

森林草莓 ‘Ruegen’ 果胶裂解酶基因的克隆及 荧光定量表达分析

周鹤莹, 张 玮, 张 卿, 沈元月, 秦 岭, 邢 宇*

(北京农学院植物科学技术学院, 农业应用新技术北京市重点实验室, 北京 102206)

摘 要: 根据森林草莓 (*Fragaria vesca*) 果胶裂解酶 (Pectate lyase) 基因序列信息设计引物, 克隆了森林草莓 ‘Ruegen’ 的果胶裂解酶基因 *PLA*、*PLB* 和 *PLC*。利用 MEGA5.0 软件将这 3 个基因编码的氨基酸序列与其他植物的果胶裂解酶氨基酸序列进行聚类分析, 同时采用荧光定量 PCR 的方法对 ‘Ruegen’ 植株不同器官及不同发育时期果实的果胶裂解酶基因表达量进行分析。结果表明: *PLA*、*PLB* 和 *PLC* 在其植株各器官中均有表达, 且在发育后期果实中的表达量明显高于其他器官, 结合进化树以及果实发育过程中果胶裂解酶活性变化, 推测果胶裂解酶基因对草莓果实发育后期的软化具有调节作用。

关键词: 森林草莓; 果胶裂解酶基因; 基因克隆; 荧光定量表达分析

中图分类号: S 668.4

文献标志码: A

文章编号: 0513-353X (2015) 03-0455-07

The Cloning and Quantitative Expression Analysis of Pectate Lyase Gene in *Fragaria vesca*

ZHOU He-ying, ZHANG Wei, ZHANG Qing, SHEN Yuan-yue, QIN Ling, and XING Yu*

(College of Plant Science and Technology, Beijing University of Agriculture, Beijing Key Laboratory for Agricultural Application and New Technique, Beijing 102206, China)

Abstract: Primers were designed based on the sequence information of woodland strawberries, and pectate lyase gene (*PLA*, *PLB*, *PLC*) was cloned from ‘Ruegen’. Phylogenetic tree is clustered by MEGA 5.0 based on amino acid of pectate lyase gene (*Fragaria vesca*) and known pectate lyase gene of other plants. At the same time, gene expression levels were analyzed by real-time quantitative PCR method for strawberries on different organs and developmental stages of fruit. The results showed that pectate lyase gene is continuous expression in all organs of strawberry plants. In developing strawberry fruit, pectate lyase gene family was significantly higher than other organs, combined with the results of the phylogenetic tree and the change of pectate lyase activity speculate that pectate lyase gene plays a role in the regulation of strawberry fruit ripening, especially in the late stage of fruit ripening.

Key words: *Fragaria vesca*; pectate lyase; gene cloning; quantitative expression

草莓 (*Fragaria × ananassa* Duch.) 是蔷薇科草莓属多年生草本植物。草莓属于典型的非呼吸跃

收稿日期: 2014-11-06; 修回日期: 2015-01-22

基金项目: 北京市教育委员会重点项目 (KZ20130020018); 北京市属高等学校高层次人才引进与培养计划项目 (CIT&TCD201404098, IDHT20140509); 国家自然科学基金项目 (31370323)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xingyu@bua.edu.cn)

变型果实, 虽然其软化的机制仍不清楚, 但许多研究表明草莓果实成熟软化最明显的变化就是果实硬度下降, 且涉及到初生细胞壁和胞间层多糖在结构和组成上发生的一系列协同变化, 最终导致胞壁空间结构的崩溃, 而且一旦发生就很难减缓和控制。果实软化主要归因于细胞壁中原果胶溶解为果胶和果胶多糖的进一步酶促降解。而果胶降解相关酶广泛分布于植物体内, 在果实细胞中主要负责果胶物质的降解。

到目前为止, 在果实组织中已发现多种降解果胶多糖的酶类, 主要包括内切多聚半乳糖醛酸酶 (endo-polygalacturonase, endo-PG)、外切多聚半乳糖醛酸酶 (exo-polygalacturonase, exo-PG)、果胶酯酶 (pectate esterase, PE)、果胶裂解酶 (pectate lyase, PL) 等 (钱春 等, 2009; 佟兆国 等, 2011; 魏潇 等, 2011)。多聚半乳糖醛酸酶活性的变化长期以来一直被认为与果实成熟软化密切相关, 果胶甲酯酶通过水解果胶分子中甲酯化的羧基, 进而影响细胞壁的质地或坚实度, 但在不同树种的果实中检测到的多聚半乳糖醛酸酶含量或酶活性差异很大。在成熟草莓中几乎检测不到 endo-PG 的活性。在草莓的 4 个果胶酯酶基因中, 仅有 *FaPEI* 在果实中特异表达, 随着果实成熟其转录逐渐积累, 在转色期时达到峰值, 且乙烯处理对其表达有明显的抑制作用。在这些相关酶基因中, 果胶裂解酶基因是控制草莓果实硬度极为突出的一类基因 (Jimenez-Berm et al., 2002)。因此果胶裂解酶基因可以作为研究草莓果实软化的候选基因。栽培草莓为八倍体, 遗传转化周期较长, 不利于基因功能研究。森林草莓为二倍体, 具有基因组小 (约 240 M), 生命周期短 (3.5 ~ 4 个月), 遗传转化较容易等特点, 是草莓基因功能研究的理想模式植物。

本试验中通过分析森林草莓 (*Fragaria vesca*) 果实软化相关基因, 并根据其基因组序列找出果胶裂解酶基因, 克隆了与草莓果实软化相关的果胶裂解酶基因 *PLA*、*PLB* 和 *PLC*。利用 MEGA5.0 软件将这 3 个基因编码的氨基酸序列与其他植物果胶裂解酶氨基酸序列进行聚类分析, 同时采用荧光定量 PCR 的方法对草莓植株不同器官及果实不同发育时期的基因表达量进行了分析研究。以期今后该基因的研究与利用提供可靠依据, 更为草莓果实成熟软化的研究提供有力的科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料 RNA 提取与 cDNA 反转录

森林草莓 ‘Ruegen’ 在植物培养室种植 (11 h 光照, 13 h 黑暗), 果实可以周年供应。采取小绿果期、大绿果期、白果期、片红期、红果期的果实 (去除瘦果), 以及叶片、匍匐茎、瘦果、叶柄和根, 液氮速冻后于 -80 °C 冰箱保存。

采用 EASYspin 植物 RNA 快速提取试剂盒 (北京博迈德科技发展有限公司) 提取样品总 RNA。使用 Invitrogen 公司的反转录试剂盒 (SuperScript III Reverse Transcriptase) 将总 RNA 反转录成 cDNA。

1.2 *PLA*、*PLB* 和 *PLC* 基因全长的扩增

根据森林草莓果胶裂解酶基因序列全长, 分别设计 5'引物和 3'引物 [表 1, 引物由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成], 克隆森林草莓 ‘Ruegen’ *PLA*、*PLB* 和 *PLC* 基因序列。以 ‘Ruegen’ 的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。反应体系为 20 μ L: ddH₂O 14.1 μ L, 10 \times PCR 缓冲液 2.0 μ L, dNTP 混合物 (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.8 μ L, 上游引物和下游引物 (10 μ mol \cdot L⁻¹) 各 1.0 μ L, 模板 DNA (20 ng \cdot μ L⁻¹) 1.0 μ L, 高保真聚合酶 Ex-Taq 酶 (TaKaRa 公司) 0.1 μ L。扩增程序: 94 °C 变性 5 min 后; 94 °C 30 s, 54 °C (不同引物退火温度不同) 60 s, 72 °C 120 s, 共 32 个循环; 最后 72 °C 10 min。1%琼脂糖凝

胶电泳检测后用 DNA 回收试剂盒 (Omega Bio-tek 公司) 回收目标片段进行 pMD19-T (TaKaRa 公司) T/A 克隆, DNA 测序由北京中科希林生物科技有限责任公司完成。

1.3 实时荧光定量 PCR 分析 (qRT-PCR)

分别提取样品 RNA, 并反转录 cDNA 第 1 链。以反转录后的 cDNA 为模板, 根据 *PLA*、*PLB*、*PLC* 基因全序列设计荧光定量 PCR 引物 (表 1), 研究其在不同时期果实和植株不同部位的表达情况。内标基因采用 *FvActin* 进行测定。荧光定量 PCR 采用 SYBR premix EX TagTM reagent 试剂盒 (TaKaRa), 按说明书进行。qRT-PCR 反应体系为 10 μ L, 包括 5 μ L SYBR premix Ex *Taq* 混合液, 1 μ L cDNA, 引物各 0.25 μ L, ddH₂O 3.5 μ L。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 然后, 95 $^{\circ}$ C 20 s, 54 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 20 s, 共 40 次循环; 每次循环第 3 步进行荧光采集, 最后退火至 65 $^{\circ}$ C, 每隔 30 s 上升 0.5 $^{\circ}$ C, 至 95 $^{\circ}$ C 变性 1 min。qRT-PCR 反应于 Bio-RAD C1000TM Thermal Cycler 上进行, 使用 CFX96TM 系统进行荧光采集。cDNA 标样和待测样均设置 3 次重复。

表 1 引物序列
Table 1 Listed sequence of primers

用途 Use	基因 Gene	引物序列 5'→3' Sequences	T _m / $^{\circ}$ C
基因 ORF 扩增	<i>FvPLA</i>	GCAATGGCGGTTTCGG ACTAGCAGGTACGTCCTCT	54
	<i>FvPLB</i>	ATGAGGTTAGCTAGCTCGAGGG TTAACATTGACGACCAACCGGC	54
Gene ampli- fication	<i>FvPLC</i>	ATGAGGTTAGCTAGCTCG TTAGAAATAGGCTCCGTTAAGG	54
	<i>FvActin</i>	GCGACAATGGAAGTGAATGG GACAATTCCCGTTCAGCAGTG	54
荧光定量 PCR Quantitative PCR	<i>FvPLA</i>	GCGTGTCCGGTGCTTCT ATGCTTATTCAACCCTCC	54
	<i>FvPLB</i>	TCAGACCACAGGCAGAT ACATTGACGACCAACCC	54
	<i>FvPLC</i>	TGATGGTGATGGTATATC AACAGCATAACCTCATTA	54

T_m: 退火温度。
T_m: Annealing temperature.

1.4 草莓果果胶裂解酶活性及硬度的测定

花后 11~35 d 内, 每两天取 1 次外观一致的草莓果实, 进行果胶裂解酶活性及硬度测定。
果胶裂解酶测定参考 Anurag 等 (2004) 的方法。果肉用 0.05 mol · L⁻¹ 磷酸钠缓冲液, 0.02 mol · L⁻¹ 盐酸半胱氨酸和 1% Triton X-100 进行匀浆, 14 000 × g 4 $^{\circ}$ C 离心 30 min, 上清液为粗酶液。取 2.5 mL 1% 多聚半乳糖醛酸酶溶液, 1.0 ml 0.01 mol · L⁻¹ CaCl₂, 1.5 mL 酶液, 混匀后 37 $^{\circ}$ C 保温 3 h, 加 0.4 mL ZnSO₄·7H₂O 缓冲液 (9%) 与 0.3 mL 0.5 mol · L⁻¹ NaOH 终止反应。将混合液 3 000 × g 离心 15 min, 取 2.5 mL 上清加入 1.5 mL 0.04 mol · L⁻¹ 硫代巴比妥酸, 0.75 mL 0.1 mol · L⁻¹ HCl 和 0.25 mL 水, 沸水浴 30 min, 冷却后在 550 nm 下测吸光度值。

硬度采用手持硬度计测定, 每次测定 25 个果实, 每个果实测定两次, 取平均值。

2 结果与分析

2.1 *PLA*、*PLB*、*PLC* 克隆的电泳检测

对森林草莓 ‘Ruegen’ 的果胶裂解酶基因 *PLA*、*PLB*、*PLC* 的全长进行克隆, 扩增结果见图 1。

将测序结果与森林草莓基因组序列进行比对分析, 得到基因序列 *PLA*、*PLB*、*PLC*。

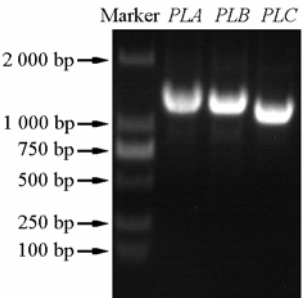


图 1 森林草莓 ‘Ruegen’ 果胶裂解酶基因的扩增结果
Fig. 1 The PCR result based on *PL* genes of *Fragaria × vesca* ‘Ruegen’

2.2 PLA、PLB 和 PLC 的序列分析及系统进化树的构建

利用 DNAMAN5.2.2 软件对测序得到的果胶裂解酶基因 *PLA*、*PLB* 和 *PLC* 的序列进行拼接, 其中 *PLA* 包含 1356 bp 的开放阅读框, 编码 451 个氨基酸; *PLB* 包含 1344 bp 的开放阅读框, 编码 447 个氨基酸; *PLC* 包含 1182 bp 的开放阅读框, 编码 393 个氨基酸。根据在线软件 (http://www.expasy.org/tools/pi_tool.html) 对编码氨基酸分子量及等电点进行分, *PLA* 分子量约为 49.39 kD, 预测等电点 (pI) 为 7.63; *PLB* 约为 49.81 kD, pI 为 8.44; *PLC* 约为 44.39 kD, pI 为 6.87。

根据 *PLA*、*PLB* 和 *PLC* 编码氨基酸序列并结合其它植物果胶裂解酶基因的编码氨基酸序列, DNAMAN 软件氨基酸序列比对结果显示, *PLA*、*PLB*、*PLC* 的蛋白序列均具有植物果胶裂解酶基因的保守的氨基酸区域 (图 2)。同时, 采用 MEGA5.0 构建了系统进化树 (图 3)。可以看出这 3 个基因与其他物种的果胶裂解酶基因亲缘关系较近, 其中 *FvPLA* 与覆盆子的亲缘关系最近, 而 *FvPLB* 和 *FvPLC* 都与香蕉有着较为相近的亲缘关系。

FvPLB	MRLASSRATMRFYMTPLILLALLVCVAASVE.NDKFVHSRFEVEEPKSS.....FNSSMAD...RSNDD.WNBHADVDFE...EIASLVD	79
FvPLCMRFYMTPLILLALLVCVAASVE.NDKFVHSRFEVEEPKSS.....FNSSMAD...RSNDD.WNBHADVDFE...EIASLVD	70
SIPL	.MAMASKKWSFSFSLILLLLGVYAAAGVQQSNDGSDTRIVEKEQLSS.....ENSTMAVSLEDVEEK.LSKHADVDFE...EVVAMVA	82
MdPL1	MAVFESKKKVVGAFTVLLVCCFAAAVVEIS.RNSE...CFGGLCNFLGFGFLNIFFQLGFYRVAEDDEG.FNKHADVDFE...EIASMVD	86
MdPL8	MAVFESKKKVVGAFTVLLVCCFAAAVVEIS.RNSE...NGGTTELQSS.....SNSSMAARVAEDDEG.FNKHADVDFE...EIASMVD	77
FvPLA	MAVSENKK.WITACVSVLLFCFVAAMSGRVS.LDGTPIILRNNGTEELQSS.....SNSSMAPRVNENDGGILNKHADVDFE...EIAAMVD	83
VvPL	MFMASSKG...WISLCSLLFFLFVAVMANDR.....NGGTTELQSS.....NNSSMAAR.....NBHADVDFE...AVASMVD	63
AtPLMAVLPFTWLLAMMCLLFFVGAMENIT.....HDNISLPS.....DETEWNCHAVTNEDEVADEVLALTE	60
Consensus	s hav p	
FvPLB	TSIRNSSARRELGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	174
FvPLC	TSIRNSSARRELGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	165
SIPL	CSIRNSTERRRLGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	177
MdPL1	MSIRNSTERRRLGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	181
MdPL8	MSIRNSTERRRLGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	172
FvPLA	MSIRNSTERRRLGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	177
VvPL	MSIRNSTERRRLGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	158
AtPL	MSIRNSTERRRLGYFSCTGNFIDDCWRCDPQCRERKRLANCGIGFGRNAGGRDGRYYVVSDEGHDFVNEFGTIRHAVICDRPLWIVFARD	155
Consensus	s zn rr lqyf c tgnpiddcwrcd w rkrla cglgfgRNA ggrdg yvv d d pvnpg pgt rhaviq plwivf rd	
FvPLB	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSNCA	269
FvPLC	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSNCA	260
SIPL	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSHCA	272
MdPL1	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSHCA	247
MdPL8	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSNCA	267
FvPLA	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSNCA	272
VvPL	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSNCA	253
AtPL	MVILKQELIMNSFKTIDARGVNVHIANGGCHTQFVTNIIHGLHIHDCCKPTGNMVRSSSEHFCWRTMADGDAISIFGSSHIWVDHNSLSHCA	250
Consensus	mvi lkqeli nsfktid rg nvhia g c t qfvtn i hglhihdcckptgna vrss h g	
FvPLB	DGLIDAIMGSTAITISNNYFTHHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	364
FvPLC	DGLIDAIMGSTAITISNNYFTHHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	355
SIPL	DGLVDVMSGTAITISNNHFAHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	367
MdPL1HHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	321
MdPL8	DGLVDVMSGTAITISNNHMTTHHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	362
FvPLA	DGLVDVMSGTAITISNNHMTTHHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	367
VvPL	DGLVDVMSGTAIIS.NNHFAHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	347
AtPL	DGLVDVMSGTAITISNNHMTTHHNEVMLLGHSDSYTRDKQMVTIAYNHFGGLIQRMFRCRHGYFHVVNNDYTHWEMYAIGGSAEPTINSQGNR	345
Consensus	hhnevmlghsdsy dk mqvtiaynhfg gliqrmpcrhgyfhvvnndythwemyaiggsa ptinsqgnr	
FvPLB	YLAENNFFAKEVTRVCTIG.RRRHNNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASASARASSLGAKSSSMIGTIAGAGVINCRRFRQC.	447
FvPLC	YLAENNFFAKEVTRVCTIG.RRRHNNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASASARASSLGAKSSSMIGTIAGAGVINCRRFRQC.	393
SIPL	YLAENNFFAKEVTRVCTIAAGQKKNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASASARASSLGAKSSSMVGAITSSAGFLACRRSRIC.	451
MdPL1	YLAENNFFAKEVTRVCTIAATKKNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASASARASSLGAKSSAMVGAITSSGALFCRRGHFC.	405
MdPL8	YLAENNFFAKEVTRVCTIAATKKNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASASARASSLGAKSSAMVGAITSSGALFCRRGHFC.	446
FvPLA	YLAENNFFAKEVTRVCTISQTKKNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASAVYARASSLGAKSSAMVGTITAGAGTLCRRGRIC.	451
VvPL	YLAENNFFAKEVTRVCTIPSGQKKNWRSBGDLLNGAYFTPSGAGASASARASSLGAKSSMVGSIISNAGALSCRRGSQC.	431
AtPL	YLAENNFFAKEVTRVCTIPASHKKNWRSBGDLLNGAYFTSSGAAASGSYARASSLSAKSSSLVGHITSDAGALFCRRGRQC.	430
Consensus	y ap n fakevt rv t w nnwrs gd nga	

图 2 氨基酸同源性比对

Fv: 森林草莓; SI: 番茄; At: 拟南芥; Vv: 葡萄; Md: 苹果。

Fig. 2 Homology comparison of amino acid sequence

Fv: *Fragaria vesca*; SI: *Solanum lycopersicum*; At: *Arabidopsis thaliana*;

Vv: *Vitis vinifera*; Md: *Malus × domestica*.

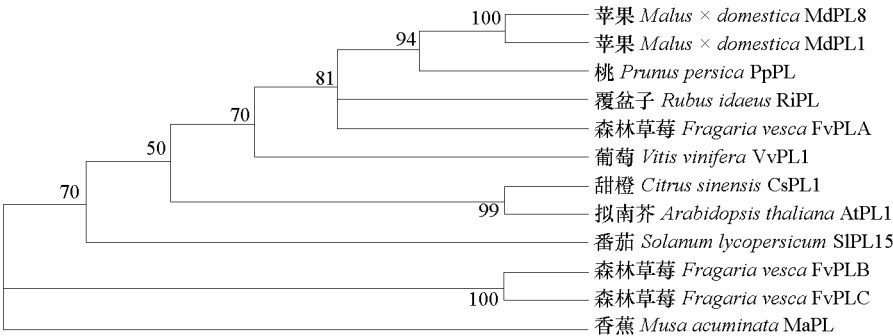


图 3 根据氨基酸序列聚类的植物果胶裂解酶基因进化关系分析
Fig. 3 Phylogenetic relationship based on amino acid sequence among plant pectate lyase

2.3 PLA、PLB、PLC 荧光定量表达分析

PLA、PLB 和 PLC 在草莓各器官中均有表达, 但相对表达量均较低 (图 4)。PLA、PLB 和 PLC 在绿果期果实中表达量相对较低, 在片红期达到最大值, 其中 PLC 的相对表达量最高, 是 PLA 的 3 倍; PLB 与 PLC 在达到高峰后均出现下降趋势, PLA 的表达量则几乎不变 (图 5)。

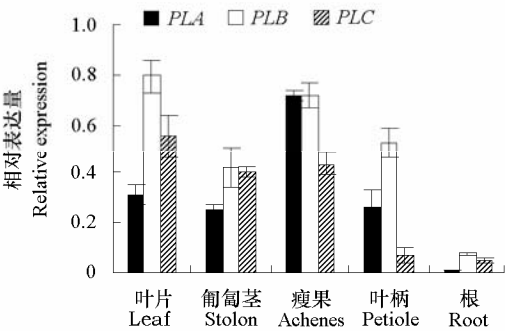


图 4 果胶裂解酶基因在草莓不同器官中的表达
Fig. 4 Relative expression of PL genes of *Fragaria vesca* ‘Ruegen’

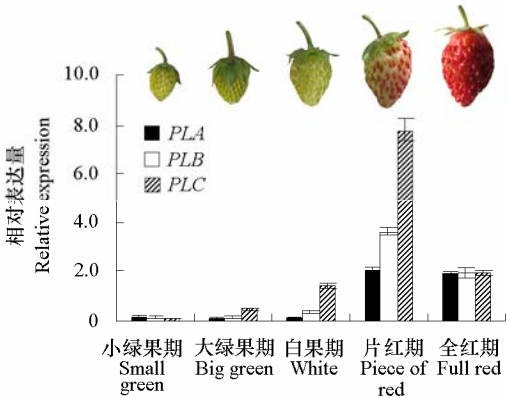


图 5 果胶裂解酶基因在不同时期果实的表达
Fig. 5 Relative expression of PL genes of *Fragaria vesca* ‘Ruegen’

2.4 草莓果实果胶裂解酶活性及硬度的测定

果胶裂解酶是一种降解果胶从而导致果实软化的酶, 由 qRT-PCR 结果推断果胶裂解酶应在草莓果实发育后期起作用。

如图 6 所示, 果实的果胶裂解酶活性呈现一个先增加后降低的趋势。在绿果期, 未检测到果实的果胶裂解酶活性。随着果实的发育, 果胶裂解酶活性开始出现变化, 尤其在果实由白色转变为红色的这一过程中, 果胶裂解酶活性呈现快速增长的趋势, 且在片红期时达到最高

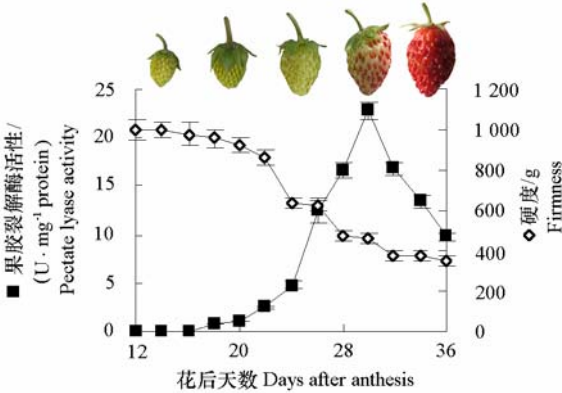


图 6 果实成熟过程中果胶酶活性及硬度变化
Fig. 6 The changes of the pectate lyase activity and firmness in fruit ripening process

值。另外,果实硬度随着果实的发育开始逐渐降低,尤其是转色期变化最大。果胶裂解酶活性在果实发育的过程中呈现先升高后下降的趋势,与果胶裂解酶基因的相对表达量变化相一致。因此可以推断果胶裂解酶基因在草莓果实发育过程中,尤其是对于果实软化有着重要的作用。

3 讨论

近年来,关于果实成熟衰老的研究主要集中在呼吸跃变型果实上。随着科学技术的发展,非呼吸跃变型果实成熟软化机制研究也逐渐增多。一些研究表明,在非呼吸跃变型果实成熟软化的过程中不仅乙烯(蒋天梅等,2011),还有其它一些与软化相关的基因(Giovannoni, 2001; White, 2002; Figueroa et al., 2008; Chai et al., 2011; Enriqueta et al., 2013)、内源激素(如 ABA、GAs)、蔗糖(Jia et al., 2013)及活性氧都参与了对其发育、成熟、软化的调控。草莓是典型的非呼吸跃变型果实(Knee et al., 1977; Perkins-Veazie et al., 1988),许多研究显示这类果实成熟软化与细胞壁有着密切的关系。植物细胞壁的主要成分为纤维素、半纤维素和果胶(Cosgrove, 2005),而果胶广泛存在于高等植物中,是植物细胞间质和初生细胞壁的重要组分。果胶裂解酶是一种降解果胶物质从而导致果实软化的酶,其基因被认为是改良果实硬度、阻止草莓果实软化的优秀候选基因(Yoder et al., 1993)。

果胶成分较为复杂(Perez et al., 2003; Martens-Uzunova & Schaap, 2009),这也表明果胶的降解需要多种不同类型的酶。本试验通过对已知的森林草莓基因序列进行分析,设计 *PL* 家族中 *PLA*、*PLB*、*PLC* 基因的特异性引物,并对草莓不同部位及不同发育时期果实进行基因克隆。通过序列比对及进化树分析可知获得了森林草莓‘Ruegen’的 *PLA*、*PLB*、*PLC* 基因序列。根据荧光定量 PCR 的结果可以看出果胶裂解酶基因在草莓植株整体发育的过程中都有作用,尤其是在草莓果实的发育过程中具有重要的调控作用,但对于该基因是如何调控果实软化以及是否与其他基因、蛋白共同调节果实软化还需进一步研究。

在草莓果实由白变红的过程中 *PLA*、*PLB* 和 *PLC* 表达量都升高,尤其是 *PLC*。但是由于二倍体草莓‘Ruegen’生长周期较短,果实由白变红的过程较短,很难细致划分出果实的转色时期,因此较难找出基因表达量上调的关键点。同时作者还系统研究了可能参与果实软化的细胞壁果胶降解相关酶,如纤维素酶、多聚半乳糖醛酸、果胶甲酯酶等,从酶活性和基因表达上综合分析发现,在森林草莓中,只有果胶裂解酶与果实软化关系最为密切。本试验中森林草莓果实中果胶裂解酶基因的相对表达量在果实发育后期出现了先增后减的趋势,猜测可能是在发育的后期果胶裂解酶已不再起着重要的作用。今后将通过 RNAi 和超表达技术(Fabiana et al., 2012),进一步研究果胶裂解酶基因沉默和超表达后果实生长发育的变化,从而使果胶裂解酶基因与果实成熟软化之间的联系更为明确,为进一步解释果实软化中的作用机理提供理论基础和科学依据。

References

- Anurag Payasi, Misra P C, Sanwal G G. 2004. Effect of phytohormones on pectate lyase activity in ripening *Musa acuminata*. *Plant Physiology and Biochemistry*, 42: 861 - 865.
- Chai Y M, Jia H F, Li C L, Dong Q H, Shen Y Y. 2011. *FaPYR1* is involved in strawberry fruit ripening. *Journal of Experimental Botany*, 62 (14): 5079 - 5089.
- Cosgrove D J. 2005. Growth of the plant cell wall. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 6 (11): 850 - 861.
- Enriqueta Moyano-Cañete, María L Bellido, Nicolás García-Caparrós. 2013. *FaGAST2*, a strawberry ripening-related gene, acts together with

- FaGAST1* to determine cell size of the fruit receptacle. *Plant Cell Physiology*, 54 (2): 218 – 236.
- Fabiana Csukasi, Livia Donaire, Ana Casañal, Llúcia Martínez-Priego, Miguel A. Botella, Nieves Medina-Escobar, César Llave, Victoriano Valpuesta. 2012. Two strawberry miR159 family members display developmental-specific expression patterns in the fruit receptacle and cooperatively regulate *Fa-GAMYB*. *New Phytologist*, 195: 47 – 57.
- Figuerola C R, Pimentel P, Gaete-Eastman C, Moya M, Herrera R, Caligari P D S, Moya-Léon M A. 2008. Softening rate of the Chilean strawberry (*Fragaria chiloensis*) fruit reflects the expression of polygalacturonase and pectate lyase genes. *Postharvest Biol Technol*, 49: 210 – 220.
- Giovannoni J J. 2001. Molecular biology of fruit maturation and ripening. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52: 725 – 749.
- Jia H F, Wang Y Y, Sun M Z, Li B B, Han Y, Zhao Y X, Li X L, Ding N, Li C, Ji W L, Jia W S. 2013. Sucrose functions as a signal involved in the regulation of strawberry fruit development and ripening. *New Phytologist*, 198: 453 – 465.
- Jiang Tian-mei, Yin Xue-ren, Wang Ping, Sun Chong-de, Xu Chang-jie, Li Xian, Chen Kun-song. 2011. Research advance in regulation of ethylene during ripening and senescence of non-climacteric fruit. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (2): 371 – 378. (in Chinese)
- 蒋天梅, 殷学仁, 王 平, 孙崇德, 徐昌杰, 李 鲜, 陈昆松. 2011. 乙烯调控非跃变型果实成熟衰老研究进展. *园艺学报*, 38 (2): 371 – 378.
- Jimenez-Bermudez S, Redondo-Nevado J, Munoz-Blanco J. 2002. Manipulation of strawberry fruit softening by antisense expression of a pectate lyase gene. *Plant Physiology*, 128 (2): 751 – 763.
- Knee M, Sargent J A, Osborne D J. 1977. Cell wall metabolism in developing strawberry fruit. *Journal Experimental Botany*, 8: 377 – 396.
- Martens-Uzunova E S, Schaap P J. 2009. Assessment of the pectin degrading enzyme network of *Aspergillus niger* by functional genomics. *Fungal Genetics and Biology*, 46 (1): 170 – 179.
- Perez S, Rodriguez-Carvajal M A, Doco T. 2003. A complex plant cell wall polysaccharide: Rhamnogalacturonan II. A structure in quest of a function. *Biochimie*, 85 (1): 109 – 121.
- Perkins-Veazie P, Huber D J, Brecht J K. 1988. Ethylene synthesis in developing strawberry fruit. *Plant Physiology*, 86: 155.
- Qian Chun, Zhang Xing-guo, Liang Guo-lu. 2009. Progress in studying genes related to strawberry (*Fragaria ananassa* Duch.) fruit ripening and softening. *China Vegetables*, (22): 6 – 12. (in Chinese)
- 钱 春, 张兴国, 梁国鲁. 2009. 草莓果实成熟软化相关基因研究进展. *中国蔬菜*, (22): 6 – 12.
- Tong Zhao-guo, Wang Fei, Gao Zhi-hong, Zhou Jun, Xu Qiu-hong, Zhang Zhen. 2011. Advances in research on the relationship between pectolytic enzymes and fruit softening. *Journal of Fruit Science*, 28 (2): 305 – 312. (in Chinese)
- 佟兆国, 王 飞, 高志红, 周 军, 徐秋红, 章 镇. 2011. 果胶降解相关酶与果实成熟软化. *果树学报*, 28 (2): 305 – 312.
- Wei Xiao, Liu Wei-sheng, Liu Ning, Zhang Qiu-ping, Zhang Yu-ping, Liu Shuo, Liu You-chun. 2011. Phylogenetic analysis and genomic localization of polygalacturonase genes related to fruit softening. *Acta Horticulturae Sinica*, 38 (9): 1791 – 1799. (in Chinese)
- 魏 潇, 刘威生, 刘 宁, 章秋平, 张玉萍, 刘 硕, 刘有春. 2011. 果实软化相关 PG 基因的进化分析和基因组定位. *园艺学报*, 38 (9): 1791 – 1799.
- White P J. 2002. Recent advances in fruit development and ripening: An overview. *Journal of Experimental Botany*, 53: 1995 – 2000.
- Yoder M D, Keen N T, Jurnak F. 1993. New domain motif: The structure of pectate lyase C, a secreted plant virulence factor. *Science*, 260: 1503 – 1507.