

黄秋葵果实老化与内切葡聚糖酶基因的关系分析

李永平¹ 陈朝文² 马慧斐¹ 康玉妹¹ 白昌辉¹ 薛珠政^{1*} 温庆放^{1*}

¹福建省蔬菜遗传育种重点实验室/福建省农业科学院作物研究所, 福州 350013;

²泉州市农业科学研究所, 泉州 362212)

摘要 黄秋葵(*Hibiscus esculentus* L.)果实极易老化, 采收期和货架期都极短, 为研究黄秋葵老化的机理, 该文通过实验测定了黄秋葵果实发育过程中和采后纤维素含量变化, 显微镜观察了细胞纤维素组织结构变化。黄秋葵果实老化过程中纤维素含量大量增加, 细胞内纤维组织增多, 推测纤维素增加是黄秋葵果实老化的主导因素。植物内切葡聚糖酶基因与纤维素的合成密切相关, 该研究从黄秋葵果实转录组测序的RNA-seq数据库中筛选得到7条功能注释为endoglucanase基因家族的片段序列, 克隆获得黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族的endoglucanase1、endoglucanase3、endoglucanase6、endoglucanase10、endoglucanase11、endoglucanase23、endoglucanase25基因全长, 分别将其命名为HeCEL1、HeCEL3、HeCEL6、HeCEL10、HeCEL11、HeCEL23、HeCEL25 7个基因, 它们均属于GH9家族。通过荧光定量PCR分析黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族7个基因的表达情况, 结果表明黄秋葵果实发育时HeCEL3、HeCEL10、HeCEL25表达模式相同, HeCEL6、HeCEL23表达模式一致; HeCEL25果实采后0~2天表达量平稳, 其余6个基因在采后1天表达水平急剧下降。黄秋葵果实发育过程中的纤维素、采后常温贮藏其纤维素含量与HeCEL3、HeCEL6、HeCEL10、HeCEL25、HeCEL23表达量呈显著负相关, 推测HeCEL3、HeCEL6、HeCEL10、HeCEL25、HeCEL23在黄秋葵果实纤维素积累中起重要作用, 与黄秋葵果实的老化密切相关。

关键词 黄秋葵; 老化; 纤维素; 内切葡聚糖酶

Studies on the Relationship between Fruit Aging Mechanism and Endoglucanase Gene Family of *Hibiscus esculentus* L.

LI Yongping¹, CHEN Chaowen², MA Huiifei¹, KANG Yumei¹, BAI Changhui¹, XUE Zhuzheng^{1*}, WEN Qingfan^{1*}

¹Fujian Key Laboratory of Vegetable Genetics and Breeding, Crops Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350013, China; ²Quanzhou Agricultural Research Institute, Quanzhou 362212, China)

Abstract *Hibiscus esculentus* L. is very easy to age, and its harvest time and shelf life are very short. In order to study the aging mechanism of *Hibiscus esculentus* L. fruit, the changes of cellulose content as well as the cell cellulose structure were analysed during the fruit development and the postharvest period. It was found that in the aging process of *Hibiscus esculentus* L. fruit, both the content of cellulose and the cell cellulose tissue were increased. It was suggested that the increase of cellulose was the leading factor of the *Hibiscus esculentus* L. fruit

收稿日期: 2021-09-29 接受日期: 2021-12-09

福建省属公益类科研院所基本科研专项(批准号: 2019R1026-9)、国家大宗蔬菜产业技术体系福州综合试验站项目(批准号: CARS-23-G-53)和福建省农科院科技创新平台专项(批准号: CXPT202001)资助的课题

*通讯作者。Tel: 13509339402, E-mail: 369654817@qq.com; Tel: 13805062692, E-mail: fjvrc@163.com

Received: September 29, 2021 Accepted: December 29, 2021

This work was supported by the Special Project on Basic Research of Fujian Academy of Public Welfare Research (Grant No.2019R1026-9), the Fuzhou Comprehensive Experimental Station, National Bulk Vegetable Industry Technology System (Grant No.cars-23-G-53), and Special Project on Science and Technology Innovation Platform of Fujian Academy of Agriculture and Technology (Grant No.CXPT202001)

*Corresponding authors. Tel: +86-13509339402, E-mail: 369654817@qq.com; Tel: +86-13805062692, E-mail: fjvrc@163.com

aging. Endoglucanase genes in plants are closely related to cellulose synthesis. In this study, seven fragments which were functionally annotated as *endoglucanase* gene family were screened from the RNA-seq database of *Hibiscus esculentus* L. fruit transcriptome sequencing, and 7 full-length genes of *endoglucanase* gene family, *endoglucanase1*, *endoglucanase3*, *endoglucanase6*, *endoglucanase10*, *endoglucanase11*, *endoglucanase23* and *endoglucanase25* were cloned and named as *HeCEL1*, *HeCEL3*, *HeCEL6*, *HeCEL10*, *HeCEL11*, *HeCEL23* and *HeCEL25* respectively. All these genes belong to the GH9 family. Expression patterns of these genes were carried out by qRT-PCR (reverse transcript quantitative PCR). It showed that expression patterns of *HeCEL3*, *HeCEL10* and *HeCEL25* were in the same, and *HeCEL6* was in concordance with *HeCEL23*, too. The expression of *HeCEL25* was stable at 0-2 days after harvest, while the expression of the other 6 genes decreased sharply at 1 day after harvest. During the development of *Hibiscus esculentus* L. fruit, the content of cellulose stored at room temperature after harvest was significantly negatively correlated with the expression of *HeCEL3*, *HeCEL10*, *HeCEL25*, *HeCEL6* and *HeCEL23*, and it was speculated that *HeCEL3*, *HeCEL10*, *HeCEL25*, *HeCEL6* and *HeCEL23* played an important role in cellulose accumulation in *Hibiscus esculentus* L. fruit, which was closely related to the aging of *Hibiscus esculentus* L. fruit.

Keywords *Hibiscus esculentus* L.; aging; cellulose; endoglucanase

黄秋葵(*Hibiscus esculentus* L.), 又名秋葵, 系秋葵属植物。我国大部区域均有栽培此植物。黄秋葵含丰富的蛋白质、脂肪、纤维素、多糖等, 幼果中富含大量果胶、牛乳聚糖及阿拉聚糖的黏滑汁液以及丰富的膳食纤维, 是一种新世纪理想的高档绿色营养保健蔬菜^[1-3]。黄秋葵的商品价值较高, 但它的采收期很短, 坐果5~7天内采收适宜, 其后果荚快速老化, 口感坚韧难嚼, 从而失去商品性^[4-5]。即使适时采收的果荚在采收后常温保存1~2天即失去商品性。有研究认为, 秋葵果实老化的生理过程主要表现为纤维素含量大为增加, 这主要由于果肉中维管束细胞的细胞壁纤维素快速累积所致^[6]。

细胞壁中纤维素的合成和降解与黄秋葵果实的纤维积累密切相关。植物纤维素酶也被称为内切葡聚糖酶(endoglucanase), 其家族可分为多个亚家族。20世纪60年代, HALL^[7]首次对植物纤维素酶开展研究, 其后研究者相继发现在正常的植物生长发育过程中, 细胞出现分裂和细胞解体时, 细胞壁的纤维素酶催化活性较高。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)^[8-10]、水稻(*Oryza sativa* L.)^[11]、欧洲大叶杨(*Populus lasiocarpa* Oliv.)^[12]和番茄(*Solanum lycopersicum*)^[13]等植物中, 纤维素酶会影响细胞壁的纤维素含量。拟南芥的内切葡聚糖酶基因突变, 致使根、下胚轴、茎、叶、花、果等器官比野生型明显缩小, 细胞壁结构发生异常, 整个植株形态结构发生改变^[14-17]。在鳄梨(*Persaamericana* Mill.)^[18]、番茄^[19-20]、草莓(*Fragaria × ananassa* Duch.)^[21]、胡椒

(*Piper nigrum* L.)^[22]等植物中, 内切葡聚糖酶与果实成熟和脱落有关。豌豆(*Pisum sativum* L.)的内切葡聚糖酶基因*EGL1*^[23]、拟南芥的*CEL1*基因^[24]和番茄的*CEL4*基因^[25], 均与其细胞伸长发育密切相关。植物内切葡聚糖酶基因与纤维素的合成密切相关, 但具体机制尚未被阐明。

本实验通过研究黄秋葵果实发育过程和采后处理的纤维素含量变化, 及通过显微镜观察其细胞组织结构变化与黄秋葵老化的关系, 分析其老化原因, 分析黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族、生物信息、序列特征及黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族成员表达和致使黄秋葵老化的主要因素纤维素积累之间的相关性。初步明确内切葡聚糖酶基因在黄秋葵老化过程中的作用, 可为黄秋葵的生产、分子育种等提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

植物材料取自于福建省农业科学院蔬菜研究中心基地绿色秋葵(‘台湾五福’)。取健康果实(花后2天、4天、6天、8天、10天)及将花后6天果实在常温下保存0天、1天、2天、3天、4天, 每个处理3个重复, 液氮处理后, -80 °C保存。所有样品均取自于长势基本一致的健康植株, 同一处理的3个重复样品分别取自于不同的植株。

1.2 黄秋葵果实细胞组织的形态结构观察

将1.1中实验材料(去芯去籽后)迅速放入固定液FAA中于常温下固定24 h。再用植物软化液(武汉塞

维尔生物科技有限公司, G1115)软化14天。参照吴华等^[26]的石蜡包埋法, 制作石蜡切片。将脱蜡好的切片用蒸馏水清洗, 再将切片放入盐酸间苯三酚染色液中染色2~5 min, 用蒸馏水冲洗, 之后进行透明封固。于光学显微镜下观察、拍照。甲苯胺蓝染色可使纤维素细胞组织呈蓝紫色。

1.3 纤维素提取和测定

采用硫酸蒽酮比色法^[27]测定纤维素含量, 3次重复。

1.4 转录组测序

将上述材料置于干冰中, 再寄往广州基迪奥生物科技有限公司, 采用Illumina HiSeq™ 2500 PE125系统进行RNA-Seq转录组测序, 经Trinity序列组装, 过滤获得49.6 Gb的有效数据。

1.5 仪器和试剂

实验仪器包括: QuantStudio7 Flex实时荧光定量PCR仪(ABI公司, 美国)、ProFlexroPCR系统(ABI公司, 美国)、通用植物总RNA提取试剂盒(上海天根生化科技有限公司)、RNA逆转录试剂盒(TaKaRa公司, 日本)、胶回收试剂盒(Omega公司, 美国)。合成引物和测序由福州尚亚生物技术有限公司完成。

1.6 基因的生物信息学分析软件

实验引物设计应用Primer Premier 5.0软件完成; 分析基因蛋白的结构与理化性质使用在线软件ProtScale(<http://web.expasy.org/protscale/0>); 预测分析黄秋葵内切葡聚糖酶蛋白亚细胞定位、结构域和相关功能, 采用在线软件线分析工具ProtComp 9.0(<http://linux1.softberry.com>)、MEME(<http://meme-suite.org/tools/meme>)、TMHMM(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>)、PFA(<http://pfam.sanger.ac.uk/-search>)和INTERPRO(<http://www.ebi.ac.uk/interpro/-scan.html/>); 用MEGA 5.0软件构建进化树。

1.7 实时荧光定量分析

依据黄秋葵 *endoglucanase1*、*endoglucanase3*、*endoglucanase6*、*endoglucanase10*、*endoglucanase11*、*endoglucanase23*、*endoglucanase25*全长序列和黄秋葵 *Actin*(登录号: QBA30212.1)、18s rRNA(登录号: AF069229.1), 运用Primer Express 3.0软件, 设计荧光定量特异引物(表1)。使用Power SYBR Green PCR Master Mix试剂盒(ABI, 美国)进行qRT-PCR反应(ABI7500)。反应体系为: 12.5 μL PCR Master Mix, 1 μL cDNA, 上、下游引物(10 μmol/L)

各0.5 μL, 加蒸馏水至总体积25 μL。反应程序为: 95 °C预变性45 s; 95 °C变性5 s, 56 °C退火30 s, 72 °C延伸45 s, 40个循环。每个反应设3个重复, 实验结果应用QuantStudio7分析软件中 $\Delta\Delta\text{CT}$ (Comparative CT)法分析处理并得出目的基因的表达情况。

1.8 数据分析

实验数据采用平均值±标准差($\bar{x}\pm s$)表示, 每组实验至少重复3次。采用SPSS 19.00软件进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 黄秋葵果实细胞组织的形态结构观察

维管束是指维管植物的维管组织, 它是木质部与韧皮部成束状排列形成的结构。维管束之间相互连接形成维管系统, 其主要的作用是为植物体输导水分、无机盐与有机养料等, 同时也为植物体提供力学支撑。观察甲苯胺蓝染色的黄秋葵果实石蜡切片, 纤维素细胞组织呈蓝紫色。从图1可知, 随着果实的发育维管束中细胞的细胞壁呈阶梯式增厚(图1中箭头a为纤维素)。花后2~6天维管束中细胞的细胞壁增厚不显著, 花后8天维管束中细胞的细胞壁显著增厚, 花后10天维管束中细胞的细胞壁有更显著的增厚; 薄壁细胞在花后2~6天变化不大, 花后8天、10天纤维素组织在薄壁细胞中有较明显的增加。采后0~2天维管束中细胞的细胞壁增厚不明显, 采后3天开始细胞壁的纤维组织增加较为显著。

2.2 纤维素提取和测定

随着黄秋葵果实的生长和发育, 其纤维素含量均呈增加趋势, 花后4天和花后6天纤维素含量增加不显著, 花后2天、花后8天、花后10天纤维素含量增加极显著($P<0.01$)。黄秋葵果实采后处理中, 纤维素的含量持续增加, 采后2~4天纤维素含量极显著增加(表2, $P<0.01$)。

2.3 目的基因

从黄秋葵果实转录组测序的RNA-seq数据库中筛选得到7条功能注释为*endoglucanase*基因的Unigene序列, *endoglucanase1*(Unigene00512235)、*endoglucanase3*(Unigene0038431)、*endoglucanase6*(Unigene0041052)、*endoglucanase10*(Unigene0067663)、*endoglucanase11*(Unigene0014494)、*endoglucanase23*(Unigene0053150)、*endoglucanase25*(Unigene0007494)。经在线软件对基

表1 黄秋葵内切葡聚糖酶基因验证与表达的引物

Table 1 Primers used to verify and analyze the expression of *endoglucanase* gene in *Hibiscus esculentus*

作用 Function	引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence (5'→3')	T _m /°C	扩增长度/bp Length of product /bp	
For full length	HCEL1-F	TTA CAG GCT ACA GCA GAT T	47.9	1 995	
	HCEL1-R	GCA CGC CAC TAA TAC CAA	52.2		
	HCEL3-F	AAT GGC AAA GAC CAA ACT	49.7	1 651	
	HCEL3-R	GAA TGG GAA TAA TCA GAC C	48.7		
	HCEL6-F	CGA ATC CCA TCT TGT AGT	46.9	2 499	
	HCEL6-R	TTG CAG CAT CAC AAC AAC	50.2		
	HCEL10-F	CAT GGG CTA TCC TGG AGT	52.2	1 633	
	HCEL10-R	ACA GTC TAC GGC CAT TTA	54.8		
	HCEL11-F	TAG TTT AGG AGG GAA GGG	49.0	1 819	
	HCEL11-R	TCT AGT AAG AGG CAA CCA AT	49.3		
	HCEL23-F	ACT TCT CAT TTC CCT TGT TT	50.6	1 597	
	HCEL23-R	AGT CGG CTC TGA CTT CTT	48.5		
	HCEL25-F	CAA CCA CTA GCC CAC AGC	53.9	2 452	
	HCEL25-R	CAC TCG ATC CAC CAC CAG	53.9		
	For the expression of cellulase	CEL1-F	GTC AGG GTG TTT CAG TTT G	49.6	157
		CEL1-R	GGT AAG TTG GGT TCT TGG	50.1	
CEL3-F		TGA GGG CAA CAA ACG ATG	55.2	245	
CEL3-R		TTG GGT GGT TGA ATA CGG	54.3		
CEL6-F		TTG ATC GGA AAG GGT AGG	52.9	186	
CEL6-R		AG AAG CTG GAA TGG TGC	52.8		
CEL10-F		CAT GCA ACA GGC AAT CAG	52.9	218	
CEL10-R		AGA CCG CAC ATA ACA CCC	53.1		
CEL11-F		GGG ACA AGT ACA GAG GTA AA	49.1	157	
CEL11-R		GCA TTG GCT ACG ACA TAA	49.5		
CEL23-F		CAG CAT GGT TAA GGA GGG C	57.9	187	
CEL23-R		CCG CAG TTG ACC GTT TGT	57.1		
CEL25-F		GGC TTC TGC TTC CAT CGT	55.4	174	
CEL25-R		CCC AAA CAA ACT CGT CCC	55.5		
For the internal control		NA-F NA-R	CAC CAC TGC TGA ACG GGAA AGA GGA	62.0	196
			CTT CTG GAC AAC GGA	62.0	

因的表达量聚类作图可知,这7个基因在10个处理中均显示表达差异,在果实发育过程中*endoglucanase3*表达量先上调,后下调,再上调;*endoglucanase23*的表达量持续下调;其他5个基因表达量均为先升后降。采后常温贮存1~4天果实中除*endoglucanase25*外其他6个基因均表达下调(图2)。

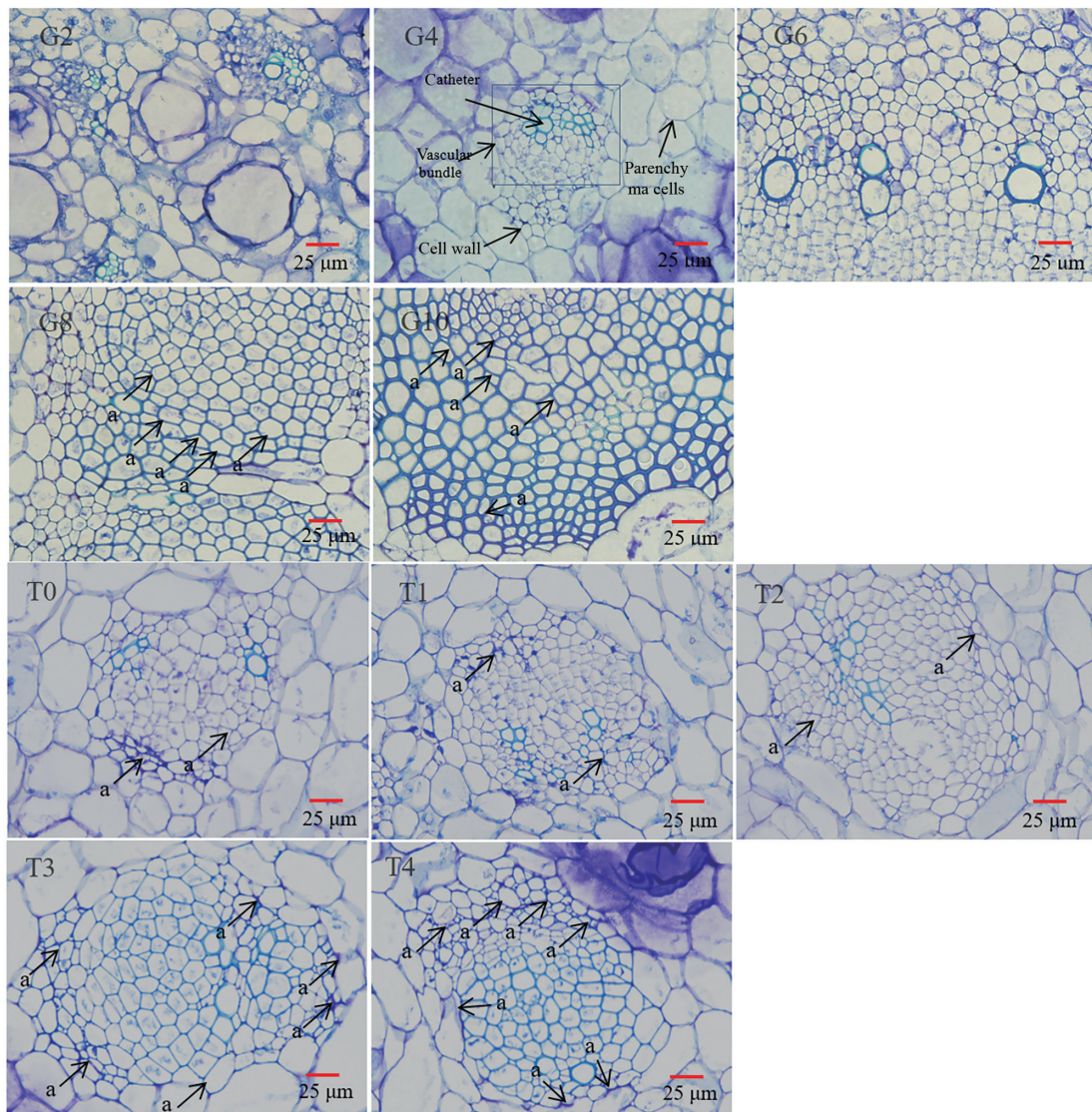
2.4 目的基因克隆及序列分析

从黄秋葵果实转录组测序的RNA-seq数据库中筛选得到*endoglucanase1*、*endoglucanase3*、*endoglucanase6*、*endoglucanase10*、*endoglucanase11*、*endoglucanase23*、*endoglucanase25*基因序列,设计引物进行验证(表1)。经回收、连结、转化、测序,结果表明,*endoglucanase1*(登录号:MW-

441770)、*endoglucanase3*(登录号:MW363889)、*endoglucanase6*(登录号:MW363890)、*endoglucanase10*(登录号:MW441773)、*endoglucanase11*(登录号:MW363894)、*endoglucanase23*(登录号:MW464894)、*endoglucanase25*(登录号:MW363891)基因的全长分别为1 995 bp、1 651 bp、2 499 bp、1 633 bp、1 819 bp、1 597 bp、2 452 bp,其编码的蛋白分别为504 aa、486 aa、626 aa、376 aa、523 aa、491 aa、619 aa。分别将其命名为*HeCEL1*、*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL0*、*HeCEL11*、*HeCEL23*、*HeCEL25*。

2.5 基因的生物信息学分析

2.5.1 编码蛋白的理化性质分析 经克隆验证



G2: 花后2天; G4: 花后4天; G6: 花后6天; G8: 花后8天; G10: 花后10天; T0: 采后0天; T1: 采后1天; T2: 采后2天; T3: 采后3天; T4: 采后4天。a: 纤维素。

G2: after flowering 2 d; G4: after flowering 4 d; G6: after flowering 6 d; G8: after flowering 8 d; G10: after flowering 10 d; T0: postharvest 0 d; T1: postharvest 1 d; T2: postharvest 2 d; T3: postharvest 3 d; T4: postharvest 4 d. a: cellulose.

图1 黄秋葵果实组织石蜡切片结果

Fig.1 Paraffin section results of *Hibiscus esculentus* L. fruit tissue

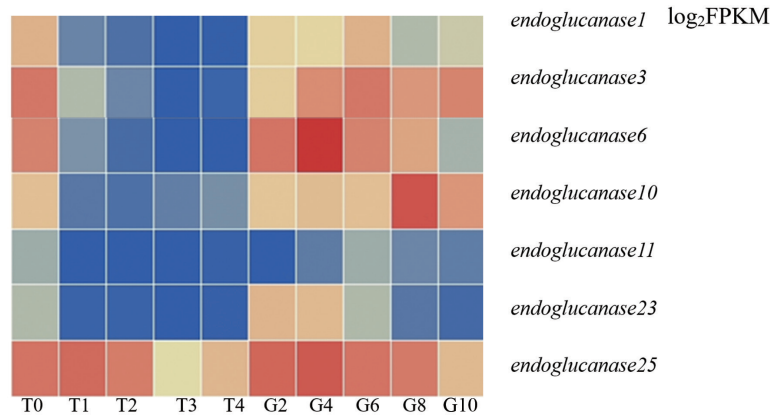
表2 黄秋葵果实发育过程中纤维素含量、果实采后处理的纤维素含量(mg/100g)

Table 2 The cellulose content in *Hibiscus esculentus* fruit development and postharvest (mg/100g)

处理 Treatment	纤维素 Cellulose	处理 Treatment	纤维素 Cellulose
After flowering 2 d	240.18±1.95 ^d	Postharvest 0 d	274.33±1.19 ^d
After flowering 4 d	268.93±1.45 ^c	Postharvest 1 d	293.01±0.71 ^d
After flowering 6 d	274.06±2.21 ^c	Postharvest 2 d	307.09±3.25 ^c
After flowering 8 d	296.41±1.96 ^b	Postharvest 3 d	321.42±1.42 ^b
After flowering 10 d	354.09±1.01 ^a	Postharvest 4 d	335.86±4.23 ^a

a、b、c、d代表多重比较, $P < 0.01$.

a, b, c, d stands for multiple comparison, $P < 0.01$.



G2、G4、G6、G8、G10、T0、T1、T2、T3、T4同上。

G2, G4, G6, G8, G10, T0, T1, T2, T3, T4 as above.

图2 黄秋葵果实内切葡聚糖酶基因的RNA-seq表达分析

Fig.2 RNA-seq expression analysis of *endoglucanase* genes of *Hibiscus esculenus* L. fruit

表3 黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族蛋白理化性质

Table 3 The protein physico-chemical analysis of the *Hibiscus esculentus* *edoglucanase* gene family

基因编号 Genetic code	氨基酸数目 Number of amino acids	分子量/Da Molecular weight /Da	理论等电点(pI) Theoretical (pI)	脂肪族指(AI) Aliphatic index	疏水性指数(GRAVY) Grand average of hydrophobicity (GRAVY)	不稳定性指(II) Instability index (II)	细胞定位 Subcellular localization
<i>HeCEL1</i>	504	55.97	9.25	76.69	-0.278	40.22	Plasma membrane
<i>HeCEL3</i>	486	53.71	9.13	74.51	-0.220	37.09	Plasma membrane
<i>HeCEL6</i>	626	69.63	9.62	72.06	-0.368	33.96	Plasma membrane
<i>HeCEL10</i>	376	41.20	6.61	74.47	-0.275	39.67	Plasma membrane
<i>HeCEL11</i>	523	59.04	5.66	76.88	-0.340	34.59	Plasma membrane
<i>HeCEL23</i>	491	54.34	5.04	76.13	-0.293	44.22	Plasma membrane
<i>HeCEL25</i>	619	68.62	8.86	72.70	-0.361	32.41	Plasma membrane

获得7条黄秋葵内切葡聚糖酶基因全长序列, 软件ProtScale预测, 其编码的蛋白为376~626 aa, 分子量为41~70 kDa, 脂肪族氨基酸指数在72.06~93.41, 均为亲水性且较稳定, HeCEL10、HeCEL11、HeCEL23为弱酸性, HeCEL1、HeCEL3、HeCEL6、HeCEL25为碱性, 7个CEL的蛋白都定位于质膜上(表3)。

2.5.2 蛋白的结构分析 利用MEME等在线软件预测黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族成员基因蛋白序列保守结构域, 所得除HeCEL25的7个蛋白序列外均含有3个保守结构域, 并且位置基本一致, 说明黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族蛋白具有高度保

守性; HeCEL10、HeCEL25没有信号肽序列, 在C-端具有1个细胞溶质结构域的特殊区域; HeCEL6、HeCEL11、HeCEL25在N-端具有1个螺旋的跨膜区域; HeCEL1、HeCEL3、HeCEL6、HeCEL11、HeCEL23具有催化区域和信号肽序列; HeCEL1、HeCEL3、HeCEL6、HeCEL23、HeCEL25具有2个活性区域, HeCEL10、HeCEL11具有1个活性区域。7个蛋白均属于GH9家族, 其中HeCEL25属于GH9A亚家族, HeCEL6属于GH9C亚家族, HeCEL1、HeCEL3、HeCEL10、HeCEL11、HeCEL23属于GH9B亚家族。

2.5.3 进化分析 将黄秋葵的7个内切葡聚糖酶基因的蛋白序列与拟南芥、番茄、鳄梨、辣椒(*Capsicum*

annuum)、草莓的33个纤维素酶基因蛋白序列应用MEGA5.0进行进化分析(图3)。41个纤维素酶基因蛋白形成6分支, Group I包含HeCEL1、HeCEL3、HeCEL23等22个蛋白; Group II包含 *HeCEL6*、*HeCEL11*等10个蛋白; Group III包含拟南芥的endoglucanase 16; Group IV包含HeCEL10等3个蛋白; Group V包含HeCEL25等4个蛋白。黄秋葵的7个内切葡聚糖酶基因的蛋白均与拟南芥相应的内切葡聚糖酶基因蛋白亲缘关系更近。

2.6 基因表达分析

2.6.1 内切葡聚糖酶基因在黄秋葵果实发育中的表达 *HeCEL6*和*HeCEL23*在花后4天果实中的表达量为最高值, 随后快速下降; *HeCEL1*、*HeCEL11*表达量的峰值出现在花后6天; *HeCEL3*、*HeCEL10*、*HeCEL25*随着果实的生长发育表达量逐步增加, 花

后2~6天的表达较为平稳, 6~8天表达量急剧上调, 在花后8天达到最大值, 之后快速下降。7个内切葡聚糖酶基因在花后10天的表达水平均呈下降趋势(图4A和图4B)。

2.6.2 内切葡聚糖酶基因家族在黄秋葵采后果实中的表达 内切葡聚糖酶基因家族在果实采后0~4天的表达量呈均下降态势, *HeCEL1*、*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL10*、*HeCEL11*、*HeCEL23*的表达在采后1天急剧下降, 3~4天基本无法检测到; 果实采后0~4天, *HeCEL5*表达量持续显著下降; 果实采后0~2天*HeCEL25*表达量平稳, 随后表达量显著且迅速下降(图5A和图5B)。

2.7 相关性分析

2.7.1 黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族RNA-seq数据库的表达与qRT-PCR表达的相关性分析 通过相

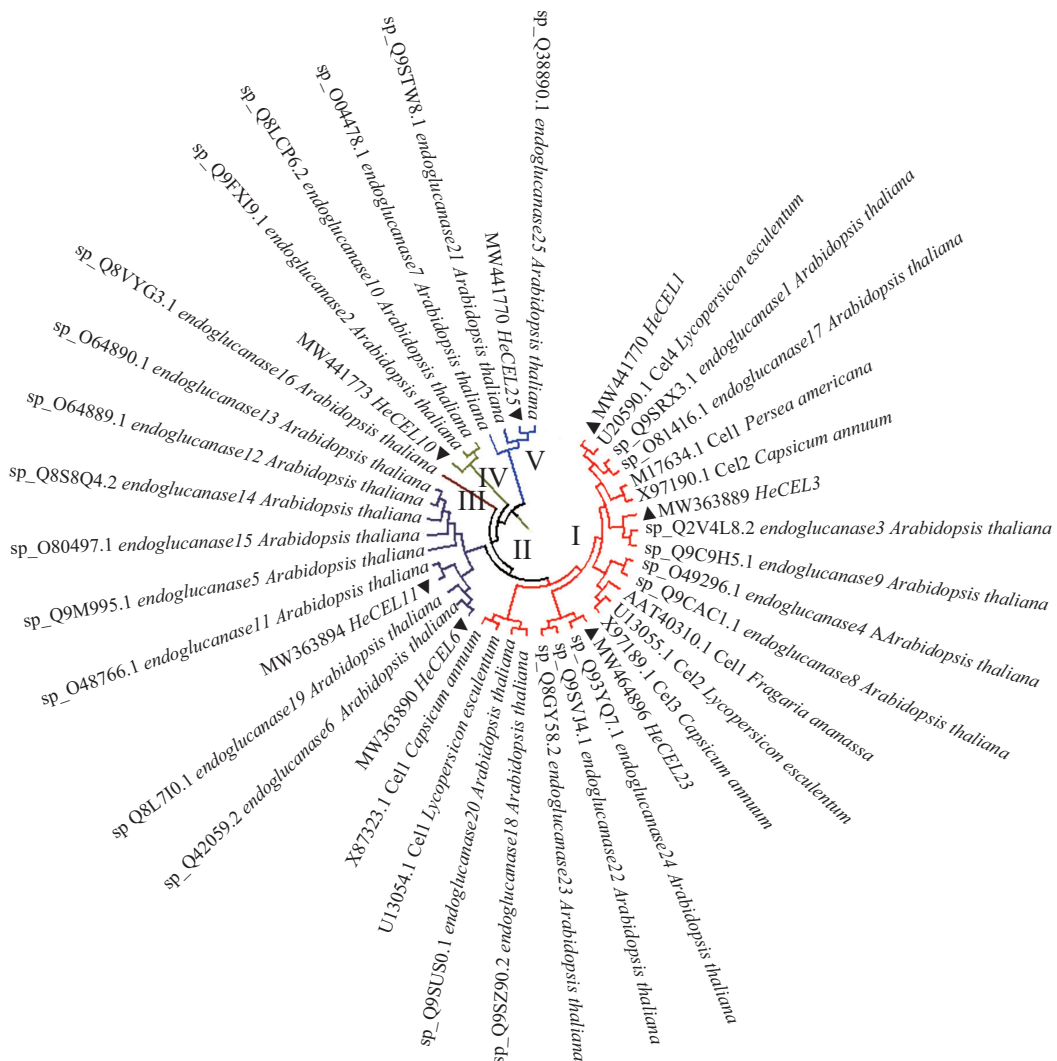


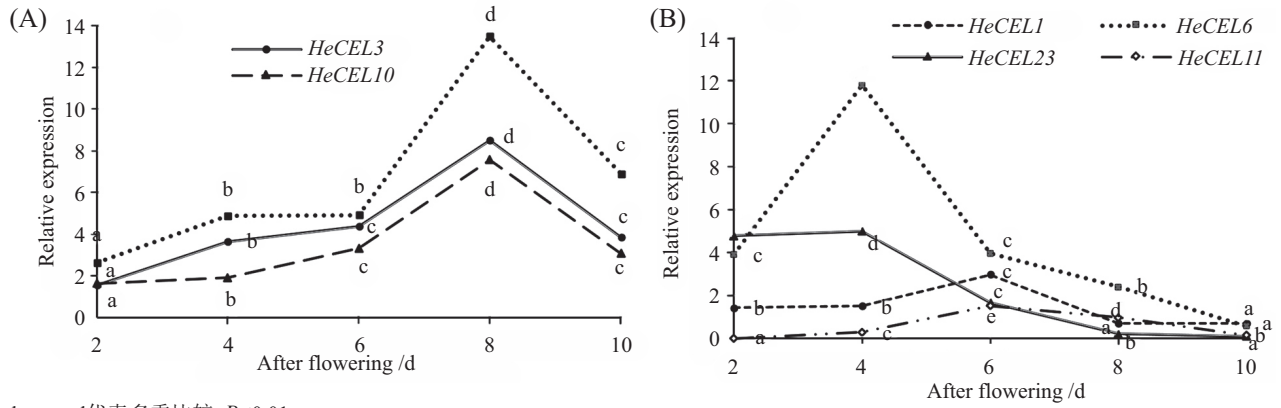
图3 黄秋葵与拟南芥、番茄等作物内切葡聚糖酶基因家族系统进化树

Fig.3 Phylogenetic trees of the *Hibiscus esculentus* and *Arabidopsis thaliana* and *Lycopersicon esculentum* endoglucanase gene family

关性分析发现, 黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族RNA-seq数据库的表达与qRT-PCR表达相关性较好, 相关系数 R^2 为0.941 4(图6)。说明转录组RNA-seq测得黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族的表达量与采用qRT-

PCR得到的表达值的变化趋势基本一致。

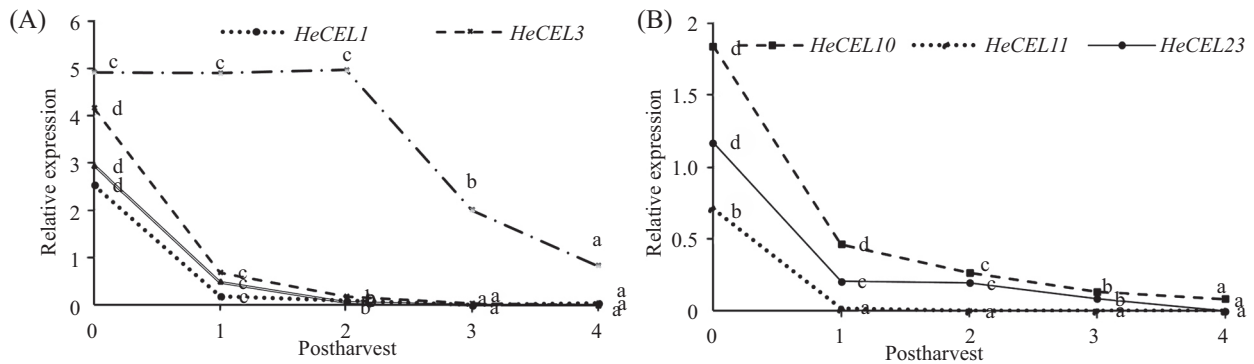
2.7.2 黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族mRNA表达与纤维素含量变化的相关性分析 通过相关性分析发现, 黄秋葵内切葡聚糖酶基因在采后处理mRNA



a、b、c、d代表多重比较, $P < 0.01$.
a, b, c, d stands for multiple comparison, $P < 0.01$.

图4 黄秋葵果实发育过程中内切葡聚糖酶基因家族的表达

Fig.4 Expression of endoglucanase gene family in the process of fruit development



a、b、c、d代表多重比较, $P < 0.01$.
a, b, c, d stands for multiple comparison, $P < 0.01$.

图5 黄秋葵果实采后内切葡聚糖酶家族的表达

Fig.5 Expression of endoglucanase gene family after *Hibiscus esculentus* fruit harvest

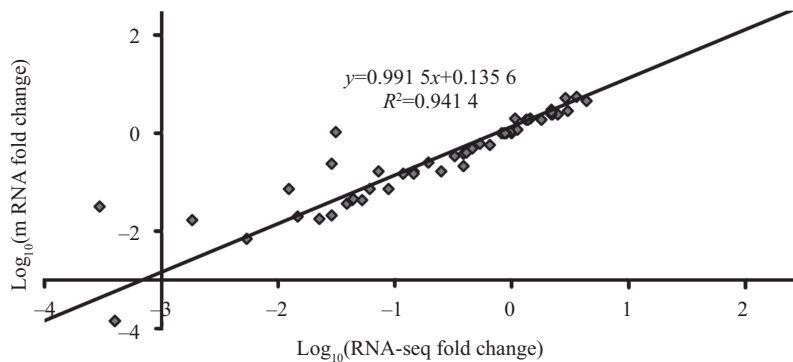


图6 黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族RNA-seq数据库的表达与mRNA表达的相关性分析
Fig.6 Correlation analysis between expression of RNA-seq database and mRNA expression of endoglucanase gene family in *Hibiscus esculentus*

表4 黄秋葵内切葡聚糖酶基因家族mRNA表达量与纤维素含量变化的相关性分析
Table 4 Correlation analysis between mRNA expression of *endoglucanase* gene family and cellulose content in *Hibiscus esculentus*

基因编号 Genetic code	采后处理 Fruit after harvest	果实发育过程 Fruit development
<i>HeCEL1</i>	0.530 8	0.528 2
<i>HeCEL3</i>	0.986 7**	0.812 9**
<i>HeCEL6</i>	0.886 4**	0.904 1**
<i>HeCEL10</i>	0.995 5**	0.842 8**
<i>HeCEL11</i>	0.612 8*	0.793 8*
<i>HeCEL23</i>	0.989 7**	0.809 8**
<i>HeCEL25</i>	0.879 2**	0.885 3**

*代表显著相关, **代表极显著相关。

* stands for significant correlation, ** stands for extremely significant correlation.

表达量与纤维素的含量变化相关性较好, 均呈负相关, 尤其是*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL10*、*HeCEL23*、*HeCEL25*基因, 相关系数 R^2 分别为0.986 7、0.886 4、0.995 5、0.989 7、0.879 2。在果实发育过程中mRNA表达量与纤维素的含量变化相关性较好的基因是*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL10*、*HeCEL23*、*HeCEL25*, 说明黄秋葵*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL10*、*HeCEL23*、*HeCEL25*基因表达与纤维素的含量关系密切(表4)。

3 讨论

许多果实的老化, 是由木质化和纤维化所引起的。无论是纤维化还是木质化都离不开纤维素和木质素的作用, 二者都涉及到纤维素和木质素的产生及调控。成熟硬肉桃的纤维素含量较软肉桃要高许多, 且果实成熟后硬度和纤维素的含量表现为极显著的正相关^[28]。果实是植物的延存器官, 在采后贮藏中依然还是一个高度协调的生命体, 有其自身的衰变老化规律, 包含物质转化与利用、质地、风味等一系列变化。果实采后老化是由果实内在成熟衰老规律协同外部环境因素共同诱发的一种主动过程。

果实质地关系到果实品质和商品性, 果实的质地与细胞张力、胞间结合力及细胞壁机械强度密切相关。中胶层、初生壁和次生壁共同构成植物细胞壁。中胶层由果胶物质组成, 初生壁则由纤维素、果胶和半纤维素组成, 而次生壁由纤维素和木质素组成^[29]。果实纤维素、木质素含量严重影响果实的食用口感。橄榄不溶性纤维含量高, 则韧, 即肉质粗、

韧度高、难嚼; 反之则脆, 即肉质细、韧度低、易嚼^[30]。‘琯溪蜜柚’汁胞粒化的起动阶段和加快阶段的纤维素含量极显著增加^[31]。黄果柑果实发生粒化果实纤维素含量增加, 细胞壁发生次生长, 细胞壁加厚^[32]。黄秋葵果实纤维素含量在花后4~6天虽有增加但变化不显著, 花后8天其水平显著上升, 口感由6天时的清脆可口逐渐变得坚韧难咀嚼, 质地由软变硬, 继而不堪食用。花后2~6天维管束中细胞的细胞壁增厚不明显, 花后6~8天维管束中细胞的细胞壁有显著的增厚, 花后8~10天时维管束中细胞的细胞壁有极其明显的增厚, 导管细胞壁的木质素也明显增加, 这与‘琯溪蜜柚’、黄果柑果实粒化的研究结果基本一致; 任健^[6]也发现发育过程中黄秋葵果实失去可食用性时, 纤维素含量显著增加, 维管束中细胞的细胞壁显著增厚, 认为黄秋葵果实的老化是由于果肉中维管束细胞的细胞壁纤维素的快速累积所致的。但他认为果实失去可食用性的时间点在花后11天, 这可能与采样研究的黄秋葵的品种与种植季节的气温条件等有关。黄秋葵果实采摘后在常温25 °C贮存, 1天口感尚可, 2天有些渣感, 随后口感急剧下降, 4天基本不可食用, 其纤维素含量在采后2天较大幅度升高, 其维管束中细胞的细胞壁增厚不明显, 但采后3~4天细胞纤维素组织增加, 因此黄秋葵果实采后老化主要由次生细胞壁增厚及纤维素的积累到一定量所致。

内切葡聚糖酶可将纤维素等水解为低分子糖类^[33], 内切葡聚糖酶的存在是导致幼果期果实细胞壁降解, 膳食纤维含量降低的主要因素。‘琯溪蜜柚’汁胞内切葡聚糖酶活性在成熟中期出现活性

高峰, 未粒化汁胞内切葡聚糖酶活性高于粒化汁胞, 粒化的发生的原因之一可能是因纤维素酶活性较低, 使纤维素、半纤维素分解速度减小^[34]。‘南丰蜜橘’果实内切葡聚糖酶水平在果实膨大中期迅速升高, 囊衣中内切葡聚酶与囊衣纤维素含量极呈显著负相关关系, ‘南丰蜜橘’果实化渣性与囊衣纤维素密切相关; 果实膨大前期至中期是纤维素降解的重要时期, 而内切葡聚糖酶是影响该过程的关键酶^[35]。黄秋葵果实发育时7个基因表达量均为先升后降模式, *HeCEL3*、*HeCEL10*、*HeCEL25*表达量在花后8天达到最值, 均增长了近5倍; *HeCEL6*、*HeCEL23*花后4天果实的表达量为最高值, 是最低值的20倍以上; *HeCEL1*、*HeCEL11*表达量的峰值出现在花后6天; 采后7个基因的表达峰值在采后0天, 除*HeCEL25*外, 其余6个基因在采后1天表达水平急剧下降。黄秋葵果实发育过程中的纤维素寒素、采后常温贮存其纤维素含量均与*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL10*、*HeCEL25*、*HeCEL23*表达量呈显著负相关, 推测*HeCEL3*、*HeCEL6*、*HeCEL10*、*HeCEL23*、*HeCEL25*表达水平降低, 使得纤维素水解速度减慢, 促进纤维素积累, 是造成黄秋葵果实老化的原因之一。

参考文献 (References)

- [1] 卢隆杰, 苏浓, 岳森. 菜药花兼用型植物—黄秋葵[J]. 蔬菜(LU L J, SU N, YUE S. Cabbage-flowering plant—Okra [J]. Vegetables), 2004, 10: 36.
- [2] 单承莺, 马世宏, 张卫明. 保健蔬菜黄秋葵的应用价值与前景[J]. 中国野生植物资源(SHAN C Y, MA S H, ZHANG W M. Utilization and prospect of okra: a health vegetable [J]. Chinese Wild Plant Resources), 2012, 31(2): 68-71.
- [3] 王君耀, 周峻, 汤谷平. 黄秋葵抗疲劳作用的研究[J]. 中国现代应用药学(WANG J Y, ZHOU J, TANG G P. A study on the effect of anti-fatigue of okra [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy), 2003, 20(4): 316-7.
- [4] 许如意, 罗丰, 袁廷庆, 等. 不同采摘期对黄秋葵果实性状和品质的影响[J]. 长江蔬菜(XU R Y, LUO F, YUAN T Q, et al. Effect of picking time on the fruit characters of Okra [J]. Journal of Changjiang Vegetables), 2011(2): 18-20.
- [5] SINGHD, TRIPATHI R D, SINGHHN. Effect of age of picking on the chemical composition of the fruits of Okra [J]. Indian J Agricultural Sci, 1974, 44(1): 22-6.
- [6] 任健. 秋葵果实老化机理的初步研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学(REN J. Preliminary Study on the Fruit Aging Mechanism of Okra (*Hibiscus esculentus* L.) [D]. Harbin: Northeast Agricultural University), 2019.
- [7] HALL C B. Cellulase in tomato fruits [J]. Nature, 1963: 1010-1.
- [8] ZUO J, NIU Q W, NISHIZAWA N, et al. Korrigan an *Arabidopsis* endo-1, 4- β -glucanase localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis [J]. Plant Cell, 2000, 12(7): 1137-52.
- [9] SHANI Z, DEKEL M, ROIZ L, et al. Expression of endo-1, 4-B-glucanase(cell) in *Arabidopsis thaliana* is associated with plant growth, xylem development and cell wall thickening [J]. Plant Cell Rep, 2006, 25(10): 1067.
- [10] SHANI Z, DEKEL M, TSABARY G, et al. Growth enhancement of transgenic poplar plants by overexpression of *Arabidopsis thaliana* endo-1, 4- β -ghicanase (cell) [J]. Mol Breed, 2004, 14: 321-30.
- [11] ZHOU H L, HE S J, CAO Y R, et al. OsGLU1, A putative membrane-bound endo-1, 4-p-D-glucanase from rice, affects plant internode elongation [J]. Plant Mol Biol, 2006, 60(1): 137.
- [12] BHANDARI S, FUJINO T, THAMMANAGOWDA S, et al. Xylem-specific and tension stress-responsive coexpression of KORRIGAN endoglucanase and three secondary wall-associated cellulose synthase genes in aspen trees [J]. Planta, 2006, 224: 828-37.
- [13] BRUMMELL D A, CATALA C, LASHBROOK C C, et al. A membrane-anchored E-type endo-1, 4-beta-glucanase is localized on Golgi and plasma membranes of higher plants [J]. Proc Natl Acade Sci, 1997, 94(9): 4794-9.
- [14] HIS I, DRIOUICH A, NICOL F, et al. Altered pectin composition in primary cell walls of korrigan, a dwarf mutant of *Arabidopsis* deficient in a membrane-bound endo -1, 4-p-glucanase [J]. Planta, 2001, 212: 348-58.
- [15] LANE D R, WIEDEMDE A, PENG L, et al. Temperature-sensitive alleles of RSW2 link the Korrigan endo-1, 4- β -glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2001, 126(1): 278-88.
- [16] SATO S, KATO T, KAKEGAWA K, et al. Role of the putative membrane-bound endo-1, 4- β -glucanase Korrigan in cell elongation and cellulose synthesis in *Arabidopsisthaliana* [J]. Plant Cell Physiol, 2001, 42(3): 251-63.
- [17] SZYJANOWICZ P M J, MCKINNON I, TAYLOR N G, et al. The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrigan that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant, 2004, 37(5): 730-40.
- [18] CASS L G, KIRVEN K A, CHRISTOFFERSEN R E. Isolation and characterization of a cellulase gene family member expressed during avocado fruit ripening [J]. Mol Gene Genom, 1990, 223(1): 76-86.
- [19] GONZALEA B C, BRUMMELL D A, BENNETT A B. Differential expression of two endo-1, 4- β -glucanase genes in pericarp and locules of wild-type and mutant tomato fruit [J]. Plant Physiol, 1996, 111(4): 1313-9.
- [20] 王禹佳. 调控番茄叶片脱落的水通道蛋白基因筛选及功能分析[D]. 沈阳: 沈阳农业大学(WANG Y J. Gene screening and functional analysis of aquaporin induced leaf abscission in tomato [D]. ShenYang: Shen Yang Agricultural University), 2020.
- [21] HARPSTER M H, BMMELL D A, DIMSMUIR P. Expression analysis of a ripening-specific, auxin-repressed endo-1, 4- β -glucanase gene in strawberry [J]. Plant Physiol, 1998, 118(4): 1307-16.
- [22] HRPSTERA M H, DAWSON D M, NEVINS D J, et al. Constitutive overexpression of a ripening-related pepper endo-1, 4-beta-

- glucanase in transgenic tomato fruit does not increase xyloglucan depolymerization or fruit softening [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 3: 357-69.
- [23] WU S C, BLUMER J M, DARVILL A G, et al. Characterization of an endo-beta-1, 4-glucanase gene induced by auxin in elongating pea epicotyls [J]. *Plant Physiol*, 1996, 110(1): 163-70.
- [24] SHANI Z, DEKEL M, TSABAIY G, et al. Cloning and characterization of elongation specific endo-1, 4-beta-glucanase(cell) from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 34(6): 837-42.
- [25] BRUMMELL D A, BIRD C R, SCHUCH W, et al. An endo-1, 4-beta-glucanase expressed at high levels in rapidly expanding tissues [J]. *Plant Mol Biol*, 1997, 33(1): 87-95.
- [26] 吴华, 陈娉婷, 袁玲, 等. 蕨类植物石蜡切片制作技术探讨[J]. 湖北农业科学(WU H, CHEN P T, YUAN L, et al. Study on the technique of making paraffin section of Fern [J]. *Hubei Agricultural Sciences*), 2011, 50(18): 3767-74.
- [27] 岳翔. 不结球白菜膳食纤维含量分析及理化特性研究[D]. 南京: 南京农业大学(YUE X. Analysis and physicochemical characteristics of dietary fiber from nonshockable cabbage [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University), 2009.
- [28] 胡留申, 董晓颖, 李培环, 等. 桃果实成熟前后细胞壁成分和降解酶活性的变化及其与果实硬度的关系[J]. 植物生理学通讯(HU L S, DONG X Y, LI P H, et al. Changes in cell wall component and degrading enzyme activity and their relation to hardness in fruits of peach (*Prunus persica* L.) before and after ripening [J]. *Plant Physiology Communications*), 2007, 43(5): 837-41.
- [29] 阚娟, 刘涛, 金昌海, 等. 硬溶质型桃果实成熟过程中细胞壁多糖降解特性及其相关酶研究[J]. 食品科学(KAN J, LIU T, JIN C H, et al. Degradation of cell wall polysaccharides and related enzyme activities during non-melting-flesh peach fruit softening [J]. *Food Science*), 2011, 32(4): 268-74.
- [30] 许长同. 橄榄鲜食果品品质的感观与理化评价初探[J]. 福建果树(XU C T. Preliminary study on sensory and physicochemical evaluation of Olive fruit quality [J]. *Fujian Fruits*), 2009, 4: 35-7.
- [31] 余文琴, 赵晓玲, 潘东明, 等. 细胞壁代谢与馆溪蜜柚果实成熟过程汁胞粒化的关系[J]. 热带亚热带植物学报(SHE W Q, ZHAO X L, PAN D M, et al. Relationship between cell wall metabolism and fruit juicy sac granulation during fruit mature stage of pummel *Citrus grandis* (L.) Osbeck Guanxi-miyou [J]. *Journal of Tropical and Subtropical Botany*), 2008, 16(6): 545-50.
- [32] 熊博, 汪志辉, 石冬冬, 等. 黄果柑果实粒化与细胞壁物质及多酚的关系[J]. 华北农学报(XIONG B, WANG Z H, SHI D D, et al. Relationship between granulation and materials of cell wall, polyamine in Huangguogan fruit [J]. *Acta Agricultura Boreali Sinica*), 2014, 29: 239-42.
- [33] 屈慧鸽, 邓军哲. 果品成熟生理研究综述[J]. 特产研究(QU H G, DENG J Z. Advances of the study on fruit physiological maturity [J]. *Special Wild Economic Animal and Plant Research*), 1996(3): 34-9.
- [34] 赵晓玲. 馆溪蜜柚成熟阶段粒化过程的若干生理生化变化[D]. 福州: 福建农林大学(ZHAO X L. Physiological and biochemical changes of Pomelo fruit in the process of granulation during maturity [D]. Fujian: Fujian Agriculture and Forestry University), 2007.
- [35] 辜青青, 唐红英, 魏清江, 等. 南丰蜜橘果实纤维素代谢与化渣关系研究[J]. 园艺学报(GU Q Q, TANG H Y, WEI Q J, et al. Studies on the relationship between cellulose metabolism and fruit mastication trait of nanfeng tangerine [J]. *Acta Horticulturae Sinica*), 2016(5): 867-75.