

中华猕猴桃品种魁蜜和红心乙烯生成潜力及 ACC 合成酶和氧化酶基因表达差异

蒋迎春 余武安 译

(湖北省农科院果茶研究所)

猕猴桃乙烯的生物合成经过了甲硫酰胺转变成 ACC 的生物反应过程。猕猴桃是一种呼吸跃变型果树, 乙烯的产生伴随着呼吸强度的增强。然而猕猴桃果实成熟过程似乎与其它典型的呼吸跃变型果实有所不同, 采收后, 除非用大量的外源乙烯催化, 猕猴桃不容易自我催熟产生乙烯。近年来从 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的分子水平上对猕猴桃的乙烯生物合成作了大量的研究。已克隆出这两种酶的 cDNA, 也对这两种酶的基因表达进行了研究。近年来, 日本已引种了中华猕猴桃, 然而有关中华猕猴桃的乙烯生成特点还没有进行过研究。在本试验中, 我们研究了采收后的中华猕猴桃果实对外源乙烯的敏感性及乙烯的自我催化诱导作用。魁蜜品种对外源乙烯非常敏感, 而红心则相反。我们也测试了二者的 ACC 含量。而且, 为了弄清品种间乙烯产生存在差异的原因, 我们从经乙烯处理的魁蜜和红心两品种的果实组织中提取了总 RNA, 用 Northern 杂交法分析了 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的基因表达水平。为了进一步了解乙烯生物合成中的限制途径, 我们研究了魁蜜品种果实的乙烯生成动态, ACC 含量的变化动态以及基因表达动态。

1 材料与方法

1.1 材料 供试材料有中华猕猴桃中的红心、魁蜜、早鲜、金丰、Golden Yellow (译者认为可能是庐山香)、实生株系 A、B 以及美味猕猴桃中的海沃德。试验果取自于静冈县同一果园。果实适期采收后 2℃ 条件下冷藏, 试验前转入 20℃ 下存放 1d。

1.2 乙烯处理 为比较不同品种对外源乙烯的敏感性, 将果实置于 5.85L 干燥器中 15℃ 下用含 1000 (10^{-6}) 乙烯的空气按 0.2L/min 的流速通过干燥器处理果实 24h, 然后存放于 15℃ 条件下测定乙烯生成量。对于用其它指标测定的果实经乙烯处理后置于 20℃ 下存放。

1.3 乙烯生成测定 乙烯处理后的果实定期测定乙烯生成。把单个果实置于 230ml 的空气密封罐中 15℃ 下存放 1h, 用皮下注射器从罐中取顶部气体 1ml, 注入气相色谱仪中测定乙烯含量, 此色谱仪装有火焰电离检测器和一个在 70℃ 下保存的活性铝色谱柱。

1.4 ACC 的提取和测定 取 1g 中果皮组织, 在 -80℃ 下冰冻, 加 10ml 80% 乙醇研成匀浆, 匀浆液于 40℃ 下 8000 转/min 离心 20min, 上清液于 45℃ 下用旋转蒸发器进行真空干燥。残留物加 5ml 蒸馏水混匀, 取 0.5ml 样液按 Lizada 和 Yang (1979) 方法测定 ACC 含量。

1.5 总 RNA 的提取 从乙烯生成量测定后的果实中取中果皮组织立即置于 -80℃ 液氮中存放用于 RNA 的提取, 按 Ikoma 等 (1996) 的方法提取总 RNA。

1.6 探针 DNA 的标记 KWACCI (编码为 ACC 合成酶的 cDNA) 或 KWACCOX1 (编码为 ACC 氧化酶的 cDNA) 附合到质粒上用限制性内切酶 ECORI 进行切割, 根据商家提供的 DIG DNA 的标记和检测方法对此含有 KWACCI 或 KWACCOX1 的 ECORI 片段嵌入 DIG (异羧酸巨地黄苷元) 而予以标记。

1.7 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因表达的 Northern 杂交分析 从经乙烯处理的红心和魁蜜的中果皮总 RNA 提取物中取 20 μ g 在含 1.2% 甲醛的琼脂凝胶上电泳分离, 用溴化乙锭染色, 把胶块固定于一层尼龙膜上, 在 80℃ 下烘干 2h, 将膜块浸于缓冲液中预杂交 4h, 缓冲液配方为 5 \times SSC, 7% SDS, 50% (V/V) 甲酰胺, 50mM 磷酸钠 (pH 7.0), 0.1% (W/V) N-甲基甘氨酸和 2% 阻断剂。杂交是在预杂交的缓冲液中加入 DIG 标记探针 40℃ 下保持一个晚上, 杂交后的膜块在 2 \times SSC, 0.1% SDS 的缓冲液中室温下洗涤 2 次, 每次 5min, 然后再置于 0.1 \times SSC, 0.1% SDS 缓冲液中 63℃ 下不断搅动, 每次 15min。在进行抗 DIG 磷酸酶与 DIG 标记探针进行免疫结合后, 经放射自显影。用 Hgpor ECL 胶片上检测信号。

2 结果

2.1 外源乙烯诱导后中华猕猴桃的乙烯生物合成特性 用乙烯反应性(产生乙烯的果实百分率)来描述外源乙烯诱导后的中华猕猴桃果实的乙烯合成特征。结果显示了中华猕猴桃品种和海沃德的乙烯反应性。乙烯反应性越高,表明该品种对外源乙烯敏感性越高。从试验中可以看出有5个中华猕猴桃品种比海沃德对外源乙烯更敏感,2个品种比海沃德的敏感性差。在上述8个品种中,朝鲜的敏感性最强,其次为魁蜜(特别是在处理后的早期);杂交株系A敏感性最差,其次为红心,二者均低于海沃德。为了进一步研究有关机制,我们选择在日本栽植较广的魁蜜代表乙烯高敏感品种,红心代表低敏感性品种。至于朝鲜和杂交株系A未作代表品种是因为朝鲜有裂果的生理缺陷,而杂交株系A在日本栽培尚少。我们进一步分析了经24h乙烯处理的魁蜜和红心的乙烯生成量,可以看出,魁蜜的乙烯生成量明显高于红心,而且乙烯产生高峰至少比红心提前一天。

2.2 二个品种乙烯产生高峰期的 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶的基因表达 用 Northern 杂交法来分析两种酶的基因表达, RNA 链来自于经乙烯处理后的魁蜜和红心, DNA 链则来自于海沃德的 cDNA 标记探针(KWACC1 或 KWKCCOX1)。魁蜜和红心在乙烯生成高峰期其乙烯的生成量和 ACC 含量存在明显的差异,魁蜜远远高于红心,同时经 Northern 杂交法检测,魁蜜果实中的 ACC 合成酶基因带谱能清晰地检测到,表明 ACC 合成酶能活跃地表达,而红心果实中的 ACC 合成酶基因表达不活跃。经与 KWACC1 的 Northern 杂交法检测,二个品种的 ACC 氧化酶基因都能活跃表达。

2.3 魁蜜乙烯生成动态及 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因的表达动态 我们分析了乙烯处理前后的魁蜜果实中的乙烯生成率和 ACC 含量,从二者的关系可以看出,在乙烯生成量达到高峰期之前,ACC 含量逐步提高,到乙烯高峰期之后的 96h, ACC 含量仍在升高。利用上述样品中提取的总 RNA,采取 Northern 杂交法分析了其 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因的表达过程,从中可以看出,ACC 氧化酶基因在乙烯处理后马上得以表达,到处理后 192h 仍很活跃。而 ACC 合成酶基因处理后并不能清晰地检测到,直到乙烯生成达到高峰期前后才能达到较高的转录水平,再往后其转录水平又逐步下降,而 ACC 合成酶的转录水平与乙烯生成率没有相关性。

3 讨论

为了达到催熟猕猴桃的目的,有必要了解猕猴桃果实对乙烯处理的反应性, Yao 等(1996)曾比较了不同产地的猕猴桃果实对乙烯的反应性,结果表明,不同生长地区的猕猴桃果实对乙烯处理的反应性明显不

同,并建议诱导那些低敏感性的猕猴桃果实应采取一些特殊的乙烯处理条件,提高乙烯处理浓度。本试验比较了不同中华猕猴桃品种以及海沃德对乙烯的敏感性,结果显示不同品种其敏感性不同。目前在日本栽培较广的两个中华猕猴桃品种魁蜜和红心,其中魁蜜比海沃德对乙烯更敏感,而红心敏感性比海沃德差。15℃下 100g/m³ 乙烯处理 24h,低敏感性的品种红心产生乙烯的果实比例不到 50%,我们认为为了催熟红心果实应采取更高的乙烯浓度。

为了弄清不同品种对乙烯的敏感性差异原因,我们研究了魁蜜和红心果实在乙烯产生高峰期 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因的表达,魁蜜的乙烯生成量高,ACC 含量高,ACC 合成酶基因表达活跃,相反,红心的乙烯产生量较低,ACC 含量也低,ACC 合成酶基因不易表达。魁蜜的 ACC 氧化酶基因的表达水平似乎略高于红心。这些结果表明魁蜜和红心果实乙烯的生成差异主要是由于 ACC 合成酶基因表达水平的差异所致。为了进一步弄清中华猕猴桃乙烯生成的限制过程,我们又研究了魁蜜的乙烯生物合成动态以及 ACC 合成酶和 ACC 氧化酶基因的表达过程,ACC 合成酶基因只有在乙烯产生高峰期才能活跃地表达,ACC 合成酶基因表达水平的变化趋势与乙烯的生成动态呈正相关关系,相反,ACC 氧化酶基因在外源乙烯处理后即能马上清晰地检测到,并维持较高的表达水平,ACC 氧化酶的表达水平与乙烯的生成没有明显的相关关系,因此,我们认为魁蜜果实的乙烯生成主要受 ACC 合成酶基因的控制。然而,在后期 ACC 含量仍处于上升的趋势,而乙烯的生成反而降低,关于这种现象的解释,还有必要测定 ACC 氧化酶活性。

猕猴桃 ACC 合成酶及 ACC 氧化酶的基因表达特征与其它亚热带果树的表达特征相似。西红柿的 ACC 合成酶基因表达水平在成熟过程中逐步提高(Rottmann 等, 1991),开始成熟的青西红柿中检测不到 ACC 合成酶的转录,随着成熟度的增加,ACC 合成酶转录水平迅速增加,果实一旦变红,其转录水平达到高峰。外源乙烯处理促进了西红柿的成熟过程,诱导了 ACC 合成酶的转录和表达(Rottmann 等 1991)。西红柿在青果阶段,能检测到很低的 ACC 氧化酶基因表达水平,随着果实的成熟,其表达水平不断提高,到橙色阶段达到高峰期(Barry 等, 1996)。Yamamoto 等(1995)研究西瓜果实时发现西瓜的中果皮和胎座组织的 ACC 合成酶基因转录水平的提高早于 ACC 氧化酶基因。在我们的研究中,猕猴桃的 ACC 氧化酶基因表达先于 ACC 合成酶,由此可推测,对乙烯敏感性较差的猕猴桃自我催熟产生乙烯是由于 ACC 合成酶基因的转录延迟表达的缘故。综上所述,我们认为猕猴桃不同品种内源乙烯产生的差异主要是由于 ACC 合成酶基因表达水平不同所致。(邮编 430209)