

果实脱落过程中水解酶作用的研究现状及展望

杨子琴¹, 许真², 张蕾¹, 洪继旺¹, 李松刚¹

(1. 中国热带农业科学院 热带作物品种资源研究所, 农业部华南作物基因资源与种质创制重点实验室 国家热带果树品种改良中心, 海南 儋州 571737; 2. 鹤壁职业技术学院, 河南 鹤壁 458030)

摘要: 果实的脱落是由于离区细胞间质的降解, 而细胞间质的降解有赖于水解酶的参与, 这使得水解酶成为近年来器官脱落研究的热点之一。该文主要综述了各种水解酶的生化特性、克隆表达以及降解细胞间质作用等方面的研究现状, 并展望了其未来的发展方向, 以期推进水解酶在果实脱落上的研究及其相关制品的开发利用。

关键词: 水解酶; 纤维素酶; 内切-1,4- β -D-葡萄糖酶; β -甘露聚糖酶; 多聚半乳糖醛酸酶; 果胶甲酯酶

中图分类号: Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2014)13-0199-03

果实是一种大量消耗养分的异养生殖器官。在果实发育过程中, 落果是植物减少果实负载量, 集中树体资源保证留树果实个体发育的正常现象。这种现象被视为植物果实负载量的自我调节机制。过量的负载量会导致树体状况下降, 同时由于果量过大还会导致单果

重下降、品质低, 因此生产中往往需要大量的人力来进行疏果, 而外界环境不适宜或者营养供应不足情况下又会出现落果严重, 导致欠收^[1]。在劳动力成本飞涨的今天, 用化控代替人工投入将是植物界最有潜力的发展方向。因此, 研究果实坐果/落果调节机制对开发新型的保果剂/疏果剂, 高效果园管理具有重要的指导作用。

1 果实脱落的机制与相关水解酶

脱落涉及离层细胞中间层的水解, 通过细胞壁修饰和水解酶的作用实现。因此, 脱落需要植物器官发育早期有离区的形成和随后的细胞分离反应激活^[2-5]。离区的分化可能在器官脱落前的很长时间就已经完成了, 这暗示着分化程度是脱落发生的重要前提^[6]。脱落过程本身也是一个程序性细胞死亡过程的经典模型, 因为脱落发生的区域-离区(AZ)是一个由特殊细胞组成的类激素靶细胞区域^[7-8]。细胞凋亡过程中液泡膜破裂, 释放出许多水解酶, 引起细胞死亡^[9]。因此, 水解酶的作用是脱落过程中较靠下游的信号, 在脱落的执行阶段起作

第一作者简介: 杨子琴(1981-), 女, 博士, 助理研究员, 研究方向为果树栽培生理, 现主要从事果树逆境生理等研究工作。E-mail: yangzqin1@163.com.

责任作者: 李松刚(1976-), 男, 硕士, 副研究员, 研究方向为果树栽培生理, 现主要从事南方果树反季节生产研究工作。E-mail: lsg1976@sina.com.

基金项目: 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所)资助项目(1630032014017); 国家现代农业产业技术体系专项资助项目(CARS-33); 国家公益性行业(农业)科研专项资助项目(201003021)。

收稿日期: 2014-03-20

Research Advances in Application of Plant Tissue Culture in Agricultural Production

ZHOU Quan-nan, ZHANG HUI-jun, DAI Xue-mei, SUN Ai-hua, HUANG Tian-dai, HUANG Hua-sun, HUA Yu-wei

(Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, State Center for Rubber Breeding, Danzhou, Hainan 571737)

Abstract: Plant tissue culture is the use of totipotent cells cultured plant regeneration technology, the genetic engineering of tissue culture, germplasm stored in the native culture and somatic hybridization, haploid breeding, select progress body detoxification and other aspects of *in vitro* mutation were discussed in this paper; brief introduction of tissue culture in factory application breeding, artificial seeds, etc.; and tissue culture plants in billing applications in various fields were discussed.

Key words: plant tissue culture; genetic engineering; plant breeding

用。通常情况下果实可受不良环境影响而进行非正常脱落,是一个主动分离的过程。该过程的一个重要特点就是离层部位的细胞壁不同程度的瓦解。植物细胞的细胞壁主要成分是纤维素、半纤维素、果胶,并有结构蛋白、酚类、脂肪酸及矿物质存在^[10]。而对细胞壁具有降解作用的酶包括果胶酯酶(pectin esterase, PE)、内切-多聚半乳糖醛酸酶(endo-PG; endo-polygalacturonases)、半纤维素酶(hemicellulases)以及纤维素酶(cellulase)等。

2 果实脱落相关水解酶作用的研究现状

2.1 纤维素酶

内切-1,4- β -D-葡聚糖酶(endo-1,4- β -D-glucanase, EG),即通常所说的纤维素酶,主要水解具有 β -1,4-D 葡糖键的多糖,在纤维素降解过程中起主要作用^[11]。一般认为,EG的作用主要集中在植物体中细胞的伸长生长^[12]、组织脱落^[13]、果实成熟软化及抗病防御^[14]等方面。在荔枝上分离出来的2个EG基因EG1和EG2在果实的生长发育过程中起着不同的作用,EG1的表达可能跟荔枝果皮和果肉细胞的发育有关,而EG2可能只跟果肉的早期生长相关^[15]。也就是说EG1可能参与纤维素代谢过程。Cel1和Cel2是番茄内切- β -1,4-葡聚糖酶(EG)家族的成员,已有证据表明其在果实成熟和器官的脱落中发挥作用,且纤维素酶与细胞壁代谢有关,在脱落信号传导中具有重要作用^[16]。

2.2 半纤维素酶

β -甘露聚糖酶(endo-1,4- β -D-mannan endohydrolase)是降解植物细胞壁半纤维素重要成分中甘露聚糖的主要酶类。目前已从不同水平上深入研究了该酶在植物种子萌发、果实成熟和花粉发育等过程中的生理功能,但对于该酶是否在器官脱落中发挥作用及其生理功能等方面报道很少。任艳芳等^[17]在脐橙离区克隆了 β -甘露聚糖酶基因片段,进一步肯定了 β -甘露聚糖酶在植物脱落器官离区中的存在。Belfield等^[18]认为 β -甘露聚糖酶虽在脱落中活性水平和基因水平上有一定表达,但它不是引起脱落的关键酶。植物器官的脱落涉及细胞壁的降解和细胞壁水解酶活性的增加,但是 β -甘露聚糖酶作为一种重要的半纤维素酶与器官脱落关系却不明确。探索 β -甘露聚糖酶在饥饿胁迫诱导的果实脱落过程中的活性变化,以期揭示其在脱落中的作用。

2.3 多聚半乳糖醛酸酶

器官的脱落受发育进程调控,器官分离是细胞壁和中胶层瓦解的结果,这涉及了多种生理生化变化,如RNA和蛋白质的新合成,呼吸代谢升高以及水解酶活性增加。在许多物种的花和果实的离区可以检测到半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)活性。PG是多聚- α -1,4-半乳糖醛酸聚糖水化酶(poly-galacturonideglycanohydase)的通用名,是果胶或果胶酸分解酶类中的一种,

亦称果胶酶(pectic enzyme)或果胶解聚酶(pectin depolymerase)。PG是一种细胞壁结构蛋白,可以催化果胶分子多聚半乳糖醛酸的裂解,参与果胶的降解,使细胞壁结构解体,导致细胞瓦解^[19]。而PG的多基因家族成员在植物发育不同阶段和不同组织中的表达与果实成熟、细胞分离过程(如叶、花、果实的脱落)有关^[20]。已证实多聚半乳糖醛酸酶活性升高与植物器官离区脱落进程相一致,且在离区表达^[21-22]。在番茄中,离区PG酶活性的上升伴随着叶片及花的脱落过程,番茄果实的PG多克隆抗体不能识别叶片脱落区分离的蛋白质,而且脱落区的PG活性不受反义果实PG基因的影响,而该基因却能抑制果实中PG活性的99%^[23],因此被认为是植物离区发生脱落的主要水解酶之一。

2.4 果胶甲酯酶

果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PME)在脱落过程中的作用还存在争议^[3,13,24]。Yager^[25]在烟草叶柄离区中发现有较高活性的果胶甲酯酶;而Ratner等^[26]在柑桔叶柄中发现脱落与果胶甲酯酶不存在必然联系。课题组前期的研究也证明,果胶甲酯酶与龙眼果实的脱落无关^[1];但更多的研究证明,果胶甲酯酶促进器官脱落,如Tabuchi等^[6]对无离层番茄果实脱落过程的研究发现,在番茄果实绿熟期,果实与花托的连接处无果胶甲酯酶活性,而在即将脱落果实与花托连接处一侧的次生木质部中,果胶甲酯酶活性显著增强。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,诱导并参加了番茄离区细胞壁与细胞膜的降解。

3 展望

目前,国内外学者对植物器官脱落机制进行了大量深入研究,取得了很大进展。随着研究手段的不断提高,研究领域的不断深入,使得果实脱落研究逐渐由生理学向分子生物学发展。果实脱落是受多因素调控的复杂生理过程,外界环境变化、植物自身的营养条件的改变、激素刺激、酶类调节等各种因素综合调控果实脱落。因此,落果机制的研究还有很长的路要走。水解酶对果实脱落的调控作用位于脱落信号的下游,是脱落过程的最后执行酶类,因此其在果实脱落过程中的作用无可替代,倘若了解了其作用机理并设法阻断或促进其发挥作用,将会解决生产上的许多难题,由此可见,对脱落相关水解酶的研究显得尤为重要。脱落相关酶调控果实脱落过程中的合成、降解、信号传导、细胞定位等生理机制将会成为未来研究的热点。利用转录组学、蛋白质组学等生物学手段研究植物器官的脱落机制具有高效、目标明确等优点,已经成为研究植物器官脱落的新亮点,在今后的相关研究中将会占据重要的地位。深入的研究果实的脱落机制,完善各种物质之间的互作,才能为进一步解决果实负载调节提供理论依据。

参考文献

- [1] 杨子琴. 饥饿胁迫诱导龙眼果实脱落的信号发生与调控机理研究[D]. 广州:华南农业大学, 2011.
- [2] Bleecker A B, Patterson S E. Last exit; senescence, abscission, and meristem arrest in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(7): 1169-1179.
- [3] Patterson S E. Cutting Loose. Abscission and dehiscence in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2001, 126(2): 494-500.
- [4] Roberts J A, Elliott K A, Gonzalez-Carranza Z H. Abscission, dehiscence, and other cell separation processes[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2002, 53: 131-158.
- [5] Lewis M W, Leslie M E, Liljegren S J. Plant separation: 50 ways to leave your mother[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2006, 9(1): 59-65.
- [6] Tabuchi T, Ito S, Arai N. Development of the abscission zones in j22 in pedicels of Galapagos wild tomatoes [J]. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 2000, 69(4): 443-445.
- [7] Agustí J, Merelo P, Cercós M, et al. Comparative transcriptional survey between laser-microdissected cells from laminar abscission zone and petiolar cortical tissue during ethylene-promoted abscission in citrus leaves[J]. *BMC Plant Biology*, 2009(9): 127.
- [8] McManus M T. Further examination of abscission zone cells as ethylene target cells in higher plants [J]. *Annals of Botany*, 2008, 101(2): 285-292.
- [9] 黄立钰, 傅彬英. 植物细胞程序化死亡响应非生物逆境胁迫反应机理[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(4): 764-770.
- [10] 尹增芳, 樊汝汶. 植物细胞壁的研究进展[J]. *植物研究*, 1999, 19(4): 407-414.
- [11] McCleary B V, Mangan D, Daly R, et al. Novel substrates for the measurement of endo-1, 4- β -glucanase (*endo*-cellulase)[J]. *Carbohydrate Research*, 2013, 385: 9-17.
- [12] Yoshida K, Imaizumi N, Kaneko S, et al. Carbohydrate-binding module of a rice endo- β -1, 4-glycanase, *OsCel9A*, expressed in auxin-induced lateral root primordia, is post-translationally truncated[J]. *Plant and Cell Physiology*, 2006, 47(11): 1555-1571.
- [13] Kalaitzis P, Hong S B, Solomos T, et al. Molecular characterization of a tomato endo- β -1, 4-glucanase gene expressed in mature pistils, abscission zones and fruit[J]. *Plant and Cell Physiology*, 1999, 40(8): 905-908.
- [14] Harpster M H, Lee K Y, Dunsmuir P. Isolation and characterization of a gene encoding endo- β -1, 4-glucanase from pepper (*Capsicum annuum* L.) [J]. *Plant Molecular Biology*, 1997, 33(1): 47-59.
- [15] 吴富旺, 邝健飞, 陆旺金, 等. 荔枝果实内切-1, 4- β -葡聚糖酶基因(*EG*)的克隆及其表达分析[J]. *园艺学报*, 2009, 36(12): 1733-1740.
- [16] Flors V, Leyva M de L, Vicedo B, et al. Absence of the endo- β -1, 4-glucanases Cel1 and Cel2 reduces susceptibility to *Botrytis cinerea* in tomato [J]. *The Plant Journal*, 2007, 52(6): 1027-1040.
- [17] 任艳芳, 刘厚宇, 何俊瑜. 脐橙离区 β -甘露聚糖酶基因片段克隆和序列分析[J]. *中国农学通报*, 2011, 27(2): 119-122.
- [18] Belfield E J, Ruperti B, Roberts J A, et al. Changes in expansin activity and gene expression during ethylene-promoted leaflet abscission in *Sambucus nigra* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2005, 56(413): 817-823.
- [19] 陈丽萍, 韩明丽, 赵根, 等. 植物多聚半乳糖醛酸酶研究进展[J]. *上海蔬菜*, 2013, 2(2): 11-13.
- [20] 寇晓虹, 罗云波. 植物多聚半乳糖醛酸酶研究进展[J]. *山西农业大学学报(自然科学版)*, 2004, 24(4): 411-415.
- [21] Bonghi C, Rascio N, Ramina A, et al. Cellulase and polygalacturonase involvement in the abscission of leaf and fruit explants of peach [J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, 20(5): 839-848.
- [22] Taylor J E, Coupe S A, Picton S, et al. Characterization and accumulation pattern of an mRNA encoding an abscission-related β -1, 4-glucanase from leaflets of *Sambucus nigra* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24(6): 961-964.
- [23] Taylor J E, Tucker G A, Lasslett Y, et al. Polygalacturonase expression during leaf abscission of normal and transgenic tomato plants [J]. *Planta*, 1991, 183(1): 133-138.
- [24] Bunya-atichart K, Ketsa S, van Doorn W G. Ethylene-sensitive and ethylene-insensitive abscission in *Dendrobium*: Correlation with polygalacturonase activity[J]. *Postharvest Biology and Technology*, 2011, 60(1): 71-74.
- [25] Yager R E. Possible role of pectic enzymes in abscission[J]. *Plant Physiology*, 1960, 35(2): 157-162.
- [26] Ratner A, Goren R, Monselise S P. Activity of pectin esterase and cellulase in the abscission zone of citrus leaf explants [J]. *Plant Physiology*, 1969, 44(12): 1717-1723.

Research Progress and Prospect of Hydrolases During Fruit Abscission

YANG Zi-qin¹, XU Zhen², ZHANG Lei¹, HONG Ji-wang¹, LI Song-gang¹

(1. Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Key Laboratory of Crop Gene Resources and Germplasm Enhancement in Southern China, Ministry of Agriculture, National Cultivar Improvement Center of Tropical Fruit Tree, Danzhou, Hainan 571737; 2. Hebi College of Vocation and Technology, Hebi, Henan 458030)

Abstract: The abscission of fruit due to the degradation of intercellular substance in abscission zone, while the degradation of intercellular substance depends hydrolase, which made hydrolase become one of the focused researches in recent years. In this review, the research status of hydrolase was summarized, including its biochemical characteristics, cloning and expression, and degradation of intercellular substance effect. Besides, the future directions of hydrolase were also pointed out, with a hope to guide the further study of hydrolases during fruit abscission process and the development and utilization of related products.

Key words: hydrolases; cellulase; endo-1, 4- β -D-glucanase; endo-1; 4- β -D-mannan endohydrolase; polygalacturonase; pectin methylesterase