

丝瓜过氧化氢酶CAT2基因的分离及表达分析

刘建汀 朱海生* 温庆放* 王彬 张前荣 陈敏敏 林珲 薛珠政

(福建省农业科学院作物研究所, 福建省农业科学院蔬菜研究中心, 福建省蔬菜工程技术研究中心, 福州 350013)

摘要 该研究对普通丝瓜品种‘WL-3’的褐变果肉开展转录组测序, 对高质量片段进行拼接和组装后获得58 073条unigenes序列, 其中, 27 301条unigenes在褐变前后表达水平发生变化。从差异表达的基因中筛选得到1条功能注释为过氧化氢酶(catalase, CAT)的基因全长序列(unigene0033876)。分析发现, 该序列全长1 690 bp, 包含1个1 479 bp的开放读码框(open reading frame, ORF), 预测编码492个氨基酸, 理论分子量(molecular weight, Mw)为56.94 kDa, 等电点(isoelectric point, pI)为7.31, 编码的蛋白质与葫芦科作物南瓜、西葫芦和黄瓜中同源蛋白质的相似性均在97%以上, 显示其高度的保守性, 基因命名为*LcCAT2*, GenBank登录号为KR184674。荧光定量PCR分析结果表明, *LcCAT2*基因具有组织表达特异性, 在丝瓜叶片中表达量最高, 花中表达量最低。*LcCAT2*基因在所选的6个丝瓜品种中的表达量存在一定的差异, 普通丝瓜中的表达量均高于有棱丝瓜。*LcCAT2*基因在普通丝瓜品种‘WL-3’采后储藏条件下的表达量随时间增加而呈上调表达趋势。初步推测, *LcCAT2*基因在丝瓜果肉褐变过程中起着一定的调控作用。该研究旨在从转录组测序结果中挖掘与丝瓜果肉褐变相关的基因, 为今后丝瓜品种的选育及进一步揭示其酶促褐变产生的分子机制奠定理论基础。

关键词 丝瓜; 转录组测序; *LcCAT2*; 荧光定量PCR

Isolation and Expression of Catalase *CAT2* Gene from *Luffa cylindrical*

Liu Jianting, Zhu Haisheng*, Wen Qingfang*, Wang Bin, Zhang Qianrong, Chen Mindong, Lin Hui, Xue Zhuzheng

(Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Vegetable Research Center, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fujian Engineering Research Center for Vegetables, Fuzhou 350013, China)

Abstract The RNA-seq technique was used to analyze the changes of transcriptomic occurring in the browning of fruits from *Luffa* cultivar ‘WL3’. A total of 58 073 unigenes were assembled from high-quality reads, and 27 301 unigenes were differentially expressed during the browning process of *Luffa* fruits. In this study, full length of agene sequence (i.e., unigene0033876) annotated as catalase *CAT* gene was filtrated from the differentially expressed genes. The sequence analysis showed that unigene0033876 reached a length of 1 690 bp and contained a 1 479 bp open reading frame (ORF) that encoded 492 amino acids, with a predicted molecular weight of 56.94 kDa and a hypothetical isoelectric point of 7.31. It shared over 97% identity with the homologous proteins from *Cucurbita moschata*, *Cucurbita pepo* and *Cucumis sativus*, revealing that it was highly conservative, and the GenBank accession was KR184674. The results of qPCR (Real-time quantitative PCR) revealed that *LcCAT2* exhibited a

收稿日期: 2017-05-16 接受日期: 2017-06-22

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2017R1026-3)、福建省农业科学院青年人才创新基金(批准号: 2015QC-6)、福建省农业科学院创新团队PI项目(批准号: 2016PI-40)和国家大宗蔬菜产业体系福州试验站(批准号: CARS-25-G-20)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13809542070, E-mail: zhs0246@163.com; Tel: 13805062692, E-mail: fjvrc@163.com

Received: May 16, 2017 Accepted: June 22, 2017

This work was supported by Fujian Provincial Public Research Institute of Fundamental Research (Grant No.2017R1026-3), Young Talent Innovation Fund of Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2015QC-6), Project of Innovative Team in Fujian Academy of Agricultural Sciences (Grant No.2016PI-40) and the Experimental Station of Fuzhou of China Commodity Vegetable Industry System (Grant No.CARS-25-G-20)

*Corresponding authors. Tel: +86-13809542070, E-mail: zhs0246@163.com; Tel: +86-13805062692, E-mail: fjvrc@163.com

网络出版时间: 2017-07-25 17:24:32

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20170725.1724.012.html>

tissue specific expression, the expression level in *Luffa* cultivar ‘WL-3’ leaves was the highest, and minimally expressed in flowers on the contrary. The levels of *LcCAT2* were different among six luffa varieties, and the expression in *Luffa cylindrical* was higher than that in *Luffa acutangula* Roxb. Furthermore, the level of *LcCAT2* in ‘WL3’ was up-regulated during post-harvest storage, suggesting that *LcCAT2* gene may play a regulatory role in luffa browning process. The survey aims to excavate the genes associated with *Luffa* browning from transcriptome sequencing results, and make contributions to breeding of the *Luffa* varieties and ulteriorly revealing the molecular mechanism of *Luffa* enzymatic browning process for the future.

Keywords *Luffa cylindrical*; RNA-Seq; *LcCAT2*; qPCR

植物在长期进化的过程中, 形成了一系列复杂的机制, 以适应和抵御各种生物和非生物胁迫^[1]。过氧化氢酶又称触酶(catalase, CAT, EC 1.11.1.6), 属于重要的氧化还原酶类, 广泛参与植物各种生理过程, 如应答胁迫、细胞氧化还原平衡的控制和延缓衰老等^[2-4]。褐变是影响果蔬采后贮藏品质和保鲜期最为突出的问题之一, 极大地影响了果蔬外观品质、商品价值及贮藏时间, 从而造成很大的经济损失^[5-6]。许多果蔬在采后储藏过程中容易产生褐变现象, 果肉细胞呼吸作用产生过多的自由基而导致膜脂质过氧化而使其细胞膜产生破裂, 酚类物质、酶和氧气三者发生接触并导致其褐变^[7-8]。研究表明, CAT酶活性与果蔬褐变高度相关, 能有效地参与清除细胞内产生的过剩自由基, 使之维持正常的动态水平, 并在一定程度上减缓果蔬的褐变进程^[9-11]。Abbasi等^[12]对枇杷的研究发现, 枇杷采后储藏过程中果肉逐渐产生褐变, 其体内CAT活性显著上升。Zhang等^[13]对荔枝的研究发现, 利用苹果多酚处理荔枝后, 储藏过程中的褐变反应得到了有效的抑制, 果肉的CAT活性明显增强。

丝瓜(*Luffa cylindrical* Roem.), 为葫芦科(Cucurbitaceae)丝瓜属(*Luffa*)一年生攀缘性草本植物, 分为有棱丝瓜(*Luffa acutangula* Roxb.)和普通丝瓜(*Luffa cylindrical* Roem.)两个栽培种。在贮藏过程中, 普通丝瓜与龙眼^[14]、苹果^[15]、梨^[16]等果蔬一样, 体内细胞液中产生的酚类物质容易导致果肉发生酶促褐变。研究者已从大麦^[17]、拟南芥^[18]、棉花^[19]、荷花^[20]和甘蔗^[21]等多种植物中克隆得到CAT基因。目前, 丝瓜中有关CAT基因克隆及褐变的研究报道极少。许多研究表明, 利用RNA-seq测序技术, 可快速、准确挖掘潜在的目的基因, 帮助科研工作者摆脱以往非模式生物中遗传背景缺乏的束缚^[22-24]。本研究采用RNA-seq技术分析了丝瓜褐变前后转录组变化, 从转录组

数据中筛选得到1条具有差异表达的*LcCAT2*基因全长序列, 并对其序列特征、表达模式及褐变相关性进行了分析, 以期今后丝瓜分子育种研究及果肉褐变产生的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 处理及采样

材料于2016年3月15日育苗, 4月26日定植到大棚内, 株距40 cm, 行距60 cm。选取表面完整、无机械损伤、大小均一的丝瓜果实, 清水洗净晾干, 用无菌刀片切取果实中间部位为实验材料。丝瓜样品采集均做3次独立重复, 采集后立即用液氮速冻后-80 °C保存, 用于后续荧光定量PCR实验, 样品研磨时去除果实表皮。共设置3个实验: (1)不同组织材料: 采集普通丝瓜品种‘WL-3’同一时期的根、茎、叶、花和果实(授粉后5周左右); (2)不同品种材料: 采集普通丝瓜(易褐变)‘WL-1’、‘WL-2’、‘WL-3’、‘WL-4’品种和有棱丝瓜(不易褐变)‘YL-5’、‘YL-6’品种果实(授粉后5周左右)部分; (3)不同储藏时间材料: 丝瓜‘WL-3’(果实授粉后5周左右)室温(25±1 °C)放置, 实验组于1、3、5、7 d后分别采样, 对照组在清洗晾干后, 立即采样。

1.2 仪器与试剂

实时荧光定量PCR仪(ABI 7500)购自美国ABI公司。荧光定量试剂盒SYBR® Premix EX Taq™ II、PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司。通用植物总RNA提取试剂盒购于北京百泰克生物技术有限公司。其他生化试剂和常规试剂均为超纯或分析纯级。

1.3 基因序列分析

基因序列分析的软件主要采用EditSeq 5.01软件, 序列蛋白质翻译采用SMS在线软件(<http://www.bio-soft.net/sms/index.html>), 序列翻译后的蛋白质修

饰采用MotifScan软件(http://myhits.isb-sib.ch/cgi-bin/motif_scan), 同源多序列比对和蛋白质进化树的构建采用MEGA 4.0软件, 基因编码的蛋白质一级结构分析采用ProtParam和ProtScale软件, 蛋白质二级结构分析采用CFSSP在线软件(<http://www.biogem.org/tool/chou-fasman/>), 蛋白质三级结构分析采用SWISS-MODEL在线软件(<http://swissmodel.expasy.org/interactive>), 亚细胞定位分析采用Wolf Psort Prediction软件(http://www.genscript.com/psort/wolf_psort.html)。

1.4 荧光定量PCR分析

采用Primer Premier 5.0软件, 对获得的*LcCAT2*基因序列设计荧光定量PCR引物, 并对引物熔解曲线进行分析。选择具有特异性(扩增长度为152 bp)和扩增效率高的*LcCAT2*-Fq/Rq作为*LcCAT2*基因荧光定量PCR引物。基因正向引物*LcCAT2*-Fq: 5'-TCA CCA TAA CAA CCA CCA TGA AG-3', 反向引物*LcCAT2*-Rq: 5'-CAC ACA CCT TTC TCT CTT TCC G-3', 并使用课题组前期获得的丝瓜*Lc18S* rRNA作为内参基因^[25]。提取1.1中丝瓜样品总RNA, 并反转录合成cDNA第1链。按照SYBR[®] Premix Ex Taq[™]试剂盒的说明书, 配制25 μ L反应体系, 在荧光定量PCR仪(ABI 7500)上进行扩增。反应体系为: 4 μ L cDNA模板, 10 μ L SYBR[®] Premix(TaKaRa公司), 0.4 μ L正、反向引物(10 μ mol/L), ddH₂O补足至25 μ L。荧光定量PCR扩增条件为: 95 $^{\circ}$ C预变性30 s; 95 $^{\circ}$ C变性5 s, 58 $^{\circ}$ C退火30 s, 40个循环。荧光定量PCR实验重复3次, 并用蒸馏水取代cDNA模板作为阴性对照。在Excel软件中采用2^{- $\Delta\Delta$ C_t}法分析处理数据并得出基因表达情况。

1.5 丝瓜CAT活性和总酚测定

丝瓜CAT活性的测定参考温庆放等^[26]的方法进行, 总酚含量的测定参考Dewanto等^[27]的方法进行。

2 结果

2.1 目的基因的获得

课题组前期对普通丝瓜品种‘WL-3’的褐变前后的果肉进行了转录组测序, 并获得了11.2 Gb的有效数据, 经组装和拼接得到高质量的unigenes序列58 073条[平均长度为896.93 bp, 序列长度 \geq 200 bp, N50(unigene从长到短累加长度达到总片段的50%时, 对应那个片段的长度和数量)为1 510 bp]。丝瓜果肉褐变前后差异表达基因(unigenes, ratio $>$ 2, FDR \leq 0.001)数目为27 301条。从差异表达的unigenes中筛选得到一

条全长为1 690 bp的cDNA(unigene0033876)序列, 基因编码的蛋白与NCBI中南瓜(*Cucurbita moschata*, AHF27430.1)同源蛋白的相似性达到98%(E-value为0)。丝瓜*LcCAT2*(GenBank登录号: KR184674)的ORF长为1 479 bp, 预测编码492个氨基酸, 其分子式为C₂₅₆₃H₃₈₆₂N₇₂₀O₇₂₇S₁₇(图1)。

2.2 基因序列的生物信息学分析

2.2.1 *LcCAT2*基因编码蛋白质的一级结构分析
序列分析表明, *LcCAT2*编码蛋白质理论分子量(molecular weight, Mw)为56.94 kDa, GC含量为58.22%, 等电点(isoelectric point, pI)为7.31。利用EditSeq 5.01和ProtParam软件对丝瓜*LcCAT2*和南瓜、西葫芦、黄瓜、萝卜、大豆和葡萄编码同源蛋白的组成成分及理化性质进行分析(表1)。结果表明, 这些植物中CAT蛋白的氨基酸残基数均在492个左右, 理论相对分子质量为56.72~57.06 kDa, 等电点为6.93~7.32。*LcCAT2*基因编码蛋白的酸性氨基酸数略多于碱性氨基酸数, 脂肪族氨基酸数明显多于芳香族氨基酸数。不同植物CAT中氨基酸理化性质较为一致, 存在的差异可能与非保守区域的氨基酸差异有关。蛋白质总平均疏水性(GRAVY)为-0.5左右。另外, 疏水性/亲水性(ProtScale)分析显示, 丝瓜*LcCAT2*属于亲水性蛋白质。采用Wolf Psort预测表明, 其亚细胞定位于过氧化物酶体(peroxisomal)中。

2.2.2 *LcCAT2*蛋白质的二级、三级结构分析
二级结构分析显示, *LcCAT2*中随机卷曲占50.6%, 是最大的结构元件, α 螺旋占28.66%, 延伸链占20.73%, 没有发现 β 转角的存在。利用SWISS-MODEL对丝瓜*LcCAT2*蛋白的三级结构进行在线预测, 结果如图2所示。

2.2.3 *LcCAT2*同源蛋白比对与进化分析
同源比对分析表明, *LcCAT2*与南瓜(*Cucurbita moschata*, AHF27430.1)、西葫芦(*Cucurbita pepo*, P48352.1)、黄瓜(*Cucumis sativus*, NP_001295845.1)、欧洲油菜(*Brassica napus*, XP_013723778.1)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*, NP_195235.1)和枇杷树(*Eriobotrya japonica*, AGC65520.1)中同源蛋白的相似性分别为98%、97%、97%、79%、78%和78%, 具有高度的保守性(图3)。分析发现, *LcCAT2*包含2个(I和II)保守结构域, 343~351和54~70位分别为CAT近端血红素-配体特征序列和近端血红素活性位点特征序列, 属于过氧化氢血红素结合蛋白超家族。

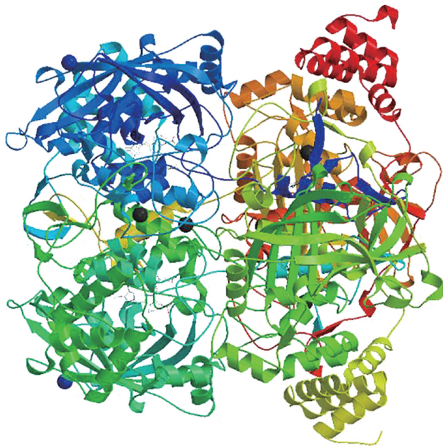


图2 LcCAT2三级结构预测

Fig.2 Prediction of three-dimensional of LcCAT2

通过BLASTp检索并从NCBI中下载其他物种中9个过氧化氢血红素结合蛋白超家族的CAT氨基酸序列,并用MEGA 4.0软件对所得的序列做系统进化分析(bootstrap值设为1 000),发现丝瓜LcCAT2与同为葫芦科的南瓜、西葫芦和黄瓜CAT亲缘关系较近,聚为一类,而与烟草同源蛋白亲缘关系较远(图4)。

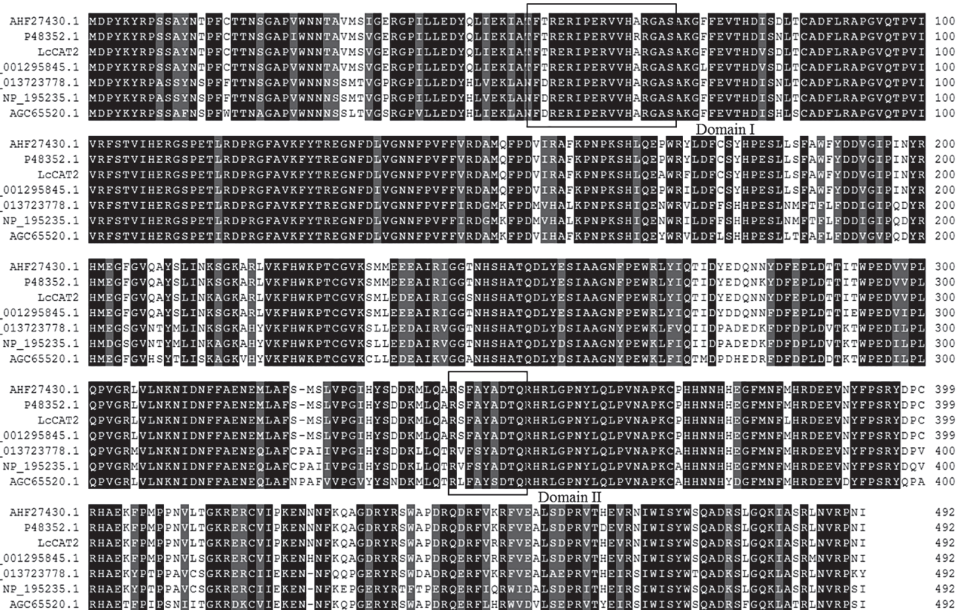
2.3 LcCAT2基因的表达模式分析

2.3.1 不同组织荧光定量PCR 分析结果表明,LcCAT2基因在丝瓜品种‘WL-3’的不同组织,即根、茎、叶、花和果实(授粉后5周左右)中均有表达,在

叶片中的表达丰度最高,其次为茎和根,花中的表达量最低。正常(未褐变)情况下,丝瓜‘WL-3’品种果肉中LcCAT2的表达丰度相对较低(图5)。

2.3.2 不同品种实验 选取4个普通丝瓜(‘WL-1’、‘WL-2’、‘WL-3’和‘WL-4’)和2个有棱丝瓜(‘YL-1’、‘YL-2’)品种相同时期的果实组织作为研究对象,对LcCAT2基因进行荧光定量分析。结果表明,LcCAT2在所选的6个丝瓜品种呈差异表达,其中,普通丝瓜品种‘WL-4’内表达量最高,其次为‘WL-1’、‘WL-2’和‘WL-3’,有棱丝瓜品种‘YL-1’和‘YL-2’均呈低丰度表达,普通丝瓜(易褐变)品种中LcCAT2基因表达水平均高于有棱丝瓜(不易褐变)品种(图6)。

2.3.3 采后不同储藏时间 前期的田间观察发现,丝瓜‘WL-3’品种果肉在采后常温条件放置容易产生褐变现象,实验从上述6个品种选择正常果肉中LcCAT2基因表达水平较为适中的‘WL-3’丝瓜品种(授粉后5周左右)作为采后不同储藏时间的材料,采集恒温(25±1 °C)条件下储藏1、3、5、7 d的果实样品。荧光定量PCR结果表明,正常情况下,丝瓜果肉中LcCAT2基因的表达丰度较低,随着采后储藏天数的增加,果肉逐渐产生褐变,体内LcCAT2基因的表达量相对于对照组上调表达,并在第7 d果肉中LcCAT2基因表达丰度达到最高(图7)。



AHF27430.1: 南瓜; P48352.1: 西葫芦; NP_001295845.1: 黄瓜; XP_013723778.1: 欧洲油菜; NP_195235.1: 拟南芥; AGC65520.1: 枇杷树。近端血红素-配体和血红素活性位点特征序列用方框标出。

AHF27430.1: pumpkin; P48352.1: cocozelle; NP_001295845.1: cucumber; XP_013723778.1: winter rape; NP_195235.1: *Arabidopsis*; AGC65520.1: loquat. Domain I represented for catalase proximal heme-ligand, and domain II represented for heme active site.

图3 LcCAT2与其他物种中的同源蛋白的多序列对比

Fig.3 Multiple sequence alignment of LcCAT2 with other homologous sequences

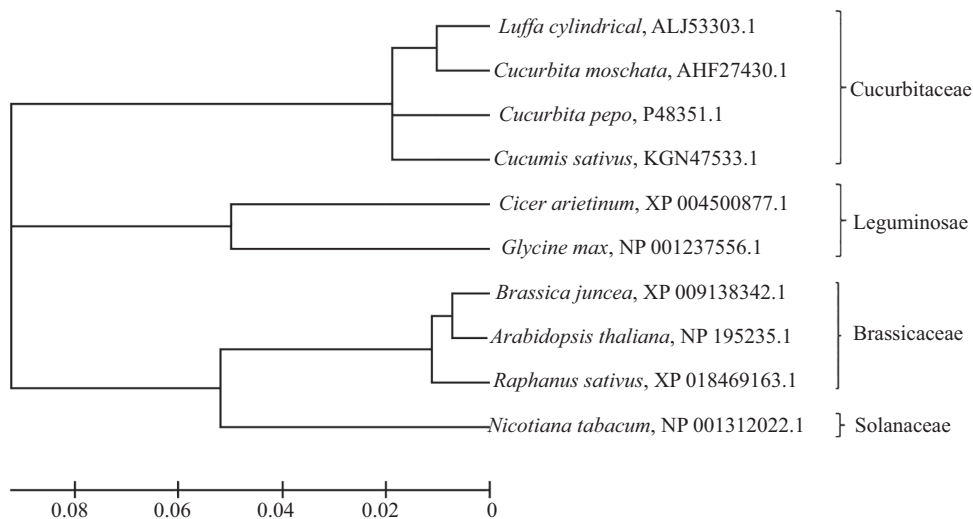


图4 丝瓜LcCAT2与其他同源蛋白序列的系统进化树

Fig.4 Phylogenetic tree of LcCAT2 in *Luffa* and other homologous sequences

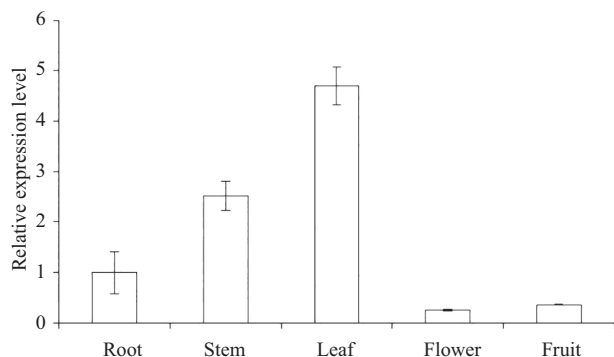


图5 丝瓜LcCAT2不同组织下的表达模式分析

Fig.5 *LcCAT2* of *Luffa* in different tissues analysed by qPCR

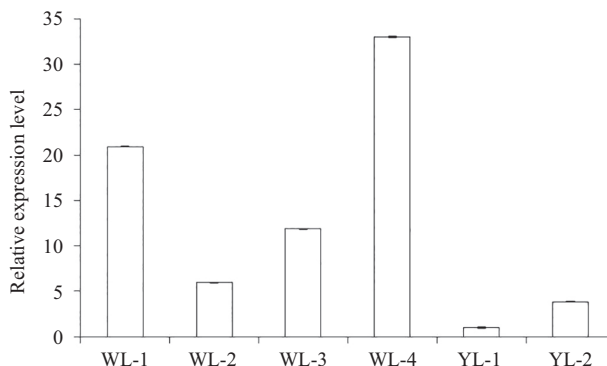


图6 丝瓜LcCAT2不同品种下的表达模式分析

Fig.6 *LcCAT2* of *Luffa* in different varieties analysed by qPCR

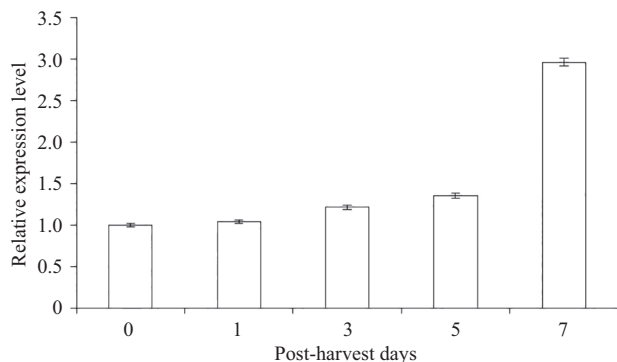


图7 丝瓜LcCAT2在不同采后时间下的表达模式分析

Fig.7 *LcCAT2* of *Luffa* in different postharvest time analysed by qPCR

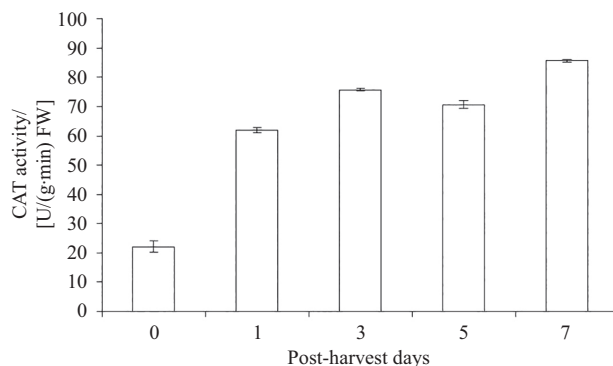


图8 在不同采后时间下的LcCAT2酶活性变化

Fig.8 The changes of *LcCAT2* activities in different postharvest time

随着丝瓜褐变的发生, LcCAT活性显著增加, 在其变化趋势和LcCAT2基因的表达大体一致, 1、3、5和7 d时LcCAT酶活性均高于采后当时(0 d), 7 d时达到最高值(图8)。总酚含量逐渐上升趋势, 在3 d达到峰值, 3 d后变化减小, 趋于稳定(图9)。

3 讨论

前期对丝瓜‘WL-3’品种的褐变果肉展开RNA-seq分析, 共得到58 073条有效高质量的unigenes序列, 并有27 301条unigenes呈现差异表达, 从中筛选得到

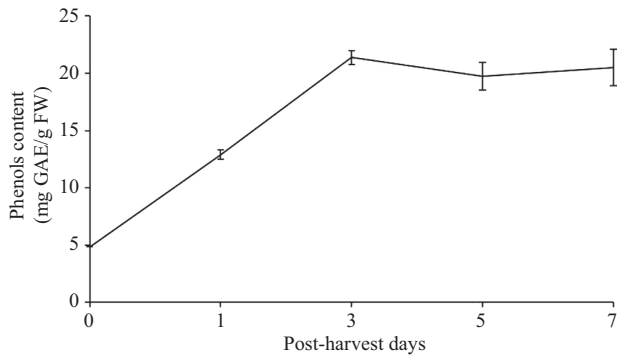


图9 丝瓜不同采后时间下的总酚含量变化

Fig.9 The changes of total phenols content from *Luffa* in different postharvest time

一条全长为1 690 bp的cDNA序列(unigene0033876)。BLASTp分析显示, unigene0033876序列编码的蛋白质含有一个CAT保守结构域(第18~488位), 与南瓜同源蛋白的相似性高达98%, 同西葫芦和黄瓜同源蛋白的相似性也均在97%以上, 具有高度保守性。系统进化树分析发现, 丝瓜LcCAT2与同为葫芦科的南瓜、西葫芦和黄瓜等同源蛋白的亲缘关系较近, 处于同一分支, 而与属茄科的烟草同源蛋白的亲缘关系较远。Motif Scan分析显示, LcCAT2基因编码蛋白的氨基酸序列第343~351和第54~70位点分别为CAT酶类特有的近端血红素-配体及血红素活性位点特征序列, 属于典型的CAT酶类(typical catalase, tCAT), 而此类CAT几乎存在于所有的生物体中^[28-29]。此外, Wolf Psort预测表明, 其亚细胞定位于过氧化物酶体(peroxisomal)中^[26]。

研究表明, CAT是植物体内非常重要的一类抗氧化酶, 广泛参与植物生物胁迫及非生物胁迫反应, 对CAT基因进行克隆和分析具有重要意义^[30-32]。本研究对丝瓜品种‘WL-3’不同组织的荧光定量分析结果发现, LcCAT2基因在光合组织叶片中高丰度表达, 提示丝瓜LcCAT2基因对于叶片中光呼吸作用产生过多的H₂O₂具有催化作用, 并维持其体内氧化还原平衡^[33-34]。对不同丝瓜品种的荧光定量PCR分析发现, LcCAT2的表达模式存在品种差异性, LcCAT2基因在4个普通丝瓜品种(‘WL-1’、‘WL-2’、‘WL-3’和‘WL-4’)中的相对表达水平平均高于2个不易褐变的有棱丝瓜品种(‘YL-1’和‘YL-2’)。研究表明, 果蔬在采后储藏过程中容易产生褐变现象^[35-36]。Fan等^[37]对梨的研究发现, 即使在多酚氧化酶(polyphenol oxidase, PPO)活性受抑制的前提下, 酶促褐变也同CAT活性

密切相关。Ali等^[38]对荔枝的研究发现, 常温储藏条件下果肉中CAT酶活性明显高于同一时期低温条件下储藏的荔枝, CAT能够降低PPO活性并有效延缓荔枝果肉褐变进程。Ma等^[39]对‘皇冠’梨采后储藏的研究发现, 随着果皮褐变的发生, 其体内的CAT活性显著上调, 总酚含量的变化呈先上升后趋于平衡的趋势。本研究对LcCAT2基因在不同储藏时间下‘WL-3’的荧光定量PCR分析显示, 伴随着丝瓜果肉褐变的产生, LcCAT2基因的表达趋势明显上调, 并在7 d时的表达量达到最高, 其编码的CAT活性也随之增强; 果肉总酚逐渐积累, 在3 d左右时总酚含量达到最大值, 随后3~7 d总酚含量变化趋于平缓。推测LcCAT2基因可参与丝瓜果肉酶促褐变调控过程, 使总酚含量维持相对平衡的状态, 其编码合成的CAT对丝瓜褐变过程中果肉细胞内产生过多的H₂O₂具有积极的清除作用, 能有效降低果肉细胞因膜脂质过氧化而产生破裂, 从而在一定程度上延缓丝瓜果肉褐变进程^[40-42]。对丝瓜LcCAT2基因进行分离和表达分析研究, 可以丰富丝瓜CAT基因资源, 也为今后对其作进一步的基因功能验证以及揭示丝瓜褐变分子机制及品种的选育奠定了一定的理论基础。

参考文献 (References)

- Ara N, Nakkanong K, Lv W, Yang J, Hu Z, Zhang M. Antioxidant enzymatic activities and gene expression associated with heat tolerance in the stems and roots of two cucurbit species (*Cucurbita maxima* and *Cucurbita moschata*) and their interspecific inbred line ‘*Maxchata*’. *Int J Mol Sci* 2013; 14(12): 24008-28.
- Ransberry VE, Blewett TA, McClelland GB. The oxidative stress response in freshwater-acclimated killifish (*Fundulus heteroclitus*) to acute copper and hypoxia exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol* 2016; 179: 11-8.
- Li J, Liu J, Wang GQ, Cha JY, Li GN, Chen S, et al. A chaperone function of no catalase activity is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2015; 27(3): 908-25.
- Jyothsna P, Murthy SD. A review on effect of senescence in plants and role of phytohormone in delaying senescence. *Int J Plant Animal Environ Sci* 2016; 6(1): 152-61.
- Li P, Dai SJ, Zhao B, Zhang YS, Liao K, Xu F, et al. Effect of low temperatures on pulp browning and endogenous abscisic acid and ethylene concentrations in peach (*Prunus persica* L.) fruit during post-harvest storage. *J Horticultural Sci Biotechnol* 2014; 89(6): 686-92.
- Quevedo R, Díaz O, Valencia E, Pedreschi F, Bastias JM, Siche R. Differences between the order model and the weibull model in the modeling of the enzymatic browning. *Food Bioprocess Technol* 2016; 9(11): 1961-7.
- Constabel CP, Barbehenn R. Defensive roles of polyphenol oxidase in plants. *Induced plant resistance to herbivory*. Springer Netherlands 2008, 253-70.

- 8 Chang TS. An updated review of tyrosinase inhibitors. *Int J Mol Sci* 2009; 10(6): 2440-75.
- 9 Gechev T, Willekens H, Montagu MV, Inzé D, Camp WV, Toneva V, *et al.* Different responses of tobacco antioxidant enzymes to light and chilling stress. *J Plant Physiol* 2003; 160(5): 509-15.
- 10 Bustos MC, Mazzobre MF, Buera MP. Stabilization of refrigerated avocado pulp: Effect of *Allium* and *Brassica* extracts on enzymatic browning. *Food Sci Technol* 2015; 61(1): 89-97.
- 11 Chen X, Tan T, Xu C, Huang S, Tan J, Zhang M, *et al.* Genome-wide transcriptome profiling reveals novel insights into *Luffa cylindrica* browning. *Biochem Biophys Res Commun* 2015; 463(4): 1243-9.
- 12 Abbasi NA, Akhtar A, Hussain, AZHAR, Ali IRFAN. Effect of anti-browning agents on quality changes of loquat [*Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindley] fruit after harvest. *Pak J Bot* 2013; 45(4): 1391-6.
- 13 Zhang Z, Huber DJ, Qu H, Yun Z, Wang H, Huang Z, *et al.* Enzymatic browning and antioxidant activities in harvested litchi fruit as influenced by apple polyphenols. *Food Chem* 2015; 171: 191-9.
- 14 Duan X, Su X, You Y, Qu H, Li Y, Jiang Y. Effect of nitric oxide on pericarp browning of harvested longan fruit in relation to phenolic metabolism. *Food Chem* 2007; 104(2): 571-6.
- 15 Tong CB, Chang HY, Boldt JK, MaB, DeEll JR, Moran RE, *et al.* Diffuse flesh browning in 'Honeycrisp' apple fruit is associated with low temperatures during fruit growth. *Hort Science* 2016; 51(10): 1256-64.
- 16 Kaur K, Dhillon WS. Effect of harvesting date and packaging materials on core browning and phenolic contents of pear cv. Punjab Beauty during storage. *Indian J Hortic* 2016; 73(4): 619-22.
- 17 Skadsen RW, Schulz-Lefert P, Herbst JM. Molecular cloning, characterization and expression analysis of two catalase isozyme gene in barley. *Plant Mol Biol* 1995; 29(5): 1005-14.
- 18 Yu D, Xie Z, Chen C, Fan B, Chen Z. Expression of tobacco class II catalase gene activates the endogenous homologous gene and is associated with disease resistance in transgenic potato plants. *Plant Mol Biol* 1999; 39(3): 477-88.
- 19 Garratt L, Cjanagoudar B, Lowe K. Salinity tolerance and antioxidant status in cotton cultures. *Free Radic Biol Med* 2002; 33(4): 502-11.
- 20 Dong C, Zheng X, Diao Y, Wang Y, Zhou M, Hu Z. Molecular cloning and expression analysis of a catalase gene (*NnCAT*) from *Nelumbo nucifera*. *Appl Biochem Biotechnol* 2015; 177(6): 1216-28.
- 21 Liu Y, Hu X, Yao Y, Xu L, Xing S. Isolation and expression analysis of catalase genes in *erianthus arundinaceus* and sugarcane. *Sugar Tech* 2016; 18(5): 468-77.
- 22 Haas BJ, Papanicolaou A, Yassour M, Grabherr M, Blood PD, Bowden J, *et al.* *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. *Nat Protoc* 2013; 8(8): 1494-512.
- 23 Wang HJ, Li WT, Liu YN, Yang FS, Wang XQ. Resolving interspecific relationships within evolutionarily young lineages using RNA-seq data: An example from *Pedicularis* section *Cyathophora* (*Orobanchaceae*). *Mol Phylogenet Evol* 2017; 107: 345-55.
- 24 Abruzzi KC, Zadina A, Luo W, Wiyanto E, Rahman R, Guo F, *et al.* RNA-seq analysis of *Drosophila* clock and non-clock neurons reveals neuron-specific cycling and novel candidate neuropeptides. *PLoS Genetics* 2017; 13(2): e1006613.
- 25 朱海生, 陈敏敏, 温庆放, 蓝新隆, 李永平, 王彬, 等. 丝瓜 18S rRNA 基因克隆及其作为内参基因的应用. *核农学报* (Zhu Haisheng, Chen Mmindong, Wen Qingfang, Lan Xinlong, Li Yongping, Wang Bin, *et al.* Cloning of 18S rRNA gene from *Luffa cylindrica* and its application as an internal standard. *J Nuc Agricul Sci*) 2016; 30(1): 35-41.
- 26 温庆放, 刘建汀, 朱海生, 陈敏敏, 王彬, 张前荣. 丝瓜过氧化氢酶基因 *CAT1* 的克隆及表达分析. *园艺学报* (Wen Qingfang, Liu Jianting, Zhu Hhaisheng, Chen Mindong, Wang Bin, Zhang Qianrong. Cloning and expression analysis of catalase *CAT1* gene from *Luffa cylindrica*. *Acta Horticulturae Sinica*) 2016; 43(10): 2039-48.
- 27 Dewanto V, Wu X, Adom KK, Liu RH. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem* 2002; 50: 3010-4.
- 28 Mani R, Meena B, Valivittan K, Suresh A. Glutathione-S-transferase and catalase activity in different tissues of marine catfish (*Arius arius*) on exposure to cadmium. *Int J Pharmacy Pharmaceutical Sci* 2014; 6(1): 326-32.
- 29 Hu L, Yang Y, Jiang L, Liu S. The catalase gene family in cucumber: Genome-wide identification and organization. *Genet Mol Biol* 2016; 39(3): 408-15.
- 30 Mhamdi A, Queval G, Chaouch S, Vanderauwera S, Breusegem FV, Noctor G. Catalase function in plants: A focus on *Arabidopsis* mutants as stress-mimic models. *J Exp Bot* 2010; 61(15): 4197-220.
- 31 Su Y, Guo J, Ling H, Chen S, Wang S, Xu L, *et al.* Isolation of a novel peroxisomal catalase gene from sugarcane, which is responsive to biotic and abiotic stresses. *PLoS One* 2014; 9(1): e84426.
- 32 Suzuki N, Rivero RM, Shulaev V, Blumwald E, Mittler R. Abiotic and biotic stress combinations. *New Phytologist* 2014; 203(1): 32-43.
- 33 Vandenamee S, Vanderauwera S, Vuylstecke M, Rombauts S, Langebartels C, Seiditz HK, *et al.* Catalase deficiency drastically affects gene expression induced by high light in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 2004; 39(1): 45-58.
- 34 Causin HF, Marchetti CF, Pena LB, Gallego SM, Barneix AJ. Down-regulation of catalase activity contributes to senescence induction in wheat leaves exposed to shading stress. *Biologia Plantarum* 2015; 59(1): 154-62.
- 35 Mellidou I, Buts K, Hatoum D, Ho QT, Johnston JW, Watkins CB, *et al.* Transcriptomic events associated with internal browning of apple during postharvest storage. *BMC Plant Biol* 2014; 14: 328.
- 36 Kagan IA, Dinkins RD, Taylor NL. Phenolic profiles and polyphenol oxidase (PPO) gene expression of red clover (*Trifolium pratense*) selected for decreased postharvest browning. *Am J Plant Sci* 2016; 7(10): 1478.
- 37 Fan M, Li W, Hu X, Sun YN, Yu G, Zhang X. Effect of micro-vacuum storage on active oxygen metabolism, internal browning and related enzyme activities in Laiyang pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd). *LWT-Food Sci Tech* 2016; 72: 467-74.
- 38 Ali S, Khan AS, Malik AU, Shahid M. Effect of controlled atmosphere storage on pericarp browning, bioactive compounds and antioxidant enzymes of litchi fruits. *Food Chem* 2016; 206: 18-29.
- 39 Ma Y, Yang M, Wang J, Jiang CZ, Wang Q. Application of exogenous ethylene inhibits postharvest peel browning of 'Huangguan' pear. *Front Plant Sci* 2016; 7: 2029.
- 40 Li J, Liu J, Wang GQ, Cha JY, Li GN, Chen S, *et al.* A chaperone function of no catalase activity is required to maintain catalase activity and for multiple stress responses in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2015; 27(3): 908-25.
- 41 Pasquariello MS, Di Patre D, Mastrobuoni F, Zampella L, Scortichini M, Petriccione M. Influence of postharvest chitosan treatment on enzymatic browning and antioxidant enzyme activity in sweet cherry fruit. *Postharvest Biol Technol* 2015; 109: 45-56.
- 42 Shafique M, Khan AS, Malik AU, Shahid M. Influence of harvest location and cultivar on pericarp browning and biochemical fruit quality of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). *Pak J Agri Sci* 2015; 52(1): 123-8.