

植物乙烯信号转导研究进展

牟望舒, 应铁进*

(浙江大学生物系统工程与食品科学学院, 馥莉食品研究院, 浙江省农产品加工技术研究重点实验室, 浙江省食品加工技术与装备工程中心, 杭州 310058)

摘要: 结合最新研究进展, 综述了植物乙烯信号转导途径中的各级元件, 其中包括受体的组成结构和功能, CTR1 的负调控模式, MAPK 级联是否参与乙烯信号转导, EIN2 向细胞核传递信息的方式, EIN3/EILs、ERF 的作用机制及调控机制等, 并对今后有待解决的问题及研究方向进行展望。

关键词: 乙烯; 信号转导; 各级元件; 调控机制

中图分类号: Q 946.885; S 601 **文献标志码:** A **文章编号:** 0513-353X (2014) 09-1895-18

Study Progress on Ethylene Signal Transduction

MOU Wang-shu and YING Tie-jin*

(College of Biosystems Engineering and Food Science, Fuli Institute of Food Science, Zhejiang Key Laboratory for Agro-food Processing, Zhejiang R & D Center for Food Technology and Equipment, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China)

Abstract: This review summarizes major recent discoveries in key components of ethylene signaling pathway which have substantially expanded our view of regulatory networks of the ethylene action. The structure and function of the receptors, the negative regulator CTR1, the controversy on the involvement of MAPK cascade in the ethylene signaling, the mechanisms of EIN2 nuclear translocation, the stability control of EIN3/EILs as well as some other major advances about ethylene signaling made in the last few years are covered. Finally, several unsolved questions are raised for future studies that will help to build a more complete model of ethylene signal transduction.

Key words: ethylene; signal transduction; related components; regulatory mechanism

乙烯生物合成途径首先是由甲硫氨酸 (Methionine, Met) 合成 S-腺苷甲硫氨酸 (S-Adenosyl methionine, SAM), SAM 在 ACC (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) 合成酶 (ACC synthase, ACS) 的作用下合成 ACC, 最后 ACC 在 ACC 氧化酶 (ACC oxidase, ACO) 作用下生成乙烯 (Yang & Hoffman, 1984)。乙烯受体作为负调控元件对乙烯信号进行感知, 抑制下游的 CONSTITUTIVE TRIPLE RESPONSE1 (CTR1), 激活细胞质中正调控因子 ETHYLENE INSENSITIVE2 (EIN2), 进而将信号传递给细胞核内的 ETHYLENE INSENSITIVE3/EIN3-LIKEs (EIN3/EILs), 促进转录因子 ETHYLENE RESPONSE FACTOR (ERF) 的表达, 最终诱导一系列与乙烯反应相关基因的转录翻译 (殷学仁 等, 2009)。本文中以传统的乙烯信号线性模型为主线, 结合近几年新的研究发现, 全面

收稿日期: 2014-03-01; 修回日期: 2014-07-25

基金项目: 国家重点基础研究发展计划项目 (2013CB127101)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: tjying@zju.edu.cn)

详细地介绍乙烯信号转导的途径及各组分的功能,其中包括受体各部分结构及在乙烯响应中的作用,关于 MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE (MAPK) 级联反应的争议, EIN2 信号传递机制, EIN3/EILs 的调控方式及 ERFs 的功能等。

1 乙烯受体的结构和功能

1.1 乙烯受体的种类

在拟南芥中, 乙烯的 5 个受体是通过功能缺失性突变体分离得来, 并确定它们对乙烯的信号转导起负调控作用 (Hua & Meyerowitz, 1998)。根据序列的不同可以将它们分为两个亚族: 亚族 1 包括 ETR1 和 ERS1, 含有保守的组氨酸序列, 其中 ETR1 只具有组氨酸激酶活性, 而 ERS1 具有双重功能, 既具有组氨酸激酶活性还具有丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 激酶活性 (Moussatche & Klee, 2004); 亚族 2 包括 ETR2、EIN4 和 ERS2, 不含保守的组氨酸残基, 具有 Ser/Thr 激酶活性。此外, 亚族 2 受体在氨基端 (N 端) 比亚族 1 受体多一个疏水跨膜片段, 这个片段的功能是分泌路径的靶标序列, 作为膜定位的信号肽 (Qu & Schaller, 2004)。然而这个片段结构也会使亚族 2 受体与 EIN2 的距离增大, 使其与 EIN2 的结合能力弱于亚族 1 (Bisson & Groth, 2010)。ETR1、ETR2 和 EIN4 的羧基端 (C 端) 还有一个反应调控域, 而 ERS1、ERS2 则缺乏这个结构 (魏绍冲 等, 2004)。乙烯受体大部分定位在内质网上, 而小部分位于高尔基体中 (Dong et al., 2008)。Chen 等 (2002) 推测这样的定位分布可能有助于高效利用能量, 并更好地满足乙烯在水溶性和脂溶性两种环境中扩散。

1.2 乙烯受体的结构和功能

1.2.1 ETR1

在乙烯受体家族中最先被确定的就是 ETR1。ETR1 的结构与细菌的双组分调节系统极为相似, 是由 N 端的乙烯结合域 (ethylene binding domain, EBD) 和 C 端的组氨酸激酶域、反应调控域组成 (Schaller et al., 1995)。因为 ETR1 的组氨酸激酶与反应调控域在同一个蛋白质上, 所以构成了“杂交”的结构。N 端的 128 个氨基酸是由 3 个跨膜疏水片段组成, 构成 α 跨膜螺旋 (Schaller et al., 1995; Voet-van-Vormizeele & Groth, 2008)。其中, 乙烯结合口袋 (ethylene binding pocket) 是在前两个跨膜螺旋内形成的, 结合位点在膜上氨基端的第 165 个残基处 (Schaller et al., 1995)。相比前两个跨膜域, 第 3 个疏水域在乙烯的结合方面发挥的作用较小, 但是它可能在促进乙烯结合或是乙烯结合口袋的形成方面发挥一定作用 (Wang et al., 2006a)。乙烯与受体结合需有过渡金属铜离子参与, 受体与铜离子结合位点在乙烯结合域内 (Rodriguez et al., 1999), 且需要受体蛋白上的半胱氨酸 (Cys)、组氨酸 (His) 和甲硫氨酸 (Met) 残基参与 (Martin, 1991), 其中在第二个跨膜片段上的 Cys⁶⁵、His⁶⁹ 是结合乙烯所必需的 (Schaller & Bleecker, 1995; Rodriguez et al., 1999)。例如, 突变体 *etr1-1* 就是将 Cys⁶⁵ 转变为 Tyr, 阻碍了受体与铜离子的结合, 使受体蛋白丧失结合乙烯的能力 (Schaller et al., 1995; Schaller & Bleecker, 1995; Rodriguez et al., 1999), 且证实 *etr1-1* 抑制乙烯响应是完全不依赖其它受体 (Liu & Wen, 2012)。业已知道 Ag⁺ 会抑制乙烯信号转导, 而最近的研究发现在 *etr1* 受体突变体中如果用各种受体基因进行互补, 只有 ETR1 可以恢复突变体对 Ag⁺ 的敏感性, 说明 ETR1 可能是因为自身既具有保守的组氨酸激酶活性又具有反应调控域上保守的天门冬氨酸 (Asp) 残基这一特殊性, 才能在调节银离子的影响方面起到关键作用 (McDaniel & Binder, 2012)。

ETR1 氨基端的功能: ETR1 N 端上的两个保守的半胱氨酸残基 (Cys⁴, Cys⁶) 能够形成由二硫键连接的同源二聚体, 每一个二聚体均含有一个乙烯结合位点 (Schaller et al., 1995)。如果 ETR1 发生获得功能性突变, 那么受体蛋白就会被锁定在活化的二聚体状态。在 N 端还含有一个 GAF 域,

是一种普遍的信号模体，用来连接乙烯结合域和组氨酸激酶域。GAF 域能特异性地结合 cGMP，激活磷酸二酯酶，腺苷酸环化酶以及大肠杆菌蛋白 FhlA，可以促进环核苷酸的水解，并且参与光调节，然而早期对 GAF 域在 ETR1 上的具体功能还不是很明确 (Aravind & Ponting, 1997)。但是近来也有研究提出 GAF 域可能对乙烯的信号转导起到一定的调控作用。Xie 等 (2006) 发现 ETR1 的 N 端在含有亚族 1 受体的情况下可以单独转导信号，且受 C 端的影响较小。因此，推测 ETR1 N 端上 GAF 域可能与其它受体形成异源二聚体，通过受体间的互作来进行乙烯信号调节 (Qu & Schaller, 2004; Xie et al., 2006; Gao et al., 2008; Grefen et al., 2008; Chen et al., 2010; Liu & Wen, 2012)。

ETR1 羧基端的功能：ETR1 C 端包含一个组氨酸激酶域，其结构包括自动磷酸化位点 (His³⁵³) 以及由两个保守甘氨酸残基构成的催化域 (G1 和 G2 盒)，其中 ETR1 是通过 His³⁵³ 和反应调控域 (D659) 来激活双组分调节系统，G2 盒含有与 ATP 结合的保守序列 (Gamble et al., 2002; Cho & Yoo, 2007)。如果在这些保守的残基上任意发生突变都会导致自动磷酸化功能的丧失 (Gamble et al., 1998; Hall et al., 2012)。在外界环境的刺激下，保守的组氨酸残基会发生自动磷酸化，将磷酸根转移到反应调控域上的 Asp 残基上，从而调控下游的信号元件 (Gamble et al., 1998)。且 ETR1 及亚族 2 受体的自动磷酸化作用均需要 Mn²⁺ (Gamble et al., 1998; Voet-van-Vormizeele & Groth, 2008)。Gamble 等 (1998) 发现受体的磷酸化活性还会受到环境 pH 的影响，磷酸组氨酸只有在中性的条件下才稳定，但磷酸丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸需要在酸性环境中才稳定。虽然有许多研究已证实 ETR1 的组氨酸激酶域在信号转导中并不是必需的 (Gamble et al., 2002; Binder et al., 2004; Qu & Schaller, 2004; Xie et al., 2006)，但是组氨酸激酶的活性可能在去除乙烯后的生长速率恢复方面有着重要作用 (Binder et al., 2004)，且组氨酸激酶活性的缺失会抑制植株的生长 (Cho & Yoo, 2007)。同时，组氨酸激酶域也是受体与下游 CTR1 发生互作的位点 (Clark et al., 1998)。例如曾有报道称亚族 1 受体的 C 端与 CTR1 的 N 端之间的互作明显强于亚族 2 受体，这正是组氨酸激酶域起的作用 (Clark et al., 1998; Qu et al., 2007)，并且受体—EIN2 复合体的形成主要也是依赖这一结构 (Bisson & Groth, 2011)。Hall 等 (2012) 最新提出乙烯能够促进受体组氨酸激酶活性，且磷酸化作用对乙烯信号的调控可能存在两种机制：第 1 种是 ETR1 通过多步磷酸化作用来传送信号，并且下游的磷酸转移蛋白 (APHs) 和应答调控因子 (ARRs) 也会参与，而受体与 APH 和 ARR 之间的互作可能需要依靠这种磷酸化作用；第 2 种可能是 ETR1 的磷酸化作用会影响信号路径中的关键组分，能够引发蛋白质构型的改变，调节蛋白间的互作。当然，其它信号元件，例如 EIN2 或者是 RTE1 可能也会与 ETR1 的组氨酸激酶域发生互作 (Bisson et al., 2009)。

ETR1 的羧基端还具有反应调控域，也称为信号接收域，所含的 Asp 会接受由 His 磷酸化后解离下来的一个磷酸根。如果 Asp 发生突变，并不会影响组氨酸残基的自动磷酸化能力 (Gamble et al., 1998)。ETR1 的信号接收域也会形成二聚体，且二聚化作用是由受体的 C 端调控，它会以 5 个 β 链为核心形成扩展的 β 折叠的二聚体形式，在保守的 Asp⁶⁵⁹ 残基附近形成一个 γ -loop，这个结构可以显著提高 ETR1 与 CTR1 的互作强度 (Müller-Dieckmann et al., 1999)。同时研究还发现，虽然所有的受体均参与乙烯诱导产生的下胚轴侧弯，但是 ETR1 在这一过程中是必不可少的，最主要的原因就是 ETR1 上的 γ -loop 在与下游信号分子发生互作中发挥重要的作用 (Berg & Peacock, 1992; Binder et al., 2006)。试验还发现 ETR1、ETR2 和 EIN4 在去除乙烯后的快速恢复生长上显得尤为关键，而 ERS1、ERS2 起到的作用相对较小，这个现象也说明了信号接受域在生长恢复方面具有一定的功能 (Kim et al., 2011)。还有研究发现缺失接收域的受体在激活 CTR1 的能力上低于野生型，再次说明信号接收域在乙烯信号转导方面具有特定的功能 (Qu & Schaller, 2004)。

1.2.2 ERS1

ERS1 最早在酵母中通过与 ETR1 交叉杂交分离得到 (Hua et al., 1995)。ERS1 的结构与 ETR1

的相似度最高,且 N 端也有 Cys⁴、Cys⁶ 保守残基形成二聚体结构 (Hall et al., 2000)。由于 ERS1 在 C 端缺少信号接收域,因此与下游负调控因子 CTR1 的结合能力比 ETR1 略低 (Hall et al., 2000)。另外 ERS1 的表达受乙烯诱导,而 ETR1 则不受。有报道称 ERS1 表达量的增加能够提高组织对乙烯的敏感性 (Sato-Nara et al., 1999)。Contreras-Vergara 等 (2012) 在芒果中得到 ERS1 的同源基因 *Mi-ERS1*, 其表达量会随着果实的成熟而上升,并在乙烯跃变期达到最高值。这些现象虽然与乙烯负调控模型矛盾,但可能是由于乙烯与受体结合后需要一定的时间来释放乙烯,因此会促进组织生成更多的受体来结合乙烯 (O'Malley et al., 2005),同时不断合成新的受体会激活 CTR1,在乙烯水平下降时会适当地减弱乙烯反应 (Hall et al., 2000)。最近发现 ERS1 具有双重的生物特性,不仅能像其它受体一样抑制乙烯信号,而且能够在依赖 ETR1 的条件下促进乙烯反应,因为 ERS1 需要与其它受体共同协作才能负调控乙烯信号,它与 ETR1 结合形成异源复合体后会在一定程度上降低 ETR1 的活性,如果过量表达 ERS1 则会对 ETR1 功能产生抑制,从而增强乙烯反应 (Liu et al., 2010)。

1.2.3 ETR2

在拟南芥中,ETR2 受体会在泛素-26S 蛋白酶体的作用下发生由配体诱导的降解反应。在外源乙烯的刺激下它的表达量在初期会有明显上升,但是当乙烯浓度高于 $1 \mu\text{L} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,ETR2 的 RNA 水平不再有显著变化,且蛋白水平反而明显下降,说明乙烯可能会对 ETR2 进行转录后调节 (Chen et al., 2007)。这可能是由于过多的乙烯与 ETR2 结合就会使其构型发生改变,泛素化位点暴露,导致其降解。当然,如果不存在这种配体诱导的受体降解,就会使得受体在植物体内堆积,并牢牢结合乙烯,从而使植株不再感受乙烯的浓度变化,因此将配体-受体的复合体降解能够产生新的受体来代替旧的,这样就可以激活 CTR1 的活性,从而使植株再次对乙烯敏感 (Chen et al., 2007)。

1.2.4 EIN4 和 ERS2

以 ETR2 序列为探针,Hua 等 (1998) 在拟南芥中分离出两个 ETR2 同源基因——EIN4 和 ERS2。这两者的序列与 ETR2 最为接近,虽然在功能上有差异,但相互之间存在功能冗余 (Hua et al., 1998)。在拟南芥中 EIN4 在乙烯的 5 个受体中表达丰度最低 (O'Malley et al., 2005),主要是在胚胎,黄化幼苗、叶、根以及花序中表达,而 ERS2 主要在黄化幼苗、叶、根中表达,而且 ERS2 的表达主要集中在隔膜的表皮层,其它编码受体蛋白基因不会在这个部位表达 (Hua et al., 1998)。

1.3 乙烯受体突变体

乙烯对黑暗中生长的黄化幼苗会产生所谓的“三重反应”,根和上胚轴的伸长受到抑制,上胚轴横向增粗和横向生长 (Guzman & Ecker, 1990)。利用这一现象,可以对突变体进行乙烯合成、信号感受及响应等分析。ETR1 的突变体分为两类。一类是乙烯不敏感突变,有 *etr1-1*、*etr1-3* 和 *etr1-4* 等,例如突变体 *etr1-1* 和 *etr1-4* 是在第 2 个跨膜域发生突变,导致结合乙烯的能力完全丧失,*etr1-3* 突变是发生在第 1 个跨膜域中,虽然乙烯结合能力还存在,但是显著下降 (Hall et al., 1999)。在这些对乙烯不敏感的突变体中发现,ETR1 受体在转录后水平上有一个较大的提高,例如在 *etr1-1*、*etr1-3* 和 *etr1-4* 中的 ETR1 蛋白含量几乎是野生型的 2~3 倍,说明乙烯不敏感突变体会诱导受体的数量增加 (Zhao et al., 2002)。另一类是功能缺失性突变,表现出连续的乙烯反应,像 *etr1-5*、*etr1-6*、*etr1-7* 和 *etr1-8* 等均是 ETR1 的缺失型突变体 (Hua et al., 1998)。例如 *etr1-7* 是在终止密码子 Trp⁷⁴ 上发生突变造成 ETR1 的功能缺失 (Hua et al., 1998)。研究发现,5 个受体中只有 ETR1 发生单重缺失才会增强乙烯反应,而其它受体由于功能冗余使得单突变表型并不明显,这也反映了 ETR1 具有其独特的功能 (Cancel & Larsen, 2002)。此外,Wang 等 (2003) 通过构建由 ETR1 启动子驱动 5 个受体 cDNA 表达的载体,发现 ETR1 启动子能够诱导所有受体的转录,这也意味着 ETR1 在受体家族中可能扮演了主导角色。

受体的双重或者多重的缺失性突变均会表现出组成型的乙烯反应 (Hua et al., 1998)。其中 *ers1/etr1* 这组双重突变体的组成型乙烯反应表现最明显, 说明亚族 1 的这对受体所含的保守组氨酸序列在信号转导中有着独特的作用 (Hall et al., 2012)。当然, 这也说明了在亚族 1 受体缺失的情况下, 亚族 2 的受体能够在黄化幼苗的胚轴和根处进行乙烯的信号转导。同样, *etr2/ein4/ers2* 三重突变体也能表现出相似的乙烯反应, 说明在没有亚族 2 受体的情况下, 亚族 1 受体也能够进行乙烯调控的信号转导, 证明了两个亚族的受体之间存在功能冗余 (Hall & Bleecker, 2003)。

1.4 对乙烯受体的调控

1.4.1 RAN1 的铜离子转运功能

乙烯受体只有在铜离子的辅助下才能与乙烯结合 (Schaller & Bleecker, 1995)。N 端 Cys⁶⁵ 残基不仅能与乙烯结合, 且与 His⁶⁹ 均是铜离子的结合位点 (Rodriguez et al., 1999)。分离得到 *RAN1* (response to antagonist 1) 基因, 其编码的蛋白位于高尔基体上, 与铜转运 P 型 ATP 酶非常相似, 作用于乙烯受体的上游, 具有铜转运功能, 其结构具有金属结合序列、磷酸激酶域、信号转导域、磷酸化作用域和 ATP 结合域 (Hirayama et al., 1999)。如果 *ETR1* 在缺失 *Ccc2* (酵母中 *RAN1* 的同系物) 的酵母细胞中表达, 则会丧失结合乙烯的能力, 但如果加入外源铜离子则会恢复这种表型 (Binder et al., 2010)。关于高尔基体上的 *RAN1* 如何使 ER 上的受体获得铜离子, 目前有两种假设, 一种是可能存在铜离子的分子伴侣将其进一步转运到受体上, 另一种是推测位于高尔基体上的受体接受铜离子后再转运给 ER 上的受体 (Ju & Chang, 2012)。有研究发现 *RAN1* 不仅具有转运铜离子功能, 而且还能维持植物体铜离子平衡, 防止植物细胞因铜离子累积过多中毒 (Hirayama & Alonso, 2000)。但是如果在拟南芥中过表达 *RAN1* 就会改变原分生组织有丝分裂的进程以及对生长素的敏感性 (Wang et al., 2006b)。

1.4.2 RTE1 对 ETR1 的调控

RTE1 (REVERSION-TO-ETHYLENE SENSITIVITY1) 是乙烯反应的负调控因子, 具有较高的保守性, 位于 *ETR1* 的上游, 只能特异性地调控 *ETR1* 受体, 不参与调节其它受体 (Zhou et al., 2007; Rivarola et al., 2009; Kim et al., 2011)。试验证明 *RTE1* 与 *ETR1* 作用在同一路径, 且 *RTE1* 对乙烯的抑制作用必须依赖 *ETR1*, 因为 *ETR1* 氨基端的 3 个跨膜区和 GAF 域对激活 *RTE1* 非常重要 (Zhou et al., 2007), 而 *RTE1* 正是通过与 *ETR1* 直接互作来改变乙烯结合域的构型从而抑制乙烯反应, 并且这种互作不需要其它的植物蛋白参与, 遗传分析表明 *RTE1* 与 *ETR1* 极有可能是共同进化得到的 (Resnick et al., 2008; Chen et al., 2010)。乙烯虽然能够诱导 *RTE1* 的表达, 但是如果 *RTE1* 过表达就会降低乙烯的敏感性。试验也证实了 *RTE1* 对于 *ETR1* N 端的信号传递是必需的, 且不依赖 *CTR1* 途径, 这也证明了过表达 *RTE1* 对 *CTR1* 无影响 (Qiu et al., 2012)。虽然 *RAN1* 与 *RTE1* 均能正调控 *ETR1*, 但是 *RTE1* 的作用与 *RAN1* 毫不相干, 彼此不存在功能冗余 (Resnick et al., 2008)。在番茄中发现与拟南芥 *RTE1* 有较高同源性的两个基因 (Barry & Giovannoni, 2006), 分别为 *SIGR* 和 *SIGRL1*, 但这两个基因在乙烯信号转导模式上有着显著差别 (Ma et al., 2012)。

2 CTR1 及 MAPK 级联反应

2.1 CTR1 的结构

位于乙烯受体下游的是 *CTR1*, 其 C 端与哺乳动物的 Raf 激酶家族中的有丝分裂活化蛋白激酶激酶激酶 (Mitogen-activated protein kinase kinase kinase, MAPKKK) 非常相似, 具有 Ser/Thr 激酶活性, 且在 Mg²⁺ 和 Mn²⁺ 的条件下才具有催化活性, 而 N 端能够与 *ETR1* 和 *ERS1* 的组氨酸激酶域

发生互作 (Kieber, 1997; Clark et al., 1998; Huang et al., 2003)。CTR1 自身不具有跨膜结构及脂修饰位点, 但它与受体的互作形成了稳定的乙烯受体信号复合体, 从而也定位在内质网膜上 (Gao et al., 2003)。同时, 大多数的单受体突变对 CTR1 水平影响非常小, 而双重或者是三重受体突变会对 CTR1 的水平有较大的影响, 这说明乙烯受体是共同来调控 CTR1 的 (Novikova et al., 2000)。如果在 CTR1 的 N 端保守序列里发生单个氨基酸的取代, 构建为 *ctr1-8* 突变体, 虽然激酶活性没有受到影响, 但是会阻断 CTR1 与 ETR1 之间的互作, 表现出组成型三重反应, 这说明两者之间的互作对 CTR1 的负调控功能是必需的 (Huang et al., 2003; Zhong et al., 2008), 并且在拟南芥中的 CTR1 能够促进乙烯受体之间的交互作用, 它可以通过背靠背的二聚体形式互作, 从而将附近的受体激活 (Mayerhofer et al., 2012)。但是 CTR1 相比于 Raf, 还缺少锌指结构和结合 Ras 蛋白的结构域, 说明 CTR1 与 MAPKKK 可能在功能上还存在着一定的不同 (Kieber, 1997; Ouaked et al., 2003)。曾经有报道, Raf-1 激酶上的磷脂酸 (PA) 可以诱导 Raf-1 从细胞质向细胞膜转移, 从而激活 MAPK 级联反应 (Ghosh et al., 2003)。并且 PA 作为一种重要的脂质信号分子, 能够与拟南芥中的 CTR1 的激酶域结合并抑制其活性, 同时也会阻断 ETR1 与 CTR1 之间的互作, 因此推测 PA 在 CTR1 从受体上分离下来并失活这一过程中起到了重要的作用 (Testerink et al., 2007)。

2.2 关于 MAPK 级联反应在乙烯信号转导方面的争议

Raf 激酶可以通过磷酸化作用激活有丝分裂活化蛋白激酶激酶 (Mitogen-activated protein kinase kinase, MAPKK), 并进一步激活有丝分裂活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK), 参与 MAPK 级联反应 (Kieber, 1997; Wurgler-Murphy & Saito, 1997)。生物体经常通过 MAPK 级联反应来调控细胞对外界信号作出应答。Kieber (1997) 首先提出乙烯的信号可能是通过蛋白质激酶级联反应进行转导的。曾有试验发现外源乙烯能够增强类似 MAPK 激酶的髓鞘碱性蛋白 (MBP) 的磷酸化作用, 暗示 MAPK 级联反应可能参与了乙烯的信号转导 (Novikova et al., 2000)。直到在苜蓿和拟南芥中发现 ACC 能够激活 MMK2、SIMK (苜蓿中的两个 MAPKs) 和 MPK6 (拟南芥中的 MAPK) 及其上游的 SIMKK (MAPKK), 才直接证明了 MAPK 级联参与了乙烯的信号转导, 且这个激活过程需要 CTR1 和乙烯受体的存在, 不依赖 EIN2 和 EIN3 (Ouaked et al., 2003)。基于这一结论人们建立了乙烯信号从 CTR1 (MAPKKK) 到 SIMKK 到 SIMK/MMK3/MPK6 的线性模型, 且 CTR1 (MAPKKK) 负调控下游的 SIMKK (Kieber, 1997; Ouaked et al., 2003)。近来有研究认为乙烯能够抑制 CTR1 的活性, 从而激活 MKK9-MPK3/6 级联, 可绕过 EIN2 直接作用 EIN3, 使 EIN3 上的 Thr¹⁷⁴ 位点发生磷酸化而变得更为稳定, 从而促进乙烯的信号转导 (详见图 1。Colcombet & Hirt, 2008; Yoo et al., 2008)。ACC 处理会促进 MKK9 向细胞核转移, 进而去激活 MPK6 和 MPK3, 使得下游的转录因子 EIN3 发生磷酸化 (Chao et al., 1997; Solano et al., 1998)。而 CTR1 作为一个非传统的 MAPKKK, 会抑制下游 MKK9-MPK3/MPK6 级联的活性, 并同时通过其它的 MAPK 途径使 EIN3 上的 Thr⁵⁹² 发生磷酸化, 降解 EIN3 (图 1。Yoo et al., 2008)。当然, 在 *ctr1* 突变体中乙烯仍能够诱导 EIN3 的积累, 表明其它不依赖 CTR1 的信号通路能够被乙烯激活 (Iqbal et al., 2013)。

也有学者提出了相反的观点, 认为 MKK9-MPK3/MPK6 级联是参与了乙烯的生物合成而非信号转导过程 (Ecker, 2004; Guo & Ecker, 2004; Liu & Zhang, 2004; Joo et al., 2008; Xu et al., 2008; Bethke et al., 2009)。因为研究发现, 拟南芥 MPK6 可以通过磷酸化作用调控 ACS2/6 的稳定性, 诱导 ACS 的表达, 提高乙烯的生物合成量, 并在烟草中发现 NtSIPK (AtMPK6 的同源物) 也会诱导乙烯的合成 (Kim et al., 2003; Ouaked et al., 2003; Liu & Zhang, 2004)。MPK3 和 MPK6 均能通过磷酸化作用在 ACS2/6 酶的 C 端引入负电荷增强其稳定性, 而未被磷酸化的 ACS2/6 会迅速被泛素-26S 蛋白酶体途径降解 (Joo et al., 2008; Han et al., 2010), 并且发现 MPK3 在 MKK4/MKK5

的下游 (Han et al., 2010)。当然也并不是所有的 ACS 酶都受到 MPK3/6 的调控, 例如 ACS5 不含 MPK3/6 的磷酸化作用位点, 它受到 E3 泛素连接酶 ETO1 的调控, 通过泛素 - 26S 蛋白酶体途径降解 (Wang et al., 2004)。与之前结论矛盾的是, 许多研究发现外源乙烯 (或 ACC) 并不能提高 MPK6 酶的活性, 且不论在乙烯不敏感突变体或是在组成型三重反应的突变体中, MPK6 的活性均没有明显的变化, 因此推断过表达 SIMKK 表现出的持续的乙烯反应可能是乙烯合成量上升的结果 (Ouaked et al., 2003; Ecker, 2004; Guo & Ecker, 2004; Liu & Zhang, 2004)。也有试验报道 *mpk6/ctr1* 双重突变体与 *ctr1* 突变体的表型相似, 这也支持了 MPK6 并没有参与乙烯信号转导的观点 (Ecker, 2004; Menke et al., 2004)。通过 RNAi 技术抑制 MPK6, 发现对乙烯反应没有显著影响 (Menke et al., 2004)。这就与之前的结果矛盾, Zhao 和 Guo (2011) 给出的解释是 MAPK 途径很容易被其它外界环境因素所诱导 (例如损伤、触摸等), 而之前 ACC 对 MPK6 的激活可能是一定程度上被这些环境因素所诱导, 而并不是 ACC 真正在起作用, 因此试验环境中的干扰因素值得注意。

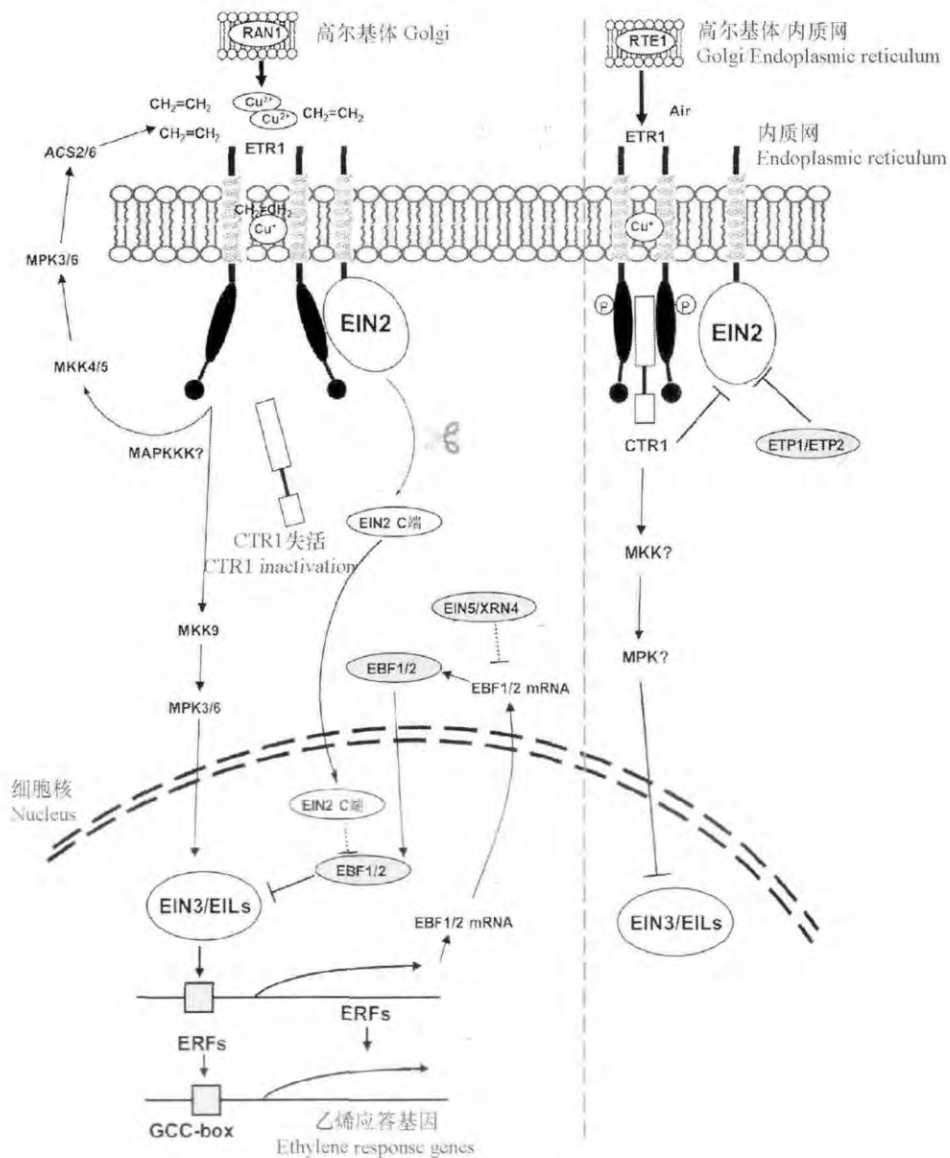


图 1 乙烯信号转导模型示意图 (参考 Zhao & Guo, 2011)

尖头直线表示正调控, 平头直线表示负调控, 虚线表示具体的生化机制未知。

Fig. 1 Schematic model of ethylene signal transduction (refer to Zhao & Guo, 2011)

Arrows and T bars indicate positive and negative regulations, respectively. Solid lines represent direct interaction and dotted lines represent the mechanisms have yet to be demonstrated.

2.3 番茄中的 *LeCTR*s

在番茄中也分离出与拟南芥 *CTR1* 同源的基因。不同的是, 在拟南芥中只有一个 *CTR1* 基因, 而番茄中是由 4 个基因构成 *CTR1*-like 家族 (*LeCTR1* ~ *LeCTR4*), 4 个 *LeCTR*s 在 N 端均有一段保守序列, 是与受体发生互作所必需的 (Huang et al., 2003; Adams-Phillips et al., 2004), 并且番茄中不同的 *LeCTR*s 会与相应的受体发生特异性互作, 例如 *LeCTR1* 与 *LeETR3*、*LeETR4* 发生特异性的互作 (Adams-Phillips et al., 2004), 而 *LeCTR2* 能够与除了 NR 以外其它所有受体发生互作, 且 *LeCTR2* 与亚族 1 类似受体 *LeETR1*、*LeETR2* 的互作明显强于亚族 2 受体 *LeETR4*、*LeETR5* 和 *LeETR6*, 这再一次说明组氨酸激酶域在两者的互作中所起的作用 (Lin et al., 2008)。有试验发现 *LeCTR1*、*LeCTR3* 和 *LeCTR4* 只有在受体 NR 存在的条件下才能定位在内质网上, 这是由于 NR 能够与它们形成蛋白复合体, 从而将 *LeCTR*s 吸引至内质网上 (Zhong et al., 2008)。同时, *LeCTR1* mRNA 会随着果实的成熟上升, 且会受到外源乙烯的诱导, 但是拟南芥 *AtCTR1* 的表达就不会明显受到乙烯影响, 这说明乙烯对 *AtCTR1* 的诱导还存在着一定的限制 (Kieber et al., 1993; Leclercq et al., 2002)。

3 EIN2: 乙烯信号转导的关键枢纽

EIN2 是一个跨膜蛋白, 作为乙烯信号从内质网向细胞核传输路径中的一个关键枢纽, 位于 *CTR1* 下游, 且正调控乙烯反应 (Alonso et al., 1999)。其 N 端由 12 个跨膜螺旋组成并与 *Nramp* 家族的金属转运蛋白非常相似, 且受到乙烯的调控, 而它的 C 端与其它蛋白都不具有相似性, 在功能上主要负责乙烯的响应, 如果过表达 EIN2 的 C 端就会使植株表现出持续的乙烯反应 (Alonso et al., 1999)。EIN2 位于内质网, 能与 *ETR1* 的组氨酸激酶域发生特异性互作, 但亚族 2 受体激酶域上的 Ser/Thr 活性能否直接影响与 EIN2 的互作至今还未明确 (Bisson & Groth, 2010)。在没有乙烯的情况下, 受体会自动磷酸化并通过激酶域与 *CTR1* 牢牢地结合, 阻碍受体与 EIN2 互作。同时, *CTR1* 由于含有 Ser/Thr 激酶域, 因此能够通过 MAPK 级联直接使 EIN2 C 端上的 Ser⁶⁴⁵ 和 Ser⁹²⁴ 发生磷酸化, 抑制 EIN2 的活性, 负调控乙烯信号转导 (图 1)。但乙烯与受体结合后, 不仅能抑制受体的自动磷酸化, 使 *CTR1* 因构型改变而失活, 从受体上释放出来, 同时乙烯使 EIN2 发生去磷酸化作用, 并与受体互作形成受体 - EIN2 复合体激活下游信号通路 (Bisson & Groth, 2010)。研究发现 EIN2 会受到泛素 - 26S 蛋白酶体途径的调控, 由乙烯调控的 F-box 蛋白 ETP1/ETP2 能够降解 EIN2, 且 ETP1、ETP2 之间可能存在着功能冗余 (Qiao et al., 2009; Bisson & Groth, 2011, 2012; Ju et al., 2012)。之前对于在内质网上的 EIN2 是如何把信号传递给细胞核内的 EIN3/EIL 还不是很明确, 最近学者们提出了一个新的观点, 认为 EIN2 的 C 端能够在乙烯诱导下发生剪切, 且剪切的位点是在 C 端的 630 ~ 645 aa 之间; 分离下来的 C 端就相当于一个转运分子, 将信号从内质网运输到细胞核内 (Ju et al., 2012; Qiao et al., 2012; Wen et al., 2012)。EIN2 的羧基片段上还含有一个保守的核定位信号 (nuclear localization signal, NLS), 它能够帮助 EIN2 的 C 端定位到细胞核上 (Wen et al., 2012)。研究发现, 只有 EIN2 的 C 端转移到细胞核内才能稳定 EIN3 的结构, 从而激活由 EIN3 调控的转录及下游的乙烯信号转导 (图 1; Wen et al., 2012)。研究还发现如果 *CTR1* 的激酶域上发生氨基酸取代, 或者是 EIN2 的磷酸化位点 (Ser⁶⁴⁵ 和 Ser⁹²⁴) 发生突变均会导致 EIN2 发生持续裂解, C 端会连续向细胞核转移, 从而不断激活依赖 EIN3/EILs 途径的乙烯信号转导, 这也表明乙烯的信号转导路径可能并不只依赖 *CTR1* 下游的 MAPK 级联反应 (Qiao et al., 2009; Ju et al., 2012; Ji & Guo, 2013)。

4 EIN3/EILs: 细胞核内的正调控因子

4.1 EIN3/EILs 的结构与功能

从突变体中分离得到的 *EIN3* 基因, 编码的蛋白位于 *EIN2* 的下游, 在乙烯信号转导中发挥着关键作用 (Potuschak et al., 2003)。同时也发现了 *EIN3* 的同源基因 *EIN3-LIKE* (*EIL*) *EIL1-5*, 其中只有 *EIL1*、*EIL2* 参与乙烯反应, 且 *EIL1* 与 *EIN3* 相似度最高 (Chao et al., 1997)。*EIN3/EILs* 位于细胞核内, 编码的是一类能够与 DNA 结合的蛋白质, 其 N 端富含酸性氨基酸, 所具有的螺旋结构有助于与 DNA 结合; 而 C 端附近会出现多聚天冬酰胺和多聚谷氨酰胺的重复片段 (Chao et al., 1997; Kosugi & Ohashi, 2000)。*EIN3/EILs* 能与下游的 *ERF* 基因启动子上的特定 DNA 序列结合 (也被称为初级乙烯应答元件, PERE), 来诱导 *ERF* 的表达 (Solano et al., 1998)。虽然 *EIL1/EIL2* 与 *EIN3* 功能冗余, 但还是存在差异, 例如在作用时间及部位方面, *EIL1* 主要在成年植株中抑制叶片扩展和茎的伸长, 而 *EIN3* 主要负责调控幼苗中大部分的乙烯反应 (Chao et al., 1997; An et al., 2010)。

4.2 对 EIN3/EILs 的调控

在植物体内, *EIN3/EILs* 是受到翻译后水平的调控。试验发现属于泛素连接酶 (E3) 类的 SCF 复合体中的两种 F-box 蛋白 *EBF1/EBF2* 位于 *EIN3/EILs* 上游, 可以在细胞核内直接与之发生互动 (Potuschak et al., 2003)。在没有乙烯的条件下, *EBF1/EBF2* 能够识别 *EIN3/EILs*, 通过泛素 - 26S 蛋白酶体途径的方式对它们进行降解; 而在乙烯存在下, 外源乙烯会加速 *EBF1/EBF2* 的降解, *EIN3* 才能维持稳定 (Guo & Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; An et al., 2010)。但是乙烯诱导 *EIN3* 的积累是必须有 *EBF1/EBF2* 的存在, 因为 *EBF1/EBF2* 能够激活 *EIN3* 基因的表达 (An et al., 2010), 并且 *EBF1* 在乙烯反应的前期起主要作用, 而 *EBF2* 会在反应的后期占主导地位 (Binder et al., 2007)。在拟南芥中, *ebf1/ebf2* 双突变体表现出生长受到抑制, 这说明 *EIN3* 对幼苗的生长起到抑制作用 (Gagne et al., 2004; Binder et al., 2007)。

4.3 对 EBF1/EBF2 的调控

EBF1/EBF2 作为蛋白酶, 可以在乙烯的调控下自身也能被泛素 - 26S 蛋白酶体降解, 但这个途径会受到银离子抑制 (An et al., 2010), 并且 *EIN2* 是 *EBF1/EBF2* 降解的关键因素, 推测可能是由于 *EIN2* 抑制某些 COP9 信号复合体 (CSN), 进而加快了 F-box 蛋白的自动泛素化作用, 促进其降解 (Christians et al., 2008; An et al., 2010)。但是这种机制也存在着负反馈调控, 如果乙烯诱导过量的 *EIN3* 积累, *EIN3* 就能直接与 *EBF2* 基因的启动子结合, 诱导 *EBF2* 的表达, 降解多余的 *EIN3*, 从而维持体内的 *EIN3* 水平 (Guo & Ecker, 2003; Potuschak et al., 2003; Binder et al., 2007; An et al., 2010)。但是研究发现 *EIN3* 的活性只对 *EBF2* 的 mRNA 水平有影响, 而对 *EBF1* 的影响非常小 (Binder et al., 2007; Konishi & Yanagisawa, 2008)。同时, 在拟南芥中分离出位于 *CTR1* 下游的 *EIN5/XRN4*, 编码的蛋白为 5' - 3'核糖核酸外切酶 (Kastenmayer & Green, 2000)。这种酶位于细胞质中, 能够直接降解下游 *EBF1/EBF2* 的 mRNA, 从而抑制 *EIN3* 的负反馈调节 (Kastenmayer & Green, 2000; Olmedo et al., 2006; Potuschak et al., 2006)。

在番茄中分离得到的 *LeEIL1* 会在果实成熟阶段不断表达, 在番茄果实乙烯信号转导中起着关键作用, 并部分恢复 *ein2* 的突变表型 (Pan et al., 2011), 在烟草中也分离出 *EIN3* 的同源基因 *TEIL* (Kosugi & Ohashi, 2000), 在绿豆中分离出 *EIL* 的同源基因 *pVR-EIL1* 和 *pVR-EIL2* (Lee & Kim, 2003), 在紫草中分离出 *EIN3* 的同源基因 *LeEIL1-1* (Zou et al., 2011), 在牡丹中分离出 3 个 *EIN3* 的同源基因, 分别为 *PsEIL1*、*PsEIL2* 和 *PsEIL3*, 在不同的组织中的表达不同, 其中 *PsEIL2* 和 *PsEIL3*

的转录还能受到 1-MCP 的影响 (Wang et al., 2013)。

5 转录因子 ERFs

5.1 ERFs 的结构

转录因子 ERF 是高等植物所特有的,并不存在酵母或其它真菌中 (Ohme-Takagi et al., 2000)。ERF 类转录因子是属于 AP2 DNA 结合蛋白大家族中的一类,这个大家族是由 AP2 (APETALA 2)、RAV (与 ABI3/VP1 相关) 及 ERF 转录因子 3 个亚族组成 (Pan et al., 2013)。其中 AP2 亚族的转录因子含有两个 AP2 域。RAV 亚族含有两个 DNA 结合域,一个类似 AP2 域,可以与 CAACA 序列结合,另一个类似 B3 域,与 CACCTG 序列结合 (Pirrello et al., 2012)。而 ERF 亚族也可分为两类。一类是 ERF,能够与编码病程相关蛋白 (PR, 如几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶、防御素等) 的基因启动子上的 GCC-box (TAAGAGCCGCC) 结合,应答外界的生物胁迫;另一类是 CBF/DREB,能够与干旱应答元件 (DRE) 结合,与非生物胁迫相关 (Pirrello et al., 2012)。转录因子 ERF 含有 DNA 结合域、转录调控域、寡聚化位点、核定位信号 (NLS) (葛宝宇等, 2007),其中 DNA 结合域也称为 ERF 域,由 58 或者 59 个保守的氨基酸组成,能够特异性地与 PR 基因上的 GCC 框结合,在乙烯调控的抗病应答方面起到相应的作用 (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995)。之前虽然提到 ERF 域与 AP2 域非常相似,但是发现 AP2 域并不像 ERF 域可以直接与 GCC-box 发生互作,这说明 AP2 域识别、结合的 DNA 序列与 ERF 域有所不同 (Büttner & Singh, 1997; Hao et al., 1998; Fujimoto et al., 2000; Alonso et al., 2003)。ERFs 主要是通过通过与靶 DNA 片段形成由 3 条反向平行的链构成的 β 折叠和一个 α 螺旋的复杂结构,且利用 β 折叠上的精氨酸和色氨酸残基与 DNA 深沟中 8 个碱基对发生互作,并与糖磷酸骨架结合 (Allen et al., 1998)。试验发现这种结合非常牢固,解离常数 (kd 值) 已达到数量级 pm,且在 GCC 框的 11 个碱基对中,只有其中的 6 个碱基对 (GCCGCC) 参与了和氨基酸的互作,其中第 1、4 个 G 及第 6 个 C 表现出的结合能力最强 (Hao et al., 1998)。当然这种结合还受到 GCC-box 当时所处的核苷酸环境以及在 ERF 域上一些氨基酸残基的性质所影响 (Pirrello et al., 2012)。目前已经分离得到了烟草中的 EREBPs (Ohme-Takagi & Shinshi, 1995),拟南芥中的 AtEBP (Büttner & Singh, 1997),番茄中的 Pti4-6 (Zhou et al., 1997)、LeERF1 (张红星等, 2008) 以及拟南芥中的 AtEBP、AtERFs 和 ERF1 (Büttner & Singh, 1997; Solano et al., 1998; Fujimoto et al., 2000),柿子中的 DkERF1、DkERF6 (Yin et al., 2012) 等,它们的 ERF 域均能够与 GCC-box 发生结合。当然也有研究发现,番茄中的 Pti4 虽然作为一类 ERF 类的转录因子,但也能与缺少 GCC-box 的 E4 启动子结合 (Chakravarthy et al., 2003)。

5.2 ERFs 的作用机制

不同的 ERFs,对基因转录的调控存在着差异。例如 ERF 对于依赖 GCC-box 表达的基因来说,既可以是转录激活因子,也可以是转录抑制子 (Fujimoto et al., 2000)。例如,拟南芥中的 AtERF1、AtERF2、AtERF5 与 GCC-box 结合后会激活基因的转录,而 AtERF3、AtERF4 与 GCC-box 结合后则会抑制这些基因的表达,并且对于外界不同的环境胁迫,不同的 AtERFs 会作出不同的应答 (Fujimoto et al., 2000)。同时也有研究发现 AtERF1、AtERF2、AtERF5 对 GCC 框的序列发生变化要更为敏感,而 AtERF3、AtERF4 对于靶序列的识别则相对灵活一点 (Fujimoto et al., 2000)。

在过去的研究中也发现蛋白质互作在这一过程中也起到了非常重要的作用。拟南芥中的 AtEBPs 能够与章鱼碱合成酶元件结合因子 (OBF4) 发生互作,说明 ERF 与碱性亮氨酸拉链蛋白 (bZIP) 的交互耦合能够调控防御基因的表达 (Büttner & Singh, 1997)。在番茄中分离出与烟草 ERF2 同源

的 *Pti4*、*Pti5*, 它们不仅能够与抗病基因 *Pto* 上的 GCC 框结合调控转录, 而且可以直接与 *Pto* 激酶互作进而被磷酸化, 这种磷酸化作用具有高度特异性并能进一步增强 *Pti4* 与 GCC-box 的结合程度 (Zhou et al., 1997; Gu et al., 2000)。同时, 磷酸化作用也能够对 ERF 的相关功能产生影响, 例如拟南芥中的 *AtERF5* 会受到 MAPK 途径的调控 (Fujimoto et al., 2000)。Cheng 等 (2012) 最近利用酵母双杂交技术, 在拟南芥中分离出了一个 RING E3 泛素连接酶——RGLG2, 它能够与 *AtERF35* 在细胞核内发生互作, 并通过泛素化途径将 *AtERF35* 降解。

乙烯在 ERF1 作为反式作用因子调控基因表达的过程中并不是必需的, 因为在乙烯不敏感突变体 *ein2* 中, *AtERF1*、*AtERF2*、*AtERF5* 仍然可以激活含有 GCC-box 基因的转录 (Fujimoto et al., 2000)。之前也报道了真菌的诱导剂木聚糖酶能够激活烟草细胞中的 GCC-box 基因的转录, 并且这个激活作用不依赖乙烯, 而是通过蛋白质的磷酸化作用诱导烟草细胞中 *ERF2* 基因的表达 (Yamamoto et al., 1999)。

与植株抗病相关的 *PR* 基因上的 GCC 框只是乙烯应答元件 (Ethylene response element, ERE) 的一种, 而与成熟或者衰老相关的基因中均不存在 GCC-box, 说明还有其他不同的顺式作用元件参与调节成熟与衰老过程的基因表达 (Ohme-Takagi et al., 2000)。

6 新调控因子 EER

6.1 EER1

在拟南芥中得到了一类新的突变体 *eer1* (enhanced ethylene responsiveness 1), 它是由于蛋白磷酸酶 2A (protein phosphatase 2A, PP2A) 上的 A 调节亚基 RCN1 发生缺失型突变导致的, 能够在幼苗和根部表现出对乙烯的强敏感性, 这说明 EER1 作为 RCN1 的等位基因, 是乙烯信号转导的负调控因子 (Larsen & Chang, 2001)。深入分析发现 PP2A 与 CTR1 的氨基端存在互作, 如果 PP2A 的活性发生缺失, 那么就会明显抑制 CTR1 的活性, 从而提高了植物对乙烯的敏感性 (Larsen & Cancel, 2003)。但是 RCN1 的转录水平和转录后水平均不受到乙烯的调控 (Larsen & Cancel, 2003)。

6.2 EER2

另一类新的突变体 *eer2*, 与 *eer1* 不同, *eer2* 需要在光照条件下才能对乙烯反应增强, 并且 *eer1* 的乙烯合成量会有所上升, 而 *eer2* 并没有明显的变化。同时, *eer2* 在外源 ACC 的刺激下表现的性状与野生型相似 (De Paepe et al., 2005)。推断 EER2 基因是衰老系统中的一个调控因子, 如果 EER2 缺失突变, 会促进早熟相关的基因表达, 并同时抑制光合作用相关的基因表达, 从而延缓叶片衰老 (De Paepe et al., 2005)。

6.3 EER3

eer3 缺失型突变体也表现出对乙烯的敏感性增强。这种突变是由于在一种抗增殖蛋白 *AtPHB3* 上发生了一个氨基酸的取代造成 EER3 的功能完全丧失, 表现出连续的乙烯反应, 并且发现 *AtPHB3* 蛋白定位在细胞核和细胞质中。遗传学分析发现 EER3 是作用在 EIN2 的下游, 是乙烯信号转导的关键负调控因子 (Christians & Larsen, 2007)。*eer3* 突变体不仅表现出对乙烯过于敏感, 而且乙烯的合成量明显上升 (Christians & Larsen, 2007)。当然 *AtPHB3* 对于某些乙烯诱导表达的基因还起到正调控的作用, 例如 *ACO2*、*EBP* 需要在 EER3 存在的条件下才能够表达 (Christians & Larsen, 2007)。

6.4 EER4

分离得到的拟南芥突变体 *eer4*, 是在编码区发生单核苷酸突变造成的, 因此会产生一个过早的终止密码。*EER4* 基因编码的是一种 C 端能与 TFIID 互作的转录因子, 能够正调控 ERF1 的表达, 并且发现 *EER4* 能够与 EIN3 和 ERF1 发生特异性结合。*EER4* 作为一种转录因子, 不仅能够诱导能够促进乙烯反应的基因表达 (例如 *ERF1*), 也能够诱导抑制乙烯信号转导的基因表达 (例如 *EBF1* 和 *EBF2*)。但总的来说, *EER4* 编码的转录因子主要是抑制乙烯信号转导, 因此缺失型突变能增强对乙烯的响应 (Robles et al., 2007)。

6.5 EER5

拟南芥 *eer5* 突变体表现出对乙烯过敏感以及乙烯反应增强, 但是乙烯的合成量不会增加。该突变是由一个含有 PAM 域 [蛋白酶体 COP9 启动因子 (PCI/PINT) 相关的结构] 的蛋白质发生单个氨基酸取代 (Gly¹⁵²→Glu¹⁵²) 造成的, 并且这种蛋白质 CSN 的组成非常相似。试验表明 *EER5* 作用在 CTR1 的下游, 能够直接与 EIN2 的 C 端和 CSN 发生互作, 同时 EIN2 能够通过 *EER5* 调控 CSN 的活性, 并且 *EER5* 可以在不依赖 EIN3 的条件下调控乙烯的信号转导, 对蛋白质的修饰和降解起到一定作用 (Christians et al., 2008)。

7 展望

近几年对乙烯信号通路中各个组分的结构和功能已经有了一个较为深入的了解, 但是仍然有一些问题有待解决, 例如在受体——CTR1 复合体状态下, CTR1 的激酶域是如何抑制自身活性的; MAPK 级联反应在乙烯信号转导中到底扮演怎样的角色; EIN2 的 C 端在乙烯刺激下发生剪切转移到核内后是如何稳定 EIN3 的, 而 EIN2 的保守 N 端又具有怎样的潜在功能。今后可以利用蛋白质组学等研究方法, 在翻译后水平上了解乙烯信号转导中的蛋白调控模式并挖掘该通路上新的调控因子。同时, 乙烯信号传导途径并不是独立存在的, 与其它植物激素如生长素、赤霉素、脱落酸等具有交互作用, 例如外源生长素能促进细胞核内 EIN3 的积累 (He et al., 2011)。因此, 通过继续挖掘每个信号组分的功能与作用机制, 从而建立完善的乙烯信号网络可以为今后构建植物各个生理阶段的激素互作调控模型奠定基础。

References

- Adams-Phillips L, Barry C, Kannan P, Leclercq J, Bouzayen M, Giovannoni J. 2004. Evidence that CTR1-mediated ethylene signal transduction in tomato is encoded by a multigene family whose members display distinct regulatory features. *Plant Molecular Biology*, 54 (3): 387 - 404.
- Allen M D, Yamasaki K, Ohme-Takagi M, Tateno M, Suzuki M. 1998. A novel mode of DNA recognition by a beta-sheet revealed by the solution structure of the GCC-box binding domain in complex with DNA. *Embo Journal*, 17 (18): 5484 - 5496.
- Alonso J M, Hirayama T, Roman G, Nourizadeh S, Ecker J R. 1999. EIN2, a bifunctional transducer of ethylene and stress responses in *Arabidopsis*. *Science*, 284 (5423): 2148 - 2152.
- Alonso J M, Stepanova A N, Leisse T J, Kim C J, Chen H M, Shinn P, Stevenson D K, Zimmerman J, Barajas P, Cheuk R, Gadrinab C, Heller C, Jeske A, Koesema E, Meyers C C, Parker H, Prednis L, Ansari Y, Choy N, Deen H, Geralt M, Hazari N, Hom E., Karnes M, Mulholland C, Ndubaku R, Schmidt I, Guzman P, Aguilar-Henonin L, Schmid M, Weigel D, Carter D E, Marchand T, Risseuw E, Brogden D, Zeko A, Crosby W L, Berry C C, Ecker J R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*, 301 (5633): 653 - 657.
- An F Y, Zhao Q O, Ji Y S, Li W Y, Jiang Z Q, Yu X C, Zhang C, Han Y, He W R, Liu Y D, Zhang S Q, Ecker J R, Guo H W. 2010. Ethylene-induced stabilization of ETHYLENE INSENSITIVE3 and EIN3-LIKE1 is mediated by proteasomal degradation of EIN3 binding F-Box 1 and 2 that

- requires EIN2 in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 22 (7): 2384 - 2401.
- Aravind L, Ponting C P. 1997. The GAF domain: An evolutionary link between diverse phototransducing proteins. *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (12): 458 - 459.
- Barry C S, Giovannoni J J. 2006. Ripening in the tomato Green-ripe mutant is inhibited by ectopic expression of a protein that disrupts ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (20): 7923 - 7928.
- Berg A R, Peacock K. 1992. Growth patterns in nutating and nonnutating sunflower (*Helianthus annuus*) hypocotyls. *American Journal of Botany*, 79 (1): 77 - 85.
- Bethke G, Unthan T, Uhrig J F, Poschl Y, Gust A A, Scheel D, Lee J. 2009. Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106 (19): 67 - 72.
- Binder B M, Mortimore L A, Stepanova A N, Ecker J R, Bleecker A B. 2004. Short-term growth responses to ethylene in *Arabidopsis* seedlings are EIN3/EIL1 independent. *Plant Physiology*, 136 (2): 2921 - 2927.
- Binder B M, O'Malley R C, Wang W Y, Zutz T C, Bleecker A B. 2006. Ethylene stimulates nutations that are dependent on the ETR1 receptor. *Plant Physiology*, 142 (4): 1690 - 1700.
- Binder B M, Rodriguez F I, Bleecker A B. 2010. The copper transporter RAN1 is essential for biogenesis of ethylene receptors in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 285 (48): 37263 - 37270.
- Binder B M, Walker J M, Gagne J M, Emborg T J, Hemmann G, Bleecker A B, Vierstra R D. 2007. The *Arabidopsis* EIN3 binding F-box proteins EBF1 and EBF2 have distinct but overlapping roles in ethylene signaling. *Plant Cell*, 19 (2): 509 - 523.
- Bisson M M A, Bleckmann A, Allekotte S, Groth G. 2009. EIN2, the central regulator of ethylene signalling, is localized at the ER membrane where it interacts with the ethylene receptor ETR1. *Biochemical Journal*, 424 (1): 1 - 6.
- Bisson M M A, Groth G. 2010. New insight in ethylene signaling: Autokinase activity of ETR1 modulates the interaction of receptors and EIN2. *Molecular Plant*, 3 (5): 882 - 889.
- Bisson M M A, Groth G. 2011. New paradigm in ethylene signaling: EIN2, the central regulator of the signaling pathway, interacts directly with the upstream receptors. *Plant Signaling & Behavior*, 6 (1): 164 - 166.
- Bisson M M A, Groth G. 2012. Cyanide is an adequate agonist of the plant hormone ethylene for studying signalling of sensor kinase ETR1 at the molecular level. *Biochemical Journal*, 444 (2): 261 - 267.
- Büttner M, Singh K B. 1997. *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (AtEBP), an ethylene-inducible, GCC box DNA-binding protein interacts with an ocs element binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94 (11): 5961 - 5966.
- Cancel J D, Larsen P B. 2002. Loss-of-function mutations in the ethylene receptor ETR1 cause enhanced sensitivity and exaggerated response to ethylene in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 129 (4): 1557 - 1567.
- Chakravarthy S, Tuori R P, D'Ascenzo M D, Fobert P R, Despres C, Martin G B. 2003. The tomato transcription factor Pti4 regulates defense-related gene expression via GCC box and non-GCC box cis elements. *Plant Cell*, 15 (12): 3033 - 3050.
- Chao Q M, Rothenberg M, Solano R, Roman G, Terzaghi W, Ecker J R. 1997. Activation of the ethylene gas response pathway in *Arabidopsis* by the nuclear protein ETHYLENE-INSENSITIVE3 and related proteins. *Cell*, 89 (7): 1133 - 1144.
- Chen Y F, Gao Z Y, Kerris R J, Wang W Y, Binder B M, Schaller G E. 2010. Ethylene receptors function as components of high-molecular-mass protein complexes in *Arabidopsis*. *Plos One*, 5 (1): e8640.
- Chen Y F, Randlett M D, Findell J L, Schaller G E. 2002. Localization of the ethylene receptor ETR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277 (22): 19861 - 19866.
- Chen Y F, Shakeel S N, Bowers J, Zhao X C, Etheridge N, Schaller G E. 2007. Ligand-induced degradation of the ethylene receptor ETR2 through a proteasome-dependent pathway in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 282 (34): 24752 - 24758.
- Cheng M C, Hsieh E J, Chen J H, Chen H Y, Lin T P. 2012. *Arabidopsis* RGLG2, Functioning as a RING E3 ligase, interacts with AtERF53 and negatively regulates the plant drought stress response. *Plant Physiology*, 158 (1): 363 - 375.
- Cho Y H, Yoo S D. 2007. ETHYLENE RESPONSE 1 histidine kinase activity of *Arabidopsis* promotes plant growth. *Plant Physiology*, 143 (2):

- 612 - 616.
- Christians M J, Larsen P B. 2007. Mutational loss of the prohibitin AtPHB3 results in an extreme constitutive ethylene response phenotype coupled with partial loss of ethylene-inducible gene expression in *Arabidopsis* seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 58 (8): 2237 - 2248.
- Christians M J, Robles L M, Zeller S M, Larsen P B. 2008. The eer5 mutation, which affects a novel proteasome-related subunit, indicates a prominent role for the COP9 signalosome in resetting the ethylene-signaling pathway in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 55 (3): 467 - 477.
- Clark K L, Larsen P B, Wang X X, Chang C. 1998. Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (9): 5401 - 5406.
- Colcombet J, Hirt H. 2008. *Arabidopsis* MAPKs: A complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal*, 413 (2): 217 - 226.
- Contreras-Vergara C A, Stephens-Camacho N A, Yepiz-Plascencia G, Gonzalez-Aguilar G A, Arvizu-Flores A A, Sanchez-Sanchez E, Islas-Osuna M A. 2012. Cloning and expression of ethylene receptor ERS1 at various developmental and ripening stages of mango fruit. *Genetics and Molecular Research*, 11 (4): 4081 - 4092.
- De Paepe A, De Grauwe L, Bertrand S, Smalle J, Van Der Straeten D. 2005. The *Arabidopsis* mutant eer2 has enhanced ethylene responses in the light. *Journal of Experimental Botany*, 56 (419): 2409 - 2420.
- Dong C H, Rivarola M, Resnick J S, Maggin B D, Chang C. 2008. Subcellular co-localization of *Arabidopsis* RTE1 and ETR1 supports a regulatory role for RTE1 in ETR1 ethylene signaling. *Plant Journal*, 53 (2): 275 - 286.
- Ecker J R. 2004. Reentry of the ethylene MPK6 module. *Plant Cell*, 16 (12): 3169 - 3173.
- Fujimoto S Y, Ohta M, Usui A, Shinshi H, Ohme-Takagi M. 2000. *Arabidopsis* ethylene-responsive element binding factors act as transcriptional activators or repressors of GCC box-mediated gene expression. *Plant Cell*, 12 (3): 393 - 404.
- Gagne J M, Smalle J, Gingerich D J, Walker J M, Yoo S D, Yanagisawa S, Vierstra R D. 2004. *Arabidopsis* EIN3-binding F-box 1 and 2 form ubiquitin-protein ligases that repress ethylene action and promote growth by directing EIN3 degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101 (17): 6803 - 6808.
- Gamble R L, Coonfield M L, Schaller G E. 1998. Histidine kinase activity of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95 (13): 7825 - 7829.
- Gamble R L, Qu X, Schaller G E. 2002. Mutational analysis of the ethylene receptor ETR1. Role of the histidine kinase domain in dominant ethylene insensitivity. *Plant Physiology*, 128 (4): 1428 - 1438.
- Gao Z Y, Chen Y F, Randlett M D, Zhao X C, Findell J L, Kieber J J, Schaller G E. 2003. Localization of the Raf-like kinase CTR1 to the endoplasmic reticulum of *Arabidopsis* through participation in ethylene receptor signaling complexes. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (36): 34725 - 34732.
- Gao Z, Wen C K, Binder B M, Chen Y F, Chang J, Chiang Y H, Ill R J K, Chang C, Schaller G E. 2008. Heteromeric interactions among ethylene receptors mediate signaling in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (35): 23801 - 23810.
- Ge Bao-yu, Lin Yi, Hou He-sheng. 2007. Structure and function of ERF transcription factors. *Anhui Agricultural Science Bulletin*, 13 (27): 32 - 35. (in Chinese)
- 葛宝宇, 林 轶, 侯和胜. 2007. ERF 类转录因子的结构与功能. *安徽农学通报*, 13 (27): 32 - 35.
- Ghosh S, Moore S, Bell R M, Dush M. 2003. Functional analysis of a phosphatidic acid binding domain in human Raf-1 kinase-Mutations in the phosphatidate binding domain lead to tail and trunk abnormalities in developing zebrafish embryos. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (46): 45690 - 45696.
- Grefen C, Stadele K, Ruzicka K, Obrdlík P, Harter K, Horak J. 2008. Subcellular localization and *in vivo* interactions of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor family members. *Molecular Plant*, 1 (2): 308 - 320.
- Gu Y Q, Yang C, Thara V K, Zhou J, Martin G B. 2000. Pti4 is induced by ethylene and salicylic acid, and its product is phosphorylated by the Pto kinase. *Plant Cell*, 12 (5): 771 - 785.
- Guo H W, Ecker J R. 2003. Plant responses to ethylene gas are mediated by SCF (EBF1/EBF2) -dependent proteolysis of EIN3 transcription factor. *Cell*, 115 (6): 667 - 677.
- Guo H W, Ecker J R. 2004. The ethylene signaling pathway: New insights. *Current Opinion in Plant Biology*, 7 (1): 40 - 49.

- Guzman P, Ecker J R. 1990. Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. *Plant Cell*, 2 (6): 513 - 523.
- Hall A E, Bleecker A B. 2003. Analysis of combinatorial loss-of-function mutants in the *Arabidopsis* ethylene receptors reveals that the *ers1 etr1* double mutant has severe developmental defects that are EIN2 dependent. *Plant Cell*, 15 (9): 2032 - 2041.
- Hall A E, Chen Q H G, Findell J L, Schaller G E, Bleecker A B. 1999. The relationship between ethylene binding and dominant insensitivity conferred by mutant forms of the ETR1 ethylene receptor. *Plant Physiology*, 121 (1): 291 - 299.
- Hall A E, Findell J L, Schaller G E, Sisler E C, Bleecker A B. 2000. Ethylene perception by the ERS1 protein in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 123 (4): 1449 - 1457.
- Hall B P, Shakeel S N, Amir M, Haq N U, Qu X, Schaller G E. 2012. Histidine kinase activity of the ethylene receptor ETR1 facilitates the ethylene response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 159 (2): 682 - 695.
- Han L, Li G J, Yang K Y, Mao G H, Wang R Q, Liu Y D, Zhang S Q. 2010. Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 64 (1): 114 - 127.
- Hao D Y, Ohme-Takagi M, Sarai A. 1998. Unique mode of GCC box recognition by the DNA-binding domain of ethylene-responsive element-binding factor (ERF domain) in plant. *Journal of Biological Chemistry*, 273 (41): 26857 - 26861.
- He W, Brumos J, Li H J, Ji Y S, Ke M, Gong X Q, Zeng Q L, Li W Y, Zhang X Y, An F Y, Wen X, Li P P, Chu J F, Sun X H, Yan C Y, Yan N, Xie D Y, Raikhel N, Yang Z B, Stepanova A N, Alonso J M, Guo H W. 2011. A small-molecule screen identifies L-Kynurenine as a competitive inhibitor of TAA1/TAR activity in ethylene-directed auxin biosynthesis and root growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 23: 3944 - 3960.
- Hirayama T, Alonso J M. 2000. Ethylene captures a metal! Metal ions are involved in ethylene perception and signal transduction. *Plant and Cell Physiology*, 41 (5): 548 - 555.
- Hirayama T, Kieber J J, Hirayama N, Kogan M, Guzman P, Nourizadeh S, Alonso J M, Dailey W P, Dancis A, Ecker J R. 1999. Responsive-antagonist1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Cell*, 97 (3): 383 - 393.
- Hua J, Chang C, Sun Q, Meyerowitz E M. 1995. Ethylene insensitivity conferred by *Arabidopsis* *ers* gene. *Science*, 269 (5231): 1712 - 1714.
- Hua J, Meyerowitz E M. 1998. Ethylene responses are negatively regulated by a receptor gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Cell*, 94 (2): 261 - 271.
- Hua J, Sakai H, Nourizadeh S, Chen Q H G, Bleecker A B, Ecker J R, Meyerowitz E M. 1998. EIN4 and ERS2 are members of the putative ethylene receptor gene family in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 10 (8): 1321 - 1332.
- Huang Y F, Li H, Hutchison C E, Laskey J, Kieber J J. 2003. Biochemical and functional analysis of CTR1, a protein kinase that negatively regulates ethylene signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 33 (2): 221 - 233.
- Iqbal N, Trivellini A, Masood A, Ferrante A, Khan N A. 2013. Current understanding on ethylene signaling in plants: The influence of nutrient availability. *Plant Physiology and Biochemistry*, 73: 128 - 138.
- Ji Y S, Guo H W. 2013. From endoplasmic reticulum (ER) to nucleus: EIN2 bridges the gap in ethylene signaling. *Molecular Plant*, 6 (1): 11 - 14.
- Joo S, Liu Y, Lueth A, Zhang S Q. 2008. MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant Journal*, 54 (1): 129 - 140.
- Ju C L, Chang C. 2012. Advances in ethylene signalling: Protein complexes at the endoplasmic reticulum membrane. *Aob Plants*, doi: 10.1093/aobpla/pls031.
- Ju C L, Yoon G M, Shemansky J M, Lin D Y, Ying Z I, Chang J H, Garrett W M, Kessenbrock M, Groth G, Tucker M L, Cooper B, Kieber J J, Chang C. 2012. CTR1 phosphorylates the central regulator EIN2 to control ethylene hormone signaling from the ER membrane to the nucleus in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109 (47): 19486 - 19491.
- Kastenmayer J P, Green P J. 2000. Novel features of the XRN-family in *Arabidopsis*: Evidence that AtXRN4, one of several orthologs of nuclear Xrn2p/Rat1p, functions in the cytoplasm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (25): 13985 - 13990.
- Kieber J J, Rothenberg M, Roman G, Feldmann K A, Ecker J R. 1993. Ctr1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the raf family of protein-kinases. *Cell*, 72 (3): 427 - 441.
- Kieber J J. 1997. The ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48: 277 - 296.
- Kim C Y, Liu Y D, Thorne E T, Yang H P, Fukushige H, Gassmann W, Hildebrand D, Sharp R E, Zhang S Q. 2003. Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell*, 15 (11): 2707 - 2718.
- Kim H, Helmbrecht E E, Stalans M B, Schmitt C, Patel N, Wen C K., Wang W Y, Binder B M. 2011. Ethylene receptor ETHYLENE RECEPTOR1

- domain requirements for ethylene responses in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 156 (1): 417 - 429.
- Konishi M, Yanagisawa S. 2008. Ethylene signaling in *Arabidopsis* involves feedback regulation via the elaborate control of EBF2 expression by EIN3. *Plant Journal*, 55 (5): 821 - 831.
- Kosugi S, Ohashi Y. 2000. Cloning and DNA-binding properties of a tobacco Ethylene-Insensitive3 (EIN3) homolog. *Nucleic Acids Research*, 28 (4): 960 - 967.
- Larsen P B, Chang C. 2001. The *Arabidopsis* eer1 mutant has enhanced ethylene responses in the hypocotyl and stem. *Plant Physiology*, 125 (2): 1061 - 1073.
- Larsen P B, Cancel J D. 2003. Enhanced ethylene responsiveness in the *Arabidopsis* eer1 mutant results from a loss-of-function mutation in the protein phosphatase 2A A regulatory subunit, RCN1. *Plant Journal*, 34 (5): 709 - 718.
- Leclercq J, Adams-Phillips L C, Zegzouti H, Jones B, Latche A, Giovannoni J J, Pech J C, Bouzayen M. 2002. LeCTR1, a tomato CTR1-like gene, demonstrates ethylene signaling ability in *Arabidopsis* and novel expression patterns in tomato. *Plant Physiology*, 130 (3): 1132 - 1142.
- Lee J H, Kim W T. 2003. Molecular and biochemical characterization of VR-EILs encoding Mung bean ETHYLENE INSENSITIVE3-LIKE proteins. *Plant Physiology*, 132 (3): 1475 - 1488.
- Lin Z F, Alexander L, Hackett R, Grierson D. 2008. LeCTR2, a CTR1-like protein kinase from tomato, plays a role in ethylene signalling, development and defence. *Plant Journal*, 54 (6): 1083 - 1093.
- Liu Q, Wen C K. 2012. *Arabidopsis* ETR1 and ERS1 differentially repress the ethylene response in combination with other ethylene receptor genes. *Plant Physiology*, 158 (3): 1193 - 1207.
- Liu Q, Xu C, Wen C K. 2010. Genetic and transformation studies reveal negative regulation of ERS1 ethylene receptor signaling in *Arabidopsis*. *Bmc Plant Biology*, 10.
- Liu Y D, Zhang S Q. 2004. Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (12): 3386 - 3399.
- Ma Q, Du W Y, Brandizzi F, Giovannoni J J, Barry C S. 2012. Differential control of ethylene responses by GREEN-RIPE and GREEN-RIPE LIKE1 provides evidence for distinct ethylene signaling modules in tomato. *Plant Physiology*, 160 (4): 1968 - 1984.
- Martin R B. 1991. The biological chemistry of the elements—the inorganic-chemistry of life—Dasilva, Jr, Williams, Rjp. *Nature*, 354 (6352): 367 - 367.
- Mayerhofer H, Panneerselvam S, Mueller-Dieckmann J. 2012. Protein kinase domain of CTR1 from *Arabidopsis thaliana* promotes ethylene receptor cross talk. *Journal of Molecular Biology*, 415 (4): 768 - 779.
- McDaniel B K, Binder B M. 2012. Ethylene receptor 1 (ETR1) is sufficient and has the predominant role in mediating inhibition of ethylene responses by silver in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 287 (31): 26094 - 26103.
- Menke F L H, van Pelt J A, Pieterse C M J, Klessig D F. 2004. Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 16 (4): 897 - 907.
- Moussatche P, Klee H J. 2004. Autophosphorylation activity of the *Arabidopsis* ethylene receptor multigene family. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (47): 48734 - 48741.
- Müller-Dieckmann H J, Grantz A A, Kim S H. 1999. The structure of the signal receiver domain of the *Arabidopsis thaliana* ethylene receptor ETR1. *Structure with Folding & Design*, 7 (12): 1547 - 1556.
- Novikova G V, Moshkov I E, Smith A R, Hall M A. 2000. The effect of ethylene on MAPKinase-like activity in *Arabidopsis thaliana*. *Febs Letters*, 474 (1): 29 - 32.
- Ohme-Takagi M, Shinshi H. 1995. Ethylene-inducible DNA-binding proteins that interact with an ethylene-responsive element. *Plant Cell*, 7 (2): 173 - 182.
- Ohme-Takagi M, Suzuki K, Shinshi H. 2000. Regulation of ethylene-induced transcription of defense genes. *Plant and Cell Physiology*, 41 (11): 1187 - 1192.
- Olmedo G, Guo H W, Gregory B D, Nourizadeh S D, Aguilar-Henonin L, Li H J, An F Y, Guzman P, Ecker J R. 2006. ETHYLENE-INSENSITIVE5 encodes a 5'→3' exoribonuclease required for regulation of the EIN3-targeting F-box proteins EBF1/2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (36): 13286 - 13293.
- O'Malley R C, Rodriguez F I, Esch J J, Binder B M, O'Donnell P, Klee H J, Bleeker A B. 2005. Ethylene-binding activity, gene expression levels,

- and receptor system output for ethylene receptor family members from *Arabidopsis* and tomato. *Plant Journal*, 41 (5): 651 - 659.
- Ouaked F, Rozhon W, Lecourieux D, Hirt H. 2003. A MAPK pathway mediates ethylene signaling in plants. *Embo Journal*, 22 (6): 1282 - 1288.
- Pan X Q, Fu D Q, Zhu B Z, Lu C W, Luo Y B. 2013. Overexpression of the ethylene response factor SIERF1 gene enhances resistance of tomato fruit to *Rhizopus nigricans*. *Postharvest Biology and Technology*, 75: 28 - 36.
- Pan Y, Chen G P, Lu C G, Chen X Q, Hu Z L. 2011. Functional analysis of tomato LeEIL1 in an *Arabidopsis* ein2 mutant. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33 (2): 489 - 496.
- Pirrello J, Prasad B C N, Zhang W S, Chen K S, Mila I, Zouine M, Latche A, Pech J C, Ohme-Takagi M, Regad F, Bouzayen M. 2012. Functional analysis and binding affinity of tomato ethylene response factors provide insight on the molecular bases of plant differential responses to ethylene. *Bmc Plant Biology*: 12: 190.
- Potuschak T, Lechner E, Parmentier Y, Yanagisawa S, Grava S, Koncz C, Genschik P. 2003. EIN3-dependent regulation of plant ethylene hormone signaling by two *Arabidopsis* F box proteins: EBF1 and EBF2. *Cell*, 115 (6): 679 - 689.
- Potuschak T, Vansiri A, Binder B M, Lechner E, Vierstra R D, Genschik P. 2006. The exoribonuclease XRN4 is a component of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (11): 3047 - 3057.
- Qiao H, Chang K N, Yazaki J, Ecker J R. 2009. Interplay between ethylene, ETP1/ETP2 F-box proteins, and degradation of EIN2 triggers ethylene responses in *Arabidopsis*. *Genes & Development*, 23 (4): 512 - 521.
- Qiao H, Shen Z X, Huang S S C, Schmitz R J, Urich M. A, Briggs S P, Ecker J R. 2012. Processing and subcellular trafficking of ER-rethered EIN2 control response to ethylene gas. *Science*, 338 (6105): 390 - 393.
- Qiu L P, Xie F, Yu J, Wen C K. 2012. *Arabidopsis* RTE1 is essential to ethylene receptor ETR1 amino-terminal signaling independent of CTR1. *Plant Physiology*, 159 (3): 1263 - 1276.
- Qu X, Hall B P, Gao Z Y, Schaller G E. 2007. A strong constitutive ethylene-response phenotype conferred on *Arabidopsis* plants containing null mutations in the ethylene receptors ETR1 and ERS1. *Bmc Plant Biology*, 7 (3): 1 - 15.
- Qu X, Schaller G E. 2004. Requirement of the histidine kinase domain for signal transduction by the ethylene receptor ETR1. *Plant Physiology*, 136 (2): 2961 - 2970.
- Resnick J S, Rivarola M, Chang C. 2008. Involvement of RTE1 in conformational changes promoting ETR1 ethylene receptor signaling in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 56 (3): 423 - 431.
- Rivarola M, McClellan C A, Resnick J S, Chang C. 2009. ETR1-specific mutations distinguish ETR1 from other *Arabidopsis* ethylene receptors as revealed by genetic interaction with RTE1. *Plant Physiology*, 150 (2): 547 - 551.
- Robles L M, Wampole J S, Christians M J, Larsen P B. 2007. *Arabidopsis* enhanced ethylene response 4 encodes an EIN3-interacting TFIIID transcription factor required for proper ethylene response, including ERF1 induction. *Journal of Experimental Botany*, 58 (10): 2627 - 2639.
- Rodriguez F I, Esch J J, Hall A E, Binder B M, Schaller G E, Bleecker A B. 1999. A copper cofactor for the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Science*, 283 (5404): 996 - 998.
- Sato-Nara K, Yuhashi K, Higashi K, Hosoya K, Kubota M, Ezura H. 1999. Stage- and tissue-specific expression of ethylene receptor homolog genes during fruit development in muskmelon. *Plant Physiology*, 120 (1): 321 - 329.
- Schaller G E, Bleecker A B. 1995. Ethylene-binding sites generated in yeast expressing the *Arabidopsis* ETR1 gene. *Science*, 270 (5243): 1809 - 1811.
- Schaller G E, Ladd A N, Lanahan M B, Spanbauer J M, Bleecker A B. 1995. The ethylene response mediator etr1 from *Arabidopsis* forms a disulfide-linked dimer. *Journal of Biological Chemistry*, 270 (21): 12526 - 12530.
- Solano R, Stepanova A, Chao Q M, Ecker J R. 1998. Nuclear events in ethylene signaling: A transcriptional cascade mediated by ETHYLENE-INSENSITIVE3 and ETHYLENE-RESPONSE-FACTOR1. *Genes & Development*, 12 (23): 3703 - 3714.
- Testerink C, Larsen P B, van der Does D, van Himbergen J A J, Munnik T. 2007. Phosphatidic acid binds to and inhibits the activity of *Arabidopsis* CTR1. *Journal of Experimental Botany*, 58 (14): 3905 - 3914.
- Voet-van-Vormizee J, Groth G. 2008. Ethylene controls autophosphorylation of the histidine kinase domain in ethylene receptor ETR1. *Molecular Plant*, 1 (2): 380 - 387.
- Wang K L C, Yoshida H, Lurin C, Ecker J R. 2004. Regulation of ethylene gas biosynthesis by the *Arabidopsis* ETO1 protein. *Nature*, 428 (6986): 945 - 950.

- Wang W Y, Esch J J, Shiu S H, Agula H, Binder B M, Chang C, Patterson S E, Bleecker A B. 2006a. Identification of important regions for ethylene binding and signaling in the transmembrane domain of the ETR1 ethylene receptor of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (12): 3429 - 3442.
- Wang W Y, Hall A E, O'Malley R, Bleecker A B. 2003. Canonical histidine kinase activity of the transmitter domain of the ETR1 ethylene receptor from *Arabidopsis* is not required for signal transmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100 (1): 352 - 357.
- Wang X, Xu Y Y, Han Y, Bao S L, Du J Z, Yuan M, Xu Z H, Chong K. 2006b. Overexpression of RAN1 in rice and *Arabidopsis* alters primordial meristem, mitotic progress, and sensitivity to auxin. *Plant Physiology*, 140 (1): 91 - 101.
- Wang Y J, Zhang C, Jia P Y, Wang X Q, Wang W R, Dong L. 2013. Isolation and expression analysis of three EIN3-like genes in tree peony (*Paeonia suffruticosa*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 112 (2): 181 - 190.
- Wei Shao-chong, Chen Kun-song, Luo Yun-bo. 2004. Ethylene receptor and its regulation in ripening fruits. *Acta Horticulturae Sinica*, 31 (4): 543 - 548. (in Chinese)
- 魏绍冲, 陈昆松, 罗云波. 2004. 乙烯受体与果实成熟调控. *园艺学报*, 31 (4): 543 - 548.
- Wen X, Zhang C L, Ji Y S, Zhao Q, He W R, An F Y, Jiang L W, Guo H W. 2012. Activation of ethylene signaling is mediated by nuclear translocation of the cleaved EIN2 carboxyl terminus. *Cell Research*, 22 (11): 1613 - 1616.
- Wurgler-Murphy S M, Saito H. 1997. Two-component signal transducers and MAPK cascades. *Trends in Biochemical Sciences*, 22 (5): 172 - 176.
- Xie F, Liu Q, Wen C K. 2006. Receptor signal output mediated by the ETR1 N terminus is primarily subfamily I receptor dependent. *Plant Physiology*, 142 (2): 492 - 508.
- Xu J, Li Y, Wang Y, Liu H X, Lei L, Yang H L, Liu G Q, Ren D T. 2008. Activation of MAPK kinase 9 induces ethylene and camalexin biosynthesis and enhances sensitivity to salt stress in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 283 (40): 26996 - 27006.
- Yamamoto S, Suzuki K, Shinshi H. 1999. Elicitor-responsive, ethylene-independent activation of GCC box-mediated transcription that is regulated by both protein phosphorylation and dephosphorylation in cultured tobacco cells. *Plant Journal*, 20 (5): 571 - 579.
- Yang S F, Hoffman N E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher-plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 35: 155 - 189.
- Yin X R, Shi Y N, Min T, Luo Z R, Yao Y C, Xu Q, Ferguson I, Chen K S. 2012. Expression of ethylene response genes during persimmon fruit astringency removal. *Planta*, 235 (5): 895 - 906.
- Yin Xue-ren, Zhang Bo, Li Xian, Chen Kun-song. 2009. Ethylene signal transduction during fruit ripening and senescence. *Acta Horticulturae Sinica*, 36 (1): 133 - 140. (in Chinese)
- 殷学仁, 张波, 李鲜, 陈昆松. 2009. 乙烯信号转导与果实成熟衰老的研究进展. *园艺学报*, 36 (1): 133 - 140.
- Yoo S D, Cho Y H, Tena G, Xiong Y, Sheen J. 2008. Dual control of nuclear EIN3 by bifurcate MAPK cascades in C₂H₄ signalling. *Nature*, 451 (7180): 789 - U781.
- Zhang Hong-xing, Zhu Ben-zhong, Zhang Wen, Xie Yuan-hong, Li Xin, Luo Yun-bo. 2008. Preparation and appliance of tomato ethylene signal transcription factor Anti-LeERF1 polyclonal antibody. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 8 (1): 55 - 59. (in Chinese)
- 张红星, 朱本忠, 张文, 谢远宏, 李欣, 罗云波. 2008. 番茄乙烯信号转录因子 LeERF1 多克隆抗体制备及应用. *中国食品学报*, 8 (1): 55 - 59.
- Zhao Q, Guo H W. 2011. Paradigms and paradox in the ethylene signaling pathway and interaction network. *Molecular Plant*, 4 (4): 626 - 634.
- Zhao X C, Qu X, Mathews D E, Schaller G E. 2002. Effect of ethylene pathway mutations upon expression of the ethylene receptor ETR1 from *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130 (4): 1983 - 1991.
- Zhong S L, Lin Z F, Grierson D. 2008. Tomato ethylene receptor-CTR interactions: Visualization of NEVER-RIPE interactions with multiple CTRs at the endoplasmic reticulum. *Journal of Experimental Botany*, 59 (4): 965 - 972.
- Zhou J M, Tang X Y, Martin G B. 1997. The Pto kinase conferring resistance to tomato bacterial speck disease interacts with proteins that bind a cis-element of pathogenesis-related genes. *Embo Journal*, 16 (11): 3207 - 3218.
- Zhou X, Liu Q, Xie F, Wen C K. 2007. RTE1 is a golgi-associated and ETR1-dependent negative regulator of ethylene responses. *Plant Physiology*, 145 (1): 75 - 86.
- Zou A L, Zhang W J, Pan Q Y, Zhu S M, Yin J J, Tian R N, Gu H W, Wang X M, Qi J L, Yang Y H. 2011. Cloning, characterization, and expression of LeEIL-1, an *Arabidopsis* EIN3 homolog, in *Lithospermum erythrorhizon*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 106 (1): 71 - 79.