

行政院國家科學委員會專題研究計畫 成果報告

不同後熟特性之番石榴果實 ACC 合酶基因之選殖與分析 研究成果報告(精簡版)

計畫類別：個別型
計畫編號：NSC 95-2313-B-002-068-
執行期間：95年08月01日至96年07月31日
執行單位：國立臺灣大學園藝學系暨研究所

計畫主持人：吳俊達

計畫參與人員：碩士班研究生：陳國恩

處理方式：本計畫可公開查詢

中華民國 96 年 10 月 31 日

行政院國家科學委員會補助專題研究計畫 成果報告

不同後熟特性之番石榴果實ACC 合成酶基因之選殖與分析

Cloning and Characterization of ACC Synthase Genes from Different
Ripeing-behaviour Guava Fruits

計畫類別： 個別型計畫 整合型計畫

計畫編號：NSC 95-2313-B-002-068

執行期間：95年8月1日至96年7月31日

計畫主持人：吳俊達

共同主持人：

計畫參與人員：陳國恩

成果報告類型(依經費核定清單規定繳交)：

精簡報告 完整報告

本成果報告包括以下應繳交之附件：

赴國外出差或研習心得報告一份

赴大陸地區出差或研習心得報告一份

出席國際學術會議心得報告及發表之論文各一份

國際合作研究計畫國外研究報告書一份

處理方式：除產學合作研究計畫、提升產業技術及人才培育研究計畫、列管計畫及下列情形者外，得立即公開查詢

涉及專利或其他智慧財產權，一年二年後可公開查詢

執行單位：台灣大學 園藝學系

中華民國 96 年 10 月 31 日

中文摘要

利用 RT-PCR 基因選殖策略，自番石榴果實 (*Psidium guajava* L.) 選殖出兩個 cDNA 片段，核苷酸長度分別為 1576 鹼基對、解碼 435 個胺基酸，與 977 個鹼基對、解碼 326 個胺基酸。由核苷酸定序結果與基因庫序列比對顯示，這兩個 cDNA 選殖系皆具有 ACC 合成酶 (ACC synthase, ACS) 應有的七個胺基酸保守區域，尤其 ACS 酵素活性區域 (第五保守區域 SLSKDMGLPGFR) 更呈現高度相同性，推測極可能是番石榴 ACS 基因無誤，分別命名為 *Pg-ACS1* 與 *Pg-ACS2*。以專一性 RT-PCR 引子，分析 *Pg-ACS1* 與 *Pg-ACS2* 基因在不同發育階段 ‘大蒂’ (更年期) 與 ‘珍珠拔’ (非更年期) 番石榴表現的情形，*Pg-ACS1* mRNA 在更年期 ‘大蒂’ 番石榴發育到綠熟期與後熟期才可偵測到明顯的累積。相反的，*Pg-ACS2* 基因只在 ‘珍珠拔’ 著果期有少量表現。因此推測，*Pg-ACS1* 基因應隸屬於乙烯合成系統 II，*Pg-ACS2* 基因則是系統 I 的 ACS。而非更年期 ‘珍珠拔’ 與更年期 ‘大蒂’ 拔番石榴後熟行為的差異點應該是前者無法表現 *Pg-ACS1* 基因，因而無法在後熟時期產生大量乙烯所致。

關鍵字：

番石榴 (*Psidium guajava* L.)、後熟、乙烯、ACC 合成酶

Abstract

Two cDNA fragments, 1576 bp encoding 435 amino acids and 977 bp encoding 326 amino acids, respectively, were amplified from total mRNA prepared from guava fruit tissues by RT-PCR gene cloning strategy. Sequence analysis revealed that both of these two cDNA fragments contain all the seven regions that are highly conserved among ACC (1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid) synthases (ACS). Notably, the amino acid sequence (SLSKDMGLPGFR) in the active-site of ACS enzyme (the fifth conserved region) is almost identical with the cases studied before. Therefore, it is very like that the two cDNA clones isolated are guava ACS genes and were named *Pg-ACS1* and *Pg-ACS2*, respectively. Gene expression patterns were investigated via RT-PCR differential display analysis in different fruit development stages of ‘Da-Di’, a climacteric guava variety, as well as ‘Jen-Ju Bar’, a nonclimacteric guava cultivar, by utilization of gene specific primers. The significant mRNA accumulation of *Pg-ACS1* was detected only in green mature and ripening phases of ‘Da-Di’ fruit tissues. In contrast, *Pg-ACS2* gene was not expressed in any fruit development stage examined in this research, except in fruit set stage of ‘Jen-Ju Bar’. Base on the gene expression pattern obtained, *Pg-ACS1* should belong to System II ACS isoform, and *Pg-ACS2*, on the other hand, will

attribute to System I counterpart. The key factor that causes the different ripening behaviors between ‘Da-Di’ and ‘Jen-Ju Bar’ is attributed to the lack of *Pg-ACSI* gene expression in the later variety during fruit ripening.

Keywords:

Guava (*Psidium guajava* L.); Ripening; Ethylene; 1-Aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase

目錄

一、報告內容	4
1、前言	4
2、研究目的	5
3、文獻探討	5
4、研究方法	6
5、結果與討論	6
二、參考文獻	7
三、計畫成果自評	13

【壹、報告內容】

前言

後熟 (ripening) 是肉質果實 (fleshy fruit) 生長發育達到成熟 (maturation) 階段末期至老化 (senescence) 初期之間的過度狀態；此一時期的果實組織會進行一系列特殊的生理、生化反應，包括種子成熟、色澤的改變、質地軟化、醣類與有機酸組成的改變、揮發性成分的生成 (Giovannoni, 2004)。就被子植物本身而言，後熟階段是果實功能由「保護未成熟種子」變換成「吸引種子散播者」的轉捩點；以園產品採後處理 (postharvest handling) 觀點而論，後熟則是決定果實品質發展完備與否及儲運性長短的重要指標 (Kays and Paull, 2004)。因此，果實後熟的研究除了在植物生長發育上具有學術價值外，對於園藝產業更有其實際的應用性。

番石榴(學名：*Psidium guajava* L.；英名:guava)又稱拔仔、芭樂，為熱帶美洲原產之桃金娘科 (Myrtaceae) 多年生常綠性小喬木或灌木。由於番石榴樹勢強健、土壤適應性廣，且果實營養豐富，尤其富含維生素C，舉凡全球熱帶及亞熱帶地區均有栽培，近年來由於栽培技術改進、品種更新及政府的推廣，番石榴也是我國重要的熱帶經濟果樹之一。台灣栽培面積約七千五百公頃，產地集中於高雄縣、台南縣、彰化縣。主要栽培品種有‘珍珠拔’、‘水晶拔’、‘二十世紀拔’、‘梨仔拔’、‘東山月拔’、‘大蒂’ (王，2000；謝等，2001)；臺灣早年引進栽培的品種多屬更年性香味濃郁、球型小果品種，適合果汁加工利用；然而，更年性番石榴果實採收後易軟熟不耐儲運，不符合鮮食消費強調果色翠綠、肉質清脆的市場需求。民國六十五年間引進‘泰國拔’，以果型大、不具更年性、果肉脆、耐儲運而深受消費者喜愛，我國番石榴經濟栽培面積才顯著增加，再加上近年來本地農民由‘泰國拔’系統實生或芽條變異選育出‘珍珠拔’、‘水晶拔’、‘二十世紀拔’等優良品種，已完全取代更年性品種成為鮮果市場主流，可見鮮果番石榴品種發展趨勢是以非更年性的品種為主 (林，1998)。國外有關番石榴後熟生理變化的研究，大多以更年性品種為材料 (Brown and Wills, 1983; Mercado-Silva et al., 1998; Abu-Goukh and Bashir, 2003; Bassetto et al., 2005; Bron et al., 2005)，對於非更年性番石榴果實採後生理的研究幾近闕如。林 (1998) 調查二十個番石榴品種果實採收後呼吸率及乙烯產生量的結果指出，大多數品種如‘梨仔拔’、‘東山月拔’、‘大蒂’為更年性果實，而少數源於‘泰國拔’的大果型品種如珍珠拔’、‘水晶拔’、‘二十世紀拔’則為非更年性果實。因此，同屬於*P. guajava* 種內的不同番石榴品種，依其果實後熟行為可分為更年性與非更年性兩群。而造成這兩群番石榴品種後熟行為的差異為何？典型更年性果實突變成非更年性果實單株的可能原因有乙烯合成障礙或是乙烯訊息傳導受阻。以‘大蒂’ (更年性) 及‘珍珠拔’ (非更年性) 番石榴果實在20°C環境下所做的預試驗結果顯示，‘大蒂’在採收後置於空氣中會有明顯的呼吸與乙烯高峯出現，是典型的更年性果實，同時伴隨著果實硬度降低、轉色等後熟特徵的進行；‘珍珠拔’在兩週的觀察時間內並未有呼吸速率和乙

烯釋出的明顯上升，至於果實也可以維持較脆、綠的狀態。若以1000 $\mu\text{L/L}$ 丙烯（乙烯類似物，具有誘導乙烯生理作用之功能）（McMurchie et al., 1972）處理24 小時後測定兩者的乙烯生成速率，‘珍珠拔’並無法經由丙烯的誘導啟動系統II 的大量乙烯合成，更年性的‘大蒂’果實則可因為丙烯處理產生大量內生乙烯合成而提前進入後熟階段。但是，這兩個品種對於100 $\mu\text{L/L}$ 乙烯處理24 小時都可反應而造成呼吸速率提高。綜合以上所以結果可推論出非更年性‘珍珠拔’果實具有對乙烯感受的能力，其與更年性‘大蒂’的差異是在於其果實組織無法合成內生乙烯的緣故，此與林（1998）的研究結論一致。林（1998）的論文進一步指出非更年性‘珍珠拔’果實後熟時ACC氧化酶（ACC oxidase）的活性較更年性的‘梨仔拔’為高，故非更年性番石榴ACC合成能力較低可能是兩者後熟行為差異的主要癥結所在。

研究目的

有鑑番石榴果實後熟行為（更年性或非更年性）是番石榴產業興起的關鍵，且未來鮮果番石榴育種趨勢是以清脆鮮綠、耐儲運的非更年性品種為主流，ACC合成酶極可能是更年性與非更年性番石榴果實後熟行為差異的關鍵。本計劃擬選殖番石榴後熟所表現之ACC合成酶的cDNA，研究其核苷酸序列結構；並探討這些ACC合成酶選殖系在後熟時期更年性與非更年性番石榴表現的差異性。此依研究結果，將可作為番石榴果實採後保鮮、儲運處理技術開發的基礎；並且，也可供爾後雜交育種親本選擇及子代後熟特性早期選拔之標誌。

文獻探討

Biale（1960）依據肉質果實後熟期間呼吸速率變化及對外加乙烯反應的不同，區分為更年性果實（climacteric fruit）與非更年性果實（nonclimacteric fruit）兩大類。所謂「更年性果實」如香蕉、番茄，其果實發育進入後熟時期會有明顯的呼吸速率上升與乙烯生成量的遽增；反之，「非更年性果實」如柑橘、葡萄，果實呼吸速率隨著發育逐漸平緩降低，後熟階段並無顯著的呼吸與乙烯高峯的出現。長久以來，乙烯一直被認為在更年性果實後熟老化過程中扮演最主要的調控角色（Srivastava and Handa, 2005）；吾人對於高等植物乙烯生成路徑已有相當的瞭解（Yang and Hoffman, 1984），ACC（1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid）合成酶（ACC synthase, ACS）被認為是乙烯生成調控最主要的關鍵酵素。至於果實乙烯生成的控制，目前學者認為是由兩個系統分別管控（Lelievre et al., 1998），一個稱為系統I（System I），主要負責果實進入後熟之前的乙烯生成，此一系統所生成的乙烯量並不多，但是卻擔任果實進入後熟之誘發者的角色；當果實開始後熟時，另一個乙烯生成系統稱為系統II（System II）的乙烯開始生成，系統II 的特性就是具有乙烯自動催化作用（autocatalytic ethylene production），也就是說系統II 乙烯的生成會受到乙烯分子的回饋刺激而促進更多乙烯的生成。更年性果實同時擁有系統I 及系統II 的乙烯合成系統，而非更年性果實因為

只有系統I 而缺少系統II，所以在其後熟時沒有大量的乙烯釋出。由分子生物上的證據顯示果實中的確有兩組的乙烯生成系統，會受到不同因子啟動，而系統I 及系統II 可能代表著兩組不同的ACS 基因，例如Barry et al. (2000) 分析番茄ACS 基因家族中不同ACS 同功異構酶在其果實後熟前後的差異性表現，*LEACS1A*、*LEACS6* 屬於系統I，*LEACS2* 則是在後熟期大量表達的系統II ACS 基因。

研究方法

本計畫擬以更年前期 (preclimacteric)、更年高峰 (climacteric peak)、更年後期 (postclimacteric) 的‘大蒂’ (更年性) 及‘珍珠拔’ (非更年性) 番石榴果實之為材料，抽取mRNA 後，進行RT-PCR (reverse transcription-polymerase chain reaction) 擴增出番石榴ACS 基因片段，接合於載體後，轉殖於大腸菌寄主細胞內增殖。cDNA 選殖系經核酸定序分析後，以RACE (rapid amplification of cDNA ends) 的技術取得全長cDNA，再經核酸定序後研究其結構；各ACS cDNA 選殖系分別於‘大蒂’與‘珍珠拔’番石榴果實生長發育不同階段—著果 (fruit set)、小果 (‘珍珠拔’果徑23-26 mm；‘大蒂’拔果徑21-24 mm)、中果 (‘珍珠拔’果徑41-43 mm；‘大蒂’果徑28-32 mm) 成熟果 (‘珍珠拔’果徑84-93 mm；‘大蒂’拔果徑50-55 mm) 及後熟之大蒂拔番石榴果實果心、果肉之組織，進行基因表現的分析，分別以兩個基因片段之專一性引子對 (gene specific primer) 進行RT-PCR的分析。

結果與討論

(1) 番石榴ACC合成酶cDNA之胺基酸序列分析

以退化性引子 (degenerated primer) 自‘大蒂’番石榴果實選殖出之ACC合成酶基因片段，經進行核苷酸序列定序，分別命名為*Pg-ACS1*及*Pg-ACS2*。其中*Pg-ACS1*共有1576個鹼基對 (base pairs)，解碼435個胺基酸；*Pg-ACS2*共有977個鹼基對，解碼326個胺基酸。*Pg-ACS1*與*Pg-ACS2*推演出的第五保守區的ACS酵素活化區 (active site) 的胺基酸序列同為SLSKDMGLPGFR (Kende, 1993)，與其他物種的ACC合成酶具有高度保守性，而將這兩個番石榴胺基酸序列及其他物種ACC合成酶胺基酸序列排列比對，ACS七個胺基酸胺基酸的演化保守區域 (Kende, 1993)也都可以找到 (圖1)。因此，所選殖出的*Pg-ACS1*及*Pg-ACS2*很可能是番石榴ACS基因cDNA。

以軟體分析不同物種間ACC合成酶胺基酸序列相似性，圖2樹狀圖顯示ACC合成酶可分成三大類群，*Pg-ACS1*與*Pg-ACS2*分別被分在Group II及Group I；其中在Group I 中的有番茄LE-ACS1A、LE-ACS1B及LE-ACS6，在Group II 中的有阿拉伯芥AT-ACS1及AT-ACS2，因此可以藉由此樹狀圖的分析推測，*Pg-ACS1*的胺基酸序列和番茄LE-ACS1A、LE-ACS1B及LE-ACS6較為相似，而*Pg-ACS2*和阿拉伯芥的AT-ACS1及AT-ACS2較為相似；然而依據ACC合成酶胺基酸序列無法辨識「系統 I」或「系統 II」ACC合成酶基因，因此進一步對所選殖出的兩

個番石榴ACC合成酶基因進行基因表現分析。

(2) 番石榴果實生長發育階段ACC合成酶基因表現分析

專一性引子對的設計為RT-PCR檢測基因表現分析的重要關鍵。針對選殖出的番石榴果實*Pg-ACS1*及*Pg-ACS2*基因所設計的專一性PCR引子對，可以區別性的擴增出這兩個cDNA，具有高度專一性（圖3）。

以前述*Pg-ACS1*及*Pg-ACS2*基因專一性引子，對不同‘大蒂’及‘珍珠拔’番石榴果實生長發育階段總RNA進行基因表現RT-PCR分析，結果如圖4所示，*Pg-ACS1*在更年型‘大蒂’番石榴果實著果到綠熟期前，未能偵測到明顯的*Pg-ACS1* mRNA累積；但是當‘大蒂’進入綠熟期與後（黃）熟期期，*Pg-ACS1* mRNA則有顯著的表現（圖4）。反之，對於非更年型的‘珍珠拔’番石榴而言，整個果實發育過程並未偵測到*Pg-ACS1* mRNA累積。而*Pg-ACS2*基因只有在‘珍珠拔’番石榴果實著果階段有少量表現，在‘大蒂’果實及‘珍珠拔’果實其他生長發育階段皆無法偵測到其mRNA累積。

由以上試驗結果我們可以推測，由於*Pg-ACS1*在番石榴果實後熟階段表現，應屬於系統II之ACC合成酶基因；*Pg-ACS2*只在非更年型的‘珍珠拔’果實著果階段表現，推測應為系統I之ACC合成酶基因。因此，在番石榴的例子，造成‘珍珠拔’採後果實呈現非更年性的現象之關鍵點，似乎是因為缺乏系統II *Pg-ACS1* 基因的ACC合成酶表現，所以其果實後熟階段並沒有大量的乙烯生合成，因此果實可維持清脆鮮綠的特性，迥異於更年性的‘大蒂’番石榴。由於系統II之ACC合成酶基因具有受到乙烯正向調控之特性，系統I之ACC合成酶基因則受到乙烯的負向調控（Barry et al., 2000; Barry and Giovannoni, 2007），進一步的試驗則可以針對外施乙烯或乙烯類似物質，並觀察這兩者ACC合成酶基因表現情形，以確認其屬性。

【貳、參考文獻】

- 王武彰(2000) 番石榴. 台灣農家要覽農作篇(二). p.51-58. 豐年社.台北.
- 林慧玲(1998) 番石榴果實後熟生理之研究. 台灣大學園藝研究所博士論文.
- 謝鴻業、黃炎和、鄭安秀(2001) 番石榴栽培管理. 台南區農業改良場技術專刊 90-8 (No.117). 台南區農業改良場編印.
- Abu-Goukh AA, Bashir HA (2003) Changes in pectic enzymes and cellulose activity during guava fruit ripening. *Food Chem* 83: 213-218.
- Alexander L, Grierson D (2002) Ethylene biosynthesis and action in tomato: a model for climacteric fruit ripening. *J Exp Bot* 53: 2039-2055.
- Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Smith JA, Seidman JG, Struhl K (1987) *Current Protocols in Molecular Biology*. Wiley-Interscience, New York.

- Aviv H, Leder P (1972) Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. *Proc Natl Acad Sci USA* 69: 1408-1412.
- Barry CS, Giovannoni JJ (2007) Ethylene and fruit ripening. *J Plant Growth Regul* 26: 143-159.
- Barry CS, Llop-Tous MI, 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.
- Bassetto E, Jacomino AP, Pinheiro AL, Kluge RA (2005) Delay of ripening of 'Pedro Sato' guava with 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biol Technol* 35: 303-308.
- Biale JB (1960) Respiration of fruits. Pp.536-592. In: *Ruhland W (ed.), Encyclopedia of Plant Physiology Vol. 12 (2)*, Springer, Berlin.
- Bron IU, Ribeiro RV, Cavalini FC, Jacomino AP, Trevisan MJ (2005) Temperature-related changes in respiration and Q10 coefficient of guava. *Sci Agric* 62: 458-463.
- Brown BI, Wills RBH (1983) Post-harvest changes in guava fruit of different maturity. *Sci Hortic* 19:237-243.
- Giovannoni JJ (2004) Genetic regulation of fruit development and ripening. *Plant Cell* 16: S170-S180.
- Kays SJ, Paull RE (2004) *Postharvest Biology*. Exon Press. Athens, GA, USA. 568pp.
- Kende H (1993) Ethylene biosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 44: 283-307.
- Lelievre JM, Latche A, Jones B, Bouzayen M, Pech JC (1998) Ethylene and fruit ripening. *Physiol Plant* 101: 727-739.
- Lincoln JE, Campbell Ad, Oetiker J, Rottmann WH, Oeller PW, Shen NF, 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 EJ, McGlason WB, Eaks IL (1972) Treatment of fruit with propylene gives information about the biogenesis of ethylene. *Nature* 237: 235-236.
- Mercado-Silva E, Benito-Bautista P, Garcia-Velasco MA (1998) Fruit development, harvest index and ripening changes of guavas produced in central Mexico. *Postharvest Biol Technol* 13: 143-150.
- Prakash DP, Narayanaswamy P, Sondur SN (2002) Analysis of molecular diversity in guava using RAPD markers. *J Hort Sci Biotechnol* 77: 287-293.
- Srivastava A, Handa AK (2005) Hormonal regulation of tomato fruit development: a molecular perspective. *J Plant Growth Regul* 24: 67-82.

Yang SF, Hoffman NE (1984) Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants. *Annu Rev Plant Physiol* 35: 155-189.

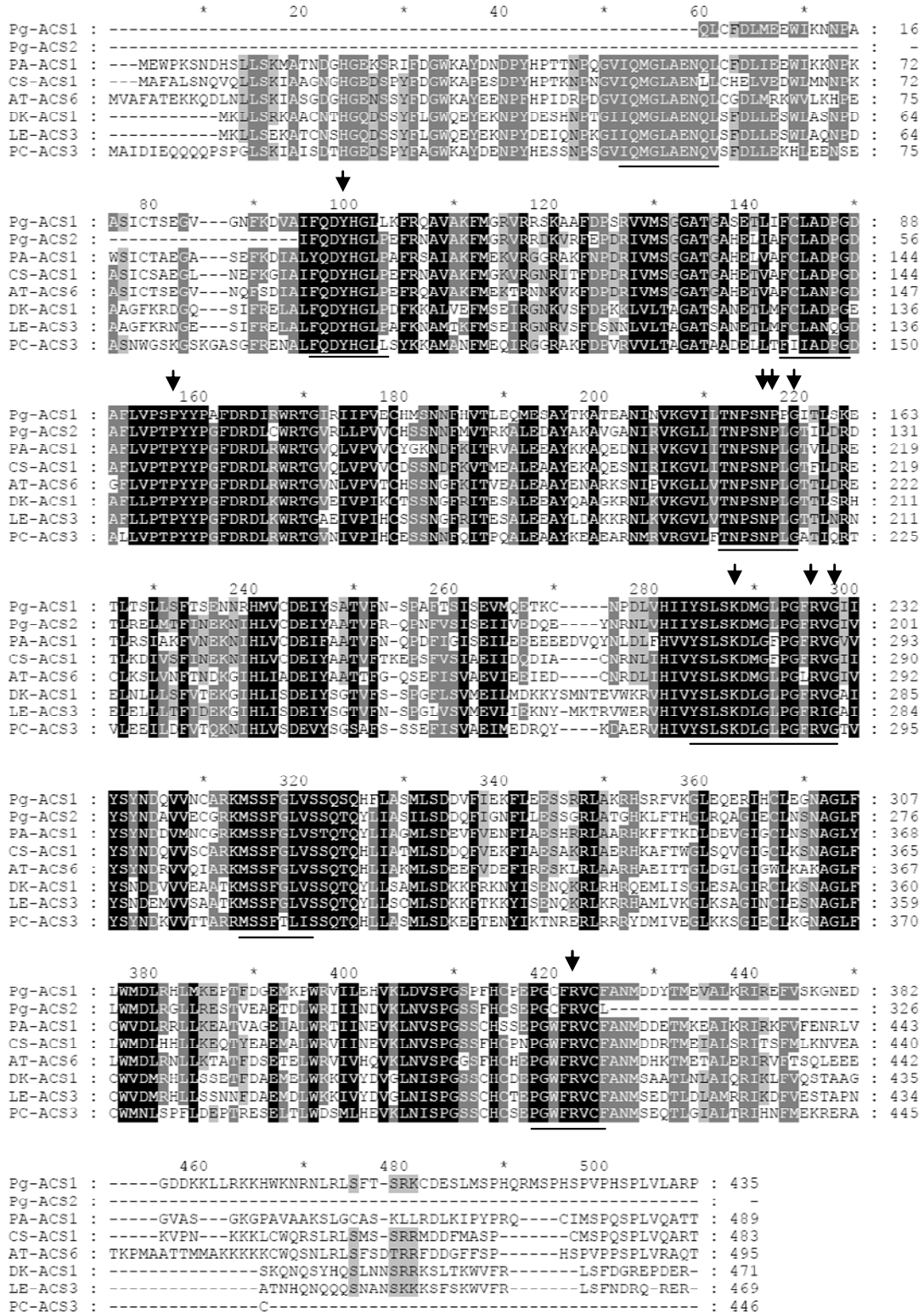


圖 1.番石榴 (Pg-ACS1、Pg-ACS2)、酪梨 (PA-ACS1)、甜橙 (CS-ACS1)、阿拉伯芥(AT-ACS6)、柿子(DK-ACS1)、番茄(LE-ACS3)及西洋梨(PC-ACS3) ACC 合成酶胺基酸序列之比較。黑色底線區域為 ACC 合成酶胺基酸序列保守區域、上標箭頭為 ACC 合成酶轉氨酶 (aminotransferases) 位置。

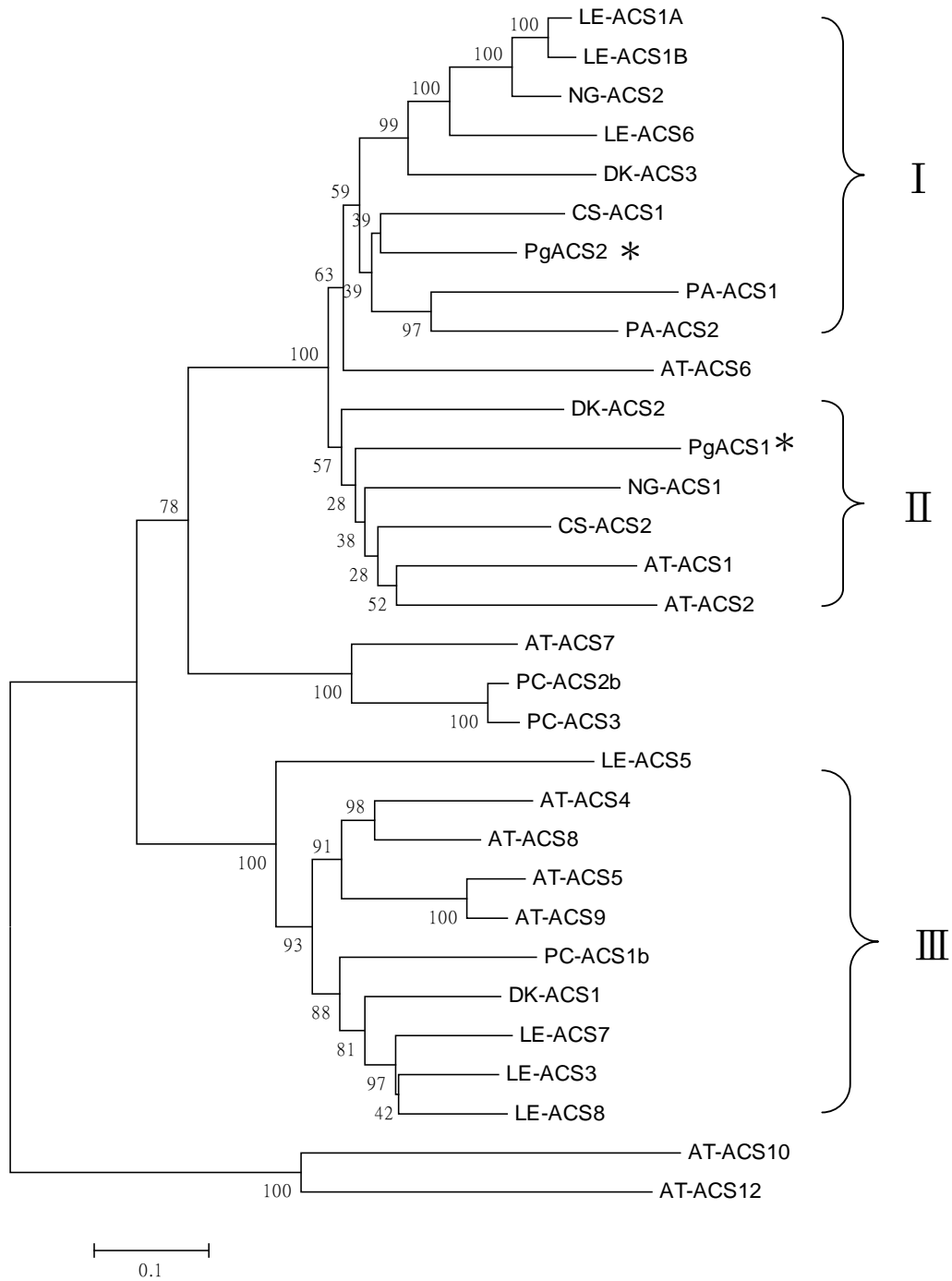


圖 2. 番石榴 (*Psidium guajava*)、番茄 (*Solanum lycopersicum*)、菸草 (*Nicotiana glutinosa*)、甜橙 (*Citrus sinensis*)、柿子 (*Diospyros kaki*)、酪梨 (*Persea americana*)、西洋梨 (*Pyrus communis*)、阿拉伯 (*Arabidopsis thaliana*) ACC 合成酶胺基酸序列之演化相關性。星號*標示處為番石榴 ACC 合成酶基因—Pg-ACS1、Pg-ACS2 位置。

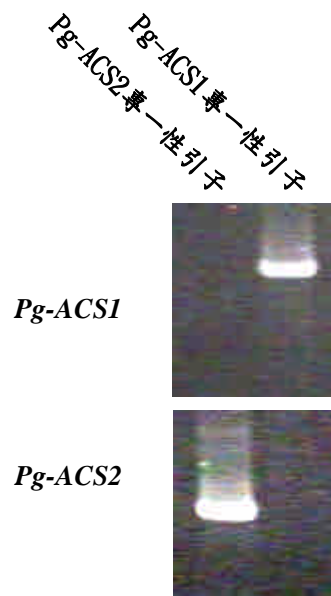


圖 3. 番石榴 ACC 合成酶基因 *Pg-ACS1* 與 *Pg-ACS2* 引子專一性分析

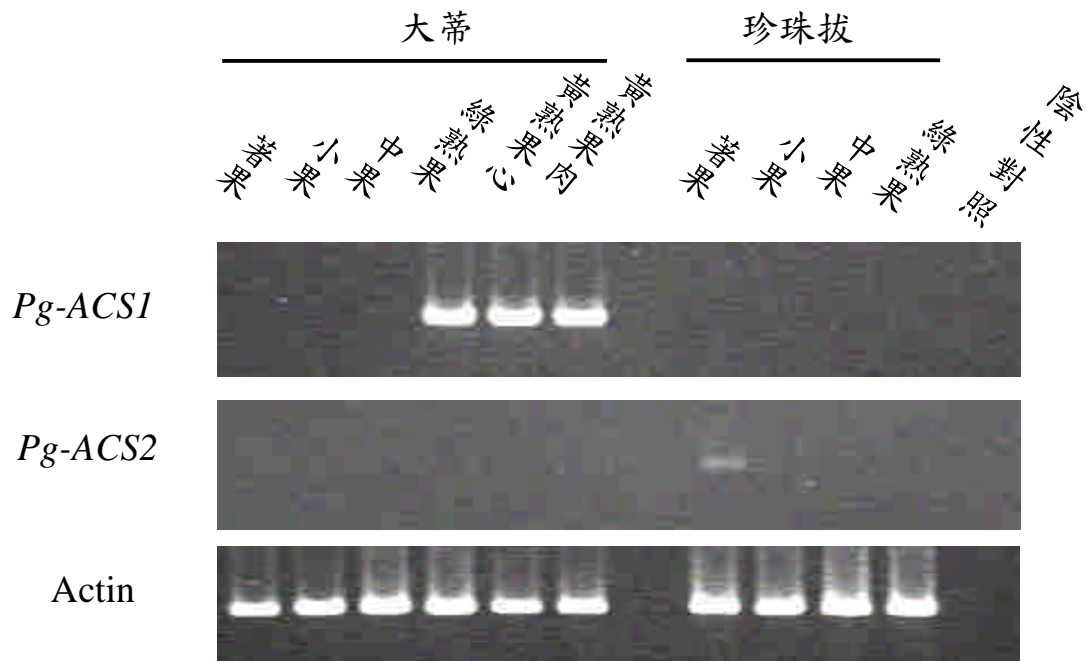


圖 4. 不同‘大蒂’及‘珍珠拔’番石榴果實生長發育時期 ACC 合成酶基因 *Pg-ACS1* 及 *PgACS2* 基因表現之 RT-PCR 分析

【參、計畫成果自評】

執行本計畫之初，遭遇最大的試驗困難是自番石榴果實抽取品質優良的總 RNA，因為番石榴果實含有大量的碳水化合物、酚類化合物，對於 RNA 的抽取純化造成很大的障礙，一般運用在植物營養器官 RNA 抽取的步驟方法，並不能在番石榴果實 RNA 抽取發揮很好的效果。嘗試比較幾種不同的 RNA 抽取的方法，並經過修飾，本實驗室目前已能穩定的由各個番石榴發育階段的果實樣品抽取優質的總 RNA 以進行後續的 RT-PCR 反應或北方墨點法分析。

目前已選殖出兩個番石榴 ACC 合成酶基因片段，由其核苷酸序列所推演出的胺基酸序列，已可比對出 ACC 合成酶的七個保守區域，十分可能是 ACC 合成酶基因無誤。現在仍持續進行 RT-PCR 選殖新的 ACC 合成酶基因的試驗，並以 5 端及 3 端 RACE 的技術以得到全長 cDNA。