

与质外体活性氧产生相关的酶基因在库尔勒香梨果实不同发育时期的表达特性

史智勇^{1,2}, 曹艺洁², 玉苏甫·阿不力提甫², 艾沙江·买买提^{1*}

(¹新疆农业科学院园艺作物研究所, 乌鲁木齐 830091; ²新疆农业大学林学与园艺学院, 乌鲁木齐 830052)

摘要:【目的】探讨库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yü)果实不同发育时期石细胞的形成与质外体活性氧产生之间可能存在的关系,为调控库尔勒香梨果实石细胞含量、改善果实品质提供科学依据。【方法】以15年生库尔勒香梨为试材,利用显微镜观察果肉中石细胞发育特征,通过实时荧光定量PCR分析与活性氧产生相关的酶基因的相对表达量,探讨质外体活性氧在库尔勒香梨果实石细胞分化过程中的作用。【结果】库尔勒香梨石细胞染色结果表明,在果实发育过程中石细胞相对含量呈先上升后下降趋势,在花后10~30 d呈上升趋势。该时期果实中石细胞处于初步分化和形成阶段,数量最多,相对分散,部分细胞没有或者不完全被染色,其中心部位染色面积慢慢加深;花后60 d石细胞相对含量(单位面积)随着薄壁细胞的膨大迅速下降;花后80~100 d石细胞相对含量趋于稳定。实时荧光定量PCR结果表明,与质外体活性氧产生相关的酶基因的表达趋势与石细胞的变化趋势大致相同,编码与质外体活性氧产生相关的呼吸暴发氧化酶同源物蛋白D(RBOHD)、超氧化物歧化酶(SOD)、具有草酸氧化酶活性的类萌发素蛋白(GLP)、脂氧合酶(LOX、LOX5)及多胺氧化酶(PAO1、PAO 5-like)等酶基因也是在果实发育早期高表达。随着果实的发育,这些酶基因的表达量逐渐下降,并在花后80~100 d其表达水平趋于较低水平且保持稳定。这些基因最高表达水平和最低表达水平之间的差异倍数在5~157倍之间。【结论】花后10~60 d是库尔勒香梨果实石细胞形成的关键时期,该时期同样是与质外体活性氧产生相关的酶基因高水平表达时期,说明石细胞分化和质外体活性氧积累之间存在协同关系。

关键词: 库尔勒香梨; 果实发育; 石细胞; 质外体活性氧; 基因表达

中图分类号: S661.2

文献标志码: A

文章编号: 1009-9980(2021)11-1829-10

Expression characteristics of apoplastic ROS-related-enzyme genes at different development stages of Kuerlexiangli pear

SHI Zhiyong^{1,2}, CAO Yijie², Yusuf·Ablitif², Aisajan·Mamat^{1*}

(¹Institute of Horticultural Crops, Xinjiang Academy of Agricultural Sciences, Urumqi 830091, Xinjiang, China; ²College of Forestry and Horticulture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830052, Xinjiang, China)

Abstract: 【Objective】Kuerlexiangli pear (*Pyrus sinkiangensis* Yü) is a cultivar selected from a hybrid pear species of Xinjiang Autonomous Region in China. Kuerlexiangli pear is distinctive for its aroma, rich juicy flesh and crispy texture. However, recently the formation of rough skin fruits has been one of the major factors that adversely affect fruit quality, and increasing stone cell content is the typical phenotype of rough skin fruits. Stones cells are dead ones derived from parenchyma cells and mainly composed of cellulose, hemicellulose and lignin. The formation of stone cells is closely related to reactive oxygen species (ROS) in plasma membrane, especially for apoplastic H₂O₂. Apoplastic H₂O₂ serving as an oxidant, plays important roles in oxidative coupling of lignin monomers, and cross-linking between cell wall polymers by diferulic linkages. In addition, H₂O₂ can also promote the process of programmed cell death (PCD). Since the polymerization of lignin is carried out on the cell wall, in this experiment,

收稿日期: 2021-02-19 接受日期: 2021-06-28

基金项目: 新疆维吾尔自治区自然科学基金(2019D01A63); 新疆维吾尔自治区园艺重点学科(2016-10758-3); 新疆农业大学特色林果果实发育与调控创新团队

作者简介: 史智勇, 男, 在读硕士研究生, 研究方向为果树生理及品质调控。Tel: 15738368553, E-mail: 272450912@qq.com

*通信作者 Author for correspondence. Tel: 13659959134, E-mail: 103326533@qq.com

we tried to explore the possible relationship between the formation of stone cells and the apoplastic ROS production in Kuerlexiangli pear by analyzing the expression patterns of genes encoding, respiratory burst oxidase homologue D (RBOHD), superoxide dismutase (SOD), lipoxygenase(LOX), germin-like protein (GLP) with oxalate oxidase activity and polyamine oxidase (PAO) that were related to apoplastic ROS production, so as to provide a scientific basis for regulating the content of stone cells in 'Korla Fragrant Pear' fruit and improving fruit quality.【Methods】15 years old Kuerlexiangli pear trees were used as the plant materials to study the possible roles of apoplastic ROS during the formation of stone cells. Stone cell staining and relative expression levels of apoplastic ROS generating genes were then performed on fruit samples that were collected at five different developmental stages (10, 30, 60, 80 and 100 days after flowering, DAF), representing the prime stage (10–30 DAF), late (60 DAF) and stationary stage (80–100 DAF) of stone cell differentiation, respectively. Stone cell staining and lignin content determination were also performed with the fruit pulp and pericarp of rough skin and normal fruits. 【Results】The number of stone cells increased first and reached the highest level at 30 DAF, and at this period stone cell content also reached the highest level (19.64%). The stone cell content decreased rapidly thereafter, with the growth of surrounding parenchyma cells and the trend starting to level off 80 DAF, and reached the lowest level of 3.7% 100 DAF with a 5.3-fold decrease. Meanwhile, the numbers and diameters of stone cells in the pulp and skin of rough skin fruits were significantly higher than those of normal fruits, and lignin contents in the pulp and skin of rough skin fruits were 1.12–2.7-fold higher than those of normal fruits. Meanwhile, qPCR results showed that expression trends of *Germin-like protein 5-1 (GLP5-1)* with *OXO* activity, *RBOHD*, *SOD [Cu-Zn] 2-like*, *LOX*, *LOX5*, *PAO1* and *PAO 5-like* genes were also highly expressed at the early stages of fruit development, the expression levels of these enzyme genes decreased gradually with the development of fruit, and tended to be low and stable at later stages of fruit development (80–100 DAF). However, there were some differences in the occurrence of peak expression value among these genes, *LOX* and *LOX5* peaked at 10 DAF, *GLP5-1* peaked at 60 DAF, and the rest peaked at 30 DAF, indicating that all of apoplastic ROS related genes showed peak expression during the prime stage of stone cell differentiation, the expression levels of these genes decreased rapidly at the stationary stage of stone cell differentiation, and expression levels of these genes ranged from 5 to 157 among the prime and stationary stages of stone cell differentiation. The result was consistent with the changes of stone cells in pear fruit, indicating that genes may participate in the differentiation of stone cells. 【Conclusion】The increased content of stone cells is one of the major factors that lead to the formation of rough skin in Kuerlexiangli pear. Apoplastic ROS, especially apoplastic H₂O₂, plays important roles in oxidative coupling of lignin monomers, cross-linking between cell wall polymers and the process of PCD. The time from 10 to 60 DAF was the key period for stone cells formation in Kuerlexiangli pear. Similarly, all of genes related to apoplastic ROS production were abundantly expressed at the early stage of fruit development, and expression levels gradually decreased along with fruit-development, indicating that apoplastic ROS accumulation basically overlapped with the period of stone cells formation. These results suggest that the apoplast may be the main source of ROS that participates in the process of stone cell differentiation.

Key words: Kuerlexiangli pear; Fruit development; Stone cells; Apoplastic ROS; Gene expression

库尔勒香梨(*Pyrus sinkiangensis* Yü),属蔷薇科梨属新疆梨系统,是新疆梨和西洋梨的自然杂交后代^[1],也是新疆的特色果树之一。库尔勒香梨因其皮薄汁多、香气浓郁、肉细渣少、耐久储存、品质优良等特点^[1]享誉国内外,已成为巴州地区农民脱贫致富、乡村振兴的重要产业,在我国优质梨生产中具有重要且特殊的地位。由于受社会经济发展和科技水平的限制,库尔勒香梨栽培问题较多,其中“粗皮病”是导致梨果整体品质下降的重要原因之一,主要表现为果实果皮变粗、果肉粗糙、汁水变少等,发病率通常在20%以上。石细胞的增多是粗皮病形成的主要原因^[2]。因此,有效解决库尔勒香梨的粗皮病相关问题,需要对石细胞分化的相关机制进行深入研究。

前人的研究表明,石细胞是进行细胞凋亡(programmed cell death, PCD)后的果肉细胞,其分化过程实质上是细胞壁二次增厚的过程^[3]。木质素是细胞壁次生结构和石细胞的主要成分^[4],木质素的积累是石细胞形成的典型特征^[5]。因此,PCD过程和木质素在次生壁的沉积是石细胞分化和形成过程中的关键点。PCD是植物抵抗不良环境的生理反应,植物通过PCD去除那些有损伤的或者具有不稳定基因组的细胞来适应生长环境,其中有很多诱导因素,如逆境胁迫因子、钙离子、活性氧以及植物激素等^[6]。艾沙江·买买提等^[7]通过研究果实发育过程中石细胞的形成规律和活性氧(reactive oxygen species, ROS)的积累特性,发现PCD和石细胞分化的时期与ROS的积累重叠,说明ROS与石细胞的形成有一定的关联性。此外,木质素单体在细胞质中合成后,通过质膜转运到细胞壁,并在O₂依赖性漆酶(LAC)和H₂O₂依赖性过氧化物酶(PRX)的作用下聚合成木质素^[8],ROS在这一过程中也起着关键作用。因此,ROS在石细胞的分化和形成过程中起到了重要的作用。

由于细胞结构和功能上的差异,细胞内产生ROS的细胞器和途径也不尽相同。原生质体的ROS主要产生于叶绿体、线粒体、过氧化酶体以及乙醛酸循环体等细胞器^[9]。光合组织中叶绿体是O₂的主要产生场所,非光合组织中线粒体是产生ROS的主要场所^[10]。乙醛酸循环体和过氧化酶体中,H₂O₂分别通过脂肪酸氧化和光呼吸过程产生^[11]。质外体ROS主要由草酸氧化酶(oxalate oxidase, OXO)、脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)、多胺氧化酶

(polyamine oxidase, PAO)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、呼吸爆发氧化酶同源物蛋白(respiratory burst oxidase homologue, RBOH)等产生^[12]。由于木质素的聚合在细胞壁上进行,且发挥作用的主要是质外体ROS,因此,笔者在本研究中将重点关注与质外体ROS产生相关的酶基因。笔者通过对果实发育不同时期的石细胞染色观察、石细胞和木质素的含量测定以及与质外体ROS产生相关的酶基因的相对表达分析,探究ROS的产生对果实石细胞的形成的影响。本研究结果对于调控库尔勒香梨果实石细胞含量、改善果实品质具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 材料

试验材料采自新疆库尔勒市阿瓦提乡哈拉亚尔奇村15年生香梨树,库尔勒香梨果实在花后10、30、60、80、100 d进行取样,总取5次,前期每次取大小均匀的40个果实,后期每次取大小均匀的15个果实,取果皮下方2 mm的果肉,液氮速冻后用IKA A11磨样机磨成粉末状混样,做好采样标签,存于-80 °C冰箱中备用。所有试验均设置3次重复。另外,每个阶段另取5~10个果实用于ROS和石细胞的组织染色剂石蜡切片的制作。

1.2 石细胞染色

间苯三酚-乙醇染色试验所用试剂与仪器包括:间苯三酚(108-73-6,天津大茂)、盐酸(7647-01-0,国药)、无水乙醇(64-17-5,天津大茂)和显微镜(CX41 OLYMPUS)。将一部分果实去核后切成0.1 cm³大小的方块,用甲醛-乙酸-乙醇固定液(formaldehyde-acetic acid-ethanol fixative, FAA,体积分数50%乙醇50 mL+冰醋酸5 mL+福尔马林5 mL)固定保存,用于石细胞的解剖学观察。具体参考艾沙江·买买提等^[7]的方法。

1.3 石细胞、木质素含量的测定

石细胞含量测定参考聂继云等^[13]的方法。取5 g果肉,于-20 °C冷冻24 h,在20 000 r·min⁻¹转速下匀浆3 min,匀浆加入水静置,倒出上层悬浮物,5次重复,所得石细胞烘干称质量,3次重复。

木质素含量的测定参照王斌等^[14]的方法。将待测样品烘干后研磨成粉末,过筛并取其干粉0.02 g。放入10 mL磨口玻璃试管中,加入体积分数25%溴

乙酰-冰乙酸 2 mL, 将试管口加玻璃塞密封, 70 °C 恒温水浴 30 min, 每 10 min 振荡 1 次试管。加入 3 mL 2 mol·L⁻¹ 的 NaOH 终止反应, 将混合液转移至容量瓶并用冰乙酸定容至 100 mL。溶液在 280 nm 下测定吸光度值, 3 次重复。

1.4 实时荧光定量 PCR

研究库尔勒香梨果实中 7 个与质外体 ROS 产生相关的酶基因在 5 个不同发育期的表达特征。以相关 unigene 序列为模板, 利用 NCBI 的在线设计工具 Primer-Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) 设计引物(表 1)。利用 RR037A (TaKaRa, USA) 将 1 μg 总 RNA 反转录成 cDNA。利用 STEP ONE PLUS™ Real-Time PCR 系统 (Applied Biosystems, USA) 进行荧光定量 PCR, 反应体系为 20 μL, 含正向和反向引物各 1 μL, cDNA 模板 1 μL 和 SYBR Green Real-Time PCR Master Mixes (Invitrogen, USA) 17 μL。反应程序为: 95 °C 15 min, 95 °C 10 s, 58 °C 20 s 和 72 °C 20 s, 40 个循环。每个样品 3 个重复。以梨 *Actin* 作为内参基因, 每个基因表达量以其为准进行校对, 用 2^{-ΔΔCT} 方法计算相对表达量^[15]。

1.5 数据分析

所有数据采用 Excel 2010 软件进行汇总和处

表 1 本研究使用的实时荧光定量 PCR 引物

Table 1 Primers used for qRT-PCR in this study

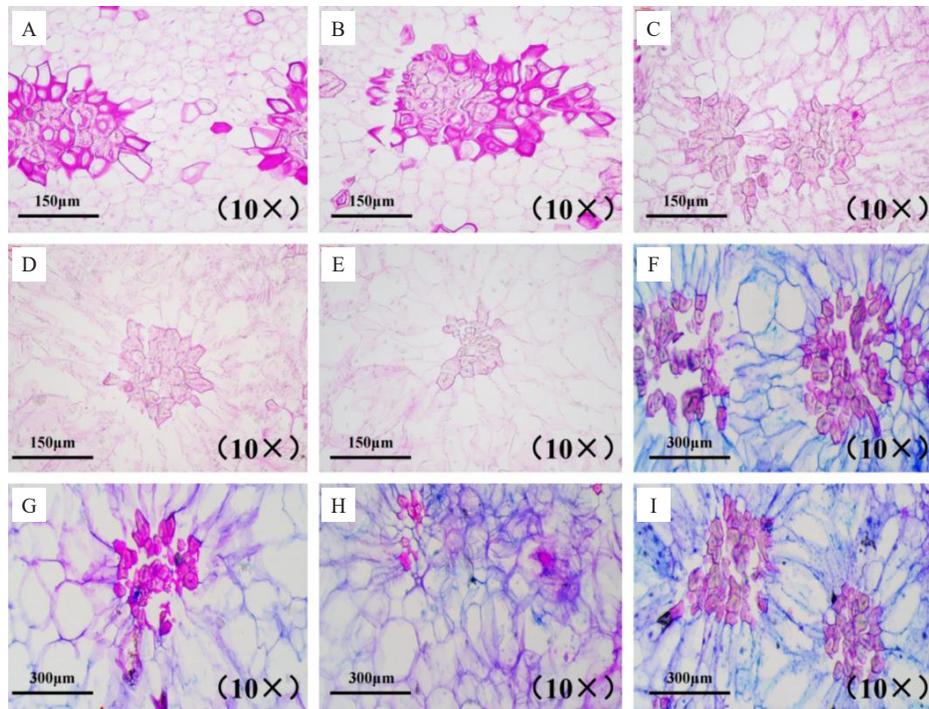
引物名称 Primer name	序列 (5'-3') Sequence (5'-3')
Germin-like protein 5-1-F	CACCGTCTTAGGCAGCTCT
Germin-like protein 5-1-R	TAAAGTCACCAAGGAGCCGAAT
RBOHD-like-F	CCACCTTCTCTGTCTACCAC
RBOHD-like-R	ATTGGTTATGAATGTGCGTCT
SOD [Cu-Zn] 2-like-F	GCATGTCATAGGCTTATCGG
SOD [Cu-Zn] 2-like-R	CTACAACCTGCTCGCCCAA
LOX-F	AATTGTTGTATTTCATGGGT
LOX-R	AATACAAACATAAATGCCACT
LOX5-F	TTCCTCAAAAACAATTACAGCTC
LOX5-R	TTTGCCCAAGATAAACCTCA
PAO1-F	CAGAAAACGCCCATAGAGC
PAO1-R	TGTGAAAACCTGACCTGGCATC
PAO 5-like-F	CATCCTCTCTAAAAGTCCCAA
PAO 5-like-R	CGTCTTCTCATCCACCA
Actin-F	CCCAGAAGTGCTCTTCCAAC
Actin-R	TTGATCTTCATGCTGCTTGG

理, 利用 GraphPad Prism 7.0 软件进行作图。

2 结果和分析

2.1 库尔勒香梨不同时期石细胞的形态变化及正常果与粗皮果的对比分析

如图 1 所示, 对花后 10、30、60、80、100 d 的库尔



A-E. 花后 10、30、60、80 和 100 d; F-I. 粗皮果果皮、果肉, 正常果果肉、果皮。

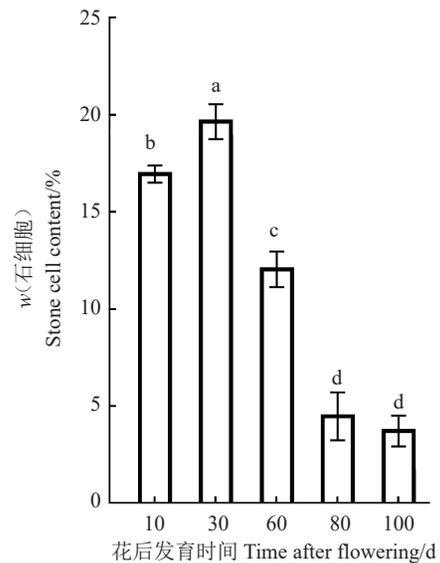
A-E represents 10, 30, 60, 80 and 100 days after flowering, respectively; F-I represents pericarp and flesh of coarse fruit, flesh and skin of normal fruit, respectively.

图 1 库尔勒香梨果实石细胞发育进程的显微观察

Fig. 1 Microscopic observation of the stone cell formation during fruit development in Kuerlexiangli pear

勒香梨果肉细胞进行染色,染色结果表明,花后10~30 d香梨果肉细胞体积相对较小,分布呈松散状态;将花后10 d(图1-A)和30 d(图1-B)染色的石细胞对比发现,石细胞中心部位染色面积慢慢加深,同时发生聚拢作用形成石细胞团,说明此时石细胞在初步分化和形成阶段;从梨果花后60 d(图1-C)开始,周围果实细胞的体积不断膨大,石细胞团与周围细胞相比体积显著减小。将果实发育前期与花后100 d(图1-E)对比发现,石细胞团体积与周围细胞相比体积还在不断缩小,同时石细胞的聚拢作用更加明显,石细胞开始以团状结构稳定存在。结合图2中库尔勒香梨果实5个发育阶段中的木质素含量,染色结果表明在花后30 d木质素含量最高,而30 d之后木质素含量逐渐下降,并在花后80~100 d趋于稳定。

通过将同一时期的库尔勒香梨粗皮果的果皮(图1-F)、果肉(图1-G)和正常果的果肉图(1-H)、果皮(图1-I)染色观察结果进行对比发现,无论在果皮或者果肉中,粗皮果的石细胞和石细胞团都明显大于正常果,且粗皮果中的木质素含量相对较高;通过将同一果实的果皮和果肉进行对比发现,无论是在粗皮果还是正常果中,其果皮的石细胞和石细胞团都明显大于果肉的石细胞和石细胞团,果皮的木质



不同小写字母表示在 $p < 0.05$ 差异显著。下同。

Different small letters indicate significant difference at $p < 0.05$.

The same below.

图2 库尔勒香梨果实不同发育时期的石细胞含量

Fig. 2 Stone cell content in different developmental stages of Kuerlexiangli pear

素含量相对较高(表2)。

2.2 Germin-like protein 5-1 基因表达情况分析

Germin-like protein 5-1 (GLP5-1) 基因是编码 OXO 的基因。OXO 主要通过分解草酸毒素为 H_2O_2

表2 粗皮果与正常果石细胞团、木质素含量的差异

Table 2 Difference of stone cell mass and lignin content between rough skin fruit and normal fruit

果实类型 Fruit type	果实部位 Fruit parts	单位视野里石细胞团个数 Number of stone cell clusters per unit field of view	石细胞团直径 Diameter of stone cell mass/mm	w(木质素) Lignin content/%
粗皮果 Rough fruit	果皮 Skin	12.00±2.83 ab	642.12±178.30 a	8.54±0.14 a
	果肉 Pulp	7.00±1.41 b	250.41±98.16 b	4.05±0.21 c
正常果 Normal fruit	果皮 Skin	25.00±5.66 a	211.12±29.40 b	7.64±0.30 b
	果肉 Pulp	10.50±2.12 b	169.23±39.72 b	1.40±0.20 d

和 CO_2 , 产生大量的 H_2O_2 , 进而影响果肉细胞的 PCD 过程和木质素的合成过程, 该基因表达情况如图3所示。 *GLP5-1* 基因在花后10~100 d 呈现相对表达量先上升后下降的趋势, 在花后30和60 d 其相对表达量较高且差异不显著, 并在花后30 d 其相对表达量达到高峰, 是花后10 d 相对表达量的1.5倍。 *GLP5-1* 基因在花后60 d 之后相对表达量骤降, 并在花后80~100 d 保持较低水平的平稳状态, 仅为花后10 d 相对表达量的1%左右。结合石细胞各个时期的染色情况及该基因的表达情况分析, 在果实发育早期阶段, 即花后30~60 d 这个时间段, 石细胞含量

最高, 该时期内主要进行细胞分裂, 而 *GLP5-1* 基因在果实花后10~60 d 这个生长阶段中大量表达; 在花后60 d 后, 石细胞含量降低且 *GLP5-1* 基因的表达水平也发生了骤降。石细胞在果实不同时期的含量变化趋势与 *GLP5-1* 基因不同时期的相对表达量趋势高度重合, 说明 *GLP5-1* 基因与石细胞的形成有密切的关系。

2.3 RBOHD-like 基因表达情况分析

RBOHD-like 基因是编码呼吸爆发氧化酶同源物蛋白D的基因, *RBOHD* 主要是将质外体 O_2 通过黄素腺嘌呤二核苷酸 (flavin adenine dinucleotide,

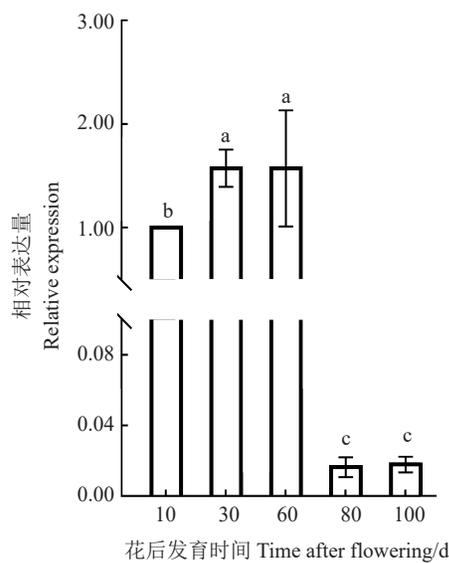


图3 库尔勒香梨不同发育时期中 *GLP5-1* 基因的相对表达量

Fig. 3 Relative expression of *GLP5-1* gene in different developmental stages of Kuerlexiangli pear

FAD)和2个独立的血红素基因还原为 $O_2^{[16]}$,主要产生的ROS是 O_2^- 和 H_2O_2 ,该基因的表达情况如图4所示。*RBOHD-like*基因在花后10~30 d相对表达量不断上升,并在花后30 d达到最高,为花后10 d相对表达量的2.4倍。在30 d之后其表达水平骤降,并在之后保持低水平平稳表达。花后60~80 d相对表达量仅为花后10 d相对表达量的20%左右。*RBOHD-like*基因在花后30 d表达水平最高,而在花后10~30 d这个时间段石细胞含量最高,在花后60 d该基因表

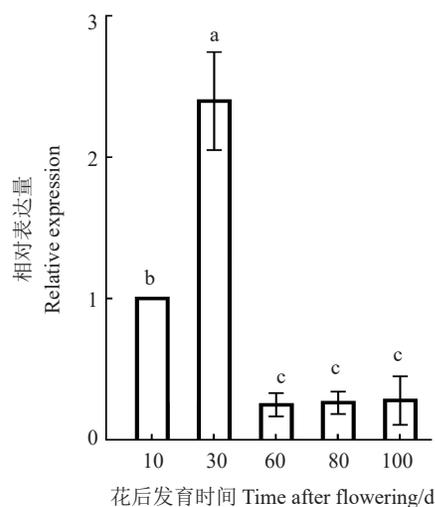


图4 库尔勒香梨不同发育时期中 *RBOHD-like* 基因的相对表达量

Fig. 4 Relative expression of *RBOHD-like* gene in different developmental stages of Kuerlexiangli pear

达水平降低,说明该基因并非在石细胞分化和形成的全过程中起作用,而在花后30 d对石细胞的分化和形成的作用最为明显。

2.4 *SOD[Cu-Zn]2-like* 基因表达情况分析

SOD [Cu-Zn] 2-like 基因是编码质外体中超氧化物歧化酶(*SOD[Cu-Zn]*)的基因,超氧化物歧化酶主要是将植物中过量的 O_2^- 歧化转化成 O_2 和 H_2O_2 。该基因的表达情况如图5所示。*SOD [Cu-Zn] 2-like* 基因在花后30 d达到最高相对表达量,为花后10 d相对表达量的1.2倍。随着果实发育时间的增长,该基因呈现出了先下降再微上升最后又下降的趋势。*SOD [Cu-Zn] 2-like* 基因在花后60 d达到最低相对表达量,仅为该基因花后10 d相对表达量的20%;之后其相对表达量又稍微升高,并逐渐保持着平稳的表达水平,为花后10 d相对表达量的40%左右。*SOD [Cu-Zn] 2-like* 基因在花后30 d的相对表达量最高,在花后60 d的相对表达量最低,与其他ROS产生相关的酶基因的相对表达量的变化趋势以及与石细胞含量的变化趋势有所不同。

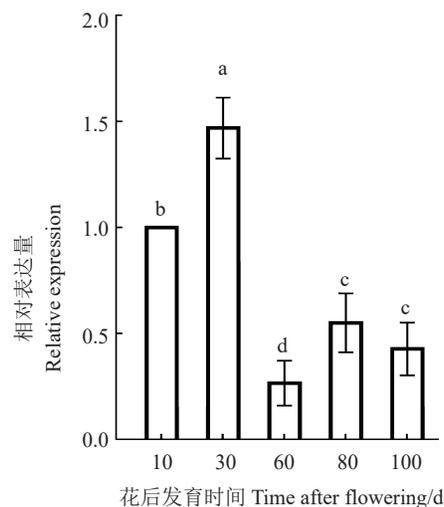


图5 库尔勒香梨不同发育时期中 *SOD[Cu-Zn]2-like* 基因的相对表达量

Fig. 5 Relative expression of *SOD [Cu-Zn] 2-like* gene in different developmental stages of Kuerlexiangli pear

2.5 *LOX*和*LOX5*基因表达情况分析

*LOX*和*LOX5*基因都是编码脂氧合酶的基因,脂氧合酶通过催化植物中的亚油酸、亚麻酸转变成氢过氧化物^[17],该基因的相对表达量如图6所示。*LOX*和*LOX5*基因都在花后10 d相对表达量最高,且都在花后60 d之后相对表达量骤降并保持平稳的

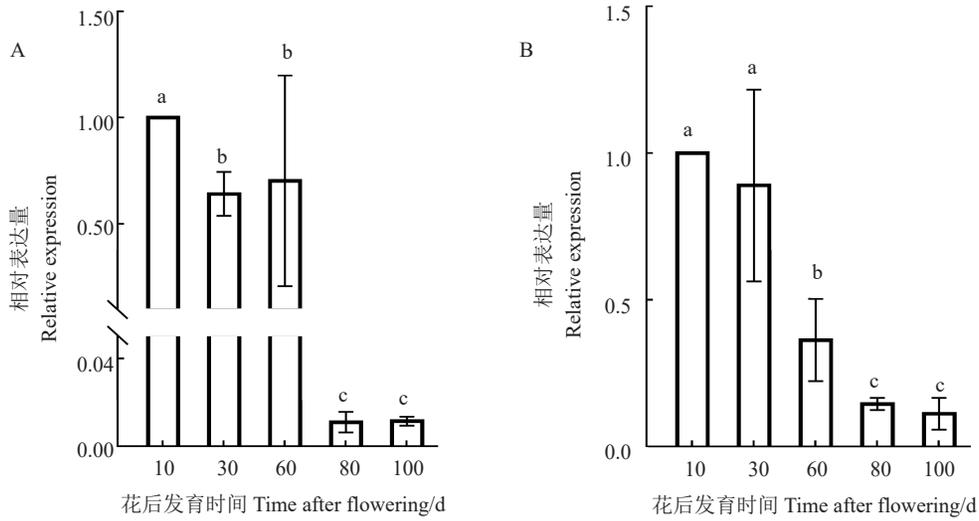


图 6 库尔勒香梨不同发育时期中 *LOX*(A)和 *LOX5*(B)基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression of *LOX* (A) and *LOX5* (B) gene in different developmental stages of Kuerlexiangli pear

状态,最小值分别为花后 10 d 相对表达量的 1%和 10%左右。不同的是,2 个基因在花后 60 d 的表达水平有较为明显的差异,说明 2 个基因的作用时间具有一定的差异性。*LOX*和 *LOX5* 基因的表达水平随着果实的发育一直在下降,与石细胞含量的变化趋势高度重叠,该结果说明 2 个基因的作用机制大致相同。

2.6 *PAOI*和 *PAO5-like* 基因表达情况分析

*PAOI*和 *PAO 5-like* 基因都是编码 PAO 的基因,PAO 催化多胺(Polyamine, PAs)氧化降解成 H_2O_2 ^[18],该基因表达情况如图 7 如示。2 种基因表达水平的总体趋势都是在花后 10~100 d 先升后降,峰值都出

现在花后 30 d,分别为花后 10 d 的 1.4 倍和 2.1 倍,且都在花后 80~100 d 相对表达量保持较低水平。尤其是 *PAOI* 基因,在果实发育后期几乎检测不到,其相对表达量仅为花后 10 d 相对表达量的百分之一,而 *PAO 5-like* 基因的最低相对表达量为花后 10 d 相对表达量的 30%。在花后 10~60 d 发育时期中,*PAOI* 基因表达水平的变化趋势相比 *PAO 5-like* 基因更为平缓,说明 *PAOI* 基因可能在石细胞的分化过程中发挥作用的时间更长。2 种编码 PAO 的基因 *PAOI*和 *PAO 5-like* 都在花后 30 d 有高水平的表达,且表达情况都是先升后降。结合石细胞含量的变化情况可知,三者变化趋势高度重叠,说明 *PAOI* 基因

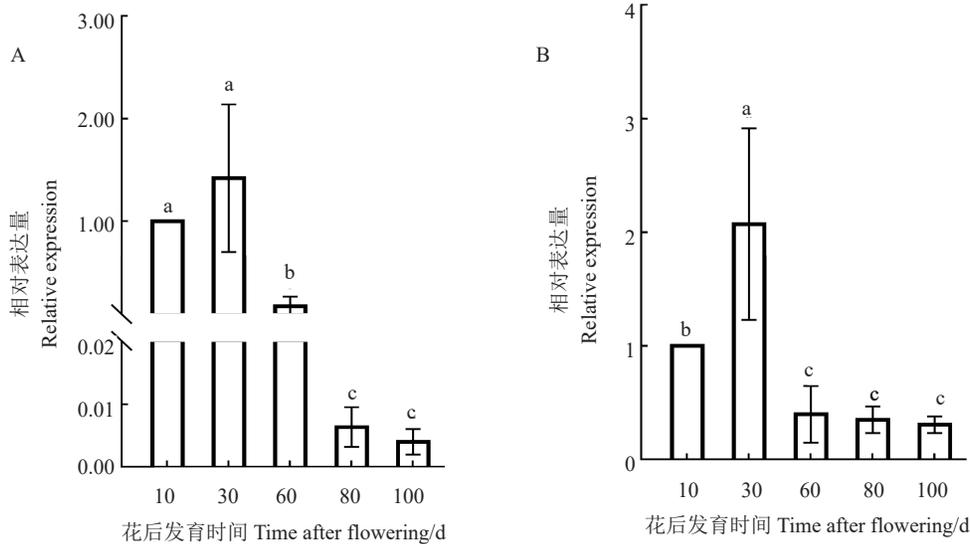


图 7 库尔勒香梨不同发育时期中 *PAOI*(A)和 *PAO5-like*(B)基因的相对表达量

Fig. 7 Relative expression of *PAOI* (A) and *PAO 5-like* (B) gene in different developmental stages of Kuerlexiangli pear

和 *PAO 5-like* 基因都与石细胞的分化和形成具有密切的联系。

3 讨论

梨石细胞含量的增多是影响梨果品质的重要原因,也是造成粗皮病的主要原因。了解石细胞分化过程的关键在于对薄壁细胞的PCD和木质素合成、积累相关过程的研究,而ROS在该过程中发挥着极其重要的作用。在前期的研究中,笔者课题组发现,库尔勒香梨果实中石细胞的分化、ROS的积累及果肉细胞发生凋亡的时期基本重叠^[7]。H₂O₂在木质素单体的合成^[19]、氧化偶联和细胞壁的聚合物交联中起着重要的作用^[20],同时作为信号分子渗透膜结构导致ROS二次暴发,并大量积累诱导植物细胞的死亡^[21]。笔者在本研究中发现,编码与质外体H₂O₂产生相关的酶关键基因(*GLP5-1*、*RBOH D-like*、*SOD [Cu-Zn] 2-like*、*LOX*、*LOX5*、*PAO1* 和 *PAO 5-like*)的表达量在果实不同发育时期的变化幅度较大,其中 *GLP5-1* 基因的表达差异倍数最大(157倍),*SOD [Cu-Zn] 2-like* 基因最小(5倍)。但其总体趋势为:在果实发育早期表达水平较高,在果实发育后期表达水平较低,与果实中石细胞的变化趋势相一致。该结果侧面说明质外体产生的H₂O₂参与梨石细胞的分化过程。

由于木质素的聚合在细胞壁上进行,发挥作用的主要是质外体ROS,因此重点探究与质外体ROS产生相关的酶基因在库尔勒香梨果实中的表达特性更有利于对该过程的深入了解。*GLP5-1* 基因编码1个具有草酸氧化酶活性的细胞壁糖蛋白,而草酸氧化酶则可以通过分解草酸为H₂O₂和CO₂降解草酸的毒性,且产生的H₂O₂作为过氧化物酶的底物参与木质素的聚合过程^[22]。另外,形成的H₂O₂可促进细胞壁物质之间的共价交联^[8-9]。*Germin* 的多糖部分是细胞壁半纤维素的直接前体,而半纤维素也是石细胞的主要成分,说明 *GLP5-1* 与半纤维前体物质的合成相关基因或蛋白之间可能存在某种互作或协调关系。油菜的钙依赖性蛋白激酶(*Brassica napus L. calciumdependent protein kinase, BnaCPK6L*)、质膜相关细胞质激酶(*botrytis-induced kinase1, BK1*)通过磷酸化 *RBOHD* 基因在PCD过程中发挥着重要的作用^[23],且 *RBOHD* 基因介导产生的H₂O₂诱导拟南芥的胼胝质沉积进而促进其细胞壁的加厚^[24],说明

RBOHD 基因与次生壁的加厚以及石细胞分化过程中的PCD有密切联系。*SOD*通过减小O₂对细胞的毒害作用以及提高H₂O₂的浓度,从而促进石细胞的分化^[25]。结合上述 *SOD [Cu-Zn] 2-like* 基因的表达情况,笔者推测O₂的浓度也同样会影响 *SOD* 基因的表达。*LOX*基因主要在木质部接触细胞中表达^[26],且被证明与根瘤壁的形成有关。*LOX*基因还被证明可以引起超过敏反应(hypersensitive response, HR)^[27],据此推测该基因可能与石细胞分化过程中的次生壁形成和PCD有关。*PAO*基因催化多胺氧化降解产生的H₂O₂也在胞壁木质化过程中起着重要作用,且 *PAO*基因还在菊花花芽分化期间影响着木质素的合成^[28]。

纤维细胞和石细胞同属厚壁组织,由薄壁细胞分化而来^[29]。纤维细胞分化过程中木质素的沉积和PCD同步进行,即细胞壁木质化所需的木质素由正在凋亡的细胞自己合成^[30]。因此,梨果实石细胞形成的实质是果肉细胞的程序性死亡过程。在果实正常发育过程中,石细胞形成主要是在果肉细胞分裂期,本研究中不同发育时期果肉石细胞的染色结果也验证了前人的研究结果^[31]。因此,早期石细胞形成的实质可能是薄壁细胞发育性细胞凋亡(developmental programmed cell death, dPCD)过程。果实发育早期石细胞主要在维管束组织周围形成,且可以观察到完整的维管束。而在果实发育晚期观察到不连续或观察不到维管组织,表明石细胞的形成更可能是维管束附近薄壁细胞分化的结果。据此,笔者推测,维管束附近的薄壁细胞可能一直处于半分化的状态。早期石细胞的形成可能与果实维管束组织的发育相关,维管束周围的薄壁细胞在细胞分裂阶段停止生长,分化形成原始维管系统的延伸部分。随着周围薄壁细胞的体积不断增大,早期形成的石细胞及维管束组织可能被挤断聚集在一起形成石细胞团。粗皮果一般在7月下旬至8月上旬才出现,而正常生长条件下该时期一般极少出现石细胞的分化现象。据此,笔者推测,果实发育后期不利的生长条件会引起细胞氧化还原稳态的紊乱和部分果肉细胞的凋亡。果实发育后期果实体积不断增大,因此果皮部分花托维管束周围的薄壁细胞不断分化形成果实外果皮,即表皮、具角质层和气孔。梨外果皮周围的薄壁细胞可能一直处于半分化的状态。如果果实发育后期梨树或部分果实遭受了不利环境因素的影

响,为了维持机体的正常生长,果实内因环境胁迫诱导产生的ROS可能会优先导致维管束周围薄壁细胞的分化,即石细胞的形成可能主要先从梨果果皮附近的果肉细胞开始进行分化,然后再依次进行分化,从而使得果皮附近的石细胞含量增多,最终导致粗皮病的发生。该假设仍需进一步研究。

4 结 论

库尔勒香梨果实发育过程中石细胞的分化和形成最主要的时期是花后10~60 d,之后石细胞含量不断减少并逐渐趋于稳定;石细胞的分化过程主要是受与质外体ROS产生相关的酶基因的调控,这些基因通过花后10~60 d高水平表达来提高与质外体ROS产生相关的酶的活性,从而提高质外体ROS的浓度,诱导果肉细胞的PCD过程和木质素的合成与积累,最终分化成为石细胞。

参考文献 References:

- [1] 李学文,张辉,韩江,藤康宁.不同成熟度香梨果实采后生理和品质的变化[J].新疆农业科学,2007,44(3):264-267.
LI Xuewen, ZHANG Hui, HAN Jiang, TENG Kangning. Changes in postharvest physiology and quality of fragrant pear fruit with different maturities at harvest[J]. Xinjiang Agricultural Science, 2007, 44(3):264-267.
- [2] 刘小阳,付金沐,高贵珍.梨石细胞与石果病[J].安徽农业科学,2008,36(2):632-633.
LIU Xiaoyang, FU Jinmu, GAO Guizhen. *Pyrus* stone cells and stone fruit disease[J]. Journal of Anhui Agricultural Science, 2008, 36(2):632-633.
- [3] ARIOLI T, PENG L, BETZNER A S, BURN J, WITTKER W, HERTH W, CAMILLERI C, HÖFTE H, PLAZINSKI J, BIRCH R, CORK A, GLOVER J, REDMOND J, WILLIAMSON R E. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis*[J]. Science, 1998, 279(5351):717-720.
- [4] 王红宝,朱洁,王丹阳,陶书田.梨果肉石细胞含量分析[J].江苏农业科学,2018,46(3):173-176.
WANG Hongbao, ZHU Jie, WANG Danyang, TAO Shutian. Analysis of the content of stone cells in pear fruit[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2018, 46(3):173-176.
- [5] YAN C, YIN M, ZHANG N, JIN Q, FANG Z, LIN Y, CAI Y. Stone cell distribution and lignin structure in various pear varieties[J]. Scientia Horticulturae, 2014, 174:142-150.
- [6] DANEVA A, GAO Z, DURME M V, NOWACK M K. Functions and regulation of programmed cell death in plant development[J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2016, 32(1):441-468.
- [7] 艾沙江·买买提,张校立,梅闯,马凯,闫鹏,韩立群,王继勋. ‘库尔勒香梨’果实发育过程中石细胞形成与细胞凋亡的关系研究[J].果树学报,2020,37(1):59-67.
Aisajiang·Mamat, ZHANG Xiaoli, MEI Chuang, MA Kai, YAN Peng, HAN Liqun, WANG Jixun. Study on the relationship between the stone cell formation and apoptosis during the fruit development of Kuerlexiangli pear[J]. Journal of Fruit Science, 2020, 37(1):59-67.
- [8] JAIME B, HENRIK S, IRENE G, EDOUARD P. The cell biology of lignification in higher plants[J]. Annals of Botany, 2015, 115(7):1053-1074.
- [9] SINGH R, SINGH S, PARIHAR P, MISHRA R K, TRIPATHI D K, SINGH V P, CHAUHAN D K, PRASAD S M. Reactive oxygen species(ROS): Beneficial companions of plants' developmental processes[J]. Frontiers in Plant Science, 2016, 7:1299.
- [10] HUANG S, VAN AKEN O, SCHWARZLÄNDER M, BELT K, MILLAR A H. The roles of mitochondrial reactive oxygen species in cellular signaling and stress response in plants[J]. Plant Physiology, 2016, 171(3):1551-1559.
- [11] GILROY S, BIAŁASEK M, SUZUKI N, GÓRECKA M, DEVI-REDDY A R, KARPIŃSKI S, MITTLER R. ROS, calcium, and electric signals: Key mediators of rapid systemic signaling in plants[J]. Plant Physiology, 2016, 171(3):1606-1615.
- [12] KÄRKÖNEN A, KUCHITSU K. Reactive oxygen species in cell wall metabolism and development in plants[J]. Phytochemistry, 2015, 112:22-32.
- [13] 聂继云,李静,杨振锋,张红军,李明强.冷冻法测定梨的石细胞含量[J].果树学报,2006,23(1):133-135.
NIE Jiyun, LI Jing, YANG Zhenfeng, ZHANG Hongjun, LI Mingqiang. Study on the conditions for measuring stone cell content in pear flesh by freezing method[J]. Journal of Fruit Science, 2006, 23(1):133-135.
- [14] 王斌,张楠,闫冲冲,金青,林毅,蔡永萍,张金云.套袋对砀山酥梨果实石细胞发育及木质素代谢的影响[J].园艺学报,2013,40(3):531-539.
WANG Bin, ZHANG Nan, YAN Chongchong, JIN Qing, LIN Yi, CAI Yongping, ZHANG Jinyun. Bagging for the development of stone cell and metabolism of lignin in *Pyrus bretschneideri* ‘Dangshan Suli’[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2013, 40(3):531-539.
- [15] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method[J]. Methods, 2001, 25(4):402-408.
- [16] BABIOR B M. NADPH oxidase[J]. Current Opinion in Immunology, 2003, 16(1):42-47.
- [17] 曹嵩晓,张冲,汤雨凡,齐红岩.植物脂氧合酶蛋白特性及其在果实成熟衰老和逆境胁迫中的作用[J].植物生理学报,2014,50(8):1096-1108.
CAO Songxiao, ZHANG Chong, TANG Yufan, QI Hongyan. Protein characteristics of plant lipoxygenase and function on fruit ripening and senescence and adversity stress[J]. Plant Physiology

- gy Journal, 2014, 50(8): 1096-1108.
- [18] 张灵,陶亚军,方琳,范方军,李文奇,王芳权,许扬. 植物多胺的代谢与生理研究进展[J]. 植物生理学报, 2020, 56(10): 2029-2039.
ZHANG Ling, TAO Yajun, FANG Lin, FAN Fangjun, LI Wenqi, WANG Fangquan, XU Yang. Research progress in metabolism and physiology of plant polyamines[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(10): 2029-2039.
- [19] BERNIER F, BERNA A. Germins and germin-like proteins: plant do-all proteins. But what do they do exactly?[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2001, 39(7): 545-554.
- [20] NOVO-UZAL E, FERNÁNDEZ-PÉREZ F, HERRERO J, GUTIÉRREZ J, GÓMEZ-ROS L V, BERNAL M A, DÍAZ J, CUELLO J, POMAR F, PEDREÑO M A. From *Zinnia* to *Arabidopsis*: Approaching the involvement of peroxidases in lignification[J]. Journal of Experimental Botany, 2013, 64(12): 3499-3518.
- [21] MATAMOROS M A, DALTON D A, RAMOS J, CLEMENTE M R, RUBIO M C, BECANA M. Biochemistry and molecular biology of antioxidants in the rhizobia-legume symbiosis[J]. Plant Physiology, 2003, 133(2): 499-509.
- [22] 程征. 转 *OxO* 拟南芥抗黄萎病机制的初步研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2017.
CHENG Zheng. A preliminary study on the mechanism of resistance to *Verticillium wilt* in transgenic *OxO Arabidopsis thaliana* [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2017.
- [23] PAN G, ZHANG H, CHEN B, GAO S, YANG B, JIANG Y. Rapeseed calcium-dependent protein kinase CPK6L modulates reactive oxygen species and cell death through interacting and phosphorylating RBOHD[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2019, 518(4): 719-725.
- [24] LUNA E, PASTOR V, ROBERT J, FLORS V, MAUCH-MANI B, TON J. Callose deposition: A multifaceted plant defense response[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2011, 24(2): 183-193.
- [25] 魏婧,徐畅,李可欣,贺洪军,徐启江. 超氧化物歧化酶的研究进展与植物抗逆性[J]. 植物生理学报, 2020, 56(12): 2571-2584.
WEI Jing, XU Chang, LI Kexin, HE Hongjun, XU Qijiang. Research progress of superoxide dismutase and plant stress resistance[J]. Plant Physiology Journal, 2020, 56(12): 2571-2584.
- [26] 董春燕,梁卫红,程辉,于东明,吕东,孙炎锋,苗琛. 植物脂氧合酶在逆境胁迫应答中功能研究进展[J]. 中国农学通报, 2020, 36(33): 102-107.
DONG Chunyan, LIANG Weihong, CHENG Hui, YU Dongming, LÜ Dong, SUN Yanfeng, MIAO Chen. Plant lipoxygenases: advance of the function in stress response[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2020, 36(33): 102-107.
- [27] BUROW G B, GARDNER H W, KELLER N P. A peanut seed lipoxygenase responsive to *Aspergillus* colonization[J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(5): 689-701.
- [28] LAURENZI M, REA G, FEDERICO R, TAVLADORAKI P, ANGELINI R. De-etiolation causes a phytochrome-mediated increase of polyamine oxidase expression in outer tissues of the maize mesocotyl: A role in the photomodulation of growth and cell wall differentiation[J]. Planta, 1999, 208(2): 146-154.
- [29] 朱晓博,张贵粉,陈鹏. 植物次生细胞壁加厚过程的转录调控[J]. 植物生理学报, 2017, 53(9): 1598-1608.
ZHU Xiaobo, ZHANG Guifen, CHEN Peng. Transcriptional regulation of secondary cell wall thickening in plants[J]. Plant Physiology Journal, 2017, 53(9): 1598-1608.
- [30] CHEN X, MEI Q, LIANG W, SUN J, WANG X, ZHOU J, WANG J, ZHOU Y, ZHENG B, YANG Y, CHEN J. Gene mapping, genome-wide transcriptome analysis, and WGCNA reveals the molecular mechanism for triggering programmed cell death in rice mutant *pir1*[J]. Plants, 2020, 9(11): 1607.
- [31] MAMAT A, TUSONG K, XU J, WANG J. Identification of candidate genes and proteins related to the production of ROS in Korla pear fruit[J]. Plant, 2021, 9(1): 1-9.