

苹果果实成熟过程中 ACC 合成酶基因作用机理研究进展

李 通, 张志宏, 王爱德*

(沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110866)

摘 要: 苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 果实贮藏期的长短直接决定着其采后的经济价值, 其与果实在室温下的软化率有直接的关系。乙烯能够调控苹果成熟和软化过程, 因此, 苹果果实软化和乙烯之间的关系得到了广泛的研究。ACC 合成酶 (1-氨基环丙烷-1-羧酸合成酶, ACS) 是植物乙烯合成中的关键酶, 通过检索苹果全基因组序列, 共发现 20 个 ACC 合成酶 (ACS) 基因, 其中 *MdACS1* 和 *MdACS3* 已经被证明与苹果果实成熟有着直接关系, 并在不同的时空点调控果实成熟过程。对 ACS 基因调控苹果果实成熟过程的最新研究进展进行了综述, 并提出了 ACS 基因调控苹果果实成熟和乙烯合成的分子模型, 同时也对本领域今后的研究方向作了展望。

关键词: 苹果; 果实成熟; 乙烯; 贮藏性; ACC 合成酶

中图分类号: S 661.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 09-1665-08

The Role of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate Synthase Genes in Apple Fruit Ripening

LI Tong, ZHANG Zhi-hong, and WANG Ai-de*

(College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110866, China)

Abstract: The postharvest economic quality of mature apple (*Malus × domestica* Borkh.) is determined by the fruit shelf-life, which is associated with the fruit softening rate at room temperature. Ethylene is the factor that has been most studied in relation to the regulation of fruit softening. ACS (1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase) is one of the key enzymes in ethylene biosynthesis and pathway. Twenty ACS genes have been found by retrieving apple genome, two of which, *MdACS1* and *MdACS3*, have been studied extensively due to their specific expression in fruit tissue. Recent characterization of these genes has provided insight into the molecular basis of ACS gene involvement in fruit ripening. This paper reviews the advances in our understanding of the role of ACS gene in apple fruit ripening and a model by which ACS regulating fruit ripening and ethylene production is proposed. In addition, we prospectively overview promising research avenues that could lead to further clarification of the regulatory events involved in ripening.

Key words: apple; fruit ripening; ethylene; shelf life; ACS

收稿日期: 2012-06-12; 修回日期: 2012-07-17

基金项目: 沈阳农业大学青年教师科研基金项目 (20111002); 国家自然科学基金青年基金项目 (31201601)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: adwang333@163.com; Tel: 024-88487143)

苹果 (*Malus × domestica* Borkh.) 是世界上栽培面积和产量最大的水果之一。不同苹果品种的贮藏期不同, 果实的贮藏期长短直接决定其经济价值 (Johnston et al., 2002; Costa et al., 2005)。选育贮藏性较好并易在生产上推广的优良品种是苹果育种的重要课题, 而对苹果果实贮藏性和成熟机理的研究, 特别是在分子生物学水平上的研究尤为重要, 也是该研究领域的发展方向。

苹果果实的成熟过程受到各种内外部因素的影响, 包括基因调控, 激素调节以及温度和光照等 (Vahala et al., 1998; Vogel et al., 1998; Adams-Phillips et al., 2004; Giovannoni, 2004; Yoshida et al., 2006; Wang et al., 2009a)。对于苹果等呼吸跃变型果实来说, 乙烯是调节果实成熟的主要激素 (Lelievre et al., 1997; Giovannoni, 2004)。研究表明, 乙烯能够启动果实的成熟并协同完成整个后熟过程, 使细胞壁降解, 从而导致果实软化 (Chaves & de Mello-Farias, 2006)。

半个多世纪以来, 科学家对乙烯生物合成过程做了深入的研究 (Liang et al., 1992, 1995; Lincoln et al., 1993; Seymour et al., 1993; Abel et al., 1995; Capitani et al., 2002)。乙烯生物合成的直接前体是 ACC (1-氨基环丙烷-1-羧酸), 由 SAM (S-腺苷甲硫氨酸) 在 ACS (ACC 合成酶) 的催化作用下合成, ACC 在 ACO (ACC 氧化酶) 的作用下氧化生成乙烯 (Yang & Hoffman, 1984; Gussman et al., 1993; Rodrigues-pousada et al., 1993; Gorny & Kader, 1997; Tsuchisaka & Theologis, 2004)。ACC 的合成是乙烯合成途径中的限速步骤。因此, ACC 合成酶 (ACS) 是这个过程中的关键酶 (Kende, 1993)。

番茄 (*Solanum lycopersicum*) 作为一种果实发育的模式植物获得了广泛研究。在番茄基因组中已报道有 9 个 ACS 基因: *LeACS1A*、*LeACS1B*、*LeACS2* ~ *LeACS8* (Lin et al., 2009)。其中 *LeACS1A*、*LeACS2*、*LeACS4* 和 *LeACS6* 能在番茄果实中以不同的方式特异性表达 (Nakatsuka et al., 1998; Barry et al., 2000), 而且不同 ACS 基因对 1-MCP (1-甲基环丙烯) 和乙烯的响应方式也不同 (Nakatsuka et al., 1998)。在成熟果实中 1-MCP 抑制 *LeACS2* 和 *LeACS4* 的表达; *LeACS1A* 和 *LeACS3* 的表达贯穿植株生长发育和果实成熟的整个过程, 其表达不受 1-MCP 处理的影响; *LeACS6* 只在未成熟果实中表达, 但是 1-MCP 处理会诱导其表达。乙烯对 *LeACS1A* 的表达没有影响; *LeACS6* 的表达则被乙烯抑制。这些研究表明, ACS 基因对呼吸跃变型果实的乙烯合成和成熟过程起着重要的调控作用。

作者在现有研究的基础上综述苹果果实成熟相关 ACS 基因的最新研究进展, 概括 ACS 基因在乙烯合成系统和果实成熟过程中的调控作用, 并讨论该研究领域的发展方向。

1 苹果 ACS 基因家族

在苹果中, 已报道有 4 个 ACS 基因家族: MdACS1 (U89156)、MdACS3 (U73816)、MdACS4 (Kim et al., 1992) 和 MdACS5 (AB034992) (Rosenfield et al., 1996; Sunako et al., 1999, 2000)。Dong 等 (1991) 从成熟的苹果中分离出来一段 cDNA, 经预测为 ACS 基因的 cDNA 片段, 随后 Lay-Yee 和 Knighton (1995) 报道了 *MdACS1* 的 cDNA 的全长序列 (L31347)。*MdACS3* 的 cDNA (U73816) 也由 Rosenfield 等 (1996) 在 GenBank 上登录。Kim 等 (1992) 分离鉴定了 *MdACS4*。Sunako 等 (2000) 报道了 *MdACS-5A* (AB034992) 和 *MdACS-5B* (AB034993) 的序列。

根据 Yoshida 等 (2005) 的报道, 植物 ACS 基因可以按照其 3' 端的氨基酸序列分为 3 种类型 (图 1)。类型 I ACS 基因有一个含有丝氨酸残基的 'RLSF' 元件, 是蛋白激酶 (CDPK) 磷酸化所必需的, 另外还有一个长的 C 末端尾巴, 这个尾巴包含 3 个保守的丝氨酸残基, 是 MPK6 磷酸化的靶位点; 类型 II ACS 基因, 在 'RLSF' 元件之前有一个 'WVF' 元件; 类型 III ACS 基因缺少磷酸化的元件, 即没有 'RLSF' 和 'WVF' 元件, 其 C 末端缺少 24 ~ 47 个氨基酸。另外, ETO1 (ethylene-overproducer1) 是乙烯合成的负调控因子, 它通过 TOE 靶位点 (Target of ETO1) 序列来抑制类型

II ACS 基因的表达，进而通过蛋白酶体途径促进 ACS 的降解（Chae et al. 2003）。

在苹果中，MdACS1（AAB68617）C 端的氨基酸序列在‘RLSF’元件前有一个‘WVS’元件，虽然不是‘WVF’，但属于类型 II；MdACS3 缺少 C 末端序列和‘RLSF’元件，具有类型 III ACS 的典型特点（Wang et al., 2009b）。MdACS4 和 MdACS5 具有‘RLSF’元件而没有‘WVF’元件，属于类型 I（Sunako et al., 2000）。在苹果中，还没有分离 ETO1 及其同源基因，有必要研究 ETO1 及其同源基因与 ACS 基因之间的互作关系。

在目前分离得到的苹果 ACS 基因中，只有 *MdACS1* 和 *MdACS3a* 与果实成熟有着直接关系。

LeACS1A	ISYFVLQPKGLNNIAAIKKQCSRRLQI.....SLSF..RRLDHEFMNSPAHSPMNSPLVRT	I
LeACS1B	IRNFVLQTKGLNNIAAIKKQCSRSLQI.....SLSF..RRLDDEFNSPAHSPMNSPLVRT..	
LeACS2	IRRFVGVKSGDKSSMEKKQQWKNNL.....RLSF..SKRMYDESVLSPSSPIPPSPLV	
LeACS6	IRHFVYLQPNKGVEVATKKQYCRTRSKLEI.....SLSF..RRLDDEFMNSPHSPMSSPMVQARN	
LeACS3	IKDFVESTAPNATNHQNNQSSNANSKKKFSK.....WVFRLSF..NDRQRE..	II
LeACS7	LKAFVDSRVNNKDDIQNNQCSNKKKFSK.....WVFRLSF..NERQRE..	
LeACS8	IKSFVDSDDVIGINVDQSNQTNQNTSTSPKKKLF..WGFRLSF..NDRER..	
MdACS1	LKAFVG.EYYNVPEVNGGSQSSHLSHSRRLTK...WVSRLSF..DDRXPPIGR..	
LeACS4	IRMFMDAYNNVNKNGVMKNKHNGRGTTYDLTPQMG..TMKMLLA..	III
LeACS5	INNFNVSDDRIHRQQPLRFVTGAGSRRRTIAN.....WVVKFSSGDGRDR..	
MdACS3a	IHNFMKRRERAC.....	

图 1 苹果与番茄 ACS 基因氨基酸 C 末端序列比对
Fig. 1 Alignment of C-terminal sequence of ACS genes in apple and tomato

2 MdACS 基因与苹果果实成熟的关系

MdACS1 和 *MdACS3* 因为在苹果果实中特异表达而得到了广泛的关注。Varanasi 等（2011）分析了 *MdACS3a* 在不同苹果品种中的表达变化，发现其表达开始于果实采收前 6 周，远远早于 *MdACS1* 和 *MdACO1* 的表达。在富士苹果果实发育、成熟和室温贮藏过程中，*MdACS3* 呈组成型表达（Wang et al., 2009a）而且一直能够持续至采后 3 个月（Tatsuki et al., 2007）；然而在早熟富士苹果品系中，*MdACS3* 的表达量在室温贮藏过程中一直呈下降趋势（Wang et al., 2009a）。这些结果表明，*MdACS3* 在果实发育和成熟时各个阶段起着不同的作用。

MdACS1 的表达模式和 *MdACS3* 明显不同，*MdACS1* 在果实采收后的贮藏过程中才表达（Wang et al., 2009b）。在富士苹果及其早熟性芽变品种果实的贮藏过程中没有发现 *MdACS1* 的表达（Wang et al., 2009a）。但是在‘王林’、‘澳洲青苹’、‘津轻’以及‘金冠’品种中，*MdACS1* 在室温贮藏过程中有一定量的表达并随乙烯生成量的增加而升高（Wakasa et al., 2006；Tatsuki et al., 2007；Zhu et al., 2008；Kondo et al., 2009）。*MdACS1* 的表达被 1-MCP 强烈抑制，而 *MdACS3* 几乎不受其影响（Wakasa et al., 2006；Tatsuki et al., 2007；Zhu et al., 2008；Asif et al., 2009；Wang et al., 2009a），而且用乙烯利处理以后，*MdACS3* 的表达受到一定程度的抑制，说明乙烯对 *MdACS1* 起正调控作用，而过量乙烯会对 *MdACS3* 的表达起负反馈调节作用（Wang et al., 2009b；Varanasi et al., 2011）。对 *MdACS4* 和 *MdACS5* 的研究相对较少，*MdACS4* 在花柱头和花托中表达，且能被生长素抑制；*MdACS5* 不能在果实中表达，但可以被机械损伤诱导（Wakasa & Harada, 2001），可能与果实成熟没有密切关系（Wiersma et al., 2007）。

2.1 MdACS1 与苹果果实的成熟

MdACS1 被沉默的苹果果实中乙烯生成量极低，并表现果实在室温贮藏的时间增加（Dandekar et al., 2004），表明 *MdACS1* 在调节苹果果实贮藏能力方面起着重要作用。Harada 等（1997）报道了

MdACSI (U89156) 基因组序列, Sunako 等 (1999) 从‘金冠’苹果的基因组文库中分离出两个 *MdACSI* 的等位基因: *MdACSI-1* 和 *MdACSI-2*。其中, *MdACSI-2* 的启动子区有一个反转录转座子 SINE (short interspersed nuclear element), 这使得 *MdACSI-2* 比 *MdACSI-1* 的转录活性大大降低。检测不同 *MdACSI* 等位基因型的苹果品种发现, *MdACSI-2/2* 的纯合型品种在贮藏期间乙烯生成量较低, *MdACSI-1/2* 的杂合型以及 *MdACSI-1/1* 的纯合型品种的乙烯生成量则较高 (Sunako et al., 1999)。Oraguzie 等 (2004) 调查了 5 个杂交组合的 F₁ 代果实中 *MdACSI* 的分离情况, 发现 *MdACSI* 符合孟德尔遗传规律。Harada 等 (2000) 测定了 35 个栽培苹果品种和 13 个 F₁ 代杂交种的果实内源乙烯生成量, 发现 *MdACSI* 的基因型与果实内源乙烯生成量呈线性相关, *MdACSI-2/2* 的纯合型品种的乙烯生成量较低且较耐贮藏。然而, *MdACSI* 的基因型与苹果果实的贮藏性并不总是一致。例如, ‘Megumi’ 虽然是 *MdACSI-2/2* 纯合型苹果品种, 但果实在室温贮藏 20 d 后硬度下降 52% (Harada et al., 2000; Oraguzie et al., 2004)。另外, 在相同 *MdACSI* 基因型的个别苹果品种中, 乙烯生成量差别较大, 例如苹果品种 ‘Kitaro’ 和 ‘Kotaro’ 是来自相同杂交亲本的姊妹品种, 且均属于 *MdACSI-1/2* 的杂合型。‘Kitaro’ 果实的乙烯生成量很低, 贮藏性较好, 而 ‘Kotaro’ 果实的乙烯生成量却很高, 且不耐贮藏 (Wakasa et al., 2006)。

Oraguzie 等 (2007) 研究发现, *MdACSI* 等位基因型和采收期都会导致果实乙烯生成量的变化, 也会影响果实在 0 °C 条件下的贮藏时间。在低温贮藏过程中, *MdACSI-2/2* 基因型的栽培品种的果实乙烯生成量变化不大, 且果实硬度下降也较为缓慢。早熟的品种比晚熟的品种果实软化速率快, 晚熟的 *MdACSI-2/2* 纯合型栽培品种果实软化速率最慢, 而早熟的 *MdACSI-1/1* 纯合型品种软化速率最快。然而, 这仍然不能解释在 ‘Megumi’、‘Kitaro’ 和 ‘Kotaro’ 苹果中出现的异常现象。确切地说, *MdACSI* 基因型理论只能部分地解释果实乙烯生成量与贮藏性之间的关系。

有趣的是, Sato 等 (2004) 通过 40 个栽培苹果品种采前落果率的统计发现, *MdACSI* 基因型和采前落果率有一定的线性关系。*MdACSI-2/2* 纯合型品种的果实落果率远远低于 *MdACSI-1/1* 和 *MdACSI-1/2* 基因型的品种, *MdACSI* 基因型与果实采前落果率之间似乎有更密切的相关性, 这有待于进一步的调查研究。

2.2 *MdACS3* 与苹果果实的成熟

Wang 等 (2009b) 分离并鉴定了 *MdACS3* 的基因组 DNA 序列。在苹果基因组中, *MdACS3* 中有 3 个成员, 分别是 *MdACS3a*, *MdACS3b* 和 *MdACS3c*。*MdACS3b* 和 *MdACS3c* 的启动子区含有 333 bp 的转座子插入序列: *Makh*, 它的存在使这两个基因无法转录而失去功能。在梨 (*Pyrus communis* L.) 和李 (*Prunus salicina* L.) 的同源基因中并没有发现 *Makh* 的存在 (Itai et al., 1999; El-Sharkawy et al., 2004, 2008)。

对 *MdACS3a* 在苹果果实成熟中的作用做了深入研究 (Wang et al., 2009b), 发现在苹果基因组中有一个 *MdACS3a* 的等位基因 *MdACS3a-G289V*。其第 289 个氨基酸由甘氨酸 (G) 转换为缬氨酸 (V), 这个氨基酸转换位于该基因的活性位点, 使 *MdACS3a-G289V* 蛋白的酶活性丧失。此外, *MdACS3a* 的另一个等位基因 *Mdacs3a* 不能被转录成 mRNA。因此, 苹果的栽培品种可以依据 *MdACS3a* 的等位基因型来分类。*Mdacs3a/MdACS3a-G289V* 杂合型的苹果品种, 例如 ‘Kitaro’ 和 ‘Koukou’, 与 *MdACS3a* 纯合型品种相比, 因为两个等位基因均失去活性而降低了乙烯生成量, 从而使果实有更好的贮藏性。通过 *MdACS3a* 的等位基因型更容易解释 ‘Kitaro’ 和 ‘Kotaro’ 两个姊妹品种之间贮藏性的明显差异, 说明 *MdACS3a* 基因可能是决定苹果果实贮藏能力的关键因素。

Bai 等 (2012) 通过分析 *MdACS3a* 基因的启动子区, 开发了可以鉴定 *MdACS3a* 无功能等位基因型 (null allele) 的 CAPS (cleaved amplified polymorphic sequences) 标记, 使得 *MdACS3a* 基因型

的鉴定更加简化, 提高了其在分子标记辅助育种中的应用价值。

3 苹果 ACS 基因与果实系统 1 和系统 2 乙烯合成

果实的乙烯合成被分为两个系统, 系统 1 和系统 2 (Mcmurchie et al., 1972)。系统 1 乙烯合成主要发生在植物营养生长阶段, 未成熟果实中的乙烯也由系统 1 合成; 系统 2 是负责果实成熟阶段的乙烯合成, 主要在呼吸跃变型果实的成熟过程中产生。Lelièvre 等 (1997) 研究发现, 系统 1 到系统 2 的转化过程是在果实成熟过程中起着重要的调控作用。

在呼吸跃变型果实产生乙烯高峰时, 乙烯合成与信号转导途径中的各种基因会发出响应, 并直接关系到系统 1 到系统 2 的转化 (Nakatsuka et al., 1998)。番茄果实中系统 1 乙烯合成受 *LeACS1A* 和 *LeACS6* 的调控; *RIN* (*ripening inhibitor*) 基因在系统 1 至系统 2 的转化过程中诱导 *LeACS4* 的表达, 随后启动 *LeACS2* 的大量表达和系统 2 乙烯合成 (Barry et al., 2000)。Yokotani 等 (2009) 报道番茄系统 2 乙烯合成可能受到果实发育过程中的乙烯以外的其它因素的调控, 为研究乙烯合成系统找到了新的突破点。

在苹果中, *MdACS3a* 在果实中的表达早于 *MdACS1*, 并在产生乙烯高峰后迅速下降 (Wang et al., 2009a)。*MdACS1* 是果实成熟后才开始表达, 且受 1-MCP 处理的强烈抑制, 而 *MdACS3a* 的表达并不受 1-MCP 的影响 (Wakasa et al., 2006; Tatsuki et al., 2007; Zhu et al., 2008; Kondo et al., 2009)。Dandekar 等 (2004) 报道, 沉默 *MdACS1* 的转基因苹果果实的乙烯生成量极低。这些研究表明 *MdACS1* 在系统 2 乙烯的合成中起着重要的调控作用。另外, 一些苹果栽培品种, 例如 ‘富士’ 的果实在贮藏过程中没有发现 *MdACS1* 的表达, 乙烯生成量也很低 (Wakasa et al., 2006; Tatsuki et al., 2007; Wang et al., 2009a), 可能是系统 2 乙烯合成缺失的结果。我们最近研究了 *MdACS3a* 和 *MdACS1* 在苹果果实中的表达及其对乙烯和 1-MCP 的响应方式, 证明了 *MdACS3a* 和 *MdACS1* 分别作用于系统 1 和系统 2 乙烯合成 (Tan et al., 2012)。

综上所述, *MdACS3a* 在成熟和未成熟苹果果实中均有表达, 而 *MdACS1* 仅在成熟果实中表达, 且其表达模式与果实乙烯生成量的变化模式相同。因此可以断定, *MdACS3a* 负责系统 1 乙烯合成, 而 *MdACS1* 负责系统 2 乙烯合成 (图 2)。

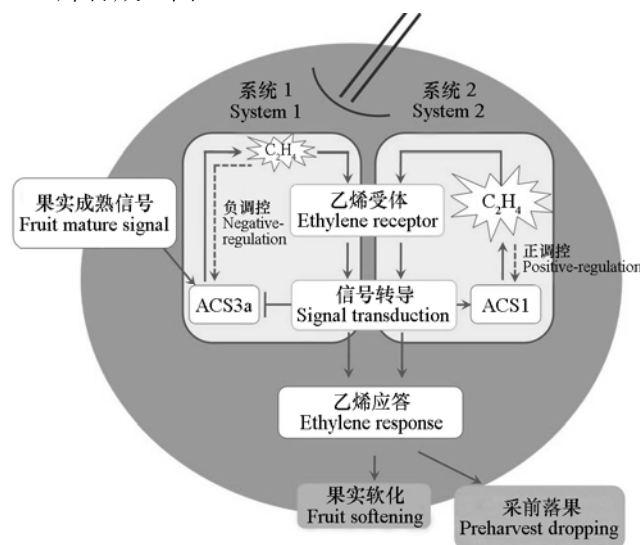


图 2 苹果 ACS 基因调控果实乙烯合成与软化的分子模型 (引自 Tan 等, 2012)

Fig. 2 Molecular model for apple ACS gene regulating fruit ethylene biosynthesis and softening (Modified from Tan et al., 2012)

4 展望

Lelièvre 等 (1997) 报道, 乙烯合成中从系统 1 到系统 2 的过渡阶段在调控果实成熟过程中起着重要作用。在番茄中, *LeACS4* 作用于过渡期 (Barry et al., 2000)。然而, 在苹果中到目前为止还没有找到 *LeACS4* 的同源基因。Velasco 等 (2010) 报道了苹果的全基因组序列 (<http://www.rosaceae.org/>), 这使得研究者可以在整个苹果基因组范围内寻找与成熟相关的 ACS 基因。最近, 作者发现了另外两个苹果 ACS 基因 (*MdACS6* 和 *MdACS7*) 能在果实成熟过程中差异表达 (未发表数据), 目前正在研究这两个基因在乙烯合成与调控果实成熟中的作用。

MADS box 基因家族是植物中广泛存在的转录因子, 在植物生长发育过程中的多个阶段都起着重要的作用, 包括营养生长, 开花和果实成熟等 (Ng & Yanofsky, 2001)。RIN (ripening inhibitor) 是番茄 MADS box 家族的成员之一, 它在乙烯合成系统 1 到系统 2 的转化过程中起着重要的作用, 而且它作为转录因子能与 *LeACS2* 和 *LeACS4* 启动子相结合 (Fujisawa et al., 2011; Martel et al., 2011)。此外, Matarasso 等 (2005) 报道, 番茄果实中能被成熟诱导的半胱氨酸蛋白酶 (LeCp) 基因能结合到 *LeACS2* 启动子区的 TAAAAT 元件并调节其表达。在有些苹果品种中, 系统 2 乙烯合成缺失可能与 RIN 和 LeCp 等转录因子无法与相应的 ACS 基因启动子结合有关。因此, 在苹果基因组中分离 MADS box 基因和 LeCp 等转录因子并研究其功能, 将有助于更加深入地了解 ACS 基因在苹果果实乙烯生物合成与成熟过程中的作用。

References

- Abel S, Nguyen M D, Chow W, Theologis A. 1995. ACS4, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-ami-nocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 270: 19093 – 19099.
- Adams-phillips L, Barry C, Giovannoni J J. 2004. Signal transduction systems regulating fruit ripening. *Trends Plant Sci*, 9: 331 – 338.
- Asif M H, Pathak N, Solomos T, Trivedi P K. 2009. Effect of low oxygen temperature and 1-methylcyclopropane on the expression of genes regulating ethylene biosynthesis and perception during ripening in apple. *S Afr J Bot*, 75: 137 – 144.
- Bai S, Wang A, Li T, Kon T, Akada T, Igarashi M, Harada T, Hatsuyama Y. 2012. Distribution of *MdACS3* null alleles in apple (*Malus × domestica* Borkh.) and its relevance to fruit storage properties. *Breeding Sci*, 62: 46 – 52.
- Barry C S, Llop-tous M I, Grierson D. 2000. The regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene expression during the transition from system-1 to system-2 ethylene synthesis in tomato. *Plant Physiol*, 123: 979 – 986.
- Capitani G, McCarthy D L, Gut H, Grutten M G, Kirsch J F. 2002. Apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in complex with the inhibitor 1-aminoethoxyvinylglycine—Evidence for a ketimine intermediate. *J Biol Chem*, 277: 49735 – 49742.
- Chae H S, Faure F, Kieber J J. 2003. The *eto1*, *eto2* and *eto3* mutations and cytokinin treatment increase ethylene biosynthesis in *Arabidopsis* by increasing the stability of ACS protein. *Plant Cell*, 15: 545 – 559.
- Chaves A L S, de Mello-Farias P C. 2006. Ethylene and fruit ripening: From illumination gas to the control of gene expression, more than a century of discoveries. *Genet Mol Biol*, 29: 508 – 515.
- Costa F, Sara S, Va de Weg W E, Guerra W, Cecchin M, Dallivina J, Koller B, Sansivini S. 2005. Role of the genes *Md-ACO1* and *Md-ACS1* in ethylene production and shelf life of apple (*Malus domestica* Borkh.). *Euphytica*, 141: 181 – 190.
- Dandekar A M, Teo G, Defilippi B G, Uratsu S L, Passey A J, Kader A A, Stow J R, Colgan R J, James D J. 2004. Effect of down-regulation of ethylene biosynthesis on fruit flavor complex in apple fruit. *Transgenic Res*, 13: 373 – 384.
- Dong J G, Kim W T, Yip W K, Thompson G A, Li L, Bennett A B, Yang S F. 1991. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit. *Planta*, 185: 38 – 45.
- El-Sharkawy I, Jones B, Gentzittel L, Lelièvre J M, Pech J C, Latché A. 2004. Differential regulation of ACC synthase genes in cold-dependent and -independent ripening in pear fruit. *Plant Cell Environ*, 27: 1197 – 1210.

- El-Sharkawy I, Kim W S, Jayasankar S, Svircev A M, Brown D C W. 2008. Differential regulation of four members of the ACC synthase gene family in plum. *J Exp Bot*, 59: 2009 – 2027.
- Giovannoni J J. 2004. Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell*, 16: 170 – 180.
- Gorny J R, Kader A A. 1997. Low oxygen and elevated carbon dioxide atmospheres inhibit ethylene biosynthesis in preclimacteric and climacteric apple fruit. *J Amer Soc Hortic Sci*, 122: 542 – 546.
- Gussman C D, Goffreda J C, Gianfagna T J. 1993. Ethylene production and fruit-softening rates in several apple fruit ripening variants. *HortSci*, 28: 135 – 137.
- Harada T, Sunako T, Wakasa Y, Soejima J, Satoh T, Niizek I M. 2000. An allele of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*Md-ACS1*) accounts for the low ethylene production in climacteric fruits of some apple cultivars. *Theor Appl Genet*, 101: 742 – 746.
- Harada T, Sunako T, Sakuraba W, Goto S, Senda M, Akada S, Niizeki M. 1997. Genomic nucleotide sequence of a ripening-related 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (*MdACS-1*) in apple (accession No. U89156) (PGR 97-066). *Plant Physiol*, 113: 1465.
- Itai A, Kawata K, Tanabe K, Tamura F. 1999. Identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes controlling the ethylene level of ripening fruit in Japanese pear (*Pyrus pyrifolia* Nakai). *Mol Gen Genet*, 261: 42 – 49.
- Johnston J W, Hewett E W, Hertog M L A T M. 2002. Postharvest softening of apple (*Malus domestica*) fruit. *N Z J Crop Hort Sci*, 30: 145 – 160.
- Kende H. 1993. Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol*, 44: 283 – 307.
- Kim W T, Silverstone A, Yip W K, Dong J G, Yang S F. 1992. Induction of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase mRNA by auxin in mung bean hypocotyls and cultured apple shoots. *Plant Physiol*, 98: 465 – 471.
- Kondo S, Meemark S, Ban Y, Moriguchi T, Harada T. 2009. Effects of auxin and jasmonates on 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) synthase and ACC oxidase gene expression during ripening of apple fruit. *Postharvest Biol Technol*, 51: 281 – 284.
- Lay-Yee M, Knighton M L. 1995. A full-length cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from apple (accession No. L31347) (PID. g606759). *Plant Physiol*, 107: 1017 – 1018.
- Lelievre J M, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech J C. 1997. Ethylene and fruit ripening. *Physiol Plant*, 101: 727 – 739.
- Liang X, Oono Y, Shen N F, Köhler C, Li K, Scolnik P A, Theologis A. 1995. Characterization of two members (ACS1 and ACS3) of the 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 167: 17 – 24.
- Liang X W, Abel S, Keller J A, Shen N F, Theologis A. 1992. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene family of *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89: 11046 – 11050.
- Lin Z, Zhong S, Grierson D. 2009. Recent advances in ethylene research. *J Exp Bot*, 60: 3311 – 3336.
- Lincoln J E, Campbell A D, Oetiker J, Rottmann W H, Oeller P W, Shen N F, Theologis A. 1993. LE-ACS4, a fruit ripening and wound-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene of tomato (*Lycopersicon esculentum*). *J Biol Chem*, 268: 19422 – 19430.
- McMurchie E J, McGlasson W B, Eaks I L. 1972. Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature*, 287: 235 – 236.
- Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H, Shiomi S, Nakano R, Kubo Y, Inaba A. 1998. Differential expression and internal feedback regulation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase and ethylene receptor genes in tomato fruit during development and ripening. *Plant Physiol*, 118: 1295 – 1305.
- Ng M, Yanofsky M F. 2001. Function and evolution of the plant MADS-box gene family. *Nat Rev Genet*, 2: 186 – 195.
- Oraguzie NC, Iwanami H, Soejima J, Harada T, Hall A. 2004. Inheritance of *Md-ACS1* gene and its relationship to fruit softening in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Theor Appl Genet*, 108: 1526 – 1533.
- Oraguzie N C, Volz R K, Whitworth C J, Bassett H C M, Hall A J, Gardiner S E. 2007. Influence of *Md-ACS1* allelotype and harvest season within an apple germplasm collection on fruit softening during cold air storage. *Postharvest Biol Technol*, 44: 212 – 219.
- Rodrigues-pousada RA, de Rycke R, Dedonder A, Van Caeneghem W, Engler G, Van Montagu M, Van Der Straeten D. 1993. The *Arabidopsis* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene 1 is expressed during early development. *Plant Cell*, 5: 897 – 911.
- Rosenfield C L, Kiss E, Hrazdina G. 1996. *MdACS-2* (accession No. U73815) and *Md-ACS3* (accession No. U73816) two new 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases in ripening apple fruit. *Plant Physiol*, 112: 1735.

- Sato T, Wakasa Y, Kudo T, Akada T, Niizeki M, Harada T. 2004. Allelotype of a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene defines the rate of fruit drop in apple. *J Am Soc Hort Sci*, 129: 32 – 36.
- Seymour G B, Taylor J E, Tucke G A. 1993. *Biochemistry of fruit ripening*. London: Chapman & Hall Press.
- Sunako T, Ishikawa R, Senda M, Akada S, Niizeki M, Harada T. 2000. MdACS-5A (accession No. AB034992) and 5B (accession No. AB034993) two wound-responsive genes encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in apple. *Plant Physiol*, 122: 620.
- Sunako T, Sakuraba W, Senda M, Akada S, Ishikawa R, Niizeki M, Harada T. 1999. An allele of the ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene (ACS1) in apple fruit with a long storage life. *Plant Physiol*, 119: 1297 – 1303.
- Tan D, Li T, Wang A. 2012. Apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase genes, *MdACS1* and *MdACS3a*, are expressed in different systems of ethylene biosynthesis. *Plant Mol Biol Rep* (Online, DOI: 10.1007/s11105-012-0490-y).
- Tatsuki M, Endo A, Ohkawa H. 2007. Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biol Technol*, 43: 28 – 35.
- Tsuchisaka A, Theologis A. 2004. Heterodimeric interactions among the 1-amino-cyclopropane-1-carboxylate synthase polypeptides encoded by the *Arabidopsis* gene family. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101: 2275 – 2280.
- Vahala J, Schlagnhauser C D, Pell E J. 1998. Induction of an ACC synthase cDNA by ozone in light-grown *Arabidopsis thaliana* leaves. *Physiol Plant* 103: 45 – 50.
- Varanasi V, Shin S, Mattheis J, Rudell D, Zhu Y. 2011. Expression profiles of the *MdACS3* gene suggest a function as an accelerator of apple (*Malus × domestica*) fruit ripening. *Postharvest Biol Technol*, 62: 141 – 148.
- Velasco R, Zharkikh A, Affourtit J, Dhingra A, Cestaro A, Kalyanaraman A, Fontana P, Bhatnagar S K, Troggio M, Pruss D, Salvi S, Pindo M, Baldi P, Castelletti S, Cavaiuolo M, Coppola G, Costa F, Cova V, Dal Ri A, Goremykin V, Komjanc M, Longhi S, Magnago P, Malacarne G, Malnoy M, Micheletti D, Moretto M, Perazzolli M, Si-Ammour A, Vezzulli S, Zini E, Eldredge G, Fitzgerald L M, Gutin N, Lanchbury J, Macalma T, Mitchell J T, Reid J, Wardell B, Kodira C, Chen Z, Desany B, Niaz F, Palmer M, Koepke T, Jiwan D, Schaeffer S, Krishnan V, Wu C, Chu V T, King S T, Vick J, Tao Q, Mráz A, Stormo A, Stormo K, Bogden R, Ederle D, Stella A, Vecchietti A, Kater M M, Masiero S, Lasserre P, Lespinasse Y, Allan A C, Bus V, Chagne D, Crowhurst R N, Gleave A P, Lavezzo E, Fawcett J A, Proost S, Rouze P, Sterck L, Toppo S, Lazzari B, Hellens R P, Durel C E, Gutin A, Bumgarner R E, Gardiner S E, Skolnick M, Egholm M, van de Peer Y, Salamini F, Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nat Genet*, 42: 833 – 839.
- Vogel J P, Woeste K W, Theologis A, Kieber J J. 1998. Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene ACS5 of *Arabidopsis* confer cytokinin insensitivity and ethylene overproduction respectively. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 4766 – 4771.
- Wakasa Y, Harada T. 2001. DNA markers for ethylene production and skin color in apple fruit. *Regul Plant Growth Dev*, 36: 125 – 130.
- Wakasa Y, Kudo H, Ishikawa R, Akada S, Senda M, Niizeki M, Harada T. 2006. Low expression of an endopolygalacturonase gene in apple fruit with long-term storage potential. *Postharvest Biol Technol*, 39: 193 – 198.
- Wang A, Tan D, Tatsuki M, Kasai A, Li T, Saito H, Harada T. 2009a. Molecular mechanism of distinct ripening profiles in ‘Fuji’ apple fruit and its early maturing sports. *Postharvest Biol Technol*, 52: 38 – 43.
- Wang A, Yamakake J, Kudo H, Wakasa Y, Hatsuyama Y, Igarashi M, Kasa i A, Li T, Harada T. 2009b. Null mutation of the *MdACS3* gene coding for a ripening-specific 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase leads to long shelf life in apple fruit. *Plant Physiol*, 151: 391 – 399.
- Wiersma P A, Zhang H, Lu C, Quail A, Toivonen P M A. 2007. Survey of the expression of genes for ethylene synthesis and perception during maturation and ripening of ‘Sunrise’ and ‘Golden Delicious’ apple fruit. *Postharvest Biol Technol*, 44: 204 – 211.
- Yang S F, Hoffman N E. 1984. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol*, 35: 155 – 189.
- Yoshida H, Nagata M, Saito K, Wang K L C, Ecker J R. 2005. *Arabidopsis* ETO1 specifically interacts with and negatively regulates type 2 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthases. *BMC Plant Biol*, 5: 14.
- Yoshida H, Wang K L C, Chang C M, Mori K, Uchida E, Ecker J R. 2006. The ACC synthase TOE sequence is required for interaction with ETO1 family proteins and destabilization of target proteins. *Plant Mol Biol*, 62: 427 – 437.
- Zhu Y, Rudell D R, Mattheis J P. 2008. Characterization of cultivar differences in alcohol acyltransferase and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase gene expression and volatile ester emission during apple fruit maturation and ripening. *Postharvest Biol Technol*, 49: 330 – 339.