

园艺作物器官脱落相关酶的研究进展

齐明芳¹, 李天来¹, 许涛¹, 曹霞²

(1. 沈阳农业大学园艺学院, 辽宁省设施园艺重点实验室, 110164; 2. 河北科技师范学院园艺园林系, 秦皇岛 066600)

摘要: 植物器官脱落是植物以一种可控方式将其某一器官与母体分离的进程, 是多种变化协同作用的结果, 而起直接作用的是一些关键酶的作用。现综述在植物器官脱落过程中相关酶—纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶、果胶(甲)酯酶、过氧化物酶、苯丙氨酸解氨酶、几丁质酶等酶在脱落过程中的作用, 为进一步认识脱落过程及实现对脱落的调控具有重要意义。

关键词: 作物器官; 脱落; 纤维素酶; 过氧化物酶

中图分类号: Q 944.5; Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)06-0062-04

植物器官脱落是植物以一种可控方式将其某一器官与母体分离的进程, 通常发生在植物一个特定的区域—离区。器官脱落主要分为三种类型: 一是由于衰老或成熟引起的脱落叫正常脱落, 比如果实和种子的成熟脱落; 二是因植物自身的生理活动而引起的生理脱落, 例如营养生长与生殖生长的竞争, 源与库不协调等引起的脱落; 三是因逆境条件(水涝、干旱、高温、虫害等)引起的胁迫脱落。植物器官的脱落对于植物种的保存具有重要的生物学意义, 然而异常脱落也常常给农业生产带来重大损失, 引起人们的关注。

近年来园艺植物脱落过程成为植物激素研究与器官发育研究中的一个热点, 研究比较多的是关于花、果实与叶片的脱落。脱落受植物本身的遗传因素与外界环境因素的控制, 是包括细胞结构、代谢调控及基因表达的多种变化协同作用的结果^[1], 而起直接作用的是一些关键酶的作用, 目前已证明与脱落相关的酶类主要有纤维素酶(Cellulase, EG)、多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)、果胶(甲)酯酶(Pectinmethylesterase, PME), 此外过氧化物酶(Peroxidase, POD)、苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)、几丁质酶(Chitinase)等与脱落也有一定关系。现对与脱落相关酶在脱落进程中的作用研究进展作一简要概述。

1 纤维素酶(Cellulase, EG)

不同植物或同种植物的不同器官的细胞壁组成的基本成分大致相同, 为纤维素微丝与半纤维素、几丁质

与蛋白质等的复合体, 纤维素酶与半纤维素酶在细胞壁的酶解进程中可能起重要作用。纤维素酶是多酶组分的一个复杂酶系, 在细菌与真菌中研究较多, 根据功能的不同分为三类: 葡聚糖内切酶(EG)、葡聚糖外切酶(CBH), β -葡萄糖苷酶(BG), 而与植物器官脱落相关的纤维素酶多为 β -葡萄糖苷酶。

早期的研究发现乙烯诱导的内切 β -1,4-葡萄糖苷酶的活性与脱落正相关, Lewis 与 Varner^[2] (1970)分离了与菜豆叶片脱落有关的两种纤维素酶, 它们的等电点分别为 4.5 和 9.5, 等电点 9.5 的纤维素酶只在菜豆叶柄脱落过程中出现, 而且只在菜豆叶柄离区附近微管组织的几层细胞中表达葡聚糖内切酶功能, 并且等电点 9.5 的纤维素酶与等电点 4.5 的纤维素酶不亲和, 认为其只有在乙烯诱导的离区脱落进程中表达。以后又相继从梨树^[3] (1992)、柑桔^[4] (1998)、羽扇豆^[5] (2001)等植物中分离出与脱落相关的纤维素酶, 这些酶的分子量与等电点不尽相同, 表明在不同的植物或同一植物不同的器官的离区组织中可能有多种纤维素酶。

关于纤维素酶在离区的定位, Sexton^[6] (1980)纯化了菜豆脱落过程中起主要作用的等电点 9.5 的纤维素酶, 并制备了免疫抗体, 利用该抗体对等电点为 9.5 的纤维素酶在菜豆叶片离区进行了酶免疫定位, 发现等电点为 9.5 的纤维素酶定位于离区皮层的 2~3 层细胞。Tucker 等^[7] (1991)在菜豆外植体的离区皮层中发现有内切 β -1,4-葡萄糖苷酶的 mRNA, 表明离区的皮层细胞与中柱可以合成等电点为 9.5 的内切 β -1,4-葡萄糖苷酶。等电点 9.5 的纤维素酶空间分布表明, 它开始在分裂部位上方维管束的柔软细胞中积累, 然后穿过破裂面的层细胞。Thompson 与 Osborne^[8] (1994)认为维管束细胞负责为细胞分裂与脱落位点皮层细胞产生等电点 9.5 纤维素酶提供必要的分子信号。他们推断至少应该

第一作者简介: 齐明芳(1976-), 博士研究生, 讲师, 主要从事设施蔬菜栽培与生理研究, E-mail: qimf@syau.edu.cn.

通讯作者: 李天来.

基金项目: 国家自然科学基金(30571265); 高等学校博士科点专项科研基金(20040157004)。

收稿日期: 2007-01-22

存在两种类型乙烯的靶细胞,一种位于中柱,这些细胞感应乙烯后,产生信号分子,离区皮层细胞接收这种信号分子后合成内切- β -1,4-葡萄糖苷酶,而后细胞发生分裂。

脱落相关纤维素酶基因的研究也取得了重大进展, Tucker 等^[9] (1988)首先克隆了菜豆叶片脱落进程中的纤维素酶基因,与菜豆叶片脱落进程中只有一种纤维素酶基因占优势不同的是,番茄中已分离到至少6种与花柄脱落相关的纤维素酶基因(Cel1—Cel6),这6种纤维素酶基因含有一个保守序列。De1 Campillo^[10] (1996)认为这些纤维素酶在脱落过程中的相对重要性受脱落的生理条件所决定。另外, Trainotti 等^[11] (1998)从辣椒中明确三种纤维素酶基因: cCel1、cCel2、cCel5。Cel1、Cel2与Cel5都在花柄离区中表达,但在离区的近轴端与远轴端表达不同, Cel1在离区与远轴端表达强烈, Cel2与Cel5主要在离区表达,近轴端表达水平很低,而远轴端的刚能检测到表达。纤维素酶的启动子序列分析结果表明,在菜豆离区由乙烯诱导的纤维素酶启动子序列与大豆离区的纤维素酶启动子序列具有高度的保守性,一个2.9-kb BAC保留了纤维素酶的组织特异性及激素调控元件^[12]。Tucker 等^[13] (2002)进一步研究表明,菜豆离区特殊纤维素酶BAC启动子近端150bp含有积极与消极的顺式作用元件,而且由生长素与乙烯调控基因表达可能部分相互独立,三个TGA-type bZIP转录子有可能参与基因离区组织特异性表达。

纤维素酶的转基因的研究进一步证明了纤维素酶在脱落中的作用。Lashbrook 等^[14] (1998)与 Brummell 等^[15] (1999)分别用花椰菜花叶病毒的35S启动子将Cel1与Cel2的反义基因转化番茄的结果表明,转Cel1反义基因植株离区的Cel1表达仅为未经转Cel1反义基因植株的5%~7%,脱落率也降低三分之二;转Cel2反义基因植株,离区的Cel2 mRNA抑制了80%,离区的折断强度在两个转化体系中分别增加27%和46%,但转基因植物果实的软化并没能受到影响。以上结果说明Cel1、Cel2 mRNA的基因产物参与离区细胞分裂过程中细胞壁的降解,但参与离区脱落的纤维素酶与果实软化进程中的纤维素酶并不完全一致。

2 多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)

多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase)属果胶酶的一种,能够水解植物细胞壁及胞间层的果胶物质。按作用方式分为内切多聚半乳糖醛酸酶(endo-PG, EC 3.2.1.15)和外切多聚半乳糖醛酸酶(exo-PG, EC 3.2.1.67)。外切多聚半乳糖醛酸酶水解果胶分子的非还原端产生半乳糖醛酸,但是它们不能作用于果胶分子中的鼠李糖残基和被酯化的糖醛酸;内切多聚半乳糖醛酸酶随机地

在不同部位水解切开 α -1,4-半乳糖糖苷键,断裂多聚半乳糖醛酸链。

在乙烯诱导梨果实脱落过程中,离区多聚半乳糖醛酸酶活性增强^[3]。Tucker 等^[16] (1984)对番茄 rin 与 Nr 两个突变体的研究表明,多聚半乳糖醛酸酶可能的确作用于花脱落。Riov 等^[17] (1974)研究了柑橘叶片外植体中的多聚半乳糖醛酸酶,认为此多聚半乳糖醛酸酶是水溶性外切酶,但目前与植物器官脱落相关的多聚半乳糖醛酸酶蛋白还没有被分离鉴定。但是 Robert 等^[18] (1989)报道,多聚半乳糖醛酸酶活性只限制在离区组织的远轴端。总体来说,多聚半乳糖醛酸酶的活性的升高与离区脱落进程中强度的降低相一致,并且位于细胞发生分离的部位。

多聚半乳糖醛酸酶活性不仅在番茄花柄离区显著增强,而且在离区脱落开始之前及脱落过程中均分离到多聚半乳糖醛酸酶基因,目前在番茄中已确定了7个多聚半乳糖醛酸酶基因,即: TAPG 1~TAPG 6与 TPG 7,其中 TAPG 1, TAPG 2, TAPG 4与 TAPG 5在乙烯诱导叶片与花柄脱落中表达。TAPG 1, TAPG 2, TAPG 4与 TAPG 5在乙烯诱导叶柄与果柄脱落的离区中表达^[19,22]。另外, Zinnia 等^[23] (2002)从乙烯诱导油菜离区中分离出一种多聚半乳糖醛酸酶基因(CAW 471); Burns 等^[24] (2000)从柑桔中分离出两种多聚半乳糖醛酸酶基因, CsPG 1与 CsPG 2, 两种基因在花、叶及果实离区中表达,而在营养及生殖组织中无表达。

从番茄叶柄与果柄中分离出的3种与脱落相关的多聚半乳糖醛酸酶克隆,即 TAPG 1, TAPG 2与 TAPG 4, 虽然它们相互在核苷酸序列上具有76%~93%的相似性,但它们与果实多聚半乳糖醛酸酶的相似性仅为38%~41%。这三种多聚半乳糖醛酸酶 mRNA 在果实、茎杆、完全开放花的花粉囊中均不表达,推断 TAPG 基因可能编码内切多聚半乳糖醛酸酶,因为其编码内切多聚半乳糖醛酸酶的 PFPG 基因具有较高的同源性(62%)。与番茄离区发现的纤维素酶基因不同的是,三种多聚半乳糖醛酸酶 mRNA 经乙烯处理后只有在离区及其远轴端表达,而近轴端却没有积累,乙烯处理6h后 TAPG 4迅速积累,并在处理的24h内保持稳定,而 TAPG 2在处理6h后也开始出现,但比 TAPG 4要低得多,以后逐渐增加,24h后与 TAPG 4基本相当, TAPG 1在处理12h后也开始出现,以后表达与 TAPG 2相似。Kalaitzis 等^[25] (1997)认为 TAPG 4是一种特殊的多聚半乳糖醛酸酶,它是最先表达的水解酶 mRNA,可能有信号传导的作用。

Hong 等^[21] (2000)分析了将 TAPG 1与 TAPG 4基因与 GUS 报告基因相连接并转化番茄植株,对其时空

表达进行了研究,在叶柄与果柄等的弱化离区组织都发现了 GUS 活性,并且 GUS 的活性被乙烯所促进,而被生长素所抑制。在对乙烯的感应过程中, TAPG 4 的表达明显早于 TAPG 1。发现 TAPG 1 上游 247bp 的启动子序列足以使基因在叶片与果柄离区中表达。

PG 除作为水解酶参予细胞壁的降解, Hong 等^[22] (2000)还认为多聚半乳糖醛酸酶在脱落信号系统中起重要作用,由其分解细胞壁产生的寡糖在诱导产生防御反应中起重要作用。

3 果胶(甲)酯酶(Pectinmethylesterase, PME)

果胶(甲)酯酶能使果胶中的甲酯水解,形成果胶酸,属另一种果胶酶,其生理意义可能在于为多聚半乳糖醛酸酶作用准备底物,对果胶物质的降解起辅助作用。许多研究表明果胶(甲)酯酶与果实的成熟有关,而在器官脱落方面有不同的说法。Yager^[29] (1960)的试验结果证明在烟草叶柄离区中果胶(甲)酯酶的活性较高,果胶(甲)酯酶能够延缓或阻止脱落。而 Ratner 等^[27] (1969)的试验结果发现在柑桔叶柄中没有发现脱落与果胶(甲)酯酶存在必然联系。但更多的研究证明果胶(甲)酯酶促进器官脱落。

Tabuchi 与 Arai^[28] (1999)对无离层番茄果实脱落过程中果胶(甲)酯酶进行了组织化学研究,发现在番茄果实绿熟期,在果实与花托的连接处无果胶(甲)酯酶活性,而在果实完熟期,果实即将脱落,在果实一侧的次生木质部中,果胶(甲)酯酶活性显著增强。但随着果实成熟进程,果胶(甲)酯酶的活性迅速降低,尤其是在离区的膨大细胞中。因此认为果胶(甲)酯酶通过水解作用改变了离区组织的化学结构,诱导并参加了加工番茄离区细胞壁与细胞膜的降解。

Burns 等^[29] (2000)从柑桔中分离出两种果胶(甲)酯酶基因 CsPME1 和 CsPME3, CsPME1 在组织中持续表达,而 CsPME3 在离区中由乙烯调控表达。在由乙烯诱导的柑桔果实脱落过程中两种基因都在离区中表达,尤其是 CsPME3 的表达更明显。

4 过氧化物酶(Peroxidase, POD)

过氧化物酶是植物呼吸作用中呼吸末端氧化酶之一,在植物器官脱落过程中过氧化物酶活性也有增强的报道^[30~32]。Poovaiah 与 Rasmussen^[33] (1973)对菜豆叶柄脱落进程中离区过氧化物酶活性及组织定位进行了研究,发现摘叶、乙烯利、乙烯处理都能提高叶柄过氧化物酶活性,尤其是在脱落进程中离区中已分离的细胞中活性更强。过氧化物酶同工酶电泳发现在脱落进程中,6条同工酶谱带中的第4与第5条带明显增加,而第6条带减弱,但总的酶活性增强。可以认为菜豆脱落进程中过氧化物酶活性的增强与增强离区形成过程中的呼

吸氧化进程,加速细胞衰老有关。

Wittenbach 与 Bukovac^[34] (1975)认为过氧化物酶通过参与生长素的氧化进程,降低离区生长素的水平,而间接促进脱落。Tabuchi 等^[35] (1999)在研究加工番茄离区的解剖学与细胞学时发现,在离区伤痕的表面明显有过氧化物酶活性,暗示过氧化物酶对脱落后的木质化进程有重要作用。

5 苯丙氨酸解氨酶(phenylalanine ammonia-lyase, PAL)

苯丙氨酸解氨酶,是苯丙氨酸代谢途径的关键酶,催化 L-苯丙氨酸解氨生成反式肉桂酸,反式肉桂酸是木质素、香豆酸、类黄酮等酚类物质的前体。苯丙氨酸解氨酶的活性与植物抗病性、伤害反应、冷害等多种逆境反应密切相关。在器官的脱落进程中,苯丙氨酸解氨酶对脱落断面的木质化有重要作用。

Kostenyuk 等^[36] (2002)从成熟桔子果柄离区的总 RNA 中发现两种编码特定 PAL 序列的克隆。用 CEPA (乙烯利, 2-氯乙基膦酸)与 CMN-P (5-氯-3-甲基-4-氢-吡唑)处理巴伦西亚桔的果柄(CEPA 为一种脱落的促进剂,而 CMN-P 只促进成熟柑桔脱落,而对未成熟果实及叶片无影响),结果发现,CEPA 与 CMN-P 分别在处理后 6.24h 发现在成熟桔子果柄中有苯丙氨酸解氨酶基因表达,并且一直持续到 72h。CEPA 处理 6h 也能诱导叶柄离区中苯丙氨酸解氨酶的表达,而 CMN-P 不能。AIP (2-aminoindan-2-phosphonic acid, 苯丙氨酸解氨酶抑制剂)处理降低了 CMN-P 在果柄离区诱导的苯丙氨酸解氨酶的活性,同时降低了果实的脱落。苯丙氨酸解氨酶转录后在未成熟的果实果柄中少量存在,但可以被 CMN-P 诱导,但不及 CEPA 诱导作用大。说明苯丙氨酸解氨酶的产物不仅对伤口复原及防御反应有重要作用,对苯丙氨酸解氨酶在离区的表达也有重要调控作用。

6 几丁质酶(Chitinase)

几丁质酶是一种重要的病原相关蛋白。几丁质酶 mRNA 在乙烯诱导菜豆叶柄脱落进程中表达^[37]。Campilo 等^[38] (1992)在鉴定乙烯诱导的菜豆叶片脱落过程中,离区蛋白中在等电点 9.5 纤维素酶出现之前,至少有 7 种蛋白在离区积累,其中有 6 种为病原相关蛋白,包括几丁质酶和 β -1, 3-葡聚糖酶。病原相关蛋白或者参与细胞分裂过程,或者保护植株免于病菌侵袭,这对于植物器官脱落后伤口的保护有重要作用。

另外,除了以上几种酶外,近年来发现的一种细胞壁蛋白—苹果菌素,在植物器官脱落的过程也起着重要作用。它作为一种控制细胞生长重要因子,它对细胞壁有一种独特的“疏松”作用,引起许多研究人员的注

意。目前许多研究认为它在植物细胞的生长、细胞壁解体、细胞分裂、花粉管的穿透、叶原基发生中都起到重要作用,已有专门的网站介绍有关苹果菌素的研究情况(<http://www.bio.psu.edu/expansins/>)。关于苹果菌素的研究详见 Cosgrove 等^[39](2002)的综述。Hyung-Taeg Cho 等^[40](2000)构建了一苹果菌素基因—AtEXP10的控制结构基因及其正义与反义基因转化拟南芥。结果发现叶柄的断裂可以通过调节 AtEXP10 基因的表达来加以改变。

7 总结

植物脱落过程存在着包括纤维素酶、多聚半乳糖醛酸酶等多种酶的不同作用,是多种酶协同作用的结果^[41],尽管人们对脱落过程中相关酶在生理化学与分子生物学方面作了大量的研究,但对于各种酶在脱落中的作用机制仍不是十分明了,今后应加强以下几个方面的研究。

分离鉴定在脱落过程中起主要作用的酶,研究不同酶的作用机制及协同作用。菜豆叶片脱落过程中的纤维素酶已得到分离纯化,并获得抗体,为纤维素酶在脱落中的作用研究起到重要推动作用,但其它植物脱落相关酶的分离纯化研究较少。不同植物器官脱落过程中起主要作用的酶并不一致,并且同一种酶具有不同的同工酶,其作用机制也不相同。通过分离提取脱落过程中特异的酶,研究其性质,进而研究酶在脱落过程中的合成、降解、运输、定位,确定不同酶的作用机制及协同作用。

目前对脱落调控的研究涉及了激素、光照、温度、湿度等方面,其中对于激素对脱落的调控研究比较深入外,其它研究比较肤浅,对调控机制还不十分清楚。近10年来,国外研究者利用分子生物学手段研究了器官脱落的基因转导,克隆了控制番茄花柄离区形成的JOINTLESS盒基因以及多个离区细胞壁降解酶基因,并从基因方面对酶的表达进行了调控,今后这方面仍然是脱落的研究重点。另外从生化方面研究对酶活性的调控也是一个很好的途径。

由于植物器官脱落与不脱落均是人们所需要的,对于一种植物的器官来说,在某一生长发育阶段需要器官不脱落,而在另外一个生长发育阶段需要器官脱落。深入了解植物器官脱落的机制,进而采用诱导因子的方法调控植物器官脱落酶系统的活性及基因表达在实际生产中具有重要意义。

参考文献

- [1] Jane E Taylor, Catherine A., Whitelaw. Signals in abscission[J]. New Phytol. 2001, 151: 323-339.
- [2] Lewis LN, Vamer JE. Synthesis of cellulase during abscission of *Phaseolus vulgaris* leaf explants[J]. Plant Physiol. 1970, 46: 194-199.

- [3] Bonghi CN, Rascio A, Ramina A et al. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach[J]. Plant Mol Biol. 1992, 20: 839-848.
- [4] Burns JK, Lewandowski DJ, Naim CJ et al. Endo-1, 4-beta-glucanase gene expression and cell wall hydrolase activities during abscission in Valencia orange[J]. Physiol plant. 1998, 102(2): 217-225.
- [5] Clements JG, Atkins CA. Characterization of a non-abscission mutant in *Lupinus angustifolius* L.; Physiological aspects[J]. Ann Bot. 2001, 88, (4): 629-635.
- [6] Sexton R, Durbin ML, Lewis LN et al. Use of cellulase antibodies to study leaf abscission[J]. Nature. 1980, 283: 873-874.
- [7] Tucker ML, Baird SL, Sexton R. Bean leaf abscission: tissue-specific accumulation of a cellulase mRNA[J]. Planta. 1991, 186: 52-57.
- [8] Thompson DS, Osborne DJ. A. Role for the stele in intertissue signaling in the initiation of abscission in bean leaves (*Phaseolus vulgaris* L.)[J]. Plant Physiol. 1994, 105: 341-347.
- [9] Tucker ML, Sexton R, Del Campillo E et al. (1988). Bean abscission cellulase: Characterization of a cDNA clone and regulation of gene expression by ethylene and auxin[J]. Plant Physiol. 1988, 88: 1257-1262.
- [10] Del Campillo E, Bennett AB. Pedicel break strength and cellulase gene expression during tomato flower abscission[J]. Plant Physiol. 1996, 111(1): 813-820.
- [11] Trainotti L, Ferrarese L, Casaduro G. Characterization of Cel3, a member of the pepper endo-beta-1, 4-glucanase multigene family[J]. Hereditas. 1998, 128(2): 121-126.
- [12] Koehler SM, Matters GM, Nath P, et al. The gene promoter for a bean abscission cellulase is ethylene-induced in transgenic tomato and shows high sequence conservation with a soybean abscission cellulase[J]. Plant Mol Biol. 1996, 31: 595-606.
- [13] Tucker ML, Whitelaw CA, Lysenko NN, et al. Functional analysis of regulatory elements in the gene promoter for an abscission-specific cellulase from bean and isolation, expression and binding affinity of three TGA-type basic leucine zipper transcription factors[J]. Plant Physiol. 2002, 130(3): 1487-1496.
- [14] Lashbrook CC, Giovannoni JJ, Hall BD et al. Transgenic analysis of tomato endo-b-1, 4-glucanase gene function. Role of cell in floral abscission[J]. Plant Journ. 1998, 13: 303-310.
- [15] Brummell DA, Bennett AB, Hall BD. Antisense suppression of tomato endo-1, 4-beta -glucanase Cel2 mRNA accumulation increases the force required to break fruit abscission zones but does not affect fruit softening[J]. Plant Mol Biol. 1999, 40(4): 615-622.
- [16] Tucker GA, Schindler BC, Roberts JA. Flower abscission in mutant tomato plant[J]. Planta. 1984, 160: 164-167.
- [17] Rivov JA. Polygalacturonase from citrus leaf explants[J]. Plant Physiol. 1974, 53: 312-316.
- [18] Roberts JA, Taylor JE, Laskett YV, et al. Changes in gene expression during ethylene-induced leaf abscission[J]. Cell Separation in Plants. 1989, 35: 61-68.
- [19] Hadfield KA, Bennett AB. Polygalacturonases: many genes in search of a function[J]. Plant Physiol. 1998, 117: 337-343.
- [20] Kalaitzis P, Solomos T, Tucker ML. Three different polygalacturonases are expressed in tomato leaf and flower abscission, each with a different temporal expression pattern[J]. Plant Physiol. 1997, 113: 1303-1308.

注:参考文献 21~41 省略,有需要者请与编辑部联系。