

## 乙烯生物合成途径及其相关基因工程的研究进展(综述)

陈新建<sup>1,3</sup> 刘国顺<sup>1</sup> 陈占宽<sup>2</sup> 邴玉宝<sup>2</sup> 易明林<sup>2</sup> 刘鸿先<sup>3</sup>

(1. 河南农业大学农学系, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业科学院重点实验室, 河南 郑州 450002;

3. 中国科学院华南植物研究所, 广东 广州 510650)

**摘要:**在对植物激素乙烯生理功能作简要回顾的基础上着重对乙烯的生物合成途径中的关键酶,包括腺苷蛋氨酸合成酶、ACC合成酶及ACC氧化酶的性质和基因的研究进展作了综述,同时展现出了与调控内源乙烯生物合成有关的基因工程的整体轮廓

**关键词:**乙烯; 生物合成; 基因工程

**中图分类号:** Q946.885.7

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1005-3395(2002)01-0083-16

## A Review of the Pathway of Ethylene Biosynthesis and the Relevant Genetic Engineering

CHEN Xin-jian<sup>1,3</sup> LIU Guo-shun<sup>1</sup> CHEN Zhan-kuan<sup>2</sup> ZHI Yu-bao<sup>2</sup> YI Ming-lin<sup>2</sup> LIU Hong-xian<sup>3</sup>

(1. Dept. Agronomy, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China; 2. Henan Key Laboratory of

Crop Improvement, Henan Academy of Agriculture Science, Zhengzhou 450002, China; 3. South China

Institute of Botany, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

**Abstract:** This review contents a brief retrospection of physiological functions of plant hormone, ethylene. The progresses concerned three important enzymes: SAMS, ACS and ACO in ethylene biosynthetic pathway are highlighted. The possible methods to control endogenous ethylene's production in fruits or flowers by genetic engineering are outlined.

**Key words:** Ethylene; Biosynthesis; Genetic engineering

乙烯(C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>)是五大类植物激素中结构最为简单的唯一的气态物质。它参与了从种子萌发到成熟衰老的一系列生命过程的调节<sup>[1]</sup>(图1)。由于乙烯与植物的花、果的成熟和衰老有密切关系,控制乙烯的生物合成就可延缓其衰老,因而有重要的商业价值,如抑制乙烯的产生可使许多重要农产品的运输和贮藏更为方便,同时也延长了货架期,可以增值增效。随着植物生理生化及分子生物学研究的深入,近年来对乙烯的生物合成途径及其基因工程的研究取得了一系列令人鼓舞的成果,使之成为现代植物科学研究的热点之一。

### 1 乙烯的生物合成途径

阐明乙烯的生物合成途径不是一件容易的事。许多化合物都曾被作为前体物(precursor)提出,如亚麻酸、丙醛、乙醇、丙烯酸、β-丙氨酸、β-羟基、β-羟基酸、延胡索酸、蛋氨酸等。真正的前体蛋氨酸(methionine)首先是由Lieberman和Mapson于1964年基于一个化学模式系统而提出的<sup>[2]</sup>,随后他们<sup>[3]</sup>又证明<sup>14</sup>C-标记的蛋氨酸在苹果组织内转变成为<sup>14</sup>C标记的乙烯,由此可以看到蛋氨酸的确可作为高等植物体内乙烯生物合成的前体物。蛋氨酸的CH<sub>3</sub>S基仍保存于体内,这对于维持体内蛋

收稿日期 2000-12-15 接受日期: 2000-05-22

基金项目: 国家烟草专卖局资助项目

氨酸的水平是很重要的。因为与乙烯产生速率相比较,正常情况下蛋氨酸含量是很低的。Adams和Yang<sup>[4]</sup>证明<sup>[4]</sup>,蛋氨酸的硫被重新循环形成蛋氨酸,以稳定乙烯形成的速率,蛋氨酸的CH<sub>3</sub>S基来源于S-腺苷蛋氨酸(S-adenosylmethionine, SAM or AdoMet),存在于甲硫腺苷(methylthioadenosine, MTA)中,然后迅速水解成为甲基硫核糖(methylthioribose MTR)。MTR中的CH<sub>3</sub>S经循环回到蛋氨酸中。Yung等<sup>[5]</sup>证明MTR中的核糖部分与CH<sub>3</sub>S基一起转变成为蛋氨酸。整个循环的结果是乙烯分子源于蛋氨酸的3,4位碳,CH<sub>3</sub>S基在循环中保持不变,而蛋氨酸中的氨基丁酸由ATP中的核糖补充。因此最终形成乙烯分子的两个碳原子实际上来自ATP核糖残基的第4,5碳原子。此循环称为蛋氨酸环,或称Yang循环。

在乙烯生物合成途径中的一个重要的中间产物为1-氨基-1-羧基环丙烷(1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid, ACC),是一种非蛋白氨基酸。乙烯由ACC直接产生,其反应为:



这里乙烯来源于ACC的C-2和C-3,CO<sub>2</sub>来源于羧基。HCN(氢氰酸)由ACC的C-1和氨基组成。HCN形成后会马上被代谢掉,它先形成β-氰丙氨酸,β-氰丙氨酸继续代谢成为天冬氨酸或γ-谷氨酰胺-β-氰氨丙氨酸,从而清除了HCN的毒害。因此即使在乙烯合成的高峰期也不会有HCN的积累<sup>[6]</sup>。ACC除了可以形成乙烯外,还能被代谢成为丙二酰ACC(1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid, MACC),据分析在生理条件下MACC难以逆转。但也有高水平的MACC(烟草)在淹水条件下可以转变成为ACC的报道<sup>[7]</sup>,MACC的形成对解除过多乙烯的毒害可能具有一定的作用。

在乙烯生物合成过程中,有三个重要的酶已被鉴定和研究,这三个酶是:催化腺苷蛋氨酸形成的腺苷蛋氨酸合成酶(SAM synthetase, SAMS, ATP:methionine s-adenosyltransferase EC2.5.1.6);催化SAM生成ACC的ACC合成酶(ACC synthase, ACS或ACCS, S-adenosyl-L-methioninemethylthioadenosine-lyase, EC4.4.1.14);ACC氧化酶(ACC oxidase, ACO或ACCO)又称乙烯形成酶(ethylene-forming enzyme, EFE),它催化ACC形成乙烯。

### 1.1 腺苷蛋氨酸合成酶(SAMS)

SAMS是植物体内物质代谢中一个重要的酶,催化Met和ATP形成SAM。SAMS除了参与乙烯合成外,还参与了多胺的生物合成<sup>[8]</sup>(图2)及甲酯化反应<sup>[9]</sup>。尽管它是乙烯生物合成途径中的第一个酶,但是人们对它的认识却较晚,从80年代末期人们才注意到这个酶,因此对SAMS的研究远没有ACS和ACO那样深入和广泛。SAMS是一个多基因家族<sup>[10,11]</sup>,其中一些基因是组成性表达,即所谓管家(house-keep)基因,而另一些基因的表达则受到了发育阶段或环境因素的严格控制。

SAMS的mRNA的水平在植物不同发育阶段中<sup>[12-15]</sup>及不同的植物组织中<sup>[16]</sup>有着显著的差异。同时在不同的环境因素中,SAMS的表达被提高,这些环境包括盐胁迫、真菌和细菌的诱变剂

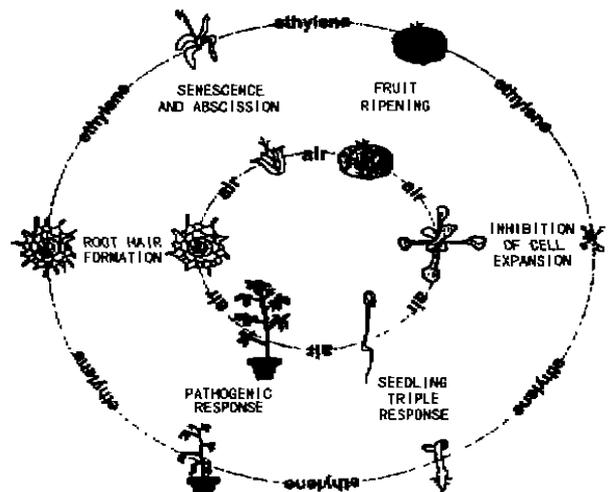


图1 乙烯的主要生理效应<sup>[11]</sup>  
Fig. 1 Main physiological effects of ethylene<sup>[11]</sup>

(elicitors), 臭氧处理及机械刺激<sup>[7]</sup>, 所有这些都是已知的刺激乙烯生成的因素。另外, 植物激素也可以刺激 SAMS 的转录。如 GA<sub>3</sub> 可以诱导麦胚和矮生豌豆突变体的 SAMS 的转录, ABA 处理番茄可以诱导两种 SAMS 异构酶的产生。Gomez-Gomez<sup>[17]</sup> 从豌豆中分离出了 SAMS 的基因 (*SAMS1* 和 *SAMS2* 基因)。这两个基因的编码区同源性很高, 但是在 5' 和 3' 的非编码区却有一定程度的变异。他们用这两个非编码区作为特异的探针, 来研究豌豆中 *SAMS1* 和 *SAMS2* 基因的表达情况。核酸酶保护分析披露了它们不同的表达模式: *SAMS1* 几乎在所有的组织 (尤其在根中) 内都强烈表达, *SAMS2* 表达较弱, 即便在峰值时也很弱。授粉后 *SAMS1* 的表达则被特异地上调 (up-regulated), 而 *SAMS2* 是组成性地表达。用生长素处理未授粉的子房, 在子房的发育阶段 *SAMS1* 也被上调, 接之而来的是乙烯的水平增加。在子房的衰老过程中 *SAMS1* 和 *SAMS2* 基因表达量均提高。用乙烯处理未授粉的子房也导致了 *SAMS1* mRNA 水平的提高, 而 *SAMS2* 的表达却未发生变化。说明在子房衰老中诱导的 *SAMS2* 与乙烯无关。原位杂交结果显示出 *SAMS* mRNA 定位于发育果实的内果皮和衰老子房的胚珠中。

迄今, SAMS 酶的结构和活性调节尚未见报道。

## 1.2 ACC 合成酶 (ACS)

ACC 合成酶的中文名字的译法值得商榷。它的英文名为 ACC synthase (而不是 ACC synthetase), 似乎应该译为 ACC 合酶。但是在中文的文献中则多用 ACC 合成酶, 而未用 ACC 合酶。因此本文沿用了 ACC 合成酶。

ACS 是植物体内乙烯生物合成的限速酶 (rate-limited), 同时也是多基因家族。近年来人们对 ACS 的研究一直相当重视, 已成为研究乙烯的重点。ACS 的种属差异, 活性调节及基因序列等均在研究之列, 因此涉及 ACS 研究的文献量是惊人的。

### 1.2.1 纯化与鉴定

ACS 最早是在番茄的果皮组织中发现的<sup>[18]</sup>。在多种情况下, 它的活性限制了乙烯的形成, 同时它的活性也受到了乙烯及不同胁迫条件的刺激<sup>[19]</sup>。LiCl 处理以及受伤可提高成熟番茄果皮内 ACS 的水平, 常规方法和 HPLC 凝胶过滤得出这两种条件下所形成的 ACS 同质, 其分子量在 50–57 kD<sup>[20]</sup>。用一系列的色谱法将此酶纯化超过 6 500 倍后, 用双向凝胶电泳分析表明其分子量为 50 kD, 纯化酶的比活为  $4 \times 10^5$  Units mg<sup>-1</sup> 蛋白 (在 30°C 下每小时形成 1 nmol 的 ACC 定义为 1 unit), 为了更进一步研究 ACS, Bleecker 等<sup>[21]</sup> 生产出了 ACS 的单克隆抗体, 建立了灵敏的 ELISA 和 RIA 分析法。免疫分析和放射性标记表明 ACS 是在伤害组织中从头合成, 确证了早期密度标记实验的结果。在活体放射标记的实验中, 单克隆抗体可以识别一个 56 kD 的小多肽, 同样在体外翻译中也产生了 56 kD 的免疫沉淀物<sup>[21]</sup>。结果说明 ACS 在组织匀浆时被切割修饰。Rottmann 等 1991 年得出了类似的结果<sup>[22]</sup>。Van

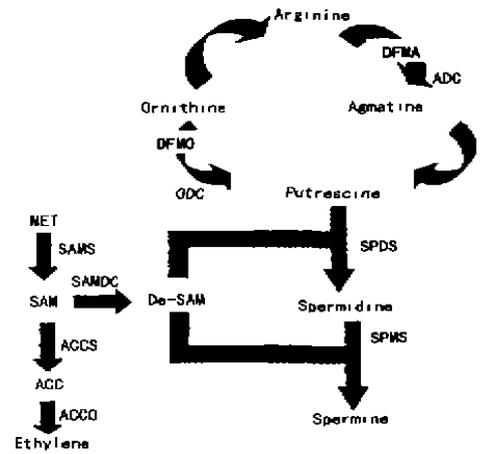


图 2 乙烯和多胺生物合成之间的关系<sup>[18]</sup>

Fig. 2 The relationship between ethylene and polyamine biosynthesis<sup>[18]</sup>

ADC: arginine decarboxylase; De-SAM: decarboxylate S-adenosylmethionine; DFMA: difluoromethylarginine; DFMO: difluoromethylornithine; ODC: ornithine decarboxylase; SAMDC: adenosylmethionine decarboxylase; SAMS: adenosylmethionine synthetase; SPDS: spermidine synthetase.

Der Straeten 等<sup>[24]</sup>基于氨基序列的数据提出 ACS 羧基端将近 85 个 aa 残基被切掉。

Privalle 等<sup>[25]</sup>用  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  还原醛亚氨的方法将酶与其辅酶 (磷酸吡哆醛, PLP) 连接起来,用 SDS-PAGE 分析表明放射活性主要与 50 kD 蛋白相联系。用单克隆抗体分离后再用  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  处理的酶,得到了同样的结果<sup>[25]</sup>。用放射性标记的  $\text{Ado}(3,4\text{-}^{14}\text{C})\text{Met}$  进行实验,发现放射性标记集中于 50 kD 的肽中,然而也有 45 kD 和 67 kD 的报道<sup>[26]</sup>。

从笋瓜提取纯化的 ACS 与上述稍有差异,Hyode 等<sup>[27]</sup>从笋瓜受伤的果皮中分析到 ACS 的活性,经过纯化分离得到一个 50 kD 的蛋白质,用番茄的抗体可以识别出一个 58 kD,说明笋瓜中这个酶在提取和纯化过程同样被剪切,去除一段。抗体能识别伤诱导的 ACS,却不能识别生长素诱导的 ACS,说明在笋瓜中有两个 ACS 的同工酶,它们的差异足以引起免疫学的区分。

Sato 等<sup>[28]</sup>从笋瓜果实组织纯化到 ACS,经 6 000 倍纯化后,用凝胶测其分子量为 86 kD,经 SDS-PAGE 测定为 46 kD,说明笋瓜 ACS 是由两个同样亚基组成的二聚体,体外翻译,免疫沉淀,活体标记等技术得到的 ACS,经过 SDS 缓冲液煮沸后分子量分别为 53 和 55 kD,再一次说明此酶经过了翻译后的加工处理。此外,在用生长素处理的绿豆下胚轴及番茄、笋瓜、苹果等(Kende 等 1993)多种植物中得到了 ACS。

### 1.2.2 活性中心及催化机理的研究

利用磷酸吡哆醛作为辅酶的酶,通常通过  $\alpha, \beta$  或  $\beta, \gamma$  碳位消除而催化  $\alpha$ -氨基酸的消除性反应。如果 ACS 的情况也是如此,那么由  $\text{AdoMet}$  向 ACC 的转化,应包括一个丙烯苷氨酸的中间体。相反,Adams 等<sup>[29]</sup>提出通过  $\alpha, \gamma$  消除反应,有一个环丙烯的中间产物。ACS 反应催化的立体化学过程证明  $\text{AdoMet}$  中 Met 的碳上的 H 原子没有参与反应,说明 ACC 的形成的确通过  $\alpha, \gamma$  消除性反应<sup>[30]</sup>。

在 ACC 合成酶鉴定的初期,Boller 等<sup>[31]</sup>就注意到高浓度的底物可以降低酶的活性。Sato 等<sup>[32]</sup>注意到 SAM 对 ACS 的抑制是有时间性的,提出高浓度的  $\text{AdoMet}$  可以作为一个酶的抑制剂。Sato 等<sup>[32]</sup>提出在底物对酶不可逆抑制中,至少  $\text{AdoMet}$  的一部分共价地结合到 ACS 上,放射性标记的  $\text{Ado}(3,4\text{-}^{14}\text{C})\text{Met}$  实验证明其属实。50 kD 的一个蛋白质被放射性所标记,这个蛋白质可以用 ACS 专一的单克隆抗体识别。进一步的实验表明<sup>[33]</sup> $\text{AdoMet}$  的 2-氨基-丁酸在酶失活时结合到 ACS 上。鉴于此,Sato 和 Yang 提出两个催化反应:通过  $\alpha, \gamma$  消除反应形成 ACC 和通过  $\beta, \gamma$  消除反应形成一个高活性的中间体—乙烯甘氨酸-乙烯甘氨酸共价地结合到 ACS 上。基于动力学数据计算, $\alpha, \gamma$  和  $\beta, \gamma$  消除反应的比率为 30000:1,换言之,催化反应每生成 3 万分子的 ACC,便有一分子的乙烯甘氨酸形成,一分子的酶被抑制。Sato 指出 ACS 活性的这种抑制使得 ACS 在植物组织中迅速失活。然而至少有一种从番茄叶片和培养细胞中胁迫诱导的 ACS 没有这种不可逆的抑制。说明不同的 ACS 其作用机理可能有别。

Yip 等<sup>[34]</sup>用了两种方法标记 ACS 的活性位点。成熟苹果 ACS 经上述的  $\text{NaB}^3\text{H}_4$  还原醛亚氨的方法使磷酸吡哆醛和酶间形成双键,然后蛋白质用胰蛋白酶水解,用 HPLC 分离到被标记的氨基酸序列为  $\text{SLS}(X_i)\text{DLGLPGFR}$ ,其中  $X_i$  为未知的具放射性的 aa 衍生物。色谱和电泳表明这一未知物的酸解产物与 N<sup>ε</sup>-吡哆赖氨酸有相同的迁移率。因此上述的 12 肽的第 4 位氨基酸为 Lys (在 ACS 的 K278),  $\text{SLSK}$  序列是其他含吡哆醛的酶的活性位点。成熟苹果 ACS 的免疫纯化品,用上述方法处理,同样得到 12 肽,其中第 4 位具放射性标记的氨基酸又是一未知物( $X_{ii}$ ),此 12 肽经质谱分析,经计算  $X_{ii}$  的分子量等于用乙烯甘氨酸醛基化的 Lys。这些结果说明此 12 肽第 4 位的  $-\text{NH}_2$

通过醛亚氨与磷酸吡哆醛相连,也正是这个 Lys 的  $-NH_2$  通过醛化与 AdoMet 的氨基丁酸相连,导致该酶的不可逆失活。Yip 等也标记了成熟番茄果皮组织受伤害诱导的 ACS。用( $^{14}C$ )AdoMet 标记,分离到胰蛋白酶水解片段中同样含有此活性位点,苹果和番茄受成熟诱导的 ACS 的两个 12 肽完全一样,而诱导的 ACS 的 12 肽第 6 位氨基酸由 Met 代替了 Leu。因此,伤害和成熟诱导了不同类型的 ACS 的同工酶。

ACS 对 AdoMet 有严格的立体异构专一性。由于 AdoMet 的 Met 上的  $\alpha$  碳原子为不对称原子,因此 AdoMet 有 D 和 L 型之分,同时也有左旋右旋异构体。天然存在的都是(-)-L-AdoMet。若用非天然的(+)-L-AdoMet 作为底物,或用其外消旋体作为底物,ACS 对它完全无活性<sup>[7]</sup>。

近期,由于基因突变技术的应用,对酶的活性中心氨基酸有了更深入的认识。

Li 等<sup>[8]</sup>首先研究了番茄 ACS(486 个 aa)的几个缺失突变体。从 Arg429 开始缺失 C-末端,该酶完全没有了活性(缺失 56 个 aa)。从 C-末端缺失 46-52 个 aa 残基后酶对底物的亲和力比野生型的高出 9 倍。被截短的 ACS 以单体形式出现(用凝胶过滤法测得其分子量为  $52 \pm 1.8$  kD)活性更高。在同样的条件下,野生型是以二聚体的形式出现。这些结果表明 ACS 的非保守的 C-末端的存在与否影响了二聚体的形成和酶的催化活性。White 等<sup>[9]</sup>在点突变研究中证明了苹果的 ACS 存在 Lys-273, Arg-407, 和 Tyr-233 点突变。其中 Lys-273 变为 Ala 的突变体,ACS 的活性完全丧失,说明它催化了  $\alpha$  碳位上质子的脱离。Arg-407 变为 Lys 亲和常数至少下降到 5%,说明了与底物  $\alpha$  碳位上的羟基结合有关。Tyr-233 变为 Phe 导致了  $K_m$  值提高了 24 倍,而最大反应速度不变,说明 Tyr 在活性中心只与辅酶 PLP 的定向有关。

为了决定氨基酸残基对酶的结构和功能的重要性, Tarun 等<sup>[10]</sup>用了点突变技术和 PCR 自由突变技术对番茄的 Le-ACS2 同功酶进行了突变,突变体的筛选是通过 *E. coli* 的 Ile 营养缺损型菌株,这个菌是一个表达了 ACC 脱氢酶(来自 *Pseudomonas* sp.)的工程菌,它能在 ACC 为唯一碳源的培养基上生长。用这样的菌来鉴定 ACS 的活性很方便。他们建立了一个突变文库,包括近 1 000 个 DNA 序列的突变克隆株。其中选用了 334 个单个“失意”(missense)突变体来进行分析。基于它们在该 *E. coli* 中的活性将其分为三类。突变 1 及突变 2 和野生型 ACS 的表达水平相同,但是 ACS 的活性分别降低到野生型的 0-5%和 5%-50%,突变 3 检测不到其蛋白质的表达和活性。这种方法的建立为研究提供了极为方便的工具。Zhou 等<sup>[11]</sup>用了突变技术对番茄 L-ACS2 Arg 286 进行了位点直接突变使之变为 Leu,圆二色分析表明突变体的整个二相结构和野生型没有明显的差异,荧光光谱分析表明突变体对辅酶 PLP 的亲和力则下降到 4%-5%。动力学分析表明酶的转化数( $K_{cat}$ )由  $9.85 S^{-1}$  降低为  $8.2 \times 10^{-3} S^{-1}$ ,  $K_m$  值由  $120 \mu mol/L$  上升到  $730 \mu mol/L$ ,因此,突变体的整个催化常数  $K_{cat}/K_m$  是对照的八千分之一。由此 Zhou 等推测 Arg- $NH_2$  与 PLP 的磷酸形成离子桥对酶的活性影响极大,这些现象与在其他需 PLP 的酶类中的研究一致。

此外,ACS 的结晶结构也在研究之中<sup>[11-13]</sup>。

### 1.2.3 ACS 的基因及克隆

第一个 ACS 基因序列是 1990 年 Van Der Straeten 等从番茄果实的 cDNA 文库中分离得到的<sup>[14]</sup>。Yip 等<sup>[15]</sup>在 *E. coli* 中表达的 ACS 的 cDNA 不能产生具酶活性的 ACS,但它的 12 肽活性位点的出现,说明它是 ACS。用 CNBr 处理 ACS 可以得到 3 个肽片段。除了全长 ACS 的 cDNA 克隆外, Van Der Straeten 等还发表了具 420 bp 的部分核苷酸序列的克隆,它与全长 cDNA 克隆的对应区域显

示出 82% 的相似性, 这进一步表明番茄中 ACS 的基因不止一个。接着 Olson 等<sup>[44]</sup>报道了第二条全长的番茄果实 ACS cDNA 克隆, 这两个克隆序列极为接近。之后 Rottmann 等<sup>[29]</sup>又报道了番茄另外 ACS 的序列。Nakajima 等从笋瓜中得到了两个 ACS 的基因序列及相应衍生的 aa 序列<sup>[45,46]</sup>。所有 ACS 的编码区都有一定的同源性。DNA 序列的同源约为 60%, 酶的 aa 序列变幅为 48%–97%。截止 2000 年 5 月在 Genbank 注册的序列就多达 170 项之多。根据 ACS 的进化关系, 无疑还将有更多的 ACS 基因被分离测序。现已明确 ACS 的多态性早于单双子叶植物的分歧时间。表 1 列出了部分 ACS 的基因。

表 1 部分已克隆到的 ACS 基因  
Table 1 Some of ACS genes cloned

| 植物 Plants               | 调节 Regulations (基因 genes)         | 作者 Authors    | 年份 Years | 文献 Citations |
|-------------------------|-----------------------------------|---------------|----------|--------------|
| 拟南芥 <i>Arabidopsis</i>  | 被生长素迅速调节 (ACS4)                   | Abels 等       | 1995     | [47]         |
|                         | 被低水平的 CTK 诱导 (ACSS)               | Vogel 等       | 1998     | [48]         |
|                         | 磷酸运输信号诱导                          | Imamura 等     | 1998     | [58]         |
| 酸模属 <i>Rumex</i>        | 淹水忍耐下调                            | Banga 等       | 1996     | [49]         |
| 水稻 Rice                 | 受低氧或淹水诱导                          | Cohen 等       | 1987     | [50]         |
| 绿豆 Mung bean            | 机械损伤诱导 (AIM1)                     | Botella 等     | 1995     | [51]         |
|                         | 生长素诱导 (PVR-ACS1, 6, 7)            | Yi 等          | 1999     | [52]         |
|                         | 果实成熟诱导 (rin)                      | Terai 等       | 1993     | [53]         |
| 番茄 Tomato               | 淹水迅速诱导 (ACS3)                     | Olson 等       | 1995     | [54]         |
|                         | 淹水慢诱导, 臭氧诱导 (ACS2)                | Tuomainen 等   | 1997     | [55]         |
|                         | 受乙烯, 授粉诱导 12-24 h 在花瓣出现 (CARACC3) | Woodson 等     | 1992     | [12]         |
| 蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis</i> | 受乙烯诱导 (ACS1)                      | Bui 等         | 1998     | [56]         |
|                         | 授粉后或生长素处理在柱头出现 (ACS1 ACS2)        |               |          |              |
|                         | 授粉后或生长素处理在子房中出现 (ACS3)            |               |          |              |
| 烟草 Tobacco              | 真菌诱导                              | Knoester 等    | 1998     | [57]         |
| 土豆 Potato               | 受臭氧, 感病和 Cu 快诱导 (ACS5)            |               |          |              |
|                         | 受臭氧, 感病和 Cu 慢诱导 (ACS5)            |               |          |              |
|                         | 生物胁迫和非生物胁迫诱导 (st-ACS4, 5)         | Schlagbauer 等 | 1997     | [59]         |
| 苹果 Apple                | 成熟特异                              | Sunako 等      | 1999     | [60]         |
| 梨 Pear                  | 低温诱导                              | Leliever      | 1997     | [61]         |
| 黄瓜 Cucumber             | 诱导雌花分化 (cs-ACS1G)                 | Trebitsh 等    | 1997     | [62]         |
| 小麦 Wheat                | 根顶端优势 (TA-ACS1, 2)                | Subramaniam 等 | 1996     | [63]         |

从 cDNA 克隆推断出的 ACS 的一级结构表明不同来源的酶分子量极为接近, 在 53–58 kD 之间。Northern 印迹表明编码不同的 ACS 基因的 mRNA 在 1.8–2.1 kb 之间<sup>[29]</sup>。不同的 ACS 在分子内存在着较高的同源性, 而羧基端则差异很大。比较苹果、番茄和西葫芦果实中推断的 ACS 氨基酸序列, 发现它们的相似性约 80%, 有 7 个极为相似的高度保守区域, 而且各区域的相对位置也大体相同, 这些保守区域至少有 8 个氨基酸残基, 一致性高达 80% 以上, 保守区 5 被认为是活性中心, 它含有一个赖氨酸残基, 这个残基和结合辅酶 PLP 并与依赖底物的酶的钝化有关。番茄果实 ACS 基因由 4 个外显子和 3 个内含子组成, 它的 5'-侧翼区含有与番茄基因 E4 的启动子共用的序列。E4 基因的表达由成熟或乙烯所诱导。

应用 cDNA 克隆, 人们可以研究两个重要问题, ACS 的调节发生在哪一水平上, 发育、环境和化学因素表达的是相同还是不同的 ACS 基因? 用 Northern 印迹和 RNase 保护分析证明果实成熟、花的衰败、外源信号的诱导(伤、生长素和细胞分裂、乙烯)等明显地基于 ACS 的 mRNA 的合成, 即

在转录水平上的调控<sup>[64]</sup>。应用特异的探针,Olson 等<sup>[64]</sup>表明了番茄果皮成熟和损伤诱导的 ACS 的基因有不同的表达。类似的情况有,番茄果实、细胞培养和胚轴表达的 4 种 ACS 的基因也受到了成熟、损伤和生长素的不同调节。伤诱导的番茄果实 ACS 的转录产物受到了水杨酸(损伤信号传导的抑制剂)和多胺(已知为乙烯生物合成抑制剂)的抑制<sup>[65]</sup>,两个 ACS 基因在笋瓜中也受到了乙烯和伤害的不同调节<sup>[47]</sup>。

也有报道<sup>[66]</sup>ACS 基因的调节发生在转录后,即发生在成熟 mRNA 的形成过程中。

所有研究过的植物都含有一个以上 ACS 基因<sup>[66]</sup>。番茄至少有 9 个,其中 6 个为生长素诱导的,绿豆下胚轴至少有 5 个,水稻 3 个,拟南芥 5 个等。近期,人们对同一植物不同 ACS 表达的差异的研究越来越多,使人们对此有了较为深入的认识。

Bui 等研究了兰花授粉的信号激活了一连串的生理生化反应<sup>[69]</sup>,包括乙烯的生物合成。乙烯生物合成的启动与加速伴随着 3 个不同的 ACS 基因被调节。一个 ACS 基因(*Phal-ACS1*)受到乙烯的调节,参与了授粉信号的放大及器官内的传播,另外的两个 ACS 基因(*Phal-ACS2* 和 *Phal-ACS3*)最早是在柱头和子房内表达。授粉后 1 h, *Phal-ACS2* 在花柱内积累,而 *Phal-ACS1* 授粉 6 h 后才被探测出。*Phal-ACS2* 和 *Phal-ACS3* 授粉后 2 h 在子房内表达。外用生长素和用刺激模拟授粉,ACS 在柱头和子房中的活性迅速提高,其中 *ACS2* 和 *ACS3* 也分别在柱头和子房中积累。这些结果提供了 ACS 基因内源表达的基本模式。授粉信号刺激后先表达的是 *Phal-ACS2* 和 *Phal-ACS3*,后表达是 *Phal-ACS1*。

Oetiker 等 1997 年研究了番茄悬浮培养中的 7 个 ACS 基因<sup>[67]</sup>。他们用 RNase 保护分析方法研究了用一个诱发剂后 ACS 基因的转录情况。*LE-ACS2*、*LE-ACS5* 和 *LE-ACS6* 受这个诱发剂的强烈诱导,相反 *LE-ACS1B*、*LE-ACS3* 和 *LE-ACS4* 为组成性表达,*LE-ACS1B* 在所有的时间内都表达出特别高的水平。因此,在番茄细胞内有两种类型的 ACS 基因:诱导型和组成型。*LE-ACS1A* 没有被探测到。在缺乏诱发剂的情况下尽管也出现 *LE-ACS1B*、*LE-ACS2*、*LE-ACS3*、*LE-ACS4* 和 *LE-ACS5*,但只有很少的乙烯产生。乙烯量的增加常常伴随着 ACS 转录的积累,说明乙烯的产生是通过 ACS 基因在转录水平上的活化。然而,几种 ACS mRNA 的大量出现与乙烯形成诱发剂之间没有严格的相关关系,因此他们指出 ACS 的活性不仅只限于转录水平上的控制。

Mathooko 等研究了在 CO<sub>2</sub> 胁迫下黄瓜果实 ACS 基因的表达<sup>[68]</sup>。CO<sub>2</sub> 对乙烯的诱导只与 *CS-ACS1* 的转录产物相一致,当 CO<sub>2</sub> 胁迫取消后,*CS-ACS1* 也消失,环己亚胺抑制 CO<sub>2</sub> 胁迫诱导的乙烯的产生,但却引起较高 *CS-ACS1* 转录产物的积累。较高浓度的环己亚胺还诱导了 *CS-ACS2* 和 *CS-ACS3* 转录产物的积累。在 CO<sub>2</sub> 和环己亚胺同时出现时 *CS-ACS2* 转录产物的积累发生在 1 h 内,3 h 后消失。去掉 CO<sub>2</sub>,*CS-ACS2* 却大幅度地增加。CO<sub>2</sub> 胁迫诱导的乙烯对这些(*ACS2* 和 *ACS3*)基因的表达几乎没有效应。结果说明 *CS-ACS1* 作为 ACS 主要的基因在 CO<sub>2</sub> 胁迫时在黄瓜果实内负责提高乙烯的合成量。

柑橘表皮的颜色经过低温和高于 12.5℃ 的日变化处理后由绿变黄,乙烯在这个过程中起了启动的作用。为了研究颜色的变化是否因低温引起,Wong 等从柑橘果皮中分离到两个低温诱导的 ACS,*CS-ACS1* 和 *CS-ACS2* 两个基因<sup>[70]</sup>。*CS-ACS1* 转录出 1.7 kb 的 RNA,编码 483 个氨基酸(Mr 54 115, pI6.63),而 *CS-ACS2* 转录出 1.8 kb 的 RNA,编码 477 个氨基酸(Mr 53 291, pI6.72),4℃ 处理变暖后两个基因在 2.4 h 内都被迅速地诱导。室温 24 h 后,*CS-ACS1* 的 RNA 回到冷处理前的水平。冷诱导的乙烯和 ACC 都可以测到。这两个基因还被伤害所诱导。蛋白质合成抑制剂环己亚胺能促进这两个转录产物在室温下的积累。3.3 kb 的基因组分析,*CS-ACS1* 由 4 个外显子和 3 个内

含子组成,这三个内含子很大(1.2 kb),明显地和线粒体 DNA 同质。

ACS 启动子的结构也已开始研究。在不同的耐贮性的苹果品种中得到了不同的 ACS 的等位基因克隆。Sunako 等<sup>[60]</sup>在成熟苹果(栽培种为 Golden Delicious)中发现了一对等位基因 *Md-ACS1-1* 和 *Md-ACS1-2*。基因研究表明两者的编码区有 7 个不同的核苷酸,但只有一个 aa 被改变。一个 162 bp 的片段作为一个短的分散重复单元反向转座子被插在 *ACS1-2* 的 5'-侧翼区,此区对应于 *ACS1-1* 的-781 处,定位于 *ACS1-2* 3'-端的预期编码区 XhoI 位点没有被发现(用 RT-PCR 法),在 Golden Delicious 苹果成熟时只有 *ACS1-1* 进行转录。DNA 凝胶印迹和 PCR 分析清楚地表明苹果栽培品种要么是 *ACS1-1* 和 *ACS1-2* 的杂合子,或者是每一种的纯合子。RNA 凝胶印迹分析表明 Fuji 品种为 *ACS1-2* 的纯合子(这种品种产生很少的乙烯,因此有较长的贮存期),在成熟期 *ACS1-2* 的转录水平很低。Yoon 等<sup>[61]</sup>研究了绿豆胚轴生长素诱导的 ACS 基因(*VR-ACS6*),它的启动子的活性在转基因烟草中进行了检查。这个克隆含有 1 612 bp 长度的 5' 非翻译区,其编码序列由三个外显子和两个内含子组成。基因组 Southern 杂交说明 *VR-ACS6* 是一个单拷贝基因。转录开始于翻译起点密码上游的 231- 碱基处,此处的碱基为 C。*VR-ACS6* 启动子含有与已鉴定的不同功能的生长素反应元同质。为了证明这个启动子区域的响应性,用了 1 719 bp 的 *VR-ACS6* 启动子和 *Gus* 基因相连接,然后将构建好的基因转入烟草。用生长素处理转基因植株的叶和黄化幼苗胚轴引起了 *Gus* 基因的强烈表达。CTK 提高了报告基因受生长素诱导后基因的表达量,而 ABA 和乙烯则抑制这种表达。*VR-ACS6* 启动子在转基因植物里的活动特点与在绿豆胚轴中的表达高度一致。组织化学染色表明 *Gus* 活性可在用生长素处理的黄化或正常的幼苗中检测到,CTK 增加了生长素诱导的 *Gus* 的染色强度和扩大了染色区,而 ABA 和乙烯则恰好相反。

综上所述 ACS 基因的表达极为复杂,有不同的诱导方式,其调节主要发生在转录水平上,也可在翻译水平上,相信随着研究的深入,会有越来越多 ACS 的基因被克隆,基因的调节方式被披露,基因的启动子被发现。

### 1.3 ACC 氧化酶(ACO)

ACO 是乙烯合成途径中的最后一个酶。此酶最早被 Yang 及其同事定名为乙烯形成酶(EFE)。直到 90 年代初才阐明了这个酶的反应特征、它需要抗坏血酸和氧作为辅助底物(cosubstrates), $Fe^{2+}$  和  $CO_2$  作为辅助因子,据此把 EFE 称为 ACC 氧化酶(ACO)更适合。把外源的 ACC 供给植物组织就能使乙烯的生成量增加,表明这个酶是组成性的,不构成乙烯生物合成的限速酶。

#### 1.3.1 ACO 基因的克隆

ACO 的鉴定远比 ACS 困难得多,因为不能用通常的生物化学方法分离无细胞提取液中的 ACO。用分子克隆的办法来鉴定 ACO,克服了直接从植物组织中提取 ACO 的困难,使 ACO 的研究柳岸花明。虽然不能用传统的生化方法分离出这个酶,但是可以鉴定与成熟有关的 cDNA 克隆的功能性表达。Grierson 等<sup>[71]</sup>从不同成熟阶段的番茄中分离到了 ACO 的 mRNA,并使之在兔子网状细胞裂解液系统中翻译。用 SDS-PAGE 分析翻译产物,他们发现有 4-8 个翻译产物的水平在成熟过程中提高,其中一个为 PG,而其他的功能不知。其中一个为 35 kD。Slater 等提取了成熟时番茄 Poly(A)<sup>+</sup>RNA,建立了 cDNA 文库<sup>[72]</sup>。用完全成熟的番茄和成熟的绿色番茄的 cDNA 作为探针进行差异杂交筛选。用此方法鉴定出的与成熟有关的 cDNA 克隆,其中 6 个编码多肽的分子量与

Grierson 体外翻译的一致,其中一条克隆编码 35 kD 的蛋白被命名为 pTOM13,在番茄成熟过程中和绿果及叶受伤后,编码 35 kD 的蛋白质的 mRNA 的出现与乙烯合成量的增加相一致。用 pTOM13 作为探针在成熟、损伤未成熟的果实及受伤叶片的 RNA 中筛选出的 mRNA,体外翻译时同样产生 35 kD 的蛋白,但在未受伤的果和叶中,却未得到相应的蛋白。于是 Smith 等提出 pTOM13 可能是一个与乙烯生物合成有关的酶<sup>[73]</sup>。用 pTOM13 cDNA 作为探针对番茄的基因组 DNA 进行的 Southern 印迹表明,在基因组中有低拷贝数目的基因与 pTOM13 同质。鉴定 pTOM13 是 ACO 的第一个有突破性进展的是来自 pTOM13 的转化实验。Hamilton 等将 pTOM13 的 1.1 kb 片段在 CaMV35S 启动子的控制下反义地转入番茄植物体内<sup>[74]</sup>。在转基因植物体内,损伤的叶片或成熟的果实与 pTOM13 同质的 mRNA 的积累被大幅度降低,甚至难以测出。由于推测的 pTOM13 的氨基酸序列与黄烷酮-3-羟化酶的氨基酸有 58% 的同源性,Hamilton 提出 pTOM13 编码的是乙烯形成酶,其催化模式与羟化酶类似,这与 Yang 等根据由羟化酶通过 N-羟基-ACC 作为中间体把 ACC 氧化成乙烯和氰基甲酸而提出的 ACO 反应机理相一致<sup>[75]</sup>。最初试图在酵母中表达 pTOM13 未成功,因为在 pTOM13 的插入片段 5'-端缺少了两个碱基,故 mRNA 不能翻译,经过修正的 cDNA 克隆导入酵母,成功表达了 ACO 活性,抗坏血酸可提高其活性,CoCl<sub>2</sub> 及铁螯合剂非咯啉可抑制其活性,从而证实 pTOM13 翻译的产物是 ACO<sup>[76]</sup>。几乎在同时,Spanu 等<sup>[77]</sup>从病原激发因子处理的番茄细胞中提取的 RNA,然后,注入到爪蟾卵细胞中,使其获得了转变 ACC 为乙烯的能力,并且该酶的动力学、需铁及立体专一性与所期望的真实的 ACO 一致。反义的 pTOM13 和番茄细胞 RNA 一起注入到爪蟾卵细胞中,抑制了 ACO 的表达,因此,指导合成 ACO 的 RNA 与 pTOM13 有同源区,从病原菌诱发因子所诱导而准备的 cDNA 文库中得到了与 pTOM13 有高同源性的几个克隆株,其中的一个为 pTOM5,它所编码的 ACO 与 pTOM13 转录产物有 88% 的同源性。

除了番茄外,从其他多种植物中获得了 ACO 基因(表 2)。像 ACS 一样,ACO 也为多基因家族所编码。如从番茄中已分离到了 3 个不同 ACO 基因。用专一的基因探针研究表明,这些基因在成熟果实和伤害叶片里表达有差异,不同植物 ACO 基因的同源性比 ACS 高,一般在蛋白质水平上同源性都在 80% 以上。

### 1.3.2 ACO 的生物化学性质

由于从 pTOM13 推测的 aa 序列与黄烷酮-3-羟化酶的序列类似,Ververidis 等利用与提取和分析黄烷酮-3-羟化酶相同的条件进行试验<sup>[78]</sup>,首先报道了从甜瓜果实匀浆中提取到具活性的 ACO。这些条件包括在 N<sub>2</sub> 下、加铁和抗坏血酸。这些条件使 ACO 活性完全恢复,并具有一定的立体专一性。离心分离时,酶存在于可溶性成分中。基于这些结果,Ververidis 认为<sup>[79]</sup>,ACO 与 2-氧谷氨酸的双氧酶相类似,所有这些酶都要求 Fe<sup>2+</sup> 和抗坏血酸。进一步研究表明,用凝胶过滤测得酶的 Mr 为 41 kD, Km 为 60 μM,最适 pH7.5。尽管类似于 2-氧谷氨酸的双氧酶,但 ACO 不要求 2-氧谷氨酸为辅基,ACO 反应机理可能类似于异青霉素合成酶和 GA<sub>20</sub> 3β-羟化酶,这些酶都需 Fe<sup>2+</sup>,但不需要 2-氧谷氨酸<sup>[79]</sup>。Co<sup>2+</sup>、SH-试剂、自由基淬灭剂和 EDTA 可以抑制 ACO 的活性。EDTA 可能是螯合介质中的自由铁离子。1,2-二羟萘是 ACO 活性最强的抑制剂,因为它与铁有很强的结合能力。1,10-菲咯啉也是 Fe<sup>2+</sup> 的螯合剂,所以也可以抑制 ACO。2-氨基异丁酸为 ACO 竞争性抑制剂。氧化磷酸化的偶联剂(DNP 和 CCCP)也能抑制酶活。

表 2 部分已克隆到的 ACO 基因  
Table 2 Some of ACO genes cloned

| 植物<br>Plants            | 调节<br>Regulations             | 基因<br>Genes                                      | 作者<br>Authors       | 年代<br>Years  | 文献<br>Citations |
|-------------------------|-------------------------------|--|---------------------|--------------|-----------------|
| 拟南芥 <i>Arabidopsis</i>  | 受乙烯调节的基因<br>成熟诱导              | <i>ACO2/E1305</i>                                | Kieber 等<br>Clark 等 | 1993<br>1997 | [81]<br>[89]    |
| 番茄 Tomato               | 淹水后引起偏上生长<br>花发育中的<br>伤诱导     | <i>ACO1</i><br><i>ACO1-3</i><br><i>ACO1 ACO3</i> | English 等           | 1995         | [82]            |
| 蝴蝶兰 <i>Phalaenopsis</i> | 衰老过程中成熟诱导                     | <i>LE-ACO1</i> 和 <i>LE-ACO2</i>                  | Nakatsuka 等         | 1998         | [88]            |
| 罗马甜瓜 Cantaloupe         | 乙烯诱导不授粉不能转变 ACC 为乙烯           |  | O'Neill 等           | 1993         | [83]            |
| 罗马甜瓜 Cantaloupe         | 受乙烯、伤、NaCl、淹水和成熟诱导            | <i>ACO1 ACO3</i>                                 | Guis 等              | 1997         | [84]            |
| 笋瓜 Winter squash        | 被伤诱导、乙烯抑制剂 NBD 抑制<br>被外源乙烯促进的 |  | Hyodo 等             | 1997         | [85]            |
| 康乃馨 Carnation           | 在花柱和花瓣中被授粉所诱导                 | <i>SR120</i>                                     | Woodson 等           | 1992         | [11]            |
| 绿豆 Mung bean            | 被乙烯诱导<br>被伤诱导                 | <i>ACO1 ACO2</i>                                 | Kim 等               | 1994         | [86]            |
| 桃 Peach                 | 伤和果实成熟诱导                      | <i>pch313</i>                                    | Collahan 等          | 1992         | [87]            |
| 苹果 Apple                | 果实成熟时诱导                       |  | Dong 等              | 1992         | [80]            |

在苹果的匀浆中 ACO 与颗粒组分相结合<sup>[80]</sup>。从苹果中纯化的溶解状态的 ACO 表现出了均一性,凝胶过滤法测得其分子量为 39 kD, SDS-PAGE 测得其分子量为 35 kD,表明它是一种单体。部分的氨基酸序列与 *pAE12* 克隆片段推测的序列极为吻合。在苹果呼吸峰之前,用乙烯处理,不管在体内或离体情况 ACO 的活性都与乙烯的形成相吻合。纯化的 ACO 绝对需要  $Fe^{2+}$  和 Vc,但不需 2-氧谷氨酸。在许多植物中 ACO 活性随  $CO_2$  浓度的升高而提高。空气中的  $CO_2$  浓度达 0.5% 时酶活性达到其最大活性的一半,当  $CO_2$  为 2%–4% 时,酶活达到最大。

Dong 等建立了由 ACC 到乙烯反应的化学计量<sup>[80]</sup>:



ACO 氧化的确切机理仍有待于进一步研究。

### 1.3.3 ACO 在细胞中的定位

在乙烯生物合成途径未被阐明之前,人们都已广泛相信,至少一部分的乙烯形成酶应定位于膜上,因为人们发现<sup>[90]</sup>乙烯生物合成对渗透溶液敏感,被  $Ca^{2+}$  所稳定。当发现 ACC 是乙烯生物合成的直接前体后,两个与乙烯合成有关的特异催化酶被提出,ACO 在细胞中的定位被重新提出。在番茄果实中 ACS 为可溶性酶,并且没有证据说明它在其他植物中定位于膜上,而大量证据都证明乙烯的生物合成要求具完整性的膜<sup>[91]</sup>。John 等提出 ACO 的活性偶联质子的跨膜运输,乙烯的形成要求维持一定的膜势<sup>[91]</sup>。然而这个理论没有被实验所证实<sup>[92]</sup>,从蚕豆叶片分离到具有中心液泡的原生质体或从原生质体分离到的液泡都能把外施的 ACC 转变为乙烯,无液泡的原生质体丧失了 ACO 活性,当无液泡的原生质体一旦重新形成液泡,ACO 活性就恢复,说明 ACO 可能定位于液泡膜上<sup>[93]</sup>。转基因的酵母经差速离心,发现 ACO 是一种颗粒状,与 18 000×g 的离心区段相联系。由于 ACO 是以颗粒形式出现,因此,ACO 可能与膜蛋白形成蛋白与蛋白的复合物。从 ACO 氨基酸序列上从 113–134 位(甚至到 145)氨基酸有很大可能形成含有多个 Leu 的两性的  $\alpha$ -螺旋体,定位于疏水一端,这个假设的 Leu 拉链的出现在所有已知的 ACO 中是保守的,这可以解释 ACO 在酵母中

以颗粒状出现的原因,也可以解释早期认为 ACO 与植物膜相联的原因。由于有不同的实验证据,ACO 的定位至今尚未解决。可能是不同的 ACO 有不同的定位。

此外,如前所述 ACC 也可以在 ACC 丙二酰转移酶(ACC N-malonyltransferase)的作用下代谢成为丙二酰 ACC(1-(malonylamino) cyclopropane-1-carboxylic acid, MACC)。MACC 实际上是 ACC 的结合形态。MACC 的形成可调节植物体内乙烯的水平。植物体内乙烯的水平也可以通过乙烯的降解来调节。由于本文主要集中于乙烯的生物合成途径,所以这些问题在此不拟详述。

## 2 与乙烯有关的基因工程

通过阻断乙烯生物合成或使乙烯受体不敏感从而达到延迟果实的成熟和花的衰败是采后生理研究的主要目标。近年来由于对乙烯分子生物学的研究逐步深入,使人们可以从多种途径,多方位地控制乙烯以延迟成熟。用遗传工程的方法达到这一目标,有五种不同的途径(图 3)。第一种途径就是通过 SAM 水解酶(SAMase),分解 SAM,使之成为 MTA 和高丝氨酸;第二种途径就是用反义的 ACS、抑制 ACC 的产生,或用正义的 ACS,通过同源共抑制而抑制内源的 ACS 基因的表达;第三种途径是反义的 ACO,从而不能产生乙烯,或用正义的 ACO,通过同源共抑制而抑制内源的 ACO 基因的表达;第四种途径就是 ACC 脱氨酶,将 ACC 分解成为  $\alpha$ -酮丁酸和氨;第五种途径是乙烯受体突变体的应用,使植物对乙烯反应迟钝或使乙烯信号中断,从而达到保鲜之目的。

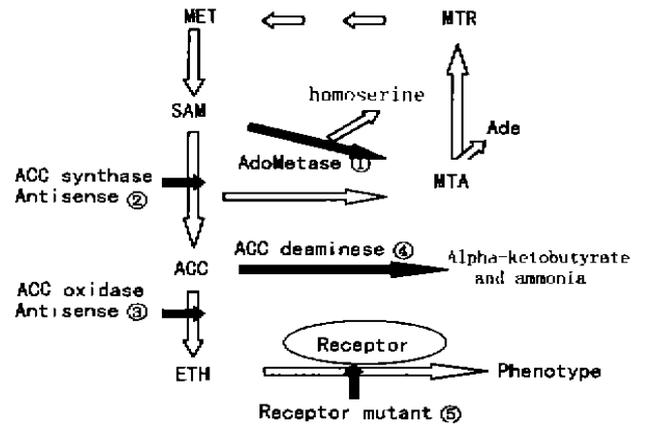


图 3 用基因工程的方法控制乙烯合成的可能途径  
Fig. 3 The possible pathways to control ethylene and therefore to enhance shelf-life and market ability of fruits or flowers by genetic transformation

### 2.1 SAMase

通过控制 SAM(或 AdoMet)(乙烯生物合成中的第一步)来控制乙烯生物合成的试图没有成功,因为至少有三种不同的 AdoMet 合成酶,另外已知 AdoMet 生成的抑制剂对哺乳细胞都是剧毒<sup>[4]</sup>,但通过分解 SAM,使合成途径形成短路,即不能合成 ACC,(图 3 中①)却是可能的。在大肠杆菌的 T3 中有一种酶,称为 AdoMet 水解酶(AdoMetase 或 SAMase)能够将 SAM 分解成高丝氨酸和 MTA。由于 AdoMet 是乙烯合成的单一前体,它的分解直接降低了乙烯的生物合成。SAM 分解后形成的 MTA 又是 ACS 的一个抑制剂,所以 SAMase 的转入,起到了一箭双雕的作用,既减少了前体物又抑制了 ACS 的活性。将 SAMase 的基因转入植物中,转基因植物的花和果实的衰老得到了明显的抑制<sup>[6]</sup>。

### 2.2 反义的 ACS

Oeller 等 1991 年首先将 ACC 基因反义地转入番茄,使番茄的成熟被推迟,外用乙烯又可以恢复其正常成熟<sup>[6]</sup>。在其他的植物中也有用 ACS 的反义基因,如苹果<sup>[66]</sup>等。此外,也有正义表达,利用同源共抑制现象控制内源乙烯合成<sup>[67]</sup>。

### 2.3 反义的 ACO

Hamilton 等<sup>[9]</sup>首先把 pTOM13(即 ACO)引入番茄植株,获得了反义 RNA 转化植株。该植株受伤叶片和果实成熟过程的乙烯生成均受到明显的抑制,不转化的对照果实乙烯最高释放量为  $6.5 \text{ nmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,而转化植株果实仅为  $0.25 \text{ nmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。对照受伤叶片乙烯产量最大释放量为  $9.5 \text{ nmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ ,转化植株仅为  $1.0 \text{ nmol g}^{-1}\text{h}^{-1}$ 。用反义的 ACO 基因控制花果的成熟和衰老受到科学家的重视,在许多植物上均有尝试,如在番茄<sup>[98-100]</sup>、香瓜<sup>[101]</sup>、椰菜<sup>[102]</sup>、三角杨<sup>[103]</sup>及康乃馨<sup>[104]</sup>等均有应用,取得了较为满意的效果。

### 2.4 ACC 脱氨酶

ACC 脱氨酶是从土壤的假单孢菌(*Pseudomonas* sp.)中分离出来的一种可以将 ACC 分解成为  $\alpha$ -酮丁酸和氨的酶。在 ACC 为唯一碳源的培养基上筛选菌株,能正常生长的菌株中含有 ACC 脱氨酶。Klee 等首先将此酶转入番茄植物中<sup>[105]</sup>,获得了转基因的番茄果实,乙烯生物合成的抑制率达 97%,从而果实成熟明显延迟,ACC 脱氨酶的优势之处在于它破坏 ACC,而不是靠反义抑制,因此,它具有通用性,可用于不同的作物,扩大了使用范围。而反义的 ACC 和 ACO 只能用于同种植物,如番茄中的 ACS 和 ACO 只能用于番茄。最近 Jia 等人<sup>[106,107]</sup>又从青霉菌(*Penicillium*)中得到了 ACC 脱氨酶,发现它与已发现的 *Pseudomonas* sp.及土星汉逊酵母(*Hansenula saturnus*)中的 ACC 脱氨酶分别有 50%和 54%的同源性。可见自然界中也存在着多种类型的 ACC 脱氨酶,目前至少发现了三种,但在植物中尚未发现。

### 2.5 乙烯受体突变体

近年来乙烯受体的研究为利用基因工程控制植物对乙烯的感知,开辟了一条延迟花果衰老的新途径<sup>[108,109]</sup>。拟南芥 *etr-1* 是一个乙烯受体的显性突变体。突变体是由于乙烯受体的氨基酸改变,使之结合乙烯的能力下降(如前所述),从而阻碍了植物对乙烯信号的感知及传导途径,因而突变体对乙烯不敏感。将 *etr-* 必的基因转入番茄和矮牵牛,使转基因植物的花果的成熟及衰老明显地推迟,从而起到了保鲜之目的(图 3 中⑤)。

### 2.6 其他

以上都是利用抑制乙烯,起到果实保鲜作用。但是,在农业生产上有时需要促进成熟,以提高品质或促进早熟利于下茬作物的播种,如烟草成熟度好,品质就好,因此需要乙烯的正义表达。然而,这方面的研究极为鲜见。笔者已构建了在 *Psag<sub>3</sub>* 控制下的兰花 ACS 基因,并在烟草中得到表达(文章待发),以图获得成熟度好的烟草新品种。此基因也可用于棉花等作物的催熟,有利于收获。

综上所述,近年来人们对乙烯的研究取得了长足的进展,乙烯生物合成途径中的关键酶基因已相继被克隆、被鉴定。通过基因工程的方法人为调控乙烯的生物合成已初步显示出诱人的前景。相信随着研究的不断深入,技术的不断完善,会有更多、更好的通过调控内源乙烯生物合成的新品种出现,人类生活也将会因此而增色。

### 参考文献:

- [1] Johnson P R, Ecker J R. The ethylene gas signal transduction pathway a molecular perspective [J]. *Annu Rev Genet*, 1998, 32:227-254.
- [2] Lieberman M, Mapson L W. Genesis and biogenesis of ethylene [J]. *Nature*, 1964, 204:343-345.

- [3] Lieberman M, Kunishi A, Mapson L W, et al. Stimulation of ethylene production in apple tissue slices by methionine [J]. *Plant Physiol*, 1966, 41:376-382.
- [4] Adams D O, Yang S F. Methionine metabolism in apple tissue: implication of S-adenosylmethionine as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene [J]. *Plant Physiol*, 1977, 60:892-896.
- [5] Yung K H, Yang S F, Schlenk F. Methionine synthesis from 5-methylthioribose in apple tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1982, 104:771-777.
- [6] Yip W K, Yang S R. Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues [J]. *Plant Physiol*, 1988, 98:473-476.
- [7] Jiao X Z, Philosoph-Hadas S, Su L Y. The conversion of 1-(malonylamino)cyclopropane-1-carboxylic acid to 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid in plant tissues [J]. *Plant Physiol*, 1986, 81:637-641.
- [8] Heby O, Persson L. Molecular genetics of polyamine synthesis in eukaryotic cells [J]. *Trends Biochem Sci*, 1990, 15:153-158.
- [9] Tabor C W, Tabor H. Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase [J]. *Adv Enzymol*, 1984, 56:251-282.
- [10] Thomas D, Surdin-Kerjan Y. *SAMS1*, the structural gene for one of the S-adenosylmethionine synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *J Biol Chem*, 1987, 262:16704-16709.
- [11] Peleman J, Saito K, Cottyn B. Structure and expression analyses of the S-adenosylmethionine synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Gene*, 1989, 84:359-369.
- [12] Woodson W R, Park K Y, Drory A. Expression of ethylene biosynthetic pathway transcripts in senescing carnation flowers [J]. *Plant Physiol*, 1992, 99:526-532.
- [13] Boerjan W, Bauw G, Van Montagu M. Distinct phenotypes generated by overexpression and suppression of S-adenosyl-L-methionine reveal developmental patterns of gene silencing in tobacco [J]. *Plant Cell*, 1994, 6:1401-1414.
- [14] Izhaki A, Shoseyov O, Weiss D. A petunia cDNA encoding S-adenosyl-methionine synthase [J]. *Plant Physiol*, 1995, 108:841-842.
- [15] Dekeyser R A, Claes B, De Rycke R, et al. Transient gene expression in intact and organized tissues [J]. *Plant Cell*, 1990, 2:591-602.
- [16] Espartero J, Pintor-Toro J A, Pardo J M. Differential accumulation of S-adenosylmethionine synthetase transcripts in response to salt stress [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25:217-227.
- [17] Gomez-Gomez L, Carrasco P. Differential expression of the S-adenosyl-L-methionine synthase genes during pea development [J]. *Plant Physiol*, 1998, 117:397-405.
- [18] Yu Y B, Adams D O, Yang S F. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1979, 198:280-286.
- [19] Boller T. Time-dependent inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by its substrate, S-adenosylmethionine [A]. In: 12th International Conference on Plant Growth Substances [C] Heidelberg: Int: Plant Growth Substances Assoc, 1985, 36 (Abstr).
- [20] Acaster M A, Kende H. Properties and partial purification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) synthase [J]. *Plant Physiol*, 1983, 72:139-145.
- [21] Bleecker A B, Kenyon W H, Somerville S C. Use of monoclonal antibodies in the purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, an enzyme in ethylene biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1986, 83:7755-7759.
- [22] Edelman H, Kende H. A comparison of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate *in vitro* translation product and *in vivo*-labeled protein in ripening tomato [J]. *Planta*, 1990, 182:632-638.
- [23] Rottmann W H, Peter G E, Oeller P W, et al. 1-Aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato is encoded by a multigene family whose transcription is induced during fruit and floral senescence [J]. *J Mol Biol*, 1991, 222:937-961.
- [24] Van Der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman H M, et al. Purification and partial characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase from tomato pericarp [J]. *Eur J Biochem*, 1989, 182:639-647.
- [25] Van Der Straeten D, Van Wiemeersch L, Goodman H M, et al. Cloning and sequence of two different cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:4859-4863.
- [26] Privalle L S, Graham J S. Radio-labeling of a wound-inducible pyridoxal phosphate-utilizing enzyme: evidence for its identification as ACC synthase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1987, 253:333-340.
- [27] Hyodo H, Tanaka Y, Watanabe K. Wound-induced ethylene production and 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in mesocarp tissue of winter squash fruit [J]. *Plant Cell Physiol*, 1983, 24:963-969.
- [28] Sato T, Oclier P W, Theologis A. The 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of *Curcubita*. Purification, properties, expression in *Escherichia coli*, and primary structure determination by DNA sequence analysis [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266:3752-3759.
- [29] Adams D O, Yang S F. Ethylene biosynthesis: identification of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid as an intermediate in the conversion of methionine to ethylene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76:170-174.
- [30] Ramalingam K, Lee K M, Woodart R W, et al. Stereochemical course of the reaction catalyzed by the pyridoxal phosphate-dependent enzyme 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1985, 82:7820-7824.

- [31] Boller J B, Hemer R C, Kende H. Assay for and enzymatic formation of ethylene precursor, 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid [J]. *Planta*, 1979, 145:293-303.
- [32] Satoh S, Esashi Y. Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase of etiolated mung bean hypocotyl segments by its substrate, S-adenosyl-L-methionine [J]. *Plant Cell Physiol*, 1986, 27:285-291.
- [33] Satoh S, Yang S F. S-Adenosylmethionine-dependent inactivation and radiolabeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88:109-114.
- [34] Satoh S, Yang S F. Inactivation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase by L-vinylglycine as related to the mechanism-based inactivation of the enzyme by S-adenosyl-L-methionine [J]. *Plant Physiol*, 1989, 91:1036-1039.
- [35] Satoh S, Yang S F. Specificity of S-adenosyl-L-methionine in the inactivation and the labeling of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase isolated from tomato fruits [J]. *Arch Biochem Biophys*, 1989, 271:107-112.
- [36] Yip W K, Dong J G, Kenny J W, et al. Characterization and sequencing of the active site of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:7930-7934.
- [37] Kende H. Enzymes of ethylene synthesis [J]. *Plant Physiol*, 1989, 91:1-4.
- [38] Li N, Mattoo A K. Deletion of the carboxyl-terminal region of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key protein in the biosynthesis of ethylene, results in catalytically hyperactive monomeric enzyme [J]. *J Bio Chem*, 1994, 269:6908-6917.
- [39] White M F, Vasquez J, Yang S F, et al. Expression of apple 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Escherichia coli*: Kinetic characterization of wild-type and active-site mutant forms [J]. *Proc Natl Acad Sci UAS*, 1994, 91:12428-12432.
- [40] Tarun A S, Lee J S, Theologis A. Random mutagenesis of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase: A key enzyme in ethylene biosynthesis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95(17):9796-9801.
- [41] Zhou H, Wang H W, Zhu K, et al. The multiple roles of conserved arginine 286 of aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, coenzyme binding, substrate binding and beyond [J]. *Plant Physiol*, 2000, 121:913-919.
- [42] Capitani G, Hohenester E, Feng L, et al. Structure of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase, a key enzyme in the biosynthesis of ethylene [J]. *J Mol Biol*, 1999, 294:745-756.
- [43] Hohenester E, White M F, Kirsch J F, et al. Crystallization and preliminary x-ray analysis of recombinant 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase from apple, a key enzyme in the biosynthesis of plant hormone ethylene [J]. *J Mol Bio*, 1994, 243:594-599.
- [44] Olson D C, White J A, Edelman L, et al. Differential expression of two genes for 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in tomato fruits [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88:5340-5344.
- [45] Nakagima N, Mori H, Yamazaki K. Molecular cloning and sequence of a complementary DNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase induced by tissue wounding [J]. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31:1021-1029.
- [46] Nakagima N, Mori H, Yamazaki K. Cloning of a complementary DNA for auxin-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase and differential expression of the gene by auxin and wounding [J]. *Plant Cell Physiol*, 1991, 32:1153-1163.
- [47] Abel S, Nguyen M D, Chow W, et al. *ASC4*, a primary indoleacetic acid-responsive gene encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase in *Arabidopsis thaliana*. Structural characterization, expression in *Escherichia coli*, and expression characteristics in response to auxin [J]. *J Biol Chem*, 1995, 270:19093-19099.
- [48] Vogel J P, Woeste K E, Theologis A, et al. Recessive and dominant mutations in the ethylene biosynthetic gene *ACS5* of *Arabidopsis thaliana* confer cytokinin-insensitivity and ethylene overproduction respectively [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:4766-4771.
- [49] Banga M, Slaa E J, Blom C W P M, et al. Ethylene biosynthesis and accumulation under drained and submerged conditions. A comparative study of two *Rumex* species [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112:229-237.
- [50] Cohen E, Kende H. *In vivo* 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase activity in internodes of deepwater rice [J]. *Plant Physiol*, 1987, 84:282-286.
- [51] Botella J R, Arteca R N, Frangos J A. A mechanical strain-induced 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92:1595-1598.
- [52] Yi H C, Jao S, Lee J S, et al. Auxin and brassinosteroid differentially regulate the expression of three members of the 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase gene family in mung bean [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 41:443-454.
- [53] Terai H. Behaviors of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC) and ACC synthase responsible for ethylene production in normal and mutant (*nor* and *rin*) tomato fruits at various ripening stages [J]. *J Jpn Soc Hort Sci*, 1993, 61:805-812.
- [54] Olson D C, Oetiker J H, Yang S F. Analysis of a 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid gene expressed during roots of tomato plants [J]. *J Biol Chem*, 1995, 70:1405-1406.
- [55] Tuomainen J, Betz C, Kangasjarvi J, et al. Ozone induction of ethylene emission in tomato plants. regulation by differential accumulation of transcripts for the biosynthetic enzymes [J]. *Plant J*, 1997, 12:1151-1162.
- [56] Bui A Q, O'Neill S D. Three 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes regulated by primary and secondary pollination signals in orchid flowers [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116:419-429.
- [57] Knoester M, Van Leon L C, Van den Heuvel J, et al. Ethylene-insensitive tobacco lacks non-host resistance against soil-borne fungi [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:1933-1937.

- [58] Imamura A, Hanaki N, Umeda H, et al. Response regulators implicated in His-to-Asp phosphotransfer signaling in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95:2691-2696.
- [59] Schlagnhauer C, Arteca R, Pell E. Sequential expression of two 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase gene in response to biotic and abiotic stresses in potato leaves [J]. Plant Mol Biol, 1997, 35:683-688.
- [60] Sunako J, Sakuraba W, Sende M. An allele of the ripening-specific ACS1 in apple fruit with a long storage life [J]. Plant Physiol, 1999, 119:1294-1304.
- [61] Lelievre J M, Tichit L, Dao P. Effects of chilling on the expression of ethylene biosynthetic genes in Passe-Craesan pear fruits [J]. Plant Mol Biol, 1997, 33:847-855.
- [62] Trebitsch T, Staub J E, O'Neill S D. Identification of 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase gene linked to the female(F) locus that enhances female sex expression in cucumber [J]. Plant Physiol, 1997, 113:978-995.
- [63] Subramaniam K, Abbo S, Ueng P P. Isolation of two differentially expressed wheat 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase gene cDNAs and the characterization of one of their genes with root-predominant expression [J]. Plant Mol Biol, 1996, 31:1009-1012.
- [64] Kende H. Ethylene biosynthesis [J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1993, 44:283-307.
- [65] Li N, Parsons B L, Liu D, et al. Accumulation of wound-inducible ACC synthase transcript in tomato fruit is inhibited by salicylic acid and polyamine [J]. Plant Mol Biol, 1992, 18:477-487.
- [66] Chappell J, Hahlbrock K, Boller T. Rapid induction of ethylene biosynthesis in cultured parsley cells by fungal elicitor and its relationship to the induction of phenylalanine ammonia-lyase [J]. Planta, 1994, 161:475-480.
- [67] Oetiker J D. Differential induction of seven 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes by elicitor in suspension cultures of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Plant Mol Biol, 1997, 34:275-286.
- [68] Mathooko F M, Mwaniki M M, Nakatsuka A. Expression characteristics of CS-ACS1, CS-ACS2 and CS-ACS3, three members of the ACS gene family in cucumber fruit under carbon dioxide stress [J]. Plant Cell, 1999, 40:164-172.
- [69] Wong W S, Ning W, Xu P L. Identification of two chilling-regulated 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase genes from citrus fruit [J]. Plant Mol Biol, 1999, 41:587-600.
- [70] Yoon I S, Park D H, Mari H. Characterization of an auxin-inducible 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid synthase gene, VR-ACS6, of mung bean and hormonal interaction on the promoter activity in transgenic tobacco [J]. Plant Cell Physiol, 1999, 40:431-438.
- [71] Grierson D, Slater A, Speirs J, et al. The appearance of polygalacturonase mRNA in tomatoes: one of a series of changes in gene expression during development and ripening [J]. Planta, 1985, 163:263-271.
- [72] Slater A, Maunder M J, Edwards K, et al. Isolation and characterization of cDNA clones for tomato polygalacturonase and other ripening-related proteins [J]. Plant Mol Biol, 1985, 5:137-147.
- [73] Smith C J S, Slater A, Grierson D. Rapid appearance of an mRNA correlated with ethylene synthesis encoding a protein of molecular weight 35000 [J]. Planta, 1986, 168:94-100.
- [74] Hamilton A J, Lycett G W, Grierson D. Antisense gene that inhibits synthesis of the hormone ethylene in transgenic plant [J]. Nature, 1990, 346:284-287.
- [75] Yang S F, Hoffman N E. Ethylene biosynthesis and its regulation in higher plants [J]. Ann Rev Plant Physiol, 1984, 35:155-189.
- [76] Hamilton A J, Bouzayen N I, Grierson D. Identification of a tomato gene for the ethylene-forming enzyme by expression in yeast [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88:7434-7437.
- [77] Spanu P, Reinhardt D, Boller T. Analysis and cloning of the ethylene-forming enzyme from tomato by functional expression of its mRNA in *Xenopus laevis* oocytes [J]. EMBO J, 1991, 10:2007-2013.
- [78] Ververidis P, John P. Complete recovery *in vitro* of ethylene-forming enzyme activity [J]. Phytochem, 1991, 30:725-727.
- [79] Smith J J, Ververidis P, John P. Characterization of the ethylene-forming enzyme partially purified from melon [J]. Phytochem, 1992, 31:1485-1494.
- [80] Dong J G, Fernandez-Maculet J C, Yang S F. Purification and characterization of 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase from apple fruit [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89:9789-9793.
- [81] Kieber J J, Rothenberg M, Roman G, et al. CTR1, a negative regulator of the ethylene response pathway in *Arabidopsis*, encodes a member of the Raf family of protein kinases [J]. Cell, 1993, 72:427-441.
- [82] English P J, Lycett G W, Roberts J A, et al. Increased 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase activity in shoots of flooded tomato plants raises ethylene production to physiologically active levels [J]. Plant Physiol, 1995, 109:1435-1440.
- [83] O'Neil S D, Nadeau J A, Zhang X S. Interorgan regulation of ethylene biosynthetic genes by pollination [J]. Plant Cell, 1993, 5:419-432.
- [84] Guis M, Bouquim T, Zegzouti H, et al. Differential expression of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase genes in melon and physiological characterization of fruit expressing an antisense ACC oxidase gene [A]. In: Biology and Biotechnology of the Plant Hormone Ethylene [M]. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer, 1994, 327-338.
- [85] Hyodo H, Hashimoto C, Morozumi S, et al. Characterization and induction of the activity of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid oxidase in the wounded mesocarp tissue of *Cucurbita maxima* [J]. Plant Cell Physiol, 1993, 34:667-671.
- [86] Kim W T, Yang S P. Structure expression of cDNAs encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylate oxidase homologs isolated from

- excised mung bean hypocotyls [J]. *Planta*, 1994, 194:223-229.
- [87] Callahan A M, Morgens P H, Wright P, et al. Comparison of Pch313 (pTOM13 homolog) RNA accumulation during fruit softening and wounding of two phenotypically different peach cultures [J]. *Plant Physiol*, 1992, 100:482-488.
- [88] Nakatsuka A, Murachi S, Okunishi H. Differential expression and internal feedback regulation of ACS and ACO and receptor genes in tomato fruit during development and ripening [J]. *Plant Physiol*, 1998, 118:1295-1305.
- [89] Clark K L, Larsen P B, Wang X, et al. Association of the *Arabidopsis* CTR1 Raf-like kinase with the ETR1 and ERS ethylene receptors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:5401-5406.
- [90] Lieberman M. Biosynthesis and action of ethylene [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1979, 30:533-591.
- [91] John P. The coupling of ethylene biosynthesis to a transmembrane electrogenic proton flux [J]. *FEBS Lett*, 1983, 152:141-143.
- [92] John P, Porter A J R, Miller A J. Activity of the ethylene-forming enzyme measured *in vivo* at different cell potentials [J]. *J Plant Physiol*, 1985, 121:397-406.
- [93] Mayne R G, Kende H. Ethylene biosynthesis in isolated vacuoles of *Vicia faba* L.-requirement for membrane integrity [J]. *Planta*, 1986, 167:159-165.
- [94] Ferro A J. Genetic control of ethylene biosynthesis in plants using S-adenosylmethionine hydrolase. 1995, United States Patent (NO: 5416250)
- [95] Oeller P W, Taylor M W. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA [J]. *Sci*, 1991, 25:437-439.
- [96] Dong J G, Kim W T, Yip W K, et al. Cloning of a cDNA encoding 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase and expression of its mRNA in ripening apple fruit [J]. *Planta*, 1991, 185:38-45.
- [97] Nagata M, Mori H, Tabei Y, et al. Modification of tomato fruit ripening by transformation with sense or antisense chimeric 1-aminocyclopropane-1-carboxylate synthase genes [J]. *Acta Horti*, 1995, 394:213-218.
- [98] Atkinson R G, Bolitho K M, Wright M A. Apple ACC oxidase and polygalacturonase: ripening specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato [J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 38: 449-460.
- [99] Hamilton A J, Brown S, Han Y H, et al. A transgene with repeated DNA causes high frequency, post transcriptional suppression of ACC oxidase gene expression in tomato [J]. *Plant J*, 1998, 15:737-746.
- [100] Henzi M X, McNeil D L, Christey M C, et al. A tomato antisense 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase gene causes reduced ethylene production in transgenic broccoli [J]. *Aust J Plant Physiol*, 1999, 26:179-183.
- [101] Ayub R, Guis M, Ben Amor M, et al. Expression of ACC oxidase antisense gene inhibits ripening of cantaloupe melon fruits [J]. *Nature Biotechnol*, 1996, 14:862-866.
- [102] Henzi M X, Christey M C, McNeil D L, et al. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *italica*) with an antisense 1-aminocyclopropane 1-carboxylic acid oxidase gene [J]. *Plant Sci Limer*, 1999, 143:55-62.
- [103] Li M L, Han Y F, Li L, et al. Cloning of ACC oxidase cDNA and its inhibition of ethylene synthesis by its antisense RNA in transgenic *Populus deltoides* [J]. *Forest Res*, 1999, 12:223-228.
- [104] Savin K W, Baudinette S C, Graham M W, et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence [J]. *HortSci*, 1995, 30:970-972
- [105] Kløe R E. Isolation, sequence, and expression ACP gene encoding 1-aminocyclopropane 1-carboxylate deaminase [J]. *J Bacteriol*, 1991, 173:5260-5265.
- [106] Jia Y J, Kakuta Y, Sugawara M, et al. Synthesis and degradation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid by *Penicillium citrinum* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1999, 63(3):542-549.
- [107] Jia Y J, Ito H, Matsui H, et al. 1-aminocyclopropane-1-carboxylate (ACC) deaminase induced by ACC synthesized and accumulated in *Penicillium citrinum* intracellular spaces [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2000, 64(2):299-305.
- [108] Wilkinson J Q, Lanahan M B, Yen H C, et al. An ethylene-inducible component of signal transduction encoded by *Never-ripe* [J]. *Sci*, 1995, 270:1807-1809.
- [109] Wilkinson J Q, Lanahan M B, Clark D G, et al. A dominant mutant receptor from *Arabidopsis* confers ethylene insensitivity in heterologous plants [J]. *Nature Biotechnol*, 1997, 15:5444-5447.