

甜樱桃 *PaPME1* 与 *PaPME2* 在果实成熟软化中的功能分析

齐希梁, 李明*, 刘聪利, 宋露露

(中国农业科学院郑州果树研究所, 郑州 450009)

摘要:【目的】明确甜樱桃PMEs基因家族在果实成熟软化中的功能。【方法】利用qRT-PCR分析2个果胶甲酯酶基因(*PaPME1*和*PaPME2*)在果实发育过程中的表达,并利用果实的VIGS技术鉴定其功能。【结果】*PaPME2*基因在果实发育前期表达量较低,在果实发育后期显著上调表达,一直持续到果实成熟,表达模式与甜樱桃果实成熟软化时期一致;而*PaPME1*基因在果实发育的各个时期均有表达,其中花后28 d表达量最高。沉默甜樱桃果实的*PaPME2*基因延缓了甜樱桃果实成熟软化,同时*PaPME2*基因沉默甜樱桃果实的果实硬度、可溶性果胶含量和PME活性显著低于空载对照;而*PaPME1*基因被沉默的甜樱桃果实的果实硬度、可溶性果胶含量和PME活性与空载对照相比没有显著变化。【结论】*PaPME2*基因是甜樱桃果实成熟软化过程中的关键基因。

关键词:甜樱桃; *PaPME2*; VIGS; 果实成熟软化; 功能分析

中图分类号:S662.5

文献标志码:A

文章编号:1009-9980(2020)10-1455-09

Functional characterization of sweet cherry *PaPME1* and *PaPME2* during fruit ripening and softening

QI Xiliang, LI Ming*, LIU Congli, SONG Lulu

(Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Zhengzhou 450009, Henan, China)

Abstract:【Objective】Pectin methyl esterases (PMEs) are key enzymes in the de-methylation of pectin, which participates in the degradation of pectin during fruit softening. However little has been studied about the functional characteristics of PME genes during fruit ripening. In order to provide a theoretical basis for determining the function of pectin methyl esterase genes (PMEs) during fruit ripening and softening, we characterized the biological function of *PaPME1* and *PaPME2* genes in sweet cherry.【Methods】7-year-old trees of sweet cherry (*P. avium*) cultivar ‘Zaohongzhu’ were selected grown in the resource collections of the National Fruit Tree Germplasm Repository, Zhengzhou Fruit Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences (Zhengzhou, China). To examine the expression pattern of *PaPME1* and *PaPME2* at different growth and developmental stages of sweet cherry fruits, quantitative real-time PCR (qRT-PCR) was implemented using total RNA from different fruit developmental stages. In addition, we used TRV-mediated virus-induced gene silencing (VIGS) to further evaluate the function of *PaPME1* and *PaPME2* during the course of sweet cherry fruit ripening and softening. Meanwhile, The fruit hardness, soluble solids, soluble pectin and PME activity of the TRV::*PaPME1*- and *PaPME2* infected fruit were detected.【Results】Gene expression analysis showed that the expression level of *PaPME2* was low during early fruit growth and development. Subsequently, *PaPME2* expression was sequentially and significantly upregulated during fruit ripening and softening, suggesting that

收稿日期:2020-03-31 接受日期:2020-06-18

基金项目:中国农业科学院科技创新工程专项(CAAS-ASTIP-2020-ZFRI)

作者简介:齐希梁,男,助理研究员,博士,主要从事樱桃分子生物学研究。Tel:0371-65330965,E-mail:qiliangxi@163.com

*通信作者 Author for correspondence。Tel:0371-65330965,E-mail:liming06@caas.cn

the expression pattern was consistent with the ripening and softening period of sweet cherry fruit. The expression of *PaPME1* gene was low in the early stage of fruit development, and was up-regulated with the development of fruit until the fruit ripened and softened. In addition, the expression of *PaPME1* gene showed two peaks on 28 days and 56 days after flowering, but the expression of *PaPME1* gene showed a trend of up-regulation and down-regulation during fruit maturation and development. The tobacco rattle virus-induced gene silencing (TRV-VIGS) technique was used to knock down expression of the *PaPME1* and *PaPME2* genes in the sweet cherry ‘Zaohongzhu’. RT-PCR was performed using cDNA samples from infiltrated fruit at 15 dpi to verify if the *PaPME1* and *PaPME2* genes in ‘Zaohongzhu’ were effectively silenced. This showed that the expression of *PaPME1* and *PaPME2* genes were markedly reduced in the *TRV::PaPME1-* and *PaPME2* infected fruit compared with the *TRV::00*-infected fruit, suggesting that each gene was effectively silenced. Furthermore, silencing of *PaPME2* of sweet cherry fruit delayed fruit ripening and softening in comparison with *TRV::00*-infected control fruit on 21 days post-inoculation (dpi). The fruit firmness, soluble solid concentration, water soluble pectin (WSP) content, CDTA soluble pectin (CSP) content, Na₂CO₃ soluble pectin (NSP) content, PME activity, cellulose content, and hemicelluloses content of the *TRV::PaPME1-* and *TRV::PaPME2*-infected fruits were analyzed. The results showed fruit firmness, WSP content, and PME activity of the *TRV::PaPME2*-infected fruit was significantly reduced compared with that of the *TRV::00*-infected fruit on 15 dpi. And in *PaPME2*-silenced fruits, CSP content and NSP content were significantly increased compared with those of the *TRV::00*-infected fruits on 15 dpi. However, soluble solid concentration, cellulose content, and hemicelluloses content of *TRV::PaPME2*-infected fruit did not differ significantly from that of *TRV::00*-infected fruit on 15 dpi. Compared with *TRV::00*-infected fruit, *TRV::PaPME2*-infected sweet cherry fruits had no significant differences in fruit firmness, soluble solid concentration, WSP content, CSP content, NSP content, PME activity, cellulose content, and hemicelluloses content on 15 dpi. Together, our findings indicate that *PaPME2* is involved in sweet cherry fruit ripening and softening. 【Conclusion】 In conclusion, this study highlighted an important role for *PaPME2* that would most likely be a key gene regulating fruit softening during sweet cherry fruit ripening and softening. These findings would provide novel insights into understanding the molecular mechanisms underlying fruit softening determination during fruit ripening and softening in fruit trees and might have potential value for improving the postharvest quality and shelf life of fruits in sweet cherry.

Key words: Sweet cherry; *PaPME2*; VIGS; Fruit ripening and softening; Functional analysis

欧洲甜樱桃(*Prunus avium* L.)属蔷薇科李属植物,是我国北方春季上市最早的鲜果,具有很高的经济价值。甜樱桃果实具有极高的营养价值和保健功效,含有丰富的有机酸、维生素、氨基酸和褪黑素等,深受广大消费者的喜爱^[1-2]。然而甜樱桃果实成熟后迅速软化,导致甜樱桃采后极易软化腐烂、品质下降,在运输和贮藏过程中造成大量损失,限制了甜樱桃产业的发展^[3-4]。因此,研究甜樱桃果实成熟软化的生理和分子机制,增强甜樱桃的耐储运性,延长果实的货架期,一直是研究探讨的热点问题之一。

甜樱桃果实软化主要是由细胞壁结构的变化和细胞壁组分发生降解导致的,细胞壁的主要成分为

果胶和纤维素^[5]。参与细胞壁物质降解的主要是一些水解酶,如果胶甲酯酶(pectin methylesterase, PME)、多聚半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)、纤维素酶(cellulase, Cx)和β-半乳糖苷酶(β-Galactosidase)等^[3-4,6]。果胶甲酯酶基因(PMEs)是广泛存在于植物体内的一类较大的基因家族,分为Type I 和 Type II。PME主要催化果胶酯酸转变成果胶酸,为PG提供水解底物,与PG酶协同作用使果实软化^[7]。研究发现,在香蕉、木瓜、杧果、草莓、番茄、葡萄和桃等园艺作物的果实成熟软化过程中,PME活性显著上升,表明PME在果实成熟软化中发挥重要作用^[8-14]。尽管已经明确PME影响果实成熟软化,但

是由果胶甲酯酶是一个多基因家族,不同的果胶甲酯同工酶在果实成熟软化中发挥的作用不同,哪一个或几个果胶甲酯酶基因调控果实成熟软化仍未报道,因此有必要对果胶甲酯酶基因家族功能进行系统的研究,明晰其在果实成熟软化中的作用。因此,笔者利用生物信息学方法对甜樱桃基因组中 PME 基因家族成员进行鉴定,获得12个 $PaPME$ 家族成员。通过实时荧光定量PCR技术分析发现有2个 $PaPME$ 基因[$PaPME1(Pav_sc0001102.1_g920)$ 和 $PaPME2(Pav_sc0000129.1_g1650)$]在甜樱桃果实成熟软化过程中表达量较高,然后利用甜樱桃果实的VIGS技术分别沉默甜樱桃果实中 $PaPME1$ 和 $PaPME2$ 基因,分析其的表达情况对甜樱桃果实成熟软化的影响,为明确甜樱桃果胶甲酯酶基因的功能及在果实成熟软化过程中的作用提供理论基础,同时为培育硬肉、耐贮运的甜樱桃新品种提供基因资源。

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料:欧洲甜樱桃栽培品种‘早红珠’来自中国农业科学院郑州果树研究所樱桃种质资源圃,砧木为‘ZY-1’,树龄7 a(年),树体生长正常。

菌株和TRV病毒载体:VIGS载体烟草脆裂病毒载体(tobacco rattle virus, TRV)pTRV1与pTRV2由清华大学刘玉乐教授惠赠,根癌农杆菌菌种GV3101由实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 VIGS 重组载体的构建及转化农杆菌 pTRV2- $PaPME1$ 和 pTRV2- $PaPME2$ 载体的构建采用 In-Fusion Cloning 技术。分别设计带有16个重叠区域(与经 $EcoR$ I 和 Kpn I 线性化的 pTRV2 片段互为反向互补的接头)的 $PaPME1$ 和 $PaPME2$ 基因特异性引物对 $PaPME1$ -F/R 和 $PaPME2$ -F/R(表1),以甜樱桃cDNA为模板扩增出 $PaPME1$ 和 $PaPME2$ 的片段,利用 In-Fusion™ HD Cloning kit(Clontech, Mount-ain View, CA, United States)分别将扩增得到的 $PaPME1$ 和 $PaPME2$ 基因片段连接到经 $EcoR$ I 和 Kpn I 双酶切线性化的 pTRV2 载体上,构建成 pTRV2- $PaPME1$ 和 pTRV2- $PaPME2$ 重组载体,并转入大肠杆菌 DH5 α 感受态中,挑取阳性菌株,经 PCR 鉴定,双酶切鉴定和测序正确后,分别将 pTRV2-

表1 本研究所用的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	序列 Sequences (5'→3')
PaPME1-F	AGTAAGGTTACCGAATTGAAAGGGGTG-GTCGAGGAT
PaPME1-R	GAGCTCGGTACCGGATCCTGCTGTTCTT-GATGGCGGTC
PaPME2-F	AGTAAGGTTACCGAATTCTGCCGGAC-CACCCCTCTACC
PaPME2-R	GAGCTCGGTACCGGATCCTCACCCA-CAGTTGCTTGCCT
Histone2-F	GGTGTGCTTCCGCAGATAA
Histone2-R	TCCTCCTTGGGTGGTGAAT
PaPME1-J-F	GCACACAACCTTGGCAACTTC
PaPME1-J-R	CACACCATCAAATCCATCCGT
PaPME2-J-F	GTGTTGAGCCTTCCTTGCTA
PaPME2-J-R	TTGCTGGTGACCTGAGCCACA
PaPME1-q-F	GAAAGGGGTGGTCGAGGAT
PaPME1-q-R	TGCTGTTCTTGATGGCGGTC
PaPME2-q-F	TGCCGGACCACCCCTTACCA
PaPME2-q-R	TTCACCCACAGTTGCTTGCCT

$PaPME1$ 和 pTRV2- $PaPME2$ 载体转入农杆菌菌种 GV3101 中备用。

1.2.2 利用 VIGS 技术瞬时转化甜樱桃果实 甜樱桃果实的 VIGS 技术参照齐希梁等^[15]的方法操作。选取花后 25 d 的甜樱桃果实,采用注射压迫法将含有 pTRV2 或 pTRV2- $PaPME1$ 或 pTRV2- $PaPME2$ 与 pTRV1 的混合菌液从果实果柄处注射,看到果实组织中果实表面颜色改变,表示注射液扩散到果实组织,注射后的甜樱桃果实发育阶段的温度和湿度要相对低,温度不宜超过 25 ℃,湿度控制在 30%~70%,同时对注射过的果实进行套袋处理,3 d 后去除果袋。每次选择 1 株健壮的植株,每种混合菌液注射 60 个果实以上,并进行 3 次生物学重复。

1.2.3 半定量 RT-PCR 检测和实时荧光定量 PCR (qPCR) 分析 提取甜樱桃果实样品的总 RNA,并反转录成 cDNA,以甜樱桃的 Histone2 ($Pav_sc0000671.1$) 基因为内参,对不同样品的 cDNA 含量进行调节,然后利用 $PaPME1$ 和 $PaPME2$ 的基因特异性引物对 $PaPME1$ -J-F/R 和 $PaPME2$ -J-F/R(表1)检测沉默后 $PaPME1$ 和 $PaPME2$ 的基因的表达水平。

qPCR 反应在 ABI7500 PCR 热循环仪(Applied Biosystems, Foster City, CA, United States)上进行,使用 TransStart Top Green qPCR SuperMix(北京全

式金生物技术有限公司,北京,中国)试剂盒进行反应,以甜樱桃的*Histone2*(*Pav_sc0000671.1*)基因为内参进行分析。设置3次生物学重复,取平均值。

1.2.4 果实硬度、可溶性固形物含量测定 果实硬度利用GY-4型硬度计测定,单位为kg·cm⁻²。每次随机选取6个果实(不削果皮),在每个果实不同部位选2个点测定,P/2柱状探头(直径1 mm),测前速度为0.5 mm·s⁻¹,测定速度为1 mm·s⁻¹,测后速度为1 mm·s⁻¹,穿刺深度为10 mm,3次重复,取平均值。采用手持式糖度仪(PAL-1,爱拓,日本)测定可溶性固形物含量(%),3次重复,取平均值。

1.2.5 可溶性果胶、纤维素和半纤维素含量测定 称取0.5 g果肉样本,在5 mL 80%乙醇煮沸20 min,冷却至室温,6 000 g室温离心15 min,弃上清液,然后用2 mL 90%二甲亚砜(去除淀粉)浸泡15 h,6 000 g室温离心15 min,弃上清,随后用2 mL 80%乙醇洗2遍,2 mL 80%丙酮洗2遍,6 000 g室温离心15 min,弃上清液,将沉淀物置于烘箱干燥,随后将干燥的细胞壁物质按以下步骤依次提取不同成分:用1 mL 50 mmol·L⁻¹乙酸钠(pH=6.5)提取得到水溶性果胶(Water soluble pectin, WSP);用1 mL 50 mmol·L⁻¹CDTA和乙酸钠(pH=6.5)提取离心得到螯合型果胶(CDTA-soluble pectin, CSP);用1 mL 50 mmol·L⁻¹Na₂CO₃(含2 mmol·L⁻¹CDTA)提取得到共价结合果胶(Na₂CO₃-soluble pectin, NSP)。剩下的沉淀用2 mL 4 mol·L⁻¹KOH(含100 mmol·L⁻¹NaBH₄)提取离心得到半纤维素;剩余残渣用去离子水冲洗,得到纤维素。可溶性果胶含量参考曹建康等^[16]的方法,采用咔唑硫酸比色法测定,于530 nm处测定吸光度;纤维素和半纤维素含量参考王学奎^[17]的方法,采用蒽酮比色法测定,于620 nm处测定吸光度。每次随机选取6个果实进行测定,3次重复,取平均值。

1.2.6 果胶甲酯酶(Pectin methylesterase, PME)活性测定 PME酶的提取参照曹建康等^[16]的方法进行。采用DNS比色法测定果胶甲酯酶(Pectin methylesterase, PME)活性。每次随机选取6个果实进行测定,3次重复,取平均值。

1.2.7 数据处理 使用Microsoft Excel 2010软件对所获数据处理并绘图;使用SPSS 17.0软件进行相关性分析和差异显著性($p < 0.05$)分析。

2 结果与分析

2.1 *PaPME1* 和 *PaPME2* 基因在果实成熟软化中的表达模式

*PaPME1*基因在果实发育初期(第一次膨大期)基因表达量较低,随着果实的发育,*PaPME1*基因的表达呈上调趋势,一直持续到果实成熟软化;而且*PaPME1*基因的表达量在花后28 d和花后56 d出现2个峰值,在果实成熟发育过程中,*PaPME1*基因的表达量呈先上调后下调的趋势(图1-A)。*PaPME2*基因在果实发育初期(第一次膨大期和硬核期)和中期(第二次膨大期)的表达量一直较低,从花后42 d开始,*PaPME2*的表达量持续显著上调,是果实发育初期表达量的几十倍,在软化末期达到最大值(图1-B)。

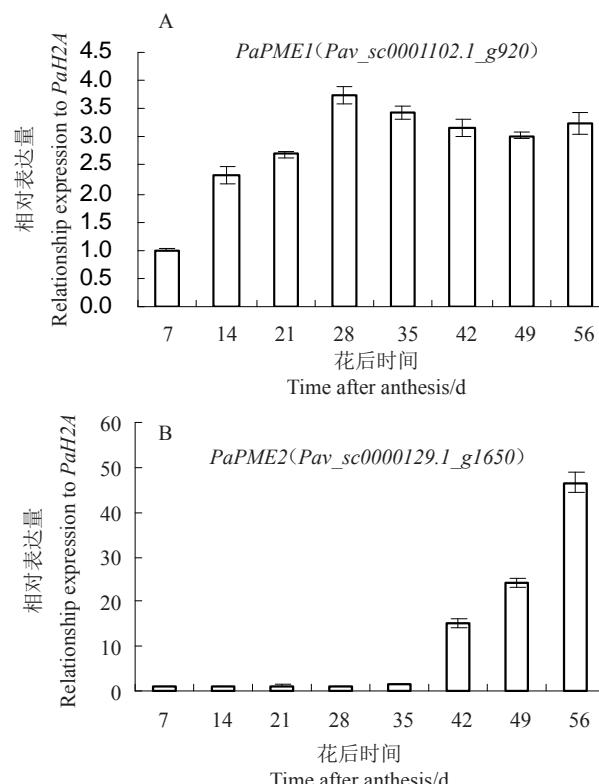


图1 *PaPME1* 和 *PaPME2* 基因在果实发育中表达模式

Fig. 1 Expression profile of *PaPME1* and *PaPME2* during fruit growth and development of sweet cherry

2.2 VIGS 沉默甜樱桃果实 *PaPME1* 和 *PaPME2* 基因的表型性状和 RT-PCR 检测

2.2.1 *PaPME1* 和 *PaPME2* 基因表达水平的分子检测 采用半定量RT-PCR方法检测甜樱桃果实*PaPME1*和*PaPME2*基因的沉默效率。分别提取侵染后10 d甜樱桃果实的总RNA,以甜樱桃*Histone2*

为内参基因进行RT-PCR分析。结果显示,*PaPME1*和*PaPME2*在被侵染的甜樱桃果实中的mRNA的表达量显著降低(图2)。通过Quantity One软件定性分析发现,*PaPME1*基因被沉默的甜樱桃果实中

*PaPME1*的表达量与空载对照相比,下降了68%;*PaPME2*基因被沉默的甜樱桃果实中*PaPME2*的表达量下降了77%(图2)。上述结果表明,甜樱桃果实中*PaPME1*和*PaPME2*基因被有效地沉默。

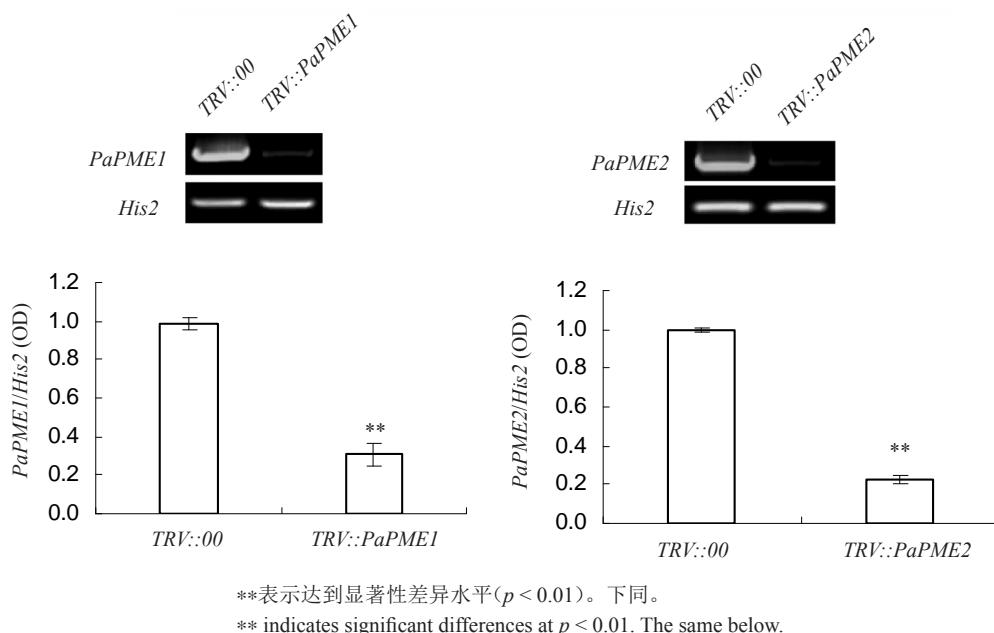


图2 甜樱桃果实*PaPME1*(左)和*PaPME2*(右)基因的相对表达量分析

Fig. 2 Quantify of *PaPME1* (left) and *PaPME2* (right) genes in sweet cherry fruit using semi-quantitative RT-PCR

2.2.2 *PaPME1*和*PaPME2*被沉默的甜樱桃果实表型观察 如图3所示,甜樱桃果实被携带 $TRV:::$

*PaPME1*和 $TRV:::PaPME2$ 载体的农杆菌GV3101侵染21 d后,与阴性对照 $TRV:::00$ 相比,*PaPME2*基因



图3 *PaPME1*和*PaPME2*基因沉默后欧洲甜樱桃果实的表型

Fig. 3 Phenotype observation of $TRV:::00$ -, $TRV:::PaPME1$ -, and $TRV:::PaPME2$ -silenced sweet cherry fruit

被有效沉默的甜樱桃果实果皮颜色和成熟度的表型变化程度显著低于空载对照果实,且软化程度显著低于空载对照果实;然而 *PaPME1* 基因被有效沉默的甜樱桃果实果皮颜色、成熟度和软化程度与空载对照相比,表型变化不显著(图3)。上述结果表明, *PaPME2* 基因在甜樱桃果实成熟软化中起重要的作用,而 *PaPME1* 基因与果实的成熟软化的关系可能不紧密。

2.3 *PaPME1* 和 *PaPME2* 沉默对甜樱桃果实软化的影响

2.3.1 对果实硬度和可溶性固形物含量的影响

果实硬度是果实质地的重要表现,果实硬度和可溶性

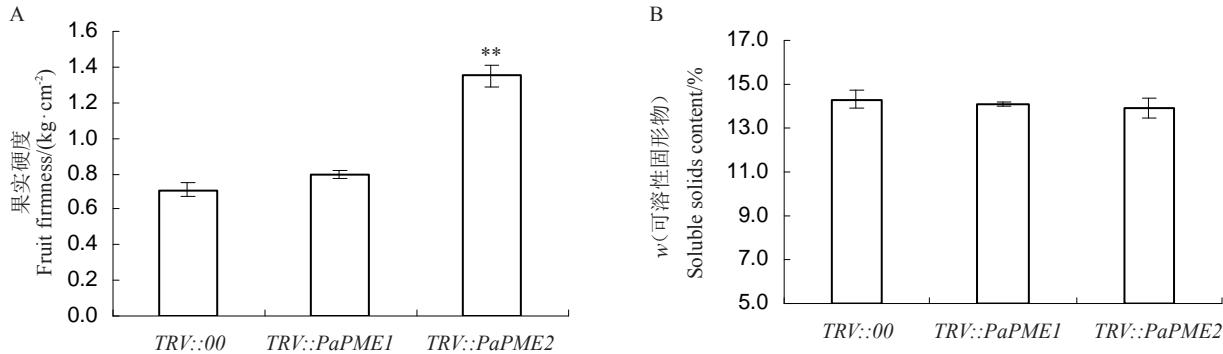


图 4 *PaPMEs* 基因沉默的甜樱桃果实的果实硬度 (A) 和可溶性固形物含量 (B) 的变化

Fig. 4 The change of fruit firmness (A) and soluble solids content (B) in *TRV::PaPMEs*-silenced sweet cherry fruits

软化过程中,细胞壁中果胶由不溶的原果胶状态降解变为水溶性果胶(WSP)。WSP含量的升高和螯合性果胶(CSP)、碱溶性果胶(NSP)含量的降低可直接引起果实质地变化^[18]。为进一步分析 *PaPME1* 和 *PaPME2* 基因对果实成熟软化的影响,对 *PaPME1* 和 *PaPME2* 沉默的甜樱桃果实中 WSP、CSP 和 NSP 含量进行测量分析(图5)。侵染 21 d 后,与空载对照相比, *PaPME2* 基因沉默的甜樱桃果实中 WSP 含量显著低于空载对照组,CSP 和 NSP 含量显著高于空载对照组;而 *PaPME1* 基因沉默的甜樱桃果实中 WSP、CSP 和 NSP 含量与空载对照相比差异不显著(图5-A~C)。以上结果表明,甜樱桃果实中 *PaPME2* 基因的表达量与果实中的可溶性果胶质含量密切相关,进一步影响果实的质地。

2.3.3 对果胶甲酯酶(PME)活性的影响

PME 可以催化果胶酯酸转化为果胶酸,为 PG 的作用提供更多的底物。为了确定 *PaPME1* 和 *PaPME2* 基因表达量的变化是否影响 PME 活性,对 *PaPME1* 和 *PaPME2* 沉默的甜樱桃果实中 PME 活性进行分

析。结果显示,侵染 21 d 后, *PaPME2* 基因沉默的甜樱桃果实中 PME 活性显著低于空载对照组,而 *PaPME1* 基因沉默的甜樱桃果实中 PME 活性与空载对照基本一致(图 5-D),表明 *PaPME2* 基因的表达影响 PME 活性,笔者断定在果实成熟软化过程中, *PaPME2* 基因通过控制 PME 活性而影响甜樱桃果实软化。

2.3.4 对纤维素和半纤维素含量的影响

在果实成熟软化过程中,纤维素的水解也是导致果实质地变化的关键因素之一。因此,纤维素和半纤维素的含量也是反映果实成熟软化的重要评价指标。为了确定 *PaPME2* 基因在果实成熟软化过程中是否关联果实在细胞壁中纤维素和半纤维素含量的变化,对 *PaPME1* 和 *PaPME2* 沉默的甜樱桃果实中纤维素和半纤维素含量进行测定。结果显示, *PaPME1* 和 *PaPME2* 沉默的甜樱桃果实中纤维素和半纤维素含量与空载对照相比基本一致(图 6),表明甜樱桃果实 *PaPME2* 基因的表达与果实中纤维素和半纤维素含量的变化不相关,进一步证实 *PaPME2* 基因是通过

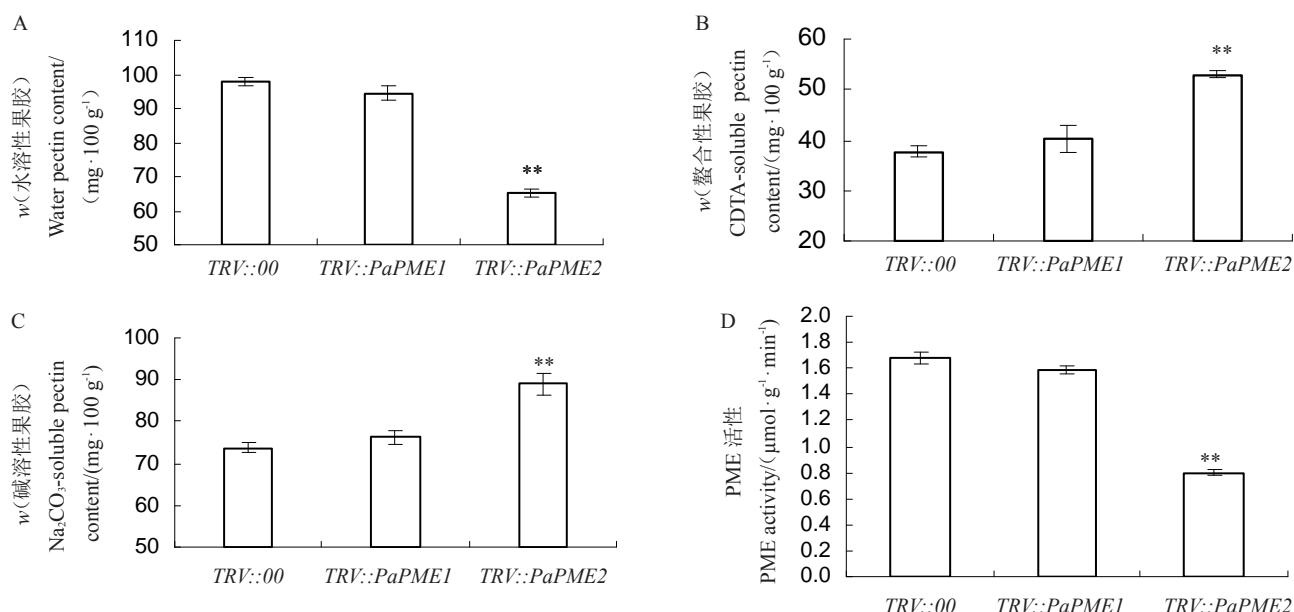


图5 *PaPMEs*基因沉默的甜樱桃果实的水溶性果胶(A)、螯合性果胶(B)、碱溶性果胶(C)的含量及PME酶活性(D)的变化

Fig. 5 The change of WSP content (A), CSP content (B), NSP content (C), and PME activity (D) in *TRV::PaPMEs*-silenced sweet cherry fruits

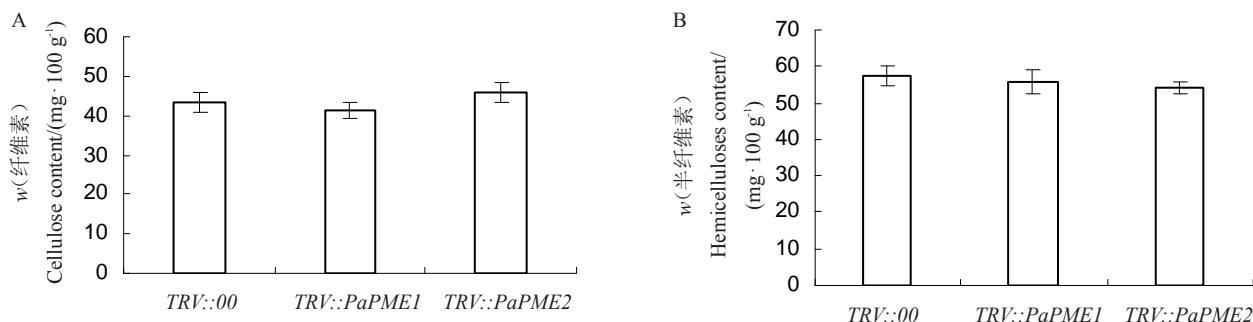


图6 *PaPMEs*基因沉默的甜樱桃果实的纤维素(A)和半纤维素(B)含量的变化

Fig. 6 The change of cellulose (A) and hemicelluloses (B) content in *TRV::PaPMEs*-silenced sweet cherry fruits

改变可溶性果胶含量影响甜樱桃果实软化的。

3 讨论

甜樱桃果实成熟软化是果实衰老的主要特征之一,伴随果实品质下降,如硬度降低、质地变软等,严重影响口感及其商品价值。研究表明,甜樱桃果实细胞壁成分的改变,尤其是果胶组分的变化及相关酶的相互作用是果实软化的直接原因^[19-21],然而至今没有果胶甲酯酶基因家族功能的研究报道。笔者通过对2个甜樱桃果实的果胶甲酯酶(PME)基因进行功能研究:发现*PaPME2*基因的表达模式与甜樱桃果实成熟软化的过程密切关联。进一步利用甜樱桃果实的VIGS技术沉默甜樱桃果实*PaPME2*基因,发

现*PaPME2*基因被沉默甜樱桃果实的果实硬度和可溶性果胶含量等果实成熟软化相关生理指标变化显著,进一步酶活检测分析发现,*PaPME2*基因被沉默的甜樱桃果实的PME活性降低,表明*PaPME2*基因通过调控PME活性影响甜樱桃果实软化,是果实成熟软化过程中的一个关键基因。

Harriman等^[11]研究发现,在番茄果实的整个发育过程中,PME基因的表达量一直较高,而且从果实绿熟期开始呈现上调表达,随着果实的成熟软化,呈现下调表达;在苹果中,随着果实的成熟,*MdPME*基因的表达也呈现先升高后降低的趋势^[22];‘琯溪蜜柚’中,在果实的发育初期,*CmPME1*转录本逐渐积累,基因的表达量先上调后下调^[23]。草莓中4个

*PMEs*基因仅有*FaPME1*在果实中表达,而且随着果实的成熟软化,其转录本逐渐积累,在转色期时达到峰值,同时研究确定草莓的*FaPME1*基因是草莓成熟软化过程中的关键基因^[24]。尽管在数种果树中已经发现PME基因是果实成熟软化的关键基因,但是上述研究仅通过基因的时空表达确定PME与果实的成熟软化紧密关联,未进一步利用分子生物学手段对发现关键基因进行功能研究,研究结果存在一定的局限性。例如笔者发现*PaPME1*基因的表达在果实成熟发育过程中呈现先上调后下调又上调的趋势,但对其进一步功能研究发现*PaPME1*基因不是甜樱桃果实成熟软化的关键基因。然而,*PaPME2*基因在甜樱桃的整个发育期一直持续低表达,而在果实发育后期显著上调表达,与甜樱桃果实成熟软化的发育时期基本一致。本研究利用VIGS技术确定了*PaPME2*在甜樱桃果实成熟软化中起着重要作用,表明果胶甲酯酶基因*PaPME2*是甜樱桃果实成熟软化过程中一个关键基因,且与桃中被认为是果实成熟软化的关键基因*PpPME*(Prupe.7G192800)的同源度极高,表明*PaPME2*基因在核果类果树中影响果实成熟软化功能的重要性。

4 结 论

明确了*PaPME2*基因在甜樱桃果实成熟软化中起着极其重要的作用,极可能是调控甜樱桃果实软化的关键基因,为进一步解析*PaPME*基因家族在果实成熟软化过程中的作用机制奠定了理论和实验基础。

参考文献 References:

- [1] LI B, XIE Z, ZHANG A, XU W, ZHANG C, LIU Q, LIU C, WANG S. Tree growth characteristics and flower bud differentiation of sweet cherry (*Prunus avium* L.) under different climate conditions in China[J]. Horticultural Science, 2010, 37(1): 6-13.
- [2] PRINSI B, NEGRI A S, ESPEN L, PIAGNANI M C. Proteomic comparison of fruit ripening between ‘Hedelfinger’ sweet cherry (*Prunus avium* L.) and its somaclonal variant ‘HS’ [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 2016, 64(20): 4171-4181.
- [3] 宣继萍,王刚,贾展慧,郭忠仁.李属植物果实成熟软化研究进展[J].中国农学通报,2015,31(31): 104-118.
XUAN Jiping, WANG Gang, JIA Zhanhui, GUO Zhongren. Research advances of ripening and softening in *Prunus* fruit[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2015, 31(31): 104-118.
- [4] BRUMMELL D A, HARPSTER M H. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 2001, 47(1/2): 311-340.
- [5] 赵云峰,林瑜,林河通.细胞壁组分变化与果实成熟软化的关系研究进展[J].食品科技,2012(12): 29-33.
ZHAO Yunfeng, LIN Yu, LIN Hetong. Change of cell wall component in fruit ripening and softening[J]. Food Science and Technology, 2012(12): 29-33.
- [6] BRUMMELL D A, DAL CIN V, CRISOSTO C H, LABAVITCH J M. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(405): 2029-2039.
- [7] 程杰山,沈火林,孙秀波,杨学妍,张梅,连序海,李玫瑰.果实成熟软化过程中主要相关酶作用的研究进展[J].北方园艺,2008(1): 49-52.
CHENG Jieshan, SHENG Huolin, SUN Xiubo, YANG Xueyan, ZHANG Mei, LIAN Xuhai, LI Meigui. Research process in enzymes related to ripening and softening of fruit[J]. Northern Horticulture, 2008(1): 49-52.
- [8] 钟曼茜,从心黎,张史青,黄绵佳.外源壳聚糖涂膜处理番木瓜的常温保鲜效果[J].热带生物学报,2016,7(2): 220-223.
ZHONG Manxi, CONG Xinli, ZHANG Shiqing, HUANG Mianjia. Effect of exogenous chitosan on fresh-keeping of papaya fruits at ambient temperature[J]. Journal of Tropical Biology, 2016, 7(2): 220-223.
- [9] ALI Z M, CHIN L H, LAZAN H. A comparative study on wall degrading enzymes, pectin modifications and softening during ripening of selected tropical fruits[J]. Plant Science, 2004, 167 (2): 317-327.
- [10] MUENGKAEW R, WHANGCHAI K, CHAIPRASART P. Application of calcium - boron improve fruit quality, cell characteristics, and effective softening enzyme activity after harvest in mango fruit (*Mangifera indica* L.) [J]. Horticulture, Environment, and Biotechnology, 2018, 59(4): 537-546.
- [11] HARRIMAN R W, TIEMAN D M, HANDA A K. Molecular cloning of tomato pectin methylesterase gene and its expression in Rutgers, ripening inhibitor, nonripening, and never ripe tomato fruits[J]. Plant Physiology, 1991, 97(1): 80-87.
- [12] NUNAN K J, DAVIES C, ROBINSON S P, FINCHER G B. Expression patterns of cell wall-modifying enzymes during grape berry development[J]. Planta, 2001, 214(2): 257-264.
- [13] 周厚成.草莓果实成熟软化相关基因的研究[D].杨凌:西北农林科技大学,2014.
ZHOU Houcheng. Study on the related genes of ripening and softening of strawberry fruit [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2014.
- [14] MANGANARIS G A, VASILAKAKIS M, DIAMANTIDIS G, MIGNANI I. Diverse metabolism of cell wall components of melting and non-melting peach genotypes during ripening after harvest or cold storage[J]. Journal of the Science of Food and

- Agriculture, 2006, 86(2): 243-250.
- [15] 齐希梁,李明,刘聪利,宋露露. TRV 介导欧洲甜樱桃果实 VIGS 体系的建立[J]. 果树学报,2018,35(11): 1309-1315.
QI Xiliang, LI Ming, LIU Congli, SONG Lulu. Construction of TRV-mediated virus induced gene silencing (VIGS) system in sweet cherry fruit[J]. Journal of Fruit Science, 2018, 35(11): 1309-1315.
- [16] 曹建康,姜微波,赵玉梅. 果蔬采后生理生化实验指导[M]. 北京:中国轻工业出版社,2007.
CAO Jiankang, JIANG Weibo, ZHAO Yumei. Postharvest physiological and biochemical experimental guidance for fruits and vegetable[M]. Beijing: China Light Industry Press, 2007.
- [17] 王学奎. 植物生理生化实验原理和技术[M]. 北京:高等教育出版社,2006: 122-126.
WANG Xuekui. Principles and techniques of plant physiology and biochemistry experiment[M]. Beijing: Higher Education Press, 2006: 122-126.
- [18] DONG Y, ZHANG S, WANG Y. Compositional changes in cell-wall polyuronides and enzyme activities associated with melting/mealy textural property during ripening following long-term storage of 'Comice' and 'd'Anjou' pears[J]. Postharvest Biology and Technology, 2018, 135: 131-140.
- [19] BRUMMELL D S. Primary cell wall metabolism during fruit ripening[J]. New Zealand Journal of Forestry Science, 2006, 36(1): 99.
- [20] PELLOUX J, RUSTERUCCI C, MELLEROWICZ E J. New insights into pectin methylesterase structure and function[J]. Trends in plant science, 2007, 12(6): 267-277.
- [21] MATAS A J, GAPPER N E, CHUNG M Y, GIOVANNONI J J, ROSE J K. Biology and genetic engineering of fruit maturation for enhanced quality and shelf-life[J]. Current Opinion in Biotechnology, 2009, 20(2): 197-203.
- [22] 齐秀东,魏建梅,赵伶俐. 嘎拉苹果果实质地发育软化与细胞壁降解及其基因表达的关系[J]. 现代食品科技,2015,31(6): 91-96.
QI Xiudong, WEI Jianmei, ZHAO Lingli. Correlation of fruit texture development and softening with cell wall degradation and related gene expression in Gala apples[J]. Modern Food Science & Technology, 2015, 31(6): 91-96.
- [23] 刘志发,潘腾飞,潘东明. 瑞溪蜜柚 CmPME1 的克隆及其在果实发育过程中的表达分析[J]. 热带作物学报,2015,36(4): 687-691.
LIU Zhifa, PAN Tengfei, PAN Dongming. Cloning and expression analysis of CmPME1 during fruit development of *Citrus maxima* (Burm.) Merr. [J]. Chinese Journal of Tropical Crops, 2015, 36(4): 687-691.
- [24] CASTILLEJO C, DE LA FUENTE J I, IANNETTA P, BOTELLA M Á, VALPUESTA V. Pectin esterase gene family in strawberry fruit: study of FaPME1, a ripening-specific isoform[J]. Journal of Experimental Botany, 2004, 55(398): 909-918.

欢迎订阅2021年《北方园艺》

《北方园艺》是由黑龙江省农业科学院主管,黑龙江省园艺学会、黑龙江省农业科学院主办的园艺类综合性学术期刊。创刊以来,《北方园艺》始终与时代同频,策划新栏目,报道行业热点,不断推出具有创新价值、学术价值和实用价值的科研成果,在全国园艺类核心期刊中排名第三;在新时代背景下,《北方园艺》积极推动传统媒体与新兴媒体的融合发展,探索新型出版模式,设有专属投稿网站和微信公众号,学术传播力不断提升。现为中文核心期刊(1992-2017)、中国农业核心期刊、美国化学文摘社(CAS)收录期刊,2015、2016、2018年期刊数字影响力100强。

为增加文章的可读性和更好的体现研究成果,本刊增加了内文和封二新品种彩版宣传;作者也可将团队试验成果以音视频形式在本刊微信公众号传播,具体事宜联系编辑部。

栏目设置:研究论文、研究简报、设施园艺、园林花卉、资源环境生态、贮藏加工检测、中草药、食用菌、专题综述、产业论坛、农业信息技术、农业经济、农业经纬、实用技术、新品种(彩版封二)。

国际标准刊号:ISSN 1001-0009, **国内统一刊号:**CN 23-1247/S, **邮发代号:**14-150, **半月刊**,每月15、30日出版, **单价:**20.00元, **全年:**480.00元。

投稿网址:www.haasep.cn

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路368号《北方园艺》编辑部

邮编:150086

电话:0451-86694145

信箱:bfyybjb@vip.163.com

