

石榴种皮总木质素含量及*PgCOMT*基因的克隆与表达

张水明*, 龚凌燕, 曹丹琴, 张永娟, 杨健

(安徽农业大学园艺学院, 合肥 230036)

摘要: 为探讨石榴(*Punica granatum* L.)籽粒硬度与种皮总木质素含量的相关性及种皮 *COMT* 基因的表达方式, 利用 Texture Analyser 质构仪和巯基乙酸法测定 6 个品种的成熟籽粒硬度及种皮总木质素含量。结果表明, 6 个石榴品种的籽粒硬度与种皮总木质素含量呈正相关, 相关系数为 0.9246。采用 RACE 技术从石榴种皮中克隆得到 1 条长度为 1456 bp 的 *PgCOMT* 基因 cDNA 序列(GenBank 登录号为 KJ713968)。实时荧光定量 PCR 分析表明, *PgCOMT* 在‘红玉石籽’、‘粉皮’、‘会理软籽’、‘蒙自甜’和‘突尼斯软籽’石榴种皮中的相对表达量与石榴籽粒硬度较为一致;随着石榴种皮的发育其表达量先下降后上升。这为深入了解石榴软籽性状的产生机理奠定了基础。

关键词: 石榴; 籽粒硬度; 木质素; *COMT* 基因; 基因表达

doi: 10.11926/j.issn.1005-3395.2015.01.010

Total Lignin Content in Pomegranate Seed Coat and Cloning and Expression Analysis of *PgCOMT* Gene

ZHANG Shui-ming*, GONG Ling-yan, CAO Dan-qin, ZHANG Yong-juan, YANG Jian

(College of Horticulture, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, China)

Abstract: In order to understand the correlation between seed hardness and total lignin content in seed coat of pomegranate (*Punica granatum*), the seed hardness and total lignin content of six cultivars were measured by Texture Analyser and thioglycolic acid method. The results showed that the correlation coefficient was 0.9246 between seed hardness and total lignin content in seed coat. A full-length cDNA sequence of 1456 bp (GenBank accession No.: KJ713968) was cloned from pomegranate seed coat by RACE, named *PgCOMT* gene. Real-time quantitative PCR showed that the relative expression of *PgCOMT* in ‘Hongyushizi’, ‘Fenpi’, ‘Huiliruanzi’, ‘Mengzitian’ and ‘Tunisiranzi’ seed coat had a similar trend with seed hardness. The relative expression of *PgCOMT* declined at first, and then rose with development stage of pomegranate seed coat the last stage. These lay a foundation for further study the mechanism of soft seed traits in pomegranate.

Key words: Pomegranate; Seed hardness; Lignin; *COMT*; Gene expression

石榴(*Punica granatum* L.)为石榴科(Punicaceae)石榴属落叶灌木或小乔木,果实酸甜可口,含有丰富的天然活性物质,具有较高的保健价值^[1]。籽粒硬度是石榴品质的一项重要指标,直接影响着口感

和可食率,硬籽石榴籽粒较硬,可食用部分少,软籽石榴核软可食,深受消费者喜爱。目前对石榴籽粒硬度的研究主要集中在品种的划分上,Abdolkarim等^[2]通过破坏性试验测定石榴籽粒硬度,将其分为

收稿日期: 2014-05-07

接受日期: 2014-07-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(30900971)资助

作者简介: 张水明,博士,副教授,主要从事园艺植物种质资源与生物技术研究。

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhangshm893@sohu.com

软籽、较软籽、较硬籽、硬籽四类。陆丽娟等^[3]通过测定中国主要石榴品种的鲜籽硬度,将其分为软籽、半软籽和硬籽三类。

石榴籽粒包含假种皮、种皮和种仁3个部分,通常可食用部分为假种皮,种仁中因富含多种脂肪酸和蛋白质,也具有较高的营养价值^[4],而种皮中含有较高的木质素^[5],是影响籽粒硬度的主要成分。目前关于木质素生物合成途径的研究较为明确,一般认为是从苯丙氨酸开始,进入苯丙烷途径,经过一系列脱氨基、羟基化和甲基化等步骤,合成羟基肉桂酸类化合物,再通过连接和还原反应生成不同单体,单体进一步氧化聚合生成木质素^[6-7]。咖啡酸-O-甲基转移酶(Caffeic acid O-methyltransferase, COMT)是木质素合成途径中的一个关键酶,催化咖啡酸、5-羟基松柏醛和5-羟基松柏醇甲基化分别生成阿魏酸、芥子醛和芥子醇^[8]。目前已从绿竹(*Bambusa oldhamii*)^[9]、苧麻(*Boehmeria nivea*)^[10]、棉花(*Gossypium hirsutum*)^[11]和丹参(*Salvia miltiorrhiza*)^[12]等植物中克隆了COMT基因,通过抑制COMT基因的表达可使转基因植株烟草中的总木质素含量下降^[13],将绿竹COMT基因反向导入烟草中,转基因植株木质素含量均有下降,下降幅度最大达28.7%^[14]。

籽粒硬度是影响石榴口感和食用率的一项重要品质指标,软籽石榴在市场上非常受欢迎。目前,关于石榴软籽性状的形成机理还鲜有报道。本研究选取6个籽粒硬度的石榴品种‘红玉石籽’、‘白玉石籽’、‘粉皮’、‘会理软籽’、‘蒙自甜’和‘突尼斯软籽’为材料,测定成熟籽粒硬度及种皮总木质素含量并分析两者关系。同时采用RACE技术克隆石榴木质素生物合成相关基因COMT的全长cDNA,采用实时荧光定量PCR分析其在石榴种皮中的表达,为深入了解石榴软籽性状的产生机理奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试石榴(*Punica granatum* L.)采自安徽农业大学农业园石榴种质资源圃,土肥水管理水平一致。于2013年9月15日分别采集‘红玉石籽’、‘白玉石籽’、‘粉皮’、‘会理软籽’、‘蒙自甜’和‘突尼斯软籽’成熟度一致的果实若干,置于冰盒带回实验室,

剥取石榴籽粒,部分在4℃保存,用于籽粒硬度和总木质素含量的测定;部分在-80℃下保存,用于基因克隆与表达。

2013年5月20日起,在开花后20、40、60、80、100和120 d,分别从‘红玉石籽’树冠外围东、西、南、北面及内膛枝条上随机摘取果实各2个,置于冰盒带回实验室,剥取石榴籽粒,于-80℃保存,用于基因表达分析。

M-MLV反转录酶和SYBRTM Premix Ex Taq购自TaKaRa公司, pGEM-T载体购自Promega公司, BD SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit试剂盒购自Clontech公司,试验所用引物均由上海生工生物公司合成。

1.2 籽粒硬度测定

每个品种随机选取3个果实,剥离出籽粒,任取30个石榴籽粒,去除外层假种皮,擦净待用。选用Texture Analyser质构仪P/36R圆柱型平底探头,采用0.5 mm的形变量进行硬度测定,单位为g cm⁻²。

1.3 种皮总木质素含量测定

利用巯基乙酸法^[15]测定石榴籽粒种皮中的总木质素含量。每个品种随机选取3个石榴果实,剥离出籽粒,任意取100个籽粒,去除假种皮、种仁,仅留下种皮部分,研磨至粉末。称取2 mg种皮粉末至2 mL离心管,加入1.5 mL 2 mol L⁻¹ HCl和0.3 mL 巯基乙酸,95℃培养4 h,轻微震荡;样品冰上迅速冷却,在13225×g下离心10 min,弃上清液;沉淀用蒸馏水冲洗3次,加入1 mL 0.5 mol L⁻¹的NaOH在室温下震荡18 h;13225×g悬浮离心10 min,上清液小心转入2 mL离心管;沉淀悬浮于0.5 mL 0.5 mol L⁻¹的NaOH,用力混匀,离心取上清液;两次上清液合并与0.3 mL浓盐酸混合置于4℃下4 h,离心,弃上清液,沉淀用1 mL 0.5 mol L⁻¹的NaOH溶解,溶液在280 nm处测定吸光值,以0.5 mol L⁻¹的NaOH作为空白对照。将木质素标准品配制成0、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25 mg mL⁻¹共6个浓度梯度,测定其OD值,绘制标准曲线,求得线性回归方程,每个样品3次重复。将样品的OD值代入线性回归方程中,求得样品的木质素质量(mL)。木质素含量的计算公式为 $C=m_1/M \times 100\%$,式中, m_1 为样品木质素的质量, M 为样品质量。

1.4 PgCOMT的克隆和生物信息学分析

采用改良 CTAB 法^[16]提取‘红玉石籽’种皮(去除假种皮和种仁)的总 RNA, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测其质量。参照 TaKaRa 的 M-MLV 反转录试剂盒说明书合成 cDNA 的第一链。根据 Clontech 公司的 BD SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书分别合成 3' cDNA 和 5' cDNA。

根据已知 COMT 基因的保守序列设计简并引物 COMT-F1: 5'-AGGTCCTYATGGAGAGCTGGTA-3' 和 COMT-R1: 5'-GTCGCTCCAGTCGTGGAGGATC-3', 以‘红玉石籽’种皮 cDNA 为模板, PCR 反应体系为 25 μ L, 反应程序为: 94℃ 3 min; 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 共 30 个循环。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收, 连接至 pGEM-T 载体, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH-5 α , 挑取单菌落送至上海生工生物公司进行测序。

根据目的片段序列设计 3' RACE 扩增的特异引物 3' GSP1: 5'-GACATACAAGGGCTTTGAGG-GC-3' 和 3' GSP2: 5'-GCCGTGCTCAGTATGATCG-TGG-3', 分别与通用引物 UPM: 5'-CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCAGTGGTATCAACGC-AGAGT-3' 和 NUP: 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' 进行 3' cDNA 末端扩增。设计 5' RACE 扩增的特异引物 5' GSP1: 5'-CCGACATTC-CCCTATTGAAGACCT-3' 和 5' GSP2: 5'-CGAACGCAGTCATTCCGTAGGC-3', 分别与通用引物 UPM 和 NUP 进行 5' cDNA 末端扩增。操作步骤参照 BD SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书完成。PCR 产物经回收连接到 pGEM-T 载体后转化至大肠杆菌 DH-5 α , 挑取单菌落送上海生工生物公司进行测序。

利用 DNASTAR 软件对获得的序列进行初步分析、比对与拼接, 得到 COMT 基因全长序列, 运用 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找和翻译开放阅读框(Open Reading Frame, ORF); ProtParam 软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)分析编码蛋白的氨基酸序列组成、分子量、等电点等理化性质; 运用 NCBI 数据库中的 BLASTX 对氨基酸序列进行同源性搜索和比对; 氨基酸多重序列比较采用 DNAMAN 软件。

1.5 PgCOMT的表达分析

分别以 6 个品种的石榴种皮 cDNA 为模板, 以

石榴组成型表达基因 *Actin* 为内参, 设计荧光引物 PgACTIN-PF: 5'-AGTCCTCTTCCAGCCATCTC-3' 和 PgACTIN-PR: 5'-ACTGAGCACAATGTTTCA-3', PgCOMT-PF: 5'-GTGCTGCGCTTTCAACA-CCTAC-3' 和 PgCOMT-PR: 5'-CGTCCCATTAAACC-ACCACAAGA-3', 根据 TaKaRa 公司的 SYBR™ Premix Ex Taq™ 试剂盒说明书, 使用 ABI STEPONE 荧光定量 PCR 仪对 PgCOMT 基因进行实时定量 PCR 检测。PCR 扩增程序为: 95℃ 预变性 30 s; 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火 1 min, 共 40 个循环, 每个样品 4 次重复检测, 使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法, 求得待测样品相对表达量。

以花后 20、40、60、80、100 和 120 d 的‘红玉石籽’种皮 cDNA 为模板, 以石榴 *Actin* 为内参基因, 按照同样的方法检测 PgCOMT 基因在果实不同发育时期的表达量。

2 结果和分析

2.1 石榴不同品种籽粒硬度和种皮总木质素含量分析

采用 Texture Analyser 质构仪 P/36R 圆柱型平底探头, 在 0.5 mm 形变量下, 6 个品种的籽粒硬度不同, ‘红玉石籽’、‘白玉籽’和‘粉皮’硬度较大, 分别为 4435、4237、4123 g cm⁻²; ‘会理软籽’和‘蒙自甜石榴’的居中, 分别为 3859、3515 g cm⁻²; ‘突尼斯软籽’的最小, 仅为 1991 g cm⁻² (图 1)。

用巯基乙酸法测定 6 个品种的石榴种皮总木质素含量(图 2), ‘红玉石籽’、‘白玉籽’和‘粉皮’种皮总木质素含量较高, 分别为 9.25%、9.25% 和 8.66%; ‘会理软籽’和‘蒙自甜石榴’的相近, 分别为 7.57% 和 7.99%; ‘突尼斯软籽’的最低, 仅为 6.36%。

采用 SPSS 统计软件进行相关性分析, 结果表明籽粒硬度与种皮总木质素之间呈正相关性, 相关系数为 0.9246。

2.2 PgCOMT基因的克隆

根据其他物种 COMT 基因的保守序列设计简并引物, 以‘红玉石籽’种皮 cDNA 为模板, 经 PCR 扩增克隆得到一条长 419 bp 的目的片段(图 3: A)。经测序和比对初步确定其是 COMT 基因片段。根据此片段, 参照 BD SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit 试剂盒说明书分别设计 3' RACE 和 5' RACE 引物进行 cDNA 末端的扩增。3'

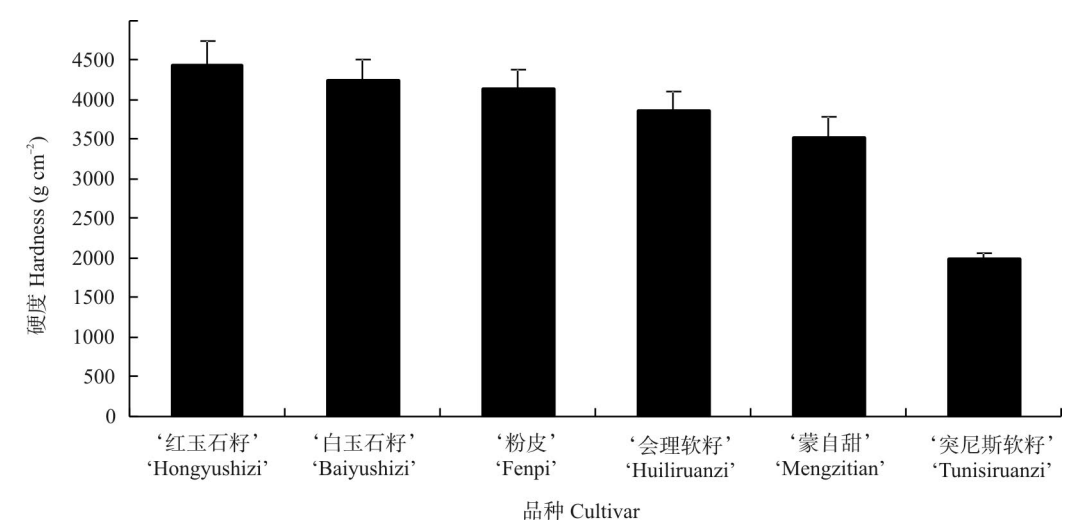


图 1 不同品种石榴籽粒硬度
Fig. 1 Seed hardness of different pomegranate cultivars

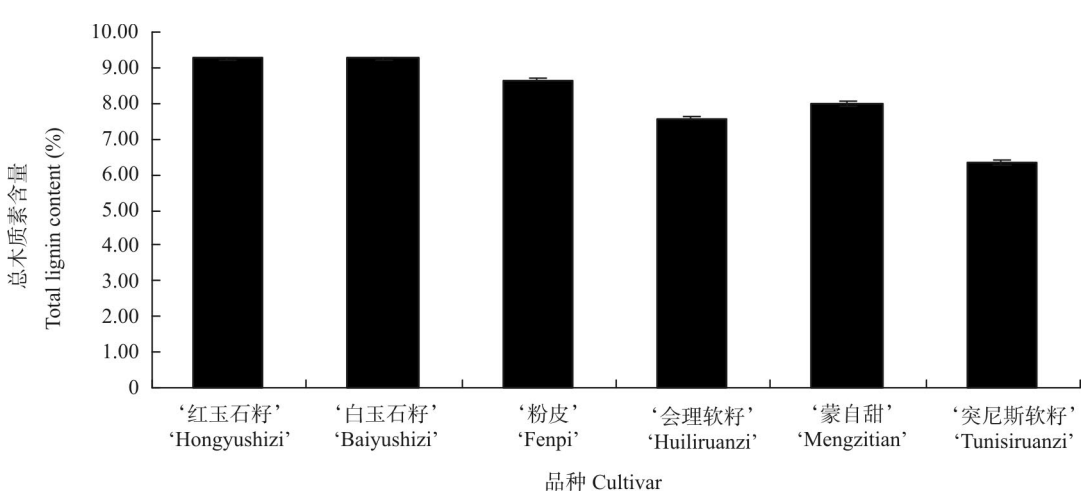


图 2 不同品种石榴籽粒种皮总木质素含量
Fig. 2 Total lignin content in seed coat of different pomegranate cultivars

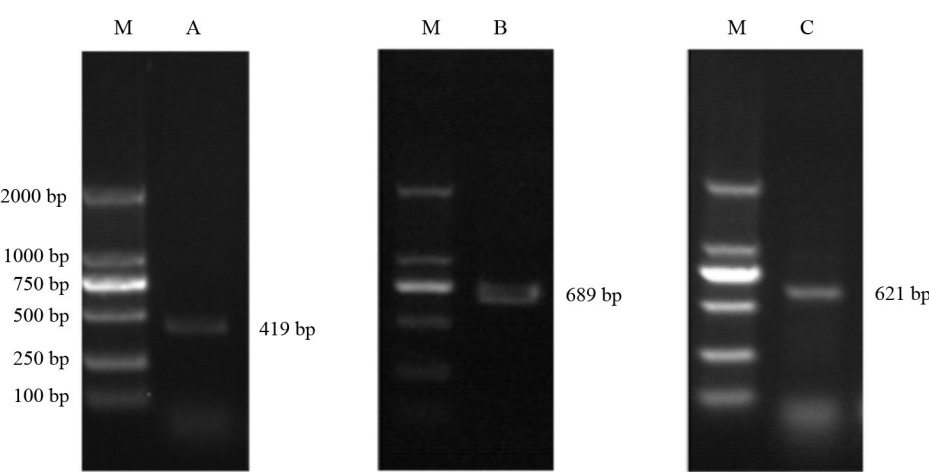


图 3 *COMT* 基因的目的片段(A)、3' RACE (B)和 5' RACE (C)
Fig. 3 PCR of fragment (A), 3' RACE (B) and 5' RACE (C) of *COMT*

RACE 获得 1 条特异谱带(图 3: B), 经回收克隆并测序, 该片段的长度为 689 bp, 其中包含 37 个碱基的 polyA 尾巴和 3' 端接头引物序列, 说明已经到达 3' 末端。5' RACE 获得 1 条特异谱带(图 3: C), 测序表明该片段长度为 621 bp, 其 5' 端有起始密码子。

将获得的两端序列与目的片段序列进行拼接, 得到 1 条完整的 cDNA 序列, 长度为 1456 bp。将其命名为 *PgCOMT*, GenBank 登录号为 KJ713968。

2.3 *PgCOMT* 基因的生物信息学分析

通过 NCBI 的 ORF Finder 分析, *PgCOMT* 基

因的全长 cDNA 为 1456 bp, 其中包含 5' 非编码区 116 bp, 3' 非编码区 227 bp 和开放阅读框 1113 bp, 编码一个含有 370 个氨基酸的蛋白质, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TAA(图 4)。

采用 ProtParam 分析其理化性质, 推测 *PgCOMT* 的分子式为 $C_{1804}H_{2846}N_{464}O_{527}S_{26}$, 相对分子量为 40300.8, 等电点(pI)为 5.61。将 *PgCOMT* 基因编码的氨基酸序列进行同源性分析(图 5), 结果表明, 该氨基酸序列与很多植物 COMT 的氨基酸序列具有较高的同源性。*PgCOMT* 的氨基酸序列与仙女扇(*Clarkia breweri*) CbCOMT 的同源性最高, 为 90.0%, 与蓖麻(*Ricinus communis*)、

```

1      AAGCAGTGGTATCAACGAGAGTACGCGGGGCGCTTTGCGCCATCCTCTCCTTTGTTCTT
61     CCCTTCTTCTCCGCTTCAACCTCTCAGCCTTCTTCACTCTCCCTCACCGGAAATGG
      M
121    GCTCCACCGGGCAATCAGCGGAGACCCAGATGACCCCGACCCAGGTCTCCGACGAGGAGG
      G S T G Q S A E T Q M T P T Q V S D E E
181    CCAACCTCTTCGCTATGAGCTGGCCAGCGCCTCGTCTCTCCCATGCTCTCAAGGCCG
      A N L F A M Q L A S A S V L P M V L K A
241    CCCTGGAGCTCGACCTCCTCGAGATCATGGCAAGTCATGCCCCGCCAGAGGCGGTACA
      A L E L D L L E I M A K S C P A R G G Y
301    TCTCCTCTCCGACATCGCCGTCAGCTCCCGACCATCAACCCGAGGCCCCCGTACGCG
      I S S S D I A V Q L P T I N P E A P V T
361    TCGACCGCGTCTCCGCTCTCTGGCCAGCTACTCGTCTCAGATGCAAGCTCAGGGACC
      L D R V L R L L A S Y S V L T C K L R D
421    TCCCCGATGGGAAGGTCGAGAGGCTCTACGGGCTCGGCCCGTCTGCAAGTCTTGTACGA
      L P D G K V E R L Y G L G P V C K F L T
481    AGAACGAGGACGGCGTATCGATCGCTCCGCTCTGCTCATGAACAGGACAAGGTCTCTCA
      K N E D G V S I A P L C L M N Q D K V L
541    TGGAGAGCTGGTATCACTTGAAGATGCGATTCTCGAAGGTGGAATCCCGTTCAACAAAG
      M E S W Y H L K D A I L E G G I P F N K
601    CCTACGGAATGACTGCGTTCGAGTACCATGGCACTGATCCCCGATTCAACAAGGTCTTCA
      A Y G M T A F E Y H G T D P R F N K V F
661    ATAGGGGAATGTCGATCACTCTACTATTACCATGAAGAAGATCCTCGAGACATACAAGG
      N R G M S D H S T I T M K K I L E T Y K
721    GCTTTGAGGGCCTGAACACAATTGTGATGTCGGTGGTGAACCGGAGCCGTGCTCAGTA
      G F E G L N T I V D V G G T G A V L S
781    TGAICGTGGCTAAGTACCCATCGATCAAGGGCACTCAACTTCGACCTGCCACAGTGAATCG
      M I V A K Y P S I K G I N F D L P H V I
841    AAGATGCTCCTTCTTTGCGGGTGTGGAGCATGTCGAGGGGACATGTTTGTGACGCTTC
      E D A P S L P G V E H V G G D M F V S V
901    CGAAAGGAGATGCCATCTTCAATGAAGTGGATATGTCACGACTGGAGCGACGAGCACTGCC
      P K G D A I F M K W I C H D W S D E H C
961    TCAAGTTCCTCAAGAACTGCTACGCGCGCTTCCCGACCATGGGAAGGTGATTGTGGCTG
      L K F L K N C Y A A L P D H G K V I V A
1021   AGTGCATCTCTCCATTGTCTCTGACCCGAGCCTTGCACCAAGGGAGTGATCCACATCG
      E C I L P L S P D P S L A T K G V I H I
1081   ACTGCATCATGTTGGCCACAACCCAGGCGGGAAGGAGAGGACAGAGAAGGAGTTCGAGG
      D C I M L A H N P G G K E R T E K E F E
1141   CCTTGGCTAAGGGGGCGGGAATCGAAGGGTTCGCGTGGCGTGTGCGCTTTCAACACCT
      A L A K G A G F E G F R V A C C A F N T
1201   ACGTGATGGAGTTCCTCAAGAAGGCTTAAAAATTTCCGGGATTTCGGGTACATATACAAG
      Y V M E F L K K A *
1261   CATTGATTGCTGGTTCCTTGTGGTGAATGGGACGCTTCTTGTCTGATGGAGTTTTCTT
1321   ATGTATTGGTAATCTTAGTATTCTTCTTACAAAAAGAAAAATAATAAGAAAAAGAGTG
1381   ATTTTGTGCTGCTAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGAAAAAAGTACTCTGCG
1441   GTTGATACCACTGCTT

```

图 4 *PgCOMT* 的核苷酸序列及推测的氨基酸序列。ATG: 起始密码子; TAA: 终止密码子。

Fig. 4 cDNA sequence of *PgCOMT* and deduced amino acid sequence. ATG and TAA present start codon and stop codon, respectively.

CbCOMT	023760.1	MGSTG---AQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAVTSPTTASQLP	TNPDPAPVMDRLRLRLASYSV	94
RcCOMT	XP_002525818.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	SAFLSPSEIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSV		89
PdCOMT	Q43609.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPPTIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
PpCOMT	XP_007218167.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPPTIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
RchCOMT	BAC78827.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPNDIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
EcCOMT	AAD50440.1	MGSTGS---ETQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPDEIAAQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSV		90
EgCOMT	CAA52814.1	MGSTGS---ETQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPDEIAAQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSV		90
FvCOMT	XP_004307899.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPNDIASQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSI		89
JcCOMT	ACT87981.1	MGSTAE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPPTIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
BpCOMT	ACB41351.2	MGSTAE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPSEIASQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSV		89
BnCOMT	ABG27066.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPDEIAAQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSV		89
BplCOMT	AGG91492.1	MGSTFE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPSEIASQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSV		89
MdCOMT	ABI54119.1	MGSTFE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSPDEIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
PtCOMT	AF278575.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSTSEIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
PtrCOMT	Q00763.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSTSEIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
PkCOMT	Q43046.1	MGSTGE---TQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSTSEIASQLPTKNPDAPVMDRLRLRLASYSI		89
PgCOMT	KJ713968	MGSTGSAETQMTPTQVSDEEANLFAMQLASASVLPVWLKAAETDLLEIMAKGPFHGS	CAFLSTSSIAVQLPTNPDPAPVMDRLRLRLASYSV		94
CbCOMT	023760.1	MTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		189
RcCOMT	XP_002525818.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		189
PdCOMT	Q43609.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		189
PpCOMT	XP_007218167.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		189
RchCOMT	BAC78827.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		189
EcCOMT	AAD50440.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		185
EgCOMT	CAA52814.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		185
FvCOMT	XP_004307899.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
JcCOMT	ACT87981.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
BpCOMT	ACB41351.2	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
BnCOMT	ABG27066.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
BplCOMT	AGG91492.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
MdCOMT	ABI54119.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
PtCOMT	AF278575.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
PtrCOMT	Q00763.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
PkCOMT	Q43046.1	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		184
PgCOMT	KJ713968	LTCSLRRLPDGKVERLYGLAPVCKFLTKNEDGVSIAPLCLMNQDKVLMESWYLLKDAVLGGIPFNKAYGMTAF	YHGTDPRFNKVFNRGMSDHS		189
CbCOMT	023760.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	284
RcCOMT	XP_002525818.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
PdCOMT	Q43609.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
PpCOMT	XP_007218167.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
RchCOMT	BAC78827.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
EcCOMT	AAD50440.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	280
EgCOMT	CAA52814.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	280
FvCOMT	XP_004307899.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
JcCOMT	ACT87981.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
BpCOMT	ACB41351.2	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
BnCOMT	ABG27066.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
BplCOMT	AGG91492.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
MdCOMT	ABI54119.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
PtCOMT	AF278575.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
PtrCOMT	Q00763.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
PkCOMT	Q43046.1	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	279
PgCOMT	KJ713968	TITMKKILETYKGFEGLTSLVDVGGGTGAVLNMIVSKYPSIKGINFDLPHVIEDAP	SYPGVEHVGGDMFVSVPKGAIFMKWI	CHDWSDEHCLKF	284
CbCOMT	023760.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			370
RcCOMT	XP_002525818.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
PdCOMT	Q43609.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
PpCOMT	XP_007218167.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
RchCOMT	BAC78827.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
EcCOMT	AAD50440.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			366
EgCOMT	CAA52814.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			366
FvCOMT	XP_004307899.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
JcCOMT	ACT87981.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
BpCOMT	ACB41351.2	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
BnCOMT	ABG27066.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
BplCOMT	AGG91492.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
MdCOMT	ABI54119.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
PtCOMT	AF278575.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
PtrCOMT	Q00763.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
PkCOMT	Q43046.1	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			365
PgCOMT	KJ713968	LKNCYDALPANGKVIVABCILPVPADTSLATKGVVHIDVIMLAHNPGGKERTKEFEALAKGAGGQGVVCCAFNTYVMEFLKKA			370

图 5 PgCOMT与其他植物COMT的氨基酸序列比较。CbCOMT: 仙女扇; RcCOMT: 蓖麻; PdCOMT: 扁桃; PpCOMT: 毛桃; RchCOMT: 月季; EcCOMT: 赤桉; EgCOMT: 冈尼桉; FvCOMT: 野草莓; JcCOMT: 麻风树; BpCOMT: 垂枝桦; BnCOMT: 苎麻; PtCOMT: 白桦; MdCOMT: 苹果; PkCOMT: 杂交白杨。

Fig. 5 Amino acid alignment of PgCOMT with COMT in other plants. CbCOMT: *Clarkia breweri*; RcCOMT: *Ricinus communis*; PdCOMT: *Prunus dulcis*; PpCOMT: *P. persica*; RchCOMT: *Rosa chinensis*; EcCOMT: *Eucalyptus camaldulensis*; EgCOMT: *E. gunnii*; FvCOMT: *Fragaria vesca*; JcCOMT: *Jatropha curcas*; BpCOMT: *Betula pendula*; BnCOMT: *Boehmeria nivea*; BpCOMT: *Betula platyphylla*; MdCOMT: *Malus domestica*; PtCOMT: *Populus tomentosa*; PkCOMT: *P. kitakamiensis*.

扁桃(*Prunus dulcis*)、毛桃(*Prunus persica*)、赤桉(*Eucalyptus camaldulensis*)、垂枝桦(*Betula pendula*)、月季(*Rosa chinensis*)、野草莓(*Fragaria ananassa*)、冈尼桉(*E. gunnii*)、麻风树(*Jatropha curcas*)、白桦(*B. platyphylla*)、苕麻(*Boehmeria nivea*)、苹果(*Malus pumila*)、毛白杨(*Populus tomentosa*)、杂交白杨(*Populus kitakamiensis*)和毛果杨(*P. trichocarpa*)的分别为 87.30%、87.0%、87.0%、86.6%、86.0%、85.9%、85.9%、85.7%、85.5%、85.5%、85.1%、84.9%、83.8%、83.8% 和 83.5%。

2.4 不同品种PgCOMT的表达分析

PgCOMT 在 6 个石榴品种种皮中均有表达,在

‘红玉石籽’中的表达量最高,其次是‘粉皮’、‘会理软籽’、‘蒙自甜’和‘突尼斯软籽’,与石榴籽粒硬度和总木质素含量的大小较为一致。但‘白玉石籽’的表达量最低。以‘粉皮’的表达量为 1,‘红玉石籽’的是其 1.26 倍,‘突尼斯软籽’石榴的表达量仅为‘粉皮’的 0.16 (图 6)。

2.5 不同发育时期PgCOMT的表达分析

荧光定量 PCR 分析 PgCOMT 在‘红玉石籽’种皮不同发育时期的表达情况,结果表明(图 7),PgCOMT 在花后 20 d 的种皮中表达量最高,且随着果实的发育, PgCOMT 表达量逐渐下降,在花后 120 d 的 PgCOMT 表达量反而上升。

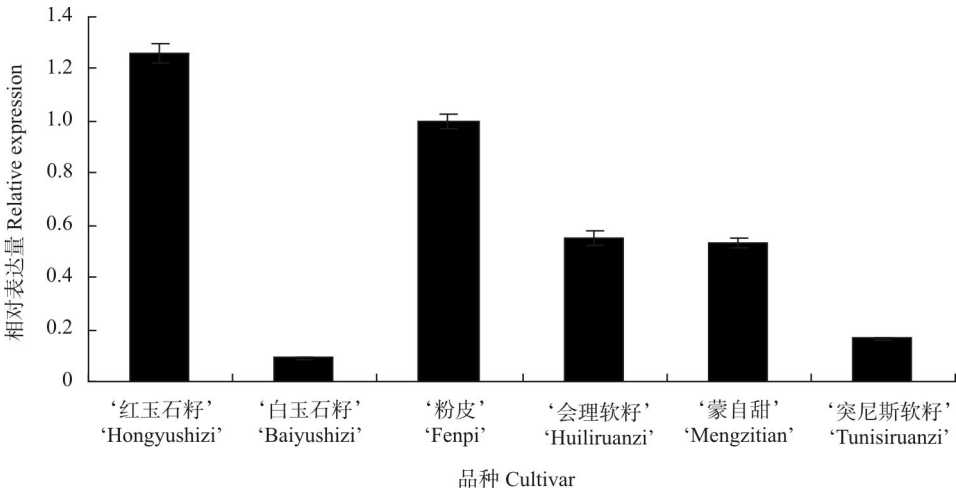


图 6 PgCOMT 在不同品种石榴种皮中的相对表达量
Fig. 6 Relative expression of PgCOMT in seed coat of different pomegranate cultivars

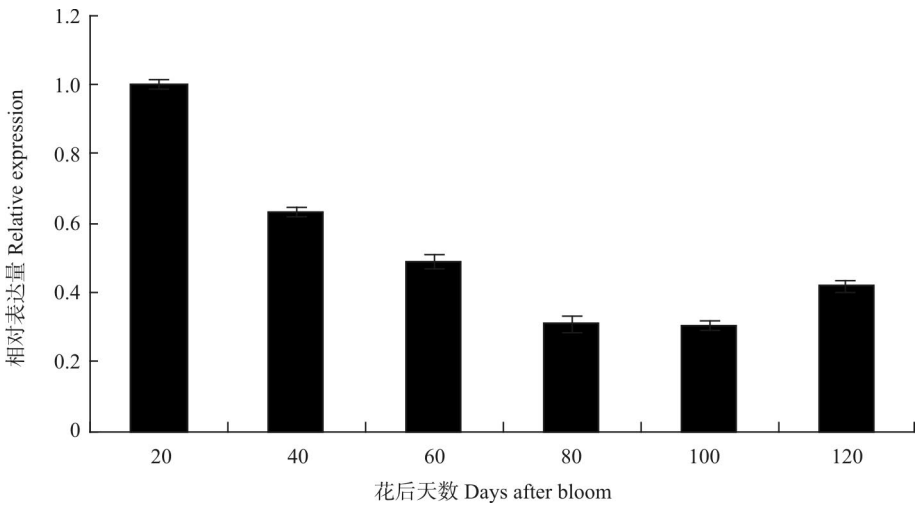


图 7 PgCOMT 在石榴种皮不同发育时期的相对表达量
Fig. 7 Relative expression of PgCOMT in pomegranate seed coat at different developmental stages

3 讨论

石榴自古就有软籽和硬籽之分,但如何划分目前却无明确标准,籽粒硬度也仅凭模糊的“软”和“硬”等词进行界定。Jalikor 等^[17]曾测定多个品种的石榴籽粒硬度,并对其进行了硬度划分,但其所测定的为干种子,并不能真实反映新鲜石榴在食用中的硬度。陆丽娟等^[3]用 YD-1 型果实硬度计测定中国多种鲜食品种的硬度,一定程度上反映了我国部分鲜食品种的硬度,本研究中利用 Texture Analyser 质构仪测定成熟鲜籽硬度,符合人们通常的鲜食口感和对于鲜食石榴的硬度判定,且能有效避免人为操作误差对于实验结果的影响,可信度高。

石榴硬度产生机理比较复杂,山东农学院在枣庄的调查发现石榴树随着更新次数的增加,果实种子有退化变软现象^[18]。陆丽娟等^[3]在研究中国代表性石榴品种的硬度时指出石榴种子硬度性状可能是多基因控制,且可能存在主效基因,同时发现光照、树体营养等环境因素对种子硬度也具有一定影响。Frczek 等^[19]通过对不同植物种子的种皮厚度与硬度进行测定,认为种皮厚度是种子硬度产生的一个主要因素。本研究首次通过测定 6 个石榴品种籽粒的硬度和种皮总木质素含量,发现两者呈显著正相关性。

木质素是由一组相关联的苯基丙烷单元-木质素单体聚合而成,木质素单体的合成过程极其复杂,存在多基因、多途径交互作用^[6]。COMT 是其合成途径中一个重要的甲基转移酶,参与 S-木质素的合成^[20-21]。本研究从石榴籽粒中克隆出一个 COMT 基因,经核酸和氨基酸序列比对,发现其与已知的许多物种中的 COMT 基因具有很高的同源性。定量结果表明 *PgCOMT* 在‘红玉石籽’、‘粉皮’、‘会理软籽’、‘蒙自甜’和‘突尼斯软籽’石榴种皮中的表达量的高低与石榴籽粒硬度及总木质素含量大小较为一致,而‘白玉石籽’除外。在石榴种皮的发育进程中, *PgCOMT* 的表达量呈先下降后上升的趋势。木质素的生物合成受木质素合成途径中多个酶基因、转录调控因子及各种环境因子的影响^[22],对于石榴种皮木质素的生物合成尚需进一步研究。

籽粒硬度是石榴一个重要的品质因素,本研究初步明确了石榴籽粒硬度与种皮总木质素含量呈

正相关,同时克隆得到了石榴木质素生物合成途径中的一个关键基因 *COMT* 并分析了其表达特性。研究结果为深入了解和调控石榴软籽性状奠定了基础。

参考文献

- [1] Bi X F, Li Y. Study on chemical composition and health functions of pomegranate [J]. Mod Agri Sci Techn, 2010, (22): 356–357, 360.
毕晓菲, 李勇. 石榴化学成分及其保健功能的研究进展 [J]. 现代农业科技, 2010, (22): 356–357, 360.
- [2] Abdolkarim Z, Zabihollah Z, Reza F, et al. A mechanical method of determining seed-hardness in pomegranate [J]. J Crop Improv, 2013, 27(4): 444–459.
- [3] Lu L J, Gong X M, Zhu L W. Study on seed hardness of pomegranate cultivars in China [J]. J Anhui Agri Univ, 2006, 33(3): 356–359.
陆丽娟, 巩雪梅, 朱立武. 中国石榴品种资源种子硬度性状研究 [J]. 安徽农业大学学报, 2006, 33(3): 356–359.
- [4] Hang Z Q, Han Q B, Xu J S. Components analysis of *Punica granatum* L. seed [J]. J Anhui Agri Sci, 2010, 38(33): 18740–18741.
杭志奇, 韩清波, 许景松. 石榴籽成分分析 [J]. 安徽农业科学, 2010, 38(33): 18740–18741.
- [5] Dalimov D N, Dalimova G N, Bhatt M. Chemical composition and lignins of tomato and pomegranate seeds [J]. Chem Nat Compd, 2003, 39(1): 37–40.
- [6] Liu X N, Liu X M, Yang C P, et al. Progress in lignin biosynthesis [J]. Chin J Biotechn, 2007, 27(3): 120–126.
刘晓娜, 刘雪梅, 杨传平, 等. 木质素合成研究进展 [J]. 中国生物工程杂志, 2007, 27(3): 120–126.
- [7] van Acker R, Vanholme R, Storme V, et al. Lignin biosynthesis perturbations affect secondary cell wall composition and saccharification yield in *Arabidopsis thaliana* [J]. Biotechn Biofuels, 2013, 6(1): 46–62.
- [8] Li Y, Gu H, Qi C K. Expression of lignin synthesis key genes of *F5H*, *4CL* and *COMT* on lodging resistance of *Brassica napus* L. [J]. J Oil Crop Sci, 2013, 35(1): 24–28.
李扬, 顾慧, 戚存扣. 甘蓝型油菜木质素合成关键基因 *F5H*、*4CL* 和 *COMT* 的定量表达 [J]. 中国油料作物学报, 2013, 35(1): 24–28.
- [9] Li X P, Gao Z M, Peng Z H, et al. Cloning and characterization of *COMT* gene from *Bambusa oldhamii* [J]. Sci Silv Sin, 2007, 20(5): 722–725.
李雪平, 高志民, 彭镇华, 等. 绿竹咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (*COMT*) 的克隆及相关分析 [J]. 林业科学研究, 2007, 20(5): 722–725.
- [10] Huang C Q, Guo A P, Zhang X Y, et al. cDNA cloning and sequence analysis of *COMT* gene from ramie [J]. Chin Agri Sci

- Bull, 2008, 24(5): 386–391.
- 黄春琼, 郭安平, 章霄云, 等. 苎麻COMT基因的克隆及序列分析 [J]. 热带农业科学, 2008, 24(5): 386–391.
- [11] Ni Z Y, Lü M, Li B, et al. Cloning and characterization of COMT genes from *Gossypium hirsutum* L. [J]. Sci Agri Sin, 2010, 43(6): 1117–1126.
- 倪志勇, 吕萌, 李波, 等. 棉花咖啡酸-O-甲基转移酶基因的克隆及特征分析 [J]. 中国农业科学, 2010, 43(6): 1117–1126.
- [12] Song Y, Wang D H, Wu J B, et al. Cloning and analysis of caffeic acid O-methyltransferase gene (*SmCOMT1*) from *Salvia miltiorrhiza* Bge [J]. Bot Res Bull, 2012, 32(4): 437–443.
- 宋银, 王东浩, 吴锦斌, 等. 丹参咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (*SmCOMT1*)的克隆及其分析 [J]. 植物研究, 2012, 32(4): 437–443.
- [13] Zhao H Y, Wei J H, Zhang J Y, et al. Inhibitor of the biosynthesis and regulation of plant lignin by COMT and CCoAOMT [J]. Chin Sci Bull, 2002, 47(8): 604–607.
- 赵华燕, 魏建华, 张景昱, 等. 抑制COMT与CCoAOMT调控植物木质素的生物合成 [J]. 科学通报, 2002, 47(8): 604–607.
- [14] Li X P, Peng Z H, Gao Z M, et al. The effects of depressing expression of COMT on lignin synthesis of transgenic tobacco [J]. Mol Plant Breed, 2012, 10(6): 689–692.
- 李雪平, 彭镇华, 高志民, 等. 抑制COMT基因表达对转基因烟草木质素合成的影响 [J]. 分子植物育种, 2012, 10(6): 689–692.
- [15] Dyckmans J, Flessa H, Brinkmann K, et al. Carbon and nitrogen dynamics in acid detergent fibre lignins of beech (*Fagus sylvatica* L.) during the growth phase [J]. Plant Cell Environ, 2002, 25(4): 469–478.
- [16] Wang Z W, Qu S C, Zhang Z, et al. A fast method for total RNA extraction from the tissue culture material of *Malus sp.* [J]. J Fruit Sci, 2004, 21(4): 385–387.
- 王壮伟, 渠慎春, 章镇, 等. 苹果属RNA高效快速提取新方法 [J]. 果树学报, 2004, 21(4): 385–387.
- [17] Jalikop S H, Kumar P S. Use of soft, semi-soft and hard seeded types of pomegranate (*Punica granatum*) for improvement of fruit attributes [J]. Ind J Agri Sci, 1998, 68(2): 87–91.
- [18] Qu Z Z. Fruit Tree Cultivation [M]. 2nd ed. Beijing: Chinese Agriculture Publication, 2001: 444–445.
- 曲泽洲. 果树栽培学 [M]. 第2版. 北京: 中国农业出版社, 2001: 444–445.
- [19] Frczek J, Hebda I, Dlipek Z, et al. Effect of seed coat thickness on seed hardness [J]. Can Biosyst Eng, 2005, 47(4): 1–5.
- [20] Li B, Ni Z Y, Wang J, et al. Advances on key enzyme gene (COMT) involved in lignin biosynthesis [J]. Mol Plant Breed, 2010, 8(1): 117–124.
- 李波, 倪志勇, 王娟, 等. 木质素生物合成关键酶咖啡酸-O-甲基转移酶基因 (COMT) 的研究进展 [J]. 分子植物育种, 2010, 8(1): 117–124.
- [21] Ma Q H, Xu Y. Characterization of a caffeic acid 3-O-methyltransferase from wheat and its function in lignin biosynthesis [J]. Biochimie, 2008, 90(3): 515–524.
- [22] Li J H, Zhang Q W, Niu Z T, et al. Advances in study of lignin biosynthesis and genetic engineering modification [J]. World For Res, 2007, 20(1): 29–37.
- 李金花, 张绮纹, 牛正田, 等. 木质素生物合成及其基因调控的研究进展 [J]. 世界林业研究, 2007, 20(1): 29–37.