

“红阳”猕猴桃采后乙烯生成系统 I、II 转变中的关键基因

刘瑞豪, 姚鳗鲡, 高贵田*, 王 鹏
(陕西师范大学食品工程与营养科学学院 西安 710100)

摘要 以“红阳”猕猴桃为原料,采用乙烯进行干预,探究采后果实贮藏期内后熟理化指标、乙烯生成速率和乙烯生成关键酶 ACS 和 ACO 活性的变化差异。利用实时荧光定量 PCR 结合生物信息学分析研究影响 ACS 和 ACO 的基因家族各成员的表达差异,克隆乙烯生成系统 I 到 II 转变的关键基因。结果表明:“红阳”猕猴桃在采后贮藏期间硬度从 8.7 kg/cm² 下降至 0.02 kg/cm²、可溶性固容物从 8.1% 上升至 16.9%,乙烯干预和未干预组猕猴桃果实的 ACS、ACO 活性都呈先上升后下降的趋势,与呼吸强度、乙烯释放速率的变化趋势具有一致性。未干预组样本果实 ACS、ACO 活性、呼吸强度同时第 9 天达到峰值,而乙烯释放速率第 7 天达到峰值,乙烯处理组则同时第 5 天达到峰值,表明乙烯处理可以加快猕猴桃果实呼吸高峰、乙烯释放速率高峰和 ACS、ACO 活性变化峰值的到来。从“红阳”猕猴桃果实中克隆得到 6 个 ACO 基因,命名为 *AcACO1-6*。*AcACO1-6* 编码区序列为 1 101~1 270 bp,编码 352~402 个氨基酸,核苷酸序列同源性为 28.3%~99.3%,且均有相同保守结构域 PLN02299,该结构域具有 ACO 酶活性。qRT-PCR 结果表明 ACO 相对表达量是 ACS 的 500 倍,ACO 基因家族中的 *AcACO1* 和 *AcACO3* 表达量的变化,和乙烯生成、酶活性变化有高度一致性($R>0.85$),且其启动子序列富含涉及转录调控的顺式作用元件,提示 *AcACO1* 和 *AcACO3* 基因是乙烯生成系统 I 到系统 II 转变的关键基因。

关键词 猕猴桃; 红阳; 乙烯; ACS; ACO

文章编号 1009-7848(2024)03-0191-10 DOI: 10.16429/j.1009-7848.2024.03.019

“红阳”猕猴桃属于中华猕猴桃,营养价值丰富^[1],在清除自由基、预防癌症、抗衰老等方面具有明显的生物活性功能^[2-3]。因“红阳”猕猴桃呼吸跃变的特性,故在采后贮藏过程中极易软化腐烂,鲜食期明显减短^[4]。相关研究已证实,在果实后熟阶段乙烯是调控成熟衰老植物激素,参与果实成熟衰老、花与叶片衰老脱落等多个过程的生物调控,对果实采后品质变化有着重要的影响^[5]。

乙烯的生成由系统 I 和系统 II 共同调控,系统 I 负责基础乙烯低速率的生成,系统 II 负责乙烯集中生成。猕猴桃果实采后一系列生理变化都受到乙烯的调控,且大多数与成熟相关的生理变化发生在系统 I 阶段^[6]。目前关于猕猴桃果实中乙烯调控的研究主要集中在信号转导途径,乙烯信号传导过程中多个调控元件的功能及如何对非生物因素的应答,研究发现 *AdETR1* 基因可能在传感中起关键作用并将这种反应传递给受体家族的

其它成员,而激活了信号转导途径^[7-9]。ACS、ACO 是乙烯生成过程中重要的限速酶,均由多基因家族编码,并会在植物的生长发育与生物和非生物逆境胁迫的进程中发生响应,进而调节植物中乙烯的生成及作用^[10-12]。乙烯生成系统 I 到 II 的转变与 ACS、ACO 存在紧密联系^[13-14],然而转变中的关键基因尚未见报道。基于已完成测序的“红阳”猕猴桃基因组,为实施猕猴桃乙烯生成系统 I 到 II 转变的关键基因筛选与验证奠定了研究基础。

本研究通过监测采后贮藏过程中“红阳”猕猴桃果实品质、呼吸强度、乙烯释放速率、相关酶活性及基因表达的动态变化,克隆关键基因及序列分析,厘清“红阳”猕猴桃乙烯生成系统 I 到 II 转变的关键基因,以期延缓猕猴桃果实衰老和延长果实贮藏期提供理论参考。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

“红阳”猕猴桃,采于陕西省眉县果业中心试验基地。挑选果型大小均匀、无机械损伤、成熟度一致的猕猴桃果实分成 2 组,处理组(ETH)采用 100 μL/L 的乙烯利浸泡 1 min,对照组(CK)猕猴

收稿日期: 2023-03-26

基金项目: 西安市重点产业链项目(22NYGG0008)

第一作者: 刘瑞豪,男,硕士

通信作者: 高贵田 E-mail: gaoguitian2006@snnu.edu.cn

桃样本无处理。猕猴桃按每30个一组放入已消毒的筐中,于(20±0.5)℃、85%~95%湿度下贮藏,每2天取一组猕猴桃测定预设指标,共取11d。分别取果实果肉与中轴胎座部分液氮速冻,样品保存于-80℃冰箱,用于酶活测定、基因表达和克隆研究。

1.2 仪器与设备

Multiscan GO 全波长酶标仪,美国赛默飞世尔公司;Agilent 6890N 气相测谱仪,安捷伦科技(中国)有限公司;3500D 凝胶成像仪,北京君意东方电泳设备有限公司;RF-6000 荧光定量PCR仪,美国热力公司;BIO-RAD 梯度PCR仪,北京元业伯乐科技发展有限公司;TS-200DC 恒温振荡器,上海天呈实验仪器制造有限公司。

1.3 方法

1.3.1 “红阳”猕猴桃果实采后生理变化研究 随机选取8个猕猴桃,削去果皮,硬度计测定取其平均值。测定硬度后的猕猴桃果实样品研碎过滤,滤液用手持折光仪测定可溶性固形物含量并取其平均值。称取1kg左右猕猴桃果实参照曹建康等^[15]的方法计算呼吸强度。乙烯释放速率参照刘洪冲

等^[16]方法测定。每个试验重复3次。

1.3.2 “红阳”猕猴桃果实采后 ACS、ACO 活性变化研究 ACS、ACO 提取缓冲液在 Dong 等^[17]的基础上参照曹建康等^[15]方法配置。具体为,称取5g猕猴桃组织在液氮条件下研磨成粉进行粗提,然后用 mlbio 酶联免疫分析试剂盒测定酶的活性,试验重复3次取平均值。

1.3.3 “红阳”猕猴桃果实 ACS、ACO 基因差异表达分析 “红阳”猕猴桃果实在液氮条件下研磨成粉,使用试剂盒(HiPure Plant RNA Mini Kit)提取RNA进行反转录,得到的cDNA进行实时荧光定量PCR,引物见表1。

Real-Time PCR 反应以猕猴桃 Actin 为内参,上游引物序列 5'-TGCATGAGCGAT-CAAGTTTCAAG-3',下游引物序列 5'-TGTCC-CATGTCTGGTTGATGACT-3'。反应程序为:95℃预变性 10 min;90℃变性 20 s,61℃退火 20 s(此处荧光信号采集),循环 40 次;熔解曲线温度范围为 55~95℃。每个样品 3 个生物学重复,基因相对表达量通过 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers for quantitative real-time PCR

基因名称	上游引物	下游引物
<i>AcACS1</i>	TTCGCCAGGGTCATCCTTTC	AGCTTGCTTTGCCAACACTG
<i>AcACS2</i>	CACGGTTTTCAATCAGCCCG	GGGTGGAAACTAGCCCGAAA
<i>AcACS3</i>	AAGTTGGCACAAGGCGAGTA	ACATCTGGGTCAACCGACAC
<i>AcACS4</i>	AATTTCTGTCCTCCAAACGCAGC	TCCCTTCCAAACTCCACG
<i>AcACS5</i>	CACGGAATTCACGAGCGTTG	TTCTCCTAGCGGTTGTCACG
<i>AcACS6</i>	CCAGGCAACTGCTGATGGAT	CCGGGTCTGCCAAACAAAAG
<i>AcACO1</i>	CCTGCACTGGTGGACAAAGA	ACCCAAGTTAGCGGCACTTT
<i>AcACO2</i>	TCGATGTCCCGCAATGAAA	GTGCCGGATAGATGACAGCA
<i>AcACO3</i>	AGAATGGATCGATGTCCCGC	TTGCCATCCGTCTGAGCAAT
<i>AcACO4</i>	CGTGATGCACCGTGTGATTG	TTAAACCTCGGCTCCTTGGC
<i>AcACO5</i>	CAATCCTGGCAATGATGCGG	AATCTTGGCCCTTAGCCTG
<i>AcACO6</i>	CTCGTTCTACAACCCTGGCA	GCCTTCATGGCTTCAAACCG

1.3.4 “红阳”猕猴桃果实 ACO 基因克隆 用 Gene ID 在 NCBI 检索并获得相应基因的 CDS 序列,通过 Primer 6.0 软件设计引物(表 2),以反转录得到的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应程序为:98℃预变性 30 s;98℃变性 10 s,58~60℃退

火 20 s,72℃延伸 30 s,30 个循环;72℃终延伸 10 min。扩增产物进行胶回收,然后与 pTOPO-Blunt 载体连接,转化至大肠杆菌感受态细胞 DH5 α ,挑取阳性克隆,测序验证。

表 2 克隆所用引物
Table 2 Primers for cloning

基因名称	上游引物	下游引物
<i>AcACO1</i>	ATGGAGGCTTCCAGTCATTGAC	CAACACACCAGCCAAGCAA
<i>AcACO2</i>	ATGGAGACTTCCAGTCATCGA	AAGACCACCAGCCAAGCAC
<i>AcACO3</i>	ATGGAGGCTTCCAGTCATTG	TGTGAACTCCAAGACCAAGCTC
<i>AcACO4</i>	ATGGAGGCTTCCCAATCATTG	AGCAAATCCTGTGGTCAGCAC
<i>AcACO5</i>	ATGGAGACCTTCCAGTGATTAAC	AGAACCCAACACTTGACACTTCC
<i>AcACO6</i>	ATGGAGGCTTCCAGTC	CTCGTAACTGCCTTATGAGT

1.3.5 “红阳”猕猴桃果实 ACO 基因序列分析 通过软件 DNASTar, DNAMAN, 在线工具 NCBI, PlantCARE 和数据库 CDD 进行生物信息学分析。

1.4 数据统计分析

通过 originPro 2015 进行绘图, SPSS19.0 进行数据统计分析, LSD 法用于数据的多重比较 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 “红阳”猕猴桃采后 20 °C 贮藏生理指标的变化

如图 1a 和图 1b 所示, “红阳”猕猴桃对照组

和处理组果实硬度在整个贮藏期均随着贮藏时间的延长而下降, 可溶性固形物含量(TSS)则都呈整体上升的趋势。乙烯延缓了果实硬度的下降和 TSS 的上升, 但对照组和处理组整体并无显著性差异 ($P < 0.05$), 表明乙烯处理对猕猴桃硬度和 TSS 影响较小。进入贮藏后期, 对照组和处理组果实均处于可食用硬度范围内。

图 1c 和图 1d 显示了贮藏过程中对照组和处理组“红阳”猕猴桃果实呼吸强度和乙烯释放速率的动态变化。结果表明呼吸强度与乙烯释放速率变化趋势具有一致性, 均表现为先上升后下降的趋势。乙烯处理加快了猕猴桃果实呼吸高峰的到

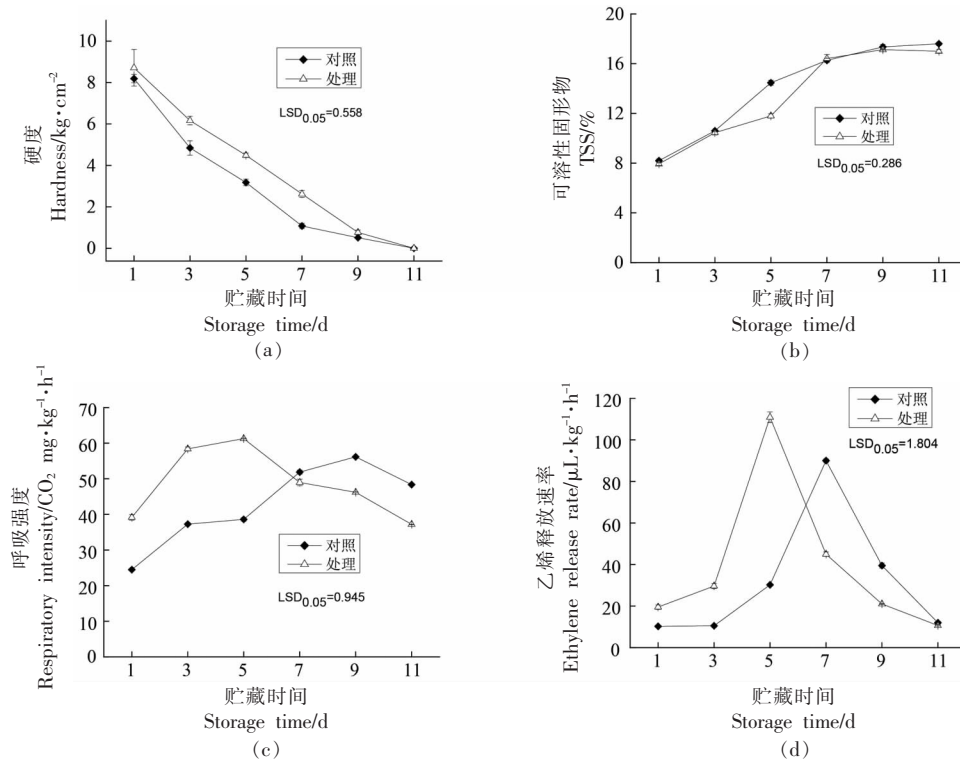


图 1 “红阳”猕猴桃采后 20 °C 贮藏生理指标的变化

Fig.1 Changes of physiological indexes of 'Hongyang' kiwifruit stored at 20 °C

来,提高了果实的呼吸速率。处理组在第5天达到峰值 $61.3 \text{ CO}_2 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$, 对照组则在第9天达到峰值 $56.2 \text{ CO}_2 \text{ mg}/(\text{kg}\cdot\text{h})$ 。在第7日之前,处理组猕猴桃果实呼吸强度和乙烯释放速率均高于对照组,之后对照组高于处理组。处理组猕猴桃乙烯释放速率高峰与呼吸高峰出现的时间一致,均为第5天;而对照组乙烯释放速率高峰在第7天出现早于呼吸高峰,表明外源乙烯处理促进了猕猴桃果实乙烯的自催化。

2.2 “红阳”猕猴桃采后贮藏果实 ACS 和 ACO 活性的变化

图 2a 和图 2b 显示了贮藏过程中对照组和

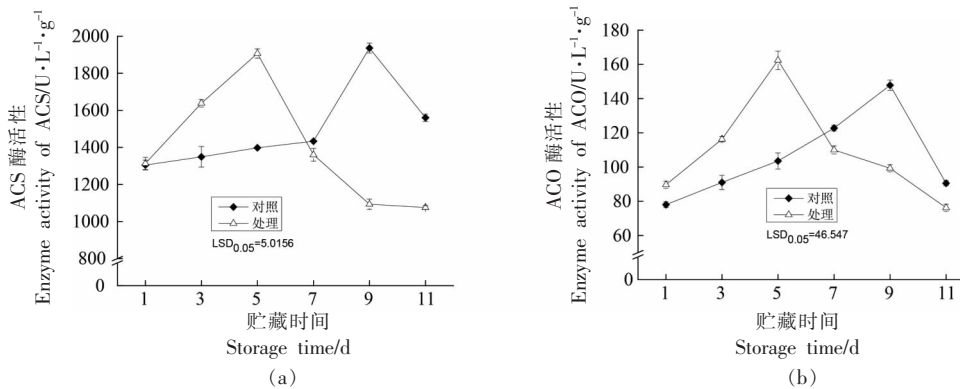


图 2 “红阳”猕猴桃采后 20 °C 贮藏果实 ACS 和 ACO 活性的变化

Fig.2 Changes of ACS activity and ACO activity of ‘Hongyang’ kiwifruit during storage at 20 °C

2.3 “红阳”猕猴桃采后贮藏期乙烯释放速率相关性分析

如表 3 所示,“红阳”猕猴桃乙烯释放速率与呼吸强度、ACS 活性、ACO 活性总体趋势有一致性。乙烯处理组果实乙烯释放速率与 ACS 活性呈显著正相关 ($P<0.05$), 与 ACO 活性呈极显著正相关 ($P<0.01$), 相关系数分别为 0.846 和 0.956。

2.4 “红阳”猕猴桃果实 ACS、ACO 基因差异表达

2.4.1 “红阳”猕猴桃 ACS 基因相对表达量的变化 如图 4 所示,对“红阳”猕猴桃有关乙烯生成的 ACS 基因的相对表达量变化进行分析, *A-cACS1~6* 是猕猴桃 ACS 基因家族中的 6 个基因,在“红阳”猕猴桃果实中的表达丰度均较低。对照组和处理组 ACS 基因表达量均呈先上升后下降又上升的趋势,但处理组表达量均小于对照组,表

处理组“红阳”猕猴桃果实 ACS 和 ACO 活性的动态变化。结果表明 ACS 和 ACO 的变化趋势相似,均为先上升后下降。乙烯处理加快了两种酶活性高峰的到来。处理组猕猴桃 ACS、ACO 活性均在第 5 天达到峰值, 对照组活性则均在第 9 天达到峰值。

不同的是, 处理组和对照组猕猴桃在峰值处的 ACS 活性基本一致, 但 ACO 活性处理组要高于对照组, 表明乙烯似乎对 ACO 的影响更大。除此之外, 两种酶的活性从第 7 天开始, 对照组均大于处理组。

表 3 “红阳”猕猴桃乙烯释放速率相关系数

Table 3 Relation coefficient of ethylene release rate of ‘Hongyang’ kiwifruit

乙烯释放速率	呼吸强度	ACS 活性	ACO 活性
对照	0.581	0.764	0.740
处理	0.758	0.846*	0.956**

注: * 和 ** 分别表示显著相关 ($P<0.05$) 和极显著相关 ($P<0.01$)。

明乙烯抑制了 ACS 基因的表达。基因家族中 *A-cACS3* 基因表达量高于其它基因, 但未见绝对量差异极显著的成员。

2.4.2 “红阳”猕猴桃 ACO 基因相对表达量的变化 如图 5 所示,对“红阳”猕猴桃有关乙烯生成的 ACO 基因的相对表达量变化进行分析, *A-cACO1~6* 是猕猴桃 ACO 基因家族中的 6 个基因。 *A-cACO1*、*A-cACO3*、*A-cACO5* 在“红阳”猕猴桃果实中的表达均对乙烯有所响应; *A-cACO2* 和 *A-cACO4*

的表达明显受乙烯的抑制调控，且在整个贮藏期内处理组基因表达量均小于对照组。此外，在基因家族中 *AcACO1*、*AcACO3* 基因表达量显著高于其它基因，可作为乙烯处理前后基因调控程度表征的关键靶点。结果发现 *AcACO1*、*AcACO3* 对照组基因表达量在整个贮藏期间基本呈现一直上升的趋势，而处理组则呈现先上升后下降再上升的趋

势。乙烯处理加快了 *AcACO1*、*AcACO3* 基因表达高峰的到来，对照组分别在第 11 天、第 9 天达到峰值；处理组则均都在第 7 天达到峰值。*AcACO1*、*AcACO3* 基因表达量在贮藏前期对照组和处理组无显著差异，贮藏后期处理组小于对照组，与 ACO 酶活性变化相似。



图 3 “红阳”猕猴桃采后 20 °C 贮藏 ACS 基因相对表达量热图

Fig.3 The heatmap of ACS genes expression of ‘Hongyang’ kiwifruit during storage at 20 °C



图 4 “红阳”猕猴桃采后 20 °C 贮藏 ACO 基因相对表达量热图

Fig.4 The heatmap of ACO genes expression of ‘Hongyang’ kiwifruit during storage at 20 °C

2.5 ACO 基因编码蛋白的结构域预测

通过 NCBI 数据库 CDD 预测蛋白质结构域，结果如图 6 所示，均含有保守结构域 PLN02299，该结构域具有 1-氨基环丙烷-1-羧酸氧化酶活性

(ACC 氧化酶, ACO)。

2.6 猕猴桃 ACO 家族基因同源性比对

运用 DNAMAN 软件进行核酸序列比对、同源性分析，猕猴桃 ACO 基因家族的同源性如表 4 所

示。家族中各基因之间同源性差异性较大,同源性位于 28.3%~99.3%之间。其中 *AcACO2* 和 *AcACO3* 核酸序列同源性最高,达到 99.3%;*AcACO4*

和 *AcACO5* 核酸序列同源性最低,为 28.3%。其余核酸序列同源性达到了 70%以上,同源性较高。

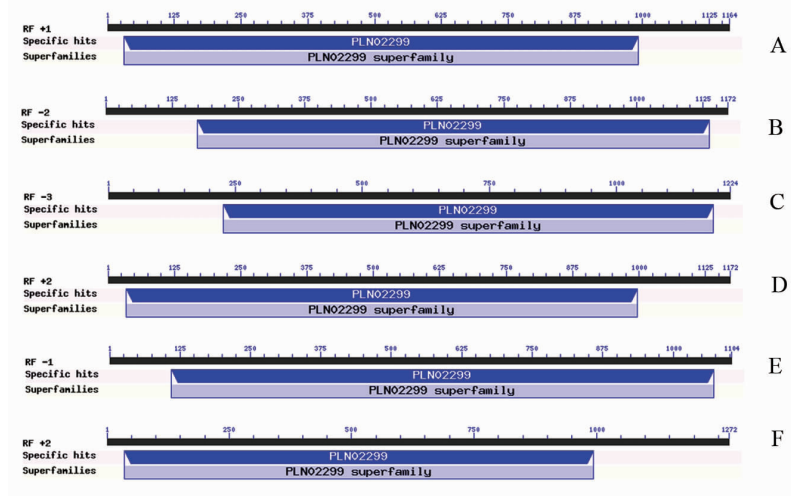


图 5 ACO 蛋白保守结构域分析(A~F 为 *AcACO1*~6)

Fig.5 Analysis the conserved domain of ACO protein (A~F is *AcACO1*~6)

表 4 猕猴桃 ACO 家族基因同源性(%)

Table 4 The pairwise comparison (%) of ACO gene in kiwifruit

AcACO	1	2	3	4	5	6
1	100					
2	40.6	100				
3	40.6	99.3	100			
4	98.8	41.0	41.1	100		
5	38.2	76.1	76.1	28.3	100	
6	83.4	38.6	38.7	83.3	36.9	100

2.7 猕猴桃 ACO 基因启动子预测

将克隆得到的 *AcACO1*~6 基因在“红阳”猕猴桃网站 (<http://kiwifruitgenome.org/home>) 进行 BLAST,选取起始密码子 ATG 上游 2 000 bp 序列作为预测的启动子序列,然后使用 PlantCare 在线分析软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.Be/webtools/Plantcare/html/>) 对其进行分析。PlantCare 分析结果显示,*AcACO1*~6 基因启动子上包含众多涉及转录调控的顺式作用调控元件和富含核心元件的保守序列,如 TATA 框、CAAT 框等,初步证明本研究选取的基因范围的确是启动子区域。同时利用 TBtools 软件将所有的转录调控作用元件分布进行了统一整理归纳并绘制成图,如图 6 所示。

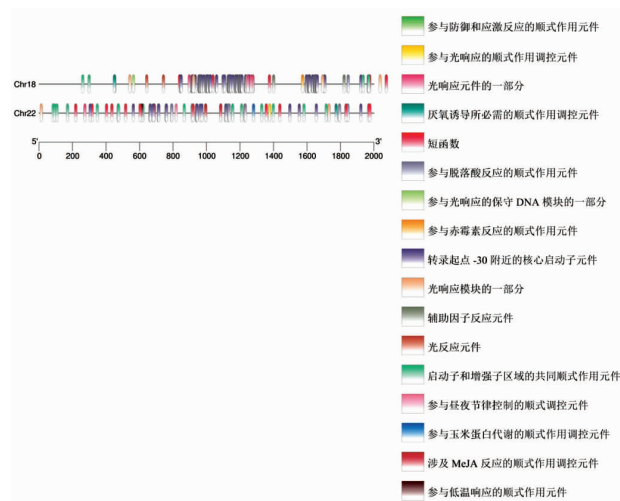


图 6 *AcACO1*~6 基因启动子顺式作用调控元件分布图

Fig.6 Distribution of cis-acting regulatory elements on *AcACO1*~6 gene promoter

AcACO1-6 基因启动子区域上包括的转录调控顺式作用元件涉及到光响应元件、昼夜节律控制元件、低温胁迫响应元件、脱落酸响应元件、生长素响应元件、赤霉素响应元件、干旱胁迫响应元件等,可以发现 *AcACO1* 和 *AcACO4*, *AcACO2* 和 *AcACO3* 上的转录调控顺式作用元件分布相同,这是因为这两对基因的同源率分别达到 98.8% 和 99.3%。6 个基因的光响应元件数量基本相同;植物激素元件 *AcACO1-4* 基因要多于 *AcACO5* 基因和 *AcACO6* 基因;环境响应元件 *AcACO6* 基因最多,达到了 8 个,而其它 5 个基因均较少。*AcACO1* 基因没有特有的元件,*AcACO3* 基因有两个特有元件:生长素反应元件和参与赤霉素反应的顺式作用元件,6 个基因共有的元件有 7 个。

3 讨论与结论

“红阳”猕猴桃在整个采后贮藏期硬度持续下降、可溶性固容物含量持续上升,对照组和乙烯处理组之间没有显著性差异 ($P>0.05$),Tilahun 等^[20]的研究中认为猕猴桃如果采收较晚,会导致外源乙烯对猕猴桃硬度、可溶性固容物含量的影响不明显。现有报道发现乙烯的生成由两个系统负责调控,系统 I 参与跃变前低速率生成基础乙烯,系统 II 负责在跃变期生成大量乙烯且与猕猴桃等呼吸跃变型果实成熟紧密相关^[22-23]。而外源乙烯只有在果实跃变期前处理才会发挥作用,导致果实呼吸强度的增大以及内源乙烯的自催化反应,并且这种效应是不可逆的^[24]。本研究中对对照组猕猴桃果实第 7 天达到乙烯释放速率高峰,早于呼吸跃变高峰;乙烯处理组猕猴桃果实同时第 5 天达到呼吸跃变高峰和乙烯释放速率高峰,且处理组呼吸强度峰值和乙烯释放速率峰值均高于对照组,证明外源乙烯会诱导猕猴桃果实中乙烯的自催化生成,促进猕猴桃的呼吸作用。

ACS 和 ACO 是乙烯合成途径中重要的限速酶,其活性的高低会直接影响到乙烯的生成量。本研究中两组猕猴桃果实 ACS、ACO 活性都呈先上升后下降的趋势,对照组猕猴桃果实 ACS、ACO 活性、呼吸强度同时第 9 天达到峰值,而乙烯释放速率第 7 天达到峰值;乙烯处理组 ACS、ACO 活性、呼吸强度、乙烯释放速率同时第 5 天达到峰值,表

明外源乙烯对 ACS、ACO 活性有一定的诱导作用。

有研究报道,乙烯系统 I (乙烯低速率生成)到系统 II (大量乙烯生成)的转变涉及 ACS、ACO 家族基因的差异表达^[25]。同一植物中可能存在多个编码结构和功能类似的 ACO 基因,比如番茄基因家族共鉴定出 6 个成员 *LeACO1-6*,这 6 个成员在果实中的表达特性、调节机制存在差异^[26]。在本研究中,ACS 基因家族中 *AcACS1-6* 在“红阳”猕猴桃贮藏期内表达丰度均较低,ACO 基因家族中 *AcACO1* 和 *AcACO3* 对乙烯有所响应,*AcACO2* 则受乙烯的抑制调控。乙烯处理之后,*AcACO1* 和 *AcACO3* 基因表达量在贮藏前期上调,之后下降,与乙烯释放速率、ACO 活性的变化趋势基本一致。不同的是,*AcACO1* 和 *AcACO3* 基因表达量在第 7 天达到峰值,乙烯释放速率、ACO 活性峰值则是在第 5 天达到峰值。除此之外,第 9 天后 ACO 活性下降、乙烯生成速率下降,但 *AcACO1* 和 *AcACO3* 基因表达量仍上调,说明 *AcACO1* 和 *AcACO3* 可能存在转录后调控,有研究报道猕猴桃果实组织中 ACO 的转录与翻译并不同时进行^[27]。*AcACO1* 和 *AcACO3* 绝对表达量远高于另外 4 个基因,推测呼吸跃变后乙烯生成系统 II 的启动与 *AcACO1* 和 *AcACO3* 有关。

启动子分析表明 *AcACO1-6* 含有较多的转录调控顺式作用元件,*AcACO1* 基因表达量高,可能是因为它含有参与 MeJA 反应的顺式作用调节元件。MeJA (茉莉酸甲酯)是一种茉莉酸类化合物,作为内源信号分子通过调节 MYB、NAC、ERF 等转录因子,参与植物在干旱、盐胁迫、低温等条件下的抗逆反应^[28-30]。然而在表达量低的 *AcACO5* 和 *AcACO6* 中也发现了参与 MeJA 反应的顺式作用调节元件。*AcACO3* 基因表达量高,可能是因为它含有 126 个转录起始点-30 附近的核启动子元件,而 *AcACO5* 基因和 *AcACO6* 基因分别只有 57 个和 11 个,表明 6 个基因的表达量差异可能与启动子的差异和 miRNA 表达水平的差异共同导致。如 Wang 等^[31]对 3 种处理下 (对照,乙烯处理,1-MCP 处理) 的猕猴桃 miRNAs 进行高通量测序发现乙烯-miR164-NAC 途径参与猕猴桃采后成熟的调控,miR164 的两个靶标 AdNAC6/7 的丰度和亚细胞积累高度依赖于 miR164 的存在,但并不通

过启动子直接响应乙烯。综上所述,本研究筛选出的 *AcACO1* 和 *AcACO3* 基因是乙烯生成过程系统 I 到 II 转变关键基因, 后期延续开展关键基因的调控代谢机制的研究, 可为猕猴桃贮藏保鲜期延长及品质调控奠定基础。

参 考 文 献

- [1] WANG M, LI M, MENG A. Selection of a new red-fleshed kiwifruit cultivar 'Hongyang' [J]. *Acta Horticulturae*, 2003, 610(13): 115-117.
- [2] 胡锴, 刘青青, 张锐, 等. 四川宜宾县野生猕猴桃保肝作用的研究[J]. *现代食品*, 2019, 5(2): 131-136.
HU K, LIU Q Q, ZHANG R, et al. Study on the liver-protective effects of wild kiwifruit from Yibin Sichuan[J]. *Modern Food*, 2019, 5(2): 131-136.
- [3] YOU J L, LIM C K, EOM S H. Changes in bioactive components, antioxidant radical scavenging activities, and cholinesterase inhibition activities in periodically harvested and post-harvested kiwifruits [J]. *Horticultural Science & Technology*, 2018, 36(2): 245-255.
- [4] 黄文俊, 钟彩虹. 猕猴桃果实采后生理研究进展[J]. *植物科学学报*, 2017, 35(4): 622-630.
HUANG W J, ZHONG C H. Research advances in the postharvest physiology of kiwifruit[J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(4): 622-630.
- [5] WANG L, GENG X, XU S. Ethylene receptor in fruit ripening and flower senescence[J]. *Biotechnology Bulletin*, 2021, 37(3): 144-152.
- [6] BARRY C S, GIOVANNONI J J. Ethylene and fruit ripening [J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, 26(2): 143.
- [7] ATKINSON R G, GUNASEELAN K, WANG M Y, et al. Dissecting the role of climacteric ethylene in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) ripening using a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase knock-down line[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, 62(11): 3821.
- [8] YIN X R, CHEN K S. Ethylene-induced modulation of genes associated with the ethylene signalling pathway in ripening kiwifruit[J]. *Journal of Experimental Botany*, 2008, 59(8): 2097-2108.
- [9] ZHANG A D, HU X, KUANG S, et al. Isolation, classification and transcription profiles of the Ethylene Response Factors (ERFs) in ripening kiwifruit [J]. *Scientia Horticulturae*, 2016, 199(2): 209-215.
- [10] PARK C, LEE H Y, YOON G M. The regulation of ACC synthase protein turnover: a rapid route for modulating plant development and stress responses[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2021, 63: 102046.
- [11] WU Z, ZHANG X, ZHANG N, et al. Identification of ACC synthetase genes in *Saccharum* and their expression profiles during plant growth and in response to low-nitrogen stress[J]. *Tropical Plant Biology*, 2022, 15(3): 197-210.
- [12] NORIKOSHI R, NIKI T, ICHIMURA K. Differential regulation of two 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase (ACO) genes, including the additionally cloned *DcACO2*, during senescence in carnation flowers[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2022, 183(1): 111752.
- [13] FABI J P, DO PRADO S B R. Fast and furious: Ethylene-triggered changes in the metabolism of papaya fruit during ripening[J]. *Frontiers in Plant Science*, 2019, 10: 535.
- [14] WU X Q, YU M L, HUAN C, et al. Regulation of the protein and gene expressions of ethylene biosynthesis enzymes under different temperature during peach fruit ripening[J]. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2018, 40(3): 1-9.
- [15] 曹建康, 姜微波, 赵玉梅. 果蔬采后生理生化试验指导[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007: 111-112.
CAO J K, JIANG W B, ZHAO Y M. Experiment guidance of postharvest physiology and biochemistry of fruits and vegetables[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007: 111-112.
- [16] 刘洪冲, 王新茹, 姚悦, 等. '瑞雪' 苹果不同采收期果实品质及耐贮性[J]. *北方园艺*, 2022(7): 38-46.
LIU H C, WANG X R, YAO Y, et al. Fruit quality and storage tolerance of 'Ruixue' apple at different harvesting periods[J]. *Northern Horticulture*, 2022(7): 38-46.
- [17] DONG J G, FERNANDEZ-MACULET J C, YANG S F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*,

- 1991, 89(20): 9789–9793.
- [18] HUANG W J, CHEN M Y, ZHAO T T, et al. Genome-wide identification and expression analysis of polygalacturonase gene family in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) during fruit softening[J]. *Plants – Basel*, 2020, 9(3): 327.
- [19] GAO X, ZHANG Y, XIN G, et al. Classification criteria and storage characteristics of actinidia arguta fruits with different maturities[J]. *Scientia Agricultura Sinica*, 2019, 52(10): 1784–1796.
- [20] TILAHUN S, CHOI H R, PARK D, et al. Ripening quality of kiwifruit cultivars is affected by harvest time[J]. *Scientia Horticulturae*, 2019, 261(3): 108936.
- [21] WONGJUNTA M, WONGS-AREE C, SALIM S, et al. Involvement of ethylene in physiological processes determining the vase life of various hybrids of mokara orchid cut flowers[J]. *Agronomy–Basel*, 2021, 11(1): 160.
- [22] 谢鸣, 蒋桂华, 赵安祥, 等. 猕猴桃采后生理变化及其与耐藏性的关系[J]. *浙江农业学报*, 1994, 64(3): 124–127.
- XIE M, JIANG G H, CHEN A X, et al. Relationship of the physiological changes during postharvest ripening to the storage quality of kiwi fruit[J]. *Acta Agricu lturae Zhejiangensis*, 1994, 64(3): 124–127.
- [23] MANOLOPOULOU H, PAPADOPOULOU P. A study of respiratory and physico-chemical changes of four kiwifruit cultivars during cool-storage[J]. *Food Chemistry*, 1998, 63(4): 529–534.
- [24] 罗云波. 果蔬采后生理与生物技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2010.
- LUO Y B. Postharvest physiology and biotechnology of fruits and vegetables[M]. Beijing: China Agriculture Press, 2010.
- [25] MCATEE P A, RICHARDSON A C, NIEUWEN-HUIZEN N J, et al. The hybrid non-ethylene and ethylene ripening response in kiwifruit (*Actinidia chinensis*) is associated with differential regulation of MADS-box transcription factors[J]. *BMC Plant Biology*, 2015, 15(1): 304.
- [26] KCK M, HAMILTON A, GRIERSON D. Eth1, a gene involved in ethylene synthesis in tomato [J]. *Plant Molecular Biology*, 1991, 17(1): 141–142.
- [27] 徐忠传. 成熟猕猴桃果实不同组织中 ACC 氧化酶基因的表达差异研究[J]. *中国科学技术大学学报*, 2001, 35(2): 235–240.
- XUE Z C. Study on the differences for the expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid xidase in different tissues of ripening Kiwifruit [J]. *Journal of China University of Science and Technology*, 2001, 35(2): 235–240.
- [28] LI Y L, CHEN X L, WANG J Q, et al. Two responses to MeJA induction of R2R3-MYB transcription factors regulate flavonoid accumulation in *Glycyrrhiza uralensis* Fisch[J]. *Plos One*, 2020, 15(7): 1–19.
- [29] CHENG H L, FENG X X, ZUO D Y, et al. Gene expression correlation analysis reveals MYC-NAC regulatory network in cotton pigment gland development[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(9): 5007.
- [30] LIN T W, DU J F, ZHENG X Y, et al. Comparative transcriptome analysis of MeJA-responsive AP2/ERF transcription factors involved in notoginsenosides biosynthesis[J]. *3 Biotech*, 2020, 10(7): 1–11.
- [31] WANG W Q, WANG J, WU Y Y, et al. Genome-wide analysis of coding and non-coding RNA reveals a conserved miR164-NAC regulatory pathway for fruit ripening [J]. *New Phytologist*, 2020, 225(4): 1618–1634.

The Key Genes in the Transformation of Ethylene Production System I and II of ‘Hongyang’ Kiwifruit

Liu Ruihao, Yao Manli, Gao Guitian*, Wang Peng

(Shaanxi Normal University, College of Food Engineering and Nutritional Sciences, Xi'an 710100)

Abstract In this study, ‘Hongyang’ kiwifruit was used as raw material. We used ethylene as an intervention method to investigate the changes in physicochemical indexes, ethylene production rate, and the activities of ACS and ACO, the

key enzymes involved in ethylene production during postharvest storage period. In addition, the expression differences of each member of the gene family affecting ACS and ACO were also studied using real-time quantitative PCR combined with bioinformatics analysis, and the key genes for the transition from ethylene production system I to II were cloned. The results showed that the hardness of 'Hongyang' kiwifruit decreased from 8.7 kg/cm² to 0.02 kg/cm² and the content of soluble solids increased from 8.1% to 16.9% during postharvest storage, and the ACS and ACO activities in both the ethylene intervention and non-intervention groups showed a trend of first increase and then decrease, which was consistent with the trends of respiratory intensity and ethylene release rate. Besides, The ACS, ACO activity and respiration intensity of the samples in the non-intervention group reached their peaks on the 9th day, and the ethylene release rate peaked on the 7th day, while the ethylene treatment group all peaked on the 5th day, indicating that ethylene could accelerate the arrival of the kiwifruit respiration peak, ethylene release rate peak and the peaks of ACS, ACO activity. Six ACO genes were successfully cloned from 'Hongyang' kiwifruit fruit, named as *AcACO1-6*. The sequence of the coding region of *AcACO1-6* was 1 101-1 270 bp, encoding 352-402 amino acids, and the nucleotide sequence homology was 28.3%-99.3%. Moreover, all ACO genes had the same conserved structural domain PLN02299, which had ACO activity. Finally, the qRT-PCR results showed that the relative expression of ACO is 500 times higher than that of ACS, and there was a high consistency between the expression changes of *AcACO1* and *AcACO3* in the ACO gene family and changes in ethylene production and enzyme activity ($R>0.85$). Particularly, their promoter sequences were enriched with cis-acting elements involved in transcriptional regulation. Overall, the findings suggested that *AcACO1* and *AcACO3* were pivotal genes in the transition from ethylene production system I to system II.

Keywords kiwifruit; Hongyang; ethylene; ACS; ACO