

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2012.00412

香蕉品质相关功能基因组学的研究进展

刘菊华¹, 徐碧玉¹, 张静¹, 王甲水², 贾彩红¹, 张建斌¹, 金志强^{1,2}

1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 农业部热带作物生物技术重点开放实验室, 海口 571101;
2. 中国热带农业科学院海口实验站, 海口 570102

摘要: 香蕉是重要的热带水果之一, 是热区人民脱贫致富的主要经济来源。香蕉品质一直是人们关注的焦点。

文章综述了近年来香蕉果实品质如成熟、软化、糖代谢及香气相关功能基因分离和鉴定等方面的最新研究进展, 将有助于从源头上对香蕉进行创新性的探索与研究, 支撑香蕉品质改良和新品种培育。

关键词: 香蕉; 品质; 功能基因; 分离; 鉴定

Research progress on banana functional genomics involved in fruit quality

LIU Ju-Hua¹, XU Bi-Yu¹, ZHANG Jing¹, WANG Jia-Shui², JIA Cai-Hong¹, ZHANG Jian-Bin¹, JIN Zhi-Qiang^{1,2}

1. Key laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Ministry of Agriculture, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China;
2. Haikou Experimental Station, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571102, China

Abstract: Banana is one of the most important tropical fruits and main economical resource for tropical people. Banana quality is always becoming a focus for people to follow with interest. Here, we reviewed recent research progresses on isolation and identification of banana genes involved in fruit quality such as ripening, softening, glycometabolism, and scent, which will help us explore their functions and facilitate banana quality improvement.

Keywords: banana; quality; functional gene; isolation; identification

香蕉(*Musa accuminata* Colla)是重要的热带水果, 年产 1 亿吨以上, 是全球近 5 亿人口的主食, 是热带亚热带贫困地区人民经济收入的重要来源, 因此, 香蕉对发展中国家脱贫致富具有非常重要的作用。随着经济社会的不断发展和人民生活水平的提

高, 对果实品质的要求也越来越高。从今年 4 月下旬的“香蕉有毒”事件再次折射出了这样的事实, 即香蕉果实品质一直是人们关注的焦点和核心。因此如何提高香蕉果实的品质, 充分发挥香蕉的市场潜力就成为限制香蕉产业化发展的关键问题。本文围

收稿日期: 2011-09-27; 修回日期: 2012-01-18

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 30960232), 国家现代香蕉产业技术体系(编号: CARS-32)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(编号: ITBB110202) 资助

作者简介: 刘菊华, 博士, 副研究员, 研究方向: 园艺作物分子遗传学。Tel: 0898-66890772; E-mail: juhua69@126.com

通讯作者: 金志强, 博士, 研究员, 研究方向: 作物分子遗传学。Tel: 0898-66890772; E-mail: zhiqiangjin2001@yahoo.com.cn

网络出版时间: 2012-3-16 14:50:48

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20120316.1450.003.html>

绕香蕉品质形成这一关键问题,综述了近年来香蕉品质相关的功能基因组学的最新研究进展,以期对香蕉品质改良提供一定的理论依据。

1 香蕉品质相关功能基因较大规模分离鉴定

近5年来,对于香蕉功能基因的分离研究,国际上比较系统的研究有4例报道。2006年, Gupta等^[1]采用mRNA差异显示的方法从香蕉果实中分离了22个与成熟相关基因,其中只有2个基因是已报道基因。转录水平上的分析表明有6个基因下调表达,16个基因上调表达,且大部分是在果实中特异表达。1-MCP处理抑制了果实成熟也抑制了大多数上调基因的表达,10~30 min的乙烯处理诱导了4个上调基因的表达,30~60 min的乙烯处理抑制了2个下调基因的表达。这表明这些基因的表达是直接间接受乙烯调控的。生物信息学分析结果表明这些基因的功能涉及信号转导、防御反应、软化和其它未知功能。2007年, Manrique-Trujillo等^[2]采用抑制消减文库的方法分离了一些香蕉采后晚期的100多条EST序列,其中84个EST上调表达,36个EST下调表达,并对其的一些序列进行了鉴定,发现它们的功能参与了果实成熟、逆境和芳香物质的合成代谢等方面。

Xu等^[3]选取采后在空气中分别放置0、48 h的香蕉果实(0号、2号),以2号作为检测子、0号作为驱动子,进行抑制差减杂交。为了研究抑制消减文库所获得的cDNA在果实采后成熟早期表达特性,采用微阵列(Microarray)技术对这些cDNA片段进行基因表达差异分析,获得了289个香蕉果实成熟早期差异表达基因,许多低丰度的cDNA被分离出来。这些分离到的cDNA所编码的产物与基础代谢、果实品质形成、信号转导、转录调控、蛋白质储藏、细胞间运输、细胞生长与发育、抗逆等过程相关。该研究所获得的低丰度基因远远多于以前的研究,而且分离鉴定出很多转录调控因子。为了进一步研究香蕉果实采后乙烯生物合成启动期基因在转录水平上的变化规律,再次利用基因芯片技术,从抑制消减文库中所获得的289个cDNA片段中,筛选出在采后成熟乙烯生物合成启动期差异表达的基因22个,其中上调基因16个,下调基因6个。揭示了在香蕉果实成熟乙烯生物合成启动后,有许多生理生化过程如氨基酸代谢、钾离子、有机酸代谢以及信号转导等参

与其中^[4]。

2 香蕉品质相关功能基因小规模分离鉴定

2.1 香蕉成熟相关的基因

香蕉是典型的呼吸跃变型果实,研究证明香蕉的成熟过程是由乙烯生物合成所诱导,并产生呼吸高峰^[5]。鉴于香蕉果实生理上的特殊性,很多成熟相关的基因被分离鉴定出来并进行了较为深入的研究。

ACC合成酶是乙烯生物合成过程中的关键酶,它催化S-腺苷蛋氨酸向ACC的转化,在乙烯生物合成过程中起非常重要的调节作用。香蕉果实成熟过程中乙烯的释放是与ACC(1-aminocyclopropane-1-carboxylate, ACC)含量、ACC合成酶基因(MA-ACS1)转录水平以及ACC合成酶活性的显著增加紧密关联的。香蕉基因组中至少有9个ACC合成酶基因, Southern blotting分析结果表明它们分别位于香蕉基因组不同部位,只有MACS1在果实成熟过程中受外源乙烯诱导,这表明MACS1是与香蕉果实成熟相关的重要一员^[6]。ACS1基因序列在植物中高度保守,在苹果和番茄中,香蕉ACS1与共因子5-磷酸吡哆醛(PLP)和抑制剂氨乙氧基乙烯基甘氨酸(AVG)形成复合物^[7]。2008年, Roy等^[8]研究了香蕉ACS1和编码ACC氧化酶基因——ACO1在不同处理条件下转录水平和蛋白质水平上表达的差异,结果表明,外源乙烯和生长素诱导ACS1基因的表达,而ACO1基因只在乙烯处理之后跃变高峰之前微量增加表达且不受生长素的诱导。因此,生长素处理的香蕉果实比乙烯处理的香蕉果实的乙烯释放量要低得多。相反,伤害和冷处理的香蕉果实中,这两个基因的表达都下调,因此抑制了乙烯生物合成和释放。这表明, ACS1和ACO1基因的表达受环境因素的诱导,与果实采后乙烯生物合成具有生理上的相关性。Do等^[9]从香蕉果实中克隆了一个新的ACC氧化酶基因Mh-ACO1,它与已报道的Mh-ACO2基因只有65%的相似性,这两个基因在香蕉果实成熟过程中的表达水平都呈现上升趋势且受外源乙烯的诱导,因此推测这两个基因都在果实成熟过程中的乙烯生物合成过程中发挥重要作用。

为了研究香蕉果实成熟过程中乙烯生物合成的反馈调节作用。Inaba等^[10]鉴定1-MCP在香蕉果实

成熟中的作用,发现 1-MCP 预处理完全阻止了呼吸高峰前的丙烯处理对成熟的诱导作用,然而在成熟后的处理则促进乙烯生物合成。对于呼吸高峰前的果实,不管早期乙烯的诱导效果,高浓度的丙烯还是强烈抑制乙烯生物合成。把丙烯催熟的果实再用 1-MCP 处理后,显著促进了果肉中的乙烯生物合成、增加了 ACC 合成酶活性、提高了 ACC 含量。相反,在果皮中,1-MCP 通过降低 *MA-ACS1* 和 *MA-ACO1* 转录水平以及 ACS 和 ACO 酶活性从而阻止了乙烯生物合成和果实成熟进程。这些结果表明,香蕉果实成熟过程中乙烯生物合成可能在果肉组织中是负调控、在果皮组织中是正调控的,并且这种不同的反馈调节过程在 *MA-PL*、*MA-Exp* 和 *MA-MADS* 基因上也得到了验证。

成熟乙烯生物合成的启动还受转录因子所调控。MADS 基因编码的蛋白是一类数目庞大的转录因子家族,通过与其他转录因子相互作用形成同源或异源二聚体,调控着整个植株的生长发育^[11]。最早对植物 MADS 基因功能的研究主要集中在花上,近年来,科学家们证明了 MADS 转录因子对果实的发育和成熟的调控作用。自 2002 年 Vrebalov 等^[12]发现由于番茄中的一个 MADS 基因——*LeMADS-RIN* 基因的突变使果实不能成熟以后,2007 年,Inaba 等^[10]研究了香蕉中获得的一个 MADS 基因 *MaMADS2* 与成熟的关系,他们利用荧光定量 PCR 方法研究了该基因在香蕉果实采后成熟过程中的表达,基因在香蕉果皮和果肉中表现乙烯反馈调节,结果显示 MADS 基因作为转录因子在调节跃变型果实成熟过程中扮演着重要角色。2009 年, Liu 等^[13]从香蕉果实中分离了一个 MADS 基因 *MuMADS1*,它是一个 D 类 MADS 基因,主要在花、果实及假茎中表达。在果实采后不同成熟阶段的表达呈现出受外源乙烯诱导,1-MCP 抑制的特点,表现出与香蕉果实采后成熟的密切相关性。采用农杆菌介导的遗传转化方法将 MADS 转录因子基因转入番茄,发现番茄果实的成熟期、果实大小、形状、颜色、Vc 含量、可溶性固形物含量、有机酸含量等都发生了显著的变化,证明 MADS-box 转录因子确实参与调控果实成熟及品质相关的各种代谢过程,为下一步在香蕉中充分利用该基因调控果实成熟和品质奠定了基础。Elitzur 等^[14]从香蕉中克隆了 6 个 MADS 基因 *MaMADS1-*

MaMADS6, 分别研究了它们在香蕉果实发育采后成熟过程中果皮和果肉中的表达、乙烯诱导下的表达等,结果表明果皮和果肉中发生的是两个相对独立的成熟过程。在果肉中,主要是与 *MaMADS2*、4 和 5 以及后期的 *MaMADS1* 的激活有关,而在果皮中,主要是与 *MaMADS1* 和 3 的转录激活有关。*MaMADS2* (*SEP3* 的同源基因)在果肉中乙烯生物合成增加的上游起作用,这与番茄的 *LeMADS-RIN* 的功能相似。Wang 等^[15]从香蕉果实中分离了一个编码 181 个氨基酸的全长 ADP 核糖基化因子基因 *MaArf* (ribosylation factor, ARF),该基因包含有 5 个外显子和 4 个内含子,定位于细胞质中,该基因在果实采后成熟过程中的表达受外源乙烯的诱导,受 1-MCP 的抑制,表明该基因参与与香蕉果实的成熟过程。

香蕉果实的成熟还涉及其它的生理代谢过程。几丁质酶 (EC 3.2.1.14) 是一种以几丁质 (β -1,4-乙酰葡萄糖胺线性同聚物) 为底物的水解酶,其主要功能是维持细胞壁的形态。虽然植物细胞壁中没有几丁质,但几丁质酶却普遍存在于植物体中。III 类酸性几丁质酶是很重要的一类几丁质酶,近年来关于它的研究也有几例成功的报导。Peumans 等^[16]从蛋白质水平上发现了发育的幼嫩香蕉果实中含有大量的 III 类几丁质酶 (占蛋白质总量的 40%), 它们可能是营养贮藏蛋白,为成熟相关蛋白的生物合成提供了重要的氨基酸给源。然而,到目前为止,没有从转录水平上证明 III 类酸性几丁质酶在香蕉果实发育及成熟过程中的作用。2007 年, Xu 等^[17]从香蕉果实 SSH cDNA 文库中分离到了克隆数最多 (BR-117、BR180、BR-190 与 BR-208) 的 III 类酸性几丁质酶基因,研究了其与果实成熟的关系,芯片表达结果表明它们在香蕉果实采后成熟过程中下调表达,因此推测该基因与香蕉果实采后成熟密切相关。后来,刘菊华等^[18]对在乙烯催熟处理、1-MCP 抑制处理以及对照条件下的香蕉果实采后不同时期分别进行了基因的差异表达分析,研究了 III 类酸性几丁质酶与香蕉果实采后成熟的关系。对经乙烯和 1-甲基环丙烯 (1-MCP) 处理的巴西香蕉果实采后乙烯释放量、III 类酸性几丁质酶基因 (*MaCH111*) 表达以及几丁质酶活性进行了测定。结果表明: 乙烯催熟处理的香蕉果实,乙烯释放量比对照处理的果实提前 15 d 达到高峰; 1-MCP 处理的香蕉果实,乙烯生物合成和果

实成熟明显地受到了抑制。外源乙烯加速了*MaCHII*基因的下调表达和III类酸性几丁质酶活性的下降,*MaCHII*表达量和III类酸性几丁质酶活性分别在采后第3 d和第4 d下降到最小值。1-MCP处理使*MaCHII*基因呈现上调表达,III类酸性几丁质酶活性上升,*MaCHII*基因表达量和III类酸性几丁质酶活性分别在采后18 d和25 d达到高峰。*MaCHII*基因可能与香蕉果实采后成熟呈负相关。

外界环境条件通过影响基因表达也调控香蕉果实的成熟过程。2011年,Yan等^[19]报道了高温加速果实软化,促进乙烯生物合成,阻碍了香蕉果实的退绿过程,导致了果实非正常成熟。此外,在高温贮藏的香蕉果实中,*MaACS1*、*MaACO1*、*MaERS2*、*MaERS3*、*MaERS4*、*MaEIL1*、*MaEIL3*和*MaEIL4*基因的表观水平平均上升。然而,在高温之前用1-MCP处理却延迟了果实的非正常成熟过程同时抑制了*MaACS1*、*MaERS2*、*MaERS3*、*MaEIL1*、*MaEIL3*和*MaEIL4*基因的表达。这些结果表明,这些与乙烯信号转导相关的基因的表达可能参与了香蕉果实的高温非正常成熟。

2.2 香蕉果实成熟软化相关基因

果实软化是成熟的一个重要特征。引起果实软化的主要原因是细胞壁物质的降解,果实细胞壁中层的果胶质变为可溶性的果胶,果肉细胞相互分离。果实成熟期间多种与细胞壁有关的水解酶活性上升,细胞壁结构成分及聚合物分子大小发生显著变化,如纤维素长链变短,半纤维素聚合分子变小,其中变化最显著的是果胶物质的降解。不溶性的原果胶分解成可溶性的果胶或果胶酸,果胶酸甲基化程度降低,果胶酸钙分解^[20]。除此之外,香蕉果实成熟软化是与淀粉的降解直接相关的^[21]。Shiga等^[22]对3个香蕉品种在不同的成熟期的细胞壁碳水化合物和果肉淀粉的水平以及可溶性细胞壁多糖的水平进行分析,结果发现Nanicão和Mysore果实软化似乎与淀粉的降解水平密切相关,而对于plantain Terra,细胞壁多糖的降解以及淀粉的降解对于果实软化具有同样重要的作用。因此,香蕉果实软化是依赖于品种特性的淀粉降解,可溶性多糖积累的结果。然而,细胞壁相关的变化不容忽视。

果胶裂解酶是果实成熟软化过程中的关键酶。

Marín-Rodríguez等^[23]从成熟的香蕉果实中分离了两个果胶裂解酶基因,它们只在果实中表达与果实成熟密切相关。在酵母中表达出了具有果胶裂解酶活性的重组蛋白,这表明该基因在植物中也有可能编码果胶裂解酶蛋白。在果实成熟过程中,果胶裂解酶活性的升高是与果肉中可溶性聚糖醛酸酯的含量升高紧密相关的。同年,Payasi和Sanwal^[24]也从香蕉果实中分离了果胶裂解酶,它是依赖于 Mg^{2+} 、 Ca^{2+} 的酶。在果实呼吸跃变之前没有检测到其活性,但在呼吸跃变早期活性上升且到达呼吸峰时达到最大值,在呼吸跃变峰之后和过熟的香蕉果实中活性下降。将香蕉果实用25 ppm的乙烯处理24 h和用1 mmol/L 2,4-D处理4 h,都加速了果实的成熟,果胶裂解酶活性和呼吸峰分别在处理后的第4 d和第10 d达到最大值,而对照果实是在第16 d达到最大值。赤霉素处理的香蕉果实则延迟了果实成熟以及果胶裂解酶活性和呼吸峰的出现,到第19 d才到达最大值^[25]。

多聚半乳糖醛酸酶(Polygalacturonase, PG)可催化多聚半乳糖醛酸 α -1,4键的水解,是果实成熟期间变化最显著的酶,在果实软化过程中起着重要的作用。Asif和Nath^[26]分离了4个多聚半乳糖醛酸酶基因片段,*MAPG1*(GenBank登录号:AF311881)、*MAPG2*(GenBank登录号:AF311882)、*MAPG3*(GenBank登录号:AF542382)和*MAPG4*(GenBank登录号:AY603341)。*MAPG3*和*MAPG4*的表达受乙烯诱导,与果实成熟相关,然而*MAPG1*是一个组成型表达的基因,*MAPG2*与衰老相关。这些结果表明香蕉果实成熟过程的软化至少是由于4个PG基因协同作用的结果。多聚半乳糖醛酸酶的活性在果实成熟的整个过程中都呈现上升趋势,甚至在呼吸跃变峰之后活性仍然增加^[24]。乙烯和2,4-D处理的香蕉果实多聚半乳糖醛酸酶的活性高峰提前出现,而赤霉素处理的香蕉果实则延迟了多聚半乳糖醛酸酶的活性高峰的出现^[25]。

果胶甲酯酶是果实成熟软化过程中的又一关键酶。2009年,Mbégué-A-Mbégué等^[27]分析了3个果胶甲酯酶基因(PME)和7个木葡聚糖转糖苷酶/水解酶基因(XTH)、多聚半乳糖醛酸酶基因(PG)、膨大素(EXP)、果胶裂解酶基因(PEL)在中间区和脱落区的表达。结果所有这些基因在这两个区域都有表达,但表达情况不一样。*MaPME1*、*MaPG1*和*MaXTH4*

的表达无变化。*MaPME3* 和 *MaPG3* 基因在果实成熟的晚期在中间区域的表达显著上升。与 *MaXTH3*、*MaXTH5* 和 *MaEXP2* 相反, *MaPME2*、*MaPEL1*、*MaPEL2*、*MaPG4*、*MaXTH6*、*MaXTH8*、*MaXTH9*、*MaEXP1*、*MaEXP4* 和 *MaEXP5* 在整个成熟过程中在脱落区的表达明显上升。这些结果表明果指脱落和果皮软化具有相同的作用机理。

β -半乳糖苷酶通过 β -1,4 糖苷键裂解细胞壁的半纤维素从而参与果实的成熟软化过程。为了研究香蕉果实软化与 β -半乳糖苷酶的关系, Zhuang 等^[28]从香蕉果实中克隆了一个 927 bp 的 β -半乳糖苷酶基因 *MA-Gal*, 它编码 309 个氨基酸, 具有 5 个典型的保守结构域。Northern 杂交分析结果表明在呼吸跃变高峰之前该基因的表达水平较低, 然后逐渐升高, 到跃变峰后达到最大值。这些结果表明 *MA-Gal* 在香蕉果实成熟和软化过程中发挥重要作用。

此外, 2010 年, Roy 等^[29]证明了 β -1,3 葡聚糖酶基因可能参与了果实成熟软化的生理过程。因为香蕉 β -1,3 葡聚糖酶基因的表达受外源乙烯强诱导, 受 ABA 部分诱导, 受生长素和光周期的负调控, 不受伤害诱导。此外, 在乙烯处理条件下, β -1,3 葡聚糖酶基因的蛋白质水平和酶活性的增加是与果实软化密切相关的。

2.3 香蕉糖代谢相关的基因

糖的代谢是整个生物代谢的中心, 它沟通了蛋白质代谢、脂类代谢、核酸代谢及次生物质代谢。糖类的运输及分配沟通了源器官和库器官。叶片光合作用合成的糖分, 通过韧皮部的装载运到库端, 卸载进入库细胞, 为库的生长提供氧分。如花粉管的萌发、果实、子房的膨大与成熟。香蕉果实发育过程中主要以淀粉积累为主, 在后期有可溶性糖的积累, 主要是蔗糖、果糖和葡萄糖的积累, 其来源主要是淀粉的水解。香蕉果实糖积累的动态变化, 蔗糖、果糖和葡萄糖是香蕉果实中主要的可溶性糖。在不同香蕉种类与品种之间的果实糖积累类型不同。

未熟的香蕉果实中含有大量的淀粉, 一般高达 20%~25%, 而且不同品种的成熟香蕉果实中的淀粉含量也不一样。 β -淀粉酶(EC 3.2.1.2)是糖基水解酶家族的成员之一, 能水解淀粉的 α -1,4 糖苷键, 从链的非还原性末端去除麦芽糖亚基, 因此, β -淀粉酶

在 α 糖苷链的降解过程中发挥重要的作用。 β -淀粉酶活性的增加是与淀粉的降解过程密切相关的, β -淀粉酶基因在香蕉果实成熟过程中是一个上调表达的基因^[30], β -淀粉酶活性受 IAA 抑制^[31]。2006 年, do Nascimento 等^[32]从香蕉果实中分离了一个全长的 β -淀粉酶基因, 它在正常成熟的果实和乙烯处理的果实中都是上调表达的, 在 1-MCP 处理的果实中基本检测不到 β -淀粉酶蛋白质。这说明 β -淀粉酶活性的增加是由于香蕉果实中该酶从头生物合成的结果。

淀粉磷酸化酶(EC 2.4.1.1)以淀粉为底物, 在淀粉合成和分解过程中发挥重要作用。在香蕉果实成熟过程中 α -1,4 葡聚糖磷酸化酶活性受成熟诱导, 与淀粉降解过程密切相关。 α -1,4 葡聚糖磷酸化酶活性主要是由基因表达的变化造成的^[33]。2008 年, 迟光红等^[34]根据 SSH 片段 (BR63) 设计引物进行全长基因扩增。获得一个具有完整阅读框架(ORF)的 α -1,4 葡聚糖磷酸化酶基因序列, 包含 1 959 碱基, 编码 652 个氨基酸。在 NCBI 中进行 Blastx 比较, 与水稻、小麦的 α -1,4 葡聚糖磷酸化酶基因同源性分别为 72% 和 71%。研究了该基因在香蕉果实采后成熟过程中与乙烯释放量、淀粉含量及酶活性之间的关系, 结果证实香蕉果实采后果肉中淀粉磷酸化酶活性在呼吸、乙烯跃变前开始增强, 随后迅速增加。与果实中淀粉大量降解、糖及其他次生代谢产物迅速增加一致。基因表达呈现出在乙烯跃变前表达量增加, 随着乙烯释放量的增加表达量降低。由于淀粉为采后香蕉果实中主要成分(成熟果实淀粉含量占鲜重的 70%~80%), 在采后果实品质形成过程中, 淀粉大量水解形成可溶性糖, 糖含量达到 16%~20%, 而在最佳食用期果实淀粉含量已降至 1% 以下。因此, 在果实采后成熟的过程中, 正是由于淀粉的转化使得果实具有了独特的风味、适宜的硬度、丰富的营养。因此研究淀粉酶的功能对了解果实成熟机理及果实品质的形成具有重要意义。

蔗糖磷酸合成酶(SPS)是香蕉果实成熟过程中蔗糖合成的关键酶之一, 与果实发育、碳水化合物运输、品质形成及成熟衰老有着密切关系。李雯研究了在不同的后熟条件下, SPS 与香蕉果实呼吸速率、乙烯释放、硬度变化以及糖积累的关系, SPS 与其他蔗糖代谢相关酶类的内在联系; 研究了采收饱满度对香蕉果实 SPS 酶活性和贮藏品质的影响; 研

究了SPS cDNA片段的克隆及不同后熟条件和不同成熟阶段香蕉果实SPS基因表达水平的变化,以探讨香蕉果实SPS的作用机理及其与基因表达和成熟衰老的关系,为控制香蕉的成熟和提高香蕉果实的贮藏品质提供科学依据。研究结果表明采后香蕉果实SPS活性变化与果实软化、淀粉降解和蔗糖形成有密切关系。香蕉果实后熟过程中,果实硬度和淀粉含量随着贮藏时间的延长不断下降,蔗糖含量则逐渐增加,至高峰后下降;乙烯吸收剂明显延缓这些变化的发生,而乙烯处理则加速这些变化的发生。表明SPS活性的提高对于果实蔗糖积累发挥着重要作用。同时SPS在果实软化、淀粉降解中也有着非常重要的作用^[35]。后来, Roy等^[36]又报道了蔗糖磷酸合成酶基因的转录水平和蛋白质水平都显著地受到外源乙烯和光照的诱导。为了进一步研究该基因的转录调节机理,分离了该基因的启动子,发现香蕉细胞核提取物能与启动子区域的很多顺式作用元件如GCC-box ERE、ARE motifs (TGTCTC)、LTRE (CCGAA)、GAGA-box (GAGA...), GATA-box LRE (GATAAG)结合,证明SPS基因受植物激素和光照诱导的转录调节机理。

苹果酸脱氢酶(Malate dehydrogenase, MDH)是合成苹果酸的关键酶之一,催化苹果酸和草酰乙酸的相互转化,参与众多生理代谢途径,如TCA循环、C4循环、脂肪酸的氧化、呼吸作用、氮同化等,因此MDH在植物的糖代谢过程中发挥着重要的作用,影响果实的酸度和口感。2011年,邓秋菊等^[37]以巴西香蕉果实为材料,分离了苹果酸脱氢酶基因,研究果实采后正常成熟过程中乙烯释放速率、苹果酸脱氢酶活性、苹果酸、淀粉以及可溶性总糖含量的变化。结果表明:香蕉果实采后成熟过程中乙烯释放速率在采后10 d开始增加,到采后14 d达到高峰;MDH酶活性在采后10 d迅速增强,到采后16 d达到峰值;苹果酸含量在果实成熟早期上升,晚期下降,可溶性总糖含量逐渐增加,而淀粉含量持续下降。推测MDH通过参与果实物质代谢而改变香蕉品质。

2.4 香蕉香气相关的基因

芳香物质是衡量香蕉果实品质的又一重要指标。香蕉果实香气的主要成份是最容易被果蝇识别的2-戊基3-羟基己酸酯等酯类物质^[38],此外还有醇

类、酮类、醛类、萜类和挥发性酚类物质等,这些物质主要由脂肪酸、氨基酸和次生代谢产生,受基因表达调控。2004年,Beekwilder等^[39]从香蕉果实中克隆了乙醇乙酰基转移酶基因(Alcohol acyltransferases, AATs),首先在大肠杆菌中生产出了这种重组酶,并测定了在不同乙醇和乙酰辅酶A底物条件下的酶活性,结果发现果实的香气在很大程度上取决于前体物质的供给情况。采用转基因的方法将该基因在矮牵牛中过表达,尽管可以稳定检测到SAAT基因的表达和相应的酶活性,但转基因植物芳香物质的含量并未发生改变。给转基因植物的外植体营养中添加异戊醇以后,导致了乙酰酯这种芳香物质的合成和释放。这表明乙醇底物对香蕉果实芳香物质的合成起非常重要的作用。宁文彬等^[40]从香蕉果实中分离获得了乙醇脱氢酶基因,研究证明该基因的表达受外源乙烯诱导而不受逆境因素的影响,乙醇脱氢酶活性与乙烯代谢呈正相关,推测该基因参与了香蕉果实成熟过程中芳香物质的代谢过程。

综上所述,近年来香蕉在高通量功能基因的分离及重要品质相关基因的功能鉴定等方面都向前迈出了一大步,取得了可喜的成绩。但是目前对于香蕉品质相关的功能基因的挖掘还比较片面,利用水平还十分有限,特别是香蕉糖代谢以及芳香物质的生物合成与代谢相关的功能基因的分离鉴定及利用工作相当缺乏,有些与性状相关的基因虽然已经分离出来,但利用的广度和深度远没有达到预期的目标,要想从根本上改良香蕉的品质还有相当大的难度。因此,笔者认为,全球从事香蕉功能基因组学研究的科学家们必须携起手来,加大力度对香蕉品质相关香蕉重要功能基因分离鉴定工作的研究,早日构建系统而详细的香蕉功能基因组图谱,从源头进行创新性的探索与研究,为香蕉品质改良提供基因资源的基础。

参考文献(References):

- [1] Gupta SM, Srivastava S, Sane AP, Nath P. Differential expression of genes during banana fruit development, ripening and 1-MCP treatment: Presence of distinct fruit specific, ethylene induced and ethylene repressed expression. *Post-harvest Biol Technol*, 2006, 42(1): 16–22. DOI
- [2] Manrique-Trujillo SM, Ramirez-López AC, Ibarra-Laclette

- E, Gómez-Lim MA. Identification of genes differentially expressed during ripening of banana. *J Plant Physiol*, 2007, 164(8): 1037–1050. [DOI](#)
- [3] Xu BY, Su W, Liu JH, Wang JB, Jin ZQ. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Planta*, 2007, 226(2): 529–539. [DOI](#)
- [4] Jin ZQ, Xu BY, Liu JH, Su W, Zhang JB, Yang XL, Jia CH, Li MY. Identification of genes differentially expressed at the onset of the ethylene climacteric in banana. *Postharvest Biol Technol*, 2009, 52(3): 307–309. [DOI](#)
- [5] 曾骥. 果树生理学. 北京: 北京农业大学出版社, 1992: 237–238. [DOI](#)
- [6] Huang FC, Do YY, Huang PL. Genomic organization of a diverse ACC synthase gene family in banana and expression characteristics of the gene member involved in ripening of banana fruits. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(11): 3859–3868. [DOI](#)
- [7] Choudhury SR, Singh SK, Roy S, Sengupta DN. An insight into the sequential, structural and phylogenetic properties of banana 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase 1 and study of its interaction with pyridoxal-5'-phosphate and aminoethoxyvinylglycine. *J Biosci*, 2010, 35(2): 281–294. [DOI](#)
- [8] Roy CS, Roy S, Sengupta DN. Characterization of transcriptional profiles of *MA-ACS1* and *MA-ACO1* genes in response to ethylene, auxin, wounding, cold and different photoperiods during ripening in banana fruit. *J Plant Physiol*, 2008, 165(18): 1865–1878. [DOI](#)
- [9] Do YY, Thay TS, Chang TW, Huang PL. Molecular cloning and characterization of a novel 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase gene involved in ripening of banana fruits. *J Agric Food Chem*, 2005, 53(21): 8239–8247. [DOI](#)
- [10] Inaba A, Liu XJ, Yokotani N, Yamane M, Lu WJ, Nakano R, Kubo Y. Differential feedback regulation of ethylene biosynthesis in pulp and peel tissues of banana fruit. *J Exp Bot*, 2007, 58(5): 1047–1057. [DOI](#)
- [11] 刘菊华, 徐碧玉, 张静, 金志强. MADS-box 转录因子的相互作用及对果实发育和成熟的调控. *遗传*, 2010, 32(9): 893–902. [DOI](#)
- [12] Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 2002, 296(5566): 343–346. [DOI](#)
- [13] Liu JH, Xu BY, Hu LF, Li MY, Su W, Wu J, Yang JH, Jin ZQ. Involvement of a banana MADS-box transcription factor gene in ethylene-induced fruit ripening. *Plant Cell Rep*, 2009, 28(1): 103–111. [DOI](#)
- [14] Elitzur T, Vrebalov J, Giovannoni JJ, Goldschmidt EE, Friedman H. The regulation of MADS-box gene expression during ripening of banana and their regulatory interaction with ethylene. *J Exp Bot*, 2010, 61(5): 1523–1535. [DOI](#)
- [15] Wang Y, Wu J, Xu BY, Liu JH, Zhang JB, Jia CH, Jin ZQ. Cloning of an ADP-ribosylation factor gene from banana (*Musa acuminata*) and its expression patterns in postharvest ripening fruit. *J Plant Physiol*, 2010, 167(12): 989–995. [DOI](#)
- [16] Peumans WJ, Proost P, Swennen RL, van Damme EJM. The abundant class III chitinase homolog in young developing banana fruits behaves as a transient vegetative storage protein and most probably serves as an important supply of amino acids for the synthesis of ripening-associated proteins. *Plant Physiol*, 2002, 130(2): 1063–1072. [DOI](#)
- [17] Xu BY, Su W, Liu JH, Wang JB, Jin ZQ. Differentially expressed cDNAs at the early stage of banana ripening identified by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Planta*, 2007, 226(2): 529–539. [DOI](#)
- [18] Liu JH, Xu BY, Zhang JB, Jia CH, Jin ZQ. A class III acidic chitinase gene was closely correlated with postharvest banana fruit ripening. *Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica*, 2010, 30(10): 2022–2027. [DOI](#)
- [19] Yan SC, Chen JY, Yu WM, Kuang JF, Chen WX, Li XP, Lu WJ. Expression of genes associated with ethylene-signalling pathway in harvested banana fruit in response to temperature and 1-MCP treatment. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(4): 650–657. [DOI](#)
- [20] 金志强. 香蕉果实生长发育的生理学与分子生物学. 北京: 中国农业大学出版社, 2006: 39–46. [DOI](#)
- [21] Soares CA, Peroni-Okita FH, Cardoso MB, Shitakubo R, Lajolo FM, Cordenunsi BR. Plantain and banana starches: granule structural characteristics explain the differences in their starch degradation patterns. *J Agric Food Chem*, 2011, 59(12): 6672–6681. [DOI](#)
- [22] Shiga TM, Soares CA, Nascimento JR, Purgatto E, Lajolo FM, Cordenunsi BR. Ripening-associated changes in the amounts of starch and non-starch polysaccharides and their contributions to fruit softening in three banana cultivars. *J Sci Food Agric*, 2011, 91(8): 1511–1516. [DOI](#)
- [23] Marín-Rodríguez MC, Smith DL, Manning K, Orchard J, Seymour GB. Pectate lyase gene expression and enzyme activity in ripening banana fruit. *Plant Mol Biol*, 2003, 51(6): 851–857. [DOI](#)
- [24] Payasi A, Sanwal GG. Pectate lyase activity during ripening

- of banana fruit. *Phytochemistry*, 2003, 63(3): 243–248. [DOI](#)
- [25] Payasi A, Misra PC, Sanwal GG. Effect of phytohormones on pectate lyase activity in ripening *Musa acuminata*. *Plant Physiol Biochem*, 2004, 42(11): 861–865. [DOI](#)
- [26] Asif MH, Nath P. Expression of multiple forms of polygalacturonase gene during ripening in banana fruit. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43(2): 177–184. [DOI](#)
- [27] Mbéguié-A-Mbéguié D, Hubert O, Baurens FC, Matsumoto T, Chillet M, Fils-Lycaon B, Sidibé-Bocs S. Expression patterns of cell wall-modifying genes from banana during fruit ripening and in relationship with finger drop. *J Exp Bot*, 2009, 60(7): 2021–2034. [DOI](#)
- [28] Zhuang JP, Su J, Li XP, Chen WX. Cloning and expression analysis of β -galactosidase gene related to softening of banana (*Musa* sp.) fruit. *J Plant Physiol Mol Biol*, 2006, 32(4): 411–419. [DOI](#)
- [29] Roy CS, Roy S, Singh SK, Sengupta DN. Molecular characterization and differential expression of β -1,3-glucanase during ripening in banana fruit in response to ethylene, auxin, ABA, wounding, cold and light-dark cycles. *Plant Cell Rep*, 2010, 29(8): 813–828. [DOI](#)
- [30] Medina-Suarez R, Manning K, Fletcher J, Aked J, Bird CR, Seymour GB. Gene expression in the pulp of ripening bananas. *Plant Physiol*, 1997, 115(2): 453–461. [DOI](#)
- [31] Purgatto E, Lajolo FM, do Nascimento JRO, Cordenunsi BR. Inhibition of β -amylase activity, starch degradation and sucrose formation by indole-3-acetic acid during banana ripening. *Planta*, 2001, 212(5–6): 823–828. [DOI](#)
- [32] do Nascimento JRO, Júnior AV, Bassinello PZ, Cordenunsi BR, Mainardi JA, Purgatto E, Lajolo MF. Beta-amylase expression and starch degradation during banana ripening. *Postharvest Biol Technol*, 2006, 40(1): 41–47. [DOI](#)
- [33] Mainardi JA, Purgatto E, Vieira A Jr, Bastos WA, Cordenunsi BR, do Nascimento JRO, Lajolo FM. Effects of ethylene and 1-methylcyclopropene (1-MCP) on gene expression and activity profile of α -1,4-glucan-phosphorylase during banana ripening. *J Agric Food Chem*, 2006, 54(19): 7294–7299. [DOI](#)
- [34] 迟光红, 徐碧玉, 贾彩红, 张建斌, 刘菊华, 金志强. 香蕉果实采后淀粉磷酸化酶活性、基因克隆及表达研究. 中国生物工程杂志, 2008, 28(增刊): 26–29. [DOI](#)
- [35] 李雯. 蔗糖磷酸合成酶与采后香蕉果实成熟衰老、糖代谢及基因表达的研究[学位论文]. 广州: 华南农业大学, 2006.
- [36] Choudhury SR, Roy S, Das R, Sengupta DN. Differential transcriptional regulation of banana sucrose phosphate synthase gene in response to ethylene, auxin, wounding, low temperature and different photoperiods during fruit ripening and functional analysis of banana SPS gene promoter. *Planta*, 2008, 229(1): 207–223. [DOI](#)
- [37] 邓秋菊, 刘菊华, 金志强, 徐碧玉. 香蕉果实采后成熟过程中苹果酸脱氢酶(MDH)及苹果酸含量的变化. 热带农业科学, 2011, 31(7): 1–5. [DOI](#)
- [38] Mowat J, Gries R, Khaskin G, Gries G, Britton R. (S)-2-pentyl (R)-3-hydroxyhexanoate, a banana volatile and its olfactory recognition by the common fruit fly, *Drosophila melanogaster*. *J Nat Prod*, 2009, 72(4): 772–776. [DOI](#)
- [39] Beekwilder J, Alvarez-Huerta M, Neef E, Verstappen FWA, Bouwmeester HJ, Aharoni A. Functional characterization of enzymes forming volatile esters from strawberry and banana. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 1865–1878. [DOI](#)
- [40] 宁文彬, 刘菊华, 贾彩红, 徐碧玉, 金志强. 香蕉果实采后乙醇脱氢酶活性与乙烯代谢的关系. 果树学报, 2009, 26(3): 386–389. [DOI](#)