

果实成熟过程中细胞壁多糖的变化

程杰山¹, 沈火林¹, 朱鑫¹, 杨辉¹, 于岩², 井玉芳¹

(1. 中国农业大学农学与生物技术学院蔬菜系, 北京 100094; 2. 中国农业大学烟台校区农学系, 烟台 264002)

摘要:综述重点讨论果实组织中多聚醛酸和木葡聚糖的降解对果实软化可能的作用以及这些多聚物降解的调节机制。许多果实在成熟过程中都因果实软化而使组织硬度降低, 由于细胞壁中胶层的降解, 果实黏度下降。在细胞壁多聚物中, 果胶多糖, 特别是多聚醛酸, 是中胶层的主要组成成分。果实组织硬度的降低与果胶多聚醛酸的降解之间的关系有很多相关报道。除了果胶降解, 木葡聚糖的降解在一些果实软化的初期也有发生。根据这些发现推测多聚醛酸和木葡聚糖在果实软化过程中是协同作用的, 木葡聚糖的降解可能出现在软化初期, 而多聚醛酸的降解在果实软化的后期发生。

关键词: 细胞壁; 多糖降解; 果实多聚醛酸; 木葡聚糖

中图分类号: Q945.6⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2006)05-0070-03

果实成熟常被看作是果实老化的开始, 实际上, 果实成熟是一个非常复杂的、受遗传基因调控的、各种组织器官变化高度协调的过程。虽然其确切的机制仍不清楚, 但许多研究表明果实成熟软化与细胞壁结构的变化及多糖(果胶、纤维素、半纤维素)的降解密切相关, 果实软化时在细胞壁中发生的最显著的变化是果胶物质溶液化, 同时伴随着细胞壁中胶层的溶解和初生壁的破坏, 在此过程中, 细胞壁总的组分也许变化不大, 但细胞壁内多糖微细结构的改变在许多果实中得到了证实, 例如分子的数目、可溶性、多糖侧链的取代和修饰等。这种变化是通过以一种可控的方式, 经由一系列相关酶的作用、进行一系列有序调节而实现的。在各种各样的生理生化物质转化如色素合成、挥发成分的产生等过程中, 组织发生软化都是果实成熟过程中最典型的特征之一。

一般情况下, 果实细胞壁含有大量果胶, 果胶也是中胶层的主要组成成分, 因而对于细胞粘连起重要作用。果胶的降解特别是多聚醛酸的降解, 能造成细胞粘度下降, 继而使组织强度降低。多聚醛酸的降解与果实软化之间的关系在许多果实中都有广泛的报道。另外, 最近采用分子遗传的方法, 如转基因植株研究表明多聚醛酸的降解对番茄果实软化的作用并不明显。果实细胞壁还有大量木葡聚糖。在许多果实如番茄、鳄梨、甜瓜和猕猴桃等软化的早期都观测到了木葡聚糖的降解, 这些发现使人们猜测细胞壁其他物质的降解对果实软化也起作用, 有可能多聚醛酸和其他成分如木葡聚糖的协同降解造成了果实的最终软化。

1 木葡聚糖

在双子叶植物中, 木葡聚糖是最主要的半纤维素多糖之一, 占原生细胞壁成分的 20%~25%。一般情况下, 木葡聚糖通过氢键附着在纤维素微纤丝上, 在相邻微纤丝之间交叉排列。报道的木葡聚糖在细胞壁中的分子量在 500~1 500 kDa 之间, 估计木葡聚糖分子长度约 400~600 nm^[1], 其长度比相邻纤维素微纤丝之间的距离 10~15 nm 长很多^[2], 与纤维素分子 250~1 000 nm 相当, 因而, 纤维素—木葡聚

糖网络结构可能形成了细胞壁的机械支撑力。观察发现在赤豆的上胚轴木葡聚糖分子量的增加与细胞壁机械强度的增加有密切关系^[8], 木葡聚糖的分子量比对照增加或减少 20%~40%, 表明木葡聚糖分子量的变化对细胞壁机械张力的调节起一定的作用。

1.1 木葡聚糖在成熟果实中的降解

在果实组织中, 木葡聚糖占番茄果皮组织细胞壁组成成分的 20%~30%, 鳄梨果皮细胞壁成分的 5%~10%^[4], 葡萄果皮细胞壁成分的 10%^[5], 甜瓜果实细胞壁成分的 20%~25%^[6], 柿子果实细胞壁成分的 7%^[7]。

木葡聚糖在未成熟果实中分子量较高(几百到 1 000 kDa), 与茎干组织中相似, 说明在果实细胞壁中, 高分子量的木葡聚糖分子是一个重要的组成成分。

在果实组织中木葡聚糖的降解, 应用胁迫相关的方法, Sakurai 和 Nevins 发现成熟番茄果实组织与绿熟果相比比较松软, 可能是由于细胞壁多聚物降解造成组织粘度和弹性下降而引起。从绿熟果到红熟果, 木葡聚糖减少 30%。另外, 半纤维素分子的分子量特别是木葡聚糖在红熟果的细胞壁中降低 50%, 而溶于 EDTA 的果胶分子的分子量与绿熟果相似。Madachlan 和 Brady 也发现在番茄果实软化早期木葡聚糖的分子量降低并伴随着果实硬度的降低, 虽然木葡聚糖在软化过程中总量保持恒定。

在番茄果实成熟抑制突变体 rin 中, 软化、多聚醛酸降解和乙烯合成都受到了不同程度的抑制, 并且 rin 果实的 PG 酶活性不到正常果实的 1%, 低的 PG 酶活性可能导致多聚醛酸降解受到抑制从而阻碍果实软化, 然而, 通过 PG 基因导入使 rin 的 PG 酶活性达到正常植株的水平, 使多聚醛酸大量降解或溶解后, 果实软化仍然受到抑制, 这一结果表明在 rin 果实中, 高水平的 PG 酶活性与多聚醛酸的大量降解并不足以造成果实的软化, 在 rin 果实中, 木葡聚糖的含量与分子量在成熟过程中没有变化, 而在正常果实番茄品种中, 随着果实成熟, 木葡聚糖大量减少^[8], rin 果实的硬度在成熟过程中仅有轻微减少, 因而, 可能是有限的木葡聚糖的降解起到了抑制组织软化的作用。

甜瓜果实成熟非常迅速,在甜瓜果实细胞壁中半纤维素多糖的解聚在整个果实成熟过程中一直发生,在软化开始阶段紧密结合的木葡聚糖开始降解而多聚醛酸的降解则发生在软化稍晚的阶段^[9]。

鳄梨果实成熟过程中软化也很剧烈,果实软化早期溶于强碱 4M NaOH 的木葡聚糖的分子量急剧下降,另外,含量也有所下降^[9]。

柿子果实中,快速软化阶段其木葡聚糖的分子量和含量分别是未成熟果实的 30% 和 70%^[6];猕猴桃果实中也观测到木葡聚糖的解聚^[10]。

这些观测清楚表明,木葡聚糖在细胞壁中的降解与果实质地改变具有密切联系。在果实软化早期木葡聚糖分子断裂可能部分打破了纤维素—木葡聚糖网络,从而导致果实组织细胞壁硬度的降低。另外,该网络结构的部分断裂降低了细胞壁结构的整体性,增加了壁间空隙,加快了细胞壁中水解酶的扩散。研究表明,用赤霉素处理茎组织细胞壁能刺激木葡聚糖降解增加细胞壁孔隙的大小^[11]。由于在成熟果实中,木葡聚糖的降解常常伴随着多聚醛酸的降解,可能木葡聚糖的降解通过增加水解酶如 PG 等的移动能力从而促进多聚醛酸的降解。

1.2 木葡聚糖在成熟果实中的降解活性

一直以来人们认为木葡聚糖分子的降解是细胞壁水解酶作用的结果。在番茄果实成熟过程中, β -1,4-葡聚糖酶(Cx-纤维素酶)活性增加。番茄果实至少含有三种类型的 β -1,4-葡聚糖酶能够水解木葡聚糖。相反,从成熟鳄梨果实中提纯的 Cx-纤维素酶并不促进木葡聚糖的降解而除去 Cx-纤维素酶的蛋白碎片能使木葡聚糖降解^[9]。这一结果表明在鳄梨果实中 Cx-纤维素酶与成熟相关的木葡聚糖降解并不相关。

在最近的半纤维素代谢研究中,木葡聚糖内切转糖基酶受到人们的关注^[12]。该酶的转糖基活性已经被确认并被定义为木葡聚糖内切转糖基酶(XET)。具有 XET 活性的蛋白从赤豆的茎中得到了提纯^[13]。从赤豆茎^[14]中和旱金莲种子中提纯的木葡聚糖内切水解酶既具有水解酶的活性又具有转糖基活性,因而 XETs 可以利用木葡聚糖寡糖和水作为受体。并且木葡聚糖寡糖能够刺激 XETs 的活性^[14],因而,有人认为 XETs 能使木葡聚糖解聚。番茄果实含有一种能被木葡聚糖寡糖大量激活的木葡聚糖酶,并且在果实软化的早期其活性最高,随着果实老化逐渐降低^[8]。而且,木葡聚糖降解的发生与木葡聚糖酶最高活性的时期相吻合。因此, XETs 很可能负责果实组织中的木葡聚糖降解。在柿子果实软化过程中 XET 具有较高活性^[9]。在猕猴桃果实中, XET 在果实软化的整个过程中都在增加^[13],并且其活性与木葡聚糖的解聚相关^[10]。从成熟的猕猴桃果实中也提纯出了 XET,并且该酶能够在没有木葡聚糖寡糖存在的情况下水解高分子量的猕猴桃木葡聚糖^[10]。在 pH 5.5~5.8 时该酶具有最大活性。猕猴桃 XET 的分子量 34 kDa^[15]与赤豆茎中 XET 的分子量 33 kDa^[12]以及绿色番茄小果中的 XET 分子量 34 kDa(De Silva et al. 1994)相当。另外,猕猴桃 XET 中的氨基酸与赤豆茎和绿色番茄小果中的 XET 具有高度同一性,尽管番茄和赤豆中的 XETs 没有水解活性^[16]。很可能 XET 既有水解活性又有

转糖基活性在成熟果实木葡聚糖降解过程中扮演了关键角色。

2 多聚醛酸

多聚醛酸由 α -(1,4)-半乳糖醛酸(同型半乳糖)和含有鼠李糖残基的半乳糖(鼠李糖半乳糖)组成。鼠李糖半乳糖通常含有富含阿拉伯糖和半乳糖的侧链(阿拉伯半乳糖)。多聚醛酸中的半乳糖醛酸残基通常部分甲基化。多聚醛酸是果实细胞壁的主要组成成分。

2.1 成熟果实中多聚醛酸的降解

在许多果实的成熟过程中都观测到了多聚醛酸的大量降解和溶解。在成熟的鳄梨果实中,细胞壁中超过 90% 的多聚醛酸可以溶于水或 CDTA 溶液,并且其分子量与未成熟硬果相比非常小。在果实成熟过程中水溶性多聚醛酸的增加伴随着水不溶性多聚醛酸的减少,表明在果实成熟期间溶解的多聚醛酸来自与细胞壁紧密结合的多聚物或者可能与半纤维素相连接的多聚物。同样,番茄、猕猴桃、黑莓、柿子、棕榈和草莓果实成熟过程中水溶性多聚醛酸都大量增加。多聚醛酸的降解和水溶性的增加通常与果实组织硬度的降低密切相关。因而,认为多聚醛酸的降解参与了果实软化的进程。多聚半乳糖醛酸酶 PG 能够水解 α -(1,4)-半乳糖链的亲水末端。许多果实成熟过程中 PG 活性都有增加并且多聚醛酸的降解与 PG 活性的增加具有相关关系。观察表明离体细胞壁的降解与体内发生的多聚醛酸的降解非常相似,表明了 PG 对成熟果实中多聚醛酸的降解起了中心作用。

然而,利用反义技术抑制 PG mRNA 的积累,降低酶活性到正常果实的 1%,虽然抑制了溶解于螯合剂的多聚醛酸的降解,但并不阻止多聚醛酸溶解性的增加和果实的软化。这一结果表明单单多聚醛酸的降解并不足以诱导果实软化。然而,转基因番茄的采后性状得到了很大改善,贮存时间、固形物含量和粘度都有所增加。另外,从完熟到过熟期间转基因果实比正常果实略硬^[17]。这些结果表明在果实成熟后期,PG 调节果实多聚醛酸降解对减少果实整体性和硬度起了关键作用。

在番茄 rin 突变体中,通过转基因的办法将低的 PG 活性恢复到正常水平,引起多聚醛酸大量溶解与解聚,但是并不促进果实软化。如前所述, rin 果实成熟过程中木葡聚糖的降解被显著抑制,因而,有限的木葡聚糖降解可能阻碍了果实的软化。

2.2 成熟果实中多聚醛酸降解的调控

PG 活性的增加可以通过增加 PG 蛋白的水平和 PG mRNA 的积累实现。在番茄中,果实成熟时 PG mRNA 的积累达到了很高的水平,大约占总 mRNA 的 2%。可提取的 PG 活性在成熟的番茄和鳄梨果实中增加了大约 10 倍^[9]。一般来讲,PG 活性与多聚醛酸的降解具有相关关系,表明 PG 蛋白的重新合成诱导参与了多聚醛酸降解的激活。

除了就 PG 蛋白的水平,许多其他因素,如细胞壁环境与调节因子等似乎也参与了 PG 酶活性的调节。在细胞壁环境中, pH 值和离子浓度对番茄 PG 活性影响很大^[18]。番茄 PG 酶在 pH 6.0 以上和体外低离子浓度的条件下几乎没有活性,但降低 pH 到 4.5 以下和增加离子强度能大大增加其活性^[18]。在番茄果实中,绿熟果质外体的 pH 为 6.7,但是完熟

果降到 4.4 而且离子强度特别是钾离子浓度在此期间增加 3 倍^[19]。由于从完熟到过熟期间番茄果实体内观测到了大量的多聚醛酸解聚,因此在细胞质外体中较低的 pH 环境和钾离子浓度的增加可能刺激已经存在于细胞壁中的 PG 酶的活性从而引起多聚醛酸降解。

在鳄梨果实中,提纯的 PG 在离体条件下能大大促进多聚醛酸从未成熟果实细胞壁的解离,伴随着分子量的显著降低^[20],而在完全成熟的果实中,虽然 PG 也能使多聚醛酸解离但是具有相对较高的分子量,重复用 PG 处理也不能促进多聚醛酸的进一步解聚。相反,当解离下来的多聚醛酸用果胶甲酯酶(PME)处理,多聚醛酸的分子量大大降低。这些观察表明 PG 催化多聚醛酸的降解要以 PME 的部分去甲酯化作用为前提。因而,多聚醛酸的甲酯化程度可能是调节多聚醛酸降解的一个调节因素,PG 与 PME 的协同作用参与了鳄梨果实中多聚醛酸的降解过程。在绿熟期番茄果实中也有类似的报道,用 PME 处理细胞壁后再用 PG 处理会增加多聚醛酸的解离。

果实细胞壁含有大量半乳糖和阿拉伯糖,这些核糖是阿拉伯半乳糖的组成成分,通常附着在鼠李糖聚半乳糖醛酸上面。在许多果实的成熟过程中都伴有半乳糖和阿拉伯糖数量的减少。甜瓜果实成熟过程中多聚醛酸的溶解和半乳糖的丧失具有短暂的相关时期^[9]。

另外, β -半乳糖苷酶和 β -半乳糖酶具有改变多聚醛酸分子量的能力。因而,在果实成熟过程中,除去阿拉伯半乳糖含有半乳糖的侧链,可能更加易于多聚醛酸的降解。

3 结束语

在果实成熟过程中木葡聚糖和多聚醛酸在组织中进行是非常活跃的转化,两种多聚物的降解似乎都参与了细胞壁整体性的降低,从而降低了组织硬度。果实组织中细胞壁多糖降解的调节是由许多因子共同作用的,例如水解酶的含量和活性,水解酶与多糖多聚物的相互作用等。水解酶活性增加过程中还伴随着水解酶的重新诱导合成。另外,细胞壁环境,特别是 pH 值对水解酶活性具有很大的调节作用。细胞壁结构的整体性,胞间空隙的大小以及多聚物的修饰(增加和减少侧链或甲基化)都对水解酶活性和多糖对水解酶的敏感性起到了调节的作用。

总之,果实组织中细胞壁多糖降解的变化非常迅速。综合果实成熟过程中细胞壁多糖降解的有关信息,将为我们进一步了解植物细胞壁降解的机理和各种调控因子提供理论基础。

参考文献:

- [1] Vincken, J.-P., York, W.S., Beldman, G. and Voragen, A. G. J. Two general branching patterns of xyloglucan, XXXG and XXGG. *Plant Physiol* 1997, 114: 9-13.
- [2] Fujino, T., Sone, Y., Mitsuishi, Y. and Itoh, T. Characterization of cross-links between cellulose microfibrils and their occurrence during elongation growth in pea epicotyl. *Plant Cell Physiol* 2000, 41: 486-494.
- [3] Miyamoto, K., Mitani, Y., Soga, K. Et al. Modification of chemical properties of cell wall polysaccharides in the inner tissues by white light in relation to the decrease in tissue tension in *Pisum sativum*

epicotyls. *Physiol. Plant*, 1997, 101: 38-44.

- [4] Sakurai, N. and Nevins, D. J. Relationship between fruit softening and wall polysaccharides in avocado (*Persea americana* Mill) mesocarp tissues. *Plant Cell Physiol* 1997, 38: 603-610.
- [5] Nunan, K. J., Sims, I. M., et al. Changes in cell wall composition during ripening of grape berries. *Plant Physiol* 1998, 118: 783-792.
- [6] Rose, J. K. C., Hadfield, K. A., et al. Temporal sequence of cell wall disassembly in rapidly ripening melon fruit. *Plant Physiol* 1998, 117: 345-361.
- [7] Cutillas-Llurda, A., Zorra, I. et al. Implication of persimmon fruit hemicellulose metabolism in the softening process. Importance of xyloglucan endotransglycosylase. *Physiol. Plant*, 1994, 91: 169-176.
- [8] MacLachlan, G. and Brady, C. Endo-1, 4-p-glucanase, xyloglucanase and xyloglucan endo-transglycosylase activities versus potential substrates in ripening tomatoes. *Plant Physiol* 1994, 105: 965-974.
- [9] O'Donoghue, E. M. and Huber, D. J. Modification of matrix polysaccharides during avocado (*Persea americana*) fruit ripening: an assessment of the role of Cx-cellulase. *Physiol. Plant* 1992, 86: 33-42.
- [10] MacRae, E. and Redgwell, R. J. Softening in kiwifruit Post-harvest. *News and Information*, 1992, 3: 49N-52N.
- [11] Hoson, T. Regulation of polysaccharide breakdown. *Phys.* 1993, 298: 365-370.
- [12] Fry, S. C., Smith, R. C. et al. Xyloglucan endotransglycosylase: a new wall-loosening enzyme activity from plants. *Biochem. J.* 1992, 282: 821-828.
- [13] Nishitani, K. and Tominaga, R. Endo-xyloglucan transferase, a novel class of glycosyltransferase that catalyzes transfer of a segment of xyloglucan molecule to another xyloglucan molecule. *J. Biol. Chem.* 1992, 267: 21058-21064.
- [14] Tabuchi, A., Kamisaka, S. and Hoson, T. Purification of xyloglucan hydrolase/endotransferase from cell walls of azuki bean epicotyls. *Plant Cell Physiol* 1997, 38: 653-658.
- [15] Redgwell, R. J. and Fry, S. C. Xyloglucan endotransglycosylase activity increases during kiwifruit (*Actinidia deliciosa*) ripening. Implications for fruit softening. *Plant Physiol* 1993, 103: 1399-1406.
- [16] Schröder, R., Atkinson, R. G. et al. Biochemical and molecular characterization of xyloglucan endotransglycosylase from ripe kiwifruit. *Planta* 1998, 204: 242-251.
- [17] Brummell, D. A. and Lahavitch, J. M. Effect of antisense suppression of endopolygalacturonase activity on polyuronide molecular weight in ripening tomato fruit and in fruit homogenates. *Plant Physiol* 1997, 115: 717-725.
- [18] Chun, J.-P. and Huber, D. J. Polygalacturonase-mediated solubilization and depolymerization of pectic polymers in tomato fruit cell walls. Regulation by pH and ionic conditions. *Plant Physiol* 1998, 117: 1293-1299.
- [19] Almeida, D. P. F. and Huber, D. J. Apoplastic pH and inorganic ion levels in tomato fruit: A potential means for regulation of cell wall metabolism during ripening. *Physiol. Plant*, 1999, 105: 506-512.
- [20] Wakabayashi, K., Chun, J.-P. Extensive solubilization and depolymerization of cell wall polysaccharides during avocado (*Persea americana*) ripening involves concerted action of polygalacturonase and pectinmethylesterase. *Physiol. Plant*, 2000, 108: 345-352.