

- 1, 4 - 甘露聚糖内切酶在番茄发育中的作用

王傲雪 张丙秀 李景富*

(东北农业大学园艺学院, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要: 以番茄为例, 对 - 1, 4 - 甘露聚糖内切酶 EC3.2.1.78在种子发芽、花药花粉发育和果实成熟等过程中所充当的角色加以综述, 进而说明该酶的功能和作用, 并阐述了甘露聚糖内切酶参与植物发育调控机理的研究方向和甘露聚糖内切酶基因的应用方向。

关键词: 番茄; 甘露聚糖内切酶; 角色; 发育; 综述

中图分类号: S 641.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2006) 05-1157-05

Effect of Endo- -1, 4-mannanase in Tomato Development Events

Wang Aoxue, Zhang Bingxiu, and Li Jingfu*

(College of Horticulture, Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030, China)

Abstract: Endo- -1, 4-mannanase is a kind of polysaccharide hydrolase. It exists broadly in different plants. The different roles of endo- -1, 4-mannanase were played in tomato different development events. In this paper, the roles of endo- -1, 4-mannanase were reviewed during some development events of tomato including seed germination, anther and pollen development, fruit ripening. And the function of endo- -1, 4-mannanase were analyzed. Moreover, The further work was suggested for elucidating the regulation mechanism of this enzyme in some development events and utilizing endo- -1, 4-mannanase genes in plants.

Key words: Tomato; Endo- -1, 4-mannanase; Role; Development; Review

- 1, 4 - 甘露聚糖内切酶 (以下简称甘露聚糖酶) 是一种多糖降解酶, 它的主要生化功能是水解甘露聚糖之间的 - 1, 4共价键^[1,2]。迄今为止, 已经在莴苣^[3]、番茄^[4,5]、水稻^[6]、曼陀罗 (datura ferrox)^[7]、枣椰子 (date)、长角豆 (carob)、番泻树 (Chinese senna)、葫芦巴 (fenugreek)^[1,8]等许多植物检测到了该酶的活性。虽然该酶在植物中的基本生化功能是一致的, 但在不同植物中所充当的角色却不尽相同, 如在莴苣种子中该酶的主要作用是降解胚乳细胞壁, 为种子萌发提供营养^[9], 而在番茄种子中该酶除提供碳水化合物营养外, 还有减弱胚乳对胚根萌发阻力的作用。不仅如此, 该酶在同一植物的不同发育阶段也扮演不同的角色, 例如该酶在番茄种子中为胚根萌发提供营养和减少阻力, 而在番茄果实发育中却主要和果实软化有关。

甘露聚糖是一种多糖, 因其侧链的不同分别以半乳甘露聚糖、半乳葡萄甘露聚糖等形式存在^[10]。甘露聚糖是构成细胞壁的重要成分, 在裸子植物如松柏科的木质化次生细胞壁中含量占 12% ~ 15%, 在被子植物细胞壁中含量占 3% ~ 5%^[11]。大部分植物种子的胚乳细胞壁主要是由半乳甘露聚糖构成^[1,2,12], 在种子发育的生化过程中, 半乳甘露聚糖主链经过甘露聚糖酶作用后, 甘露聚糖被降解为甘露二糖和甘露三糖, 而它的侧链由 - 半乳糖苷酶 (- galactosidase) 所降解, 形成的甘露二糖和甘露三糖经 - 甘露糖苷酶 (- mannosidase) 进一步降解为甘露糖单体, 甘露糖单体进一步经过一系列的生化变化为植物发育提供物质基础或参与其它生化过程^[13,14]。

收稿日期: 2006 - 04 - 11; 修回日期: 2006 - 07 - 17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30600414)

*通讯作者 Author for correspondence

甘露聚糖酶首先在葫芦巴种子中被发现^[1],并在莴苣和番茄种子中得到了广泛的研究。目前,已经在莴苣种子和番茄的果实、花粉以及种子中克隆了该基因,进一步明确了该酶在分子层面上参与植物发育的机理。

1 甘露聚糖酶在番茄种子发芽中的作用

番茄种子主要由胚和胚乳两部分组成,其中,甘露聚糖是胚乳细胞壁的主要组成成分,约占种子胚乳细胞壁 60%^[2,15]。坚硬的胚乳包裹着胚,同时也构成对胚根萌发的阻力。番茄甘露聚糖酶在种子发芽之前就已经表达,推断该酶可能通过降解胚乳细胞壁来减弱胚乳对胚根萌发的阻力,从而辅助胚根穿透胚乳。该酶首先在胚根附近的尖端胚乳部位增加,至少在 48 h 后该酶才在胚乳的侧面部位开始增加^[16~19],该酶在这两个部位产生的时间不同,而且在两个部位所产生的甘露聚糖酶不是同一种蛋白,是同工酶,由不同基因所控制^[20,21]。此外,ABA 能够抑制胚乳的侧面部位甘露聚糖酶活性,却不影响尖端胚乳部位的酶活性^[22]。目前这两个基因已经被分离出来,分别命名为 *LdMan1*^[21]和 *LdMan2*^[10]。其中 *LdMan2* 基因在尖端胚乳部位转录和表达,而 *LdMan1* 基因在侧面胚乳部位转录和表达,它们之间的氨基酸有 77% 的同源性。

从以上研究推断,在番茄种子中,*LdMan2* 基因的功能是弱化胚乳对胚根萌发的阻力,从而胚根能够顺利地穿透胚乳完成发芽过程,而 *LdMan1* 基因的功能是进一步降解侧面胚乳部位,为种子的萌发提供碳水化合物营养^[10,21]。这两个基因的表达都受 GA 的诱导,尖端胚乳部位和侧面胚乳部位的甘露聚糖酶的酶活性经 GA 处理后都升高。在 GA 突变体 (*gib-1* 突变体) 番茄种子中,种子休眠必须用 GA 来打破。用水浸泡该突变体种子后检测不到甘露聚糖酶的存在,而经 GA 处理该突变体种子后可以检测到该酶的活性^[22,23]。由此可见,GA 是该酶产生和增加的一个信号。甘露聚糖酶参与发芽的大致过程如下:种子在适当的环境(如充分吸水)条件下,胚根就会释放 GA 信号,GA 进一步诱导尖端胚乳部位产生甘露聚糖酶,从而降解尖端部位的胚乳细胞壁,减少了胚根萌发的阻力,胚根萌发并穿透胚乳完成发芽过程,*LdMan2* 基因表达,降解侧面部位的甘露聚糖,为番茄种子萌发提供碳水化合物营养,为种子继续发育提供物质基础^[5,6,19,20,22,23]。

2 甘露聚糖酶在番茄花药花粉发育中的作用

在番茄的花粉和花药中也检测到了甘露聚糖酶的存在。花粉和花药中的甘露聚糖酶基因已被克隆出来,命名为 *LdMan5*^[32]。该基因的蛋白质序列与 *LdMan2* 基因一致,而且核苷酸序列也有 98% 的一致性,说明这两个基因在进化关系上很接近。由于 *LdMan5* 基因与 *LdMan2* 基因蛋白质序列一致,所以蛋白的基本性质相同。由于该酶在释放的花粉中存在,所以该酶可能参与花粉管的萌发和生长,在花药中存在,可能与花药的开裂有关,但是这些只是推测,还没有具体的证据。由于 *LdMan5* 基因分离时间较晚,目前还没有见到更多的报道,需要进一步进行相关研究。

3 甘露聚糖酶在番茄果实发育中的作用

在番茄果实成熟中,软化和细胞壁的降解是果实成熟中的重要发育环节。番茄果实细胞壁主要由胶质、半纤维素(包括木葡聚糖和甘露聚糖、半乳聚糖等)、纤维素和蛋白质组成,半纤维素的主要组成元件是木质葡聚糖、葡萄糖甘露聚糖和半乳甘露聚糖等,半纤维素通过共价键与胶质相连,通过氢键与纤维素相连,其中半纤维素和纤维素微纤丝构成细胞壁稳定的框架结构,而胶质聚合体就嵌合在这个框架结构中间^[24,25]。

Huysamer 等^[26]检测了番茄果实中的多糖,首先发现了番茄果实中存在甘露聚糖。随着番茄果实的成熟,甘露糖残基在果实中逐渐增加。甘露糖残基在果实成熟过程中替代一些多糖的阿拉伯糖侧链从而组成新的多糖,同时一部分用来合成新的半乳甘露聚糖^[24,26]。甘露聚糖在番茄果实细胞壁中比

例不高, 所以甘露糖残基主要可能是参与一些多糖的结构变化, 进而促进果实质地的变化。Pressy^[27]发现了番茄果实中存在甘露聚糖酶。该酶可能通过降解细胞壁在番茄果实的软化过程中充当一个角色。在番茄品种‘Trust’中, 甘露聚糖酶活性随果实成熟而增加, 而果实硬度随果实成熟而降低。而且在一些果实硬度较大的番茄成熟果实突变体中, 如不成熟突变体、成熟抑制突变体和从不成熟突变体均检测不到该酶的活性^[28]。在番茄品种‘Walter’的果实中没能发现该酶的活性, 但是该品种仍然能够正常成熟, 果实硬度较大, 和成熟突变体的硬度相当^[28, 29]。初步证明该酶与果实的软化具有相关性。组织印迹分析表明, 该酶在果皮上具有更大的活力^[28], 这可能因为果皮质地更致密, 因此单位面积上含有更多的细胞, 需要更多的甘露聚糖酶参与该部位细胞壁降解。

目前, 果实中的甘露聚糖酶基因已经被分离出来, 命名为 *LMan4* 基因, 该基因有 399 氨基酸残基, 26 个氨基酸的信号肽, 分子量为 42 398 道尔顿, 等电点为 8.75。*LMan4* 基因与 *LMan1* 基因有 46% 的同源性, 与 *LMan2* 基因有 51% 的同源性。有趣的是, 在番茄品种‘Walter’中, 由于在该酶的基因序列 3' 端有两个核苷酸的删除突变, 导致该酶比正常的蛋白质在 C 端少了 4 个氨基酸, 使该番茄品种果实中甘露聚糖酶失去了活性^[30]。经 PCR 定点突变试验证实, C 端的亮氨酸对该酶是否具有全酶活性起关键作用。蛋白质结构分析显示, 亮氨酸为疏水氨基酸, 很可能该氨基酸与其他疏水氨基酸可以形成氢键, 这对于稳定该酶的结构至关重要^[31]。

4 展望

甘露聚糖酶的基本生化功能非常清楚一致, 但它在植物的不同发育阶段和发育环节中却扮演着不同的角色。目前的证据表明, 在果实发育中, 该酶与果实的软化相关; 然而, 该酶在果实软化中的重要作用, 还需要进一步通过基因敲除和过量表达等方法进行深入研究。根据目前的文献推断, 甘露聚糖酶基因很可能与其它细胞壁降解酶或修饰酶等协同作用, 共同参与果实发育。在番茄果实成熟中, 目前至少发现了 6 种以上与细胞壁有关的修饰酶或降解酶, 包括多聚半乳糖醛酸酶 (PG)^[33, 34], 果胶甲酯酶 (pectin methylesterase, PME)^[35], 1, 4- 葡聚糖内切酶 (EGase)^[36], 木葡聚糖内糖基转移酶 (xyloglucan endotransglycosylase, XET)^[37], 半乳聚糖酶^[38]和扩张蛋白 (expansin)^[39]等等, 它们都与果实成熟和软化相关。但是甘露聚糖酶与它们之间怎样协同作用还没见报道, 还要通过基因组学和蛋白组学等方法做进一步研究。

在番茄种子发芽中, 该酶是通过降解胚乳细胞壁为种子发芽提供碳水化合物营养和为胚根穿透胚乳减少阻力, 今后还应该研究敲除或过量表达甘露聚糖酶基因, 进一步为明确该酶在种子发芽的地位和功能提供更充分的证据; 在花粉和花药中表达的甘露聚糖酶基因 (*LMan5* 基因) 的研究才刚刚开始, 还没有详细功能的研究报道, 需要进一步大量研究工作。

今后, 还要进行甘露聚糖酶亚细胞定位和追踪该蛋白运动轨迹的研究, 并与传统的生物化学方法结合起来, 以明确该蛋白在不同发育过程中的作用部位, 为基因的功能提供更充足的信息和证据, 从而明确该酶参与发育过程的机制。

明确这些基因功能的角色和重要性, 就可以为实际的基因改造工作提供理论依据。例如, 果实成熟的提前和延后都会在生产上带来重大的社会效益与经济效益。弄清甘露聚糖酶参与果实成熟的机制, 就可以通过转基因、RNA 干扰、反义 RNA 等基因调控方法改造果实质地, 干预果实成熟与软化过程, 达到促进果实提前成熟, 或者延长果实的货架寿命, 或者增强果实抵抗物理和病理的伤害能力等等; 弄清参与种子萌发的机制, 就可以进一步研究一些种子的休眠过程, 从而通过基因改造打破种子休眠等。弄清参与花药花粉的调控, 就可以进一步研究杂交亲和问题, 打破杂交不亲和等。由于该酶的活性容易检测和鉴定, 所以, 通过研究该酶与一些发育事件的相关性, 可以将其作为发育事件中的生化指标用于辅助育种选择工作中。

参考文献:

- 1 Reid J S G, Meier H. The function of the aleurone layer during galactomannan mobilisation in germinating seeds of fenugreek (*Trigonella foenum-graecum* L.), crimson clover (*Trigonella incarnatum* L.): a correlative biochemical and ultrastructural study. *Planta*, 1972, 134: 209 ~ 221
- 2 Bewley J D. Breaking down the walls—a role for endo- α -mannanase in release from seed dormancy? *Trends in Plant Sci*, 1997, 2 (12): 464 ~ 469
- 3 Halmer P, Bewley J D, Thorpe T A. Enzyme to break down lettuce endosperm cell wall during gibberellin- and light-induced germination. *Nature*, 1975, 258: 716 ~ 718
- 4 Groot S P C, Kieliszewska-Rokicka B, Vemeer E, Karssen C M. Gibberellin-induced hydrolysis of endosperm cell walls in gibberellin-deficient tomato seeds prior to radicle protrusion. *Planta*, 1988, 174: 500 ~ 504
- 5 Nonogaki H, Nomaguchi M, Morohashi Y. Endo- α -mannanases in the endosperm of germinated tomato seeds. *Plant Physiol*, 1995, 94: 328 ~ 334
- 6 Wang A, Wang X, Ren Y, Gong X, Bewley J D. Endo- α -mannanase and α -mannosidase activities in rice grains during and following germination, and the influence of gibberellin and abscisic acid. *Seed Sci Res*, 2005, 15: 219 ~ 227
- 7 Sanchez R A, Sunell L, Labavitch J M, Bonner B A. Changes in the endosperm cell walls of two *Datura* species before radicle protrusion. *Plant Physiol*, 1990, 93: 89 ~ 97
- 8 Gong X, Bassel G, Wang A, Greenwood J, Bewley J D. The emergency of embryos from hard seeds is related to the structure of cell walls of micropylar endosperm, and not to Endo- α -mannanase activity. *Ann Bot*, 2005, 96: 1165 ~ 1173
- 9 Wang A, Li J, Bewley J D. Molecular cloning and characterization of an endo- α -Mannanase expressed in the lettuce endosperm following radical emergence. *Seed Sci Res*, 2004, 14: 267 ~ 276
- 10 Nonogaki H, Gee O H, Bradford K J. A germination-specific gene is expressed in the micropylar endosperm cap of tomato seeds. *Plant Physiol*, 2000, 123: 1235 ~ 1245
- 11 Bacic A, Harris P J, Stone B A. Structure and function of plant cell walls. New York: Academic Press, 1988. 297 ~ 391
- 12 Reid J S G. Galactomannans in biochemistry of storage carbohydrates in green plants. New York: Academic Press, 1985. 265 ~ 288
- 13 Bewley J D, Black M. Seeds physiology of development and germination (2nd ed), New York: Plenum Press, 1994. 309
- 14 McCleary B V. Enzymic hydrolysis, fine structure, and gelling interactions of legume-seed D-galacto-D-mannans. *Carbohydr Res*, 1979, 71: 205 ~ 230
- 15 Dahal P, Nevins J, Bradford K J. Relationships of endo- α -mannanase activity and cell wall hydrolysis in tomato endosperm to germination rates. *Plant Physiol*, 1997, 113: 1243 ~ 1252
- 16 Nomaguchi M, Nonogaki H, Morohashi Y. Development of galactomannan-hydrolyzing activity in the micropylar endosperm tip of tomato seed prior to germination. *Physiol Plant*, 1995, 94: 105 ~ 109
- 17 Leviatov S, Shoseyov O, Wolf S. Involvement of endo- α -mannanase in the control of tomato seed germination under low temperature conditions. *Ann Bot*, 1995, 76: 1 ~ 6
- 18 Toorop P E, Bewley J D, Hilhorst H W M. Endo- α -mannanase isoforms are present in the endosperm of tomato seeds, but are not essentially linked to the completion of germination. *Planta*, 1996, 200: 153 ~ 158
- 19 Voigt B, Bewley J D. Developing tomato seeds when removed from the fruit produce multiple forms of germinative and post-germinative endo- α -mannanase. Responses to desiccation, abscisic acid and osmoticum. *Planta*, 1996, 200: 71 ~ 77
- 20 Nonogaki H, Morohashi Y. An endo- α -mannanase develops exclusively in the micropylar endosperm of tomato seeds prior to radicle emergence. *Plant Physiol*, 1996, 110: 555 ~ 559
- 21 Bewley J D, Burton R A, Morohashi Y, Fincher G B. Molecular cloning of a cDNA encoding a (1, 4)- α -mannan endohydrolase from the seeds of germinated tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Planta*, 1997, 203: 454 ~ 459
- 22 Mo B, Bewley J D. The relationship between α -mannosidase and endo- α -mannanase activities in tomato seeds during and following germination: a comparison of seed populations and individual seeds. *J. Exp. Bot*, 2003, 54 (392): 2503 ~ 2510
- 23 Groot S P C, Karssen C M. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta*, 1987, 171: 525 ~ 531
- 24 Tong C B S, Gross K C. Glycosyl-linkage composition of tomato fruit cell wall hemicellulosic fractions during ripening. *Plant Physiol*, 1988, 74: 365 ~ 370
- 25 Fischer R L, Bennett A B. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annual Rev. of Plant Physiol and PlantMol Biol*, 1991, 42: 67 ~ 73
- 26 Huysamer M, Greve C, Labavitch J M. Cell wall metabolism in ripening fruit. Cell wall composition and synthetic capacity of two regions

- of the outer pericarp of mature green and red ripe cv. Jackpot tomatoes. *Plant Physiol*, 1997, 101: 314 ~ 322
- 27 Pressy R. Endo- α -mannanase in tomato fruit. *Phytochemistry*, 1989, 28: 3277 ~ 3280
- 28 Bewley J D, Banik M, Bourgault R, Feurtado J A, Toorop P, Hilhorst H W M. Endo- α -mannanase increases in the skin and outer pericarp of tomato fruits during ripening. *J. Exp. Bot.*, 2000, 51 (344): 529 ~ 538
- 29 Mitali M, Bourgault R, Bewley J D. Endo- α -mannanase is present in an inactive form in ripening tomato fruits of the cultivar Walter. *J. Exp. Bot.*, 2001, 52 (354): 105 ~ 111
- 30 Bourgault R, Bewley J D. Variation in its C-terminal amino acids determines whether endo- α -mannanase is active or inactive in ripening tomato fruits of different cultivars. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1254 ~ 1262
- 31 Bourgault R, Oakley A J, Bewley J D, Wilce M C. Three-dimensional structure of (1, 4)- β -D-mannan mannanohydrolase from tomato fruit. *Protein Sci*, 2005, 14 (5): 1233 ~ 1241
- 32 Filichkin S A, Leonard J M, Monteros A, Liu P P, Nonogaki H. A novel endo- α -mannanase gene in tomato LeMan5 is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1080 ~ 1087
- 33 Cosgrove D J. Enzymes and other agents that enhance cell wall extensibility. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, 50: 391 ~ 417
- 34 Brady C J, MacAlpine G, McGlasson W B, Ueda Y. Polygalacturonase in tomato fruits and the induction of ripening. *Aust. J. Plant Physiol*, 1982, 9: 171 ~ 178
- 35 Harriman R W, Tieman D M, Handa A K. Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and Never Ripe tomato fruits. *Plant Physiol*, 1991, 97: 80 ~ 87
- 36 Hobson G E. Cellulase activity during the maturation and ripening of tomato fruit. *J. Food Sci*, 1968, 33: 588 ~ 592
- 37 Arrowsmith D A, de Silva J. Characterization of two tomato fruit expressed cDNAs encoding xyloglucan endo-transglycosylase. *Plant Mol Biol*, 1995, 28: 391 ~ 403
- 38 Carey A T, Holt K, Picard S, Wilde R, Tucker G A, Bird C R, Schuch W, Seymour G B. Tomato exo- α -(1, 4)-D-galactosidase. Isolation, changes during ripening in normal and mutant tomato fruit, and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiol*, 1995, 108: 1099 ~ 1107
- 39 Rose J K C, Lee H H, Bennett A B. Expression of a divergent expansin gene is fruit-specific and ripening-regulated. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 5955 ~ 5960

新书推荐

《中国果树病虫原色图谱》(第二版) 吕佩珂主编

《中国果树病虫原色图谱》(第二版)含彩版 144页,彩色生态照片 1 152幅,文字 120万,包括落叶果树病害 305种,害虫 338种;常绿及热带亚热带果树病害 195种,害虫 160种,全书介绍果树病虫害近千种,较原图谱图片和病虫数量增加了 50%,成为中国果树病虫识别与防治大全。该书图文并茂、内容新颖、信息量大,既突出了无公害和生物防治,也介绍了综合防治方法,以适应入关后南北方生产无公害果品防治病虫的需要。可供全国果树站、植保站、果树科技人员、广大果农、农资系统、农林院校师生参考。定价:101元(含邮资)。

《中国蔬菜病虫原色图谱》(第三版·无公害)

《中国蔬菜病虫原色图谱》第三版包括南北方瓜类、茄果类、豆类、葱蒜类、绿叶蔬菜类、多年生及水生蔬菜等病虫害 521种,其中蔬菜病害 389种,虫害 134种,彩图 680幅、文字 55万,该书图文并茂,内容新颖。第三版防治方法定位在无公害蔬菜生产上,除充实大量生物防治法外,还介绍了综合防治技术和方法,药剂防治中删去了蔬菜上不得使用 and 限制使用的农药,重点选择使用全国农业技术推广服务中心推荐的无公害农药及高效、低毒、低残留的新品种,以适应加入世贸组织后,全国实施新阶段“菜篮子”工程生产无公害蔬菜的防治病虫害的需要。可供蔬菜站、植保站、农技站、农资系统、庄稼医院、农业院校师生、有关农业企业和科技人员参考。定价:69元(含邮资)。