

采后龙眼果肉自溶过程中 *PME* 基因的表达分析

赵明磊¹, 邝健飞², 陆旺金¹, 陈建业^{1*}

(1. 华南农业大学园艺学院 广东省果蔬保鲜重点实验室, 广州 510642; 2. 中国科学院华南植物园, 广州 510650)

摘要: 采用 RT-PCR 和 RACE-PCR 相结合的方法, 研究了果胶甲酯酶基因 (*PME*) 表达与采后龙眼 (*Dimocarpus longan* Lour.) 果肉自溶的关系。从龙眼果实中分离得到 3 个包含 3' 非翻译区的 *PME* 基因片段, 分别命名为 *DIPME1*、*DIPME2* 和 *DIPME3*, 其推导的氨基酸序列与多种植物的 *PME* 蛋白有较高的同源性。采用半定量 RT-PCR 的方法分析了常温(22℃)和低温(4℃)贮藏下的龙眼果肉自溶过程中 3 个 *PME* 基因的表达特征, 结果表明: 常温贮藏下, 果肉自溶过程中 *DIPME1* 的表达逐渐减弱, *DIPME2* 和 *DIPME3* 的表达先增高后降低; 低温贮藏下, 果肉自溶过程中 *DIPME1* 和 *DIPME3* 的表达先增强后降低, 而 *DIPME2* 的表达持续减弱。这些表明, 龙眼果实 *PME* 基因在常温和低温下的果肉自溶中可能具有不同的响应机制, 常温下可能与 *DIPME2* 和 *DIPME3* 的表达有关, 而低温下可能与 *DIPME1* 和 *DIPME3* 的表达有关。

关键词: 龙眼; 果胶甲酯酶; 基因表达; 果肉自溶

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2011)02-0135-07

doi: 10.3969/j.issn.1005-3395.2011.02.006

Expression Analysis of Pectin Methylesterase Genes in Postharvest Longan Fruit during Aril Breakdown

ZHAO Ming-lei¹, KUANG Jian-fei², LU Wang-jin¹, CHEN Jian-ye^{1*}

(1. Guangdong Key Laboratory for Postharvest Science, College of Horticultural Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; 2. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China)

Abstract: The relationship between pectin methylesterase (*PME*) genes expression and aril breakdown of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) fruit was studied by using RT-PCR and RACE-PCR methods. Three *PME* cDNA fragments containing 3' UTR (untranslated region), named as *DIPME1*, *DIPME2* and *DIPME3*, respectively, were cloned from longan fruits. The deduced amino acid sequences of the three *DIPMEs* genes shared high homology with those of other plants. Moreover, their expression profiles were studied by using semiquantitative RT-PCR during aril breakdown of longan fruits. When stored at room temperature, the expression of *DIPME1* gradually weakened during aril breakdown of longan fruits, while *DIPME3* and *DIPME2* transcripts increased progressively and then decreased. However, accumulations of *DIPME1* and *DIPME3* transcripts enhanced firstly, then decreased stored at low temperature (4℃), and *DIPME2* transcript continuously decreased. These suggested that the expression patterns of *DIPMEs* were different during aril breakdown of longan fruits, *DIPME2* and *DIPME3* might be involved in the aril breakdown of longan fruits stored at room temperature, while *DIPME1* and *DIPME3* did at low temperature.

Key words: Longan; Pectin methylesterase; Gene expression; Aril breakdown

果实的成熟、衰老常伴随细胞壁结构的变化和成分的酶促分解过程, 果胶甲酯酶 (pectin

methylesterase, *PME*) 是细胞壁代谢的关键酶之一, 可使植物细胞壁组分中的果胶脱甲基, 然后在多聚

收稿日期: 2010-06-22

接受日期: 2010-09-22

基金项目: 广东省岭南水果产业技术体系项目([2009]356); 广东省自然科学基金团队项目(06200670)资助

作者简介: 赵明磊(1985 ~), 男, 河南南阳人, 硕士, 研究方向为果品采后生理及分子生物学, email: zhaominglei503@126.com.

* 通讯作者 Corresponding author, email: chenjianye@scau.edu.cn

半乳糖醛酸酶(polygalacturonase, PG)和果胶裂解酶(pectatelyase)等作用下降解^[1]。研究表明,植物中 PME 常以不同异构体的形式参与各种生理过程,如细胞壁的伸展^[2]、裂果及果实的成熟软化等^[3-6]。番茄(*Lycopersicon esculentum*)、梨(*Pyrus* sp.)、桃(*Prunus persica*)、冬枣(*Ziziphus jujuba*)、柑橘(*Citrus reticulata*)等果实在快速软化衰老之前出现 PME 活性高峰,表明 PME 与果实成熟衰老密切相关^[7-8]。

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)是我国南方主要的亚热带果树之一,果实成熟于高温季节,采后生理代谢旺盛,不耐贮藏和运输,除了果皮迅速褐变外,常温下采后 3~4 d 果肉出现快速软化、流汁和腐烂现象,而果壳看似完整,称为“果肉自溶”^[9]。果肉自溶是龙眼果实采后常见的品质劣变现象之一,严重影响其食用品质和商品价值,是限制龙眼长期贮藏和远距离运销的主要因素之一^[10]。果肉自溶可能是龙眼采后果实衰老引起果肉细胞壁物质降解,导致果肉溶解、流汁^[10]。我们前期的研究表明细胞壁代谢相关的木葡聚糖内糖基转移酶(XET),内切-1,4- β -葡聚糖酶(EG)和扩张蛋白(Expansin)的基因表达与龙眼果肉自溶有关^[11-12]。而有关 PME 基因表达与龙眼果肉自溶的关系尚未见报道。分析龙眼果肉自溶过程中 DIPMEs 基因的功能及其调控机理,对于理解龙眼果实自溶机理,为生产上控制龙眼果肉自溶,延缓品质变化,提高保鲜、运销效果将具有一定的意义。为此,本研究在克隆龙眼果实 PME 基因片段的基础上,探讨在常温和低温贮藏下果肉自溶过程中 PME 基因的表达特征,从分子生物学水平上分析 PME 基因表达与龙眼果肉自溶的关系,以期控制龙眼果肉自溶,延缓品质劣变提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 材料和处理

实验材料为广东省普遍栽培的优质龙眼品种石硖(*Dimocarpus longan* Lour. ‘Shixia’),采自珠海市金果达果园,采后立即运回实验室,选取成熟度一致(8~9 成熟),无病虫害、无机械伤的果实,用 0.5 g L⁻¹施保功浸果 1 min 后晾干备用。之后随机地把龙眼果实分成 2 组,分别用打孔的聚乙烯薄膜(厚度为 0.04 mm)包装(每袋 30 个果)。第 1 组贮藏于 22℃ 恒温箱 7 d,每天取样。第 2 组贮藏于 4℃ 恒温箱 40 d,在贮藏的 0、2、5、10、15、20、25、30、35、

40 d 时取样,每次取样统计果肉自溶指数,并将果肉经液氮速冻后置于 -80℃ 贮存备用。

1.2 果肉自溶的评价

果肉自溶指数的统计参考 Zhong 等^[13]的方法,每次随机取 30 个果实,按照果肉自溶面积大小把果肉自溶程度分为 5 级。0 级:果肉有弹性、果肉无自溶;1 级:果肉变软、果肉自溶面积 < 1/4;2 级:果肉变软、流汁,1/4 ≤ 果肉自溶面积 < 1/2;3 级:果肉变软、流汁,1/2 ≤ 果肉自溶面积 < 3/4;4 级:果肉糜烂,果肉自溶面积 ≥ 3/4。果肉自溶指数 = Σ (果肉自溶级数 × 该级果数)/总果数。

1.3 PME 基因片段的分离

总 RNA 的提取 采用 Wan 和 Wilkins 的热硼酸法^[14]。反转录生成 cDNA 作为模板用于 PCR 扩增。

引物设计与合成 按照 GenBank 中登录的已知 PME 基因功能保守区域,设计简并引物。正向引物 PME-For 为 5'-CTTCTAAGCAYCARGCNG-TNG-3',反向引物 PME-Rev 为 5'-AATACTCCT-TCCANGGCKNC-3'。引物委托上海生工生物工程技术有限公司合成。

cDNA 片段的克隆 以反转录生成的 cDNA 为模板与 PME 基因的简并引物进行 PCR 扩增。PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 4 min;94℃ 变性 30 s,复性 30 s(复性温度依据引物而定)、72℃ 延伸 30 s(延伸时间根据片段长度而定),30 个循环;然后 72℃ 延伸 10 min。用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物,回收目的条带,连接在 pMD20-T 载体上,转化,测序,得到 3 个 PME 基因片段,并分别命名为 DIPME1、DIPME2 和 DIPME3。根据得到的 3 个 DIPME cDNA 片段序列,分别设计 3'端特异引物进行 RACE (Rapid amplification of cDNA ends)扩增,按照 3'-Full RACE Core Set Ver.2.0 (TaKaRa,日本)试剂盒说明书的方法操作。

1.4 半定量 RT-PCR 分析

提取的各样品总 RNA 经 DNAase 酶消化除去基因组 DNA 后,取 2 μ g 纯化的总 RNA,加入 M-MLV 反转录酶(Promega)和 oligo(dT)18 引物合成 cDNA 第一链,取 2 μ L 反应液用于半定量 RT-PCR 分析。根据 3 个龙眼 PME 基因 3'-端序列设计特异引物用于半定量 RT-PCR 分析。为防止扩增达到平台期,分别进行了 26、28、30、32 和 34 个循环

表 1 用于半定量 RT-PCR 分析的引物

Table 1 Primers used for semiquantitative RT-PCR analysis		
引物 Primers	序列 Sequence (5' ~ 3')	
DIPME1-For	TGAGGTGGGGTGGTTATCAT	
DIPME1-Rev	ATGGGTGAGGAAAATGGA	
DIPME2-For	CAAAATTGCACGATCAAAGC	
DIPME2-Rev	GCAACCAATCATCTCCAGT	
DIPME3-For	TTCCGAACCGAACAGATTTC	
DIPME3-Rev	ACTTGTGCGCAAAAGCAAAG	
DIActin-For	GAGTTGCCTGATGGACAGGT	
DIActin-Rev	AATCCACATCTGCTGGAAGG	

的扩增,循环结束后,取出 6 μL 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,检测不同循环次数的扩增情况,最后确定 30 个循环为最佳。同时,为了保证 RT-PCR 扩增中 cDNA 模板量的一致性 & 确定目标基因的相对表

达量,以龙眼 *β-actin* 基因 (NCBI 登录号为 EU340557)为内标进行平行扩增,各基因的半定量 RT-PCR 的引物序列见表 1。半定量 RT-PCR 的目的条带采用 ImageQuant 软件 (Bio-Rad)分析光密度值,光密度值越大,表示其表达越强。每个基因 3 次重复。

2 结果和分析

2.1 龙眼果实 *PME* 基因的克隆和序列分析

以 *PME* 蛋白保守序列为基础,设计简并引物进行 PCR 扩增,从龙眼果实中获得了 1 个约 370 bp 的 cDNA 片段,挑选阳性克隆测序后得到 3 个序列,然后以这 3 个片段为模板,分别设计特异引物进行 3'-RACE 后,获得了 3 条包含 3'-UTR (非翻译区)的 *PME* 基因片段,分别命名为 *DIPME1*、*DIPME2*

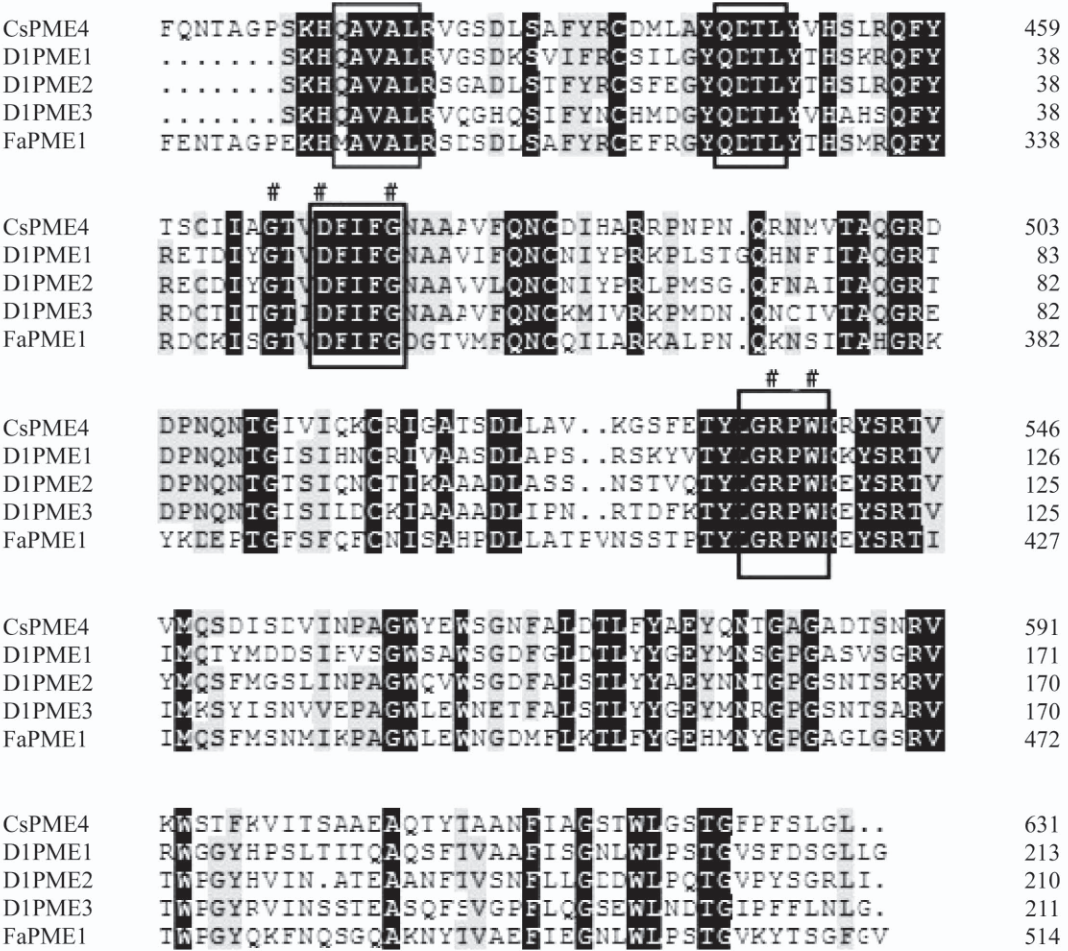


图 1 *PME* 基因推导的氨基酸序列

Fig. 1 Deduced amino-acid sequences from *PME* sequences

黑色表示完全相同,灰色部分表示部分相同。5 个保守位点和 4 个保守区域分别用“#”和方框表示。Black indicate complete identity and gray show partly identity. Five conserved residues and four conserved regions were indicated by ‘#’ and rectangle, respectively. FaPME1: 草莓 *Fragaria ananassa* (AAQ21124);CsPME4: 甜橙 *Citrus sinensis* (AAK84485)。

和 *DIPME3*。*DIPME1*、*DIPME2* 和 *DIPME3* 的开放阅读框(open reading frame, ORF)分别为 641、632 和 635 bp,分别编码 213、210 和 211 个氨基酸。NCBI 比对表明, *DIPME1* 与 *DIPME2* 的同源性最高,为 67%;*DIPME1*、*DIPME2* 和 *DIPME3* 与草莓 *FaPME1* (AAQ21124)的同源性分别为 56%、57%、51%;与甜橙 *CsPME4* (AAK84485)的同源性分别为 58%、61%、59%。此外, *DIPME1*、*DIPME2* 和 *DIPME3* 蛋白与其他植物的 PME 蛋白有相似的结构域,均包含 PME 家族蛋白特有的 Gly(G)、Asp(D)、Arg(R)和 Trp (W) 保守位点及 QAVAL、QDTL、DFIFG、LGRPW 保守域^[15](图 1)。

2.2 室温下龙眼果肉自溶及 *DIPMEs* 表达

图 2 表明,室温(22℃)贮藏下,龙眼果实果肉在贮藏第 3 天开始出现自溶,而后自溶指数随贮藏时间的延长而逐渐增加,至贮藏第 7 天时,果肉自溶指数大约是贮藏第 3 天时自溶指数的 3 倍,此时大部分果实果肉变软、自溶和流汁。

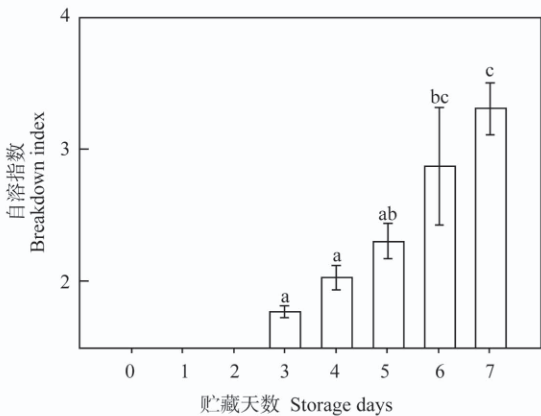


图 2 室温下龙眼果肉的自溶指数变化

Fig. 2 Changes in breakdown index of longan fruits stored at room temperature

$n=3$, 不同字母表示差异显著 ($P<0.05$)。Different letters indicate significant differences at the 0.05 level by Duncan's multiple range test. 图 4 同。The same as Fig. 4.

半定量 RT-PCR 分析(图 3)表明,室温贮藏下的龙眼果肉自溶进程中, *DIPME1*、*DIPME2* 和 *DIPME3* 呈现出不同的表达特征: *DIPME1* 的表达在贮藏前期较强,随果肉的自溶,其表达逐渐减弱; *DIPME2* 和 *DIPME3* 的表达在贮藏前 2 d 很弱,从第 3 天开始(此时龙眼果肉开始出现自溶),其表达明显增强,分别在第 5 天或第 6 天达到最大值,随后又降低。上述结果表明,常温贮藏下的龙眼果肉自溶可能与 *DIPME2* 和 *DIPME3* 的表达有关。

2.3 低温下龙眼果肉自溶及 *PME* 基因表达

图 4 表明,低温贮藏(4℃)显著抑制了龙眼果肉自溶,在贮藏第 30 天后果肉才出现自溶现象,随贮藏时间延长,自溶指数显著增加。半定量 RT-PCR 分析显示,低温贮藏下的龙眼果肉自溶过程中, *DIPME1* 和 *DIPME3* 的表达在贮藏前 30 d 逐渐增强,分别在第 25 天和第 20 天达到最大值,随后下降; *DIPME2* 的表达在整个贮藏期间都较弱(图 5)。这表明低温贮藏的龙眼果肉自溶可能与 *DIPME1* 和 *DIPME3* 的表达有关。

3 讨论

在果实的成熟过程中,细胞壁组成物质对果实的软化过程起着重要作用。细胞壁的果胶质、纤维素、半纤维素等降解,细胞结构被破坏,果实硬度降低^[16]。果胶甲酯酶(PME)是一种细胞壁代谢酶,使果胶脱酯,对细胞壁的结构变化具有重要作用。樱桃(*Prunus pseudocerasus*)果实的成熟软化过程中 *PME* 基因的表达增强^[17]。Eriksson 等^[5]报道番茄的一个与成熟相关的基因 *PME2* 在花后 15 d 的表达量很低,而花后 25 d 达到最大值,以后逐渐降低。这些表明,果胶甲酯酶基因的不同家族成员在不同植物中的作用和表达模式不同。本研究结果表明,常温和低温贮藏的龙眼果肉自溶进程中,3 个 *DIPMEs* 基因的表达模式不同,常温贮藏下, *DIPME1* 的表达逐渐减弱, *DIPME2* 和 *DIPME3* 的表达先增加后降低;而低温贮藏下, *DIPME1* 和 *DIPME3* 的表达先增强后降低, *DIPME2* 的表达减弱。这表明,龙眼在常温及低温贮藏下的果肉自溶的发生机制可能不同,常温下果肉自溶可能与 *DIPME2* 和 *DIPME3* 的表达有关,而低温下可能与 *DIPME1* 和 *DIPME3* 的表达有关。无论是在常温还是低温下,参与果肉自溶的 *PME* 基因的表达均是在前期较强,而在自溶后期减弱,推测可能与果胶甲酯酶的作用特点有关。前人曾报道 PME 是将植物细胞壁组分中的果胶脱甲基,使其能在其他细胞壁代谢酶的作用下降解^[1]。林河通等^[18]报道,龙眼果肉 PME 活性在贮藏过程中表现出下降的趋势,但不同贮藏时期,其下降幅度不同,在果肉自溶启动期 PME 活性变化很小,保持较高的活性;之后, PME 活性下降较快;到贮藏末期, PME 活性基本丧失。因此认为在龙眼果实采后贮藏期间,较高活性的 PME 促进了果胶物质的降解,在果肉软化和自

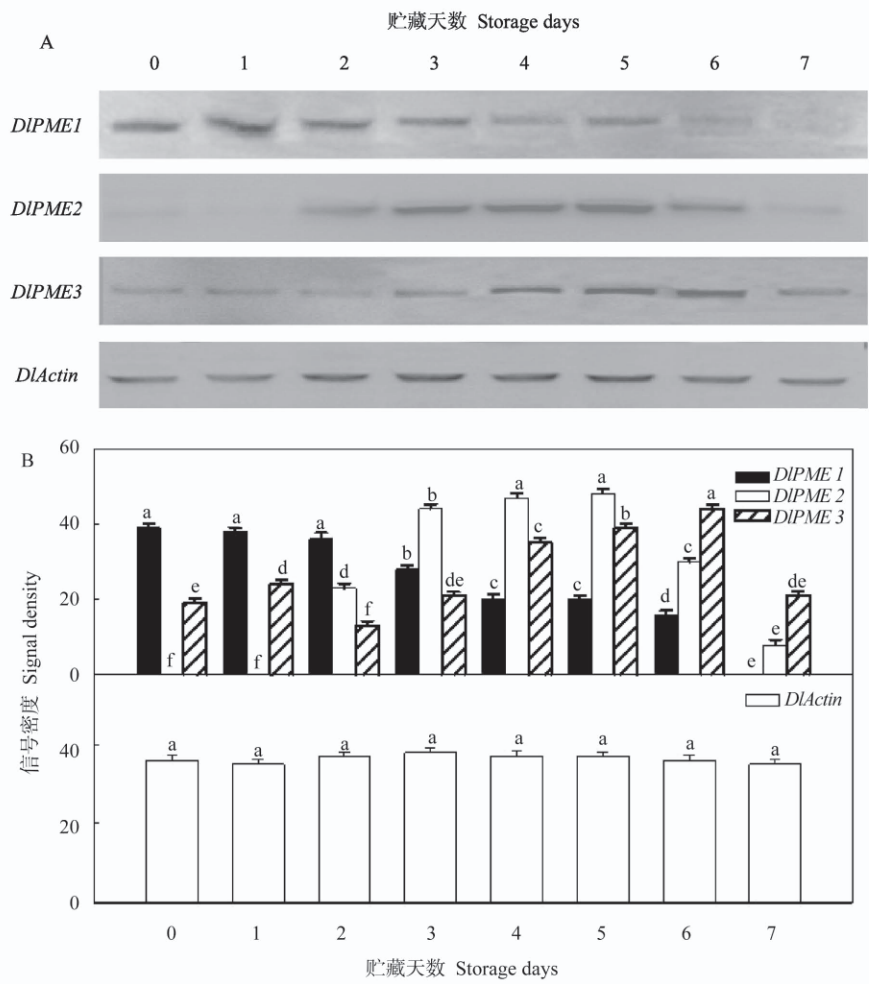


图 3 室温贮藏下龙眼果肉自溶过程中 *PME* 的表达

Fig. 3 Expression of *PME* genes during aril breakdown of longan fruits stored at room temperature

A. 半定量 RT-PCR Semiquantitative RT-PCR; B. ImageQuant 分析的光密度信号强度值 Signal density values by using ImageQuant. 以龙眼 *DActin* 为内参基因. *DActin* is used as internal marker gene. $n = 3$, 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$). Different letters indicate significant differences at 0.05 level by Duncan's multiple range test. 图 5 同。The same as Fig. 5.

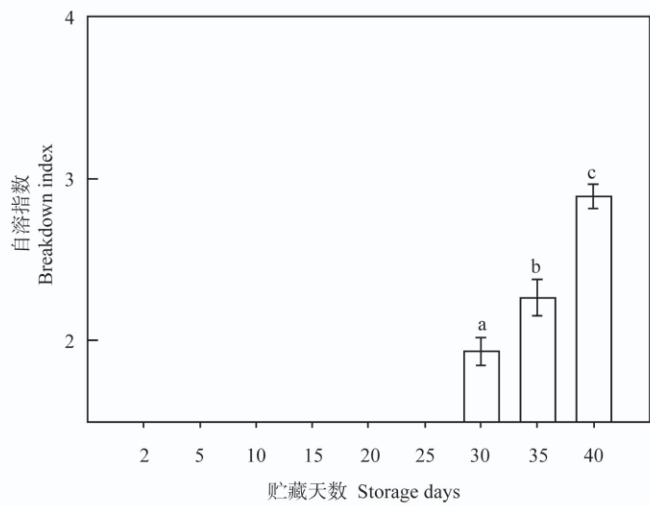


图 4 低温贮藏下龙眼果肉自溶指数变化

Fig. 4 Changes of breakdown index of longan fruit stored at low temperature

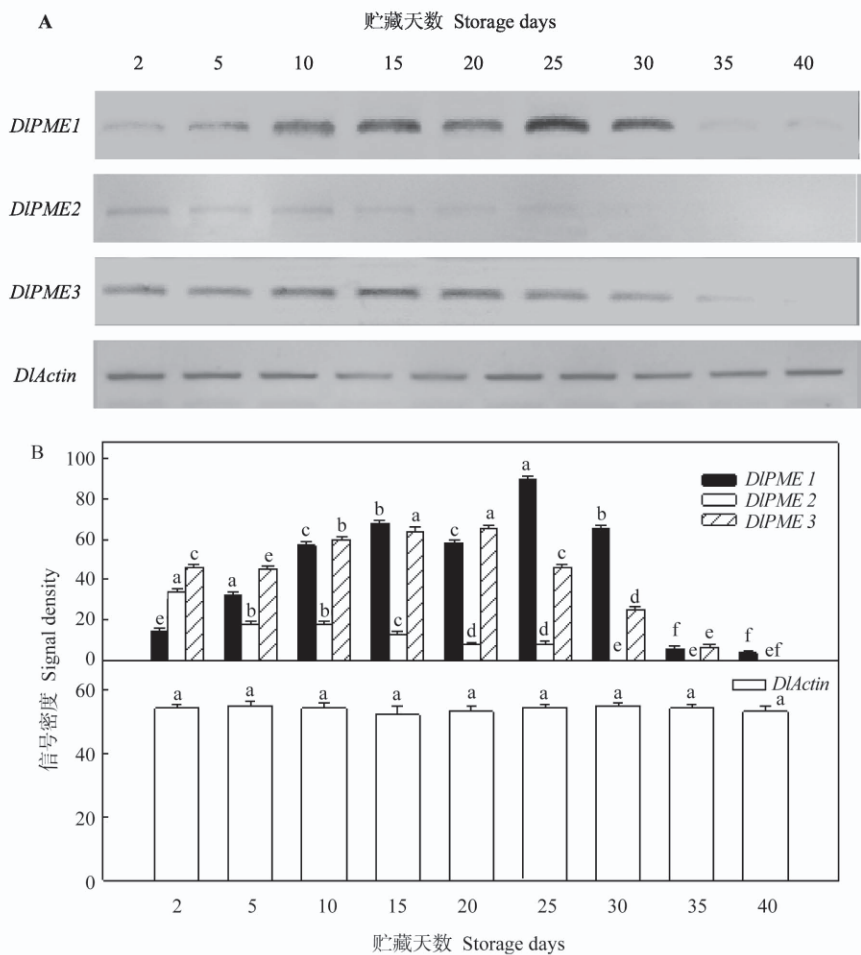


图 5 低温贮藏下龙眼果肉自溶过程中 *DIPME* 的表达
Fig. 5 Expression of *DIPME* genes during aril breakdown of longan fruits stored at low temperature

溶过程中可能起重要作用。我们前期的研究表明，常温下 *DI-EXP3*、*DI-XET1*、*DI-XET2* 和 *DI-EGase2* 基因在贮藏后期表达增强而参与果肉自溶；低温下，*DI-EGase3* 基因在贮藏后期表达增强而参与果肉自溶^[12-13]。因此，推测龙眼果肉自溶进程的前期可能是 PME 起主要作用，而后期可能是 XET、EXP、EG 起主要作用。

参考文献

[1] Micheli F. Pectin methylesterases: Cell wall enzymes with important roles in plant physiology [J]. Trends Plant Sci, 2001, 6: 414–419.
[2] Moustakas A M, Nari J, Borel M, et al. Pectin methylesterase, metal ions and plant cell-wall extension [J]. Biochemistry, 1991, 279: 351–354.
[3] Ferrández C. Regulation of fruit dehiscence in *Arabidopsis* [J]. J Exp Bot, 2002, 53: 2031–2038.
[4] Brummell D A, Dal C V, Crisosto C H, et al. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit [J]. J Exp Bot, 2004, 55: 2029–2039.
[5] Eriksson E M, Bovy A, Manning K, et al. Effect of the colorless

non-ripening mutation on cell wall biochemistry and gene expression during tomato fruit development and ripening [J]. Plant Physiol, 2004, 136: 4184–4197.
[6] Arancibia R A, Motsenbocker C E. Pectin methylesterase activity *in vivo* differs from activity *in vitro* and enhances polygalacturonase-mediated pectin degradation in tabasco pepper [J]. J Plant Physiol, 2006, 163: 488–496.
[7] Zhao Y F(赵云锋), Lin H T(林河通), Lin J F(林娇芬), et al. A review of cell wall-degrading enzymes in fruit softening and their control [J]. J Zhongkai Univ Agri Techn(仲恺农业技术学院学报), 2006, 19(1): 65–70.(in Chinese)
[8] Zhang J X(张进献), Li D J(李冬杰), Li H J(李宏杰). Changes of cell wall structure, composition and hydrolytic enzymes in fruit softening process [J]. Hebei J For Orch Res(河北林果研究), 2007, 22(2): 180–182.(in Chinese)
[9] Shi Q(施清). Studies on postharvest physiology and handling of longan fruit [J]. Fujian Fruits(福建果树), 1990, 18(2): 1–4.(in Chinese)
[10] Jiang Y M, Zhang Z Q, Joyce D C, et al. Postharvest biology and handling of longan fruit (*Dimocarpus longan* Lour.) [J]. Postharv Biol Techn, 2002, 26(3): 241–252.

- [11] Feng H L, Zhong Y X, Xie H, et al. Differential expression and regulation of longan *XET* genes in relation to fruit growth [J]. *Plant Sci*, 2008, 174: 32–37.
- [12] Xiao R, Chen J Y, Chen J W, et al. Expression analysis of endo-1, 4- β -glucanase genes during aril breakdown of harvested longan fruit [J]. *J Sci Food Agri*, 2009, 89: 1129–1136.
- [13] Zhong Y X, Chen J Y, Feng H L, et al. Expansin and *XET* genes are differentially expressed during aril breakdown in harvested longan fruit [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 2008, 133: 462–467.
- [14] Wan C Y, Wilkins T A. A modified hot borate method significantly enhances the yield of high-quality RNA from cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Anal Biochem*, 1994, 223: 7–12.
- [15] Oskar M, Stefan J. Pectin methylsterases: Sequence-structural features and phylogenetic relationships [J]. *Carb Res*, 2004, 339: 2281–2295.
- [16] Brummell D A, Cin V D, Crisosto C H, et al. Cell wall metabolism during maturation, ripening and senescence of peach fruit [J]. *J Exp Bot*, 2004, 55: 2029–2039.
- [17] Awad M, Young R E. Avocado pectinmethylsterase activity in relation to temperature, ethylene and ripening [J]. *J Amer Soc Hort Sci*, 1980, 105: 638–641.
- [18] Lin H T(林河通), Zhao Y F(赵云峰), Xi Y F(席均芳). Changes in cell wall components and cell wall-degrading enzyme activities of postharvest longan fruit during aril breakdown [J]. *J Plant Physiol Mol Bio*(植物生理与分子生物学学报), 2007, 33(2): 137–145.(in Chinese)