

# **Isolation and Expression analysis of alcohol dehydrogenase (ADH) gene from Banana (*Musa* spp.)**

*A Thesis*

Submitted in Partial Fulfillment of the Requirement  
*For the Master Degree in Crop Genetics and Breeding*

**By**

**Wang shaohua**

**Postgraduate Program**

**College of Agriculture**

**Hainan University**

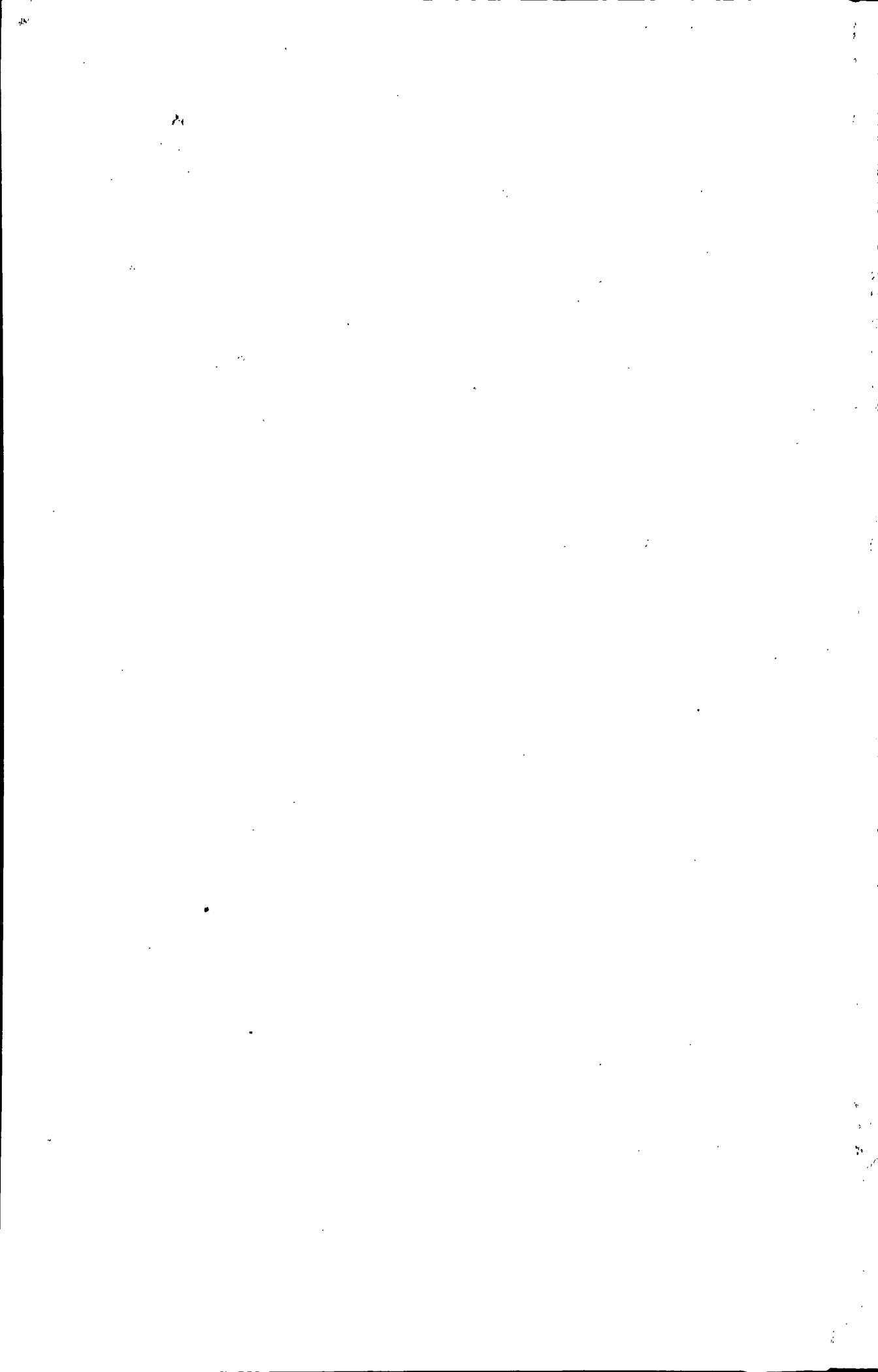
Supervisor: Jin Zhiqiang

Academic Title: Professor

Signature 

Approved

June, 2010



# 海南大学学位论文原创性声明和使用授权说明



## 原创性声明

本人郑重声明：所呈交的学位论文，是本人在导师的指导下，独立进行研究工作所取得的成果。除文中已经注明引用的内容外，本论文不含任何其他个人或集体已经发表或撰写过的作品或成果。对本文的研究做出重要贡献的个人和集体，均已在文中以明确方式标明。本声明的法律结果由本人承担。

论文作者签名：

日期：2010年6月2日

## 学位论文版权使用授权说明

本人完全了解海南大学关于收集、保存、使用学位论文的规定，即：学校有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和电子版，允许论文被查阅和借阅。本人授权海南大学可以将本学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存和汇编本学位论文。本人在导师指导下完成的论文成果，知识产权归属海南大学和中国热带农业科学院。

保密论文在解密后遵守此规定。

论文作者签名：

日期：2010年6月2日

导师签名：

日期：2010年6月2日

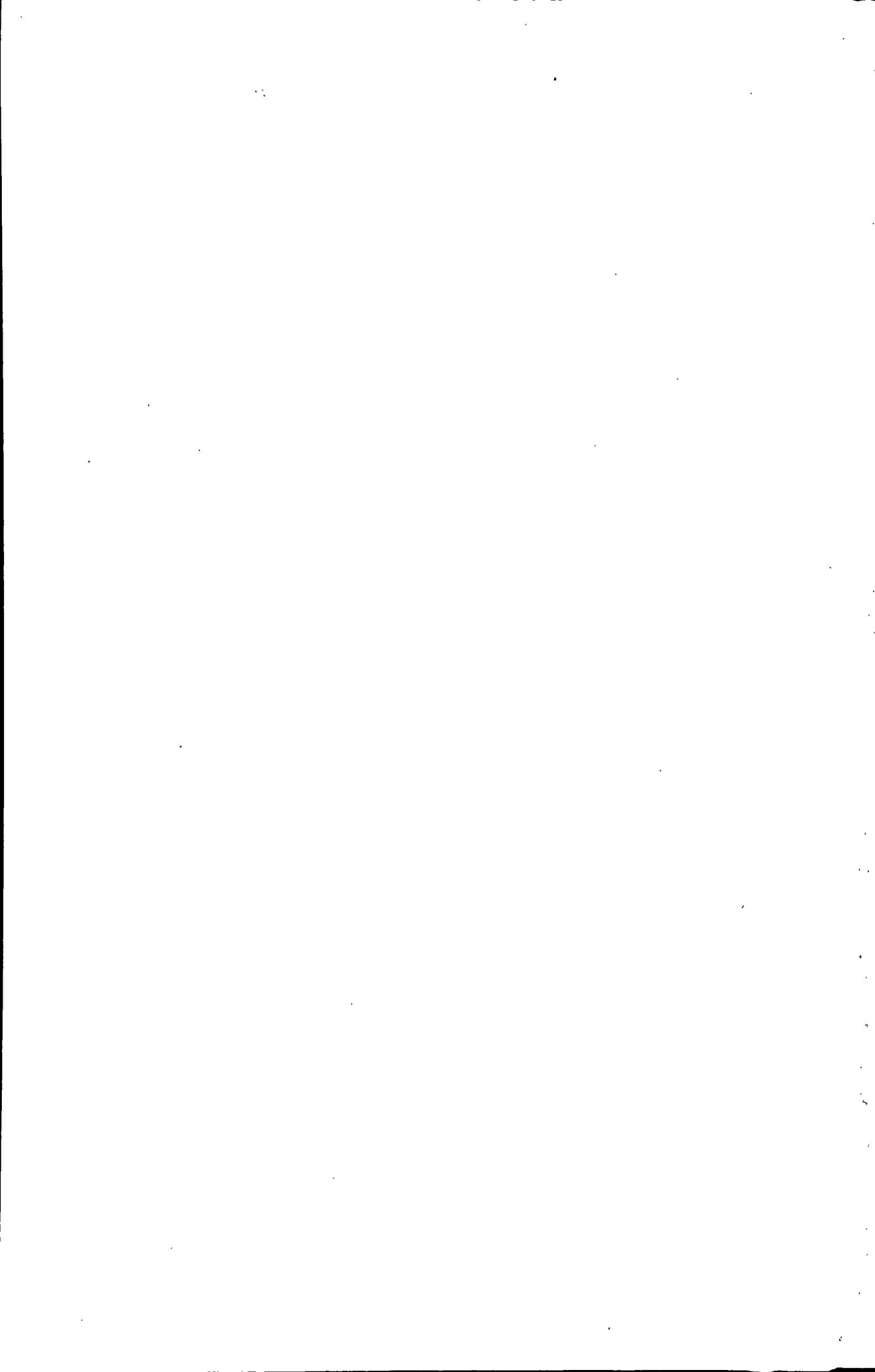
本人已经认真阅读“CALIS 高校学位论文全文数据库发布章程”，同意将本人的学位论文提交“CALIS 高校学位论文全文数据库”中全文发布，并可按“章程”中规定享受相关权益。同意论文提交后滞后：半年；一年；二年发布。

论文作者签名：

日期：2010年6月2日

导师签名：

日期：2010年6月2日



## 摘 要

香蕉是世界上最重要的水果之一,被联合国粮农组织确定为世界第四大粮食作物。在香蕉生长发育过程许多逆境,如涝害,低温等都会影响香蕉苗的生长发育,从而影响了香蕉果实的产量;香蕉果实是一种典型的呼吸跃变型果实,其采后成熟过程关系着香蕉果实的品质和货架期的长短。乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase,ADH,E.C.1.1.1.1.)广泛分布于各类植物器官组织中,与植物逆境生理、植株生长发育、果实采后成熟衰老和芳香物质的生物合成等过程密切相关。因此研究乙醇脱氢酶和香蕉幼苗的逆境生长以及香蕉果实的采后成熟之间的关系,为我们培育更加具有抗逆性的香蕉品种以及发展改良创新采后保鲜和催熟技术具有重要意义。

本实验室于 2003 年采用抑制差减杂交的方法在香蕉采后成熟早期差异表达的低丰度 cDNA 序列,获得 289 个克隆。BlastX 显示,有一个 500bp 的片段和其他植物的 ADH 基因相似性很高,为此我们设计兼并引物对 ADH 基因进行全长扩增,PCR 电泳结果发现两条很特异的带,测序结果表明,他们都属于 ADH 家族,分别命名为 MaADH1 和 MaADH2。在此基础上,我们采用 RACE 技术从香蕉果实 cDNA 文库中分离获得 MaADH2 cDNA 全长,经序列测定和同源性分析表明,该 cDNA 全长为 1140bp,含完整的开放阅读框,编码 379 个氨基酸残基,BlastX 分析表明,该 cDNA 推导的氨基酸序列与拟南芥、蓖麻、水稻有较高的一致性,(92%、92%、91%)。保守结构域分析表明, MaADH2 含有 ADH\_N superfamily 和 NADB\_ROssmann superfamily 两个保守结构位点,这与典型的 ADH 基因的结构域相符。采用 RT-PCR 的方法对其在香蕉各器官的表达情况分析表明,该基因在香蕉的根、茎、叶、花、果实中均有表达。其中,茎、叶、花、果的表达量较低并且差异不明显,根中的表达量较高。所以, MaADH2 可能在香蕉不同的生长发育中起作用。

为研究 MaADH2 与香蕉采后乙烯生物合成的关系,在正常成熟、乙烯诱导成熟和 1-MCP 抑制成熟的条件下,测定了香蕉果实采后不同阶段的乙烯释放量并采用荧光定量 PCR 的方法研究了 MaADH2 在香蕉果实采后不同成熟阶段的表达情况。结果表明,乙烯在诱导果实成熟时并没有诱导 MaADH2 基因的表达量上升,而 1-MCP 在抑制成熟时,并没有随着内源乙烯被抑制而 MaADH2 基因的相对表达量下降。

为了研究 MaADH2 与香蕉果实外源 ABA 之间的关系,在正常成熟,ABA 诱导成熟的条件下,用荧光定量 PCR 的方法研究了 MaADH2 在香蕉果实采后不同成熟阶段的表达情况。结果表明,ABA 推迟了 MaADH2 的相对表达量达到最大值的时间。

为了研究香蕉幼苗在逆境胁迫下 MaADH2 的表达情况,采用 RT-PCR 方法研究了该基因在伤害胁迫、盐胁迫、低温胁迫下的表达情况;采用实时荧光定量 PCR 的方法

研究了该基因在干旱胁迫及涝害胁迫下的表达情况。结果表明：伤害胁迫条件下，MaADH2 基因在香蕉幼苗叶片中下调表达；盐胁迫条件下，MaADH2 基因在香蕉幼苗叶片中上调表达；在低温胁迫下，MaADH2 基因在香蕉幼苗叶片中上调表达；在干旱胁迫下，轻度干旱诱导了香蕉幼苗根中 MaADH2 基因的表达，但是随着干旱程度的增加，MaADH2 基因的相对表达量降低；在涝害胁迫下，涝害胁迫诱导了 MaADH2 在根中的表达，且在涝害胁迫 24 小时时，MaADH2 的相对表达量达到最大值，而在叶中，MaADH2 相对表达量变化很小。我们对正常生长的香蕉幼苗根和涝害胁迫下的香蕉幼苗根中的 MaADH2 和 MaPDC 活性进行测定发现，在正常生长的香蕉幼苗根中 MaPDC 和 MaADH2 活性维持在很低的水平，而在涝害胁迫下的香蕉幼苗根中，MaADH2 和 MaPDC 活性上升，且在 24 小时达到高峰，然后下降。

根据以上的研究结果，得出了以下结论：我们所克隆的 MaADH2 基因和香蕉果实的成熟无关，与香蕉的逆境生理密切相关。

关键词：香蕉 (*Musa acuminata* L. AAA group cv. Brazilian)； MaADH2； 克隆； 果实成熟； 胁迫； 表达分析

## Abstract

Banana is one of the most important fruit in the world, which is ranked as the world's fourth most important food crop. Some adversity, such as waterlogging and low temperature and so on, affect banana seedling growth and fruit production during banana growth and development. Banana fruit is a typical climacteric fruit, which concerns with banana fruit quality and shelf life. Banana seedling growth and fruit ripening have a direct impact on the development of the banana industry. Alcohol dehydrogenase (alcohol dehydrogenase, ADH, EC1.1.1.1.) widely distributed in various organs and tissues of plants. ADH was found to play important roles in plant stress tolerance, growth, development, fruit ripening, senescence and aromatic biosynthesis. So, investigating the relationship between ADH and banana seedling growth and fruit ripening is an important issue, which will offer us more resistant banana seedlings and improve post-harvest preservation and ripening technology.

In order to gain a better understanding of the mechanism about banana postharvest ripening, we isolate differentially cDNAs at the early stage of banana ripening by suppression subtractive hybridization. A total of 289 clones in the SSH library are sequenced. BlastX showed that a 500bp fragment was very similar with other plants ADH gene. We designed degenerate primers to obtain two full-length of ADHs named *MaADH1* and *MaADH2*. The full length of *MaADH2* is 1140 bp with a complete open reading frame, encoding 379 amino acids that shared high identities of 92%, 92% and 91% with that from *Arabidopsis thaliana*, *Ricinus communis*, *Oryza sativa* respectively. Conserved domain analysis showed that this cDNA contain two conserved sites, ADH\_N superfamily and NADB\_ROssmann superfamily, which are typical *ADH* gene domain match. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis showed that *MaADH2* was expressed in root, stem, leaf, flower and fruit. The expression level was higher in roots than other organs. Therefore, *MaADH2* may play a certain role in different physiological processes.

In order to investigate the relation between *MaADH2* and banana ripening, we measured the ethylene production and analysed the expression level of *MaADH2* at different stages with the treatment of ethylene and 1-MCP. The results showed that ethylene induced the banana fruit ripening but did not induce *MaADH2* expression. 1-MCP inhibited banana fruit ripening. However, the expression of *MaADH2* did not decrease when the endogenous ethylene was inhibited.

In order to study the relation between *MaADH2* and exogenous ABA in banana fruit ripening, we analysed the expression level of *MaADH2* at different stages with the treatment

of ABA. The results showed that ABA delayed the expression level of *MaADH2* to reach a maximum value.

To research the relationship between *MaADH2* and under-stress banana seedlings, we used RT-PCR to analyse the expression level of *MaADH2* in leaves at injury stress, salt stress, low temperature stress. We used real-time QPCR to analyse the expression level of *MaADH2* in leaves and roots at drought stress and waterlogging stress. Results showed that the injury stress negatively regulated *MaADH2* expression. Salt stress up-regulated it. Low temperature induced it. Mild drought stress induced the expression level of *MaADH2*, but it is down with drought increasing. Waterlogging stress induced the expression level of *MaADH2* in roots, but it changed little in leaves. We measured *MaADH2* and *MaPDC* activity in normal roots and waterlogging stress roots and found that *MaADH2* and *MaPDC* activities peaked at 24 hours, then declined under waterlogging stress in banana roots.

According to these results, the *MaADH2* gene was not related to fruit ripening but closely related to various of stress.

**Keywords:** *Musa acuminata* L. AAA group cv. Brazilian; *MaADH2*; clone; fruit ripening; stress; expression analysis

# 目 录

摘 要.....	I
Abstract .....	III
1. 前言.....	1
1.1 香蕉概述.....	1
1.2 香蕉成熟过程与香蕉品质形成的关系.....	1
1.3 果实成熟的生理学与分子生物学研究概述.....	2
1.3.1 乙烯与果实成熟.....	2
1.3.2 乙烯与香蕉的成熟.....	3
1.3.3 ABA 与果实成熟.....	3
1.3.4 果实成熟过程中的基因表达调控.....	4
1.4 乙醇脱氢酶(ADH)的研究进展.....	5
1.4.1 植物 ADH 概述.....	5
1.4.2 ADH 和植物器官发育的关系研究.....	5
1.4.3 ADH 和逆境胁迫关系的研究进展.....	7
1.5 逆境与香蕉的生长发育.....	8
1.6 研究内容.....	9
1.7 研究目的意义.....	10
1.8 技术路线.....	10
2. 实验材料、试剂及仪器.....	10
2.1 实验材料.....	10
2.2 实验试剂.....	11
2.3 实验仪器.....	12
3. 材料处理.....	13
3.1 香蕉果实的不同处理.....	13
3.2 香蕉幼苗不同胁迫的处理.....	13
4. 方法.....	14
4.1 香蕉果实采后乙烯释放量的测定.....	14
4.2 香蕉果实采后成熟度的划分.....	14
4.3 涝害胁迫下 MaADH2 和 MaPDC 活性的测定.....	14
4.4 香蕉不同器官总 RNA 提取.....	14
4.5 果实采后不同阶段总 RNA 提取.....	16
4.6 cDNA 第一链的合成.....	16
4.7 MaADH2 基因的克隆与生物信息学分析.....	16
4.7.1 从香蕉果实 cDNA 文库中克隆 MaADH2 基因 5' 端.....	17
4.7.2 MaADH2 cDNA 全长克隆.....	19
4.7.3 生物信息学分析.....	20
4.8 半定量 RT-PCR.....	20
4.8.1 cDNA 第一链的合成.....	20
4.8.2 RT-PCR 引物设计.....	21
4.8.3 PCR 反应.....	21
4.9 荧光定量 RT-PCR 分析 MaADH2.....	21
4.9.1 cDNA 第一链的合成.....	21

4.9.2 荧光定量 PCR 的引物设计 .....	21
4.9.3 荧光定量 PCR 的反应体系和反应程序 .....	22
4.9.4 荧光定量 PCR 的定量方法 .....	22
5 结果 .....	22
5.1 MaADH2 基因的克隆 .....	22
5.1.1 MaADH2 基因 5' 端的克隆 .....	22
5.1.2 MaADH2 cDNA 全长克隆 .....	23
5.2 MaADH2 基因的序列分析 .....	23
5.2.1 生物信息学分析 .....	24
5.2.2 同源性比较 .....	25
5.2.3 进化树分析 .....	27
5.3 MaADH2 基因在香蕉不同器官的差异表达 .....	28
5.4 乙烯、1-MCP 处理条件下 MaADH2 基因在香蕉采后不同成熟度的表达量变化 .....	29
5.5 香蕉采后果实乙烯释放速率的变化规律 .....	30
5.6 ABA 处理, MaADH2 基因在香蕉果实采后的表达量变化 .....	31
5.7 香蕉幼苗在伤害胁迫下, MaADH2 基因在香蕉幼苗叶片中的表达特征 .....	32
5.8 香蕉幼苗在盐胁迫下, MaADH2 基因在叶片中的表达特征 .....	32
5.9 香蕉幼苗在低温胁迫下, MaADH2 基因在叶片中的表达特征 .....	33
5.10 香蕉幼苗在干旱胁迫下, MaADH2 基因在根中的表达特征 .....	33
5.11 香蕉幼苗在涝害胁迫下, MaADH2 基因在根和叶中的表达以及 MaADH2 和 MaPDC 酶活性的变化 .....	33
5.11.1 Ma-ADH2 基因在涝害胁迫下叶片中的表达变化 .....	33
5.11.2 Ma-ADH2 基因在涝害胁迫下香蕉幼苗根中的表达变化 .....	34
5.11.3 涝害胁迫下香蕉幼苗根中 Ma-ADH2 和 Ma-PDC 活性变化 .....	34
6. 讨论 .....	35
6.1 MaADH2 基因的克隆与序列分析 .....	35
6.2 MaADH2 基因在香蕉采后不同器官的差异表达分析 .....	35
6.3 乙烯、1-MCP 处理条件下 MaADH2 基因在香蕉采后不同成熟度差异表达与内源乙烯释放的关系 .....	36
6.4 ABA 处理条件下 MaADH2 基因在香蕉采后不同成熟度时的差异表达 .....	36
6.5 MaADH2 基因在伤害胁迫, 盐胁迫, 低温胁迫的香蕉幼苗叶表达 .....	37
6.6 MaADH2 基因在干旱胁迫下香蕉幼苗根中的表达 .....	37
6.7 MaADH2 基因在涝害胁迫下香蕉幼苗根和叶中的表达 .....	37
7. 结论 .....	38
参考文献 .....	40
附录 .....	51
致谢 .....	52

# 1. 前言

## 1.1 香蕉概述

香蕉是热带、亚热带发展中国家的最重要作物之一。中国的香蕉产量居世界第四位，在海南、广东、云南、广西、福建、台湾等地区大面积种植。香蕉及部分大蕉是鲜食水果中消费量最大的水果，煮食蕉则是产蕉区人民的主要粮食来源。因此发展香蕉生产有助于解决这些地区普遍存在的粮食短缺及经济落后等问题。出于对香蕉研究的巨大经济效益和应用前景的考虑，联合国粮农组织（FAO）将香蕉列为世界第四大粮食作物，并设立了香蕉改良计划（Banana Improvement Program），以及国际香蕉改良网络（The International Network for the Improvement of Banana and Plantain INIBAP），并已取得了很大进展。

香蕉在热带和亚热带地区农业和社会发展中具有重要的作用。从世界范围看，香蕉贸易是这些地区发展中国家换取外汇的主要方式之一。据统计，2001年世界香蕉出口值42.38亿美元，其中发展中国家从中获取了85.5%。香蕉的出口量由1997年的15%上升到2001年的20.4%，并且目前仍在逐年递增，因此发展香蕉生产，增加出口，可以有助于发展中国家解决贫困问题，促进其经济的发展。就我国的情况来看，相对于其它地区，热带农业在大宗粮、棉、油作物方面远远不及温带地区。而在热带水果方面却比其它地区有更大的优势。在我国农业产业结构调整中，热带水果在热带农业中的地位也将越来越重要。尤其重要的是加入WTO后，在国际竞争中，热带水果比其它大宗粮食作物及其产品更具有竞争优势。因此热带水果的发展，可扩大出口或替代进口，可能带动热带地区大农业的重心逐步向以热带水果为代表的热带作物方向转移。而香蕉作为世界上产量最大的水果，在其中发挥着龙头作用。大力发展香蕉产业，是我国热带地区农民脱贫致富的好门路。

## 1.2 香蕉成熟过程与香蕉品质形成的关系

香蕉果实成熟过程十分复杂，涉及许多复杂生理生化变化，它对香蕉品质形成具有非常重要的作用。一般对香蕉果实成熟过程可以分采前果实生长发育和采后果实的成熟。香蕉果实采前的生长发育为单S型，分为三个时期：I期，抽蕾后4周之前为细胞分裂期；II期，抽蕾后4~12周为细胞膨大期；III期，抽蕾后12~15周为（成熟期）。香蕉在不同的生长发育期，其果肉的内部发生着复杂的生理生化变化。在Peumans研究过程中发现香蕉果实早期发育到成熟阶段蛋白质的含量和种类发生着剧烈的变化，如三类几丁质酶和几丁质酶相关的蛋白在果实发育的早期阶段含量很高，尤其是三类几丁质酶占总蛋白的40%以上，伴随着果实的成熟三类几丁质酶含量逐渐下降，而成熟相关蛋白的种类和含量却逐渐增加，如甜蛋白、葡聚糖酶等（Peumans et al. 2002）。除了蛋白含量和成份变化以外，香蕉果实发育至成熟阶段的其它物质如：果胶、有机酸、芳香

物质和维生素的含量也生相应的变化。另外，果实外观形态的改变也随着果实生长发育及成熟而改变，如果实颜色，果实硬度，大小。这些物质的改变必定影响到香蕉果实品质的形成。在商业生产上，一般是在绿熟期采收香蕉。这种香蕉果实从食用品质的角度讲尚未成熟，需要进行后熟过程才具备最佳的食用品质。香蕉是典型的呼吸跃变型果实，其采后成熟过程同样涉及许多生理生化变化，包括淀粉转变为糖、结构性碳水化合物的降解、多酚的降解、乙酸异戊酯的增加和叶绿素的降解，这些变化直接影响香蕉果实的硬度、涩味、香气、颜色等品质，进而影响到香蕉的商品价值。因此，研究是香蕉果实成熟过程与香蕉品质形成的关系，将为人工控制香蕉成熟过程及改善香蕉品质方面发挥着重要作用，也是发展香蕉生产和提高香蕉经济效益的重要保证。

## 1.3 果实成熟的生理学与分子生物学研究概述

### 1.3.1 乙烯与果实成熟

乙烯是一种十分重要的植物激素，它调控植物生长和发育的许多方面，如种子萌发、幼苗生长、开花、果实成熟和器官衰老等。乙烯促进果实成熟的研究，最早始于1924年，Denny观察到乙烯对诱导果实成熟有很高的效率。1934年Gane提出乙烯是果实成熟时的产物，乙烯的存在也许造成了果实相互促进成熟的效应（Biale et al. 1964）。与此同时，Kidd和West（Zarebinski et al. 1993）发现采后的苹果放出的二氧化碳量一度下降至最低，随后又很快上升，最后又下降的现象，他们称之为“跃变”（The climacteric）。在呼吸跃变同时伴随出现其它与成熟有关的变化，如果实颜色、化学成分、细胞及组织结构等。同样的现象在包括梨、香蕉、番茄等的许多果实中也有发现。而另一些果实，如柑桔、草莓、葡萄等在成熟过程中没有明显的呼吸高峰出现。据此Biale（1964）把不同果实分为“跃变型”（Climacteric）和“非跃变型”（Non-climacteric）两大类。跃变型果实在成熟期间出现明显的呼吸高峰，而非跃变型果实则无此高峰。两类果实的本质区别可归纳为三点：（1）跃变型果实的呼吸高峰以乙烯为先导，非跃变型果实则不然；（2）两类果实对外源乙烯的反应有本质的不同。跃变型果实在外源乙烯的触发下，产生内源乙烯的自我催化，即外源乙烯使自然的呼吸峰提早出现。非跃变型果实的呼吸强度只受外源乙烯的影响，没有内源乙烯的自我催化功能；（3）跃变型果实在成熟时发生一系列急速的成分上的变化，并且这种变化与乙烯有关，非跃变型果实的这种变化与乙烯无关。但是，一个有趣的现象是，虽然非跃变型果实成熟时没有呼吸上升高峰，但外源乙烯处理能促进呼吸增加，同时也能促进诸如叶绿素破坏，组织软化，多糖水解等变化（McGarvey et al. 1995；Yang . 1985）。

McMurchie等根据两类果实对丙烯（乙烯类似物，代替乙烯作用）处理时其乙烯生成反应不同，提出跃变型果实中乙烯生成有两个调节系统。系统I负责跃变前果实中低速率的基础乙烯生成；系统II负责跃变时乙烯自我催化而大量形成的乙烯，有些品种

短时间内系统 II 形成的乙烯可比系统 I 增加几个数量级,非跃变型果实乙烯生成速率相对较低,变化平稳,整个成熟过程中只有系统 I 活动,缺乏系统 II。

在果实的组织中存在乙烯的受体尚缺乏直接的证据。推测,果实中同样存在与营养体中相似的乙烯受体,它可能是一种含  $Zn^{2+}$  或  $Cu^+$  的金属蛋白。由于乙烯的作用依赖于氧,推测这种金属蛋白受体只有被一种氧化酶氧化成氧化态后才能被乙烯激活,进而引起有关基因的活化和一系列代谢上的变化。 $Ag^+$  与  $Zn^{2+}$  和  $Cu^+$  的结构相似,可取代  $Zn^{2+}$  或  $Cu^+$  与金属蛋白结合,使乙烯—受体复合物失活,从而抑制乙烯原初反应的发生,这可能是  $Ag^+$  具有拮抗乙烯的作用、被广泛用于花卉保鲜的原因。概括地说,乙烯在果实成熟过程中有双重的作用:其一是它激活一些基因,这些基因的产物是果实成熟所必须的。乙烯的这种作用具有发育的阶段性和组织上的特异性。其二是它调节由发育信号所调节 mRNAs(如聚半乳糖醛酸酶)的翻译。此外,乙烯还可以通过调节转录后的某些过程(如 mRNA 在细胞质内的运输)来调节与果实成熟有关的基因的表达。

### 1.3.2 乙烯与香蕉的成熟

香蕉属于典型的跃变型果实(曾骧, 1992)。许多实验都证明香蕉的成熟过程是由乙烯所诱导,并产生呼吸高峰(Abeles, 1973; Burg et al. 1962)。Dominguez 和 Vendrell 对香蕉果实采后的乙烯释放速率,乙烯形成酶(ethylene forming enzyme, EFE)活性,呼吸强度,果皮和果肉的 ACC 含量进行了较为系统的研究。研究表明:在香蕉成熟过程中,乙烯生成量的提高稍早于呼吸跃变和其它生理过程,如淀粉水解,叶绿素的降解。ACO 活性的增加先于其它明显的生理变化之前,说明内源乙烯浓度提高到一定水平后,就可以诱导跃变。果皮和果肉在成熟过程中的作用是不同的。果皮几乎不产生乙烯,果肉乙烯生成量较大,而且果皮所发生的变化是由果肉诱导的。在香蕉后熟过程中,ACO 活性的增加发生在乙烯生成量增加之前,ACO 活性的增加导致乙烯峰出现,其活性随后降低,这可能是通过调节该酶的辅因子,如维生素 C、一些离子等的浓度来实现的(Liu et al. 1999)。在跃变期前香蕉中 ACC 含量低,表明 ACC 限制着香蕉乙烯自我合成过程的启动。ACO 增加与乙烯生成同步,但当 ACC 含量达到最大值时,乙烯产量开始下降(Domingue et al. 1993)。已有的研究表明,ACO 的活性是启动乙烯自我催化合成的关键因子,当乙烯合成开始增加时,则诱导 ACS 活性增加,ACC 含量提高,ACC 氧化酶活性同时进一步提高,乙烯自我催化作用开始进行(Liu et al. 1985)。

### 1.3.3 ABA 与果实成熟

脱落酸(ABA)也是植物体内一种重要的内源激素,具有促进种子休眠、气孔关闭和器官脱落等生理功能,但有关 ABA 对果实成熟的生理作用的报道却并不多。ABA 作为一种内源激素在发挥其生理功能前必须与其受体蛋白(或称结合蛋白)结合。现已证明 ABA 结合蛋白广泛存在于气孔保卫细胞膜上,根尖与叶肉细胞内也存在 ABA 结合

蛋白。但直到近几年才发现果肉细胞中也存在符合受体结构特性的 ABA 特异结合蛋白，同 ABA 浓度在果实发育成熟过程中有规律性变化一样，ABA 结合蛋白与 ABA 的亲力和最大容量在果实发育成熟的不同阶段也有相似的规律性变化。在果实始熟时结合蛋白对 ABA 的亲合力显著提高，这可能是 ABA 启动果实成熟的前提。利用 ABA 处理果实，可以诱导果实的成熟，对跃变型果实可以使乙烯呼吸高峰提前。目前对果实成熟有效生理调控的化学药剂还很少，并且对其调控机理的研究更少，而且大多都集中在跃变型果实研究。对于非跃变型果实，其成熟与外源激素的相关性及调控机理，及是否能启动此类果实的成熟，这些问题长期以来一直成为植物生理学家和园艺学家关注的热点之一。

### 1.3.4 果实成熟过程中的基因表达调控

果实生长发育中基因的表达调控对果实的成熟具有非常重要的作用。果实成熟的关键酶 ACC 氧化酶 (ACO) 和 ACC 合成酶 (ACS) 基因均已被克隆，通过对克隆到的基因 ACO 和 ACS 研究发现，其在乙烯生物合成及信号转导过程中起非常重要的作用。成熟发生时，体内 ACO 的活性快速升高，然后急剧下降。在跃变前可以检测到 ACO 基因 (MAACO1) 的表达，随着跃变的发生表达量也升高，并在随后的成熟过程中依然维持一个相对高的表达量。Argueso 等指出 ACS 是乙烯生物合成关键酶，而在像果实成熟这样的高浓度乙烯的条件下，ACO 才往往是乙烯生物合成的限速步骤。因此可以推测果实采后成熟过程中诱导成熟的乙烯生物合成是受乙烯生物合成关键酶基因在转录水平上调控的，而且在乙烯生物合成的不同阶段是受基因家族不同成员的调控，其中 MaACS1 是在跃变发生时起调控作用，MaACO1 是在跃变前起调控作用，并于跃变时表达量也迅速提高。成熟果实中乙烯的生物合成是以反馈方式进行自我调控，在果肉中是负反馈的，在果皮中是正反馈的 (Argueso et al. 2007)。与成熟相关的其它作用蛋白酶类如 M.Torki 获得的 PG 是主要的细胞壁水解酶之一，作用于植物细胞壁和胞间层的果胶。果胶参与很多植物生长发育过程，是细胞壁中的一种重要的多糖形式，在果实成熟时通过溶解和解聚两种作用而被降解，有很多酶 (如果胶溶酶 pectolytic enzymes、果胶裂解酶 pectate lyase) 参与果胶的结构修饰，PG 对果胶的水解作用能促进其它细胞壁水解酶的活性 (M.Torki et al. 1999)。依据 PG 参与的 3 个生理生化过程如果实成熟、组织脱落和花粉粒发育。EGase 是一般所指的纤维素酶 (cellulase)，它的系统名称是  $\beta$ -(1 $\rightarrow$ 4)-葡聚糖-4-葡萄糖水解酶。EGase 的活性与细胞壁软化的几个过程有关，如细胞伸长、组织脱落和果实软化。Bruxelles 等报道番茄、鳄梨和草莓的果实软化伴随着 EGase 活性的上升和木葡聚糖平均分子量的降低。先后已从鳄梨、番茄、胡椒和草莓中克隆到成熟相关的 EGase 的 cDNA。并推断其为基因家族编码，不同物质间的 EGase 同源性不同 (Bruxelles et al. 1994)。另外如 S-腺苷-L-蛋氨酸合成酶 ((S-Adenosyl-L-methionine synthetase, SAM-s)，NADH 脱氢酶、几丁质酶等的克隆。

## 1.4 乙醇脱氢酶(ADH)的研究进展

### 1.4.1 植物 ADH 概述

ADH 催化相应醇和醛之间的可逆转化。在植物中 ADH 具有一个特殊的与  $\text{NAD}^+$  结合区域, 能够与  $\text{NAD}^+$  结合从而使整个糖酵解过程得以进行。对植物组织离体培养再生、种子萌发、果实发育及采后成熟过程进行研究, 发现 ADH 与这些过程密切相关 (Chervin et al. 1999)。ADH 基因被如缺氧、脱水和低温等逆境胁迫诱导表达已有很多报道, 如基因的结构和启动子元件(Dolferus. 1994; Bruxelles et al. 1996)、器官特异性表达(Newman et al. 1992; Ingersoll et al. 1994)和信号转导机制(Dolferus. 1994; Chung et al. 1999)等。

ADH 基因已经在拟南芥、水稻、番茄、甜瓜等植物中被克隆, 结果表明, 该基因存在于植物各组织中, 其表达变化在果实发育, 外界刺激及果实成熟中呈现出差异表达。

ADH 蛋白也在草莓、番茄、柑橘、大麦、茶叶等被分离纯化。它们大部分为含锌蛋白, 其含量为 2 个 Zn/亚基。而 ADH 蛋白亚基中包含的两个锌原子中, 有一个处于酶活性中心, 为其维持生物活性所必须, 另外一个则有利于酶分子的稳定, 通过 X-射线分析已经明确了 Zn 结合的催化位点所必须的 3 个氨基酸残基分别为 Cys (46)、Cys (174)、His (67), 而第二个 Zn 原子结合于 Cys (97)、Cys (100)、Cys (103) 和 Cys (111) 这四个氨基酸残基上(Vallee et al. 1990)。

但是在香蕉中, 还未见报道, 因此, 研究香蕉中该基因与外界刺激及果实成熟是一个值得探讨的课题。

### 1.4.2 ADH 和植物器官发育的关系研究

在植物的发育过程中, 胚的发育、种子的萌发以及植物的生长等都有可能与 ADH 的存在密切关系。但由于 ADH 广泛分布于各植物种类和各种植物器官组织中, 其产生的作用也各有不同, 在植物的离体培养再生中、在果实正常的生长发育过程中、在果实采后成熟及芳香物质的合成中, 出现的 ADH 基因的高表达及其 ADH 活性的快速上升却与厌氧机制无关。现将 ADH 与植物器官发育的关系做简单介绍:

ADH 与种子发育的关系: 生长中的种子种子库器官, 促使代谢过程中的同化产物由韧皮部向其运输。因而种子的发育主要以异养为主, 线粒体呼吸代谢过程中所产生的 ATP 是其主要的能量供应来源。因此, 用于呼吸作用的代谢底物量的多少是其呼吸作用的限制因子, 然而, 除了糖等能量物质, 氧气也是线粒体呼吸作用的底物, 并且也会成为其限制因子。Rolletschek 等用微感应器检测蚕豆和豌豆豆荚不同部位的含氧量, 证明了胚发育的低氧环境以及胚内部的低含氧量。在胚发育过程中, 由于种皮的存在使得呼吸作用的氧气供应不足。Yeung 等通过对发育中的菜豆种子进行 ADH 组织化学定位研究发现: 菜豆的种子在发育至子叶之前, ADH 在种皮中具有很高的活性。同时胚的 ADH

活性随种子的发育进而增加,同时 ADH 的存在起着代谢方式调整的作用(Yeung. 1997)。对大麦糊粉层 ADH1 基因表达研究发现,随着谷粒发育,ADH1 的活性水平、和 mRNA 的水平显著增加。同时,发现 ADH 基因的表达还受 ABA/GA 的互作调控。用 ABA 处理后,其 mRNA 水平显著增加。而 GA 处理后,ADH 的 mRNA 水平下降 (Macnicol et al. 2001)。Rolletschek 等通过对蚕豆的研究发现:在种子发育的前期,ADH 活性和乙醇生成量最高,但随着发育的进程,ADH 活性和乙醇生成量都开始下降,为种子的前期发育提供代谢的能量(Rolletschek et al. 1999)。郭志雄等人研究了龙眼胚胎发生发育过程中 ADH 活性进行了研究发现,从胚性愈伤组织到子叶胚阶段,ADH 活性下降,同工酶谱分析也证明了该结论的正确性,表明 ADH 与胚胎发育相关(郭志雄. 2006)

ADH 与种子萌发:在部分高等植物的种子萌发过程中,ADH 活性表现为早期上升而后快速下降的变化(Toyomasu et al. 1995)。通过示差筛选,从 GA3 处理的莴苣种子中分离得到两个 cDNA 克隆, cLRG5 和 cLRG11。Northern blot 分析发现,GA 处理 10 小时后,这两个基因在 mRNA 水平上会上升,并且以后的 8 小时内能维持高水平;而对照在该时期,它们在 mRNA 水平逐步降低。对 cLRG5 进行序列分析,发现该基因的所编码的氨基酸与 ADH 有很高的同源性。在拟南芥种,ADH 蛋白水平在整个萌发过程中则保持稳定。

ADH 与植物的离体再生:研究发现,在悬浮培养的细胞或离体培养的愈伤组织中,ADH 表现出很高的活性,尤其是在分裂期的悬浮培养细胞和愈伤组织(Li et al. 1996)。在离体培养的细胞中,ADH 活性并没受低氧环境的调节(Li et al. 1996)。高活性的 ADH 在细胞培养过程中具有重要意义。培养基的蔗糖在被细胞吸收后很快会被水解为葡萄糖和果糖,然后进入糖酵解,生成丙酮酸,大部分的丙酮酸又会转变为乙醇(Ashihara et al. 1988)。在水稻的细胞培养中,从培养基吸收的蔗糖接近 40%被转化为乙醇(Wasternack et al. 1985)。在大麦的离体培养中,成熟胚可被诱导产生 4 种不同的愈伤组织:松软水化的愈伤组织、表面紧密的愈伤组织、仅能长根和仅能长芽的愈伤组织。通过同工酶谱分析发现,ADH 在紧密的愈伤组织和仅能长根的愈伤组织中活性很强且酶谱特征相同。但在松软的愈伤组织中,并没有检测 ADH 活性(Li et al. 1992)。在葡萄体细胞胚胎发生过程中,对 ADH 进行酶谱带分析,发现 ADH 谱带在胚性愈伤组织中显色很深,且活性是上升(Martinelli et al. 1993)。

ADH 与果实的生长发育:乙醇脱氢酶(ADH)在果实的生长发育中起到一定的作用,可参与鳄梨(Kanellis et al. 1991)的成熟调节等多种生理生化代谢。乙醇脱氢酶(ADH)在柿果实脱涩过程中也起着重要作用(Yamada et al. 2002)。在番茄中还发现了一个仅在花药发育后期表达的 ADH 基因。Tesniere 等(Tesniere et al. 2000)在葡萄的果实生长发育中克隆 3 个 ADH 基因,分别为 VvADH1、VvADH2、VvADH3。通过 Northern 表明 VvADH1 和 VvADH3 的 mRNA 仅在浆果发育的早期有短暂的累积;而一旦进入转熟期,VvADH2 产生过量表达。后来进一步分析表明,在浆果发育过程中,果实中

ADH 基因主要就是 VvADH2。浆果进入转熟期后, ADH 活性的上升与 VvADH2 表达相一致。其中 VvADH2 基因的表达水平和 ADH 的活性成正相关。当用 1-MCP 处理后发现可以抑制 VvADH2 的表达水平和 ADH 的活性。同时用 2-CEPA 处理并在厌氧的条件下发现可以提高 VvADH2 的表达水平和 ADH 的活性(Tesniere et al. 2004)。Catherine 等(Catherine et al. 2003)研究发现在葡萄浆果中和悬浮细胞中发现乙烯信号的传导可能涉及控制 VvADH2 的表达水平和 ADH 的活性。当用 1-MCP 处理后可以抑制 VvADH2 的表达水平和 ADH 的活性。同是 2-CEPA 处理并在厌氧的条件下发现以提高 VvADH2 的表达水平和 ADH 的活性。Daniel 在研究两个同源性很低的哈密瓜 ADH 基因 Cm-ADH1 和 Cm-ADH2 时发现用 1-MCP 处理可以抑制 ACC 氧化酶表达, 同时也抑制 Cm-ADH 基因的表达。乙烯处理则可以提高 Cm-ADH 和 ACC 氧化酶的表达水平,同时 Cm-ADH 参与调节果实中芳香物质的合成(Daniel. 2006)。在香蕉中, ADH1 基因参与调控香蕉果实采后乙烯的生物合成, 从而来调控果实成熟(宁文彬. 2009)。

ADH 与花粉发育: 烟草在花粉萌、小孢子发育过程中, 在正常生长的烟草的叶片和根中 ADH 基因的表达量基本检测不到, 花中的萼片, 花柱、子房、花瓣、花丝 ADH 基因的表达水平也很低, 但是在花粉中的表达水平很高。在小孢子发育过程中, ADH 基因的表达迅速增加, 当花粉成熟时, 其表达量才会降低。同时, 在花粉的离体萌发中, 乙醇的累积速率增加显著, 花粉呼吸商维持在高水平, 三分之二的呼吸代谢底物进入乙醇发酵途径(Bucher et al. 1995)。

#### 1.4.3 ADH 和逆境胁迫关系的研究进展

植物在生长发育过程并不是一帆风顺, 在这个过程中, 许多不利环境因素影响植物的生长发育。ADH 是一种缺氧条件所诱导的应激酶, 在植物细胞内也维持有一定活性, 可能对拉动糖酵解和维持细胞内 NADH 水平有一定作用。植物 ADH 基因表达具有组织特异性, 在植物中不同时期, 不同部位的 ADH 基因表达不同, 同时 ADH 表达水平还受不同的物理条件如: 脱水、低温、以及缺氧制约。

James R 等通过调节氮气和氧气的比例先使玉米根尖处于低氧环境进行短期处理, 然后再把经过低氧短期处理后的玉米根尖和正常生长的玉米根尖置于严格厌氧的环境中, 结果发现未经处理的玉米根尖在严格厌氧条件下存活了 6 个小时, 而经过处理的存活了 18 个小时, 乙醇含量以及 ATP 的量比未经短期低氧处理的根尖高许多的, ADH 活性也明显增加(James et al. 1994)。Rolletschek 等用微感应器检测蚕豆和豌豆豆荚不同部位的含氧量, 证明了胚发育的低氧环境以及胚内部的低含氧量。在胚发育过程中, 由于种皮的存在使得呼吸作用的氧气供应不足(Rolletschek et al. 1999)。Yeung 等通过对发育中的菜豆种子进行 ADH 组织化学定位研究发现: 菜豆的种子在发育至子叶之前, ADH 在种皮中具有很高的活性。由于菜豆种胚被种皮宝贝, 同时种子又被豆荚包被, 因此, 种子处于一定的厌氧环境中, 而种皮内 ADH 的高活性, 为处于厌氧中的胚胎发

育提供了必要的能量(Yamada et al. 2002)。在莴苣种子的萌发过程中,由于种子被种皮包裹,使种子萌发处于厌氧环境,造成了 ADH 的表达量增加(Toyomasu et al. 1995)。从大豆中克隆得到了个不同而又与 ADH 高同源的 cDNA, Northern 印迹显示,这 3 个 ADH 基因具有不同的表达特性,其中的一个表现为在幼苗的各器官中组成型表达,能被厌氧胁迫所诱导;而另一个只在厌氧器官中表达;第三个 ADH 基因主要在厌氧根系中表达。赵森等通过荧光定量 PCR 的方法研究了水稻中 ADH 基因在涝害胁迫下的表达,发现 ADH 基因在涝害胁迫 4 小时前表达量都很低,但是在 4 小时时候,其表达量上升并在涝害胁迫 8 小时时达到高峰,然后下降 (Zhao et al. 2008)。在拟南芥中,ADH 的过量表达提高了拟南芥根对低氧环境的适应性。吴庆功等人通过半定量 PCR 的方法研究了涝害胁迫下薏苡 ADH 和 PDC 表达量的变化,发现 ADH 涝害诱导了 ADH 基因和 PDC 基因在根中的表达,在涝害胁迫下,ADH 在 mRNA 水平于 2 小时的时候开始累积并在 4 小时的时候达到高峰,然后下降,ADH 活性在涝害胁迫 6 小时达到高峰,然后降低 (吴庆功. 2006)。据 Bruxelles 等研究报道在正常的光照条件下,低温逆境和 ABA 诱导的 ADH 基因表达主要发生在根部、黄化叶以及置于暗处诱导愈伤组织的叶片外植体中,而在其它部位表达量很低或不表达(Bruxelles. 2002)。黑暗条件对 ADH 的诱导表达却有一定普遍性。通过把拟南芥 ADH 基因的启动子与 GUS 报告基因构建成融合基因,通过研究该 CADH-GUS,发现该启动子中含 4 个区域是逆境诱导表达必须的,其中以区域 4 最典型,区域 3 包含两个区 G-box-1 和 G-box-2,它们的作用是结合调节蛋白,其中 G-box-1 显著降低低温胁迫并在一定程度上降低脱水胁迫的诱导表达水平,G-box-2 的突变促进了非诱导状态下的高水平表达,但对缺氧反应没有影响。而区域 2 对于胁迫处理产生高表达是必须的(Dolferus. 1994)。对拟南芥的 ABA 突变体 (aba1 和 abi2) 进行脱水处理,发现 ADH 基因的诱导表达水平降低,而低氧处理使 aba1 突变体 ADH 基因的表达水平增加,但对 abi2 没影响,但是低温处理对这两个突变体中 ADH 的表达水平没影响。结果显示,虽然脱水和低温处理诱导了 ADH 基因的表达需要相同的启动子元件,但其诱导表达的途径是不相同的(Bruxelles et al. 1996)。低温处理的水稻和玉米幼苗,发现 ADH 无论是在 mRNA 水平还是在蛋白水平都会增加,组织化学染色显示,玉米的初生根和根系,水稻的茎干和叶片,其 ADH 活性能被低温诱导。ADH 基因的诱导表达表明,低温处理类似厌氧反应,使植物能量代谢发生改变,从而使其对逆境的适应(Christie et al. 1991)。

总结上述研究结果:在果实成熟中,ADH 通过催化醇和醛之间的转变而在果实成熟中起作用。在植物器官的发育过程中,ADH 参与糖酵解为植物提供能量以及通过调节生物体内的物质代谢。在逆境胁迫(特别是厌氧)条件下,植物通过 ADH 参与的乙醇代谢途径而获得能量,同时也减少了乙醛对植物体的伤害。

## 1.5 逆境与香蕉的生长发育

香蕉属于典型的热带植物，其生长发育过程并不是一帆风顺的过程，许多逆境都会影响香蕉的生长发育。低温逆境与香蕉的生长发育，香蕉是低温特敏感植物，当外界温度降低到 10℃左右的低温时就开始出现寒害，香蕉受到寒害胁迫时，主要表现为叶片凋萎和黄化，细胞内代谢失常，包括蛋白质合成量减低、光合作用和呼吸作用变缓以及细胞结构受损等（何伟等. 2009；张志刚等. 2010）。水分逆境与香蕉生长发育，水分逆境分为水分过多或水分过少。水分过多会使植物根部组织缺少氧气，因此限制根部的呼吸作用。缺水会使水分由叶片过量散失，产生脱水逆境。香蕉属于典型的热带需水植物，但它对水分胁迫又很敏感，热带地方由于受环境因素的影响，降雨量变化很大，而降雨量过多或过少都会影响香蕉的生长发育。当香蕉受到水分胁迫时，会造成细胞膜正常结构发生改变、细胞液浓度发生改变，从而造成代谢紊乱（王宇超等. 2010）；盐分逆境与香蕉的生长发育，土壤中的离子浓度过高（主要为钠离子和氯离子），会使香蕉根部的渗透压调节功能散失，导致体内的水分代谢紊乱（吴雪霞. 2009；杨剑超等. 2009）。伤害逆境与香蕉的生长发育，在香蕉生长的热带地区，由于季风的影响，香蕉组织会受到自然力的伤害，香蕉的水分代谢和能量代谢在受到伤害的短时间内会受到影响。

## 1.6 研究内容

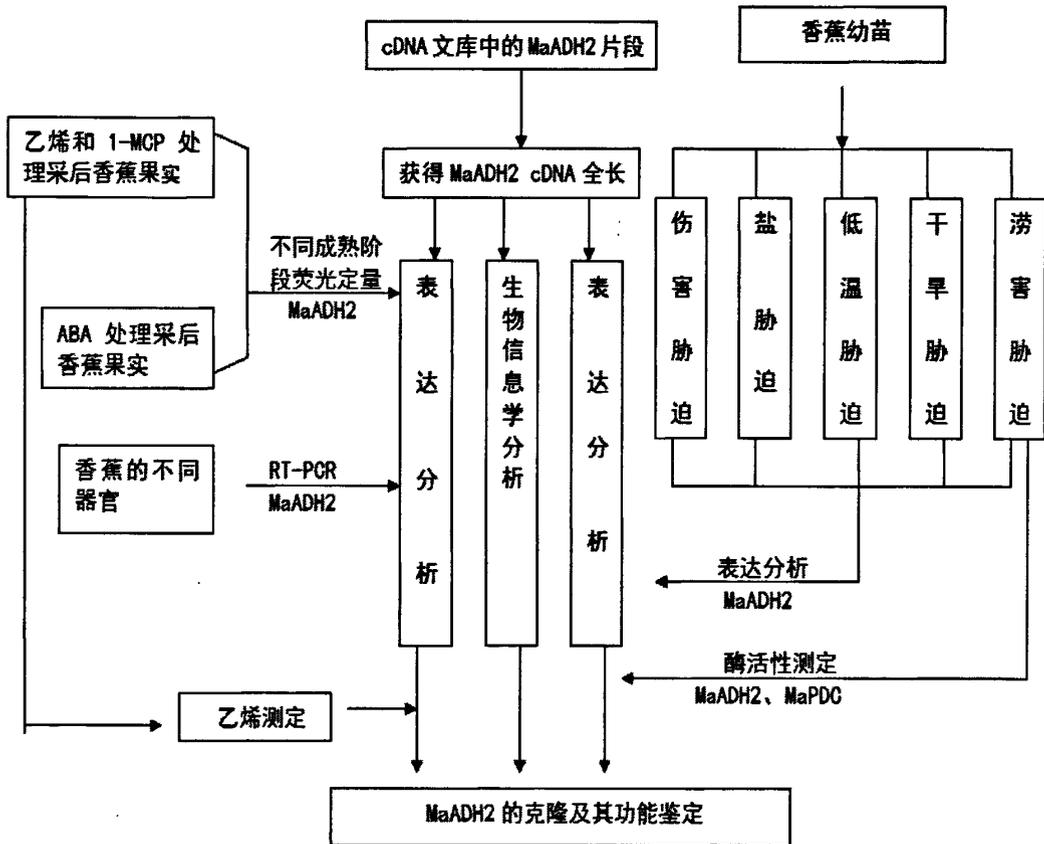
- 1) 克隆香蕉中 MaADH2 基因: 利用 RACE 技术从香蕉果实 cDNA 文库中克隆 MaADH2 基因。
- 2) 探讨 MaADH2 基因与乙烯生物合成的关系: 通过分析正常成熟、外源乙烯诱导和 1-MCP 抑制成熟的香蕉果实中 MaADH2 基因的表达情况，初步判定 MaADH2 基因是否参与调控乙烯生物合成过程。并通过分析 MaADH2 与乙烯生物合成关键酶基因的表达调控关系，从而更进一步确定 MaADH2 与乙烯生物合成的关系。
- 3 探讨 MaADH2 基因与香蕉果实采后成熟及果实品质的关系: 在不同处理条件下，分析 MaADH2 基因在香蕉采后成熟过程中的表达情况，判定 MaADH2 基因是否与香蕉果实采后成熟有关。
- 4) 探讨 ABA 处理香蕉果实对 MaADH2 基因表达的影响: 在 ABA 处理和正常成熟条件下，分析 MaADH2 基因在 ABA 处理和正常成熟下的表达。
- 5) 探讨香蕉幼苗在干旱胁迫下，ADH2 基因的表达变化: 在不同干旱程度下，分析 MaADH2 基因在干旱胁迫和正常生长下的表达。
- 6) 探讨香蕉幼苗在低温胁迫下，ADH2 基因的表达变化: 在不同低温条件下，分析 MaADH2 基因在低温胁迫和正常生长下的表达。
- 7) 探讨香蕉幼苗在盐胁迫下，ADH2 基因的表达变化: 在不同盐离子浓度下，分析 MaADH2 基因在盐胁迫和正常生长下的表达。

8) 探讨香蕉幼苗在涝害胁迫下, ADH2 基因表达及其酶活性的变化: 在不同涝害胁迫时间下, 分析 MaADH2 基因在涝害胁迫和正常生长下的表达, 并测定 ADH2 酶活性以及 PDC 酶活性, 通过对 MaADH2 基因的表达量及其 ADH2 和 PDC 酶活性的变化, 分析 MaADH2 基因和涝害胁迫的关系。

### 1.7 研究目的意义

通过对香蕉乙醇脱氢酶基因的 cDNA 全长克隆和生物信息学分析, 非生物胁迫下分析该基因在 mRNA 水平上的变化的分析, 为我们培育更加具有抗逆性的品种奠定基础。

### 1.8 技术路线



## 2. 实验材料、试剂及仪器

### 2.1 实验材料

香蕉果实从中国热带农业科学院热带生物技术研究所澄迈香蕉种植园获得，果实、花、根和叶均取自同一植株。香蕉果实 cDNA 文库由本室构建（徐碧玉等，2005）；该文库以采后各天的香蕉果肉为材料提取 RNA，然后用 SMART 试剂盒反转录为双链 cDNA 而建成的；提取香蕉基因组 DNA 的材料采自本实验室试验地的巴西香蕉（M.AAA Group）叶片；测定香蕉采后乙烯及呼吸强度的材料为巴西香蕉（M.AAA Group）果实，采自广州市郊区的一个香蕉园，采收时果实饱满度约为 7-8 成，采后马上用液氮冻上一个果备用。采后于当天运至华南农业大学园艺学院生理实验室，将香蕉去轴落梳，分成单个蕉指后，挑大小均匀，无病虫及机械伤的果实，先用 5g/L 的漂白粉处理 10min，晾干，再用 0.1% 的多菌灵浸泡 10min，晾干放置在 25℃ 通风的恒温箱中，每隔 24hour 取一次样备用。测完的样品用液氮速冻，放在 -75℃ 度冰箱备用；提取的 RNA 的材料中的香蕉的根、茎、叶和花来自本实验室试验地，而香蕉 0 天、采后 2 天、6 天、10 天、12 天、14 天的果实为储藏在 25℃ 的采收时果实饱满度约为 7-8 成的香蕉果实。

香蕉幼苗为组培苗，购自中国热带农业科学院组培中心。

## 2.2 实验试剂

pMD19-T Vector 为 Takara 公司的产品；各种内切酶为 Takara 公司的产品；弗氏完全和不完全佐剂为 Sigma 公司的产品；辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗购于中杉金桥公司；碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗为华美公司的产品；细菌用胰化蛋白胨和酵母提取物为 OXOID 公司的产品；丙烯酰胺为 Amresco 公司的产品；硝酸纤维膜为 BBI 公司的产品；96 孔酶标板为 Corning costar 的产品；核酸 Marker 为申能博彩公司的产品；蛋白 Marker 为天为时代公司的产品；透析袋为 SPECTRUM 公司(美国)的产品；PCR 相关试剂购于上海申能博彩生物科技有限公司；反转录酶购自 INVITROGEN 公司；反转录试剂购自 PROMEGA、TAKARA 公司；其它生化试剂和常规试剂均为超纯或分析纯，为广州化学试剂厂的产品。

## 2.3 实验仪器

表 1 主要仪器  
Table 1 The main apparatus

名称	型号	生产厂家
台式冷冻离心机	MIK2-Wzzk	MIKRO
PCR扩增仪	T1Thermocycle	Biometra
恒温混匀器	Thermomicro Lomsort	Eppendorf
电泳仪	2301	LKB
低温循环水浴	Polyscience9106	Polyscience
紫外分光光度计	DU-800	BECKMAN
凝胶扫描系统	White/UV, TMW-20	Alpha Innotech
恒温水浴箱	2219	LKB
恒温摇床	G-27 EKISO	N.J
真空干燥系统	DNA10	Savant
全自动酶标仪	ELX800	美国BIO-TEK
超净工作台	YJ-875	吴江市净化设备
灭菌锅	HVE-2510	HIRAYAMA
Digital PH meter	5938-10	Cole-Parmer
磁力搅拌器	SH-3	北京金贸德
超声波破碎仪	VCX130PB	美国sonics
生物恒温摇床	SI6R	美国shellab公司

### 3.材料处理

#### 3.1 香蕉果实的不同处理

将采收成熟度一致、饱满度约为 7-8 成、生长期为 110 天的果实，将香蕉去轴落梳，分成单个香蕉果指，挑选大小均匀，无病虫害及机械损伤的果实，去掉顶部的干花，并用 0.1%次氯酸钠进行表面消毒 10 min。取出晾干一个晚上，随机选取 3 个果实装进一个保鲜盒中，每个处理准备 12 个盒。

外源乙烯处理：利用采后 0 天单蕉指密闭注射 100ul/L 乙烯,于 22℃放置 18h 后开盖，分别取采后天数为 0 天、1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天的香蕉果实用以进行后续实验 (Liu et al. 1999)。

1-甲基环丙烯(1-MCP)处理：利用采后 0 天香蕉果指，按 1u/L 的量称取 1-MCP 粉未加水，于 22℃条件下密闭 18h。分别取采后天数为 0 天、2 天、4 天、6 天、8 天、10 天、12 天、14 天、16 天、18 天的果实进行后续实验 (Seemi et al. 2004)。

脱落酸 (ABA) 处理：取晾干后的果实 60 个，浸在含 100uM 的 ABA 溶液中，6 小时后取出晾干，置于 22℃恒温箱中。按果皮颜色成熟度随机取 3 个果用于测硬度，测完的样品用液氮速冻，放在-80℃度冰箱备用。

#### 3.2 香蕉幼苗不同胁迫的处理

干旱胁迫处理：以正常生长的五叶龄香蕉幼苗土壤水势为对照，把干旱程度分为 3 个等级，轻度干旱，中度干旱和重度干旱。为了减小误差，每个点处理 3 棵幼苗。叶片取中间两个，用自来水冲洗干净，然后用滤纸除去根表面的水分，立即用液氮冷冻，置于-80 度冰箱中备用。

低温胁迫处理：以正常生长的五叶龄香蕉幼苗，模拟低温环境，分别把香蕉幼苗置于，5 度、7 度、10 度、15 度的低温环境中 2 小时，然后取样。叶片取中间两个，用自来水冲洗干净，然后用滤纸除去叶片表面的水分，立即用液氮冷冻，置于-80 度冰箱中备用。

盐胁迫处理：以正常生长的五叶龄香蕉幼苗，模拟高盐环境，用 1M 的 NaCl 溶液处理香蕉幼苗，然后在胁迫 0h、2h、4h、6h 时取样。叶片取中间两个，用自来水冲洗干净，然后用滤纸除去叶片表面的水分，立即用液氮冷冻，置于-80 度冰箱中备用。

伤害胁迫处理：以正常生长的五叶龄香蕉幼苗，模拟外界对香蕉幼苗造成的伤害，用剪刀除去香蕉叶片，然后再 0h、1h、3h、6h、12h 时取样。叶片取中间两个，用自来水冲洗干净，然后用滤纸除去叶片表面的水分，立即用液氮冷冻，置于-80 度冰箱中备用。

涝害胁迫处理：模拟自然界的涝害，把正常生长的五叶龄香蕉幼苗置于水中，水刚好淹没球茎。然后按照 0h、6h、12 h、24 h、36 h、48 h 取样。为了减小误差，每个点处理 3 棵幼苗。叶片取中间两个，用自来水冲洗干净，然后用滤纸除去叶片表面的水分，立即用液氮冷冻，置于-80 度冰箱中备用。根用自来水冲洗干净，用滤纸除去根上的水分，立即用液氮冷冻，置于-80 度冰箱备用。

## 4.方法

### 4.1 香蕉果实采后乙烯释放量的测定

正常成熟和抑制成熟的采后 0d, 2d, 4d, 6d, 8d, 10d, 12d, 14d, 16d, 18d, 以及诱导成熟的采后 0d, 1d, 2d, 3d, 4d, 5d, 6d 测定乙烯的释放量。测定前，将果实放入密封罐中，闷罐 3 小时，用 1mL 注射器抽出气体，每罐抽 4 针，用日本岛津 GC17A 型气相色谱仪测定果实乙烯释放量。气相色谱的工作条件为：火焰离子化检测器(FID)，载体为 60-80 目 Al<sub>2</sub>O<sub>2</sub>，柱温 90 度，进样气温度 100 度，载气为 N<sub>2</sub>，流速为 25mL/min。(李雯. 2003)

### 4.2 香蕉果实采后成熟度的划分

根据 Stover 和 Simmonds 的标准(Stover and Simmonds 1987)，在香蕉采后成熟研究中，果实达到绿色成熟期采收，置于室温下(22—26 °C)让其自然成熟。香蕉果实成熟度被分成 7 个成熟阶段：全绿期，黄色出现期，绿多于黄，黄多于绿，稍微绿色存在，全黄期，全黄并有黑色斑点。这 7 个时期分别定为香蕉果实成熟的 7 个成熟度。

### 4.3 涝害胁迫下 MaADH2 和 MaPDC 活性的测定

Ma-ADH2 和 Ma-PDC 活性测定：乙醇脱氢酶 (ADH) 活性测定 (参考 David 等人 1994 的方法)：反应混合液含 940 $\mu$ L 50 mmol/L TES 缓冲液 (PH7.5 0.15mmol/L NAD<sup>+</sup>)，50 $\mu$ L 酶提取液，用 10 $\mu$ L 乙醇 (40%) 启动反应。在 340nm 处检测吸光值 (OD 值) 的变化，以每分钟 OD 值变化 0.01 为一个酶活单位。

丙酮酸脱羧酶 (PDC) 活性测定 (参考 David 等人 1994 的方法)：反应混合液含 940 $\mu$ L 50mmol/L MES 缓冲液 (PH6.8, 含 25mmol/L NaCl, 1mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0.5mmol/L TPP, 2mmol/L DTT, 0.17mmol/L NAD<sup>+</sup>, 50mmol/L 草氨酸钠)，50 $\mu$ L 酶提取液，用 10 $\mu$ L 丙酮酸启动反应，在 340nm 处检测吸光值的变化，以每分钟 OD 值变化 0.01 为一个酶活力单位。酶液蛋白含量按考马斯亮蓝法测定。酶活性以 U/mg Protein 表示。

### 4.4 香蕉不同器官总 RNA 提取

采后 0 天果实，花，根，茎，叶切成小块立即置于液氮中，于-80°C 冰箱保存用于总 RNA 提取。RNA 提取参照改良的 CTAB 方法 (李燕强等. 2005)。

1) 提取缓冲液 (2.5% CTAB, 100mM Tris-Cl, pH8.2, 1.4M NaCl, 20mM EDTA, pH8.0) 用前加入  $\beta$ -巯基乙醇至终浓度为 2%, 将其预热至 65°C。

2) 每 3g 香蕉材料加入 2mL 40% 的 PVP 磨成粉末, 加入到 20mL 提取缓冲液, 用力混匀, 65°C 中放置 20min, 每隔 5-10min 混匀 1 次。

3) 之后冷至室温, 用等体积的氯仿抽提, 25°C 以 12000rpm 离心 15min。

4) 上清液加 8MLiCl 至终浓度为 3M (0.6 体积), -20°C 中放置 4h。4°C 下以 12000rpm 离心 20min, 沉淀 RNA。

5) 沉淀用 5mL 的 DEPC 处理水溶解, 再用等体积的水饱和酚或酸酚, 氯仿顺序抽提。

6) 上清液加 1/10 体积 3MNaAc 和 3 倍体积无水乙醇放在 -80°C 冰箱里沉淀 2 小时或以上。然后 4°C 下以最大速度离心 20min 沉淀 RNA。沉淀物用 70% 乙醇洗涤 2 次, 真空干燥后溶于 RNase-free 水中。

7) 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性, 用紫外分光光度计测定提取的 RNA 在 260nm、280nm 及 230nm 处的光吸收值, 确定 RNA 的纯度及浓度。

所需试剂的配制:

1) DEPC-H<sub>2</sub>O 的配制

在 Mili-Pore 纯水中加入 0.1% 的 DEPC, 混匀, 于 37°C 中保温过夜, 121°C 高压灭 30min。

2) RNA 提取缓冲液

100mM Tris-Cl (pH8.2)

1.4M NaCl

20mM EDTA (pH8.0)

2% CTAB

(其中 Tris-Cl (pH8.2) 的母液为 1M, 而 EDTA (pH8.0) 的母液为 0.5M)

3) 1M Tris-HCl (pH 8.2)

称取 12g Tris, 加入 80mL RNase-free 水, 用浓盐酸调节 pH 值达到 8.2

4) 0.5 mol/L EDTA (pH 8.0)

称取 18.61 g EDTA-Na<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 加入 80mL RNase-free 水和 2.0g 左右的固体 NaOH, 于磁力搅拌器上搅拌至固体完全溶解后, 用 NaOH 溶液将 pH 值准确调至 8.0。用 RNase-free 水定容到 100mL。

5) 3M NaAc (pH5.2)

称取 61.52g NaAc, 加 DEPC-H<sub>2</sub>O 至 250mL, 搅拌溶解, 用冰乙酸调至 pH5.2, 121°C 高压灭菌 20min。

6) 70% 乙醇

加 75mL 的 DEPC-H<sub>2</sub>O 于 175mL 的无水乙醇中。

#### 7) 8M LiCl

称取 84.78g 的 LiCl 加 DEPC 水至 250mL, 高压灭菌。

#### 8) 5×MOPS 电泳缓冲液

0.1mol/L MOPS(pH 7.0)、40 mmol/L NaAc、5 mmol/L EDTA(pH 8.0)。

### 4.5 果实采后不同阶段总 RNA 提取

取采后 0d, 2d, 6d, 10d, 12d, 14d, 16d 的香蕉果实, 乙烯诱导成熟的采后 0d, 2d, 4d, 6d, 8d, 10d 的香蕉果实, 切成小块立即于液氮中冻透放入-80℃冰箱中用于总 RNA 提取。提取方法同 3.3.3。

### 4.6 cDNA 第一链的合成

取 4μg 总 RNA, 用 Invitrogen 的 SuperScript™ III Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一链, 具体操作如下:

1) 在无 RNase 的 0.2mL 离心管中加入以下组分:

Oligo(dT) <sub>20</sub> (50μM)	1μL
Total RNA(4μg)	9μL
10mM dNTP Mix	1μL
DEPC 处理水	2μL
<hr/>	
总体积	13μL

2) 混匀, 65℃加热 5min, 冰上冷却至少 1min;

3) 瞬时离心, 收集管壁上液滴至管底, 并加入:

5×First-Strand Buffer	4μL
0.1M DTT	1μL
RNaseOUT™ Recombination RNase Inhibitor(40units/μL)	1μL
SuperScript™ III RT (200units/μL)	0.5μL
<hr/>	
总体积	20μL

4) 用枪混匀, 50℃保温 30-60min;

5) 70℃放置 15min 使反应失活;

6) 直接用于 PCR 或置于-20℃保存备用。

### 4.7 MaADH2 基因的克隆与生物信息学分析

## 4.7.1 从香蕉果实 cDNA 文库中克隆 MaADH2 基因 5'端

### 4.7.1.1 引物设计

根据 SSH 获得的基因片段, 然后利用 BLASTx 进行分析, 发现 BR24-3 的 3'端包含终止密码子 TGA。根据已知序列用 Primer Premier 5 设计两条扩增 5'端的 RACE 引物交由上海生物工程有限公司合成。其中 BR24-3 p1 是外引物, BR24-3 p2 是内引物。

BR24-3 p1: 5'-GCCACGCCTACGATAACTGATG-3'

BR24-3 p2: 5'-GCATACGAGGAAACGAGGGGTC-3'

接头引物 PTR5': 5'-CTCCGAGATCTGGACGAGC-3'

### 4.7.1.2 PCR 反应

在 0.2mL 离心管中依次加入: cDNA 文库库液 1.0 $\mu$ L, 10 $\times$ Buffer(含 2.5mM Mg<sup>2+</sup>) 2.5 $\mu$ L, dNTP(dA/G/C/TTP:10mM each) 0.5 $\mu$ L, ptr5'(10pM) 1.0 $\mu$ L, BR24-3 p1 (10pM) 1.0 $\mu$ L, Taq 聚合酶(5u/ $\mu$ L) 0.3 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 18.7 $\mu$ L, 总体积 25.0 $\mu$ L 轻弹混匀, 瞬时离心收集管壁上的液滴至管底。反应程序: 94 $^{\circ}$ C, 7min, 94 $^{\circ}$ C, 1min, 55 $^{\circ}$ C, 45s, 72 $^{\circ}$ C, 1min, 72 $^{\circ}$ C, 10min 共 40 个循环。该体系是扩增目的基因 5'端片段的第一轮反应体系, 第二轮把 BR24-3 p1 换成 BR24-3 p2, 模板是第一轮 PCR 产物稀释 100 倍。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 4.7.1.3 目的片段的回收

用 TIANGEN 的琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收:

- 1) 将单一的目的 DNA 条带从琼脂糖凝胶中切下(尽量切除多余部分)放入干净的离心管中, 称取重量。
- 2) 向胶块中加入 3 倍体积溶胶液 PN(如果凝胶重为 0.1g, 其体积可视为 100 $\mu$ L, 则加入 300 $\mu$ L 溶胶液), 50 $^{\circ}$ C 水浴放置 10 分钟, 其间不断温和地上下翻转离心管, 以确保胶块充分溶解。如果还有未溶的胶块, 可再补加一些溶胶液或继续放置几分钟, 直至胶块完全溶解(若胶块体积过大, 可先将胶块切成碎块)。
- 3) 将上一步所得溶液加入一个吸附住 CA2 中(吸附柱放入收集管中), 13000rpm 离心 30 秒, 倒掉收集管中的废液, 将吸附管重新放入收集管中。
- 4) 向吸附柱中加入 700 $\mu$ L 漂洗液 PW(使用前请先检查是否已加入无水乙醇), 13000rpm 离心 30 秒, 倒掉废液, 将吸附柱重新放入收集管中。
- 5) 向吸附柱中加入 500 $\mu$ L 漂洗液 PW, 13000rpm 离心 30 秒, 倒掉废液。将离心吸附柱 CA2 放回收集管中, 13000rpm 离心 2 分钟, 尽量除去漂洗液。将吸附柱置于室温或 50 $^{\circ}$ C 温箱数分钟, 彻底地晾干, 以防止残留的漂洗液影响下一步的实验。
- 6) 将吸附柱放到一个干净离心管中, 向吸附膜中间位置悬空滴加适量 65-70 $^{\circ}$ C 水浴预热的洗脱缓冲液 EB, 室温放置 2 分钟。13000rpm 离心 1 分钟收集 DNA 溶液。
- 7) 为了提高 DNA 的回收量, 可将离心得到的溶液重新加回离心吸附柱中, 重复步骤 6。(CA2 柱的洗脱体积不应小于 30 $\mu$ L 过小影响回收效率)

DNA 浓度及纯度检测:

回收得到的 DNA 片段可用琼脂糖凝胶电泳和紫外分光光度剂检测浓度与纯度。

DNA 应在 OD260 处有显著吸收峰,OD260 值为 1 相当于大约 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  双链 DNA、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$  单链 DNA。

OD260/ OD280 比值应为 1.7—1.9, 如果洗脱时不使用洗脱缓冲液, 而使用去离子水, 比值会偏低, 因为 PH 值和离子存在会影响光吸收值, 但不表示纯度低。

#### 4.7.1.4 回收产物与 pMD20-T vector 连接 (参照 TaKaRa 说明书)

pMD20-T vector(50ng/ $\mu\text{L}$ )	1.0 $\mu\text{L}$
回收产物(100ng/ $\mu\text{L}$ )	3.0 $\mu\text{L}$
Solution I	5.0 $\mu\text{L}$
ddH <sub>2</sub> O	1.0 $\mu\text{L}$
<hr/>	
总体积	10.0 $\mu\text{L}$

混匀后瞬时离心, 将管壁上的液滴收集到管底, 16 $^{\circ}\text{C}$  连接 12—16 小时。

#### 4.7.1.5 E.coli DH5 $\alpha$ 感受态细胞的制备

参照分子克隆实验指南(黄培堂 2002)

1)挑取保存于 LB 固体培养基上的 E.coli DH5 $\alpha$  单菌落接种于液体 LB 培养基(不加抗生素)中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 300rpm, 培养过夜。次日按 1% 的体积转入新鲜的液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ , 摇动培养 1—2 小时, 至 OD600 约为 0.3。

2)将菌液转入 10mL 灭菌离心管中, 于冰上放置 10min。

3)4 $^{\circ}\text{C}$ , 5000rpm 离心 10min, 去上清, 回收菌体。

4)加入 3—5mL 冰预冷的 0.1M CaCl<sub>2</sub>, 重悬菌体, 冰上放置 30min。

5)离心回收菌体, 以 0.4mL 冰预冷的 0.1M CaCl<sub>2</sub> 重悬菌体, 所得即为感受态宿主菌。

#### 4.7.1.6 连接产物转化 E.coli DH5 $\alpha$

参照分子克隆实验指南(黄培堂 2002)

1)取连接产物 5.0 $\mu\text{L}$  加入 100 $\mu\text{L}$  感受态细菌中, 冰浴 30min。同时设对照: 正对照, 标准质粒 DNA 及感受态细菌; 负对照, 不加质粒的感受态细胞。

2)42 $^{\circ}\text{C}$  热激 90sec, 立即放回冰浴中。5min 后补加 500mL LB 液体培养基(无抗生素), 37 $^{\circ}\text{C}$ , 200rpm, 摇动培养 40—60min。

3)取 200 $\mu\text{L}$  转化菌均匀涂布于含 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$  氨苄青霉素的 LB 固体培养基上。

4)平板上液体被吸收后, 倒置平板, 于 37 $^{\circ}\text{C}$  培养约 12 小时, 观察平板上细菌的生长情况。

#### 4.7.1.7 重组质粒 DNA 的小量提取

参照分子克隆实验指南(黄培堂 2002)

1)挑取平板单菌落于含 50 $\mu$ g/mL 氨苄青霉素的 3 mL 液体 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 300 rpm, 摇动培养过夜。

2)转移约 1.2 mL 菌液到 1.5 mL 的离心管中, 4 $^{\circ}$ C, 13000 rpm 离心 1 min, 收集菌体, 弃上清, 再离心 5s, 吸去剩余的上清。

3)每个离心管中加入冰预冷的溶液 I 100 $\mu$ L, 使菌体分散混匀。

4)每管各加入新配制的溶液 II 200 $\mu$ L, 缓慢倒转 5 次, 混匀, 冰浴 5 min。

5)每管各加入 150 $\mu$ L 冰预冷的溶液 III, 倒转几次混匀, 冰浴 10 min。

6)4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 10 min。

7)取上清, 加 2 倍体积的无水乙醇, 混匀后-20 $^{\circ}$ C放置 20 min。

8)4 $^{\circ}$ C, 12000 rpm, 离心 10 min 得到质粒 DNA 沉淀。

9)70%乙醇洗涤沉淀一次, 4 $^{\circ}$ C 12000 rpm 离心 5 min, 弃上清, 沉淀物真空干燥。

10)将沉淀溶于 20 $\mu$ L TE(pH8.0), 加入 1 $\mu$ LRNase(10 $\mu$ g/ $\mu$ L)消除小分子 RNA, 贮于 -20 $^{\circ}$ C 备用。

#### 4.7.1.8 重组质粒的 PCR 和酶切鉴定及测序

1) PCR 反应体系同 3.7.1.2, 反应程序同 3.7.1.3

2) 重组质粒双酶切鉴定

在 0.2mL 离心管中加入以下试剂:

重组质粒(900ng/ $\mu$ L)	2.0 $\mu$ L
EcoR I (15u/ $\mu$ L)	0 .5 $\mu$ L
HindIII(15u/ $\mu$ L)	0 .5 $\mu$ L
10 $\times$ buffer M	1.0 $\mu$ L
ddH <sub>2</sub> O	6.0 $\mu$ L
<hr/>	
总体积	10 $\mu$ L

混匀后, 稍稍离心, 37 $^{\circ}$ C 温浴 3h, 然后将酶切产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 与 PCR 鉴定结果结合分析判断是否有相应的片段插入。测序由上海生物工程有限公司完成。

#### 4.7.2 MaADH2 cDNA 全长克隆

##### 4.7.2.1 引物设计

根据 5'RACE 所获得的序列及 MaADH2 cDNA 的已知片段拼接设计两条引物

BR24-(3)5': TCCTCTCCTTCCGTAATGGC;

BR24-(3)3': GCGTGCTTGCTTTGCAACCATGA;

##### 4.7.2.2 PCR 反应

在 0.2mL 离心管中依次加入：cDNA 文库库液 1.0 $\mu$ L，10 $\times$ Buffer(含 2.5mM Mg<sup>2+</sup>)2.5 $\mu$ L，dNTP(dA/G/C/TTP:10mM each) 0.5 $\mu$ L，BR24-(3)5'(10pM) 1.0 $\mu$ L，BR24-(3)3'(10pM) 1.0 $\mu$ L，Taq 聚合酶(5u/ $\mu$ L) 0.3 $\mu$ L，ddH<sub>2</sub>O 18.7 $\mu$ L，总体积 25.0 $\mu$ L 轻弹混匀，瞬时离心收集管壁上的液滴至管底。反应程序：94 $^{\circ}$ C，7min，94 $^{\circ}$ C，1min，55 $^{\circ}$ C，45s，72 $^{\circ}$ C，1min，72 $^{\circ}$ C，10min 共 40 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

#### 4.7.2.3 PCR 产物回收、连接、转化及重组质粒的提取鉴定

实验步骤参考 4.7.1.3-4.7.1.8。

### 4.7.3 生物信息学分析

采用 DNAMAN 软件对香蕉 MaADH1 各成员的核苷酸序列进行比较分析，DNASIS2.6 进行氨基酸的同源性比较分析，运用 NCBI Blastx (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)进行基因的同源性分析，并从中选取同源性较高的序列用 Vector NTI 软件进行氨基酸序列的多重比对。利用 ORF Finder 在线 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ORF/>)分析软件分析 ADH 基因 cDNA 序列的开放阅读框和编码的蛋白质序列，利用 conserve domain research (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/CONSERVATION/>)分析保守结构域。根据植物中 ADH 基因家族中已发表序列，用 MEGA3.1 软件的邻位相连法 (Neighbor-Joining, NJ) 法构建系统进化树。另外，用 GENSCAN 软件(<http://www.genscan.org/>)分析 MaADH2 基因 cDNA 序列的开放阅读框。

## 4.8 半定量 RT-PCR

### 4.8.1 cDNA 第一链的合成

1)取 4 $\mu$ g 总 RNA，用 Invitrogen 的 SuperScript<sup>TM</sup> III Reverse Transcriptase 合成 cDNA 第一链，具体操作如下：

在无 Rnase 得 0.2mL 离心管中加入以下组分：

Oligo(dT) <sub>20</sub> (50 $\mu$ M)	1 $\mu$ L
Total RNA(4 $\mu$ g)	9 $\mu$ L
10mM dNTP Mix	1 $\mu$ L
DEPC 处理水	2 $\mu$ L
<hr/>	
总体积	13 $\mu$ L

2) 混匀，65 $^{\circ}$ C 加热 5min，冰上冷却至少 1min；

3) 瞬时离心，收集管壁上液滴至管底，并加入：

5 $\times$ First-Strand Buffer	4 $\mu$ L
0.1M DTT	1 $\mu$ L
RNaseOUT <sup>TM</sup> Recombination RNase Inhibitor(40units/ $\mu$ L)	1 $\mu$ L

SuperScript™ III RT (200units/μL)	0.5μL
总体积	20μL

- 4) 用枪混匀, 50℃保温 30-60min;
- 5) 70℃放置 15min 使反应失活;
- 6) 直接用于 PCR 或置于-20℃保存备用。

#### 4.8.2 RT-PCR 引物设计

根据香蕉的 MAACTIN1 基因的序列设计 Act1 引物:

A1:5'-CGAGGCTCAATCAAAGA-3'

A2:5'-ACCAGCAAGGTCCAAAC-3'

MaADH2 已知的 cDNA 序列, 在非保守区设计一对引物,

MaADH2 S1:5'-CATCAGTTATCGTAGGCGTGG-3'

MaADH2 S2:5'-GCATACGAGGAAACGAGGGGTC-3'

#### 4.8.3 PCR 反应

在 0.2mL 离心管中加入以下成分: cDNA 第一链 1.0μL, 10×Buffer(Mg<sup>2+</sup>)(2.5mM) 2.5μL, dNTP (dA/G/C/TTP:10mM each) 0.5μL, MaADH2 S1 (10pM) 1.0μL, MaADH2 S2(10pM) 1.0μL, Taq 聚合酶(5u/μL) 0.3μL, ddH<sub>2</sub>O 16.7μL, 总体积 25.0μL。该体系是用于扩增目的基因 ADH2 的, 内参基因 Ma-act1 与它相同, 只将两引物换为 A1 和 A2 即可。反应程序: 94℃3min, 94℃30s, 55℃30s, 72℃30s, 72℃5 min, 28 个循环, 该反应程序为目的基因和内参基因共有。

### 4.9 荧光定量 RT-PCR 分析 MaADH2

#### 4.9.1 cDNA 第一链的合成

操作过程同 4.8.1

#### 4.9.2 荧光定量 PCR 的引物设计

首先用 NCBI 的保守结构域分析软件分析 MaADH2 和 Ma-actin1 的保守结构, 确保所设计引物的扩增片段位于非保守区; 然后根据荧光定量 PCR 的引物设计原则, 设计引物。

Ma-actin1 扩增长度为 379bp, 引物序列为:

ACTIN5': 5'CAGTGGTTCGTACAACACTGGTAT 3'

ACTIN3': 5'ATCCTCCAATCCAGACACTGT 3'

MaADH2 扩增长度为 298bp 引物序列为

MaADH2 P1:5'-CATCAGTTATCGTAGGCGTGG-3'

MaADH2 P2:5'-GCATACGAGGAAACGAGGGGTC-3'

### 4.9.3 荧光定量 PCR 的反应体系和反应程序

在 Stratagene 的 Mx3000P 仪器上进行荧光定量 PCR。在 0.2mL 的 PCR 反应管中加入 SYBR Premix Ex Taq(2×)(TAKARA)12.5μL、Rox reference Dye II (50×)(TAKARA)0.5μL、5μM 的一对引物各 0.75μL, cDNA 样品 1μL, 然后用水补足至 25μL (五个基因的反应体系除引物不同外其它试剂是相同的)。

每个样品既要用于扩增目的基因 MaADH2, 又要扩增内参基因 MaACT1, 各个基因的扩增都做三个重复。实际加样时, 为减小误差, 各 PCR 反应管中共有的试剂可加在一起然后分装。加样完毕, 进行荧光定量 PCR。

按照 94℃ 预变性 3min, 94℃ 变性 7s, 55℃ 退火 15s, 72℃ 延伸 20s, 共 40 个循环的反应程序进行扩增 (两个基因的反应程序是一致的), 并于每个循环的延伸阶段采集荧光信号。反应结束后做 94℃—55℃ 的融解曲线分析。

### 4.9.4 荧光定量 PCR 的定量方法

采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  相对定量方法 (Livak et al.,2001) 研究三个基因表达量的差异, 该方法无需制作标准曲线, 将 0d 的 cDNA 模板视为对照样品, 其它天数的视为不同处理的样品, 以看家基因 MaAct1 为内参基因, 仪器自带的分析软件即可自动生成表达变化的曲线。

## 5 结果

### 5.1 MaADH2 基因的克隆

#### 5.1.1 MaADH2 基因 5'端的克隆

已测序的 cDNA 文库中的 675bp 片段通过序列比对发现, 该序列的 3'端包含 TGA 终止密码子。我们在以此为基础设计合成了用于 5'RACE 的扩增引物, 从香蕉 cDNA 文库中克隆该基因 5'序列, PCR 结果测序表明, 该片段为 827bp, 包含 ATG 起始密码子。

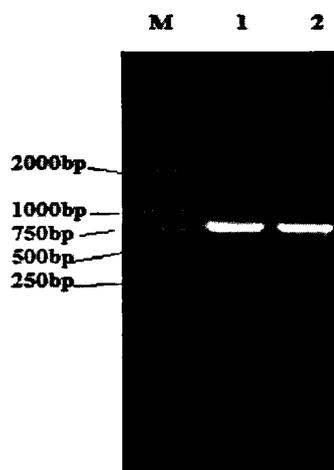


图1 MaADH2 5'端序列PCR扩增

M: Marker; 1、2: MaADH2片段

Fig.1 Product of MaGAD1 gene 5'RACE amplification

M: Marker; 1、2: The segment of MaADH2

### 5.1.2 MaADH2 cDNA 全长克隆

根据 MaADH2 的已知序列及 5'-RACE 所获得的序列拼接后设计 2 条引物从香蕉果实 cDNA 文库中克隆该基因 cDNA 全长。PCR 及测序结果显示, 该基因 cDNA ORF 为 1140 bp(图 8)。

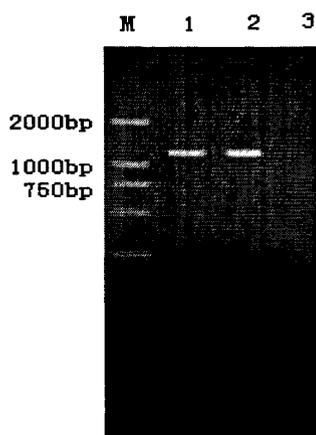


图2 MaADH2 cDNA序列PCR扩增

M: Marker; 1, 2: MaADH2 cDNA; 3: 阴性对照

Fig.2 Product of MaADH2 gene cDNA amplification

M:Marker; 1,2 :MaADH2 cDNA; 3: negative control

### 5.2 MaADH2 基因的序列分析

### 5.2.1 生物信息学分析

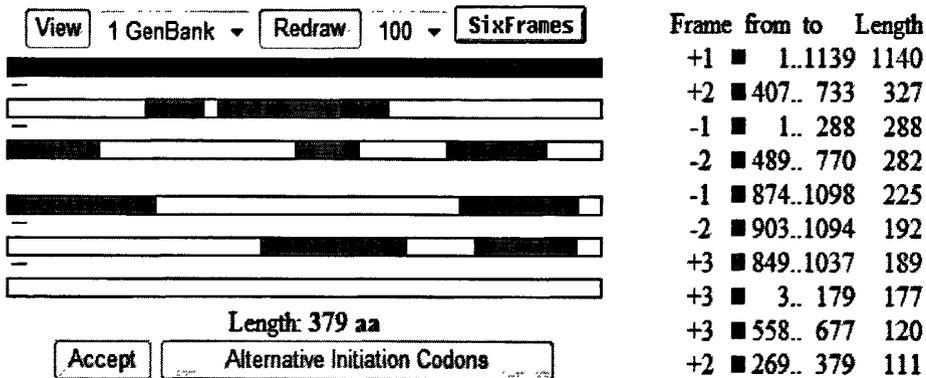
利用生物信息学数据库和互联网上的软件对 MaADH2 的 cDNA 进行分析。通过 ORF Finder 和 GENSCAN 软件分析表明该 cDNA 序列 ORF 为 1140 bp, 有一个翻译起始密码子 ATG, 相同读码框内有一个终止密码子 TGA, 表明此序列是一个全长基因, 其 ORF 编码 379 个氨基酸, ProtParam 分析表明该基因编码的蛋白分子量为 40.7KDa, 等电点 7.09,; NetPhos 2.0 Server 对 MaADH2 的翻译后修饰预测, 发现在 4 个 Tyr, 4 个 Ser, 4 个 Thr 发生了磷酸化; ProtScale 预测香蕉 MaADH2 氨基酸序列的疏水性/亲水性, 发现该氨基酸为亲水性氨基酸。

```

MATQGRVITCKAAVAWEANKPLVIEDVQVAPPQAGEVRIKILFTALCHTDAYTWSGKDPE
GLFPCILGHEAAGIVESVGEVTEVQPGDHVPCYQAECRECKFCKSGKTNLGKVRLAT
GVGVMLNDRKSRFSVNGKPIYHFMGTSTFSQYTVVHDVSVAKIHPQAPLEKVCLLGCGVPTGLGA
VWNTAKVEAGSNVAIFGLGTVGLAVAEGAKTAGASRIIGVDIDSKKFDIAKKFGV
NEFVNPKDHDKPIQQVIVDLTDGGVDYSFECIGNVSVMRAALECCHKGWGTSVIVGVAASGQEIS
TRPFQLVTGRVWKGTAFFGGFKSRSQVPWLVDKYMNKEIKVDEYITHMTLEDINKAFDLMHEGG
CLRCVLALQP
    
```

图 3 MaADH2 核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Fig3 nuclear acid and deduced amino acid sequence of MaADH2



GENSCAN predicted genes in sequence /tmp/03\_18\_10-11:33:19.fasta

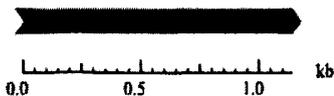


图 4 采用 GENSCAN 和 ORF FINDER 对 MaADH2 cDNA 序列分析结果

Fig.4 Analysis of MaADH2 cDNA by using GENSCAN and ORF FINDER

### 5.2.2 同源性比较

Nucleotide 分析表明：MaADH2 cDNA 推导的氨基酸序列与拟南芥 (BAB09054)、蓖麻 (EEF28759)、水稻 (AAB19117)、玉米 (ACG32791)、马铃薯 (ABB72806) 有较高的一致性，分别为 92%、92%、91%、90%、90%。多序列比对发现，Ma-ADH2 cDNA 推导的氨基酸序列具有相似的保守区域和活性结合区域。保守结构域分析发现，Ma-ADH2 cDNA 推导的氨基酸序列有两个保守结构域：分别是 ADH\_N superfamily 和 NADB\_ROssmann superfamily，是一个依赖于锌离子的蛋白，属于脱氢酶家族。

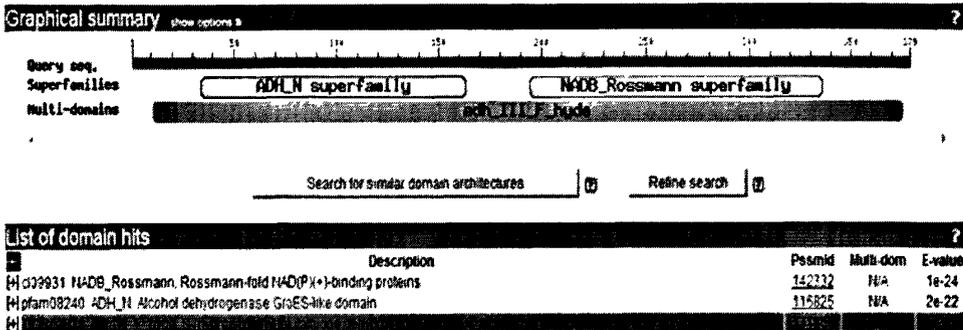


图 5 采用 CONSERVED DOMAIN 对 MaADH2 cDNA 序列分析结果

Fig.5 Analysis of MaADH2 cDNA by using CONSERVED DOMAIN

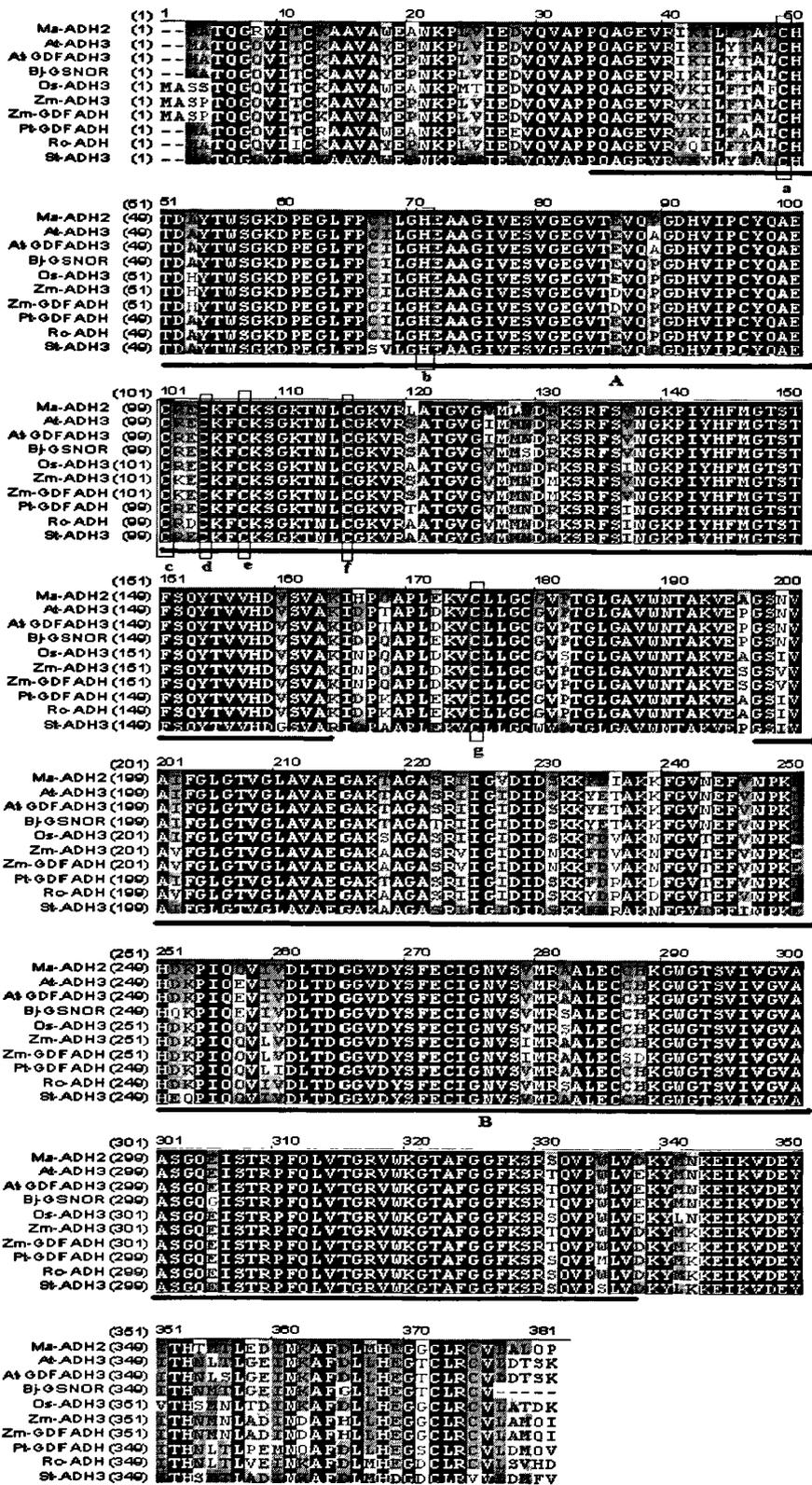


图 6: MaADH2 编码氨基酸序列的多序列比较

A. ADH\_N superfamily; B. NADH\_ROssmann superfamily; a b c d e f g.与 Zn<sup>2+</sup>结

合位点:

**Ma-ADH2.**香蕉; **At-ADH3.**拟南芥 (BAB09054); **At-GDFADH3.**拟南芥 (CAA57973); **Bj-GSNOR.**芥菜 (ACR40091); **Os-ADH3.**水稻 (AAB19117); **Zm-ADH3.**玉米 (ACG32791); **Zm-GDFADH.**玉米; **Pt-GDFADH.**毛果杨 (XP\_002301836); **Rc-ADH.**蓖麻 (EEF28759); **St-ADH3.**马铃薯 (ABB72806)

**Fig.6 Multiple sequence alignment of Ma-ADH2 Putative amino acid sequence**

**A and B: The active of ADHs; a b c d e f g: The consensus motif for the binding of zinc**

**Ma-ADH2.***Musa acuminata*; **At-ADH3.** *Arabidopsis thaliana* (BAB09054); **At-GDFADH3.** *Arabidopsis thaliana* (CAA57973); **Bj-GSNOR.** *Brassica juncea* (ACR40091); **Os-ADH3.** *Oryza sativa* (AAB19117); **Zm-ADH3.** *Zea mays* (ACG32791); **Zm-GDFADH.** *Zea mays*; **Pt-GDFADH.** *Populus trichocarpa* (XP\_002301836); **Rc-ADH.** *Ricinus communis* (EEF28759); **St-ADH3.** *Solanum tuberosum* (ABB72806)

### 5.2.3 进化树分析

根据植物中 ADH 已发表序列, 用 NJ 法构建系统发生树, 以确定 MaADH2 系统进化中的位置。结果 (图 7) 表明, MaADH2 与 AtADH3 (*Arabidopsis thaliana*) 亲缘关系很近, 并与其它植物的 ADH 基因 At-GDFADH3 (*Arabidopsis thaliana*)、Bj-GSNOR (*Brassica juncea*) 共同组成一个单元的进化枝。

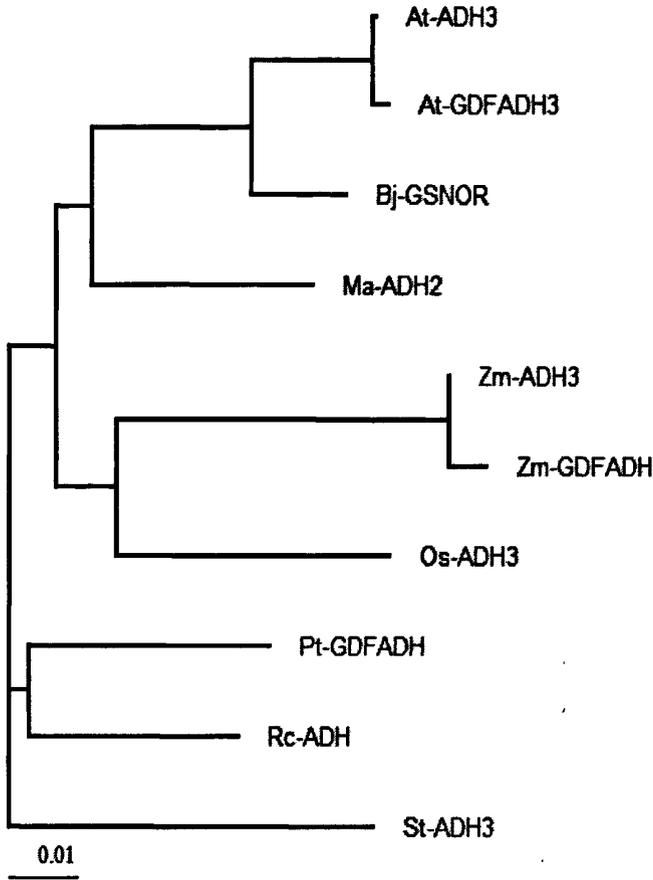


图 7.香蕉 Ma-ADH2 与其他植物同源的 ADH 氨基酸序列通过 Clustal W 软件构件系统树

Ma-ADH2.香蕉; At-ADH3.拟南芥 (BAB09054); At-GDFADH3.拟南芥 (CAA57973); Bj-GSNOR.芥菜 (ACR40091); Os-ADH3.水稻 (AAB19117); Zm-ADH3.玉米 (ACG32791); Zm-GDFADH.玉米; Pt-GDFADH.毛果杨 (XP\_002301836); Rc-ADH.蓖麻 (EEF28759); St-ADH3.马铃薯 (ABB72806)

Fig 7 Phylogenetic tree generated by Clustal W analysis based on ADH amino acid sequence from banana and other plants.

Ma-ADH2. *Musa acuminata*; At-ADH3. *Arabidopsis thaliana* (BAB09054); At-GDFADH3. *Arabidopsis thaliana* (CAA57973); Bj-GSNOR. *Brassica juncea* (ACR40091); Os-ADH3. *Oryza sativa* (AAB19117); Zm-ADH3. *Zea mays* (ACG32791); Zm-GDFADH. *Zea mays*; Pt-GDFADH. *Populus trichocarpa* (XP\_002301836); Rc-ADH. *Ricinus communis* (EEF28759); St-ADH3. *Solanum tuberosum* (ABB72806)

### 5.3 MaADH2 基因在香蕉不同器官的差异表达

从图 8 可知, MaADH2 基因在香蕉根、茎、叶、花、果实中均有表达。其中, 茎、叶、花、果的表达量较低并且差异不明显, 根中的表达量较高, 推测 MaADH2 可能在许多不同的生理过程中都起着一定的作用。

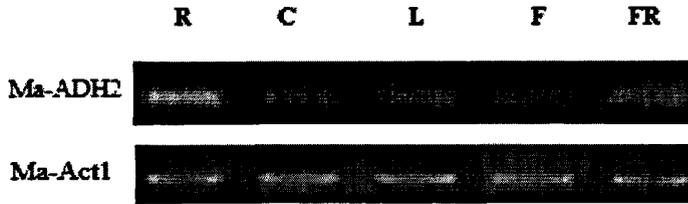


图8 香蕉MaADH2基因组织特异性表达

R、C、L、F、FR分别代表香蕉根、茎、叶、花、果实

Fig.8 Expression of MaADH2 in different organs

R. Root; C. Corm; L. Leaf; F. Flower; FR. Fruit

#### 5.4 乙烯、1-MCP 处理条件下 MaADH2 基因在香蕉采后不同成熟度的表达量变化

根据表 2 和图 9 可知, 在正常成熟时, MaADH2 的相对表达量在成熟度III时达到高峰, 相对值从 0.80 变化到 1.9, 然后下降。在乙烯诱导成熟时, MaADH2 的相对表达量在成熟度VI时达到最大值, 相对值从 0.65 增加到 3.85, 然后降低。在 1-MCP 抑制成熟时, MaADH2 的相对表达量在成熟度VI时达到高峰, 相对值从 0.2 上升到 1.5。但是当我们对这些数据进行方差分析, 结果显示: 乙烯处理, 正常成熟, 以及 1-MCP 处理, MaADH2 基因的相对表达量变化差异并不显著。

表 2 各种处理的成熟度所对应的天数

Table2 The days of ripening degree

成熟度	正常成熟	乙烯处理	1-MCP 处理
I	0	0	0
II	5	1	5
III	8	2	9
IV	10	3	12
V	12	4	15
VI	15	5	20
VII	20	6	23

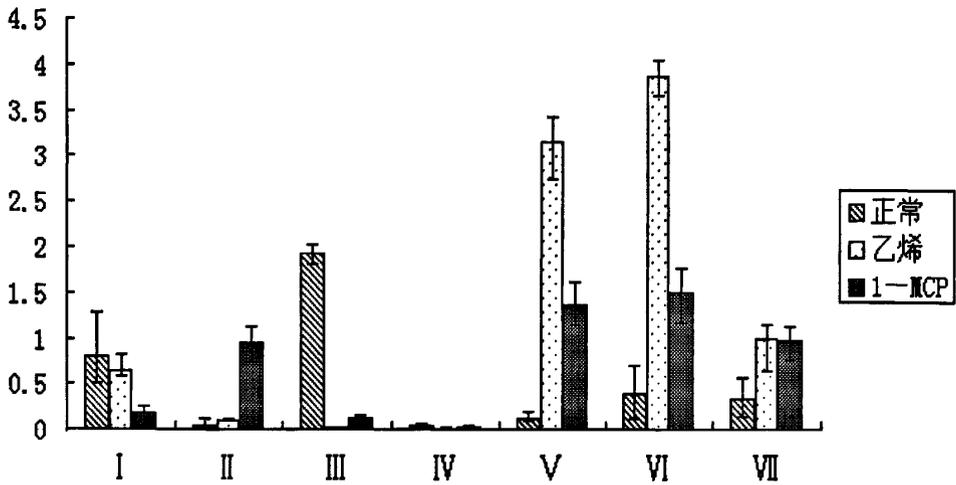


图 9. MaADH2 基因荧光定量结果

Fig.9 Real-time QPCR result of MaADH2

### 5.5 香蕉采后果实乙烯释放速率的变化规律

从图 10 可以看出:香蕉果实正常成熟条件下,采后早期(0-8d)乙烯的释放量是很低,变化范围为 0.1-0.2,而到了采后 10d,乙烯的生物合成即开始明显的增加到 2.6,即乙烯大量合成启动。在采后 14d 达到峰值 26.2,约是 10d 的 10 倍,从 14d 到 18d 一直呈直线下降,在采后 18d 下降到 2.6。外源乙烯诱导成熟时,乙烯释放量在采后 1d 为 2.4,在采后 2d 为 19.3,在采后 3d 达到最大值 29.1,这表明内源乙烯的生物合成在第 1-2d 即开始启动,于采后 3d 即达到最大值。但乙烯的释放规律在两种处理条件下是相同的,先上升后下降。1-MCP 抑制成熟时乙烯释放量明显减少,维持在 0.1-0.4,呈缓慢上升的趋势增加。

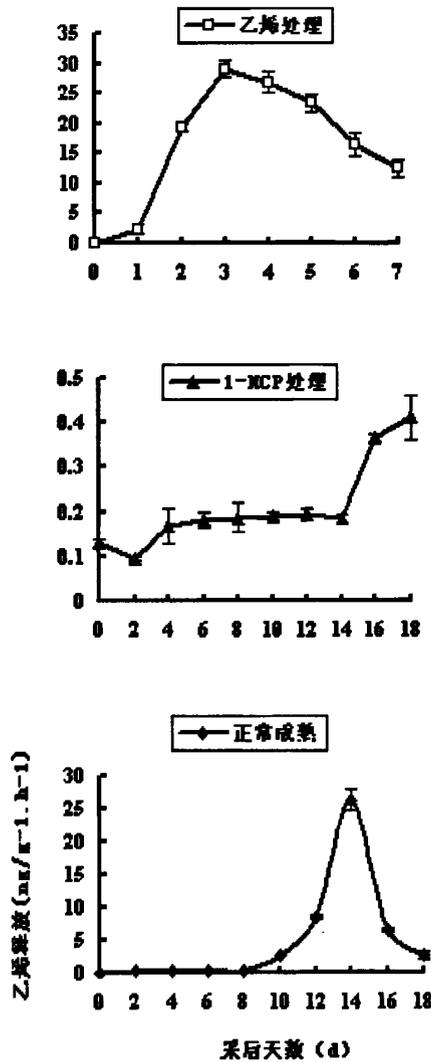


图 10 香蕉采后乙烯释放速率变化

Fig 10 Ethylene production during postharvest banana ripening

## 5.6 ABA 处理，MaADH2 基因在香蕉果实采后的表达量变化

从图 11 可以看出，ABA 处理的香蕉果实，MaADH2 基因的表达量在成熟度 I 到成熟度 IV 都维持在很低的水平，且变化不大，从成熟度 V 开始上升，到成熟度 VII 的时候达到高峰。正常成熟的香蕉果实在成熟度 II 的时候，MaADH2 的相对表达量达到高峰，然后下降。但是从成熟度 V 到成熟度 VII，ABA 处理的香蕉果实，MaADH2 基因的表达量高于正常成熟时的表达量。

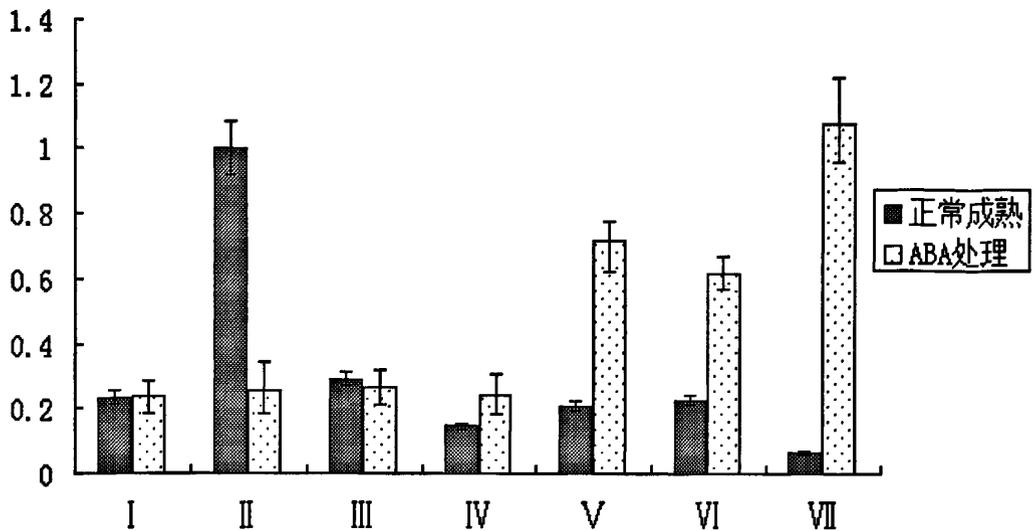


图 11 MaADH2 基因荧光定量结果

Fig 11 Real-time QPCR result of MaADH2

### 5.7 香蕉幼苗在伤害胁迫下，MaADH2 基因在香蕉幼苗叶片中的表达特征

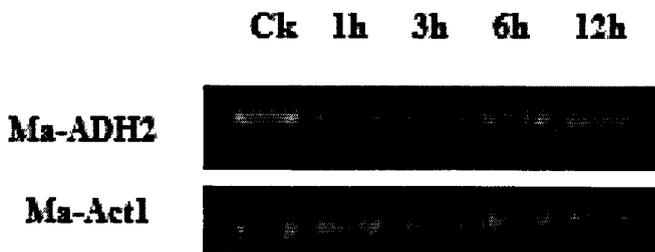


图 12 MaADH2 基因半定量 RT-PCR 结果

Fig 12 RT-PCR result of MaADH2

在伤害胁迫下，相对于正常生长的香蕉幼苗，MaADH2 基因在叶片中的表达量在伤害胁迫 1 小时其相对表达量下降趋势，但是随着伤害胁迫时间的延长，其表达量会升高。也就是说伤害胁迫在短期内可以抑制 MaADH2 基因的表达。

### 5.8 香蕉幼苗在盐胁迫下，MaADH2 基因在叶片中的表达特征

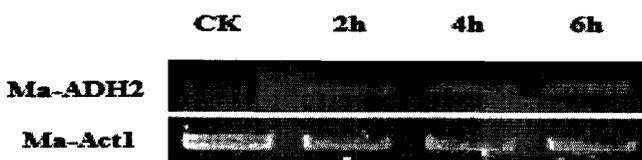


图 13 MaADH2 基因半定量 RT-PCR 结果

Fig 13 RT-PCR result of MaADH2

从图 13 可以看出，在正常情况下，香蕉叶片中 MaADH2 基因的相对表达量很低，但是当盐胁迫后，MaADH2 基因的表达量程上升趋势。

### 5.9 香蕉幼苗在低温胁迫下，MaADH2 基因在叶片中的表达特征



图 14 MaADH2 基因半定量 RT-PCR 结果  
Fig 14 RT-PCR result of MaADH2

从图 14 可以看出，低温能够被诱导 MaADH2 基因的表达。在外界温度为 5 摄氏度时候，其表达量很低；在 7 摄氏度的时候，其表达量会上升；当外界温度为 15 摄氏度时候其表达量达到高峰。

### 5.10 香蕉幼苗在干旱胁迫下，MaADH2 基因在根中的表达特征

从图 15 可以看出，正常生长香蕉幼苗，MaADH2 基因在根中的相对表达量为 1，轻度干旱胁迫下，MaADH2 基因在根中的相对表达量上升到 5.78。但是随着干旱程度的增加，MaADH2 基因的相对表达量程下降趋势，在中度干旱时其相对表达量下降到 0.95，而在重度干旱时，其相对表达量为 0.18。

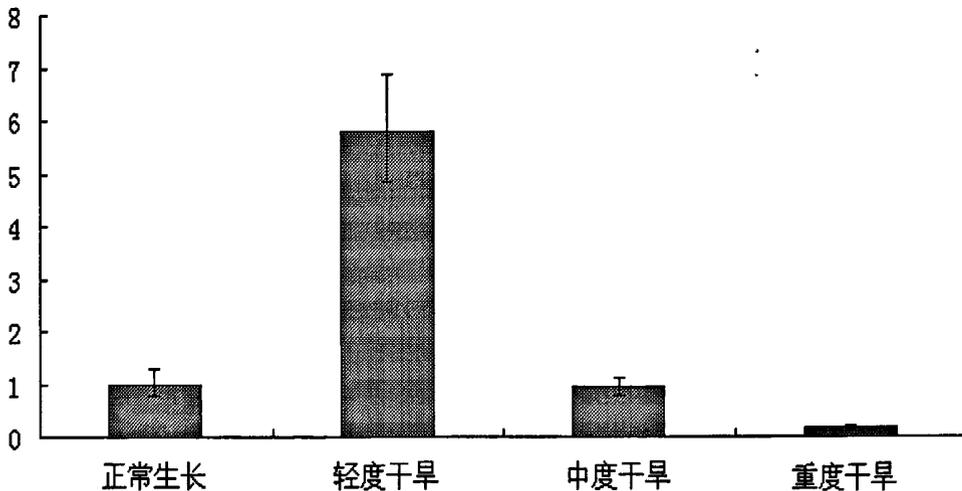


图 15 MaADH2 基因在干旱胁迫下的荧光定量结果  
Fig 15 Real-time QPCR result of MaADH2

### 5.11 香蕉幼苗在涝害胁迫下，MaADH2 基因在根和叶中的表达以及 MaADH2 和 MaPDC 酶活性的变化

#### 5.11.1 Ma-ADH2 基因在涝害胁迫下叶片中的表达变化

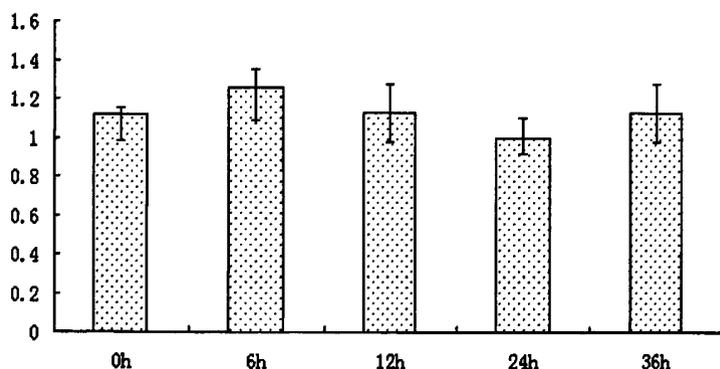


图 16 香蕉 Ma-ADH2 基因在涝害胁迫下香蕉幼苗叶中的表达

Fig.16 Expression of Ma-ADH2 banana leaves under waterlogging stress

由图 16 可知,与正常生长的相比,在涝害胁迫下的香蕉幼苗叶片中, Ma-ADH2 基因在叶片中的相对表达量维持在一个很低的水平。在涝害胁迫 0h 时,其相对表达量为 1.12, 6h 时为 1.35,12h 时为 1.13,24h 时为 1, 36h 时为 1.12。当我们对其进行方差分析发现,它们之间的差异并不显著。

### 5.11.2 Ma-ADH2 基因在涝害胁迫下香蕉幼苗根中的表达变化

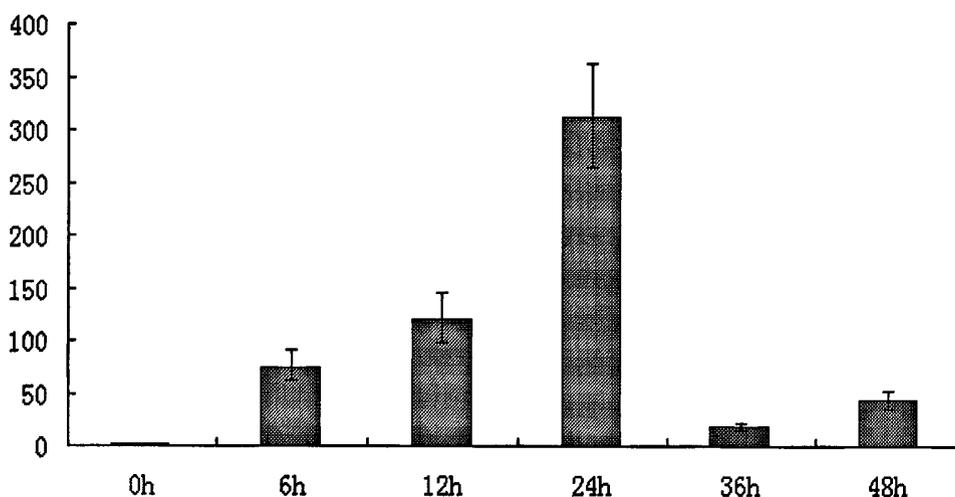


图 17. Ma-ADH2 基因在涝害胁迫下香蕉幼苗根中的表达

Fig 17 Expression of Ma-ADH2 in banana roots under waterlogging stress

由图 17 可知,在涝害胁迫下 0h 时, MaADH2 基因在香蕉幼苗根中的的相对表达量很低,在涝害胁迫 6h 时其相对表达量开始上升,相对值由 1.0 变化到 75.12,在 12h 时,其相对表达量由 6h 的 75.12 变化为时逐渐上升到 119.81,在涝害胁迫 24h 时,其相对表达量达到高峰,其相对表达量增加到 312.29,然后下降。

### 5.11.3 涝害胁迫下香蕉幼苗根中 Ma-ADH2 和 Ma-PDC 活性变化

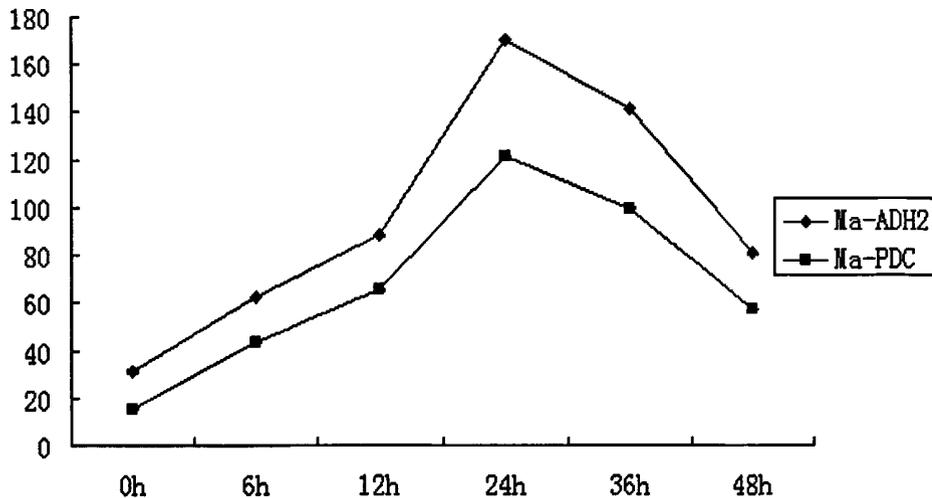


图 18.涝害胁迫下 MaADH2 和 MaPDC 活性分析

Fig 18. MaADH2 and MaPDC enzymes activity assaying under waterlogging stress

由图 18 可知, 无论是 ADH 还是 PDC 在根中都表现出相当高的活性, 且对涝害胁迫信号敏感。ADH 在涝害胁迫 24 小时的时候达到最大值, 由 0 小时的 31.51U/mg Protein 上升到 170.01U/mg Protein, 上升了接近 5.5 倍; PDC 在涝害胁迫 24 小时时候达到最大值, 由 0 小时的 15.55U/mg Protein 上升到 120.96U/mg Protein, 上升了接近 8 倍。尽管 PDC 上升的幅度比较大, 但是, 就整体来讲, 各个时间点对应的 PDC 活性都比 ADH 活性低。

## 6. 讨论

### 6.1 MaADH2 基因的克隆与序列分析

本研究克隆了香蕉 ADH2 cDNA 全长, 该 cDNA 编码 379 个氨基酸残基。对 Ma-ADH2 进行序列分析发现, 该 cDNA 推导的氨基酸序列含有 ADH\_N superfamily 和 NADB\_ROssmann superfamily 两个保守结构位点, 与玉米, 拟南芥等一致; 通过对其所编码的氨基酸序列分析, 发现它属于高度保守的带锌脂的中链乙醇脱氢酶。这类蛋白的部分氨基酸残基具有位点保守性: Cys-50, His-72, Cys-178, cys-100, 103, 106, 114 结合了两个 Zn 原子, Cys-101, 104, 107, 115 形成两个二硫键, 无论是在动物还是植物中这些氨基酸残基都十分保守, 而 230 位的 Asp 则可能和 NAD 的脱氢相关 (Eklund et al. 1976; Yokoyama. 1993; Fan et al. 1991)。而这些位点, 我们可以在 Ma-ADH2 推导的氨基酸序列中找到 (图 6)。这些结果表明, 我们所克隆的是一个香蕉二类的乙醇脱氢酶基因的 cDNA 全长。

### 6.2 MaADH2 基因在香蕉采后不同器官的差异表达分析

当植物受到逆境胁迫时, 细胞内  $Ca^{2+}$  水平发生变化, ADH 的转录物含量会发生改

变。而 ADH 转录物含量的变化,对植物的逆境生存起着重要作用(Chervin et al. 1999; Daniel. 2006)。所以,植物 ADH 基因通常在许多不同的组织中都有表达,在不同的刺激和面对不同的生理过程时表现出表达差异(吴庆功. 2006)。Ma-ADH2 基因的组织特异性表达分析表明,该基因在香蕉的根、茎、叶、花、果实中均有表达。其中,茎、叶、花、果的表达量较低并且差异不明显,根中的表达量较高。所以,香蕉 ADH2 基因可能在不同的生理过程中起着一定的作用,而且可能和根部的生理作用相关。

### 6.3 乙烯、1-MCP 处理条件下 MaADH2 基因在香蕉采后不同成熟度差异表达与内源乙烯释放的关系

从表 2,图 9,图 10 可知在乙烯诱导香蕉果实成熟时,乙烯的释放量在成熟度 I 的时候开始上升,在成熟度 III 的时候乙烯的释放量达到最大值,然后下降;而 MaADH2 基因的相对表达量在成熟度 V 的时候开始上升,并在成熟度 VI 的时候达到最大值。在香蕉果实的正常成熟过程中,乙烯释放量在成熟度 III 的时候开始上升,在成熟度 VI 的时候达到高峰;MaADH2 基因的相对表达量在成熟度 I 的时候开始上升,在成熟度 II 的时候达到高峰。1-MCP 抑制香蕉果实成熟时,乙烯的释放量从成熟度 I 到成熟度 VII 都维持在一个相对低的水平,而 MaADH2 基因的相对表达量则在成熟度 I 的时候开始上升,在成熟度 VI 的时候达到高峰。当我们对这三种处理下的 MaADH2 基因的相对表达量进行方差分析时发现, MaADH2 基因的相对表达量之间差异并不显著。

出现这种结果,可能的原因有以下几个方面:其一、该基因启动子的核心区域没有乙烯受体的顺式作用元件,从而使该基因在果实成熟中不起作用。其二、该基因在水稻、玉米等植物中是多基因编码,在香蕉和番茄种也可能是多基因家族编码的,家族中不同成员的 ADH 基因的结构、功能和作用方式不同。

### 6.4 ABA 处理条件下 MaADH2 基因在香蕉采后不同成熟度时的差异表达

从图 11 可知,ABA 处理的香蕉果实, MaADH2 基因的表达量在成熟度 I 到成熟度 IV 都维持在很低的水平,且变化不大,从成熟度 V 开始上升,到成熟度 VII 的时候达到高峰。正常成熟的香蕉果实在成熟度 II 的时候, MaADH2 的相对表达量达到高峰,然后下降。但是从成熟度 V 到成熟度 VII, ABA 处理的香蕉果实, MaADH2 基因的表达量高于正常成熟时的表达量。当我们对这两组数据进行方差分析时发现, ABA 处理以及正常成熟的香蕉果实, MaADH2 基因的相对表达量之间差异并不显著。出现这种情况的原因可能有以下几点:一、在香蕉果实中, ABA 并没有诱导 MaADH2 基因的相对表达量上升;二、可能是加样误差造成;三、MaADH2 和香蕉果实的成熟无关。

## 6.5 MaADH2 基因在伤害胁迫，盐胁迫，低温胁迫的香蕉幼苗叶表达

从我们的结果可知，伤害胁迫负调控于 MaADH2 基因的表达，但是当随着伤害胁迫时间的延长，MaADH2 基因的相对表达量上升趋势，但是，其相对表达量低于正常叶片中的相对表达量。这可能是伤害暂时影响了香蕉幼苗的正常生理代谢，当随着时间的延长，香蕉幼苗又逐渐适应了环境，然后 MaADH2 基因的相对表达量也逐渐趋近正常生长时的相对表达量。

盐胁迫正调控于 MaADH2 基因的表达，随着盐胁迫时间的延长，MaADH 基因的相对表达量上升趋势。这可能是在盐胁迫降低了土壤溶液的渗透势，使香蕉根尖的吸水能力受到土壤中盐离子浓度的影响，从而造成香蕉幼苗供水不足，同时叶片的蒸腾速率也会受到影响，但植物叶片过度失水时，会造成气孔关闭，光合作用速率收到影响，离子间对载体的竞争，会造成细胞内环境的变化，许多生化反应受到影响，这会造成植物体内的能量供应不足，而细胞为了正常生长，不得不采取另一种获取能量的方式（潘瑞炽. 2005；杨国会. 2009）。

低温胁迫诱导 MaADH2 基因的表达，当外界温度降低到 7 和 15 度时，MaADH2 基因的相对表达量明显升高，但当外界温度继续下降到 5 度时，MaADH2 基因的相对表达量接近正常生长时的表达量。这可能是由于气温降低，会使水在细胞中的存在方式受到影响，从而影响香蕉幼苗叶片细胞中的水份代谢，继而影响到能量代谢；但是当温度降到 5 度时，香蕉幼苗叶片中膜结构会发生变化，从而使代谢活动中的酶活性受到影响，呼吸速率明显减弱，同时也会导致能量代谢减弱（徐燕. 2007；贾凤勤. 2009）。

## 6.6 MaADH2 基因在干旱胁迫下香蕉幼苗根中的表达

从我们的结果可以看出，轻度干旱可以诱导 MaADH2 基因的表达，但是当随着干旱程度的增加，MaADH2 基因的相对表达量下降的趋势。这可能是由于香蕉幼苗受到轻度干旱胁迫时，植物细胞中的水势高于土壤中的水势，从而造成根尖细胞的吸水能力下降，从而使细胞液的粘稠度增加，使细胞内生化反应速率降低，从而导致能量代谢受到抑制，而这时，根尖细胞为了能够完成正常的生命活动，可能会采取其他获取能量的方式，例如，无氧呼吸。但是当随着干旱程度的增加，细胞会失水，从而造成植物细胞液的粘稠度升高，细胞内的代谢活动减弱，在此时，植物可能会采取一序列的自我保护措施，例如，减少叶片的蒸腾速率，降低体内的物质代谢和能量代谢活动（牛翠娟. 2007；刘培等. 2010）。

## 6.7 MaADH2 基因在涝害胁迫下香蕉幼苗根和叶中的表达

涝害是引起植物根系缺氧的主要因素之一，在涝害胁迫下，植物根系主要是通过无氧呼吸获取能量。乙醇脱氢酶和丙酮酸脱羧酶作为无氧呼吸过程中的关键酶。在许多植物中，和无氧呼吸相关的乙醇脱氢酶基因都已被克隆，但在香蕉中，还未见报道。我们

的结果表明,在涝害胁迫下的香蕉幼苗的叶中,香蕉 ADH2 基因的相对表达量则变化很小。在根中,香蕉 ADH2 基因的相对表达量在涝害胁迫 24 小时达到高峰,而 Ma-ADH2 和 Ma-PDC 的酶活性则在涝害胁迫 6 小时时候急剧上升,且在 24 小时达到高峰;但在相对应的时间点, Ma-ADH2 活性明显高于 Ma-PDC 活性。在缺氧状态下,玉米根尖的 ADH 基因 mRNA 的表达量在短期内迅速升高,在 6 小时时候达到最高,其后下降(Malcolm et al. 1994)。在水稻中,赵森等通过荧光定量 PCR 的方法研究了水稻中 ADH 基因在涝害胁迫下的表达,发现 ADH 基因在涝害胁迫 4 小时前表达量都很低,但是在 4 小时时候,其表达量上升并在涝害胁迫 8 小时时候达到高峰,然后下降(Zhao et al. 2008)。在薏苡根中,ADH 基因的 mRNA 表达量在涝害 4 小时时候达到高峰,然后逐步下降,而 ADH 酶活性的变化则在涝害胁迫 6 小时时候达到高峰;PDC 酶活性在第 10 个小时达到高峰;在叶中,ADH mRNA 的相对表达量随着淹水时间的改变,基本没什么变化(吴庆功. 2006)。这和我们所得出的结论较为一致,无氧或低氧可能诱导了 ADH2 基因 mRNA 含量的上升,从而导致无氧呼吸中的关键酶 ADH 和 PDC 活性的变化。而对于 ADH/PDC 活性的高比例主要原因可能是:为了防止乙醛的生成,从而减轻乙醛对植物细胞的伤害。但是在薏苡中,ADH 的相对表达量是在涝害胁迫 4 小时时候达到高峰,ADH 的酶活性在 6 小时时候达到高峰;PDC 酶活性在 10 小时达到高峰(吴庆功. 2006),而我们的结果显示 ADH 的相对表达量在 24 小时时候达到高峰,而 ADH 和 PDC 的酶活性也是在 24 小时达到高峰,这说明香蕉比薏苡耐涝。

## 7. 结论

### 1 首次从香蕉中克隆了 MaADH2 基因

在香蕉果实 cDNA 文库中通过 PCR 的方法筛选了一条命名为 MaADH2 的 1140bp 的 cDNA 片段,该 cDNA 推导的氨基酸序列含有 ADH\_N superfamily 和 NADB\_ROssmann superfamily 两个保守结构位点;通过对其所编码的氨基酸序列分析,发现它属于高度保守的带锌指结构的中链乙醇脱氢酶,和其他植物的 ADH 基因有较高的同源性和特定氨基酸的位点保守性。

### 2 首次从 mRNA 水平证明了 MaADH2 基因的表达属于组成型表达,且在根中相对表达量较高

RT-PCR 分析表明, MaADH2 基因在香蕉的不同器官中均有表达,但是在根中相对表达量较高。

### 3 首次证明 MaADH2 基因和香蕉果实采后成熟无关

我们通过测定不同激素处理条件下(乙烯催熟, 1-MCP 抑制成熟)不同成熟度下乙烯的释放量和 MaADH2 基因的相对表达量,并对 MaADH2 基因的相对表达量进行方差分析发现,乙烯在诱导果实成熟时并没有诱导 MaADH 基因的表达量上升,而 1-MCP 在抑制成熟时,并没有随着内源乙烯被抑制而相对表达量下降。

### 4 首次证明了外源 ABA 抑制了 MaADH2 基因在香蕉果实中的表达

实时荧光定量 PCR 分析表明, MaADH2 基因的相对表达量在正常成熟的香蕉果实中在成熟度 II 的时候达到高峰,而 ABA 处理的香蕉果实成熟度 VII 的时候达到高峰,其相对表达量峰值和正常成熟时的相对表达量峰值差异不显著。也就是说 ABA 推迟了

MaADH2 的相对表达量达到峰值的时间。

5 证明了伤害胁迫负调控香蕉幼苗叶片中 MaADH2 基因的表达

6 盐胁迫诱导了香蕉幼苗叶片中 MaADH2 基因的表达,

7 低温胁迫和香蕉幼苗叶片中 MaADH2 基因的表达相关

8 干旱胁迫诱导了香蕉幼苗根中 MaADH2 基因的表达

9 首次证明了涝害胁迫能诱导 MaADH2 基因在香蕉幼苗根中的表达, 并诱导了 MaADH2 和 MaPDC 的活性上升; 在叶片中, MaADH2 基因的表达量和涝害无关。

## 参考文献

1. 黄丛林, 贾文锁, 张大鹏. 调控葡萄果实成熟的 ABA 信号传递. 见:张大鹏主编. 全国首届果树生理与分子生物学学术论文摘要集. 北京:中国农业大学出版社. 1997
2. 黄培堂译. 分子克隆实验指南. 科学出版社, 2002, 第三版, P26-27, P96-99
3. 冯斗, 张春发, 张颖. 香蕉乙烯受体基因 cDNA 的克隆及其表达分析. 热带作物学报, 2004, 25(1): 6-10
4. 胡伟, 杨晓颖, 李美英, 王卓, 徐碧玉, 金志强. 香蕉谷氨酸脱羧酶基因克隆与表达, 西北植物学报, 2009, 29 (3): 0429-0434
5. 张明晶, 姜微波, 徐杏连. 1-MCP 对香蕉果实采后品质的影响. 食品科学, 2002, 23(2): 126-128
6. 胡位荣, 朱西儒, 王正询. 香蕉果实采后及贮藏的效应及其生理研究进展. 广州大学学报, 2003 (3) : 228-234
7. 蒋跃明, 陈芳, 张东林 等. ABA 对香蕉果实的呼吸作用及其与乙烯的关系. 热带作物学报. 1994, 15(2): 35-38
8. 李燕强, 金志强, 徐碧玉. 香蕉果实 RNA 提取方法的改进和比较. 福建热作科技, 2005, 30 (2): 37-39
9. 华南农业大学主编. 果树栽培学各论(南方本) 第二版. 农业出版社, 1993, P104
10. 杨小亮. 香蕉果实成熟相关基因的克隆及表达分析及橡胶乙烯受体基因的克隆. 华南热带农业大硕士学位论文, 2003: 35-38
11. 李育阳主编. 基因表达技术, 第一版. 科学出版社, 2002, P8-10
12. 刘愚. 植物生理与分子生物学第二版. 科学出版社, 1999, P610-620
13. 徐碧玉, 苏伟, 张建斌, 刘菊华, 金志强. 香蕉果实 SMART cDNA 文库的构建及利用 PCR 方法筛选香蕉 *Actin2* 基因. 热带亚热带植物学报, 2005, 13 (5): 375-380
14. 李雯. 蔗糖磷酸合成酶与香蕉果实成熟衰老糖代谢及基因表达的研究. 华南农业大学博士学位论文. 2006, 11~12,42~43
15. 莫磊兴. 香蕉的采后生理与保鲜技术. 广西农业科学, 1998, 5: 266~269
16. 杨晓颖. 香蕉 MADS-box 基因的克隆、表达及与乙烯生物合成和信号转导的关系研究. 海南大学硕士学位论文, 2008, 61
17. 宁文彬. 香蕉果实采后乙烯生物合成与乙醇脱氢酶的关系研究. 海南大学硕士学位论文, 2009, 30

18. 赵宏亮, 冯仁军, 苏伟, 徐碧玉, 金志强. 香蕉中Maasr1基因的生物信息学分析. 生物技术通讯, 2006, 17(3): 336~340
19. 徐燕, 薛立, 屈明. 植物抗害性的生理生态学机制研究进展. 林业科学, 2007, 43(4): 88~94
20. 潘瑞炽主编. 植物生理学(第五版). 北京: 高等教育出版社, 2005, 282~305
21. 史建伟, 张育平, 王国昌. 环境胁迫对植物体内非结构性碳水化合物的影响. 安徽农业科学, 2007, 35(9): 2545~2546
22. 牛翠娟, 娄安如, 孙儒泳. 基础生态学(第二版). 北京: 高等教育出版社, 2007, 21~63
23. 周生荟, 刘玉冰, 谭会娟, 王进. 荒漠植物红砂在持续干旱胁迫下的光保护机制研究. 中国沙漠, 2010, 30(1): 69~72
24. 贾凤勤. 植物对环境胁迫的适应策略. 生物学教学, 2009, 34(11): 8~10
25. 刘培, 蔡焕杰, 王健. 土壤水分胁迫下冬小麦籽粒灌浆特性的研究. 节水灌溉, 2010, 1: 1~4
26. 王宇超, 王得祥, 彭少兵, 何帆. 干旱胁迫对木本滨藜生理特性的影响. 林业科学, 2010, 46(1): 61~67
27. 何玮, 张健, 蒋安, 郭彦军. 低温胁迫对玉草1号和甜高粱相关生理指标的影响. 牧草科学, 2009, 12: 22~23
28. 杨华庚, 林位夫. 低温胁迫对油棕幼苗光合作用及叶绿素荧光特性的影响. 中国农学通报. 2009, 25(24): 506~509
29. 张志刚, 尚庆茂. 低温、弱光及盐胁迫下辣椒叶片的光合特性. 中国农业科学, 2010, 43(1): 123~131
30. 杨剑超, 袁芳, 王新慧, 史瑶瑶, 隋娜, 王宝山. 不同浓度 NaCl 胁迫下盐芥与拟南芥有机渗透调节物质与抗氧化酶系统的比较. 山东农业科学, 2009, 12: 48~51
31. 吴雪霞, 查丁石. NaCl 胁迫对茄子幼苗叶片叶绿素荧光参数和能量分配的影响. 华北农学报, 2009, 24(6): 83~87
32. 杨国会, 石德成. NaCl 胁迫对甘草叶片相对含水量及保护酶活性的影响. 河南农业科学, 2009, 12: 104~106
33. 胡晓辉, 郭世荣, 李璟. 低氧胁迫对黄瓜幼苗根系无氧呼吸酶和抗氧化酶活性的影响. 武汉植物学研究, 2005, 23(4): 337~341

34. 马月花, 郭世荣. 低氧胁迫对黄瓜幼苗根系呼吸代谢的影响. 中国蔬菜, 2005, (2): 18~20
35. 吴庆功, 陈大清, 李亚男. 淹水胁迫下薏苡乙醇脱氢酶(ADH)和丙酮酸脱羧酶(PDC)基因 cDNA 片段的克隆及其表达的初步分析. 华中农业大学硕士学位论文, 2006: 48~49
36. Agravante, G Bauw, E Prinsen, et al. Molecular and physiological responses to abscisic acid and salts in roots of salt-sensitive and tolerant indica varieties. *Plant Physiol.* 1996,107:177-186
37. Argueso C T, Hansen M, Kieber J J. Regulation of Ethylene Biosynthesis. *J Plant Growth Regul.* 2007,26:92-105
38. B er enice Ricard , Bernard Mocquot , Alain Fournier , Michel Delseny , Alain Pradet. Expression of alcohol dehydrogenase in rice embryos under anoxia, *Plant Molecular Biology.* 1986, 7: 321-329
39. Barry C S, Giovannoni J J. Ethylene and Fruit Ripening. *J Plant Growth Regul.* 2007,26:143-159
40. Bajic VB. Comparing the success of different prediction software in sequence analysis. *Brief Bioinformatics.* 2000,1(3):214-228
41. Binder B M, Mortimer L A, Stepanova A N, Ecker J R, Bleecker A B. Short-term growth responses to ethylene in *Arabidopsis* seedlings are EIN3/EIL1 independent. *Plant Physiol.* 2004,136:2921-2927
42. Biale. Effect of abscisic acid on sorbitol uptake in growing apple fruit . *Exp Bot.* 1964,34:737-743
43. Bleecker A B. Ethylene perception and signaling: an evolutionary perspective. *Trends Plant Sci.* 1999,4:269-274
44. Bleecker A B, Estelle M A, Somerville C, Kende H. Insensitivity to ethylene conferred by a dominant mutation in *Arabidopsis thaliana*. *Science.* 1988,241:1086-1089
45. Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genes directing flower development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell.* 1989,1:37-52
46. Bowman J L, Smyth D R, Meyerowitz E M. Genetic interactions among floral homeotic genes of *Arabidopsis*. *Development.* 1991,112:1-10

47. Burg S P, Burg E A. Relationship between ethylene production and ripening in bananas. *Bot Gaz*, 1965, 126: 200-204
48. Burg S P, Burg E A. Role of ethylene in fruit ripening. *Plant Physiol*, 1962, 37: 179-189
49. Bruxelles G L, Peacock W J, Dennis E S, et al. Abscisic acid induced the alcohol dehydrogenase in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111(2): 381-391
50. Chao Q, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker J R. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 1997, 89: 1133-1144
51. Chen Y F, Etheridge N, Schaller GE. Ethylene signal transduction. *Ann Bot (Lond)*, 2005, 95: 901-915
52. Chervin C, Truett JK. Alcohol dehydrogenase expression and alcohol production during rear ripening. *J Amer Soc Hort Sci*. 1999, 124: 71-75
53. Chase T Jr. Alcohol dehydrogenases: identification and names for gene families. *Plant Mol Biol Rep*. 1999, 17: 333-350
54. Chung HJ, Ferl RJ. *Arabidopsis* alcohol dehydrogenase expression in both shoots and roots is conditioned by root growth environment. *Plant Physiol*. 1999, 121: 429-436
55. Coen E S, Meyerowitz E M. The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature*, 1991, 353: 31-37
56. Colombo L, Franken J, Koetje E, van Went J, Dons H J, Angenent G C, van Tunen A J. The *Petunia* ADH gene FBP11 determines ovule identity. *Plant Cell*, 1995, 7: 1859-1868
57. Colombo L, Franken J, Van del Krol A R, Wittich P E, Dons HJM, Angenent G C. Downregulation of ovule-specific MADS box genes from *Petunia* results in maternally controlled defects in seed development. *Plant Cell*, 1997, 9: 703-715
58. DANIEL MANRIQUEZ, ISLAM ES, FRANCISCO B F. Two highly divergent alcohol dehydrogenases of melon exhibit fruit ripening-specific expression and distinct biochemical characteristics [J]. *Plant Mol Biol*. 2006, 61: 675-685
59. De Bruxelles GL, Peacock WJ, Dennis ES, Dolferus R. Abscisic acid induces the alcohol dehydrogenase gene in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 1996, 111: 381-391
60. David L Andrews, Malcolm C, Drew, James R, Johnson B, Greg Cobb. The Response of Maize Seedlings of Different Ages to Hypoxic and Anoxic Stress. *Plant Physiol*. 1994,

61. David L ,Andrews B,Creg Cobb,James R,Johnson,Malcolm C,Drew. Hypoxic and Anoxic Induction of Alcohol Dehydrogenase in Roots and Shoots of Seedlings of *Zea mays*. *Plant Physiol.*1993, 101: 407-414
62. David L Andrews,David M. Differential induction of mRNAs for the Glycolytic and Ethanolic Fermentative Pathways by Hypoxia and Anoxia in Maize Seedlings. *Plant Physiol.* 1994, 106:1575-1582
63. Ditta G,Pinyopich A,Robles P,Pelaz S,Yanofsky M F.The SEP4 gene of *Arabidopsis thaliana* functions in floral organ and meristem identity.*Curr Biol*,2004,14:1935-1940
64. Dolferus R, Jacobs M, Peacock WJ, et al.Differential interactions of promoter in stress responses of the *Arabidopsis*.*Plant Physiol*,1996,111:381-391
65. Do Y Y,Thay T S,Chang T W.Molecular cloning and characterization of a novel 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene involved in ripening of banana fruits.*J Agri Food Chem*,2005,53(21):8239-8247
66. Egea-Cortines, Saedler M H,Sommer H.Ternary complex formation between the Vv-ADH proteins SQUAMOSA,DEFICIENS and GLOBOSA is involved in the control of floral architecture in *Antirrhinum majus*.*EMBO J*,1999,18: 5370-5379
67. Eklund H,Zeppezauer E,Ohlsson I et al. Three-dimensional structure of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.4 Å resolution. *J Mol Biol.*1976, 102:27–59
68. Favaro R,Pinyopich A,Battaglia R,Kooiker M,Borghi L,Ditta G,Yanofsky M F, Kater M M,Colombo L.ADH protein complexes control carpel and ovule development in *Arabidopsis*.*Plant Cell*,2003,15:2603-2611
69. Fan F,Lorenzen JA.,Plapp BV. An aspartate residue in yeast alcohol dehydrogenase I determines the specificity for coenzyme. *Biochemistry.* 1991, 30:6397–6401
70. Ferrandiz C,Liljegren S J,Yanofsky M F.Negative regulation of the SHATTERPROOF genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development. *Science*, 2000, 289 (5478):436-438
71. Gu Q,Ferrandiz C,Yanofsky M F,Martienssen R.The FRUITFULL. ADH gene mediates cell differentiation during *Arabidopsis* fruit development. *Development*, 1998, 125 (8):1509-1517

72. Hill, Rose JKC, Yaver DS et al. Polygalacturonase gene expression in ripe melon fruit supports a role for polygalacturonase in ripening-associated pectin disassembly. *Plant Physiol.* 1995, 117:363-373
73. Hagit Amitai-Zeigerson, Pablo A. Scolnik, Dudy Bar-Zvi. Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid. *Plant Science.* 1995, 110:205-213
74. Huang F C, Do Y Y, Huang P L. Genomic organization of a diverse ACC synthase gene family in banana and expression characteristics of the gene member involved in ripening of banana fruits. *Agric Food Chem.* 2006, 54(11):3859-3868
75. Huang P L, Do Y Y, Huang F C, Thang F C, Thay T S, Chang T W. Characterization and expression analysis of a banana gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase. *Biochem Mol Bio Int.* 1997, 41:941-950
76. Inaba A, Liu X, Yokotani N, Yamane M, Lu WJ, Nakano R, Kubo Y. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *Journal of Experimental Botany.* 2007, 58(5):1047-1057
77. Ismond KP, Dolferus R, Pauw MD et al. Enhanced low oxygen survival in Arabidopsis through increased metabolic flux in the fermentative pathway. *Plant Physiol.* 1996, 132: 1292-1302
78. Ingersoll JC, Rothenberg M, Liedl BE, et al. A novel anther-expressed adh-homologous gene in *Lycopersicon esculentum*. *Plant Mol Biol.* 1994, 26:1875-1891
79. Jarillo J A, Leyva A, Salinas J, et al. Low temperature induces the accumulation of alcohol dehydrogenase mRNA in *Arabidopsis thaliana*, a chilling-tolerant plant[J]. *plant Physiol.* 1993, 101(3):833-837
80. JAMES J, GIOVANNONI. Genetic Regulation of Fruit Development and Ripening[J]. *The Plant Cell*, 2004, 16:170-180
81. Kaplan A K. *Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene*. Kluwer Academic Publishers, Printed in the Netherlands, 1997, 141-148
82. KANELIS A K, SOLAMOS T, ANGELAK K A. Suppression of cellulose and polygalacturonase and induction of alcohol dehydrogenase isoenzymes in avocado fruit me so carp subjected to low oxygen stress. *Plant Physiology*, 1991, 96:269-274

83. Kidd H. Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1993, 44:283-307
84. Kieber J J, Rothenberg M, Roman G, Feldmann K A, Ecker J R. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein kinases. *Cell*, 1993, 72:427-441
85. K Shinozaki, K Yamaguchi-Shinozaki. Gene expression and signal transduction in water-stress response. *Plant Physiol*. 1997, 115:327-334
86. Koch J L, Nevins D J. Tomato fruit cell wall I. Use of purified tomato polygalacturonase and pectinmethylesterase to identify developmental changes in pectins. *Plant Physiol*. 1989, 91:816-822
87. Kunst L, Klenz J E, Martinez-Zapater J, Haughn G W. AP2 gene determines the identity of perianth organs in flowers of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 1989, 1:1195-1208
88. Li H, Johnson P, Stepanova A, Alonso J M, Ecker J R. Convergence of signaling pathways in the control of differential cell growth in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2004, 7:193-204
89. Liu Xue-jun. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. *Plant physiology*, 1999, 121:1257-1265
90. Liu X, Shiomi S, Nakstsuka A, Kubo Y, Nakamura R, Inaba A. Characterization of ethylene biosynthesis associated with ripening in banana fruit. *Plant Physiol*, 1999, 121:1257-1265
91. Li SM, Wang ZX, Heide L. Purification and characterization of an alcohol dehydrogenase from *Lithospermum* cell cultures. *Plant Cell Reports*. 1996, 15:786-790
92. Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  Method. *Methods*, 2001, 25:402-408
93. Lopez-Dee Z P, Wittich P, Enrico Pe M, Rigola D, Del Buono I, Sari-Gorla M, Kater M M, Colombo L. OsMADS13, a novel rice MADS-box gene expressed during ovule development. *Dev Genet*, 1999, 25:237-244
94. Lopez-Gomez R, Campbell A, Dong J G, Yang S F, Gomez-Lim M A. Ethylene biosynthesis in banana fruit: isolation of a genomic clone to ACC oxidase and expression studies. *Plant Sci*, 1997, 123:123-131
95. Ma H, Yanofsky M F, Meyerowitz E M. AGL1-AGL6, an *Arabidopsis* gene family with similarity to floral homeotic and transcription factor genes. *Genes Dev*, 1991, 5(3):484-495

96. Mandel M A, Yanofsky M F. The Arabidopsis AGL9 MADS-box gene is expressed in young flower primordia. *Sex Plant Reprod*, 1998, 11:22-28
97. Matton DP, Constable P, Brisson N. Alcohol dehydrogenase gene expression in potato following elicitor and stress treatment. *Plant Mol Biol*. 1990, 14:775-783
98. Malcolm C, Drew B, Greg C. Metabolic Acclimation of root tips to oxygen deficiency. *Plant Physiol*. 1994, (91):837-841
99. Mendoza, Dubois. cofactors in combinatorial control of gene expression and cell development. *Genes*, 1994, 316:1-21
100. Mitchell H J, Hall J L, Barber M S, Elicitor-induced cinnamyl alcohol dehydrogenase activity in lignifying wheat leaves [J]. *plant physiol*, 1994, 104(2):551-556
101. Nam J, Kim J, Lee S, An G, Ma H, Nei M. Type I MADS-box genes have experienced faster birth-and death evolution than type II MADS-box genes in angiosperms. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004, 101(7):1910-1915
102. Nehring R, Ecker J R. In: Ethylene signal transduction in stem elongation. *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!* Edited by Davies P J. Dordrecht, the Netherlands, Kluwer, 2004, 350-368
103. Newman KD, Vantoi TT. Molecular characterization of the soybean alcohol dehydrogenase gene family amplified in vitro by the polymerase reaction. *Plant Physiol*. 1992, 100:489-495
104. Norman C, Runswick M, Pollock R, Treisman R. Isolation and properties of cDNA clones encoding SRF, a transcription factor that binds to the c-fos serum response element. *Cell*, 1998, 55:989-1003
105. O'Malley RC, Rodriguez F I, Esch J J, Binder B M, O'Donnell P, Klee H J, Bleeker A B. Ethylene-binding activity, gene expression levels, and receptor system output for ethylene receptor family members from Arabidopsis and tomato. *Plant J*, 2005, 41:651-659
106. PATHAK N, ASTF M, DHAWAN P. Expression and activities of ethylene biosynthesis enzymes during ripening of banana fruits and effect of 1-MCP treatment. *Plant Growth Regulation*, 2003, 40(1): 11-19
107. Peng H P, Cha C S, Shih M C, et al. Signaling events in the hypoxic induction of alcohol dehydrogenase gene in Arabidopsis [J]. *plant physiol*, 2001, 126:724-749

108. Peumans, Tapia-Lopez R, Alvarez-Buylla E R, Yanofsky M F. Conversion of leaves into petals in *Arabidopsis*. *Curr Biol*, 2001, 11:182-184
109. Penarrubia L, Kim R, Giovannoni J, Kim S H, Fisher R. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/Technol*, 1992, 19:561-564
110. PINHERO R G, COPP L J, AMAYA C L, MARANGONI A G, YADA R Y. Roles of alcohol dehydrogenase, lactate dehydrogenase and pyruvate decarboxylase in low-temperature sweetening in tolerant and susceptible varieties of potato (*Solanum tuberosum*). *Physiologia Plantarum*, 2007, 130:230-239
111. Riechmann J L, Wang M, Meyerowitz E M. DNA-binding properties of *Arabidopsis* MADS domain homeotic proteins APETALA1, APETALA3, PISTILLATA and AGAMOUS. *Nucleic Acid Res*, 1996, 24(16):3134-3141
112. Roman G, Lubarsky B, Kieber J J, Rothenberg M, Ecker J R. Genetic analysis of ethylene signal transduction in *Arabidopsis thaliana*: five novel mutant loci integrated into a stress response pathway. *Genetics*, 1995, 139:1393-1409
113. Rounsley S D, Ditta G S, Yanofsky M F. Diverse roles for MADS box genes in *Arabidopsis* development. *Plant Cell*, 1995, 7:1259-1269
114. Rutledge R, Regan S, Nicolas O, Fobert P, Côté C, Bosnich W, Kauffeldt C, Sunohara G, Séguin A, Stewart D. Characterization of an AGAMOUS homologue from the conifer black spruce (*Picea mariana*) that produces floral homeotic conversions when expressed in *Arabidopsis*. *Plant J*, 1998, 15:625-634
115. Schwarz-Sommer Z, Huijser P, Nacken W, Saedler H, Sommer H. Genetic control of flower development by homeotic genes in *Antirrhinum majus*. *Science*, 1990, 250:931-936
116. SCANDALIOS J G. Phytochemical Society Symposia Series No.14 Regulation Of Enzyme Synthesis and Activity in Higher Plants. Academic Press, 1977, 35: 120~135
117. Shiao T, Ellis M H, Dolferus R., Dennis E S, Doran P M. Overexpression of alcohol dehydrogenase or pyruvate decarboxylase improves the growth of hairy roots under hypoxia. *Biotechnology and Bioengineering*. 2002, 77, 455-461
118. SISLER E C, SEREK M. Inhibitors of ethylene responses in plants at the receptor level: recent developments. *Physiol Plant*, 1999, 100(3):577-582
119. Stepanova A N, Hoyt J M, Hamilton A A, Alonso J M. A link between ethylene and auxin

- uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2005, 17:2230-2242
120. SEEMI L, PRABODH K, TRIVEDI. Changes in activities of cell wall hydrolases during ethylene induced ripening in banana: effect of 1-MCP, ABA and IAA. *Postharvest Biology and Technology*, 2004, 31(2):124-129
121. TESNIERE C, MARTINE P. Involvement of ethylene signaling in an non-climacteric fruit: new elements regarding the regulation of ADH expression in grapevine. *Journal of Experimental Botany*, 2004, 406:2235-2240
122. TESNIERE C, VERRIES C. Molecular cloning and expression of cDNAs encoding alcohol dehydrogenases from *Vitis vinifera* L. during berry development. *Plant Sci*, 2000, 157:77-88
123. Theissen G, Strater T, Fischer A, Saedler H. Structural characterization, chromosomal location and phylogenetic evaluation of two pairs of AGAMOUS-like alcohol dehydrogenases genes from maize. *Gene*, 1995, 156:155-166
124. Theissen G. Development of floral organ identity: stories from the alcohol dehydrogenases house. *Curr Opin Biol*, 2001, 4:75-85
125. Tzeng T-Y, Cen H-Y, Yang C-H. Ectopic expression of carpel-specific alcohol dehydrogenases genes from lily and lisianthus causes similar homeotic conversion of sepal and petal in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2002, 130:1827-1836
126. Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. A Vv-ADH gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (Rin) Locus. *Science*, 2002, 296 (5566):343-346
127. Wan CY, Wilkins TA. A modified hot borate method significantly enhance the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Anal Biochem*. 1994, 227:7-12
128. Winter K-U, Becker A, Münster T, Kim J T, Saedler H, Theissen G. ADH genes reveal that gnetophytes are more closely related to conifers than to flowering plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:7342-7347
129. Wu H T, Do YY, Huang P L. Nucleotide sequence of a cDNA encoding ethylene receptor from banana fruits. *Plant Physiol*, 1999, 119 (2):805
130. Xu B Y, Su W, Liu J H, Wang J B, Jin Z Q. Differentially expressed cDNAs at the early

- stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Planta*, 2007, 226:529-539
131. Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 1984, 35:155-189
132. Yanofsky M F, Ma H, Bowman J L, Drews G N, Feldmann K A, Meyerowitz E M. The protein encoded by the *Arabidopsis* homeotic gene *agamous* resembles transcription factors. *Nature*, 1990, 346:35-39
133. Yokoyama S, Harry DE. Molecular phylogeny and evolutionary rates of alcohol dehydrogenases in vertebrates and plants. *Mol Biol Evol*. 1993, 10:1215–1226
134. Yun P Y, Kim S Y, Ochiai T, Fukuda T, Ito T, Kanno A, Kameya T. AVAG2 is a putative D-class gene from an ornamental asparagus. *Sex Plant Reprod*, 2004, 17:107-116
135. Zhao sen, CHEN Yong-Hua, CHEN Hao, Xiao Guo-Ying. Dynamic analysis of *Adh2* gene of rice (*Oryza sativa* L.) under submergence stress using real-time quantitative PCR. *Chinese Journal of Eco-Agriculture*. 2008, 16(2):455-458

# 附录

## 缩写词 (Abbreviation)

<b>ACO</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase	ACC 氧化酶
<b>ACS</b>	1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase	ACC 合成酶
<b>Amp</b>	ampicillin	氨苄青霉素
<b>BLAST</b>	Basic Alignment Search Tool	基本比对搜索工具
<b>bp</b>	base pair	碱基对
<b>cDNA</b>	complementary deoxyribonucleic acid	互补 DNA
<b>dNTP</b>	Depxyribonucleoside triphosphate	脱氧核苷三磷酸
<b>EDTA-Na<sub>2</sub></b>	Ethylene diamine tetraacetic acid Na <sub>2</sub>	乙二胺四乙酸二钠
<b>ETR</b>	ethylene receptor gene	乙烯受体基因
<b>Kan</b>	Kanamycin	卡那霉素
<b>mRNA</b>	Message ribonucleic acid	信使核糖核酸
<b>PCR</b>	Polymerase Chain Reaction	聚合酶链式反应
<b>PVP</b>	Polyvinylpyrrolidone	聚乙烯吡咯烷酮
<b>RNase</b>	RNA hydrolase	核糖核酸酶
<b>rpm</b>	revolutions per minute	转/分钟
<b>SDS</b>	Sodium dodecylsulfate	十二烷基硫酸钠
<b>Taq</b>	Thermus aquaticus DNA(polymerase)	嗜热水生菌 DNA (聚合酶)

## 致 谢

本论文是在导师金志强研究员和徐碧玉研究员的悉心指导下完成的，从论文的选题、设计、操作到撰写，导师都倾注了大量的心血，他们广博的学识、严谨的治学态度、敏锐的洞察力，求实的工作作风是我学习的楷模，同时他们的人格魅力对我产生了深刻影响，在此表示最衷心的感谢。

特别感谢刘菊华博士、董凤英博士、姜成东博士、杨小亮师姐、贾彩虹师姐、张建斌师兄、胡伟师兄、王卓师兄、宁文斌师兄、迟光红师姐、周雪丽师姐对我的指导和帮助。

特别感谢同门王纪、王甲水、王园、郑雯、刘琳、邓成菊对我各方面的关心和帮助。感谢师弟牛杰的帮助。

感谢海南大学农学院、研究生处全体工作人员对我的支持和帮助。

特别感谢我的爸爸、妈妈和一直以来对我的关心、理解、支持和鼓励。

在此衷心地感谢所有关心、支持和帮助过我的人们。

王绍华

2010年6月