

# 纽荷尔脐橙贮藏枯水相关 ESTs 分离与初步分析

许兰珍, 刘小丰, 何永睿, 姚利晓, 彭爱红, 雷天刚, 陈善春\*

(中国农业科学院/西南大学柑桔研究所, 国家柑桔品种改良中心, 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712)

**摘 要:** 为分析柑橘果实贮藏过程中枯水相关特异基因的表达情况, 以纽荷尔脐橙 (*Citrus Sinensis* Osbeck) 采摘后贮藏至略见枯水果实的果肉为测验方 (Tester), 以刚采摘果实的果肉为驱动方 (Driver), 采用抑制性差减杂交 (Suppression Subtractive Hybridization, SSH) 技术成功构建了贮藏果实差减 cDNA 文库, 共获得 656 个阳性克隆。随机挑取克隆进行菌液 PCR 分析, 插入片段长度主要集中在 100 ~ 1 000 bp。成功对 213 个克隆进行测序, 获得有效序列 143 条, 经序列分析, 共得到 53 条 uniESTs 序列。在 NCBI 基因库中对这 53 个 uniESTs 进行 BLAST 分析, 比对结果参照 MIPS 的分类标准, 按功能分为 14 类, 其中参与代谢、能量及蛋白合成的 ESTs 最多, 分别占到了全部 ESTs 的 17%、11% 和 13%。

**关键词:** 柑橘; 果实; 枯水; 抑制性差减杂交; EST

**中图分类号:** S 666

**文献标识码:** A

**文章编号:** 0513-353X (2011) 06-1153-08

## Isolation of Granulation-related ESTs in Newhall Navel Orange Fruit Storage and Primary Analyses of the Sequences

XU Lan-zhen, LIU Xiao-feng, HE Yong-rui, YAO Li-xiao, PENG Ai-hong, LEI Tian-gang, and CHEN Shan-chun\*

(*Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences/Southwest University, National Citrus Improvement Center, National Citrus Engineering Research Center, Chongqing 400712, China*)

**Abstract:** In order to analyze the differentially expressed genes in the post-harvested citrus fruit, a subtracted cDNA library was constructed by suppression subtractive hybridization (SSH) between the fruit pulp of post-storage (experimental group, the Tester) and that of pre-storage (control group, the Driver). The library included about 656 clones which were 100 - 1 000 bp in size, among which 213 clones were selected randomly and sequenced. Totally 143 useful ESTs were acquired, and 53 uniESTs were finally obtained. Sequence similarity searches via BLASTx and BLASTn on NCBI showed that the ESTs were sorted into 14 functional categories according to the Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS). The ESTs involved in metabolism, energy, protein synthesis accounted for 17%, 11% and 13% of the total ESTs, respectively.

**Key words:** citrus; fruit; granulation; suppression subtractive hybridization; EST

柑橘属于非呼吸跃变型果实 (谭兴杰 等, 1985), 贮藏期间发生的生理性病害以枯水、褐斑为

收稿日期: 2010 - 09 - 25; 修回日期: 2011 - 05 - 20

基金项目: 长江学者和创新团队发展计划项目 (PCSIRT); 国家高科技研究发展计划项目 (2011AA100205); 柑桔产业技术体系 (CARS-27) 农业部公益性行业 (农业) 科研专项 (2010 03067-02-4); 重庆市科委重点实验室专项经费项目 (CSTC)

\* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: scchen2004@vip.sina.com)

主。枯水主要表现为果皮与果肉相分离,囊瓣变厚变硬,汁胞粒化,营养物质大量减少,果汁减少,甜香味丧失,品质劣变以致直接影响食用价值和商品性(李斌和刘绍德,1988;蒋跃明等,1991)。目前国内外对柑橘贮藏期枯水病的研究主要集中在 ABA、GA<sub>3</sub>、IAA 等激素和 SOD、POD、PE、PG 等酶的变化以及各种防治措施方面,对枯水的原因和机理尚无统一认识(Lowell et al., 1967; 蒋跃明等, 1991; Seymour & Gross, 1996; 陈昆松等, 1997)。近年来多数研究者认为,枯水与衰老的调节因素直接相关,是衰老的最终表现或主要表现形式,衰老关键酶作用、激素平衡失调、营养物质异常代谢等直接促使枯水。利用分子生物学手段从基因水平上研究枯水机理,更具有理论和实践意义。

本研究中以纽荷尔脐橙贮藏后轻微枯水果实和采摘的鲜果为材料,进行抑制性差减杂交(Suppression Subtractive Hybridization, SSH),构建贮藏后果实消减 cDNA 文库,发掘了一批柑橘果实贮藏特异表达基因和 EST,为克隆柑橘贮藏衰老有关基因及基因功能分析奠定基础,对深入揭示果实枯水的分子机制具有重要意义。

## 1 材料与方法

### 1.1 果实材料与贮藏处理

在中国农业科学院柑桔研究所脐橙果园中选择果实大小和着色等性状较为一致的‘纽荷尔’脐橙(*Citrus sinensis* Osbeck)单株果实。当果实达八成熟(2/3 果面正常着色)时,选择连续 3 个晴天后的上午,在果面无水时采摘供试样品果。于 2006 年 12 月 4 日采果,一部分(21 个果实,取果肉)于液氮中速冻后置 -80 °C 超低温冰箱保存,作为贮藏前材料备用;另一部分(123 个果实)采收后立即用 0.05% 抑霉唑浸果 1 min,通风贮藏库中晾干,3 d 后用专用无色透明聚氯乙烯薄膜袋单果包装,常温通风贮藏库中贮藏。4 个月后贮藏的果实开始变软,果蒂部位出现轻微枯水症状,选取这些果实的果肉于液氮中速冻后置 -80 °C 超低温冰箱保存,作为贮藏后材料备用。

### 1.2 总 RNA 的提取与 mRNA 的纯化

果肉总 RNA 提取参考 Tao 等(2004)的方法,并作适当调整,即将 -80 °C 超低温保存的果肉取出立即置于液氮中磨碎,用无水酒精脱水后加入 RNA 提取缓冲液,经 4~6 次苯酚氯仿抽提和 2 次 LiCl 沉淀。分别提取贮藏前后果肉总 RNA,用 Oligotex mRNA Mini Kit(QIAGEN, cat. No.70022)从总 RNA 中分离纯化 mRNA。

### 1.3 抑制差减杂交、文库的构建及阳性克隆鉴定

以贮藏前果肉 mRNA 作为 Driver,以贮藏后果肉 mRNA 作为 Tester,按照 PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtractive Kit(Clontech, USA)的操作方法进行抑制消减杂交。分别反转录得到双链 cDNA,在 37 °C 下用 *Rsa* I 酶切;酶切后的 Tester 的 cDNA 分成两份,分别与接头 1 和 2R 连接,酶切后的 Driver 的 cDNA 不与接头连接;在 68 °C 下把过量酶切后的 Driver 的 cDNA 分别与接有不同接头的酶切后的 Tester 的 cDNA 杂交 8 h 后,将两者互相混合在 68 °C 下杂交 20 h;利用抑制性 PCR 差异表达序列,用巢式引物进行第 2 轮 PCR 扩增,以进一步富集差异片段。

用 PCR 产物回收试剂盒(TaKaRa DNA Fragment Purification Kit Ver2.0 cat. No. DN807A)对抑制差减杂交后的产物进行回收。将回收产物与载体 pMD18-T 连接过夜,连接产物采用电转化法转入 *E. coli* DH5 $\alpha$  中,于 LB 培养基培养后,涂布在含 X-gal 和 IPTG 的 LB/Amp 琼脂培养基平板上,37 °C 培养过夜,挑取清晰饱满的白色克隆,接种于装有 80  $\mu$ L LB 液体培养基(含有 100  $\mu$ g  $\cdot$  mL<sup>-1</sup>

Amp、20%甘油)的 384 孔培养板中, 37 °C 静置培养 36 h 后, 从培养板各孔中取出 20  $\mu\text{L}$  菌液分装于对应编号的 PCR 管中, 4 °C 保存备用; 384 孔培养板 (保存有菌液约 60  $\mu\text{L}$ ) 用 Parafilm 封好, 于 -80 °C 长期保存。采用菌落 PCR 法对文库进行阳性克隆筛选, 所用引物为试剂盒提供 Nested PCR Primer 1 和 Nested PCR Primer 2R, 进行菌落 PCR, 检测插入片段的大小。

#### 1.4 阳性克隆序列测定及序列同源性比较分析

随机挑选部分经菌液 PCR 验证的含阳性克隆的菌株, 送北京三博远志生物技术有限责任公司测序, 对所测序列整理, 除去载体与接头部分的序列, 用序列分析软件 Sequencher 4.6 筛选去重复或互补的序列, 得到单一的、无重复的 EST 序列。将这些 ESTs 序列用 BLASTn 和 BLASTx 分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), 进行功能注释, 并参照 MIPS (Munich Information Center for Protein Sequences, <http://mips.gsf.de>) 的分类标准进行功能分类。

## 2 结果与分析

### 2.1 总 RNA 与 mRNA 质量检测

总 RNA 经核酸蛋白检测仪检测, Tester 样品总 RNA 的  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值为 1.98, Driver 样品为 1.98, 且浓度都超过  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$ 。2.0%琼脂糖凝胶电泳结果 (图 1) 可以看出, 每份样品 28S rRNA 和 18S rRNA 条带清晰, 条带亮度之比接近为 2:1, 并且无拖尾现象, 说明 RNA 的完整性很好; 加样孔未见任何杂质, 说明所得总 RNA 没有多糖等其它物质污染, 总 RNA 的纯度高能够满足下一步试验的要求。

总 RNA 用 Oligotex mRNA Mini Kit 分离纯化 mRNA 后, 经真空干燥器浓缩, 核酸蛋白检测仪测定, 所有样品浓度在  $1 \mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$  以上,  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  比值在 2.0 左右; mRNA 经 1.2%的琼脂糖凝胶电泳呈均匀弥散条带 (图 2), 由此可以看出 mRNA 质量良好, 符合 SSH 建库要求。

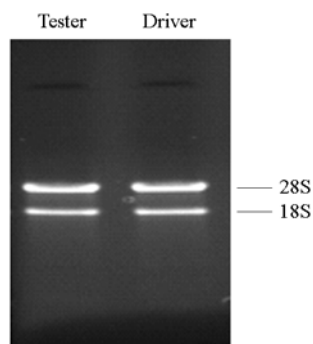


图 1 总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis analysis of the total RNA

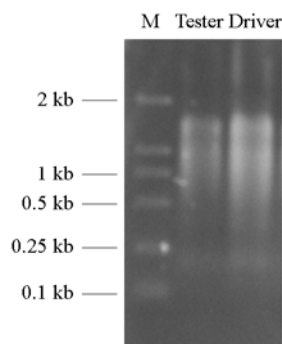


图 2 mRNA 电泳图

Fig. 2 Electrophoresis analysis of mRNA

### 2.2 SSH 文库的构建

按照 Clontech PCR-Select<sup>TM</sup> cDNA Subtractive Kit 操作程序进行 mRNA 反转录和 cDNA 双链合成, 经 *Rsa* I 酶切、接头连接、差减杂交和两轮抑制性 PCR 扩增。PCR 产物经分离纯化后克隆于 pMD18-T 载体中, 采用电转化方法转化到宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ 。转化后的宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  经平

板培养, 共获得菌斑 676 个, 其中白斑 656 个。挑取白斑单菌落培养构建了库容量为 656 个克隆的差减 cDNA 文库。随机挑选阳性克隆用 SSH 试剂盒提供的 Nest PCR primer 1 和 Nest PCR primer 2R 进行扩增, 所有的单克隆中插入片段长度分布在 100 ~ 1 000 bp 之间, 主要集中在 150 ~ 750 bp 以内, 极个别片段大于 1 000 bp (图 3)。

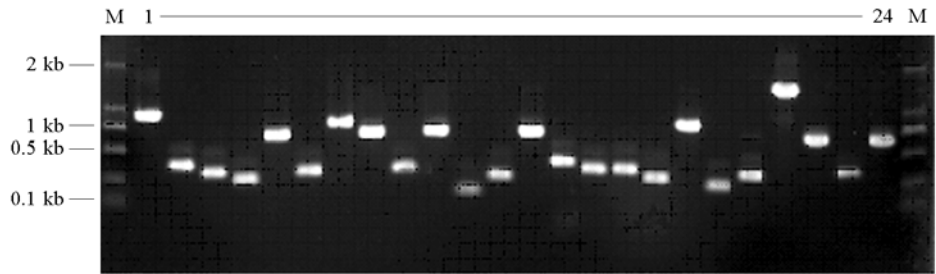


图 3 菌落 PCR 鉴定文库白色阳性克隆

M: DL 2000 marker; 1 ~ 24: 白色克隆。

Fig. 3 Identification of the positive clones of the subtracted cDNA library by PCR

M: DL 2000 marker; 1 - 24: White positive clones.

2.3 EST 序列 BLAST 分析和功能归类

随机挑选 213 个经 PCR 验证的阳性克隆进行单向测序, 得到 143 条有效 ESTs。利用 Sequencher 4.6 软件对 ESTs 进行整理分析, 去除重复的和互补的序列, 共得到 53 条 uniESTs, 其中最大长度 EST 为 732 bp, 最短的为 111 bp, 与 PCR 检测结果相一致。在 NCBI 基因库中对这 53 个 uniESTs 进行 BLAST 分析, 比对结果用 MIPS 的分类标准, 按功能分为 14 类 (表 1), 其中参与代谢、能量及蛋白合成的 ESTs 最多, 分别占到了全部 ESTs 的 17%、11%和 13%。

表 1 EST 功能分析结果

Table 1 Functional analysis of citrus EST unigenes

克隆编号 Clone No.	来源 Source	功能描述 Function description	功能归类 Function class	比例/% Percent
I B11	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	酰胺基磷酸核糖转移酶 Amidophosphoribosyltransferase	代谢 Metabolism	17
I C8	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	蔗糖磷酸合成酶 Sucrose-phosphate synthase 1		
I C12	葡萄柚 <i>Citrus × paradisi</i>	假定萜类合酶 Putative terpene synthase		
I E13	紫苏 <i>Perilla frutescens</i> var. <i>frutescens</i>	倍半萜合酶 Putative sesquiterpene synthase		
I F3	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	朱栾倍半萜合酶 Valencene synthase		
II C7	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	黄酮醇合成酶 Flavonol synthase/flavanone 3-hydroxylase (FLS)		
II F4	葡萄柚 <i>Citrus × paradisi</i>	乙醇脱氢酶 Alcohol dehydrogenase		
II F17	酸橙 <i>Citrus aurantium</i>	脂肪酸氢过氧化物裂合酶 Fatty acid hydroperoxide lyase		
II J1	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	(E) - β - 罗勒烯合酶 (E)-beta-ocimene synthase		

续表 1

克隆编号 Clone No.	来源 Source	功能描述 Function description	功能归类 Function class	比例/% Percent
I C14	玉米 <i>Zea mays</i>	烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶亚单位 1 NADH dehydrogenase subunit 1	能量 Energy	11
I C16	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	乙酰 CoA 连接酶 AMP binding / acetate-CoA ligase/ catalytic		
I G22	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	ATP 合酶 CF1 $\epsilon$ 亚基 ATP synthase CF1 epsilon subunit		
I J22	柠檬 <i>Citrus limon</i>	辅酶 - 异柠檬酸脱氢酶 NADP-isocitrate dehydrogenase		
II E11	水韭 <i>Isoetes lacustris</i>	细胞色素氧化酶 Cytochrome oxidase		
II H7	不知火杂柑 <i>Citrus</i> cv. Shiranuhi	假定谷氧还蛋白 Putative glutaredoxin-like protein		
I B20	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	LIM 域结合蛋白 LIM domain-containing protein	转录 Transcription	9
I D5	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	MADS-box 结构域转录调控因子 MADS-box protein		
I F11	大翼橙 <i>Citrus macrophylla</i>	MYB60 类似蛋白 MYB60-like protein		
I I13	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	RNA 聚合酶 $\beta$ 亚单位 RNA polymerase beta subunit		
II J9	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	DNA/RNA 解旋酶盒 DEAD/DEAH box helicase		
I A15	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	D - 柠檬烯合成酶 D-limonene synthase	蛋白合成 Protein synthesis	13
I A23	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	核糖体蛋白 S2 Ribosomal protein S2		
I B19	椪柑 <i>Citrus reticulata</i>	$\alpha$ 葡聚糖水解激酶 Alpha-glucan water dikinase		
I C15	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	小核糖核蛋白相关蛋白 B Small nuclear ribonucleoprotein associated protein B		
I D17	温州蜜柑 <i>Citrus unshiu</i>	番茄红素 $\epsilon$ 环化酶 Lycopene epsilon-cyclase		
I E23	香橙 <i>Citrus junos</i>	线粒体柠檬酸合成酶前体 Mitochondrial citrate synthase precursor		
I F14	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	辣椒玉红素合成酶 Capsorubin synthase		
I A7	黄鹰苜蓿 <i>Triphysaria versicolor</i>	$\alpha$ - 1,3 - 岩藻糖基转移酶类似蛋白 Alpha - 1,3 - fucosyltransferase-like protein	蛋白质生命周期 Protein fate	9
I D15	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	$\alpha$ 链新生多肽相关复合物 Alpha chain of nascent polypeptide associated complex		
I E4	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	泛素羧基端水解酶 Ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase-related		
II A22	克里曼丁桔 <i>Citrus clementina</i>	9 - 顺式 - 环氧类胡萝卜素双加氧酶 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 5		
II B5	人 <i>Homo sapiens</i>	泛素特异性肽酶 24 Ubiquitin specific peptidase 24		
I C18	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	双链 DNA 结合/蛋白结合 Double-stranded DNA binding / protein binding	蛋白结合功能或辅因子 Protein with binding function or cofactor requirement	2
II I18	柠檬 <i>Citrus limon</i>	顺乌头酸酶铁离子调节蛋白 Aconitase-iron regulated protein 1	调节代谢及蛋白功能 Regular of metabolism and protein function	2
I D13	大翼橙 <i>Citrus macrophylla</i>	硼元素转运蛋白 Boron transporter	细胞运输 Cellular transport	6
I J3	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	钙离子 - ATP 酶 Ca <sup>2+</sup> -ATPase		
I M22	葡萄柚 <i>Citrus <math>\times</math> paradisi</i>	钠离子/H <sup>+</sup> 交换蛋白 Sodium/proton exchanger		

续表 1

克隆编号 Clone No.	来源 Source	功能描述 Function description	功能归类 Function class	比例/% Percent
I B23	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	bHLH 蛋白相关转录调控因子 Basic helix-loop-helix (bHLH) protein-related	信号传导 Signal transduction	8
I D10	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	丝裂原激活的蛋白激酶的激酶 6 MAP kinase kinase 6		
I D12	水稻 <i>Oryza sativa</i>	推测环指蛋白 Putative ring finger protein		
II D18	人 <i>Homo sapiens</i>	锌指同源物 3, mRNA Homo sapiens zinc finger homeobox 3, mRNA		
I A3	大豆 <i>soybean</i>	胁迫诱导蛋白 Stress-inducible protein	细胞救援防御 Cell rescue and defense	2
I D6	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	推测乙烯受体 Putative ethylene receptor	环境互动 Interaction with the environment	2
I B16	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	果胶脂酶 Pectinesterase	细胞结构 Cell structure	6
I P18	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	膨胀素 Expansin		
II A19	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	富含脯氨酸蛋白 Proline-rich protein		
I F7	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	肌动蛋白 Actin	细胞组分生成 Biogenesis of cellular components	4
II E19	水稻 <i>Oryza sativa</i>	推测肌球蛋白重链 Putative myosin heavy chain		
I D3	华盛顿脐橙 Washington Navel Orange	未知 Unknown	未知 Unknown	9
I D4	油菜 <i>Brassica napus</i>	未知 Unknown		
I E21	莲花 Lotus	未知 Unknown		
I H5	甜橙 <i>Citrus sinensis</i>	未知 Unknown		
I I23	乌龙茶 <i>Camellia sinensis</i>	未知 Unknown		

### 3 讨论

采摘后柑橘果实通过呼吸提供各种生理活动所需的能量,本试验中发现的如乙酸-CoA 连接酶 (acetate-CoA ligase)、线粒体柠檬酸合成酶前体 (mitochondrial citrate synthase precursor)、顺乌头酸酶铁离子调节蛋白 (aconitase-iron regulated protein) 等都直接参与细胞的呼吸作用 (Takahashi et al., 2006; Arnaud et al., 2007); 而三磷酸腺苷合成酶 (ATP synthase)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸脱氢酶 (NADH dehydrogenase) 等则保障和推动了细胞生长代谢,大分子的合成,能量提供等各种生化活动 (Mccarty, 1992; Petrussa et al., 2009); 呼吸作用引起果实内营养物质的消耗,果实细胞易受到各种生理及侵染性病害的胁迫,参与细胞内的应激防御系统和信号传导系统得到了特异的调节,如胁迫诱导蛋白 (Stress-inducible protein)、bHLH 蛋白相关转录调控因子 [basic helix-loop-helix (bHLH) protein-related] 和丝裂原激活的蛋白激酶的激酶 6 [mitogen-activated protein (MAP) kinase kinase 6] 等基因的特异表达 (Parra et al., 1996; Heim et al., 2003; Kumar et al., 2008); 呼吸作用最终引起果实细胞的衰老,如果胶脂酶 (pectinesterase)、泛素羧基端水解酶 (ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase)、乙烯受体 (ethylene receptor)、泛素特异性肽酶 (ubiquitin specific peptidase) 等与细胞的衰老及蛋白的降解直接相关 (Inari et al., 2000; Doelling et al., 2001; Ma et al., 2006; Liu et al., 2008)。

柑橘贮藏过程中, 随着果肉细胞水分的流失, 形成枯水, 随着胞内外离子浓度发生改变, 一些与离子运输相关的基因得到了上升表达。在本研究中, 发现了几个在枯水过程中特异表达的基因及转录调控因子, 如参与细胞内离子运输蛋白的编码基因如钠离子/ $H^+$ 交换蛋白 (sodium/proton exchanger)、钙离子-ATP 酶 ( $Ca^{2+}$ -ATPase) 等获得了特异表达 (Venema et al., 2002; Mills et al., 2008); 以及转录调控因子如 MADS-box protein、MYB60-like protein、DNA/RNA 解旋酶盒 (DEAD/DEAH box helicase) (West et al., 1997; Cominelli et al., 2005), 以 MADS-box 为例, 作为转录因子, 它在果实的成熟衰老中起着重要作用, MADS-box 由反向平行折叠的  $\alpha$ -螺旋基元所形成特定的二聚体结构, 与目标基因的保守结构域或特定的 DNA 小沟相结合来调控基因的表达, 从而引起分生组织异常发育, 产生异位器官或引起表型性状改变, 如在番茄中参与果实成熟的 *LeMADS-RIN* 和在草莓中分离的 *Fv-MADS-9* 基因 (Vrebalov et al., 2002), 以及在拟南芥中发现的与果实开裂密切相关的 *SHP* 和 *FUL* 基因 (Ferrandiz et al., 2000)。

本研究中经 SSH 获得的柑橘果实贮藏后枯水特异性表达 EST, 包括大部分基因和几个转录因子, 其中参与细胞代谢、能量、蛋白合成的基因占到了差异表达总基因数的四成以上, 同时也包括在生长健壮的番茄和拟南芥植株中同样表达的基因, 如番茄红素  $\epsilon$  环化酶 (lycopene epsilon-cyclase) 基因 (马超 等, 2010)、双链 DNA 结合/蛋白结合 (double-stranded DNA binding/protein binding) 基因 (Stockinger et al., 1997), 推测可能为假阳性克隆, 为此可采用反向 Northern blotting 对文库进行更进一步筛选, 从而获得真正意义的特异表达 EST。

总之, 柑橘贮藏后衰老过程的机理十分复杂, 是许多基因协同作用的结果。这些贮藏后枯水相关 EST 的获得, 为下一步研究衰老过程中的分子机理创造了一个平台, 为深入研究贮藏过程中的与衰老相关的每一个生理生化现象 (如枯水、褐斑病、风味改变以及病虫害胁迫等) 奠定了一定的基础。

## References

- Arnaud N, Ravet K, Borlotti A, Touraine B, Boucherez J, Fizames C, Briat J F, Cellier F, Gaymard F. 2007. The iron-responsive element (IRE) /iron-regulatory protein 1 (IRP1) -cytosolic aconitase iron-regulatory switch does not operate in plants. *Biochemical Journal*, 405 (3): 523 - 531.
- Chen Kun-song, Chen Qing-jun, Zhang Shang-long. 1997. The relationship between changes of endogenous ABA and IAA levels and granulation in 'Bendizao' (*Citrus reticulata*) citrus fruit during storage. *Acta Horticultrae Sinica*, 24 (3): 291 - 292. (in Chinese)
- 陈昆松, 陈青俊, 张上隆. 1997. 本地早柑橘果实贮藏中内源 ABA、IAA 变化与枯水的关系. *园艺学报*, 24 (3): 291 - 292.
- Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, Conti L, Sala T, Vuylsteke M, Leonhardt N, Dellaporta S L, Tonelli C. 2005. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance. *Current Biology*, 15 (13): 1196 - 1200.
- Doelling J H, Yan N, Kurepa J, Walker J, Vierstra R D. 2001. The ubiquitin-specific protease UBP14 is essential for early embryo development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 27: 393 - 405.
- Ferrandiz C, Liljegren S J, Yanofsky M F. 2000. Negative regulation of the *SHATTERPROOF* genes by FRUITFULL during *Arabidopsis* fruit development. *Science*, 289 (5478): 436 - 438.
- Heim M A, Jakoby M, Werber M, Martin C, Weisshaar B, Bailey P C. 2003. The basic helix-loop-helix transcription factor family in plants: A genome-wide study of protein structure and functional diversity. *Molecular Biology and Evolution*, 20 (5): 735 - 747.
- Inari T, Yamaguchi R, Kato K, Takeuchi T. 2000. Purification and some properties of pectinesterase from fruits of a miniature-fruited red type tomato. *Food Science and Technology Research*, 6 (1): 54 - 58.
- Jiang Yue-ming, Liu Shu-xian, Chen Fang. 1991. The granulation and control of harvested citrus fruit. *Chinese Bulletin of Botany*, 8 (2): 9 - 12. (in Chinese)
- 蒋跃明, 刘淑娴, 陈芳. 1991. 采后柑桔果实枯水及控制. *植物学通报*, 8 (2): 9 - 12.
- Kumar K, Rao K P, Sharma P, Sinha A K. 2008. Differential regulation of rice mitogen activated protein kinase kinase(MKK)by abiotic stress. *Plant*

- Physiol Biochem, 46: 891 – 897.
- Li Bin, Liu Shao-de. 1988. Mechanism of the postharvest citrus fruit granulation. *Plant Physiology Communications*, (3): 5 – 9. (in Chinese)
- 李 斌, 刘绍德. 1988. 柑桔果实采后枯水的机理. *植物生理学通讯*, (3): 5 – 9.
- Liu Y F, Wang F, Zhang H Y, He H, Ma L G, Xing W D. 2008. Functional characterization of the *Arabidopsis* ubiquitin-specific protease gene family reveals specific role and redundancy of individual members in development. *The Plant Journal*, 55: 844 – 856.
- Lowell N, Lewis L N, Coggins J C W, Labanauskas C K, Dugger J W M. 1967. Biochemical changes associated with natural and GA<sub>3</sub> delayed senescence in the navel orange rind. *Plant and Cell Physiology*, 8 (1): 151-160.
- Ma Chao, He Juan, Hao Qing-nan, Wang Lei, Lu Xiao-yan, Ma Bing-gang. 2010. Construction of RNAi plant expression vectors for interfering lycopene cyclase- $\beta/\epsilon$  genes and its expression analysis. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 24 (3): 482 – 489. (in Chinese)
- 马 超, 何 娟, 郝青南, 王 蕾, 鲁晓燕, 马兵钢. 2010. 构建番茄红素  $\beta/\epsilon$  环化酶基因 RNAi 植物表达载体及其表达分析. *核农学报*, 24 (3): 482 – 489.
- Ma N, Tan H, Liu X H, Xue J Q, Li Y H, Gao J P. 2006. Transcriptional regulation of ethylene receptor and *CTR* genes involved in ethylene-induced flower opening in cut rose (*Rosa hybrida*) cv. Samantha. *Journal of Experimental Botany*, 57 (11): 2763 – 2773.
- Mccarty R E. 1992. A plant biochemist's view of H<sup>+</sup>-ATPases and ATP synthases. *The Journal of Experimental Biology*, 172: 431 – 441.
- Mills R F, Doherty M L, Lopez-Marques R L, Weimar T, Dupree P, Palmgren M G, Pittman J K, Williams L E. 2008. ECA3, a Golgi-localized P2A-type ATPase, plays a crucial role in manganese nutrition in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 146: 116 – 128.
- Parra M M, del Pozo O, Luna R, Godoy J A, Pintor-Toro J A. 1996. Structure of the dehydrin *tas14* gene of tomato and its developmental and environmental regulation in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 32: 453 – 460.
- Petrussa E, Bertolini A, Casolo V, Krajnánková J, Macri F, Vianello A. 2009. Mitochondrial bioenergetics linked to the manifestation of programmed cell death during somatic embryogenesis of *Abies alba*. *Planta*, 231 (1): 93 – 107.
- Seymour G B, Gross K C. 1996. Cell wall disassembly and fruit softening. *Postharvest News Information*, 7 (3): 45 – 52.
- Stockinger E J, Gilmour S J, Thomashow M F. 1997. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, (94): 1035 – 1040.
- Takahashi H, McCaffery J M, Irizarry R A, Boeke J D. 2006. Nucleocytosolic acetyl-coenzyme A synthetase is required for histone acetylation and global transcription. *Molecular Cell*, 23 (2): 207 – 217.
- Tan Xing-jie, Chen Fang, Zhou Yong-cheng, Liu Shu-xian, Li Yue-biao, Chen Mian-da. 1985. Studies on the postharvest granulation of ponkan (*Citrus reticulata* Blanco var. *ponkan*) fruit. *Acta Horticultrae Sinica*, 12 (3): 155 – 170. (in Chinese)
- 谭兴杰, 陈 芳, 周永成, 刘淑娴, 李月标, 陈绵达. 1985. 椪柑果实采后枯水的研究. *园艺学报*, 12 (3): 155 – 170.
- Tao Nengguo, Cheng Yunjiang, Xu Juan, Deng Xiuxin. 2004. An effective protocol for the isolation of RNA from the pulp of ripening *Citrus* fruits. *Plant Molecular Biology Reporter*, 22: 305a – 305f.
- Venema K, Quintero F J, Pardo J M, Donaire J P. 2002. The *Arabidopsis* Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger AtNHX1 catalyzes low affinity Na<sup>+</sup> and K<sup>+</sup> transport in reconstituted liposomes. *Journal of Biological Chemistry*, 277: 2413 – 2418.
- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. 2002. A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato ripening-inhibitor (*rin*) locus. *Science*, 296 (5566): 343 – 346.
- West A G, Shore P, Sharrocks A D. 1997. DNA binding by MADS-box transcription factors: A molecular mechanism for differential DNA bending. *Molecular and Cellular Biology*, 17 (5): 2876 – 2887.