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO) 含量均显著高于野生型; B14、B18 和 B20 株系植株的脱落酸含量显著高于野生型, A7 株系植株的脱落酸含量高于野生型但差异不显著, A2 和 A6 株系植株的脱落酸含量显著低于野生型。

2.6 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥植株受激素诱导的表达分析

分别在 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T₂ 代株系中选择 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶(ACO) 含量高的 2 个株系, 即 *RuACO1a* 转基因 A7 株系和 *RuACO1b* 转基因 B20 株系, 在结荚初期用乙烯利和脱落酸处理 15 d 后观察植株成熟情况。结果(图 8)



箭头示角果 The arrows show siliques. 同一柱形图中不同小写字母表示不同处理间差异显著 ($P < 0.05$) Different lowercases in the same bar graph indicate the significant ($P < 0.05$) differences between different treatments.

A, B, C: 分别为对照(CK)、乙烯利(ETH)和脱落酸(ABA)处理后 *RuACO1a* 转基因拟南芥 A7 株系角果生长情况 Growth status of siliques of A7 lines of *RuACO1a*-transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. after the control (CK), ethephon (ETH), and abscisic acid (ABA) treatments, respectively; D, E, F: 分别为 CK、ETH 和 ABA 处理后 *RuACO1b* 转基因拟南芥 B20 株系角果生长情况 Growth status of siliques of B20 lines of *RuACO1b*-transgenic *A. thaliana* after CK, ETH, and ABA treatments, respectively; G: 野生型拟南芥角果生长情况 Growth status of siliques of wild type of *A. thaliana*; H: ETH 和 ABA 处理后 A7 株系 *RuACO1a* 表达分析 Analysis on *RuACO1a* expression of A7 lines after ETH and ABA treatments; I: ETH 和 ABA 处理后 B20 株系 *RuACO1b* 表达分析 Analysis on *RuACO1b* expression of B20 lines after ETH and ABA treatments.

图 8 乙烯利和脱落酸处理后 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥角果的生长情况及基因表达分析

Fig. 8 Growth status of siliques and analyses on gene expression of *RuACO1a*- and *RuACO1b*-transgenic *Arabidopsis thaliana* (Linn.) Heynh. after the ethephon and abscisic acid treatments

显示:野生型(WT)的角果次第成熟,A7和B20株系的角果已明显成熟,尤其是脱落酸处理的角果成熟度趋向一致。进一步对乙烯利和脱落酸处理后A7和B20株系基因的表达情况进行分析,乙烯利和脱落酸处理后A7株系的*RuACO1a*相对表达量均较野生型和未处理A7株系显著($P<0.05$)升高,且脱落酸处理后A7株系的*RuACO1a*相对表达量显著高于乙烯利处理。乙烯利和脱落酸处理后B20株系的*RuACO1b*相对表达量也较野生型和未处理B20株系显著升高,且乙烯利处理后B20株系的*RuACO1b*相对表达量显著高于脱落酸处理。

3 讨论和结论

植物乙烯参与果实成熟和器官衰老等生长发育过程的调节。乙烯的生物合成包括2个步骤,首先S-腺苷甲硫氨酸在1-氨基环丙烷-1-羧酸合酶(ACO)的作用下转化成1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)^[39],进而通过ACO合成乙烯,ACO是催化乙烯生物合成的最终步骤限速酶^[40]。植物乙烯生物合成研究中ACO是重要的调控因子,研究ACO基因的表达调控模式对调控乙烯生物合成至关重要,控制ACO基因的表达能有效控制乙烯的生物合成并且对果实的成熟软化具有调控作用。目前研究者已在多种植物中克隆到ACO基因,并通过遗传转化证实其参与调控植株的成熟和衰老过程^[41]。黑莓果实作为一种非呼吸跃变类型小浆果,ACO基因在黑莓果实成熟软化中的功能尚未揭示。本研究首次从黑莓中克隆得到2个ACO1基因*RuACO1a*和*RuACO1b*的全长序列。

ACO蛋白含有位于N端的DIOX_N结构域和位于C端的2OG-Fe II_Oxy结构域,其中2OG-Fe II_Oxy结构域是ACO蛋白发挥活性的关键部位^[19]。本研究中,*RuACO1a*和*RuACO1b*均与蔷薇科植物月季ACO1蛋白在氨基酸序列上的一致性最高,但又各包含1个不同保守性结构域,表明二者虽均属于二价铁离子/抗坏血酸依赖型双加氧酶家族成员,但功能上存在差异。黑莓2个ACO1蛋白各自与蔷薇科其他6种植物ACO1成员具有保守的ACO蛋白活性位点,但在序列上又具有明显差异,尤其是在3'端序列差异更为明显,进一步说明蔷薇科植物存在2种类型ACO1蛋白,反映出这2个基因既存在进化上的保守

性,也明显属于2种不同类型。此外,*RuACO1a*和*RuACO1b*分别具有4和3个外显子,推测二者存在功能分化。

ACO基因家族不同成员在组织表达特异性和时空表达特性等方面的差异较大^[36]。研究发现沙梨[*Pyrus pyrifolia* (Burm. f.) Nakai] *PpACO1*和*PpACO2*均在果实中优势表达^[42];苹果中3个ACO基因成员中仅ACO1基因主要在果实中表达^[31]。番茄ACO基因家族成员ACO1、ACO2和ACO3基因的开放阅读框(ORF)区域核苷酸同源性相似度更高,且均有组织表达特异性^[21]。番茄*SlACO1*^[21]、草莓*FaACO1*^[43-44]和甜瓜(*Cucumis melo* Linn.) *CmACO1*^[45]均在果实开始成熟时急剧上调表达。本研究中,*RuACO1a*在黑莓生殖器官(幼果、花蕾和花)中的相对表达量更高,表明*RuACO1a*可能主要参与果实成熟过程;*RuACO1b*在幼果和根中的相对表达量较高,推测*RuACO1b*具有更广泛的生理功能,即除参与幼果发育外,在黑莓根生长发育调节方面也有重要作用。马兰^[46]的研究结果显示:百脉根(*Lotus corniculatus* Linn.) *LcACO1*在根中的相对表达量最高,主要参与根生长发育调节,与*RuACO1b*在黑莓根中的表达情况相似。本研究中,黑莓花中*RuACO1a*和*RuACO1b*的相对表达量均高于花蕾,推测这2个基因也参与黑莓花的衰老,促进黑莓植株从营养生长转向生殖生长。高园等^[47]的研究结果显示:茶梅(*Camellia sasanqua* Thunb.)单花花期越短,ACO基因的相对表达量越高,且盛花期ACO基因的相对表达量较花蕾期更高,这与黑莓*RuACO1a*在花中的相对表达量较花蕾更高一致。

黑莓果实着色后,*RuACO1a*和*RuACO1b*对脱落酸处理的响应模式基本相同,即均在果实着色后14d时相对表达量显著升高,这与不同硬度黑莓果实脱落酸含量在发育中期出现峰值的趋势一致^[8],表明ACO基因的表达可能受脱落酸调控。此外,与脱落酸处理相比较,乙烯利处理黑莓*RuACO1a*在成熟期(果实着色后28d)的相对表达量急剧升高,而*RuACO1b*在红果期(果实着色后21d)的相对表达量开始升高,但在成熟期其相对表达量的升高幅度低于*RuACO1a*,表明2个基因在果实成熟期均明显受乙烯诱导表达,且*RuACO1a*可能更多参与了黑莓果实的成熟。

葡萄正义ACO基因转入番茄可以有效缩短番茄

营养生长期并促进成熟^[48]。水仙 [*Narcissus tazetta* subsp. *chinensis* (M. Roem.) Masam. et Yanagih.] *NtACO1* 过表达转基因烟草 (*Nicotiana tabacum* Linn.) 的营养生长期缩短,开花较早且叶片较少^[41]。本研究将黑莓 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转入拟南芥,发现转基因株系花期较野生型提前 5~7 d, *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥 T2 代株系的角果成熟期分别较野生型提前 10~11 和 8~9 d。此外,乙烯利和脱落酸处理后 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 转基因拟南芥株系均在结荚期促进了角果成熟,且在脱落酸处理下出现角果倾向一致成熟的现象,推测在拟南芥结荚初期用脱落酸处理可以加速 *ACO* 转基因拟南芥角果的成熟和衰老,与前述 *ACO* 基因可能受脱落酸调控参与果实成熟启动一致。

综上所述,本研究对参与黑莓果实成熟软化中的 2 个 ACC 氧化酶基因 *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 进行了克隆、序列分析和功能鉴定,其蛋白序列既具有保守的 *ACO* 蛋白活性位点又具有各自的功能结构域,分属于蔷薇科植物 *ACO1* 蛋白的 2 种类型。在表达模式上, *RuACO1a* 和 *RuACO1b* 在果实生长发育阶段响应脱落酸和乙烯利处理的表达模式有一定程度相似性,但 *RuACO1a* 参与果实发育成熟的作用更积极。转基因功能鉴定结果显示这 2 个基因均有促进拟南芥提早开花和角果成熟的作用。本研究结果为后续揭示黑莓等柔软多汁浆果果实的成熟软化机制和分子调控提供了基础理论依据。

参考文献:

- [1] DE SOUZA V R, PEREIRA P A P, DA SILVA T L T, et al. Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits[J]. Food Chemistry, 2014, 156: 362-368.
- [2] SEERAM N P. Berry fruits: compositional elements, biochemical activities, and the impact of their intake on human health, performance, and disease[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2008, 56(3): 627-629.
- [3] JUNQUEIRA-GONÇALVES M P, ALARCON É, NIRANJAN K. The efficacy of potassium sorbate-coated packaging to control postharvest gray mold in raspberries, blackberries and blueberries[J]. Postharvest Biology and Technology, 2016, 111: 205-208.
- [4] CLARK J R, FINN C E. New trends in blackberry breeding[J]. Acta Horticulturae, 2008, 777: 41-48.
- [5] SEYMOUR G B, ØSTERGAARD L, CHAPMAN N H, et al. Fruit development and ripening[J]. Annual Review of Plant Biology, 2013, 64: 219-241.
- [6] 彭永彬, 李玉, 徐鹏程, 等. 葡萄果实硬度及影响硬度的主要因素[J]. 浙江农业学报, 2014, 26(5): 1227-1234.
- [7] WANG H, HUANG H, HUANG X. Differential effects of abscisic acid and ethylene on the fruit maturation of *Litchi chinensis* Sonn. [J]. Plant Growth Regulation, 2007, 52(3): 189-198.
- [8] 熊振豪, 张春红, 李维林, 等. 黑莓果实转色至成熟进程中相关激素含量的变化[J]. 北方园艺, 2018(12): 13-19.
- [9] JIA H, XIE Z, WANG C, et al. Abscisic acid, sucrose, and auxin coordinately regulate berry ripening process of the Fujiminori grape [J]. Functional and Integrative Genomics, 2017, 17(4): 441-457.
- [10] JIA H F, CHAI Y M, LI C L, et al. Abscisic acid plays an important role in the regulation of strawberry fruit ripening [J]. Plant Physiology, 2011, 157(1): 188-199.
- [11] BLEECKER A B, KENDE H. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2000, 16: 1-18.
- [12] PALONEN P, WEBER C. Fruit color stability, anthocyanin content, and shelf life were not correlated with ethylene production rate in five primocane raspberry genotypes [J]. Scientia Horticulturae, 2019, 247: 9-16.
- [13] YANG H, WU Y, WU W, et al. Transcriptomic analysis of blackberry plant (*Rubus* spp.) reveals a comprehensive metabolic network involved in fruit ripening process[J]. Biologia, 2021, 76(12): 3827-3840.
- [14] PERKINS-VEAZIE P, CLARK J R, HUBER D J, et al. Ripening physiology in 'Navaho' thornless blackberries: color, respiration, ethylene production, softening, and compositional changes [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 2000, 125(3): 357-363.
- [15] LIPE J A. Ethylene in fruits of blackberry and rabbiteye blueberry [J]. Journal of the American Society for Horticultural Science, 1978, 103(1): 76-77.
- [16] BURDON J N, SEXTON R. Fruit abscission and ethylene production of red raspberry cultivars [J]. Scientia Horticulturae, 1990, 43(1/2): 95-102.
- [17] LÓPEZ-GÓMEZ A, NAVARRO-MARÍNEZ A, GARRE A, et al. The potential of essential oils from active packaging to reduce ethylene biosynthesis in plant products. Part 1: vegetables (broccoli and tomato) [J]. Plants, 2023, 12(19): 3404.
- [18] SHAH H M S, SINGH Z, KAUR J, et al. Trends in maintaining postharvest freshness and quality of *Rubus* berries [J]. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 2023, 22: 4600-4643.
- [19] RUDUŚ I, SASIAK M, KĘPCZYŃSKI J. Regulation of ethylene biosynthesis at the level of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (*ACO*) gene [J]. Acta Physiologiae Plantarum, 2013, 35(2): 295-307.
- [20] HOLDSWORTH M J, BIRD C R, RAY J, et al. Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato [J]. Nucleic Acids Research, 1987, 15(2): 731-739.
- [21] HOUBEN M, VAN DE POEL B. 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase (*ACO*): the enzyme that makes the plant

- hormone ethylene[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 695.
- [22] XIONG A S, YAO Q H, PENG R H, et al. Different effects on ACC oxidase gene silencing triggered by RNA interference in transgenic tomato [J]. *Plant Cell Reports*, 2005, 23(9): 639–646.
- [23] BATRA A, SANE V A, TRIVEDI P K, et al. Suppression of ACC oxidase expression in tomato using heterologous gene from banana prolongs shelf-life both on vine and post-harvest [J]. *Current Science*, 2010, 99(9): 1243–1250.
- [24] BRISOU G, PIQUEREZ S J M, MINOIA S, et al. Induced mutations in *SIE8* and *SLACO1* control tomato fruit maturation and shelf-life[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2021, 72(20): 6920–6932.
- [25] KOSUGI Y, MATSUOKA A, HIGASHI A, et al. 2-aminooxyisobutyric acid inhibits the *in vitro* activities of both 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase in ethylene biosynthetic pathway and prolongs vase life of cut carnation flowers[J]. *Journal of Plant Biology*, 2014, 57(4): 218–224.
- [26] SHI L S, LIU J P. Molecular cloning and expression analysis of an 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene from *Oncidium Gower Ramsey* [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2016, 469(2): 203–209.
- [27] SORNCHAI P, VAN DOORN W G, IMSABAI W, et al. *Dendrobium* orchids carrying antisense ACC oxidase: small changes in flower morphology and a delay of bud abortion, flower senescence, and abscission of flowers [J]. *Transgenic Research*, 2020, 29(4): 429–442.
- [28] 马 男, 蔡 蕾, 陆旺金, 等. 外源乙烯对月季(*Rosa hybrida*)切花花朵开放的影响与乙烯生物合成相关基因表达的关联[J]. *中国科学 C 辑: 生命科学*, 2005, 35(2): 104–114.
- [29] 刘 月. 观赏海棠叶花果表型变异及果实宿存相关的乙烯、脱落酸和 *ACO1* 基因研究[D]. 秦皇岛: 河北科技师范学院, 2020: 31–33.
- [30] 吴建阳, 李彩琴, 陆旺金, 等. 荔枝 *ACO1* 基因克隆及其与幼果落果的关系[J]. *果树学报*, 2013, 30(2): 207–213.
- [31] BINNIE J E, MCMANUS M T. Characterization of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) oxidase multigene family of *Malus domestica* Borkh [J]. *Phytochemistry*, 2009, 70(3): 348–360.
- [32] 朱 敏, 尹明安, 叶红红, 等. 苹果 *ACO1* 基因及转录因子 *MdHB-1* 基因的表达模式[J]. *食品科学*, 2014, 35(23): 166–170.
- [33] 张春红, 汤飞云, 王小敏, 等. 不同黑莓品种果实形态和硬度分析及其解剖结构和微形态特征观察[J]. *植物资源与环境学报*, 2013, 22(3): 88–94.
- [34] 张春红, 吴文龙, 闫连飞, 等. 不同硬度类型黑莓果实生长发育动态分析[J]. *经济林研究*, 2014, 32(4): 88–93.
- [35] ZHANG C, WU Y, XIONG Z, et al. ABA accelerates blackberry (*Rubus* spp.) fruit ripening by positively affecting ripening-related gene expression and metabolite profiles [J]. *Journal of Berry Research*, 2021, 11(4): 705–720.
- [36] 陈银华, 黄 伟, 王 海. ACC 氧化酶基因研究进展[J]. *海南大学学报: 自然科学版*, 2006, 24(2): 194–200.
- [37] LI X, WANG Y, LI J, et al. qPCRtools: an R package for qPCR data processing and visualization[J]. *Frontiers in Genetics*, 2022, 13: 1002704.
- [38] 李华盛, 鹿金颖, 潘 毅, 等. 航天环境对拟南芥幼苗内参基因表达稳定性的影响[J]. *航天医学与医学工程*, 2014, 27(1): 50–53.
- [39] ADAMS D O, YANG S F. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene[J]. *Plant Physiology*, 1977, 60(6): 892–896.
- [40] ADAMS D O, YANG S F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1979, 76(1): 170–174.
- [41] 孙申申, 温秀萍, 杨菲颖, 等. ‘云香’水仙 ACC 氧化酶基因克隆及遗传转化[J]. *园艺学报*, 2017, 44(7): 1388–1396.
- [42] SHI H Y, ZHANG Y X. Pear *ACO* genes encoding putative 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs are functionally expressed during fruit ripening and involved in response to salicylic acid[J]. *Molecular Biology Reports*, 2012, 39(10): 9509–9519.
- [43] TRAINOTTI L, PAVANELLO A, CASADORO G. 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? [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(418): 2037–2046.
- [44] MERCHANTE C, VALLARINO J G, OSORIO S, et al. Ethylene is involved in strawberry fruit ripening in an organ-specific manner [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2013, 64(14): 4421–4439.
- [45] LASSERRE E, BOUQUIN T, HERNANDEZ J A, et al. Structure and expression of three genes encoding ACC oxidase homologs from melon (*Cucumis melo* L.) [J]. *Molecular and General Genetics*, 1996, 251(1): 81–90.
- [46] 马 兰. 百脉根 ACC 氧化酶基因 *LcACO1* 的克隆及序列分析[J]. *分子植物育种*, 2017, 15(2): 447–453.
- [47] 高 园, 宫树森, 解 元, 等. 茶梅 *ACO* 基因的克隆及表达分析[J]. *基因组学与应用生物学*, 2023, 42(3): 308–317.
- [48] 佟少明, 席海秀, 艾可筠, 等. 葡萄 *VvACO1* 的表达及在拟南芥和番茄中的遗传转化[J]. *园艺学报*, 2016, 43(12): 2315–2324.

(责任编辑: 张明霞)